



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104114571 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 22

(21) 申请号 201280059878. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 10. 04

*C07H 21/02* (2006. 01)

*C12N 15/11* (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/543, 700 2011. 10. 05 US

61/599, 238 2012. 02. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/058770 2012. 10. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/052677 EN 2013. 04. 11

(71) 申请人 普洛维维生物治疗公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 伊恩·麦克拉克伦 埃米·C·H·李

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 张国梁

权利要求书4页 说明书64页  
序列表10页

(54) 发明名称

用于沉默醛脱氢酶的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供包含以醛脱氢酶 (ALDH) 基因表达为靶标的治疗性核酸如干扰 RNA (例如, dsRNA 如 siRNA) 的组合物、包含治疗性核酸的一种或多种 (例如, 混合物) 的脂质颗粒、制造脂质颗粒的方法、以及递送和 / 或施用脂质颗粒的方法 (例如, 用于治疗人中的酒精中毒)。

1. 一种包含沉默醛脱氢酶 (ALDH) 基因表达的干扰 RNA 的组合物,其中所述干扰 RNA 包含有义链和互补的反义链,并且其中所述干扰 RNA 包含长度为约 15 至约 60 个核苷酸的双链区。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述干扰 RNA 是选自由下列组成的组的双链 RNA(dsRNA):siRNA、切酶底物 dsRNA、shRNA、aiRNA、前体 miRNA、以及它们的组合。

3. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述干扰 RNA 包含长度为约 19 至约 25 个核苷酸的双链区。

4. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述干扰 RNA 是化学合成的。

5. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述干扰 RNA 在所述干扰 RNA 的一条或两条链中包含 3' 突出端。

6. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述干扰 RNA 在双链区中包含至少一个修饰的核苷酸。

7. 根据权利要求 6 所述的组合物,其中在双链区中小于约 30% 的核苷酸包含修饰的核苷酸。

8. 根据权利要求 6 所述的组合物,其中所述修饰的核苷酸是 2' -O- 甲基 (2' OMe) 核苷酸。

9. 根据权利要求 8 所述的组合物,其中所述 2' OMe 核苷酸包含 2' OMe- 鸟苷核苷酸、2' OMe- 尿苷核苷酸、或它们的混合物。

10. 根据权利要求 1 所述的组合物,还包含药用载体。

11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的组合物,其中所述干扰 RNA 沉默醛脱氢酶 2(ALDH2) 基因表达。

12. 一种核酸-脂质颗粒,所述核酸-脂质颗粒包含:

(a) 根据权利要求 1 所述的干扰 RNA;

(b) 阳离子脂质;和

(c) 非阳离子脂质。

13. 根据权利要求 11 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述阳离子脂质包括 1,2- 二亚油基氧基 -N, N- 一甲基氨基丙烷 (DLinDMA)、1,2- 二亚麻基氧基 -N, N- 二甲基氨基丙烷 (DLenDMA)、1,2- 二- $\gamma$ - 亚麻基氧基 -N, N- 二甲基氨基丙烷 ( $\gamma$ -DLenDMA)、它们的盐、或它们的混合物。

14. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述阳离子脂质包括 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)、它们的盐、或它们的混合物。

15. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述阳离子脂质包括 (6Z,9Z,28Z,31Z)- 三十七烷 -6,9,28,31- 四烯 -19- 基 4-( 二甲基氨基) 丁酸酯 (DLin-M-C3-DMA)、二亚油基甲基 -3- 二甲基氨基丙酸酯 (DLin-M-C2-DMA)、它们的盐、或它们的混合物。

16. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质是磷脂。

17. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质是胆固醇或其衍生物。

18. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质是磷脂和胆固醇

或其衍生物的混合物。

19. 根据权利要求 16 或权利要求 18 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述磷脂包括二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、或它们的混合物。

20. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质是 DPPC 和胆固醇的混合物。

21. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,还包括抑制颗粒聚集的缀合脂质。

22. 根据权利要求 21 所述的核酸-脂质颗粒,其中抑制颗粒聚集的缀合脂质是聚乙二醇 (PEG)-脂质缀合物。

23. 根据权利要求 22 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述 PEG-脂质缀合物选自下列组成的组:PEG-二酰甘油 (PEG-DAG) 缀合物、PEG-二烷氧基丙基 (PEG-DAA) 缀合物、PEG-磷脂缀合物、PEG-神经酰胺 (PEG-Cer) 缀合物、和它们的混合物。

24. 根据权利要求 22 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述 PEG-脂质缀合物是 PEG-DAA 缀合物。

25. 根据权利要求 24 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述 PEG-DAA 缀合物选自下列组成的组:PEG-二癸氧基丙基 (C<sub>10</sub>) 缀合物、PEG-二月桂基氧基丙基 (C<sub>12</sub>) 缀合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基 (C<sub>14</sub>) 缀合物、PEG-二棕榈基氧基丙基 (C<sub>16</sub>) 缀合物、PEG-二硬脂基氧基丙基 (C<sub>18</sub>) 缀合物、和它们的混合物。

26. 根据权利要求 21 所述的核酸-脂质颗粒,其中抑制颗粒聚集的缀合脂质是聚噻唑啉 (POZ)-脂质缀合物。

27. 根据权利要求 26 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述 POZ-脂质缀合物是 POZ-DAA 缀合物。

28. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述干扰 RNA 完全包封在所述颗粒中。

29. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述颗粒具有约 5 : 1 至约 15 : 1 的脂质:干扰 RNA 质量比。

30. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述颗粒具有约 30nm 至约 150nm 的中位数直径。

31. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述阳离子脂质占所述颗粒中存在的总脂质的约 50 摩尔%至约 65 摩尔%。

32. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质包含磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物,其中所述磷脂占所述颗粒中存在的总脂质的约 4 摩尔%至约 10 摩尔%,并且所述胆固醇或其衍生物占所述颗粒中存在的总脂质的约 30 摩尔%至约 40 摩尔%。

33. 根据权利要求 32 所述的核酸-脂质颗粒,其中所述磷脂占所述颗粒中存在的总脂质的约 5 摩尔%至约 9 摩尔%,并且所述胆固醇或其衍生物占所述颗粒中存在的总脂质的约 32 摩尔%至约 37 摩尔%。

34. 根据权利要求 21 所述的核酸-脂质颗粒,其中抑制颗粒聚集的缀合脂质占所述颗粒中存在的总脂质的约 0.5 摩尔%至约 2 摩尔%。

35. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 12 的核酸-脂质颗粒和药用载体。

36. 一种将沉默 ALDH 基因表达的干扰 RNA 引入至细胞中的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求 12 的核酸-脂质颗粒接触。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述细胞在哺乳动物中。

38. 根据权利要求 36 所述的方法,其中通过将所述颗粒经由全身途径施用至所述哺乳动物来接触所述细胞。

39. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

40. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述哺乳动物已经被诊断患有酒精中毒。

41. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述干扰 RNA 在细胞中沉默 ALDH2 基因表达。

42. 一种用于在需要其的哺乳动物中沉默 ALDH 基因表达的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用权利要求 12 的核酸-脂质颗粒。

43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述颗粒经由全身途径施用。

44. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述人罹患酒精中毒。

46. 根据权利要求 42 所述的方法,其中,相对于缺乏所述颗粒的情况下的 ALDH RNA 水平,所述颗粒的施用将哺乳动物中的 ALDH RNA 水平降低至少约 50%。

47. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述核酸-脂质颗粒沉默 ALDH2 基因表达。

48. 一种用于治疗 and / 或改善与人中酒精中毒相关的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述人施用治疗有效量的权利要求 12 的核酸-脂质颗粒。

49. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述颗粒经由全身途径施用。

50. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述人患有酒精中毒。

51. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述核酸-脂质颗粒的干扰 RNA 抑制所述人中 ALDH2 基因的表达。

52. 一种用于抑制需要其的哺乳动物中 ALDH 的表达的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的权利要求 12 的核酸-脂质颗粒。

53. 根据权利要求 52 所述的方法,其中所述颗粒经由全身途径施用。

54. 根据权利要求 52 所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

55. 根据权利要求 54 所述的方法,其中所述人患有酒精中毒。

56. 根据权利要求 52 所述的方法,其中,相对于缺乏所述颗粒的情况下的 ALDH 基因表达,所述颗粒的施用将哺乳动物中的 ALDH 基因表达降低至少约 50%。

57. 根据权利要求 52 所述的方法,其中在所述哺乳动物中 ALDH2 的表达被抑制。

58. 一种用于预防和 / 或治疗人中酒精中毒的方法,所述方法包括向所述人施用治疗有效量的权利要求 12 的核酸-脂质颗粒。

59. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述颗粒经由全身途径施用。

60. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述人罹患酒精中毒。

61. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述核酸-脂质颗粒的所述干扰 RNA 抑制所述人中 ALDH2 基因的表达。

62. 一种选自由下列组成的组的双链 siRNA 分子:如在本文中实施例 4 的表 A 中给出的标识符 1、标识符 2、标识符 3、标识符 4、标识符 5 和标识符 6。

63. 一种单链 RNA 分子,其选自在本文中实施例 4 的表 A 中给出的单链有义链分子。

64. 一种单链 RNA 分子,其选自在本文中实施例 4 的表 A 中给出的单链反义链分子。
65. 本发明的 siRNA 分子用于抑制活细胞中 ALDH 基因表达的用途。
66. 本发明的药物组合物用于抑制活细胞中 ALDH 基因表达的用途。

## 用于沉默醛脱氢酶的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据 35U. S. C. §119(e) 要求于 2012 年二月 15 日提交的美国临时专利申请号 61/599, 238 和于 2011 年 10 月 5 日提交的美国临时专利申请号 61/543, 700 的权益, 通过引用它们的全部将它们的内容结合在本文中。

[0003] 关于序列表的说明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式提供而代替纸质版本, 并且在此通过引用结合在说明书中。含有序列表的文本文件的名称是 TEKM\_074\_02WO\_ST25. txt。文本文件为 12KB, 创建于 2012 年 10 月 4 日, 并且经由 EFS-Web 电子提交。

[0005] 发明背景

[0006] 酒精中毒 (alcoholism) 是对饮用过量的酒精饮料如啤酒、葡萄酒和蒸馏酒的成瘾或依赖。酒精中毒有时也被称为酒精滥用或酒精依赖。

[0007] 支持酒精中毒的生物学机制是不确定的, 然而风险因素包括压力、精神健康问题、和遗传体质。长期的酒精滥用在大脑中产生生理变化, 在中断饮酒时导致酒精戒断综合征 (alcohol withdrawal syndrome)。酒精损害身体中的几乎每个器官, 并且具有使人罹患医学病症和精神病症的风险。

[0008] 酒精中毒的治疗是有困难的, 并且通常包括酒精解毒作用以使酒精中毒的人戒断饮酒。可以使用神经活性药物, 如苯二氮卓类 (benzodiazepines), 以控制酒精戒断症状。通常需要医疗后护理, 如心理治疗, 以维持酒精的戒除。

[0009] 双硫仑 (disulfiram) 是引起对摄入的酒精 (乙醇) 急性过敏的药物, 但是有时用于慢性酒精中毒的治疗。酒精在肝脏中通过酶醇脱氢酶分解为乙醛, 然后通过酶乙醛脱氢酶转化为乙酸。双硫仑阻断酶乙醛脱氢酶。因此, 双硫仑可以导致摄入了酒精的人类的血液中乙醛浓度比在缺乏双硫仑的情况下摄入相同量的酒精的人的血液中发现的乙醛浓度高得多 (例如, 高 5 至 10 倍)。乙醛是“宿醉”症状的一种主要原因, 并且双硫仑的摄入造成了对酒精的严重负反应。症状包括皮肤的潮红、加速的心率、呼吸急促、恶心、呕吐、搏动性头痛 (throbbing headache)、视觉障碍、精神错乱、体位晕厥 (postural fainting)、和循环虚脱 (circulatory collapse)。

[0010] 然而, 由于低的病人依从性, 以及一系列副作用如嗜睡、头痛和较不常见的神经毒性, 双硫仑具有临床上的限制。为了有效, 通常每天施用双硫仑, 并且因此对于病人来说, 容易中断药物的使用。

[0011] 因此, 存在对用于抑制、降低和 / 或消除在哺乳动物特别是人类中参与代谢酒精的乙醛脱氢酶的活性的组合物和方法的持续的需求。例如, 可以在酒精中毒的治疗中使用此类组合物和方法。具体地, 存在对在明显长于双硫仑的有效时间的时间段 (例如, 数周或数月) 内抑制、降低和 / 或消除乙醛脱氢酶的活性的组合物和方法的需求, 从而使得人受试者在摄入此类相对长效的 ALDH 抑制剂之后难以中断酒精厌恶治疗 (alcohol aversion therapy)。还存在对抑制、降低和 / 或消除乙醛脱氢酶的活性并且具有比双硫仑更少或严重性更低的副作用的组合物和方法的特别的需求。

**[0012] 发明概述**

**[0013]** 如在本文中更充分描述的,乙醛脱氢酶是醛脱氢酶 (ALDH) 的较大范围类别中的成员。据信主要负责在人肝脏中将乙醛转换为乙酸的 ALDH 家族的成员是醛脱氢酶 2 (ALDH2),尽管在人中酒精的代谢中还涉及 ALDH 的其他同种型,如 ALDH1。本发明的目标是提供用于抑制编码一种或多种 ALDH 酶尤其是 ALDH2 酶的一个或多个基因的表达的组合物和方法。抑制是通过 RNA 干扰的机制。本发明的组合物和方法因此可用于例如通过以下方式在人类中治疗酒精中毒:抑制、或阻断乙醛向乙酸的转换,从而增加摄入酒精的人的身体中乙醛的量,并且因此增加身体中与乙醛的存在相关的副作用(例如,头痛和恶心)。

**[0014]** 因此,本发明提供包含靶向醛脱氢酶 (ALDH) 基因表达的治疗性核酸如干扰 RNA(例如,dsRNA 如 siRNA) 的组合物、包含治疗性核酸的一种或多种(例如,混合物)的脂质颗粒、制造脂质颗粒的方法、以及递送和/或施用脂质颗粒的方法(例如,用于治疗酒精中毒)。

**[0015]** 更具体地,本发明提供包含抑制或沉默 ALDH 基因表达的、未修饰的和化学修饰的干扰 RNA(例如,siRNA) 分子的组合物。本发明还提供血清稳定性的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP) 及其制剂,所述制剂包含在本文中所描述的干扰 RNA(例如,siRNA) 的一种或多种(例如,混合物)、阳离子脂质、和非阳离子脂质,其还可以包含抑制颗粒聚集的缀合脂质。干扰 RNA 分子的实例包括但不限于,双链 RNA(dsRNA) 如 siRNA、切酶 (Dicer) 底物 dsRNA、shRNA、aiRNA、前体 miRNA、以及它们的组合。

**[0016]** 在一个方面中,本发明提供靶向 ALDH 基因表达的干扰 RNA,其中所述干扰 RNA 包含有义链和互补的反义链,并且其中所述干扰 RNA 包含长度为约 15 至约 60 个核苷酸的双链区。在某些实施方案中,本发明提供包含至少约 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、或更多个靶向 ALDH 基因组的相同和/或不同区域的干扰 RNA 分子的组合(例如,混合物)的组合物。本发明的干扰 RNA 能够体外和体内抑制或沉默 ALDH 基因表达。

**[0017]** 在 Genbank([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) 中给出了可以用于例如抑制 ALDH2 基因表达的 siRNA 分子的设计的 ALDH2 转录本序列的非限制性实例,如编号 NM\_000690.3(基因 ID217,同种型 1) 和 NM001204889.1(基因 ID217,同种型 2)。

**[0018]** 在 Genbank([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) 中给出了可以用于例如抑制 ALDH1 基因表达的 siRNA 分子的设计的 ALDH1 转录本序列的非限制性实例,如编号 NM\_000689.4(ALDH1A1,基因 ID216)、和 NM\_000692.4(ALDH1B1,基因 ID219)。

**[0019]** 在另一个方面中,本发明提供靶向醛脱氢酶 (ALDH) 基因表达的干扰 RNA,其中所述干扰 RNA 包含有义链和互补的反义链,并且其中所述干扰 RNA 包含长度为约 15 至约 60 个核苷酸的双链区。在某些实施方案中,本发明提供包含至少约 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、或更多个靶向 ALDH 基因的相同和/或不同区域的干扰 RNA 分子的组合(例如,混合物)的组合物。本发明的干扰 RNA 能够体外和体内抑制或完全沉默 ALDH 基因表达。

**[0020]** 存在于本发明的组合物中的干扰 RNA 序列中的每一个可以独立地包含至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、或更多个修饰的核苷酸如 2' OMe 核苷酸,例如在双链区的有义和/或反义链中。优选地,用 2' OMe 核苷酸修饰尿苷和/或鸟苷核苷酸。在具体的实施方案中,存在于本发明的组合物中的每个干扰 RNA 序列在有义链

和 / 或反义链中包含至少一个 2' -OMe- 尿苷核苷酸和至少一个 2' -OMe- 鸟苷核苷酸。

[0021] 可在本发明的实施中使用的、用于抑制 ALDH2 基因表达的双链 siRNA 分子的实例包括,具有在本文中实施例 4 的表 A 中给出的、化学修饰的有义和反义链序列的双链 siRNA 分子(编号为 1 至 6)。在实施例 4 的表 A 中给出的双链 siRNA 分子是通过在用字母“m”标识的核糖核苷酸单元上的 2' -O- 甲基部分的存在而化学修饰的。本发明还包括具有在实施例 4 的表 A 中给出的有义和反义序列的双链 siRNA 分子,其中有义链和反义链没有被化学修饰。本发明还包括具有在实施例 4 的表 A 中给出的有义链序列(化学修饰的或未化学修饰的)中任一种的分离的、单链、核酸分子。本发明还包括具有在实施例 4 的表 A 中给出的反义链序列(化学修饰的或未化学修饰的)中任一种的分离的、单链、核酸分子。

[0022] 本发明还提供包含靶向 ALDH 基因表达的干扰 RNA(例如, siRNA) 分子的一种或混合物和药用载体的药物组合物。

[0023] 在另一个方面中,本发明提供靶向 ALDH 基因表达的核酸-脂质颗粒。核酸-脂质颗粒通常包含一个或多个未修饰的和 / 或修饰的沉默 ALDH 基因表达的干扰 RNA、阳离子脂质、和非阳离子脂质。在某些实例中,核酸-脂质颗粒还包含抑制颗粒聚集的缀合脂质。在优选的实施方案中,核酸-脂质颗粒包含一个或多个未修饰的和 / 或修饰的沉默 ALDH 基因表达的干扰 RNA、阳离子脂质、非阳离子脂质、和抑制颗粒聚集的缀合脂质。

[0024] 在其他实施方案中,本发明的干扰 RNA 分子完全包封在核酸-脂质颗粒(例如, SNALP) 中。对于包含干扰 RNA 的混合物的制剂来说,可以将不同类型的干扰 RNA 分子共同包封在相同的核酸-脂质颗粒中,或者可以将存在于混合物中的每种类型的干扰 RNA 物种包封在其本身的颗粒中。

[0025] 本发明还提供包含核酸-脂质颗粒和药用载体的药物组合物。

[0026] 本发明的核酸-脂质颗粒可用于沉默一种或多种 ALDH 基因(例如, ALDH2 基因)的表达的干扰 RNA(例如, dsRNA) 分子的预防性或治疗性递送。在一些实施方案中,将在本文中所描述的干扰 RNA 分子中的一种或多种配制为核酸-脂质颗粒,并且将所述颗粒施用于需要这种治疗的哺乳动物(例如, 人)。在某些实例中,可以将治疗有效量的核酸-脂质颗粒施用于哺乳动物,例如,用于预防或治疗人类中的酒精中毒。本发明的核酸-脂质颗粒尤其可用于靶向人中的肝细胞,其为大多数 ALDH2 基因表达的部位。可以通过任何本领域已知的途径进行核酸-脂质颗粒的施用,诸如,例如口服、鼻内、静脉内、腹膜内、肌内、关节内、病灶内、气管内、皮下、或皮内。在具体的实施方案中,全身施用核酸-脂质颗粒,例如,通过肠内或肠胃外给药途径。

[0027] 在一些实施方案中,通过检测来自核酸-脂质颗粒施用后哺乳动物的生物样品中的 ALDH RNA 或蛋白水平,确定 ALDH 基因表达的下调。在其他实施方案中,通过检测来自核酸-脂质颗粒施用后哺乳动物的生物样品中的 ALDH mRNA 或蛋白水平,确定 ALDH 基因表达的下调。在某些实施方案中,通过监测颗粒施用后哺乳动物中与酒精戒断相关的症状,检测 ALDH 或 ALDH 基因表达的下调。

[0028] 在另一个实施方案中,本发明提供将沉默 ALDH 基因表达的干扰 RNA 引入至细胞中的方法,所述方法包括使所述细胞与本发明的核酸-脂质颗粒接触的步骤。

[0029] 在另一个实施方案中,本发明提供用于在需要其的哺乳动物(例如, 人)中沉默 ALDH 基因表达的方法,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-脂质颗



粒的步骤。

[0030] 在另一个方面中,本发明提供用于治疗和 / 或改善与人中酒精中毒相关的一种或多种症状的方法,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的核酸-脂质颗粒的步骤。

[0031] 在另一个方面中,本发明提供用于抑制需要其的哺乳动物(例如,罹患酒精中毒的人)中 ALDH 的表达的方法,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的核酸-脂质颗粒的步骤。

[0032] 在进一步的方面中,本发明提供用于预防和 / 或治疗人中酒精中毒的方法,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的核酸-脂质颗粒的步骤。

[0033] 根据以下详细描述和附图,对于本领域技术人员来说,本发明的其他目的、特点和优势将会是显而易见的。

[0034] 发明详述

[0035] I. 引言

[0036] 在本文中所描述的干扰 RNA(例如, siRNA) 药物治疗有益地提供了用于治疗人类中酒精中毒的显著的新型组合物和方法。例如,可以每天一次、每周一次、或每数周一次(每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次)施用本发明的实施方案。在摄入在数天或数周的时期内有效抑制 ALDH 的本发明的组合物后,酒精中毒的人更难以中断酒精厌恶治疗。

[0037] 此外,在本文中所描述的脂质颗粒(例如, SNALP) 使得核酸药物如干扰 RNA 能够向身体内的靶组织和细胞有效递送。脂质颗粒的存在赋予了对核酸酶降解的保护,允许在靶组织中的优先累积,并且提供药物进入细胞质的方式,在细胞质中 siRNA 能够发挥其 RNA 干扰的预期功能。

[0038] II. 定义

[0039] 如在本文中所使用的,除非另外指明,以下术语具有属于其本身的含义。

[0040] 术语“醛脱氢酶”(缩写为 ALDH) 意指催化醛(例如,乙醛)变为羧酸(例如,乙酸)的氧化(脱氢)的酶。在哺乳动物中存在结构上和功能上相关的一类醛脱氢酶,并且包括醛脱氢酶 2(ALDH2),其为位于线粒体的酶,所述酶据信是主要负责在人类中将乙醛转化为乙酸。

[0041] 如在本文中所使用的术语“干扰 RNA”或“RNAi”或“干扰 RNA 序列”包括单链 RNA(例如,成熟 miRNA、ssRNAi 寡核苷酸、ssDNAi 寡核苷酸)或双链 RNA(即,双链体 RNA 如 siRNA、切酶底物 dsRNA、shRNA、aiRNA、或前体 miRNA),其在当干扰 RNA 与靶基因或序列处于相同细胞中时,能够降低或抑制靶基因或序列的表达(例如,通过介导降解和抑制与干扰 RNA 序列互补的 mRNA 的翻译)。干扰 RNA 因此是指与靶 mRNA 序列互补的单链 RNA 或者由两条互补链或由单条自互补链形成的双链 RNA。干扰 RNA 可以与靶基因或序列具有基本或完全的同源性,或可以包括错配区(即,错配基序)。干扰 RNA 的序列可以与全长靶基因或其子序列相对应。优选地,干扰 RNA 分子是化学合成的。

[0042] 干扰 RNA 包括“小干扰 RNA”或“siRNA”,例如,长度为约 15-60、15-50、或 15-40 的(双链体)核苷酸,更典型长度为约 15-30、15-25、或 19-25 的(双链体)核苷酸,并且优选长度为约 20-24、21-22、或 21-23 的(双链体)核苷酸的干扰 RNA(例如,双链 siRNA 的每

互补链序列是长度为 15-60、15-50、15-40、15-30、15-25、或 19-25 的核苷酸,优选长度为约 20-24、21-22、或 21-23 的核苷酸,并且双链 siRNA 是长度为约 15-60、15-50、15-40、15-30、15-25、或 19-25 的碱基对,优选长度为约 18-22、19-20、或 19-21 的碱基对)。siRNA 双链体可以包含约 1 至约 4 个核苷酸或约 2 至约 3 个核苷酸的 3' 突出端以及 5' 磷酸末端。siRNA 的实例包括但不限于,由两个单独的链分子装配的双链多核苷酸分子,其中一条链是有义链并且另一条是互补的反义链;由单链分子装配的双链多核苷酸分子,其中有义区和反义区通过基于核酸或基于非核酸的接头相连;含有具有自互补有义区和反义区的发夹二级结构的双链多核苷酸分子;和含有有两个以上环结构和具有自互补有义区和反义区的茎部的环形单链多核苷酸分子,其中所述环形多核苷酸可以在体内或体外加工以生成活性双链 siRNA 分子。

[0043] 优选地,siRNA 是化学合成的。siRNA 还可以通过使用大肠杆菌 (*E. coli*) RNA 酶 III 或切酶 (Dicer) 裂解较长的 dsRNA (例如,长度大于约 25 个核苷酸的 dsRNA) 来产生。这些酶将 dsRNA 加工为生物活性 siRNA (参见,例如, Yang 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (美国科学院院刊), 99:9942-9947 (2002); Calegari 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (美国科学院院刊), 99:14236 (2002); Byrom 等人, *Ambion TechNotes* (Ambion 技术手册), 10(1): 4-6 (2003); Kawasaki 等人, *Nucleic Acids Res.* (核酸研究), 31:981-987 (2003); Knight 等人, *Science* (科学), 293:2269-2271 (2001); 和 Robertson 等人, *J. Biol. Chem* (生物化学杂志), 243:82 (1968))。优选地, dsRNA 长度为至少 50 个核苷酸至约 100 个、200 个、300 个、400 个、或 500 个核苷酸。dsRNA 长度可以长达 1000 个、1500 个、2000 个、5000 个核苷酸或更长。dsRNA 可以编码完整基因转录本或部分基因转录本。在某些实例中, siRNA 可以由质粒来编码 (例如,作为自动折叠成具有发夹环的双链体的序列而转录)。

[0044] 如在本文中所使用的,术语“错配基序”或“错配区”是指与其靶序列不具有 100% 互补性的干扰 RNA (例如, siRNA) 序列的一部分。干扰 RNA 可以具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、或更多个错配区。错配区可以是连续的或者可以被 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、或更多个核苷酸分开。错配基序或错配区可以包括单核苷酸或可以包括 2 个、3 个、4 个、5 个、或更多个核苷酸。

[0045] 短语“抑制靶基因的表达”是指本发明的干扰 RNA (例如, siRNA) 沉默、降低、或抑制靶基因 (例如, ALDH 基因) 的表达的能力。为了检验基因沉默的程度,使测试样品 (例如,来自表达靶基因的目标生物体的生物样品或在培养物中的表达靶基因的细胞的样品) 与沉默、降低、或抑制靶基因的表达的干扰 RNA (例如, siRNA) 接触。将测试样品中靶基因的表达与不与干扰 RNA (例如, siRNA) (例如,来自表达靶基因的目标生物体的生物样品或在培养物中的表达靶基因的细胞的样品) 中靶基因的表达比较。可以将对照样品 (例如,表达靶基因的样品) 设定为 100% 的值。在具体的实施方案中,当测试样品相对于对照样品的值为约 95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、10%、5%、或 0% 时,实现靶基因的表达的沉默、抑制、或降低。适合的测定包括但不限于,利用本领域技术人员已知的技术检验蛋白质或 mRNA 水平,诸如,例如点印迹、Northern 印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能、以及本领域技术人员已知的表型测定。

[0046] “有效量”或“治疗有效量”的治疗性核酸如干扰 RNA 是足以产生希望的效果的量,例如与在缺乏干扰 RNA 的情况下检测的正常表达水平相比的靶序列表达的抑制。在具体

的实施方案中,当用干扰 RNA 获得的值相对于对照为约 95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、或 0% 时,实现了靶基因或靶序列的表达的抑制。用于测量靶基因或靶序列表达的适合的测定包括但不限于,利用本领域技术人员已知的技术检验蛋白质或 RNA 水平,诸如,例如点印迹、Northern 印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能、以及本领域技术人员已知的表型测定。

[0047] 通过干扰 RNA “减小”、“减少”、“降低”、或“减低”免疫应答,意指针对给定的干扰 RNA (例如,修饰的干扰 RNA) 的免疫应答的可检测到的减小。由修饰的干扰 RNA 引起的免疫应答的减小量可以相对于存在未修饰的干扰 RNA 的条件下的免疫应答水平来确定。可检测到的减小可以是比在存在未修饰的干扰 RNA 的条件下检测到的免疫应答低约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、或更多。针对干扰 RNA 的免疫应答的减小典型地通过在体外由应答细胞引起的细胞因子产量 (例如,  $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{IFN-}\alpha$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 或 IL-12) 减小或施用干扰 RNA 后哺乳动物受试者血清内细胞因子产量减小来测量。

[0048] 如在本文中所使用的,术语“应答细胞”是指在与免疫刺激性的干扰 RNA 如未修饰的 siRNA 接触时产生可检测到的免疫应答的细胞,优选哺乳动物细胞。示例性的应答细胞包括,例如,树突细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞 (PBMC)、脾细胞等。可检测到的免疫应答包括,例如,产生细胞因子或生长因子如  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\beta$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、TGF 及其组合。可检测到的免疫应答还包括,例如利用三十四肽重复序列 1 (IFIT1) mRNA 的干扰素诱导的蛋白质的诱导。

[0049] “基本同一性”是指在严格条件下与参比序列杂交的序列,或在参比序列特定区域范围内具有特定百分比同一性的序列。

[0050] 短语“严格杂交条件”是指这样的条件,在该条件下,核酸会与其靶序列杂交,典型地在核酸的复杂混合物中,但不与其他序列杂交。严格条件是序列依赖性的并且在不同环境中应该不同。较长的序列在较高温度下特异性杂交。关于核酸杂交的广泛指导参见 Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes* (生物化学和分子生物学技术—使用核探针的杂交), “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays (杂交原则和核酸测定策略综述)” (1993)。通常,选择在限定的离子强度 pH 下比特定序列的热熔点 ( $T_m$ ) 低约 5–10°C 的严格条件。 $T_m$  是这样的温度 (在确定的离子强度、pH、和核酸浓度下), 在所述温度下, 50% 与靶标互补的探针在平衡时与靶序列杂交 (因为靶序列在  $T_m$  下过量存在, 50% 的探针在平衡时被占用)。严格条件还可以通过加入去稳定剂如甲酰胺来获得。对于选择性或特异性杂交来说, 正信号是至少两倍背景、优选 10 倍背景杂交。

[0051] 示例性的严格杂交条件可以如下: 50% 甲酰胺, 5x SSC、和 1% SDS、在 42°C 温育, 或者 5x SSC、1% SDS、在 65°C 温育, 并且在 65°C 在 0.2x SSC、和 0.1% SDS 中进行洗涤。对于 PCR 来说, 约 36°C 的温度对于低严格扩增是典型的, 尽管退火温度可以根据引物长度在约 32°C 与 48°C 之间变化。对于高严格 PCR 扩增来说, 约 62°C 的温度是典型的, 尽管高严格退火温度可以根据引物长度和特异性在约 50°C 至约 65°C 的范围内变化。高和低严格扩增二者的典型循环条件包括 90°C–95°C 下 30 秒至 2 分钟的变性阶段, 持续 30 秒至 2 分钟的退火阶段, 和约 72°C 下 1 至 2 分钟的延伸阶段。例如, 在 Innis 等人, *PCR Protocols* (PCR 方

案), A Guide to Methods and Applications(方法和应用指导), Academic Press, Inc. (学术出版社公司) N.Y(1990) 中, 提供了用于低和高严格扩增反应的方案和指导。

[0052] 在严格条件下彼此不杂交的核酸仍然基本上相同, 条件是它们的编码的多肽基本上相同。这发生在, 例如, 当利用遗传密码允许的最大密码子简并性产生核酸的拷贝时。在此类情况中, 核酸典型地在中等严格杂交条件下杂交。示例性的“适度严格杂交条件”包括于 37℃ 在 40% 甲酰胺, 1M NaCl, 1% SDS 的缓冲液中的杂交, 和于 45℃ 在 1xSSC 中的洗涤。阳性杂交至少两倍于背景。普通技术人员应该容易地认识到备选的杂交和洗涤条件可以用于提供相似严格性的条件。在许多参考文献中, 例如 Current Protocols in Molecular Biology(当前分子生物学试验技术), Ausubel 等编, 提供了关于确定杂交参数的其他指导。

[0053] 在两个以上核酸的上下文中, 术语“基本上相同”或“基本同一性”是指, 当在根据使用以下序列比较算法中的一种或通过手动比对和肉眼观察而测量的比较窗、或指定区域内比较和比对最大对应性时, 相同的或具有特定百分比的相同核苷酸(即, 在特定区域范围内至少约 60%, 优选至少约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、或 95% 同一性)的两个以上序列或子序列。当上下文指出时, 此定义还类似地指序列的互补体。优选地, 基本同一性存在于长度为至少约 5 个、10 个、15 个、20 个、25 个、30 个、35 个、40 个、45 个、50 个、55 个、或 60 个核苷酸的区域内。

[0054] 对于序列比较来说, 通常一个序列起到与测试序列比较的参比序列的作用。当使用序列比较算法时, 将测试和参比序列输入计算机中, 如果需要, 指定子序列坐标, 并且指定序列算法程序参数。可以使用默认的程序参数, 或者可以指定备选的参数。然后序列比较算法可以基于程序参数计算测试序列相对于参比序列的百分比序列同一性。

[0055] 如在本文中所使用的“比较窗”包括与许多连续位置中任一个的片段的参比, 所述连续位置选自自由 5 至约 60、通常约 10 至约 45、更通常约 15 至约 30 组成的组, 其中在最优化地比对两个序列之后, 可以将序列与相同数目的连续位置的参照序列比较。用于比较的序列比对方法在本领域内是众所周知的。例如, 通过 Smith 和 Waterman, Adv. Appl. Math. (现代应用方法学), 2:482(1981) 的局部同源算法, 通过 Needleman 和 Wunsch, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 48:443(1970) 的同源比对算法, 通过 Pearson 和 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国科学院院刊), 85:2444(1988) 的相似性搜索方法, 通过这些算法的计算机化实现(威斯康星遗传学软件包中的 GAP、BESALDHIT、FASTA 和 ALDHASTA, Genetics Computer Group(遗传学计算机小组), 575 Science Dr., Madison, WI), 或者通过手动比对和目测(参见, 例如, Current Protocols in Molecular Biology(当前分子生物学试验技术), Ausubel 等人, 编.(1995 增刊)), 可以进行用于比较的序列的最优化比对。

[0056] 适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的非限制性实例是 BLAST 和 BLAST2.0 算法, 其分别描述于 Altschul 等人, Nuc. Acids Res. (核酸研究), 25:3389-3402(1977) 和 Altschul 等人, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 215:403-410(1990) 中。BLAST 和 BLAST2.0 与在本文中所描述的参数一起使用, 以确定本发明的核酸的百分比序列同一性。用于进行 BLAST 分析的软件是可以通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公开获得的。另一个实例是用于测定百分比序列同一性的总体比对算法(global alignment

algorithm),如用于比对蛋白质或核苷酸(例如,RNA)序列的Needleman-Wunsch算法。

[0057] BLAST算法也进行两序列之间相似性的统计学分析(参见,例如,Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院刊),90:5873-5787(1993))。由BLAST算法提供的相似性的一个量度是最小总和概率(P(N)),其提供两核苷酸序列之间会偶然发生匹配的概率指示。例如,如果在测试核酸与参比核酸的比较中最小总和概率小于约0.2,更优选小于约0.01,并且最优选小于约0.001,认为核酸与参比序列相似。

[0058] 如在本文中所使用的,术语“核酸”是指单链或双链形式的包含至少两个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。DNA可以为下列形式:例如,反义分子、质粒DNA、预凝聚的DNA(pre-condensed DNA)、PCR产物、载体(P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA、或这些组的衍生物和组合。RNA可以为下列形式:小干扰RNA(siRNA)、切酶底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、病毒RNA(vRNA)、以及它们的组合。核酸包括包含已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或键的核酸,其是合成的、天然存在的、和非天然存在的,并且其具有与参比核酸类似的结合特性。此类类似物的实例包括但不限于,硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性-甲基磷酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。除非特别限定,该术语包括包含具有与参比核酸类似的结合特性的天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另外指出,具体的核酸序列无疑还包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子替换)、等位基因、直向同源物、SNPs、和互补序列以及明确指出的序列。具体地,可以通过产生在其中一个或多个所选(或全部)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基替换的序列来实现简并密码子替换(Batzer等人,Nucleic Acid Res.(核酸研究),19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.(生物化学杂志),260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes(分子细胞探针),8:91-98(1994))。“核苷酸”包含糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基、和磷酸基团。核苷酸通过磷酸基团连接在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,其还包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷、和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,其包括但不限于,放置新的反应基团如但不限于胺、醇、硫醇、羧化物和烷基卤化物的修饰。

[0059] 术语“基因”是指包含用于产生多肽或前体多肽所必需的部分长度或全长的编码序列的核酸(例如,DNA或RNA)序列。

[0060] 如在本文中所使用的“基因产物”是指基因的产物如RNA转录本或多肽。

[0061] 术语“脂质”是指一组有机化合物,其包括但不限于,脂肪酸的酯,并且特征是不溶于水,但是可溶于许多有机溶剂。通常将它们分为至少三类:(1)“单纯脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,其包括磷脂和糖脂;以及(3)“衍生的脂质”如类固醇。

[0062] 术语“脂质颗粒”包括可以用于将治疗性核酸(例如,干扰RNA)递送至目标靶部位(例如,细胞、组织、器官等)的脂质制剂。在优选的实施方案中,本发明的脂质颗粒是核酸-脂质颗粒,其通常由阳离子脂质、非阳离子脂质、和任选地防止颗粒聚集的缀合脂质形成。在其他优选的实施方案中,可以将治疗性核酸(例如,干扰RNA)包封在颗粒的脂质部分中,从而防止其被酶降解。

[0063] 如在本文中所使用的,“SNALP”是指稳定的核酸-脂质颗粒。SNALP表示由脂质(例如,阳离子脂质、非阳离子脂质、和任选地防止颗粒聚集的缀合脂质)制成的颗粒,其中

核酸(例如,干扰RNA)完全包封在脂质内。在某些实例中,SNALP极其有效用于全身应用,因为它们可以在静脉内(i. v.)注射后表现出延长的循环寿命,它们可以在积聚在远端部位(例如,与施用部位身体上分开的部位),并且它可以在这些远端部位处介导靶基因表达的沉默。核酸可以与凝聚剂(condensing agent)复合并且被包封在如PCT公开号W000/03683中给出的SNALP内,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0064] 本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)平均直径通常为约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,并且是基本无毒的。此外,当存在于本发明的脂质颗粒中时,核酸在水溶液中对核酸酶的降解具有抗性。核酸-脂质颗粒及其制备方法公开于,例如美国专利公开号20040142025和20070042031,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0065] 如在本文中所使用的,“脂质包封的”可以指提供具有完全包封、部分包封、或二者的治疗性核酸如干扰RNA(例如,siRNA)的脂质颗粒。在优选的实施方案中,核酸(例如,干扰RNA)完全包封在脂质颗粒中(例如,以形成SNALP或其他核酸-脂质颗粒)。

[0066] 术语“脂质缀合物”是指抑制脂质颗粒聚集的缀合脂质。此类脂质缀合物包括但不限于,PEG-脂质缀合物诸如,例如与二烷氧基丙基偶联的PEG(例如,PEG-DAA缀合物)、与二酰甘油偶联的PEG(例如,PEG-DAG缀合物)、与胆固醇偶联的PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG、和与神经酰胺缀合的PEG(参见,例如,美国专利号5,885,613)、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如,POZ-DAA缀合物;参见,例如,于2010年1月13日提交的美国临时申请号61/294,828、和于2010年1月14日提交的美国临时申请号61/295,140)、聚酰胺低聚物(例如,ATTA-脂质缀合物)、以及它们的混合物。在PCT公开号W02010/006282中描述了POZ-脂质缀合物的额外的实例。PEG或POZ可以与脂质直接缀合或可以通过接头部分与脂质相连。可以使用适用于将PEG或POZ与脂质偶联的任何接头部分,其包括,例如不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施方案中,使用不含酯的接头部分,如酰胺或氨基甲酸酯。以上专利文献中的每一个的公开内容通过引用整体结合在本文中用于全部目的。

[0067] 术语“两亲性脂质”部分地指任何适合的材料,脂质材料的疏水部分朝向疏水相,而亲水性部分朝向水相。亲水性源自极性 or 带电基团的存在,如糖类、磷酸根、羧基、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基、和其他类似的基团。可以通过包含非极性基团赋予疏水性,所述基团包括但不限于,长链饱和与不饱和脂族烃基团以及由一个或多个芳族、脂环族或杂环基团取代的此类基团。两亲性化合物的实例包括但不限于,磷脂、氨基脂和鞘脂类。

[0068] 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、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、和二亚油酰磷脂酰胆碱。缺乏磷的其他化合物,如鞘脂、鞘糖脂家族、二酰甘油和 $\beta$ -酰氧酸也包括在被称为两亲性脂质的组中。另外,上述的两亲性脂质可与其他脂质混和,其他脂质包括甘油三酯和固醇。

[0069] 术语“中性脂质”是指在选定的pH下以不带电荷或中性两性离子形式存在的许多

脂质物种中的任何一种。在生理 pH 下,此类脂质包括,例如,二酰磷脂酰胆碱、二酰磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰甘油。

[0070] 术语“非阳离子脂质”是指任何两亲性脂质以及任何其他中性脂质或阴离子脂质。

[0071] 术语“阴离子脂质”是指在生理 pH 下带负电荷的任何脂质。这些脂质包括但不限于,磷脂酰甘油、心磷脂、二酰磷脂酰丝氨酸、二酰磷脂酸、N- 十二烷酰磷脂酰乙醇胺、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),和其他与中性脂质连接的阴离子修饰基团。

[0072] 术语“疏水脂质”是指具有非极性基团的化合物,所述基团包括但不限于,长链饱和与不饱和脂族烃基团以及任选地由一个或多个芳族、脂环族或杂环基团取代的此类基团。适合的实例包括,但不仅限于,二酰甘油、二烷基甘油、N-N- 一烷基氨基、1,2- 二酰氧基-3- 氨基丙烷、和 1,2- 二烷基-3- 氨基丙烷。

[0073] 术语“阳离子脂质”和“氨基脂质”在本文中可互换使用以包括具有一个、两个、三个、或更多个脂肪酸或脂肪烷基链和可 pH 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。阳离子脂质通常在低于阳离子脂质的  $pK_a$  的 pH 下质子化(即,带正电)并且在高于所述  $pK_a$  的 pH 下是基本中性的。本发明的阳离子脂质还可以被称为可滴定的阳离子脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质包含:可质子化的叔胺(例如,可 pH 滴定的)头部基团; $C_{18}$  烷基链,其中每个烷基链独立地具有 0 至 3 个(例如,0 个、1 个、2 个、或 3 个)双键;以及在头部基团和烷基链之间的醚、酯、或缩醛键。此类阳离子脂质包括但不限于,DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 $\gamma$ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA(也被称为 DLin-C2K-DMA、XTC2、和 C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 $\gamma$ -DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA(也被称为 MC2)、和 DLin-M-C3-DMA(也被称为 MC3)。

[0074] 术语“盐”包括任何阴离子和阳离子复合物,如阳离子脂质与一种或多种阴离子之间形成的复合物。阴离子的非限制性实例包括无机和有机阴离子,例如,氢化物、氟化物、氯化物、溴化物、碘化物、草酸根离子(例如,半草酸根离子)、磷酸根离子、膦酸根离子、磷酸氢根离子、磷酸二氢根离子、氧化物、碳酸根离子、碳酸氢根离子、硝酸根离子、亚硝酸根离子、氮离子、亚硫酸氢根离子、硫醚、亚硫酸根离子、硫酸氢根离子、硫酸根离子、硫代硫酸根离子、硫酸氢根离子、硼酸根离子、甲酸根离子、乙酸酯、苯甲酸根离子、柠檬酸根离子、酒石酸根离子、乳酸酯、丙烯酸酯、聚丙烯酸根离子、富马酸根离子、马来酸根离子、衣康酸根离子、乙醇酸根离子、葡萄糖酸根离子、苹果酸根离子、扁桃酸根离子、惕各酸根离子(tiglate)、抗坏血酸根离子、水杨酸根离子、聚甲基丙烯酸根离子、高氯酸根离子、氯酸根离子、亚氯酸根离子、次氯酸根离子、溴酸根离子、次溴酸根离子、碘酸根离子、烷基磺酸根离子、芳基磺酸根离子、砷酸根离子、亚砷酸根离子、铬酸根离子、重铬酸根离子、氰根离子、氰酸根离子、硫氰酸根离子、氢氧化物、过氧化物、高锰酸根离子、以及它们的混合物。在具体的实施方案中,在本文中所公开的阳离子脂质的盐是结晶盐。

[0075] 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。代表性的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、正己基等,而饱和支链烷基包括但不限于,异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性饱和环状烷基包括但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环己基等,而不饱和环状烷基包括但不限于,环戊烯基、环己烯基等。

[0076] 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定义的烷基。烯基包括顺式和反式同分异构体二者。代表性的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-丁烯基等。

[0077] 术语“炔基”包括在相邻碳之间额外含有至少一个三键的如以上定义的任何烷基或烯基。代表性的直链和支链炔基包括但不限于, 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-丁炔基等。

[0078] 术语“酰基”包括如以下定义的在其中碳在连接点被氧代基取代的任何烷基、烯基、或炔基。以下是酰基的非限制性实例:  $-C(=O)$  烷基、 $-C(=O)$  烯基、和  $-C(=O)$  炔基。

[0079] 术语“杂环”包括 5 至 7 元单环或 7 至 10 元双环杂环, 所述杂环为饱和的、不饱和的、或芳族, 并且所述杂环含有独立地选自氮、氧和硫的 1 或 2 个杂原子, 并且其中氮和硫杂原子可以被任选地氧化, 并且氮杂原子可以被任选地季铵化, 所述杂环包括在以上杂环耦合至苯环的双环。杂环可以通过任何杂原子或碳原子连接。杂环包括但不限于, 如以下定义的杂芳基, 以及吗啉基、吡咯烷酮基 (pyrrolidinonyl)、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基 (piperizynyl)、己内酰脲基 (hydantoinyl)、戊内酰胺基 (valerolactamyl)、环氧乙烷基 (oxiranyl)、氧杂环丁烷基 (oxetanyl)、四氢呋喃基 (tetrahydrofuryl)、四氢吡喃基 (tetrahydropyryl)、四氢吡啶基 (tetrahydropyridinyl)、四氢嘧啶基 (tetrahydropyrimidinyl)、四氢苯硫基 (tetrahydrothiophenyl)、四氢噻喃基 (tetrahydrothiopyryl)、四氢嘧啶基 (tetrahydropyrimidinyl)、四氢苯硫基 (tetrahydrothiophenyl)、四氢噻喃基 (tetrahydrothiopyryl) 等。

[0080] 术语“任选地取代的烷基”、“任选地取代的烯基”、“任选地取代的炔基”、“任选地取代的酰基”、和“任选地取代的杂环”意指, 当取代时, 至少一个氢原子被取代基取代。在氧代取代基 ( $=O$ ) 的情况下, 两个氢原子被取代。就此而言, 取代基包括但不限于, 氧代基、卤素、杂环、 $-CN$ 、 $-OR^x$ 、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 、和  $-SO_nNR^xR^y$ , 其中  $n$  是 0、1、或 2,  $R^x$  和  $R^y$  是相同的或不同的并且独立地为氢、烷基、或杂环、和中的每一个烷基和杂环取代基可以进一步取代用一个或多个的氧代基、卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、烷基、 $-OR^x$ 、杂环、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 、和  $-SO_nNR^xR^y$ 。当在一列取代基前使用时, 术语“任选地取代的”意指在该列中的取代基中的每一个可以按照如在本文中所描述的被任选地取代。

[0081] 术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

[0082] 术语“融合的”是指脂质颗粒如 SNALP 与细胞膜融合的能力。所述膜可以是质膜或围绕细胞器 (例如, 内体、细胞核等) 的膜。

[0083] 如在本文中所使用的, 术语“水溶液”是指全部或部分地包含水的组合物。

[0084] 如在本文中所使用的, “有机脂质溶液”是指全部或部分地包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0085] 如在本文中所使用的“远端部位”是指身体上分开的部位, 其不限于相邻的毛细血管床, 而是包括广泛分布于整个生物体的位点。

[0086] 与核酸-脂质颗粒如 SNALP 相关的“血清稳定性的”意指颗粒在暴露于将会显著



降解游离 DNA 或 RNA 的血清或核酸酶测定后不被显著降解。适合的测定包括,例如标准血清测定、DNA 酶测定或 RNA 酶测定。

[0087] 如在本文中所使用的“全身递送”是指导致活性剂如干扰 RNA(例如, siRNA) 在生物体内广泛生物分布的脂质颗粒递送。一些施用技术可以导致某些试剂,但不能导致其他试剂的全身递送。全身递送意指将有效量、优选治疗量的试剂暴露于身体的大多数部位。为了获得广泛的生物分布,通常需要这样的血液寿命,使得试剂在到达远离施用部位的疾病部位之前不被迅速降解或清除(如被首过器官(肝脏、肺等)或被迅速的、非特异性细胞结合而降解或清除)。脂质颗粒的全身递送可以通过本领域已知的任何方式进行,包括,例如,静脉内、皮下、和腹膜内。在优选的实施方案中,脂质颗粒的全身递送通过静脉内递送来进行。

[0088] 如在本文中所使用的“局部递送”是指活性剂如干扰 RNA(例如, siRNA) 直接向生物体内靶部位的递送。例如,可以通过直接向疾病部位、其他靶部位、或靶器官如肝脏、心脏、胰腺、肾脏等中注射而局部递送试剂。

[0089] 术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物物种如人、小鼠、大鼠、狗、猫、仓鼠、豚鼠、兔、家畜等。

[0090] 术语“网状内皮系统”或“RES”是指免疫系统的含有网状内皮细胞的部分,包括位于网状结缔组织中的吞噬细胞如单核细胞和巨噬细胞。这些细胞通常积聚在淋巴结和脾中。肝脏的 Kupffer 细胞和组织细胞也是 RES 的一部分。RES 分为一级和二级淋巴器官。一级(“中枢”)淋巴器官是 RES 的细胞产生的部位。RES 的细胞在骨髓中产生。还包括胸腺,因为它是 T 细胞成熟所需的部位。二级(“外周”)淋巴器官是 RES 的细胞发挥功能的部位。这包括淋巴结、扁桃体、脾、和“MALT”(粘膜相关淋巴组织)。MALT 进一步分为“GALT”(肠相关淋巴组织)和“BALT”(支气管相关淋巴组织)。肝脏的 Kupffer 细胞作为系统的一部分发挥作用,但是并没有构成组织;相反,它们分散在整个肝血窦中。中枢神经系统(CNS)的小胶质细胞可以被认为是 RES 的一部分。它们是针对 CNS 损伤而增殖的清除细胞(scavenger cell)。

[0091] III. 实施方案描述

[0092] 本发明提供靶向 ALDH 基因、尤其是 ALDH2 基因的表达的治疗性核酸如干扰 RNA(例如, dsRNA 如 siRNA),包含治疗性核酸的一种或多种(例如,混合物)的脂质颗粒、制造脂质颗粒的方法、以及递送和/或施用脂质颗粒的方法(例如,用于人中酒精中毒的治疗)。

[0093] 在一个方面中,本发明提供靶向 ALDH 基因表达的干扰 RNA 分子。干扰 RNA 分子的非限制性实例包括能够介导 RNAi 的双链 RNA 如 siRNA、切酶底物 dsRNA、shRNA、aiRNA、前体 miRNA、以及它们的混合物。在某些实例中,本发明提供包含靶向 ALDH 基因的不同区域的干扰 RNA 的组合(例如,混合物(cocktail)、集合(pool)、混合物(mixture))的组合物。在某些实例中,本发明的干扰 RNA(例如, siRNA) 分子能够沉默 ALDH 基因表达,使 ALDH 失活,和/或体外或体内抑制 ALDH 的复制。

[0094] 在具体的实施方案中,本发明提供沉默 ALDH 基因表达的干扰 RNA(例如, siRNA),其中干扰 RNA 包含有义链和互补的反义链,并且其中干扰 RNA 包含双链区,所述双链区是长度为约 15 至约 60 的核苷酸(例如,长度为约 15-60、15-30、15-25、19-30、19-25、20-60、

20-55、20-50、20-45、20-40、20-35、20-30、20-25、21-30、21-29、22-30、22-29、22-28、23-30、23-28、24-30、24-28、25-60、25-55、25-50、25-45、25-40、25-35、或 25-30 的核苷酸，或者长度为约 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、或 35 的核苷酸）。

[0095] 在某些实施方案中，本发明的干扰 RNA（例如，siRNA）可以包含至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、或更多个修饰的核苷酸如 2' OMe 核苷酸，例如在干扰 RNA 的双链区的有义和 / 或反义链中。优选地，用 2' OMe 核苷酸修饰干扰 RNA 中的尿苷和 / 或鸟苷核苷酸。在某些实例中，干扰 RNA 在有义链和反义链二者中都含有 2' OMe 核苷酸并且在双链区包含至少一个 2' OMe-尿苷核苷酸和至少一个 2' OMe-鸟苷核苷酸。在一些实施方案中，干扰 RNA 的有义和 / 或反义链还可以包含修饰的（例如，2' OMe 修饰的）腺苷核苷酸和 / 或修饰的（例如，2' OMe 修饰的）胞嘧啶核苷酸，例如在干扰 RNA 的双链区中。

[0096] 在具体的实施方案中，本发明的干扰 RNA（例如，siRNA）分子在一条链或两条链中包含 1 个、2 个、3 个、或 4 个核苷酸的 3' 突出端。在某些实例中，干扰 RNA 可以含有至少一个平末端。在具体的实施方案中，在干扰 RNA 的一条或两条链中的 3' 突出端可以各自独立地包含 1 个、2 个、3 个、或 4 个修饰的和 / 或未修饰的脱氧胸苷（“t”或“dT”）核苷酸，1 个、2 个、3 个、或 4 个修饰的（例如，2' OMe）和 / 或未修饰的尿苷（“U”）核糖核苷酸，或者具有与靶序列或其互补链的互补性的 1 个、2 个、3 个、或 4 个修饰的（例如，2' OMe）和 / 或未修饰的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。

[0097] 本发明还提供药物组合物，其包含在本文中所描述的干扰 RNA 的一种或多种（例如，混合物）以及药用载体。

[0098] 在另一个方面中，本发明提供靶向 ALDH 基因表达的核酸-脂质颗粒（例如，SNALP）。核酸-脂质颗粒（例如，SNALP）通常包含在本文中所描述的干扰 RNA 的一种或多种（例如，混合物）、阳离子脂质、和非阳离子脂质。在某些实例中，核酸-脂质颗粒（例如，SNALP）还包含抑制颗粒聚集的缀合脂质。优选地，核酸-脂质颗粒（例如，SNALP）包含在本文中所描述的干扰 RNA 的一种或多种（例如，混合物）、阳离子脂质、非阳离子脂质、和抑制颗粒聚集的缀合脂质。

[0099] 在一些实施方案中，本发明的干扰 RNA（例如，siRNA）完全包封在核酸-脂质颗粒（例如，SNALP）中。对于包含干扰 RNA 混合物的制剂来说，可以将存在于混合物（例如，具有不同序列的干扰 RNA 化合物）中的不同类型的干扰 RNA 物种共同包封在相同的颗粒中，或者可以将存在于混合物中的每种类型的干扰 RNA 物种包封在单独的颗粒中。可以使用两个以上单独的干扰 RNA（每个具有独特的序列）的混合物，以相同、相似、或不同的浓度或摩尔比，在在本文中所描述的颗粒中配制干扰 RNA 混合物。在一个实施方案中，使用相同、相似、或不同浓度或摩尔比的每个干扰 RNA 物种配制干扰 RNA 的混合物（对应于具有不同序列的多个干扰 RNA），并且将不同类型的干扰 RNA 共同包封在相同的颗粒中。在另一个实施方案中，以相同、相似、或不同的干扰 RNA 浓度或摩尔比，将每种类型的存在于混合物中的干扰 RNA 物种包封在不同的颗粒中，并且因此形成的颗粒（各自含有不同的干扰 RNA 有效负荷）单独施用（例如，根据治疗方案在不同时间），或者组合并且作为单一单位剂量一起施用（例如，与药用载体）。在本文中所描述的颗粒是血清稳定性的，对核酸酶降解具有抗

性,并且对哺乳动物如人是基本无毒的。

[0100] 在本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的阳离子脂质可以包括,例如在本文中所描述的式 I-III 的一种或多种阳离子脂质或任何其他阳离子脂质物种。在一个具体的实施方案中,阳离子脂质选自由下列组成的组: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- $\gamma$ -亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷( $\gamma$ -DLenDMA)、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)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-M-C3-DMA)、它们的盐、或它们的混合物。

[0101] 在本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的非阳离子脂质可以包括,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成分中的一种:(1)磷脂和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。在某些优选的实施方案中,磷脂包括二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、或它们的混合物。在特别优选的实施方案中,非阳离子脂质是 DPPC 和胆固醇的混合物。

[0102] 在本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的脂质缀合物抑制颗粒聚集并且可以包括,例如在本文中所描述的脂质缀合物中的一种或多种。在一个具体的实施方案中,脂质缀合物包括 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、和它们的混合物。在某些实施方案中,脂质颗粒中的 PEG-DAA 缀合物可以包括 PEG-一癸氧基丙基(C<sub>10</sub>)缀合物、PEG-一月桂基氧基丙基(C<sub>12</sub>)缀合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C<sub>14</sub>)缀合物、PEG-二棕榈基氧基丙基(C<sub>16</sub>)缀合物、PEG-一硬脂基氧基丙基(C<sub>18</sub>)缀合物、和它们的混合物。在另一个实施方案中,脂质缀合物包括 POZ-脂质缀合物如 POZ-DAA 缀合物。

[0103] 在一些实施方案中,本发明提供包含下列各项的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP):(a)靶向 ALDH 基因表达的干扰 RNA 分子的一种或多种(例如,混合物);(b)一种或多种阳离子脂质或其盐,其占所述颗粒中存在的总脂质的约 50 摩尔%至约 85 摩尔%;(c)一种或多种非阳离子脂质,其占所述颗粒中存在的总脂质的约 13 摩尔%至约 49.5 摩尔%;和(d)一种或多种抑制颗粒聚集的缀合脂质,其占所述颗粒中存在的总脂质的约 0.5 摩尔%至约 2 摩尔%。

[0104] 在这个实施方案的一个方面中,核酸-脂质颗粒包含:(a)靶向 ALDH 基因表达的干扰 RNA 分子的一种或多种(例如,混合物);(b)阳离子脂质或其盐,其占所述颗粒中存在的总脂质的约 52 摩尔%至约 62 摩尔%;(c)磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物,其占所述颗粒中存在的总脂质的约 36 摩尔%至约 47 摩尔%;和(d)PEG-脂质缀合物,其占所述颗粒中存在的总脂质的约 1 摩尔%至约 2 摩尔%。核酸-脂质颗粒的这个实施方案在本文中一般被称为“1:57”制剂。在一个具体的实施方案中,1:57 制剂是四组分系统,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,DLin-K-C2-DMA)或其盐、约 7.1 摩尔% DPPC(或 DSPC)、和约 34.3 摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0105] 在这个实施方案的另一个方面中,核酸-脂质颗粒包含:(a)靶向ALDH基因表达的干扰RNA分子的一种或多种(例如,混合物);(b)阳离子脂质或其盐,其占所述颗粒中存在的总脂质的约56.5摩尔%至约66.5摩尔%;(c)胆固醇或其衍生物,其占所述颗粒中存在的总脂质的约31.5摩尔%至约42.5摩尔%;和(d)PEG-脂质缀合物,其占所述颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约2摩尔%。核酸-脂质颗粒的这个实施方案在本文中一般被称为“1:62”制剂。在一个具体的实施方案中,1:62制剂是无磷脂的三组分系统,其包含约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、和约36.9摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0106] 与1:57制剂和1:62制剂相关的额外实施方案描述于PCT公开号W009/127060和公开的美国专利申请公开号US2011/0071208A1中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0107] 在其他实施方案中,本发明提供包含下列各项的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP):(a)靶向ALDH基因表达的干扰RNA分子的一种或多种(例如,混合物);(b)一种或多种阳离子脂质或其盐,其占所述颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约50摩尔%;(c)一种或多种非阳离子脂质,其占所述颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约90摩尔%;和(d)一种或多种抑制颗粒聚集的缀合脂质,其占所述颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约20摩尔%。

[0108] 在这个实施方案的一个方面中,核酸-脂质颗粒包含:(a)靶向ALDH基因表达的干扰RNA分子的一种或多种(例如,混合物);(b)阳离子脂质或其盐,其占所述颗粒中存在的总脂质的约30摩尔%至约50摩尔%;(c)磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物,,其占所述颗粒中存在的总脂质的约47摩尔%至约69摩尔%;和(d)PEG-脂质缀合物,其占所述颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约3摩尔%。核酸-脂质颗粒的这个实施方案在本文中一般被称为“2:40”制剂。在一个具体的实施方案中,2:40制剂是四组分系统,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)、和约48摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0109] 在进一步的实施方案中,本发明提供包含下列各项的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP):(a)靶向ALDH基因表达的干扰RNA分子的一种或多种(例如,混合物);(b)一种或多种阳离子脂质或其盐,其占所述颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约65摩尔%;(c)一种或多种非阳离子脂质,其占所述颗粒中存在的总脂质的约25摩尔%至约45摩尔%;和(d)一种或多种抑制颗粒聚集的缀合脂质,其占所述颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%。

[0110] 在这个实施方案的一个方面中,核酸-脂质颗粒包含:(a)靶向ALDH基因表达的干扰RNA分子的一种或多种(例如,混合物);(b)阳离子脂质或其盐,其占所述颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约60摩尔%;(c)磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物,,其占所述颗粒中存在的总脂质的约35摩尔%至约45摩尔%;和(d)PEG-脂质缀合物,其占所述颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%。核酸-脂质颗粒的这个实施方案在本文中一般被称为“7:54”制剂。在某些实例中,在7:54制剂中的非阳离子脂质混合物包含:(i)所述颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%的磷脂;和(ii)所述颗粒中

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。在一个具体的实施方案中,7 : 54 制剂是四组分系统,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)、和约 32 摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0111] 在这个实施方案的另一个方面中,核酸-脂质颗粒包含:(a) 靶向 ALDH 基因表达的干扰 RNA 分子的一种或多种(例如,混合物);(b) 阳离子脂质或其盐,其占所述颗粒中存在的总脂质的约 55 摩尔%至约 65 摩尔%;(c) 胆固醇或其衍生物,其占所述颗粒中存在的总脂质的约 30 摩尔%至约 40 摩尔%;和 (d) PEG- 脂质缀合物,其占所述颗粒中存在的总脂质的约 5 摩尔%至约 10 摩尔%。核酸-脂质颗粒的这个实施方案在本文中一般被称为“7 : 58”制剂。在一个具体的实施方案中,7 : 58 制剂是无磷脂的三组分系统,其包含约 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、和约 35 摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0112] 与 7 : 54 制剂和 7 : 58 制剂相关的额外实施方案描述于公开的美国专利申请公开号 US2011/0076335A1 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0113] 本发明还提供包含核酸-脂质颗粒如 SNALP 和药用载体的药物组合物。

[0114] 本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)可用于沉默一种或多种 ALDH 基因表达的干扰 RNA(例如,siRNA)的治疗性递送。在一些实施方案中,靶向 ALDH 基因的不同区域(例如,重叠序列和/或非重叠序列)的干扰 RNA 的混合物配制为相同的或不同的核酸-脂质颗粒,并且将所述颗粒施用于需要这种治疗的哺乳动物(例如,人)。在某些实例中,可以将治疗有效量的核酸-脂质颗粒施用于哺乳动物,例如,用于治疗人中的酒精中毒。

[0115] 在某些实施方案中,本发明提供用于通过使细胞与在本文中所描述的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP 制剂)接触将一种或多种在本文中所描述的干扰 RNA(例如,siRNA)分子引入至细胞中的方法。在一个具体的实施方案中,所述细胞是网状内皮细胞(例如,单核细胞或巨噬细胞)、成纤维细胞、内皮细胞、或血小板细胞。

[0116] 在一些实施方案中,通过以下给药途径中的一种施用在本文中所描述的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP):口服、鼻内、静脉内、腹膜内、肌内、关节内、病灶内、气管内、皮下、和皮内。在具体的实施方案中,全身施用核酸-脂质颗粒,例如,通过肠内或肠胃外给药途径。

[0117] 在具体的实施方案中,与其他组织相比,本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)可以优先地将有效负荷如干扰 RNA(例如,dsRNA)递送至肝脏,例如,用于急性或慢性酒精中毒的治疗。

[0118] 在某些方面中,本发明提供用于在需要其的哺乳动物(例如,人)中沉默 ALDH 基因表达的方法,所述方法包括向哺乳动物施用治疗有效量的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP 制剂),所述核酸-脂质颗粒包含一种或多种在本文中所描述的干扰 RNA(例如,siRNA)(例如,靶向一种或多种 ALDH 基因的 siRNA)。在一些实施方案中,相对于在缺乏干扰 RNA 的情况下(例如,缓冲液对照或不相关非 ALDH 靶向干扰 RNA 对照)检测的 ALDH RNA 水平,包含一种或多种 ALDH 干扰 RNA 的核酸-脂质颗粒的施用使 ALDH RNA 水平降低至少约 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%(或其中的任意范围)。在其他实施方案中,相对于阴性对照诸如,例如,缓冲液对照或不相

关非 ALDH 靶向干扰 RNA 对照,包含一种或多种 ALDH 靶向干扰 RNA 的核酸-脂质颗粒的施用使 ALDH RNA 水平降低至少约 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天、20 天、21 天、22 天、23 天、24 天、25 天、30 天、35 天、40 天、45 天、50 天、55 天、60 天、65 天、70 天、75 天、80 天、85 天、90 天、95 天、或 100 天、或更多天(或其中的任意范围)。

[0119] 在其他方面中,本发明提供用于在需要其的哺乳动物(例如,人)中沉默 ALDH 基因表达的方法,所述方法包括向哺乳动物施用治疗有效量的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP 制剂),所述核酸-脂质颗粒包含一种或多种在本文中所描述的干扰 RNA(例如,siRNA)(例如,靶向 ALDH 基因的一个或多个区域的 siRNA)。在一些实施方案中,相对于在缺乏干扰 RNA 的情况下(例如,缓冲液对照或不相关非 ALDH 靶向干扰 RNA 对照)检测的 ALDH mRNA 水平,包含一种或多种 ALDH 干扰 RNA 的核酸-脂质颗粒的施用使 ALDH mRNA 水平降低至少约 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%(或其中的任意范围)。在其他实施方案中,相对于阴性对照诸如,例如,缓冲液对照或不相关非 ALDH 靶向干扰 RNA 对照,包含一种或多种 ALDH 靶向干扰 RNA 的核酸-脂质颗粒的施用使 ALDH mRNA 水平降低至少约 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天、20 天、21 天、22 天、23 天、24 天、25 天、30 天、35 天、40 天、45 天、50 天、55 天、60 天、65 天、70 天、75 天、80 天、85 天、90 天、95 天、或 100 天、或更多天(或其中的任意范围)。

[0120] 在其他方面中,本发明提供用于治疗需要其的哺乳动物(例如,人)中与酒精中毒相关的一种或多种症状,预防所述症状,降低发展成为所述症状的风险或可能性(例如,降低对所述症状的易感性),延缓所述症状的发病,和/或改善所述症状,所述方法包括向哺乳动物施用治疗有效量的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP 制剂),所述核酸-脂质颗粒包含靶向 ALDH 基因表达的、一种或多种在本文中所描述的干扰 RNA 分子(例如,siRNA)。

[0121] 在进一步的方面中,本发明提供用于使需要其的哺乳动物(例如,人)(例如,罹患酒精中毒的人)中 ALDH 失活的方法,所述方法包括向哺乳动物施用治疗有效量的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP 制剂),所述核酸-脂质颗粒包含靶向 ALDH 基因表达的、一种或多种在本文中所描述的干扰 RNA(例如,siRNA)。在一些实施方案中,相对于在缺乏干扰 RNA 的情况下(例如,缓冲液对照或不相关非 ALDH 靶向干扰 RNA 对照)检测的 ALDH 酶水平,包含一种或多种 ALDH 靶向干扰 RNA 的核酸-脂质颗粒的施用使 ALDH 酶水平下降、降低、减小了至少约 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%(或其中的任意范围)。

[0122] 通过举例,可以使用分支 DNA 测定测量 ALDH2mRNA(QuantiGene®;Affymetrix)。分支 DNA 测定是夹心核酸杂交方法,所述方法使用 bDNA 分子以由捕获的靶向 RNA 扩增信号。再次通过举例,可以通过将 NAD 和底物(例如,乙醛)加入至蛋白质样品并且测量在 340nm 的 NADH 的形成,可以通过分光光度法测量 ALDH 酶活性(参见,例如,Sheppard, Albersheim&McClearn, J. Biol. Chem. 1970245(11):2876;Arolfo 等人, Alcoholism: Clinical and Experimental Research(酒精中毒:临床与实验研究)200933(11):1935;

Garver 等人, Alcohol&Alcoholism( 酒精 & 酒精中毒 )200035 (5) :435)。

#### [0123] IV. 治疗性核酸

[0124] 术语“核酸”包括任何寡核苷酸或多核苷酸,其具有一般被称为寡核苷酸的含有多至 60 个核苷酸的片段,和被称为多核苷酸的较长片段。在具体的实施方案中,本发明的寡核苷酸长度为约 15 至约 60 个核苷酸。在一些实施方案中,核酸与载体系统如在本文中所描述的脂质颗粒关联。在某些实施方案中,核酸完全包封在脂质颗粒中。核酸可以在本发明的脂质颗粒中单独施用,或者与包含肽、多肽、或小分子如常规药物的脂质颗粒组合施用(例如,共同施用)。

[0125] 在本发明的上下文中,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”是指由天然存在的碱基、糖和糖间(骨架)键组成的核苷酸或核苷单体的聚合物或低聚物。术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”还包括,包含功能相似的非天然存在的单体、或其部分的聚合物或低聚物。所述修饰的或取代的寡核苷酸通常比天然形式更优选,这归因于这样的性质,诸如,例如,增强的细胞吸收、减小的免疫原性、和在核酸酶存在下增加的稳定性。

[0126] 寡核苷酸一般被分类为脱氧核糖寡核苷酸或核糖寡核苷酸。脱氧核糖寡核苷酸由被称为脱氧核糖的 5 碳糖组成,5 碳糖在该糖的 5' 和 3' 碳处与磷酸共价连接,以形成交替的无支链聚合物。核糖寡核苷酸由相似的重复结构组成,其中 5 碳糖是核糖。

[0127] 核酸可以是单链 DNA 或 RNA、或双链 DNA 或 RNA、或 DNA-RNA 杂合体。在优选的实施方案中,核酸是双链 RNA。在本文中描述了双链 RNA 的实例并且其包括,例如,siRNA 和其他 RNAi 试剂如切酶底物 dsRNA、shRNA、aiRNA、和前体 miRNA。在其他实施方案中,核酸是单链。单链核酸包括,例如,反义寡核苷酸、核酶、成熟 miRNA、和形成三链体的寡核苷酸。

[0128] 本发明的核酸可以是多种长度的,一般取决于核酸的特定形式。例如,在具体的实施方案中,质粒或基因可以是长度为约 1,000 至约 100,000 个核苷酸残基。在具体的实施方案中,寡核苷酸长度范围可以为约 10 至约 100 个核苷酸。在多个相关的实施方案中,单链、双链、和三链寡核苷酸,长度范围可以为约 10 至约 60 个核苷酸、约 15 至约 60 个核苷酸、约 20 至约 50 个核苷酸、约 15 至约 30 个核苷酸、或约 20 至约 30 个核苷酸。

[0129] 在具体的实施方案中,本发明的寡核苷酸(或其链)与靶多核苷酸序列特异性杂交或互补。如在本文中所使用的术语“特异性杂交”和“互补”表示足以使 DNA 或 RNA 靶标与寡核苷酸之间发生稳定的和特异性结合的互补性程度。应理解的是,寡核苷酸不需要与其靶核酸序列 100% 互补以特异性杂交。在优选的实施方案中,当寡核苷酸与靶序列的结合妨碍靶序列的正常功能从而导致其效用或表达丧失时,寡核苷酸是特异性杂交的,并且存在足以在需要特异性结合的条件下,即在体内测定或治疗性处理情况中的生理学条件下,或者在体外测定情况中、进行测定的条件下,避免寡核苷酸与非靶序列非特异性结合的互补性程度。因此,寡核苷酸与其靶向或特异性杂交的基因或 mRNA 序列的区域相比,可以包括 1 个、2 个、3 个、或更多个碱基置换。

#### [0130] A. siRNA

[0131] 本发明的未修饰的和修饰的 siRNA 分子能够沉默 ALDH 基因表达。siRNA 双链体的每条链通常长度为约 15 至约 60 个核苷酸,优选约 15 至约 30 个核苷酸。在某些实施方案中,siRNA 包含至少一个修饰的核苷酸。修饰的 siRNA 一般具有比相应未修饰的 siRNA 序列更低的免疫刺激性,并且保持针对目标靶基因的 RNAi 活性。在一些实施方案中,修饰的 siRNA

含有至少一个 2' OMe 嘌呤或嘧啶核苷酸如 2' OMe- 鸟苷、2' OMe- 尿苷、2' OMe- 腺苷、和 / 或 2' OMe- 胞嘧啶核苷酸。修饰的核苷酸可以存在于 siRNA 的一条链 ( 即, 有义或反义 ) 或两条链中。在一些优选的实施方案中, 在 siRNA 的一条链 ( 即, 有义或反义 ) 或两条链中, 尿苷和 / 或鸟苷核苷酸中的一个或多个是修饰的 ( 例如, 2' OMe 修饰的 )。在这些实施方案中, 修饰的 siRNA 还可以包含一个或多个修饰的 ( 例如, 2' OMe 修饰的 ) 腺苷和 / 或修饰的 ( 例如, 2' OMe 修饰的 ) 胞嘧啶核苷酸。在其他优选的实施方案中, 在 siRNA 的一条链 ( 即, 有义或反义 ) 或两条链中, 只有尿苷和 / 或鸟苷核苷酸是修饰的 ( 例如, 2' OMe 修饰的 )。siRNA 序列可以具有突出端 ( 例如, 如在 Elbashir 等人, *Genes Dev.*, 15:188 (2001) 或 Nykanen 等人, *Cell*, 107:309 (2001) 中描述的 3' 或 5' 突出端 ), 或者可以缺少突出端 ( 即, 具有平末端 )。

[0132] 在具体的实施方案中, 修饰的核苷酸如 2' OMe 尿苷和 / 或鸟苷核苷酸与 siRNA 的一条或两条链的双链区的选择性结合降低或完全消除了对所述 siRNA 分子的免疫应答。在某些实例中, 通过在 siRNA 双链体的双链区内引入最小和选择性 2' OMe 修饰, 可以平衡或优化特异性 siRNA 序列的免疫刺激性和它们沉默基因表达的能力。这可以在治疗可行的 siRNA 剂量获得, 而没有与使用未修饰的 siRNA 相关的细胞因子诱导、毒性和脱靶作用。

[0133] 在 siRNA 双链体的双链区中, 修饰的 siRNA 一般包含约 1% 至约 100% ( 例如, 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%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 100% ) 修饰的核苷酸。在某些实施方案中, siRNA 的双链区中一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、或更多个核苷酸包括修饰的核苷酸。在某些其他实施方案中, siRNA 的双链区中一些或所有修饰的核苷酸是 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、或更多个彼此分开的核苷酸。在一个优选的实施方案中, 在 siRNA 的双链区中, 所有修饰的核苷酸都不是彼此相邻的 ( 例如, 在每个修饰的核苷酸之间存在至少 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、或 10 个未修饰的核苷酸的间隙 )。

[0134] 在一些实施方案中, siRNA 的双链区中小于约 50% ( 例如, 小于约 49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、或 36%, 优选小于约 35%、34%、33%、32%、31%、或 30% ) 的核苷酸包括修饰的 ( 例如, 2' OMe ) 核苷酸。在这些实施方案的一个方面中, siRNA 的一条或两条链的双链区中小于约 50% 的尿苷和 / 或鸟苷核苷酸被选择性地 ( 例如, 仅选择性地 ) 修饰。在这些实施方案的另一个方面中, siRNA 的双链区中小于约 50% 的核苷酸包括 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 在 siRNA 的两条链中包含 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 包含至少一个 2' OMe- 鸟苷核苷酸和至少一个 2' OMe- 尿苷核苷酸, 并且其中 2' OMe- 鸟苷核苷酸和 2' OMe- 尿苷核苷酸只是存在于双链区中的 2' OMe 核苷酸。在这些实施方案的此外另一个方面中, siRNA 的双链区中小于约 50% 的核苷酸包括 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 在修饰的 siRNA 的两条链中包含 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 包含选自下列组成的组的 2' OMe 核苷酸: 2' OMe- 鸟苷核苷酸、2' OMe- 尿苷核苷酸、2' OMe- 腺苷核苷酸、和它们的混合物, 并且其中 siRNA 在双链区中不包含 2' OMe- 胞嘧啶核苷酸。在这些实施方案的进一步的方面中, siRNA 的双链区中小于约 50% 的核苷酸包括 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 在 siRNA 的两条链中包含 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 包含至



少一个 2' OMe- 鸟苷核苷酸和至少一个 2' OMe- 尿苷核苷酸, 并且其中 siRNA 在双链区中不包含 2' OMe- 胞嘧啶核苷酸。在这些实施方案的另一个方面中, siRNA 的双链区中小于约 50% 的核苷酸包括 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 在修饰的 siRNA 的两条链中包含 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 包含选自下列组成的组的 2' OMe 核苷酸: 2' OMe- 鸟苷核苷酸、2' OMe- 尿苷核苷酸、2' OMe- 腺苷核苷酸、和它们的混合物, 并且其中双链区中 2' OMe 核苷酸彼此不相邻。

[0135] 在其他实施方案中, 在 siRNA 的双链区中, 约 1% 至约 50% (例如, 约 5% -50%、10% -50%、15% -50%、20% -50%、25% -50%、30% -50%、35% -50%、40% -50%、45% -50%、5% -45%、10% -45%、15% -45%、20% -45%、25% -45%、30% -45%、35% -45%、40% -45%、5% -40%、10% -40%、15% -40%、20% -40%、25% -40%、25% -39%、25% -38%、25% -37%、25% -36%、26% -39%、26% -38%、26% -37%、26% -36%、27% -39%、27% -38%、27% -37%、27% -36%、28% -39%、28% -38%、28% -37%、28% -36%、29% -39%、29% -38%、29% -37%、29% -36%、30% -40%、30% -39%、30% -38%、30% -37%、30% -36%、31% -39%、31% -38%、31% -37%、31% -36%、32% -39%、32% -38%、32% -37%、32% -36%、33% -39%、33% -38%、33% -37%、33% -36%、34% -39%、34% -38%、34% -37%、34% -36%、35% -40%、5% -35%、10% -35%、15% -35%、20% -35%、21% -35%、22% -35%、23% -35%、24% -35%、25% -35%、26% -35%、27% -35%、28% -35%、29% -35%、30% -35%、31% -35%、32% -35%、33% -35%、34% -35%、30% -34%、31% -34%、32% -34%、33% -34%、30% -33%、31% -33%、32% -33%、30% -32%、31% -32%、25% -34%、25% -33%、25% -32%、25% -31%、26% -34%、26% -33%、26% -32%、26% -31%、27% -34%、27% -33%、27% -32%、27% -31%、28% -34%、28% -33%、28% -32%、28% -31%、29% -34%、29% -33%、29% -32%、29% -31%、5% -30%、10% -30%、15% -30%、20% -34%、20% -33%、20% -32%、20% -31%、20% -30%、21% -30%、22% -30%、23% -30%、24% -30%、25% -30%、25% -29%、25% -28%、25% -27%、25% -26%、26% -30%、26% -29%、26% -28%、26% -27%、27% -30%、27% -29%、27% -28%、28% -30%、28% -29%、29% -30%、5% -25%、10% -25%、15% -25%、20% -29%、20% -28%、20% -27%、20% -26%、20% -25%、5% -20%、10% -20%、15% -20%、5% -15%、10% -15%、或 5% -10%) 的核苷酸包括修饰的核苷酸。在这些实施方案的一个方面中, siRNA 的一条或两条链的双链区中约 1% 至约 50% 的尿苷和 / 或鸟苷核苷酸被选择性地 (例如, 仅选择性地) 修饰。在这些实施方案的另一个方面中, siRNA 的双链区中约 1% 至约 50% 的核苷酸包括 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 在 siRNA 的两条链中包含 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 包含至少一个 2' OMe- 鸟苷核苷酸和至少一个 2' OMe- 尿苷核苷酸, 并且其中 2' OMe- 鸟苷核苷酸和 2' OMe- 尿苷核苷酸只是存在于双链区中的 2' OMe 核苷酸。在这些实施方案的此外另一个方面中, siRNA 的双链区中约 1% 至约 50% 的核苷酸包括 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 在修饰的 siRNA 的两条链中包含 2' OMe 核苷酸, 其中 siRNA 包含选自下列组成的组的 2' OMe 核苷酸: 2' OMe- 鸟苷核苷酸、2' OMe- 尿苷核苷酸、2' OMe- 腺苷核苷酸、和它们的混合物, 并且其中 siRNA 在双链区中不包含 2' OMe- 胞嘧啶核苷酸。在这些实施方案的进一步的方面中, siRNA 的双链区中约 1% 至约 50% 的核

核苷酸包括 2' OMe 核苷酸,其中 siRNA 在 siRNA 的两条链中包含 2' OMe 核苷酸,其中 siRNA 包含至少一个 2' OMe- 鸟苷核苷酸和至少一个 2' OMe- 尿苷核苷酸,并且其中 siRNA 在双链区中不包含 2' OMe- 胞嘧啶核苷酸。在这些实施方案的另一个方面中, siRNA 的双链区中约 1%至约 50%的核苷酸包括 2' OMe 核苷酸,其中 siRNA 在修饰的 siRNA 的两条链中包含 2' OMe 核苷酸,其中 siRNA 包含选自下列组成的组的 2' OMe 核苷酸:2' OMe- 鸟苷核苷酸、2' OMe- 尿苷核苷酸、2' OMe- 腺苷核苷酸、和它们的混合物,并且其中双链区中 2' OMe 核苷酸彼此不相邻。

[0136] 可以引入至 siRNA 中的修饰的额外的范围、百分数、和方式描述于美国专利公开号 20070135372 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0137] 1. siRNA 序列的选择

[0138] 可以使用本领域已知的任何方法来识别适合的 siRNA 序列。通常,在 Elbashir 等人, *Nature* (自然), 411:494-498 (2001) 和 Elbashir 等人, *EMBO J.* (欧洲分子生物学组织杂志), 20:6877-6888 (2001) 中的方法与 Reynolds 等人, *Nature Biotech.* (自然生物技术), 22(3):326-330 (2004) 中给出的合理设计规则相结合。

[0139] 作为非限制性实例,对于二核苷酸序列(例如, AA、NA、CC、GG、或 UU,其中 N = C、G、或 U),可以扫描来自目标靶基因的转录本的 AUG 起始密码子的核苷酸序列 3' (参见,例如, Elbashir 等人, *EMBO J.* (欧洲分子生物学组织杂志), 20:6877-6888 (2001))。将与二核苷酸序列直接 3' 相连的核苷酸识别为潜在的 siRNA 序列(即,靶序列或有义链序列)。通常,将与二核苷酸序列直接 3' 相连的 19 个、21 个、23 个、25 个、27 个、29 个、31 个、33 个、35 个、或更多个核苷酸识别为潜在的 siRNA 序列。在一些实施方案中,二核苷酸序列是 AA 或 NA 序列并将与 AA 或 NA 二核苷酸直接 3' 相连的 19 个核苷酸识别为潜在的 siRNA 序列。siRNA 序列通常沿靶基因的长度在不同位点被间隔开。为了进一步提高 siRNA 序列的沉默效率,可以分析潜在的 siRNA 序列以识别不含与其他编码序列同源的区域位点,例如在靶细胞或生物体中。例如,在靶细胞或生物体中,约 21 个碱基对的适合的 siRNA 序列通常不会具有多于 16-17 个与编码序列同源的连续碱基对。如果 siRNA 序列要从 RNA Pol III 启动子表达,则选择缺少多于 4 个连续 A 或 T 的 siRNA 序列。

[0140] 一旦已经识别潜在的 siRNA 序列,可以设计互补序列(即,反义链序列)。还可以使用多种本领域已知的标准来分析潜在的 siRNA 序列。例如,为了提高它们的沉默效率,可以通过合理的设计算法来分析 siRNA 序列,从而识别具有一种或多种以下特点的序列:(1) G/C 含量为约 25%至约 60% G/C;(2) 在有义链位点 15-19 至少 3 个 A/U;(3) 无内部重复序列;(4) 有义链的位点 19 的 A;(5) 有义链的位点 3 的 A;(6) 有义链的位点 10 的 U;(7) 有义链的位点 19 的无 G/C;和 (8) 有义链的位点 13 的无 G。结合对这些特点中的每一个赋予适合的数值的算法并有效用于 siRNA 选择的 siRNA 设计工具可以参见,例如, <http://ihome.ust.hk/~bokcmho/siRNA/siRNA.html>。本领域技术人员应该理解可以选择具有一种或多种前述特征的序列,以作为潜在 siRNA 序列来进一步分析和测试。

[0141] 另外,具有以下标准中一个或多个的潜在 siRNA 序列通常可以被排除为 siRNA:(1) 在一行包括 4 个以上相同的碱基的片段的序列;(2) 包括 G 均聚物的序列(即,以减小由于这些聚合物的结构特征导致的可能的非特异性作用);(3) 包括三个碱基基序的序列(例如, GGG、CCC、AAA、或 TTT);(4) 在一行包括 7 个以上 G/C 的片段的序列;和 (5) 在候选

物内包含 4 个以上碱基的直接重复导致内部折回结构的序列。然而,本领域技术人员应该理解仍可以选择具有前述特征中的一个或多个的序列作为潜在 siRNA 序列用于进一步分析和测试。

[0142] 在一些实施方案中,基于如描述于例如 Khvorova 等人,Cell,115:209-216(2003);和 Schwarz 等人,Cell,115:199-208(2003) 中的 siRNA 双链体非对称性,可以进一步分析潜在的 siRNA 序列。在其他实施方案中,基于如描述于例如 Luo 等人,Biophys. Res. Commun.,318:303-310(2004) 中的在靶部位的二级结构,可以进一步分析潜在的 siRNA 序列。例如,可以使用 Mfold 算法(可以在 [http://mfold.burnet.edu.au/rna\\_form](http://mfold.burnet.edu.au/rna_form) 获得)对在靶部位的二级结构建模,以选择有利于在靶部位的可接近性(accessibility)的 siRNA 序列,在靶部位处二级结构较少以碱基配对和茎-环形式存在。

[0143] 一旦已经识别潜在的 siRNA 序列,可以分析序列的任何免疫刺激性的存在,例如,使用体外细胞因子测定或体内动物模型。siRNA 序列的有义和/或反义链中的基序如富含 GU 的基序(例如,5'-GU-3'、5'-UGU-3'、5'-GUGU-3'、5'-UGUGU-3'等)也可以提供序列是否可以具有免疫刺激性的指示。一旦发现 siRNA 分子是免疫刺激性的,则可以对其进行修饰以减小其如在本文中所描述的免疫刺激性。作为非限制性实例,siRNA 序列可以与哺乳动物应答细胞在使得细胞产生可检测到的免疫应答的条件下接触,以确定 siRNA 是免疫刺激性的还是非免疫刺激性的 siRNA。哺乳动物应答细胞可以来自初次用于实验的(naïve)哺乳动物(即,以前未与 siRNA 序列的基因产物接触过的哺乳动物)。哺乳动物应答细胞可以是,例如,外周血单核细胞(PBMC)、巨噬细胞等。可检测的免疫应答可以包括生成细胞因子或生长因子诸如,例如,TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-12、或它们的组合。然后可以修饰被识别具有免疫刺激性的 siRNA 分子,以通过用修饰核苷酸替换有义和/或反义链上的核苷酸中的至少一个来减小其免疫刺激性。例如,siRNA 双链体的双链区中小于约 30%(例如,小于约 30%、25%、20%、15%、10%、或 5%)的核苷酸可以被修饰的核苷酸如 2'-OMe 核苷酸替换。修饰的 siRNA 然后可以与如上所述的哺乳动物应答细胞相接触,以确认其免疫刺激性已经被降低或消除。

[0144] 用于检测免疫应答的适合的体外测定包括但不限于,David 等人的双单克隆抗体夹心免疫测定技术(美国专利号 4,376,110);单克隆-多克隆抗体夹心测定(Wide 等人,在 Kirkham 和 Hunter,编,Radioimmunoassay Methods(放射免疫测定方法)中,E. and S. Livingstone,Edinburgh(1970));Gordon 等人的“Western 印迹”法(美国专利号 4,452,901);标记配体的免疫沉淀(Brown 等人,J. Biol. Chem. (生物化学杂志),255:4980-4983(1980));如,例如,Raines 等人,J. Biol. Chem. (生物化学杂志),257:5154-5160(1982)所述的酶联免疫吸附测定(ELISA);免疫细胞化学技术,包括荧光染料的使用(Brooks 等人,Clin. Exp. Immunol. (临床实验免疫学),39:477(1980));和活性中和(Bowen-Pope 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国科学院院刊),81:2396-2400(1984))。除了上述免疫测定之外,许多其他免疫测定是可用的,包括美国专利号 3,817,827;3,850,752;3,901,654;3,935,074;3,984,533;3,996,345;4,034,074;和 4,098,876 中描述的那些。通过引用将这些参考文献的公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0145] 用于检测免疫应答的体内模型的非限制性实例包括,如在例如 Judge 等人,Mol. Ther.,13:494-505(2006)中描述的体内小鼠细胞因子诱导测定。在某些实施方案中,测

定可以如下进行：(1) 可以通过标准静脉内注射将 siRNA 施用于侧尾静脉中；(2) 可以在施用后约 6 小时通过心脏穿刺收集血液并加工为血浆，以用于细胞因子分析；和 (3) 根据制造商的说明，使用夹心 ELISA 试剂盒量化细胞因子（例如，小鼠和人 IFN- $\alpha$  (PBL Biomedical (PBL 生物学)；Piscataway, NJ)；人 IL-6 和 TNF- $\alpha$  (eBioscience；圣地亚哥, CA)；以及小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$ 、和 IFN- $\gamma$  (BD Biosciences (BD 生物科学, 圣地亚哥, CA))。

[0146] 特异性结合细胞因子和生长因子的单克隆抗体可商购自多个来源，并且可以使用本领域已知的方法产生（参见，例如，Kohler 等人，Nature (自然)，256：495-497 (1975) 以及 Harlow 和 Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (抗体, 实验手册)，Cold Spring Harbor Publication (冷泉港出版社)，纽约 (1999))。之前已经描述了单克隆抗体的产生，并且可以通过本领域已知的任何方式完成 (Buhring 等人，在 Hybridoma (杂交瘤)，第 10 卷，第 1 期，第 77-78 页 (1991) 中)。在一些方法中，将单克隆抗体标记（例如，利用可通过光谱法、光化学、生物化学、电学、光学、或化学方式检测的任何组合物）以利于检测。

## [0147] 2. 产生 siRNA 分子

[0148] 可以以多种形式提供 siRNA，所述形式包括，例如，作为一个或多个分离的小干扰 RNA (siRNA) 双链体、作为较长的双链 RNA (dsRNA)、或者作为由 DNA 质粒中的转录表达盒转录的 siRNA 或 dsRNA。在一些实施方案中，可以通过酶或通过部分 / 总体有机合成来制备 siRNA，并且可以通过体外酶或有机合成来引入修饰的核糖核苷酸。在某些实例中，各条链是化学制备的。合成 RNA 分子的方法是本领域已知的，例如，如在 Verma 和 Eckstein (1998) 中描述的或如在本文中所描述的化学合成方法。

[0149] 可以使用 RNA 群以提供长前体 RNA，或者可以使用与所选靶序列具有基本或完全的同性的长前体 RNA 以制备 siRNA。RNA 可以是从小细胞或组织中分离的、合成的、和 / 或根据对本领域技术人员来说众所周知的方法克隆的。RNA 可以是混合群（由细胞或组织获得、由 cDNA 转录、缩减、选择等），或者可以表示单靶序列。RNA 可以是自然存在的（例如，从组织或细胞样品中分离的）、体外合成的（例如，使用 T7 或 SP6 聚合酶和 PCR 产物或克隆的 cDNA）、或化学合成的。

[0150] 为了形成长 dsRNA，对于合成的 RNA 来说，互补体也在体外转录并杂交以形成 dsRNA。如果使用天然存在的 RNA 群，还提供 RNA 互补体（例如，以形成用于被大肠杆菌 (E. coli) RNA 酶 III 或切酶消化的 dsRNA），例如，通过转录对应于 RNA 群的 cDNA，或通过使用 RNA 聚合酶。然后将前体 RNA 杂交以形成用于消化的双链 RNA。dsRNA 可以直接施用于受试者或可以在施用前在体外消化。

[0151] 用于分离 RNA、合成 RNA、杂交核酸、制备和筛选 cDNA 文库、以及进行 PCR 的方法是在本领域内众所周知的（参见，例如，Gubler 和 Hoffman, Gene (基因)，25：263-269 (1983)；Sambrook 等人，见上；Ausubel 等人，见上），PCR 方法也是在本领域内众所周知的（参见，美国专利号 4,683,195 和 4,683,202；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (PCR 试验技术：方法和应用指南) (Innis 等人，编，1990))。表达文库对本领域技术人员来说也是众所周知的。公开本发明中使用的一般方法的额外基础教科书包括，Sambrook 等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual (分子克隆, 实验室手册) (第二版 1989)；Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (基因转移和表达：实验室手册) (1990)；和 Current Protocols in Molecular Biology (当前分

子生物学试验技术)(Ausubel 等人,编,1994)。通过引用将这些参考文献的公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0152] 优选地, siRNA 是化学合成的。使用本领域已知的多种技术中的任何一种,如在 Usman 等人, J. Am. Chem. Soc. (美国化学协会杂志), 109:7845(1987); Scaringe 等人, Nucl. Acids Res. (核酸研究), 18:5433(1990); Wincott 等人, Nucl. Acids Res. (核酸研究), 23:2677-2684(1995); 和 Wincott 等人, Methods Mol. Bio. (分子生物学方法), 74:59(1997) 中描述的那些, 可以合成包含本发明的 siRNA 分子的寡核苷酸。寡核苷酸的合成利用常见的核酸保护和偶联基团, 如在 5' 末端的二甲氧基三苯甲基和在 3' 末端的亚磷酸酰胺。作为非限制性实例, 可以使用 0.2  $\mu$ mol 规模方案在 Applied Biosystems 合成仪上进行小规模合成。备选地, 可以以 0.2  $\mu$ mol 规模在来自 Protogene (Palo Alto, CA) 的 96 孔板合成仪上进行合成。然而, 更大或更小规模的合成也在本发明的范围内。用于寡核苷酸合成的适合的试剂、用于 RNA 去保护的方法、和用于 RNA 纯化的方法对本领域技术人员来说是已知的。

[0153] 还可以通过串联合成技术来合成 siRNA 分子, 其中两条链均作为被可裂解的接头分开的单个连续寡核苷酸片段或链来合成, 所述接头随后裂解以提供杂交形成 siRNA 双链体的分离的片段或链。接头可以是多核苷酸接头或非核苷酸接头。siRNA 的串联合成可以容易地适合于多孔 / 多板合成 plaALDHorms 以及使用间歇反应器、合成柱等的大规模合成 plaALDHorms 二者。备选地, 可以由两个不同的寡核苷酸装配 siRNA 分子, 其中一个寡核苷酸包含有义链其另一个包含 siRNA 的反义链。例如, 每条链可以单独合成并在合成和 / 或去保护后通过杂交或连接 (ligation) 结合在一起。在某些其他实例中, siRNA 分子可以作为单个连续寡核苷酸片段合成, 其中自互补的有义区和反义区杂交形成具有发夹二级结构的 siRNA 双链体。

### [0154] 3. 修饰 siRNA 序列

[0155] 在某些方面中, siRNA 分子包括具有两条链和双链区中的至少一个修饰的核苷酸的双链体, 其中每条链长度为约 15 至约 60 个核苷酸。有利地, 修饰的 siRNA 具有比相应未修饰的 siRNA 序列更低的免疫刺激性, 但是却保持沉默靶序列的表达的能力。在优选的实施方案中, 引入至 siRNA 分子中的化学修饰程度使在减小或消除 siRNA 免疫刺激性与保持 RNAi 活性之间达到平衡。作为非限制性实例, 靶向目标基因的 siRNA 分子可以在 siRNA 双链体内的选择性尿苷和 / 或鸟苷核苷酸处最小程度地修饰 (例如, 小于约 30%、25%、20%、15%、10% 或 5% 的修饰), 以消除由 siRNA 产生的免疫应答, 同时保持其沉默靶基因表达的能力。

[0156] 适合用于在本发明中使用的修饰的核苷酸的实例包括但不限于, 具有 2' -O- 甲基 (2' -OMe)、2' -脱氧-2' -氟代 (2' -F)、2' -脱氧-5-C- 甲基、2' -O-(2- 甲氧基乙基) (MOE)、4' -硫代、2' -氨基、或 2' -C- 烯丙基的核糖核苷酸。具有 Northern 构象的修饰的核苷酸, 如描述于例如 Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure (核酸结构原理), Springer-Verlag 编 (1984) 中的那些, 也适合用于 siRNA 分子。此类修饰的核苷酸包括但不限于, 锁核酸 (LNA) 核苷酸 (例如, 2' -O, 4' -C- 亚甲基 - (核糖呋喃基) 核苷酸)、2' -O-(2- 甲氧基乙基) (MOE) 核苷酸、2' -甲基 - 硫代 - 乙基核苷酸、2' -脱氧-2' -氟代 (2' -F) 核苷酸、2' -脱氧-2' -氯代 (2' -Cl) 核苷酸、和 2' -叠氮基核

苷酸。在某些实例中,在本文中所描述的 siRNA 分子包含一个或多个 G- 钳 (clamp) 核苷酸。G- 钳核苷酸是指修饰的胞嘧啶类似物,其中修饰赋予双链体内互补的鸟嘌呤核苷酸的 Watson-Crick 和 Hoogsteen 面两者以氢键的能力(参见,例如,Lin 等人, J. Am. Chem. Soc. (美国化学学会杂志), 120 :8531-8532(1998))。此外,具有核苷酸碱基类似物的核苷酸,诸如,例如, C- 苯基、C- 萘基、其他芳族衍生物、肌苷、唑类甲酰胺 (azole carboxamide) 和硝基唑类 (nitroazole) 衍生物如 3- 硝基吡咯、4- 硝基咪唑、5- 硝基咪唑、和 6- 硝基咪唑(参见,例如,Loakes, Nucl. Acids Res. (核酸研究), 29 :2437-2447(2001)) 可以结合至 siRNA 分子中。

[0157] 在某些实施方案中, siRNA 分子还可以包括一个或多个化学修饰如端帽部分、磷酸骨架修饰等。端帽部分的实例包括,但不仅限于,反向脱氧无碱基残基、甘油基修饰、4' , 5' - 亚甲基核苷酸、1-( $\beta$ -D- 赤型呋喃酰基) 核苷酸、4' - 硫代核苷酸、碳环核苷酸、1,5- 脱水己糖醇核苷酸、L- 核苷酸、 $\alpha$ - 核苷酸、修饰的碱基核苷酸、苏型 - 戊呋喃酰核苷酸、无环 3' , 4' - 断裂核苷酸,无环 3,4- 二羟基丁基核苷酸、无环 3,5- 二羟基戊基核苷酸、3' - 3' - 反向核苷酸部分、3' - 3' - 反向无碱基部分、3' - 2' - 反向核苷酸部分、3' - 2' - 反向无碱基部分、5' - 5' - 反向核苷酸部分、5' - 5' - 反向无碱基部分、3' - 5' - 反向脱氧无碱基部分、5' - 氨基 - 烷基磷酸酯、1,3- 二氨基 - 2- 丙基磷酸酯、3- 氨基丙基磷酸酯、6- 氨基己基磷酸酯、1,2- 氨基十二烷基磷酸酯、羟基丙基磷酸酯、1,4- 丁二醇磷酸酯、3' - 氨基磷酸酯、5' - 氨基磷酸酯、己基磷酸酯、氨基己基磷酸酯、3' - 磷酸酯、5' - 氨基、3' - 硫代磷酸酯、5' - 硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、和桥连或非 - 桥连的甲基磷酸酯或 5' - 巯基部分(参见,例如,美国专利号 5, 998, 203 ;Beaucage 等人, Tetrahedron (四面体) 49 :1925(1993))。磷酸骨架修饰的非限制性实例(即,形成修饰的核苷酸间键)包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、磷酸三酯、吗啉代、酰胺化物、氨基甲酸酯、羧甲基、乙酰酰胺化物 (acetamidate)、聚酰胺、磺酸酯、磺酰胺、氨基磺酸酯、甲缩醛 (formacetal)、硫代甲缩醛 (thioformacetal) 和烷基甲硅烷基取代(参见,例如, Hunziker 等人, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties (核酸类似物: 合成和特性), 在 Modern Synthetic Methods (现代合成方法) 中, VCH, 331-417(1995); Mesmaeker 等人, Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides (寡核苷酸的新型骨架替换), 在 Carbohydrate Modifications in Antisense Research (反义研究中的碳水化合物修饰) 中, ACS, 24-39(1994))。此类化学修饰可以发生在 siRNA 的有义链、反义链、或两条链的 5' - 末端和 / 或 3' - 末端。通过引用将这些参考文献的公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0158] 在一些实施方案中, siRNA 分子的有义和 / 或反义链还可以包含 3' - 端突出端, 所述突出端具有约 1 至约 4 个(例如, 1 个、2 个、3 个或 4 个) 2' - 脱氧核糖核苷酸、修饰的(例如, 2' OMe) 和 / 或未修饰的尿苷核糖核苷酸、和 / 或修饰的(例如, 2' OMe) 和未修饰的核苷酸的任何其他组合。

[0159] 例如, 在英国专利号 GB2, 397, 818B 和美国专利公开号 20040192626、20050282188、和 20070135372 中, 描述了修饰的核苷酸和可以引入至 siRNA 分子中的化学修饰类型的额外实例, 通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0160] 在本文中所描述的 siRNA 分子可以任选地在 siRNA 的一条或两条链中包含一个

或多个非核苷酸。如在本文中所使用的,术语“非核苷酸”是指可以结合至核酸链中代替一个或多个核苷酸单元(包括糖和/或磷酸取代)并允许其余碱基表现它们的活性的任何基团或化合物。所述基团或化合物是无碱基的,因为其不包含公认的核苷酸碱基如腺苷、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、或胸腺嘧啶,并且因此缺少在 1' 位点的碱基。

[0161] 在其他实施方案中, siRNA 的化学修饰包括将缀合物连接至 siRNA 分子上。通过共价连接诸如,例如,可生物降解的接头,可以在 siRNA 的有义和/或反义链的 5' 和/或 3' - 末端连接缀合物。例如,通过氨基甲酸酯基或其他连接基团,也可以将缀合物与 siRNA 连接(参见,例如,美国专利公开号 20050074771、20050043219、和 20050158727)。在某些实例中,缀合物是促进 siRNA 向细胞中递送的分子。适用于与 siRNA 连接的缀合物分子的实例包括但不限于,类固醇如胆固醇、乙二醇如聚乙二醇(PEG)、人血清白蛋白(HSA)、脂肪酸、类胡萝卜素、萜类、胆酸、叶酸盐(例如,叶酸、叶酸类似物及其衍生物)、糖(例如,半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、葡萄糖、甘露糖、果糖、岩藻糖等)、磷脂、肽、能够介导细胞吸收的细胞受体的配体、以及它们的组合(参见,例如,美国专利公开号 20030130186、20040110296、和 20040249178;美国专利号 6,753,423)。其他实例包括,美国专利公开号 20050119470 和 20050107325 中描述的亲脂性部分、维生素、聚合物、肽、蛋白质、核酸、小分子、寡糖、碳水化合物簇、嵌入剂、小沟结合物、裂解剂、和交联剂缀合物分子。另外的其他实例包括,美国专利公开号 20050153337 中描述的 2' -O-烷基胺、2' -O-烷氧基烷基胺、聚胺、C5-阳离子修饰的嘧啶、阳离子肽、胍基、脒基、阳离子氨基酸缀合物分子。额外的实例包括,美国专利公开号 20040167090 中描述的疏水性基团、膜活性化合物、细胞渗透化合物、细胞靶向信号、相互作用修饰剂、和空间稳定剂缀合物分子。进一步的实例包括,美国专利公开号 20050239739 中描述的缀合物分子。对于 siRNA 的在保持 RNAi 活性的同时而提高的药代动力学分布、生物利用度、和/或稳定性,可以评估所使用的缀合物类型和与 siRNA 分子的缀合程度。同样地,使用许多众所周知的体外细胞培养或体内动物模型中的任一种,本领域技术人员可以筛选具有多种与其连接的缀合物的 siRNA 分子,从而鉴别具有提高的特性和完全 RNAi 活性的 siRNA 分子。通过引用将上述专利文献的公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

#### [0162] 4. 示例性的 siRNA 实施方案

[0163] 在一些实施方案中, siRNA 分子的每条链包含长度为约 15 至约 60 的核苷酸(例如,长度为约 15-60、15-50、15-40、15-30、15-25、或 19-25 的核苷酸,或者长度为 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或 25 的核苷酸)。在一个具体的实施方案中, siRNA 是化学合成的。本发明的 siRNA 分子能够体外和/或体内沉默靶序列的表达。

[0164] 在其他实施方案中, siRNA 包含至少一个修饰的核苷酸。在某些实施方案中, siRNA 在双链区中包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、或更多个修饰的核苷酸。在具体的实施方案中, siRNA 的双链区中小于约 50% (例如,小于约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、或 5%) 的核苷酸包括修饰的核苷酸。在优选的实施方案中,在 siRNA 的双链区中,约 1% 至约 50% (例如,约 5% -50%、10% -50%、15% -50%、20% -50%、25% -50%、30% -50%、35% -50%、40% -50%、45% -50%、5% -45%、10% -45%、15% -45%、20% -45%、25% -45%、30% -45%、35% -45%、40% -45%、5% -40%、10% -40%、15% -40%、20% -40%、25% -40%、30% -40%、

35 % -40 %、5 % -35 %、10 % -35 %、15 % -35 %、20 % -35 %、25 % -35 %、30 % -35 %、5 % -30 %、10 % -30 %、15 % -30 %、20 % -30 %、25 % -30 %、5 % -25 %、10 % -25 %、15 % -25 %、20 % -25 %、5 % -20 %、10 % -20 %、15 % -20 %、5 % -15 %、10 % -15 %、或 5 % -10 % ) 的核苷酸包括修饰的核苷酸。

[0165] 在进一步的实施方案中, siRNA 包含修饰的核苷酸, 所述修饰的核苷酸包括但不限于, 2' -O- 甲基 (2' OMe) 核苷酸、2' -脱氧-2' -氟代 (2' F) 核苷酸、2' -脱氧核苷酸、2' -O-(2- 甲氧基乙基) (MOE) 核苷酸、锁核酸 (LNA) 核苷酸、和它们的混合物。在优选的实施方案中, siRNA 包含 2' OMe 核苷酸 (例如, 2' OMe 嘌呤和 / 或嘧啶核苷酸) 诸如, 例如, 2' OMe- 鸟苷核苷酸、2' OMe- 尿苷核苷酸、2' OMe- 腺苷核苷酸、2' OMe- 胞嘧啶核苷酸、或它们的混合物。在一个具体的实施方案中, siRNA 包含至少一个 2' OMe- 鸟苷核苷酸、2' OMe- 尿苷核苷酸、或它们的混合物。在某些实例中, siRNA 不包含 2' OMe- 胞嘧啶核苷酸。在其他实施方案中, siRNA 包含发夹环结构。

[0166] 在某些实施方案中, siRNA 在 siRNA 分子的双链区的一条链 (即, 有义或反义) 或两条链中包含修饰的核苷酸。优选地, 尿苷和 / 或鸟苷核苷酸在 siRNA 双链体的双链区中的选择性位点修饰。对于尿苷核苷酸修饰来说, 在有义和 / 或反义链中的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、或更多个尿苷核苷酸可以是修饰的尿苷核苷酸, 如 2' OMe- 尿苷核苷酸。在一些实施方案中, 在有义和 / 或反义链中的每一个尿苷核苷酸是 2' OMe- 尿苷核苷酸。关于鸟苷核苷酸修饰, 在有义和 / 或反义链中的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、或更多个鸟苷核苷酸可以是修饰的鸟苷核苷酸, 如 2' OMe- 鸟苷核苷酸。在一些实施方案中, 在有义和 / 或反义链中的每一个鸟苷核苷酸是 2' OMe- 鸟苷核苷酸。

[0167] 在某些实施方案中, 例如, 通过引入错配以消除 5' -GU-3' 基序和 / 或通过引入修饰的核苷酸如 2' OMe 核苷酸, 可以修饰 siRNA 序列中至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、或更多个 5' -GU-3' 基序。5' -GU-3' 基序可以在 siRNA 序列的有义链、反义链、或两条链中。5' -GU-3' 基序可以彼此相邻或者, 备选地, 它们可以被 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、或更多个核苷酸分开。

[0168] 在一些实施方案中, 修饰的 siRNA 分子比相应未修饰的 siRNA 序列免疫刺激性低。在此类实施方案中, 具有降低的免疫刺激性的修饰的 siRNA 分子有利地保持 RNAi 针对靶序列的活性。在另一个实施方案中, 通过在 siRNA 序列内诸如, 例如, 在 siRNA 双链体的双链区内引入最小和选择性 2' OMe 修饰, 可以平衡或优化修饰的 siRNA 分子的免疫刺激性及其沉默靶基因表达的能力。在某些实例中, 修饰的 siRNA 比相应未修饰的 siRNA 的免疫刺激性低至少约 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、或 100 %。对本领域技术人员来说将会显而易见的是, 通过, 例如, 使用适当的基于脂质的递送系统 (如在本文中所公开的 SNALP 递送系统), 在哺乳动物中全身施用或转染哺乳动物应答细胞后约二至约十二小时, 测量 INF- $\alpha$  和 / 或 IL-6 水平, 可以确定修饰的 siRNA 分子和相应未修饰的 siRNA 分子的免疫刺激性。

[0169] 在其他实施方案中, 修饰的 siRNA 分子具有这样的 IC<sub>50</sub> (即, 半最大抑制浓度), 其小于或等于相应未修饰的 siRNA 的 IC<sub>50</sub> 的 10 倍 (即, 修饰的 siRNA 具有小于或等于相应未修饰的 siRNA 的 IC<sub>50</sub> 十倍的 IC<sub>50</sub>)。在其他实施方案中, 修饰的 siRNA 具有小于或等于相应



未修饰的 siRNA 序列的  $IC_{50}$  三倍的  $IC_{50}$ 。在另外其他实施方案中,修饰的 siRNA 具有小于或等于相应未修饰的 siRNA 的  $IC_{50}$  两倍的  $IC_{50}$ 。对本领域技术人员来说将会显而易见的是,使用对本领域技术人员来说已知的方法,可以形成剂量 - 反应曲线并且可以容易地确定修饰的 siRNA 和相应未修饰的 siRNA 的  $IC_{50}$  值。

[0170] 在另一个实施方案中,相对于阴性对照(例如,仅有缓冲液、靶向不同的基因的 siRNA 序列、乱序(scrambled) siRNA 序列等),未修饰的或修饰的 siRNA 分子能够沉默靶序列表达的至少约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%。

[0171] 在此外另一个实施方案中,相对于相应未修饰的 siRNA 序列,修饰的 siRNA 分子能够沉默靶序列表达的至少约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%。

[0172] 在一些实施方案中, siRNA 分子不包含磷酸骨架修饰,例如,在双链区的有义和 / 或反义链中。在其他实施方案中, siRNA 包含一个、两个、三个、四个、或更多个磷酸骨架修饰,例如,在双链区的有义和 / 或反义链中。在优选的实施方案中, siRNA 不包含磷酸骨架修饰。

[0173] 在进一步的实施方案中, siRNA 不包含 2' - 脱氧核苷酸,例如,在双链区的有义和 / 或反义链中。在更进一步的实施方案中, siRNA 包含一个、两个、三个、四个、或更多个 2' - 脱氧核苷酸,例如,在双链区的有义和 / 或反义链中。在优选的实施方案中, siRNA 不包含 2' - 脱氧核苷酸。

[0174] 在某些实例中,在有义和 / 或反义链中双链区的 3' 末端处的核苷酸不是修饰的核苷酸。在某些其他实例中,有义和 / 或反义链中双链区的 3' - 末端附近的核苷酸(例如,在 3' - 末端的一个、两个、三个、或四个核苷酸内)不是修饰的核苷酸。

[0175] 在本文中所描述的 siRNA 分子在双链区的一侧或两侧上可以具有一个、两个、三个、四个、或更多个核苷酸的 3' 突出端,或者在双链区的一侧或两侧上可以缺少突出端(即,具有平末端)。在某些实施方案中,在有义和 / 或反义链上的 3' 突出端独立地包含一个、两个、三个、四个、或更多个修饰的核苷酸如 2' OMe 核苷酸和 / 或在本文中所描述的或本领域已知的任何其他修饰的核苷酸。

[0176] 在具体的实施方案中,使用载体系统如核酸 - 脂质颗粒来施用靶向 ALDH RNA 或 ALDH mRNA 的 siRNA。在优选的实施方案中,核酸 - 脂质颗粒包含:(a) 一种或多种靶向 ALDH 的 siRNA 分子;(b) 阳离子脂质(例如,DLinDMA、DLenDMA、DLin-K-C2-DMA、和 / 或  $\gamma$ -DLenDMA);和(c) 非阳离子脂质(例如,DPPC、DSPC、DSPE、和 / 或胆固醇)。在某些实例中,核酸 - 脂质颗粒还可以包含防止颗粒聚集的缀合脂质(例如,PEG-DAA 和 / 或 POZ-DAA)。

[0177] 除了其出于治疗目的而沉默任何上述 ALDH 基因的表达的效用之外,在本文中所描述的 siRNA 还有效用于研究用途和开发用途,以及诊断、预防、预后、临床、和其他卫生保健用途。作为非限制性实例, siRNA 可以用于靶点验证研究,其目标为测试 ALDH 基因家族的特定成员是否具有作为治疗性靶点的潜力。

**[0178] B. 切酶底物 dsRNA**

**[0179]** 如在本文中所使用的,术语“切酶底物 dsRNA”或“前体 RNAi 分子”意在包括在体内由切酶加工以产生活性 siRNA 的任何前体分子,所述活性 siRNA 结合至 RISC 复合物用于靶基因的 RNA 干扰。

**[0180]** 在一个实施方案中,切酶底物 dsRNA 具有足够的长度,以使得其被切酶加工以产生 siRNA。根据这个实施方案,切酶底物 dsRNA 包含 (i) 第一寡核苷酸序列(也被称为有义链),其为长度为约 25 至约 60 之间的核苷酸(例如,长度为约 25-60、25-55、25-50、25-45、25-40、25-35、或 25-30 的核苷酸),优选长度为约 25 至约 30 之间的核苷酸(例如,长度为 25、26、27、28、29、或 30 的核苷酸),以及 (ii) 第二寡核苷酸序列(也被称为反义链),其在生物条件下与第一序列退火,如在细胞的细胞质中发现的条件。第二寡核苷酸序列可以为长度为约 25 至约 60 的核苷酸(例如,长度为约 25-60、25-55、25-50、25-45、25-40、25-35、或 25-30 的核苷酸),并且优选为长度为约 25 至约 30 的核苷酸(例如,长度为 25、26、27、28、29、或 30 的核苷酸)。此外,切酶底物 dsRNA 的一个序列的、尤其是反义链的区域具有至少约 19 个核苷酸的长度,例如,约 19 至约 60 个核苷酸(例如,约 19-60 个、19-55 个、19-50 个、19-45 个、19-40 个、19-35 个、19-30 个、或 19-25 个核苷酸),优选约 19 至约 23 个核苷酸(例如,19 个、20 个、21 个、22 个、或 23 个核苷酸),所述核苷酸足以与由靶基因产生的 RNA 的核苷酸序列互补以引发 RNAi 反应。

**[0181]** 在第二实施方案中,切酶底物 dsRNA 具有增强其由切酶加工的多种特性。根据这个实施方案,dsRNA 具有足够的长度,以使得其被切酶加工以产生 siRNA 并且具有以下特性中的至少一种:(i) dsRNA 是非对称的,例如,在反义链上具有 3' - 突出端;和/或 (ii) dsRNA 在有义链上具有修饰的 3' - 末端以将 dsRNA 的切酶结合与加工的目标指引为活性 siRNA。根据这个后面的实施方案,有义链包含约 22 至约 28 个核苷酸并且反义链包含约 24 至约 30 个核苷酸。

**[0182]** 在一个实施方案中,切酶底物 dsRNA 在反义链的 3' - 末端具有突出端。在另一个实施方案中,有义链由位于有义链的 3' - 末端的适合的修饰剂修饰,用于切酶结合与加工。适合的修饰剂包括核苷酸如脱氧核糖核苷酸、非环状核苷酸等,和位阻分子如荧光分子等。当使用核苷酸修饰剂时,它们代替 dsRNA 中的核糖核苷酸,以使得 dsRNA 的长度不发生变化。在另一个实施方案中,切酶底物 dsRNA 在反义链的 3' - 末端具有突出端并且修饰有义链用于切酶加工。在另一个实施方案中,有义链的 5' - 末端具有磷酸盐。在另一个实施方案中,反义链的 5' - 末端具有磷酸盐。在另一个实施方案中,反义链或有义链或两条链具有一个或多个 2' -O- 甲基 (2' OMe) 修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,反义链含有 2' OMe 修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,反义链含有由 2' OMe 修饰的核苷酸组成的 3' - 突出端。反义链还可以包含额外的 2' OMe 修饰的核苷酸。有义链和反义链在生物条件下退火,如在细胞的细胞质中发现的条件。此外,切酶底物 dsRNA 的一个序列的、尤其是反义链的区域具有至少约 19 个核苷酸的长度,其中这些核苷酸在与反义链的 3' - 末端相邻的 21 个核苷酸的区域中,并且足以与由靶基因产生的 RNA 的核苷酸序列互补。此外,根据这个实施方案,切酶底物 dsRNA 还可以具有以下额外的特性中的一种或多种:(a) 反义链具有从典型的 21 聚体的右移(即,当与典型的 21 聚体相比时,反义链包含在分子的右侧上的核苷酸);(b) 链可以不是完全互补的,即链可以含有简单错配配对;以及 (c) 碱基修饰

如一个或多个锁核酸可以包含在有义链的 5' - 末端中。

[0183] 在第三实施方案中,有义链包含约 25 至约 28 个核苷酸(例如,25 个、26 个、27 个、或 28 个核苷酸),其中在有义链的 3' - 末端上的 2 个核苷酸是脱氧核糖核苷酸。有义链在 5' - 末端含有磷酸盐。反义链包含约 26 至约 30 个核苷酸(例如,26 个、27 个、28 个、29 个、或 30 个核苷酸)并且含有 1-4 个核苷酸的 3' - 突出端。包含 3' - 突出端的核苷酸是被 2' OMe 修饰的核糖核苷酸修饰的。反义链含有交替的 2' OMe 修饰的核苷酸,其在与 3' - 突出端相邻的反义链的第一单体处开始,并且从与 3' - 突出端相邻的第一单体延伸 15-19 个核苷酸。例如,对于 27 个核苷酸的反义链来说,并且将在反义链的 5' - 末端的第一碱基计为 1 号位点,2' OMe 修饰将会被置于 9 号、11 号、13 号、15 号、17 号、19 号、21 号、23 号、25 号、26 号、和 27 号碱基。在一个实施方案中,切酶底物 dsRNA 具有以下结构:

[0184] 5' -pXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3' (SEQ ID NO:1)

[0185] 3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXp-5' (SEQ ID NO:2)

[0186] 其中“X”= RNA,“p”=磷酸基团,“X”= 2' OMe RNA,“Y”是由 1 个、2 个、3 个、或 4 个任选为 2' OMe RNA 单体的 RNA 单体组成的突出端结构域,并且“D”= DNA。上链是有义链,并且下链是反义链。

[0187] 在第四实施方案中,切酶底物 dsRNA 具有增强其由切酶加工的多种特性。根据这个实施方案,dsRNA 具有足够的长度,以使得其被切酶加工以产生 siRNA,并且具有以下特性中的至少一种:(i)dsRNA 是非对称的,例如,在有义链上具有 3' - 突出端;和(ii)dsRNA 在反义链上具有修饰的 3' - 末端以将 dsRNA 的切酶结合与加工的目标指引为活性 siRNA。根据这个实施方案,有义链包含约 24 至约 30 个核苷酸(例如,24 个、25 个、26 个、27 个、28 个、29 个、或 30 个核苷酸),并且反义链包含约 22 至约 28 个核苷酸(例如,22 个、23 个、24 个、25 个、26 个、27 个、或 28 个核苷酸)。在一个实施方案中,切酶底物 dsRNA 在有义链的 3' - 末端具有突出端。在另一个实施方案中,反义链由位于反义链的 3' - 末端的适合的修饰剂修饰,用于切酶结合与加工。适合的修饰剂包括核苷酸如脱氧核糖核苷酸、非环状核苷酸等,和位阻分子如荧光分子等。当使用核苷酸修饰剂时,它们代替 dsRNA 中的核糖核苷酸,以使得 dsRNA 的长度不发生变化。在另一个实施方案中,dsRNA 在有义链的 3' - 末端具有突出端并且修饰反义链用于切酶加工。在一个实施方案中,反义链具有 5' - 磷酸盐。有义链和反义链在生物条件下退火,如在细胞的细胞质中发现的条件。此外,dsRNA 的一个序列的、尤其是反义链的区域具有至少 19 个核苷酸的长度,其中这些核苷酸与反义链的 3' - 末端相邻,并且足以与由靶基因产生的 RNA 的核苷酸序列互补。此外,根据这个实施方案,切酶底物 dsRNA 还可以具有以下额外的特性中的一种或多种:(a)反义链具有从典型的 21 聚体的左移(即,当与典型的 21 聚体相比时,反义链包含在分子的左侧上的核苷酸);和(b)链可以不是完全互补的,即链可以含有简单错配配对。

[0188] 在优选的实施方案中,切酶底物 dsRNA 具有非对称结构,所述非对称结构具有长度为 25 个碱基对的有义链、和长度为 27 个碱基对的具有 2 个碱基的 3' - 突出端的反义链。在某些实例中,这个具有非对称结构的 dsRNA 在有义链的 3' - 末端还含有代替两个核糖核苷酸的 2 个脱氧核苷酸。在某些其他实例中,这个具有非对称结构的 dsRNA 在反义链的 9 号、11 号、13 号、15 号、17 号、19 号、21 号、23 号、和 25 号位点还含有 2' OMe 修饰(其中在反义链的 5' - 末端的第一碱基是 1 号位点)。在某些额外的实例中,这个具有非对称

结构的 dsRNA 在反义链上还含有包含 1 个、2 个、3 个、或 4 个 2' OMe 核苷酸的 3' - 突出端（例如，在反义链的 26 号和 27 号位点上的 2' OMe 核苷酸的 3' - 突出端）。

[0189] 在另一个实施方案中，可以通过选择长度为至少 19 个核苷酸的反义链 siRNA 序列来设计切酶底物 dsRNA。在一些实例中，将反义 siRNA 修饰为在 5' - 末端上包含约 5 至约 11 个核糖核苷酸，以提供约 24 至约 30 个核苷酸的长度。当反义链具有 21 个核苷酸的长度时，可以在 5' - 末端上加入 3-9 个、优选 4-7 个、或更优选 6 个核苷酸。尽管所加入的核糖核苷酸可以与靶基因序列互补，靶序列与反义 siRNA 之间的完全互补性不是必需的。也就是说，得到的反义 siRNA 足以与靶序列互补。然后产生具有约 22 至约 28 个核苷酸的有义链。有义链与反义链基本互补，以在生物条件下与反义链退火。在一个实施方案中，将有义链合成为含有修饰的 3' - 末端，以指导反义链的切酶加工。在另一个实施方案中，dsRNA 的反义链具有 3' - 突出端。在进一步的实施方案中，为了切酶结合与加工将有义链合成为含有修饰的 3' - 末端，并且 dsRNA 的反义链具有 3' - 突出端。

[0190] 在相关的实施方案中，可以将反义 siRNA 修饰为在 5' - 末端上包含约 1 至约 9 个核糖核苷酸，以提供约 22 至约 28 个核苷酸的长度。当反义链具有 21 个核苷酸的长度时，可以在 3' - 末端上加入 1-7 个、优选 2-5 个、或更优选 4 核糖核苷酸。所加入的核糖核苷酸可以具有任何序列。尽管所加入的核糖核苷酸可以与靶基因序列互补，靶序列与反义 siRNA 之间的完全互补性不是必需的。也就是说，得到的反义 siRNA 足以与靶序列互补。然后产生具有约 24 至约 30 个核苷酸的有义链。有义链与反义链基本互补，以在生物条件下与反义链退火。在一个实施方案中，将反义链合成为含有修饰的 3' - 末端，以指导切酶加工。在另一个实施方案中，dsRNA 的有义链具有 3' - 突出端。在进一步的实施方案中，为了切酶结合与加工将反义链合成为含有修饰的 3' - 末端，并且 dsRNA 的有义链具有 3' - 突出端。

[0191] 使用本领域已知的用于设计、合成、和修饰 siRNA 序列的任何方法，可以识别、合成、和修饰适合的切酶底物 dsRNA 序列。在某些实施方案中，本发明的切酶底物 dsRNA 可以沉默 ALDH 基因表达。在具体的实施方案中，使用载体系统如核酸 - 脂质颗粒来施用靶向 ALDH mRNA 的切酶底物 dsRNA。在优选的实施方案中，核酸 - 脂质颗粒包含：(a) 一种或多种靶向 ALDH 基因表达的切酶底物 dsRNA 分子；(b) 阳离子脂质（例如，DLinDMA、DLenDMA、DLin-K-C2-DMA、和 / 或  $\gamma$ -DLenDMA）；和 (c) 非阳离子脂质（例如，DPPC、DSPC、DSPE、和 / 或胆固醇）。在某些实例中，核酸 - 脂质颗粒还可以包含防止颗粒聚集的缀合脂质（例如，PEG-DAA 和 / 或 POZ-DAA）。

[0192] 与本发明的切酶底物 dsRNA 相关的额外的实施方案，以及设计和合成此类 dsRNA 的方法描述于美国专利公开号 20050244858、20050277610、和 20070265220、2011/0071208 中，通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0193] C. shRNA

[0194] “小发夹 RNA”或“短发夹 RNA”或“shRNA”包括产生紧密发夹转角 (hairpin turn) 的短 RNA 序列，所述发夹转角可以用于通过 RNA 干扰来沉默基因表达。本发明的 shRNA 可以是化学合成的或者是由 DNA 质粒中的转录表达盒转录的。shRNA 发夹结构由细胞机器裂解为 siRNA，其然后与 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC) 结合。

[0195] 本发明的 shRNA 通常是长度为约 15-60、15-50、或 15-40 的（双链体）核苷酸，更典

型长度为约 15-30、15-25、或 19-25 的（双链体）核苷酸，并且优选长度为约 20-24、21-22、或 21-23 的（双链体）核苷酸（例如，双链 shRNA 的每互补链序列是长度为 15-60、15-50、15-40、15-30、15-25、或 19-25 的核苷酸，优选长度为约 20-24、21-22、或 21-23 的核苷酸，并且双链 shRNA 是长度为约 15-60、15-50、15-40、15-30、15-25、或 19-25 的碱基对，优选长度为约 18-22、19-20、或 19-21 的碱基对）。shRNA 双链体可以在反义链上包含约 1 至约 4 个核苷酸或约 2 至约 3 个核苷酸的 3' 突出端和 / 或在有义链上的 5' 磷酸末端。在一些实施方案中，shRNA 包含长度为约 15 至约 60 个核苷酸（例如，长度为约 15-60 个、15-55 个、15-50 个、15-45 个、15-40 个、15-35 个、15-30 个、或 15-25 个核苷酸）、优选长度为约 19 至约 40 个核苷酸（例如，长度为约 19-40 个、19-35 个、19-30 个、或 19-25 个核苷酸）、更优选长度为约 19 至约 23 个核苷酸（例如，长度为 19 个、20 个、21 个、22 个、或 23 个核苷酸）的有义链和 / 或反义链。

[0196] shRNA 的非限制性实例包括由单链分子装配的双链多核苷酸分子，其中有义区和反义区通过基于核酸的或非基于核酸的接头连接；以及具有发夹二级结构的双链多核苷酸分子，所述发夹二级结构具有自互补的有义区和反义区。在优选的实施方案中，shRNA 的有义链和反义链通过环结构连接，所述环结构包含约 1 至约 25 个核苷酸、约 2 至约 20 个核苷酸、约 4 至约 15 个核苷酸、约 5 至约 12 个核苷酸，或者 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、21 个、22 个、23 个、24 个、25、或更多个核苷酸。

[0197] 使用本领域已知的用于设计、合成、和修饰 siRNA 序列的任何方法，可以识别、合成、和修饰适合的 shRNA 序列。在某些实施方案中，本发明的 shRNA 可以沉默 ALDH 基因表达。在具体的实施方案中，使用载体系统如核酸-脂质颗粒来施用靶向 ALDH mRNA 的 shRNA。在优选的实施方案中，核酸-脂质颗粒包含：(a) 一种或多种靶向 ALDH 基因表达的 shRNA 分子；(b) 阳离子脂质（例如，DLinDMA、DLenDMA、DLin-K-C2-DMA、和 / 或  $\gamma$ -DLenDMA）；和 (c) 非阳离子脂质（例如，DPPC、DSPC、DSPE、和 / 或胆固醇）。在某些实例中，核酸-脂质颗粒还可以包含防止颗粒聚集的缀合脂质（例如，PEG-DAA 和 / 或 POZ-DAA）。

[0198] 与本发明的 shRNA 相关的额外的实施方案，以及设计和合成此类 shRNA 的方法描述于美国专利申请公开号 2011/0071208 中，通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

#### [0199] D. aiRNA

[0200] 与 siRNA 类似，非对称干扰 RNA(aiRNA) 可以募集 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)，并且通过介导靶序列的在相对于反义链的 5' 末端的核苷酸 10 和 11 之间的序列特异性裂解，可以在哺乳动物细胞中导致多个基因的有效沉默(Sun 等人, Nat. Biotech. (自然生物技术), 26:1379-1382(2008))。通常，aiRNA 分子包含具有有义链和反义链的短 RNA 双链体，其中所述双链体在反义链的 3' 和 5' 末端含有突出端。aiRNA 一般是非对称的，因为当与互补的反义链相比时有义链在两个末端均较短。在一些方面中，aiRNA 分子可以在与用于 siRNA 分子的条件相似的条件下进行设计、合成、和退火。作为非限制性实例，可以使用上述用于选择 siRNA 序列的方法来选择和生成 aiRNA 序列。

[0201] 在另一个实施方案中，可以将多种长度（例如，约 10-25 个、12-20 个、12-19 个、12-18 个、13-17 个、或 14-17 碱基对个、更通常 12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、

19 个、或 20 个碱基对) aiRNA 双链体设计为在反义链的 3' 和 5' 末端具有突出端, 以靶向目标 mRNA。在某些实例中, aiRNA 分子的有义链是长度为约 10-25、12-20、12-19、12-18、13-17、或 14-17 的核苷酸, 更典型地长度为 12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 的核苷酸。在某些其他实例中, aiRNA 分子的反义链是长度为约 15-60、15-50、或 15-40 的核苷酸, 更典型地长度为约 15-30、15-25、或 19-25 的核苷酸, 并且优选地长度为约 20-24、21-22、或 21-23 的核苷酸。

[0202] 在一些实施方案中, 5' 反义突出端含有一个、两个、三个、四个、或更多个非靶向核苷酸 (例如, “AA”、“UU”、“dTdT”等)。在其他实施方案中, 3' 反义突出端含有一个、两个、三个、四个、或更多个非靶向核苷酸 (例如, “AA”、“UU”、“dTdT”等)。在某些方面中, 在本文中所描述的 aiRNA 分子可以包含一个或多个修饰的核苷酸, 例如, 在双链 (双链体) 区和 / 或在反义突出端中。作为非限制性实例, aiRNA 序列可以包含一个或多个以上对于 siRNA 序列所描述的修饰的核苷酸。在优选的实施方案中, aiRNA 分子包含 2' OMe 核苷酸诸如, 例如, 2' OMe- 鸟苷核苷酸、2' OMe- 尿苷核苷酸、或它们的混合物。

[0203] 在某些实施方案中, aiRNA 分子可以包含反义链, 所述反义链对应于 siRNA 分子的反义链, 例如, 在本文中所描述的 siRNA 分子的反义链。在某些实施方案中, 本发明的 aiRNA 可以沉默 ALDH 基因表达。在具体的实施方案中, 使用载体系统如核酸-脂质颗粒来施用靶向 ALDH mRNA 的 aiRNA。在优选的实施方案中, 核酸-脂质颗粒包含: (a) 一种或多种靶向 ALDH 基因表达的 aiRNA 分子; (b) 阳离子脂质 (例如, DLinDMA、DLenDMA、DLin-K-C2-DMA、和 / 或  $\gamma$ -DLenDMA); 和 (c) 非阳离子脂质 (例如, DPPC、DSPC、DSPE、和 / 或胆固醇)。在某些实例中, 核酸-脂质颗粒还可以包含防止颗粒聚集的缀合脂质 (例如, PEG-DAA 和 / 或 POZ-DAA)。

[0204] 使用本领域已知的用于设计、合成、和修饰 siRNA 序列的任何方法, 可以识别、合成、和修饰适合的 aiRNA 序列。与本发明的 aiRNA 分子相关的额外的实施方案描述于 2008 年 12 月 23 日提交的美国专利申请号 12/343, 342、和 2009 年 4 月 15 日提交的美国专利申请号 12/424, 367, 通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

#### [0205] E. miRNA

[0206] 通常, 微 RNA (miRNA) 是长度为约 21-23 个核苷酸的调节基因表达的单链 RNA 分子。miRNA 由基因编码, 所述 miRNA 由所述基因的 DNA 转录, 但是 miRNA 没有被翻译为蛋白质 (非编码 RNA); 代替地, 将每个初级转录本 (pri-miRNA) 加工为被称为前体 miRNA 的茎-环结构, 并且最终加工为功能成熟的 miRNA。成熟的 miRNA 分子与一种或多种信使 RNA (mRNA) 分子部分或完全互补, 并且它们的主要功能是下调基因表达。例如, 在 Lagos-Quintana 等人, Science (科学), 294:853-858; Lau 等人, Science (科学), 294:858-862; and Lee 等人, Science (科学), 294:862-864 中, 描述了 miRNA 分子的鉴别。

[0207] 编码 miRNA 的基因比加工成熟的 miRNA 分子长得多。miRNA 首先被转录为具有帽和多聚 A 尾部的初级转录本或 pri-miRNA, 并且在细胞核中被加工为短的、~ 70 个核苷酸的被称为前体 miRNA 的茎-环结构。这个加工过程在动物中通过被称为微加工器复合物 (Microprocessor complex) 的蛋白复合物来进行, 其由核酸酶 Drosha 和双链 RNA 结合蛋白 Pasha 组成 (Denli 等人, Nature (自然), 432:231-235 (2004))。这些前体 miRNA 然后在细胞质中通过与核酸内切酶相互作用被加工为成熟的 miRNA, 所述核酸内切酶切

酶还引发 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC) 的形成 (Bernstein 等人, Nature(自然), 409 : 363-366 (2001))。DNA 的有义链或反义链都可以发挥作为用于产生 miRNA 的模板的功能。

[0208] 当切酶裂解前体 miRNA 茎-环时, 形成两个互补的短 RNA 分子, 但是只有一个整合至 RISC 复合物中。这条链被称为引导链 (guide strand) 并且由 argonaute 蛋白基于 5' 末端的稳定性来选择, 所述 argonaute 蛋白为 RISC 复合物中催化活性的 RNA 酶 (Preall 等人, Curr. Biol. (现代生物学), 16 : 530-535 (2006))。另一条链被称为反引导链 (anti-guide strand) 或过客链 (passenger strand), 被降解为 RISC 复合物底物 (Gregory 等人, Cell(细胞), 123 : 631-640 (2005))。在整合至活性 RISC 复合物中之后, miRNA 碱基与其互补的 mRNA 分子配对并且诱导靶 mRNA 降解和 / 或翻译沉默。

[0209] 哺乳动物 miRNA 分子通常与靶 mRNA 序列的 3' UTR 中的位点互补。在某些实例中, miRNA 与靶 mRNA 的退火通过阻断蛋白翻译机器来抑制蛋白翻译。在某些其他实例中, miRNA 与靶 mRNA 的退火通过与 RNA 干扰 (RNAi) 相似的过程来促进靶 mRNA 的裂解和降解。miRNA 也可以靶向对应于作为靶标的 mRNA 的甲基化基因组位点。通常, 与蛋白的互补体相关的 miRNA 功能被总称为 miRNP。

[0210] 在某些方面中, 在本文中所描述的 miRNA 分子是长度为约 15-100、15-90、15-80、15-75、15-70、15-60、15-50、或 15-40 的核苷酸, 更典型地长度为约 15-30、15-25、或 19-25 的核苷酸, 并且优选地长度为约 20-24、21-22、或 21-23 的核苷酸。在某些其他方面中, miRNA 分子可以包含一个或多个修饰的核苷酸。作为非限制性实例, miRNA 序列可以包含一个或多个以上对于 siRNA 序列所描述的修饰的核苷酸。在优选的实施方案中, miRNA 分子包含 2' OMe 核苷酸诸如, 例如, 2' OMe- 鸟苷核苷酸、2' OMe- 尿苷核苷酸、或它们的混合物。

[0211] 在一些实施方案中, miRNA 分子可以用于沉默 ALDH 基因表达。在具体的实施方案中, 使用载体系统如核酸-脂质颗粒来施用靶向 ALDH mRNA 的 miRNA。在优选的实施方案中, 核酸-脂质颗粒包含 : (a) 一种或多种靶向 ALDH 基因表达的 miRNA 分子 ; (b) 阳离子脂质 (例如, DLinDMA、DLenDMA、DLin-K-C2-DMA、和 / 或  $\gamma$ -DLenDMA) ; 和 (c) 非阳离子脂质 (例如, DPPC、DSPC、DSPE、和 / 或胆固醇)。在某些实例中, 核酸-脂质颗粒还可以包含防止颗粒聚集的缀合脂质 (例如, PEG-DAA 和 / 或 POZ-DAA)。

[0212] 在其他实施方案中, 使用本发明的脂质颗粒 (例如, 核酸-脂质颗粒) 来施用一种或多种阻断靶向 ALDH mRNA 的 miRNA 的活性的试剂。阻断剂的实例包括但不限于, 空间阻断寡核苷酸、锁核酸寡核苷酸、和吗啉代寡核苷酸。此类阻断剂可以直接与 miRNA 或与靶 RNA 上的 miRNA 结合位点结合。

[0213] V. 含有治疗性核酸的载体系统

[0214] 在一个方面中, 本发明提供含有一种或多种治疗性核酸 (例如, 干扰 RNA 如 dsRNA) 的载体系统。在一些实施方案中, 载体系统是基于脂质的载体系统如脂质颗粒 (例如, SNALP)、阳离子脂质或脂质体核酸复合物 (即, 脂质核酸复合物 (lipoplex))、脂质体、胶束、病毒体、或它们的混合物。在其他实施方案中, 载体系统是基于聚合物的载体系统如阳离子聚合物-核酸复合物 (即, 聚合物核酸复合物 (polyplex))。在额外的实施方案中, 载体系统是基于环糊精的载体系统如环糊精聚合物-核酸复合物。在进一步的实施方案中, 载体系统是基于蛋白质的载体系统如阳离子肽-核酸复合物。优选地, 载体系统是脂质颗

粒如 SNALP。本领域技术人员将会理解,本发明的治疗性核酸还可以作为裸露分子递送。

[0215] A. 脂质颗粒

[0216] 在某些方面中,本发明提供包含一种或多种治疗性核酸(例如,干扰 RNA 如 dsRNA)以及一种或多种阳离子(氨基)脂质或其盐的脂质颗粒。在一些实施方案中,本发明的脂质颗粒还包含一种或多种非阳离子脂质。在其他实施方案中,脂质颗粒还包含一种或多种能够降低或抑制颗粒聚集的缀合脂质。

[0217] 本发明的脂质颗粒优选包含治疗性核酸如干扰 RNA(例如, siRNA)、阳离子脂质、非阳离子脂质、和抑制颗粒聚集的缀合脂质。在一些实施方案中,治疗性核酸完全包封在脂质颗粒的脂质部分内,以使得脂质颗粒中的治疗性核酸在水溶液中对核酸酶降解具有抗性。在其他实施方案中,在本文中所描述的脂质颗粒对哺乳动物如人是基本无毒的。本发明的脂质颗粒通常具有约 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。本发明的脂质颗粒通常还具有约 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 : 治疗剂(例如,脂质 : 核酸)比例(质量 / 质量比)。

[0218] 在优选的实施方案中,本发明的脂质颗粒是血清稳定性的核酸 - 脂质颗粒(SNALP),其包含干扰 RNA(例如, dsRNA 如 siRNA、切酶 - 底物 dsRNA、shRNA、aiRNA、和 / 或 miRNA)、阳离子脂质(例如,如在本文中给出的一种或多种式 I-III 的阳离子脂质或其盐)、非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂和胆固醇的混合物)、以及抑制颗粒聚集的缀合脂质(例如,一种或多种 PEG- 脂质缀合物)。SNALP 可以包含至少 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10、或更多个在本文中所描述的未修饰的和 / 或修饰的、靶向一个或多个基因的干扰 RNA(例如, siRNA)。核酸 - 脂质颗粒及其制备方法描述于,例如美国专利号 5,753,613 ;5,785,992 ;5,705,385 ;5,976,567 ;5,981,501 ;6,110,745 ;和 6,320,017 ;以及 PCT 公开号 W096/40964 中,通过引用将其公开内容分别整体结合在本文中用于全部目的。

[0219] 在本发明的核酸 - 脂质颗粒中,核酸可以完全包封在颗粒的脂质部分内,从而保护核酸免于核酸酶降解。在优选的实施方案中,包含核酸如干扰 RNA 的 SNALP 完全包封在颗粒的脂质部分内,从而保护核酸免于核酸酶降解。在某些实例中,颗粒在 37°C 暴露于核酸酶至少约 20、30、45、或 60 分钟之后,SNALP 中的核酸基本上不降解。在某些其他实例中,颗粒在血清中在 37°C 下温育至少约 30、45、或 60 分钟或者至少约 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,SNALP 中的核酸基本上不降解。在其他实施方案中,核酸与颗粒的脂质部分复合。本发明的制剂的益处之一是,核酸 - 脂质颗粒组合物对哺乳动物如人是基本无毒的。

[0220] 术语“完全包封”表示,在暴露于将会明显降解游离 DNA 或 RNA 的血清或核酸酶测定之后,核酸 - 脂质颗粒中的核酸没有明显降解。在完全包封的系统中,颗粒中优选小于约 25% 的核酸在通常将会降解 100% 的游离核酸的处理中降解,颗粒中更优选小于约 10%、并且最优选小于约 5% 的核酸降解。“完全包封”还表示,核酸 - 脂质颗粒是血清稳定性的,即在体内施用它们时它们没有迅速地分解为它们的组成部分。

[0221] 在核酸的上下文中,可以通过进行不可透过膜荧光染料排阻测定



(membrane-impermeable fluorescent dye exclusion assay) 来确定完全包封,所述测定使用当与核酸结合时增强了荧光的染料。特定的染料如 OliGreen® 和 RiboGreen® (Invitrogen Corp. ;Carlsbad,CA) 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。包封通过以下方式确定:将染料加入至脂质体制剂,测量得到的荧光,并且将其与加入少量的非离子洗涤剂时观察到的荧光比较。洗涤剂介导的脂质体双分子层的破裂将包封的核酸释放,使其与不可透过膜染料相互作用。可以根据  $E = (I_0 - I) / I_0$  计算核酸包封,其中  $I$  和  $I_0$  是指加入洗涤剂前后的荧光强度(参见, Wheeler 等人, Gene Ther., 6 :271-281 (1999))。

[0222] 在其他实施方案中,本发明提供包含多种核酸-脂质颗粒的核酸-脂质颗粒(例如, SNALP) 组合物。

[0223] 在一些实例中, SNALP 组合物包含完全包封在颗粒的脂质部分内的核酸,以使得约 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% (或其任意部分或其中的任意范围) 的颗粒具有包封在其中的核酸。

[0224] 在其他实例中, SNALP 组合物包含完全包封在颗粒的脂质部分内的核酸,以使得约 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% (或其任意部分或其中的任意范围) 的输入核酸包封在颗粒中。

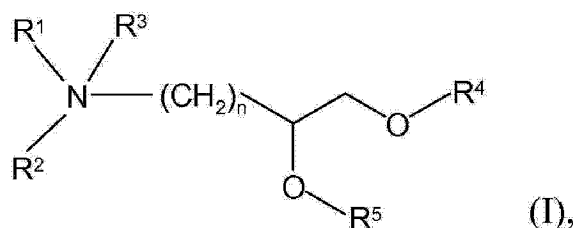
[0225] 取决于本发明的脂质颗粒的预期用途,可以改变组分的比例,并且可以使用例如内体释放参数 (ERP) 测定来测量特定制剂的递送效率。

[0226] 1. 阳离子脂质

[0227] 在本发明的脂质颗粒(例如, SNALP) 中,多种阳离子脂质或其盐任一种可以单独使用、或与一种或多种其他阳离子脂质物种或非阳离子脂质物种组合使用。阳离子脂质包括其 (R) 和 / 或 (S) 对映体。

[0228] 在一个方面中,具有以下结构的式 I 的阳离子脂质可用于本发明中:

[0229]



[0230] 或其盐,其中:

[0231]  $R^1$  和  $R^2$  是相同的或不同的,并且独立地为氢(H)或任选取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_2$ - $C_6$  烯基、或  $C_2$ - $C_6$  炔基,或者  $R^1$  和  $R^2$  可以连接形成任选取代的杂环,所述杂环具有 4 至 6 个碳原子和 1 或 2 个选自氮(N)、氧(O)、及其混合物组成的组的杂原子;

[0232]  $R^3$  不存在或者是氢(H)或  $C_1$ - $C_6$  烷基,以提供季胺;

[0233]  $R^4$  和  $R^5$  是相同的或不同的,并且独立地为任选取代的  $C_{10}$ - $C_{24}$  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  $R^5$  中的至少一个包含至少两个不饱和位点;并且

[0234]  $n$  是 0、1、2、3、或 4。

[0235] 在一些实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  独立地为任选取代的  $C_1$ - $C_4$  烷基、 $C_2$ - $C_4$  烯基、或  $C_2$ - $C_4$  炔基。在一个优选的实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  二者都是甲基。在其他优选的实施方案中, $n$  是 1 或 2。在其他实施方案中,当 pH 高于阳离子脂质的  $pK_a$  时  $R^3$  不存在,并且当 pH 低于阳离子脂质的  $pK_a$  时  $R^3$  为氢,以使得氨基头部基团质子化。在备选的实施方案中, $R^3$  是任选取代的  $C_1$ - $C_4$  烷基,以提供季胺。在进一步的实施方案中, $R^4$  和  $R^5$  独立地为任选取代的  $C_{12}$ - $C_{20}$  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  $R^5$  中的至少一个包含至少两个不饱和位点。

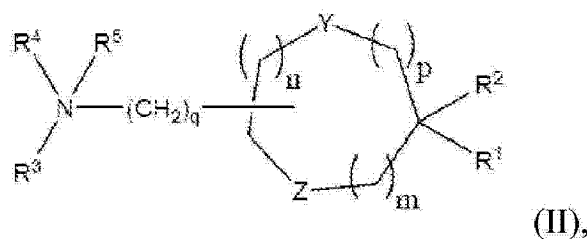
[0236] 在某些实施方案中, $R^4$  和  $R^5$  独立地选自由下列组成的组:十二碳二烯基部分、十四碳二烯基部分、十六碳二烯基部分、十八碳二烯基部分、二十碳二烯基部分、十二碳三烯基部分、十四碳三烯基部分、十六碳三烯基部分、十八碳三烯基部分、二十碳三烯基部分、花生四烯基部分、和二十二碳六烯基部分、以及它们的酰基衍生物(例如,亚油酰基、亚麻酰基、 $\gamma$ -亚麻酰基等)。在一些实例中, $R^4$  和  $R^5$  之一包含支链烷基(例如,植烷基部分)或其酰基衍生物(例如,植烷酰基部分)。在某些实例中,十八碳二烯基部分是亚油基部分。在某些其他实例中,十八碳三烯基部分是亚麻基部分或  $\gamma$ -亚麻基部分。在某些实施方案中, $R^4$  和  $R^5$  二者都是亚油基部分、亚麻基部分、或  $\gamma$ -亚麻基部分。在具体的实施方案中,式 I 的阳离子脂质是 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)、1,2-二亚油酰基氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDAP)、或它们的混合物。

[0237] 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式盐(优选结晶盐)。在一个具体的实施方案中,式 I 的阳离子脂质是其草酸(例如,半草酸)盐,其优选为结晶盐。

[0238] 阳离子脂质如 DLinDMA 和 DLenDMA、以及额外的阳离子脂质的合成描述于美国专利公开号 20060083780 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。阳离子脂质如 C2-DLinDMA 和 C2-DLinDAP、以及额外的阳离子脂质的合成描述于国际专利申请号 W02011/000106 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0239] 在另一个方面中,具有以下结构的式 II 的阳离子脂质(或其盐)可用于本发明中:

[0240]



[0241] 其中  $R^1$  和  $R^2$  是相同的或不同的, 并且独立地为任选取代的  $C_{12}$ - $C_{24}$  烷基、 $C_{12}$ - $C_{24}$  烯基、 $C_{12}$ - $C_{24}$  炔基、或  $C_{12}$ - $C_{24}$  酰基;  $R^3$  和  $R^4$  是相同的或不同的, 并且独立地为任选取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_2$ - $C_6$  烯基、或  $C_2$ - $C_6$  炔基, 或者  $R^3$  和  $R^4$  可以连接形成任选取代的杂环, 所述杂环具有 4 至 6 个碳原子和 1 或 2 个选自氮和氧的杂原子;  $R^5$  不存在或者是氢 (H) 或  $C_1$ - $C_6$  烷基, 以提供季胺;  $m$ 、 $n$ 、和  $p$  是相同的或不同的, 并且独立地为 0、1、或 2, 条件是  $m$ 、 $n$ 、和  $p$  不同时为 0;  $q$  是 0、1、2、3、或 4; 并且  $Y$  和  $Z$  是相同的或不同的, 并且独立地为 O、S、或 NH。在优选的实施方案中,  $q$  是 2。

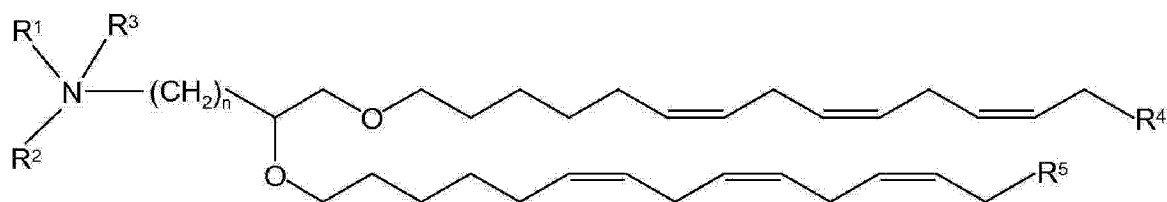
[0242] 在一些实施方案中, 式 II 的阳离子脂质是 2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环 (DLin-K-C2-DMA; “XTC2” 或 “C2K”)、2,2-二亚油基-4-(3-二甲基氨基丙基)-[1,3]-二氧戊环 (DLin-K-C3-DMA; “C3K”)、2,2-二亚油基-4-(4-二甲基氨基丁基)-[1,3]-二氧戊环 (DLin-K-C4-DMA; “C4K”)、2,2-二亚油基-5-二甲基氨基甲基-[1,3]-二噁烷 (DLin-K6-DMA)、2,2-二亚油基-4-N-甲基哌嗪基-[1,3]-二氧戊环 (DLin-K-MPZ)、2,2-二亚油基-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 (DO-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-吗啉代-[1,3]-二氧戊环 (DLin-K-MA)、2,2-二亚油基-4-三甲基氨基-[1,3]-二氧戊环氯离子 (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-K<sup>2</sup>-DMA)、2,2-二亚油基-4-甲基哌嗪-[1,3]-二氧戊环 (D-Lin-K-N-甲基哌嗪)、或它们的混合物。在优选的实施方案中, 式 II 的阳离子脂质是 DLin-K-C2-DMA。

[0243] 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式盐 (优选结晶盐)。在一个具体的实施方案中, 式 II 的阳离子脂质是其草酸 (例如, 半草酸) 盐, 其优选为结晶盐。

[0244] 阳离子脂质如 DLin-K-DMA、以及额外的阳离子脂质的合成描述于 PCT 公开号 W009/086558 中, 通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。阳离子脂质如 DLin-K-C2-DMA、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLin-K6-DMA、DLin-K-MPZ、DO-K-DMA、DS-K-DMA、DLin-K-MA、DLin-K-TMA.Cl、DLin-K<sup>2</sup>-DMA、和 D-Lin-K-N-甲基哌嗪、以及额外的阳离子脂质的合成描述于 2009 年 10 月 9 日提交的题目为“改善的氨基脂质和递送核酸的方法”的 PCT 申请号 PCT/US2009/060251 中, 通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0245] 在进一步的方面中, 具有以下结构的式 III 的阳离子脂质可用于本发明中:

[0246]



(III)

[0247] 或其盐,其中: $R^1$ 和 $R^2$ 是相同的或不同的,并且独立地为任选取代的 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $C_2$ - $C_6$ 烯基、或 $C_2$ - $C_6$ 炔基,或者 $R^1$ 和 $R^2$ 可以连接形成任选取代的杂环,所述杂环具有4至6个碳原子和1或2个选自由氮(N)、氧(O)、及其混合物组成的组的杂原子; $R^3$ 不存在或者是氢(H)或 $C_1$ - $C_6$ 烷基,以提供季胺; $R^4$ 和 $R^5$ 是不存在的或存在的,并且当存在时是相同的或不同的并且独立地为任选取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基或 $C_2$ - $C_{10}$ 烯基;并且 $n$ 是0、1、2、3、或4。

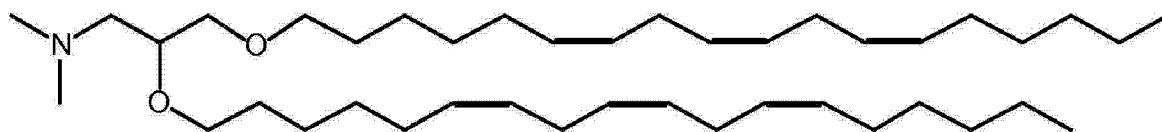
[0248] 在一些实施方案中, $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为任选取代的 $C_1$ - $C_4$ 烷基、 $C_2$ - $C_4$ 烯基、或 $C_2$ - $C_4$ 炔基。在优选的实施方案中, $R^1$ 和 $R^2$ 二者都是甲基。在另一个优选的实施方案中, $R^4$ 和 $R^5$ 二者都是丁基。在此外另一个优选的实施方案中, $n$ 是1。在其他实施方案中,当pH高于阳离子脂质的 $pK_a$ 时 $R^3$ 不存在,并且当pH低于阳离子脂质的 $pK_a$ 时 $R^3$ 为氢,以使得氨基头部基团质子化。在备选的实施方案中, $R^3$ 是任选取代的 $C_1$ - $C_4$ 烷基,以提供季胺。在进一步的实施方案中, $R^4$ 和 $R^5$ 独立地为任选取代的 $C_2$ - $C_6$ 或 $C_2$ - $C_4$ 烷基、或 $C_2$ - $C_6$ 或 $C_2$ - $C_4$ 烯基。

[0249] 在备选的实施方案中,式III的阳离子脂质在氨基头部基团与烷基链之一或二者之间包含酯键。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式盐(优选结晶盐)。在一个具体的实施方案中,式III的阳离子脂质是其草酸(例如,半草酸)盐,其优选为结晶盐。

[0250] 尽管式III中每条烷基链在位点6、9、和12含有顺式双键(即,顺,顺,顺, $-\Delta^6$ ,  $\Delta^9$ ,  $\Delta^{12}$ ),在备选的实施方案中,在一条或两条烷基链中的这些双键中的一个、两个、或三个可以处于反式构型。

[0251] 在特别优选的实施方案中,式III的阳离子脂质具有结构:

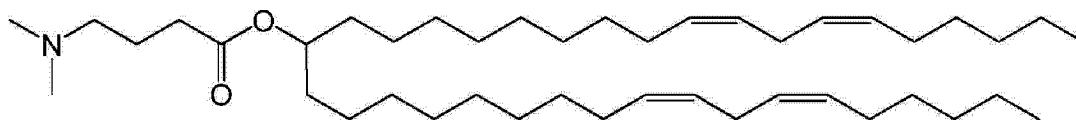
[0252]

 $\gamma$ -DLenDMA

[0253] 阳离子脂质如 $\gamma$ -DLenDMA、以及额外的阳离子脂质的合成描述于2009年7月1日提交的题目为“改善的阳离子脂质和递送核酸的方法”的美国临时申请号61/222,462中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0254] 在具体的实施方案中,具有以下结构的阳离子脂质可用于本发明中:

[0255]



DLin-M-C3-DMA (“MC3”)

[0256] 阳离子脂质如 DLin-M-C3-DMA (“MC3”)、以及额外的阳离子脂质（例如，某些 MC3 的类似物）的合成描述于 2009 年 6 月 10 日提交的题目为“用于递送治疗剂的新型脂质和组合物”的美国临时申请号 61/185,800、和 2009 年 12 月 18 日提交的题目为“用于递送核酸的方法和组合物”的美国临时申请号 61/287,995 中，通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0257] 可以包含在本发明的脂质颗粒中的其他阳离子脂质或其盐的实例包括但不限于，阳离子脂质如在 W02011/000106 中描述的那些（通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的），以及阳离子脂质如 N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵 (DODAC)、1,2-二油基氧基-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-(2,3-二油基氧)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-羧乙基溴化铵 (DMRIE)、2,3-二油基氧基-N-[2(精胺-甲酰氨基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸盐 (DOSPA)、双十八基氨基甘氨酸精胺 (DOGS)、3-二甲基氨基-2-(胆甾-5-烯-3-β-氧基丁-4-氧基)-1-(顺,顺式-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷 (CLinDMA)、2-[5'-(胆甾-5-烯-3-β-氧基)-3'-氧杂戊氧基]-3-二甲基-1-(顺,顺式-9',12'-十八碳二烯氧基)丙烷 (CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油基氧基苄胺 (DMOBA)、1,2-N,N'-二油基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷 (DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亚油基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷 (DLincarbDAP)、1,2-二亚油酰氨基甲酰氧基-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-吗啉代丙烷 (DLin-MA)、1,2-二亚油基-3-二甲基氨基丙烷 (DLinDAP)、1,2-二亚油基硫代-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-DAP)、1,2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷盐酸盐 (DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油基-3-三甲基氨基丙烷盐酸盐 (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)乙氧基丙烷 (DLin-EG-DMA)、1,2-二油基氨基甲酰基氧基-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；也被称为 DLin-M-K-DMA 或 DLin-M-DMA)、和它们的混合物。可以包含在本发明的脂质颗粒中的额外的阳离子脂质或其盐描述于美国专利公开号 20090023673 中，通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0258] 阳离子脂质如 CLinDMA、以及额外的阳离子脂质的合成描述于美国专利公开号 20060240554 中，通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。阳离子脂质如

DLin-C-DAP、DLinDAC、DLinMA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMA、DLinTMA、Cl、DLinTAP、Cl、DLinMPZ、DLinAP、DOAP、和 DLin-EG-DMA、以及额外的阳离子脂质的合成描述于 PCT 公开号 W009/086558 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。阳离子脂质如 DO-C-DAP、DMDAP、DOTAP、Cl、DLin-M-C2-DMA、以及额外的阳离子脂质的合成描述于 2009 年 10 月 9 日提交的题目为“改善的氨基脂质和递送核酸的方法”的 PCT 申请号 PCT/US2009/060251 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。许多其他阳离子脂质和相关类似物的合成描述于美国专利号 5,208,036 ;5,264,618 ;5,279,833 ;5,283,185 ;5,753,613 ;和 5,785,992 ;和 PCT 公开号 W096/10390 中,通过引用将其公开内容分别整体结合在本文中用于全部目的。另外,可以使用许多阳离子脂质的商业制剂,诸如,例如 LIPOFECTIN® (包含 DOTMA 和 DOPE,可从 Invitrogen 获得);LIPOFECT AMINE® (包含 DOSPA 和 DOPE,可从 Invitrogen 获得);和 TRANSFECTAM® (包含 DOGS,可从 Promega Corp. 获得)。

[0259] 在一些实施方案中,阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约 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% (或其任意部分或其中的任意范围)。在具体的实施方案中,阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约 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% (或其任意部分)。

[0260] 在其他实施方案中,阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约 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% (或其任意部分或其中的任意范围)。

[0261] 适用于本发明的脂质颗粒的阳离子脂质的额外的百分数和范围描述于 PCT 公开号 W009/127060、美国公开申请号 US2011/0071208、PCT 公开号 W02011/000106、和美国公开申请号 US2011/0076335 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0262] 应该理解的是,存在于本发明的脂质颗粒中的阳离子脂质的百分数是目标量,并且存在于制剂中的阳离子脂质的实际量可以变化,例如,±5 摩尔%。例如,在 1 : 57 脂质颗粒 (例如,SNALP) 制剂中,阳离子脂质的目标量是 57.1 摩尔%,但是阳离子脂质的实际量可以为所述目标量的 ±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%,而制剂的余量由其他脂质 (加入至多颗粒中存在的总脂质的 100 摩尔%) 组分组成。

## [0263] 2. 非阳离子脂质

[0264] 在本发明的脂质颗粒 (例如,SNALP) 中使用的非阳离子脂质可以是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。

[0265] 非阳离子脂质的非限制性实例包括磷脂如卵磷脂、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、蛋黄鞘磷脂 (ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、联十六烷基磷酸酯、二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、二油酰磷脂酰甘油 (DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘

油 (DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、棕榈酰油酰基 - 磷脂酰胆碱 (POPC)、棕榈酰油酰基 - 磷脂酰乙醇胺 (POPE)、棕榈酰油酰基 - 磷脂酰甘油 (POPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺 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)、硬脂酰油酰基 - 磷脂酰乙醇胺 (SOPE)、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰磷脂酰胆碱、和它们的混合物。还可以使用其他二酰磷脂酰胆碱和二酰磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选为衍生自具有  $C_{10}$ - $C_{24}$  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。

[0266] 非阳离子脂质的额外的实例包括固醇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如  $5\alpha$ -胆甾烷醇、 $5\beta$ -粪甾醇、胆固醇基-(2'-羟基)-乙基醚、胆固醇基-(4'-羟基)-丁基醚、和 6-酮基胆甾烷醇; 非极性类似物如  $5\alpha$ -胆甾烷、胆甾烯酮、 $5\alpha$ -胆甾烷酮、 $5\beta$ -胆甾烷酮、和胆固醇基癸酸酯; 和它们的混合物。在优选的实施方案中, 胆固醇衍生物是极性类似物如胆固醇基-(4'-羟基)-丁基醚。胆固醇基-(2'-羟基)-乙基醚的合成描述于 PCT 公开号 W009/127060 中, 通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0267] 在一些实施方案中, 存在于脂质颗粒 (例如, SNALP) 中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者由所述混合物组成。在其他实施方案中, 存在于脂质颗粒 (例如, SNALP) 中的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂或者由一种或多种磷脂组成, 例如, 无胆固醇的脂质颗粒制剂。在另外其他实施方案中, 存在于脂质颗粒 (例如, SNALP) 中的非阳离子脂质包含胆固醇或其衍生物或者由胆固醇或其衍生物组成, 例如, 无磷脂的脂质颗粒制剂。

[0268] 适用于在本发明中使用的非阳离子脂质的其他实例包括不含磷的脂质诸如, 例如, 硬脂胺, 十二烷胺、十六烷胺、乙酰棕榈酸酯、甘油蓖麻醇酸酯 (glycerolricinoleate)、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸异丙基酯、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺 - 硫酸月桂酯、硫酸烷基 - 芳基酯聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八烷基二甲基溴化铵、神经酰胺、鞘磷脂等。

[0269] 在一些实施方案中, 非阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约 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 42 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% (或其任意部分或其中的任意范围)。

[0270] 在其中脂质颗粒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, 混合物可以占颗粒中存在的总脂质的至多约 40 摩尔%、45 摩尔%、50 摩尔%、55 摩尔%、或 60 摩尔%。

[0271] 在一些实施方案中, 混合物中的磷脂组分可以占颗粒中存在的总脂质的约 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% (或其任意部分或其中的任意范围)。在某

些优选的实施方案中,混合物中的磷脂组分占颗粒中存在的总脂质的约 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% (或其任意部分或其中的任意范围)。作为非限制性实例,包含磷脂与胆固醇的混合物的 1 : 57 脂质颗粒制剂可以包含占颗粒中存在的总脂质的约 7 摩尔% (或其任意部分) 的磷脂如 DPPC 或 DSPC,例如与占颗粒中存在的总脂质的约 34 摩尔% (或其任意部分) 的胆固醇或胆固醇衍生物的混合物中。作为另一个非限制性实例,包含磷脂与胆固醇的混合物的 7 : 54 脂质颗粒制剂可以包含占颗粒中存在的总脂质的约 7 摩尔% (或其任意部分) 的磷脂如 DPPC 或 DSPC,例如与占颗粒中存在的总脂质的约 32 摩尔% (或其任意部分) 的胆固醇或胆固醇衍生物的混合物中。

[0272] 在其他实施方案中,混合物中的胆固醇组分可以占颗粒中存在的总脂质的约 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% (或其任意部分或其中的任意范围)。在某些优选的实施方案中,混合物中的胆固醇组分占颗粒中存在的总脂质的约 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% (或其任意部分或其中的任意范围)。通常,包含磷脂与胆固醇的混合物的 1 : 57 脂质颗粒制剂可以包含占颗粒中存在的总脂质的约 34 摩尔% (或其任意部分) 的胆固醇或胆固醇衍生物,例如,在与占颗粒中存在的总脂质的约 7 摩尔% (或其任意部分) 的磷脂如 DPPC 或 DSPC 的混合物中。通常,包含磷脂与胆固醇的混合物的 7 : 54 脂质颗粒制剂可以包含占颗粒中存在的总脂质的约 32 摩尔% (或其任意部分) 的胆固醇或胆固醇衍生物,例如,在与占颗粒中存在的总脂质的约 7 摩尔% (或其任意部分) 的磷脂如 DPPC 或 DSPC 的混合物中。

[0273] 在其中脂质颗粒不含磷脂的实施方案中,胆固醇或其衍生物可以占颗粒中存在的总脂质的至多约 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%。

[0274] 在一些实施方案中,无磷脂脂质颗粒制剂中的胆固醇或其衍生物可以占颗粒中存在的总脂质的约 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% (或其任意部分或其中的任意范围)。作为非限制性实例,1 : 62 脂质颗粒制剂可以包含占颗粒中存在的总脂质的约 37 摩尔% (或其任意部分) 的胆固醇。作为另一个非限制性实例,7 : 58 脂质颗粒制剂可以包含占颗粒中存在的总脂质的约 35 摩尔% (或其任意部分) 的胆固醇。

[0275] 在其他实施方案中,非阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约 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,仅包含磷脂)、或约 60 摩尔% (例如,包含磷脂和胆固醇或其衍生物) (或其任意部分或其中的



任意范围)。

[0276] 适用于本发明的脂质颗粒的非阳离子脂质的额外的百分数和范围描述于 PCT 公开号 W009/127060、美国公开申请号 US2011/0071208、PCT 公开号 W02011/000106、和美国公开申请号 US2011/0076335 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0277] 应该理解的是,存在于本发明的脂质颗粒中的非阳离子脂质的百分数是目标量,并且存在于制剂中的非阳离子脂质的实际量可以变化,例如,±5 摩尔%。例如,在 1 : 57 脂质颗粒(例如,SNALP)制剂中,磷脂的目标量是 7.1 摩尔%并且胆固醇的目标量是 34.3 摩尔%,但是磷脂的实际量可以为所述目标量的 ±2 摩尔%、±1.5 摩尔%、±1 摩尔%、±0.75 摩尔%、±0.5 摩尔%、±0.25 摩尔%、或 ±0.1 摩尔%,并且胆固醇的实际量可以为所述目标量的 ±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%,而制剂的余量由其他脂质(加入至多颗粒中存在的总脂质的 100 摩尔%)组分组成。类似地,在 7 : 54 脂质颗粒(例如,SNALP)制剂中,磷脂的目标量是 6.75 摩尔%并且胆固醇的目标量是 32.43 摩尔%,但是磷脂的实际量可以为所述目标量的 ±2 摩尔%、±1.5 摩尔%、±1 摩尔%、±0.75 摩尔%、±0.5 摩尔%、±0.25 摩尔%、或 ±0.1 摩尔%,并且胆固醇的实际量可以为所述目标量的 ±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%,而制剂的余量由其他脂质(加入至多颗粒中存在的总脂质的 100 摩尔%)组分组成。

### [0278] 3. 脂质缀合物

[0279] 除了阳离子和非阳离子脂质之外,本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)还可以包含脂质缀合物。缀合脂质是可用的,因为它防止颗粒聚集。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)、和它们的混合物。在某些实施方案中,颗粒包含 PEG-脂质缀合物或 ATTA-脂质缀合物以及 CPL。

[0280] 在优选的实施方案中,脂质缀合物是 PEG-脂质。PEG-脂质的实例包括但不限于,如在例如 PCT 公开号 W005/026372 中描述的和二烷氧基丙基偶联的 PEG(PEG-DAA)、如在例如美国专利公开号 20030077829 和 2005008689 中描述的和二酰甘油偶联的 PEG(PEG-DAG)、与磷脂如磷脂酰乙醇胺偶联的 PEG(PEG-PE)、如在例如美国专利号 5,885,613 中描述的和神经酰胺偶联的 PEG、与胆固醇或其衍生物缀合的 PEG、和它们的混合物。通过引用将这些专利文献的公开内容整体结合在本文中用于全部目的。适用于在本发明中使用的额外的 PEG-脂质包括但不限于,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 公开号 W009/086558,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。其他额外的适合的 PEG-脂质缀合物包括但不限于,1-[8'-(1,2-二肉豆蔻酰基-3-丙烷氧基)-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号 7,404,969,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0281] PEG 是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 根据其分子量分类;例如,PEG2000 具有约 2,000 道尔顿的平均分子量,并且 PEG5000 具有约 5,000 道尔顿的平均分子量。PEG 可商购自 Sigma Chemical Co. 和其他公司,并且包括但不限于以下: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-琥珀酰亚胺琥珀酸酯 (MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺 (MePEG-NH<sub>2</sub>)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯 (MePEG-TRES)、和单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基 (MePEG-IM), 以及含有末端羟基代替末端甲氧基的此类化合物 (例如, HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH<sub>2</sub> 等)。其他 PEG 如美国专利号 6,774,180 和 7,053,150 中描述的那些 (例如, mPEG(20KDa) 胺) 也可用于制备本发明的 PEG-脂质缀合物。通过引用将这些专利的公开内容整体结合在本文中用于全部目的。此外, 单甲氧基聚乙二醇-乙酸 (MePEG-CH<sub>2</sub>COOH) 尤其可用于制备包括例如 PEG-DAA 缀合物之内的 PEG-脂质缀合物。

[0282] 在本文中所描述的 PEG-脂质缀合物的 PEG 部分可以包括范围为约 550 道尔顿至约 10,000 道尔顿的平均分子量。在某些实例中, 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。在优选的实施方案中, PEG 部分具有约 2,000 道尔顿或约 750 道尔顿的平均分子量。

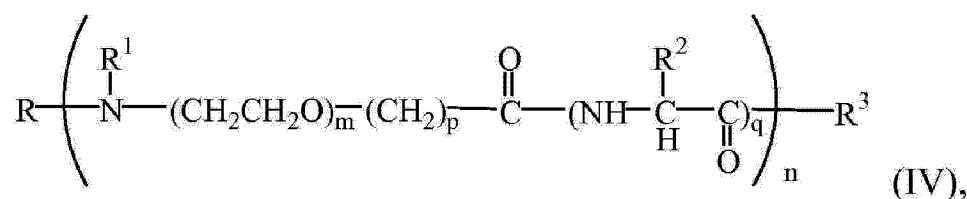
[0283] 在某些实例中, PEG 可以任选地被烷基、烷氧基、酰基、或芳基取代。PEG 可以与脂质直接缀合或可以通过接头部分与脂质相连。可以使用适用于将 PEG 与脂质偶联的任何接头部分, 其包括, 例如不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在优选的实施方案中, 接头部分是不含酯的接头部分。如在本文中所使用的, 术语“不含酯的接头部分”是指不包含羧酸酯键 (-OC(O)-) 的接头部分。适合的不含酯接头部分包括但不限于, 酰氨基 (-C(O)NH-)、氨基 (-NR-)、羰基 (-C(O)-)、氨基甲酸酯 (-NHC(O)O-)、脲 (-NHC(O)NH-)、二硫化物 (-S-S-)、醚 (-O-)、琥珀酰基 (- (O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、琥珀酰氨基 (-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、醚、二硫化物、以及它们的组合 (如含有氨基甲酸酯接头部分和酰氨基接头部分二者的接头)。在优选的实施方案中, 使用氨基甲酸酯接头将 PEG 与脂质偶联。

[0284] 在其他实施方案中, 使用含酯的接头部分将 PEG 与脂质偶联。适合的含酯的接头部分包括, 例如, 碳酸酯 (-OC(O)O-)、琥珀酰基 (succinoyl)、磷酸酯 (-O-(O)POH-O-)、磺酸酯、和它们的组合。

[0285] 具有不同链长度和饱和度的多种酰基链基团的磷脂酰乙醇胺可以与 PEG 缀合而形成脂质缀合物。此类磷脂酰乙醇胺是可商购的, 或者可以使用对本领域技术人员来说已知的常规技术分离或合成。含有碳链长度在 C<sub>10</sub> 至 C<sub>20</sub> 的范围内的饱和或不饱和脂肪酸的磷脂酰乙醇胺是优选的。也可以使用具有单不饱和脂肪酸或二不饱和脂肪酸以及饱和脂肪酸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)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。

[0286] 术语“ATTA”或“聚酰胺”包括但不限于在美国专利号 6,320,017 和 6,586,559 中描述的化合物, 通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。这些化合物包括具有下式的化合物:

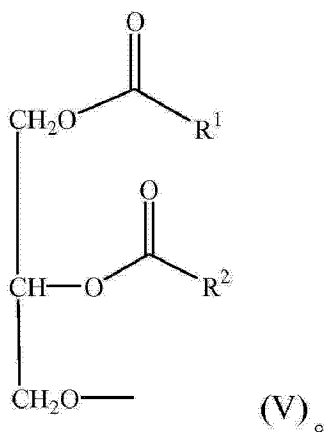
[0287]



[0288] 其中 R 是选自由氢、烷基和酰基组成的组的成员；R<sup>1</sup> 是选自由氢和烷基组成的组的成员；或者任选地，R 和 R<sup>1</sup> 以及与它们结合的氮形成叠氮基部分；R<sup>2</sup> 是选自氢、任选取代的烷基、任选取代的芳基和氨基酸侧链的组的成员；R<sup>3</sup> 是选自由氢、卤素、羟基、烷氧基、巯基、胍基、氨基和 NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> 组成的组的成员，其中 R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 独立地为氢或烷基；n 是 4 至 80；m 是 2 至 6；p 是 1 至 4；并且 q 是 0 或 1。对本领域技术人员来说将会清楚的是，可以在本发明的化合物中使用其他聚酰胺。

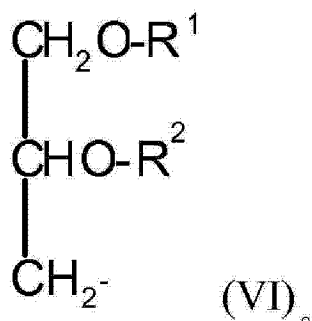
[0289] 术语“二酰甘油”或“DAG”包括具有 2 个脂肪酰基链 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 的化合物，R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 二者独立地具有通过酯键与甘油的 1 号位和 2 号位结合的 2 至 30 个碳。酰基可以是饱和的或者具有不同的不饱和度。适合的酰基包括但不限于，月桂酰基 (C<sub>12</sub>)、肉豆蔻酰基 (C<sub>14</sub>)、棕榈酰基 (C<sub>16</sub>)、硬脂酰基 (C<sub>18</sub>)、和二十烷酰基 (C<sub>20</sub>)。在优选的实施方案中，R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 是相同的，即 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 二者都是肉豆蔻酰基（即，二肉豆蔻酰基），R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 二者都是硬脂酰基（即，二硬脂酰基）等。二酰甘油具有以下通式：

[0290]



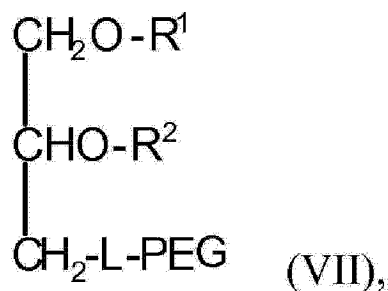
[0291] 术语“二烷氧基丙基”或“DAA”包括具有 2 个烷基链 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 的化合物，R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 二者独立地具有 2 至 30 个碳。烷基可以是饱和的或者具有不同的不饱和度。二烷氧基丙基具有以下通式：

[0292]



[0293] 在优选的实施方案中，PEG-脂质是具有以下式的 PEG-DAA 缀合物：

[0294]



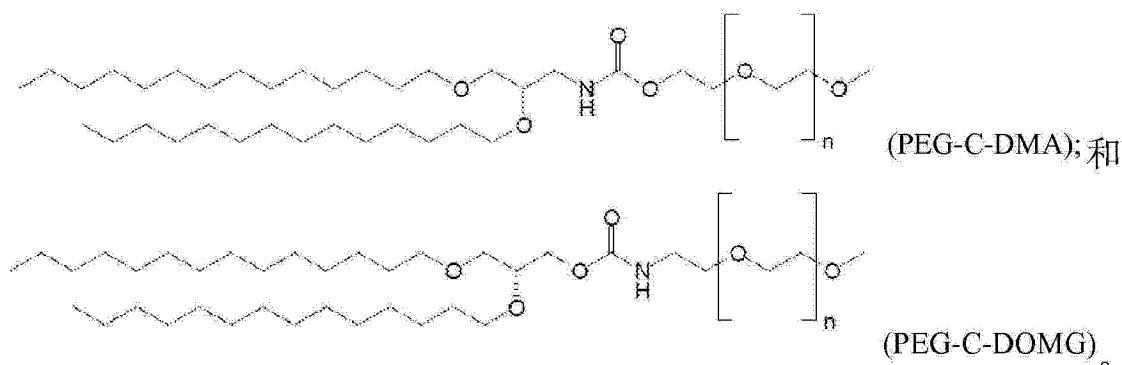
[0295] 其中  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  独立地选择,并且是具有约 10 至约 22 个碳原子的长链烷基;PEG 是聚乙二醇;并且 L 是如上所述的不含酯的接头部分或含酯的接头部分。长链烷基可以是饱和的或不饱和的。适合的烷基包括但不限于,癸基 ( $\text{C}_{10}$ )、月桂基 ( $\text{C}_{12}$ )、肉豆蔻基 ( $\text{C}_{14}$ )、棕榈基 ( $\text{C}_{16}$ )、硬脂基 ( $\text{C}_{18}$ )、和二十烷基 ( $\text{C}_{20}$ )。在优选的实施方案中, $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  是相同的,即  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  二者都是肉豆蔻基(即,二肉豆蔻基), $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  二者都是硬脂基(即,二硬脂基)等。

[0296] 在以上式 VII 中,PEG 具有范围为约 550 道尔顿至约 10,000 道尔顿的平均分子量。在某些实例中,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。在优选的实施方案中,PEG 具有约 2,000 道尔顿或约 750 道尔顿的平均分子量。PEG 可以任选地被烷基、烷氧基、酰基、或芳基取代。在某些实施方案中,末端羟基被甲氧基或甲基取代。

[0297] 在优选的实施方案中,“L”是不含酯的接头部分。适合的不含酯的接头包括包括但不限于,酰氨基接头部分、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、二硫化物接头部分、琥珀酰胺基接头部分、以及它们的组合。在优选的实施方案中,不含酯的接头部分是氨基甲酸酯接头部分(即,PEG-C-DAA 缀合物)。在另一个优选的实施方案中,不含酯的接头部分是酰氨基接头部分(即,PEG-A-DAA 缀合物)。在此外另一个优选的实施方案中,不含酯的接头部分是琥珀酰胺基接头部分(即,PEG-S-DAA 缀合物)。

[0298] 在具体的实施方案中,PEG-脂质缀合物选自:

[0299]



[0300] PEG-DAA 缀合物使用对本领域技术人员来说已知的标准技术和试剂合成。应该认识到,PEG-DAA 缀合物将会含有多种酰胺、胺、醚、硫代、氨基甲酸酯、和脲键。本领域技术人员应该认识到,用于形成这些键的方法和试剂是众所周知的并且容易获得。参见,例如, March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY(现代有机化学)(Wiley1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS(综合有机转化)(VCH1989); 和 Furniss,

VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY (VOGEL 应用有机化学教科书), 第 5 版 (Longman1989)。还应该理解,任何存在的官能团可能在 PEG-DAA 缀合物合成中的不同点时需要保护和去保护。本领域技术人员应该认识到,此类技术是众所周知的。参见,例如,Green 和 Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (有机合成中的保护基) (Wiley1991)。

[0301] 优选地,PEG-DAA 缀合物是 PEG-二癸氧基丙基 ( $C_{10}$ ) 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 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,并且“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,并且“DMA”表示二肉豆蔻基氧基丙基。在具体的实施方案中,PEG 的末端羟基被甲基取代。本领域技术人员应该容易理解,可以在本发明的 PEG-DAA 缀合物中使用其他二烷氧基丙基。

[0302] 除前述外,对本领域技术人员来说将会显而易见的是,可以使用其他亲水性聚合物代替 PEG。可以代替 PEG 使用的合适聚合物实例包括但不限于,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、聚甲基丙烯酸酰胺和聚二甲基丙烯酸酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸,和衍生的纤维素如羟甲基纤维素或羧乙基纤维素。

[0303] 除前述组分外,本发明的脂质颗粒 (例如,SNALP) 还可以包含阳离子聚 (乙二醇) (PEG) 脂质或 CPL (参见,例如,Chen 等人, Bioconj. Chem. (生物缀合化学), 11: 433-437 (2000); 美国专利号 6,852,334; PCT 公开号 W000/62813,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的)。

[0304] 适合的 CPL 包括式 VIII 的化合物:

[0305] A-W-Y (VIII),

[0306] 其中 A、W、和 Y 如下所述。

[0307] 参照式 VIII,“A”是起脂质锚 (lipid anchor) 作用的脂质部分如两亲性脂质、中性脂质、或疏水脂质。适合的脂质实例包括但不限于,二酰甘油基、二烷基甘油基、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷、和 1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0308] “W”是聚合物或低聚物如亲水性聚合物或低聚物。优选地,亲水性聚合物是非免疫原性或具有低固有免疫原性的生物相容性聚合物。备选地,如果与适当的佐剂一起使用,亲水性聚合物可以是弱抗原性的。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、以及它们的组合。在优选的实施方案中,聚合物具有约 250 至约 7,000 道尔顿的分子量。

[0309] “Y”是聚阳离子部分。术语聚阳离子部分是指,在所选 pH、优选生理 pH 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;阳离子树枝状大分子;聚胺;聚胺糖;和氨基多糖。聚阳离子部分在结构上可以是线性的,如线性四赖氨酸,分支的,或者树枝状的。聚阳离子部分在所选 pH 值下具有约 2 至约 15 个正电荷,优选约 2 至约 12 个正电荷,并且更优选约 2 至约 8 个正电荷。选择使用哪种聚阳离子部分

可以通过所需的颗粒应用类型来确定。

[0310] 聚阳离子部分上的电荷可以分布在整个颗粒部分周围,或者备选地,它们可以是在颗粒部分的一个特定区域中的电荷密度的不连续集中,例如,电荷尖峰(spike)。如果电荷密度分布在颗粒上,则电荷密度可以平均分布或不平均分布。本发明包括聚阳离子部分的电荷分布的所有变化。

[0311] 脂质“A”和非免疫原性聚合物“W”可以通过多种方法连接,并且优选通过共价连接。对本领域技术人员来说已知的方法可以用于“A”和“W”的共价连接。适合的键包括但不限于,酰胺、胺、羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、酯、和胍键。对本领域技术人员来说将会清楚的是,“A”和“W”必须具有互补的官能团以完成键合。这两个基团(一个基团在脂质上,另一个基团在聚合物上)的反应将提供所需的键。例如,当脂质是二酰甘油并且末端羟基被例如 NHS 和 DCC 活化以形成活性酯、并随后与含有氨基的聚合物如聚酰胺反应时(参见,例如,美国专利号 6,320,017 和 6,586,559 通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的),在这两个基团之间将形成酰胺键。

[0312] 在某些实例中,聚阳离子部分可以具有连接的配体,如靶向配体或络合钙的螯合部分。优选地,在连接配体之后,阳离子部分维持正电荷。在某些实例中,连接的配体具有正电荷。适合的配体包括但不限于,具有反应性官能团的化合物或装置并且包括脂质、两亲性脂质、载体化合物、生物亲和性化合物、生物材料、生物聚合物、生物医学装置、可分析检测的化合物、治疗活性化合物、酶、肽、蛋白、抗体、免疫刺激剂、放射性标记物、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、其他靶向部分、或毒素。

[0313] 在一些实施方案中,脂质缀合物(例如,PEG-脂质)占颗粒中存在的总脂质的约 0.1 摩尔%至约 2 摩尔%、约 0.5 摩尔%至约 2 摩尔%、约 1 摩尔%至约 2 摩尔%、约 0.6 摩尔%至约 1.9 摩尔%、约 0.7 摩尔%至约 1.8 摩尔%、约 0.8 摩尔%至约 1.7 摩尔%、约 0.9 摩尔%至约 1.6 摩尔%、约 0.9 摩尔%至约 1.8 摩尔%、约 1 摩尔%至约 1.8 摩尔%、约 1 摩尔%至约 1.7 摩尔%、约 1.2 摩尔%至约 1.8 摩尔%、约 1.2 摩尔%至约 1.7 摩尔%、约 1.3 摩尔%至约 1.6 摩尔%、或约 1.4 摩尔%至约 1.5 摩尔%(或其任意部分或其中的任意范围)。

[0314] 在其他实施方案中,脂质缀合物(例如,PEG-脂质)占颗粒中存在的总脂质的约 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%(或其任意部分或其中的任意范围)。

[0315] 在进一步的实施方案中,脂质缀合物(例如,PEG-脂质)占颗粒中存在的总脂质的约 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%(或其任意部分或其中的任意范围)。

[0316] 适用于本发明的脂质颗粒的脂质缀合物的额外的百分数和范围描述于 PCT 公开号 W009/127060、美国公开申请号 US2011/0071208、PCT 公开号 W02011/000106、和美国公开申请号 US2011/0076335 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0317] 应该理解的是,存在于本发明的脂质颗粒中的脂质缀合物(例如,PEG-脂质)的百分数是目标量,并且存在于制剂中的脂质缀合物的实际量可以变化,例如,±2摩尔%。例如,在1:57脂质颗粒(例如,SNALP)制剂中,脂质缀合物的目标量是1.4摩尔%,但是脂质缀合物的实际量可以为所述目标量的±0.5摩尔%、±0.4摩尔%、±0.3摩尔%、±0.2摩尔%、±0.1摩尔%、或±0.05摩尔%,而制剂的余量由其他脂质(加入至多颗粒中存在的总脂质的100摩尔%)组分组成。类似地,在7:54脂质颗粒(例如,SNALP)制剂中,脂质缀合物的目标量是6.76摩尔%,但是脂质缀合物的实际量可以为所述目标量的±2摩尔%、±1.5摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%、或±0.1摩尔%,而制剂的余量由其他脂质(加入至多颗粒中存在的总脂质的100摩尔%)组分组成。

[0318] 本领域普通技术人员应该理解,脂质缀合物的浓度可以变化,取决于所使用的脂质缀合物和脂质颗粒成为融合的的速率。

[0319] 通过控制脂质缀合物的组成和浓度,人们可以控制脂质缀合物从脂质颗粒中交换出来的速率,进而控制脂质颗粒成为融合的的速率。例如,当将PEG-DAA缀合物用作脂质缀合物时,脂质颗粒成为融合的的速率可以变化,例如,通过改变脂质缀合物的浓度、通过改变PEG的分子量、或者通过改变PEG-DAA缀合物上烷基的链长度和饱和度。此外,可以使用其他变量(包括,例如,pH、温度、离子强度等)改变和/或控制脂质颗粒成为融合的的速率。经过阅读本公开内容,可以用于控制脂质颗粒成为融合的的速率的其他方法对本领域技术人员来说将会是显而易见的。而且,通过控制脂质缀合物的组成和浓度,人们可以控制脂质颗粒(例如,SNALP)的尺寸。

#### [0320] B. 额外的载体系统

[0321] 适用于在本发明中使用的额外的基于脂质的载体系统的非限制性实例包括脂质核酸复合物(参见,例如,美国专利公开号20030203865;和Zhang等人,J. Control Release(控制释放杂志),100:165-180(2004))、pH-敏感性脂质核酸复合物(参见,例如,美国专利公开号20020192275)、可逆地掩蔽的脂质核酸复合物(参见,例如,美国专利公开号20030180950)、基于阳离子脂质的组合物(参见,例如,美国专利号6,756,054;和美国专利公开号20050234232)、阳离子脂质体(参见,例如,美国专利公开号20030229040、20020160038、和20020012998;美国专利号5,908,635;和PCT公开号W001/72283)、阴离子脂质体(参见,例如,美国专利公开号20030026831)、pH-敏感性脂质体(参见,例如,美国专利公开号20020192274;和AU2003210303)、抗体包被的脂质体(参见,例如,美国专利公开号20030108597;和PCT公开号W000/50008)、细胞类型特异性脂质体(参见,例如,美国专利公开号20030198664)、含有核酸和肽的脂质体(参见,例如,美国专利号6,207,456)、含有用可释放的亲水性聚合物衍生的脂质的脂质体(参见,例如,美国专利公开号20030031704)、脂质包埋的核酸(参见,例如,PCT公开号W003/057190和W003/059322)、脂质包封的核酸(参见,例如,美国专利公开号20030129221;和美国专利号5,756,122)、其他脂质体组合物(参见,例如,美国专利公开号20030035829和20030072794;和美国专利号6,200,599)、脂质体和乳液的稳定的混合物(参见,例如,EP1304160)、乳液组合物(参见,例如,美国专利号6,747,014)、和核酸微乳液(参见,例如,美国专利公开号20050037086)。

[0322] 适用于在本发明中使用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,聚合物核酸复合物)。为了形成聚合物核酸复合物,核酸(例如,干

扰 RNA) 通常与具有线性、分支、星形、或树枝状聚合物结构的阳离子聚合物复合,所述阳离子聚合物将核酸凝聚为带正电荷的颗粒,所述颗粒能够与在细胞表面的阴离子蛋白聚糖相互作用并且通过内吞作用进入细胞。在一些实施方案中,聚合物核酸复合物包括与阳离子聚合物复合的核酸(例如,干扰 RNA),所述阳离子聚合物如聚氮丙啶(PEI)(参见,例如,美国专利号 6,013,240;可作为 In vivo jetPEI™(线性形式的 PEI) 商购自 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)-葡聚糖、聚( $\beta$ -氨基酯)(PAE) 聚合物(参见,例如, Lynn 等人, J. Am. Chem. Soc(美国化学协会杂志), 123:8155-8156(2001))、壳聚糖、聚酰氨基胺(PAMAM) 树枝状大分子(参见,例如, Kukowska-Latallo 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院学报), 93:4897-4902(1996))、卟啉(参见,例如,美国专利号 6,620,805)、聚乙烯醚(参见,例如,美国专利公开号 20040156909)、多环脒鎓(amidinium)(参见,例如,美国专利公开号 20030220289)、其他包含伯胺、亚胺、胍、和/或咪唑基团的聚合物(参见,例如,美国专利号 6,013,240;PCT 公开号 W0/9602655;PCT 公开号 W095/21931;Zhang 等人, J. Control Release(控制释放杂志), 100:165-180(2004);和 Tiera 等人, Curr. Gene Ther., 6:59-71(2006))、以及它们的混合物。在其他实施方案中,聚合物核酸复合物包括如在美国专利公开号 20060211643、20050222064、20030125281、和 20030185890、和 PCT 公开号 W003/066069 中描述的阳离子聚合物-核酸复合物;如在美国专利公开号 20040071654 中描述的可生物降解的聚( $\beta$ -氨基酯) 聚合物-核酸复合物;如在美国专利公开号 20040142475 中描述的含有聚合物基质的微粒;如在美国专利公开号 20030157030 中描述的其他微粒组合物;如在美国专利公开号 20050123600 中描述的凝聚的核酸复合物;以及如在美国专利公开号 AU2002358514 和 PCT 公开号 W002/096551 中描述的纳米胶囊和微胶囊组合物。

[0323] 在某些实例中,干扰 RNA 可以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,在美国专利公布号 20040087024 中描述的环糊精修饰的聚合物-核酸复合物;在美国专利号 6,509,323、6,884,789、和 7,091,192 中描述的线性环糊精共聚物-核酸复合物;以及在美国专利号 7,018,609 中描述的环糊精聚合物-络合剂-核酸复合物。在某些其他实例中,干扰 RNA 可以与肽或多肽复合。基于蛋白质的载体系统的实例包括但不限于,在 PCT 公开号 W095/21931 中描述的阳离子寡肽-核酸复合物。

#### [0324] VI. 脂质颗粒的制备

[0325] 本发明的脂质颗粒,例如, SNALP, 其中核酸如干扰 RNA(例如, siRNA) 包埋在颗粒的脂质部分内并且受到保护免于降解,可以通过本领域已知的任何方法形成,所述方法包括,但不限于,连续混合法、直接稀释法、和管内稀释(in-line dilution) 法。

[0326] 在具体的实施方案中,阳离子脂质可以单独、或者与其他阳离子脂质组合包含式 I-III 的脂质或其盐。在其他实施方案中,非阳离子脂质是蛋黄鞘磷脂(ESM)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(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,PEG2000、PEG5000、PEG-改性的二酰甘油、或PEG-改性的二烷氧基丙基)、胆固醇、它们的衍生物、或它们的组合。

[0327] 在某些实施方案中,本发明提供通过连续混合法制备的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP),例如,包括以下步骤的方法:在第一储蓄器中提供包含核酸(例如,干扰RNA)的水溶液,在第二储蓄器中提供有机脂质溶液(其中,存在于有机脂质溶液中的脂质溶解于有机溶剂,例如,低级烷醇如乙醇),并且将所述水溶液与所述有机脂质溶液混合,以使所述有机脂质溶液与所述水溶液混合,以便基本上瞬间产生脂质囊泡(例如,脂质体)而将核酸包封在脂质囊泡内。这种方法和用于进行这种方法的装置详细描述于美国专利公开号20040142025中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0328] 将脂质和缓冲溶液连续引入至混合环境(如混合室中)的操作导致用缓冲溶液连续稀释脂质溶液,从而在混合时基本上立即产生脂质囊泡。如在本文中所使用的,短语“用缓冲溶液连续稀释脂质溶液”(和变体)一般意指,在水合过程中用足够的力足够迅速地稀释脂质溶液以完成囊泡形成。通过将包含核酸的水溶液与有机脂质溶液混合,有机脂质溶液在缓冲溶液(即,水溶液)的存在下经历连续的分步稀释,从而产生核酸-脂质颗粒。

[0329] 使用连续混合法形成的核酸-脂质颗粒尺寸通常为约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、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(或其任意部分或其中的任意范围)。由此形成的颗粒不聚集,并且任选地确定尺寸以获得均匀的粒度。

[0330] 在另一个实施方案中,本发明提供通过直接稀释法制备的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP),所述直接稀释法包括:形成脂质囊泡(例如,脂质体)溶液,并且将脂质囊泡溶液直接引入至含有受控量的稀释缓冲溶液的收集容器中。在优选的方面中,收集容器包括一个或多个元件,所述元件被配置为搅拌收集容器内容物以促进稀释。在一个方面中,存在于收集容器中的稀释缓冲溶液的量基本等于被引入至其中的脂质囊泡溶液的体积。作为非限制性实例,当被引入至含有等体积的稀释缓冲溶液的收集容器中时,在45%乙醇中的脂质囊泡溶液将会有利地产生较小的颗粒。

[0331] 在此外另一个实施方案中,本发明提供通过管内稀释法制备的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP),其中含有稀释缓冲液的第三储蓄器与第二混合区流体耦接。在这种实施方案中,在第一混合区中形成的脂质囊泡(例如,脂质体)溶液与稀释缓冲溶液在第二混合区中立刻并直接混合。在优选的方面中,第二混合区包括T连接器,所述T连接器这样排列以使脂质囊泡溶液流和稀释缓冲溶液流作为反向180°的流而相遇;然而,可以使用提供较浅角度的连接器,例如,约27°至约180°(例如,约90°)。泵机构将缓冲液的可控流递送至第二混合区。在一个方面中,将提供至第二混合区的稀释缓冲溶液的流速控制为基本等于从第一混合区引入至其中的脂质囊泡溶液的流速。这种实施方案有利地允许更好地控制在第二混合区与脂质囊泡溶液混合的稀释缓冲溶液流,并且因此也更好地控制在整个第二混合过程中缓冲溶液中的脂质囊泡溶液的浓度。稀释缓冲液流速的这种控制有利地允许在降低的浓度下形成小粒度。

[0332] 这些方法和用于进行这些直接稀释法和管内稀释法的装置详细描述于美国专利公开号 20070042031 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0333] 使用直接稀释法和管内稀释法形成的核酸-脂质颗粒尺寸通常为约 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、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(或其任意部分或其中的任意范围)。由此形成的颗粒不聚集,并且任选地确定尺寸以获得均匀的粒度。

[0334] 如果需要,可以通过任何可用于确定脂质体的尺寸的方法来确定本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)的尺寸。可以确定尺寸以获得所需的尺寸范围和相对窄的粒度分布。

[0335] 多种技术可以用于确定颗粒的尺寸为所需的尺寸。一种用于脂质体并且同样适用于本发明的颗粒的确定尺寸的方法描述于美国专利号 4,737,323 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。通过浴槽(bath)或探头超声波降解来超声波处理颗粒混悬液,产生了尺寸逐渐缩小至尺寸小于约 50nm 的颗粒。均质化是另一种依赖剪切能将较大颗粒碎裂为较小颗粒的方法。在典型的均质化步骤中,颗粒通过标准乳液均质器再循环,直到观察到所选的粒度,通常在约 60 至约 80nm 之间。在这两种方法中,可以通过常规激光束粒度判定、或 QELS 来监测粒度分布。

[0336] 通过小孔聚碳酸酯膜或非对称陶瓷膜将颗粒挤出也是一种将粒度降低至相对清楚确定的尺寸分布的有效方法。通常,通过膜将混悬液循环一次或多次,直到获得所需的粒度分布。可以通过依次变小的孔膜将颗粒挤出,以实现尺寸逐渐减小。

[0337] 在一些实施方案中,预凝聚存在于颗粒中的核酸,如描述于,例如,美国专利申请号 09/744,103 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0338] 在其他实施方案中,所述方法还可以包括加入非脂质聚阳离子,其用于使用本发明的组合物实现细胞的脂质转染。适合的非脂质聚阳离子的实例包括,海美溴铵(hexadimethrine bromide)(以商品名 **POLYBRENE®** 销售,来自 Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA)或己二甲胺的其他盐。其他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、和聚乙烯亚胺的盐。优选在已经形成颗粒之后加入这些盐。

[0339] 在一些实施方案中,在形成的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的核酸与脂质的比(质量/质量比)范围应为约 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。起始材料(输入的)的比也落在此范围内。在其他实施方案中,颗粒制备使用约 400  $\mu$ g 核酸/10mg 总脂质,或核酸与脂质的质量比为约 0.01 至约 0.08 并且更优选约 0.04,这对应于 1.25mg 总脂质/50  $\mu$ g 核酸。在其他优选的实施方案中,颗粒具有约 0.08 的核酸:脂质质量比。

[0340] 在其他实施方案中,在形成的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的脂质与核酸的比(质量/质量比)范围应为约 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),或其任意部分或其中的任意范围。起始材料(输入的)的比也落在此范围内。

[0341] 如前面所讨论的,缀合脂质还可以包括 CPL。在本文中讨论了多种用于制备 SNALP-CPL(含有 CPL 的 SNALP)的一般方法。两种一般技术包括“插入后”技术,即将 CPL 插入至例如预先形成的 SNALP 中,和“标准”技术,其中 CPL 包含在例如 SNALP 形成步骤期间的脂质混合物中。插入后技术产生具有主要位于 SNALP 双分子层膜的外部面中的 CPL 的 SNALP,而标准技术提供具有在内部面和外部面上的 CPL 的 SNALP。所述方法尤其可用于由磷脂制备的囊泡(其可以含有胆固醇)和含有 PEG-脂质(如 PEG-DAA 和 PEG-DAG)的囊泡。例如,在美国专利号 5,705,385 ;6,586,410 ;5,981,501 ;6,534,484 ;和 6,852,334 ;美国专利公开号 20020072121 ;和 PCT 公开号 W000/62813 中教导了制备 SNALP-CPL 的方法,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

#### [0342] VII. 试剂盒

[0343] 本发明还提供试剂盒形式的脂质颗粒(例如,SNALP)。在一些实施方案中,试剂盒包括划分以容纳脂质颗粒的各种组分(例如,活性剂或治疗剂如颗粒的核酸和单独脂质组分)的容器。优选地,试剂盒包括容纳本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)的容器(例如,小药瓶或安瓿瓶),其中颗粒由在本文中给出方法制备。在某些实施方案中,试剂盒还可以包含内体膜去稳定剂(例如,钙离子)。试剂盒通常含有本发明的颗粒组合物(作为药用载体中的混悬液或脱水形式)、连同它们的再水合(如果是冻干的)和施用的说明书。

[0344] 可以调整本发明的 SNALP 制剂以优先地靶向特定的目标细胞、组织、或器官。可以通过控制 SNALP 本身的组成来进行 SNALP 的优先靶向。在具体的实施方案中,本发明的试剂盒包含这些脂质颗粒,其中所述颗粒作为混悬液或以脱水形式存在于容器中。

[0345] 在某些实例中,可能需要使靶向部分与脂质颗粒的表面连接,以进一步增强颗粒的靶向性。对本领域技术人员来说,将靶向部分(例如,抗体、蛋白质等)与脂质(如在本发明的颗粒中使用的那些)连接的方法是已知的。

#### [0346] VIII. 脂质颗粒的施用

[0347] 一旦形成,本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)尤其可用于将核酸(例如,干扰 RNA 如 dsRNA)引入至细胞中。因此,本发明还提供用于将核酸(例如,干扰 RNA)引入至细胞中的方法。在具体的实施方案中,核酸(例如,干扰 RNA)被引入至感染的细胞如网状内皮细胞(例如,巨噬细胞、单核细胞等)以及其他细胞类型,其包括成纤维细胞、内皮细胞(如衬贴于(lining)血管的内表面的那些)、和/或血小板细胞。所述方法可以通过以下方式体外或体内进行:首先形成如上所述的颗粒,并且之后使颗粒与细胞接触一段时间,所述时间足以使干扰 RNA 向细胞的递送发生。

[0348] 本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)可以吸附于任何与其相混合或相接触的细胞类型。一旦吸附,颗粒可以被细胞的一部分内吞,与细胞膜交换脂质,或与细胞融合。颗粒的

核酸（例如，干扰 RNA）部分的转移或结合可以通过这些途径中的任一种发生。具体地，当融合发生时，颗粒膜整合至细胞膜中并且颗粒的内容物与细胞内流体结合。

[0349] 本发明的脂质颗粒（例如，SNALP）可以单独施用或以与药用载体（例如，生理盐水或磷酸盐缓冲液）的混合物施用，所述药用载体根据给药途径和标准药物实践来选择。通常，将会采用普通缓冲盐水（例如，135–150mMNaCl）作为药用载体。其他适合的载体包括，例如，水、缓冲的水、0.4% 盐水，0.3% 的甘氨酸等，包括用于提高稳定性的糖蛋白，如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。额外的适合的载体描述于，例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES（雷明顿制药科学），Mack Publishing Company（马克出版公司），费城，PA，第 17 版（1985）中。如在本文中所使用的，“载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、赋形剂、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂、缓冲剂、载体溶液、混悬液、胶体等。短语“药用”是指当被施用于人时不产生过敏或类似的不良反应的分子实体和组合物。

[0350] 药用载体一般在脂质颗粒形成之后加入。因此，在形成脂质颗粒（例如，SNALP）之后，可以将颗粒稀释至药用载体如普通缓冲盐水中。

[0351] 药物制剂中颗粒的浓度可以大范围地变化，即从小于约 0.05 重量%，通常为或至少约 2 至 5 重量%，到多至约 10 至 90 重量%，并且主要根据所选择的具体给药方式通过流体体积、粘度等来选择。例如，可以增加浓度以降低与治疗相关的流体负荷。这在患有与动脉粥样硬化（atherosclerosis）相关的充血性心力衰竭（congestive heart failure）或严重高血压的病人中可能特别理想。备选地，可以将由刺激性脂质组成的颗粒稀释至低浓度，以减轻施用部位处的炎症。

[0352] 可以通过常规的、众所周知的灭菌技术将本发明的药物组合物灭菌。水溶液可以包装以使用或在无菌条件下过滤并冻干，冻干的制剂在施用前与无菌水溶液结合。为了接近生理条件，所述组合物可以按需要包含药用辅助物质，如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂等，例如，乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、和氯化钙。另外，颗粒混悬液可以包括脂质 – 保护剂，其在存储时保护脂质免于自由基和脂质 – 过氧化损伤。亲脂性自由基猝灭剂如  $\alpha$  生育酚、和水溶性铁特异性螯合剂如铁草铵（ferrioxamine）是适合的。

[0353] 在一些实施方案中，本发明的脂质颗粒（例如，SNALP）尤其可用于一种或多种包含干扰 RNA 序列（例如，siRNA）的核酸的治疗性递送的方法。具体地，本发明的目标是提供用于通过下调或沉默一种或多种 ALDH 同工酶的转录和 / 或翻译来治疗人中酒精中毒的体内方法。

#### [0354] A. 体内施用

[0355] 使用核酸 – 脂质颗粒，如在 PCT 公开号 W005/007196、W005/121348、W005/120152、和 W004/002453（通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的）中描述的那些，已经实现了用于体内治疗的全身递送，例如，治疗性核酸通过身体系统如循环向远端靶细胞的递送。本发明还提供完全包封的脂质颗粒，所述完全包封的脂质颗粒保护核酸免于在血清中核酸酶降解，是非免疫原性的，尺寸小，并且适用于反复给药。

[0356] 对于体内施用来说，施用可以是本领域已知的任何方式，例如，通过注射、口服施用、吸入（例如，鼻内或气管内）、经皮涂覆、或直肠施用。可以通过单次或分次剂量完成施用。药物组合物可以经肠胃外（即，关节内、静脉内、腹膜内、皮下、或肌内）施用。在一些实施方案中，药物组合物通过推注注射而静脉内或腹膜内施用（参见，例如，美国专利

号 5, 286, 634)。在 Straubinger 等人, *Methods Enzymol.* (酶学方法), 101 :512(1983) ; Mannino 等, *Biotechniques* (生物技术), 6 :682(1988) ;Nicolau 等, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (治疗药物载体系统评述), 6 :239(1989) ;和 Behr, *Acc. Chem. Res.* (化学研究报告), 26 :274(1993) 中, 也讨论了细胞内核酸递送。施用基于脂质的治疗剂的其他方法记述在, 例诸如, 例如, 美国专利号 3, 993, 754 ;4, 145, 410 ;4, 235, 871 ;4, 224, 179 ;4, 522, 803 ;和 4, 588, 578 中。脂质颗粒可以通过在疾病部位处直接注射或通过远离疾病部位的部位处注射来施用 (参见, 例如, Culver, *HUMAN GENE THERAPY* (人类基因治疗), MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, 纽约. 第 70-71 页 (1994))。通过引用将上述参考文献的公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0357] 在其中静脉内施用本发明的脂质颗粒 (例如, SNALP) 的实施方案中, 颗粒的总注射剂量的至少约 5%、10%、15%、20%、或 25% 在注射之后在血浆中存在约 8、12、24、36、或 48 小时。在其他实施方案中, 脂质颗粒的总注射剂量的大于约 20%、30%、40% 并且多至约 60%、70% 或 80% 在注射之后在血浆中存在约 8、12、24、36、或 48 小时。在某些实例中, 许多颗粒中的大于约 10% 在施用之后在哺乳动物的血浆中存在约 1 小时。在某些其他实例中, 在施用颗粒之后至少约 1 小时, 可检测到脂质颗粒的存在。在一些实施方案中, 在施用之后约 8、12、24、36、48、60、72 或 96 小时, 在细胞中可检测到治疗性核酸如干扰 RNA 分子的存在。在其他实施方案中, 在施用之后约 8、12、24、36、48、60、72 或 96 小时, 可检测到由干扰 RNA (例如, siRNA) 引起的靶序列如病毒或宿主序列的表达的下调。在另外其他实施方案中, 在感染的细胞和 / 或能够被感染的细胞中, 优先发生由干扰 RNA (例如, siRNA) 引起的靶序列如病毒或宿主序列的表达的下调。在进一步的实施方案中, 在施用之后约 12、24、48、72、或 96 小时, 或者在施用之后约 6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26、或 28 天, 可检测到细胞中干扰 RNA (例如, siRNA) 在接近或远离施用部位的存在或作用。在额外的实施方案中, 肠胃外或腹膜内施用本发明的脂质颗粒 (例如, SNALP)。

[0358] 本发明的组合物可以单独或与其他适合组分组合制成气雾制剂 (即, 它们可以被“雾化”), 以通过吸入 (例如, 鼻内或气管内) 来施用 (参见, Brigham 等人, *Am. J. Sci.* (美国科学杂志), 298 :278(1989))。可以将气雾制剂置于可接受加压的推进剂如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等中。

[0359] 在某些实施方案中, 可以通过鼻内喷雾、吸入、和 / 或其他气雾剂递送赋形剂来递送药物组合物。例如, 在美国专利号 5, 756, 353 和 5, 804, 212 中, 已经描述了用于将核酸组合物通过鼻腔气雾剂喷雾直接递送至肺的方法。同样地, 使用鼻内微粒树脂和溶血磷脂酰基 - 甘油化合物 (美国专利 5, 725, 871) 的药物递送也是制药领域中众所周知的。类似地, 在美国专利号 5, 780, 045 中, 描述了采取聚四氟乙烯支持基质的形式的经粘膜药物递送。通过引用将上述专利的公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0360] 适用于肠胃外施用, 诸如, 例如, 通过关节内 (关节中)、静脉内、肌内、皮内、腹膜内、和皮下途径的制剂包括, 水性和非水性、等渗无菌注射溶液 (其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、和使所述制剂与预期的接受者的血液等渗的溶质) 以及水性和非水性无菌混悬液 (其可以包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、和防腐剂)。在本发明的实施中, 例如, 通过静脉内输注、口服、局部、腹膜内、膀胱内、或鞘内, 优选施用组合物。

[0361] 通常, 当静脉内施用时, 脂质颗粒制剂与适合的药物载体一起配制。在本发明

的组合和方法中可以采用许多药用载体。用于在本发明中使用的适合的制剂见于,例如, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(雷明顿药典科学), Mack 出版公司, Philadelphia, PA, 第 17 版 (1985) 中。可以使用多种水性载体,例如,水、缓冲水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸等,并且其可以包括用于提高稳定性的糖蛋白,如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。通常,将会采用普通缓冲盐水 (135-150mM NaCl) 作为药用载体,但其他适合的载体也会满足需求。可以通过常规脂质体灭菌技术如过滤来将这些组合物灭菌。为了接近生理条件,所述组合物可以按需要包含药用辅助物质,如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如,乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。可以使用以上所提到的技术来将这些组合物灭菌,或者备选地,它们可以在无菌条件下生产。得到的水溶液可以包装以使用或在无菌条件下过滤并冻干,冻干的制剂在施用前与无菌水溶液结合。

[0362] 在某些应用中,可以通过向个体口服施用来递送在本文中所公开的脂质颗粒。颗粒可以与赋形剂结合并且以下列形式使用:可摄取的片剂、颊含片剂、锭剂 (troche)、胶囊、丸剂、糖锭剂 (lozenge)、酏剂 (elixir)、漱口剂、混悬液、口腔喷雾剂、糖浆剂、糯米纸囊剂 (wafer) 等 (参见,例如,美国专利号 5,641,515、5,580,579、和 5,792,451,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的)。这些口服剂型还可以包含以下:粘合剂、明胶;赋形剂、润滑剂、和/或调味剂。当单位剂型是胶囊剂时,其除上述材料外,还可以含有液体载体。可以存在多种其他材料,其作为包衣,或者另外用于改变剂量单位的外形。当然,在制备任何单位剂型中使用的任何材料应该是药物纯的并且在使用量中是基本无毒的。

[0363] 通常,尽管颗粒的百分数确实可以变化并且可以方便地处于全部制剂的重量或体积的约 1% 或 2% 至约 60% 或 70% 以上之间,这些口服制剂可以含有至少约 0.1% 的脂质颗粒或更多。自然地,在可以制备的每种治疗有效的组合物中颗粒的量是这样的方式:应该在任意给定单位剂量的化合物中获得合适剂量。制备这种药物制剂的领域中的技术人员将会考虑多种因素如溶解度、生物利用度、生物半衰期、给药途径、产品保存期、以及其他药理学的考虑因素,并且同样地,许多剂量和治疗方案可以是合乎需要的。

[0364] 适用于口服施用的制剂可以由以下组成:(a) 液体溶液,如悬浮在稀释剂如水、盐水、或 PEG400 中的有效量的包装的治疗性核酸 (例如,干扰 RNA);(b) 胶囊、囊剂、或片剂,各自含有预定量的治疗性核酸 (例如,干扰 RNA),为液体、固体、颗粒、或明胶;(c) 适当液体中的混悬液;和 (d) 适合的乳剂。片剂形式可以包含乳糖、蔗糖、甘露糖、山梨糖醇、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、和其他赋形剂、着色剂、填充剂、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、调味剂、染料、崩解剂、和药物相容载体中的一种或多种。糖锭剂形式可以包括在调味剂例如蔗糖中的治疗性核酸 (例如,干扰 RNA)、以及软锭剂 (pastille),所述软锭剂包含在惰性基质如明胶和甘油中的治疗性核酸或除了治疗剂之外含有本领域已知的载体的阿拉伯树胶乳剂、凝胶、和类似物质。

[0365] 在其用途的另一个实例中,脂质颗粒可以与大范围的局部剂型结合。例如,可以配制含有核酸-脂质颗粒如 SNALP 的混悬液并且将其作为凝胶、油、乳剂、局部霜剂、糊剂、膏剂、洗剂、泡沫剂、摩丝剂等施用。

[0366] 当制备本发明的脂质颗粒的药物制剂时,优选使用大量已经纯化以减少或消除空颗粒或具有与外表面结合的治疗剂(如核酸)的颗粒。

[0367] 可以在多种宿主中实施本发明的方法。优选的宿主包括哺乳动物物种,如灵长类动物(例如,人和黑猩猩以及其他非人灵长类动物)、犬科动物、猫科动物、马科动物、牛科动物、绵羊、山羊、啮齿动物(例如,大鼠和小鼠)、兔类动物、和猪。

[0368] 施用的颗粒的量将取决于治疗性核酸(例如,干扰 RNA)与脂质的比,所用的具体治疗性核酸,待治疗的疾病或病症,患者的年龄、体重和状况,以及临床医师的判断,但是一般将会约 0.01 至约 50mg/ 千克体重之间,优选约 0.1 至约 5mg/ 千克体重之间,或者约  $10^8$ - $10^{10}$  个颗粒 / 施用(例如,注射)。

#### [0369] B. 体外施用

[0370] 为了体外应用,可以将治疗性核酸(例如,干扰 RNA)递送至培养物中生长的任何细胞(无论植物或动物来源、脊椎动物或无脊椎动物)和任何组织或类型。在优选的实施方案中,所述细胞是动物细胞,更优选哺乳动物细胞,并且最优选人细胞。

[0371] 当在体外进行时,在生物相容培养基中发生细胞与脂质颗粒之间的接触。取决于具体应用,颗粒的浓度大范围地变化,但是通常在约  $1\mu\text{mol}$  至约  $10\text{mmol}$  之间。用脂质颗粒治疗细胞通常在生理温度(约  $37^\circ\text{C}$ )下进行约 1 至 48 小时、优选约 2 至 4 小时的时间段。

[0372] 在一组优选的实施方案中,将脂质颗粒混悬液加入至细胞密度为约  $10^3$  至约  $10^5$  细胞 /ml、更优选约  $2\times 10^4$  细胞 /ml 的 60-80% 汇合的接种细胞中。加入至细胞中的混悬液的浓度优选为约 0.01 至  $0.2\mu\text{g/ml}$ ,更优选约  $0.1\mu\text{g/ml}$ 。

[0373] 就可能需要细胞的组织培养而言,是本领域众所周知的。例如,Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique(动物细胞培养,基础技术手册),第 3 版, Wiley-Liss, 纽约(1994), Kuchler 等人, Biochemical Methods in Cell Culture and Virology(细胞培养和病毒学中的生物化学方法), Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977), 以及其中引用的参考文献对细胞培养提供一般性指导。培养的细胞系统经常采用单层细胞的形式,尽管也使用细胞混悬液。

[0374] 利用内体释放参数(ERP)测定,可以优化本发明的 SNALP 或其他脂质颗粒的递送效率。ERP 测定详细描述于美国专利公开号 20030077829 中,通过引用将其公开内容整体结合在本文中用于全部目的。更具体地,ERP 测定的目的是,基于它们对内体膜的结合 / 摄取或与内体膜融合 / 使内体膜不稳定的相对作用,区分 SNALP 或其他脂质颗粒的多种阳离子脂质和辅助脂质组分的作用。这种测定允许人们定量地确定 SNALP 或其他脂质颗粒的各种成分是如何影响递送效率的,从而优化 SNALP 或其他脂质颗粒。通常,ERP 测定测量报告蛋白(例如,荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白(GFP)等)的表达,并且在一些实例中,对于表达质粒优化的 SNALP 制剂也将会适用于包封干扰 RNA。在其他实例中,ERP 测定可以适用于测量靶序列在存在或缺乏干扰 RNA(例如,siRNA)的条件下转录或翻译的下调。通过比较各种 SNALP 或其他脂质颗粒中的每一种的 ERP,人们可以容易地确定优化的系统,例如细胞中具有最大摄取量的 SNALP 或其他脂质颗粒。

#### [0375] C. 用于递送脂质颗粒的细胞

[0376] 本发明的组合物和方法特别好地适用于在体内通过靶向 ALDH 基因表达来治疗酒精中毒。本发明可以在来自任何脊椎动物物种的广泛多样的细胞类型上实施,所述脊椎动

物物种包括哺乳动物,诸如,例如,犬科动物、猫科动物、马科动物、牛科动物、绵羊、山羊、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、和豚鼠)和灵长类动物(例如,猴、黑猩猩、和人)。

#### [0377] D. 脂质颗粒的检测

[0378] 在一些实施方案中,在约 1、2、3、4、5、6、7、8 或更多小时时,在受试者中可检测到本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)。在其他实施方案中,在施用颗粒之后约 8、12、24、48、60、72、或 96 小时,或在施用颗粒之后约 6、8、10、12、14、16、18、19、22、24、25、或 28 天,在受试者中可检测到本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)。可以在来自受试者的细胞、组织、或其他生物样品中检测到颗粒的存在。例如,通过直接检测颗粒、检测治疗性核酸如干扰 RNA(例如,siRNA)序列、检测目标靶序列(即,通过检测目标序列的表达或减少的表达)、检测由 EBOV 蛋白质调节的化合物(例如,干扰素)、检测受试者中的病毒负荷量、或其组合,可以检测到颗粒。

#### [0379] 1. 颗粒的检测

[0380] 可以使用本领域任何已知的方法来检测本发明的脂质颗粒如 SNALP。例如,可以利用本领域众所周知的方法将标记物与脂质颗粒的组分直接或间接偶联。可以使用广泛多样的标记物,标记物的选择取决于所需的灵敏度、与脂质颗粒组分缀合的容易程度、稳定性要求、和可用的仪器和处理规定。适合的标记物包括,但不仅限于,光谱标记物如荧光染料(例如,荧光素及衍生物,如异硫氰酸荧光素(FITC)和 Oregon Green™;若丹明及衍生物如德克萨斯红、异硫氰酸四甲基若丹明(TRITC)等,地高辛配基,生物素,藻红蛋白,AMCA, CyDyes™等;放射性标记物如  $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 等;酶如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等;光谱比色标记物如胶体金或有色玻璃或塑料珠如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等。可以使用本领域已知的任何方式来检测标记物。

#### [0381] 2. 核酸的检测

[0382] 通过对本领域技术人员来说众所周知的许多方式中的任何一种,在此检测和定量核酸(例如,干扰 RNA)。可以通过众所周知的方法进行核酸的检测,如 Southern 分析、Northern 分析、凝胶电泳、PCR、放射性标记、闪烁计数、和亲和层析。也可以采用额外的分析生物化学方法如分光光度法、X 射线照相法、电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、和高扩散色谱法。

[0383] 核酸杂交形式的选择并不重要。本领域技术人员已知多种核酸杂交形式。例如,常见的形式包括夹心测定和竞争或置换测定。杂交技术一般描述于,例如,“Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach(核酸杂交,实践方法)”,Hames 和 Higgins 编,IRL Press(1985)。

[0384] 可以通过使用核酸扩增系统来提高杂交测定的灵敏度,所述核酸扩增系统使被检测的靶核酸倍增。适用于扩增用作分子探针或用于产生核酸片段以进行随后的亚克隆的序列的体外扩增技术是已知的。足以通过此类体外扩增方法指导技术人员的技术实例包括,聚合酶链式反应(PCR),连接酶链式反应(LCR),Q $\beta$ -复制酶扩增、和其他 RNA 聚合酶介导的技术(例如,NASBA™),见于 Sambrook 等人,在 Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册)中,Cold Spring Harbor Laboratory Press(冷泉港实验室出版社)(2000);和 Ausubel 等人,SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(分子生物学中的简短试验技术),编,Current Protocols(当前试验技术),



Greene Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley&Sons, Inc. (2002) ; 以及美国专利号 4,683,202 ;PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications(PCR 试验技术, 方法和应用指南) (Innis 等人编) Academic Press Inc. (学术出版社) 圣地亚哥, CA(1990) ;Arnheim&Levinson(1990 年 10 月 1 日), C&EN36 ;The Journal Of NIH Research(NIH 研究杂志), 3 :81(1991) ;Kwoh 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国科学院院刊), 86 :1173(1989) ;Guatelli 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国科学院院刊), 87 :1874(1990) ;Lomell 等人, J. Clin. Chem. (临床化学杂志), 35 :1826(1989) ;Landegren 等人, Science(科学), 241 :1077(1988) ;Van Brunt, Biotechnology(生物技术), 8 :291(1990) ;Wu 和 Wallace, Gene(基因), 4 :560(1989) ;Barringer 等人, Gene(基因), 89 :117(1990) ;和 Sooknanan 和 Malek, Biotechnology(生物技术), 13 :563(1995)。克隆体外扩增的核酸的改良方法描述于美国专利号 5,426,039 中。本领域中描述的其他方法是基于核酸序列的扩增 (NASBA™, Cangene, Mississauga, 安大略) 和 Q $\beta$ -复制酶系统。这些系统可以用于直接识别突变体, 其中 PCR 或 LCR 引物被设计为仅在选择序列存在时延伸或连接。备选地, 可以利用, 例如, 非特异性 PCR 引物, 来扩增选择的序列, 并且随后探测扩增的靶区域中指示突变的特异性序列。通过引用将上述参考文献的公开内容整体结合在本文中用于全部目的。

[0385] 用作探针的核酸, 例如, 在体外扩增方法中用作基因探针, 或用作抑制剂组分的核酸通常根据 Beaucage 等人, Tetrahedron Letts. (四面体通讯), 22 :18591862(1981) 中记述的固相亚磷酰胺三酯法化学合成, 例如, 使用如在 Needham VanDevanter 等人, Nucleic Acids Res. (核酸研究), 12 :6159(1984) 中描述的自动合成仪。如在 Pearson 等人, J. Chrom. (染色体杂志), 255 :137149(1983) 中描述的, 在需要时, 通常通过天然丙烯酰胺凝胶电泳或通过阴离子交换 HPLC 进行多核苷酸的纯化。使用 Grossman 和 Moldave(编) 学术出版社, 纽约, Methods in Enzymology(酶学方法), 65 :499 中的 Maxam 和 Gilbert(1980) 的化学降解法, 可以验证合成的多核苷酸的序列。

[0386] 用于确定转录水平的备选方式是原位杂交。原位杂交测定是众所周知的, 并且一般描述于 Angerer 等人, Methods Enzymol(酶学方法), 152 :649(1987) 中。在原位杂交测定中, 将细胞固定至固体载体, 其通常为玻璃载玻片。如果需要探测 DNA, 则利用热或碱使细胞变性。然后使细胞与杂交溶液在适当的温度下接触, 以允许被标记的特异性探针退火。所述探针优选被放射性同位素或荧光报告分子标记。

#### [0387] IX. 实施例

[0388] 将通过具体实施例更详细地描述本发明。提供以下实施例用于举例说明的目的, 并且其并非意在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地认识到多种可以被改变或修改以产生基本上相同的结果的非关键参数。

#### [0389] 实施例 1

[0390] 本实施例说明含有靶向 ALDH2 的 siRNA 的血清稳定核酸-脂质颗粒 (SNALP) 在体外降低鼠肝细胞系中的醛脱氢酶 2 基因表达。

#### [0391] 材料 :

[0392] 在这些研究中使用的所有 siRNA 分子使用标准步骤化学合成并退火。

[0393] 在此研究中使用的靶向醛脱氢酶 2(ALDH2) 的 siRNA 序列 :

[0394]

| siRNA<br>标识符 | 有义链(5'至3')                                                | 反义链(5'至3')                                                   |
|--------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1            | rArArCrArAmGrArUrArUrArCmUrGrAmGrArArATT<br>(SEQ ID NO:3) | rUrUrCrUrCrAmGrUrArUrArUrCmUrUrGrUmUrGrG<br>(SEQ ID NO:4)    |
| 2            | mGrCrAmGrCrArArUrGrAmGrCrArAmUrArArATT<br>(SEQ ID NO:5)   | rUrUrUrArUrUmGrCrUrCrArUrUmUrGrUmGrCrUrU<br>(SEQ ID NO:6)    |
| 3            | rGmGrArGrArAmUrGrUrGrUrAmUrGrArCmGrArATT<br>(SEQ ID NO:7) | rUrUrCrGrUrCrAmUrArCrArCrArUmUrCrUrCrCmUrG<br>(SEQ ID NO:8)  |
| 4            | rCmGrArCmGrCrCrGrUrCrAmGrCrArGmGrArArATT<br>(SEQ ID NO:9) | rUrUrUrCrCmUrGrCrUrGrArCrGmGrCrGrUrCmGrUrG<br>(SEQ ID NO:10) |

[0395] 其中‘r’表示核糖核苷酸,‘m’表示 2'-O-甲基化核糖核苷酸,并且不具有任何前缀表示脱氧核苷酸。

[0396] 另外,在研究中包括非靶向 siRNA 作为对照。这种 siRNA 靶向萤火虫荧光素酶基因并且并非意在在哺乳动物细胞中具有任何特异性基因沉默活性。

[0397] 方法:

[0398] 核酸-脂质颗粒由以下“1:57”制剂构成:1.4% PEG2000-C-DMA;57.1% DLinDMA;7.1% DPPC;和 34.3%胆固醇。通常,在 1:57 制剂中,DLinDMA 的量为 57.1 摩尔%±5 摩尔%,并且脂质缀合物的量为 1.4 摩尔%±0.5 摩尔%,而 1:57 制剂的余量由非阳离子脂质(例如,磷脂、胆固醇、或二者的混合物)构成,并且最终的 siRNA/脂质比为约 0.11 至 0.15(wt/wt)。在负载 siRNA 的颗粒形成时,以直径计,平均粒度为 85-100nm。

[0399] 哺乳动物细胞处理和 mRNA 分析:

[0400] 从小鼠中分离初级肝细胞并且将其作为贴壁培养物保持在 96 孔板中。以 0.03125 至 0.5  $\mu$ g/mL 的 siRNA 浓度将靶向或非靶向 ALDH-2 的对照 SNALP 加入至培养基中;每种处理条件在三个重复孔中进行。在 SNALP 存在下约 24h 温育之后,收获并裂解细胞用于 mRNA 分析。使用分支 DNA 测定(QuantiGene®, Affymetrix)来测量针对小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)标准化的细胞裂解物中的小鼠 ALDH2mRNA。

[0401] 结果:

[0402] 表 A 示出了脂质-核酸处理的基因沉默活性(三个重复孔的平均值,±标准差),其相对于任意地设定为“100.0%”的在未处理的培养物孔中测量的 GAPDH 标准化的 ALDH2mRNA 的量(九个重复孔的平均值,±6.9%标准差)。

[0403] 表 A

[0404]

| siRNA | 0.03125 $\mu$ g/mL | 0.125 $\mu$ g/mL | 0.5 $\mu$ g/mL |
|-------|--------------------|------------------|----------------|
| 1     | (14.7±0.7)%        | (5.0±0.3)%       | (3.1±0.2)%     |
| 2     | (32.9±2.9)%        | (9.9±1.2)%       | (5.5±0.5)%     |
| 3     | (20.9±1.6)%        | (6.3±0.4)%       | (3.5±0.3)%     |
| 4     | (91.3±0.5)%        | (71.5±7.0)%      | (47.7±3.1)%    |
| 非靶向对照 | (87.9±10.9)%       | (85.5±10.2)%     | (79.6±6.4)%    |

[0405] 结论：

[0406] 靶向小鼠 ALDH2 的所有四种 siRNA 制剂在分离的初级小鼠肝细胞中以剂量应答方式显示出基因沉默活性。在测试的四种 siRNA 中，双链体 1 活性最高，而双链体 4 活性最低。

[0407] 实施例 2

[0408] 本实施例示出了包含靶向 ALDH2 的 siRNA 的 SNALP 通过静脉内给药途径降低整个动物系统中的醛脱氢酶 2 基因表达。

[0409] 材料：

[0410] 在实施例 1 描述了在本研究中使用的小鼠 ALDH-2siRNA 双链体 1 和非靶向对照 siRNA。

[0411] 方法：

[0412] 按照实施例 1 中描述，制备 SNALP 制剂。

[0413] 动物处理：

[0414] 从 Harlan Labs 获得雌性 BALB/c 小鼠。通过在侧尾静脉中静脉内注射 10mL/kg，对动物施用单次剂量的 SNALP 配制的 siRNA、或磷酸盐 - 缓冲盐水。施用的 siRNA 剂量是 0.025、0.050 或 0.25mg/kg 体重。在 SNALP 注射之后约 48h，对动物进行安乐死并且将肝组织收集在 RNeasy<sup>®</sup> RNA 稳定溶液中。

[0415] 组织分析：

[0416] 基本上如 Judge 等人，2006, Molecular Therapy (分子治疗) 13:494 中描述的，使用 QuantiGene<sup>®</sup> 分支 DNA 测定 (Panomics, Freemont, CA ; 现为 Affymetrix 的一部分) 来分析肝组织的针对 GAPDH mRNA 水平标准化的小鼠 ALDH2mRNA 水平。

[0417] 结果：

[0418] 表 B 示出了 SNALP 的基因沉默活性 (三只动物的平均值,  $\pm$  标准差), 其相对于任意地设定为 “100.0%” 的在对照的 PBS 处理的动物中测量的 GAPDH 标准化的肝 ALDH2mRNA 的量 (六只动物的平均值,  $\pm$  6.3% 标准差)。

[0419] 表 B

[0420]

| 处理                       | 相对于 PBS 对照组平均值的<br>肝脏 ALDH2:GAPD mRNA 的比值 |
|--------------------------|-------------------------------------------|
| 配制的 siRNA 1, 0.025 mg/kg | (70.2 $\pm$ 18.4)%                        |
| 配制的 siRNA 1, 0.050 mg/kg | (35.9 $\pm$ 3.7)%                         |
| 配制的 siRNA 1, 0.25 mg/kg  | (10.8 $\pm$ 0.9)%                         |
| 非靶向对照 siRNA, 0.25 mg/kg  | (86.8 $\pm$ 6.3)%                         |

[0421] 结论：

[0422] SNALP 配制的靶向小鼠 ALDH2 的 siRNA1 的单次静脉内施用在小鼠中以剂量应答方式产生 ALDH2 基因沉默活性。

[0423] 实施例 3

[0424] 本实施例描述了用于制造本发明的血清稳定性的核酸 - 脂质颗粒的方法。

[0425] siRNA 分子使用标准步骤化学合成并退火。

[0426] 在一些实施方案中，将 siRNA 分子包封至由以下脂质构成的血清稳定性的核酸 - 脂质颗粒中：(1) 脂质缀合物 PEG2000-C-DMA (3-N-[(- 甲氧基聚 (乙二醇) 2000) 氨甲

酰基]-1,2-二肉豆蔻基氧基丙胺);(2) 阳离子脂质,例如 DLinDMA;(3) 磷脂 DPPC(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)(Avanti Polar Lipids;Alabaster,AL);和(4) 合成胆固醇(Sigma-Aldrich Corp.;St.Louis,MO),其摩尔比分别为 1.4 : 57.1 : 7.1 : 34.3。换句话说,将 siRNA 分子包封在以下“1 : 57”制剂的核酸-脂质颗粒中:1.4 % PEG2000-C-DMA;57.1 % 阳离子脂质;7.1 % DPPC;和 34.3 % 胆固醇。应该理解的是,1 : 57 制剂是靶制剂,并且存在的脂质(阳离子脂质和非阳离子脂质二者)的量与存在于制剂中的脂质缀合物的量可以变化。通常,在 1 : 57 制剂中,阳离子脂质的量为 57.1 摩尔% ± 5 摩尔%,并且脂质缀合物的量为 1.4 摩尔% ± 0.5 摩尔%,而 1 : 57 制剂的余量由非阳离子脂质(例如,磷脂、胆固醇、或二者的混合物)构成。制剂使用在美国专利申请 US2007/0042031 中描述的方法制备,其通过引用其全部内容结合在本文中。在形成时,将核酸-脂质颗粒针对 PBS 透析,并且在使用前通过 0.2 μm 过滤器进行过滤灭菌。平均粒度可以在 75-90nm 的范围内,并且最终 siRNA/脂质比为 0.15(wt/wt)。

#### [0427] 实施例 4

[0428] 本实施例描述了体外 siRNA 介导的人细胞中 ALDH2 基因表达的降低。

[0429] 材料:

[0430] 在这些研究中使用的所有 siRNA 分子使用标准步骤化学合成并退火。

[0431] 本实施例的表 A 中示出了用于本实施例中描述的实验的靶向醛脱氢酶 2 (ALDH2) 的 siRNA 序列:

[0432] 表 A

[0433]

| siRNA 标识符 | 有义链(5'至3')                                                      | 反义链(5'至3')                                                      |
|-----------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1         | rGmUrG rGrAmU rGrArA rArCmUrCrArG mUrUrU rArArG (SEQ ID NO:11)  | rUrArA rArCrU mGrAmG rUrUrU rCrAmU rCrCrA rCrCrU (SEQ ID NO:12) |
| 2         | mGrUmG rGrArU mGrArA rArCrU rCrAmG rUrUrU rArArG (SEQ ID NO:13) | rUrArA rArCrU mGrAmG rUrUrU rCrAmU rCrCrA rCrCrU (SEQ ID NO:12) |
| 3         | rGmGrA rUmGrA rArArC rUrCrA mGrUmU rUrArA rGrArA (SEQ ID NO:14) | rCrUrU rArArA rCmUrG rArGrU mUrUrC rAmUrC rCrArC (SEQ ID NO:15) |
| 4         | mGrGrA rUmGrA rArArC rUrCrA rGmUrU mUrArA rGrArA (SEQ ID NO:16) | rCrUrU rArArA rCmUrG rArGrU mUrUrC rAmUrC rCrArC (SEQ ID NO:15) |
| 5         | rCmUrG rUrCmU rUrCrA rCrArA rAmGrG rAmUrU rUrGrG (SEQ ID NO:17) | rArArA rUrCrC rUmUrU rGrUmG rArAmG rArCrA mGrCrU (SEQ ID NO:18) |
| 6         | rCmUrG mUrCrU mUrCrA rCrArA rArGmG rArUrU rUrGrG (SEQ ID NO:19) | rArArA rUrCrC rUmUrU rGrUmG rArAmG rArCrA mGrCrU (SEQ ID NO:18) |

[0434] 其中‘r’表示核糖核苷酸并且‘m’表示 2'-O-甲基化核糖核苷酸。

[0435] 方法:

[0436] 核酸-脂质颗粒由以下“1 : 57”制剂构成:1.4 % PEG2000-C-DMA;57.1 % DLinDMA;7.1 % DPPC;和 34.3 % 胆固醇。通常,在 1 : 57 制剂中,DLinDMA 的量为 57.1 摩尔% ± 5 摩尔%,并且脂质缀合物的量为 1.4 摩尔% ± 0.5 摩尔%,而 1 : 57 制剂的余量由非阳离子脂质(例如,磷脂、胆固醇、或二者的混合物)构成,并且最终的 siRNA/脂质比为约 0.11 至 0.15(wt/wt)。在负载 siRNA 的颗粒形成时,以直径计,平均粒度为 85-100nm。

[0437] 哺乳动物细胞处理和 mRNA 分析:将 HepG2(人肝细胞癌(hepatocellular carcinoma))细胞作为贴壁培养物保持在 96 孔板中。以 3.91 和 15.63ng/mL 的 siRNA 浓度将靶向或非靶向 ALDH2 的对照核酸-脂质颗粒加入至培养基中;每种处理条件在重复孔中进行。在核酸-脂质颗粒温育约 48 小时之后,收获并裂解细胞用于 mRNA 分析。使用分支 DNA 测定(Panomics, Freemont, CA;现为 Affymetrix 的一部分)来测量针对人甘油

醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 标准化的细胞裂解物中的人 ALDH2mRNA。

[0438] 结果：

[0439] 本实施例中的表 B 示出了核酸-脂质颗粒处理的基因沉默活性（重复孔的平均值，± 标准差）被描述为 GAPDH 标准化的 ALDH2mRNA 的百分数，其相对于任意地设定为“100.0%”的在未处理的培养物孔中测量的 GAPDH 标准化的 ALDH2mRNA 的量（2 个重复孔的平均值，± 7.4% 标准差）。

[0440] 表 B

[0441]

| siRNA | 3.9ng/mL     | 15.63ng/mL   |
|-------|--------------|--------------|
| 1     | (19.8±3.4) % | (7.5±0.6) %  |
| 2     | (18.9±0.8) % | (6.6±0.6) %  |
| 3     | (34.2±0.0) % | (11.2±1.4) % |
| 4     | (22.6±0.5) % | (7.6±0.9) %  |
| 5     | (21.9±3.2) % | (6.8±0.7) %  |
| 6     | (24.1±2.2) % | (7.7±0.6) %  |
| 非靶向对照 | (85.5±7.1) % | (90.2±3.8) % |

[0442] 结论：

[0443] 在脂质颗粒内配制的所有六种 siRNA 以剂量应答方式沉默人 HepG2 细胞中的 ALDH2 活性。在测试的六种 siRNA 中，siRNA2 活性最高，而 siRNA3 活性最低。

[0444] 在本说明书中提所有全部美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物通过引用、以不与本说明书相抵触的程度整体结合在本文中。

[0445] 根据前述，应该理解的是，尽管出于示例说明的目的已经在本文中描述了本发明的具体实施方案，可以做出多种修改而不背离本发明的精神和范围。

[0001]

## 序列表

<110> 普洛维维生物治疗公司  
<120> 用于沉默醛脱氢酶的组合物和方法  
<130> TEKM-074/02W0 31118-2484  
<150> US 61/599,238  
<151> 2012-02-15  
<150> US 61/543,700  
<151> 2011-10-05  
<160> 19  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 切酶底物dsRNA寡聚核苷酸  
<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (1).. (23)  
<223> n = 任何核糖核酸  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1).. (25)  
<223> n为a, c, g, t或u  
<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (24).. (25)  
<223> n = 任何脱氧核糖核酸  
<400> 1  
nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnn  
<210> 2  
<211> 29  
<212> RNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 切酶底物dsRNA寡聚核苷酸  
<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (1).. (8)  
<223> n = 任何核糖核酸  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1).. (29)  
<223> n为a, c, g, 或u  
<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (9).. (9)  
<223> n = 任何2' OMe修饰的核糖核酸  
<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (10).. (10)  
<223> n = 任何核糖核酸

25

[0002]

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (11)..(11)  
<223> n = 任何2' OMe修饰的核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (12)..(12)  
<223> n = 任何核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (13)..(13)  
<223> n = 任何2' OMe修饰的核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (14)..(14)  
<223> n = 任何核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (15)..(15)  
<223> n = 任何2' OMe修饰的核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (16)..(16)  
<223> n = 任何核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (17)..(17)  
<223> n = 任何2' OMe修饰的核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (18)..(18)  
<223> n = 任何核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (19)..(19)  
<223> n = 任何2' OMe修饰的核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (20)..(20)  
<223> n = 任何核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (21)..(21)  
<223> n = 任何2' OMe修饰的核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (22)..(22)  
<223> n = 任何核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (23)..(23)  
<223> n = 任何2' OMe修饰的核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (24)..(24)  
<223> n = 任何核糖核酸

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (25)..(25)  
<223> n = 任何2' OMe修饰的核糖核酸

[0003]

|       |                                   |    |
|-------|-----------------------------------|----|
| <220> |                                   |    |
| <221> | 修饰的碱基                             |    |
| <222> | (26)..(28)                        |    |
| <223> | n = 任何核糖核酸, 2' OMe核糖核酸或不存在        |    |
| <220> |                                   |    |
| <221> | 修饰的碱基                             |    |
| <222> | (29)..(29)                        |    |
| <223> | n = 任何核糖核酸或2' OMe核糖核酸             |    |
| <400> | 2                                 |    |
|       | nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnn | 29 |
| <210> | 3                                 |    |
| <211> | 21                                |    |
| <212> | DNA                               |    |
| <213> | 人工序列                              |    |
| <220> |                                   |    |
| <223> | 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子                   |    |
| <220> |                                   |    |
| <221> | 修饰的碱基                             |    |
| <222> | (6)..(6)                          |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基                    |    |
| <220> |                                   |    |
| <221> | 修饰的碱基                             |    |
| <222> | (13)..(13)                        |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基                    |    |
| <220> |                                   |    |
| <221> | 修饰的碱基                             |    |
| <222> | (16)..(16)                        |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基                    |    |
| <400> | 3                                 |    |
|       | aacaagauau acugagaaat t           | 21 |
| <210> | 4                                 |    |
| <211> | 21                                |    |
| <212> | RNA                               |    |
| <213> | 人工序列                              |    |
| <220> |                                   |    |
| <223> | 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子                   |    |
| <220> |                                   |    |
| <221> | 修饰的碱基                             |    |
| <222> | (8)..(8)                          |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基                    |    |
| <220> |                                   |    |
| <221> | 修饰的碱基                             |    |
| <222> | (15)..(15)                        |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基                    |    |
| <220> |                                   |    |
| <221> | 修饰的碱基                             |    |
| <222> | (19)..(19)                        |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基                    |    |
| <400> | 4                                 |    |
|       | uuucucagua uaucuuguug g           | 21 |
| <210> | 5                                 |    |
| <211> | 21                                |    |
| <212> | DNA                               |    |
| <213> | 人工序列                              |    |

[0004]



|       |                         |    |
|-------|-------------------------|----|
| <220> |                         |    |
| <223> | 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子         |    |
| <220> |                         |    |
| <221> | 修饰的碱基                   |    |
| <222> | (1).. (1)               |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基          |    |
| <220> |                         |    |
| <221> | 修饰的碱基                   |    |
| <222> | (4).. (4)               |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基          |    |
| <220> |                         |    |
| <221> | 修饰的碱基                   |    |
| <222> | (12).. (12)             |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基          |    |
| <220> |                         |    |
| <221> | 修饰的碱基                   |    |
| <222> | (16).. (16)             |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基          |    |
| <400> | 5                       |    |
|       | gcagcaaaug agcaauaaat t | 21 |
| <210> | 6                       |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | RNA                     |    |
| <213> | 人工序列                    |    |
| <220> |                         |    |
| <223> | 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子         |    |
| <220> |                         |    |
| <221> | 修饰的碱基                   |    |
| <222> | (7).. (7)               |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基          |    |
| <220> |                         |    |
| <221> | 修饰的碱基                   |    |
| <222> | (14).. (14)             |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基          |    |
| <220> |                         |    |
| <221> | 修饰的碱基                   |    |
| <222> | (18).. (18)             |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基          |    |
| <400> | 6                       |    |
|       | uuuauugcuc auuugcugcu u | 21 |
| <210> | 7                       |    |
| <211> | 21                      |    |
| <212> | DNA                     |    |
| <213> | 人工序列                    |    |
| <220> |                         |    |
| <223> | 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子         |    |
| <220> |                         |    |
| <221> | 修饰的碱基                   |    |
| <222> | (2).. (2)               |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基          |    |
| <220> |                         |    |
| <221> | 修饰的碱基                   |    |
| <222> | (7).. (7)               |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基          |    |

[0005]

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (13)..(13)  
<223> 2' Ome修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (17)..(17)  
<223> 2' Ome修饰的RNA碱基

<400> 7  
ggagaaugug uaugacgaat t 21

<210> 8  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (8)..(8)  
<223> 2' Ome修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (15)..(15)  
<223> 2' Ome修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (20)..(20)  
<223> 2' Ome修饰的RNA碱基

<400> 8  
uucgucauac acauucuccu g 21

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (2)..(2)  
<223> 2' Ome修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (5)..(5)  
<223> 2' Ome修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (12)..(12)  
<223> 2' Ome修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (16)..(16)  
<223> 2' Ome修饰的RNA碱基

<400> 9  
cgacgccguc agcaggaaat t 21

[0006]

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子

<220>  
 <221> 修饰的碱基  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
 <221> 修饰的碱基  
 <222> (14)..(14)  
 <223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
 <221> 修饰的碱基  
 <222> (19)..(19)  
 <223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<400> 10  
 uuuccugcug acggcgucgu g

21

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子

<220>  
 <221> 修饰的碱基  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
 <221> 修饰的碱基  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
 <221> 修饰的碱基  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
 <221> 修饰的碱基  
 <222> (16)..(16)  
 <223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<400> 11  
 guggaugaaa cucaguuaa g

21

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子

<220>  
 <221> 修饰的碱基  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 2' OMe修饰的RNA碱基

[0007]

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (9).. (9)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (15).. (15)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<400> 12  
uaaacugagu uucauccacc u

21

<210> 13  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (1).. (1)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (3).. (3)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (7).. (7)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (15).. (15)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<400> 13  
guggaugaaa cucaguuuaa g

21

<210> 14  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (2).. (2)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (5).. (5)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (13).. (13)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (15).. (15)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

[0008]

|                         |    |
|-------------------------|----|
| <400> 14                |    |
| ggaugaaacu caguuaaaga a | 21 |
| <210> 15                |    |
| <211> 21                |    |
| <212> RNA               |    |
| <213> 人工序列              |    |
| <220>                   |    |
| <223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子   |    |
| <220>                   |    |
| <221> 修饰的碱基             |    |
| <222> (8)..(8)          |    |
| <223> 2' OMe修饰的RNA碱基    |    |
| <220>                   |    |
| <221> 修饰的碱基             |    |
| <222> (13)..(13)        |    |
| <223> 2' OMe修饰的RNA碱基    |    |
| <220>                   |    |
| <221> 修饰的碱基             |    |
| <222> (17)..(17)        |    |
| <223> 2' OMe修饰的RNA碱基    |    |
| <400> 15                |    |
| cuuaaacuga guucaucca c  | 21 |
| <210> 16                |    |
| <211> 21                |    |
| <212> RNA               |    |
| <213> 人工序列              |    |
| <220>                   |    |
| <223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子   |    |
| <220>                   |    |
| <221> 修饰的碱基             |    |
| <222> (1)..(1)          |    |
| <223> 2' OMe修饰的RNA碱基    |    |
| <220>                   |    |
| <221> 修饰的碱基             |    |
| <222> (5)..(5)          |    |
| <223> 2' OMe修饰的RNA碱基    |    |
| <220>                   |    |
| <221> 修饰的碱基             |    |
| <222> (14)..(14)        |    |
| <223> 2' OMe修饰的RNA碱基    |    |
| <220>                   |    |
| <221> 修饰的碱基             |    |
| <222> (16)..(16)        |    |
| <223> 2' OMe修饰的RNA碱基    |    |
| <400> 16                |    |
| ggaugaaacu caguuaaaga a | 21 |
| <210> 17                |    |
| <211> 21                |    |
| <212> RNA               |    |
| <213> 人工序列              |    |
| <220>                   |    |
| <223> 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子   |    |

[0009]

|       |                          |    |
|-------|--------------------------|----|
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (2).. (2)                |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (6).. (6)                |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (14).. (14)              |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (17).. (17)              |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |
| <400> | 17                       |    |
|       | cugucuuucac aaaggauuug g | 21 |
| <210> | 18                       |    |
| <211> | 21                       |    |
| <212> | RNA                      |    |
| <213> | 人工序列                     |    |
| <220> |                          |    |
| <223> | 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子          |    |
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (8).. (8)                |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (12).. (12)              |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (15).. (15)              |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (19).. (19)              |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |
| <400> | 18                       |    |
|       | aaauccuuug ugaagacagc u  | 21 |
| <210> | 19                       |    |
| <211> | 21                       |    |
| <212> | RNA                      |    |
| <213> | 人工序列                     |    |
| <220> |                          |    |
| <223> | 靶向醛脱氢酶2的siRNA分子          |    |
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (2).. (2)                |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |
| <220> |                          |    |
| <221> | 修饰的碱基                    |    |
| <222> | (4).. (4)                |    |
| <223> | 2' OMe修饰的RNA碱基           |    |

[0010]

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (7)..(7)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (15)..(15)  
<223> 2' OMe修饰的RNA碱基

<400> 19  
cugucuucac aaaggauuug g

21