

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 10 月 6 日 (06.10.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/206809 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/083951

(22) 国际申请日: 2022 年 3 月 30 日 (30.03.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110336187.2 2021年3月30日 (30.03.2021) CN

(71) 申请人: 南京大学(NANJING UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道
163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。

(72) 发明人: 张辰宇(ZHANG, Chenyu); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 陈熹(CHEN, Xi); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 付正(FU, Zheng); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 李菁(LI, Jing); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 张翔(ZHANG, Xiang); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 周心妍(ZHOU, Xinyan); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 张丽(ZHANG, Li); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 余梦超(YU, Mengchao); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。 郭宏源

(54) Title: RNA DELIVERY SYSTEM FOR TREATMENT OF LUNG CANCER

(54) 发明名称: 一种用于治疗肺癌的RNA递送系统

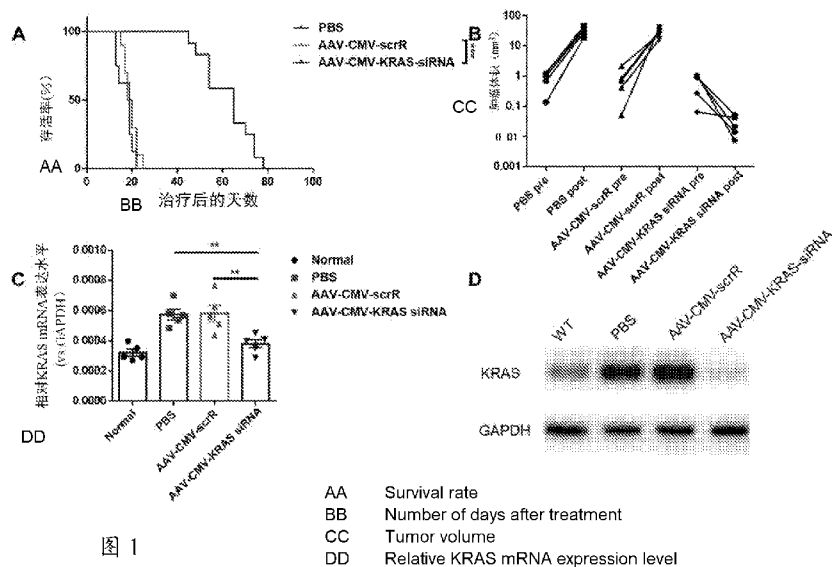


图 1

(57) Abstract: Provided is an RNA delivery system for the treatment of lung cancer. The provided RNA delivery system for the treatment of lung cancer comprises a viral vector, the viral vector carries RNA fragments capable of treating lung cancer, the viral vector can be enriched in organ tissues of a host, and endogenously and spontaneously form a complex structure containing RNA in the organ tissues of the host, and the complex structure can deliver the RNA fragments into the lung to treat lung cancer.

(57) 摘要: 提供了一种用于治疗肺癌的RNA递送系统。提供的用于治疗肺癌的RNA递送系统包括病毒载体, 所述病毒载体携带有能够治疗肺癌的RNA片段, 所述病毒载体能够在宿主的器官组织中富集, 并在所述宿主器官组织中内源性自发形成含有所述RNA的复合结构, 所述复合结构能够将所述RNA片段送入肺部, 实现肺癌的治疗。

(GUO, Hongyuan); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号刘颖, Jiangsu 210023 (CN)。

(74) 代理人: 北京智丞瀚方知识产权代理有限公司 (BEIJING ZHI CHENG HAN FANG IP AGENCY CO., LTD.); 中国北京市西城区西直门外大街1号院2号楼11C8-02刘颖, Beijing 100044 (CN)。

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

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

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种用于治疗肺癌的 RNA 递送系统

技术领域

本申请涉及生物医学技术领域，特别涉及一种用于治疗肺癌的 RNA 递送系统。

背景技术

肺癌是发病率和死亡率增长最快，对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一。肺癌目前主要采用以下手段进行治疗：1、化学治疗：化疗是肺癌的主要治疗方法，90%以上的肺癌需要接受化疗治疗，化疗对小细胞肺癌的疗效无论早期或晚期均较肯定，甚至有约 1%的早期小细胞肺癌通过化疗治愈。但化疗会抑制骨髓造血系统，主要是白细胞和血小板的下降。2、放射治疗：肺癌放疗照射野应包括原发灶、淋巴结转移的纵隔区，同时要辅以药物治疗。但放疗并发症较多，比如放射性肺炎、放射性食管炎、放射性肺纤维化和放射性脊髓炎等。3、外科治疗：其可以完全切除肺癌原发病灶及转移淋巴结，达到临床治愈；或切除肿瘤的绝大部分，为其他治疗创造有利条件，即减瘤手术；但外科治疗限制条件较多，无法大规模应用。

RNA 干扰(RNAi)疗法自从被发明以来，一直被认为是治疗人类疾病的一种很有前途的策略，但在临床实践过程中遇到了许多问题，该疗法的发展进度远远落后于预期。

一般认为 RNA 无法在细胞外长期稳定存在，因为 RNA 会被细胞外富含的 RNase 降解成碎片，因此必须找到能够使 RNA 稳定存在于细胞外，并且能够靶向性地进入特定组织的方法，才能将 RNAi 疗法的效果凸显出来。

目前与 siRNA 相关的专利很多，主要聚焦在以下几个方面：1、设计具有医学效果的 siRNA。2、对 siRNA 进行化学修饰，提高 siRNA 在生物体内的稳定性，提高产率。3、提高设计各种人工载体（如脂质纳米粒子、阳离子聚合物和病毒），以提高 siRNA 在体内传递的效率。其中第 3 方面的专利很多，其根本原因是研究人员们已经意识到目前缺乏合适的 siRNA 传递系统，将 siRNA 安全地、精确地、高效地输送到目标组织，该问题已经成为制约 RNAi 疗法的核心问题。

病毒（Biological virus）是一种个体微小，结构简单，只含一种核酸（DNA 或 RNA），必须在活细胞内寄生并以复制方式增殖的非细胞型生物。病毒载体可将遗传物质带入细胞，原理是利用病毒具有传送其基因组进入其他细胞，进行感染的分子机制，可发生于完整活体（in vivo）或是细胞培养（in vitro）中，主要应用于基础研究、基因疗法或疫苗。但是目前很少有针对将病毒作为载体利用特殊的自组装机制递送 RNA，特别是 siRNA 的相关研究。

公开号为 CN108624590A 的中国专利公开了一种能够抑制 DDR2 基因表达的 siRNA；公开号为 CN108624591A 的中国专利公开了一种能够沉默 ARPC4 基因的 siRNA，并且对该 siRNA 进行了 α -磷-硫修饰；公开号为 CN108546702A 的中国专利公开了一种靶向长链非编码 RNA DDX11-AS1 的 siRNA。公开号为 CN106177990A 的中国专利公开了一种可以用于多种肿瘤治疗的 siRNA 前体。这些专利均设计了特定的 siRNA 并且来针对某些由基因变化引起的疾病。

公开号为 CN108250267A 的中国专利公开了一种多肽、多肽-siRNA 诱导共组装体，使用多肽作为 siRNA 的载体。公开号为 CN108117585A 的中国专利公开了一种靶向导入 siRNA 促进乳腺癌细胞凋亡的多肽，同样使用多肽作为 siRNA 的载体。公开号为 CN108096583A 的中国专利公开了一种纳米粒子载体，该载体在包含化疗药物的同时还可以装载具有乳腺癌疗效的 siRNA。这些专利均为在 siRNA 载体方面的发明创造，但是其技术方案具有一个共同特征，那就是载体和 siRNA 均在体外预先组装，然后再引入宿主体内。事实上，目前绝大部分设计的传递技术均是如此。然而这类传递体系具有共同的问题，那就是这

些人工合成的外源性传递体系很容易被宿主的循环系统清除，也有可能引起免疫原性反应，甚至可能对特定的细胞类型和组织有毒。

本发明的研究团队发现内源性细胞可以选择性地将 miRNAs 封装到外泌体(exosome)中，外泌体可以将 miRNA 传递到受体细胞中，其分泌的 miRNA 在相对较低的浓度下，即可有力阻断靶基因的表达。外泌体与宿主免疫系统生物相容，并具有在体内保护和运输 miRNA 跨越生物屏障的先天能力，因此成为克服与 siRNA 传递相关的问题的潜在解决方案。例如，公开号为 CN110699382A 的中国专利就公开了一种递送 siRNA 的外泌体的制备方法，公开了从血浆中分离外泌体，并将 siRNA 通过电穿孔的方式封装到外泌体中的技术。

但是这类在体外分离或制备外泌体的技术，往往需要通过细胞培养获取大量的外泌体，再加上 siRNA 封装的步骤，这使得大规模应用该产品的临床费用变得非常高，一般患者无法负担；更重要的是，外泌体复杂的生产/纯化过程，使其几乎不可能符合 GMP 标准。

到目前为止，以外泌体为有效成分的药物从未获得 CFDA 批准，其核心问题就是无法保证外泌体产品的一致性，而这一问题直接导致此类产品无法获得药品生产许可证。如果能解决这一问题，则对推动 RNAi 疗法治疗肺癌意义非凡。

因此，开发一个安全、精确和高效的 siRNA 传递系统是对提高 RNAi 治疗效果，推进 RNAi 疗法至关重要的一环。

发明内容

有鉴于此，本申请实施例提供了一种用于治疗肺癌的 RNA 递送系统及其应用，以解决现有技术中存在的技术缺陷。

本申请的一个发明点为提供一种用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，该系统包括病毒载体，所述病毒载体携带有能够治疗肺癌的 RNA 片段，所述病毒载体能够在宿主的器官组织中富集，并在所述宿主器官组织中内源性地自发形成含有所述 RNA 的复合结构，所述复合结构能够将所述 RNA 片段送入肺部，实现肺癌的治疗。

进一步地，所述病毒载体为腺病毒相关病毒。

进一步地，所述腺病毒相关病毒为腺病毒相关病毒 5 型、腺病毒相关病毒 8 型或腺病毒相关病毒 9 型。

进一步地，所述 RNA 片段包含 1 个、两个或多个具有医疗意义的具体 RNA 序列，所述 RNA 序列是具有医学意义的 siRNA、shRNA 或 miRNA。

进一步地，所述病毒载体包括启动子序列和靶向标签，所述靶向标签能够在宿主的器官组织中形成所述复合结构的靶向结构，所述靶向结构位于复合结构的表面，所述复合结构能够通过所述靶向结构寻找并结合目标组织，将所述 RNA 片段递送进入目标组织。

进一步地，所述病毒载体中包括以下任意一种线路或几种线路的组合：启动子-RNA 片段、启动子-靶向标签、启动子-RNA 片段-靶向标签；每一个所述病毒载体中至少包括一个 RNA 片段和一个靶向标签，所述 RNA 片段和靶向标签位于相同的线路中或位于不同的线路中。

进一步地，所述病毒载体还包括能够使所述线路折叠成正确结构并表达的侧翼序列、补偿序列和 loop 序列，所述侧翼序列包括 5'侧翼序列和 3'侧翼序列；

所述病毒载体中包括以下任意一种线路或几种线路的组合：5'-启动子-5'侧翼序列-RNA 片段-loop 序

列-补偿序列-3'侧翼序列、5'-启动子-靶向标签、5'-启动子-靶向标签-5'侧翼序列-RNA 片段-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列。

进一步地, 所述 5'侧翼序列为 ggatcctggaggcttgctgaaggctgtatgctgaattc 或与其同源性大于 80% 的序列;

所述 loop 序列为 gttttggccactgactgac 或与其同源性大于 80% 的序列;

所述 3'侧翼序列为 accggtcaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaatggcccagatctggccgactcgag 或与其同源性大于 80% 的序列;

所述补偿序列为所述 RNA 片段的反向互补序列, 并删除其中任意 1-5 位碱基。删除 RNA 反向互补序列的 1-5 位碱基的目的是使该序列不表达。

优选地, 所述补偿序列为所述 RNA 片段的反向互补序列, 并删除其中任意 1-3 位碱基。

更为优选地, 所述补偿序列为所述 RNA 片段的反向互补序列, 并删除其中任意 1-3 位连续排列的碱基。

最为优选地, 所述补偿序列为所述 RNA 片段的反向互补序列, 并删除其中的第 9 位和/或第 10 位碱基。

进一步地, 在病毒载体中存在至少两种线路的情况下, 相邻的线路之间通过序列 1-3 (序列 1-序列 2-序列 3) 组成的序列相连;

其中, 序列 1 为 CAGATC, 序列 2 是由 5-80 个碱基组成的序列, 序列 3 为 TGGATC。

进一步地, 在病毒载体中存在至少两种线路的情况下, 相邻的线路之间通过序列 4 或与序列 4 同源性大于 80% 的序列相连;

其中, 序列 4 为 CAGATCTGGCCGCACTCGAGGTAGTGAGTCGACCAGTGGATC。

进一步地, 所述器官组织为肝脏, 所述复合结构为外泌体。

进一步地, 所述靶向标签选自具有靶向功能的靶向肽或靶向蛋白。

进一步地, 所述靶向肽包括 RVG 靶向肽、GE11 靶向肽、PTP 靶向肽、TCP-1 靶向肽、MSP 靶向肽;

所述靶向蛋白包括 RVG-LAMP2B 融合蛋白、GE11-LAMP2B 融合蛋白、PTP-LAMP2B 融合蛋白、TCP-1-LAMP2B 融合蛋白、MSP-LAMP2B 融合蛋白。

进一步地, 所述 RNA 序列的长度为 15-25 个核苷酸。比如, 所述 RNA 序列的长度可以为 16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 个核苷酸。优选地, 所述 RNA 序列的长度为 18-22 个核苷酸。

进一步地, 所述能够治疗肺癌的 RNA 序列选自以下 RNA 中的任意一种或几种: EGFR 基因的 siRNA、KRAS 基因的 siRNA 或编码上述 RNA 的核酸分子。

EGFR 基因的 siRNA 包括 UGUUGCUUCUCUUAUUUCCU、AAAUGAUCUUCAAAAGUGCCC、UCUUUAAGAAGGAAAGAUCAU、AAUAUUCGUAGCAUUUAUGGA、UAAAAAUCCUCACAUUAUACUU、其他具有抑制 EGFR 基因表达的序列以及与上述序列同源性大于 80% 的序列。

KRAS 基因的 siRNA 包括 UGAUUUAGUAUUUAUUUAUGGC、AAUUUGUUCUCUAUAAUGGUG、UAAUUUGUUCUCUAUAAUGGU、UUAUGUUUUCGAAUUUCUCGA、UGUAUUUACAUAAUUACACAC、其他具有抑制 KRAS 基因表达的序列以及与上述序列同源性大于 80% 的序列。

需要说明的是, 以上所述的“同源性大于 80% 的序列”可以为同源性为 85%、88%、90%、95%、98% 等。

可选地,所述 RNA 片段包括 RNA 序列本体和对 RNA 序列本体进行核糖修饰得到的修饰 RNA 序列。即 RNA 片段既可以仅由至少一个 RNA 序列本体组成,也可以仅由至少一个修饰 RNA 序列组成,还可以由 RNA 序列本体与修饰 RNA 序列组成。

在本发明中,所述分离的核酸还包括其变体和衍生物。本领域的普通技术人员可以使用通用的方法对所述核酸进行修饰。修饰方式包括(但不限于):甲基化修饰、烃基修饰、糖基化修饰(如 2-甲氧基-糖基修饰、烃基-糖基修饰、糖环修饰等)、核酸化修饰、肽段修饰、脂类修饰、卤素修饰、核酸修饰(如“TT”修饰)等。在本发明的其中一种实施方式中,所述修饰为核苷酸间键合,例如选自:硫代磷酸酯、2'-O 甲氧基乙基(MOE)、2'-氟、磷酸烷基酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酯、羧甲基酯及其组合。在本发明的其中一种实施方式中,所述修饰为对核苷酸的修饰,例如选自:肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、阿拉伯糖-核酸(FANA)、类似物、衍生物及其组合。优选的,所述修饰为 2' 氟嘧啶修饰。2' 氟嘧啶修饰是将 RNA 上嘧啶核苷酸的 2'-OH 用 2'-F 替代,2'-F 能够使 RNA 不易被体内的 RNA 酶识别,由此增加 RNA 片段在体内传输的稳定性。

进一步地,所述递送系统为用于包括人在内的哺乳动物中的递送系统。

本申请的另一个发明点为提供一种如上所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统在药物中的应用。

进一步地,所述药物的给药方式包括口服、吸入、皮下注射、肌肉注射、静脉注射。

所述药物的剂型可以为片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、丸剂、栓剂、软膏剂、溶液剂、混悬剂、洗剂、凝胶剂、糊剂等。

本申请的技术效果为:

本申请提供的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统以病毒作为载体,病毒载体作为成熟的注入物,其安全性和可靠性已被充分验证,成药性非常好。最终发挥效果的 RNA 序列由内源性外泌体包裹输送,不存在任何免疫反应,无需验证该外泌体的安全性。该递送系统可以递送各类小分子 RNA,通用性强。并且病毒载体的制备要比外泌体或是蛋白质、多肽等物质的制备便宜地多,经济性好。本申请提供的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统在体内自组装后能够与 AGO₂ 紧密结合并富集为复合结构(外泌体),不仅能防止其过早降解,维持其在循环中的稳定性,而且有利于受体细胞吸收、胞浆内释放和溶酶体逃逸,所需剂量低。

本申请提供的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统应用于药物中,即提供了一个药物递送平台,可以大大提高肺癌治疗效果,还可以通过该平台形成更多 RNA 类药物的研发基础,对 RNA 类药物研发和使用具有极大的推动作用。

附图说明

图 1 是本申请一实施例提供的基于 KRAS siRNA 的小鼠肺癌治疗情况图;

图 2 是本申请一实施例提供的基于 EGFR siRNA 的小鼠肺癌治疗情况图;

图 3 是本申请一实施例提供的小鼠多种酶含量对比图。

图 4 是本申请一实施例提供的慢病毒载体在肝、肺、血浆、外泌体的富集效果以及 EGFR 基因表达量检测,图中,A 为静脉注射慢病毒载体后在肝和肺中的 EGFR siRNA 富集效果,B 静脉注射慢病毒载体后在血浆和外泌体中的 EGFR siRNA 富集效果,C 静脉注射慢病毒载体后的 EGFR 蛋白表达效果,D 静脉注射慢病毒载体后的 EGFR mRNA 表达效果。

图 5 是本申请一实施例提供的腺病毒载体在肝、肺、血浆、外泌体的富集效果以及 EGFR 基因表达量检测,图中,A 为静脉注射腺病毒载体后在肝和肺中的 EGFR siRNA 富集效果,B 静脉注射腺病毒载体后在血浆和外泌体中的 EGFR siRNA 富集效果,C 静脉注射腺病毒载体后的 EGFR 蛋白表达效果,D 静

脉注射腺病毒载体后的 EGFR mRNA 表达效果。

图 6 是本申请一实施例提供的将 6 种不同 RNA 分别构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, 图中 A 为 siR^E 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, B 为 siR^T 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, C 为 miR-7 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, D 为 shR^E 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, E 为 shR^T 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, F 为 miR-133b 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计。

图 7 是本申请一实施例提供的将 6 种不同 RNA 中任意 2 种 RNA 序列组成的 4 组 RNA 片段分别构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, 图中 A 为 siR^E+ shR^T 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, B 为 siR^T+ miR-7 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, C 为 shR^E + miR-133b 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, D 为 shR^T+miR-133b 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计。

图 8 是本申请一实施例提供的将 6 种不同 RNA 中任意 3 种 RNA 序列组成的 3 组 RNA 片段分别构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, 图中 A 为 siR^E+shR^T+miR-7 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, B 为 siR^T+ shR^E +miR-7 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计, C 为 shR^E +siR^T+ miR-133b 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计。

图 9 是本申请一实施例提供的静脉注射后 siRNA 在肝、肺、血浆、外泌体种的富集结果和 EGFR 蛋白及 mRNA 的表达量检测结果, 图中 A 为 AAV-siR^E 和 AAV-GE11-siR^E 在肝、肺中的富集结果, B 为 AAV-siR^E 和 AAV-GE11-siR^E 在血浆、外泌体中的富集结果, C 为 AAV-siR^E 和 AAV-GE11-siR^E 的 EGFR 蛋白表达量, D 为 AAV-siR^E 和 AAV-GE11-siR^E 的 EGFR mRNA 表达量。

图 10 是本申请一实施例提供的与 5' 侧翼序列同源性大于 80% 的 2 条序列构建进 AAV 载体后, 在肺部富集效果及治疗效果, 图中 A 为通过 EGFR siRNA 含量显示出在肺部的富集结果, B 为其中 1 条序列的治疗效果, C 为另一条序列的治疗效果。

图 11 是本申请一实施例提供的与 loop 序列同源性大于 80% 的序列构建进 AAV 载体后, 在肺部富集效果及治疗效果, 图中 A 为通过 EGFR siRNA 含量显示出在肺部的富集结果, B 为其中 1 条序列的治疗效果, C 为另一条序列的治疗效果。

图 12 是本申请一实施例提供的与 3' 侧翼序列同源性大于 80% 的序列构建进 AAV 载体后, 在肺部富集效果及治疗效果, 图中 A 为通过 EGFR siRNA 含量显示出在肺部的富集结果, B 为其中 1 条序列的治疗效果, C 为另一条序列的治疗效果。

图 13 是本申请一实施例提供的序列 4 以及 2 条与序列 4 同源性大于 80% 的序列 4-1、4-2 构建进 AAV 载体中, 静脉注射 9 小时后肺部组织的 EGFR siRNA 含量检测结果, 图中 A 为序列 4 的检测结果, B 为序列 4-1 的检测结果, C 为序列 4-2 的检测结果。

图 14 是本申请一实施例提供的含有 3 种不同长度 RNA 序列的基因环路静脉注射后 EGFR 表达量检测, 图中 A 为 EGFR 蛋白含量结果, B 为 EGFR mRNA 含量结果。

具体实施方式

下面结合附图对本申请的具体实施方式进行了描述。

首先, 对本发明涉及到的专业名词、试验方法等进行解释说明。

Western 免疫印迹 (Western Blot) 是将蛋白质转移到膜上,然后利用抗体进行检测.对已知表达蛋白,可用相应抗体作为一抗进行检测,对新基因的表达产物,可通过融合部分的抗体检测。

Western Blot 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳,被检测物是蛋白质,“探针”是抗体,“显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品,转移到固相载体(例如硝酸纤维素薄膜)上,固相载体以非共价键形式吸附蛋白质,且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变,以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原,与对应的抗体起免疫反应,再与酶或同位素标记的第二抗体起反应,经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。其步骤主要包括:提取蛋白、蛋白定量、制胶和电泳、转膜、免疫标记及显影。

本发明中涉及到的 siRNA 水平、蛋白含量和 mRNA 含量的检测,均是通过向小鼠体内注射 RNA 递送系统,建立了小鼠干细胞体外模型。利用 qRT-PCR 检测细胞、组织中 mRNA 和 siRNA 表达水平。对于 siRNA 的绝对定量利用标准品绘制标准曲线的方式进行确定。每个 siRNA 或 mRNA 相对于内参的表达量可以用 $2^{-\Delta CT}$ 表示,其中 $\Delta CT = C_{\text{样品}} - C_{\text{内参}}$ 。扩增 siRNA 时内参基因为 U6 snRNA (组织中) 或 miR-16 (血清、外泌体中) 分子,扩增 mRNA 时基因为 GAPDH 或 18s RNA。利用 Western blotting 实验检测细胞、组织中蛋白质的表达水平,用 ImageJ 软件进行蛋白定量分析。

在本发明所提供的图示中,“*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$, “***”表示 $P < 0.005$ 。

在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的试剂、材料和操作步骤均为相应领域内广泛使用的试剂、材料和常规步骤。

实施例 1

本实施例提供一种用于治疗肺癌的 RNA 递送系统,该系统包括病毒载体,所述病毒载体携带有能够治疗肺癌的 RNA 片段,所述病毒载体能够在宿主的器官组织中富集,并在所述宿主器官组织中内源地自发形成含有所述 RNA 的复合结构,所述复合结构能够将所述 RNA 片段送入肺部,实现肺癌的治疗。

见附图 4-5,图 4 为慢病毒载体在肝、肺、血浆、外泌体的富集效果以及 EGFR 基因表达量检测,图 5 为腺相关病毒在肝、肺、血浆、外泌体的富集效果以及 EGFR 基因表达量检测。

在本实施例中,病毒载体还包括启动子和靶向标签。所述病毒载体包括以下任意一种线路或几种线路的组合:启动子-RNA 序列、启动子-靶向标签、启动子-RNA 序列-靶向标签,每一个所述病毒载体中至少包括一个 RNA 片段和一个靶向标签,所述 RNA 片段和靶向标签位于相同的线路中或位于不同的线路中。换言之,病毒载体中可以仅包括启动子-RNA 序列-靶向标签,也可以包括启动子-RNA 序列、启动子-靶向标签的组合,或是启动子-靶向标签、启动子-RNA 序列-靶向标签的组合。

见附图 9,5'-启动子-5'侧翼序列-RNA 序列-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列对应递送系统名称为 AAV-siR^E,5'-启动子-靶向标签-5'侧翼序列-RNA 序列-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列对应递送系统名称为 AAV-GE11-siR^E,图 9 为静脉注射后 siRNA 在肝、肺、血浆、外泌体中的富集结果和 EGFR 蛋白及 mRNA 的表达量检测结果。

进一步地,所述病毒载体还可以包括能够使所述线路折叠成正确结构并表达的侧翼序列、补偿序列和 loop 序列,所述侧翼序列包括 5'侧翼序列和 3'侧翼序列;所述病毒载体包括以下任意一种线路或几种线路的组合:5'-启动子-5'侧翼序列-RNA 片段-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列、5'-启动子-靶向标签、5'-启动子-靶向标签-5'侧翼序列-RNA 片段-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列。

其中,所述 5'侧翼序列优选为 ggatcctggaggcttgctgaaggctgtatgctgaattc 或与其同源性大于 80% 的序列,包括与 ggatcctggaggcttgctgaaggctgtatgctgaattc 同源性为 85%、90%、92%、95%、98%、99% 的序列等。

所述 loop 序列优选为 gttttggccactgactgac 或与其同源性大于 80% 的序列, 包括与 gttttggccactgactgac 同源性为 85%、90%、92%、95%、98%、99% 的序列等。

所述 3' 侧翼序列优选为 accggtcaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggcccagatctggccgactcgag 或与其同源性大于 80% 的序列, 包括与 accggtcaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggcccagatctggccgactcga g 同源性为 85%、90%、92%、95%、98%、99% 的序列等。

序列具体如下表 1 所示。

名称	序列
5'侧翼序列-1	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAATTCG
5'侧翼序列-2	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGGCAGCTGAATTCG
loop-1	GTTTTGGCCACTGACTGAC
loop-2	GTTTTGGTAACTGACTGAC
3'侧翼序列-1	CACCGGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCC
3'侧翼序列-2	CACCGGTCTGAACACAAGGCCTGTTACTAGCACGTCCATGGAACAAATGGCC

所述补偿序列为所述 RNA 片段的反向互补序列, 并删除其中任意 1-5 位碱基。在 RNA 片段中仅包含一个 RNA 序列时, 所述补偿序列可以为该 RNA 序列的删除其中任意 1-5 位碱基的反向互补序列。

优选地, 所述补偿序列为所述 RNA 片段的反向互补序列, 并删除其中任意 1-3 位碱基。在 RNA 片段中仅包含一个 RNA 序列时, 所述补偿序列可以为该 RNA 序列的删除其中任意 1-3 位碱基的反向互补序列。

更为优选地, 所述补偿序列为所述 RNA 片段的反向互补序列, 并删除其中任意 1-3 位连续排列的碱基。在 RNA 片段中仅包含一个 RNA 序列时, 所述补偿序列可以为该 RNA 序列的删除其中任意 1-3 位连续排列的碱基的反向互补序列。

最为优选地, 所述补偿序列为所述 RNA 片段的反向互补序列, 并删除其中的第 9 位和/或第 10 位碱基。在 RNA 片段中仅包含一个 RNA 序列时, 所述补偿序列可以为该 RNA 序列的删除其中第 9 位和/或第 10 位的反向互补序列。删除第 9 位和第 10 位碱基效果最优。

需要说明的是, 上述侧翼序列、补偿序列、loop 序列均不是随意选择的, 而是基于大量的理论研究和试验确定的, 在上述特定侧翼序列、补偿序列、loop 序列的配合下, 能够最大程度的提高 RNA 片段的表达率。

见附图 10-12, 图 10 为 5' 侧翼序列同源性大于 80% 的序列构建进 AAV 载体在肺部富集效果以及治疗效果, 图 11 为 loop 序列同源性大于 80% 的序列构建进 AAV 载体在肺部富集效果以及治疗效果, 图 12 为 3' 侧翼序列同源性大于 80% 的序列构建进 AAV 载体在肺部富集效果以及治疗效果。

在病毒载体携带两个或多个线路的情况下, 相邻的线路之间可以通过序列 1-序列 2-序列 3 相连; 其中, 序列 1 优选为 CAGATC, 序列 2 可以为由 5-80 个碱基组成的序列, 比如 10 个、15 个、20 个、25 个、30 个、35 个、40 个、45 个、50 个、55 个、60 个、65 个、70 个、75 个碱基组成的序列均可, 优选为 10-50 个碱基组成的序列, 更优选为 20-40 个碱基组成的序列, 序列 3 优选为 TGGATC。

更为优选地, 在病毒载体携带两个或多个线路的情况下, 相邻的线路之间通过序列 4 或与序列 4 同源性大于 80% 的序列相连; 其中, 序列 4 为 CAGATCTGGCCGCACTCGAGGTAGTGAGTCGACCAGTGGA TC。

见附图 13, 图为序列 4 以及 2 条与序列 4 同源性大于 80% 的序列 4-1、4-2 构建进 AAV 载体中, 静脉注射 9 小时后肺部组织的 EGFR siRNA 含量检测结果。

序列具体如下表 2 所示。

名称	序列
序列 4	CAGATCTGGCCGCACTCGAGGTAGTGAGTCGACCAGTGGATC
序列 4-1	CAGATCTGGCCGCACTCGAGGTAGTGAGTCGTCCAGTAATTA
序列 4-2	CAGATCTGGCCGCACTCGAGTAAGTGAGTCGACTTTATGATC

以上所述的 RNA 片段包含 1 个、两个或多个具有医疗意义的具体 RNA 序列，所述 RNA 序列能够在目标受体中被表达，所述补偿序列在目标受体中不能被表达。RNA 序列可以为 siRNA 序列、shRNA 序列或 miRNA 序列，优选为 siRNA 序列。

一个 RNA 序列的长度为 15-25 个核苷酸 (nt)，优选为 18-22nt，比如 18nt、19nt、20nt、21nt、22nt 均可。此序列长度的范围并不是随意选择的，而是经过反复的试验后确定的。大量试验证明，在 RNA 序列的长度小于 18nt，特别是小于 15nt 的情况下，该 RNA 序列大多无效，不会发挥作用，而在 RNA 序列的长度大于 22nt，特别是大于 25nt 的情况下，则不仅线路的成本大大提高，而且效果也并未优于长度为 18-22nt 的 RNA 序列，经济效益差。因此，在 RNA 序列的长度为 15-25nt，特别是 18-22nt 时，能够兼顾成本与作用的发挥，效果最好。以在同一个病毒载体上联合使用“siRNA1”和“siRNA2”为例，该病毒载体的功能结构区可以表示为：（启动子-siRNA1）-连接序列-（启动子-siRNA2）-连接序列-（启动子-靶向标签），或（启动子-靶向标签-siRNA1）-连接序列-（启动子-靶向标签-siRNA2），或（启动子-siRNA1）-连接序列-（启动子-靶向标签-siRNA2）等。

见附图 14，RNA 序列长度分别为 18、20、22 的载体系统分别对应 AAV-siR^E(18)、AAV-siR^E(20)、AAV-siR^E(22)，图 14 为上述 3 种基因环路静脉注射后 EGFR 表达量检测。

具体序列如下表 3 所示。

名称	序列
siRE(18)	ACCTATTCCGTTACACACT
siRE(20)	ATACCTATTCCGTTACACAC
siRE(22)	ATACCTATTCCGTTACACACTT

以上所述的 RNA 包含 1 个、两个或多个具有医疗意义的具体 RNA 序列，所述 RNA 序列能够在目标受体中被表达，所述补偿序列在目标受体中不能被表达。

所述能够治疗肺癌的 RNA 选自以下 RNA 中的任意一种或几种：EGFR 基因的 siRNA、KRAS 基因的 siRNA 或编码上述 RNA 的核酸分子。

能够治疗肺癌的 RNA 有效序列的数量为 1 条、2 条或多条。比如可以在同一个病毒载体上联合使用 EGFR 基因的 siRNA 和 KRAS 基因的 siRNA，也可以单独使用 EGFR 基因的 siRNA 或 KRAS 基因的 siRNA。

更加具体地，该病毒载体的功能结构区可以表示为：（5'-启动子-5'侧翼序列-siRNA1-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列）-连接序列-（5'-启动子-5'侧翼序列-siRNA2-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列）-连接序列-（5'-启动子-靶向标签），或（5'-启动子-靶向标签-5'侧翼序列-siRNA1-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列）-连接序列-（5'-启动子-靶向标签-5'侧翼序列-siRNA2-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列），或（5'-启动子-5'侧翼序列-siRNA1-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列）-连接序列-（5'-启动子-靶向标签-5'侧翼序列-siRNA2-loop 序列-补偿序列-3'侧翼序列）、（5'-启动子-靶向标签-5'侧翼序列-siRNA1-siRNA2-loop 序列-补偿序列

-3'侧翼序列)等。其他情况均可以此类推,在此不再赘述。以上连接序列可以为“序列1-序列2-序列3”或“序列4”,一个括号表示一个完整的线路(circuit)。

优选地,上述RNA还可以通过对其中的RNA序列(siRNA、shRNA或miRNA)进行核糖修饰得到,优选2'氟嘧啶修饰。2'氟嘧啶修饰是将siRNA、shRNA或miRNA上嘧啶核苷酸的2'-OH用2'-F替代,2'-F能够使人体内的RNA酶不易识别siRNA、shRNA或miRNA,如此能够增加RNA在体内传输的稳定性。

具体地,肝脏会吞噬外源性的病毒,高达99%的外源性病毒会进入肝脏,因此当以病毒作为载体时并不需要做特异性设计即可在肝脏组织中富集,随后病毒载体被打开,释放出RNA分子(siRNA、shRNA或miRNA),肝脏组织自发地将上述RNA分子包裹进外泌体内部,这些外泌体就变成了RNA输送机构。

优选地,为了使该RNA输送机构(外泌体)具有“精确制导”的能力,在注入体内的病毒中我们设计了靶向标签,该靶向标签也会被肝脏组织组装到外泌体中,尤其是当选择某些特定的靶向标签时,靶向标签能够被插入外泌体表面,从而成为能够引导外泌体的靶向结构,这就大大提高了本发明所述的RNA输送机构的精准性,一方面可以使所需引入的病毒载体的用量大大减少,另一方面还大大提高了潜在药物递送的效率。

靶向标签选自具有靶向功能的肽、蛋白质或抗体中的一种,靶向标签的选择是需要创造性劳动的过程,一方面需要根据目标组织选取可用的靶向标签,另一方面还需要保证该靶向标签能够在稳定地出现在外泌体的表面,从而达到靶向功能。目前已经筛选出的靶向肽、靶向蛋白、抗体。其中,靶向肽包括但不限于RVG靶向肽(核苷酸序列如SEQ ID No: 1所示)、GE11靶向肽(核苷酸序列如SEQ ID No: 2所示)、PTP靶向肽(核苷酸序列如SEQ ID No: 3所示)、TCP-1靶向肽(核苷酸序列如SEQ ID No: 4所示)、MSP靶向肽(核苷酸序列如SEQ ID No: 5所示);靶向蛋白包括但不限于RVG-LAMP2B融合蛋白(核苷酸序列如SEQ ID No: 6所示)、GE11-LAMP2B融合蛋白(核苷酸序列如SEQ ID No: 7所示)、PTP-LAMP2B融合蛋白(核苷酸序列如SEQ ID No: 8所示)、TCP-1-LAMP2B融合蛋白(核苷酸序列如SEQ ID No: 9所示)、MSP-LAMP2B融合蛋白(核苷酸序列如SEQ ID No: 10所示)。优选采用GE11靶向肽、GE11-LAMP2B融合蛋白。

此外,为了达到精准递送的目的,我们实验了多种病毒载体搭载的方案,得出另一优化的方案:所述病毒载体还可以由具有不同结构的多种病毒构成,其中一种病毒包含启动子和靶向标签,其他病毒包含启动子和RNA片段。即将靶向标签与RNA片段装载到不同的病毒载体中,将两种病毒载体注入体内,其靶向效果不差于将相同的靶向标签与RNA片段装载在一个病毒载体中产生的靶向效果。

更优选地,两种不同的病毒载体注入宿主体内时,可以先将装有RNA序列的病毒载体注入,在1-2小时后再注入含有靶向标签的病毒载体,如此能够达到更优的靶向效果。

以上所述的递送系统均可用于包括人在内的哺乳动物。

本实施例提供的用于治疗肺癌的RNA递送系统以病毒作为载体,病毒载体作为成熟的注入物,其安全性和可靠性已被充分验证,成药性非常好。最终发挥效果的RNA序列由内源性外泌体包裹输送,不存在任何免疫反应,无需验证该外泌体的安全性。该递送系统可以递送各类小分子RNA,通用性强。并且病毒载体的制备要比外泌体或是蛋白质、多肽等物质的制备便宜地多,经济性好。本实施例提供的用于治疗肺癌的RNA递送系统在体内自组装后能够与AGO₂紧密结合并富集为复合结构(外泌体),不仅能防止其过早降解,维持其在循环中的稳定性,而且有利于受体细胞吸收、胞浆内释放和溶酶体逃逸,所需剂量低。

实施例 2

在实施例 1 的基础上，本实施例提供一种药物。一种用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，该系统包括病毒载体，所述病毒载体携带有能够治疗肺癌的 RNA 片段，所述病毒载体能够在宿主的器官组织中富集，并在所述宿主器官组织中内源性地自发形成含有所述 RNA 的复合结构，所述复合结构能够将所述 RNA 片段送入肺部，实现肺癌的治疗。

进一步地，所述 RNA 片段包含 1 个、两个或多个具有医疗意义的具体 RNA 序列，所述 RNA 序列是具有医学意义的 siRNA、shRNA 或 miRNA。

见附图 6-8，图 6 是提供的 6 种不同 RNA 构建进腺相关病毒载体治疗肺癌后的荧光信号统计，6 种 RNA 分别为：siR^E（靶基因为 EGFR）、siR^T（靶基因为 TNC）、shR^E（靶基因为 EGFR）、shR^T（靶基因为 TNC）、miR-7（靶基因为 EGFR）、miR-133b（靶基因为 EGFR）；图 7 是以上提供的 6 种 RNA 中任意 2 种 RNA 序列组成的 4 组治疗肺癌后的荧光信号统计；图 8 是以上提供的 6 种 RNA 中任意 3 种 RNA 序列组成的 3 组治疗肺癌后的荧光信号统计。

具体序列（前体）如下表 4 所示。

名称	序列
siRE 前体序列	ATACCTATTCCGTTACACACTGTTTTGGCCACTGACTGACAGTGTGTAGGAATAGGTAT
siRT 前体序列	CACACAAGCCATCTACACATGGTTTTGGCCACTGACTGACCATGTGTATGGCTTGTGTG
shRE 前体序列	ATACCTATTCCGTTACACACTGTTTTGGCCACTGACTGACAGTGTGTAACGGAATAGGTAT
shRT 前体序列	CACACAAGCCATCTACACATGGTTTTGGCCACTGACTGACCATGTGTAGATGGCTTGTGTG
miR-7	hsa-miR-7
miR-133b	hsa-miR-133b

进一步地，所述病毒载体包括启动子序列和靶向标签，所述靶向标签能够在宿主的器官组织中形成所述复合结构的靶向结构，所述靶向结构位于复合结构的表面，所述复合结构能够通过所述靶向结构寻找并结合目标组织，将所述 RNA 片段递送进入目标组织。

关于本实施例中上述病毒载体、RNA 片段、靶向标签等的解释说明均可以参考实施例 1，在此不再赘述。

该药物可以通过口服、吸入、皮下注射、肌肉注射或静脉注射的方式进入人体后，通过实施例 1 所述的 RNA 递送系统递送至目标组织肺癌，发挥治疗作用。

该药物还可以与其他治疗肺癌的药物联合使用，以增强治疗效果。比如吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼等。

本实施例的药物还可以包括药学上可以接受的载体，该载体包括但不限于稀释剂、缓冲剂、乳剂、包囊剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、喷雾剂、透皮吸收剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂、着色剂、矫味剂、佐剂、干燥剂、吸附载体等。

本实施例提供的药物的剂型可以为片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、丸剂、栓剂、软膏剂、溶液剂、混悬剂、洗剂、凝胶剂、糊剂等。

本实施例提供的药物以病毒作为载体，病毒载体作为成熟的注入物，其安全性和可靠性已被充分验证，成药性非常好。最终发挥效果的 RNA 序列由内源性外泌体包裹输送，不存在任何免疫反应，无需验证该外泌体的安全性。该药物可以递送各类小分子 RNA，通用性强。并且病毒载体的制备要比外泌体或是蛋

白质、多肽等物质的制备便宜地多，经济性好。本申请提供的药物在体内自组装后能够与 AGO₂ 紧密结合并富集为复合结构（外泌体），不仅能防止其过早降解，维持其在循环中的稳定性，而且有利于受体细胞吸收、胞浆内释放和溶酶体逃逸，所需剂量低。

实施例 3

在实施例 1 或 2 的基础上，本实施例提供一种用于治疗肺癌的 RNA 递送系统在药物中的应用。在此通过以下试验进行具体说明。

在第一个试验中，我们利用肝脏高亲和的 AAV-5 型腺相关病毒包裹 EGFR siRNA 系统（AAV-CMV-EGFR siRNA）和 KRAS siRNA 系统（AAV-CMV-KRAS siRNA），尾静脉注射 100 μ L 滴度为 10¹² V. g/ml 的 AAV 溶液至小鼠体内。通过小动物活体监测 AAV 系统的体内表达情况，3 周后可见 AAV 系统在体内尤其是肝脏，稳定表达。

在第二个试验中，设置 1 个试验组和 2 个对照组，其中，试验组为 AAV-CMV-KRAS-siRNA 组，对照组为 PBS 组和 AAV-CMV-scrR 组。

各组选取相同数量的小鼠，向小鼠体内注射小鼠肺癌细胞（LLC 细胞），采用 CT 扫描技术观察小鼠模型构建进展。30 天后对构建成功的小鼠进行给药，两天给药一次，即每两日向 PBS 组/AAV-CMV-scrR 组/AAV-CMV-KRAS siRNA 组小鼠注射一次 PBS 缓冲液/AAV-CMV-scrR/AAV-CMV-KRAS siRNA 进行治疗，分别对小鼠进行生存分析和肿瘤评估，给药 7 次后停止治疗。

统计各组小鼠在治疗后的 100 天内的生存情况，结果如图 1A 所示，可以看出，PBS 组和 AAV-CMV-scrR 组小鼠存活率相差无几，而 AAV-CMV-KRAS siRNA 组小鼠存活率最高。

给药前后分别对各组小鼠进行 CT 扫描，根据 CT 影像图对小鼠肺组织进行 3D 建模，并计算肿瘤体积大小，结果如图 1B 所示。在图 1B 中，“PBS pre”表示给药前的 PBS 组，“PBS post”表示给药后的 PBS 组；“AAV-CMV-scrR pre”表示给药前的 AAV-CMV-scrR 组，“AAV-CMV-scrR post”表示给药后的 AAV-CMV-scrR 组；“AAV-CMV-KRAS-siRNA pre”表示给药前的 AAV-CMV-KRAS siRNA 组，“AAV-CMV-KRAS-siRNA post”表示给药后的 AAV-CMV-KRAS siRNA 组。可以看出，AAV-CMV-KRAS siRNA 组的小鼠在给药后肿瘤体积显著减小，而 PBS 组和 AAV-CMV-scrR 组的小鼠在给药后肿瘤体积不仅没有减小，还呈现不同程度的增加。

分别通过 RT-qPCR 和 Western blotting 检测各组小鼠肺部 KRAS 蛋白和 mRNA 表达水平，结果如图 1C、图 1D 所示。结果显示 AAV-CMV-KRAS siRNA 组的小鼠肺部 KRAS 蛋白和 mRNA 表达量相对于对照组有所降低。

以上试验说明，AAV-CMV-KRAS siRNA 对小鼠肺癌肿瘤具有显著的治疗效果。

在第三个试验中，设置 1 个试验组和 2 个对照组，其中，试验组为 AAV-CMV-EGFR siRNA 组，对照组为 PBS 组和 AAV-CMV-scrR 组。

构建 EGFR-DEL19 小鼠模型，饲喂强力霉素饲料诱导肿瘤产生，30 天后对构建成功的小鼠进行给药，两天给药一次，即每两日向 PBS 组/AAV-CMV-scrR 组/AAV-CMV-EGFR siRNA 组小鼠注射一次 PBS 缓冲液/AAV-CMV-scrR/AAV-CMV-EGFR siRNA 进行治疗，分别对小鼠进行生存分析和肿瘤评估，给药 7 次后停止治疗。

统计各组小鼠在治疗后的 100 天内的生存情况，结果如图 2A 所示，可以看出，PBS 组和 AAV-CMV-scrR 组小鼠存活率相差无几，而 AAV-CMV-EGFR siRNA 组小鼠存活率最高。

给药前后分别对各组小鼠进行 CT 扫描，结果如图 2E 所示，根据图 2E 的 CT 影像图对小鼠肺组织进

行 3D 建模, 并计算肿瘤体积大小, 结果如图 2B 所示。在图 2B 中, “PBS pre”表示给药前的 PBS 组, “PBS post”表示给药后的 PBS 组; “AAV-CMV-scrR pre”表示给药前的 AAV-CMV-scrR 组, “AAV-CMV-scrR post”表示给药后的 AAV-CMV-scrR 组; “AAV-CMV-EGFR siRNA pre”表示给药前的 AAV-CMV-EGFR siRNA 组, “AAV-CMV-EGFR siRNA post”表示给药后的 AAV-CMV-EGFR siRNA 组。可以看出, AAV-CMV-EGFR siRNA 组的小鼠在给药后肿瘤体积显著减小, 而 PBS 组和 AAV-CMV-scrR 组的小鼠在给药后肿瘤体积不仅没有减小, 还呈现不同程度的增加。

分别通过 RT-qPCR 和 Western blotting 检测各组小鼠肺部 EGFR 蛋白和 mRNA 表达水平, 结果如图 2C、图 2D 所示。结果显示 AAV-CMV-EGFR siRNA 组的小鼠肺部 EGFR 蛋白和 mRNA 表达量相对于对照组有所降低。

以上试验说明, AAV-CMV-EGFR siRNA 对 EGFR 突变型小鼠肺癌肿瘤具有显著的治疗效果。

在第四个试验中, 设置 2 个试验组和 2 个对照组, 其中, 试验组为 AAV-CMV-KRAS siRNA 组、AAV-CMV-EGFR siRNA 组, 对照组为 PBS 组和 AAV-CMV-scrR 组。

构建 EGFR-DEL19 小鼠模型, 饲喂强力霉素饲料诱导肿瘤产生, 30 天后对构建成功的小鼠进行给药, 两天给药一次, 即每两日向 PBS 组/AAV-CMV-scrR 组/AAV-CMV-EGFR siRNA 组/AAV-CMV-KRAS siRNA 组小鼠注射一次 PBS 缓冲液/AAV-CMV-scrR/ AAV-CMV-EGFR siRNA/AAV-CMV-KRAS siRNA 进行治疗。

在治疗后分别检测各组小鼠中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、血清碱性磷酸酶 (ALP)、肌酐 (CREA)、血尿素氮 (BUN) 的含量, 结果如图 3A-图 3F 所示, 可见, PBS 组、AAV-CMV-scrR 组、AAV-CMV-EGFR siRNA 组、AAV-CMV-KRAS siRNA 组小鼠中上述酶的含量均相差无几。

以上试验可以说明, 用肝脏高亲和的 AAV-5 型腺相关病毒包裹 EGFR siRNA 系统 (AAV-CMV-EGFR siRNA) 和 KRAS siRNA 系统 (AAV-CMV-KRAS siRNA) 安全性好, 可靠性高, 不会产生负面作用, 适于大规模推广和应用。

在本文中, “上”、“下”、“前”、“后”、“左”、“右”等仅用于表示相关部分之间的相对位置关系, 而非限定这些相关部分的绝对位置。

在本文中, “第一”、“第二”等仅用于彼此的区分, 而非表示重要程度及顺序、以及互为存在的前提等。

在本文中, “相等”、“相同”等并非严格的数学和/或几何学意义上的限制, 还包含本领域技术人员可以理解的且制造或使用等允许的误差。

除非另有说明, 本文中的数值范围不仅包括其两个端点内的整个范围, 也包括含于其中的若干子范围。

上面结合附图对本申请优选的具体实施方式和实施例作了详细说明, 但是本申请并不限于上述实施方式和实施例, 在本领域技术人员所具备的知识范围内, 还可以在不脱离本申请构思的前提下做出各种变化。

13
权 利 要 求 书

1、一种用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，该系统包括病毒载体，所述病毒载体携带有能够治疗肺癌的 RNA 片段，所述病毒载体能够在宿主的器官组织中富集，并在所述宿主器官组织中内源地自发形成含有所述 RNA 的复合结构，所述复合结构能够将所述 RNA 片段送入肺部，实现肺癌的治疗。

2、如权利要求 1 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述病毒载体为腺病毒相关病毒。

3、如权利要求 2 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述腺病毒相关病毒为腺病毒相关病毒 5 型、腺病毒相关病毒 8 型或腺病毒相关病毒 9 型。

4、如权利要求 1 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述 RNA 片段包含 1 个、两个或多个具有医疗意义的具体 RNA 序列，所述 RNA 序列是具有医学意义的 siRNA、shRNA 或 miRNA。

5、如权利要求 1 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述病毒载体包括启动子序列和靶向标签，所述靶向标签能够在宿主的器官组织中形成所述复合结构的靶向结构，所述靶向结构位于复合结构的表面，所述复合结构能够通过所述靶向结构寻找并结合目标组织，将所述 RNA 片段递送进入目标组织。

6、如权利要求 5 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述病毒载体中包括以下任意一种线路或几种线路的组合：启动子-RNA 片段、启动子-靶向标签、启动子-RNA 片段-靶向标签；每一个所述病毒载体中至少包括一个 RNA 片段和一个靶向标签，所述 RNA 片段和靶向标签位于相同的线路中或位于不同的线路中。

7、如权利要求5所述的用于治疗肺癌的RNA递送系统，其特征在于，所述病毒载体还包括能够使所述线路折叠成正确结构并表达的侧翼序列、补偿序列和loop序列，所述侧翼序列包括5'侧翼序列和3'侧翼序列；

所述病毒载体中包括以下任意一种线路或几种线路的组合：5'-启动子-5'侧翼序列-RNA片段-loop序列-补偿序列-3'侧翼序列、5'-启动子-靶向标签、5'-启动子-靶向标签-5'侧翼序列-RNA片段-loop序列-补偿序列-3'侧翼序列。

8、如权利要求7所述的用于治疗肺癌的RNA递送系统，其特征在于，所述5'侧翼序列为ggatcctggaggcttgctgaaggctgtatgctgaattc或与其同源性大于80%的序列；

所述loop序列为gttttggccactgactgac或与其同源性大于80%的序列；

所述3'侧翼序列为accggtcaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggcccagatctggccgcactcgag或与其同源性大于80%的序列；

所述补偿序列为所述RNA片段的反向互补序列，并删除其中任意1-5位碱基。

9、如权利要求6所述的用于治疗肺癌的RNA递送系统，其特征在于，在病毒载体中存在至少两种线路的情况下，相邻的线路之间通过序列1-3组成的序列相连；

其中，序列1为CAGATC，序列2是由5-80个碱基组成的序列，序列3为TGGATC。

10、如权利要求9所述的用于治疗肺癌的RNA递送系统，其特征在于，在病毒载体中存在至少两种线路的情况下，相邻的线路之间通过序列4或与序列4同源性大于80%的序列相连；

其中，序列 4 为 CAGATCTGGCCGCACTCGAGGTAGTGAGTCGACCA GT GGATC。

11、如权利要求 1 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述器官组织为肝脏，所述复合结构为外泌体。

12、如权利要求 11 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述靶向标签选自具有靶向功能的靶向肽或靶向蛋白。

13、如权利要求 12 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述靶向肽包括 RVG 靶向肽、GE11 靶向肽、PTP 靶向肽、TCP-1 靶向肽、MSP 靶向肽；

所述靶向蛋白包括 RVG-LAMP2B 融合蛋白、GE11-LAMP2B 融合蛋白、PTP-LAMP2B 融合蛋白、TCP-1-LAMP2B 融合蛋白、MSP-LAMP2B 融合蛋白。

14、如权利要求 13 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述靶向标签为 GE11 靶向肽或 GE11-LAMP2B 融合蛋白。

15、如权利要求 5 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述 RNA 序列的长度为 15-25 个核苷酸。

16、如权利要求 15 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，所述能够治疗肺癌的 RNA 序列选自以下 RNA 中的任意一种或几种：EGFR 基因的 siRNA、KRAS 基因的 siRNA 或编码上述 RNA 的核酸分子。

17、如权利要求 16 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，其特征在于，EGFR 基因的 siRNA 包括 UGUUGCUUCUCUUA AUUCCU、AAAUGAUCUUCAAAAGUGCCC、UCUUUAAGAAGGAAAGAUCAU、AAUAUUCGUAGCAUUUAUGGA、UAAAAAUCCUCACAUAUACUU、其他具有抑制 EGFR 基

因表达的序列以及与上述序列同源性大于 80% 的序列；

KRAS 基因的 siRNA 包括 UGAUUUAGUAUUAUUUAUGGC、AAUUUGUUCUCUAUAAUGGUG、UAAUUUGUUCUCUAUAAUGGU、UUAUGUUUU CGAAUUUCUCGA、UGUAUUUACAUAUUACACAC、其他具有抑制 KRAS 基因表达的序列以及与上述序列同源性大于 80% 的序列。

18、如权利要求 1 所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统，所述递送系统为用于包括人在内的哺乳动物中的递送系统。

19、一种权利要求 1-18 任意一项所述的用于治疗肺癌的 RNA 递送系统在药物中的应用。

20、如权利要求 19 所述的应用，其特征在于，所述药物的给药方式包括口服、吸入、皮下注射、肌肉注射、静脉注射。

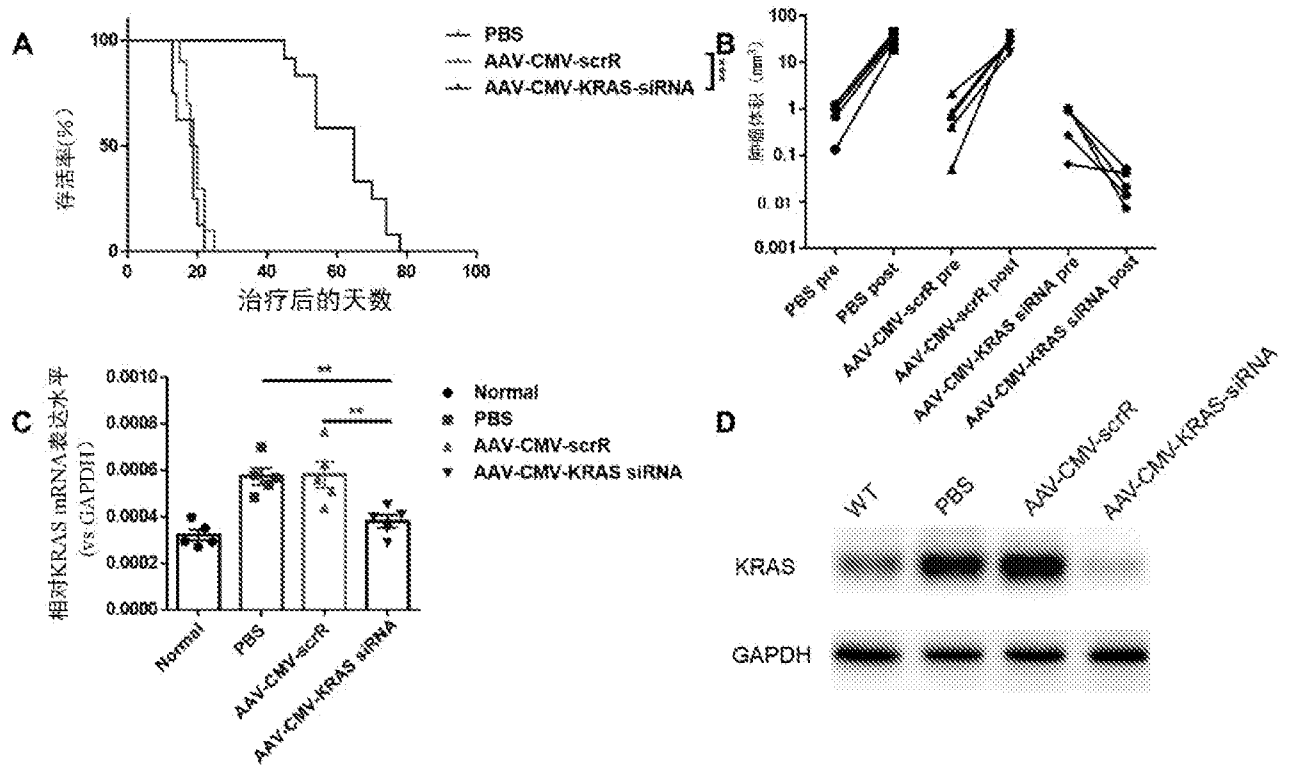


图 1

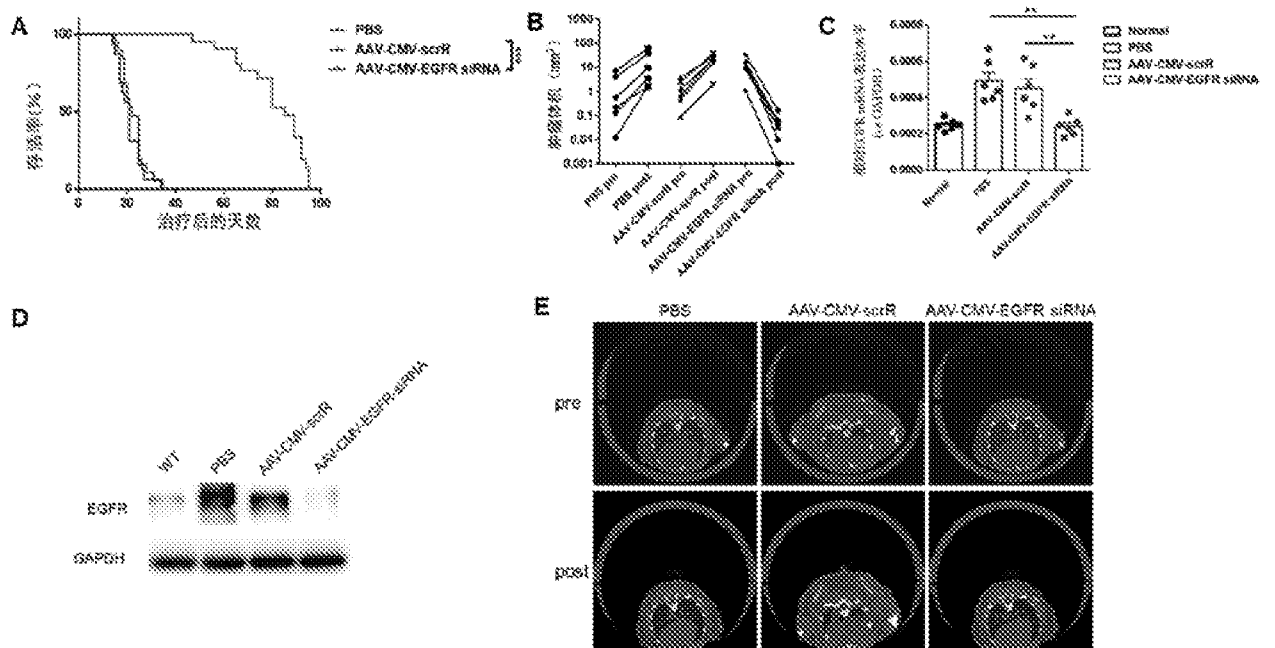


图 2

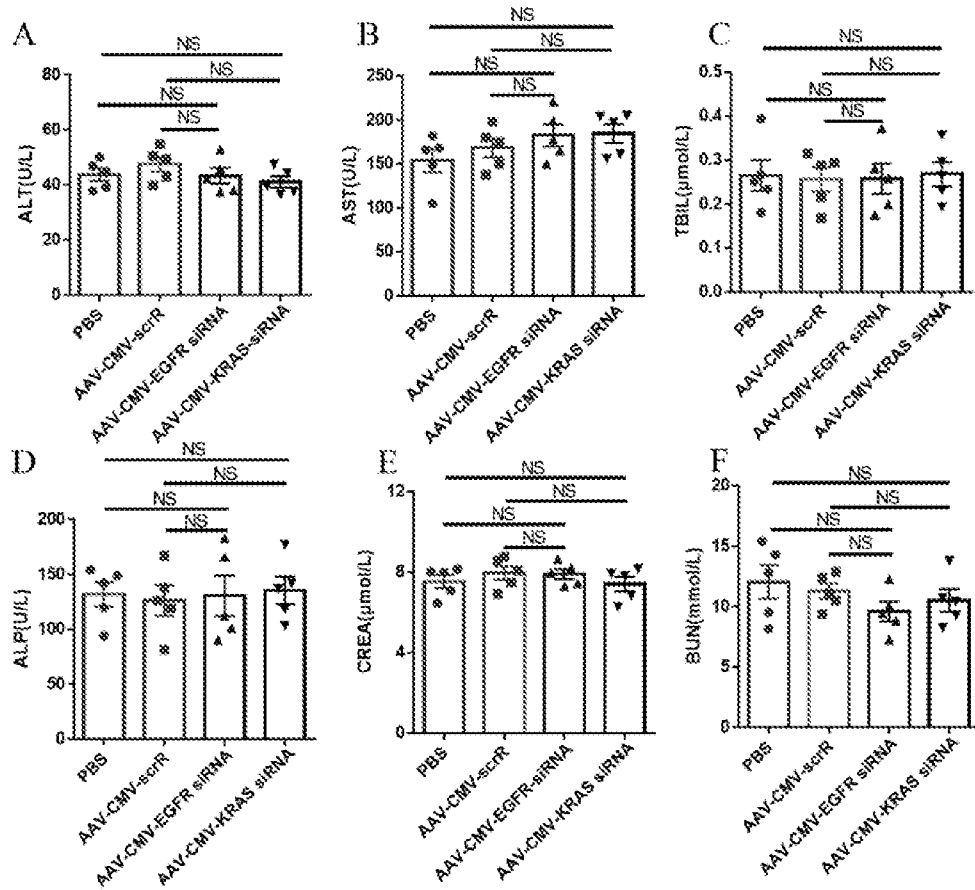


图 3

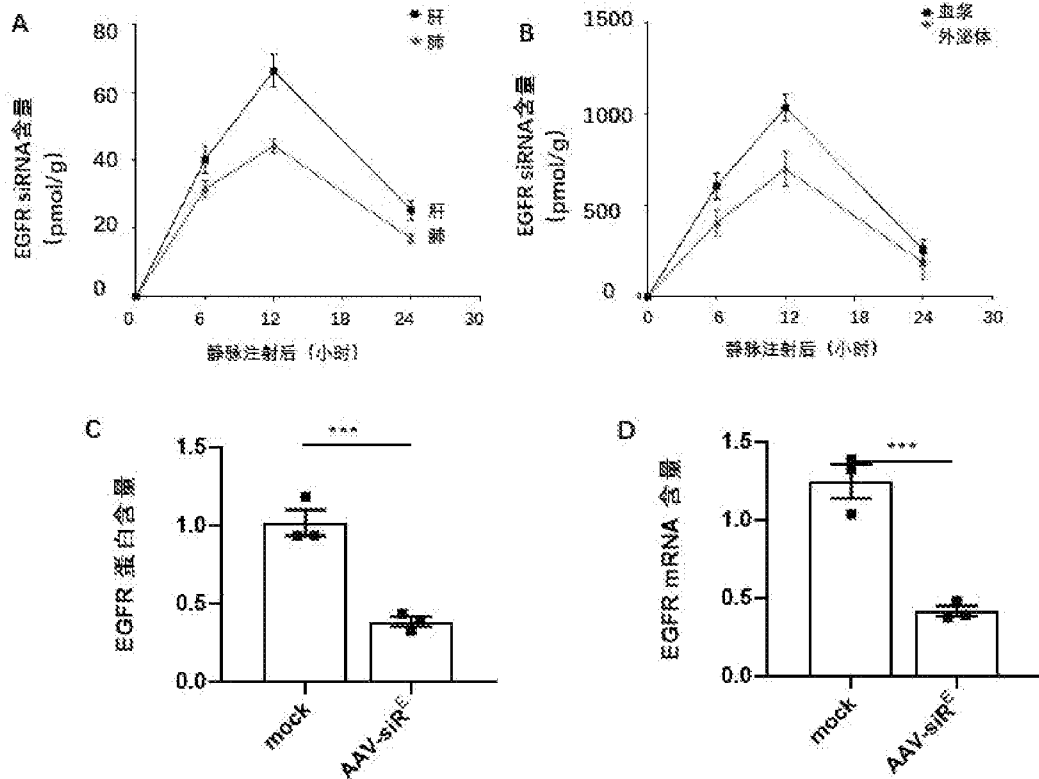


图 4

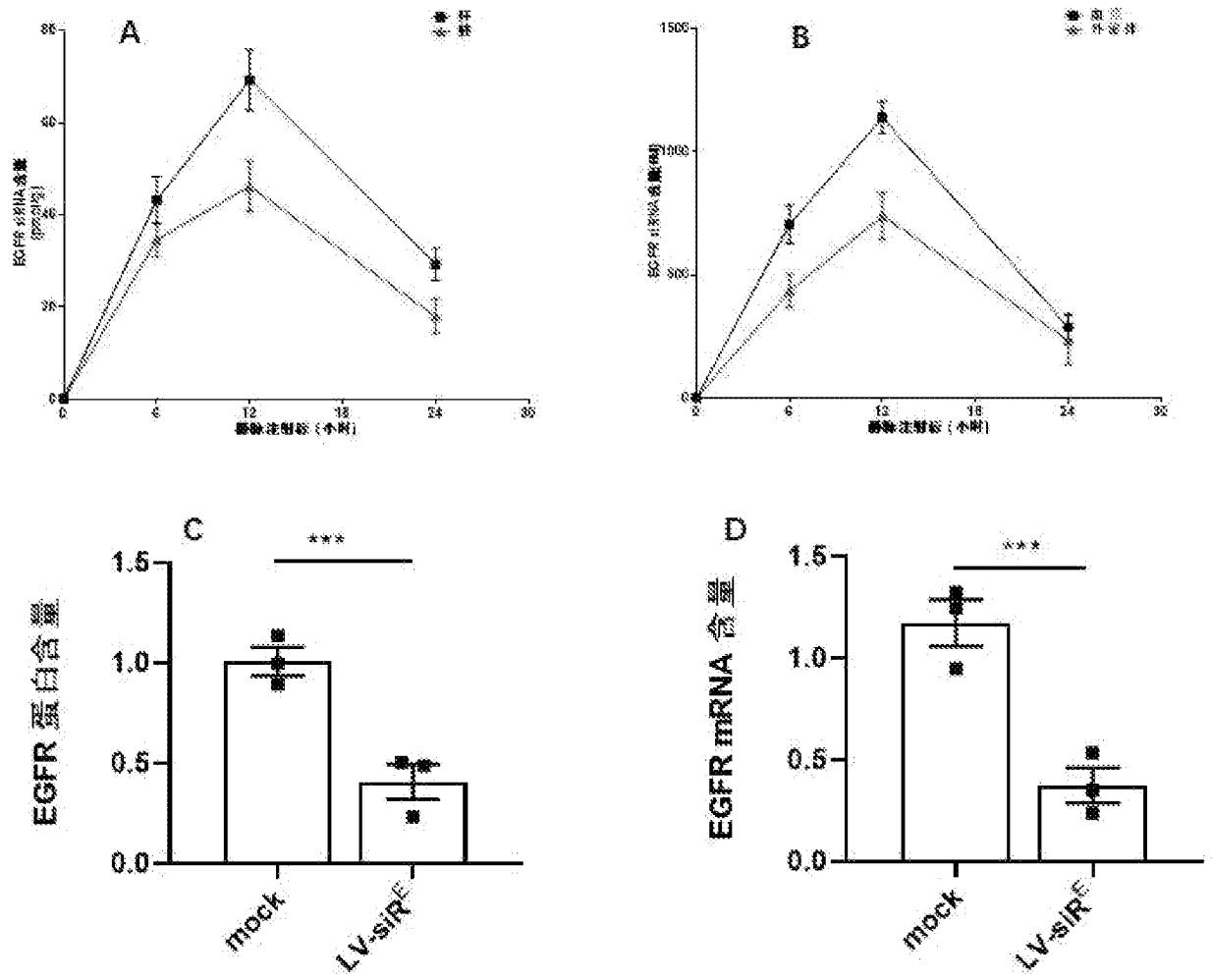


图 5

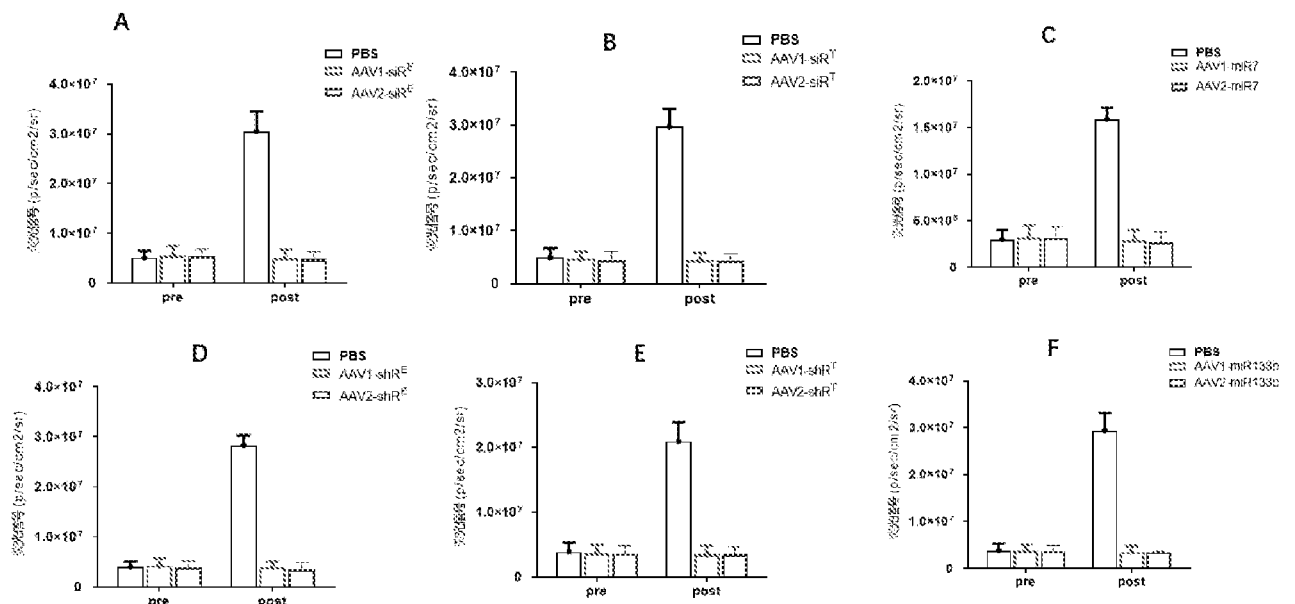


图 6

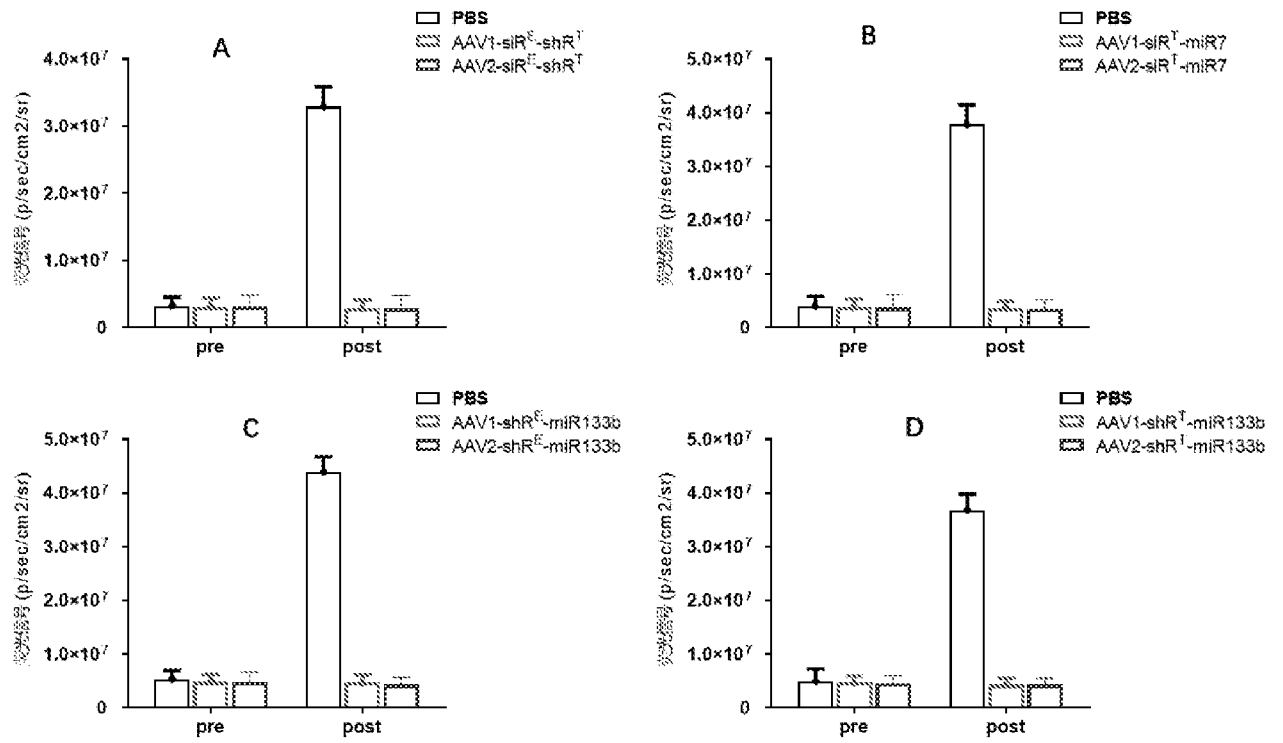


图 7

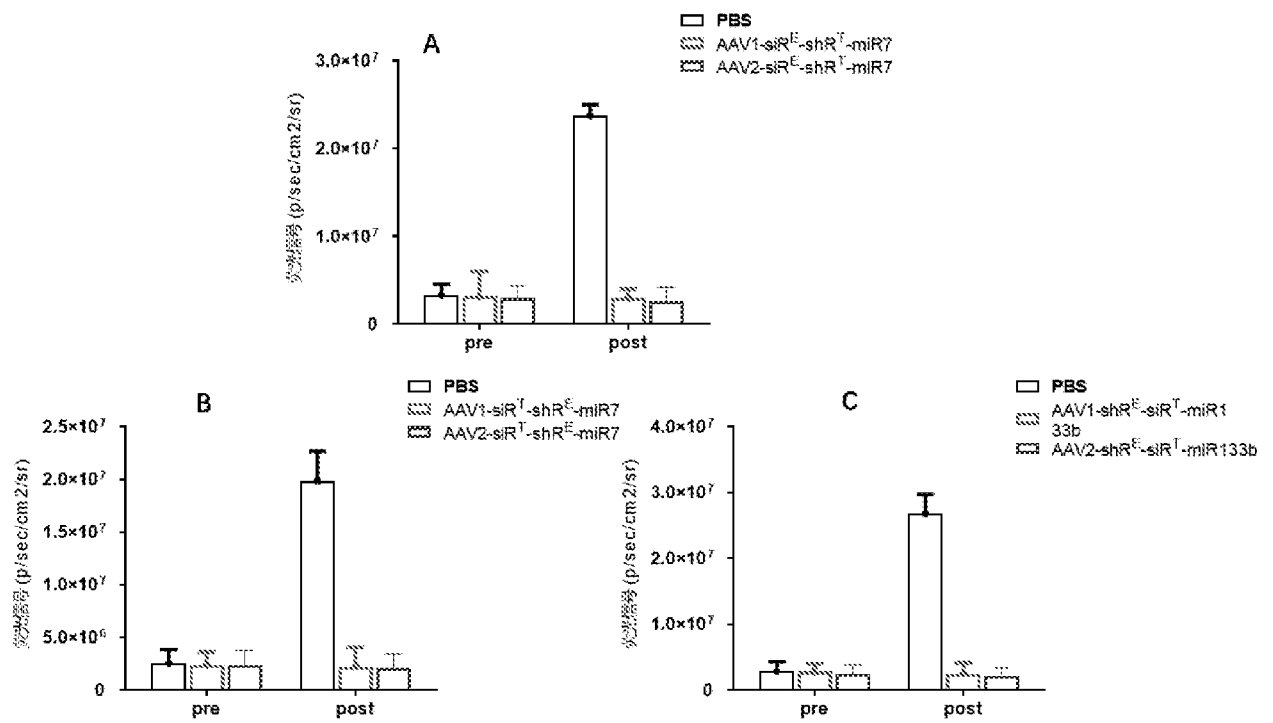


图 8

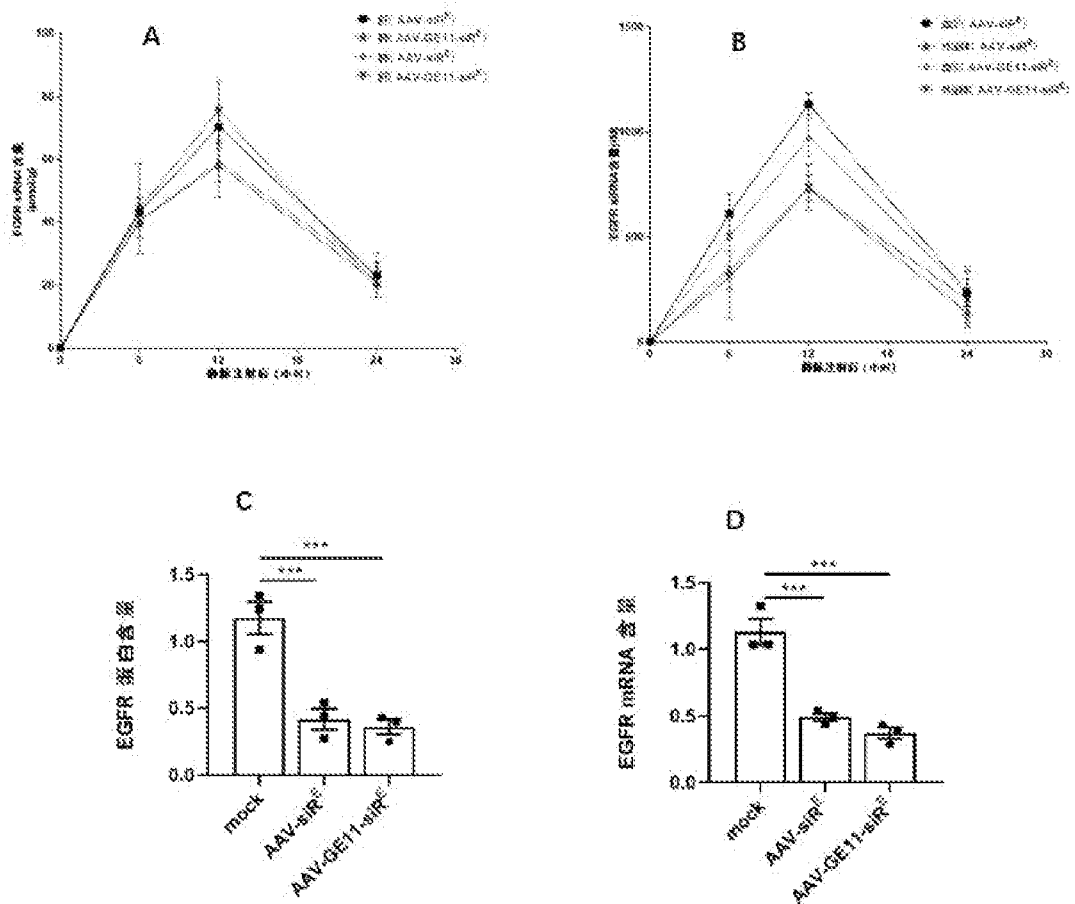


图 9

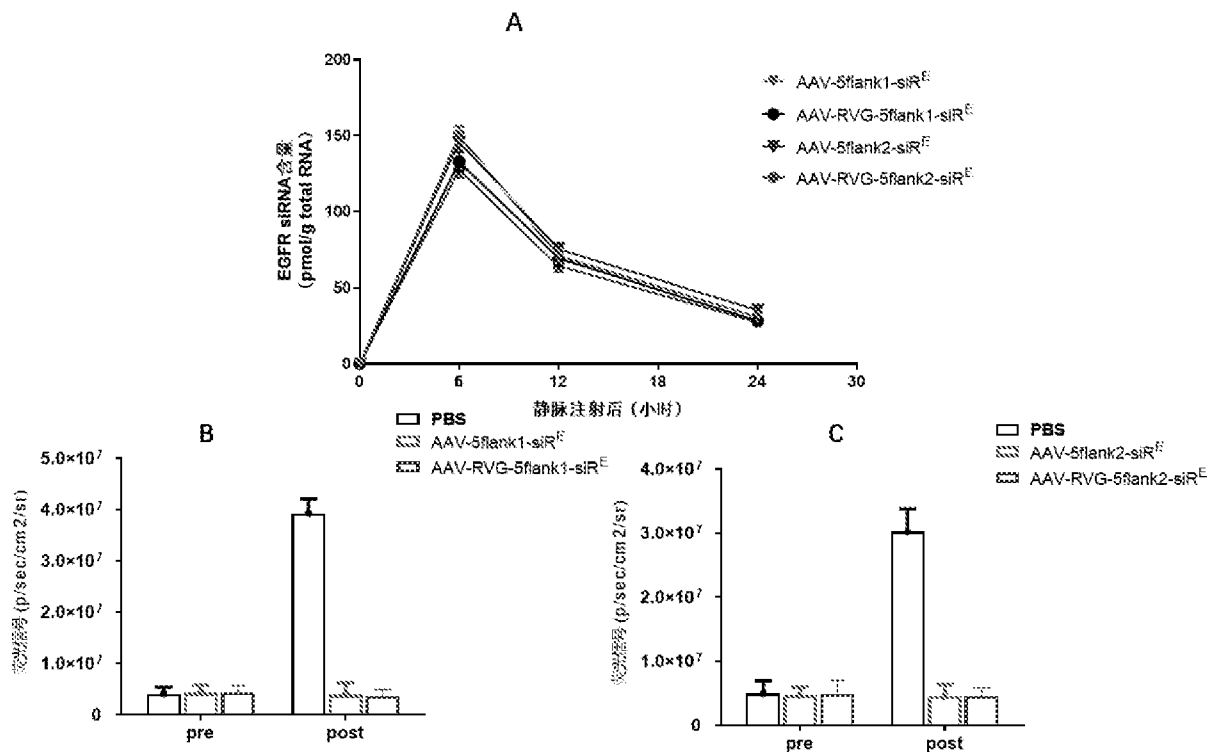


图 10

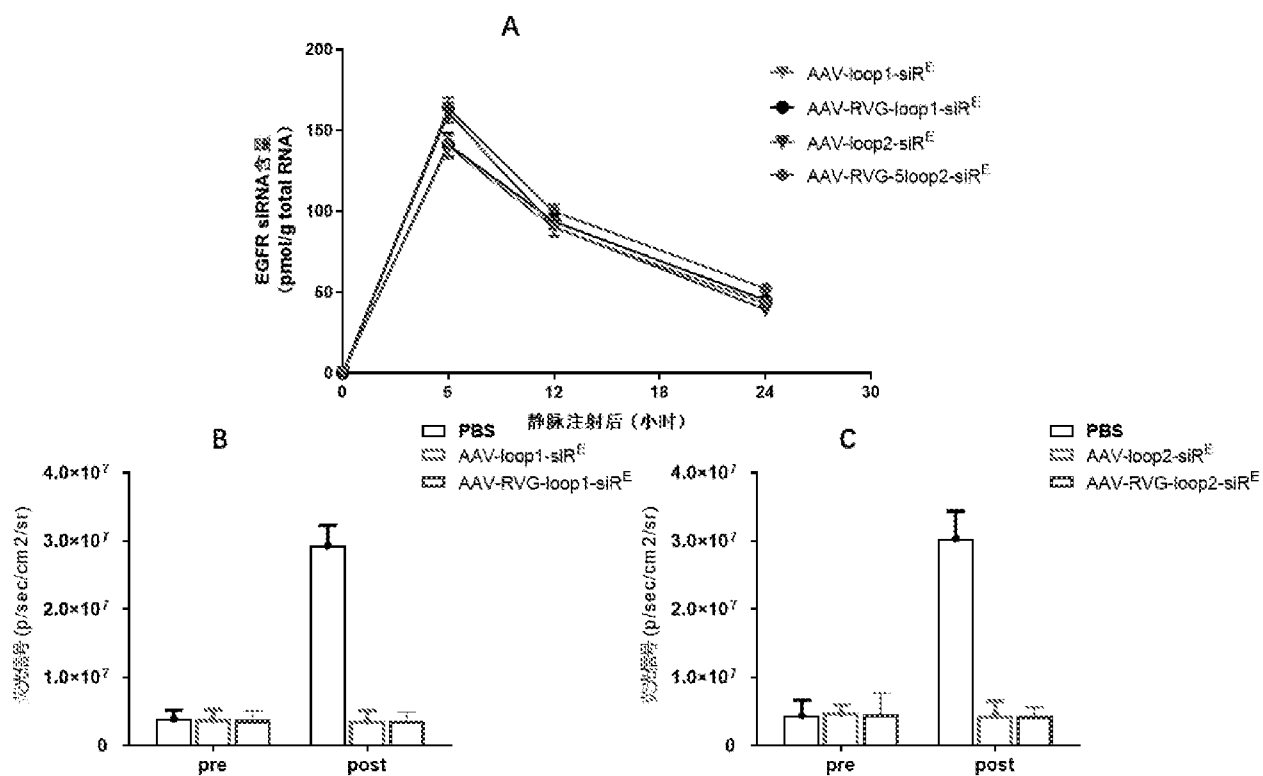


图 11

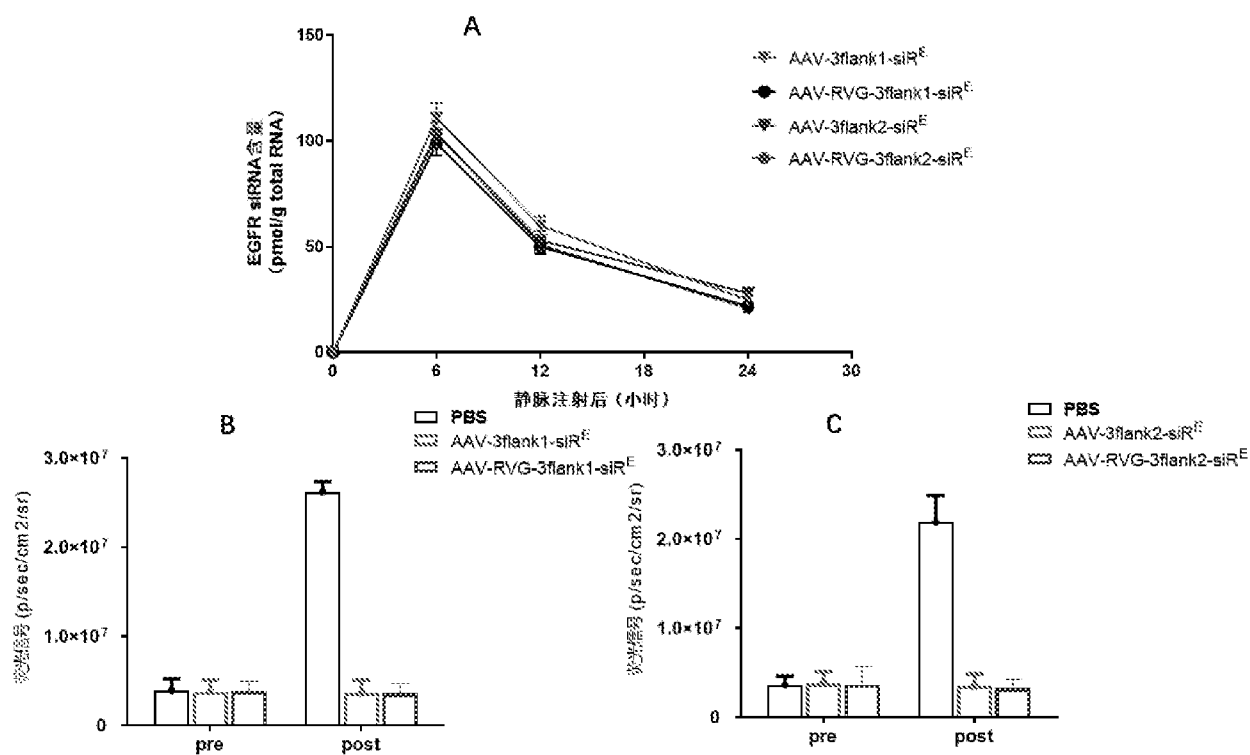


图 12

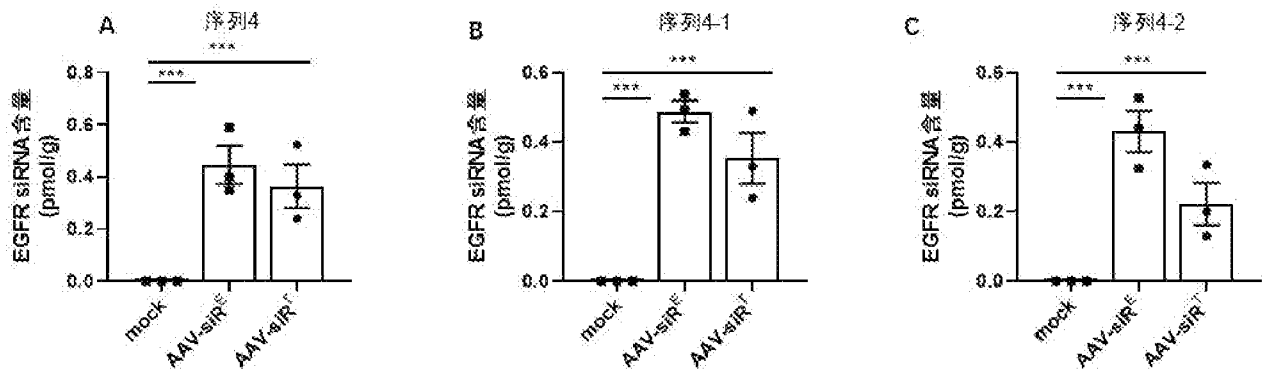


图 13

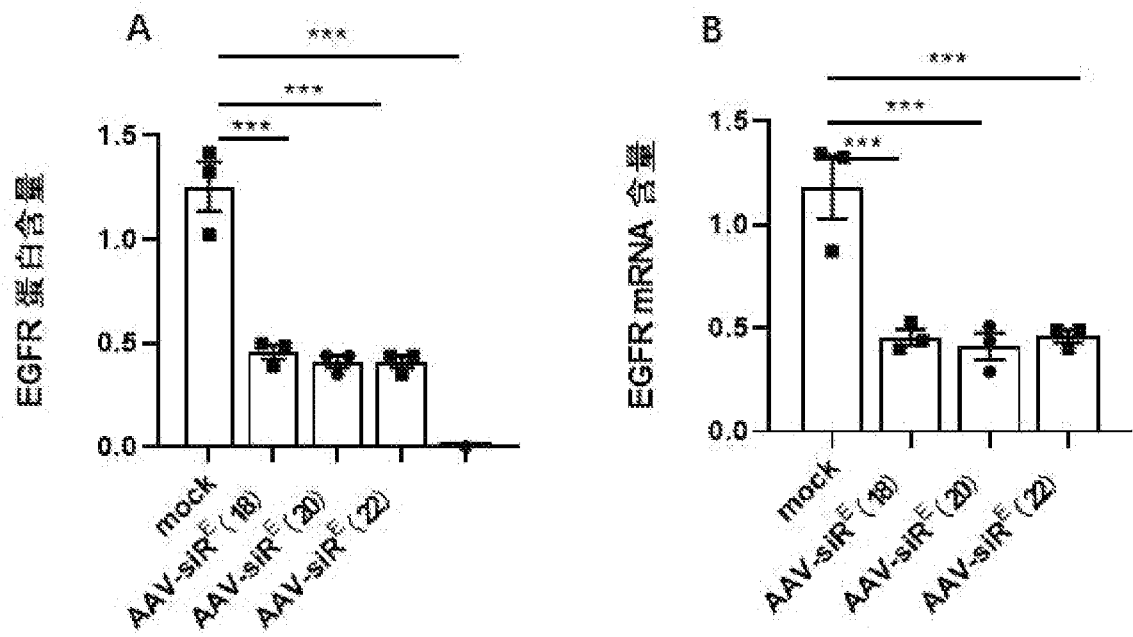


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/083951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61P

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

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

CNTEXT, ENTXT, ENTXTC, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方数据资源系统, WANFANG DATA RESOURCE SYSTEM, PubMed, ISI Web of Knowledge, 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 申请人/发明人, 肺癌, lung cancer, 腺相关病毒, AAV, siRNA, shRNA, 自组装, self-assembly, 外泌体, exosome, 肝, liver, 启动子, promoter, 靶向, target, RVG, GE11, LAMP2B, 5'UTR, 3'UTR, loop, EGFR, KRAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112980840 A (NANJING UNIVERSITY) 18 June 2021 (2021-06-18) claims 1-10, and description paragraphs 0042-0043	1-20
PX	ZHOU, X. Y. et al. "In vivo self-assembled siRNA: a new modality for combination therapy of ulcerative colitis" <i>Research Square</i> , 13 August 2021 (2021-08-13), pp. 1-13	1-20
Y	FU, Z. et al. "In vivo self-assembled small RNAs as a new generation of RNAi therapeutics" <i>Cell Research</i> , Vol. 31, 29 March 2021 (2021-03-29), pp. 631-648	1-20
Y	WANG, Danyang et al. "Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery" <i>Nature Reviews Drug Discovery</i> , Vol. 18, No. 5, 01 February 2019 (2019-02-01), pp. 358-378	1-20
A	WO 2012091136 A1 (TOKYO MEDICAL UNIVERSITY) 05 July 2012 (2012-07-05) entire document	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 June 2022

Date of mailing of the international search report

29 June 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/083951

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	张盈盈等 (ZHANG, Yingying et al.). "外泌体作为药物递送载体的研究进展 (Advances in Research on Exosomes as Drug Delivery Vehicles)" <i>药学报 (Acta Pharmaceutica Sinica)</i> , Vol. 54, No. 6, 31 December 2019 (2019-12-31), pp. 1010-1016	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/083951**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☒ Claims Nos.: **19-20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 19-20 relate to an application of an RNA delivery system for treating lung cancer in a drug, which is substantially a disease treatment method, and said claims do not comply with PCT Rule 39.1(iv); the present report is formed on the basis that claims 19-20 are amended to relate to a use of the RNA delivery system for treating lung cancer according to claims 1-18 in the preparation of a drug.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/083951

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	112980840	A	18 June 2021	None	
WO	2012091136	A1	05 July 2012	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/083951

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNTXT, ENTXT, ENTXTC, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方数据资源系统, PubMed, ISI Web of Knowledge, 百度学术; 申请人/发明人, 肺癌, lung cancer, 腺相关病毒, AAV, siRNA, shRNA, 自组装, self-assembly, 外泌体, exosome, 肝, liver, 启动子, promoter, 靶向, target, RVG, GE11, LAMP2B, 5' UTR, 3' UTR, loop, EGFR, KRAS

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 112980840 A (南京大学) 2021年6月18日 (2021 - 06 - 18) 权利要求1-10, 说明书第0042-0043段	1-20
PX	ZHOU, X.Y. 等. "In vivo self-assembled siRNA: a new modality for combination therapy of ulcerative colitis" Research Square, 2021年8月13日 (2021 - 08 - 13), 第1-13页	1-20
Y	FU, Z. 等. "In vivo self-assembled small RNAs as a new generation of RNAi therapeutics" Cell Research, 第31卷, 2021年3月29日 (2021 - 03 - 29), 第631-648页	1-20
Y	WANG, D. 等. "Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery" Nature Reviews Drug Discovery, 第18卷, 第5期, 2019年2月1日 (2019 - 02 - 01), 第358-378页	1-20
A	W0 2012091136 A1 (TOKYO MEDICAL UNIVERSITY) 2012年7月5日 (2012 - 07 - 05) 全文	1-20

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年6月8日

国际检索报告邮寄日期

2022年6月29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

杨佳倩

电话号码 86-(10)-53961939

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	张盈盈等. “外泌体作为药物递送载体的研究进展” 药学报, 第54卷, 第6期, 2019年12月31日 (2019 - 12 - 31), 第1010-1016页	1-20

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 19-20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求19-20涉及一种用于治疗肺癌的RNA递送系统在药物中的应用，实质上是一种疾病的治疗方法，不符合PCT第39.1(iv)的规定，本报告基于权利要求19-20修改为如权利要求1-18所述的用于治疗肺癌的RNA递送系统在制备药物中的用途而作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/083951

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	112980840	A	2021年6月18日	无	
WO	2012091136	A1	2012年7月5日	无	