(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110352069 A
(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201780081248.7

(22)申请日 2017.08.08

(30)优先权数据
1660439 2016.10.27 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2017/052214 2017.08.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/078225 FR 2018.05.03

(71)申请人 瑟莱塞尔
地址 法国图卢兹

(72)发明人 佛罗伦萨·卡布恩
希拉里·布鲁科斯 莫德·许斯奥
斯蒂芬妮·德尔马斯

(74)专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理事务所(普通合伙) 11017
代理人 韩登营

(51)Int.Cl.
A61K 38/18(2006.01)
A61K 38/189(2006.01)
A61K 38/39(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61M 5/00(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书45页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

siRNA在癌症治疗中的用途

(57)摘要

本发明涉及一种至少包括一种siRNA的组合物,所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交以诱导所述mRNA降解或抑制所述mRNA的翻译,所述mRNA或其编码蛋白的表达参与疾病,所述组合物用于预防和/或治疗所述疾病,所述组合物被配制用于连续的全身给药模式,本发明还涉及包含这样给药模式的装置。

CN 110352069 A

1.一种至少包括一种siRNA的组合物,所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交以诱导所述mRNA降解或抑制所述mRNA的翻译,所述mRNA或其编码的蛋白的表达参与疾病,所述组合物用于预防和/或治疗所述疾病,所述组合物被配制用于连续的全身给药模式。

2.根据权利要求1所述的组合物,所述组合物配制成用于连续全身给药模式,其中所述至少一种siRNA在酸性pH的缓冲溶液中,尤其是在柠檬酸盐或组氨酸缓冲液中。

3.根据权利要求2所述的组合物,其中所述至少一种siRNA在添加有无机或有机盐的酸性pH的缓冲溶液中,所述盐的阳离子特别选自多胺,特别是选自精胺,亚精胺或腐胺,或所述盐特别是选自金属阳离子的盐,特别是选自锌,钴,铜,锰,钙,镁或铁的盐,特别是锰,锌,镁的单独的或两种组合或三种组合的盐。

4.根据权利要求1至3任一项所述的组合物,其中所述组合物包含或不包含有定位剂,优选地包含有不与siRNA共价连接的定位剂。

5.根据权利要求4所述的组合物,所述定位剂是CD36受体配体,所述CD36受体配体优选为氧化LDL,海沙瑞林,长链脂肪酸或其两种或三种的混合物,所述氧化LDL与siRNA的重量比为10.01至10:1,优选0.1至1:1,或所述海沙瑞林与siRNA的重量比为0.01至10:1,优选0.1至1:1。

6.根据权利要求1至5任一项所述的组合物,其中所述至少一种siRNA在包含有载体化试剂的溶液中。

7.根据权利要求1至5任一项所述的组合物,其中所述siRNA在不包含有载体化试剂的溶液中。

8.一种提供根据前述任一项权利要求所述的组合物的全身连续给药机构的装置,所述全身连续给药机构尤其是用于缓慢和连续释放siRNA以使其在体内全身分布的渗透泵,注射泵,弹性泵,蠕动泵,“智能”泵,“贴片”泵,或聚合物基质或水凝胶,或任何其它可生物降解的化合物。

9.根据前述任一项权利要求所述的组合物,其中所述疾病与编码雄激素受体的mRNA,血小板反应蛋白-1(TSP1),FoxP3转录因子或血管内皮生长因子A(VEGF)的表达相关。

10.根据前述任一项权利要求所述的组合物,其中所述至少一种siRNA是以下siRNA的一种:来自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:52的siAR-1,siAR-1b,siAR-2,siAR-2b,siAR-3,siRNA3b,siAR-4,siAR4b,siAR-5,siAR-5b,siVEGF-1,siVEGF-1b,siTSP1-1,siTSP1-1b,siTSP1-2,siTSP1-2b,siTSP1-3,siTSP1-3b,siTSP1-4,siTSP1-4b,siTSP1-5,siTSP1-5b,siFoxP3-1,siFoxP3-1b,siFoxP3-2,siFoxP3-2b。

11.根据前述任一项权利要求所述的组合物,其中所述siRNA是以下siRNA的一种:SEQ ID NO:45至SEQ ID NO:52的siFoxP3-1,siFoxP3-1b,siFoxP3-2或siFoxP3-2b,所述siRNA用作药物或与药学上可接受的载体联合以用于预防和/或治疗与FoxP3转录因子的表达相关的疾病。

12.根据前述任一项权利要求所述的组合物,其中所述siRNA是SEQ ID No:1和2的siAR-1,用于作为药物或用于预防和/或治疗与雄激素受体表达相关的疾病,特别是用于与药学上可接受的载体联合一起预防和/或治疗前列腺癌。

13.根据前述任一项权利要求所述的组合物,其中至少一种的所述siRNA缺乏化学修饰或具有化学修饰。

14.根据前述任一项权利要求所述的组合物，其中所述siRNA与至少一种抗血管生成剂或抗肿瘤剂或免疫治疗剂或与这些不同类别的药剂组合使用。

15.如前述任一项权利要求所述的组合物，其中所述全身给药模式选自由下列模式组成的组或由下列模式组成：皮下，腹膜内，静脉内，动脉内，心内，肌肉内，皮内，鼻内，阴道内，直肠内，舌下，口腔，鞘内，脊柱内，硬膜外，呼吸道，皮肤，透皮，透粘膜。

16.根据前述任一项权利要求中所述的组合物，其中所述组合物被配制为以治疗有效剂量来用于给药模式，特别是以0.005mg/kg/天至30mg/kg/天的剂量给药，尤其是以0.01mg/kg/天至10mg/kg/天的剂量给药，更特别是以0.01mg/kg/天至2mg/kg/天的剂量给药。

17.根据前述任一项权利要求中所述的组合物，其中所述疾病是原发性肿瘤，转移性肿瘤或与抑制性或免疫抑制性细胞的存在相关的疾病，尤其是肛门癌，阑尾癌，口腔癌，支气管和/或上呼吸道癌，胆管癌，鼻腔和鼻窦癌，脑癌，心脏癌，宫颈癌，结肠癌，胃癌，肝癌，唾液腺癌，喉癌，舌癌，唇癌，鼻咽癌，食道癌，骨癌，卵巢癌，胰腺癌，甲状旁腺癌，阴茎癌，胸膜癌，肺癌，前列腺癌，直肠癌，肾癌，乳腺癌，肾上腺癌，睾丸癌，头颈部癌，胸腺癌，甲状腺癌，尿道癌，阴道癌，胆囊癌，膀胱癌，外阴癌，胃肠癌，淋巴瘤，黑色素瘤或癌症非黑色素瘤皮肤，骨髓瘤，肉瘤，白血病，间皮瘤，胆管癌，骨肉瘤，胶质母细胞瘤，星形细胞瘤，少突神经胶质瘤，软骨肉瘤，脂质肉瘤，横纹肌肉瘤或嗜铬细胞瘤，或在其它器官中发展的任何这些原发性肿瘤的转移。

siRNA在癌症治疗中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种双链寡核苷酸的新用途,尤其是涉及一种根据新制剂和新给药模式的用途。

背景技术

[0002] 由于在1998年发现了RNA的干扰机制,在开发该工具以用于人类疾病的治疗潜力上已经做出相当大的努力。微小RNA(miRNA)是由所有真核生物的基因组编码的小RNA。转录和成熟后,它们被加载到蛋白复合物中:RNA诱导沉默复合物(RISC)。当它们与信使RNA(mRNA)杂交或它们诱导其切割时,导致mRNA的降解,或者它们抑制mRNA翻译成蛋白。干扰RNA或小干扰RNA(siRNA)是合成的双链寡核糖核苷酸,当被引入细胞时其模拟miRNA的作用并触发RNA干扰机制。因此,它们的作用机制不能与任何其它类型的寡核苷酸相比。

[0003] 以下“双链寡核苷酸”更具体地指siRNA。更确切地说,当双链寡核苷酸是siRNA时,将其加载到RISC复合物中。两条链中的被称为“过客(passenger)”的一条链被切割并降解,而另一条被称为“引导(guide)”的链保留在RISC复合体中。该引导链与mRNA的互补区域杂交。该mRNA被称为“siRNA靶mRNA”,并且通过扩展,转录而产生该RNA的基因被称为“siRNA靶基因”。该靶mRNA可以是编码的或非编码的。siRNA切割与其杂交并导致其降解的靶mRNA,或者阻止其翻译。这将导致靶mRNA的量减少,和/或mRNA编码的蛋白的量减少(如果该mRNA是编码mRNA)。siRNA的这些作用在以下描述中共同命名为“基因表达的抑制作用”。

[0004] 为了能够将siRNA用于特别是在人类中的治疗目的,必须克服的主要障碍是获得siRNA穿透目标组织,并使siRNA在所述组织中以足够的浓度和活性的状态保持足够长的状态以产生所需的基因表达的抑制。siRNA的给药方法还应该是临床上可接受的,无毒的并且不引发不良免疫应答。无论siRNA靶mRNA及其表达水平如何,该方法必须可用于递送任何类型的siRNA。

[0005] 过去已经开发了用于向体内递送诸如反义寡脱氧核苷酸(ODN),核酶,适体,吗啉反义寡核苷酸,三螺旋寡核苷酸的其它类型的寡核苷酸的方法。这些寡核苷酸中的一些通过受体介导的内吞作用机制而进入细胞(Vlassov等,1994),但siRNA的这种机制尚未得到证实。因此,已开发的用于RNA或DNA单链寡核苷酸的给药方法,特别是在不存在载体化试剂的情况下的给药方法,不能转用于siRNA,为此必须的开发其它给药方法(Tatiparti等,2017)。

[0006] 大多数治疗用途要求在体内全身给药siRNA。在下文中,全身是指siRNA在体内被传递以在距其给药的位置相距一段距离起作用,这与局部或局部区域给药相反,特别是与肿瘤内给药相反。该siRNA在体内的全身分布是由任何导致在诸如血液,淋巴或脑脊液的细胞外液体中的siRNA的传递的方法而获得的,即含有siRNA的化合物由摄取(口服)、或注射(肠胃外)或通过皮肤或粘膜摄取。

[0007] 通常地,核酸特别是siRNA是带负电荷的。当它们位于细胞外时,这些负电荷限制它们穿透细胞。为此原因,已经开发了许多例如电穿孔,脂质体,纳米颗粒,不同种类的聚合

物的方法,以使siRNA穿透到培养的细胞中。然而,这些工具不适用于siRNA在活体生物中的全身给药。siRNA的负电荷促进了它们与阳离子分子如脂质或聚合物组合物的结合。为了在活生物体中使用siRNA,siRNA要化学缀合或掺入不同的载体化试剂中。下面的“载体化试剂”是指旨在将生物体液中的寡核苷酸从给药点传递到靶组织,并通过将寡核苷酸穿透到细胞内部或通过与细胞的质膜融合并在其中释放寡核苷酸来使得寡核苷酸进入细胞体内。

[0008] 这些载体化试剂一方面是含有大分子的化合物,所述大分子与寡核苷酸形成复合物并具有大于20nm的粒子形式,另一方面是化学缀合物,该缀合物通过共价键将siRNA的一个和/或另外一个链与旨在使该siRNA进入细胞的化合物(诸如胆固醇或穿透肽)结合。“穿透肽”是能够自发穿透到细胞内并且当它们与分子缀合并导致其杂交时保持这种性质的肽。因此,载体化实际可用由不同种类的大分子组成,所述大分子例如是胶束脂质,胆固醇,脂质体,聚合物,复合物,壳聚糖,量子点,穿透肽,树枝状聚合物,聚乙烯亚胺衍生物,纳米粒子,磁性或超磁性球体,或无机或有机纳米结构。

[0009] 科学和医学界最普遍的共识是非载体化的siRNA是无效的,它们必须被稳定化并被载体化以具有活性(Scomparin等,2015)。因此已经开发了大量用于siRNA的载体化试剂。有几种用于人类的治疗试验,具有不同的适应症。这些载体化工具的实施通常是复杂的,需要连续步骤和良好控制的过程和/或需要寡核苷酸与另一组分进行共价连接。由于它们的化学或结构性质,或者由于它们与寡核苷酸的结合,几种类型的载体化试剂已经显示出在动物或人类中表现出毒性作用或引发不希望的免疫应答(Robbins等,2009),而非载体化siRNA则不是这种情况(Heidel等,2004)。

[0010] 此外,这些载体化试剂通常优先将siRNA分布在某些器官中,特别是分布肝脏中,这限制了它们在其它器官中的治疗用途。因此,不需要添加载体化试剂的给药方法是有利的。

[0011] 因此已经提出了用非载体化siRNA进行全身给药并抑制基因在组织或肿瘤中的表达的各种方法。第一种被称为流体动力学的方法是在几秒钟内静脉内注射大量含有siRNA的生理盐水溶液:在小鼠中注射了相当于其血液体积的一半以上的1.8mL的生理盐水溶液(McCaffrey等,2002)。该方法不适用于人类和大型动物。

[0012] 其它作者在小鼠中腹膜内使用非载体siRNA。该方法可有效抑制siRNA靶标表达,并抑制小鼠异种移植肿瘤的生长。这在文献中有说明(Delloye-Bourgeois等,2009,Pannequin等,2007)。在腹膜内注射针对雄激素受体(siAR-1)(Compagno等,2007)或针对血小板反应蛋白-1(siTSP1-1)(Firlej等,2011)的siRNA有效抑制了小鼠异种移植前列腺肿瘤的生长。

[0013] 腹膜内途径在动物中是有效的,但是其在人体中特别是如果必须重复使用时则是复杂的,特别是因为该方法需要手术安装导管而会导致感染风险以及其用途通常限于治疗腹膜或腹膜内器官如卵巢中发生的病变。即使在这些治疗适应症中,这种给药途径也存在限制其使用和有效性的重大障碍,因此有必要提供替代解决方案(Zeimet等,2009)。

[0014] 还测试了非载体siRNA的静脉内给药。然而,与其它寡核苷酸一样,静脉内注射的siRNA通过肾过滤而被消除(Van de Water等,2006)。

发明内容

[0015] 因此,目前没有与人临床应用相容的、无载体化试剂的siRNA给药模式,使得有可能将siRNA有效地定位在许多靶器官中,特别是在前列腺中和/或在肿瘤和/或肿瘤转移中以预防和/或治疗疾病。确实需要提供这样的手段。因此,本发明的目的之一是提供一种给药模式,其能够有效地将siRNA分布到多个靶器官中,尤其是分布到前列腺,和/或肿瘤和/或这些肿瘤的转移中,以预防和/或治疗直接或间接由基因表达产生的疾病,所述siRNA靶向从该基因转录的mRNA。

[0016] 已经描述了用于将寡核苷酸靶向身体的特定细胞的溶液。在下文中,定位分子是将寡核苷酸定位到诸如内皮细胞或癌细胞的特定类型细胞的分子。定位分子(addressing molecule)不是为了使寡核苷酸穿透到细胞内或用寡核苷酸穿透细胞,而是为了增加寡核苷酸在目标细胞的外膜的浓度。定位分子的非限制性例子可以是适体,抗体,转铁蛋白,RGD肽,受体的配体,该定位分子与在靶细胞表面表达的分子相互作用或结合,所述表达的分子例如是受体、整联蛋白、诸如PSMA(前列腺特异性膜抗原)的膜抗原。

[0017] 靶向分子通常共价连接于寡核苷酸,或掺入到载体化试剂,例如纳米颗粒或含有寡核苷酸的脂质体,以便将载体化试剂定位于细胞或靶组织。没有能够简单实施的描述siRNA与化合物的混合物的解决方案,特别是没有共价连接或没有掺入载体化试剂以使得siRNA可以针对特定细胞类型而定位。

[0018] CD36受体是在血管和淋巴管内皮细胞的膜上表达的膜受体,并且由许多类型的细胞表达,特别是由例如白血病细胞的肿瘤细胞表达。CD36受体结合不同性质的分子。特别是尤其是C16或C18脂肪酸的长链脂肪酸受体,低密度氧化的脂蛋白受体,或氧化的LDL(低密度脂蛋白)受体,氧化的磷脂受体,血小板反应蛋白受体,多肽海沙瑞林的受体,原纤维淀粉样蛋白受体。

[0019] siRNA的基因表达的抑制作用是短暂的:当siRNA进入细胞时,它仅在短时间内抑制其靶基因的表达,这是因为细胞经常分裂,这对于大多数癌细胞尤其如此。然后从该靶基因转录的mRNA和/或由该mRNA编码的蛋白的量又得到恢复,产生“峰-谷”(peaks and valleys)效应(Bartlett和Davis,2006)。

[0020] siRNA的有效性取决于其在靶组织细胞中的浓度及其在该组织中的停留时间。该浓度本身取决于siRNA的给药剂量,后者在细胞外介质中的稳定性,siRNA穿透靶组织细胞的能力,这种穿透的动力学以及其消除的动力学。本发明的目的之一是提供siRNA的全身给药方法,特别是制剂,其增加血清和/或组织中siRNA的浓度和/或延长其作用的持续时间,避免峰-谷效应。

[0021] 本发明因此涉及一种至少包括一种siRNA的组合物,所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交以诱导所述mRNA降解或抑制所述mRNA的翻译,所述mRNA或其蛋白的表达参与疾病,所述组合物用于预防和/或治疗所述疾病,所述组合物被配制用于连续的全身给药模式。

[0022] 根据本发明的siRNA是一对的两个寡核苷酸,所述寡核苷酸彼此杂交,每个寡核苷酸包括2至100个核苷酸,尤其是5至50个,优选为13至25个,更优选为19,20或21个。“2至100”指的是2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,

52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100。

[0023] 根据本发明及其特定方面,所述siRNA可以具有化学改性,所述化学改性可以位于引导链和/或过客链上、位于3'或5'端的一个或多个核苷酸上和/或位于构成内部骨架的一个或多个核苷酸上。

[0024] 根据本发明的所述化学修饰在核糖和/或碱和/或磷酸上。所述化学修饰包括,例如,用2'-O-甲基RNA(2'OMe)或2'-O'-甲氧基乙基(2'MOE)或2'-氟(2F)或2'-氟-β-阿拉伯糖核苷酸(FANA)基团对核糖的2'-OH基团取代至少一次,将2'-氧烷基化成氨基乙基-、胍基乙基-、氰基乙基-或烯丙基,用硫代磷酸酯代替磷酸二酯基团,将siRNA的一个或多个核苷酸的烷基化或硫醇化,用脱氧核糖核苷酸取代核糖核苷酸,或用锁核酸(LNA)取代核苷酸。

[0025] 在一个特定方面,所述siRNA缺乏化学修饰。

[0026] 在一个特定方面,所述siRNA缺乏化学修饰,并且包含在3'端突出的两个脱氧核苷酸,特别是两个脱氧胸苷。

[0027] 在另一个特定方面,所述siRNA缺乏化学修饰,并且不包含在3′端突出的两个脱氧核苷酸,特别是不包含两个脱氧胸苷。

[0028] 本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述siRNA可以是任何类型的siRNA。实际上,如实施例3和9所示,本发明的制剂和给药方法不依赖于所给药的siRNA,也不依赖于siRNA的靶标。

[0029] 在尤其优选的方面,本发明涉及一种用于上述(全身且连续)用途的组合物,其中至少一种siRNA包含表1中定义的其中一对寡核苷酸或由其组成。

[0030] 在特定的方面,本发明涉及一种用于上述用途的组合物,其中所述至少一种siRNA是以下的一种siRNA:如表1所示的来自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:52的序列的siAR-1,siAR-1b,siAR-2,siAR-2b,siAR-3,siAR-3b,siAR-4,siAR4b,siAR-5,siAR-5b,siVEGF-1,siVEGF-1b,siTSP1-1,siTSP1-1b,siTSP1-2,siTSP1-2b,siTSP1-3,siTSP1-3b,siTSP1-4,siTSP1-4b,siTSP1-5,siTSP1-5b,siFoxP3-1,siFoxP3-1b,siFoxP3-2,siFoxP3-2b。

[0031] 本发明还基于发现了靶向FoxP3转录因子的新siRNA的发明者的意外结果。

[0032] 靶向FoxP3的siRNA更特别地用于靶向抑制性或免疫抑制性细胞,特别是在所有类型的癌症或自身免疫疾病中的抑制性T细胞(也称为调节性T细胞)。靶向FoxP3的寡核苷酸也用于靶向表达该转录因子的癌症细胞。

[0033] 在特定的方面,本发明还涉及抑制FoxP3转录因子合成的siRNA,其中所述siRNA是以下siRNA的一种:如图1定义的siFoxP3-1,siFoxP3-1b,siFoxP3-2或siFoxP3-2b,所述siRNA用作药物或与药学上可接受的载体联合以用于预防和/或治疗与FoxP3转录因子的表达相关的疾病。

[0034] 在特定的方面,在用于预防和/或治疗与FoxP3转录因子表达相关的疾病的所述组合物中,所述siRNA具有化学修饰。

[0035] 在特定的方面,在用于预防和/或治疗与FoxP3转录因子表达相关的疾病的所述组合物中,所述siRNA不具有化学修饰。

[0036] 在特定的方面,在用于预防和/或治疗与FoxP3转录因子表达相关的疾病的所述组合物中,所述siRNA不具有化学修饰,并包括桥接于3'端的两个脱氧核苷酸,特别是两个脱

氧胸苷。

[0037] 在特定的方面,在用于预防和/或治疗与FoxP3转录因子表达相关的疾病的所述组合物中,所述siRNA不具有化学修饰,并且不包括在3'端突出的两个脱氧核苷酸,特别是两个脱氧胸苷。

[0038] 如表1中所限定,在本发明中,siRNA siAR-1,siAR-1b,siAR-2,siAR-2b,siAR-3,siAR-3b,siAR-4,siAR-4b,siAR-5,siAR-5b被统称为siRNA-AR家族。

[0039] 如表1中所限定,siRNA siVEGF-1,siVEGF-1b被统称为siRNA-VEGF家族。

[0040] 如表1中所限定,在本发明中,siRNA siTSP1-1,siTSP1-1b,siTSP1-2,siTSP1-2b,siTSP1-3,siTSP1-3b,siTSP1-4,siTSP1-4b,siTSP1-5.siTSP1-5b被统称为siRNA-TSP1家族。

[0041] 如表1中所限定,siRNA siFOXP3-1,siFOXP3-1b,siFOXP3-2,siFOXP3-2b被统称为siRNA-FoxP3家族。

[0042] 表1中"与序列至少75%同源性"的表述意指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%和100%的同源性,特别是79%,81%,84%,86%,90%,95%和99%的同源性。

[0043] 在特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述至少一种siRNA是siRNA的混合物。

[0044] 在特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述混合物是两种siRNA的混合物。

[0045] 在特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述混合物是三种siRNA的混合物。

[0046] 在特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述siRNA混合物包括以下siRNA或由以下siRNA构成:

-属于siRNA-AR家族的一种siRNA和属于siRNA-VEGF家族的一种siRNA,尤其是siAR-1 siRNA和siVEGF-1 siRNA;

-属于siRNA-AR家族的一种siRNA和属于siRNA-TSP-1家族的一种siRNA,尤其是siAR-1 siRNA和siTSP1-1 siRNA;

-属于siRNA-AR家族的一种siRNA和属于siRNA-FoxP3家族的一种siRNA,尤其是siAR-1 siRNA和siFoxP3-2 siRNA;

-属于siRNA-VEGF家族的一种siRNA和属于siRNA-TSP1家族的一种siRNA,尤其是siVEGF-1 siRNA和siTSP1-1 siRNA;

-属于siRNA-VEGF家族的一种siRNA和属于siRNA-FoxP3家族的一种siRNA,尤其是siVEGF-1 siRNA和siFoxP3-2 siRNA;

-属于siRNA-TSP1家族的一种siRNA和属于siRNA-FoxP3家族的一种siRNA,尤其是siTSP1-1 siRNA和siFoxP3-2 siRNA;

-属于siRNA-VEGF家族的一种siRNA和属于siRNA-TSP1家族的一种siRNA,以及属于siRNA-FoxP3家族的一种siRNA,尤其是siVEGF-1 siRNA,siTSP1-1 siRNA和siFoxP3-2 siRNA;属于siRNA-VEGF家族的一种siRNA和属于siRNA-TSP1家族的一种siRNA,以及属于

siRNA-AR家族的一种siRNA,尤其是siVEGF-1 siRNA,siTSP1-1 siRNA和siAR-1 siRNA。

[0047] 本发明的有利方面涉及一种组合物,其中所述siRNA是SEQ ID No:1和2的siAR-1,用于作为药物或用于预防和/或治疗与雄激素受体表达相关的疾病,特别是用于根据连续全身给药模式与药学上可接受的载体联合一起预防和/或治疗前列腺癌或该癌症的转移。

[0048] 在本发明的所有方面,根据本发明的疾病是人或动物疾病。

[0049] 根据本发明的特定方面,根据本发明的疾病尤其是与编码雄激素受体(AR)或血小板反应蛋白-1(TSP1)或FoxP3转录因子,或血管内皮生长因子A(VEGF)的mRNA的表达相关。

[0050] 根据本发明的疾病,无论是否与AR,或TSP1,或FoxP3或VEGF的表达相关,所述疾病尤其是原发性肿瘤,转移性肿瘤,或是与抑制性或免疫抑制性细胞的存在相关的疾病。根据本发明的“原发性肿瘤”特别是但不限于肛门癌,阑尾癌,口腔癌,支气管和/或上呼吸道癌,胆管癌,鼻腔和鼻窦癌,脑癌,心脏癌,宫颈癌,结肠癌,子宫体癌,胃癌,肝癌,唾液腺癌,喉癌,舌癌,唇癌,鼻咽癌,食道癌,骨癌,卵巢癌,胰腺癌,甲状旁腺癌,阴茎癌,胸膜癌,肺癌,前列腺癌,直肠癌,肾癌,乳腺癌,肾上腺癌,睾丸癌,头颈部癌,胸腺癌,甲状腺癌,尿道癌,阴道癌,胆囊癌,膀胱癌,外阴癌,胃肠癌,淋巴瘤,黑色素瘤或癌症非黑色素瘤皮肤,骨髓瘤,肉瘤,白血病,间皮瘤,胆管癌,骨肉瘤,成胶质细胞瘤,星形细胞瘤,少突神经胶质瘤,软骨肉瘤,脂质肉瘤,横纹肌肉瘤或嗜铬细胞瘤(在下面的描述中统称为原发性肿瘤),或在其它器官中发展的任何这些原发性肿瘤的转移。肿瘤转移是癌症的常见且主要的并发症,并且肿瘤学中的治疗失败主要与转移的发展有关。原发性肿瘤可以在例如骨,肝,脾,神经节或脑的一种或多种类型的组织中扩散以形成一种或多种转移。因此,为了用一种siRNA或各siRNA的组合治疗癌症,能够将siRNA分布在几种组织中的给药方法是特别有用和有利的。

[0051] 表达“与抑制性或免疫抑制性细胞的存在相关的疾病”是指所述抑制性或免疫抑制性细胞促进疾病的发展,特别是促进肿瘤的起始,植入或发展或其转移性传播。该术语尤其包括调节性T细胞(也称为T抑制子),Th17淋巴细胞和MDSC(髓样来源的抑制性细胞)。

[0052] 在特定的方面,本发明涉及一种用于上述用途的组合物,其中所述siRNA与至少一种抗血管生成剂和/或抗肿瘤剂和/或免疫治疗剂联合,随着时间的推移同时,分开或分散使用。术语“随着时间的推移分开或分散”指的是“连续的”。

[0053] 根据本发明,术语抗血管生成剂是指用于抑制血管形成的药剂,特别是通过抑制VEGF,FGF2,PDGF,HGF,MET,FLT3,VEGFR1,VEGFR2,VEGFR3,KIT,TIE1,TIE2,RET,TRKB,AXL的表达或功能来作用。这些药剂特别是西仑吉肽,凡德他尼,来那度胺,沙利度胺,三氧化二砷,贝伐单抗或表2中列出的药剂。

[0054] 根据本发明,免疫治疗剂是一种目的是尤其通过疫苗接种来刺激免疫应答,和/或尤其通过抑制免疫抑制或抑制细胞和/或通过抑制淋巴细胞无反应性来恢复免疫应答的药剂。

[0055] 本发明意义内的免疫疗法包括涉及涉及细胞因子给药的治疗,靶向控制点的抗体和免疫系统的调节(免疫检查点例如是PD1,PDL1,CTLA4,Tigit),用(无论是否具有基因修饰(Car-T))T淋巴细胞治疗,或通过树突细胞,疫苗接种,抗蠕虫的治疗。这样的药剂特别选自伊匹单抗(Ipilimumab),纳武单抗(nivolumab),T-Vec,普罗文奇(Sipuleucel-T),博纳吐单抗(Blinatumomab)和派姆单抗(Pembrolizumab),或来自表3的药剂。

[0056] 根据本发明,抗肿瘤或化学治疗剂是具有抗癌特性的药剂,其选自:烷化剂,抗代

谢剂,细胞毒性抗生素,拓扑异构酶I抑制剂,拓扑异构酶II抑制剂,抗肿瘤抗生素,基因毒性剂,PARP抑制剂,抗微管剂。这样的药剂例如选自:苯达莫司汀,替莫唑胺,二氯甲基二乙胺,环磷酰胺,卡莫司汀,顺铂,白消安,噻替派,达卡巴嗪,喷司他丁,甲氨蝶呤,培美曲塞,氟尿苷,氟尿嘧啶,阿糖胞苷,巯基嘌呤,硫乌嘌呤,鲁比替康,丝裂霉素C,柔红霉素,阿霉素,博来霉素,普卡霉素,盐酸米托蒽醌,奥沙利铂,长春瑞滨,BMS 184476,硫酸长春新碱,长春碱,泰索帝,紫杉醇或表4中列出的药剂。

[0057] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述组合物包含属于siRNA-AR家族的siRNA以及抗肿瘤剂和/或免疫治疗剂和/或抗血管生成剂。

[0058] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述组合物包含属于siRNA-VEGF家族的siRNA以及抗肿瘤剂和/或免疫治疗剂和/或抗血管生成剂。

[0059] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述组合物包含属于siRNA-TSP1家族的siRNA以及抗肿瘤剂和/或免疫治疗剂和/或抗血管生成剂。

[0060] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述组合物包含属于siRNA-FoxP3家族的siRNA以及抗肿瘤剂和/或免疫治疗剂和/或抗血管生成剂。

[0061] 在本发明的所有方面,根据本发明的所述全身给药模式选自包括以下给药模式的组或选自由以下模式方式组成的组:皮下,腹膜内,静脉内,动脉内,心内,肌肉内,皮内,鼻内,阴道内,直肠内,舌下,口腔,鞘内,脊柱内,硬膜外,呼吸,皮肤,透皮,透粘膜。

[0062] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述组合物被配制为以治疗有效剂量来用于给药模式,特别是以0.005mg/kg/天至30mg/kg/天的剂量给药,尤其是以0.01mg/kg/天至10mg/kg/天的剂量给药,更特别是以0.01mg/kg/天至2mg/kg/天的剂量给药。

[0063] “0.005mg/kg/天至30mg/kg/天”是指范围是0.005mg/kg/天至30mg/kg/天的所有剂量,例如,剂量是0.008;0.01;0.05;0.1;0.5;1.0;1.5;10.0;10.5;14.0;14.5;20;20.5;25;25.5;29.5mg/kg/天。

[0064] 在第一方面,本发明基于本发明人的意外结果,即通过连续全身给药模式来给药的siRNA的功效优于通过推注全身给药模式来对在相同溶液中配制的相同siRNA进行给药时的功效,“推注”定义为一次给予全剂量,所述全剂量可在治疗期间重复,例如每天一次或每天数次。连续给药模式定义为避免当所述siRNA作为推注给药时在血液、血清和各种器官中观察到的siRNA浓度的峰-谷效应的模式。连续给药的目的是在整个siRNA给药期间保持血液和外周组织中基本恒定的siRNA浓度。短语“保持基本恒定”是指血液和外周组织中siRNA的浓度可以根据接受所述组合物的个体的代谢而略微变化。

[0065] 给药时间可以从几小时到几周不等,这取决于用于给药siRNA的装置。该装置可以是泵或用于缓慢释放和延长siRNA释放的任何组合物。

[0066] 在该特定方面,本发明因此涉及一种至少包括一种siRNA的组合物,所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交以诱导所述mRNA降解或抑制所述mRNA的翻译,所述mRNA或其编码的蛋白的表达参与疾病,所述组合物用于预防和/或治疗所述疾病,所述组合物被配制用于连续的全身给药模式。

[0067] 在本发明的一个优选方面,在连续全身给药模式中给药的siRNA在不中断的情况下给药大于或等于2天的时间段。在本发明的一个优选方面,根据连续全身给药模式给药的

siRNA中断的时间不超过再填充或置换给药siRNA的装置所需的时间(例如4小时),其时间范围为2天至1年,例如持续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,3周,1个月,2个月,3个月,4个月,5个月,6个月,9个月,1年。

[0068] 在本发明的一个优选方面,以连续全身递送模式给药的siRNA是以连续周期的形式进行给药的,其不治疗的间隔时间段从超过24小时至数周,每个周期限定为连续全身给药而没有中断超过再填充或更换递送siRNA的装置所需的时间例如是4小时,并且给药持续时间为2天至1个月。

[0069] 在根据本发明的一个优选方面,所述连续全身给药模式是皮下给药。

[0070] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述组合物被配制为以治疗有效剂量来用于连续皮下给药模式,特别是以0.005mg/kg/天至30mg/kg/天的剂量给药,尤其是以0.01mg/kg/天至10mg/kg/天的剂量给药,更特别是以0.01mg/kg/天至2mg/kg/天的剂量给药。

[0071] 在特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述寡核苷酸的一条链的序列不同于:

-SEQ ID NO:53(GGGUUAUGUCUAUGUUCAUUCUU),或

-SEQ ID NO:54(GGAAUGGCCUGUGCUUUCUCAUU)。

[0072] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述连续全身给药模式是以下给药模式之一:腹膜内,静脉内,肌肉内,皮内,鼻内,阴道内,直肠内,舌下,口腔,鞘内;并且所述至少一种siRNA属于以下四个siRNA家族之一:siRNA-AR家族,siRNA-VEGF家族,siRNA-TSP1家族,siRNA-FoxP3家族。

[0073] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述连续全身给药模式是皮下给药;并且所述至少一种siRNA属于以下四个siRNA家族之一:siRNA-AR家族,siRNA-VEGF家族,siRNA-TSP1家族,siRNA-FoxP3家族。

[0074] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述疾病是任何上述原发性肿瘤,或这些原发性肿瘤的其中之一在其它器官中发展的转移;并且所述至少一种siRNA属于以下四个siRNA家族之一:siRNA-AR家族,siRNA-VEGF家族,siRNA-TSP1家族,siRNA-FoxP3家族。

[0075] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述疾病是乳腺癌,或黑素瘤,或成胶质细胞瘤,或肾癌,或肝癌,或膀胱癌,或结肠癌,或这些癌症的其中之一在其它器官中发生的转移,或白血病,或骨髓瘤;并且所述至少一种siRNA属于以下4种siRNA家族之一:siRNA-AR家族,siRNA-VEGF家族,siRNA-TSP1家族,siRNA-FoxP3家族,特别是以单独的形式或两种组合或三种组合的形式的siAR-1 siRNA,或siVEGF-1 siRNA,或siTSP1-1 siRNA,或siFoxP3-1 siRNA。

[0076] 在一个特定的方面,本发明涉及用于上述用途的组合物,其中所述疾病是前列腺癌或该癌症在其它器官中发展的转移,并且所述至少一种siRNA属于以下4种siRNA家族之一:siRNA-AR家族,siRNA-VEGF家族,siRNA-TSP1家族,siRNA-FoxP3家族,特别是以单独的形式或两种组合或三种组合的形式的siAR-1 siRNA,siVEGF-1 siRNA或siRNA siTSP1-1,或siRNA siFoxP3-2,更特别是siRNA siAR-1。

[0077] 在另一方面,本发明还涉及一种提供组合物的全身连续给药机构的装置,该组合

物配制用于连续全身给药模式并包括至少一种siRNA，所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交，以诱导所述mRNA的降解或抑制其翻译，所述mRNA的表达或其编码的蛋白参与疾病，而所述组合物用于预防和/或治疗所述疾病。

[0078] 在一个特定方面，所述全身连续给药机构特别是用于缓慢和连续释放siRNA以使其在体内全身分布的渗透泵，注射泵，弹性泵，蠕动泵，多通道泵，由患者控制的泵，“智能”泵或“贴片”泵，或聚合物基质或水凝胶，或任何其它可生物降解的化合物。这些装置中的一些可用于其它治疗适应症，以不连续地递送治疗剂，特别是推注。在该方面，它们用于以基本恒定的流速在连续数天至数周或更长时间中释放上述组合物。表述“基本恒定的流速”意味着流速可以根据所用装置的精度稍微变化。

[0079] 例如，相对于设定流速，变化可以是约±10％。

[0080] 该装置可以是机械的或电子的。它可以穿在外面，或通过外科手术植入到例如皮下、或腹膜中、或肌肉内。可以在人体临床中使用的这些装置的非详尽的例子是：渗透泵，该渗透泵由被一个包含有生理盐水凝胶的隔室包围的柔性存储器组成，通过润湿强制排出液体来压缩内部存储器。这种机制，例如在人体临床使用的Durect公司的Duros泵中使用，该泵类似于仅授权用于动物的Alzet泵；

-自动注射器，例如：McKinley T34或T60，Bodyguard 323，AD注射器驱动器(Cardinal health)，MS驱动器(Smiths Medical)；-弹性泵：产品包含在一个可压缩的容器中，该容器包含在一个气囊中，在内部容器上施加受控压力并迫使液体排出，例如Accufuser(WOO YOUNG Medical)，Dosi-fuser(spirit medical)，Exacta(Gamastech)，Myfuser；

-蠕动泵：机械压缩柔性管以递送内容物，例如：iPrecio，SP100(APT仪器)

-由患者控制的多通道或单通道泵，例如：Accucheck，one touching(Animas)，Accufuser；

-“贴片”泵：产品储存器直接粘附在皮肤上，并包含一个集成系统，无需管道，例如：CeQurPaQ，Omnipod(Insulet)，Finesse(Calibra)，V-Go(Valeritas)；

-所谓的“智能”泵，其配备有安全装置，其根据预定义参数或在患者中的测量的参数调节产品的给药，例如：miniMed 530G，paradigm Veo(medtronics)，Vibe(Animas)；

-植入式泵，如：补充微型泵，Medtronic，Duros Durect，Infusaid，promedos。这些泵以精确的流速或以预定的时间间隔自动递送小体积的治疗产品。

[0081] 还可以设想将干燥的寡核苷酸置于这样的装置中，一旦该装置置于皮肤下就捕获组织中的水，并释放siRNA使其溶解在细胞外液中。还可以想到将siRNA掺入聚合物基质，凝胶或任何其它化合物中，所述化合物随着时间的推移以缓慢和延长的方式释放siRNA。该装置可以是粘膜粘附的片剂并通过该粘膜释放siRNA。在一个特定的方面，由前述装置给药的所述siRNA与定位分子缔合。

[0082] 在一个特定的方面，由前述装置给药的所述siRNA不与定位分子缔合。

[0083] 在一个特定的方面，由所述装置给药的所述至少一种寡核苷酸包含属于以下siRNA家族的其中之一的siRNA或由其组成：siRNA-AR家族，siRNA-VEGF家族，siRNA-TSP1家族，siRNA-FoxP3家族，特别是siAR-1 siRNA，或siVEGF-1 siRNA，或siTSP1-1 siRNA，或siFoxP3-2 siRNA。

[0084] 在本发明的一个优选方面，在含有154mM NaCl的水溶液中稀释以连续全身给药模

式给药的siRNA。

[0085] 在本发明的一个优选方面，在含有154mM NaCl的水溶液中稀释、根据连续皮下全身给药模式给药的siRNA属于以下四种siRNA家族之一：siRNA-AR家族，siRNA-VEGF家族，siRNA-TSP1家族，siRNA-FoxP3家族，特别是以单独的形式或两种组合或三种组合的形式的siAR-1 siRNA，或siVEGF-1 siRNA，或siTSP1-1 siRNA，或siRNA siFoxP3-1。

[0086] 另一方面，本发明基于本发明人的意外结果，根据该结果，当用于全身给药时，在酸性pH缓冲溶液中配制的siRNA比在包含154mM NaCl水性溶液中配制的siRNA在血清，许多组织和/或肿瘤中的浓度更高。siRNA水溶液中如Zn^{2+}或Mg^{2+}的阳离子的存在导致它们的降解，并且当全身给药siRNA时，注射溶液中这种阳离子的存在降低了血清和器官中siRNA的浓度。出乎意料的是，本发明人已经观察到，当用所述siRNA进行全身给药时，在酸性pH缓冲溶液中添加阳离子会增加血清、许多组织和/或肿瘤中siRNA的浓度。

[0087] 根据本发明的缓冲溶液提供siRNA稀释溶液的pH稳定性。表5中给出了这种缓冲剂的例子。

[0088] 在该方面，本发明因此涉及一种至少包括一种siRNA的组合物，所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交以诱导所述mRNA降解或抑制所述mRNA的翻译，所述mRNA或其编码的蛋白的表达参与疾病，所述组合物用于预防和/或治疗所述疾病，所述组合物被配制用于连续的全身给药模式，其中所述至少一种siRNA处于酸性pH的缓冲溶液中。

[0089] 在本发明的一个优选方面，缓冲溶液的pH是酸性的，范围是pH3至pH7，优选范围是pH5至pH6.5，更优选为pH6。

[0090] 在本发明的一个优选方面，缓冲溶液是pH6的柠檬酸盐或组氨酸缓冲液。

[0091] 本发明还基于本发明人的意外结果，根据该结果，当用于全身给药时，在包含有来自无机或有机盐的阳离子的酸性pH缓冲溶液中配制的siRNA比在没有来自阳离子的酸性pH缓冲溶液或154mM NaCl溶液中配制的siRNA在血清，许多组织和/或肿瘤中的浓度更高。在本发明的角度上，这些阳离子不是缓冲溶液的组分，它们不是为了确保缓冲效果，而是被另外添加到该缓冲溶液中的。这些阳离子例如是但不限于尤其是腐胺、和/或亚精胺、和/或精胺的多胺，和/或其阳离子选自例如Zn^{2+}，Co^{2+}，Cu^{2+}，Mn^{2+}，Ca^{2+}，Mg^{2+}，Fe^{2+}的金属阳离子的盐，平衡离子具有任何性质，例如氯离子，硝酸根，硫酸根离子或碳酸根离子。在本发明的一个优选方面，缓冲溶液含有$MgCl_2$，$ZnCl_2$，$MnCl_2$，或这些盐的两种混合物，或三种盐的混合物。

[0092] 在一个特定的方面，无论是单独使用还是组合使用，每种阳离子的浓度为0.02mM至200mM，优选0.05至100mM，优选1至50mM。在本发明的一个优选方面，将阳离子加入到缓冲溶液中，该缓冲溶液是柠檬酸盐缓冲液或组氨酸缓冲液。在本发明的一个优选方面，该溶液的pH为6。

[0093] 在本发明的一个优选方面，以连续全身给药模式给药的siRNA在含有10mM $MgCl_2$的pH6的柠檬酸盐或组氨酸缓冲液中被稀释。

[0094] 在本发明的一个优选方面，在含有阳离子的酸性缓冲液中稀释并以连续全身给药模式给药的siRNA属于4个siRNA家族之一：siRNA-AR家族，siRNA-VEGF家族，siRNA-TSP1家族，siRNA-FoxP3家族，特别是以单独的形式或两种组合或三种组合的形式的siAR-1siRNA，siVEGF-1 siRNA，或siTSP1-1 siRNA，或siFoxP3-1 siRNA。

[0095] 另一方面，本发明基于发明人的意外结果，根据该结果，当连续全身给药含有定位

分子的siRNA时，血清、许多组织和/或肿瘤中siRNA的浓度较高。

[0096] 因此，根据本发明及特定的方面，所述组合物含有定位剂，特别地，所述组合物含有不与siRNA共价连接的定位剂。

[0097] 根据本发明及特定方面，所述组合物不含定位剂。

[0098] 根据本发明及特定方面，所述组合物被配制用于连续全身给药模式，其中所述至少一种siRNA在酸性pH缓冲溶液中，所述组合物含有定位剂，特别是所述组合物含有不与siRNA共价连接的定位剂。

[0099] 根据本发明及特定方面，所述组合物被配制用于连续全身给药模式，其中所述至少一种siRNA在酸性pH缓冲溶液中，所述组合物不含有定位剂。

[0100] 在本发明的一个特定方面，该定位分子是CD36受体配体，例如氧化的LDL(低密度脂蛋白)，海沙瑞林或长链脂肪酸(超过16个碳)，或这些组分两种或三种的混合物。

[0101] 在本发明的一个优选方面，上述组合物含有氧化LDL，其与siRNA的重量:重量比为0.01至10:1，优选0.1至1:1，或上述组合物含有海沙瑞林，所述海沙瑞林与siRNA的重量:重量比为0.01至10:1，优选0.1至1:1。

[0102] 在本发明的一个优选方面，上述组合物含有氧化LDL，其与siRNA的重量:重量比为0.01至10:1，优选0.1至1:1，或上述组合物含有海沙瑞林，所述海沙瑞林与siRNA的重量:重量比为0.01至10:1，优选0.1至1:1，并全身连续给药。

[0103] 在本发明的一个优选方面，上述组合物被配制用于连续全身给药模式，其中所述至少一种siRNA在酸性pH的缓冲溶液中，特别是在柠檬酸盐或组氨酸缓冲液中，并且所述组合物含有不与siRNA共价连接的定位剂，所述定位剂是CD36受体配体，所述CD36受体配体优选被氧化的LDL，海沙瑞林，长链脂肪酸或这些组分的两种或三种的组合物。

[0104] 在本发明的一个优选方面，将上述组合物配制成用于连续全身给药模式，其中所述至少一种siRNA在柠檬酸盐缓冲液中，并且所述组合物含有用于定位的试剂，所述定位剂是氧化的LDL。

[0105] 根据本发明，所述组合物包括包括至少一种siRNA的组合物，所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交以诱导所述mRNA降解或抑制所述mRNA的翻译，所述mRNA或其编码的蛋白的表达参与疾病，所述组合物用于预防和/或治疗所述疾病，所述siRNA在含有或不含有载体化试剂的溶液中。

[0106] 在特定的方面，本发明涉及包含至少一种siRNA的上述组合物，其中所述siRNA在不含靶向剂的溶液中，或其中所述siRNA不与载体化试剂结合。

[0107] 在特定的方面，本发明涉及包含至少一种siRNA的上述组合物，其中所述siRNA含有载体化试剂的溶液中。

[0108] 在另一方面，本发明涉及一种至少包括一种siRNA的组合物，所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交以诱导所述mRNA降解或抑制所述mRNA的翻译，所述mRNA或其编码的蛋白的表达参与疾病，所述组合物用于预防和/或治疗所述疾病，所述组合物被配制用于除连续给药模式之外的全身给药模式。在数分钟至数小时的时间内单次或重复推注给药或缓慢输注给药是除连续给药模式之外的全身给药模式的非限制性例子。

[0109] 在本发明的一个特定方面，除了包含至少一种siRNA的所述组合物的连续给药模式之外的全身给药可以同时地以同时，分开或扩散的方式与所述组合物的连续全身给药相

关。

[0110] 在一个特定的方面,所述组合物可以配制用于成全身给药模式,而不是连续给药模式,其中所述至少一种siRNA在酸性pH下处于缓冲溶液中,特别是处于柠檬酸盐或组氨酸缓冲液中。

[0111] 在除连续给药模式之外的全身给药的特定方面,酸性pH缓冲溶液可以补充有无机或有机盐,特别是其阳离子选自多胺的盐,搜索多胺尤其是选自精胺,亚精胺或腐胺,或者所述盐选自阳离子是金属阳离子的盐,特别是选自锌,钴,铜,锰,钙,镁或铁的盐,特别是锰,锌,镁的单独的或两种组合或三两种组合的盐。

[0112] 在除连续给药模式之外的全身给药的特定方面,所述组合物可含有定位剂。

[0113] 在除连续给药模式之外的全身给药的特定方面,所述组合物含有定位剂,该定位剂优选地不与siRNA共价连接。

[0114] 在除连续给药模式之外的全身给药的特定方面,所述组合物不含有定位剂。

[0115] 所述定位分子例如可以是CD36受体的配体,例如是氧化的LDL,海沙瑞林,长链脂肪酸,或这些组分的两种或三种的混合物。

[0116] 在一个特定的方面,其中所述siRNA在不含载体化试剂的溶液中,或者其中所述siRNA不与载体化试剂结合。

[0117] 在一个特定方面,所述组合物在含有载体化试剂的溶液中。

[0118] 在特定的方面,本发明涉及根据全身给药模式使用的组合物,其中所述siRNA与至少一种抗血管生成剂和/或抗肿瘤剂和/或免疫治疗剂联合,随着时间的推移同时,分开或分散使用。

[0119] 本发明还依赖于本发明人的意外结果,根据该结果,通过连续给药模式,在脑内或鞘内给药靶向血小板反应蛋白-1或VEGF的siRNA,也可以有效地递送所述siRNA,并因此抑制siRNA靶基因的基因表达。

[0120] 因此,在该特定方面,本发明因此涉及一种至少包括一种siRNA的组合物,所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交以诱导所述mRNA降解或抑制所述mRNA的翻译,所述mRNA或其编码的蛋白的表达参与疾病,所述组合物用于预防和/或治疗所述疾病,所述组合物被配制用于连续的脑内或鞘内给药模式。

[0121] 在本发明的一个方面,用于上述连续的脑内使用的所述组合物特别用于预防和/或治疗脑癌,特别是成胶质细胞瘤。当疾病是脑癌,特别是成胶质细胞瘤时,siRNA更特别地选自以下两个siRNA家族之一:siRNA-VEGF家族和siRNA-TSP1家族,特别是单独的或组合的形式的siVEGF-1 siRNA,或siTSP1-1 siRNA。

[0122] 在本发明的一个特定方面,所述用于其上述用途的组合物配制成以治疗有效剂量来用于连续的脑内或鞘内给药模式,特别以0.01mg/kg/天至10mg/kg/天的剂量下,尤其是以0.01mg/kg/天至2mg/kg/天的剂量。

[0123] 本发明因此涉及一种药物组合物,所述药物组合物至少包括一种siRNA,所述siRNA与编码或非编码mRNA杂交以诱导所述mRNA降解或抑制所述mRNA的翻译,所述mRNA或其编码的蛋白的表达参与疾病,所述至少一种siRNA与在酸性pH的的缓冲溶液中的药学上可接受的载体结合,所述缓冲液特别是柠檬酸盐或组氨酸缓冲液并且添加或不添加有无机或有机盐,所述盐选自阳离子为多胺的盐,所述多胺特别是选自精胺,亚精胺或腐胺,或者

所述盐选自阳离子为金属阳离子的盐，特别是选自锌，钴，铜的盐，锰，钙，镁或铁的盐，尤其是锰，锌，镁的单独或两种或三种组合的盐。

[0124] 在一个特定的方面，所述至少一种siRNA在不含有载体化试剂的溶液中并与定位分子缔合，或者所述所述至少一种siRNA在含有载体化试剂的溶液中并且与定位分子缔合，或者所述所述至少一种siRNA在含有载体化试剂的溶液中且不与定位分子缔合，或所述所述至少一种siRNA在不含有载体化试剂的溶液中并且不与定位分子缔合。

表 1：组成根据本发明的 siRNA 的寡核苷酸对。

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’-3’序列	物种
siRNA-AR	siAR-1	siAR-1 的链 1，其序列是:SEQ ID NO: 1 或与所述 SEQ ID NO: 1 具有至少 75%同源性的序列 以及 siAR-1 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:2 或与所述 SEQ ID NO:2 具有至少 75%同源性的序列	1	GACUCAGCUGCCCCAUCCA[dT][dT]	h, r, so, si, c
			2	UGGAUGGGGCAGCUGAGUC[dT][dT]	
	siAR-1b	siAR-1 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:3 或与所述 SEQ ID NO:3 具有至少 75%同源性的序列 以及 siAR-1 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:4 或与所述 SEQ ID NO:4 具有至少 75%同源性的序	3	GACUCAGCUGCCCCAUCCA	h, r, so, si, c
			4	UGGAUGGGGCAGCUGAGUC	

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
		列			
	siAR-2	siAR-2 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:5 或与所述 SEQ ID NO:5 具有至少 75%同源性的序列 siAR-2 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:6 或与所述 SEQ ID NO:6 具有至少 75%同源性的序列	5	GACUCAGCUGCCCCAUCCACG[dT][dT],	h, r, so, si, c
			6	CGUGGAUGGGGCAGCUGAGUC[dT][dT]。	
	siAR-2b	siAR-2 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:7 或与所述 SEQ ID NO:7 具有至少 75%同源性的序列 以及 siAR-2 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:8 或与所述 SEQ ID NO:8 具有至少 75%同源性的序列	7	GACUCAGCUGCCCCAUCCACG	h, r, so, si, c
			8	CGUGGAUGGGGCAGCUGAGUC	

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
	siAR-3	siAR-3 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:9 或与所述 SEQ ID NO:9 具有至少 75%同源性的序列以及 siAR-3 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:10 或与所述 SEQ ID NO:10 具有至少 75%同源性的序列	9	UCCCCAAGCCCAUCGUAGA[dT][dT],	h
			10	UCUACGAUGGGCUUGGGGGA[dT][dT];	
	siAR-3b	siAR-3 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:11 或与所述 SEQ ID NO:11 具有至少 75%同源性的序列以及 siAR-3 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:12 或与所述 SEQ ID NO:12 具有至少 75%同源性的序列	11	UCCCCAAGCCCAUCGUAGA	h
			12	UCUACGAUGGGCUUGGGGGA	
	siAR-4	siAR-4 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:13 或与所述 SEQ ID NO:13 具有至	13	GUAGUUGUGAGUAUCAUGA[dT][dT]	h

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
		少 75%同源性的序列 以及 siAR-4 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:14 或与所述 SEQ ID NO:14 具有至少 75%同源性的序列	14	UCAUGAUACUCACAACUAC[dT][dT]	
	siAR-4b	siAR-4 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:15 或与所述 SEQ ID NO:15 具有至少 75%同源性的序列 以及 siAR-4 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:16 或与所述 SEQ ID NO:16 具有至少 75%同源性的序列	15 16	GUAGUUGUGAGUAUCAUGA UCAUGAUACUCACAACUAC	h
	siAR-5	siAR-5 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:17 或与所述 SEQ ID NO:17 具有至	17	GCAUCAGUUCGCUUUUGAC[dT][dT]	h

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
		少 75%同源性的序列 以及 siAR-5 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:18 或与所述 SEQ ID NO:18 具有至少 75%同源性的序列	18	GUCAAAAGCGAACUGAUGC[dT][dT]	
	siAR-5b	siAR-5 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:19 或与所述 SEQ ID NO:19 具有至少 75%同源性的序列 以及 siAR-5 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:20 或与所述 SEQ ID NO:20 具有至少 75%同源性的序列	19	GCAUCAGUUCGCUUUUGAC	h
			20	GUCAAAAGCGAACUGAUGC	
siRNA-VEGF	siVEGF-1	siVEGF-1 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:21 或与所述 SEQ ID NO:21 具有至少 75%同源性的序列	21	AUGUGAAUGCAGACCAAAGAA[dT][dT]	h, r, so, si, c

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
		以及 siVEGF-1 的链 2, 其序列是:SEQ ID NO:22 或与所述 SEQ ID NO:22 具有至少 75%同源性的序列	22	UUCUUUGGUCUGCAUUCACAU[dT][dT]	
	siVEGF-1b	siVEGF-1 的链 1b, 其序列是:SEQ ID NO:23 或与所述 SEQ ID NO:23 具有至少 75%同源性的序列 以及 siVEGF-1 的链 2b, 其序列是:SEQ ID NO:24 或与所述 SEQ ID NO:24 具有至少 75%同源性的序列	23	AUGUGAAUGCAGACCAAAGAA	h, r, so, si, c
			24	UUCUUUGGUCUGCAUUCACAU	
siRNA-TSP1	siTSP1-1	siTSP1-1 的链 1, 其序列是:SEQ ID NO:25 或与所述 SEQ ID NO:25 具有至少 75%同源性的序列	25	CCUUGACAACAACGUGGUG[dT][dT]	h, r, so, si, c

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
		以及 siTSP1-1 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:26 或与所述 SEQ ID NO:26 具有至少 75%同源性的序列	26	CACCACGUUGUUGUCAAGG[dT][dT]	
	siTSP1-1b	siTSP1-1 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:27 或与所述 SEQ ID NO:27 具有至少 75%同源性的序列 以及 siTSP1-1 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:28 或与所述 SEQ ID NO:28 具有至少 75%同源性的序列	27 28	CCUUGACAACAACGUGGUG CACCACGUUGUUGUCAAGG	h, r, so, si, c
	siTSP1-2	siTSP1-2 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:29 或与所述 SEQ ID NO:29 具有至少 75%同源性的序列	29	UACCCGAGACGAUUGUAUG[dT][dT]	h

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
		以及 siTSP1-2 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:30 或与所述 SEQ ID NO:30 具有至少 75%同源性的序列	30	CAUACAAUCGUCUCGGGUA[dT][dT]	
	siTSP1-2b	siTSP1-2 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:31 或与所述 SEQ ID NO:31 具有至少 75%同源性的序列 以及 siTSP1-2 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:32 或与所述 SEQ ID NO:32 具有至少 75%同源性的序列	31 32	UACCCGAGACGAUUGUAUG CAUACAAUCGUCUCGGGUA	h
	siTSP1-3	siTSP1-3 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:33 或与所述 SEQ ID NO:33 具有至少 75%同源性的序列 以及 siTSP1-3 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:34	33 34	GCCAGAACUCGGUUACCAU[dT][dT] AUGGUAACCGAGUUCUGGC[dT][dT]	so

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
		或与所述 SEQ ID NO:34 具有至少 75%同源性的序列			
	siTSP1-3b	siTSP1-3 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:35 或与所述 SEQ ID NO:35 具有至少 75%同源性的序列 以及 siTSP1-3 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:36 或与所述 SEQ ID NO:36 具有至少 75%同源性的序列	35	GCCAGAACUCGGUUACCAU	so
			36	AUGGUAACCGAGUUCUGGC	
	siTSP1-4	siTSP1-4 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:37 或与所述 SEQ ID NO:37 具有至少 75%同源性的序列 以及 siTSP1-4 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:38 或与所述 SEQ ID NO:38 具有至少 75%同源性的序列	37	CCAACAAACAGGUGUGCAA[dT][dT]	h
			38	UUGCACACCUGUUUGUUGG[dT][dT]	

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
	siTSP1-4b	siTSP1-4 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:39 或与所述 SEQ ID NO:39 具有至少 75%同源性的序列 以及 siTSP1-4 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:40 或与所述 SEQ ID NO:40 具有至少 75%同源性的序列	39	CCAACAAACAGGUGUGCAA	h
			40	UUGCACACCUGUUUGUUGG	
	siTSP1-5	siTSP1-5 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:41 或与所述 SEQ ID NO:41 具有至少 75%同源性的序列 以及 siTSP1-5 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:42 或与所述 SEQ ID NO:42 具有至少 75%同源性的序列	41	GCAACUACCUGGGUCACUA[dT][dT]	so
			42	UAGUGACCCAGGUAGUUGC[dT][dT]	
	siTSP1-5b	siTSP1-5 的链 1b，其序列	43	GCAACUACCUGGGUCACUA	so

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
		是:SEQ ID NO:43 或与所述 SEQ ID NO:43 具有至少 75%同源性的序列 以及 siTSP1-5 的链 2b, 其序列是:SEQ ID NO:44 或与所述 SEQ ID NO:44 具有至少 75%同源性的序列	44	UAGUGACCCAGGUAGUUGC	
siRNA-FoxP3	siFoxP3-1	siFoxP3-1 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:45 或与所述 SEQ ID NO:45 具有至少 75%同源性的序列 以及 siFoxP3-1 的链 2, 其序列是:SEQ ID NO:46 或与所述 SEQ ID NO:46 具有至少 75%同源性的序列	45	CACAACAUGGACUACUUCA[dT][dT]	h, r, so, si, c
			46	UGAAGUAGUCCAUGUUGUG[dT][dT]	
	siFoxP3-1b	siFoxP3-1 的链 1b, 其序列是:SEQ ID NO:47 或与所述 SEQ ID NO:47 具有至少 75%同源性的序列	47	CACAACAUGGACUACUUCA	h, r, so, si, c

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’ - 3’序列	物种
		以及 siFoxP3-1 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:48 或与所述 SEQ ID NO:48 具有至少 75%同源性的序列	48	UGAAGUAGUCCAUGUUGUG	
	siFoxP3-2	siFoxP3-2 的链 1，其序列是:SEQ ID NO:49 或与所述 SEQ ID NO:49 具有至少 75%同源性的序列 以及 siFoxP3-2 的链 2，其序列是:SEQ ID NO:50 或与所述 SEQ ID NO:50 具有至少 75%同源性的序列	49	CAUGGACUACUUCAAGUUC[dT][dT]	h, r, so, si, c
			50	GAACUUGAAGUAGUCCAUG[dT][dT]	
	siFoxP3-2b	siFoxP3-2 的链 1b，其序列是:SEQ ID NO:51 或与所述 SEQ ID NO:51 具有至少 75%同源性的序列 以及 siFoxP3-2 的链 2b，其序列是:SEQ ID NO:52 或与所述 SEQ ID NO:52	51	CAUGGACUACUUCAAGUUC	h, r, so, si, c
			52	GAACUUGAAGUAGUCCAUG	

家族	siRNA	组成	SEQ ID NO:	5’-3’序列	物种
		具有至少75%同源性的序列			

[0125] 对于表1中标号(SEQ ID NO)为1至52的每个序列：

[0126] -第一列表示siRNA所属的家族的名字。

[0127] -第二列表示寡核苷酸的名字。

[0128] -第三列表示siRNA的组成，由链型寡核苷酸(分别为1和1b)或与该链型寡核苷酸(分别为1和1b)具有至少75％同源性的寡核苷酸，以及由链型寡核苷酸(分别为2和2b)或与该链型寡核苷酸(分别为2和2b)具有至少75％的同源性的寡核苷酸构成。

[0129] -第四列表示所提交的寡核苷酸的编号。

[0130] -第五列表示5′至3′方向的序列。符号[dT][dT]用于表示存在两个突出的脱氧胸苷。

[0131] -第六列表示由具有与第5列中记载的序列100％相同的序列的两种寡核苷酸的组合而构成的siRNA是否与人(h)，大鼠(r)，小鼠(s)，猴子(si)或狗(c)的RNA杂交。保存人和其它动物物种之间siRNA的靶序列是有利的，因为它极大地增加了临床前研究结果，特别是毒理学结果预测人类效应的可能性。

[0132] 当表1中所示的siRNA由两个具有与表中列出的序列100％相同的序列的单链寡核苷酸组成时，这些siRNA还具有以下特征：

[0133] -SiAR-2 siRNA描述于申请PCT/FR2002/003843中。该siRNA的靶序列(即siRNA引导链杂交的mRNA序列)存在于人体的编码雄激素受体的所有mRNA中，该受体是野生型、突变的、或具有导致激素结合结构域的部分或完全缺失的剪接变异(例如变体AR-V7)。SiAR-1 siRNA对应于在3′端缺失2个核苷酸的siAR-2。

[0134] 编码雄激素受体的mRNA上的siRNA靶序列siAR-1，SiAR-1b，siAR-2，siAR-2b siRNA在包括人，大鼠，小鼠，猴子和狗的许多物种中是保守的。

[0135] siRNA靶序列siAR-3和SiAR-3b位于编码人雄激素受体的mRNA上。该靶序列仅在其它物种中部分保守。

[0136] siRNA siAR-4和siAR-4b的靶序列位于编码特别是在去势抗性前列腺癌中表达的雄激素受体的变体V7的人mRNA上。该靶序列仅在其它物种中部分保守。

[0137] -siRNA AR-5描述于申请PCT/FR2002/003843中。该siRNA和AR-5b siRNA的靶序列位于编码带有常见于前列腺癌中的T877A突变的雄激素受体的人mRNA中。该靶序列仅在其它物种中部分保守。

[0138] -SiVEGF-1 siRNA描述于专利申请PCT/FR2002/003843中。编码VEGF的mRNA上的siRNA siVGF-1，siVEGF-1b的靶序列在包括人，大鼠，小鼠，猴子和狗的许多物种中是保守的。

[0139] SiTSP1-1，siTSP1-1b，siTSP1-2和siTSP1-2b已在申请PCT/EP2010/061156中描述。血小板反应蛋白-1的mRNA上的siRNA siTSP1-1 siTSP1-1b靶序列在包括人，大鼠，小鼠，猴子和狗的许多物种中是保守的。

[0140] -编码血小板反应蛋白-1的人mRNA上的siRNA siTSP1-2和siTSP1-2b的靶序列在其它物种中是部分保守的。

[0141] -siRNA siTSP1-3，siTSP1-3b，siTSP1-4，siTSP1-4b，siTSP1-5，siTSP1-5b是对应于专利申请US2011/0166199中提到的siRNA。

-siRNA siFOXP3-1，siFoxP3-1b，siFOXP3-2和siFoxP3-2b是新的并且在本专利申请中首次描述。这些siRNA的靶序列位于编码FoxP3转录因子的人mRNA上，并且在包括人，大鼠，小鼠，猴子和狗的许多物种中是保守的。

表2:可用于本发明的抗血管生成剂(药物名称)的例子

药品名称	种类	作用机制	临床阶段	厂商
贝伐单抗 (Avastin)	人源化单克隆抗体	阻断 VEGF-A 与受体结合	批准用于转移性 CRC，NSCLC，RCC，复发性 GBM	Genentech/Roche (巴塞尔，瑞士)
舒尼替尼 (Sutent)	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR, PDGFR, FLT-3, CSF1R 的信号传导	批准用于转移性 RCC，伊马替尼耐药 GIST，PNET	Pfizer (纽约，纽约州)
索拉非尼 (Nexavar)	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR，raf, PDGFR，Kit 的信号传导	批准用于转移性 RCC，HPCC	Bayer/onyx (南圣弗朗西斯科，加州)
帕唑帕尼 (Votrient)	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR，PDGFR，Kit 的信号传导	批准用于转移性 RCC	Glaxo Smith Kline (伦敦，英国)
凡德他尼 (Caprelsa)	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR，PDGFR，EGFR 的信号传导	批准转移性甲状腺髓样癌	Astra Zeneca (伦敦,英国)
阿西替尼 (Inlyta)	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR，PDGFR，Kit 的信号传导	批准用于一线治疗失败的 RCC	Pfizer (纽约,纽约州)
阿柏西普注射剂	嵌合可溶性受体	与 VEGF-A，VEGF-B 和 PLGF 结合	第 3 阶段多种肿瘤类型	Regeneron/Sanofi Aventis (巴黎)
AGM386	肽抗体（peptidobody）	与血管生成素-1 和-2 结合	第 3 阶段多种肿瘤类型	Amgen(千橡市，加州)
莫特塞尼	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR，PDGFR，Kit 的信号传导	第 3 阶段多种肿瘤类型	Amgen(千橡市，加州)
西地尼布 (Recentin)	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR，PDGFR，Kit 的信号传导	第 3 阶段多种肿瘤类型	Astra Zeneca (伦敦,英国)
卡博替尼	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR，PDGFR，cMET，RET，Kit 的信号传导	第 3 阶段多种肿瘤类型	Exelixis (南圣弗朗西斯科，加州)
Tivozanib	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR，PDGFR，Kit 的信号传导	第 3 阶段转移性 RCC	Aveo (剑桥市，马萨诸塞州)
瑞戈非尼	小分子 RTK 抑制剂	抑制 VEGFR，PDGFR，Kit 的信号传导	3 期复发的 CRC 和其它肿瘤	Bayer/Onyx
雷莫芦单抗	人类单克隆抗体	阻断 VEGFR-2 的信号传导	第 3 阶段多种肿瘤类型	ImClone/Lilly (印第安纳波利斯,伊利诺伊州)
西仑吉肽	环肽	阻断 αv 整合素	第 3 阶段 GBM	Merck KGaA (达姆施塔特,德国)
伏洛昔单抗	嵌合单克隆抗体	阻断 α5β1 整合素	第 2 阶段多种肿瘤类型	PDL/Biogen Idec (剑桥市，马萨诸塞州)
IMC-18F1	人类单克隆抗体	阻断 VEGFR-1 的信号传导	第 2 阶段多种肿瘤类型	ImClone/Lilly
TB-403	人源化单克隆抗体	阻止 PLGF 结合到 VEGFR-1	第 2 阶段多种肿瘤类型	Thrombogenix/Roche
抗-EGFL7	人源化单克隆抗体	阻断 EGFL7，一种与血管成熟有关的蛋白质	第 2 阶段多种肿瘤类型	Genentech/Roche (巴塞尔，瑞士)
TKI，酪氨酸激酶抑制剂；CRC，结直肠癌 r；NSCLC，非小细胞肺癌；RCC，肾细胞癌；GBM，多形性胶质母细胞瘤；GIST，胃肠道间质瘤；HPCC，肝细胞癌				

表 3：可用于本发明的免疫治疗剂（“形式”列）的例子

形式	状态	临床前研究发现	药代动力学	药效动力学	临床	
					疗效	安全性
细胞因子	IL-2 和 IFNα 被批准，但由于高毒性和低效率而不常用	中度效果	明确的动力学	多重效果，作用机制（MoA）很复杂，难以归因于一种机制	低	高非特异性毒性（例如，全身水肿）
细胞疗法 (CAR-Ts 和 TCR-Ts)	多种 CAR-Ts 和 TCR-Ts 处于临床试验中；高度复杂的制造和供应链；强烈的靶依赖；并且临床有效靶很少（例如，CD19 和 NY-ESO-1）	中度至强效果	输注细胞的体内追踪和寿命	明确的 MoA；靶依赖的效应	依赖于靶的高响应率（CD19 高达 90％，NY-ESO-1 高达 50-60％）129	细胞因子释放综合征；与健康组织的靶依赖的交叉反应
疫苗	许多类型的癌症疫苗（包括肽，蛋白质，病毒和细胞）处于临床试验中	在小鼠中有明显效果，但这些并不能直接用于人类	基于肽或蛋白质的疫苗没有直接的药代动力学	可测量的免疫反应	单药疗法疗效极低，需要探索联合用药	毒性极小
检查点 - 调节性抗体	伊匹单抗（靶向 CTLA4），派姆单抗（靶向 PD1）和纳武单抗（靶向 PD1）被批准；许多化合物（包括 PDL1 阻断剂）处于临床研究中	中度效果	明确的动力学	通用机制不受组织学，特定突变或癌症抗原的束缚；靶结合后的多个下游效应	对一部分患者的长期生存存活率来说具有强效果	独特的 irAEs；可通过治疗算法进行管理
连接双特异性抗体	博纳吐单抗（BITE）被批准用于 $CD19^{+}$B 细胞恶性肿瘤	强体外溶细胞活性	明确的动力学	明确的 MoA；激活并将 T 细胞连接到表达靶的癌细胞	响应率高	中度至重度毒性
双特异性抗体	多种抗体形式在开发的过程中	好效果（取决于靶）	明确的动力学	依赖于靶；正在探索双重检查点抑制	NA	NA
小分子	几种小分子（例如，靶向 IDO）处于临床试验中，多种小分子在开发的过程中	强效果 (取决于靶	明确的动力学	明确的靶向效应，其中几个靶位于肿瘤微环境中	单药疗法效果低；正在探索联合用药	脱靶毒性的可能性
溶瘤病毒	T-vec 批准用于初次手术后复发不可切除的黑色素瘤；其他几种正在接受临床研究，其中大多数用于肿瘤内注射，一些扩大到全身给药	中度至强效果	明确的动力学	由肿瘤内注射诱导的全身免疫应答未得到充分研究	单药治疗反应率中度；局部注射后具有全身效应	对于肿瘤内注射来说具有中度毒性
佐剂	未经批准，未成功作为单药疗法被测试；目前正在进行联合治疗的新调查	在小鼠中有抗肿瘤效果，特别是联合给药*	明确的动力学	多重效果，MoA 很复杂，难以归因于一种机制	单药疗法效果低；联合用药有协同作用	如果全身给药，则毒性很高

CAR-Ts，嵌合抗原受体转导的 T 细胞；BITE，双特异性 T 细胞的结合者；IDO，吲哚胺 2,3-双加氧酶；IFNα，干扰素 α；IL-2，白细胞介素-2；irAE，免疫相关的不良事件；MoA,作用机制；NA，不适用；NY-ESO-1，癌症/睾丸抗原 1；TCR-Ts，T 细胞受体转导的 T 细胞；T-vec，溶瘤病毒 talimogene laherparepvec.
*与化疗或检查点调节剂联合使用

表 4：可用于本发明的抗肿瘤剂（药物名称）的例子

药品名称(主导公司)	作用模式	疗效	最近的参考数或阶段数
ARN-509 (Johnson & Johnson)	抑制 AR 核转位和 DNA 结合	在 12 周时约 47%的患者的 PSA 有减少（≥50%）	• I 期 [249] • III 期 进行中 [250]
Cabometyx, Cometriq or 卡博替尼(Exelis)	FLT3，VEGFR1，VEGFR2，VEGFR3，c-Met，KIT（也称为 cKIT），TIE1，TIE2，RET，TRKB 和 AXL 的小分子抑制剂	COMET-1 的药物中位 OS 为 11.0 个月，泼尼松龙为 9.8 个月	• III 期 [251] • 联合用药研究进行中 [252]
库司替森 or OGX-011 (Teva Pharmaceuticals)	抑制 TRPM2 的反义寡脱氧核苷酸（也称为簇蛋白）	协同作用：药物加多西紫杉醇加泼尼松的中位 OS 为 17 个月，而多西紫杉醇加泼尼松为 14 个月	• III 期 [253] • 联合用药研究进行中 [254]
DCVAC/PCa (SOTIO Group)	针对肿瘤抗原的树突细胞疫苗	延长 PSA-倍增时间 3.4 倍	•复发的前列腺癌 [255] • III 期 进行中 [256]
Lutrate (GP Pharm)	抑制促性腺激素的垂体腺分泌	在 1 个月时，在 97％的患者中抑制了睾酮的产生	• III 期 [257] • 3 个月和 6 个月的制剂正在开发中
Orteronel (Takeda)	抑制 CYP17A1 和 AR	由于与安慰剂相比缺乏疗效，研究终止	• III 期 [258] •维持研究暂停 [259]
ProstAtak or AdV-tk (Advantagene)	表达单纯疱疹病毒胸苷激酶基因的腺病毒载体，加上合成的无环鸟苷类似物	早期前列腺癌复发的绝对风险降低（20％）	• I 期 [260] • 与放疗联合使用的 III 期进行中 [261]
Prostvac or PSA-TRICOM (Bavarian Nordic)	感染抗原呈递细胞并产生用于免疫激活的蛋白质的疫苗载体	中位生存期提高约 8.5 个月，导致 PSA 下降（38％）和 PSA 增加速率下降（47％）	• 阶段 II [173] • III 期 进行中 [222]
Sprycel or dasatinib (Bristol-Myers Squibb)	抑制 SRC 家族蛋白酪氨酸激酶和 BCR-ABL 融合蛋白	与多西紫杉醇联合使用对生存无益处	•与多西紫杉醇联合使用的 III 期 [262]
TASQ (Active Biotech AB)	通过靶向 MRP14 抑制血管发生	在转移性 CRPC 中，与安慰剂相比，PFS 提高了 4 个月	• II 期 [263] • III 期完成 [264]
Yervoy or 伊匹单抗 (Bristol-Myers Squibb)	CTLA4 特异性抗体	伊匹单抗的中位 OS 为 11.2 个月，安慰剂为 10.0 个月	• III 期 [170]
DI17E6 or EMD525797 (Merck & Co.)	抑制人整合素的 αV 亚单位	69％的患者射线照射 SD≥18 周	• II 期 [265]
Ozarelix (Spectrum Pharmaceuticals)	LHRH 拮抗剂	在激素依赖性前列腺癌中抑制睾酮到去势水平；在 97％的患者中 PSA 降低≥50％	• 临床前 [266] • II 期 完成 [267]
ATL101 (ATLAB Pharma)	靶向 PSMA	10-27％患者的剂量依赖性 PSA 下降≥50％；4-6 周时 64％患者的 CTC 下降	• II 期 [268]
BIND-014 (BIND Therapeutics)	靶向 PSMA 并含有多西紫杉醇的聚合物纳米颗粒	I 期：患有前列腺癌的一名患者有 PR	• I 期 [269] • II 期 完成 [270]
Capesaris or GTx-758 (GTx)	非甾体选择性 ERIα 激动剂	36％的患者 PSA 下降≥30％	• II 期 [271]
Quinacrine or CBLC102	NF-κB 转录抑制，p53 转录诱导（恢复 p53 依赖的凋	临床前研究显示与紫杉醇的协同作用；II 期数据显示，31	•临床前 [272]

(Cleveland BioLabs)	亡途径和肿瘤细胞凋亡）	例患者中有 1 例单独使用奎纳克林时有 PR	• II 期 完成 [273]
EPO906 or patupilone (Novartis)	诱导微管蛋白聚合并稳定微管	13-47％的患者 PSA 下降≥50％; 24％的患者具有可测量 PR	• II 期 [274]
G-202 or thapsigargin prodrug (GenSpera)	靶向 PSMA 和 SERCA 泵	临床前研究显示小鼠异种移植模型中有~50％的退化	• 临床前 [275] • II 期 (撤回) [276]
GVAX (Aduro Biotech)	表达 GM-CSF 并刺激免疫应答的疫苗	19％患者的 PSA 稳定; 1 例患者 PSA 下降≥50％; 高剂量组中位 OS 为 35 个月	• I/II 期 [277]
IRX4204 (Io Therapeutics)	RXR 激动剂	13％的患者 PSA 下降≥50％	• II 期 [278]
ISIS-EIF4ERx (Isis Pharmaceuticals)	抑制 eIF4E 的反义寡核苷酸	I 期: 23％具有混合性肿瘤的患者 SD	• I 期 [279] • I/II 期合并 [108]
Ixempra or 伊沙匹隆 (Bristol-Myers Squibb)	促进微管蛋白的聚合和微管稳定化	在 17-48％的患者中，PSA 下降≥50％; 2-32％患者具有 PR	• II 期 [280]
KX2-391 (Kinex Pharmaceuticals)	SRC 激酶抑制剂	10％的患者 PSA 下降≥30％; 18％CTC 从不利转为有利; 由于预先规定的无效规则，II 期研究提前停止	• II 期 [281]
L-BLP25 (Merck & Co.)	含有 MUC1 衍生抗原的脂质体包封的肽疫苗	50％的 CSPC 患者 PSA 水平稳定或降低; 38％的患者 PSA 倍增时间延长≥50％	• II 期 [282]
Olaratumab or LY3012207 (Eli Lilly and Company)	阻断 PDGFRα	混合肿瘤类型：63％以 SD 为最佳应答	• I 期 [283] • II 期 完成 [284]
ODM-201 (Bayer & Orion)	AR 拮抗剂	87％的患者 PSA 下降≥50％; 12 周时 100％SD 或具有 PR	• I/II 期 [285] • III 期 进行中 [286]
OGX-427 (OncoGenex Pharmaceuticals)	靶向 HSP27 的反义寡核苷酸	与多西紫杉醇联合使用时，7 名患者中有 2 名患有 PR，7 名患者中有 1 名 SD 持续时间长; 30％的患者 PSA 下降≥30％	• I 期 [287] • 联合用药 II 期进行中 [288]
Lynparza or 奥拉帕尼 (AstraZeneca)	PARP 抑制剂	3 例前列腺癌患者中有 1 例（BRCA 突变携带者）PSA 下降≥50％	• I 期 [240] • II 期 进行中 [242]
Tigapotide or PCK3145 (Kotinos Pharmaceutical)	抑制 MMP9 的分泌及其与 CD44 的结合，干扰 VEGF 信号传导并降低 PTHRP 水平	15 例患者中有 10 例 SD; 1 例患者 PSA 下降≥30％	• I 期 [289]
达鲁舍替 or PHA-739358 (Nerviano Medical Sciences)	AURKs 的小分子抑制剂	26％患者 SD; 88 例患者中有 2 例 PSA 下降≥50％	• II 期 [290]
PLX3397 (Daiichi Sankyo)	抑制 FLT3，KIT，CSF1R	4 例混合肿瘤患者中 3 例 CTC 减少	• I 期 [291] • II 期 完成 [292]
PSMA ADC (Progenics Pharmaceuticals)	抗 PSMA 单克隆抗体-MMAE 缀合物	50％的患者 PSA 或 CTC 减少	• I 期 [293] • II 期 完成 [294]
Ramucirumab (Eli Lilly and Company)	抑制 VEGFR2	11％的混合肿瘤患者有 PR; 30％的患者（3 例患有前列腺癌的患者中有 1 例）的 SD 或 PR 持续 6 个月	• I 期 [295]

ADC，抗体 - 药物缀合物；AR，雄激素受体；AURKs，极光激酶；CRPC，去势抗性前列腺癌；CSF1R，巨噬细胞集落刺激因子 1 受体；CSPC，去势敏感的前列腺癌；CTC，循环肿瘤细胞；CTLA4，细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4；CYP17A1，细胞色素 P450 17A1；eIF4E，真核翻译起始因子 4E；ERlα，雌激素受体 1α；FLT3，Fms 样酪氨酸激酶 3；GM-CSF，粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子；HSP27，热休克蛋白 27；LHRH，促黄体激素释放激素；MMAE，单甲基奥瑞他汀 E.；MMP9，基质金属蛋白酶 9；MRP14，迁移抑制因子相关蛋白 14；MUC1，粘蛋白 1；NF-κB，核因子-κB；OS，总体生存率；PARP，聚（ADP-核糖）聚合酶；PDGFRα，血小板衍生生长因子受体-α；PFS，无进展生存；PR，部分应答；PSA，前列腺特异性抗原；PSMA，前列腺特异性膜抗原；PTHRP，甲状旁腺激素相关蛋白；RXR，类视黄醇 X 受体；SD，病情稳定；SERCA，肌浆/内质网钙 ATP 酶；TIE，具有免疫球蛋白样和 EGF 样结构域的酪氨酸激酶；TRKB，原肌球蛋白相关激酶 B；TRPM2，睾酮抑制的前列腺通道 2；VEGF，血管内皮生长因子；VEGFR，VEGF 受体。

表5：主要缓冲剂

缓冲盐	pH 范围	25°C 的 pKa
马来酸盐(pK1)	1.2-2.6	1.97
磷酸盐(pK1)	1.7-2.9	2.15
4-(环己基氨基)-1-丁烷磺酸（CABS）	10.0-11.4	10.7
哌啶	10.5-12.0	11.12
甘氨酸(pK1)	2.2-3.6	2.35
柠檬酸盐(pK1)	2.2-6.5	3.13
双甘氨肽 (pK1)	2.5-3.8	3.14
苹果酸盐(pK1)	2.7-4.2	3.4
甲酸盐	3.0-4.5	3.75
柠檬酸盐(pK2)	3.0-6.2	4.76
琥珀酸盐(pK1)	3.2-5.2	4.21
醋酸盐	3.6-5.6	4.76
丙酸盐	3.8-5.6	4.87
苹果酸盐(pK2)	4.0-6.0	5.13
吡啶	4.9-5.9	5.23
哌嗪(pK1)	5.0-6.0	5.33
甲次砷酸盐	5.0-7.4	6.27
琥珀酸盐(pK2)	5.5-6.5	5.64
2-(N-吗啉)乙磺酸（MES）	5.5-6.7	6.1
柠檬酸盐(pK3)	5.5-7.2	6.4

缓冲盐	pH 范围	25°C 的 pKa
马来酸盐(pK2)	5.5-7.2	6.24
组氨酸	5.5-7.4	1.70, 6.04, 9.09
双(2-羟甲基)氨基-三(羟甲基)甲烷(BIS-TRIS)	5.8-7.2	6.46
磷酸盐(pK2)	5.8-8.0	7.2
乙醇胺	6.0-12.0	9.5
N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸(ADA)	6.0-7.2	6.59
碳酸盐(pK1)	6.0-8.0	6.35
N-氨基甲酰甲基乙磺酸(ACES)	6.1-7.5	6.78
哌嗪-1,4-二乙磺酸(PIPES)	6.1-7.5	6.76
3-(N-吗啉)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)	6.2-7.6	6.87
咪唑	6.2-7.8	6.95
双三(羟甲基)氨基丙烷(BIS-TRIS 丙烷)	6.3-9.5	6.80, 9.00
2-(二乙醇胺基)乙磺酸(BES)	6.4-7.8	7.09
3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)	6.5-7.9	7.14
N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES)	6.8-8.2	7.48
N-三(羟甲基)甲基-2-氨基	6.8-8.2	7.4

缓冲盐	pH 范围	25°C 的 pKa
乙磺酸（TES）		
4-(N-吗啉基)丁磺酸（MOBS）	6.9-8.3	7.6
3-双(2-羟乙基)氨基-2-羟基丙磺酸 (DIPSO)	7.0-8.2	7.52
N-三(羟甲基)甲氨基-2-羟基丙磺酸钠盐 (TAPSO)	7.0-8.2	7.61
三羟乙基胺(TEA)	7.0-8.3	7.76
焦磷酸盐	7.0-9.0	0.91, 2.10, 6.70, 9.32
N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-羟基丙磺酸) (HEPPSO)	7.1-8.5	7.85
哌嗪-N,N-双(2-羟基乙烷磺酸) (POPSO)	7.2-8.5	7.78
三 (羟甲基) 甲基甘氨酸（tricine）	7.4-8.8	8.05
肼	7.5-10.0	8.1
双甘氨肽 (pK2)	7.5-8.9	8.25
2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇(tris）	7.5-9.0	8.06
N-2-羟乙基哌嗪-N'-3-丙磺酸 （EPPS），4-羟乙基哌嗪丙磺酸（HEPPS)	7.6-8.6	8
N,N-二羟基乙基甘氨酸（BICINE）	7.6-9.0	8.26
N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-4-丁磺酸(HEPBS)	7.6-9.0	8.3

缓冲盐	pH 范围	25°C 的 pKa
N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸（TAPS)	7.7-9.1	8.4
2-氨基-2-甲基-1，3-丙二醇（AMPD）	7.8-9.7	8.8
N-（4-羟基苯基）乙酰胺（TABS)	8.2-9.6	8.9
奎诺二甲基丙烯酯(AMPSO)	8.3-9.7	9
牛磺酸(AES)	8.4-9.6	9.06
硼酸盐	8.5-10.2	9.23, 12.74, 13.80
2-环己胺基乙磺酸（CHES）	8.6-10.0	9.5
2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP)	8.7-10.4	9.69
甘氨酸(pK2)	8.8-10.6	9.78
氢氧化铵	8.8-9.9	9.25
3-(环己胺)-2-羟基-1-丙磺酸(CAPSO)	8.9-10.3	9.6
碳酸盐(pK2)	9.5-11.1	10.33
甲胺	9.5-11.5	10.66
哌嗪(pK2)	9.5-9.8	9.73
3-(环己胺)-1-丙磺酸(CAPS)	9.7-11.1	10.4
磷酸盐(pK3)		12.33

[0142] 参考文献

Bartlett,D.W.,and M.E.Davis.2006.Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent

imaging.Nucleic Acids Res 34:322-333

Compagno,D.,C.Merle,A.Morin,Gilbert C.,J.Mathieu,A.Bozec,C.Mauduit,M.

Benhamed,and F.Cabon.2007.SIRNA-Directed In Vivo Silencing of Androgen Receptor Inhibits the Growth of Castration-Resistant Prostate Carcinomas.PLoS ONE 2:e1006.

Delloye-Bourgeois,C.,E.Brambilla,M.-Mr.Coissieux,C.Guenebeaud,R.Pedeux,V.Firlej,F.Cabon,C.Brambilla,P.Mehlen,and A.Bernet.2009.Interference With Netrin-1 and Cell Death Tumor in Non-Small Cell Lung Cancer.J.Natl.Cancer Inst.101(237/247)

Draper,D.E.2004.A guide to ions and RNA structure.Rna 10:335-343

Firlej,V.,J.R.R.Mathieu,C.Gilbert,L.Lemonnier,j.Nakhlé,C.Gallou-Kabani,B.

Guarmit,A.Morin,N.Prevarskaya,NB Delongchamps,and F.Cabon.2011.Thrombospondin-1 Triggers Cell Migration and Development of Advanced Prostate Tumors.Cancer Res carch 71:7649-7658

Forconi,M.,and D.Herschlag.2009.Metal Ion-Based RNA Cleavage as a Structural Probe.

Methods in Enzymology 468:91-106

Heidel,J.D.,S.Hu,X.F.Liu,T.J.Cheat,and M.E.Davis.2004.Lack of interferon response in animals to naked siRNAs.Nat Biotechnol 22:1579-1582

McCaffrey,A.P.,L.Meuse,T.T.Pham,D.S.Conklin,G.J.Hannon,and M.A.Kay.2002.

RNA interferenee in adult mice.Nature 418:38-39

Pannequin,J.,N.Delaunay,M.Buchert,F.Surrel,J.-F.Bourgaux,J.Ryan,S.Boireau,J.

Coelho,A.Pelegrin,P.Singh,A.Shulkes,M.Yim,G.S.Baldwin,C.Pignodel,G.

Lambeau,P.Jay,D.Joubert,and F.Holland.2007.[beta]-Catenin/Tcf-4Inhibition After Progastrin Targeting Reduces Growth and Drives Differentiation of Intestinal Tumors.Gastroenterology 133:1554-1568

Robbins,M.,A.Judge,and I.MacLachlan.2009.siRNA and Innate Immunity.

Oligonucleotides 19:89-102

Scomparin,A.,D.POlyak,A.Krivitsky,and R.Satchi-Fainaro.2015.Achieving successful delivery of oligonucleotides-From physico-chemical characterization to in vivo evaluation.Biotechnology Advances 33:1294-1309

Tatiparti,K.,S.Sau,S.K.Kashaw,and A.K.Iyer.2017.siRNA Delivery Strategies:A Comprehensive Review of Recent Developments.Nanomaterials(Basel) 7:

van de Water,F.M.,O.C.Boerman,A.C.Wouterse,J.G.P.Peters,F.G.M.Russel,and R.

Masereeuw.2006.Intravenously administered short interfering rna accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal

proximal tubules.Drug metab set 34:1393-1397

Vlassov,V.V.,L.A.Blakireva,and L.A.Yakubov.1994.Of oligonucleotides across natural and model membranes.Biochimica and Biophysica Acta(BBA)-Reviews on Biomembranes 1197:95-108Zeimet,A.G.,D.Reimer,A.C.Radl,A.Reinthaller,C.Schauer,E.Petru,N.Concin,S.Braun,and C.Marth.2009.Pros and cons of intraperitoneal chemotherapy in the treatment of epithelial ovarian cancer.Anticancer Res 29:2803-2808

[0143] 通过以下实施例和附图将更好地说明本发明。以下实施例旨在阐明本发明的目的并说明有利的实施方案,但决不是要限制本发明的范围。

附图说明

[0144] 图1:用RT-qPCR来对siRNA进行定量的方法的示意图。参考范围的示例。

[0145] 图2:静脉内注射siAR-1 siRNA不会抑制小鼠中异种移植的前列腺肿瘤的生长。

[0146] 用对照siRNA(对照组;灰色曲线)或用0.12mg/kg的siAR-1(黑色曲线)每日静脉内给药治疗的小鼠中异种移植的22RV1肿瘤的生长。平均值±SEM,每组n=4只小鼠。

[0147] 图3:连续全身递送不靶向在小鼠中表达的mRNA的siRNA荧光素酶(siLuc),以允许该酶分布到血清和不同器官中。

[0148] 在154mM NaCl溶液中稀释的SiLuc,以2mg/kg/天的剂量连续皮下给药3天,测量小鼠(n=3)的血清和各种器官中SiLuc的平均浓度(摩尔/L)。

[0149] 图4:FoxP3-1和FoxP3-2 siRNA抑制肿瘤细胞中的FoxP3表达。用siFoxP3-1或siFoxP3-2或用对照siRNA(对照组)转染C4-2前列腺细胞。转染两天后,测量细胞中FoxP3 mRNA相对于被认为是不变的亲环蛋白A mRNA的量的量(Δ-ΔCT方法),并与在对照条件下测量的值进行比较。

[0150] 图5:全身皮下给药的siFoxP3-2 siRNA分别在血清和各个器官中的情况。在含有10mM $MgCl_2$的柠檬酸盐缓冲液中稀释siFoxP3-2 siRNA,并以0.12mg/kg/天的剂量皮下推注给药连续4天,然后测量小鼠中血清和不同器官中siFNA siFoxP3-2的浓度(摩尔/L,平均值±SEM,每组n=4只小鼠)。

[0151] 图6:对雄性小鼠连续3天每天给药siFoxP3-2 siRNA,这减少了小鼠睾丸中编码FoxP3的mRNA的量。对在小鼠睾丸中编码FoxP3的mRNA相对于编码亲环蛋白A的mRNA的量进行定量,其中连续四天对所述小鼠皮下推注,以0.12mg/kg的剂量给药在含有10mM $MgCl_2$的柠檬酸盐缓冲液中稀释的siRNA siFoxP3-2(标注为siFoxP3-2),或用载体给药(标注为对照组)。

[0152] 图7:同时给药3种siRNA并实现所述各siRNA在血清和不同器官中的分布。皮下注射在含有10mM $MgCl_2$的pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液中稀释的这3种siRNA的混合物10分钟后,在血清,前列腺和骨中测定的siRNA siAR-1(黑色条),siTSP1-1(深灰色条)和siLuc(浅灰色条)的浓度。对于每种siRNA,认为血清浓度具有值1,并且按照血清中的该值来显示在各器官中的浓度。

[0153] 图8:连续4周给药siAR-1允许在猴子中维持siAR-1在血清中的浓度基本恒定。将配制在154mM NaCl中的siAR-1以0.05mg/kg/天的剂量在猴子(n=4)中皮下连续给药4周,

显示siAR-1的时间浓度。在治疗的第二周、第三周和第四周结束时测量平均血清浓度的值基于治疗第一周结束时测量的平均血清浓度。

[0154] 图9:比较推注或连续皮下给药后siRNA在血清中的药代谢动力学。在如图8所示植入渗透泵二十四小时之前,同样的动物以0.05mg/kg的剂量接受在生理盐水(154mM NaCl)中配制的siAR-1的皮下注射的单次推注,并随时间测量浓度。实线表示图8中报告的值的平均值。观察到推注注射后siRNA的血清浓度迅速增加然后siRNA迅速被消除,并从第3小时开始检测不到所述siRNA。

[0155] 图10:对于生理盐水配制的siRNA,连续皮下全身给药比推注给药更有效地抑制组织中的靶向表达。用在生理盐水(154mM NaCl)中配制的siTPS1-1 siRNA以0.12mg/kg/天的剂量通过渗透泵皮下注射小鼠1周("连续"组,黑色条)。另一组小鼠(每组n=5只小鼠)以0.12mg/kg/天的剂量接受在生理盐水溶液中配制的SiRNA TSP1-1的皮下推注7天(推注组,灰色条)。在治疗结束时,对于每组小鼠,在不同组织中定量siRNA siTSP1-1(图A)和在前列腺中测量的编码TSP1的mRNA(图B)。在图A中,对于每个器官,随着在"连续"组中测量的siTSP1-1的平均浓度被视为1,报告在"推注"组中测量的siTSP1-1的平均浓度。图B:基于用不含siRNA的154mM NaCl溶液治疗的一组小鼠("载体"组,白色条)的各个器官中测量的编码TSP1的mRNA的表达,报告了在"连续"(灰色条)或推注(黑色条)组中的各个器官中通过RT-qPCR测量的编码TSP1的mRNA的表达。

[0156] 图11:推注或连续给药siRNA对肿瘤生长的影响。对裸小鼠移植C4-2前列腺细胞。一旦检测到肿瘤,用SiAR-1 siRNA治疗小鼠。

图A:在用生理盐水(154mM NaCl)配制的siAR-1给药的小鼠中,测量肿瘤体积随时间的变化(平均值±SEM,每组n=10只动物),其中以0.12mg/kg/天的剂量皮下给药(黑色符号,不连续的线)或以1mg/kg/小时(黑色符号,连续线)的剂量给药小鼠。对照组(白色符号)每日注射载体(154mM NaCl)。

图B:用生理盐水溶液(载体组,154mM NaCl,白色菱形)或用生理盐水(154mM NaCl)配制的siRNA siAR-1来填充Alzet可植入渗透泵。根据泵流量调节siRNA浓度,以0.02mg/kg/天(浅灰色菱形),0.2mg/kg/天(深灰色菱形)或2mg/kg/天(黑色菱形)的日剂量递送。将泵皮下植入动物中并随时间测量肿瘤(平均值±SEM,每组n=8只动物)。

[0157] 图12:通过连续全身给药siAR-1抑制前列腺癌的骨转移。左图:携带22RV1人前列腺肿瘤的裸小鼠胫骨中的人AR mRNA的表达水平(平均值±SEM,n=7,各值相对于NaCl组的平均值),其中用载体(154mM NaCl,黑色条)或用在该载体中稀释的siAR-1(灰色条)治疗且连续皮下给药3周所述裸小鼠裸小鼠。右图:通过两组动物中人HPRT(次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶)mRNA的表达来测量骨中的转移量。每个条形代表小鼠的骨转移量。"0"表示在该动物中未检测到HPRT mRNA。

[0158] 图13:对通过连续皮下给药siAR-11个月来治疗的小鼠的前列腺进行雄激素受体的免疫检测。从左到右,照片代表了由载体(154mM NaCl)或剂量为0.2mg/kg/天,2mg/kg/天,或10mg/kg/天的siAR-1治疗的多组小鼠(n=10)的前列腺。

[0159] 图14:对通过连续皮下给药siAR-12周治疗的大鼠的前列腺进行雄激素受体的免疫检测。这些照片代表用载体(154mM NaCl)"对照组"或用siAR-1以剂量为0.1mg/kg/天或0.9mg/kg/天治疗的大鼠前列腺。

[0160] 图15:在以5mg/kg/天的剂量连续皮下给药该siRNA一个月的情况下对猴子的各种器官中siAR-1的定量(n=4只动物)。将器官中siAR-1的浓度与血清中测量的浓度相关。

[0161] 图16:在治疗前,或在用生理盐水(154mM NaCl)或用在生理盐水配制的siAR-1中以5毫克/千克/天的剂量连续皮下给药治疗后,对食蟹猴(每组n=6)血清中的PSA(前列腺指定抗原)进行定量。纵坐标:血液中的PSA,单位为pg/ml。由虚线表示的ELISA检测限(LLOQ或最低定量浓度)为120pg/ml。低于该值的值任意表示为119pg/ml。

[0162] 图17:对被连续脑内给药治疗裸小鼠脑中的U87胶质母细胞瘤肿瘤中的TSP1和血管(CD31染色)进行免疫检测,所述给药是用在离肿瘤一定距离处植入的导管输入siTSP1-1(以siRNA TSP1表示)或siRNA对照(siRNA-对照)。

[0163] 图18:丙烯酰胺凝胶电泳分析在不同条件下孵育的siRNA的完整性。泳道1,5和7:水溶液中的siTSP1-1;泳道2:siTSP1-1和氧化LDL的混合物(1∶1重量比);泳道3:siTSP1-1和氧化LDL的混合物(1∶10重量比);泳道4:siTSP1-1和海沙瑞林的混合物(1∶1重量比);泳道6:在调节至pH6的含有0.1mM $ZnCl_2$的水溶液中的siTSP1-1;泳道8:pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液中的siTSP1-1;泳道9-11:在补充有1mM $ZnCl_2$的pH 6的10mM柠檬酸盐缓冲液中的siTSP1-1,在37℃孵育10分钟(泳道9),1小时(泳道10)或6小时(泳道11)。M:分子量标记(25bp DNA梯形条带,Invitrogen)。

[0164] 图19:进行siRNA皮下推注给药后,血清和前列腺中siTSP1-1的浓度;制剂的效果。成年小鼠成组地以0.12mg/kg的剂量接收皮下推注siTSP-1 siRNA,所述siTSP-1 siRNA在含有154mM NaCl(灰色条对照组)的溶液中或在含有0.165mM $ZnCl_2$的水溶液中配制(黑色条)。在注射20分钟后,测量在这些不同组小鼠的血清和前列腺中的siRNA浓度,并将这些浓度与对照组的被视为1的值进行比较。

[0165] 图20:血清和不同器官中的siAR-1的浓度取决于所给药的siRNA的制剂。小鼠血清或组织中siAR1的浓度是用以下溶液之一配制的siRNA siAR-1来进行皮下注射而实现的:154mM NaCl(NaCl,对照组);10mM柠檬酸盐缓冲液pH6(柠檬酸盐);pH 6的10mM柠檬酸盐缓冲液,补充有0.1ml的$MnCl_2$(柠檬酸盐/Mn),或0.1mM的$MgCl_2$(柠檬酸盐/Mg),或0.1mM的$ZnCl_2$(柠檬酸盐/Zn),或0.1ml的$ZnCl_2$和0.1mM的$MnCl_2$(柠檬酸盐/ZnMn),或0.1mM的$ZnCl_2$和0.1mM的$MnCl_2$和0.1mM的$MgCl_2$(柠檬酸盐/ZnMnMg),或10mM的$ZnCl_2$(柠檬酸盐/Zn10)或0.05mM亚精胺(柠檬酸盐/亚精胺)。

图A:接受指定治疗的雄性动物血清中的测量值。

图B:接受指定治疗的雄性动物的前列腺(深灰色条)或脾(浅灰色条)中的测量值。

图C:接受指定治疗的雌性动物脾中的测量值。

[0166] 图21:在生理盐水(154mM NaCl)中或在含有7.5mM $MgCl_2$的pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液中配制以下3种siRNA的混合物:siAR-1,siTSP1-1和siLuc,并对携带4T1肿瘤的小鼠以每种2mg/kg/天的速率皮下连续给药siRNA3天。在血清、不同器官和4T1肿瘤中测定siRNA。以在对照组小鼠(154mM NaCl)的血清中测量的siRNA的浓度为基准表示在血清,各器官(图A)和肿瘤(图B)中测量的每种siRNA的浓度。黑条:siAR-1,深灰色条,siTSP1-1,浅灰色条:siLuc。

[0167] 图22:用剂量为0.12mg/kg的下列制剂的siRNA siAR-1对多组成年小鼠给药:配制于154mM NaCl溶液(对照组,标注为NaCl),配制于补充有海沙瑞林的pH 6的10mM柠檬酸盐

缓冲液(siRNA:海沙瑞林的重量比为1:0.2,标注为柠檬酸盐/海沙瑞林),配制于补充有氧化LDL的pH 6的10mM柠檬酸盐缓冲液(siRNA:氧化LDL的重量比为1:1,标注为柠檬酸盐/LDL)。在注射20分钟后,在这些不同组小鼠的血清(图A),前列腺(图B,深灰色条)或脾(图B,浅灰色条)中测量的siRNA浓度,并以对照组(NaCl)为基准的形式表示。

[0168] 图23:当在含有氧化LDL的柠檬酸盐缓冲液中配制时,全身给药和连续皮下给药的siRNA在血清,组织和肿瘤中的浓度增加。将渗透泵皮下植入具有22RV1瘤的小鼠中,用154mM NaCl溶液配制的siAR-1或在pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液中配制的siAR-1和氧化LDL,以2mg/kg/天siAR-1和0.2mg/kg/天氧化LDL的剂量全身连续给药2天。以注射NaCl组合物后测量的浓度为基准来表示注射柠檬酸盐缓冲液组合物后测量的血清,器官和肿瘤中siAR-1的浓度。

具体实施方式

实施例1:材料和方法

[0169] 1.通过改良的RT-PCR定量方法定量siRNA

[0170] 为了量化生物样品中的siRNA,本发明人开发了逆转录方法,随后进行定量PCR(RT-qPCR)。

[0171] 对于每个siRNA,合成具有8个突出核甘酸的特定的茎环引物,这8个核苷酸与siRNA(反义)引导链的3′端的8个核苷酸互补。在逆转录步骤之后,使用两种引物通过PCR扩增获得的产物,其中一种引物与对应于逆转录引物环的区域杂交。第二引物3′端的12个核苷酸具有对应于siRNA引导链逆转录后新合成的cDNA的5′端的12个核苷酸的DNA序列。通过Taqman荧光探针的降解或通过掺入荧光染料SybrGreen连续进行扩增检测。

[0172] 在室温反应中制备一系列10^3至10^9个拷贝的双链siRNA,进行,在水中稀释,并与样品一起通过RT-qPCR处理。图1示意性地显示了RT-qPCR方法和示例性范围,其显示了反应中存在的拷贝数与获得的CT(循环阈值或扩增阈值)之间的关系。

[0173] siRNAs定量的生物样本来自不同的来源:

[0174] -从被认为含有siRNA的已知重量的组织片段提取的总RNA。这些RNA通过常规方法提取,例如通过酚-氯仿法(trizol提取)。在提取后,用水稀释;

[0175] -血清。在这种情况下,将已知体积的血清稀释在含有RNA酶抑制剂的水中,稀释度为1/100°,如果siRNA浓度非常高,则需要更加稀释。

[0176] 将每个样品获得的CT值与该范围获得的CT值进行比较。这使得可以计算测定样品中存在的siRNA拷贝数。然后首先将这些值报告为总逆转录RNA的量,然后报告提取RNA的组织重量或血清体积,考虑到所有组织的密度为1g/cm^3,最终结果以摩尔/L(M)表示。

[0177] 2.细胞系

[0178] 实施例中使用的细胞系为来源于人体的去势抗性并表达雄激素受体的前列腺肿瘤(C4-2和22RV1系),小鼠乳腺肿瘤(4T1)或人成胶质细胞瘤U87的细胞系。

[0179] 3-小鼠中肿瘤细胞移植

[0180] 通过在裸小鼠(22RV1,C4-2肿瘤)或BalB/C小鼠(4T1肿瘤)的侧腹皮下注射肿瘤细胞获得肿瘤。仅将发现肿瘤摄取的动物包括在研究中并随机化以接受治疗或对照治疗。以每天一次,每周五天地推注给药siRNA。在其它实验中,通过立体定位注射将U87细胞植入裸

小鼠小脑脑实质中。

[0181] 将所有siRNA在含有154mM NaCl的水中或在指定的缓冲液中稀释。使用时，如果小鼠佩戴渗透泵，则将渗透泵(例如Alzet泵)皮下植入肿瘤相对侧的小鼠背部。在原位植入U87肿瘤的情况下，将渗透泵植入皮下，并将放置在泵出口处的导管通过骨水泥(cement)连接到固定在颅骨上的装置，从而在距先前植入的肿瘤的一段距离处将化合物递送到大脑中的。

[0182] 通过用游标卡尺测量肿瘤的最大(D)和最小(d)直径来估计皮下肿瘤的体积。体积通过式V＝Dxdxdx0.5计算。

[0183] 在实验结束时，处死动物并解剖来获得血清，肿瘤和不同组织，对提取的RNA和存在于这些RNA中的siRNA定量。

[0184] 所有使用的实验方案均已得到法国伦理委员会和监管机构的验证。这些实验方案以限制使用的动物数量并避免不必要的痛苦的方式实施。

[0185] 4.采用的siRNA

[0186] 实施例中使用的siRNA是表1中的siRNA。

[0187] 在一些实验中，使用不与任何已知mRNA杂交的siRNA(对照siRNA)。该siRNA的序列是：

[0188] SEQ ID NO:55:5'UAGCAAUGACGAAUGCGUA[dT][dT]

[0189] SEQ ID NO:56:5'UACGCAUUCGUCAUUGCUA[dT][dT]。

[0190] 还使用了靶向荧光素酶的siRNA，该基因是哺乳动物中不存在的基因。该siRNA的序列是：

[0191] SEQ ID NO:57:5′-CUUACGCUGAGUACUUCGA[dT][dT]，

[0192] SEQ ID NO:58:5′-UCGAAGUACUCAGCGUAAG[dT][dT]。

[0193] 5.渗透泵的制备

[0194] 在生理盐水溶液(带有154mM NaCl的注射用水)中或在指定的缓冲液中将siRNA以在24小时内达到给药所需量的必要浓度稀释。

[0195] 如制造商(Alzet)所示，考虑泵的每小时给药体积计算该浓度。将泵以无菌的方式充满并植入要治疗的动物(小鼠，大鼠，猴子)的皮下。放置在泵出口处的导管在皮下或在另一个位置处释放泵的内容物，以便实现鞘内或脑内给药。根据所示方案，将该泵保持在适当位置数天，最多保持4周。

[0196] 初步研究表明在37℃下，siRNA的无菌溶液稳定至少4周。

实施例2:通过推注静脉内注射的siRNA没有抑制肿瘤生长。

[0197] 用22RV1细胞对9周龄雄性裸小鼠在其侧腹皮下进行异种移植。在肿瘤发生并随机化后，对小鼠每天静脉注射对照siRNA或以剂量为0.12mg/kg，持续13天每天静脉注射siAR-1。每天测量肿瘤体积。结果如图2所示。发现静脉注射siAR-1对肿瘤生长没有影响。

实施例3:siRNA不需要靶向体内表达的mRNA来进行分布。

[0198] 将配制在154mM NaCl溶液中的针对萤火虫荧光素酶siLuc的siRNA以2mg/kg/天剂量用植入的渗透泵对小鼠进行连续皮下给药3天。图3中所示的血清和各种器官中siRNA siLuc的定量显示出即使在这些组织中没有该siRNA的靶mRNA，siRNA也被有效地分布在全身。

实施例4:识别抑制FoxP3并在体内分布于组织中的siRNA。

[0199] 1.抑制FoxP3转录因子在C4-2细胞中的表达。

[0200] 用对照siRNA或siFoxP3-1 siRNA或siFoxP3-2 siRNA转染C4-2细胞。转染48小时后,裂解细胞,通过RT-qPCR测量提取的RNA和FoxP3表达。通过编码亲环蛋白-A的RNA的表达将各值归一化(Δ ΔCT方法)。结果显示在图4中,图4显示了FoxP3-1和FoxP3-2 siRNA均抑制FoxP3的表达。

[0201] 2.siFoxP3-2 siRNA分布在血清和不同器官中并抑制FoxP3的表达。

[0202] 小鼠(每组4只)连续4天以0.12mg/kg的剂量接受皮下给药,一组是在pH6的含有10mM $MgCl_2$的柠檬酸盐缓冲液中的siFoxP3-2 siRNA的制剂,另一组则仅为缓冲液(对照组)。图5显示siFoxP3-2被全身分布在血清和不同器官中,图6则显示在睾丸中,siFoxP3-2相对于控制组强烈抑制编码FoxP3的mRNA的表达。

[0203] 因此,可以在不存在载体化试剂的情况下用siFoxP3-2siRNA给药,并且所述siFoxP3-2 siRNA能够在体内全身分布并抑制其靶基因的表达。

实施例5:同时给药3种siRNA并实现所述各siRNA在血清和各种器官中的全身分布。

[0204] 将siRNA siAR-1,siTSP1-1和siLuc在含有10mM $MgCl_2$的pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液中稀释。用混合物对小鼠皮下给药,使得小鼠接受3种各剂量为0.12mg/kg的siRNA。注射10分钟后处死小鼠,并在血清和不同组织中分别测定每种siRNA。

[0205] 观察到3种siRNA存在于血清和所测试的各种器官中(图7)。因此,几种siRNA的混合物的给药允许各siRNA在不同组织中同时实现全身分布。

实施例6:用生理盐水溶液中配制的siRNA进行皮下连续给药。在该实施例中,将siRNA配制在生理盐水溶液(154mM NaCl)中。

[0206] 7.连续给药的siRNA在血清中的浓度保持基本恒定。

[0207] 将在154mM NaCl溶液中配制的siAR-1 siRNA以0.05mg/kg/天的剂量用渗透泵在食蟹猴中皮下植入4周。在治疗期间每周测量血清中的siRNA浓度。与第一次测量(被认为具有值1)相比,观察到血清浓度的变化小于20%(图8)。

[0208] 在植入渗透泵二十四小时前,动物以0.05mg/kg的剂量接受在生理盐水(154mM NaCl)中配制的siAR-1的皮下注射的单次推注,并随时间测量浓度。与连续全身给药相比,0.05mg/kg剂量的皮下单次推注会被快速消除(图9),如果随时间(例如每天)重复这样的推注,则将导致峰谷效应,该效应可以通过连续给药而避免。

[0209] 2.在抑制siRNA靶基因表达方面,连续皮下给药比皮下推注途径更有效。

[0210] 用在生理盐水(154mM NaCl)中配制的siTPS1-1 siRNA以0.12mg/kg/天的剂量每天皮下推注小鼠4天,或用在相同溶液中配制相同的siRNA以0.2mg/kg/天的剂量每天用渗透泵对小鼠连续给药4天。观察到siTSP1-1 siRNA在连续给药或推注皮下给药后以相当的水平分布在几个器官中(图10A)。对于siTSP1-1的给药,连续给药比推注给药在组织中产生更好的TSP1 mRNA表达抑制效果(图10B)。

[0211] 3.连续皮下给药比推注皮下注射更有效地抑制肿瘤生长

[0212] 将C4-2移植到小鼠中。一旦注意到肿瘤,用在生理盐水(154mM NaCl)配制的siAR-1 siRNA以不同剂量给药小鼠或用载体给药小鼠。通过植入的渗透泵连续地皮下给药1个月,或通过每日注射不连续地皮下给药1个月。通过皮下推注以剂量为0.12mg/kg/天或甚至

为1mg/kg/天来每日重复给药siAR-1 siRNA,未观察到小鼠中C4-2肿瘤的生长受到抑制(图11A),而当通过植入渗透泵连续皮下以剂量为0.2mg/kg/天来给药相同的siRNA时,发生抑制效果。通过将给药剂量增加10倍(2mg/kg/天),并没有提高抑制作用(图11B)。因此,在全身给药相同的siRNA时,连续给药比不连续给药对抑制肿瘤生长的效果更好。

[0213] 4.抑制肿瘤的骨转移

[0214] 将22RV1细胞植入裸小鼠中。一旦检测到肿瘤,以0.2mg/kg/天的剂量用Alzet泵给药在生理盐水(154mM NaCl)中配制的SiAR-1 siRNA,或仅给药载体,持续3周。在治疗结束时,回收骨(胫骨)以对siAR-1,以及编码雄激素受体和HPRT的人源mRNA进行量化。

[0215] 对携带22RV1人前列腺肿瘤的小鼠连续皮下给药siAR-1siRNA,该给药抑制小鼠骨中的雄激素受体表达(图12左图)。通过对骨细胞中人mRNA(HRPT)的表达水平评估,这种抑制伴随着自发发生这些肿瘤的骨转移的小鼠的数量的减少和这些肿瘤大小的减少(图12右图)。

[0216] 因此siRNA的连续全身给药允许siRNA递送到骨中发展的癌症的转移中,以抑制siRNA的靶基因在骨中的表达并限制转移的移植和/或发展。

[0217] 5.在小鼠和大鼠前列腺中的雄激素受体的表达抑制作用

[0218] 用渗透泵将在生理盐水(154mM NaCl)中配制的SiAR-1 siRNA在小鼠中皮下植入1个月或在大鼠中皮下植入2周。以大于或等于0.2mg/kg的剂量给药小鼠(图13)或以大于或等于0.1mg/kg的剂量给药大鼠(图14),发现这样的给药在这些动物的前列腺中有效抑制了雄激素受体的蛋白表达。

[0219] 6.siRNA在猴子的组织中的分布

[0220] 使用渗透泵以5mg/kg/天的剂量,对成年雄性猴子连续皮下注射在生理盐水(154mM NaCl)配制的siAR-1,持续4周。处死动物并在不同器官中定量siAR-1。

[0221] 结果如图15所示。发现siAR-1 siRNA有效地全身分布在所分析的各种器官中。

[0222] 7.在猴子中的PSA的产生的抑制

[0223] 即使在没有前列腺疾病的情况下,在成熟雄性猴子的血清中也检测到前列腺特异性抗原或PSA。

[0224] 以5mg/kg/天的剂量连续皮下给药siAR-1 siRNA 4周,这导致在动物血清中PSA的表达降低至低于用于测定的ELISA测试的检测限度(图16)。因此,在猴子中连续皮下给药siRNA使得可以将siRNA全身分布在许多器官中,在所述器官中siRNA对基因表达发挥抑制作用。

实施例7:通过连续脑内给药在生理盐水溶液(154mM NaCl)中配制的siRNA,抑制成胶质细胞瘤中的TSP1表达。

[0225] 用U87成胶质细胞瘤细胞原位移植雌性裸小鼠。将渗透泵植入在动物背部皮下,泵的输出口连接到导管,该导管在距离肿瘤一定距离处,在脑中以2mg/kg脑重/天的速度递送泵中包含的对照siRNA或siRNA siTSP1-1。8天后,处死小鼠,在脑切片上通过免疫荧光检测TSP1的表达。结果如图17所示。

[0226] 与对照动物相比,在被治疗的动物中TSP1表达显著降低。TSP1是一种抑制血管形成(血管生成)的蛋白。在被治疗的动物中,通过CD31抗原的免疫标记观察到在相邻切片上检测到的血管密度的增加。

[0227] 因此,连续脑内给药siRNA可以有效地抑制siRNA靶基因在该器官中发展的肿瘤中的表达,并在其中产生预期的生物学效应。

实施例8:酸性缓冲剂防止siRNA的在阳离子存在下的降解。

[0228] 1.siRNA在$ZnCl_2$存在下在pH调节至6的水性溶液中发生降解。pH6的柠檬酸盐缓冲液保留siRNA。

[0229] 在不同条件下配制该siRNA后,对siTSP1-1 siRNA降解进行测量。通过在丙烯酰胺凝胶上沉积相当于来自经历以下处理的siRNA溶液的300ng siRNA的量来验证siTSP1-1 siRNA的完整性:

[0230] -混合(1:1重量比)siTSP1-1和海沙瑞林;siTSP1-1和氧化LDL的混合物(1:1或1:10的水中的重量比);在37℃下孵育4小时。

[0231] -混合siTSP1-1和氧化LDL(1:1或1:10的水中的重量比);在37℃下孵育4小时。

[0232] -在室温下在0.164mM $ZnCl_2$水性溶液中孵育siTSP1-1 1小时。

[0233] -在37℃下,在含有1mM $ZnCl_2$的pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液中,孵育siTSP1-1 10分钟、1小时或6小时。

[0234] 在图18中发现,当在$ZnCl_2$水溶液中孵育时,siRNA发生降解。在含有多达6倍的$ZnCl_2$的pH6的柠檬酸盐缓冲液中则不会发生这种降解。当siRNA在水中与氧化的LDL或己二胺混合时,未观察到siRNA的降解。

[0235] 因此,酸性pH缓冲剂的存在使得可以在阳离子存在下维持siRNA的完整性。

[0236] 2.在含有$ZnCl_2$的水溶液中配制siRNA降低siRNA在血清中的浓度及siRNA在组织中的分布。

[0237] siTSP1-1 siRNA在154mM NaCl或含有0.165mM $ZnCl_2$的水中配制,并以0.12mg/kg的剂量对小鼠进行皮下给药。当用配制在含有阳离子的水溶液中siRNA进行给药时,与以相同剂量和相同方式给药在生理盐水溶液(154mM NaCl)中配制的相同siRNA时获得的给药结果相比,在血清和组织中测量到的siRNA浓度降低(图19)。

实施例9改善siRNA在体内的生物分布的制剂

[0238] 1.当siRNA配制在柠檬酸盐缓冲液中时,全身给药的siRNA在血清和组织中浓度增加,并且当配制在含有不同阳离子的柠檬酸盐缓冲液中时siRNA的浓度甚至更高。

[0239] 将配制在不同溶液中的SiAR-1 siRNA以0.12mg/kg剂量对小鼠进行皮下给药。在注射20分钟后测量在这些不同组小鼠的血清或器官中测量的siAR-1浓度,并与对照组的浓度进行比较,对照组(表示为NaCl)由已接受在含有154mM NaCl的水溶液中稀释的siRNA的动物组成。

[0240] 与在生理盐水溶液(154mM NaCl)中的制剂相比,SiAR-1 siRNA在pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液中的制剂增加了血清中该siRNA的浓度(图20A)。当pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液补充有$ZnCl_2$,$MnCl_2$,$MgCl_2$或这些盐的组合时,SiAR-1 siRNA在血清和组织的浓度中进一步增加(图20B)。

[0241] 2.当配制在含有阳离子的柠檬酸盐缓冲液中时,全身连续给药的siRNA在组织、肿瘤和血清中的浓度增加。

[0242] 对携带鼠乳腺肿瘤4T1的小鼠,通过使用皮下植入的渗透泵来将3种siRNA,siAR-1,siTSP1-1和siLuc的混合物进行3天连续皮下给药。每种siRNA以2mg/kg/天的剂量给药。

将混合物配制在154mM NaCl溶液或含有10mM $MgCl_2$的pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液中。在3天后，测量血清，肿瘤和不同器官中每种siRNA的浓度，比较在同一组织中以配制在柠檬酸盐-$MgCl_2$缓冲液中的siRNA给药和以配制在生理盐水(154mM NaCl)缓冲液中的siRNA给药的测量的值。图21A和21B中报道的结果显示，与siRNA的生理盐水制剂相比，siRNA的柠檬酸盐-$MgCl_2$缓冲液的制剂使得siRNA在组织中的全身分布增加高达250倍。

实施例10通过添加CD36配体来靶向siRNA

[0243] 小鼠以剂量为0.12mg/kg接受皮下注射的siAR-1，所述siAR-1在生理盐水溶液(154mM NaCl)中配制，或在含有海沙瑞林的pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液(siRNA:海沙瑞林的重量比为1:0.2)中配制，或在含有氧化LDL的10mM柠檬酸盐缓冲液(siRNA:氧化LDL的重量比为1:1)中配制。测量siAR-1的浓度，并将该浓度与在生理盐水(154mM NaCl)中配制的siRNA在相同组织中时的测量的浓度相关。在血清中观察到的结果显示在图22A中，在前列腺和脾中观察到的结果显示图22B中。这些示出了海沙瑞林或氧化LDL的添加增加了siRNA在血清或组织中的浓度。

[0244] 在另一个实验中，将渗透泵植入携带22RV1肿瘤的小鼠中，泵连续3天以2mg/kg/天的剂量递送在生理盐水溶液(NaCl 154mM)中配制的siAR-1，或以2mg/kg/天siAR-1和0.2mg/kg/天氧化LDL的剂量递送在pH6的10mM柠檬酸盐缓冲液中配制的siAR-1。在后者的情况下，siRNA和氧化LDL简单地混合在柠檬酸盐缓冲液中，无需另外的操作。将在含有氧化LDL的柠檬酸盐缓冲液中配制的siAR-1的在血清，组织或肿瘤中测量的浓度与在生理盐水(154mM NaCl)中配制siRNA在相同组织中测量的值相关。在图23中可以看出，氧化LDL的存在增加了血清组织和肿瘤中siAR-1的浓度。

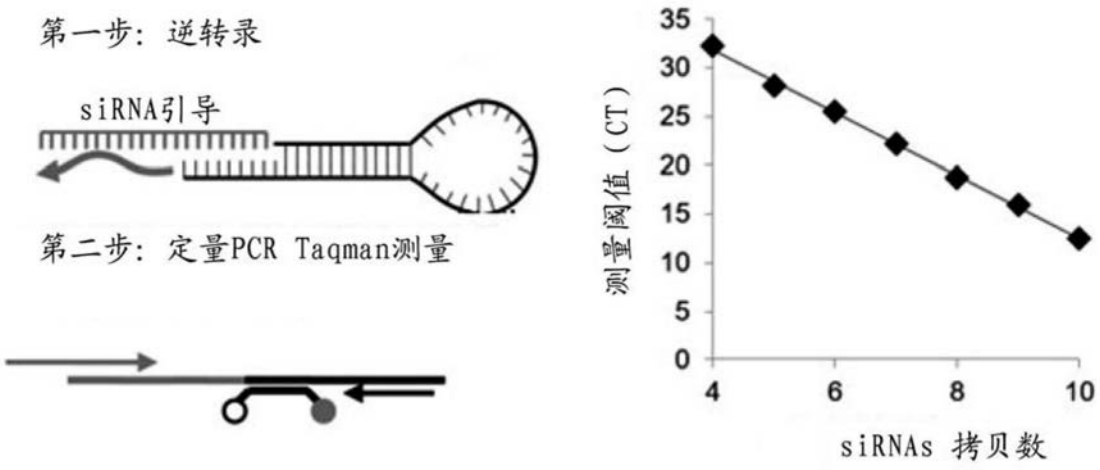

第一步：逆转录
siRNA引导
第二步：定量PCR Taqman测量
测量阈值（CT）
35
30
25
20
15
10
5
0
4
6
8
10
siRNAs 拷贝数

图1

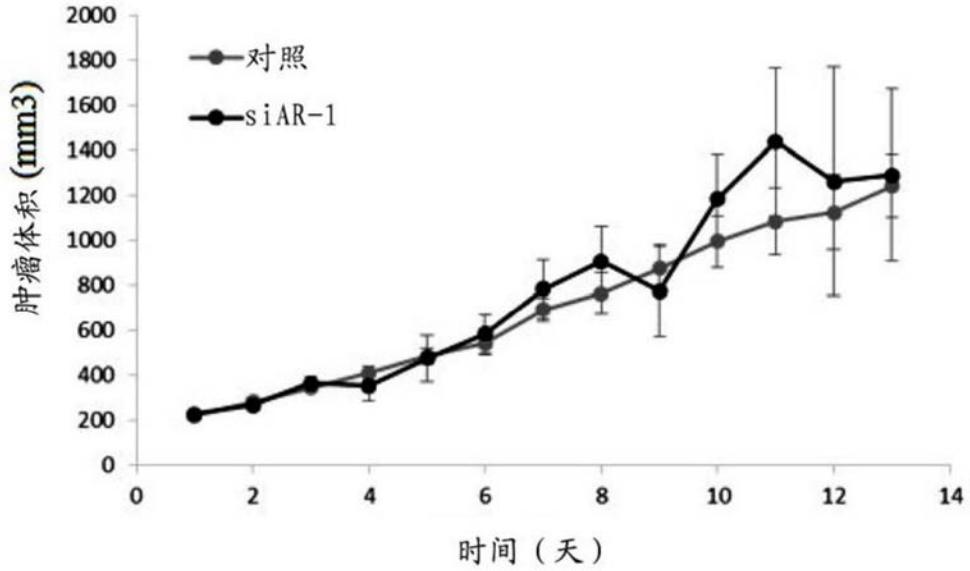

肿瘤体积（mm3）
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
对照
siAR-1
0
2
4
6
8
10
12
14
时间（天）

图2

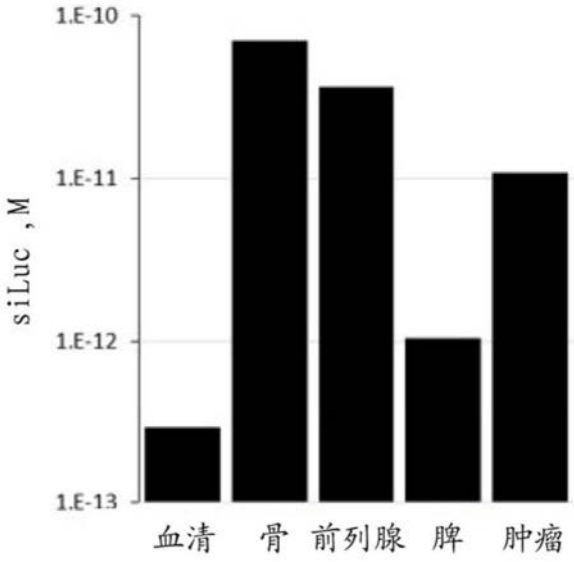

1.E-10
1.E-11
1.E-12
1.E-13
siLuc ,M
血清
骨
前列腺
脾
肿瘤

图3

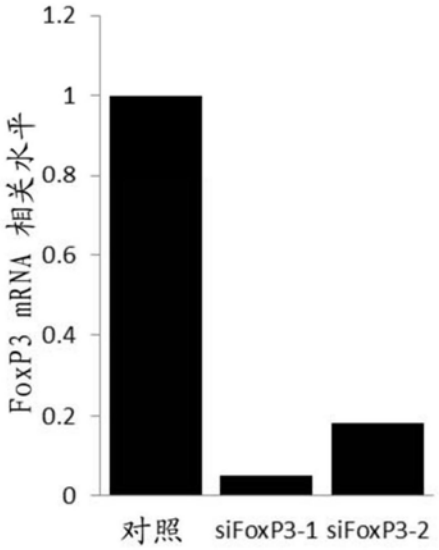

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
FoxP3 mRNA 相关水平
对照
siFoxP3-1
siFoxP3-2

图4

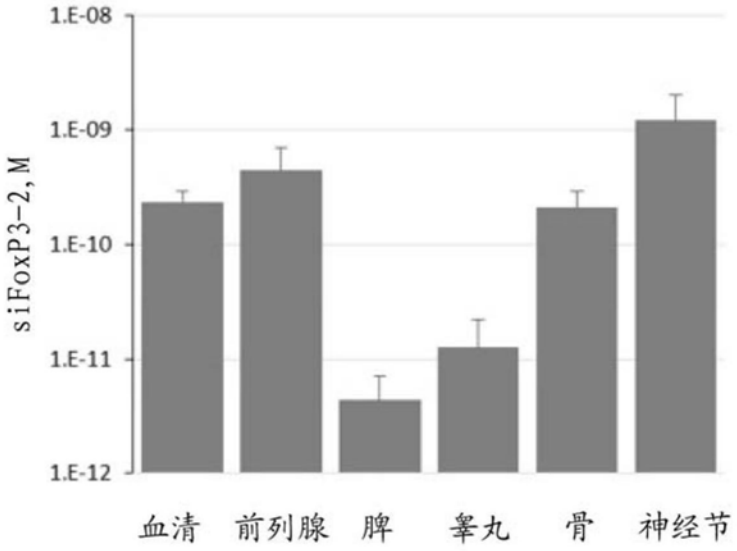

1.E-08
1.E-09
1.E-10
1.E-11
1.E-12
siFoxP3-2,M
血清
前列腺
脾
睾丸
骨
神经节

图5

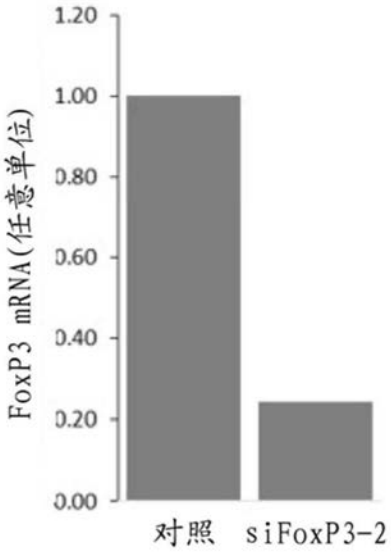

1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
FoxP3 mRNA(任意单位)
对照
siFoxP3-2

图6

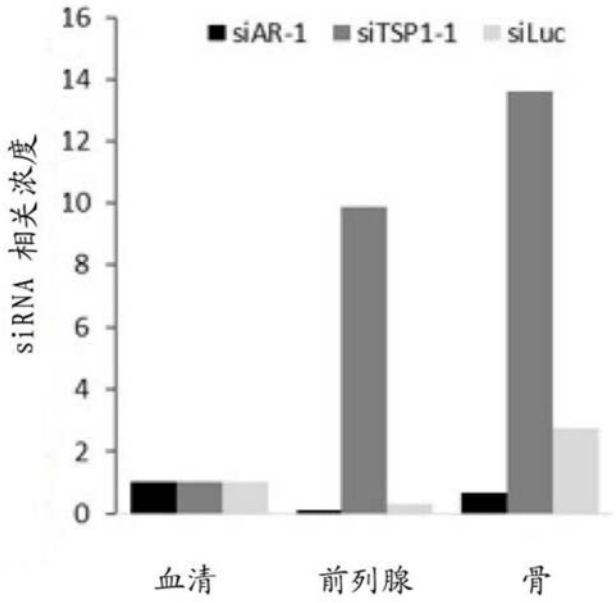

siAR-1
siTSP1-1
siLuc
siRNA 相关浓度
16
14
12
10
8
6
4
2
0
血清
前列腺
骨

图7

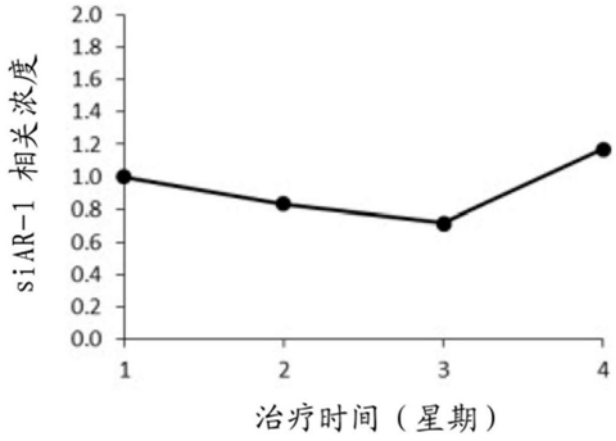

siAR-1 相关浓度
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
2
3
4
治疗时间（星期）

图8

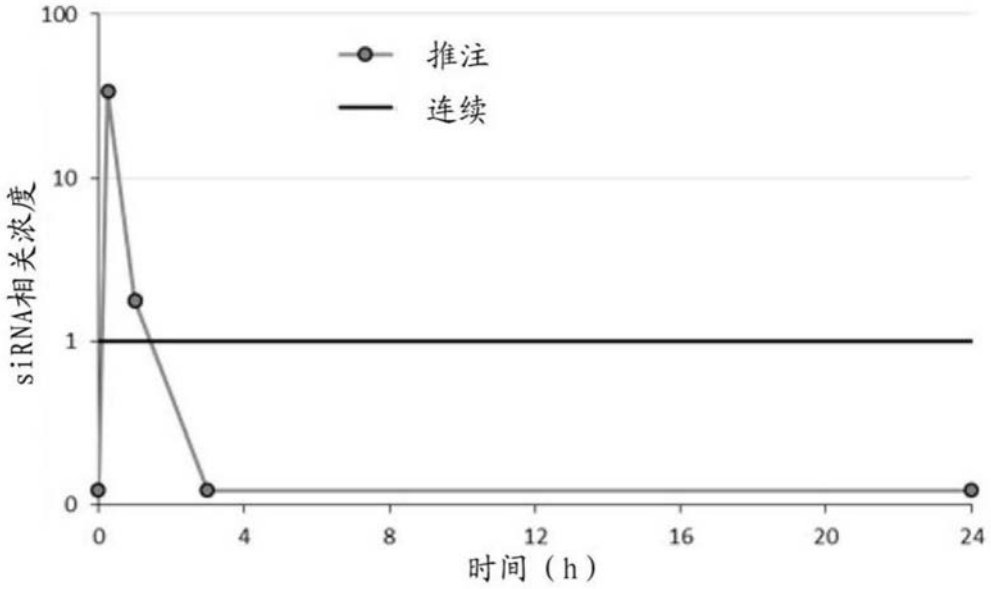

100
10
1
0
siRNA相关浓度
推注
连续
0
4
8
12
16
20
24
时间（h）

图9

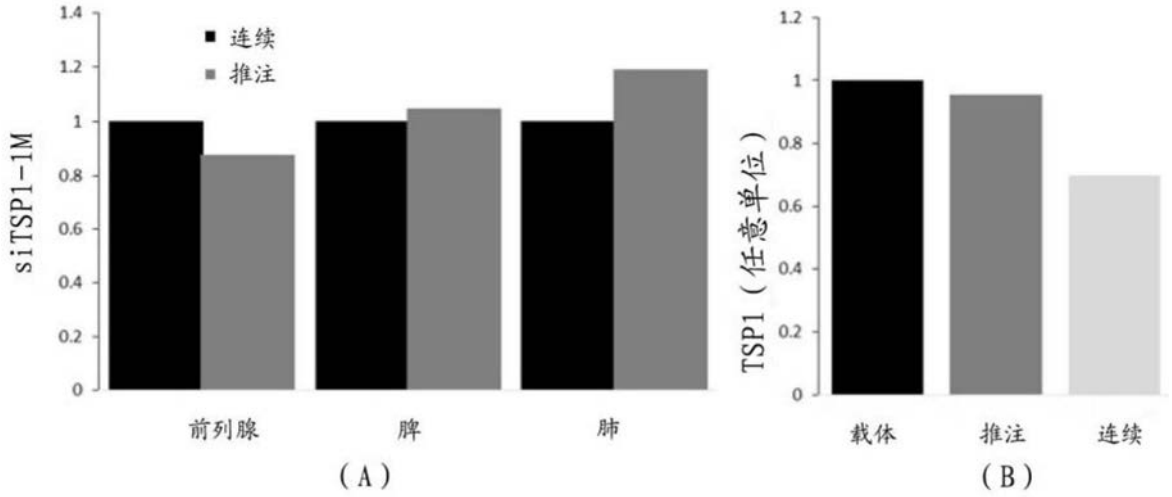
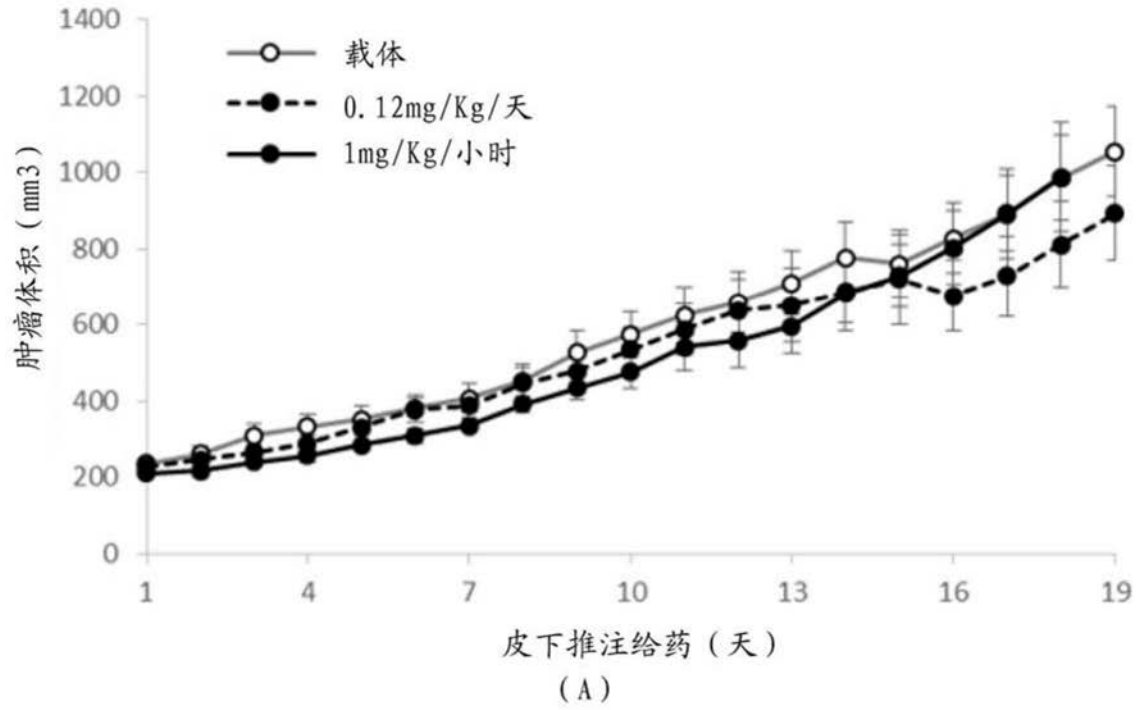
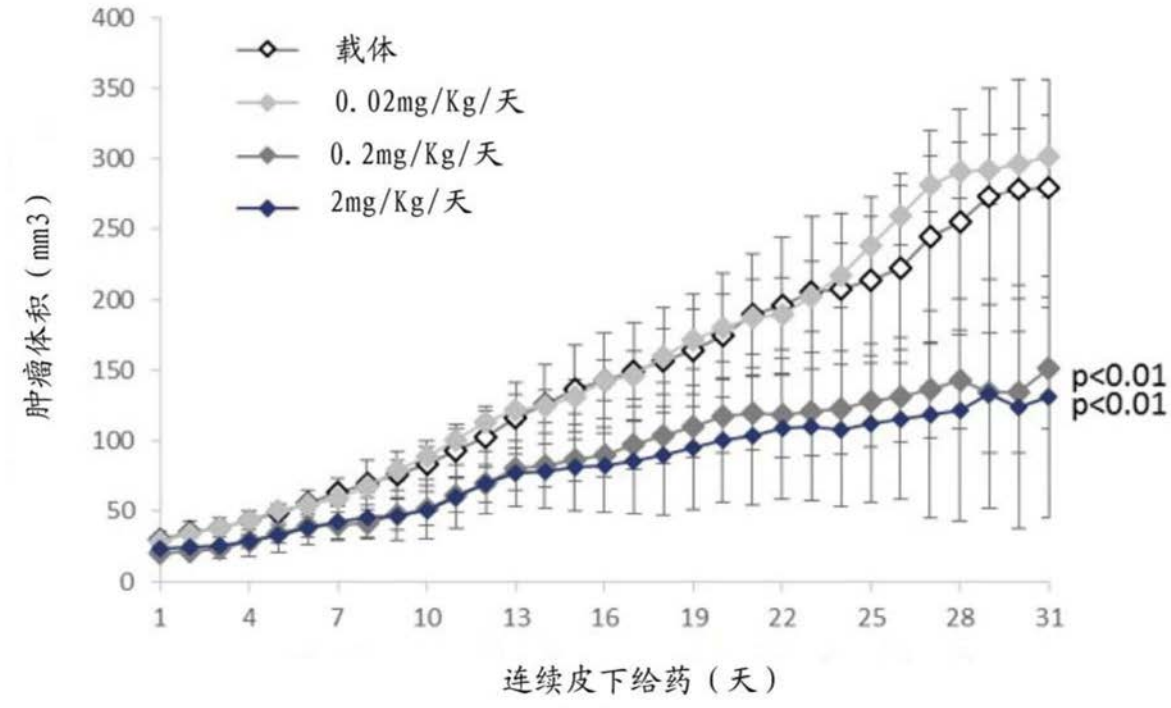

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
siTSP1-1M
连续
推注
前列腺
脾
肺
（A）
TSP1（任意单位）
载体
推注
连续
（B）

图10


1400
1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积（mm3）
载体
0.12mg/Kg/天
1mg/Kg/小时
1
4
7
10
13
16
19
皮下推注给药（天）

（A）


400
350
300
250
200
150
100
50
0
肿瘤体积（mm3）
载体
0.02mg/Kg/天
0.2mg/Kg/天
2mg/Kg/天
p<0.01
p<0.01
1
4
7
10
13
16
19
22
25
28
31
连续皮下给药（天）

（B）

图11

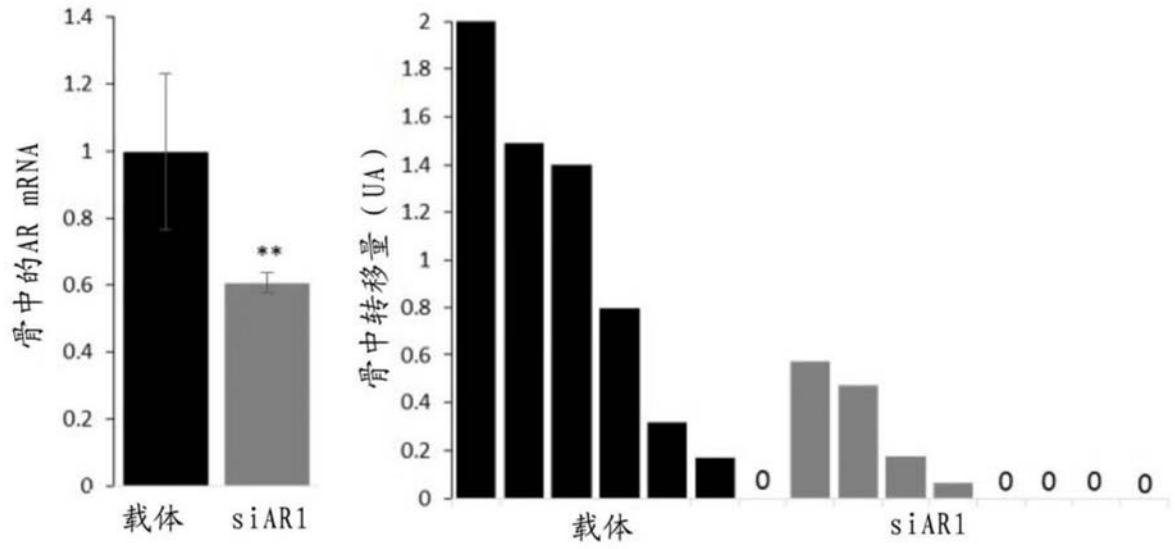

骨中的AR mRNA
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
**
载体
siAR1
骨中转移量（UA）
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
0 0 0 0
载体
siAR1

图12

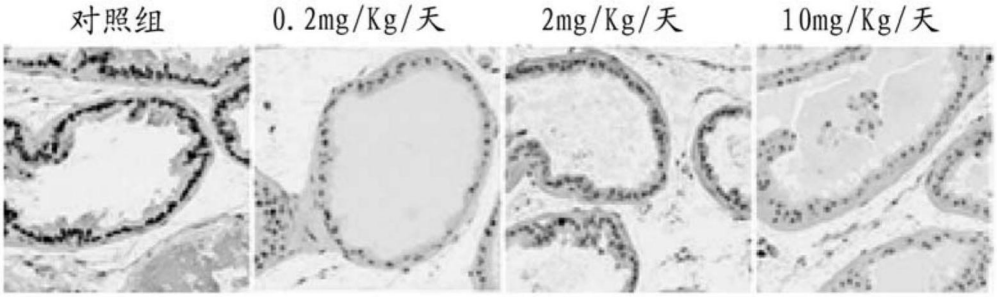

对照组
0.2mg/Kg/天
2mg/Kg/天
10mg/Kg/天

图13

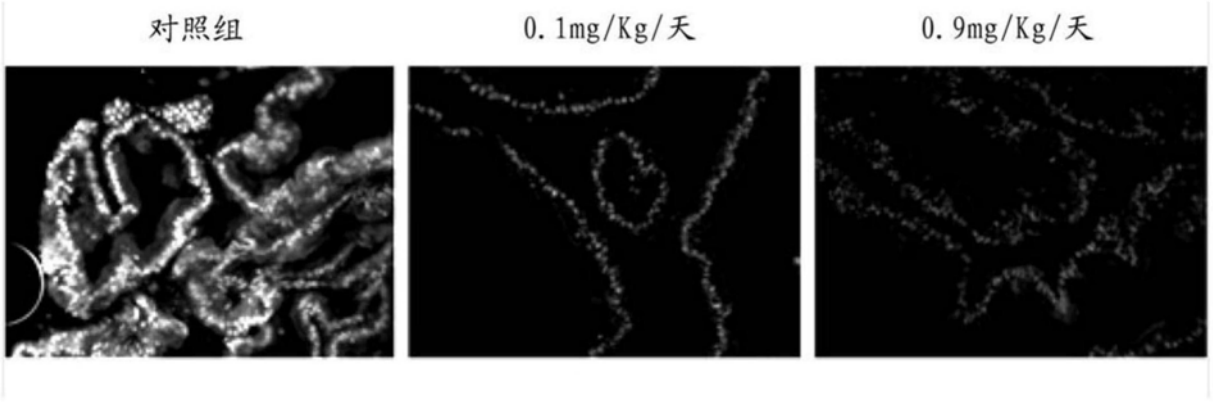

对照组
0.1mg/Kg/天
0.9mg/Kg/天

图14

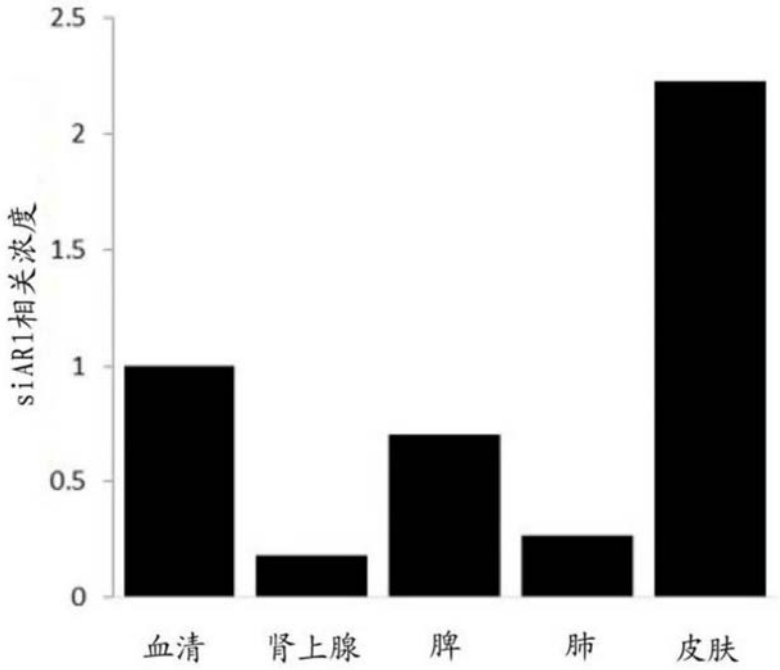

2.5
2
1.5
1
0.5
0
siAR1相关浓度
血清
肾上腺
脾
肺
皮肤

图15

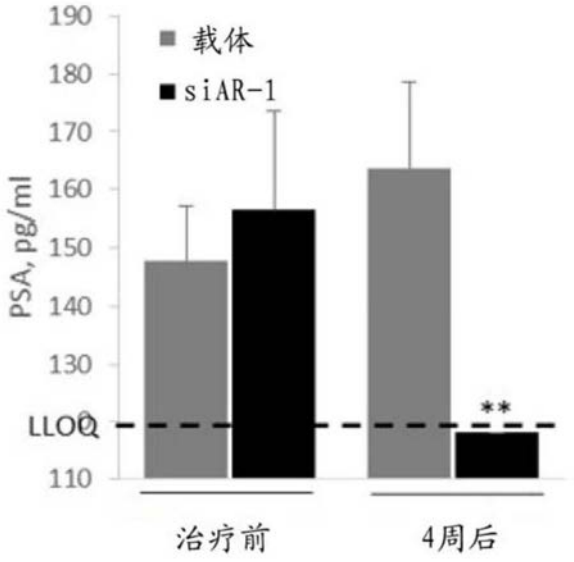

190
180
170
160
150
140
130
120
110
PSA, pg/ml
载体
siAR-1
LLOQ
**
治疗前
4周后

图16

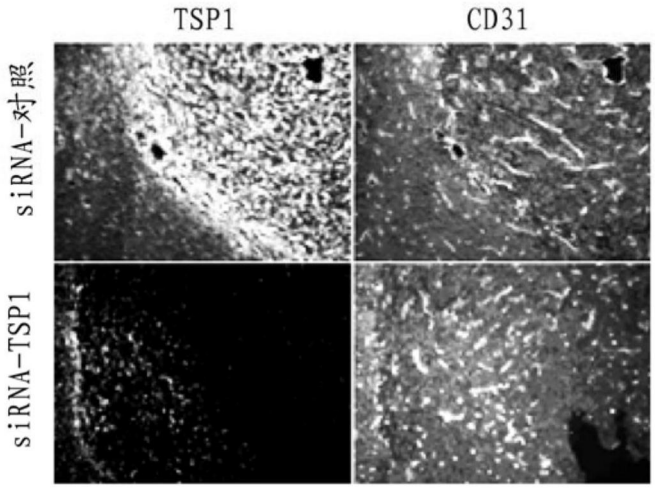


图17

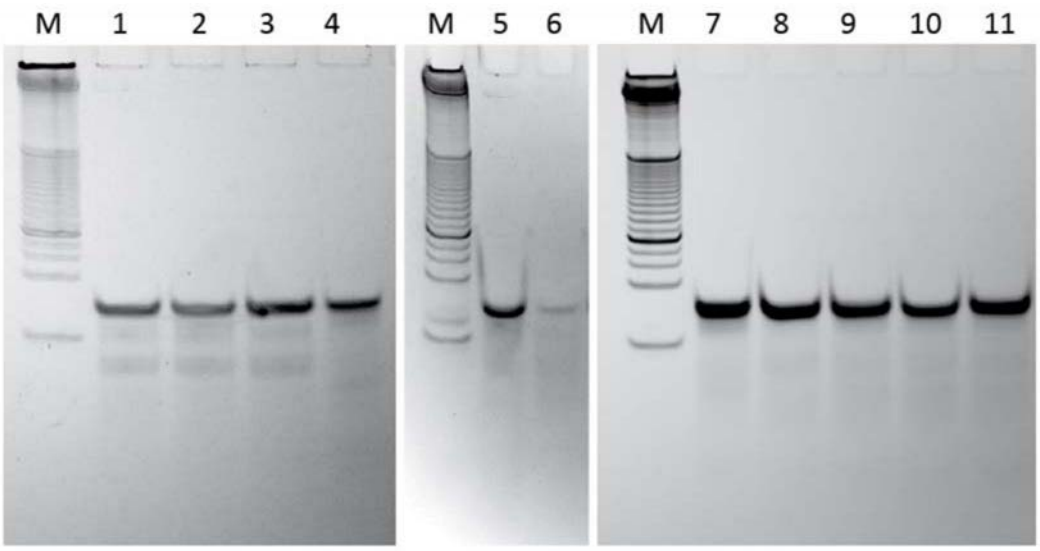


图18

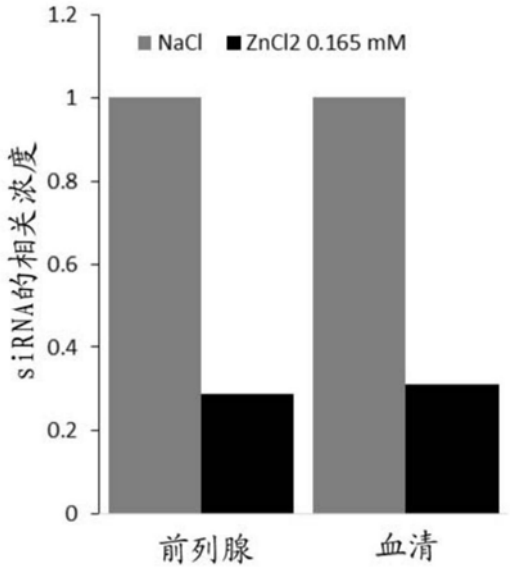

NaCl
ZnCl2 0.165 mM
siRNA的相关浓度
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
前列腺
血清

图19

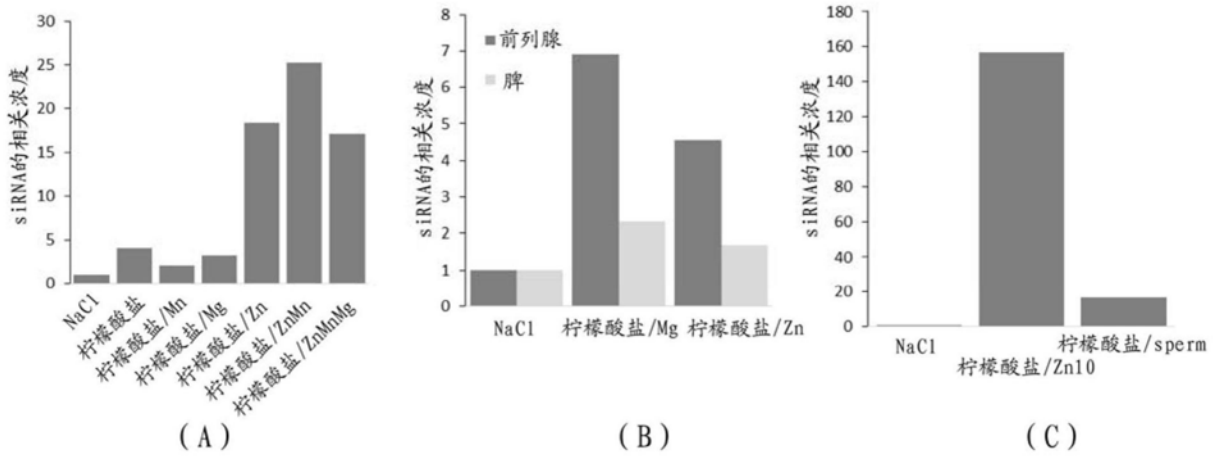

siRNA的相关浓度
30
25
20
15
10
5
0
NaCl
柠檬酸盐
柠檬酸盐/Mn
柠檬酸盐/Mg
柠檬酸盐/Zn
柠檬酸盐/ZnMn
柠檬酸盐/ZnMnMg
(A)
前列腺
脾
8
7
6
5
4
3
2
1
0
NaCl
柠檬酸盐/Mg
柠檬酸盐/Zn
(B)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NaCl
柠檬酸盐/sperm
柠檬酸盐/Zn10
(C)

图20

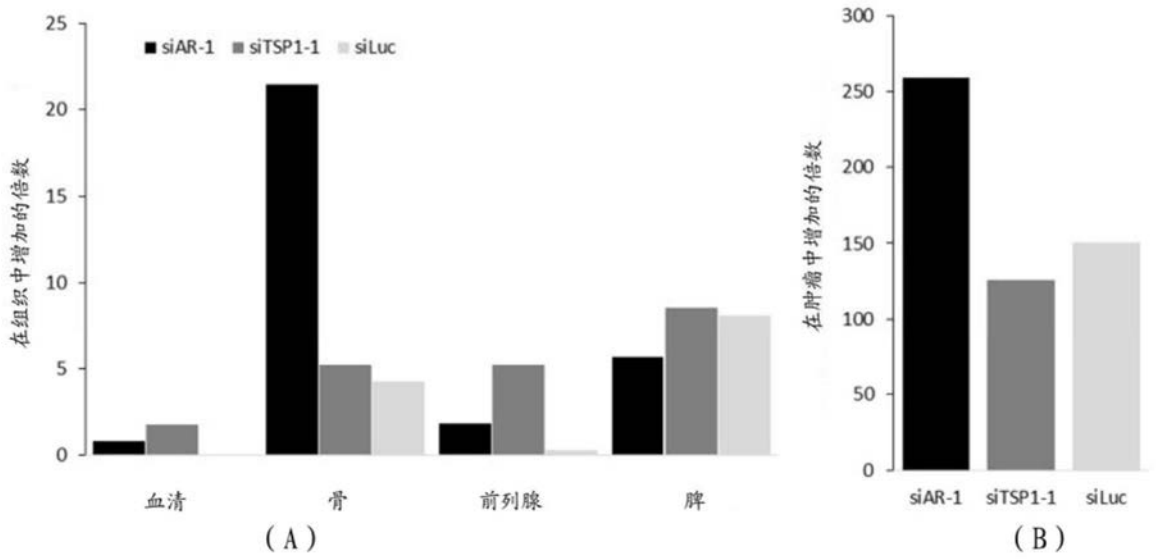

siAR-1
siTSP1-1
siLuc
在组织中增加的倍数
25
20
15
10
5
0
血清
骨
前列腺
脾
(A)
在肿瘤中增加的倍数
300
250
200
150
100
50
0
siAR-1
siTSP1-1
siLuc
(B)

图21

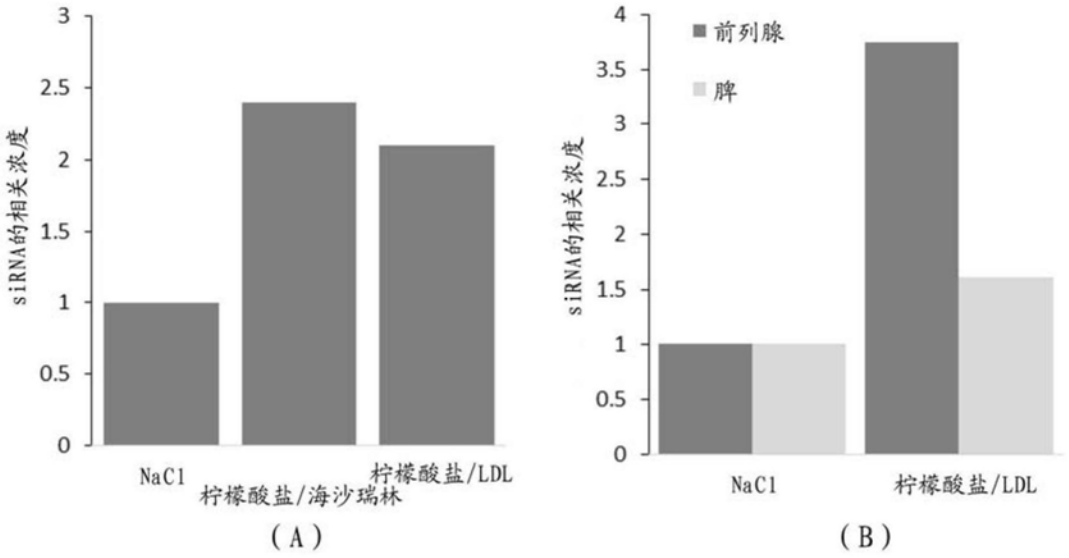

siRNA的相关浓度
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
NaCl
柠檬酸盐/海沙瑞林
柠檬酸盐/LDL
(A)
前列腺
脾
siRNA的相关浓度
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
NaCl
柠檬酸盐/LDL
(B)

图22

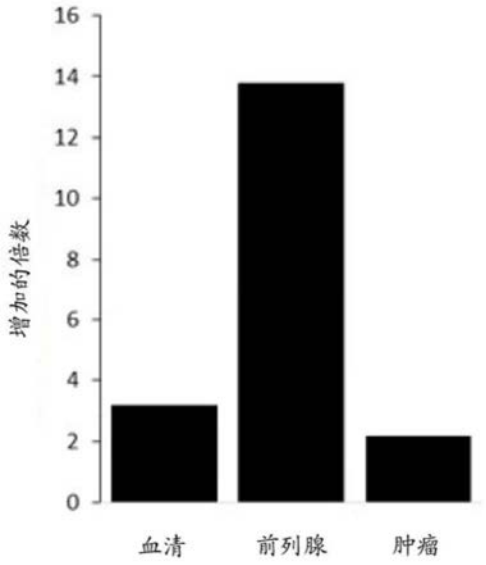


图23