



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101981189 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 23

(21) 申请号 200980111803. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 01. 29

C12N 15/11 (2006. 01)

(30) 优先权数据

P200800222 2008. 01. 29 ES

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/ES2009/000045 2009. 01. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/095517 ES 2009. 08. 06

(71) 申请人 西马生物医学计划公司

地址 西班牙纳瓦拉

(72) 发明人 哈比尔·阿瓦德略雷特

玛丽亚普里菲卡西·福特斯阿隆索

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

公司 32200

代理人 楼高潮

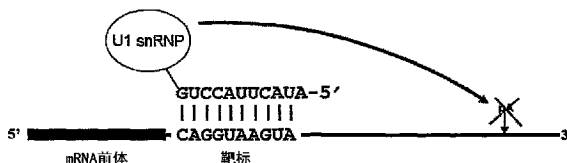
权利要求书 3 页 说明书 26 页 序列表 3 页
附图 4 页

(54) 发明名称

能够以协同方式引起基因表达转录后沉默的方法和组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于基因表达的转录后抑制的组合物,其通过经修饰的靶向作用于靶 mRNA 前体的预选区域的 U1snRNA 和 siRNA、shRNA 和 / 或 miRNA 型的基因表达沉默剂的联合使用,以及所述组合在由蛋白质的多余的过量表达所引起的疾病的治疗中的应用。



1. 一种包括一个或多个容器的组合物或者一个试剂盒部分,其包括:
 - (i) 第一组分,其包括至少一个 U1 snRNA 或者编码 U1 snRNA 的多聚核苷酸,其中所述 U1 snRNA 在其与内含子的 5' 末端的 GU 共有序列的结合序列内被修饰,使得其特异性结合到靶 mRNA 前体的 3' 末端外显子的预选区域,并能够抑制所述靶 mRNA 前体的加工;和
 - (ii) 第二组分,其包括至少一个基因表达沉默剂,该沉默剂特异性靶向于由 mRNA 前体加工而来的 mRNA 的预选区域,mRNA 前体是 (i) 中所定义的 U1 snRNA 的靶标,并且能够导致所述靶 mRNA 在体内的沉默。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物或试剂盒,其中包括在第二组分内的沉默剂选自于以下组中:
 - (i) siRNA
 - (ii) miRNA
 - (iii) shRNA
 - (iv) 编码根据 (i)、(ii)、(iii) 的试剂的多聚核苷酸,和
 - (v) 根据 (i) 到 (iv) 的一个或多个试剂的组合。
3. 根据权利要求 2 所述的组合物或试剂盒,其中组分 (ii) 是包括编码至少一个 shRNA 序列的多聚核苷酸。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的组合物或试剂盒,其中,组分 (i) 包括多个编码 U1 snRNA 的多聚核苷酸,该 U1 snRNA 在其与内含子的 5' 末端的 GU 共有序列的结合序列内被修饰,使得其特异性结合到相同靶 mRNA 前体的不同的预选区域,和 / 或组分 (ii) 包括多个基因表达沉默剂,所述沉默剂特异性靶向作用于来自 mRNA 前体的加工的 mRNA 的不同的预选区域,该 mRNA 前体是 (i) 中所定义的 U1snRNA 的靶标,并能够导致所述靶 mRNA 的体内沉默。
5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的组合物或试剂盒,其中第二组分是编码沉默剂的多聚核苷酸,其中所述多聚核苷酸和形成第一组分的多聚核苷酸形成单个载体的一部分。
6. 根据权利要求 5 所述的组合物或试剂盒,其中所述单个载体是病毒载体。
7. 根据权利要求 6 所述的组合物或试剂盒,其中病毒载体选自由腺病毒、腺有关病毒、逆转录酶病毒、慢病毒、疱疹病毒、SV40 和 α 病毒组成的组中。
8. 一种多聚核苷酸,其包括:
 - (i) 编码至少一个 U1 snRNA 的序列,U1 snRNA 在它和内含子的 5' 末端的 GU 共有序列的结合序列内被修饰,使得其特异性的结合到靶 mRNA 前体的 3' 末端外显子的预选区域,且其能够抑制靶 mRNA 前体的加工,和
 - (ii) 编码沉默剂的序列,该沉默剂特异性靶向作用于由 mRNA 前体的加工而来的预选区域,mRNA 前体是由 (i) 中所定义的多聚核苷酸编码的 U1snRNA 的靶标,并能够导致所述靶 mRNA 的体内沉默。
9. 根据权利要求 8 所述的多聚核苷酸,其中编码沉默剂的序列包括至少一个 siRNA 的有义链和反义链,编码至少一个 miRNA 前体或者编码至少一个 shRNA。
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的多聚核苷酸,其中序列 (i) 和 (ii) 可操作的连接到表达调控区域。

11. 根据权利要求 10 所述的多聚核苷酸,其中序列 (i) 和 (ii) 的表达调控序列是不同的。

12. 一种包括根据权利要求 8 至 11 中任一项所述的多聚核苷酸的表达载体。

13. 根据权利要求 12 所述的载体,其中表达载体是病毒载体。

14. 根据权利要求 13 所述的载体,其中病毒载体选自腺病毒、腺有关的病毒、逆转录酶病毒、慢病毒、疱疹病毒、SV40 和 α 病毒组成的组中。

15. 一种包括根据权利要求 12 至 14 所述的载体的细胞。

16. 一种非人的转基因动物,其包括整合到其基因组内的根据权利要求 8 至 11 中任一项所述的多聚核苷酸、根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的载体或根据权利要求 15 所述的细胞。

17. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物或试剂盒,根据权利要求 8 至 11 中任一项所述的多聚核苷酸,根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的载体或根据权利要求 15 所述的细胞在医药中的用途或作为药物的用途。

18. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物或试剂盒,根据权利要求 8 至 11 中任一项所述的多聚核苷酸,根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的载体或根据权利要求 15 所述的细胞用于治疗或预防感染病、肿瘤、成癌的或者神经退行性疾病。

19. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物或试剂盒,根据权利要求 8 至 11 中任一项所述的多聚核苷酸,根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的载体或根据权利要求 15 所述的细胞在用于治疗或预防感染病、肿瘤、成癌的或者神经退行性疾病的药物的制备中的用途。

20. 一种用于治疗感染病、肿瘤、成癌的或者神经退行性疾病的方法,包括向需要的患者给药根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物或试剂盒,根据权利要求 8 至 11 中任一项所述的多聚核苷酸,根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的载体或根据权利要求 15 所述的细胞。

21. 根据权利要求 18 所述的组合物或试剂盒,根据权利要求 19 所述的用途或者根据权利要求 20 所述的方法,其中感染病为由病毒引起的感染性疾病。

22. 根据权利要求 21 所述的组合物、试剂盒或方法,其中由病毒引起的感染病是由 HBV、HCV 或 HIV 引起的感染。

23. 一种药物组合物,包括根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物或试剂盒、根据权利要求 8 至 11 中任一项所述的多聚核苷酸、根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的载体或根据权利要求 15 所述的细胞和药物学上可接受的载体。

24. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物或试剂盒,其包括第一组分和第二组分同时的、连续的或分别的使用的说明书。

25. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物或试剂盒,其作为用于同时的、连续的或分别的使用的联合制剂。

26. 一种非治疗的方法,其用于在生物系统中的靶基因表达的体内或体外的转录后抑制,其包括将所述系统与权利要求 1 至 7 中任一项所述的组合物、权利要求 8 至 11 中任一项所述的多聚核苷酸、权利要求 12 至 14 中任一项所述的载体或权利要求 15 所述的细胞接触。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述生物模型是动物模型。

28. 根据权利要求 26 或 27 所述的方法,其中转录后抑制包括涉及相同功能途径的两个或更多的靶 mRNAs 的抑制。

能够以协同方式引起基因表达转录后沉默的方法和组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于在转录后使基因表达沉默的方法,更具体地,涉及组合物,其比单独使用所述组合物的各组分能获得更高的沉默水平。

背景技术

[0002] 基因表达的高效和特异性的抑制是某些基因治疗方案和功能性基因研究的基础。特定基因的表达有时对于细胞是有毒的,会产生疾病,比如在受感染细胞中的病毒基因的表达,这在遗传性疾病中大多是消极的,或者基因表达会受到限制,比如致癌基因。抑制这些有毒基因表达可以治愈由它们引发的疾病。此外,基因组和蛋白质组的研究允许分离大量的基因,其中一些具有未知的功能。这些技术允许将这些基因分类,或根据它们的表达水平,或根据调节所述表达的条件,但有关它们的功能并未谈太多。通过这些基因表达的系统性和特异性的抑制,可开发简单的方案以确定它们的功能。

[0003] 对于一个基因表达的特异性抑制的最简单的方式是降低由其转录的 RNA 的稳定性或阻止它转录成蛋白质。基于反义技术的最常用的传统系统(反义核酶和寡核苷酸)仍然没有取得很多成功,可能因为为了发挥作用,它们需要与“体内”的靶 RNAs 相互作用,而这些通常覆盖着蛋白质,形成使它们免于这些相互作用的二级或三级结构。

[0004] 另一个可选的特异性抑制一个基因的表达的方法是通过使用 RNA 干扰而降低 RNA 的稳定性。这个技术允许通过使用所谓的小干扰 RNAs (siRNAs) 促进感兴趣的基因的特异性降解,小干扰 RNAs (siRNAs) 由一个 RNA 双链构成,该 RNA 双链由两个互补的具有 21-22 个核苷酸长度具有突出的 3' 端的 RNA 链构成。(Elbashir, S. M. 等, *Genes Dev.* 2001, 15 : 188-200)。SiRNAs 与互补的 mRNAs 序列在被称作 RISC 的多蛋白复合体内杂交,其是 mRNAs 发生降解的地方。然而,基于 siRNAs 的使用的基因沉默方法由于高成本的通过化学合成的 siRNAs 的制备而变的复杂,尤其是当需要将它们大量使用于动物模型或者未来用于人类中时。为避免与 siRNA 合成的高成本有关的问题,已发展出允许在来自 shRNAs 的实际细胞中产生 siRNAs 的策略。然而,这种技术需要发展,以便于序列的选择,以确保最高的特异性和最低的毒性。此外,siRNAs 的使用变的更加困难,这是因为靶 mRNA 最佳位点的识别需要过多实验,所以与靶 mRNA 杂交的 siRNA 具有最高特异性和最低毒性,siRNAs 的使用变的更加困难还因为例如激活对于干扰素和“脱靶”的响应等的副作用,其中 RNA 链和与靶不同的转录子不完全互补(非特异)的结合产生了一系列不必要的效果。

[0005] 一个可替代的方式可以是小核核糖核蛋白(snRNPs)的功能特性的使用,小核核糖核蛋白的一部分与 mRNAs 的前体的特异性序列相互作用,参与到核内 mRNA 成熟过程的不同阶段。就 U1snRNP 来说,其由蛋白质 U1A, 70K, U1C 和与 7 个与 RNA 分子(U1snRNAs)结合的 Sm 蛋白组成。它的 RNA 的 5' 末端与待去除序列、内含子的 5' 端通过碱基配对杂交,其在 mRNA 前体的剪接位点进行。这种相互作用通过蛋白质与 U1snRNAs 和将被处理的 mRNA 的直接或间接的相互作用而稳定。一旦 U1snRNP 与 mRNA 前体相互作用,将触发一系列其它蛋白质和 snRNPs 的结合,这将确定消除内含子。为此,需要将 U1snRNP 与 mRNA 前体分离。

[0006] 此外,当 U1snRNP 结合到 RNA 时,它抑制了附近序列的加工作用和聚腺苷酸化体系。U1snRNP 的 70K 蛋白能够与聚腺苷酸络合物的聚(A)聚合酶(PAP)亚基的羧基末端结合,抑制其功能(Gunderson et al.,1997,Genes & Dev.11:761-773)。

[0007] U1snRNP 对加工和聚腺苷酸化体系的抑制作用已用于控制基因表达。因此,据描述,可以修饰与内含子剪接区域的识别相关的 U1 snRNAs 的区域,使得其特异性的与靶 mRNA 的 3' 末端外显子结合,导致所述靶 mRNA 的降解。这种方法已经用于降低报告基因的表达(US20030082149,Beckley,S.A. et al.,2001,Mol. Cell. Biol.,21:2815-2825,Furth,P.A. et al.,1994,Mol. Cell. Biol.,14:5278-5289,Fortes,P. et al.,2003,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,100:8264-8269 和 EP1384784) 和内源性基因的表达(Furth,P.A. et al., supra,Fortes,P. et al., supra,和 Liu,P 等人,2004,Nucleic Acid Res.,32:1512-1517)。Sajic 等人(Nucleic Acids Res.,2007,35:247-255) 已描述了对病毒 HIV-1RNA 的末端外显子具有特异性的修饰 U1 能够抑制来自 HIV-1 基因组的转录物的表达,从而抑制所述病毒的复制。

[0008] 然而,使用所述 U1 snRNAs 去抑制靶基因在体内的表达的可能性受限于下列难题,即如何寻找良好的具有最高特异性和最低毒性的且具有最大抑制作用的靶序列。因此,正如在 RNAi 中所发生的,需要改进基于 U1 snRNA 的基因沉默方法,其允许 U1 在低细胞内浓度时达到有效的沉默水平,从而它们的毒性被降低,并使所述沉默方法在体内的应用同样成为可能。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的作者已经惊人地示出,修饰的对特定靶基因具有特异性的 U1snRNAs 和用于相同靶基因的基因表达沉默剂的联合使用导致靶基因的表达的抑制大于分别使用每一种试剂时所观察到的结果。

[0011] 因此,第一方面,本发明涉及包括一个或多个容器的组合物或试剂盒部分,其包括:

[0012] (i) 第一组分,包括至少一个 U1 snRNA 或编码 U1 snRNA 的多聚核苷酸,其中所述 U1 snRNA 在其与内含子 5' 端的 GU 共有序列结合的结合序列内被修饰,使其特异性结合靶 mRNA 前体的 3' 端外显子的预选区域,并且其能够抑制所述靶 mRNA 前体的成熟;和

[0013] (ii) 第二组分,包括至少一个特异性靶向由 mRNA 前体的加工形成的 mRNA 的 mRNA 预选区域的基因表达沉默试剂,如在 (i) 中所限定的,其是 U1 snRNAs 的靶标,并且其能够导致所述靶 mRNA 在体内的沉默。

[0014] 本发明的第二方面涉及一种多聚核苷酸,其包括:

[0015] (i) 编码至少一个 U1 snRNA 的序列,该 U1 snRNA 在其与内含子 5' 端的 GU 共有序列的结合序列内被修饰,使其特异性的结合靶 mRNA 前体的 3' 端外显子的预选区域,并且其能够抑制靶 mRNA 前体的加工,和

[0016] (ii) 编码沉默剂的序列,该沉默剂特异性靶向结合由 mRNA 前体加工形成的 mRNA 的预选区域,该沉默剂是由如在 (i) 中所限定的聚核苷酸编码的 U1snRNAs 的靶标,并且其能够导致所述靶 mRNA 在体内的沉默。

[0017] 在另一方面,本发明涉及包括本发明的多聚核苷酸的表达载体,包括本发明的载体的细胞和包括本发明的多聚核苷酸的转基因动物。

[0018] 在另一方面,本发明涉及具有本发明的多聚核苷酸、载体或者细胞的作为药剂使用的组合物或试剂盒。

[0019] 在另一方面,本发明涉及具有本发明的多聚核苷酸、载体或者细胞的组合物或试剂盒,其用于治疗或者预防感染性的、肿瘤、瘤的或者神经退行性的疾病。

[0020] 在另一方面,本发明涉及在生物系统中靶基因表达的体外或体内的转录后抑制的非治疗方法,包括将所述系统与具有本发明的多聚核苷酸、载体或者细胞的用于治疗或者预防感染性的、肿瘤、瘤的或者神经退行性的疾病的组合物或试剂盒接触。

附图说明

[0021] 图 1RNAu 抑制机制的代表示意图。

[0022] U1snRNP 分子的 snRNA 的 5' 端已被修饰,从而其序列与 mRNA 前体靶的 3' 端外显子的预选区域互补。当 U1snRNP 分子通过碱基配对结合到所述预选序列时,其导致靶 RNA 聚腺苷酸化 (PA) 的抑制,从而,抑制其基因的表达。根据这个示意图修饰的 U1 snRNAs 分子也被称为 U1i。

[0023] 图 2 使用强 shRNA 对于报告基因表达的抑制作用与用 U1i 对其表达的抑制作用具有协同作用。

[0024] 使用全剂量或半剂量的表达抗荧光素酶靶序列 158 的 shRNA 的质粒 (分别为 shRNA α Luc158 和 shRNA α Luc158/2),全剂量或半剂量表达抗荧光素酶的 U1i 的质粒 (分别为 U1i α Luc 和 U1i α Luc/2),以及半剂量的 shRNA α Luc158 和半剂量的 U1i α Luc (shRNA α Luc158/2+U1i α Luc/2),计算用对照质粒转染的细胞内的荧光素酶的活性。示出的抑制系数是通过对照 (非抑制的) 细胞的荧光素酶活性除以从余下的例子中获取的荧光素酶活性而得出的。误差线代表 9 个独立测量的标准偏差。

[0025] 图 3 使用强 shRNAs 对于报告基因的表达的抑制作用与用 U1i 对其表达的抑制作用具有协同作用。

[0026] 经对照质粒转染的细胞内的荧光素酶活性通过全剂量或半剂量的表达抗荧光素酶靶向序列 1546 的 shRNA 的质粒 (分别为 shRNA α Luc1546 和 shRNA α Luc1546/2)、全剂量或半剂量的表达抗荧光素酶的 U1i 的质粒 (分别为 U1i α Luc 和 U1i α Luc/2) 以及半剂量的 shRNA α Luc1546 和半剂量的 U1i α Luc (shRNA α Luc1546/2+U1i α Luc/2) 进行计算。示出的抑制系数是通过对照 (非抑制) 细胞的荧光素酶活性除以从余下的例子中获取的荧光素酶活性而得出的。误差线代表 9 个独立测量的标准偏差。

[0027] 图 4 使用中 shRNAs 对于报告基因表达的抑制作用与用 U1i 对其表达的抑制作用具有协同作用。

[0028] 经对照质粒转染的细胞的荧光素酶活性通过全剂量或半剂量的表达抗荧光素酶靶向序列 163 的 shRNA 的质粒 (分别为 shRNA α Luc163 和 shRNA α Luc163/2),全剂量或半剂量的表达抗荧光素酶的 U1i 的质粒 (分别为 U1i α Luc 和 U1i α Luc/2),以及半剂量的 shRNA α Luc163 和半剂量的 U1i α Luc (shRNA α Luc163/2+U1i α Luc/2) 进行计算。示出的抑制系数是通过对照 (非抑制的) 细胞的荧光素酶活性除以余下例子中获取的荧光素酶活性的而得出的。误差线代表 9 个独立测量的标准偏差。

[0029] 图 5 使用弱 shRNAs 对于报告基因表达的抑制作用与用 U1i 对其表达的抑制作用

具有协同作用。

[0030] 经对照质粒转染的细胞的荧光素酶活性通过全剂量或半剂量的表达抗荧光素酶靶向序列 154 的 shRNA 的质粒（分别为 shRNA α Luc154 和 shRNA α Luc154/2），全剂量或半剂量的表达抗荧光素酶的 U1i 的质粒（分别为 U1i α Luc 和 U1i α Luc/2），以及半剂量的 shRNA α Luc154 和半剂量的 U1i α Luc (shRNA α Luc154/2+U1i α Luc/2) 进行计算。示出的抑制系数是通过对照（非抑制的）细胞的荧光素酶活性除以余下例子中获取的荧光素酶活性而得出的。误差线代表 9 个独立测量的标准偏差。

[0031] 图 6 使用强 shRNAs 的协同作用的稳定性的分析

[0032] 经对照质粒转染的细胞的荧光素酶活性通过减少剂量的（1、1/2、1/4、1/8，和 1/20）表达抗荧光素酶靶向序列 1546 的 shRNA 的质粒（1546），减少剂量的（1、1/2、1/4、1/8 和 1/20）的表达抗荧光素酶的 U1i 的质粒（U1i α Luc），半剂量的 U1i α Luc 和减少剂量的 shRNA α Luc1546（1/2、1/4、1/8 和 1/20）以及半剂量的 shRNA α Luc1546 和减少剂量的 U1i α Luc（1/2、1/4、1/8 和 1/20）进行计算。示出的抑制系数是通过对照（非抑制的）细胞的荧光素酶活性除以余下例子中获取的荧光素酶活性而得出的。误差线代表 9 个独立测量的标准偏差。

[0033] 图 7 使用中 shRNAs 的协同作用的稳定性的分析

[0034] 经对照质粒转染的细胞的荧光素酶活性通过减少剂量的（1、1/2、1/4、1/8 和 1/20）表达抗荧光素酶靶向序列 163 的 shRNA 的质粒（163），减少剂量的（1/2、1/4、1/8 和 1/20）的表达抗荧光素酶的 U1i 的质粒，半剂量的 U1i α Luc 和减少剂量的 shRNA α Luc163（1/2、1/4、1/8 和 1/20）以及半剂量的 shRNA α Luc163 和减少剂量的 U1i α Luc（1/2、1/4、1/8 和 1/20）进行计算。抑制系数是通过对照（非抑制的）细胞的荧光素酶活性除以余下例子中获取的荧光素酶活性而得出的。误差线代表 9 个独立测量的标准偏差。

[0035] 图 8 使用 shRNAs 对于内源性基因的抑制作用与用 U1i 对它的表达的抑制作用具有协同作用。

[0036] A. HeLa 细胞经两倍剂量的表达抗 Notch1 靶向序列 1 或者 2 的 shRNA 的质粒（分别为 shRNA1 α Notch1x2 和 shRNA2 α Notch1x2），或者一倍剂量的表达 shRNAs 的质粒和一倍剂量的表达 U1i α Mock 或 U1i α Notch1 的质粒的混合物转染。在转染后 48 小时收集细胞提取物，通过 Western blot. 的方法来计算 Notch1 的量。B. 如在 A 中所描述的细胞，或经 U1i α Mock 转染或由一倍剂量或两倍剂量的 U1i α Notch1 转染的细胞，在 NF- κ B- 依赖型的启动子下经表达荧光素酶的质粒共转染。荧光素酶活性在相关单元中示出。误差线代表 9 个独立测量的标准偏差。

[0037] 发明详述

[0038] 本发明的发明人已经惊人地示出，对特定靶向基因具有特异性的 U1snRNAs 和用于相同靶向基因的基因表达沉默剂的联合使用导致靶基因的表达的抑制作用大于分别使用每种试剂时所观察到的结果。

[0039] 不希望被任何理论约束，可以认为协同效应是由于 mRNAs 前体的加工过程中两种组分作用于不同的位点而造成的。因此当修饰的 U1s 在细胞核内通过抑制 mRNA 前体的多聚腺苷酸化而起作用时，它们相应地阻止其输出到细胞溶质中，基因表达沉默剂可在细胞

溶质内起作用,其作用于在 U1 抑制剂的存在下成熟的 mRNAs,导致其降解或抑制其翻译。能够抑制靶 mRNAs 前体的多聚腺苷酸作用的修饰的 U1s 在此简称为 U1is。

[0040] 因此,本发明的第一方面涉及包括一个或多个容器的组合物或试剂盒部分,其包括:

[0041] (i) 第一组分,包括至少一个 U1snRNAs 或编码 U1snRNAs 的多聚核苷酸,其中所述 U1snRNA 在其与内含子的 5' 末端的 GU 共有序列的结合序列内被修饰,使得其特异性的结合到靶 mRNA 前体的 3' 末端外显子的预选区域,并且其能够抑制靶 mRNA 前体的成熟,和

[0042] (ii) 第二组分,包括至少一个特异性靶向于由 mRNA 前体的加工形成的 mRNA 的预选区域的基因表达沉默试剂,该前体是 (i) 中所限定的 U1snRNA 的靶标,并且其能够导致所述靶 mRNA 的沉默。

[0043] 由此本发明的组合物包括两个组分,其可在一个相同的容器中一起找到或者物理性隔离。而且,本发明还涉及包括上述组分 (i) 和 (ii) 的组合物。

[0044] 本发明的组合物的第一组分

[0045] 本发明的组合物或试剂盒的第一组分是编码 U1snRNA 的多聚核苷酸,该 U1 snRNA 在其与内含子 5' 末端的 GU 共有序列的结合序列内被修饰,使得其特异性结合到靶 mRNA 前体的 3' 末端外显子的预选区域,阻止所述 mRNA 前体的 3' 末端的加工,3' 末端的加工被认为是从非聚腺苷酸 mRNA 前体到聚腺苷酸 mRNA 形成(共有聚腺苷酸位点的加工和聚(A)+尾部的加成)的必要步骤之一。这些修饰的 U1snRNAs 整合到相应的 snRNP 引起 snRNPs 的修饰,其并未结合到 mRNA 前体的内含子加工位点内,而是根据在 U1 snRNA 的修饰区域的序列特异性而结合到 mRNA 前体的特定区域内。这种相互作用引起聚腺苷酸化机制的一个停顿,导致在细胞核内的 mRNA 前体的隔离、mRNA 前体的成熟的降低以及编码蛋白质的产量的降低。基于修饰的 U1 snRNAs 具有抑制靶 mRNA 前体的表达的能力,这些修饰的 U1s 被称为 U1i。然后 U1 的效果是降低或抑制基因表达。

[0046] 修饰的 U1 snRNA 的“内含子 5' 末端的 GU 共有序列的结合序列”应理解为通过碱基配对与所谓的 U1 位点或 5' 加工位点(5'-剪接位点)相互作用的 U1i 的 5' 末端形成的区域,所谓的 U1 位点或 5' 加工位点(5'-剪接位点)出现在内含子的 5' 区域内的 mRNA 前体内,其特征在于具有 AG/GURAGU 共有序列(其中 R 是嘌呤和 / 表示外显子 / 内含子的边界),允许 mRNAs 前体的加工机制定位外显子-内含子的范围。这个区域对应于 U1 snRNA 序列的 5' 末端的 1 到 11 位置的核苷酸(Zhuang, Y 和 Weiner, A. M.:1986, Cell, 46 :827-835)。

[0047] 结合到 mRNA 前体的 U1 位点的共有序列的“修饰”应理解为包含大量突变的共有序列,使得 U1 snRNA 结合到 mRNA 前体的 U1 位点的能力大幅降低,同时,所述 U1 snRNA 获得一个新的互补,允许其在靶 mRNA 前体区域内的预选区域通过碱基配对形成双链。根据本发明结合到修饰的 U1 位点的序列和靶 mRNA 的预选区域之间互补的程度在 3 和 16 个核苷之间变化,优选在 8 和 16 个核苷之间变化,更优选在 10 和 11 个核苷之间变化。然而,当形成 U1 位点的 10-11 个核苷已被修饰,使得它们与靶 mRNA 前体内的预选区域互补(参见图 1),可以观察到靶基因表达抑制的最大效率。因此,U1i 将优选在 1 到 11 或 2 到 11 的位置的那些核苷内进行修饰,这样所述区域将与在靶 mRNA 前体的预选区域内的 11 或 10 个连续的核苷完全互补。本领域技术人员将认识到,为了产生 U1i,只需要修饰天然 U1 中与靶序列中出现的不同的核苷酸。

[0048] 本领域技术人员将认识到不同生物体的 U1 snRNA 序列是已知的。因此,一旦某个 U1 snRNA 的序列是已知的,就有可能确定它是否对应于一个天然的 U1 snRNA 或者是否在与内含子的 5' 末端相互作用的区域的一个或多个核苷内已被修饰。

[0049] 靶 mRNA 内预先选定的作为互补序列与已修饰的 U1 的 5' 区域结合的区域,定位在相应的 mRNA 前体的末端外显子内。靶序列到多聚腺苷酸位点的距离并不像 Fortes et al. (supra) 所显示的特别相关, Fortes et al. (supra) 中已显示靶向作用于报告基因的 RNA 的末端外显子已修饰的 U1s 能够导致所述 RNA 的降解,甚至当靶序列定位于距离多聚腺苷酸序列大于 1000 个核苷处。

[0050] 倘若靶序列的最小优化长度是 10 个核苷,所述长度的序列的结合位点将每 106 核苷任意出现一次,其意味着在人类基因组中它们将出现大约 3000 次。然而,倘若外显子只构成人类基因组的大约 2%,且由已修饰的 U1s 通过 snRNP 介导的抑制作用需要配对到包含多聚腺苷酸信号 (AAUAAA) 的转录物的末端外显子的非结构区域,抑制作用的特异性大大提高。优选的靶位点,其在生物体的 3' 末端外显子内出现的次数最少,由此出现在其中进行沉默的细胞。

[0051] 经序列比对可确定可能的靶标出现的频率。典型地,对于基因比对,一个序列作为参照序列,用于与测试序列进行比较。当使用序列比对算法时,测试序列和参照序列都输入计算机,指定序列坐标,如有必要,设定序列算法程序参数。优选地,可使用默认程序参数,或者指定替代参数。然后基于程序参数,序列比较算法计算测试序列相对于参照序列的百分比的序列同一性。

[0052] 这里使用的“比较窗口”包括选自下组中连续位置的任何一个数量的部分,选自从 19 到 600 的组,通常为大约 50 至大约 200 的组,更通常为大约 100 到大约 150 组成的组,其中两个序列进行最佳排列后,连续位点的相同数目的参照序列与其进行比较。用于将序列排列从而进行比较的方法在本领域是众所周知的。可通过如下方法将序列排列优化从而进行比较,例如,通过 Smith 和 Waterman, (Adv. Appl. Math., 1981, 2:482) 的局部同源性算法,通过 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol., 1970, 48:443) 的同源性排列算法,通过 Pearson 和 Lipman, (Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1988, 85:2444) 的相似法的搜索,通过这些算法 (GAP, BESTFIT, FASTA, 和 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) 的计算机化的实施,或者通过人工排列和目测 { 参见例如, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement) }。

[0053] 优选的适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的实施例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,其在 Altschul 等人的论文 (Nucl. Acids Res., 1977, 25:3389-3402) 和 Altschul 等人的论文 (J. Mol. Biol., 1990, 215:403-410) 中已经被分别描述。根据这里所描述的参数, BLAST 和 BLAST 2.0 用于确定序列同一性的百分比。用于执行 BLAST 分析的软件在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 公开可用。这种算法包括通过识别在查询序列中 W 长度的短命令而首次识别高分的序列对 (HSPs), 或者在数据库序列中用相同长度的命令比对时其匹配或满足某些正值的阈值 T。T 指的是相邻的命令的分数阈值 (Altschul 等人, supra)。这些初始的相邻命令的采样数作为种子,用作启动检索以找到包括它们的更长的 HSPs。只要累积的比对数增加,该命令的采样数沿着每个序列在

两个方向上各自延伸。对于核苷序列,使用参数 M(作为匹配残基的配对的反馈值;总是为 0)和 N(不匹配残基的损失值;总为 0)计算累积的值。对于氨基酸序列,利用计分矩阵计算累积值。当累积比对应值由于数量 X 远离最大值而下降;累积值由于一个或更多负值残基比对的累积到达 0 或更低;或到达任一个序列末端时,命令采样数在各个方面的延伸被停止。BLAST 算法参数 W, T 和 X 确定灵敏度和比对的速度。BLASTN 程序(用于核苷酸序列)的默认值为 11 的命令长度(W), 10 的期望值(E), $M = 5$, $N = -4$ 和两个链之间的比较。对于氨基酸序列, BLASTP 程序的默认值为命令长度为 3, 期望值(E)为 10, BLOSUM62 计分矩阵(参见 Henikoff 和 Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 89:10915) 比对应值(B)为 50, 期望值(E)为 10, $M = 5$, $N = -4$, 两个链的比对。

[0054] 优选地,选择已修饰的 U1 snRNAs 用于本发明的组合物中,这样它与内含子的 5'末端的 GU 共有序列结合的结合序列,已根据靶 mRNA 前体的序列修饰,与靶位点相同或实质上相同。在本文中的两个或更多的核苷酸或多肽序列中,术语“同一的”或“同一性”百分比,指的是两个或更多的序列或亚序列,其是相同的(同一的)或者具有指定百分比的氨基酸残基或核苷,其与使用具有如上所述的默认值参数的 BLAST 或者 BLAST2.0 序列比对算法,或者通过人工比对和目测方法(参见,例如,NCBI 网站或类似网站)测量而来的是相同的(例如,当在比较窗口或指定区域上为了最大对应而比较和比对时,至少 70%相同,优选的 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或比靶序列的指定区域具有更高的同一性)。这样的序列称为“实质上同一的”。

[0055] 在具有相关序列的蛋白质家族被沉默或者被沉默的 mRNA 的准确的特定的序列不可知的情况下(例如,在显示不同血清型的病毒蛋白的情况下),可以设计允许多个蛋白质同时沉默的 U1 抑制剂。为此,识别被沉默蛋白质家族的核苷酸序列内的保守序列是有必要的。这可使用本领域技术人员众所周知的算法(例如 ClustalW 算法,参见 Chenna 等人, 2003, Nucleic Acids Res., 31:3497-3500)通过对序列进行多重比对来执行。一旦不同基因之间的保守序列区域被识别,将设计一共有区域,其作为蛋白质家族设计特异性 U1 snRNA 的靶标。5'序列靶向于家族不同成员之间的保守序列的 U1 抑制剂的设计,将导致家族几个成员的同时沉默。在家族成员显示高度同一性和多个保守区域可选作用于设计 U1 抑制剂的靶标的情况下,根据前段所述,将选择那些生物体 RNAs 的 3'末端的外显子出现次数最少的序列进行沉默。

[0056] 根据本发明的编码 U1 snRNA 的聚核苷酸可有效的连结到启动子上,其允许所述聚核苷酸在表达 U1i 的细胞内进行转录。适用于执行本发明的启动子包括,但不限于,结构启动子比如 U1 启动子或源自真核细胞病毒基因组的启动子,例如多瘤病毒、腺病毒、SV40、CMV、鸟类肉瘤病毒、B 型肝炎病毒,金属硫蛋白基因启动子、单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因启动子、逆转录酶病毒的 LTR 区域、免疫球蛋白基因启动子、肌动蛋白基因启动子、EF-1 α 基因启动子,以及诱导型启动子,其基因的表达依赖于附加的分子或外源信号,例如四环素系统、NF- κ (kappa)B/UV 光系统、Cre/Lox 系统,和热休克基因启动子、在 W0/2006/135436 中所描述的可调型 RNA 聚合酶 II 启动子、以及组织特异性启动子(例如, W02006012221 中所描述的 PSA 启动子)。在优选的实施方式中,启动子是以构成性方式起作用的 RNA 聚合酶 II 启动子。

[0057] 在基因表达沉默的在组织中特异性表达的基因的情况下,使用组织特异性启动子

也是可能的：

[0058] - 一个特异性胃启动子，比如 H/K-ATP 酶 β 亚基启动子、K19 启动子、金属硫蛋白基因启动子、TFF1 启动子、TFF2 启动子、FOXA/HNF2 γ 启动子，

[0059] - 一个特异性胰腺启动子，比如弹性蛋白酶启动子、Pdx-1 启动子、胰岛素启动子或者磷酸甘油酸激酶启动子，

[0060] - 一个特异性肺启动子，比如 Clara 细胞分泌型蛋白启动子、表面活性蛋白 C 启动子，

[0061] - 一个特异性胸启动子，比如鼠乳房肿瘤病毒启动子或乳清酸性蛋白启动子，

[0062] - 一个特异性皮肤启动子，包括角蛋白启动子或 K14 启动子，

[0063] - 一个特异性食道启动子，比如 EBV 启动子 12，

[0064] - 一个特异性肝脏启动子，比如主要的尿蛋白启动子或白蛋白启动子，

[0065] - 一个特异性结肠启动子，比如绒毛蛋白启动子或 FABP-TS4 启动子，

[0066] - 一个特异性前列腺启动子，比如 cryptidin-2 启动子、前列腺特异性抗原启动子、C(3)1 启动子、由具有 94 个氨基酸 (PSP94) 的前列腺分泌的蛋白的启动子或者 probasin 启动子，

[0067] - 一个特异性肾脏启动子，比如尿调节素启动子、Tamm-Horsfall 蛋白启动子或 1 型 γ -谷氨酰转肽酶启动子，

[0068] - 一个特异性膀胱启动子，比如尿溶蛋白 (urolakin) 启动子或者 urohingin 启动子，

[0069] - 一个特异性子宫启动子，比如子宫球蛋白启动子。

[0070] 此外，在由 Chen, X 等人 (Nucleic Acids Res., 2006, 34, Database Issue) 所描述的 TiProD 组织特异性启动子数据库中所述的任何组织特异性启动子都可用于本发明的上下文中。

[0071] 本发明组合物的第二组分

[0072] 根据本发明的组合物的第二组分是一基因表达沉默剂或者基因表达沉默剂的组合，所述基因表达沉默剂对由靶 mRNA 前体的加工形成的 mRNA 具有特异性，针对该前体的是形成本发明的第一组分的部分的 U1i，并且该前体能够导致所述靶 mRNA 的沉默。

[0073] “基因表达沉默剂”应理解为引起靶 mRNA 降解或通过所谓的 RNA 干扰过程 (RNAi) 抑制靶 mRNA 翻译的那些化合物。在加工过程中，双链 RNA (dsRNA) 通过用核糖核酸酶 III 型 (剪切酶) 将所述 RNA 转化成 siRNA，从而能够使基因表达沉默。siRNA 链中的一个链整合进入被称为 RNA 诱导沉默复合物 (RISC) 的核蛋白复合物中。RISC 复合物使用单链 RNA 去识别 mRNA 分子，mRNA 分子至少部分与整合到 RISC 中的 siRNA 的 RNA 链互补，使其在翻译过程中被降解或被抑制。因此，整合到 RISC 中的 siRNA 链被称为是导向链或反义链。被称作瞬时链或有义链的另一条链从 siRNA 消失，其部分地与靶 mRNA 同源。通过 RISC 复合物的靶 mRNA 的降解导致所述 mRNA 表达水平的降低，由此导致相应编码的蛋白含量减少。此外，RISC 还可以通过抑制靶 mRNA 的翻译，导致表达的降低。

[0074] “能够引起所述 mRNA 表达沉默”的试剂在本发明的上下文中应被理解为是这样一种试剂，其在细胞内时能够为一个试剂编码，该试剂能够或者其自身能够结合到包含预选序列并导致其降解的靶 mRNA。

[0075] 沉默剂诱导抗靶 mRNA 的 RNAi 应答,其可以结合到本发明的第二组分中,包括:

[0076] (i) siRNA

[0077] (ii) shRNA

[0078] (iii) miRNA

[0079] (iv) 编码根据 (i)、(ii)、(iii) 的试剂的聚核苷酸,和

[0080] (v) 一个或几个根据 (i) 至 (iv) 的试剂的组合物

[0081] 其中试剂 (i)、(ii) 和 (iii) 基于 RNA,组合物 (iv) 基于 DNA。

[0082] (i) siRNA

[0083] siRNA 是能够通过 RNA 干扰抑制靶基因表达的试剂。siRNA 能够化学合成或者通过体外转录获取。siRNA 典型的由具有 15 至 40 个核苷酸长度的双链 RNA 组成,并且包含具有 1 到 6 个核苷酸的 3' 和 / 或 5' 突出区域。这个突出区域的长度与 siRNA 分子的总长度无关。siRNA 通过降解作用或靶信使的转录后沉默起作用。本发明的 siRNA 大体上与靶 mRNA 的预选区域同源。“大体上同源”应理解为它们具有与靶 mRNA 的充分互补或相似的序列,使得 siRNA 通过 RNA 干扰能够引起其降解。大体上同源可能意味着如上所述的实质同一性。适合于引起所述干扰的 siRNA 包括由 RNA 形成的 siRNAs,以及包括不同的化学修饰的 siRNAs,比如:

[0084] -siRNAs,其中核酸之间形成的键不同于那些在自然状态下形成的键,比如磷硫酰键,

[0085] -具有功能试剂的 siRNA 链的偶联物,比如荧光团,

[0086] -siRNA 链末端的修饰,尤其在 3' 末端,通过位置 2' 的羟基的不同功能基团的修饰,

[0087] -具有修饰糖基的核苷酸,比如在位置 2' 的 O-烷基基团,比如 2'-O-甲基核糖对 2'-O-氟基核糖,

[0088] -具有修饰碱基的核苷酸,比如卤化基团(例如 5-溴尿嘧啶和 5-碘尿嘧啶),烷基化碱基(例如 7-甲基鸟苷)。

[0089] 本发明的 siRNA 可使用本领域技术人员众所周知的一系列技术获得。例如,siRNA 可以在传统的 DNA/RNA 的合成器中从由亚磷酰胺基团保护的核糖核苷开始进行化学合成。

[0090] (ii) shRNA

[0091] 在另一个方法中,本发明的第二组分是 shRNA(短发夹 RNA)。在本发明的上下文中,shRNA 应理解为由两个反平行链形成的 RNA 分子,其中两个反平行链通过一个发夹区域连接,反平行链的其中一个的序列与靶 mRNA 的预选区域互补。shRNAs 是由短反义序列(具有 19 至 25 个核苷酸)形成的,伴随带有有义链的 5 至 9 个核苷酸的环。shRNAs 可以在传统的 DNA/RNA 合成器里由经亚磷酰胺基团保护的核糖核苷开始进行化学合成,或者它们可通过体外转录由聚核苷酸获取。shRNAs 由核糖核酸 Dicer 酶(RNase Dicer)在细胞内加工,消除发夹区域,产生如上所述的 siRNAs。shRNAs 还可以包含如在 siRNAs 的例子中所述的不同的化学修饰。

[0092] (iii) miRNA

[0093] miRNA 或者 microRNA 是天然出现在细胞内的小 RNA 分子,其负责通过调控 mRNA 的降解和翻译而控制基因表达的特异性。miRNAs 是具有 22 个核苷的单链 RNA 分子,其合成

类似大的初级转录体 (pri-mRNA), 其通过 Drosha 核糖核酸酶 III 型 (Drosha RNase type III) 在细胞核内加工产生 60 个碱基对的“发夹”前体 (miRNA 前体)。这些分子被运输到细胞质中, 由第二核酸酶 (Dicer) 加工以产生成熟形式 (miRNA)。miRNAs 整合到核糖核蛋白 RISC 复合物中, 它们通过在成熟的 mRNA-RISC 复合物和靶 mRNA 的同源区域之间的配对引起靶 mRNA 的降解而发挥作用, 尤其是在 miRNA 链的所谓的“种子”区域之间 (5' 末端的 2 至 7 个核苷酸), 导致 mRNA 的降解和 / 或翻译弱化。即使 miRNAs 是通过调节 mRNA 细胞的半衰期而起作用的内源性分子, 已经示出了内源性的 mRNA 的结构 (例如, miR-30) 可被改变成包括编码 siRNAs 的序列, 所述修饰的 miRNA 可用于引起内源性靶基因的降解 (W003093441)。还示出了 siRNA 序列作为 RNAi 效应物被整合到 mir-26a 茎区工作, 引起同源性的 mRNAs 的降解 (McManus, M. T. 等人, 2002, RNA, 8 :842-850)。在两种情况下, 引入到 miRNA 茎的核苷酸序列显示出与靶基因具有 100% 的同一性。

[0094] 适合在本发明的组分中使用的 miRNAs 由 19 至大约 24 个核苷酸组成, 优选 21 或 22 个核苷酸。miRNAs 可被设计成与具有高度特异性的 RNA 转录物杂交。miRNA 优选设计成与靶 mRNA 具有 100% 同一性或具有实质上的同一性 (例如允许至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个或更多的不匹配), 只要仅一个非互补的核苷酸可以根据其在 miRNA 链中的位置而降低抑制水平。miRNAs 可被设计成它们靶向于非翻译的 5' 区域, 靶 mRNA 的 3' 区域的编码区域。

[0095] miRNAs 来自包括茎环区域的 miRNAs 前体的加工。这种结构可被设计成由核糖核酸酶识别, 优选通过类似 Dicer 的核糖核酸酶 III 型识别, 从而形成成熟 miRNA。茎环结构可具有 40 至 100 个核苷酸, 优选具有 50 至 70 个核苷酸, 更优选具有 20 至 30 个核苷酸。茎可包括完全互补的双链或可在形成双链的至少一个链内包含额外的非互补区。优选的, 所述非互补区尺寸不是非常大的 (例如, 1、2 或 3), 由 3 个或更少的核苷酸组成。环末端可包括 4 个或更多核苷酸 (优选不多于 25 个)。环的尺寸优选为 6 至 15 个核苷酸。

[0096] 典型的仅当所述 miRNA 具有特定结构需求时, miRNA 能够有效加工和运作, 例如 Zeng 等人所述的 (RNA, 2003, 9 :112-123)。本发明的 miRNAs 优选基于 mirR-30 结构, 其中茎区域被预选的 mRNAs 的靶序列取代。miR-30 在环形区域的存在虽然是需要的, 但也并非绝对必要, 因为它可以承受特定改变, 这样环形区域与出现在 miR-30 的环形序列具有大于 70%, 优选大于 79%, 更优选大于 86%, 甚至更为优选大于 93% 的同一性。同一性百分比的确定可以使用前述提到的任何方法进行测定。

[0097] 适用于执行本发明的 miRNAs 对应于那些基于如在 W003093441 中描述的内源性的 miR-30miRNA, 或那些基于如在 W003029459 所描述的内源性的 miRNAs。

[0098] (iv) 编码 siRNA、shRNA、或者 miRNA 的多聚核苷酸

[0099] 本发明的第二组分可作为多聚核苷酸提供, 其转录产生前述的 siRNA、shRNA、和 / 或者 miRNAs。在编码 shRNA 或者 miRNA 的多聚核苷酸的情况下, 它们包括调控序列转录的单一启动子区域, 所述序列包括通过发夹或茎环区域连接的 shRNAs 和 miRNAs 的有义链或反义链。理论上, 任何启动子都可用于 shRNAs 和 miRNAs 的表达, 只要所述的启动子与其中将表达 siRNAs 的细胞可兼容。因此, 适用于执行本发明的启动子包括如前所述的用于 U1i 表达的启动子。在优选的实施方式中, 启动子是 RNA 聚合酶 III 启动子, 其构成性地发挥作用。RNA 聚合酶 III 启动子出现在有限数量的基因中, 比如 5S RNA、tRNA、RNA 7SL 和 snRNA

U6。

[0100] 另外,编码 siRNAs 的多聚核苷酸包括两个转录单位,每个均由调控形成在 siRNA 中的双链(有义链和反义链)之一的转录的启动子形成。编码 siRNAs 的多聚核苷酸可以包含收敛的和发散的转录单位。在发散的转录多聚核苷酸中,编码形成 siRNA 的每个 DNA 链的转录单位串联定位于多聚核苷酸内,这样每个 DNA 链的转录依赖于其自身的启动子,启动子可以是相同的或者不同的(Wang, J. et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 5103-5106 and Lee, N. S., et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20 : 500-505)。在收敛的转录多聚核苷酸中,产生 siRNAs 的 DNA 区域形成 DNA 区域的有义链和反义链,其侧面是两个反向的启动子。在有义 RNA 链和反义 RNA 链转录后,它们将形成对应于功能 siRNA 的杂交链。适用于包含反转录单位的多聚核苷酸启动子的组合,包括 2U6 启动子(Tran, N. et al., 2003, BMC Biotechnol., 3 : 21)、鼠 U6 启动子和人 H1 启动子(Zheng, L., et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 135-140 和 WO2005026322) 和人 U6 启动子和鼠 H1 启动子(Kaykas, A. & Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5 : 16)。在优选的实施例中,通过不同的启动子调控有义 siRNA 链和反义 siRNA 链。在更优选的实施例中,两个转录单位以收敛的方式取向。在优选的实施例中, RNA 聚合酶 III 型启动子是源自人类和鼠的 H1 和 U6 基因的启动子。在更为优选的实施方式中,启动子是源自人类或鼠的 2U6 启动子,鼠 U6 启动子和人 H1 启动子或人 U6 启动子和鼠 H1 启动子。

[0101] (v) 一个或多个 siRNAs、shRNAs、miRNAs 和 / 或编码它们的多聚核苷酸的组合物

[0102] 本发明的第二组分可由一个或多个在 (i)、(ii)、(iii) 和 (iv) 中说明的组分形成。因此本发明意在 一个或多个 siRNAs、一个或多个 shRNAs、一个或多个 miRNAs 和 / 或一个或多个编码所述多聚核苷酸的多聚核苷酸的联合使用。不同的沉默剂可以靶标于一个 mRNA 和相同的 mRNA 的不同区域。

[0103] 在优选的实施方式中,本发明一部分的组合物或试剂盒的组分 (ii) 是包括了编码至少一个 shRNA 的序列的多聚核苷酸。

[0104] 本发明的载体和基因结构

[0105] 编码本发明的第一组分的多聚核苷酸,以及编码 siRNAs、miRNAs 和 / 或 shRNAs 并形成本发明第二组分的多聚核苷酸,可以单独的找到,或者形成载体的一部分,允许所述多聚核苷酸在合适的宿主细胞内的繁殖。适用于插入所述多聚核苷酸的载体是来自原核生物细胞内的表达载体,比如 pUC18、pUC19、Bluescript 及其衍生物, mp18、mp19、pBR322、pMB9、CoIE1、pCR1、RP4、噬菌体和“穿梭”载体比如 pSA3 和 pAT28,在酵母中的表达载体比如 2 微米质粒型的载体、整合质粒载体、YEP 载体、着丝粒质粒载体和类似物、在昆虫细胞内的表达载体比如 pAC 系列和 pVL 的载体、和植物中的表达载体比如 pIB1、pEarleyGate、pAVA、pCambia、pGSA、pGWB、pMDC、pMY、pORE 系列和其类似物,以及真核细胞内的表达载体,包括利用任何市售的杆状病毒系统去转染昆虫细胞的杆状病毒。真核细胞的载体包括优选的病毒载体(腺病毒,与腺病毒有关的病毒,比如逆转录病毒,尤其是慢病毒)以及非病毒载体比如 pSilencer 4.1-CMV (Ambion)、pcDNA3、pcDNA3.1/hyg、pHMCV/Zeo、pCR3.1、pEFI/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、pZeoSV2、pCI、pSVL 和 PKSV-10、pBPV-1、pML2d 和 pTDT1。

[0106] 在优选的实施方式中,编码 U1iRNA 的多聚核苷酸和编码 siRNA、shRNA 或者 miRNA

的多聚核苷酸组成相同载体的部分。在另一个优选的实施方式中,编码 U1iRNA 的多聚核苷酸和编码 siRNA、shRNA 或者 miRNA 的多聚核苷酸组成单个载体的部分。

[0107] 载体优选包括一个报告基因或者标记基因,在细胞与其接触后,能够识别那些整合到载体的细胞。在本发明的上下文中有用的报告基因包括 lacZ、荧光素酶、胸苷激酶、GFP 等。在本发明的上下文中有用的标记基因包括,例如,新霉素抗性基因,其对氨基糖苷 G418 具有抗性;潮霉素磷酸转移酶基因,其对潮霉素具有抗性;ODC 基因,其对鸟氨酸脱羧酶(2-二氟甲基-DL-鸟氨酸(DFMO)的抑制剂具有抗性;二氢叶酸还原酶基因,其对甲氨蝶呤具有抗性;嘌呤霉素-N-乙酰转移酶基因,其对嘌呤霉素具有抗性;ble 基因,其对博来霉素具有抗性;腺苷脱氨酶基因,其对 9-β-D-木糖呋喃腺嘌呤具有抗性;胞核嘧啶脱氨酶基因,其允许细胞在存在 N-磷乙酰基-L-天冬氨酸盐的情况下生长;黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因,其允许细胞在有黄嘌呤并且没有鸟嘌呤的存在下生长;大肠杆菌的 trpB 基因,其允许细胞在吡啶而不是色氨酸存在的情况下生长;大肠杆菌的 hisD 基因允许细胞使用组氨酸代替组氨酸。选择基因被整合到质粒中,其可额外包括适合于所述基因在真核细胞内表达的启动子(例如,CMV 或 SV40 启动子),优化的翻译起始位点(例如,根据所谓的 Kozak 规则和 IRES 的位点),多聚腺苷酸位点例如 SV40 多聚腺苷酸或磷酸甘油酯激酶位点,内含子例如 β-球蛋白基因内含子。可选的,可以在相同载体内同时使用报告基因和标记基因。

[0108] 在优选的实施方式中,载体是病毒载体。在更优选的实施方式中,用于本发明第一组分或第二组分的表达的载体(假设其基于 DNA)是病毒载体,其选自于由腺病毒、腺相关的病毒、逆转录酶病毒、慢病毒、疱疹病毒、SV40 和 α 病毒构成的组中。

[0109] 作为设计 siRNAs 的基础的靶 mRNA 的区域是不受限制的,可包含编码序列的区域(在起始密码子和终止密码子之间),或者,可选的,它可以包含非翻译的 5' 区域或 3' 区域的序列。优选的,其具有在 21 至 50 个核苷酸之间的长度。

[0110] 用于设计 siRNAs、shRNAs 和 miRNAs 的标准是本领域技术人员众所周知的(例如,参见 Birmingham, A. et al., 2007, Nature Protocols, 2 :2068-2078, Ladunga, I., 2006, Nucleic Acids Res. 35 :433-440 和 Martineau, H., Pyrah, I., 2007, Toxicol. Pathol., 35 : 327-336 and Pei 和 Tuschl, 2006, Nature Methods, 3 :670-676)。

[0111] 设计适用于抑制靶基因表达的 U1is 的标准已经在上面解释过(参见 Fortes, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100 :8264-8269 and Sajic, R. et al., 2006, Nucleic Acids Res., 35 :247-255)。优选的,作为设计 U1is 的基础的靶 mRNA 前体的区域仅包括 3' 末端区域,如由 Fortes 等人 (supra) 所示的那样。

[0112] 在优选的实施方式中,本发明的组合物或试剂盒部分的组分 (i) 包括多个 U1snRNAs 或者多个编码不同的 U1is 的多聚核苷酸,它们全部都靶标于一个相同的靶 mRNA 的不同区域。以这种方式,可获得 U1is 的协同抑制效应,如由 Fortes 等人 (supra) 和 Sajic 等人 (supra) 所示的那样。

[0113] 在另一个优选的实施方式中,本发明的组合物或试剂盒部分的组分 (ii) 包括特异性靶标于由 mRNA 前体加工而来的 mRNA 的不同的预选区域的多个基因表达沉默剂,其是如 (i) 中所定义的 U1 snRNAs 的靶标,并且能够引起所述靶 mRNA 在体内的沉默。

[0114] 在还一更优选的实施方式中,本发明的组合物或试剂盒部分的组分 (i) 包括多

个 U1 snRNAs 或者多个编码在其与内含子 5' 端的 GU 共有序列结合的序列内被修饰的 U1 snRNAs 的核苷酸,使得它们特异性地结合到相同靶 mRNA 前体不同的预选区域,试剂盒部分或组合物的组分 (ii) 包括多个基因表达沉默剂,该沉默剂特异性靶向于由 mRNA 前体加工而来的 mRNA 的不同的预选区域,其是如在 (i) 中定义的 U1 snRNAs 的靶标,并且能够引起所述靶 mRNA 的体内沉默。

[0115] 本发明的组合物可将两种组分容纳在单个容器内,或者两个成分物理隔离地放置不同的容器内,在这种情况下,组合物被认为是“本发明的试剂盒”。在本发明的上下文中,试剂盒应理解为一种产品,其包含本发明的组合物的不同组分,允许包装后运输和储存。适用于包装试剂盒组分的材料包括玻璃、塑料(聚乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯等)、瓶子、小瓶、纸、信封等。另外,本发明的试剂盒可包括同时的、连续的或单独使用试剂盒中组分的说明书。所述说明书可以采用印刷材料的形式,或采用电子支持的形式,该电子支持能够存储说明书,从而其可被一个主体读取,例如电子存储介质(磁盘、磁带和类似物)、光学介质(CD-ROM, DVD) 等等。另外地或可选地,介质可包括提供所述说明书的网址。

[0116] 本发明的双功能多聚核苷酸

[0117] 本发明的作者建议,当本发明的第二组分基于 DNA 并由编码 siRNA、shRNA 或 miRNA 的序列组成时,它可以合并并在具有本发明第一组分的序列的编码 U1i 的单个多聚核苷酸中,其允许将待处理的生物体接触必要的两个组分,通过单独给药方式获取同时的协同效应。因此,在另一方面,本发明涉及一种多聚核苷酸(本发明后文中的双功能多聚核苷酸),其包括:

[0118] (i) 编码至少一个 U1 snRNA 的序列,所述 U1 snRNA 在其与内含子的 5' 端的 GU 共有序列的结合序列中被修饰,使得其可特异性结合到靶 mRNA 前体的 3' 末端外显子的预选区域,并且其能够抑制靶 mRNA 前体的加工,和

[0119] (ii) 编码沉默试剂的序列,该沉默试剂特异性的靶标于由 mRNA 前体加工而来的 mRNA 的预选区域,其是由如 (i) 中所定义的多聚核苷酸编码的 U1 snRNAs 的靶,能够引起所述靶 mRNA 在体内的沉默。

[0120] 在优选的实施方式中,本发明的双功能多聚核苷酸包括至少一个 siRNA 的有义链或反义链,编码至少一个 miRNA 前体或编码至少一个 shRNA。

[0121] 在另一方面,本发明涉及一种多聚核苷酸,其包括:

[0122] (i) 编码 U1 snRNA 的序列,所述 U1 snRNA 在其与内含子的 5' 末端的 GU 共有序列的结合序列上被修饰,使得其特异性的结合于靶 mRNA 前体的 3' 末端外显子的预选区域,并且其能够抑制靶 mRNA 前体的成熟,和

[0123] (ii) 编码至少一个 siRNA 的有义链和反义链、编码至少一个 miRNA 前体、或者编码至少一个 shRNA 的序列,其中所述 siRNA、miRNA 前体和 / 或 shRNA 特异性地结合到由 mRNA 前体加工而来的 mRNA 的预选区域,其中 mRNA 前体是由在 (i) 中定义的多聚核苷酸编码的 U1snRNA 的靶标,能够引起所述靶 mRNA 在体内的沉默。

[0124] 本发明的双功能多聚核苷酸通常结合到调控它们表达的区域,其可以与编码 U1i 的序列、编码沉默试剂的序列相同或不同。用于所述多聚核苷酸表达的合适的启动子与之前所提到的用于 U1is 的表达的是相同的(构成性、可调控和组织特异性)。

[0125] 类似的,本发明的双功能多聚核苷酸可以形成表达载体的部分。因此在另一方面,

本发明涉及包括本发明的双功能多聚核苷酸的表达载体。用于本发明的多聚核苷酸的克隆和增殖的合适的载体实质上与之前提到的用于编码 U1is 的多聚核苷酸或编码 siRNAs、shRNAs 和 / 或 miRNAs 的多聚核苷酸的表达的载体是相同的。优选的,本发明多聚核苷酸的表达载体是病毒载体、更优选的载体选自于腺病毒、腺相关病毒、逆转录酶病毒、慢病毒、疱疹病毒、SV40 和 α 病毒的组中。

[0126] 在另一方面,本发明涉及包括本发明的双功能多聚核苷酸的细胞或者包括本发明双功能多聚核苷酸的载体。适合本发明的组合物的表达的宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、真菌细胞和细菌细胞。细菌细胞包括但不限于革兰氏阳性菌细胞比如芽孢杆菌、链霉菌和葡萄球菌属,以及革兰氏阴性菌细胞比如埃希氏菌属和假单胞菌属的细胞。真菌细胞优选包括酵母细胞比如酵母属、毕赤酵母和多形汉逊酵母。昆虫细胞包括但不限于果蝇细胞和 Sf9 细胞。植物细胞中包括,农作物比如谷类、药用植物、观赏植物或者鳞茎植物。所述细胞通过已知技术转染本发明的双功能多聚核苷酸,比如农杆菌介导基因转移、叶盘转化法、聚乙二醇诱导的转化法、电穿孔法、超声降解法、显微注射法和基因枪转化法。适用于插入本发明的双功能多聚核苷酸的哺乳动物细胞包括 CHO(中国仓鼠卵巢)细胞、COS 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、911、AT1080、A549、293 或者 PER. C6。

[0127] 在另一个实施方式中,本发明涉及非人类的转基因动物,其包括集成到其基因组中的根据本发明的双功能多聚核苷酸。

[0128] 当本发明的双功能多聚核苷酸插入到干细胞的基因组中时,才可执行获取非人类动物的方法,其中干细胞可分化成所有类型的细胞,包括生殖细胞。这些是胚细胞 (ECs) 或胚胎生殖细胞 (EGCs)。胚胎干细胞 (ESCs) 是由移植之前的囊胚阶段中的胚胎内部细胞团衍生而来的。鼠和人胚胎干细胞的几个类型是已知的并已建立起来,例如,鼠的 ESC、TBV2、R1 和 D3 细胞。这些细胞在未分化阶段在合适的培养条件下体外进行培养,并保留其与囊胚结合并被植入代孕母亲的子宫内继续正常体内发育的能力。胚胎生殖细胞 (EGCs) 衍生自由生殖胎儿脊培养而来的原生殖细胞 (PGCs)。通常,本发明的携带经修饰的 GDNF 基因座的 ESC 细胞和 EGC 细胞被注入到宿主囊胚中,即宿主囊胚的囊胚腔,或者直至桑椹胚阶段与八细胞胚珠共同培养,即,自由区桑椹胚 (zone-free morula),经修饰的 ESC 细胞优选结合到正在发育的胚胎的内部细胞团中。

[0129] 随着向囊胚的注入,转基因幼仔被称为嵌合体,由于它的细胞中某些从宿主囊胚衍生而来,某些从修饰的 ESC 细胞衍生而来。为了继续发育,宿主胚胎被转移到替代的假孕母体或者中间宿主中。因此,该程序将给嵌合动物提供体细胞株和生殖细胞株组织,其中包括衍生自经基因工程获得的 ESC 细胞和受体囊胚的混合物。通常,干细胞和囊胚从具有不同皮肤着色的动物获得,这样嵌合动物具有不同颜色的斑点。因此,这些嵌合动物再次与它们的同胞杂交,直至获得生殖细胞株中的转基因动物,即,在该动物的生殖细胞内存在经修饰的转基因的动物,该性状可通过繁殖传递给动物幼仔。在生殖细胞株中的转基因动物可被识别,例如,通过观察幼仔确定性状的存在,或通过检测转基因动物的生殖细胞从而确定转基因的存在,其以遗传性相容的方式整合。这些动物与其它动物杂交,从而获得具有所需形状的单卵的动物,但其不再显示镶嵌性。

[0130] 应当理解,此处所描述的非人类的转基因动物可通过不同于上述的 ESC 细胞方法的方法生产,例如,通过前核注射方法把靶结构注射到单细胞胚胎的前核中,或者其它不基

于转染的 ESC 细胞的基因靶向方法。

[0131] 任何合适的非人类哺乳动物可用于生产这里所述的非人类转基因哺乳动物。例如,合适的哺乳动物可以是啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、沙鼠)、兔、猪、绵羊、山羊、牛、猫、狗、猪或灵长类,只要选择动物的特定株以获取良好的普遍健康、良好的胚胎性能、在胚胎内良好的原核可见性和良好的繁殖能力。在优选的实施方式中,动物是小鼠。经常使用的品种例如为 C57BL/6 株或者 C57BL/6x DBA/2Fit 株,或者 FVB 株(可从 Charles River Labs., Boston, Mass., The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME or Taconic Labs 购买)。优选的品种为 129sv 品种,以及那些具有 H2b、H-26 或者 H-2q 单倍体型的品种,比如 C57BL/6 或者 DBA/1。

[0132] 本发明的组合物的医药用途

[0133] 本发明的发明人已经展示了本发明的组合物能够以协同方式抑制靶基因的表达,即比其中每一个组分的单独使用更有效率。这允许组合物作为涉及病理学的医药产品使用,其中组分靶向作用于蛋白质的 RNA。因此另一方面,本发明涉及本发明的组合物和如上所述的本发明的双功能多聚核苷酸作为医药或药物的应用。本领域技术人员将预期到该组合物可用于治疗所有那些由特定基因的过表达导致的或者需要给定基因的表达降低的疾病或病征。

[0134] 技术人员可预期到本发明的组合物进行给药时,存在不同的可能性。组合物的两个组分可以以单独分子或者相同分子的形式给药。

[0135] 而且,第一组分和第二组分可作为抑制性分子给药,比如,即组分 (i) 可以以 U1snRNA 的形式给药,组分 (ii) 可以作为以 RNA 为基础的沉默剂给药,比如 siRNA、miRNA、shRNA。可选的,提供编码 U1snRNAs 的多聚核苷酸作为第一组分,和 / 或第二组分可基于 DNA,即,其包括编码沉默剂的多聚核苷酸。在后面的情况下,可以将多聚核苷酸作为包括组分 (i) 和组分 (ii) 的单个聚核苷酸进行给药,或者作为单独的多聚核苷酸同时、分别或者连续给药。

[0136] 因此本发明阐明的给药方案的不同组合将由医生根据情况来确定。

[0137] - 同时给药:

[0138] o 组分 (i) 是 U1 snRNA,组分 (ii) 是基于 RNA 的沉默剂。

[0139] o 组分 (i) 是 U1 snRNA,组分 (ii) 基于 DNA 的,即,它包括编码沉默 RNA 分子的多聚核苷酸。

[0140] o 组分 (i) 是编码 U1 snRNA 的多聚核苷酸,组分 (ii) 是基于 RNA 的沉默剂。

[0141] o 组分 (i) 是编码 U1 snRNA 的多聚核苷酸,组分 (ii) 是基于 DNA 的沉默剂,即,它包括编码沉默 RNA 分子的多聚核苷酸。在这个情况下,两个多聚核苷酸可形成相同的多聚核苷酸的部分或以单独的多聚核苷酸提供。

[0142] - 单独的或连续的给药

[0143] o 组分 (i) 是 U1 snRNA,组分 (ii) 是基于 RNA 的沉默剂。

[0144] o 组分 (i) 是 U1 snRNA,组分 (ii) 基于 DNA,即,它包括编码沉默试剂的多聚核苷酸。

[0145] o 组分 (i) 是编码 U1 snRNA 的多聚核苷酸,组分 (ii) 是基于 RNA 的沉默剂。

[0146] o 组分 (i) 是编码 U1 snRNA 的多聚核苷酸,组分 (ii) 基于 DNA,即,它包括编码沉

默试剂的多聚核苷酸。在这个情况下,两个多聚核苷酸必须作为单独的多聚核苷酸提供。

[0147] 本领域技术人员能够认识到,第一组分和第二组分都将以 DNA 的形式应用,即作为编码活性 RNA 分子的多聚核苷酸,可在载体内提供相应的多聚核苷酸。在单独的或者连续的递送的情况下,每个多聚核苷酸将形成不同载体的部分。在同时给药的情况下,可在不同的载体内提供两个多聚核苷酸或者在单独的一个载体内包含两个多聚核苷酸。

[0148] 为设计本发明的组合物,可用作靶标的基因的例子包括,但不限于,致癌基因、编码转录因子、受体、酶、结构蛋白质、细胞因子、细胞因子受体、凝集素、选择素、免疫球蛋白、激酶、磷酸酶、朊病毒、促血管生成多肽、涉及细胞凋亡过程的蛋白酶和蛋白质的基因、编码粘附分子的基因、编码表面受体的基因、编码涉及肿瘤细胞的转移或者侵入过程的蛋白质的基因、编码生长因子的基因、多重药物耐药基因 (MDR1)、编码淋巴因子、细胞因子、免疫球蛋白、T 细胞受体、MHC 抗原、DNA 和 RNA 聚合酶的基因、涉及代谢过程比如氨基酸和核酸合成的基因、肿瘤抑制基因、5-脂氧化酶、磷脂酶 A2、蛋白激酶 C、p53、p16、p21、MMAC1、p73、zac1、C-CAM、BRCA1、Rb、Harakiri、Ad E1B、蛋白酶 ICE-CED3、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、TNF、GMCSF、干扰素、CFTR、EGFR、VEGFR、IL-2 受体、雌激素受体、Bcl-2 家族的成员 (Bcl-2 或者 Bcl-xL), ras, myc, neu, raf erb, src, fins, jun, trk, ret, gsp, hst 和 abl, 淀粉样蛋白前体、血管抑制素、内皮生长抑制素、METH-1、METH-2、因子 IX、因子 VIII、胶原蛋白、周期素依赖性蛋白激酶、细胞周期蛋白 D1, 细胞周期蛋白 E、WAF 1、cdk4 抑制剂、MTS1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、促红细胞生成素、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、SCF、促血小板生成素、BDNF、BMP、GGRP、EGF、FGF、GDNF、GGF、HGF、IGF-1、IGF-2、KGF、肌球蛋白、NGF、OSM、PDGF、生长激素、TGF- β 、TGF- α 、VEGF、TNF- α 、TNF- β 、组织蛋白酶 K、细胞色素 P-450、法尼基转移酶、谷胱甘肽-S 转移酶、肝素酶、HMG CoA 合成酶、n-乙酰转移酶、苯丙氨酸羟化酶、磷酸二酯酶、ras 羧基末端蛋白酶、Notch、端粒酶、TNF 转化酶、钙粘蛋白 E、钙粘蛋白 N、选择素、CD40、ANF、降钙素、促肾上腺皮质激素释放因子、胰高血糖素、促性腺激素、促性腺激素释放激素、生长激素、生长激素释放因子、促生长素、胰岛素、瘦素、促黄体激素、促黄体激素释放激素、PTH、甲状腺激素、促甲状腺激素、免疫球蛋白 CTLA4、血凝素、MHC、VLA-4、激肽释放酶-激肽原-激肽 CD4 系统、sis、hst、ras、abl、mos、myc、fos、jun、H-ras、ki-ras、c-fins、bcl-2、L-myc、c-myc、gip、gsp、HER-2、蛙皮素受体、GABA 受体、EGFR、PDGFR、FGFR、NGFR、白介素受体、离子通道受体、白细胞三烯受体拮抗剂、脂蛋白受体、阿片受体、P 物质受体、视黄酸和类视黄醇受体、类固醇受体、T 细胞受体、甲状腺激素受体、TNF 受体、tPA 受体、钙泵、质子泵、钠 / 钙交换剂、MRP 1、MRP2、P170、LRP、cMOAT、转铁蛋白、APC、brca1、brca2、DCC、MCC、MTS1、NF1、NF2、nm23、p53 和 Rb。

[0149] 本发明的组合物能够靶向作用于涉及传染病、肿瘤、癌症或神经退行性疾病的基因。相应的,在另一方面,本发明提供了用于治疗或预防感染病、肿瘤、癌症或神经退行性疾病的本发明的组合物或试剂盒、本发明的双功能多聚核苷酸或者包括双功能多聚核苷酸的载体或者细胞。

[0150] 在还一方面,本发明提供了本发明的组合物或者试剂盒、双功能多聚核苷酸或者包括本发明双功能多聚核苷酸的载体或细胞在药物制备中的应用,所述药物用于治疗或预

防感染病、肿瘤、癌症或神经退行性疾病。

[0151] 在还一方面,本发明提供了一种治疗感染病、肿瘤、癌症或神经退行性疾病的方法,包括给需要的患者给药本发明的组合物或试剂盒、本发明的双功能多聚核苷酸或者包括本发明的双功能多聚核苷酸的载体或者细胞。

[0152] 在一个优选的实施方式中,本发明的组合物可以靶向于所述微生物的致病性所必要的病原微生物的基因,以及靶向于病原体与所述宿主相互作用所必须的宿主基因。在这种情况下,该组合物适用于治疗感染病,包括病毒和细菌的感染。因此在另一个方面,本发明涉及具有本发明的双功能多聚核苷酸的、具有用于治疗或预防感染病的本发明的载体或细胞的本发明的组合物或试剂盒。在另一个方面,本发明涉及具有本发明的双功能多聚核苷酸的、本发明的载体或细胞的本发明的组合物或试剂盒在治疗或预防感染病的药物的制备中的应用。

[0153] 可以用本发明的组合物治疗的病毒性疾病包括,但不限于,与造成严重急性呼吸系统综合症(SARS)的冠状病毒相关的病症或疾病、单纯性疱疹病毒(HSV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、1型和2型人类T细胞淋巴病毒(HTLV)、1型和2型人类免疫缺陷病毒(HIV)、巨细胞病毒、乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、EB(epstein-barr)病毒、痘病毒、流感病毒、麻疹病毒、狂犬病病毒、t 仙台病毒、脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、鼻病毒、呼吸道肠道病毒和风疹病毒。

[0154] 可以用本发明的组合物治疗的细菌疾病(为了简单起见,也包括酵母和真菌的病症和疾病)包括,但不限于,与不动杆菌、嗜水气单胞菌、粪产碱菌、蜡样芽胞杆菌、脆弱拟杆菌、卵形拟杆菌、解脲拟杆菌、普通拟杆菌、伯氏疏螺旋体、奋森氏螺菌、流产布鲁氏杆菌、马尔他布鲁氏杆菌、猪布鲁氏菌、胎儿弯曲菌(弧菌)、空肠弯曲菌、衣原体属、差异柠檬酸杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、杰氏棒杆菌、肉毒芽孢杆菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、多枝梭菌、生孢梭菌、梭状芽孢菌、破伤风梭菌、白喉棒状杆菌、迟钝爱德华氏菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、粪肠球菌、大肠杆菌、土拉弗朗西斯菌、流感嗜血杆菌、幽门螺杆菌、产酸克雷伯氏菌、臭鼻克雷伯氏菌、肺炎克雷伯氏菌、鼻硬结克雷伯氏菌、出血性黄疸钩端螺旋体、结核杆菌、支原体属、淋病奈瑟球菌、脑膜炎奈瑟菌、厌氧消化链球菌、不解糖消化链球菌、大消化链球菌、卡氏肺囊虫、二路普雷沃尔菌和产黑普氏菌、绿脓杆菌、荧光假单胞菌、施氏假单胞菌、普氏立克次体、恙虫病立克次氏体、鼠伤寒沙门菌、痢疾志贺菌、弗氏志贺菌、索氏志贺菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、C群链球菌、G群链球菌、溶血葡萄球菌、人葡萄球菌、模仿葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、木糖葡萄球菌、嗜麦芽寡养单胞菌、无乳链球菌、牛链球菌、马肠链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、化脓性链球菌、刚地弓形虫、品他病密螺旋体、梅毒螺旋体、细弱密螺旋体、霍乱弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌、鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌有关的疾病。

[0155] 在另一个实施方式中,本发明的组合物和试剂盒以及本发明的双功能多聚核苷酸靶向于涉及肿瘤和/或肿瘤过程的基因,因此导致活性组合物针对肿瘤过程和不同类型的癌症,比如血液癌症(例如白血病或者淋巴瘤)、神经瘤(例如星细胞瘤或者胶质母细胞瘤)、黑色素瘤、乳癌、肺癌、头颈部癌症、胃肠肿瘤(例如胃癌、胰腺癌或者结肠癌)、肝癌、肾细胞癌、泌尿生殖系的肿瘤(例如卵巢癌、阴道癌、宫颈癌、膀胱癌、睾丸癌和前列腺癌)、骨瘤和血管瘤。因此,在另一个方面,本发明涉及具有本发明的双功能多聚核苷酸、具有本

发明的载体或细胞的用于治疗或预防肿瘤或成瘤疾病的本发明的组合物或试剂盒。在另一个实施方式中,本发明涉及具有本发明的双功能多聚核苷酸的、具有本发明载体或细胞的组合物或试剂盒的用于治疗或预防肿瘤疾病或成瘤疾病的药物的制备中的应用。

[0156] 在另一个实施方式中,本发明的组分和双功能多聚核苷酸靶向于涉及神经退行性过程的基因,比如色素性视网膜炎、亚历山大病、阿尔珀斯病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、共济失调毛细血管扩张症、巴滕病、牛海绵状脑病(BSE)、卡纳万病、科克恩综合症、皮质基底核退化症、克-雅病、亨廷顿病、与HIV关联的痴呆、肯尼迪病、克拉伯病、路易氏体痴呆、马查多-约瑟夫病(脊髓小脑性共济失调3型)、多发性硬化、多系统萎缩症、神经螺旋体病、帕金森病、佩-梅病、皮克氏病、原发性脊侧索硬化、朊病毒病、雷夫叙姆病、山德霍夫氏病、希尔德病、精神分裂症、Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten病(也已知为巴滕病))、脊髓小脑性共济失调、脊髓肌肉萎缩症、Steele-Richardson-Olszewski病、脊髓痨和类似的疾病。因此,在另一个方面,本发明涉及具有本发明的双功能多聚核苷酸、具有本发明的载体或细胞的本发明的组合物或试剂盒,其用于治疗或预防神经退行性疾病。在另一个实施方式中,本发明涉及具有本发明的双功能多聚核苷酸、具有本发明的载体或细胞的组合物或试剂盒在用于治疗或预防神经退行性的药物的制备中的应用。

[0157] 在另一个方面,本发明涉及药物制剂,其包括本发明的组合物或本发明的双功能多聚核苷酸与一个或多个药学上可接受的载体。药学上有效的载体可以是固体或液体的。固相载体可包括一个或多个物质,其还可作为调味剂、润滑剂、增容剂、悬浮剂、填充剂、滑动剂、压缩剂、粘合剂或药片分解剂;它们还可以是胶囊材料。在粉末中,载体是精细分割的固体,其与精细分隔的活性成分混合在一起。在药片中,活性成分以适合的比例与具有必要的压缩特性的载体混合,并被压缩成理想的形状和尺寸。粉末和药片可包含最多99%的活性成分。合适的固相载体包括,例如,磷酸钙、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、糊精、淀粉、明胶、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、低熔点蜡和离子交换树脂。

[0158] 液相载体可用于制备溶液、悬浮液、乳浊液、糖浆、酏剂和受压组合物。活性成分可以被溶解或悬浮在药学上可接受的液相载体中,比如水、有机溶剂、两者的混合物、或药学上可接受的油或脂。液相载体可包含其它药学上合适的添加剂比如增溶剂、乳化剂、表面活性剂、缓冲液、防腐剂、甜味剂、调味剂、悬浮剂、增稠剂、染色剂、粘度调节剂、稳定剂或渗透压调节剂。用于口服或注射给药的合适的液相载体的例子包括水(部分地包含根据前述的添加剂,例如,纤维素衍生物、可能为羧甲基纤维素钠溶液)、酒精(包括单羟基的和多羟基的酒精,例如,乙二醇)及其衍生物,和油(例如,分馏椰子油和花生油)。对于注射给药,载体还可以是酯油,比如油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯。无菌液相载体在用于注射给药的液相形式的无菌的组分中是有用的。用于压缩组分的液相载体可以是卤代烃或者其他药学上适用的推进剂。

[0159] 液体药物组合物可以是无菌溶液或悬液,其适于肌肉注射、腹膜内注射和皮下注射。无菌溶液还可以静脉给药。化合物还可以以液体或固体组合物的形式口服给药。肺部给药也是可想到的。

[0160] 药物组合物可以以剂量单元的形式存在,例如,作为药片或胶囊。在所述形式中,该组合物被细分成包括适量的活性成分的剂量单元。剂量单元的形式可以是包装好的组合物,例如,封装的粉末、小瓶、水泡、预装填的注射器或包含液体的小袋。剂量单元的形式可

以是,例如,胶囊或药片自身、或者它可以是适量的那些包装形式的任何组分。在治疗中必须使用的剂量必须由医生主观确定。

[0161] 此外,本发明的化合物可以通过药物学上可接受的容器,通过剂型以溶液、乳膏或洗液的形式应用并施加于受影响的区域。

[0162] 进一步的,本发明预期的药物组合物,其尤其制备用于形成本发明第一和第二组分的核酸的给药,或者用于本发明双功能多聚核苷酸的给药。药物组合物都包括第一组分和第二组分,若其基于 DNA 和 RNA,则以裸露形式存在,即,没有化合物保护核酸免于为生物体的核酸酶降解,其优点在于可消除与用于转染的试剂有关的毒性。合适的裸露的化合物的给药途径包括血管内给药、瘤内给药、颅内给药、腹膜内给药、脾内给药、肌肉内给药、视网膜下给药、皮下给药、粘液给药、局部给药或口服给药 (Templeton, 2002, *DNACell Biol.*, 21 :857-867)。当 Heide1 等人调查研究裸露的化合物给药 (*Nat. Biotechnol.*, 2004, 22 : 1579-1582) 时,开始关注有关这些化合物诱导免疫反应的能力。在 siRNAs 的腹膜内给药和静脉内给药之后,通过确定血浆白介素和干扰素水平,未观察到免疫应答,同时,观察到 siRNA 的系统内给药具有良好的耐受性。

[0163] 在另一个实施方案中,本发明的组合物和多聚核苷酸是通过所谓的“流体力学给药”的方式给药的,其中组合物是在高速度和高容量下在血管内被引入到生物体中,其导致具有更高扩散分配的转染水平。这个技术的改良版本使得通过在多个器官内的外源基因 (Lewis et al., 2002, *Nat. Gen.*, 32 :107-108 ;McCaffrey et al., 2002, *Nature*, 418 : 38-39) 和内源基因 (Song et al., 2003, *Science, Nat. Med.*, 9 :347-351) 的裸露的 siRNAs 而获取对于沉默的阳性结果变为可能。研究表明在细胞间进入的效率直接依赖于给药的液体量和注射的速度 (Liu et al., 1999, *Science*, 305 :1437-1441)。在小鼠内,给药量已经优化为在 3-5 秒期间内的值为 1mL/10g 体重 (Hodges, et al., 2003, *Exp. Opin. Biol. Ther.*, 3 :91-918)。关于允许在它们的流体力学给药之后允许 siRNAs 的体内细胞转染的精确的机制尚未完全了解。在小鼠的例子中,一般以超过心率的速度通过尾静脉给药,所给药液累积在上腔静脉。这个液体随后进入器官内的血管,之后通过所述血管中的开窗术,进入血管外空间。以这种方式,siRNA 在它和血液混合之前与靶向机体的细胞接触,从而减少通过核酸酶降解的可能性。在优选的实施方式中,形成本发明组合物第一组分的 U1i 和基于 RNA 形成本发明组合物的第二组分的组分都可以包含它们结构内的修饰,这有助于提高它们的稳定性。降低对核酸酶的敏感性的合适的修饰包括 2' -O- 甲基 (Czuderna et al., 2003, *Nucleic Acids Res.*, 31 :2705-2716), 2' - 氟嘧啶 (Layzer et al., 2004, *RNA*, 10 : 766-771)。

[0164] 本发明的组合物和多聚核苷酸可以给药,形成脂质体的部分进行,偶联到胆固醇或者偶联到能够导致通过细胞膜迁移的化合物,比如 TAT 肽、衍生自 HIV-1TAT 蛋白、黑腹果蝇触角足蛋白的同源异型域的第三螺旋、单纯疱疹病毒的 V22 蛋白、精氨酸低聚物和肽,比如那些在 W007069090 (Lindgren, A. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21 :99-103 ;Schwarze, S. R. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21 :45-48, Lundberg, M. et al., 2003, *Mol. Therapy*, 8 :143-150 和 Snyder, E. L. 和 Dowdy, S. F., 2004, *Pharm. Res.*, 21 : 389-393) 中所描述的。可选的,本发明的第二组分,当它基于 DNA 时,可以给药,形成质粒载体的或病毒载体的部分,优选的那些基于腺病毒、基于腺有关的病毒或者逆转录酶病毒,特

别是基于鼠白血病的病毒 (MLV) 或者慢病毒 (HIV、FIV、EIAV)。

[0165] 在另一个实施方式中,在药物组合物由第一组分和由第二组分形成的情况下,所述组合物可包括本发明组合物的第一组分和第二组分的同时的、连续的或者分别使用的说明书。因此在另一个方面,本发明涉及本发明的组合物或试剂盒,其包括组合物的第一组分和第二组分同时的、连续的或者分别的使用的说明书。在还一个方面,本发明涉及作为用于同时的、分别的或者连续的使用的联合制剂的本发明的组合物或者试剂盒。

[0166] 本领域技术人员将会意识到给药方案和待治疗的相应的患者可根据本发明来确定。推荐剂量在产品标签上说明,能够使开处方的人根据具体情况下的患者预测剂量调整,根据这些信息,能够防止对于错误的患者开出错误剂量的错误药物的处方。

[0167] 给药方案将由医生和其它临床因素决定,优选的根据在先所描述的方法决定。众所周知在医学科学中,任何患者的剂量取决于许多因素,包括患者的体型、体表面积、年龄、对于他或者她将施用的特定化合物、性别、给药的时间和途径、一般健康状况和是否在相同时间施用其它药物。可通过定期评估观察进展。

[0168] 本发明的组合物可以以少于每千克体重 10mg 的量给药,优选的少于每千克体重 5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005 或者 0.00001mg,少于 200nmol 的 RNA 剂,也就是,每千克体重大约 4.4×10^{16} 份数或者少于每千克体重 1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15 或 0.075nmol。单位剂量可通过注射、吸入或者局部给药而给药。本发明的组合物和双功能核苷酸可直接给药到表达靶 mRNA 的器官,在这种情况下,给药的剂量为每个器官的剂量在 0.00001mg 和 3mg 之间,优选的每个器官的剂量在 0.0001mg 和 0.001mg 之间,每器官大约在 0.03 和 3.0mg 之间,每个器官大约在 0.1 和 3.0mg 之间,或者每个器官在 0.3 和 3.0mg 之间。

[0169] 剂量取决于待治疗病症的严重性和反应,可在几天和几个月之间变化或者直到观察到症状减轻。优化的剂量可通过对患者的器官的药剂浓度实施定期检查来确定。优化的剂量可通过之前在动物模型中的体外的或体内的试验所获得的 EC50 值来确定。单位剂量的给药可以为每天一次或小于每天一次,优选的小于每 2、4、8 或 30 天一次。可选的,初始剂量的给药后可使用一次或几次的通常小于初始剂量的更小数量的维持剂量。维持方案可涉及采用在 0.01 μ g 和 1.4mg 每千克体重每天之间的的剂量来治疗患者,例如 10、1、0.1、0.01、0.001 或 0.00001mg 每千克体重每天。维持剂量优选至多每 5、10 或 30 天给药。治疗必须持续一段时间,其根据患者所经受的的变化的类型、它的严重性和患者的症状而改变。而治疗后,必须监测患者的进展以确定在疾病对于治疗没有反应的情况下是否增加剂量,或者若观察到疾病的改善或若观察到不理想的副作用时是否减少剂量。

[0170] 根据特定的状况,给药的每日剂量可以是单份剂量或者两份或更多的剂量给药。如果需要重复给药或者频繁给药,建议植入给药装置比如泵、半永久性导管(静脉的、腹膜内的、脑池内的、囊内的)或者存储器。

[0171] 在另一个方面,本发明涉及针对靶基因表达的转录后抑制的体外的和体内的非治疗方法,其包括使本发明的组合物或双功能核苷酸接触生物模型。生物模型优选为细胞培养或动物。

[0172] 当组合物和多聚核苷酸适合应用于细胞培养物时,存在不同的程序使多聚核苷酸进入细胞的内部。在一方面,可将细胞与裸露的的与聚核苷酸接触。将细胞与多聚核苷酸

接触,虽然它允许进入细胞浆质隔间,但是不允许其进入处于功能状态的细胞质 (Lingor, P. et al., 2004, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315 :1123-1133)。因此,多聚核苷酸优选通过微注射或电穿孔给药。可选的,可使用利用合适试剂的化学转染用于 DNA 和 RNA 多聚核苷酸的转染,尤其是,阳离子脂质体、渗入膜的肽、去端肽胶原、聚天冬氨酸聚氧乙烯与磷酸钙的聚合物形成的有机-无机杂交的纳米粒子 (Kakizawa et al., 2004 ;*J. Control Rel.*, 97 :345-356 ;Minakuchi et al., 2004, *Natl. Acids Res.*, 32 :109 and Muratovska and Eccles, 2004, *Fed. Euro. Biochem. Soc. Lett.*, 558 :63-68)。在另一个实施方式中,本发明的多聚核苷酸可使用载体表达给药。明显的,这个方法是仅仅当本发明组合物的第二组分是基于 DNA 时是可行的。

[0173] 可选的,形成本发明的组合物的试剂可用能提高它们被细胞捕获的化学组成部分修饰。因此形成发明的试剂可与不同类型的化合物偶联,比如肽和有机化合物。偶联可通过本领域技术人员已知的方法实施,包括 Lambert 等人的方法 (*Drug Deliv.*, 2001, *Rev.* : 47 :99-112),其中核酸结合到聚氰基丙烯酸烷酯 (PACA) 的纳米粒子上 ;Fattal 等人的方法 (*J. Control Release* 1998, 53 :137-143),其中描述了联结到纳米粒子上的核酸 ;Schwab 等人的方法 (*Ann. Oncol.*, 1994, 5Suppl. 4 :55-58),其中核酸独特地联结到插层剂、疏水基团、聚阳离子或者 PACA 纳米粒子 ;和 Godard 等人的方法 (*Eur. J. Biochem.*, 1995, 232 : 404-410),其描述了联结到纳米粒子上的核酸。

[0174] 在另一个实施方式中,本发明联结的制剂可结合到亲脂性基团,其包括阳离子基团,并且与表达沉默剂的单链或双链连接。合适的亲脂性制剂包括胆固醇、维生素 E、维生素 K、维生素 A、叶酸、阳离子着色剂 (例如 Cy3)、胆酸、醋酸金刚硼、1- 茈丁酸、二氢睾酮、1, 3- 双 -O-(十六烷基) 甘油、香叶氧己基官能团、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1, 3- 丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰) 石胆酸、O3-(油酰) 胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或者吩噻嗪。

[0175] 通过检测表型变化或通过应用生物化学技术观察沉默效应,其中生物化学技术允许检测特定 mRNA 或者其编码的蛋白质的表达水平的变化,比如 RNA 杂交、核酸酶保护、Northern 杂交、通过 DNA 微阵列的基因表达的监视、免疫印迹、RIA、ELISA 和 FACS。在动物或培养细胞的模型中,可以检测到报告基因的表达的修饰或者对于有毒制剂具有抗性的产品易于检测的基因。合适的报告基因包括乙酰乳酸合成酶 (AHAS)、碱性磷酸酶 (AP)、 β - 牛乳糖 (lacZ)、 β - 葡萄糖苷酸酶 (GUS)、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、绿色荧光蛋白 (GFP)、辣根过氧化物酶 (HRP)、荧光素酶 (Luc)、胭脂碱合成酶 (NOS)、章鱼碱合成酶 (OCS) 及其衍生物。合适的选择标记物包括编码耐受氨苄青霉素、博莱霉素、氯霉素、庆大霉素、潮霉素、卡那霉素、林肯霉素、氨甲蝶呤、膦丝菌素、嘌呤霉素和四环素的基因。

[0176] 可选的,转录后基因表达沉默的非治疗方法可应用于动物模型中,其中对于表达的基因其表达将被沉默。在这种情况下,基因表达沉默剂需要进入动物的组织或器官,其中将导致基因表达的转录后沉默。为此,可给患者使用任何本发明的试剂的治疗性给药的上述方法。在优选的实施方式中,本发明预期给药的组合物靶向作用于编码涉及不同功能途径的蛋白质的不同靶 mRNA。功能途径可以通过本发明的组合物联合使用的抑制目标,包括但不限于,糖酵解、糖质新生、克雷伯氏循环、磷酸戊糖途径、糖元合成、卡尔文循环、三酰基甘油酯的降解、脂肪酸的活化、 β - 氧化作用、脂肪酸的从头合成、胆固醇的合成、尿素

循环、莽草酸途径、氨基酸合成、氧化磷酸化作用、光合作用、嘌呤合成、嘧啶合成、组氨酸代谢、卟啉代谢、肌醇代谢等。本领域技术人员将认识到前面提到的途径的不同步骤与负责所述步骤的每步的酶是已知的,因此,如果上述在 RNAs 前体和 RNAs 中选择靶序列的标准具有被 U1is 或者相似的沉默试剂识别的较大可能性,可通过常规试验执行 U1is 和其它针对一个或几个涉及所述过程的步骤中的基因具有特异性的表达沉默剂的发展。

[0177] 基因治疗,其通过体外或体内技术,以将治疗性基因插入到细胞中为基础,是基因转移的最重要应用之一。在文献中已经描述了合适的载体和方法,其用于已描述的并为本领域技术人员已知的体外或体内基因治疗;参见例如, Giordano, *Nature Medicine* 2(1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res* 79(1996), 911-919; Anderson, *Science* 256(1992), 808-813; Isner, *Lancet* 348(1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res* 77(1995), 1077-1086; Wang, *Nature Medicine* 2(1996), 714-716; W094/29469; W097/00957 或者 Schaper, 生物技术的最新观点 (*Current Opinion in Biotechnology*) 7(1996), 635-640 和在这里提到的参考文献。基因可设计为直接插入或通过细胞中的脂质体或病毒载体插入(例如,腺病毒载体、逆转录病毒载体)。优选的,所述细胞是非人的生殖细胞株、非人的胚细胞或非人的卵细胞或由此衍生的细胞。更优选的,所述细胞为在成体干细胞或非人的胚胎干细胞。如前所述可清楚看到,在本发明的使用中,优选核酸序列可操作的结合到调控元件,允许本发明的多肽在特异性细胞内的表达和/或整合。根据本发明可使用的合适的基因分配系统包括脂质体、受体-介导分散系统、裸露的 DNA 和病毒载体比如其中包括疱疹病毒、逆转录病毒、腺病毒、腺有关的病毒。核酸在基因治疗的体内的特异性位点的分布还可以用基因枪分布系统来实现,比如 Williams 所描述的 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(1991), 2726-2729)。用重组 DNA 转染细胞的标准方法是分子生物学领域的技术人员众所周知的,参见,例如, W094/29469; 同样参见 *supra*。基因治疗可通过如下方法进行:直接给患者施用本发明的重组 DNA 分子或载体,或体外用本发明的多聚核苷酸或载体转染细胞,并将转染的细胞施用给患者。

[0178] 本发明的上下文中的特别优选的基因治疗载体是微小病毒载体。因此,在该优选的方面,本发明涉及动物微小病毒的使用,尤其是依赖病毒比如感染性的人类或猿 AAV, 及其组分(例如动物微小病毒基因组),其用做用于本发明的试剂盒的组合物的导入和/或表达的载体。

[0179] 微小病毒家族的病毒是小 DNA 动物病毒。微小病毒家族可分为两个亚科:感染脊椎动物的微小病毒亚科,感染昆虫的浓核病毒亚科。微小病毒亚科的成员在此指的是微小病毒,包括依赖病毒属。正如从它们的属的名称可以推断出的,依赖病毒的成员是独特的,因此它们通常需要与辅助病毒比如腺病毒或者疱疹病毒共感染,使得其在细胞培养基中产生感染。依赖病毒属包括 AAV, 其通常感染人类(例如,血清型 2、3A、3B、5 和 6) 或灵长类(例如,血清型 1 和 4, 其被认为起源于猴,但也感染人类),以及感染其它恒温动物的相关病毒(例如,牛、犬、马、和绵羊的腺有关病毒)。有关 AAV 血清型和有关衍生自 AAV 血清型的杂交 AAV 载体的工程的战略的进一步的信息可参见 Wu 等人 (2006, *Molecular Therapy* 14:316-327) 的描述。应该理解的是本发明不限于 AAV, 但同样可以应用于衍生自两个或者更多不同的 AAV 血清型的杂交 AAV 载体和应用於其它微小病毒和其杂交体。在基因治疗中有关使用 AAV 载体的技术已经有描述,例如参见 W02007/046703 和 W02007/148971。

[0180] 本发明的组合物或者多聚核苷酸可以用“重组微小病毒或者 AAV 载体”(“rAAV 载体”)传递,这里指的是这样一种载体,其包含一个有关的本发明序列的多聚核苷酸,其侧面有至少一个微小病毒或 AAV 反向末端重复序列 (ITRs)。本发明的组合物可以用两个 rAAV 载体传递,每个 rAAV 载体编码这样的组合物中的一个组分。当存在于表达 AAV 重复 (rep) 和帽 (cap) 基因产品 (也就是,AAV 重复 (Rep) 和帽 (Cap) 蛋白质) 的昆虫宿主细胞内时,适用于在本发明中使用的 rAAV 载体可被复制和包装到感染性病毒颗粒中。当 rAAV 载体被整合到较大的核酸结构 (例如,在染色体中或者在另一个载体中,比如用于克隆或转染的质粒或杆状病毒),然后 rAAV 载体典型的被认为是“前载体 (pro-vector)”,其可在 AAV 组装功能和必要的辅助功能存在下通过复制和衣壳化而被“营救”。

[0181] 通过以下实施例描述本发明,其仅仅是示意性的,而绝不是对本发明的范围的限制。

具体实施例

[0182] 实施例 1

[0183] 1.1 试剂

[0184] 在试验中使用的 shRNAs/miRNAs 的列表:

[0185]

识别标志	当前序列号	MRNA 内的靶序列	靶基因
shRNA α Luc154	1	ACTTACGCTGAGTACTTCGAA	<u>荧光素酶</u>
shRNA α Luc158	2	ACGCTGAGTACTTCGAAATGT	<u>荧光素酶</u>
shRNA α Luc163	3	GAGTACTTCGAAATGTCCGTT	<u>荧光素酶</u>
shRNA α Luc1546	4	GTTGTGTTTGTGGACGAAGTA	<u>荧光素酶</u>
shRNA1 α Notch1	5	TGGCGGAAGTGTGAAGCG	Notch1
shRNA2 α Notch1	6	ACACCAACGTGGTCTTCAA	Notch1

[0186] shRNAs/miRNAs 的序列

[0187] A :5' 序列 ;B :有义链 (短暂链) ;C :环 ;D :反义链 (引导链) ;

[0188] E :终止信号。

[0189] SEQ ID NO 1-shRNA α Luc154

[0190]

CCGGACTTACGCTGAGTACTTCGAACTCGAGTTCGAAGTACTCAGCGTAAGTTTTTTG

A B C D E

[0191] SEQ ID NO 2-shRNA α Luc158

[0192]

CGGACGCTGAGTACTTCGAAATGTCTCGAGACATTCGAAGTACTCAGCGTTTTTTG

A B C D E

[0193] SEQ ID NO 3-shRNA α Luc163

[0194]

CGGGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCTCGAGAACGGACATTTCGAAGTACTCTTTTTG

A B C D E

[0195] SEQ ID NO 4-shRNA α Luc1546

[0196]

CCGGGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACTCGAGTACTTCGTCCACAAACACAACCTTTTTG

A B C D E

[0197] SEQ ID NO 5-shRNA1 α Notch1

[0198]

GATCCCCTGGCGGGAAGTGTGAAGCGTTCAAGAGACGCTTCACACTTCCCGCCATTTTTGGAAA

A B C D E

[0199] SEQ ID NO 6-shRNA1 α Notch1

[0200]

GATCCCCACACCAACGTGGTCTTCAATTCAAGAGATTGAAGACCACGTTGGTGTTTTTGGAAA

A B C D E

[0201] 序列 1 到 4 从 Sigma 获得。序列 5 (如 Purow 等人描述, Cancer Res. (2005) 65 : 2353-63) 和序列 6 是在实验室里通过在包含以下序列的寡核苷酸的质粒 pSuper 内克隆获得 (Brummelkamp 等人 Science (2002) 296 :550-3) :

[0202] SEQ ID NO :5

[0203] GATCCCCTGGCCGGGAAGTGTGAAGCGTTCAAGAGACGCTTCACACTTCCCGCCATTTTTGGAAA

[0204] SEQ ID NO :6

[0205] GATCCCCACACCAACGTGGTCTTCAATTCAAGAGATTGAAGACCACGTTGGTGTTTTTGGAAA

[0206] 在所有的例子中,序列在质粒 pSuper 的 BglIII-HindII 位点内被克隆,其设计成当它们在细胞内被转染时,用于表达它们。ShRNA 的表达是在细胞核内产生,它从细胞核中被传送到细胞质中,在细胞质中经过加工产生 siRNA。这个与沉默机制的相互作用激活它通过碱基配对去识别靶 mRNA 并激活其降解。在序列 1-5 中,靶 RNA 是萤火虫荧光素酶 [Photinus pyralis (GenBank Accession No. M15077)]。序列 6 和 7 针对 Notch1 基因 (NP_060087.3)。所有克隆的序列经 ABI Prism 310 序列发生器 (Applied Biosystems) 验证。质粒 DNA 在转染之前经 Maxiprep 试剂盒 (Marlingen) 纯化。

[0207] 在试验中使用的 U1/U1i snRNAs 的列表:

[0208]

靶基因	识别标志	序列号	与靶 mRNA 匹配的 U1i 序列
-	U1 α Mock	7	CCUGCCAGGUAAGUA ⁽¹⁾
荧光素酶	U1 α Luc	8	CCUGCCAUGGAACUA ⁽²⁾
Notch1	U1 α Notch1	9	CCUUUUGCUCUGCCU

[0209] 参考文献:

[0210] (1) Fortes P. et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003100 :8264-8269)

[0211] (2) Fortes P. et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003100 :8264-8269)

andW002083908)

[0212] 将包含与在 5' 末端的环 3 内存在 4 个点突变的内源性 U1 的序列相同的序列的 U1 snRNA (U1 α Mock) 用作对照。与在这个环内的两个鸟苷杂交的两个胞嘧啶彼此互换。得到的分子不具有任何不同于内源性 U1 snRNP 的功能。之前已经证明,一旦在报告基因的 3'UTR 部分添加一个与内源性 U1 snRNA 杂交的序列,就出现了这个报告基因的表达的抑制作用。这是系统工作的概念的证明。

[0213] U1i α Luc 是从 U1WT 序列构建而来的。在这个序列中,三个位置(粗体和加下划线的部分)已突变。将经修饰的 U1 snRNA 用包含所述 U1 snRNP 的靶的报告基因共转染,可以观察到报告基因的表达受抑制。大量构造是在 3' UTR 的不同位点进行测试,通过大量的体内研究建立了一系列用于设计不同的经修饰的 U1 snRNAs 的条件。这些规则是:

[0214] -U1 snRNA 仅当它结合到靶 mRNA 的 3' 末端的外显子时抑制;

[0215] -U1 snRNA 特异性地抑制那些通过传统的聚腺苷酸化机制被聚腺苷酸化的 mRNAs ;

[0216] -多个 U1 snRNAs 以协同方式作用;

[0217] -在 U1 snRNA 和它的靶之间的结合必须为至少 7nt,从而抑制它的表达;

[0218] -假如 U1 snRNAs 的 5' 区域被延伸,该 U1 snRNA 抑制的较差;

[0219] -靶序列的可及性影响由 U1 snRNA 介导的抑制。

[0220] U1 α Notch1 序列完全不同于模拟物或者荧光素酶序列,其起源于诱导 U1 的前 12 个核苷酸。

[0221] 1.2 荧光素酶的表达的抑制的试验模型

[0222] HeLa 细胞(从 ATCC 获的)在 5%的 CO₂ 的环境下在 DMEM 培养基中生长,添加 10% 的 BFS(胎牛血清)和 1%链霉素。所有的培养试剂从 Invitrogen 而来。所有使用的质粒都在细胞内使用根据 Aparicio 等人所述的磷酸钙转染(J. Virol., 1006, 80 :12236-47)。进一步的,表达 renilla 荧光素酶的对照质粒(pSV-RL, Promega)和另一个表达萤火虫荧光素酶的已被 siRNAs 和 U1s(pGL-3, 启动子, Promega)转染。在转染之后 48 小时收集细胞提取物,根据 Aparicio 等人所述(2006 J. Virol. 80 :12236-47.),在 Orion II 平板光度计(Berthold)中,通过测量荧光素酶的活性来定量其表达(双倍荧光素酶系统, Promega)。

[0223] 1.3 内源性 Notch 基因的表达的抑制作用的试验模型

[0224] HeLa 细胞使用脂质体(Lipofectamine) 2000 (Invitrogen) 用 pGEM 质粒 (Promega) 转染,所述 pGEM 质粒表达 U1i α Notch1 或者 U1 α Mock 作为对照或者 shRNA1 α Notch1 或者 shRNA2 α Notch1。在转染后 48 小时和 72 小时收集细胞提取物,具有特异性抗体的 Notch1 的积聚(C-20sc-6014-R, Santa Cruz Biotechnology)通过免疫印迹经化学发光(Perkin Elmer)和定量(Image Quant ECL, Amersham)来确定数量。肌动蛋白水平在每个例子里作为负荷对照也要确定数量。Notch1 的活性在测量它转移 NF κ B 核的能力时来测定。NF κ B 的活性通过测量它激活来自质粒的荧光素酶的表达的能力来确定数量,其中荧光素酶在启动子下可被 NF κ B (Stratagene) 诱导。当使用这个系统时,荧光素酶测量如前所述。

[0225] 实施例 2 不同的 snRNA U1s 和干扰 RNAs 在荧光素酶基因表达上的效应

[0226] 在一份或半份剂量的抗荧光素酶的 shRNA、一份或半份剂量的 U1i α Luc 或者半份剂量的 shRNA 和半份剂量的 U1i α Luc 的混合物的存在下,测试抑制作用。鉴于使用两个技

术获得的抑制作用大于分别使用每个系统导致获得的抑制作用,结果(图 2-5)显示存在协同作用。进一步的,鉴于在半剂量的 U1i+ 半剂量的 shRNA 时获得的抑制作用大于在一份剂量相同的 U1i 或一份剂量相同的 shRNA 时获得的抑制作用,协同作用是强大的。协同作用与使用的 shRNA 的抑制能力无关,若它是用强 shRNA 检测到的,其诱导在 10 和 20 倍之间的抑制(附图 2-3),中 snRNAs,其诱导 4 倍的抑制(附图 4),弱 shRNAs,其诱导 2 倍的抑制(附图 5)。进一步的,协同作用的存在允许在 8 和 20 倍之间降低 shRNA 的剂量或 U1 的剂量,同样如果使用强 shRNA(附图 6)或中等 shRNA(附图 7),可保持比最大剂量的 shRNA 或者 U1i 所能获得的抑制作用更强的抑制作用。

[0227] 实施例 3 不同的 shRNA U1s 和干扰 RNAs 在 Notch1 基因表达上的效应

[0228] 3. 1U1snRNA 结合成熟的干扰 RNAs(shRNAs)

[0229] 可能的,在抑制作用中的这种协同作用仅作用于被抑制子共转染的内源性基因。为找到是否存在抗内源性基因的抑制协同,已分析 Notch1 的抑制作用。Notch1 已通过免疫印迹(附图 8A)和它的减少核 NF κ B 的数量的能力来确定。在后面的例子中,已使用质粒,其中荧光素酶基因在启动子下可被 NF κ B 诱导(附图 8B)。在一份剂量或半份剂量的抗 Notch1 的 shRNA、一份剂量(8 微克)或半份剂量(4 微克)的 U1i α Notch1 或者半份剂量的 shRNA 和半份剂量的 U1i α Notch1 的混合物存在的情况下,检测抑制作用。结果显示存在协同作用,因为两个技术联用所获得的抑制作用大于分别使用每个系统所获得的抑制作用(附图 8)。进一步的,协同作用是强大的,因为半剂量 U1i+ 半剂量 shRNA 所获得的抑制作用大于一份剂量相同的 U1i 或一份剂量相同的 shRNA 所获得的抑制作用。

[0001]

序列表	序列表.txt
<110> 西马生物医学计划公司	
<120> 能够以协同方式引起基因表达转录后沉默的方法和组合物	
<130> FP10ES1065	
<150> P200800222.5	
<151> 2008-01-29	
<160> 9	
<170> Patent In version 3.4	
<210> 1	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> shRNAalphaLuc154	
<400> 1	
cggacttac gctgagtact tcgaactcga gttcgaagta ctcagcgtaa gttttttg	58
<210> 2	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> shRNAalphaLuc158	
<400> 2	
cggacgctga gtacttcgaa atgtctcgag acatttcgaa gtactcagcg ttttttg	57
<210> 3	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> shRNAalphaLuc163	
<400> 3	
cgggagtact tcgaaatgc cgttctcgag aacggacatt tcgaagtact ctttttg	57
<210> 4	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> shRNAalphaLuc1546	
<400> 4	
ccgggttggtg tttgtggacg aagtactcga gtacttcgtc cacaaacaca actttttg	58
<210> 5	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> shRNAalphaNotch1	
<400> 5	
gatcccctgg cgggaagtgt gaagcgttca agagacgctt cacacttccc gccatttttg	60
gaaa	
<210> 6	64
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

[0002]

<220>

<223> shRNA1alphaNotch1

<400> 6

gatccccaca ccaacgtggt cttcaattca agagattgaa gaccacgttg gtgttttttg 60

gaaa

64

<210> 7

<211> 607

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmid control pGem3z+:U1-MscI (wild, not-endogenous snRNA U1). Incorporates the sequence for the transcription of an endogenous snRNA U1 modified in 4 positions of its 3' end.

Codifies U1aMock

<220>

<221> Promoter

<222> (9)..(400)

<220>

<221> mic_feature

<222> (401)..(469)

<223> Transcription sequence of snRNA U1-MscI

<220>

<221> modified_base

<222> (489)..(499)

<223> Modified bases with regard to an endogenous snRNA U1

<220>

<221> modified_base

<222> (509)..(510)

<223> Modified bases with regard to an endogenous snRNA U1

<220>

<221> terminator

<222> (570)..(602)

<223> Termination sequence of the transcription

<400> 7

ggatccggta	aggaccagct	tctttgggag	agaacagacg	caggggcggg	agggaaaaag	60
ggagaggcag	acgtcacttc	cccttggcgg	ctctggcagc	agattggtcg	gttgagtggc	120
agaaaggcag	acggggactg	ggcaaggcac	tgctcggtag	atcacggaca	ggcgcacttc	180
tatgtagatg	aggcagcgca	gaggetgctg	cttcgccact	tgctgcttca	ccacgaagga	240
gttcccgtgc	cctgggagcg	ggttcaggac	cgctgatcgg	aagtgagaat	cccagctgtg	300
tgtcagggct	ggaaagggct	cgggagtgcg	cggggcaagt	gaccgtgtgt	gtaaagagtg	360
aggegtatga	ggctgtgtcg	gggcagaggc	ccaagatcct	atacttacct	ggcaggggag	420
ataccatgat	cacgaagggtg	gtttcccag	ggcagaggctt	atccattgca	ctccggatgt	480
gctgaccctt	gcgatttggc	caaatgtgcc	aaactcgact	gcataatttg	tggtagtggg	540
ggactgcgtt	cgcgctttcc	cctgactttc	tggagtttca	aaagtagact	gtacgctaac	600
cggatccc						

607

<210> 8

<211> 607

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Inhibition plasmid of reporter genes pGem3z+:U1-Mut. Derived from the plasmid pGem3z+:U1-MscI by modification of 3 bases in the 5' end of snRNA U1. Codifies and transcribes U1aLuc.

<220>

<221> modified_base

<222> (404)..(404)

<220>

<221> modified_base

<222> (407)..(407)

<220>

[0003]

<221> modified_base

<222> (409)..(409)

<400> 8

```

ggatccggta aggaccagct tctttgggag agaacagacg caggggcggg agggaaaaag      60
ggagaggcag acgtcacttc cccttggcgg ctctggcagc agattggtcg gttgagtggc      120
agaaaggcag acggggactg ggcaaggcac tgtcggtgac atcacggaca gggcgacttc      180
tatgtagatg aggcagcgca gaggctgctg cttcgccact tgctgcttca ccacgaagga      240
gttcccgtgc cctgggagcg ggttcaggac cgctgatcgg aagtgagaat cccagctgtg      300
tgtcagggct ggaaggct cgggagtgcg cggggcaagt gaccgtgtgt gtaaagagtg      360
aggcgtatga ggctgtgtcg gggcagaggc ccaagatctc atagttccat ggcaggggag      420
ataccatgat cacgaagggt gttttcccag ggcgaggctt atccattgca ctccggatgt      480
gctgaccctt gcgatttggc caaatgtgcc aaactcgact gcataattg tggtagtggg      540
ggactgcggt cgcgctttcc cctgactttc tggagtttca aaagtagact gtacgctaac      600
cggatcc

```

607

<210> 9

<211> 607

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmid for the inhibition of Notch pGem3z+:U1-Notch. Derived from plasmid pGem3z+:U1-MscI by modification of the bases at the 5' end of the snRNA U1. Codifies U1iaNotch1.

<400> 9

```

ggatccggta aggaccagct tctttgggag agaacagacg caggggcggg agggaaaaag      60
ggagaggcag acgtcacttc cccttggcgg ctctggcagc agattggtcg gttgagtggc      120
agaaaggcag acggggactg ggcaaggcac tgtcggtgac atcacggaca gggcgacttc      180
tatgtagatg aggcagcgca gaggctgctg cttcgccact tgctgcttca ccacgaagga      240
gttcccgtgc cctgggagcg ggttcaggac cgctgatcgg aagtgagaat cccagctgtg      300
tgtcagggct ggaaggct cgggagtgcg cggggcaagt gaccgtgtgt gtaaagagtg      360
aggcgtatga ggctgtgtcg gggcagaggc ccaagatctc aaggcagagc aaaaggggag      420
ataccatgat cacgaagggt gttttcccag ggcgaggctt atccattgca ctccggatgt      480
gctgaccctt gcgatttggc caaatgtgcc aaactcgact gcataattg tggtagtggg      540
ggactgcggt cgcgctttcc cctgactttc tggagtttca aaagtagact gtacgctaac      600
cggatcc

```

607

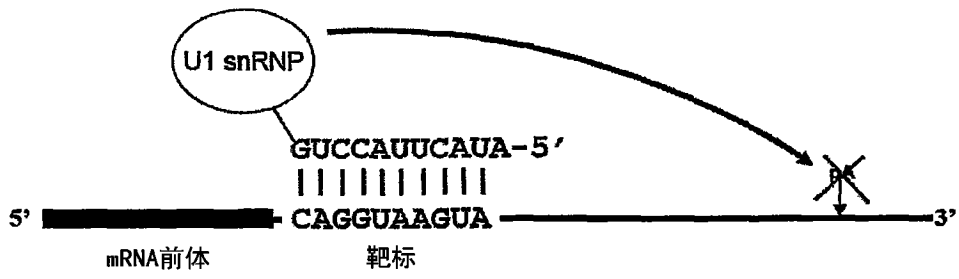


图 1

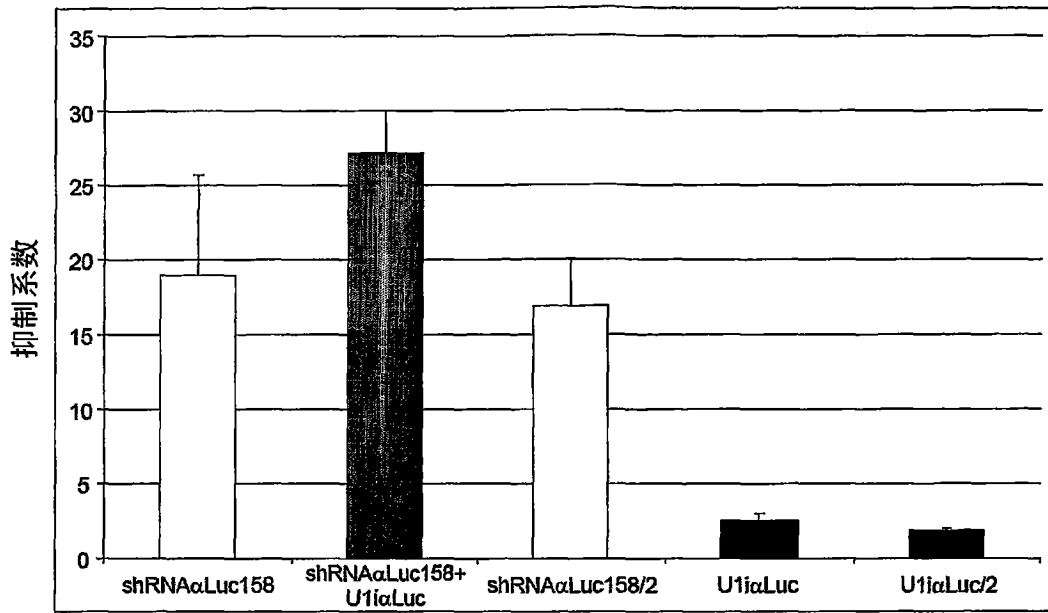


图 2

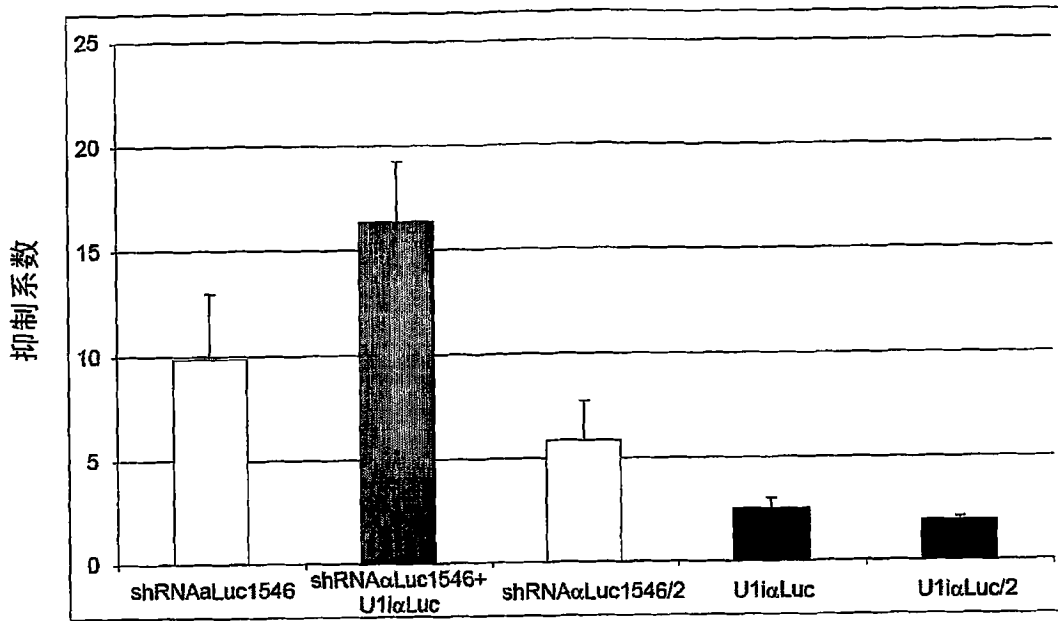


图 3

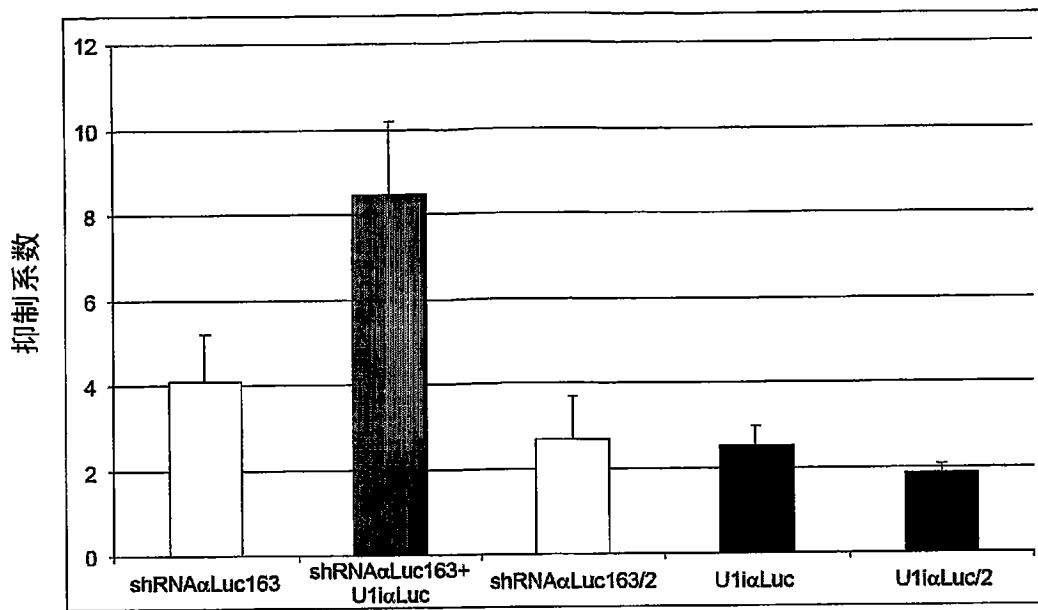


图 4

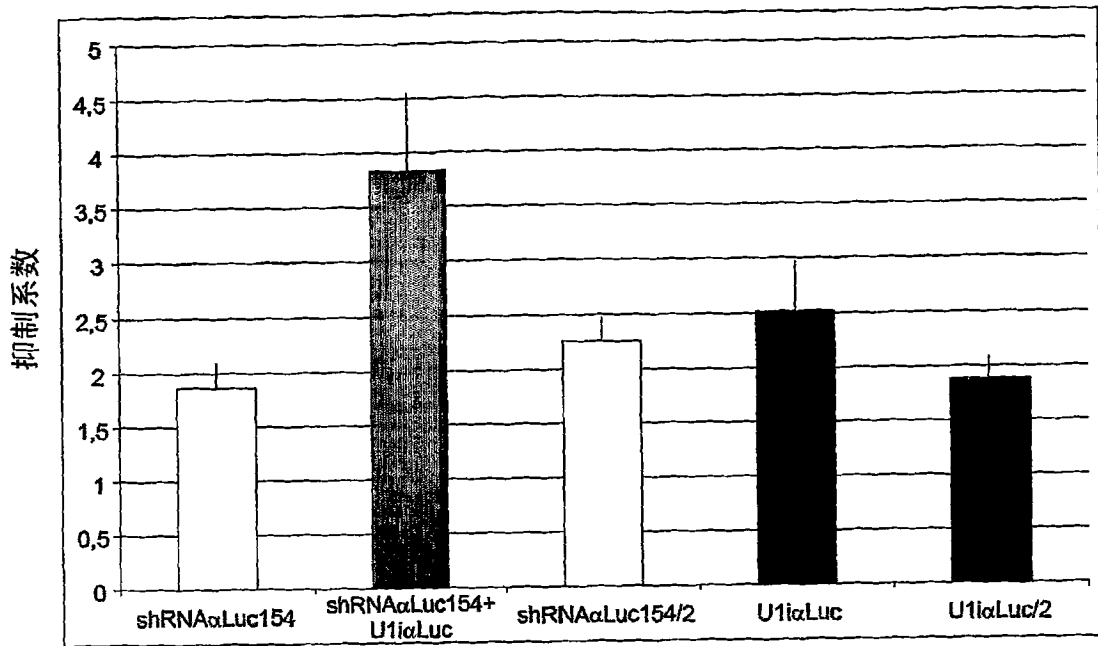


图 5

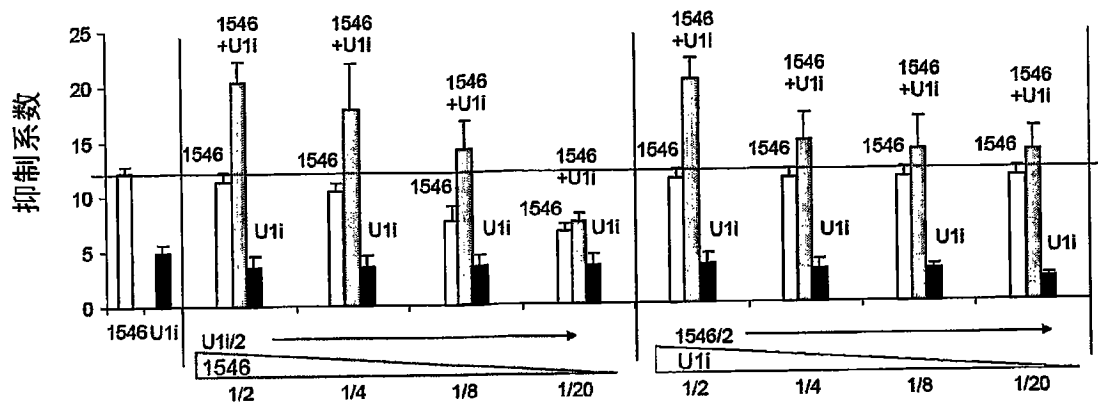


图 6

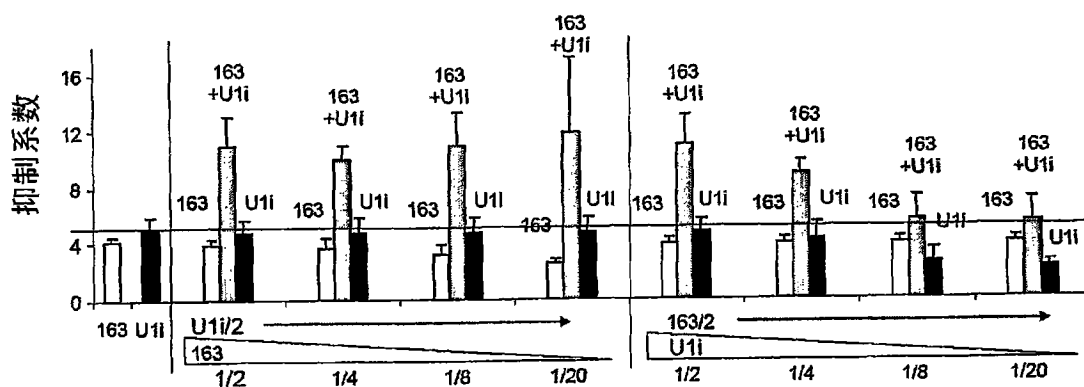
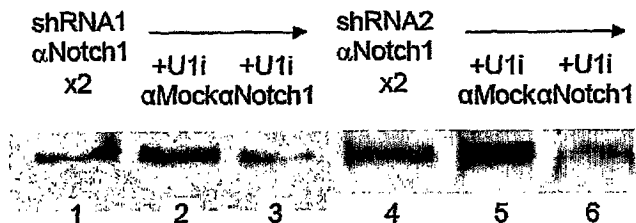


图 7

A



B

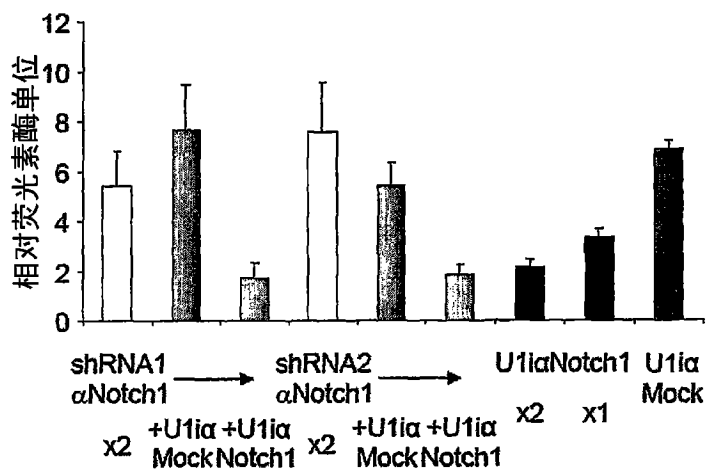


图 8