

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年3月2日 (02.03.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/024230 A1**

(51) 国际专利分类号:

*A61K 31/7088* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 31/713* (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/124412

(22) 国际申请日: 2021年10月18日 (18.10.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202111000337.9 2021年8月27日 (27.08.2021) CN

(71) 申请人: 赵小洋 (ZHAO, Xiaoyang) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区东安路 888 弄 9 号 1803 室, Shanghai 200000 (CN)。安璞国际医疗科技 (深圳) 有限公司 (ANPU INTERNATIONAL MEDICAL TECHNOLOGY (SHENZHEN) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市龙岗区龙城街道黄阁坑社区龙飞大道 333 号启迪协信 4 栋 727, Guangdong 518000 (CN)。

(72) 发明人: 赵小洋 (ZHAO, Xiaoyang); 中国上海市徐汇区东安路 888 弄 9 号 1803 室, Shanghai 200000 (CN)。

(74) 代理人: 广州三环专利商标代理有限公司 (SCIHEAD IP LAW FIRM); 中国广东省广州市越秀区先烈中路 80 号汇华商贸大厦 1508 室, Guangdong 510070 (CN)。

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

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING C/EBP $\alpha$ -SARNA

(54) 发明名称: 一种含有 C/EBP $\alpha$ -saRNA 的组合物

(57) Abstract: Provided is a composition containing C/EBP $\alpha$ -saRNA targeting a CEBPA transcript, comprising at least one C/EBP $\alpha$ -saRNA and at least one saRNA or siRNA of a protein bound to C/EBP $\alpha$ . The saRNA is selected from p21-saRNA. The siRNA is selected from C/EBP $\beta$ -siRNA. Also provided is a use of the composition of the C/EBP $\alpha$ -saRNA in preparation of medicines.

(57) 摘要: 提供一种靶向 CEBPA 转录物的含有 C/EBP $\alpha$ -saRNA 的组合物, 含有至少一种 C/EBP $\alpha$ -saRNA 和至少一种与 C/EBP $\alpha$  结合的蛋白的 saRNA 或 siRNA; 所述 saRNA 选自 p21-saRNA; 所述 siRNA 选自 C/EBP $\beta$ -siRNA。还提供 C/EBP $\alpha$ -saRNA 的组合物在制备药物中的用途。



WO 2023/024230 A1

一种含有C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物

## 技术领域

5 本发明涉及用于调节CEBPA和CEBPA途径的多核苷酸(尤其saRNA)的组合物,并且涉及该组合物在治疗性应用如治疗代谢性疾病、过度增生性疾病(如肿瘤),以及其他肝脏相关性疾病中的应用。

## 背景技术

10 核酸类药物是生物医药发展的前沿领域,包括反义核酸(ASO)、小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、小激活RNA(saRNA)、信使RNA(mRNA)适配体(aptamer)、核酶(ribozyme)、抗体核酸偶联药物(ARC)等,是医药技术发展的一大热点和趋势。核酸类药物本质上是一种基因治疗的形式,也是继小分子药物、蛋白药物、抗体药物之后得到广泛关注的领域。

15 RNA激活(RNAa)是由靶向特定的基因启动子区域的双链21寡聚核苷酸RNA(dsRNA)介导,在转录水平上调基因表达的机制。自从saRNA首次问世,RNA激活准确的分子机制一直是科学家研究围绕的重点。有研究认为,当合成并形成双链过程中,识别基因的正义链和反义链可以利用哺乳动物细胞的固有的Argonaute-2依赖性通路,启动目的基因的种子序列上的转录激活复合物以致信使RNA从头转录。这些saRNAs作为一种潜力的非药物性分子靶点以阻碍或逆转疾病发展提供了一个临床安全可靠的方式。saRNA可作为在转录水平增强目的基因的表达的强有力的生物学工具。过去的研究已经证明这种双链saRNA可以在优化目的基因靶点之后被合成并且作为一种适当的工具获得诸多预期的生物学效应。基于此,已有技术设计合成双链saRNA来激活重要的肝脏富集的转录因子CEBPA。该转录因子被认为在肝脏疾病中被抑制。在肝硬化/肝癌动物模型中,重新激活CEBPA表达可以明显的改善肝功能,降低肿瘤负荷。如同在肝脏疾病模型中增强CEBPA表达,C/EBP $\alpha$ -saRNA同样被应用在针对晚期肝癌患者的一期多中心临床试验药物(MTL-CEBPA)中。

25 在转录因子中,CCAAT/增强结合蛋白家族参与了细胞增殖、代谢、分化和免疫应答等诸多细胞过程。该家族第一个被发现的成员就是在肝脏组织、脂肪组织和造血系统富集的C/EBP $\alpha$ 。它可以通过抑制p21,E2F和CDK2/4信号通路,具备良好的抗有丝分裂功能,而被普遍认为是肿瘤抑制性基因。在肝脏,C/EBP $\alpha$ 调控成熟肝细胞分化和维持代谢平衡和体内稳态平衡。由于HCC患者常伴有较差的肝功能,这使CEBPA成为晚期肝癌非常有吸引力的基因上调靶点。因为有研究证明在小鼠模型中CEBPA基因敲入对HCC的敏感性降低,而在大鼠模型的肿瘤组织中CEBPA的表达降低。一个人肝细胞癌样本的回顾性分析证明了C/EBP $\alpha$ 在HCC中表达下调,这与HCC预后生存率差有密切关系。此外,C/EBP $\alpha$ 的其他功能性研究也印证了它对于肝脏糖和脂肪稳态平衡的调节以及抗肝纤维化的特性起着至关重要的作用。这使CEBPA成为改善多种肝脏疾病的独特靶点,其中包括肝纤维化,肝硬化,非酒精性脂肪肝病,脂肪性肝炎和HCC等。

30 基于RNA干扰(RNAi)的寡聚核苷酸疗法在人类疾病中具有巨大的治疗潜力。RNA干扰(RNAi, RNA interference)指的是,将与mRNA对应的正义RNA和反义RNA组成的双链RNA(dsRNA)导入细胞,可以使mRNA发生特异性的降解,导致其相应的基因沉默的现象。RNAi技术可以分为siRNA和miRNA两种机制。双链RNA(dsRNA)诱导的RNA干扰(RNAi)是序列特异性转录后基因沉默的过程。这种类型的dsRNA是与信使转录物序列同源。合成小干扰RNA(siRNA)可能在人类体内发展转录后基因筛选(PTGS)哺乳动物细胞中起作用。基于RNA干扰(RNAi)的技术的应用领域现在既有遗传研究,也有序列特异性疗法。小干扰RNA(Small interfering RNA, siRNA)有时称为短干扰RNA(short interfering RNA)或沉默RNA(silencing RNA),是一个长约20到25个核苷酸的双链RNA。siRNA介导的RNAi所引起的基因沉默是一种重要的基因表达调控方式,其作用机制是外源性双链RNA被Dicer酶剪切成siRNA(或者直接导入合成的siRNA),与细胞质中的Argonaute(AGO)蛋白结合成沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),siRNA解旋,其正义链被剪切降解,而结合反义链的RISC被活化,特异性结合靶mRNA并将其切断,引发靶mRNA特异性降解,阻碍特定基因的翻译并抑制该基因的表达,达到治疗疾病的效果。siRNA是带负电荷的生物活性大分子,不具备对组织或细胞的靶向能力,穿透细胞膜的能力极差,在生理环境中也极不稳定,而且siRNA药物在细胞内的转运过程直接影响其生理功能。因此,siRNA的递送系统是制约siRNA药物发展的最关键因素。

45 saRNA是一个在转录水平增强靶基因表达的有力生物学工具。已有研究证明了双链saRNA可以在优选靶点之后合成,并可以作为一种独特的方式去获得诸多所期望的生物学效应。我们发现以胰岛b细胞转录因子MAFA为靶点的saRNAs显著缩短了成熟造血干细胞CD34+向对葡萄糖梯度变化敏感的胰岛素分泌表型的转分化时间,并大大促进了它的成熟。这表明合成saRNA无疑扩大了这项技术在再生医学基因重组方面的应用范围,提供了一种临床上安全有效的选择。相关领域的研究发现C/EBP $\alpha$ -saRNA可以识别一个寡聚核苷酸序列,在人肝癌细胞系HepG2转染后获得2倍增强的CEBPAmRNA表达。与此同时,上调的CEBPAmRNA也可增强2倍的白蛋白(albumin)表达,这也与CEBPA在肝功能的作用效果是一致的。这种saRNA被用于二乙基亚硝胺(DEN)诱导的自发性肝癌小鼠模型中。应用聚酰胺(PAMAM)

树形大分子建立C/EBP $\alpha$ -saRNA-树形大分子聚合物并通过尾静脉将其注射到二乙基亚硝胺(DEN)治疗组的小鼠体内。随后发现对比对照组,治疗组的肿瘤负荷明显降低。同时血清白蛋白水平显著增高,血清胆红素、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平显著降低。定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分析治疗组小鼠的肝脏组织证实了saRNA诱导上调了CEBPA和白蛋白以及重要肝细胞标记物(HNF1 $\alpha$ 和HNF4 $\alpha$ )的mRNA表达水平。同时在四个肝细胞器上

5 (HepG2, Hep3B, PLC/PRF5, SNU475)做蛋白组学分析,也证实了上调CEBPA可以通过激活若干细胞信号转导通路,改善细胞代谢水平和肝脏生物学功能。综合前期研究,我们证实了C/EBP $\alpha$ 可以作为抑癌基因以及肝细胞功能的调节器。这也为后期深入开发C/EBP $\alpha$ -saRNA供临床使用提供了坚实的基础。

编码WAF1的基因也被称为p21,由抑制性蛋白p53转录调控。WAF1的过表达抑制肿瘤生长,可能是通过抑制cyclin/CDK复合物的活性来实现的。WAF1与cyclin/CDK复合物结合的一个结果是抑制Rb蛋白磷酸化。在p53依赖的G1抑制或凋亡的细胞中,诱导WAF1表达需要野生型p53的活性。p53基因突变是人类癌症中常见的事件,导致无法产生WAF1。其结果可能导致不受控制的细胞增殖。

研究表明:p21与肿瘤的分化、浸润深度、增生和转移有关,具有判断预后的价值。它不仅对细胞有直接的影响,而且可能控制着其他与衰变和疾病有关的若干基因。此外,p21基因对40多种与脱氧核糖复制和细胞分裂有关的基因有干扰作用。p21基因还具有促进其他约50种基因活性的作用。其中许多基因控制蛋白质形成,有的起到防止周围细胞死亡的作用,有的起到刺激他们生长的作用。这可能意味着p21基因与癌症也有关系。

15

### Argonaute蛋白

第一个激活RNA的报告已公布超过10年,在这段时间里工作的积累的研究揭示了saRNA激活机制,强调了saRNA作用相关的重要的成分,这些成分说明了saRNA分子可能与多种蛋白相互作用。其中包括编排多种RNA结合酶,目前公认的最主要的作用机制包括saRNA的缔合带有Argonaute(Ago)蛋白家族。

20

RNA干扰以及所有由小RNA分子介导的基因表达沉默机制都有一个共同的特点,那就是会有一个负责沉默作用的小RNA分子(下文中称这个分子为向导链)与Argonaute家族蛋白发生相互作用。这种RNA-Argonaute蛋白复合体就构成了RISC复合体里最基本的,也是最为核心的效应元件。在RISC复合体中,小RNA分子起到这样的作用:通过碱基互补配对原则,以序列特异性的方式引导Argonaute蛋白与靶标分子结合。mRNA的这些靶标分子被Argonaute蛋白识别之后会被切割或者抑制翻译,最终被细胞降解。

25

Argonaute蛋白在进化过程中演变出了各种亚科蛋白。这些亚科蛋白可以识别各种不同类型的小RNA分子,从而在各种小RNA沉默途径中发挥作用。siRNA和miRNA都能与Argonaute亚科蛋白AGO蛋白结合,但是piRNA则与Argonaute亚科蛋白PIWI蛋白结合。在经典的由siRNA分子介导的RNAi途径中,Argonaute蛋白可以用内切核酸酶活性来沉默mRNA靶分子,这种过程被称作切割。在生殖细胞中,面对各种外来的遗传物质,Argonaute亚科蛋白PIWI蛋白在piRNA介导的RNA沉默途径中,利用的也是切割机制。在进行切割反应时,目标RNA分子主要在磷酸基团处被切割,该处主要是对应向导链5'端开始第10和第11位碱基处磷酸基团处的位点。只有向导链和靶标链在切割位点处互补情况非常好,切割反应才能发挥作用。Argonaute蛋白也可以不依赖切割反应来达到沉默RNA的目的。在动物细胞的miRNA沉默途径中,Argonaute蛋白可以通过抑制目的mRNA翻译的办法,以及诱导目的mRNA发生脱腺苷化作用(deadenylation)后降解的方法来达到基因沉默的作用。不过,有关miRNA介导基因沉默的精细机制我们现在还不是非常清楚。

30

和RNAi一样,RNAa也需要Argonaute(Ago)蛋白特别是Ago2的参与,处理和活化saRNA分子,并介导saRNA与其启动子上的靶位点结合。双链saRNA装载到Argonaute2(Ago2)蛋白,其中的一条链被Ago2从中间切断并从Ago2复合体中脱落;之后Ago2复合体通过主动转运机制进入细胞核,与RNA helicase A(RNA解旋酶A,RHA)形成Ago2-RHA复合体,复合体中的引导链(Guide strand)找到与其互补的基因序列并结合,招募polymerase-associated factor 1(聚合酶相关因子1,PAF1)形成RITA(RNA-induced transcriptional activation, RNA介导的转录激活)复合体,该复合体进一步招募和激活RNA polymerase II(RNA聚合酶II),导致mRNA表达的增加。

35

作为小RNA介导基因沉默途径里的效应分子,Argonaute蛋白必须要能够在与siRNA双链或miRNA-miRNA双链分子结合时准确识别出小RNA向导链并与之结合,剔除掉没有功能的随从链和miRNA\*链,然后依照向导链的指引发现目的RNA。在需要RNA切割机制参与的沉默途径中,Argonaute蛋白会被多次循环利用。在Argonaute蛋白循环识别靶标分子,进行切割反应,释放出产物的过程当中,向导链继续与Argonaute蛋白结合,不会脱离。在多细胞动物miRNA的沉默途径里切割机制是通过一种不需要“切割机”的形式(slicer-independent manner)来发挥作用的,此时的Argonaute蛋白需要一直与靶标mRNA分子紧密结合,这样才能阻止其翻译。

40

Argonaute蛋白都是多结构域蛋白,其含有N末端结构域、PAZ结构域、MID结构域和PIWI结构域。原核生物Argonaute蛋白的晶体结构表现出一个二叶状(bilobate)结构。MID结构域和PIWI结构域形成其中一叶,而N末端结构域和PAZ结构域形成另一叶。PAZ结构域的折叠情况比较类似于低聚糖/低聚核苷酸结合折叠结构域(oligosaccharide/oligonucleotide-binding-fold domain)和Sm折叠结构域(Sm-fold domain)的情况。MID结构域和PIWI

45

50

结构域由被遮盖的Argonaute蛋白C末端中心部位非常保守的位点连接起来。MID结构域与lac抑制子里的糖结合结构域比较相似。PIWI结构域的折叠方式则与切割RNA-DNA杂交分子的核糖核酸内切酶RNaseH比较类似。生化研究表明,原核生物的Argonaute蛋白和RNaseH一样,可以起到DNA引导的核糖核酸酶(DNA-guided ribonuclease)作用,而真核生物的Argonaute蛋白则具有RNA引导的核糖核酸酶(RNA-guided ribonuclease)作用。

5 Argonaute蛋白是小RNA诱导的基因调控过程中的核心机制,是组成RISCs复合物的主要成员。自从它们首次在拟南芥中鉴定以来就已经得到表征。Argonautes的大小约为100kDa,并具有双瓣特征。Argonaute (AGO): AGO蛋白质主要包含两个结构域: PAZ和PIWI两个结构域, PAZ区能非序列特异性识别结合双链小RNA 3'末端悬垂的2个核苷酸,从而结合到siRNA的3'的二核苷酸突出端; PIWI区具有切割mRNA的催化中心,一些AGO蛋白质的PIWI结构域赋予 slicer 以内切酶的活性。PAZ和PIWI两个结构域,起到对于siRNA和目标mRNA相互作用,从而导致目标mRNA的切割或者翻译抑制过程的作用。同时,不同的Ago蛋白质有着不同的生物学功能。AGO蛋白还包括氨基末端(N-末端),其是小RNA结合所必需的,并参与小RNA的解链。保护引导链免受破坏的PAZ域降解产生一个特定的结合口袋,可以识别结合小RNA 5'端第1位核苷酸。人类中存在四种AGO家族的变体, AGO1, AGO2, AGO3和AGO4. 不同的Ago蛋白质有着不同的生物学功能。其中Ago2参与了RISCs对于目标mRNA的切割过程并起着重要的作用; 而Ago1和Ago3则不具备这个功能。

15 SaRNA与siRNA的联系与差异

saRNA上调基因表达的作用与siRNA干扰、抑制基因表达的作用截然相反。但是,二者具有一定的相似性: saRNA由21对核苷酸组成,具有与针对mRNA序列的siRNA相似的结构。而且,二者发挥修饰功能时需要相同的酶成分参与,即Ago。但是,与siRNA相比,saRNA激活作用的持续性更长。Place等发现,与siRNA介导的RNA抑制效应相比,saRNA介导的RNA激活反应延迟24小时以上,多达48小时。此外,saRNA具有针对不同细胞的特异性,作用效果可能有区别。这也从一个侧面说明RNA激活作用的机制更加复杂。其最佳窗口期有3-7天,通常活性较siRNA长,这与saRNA需要进入细胞核内参与转录调节的过程有关。

20 p21-saRNA可以特异性地激活p21基因的表达,是一种上调肿瘤细胞中p21表达的有效手段,在基因治疗中很有应用前景。有研究表明, p21的上调可抑制细胞的增殖,此外细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子p21的表达缺失与许多体外分子模型的耐药性相关, p21的低表达与细胞的抗药性相关。p21-saRNA可在多种细胞实现靶基因的上调,显示出saRNA机制在细胞是普遍存在的,这为进一步的基因治疗开发提供了可能性。关键蛋白的表达的下降通常是许多疾病的主要原因, saRNA技术为恢复细胞中这些蛋白表达带来了一条可行的途径。

25 saRNA还面临的问题包括免疫原性、脱靶性,以及合适的递送方式。saRNA可借助载体构建的策略,稳定构建于质粒及病毒载体中,以实现直接化学合成无法达到的长期高效地表达,且周期短、成本低。当然,saRNA也有其弊端,如需要筛靶、只能激活细胞本底表型,无法表达突变型等。但saRNA对于单基因下调引发的疾病治疗具有广阔的开发前景。

30 然而,有效的递送系统一直是阻碍小核酸类治疗药物走向临床的瓶颈问题。在证实了具有特殊序列的小双链RNA (p21-saRNA-322)对肠癌的治疗作用后,对p21-saRNA-322进行药物递送系统的构建也进行了研究。有研究利用肠癌的生理、病理特点,创建了一种具有特殊壳核结构的小核酸递释系统-生物粘附脂质多聚复合物,研制的递释系统由具有生物粘附性及肿瘤靶向性的外壳,结合对肿瘤内环境敏感的内核组成。

35 在过去的几十年中, DNA纳米材料因其无与伦比的可编程性和多功能性而受到越来越多的关注。尤其是, DNA树状大分子纳米结构作为其主要研究重点,得益于其高度分支的构型,已被应用于生物传感,治疗学和蛋白质工程领域。借助特异性识别探针和固有信号放大, DNA树状分子可以实现核酸,蛋白质,细胞和其他物质(例如脂多糖(LPS),三磷酸腺苷(ATP)和外泌体)的超灵敏检测。凭借其具有空隙的结构和生物相容性, DNA树状大分子可以在化学疗法,免疫疗法和基因疗法中将药物或功能性核酸输送到靶细胞中。此外, DNA树状大分子正被用于蛋白质工程中,以有效地指导蛋白质的进化。这篇综述总结了DNA树枝状大分子的主要研究进展,涉及其组装方法和生物医学应用,以及对未来研究的新挑战和前景。随着对肿瘤发生的机理等方面研究的进一步深入,研究者们发现肿瘤的发生及发展是由多种因素或途径综合作用的结果,而常规的单一化学药物治疗往往只能解决一方面的问题,导致治疗效果有限。而肿瘤的综合治疗是指通过联合两种或多种治疗手段,经由不同的作用机制抑制肿瘤细胞的生长,从而提高肿瘤治疗效果。早期的联合治疗包括化疗与放疗联合、化疗与光热疗法联合等等。

40 近年来,共递送化疗药物和基因用于癌症治疗成为了国内外的研究热点。化疗药物和基因抑制肿瘤细胞的机理不同,一方面,治疗基因的加入可以大大减少化疗药物的使用量从而降低毒副作用,避免肿瘤细胞多药耐药性等;另一方面,有研究表明化疗药物的使用可以有效提高基因在细胞中的表达,增强治疗基因的疗效。因此,药物和基因的联用可相互促进、相辅相成,最终达到降低毒副作用、提高治疗效果的目的。然而,共递送化疗药物和基因用于肿瘤联合治疗目前面临的最大挑战是合成既安全又高效的载体材料。

50

## 发明内容

本发明提供了出于治疗目的而调节CEBPA基因的表达和/或功能的组合物、方法和试剂盒。这些组合物、方法和试剂盒包含靶向CEBPA基因、CEBPB基因、p21基因、CTR9基因、DDX3基因、DDX5基因或hnRNPA2/B1基因等的核酸构建体。其中核酸构建体可以包括具有或没有修饰的单链或双链DNA或RNA。

5 具体地，本申请提供了一种含有C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物，该组合物具有通过调节肿瘤细胞中CEBPA基因的表达和/或功能，或者调节C/EBP $\alpha$ 的下游关键作用蛋白基因的表达从而治疗肿瘤的应用。

本申请还提供了所述含有C/EBP $\alpha$ -saDNA和C/EBP $\alpha$ 的下游关键作用蛋白基因的saRNA或siRNA的组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用。所述C/EBP $\alpha$ -saDNA和C/EBP $\alpha$ 的下游关键作用蛋白基因的saRNA或siRNA的组合物上调肿瘤细胞中CEBPA的表达。

10 本申请还提供一种C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物在制备上调细胞中CEBPA基因的药物中的应用。

优选地，其中所述细胞是癌细胞；优选地，所述癌细胞为HCC细胞、前列腺癌系或乳腺癌细胞系，进一步优选地，所述细胞是肝细胞癌(HCC)细胞。

在一些实施方式中，所述细胞为HepG2，Hep3B、PLC/PRF/5、DU-145或MCF-7细胞；

在其中一种实施方式中，所述细胞是分化的肝细胞癌(HCC)细胞；优选地所述细胞是HepG2、Hep3B细胞。

15 本申请的又一目的是提供一种C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物在制备上调细胞中的p21表达的组合物中的应用；在其中一种实施方式中，所述细胞是癌细胞；优选地，所述细胞是肝细胞癌(HCC)细胞，例如HepG2，Hep3B；进一步地，所述细胞是分化的肝细胞癌(HCC)细胞；更优选地，所述细胞是HepG2细胞。

本申请的再一目的是提供一种C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物在制备上调细胞中的白蛋白的表达的药物中的应用。在其中一种实施方式中，所述细胞是癌细胞；优选地，所述细胞是肝细胞癌(HCC)细胞，例如HepG2，Hep3B细胞；进一步地，所述细胞是分化的肝细胞癌(HCC)细胞；更优选地，所述细胞是HepG2细胞。

20 本申请的又一目的是提供一种C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物在制备降低HCC复发率的药物中的应用。

本申请的又一目的是提供一种C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物在制备抗细胞增殖的药物中的应用。在其中的一种实施方式中，所述细胞为分化型HCC细胞系，例如HepG2，Hep3B；优选地为HepG2细胞系。在另一种实施方式中，所述细胞为未分化型HCC细胞系，优选地为PLC/PRF/5细胞系。

25 本申请的再一目的是提供一种C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物在制备通过白蛋白增强来改善肝脏功能的效果的药物中的应用。

另一方面，本发明提供了一种包含C/EBP $\alpha$ -saDNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用。

本发明还对C/EBP $\alpha$ 的下游蛋白有调控作用的CTR9基因、DDX3或DDX5基因或hnRNPA2/B1基因等的核酸构建体进行了研究。

30 C/EBP $\alpha$ -saRNA可以上调CEBPA基因。在一个实施方案中，它设计成与CEBPA基因的靶反义RNA转录物互补，并且它可以对CEBPA基因表达产生影响和/或通过下调靶反义RNA转录物发挥作用。“互补”在上下文中意指能够在严格条件下与靶反义RNA转录物杂交。当用来在本发明的上下文中描述核酸序列时，术语“有义”意指序列与基因编码链上的序列具有同一性。当用来在本发明的上下文中描述核酸序列时，术语“反义”意指序列与基因编码链上的序列互补。应当说明的是，DNA的胸苷由RNA中的尿苷替换并且这种差异仍落入对术语“反义”或“互补性”的理解。

35 靶反义RNA转录物可以由编码链上在所述靶基因转录起始位点(TSS)对应位置上游达100、80、60、40、20或10kb和所述靶基因转录终止位点对应位置下游达100、80、60、40、20或10kb之间的基因座转录。在一个实施方案中，靶反义RNA转录物可以从编码链上位于靶基因转录起始位点 $\pm$ 1kb范围内的基因座转录。在另一个实施方案中，靶反义RNA转录物可以从编码链上位于靶基因转录起始位点 $\pm$ 500、 $\pm$ 250或 $\pm$ 100bp范围内的基因座转录。在另一个实施方案中，靶反义RNA转录物可以从编码链上位于靶基因转录起始位点 $\pm$ 2000个核苷酸范围内的基因座转录。在另一个实施方案中，编码链上的基因座距对应于靶基因转录起始位点的位置上游或下游不多于1000个核苷酸。在另一个实施方案中，编码链上的基因座距对应于靶基因转录起始位点的位置上游或下游不多于500个核苷酸。

如本文所用的术语“转录起始位点”(TSS)意指在基因的模板链上对应于或标志转录起点位置的核苷酸。TSS可以位于基因的模板链上的启动子区内部。

45 如本文所用的术语“转录终止位点”意指基因的模板链上这样的区域，其可以是一个或多个核苷酸，所述区域具有至少一个特征，如但不限于此：编码靶转录物的至少一个终止密码子的区域、编码靶转录物3'UTR前的序列的区域，RNA聚合酶在此释放基因的区域、编码剪接位点的区域或在剪接位点之前的区域和在模板链上靶转录物的转录终止的区域。

50 术语“从特定基因座转录”在本发明的靶反义RNA转录物的背景下意指靶反义RNA转录物的转录始于特定基因座处。

靶反义RNA转录物与靶基因的基因组序列的编码链互补，并且本文任何时候提及“基因组序列”均是“基因组序列的编码链”的简记形式。基因的“编码链”具有与所产生的mRNA相同的碱基序列，例外是mRNA中T由U替换。基因的“模板链”因此互补于并反平行于产生的mRNA。因此，靶反义RNA转录物可以包含与位于靶基因转录起始位点上游100、80、60、40、20或10kb至靶基因转录终止位点下游100、80、60、40、20或10kb之间的基因组序列互补的序列。在一个实施方案中，靶反义RNA转录物包含与位于靶基因转录起始位点上游1kb至靶基因转录终止位点下游1kb之间的基因组序列互补的序列。另一个实施方案中，靶反义RNA转录物包含与位于靶基因转录起始位点上游500、250或100个核苷酸至靶基因转录终止位点下游500、250或100个核苷酸之间的基因组序列互补的序列。

靶反义RNA转录物可以包含与包含CEBPA基因编码区的基因组序列互补的序列。靶反义RNA转录物可以包含与模板链上靶基因的启动子区对齐的基因组序列互补的序列。基因可以拥有多个启动子区，在这种情况下，靶反义RNA转录物可以与一个、两个或更多个启动子区对齐。一个注释基因座位的在线数据库可以用来鉴定基因的启动子区。在一对核苷酸序列的背景下使用时，术语“对齐”意指该核苷酸序列对彼此互补或彼此具有序列同一性。

在靶反义RNA转录物和靶基因启动子区之间的对齐区域可以是部分的并且可以在长度上短至单个核苷酸。不过，它可以是至少15或至少20个核苷酸长度、或至少25个核苷酸长度、或至少30、35、40、45或50个核苷酸长度、或至少55、60、65、70或75个核苷酸长度、或至少100个核苷酸长度。每种以下特定排列均意在落于术语“对齐”的范围内：

- a) 靶反义RNA转录物和靶基因启动子区在长度上相同并且它们对齐(即它们在其整个长度范围内对齐)。
- b) 靶反义RNA转录物短于靶基因启动子区并且在其整个长度范围内与靶基因启动子区对齐(即它在其整个长度范围内与靶基因启动子区内部的序列对齐)。
- c) 靶反义RNA转录物长于靶基因启动子区并且靶基因启动子区与其完全对齐(即靶基因启动子区在其整个长度范围内与靶反义RNA转录物内部的序列对齐)。
- d) 靶反义RNA转录物和靶基因启动子区具有相同或不同的长度并且对齐区域短于靶反义RNA转录物的长度和靶基因启动子区的长度。在一个实施方案中，靶反义RNA转录物长至少1kb、或至少2、3、4、5、6、7、8、9或10kb、例如，20、25、30、35或40kb。在一个实施方案中，靶反义RNA转录物包含沿其全长与靶基因编码链上的序列至少75%、或至少85%、或至少90%、或至少95%互补的序列。

本发明提供了靶向靶反义RNA转录物的saRNA并且可以有效及特异性下调这类靶反义RNA转录物。这可以通过与靶反义RNA转录物内部的区域具有高程度互补性的saRNA实现。所述saRNA将与靶反义RNA转录物内部待靶向的区域具有不多于5个、或不多于4或3个、或不多于2个、或不多于1个错配或与之无错配。saRNA(无论是否为单链或双链)的反义链可以与靶向的序列的反向互补物至少80%、90%、95%、98%、99%或100%相同。因此，saRNA的反义链的反向互补物与所靶向的序列具有高程度的序列同一性。所靶向的序列可以具有与saRNA和/或siRNA的反向互补物相同的长度，即，相同数目的核苷酸。在一些实施方案中，靶向的序列包含至少14个且小于30个核苷酸。在一些实施方案中，靶向的序列具有19、20、21、22或23个核苷酸。在一些实施方案中，靶向的序列的位置位于模板链的启动子区域内部。

在一些实施方案中，靶向的序列位于模板链的TSS(转录起始位点)核心内部。在一些实施方案中，靶向序列位于TSS上游1000个核苷酸及其下游1000个核苷酸之间。在一些实施方案中，靶向序列位于TSS上游500个核苷酸及其下游500个核苷酸之间。在一些实施方案中，靶向序列位于TSS上游250个核苷酸及其下游250个核苷酸之间。在一些实施方案中，靶向序列位于TSS上游100个核苷酸及其下游100个核苷酸之间。在一些实施方案中，靶向序列位于TSS核心内TSS的上游。靶向的序列可以在TSS上游小于2000、小于1000、小于500、小于250、或少于100个核苷酸。一些实施方案中，靶向序列位于TSS核心中TSS的下游。靶向的序列可以在TSS的下游小于2000、小于1000、小于500、小于250、或少于100个核苷酸。在一些实施方案中，靶向序列位于TSS核心的TSS周围 $\pm$ 50个核苷酸。在一些实施方案中，靶向序列基本上重叠TSS核心的TSS。在一些实施方案中，靶向序列重叠始于或止于TSS核心的TSS。在一些实施方案中，靶向的序列与TSS核心的TSS在上游或下游方向重叠1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个核苷酸。

模板链上的靶向序列的位置由靶向序列的5'末端的位置限定。靶向序列的5'末端可以在TSS核心的任何位置并且靶向序列可以始于选自TSS核心的位置1至位置4001中的任何位置。为了在本文中参照，当靶向序列的5'最末端是从TSS核心的位置1至位置2000时，认为靶向序列在TSS上游，当靶向的序列的5'最末端是从位置2002至4001时，认为靶向的序列在TSS下游。当靶向的序列的5'最末端在核苷酸2001时，认为靶向的序列是TSS中央序列并且既不在TSS上游，也不在其下游。为了进一步参照，例如，当靶向的序列的5'末端在TSS核心的位置1600时，即，它是TSS核心的第1600核苷酸，则靶向的序列始于TSS核心的位置1600处并且认为其在TSS上游。

在一个实施方案中，本发明的saRNA可以具有形成双链体的两条链，一条链为引导链。saRNA双链体也称作双链saRNA。如本文所用，双链saRNA或saRNA双链体，是包含多于一条并且优选地两条链的saRNA，其中链间杂交可以形成双链体结构的区域。双链saRNA的两条链称作反义链或引导链以及有义链或载体链。saRNA双链体的反义链(与反义链saRNA或反义saRNA互换使用)与靶反义RNA转录物内部的区域具有高程度互补性。反义链可以与靶反义RNA转录物

或靶向的序列内部的区域具有不多于5个、或不多于4或3个、或不多于2个、或不多于1个错配或与之无错配。因此，反义链与模板链上的靶向序列具有高度的互补性。saRNA双链体的有义链(与有义链saRNA或有义saRNA互换使用)与模板链上的靶向序列具有高度的序列同一性。在一些实施方案中，靶向的序列位于模板链的启动子区域内部。在一些实施方案中，靶向的序列位于模板链的TSS核心内部。相对于靶向的序列，通过参照TSS核心序列，确定saRNA双链体的反义链和/或有义链的位置。例如，当靶向的序列在TSS下游时，反义saRNA和有义saRNA始于TSS的下游。在另一个例子中，当靶向的序列始于TSS核心的位置200时，反义saRNA和有义saRNA始于TSS的上游。

在本发明的上下文中“链”意指连续的核苷酸(包括非天然存在的或修饰的核苷酸)序列。两条或更多条链可以是独立的分子或分别形成独立分子的部分，或它们可以共价连接，例如，通过接头如聚乙二醇接头共价连接。saRNA的至少一条链可以包含与靶反义RNA互补的区域。这种链称作saRNA双链体的反义链或引导链。包含与saRNA的反义链互补的区域的saRNA的第二链称作有义链或载体链。

saRNA双链体也可以从单个分子形成，所述单个分子至少部分地自身互补，形成发夹结构，包括双链体区。在这种情况下，术语“链”指saRNA区域中与saRNA的另一个内部区互补的区域之一。saRNA的引导链将与靶反义RNA转录物内部的序列具有不多于5个、或不多于4或3个、或不多于2个、或不多于1个错配或与之无错配。

在一个实施方案中，saRNA双链体可以显示在增殖的细胞中的功效。saRNA双链体可以与靶反义RNA转录物的区域具有siRNA样互补性；即在RNA双链体中距引导链5'末端的核苷酸2-6与靶反义RNA转录物的区域之间100%互补性。另外，saRNA的其他核苷酸可以与靶反义RNA转录物的区域具有至少80%、90%、95%、98%、99%或100%互补性。例如，saRNA的核苷酸(从5'末端计数)直至3'末端可以与靶反义RNA转录物的区域具有至少80%、90%、95%、98%、99%或100%互补性。

术语“小干扰性RNA”或“siRNA”在上下文中意指一般长20-25个核苷酸的参与RNA干扰(RNAi)途径并干扰或抑制特定基因表达的双链RNA。该基因是siRNA的靶基因。例如，干扰APOA1基因表达的siRNA称作“APOA1-siRNA”并且APOA1基因是靶基因。siRNA通常长约21个核苷酸，在两条链的每个末端具有3'突出端(例如2个核苷酸)。

siRNA通过以下方式抑制靶基因表达：与靶基因的一种或多种RNA转录物在特定序列处结合并且促进切割转录物。一般，在RNAi中，RNA转录物是mRNA，从而切割mRNA导致基因表达下调。在本发明中，不意在受任何理论约束，可能机制之一是，本发明的saRNA可以通过切割靶反义RNA转录物，调节靶基因表达。

双链saRNA可以包含一个或多个单链核苷酸突出端。在双链saRNA和siRNA的语境下，术语“突出端”或“尾”指从saRNA或siRNA的双链体结构突出的至少一个非配对核苷酸。例如，当saRNA的一条链的3'-端延伸超过另一条链的5'-端时或反之亦然，存在核苷酸突出端。saRNA可以包含至少一个核苷酸的突出端；或者，该突出端可以包含至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个或更多核苷酸。核苷酸突出端可以包含核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或由其组成。突出端可以在有义链、反义链或其任意组合上。另外，突出端的核苷酸可以存在于saRNA的反义链或有义链的5'末端、3'末端或两个末端上。在两个寡核苷酸设计成一旦杂交就形成一个或多个单链突出端的情况下，就互补性的确定而言，这类突出端不应当视作错配。例如，出于本文所述的目的，仍可以将包含长19个核苷酸的一个寡核苷酸和长21个核苷酸的另一个寡核苷酸的saRNA(其中较长的寡核苷酸包含与较短寡核苷酸完全互补的19个核苷酸的序列)称作“完全互补的”。

在一个实施方案中，双链saRNA的反义链在3'末端和/或5'末端具有含1-10个核苷酸的突出端。在一个实施方案中，双链saRNA的反义链在其3'末端具有1-4个核苷酸的突出端或在其3'末端具有1-2个核苷酸的突出端。在一个实施方案中，双链saRNA的有义链在3'末端和/或5'末端具有1-10个核苷酸的突出端。在一个实施方案中，双链saRNA的有义链在其3'末端具有1-4个核苷酸的突出端或在其3'末端具有1-2个核苷酸的突出端。在一个实施方案中，双链saRNA的有义链和反义链均具有3'突出端。3'突出端可以包含一个或多个尿嘧啶，例如，序列UU或UUU。在一个实施方案中，突出端中的一个或多个核苷酸由硫代磷酸核苷替换，其中核苷间键是硫代磷酸连接。在一个实施方案中，突出端包含一个或多个脱氧核糖核苷，例如，序列dTdT或dTdT。在一个实施方案中，突出端包含序列dT\*dT，其中\*是硫代磷酸连接核苷间键。

本发明的saRNA或者可以通过参照靶基因来定义。靶反义RNA转录物与靶基因编码链上的基因组区互补，并且本发明的saRNA转而与靶反义RNA转录物的区域互补，从而本发明的saRNA可以定义为与靶基因编码链上的区域具有序列同一性。本文中通过参照靶反义RNA转录物而就本发明的saRNA定义所讨论的全部特征在已作必要的修正情况下，适用于通过参照靶基因而对本发明saRNA的定义，从而任何与靶反义RNA转录物互补性的讨论应当理解包括与靶基因的基因组序列的同一性。因此，本发明的saRNA优选地与靶基因上的基因组序列具有高同一性百分数，例如，至少80%、90%、95%、98%或99%或者100%同一性。基因组序列可以是靶基因转录起始位点上游或下游的达2000、1000、500、250或100个核苷酸。它可以与靶基因的启动子区对齐。因此，saRNA可以与这样的序列具有序列同一性，所述序列与靶基因的启动子区对齐。

在一个实施方案中，不需要确定靶反义RNA转录物的存在以设计本发明的saRNA。换言之，saRNA的设计不需

要鉴定靶反义RNA转录物。例如，可以通过靶基因的编码链的基因组序列、通过测序或通过数据库中检索获得TSS核心的核苷酸序列，即，在靶基因转录起始位点上游2000个核苷酸至靶基因转录起点下游2000个核苷酸的区域中的序列。可以选择TSS核心内部始于模板链上从TSS核心位置1至位置4001的任何位置的靶向序列，并且其随后可以用来设计saRNA序列。如上文讨论，saRNA与靶向的序列的反向互补物具有高度的序列同一性。

5 随后确定全基因组中saRNA序列的脱靶命中数、0错配(0mm)命中数和1错配(1mm)命中数。术语“脱靶命中数”指与靶基因的模板链上saRNA的靶向序列相同的全基因组中其他位点的数目。术语“0mm命中数”指除saRNA的靶转录物之外已知的saRNA可以以0错配与其他的互补物杂交或结合的蛋白质编码转录物的数目。换言之，“0mm命中数”计数的是除saRNA的靶转录物之外已知的包含与saRNA序列完全相同的区域的蛋白质编码性转录物的数目。术语“1mm命中数”指除saRNA的靶转录物之外已知的，可以以1个错配与所述的互补物杂交或结合的蛋白质编码性转录物的数目。换言之，“1mm命中数”计数的是除saRNA的靶转录物之外已知的，包含仅具有1个错配的和saRNA序列相同的区域的蛋白质编码性转录物的数目。在一个实施方案中，仅选择没有脱靶命中、没有0mm命中和没有1mm命中的saRNA序列。对于本申请中公开的那些saRNA序列，每者均具有无脱靶命中、无0mm命中并且无1mm命中。

10 在一些实施方案中，本发明的saRNA可以是单链或双链的。双链分子包含第一链和第二链。如果为双链，则双链体的每条链可以长至少14个、或至少18个，例如19、20、21或22个核苷酸。双链体可以在至少12个、或至少15个、或至少17个、或至少19个核苷酸的长度上杂交。每条链可以正好是19个核苷酸长度。优选地，saRNA的长度小于30个核苷酸，因为超过这个长度的寡核苷酸双链体可能具有增加的诱导干扰素反应的风险。在一个实施方案中，saRNA的长度是19至25个核苷酸。形成saRNA双链体的链可以长度相等或不等。

15 在一个实施方案中，本发明的saRNA包含至少14个核苷酸和小于30个核苷酸的序列，所述序列与靶向的序列具有至少80%、90%、95%、98%、99%或100%互补性。在一个实施方案中，与靶向的序列具有至少80%、90%、95%、98%、99%或100%互补性的序列长至少15、16、17、18或19个核苷酸、或18-22个或19个至21个、或正好19个核苷酸。

20 本发明的saRNA可以包含不与靶反义RNA转录物互补的短3'或5'序列。在一个实施方案中，这种序列在链的3'末端。该序列可以长1-5个核苷酸、或2个或3个核苷酸。该序列可以包含尿嘧啶，从而它可以是2或3个尿嘧啶的3'序列段。该序列可以包含一个或多个脱氧核糖核苷，如dT。在一个实施方案中，序列中的一个或多个核苷酸由硫代磷酸核苷替换，其中核苷间键是硫代磷酸连接。作为一个非限制性例子，该序列包含序列dT\*dT，其中\*是硫代磷酸核苷间键。这种非互补序列可以称作“尾”。如果存在3'尾，则链可以较长，例如，19个核苷酸外加3'尾，其可以是UU或UUU。在确定saRNA和靶反义RNA转录物之间的互补性时，这种3'尾不应当视作错配。

25 因此，本发明的saRNA可以由以下组成：(i)与靶反义RNA转录物的区域具有至少80%互补性的序列；和(ii)1-5个核苷酸的3'尾，所述尾可以包含尿嘧啶残基或由其组成。saRNA因此一般在其整个长度与靶反义RNA转录物的区域具有互补性，3'尾除外(如果存在)。本申请中公开的任一saRNA序列可以任选地包含这种3'尾。因此，在saRNA表和序列表中公开的任一saRNA序列可以任选地包含这种3'尾。本发明的saRNA还可以包含Dicer或Drosha底物序列。

30 本发明的又一个方面提供一种包含靶向CEBPA转录物的C/EBP $\alpha$ -saDNA和siRNA的组合物和至少一种药用载体的组合物。

在其中一种实施方式中，所述siRNA为一种C/EBP $\beta$ -siRNA；在一种实施方式中，所述siRNA具有SEQ ID NO:63或者SEQ ID NO:64所示序列。

35 在其中一种实施方式中，所述组合物中的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的比例为3:1-1:2，优选地，所述C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的比例为2:1-1:2，更优选地，C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的比例为1:1-1:2；优选地，所述C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的比例为2:1；优选地，所述C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的比例为1:1。

进一步地，本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的组合物在制备上调细胞中CEBPA基因的药物中的应用。

40 进一步地，所述C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的组合物在制备上调肿瘤细胞中p21的表达的药物中的应用。

进一步地，本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的组合物在制备上调细胞中的白蛋白的药物中的应用。更进一步地，本发明提供所述的在降低HCC复发率中的应用。

进一步地，所述本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的组合物在制备抗细胞增殖的药物中的应用。

进一步地，本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的组合物制备降低HCC复发率的药物中的应用。

45 进一步地，本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的组合物在增强未分化HCC细胞系对C/EBP $\alpha$ -saRNA上调CEBPA基因的响应中的应用。

进一步地，本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA组合物在制备通过白蛋白增强来改善肝脏功能的效果的药物中的应用。

另一方面，本发明提供了一种包含C/EBP $\alpha$ -saDNA和p21-saRNA的组合物治疗肿瘤的方法。

50 本发明的又一个方面提供一种包含靶向CEBPA转录物的C/EBP $\alpha$ -saDNA和p21-saRNA的组合物和至少一种药用载



体的组合物。

在其中一种实施方式中，所述p21-saRNA具有序列为：

有义链：CCAACUCAUUCUCCAAGUA[dT][dT] (SEQ ID NO:48)

反义链：UACUUGGAGAAUGAGTTGG[dT][dT] (SEQ ID NO:49)

5 在其中一种实施方式中，所述组合物中的C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的比例为3:1-1:2，优选地，所述C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的比例为2:1-1:2，更优选地，C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的比例为1:1-1:2；优选地，所述C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的比例为2:1；优选地，所述C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的比例为1:1。

进一步地，所述C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的组合物在制备上调细胞中p21的表的药物中的应用。

进一步地，所述C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的组合物在制备上调肿瘤细胞中p21的表的药物中的应用。

10 进一步地，本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的组合物在制备上调细胞中的白蛋白的药物中的应用。更进一步地，本发明提供所述的在降低HCC复发率中的应用。

进一步地，所述本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的组合物在制备抗细胞增殖的药物中的应用。

进一步地，本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的组合物制备降低HCC复发率的药物中的应用。

15 进一步地，本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的组合物在增强未分化HCC细胞系对C/EBP $\alpha$ -saRNA上调CEBPA基因的响应中的应用。

进一步地，本发明提供所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的组合物在制备通过白蛋白增强来改善肝脏功能的效果的药物中的应用。

本发明涉及提供一种HCC细胞中CEBPA表达的最佳激活的方法。通过探讨确定肝细胞生物学和其他癌症类型中，CEBPA和CEBPB是否共享共同的途径，首先进行了优化saRNA诱导的基因激活和siRNA诱导的基因抑制的不同细胞系的转染，研究了HCC细胞系（HepG2，Hep3B和PLC/PRF/5），前列腺（DU-145）和乳腺癌（MCF-7）细胞模型。HepG2  
20 和Hep3B代表分化的表型，而PLC/PRF/5代表未分化的细胞系。在上述细胞类型中，转染激活CEBPA需要的C/EBP $\alpha$ -saRNA的最佳浓度至少为15-30nm，最佳转染后的孵育时间为48-96小时。实验证实，C/EBP $\alpha$ -saRNA上调在细胞中的CEBPA的表的活性，至少持续48-96小时。C/EBP $\beta$ -siRNA抑制作用的最佳浓度为5-15nm，最佳转染后的孵育时间为48-96小时。

25 C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的双重结合导致CEBPA表达水平比单次转染的CEBPA表达水平更高。C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的双重转染获得了与C/EBP $\alpha$ -saRNA，C/EBP $\beta$ -siRNA和p21-saRNA的共同转染相比更好的上调的p21的表水平。通过此实验证实C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA组合使用可能是抑制HepG2细胞肿瘤的理想选择。总之，由于C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的结合导致更高激活的HepG2细胞中的CEBPA，p21和白蛋白表达，表明C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的联合使用具有更好的C/EBPA和p21表上调引起的抗增殖作用，以通过白蛋白  
30 增强来改善肝功能及肝脏反应的效果。

本实施例的研究还发现，改变CEBPA和CEBPB的表达平衡可能会对HCC的特定细胞类型产生深远的影响。如前面的数据所示，CEBPA激活和CEBPB抑制的组合产生的CEBPA与CEBPB的比率升高，导致分化的HepG2细胞中，p21更好地激活以抑制细胞周期对细胞增殖的作用。此外，经过实验证实该组合应用于未分化的PLC/PRF/5细胞也具有意想不到的效果。

35 C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA共同转染具有在包括HepG2，Hep3B细胞在内的所有三种细胞系中的细胞毒性和抗增殖作用。并且，通过与C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA共同转染细胞系，PLC/PRF/5细胞可能可从抗性转化为抗性敏感。

术语“CEBPA转录物”，在上下文中可以位于CEBPA基因的任何链、CEBPA基因的反义RNA、编码CEBPA蛋白的CEBPAmRNA或调节CEBPA基因表达的非编码性RNA上。调节CEBPA基因表达的非编码性RNA的一个例子是非编码性  
40 长RNA(lncRNA)。CEBPA基因的反义RNA下文称作靶反义RNA转录物。

在一个实施方案中，靶向基因转录物的核酸构建体调节该基因表达和/或功能。术语“调节”在上下文中可以包括上调或下调特定基因的表达和/或功能。

本发明的一个方面提供药物组合物，所述药物组合物包含靶向CEBPA或CEBPB，或它们的上游、下游蛋白的转录物的一种或数种核酸构建体和至少一种可药用载体。这种核酸构建体的一个例子是活化性小RNA(saRNA)。“活化性小  
45 RNA”(small activating RNA)或“saRNA”在上下文中意指一般小于50个核苷酸的单链或双链RNA，所述RNA上调特定基因的基因表达或对其具有正向影响。所述基因称作所述saRNA的靶基因。例如，CEBPA基因是本发明C/EBP $\alpha$ -saRNA的靶基因；例如，激活p21表达的基因是p21-saRNA的靶基因；

本发明还涉及“小干扰性RNA”或“siRNA”，该术语在上下文中意指一般长20-25个核苷酸，参与RNA干扰(RNAi)途径并干扰或抑制特定基因表达的双链RNA。所述基因是所述siRNA的靶基因。例如，干扰CEBPB基因表达的siRNA称作“C/EBP $\beta$ -siRNA”并且CEBPB基因是靶基因。例如，干扰CEBPA基因表达的siRNA称作“C/EBP $\alpha$ -siRNA”并且CEBPA  
50

基因是靶基因。例如，干扰CTR9基因表达的siRNA称作“CTR9-siRNA”；干扰DDX5基因表达的siRNA称作“DDX5-siRNA”；干扰hnRNP2/B1基因表达的siRNA称作“hnRNP2/B1-siRNA”。

siRNA通常长约21个核苷酸，在两条链的每个末端具有3'突出端(2个核苷酸)。siRNA通过以下方式抑制靶基因表达：与所述基因的一种或多种RNA转录物在特定序列处结合并且促进转录物的切割。一般，在RNAi中，RNA转录物是mRNA，从而切割mRNA导致基因表达下调。在本发明中，不意在受任何理论约束，可能机制之一是C/EBP $\alpha$ -saRNA可以通过切割靶反义RNA转录物，调节CEBPA基因表达。

本申请的saRNA是通过其靶反义RNA转录物定义，而无论saRNA调节特定基因表达的机制是什么。saRNA优选地与CEBPA或P21基因上的基因组序列具有高同一性百分数，例如至少75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%，优选地100%同一性。优选基因组序列是CEBPA或P21基因转录起始位点上游或下游的达500个核苷酸。最优选地，它在CEBPA或P21基因启动子区内部。因此，saRNA优选地与CEBPA或P21基因启动子区内部的序列具有序列同一性。本发明的saRNA可以是单链的，或优选地双链的。双链分子包含第一链和第二链。如果为双链，双链体的每条链优选地具有至少14个、更优选地至少18个，例如19、20、21或22个核苷酸长度。双链体优选地在至少12个、更优选地至少15个、更优选地17个、仍然更优选地至少19个核苷酸的长度范围内杂交。每条链可以正好是19个核苷酸长度。优选地，saRNA的长度小于30个核苷酸，因为超过这个长度的寡核苷酸双链体可能具有增加的诱导干扰素反应的风险。形成saRNA双链体的链可以长度相等或不等。

本发明的saRNA可包含不与靶反义RNA转录物互补的短3'或5'序列。在一个实施方案中，这种序列是3'的。所述序列可以具有1-5个、优选地2或3个核苷酸长度。所述序列优选地包含尿嘧啶，从而它优选地是2或3个尿嘧啶的3'序列段。这种非互补序列可以称作“尾”。如果存在3'尾，则链可以较长，例如，19个核苷酸外加3'尾，其优选地是UU或UUU。本发明的saRNA还可以包含Dicer或Drosha底物序列。

本发明的saRNA可以含有侧翼序列。侧翼序列可以插入本发明saRNA的3'末端或5'末端中。在一个实施方案中，侧翼序列是miRNA的序列，从而使得saRNA具有miRNA构型并且可以用Drosha和Dicer加工。在非限制性例子中，本发明的saRNA具有两条链并且被克隆入amiR-30主链侧翼序列中。

本发明的saRNA可以包含限制性酶底物或识别序列。限制性酶识别序列可以在本发明saRNA的3'末端或5'末端。限制性酶的非限制性例子包括NotI和AscI。

在一个实施方案中，本发明的saRNA由稳定碱基配对的两条链组成，在每条链的3'末端处具有形成3'突出端的多个未配对核苷酸同未配对。形成每条链的3'突出端的未配对核苷酸的数目优选地处于1至5个核苷酸、更优选地1至3个核苷酸和最优选地2个核苷酸范围内。3'突出端可以在上文提到的3'尾上形成，从而3'尾可以是3'突出端。

因此，本发明的saRNA优选地由以下组成：(i)与靶反义RNA转录物的区域具有至少95%互补性的序列；和(ii)1-5个核苷酸的3'尾，其优选地包含尿嘧啶残基。本发明的saRNA除了3'尾(如果存在)优选地在其整个长度对靶反义RNA转录物的区域具有互补性。如上文提到，取代“与靶反义RNA转录物互补”，本发明的saRNA也可以定义为与CEBPA基因的编码链具有“同一性”。

本发明的saRNA或siRNA可以通过任何合适方法获得，或购买市售产品，例如使用所属领域技术人员熟知的标准分子生物学技术以合成方式或通过细胞中表达来产生。例如，可以使用本领域已知的方法，化学合成或重组产生本发明的saRNA。

#### saRNA的化学修饰

在saRNA中，术语“修饰”或(如果适宜)“被修饰的”指相对于A、G、U或C核糖核苷酸的结构性和/或化学性修饰。在本发明saRNA分子中的核苷酸可以包括非标准核苷酸，如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。本发明的saRNA可以包括任何有用的修饰，如对糖、核碱基或核苷间键(例如对连接性磷酸酯/对磷酸二酯键/对磷酸二酯主链)的修饰。嘧啶核碱基的一种或多种原子可以用任选取代的氨基、任选取代的巯基、任选取代的烷基(例如，甲基或乙基)或卤素(例如，氯或氟)替换或取代。在某些实施方案中，修饰(例如，一个或多个修饰)是存在于每个糖和核苷键中。本发明的修饰可以是核糖核酸(RNA)至脱氧核糖核酸(DNA)、苏糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)或其杂交分子的修饰。在非限制性例子中，U的2'-OH置换为-OMe。本发明的saRNA可以包括对糖、核碱基和/或核苷间键修饰的组合。

本发明的saRNA或siRNA可以沿整个分子长度均匀地或不均匀地被修饰。例如，一个或多个或全部类型的核苷酸(例如，嘌呤或嘧啶，或任一种或多种或全部的A、G、U、C)可以在本发明的saRNA中均匀地被修饰或可以在其中不被均匀地修饰。在一些实施方案中，在本发明saRNA中的全部核苷酸X均被修饰，其中X可以是核苷酸A、G、U、C的任一种，或A+G、A+U、A+C、G+U、G+C、U+C、A+G+U、A+G+C、G+U+C或A+G+C组合的任一种。不同的糖修饰、核苷酸修饰和/或核苷间键(例如，主链结构物)可以存在于saRNA中的各种位置。核苷酸类似物或其他修饰可以位于saRNA的任何位置处，从而saRNA的功能基本不降低。本发明的saRNA可以含有约1%至约100%的修饰核苷酸(相对于核苷酸总含量，或相对于一个或多个类型的核苷酸，即A、G、U或C的任一者或多者)或居间的任何百分数(例如，1%

至20%、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%以及95%至100%)。

5 可以将本发明的saRNA修饰成球状核酸(SNA)或环状核酸。本发明saRNA的末端可以借助化学试剂或酶连接,产生无自由末端的球状saRNA。预计球状saRNA比其线型对应物更稳定并抵抗RNase R核酸外切酶的消化。球状saRNA还可以包含相对于A、G、U或C核糖核苷酸的其他结构性和/或化学性修饰。在一些实施方案中,本发明的saRNA可以包含反向脱碱基修饰(abasic modification)。在一些实施方案中,反向脱碱基修饰可以在5'末端。

10 本发明的saRNA或siRNA可以设计成缀合至其他多核苷酸、染料、嵌入剂(例如,吡啶)、交联剂(例如,补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨斯卟啉(texaphyrin)、噻啉(Sapphyrin))、多环芳烃(例如,吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如EDTA)、烷基化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如,PEG-40K)、MPEG、[MPEG]2、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射标记的标记物、酶、半抗原(例如,生物素)、转运/吸收促进剂(例如,阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成性核糖核酸酶、蛋白质,例如糖蛋白,或肽,例如,对共配体具有特异性亲和力的分子、或抗体,例如与指定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体,激素和激素受体、非肽种类,如脂质、凝集素、糖、维生素、辅因子或药物。

15 根据本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物可以与RNAi剂、小干扰性RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、非编码性长RNA(lncRNA)、增强子RNA、增强子衍生的RNA或增强子驱动的RNA(eRNA)、微RNA(miRNA)、miRNA结合位点、反义RNA、核酶、催化性DNA、tRNA、诱导三螺旋形成的RNA、适配体或载体等一起组合使用,以实现不同功能。一种或多种RNAi剂、小干扰性RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、非编码性长RNA(lncRNA)、微RNA(miRNA)、miRNA结合位点、反义RNA、核酶、催化性DNA、tRNA、诱导三螺旋形成的RNA、适配体或载体可以包含至少一个修饰或置换。在一些实施方案中,修饰选自核酸在糖位置处的化学取代、在磷酸酯位置处的化学取代和在碱基位置处的化学取代。在其他实施方案中,化学修饰选自掺入修饰的核苷酸;3'帽结构;缀合于高分子量、无免疫原性化合物;缀合于亲脂化合物;以及硫代磷酸酯掺入磷酸酯主链中。在一个优选实施方案中,高分子量、无免疫原性化合物是聚二醇,并且更优选地是聚乙二醇(PEG)。

20 在一个实施方案中,C/EBP $\alpha$ -saRNA可以与抗体连接。产生针对靶细胞表面受体的抗体的方法是熟知的。本发明的saRNA分子可以用已知方法与这类抗体连接,例如使用RNA载体蛋白连接。所产生的复合物随后可以施用于受试者并借助受体介导的内吞作用被靶细胞摄入。

25 本发明的组合物可以与已知在正在考虑的特定方法中产生作用的其他活性成分联合提供。其他活性成分可以与本发明的组合物同时、分别或依次施用。在一个实施方案中,本发明的化合物随调节不同靶基因的saRNA一起施用。非限制性例子包括调节白蛋白基因、胰岛素基因或HNF4A基因的saRNA。可以使用单独saRNA或两种或更多种不同saRNA的组合,实现调节任何基因。

30 在一个实施方案中,本发明的组合物与一种或多种调节代谢、尤其调节肝功能的药物一起施用。在非限制性例子中,本发明的组合物与降低低密度脂蛋白(LDL)胆固醇水平的药物如他汀、辛伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀、依折麦布(ezetimibe)、烟酸、PCSK9抑制剂、CETP抑制剂、氯贝丁酯、非诺贝酸、生育三烯酚、植物甾醇类、胆汁酸螯合剂、普罗布考或其组合一起施用。本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物也可以与Orvig等人的US6287586中公开的钒双胍复合物一起施用。在另一个例子中,C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物可以与Rhodes的WO 201102838中公开的组合物一起施用,所述文献的内容通过引用方式完整并入,以降低血清胆固醇。组合物包含一种选择性结合至并抑制PCSK9蛋白的抗原结合蛋白;和抑制细胞中PCSK9基因表达的RNA效应子剂。在又一个例子中,C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物可以与具有ABC1生物学活性的ABC1多肽或编码具有ABC1活性的ABC1多肽的核酸一起施用,以如Brooks-Wilson等人的EP1854880中所述那样调节胆固醇水平,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

35 本发明提供的药物制剂可以另外包含可药用赋形剂,如本文所用,所述的可药用赋形剂包括,但不限于任何和全部溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体溶媒、分散助剂或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂等,如对所需的具体剂型合适。

40 在一些实施方案中,将组合物施用于人类、人类患者或受试者。出于本公开的目的,短语“活性成分”通常指如本文所述那样递送的saRNA和siRNA。

45 虽然本文提供的药物组合物描述主要涉及适于施用于人类的药物组合物,技术人员理解这类组合物通常适于施用于任何其他动物,例如,施用于非人类动物,例如非人类哺乳动物。

50 本文所述药物组合物的制剂可以通过药理学领域已知或此后开发的任何方法制备。通常而言,这类制备方法包括步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分结合,并且随后,如果需要和/或合乎需要的,将产品分割、

成型和/或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

本发明药物组合物中活性成分、可药用赋形剂，和/或任何额外成分的相对量将根据受到治疗的受试者的身份、体格大小和/或状况治疗变动并且进一步取决于组合物待施用的途径。以举例方式，组合物可以包含0.1%和100%之间、例如0.5%和50%之间、1-30%之间、5-80%之间至少80%(w/w)的活性成分。

5 在一些实施方案中，本文所述的制剂可以含有至少一种C/EBP $\alpha$ -saRNA和一种siRNA。作为一个非限制性例子，制剂可以含有1、2、3、4或5种具有不同序列的saRNA。在一个实施方案中，制剂含有至少3种具有不同序列的saRNA。在一个实施方案中，制剂含有至少5种具有不同序列的saRNA。

10 可以使用一种或多种赋形剂配制本发明的saRNA的组合物。除传统赋形剂如任何和全部溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体溶媒、分散剂或悬浮剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂之外，本发明的赋形剂可以包括而限于类脂质(lipidoids)、脂质体、脂质纳米粒子、聚合物、脂质-核酸复合物(lipoplex)、核-壳纳米粒子、肽、蛋白质、用saRNA转染的细胞(例如，用于移植入受试者)、透明质酸酶、纳米粒子模拟物及其组合。因此，本发明的制剂可以包含一种或多种各自处于以下量的赋形剂，所述量共同增加saRNA的稳定性和/或增加saRNA对细胞的转染。另外，可以使用自装配核酸纳米粒子配制本发明的saRNA。

15 组合使用：如本文所用，术语“组合施用”或“联合施用”意指将两种或更多种药物(例如saRNA)在相同时间或在如此间隔时间内施用至受试者，从而每种药物在该患者上的作用可存在重叠。在一些实施方案中，将它们在彼此约60、30、15、10、5或1分钟范围内施用。在一些实施方案中，药物的施用如此足够紧密地间隔，从而实现联合(例如，协同)效应。

癌症：如本文所用，术语“癌症”在个体中指存在这样的细胞，所述细胞具有为造成癌症的细胞常见的特征，如增殖失控、永生性、转移潜力、快速生长和增殖速率，和某些特征性形态学特征。经常，癌细胞将会处于肿瘤形式，但是这类细胞可以在个体内部独立存在，或可以在血流中作为独立细胞循环，如白血病细胞。

20 抑制细胞：如本文所用，“抑制细胞”指抑制、减少、静态化细胞(例如，哺乳动物细胞(例如，人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合的生长、分裂或增殖。

细胞毒性：如本文所用，“细胞毒性”指杀死细胞(例如，哺乳动物细胞(例如，人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合或对其造成有害、有毒或致死效果。

#### 试剂盒

25 本发明提供用于便利和/或有效实施本发明方法的多种试剂盒。一般，试剂盒将包含足够量和/或数目的组分以允许使用者对受试者进行多次治疗和/或以进行多次实验。

30 在一个实施方案中，本发明提供在体外或在体内调节基因表达的试剂盒，所述试剂盒包含本发明的调节CEBPA基因表达的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物或C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物、调节其他基因的saRNA、siRNA或miRNA的组合。试剂盒还可以包含包装和说明书和/或递送剂，以形成制剂组合物。递送剂可以包括本文公开的盐水、缓冲溶液、类脂质(lipidoid)、树状物或任何递送剂。基因的非限制性例子包括CEBPA、CEBPB家族的其他成员、白蛋白基因、甲胎蛋白基因、肝特异性因子基因、生长因子、核因子基因、肿瘤抑制基因、多能性因子基因。

在一个非限制性例子中，缓冲溶液可以包括氯化钠、氯化钙、磷酸盐和/或EDTA。

35 在另一个非限制性例子中，缓冲溶液可以包括，但不限于盐水、含2mM钙的盐水、5%蔗糖、含2mM钙的5%蔗糖、5%甘露醇、含2mM钙的5%甘露醇、Ringer乳酸盐、氯化钠、含2mM钙的氯化钠和甘露糖。在又一个非限制性例子中，可以将缓冲溶液沉淀或可以将它冻干。每种组分的量可以变动以实现一致、可重复的较高浓度盐水或简单缓冲液制剂。也可以变动组分以增加saRNA在缓冲溶液中随时间推移和/或多种条件下的稳定性。

在另一个实施方案中，本发明提供调节细胞增殖的试剂盒，所述试剂盒包含本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物，其以引入细胞时有效抑制所述细胞增殖的量提供；任选地包含其他siRNAs和miRNA，以进一步调节靶细胞的增殖；和包装物与说明书和/或递送剂，以形成制剂组合物。

40 在另一个实施方案中，本发明提供降低细胞中LDL水平的试剂盒，所述试剂盒包含本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物；任选地包含减少LDL的药物；和包装物与说明书和/或递送剂，以形成制剂组合物。

在另一个实施方案中，本发明提供调节细胞中miRNA表达水平的试剂盒，所述试剂盒包含本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物和siRNA的组合物；任选地包含siRNA、eRNA和lncRNA；和包装物与说明书和/或递送剂，以形成制剂组合物。

#### 装置

45 本发明提供可以并入本发明C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物中的装置。这些装置含有可用于立即递送至有需求的受试者(如人类患者)的稳定剂。这种受试者的非限制性例子包括患有过度增殖性疾病如癌症、肿瘤特别是肝脏相关性疾病的受试者。

50 装置的非限制性例子包括泵、导管、针头、透皮贴剂、加压嗅用输送装置、离子导入装置、多层微流体装置。装置可以用来根据单次、多次或分割给药方案递送本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物。装置可以用来跨生物组织、真皮内、皮下或肌内递送本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物。国际公开申请WO2013/090648中公开了适于递送寡核苷酸的装置的更

多例子，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

本发明的一个方面提供了使用C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物和至少一种可药用载体的药物组合物的方法。C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物调节CEBPA基因表达。在一个实施方案中，与不存在本发明的saRNA情况下CEBPA基因表达相比，CEBPA基因的表达在本发明的saRNA存在下增加至少20%、30%、40%、更优选地至少45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、甚至更优选地至少80%。在又一个优选的组合物实施方案中，与不存在本发明的saRNA组合物情况下CEBPA基因表达相比，CEBPA基因的表达在本发明的saRNA存在下增加至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、更优选地增加至少15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍，甚至更优选地增加至少60倍、70倍、80倍、90倍、100倍。

10 在一个实施方案中，提供一种通过本发明C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物的治疗用途，在体外和在体内调节肝代谢基因的方法。还提供一种通过本发明C/EBP $\alpha$ -saRNA治疗，在体外和在体内调节涉及NAFLD的肝基因的方法。这些基因包括但不限于固醇调节元件结合因子1(SREBF-1或SREBF)、分化抗原簇36(CD36)、乙酰-CoA羧化酶2(ACACB)、载脂蛋白C-III(APOC3)、微粒体甘油三酯转运蛋白(MTP)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活蛋白1 $\alpha$ (PPAR $\gamma$ -CoA1 $\alpha$ 或PPARGC1A)、低密度脂蛋白受体(LDLR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活蛋白1 $\beta$ (PPAR $\gamma$ -CoA1 $\beta$ 或PERC)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )、乙酰-CoA羧化酶1(ACACA)、糖应答元件结合蛋白(ChREBP或MLXIPL)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ (PPAR $\alpha$ 或PPARA)、FASN(脂肪酸合酶)、甘油二酯酰基转移酶-2(DGAT2)和雷帕霉素的哺乳动物靶(mTOR)。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少肝脏细胞中SREBF-1基因的表达至少20%、30%、优选地至少40%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少肝脏细胞中CD36基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加肝脏细胞中ACACB基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%、100%、125%、150%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少肝脏细胞中APOC3基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少肝脏细胞中MTP基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加肝脏细胞中PPAR $\gamma$ -CoA1 $\alpha$ 基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%、100%、125%、150%，更优选地至少175%、200%、250%、300%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加肝脏细胞中PPAR $\gamma$ 基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%、100%、125%、150%，更优选地至少175%、200%、250%、300%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加肝脏细胞中PPAR $\alpha$ 基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%、100%、125%、150%，更优选地至少175%、200%、250%、300%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少肝脏细胞中MLXIPL基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少肝脏细胞中FASN基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少肝脏细胞中DGAT2基因的表达至少10%、20%，优选地至少30%、40%、50%。

C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物还调节BAT细胞中上文公开的肝代谢基因的表达。在另一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少BAT细胞中SREBP基因的表达至少20%、30%，优选地至少40%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少BAT细胞中CD36基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少BAT细胞中LDLR基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加BAT细胞中PPARGC1A基因的表达至少20%、30%，优选地至少40%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少BAT细胞中APOC基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%、更优选地至少95%、99%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少BAT细胞中ACACB基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少BAT细胞中PERC基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加BAT细胞中ACACA基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%、100%、125%、150%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少BAT细胞中MLXIPL基因的表达至少20%、30%、40%，优选地至少50%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少BAT细胞中MTOR基因的表达至少20%、30%、40%，优选地至少50%、75%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA增加肝脏细胞中PPARA基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%、100%、125%、150%、更优选地至少200%、250%、300%、350%、400%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA增加BAT细胞中FASN基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA增加肝脏细胞中DGAT基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%、100%、125%、150%、更优选地至少200%、250%、300%。

50 本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物还调节WAT细胞中上文公开的肝代谢基因的表达。在另一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中SREBP基因的表达至少20%、30%，优选地至少40%。在一个实施方案中，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中CD36基因的表达至少20%、30%、40%、50%，优选地至少75%、90%。在一

个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中LDLR基因的表达至少20%、30%、40%、50%, 优选地至少75%、90%。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加WAT细胞中PPARGC1A基因的表达至少20%、30%, 优选地至少40%。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加WAT细胞中MTP基因的表达至少20%、30%、40%、50%, 优选地至少75%、90%, 更优选地至少95%, 更优选地至少1.5倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍, 更优选地至少5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加WAT细胞中APOC基因的表达至少20%、30%、40%、50%, 优选地至少75%、90%, 更优选地至少95%、99%。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中ACACB基因的表达至少20%、30%、40%、50%, 优选地至少75%。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中PERC基因的表达至少20%、30%、40%、50%, 优选地至少75%。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中ACACA基因的表达至少20%、30%、40%、50%, 优选地至少75%、90%、95%。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中MLX1PL基因的表达至少20%、30%、40%, 优选地至少50%。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中MTOR基因的表达至少20%、30%、40%, 优选地至少50%、75%。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中FASN基因的表达至少5%、10%, 优选地至少15%、20%。在一个实施方案中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物减少WAT细胞中DGAT基因的表达至少10%、20%、30%, 更优选地40%、50%。

#### 手术护理

肝切除术, 即手术切除肝脏或肝组织, 可能造成肝衰竭, 白蛋白和凝血因子产量减少。肝切除术后需要恰当的手术护理。在一些实施方案中, 本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物用于肝切除术后手术护理, 以促进肝再生并增加存活率。

#### 过度增殖性疾病

在本发明的一个实施方案中, 本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物用来减少过度增殖性细胞的细胞增殖。过度增殖性细胞的例子包括癌细胞, 例如, 癌 (carcinomas)、肉瘤、淋巴瘤和胚胎细胞肿瘤。这类癌细胞可以是良性或恶性的。过度增殖性细胞可以因自身免疫病症如类风湿性关节炎、炎症肠病或银屑病所致。过度增殖性细胞还可以在免疫系统过度敏感的接触致敏原的患者内部产生。涉及过度敏感性免疫系统的这类病状包括但不限于哮喘、过敏性鼻炎、湿疹和过敏反应, 如变应性过敏反应。在一个实施方案中, 抑制肿瘤细胞发育和/或生长。在一个优选实施方案中, 抑制实体瘤细胞增殖。在另一个优选实施方案中, 防止肿瘤细胞转移。在另一个优选的例子中, 抑制未分化的肿瘤细胞增殖。

抑制细胞增殖或减少增殖意指增殖减少或完全停止。因此, “减少增殖”是“抑制增殖”的实施方案。与本发明C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物处理之前所述细胞的增殖相比, 或与等同的未处理细胞的增殖相比, 细胞的增殖在本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物存在减少至少20%、30%或40%, 或优选地至少45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%, 甚至更优选地至少80%、90%或95%。在过度增殖性细胞中抑制细胞增殖的实施方案中, “等同”细胞也是过度增殖性细胞。在优选的实施方案中, 减少增殖至与等同的健康(非过度增殖性)细胞的增殖速率相当的速率。“抑制细胞增殖”的优选实施方案是抑制过度增殖或调节细胞增殖以达到正常的健康的增殖水平。

在一个非限制性例子中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物用来减少白血病细胞和淋巴瘤细胞的增殖。优选地, 细胞包括Jurkat细胞(急性T细胞淋巴瘤细胞系)、K562细胞(红细胞白血病细胞系)、U373细胞(胶质母细胞瘤细胞系)和32Dp210细胞(髓样白血病细胞系)。

在另一个非限制性例子中, C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物用来减少卵巢癌细胞、肝癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、大鼠肝癌细胞和胰岛瘤细胞的增殖。优选地, 细胞包括PEO1和PEO4(卵巢癌细胞系)、HepG2(肝细胞癌细胞系)、Panc1(人胰腺癌细胞系)、MCF7(人乳腺癌细胞系)、DU145(人转移性前列腺癌细胞系)、大鼠肝癌细胞和MIN6(大鼠胰岛瘤细胞系)等。

在一个实施方案中, 本发明的saRNA组合物用来治疗过度增殖性疾病。肿瘤和癌症代表一种具有特定意义的过度增殖性疾病, 并且包括全部类型的肿瘤和癌, 例如实体瘤和血液系统肿瘤。癌的例子包括, 但不限于宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、胆囊癌、肝癌、头颈癌、鳞状细胞癌、胃肠道癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、肺癌、非小细胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病(如急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病和慢性髓性白血病)、脑癌(例如, 星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤)、神经母细胞瘤、肉瘤、结肠癌、直肠癌、胃癌、直肠癌、膀胱癌、子宫内膜癌、浆细胞瘤、淋巴瘤、视网膜母细胞瘤、Wilm's肿瘤、Ewing肉瘤、黑色素瘤和其他皮肤癌。肝脏恶性肿瘤可以包括, 但不限于肝细胞癌(HCC)、胆管细胞癌、肝母细胞瘤或血管肉瘤等。

本发明利用C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物以调节CEBPA基因的表达并治疗肝硬化和HCC。本发明的方法可以缩减肿瘤体积至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。优选地, 抑制一个或多个新肿瘤的形成, 例如, 根据本发明治疗的受试者形成更少和/或更小的肿瘤。更少的肿瘤意指该受试者在给定的时间段内形成数目较同等受试者更少的肿瘤。例如, 该受试者形成比等同对照(未治疗的)受试者少了至少1、2、3、4或5个以上肿瘤。更小的肿瘤意指肿瘤的重量和/或体积比等同受试者的肿瘤减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。本发明的方法减少肿瘤负荷至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。给定的时间可以是任何合

适的时间段,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个月或年。

在一个非限制性例子中,提供一种治疗未分化肿瘤的方法,包括使细胞、组织、器官或受试者与本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物接触。与分化的肿瘤相比,未分化的肿瘤通常具有较差的预后。由于肿瘤中的分化程度对预后具有影响,所以假设使用有分化作用的生物药物可能是有益的抗增殖药物。已知C/EBP $\alpha$ 在急性髓样白血病中恢复髓样分化并阻止造血细胞过度增殖。优选地,可以用C/EBP $\alpha$ -saRNA治疗的未分化的肿瘤包括未分化的小细胞肺癌、未分化的胰腺腺癌、未分化的人胰腺癌、未分化的人转移性前列腺癌和未分化的人乳腺癌等。

在一个非限制性例子中,将C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物复合成PAMAM树状物,称作C/EBP $\alpha$ -saRNA-树状物,用于体内定向递送。如实施例1中所示那样在有临床意义的大鼠肝肿瘤模型中,证明了静脉内注射的C/EBP $\alpha$ -saRNA-树状物的治疗作用。按48小时间隔通过尾静脉内注射三个剂量后,治疗的肝硬化大鼠在1周内显示血清白蛋白水平显著增加。C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物树状物治疗组中肝脏肿瘤负荷显著减少。这项研究首次说明,可以通过全身性静脉内施用使用借助活化性小RNA分子的基因打靶,以在患有HCC合并肝硬化的大鼠中同时改善肝功能和减少肿瘤负荷。

在一个实施方式中,本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA可以采用GalNAc共价偶联修饰,从而进行体内的递送。其原理是基于ASGRP在部分肝细胞表面高表达,与GalNAc有高亲和力,因此可广泛应用于肝部疾病。是目前成熟度高、临床管线丰富的方式。如Alnylam的GalNAc平台、Dicerna的GalXC平台以及Ionis的LICA平台等。

在一个实施方案中,本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物用来调节癌基因和抑癌基因。优选地,可以是下调癌基因的表达。与不存在本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA情况下的表达相比,在本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物存在下癌基因的表达减少至少20%、30%、40%,更优选地至少45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%。在又一个优选的实施方案中,与不存在本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物情况下的表达相比,癌基因的表达在本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物存在下减少至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍,更优选地降低至少15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍,甚至更优选地降低至少60倍、70倍、80倍、90倍、100倍。优选地,可以抑制肿瘤抑制基因的表达。与不存在本发明C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物情况下的表达相比,抑癌基因的表达在本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物存在下增加至少20%、30%、40%,更优选地30%。

在另一个实施方案中,本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物用来增加肝功能。在一个非限制性例子中,本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物增加白蛋白基因表达并因而增加血清白蛋白水平。与不存在本发明的saRNA情况下白蛋白基因表达相比,在本发明的saRNA组合物存在下白蛋白基因的表达可以增加至少20%、30%、40%,更优选地至少45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%,甚至更优选地至少80%。在又一个优选的实施方案中,与不存在本发明的saRNA组合物的情况下白蛋白基因表达相比,在本发明的saRNA存在下白蛋白基因的表达增加至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍,更优选地增加至少15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍,甚至更优选地增加至少60倍、70倍、80倍、90倍、100倍。

在另一个实施方案中,本发明提供调节细胞增殖的试剂盒,所述试剂盒包含本发明的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物,其以引入细胞时有效抑制所述细胞增殖的量提供;任选地包含siRNA和miRNA,以进一步调节靶细胞的增殖;和包装物与说明书和/或递送剂,以形成制剂组合物。

#### 递送系统

本申请的组合物可适用任何公开的研究和技术涵盖了用于治疗、药物、诊断或成像用途的通过任何适宜途径的saRNA递送。递送可以是裸的或经配制的。可以将本发明的saRNA裸送至细胞。如本文所用在中,“裸”指不含促进转染的物质情况下递送saRNA。例如,递送至细胞的saRNA可以不含有修饰。可以使用本领域已知的和本文所述的施用途径,递送裸saRNA组合物至细胞。可以使用本文所述的方法,配制本发明的saRNA。制剂可以含有可以经修饰的和/或未经修饰的saRNA组合物。制剂还可以包括但不限于细胞渗透剂、可药用载体、递送剂、生物溶蚀性或生物相容性聚合物、溶剂和缓释递送储库。可以使用本领域已知的和本文所述的给药途径,递送配制的saRNA组合物至细胞。也可以配制组合物制剂以按照本领域几种方式中任一方式,直接递送至器官或组织,所述方式包括但不限于直接浸泡或浸浴、通过导管、通过凝胶剂、散剂、油膏剂、乳膏剂、凝胶剂、洗剂和/或滴剂、通过使用该组合物涂覆或浸渍的基质如织物或生物可降解材料等。也可以将本发明的saRNA组合物克隆入逆转录病毒复制型载体(RRV)并转导至细胞。

#### 给药

本发明的saRNA可以通过产生治疗有效结果的任何途径施用。这些途径包括但不限于肠内、胃肠、硬膜外、经口、经皮、硬膜外(epidural, peridural)、脑内(进入大脑)、脑室内(进入脑室)、表皮的(施加到皮肤上)、真皮内(进入皮肤本身)、皮下(在皮肤下)、经鼻施用(通过鼻)、静脉内(进入静脉)、动脉内(进入动脉)、肌内(进入肌肉)、心内(进入心脏)、骨内输注(进入骨髓)、鞘内(进入椎管)、腹膜内(输注或注射进入腹膜)、膀胱内灌注、玻璃体内(穿过眼)、海绵体内注射(进入阴茎基部)、阴道内施用、子宫内、羊膜外施用、经皮(扩散穿过完整皮肤以便全身性分布)、经粘膜(扩散穿过粘膜)、吹入(鼻吸)、舌下、唇下、灌肠、滴眼剂(滴到结膜上)或在滴耳剂中。在具体实施方案中,组合物可以按照允许它们跨越血-脑屏障、血管屏障或其他上皮屏障的方式施用。在国际公开申请WO2013/090648中公开的施用途径可以用来施用

本发明的saRNA组合物，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

#### 剂型

本文所述的药物组合物可以配制成本文所述的剂型，如局部用、鼻内、气管内或可注射用(例如，静脉内、眼内、玻璃体内、肌内、心内、腹膜内、皮下)。在WO2013/090648中描述的液态剂型、可注射制品、经肺形式和固态剂型可以作为剂型用于本发明组合物，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

可药用赋形剂：如本文所用，短语“可药用赋形剂”指除本文所述的化合物之外(例如，能够悬浮或溶解活性化合物的溶媒)并具有在患者中基本上无毒和非炎性特性的任何成分。赋形剂可以包括例如抗粘附剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压制助剂、崩解剂、染料(色料)、软化剂、乳化剂、填料(稀释剂)、成膜物质或包衣、风味剂、香料、助流剂(流动增进剂)、润滑剂、防腐剂、印刷墨、吸附剂、助悬剂或分散剂、甜味剂和水化水。示例性赋形剂包括但不限于：丁羟基甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸(氢二)钙、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交联聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、尼泊金甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预糊化淀粉、尼泊金丙酯、视黄醇棕榈酸酯、紫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、淀粉羟乙酸钠、山梨醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和木糖醇。

可药用盐：本公开还包括本文所述化合物的可药用盐。如本文所用，“可药用盐”指所公开化合物的衍生物，其中通过将现有的酸部分或碱部分转化成其盐形式(例如，通过游离碱基团与合适的有机酸反应)，对母体化合物进行修饰。可药用盐的例子包括但不限于碱性残基如胺的无机盐和有机酸盐；酸性残基如羧酸的碱式盐或有机盐等。代表性酸加成盐包含乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚糖酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐(pamoate)、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性碱或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等，以及无毒铵、季铵和胺阳离子，包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙基、乙胺等。本公开的可药用盐包括形成的母体化合物的常规无毒盐，例如，从无毒无机酸或有机酸形成。本公开的可药用盐可以通过常规化学方法从含有碱性部分或酸性部分的母体化合物合成。简而言之，这类盐可以通过将这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量数量的适宜碱或酸在水中或在有机溶剂中或在这二者的混合物中反应来制备；通常，优选非水介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。

可药用溶剂化物：如本文所用，术语“可药用溶剂化物”意指其中合适溶剂分子掺入晶体晶格中的本发明化合物。合适的溶剂是在施用的剂量上是生理可耐受的。例如，可以通过从包括有机溶剂、水或其混合物的溶液结晶、再结晶或沉淀，制备溶剂化物。合适溶剂的例子是乙醇、水(例如一水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砜(DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苜醇、2-吡咯烷酮、苜基苯甲酸盐等。当水是溶剂时，溶剂化物称作“水合物”。

在一个非限制性例子中，将C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物中的saRNA和siRNA均复合成PAMAM树状物，可以是C/EBP $\alpha$ -saRNA-树状物，C/EBP $\beta$ -siRNA-树状物，p21-saRNA-树状物，CTR9-saRNA-树状物，hnRNPA2/B1-树状物，将这些树状物组合使用，或者，分别制备C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA、CTR9-siRNA或hnRNPA2/B1组合后的混合物树状物大分子，用于体内定向递送。如实施例中所示那样在有临床意义的大鼠肝肿瘤模型中，对静脉内注射的C/EBP $\alpha$ -saRNA-树状物组合物或者组合物的树状物的治疗作用。按48小时间隔通过尾静脉内注射三个剂量后，治疗的肝硬化大鼠在1周内显示血清白蛋白水平显著增加。C/EBP $\alpha$ -saRNA树状物治疗组中肝脏肿瘤负荷显著减少。这项研究首次说明，可以通过全身性静脉内施用使用借助活化性小RNA分子的基因打靶，以在患有HCC的肝硬化症大鼠中同时改善肝功能和减少肿瘤负荷。

树枝状大分子是高度枝化的单分散大分子，其分子结构由中心核、重复单元以及末端基团构成，具有许多独特的性质。其中，以乙二胺为核，与丙烯酸甲酯通过Michael加成和酰胺化反应得到的聚酰胺-胺(PAMAM)树状大分子是研究及应用最为广泛的一类树状大分子，其具有精确的分子结构、高度的几何对称性、分子内存在空腔、大量的表面官能团、相对分子质量可控且分子量分布可达单分散性、分子本身具有纳米尺寸、高代数分子呈球状等一系列优点，其端基官能团进行化学修饰可以获得具有不同用途的树状大分子，降低其对细胞和机体的负面作用，使其在药物运载、基因治疗、重大疾病早期诊断等方面获得广泛的应用。基于PAMAM展现出的上述独特性能，研究人员开发了多种应用场景的树枝状聚合物材料，它们往往具有独特的内腔结构以及可修饰表面基团，在作为靶向递药系统载体时体现出独特的优越性。此外，PAMAM具有大量的端基基团，并且可以进行不同的功能性修饰，可以很好的作为药物、基因、疫



苗的载体,是一种很有应用前景的药物缓释、靶向释药载体。但是,PAMAM末端的正离子基团使得它对于正常细胞和红细胞具有较高的毒性,为了克服这一缺陷,可以通过氟化、乙酰化、聚乙二醇(PEG)化等进行末端修饰。

目前重组蛋白类生物药在疾病治疗和预防应用中变得越来越重要。将编码蛋白的DNA或RNA通过合适的载体引入细胞,指导细胞蛋白质的合成,是当下基因治疗研究的热点,相伴随地,合适地DNA或RNA等核酸小分子的递送系统,也成为迫切的研究方向。目前已经开发出病毒载体和非病毒载体,用于向细胞递送DNA或RNA外源基因。病毒载体存在一定的从复制缺陷型突变到野生型,甚至可能导致细胞发生诱变的风险。病毒载体的制备复杂、繁琐,并具有强免疫原性。以阳离子脂质体和聚合物为代表的非病毒载体通过转染过程将有生物活性的大分子,如质粒DNA、siRNA、mRNA和蛋白质传递到细胞中,该过程在体外是高效的。核酸通过静电作用与转染试剂形成复合物,随后通过内吞作用被细胞吸收。与病毒相比,这些非病毒载体具有简单、易于合成和放大、免疫原性低等优点,但在各种体内应用中效率通常不如病毒载体。

多聚物和阳离子脂质体是目前mRNA的递送载体之一。当脂质体或多聚体与细胞混合后,通过内吞作用或类似机制被细胞吸收,加载到脂质体上的mRNA在体内释放到靶细胞中,由此产生蛋白质并分泌血液循环中,因此这些靶细胞起到了生产这种蛋白质的仓库的作用。通过皮下、皮下或肌肉局部注射后,蛋白质表达主要局限于注射部位,有持续表达的作用,并在注射部位持续缓慢释放抗原。临床试验中已经在使用经皮注射的编码肿瘤抗原mRNA-鱼精蛋白复合物。另一些以脂质为基础的聚合物,如Lipofectamine(invitrogen)或Mirus-Trans IT-mRNA可以在培养细胞条件下有效转染mRNA,但是这类转染试剂毒性较高。现有的核酸-阳离子脂质体结构多数由磷脂双分子层覆盖的。

目前仍然需要转染效率更高的、更安全有效的mRNA载体。脂质纳米粒(LNPs)由pH敏感的阳离子类脂和中性辅助磷脂,通过微流体混合方式,自组装成100-300nm大小的纳米颗粒结构。经静脉注射后LNP自发结合血液中的脂蛋白E,作为肝细胞的天然配体,靶向肝脏。然而,LNPs的制备需要一套昂贵的精密仪器,采用相对复杂的脂类配方,和相应的技能才能完成,更适合于较大批量的制备。对于研究机体对核酸抗原的免疫反应,以及核酸疫苗的开发,需要一种非常简单实用的方法,能够很容易地制备mRNA纳米复合物,能够在局部递送后介导有效的mRNA转染和蛋白质表达。适配体(Aptamer, Apt)是小的单链脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)(30-100nt)寡核苷酸,具有高度的选择性。Apt与药物载体结合,能够选择性靶向目标细胞,增强细胞内化,影响目标肝癌细胞的增殖,从而抑制肝癌细胞生长。为了克服现有技术的不足,本发明制备了一种新型的增强肿瘤光动力治疗效果的APFHG靶向纳米复合物,既克服了Gef和Hp水溶性差、副作用明显的缺陷,同时利用PAMAM表面修饰的氟碳链携带一定量的氧气改善了肿瘤微环境的低氧状态,增强PDT的治疗效果的同时改善肝癌细胞对于EGFR-TKIs的耐药性,并且通过Apt和Gef的双重靶向EGFR突变肿瘤细胞,提升了药物的生物利用度,充分发挥了分子靶向治疗和光动力治疗的协同疗效。

类脂质的合成已有广泛描述并且含有这些化合物的制剂特别适用于递送寡核苷酸或核酸(参见Mahon等人, Bioconjug Chem. 2010 21:1448-1454; Schroeder等人, JIntern Med. 2010 267:9-21; Akinc等人, Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Love等人, Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107:1864-1869; Siegwart等人, Proc Natl Acad Sci USA. 2011 108:12996-3001; 所述文献全部完整并入本文)。

尽管这些类脂质已经用来在啮齿类和非人灵长类中有效递送双链小干扰RNA分子(参见Akinc等人, Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Frank-Kamenetsky等, Proc Natl Acad Sci USA. 2008 105:11915-11920; Akinc等人, Mol Ther. 2009 17:872-879; Love等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869; Leuschner等人, NatBiotechnol. 2011 29:1005-1010; 所述文献全部完整并入本文),本公开描述了它们的配制(制剂)和在递送saRNA中的用途。可以制备含有这些类脂质的复合物、胶束、脂质体或粒子,并且因此,借助局限化和/或全身性施用途径注射类脂质制剂之后,它们可以导致saRNA的有效递送。saRNA的类脂质复合物可以通过各种手段施用,包括但不限于静脉内、肌内或皮下途径。

体内递送核酸可能受许多参数影响,包括但不限于制剂组成、粒子PEG化的性质、装载程度、寡核苷酸对脂质比和生物物理参数,但不限于粒度(Akinc等人, Mol Ther. 2009 17:872-879; 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。尤其是针对组合物中的不同saRNA, siRNA可能采取各自最优,或者对组合物效果最优的类脂质复合物类型。可以对具有不同类脂质的制剂测试体内活性,所述类脂质包括但不限于五[3-(1-月桂基氨基丙酰基)]-三乙烯四胺盐酸盐(TETA-5LAP; aka98N12-5, 参见Murugaiah等人, Analytical Biochemistry, 401:61(2010)), C12-200(包括衍生物和变体)和MD1。本发明的saRNA和siRNA的组合物还可以使用“C12-200”的类脂质作为递送系统,该类脂质由Love等人, Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107:1864-1869及Liu和Huang, Molecular Therapy. 2010 669-670公开; 所述两篇文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

类脂质制剂可以包含粒子,除本发明的saRNA和siRNA之外,所述粒子还包含3或4种或更多种组分。作为一个例子,具有某些类脂质的制剂包含但不限于98N12-5并且可以含有42%脂质、48%胆固醇和10%PEG(C14烷基链长度)。作为另一个例子,具有某些类脂质的制剂包括但不限于C12-200并且可以含有50%类脂质、10%二硬脂酰磷脂酰胆碱、38.5%胆固醇及1.5%PEG-DMG。在一个实施方案中,用类脂质配制以全身性静脉内施用的saRNA可以靶向肝脏。例如,一种使用saRNA并且所含脂质摩尔组成为42%98N12-5、48%胆固醇和10%PEG-脂质,最终重量比为约7.5比1的总脂质对

saRNA和在PEG脂质上的C14烷基链长度,平均粒度为大约50-60nm的最终优化型静脉内制剂,可以导致该制剂分布至肝脏超过90%(Akinc等人, Mol Ther. 2009 17:872-879; 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。在另一个例子中,一种使用C12-200(参见美国临时申请61/175,770和公开的国际申请WO2010129709,所述文献每篇的内容通过引用的方式完整并入本文)类脂质的静脉内制剂可以具有50/10/38.5/1.5的C12-200/二硬脂酰磷脂酰胆碱/胆固醇/PEG-DMG摩尔比,总脂质对核酸重量比为7:1且平均粒度80nm,可以有效递送saRNA(参见, Love等人, Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107:1864-1869, 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。在另一个实施方案中,含有MD1类脂质的制剂可以用来在体内有效递送saRNA、siRNA至肝细胞。用于肌内或皮下途径的优化类脂质制剂的特征可以根据靶细胞类型和制剂穿过胞外基质扩散进入血液的能力显著地增强。尽管小于150nm的粒度可以因适应内皮窗孔的大小而是有效肝细胞递送所需的(参见, Akinc等人, Mol Ther. 2009 17:872-879, 所述文献的内容通过引用方式并入本文),但是类脂质配制的saRNA将制剂递送至其他细胞类型(包括但不限于内皮细胞、髓样细胞和肌肉细胞)的用途可能类似地不受大小限制。已经报道使用类脂质制剂在体内递送siRNA至其他非肝细胞如髓样细胞和内皮细胞(参见Akinc等人, Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Leuschner等人, Nat Biotechnol. 2011 29:1005-1010; Cho等人 Adv. Funct. Mater. 2009 19:3112-3118; 8th International Judah Folkman Conference, Cambridge, MA October 8-9, 2010)。有效递送至髓样细胞如单核细胞,类脂质制剂可以具有相似的组分摩尔比。类脂质和其他组分(包括但不限于二硬脂酰磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-DMG)的不同比率可以用来优化saRNA的制剂以递送至不同的细胞类型,包括但不限于肝细胞、髓样细胞、肌肉细胞等。例如,组分摩尔比可以包括,但不限于50% C12-200、10%二硬脂酰磷脂酰胆碱、38.5%胆固醇和1.5% PEG-DMG(参见Leuschner等人, Nat Biotechnol. 2011 29:1005-1010; 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。脂质制剂通过皮下或肌内递送用于局部递送核酸至细胞(如,但不限于脂肪细胞和肌肉细胞)的用途可能不需要全身性递送所需的全部制剂组分,并且本身可以仅包含类脂质和saRNA。脂质体(liposome)、脂质-核酸复合物(lipoplex)和脂质纳米粒子可以使用一种或多种脂质体、脂质-核酸复合物或脂质纳米粒子,配制本发明的saRNA。在一个实施方案中,saRNA的药物组合物包含脂质体。脂质体基本由脂质双层组成并且可以用作递送载体以用于氧和药物制剂的施用。脂质体可以具有不同规格,但不限于其直径可以是数百纳米并且可以含有一系列由狭窄水质区室分隔的同心双层的多层小泡(MLV);其直径可以小于50nm的小单膜小泡(SUV),和其直径可以在50和500nm之间的大单层小泡(LUV)。脂质体设计可以包含但不限于调理素(opsonin)或配体,以改善脂质体与不健康组织结合或以激活诸如但不限于内吞的事件。脂质体可以含有低pH或高pH,以改善药物制剂递送。

脂质体的形成可以取决于多种物理化学特征,如,但不限于包埋的药物制剂和脂质体成分,其中分散有脂质小泡的介质的性质,所包埋物质的有效浓度和其潜在毒性,在施加和/或递送小泡期间涉及的任何额外过程,优化规格,用于预期应用的小泡的多分散性和保质期,以及批次间重现性和大规模生产安全和高效脂质体产品的可能性。

在一个实施方案中,本文所述的药物组合物可以包含而限于多种脂质体,如从1,2-二油基氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DODMA)脂质体、来自Marina Biotech(Bothell, WA)的DiLa2脂质体、1,2-二亚油基-3-二甲氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)和MC3(US20100324120)形成的那些脂质体,以及可以递送小分子药物的脂质体。

在一个实施方案中,本文所述的药物组合物可以包含而限于多种脂质体,如从合成先前已经描述并显示适用于体外和体内递送寡核苷酸的稳定化质粒-脂质粒子(SPLP)或稳定化核酸脂质粒子(SNALP)中形成的脂质体(参见 Wheeler等人, Gene Therapy. 1999 6:271-281; Zhang等人, Gene Therapy. 1999:1438-1447; Jeffs等人, PharmRes. 2005 22:362-372; Morrissey等人, Nat Biotechnol. 2005 2:1002-1007; Zimmermann等人, Nature. 2006 441:111-114; Heyes等人, J Contr Rel. 2005 107:276-287; Semple等人, Nature Biotech. 2010 28:172-176; Judge等人, J Clin Invest. 2009 119:661-673; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132)。脂质体制剂可以由除saRNA之外的3至4种脂质组分组成。作为一个例子,脂质体可以含有但不限于55%胆固醇、20%二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、10%PEG-SDSG和15%1,2-二油基氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DODMA),如Jeffs等人所描述。在另一个例子中,某些脂质体制剂可以含有但不限于48%胆固醇、20%DSPC、2%PEG-c-DMA和30%阳离子脂质,其中阳离子脂质可以是1,2-二硬脂酰氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DSDMA)、DODMA、DLin-DMA或1,2-二亚麻基氧基-3-二甲氨基丙烷(DLenDMA),如Heyes等人所描述。在另一个例子中,核酸-脂质粒子可以包含阳离子脂质,其占粒子中存在的总脂质约50mol%至约85mol%;非阳离子脂质,其占粒子中存在的总脂质约13mol%至约49.5mol%;和抑制粒子聚集的共轭脂质,其占粒子中存在的总脂质约0.5mol%至约2mol%,如专利WO 2009127060中所述,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。在另一个例子中,核酸-脂质粒子可以在US2006008910中公开的任何核酸-脂质粒子,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。作为一个非限制性例子,核酸-脂质粒子可以包含式I的阳离子脂质、非阳离子脂质和抑制粒子聚集的共轭脂质。

在一个实施方案中,saRNA或siRNA可以在脂质小泡中配制,所述脂质小泡可以在官能化脂质双层之间具有交联。

在一个实施方案中,脂质体可以含有US595756中公开的糖修饰的脂质,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。脂质可以是量约10mol%的神经节苷脂和脑苷脂。

在一个实施方案中, saRNA或siRNA可以在包含阳离子脂质的脂质体中配制。脂质体可以具有阳离子脂质中氮原子对saRNA中磷酸酯的1:1和20:1之间的摩尔比(N:P比率), 如国际公开号WO2013006825中所述, 所述文献的内容通过引用方式完整并入本文。在另一个实施方案中, 脂质体可以具有大于20:1或小于1:1的N:P比率。

在一个实施方案中, saRNA或siRNA可以配制在脂质-聚阳离子复合物中。脂质-聚阳离子复合物的形成可以通过本领域已知的方法和/或如美国公开号US0120178702中所述那样实现。作为一个非限制性例子, 聚阳离子可以包括阳离子肽或多肽如, 但不限于, 在国际公开号WO2012013326中描述的聚赖氨酸、聚鸟氨酸和/或聚精氨酸以及阳离子肽。在一个实施方案中, saRNA可以在脂质-聚阳离子复合物中配制, 所述脂质-聚阳离子复合物还可以包含中性脂质, 如, 但不限于胆固醇或二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

可以通过但不限于阳离子脂质组分的选择、阳离子脂质饱和度、PEG化的性质、全部组分的比率和生物物理参数如大小, 影响脂质体制剂。在文献(Semple等人, Nature Biotech. 2010 28:172-176)的一个例子中, 脂质体制剂由57.1%阳离子脂质、7.1%二棕榈酰磷脂酰胆碱、34.3%胆固醇和1.4%PEG-c-DMA组成。

在一些实施方案中, 可以增加或减少脂质纳米粒子(LNP)制剂中PEG的比率和/或可以调整PEG脂质的碳链长度从C14至C18, 以改变LNP制剂的药代动力学和/或生物分布。作为一个非限制性例子, LNP制剂可以含有与阳离子脂质相比1-5%脂质摩尔比的PEG-c-DMG、DSPC和胆固醇。在另一个实施方案中, 可以将PEG-c-DMG替换为PEG脂质, 例如但不限于PEG-DSG(1,2-二硬脂酰-sn-甘油, 甲氧基聚乙二醇)或PEG-DPG(1,2-二棕榈酰-sn-甘油, 甲氧基聚乙二醇)。阳离子脂质可以选自本领域已知的任何脂质, 如, 但不限于DLin-MC3-DMA、DLin-DMA、C12-200和DLin-KC2-DMA。

在一个实施方案中, saRNA或siRNA可以在脂质纳米粒子(如在国际公开号WO 2012170930中描述的脂质纳米粒子)中配制。

在一个实施方案中, 可以在本发明制剂中使用的阳离子脂质可以选自, 但不限于在以下文献中描述的阳离子脂质: 国际公开号WO2012040184、WO2011153120、WO2011149733、WO2011090965、WO2011043913、WO2011022460、WO2012061259、WO2012054365、WO2012044638、WO2010080724、WO201021865和WO2008103276, 美国专利号7, 893, 302, 7, 404, 969和8, 283, 333和美国专利公开号US20100036115和US20120202871。在另一个实施方案中, 阳离子脂质可以选自, 但不限于在国际公开号WO2012040184、WO2011153120、WO2011149733、WO2011090965、WO2011043913、WO2011022460、WO2012061259、WO2012054365 and WO2012044638中描述的式A。在又一个实施方案中, 阳离子脂质可以选自, 但不限于国际公开号WO2008103276的式CLI-CLXXIX、美国专利号7, 893, 302的式CLI-CLXXIX、美国专利号7, 404, 969的式CLI-CLXXXII和美国专利公开号US20100036115的式I-VI。在又一个实施方案中, 阳离子脂质可以是多价阳离子脂质如在Gaucheron等人的美国专利号7223887中公开的阳离子脂质, 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。阳离子脂质可以具有包含两个季胺基团的带正电荷的头基团和包含四条烃链的疏水性部分, 如美国专利号7223887中所述, 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。在又一个实施方案中, 阳离子脂质可以是生物可降解。阳离子脂质可以具有位于阳离子脂质的脂质部分的一个或多个生物可降解基团, 如US20130195920的式I-IV中所述, 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。作为一个非限制性例子, 阳离子脂质可以选自(20Z, 23Z)-N, N-二甲基二十九碳-20,23-二烯-10-胺、(17Z, 20Z)-N, N-二甲基二十六碳-17, 20-二烯-9-胺、(1Z, 19Z)-N5N-二甲基二十五碳-16, 19-二烯-8-胺、(13Z, 16Z)-N, N-二甲基二十二碳-13, 16-二烯-5-胺、(12Z, 15Z)-N, N-二甲基二十一碳-12, 15-二烯-4-胺、(14Z, 17Z)-N, N-二甲基二十三碳-14, 17-二烯-6-胺、(15Z, 18Z)-N, N-二甲基二十四碳-15, 18-二烯-7-胺、(18Z, 21Z)-N, N-二甲基二十七碳-18, 21-二烯-10-胺、(15Z, 18Z)-N, N-二甲基二十四碳-15, 18-二烯-5-胺、(14Z, 17Z)-N, N-二甲基二十三碳-14, 17-二烯-4-胺、(19Z, 22Z)-N, N-二甲基二十八碳-19, 22-二烯-9-胺、(18Z, 21Z)-N, N-二甲基二十七碳-18, 21-二烯-8-胺、(17Z, 20Z)-N, N-二甲基二十六碳-17, 20-二烯-7-胺、(16Z, 19Z)-N, N-二甲基二十五碳-16, 19-二烯-6-胺、(22Z, 25Z)-N, N-二甲基三十七碳-22, 25-二烯-10-胺、(21Z, 24Z)-N, N-二甲基三十碳-21, 24-二烯-9-胺、(18Z)-N, N-二甲基二十七碳-18-烯-10-胺、(17Z)-N, N-二甲基二十六碳-17-烯-9-胺、(19Z, 22Z)-N, N-二甲基二十八碳-19, 22-二烯-7-胺、N, N-二甲基二十七碳-10-胺、(20Z, 23Z)-N-乙基-N-甲基二十九碳-20, 23-二烯-10-胺、1-[(11Z, 14Z)-1-壬基二十碳-11, 14-二烯-1-基]吡咯烷、(20Z)-N, N-二甲基二十七碳-20-烯-10-胺、(15Z)-N, N-二甲基二十七碳-15-烯-10-胺、(14Z)-N, N-二甲基二十九碳-14-烯-10-胺、(17Z)-N, N-二甲基二十九碳-17-烯-10-胺、(24Z)-N, N-二甲基三十三碳-24-烯-10-胺、(20Z)-N, N-二甲基二十九碳-20-烯-10-胺、(22Z)-N, N-二甲基三十六碳-22-烯-10-胺、(16Z)-N, N-二甲基二十五碳-16-烯-8-胺、(12Z, 15Z)-N, N-二甲基-2-壬基二十一碳-12, 15-二烯-1-胺、(13Z, 16Z)-N, N-二甲基-3-壬基二十二碳-13, 16-二烯-1-胺、N, N-二甲基-1-[(1S, 2R)-2-辛基环丙基]十七碳-8-胺、1-[(1S, 2R)-2-己基环丙基]-N, N-二甲基十九碳-10-胺、N, N-二甲基-1-[(1S, 2R)-2-辛基环丙基]十九碳-10-胺、N, N-二甲基-21-[(1S, 2R)-2-辛基环丙基]二十一碳-10-胺、N, N-二甲基-1-[(1S, 2S)-2-[(1R, 2R)-2-戊基环丙基]甲基]环丙基]十九碳-10-胺、N, N-二甲基-1-[(1S, 2R)-2-辛基环丙基]十六碳-8-胺、N, N-二甲基H-[(1R, 2S)-2-十一基环丙基]十四碳-5-胺、N, N-二甲基-3-{7-[(1S, 2R)-2-辛基环丙基]庚基}十二碳-1-胺、1-[(1R, 2S)-2-庚基环丙基]-N, N-二甲基十八碳-9-胺、1-[(1S, 2R)-2-癸基环丙基]-N, N-二甲基十五碳-6-胺、N, N-二甲基-1-[(1S, 2R)-2-辛基环丙基]十五碳-8-胺、R-N, N-二甲基-1-[(9Z, 12Z)-十八碳-9, 12-二烯-1-基氧]-3-(辛氧

基)丙-2-胺、S-N,N-二甲基-1-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧]-3-(辛氧基)丙-2-胺、1-{2-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧]-1-[(辛氧基)甲基]乙基}吡咯烷、(2S)-N,N-二甲基-1-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧]-3-[(5Z)-辛-5-烯-1-基氧]丙-2-胺、1-{2-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧]-1-[(辛氧基)甲基]乙基}吡啶、(2S)-1-(己氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧]丙-2-胺、(2S)-1-(庚氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧]丙-2-胺、N,N-二甲基-1-(壬氧基)-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧]丙-2-胺、N,N-二甲基-1-[(9Z)-十八碳-9-烯-1-基氧]-3-(辛氧基)丙-2-胺；(2S)-N,N-二甲基-1-[(6Z,9Z,12Z)-十八碳-6,9,12-三烯-1-基氧]-3-(辛氧基)丙-2-胺、(2S)-1-[(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯-1-基氧]-N,N-二甲基-3-(戊氧基)丙-2-胺、(2S)-1-(己氧基)-3-[(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯-1-基氧]-N,N-二甲基丙-2-胺、1-[(11Z,14Z)-二十碳-11,14-二烯-1-基氧]-N,N-二甲基-3-(辛氧基)丙-2-胺、1-[(13Z,16Z)-二十二碳-13,16-二烯-1-基氧]-N,N-二甲基-3-(辛氧基)丙-2-胺、(2S)-1-[(13Z,16Z)-二十二碳-13,16-二烯-1-基氧]-3-(己氧基)-N,N-二甲基丙-2-胺、(2S)-1-[(13Z)-二十二碳-13-烯-1-基氧]-3-(己氧基)-N,N-二甲基丙-2-胺、1-[(13Z)-二十二碳-13-烯-1-基氧]-N,N-二甲基-3-(辛氧基)丙-2-胺、1-[(9Z)-十六碳-9-烯-1-基氧]-N,N-二甲基-3-(辛氧基)丙-2-胺、(2R)-N,N-二甲基-H(1-甲基辛基)氧]-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧]丙-2-胺、(2R)-1-[(3,7-二甲基辛基)氧]-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧]丙-2-胺、N,N-二甲基-1-(辛氧基)-3-({8-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-戊基环丙基]甲基]环丙基}辛基)氧)丙-2-胺、N,N-二甲基-1-{{8-(2-辛基环丙基)辛基}氧}-3-(辛氧基)丙-2-胺和(11E,20Z,23Z)-N,N-二甲基二十九碳-11,20,2-三烯-10-胺或其可药用盐或立体异构体。

在一个实施方案中，脂质可以是可切割脂质，如国际公开号WO2012170889中描述的那些，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

在一个实施方案中，本文所述的纳米粒子可以包含本文所述的和/或本领域已知的至少一种阳离子聚合物。

在一个实施方案中，阳离子脂质可以通过本领域已知和/或如国际公开号WO2012040184、WO2011153120、WO2011149733、WO2011090965、WO2011043913、WO2011022460、WO2012061259、WO2012054365、WO2012044638、WO2010080724和WO201021865中所述的方法合成；所述文献每篇的内容通过引用的方式完整并入本文。

在一个实施方案中，saRNA或siRNA的LNP制剂可以按3%脂质摩尔比含有PEG-c-DOMG。在另一个实施方案中，saRNA的LNP制剂可以按1.5%脂质摩尔比含有PEG-c-DOMG。

在一个实施方案中，saRNA或siRNA的药物组合物可以包含至少一种在国际公开号2012099755中描述的聚乙二醇化脂质，所述文献的内容通过引用方式完整并入本文。在一个实施方案中，LNP制剂可以含有PEG-DMG2000(1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油酰-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000])。在一个实施方案中，LNP制剂可以含有PEG-DMG2000、本领域已知的一种阳离子脂质和至少一个其他组分。在另一个实施方案中，LNP制剂可以含有PEG-DMG2000、本领域已知的一种阳离子脂质、DSPC和胆固醇。作为一个非限制性例子，LNP制剂可以含有PEG-DMG2000、DLin-DMA、DSPC和胆固醇。作为另一个非限制性例子，LNP制剂可以含有摩尔比2:40:10:48的PEG-DMG 2000、DLin-DMA、DSPC和胆固醇(参见例如Geall等人，Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines, PNAS 2012 PMID:22908294；所述文献通过引用方式完整并入本文)。作为另一个非限制性例子，本文所述的saRNA可以在纳米粒子中配制以通过肠胃外途径递送，如美国公开号20120207845中所述，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。阳离子脂质也可以是在US20130156845、US20130129785、WO2012047656、WO2010144740、WO2013086322或WO2012016184中公开的阳离子脂质，所述每篇文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

在一个实施方案中，本发明的saRNA或siRNA可以用多个阳离子脂质配制，如US20130017223中所述的第一和第二阳离子脂质，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。第一阳离子脂质可以基于第一特性选择，第二阳离子脂质可以基于第二特性选择，其中可以如US20130017223中所概述那样确定所述特性，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。在一个实施方案中，第一和第二特性是互补的。

在另一个实施方案中，saRNA或siRNA可以用包含一种或多种阳离子脂质和一种或多种第二脂质的脂质粒子以及一种或多种核酸配制，其中脂质粒子包含实心，如Cullis等人的美国专利公开号US20120276209中所述，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

在一个实施方案中，本发明的saRNA或siRNA可以在水包油(o/w)乳液中与阳离子性两亲分子复合，如EP2298358中描述，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。阳离子性两亲分子可以是阳离子脂质、修饰或未修饰的精胺、布比卡因或苯扎氯铵，并且油可以是植物油或动物油。作为一个非限制性例子，至少10%的核酸-阳离子性两亲分子复合物处于水包油乳液的油相(参见例如，在欧洲公开号EP2298358中描述的复合物，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。

在一个实施方案中，本发明的saRNA组合物可以用包含阳离子性化合物和中性脂质的混合物的组合物配制。作为一个非限制性例子，阳离子性化合物可以是WO1999010390中公开的式(I)，所述文献的内容通过应用的方式在本文中完整公开，并且中性脂质可以选自二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺和鞘磷脂。

在一个实施方案中，LNP制剂可以由国际公开号WO2011127255或WO2008103276中描述的方法配制，所述文献的

每篇通过引用的方式完整并入本文。作为一个非限制性例子，本发明的saRNA可以包封于如WO2011127255和/或WO2008103276中所述的任意脂质纳米粒子(LNP)制剂中；所述文献每篇的内容通过引用的方式完整地并入本文。在一个实施方案中，本文所述的LNP制剂可以包含聚阳离子组合物。作为一个非限制性例子，聚阳离子组合物可以选自美国专利公开号US20050222064的式1-60；所述文献的内容通过引用的方式完整地并入本文。在另一个实施方案中，包含

5 聚阳离子组合物的LNP制剂可以用于体内和/或体外递送本文所述的saRNA。

在一个实施方案中，本文所述的LNP制剂可以另外包含渗透促进分子。非限制的渗透促进分子在美国专利公开号US20050222064中描述。

10 在一个实施方案中，药物组合物可以配制在脂质体中，所述脂质体例如是但不限于DiLa2脂质体(Marina Biotech, Bothell, WA)、NOV340(Marina Biotech, Bothell, WA)、基于中性DOPC(1, 2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱)的脂质体(例如，用于卵巢癌的siRNA递送(Landen等人, Cancer Biology&Therapy 2006 5(12)1708-1713)和透明质糖包覆的脂质体(Quiet Therapeutics, Israel)。在一些实施方案中，药物组合物可以用WO2008/043575和US8580297中公开的任何两性脂质体制剂，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。两性脂质体可以包含脂质混合物，所述的脂质包含阳离子性两性分子、阴离子性两性分子和任选一种或多种中性两性分子。两性脂质体可以包含基于两性分子的两性化合物，其头基团替换为一个或多个两性基团。在一些实施方案中，药物组合物可以用包含等电点在具有4和9之间的一个或多个两性基团的两性脂质配制，如US20140227345中公开。

15 纳米粒子制剂可以是包含碳水化合物载体和核酸分子(例如，saRNA或siRNA)的碳水化合物纳米粒子。作为一个非限制性例子，碳水化合物载体可以包括，但不限于酰修饰的植物糖原或糖原型材料、植物糖原琥珀酸辛烯酯、植物糖原β-糊精、酰修饰的植物糖原β-糊精。

20 可以通过将阳离子脂质替换为称作快速消除性脂质纳米粒子(reLNP)的生物可降解阳离子脂质，改进脂质纳米粒子制剂。可电离阳离子脂质，如，但不限于DLinDMA、DLinKC2-DMA和DLin-MC3-DMA，已经显示随时间推移蓄积在血浆和组织中，并且可能是毒性的潜在来源。快速消除性脂质的快速代谢可以改善脂质纳米粒子在大鼠中的耐受性和治疗指数从1mg/kg剂量至10mg/kg剂量的数量级。纳入酶促降解的酯键可以改善阳离子组分的降解和代谢特征，同时仍然维持reLNP制剂的活性。酯键可以内在地位于脂质链内部或它可以末端地位于脂质链的终端末端处。内部酯键可以替换脂质链中的任何碳。

25 在一个实施方案中，将saRNA或siRNA配制为脂质-核酸复合物，如，而但不限于，来自Silence Therapeutics(伦敦，英国)的ATUPLEXTM系统、DACC系统、DBTC系统和其他siRNA-脂质体DNA复合物技术，来自(Cambridge, MA)的STEMFECTTM和基于聚乙烯亚胺(PEI)或鱼精蛋白的定向和非定向核酸递送。在一个实施方案中，也可以构建这类制剂或改变组合物，从而它们被动或主动地在体内指向不同细胞类型，包括但不限于肝细胞、免疫细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、抗原呈递细胞和白细胞。

30 一个实施方案中，将saRNA或siRNA配制为固态脂质纳米粒子。固态脂质纳米粒子(SLN)可以为球状，平均直径在10至1000nm之间。SLN拥有可以溶解亲脂分子并可以用表面活性剂和/或乳化剂稳定化的固态脂质核心基质。在又一个实施方案中，脂质纳米粒子可以是自装配脂质-聚合物纳米粒子(参见Zhang等人, ACS Nano, 2008, 2(8) 1696-1702)。

35 在一个实施方案中，可以配制本发明的saRNA或siRNA用于控释和/或定向递送。如本文所用，“控释”指符合特定释放模式以实现治疗结果的药物组合物或化合物释放特征。在一个实施方案中，saRNA或siRNA可以包封入本文所述和/或本领域已知的递送剂中以便控释和/或定向递送。如本文所用，术语“包封”意指围绕、包围或包裹。在它涉及本发明化合物的制剂时，包封可以是基本上的、完整的或部分的。术语“基本上包封”意指至少大于50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.9%或大于99.999%的包封。

40 本发明药物组合物或化合物可以封闭、包围或包裹在递送剂内部。“部分包封”意指小于10%、10%、20%、30%、40%、50%或更少的本发明药物组合物或化合物可以封闭、包围或包裹在递送剂内部。有利地，可以通过使用荧光和/或电子显微照片测量本发明药物组合物或化合物的逃逸或活性，测定包封。例如，至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或大99.99%的本发明药物组合物或化合物被包封在递送剂中。

45 在另一个实施方案中，saRNA或siRNA可以包封入脂质纳米粒子或快速消除的脂质纳米粒子中，并且脂质纳米粒子或快速消除的脂质纳米粒子随后可以包封入本文所述的和/或本领域已知的聚合物、水凝胶和/或手术密封剂中。作为一个非限制性例子，聚合物、水凝胶或外科密封剂(surgical sealant)可以是PLGA、乙烯醋酸乙烯酯(EVAc)、泊洛沙姆、(Nano therapeutics, Inc. Alachua, FL)、(Halozyme Therapeutics, San Diego CA)、外科密封剂如纤维蛋白原聚合物(Ethicon Inc. Cornelia, GA)、(Baxter International, Inc Deerfield, IL)、基于PEG的密封剂和(Baxter International, Inc Deerfield, IL)。

在另一个实施方案中，脂质纳米粒子可以包封到本领域已知的可以在注入受试者时形成凝胶的任何聚合物中。作为另一个非限制性例子，脂质纳米粒子可以包封入可以呈生物可降解的聚合物基质中。

50 在一个实施方案中，用于控释和/或定向递送的saRNA或siRNA制剂还可以包含至少一种控释涂覆剂。控释涂覆剂

包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物, 聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、EUDRAGIT EUDRAGIT和纤维素衍生物如乙基纤维素含水分散体。

在一个实施方案中, 控释和/或靶向递送制剂可以包含至少一种可以含有聚阳离子侧链的可降解聚酯。可降解聚酯包括但不限于聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟-L-脯氨酸酯)及其组合。在另一个实施方案中, 可降解聚酯可以包含PEG缀合以形成聚乙二醇化聚合物在一个实施方案中, 本发明的saRNA或siRNA可以用具有导引(靶向)部分如US20130202652中公开的导引部分的导引脂质配制。作为一个非限制性例子, 可以选择US20130202652的式I导引部分, 旨在有利于脂质定位于所需的器官、组织、细胞、细胞类型或亚型或细胞器。本发明中包括的非限制性导引部分包括转铁蛋白、茴香酰胺、RGD肽、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、岩藻糖、抗体或适配体。

在一个实施方案中, 本发明的saRNA或siRNA可以包封在治疗性纳米粒子中。治疗性纳米粒子可以通过本文所述的本领域已知的方法配制, 如, 但不限于国际公开号WO2010005740、WO2010030763、WO2010005721、WO2010005723、WO2012054923、美国公开号US20110262491、US20100104645、US20100087337、US20100068285、US20110274759、US20100068286和US20120288541和美国专利号8, 206, 747, 8, 293, 276, 8, 318, 208和8, 318, 211; 所述文献每篇的内容通过引用的方式完整并入本文。在另一个实施方案中, 治疗性聚合物纳米粒子可以通过美国公开号US20120140790中描述的方法鉴定, 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

在一个实施方案中, 可以配制治疗性纳米粒子用于缓释。如本文所用, “缓释”指在特定时间段范围内符合释放速率的药物组合物或化合物。时间段可以包括, 但不限于数小时、数天、数周、数月 and 数年。作为一个非限制性例子, 缓释纳米粒子可以包含聚合物和治疗药, 如, 但不限于本发明的saRNA (参见国际公开号2010075072和美国公开号US20100216804、US20110217377和US20120201859, 所述文献的每一篇通过引用的方式完整并入本文)。

在一个实施方案中, 可以配制治疗性纳米粒子以具有靶特异性。作为一个非限制性例子, 治疗性纳米粒子可以包含皮质类固醇(参见国际公开号WO2011084518; 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。在一个实施方案中, 可以配制治疗性纳米粒子以具有癌特异性。作为一个非限制性例子, 治疗性纳米粒子可以配制在国际公开号WO2008121949、WO2010005726、WO2010005725, WO2011084521和美国公开号US20100069426、US20120004293和US20100104655中描述的纳米粒子中, 所述文献每篇的内容通过引用的方式完整并入本文。

在一个实施方案中, 本发明的纳米粒子可以包含聚合物基质。作为非限制性例子, 纳米粒子可以包含两种或更多种聚合物, 如但不限于聚乙烯、聚碳酸酯、聚酞、聚羟酸、聚富马酸丙酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚(原酸酯)、聚氨基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氨基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、多胺、聚赖氨酸、聚(乙烯亚胺)、聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟-L-脯氨酸酯)或其组合。

在一个实施方案中, 治疗性纳米粒子包含双嵌段共聚物。在一个实施方案中, 双嵌段共聚物可以包含与以下聚合物组合的PEG, 如但不限于聚乙烯、聚碳酸酯、聚酞、聚羟酸、聚富马酸丙酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚(原酸酯)、聚氨基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氨基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、多胺、聚赖氨酸、聚(乙烯亚胺)、聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟-L-脯氨酸酯)或其组合。

作为一个非限制性例子, 治疗性纳米粒子包含PLGA-PEG嵌段共聚物(参见美国公开号US20120004293和美国专利号8, 236, 330, 所述文献每篇通过引用的方式完整并入本文)。在另一个非限制性例子中, 治疗性纳米粒子是包含PEG和PLA或PEG和PLGA的双嵌段共聚物的隐形纳米粒子(参见美国专利号8, 246, 968和国际公开号WO2012166923, 所述文献每篇的内容通过引用方式并入完整并入本文)。

在一个实施方案中, 治疗性纳米粒子可以包含多嵌段共聚物, 如, 但不限于美国专利号8, 263, 665和8, 287, 910中描述的多嵌段共聚物; 所述文献每篇的内容通过引用方式并入完整并入本文。

在一个实施方案中, 本文所述的嵌段共聚物可以包含于含有非聚合物胶束和嵌段共聚物的多价离子复合物中。(参见例如, 美国公开号20120076836; 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。

在一个实施方案中, 治疗性纳米粒子可以包含至少一种丙烯酸聚合物。丙烯酸聚合物包括但不限于丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧乙酯、甲基丙烯酸氰乙酯、氨基烷基甲基丙烯酸酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、聚氨基丙烯酸酯及其组合。

在一个实施方案中, 治疗性纳米粒子可以包含至少一种含胺聚合物, 如, 但不限于聚赖氨酸, 聚乙烯亚胺, 聚(酰氨基胺)树状物, 聚(β-氨基酯)(参见例如, 美国专利号8, 287, 849; 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)及其组合。

在一个实施方案中, 治疗性纳米粒子可以包含至少一种可含有聚阳离子侧链的可降解聚酯。可降解聚酯包括但不限于聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟-L-脯氨酸酯)及其组合。在另一个实施方案中, 可降解聚酯可以包含PEG缀合以形成聚乙二醇化聚合物。

在另一个实施方案中, 治疗性纳米粒子可以包括至少一种导引配体的缀合。导引配体可以是本领域已知的任何配

体,如,但不限于单克隆抗体。(Kirpotin等人, *CancerRes.* 2006 66:6732-6740; 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。

在一个实施方案中, saRNA或siRNA可以包封于合成性纳米载体中、与之连接和/或缔合,可以使用本领域已知的方法和/或本文所述的方法配制合成性纳米载体。作为一个非限制性例子,合成性纳米载体可以通过国际公开号 WO2010005740、WO2010030763和WO201213501以及美国公开号US20110262491、US20100104645、US20100087337和US2012024422中描述的方法配制。

在一个实施方案中,可以配制合成性纳米载体用于定向释放。在一个实施方案中,可以配制合成性纳米载体以在指定的pH和/或在所需的时间区间后释放saRNA或siRNA。作为一个非限制性例子,可以配制合成性纳米粒子以在24小时后和/或在pH 4.5释放saRNA(参见国际公开号WO2010138193和WO2010138194和美国公开号US20110020388和US20110027217)。

在一个实施方案中,可以配制合成性纳米载体用于控释和/或缓释本文所述的saRNA或siRNA。作为一个非限制性例子,用于缓释的合成性纳米载体可以通过本领域已知、本文所述和/或如国际公开号WO2010138192和美国公开号20100303850中所述的方法配制。

在一个实施方案中,本发明的saRNA或siRNA可以包封在脂质制剂中,以形成如Fougerolles等人的US8546554中描述的稳定核酸-脂质粒子(SNALP)。脂质可以是阳离子的或非阳离子的。在一个非限制性例子中,脂质对核酸比率(质量/质量比)(例如,脂质对saRNA比率)将处于约1:1至约50:1、约1:1至约25:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1、或约6:1至约9:1、或5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1或11:1的范围内。在另一个例子中,SNALP包含40%的2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(脂质A)、10%的二油酰磷脂酰胆碱(DSPC)、40%的胆固醇、10%聚乙二醇(PEG)-C-DOMG(mol%),粒度为63.0±20nm并且核酸/脂质比为0.027。在另一个实施方案中,本发明的saRNA或siRNA可以用包含如Lam等人的US7189705中公开的内体膜去稳定化物的核酸-脂质粒子配制,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。作为一个非限制性例子,内体膜去稳定化物可以是Ca<sup>2+</sup>离子。

在一个实施方案中,可以使用脂质制剂中包含表达载体的组合物,递送本发明的saRNA或siRNA至细胞,如Tam等人的US6086913中所述。Tam公开的组合物是血清稳定的并且包含表达载体,所述表达载体包含来自腺联病毒(AAV)的第一和第二反向重复序列、来自AAV的rep基因和核酸片段。Tam中的表达载体与脂质复合。

在一个实施方案中,本发明的saRNA或siRNA可以用de Fougerolles等人的US20120270921中公开的脂质制剂配制,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。在一个非限制性例子中,脂质制剂可以包括具有在US20120270921中所述的式A的阳离子脂质,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。在另一个非限制性例子中,US20120270921的表A中公开的示例性核酸-脂质粒子的组合物可以随本发明的saRNA一起使用。

在一个实施方案中,本发明的saRNA或siRNA可以完全包封在Maurer等人的US20120276207中公开的脂质粒子中,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。这些粒子可以包含具有预先形成的脂质小泡的脂质组合物、带电荷的治疗剂和去稳定剂,以形成预先形成的小泡和治疗剂在去稳定化溶剂中的混合物,其中所述去稳定化溶剂在不破坏小泡的情况下有效地使预先形成的脂质小泡的膜去稳定化。

在一个实施方案中,本发明的saRNA或siRNA可以用共轭(conjugated)脂质配制。在非限制性例子中,共轭脂质可以具有如Lin等人的US20120264810中描述的式,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。共轭脂质可以形成脂质粒子,其还包含阳离子脂质、中性脂质和能够减少聚集的脂质的。

在一个实施方案中,本发明的saRNA或siRNA可以在Fitzgerald等人的US20120244207中公开的中性脂质体制剂中配制,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。短语“中性脂质体制剂”指在生理pH具有近中性或中性表面电荷的脂质体制剂。生理pH可以例如是约7.0至约7.5,或例如是约7.5,或例如是7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5,或例如是7.3,或例如是7.4。中性脂质体制剂的例子是可解离的脂质纳米粒子(iLNP)。中性脂质体制剂可以包含可电离的阳离子脂质,例如,DLin-KC2-DMA。

在一个实施方案中,本发明的saRNA或siRNA可以用带电荷的脂质或氨基脂质配制。如本文所用,术语“带电荷的脂质”意在包括那些具有一个或两个脂酰基或脂肪烷基链和一个季铵头基的脂质。季铵携带永久性正电荷。头基团可以任选地包括可电离基团,如可以在生理pH质子化的伯胺、仲胺或叔胺。季铵的存在可以相对于缺少季铵的结构相似的化合物中基团的pKa而改变可电离基团的pKa(例如,用叔胺替换季铵)。在一些实施方案中,带电荷的脂质称作“氨基脂质”。在非限制性例子中,氨基脂质可以是Hope等人的US20110256175中描述的氨基脂质,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。例如,氨基脂质可以具有在Hope等人的US20110256175中公开的作为结构(II)、DLin-K-C2-DMA、DLin-K2-DMA、DLin-K6-DMA公开的结构,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。在另一个例子中,氨基脂质可以具有如Muthiah等人的WO2009132131中所述的结构(I)、(II)、(III)或(IV)或4-(R)-DUn-K-DMA(VI)、4-(S)-DUn-K-DMA(V),所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。在另一个例子中,在本文所述的任何制剂中使用的带电荷脂质可以是Manoharan等人的EP2509636中描述的任何带电荷脂质,所述文献的内容通过引用的方式完整并

入本文。

在一个实施方案中，本发明saRNA或siRNA可以用含有脂质、脂质体或脂质-核酸复合物(lipoplexe)的缔合复合物配制。在非限制性例子中，缔合复合物包含一种或多种各自具有式(I)限定的结构的化合物、具有式(XV)限定的结构的PEG-脂质、Manoharan等人的US8034376中公开的类固醇和核酸，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。saRNA

5 可以用US8034376中描述的任何缔合复合物配制。

在一个实施方案中，本发明的saRNA或siRNA可以用反向头基脂质配制。作为一个非限制性例子，saRNA或siRNA可以用包含头基的两性离子脂质配制，其中正电荷是位于酰基链区域附近并且负电荷位于头基的远端，如具有Leung等人的WO2011056682中描述的结构(A)或结构(I)的脂质，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

10 在一个实施方案中，本发明的saRNA或siRNA可以配制在脂质双层载体中。作为一个非限制性例子，saRNA可以与脂质-去垢剂混合物组合，所述脂质-去垢剂混合物含量为约5mol%至约20mol%的防聚集剂、量为约0.5mol%至约50mol%的阳离子脂质和融合脂质和去垢剂的脂质混合物，以提供核酸-脂质-去垢剂混合物；并且随后用缓冲的盐溶液透析所述核酸-脂质-去垢剂混合物以移除所述去垢剂，并在脂质双层载体中包封所述核酸，以及提供脂质双层-核酸组合物，其中所述缓冲的盐溶液具有足以包封约40%至约80%的所述核酸的离子强度，如Cullis等人的WO1999018933中描述。

15 在一个实施方案中，本发明的saRNA或siRNA可以配制在能够选择性导引saRNA至心脏、肝脏或肿瘤组织部位的核酸-脂质粒子中。例如，核酸-脂质粒子可以包含(a)核酸；(b)1.0mol%至45mol%的阳离子脂质；(c)0.0mol%至90mol%的另一种脂质；(d)1.0mol%至10mol%的双层稳定组分；(e)0.0mol%至60mol%的胆固醇；和(f)0.0mol%至10mol%的阳离子聚合物脂质，如Cullis等人的EP1328254中所述。Cullis教授，变动所述阳离子脂质、双层稳定组分、另一种脂质、胆固醇和阳离子聚合物脂质中每一种的量可以赋予针对心脏、肝脏或肿瘤组织部位的组织选择性，从而鉴别能够选择性

20 导引核酸至心脏、肝脏或肿瘤组织部位的核酸-脂质粒子。

PAMAM树状大分子有强大的包容空间和大量的末端功能团，可以与许多药物作用，从而作为一种递送系统，降低药物的不良反应，提高治疗指数。PAMAM树状大分子作为基因载体通过其所带的阳离子和DNA所带的阴离子的静电相互作用，不但可以运载更多数量的基因而且体系稳定，转染效率高。运载基因量高于逆转录病毒，与脂质体相比，体系更加稳定。此外，PAMAM树状大分子对反义核苷酸也具有很高的转运活性。研究人员开发了一种基于树枝状高分子(PAMAM dendrimer)修饰的新型化学交联“平台”，将空间上邻近的DNA通过dendrimer直接共价交联在一起。

25 在一个实施方式中，本发明的saRNA或siRNA由水凝胶作为递送系统。水凝胶是由3D交联网络和50%-90%的水组成的材料，已被用作伤口敷料、玻璃体替代品和再生医学。这些系统中常用的聚合物包括 PLGA、PEG、聚(乙烯基吡咯烷酮)(PVP)、透明质酸或透明质酸(HA)、聚(丙烯酰胺)和胶原蛋白，以及天然聚合物，如壳聚糖、黄原胶、瓜尔胶和角叉菜胶。制备载药水凝胶的主要策略包括药物吸收、原位聚合或交联，以及两相分配。吸入包括使

30 凝胶溶胀一种游离药物的溶液。本申请的saRNA或siRNA递送水凝胶可以采用原位交联和聚合方法制备，具体包括将药物与单体混合，交联剂和引发剂，然后使聚合反应发生。通过该制备方法，治疗性的小分子核酸构建体在水凝胶网络中截留，通过优化反应条件以避免聚合物网络和多肽之间的副反应，包括采用策略(i)去除可浸出的引发剂、单体和/或交联剂和(ii)避免反应过程中蛋白质的变性和聚集。具体地，本申请可使用NIPAAm制备的丙烯酸化透明质酸交联的热响应水凝胶蛋白质作为递送系统(S.Awwad, et al. European Journal of Pharmaceutical, 104993, volume 137, 2019)，

35 这种水凝胶可在生理条件下降解，并可实现药物递送的持续进行，延长小分子核酸药物在体内的作用时间。

#### 附图说明

图1 在标准条件下接种生长的HepG2, MCF-7和DU-145细胞的光学显微镜图。

图2 不同saRNA浓度转染HepG2, MCF-7和DU-145细胞的光学显微镜图。

40 图3 saRNA转染后的HepG2细胞中的CEBPAmRNA表达水平。(A) C/EBP $\alpha$ -saRNA最终浓度为10nM, 20nM和50nM的CEBPA表达水平。

(B) C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后24、48和72小时的CEBPA转录水平。

图4 在不同癌症系中转染saRNA后的CEBPA转录水平。(A) HCC-Hep3B细胞中的CEBPAmRNA水平。(B) HCC-PLC/PRF/5细胞中的CEBPAmRNA水平。(C) 前列腺癌DU-145细胞中的CEBPAmRNA水平。(D) 乳腺癌MCF-7细胞中的CEBPAmRNA水平。

45 图5 在HCC中进行saRNA转染后，C/EBP $\alpha$ 蛋白表达水平。细胞用20nM杂序saRNA和C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后孵育72小时。

图6 C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后HCC和其他细胞系中的相对表达水平。(A) HCC-HepG2细胞系中的CEBPA, CEBPB, P21和ALBmRNA水平。(B) HCC-Hep3B细胞系中的CEBPA, CEBPB, P21和ALB转录水平。(C) HCC-PLC/PRF/5细胞系中，CEBPA, CEBPB, P21和ALBmRNA水平。(D) 前列腺癌DU-145细胞系中的CEBPA, CEBPB, P21和ALB

50 转录水平。(E) 乳腺癌MCF-7细胞系中的CEBPA, CEBPB和P21mRNA水平。



图7 在不同癌细胞系中转染C/EBP $\alpha$ -saRNA后的蛋白质印迹分析。在HepG2 (A), Hep3B (B)和PLC/PRF/5 (C) 细胞系中C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后的蛋白质印迹分析, (D)(E)(F)分别表示CEBPA的激活增强C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , p21和Albumin的蛋白表达水平。

图8 siRNA转染HepG2细胞后, CEBPA和CEBPBmRNA表达水平。(A)最终浓度为10nM和20nM的siRNA击倒CEBPA的表达。(B)最终浓度为10nM和20nM的C/EBP $\beta$ -siRNA转染后, CEBPB的转录水平。

图9 HCC-HepG2细胞系中C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 的击倒的Western Blot分析。击倒后CEBPA和CEBPB的蛋白表达水平通过Western印迹证实HepG2 (A)中的表达细胞系。在HepG2 (B)细胞系中也显示了相对带强度。

图10 在癌症细胞系中使用siRNA转染抑制CEBPA。(A)HCC-Hep3B细胞中的CEBPAmRNA水平;(B)HCC-PLC/PRF/5细胞中的CEBPAmRNA水平;(C)前列腺癌DU-145细胞中的CEBPAmRNA水平;(D)乳腺癌MCF-7细胞中的CEBPAmRNA水平。

图11 Western Blot分析检测HCC-HepG2细胞系中C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 的击倒。在Hep3B中(图11A)和PLC/PRF/5(图11B)细胞系击倒CEBPA和CEBPB后的蛋白表达水平通过Western blot分析并将结果如图所示。在Hep3B(图11C)和PLC/PRF/5(图11D)单元中也显示了相对谱带强度。

图12 使用siRNA转染癌细胞系对CEBPB进行击倒效果进行了研究。结果如图12所示,其中图12A为HCC-Hep3B细胞中CEBPBmRNA水平。图12B表示HCC-PLC/PRF/5细胞中的CEBPBmRNA水平。图12C表示前列腺癌DU-145细胞中的CEBPBmRNA水平。图12D表示乳腺癌MCF-7细胞中的CEBPBmRNA水平。

图13 HepG2和PLC/PRF/5细胞系中CEBPA和CEBPB的激活和击倒后, HepG2 (A), Hep3B (B)和PLC/PRF/5 (C)细胞中CEBPA, CEBPB, P21和ALB的转录水平。

图14 CEBPA和CEBPB的激活和击倒后, HepG2 (A&D), Hep3B (B&E)和PLC/PRF/5 (C&F)的蛋白质印迹和相对谱带强度分析。

图15 p21-saRNA转染HepG2细胞后, P21mRNA的表达水平。

图16 在HCC-HepG2细胞中共转染后(A)CEBPA的转录水平(B)CEBPBmRNA的相对表达水平;(C)p21转录水平;(D)ALBmRNA表达水平;(E)在每种情况下管家基因-GAPDH的Ct值。

图17 (A)通过Western blot分析在HepG2细胞中共转染后的C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ 和albumin蛋白表达水平。C/EBP $\alpha$ (B), C/EBP $\beta$ (C)和albumin(D)的相对谱带强度。

图18 HepG2 (A&D), Hep3B (B&E)和PLC/PRF5 (C&F)细胞系中单独转染C/EBP $\alpha$ -saRNA, C/EBP $\alpha$ -siRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的SRB细胞毒性试验。

图19 单独转染C/EBP $\alpha$ -saRNA, C/EBP $\alpha$ -siRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA在转染后的96小时内,每隔24小时记录在HepG2 (A), Hep3B (B)和PLC/PRF/5 (C)细胞中的细胞相对增殖。(D), (E), (F)代表单独转染48小时内的细胞增殖,分别为在HepG2 (D), Hep3B (E)和PLC/PRF/5 (F)细胞中。数据显示为相对于未转染组的值。

图20 单独转染C/EBP $\beta$ -siRNA, C/EBP $\alpha$ -saRNA, 以及共转染不同浓度的C/EBP $\alpha$ -saRNA与C/EBP $\beta$ -siRNA (10nM和20nM), 在转染后的96小时内,每隔24小时记录在HepG2 (A), Hep3B (B)和PLC/PRF/5 (C)细胞中的总细胞数。(D), (E), (F)代表单独或共转染48小时内的倍数改变,分别为在HepG2 (D), Hep3B (E)和PLC/PRF/5 (F)细胞中。数据显示为相对于未转染组的值。

图21 共转染的WST-1细胞增殖测定。(A), (B), (C)显示分别在HepG2 (A), Hep3B (B)和PLC/PRF/5 (C)细胞中单独转染C/EBP $\beta$ -siRNA, C/EBP $\alpha$ -saRNA, 以及不同浓度的C/EBP $\alpha$ -saRNA与C/EBP $\beta$ -siRNA的共转染(10nM和20nM)时,在96小时内间隔24小时的时间点测量得到的总细胞数。表示的数据显示相对细胞增殖(一式三份样品中的平均值 $\pm$ SD)。(D), (E), (F)表示在HepG2 (D), Hep3B (E)和PLC/PRF/5 (F)细胞中进行单独和共转染一段时间内的倍数变化(48小时)。数据显示为相对于未转染组的值。圆圈代表该时间点之后,单独转染或共转染失去活性;方框表示C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的单个或组合转染组;红色箭头表示C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的共转染;黑色代表C/EBP $\alpha$ -saRNA的单独转染组。

图22 Transwell细胞迁移分析结果示意图。

图23 HCC-HepG2细胞中生物素化的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染效率。

图24 从HepG2细胞沉淀的蛋白质复合物中分离蛋白质的SDS-PAGE。

图25 在saRNA复合物中鉴定hnRNPU的蛋白质的印迹分析图谱。在saRNA复合物下拉至使用抗hnRNPU (Abcam, ab20666) (A)和antiPARP (Cell Signaling, 46D11) (B)分析核蛋白和胞质蛋白的分布,以验证核蛋白的提取。

图26 HCC中生物素化的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染效率CEBPA的相对表达使用Livak方法以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 进行计算, GAPDH作为管家基因。条形代表相对CEBPA $\pm$ SEM的表达水平(n=1)。

图27 在不同的HCC系中鉴定出的复杂蛋白的百分比。HepG2细胞中的(A)有义(SS),反义(AS)和两种(SS&AS)生物素化的saRNA结合的蛋白的百分比。(B)Hep3B细胞中有义(SS),反义(AS)以及这两种(SS&AS)

生物素化saRNA结合的蛋白质的百分比。(C) PLC/PRF/5细胞中的(A)有义(SS),反义(AS)和两种(SS&AS)生物素化的saRNA结合的蛋白的百分比。

图28 CEBPA, CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1在HepG2细胞中的击倒效应。(A) C/EBP $\alpha$ -saRNA在最终浓度为20nM和50nM转染时的表达水平。(B-D) siRNA (10nM和20nM)对CTR9、DDX5和hnRNPA2/B1的击倒。

5 图29 HepG2细胞中的CEBPA, CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1 mRNA表达水平。(A)以最终浓度为20nM和50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后CEBPA的相对表达。(B-D)当用C/EBP $\alpha$ -saRNA (50nM)转染时,CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1的转录水平。相对的表达采用Livak方法以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算,并以GAPDH作为管家基因。条状图代表CEBPA, CTR9, DDX5或hnRNPA2/B1 mRNA $\pm$ SD的相对表达水平(n=3)。数据代表一式三份的生物学实验。\*p<0.05, \*\*p<0.01。

10 图30 在HepG2细胞中C/EBP $\alpha$ -saRNA和CTR(A), DDX5(B)或hnRNPA2/B1-siRNA(C)共转染后的CEBPAmRNA表达水平。相对表达水平使用Livak方法,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算,以GAPDH作为管家基因。条形图表示CEBPAmRNA $\pm$ SD的相对表达水平(n=3)。数据代表一式三份的生物学实验。

图31 saRNA复合蛋白的印迹分析。

15 图32 A. 用Fluc和C/EBP $\alpha$ -saRNA转染的HepG2细胞的CEBPA的mRNA水平; B. 用Scramble-siRNA和CTR9-siRNA转染的HepG2细胞的CTR9mRNA水平; C. 显示了用Scramble-siRNA和DDX5-siRNA转染的HepG2细胞的DDX5mRNA水平; D. 显示了用Scramble-siRNA和hnRNPA2/B1-siRNA转染的HepG2细胞hnRNPA2/B1mRNA的水平。

图33 在HepG2细胞中进行siRNA转染后,(A) siRNA (10nM和20nM)击倒CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1时的CEBPA的转录水平。(B) C/EBP $\alpha$ -saRNA分别和CTR, DDX5或hnRNPA2/B1-siRNA共转染后CEBPA转录的水平。

20 图34 在HepG2细胞中单转染和双转染siRNA和saRNA后的CEBPAmRNA表达水平。(A) 10nM siRNA击倒CTR9联合CEBPA激活(50nM)时的CEBPA转录水平。(B)当20nM siRNA击倒DDX5联合CEBPA激活(20nM)时CEBPA转录水平。(C)当10nM siRNA击倒hnRNPA2/B1联合CEBPA激活(50nM)时的CEBPA转录水平。

图35 单独转染和双重转染中GAPDH和CEBPA扩增的Ct值总结。(A)单独转染细胞中管家基因扩增的Ct值。(B)单独转染中CEBPA扩增的Ct值。(C)双重转染细胞中GAPDH扩增的Ct值。(D)双重转染的细胞中CEBPA放大的Ct值。

25 图36 最终浓度为20nM和50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染HepG2细胞后的CEBPAmRNA表达水平。 $\beta$ -ACTIN用作管家基因。条形图代表CEBPAmRNA $\pm$ SEM的相对表达水平(n=1)。

图37 单独和双重转染中GAPDH放大的选择性Ct值。(A)单独转染细胞中GAPDH扩增的Ct值。(B)双重转染细胞中GAPDH扩增的Ct值。

### 具体实施方式

#### 30 1.试剂与仪器

1)本发明所使用的如下试剂均为市售产品,

其中,以下试剂购自Sigma公司:

35 冰醋酸、甲酮、乙腈、琼脂糖(分子级)、氯苄西林、牛血清白蛋白(BSA)、氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)、细胞解离溶液非酶1x、结晶紫、二甲基亚砜(DMSO)、EDTA(乙二胺四乙酸酯)、Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)、乙醇(分子级)、溴化乙锭、甲醛、甘油、盐酸(HCl)、甲醇、改良Eagle培养基(MEM)、Ponceau S、青霉素/链霉素/谷氨酰胺、RPMI-1640中等、醋酸钠(NaAc)、碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>)、碳酸钠(NaCO<sub>3</sub>)、氯化钠(NaCl<sub>2</sub>)、10X剥离缓冲液、磺胺丁丹B(SRB)、三氟乙酸(TFA)、三氯乙酸(TCA)、Tris底料(Trizma®底料)、Triton-X(Triton® X-100)、吐温20、胰蛋白酶-EDTA(乙二胺四乙酸)(1X溶液)、超纯水、氯化钾(KCL)

考马斯亮蓝R-250染色液:伯乐公司

40 胎牛血清(FBS):美国莱伯泰科有限公司

Luminata™ HRP化学发光检测试剂(Luminata Forte Western HRP基材,密理博)

裂解缓冲液:Ambion(英国)

核酸标记(100 bp DNA阶梯):美国VWR公司

核酸标记(1kb DNA阶梯):赛默飞世尔公司

45 Precision Plus Protein™蛋白质印迹标准品(250 kDa):伯乐公司

WST-1:罗氏(英国)

#### 2)市售试剂盒

凝胶内Trypic消化试剂盒:赛默飞世尔科技

Lipofectamine 2000转染试剂盒:Invitrogen,赛默飞世尔公司

50 Nanofectamine转染试剂盒:PAA(英国)

Pierce™质谱样品制备试剂盒：赛默飞世尔科技  
 QuantiTect逆转录试剂盒：QIAGEN（美国）  
 QuantiFast SYBR Green PCR Kit：QIAGEN（美国）  
 RNeasy迷你试剂盒：QIAGEN（美国）

5 Thermo Scientific BCA蛋白测定试剂盒：赛默飞世尔科技

3) 耗材

C18旋转柱：赛默飞世尔科技  
 Eppendorf微量离心管：德国格瑞纳（Greiner）  
 猎鹰组织培养皿（35×10mm）：德国格瑞纳（Greiner）  
 多通道移液器：费希尔科学  
 移液器（15ml和25ml）：德国格瑞纳（Greiner）  
 移液器吸头（0.2-10、5-200和250-1000μl）：德国格瑞纳（Greiner）

10 PCR管（0.2和0.5ml）：QIAGEN  
 预制聚丙烯酰胺凝胶（NuPAGE®Novex®4-12%Bis-Tris凝胶）：Invitrogen, 赛默飞世尔公司

15 链霉亲和素珠：赛默飞世尔科技  
 Costar®透明平底聚苯乙烯细胞培养板（6、24和96孔）：康宁  
 组织培养培养皿（10cm）：格瑞纳  
 具有8.0μm孔径聚碳酸酯膜插入物的24孔Transwell®：康宁

4) 设备

20 Applied Biosystem 7900HT快速实时系统：赛默飞世尔科技  
 酶标仪：生物科技  
 显微镜：奥林巴斯（日本）  
 轨道平板摇床：斯图尔特  
 SpeedVac真空浓缩器：赛默飞世尔科技

25 2. 细胞系

本发明使用的肿瘤细胞均购自美国典型培养物保藏中心（ATCC）。

- 1) HepG2: HepG2是一种高度分化的肝细胞癌细胞系，来源于15岁的美国白人男性的肝脏组织。细胞不含肝炎病毒。
  - 2) Hep3B: Hep3B是源自8岁的少年黑人男性的肝组织的分化型肝细胞癌细胞系。细胞含有乙型肝炎病毒。
  - 30 3) PLC/PRF/5: PLC/PRF/5是未分化的肝癌细胞系。细胞含有乙型肝炎病毒。
  - 4) MCF-7（密歇根州癌症基金会-7）：MCF-7是一种分化的乳腺癌细胞线从69岁的白种女人的乳房组织中分离出来。
  - 5) DU-145: DU-145是从69岁的男性白种人中分离出来的前列腺癌细胞系，从前列腺腺癌转移到大脑。
- 对于上述选择的细胞系，研究了CEBPA组合物对不同类型肿瘤细胞的作用。HepG2和Hep3B属于HCC，属于分化
- 35 型，而PLC/PRF/5细胞属于未分化型HCC。乳腺癌细胞系MCF-7和前列腺癌细胞系DU-145作为HCC系的对照。

3. 抗体

表 1 一级抗体

抗原	来源/Cat.No.	浓度
C/EBPα	Abcam (ab40761)	1:1000
C/EBPβ	Abcam (ab18336)	1:1000
p21	Abcam (ab18209)	1:1000
Albumin	Abcam (ab106582)	1:1000
hnRNPU	Abcam (ab20666)	1:1000
PARP	Cell Signaling (46D11)	1:1000
ACTIN	Abcam (ab8226)	1:1000
TUBLIN	Sigma Aldrich (T9026)	1:1000

40 表 2 二级抗体

抗原	来源	浓度
山羊抗兔IgG H&L(HRP)	Abcam (ab97051)	1:2000
山羊抗鼠IgG H&L(HRP)	Abcam (ab97023)	1:2000

#### 4. 缓冲液, 溶液和介质的配制

##### 1.1 组织培养

##### 1.1.1 生长培养基

5 市售的RPMI-1640, MEM和DMEM补充了100单位/ml青霉素, 0.1mg/ml链霉素和2mmol/L谷氨酰胺 (Labtech International), 和10%的预热胎牛血清 (FBS, Sigma), 并保存在4°C下。

##### 1.1.2 用于细胞培养的冷冻介质

通过混合90%FBS和10%DMSO制成冷冻介质。

##### 1.2 蛋白质印迹实验试剂

10 PBS (磷酸盐缓冲液): 将PBS片 (Sigma) 和Tween-20溶液添加到蒸馏水中 (4片含0.8毫升Tween/800毫升) 中, 并使用磁力搅拌器混合直至完全溶解。

Western Blotting封闭缓冲液: 在100毫升含吐温 (PBST) 的磷酸盐缓冲液中加入5克脱脂奶粉。

10%SDS (十二烷基硫酸钠): 在蒸馏水中加入10%SDS, 加热至68°C, 并用HCl调节至pH 7.2。

15 用于蛋白质印迹的10X运行缓冲液: 对于一升溶液, 使用250mM Tris碱 (30.3g), 10%SDS (10g) 和2.5 M甘氨酸 (144g) 加入蒸馏水中, 在磁力搅拌器上混合直至完全溶解。

用于蛋白质印迹的1X运行缓冲液: 将10%的10X运行缓冲液稀释在90%的蒸馏水中, 用于蛋白质印迹。

用于蛋白质印迹的1X转移缓冲液: 配制一升缓冲液, 25mM Tris (2.44g), 192mM甘氨酸 (11.26g) 和20%甲醇 (200ml) 加入蒸馏的H<sub>2</sub>O中, 并在磁力搅拌器上混合直至完全溶解。

用于蛋白质印迹的裂解缓冲液: 包含如下组分:

20 0.1% SDS  
150mM 氯化钠  
0.5% NP-40  
50mM Tris HCl  
0.5%的 Triton X100

25 5% 甘油  
PIC (蛋白酶抑制剂混合物) 5μl/mL  
PMSF (苯甲基磺酰氟) 1mM

丽春红S染色液: 1克丽春红S、50毫升乙酸, 用ddH<sub>2</sub>O补足1L

##### 1.3 琼脂糖凝胶电泳试剂

30 50X TAE (Tris Acetate -EDTA) 缓冲液: 242克Tris碱, 57.1毫升冰醋酸和18.6克EDTA (或100毫升的0.5毫升EDTA钠) 完全溶解在1升蒸馏水中。

1X TAE (Tris Acetate -EDTA) 缓冲液: 将1%的50X运行缓冲液稀释到49%的蒸馏水中以进行琼脂糖凝胶电泳 (或将20ml的50X运行缓冲液稀释到980ml蒸馏水中)。

5X Orange G凝胶上样缓冲液: 将7.5ml甘油和100mg Orange G染料溶解在50ml蒸馏水中。

##### 35 1.4 凝胶固定液:

50% 甲醇  
10% 醋酸  
40% ddH<sub>2</sub>O

##### 1.5 考马斯亮蓝脱色溶液

40 10% 醋酸  
50% 甲醇  
40% ddH<sub>2</sub>O

##### 1.6 SRB工作溶液

0.057% (wt/vol) SRB配制于1% (体积/体积) 乙酸中

45 1.7 水溶性四唑-1 (WST-1) 工作溶液

在100 $\mu$ l/孔条件下生长的细胞中添加细胞增殖试剂（商业WST-1试剂盒）10 $\mu$ l/孔（1:10稀释）。

本发明使用的p21-saRNA具有序列为：

有义链：CCAACUCAUUCUCCAAGUA[dT][dT] (SEQ ID NO:48)

5 反义链：UACUUGGAGAAUGAGTTGG[dT][dT] (SEQ ID NO:49)

本发明使用的CTR9-siRNA的序列为：

有义链：GCACGUAUAGAUGGCAAUU[dT][dT] (SEQ ID NO: 50)

反义链：AAUUGCCAUCUAUACGUGC[dT][dT] (SEQ ID NO: 51)

10 或有义链：CCAAAUGCGUGGGAGCAUU[dT][dT] (SEQ ID NO: 52)

反义链：AAUGCUCACGCAUUUGG[dT][dT] (SEQ ID NO: 53)

本发明使用的hnRNPA2/B1-siRNA具有序列为：

有义链：GCAAGACCUCAUUCAAUUGUU (SEQ ID NO: 54)

15 反义链：CCAUUGAAUGAGGUCUUGCUU (SEQ ID NO: 55) 或

有义链：GAACAAUGGGGAAAGCUUAAU (SEQ ID NO: 56)

反义链：UAAGCUUCCCCAUUGUUCUU (SEQ ID NO: 57) 或

有义链：GUUCAGAGUUCUAGGAGUCUU (SEQ ID NO: 58)

反义链：CACUCCUAGAACUCUGAACUU (SEQ ID NO: 59) 或

20 有义链：GAAGAGUAGUUGAGCCAAAU (SEQ ID NO: 60)

反义链：UUUGGCUCAACUACUCUUCUU (SEQ ID NO: 61)

本发明使用的DDX5-siRNA具有序列为SEQ ID NO: 62所示。其中siRNA的阴性对照、CTR9-siRNA、DDX5-siRNA和hnRNPA2/B1-siRNA购自Life Technologies。

## 25 实施例1 针对CEBPA的小激活RNA (saRNA) 的设计

C/EBP $\alpha$ -saRNA的设计先前已有描述。根据文献 (Schuster et al., *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1766(1): p.

88-103; Paul, C.P., et al., *Nature Biotechnology*, 2002. 20(5): p. 505-508) 中提到的参数, 选择CEBPA的序列来设计小激活RNA用于特定基因调控的分子。要设计用于特异性激活CEBPA的saRNA, 使用了如下生物信息学方法。收集CEBPA的基因序列用于特异性激活的saRNA设计, 包括四个参数: (1) 下载靶基因注释; (2) 鉴定来自反义的靶序列; (3)

30 选择启动子反义序列; (4) 鉴定候选的saRNA。首先, 信息包括从可用数据库 (UCSC RefSeq) 中获得的的目标的基因组定位, 位置和转录配置。

全部saRNA均在水中合成和复性。RP-HPLC具有90%纯度。在获得的寡核苷酸样品的序列中筛选出的双链核苷酸, 其反义链具有如SEQ ID No. 2、4、6、8、10、12、14、16、18和20所示的序列; 有义链包含选自SEQ ID No. 1、3、5、7、9、11、13、19和21的序列。

35

## 实施例2 细胞培养和转染方法

### 2.1 细胞培养

HCC细胞系 (HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5), 乳腺癌 (MCF-7) 和前列腺癌 (DU-145) 细胞购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。HepG2, MCF-7和DU-145细胞在Roswell Park Memorial Institute培养基 (RPMI) 中培养; 在改良的Eagle培养基 (MEM) 中培养Hep3B和PLC/PRF/5细胞, 并在Dulbecco改良Eagle培养基 (DMEM) 中分别补充了10%的胎儿牛血清 (FBS, Sigma), 100单位/ml青霉素, 0.1mg/ml链霉素和2mmol/L谷氨酰胺 (Labtech International) 在5%湿度的CO<sub>2</sub>培养箱中于37 $^{\circ}$ C孵育。这些细胞保持在亚汇合 (80%) 的水平, 并在播种期间以1: 6的稀释度播种传代。从10cm培养皿中移出初始细胞培养基, 加入5mlPBS以洗涤细胞。除去PBS后, 将细胞与1ml的1X胰蛋白酶-EDTA在5%CO<sub>2</sub>培养箱中于37 $^{\circ}$ C温度下孵育3分钟。要停止胰蛋白酶消化, 分离的细胞重新悬浮在总共5ml体积的含有FBS的新鲜培养基中, 然后通过室温下以1300rpm离心5分钟来沉淀, 除去含胰蛋白酶的上清液。最后, 将细胞沉淀重新悬浮在5ml培养基中, 将悬浮液等分移入含有10ml完全培养基的新培养皿中。所有细胞在37 $^{\circ}$ C的5%CO<sub>2</sub>培养箱中生长。

45

### 2.2 冷冻和解冻细胞

冷冻细胞: 如上所述, 用胰蛋白酶消化细胞, 并在室温下以1300rpm离心5分钟。去除上清液后, 将细胞沉淀重悬于1ml冷冻培养基的等分试样, 然后吸移到冷冻管中。用细胞系标记后名称, 日期和浓度, 将试管储存在液氮中以备将来使用。

50

解冻细胞：从液氮中取出细胞，然后立即置于37℃水浴中解冻。然后，将细胞悬液转移至5ml试管中，并加入4ml预热的完全培养基，然后在室温下1300rpm下离心5分钟，除去含有DMSO的防腐介质。最后，如前所述，将细胞沉淀重新悬浮在完全培养基中。

2.3 细胞计数

5 通过使用标准血球计数器对细胞进行传代和细胞学计数。通过乘以10<sup>4</sup>，确认细胞浓度（细胞数/ml）以及稀释因子。用锥虫蓝以1: 6的比例稀释细胞（稀释倍数为6），细胞密度的确定如下：

密度（总的活性细胞/毫升）=活细胞总数4平方/2.4 x 10<sup>5</sup>的。

2.4 RNA寡核苷酸的转染

10 对于C/EBPα-siRNA，C/EBPβ-siRNA和C/EBPα-saRNA转染，培养细胞在24孔板中培养至60%汇合，使用Lipofectamine 2000（Invitrogen）根据制造商的使用指南进行转染。siRNA的转染终浓度为10nM。saRNA的转染终浓度为20nM。RNA转染72小时后收获细胞，提取用于mRNA表达分析。该过程至少进行了三次。

实施例3 RNA的分析

3.1 总RNA提取

15 根据RNeasy Mini操作说明，使用RNeasy Mini Kit（QIAGEN）提取总RNA。从板中收集的细胞悬液在4℃下3500rpm离心5分钟，然后除去上清液。每个样品管中的细胞沉淀使用350μl BufferRLT裂解。然后将裂解物转移到QIAshredder（cell干扰器）柱并在13,200rpm下离心30s。将每个样品加入350μl 100%乙醇混合，然后在2ml收集管中转移至RNeasy Mini spin column。在13,200rpm下离心30 s后，将样品洗涤并分别用700μl缓冲液RW1（一次）和500μl缓冲液RPE（两次）洗脱。之后，将35μl无RNase的水直接吸到每个离心柱膜上，在13,200rpm下离心1分钟。然后收集管中的总RNA用  
20 Nanodrop分光光度计定量。在42℃下进行gDNase去除5分钟，用转录试剂盒（QIAGEN）进行逆转录反应30分钟。最后，合成cDNA用于RT-PCR。全部RT-PCR反应用500ng逆转录的mRNA进行。

3.2 相对定量聚合酶链反应（qRT-PCR）

25 cDNA反转录后，使用QuantiFast SYBR Green PCR Kit（QIAGEN）定量分析CEBPA（CEBPB）和两个管家基因[GAPDH（葡萄糖醛-3-磷酸脱氢酶）和ACTIN]的表达。简而言之，将1.8μl基因特异性引物和cDNA模板添加到SYBR实时荧光定量PCR试剂盒（SYBR® Green I染料，AmpliTaq Gold®DNA聚合酶，dNTPs79带有dUTP，被动参考1和优化的缓冲区；QIAGEN）。

30 从每个样品中取10μl，使用Applied Biosystem 7900HT快速实时系统在95℃进行10分钟的一个循环的扩增cDNA。进行40个循环（95℃进行15秒，60℃进行40秒）以用于收集荧光数据。Applied Bio-System RQ Manager用于分析扩增的cDNA样品的相对表达水平（重复三次）。靶基因的相对表达使用比较Ct方法进行实验，被描述为标准化管家基因倍数差异。采用Livak方法用于计算非转染组与C/EBPα-saRNA转染组之间的相对量。步骤如下所述：

1.对于非转染组和C/EBPα-saRNA转染组，将CEBPA的Ct标准化为管家基因的Ct：

- $\Delta Ct (C/EBP\alpha-saRNA) = Ct (CEBPA \text{ 基因}, C/EBP\alpha-saRNA) - Ct (\text{管家基因}, C/EBP\alpha-saRNA)$
- $\Delta Ct (scramble-saRNA) = Ct (CEBPA \text{ 基因}, scramble-saRNA) - Ct (\text{管家基因}, scramble-saRNA)$
- $\Delta Ct (\text{非转染}) = Ct (CEBPA \text{ 基因}, \text{非转染}) - Ct (\text{管家基因}, \text{非转染})$

35 2.将C/EBPα-saRNA组的ΔCt标准化为非转染组的ΔCt：

- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (scramble-saRNA) - \Delta Ct (\text{非转染})$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (C/EBP\alpha-saRNA) - \Delta Ct (\text{非转染})$

3. C/EBPα-saRNA/scramble-saRNA与非转染组之间的相对表达

计算各组：相对量=2<sup>-ΔΔCt</sup>

40 为了进行统计分析，我们根据得的数据分布执行了非参数检验。

表4 实时RT-PCR的引物

基因	目录标号	生产厂商
ALB	QT00063693	QIAGEN
BETA-ACTIN	QT01680476	QIAGEN
CEBPA	QT00203357	QIAGEN
CEBPB	QT00998498	QIAGEN
CTR9	QT00029981	QIAGEN
DDX5	QT00033369	QIAGEN
GAPDH	QT01192646	QIAGEN

hnRNPA2/B1	QT00070931	QIAGEN
P21 (CDKN1A)	QT02588621	QIAGE

#### 实施例4 蛋白质分析

##### 4.1 Bio-Rad DC蛋白测定

5 制备2mg/ml的BSA储备液并溶解在裂解缓冲液中以进行连续稀释(0 $\mu$ g/ml, 1.8 $\mu$ g/ml, 3.9 $\mu$ g/ml, 7.8 $\mu$ g/ml, 15.6 $\mu$ g/ml, 31.25 $\mu$ g/ml, 62.5 $\mu$ g/ml, 125 $\mu$ g/ml, 250 $\mu$ g/ml, 500 $\mu$ g/ml, 1mg/ml和1.5mg/ml)作为标准曲线。BCA工作试剂A通过将BCA试剂A与BCA试剂S以50:1的比例混合来制备。在将25 $\mu$ l工作试剂A移至每个孔中之前,取5 $\mu$ l标准品和蛋白质样品添加到96孔微孔板中。然后,将200 $\mu$ l试剂B添加到每个孔中,混匀。在室温下反应15分钟后,由Bio-tek微孔板读取器在750nm下测量吸光度。根据标准曲线,在每个孔中上样5毫克蛋白质样品,计算上样量。

##### 4.2 通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质

10 根据制造商的说明,除去聚丙烯酰胺凝胶(购自Invitrogen的NuPAGE<sup>®</sup>Novex<sup>®</sup>4-12%Bis-Tris凝胶)的梳子,然后组装电泳系统(XCell SureLock<sup>™</sup>Mini Cell, Invitrogen)。凝胶罐中装有纯甘油基运行缓冲液,5mg总蛋白样品被加载到每个孔中。然后,在系统中分离蛋白质样品。电泳在125伏直流电下进行约2小时。

##### 4.3 蛋白质转移到硝酸纤维素上

15 准备在SDS聚丙烯酰胺凝胶上分离的蛋白质,以便转移到硝酸纤维素膜(使用半干式传输系统)。在半干系统组装之前,将膜和电极纸张浸入转移缓冲液中3分钟以平衡纸张。将八层电极纸放在系统上,确保每层之间没有气泡。然后将硝酸纤维素膜放在顶部,然后是SDS-PAGE,最后是另一层电极纸。蛋白转移在400mA下进行两个小时。通过使用Ponceau S染色液检测蛋白质可以确认蛋白质成功转移条带转移到印迹膜上。

##### 4.4 印迹分析

20 使用SNAPi.d.<sup>®</sup>2.0 Protein 检测系统(密理博)进行蛋白质印迹程序。抗从Abcam生物技术公司(英国)购买了 $\beta$ -ACTIN(ab8226), C/EBP $\alpha$ (ab40761), C/EBP $\beta$ (ab18336), p21(ab18209)和albumin(ab106582)的一级抗体以及二抗山羊抗兔(ab97051)和山羊抗小鼠(ab97023)。一抗和二抗分别按1:1000和1:2000在含有0.5%脱脂奶粉的Tween 20(PBST)的10X磷酸盐缓冲盐水中稀释。然后,将蛋白转移的硝酸纤维素膜置于印迹支架(SNAPi.d.<sup>®</sup>2.0 Mini, Millipore),用蒸馏水预湿,然后滚动除去里面的气泡。将该支架放置在系统中,并用30ml PBST洗涤印迹三次。然后将5ml一抗添加到膜表面,在室温下孵育10分钟,并通过洗涤印迹3次将其除去。进行相同的步骤进行二抗孵育。最后,使用Luminata<sup>™</sup>HRP化学发光检测试剂(Luminata Forte Western HRP底物, Millipore)检测第二抗体。通过使用图像Studio<sup>™</sup>软件(LI-COR Biotech),在C-DiGit<sup>®</sup>印迹扫描仪(LI-COR Biotech)上可视化印迹。为了再次进行探测,将膜存储在4 $^{\circ}$ C PBST中。为了检测新抗体,可通过以下方法去除印迹中的先前抗体:用1X剥离缓冲液(Sigma)剥离膜15分钟,然后洗涤3次在室温下使用PBST每次,每次5分钟。

#### 30 实施例5 染色质免疫沉淀(ChIP)分析

##### 5.1 基因组DNA沉淀

35 将足够的细胞( $4 \times 10^6$ )接种在Falcon盘(35 $\times$ 10mm, 353001)上,进行在37 $^{\circ}$ C下用1%的甲醛交联10分钟,然后收集。200 $\mu$ l( $10^6$ 细胞)SDS裂解缓冲液,辅以蛋白酶抑制剂混合物(PIC)和苯甲基磺酰氟(PMSF)被添加到裂解的细胞中。在整个染色质片段破碎过程中,以恒定的脉冲对裂解物进行超声处理。与10 $\mu$ l 5MNaCl<sub>2</sub>反向交联后,DNA样品用200 $\mu$ l苯酚/氯仿/异戊醇萃取并用氯仿/异戊醇萃取,然后加入500 $\mu$ l 100%乙醇和20 $\mu$ l 3MNaAc沉淀。沉淀的基因组DNA重新悬浮于NaAc溶液。

##### 5.2 琼脂糖凝胶电泳

为了研究ChIP分析的最佳超声处理效率,使用了琼脂糖凝胶。琼脂糖的浓度由DNA分子的目标大小范围决定(表5)。

表5 琼脂糖凝胶浓度

浓度 (%w/v)	DNA分子的目标尺寸范围 (bp)
0.3	5000-600000
0.6	1000-20000
0.9	500-7000
1.2	400-6000
1.5	200-3000
2.0	100-2000

由于200-300bp是DNA分子的目标范围，因此使用1.5%凝胶来检测DNA碎片。每个DNA样品用10-15μl蒸馏水稀释并充分混合。

将2μl样品复合物添加到8μl含有上样染料(orange G)的10X DNA上样缓冲液。加载样品前将凝胶置于包含1X TAE缓冲液电泳室中，电泳室加入10μl样品，电泳室包含两个附加泳道，分别包含已知长度的DNA片段，100bp和1kb的DNA条带。电泳在120V下运行约1小时，DNA片段通过上样染料(橙色G)的迁移，在凝胶上进行分离。最后使用来自紫外

#### 实施例6 磺基罗丹明B比色法(SRB)

在检测染色量的基础上，通过SRB测定磺基罗丹明B染色细胞蛋白法测定细胞毒性。简而言之，包含不同细胞数目条件的标准板(8000、10000、20000、40000、60000、80000)孵育2-3小时后放置，用于无生长对照。同时放置其余的测定板分别在5%的湿度下于37°C二氧化碳培养箱孵育24、48、72和96小时。将细胞用10%TCA在4°C固定1小时，然后再用慢速流动的清水清洗4次，并在室温下风干，并用0.057%SRB溶液染色，然后用10mMTris碱溶液将蛋白结合的染料溶解。使用BIO-TEK酶标仪在510nm下测量光密度(OD)值。由于SRB标准曲线是使用来自标准板(无生长对照)，每次处理的绝对细胞数使用SRB标准曲线计算。

#### 实施例7 WST-1细胞增殖测定

通过转染后24、48、72、96小时，使用WST-1试剂(罗氏，英国)分析细胞的线粒体脱氢酶进行细胞增殖测定。简而言之，将细胞接种到96孔板中，然后使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)转染20nmol RNA。最初的培养基被除去，将1:100稀释的WST-1试剂添加到每个孔中，孵育一小时，每隔10分钟进行检测。在每个10分钟间隔，使用BIO-TEK读板仪在420nm处读取数值，620nm处获得读数作参考。

#### 实施例8 Transwell细胞迁移测定

细胞迁移测定是使用孔径为8.0μm的Transwell™渗透性支架(24孔格式，美国康宁Costar)进行的。操作步骤如下：来自组织培养板的细胞用胰蛋白酶消化，沉淀并重新悬浮在无血清培养基中。100μl细胞悬液将其置于上部Transwell室中滤膜的顶部并孵育10分钟(37°C，5%CO<sub>2</sub>)使细胞沉淀下来。下部隔间用移液管装入600μl 10%的胎牛血清培养基，形成趋化性坡度。孵育16小时后，剩余的细胞在上层过滤器一侧，用棉签移走，而已通过顶部膜迁移的细胞用1ml 70%乙醇固定10分钟，在2%乙醇中用1%结晶紫染色，并用水冲洗。通过结晶紫染料与蛋白质和DNA结合来检测迁移细胞。过滤器底部的迁移细胞在10倍放大显微镜(日本奥林巴斯)下观察并在10个高倍视野计数，可计算每个插入片段迁移的单元格的平均数。将结晶紫染色的细胞溶于33%的乙酸中，并在600nm中检测吸光度(图2-3)。结果表示为每个视野的平均细胞数±标准偏差。

#### 实施例9 saRNA复合物免疫沉淀(IP)

用20nM生物素标记的Scramble和C/EBPα-saRNA转染细胞(反向、正向转染)，72小时收获。用SDS CHIP缓冲液裂解细胞，免疫沉淀后离心收集上清液。然后用链霉亲和素珠子免疫沉淀saRNA复合物过夜，在SDS-PAGE上分离蛋白并用考马斯蓝染色。切下感兴趣的凝胶带并用In-Gel Trypic消化试剂盒(Thermo Scientific, 美国)进行消化。肽样品用Pierce C18旋转柱纯化和浓缩(Thermo Scientific, 美国)。样品在SpeedVac中干燥，并悬浮在1-2ul的基质溶液中，然后用液相色谱-质谱分析(LC-MS)进行分析。

#### 实施例10 HCC细胞中C/EBPα表达的最佳激活

本实施例研究了HCC细胞系中的C/EBPα和C/EBPβ的关键作用。这两者涉及众多关键的细胞事件，包括细胞周期控制，肝再生，分化，能量代谢和凋亡。过去十年的研究表明，与相应的非肿瘤区域对比，大多数HCC病例中C/EBPα的表达下调。Reebye等(Reebye, V., et al, Hepatology. 2014 59 (1) : P.216-227)已证明首次出现了一种新型的可注射的saRNA-寡核苷酸，它能积极调节C/EBPα的表达，可减轻肝硬化/HCC模型中肝脏的肿瘤负担并改善肝脏功能。

本实施例的目的之一是建立HCC细胞中C/EBPα表达的最佳激活。同时还涉及探讨确定肝细胞生物学和其他癌症类型中，C/EBPα和C/EBPβ是否共享共同的途径。为此，首先进行了优化saRNA诱导的基因激活和siRNA诱导的基因抑制的不同细胞系的转染。本实施例的实验对象选取了HCC细胞系(HepG2, Hep3B和PLC/PRF/5)，前列腺(DU-145)和乳腺癌(MCF-7)细胞模型。HepG2和Hep3B代表分化的表型，而PLC/PRF/5代表未分化的细胞系。

##### 10.1 建立肝癌细胞中C/EBPα表达的最佳激活

为了获得最大化的saRNA诱导的基因激活效果，转染的最大效力优化程序是关键步骤，对于特定的细胞类型和



saRNA筛选实验的必要程序。成功的saRNA诱导的基因激活实验是由几个关键参数决定，以最大化包括细胞在内的saRNA的性能培养条件，转染方法以及saRNA的质量和数量。

### 1) 优化细胞培养条件

5 细胞培养条件是转染过程中的重要因素。细胞应该是健康且可在十代内使用，特别是用于肝癌细胞。因为在较高的传代水平后，多次分裂以及冻结/解冻的过程导致许多突变，在细胞内引发更多的DNA损伤和染色体崩溃。另外，可以改变基因表达以使细胞适应生长条件。在这里，使用传代细胞来优化转染，因为高传代细胞不断变化，很难达到很高的转染效率。细胞接种密度也影响总转染效率。稀疏或过于拥挤的培养可能使细胞承受更大培养条件压力，导致基因表达谱发生变化。对于粘附的HCC细胞，在融合时可获得最高的转染效率80%，建议范围从40%到90%。达到最佳细胞播种密度以实现理想的效率，细胞接种在不同密度（20、50、80、10万个细胞/孔）以建立理想的转染融合度。图1  
10 显示了在标准条件下接种生长的HepG2, MCF-7和DU-145细胞的光学显微镜图，培养液为RPMI-1640，补充了10%的FBS和PSG。HepG2, 将MCF-7和DU-145细胞接种到24孔板中，测试了不同的细胞融合度（60、80、100、12万个细胞每孔）然后转染。根据光学显微镜图像（图1），HepG2, MCF-7和DU-145细胞在24孔板中的最佳密度，分别为每孔100和8万个细胞。

### 2) 优化saRNA转染方法和条件

15 转染方法和条件的选择是获得高转染率的另一个关键参数转染效率水平。在这里，我们同时使用了反向和正向转染程序。正向转染需要在转染前一天预接种培养的细胞，使细胞在转染时达到活跃分裂的细胞群。反向转染是由Ziauddin和Sabatini改进的一种先进的转染方法（Ziauddin, J. and Sabatini, et al., Nature, 2001.411 (6833) : p.107-10) 其中在转型后仍然处于悬浮状态的情况下转染细胞。这建议增加细胞对转染复合物的暴露以适应高通量的应用。

20 转染条件包括转染剂与saRNA的比例，saRNA和孵育时间。商用lipofectamine 2000转染试剂（Invitrogen）被选择用于转染细胞，按照制造商的说明以1: 1的比例应用。此外，还需要优化saRNA的浓度和孵育时间。转染试剂的理想浓度是达到有效激活靶基因。本实施例中研究了五种不同的浓度（10nM, 20nM, 50nM, 100nM和150nM）来进行转染优化。三种细胞系（HepG2、MCF-7和DU-145）分别用不同浓度（10nM, 20nM, 50nM, 100nM和150nM）转染后，在标准条件下生长的C/EBP $\alpha$ -saRNA浓度（RPMI-1640，补充10%FBS和PSG）用光学显微镜进行记录。

25 从光学显微镜图像（图2）来看，24孔的孔中剩余的细胞（HepG2, MCF-7和DU-145）用超过50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后与低于50nM浓度相比要少得多。为了阐明肝癌中saRNA的浓度的影响，使用C/EBP $\alpha$ -saRNA浓度分别为10nM, 20nM和50nM转染HepG2细胞，反向和正向转染后72小时提取总RNA并进行qRT-PCR分析。图3显示了C/EBP $\alpha$ -saRNA组获得的CEBPAmRNA的相对表达。其中：（A）为C/EBP $\alpha$ -saRNA最终浓度为10nM, 20nM和50nM的CEBPA表达；

30 （B）C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后24、48和72小时的CEBPA转录水平。相对表达为使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的Livak方法，以GAPDH作为管家基因进行计算。条形图表示CEBPAmRNA的相对表达水平 $\pm$ SD（n = 3）。数据代表一式三份实验。\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001。

图3的结果显示，用HepG2细胞中的20nM C/EBP $\alpha$ -saRNA转染时的最高水平（3.5倍）。这表明20nM是在这些细胞条件下转染的saRNA的最佳浓度。

35 转染复合物的细胞暴露时间（孵育时间）也应优化为最大化saRNA活性。在这里，将包含转染试剂的培养基替换为每次转染后24小时使用新鲜培养基，并通过qRT-PCR测量saRNA活性在指定的时间点（24、48和72小时）进行分析。在图3B中，在以上不同时间点，可以观察到saRNA的活性达到峰值（转染后72小时5倍的CEBPA升高）。这表明最佳转染后的孵育时间为72小时。

### 3) 验证其他癌症细胞系的最佳转染

HepG2细胞系中的转染也进行了优化，并验证是否相同的转染方法和条件将适用于其他癌症系，其中具体验证了HCC-Hep3B细胞以及PLC/PRF/5细胞，前列腺癌DU-145细胞和乳腺癌MCF-7细胞的saRNA活性。实验结果如图4所示。

40 该实验是在其他癌症系中转染C/EBP $\alpha$ -saRNA后检测CEBPA的转录水平。用浓度为20nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染细胞，并在接种后72小时收获用于总RNA提取和逆转录。如图4所示的结果中，其中，（A）表示HCC-Hep3B细胞中的CEBPAmRNA水平；（B）表示HCC-PLC/PRF/5细胞中的CEBPAmRNA水平；（C）表示前列腺癌DU-145细胞中的CEBPAmRNA水平；（D）表示乳腺癌MCF-7细胞中的CEBPAmRNA水平。相对表达 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的Livak方法，以GAPDH作为管家基因进行计算。条形代表CEBPAmRNA的相对表达水平 $\pm$ SD（n = 3）。数据代表一式三份的生物学实验。\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001。

45 与HepG2细胞的C/EBP $\alpha$ 表达显著增加（3.5倍，见图3）相比，当我们用20nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染时，Hep3B细胞中的C/EBP $\alpha$ 激活2.6倍（图4A）。在相同的转染条件下，C/EBP $\alpha$ -saRNA转染的PLC/PRF/5细胞中可观察到1.6倍的转录水平增加（图4B）。

50 还使用蛋白质印迹实验对转染效果进行考察。细胞用20nM杂序saRNA和C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后孵育72小时。取40 $\mu$ g转染和未转染的细胞的蛋白质裂解液通过Western印迹分析。将SDS-聚丙烯酰胺凝胶（PAG）转移到PVDF膜，并用抗

CEBPA抗体进行免疫探测。 $\beta$ -肌动蛋白用作负载对照。数据代表一式三份的生物学实验。从蛋白质印迹的实验结果来看, C/EBP $\alpha$ -saRNA仅在HepG2和Hep3B细胞中激活了C/EBP $\alpha$ 的蛋白表达(图5)。这些提示C/EBP $\alpha$ -saRNA在PLC/PRF/5细胞没有活性, 但在HepG2和Hep3B细胞中显示了活性。另外, 表达C/EBP $\alpha$ 水平显示DU-145细胞增加5倍(图4C), 而在MCF-7细胞中增加1.6倍(图4D), 这表明C/EBP $\alpha$ -saRNA的活性在DU-145细胞中比在HepG2和Hep3B细胞中更强。MCF-7中的C/EBP $\alpha$ -saRNA缺少活性, 类似于PLC/PRF/5细胞, 因为信号通路对这些细胞系中的C/EBP $\alpha$ -saRNA的响应在这些细胞系中可能是不同的, 并且PLC/PRF/5和MCF-7细胞的代谢速率可能高于DU-145, HepG2和Hep3B细胞。在这里, 蛋白质印迹实验对DU-145和MCF-7细胞系中C/EBP $\alpha$ -saRNA的带来的CEBPA的表达激活活性将进一步确认。

#### 实施例11 CEBPA激活在特定的癌症细胞系中上调下游目标(CEBPB, P21和ALB)的表达

在CEBPA和CEBPB之间存在动态的转录转换。高比例CEBPA/CEBPB会增强代谢, 同时抑制急性期反应基因。相反, 低比例会抑制新陈代谢并激活急性期或细胞周期基因。P21(WAF-1/CIP-1)发挥重要的抗增殖作用, 并抑制细胞周期肝癌的进展。白蛋白减少肿瘤抑制因子的磷酸化蛋白-视网膜母细胞瘤(Rb)蛋白, 并通过增加HCC抑制HCC的增殖G0/G1细胞群和增强p21的表达以抑制细胞扩散(Nojiri, S. et al, Int J Mol Sci. 2014 15(3): p5163-74)。根据Reeye, V等的研究(Reeye, et al., Hepatology. 2014 59(1): p216-227), CEBPA活化可改善肝脏在体内模型中通过白蛋白的上调来发挥功能。研究功能CEBPA调节下游因素, 主要集中在研究CEBPB, P21和ALB, 在肝癌和其他癌症系中进行。在这里, 我们选择了五种不同的细胞系来研究CEBPA靶标参与包括三个HCC细胞系(HepG2, Hep3B和PLC/PRF/5), 一个前列腺癌症系(DU-145)和一个乳腺癌系(MCF-7)。在广泛使用的HCC细胞系中, 我们使用了HepG2, Hep3B和PLC/PRF/5细胞, 因为HepG2和Hep3B细胞代表分化良好的HCC细胞系, 而PLC/PRF/5细胞代表未分化的细胞。HepG2具有较高的CEBPA表达, 而Hep3B具有相对较低的内源性水平。这可能因为Hep3B的代谢率比HepG2高, 这意味着更多的能量会被消耗用于Hep3B的代谢, 而不是用于内源性的合成C/EBP $\alpha$ 。DU-145和MCF-7细胞与HCC进行比较以鉴定靶标影响差异, 以及这些细胞是否与HCC细胞共享信号通路。

本实施例选择CEBPB来研究C/EBP $\alpha$ 与C/EBP $\beta$ 功能协同作用的因子。CEBPA激活上调HepG2, Hep3B, DU-145和MCF-7细胞中C/EBP $\beta$ 的表达, 但不包括PLC/PRF/5细胞。这可能是因为PLC/PRF/5细胞是未分化的细胞系, 倾向于更快地生长, 更大范围扩展并且比分化细胞更具侵略性。这种特性限制了CEBPA转录激活的时间, 并抑制其下游目标效应。细胞被浓度为20nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染, 并在接种后72小时收获以进行总RNA提取和逆转录。相对表达使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的Livak方法计算, GAPDH作为管家基因。条形图表示CEBPA, CEBPB, P21和ALB mRNA $\pm$ SD (n=3)的相对表达水平。数据代表一式三份实验。\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001。结果如图6所示。

图6显示了C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后HCC和其他细胞系中的相对表达水平。(A) HCC-HepG2细胞系中的CEBPA, CEBPB, P21和ALB mRNA水平。(B) HCC-Hep3B细胞系中的CEBPA, CEBPB, P21和ALB转录水平。(C) HCC-PLC/PRF/5细胞系中, CEBPA, CEBPB, P21和ALB mRNA水平。(D) 前列腺癌-DU-145细胞系中的CEBPA, CEBPB, P21和ALB转录水平。(E) 乳腺癌MCF-7细胞系中的CEBPA, CEBPB和P21 mRNA水平。

C/EBP $\alpha$ -saRNA的转染时, HepG2细胞中CEBPB的转录水平明显升高, 达到2.5倍(图6A), Hep3B中也提升至1.7倍(图6B), 在DU-145(图6D)和MCF-7(图6E)中甚至分别达到6倍和5倍, 而CEBPB表达在PLC/PRF/5细胞中没有明显变化(图6C)。

通过免疫印迹法测定了HCC细胞系-HepG2(图7A)和PLC/PRF/5(图7C)细胞的靶标作用蛋白质, 以及相对带强度。与qRT-PCR的分析结果类似, p21蛋白的表达在HepG2细胞中检测到被C/EBP $\alpha$ 激活上调5.5倍(图7D), 在Hep3B细胞中则为表达上调2倍(图6E), 在PLC/PRF/5中观察到轻微的下调(图7F)。这些数据表明, C/EBP $\alpha$ 的激活上调了HepG2和Hep3B细胞中p21蛋白的表达, p21是C/EBP $\alpha$ 的下游蛋白因子。但是在PLC/PRF/5细胞中, C/EBP $\alpha$ 的激活对p21没有产生明显的作用。

许多研究表明, 血清白蛋白水平高是预后良好的重要指标, 因为低的肝癌复发率与患者的白蛋白水平高相关。血清高水平有关, 已有文献报道C/EBP $\alpha$ 的表达上调减少了肿瘤负担并改善了肝硬化/HCC模型中肝脏的肝功能。因此, 通过CEBPA激活来上调白蛋白的表达, 可能会降低HCC复发率。HepG2细胞中CEBPA增强引起的ALB mRNA表达水平显著增加(2.7倍)(图6A), 但在Hep3B细胞(图6B)和PLC/PRF/5细胞中没有针对白蛋白的明显的下游作用(图6C)。

本实施例还进行了蛋白质印迹实验以确认CEBPA的靶标作用, 并分析相对条带强度的蛋白质表达。在不同癌细胞系中C/EBP $\alpha$ 激活的蛋白质印迹分析如图7所示。Western blot证实了在HepG2(图7A), Hep3B(图7B)和PLC/PRF/5(图7C)细胞系中C/EBP $\alpha$ 增强C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , p21和albumin的蛋白表达水平。在HepG2(图7D)中, Hep3B(E)和PLC/PRF/5(图7F)细胞系, 相对带强度也进行测试。转染了20nM Scramble和C/EBP $\alpha$ -saRNA的细胞后孵育72小时。转染和未转染细胞的40 $\mu$ g蛋白质裂解物通过Western blot分析。将SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAG)转移到PVDF膜上并带有使用C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , p21和白蛋白抗体进行免疫探测。 $\beta$ -肌动蛋白用作负载对照。HepG2细胞中白蛋白的表达水平增加了6.5倍(图7D); 然而, 在Hep3B中和PLC/PRF/5细胞中(图7F)未观察到C/EBP $\alpha$ 激活引起的白蛋白的显著影

响(图3-8E)。这些表明白蛋白是HepG2细胞中CEBPA的下游靶标。

### 实施例12 C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 在HCC中的击倒效应

RNA干扰(RNAi)是由小分子引发的RNA依赖性基因沉默过程,一定数量的外源性双链RNA(dsRNA)进入细胞后,被类似于核糖核酸酶III的Dicer酶切割成短的21~23bp的双链小干扰RNA(siRNA),siRNA与解旋酶和其它因子结合,形成RNA诱导沉默复合物(RISC)。由于多种因素会影响siRNA诱导的击倒的程度,适当的优化对于确保实验成功至关重要。优化失败会使RNAi效应无法检测,我们首先进行优化转染效率,以实现外源导入的siRNA最大抑制作用。在这里,我们进行了体外siRNA实验,优化了转染效率,并通过定量实时PCR和通过蛋白质印迹确认。

#### 12.1 HepG2细胞中CEBPA和CEBPB击倒的优化

为了研究CEBPA基因击倒在不同细胞系中的生物学作用,小干扰RNA(siRNA)被用于沉默CEBPA的表达,该过程对细胞功能的影响随后进行考察以研究在培养的细胞中的特定基因的功能。在本实施例中,为了研究击倒CEBPA的最佳浓度,选择HepG2细胞中以10nM和20nM的终浓度进行转染。以浓度为10nM C/EBP $\alpha$ -siRNA转染HepG2细胞时,CEBPA的转录水平(0.76倍)显著降低,该降低幅度较小转染浓度20nM(0.81倍)(图8A)。但是,已经证明siRNA并不总是特异性的,并且当使用高浓度siRNA沉默其预期的靶标时,会发生许多脱靶。尽管20nM组的CEBPA降低转录效果更好,本实施例选择10nM为HepG2细胞中C/EBP $\alpha$ -siRNA的最佳抑制浓度,因为其可避免脱靶效应。

本实施例还使用siRNA进行了CEBPB表达抑制,以评估其增殖作用,以及在不同的癌症系中,并探索不同CEBPA和CEBPB相互作用状态下的产生的结果。实验结果如图8所示,代表siRNA转染HepG2细胞后,CEBPA和CEBPBmRNA表达水平。(图8A)最终浓度为10nM和20nM的siRNA击倒CEBPA的表达。(图8B)最终浓度为10nM和20nM的C/EBP $\beta$ -siRNA转染后,CEBPB的转录水平。相对表达使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的Livak方法,以GAPDH作为管家基因来计算。

条形图表示CEBPA/CEBPBmRNA $\pm$ SD的相对表达水平(n=3)。数据代表一式三份的生物学实验。

类似于CEBPA击倒,我们在HepG2中使用终浓度为10nM和20nM的C/EBP $\beta$ -siRNA进行了转染,以优化该细胞中击倒CEBPB的最佳浓度。CEBPB表达在10nM浓度时,显示0.8倍减少,而在20nM条件下,显示了0.7倍的减少(图3-9B)。这说明10nM是用于击倒C/EBP $\beta$ -siRNA的最佳浓度。由于10nM是CEBPA和CEBPB击倒的理想浓度,因此还对HepG2细胞进行了蛋白质印迹分析(图9A),以确定是否该浓度对目标蛋白表达具有理想的抑制作用。实验结果如图9所示,Western-Blot分析检测HCC-HepG2细胞系中C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 的击倒。击倒实验后C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 的蛋白表达水平通过Western印迹证实HepG2细胞系中的表达(图9A)。在HepG2(图9B)细胞系中也显示了相对带强度。转染了10nM的杂序siRNA、C/EBP $\alpha$ -siRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA后孵育48小时。40 $\mu$ g的蛋白质裂解物通过蛋白质印迹分析转染的和未转染的细胞。SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAG)上,转移到PVDF膜上,并用抗C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 抗体进行免疫探测。 $\beta$ -ACTIN用作上样对照。

从免疫印迹分析的相对带强度分析,当C/EBP $\alpha$ -siRNA击倒CEBPA时,C/EBP $\alpha$ 的蛋白表达水平减少0.8倍(图9B)。对于CEBPB抑制,通过C/EBP $\beta$ -siRNA的转染(图9B),C/EBP $\beta$ 蛋白表达降低了0.9倍。

基于这些,已经优化了使用siRNA对C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 的击倒中,10nM是进一步研究的最佳浓度。

#### 12.2验证在其他癌细胞系中的最佳击倒C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 的条件

为了验证前面得到的CEBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 组合的最佳浓度是否适用于在其他癌症系中,我们在相同的转染方法和条件下,分别对Hep3B,PLC/PRF/5,DU-145和MCF-7细胞转染了Scramble-siRNA,C/EBP $\alpha$ -siRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA。如以前在HepG2细胞中显示的一样。在这些细胞系中也成功完成了CEBPA(图10)和CEBPB(图12)的击倒。如图10所示的结果中是关于在癌症细胞系中使用siRNA转染抑制CEBPA。图10(A)HCC-Hep3B细胞中的CEBPAmRNA水平。图10(B)HCC-PLC/PRF/5细胞中的CEBPAmRNA水平。图10(C)前列腺癌DU-145细胞中的CEBPAmRNA水平;图10(D)乳腺癌MCF-7细胞中的CEBPAmRNA水平。细胞被转染C/EBP $\alpha$ -siRNA的浓度为10nM,接种后72小时收获,用于总RNA提取和逆转录。相对表达使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 进行计算,GAPDH作为管家基因。条形图表示CEBPAmRNA $\pm$ SD的相对表达水平(n=3)。

对于CEBPA抑制,DU-145和MCF-7细胞(图10D)中的CEBPA转录水平(图10C)分别如图所示。我们观察到了超过0.9倍的显著的击倒效果,比Hep3B(图10A)和PLC/PRF/5(图10B)更有效,这两种细胞转染C/EBP $\alpha$ -siRNA时分别减少了0.84和0.79倍。

图11显示Western Blot分析检测HCC-HepG2细胞系中C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 的击倒。在Hep3B中(图11A)和PLC/PRF/5(图11B)细胞系击倒C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 后的蛋白表达水平通过Western blot分析并将结果如图所示。在Hep3B(图11C)和PLC/PRF/5(图11D)单元中也显示了相对谱带强度。用10nM Scramble-siRNA,C/EBP $\alpha$ -siRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA转染的细胞孵育48小时。通过蛋白质印迹分析了来自转染和未转染细胞的40 $\mu$ g蛋白裂解物。将SDS聚丙烯酰胺凝胶(PAG)转移到PVDF膜上,并用抗C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 抗体进行免疫检测。 $\beta$ -肌动蛋白用作负载对照。数据代表一式三份的生物

学实验。

为了确定C/EBP $\alpha$ 对蛋白表达的击倒效应，蛋白质印迹和相对条带强度分析被用于HCC细胞系的Hep3B（图11A和图11C）和PLC/PRF/5细胞系（图11B和图11D）。从相对条带强度的分析来看，Hep3B（图11C）和PLC/PRF/5（图11D）细胞都具有降低了0.9倍以上C/EBP $\alpha$ 蛋白的效果。这些提示在其他HCC细胞系中CEBPA击倒成功，除了HepG2细胞。

5 图12 使用siRNA转染癌细胞系对CEBPB进行击倒效果进行了研究。结果如图12所示，其中图12A为HCC-Hep3B细胞中CEBPBmRNA水平。图12B表示HCC-PLC/PRF/5细胞中的CEBPBmRNA水平。图12C表示前列腺癌DU-145细胞中的CEBPBmRNA水平。图12D表示乳腺癌MCF-7细胞中的CEBPBmRNA水平。细胞被浓度为10nM的C/EBP $\beta$ -siRNA转染，接种后孵育72小时收获，以进行总RNA提取和逆转录。相对表达使用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>的Livak方法进行计算和GAPDH作为管家基因。条形图表示CEBPBmRNA $\pm$ SD的相对表达水平（n=3）。数据代表一式三份实验。\*\*p<0.01。

10 在C/EBP $\beta$ -siRNA转染的细胞中，CEBPB转录的击倒是明显的，Hep3B（图12A），PLC/PRF/5（图12B），DU-145（图12C）和MCF-7（图12D）细胞系下降超过0.8倍。为了确认C/EBP $\beta$ 在蛋白表达水平上击倒效果进行了蛋白质印迹。HCC细胞系中相对带强度的基因分析—Hep3B（图11A和C）和PLC/PRF/5（图11B和D）细胞证实了siRNA诱导的蛋白击倒。Hep3B细胞中（图11C）当用10nM C/EBP $\beta$ -siRNA转染时，CEBPB转录物减少0.9倍，而PLC/PRF/5（图11D）细胞下降了0.7倍。

15

### 实施例13 分化的HepG2细胞和未分化的PLC/PRF/5细胞中C/EBP $\alpha$ 下游目标效果比较

#### 13.1 C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 在不同分化HCC细胞系中发挥着不同的作用

20 HepG2和PLC/PRF/5细胞系中CEBPA和CEBPB的激活和击倒的实验结果如图13所示。用20nM的Scramble-saRNA和C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM的杂序-siRNA，C/EBP $\alpha$ -siRNA处理的HepG2（图13A），Hep3B（图13B）和PLC/PRF/5（图13C）细胞中CEBPA，CEBPB，P21和白蛋白的转录水平。

CEBPA在特定的癌症细胞系中激活上调下游目标（CEBPB，P21和白蛋白）

25 CEBPA通过p21（WAF-1/CIP-1）发挥重要的抗增殖作用，而P21是细胞循环进程，基因转录和DNA修复的调节剂。此外，许多研究表明白蛋白抑制肝癌的增殖，而高血清白蛋白水平是主要的预后较好的指标，导致肝癌复发率低。因此，在研究CEBPA在调节下游因素中的功能，我们集中研究了CEBPB，p21和白蛋白作为下游靶标。Harris等的研究证实，通过由p21的介导机制，CEBPA抑制细胞增殖，并促进细胞分化，其中p21是CDKs的抑制物，证明CEBPA的调控作用是通过其蛋白表达产物与p21和CDK2蛋白之间的相互作用来实现的。已有研究表明，在肝细胞和肝癌细胞中，CEBPA可通过蛋白-蛋白间的相互作用稳定p21蛋白，激活p21基因并促使其表达，从而表现抑制细胞增殖的作用。

30 由于HepG2和Hep3B代表分化的HCC，而PLC/PRF/5代表在未分化的情况下，选择了这三种细胞系来研究CEBPA及其下游目标。CEBPA和CEBPB之间存在动态交互。更高CEBPA与CEBPB的比例通过细胞周期和代谢基因抑制细胞增殖激活和急性期反应基因抑制，而CEBPA与CEBPB的比率低有相反的效果。在HCC细胞系中—HepG2（图13A），Hep3B（图13B）和PLC/PRF/5（图13C），对于CEBPA激活和CEBPB降低形成的高的CEBPA和CEBPB的比例（大于1），数据显示急性期反应或细胞循环基因可能被抑制，代谢基因可能被增强。相比之下，抑制CEBPA表达时，该比例降低（<1），提示细胞增殖可能被加速，并且代谢基因增强。这些影响也通过HepG2（图14A&D），Hep3B（图14B&E）和PLC/PRF/5（图14C&F）的蛋白质印迹和相对谱带强度分析得到证实。

#### 35 13.2 CEBPA的下游目标影响

CEBPA在特定的癌症细胞系中激活上调下游目标（CEBPB，p21和ALB）

40 CEBPA通过p21（WAF-1/CIP-1）发挥重要的抗增殖作用，而p21是细胞循环进程，基因转录和DNA修复的调节剂。此外，许多研究表明白蛋白抑制肝癌的增殖，而高血清白蛋白水平是主要的预后较好的指标，导致肝癌复发率低。因此，在研究CEBPA在调节下游因素中的功能，我们集中研究了CEBPB，P21和ALB作为下游靶标。Harris等的研究证实，通过由p21的介导机制，CEBPA抑制细胞增殖，并促进细胞分化，其中p21是CDKs的抑制物，证明C/EBP $\alpha$ 的调控作用是通过其蛋白表达产物与p21和CDK2蛋白之间的相互作用来实现的。已有研究表明，在肝细胞和肝癌细胞中，C/EBP $\alpha$ 可通过蛋白-蛋白间的相互作用稳定p21蛋白，激活p21基因并促使其表达，从而表现抑制细胞增殖的作用。

45 saRNA激活C/EBP $\alpha$ 可以显著增强HepG2细胞（6倍）（图13A）和Hep3B细胞（1.8倍）（图13B）分化细胞中p21的表达，但在未分化的PLC/PRF/5细胞中观察到p21表达的倍数减少0.4倍（图13C）。HepG2细胞中（图13A）白蛋白的表达通过C/EBP $\alpha$ 增强3.5-倍，但Hep3B（图13B）和PLC/PRF/5细胞（图13C）中没有增加。

50 免疫印迹和相对谱带强度分析分别用于确定此效果。HepG2中p21的蛋白表达水平上调（增加5.5倍）（图14A&D）和Hep3B（增加1.8倍）细胞（图14B&E），但PLC/PRF/5单元没有变化（图14C&F）。白蛋白的表达只能通过C/EBP $\alpha$ 增强而被上调，HepG2细胞增加6倍（图14A&D）。这些提示p21和白蛋白是分化的HepG2细胞中的C/EBP $\alpha$ 的下游因子，但可能不是未分化的PLC/PRF/5单元细胞中的C/EBP $\alpha$ 的下游因子。p21也是Hep3B中C/EBP $\alpha$ 的下游因子。C/EBP $\beta$ 的表达在分化HepG2和Hep3B（图3-14A）和（图13B）细胞中有很大改变，但未分化的PLC/PRF/5细胞（图13C）则没有发

现此现象。C/EBPβ抑制在HepG2细胞（图13A）增强C/EBPα（2倍）和p21的表达（2倍），但不在Hep3B（图13B）和PLC/PRF/5中（图13C）产生效果。表6显示了不同条件saRNA或siRNA处理下C/EBPα的目标效应。根据表6的总结，分化的HepG2和Hep3B细胞对增强C/EBPα产生响应，而高表达的C/EBPβ阻止了未分化的PLC/PRF/5细胞对C/EBPα激活的响应。分化的HepG2和Hep3B细胞中，p21是C/EBPα下游因子，在促进细胞周期抑制中。在PLC/PRF/5中细胞中的作用机制可能并非如此。白蛋白是HepG2细胞中C/EBPα发挥作用的下游因子。Hep3B和PLC/PRF/5细胞中C/EBPα则对重建白蛋白表达没有明显作用。

表6 CEBPA的目标效应

	CEBPA	CEBPB	P21	ALB
C/EBPα-saRNA	↑H (***) ↑P (*)	↑H (*) ↓P (*)	↑H (***)	↑H (**)
C/EBPα-siRNA	↓H (**) ↓P (***)	↓H (*) ↓P (*)	↓H (*) ↓P (**)	↓H (**) ↓P (*)
C/EBPβ-siRNA	↑H (**)	↓H (**) ↓P (***)	↑H (*) ↓P (**)	↑H (*) ↓P (*)

H 代表 HepG2 细胞, P 代表 PLC/PRF/5 细胞, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001  
↑代表增加, ↓代表减少

10

13.3 HepG2细胞系中，CEBPA及其下游目标的协同效应

13.3.1 HepG2细胞中p21激活的优化

为了确定用于转染的理想saRNA剂量，saRNA转染HepG2细胞后，确定p21mRNA的表达水平。细胞是用浓度为20nM和50nM的p21-saRNA转染，并在接种后72小时收获，总RNA提取和逆转录。相对表达使用2-ΔΔC<sub>T</sub>的Livak方法计算GAPDH用作管家基因。条形图表示相对表达水平CEBPAmRNA±SD (n=3)。数据代表一式三份实验。\*\*\*\* p<0.0001。我们在HepG2细胞中以终浓度为20nM和50nM转染了p21-saRNA。saRNA的浓度为20nM和50nM（图15）均在细胞中成功激活了p21转录水平，浓度为50nM时的转录水平增加了3倍以上，浓度为20nM是则增加2.5倍（图3-16）。尽管50nM的p21-saRNA达到了更高的水平，为了避免HepG2细胞潜在的脱靶效应，使用20nM p21-saRNA激活HepG2细胞中的p21。

13.3.2 C/EBPα-saRNA与C/EBPβ-siRNA和/或p21-saRNA的协同作用

为了阐明CEBPA与下游目标CEBPB和p21的协同活性，我们将C/EBPα-saRNA与C/EBPβ-siRNA或p21-saRNA进行了共转染，以及C/EBPα-saRNA、C/EBPβ-siRNA和P21-saRNA在HepG2细胞中三重转染。将C/EBPα-saRNA与C/EBPβ-siRNA或p21-saRNA混合转染细胞，浓度为20nM，并收获72播种后数小时进行总RNA提取和逆转录。图17显示了在HCC-HepG2细胞中共转染后（A）CEBPA的转录水平（B）CEBPBmRNA的相对表达水平；（C）p21转录水平；（D）ALBmRNA表达水平；（E）在每种情况下管家基因-GAPDH的Ct值。相对表达使用GAPDH作为管家基因的2-ΔΔC<sub>T</sub>的Livak方法。条形图表示相对CEBPA，CEBPB，P21和ALBmRNA±SD的表达水平 (n=3)。数据表示一式三份生物实验。

表3-2的数据表明在CEBPA中协同作用比单一治疗更具有活性。C/EBPα-saRNA和C/EBPβ-siRNA的双重结合导致CEBPA表达水平比单次转染的CEBPA表达水平更高（2.2倍），单独转染C/EBPα-saRNA的效果为2倍。（图16A）

免疫印迹也证实了这一点（图17A）。在HCC-HepG2细胞中共转染后进行蛋白质印迹分析。细胞与C/EBPα-saRNA与C/EBPβ-siRNA或p21-saRNA共同转染，播种后72小时收获，进行总RNA提取和逆转录。来自转染和未转染细胞的40μg蛋白裂解物通过蛋白质印迹分析。将SDS-聚丙烯酰胺凝胶（PAG）转移到PVDF膜上并用抗C/EBPα，C/EBPβ和白蛋白抗体进行免疫探测。β-肌动蛋白用作负载对照。该数据代表一式三份的生物学实验。通过Western blot分析共转染后的C/EBPα，C/EBPβ和白蛋白表达水平在HepG2细胞中（图17A）得到证实。C/EBPα（图17B），C/EBPβ（图17C）和白蛋白（图17D）的相对谱带强度分别如图所示。相对谱带强度分析显示共转染C/EBPα-saRNA后CEBPA增加（4倍）（图17 B），C/EBPα蛋白的表达水平增加。而通过比较C/EBPα-saRNA转染仅引起2倍C/EBPα蛋白增加（图17 B）。

C/EBPα-saRNA，p21-saRNA和C/EBPβ-siRNA的三重组合导致更有效的CEBPA激活（6倍）（图17B），与此相对C/EBPα-saRNA与C/EBPβ-siRNA的组的提升效果为4倍，和P21-saRNA共转染C/EBPα-saRNA的效果为2倍（图17 B）。

C/EBPα-saRNA和C/EBPβ-siRNA的双重转染获得了与C/EBPα-saRNA，C/EBPβ-siRNA和p21-saRNA的共同转染相比更好的上调的p21的表达水平。P21是HepG2细胞中CEBPA的下游靶标，通过促进细胞周期停滞发挥抗增殖作用。C/EBPα-saRNA和C/EBPβ-siRNA的双重转染得到了更高的p21转录水平（3.5倍）（图16C），相比之下，C/EBPα-saRNA，C/EBPβ-siRNA和p21-saRNA的三重转染的p21表达水平提高了2倍（图16C）。但是，在C/EBPα-saRNA和C/EBPβ-siRNA的双重转染（图16D）和C/EBPα-saRNA，C/EBPβ-siRNA和p21-saRNA（图17D）的三联组合中均观察到白蛋白表达增

40

加两倍。免疫印迹也证实了这种作用(图17A),相对条带强度分析显示白蛋白增加了15倍激活(图17D)。C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的双重转染显示3倍高于C/EBP $\alpha$ -saRNA, C/EBP $\beta$ -siRNA和p21-saRNA的三重转染。这可能是由于对C/EBP $\alpha$ 和p21的竞争性抑制引起的。

C/EBP $\alpha$ 和p21的竞争抑制作用可能存在于在HepG2细胞中进行的组合转染中,包括双重和三重转染。单转染C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA分别实现了p21表达的3.5倍和4.5倍激活,分别高于C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA组合的2.5倍(图16 C)。如前所示,与C/EBP $\alpha$ -saRNA, C/EBP $\beta$ -siRNA和p21-saRNA的三重转染相比(1.3倍)(图17 B),双重转染C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA达到更好的C/EBP $\alpha$ 活化(2.3倍)。在P21激活中也得到了类似的效果。C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA(图16 C)的双转染分别达到3.8倍和5倍的激活p21激活,这比用C/EBP $\alpha$ -saRNA, C/EBP $\beta$ -siRNA和p21-saRNA(1.8倍)(图16 C)的三重转染要高。此外,在C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的双重转染中观察到白蛋白表达的15倍激活,而C/EBP $\alpha$ -saRNA, C/EBP $\beta$ -siRNA和p21-saRNA的三重转染相比要高(2倍)(图17D)。通过此实验证实C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA可能是抑制HCC的理想选择。

表 7 细胞中 CEBPA和其下游靶标的协同作用。

共转染				
	CEBPA	CEBPB	P21	ALB
C/EBP $\alpha$ -saRNA	↑2	—	↑3.5	↑2
P21-saRNA	/	—	↑5	↑3.5
(C/EBP $\alpha$ +P21)-saRNA	↑2	—	↑3	
C/EBP $\alpha$ -saRNA+ C/EBP $\beta$ -siRNA	↑2.2	↓0.4	↑3.5	↑2
(C/EBP $\alpha$ +P21)-saRNA+ C/EBP $\beta$ -siRNA	—	↓0.5	↑2	↑2

总之,由于C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的结合导致更高激活的HepG2细胞中的C/EPBA, p21和白蛋白表达,表明C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的联合使用具有更好的C/EBP $\alpha$ 和p21表达上调引起的抗增殖作用,以通过白蛋白增强来改善肝功能及抑制肿瘤的效果。

肝癌是一种异质性疾病,可以分为两种表型-分化型和未分化型。在本实施例选择的细胞系中, HepG2和Hep3B代表分化的细胞系而PLC/PRF/5代表未分化型的。在本发明的研究中,我们发现HepG2细胞对C/EBP $\alpha$ 激活有响应,而PLC/PRF/5细胞则有抗性,并且C/EBP $\beta$ 水平阻止了PLC/PRF/5细胞对C/EBP $\alpha$ 增强的响应。这促使我们研究PLC/PRF/5细胞中, C/EBP $\beta$ 击倒是否会影响到对C/EBP $\alpha$ 的响应,是否会促使其从不同的抗性转变为对其敏感响应。本实施例还关注,将C/EBP $\alpha$ 激活和C/EBP $\beta$ 击倒相结合,是否对C/EBP $\alpha$ 的下游靶标-p21和白蛋白产生影响。

通过首先验证了HepG2细胞中的共转染作用,并证明与其他双重和三重转染相比, C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的组合可能导致更高水平的C/EBP $\alpha$ , p21和白蛋白的激活。因此,这种选择会导致由C/EBP $\alpha$ 和p21上调引起的更好的抗增殖反应。CEBPA和CEBPB之间存在动态相互作用:高比例的CEBPA与CEBPB通过细胞周期和代谢基因激活以及急性期响应基因的抑制,从而抑制细胞增殖。而CEBPA与CEBPB的比率低则起到相反效果。

本实施例的研究还发现,改变CEBPA和CEBPB的表达平衡可能会对HCC的特定细胞类型产生深远的影响。如前面的数据所示, CEBPA激活和CEBPB抑制的组合产生的CEBPA与CEBPB的比率升高,导致分化的HepG2细胞中, p21更好地激活以抑制细胞周期对细胞抗增殖的作用。但是,这种组合效果是否可以应用于未分化的PLC/PRF/5细胞仍然是不明确的。

根据上述研究,当C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA共转染时, C/EBP $\alpha$ 和p21的竞争抑制作用可能出现。p21是C/EBP $\alpha$ 在分化的HepG2细胞中的下游因子。实验结果显示,单次转染C/EBP $\alpha$ -saRNA或p21-saRNA时, p21的表达水平均较这两者的共同转染的条件下更高。鉴于HepG2细胞具有足够的内源性C/EBP $\alpha$ ,它可能具有自我调节C/EBP $\alpha$ 的表达的特定机制,从而可能有助于抑制双重激活作用,导致抑制p21的表达。

35 实施例14.人肝细胞中C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物的体外研究

人原代肝细胞(LifeTechnologies, HMCPTS)置于非增殖培养基中。在接种当日,对细胞进行反向转染步骤,其中在细胞单层贴壁之前,将saRNA转染复合物添加至细胞。在24小时后,更换培养基并进行正向转染。次日,更换培养基并将细胞温育另外24小时,之后收获细胞供分析。将肝细胞用AP2(优选的C/EBP $\alpha$ -saRNA)转染。在48小时和72小时测量CEBPAmRNA水平和ALBmRNA水平。使用Aha-1-siRNA和Fluc作为对照。

40 试验方法

saRNA复性:将冻干的每种saRNA链在无RNA酶10mM Tris-HCl, 20mM NaCl, 1mM EDTA中重悬至1mM。将它们

充分混合至完全重悬。通过温和涡旋混合，将等体积的有义链和反义链混合在一起。含合并链的管置于具有加热到95℃水的烧杯中。覆盖烧杯并且允许其冷却至室温。使用无RNA酶的水进行后续稀释。通常对于24孔样式，稀释母液至10μM。复性的saRNA试样等分储存在-20℃。

原代肝细胞解冻和铺种：

5 在水浴中加温CHRM和铺种培养基至37℃。将冷冻的肝细胞在37℃水浴中解冻直至无冰晶体留下。小瓶用70%乙醇消毒。在无菌的组织培养通风橱中，将解冻的肝细胞直接转移入CHRM。肝细胞以100x g(Thermo F-G1定角转子中，900转/分钟)在室温离心10分钟。将上清液小心地倾入废物瓶。将沉淀物按1x10<sup>6</sup>个冷冻的细胞重悬于1mL铺种培养基中。使用NucleoCounter NC-200聚集式细胞测定法计数细胞，以确定细胞生存力。将2.0x10<sup>5</sup>个活细胞在24孔平板中每孔500μL铺种培养基中铺种。

10 反向转染(接种后立即进行)：

对每个待转染孔，将12μL 10μMsaRNA稀释于85μLOpti-MEM中。对每个待转染孔，添加3μLHiPerFect并通过涡旋混合充分混合。将转染物在室温温育15分钟。将100μL转染复合物添加至每个孔，以便saRNA终浓度为200nM。将平板在增湿培养箱中于37℃5%CO<sub>2</sub>温育。5小时后，将培养基更换成500μL预温的维持培养基。

15 正向转染(接种后24小时进行)：对每个待转染孔，将12μL 10μM saRNA稀释于85μL Opti-MEM中。对每个待转染孔添加3μL HiPerFect并通过涡旋混合充分混合。将转染物在室温温育15分钟。在温育期间，将培养基更换成每孔500μL预温的新鲜维持培养基。将100μL转染复合物添加至每个孔，以便saRNA终浓度为200nM。将平板放回培养箱。24小时后，将培养基更换成500μL预温的新鲜维持培养基。最高的基因活化出现在细胞接种后72小时。此时收集细胞和/或上清液供下游分析。

正在增殖的人原代肝细胞中saRNA转染方案

20 人原代肝细胞(LifeTechnologies, HMCPTS)置于增殖培养基中。在接种当日，对细胞进行反向转染步骤，其中在细胞单层贴壁之前，将saRNA转染复合物添加至细胞。在24小时后，更换培养基并进行正向转染。次日，更换培养基并将细胞温育另外24小时，之后收获细胞供分析。将肝细胞用AP2(优选的C/EBPα-saRNA)转染。在48小时和72小时测量CEBPAmRNA水平和白蛋白mRNA水平。使用Aha-1-siRNA和Fluc作为对照。

saRNA复性：

25 将冻干的每种saRNA链在无RNA酶10mM Tris-HCl, 20mM NaCl, 1mM EDTA中重悬至1mM。将它们充分混合至完全重悬。通过温和涡旋混合，将等体积的有义链和反义链混合在一起。将连同合并的链的管置于具有加热到95℃水的烧杯中。覆盖烧杯并且允许其冷却至室温。使用无RNA酶的水进行后续稀释。通常对于24孔样式，稀释母液至10μM。复性的saRNA等分并储存在-20℃。

原代肝细胞解冻和铺种：

30 在水浴中加温CHRM和铺种培养基至37℃。将冷冻的肝细胞在37℃水浴中解冻直至无冰晶体留下。小瓶用70%乙醇消毒。在无菌的组织培养通风橱中，将解冻的肝细胞直接转移入CHRM。肝细胞以100x g(Thermo F-G1定角转子中，900转/分钟)在室温离心10分钟。将上清液小心地倾入废物瓶。在1mL铺种培养基中按1x10<sup>6</sup>个冷冻的细胞重悬沉淀物。使用NucleoCounter NC-200聚集式细胞测定法计数细胞，以确定细胞生存力。将1.0x10<sup>5</sup>个活细胞以每孔500μL铺种培养基在24孔平板中铺种。

35 反向转染(接种后立即进行)：

对每个待转染孔，将3μL 10μMsaRNA稀释于94μLOpti-MEM中。对每个待转染孔，添加3μLHiPerFect并通过涡旋混合充分混合。将转染物在室温温育15分钟。将100μL转染复合物添加至每个孔，以使saRNA终浓度为50nM。

将平板在增湿培养箱中于37℃ 5%CO<sub>2</sub>温育。5小时后，将培养基更换成500μL预温的维持培养基。

正向转染(接种后24小时进行)：

40 对每个待转染孔，将3μL 10μMsaRNA稀释于94μLOpti-MEM中。对每个待转染孔，添加3μLHiPerFect并通过涡旋混合充分混合。

将转染物在室温温育15分钟。在温育期间，将培养基更换成每孔500μL预温的新鲜维持培养基。将100μL转染复合物添加至每个孔，以便saRNA终浓度为50nM。将平板放回培养箱。24小时后，将培养基更换成500μL预温的新鲜维持培养基。最高的基因活化出现在细胞接种后72小时。此时收集细胞和/或上清液供下游分析。

45 实验结果显示当肝细胞暴露于增殖培养基时，C/EBPα-saRNA组合物上调肝细胞中的C/EBPα和白蛋白。因此，C/EBPα-saRNA在正在增殖的细胞中显示功效。siRNA在正在增殖的细胞和并未增殖的细胞中均显示功效。

实施例15 C/EBPα-saRNA与C/EBPβ-siRNA结合使用对HCC细胞系体外生长的协同作用。

50 单独转染的SRB细胞毒性试验的结果如图18所示。通过SRB测定证实各种基因转染后(抑制/激活CEBPA或CEBPB)在HepG2、Hep3B和PLC/PRF5细胞中的细胞毒性。细胞在标准96孔板中生长和转染，然后用10%TCA和用0.057%SRB

染色。蛋白质结合染料用10mMTris碱溶液溶解，OD值由分光光度计读板机测量。使用来自的无生长对照OD值建立SRB标准曲线，用曲线计算各处理的绝对细胞数。

图18的(A)、(B)、(C)分别表示转染C/EBP $\alpha$ -siRNA后96小时内，HepG2(A)、Hep3B(B)和PLC/PRF5(C)细胞中的C/EBP $\beta$ -siRNA和C/EBP $\alpha$ -saRNA总细胞数增加，每间隔24小时测量。数据代表显示活细胞的绝对细胞数（一式三份样品中的平均值 $\pm$ SD）。图18的(D)、(E)、(F)表示转染C/EBP $\alpha$ -siRNA后一段时间（48、96和72小时）的HepG2(D)、Hep3B(E)和PLC/PRF5(F)细胞中的C/EBP $\beta$ -siRNA和C/EBP $\alpha$ -saRNA倍数变化，显示值是相对于未转染组的数据。\*P<0.05，\*\*P<0.01，\*\*\*P<0.001，\*\*\*\*P<0.0001。圆圈代表时间siRNA或saRNA失去活性后的时间点；方框表示siRNA或saRNA处理组；箭头代表C/EBP $\alpha$ -saRNA转染组。

单独转染的WST-1细胞增殖试验。在HepG2、Hep3B和PLC/PRF5细胞中各种基因转染治疗（CEBPA或CEBPB的抑制/激活）的细胞增殖通过WST-1检测评估。实验方法为在标准96孔板中接种和转染细胞，然后按照1:100稀释加入WST-1试剂。通过分光光度计读板机以10分钟的间隔测试OD值。图19(A)、(B)、(C)分别表示在HepG2(A)、Hep3B(B)和PLC/PRF5(C)细胞中转染C/EBP $\alpha$ -siRNA、C/EBP $\beta$ -siRNA和C/EBP $\alpha$ -saRNA后96小时内相对细胞增殖增加，测量时间间隔为24小时。数据代表显示相对细胞增殖（一式三份样品中的平均值 $\pm$ SD）。图19(D)、(E)、(F)代表在转染C/EBP $\alpha$ -siRNA、C/EBP $\beta$ -siRNA和C/EBP $\alpha$ -saRNA后HepG2(D)、Hep3B(E)和PLC/PRF5(F)细胞中的倍数增加。显示的值相对于未转染组。\*P<0.01。圆圈代表siRNA或saRNA失去活性后的时间点；方框表示siRNA或saRNA处理组；箭头代表C/EBP $\alpha$ -saRNA转染组。

本实施例的目的是确认C/EBP $\alpha$ -saRNA与C/EBP $\beta$ -siRNA结合使用在体内的协同抗增殖作用。利用SRB和WST-1分析，探索了C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA结合的细胞毒性和抗增殖作用。这是通过检测两种不同浓度的两种药物的等效剂量进行组合（10nM和20nM）实现的。该实验在HCC细胞系中进行，包括HepG2、Hep3B和PLC/PRF5细胞。共转染后细胞的SRB细胞毒性测定的结果见图20所示。在HepG2、Hep3B和PLC/PRF5细胞中，各种联合转染组的细胞毒性（抑制/激活CEBPA或CEBPB）通过SRB分析得到证实。细胞生长并在标准96孔板中转染，然后用10%TCA固定和0.057%SRB染色。用10mMTris碱溶液溶解蛋白结合的染料，OD值用分光光度计读板器测量。使用OD值建立SRB标准曲线，并使用该曲线计算每种处理的绝对细胞数。图20(A)、(B)、(C)分别是单独转染C/EBP $\beta$ -siRNA后，C/EBP $\alpha$ -saRNA，以及共转染不同浓度的C/EBP $\alpha$ -saRNA与C/EBP $\beta$ -siRNA（10nM和20nM），在转染后的96小时内，每隔24小时记录在HepG2(A)、Hep3B(B)和PLC/PRF5(C)细胞中的总细胞数。数据显示活细胞的绝对细胞数（一式三份样品中的平均值 $\pm$ SD）。图21(D)、(E)、(F)代表单独或共转染48小时内的倍数改变，分别为在HepG2(图21D)、Hep3B(图21E)和PLC/PRF5(图21F)细胞中。数据显示为相对于未转染组的值。圆圈代表单个或共转染失去活性的时间点；方框表示单独或共同转染C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的组合；红色箭头代表的共转染C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA；黑色箭头代表单个C/EBP $\alpha$ -saRNA转染的组。

关于SRB分析，图21显示了在HCC细胞系中转染后的四个不同的时间点（24、48、72和96小时）绝对细胞数的增加。其结果分别为单独转染20nMC/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA，或用10nM或20nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA组合共转染后的数据。在HepG2细胞系中，单独C/EBP $\alpha$ -saRNA转染组中，转染后的前48小时内，细胞数量从25,000减至15,000，但在随后出现24小时达到峰值，然后再下降至最终达到35,000细胞(图21)。与10nMC/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA共转染组相比（50,000个细胞），20nM浓度的转染组导致96小时的绝对细胞数（40,000个细胞）从24小时后的150,000减少了(图19A)。值得注意的是相对于转染后24小时内有15,000个细胞(图21A)，C/EBP $\beta$ -siRNA在96小时（20,000个细胞）对细胞的增殖具有最佳的抑制作用。但是，对CEBPB的击倒在48小时后的时间点经历了HepG2细胞数从15,000增加到40,000。而在其他转染组没有此现象出现(图21D)。

在Hep3B细胞中也观察到了相似的结果。Hep3B细胞在四个时间点（24、48、72和96小时）的单转染组或共转染组的绝对细胞数的数据如图21B所示。单独C/EBP $\alpha$ -saRNA转染的绝对细胞数在转染后的第一个48小时内，细胞数目处于相对平稳的状态，大约有7000个细胞。然后在其余的48小时内经过一个上升过程达到12,000个细胞(图21B)。

与10nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA共转染组相比（17,000个细胞），在最初的48小时内，20nM组合的绝对细胞数较少（6,000个细胞），从在处理后24小时内的14,000下降(图21B)。此外，在20nM共转染组中的绝对细胞数在一段波动后，于96小时内达到10,000个细胞，而10nM组在持续的下降之后有8,000个细胞(图21B)。

与HepG2细胞类似，单个C/EBP $\beta$ -siRNA的转染也具有更好的细胞抑制作用（从7,000/24小时到8,000/96小时的绝对细胞数），高于其他组(图21B)。在48小时的时间点，与其他治疗方法相比，联合用药组20nM具有更好的抗增殖作用（7,000绝对Hep3B细胞）(图21E)。但是，CEBPA单独和联合转染组在PLC/PRF5细胞中具有相反的作用。

在图20C中，所有转染的PLC/PRF5细胞中的绝对细胞数均增加，在96小时内从10,000个细胞增加到大约70,000个细胞(图20C)。但是，在转染后的72个小时内，20nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA联合转染可产生最佳的抗增殖作用，其效果要优于其他组合(图20F)。这些结果表明，与C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA共同转染具有在包括HepG2、Hep3B细胞在内的所有三种细胞系中的细胞毒性和抗增殖作用。并且，通过与C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA共同转



染细胞系, PLC/PRF/5细胞可能可从抗性转化为抗性敏感。

共转染的WST-1细胞增殖测定如图21所示。在HepG2和PLC/PRF5细胞中, 各种转染疗法的细胞增殖通过WST-1分析评估(CEBPA或CEBPB的抑制/激活)。将细胞接种并在96孔标准板中转染, 然后加入以1: 100稀释的WST-1试剂。通过分光光度计读板器以10分钟间隔测试OD值。图22(A), (B), (C)显示分别在HepG2(A), Hep3B(B)和PLC/PRF/5(C)细胞中单次转染C/EBP $\beta$ -siRNA, C/EPB $\alpha$ -saRNA, 以及不同浓度的C/EBP $\alpha$ -saRNA与C/EBP $\beta$ -siRNA的共转染(10nM和20nM)时, 在96小时内间隔24小时的时间点测量得到的总细胞数。表示的数据显示相对细胞增殖(一式三份样品中的平均值 $\pm$ SD)。图22(D), (E), (F)表示在HepG2(D), Hep3B(E)和PLC/PRF/5(F)细胞中进行单次和共转染后一段时间内的倍数变化(48小时)。数据显示为相对于未转染组的值。\*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001。圆圈代表该时间点之后, 单独转染或共转染失去活性; 方框表示C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的单个或组合转染组; 红色箭头表示C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的共转染; 黑色代表C/EBP $\alpha$ -saRNA的单独转染组。

为了研究C/EBP $\alpha$ -saRNA与C/EBP $\beta$ -siRNA联合使用的具有协同抗增殖作用的治疗应用, 对C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA共转染的细胞进行WST-1检测。数据显示20nM C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA共转染组合的抑制人肝癌细胞HepG2(图21A & D)和Hep3B(图21B & E)细胞的增殖。在PLC/PRF/5细胞中, 单转染的C/EPB $\alpha$ -saRNA和双转染的C/EBP $\beta$ -siRNA的细胞相对生长具有相似的趋势, 并且在前48小时内降低了0.2倍以上, 随后在最后48小时内增加了0.2倍(图21C & F)。这些结果表明共转染20nM C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA在HepG2细胞中具有更好的细胞抗增殖能力, 而10nM的组合更有利于转化抗性的将PLC/PRF/5细胞转化为响应敏感。这种抗增殖作用在HepG2内维持96小时, 对C/EBP $\alpha$ 激活敏感, 而在PLC/PRF/5细胞中则为48小时。

#### 实施例16 C/EBP $\alpha$ 激活和C/EBP $\beta$ 沉默联合对HCC细胞迁移的影响

细胞迁移在包括侵袭和转移在内的细胞过程中起着至关重要的作用。肿瘤细胞由于细胞迁移与肿瘤内有很强的相关性肝癌中的血管生成和远处转移, 我们阐明了C/EBP $\alpha$ 的生物学功能对Hep3B细胞体外迁移的影响。在图4-7中, 当用未转染的细胞标准化时CEBPA激活和CEBPB抑制显示细胞迁移明显减少, 分别为0.8倍和0.6倍。CEBPA击倒组没有观察到明显的倍数变化, 表明CEBPA增强和CEBPB击倒可能诱导相关的信号通路抑制肿瘤的迁移。

由于细胞迁移在各种细胞中起着至关重要的作用生物功能, 如肿瘤细胞的侵袭和转移, 我们选择了Hep3B细胞系。因为它的稳定性可作为我们研究细胞迁移过程的细胞模型评估C/EBP $\alpha$ 的单一和协同效应。C/EBP家族的另一种形式C/EBP $\beta$ 被选为C/EPB $\alpha$ 的合作伙伴以研究协同效应。因为C/EBP $\beta$ 也与许多生理和病理生理过程有关包括HCC, 并且C/EPB $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 之间也存在高度动态的互动以及大量的顺式调节元件来维持人体的新陈代谢状态细胞。

Transwell细胞迁移分析的结果如图21所示。C/EPB $\alpha$ 激活抑制Hep3B细胞中的细胞迁移。将非血清培养基中的Hep3B细胞接种到上腔室中(孔径为8 $\mu$ m; 纽约州康宁, 美国, 目录号3422)。将含有10%胎牛血清的MEM培养基添加到下腔室中。经过一段时间孵育之后, 用棉签除去保留在上膜上的细胞, 而透过膜迁移的细胞用甲醛(在PBS中为3.7%)固定, 在2%的乙醇中的1%结晶紫染色。对迁移的细胞成像, 膜上的结晶紫溶解在33%中乙酸, 并使用酶标仪(BIO-TEK, USA)测量吸光度。

本实施例的目的是表征C/EPB $\alpha$ 的生物活性。为了确定C/EPB $\alpha$ 的细胞毒性和抗增殖作用, 我们在更具代表性的HCC细胞系(包括HepG2, Hep3B和PLC/PRF/5细胞系)中进行了SRB和WST-1细胞增殖检测。C/EPB $\alpha$ 与C/EBP $\beta$ 的高比例可增强代谢并抑制急性期反应基因, 而低比例则相反(代谢抑制和急性阶段基因激活)。

通过对CEBPA的单独转染的研究(图19和图20), 提示C/EPB $\alpha$ 在HepG2和Hep3B细胞中具有抗增殖作用, 但在PLC/PRF/5细胞中则缺乏效果。在HepG2细胞中, 效果可持续至转染后的48小时内, 和在Hep3B细胞中则为96小时。HepG2和Hep3B细胞对C/EPB $\alpha$ 敏感响应, 而PLC/PRF/5细胞则对其具有抗性。对于共转染研究, 由于在HepG2和Hep3B细胞中, C/EBP $\beta$ -siRNA具有更长的作用时间(96小时)的细胞抗增殖作用, 而C/EBP $\alpha$ -saRNA具有较短的抑制作用时间(48小时), C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA联合使用可能会改善药物疗效并延长药物作用时间(图21和图22)。此外, 本实验还发现通过与C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的共转染, 可将PLC/PRF/5细胞从抗药型细胞株转化为敏感型细胞株。从我们的细胞迁移研究(图23)结果来看, 表明C/EPB $\alpha$ 激活和C/EBP $\beta$ 抑制作用共同抑制了Hep3B细胞系中的细胞迁移。这表明可能存在某种具体的抑制肿瘤细胞迁移的信号通路有, 类似的机制在包括HepG2和PLC/PRF/5在内的其他HCC细胞系中也可能存在。

#### 实施例 17 saRNA作用机制的研究

RNA激活(RNAa)是一个小的RNA诱导的基因调节过程, 其中小双链RNA(dsRNA)选择特定的启动子区域以增强靶基因在转录水平表达。自2004年Li等人首次报道以来, 精确RNAa的分子机制仍然难以捉摸。一种理论是先加载saRNA, 并由AGO2蛋白加工以促进RNA诱导的转录的组装激活(RITA)复合物。研究分子机制至关重要, 与saRNA相互关键作用蛋白研究为临床试验提供更好的指导。

本实施例的目的是探明沉淀的C/EBP $\alpha$ -saRNA复合物中与转录机制有关的组成部分,以及使用该双链RNA分子进行基因激活的机制。在这里,使用生物素酰化的saRNA转染细胞,研究蛋白质间相互作用和蛋白质-核酸的相互作用,以鉴定saRNA在转染到细胞中时是否与蛋白质相互作用,识别这些可能相关的蛋白质。根据这些鉴定出的蛋白质的生物学功能,得到saRNA的作用机理的更多信息。

5 对于蛋白质相互作用的研究,我们应用了链霉亲和素-生物素系统。链霉亲和素最多可以结合四个生物素分子,形成链霉亲和素-生物素复合物,其相互作用是有利于蛋白质纯化和检测策略的理想选择。特别是,蛋白质与配体之间的非共价相互作用( $K_d = 10^{-15}M$ )使生物素和抗生物素蛋白之间高强度的结合相互作用。链霉亲和素和生物素之间的结合的形成相互作用迅速,不受极端条件的影响,包括温度,变性剂,pH和有机溶剂。

10 由于链霉亲和素-生物素系统的高亲和力和稳定性,我们合成了双链的两端都标记有生物素部分的C/EBP $\alpha$ -saRNA链(有义和反义)。在saRNA驱动的激活处于最佳状态的适当时间点,将其转染到HCC细胞中。固定细胞以维持saRNA蛋白复合物的结构,并用于ChIP研究的。该ChIP的目的是识别参与相关的saRNA蛋白复合物中的与saRNA功能相关的直接结合蛋白。

15 为了阐明形成saRNA蛋白复合物一部分的结合蛋白,进行了蛋白-蛋白相互作用的研究(PPI),因为它是大多数生物过程的基础,包括细胞信号传导和循环,蛋白质转运,定位,折叠和修饰。表征功能性蛋白质相互作用对于了解分子的药物能力靶蛋白的功能以及其细胞生物学至关重要。研究蛋白质序列,结构和复杂的结合蛋白提供了一条重要的途径来推断激活CEBPA的saRNA的功能。PPI检测中可用的方法包含共免疫沉淀,亲和纯化和层析,交联PPI分析(质谱),NMR光谱和X射线晶体学。本实施例使用的检测方法是质谱分析,提取和蛋白质纯化后鉴定了saRNA复合物的ChIP后的蛋白质。

20 为了鉴定核酸结合蛋白,与saRNA相互作用的蛋白复合物从DNA中沉淀,纯化和洗脱。然后进行质谱分析。为了阐明复合物中每种蛋白质的具体信息,进行了免疫印迹实验。这有可能揭示复杂蛋白质如何使saRNA发挥其生物学作用,包括转录,翻译,DNA复制和修复,以及RNA加工和易位。

#### 17.1 验证生物素酰化saRNA的最佳转染

25 由于生物素是合成在saRNA双链体上的,因此该寡核苷酸生物学特性可能会改变。saRNA蛋白复合物研究的重点是建立生物素化saRNA的最佳转染,以确认生物素化saRNA仍然有效,当20nM生物素化的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后,仍然观察到靶向CEBPA的作用。在HCC细胞系-HepG2细胞中分析了转染C/EBP $\alpha$ -saRNA对C/EBP $\alpha$ 表达水平上的效果。选择了三种浓度(10nM,20nM和50nM)来确定所选细胞系中最佳应答浓度。图23:HCC-HepG2细胞中生物素酰化的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染效率的结果如图所示。细胞用三种不同浓度(10nM,20nM和50nM)的生物素化C/EBP $\alpha$ -saRNA转染,播种后72小时收获,用于总RNA提取和逆转录。相对表达为使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的Livak方法以GAPDH作为管家基因进行计算。条形代表相对CEBPA $\pm$ SD的表达水平( $n=3$ )。与10nM和50nM组相比,用20nM生物素化的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染时,CEBPA转录水平增加了4倍(图23)。这证实了在20nM下仍获得了生物素化的C/EBP $\alpha$ -saRNA的活性。

#### 17.2 saRNA蛋白复合物鉴定

35 为了鉴定与saRNA相互作用的蛋白,我们首先对与C/EBP $\alpha$ -saRNA蛋白复合物相关的蛋白进行了表征。由于蛋白质与蛋白质之间的相互作用作为单个级联或其他代谢功能的一部分发生,在细胞内是短暂的,我们进行了交联来稳定相互作用蛋白复合物组分的方法,并保持蛋白质-蛋白质相互作用。然后通过商业试剂将固定的细胞裂解以进行细胞质和核提取。由于saRNA与siRNA的不同之处在于其活性发生在转录水平,在核内的活性机制相对更加相关。通过超声优化细胞裂解后,用链霉亲和素珠沉淀,进行蛋白质纯化,沉淀的蛋白质及其结合的蛋白用4%-20%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离,并用考马斯亮蓝染色。

40 通过SDS-PAGE从沉淀的蛋白质复合物中分离蛋白质。HepG2细胞是转染了20nM的Bio-scramble和Bio-C/EBP $\alpha$ -saRNA。用链霉亲和素珠沉淀后,在SDS-PAGE上分离RNA蛋白复合物并用考马斯亮蓝染色。兴趣凝胶带被切除和消化。然后用Pierce C18 Spin Columns纯化和浓缩肽样品。在LC-MS之前,样品在Speed Vac中干燥并悬浮在1-2 $\mu$ l Matrix溶液中结果如图25所示。

45 在图25中,我们检测到了代表与生物素酰化的saRNA结合的蛋白质复合物的结合蛋白的目标条带,并在SDS-PAGE上分离。在SDS-PAGE上清晰可见不同的蛋白条带。未转染的细胞没有条带出现。在两种生物素酰化的scramble-saRNA和生物素酰化的C/EBP $\alpha$ -saRNA组中均观察到数条条带。但是,与其他两组的沉淀样品相比,生物素酰化的C/EBP $\alpha$ -saRNA组具有的蛋白条带要多得多(图25)。这表明蛋白质沉淀和纯化成功执行。为了阐明saRNA复合物的结合蛋白,选择了生物素酰化的C/EBP $\alpha$ -saRNA组,并将所有可见条带分为19组,切下并用商业化的凝胶内胰蛋白酶消化试剂盒(Invitrogen,目录号89871)消化。切除每个蛋白条带后,使用Pierce C-18旋转柱(Invitrogen,Cat#89870)用于蛋白纯化和后续浓缩操作。然后将纯化的蛋白质通过SpeedVac干燥,然后送去进行质谱鉴定。

50 精确的蛋白质鉴定和分析是研究生物学的关键蛋白质组学策略化合物。由于灵敏度和准确性很高,因此质谱仪检测saRNA复合物结合蛋白的重要工具,包括基质辅助激光解吸电离(MALDI)和电喷雾电离(ESI)质谱(MS)。为了

阐明这些saRNA结合蛋白在形成saRNA复合物以启动转录过程中的功能和相关性，推定相关的蛋白质根据其功能进行了聚类，分为五个组，包括穿梭，稳定，折叠，转录和代谢，见下表8所示。

表8 质谱检测的结合蛋白

	描述	Bio-C/EBP $\alpha$		位置	功能
		AS	SS		
<b>HepG2细胞系</b>					
AK1C3	醛酮还原酶家族1成员C3	-	+	细胞质	代谢
B3GT4	$\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶4	+	-	高尔基体膜;单通道II型膜蛋白	代谢
COMA1	胶原 $\alpha$ -1 (XXII) 链	-	+	分泌, 细胞外空间, 细胞外基质, 细胞质	细胞粘附配体
DDX5	可能的ATP依赖性RNA解旋酶DDX5	-	+	细胞核, 核仁	运输、转录、翻译、凋亡
H2A1B	组蛋白H2A1-B/E型	+	-	细胞核, 染色体	转录
H2B1K	组蛋白H2B1-K型	-	+	细胞核, 染色体	转录、稳定
H14	组蛋白H1.4	+	+	细胞核, 染色体	转录, 稳定
PPIB	肽基脯氨酰顺反异构酶B	-	+	内质网腔, 黑素体	折叠、代谢、凋亡
ROA2	异质核糖核蛋白A2/B1	-	+	细胞核	折叠
TBB4A	微管蛋白 $\beta$ -4A链	+	-	细胞质, 细胞骨架	运输, 代谢
TBB5	微管 $\beta$ 链	-	+	细胞质, 细胞骨架	运输, 代谢
TBA1B	微管蛋白 $\alpha$ -1B链蛋白	-	+	细胞质, 细胞骨架	转录, 稳定
ZC3HD	含锌指CCCH结构域的蛋白质13	-	+	细胞核, 核仁	运输, 转录
<b>Hep3B细胞系</b>					
ACTH	肌动蛋白, $\gamma$ 肠平滑肌	+	-	细胞质, 细胞骨架。	运输, 稳定
CC14A	双特异性蛋白磷酸酶CDC14A	+	-	细胞核, 细胞质, 细胞骨架, 微管组织中心, 中心体	转录
COF1	咖啡碱-1	+	-	细胞核基质。细胞质, 细胞骨架。	运输, 代谢
C1QBP	补体组分1q亚组分结合蛋白, 线粒体	+	-	线粒体基质, 细胞核, 细胞膜, 外周膜蛋白	转录, 凋亡
DDX39A	ATP依赖性RNA解旋酶DDX39A	+	-	细胞核, 细胞质	运输, 转录、翻译、凋亡
H2AX	组蛋白H2AX	+	-	细胞核, 染色体	运输, 转录, 稳定
H2B1J	组蛋白H2B 1-J型	+	-	细胞核, 染色体	运输, 代谢
HNRPC	异质核糖核蛋白C1/C2	+	-	细胞核	运输、翻译、代谢、稳定
HNRH1	异质核糖核蛋白H	+	-	细胞核, 核质细胞核	运输, 代谢, 转录
IF2B1	胰岛素样生长因子2	+	-	细胞核, 细胞质, 核周	运输, 代谢

	mRNA结合蛋白1			区	
NUCB1	核结合蛋白-1	-	+	高尔基体, 顺式高尔基网络膜; 外周膜蛋白; 内腔侧。细胞质	运输, 代谢
PTBP1	多嘧啶束结合蛋白1	+	-	细胞核	运输, 代谢
RLA0	60S酸性核糖体蛋白P0	+	-	细胞核, 细胞质	运输, 代谢, 稳定
RL4	60S核糖体蛋白L4	+	-	细胞核, 胞浆	运输, 代谢
ROA2	异质核核糖核蛋白A2/B1	+	-	细胞核	运输
RS9	40S核糖体蛋白S9	+	-	细胞质	运输
TPM3	原肌球蛋白 $\alpha$ -3链	+	-	细胞质, 细胞骨架	凋亡
VIME	波形蛋白	+	-	细胞质	运输
1433Z	14-3-3蛋白质 zeta/delta	+	-	细胞核, 细胞质	运输, 代谢
<b>PLC/PRF/5细胞系</b>					
IQEC2	含IQ基序和SEC7结构域的蛋白质2	-	+	细胞核, 细胞质。	稳定
ITA1	整合素 $\alpha$ -1	-	+	膜单程 I 型膜蛋白	运输
LICH	溶酶体酸性脂肪酶/胆固醇酯水解酶 (LIPA)	-	+	溶酶体	催化、运输
PCDAD	原钙粘蛋白 $\alpha$ -13	-	+	细胞膜; 单程 I 型膜蛋白	调节、运输
RN220	E3泛素蛋白连接酶 RNF220	-	+	细胞质	运输, 代谢
ZC3HD	含锌指CCCH结构域的蛋白质13	-	+	细胞核, 核仁	转录

除了这些鉴定出的蛋白质在生物过程中的关键功能外, 细胞的亚细胞定位是另一个重要参数, 在选择蛋白质, 以及阐明蛋白质的主要位置时应加以考虑。因为寡核苷酸转染后与细胞质的各种蛋白质相互作用, 当它被运送到细胞核时也可能与核酸蛋白相互作用。为了对蛋白质鉴定进行全面分析, 蛋白被分为三组。一种被表征为细胞质蛋白质, 一个为核蛋白质, 另一个为两者。由于假设瞬时转染的saRNA将在细胞质中加工, 然后再转移到细胞核中以发挥其转录作用。因此, 所有鉴定出的蛋白质的信息将有助于阐明它们在介导的saRNA活性中的作用。在此基础上, 我们对目标蛋白进行了文库搜索并选择了一些感兴趣的蛋白。它们分别是异质核核糖核蛋白U (hnRNPU), 丙酮酸激酶同工酶M1/M2 (PKM2) 和延伸因子1 alpha1,

在这些蛋白之中, 选择hnRNPU进行进一步分析, 因为该RNA结合蛋白含有独特的核酸结合特性, 例如支架相关区域 (SAR) 特异性二体DNA结合结构域和RNA结合结构域。hnRNPU参与了异质核RNA (hnRNA) 形成核糖核蛋白复合物。它可能也可以在细胞核和细胞质之间穿梭, 并影响前mRNA加工和mRNA运输和新陈代谢。有研究发现核糖核蛋白 (hnRNP) 可以与启动子相关的小双链相互作用, 从而介导转录激活。细胞分级分离是分离细胞组分, 并辨别每个组件各自保留的功能的过程。为了验证感兴趣的-hnRNPU之一的蛋白是否主要是穿梭蛋白并参与寡核苷酸从核到细胞质的穿梭, 进行了细胞分级分离以确认其是否存在于细胞质或细胞核中。为了实现这一目的, 将HepG2细胞接种并分级分离。亚细胞部分在SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 上分离。聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 探针用于确认提取物的有效性, 因为PARP蛋白的亚细胞位置部分位于细胞核中。此外, 使用抗hnRNPU抗体来确认如果hnRNPU确实在细胞核中。

为了验证核的提取, 使用探测抗PARP的蛋白进行了蛋白质印迹实验, 该蛋白通过细胞分级分离获得, 并经过沉淀以进行RNA复合物的提取 (图24A)。图24是用于在saRNA复合物中鉴定hnRNPU的蛋白质印迹分析实验。在HepG2细胞中转染20nM Bio-Scramble-saRNA或Bio-C/EBP $\alpha$ -saRNA, 孵育72小时后与1%甲醛交联。通过沉淀用链霉亲和素珠拉下从细胞质或细胞核中提取的saRNA复合物 (Invitrogen, 5942-050)。在saRNA复合物下拉使用抗hnRNPU (Abcam,

ab20666) (A) 和antiPARP (Cell Signaling, 46D11) (B) 分析核蛋白和胞质蛋白的分布, 以验证核蛋白的提取。

在图24A中, 可以看到PARP蛋白位于核提取组中, 而不是位于细胞质组中, 这表明核蛋白提取成功实现。为了分析hnRNPU蛋白的分布, 在saRNA蛋白复合物的提取后进行了蛋白印迹分析探针hnRNPU抗体实验(图24B)。对于细胞质蛋白提取, hnRNPU蛋白条带仅出现在沉淀组中没有的泳道中(图24A)。但是, hnRNPU蛋白在核蛋白的提取中, 存在于输入蛋白和IP蛋白复合物中(图24B)。出人意料的是, 在核提取中, 当上样量相同时, 与其他两个对照组相比(未转染和scramble-saRNA), 沉淀的C/EBP $\alpha$ -saRNA蛋白复合物获得了更强的结合力。这意味着C/EBP $\alpha$ -saRNA复合物招募了更多的hnRNPU(图24B)。这表明hnRNPU是涉及CEBPA激活的saRNA复合体的一部分。

### 17.3 生物素酰化作用的验证和优化

不同HCC细胞系中的saRNA转染有义或反义生物素化的Scramble-saRNA和C/EBP $\alpha$ -saRNA的对CEBPA表达效果在一组HCC细胞系中进行了分析, 包括HepG2, Hep3B和PLC/PRF/5细胞。图25显示HCC中生物素化的C/EBP $\alpha$ -saRNA转染效率。细胞被有义或反义的生物素化的阴性对照(Scramble-saRNA), 以及两种不同浓度的C/EBP $\alpha$ -saRNA(20nM和50nM)转染, 收获后用于总RNA提取和逆转录。CEBPA的相对表达使用Livak方法以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 进行计算, GAPDH作为管家基因。条形代表相对CEBPA $\pm$ SEM的表达水平(n=1)。数据代表一项生物学实验的一式三份。

分别有两个浓度(20nM和50nM)选择以确定所选细胞系中的最佳响应。CEBPA转录在用GAPDH标准化后的HepG2和HepG2中分别增加了8倍(图25A)和3.5倍(图25B)。用20nM有义生物素化C/EBP $\alpha$ -saRNA转染PLC/PRF/5细胞时观察到减少了0.5倍(图25C)。因此, 20nM有义生物素化C/EBP $\alpha$ -saRNA是最佳浓度, 用于转染这种RNA以研究HepG2和Hep3B细胞系中C/EBP $\alpha$ -saRNA的机制, 而PLC/PRF/5细胞系用作对照。此外, CEBPA在HepG2, Hep3B和PLC/PRF/5细胞系中的表达也暗示了HepG2和Hep3B对C/EBP $\alpha$ 敏感, 而PLC/PRF/5对C/EBP $\alpha$ 不敏感(图25)。

### 17.4 通过生物素酰化的saRNA下拉实验在不同的HCC细胞系中分离蛋白复合物

HepG2和Hep3B是对C/EBP $\alpha$ -saRNA敏感的HCC细胞系, 而PLC/PRF/5是一种耐药细胞系, 生物素化的saRNA下拉实验在这些细胞系中进行了分离以获得在不同的HCC中识别出用于蛋白质复合物的saRNA复合物。该测定法使我们能够分离出saRNA复合物, 并验证AGO2是否参与直接加载到saRNA中以用于转录起始。在测定中, 将3'端生物素化的saRNA(SS和AS)转染入选定的细胞, 然后进行甲醛交联, saRNA复合物隔离和超声处理。使用链霉亲和素沉淀生物素化的蛋白质复合物并通过洗涤纯化, 将与生物素化的saRNA相关的蛋白质从珠子上洗脱下来。然后按制造商的双消化操作说明, 使用了商用质谱制备试剂盒处理。整个过程使用的SDS-PAGE分离凝胶上的蛋白质, 并使用考马斯染色进行可视化。从凝胶上切下蛋白质条带, 将其脱色并使用Lys-C和胰蛋白酶将其完全蛋白化。还原, 烷基化和酶促蛋白消化操作后, 纯化蛋白复合物肽并按照制造商的使用说明, 由C-18旋转柱浓缩。纯化的肽将其悬浮在基质溶液中并送去进行质谱分析。

通过质谱鉴定的沉淀蛋白复合物, 在HepG2和Hep3B细胞株中, saRNA复合物中分别有34和49个蛋白, 而在PLC/PRF/5细胞系中发现了12种蛋白质。图27显示了HCC-HepG2(图27A), Hep3B(图27B)和PLC/PRF/5(图27C)中鉴定出的复杂蛋白的百分比。在HepG2和PLC/PRF/5细胞中, 结合到有义生物素化的saRNA的蛋白质分别占总的复合结合蛋白的53%(图27A)和83%(图27B), 但在Hep3B细胞系中只有4%(图27C)。占总数的86%的蛋白在Hep3B细胞系中与反义结合(图27C)。这表明HepG2和PLC/PRF/5细胞系中可能saRNA有义链与大部分蛋白质结合, 但是, Hep3B细胞系中更多的蛋白质可能会与反义链结合。此外, 从这三种细胞系中与saRNA结合的蛋白质数量来看, 也可以推测PLC/PRF/5细胞对C/EBP $\alpha$ -saRNA有抗性可能是因为这些细胞可能无法表达saRNA活性所需的关键成分。除此之外与蛋白质大量结合的链可能被视为saRNA双链的引导链。也可能是Argonaute蛋白加工的链以诱导转录激活。

图27显示了在不同的HCC系中鉴定出的复杂蛋白的百分比。HepG2细胞中的(A)有义(SS), 反义(AS)和两种(SS&AS)生物素化的saRNA结合的蛋白的百分比。(B) Hep3B细胞中有义(SS), 反义(AS)以及这两种(SS&AS)生物素化saRNA结合的蛋白的百分比。(C) PLC/PRF/5细胞中的(A)有义(SS), 反义(AS)和两种(SS&AS)生物素化的saRNA结合的蛋白的百分比。

### 实施例18 确认C/EBP $\alpha$ 激活和最佳靶向击倒saRNA相互作用蛋白的关系

saRNA是一类21个寡核苷酸双链RNA分子, 其经过选择性地设计以激活基因并具有临床治疗潜力。以前我们使用的C/EBP $\alpha$ -saRNA是AP1, 可增强C/EBP $\alpha$ 的表达, 可以减轻肝硬化/肝癌模型的肿瘤负担并改善其肝功能。为了将这种新型寡核苷酸开发为临床候选药物, AP2是根据在CEBPA序列中围绕热点的核苷酸游动而设计的优选序列。对比于AP1, C/EBP $\alpha$ -saRNA(AP2)对CEBPA的激活具有更好的活性。为了进一步研究用AP2激活CEBPA, 按照下列步骤分析在HCC细胞系-HepG2细胞中转染AP2后CEBPA在的转录水平。选择了两种浓度(20nM和50nM)进行实验用于研究所选细胞系中的最佳响应。图27分别显示了CEBPA, CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1在HepG2细胞中的击倒效应。(A) CEBPA表达在最终浓度为20nM和50nM RNA时被saRNA上调。(B-D) siRNA(10nM和20nM)对CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1的击倒。相对表达是使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的Livak方法计算。GAPDH用作管家基因。条形图代表CEBPA, CTR9, DDX5或

hnRNPA2/B1 mRNA $\pm$ SD的相对表达水平 (n=3)。

与20nM组相比,用50nM AP2转染后CEBPA表达水平增加了4倍。这表明50nM是为了研究AP2转染后C/EBP $\alpha$ -saRNA的机制的最佳浓度。

5 为了对saRNA相互作用蛋白进行全面分析,除了通过定位分类(细胞质和细胞核),已鉴定的蛋白质会通过其功能以及与saRNA活性有关的推定作用进行注释。在此基础上,选择了CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1调查它们在介导的saRNA活性中的作用。

10 选择了hnRNPA2/B1进行进一步研究,因为该蛋白与mRNA中的前mRNA的核相关,似乎影响前mRNA加工和mRNA的其他方面代谢和运输。HnRNPA2/B1具有两个重复的准RNA识别基序(RRM)域参与RNA结合和单链DNA结合。这种蛋白质可以也与细胞核中的其他hnRNP形成复合物。在saRNA诱导RNAa过程中, hnRNPA2/B1可能有助于RNA引导链负载的Argonaute 2蛋白从细胞质到细胞核的转运,将转录起始位点靶向启动转录。同时, hnRNPA2/B1可被视为招募其他hnRNP家族成员(hnRNPU, hnRNPH等)的hnRNP复合物,以及RNA诱导的转录激活复合物(RITA)的一部分,以调节基因表达。该蛋白还可以稳定转录并使成熟的mRNA从核穿梭到细胞质。

15 对于可能的ATP依赖性RNA解旋酶DDX5, DEAD盒蛋白的特征在于保守基序Asp-Glu-Ala-Asp(DEAD)与许多改变细胞过程的RNA二级结构有关,包括翻译起始,核和线粒体剪接,以及核糖体和剪接体组装。在此基础上, DDX5可能协助RNA-Argonaute 2复合物穿梭至细胞核,与hnRNPA2/B1形成RITA复合物,CTR-9和RNA聚合酶II可启动转录并调节基因表达。

20 CTR9是聚合酶相关因子1(PAF1)复合物中的亚基,该复合物能够调节RNA聚合酶II,并参与胚胎期器官形成及胚胎干细胞多能性的维持。研究RNA聚合酶II相关因子1复合物(PAF1c)的骨架蛋白CTR9对肝癌细胞增殖,迁移,侵袭调控的分子机制。通过采用Western bolt和免疫组化法检测CTR9在肝癌及癌旁组织中的表达。在HepG2和Huh7细胞中沉默CTR9或瞬时转染外源CTR9,采用EdU实验,集落形成实验,Transwell实验分析CTR9对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的调控作用,发现CTR9在肝癌组织中呈高表达。沉默CTR9可抑制肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭,而过表达CTR9促进肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭。CTR9可以正调控Akt/p-Akt。明确了通过正向调控Akt/p-Akt,CTR9可促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

25 作为PAF1复合物的组成部分(PAF1C),选择CTR9进行这项研究是因为它包括SH2结构域结合和RNA聚合酶II核心结合,并参与转录延伸。所以,CTR-9可能是RITA复合物的一个组成部分,可以延长RNA的转录saRNA诱导RNA激活过程中的聚合酶II。

30 为了建立最佳的靶向击倒,用靶向在HepG2细胞中的saRNA相互作用蛋白(CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1)的siRNA进行转染。图28B显示了在HepG2细胞系中CTR9-siRNA的击倒效应的验证结果。相对于未转染的细胞中,10nM CTR9-siRNA组的CTR9转录下降了0.7倍,在20nM时为0.6倍。当用C/EBP $\alpha$ -saRNA转染时,CTR-9的转录水平增加2.5倍(图29B)。图28C显示了验证DDX5-siRNA对HepG2细胞系的击倒作用。在DDX5-siRNA组中,在10nM浓度下降0.8倍,在20nM浓度的DDX5转录下降了0.9倍。

35 同时用C/EBP $\alpha$ -saRNA对HepG2细胞进行转染。图29显示了HepG2细胞中的CEBPA,CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1 mRNA表达水平。最终浓度为20nM和50nM RNA的saRNA会上调CEBPA的表达。当用C/EBP $\alpha$ -saRNA(50nM)转染时(图29B-D),CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1的转录水平如图所示。相对表达采用Livak方法以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 进行计算,并以GAPDH作为管家基因。条状图代表CEBPA,CTR9, DDX5或hnRNPA2/B1 mRNA $\pm$ SD的相对表达水平(n=3)。

在C/EBP $\alpha$ -saRNA存在下,DDX5的转录水平增加了2.3倍(图29C)。图29D显示了HepG2细胞系中的hnRNPA2/B1-siRNA的击倒效应的验证。hnRNPA2/B1-siRNA转染组显示在10nM时,0.9倍的hnRNPA2/B1转录降低,在20nM时降低0.8倍。C/EBP $\alpha$ -saRNA转染时, hnRNPA2/B1的转录水平增加了2倍(图29D)。

40 总而言之,siRNA对推定的saRNA相互作用蛋白的击倒作用(CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1)已通过实验确认,并且存在C/EBP $\alpha$ -saRNA的情况下,CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1的所有表达水平均增加了2倍以上(图29)。这可能是因为CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1是核心RNA诱导转录激活(RITA)复合物的主要因素被用于增强CEBPA的表达。

CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1的击倒破坏HepG2细胞中的C/EBP $\alpha$ -saRNA活性。

45 在HepG2细胞中共转染后CEBPAmRNA表达水平如图30所示。其中,C/EBP $\alpha$ -saRNA和CTR(A),DDX5(B)或hnRNPA2/B1-siRNA(C)共转染后的相对表达水平使用Livak方法,以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 进行计算,以GAPDH作为管家基因。条形图表示CEBPAmRNA $\pm$ SD的相对表达水平(n=3)。

根据图30所示的各种转染组的HepG2细胞中的CEBPAmRNA水平,转染CTR9-siRNA后(图30A),CEBPAmRNA的表达水平显示降低0.65倍,C/EBP $\alpha$ -saRNA的单次转染中,C/EBPAmRNA的表达水平增长了3.5倍,用50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM的Scramble-siRNA联合转染时,其表达激活为2.5倍。50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM的CTR9-siRNA联合转染时,C/EBP $\alpha$ -saRNA的表达增加1.4倍。

50 图30B显示,CEBPA转录水平在50nM C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM Scramble-siRNA联合转染时提高了2.5倍,而在50nM

C/EBP $\alpha$ -saRNA 和10nM的DDX5-siRNA转染组, 增加1.2倍。当DDX5-siRNA加入时, C/EBP $\alpha$ -saRNA存在导致的激活被降低了1.5倍。这意味着缺少DDX5表达的可能会导致saRNA转录激活的活性丧失。在hnRNPA2/B1中也有类似的效果。在图30C中, C/EBP $\alpha$ -saRNA单次转染后, 和未经转染的组对比, CEBPA的相对表达增加了3.5倍, 与50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM的hnRNPA2/B1-siRNA共转染后, CEBPAmRNA的表达水平下降了0.6倍(图30C)。50nM C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM Scramble-siRNA的共转染使相对表达水平增加了2.5倍, 而相对于未转染组, C/EBP $\alpha$ -saRNA单独转染时增加了3.5倍(图30C)。

基于上述数据, 在存在C/EBP $\alpha$ -saRNA的情况下加入hnRNPA2/B1-siRNA共转染时, 活性降低了3倍。这表明了hnRNPA2/B1可能是RITA复合物中的关键成分并影响RNA介导基因激活的活性。缺乏hnRNPA2/B1表达可能会直接阻断C/EBP $\alpha$ -saRNA在HCC-HepG2细胞中的活性。总之, 以上数据表明C/EBP $\alpha$ -saRNA的活性通过CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1击倒被破坏, 而它们通过生物素化的saRNA下拉测定法分析被鉴定为saRNA相互作用蛋白质。

本实施例的目的是通过研究蛋白质saRNA相互作用来解释saRNA作用的机制。saRNA被认为是增强基因表达的新型工具, 有着广泛的临床应用, 尤其是针对HCC的治疗。在体外研究中, 通过使用RNA下拉实验鉴定了saRNA复合物中的蛋白质。为了阐明saRNA蛋白复合物的成分, 我们首先在HepG2细胞中进行了研究。

对于saRNA直接结合蛋白的分析, 通过SDS-PAGE分离的蛋白条切下并送去进行蛋白质鉴定C/EBP $\alpha$ -saRNA组。然而这些蛋白中还是一些非直接结合的蛋白, 需要被去除。因此, 来自未转染的和乱序的saRNA的蛋白条带, 作为C/EBP $\alpha$ -saRNA组的对照, 也将进行蛋白谱分析。此外, 蛋白质条带的强度会影响条带的切除, 因为一些较浅的条带会丢失几种目的蛋白, 从而削弱该种操作方法的实验效果。质谱分析检测到hnRNPU蛋白, 但没有检测到AGO2和RNA聚合酶II。因为实验的切除操作难以提取到浅的蛋白带, AGO2和RNA聚合酶II的大小范围的蛋白条带无法切下以进行进一步分析。基因转录是细胞周期依赖性的和动态的过程。转录因子始终存在适应基因转录开/关的条件。因此, 我们需要能够将实验的时间点控制在AGO2或转录机制将在其目标位点最为突出时。

为了改进技术, 我们使用了商业试剂盒并进行了纳米喷雾(质谱法)代替MALDI-TOF, 以避免因切除和SDS-PAGE蛋白的上样量而产生的偏差。此外, 选择了三个HCC细胞系进行实验, 互相比较结果。我们发现属于不同的分化领域的HCC细胞系显示出独特的相互作用。因为HepG2和Hep3B是高度分化的HCC, 具有更多已鉴定的复杂结合蛋白, 但未分化PLC/PRF/5的功能性结合蛋白少得多。此外, hnRNPA2/B1在HepG2和Hep3B细胞中均检测到该蛋白, 这意味着该蛋白可能是直接促进基因激活的重要因素。

#### 结论

未分化的PLC/PRF/5细胞中与saRNA结合的功能蛋白少得多, 这可能解释了为什么PLC/PRF/5细胞对C/EBP $\alpha$ -saRNA有抗性。saRNA诱导的RNA激活通过与从分化的肝细胞癌中识别的hnRNPA2/B1, DDXn的许多蛋白质相互作用而起作用, 可以从这个相互作用阵列中鉴定出了和C/EBP $\alpha$ -saRNA作用的蛋白。上调saRNA特异性结合蛋白的表达可以促进saRNA的活性, 从而将未分化的细胞系转化为分化的细胞以增加C/EBP $\alpha$ 的表达。

在这项研究中, 采用了五种癌细胞系, 包括HCC系(HepG2, Hep3B和PLC/PRF/5细胞), 前列腺癌系(DU-145细胞)和乳腺癌系(MCF-7细胞)。其中, HCC线是本申请的核心研究, 而前列腺和乳腺癌用作比较, 以验证相同的结果是否会在不同的环境中发生癌症线。在HCC系中, HepG2和Hep3B代表分化的细胞, 而PLC/PRF/5代表未分化的细胞。我们选择了这些细胞以澄清是否不同HCC的表型将受到C/EBP $\alpha$ -saRNA的影响。

本实施例还确定C/EBP $\alpha$ 和C/EBP家族的其他成员是否在HCC中扮演相似的角色, 以及如果这些作用是否与其他癌症类型相关。为此, 我们还研究了前列腺(DU145)和乳腺癌(MCF)细胞模型。我们发现改变CEBPA和CEBPB的表达平衡对每个细胞类型都有深远的影响。CEBPA或CEBPB的激活和击倒在DU-145细胞导致响应最高, 但在MCF-7响应最低。这表明DU-145前列腺癌细胞对C/EBP $\alpha$ -saRNA, C/EBP $\alpha$ -siRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA敏感, 而MCF-7乳腺癌细胞对C/EBP $\alpha$ -saRNA的抗增殖作用具有抗性, 这一结论通过WST-1和SRB分析得出。

在这项研究中, 我们发现HepG2和Hep3B(分化的HCC)具有较高的响应, PLC/PRF/5(未分化的HCC)对C/EBP $\alpha$ -saRNA有抗药性。P21和白蛋白是HepG2和Hep3B细胞中CEBPA的下游靶标, 而不是PLC/PRF/5细胞的下游靶标。这表明, PLC/PRF/5细胞中可能存在其他的相关蛋白网络。从蛋白质组学分析, 我们发现saRNA复合物结合蛋白整合素A1(ITGA-1)可能对PLC/PRF/5细胞中的C/EBP $\alpha$ -saRNA有影响。这将通过击倒ITGA1进行验证, 以确定ITGA1是否更改了C/EBP $\alpha$ -saRNA的活性。此外, 未分化的PLC/PRF/5细胞不能依赖C/EBP $\alpha$ 提高白蛋白的表达重建。我们还发现C/EBP $\beta$ 表达阻止了PLC/PRF/5单元对C/EBP $\alpha$ 激活做出响应。当击倒HepG2和Hep3B中的C/EBP $\beta$ 表达时, C/EBP $\alpha$ 表达水平上调, 但在PLC/PRF/5细胞中显著下调。这表明CEBPB基因击倒对C/EBP $\alpha$ 表达的影响在分化和未分化的HCC细胞是不同的。这敦促我们确定C/EBP $\beta$ 的组合是否会影响耐药的PLC/PRF/5细胞中对C/EBP $\alpha$ 激活的响应, 如果组合使用C/EBP $\alpha$ 活化和C/EBP $\beta$ 抑制作用是否将具有更好的抗增殖作用。我们通过PCR和蛋白质印迹发现, 这种组合策略可以更好地激活C/EBP $\alpha$ 。此外, WST-1、SRB分析还证实了其抗增殖作用。

对于共转染研究, 通过WST-1和SRB分析确定C/EBP $\alpha$ 活化和C/EBP $\beta$ 抑制作用可能会改善药物的疗效, 延长了HepG2

细胞的药物作用时间。因为C/EBP $\beta$ -siRNA具有更长的抗增殖作用的有效时间(96小时);而C/EBP $\alpha$ -saRNA具有更好的抗增殖功效比其他治疗方法高。细胞迁移实验也证明了这一点,C/EBP $\alpha$ 激活和C/EBP $\beta$ 抑制均癌细胞迁移。

#### 实施例19 saRNA相互作用蛋白:CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1

5 为了验证从saRNA复合物中提取的蛋白质(CTR-9, DDX5和hnRNPA2/B1)是否确实会影响saRNA的活性。在本实施例中,首先采用HepG2细胞进行初步研究,分别验证不同的蛋白抑制基因,以便于在执行组合转染之前确定是否可以实现目标基因的有效击倒。

##### 19.1 实验方法

10 1X10<sup>5</sup>个HepG2细胞在24孔板中培养,并分别用Fluc(scramble-saRNA), Scramble-siRNA, C/EBP $\alpha$ -saRNA, CTR9-siRNA, DDX5-siRNA或hnRNPA2/B1进行转染。转染后72小时收获细胞,通过商业试剂盒提取总RNA。使用2<sup>- $\Delta$ ACT</sup>的Livak计算方法,GAPDH作为管家基因,对蛋白的表达水平的数据标准化处理。

##### 实验结果

确认在C/EBP $\alpha$ -saRNA转染后,HepG2细胞中C/EBP $\alpha$ 的表达得到激活,以及在HepG2细胞中转染CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1相应的siRNA后,CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1被击倒。

15 图32A显示了用Fluc和C/EBP $\alpha$ -saRNA转染的HepG2细胞的CEBPAmRNA水平。相对于未转染的细胞,C/EBP $\alpha$ -saRNA组在20nM时CEBPA转录增加4倍,在50nM时显示26倍。

图32B显示了用Scramble-siRNA和CTR9-siRNA转染的HepG2细胞的CTR9mRNA水平。CTR9-siRNA组在10nM时CTR9转录物降低0.7倍,在20nM时降低0.4倍。

20 图32C显示了用Scramble-siRNA和DDX5-siRNA转染的HepG2细胞的DDX5mRNA水平。相对于未转染的细胞,DDX5-siRNA组显示DDX5在10nM时降低了0.8倍转录,在20nM时为0.9倍。

图32D显示了用Scramble-siRNA和hnRNPA2/B1-siRNA转染的HepG2细胞的hnRNPA2/B1mRNA的水平。hnRNPA2/B1-siRNA转染组在10nM时hnRNPA2/B1转录下降0.9倍,在20nM浓度时下降0.8倍。

19.2 CTR9-siRNA转染引起HepG2细胞CEBPAmRNA水平的改变,DDX5或hnRNPA2/B1-siRNA不显示此效果。

在HepG2细胞中进行siRNA转染后,CEBPAmRNA的表达水平如图33所示,其中

25 (A) siRNA(10nM和20nM)击倒CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1时的CEBPA的转录水平。

(B) C/EBP $\alpha$ -saRNA分别和CTR, DDX5或hnRNPA2/B1-siRNA共转染后CEBPA转录的水平。

30 根据图33A,当我们通过10nM的siRNA击倒下调CTR9mRNA的表达时,CEBPA的转录水平增加4倍(图33A)。但是,DDX5(图33A)和hnRNPA2/B1(图33A)的击倒没有引起明显的变化。另外,当转染10nM的DDX-siRNA或20nM的hnRNPA2/B1-siDNA时,CEBPAmRNA增加了3倍以上(图33A)。在图33B中,用50nM C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM CTR9-siRNA转染后,我们观察到了超过4倍的CEBPAmRNA增加。在用50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM的DDX5-siRNA联合转染时,观察到相同的增加(图33B)。当用50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM的hnRNPA2/B1-siRNA共转染时,CEBPAmRNA的表达增加了2倍(图33B)。

19.3. CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1击倒可削弱HepG2细胞中的C/EBP $\alpha$ -saRNA活性。

35 为了研究相关蛋白的特异性击倒对saDNA的活性的影响,分别共转染CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1蛋白的siRNA和C/EBP $\alpha$ -saRNA,并测量转染后HepG2细胞中的CEBPAmRNA表达水平。

在HepG2细胞中,共转染50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM的CTR9-siRNA。图34A显示,50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA单次转染的CEBPAmRNA的表达水平显示增加27倍,转染CTR9-siRNA后(图34A),10nM的CTR9-siRNA组的CEBPAmRNA表达水平增加4倍,50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM的CTR9-siRNA联合转染中显示4.6倍数的CEBPAmRNA表达激活,低于C/EBP $\alpha$ -saRNA单一转染的激活水平。

40 图34B显示,20nM C/EBP $\alpha$ -saRNA转染组CEBPA转录水平达到4.7倍,并与20nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和20nM DDX5-siRNA的联合转染增加3倍表达。相对于未转染组,DDX5-siRNA的单次转染后CEBPA表达没有变化。

图34C显示,50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA单次转染的CEBPAmRNA的表达水平显示增加27倍。转染hnRNPA2/B1-siRNA后(图34C),合并50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA和10nM的hnRNPA2/B1-siRNA进行转染,转染后表达增加2倍。

hnRNPA2/B1-siRNA单次转染相对于未转染的组CEBPA表达的没有变化。

45 本实验的目的是确定siRNA的特异性击倒是否通过影响ChIP下拉确定的蛋白质将影响C/EBP $\alpha$ -saRNA在相关细胞系活性的能力。HepG2细胞用于C/EBP $\alpha$ -saRNA的联合转染50nM和10nM的特异性siRNA。在存在C/EBP $\alpha$ -saRNA(50nM)的情况下,检测到CEBPA转录增加了27倍。这种增加的水平与以前的研究不符;因此,需要重新验证所看到的表达水平。为此,对每个组的基因的相关的Ct值进行了分析(图35)。显然GAPDH扩增各组之间的水平波动表明GAPDH是不合适的管家基因用于CEBPA的相对定量。这既适用于单独转染的细胞以及具有saRNA和siRNA组合的细胞。因此,为  
50 此击倒相关相互作用蛋白的初步研究,有必要确定更好的管家基因。通过研究,还有如下几种管家基因可选择进行本



项实验：1. UBC：泛素C；2. TBP：TATA结合蛋白；3. HPRT1：次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶1 4. HMBS：氩甲基胆烷合酶。

但是，可以观察到，在以下情况下，C/EBP $\alpha$ -saRNA (20nM) 转染的CEBPAmRNA增加了3倍 (图36)。另外，在分析了相关基因的Cl值之后，单次转染的ACTIN扩增水平和双重转染的GAPDH扩增水平转染组在所选组之间没有显示出很大的波动 (图37)。这提示ACTIN和GAPDH用作选定单株 (20nM C/EBP $\alpha$ -saRNA, DDX5-siRNA和hnRNPA2/B1-siRNA; 10nM的CTR9-siRNA) (图37A) 和双倍 (20nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA与20nM的CTR9-siRNA或hnRNPA2/B1-siRNA; 50nM的C/EBP $\alpha$ -saRNA与10nM DDX5-siRNA的 (图37B) 转染组是可靠的。而上述实验则进一步说明了DDX5蛋白，和hnRNPA2/B1对C/EBP $\alpha$ -saRNA在HepG2细胞内的活性基本没有影响，而CTR9蛋白则可能降低C/EBP $\alpha$ -saRNA提升CEBPA的相对表达水平的能力。

申请人通过研究saRNA相关作用蛋白的特征，以进一步了解其作用模式。我们采用蛋白质组学方法鉴定了不同肝癌细胞系中C/EBP $\alpha$ -saRNA相关作用蛋白，并识别了新的候选蛋白。我们把这些蛋白质分成六个主要的功能组，包括参与mRNA的穿梭、转录、翻译、转录稳定性、代谢和凋亡。从中高分化的HCC细胞(HepG2和Hep3B)和未分化的HCC细胞(PLCPRF5)中识别出与C/EBP $\alpha$ -saRNA直接结合的11个蛋白质。其中CTR9, DDX5和hnRNPA2/B1被普遍认为与p21-saRNA结合，提示它们是saRNA活性的重要调控因子。对比未分化、不敏感的PLC/PRF/5细胞，C/EBP $\alpha$ -saRNA在对C/EBP $\alpha$ 激活敏感的中分化HepG2和Hep3B细胞中，结合了大量蛋白。这些前期研究结果表明对比中分化HCC细胞，未分化HCC细胞或许表现为C/EBP $\alpha$ -saRNA敏感性降低。因为它们可能缺乏或减少了直接与saRNA结合或介导saRNA转录活性因子的内源性表达。这一观察为探索无应答HCC是否通过上调关键的RITA组分(如CTR9, hnRNPA2/B1或DDX5)而转变为对saRNA诱导活性更为敏感的HCC提供了机会。由于内源性CTR9, hnRNPA2/B1和DDX5表达水平对增强saRNA活性至关重要;调节它们的表达可能是优化saRNA治疗的另一个重要环节。saRNA转录激活机制在疾病细胞类型中的特征，将无疑为开发saRNA 未来的临床应用提供一种更有效的手段。图36显示HepG2细胞中的CEBPAmRNA表达水平。CEBPA表达被saRNA上调。最终浓度为20nM和50nM RNA。相对表达使用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>的Livak方法计算， $\beta$ -ACTIN用作管家基因。条形图代表CEBPAmRNA $\pm$ SEM的相对表达水平 (n = 1)。

#### 实施例20 C/EBP $\alpha$ 的表达与HCC侵袭转移的关系

本课题研究中病人的入选标准：手术为根治性切除，标准为：完全切除肿瘤，组织学检查切缘阴性；病理证实是HCC；病人临床病历资料及随访资料完整可靠。收集临床手术切除的新鲜HCC癌组织及配对的癌旁组织标本提取组织中RNA和蛋白，qRT-PCR和Western blot 检测C/EBP $\alpha$ 表达；并将切除标本制成病理切片，应用免疫组化比较癌组织与癌旁肝组织的C/EBP $\alpha$ 表达；比较复发病人和未复发病人C/EBP $\alpha$ 表达水平，研究C/EBP $\alpha$ 表达与HCC侵袭转移的关系。

侵袭试验基本方法：4 $^{\circ}$ C融解Matrigel，以无血清1640培养液稀释至终浓度为1.0mg/ml，按每孔100ul均匀涂布于预冷的Transwell小室滤膜上表面，37 $^{\circ}$ C孵育2h;将Transwell小室的上室浸于下室培养液中，上室加入100ul细胞悬液( $1 \times 10^5$ 个细胞)，37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境下孵育24 h;取出小室，吸去上室培养液，PBS洗涤，甲醛固定，用棉棒擦去微孔滤膜上室面的Matrigel和未穿越的细胞，Giemsa染色，PBS洗涤；于200倍光镜下，计数微孔滤膜下室面侵袭的肿瘤细胞。

体内原位成瘤及肺转移试验基本方法：通过肿瘤细胞SCID鼠肝脏原位注射成瘤，观察6-8周，比较siRNA介导的低表达C/EBP $\alpha$ 的肿瘤细胞株对成瘤和肺转移的影响；同时也观察在saRNA介导的高表达C/EBP $\alpha$ 的肿瘤细胞株，是否具有抑制肿瘤生长和抑制肺转移的作用。

#### 实施例21 saRNA组合物介导的C/EBP $\alpha$ 激活在HCC不同分化类型细胞器的功能性分析

##### 21.1 细胞周期分析:

区分不同细胞周期的HCC细胞器，并验证C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA组合使用的抗增殖活性。应用流式细胞双变量细胞周期试剂盒 (Millipore) 做G2/M期分析。在对照组和C/EBP $\alpha$ -saRNA转染组应用细胞周期G2/M期通路探索抗体 (Millipore, 15-120)，通过流式细胞仪评估G2/M期 (DNA复制期) 分布。同样，应用于DNA复制分析的流式细胞双变量细胞周期试剂盒 (Millipore) 和细胞周期-S期通路探索抗 (Millipore) 评估S期 (细胞生长增殖期) 分布。通过以上分析，阐明了C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA组合使用的抗增殖活性的内在本质。同样的方法也用于分析并阐明经C/EBP $\alpha$ -saRNA分别和p21-saRNA、CTR9-siRNA和hnRNPA2/B1组合转染的HCC肿瘤细胞的不同周期反应本质。

根据上述实验方法，分别使用C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA、CTR9-siRNA和hnRNPA2/B1的组合物进行，记录并分析实验结果。

##### 21.2 细胞凋亡分析:

• TUNEL分析法 (末端脱氧核糖核苷酸转移酶(TdT) dUTP镍端标记法): 通过检测DNA碎片(细胞凋亡的生化标志)评估是否C/EBP $\alpha$ 组合物诱导核酸内切酶裂解产物。细胞转染经GFP(绿色荧光蛋白)标记的C/EBP $\alpha$ -saRNA。随后Br-dUTP(溴

化脱氧尿苷三磷酸核苷酸)关联DNA 链断裂部,并通过TUNEL分析试剂盒(Abcam)及红色荧光标记的抗-BrdU单克隆抗体进行识别分析。

• Caspase 9分析法:检测半胱天冬酶9(Caspase9)活性以阐明C/EBPα和C/EBPβ-siRNA组合使用诱导细胞破坏塌陷。Caspase 9试剂盒用于检测分光光度计可定量测定的被标记底物的裂解度。同样的实验使用C/EBPα-saRNA分别和p21-saRNA、CTR9-siRNA和hnRNPA2/B1组合转染的细胞中进行,可以得到各组合物的效果。

### 21.3 细胞信号通路分析

近十年来,我们在识别肿瘤发病机制的分子机制方面取得了巨大进展。大量参与肿瘤发生的信号通路已被确定为新的分子治疗靶点。在HCC中,一些细胞信号通路参与肿瘤的发生。这些包括WNT/β-catenin, 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)、血管内皮生长因子(VEGF)、纤维母细胞生长因子(FGF)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3k)/蛋白激酶B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶(mTOR),MYC/信号传感器和转录激活3(STAT3)/白介素6(IL6R),肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、表皮生长因子受体(EGFR)和转化生长因子β(TGFβ)通路。我们之前的研究证明了C/EBPα-saRNA在C/EBPα-saRNA转染HepG2 细胞下调MYC,STAT3和IL6R通路。然而,在其他类型的肝癌细胞(Hep3B、hu -7、SK-Hep-1、SMMC-7721、Bel-7402、PG5、HCC-9204)是否也发生同样的事件尚不清楚。基于此,为了评估是否转染C/EBPα-saRNA在其他类型的肝癌细胞会影响以下信号通路因子的表达(WNT/β-catenin, MAPK, VEGF, FGF, PI3k/AKT/mTOR, MYC/STAT3/IL6R, HGF, IGF, EGFR和TGFβ),应用激酶分析阐明是否这些目的因子被磷酸化并被C/EBPα-saRNA下调表达。并通过Western blot确定这些因子在磷酸化状态和蛋白水平中的表达。

### 21.4 CDKs(细胞周期蛋白依赖性激酶)和磷酸化分析

我们通过CDKs和磷酸化分析确定转染C/EBPα-saRNA的不同类型HCC细胞器的不同CDK复合物中的酶活性,以明确是否细胞信号因子(MYC/STAT3/IL6R, PI3K/AKT/MTOR, WNT/β-catenin等)磷酸化和受C/EBPα-saRNA调控下调表达。

这些复合物被特异性抗体分离并与荧光标记的底物共同孵育。然后,这些反应CDKs的活性的底物通过qRT-PCR定量分析并通过Western Blot显示出来。

## 实施例22 小鼠肝癌模型中的应用研究

本实施例对本发明的C/EBPα-saRNA和p21-saRNA、CTR9-siRNA和hnRNPA2/B1组合使用的组合物在小鼠肝癌模型中的应用进行了研究。选用的模型是二乙基亚硝胺(DEN)诱导的自发性肝癌小鼠模型中。用DEN处理雄性Wistar大鼠以诱导HCC。简而言之,将动物用DEN处理9周,随后不做处理3周。随后根据体重,将动物随机分配至三个组(6至7只雄性/组)。在第1日处死组1动物以充当治疗前对照,并且将组2和组3动物用配制在NOV340(siFLUC)或MTLCEBPA中的非靶向性dsRNA按剂量4mg/kg静脉内处理3次(第1、第3和第5日)。在第12日,抽取血液并处死全部动物。测量肿瘤重量和肝重量并且将肝组织切片立即快速冷冻供mRNA分析。通过qRT-PCR(管家基因: GAPDH; 测量一式三份)测定CEBPA mRNA水平和ALB mRNA水平。

应用聚酰胺(PAMAM)树形大分子建立C/EBPα-saRNA和p21-saRNA、CTR9-siRNA和hnRNPA2/B1组合物的树形大分子聚合物,或者将C/EBPα-saRNA-树形大分子聚合物分别和p21-saRNA树形大分子聚合物、CTR9-siRNA树形大分子聚合物和hnRNPA2/B1树形大分子聚合物组合使用,并通过尾静脉将其分别组合使用注射到二乙基亚硝胺(DEN)治疗组的小鼠体内。随后发现对比对照组,治疗组的肿瘤负荷明显降低。同时血清白蛋白水平显著增高,血清胆红素、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平显著降低。定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分析治疗组小鼠的肝脏组织证实了saRNA组合物诱导上调了C/EBPα和白蛋白以及重要肝细胞标记物(HNF1α和HNF4α)的mRNA水平。该实验同时在四个肝癌细胞器上(HepG2, Hep3B, PLC/PRF5, SNU475)进行,并取样做蛋白组学分析,也证实了上调CEBPA基因可以通过激活若干细胞信号转导通路,改善细胞代谢水平和肝脏生物学功能。

### 野生型小鼠中配制的C/EBPα-saRNA体内研究

C/EBPα-saRNA和p21-saRNA、CTR9-siRNA和hnRNPA2/B1组合的组合物分别配制于树状物-MTL-501和NOV340(Marina)中。在野生型小鼠(每项研究中n=5)中分别对上述样品进行实验。具体方法是分别对野生型小鼠给予三次剂量的树状物-C/EBPα-saRNA组合物和NOV340-C/EBPα-saRNA组合物,并且在最末剂量后2天处死。分别测量白蛋白水平和基于ELISA读数计算血清白蛋白水平。

实验结果显示,上述两种样品均上调白蛋白。测量CEBPA和ALB的mRNA水平。提取总RNA并逆转录后进行测量。结果显示C/EBPα和ALB的相对表达水平也都获得上调。还将不同剂量水平的C/EBPα/NOV340(0.5mg/kg和3mg/kg)施用至野生型小鼠进行检测,结果证明该上调水平与剂量相关。

### 配制的C/EBPα-saRNA组合物在DEN大鼠中的体内研究

在DEN大鼠(n=6)中实施一项体内研究。HCC模型诱导肝硬化和自发性肝肿瘤。大鼠饲以二乙基亚硝胺(DEN)7周,随后饮水3周。肿瘤形成后立即启动多种C/EBPα-saRNA组合物制剂治疗。大鼠在5天内接受三次IV注射,随后监测7天。

随后处死它们用于组织学检查并测量肝mRNA和血清蛋白。实验结果显示DEN大鼠的体重、肝重量、肿瘤体积。对于全部制剂/剂量，肿瘤体积均显著缩减。

### 实施例23. C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物在人体中的应用研究

5 在临床研究中检验C/EBP $\alpha$ -saRNA-组合物的树状物。第4代(G4)二氨基丁烷(DAB)-芯部-PAMAM树状物(NanoSynthons LLC, Michigan)用来与C/EBP $\alpha$ -saRNA形成复合物。C/EBP $\alpha$ -sRNA对DAB-芯部-PAMAM的比率按重量计是1:3。

10 在肝癌患者上检验C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物-树状物治疗的效果。在这项研究中，三次剂量的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物-树状物在第1、第3和第5天按约0.5mg/kg给予肿瘤患者。测量血清白蛋白水平直至第3天。在第15天左右观察到血清中的白蛋白水平显著升高，此时血清白蛋白水平升高至正常范围。血清白蛋白水平在正常范围维持直至第34天。

在另一项研究中，C/EBP $\alpha$ -saRNA-树状物和C/EBP $\beta$ -siRNA-树状物用来增加肝硬化患者中的白细胞计数。三次剂量的C/EBP $\alpha$ -saRNA-树状物的组合物在第1、第3和第5天按约0.5mg/kg给予肝硬化患者。测量所述患者的白细胞计数。给予患者1的单次剂量含有10mg C/EBP $\alpha$ -saRNA，10mg C/EBP $\beta$ -siRNA和30mg树状物。给予患者3的单次剂量含有20mg C/EBP $\alpha$ -saRNA，20mg C/EBP $\beta$ -siRNA和60mg树状物。对于患者的观察到白细胞计数的变化，间隔一天进行记录并分析。

15 人体研究结果表明，C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物-树状物可以作为治疗药用来治疗肝病患者并用来在有需求的患者中增加白细胞计数。

## 权 利 要 求 书

1. 一种含有C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物, 含有至少一种C/EBP $\alpha$ -saRNA和至少一种C/EBP $\alpha$ 的下游关键作用蛋白的saRNA或siRNA, 所述与C/EBP $\alpha$ 的下游关键作用蛋白包括p21、C/EBP $\beta$ 、CTR9、DDX3、DDX5和hnRNPA2/B1中的一种或数种。
2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述的saRNA为p21-saRNA。
3. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述siRNA为C/EBP $\beta$ -siRNA, 具有如SEQ ID No. 63或64的序列。
4. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述p21-saRNA具有如SEQ ID No. 48的有义链和如SEQ ID No. 49的反义链。
5. 根据权利要求1-4任一项所述的组合物, 其中C/EBP $\alpha$ -saRNA至少80%互补于SEQ ID No.47上的区域, 并且其中所述saRNA具有14-30个核苷酸。
6. 根据权利要求1-4任一项所述的组合物, 其中所述C/EBP $\alpha$ -saRNA为双链并且包含反义链和有义链。
7. 根据权利要求6所述的组合物, 其中所述反义链包含选自SEQ ID No. 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46的序列。
8. 根据权利要求6所述的组合物, 其中所述有义链包含选自SEQ ID No. 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45的序列。
9. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述C/EBP $\alpha$ -saRNA是经修饰的。
10. 根据权利要求3所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物中C/EBP $\alpha$ -saRNA和C/EBP $\beta$ -siRNA的摩尔比为1:3-2:1。
11. 根据权利要求2所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物中C/EBP $\alpha$ -saRNA和p21-saRNA的摩尔比为1:3-2:1。
12. 权利要求1-4中任一项所述的含有C/EBP $\alpha$ -saRNA的组合物在制备上调细胞中CEBPA基因表达的药物中的应用。
13. 根据权利要求12所述的应用, 其中所述细胞是癌细胞。
14. 根据权利要求13所述的应用, 其中所述癌细胞为前列腺或乳腺癌细胞。
15. 根据权利要求12所述的应用, 其中所述细胞是肝细胞癌HCC细胞。
16. 根据权利要求15所述的应用, 其中所述细胞是分化的肝细胞癌HCC细胞。
17. 根据权利要求16所述的应用, 其中所述细胞是HepG2细胞。
18. 根据权利要求12所述的应用, 其中CEBPA基因表达上调至少20%。
19. 根据权利要求12所述的应用, 其中CEBPA基因表达上调至少2倍。
20. 根据权利要求1-4中任一项所述的C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物在制备上调细胞中的p21表达的药物中的应用。
21. 根据权利要求20所述的应用, 其中所述细胞是癌细胞。
22. 根据权利要求21所述的应用, 其中所述细胞是肝细胞癌HCC细胞。
23. 根据权利要求22所述的应用, 其中所述细胞是分化的肝细胞癌HCC细胞。
24. 根据权利要求22所述的应用, 其中所述细胞是HepG2细胞。
25. 权利要求1-4中任一项所述的含有C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物在制备上调细胞中的白蛋白的药物中的应用。
26. 根据权利要求25所述的应用, 其中所述细胞是癌细胞。
27. 根据权利要求26所述的应用, 其中所述细胞是肝细胞癌HCC细胞。
28. 根据权利要求27所述的应用, 其中所述细胞是分化的肝细胞癌HCC细胞。
29. 根据权利要求28所述的应用, 其中所述细胞是HepG2细胞。
30. 权利要求1-4任一项所述的含有组合物在制备降低HCC复发率的药物中的应用。
31. 根据权利要求30所述的应用, 其中所述细胞是癌细胞。
32. 根据权利要求31所述的应用, 其中所述细胞是肝细胞癌HCC细胞。
33. 根据权利要求32所述的应用, 其中所述细胞是分化的肝细胞癌HCC细胞。
34. 根据权利要求33所述的应用, 其中所述细胞是HepG2细胞。
35. 权利要求1-4任一项所述的含有C/EBP $\alpha$ -saRNA组合物在制备抗细胞增殖的药物中的应用。
36. 根据权利要求35所述的应用, 其中所述细胞为分化型HCC细胞系。
37. 根据权利要求36所述的应用, 其中所述细胞为HepG2细胞系。
38. 根据权利要求35所述的应用, 其中所述细胞为PLC/PRF/5细胞系。
39. 权利要求1-4任一项所述的组合物在制备通过白蛋白增强来改善肝脏功能的药物中的应用。
40. 权利要求1-4任一项所述的组合物在改善未分化型HCC细胞系对抗肿瘤药物的敏感性的药物应用。

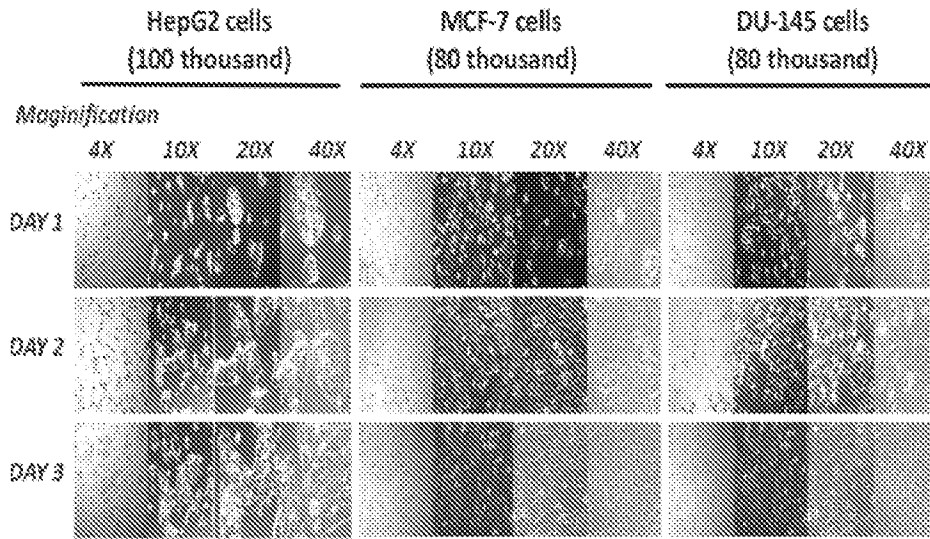


图 1

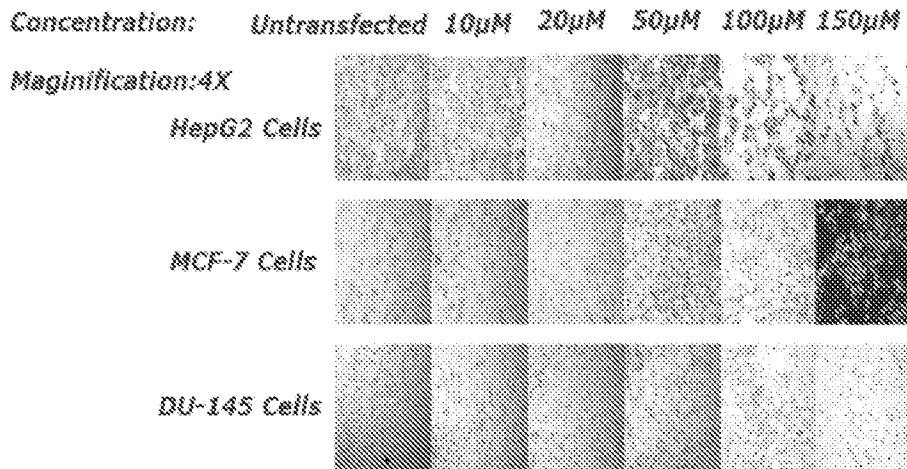


图 2

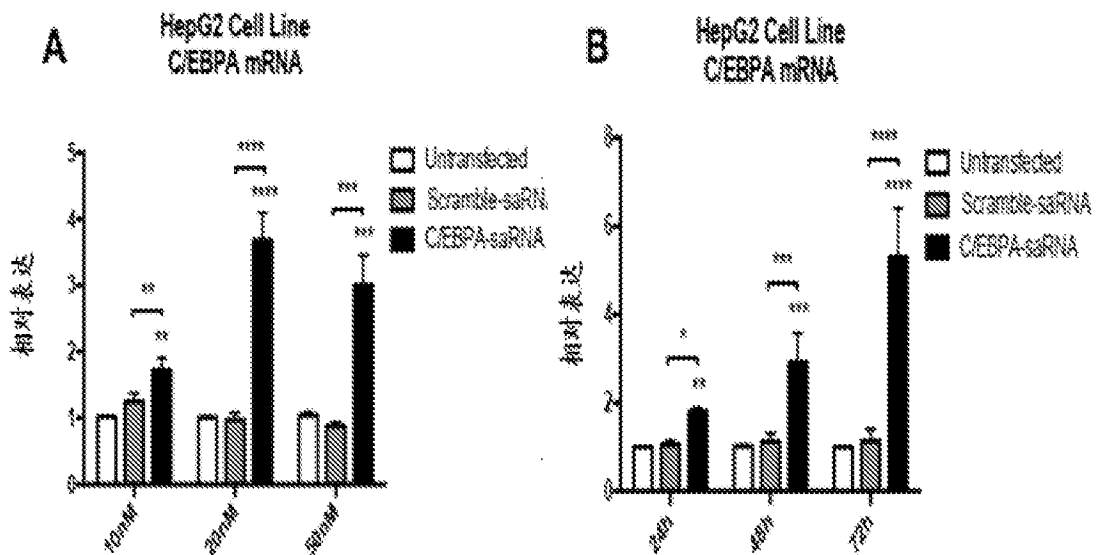


图 3

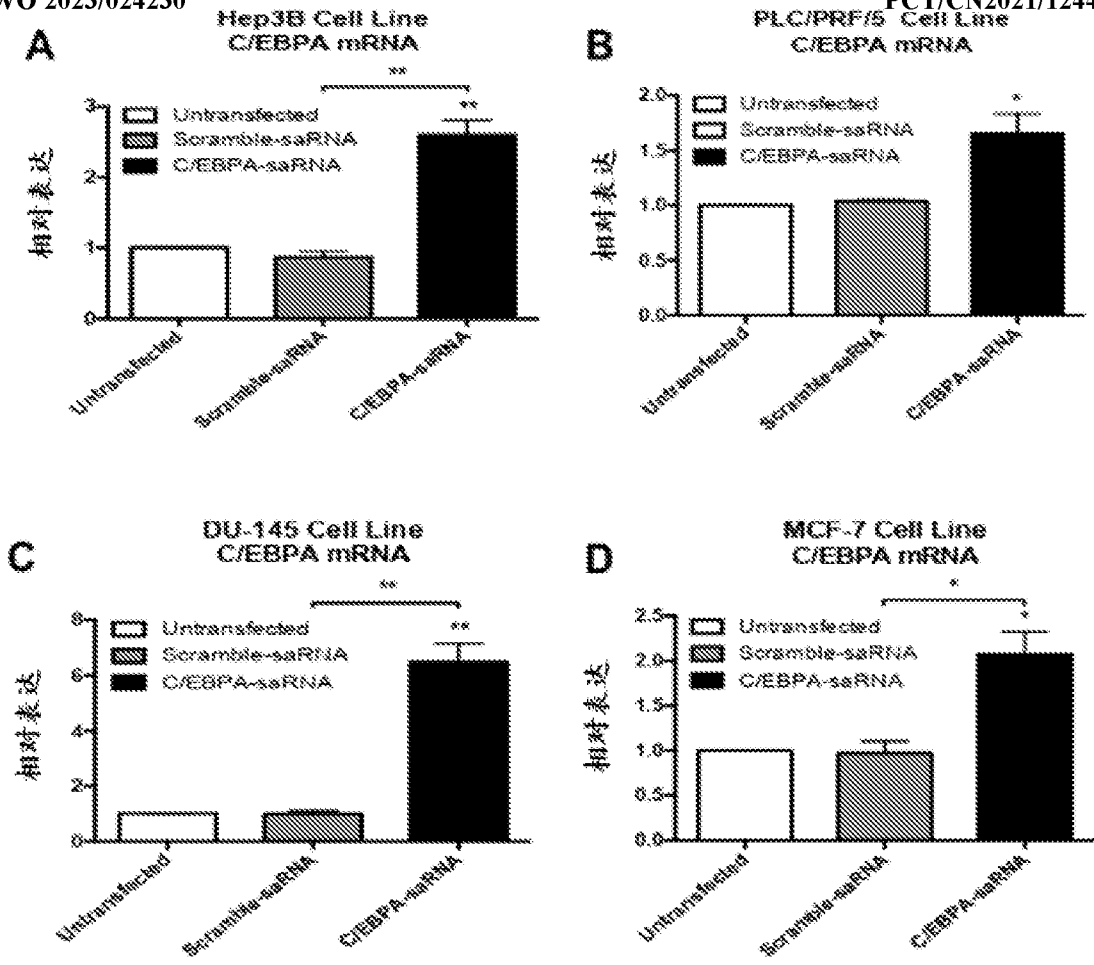


图 4

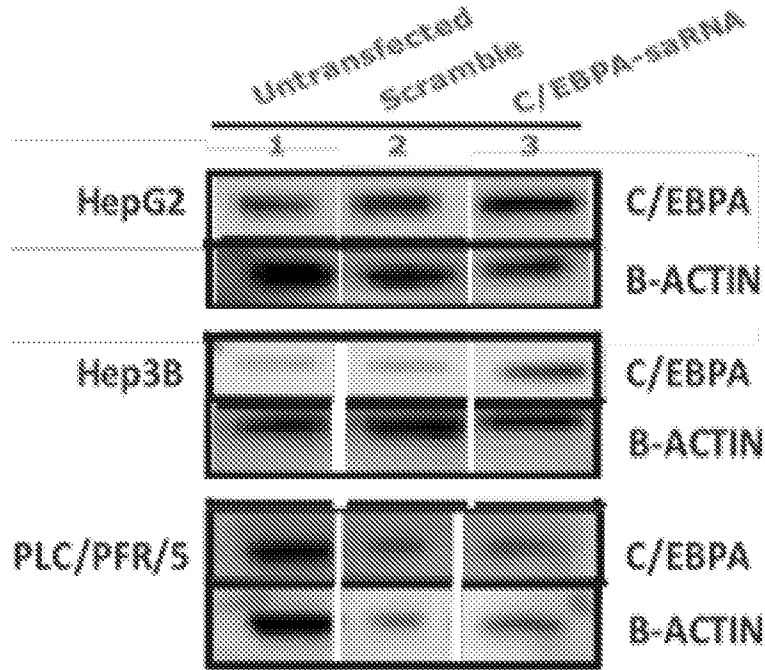


图 5

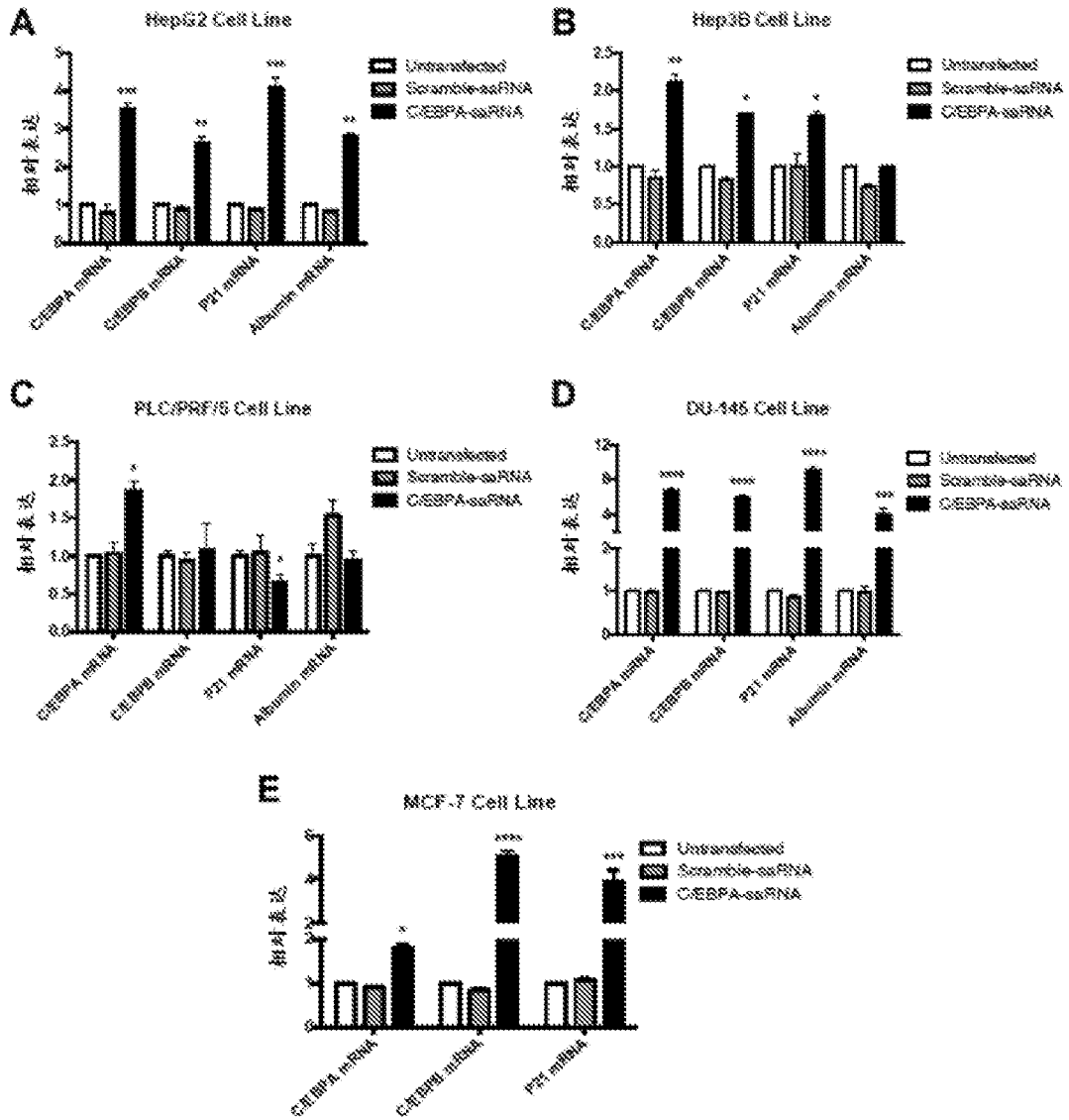


图 6

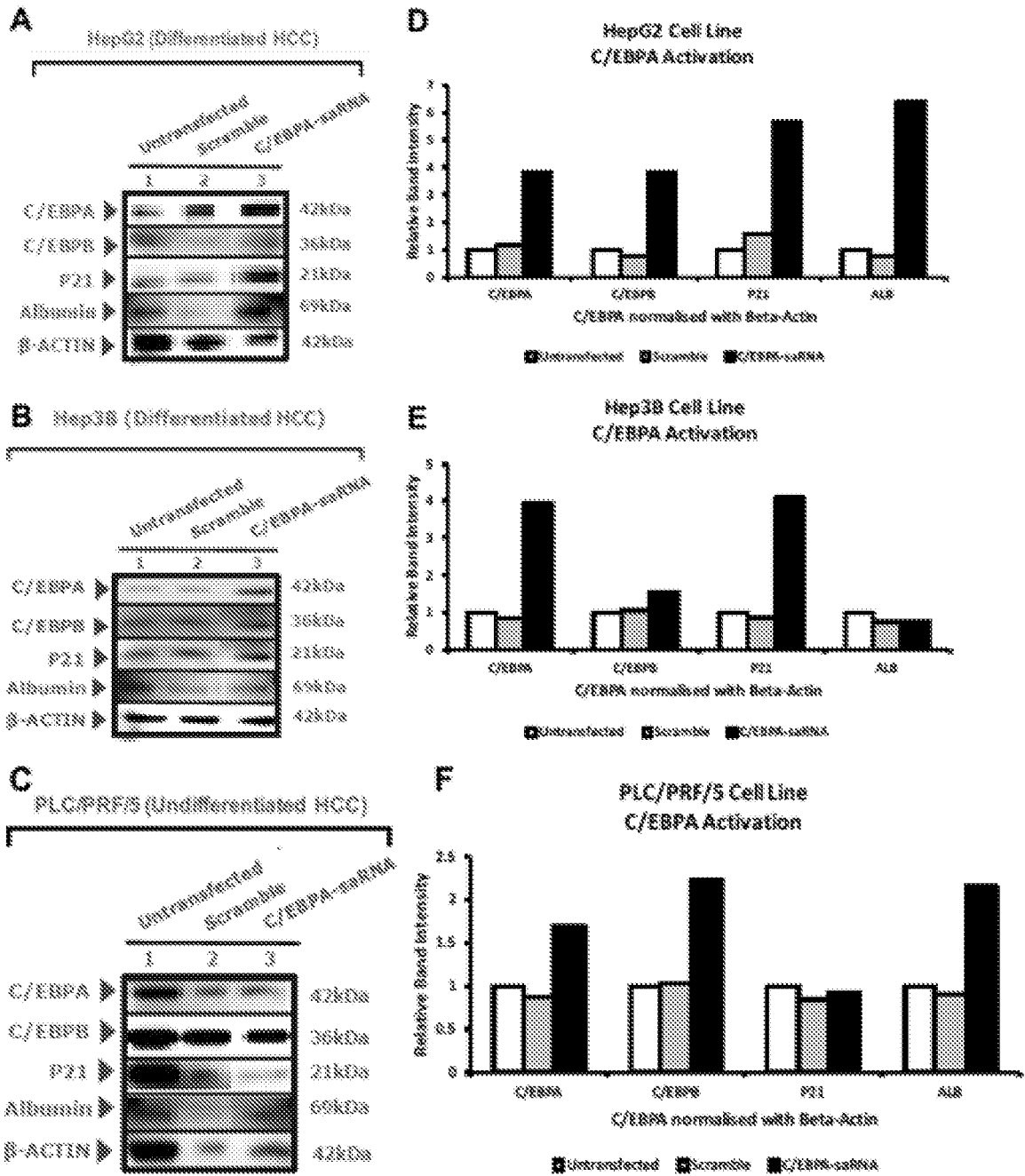


图 7

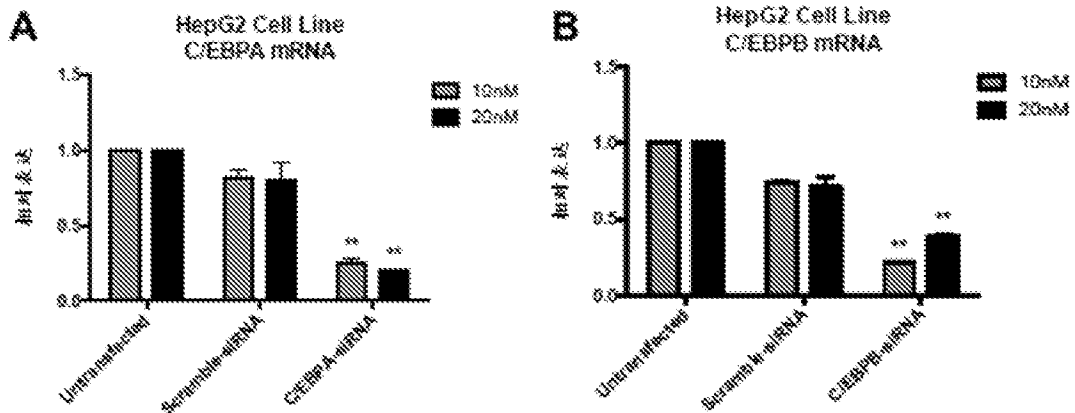


图 8



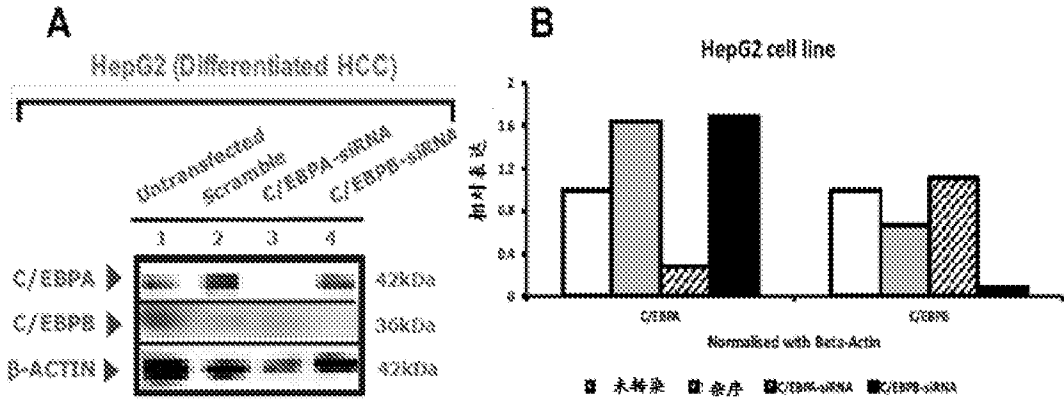


图 9

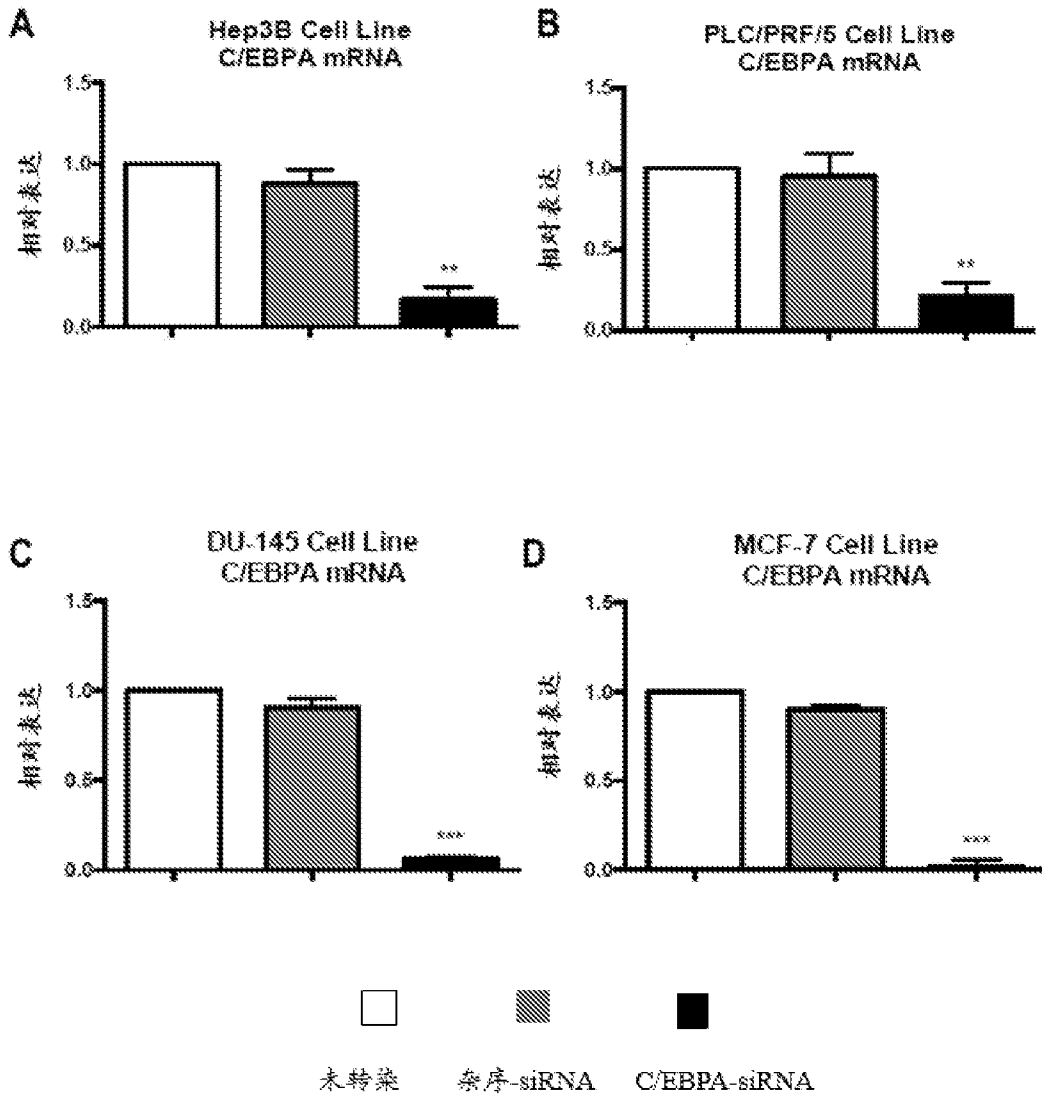


图 10

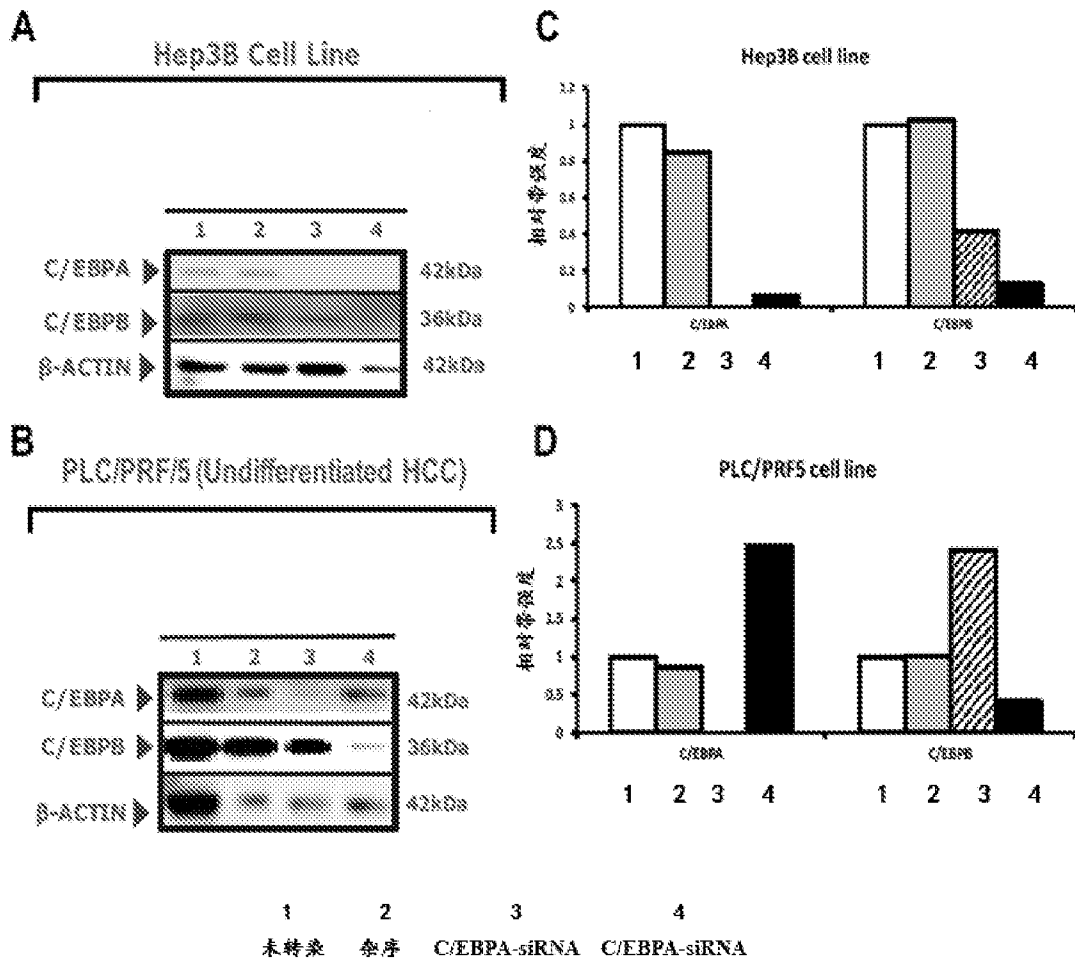


图 11

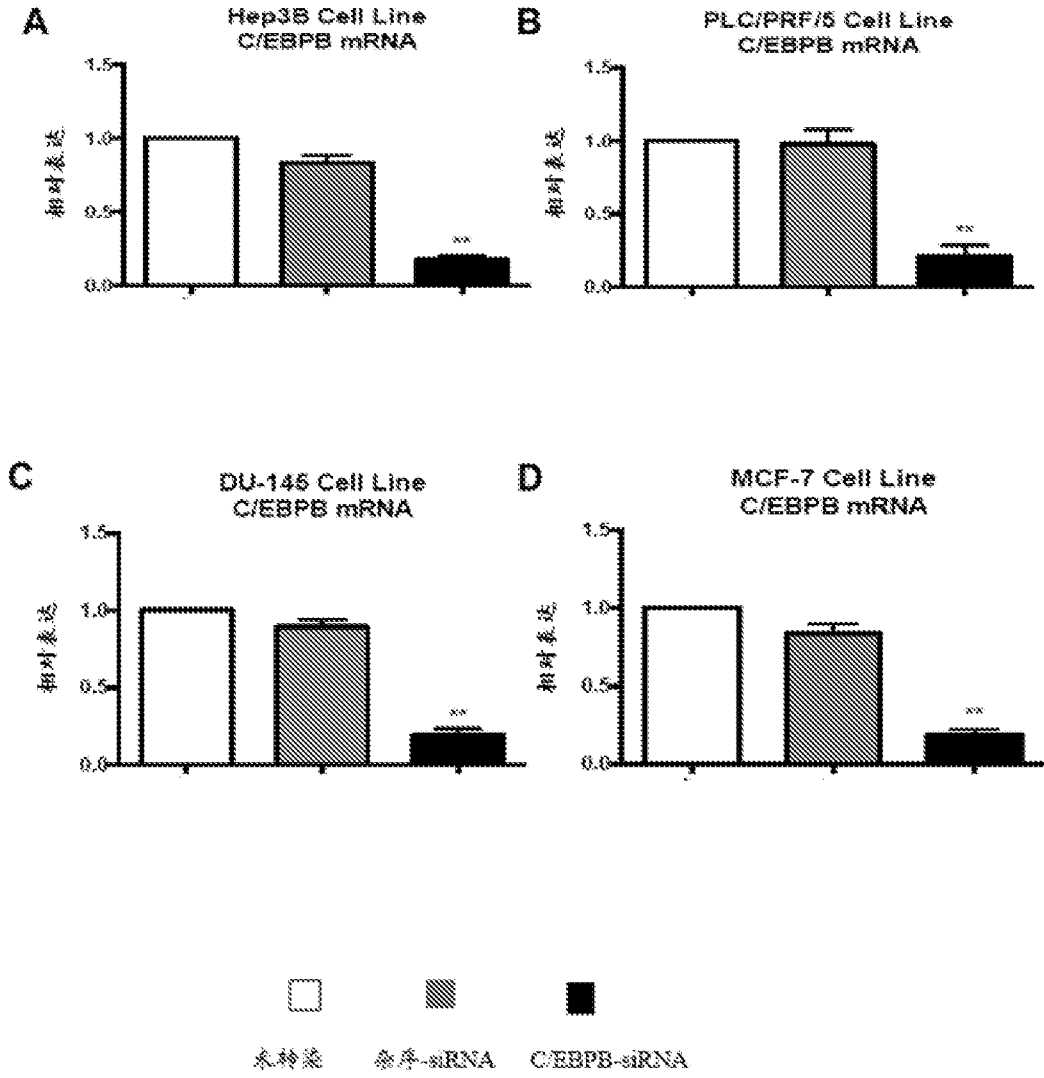


图 12

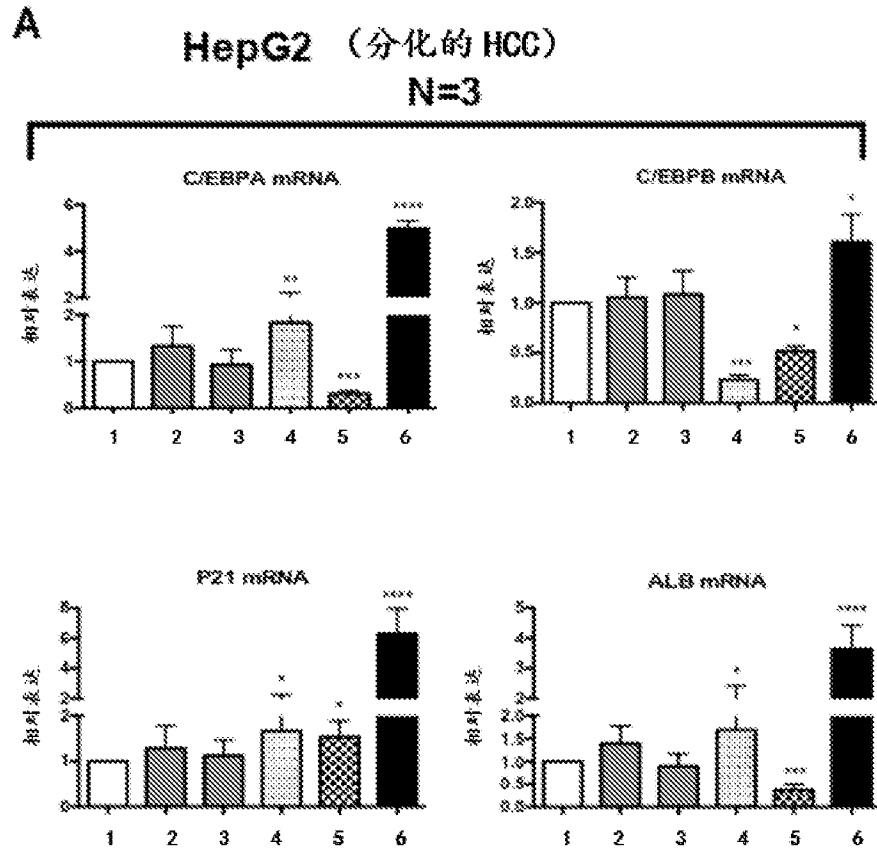
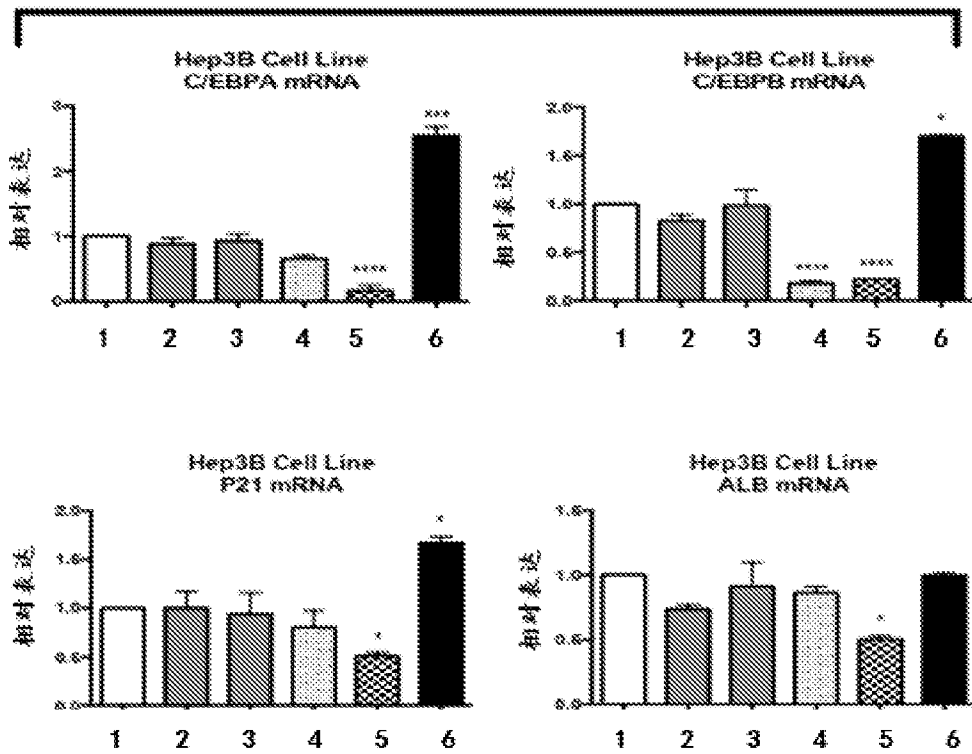


图 13A

**B**

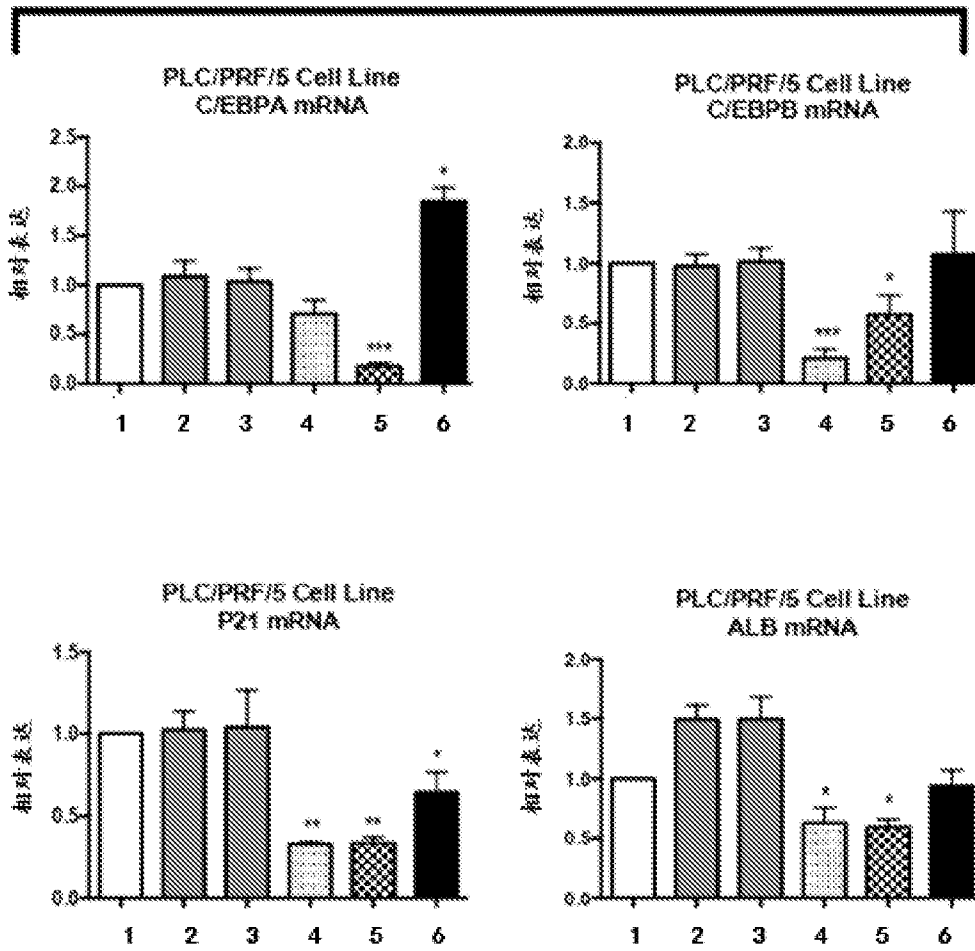
**Hep3B (分化的 HCC)**  
**N=3**



- 1 未转染
- 2 杂序-siRNA
- 3 杂序-saRNA
- 4 C/EBPB-siRNA
- 5 C/EBPA-siRNA
- 6 C/EBPA-saRNA

图 13B

**C** **PLC/PRF/5 (未分化的 HCC)**  
**N=3**



- 1 未转染
- 2 杂序-siRNA
- 3 杂序-saRNA
- 4 C/EBPB-siRNA
- 5 C/EBPA-siRNA
- 6 C/EBPA-saRNA

图 13C

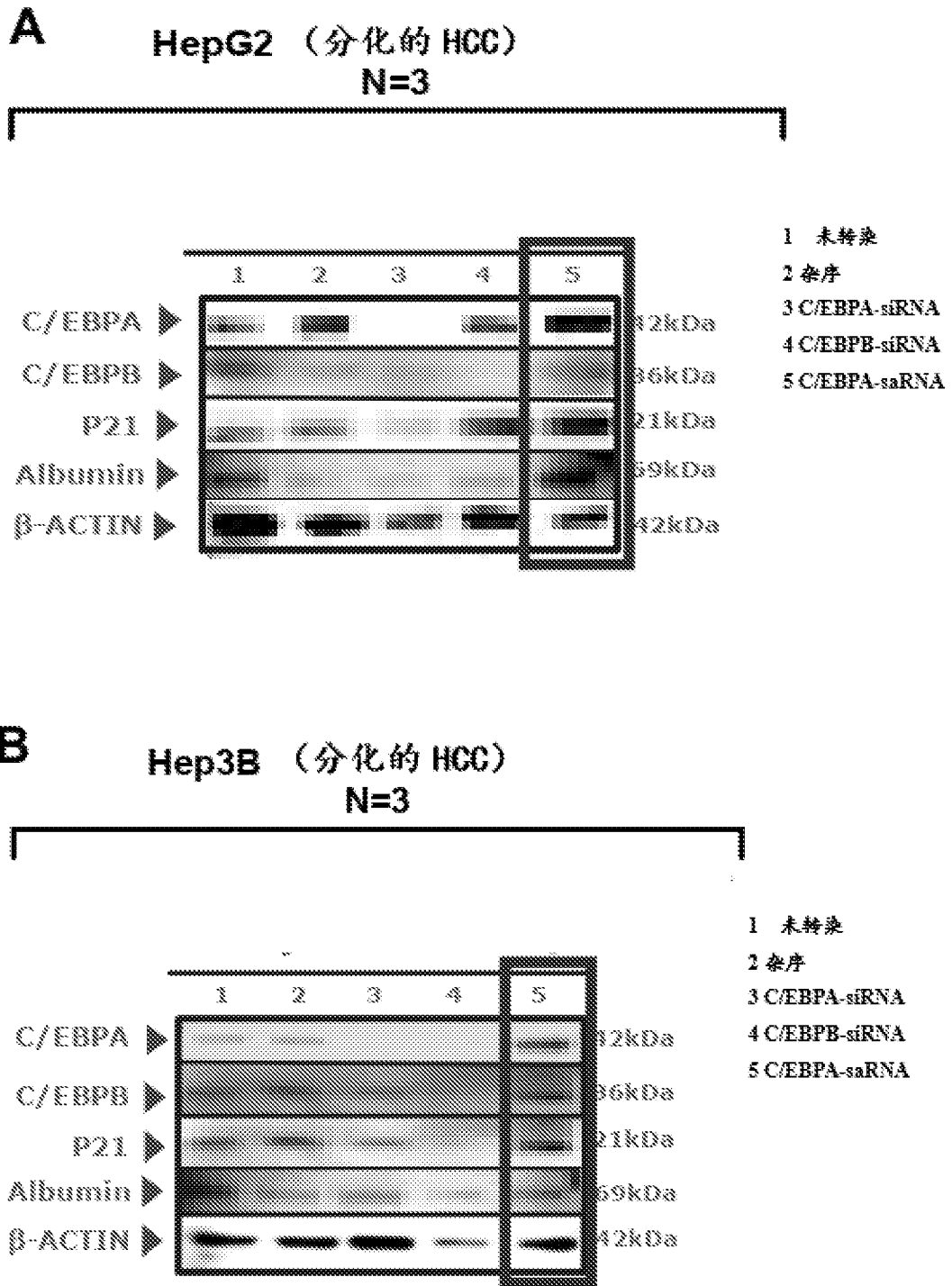


图 14 A&B

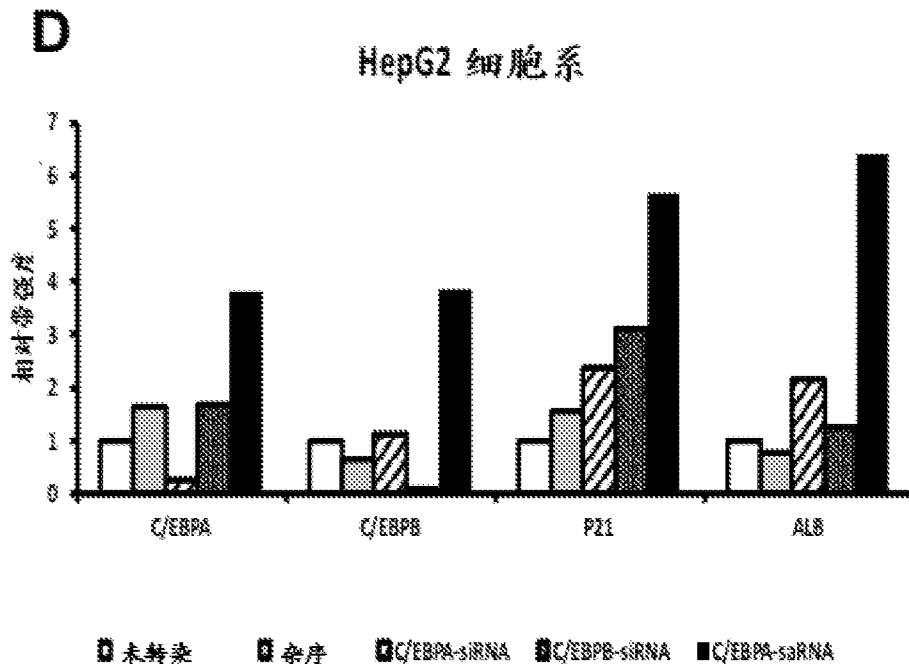
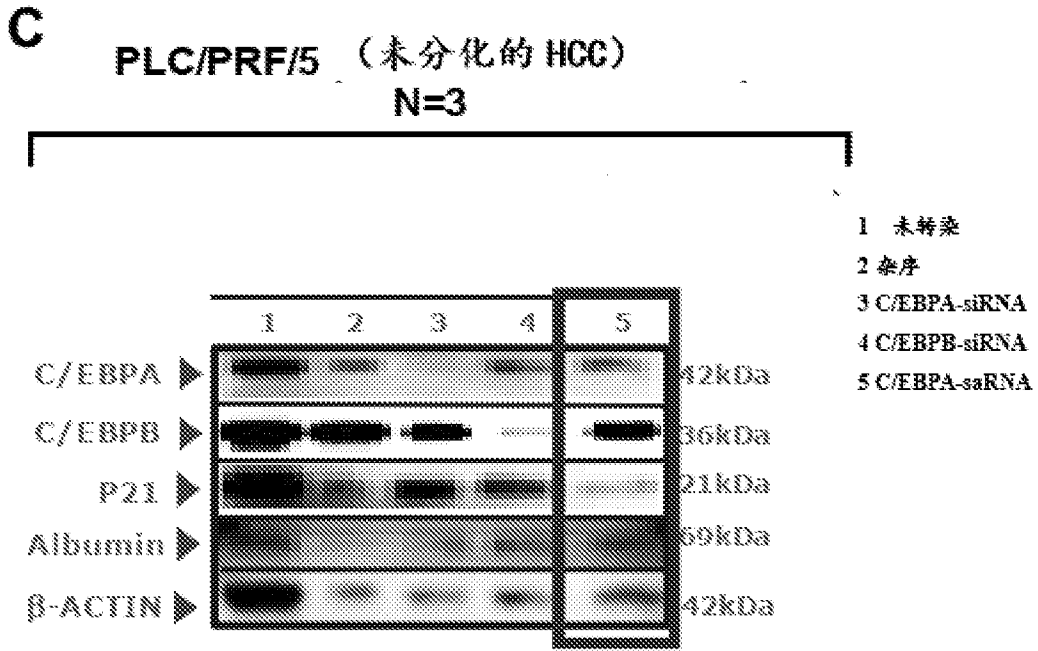


图 14 C&D



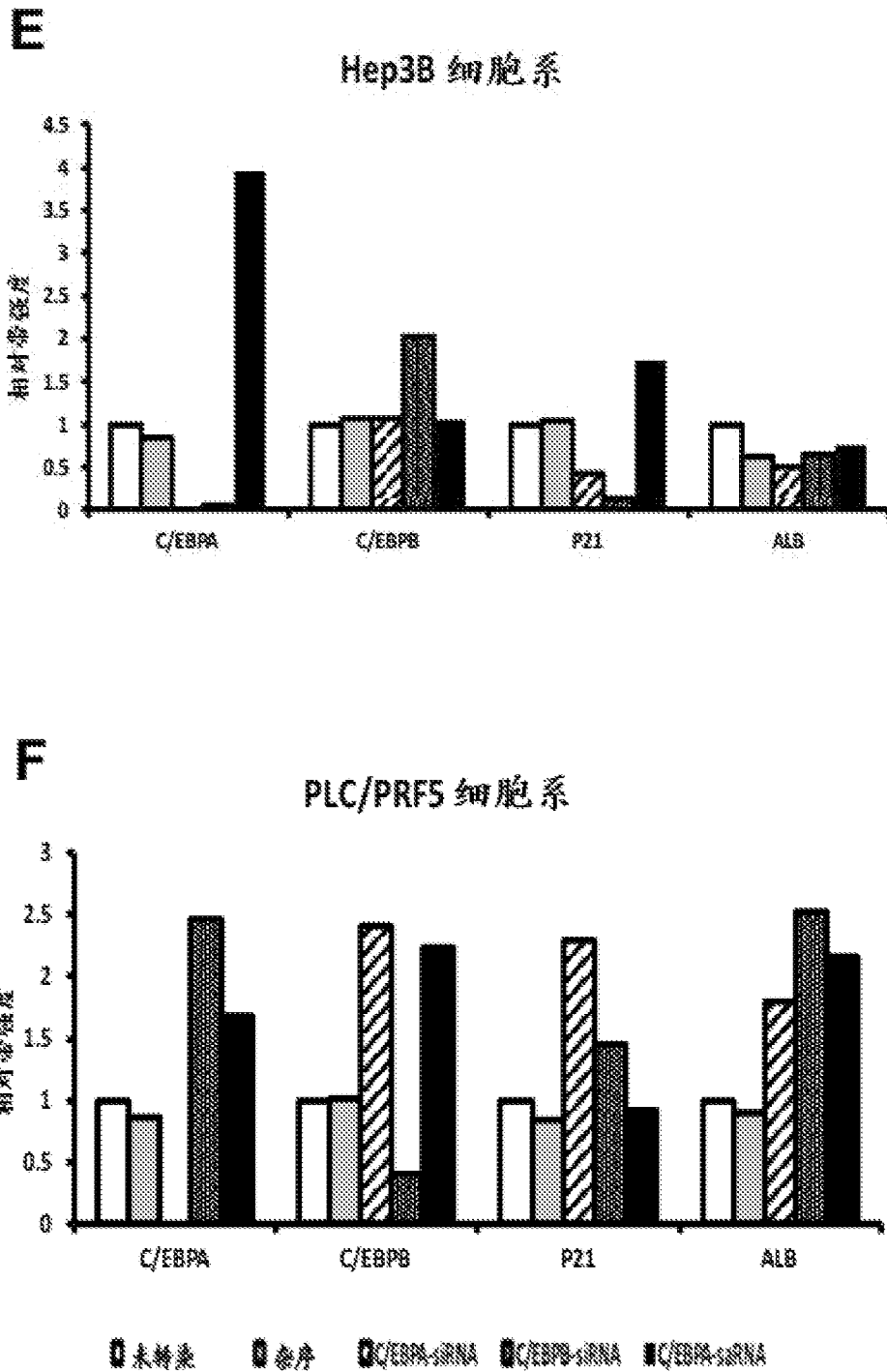
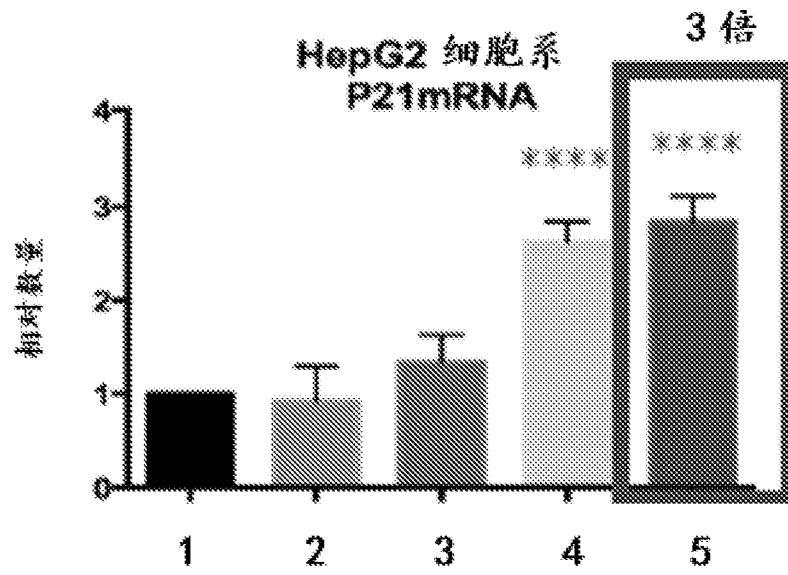


图 14 E&F



- 1 未转染
- 2 杂序-saRNA 20nM
- 3 杂序-saRNA 50nM
- 4 P21-saRNA 20nM
- 5 P21-saRNA 50nM

图 15

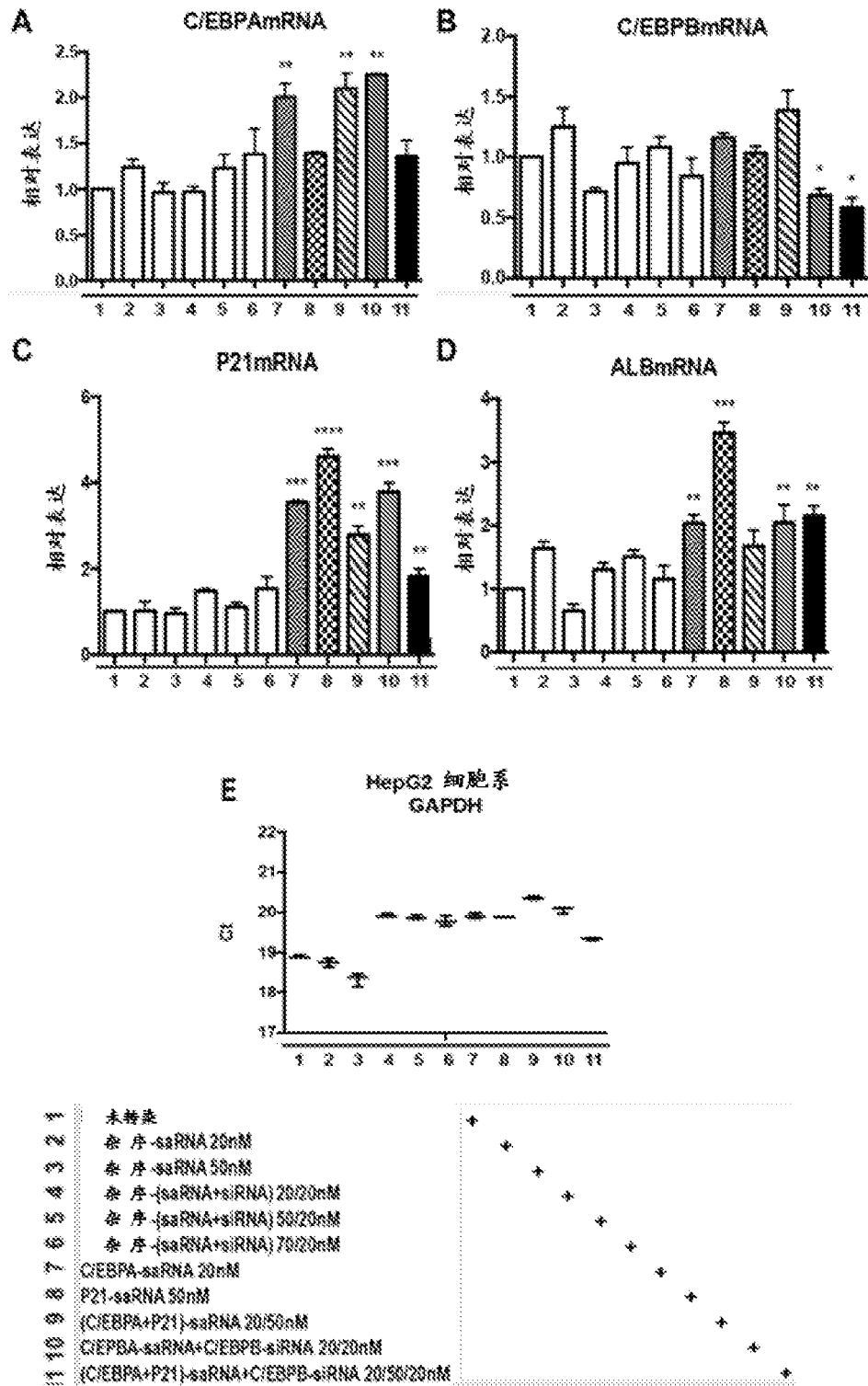


图 16

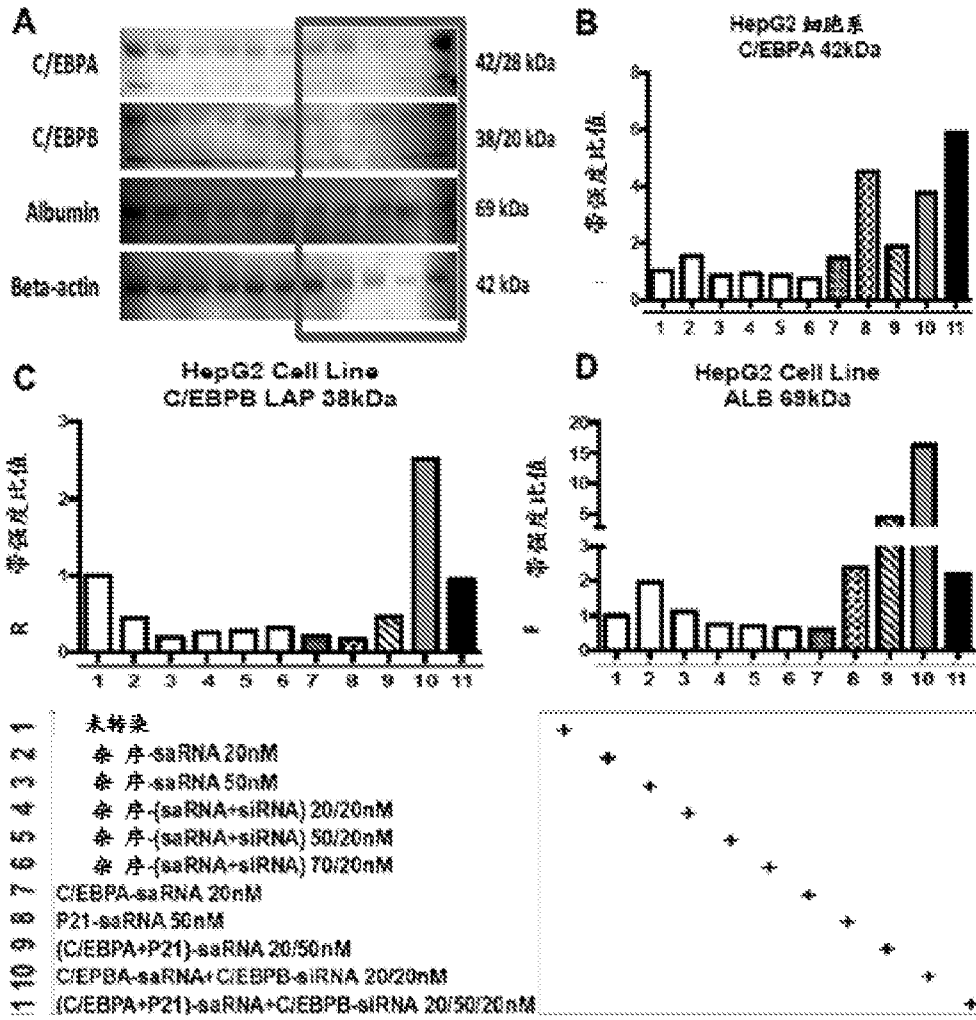


图 17

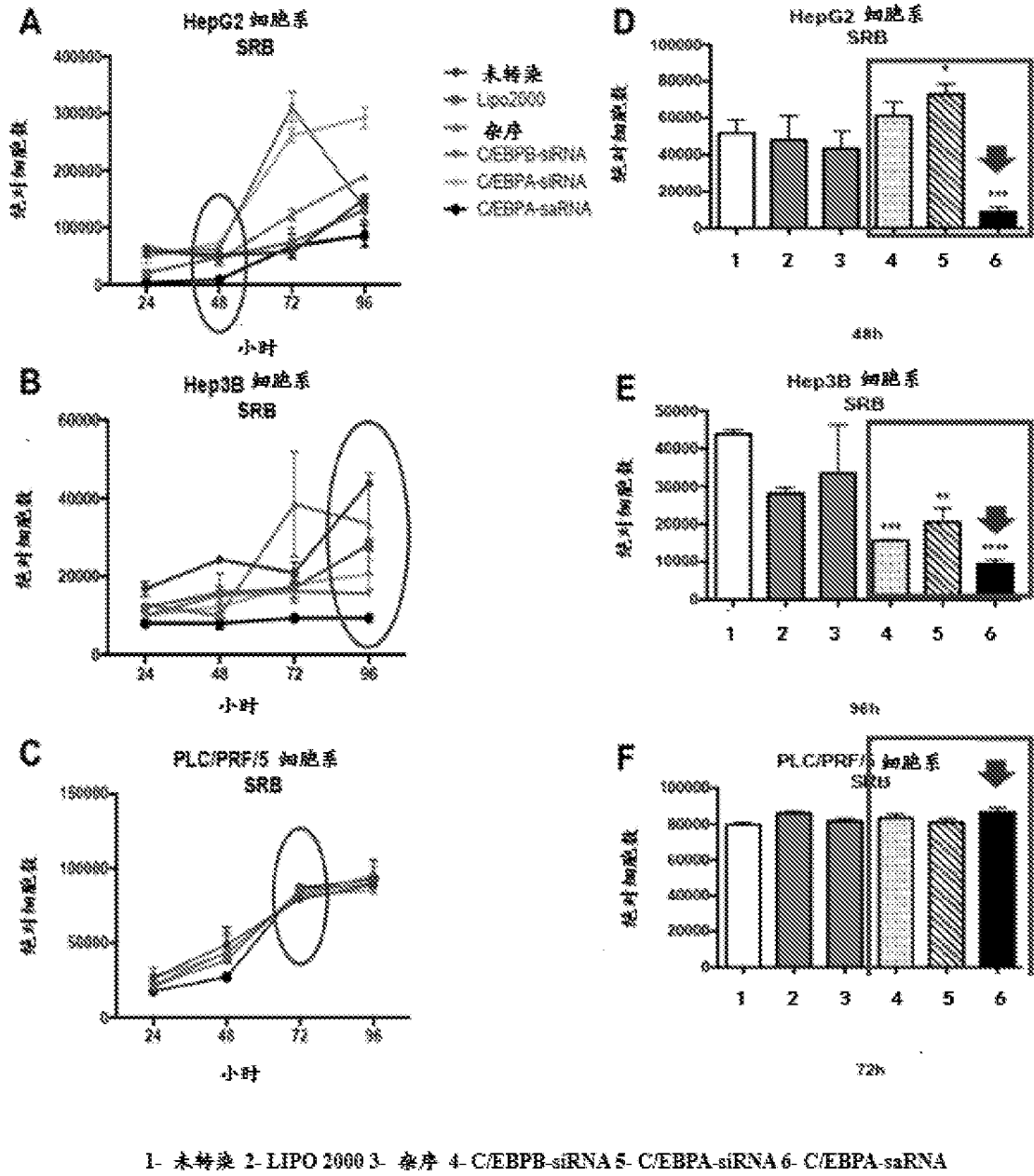


图 18

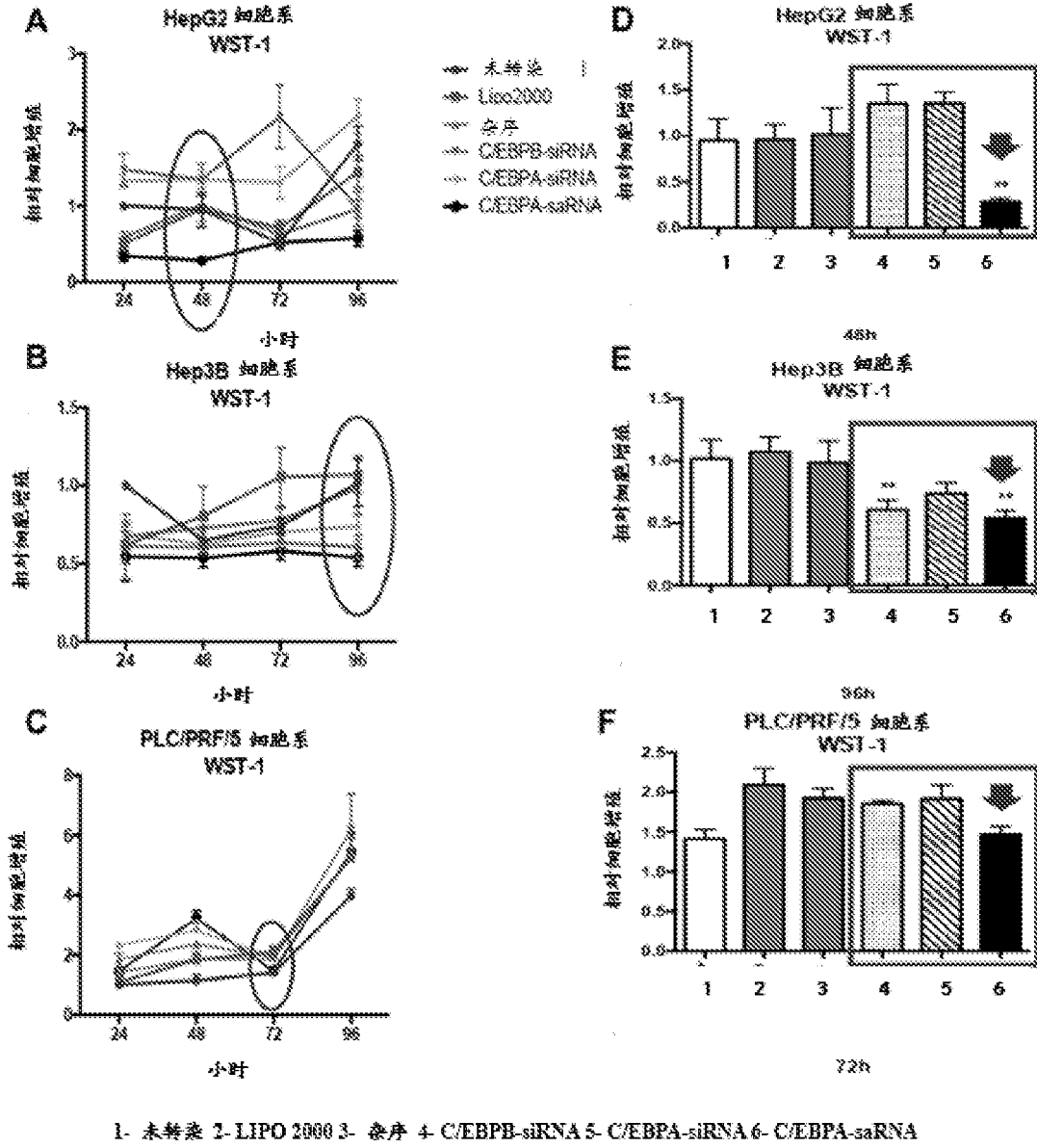


图 19

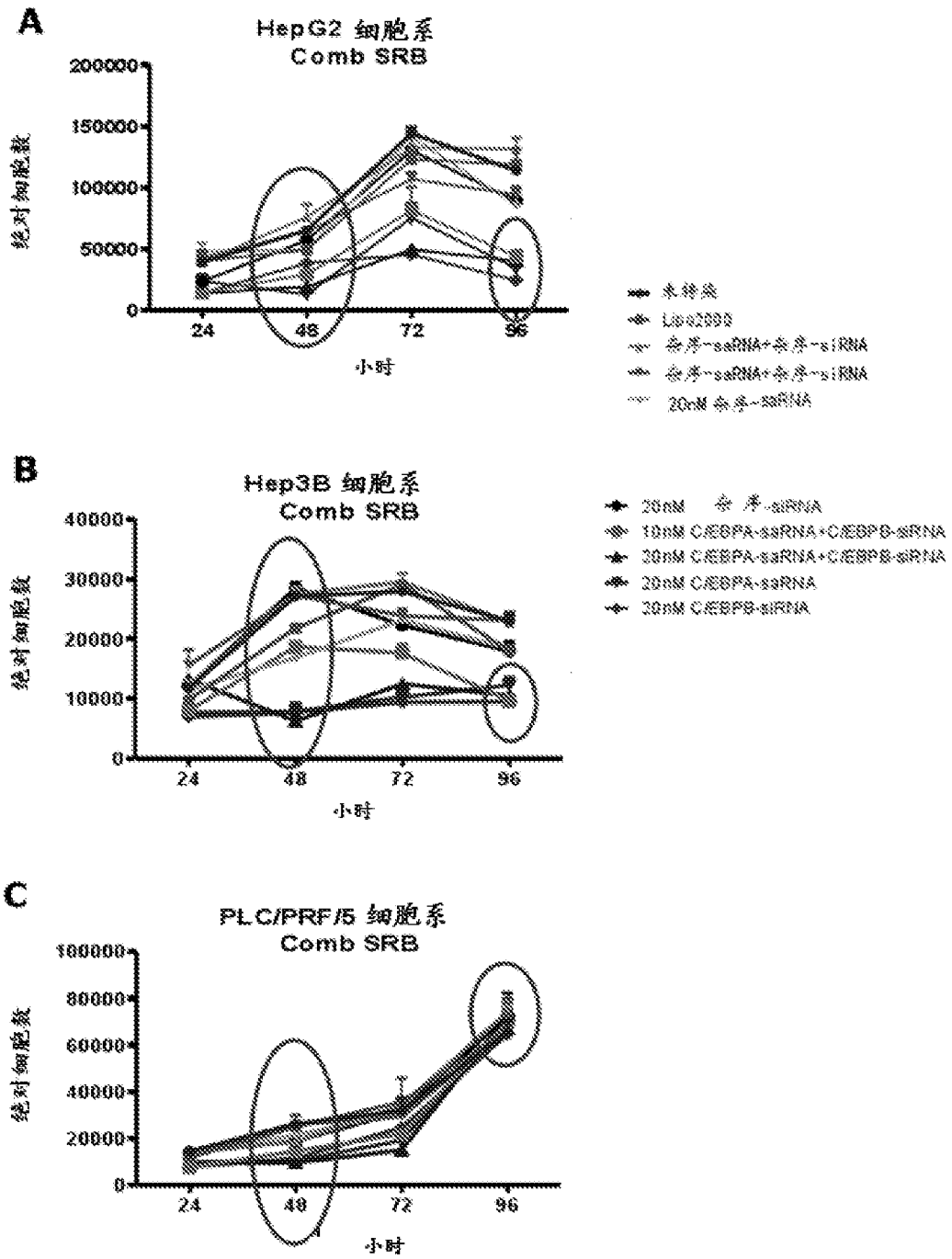


图 20-1

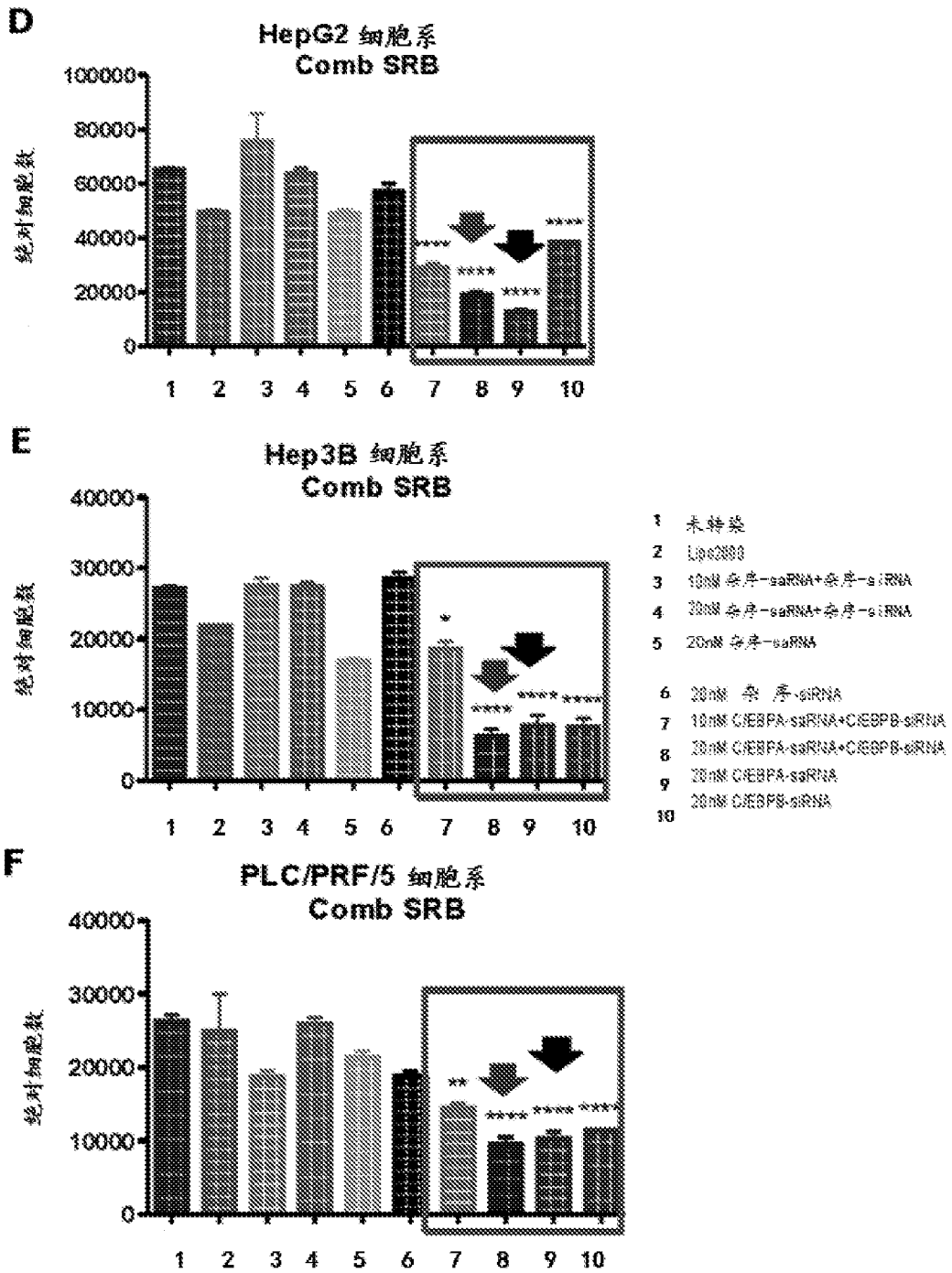


图 20-2



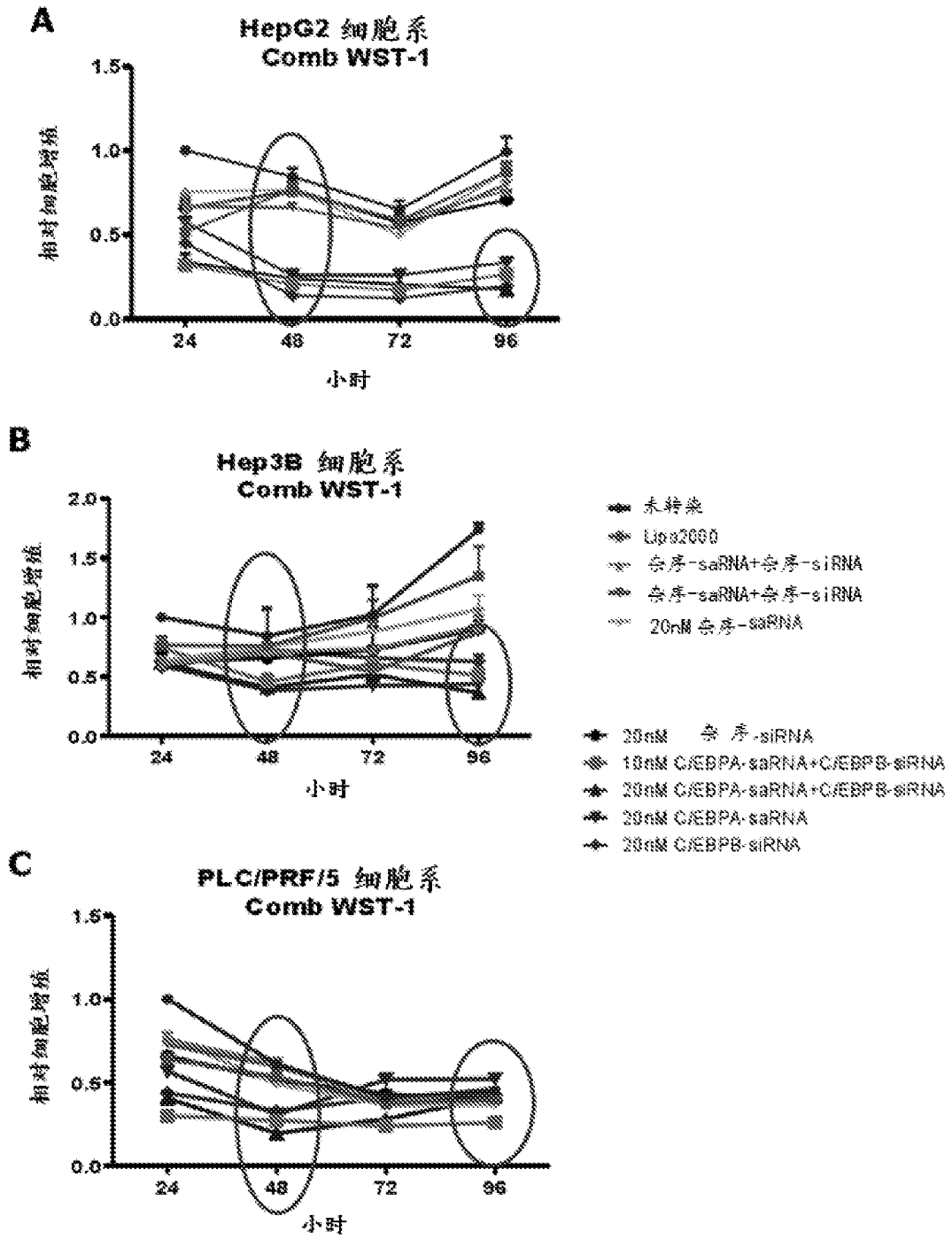


图 21-1

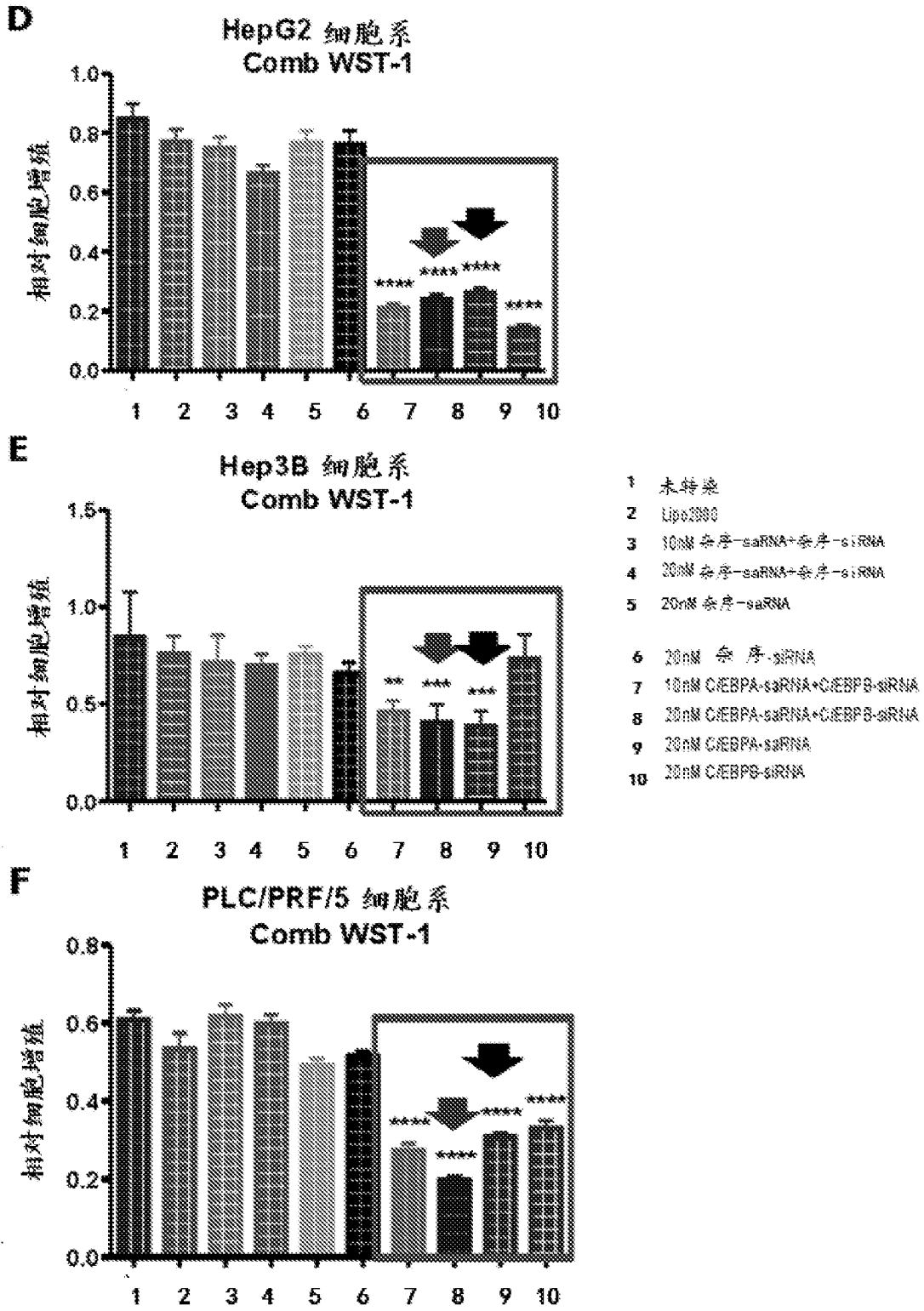


图 21-2

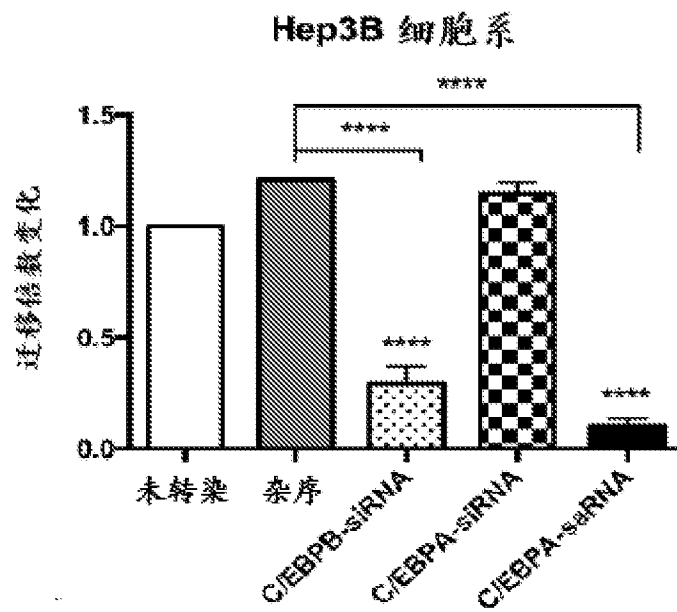
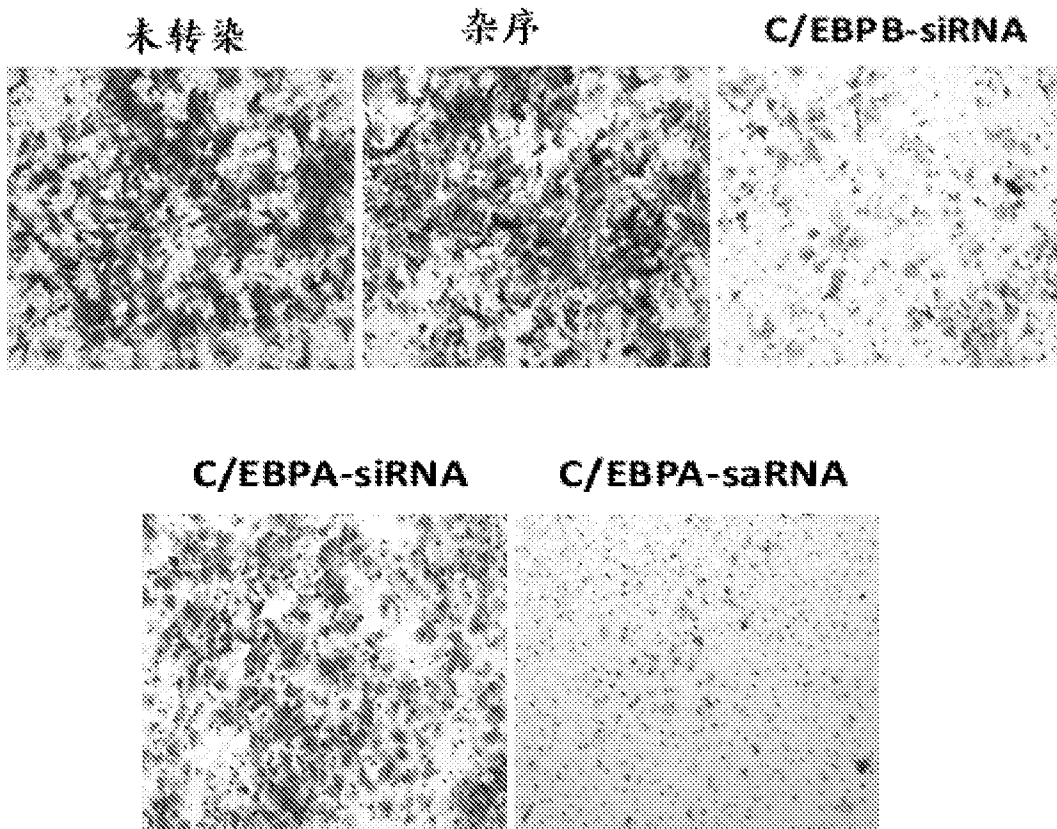


图 22

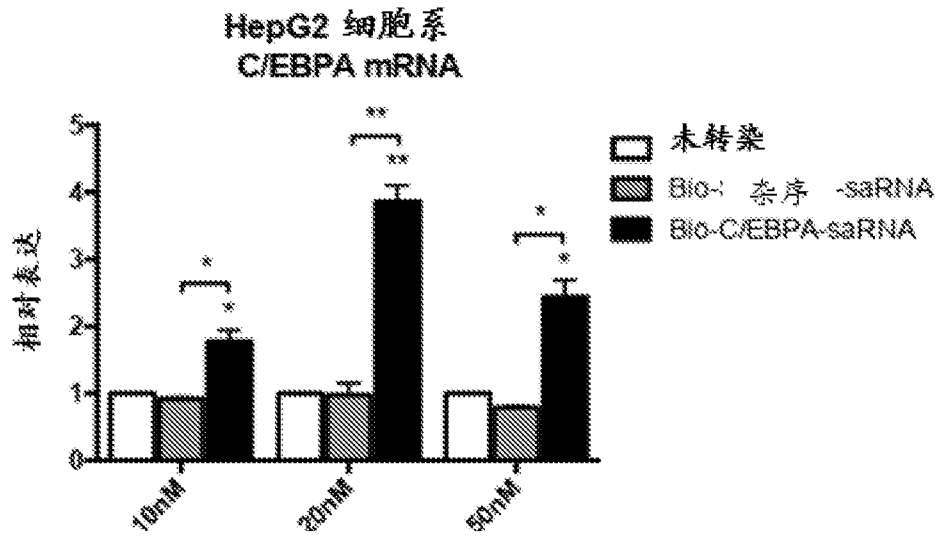


图 23

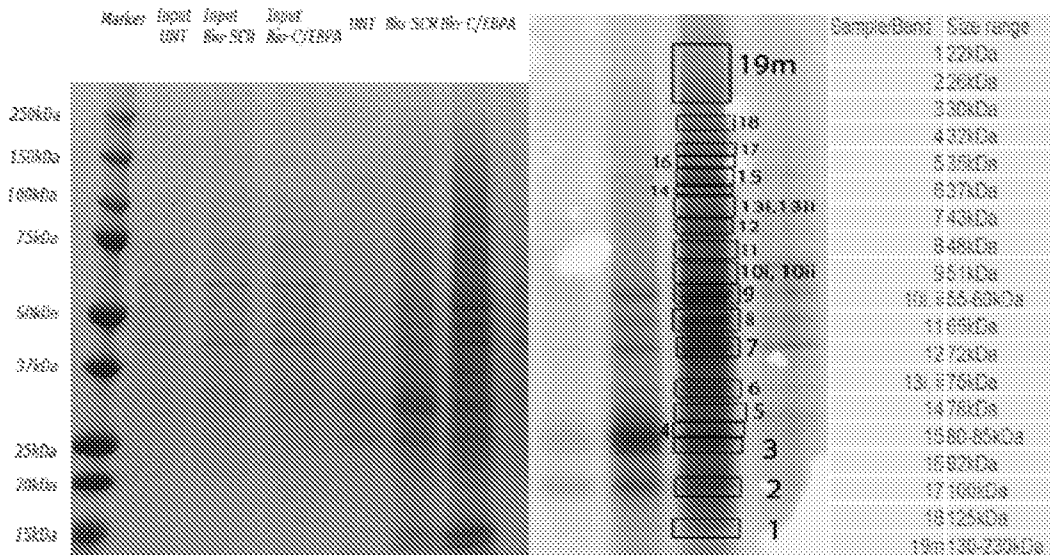


图 24

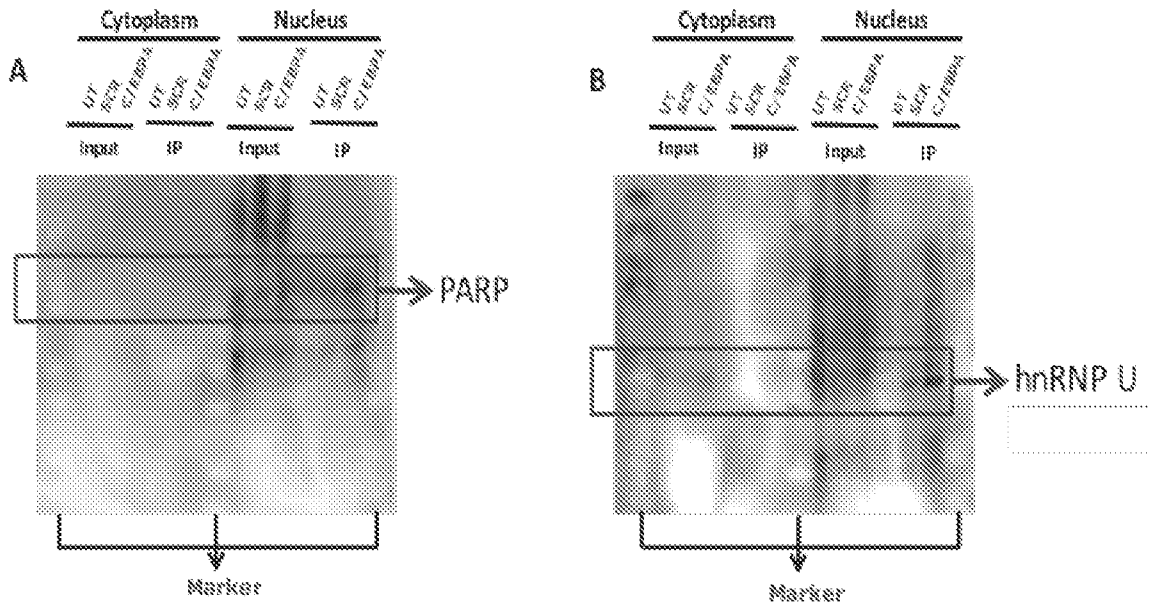


图 25

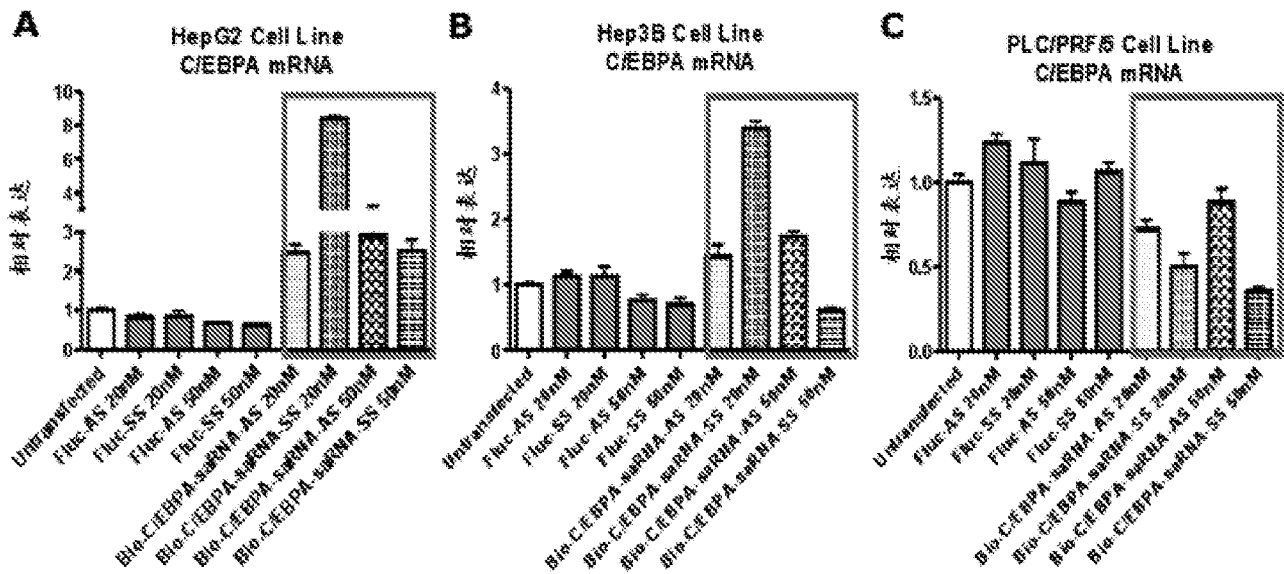


图 26

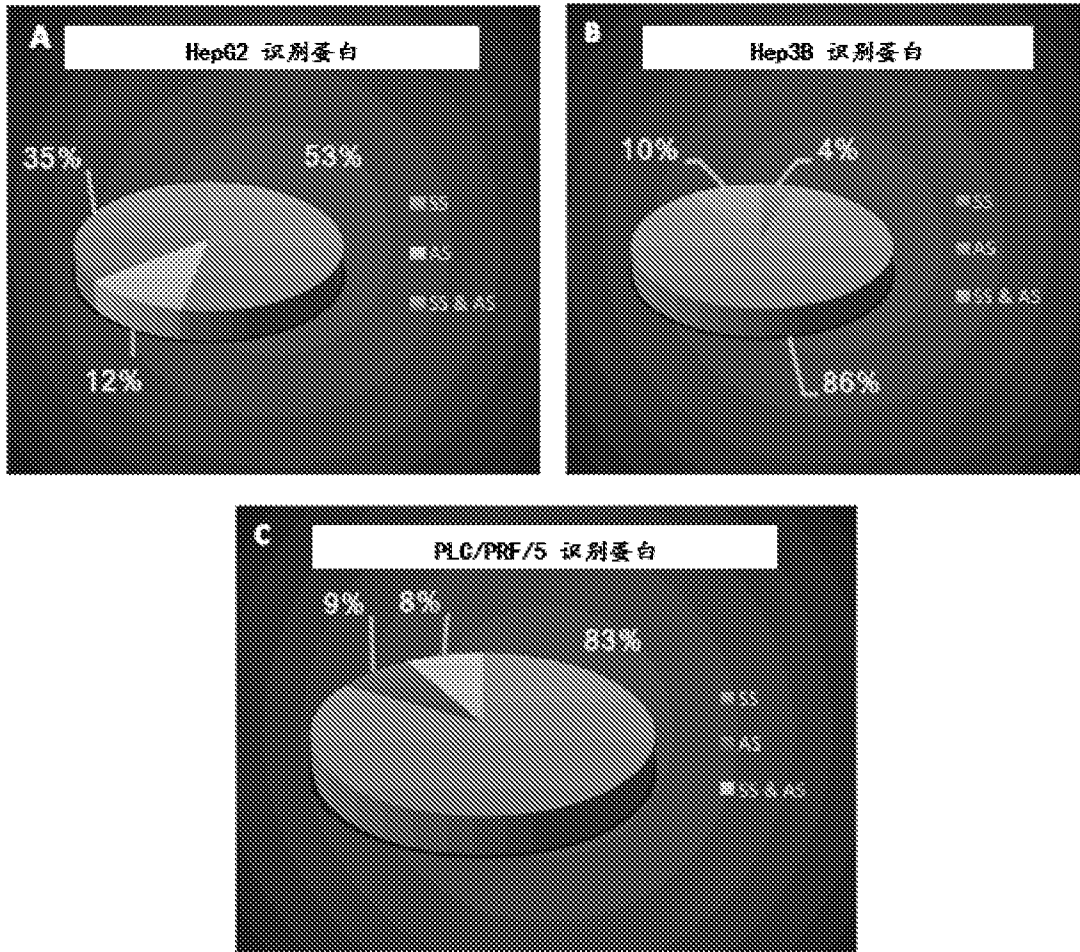


图 27

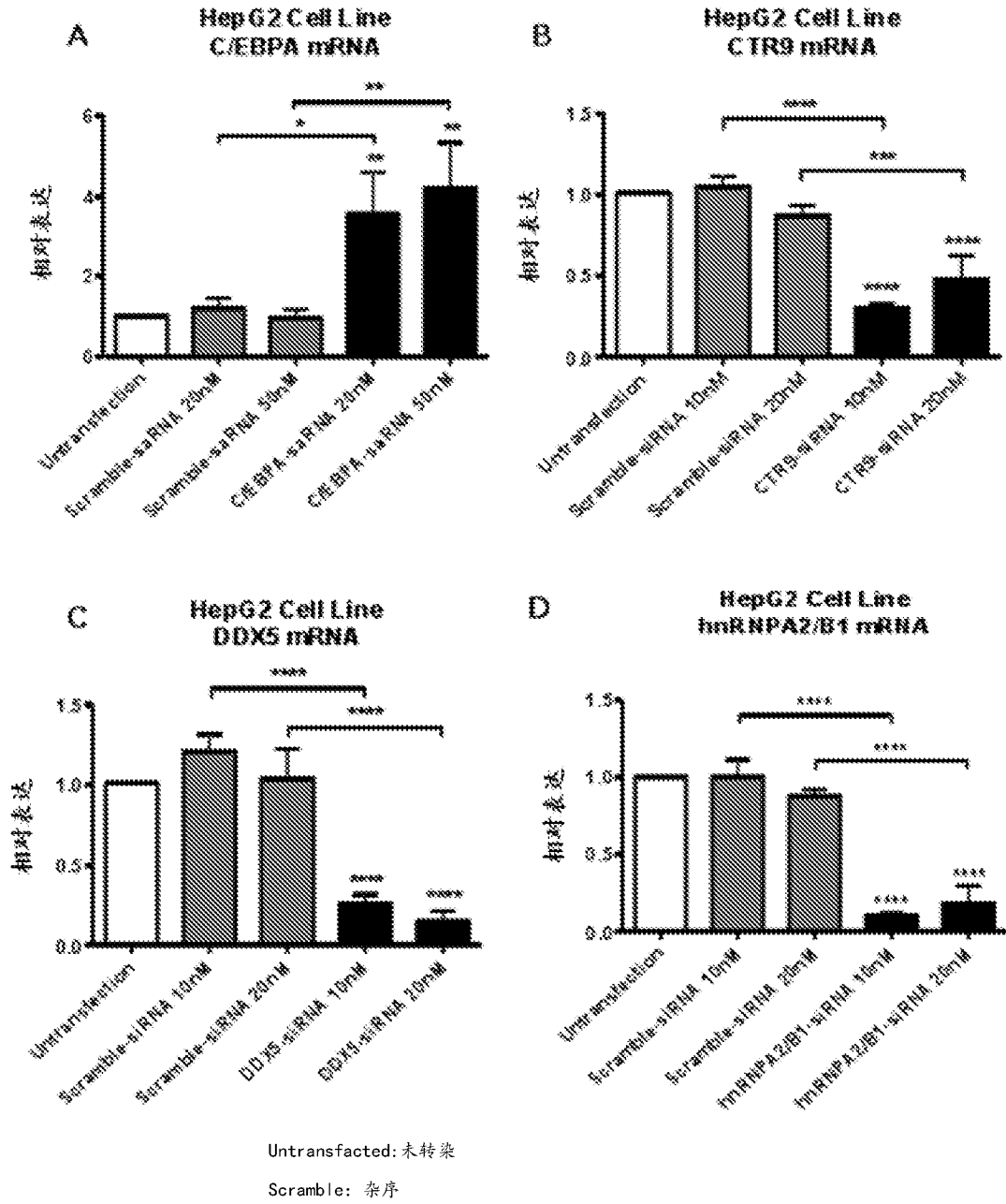


图 28

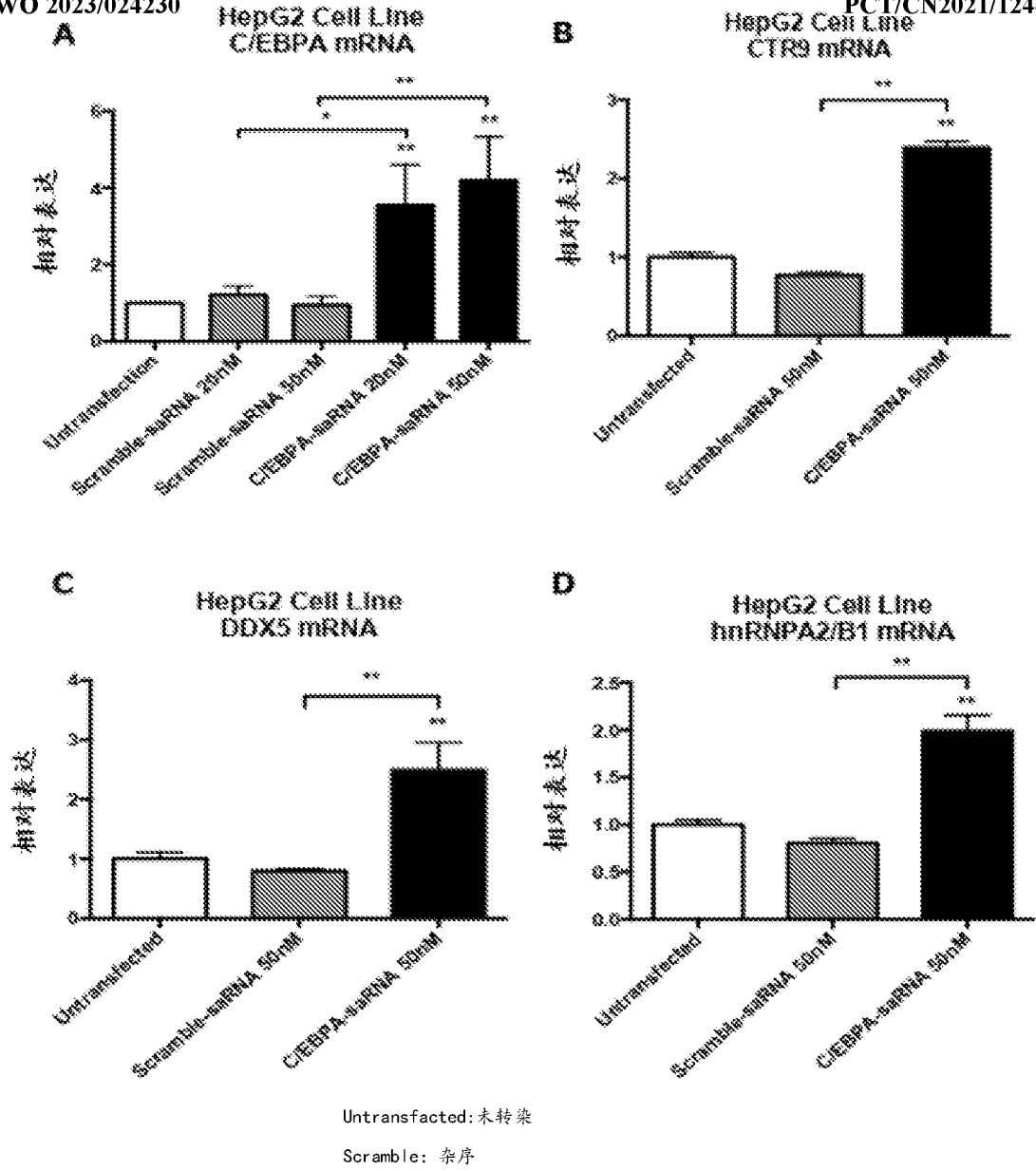


图 29



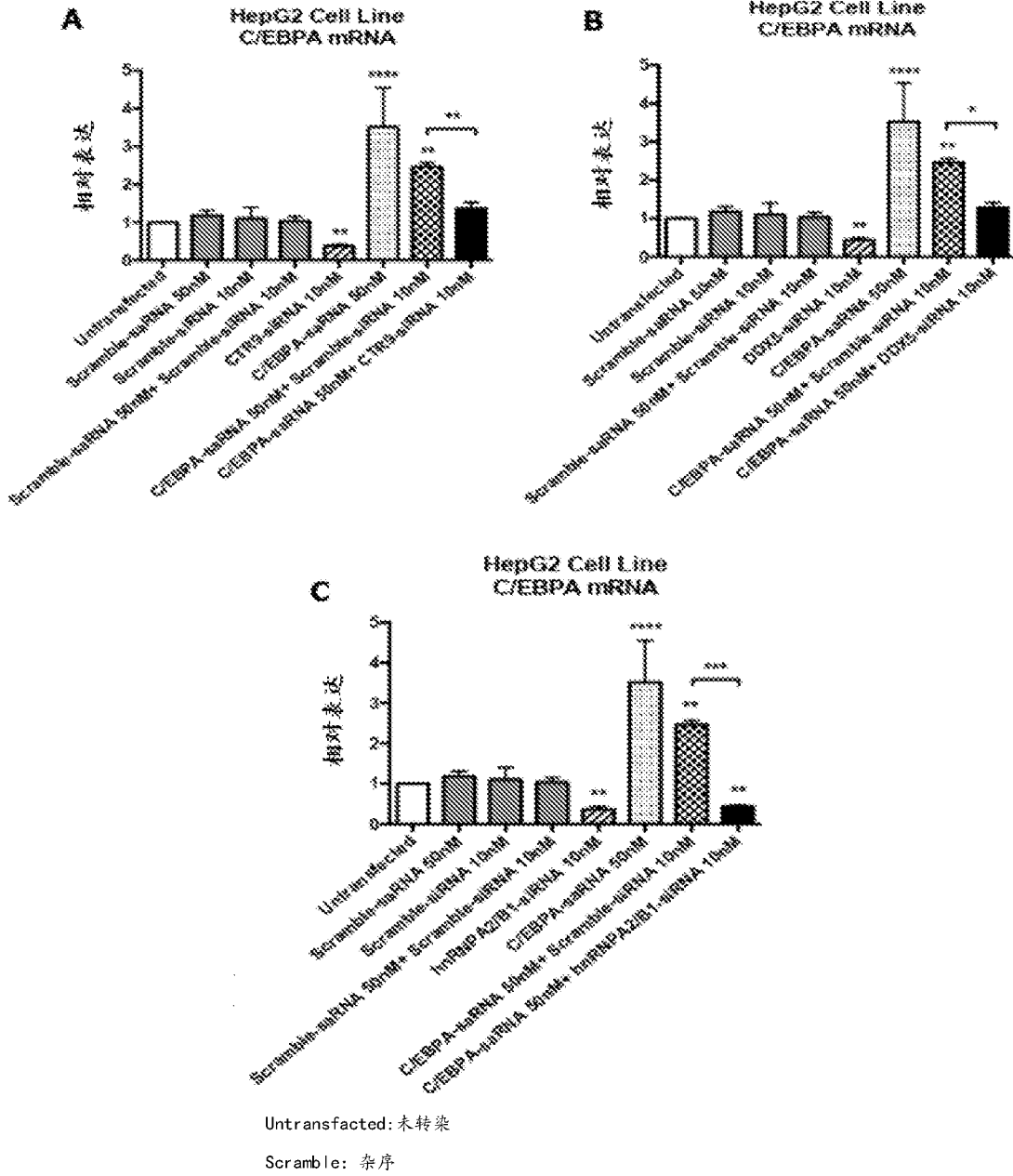


图 30

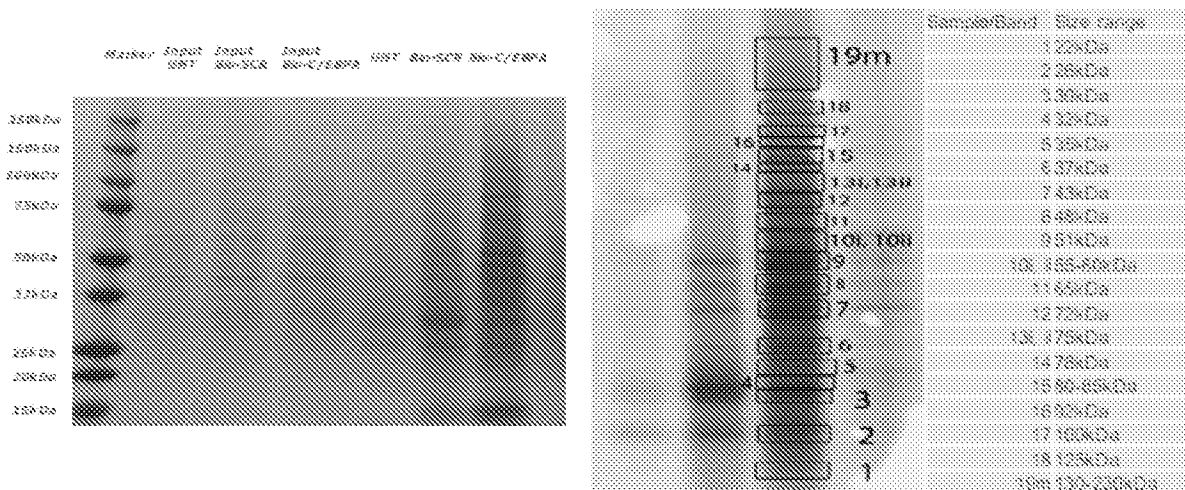


图 31

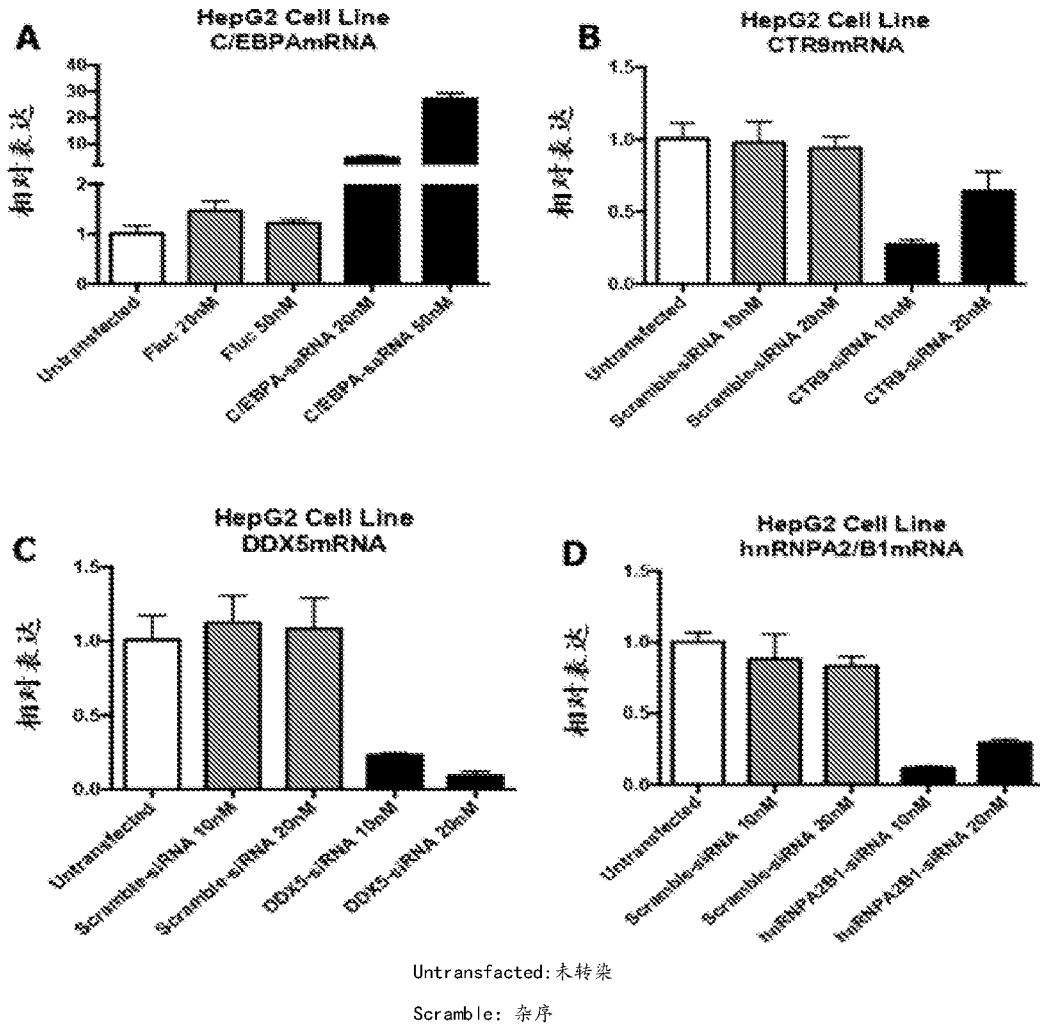


图 32

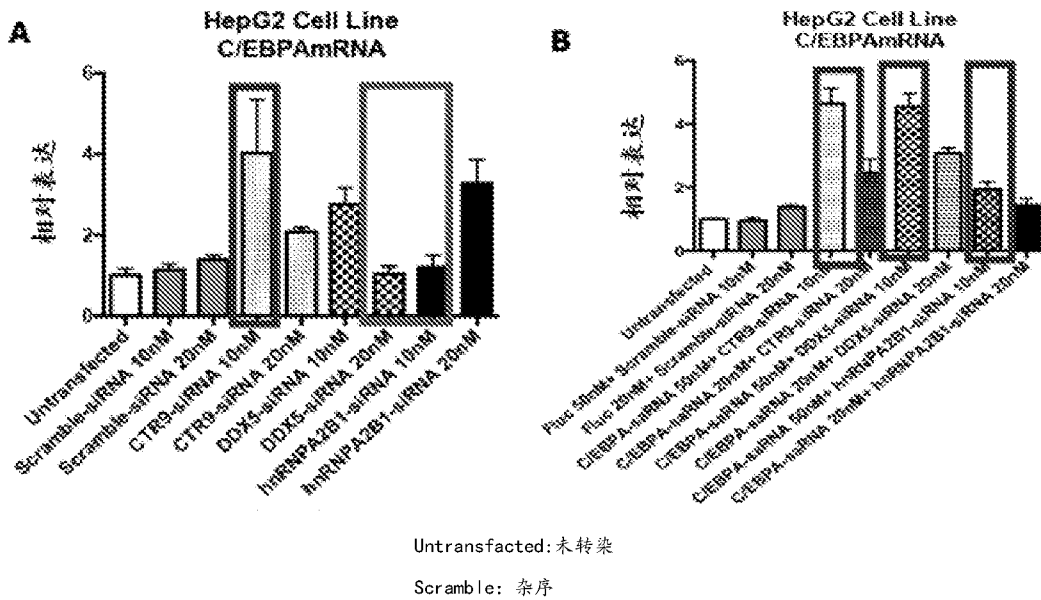
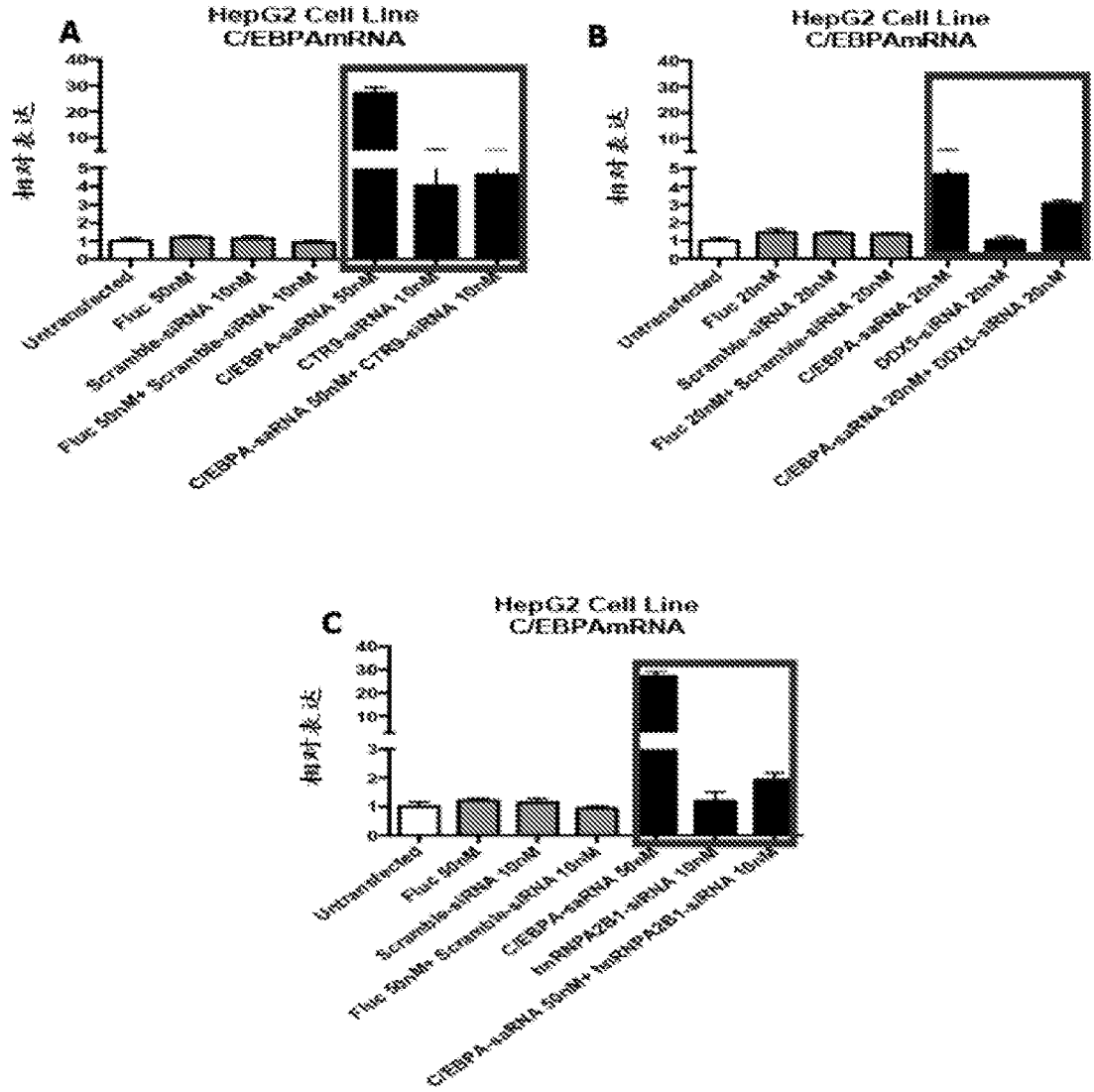


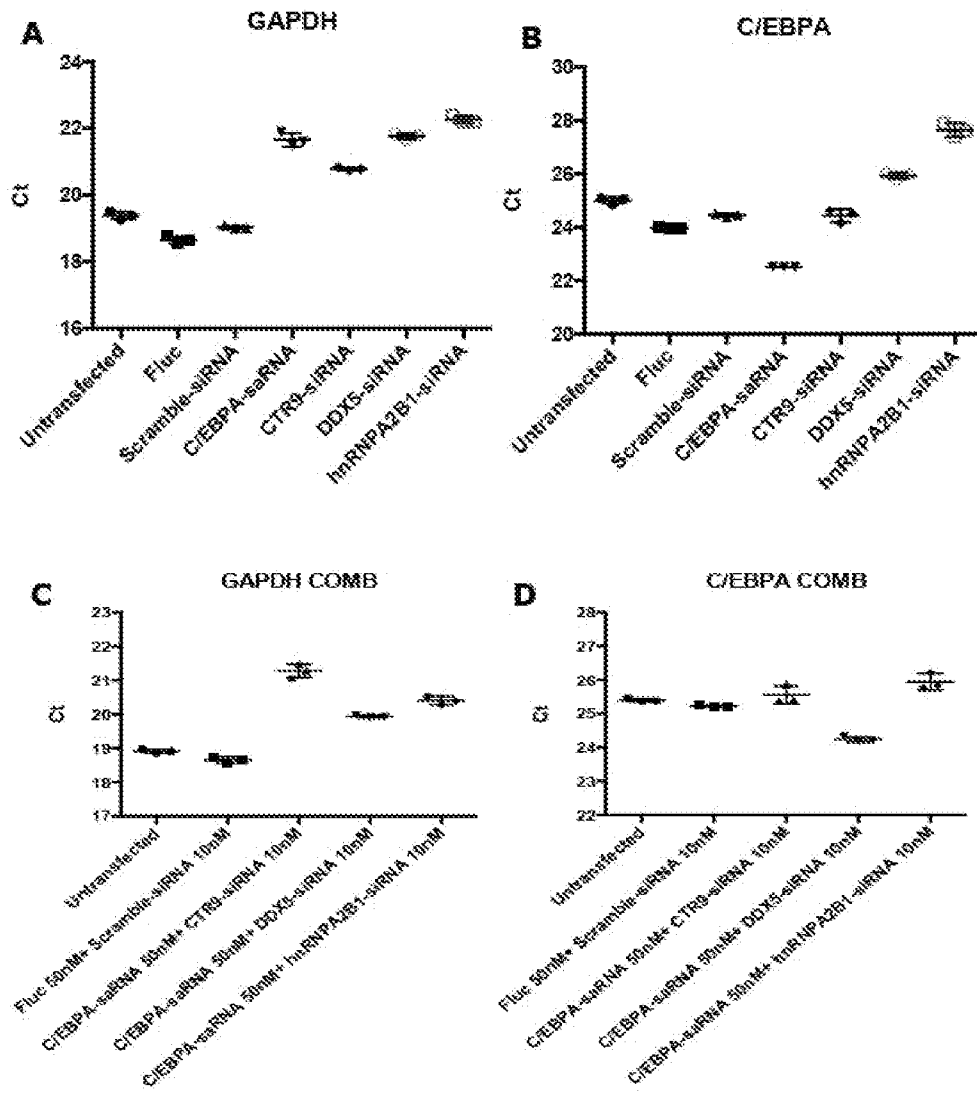
图 33



Untransfected: 未转染

Scramble: 杂序

图 34



Untransfected: 未转染

Scramble: 杂序

图 35

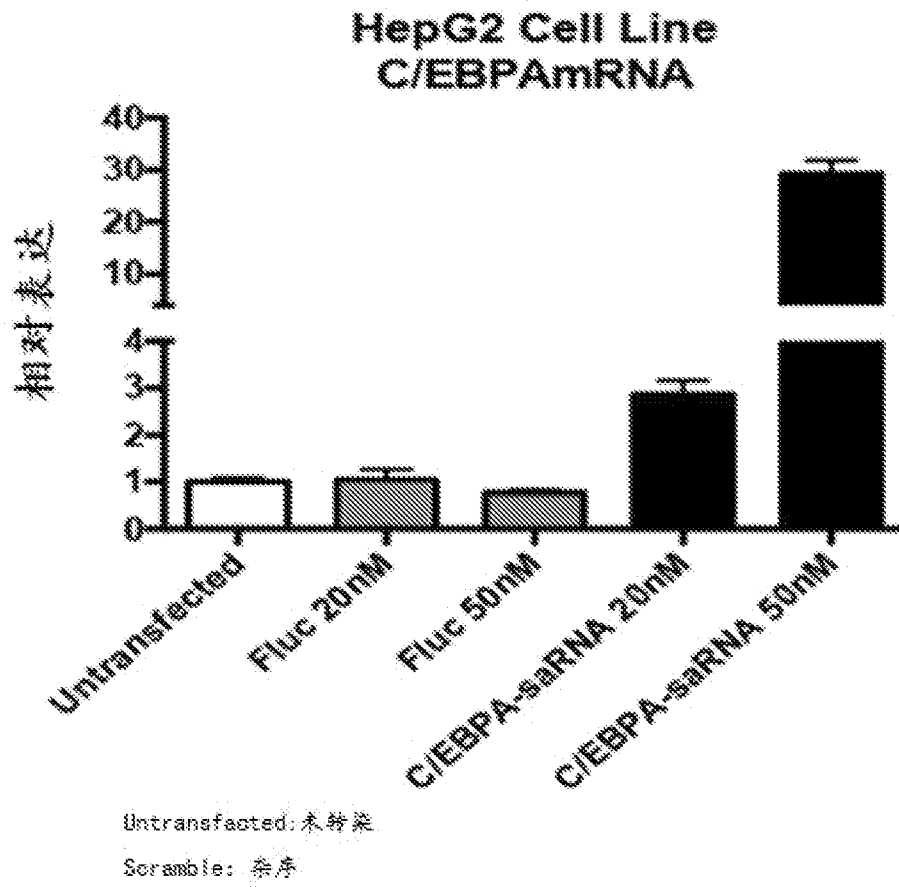


图 36

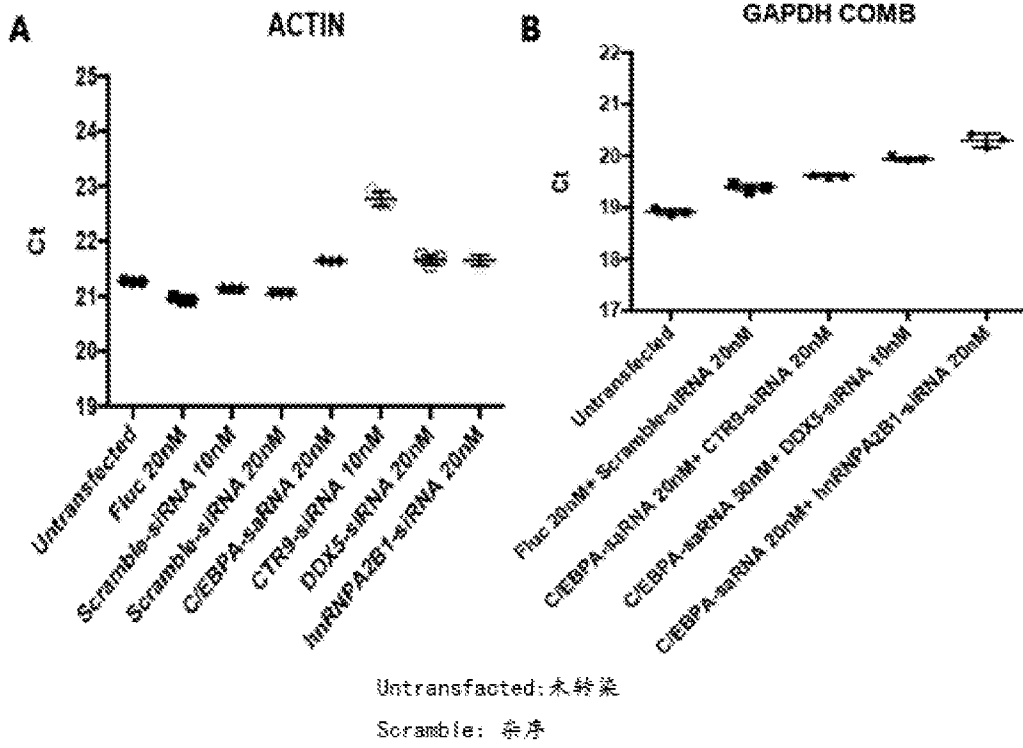


图 37

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/124412

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据资源系统, WANFANG DATA, PubMed, ISI web of knowledge, GenBank, EBI-EMBL, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 申请人, 发明人, C/EBP $\alpha$ , saRNA, C/EBP $\beta$ , WAF1, p21, C/EBP $\beta$ , CTR9, DDX3, DDX5, hnRNP A2/B1, siRNA, 活化性小RNA, small activating RNA, 肝细胞癌, HCC, 干扰RNA, SEQ ID No.1-64		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 112543809 A (MINA THERAPEUTICS LTD.) 23 March 2021 (2021-03-23) embodiment 3	1-40
X	ZHAO, Xiaoyang et al. "Mechanisms involved in the activation of C/EBP $\alpha$ by small activating RNA in hepatocellular carcinoma" <i>Oncogene</i> , Vol. 38, 14 January 2019 (2019-01-14), pp. 3446-3456	1-40
X	CN 107075515 A (MINA THERAPEUTICS LTD.) 18 August 2017 (2017-08-18) claims 1-28	1-40
X	US 2019249176 A1 (MINA THERAPEUTICS LIMITED) 15 August 2019 (2019-08-15) description, paragraphs [0235]-[0237]	1-40
X	WO 2021021713 A1 (MINA THERAPEUTICS LTD. et al.) 04 February 2021 (2021-02-04) description, paragraphs [0074]-[0076]	1-40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>28 April 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>26 May 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VOUTILA, J. et al. "Development and Mechanism of Small Activating RNA Targeting CEBPA, a Novel Therapeutic in Clinical Trials for Liver Cancer" <i>Molecular Therapy</i> , Vol. 25, No. 12, 31 December 2017 (2017-12-31), pp. 2705-2713	1-40
A	李圣爱 (LI, Shengai). "p21W AF1/CIP1基因上游主要转录调控序列区及其相关功能 (Non-official translation: p21W AF1/CIP1 Gene Upstream Main Transcription Regulatory Sequence Region and Related Function Thereof)" <i>国外医学.分子生物学分册 (Non-official translation: Foreign Medicine, Molecular Biology)</i> , Vol. 23, No. 02, 31 December 2001 (2001-12-31), pp. 70-74	1-40



**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Claim 1 comprises 42 groups of inventions relating to combining C/EBP $\alpha$ -saRNA and one or more saRNAs or siRNAs among 6 types of C/EBP $\alpha$  downstream key functional proteins. Claims 7-8 refer to preceding claims and further define 23 pairs of C/EBP $\alpha$ -saRNA double strands having different sequences. Hence, claims 1-6 and 9-40 comprise 42 inventions relating to different compositions, and claims 7-8 comprise 23 C/EBP $\alpha$ -saRNAs relating to different combinations of antisense and sense strands and related compositions of the C/EBP $\alpha$ -saRNAs.
- [2] The common technical feature shared by the 42 groups of inventions comprised in claim 1 is C/EBP $\alpha$ -saRNA. However, the feature is disclosed in Document 1 (CN107075515A 18 August 2017). Disclosed are saRNA targeting a C/EBP $\alpha$  transcript and a therapeutic composition comprising the saRNA, and the saRNA comprising SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, or 12 (see claims 1-10). Hence, the 42 groups of inventions comprised in claim 1 do not share a special technical feature that makes a contribution over the prior art as defined in PCT Rule 13.2, and the common target sequence C/EBP $\alpha$  of the 23 saRNAs having different sequences further comprised in claims 7 and 8 is known, and therefore, the 23 inventions also do not share a special technical feature that makes a contribution over the prior art as defined in PCT Rule 13.2. Therefore, the application does not comply with the requirement of unity defined in PCT Rule 13.1.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1 (in part), 2, 4, 5-9 (in part), 11, and 12-40 (in part)**

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/124412**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112543809	A	23 March 2021	EP	3807410	A1	21 April 2021
				US	2021254069	A1	19 August 2021
				WO	2019239144	A1	19 December 2019
				JP	2021527651	A	14 October 2021
				AU	2019285344	A1	10 December 2020
				CA	3102334	A1	19 December 2019
CN	107075515	A	18 August 2017	JP	2020022513	A	13 February 2020
				JP	6946399	B2	06 October 2021
				EP	3594348	A1	15 January 2020
				EP	3594348	B1	08 September 2021
				WO	2015075557	A2	28 May 2015
				WO	2015075557	A3	26 November 2015
				CA	2930973	A1	28 May 2015
				JP	2016539127	A	15 December 2016
				JP	6621409	B2	18 December 2019
				JP	2022008404	A	13 January 2022
				KR	20160079824	A	06 July 2016
				KR	102252561	B1	20 May 2021
				KR	20210047371	A	29 April 2021
				US	2016298113	A1	13 October 2016
				US	10202601	B2	12 February 2019
				AU	2020270508	A1	17 December 2020
				US	2020318114	A1	08 October 2020
				AU	2014351482	A1	09 June 2016
				AU	2014351482	B2	20 August 2020
				EP	3071696	A2	28 September 2016
EP	3071696	B1	07 August 2019				
CN	112220797	A	15 January 2021				
SI	3071696	T1	29 November 2019				
US	2019249176	A1	15 August 2019				
US	10633659	B2	28 April 2020				
DK	3071696	T3	07 October 2019				
DK	3594348	T3	11 October 2021				
US	2019249176	A1	15 August 2019	JP	2020022513	A	13 February 2020
				EP	3594348	A1	15 January 2020
				WO	2015075557	A2	28 May 2015
				CA	2930973	A1	28 May 2015
				JP	2016539127	A	15 December 2016
				JP	2022008404	A	13 January 2022
				KR	20160079824	A	06 July 2016
				KR	20210047371	A	29 April 2021
				US	2016298113	A1	13 October 2016
				AU	2020270508	A1	17 December 2020
				US	2020318114	A1	08 October 2020
				AU	2014351482	A1	09 June 2016
				EP	3071696	A2	28 September 2016
				CN	112220797	A	15 January 2021
				SI	3071696	T1	29 November 2019
				DK	3071696	T3	07 October 2019
DK	3594348	T3	11 October 2021				

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/124412**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				CN	107075515	A	18 August 2017
WO	2021021713	A1	04 February 2021	AU	2020322440	A1	24 February 2022
				CA	3148827	A1	04 February 2021



C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	VOUTILA, J. 等. "Development and Mechanism of Small Activating RNA Targeting CEBPA, a Novel Therapeutic in Clinical Trials for Liver Cancer" Molecular Therapy, 第25卷, 第12期, 2017年12月31日 (2017 - 12 - 31), 第2705-2713页	1-40
A	李圣爱. "p21W AF1/CIP1基因上游主要转录调控序列区及其相关功能" 国外医学. 分子生物学分册, 第23卷, 第02期, 2001年12月31日 (2001 - 12 - 31), 第70-74页	1-40

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

## 第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 权利要求1包含42组涉及C/EBP  $\alpha$ -saRNA与6种C/EBP  $\alpha$ 下游关键作用蛋白中的一种或数种的saRNA或siRNA组合的发明，权利要求7-8引用了在前的权利要求，并进一步限定了23对序列不同的C/EBP  $\alpha$ -saRNA双链。由此可见，权利要求1-6，9-40包含了42项涉及不同组合物的发明，而权利要求7-8包含了23项涉及不同反义链和有义链组合的C/EBP  $\alpha$ -saRNA及其相关组合物。
- [2] 上述权利要求1包含的42组发明之间具有的共同技术特征为C/EBP  $\alpha$ -saRNA，然而这一特征已经被文献1（CN107075515A，20170818）公开，其中公开了靶向C/EBP  $\alpha$ 转录物的saRNA和包含所述saRNA的治疗性组合物，以及所述saRNA包含SEQ ID No. 2、4、6、8、10或12（参见权利要求1-10）。由此可见，权利要求1包含的42组发明之间不具备PCT细则13.2规定的对现有技术做出贡献的特定技术特征；而权利要求7-8进一步包含的23项不同序列的saRNA其共同的靶序列C/EBP  $\alpha$ 是已知的，因而这23项发明也不具备PCT细则13.2规定的对现有技术做出贡献的特定技术特征。因此，申请不具备PCT细则13.1规定的单一性。

1.  由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2.  由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3.  由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4.  申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：1（部分），2，4，5-9（部分），11，12-40（部分）

## 对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。



国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/124412

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112543809	A	2021年3月23日	EP	3807410	A1	2021年4月21日
				US	2021254069	A1	2021年8月19日
				WO	2019239144	A1	2019年12月19日
				JP	2021527651	A	2021年10月14日
				AU	2019285344	A1	2020年12月10日
				CA	3102334	A1	2019年12月19日
CN	107075515	A	2017年8月18日	JP	2020022513	A	2020年2月13日
				JP	6946399	B2	2021年10月6日
				EP	3594348	A1	2020年1月15日
				EP	3594348	B1	2021年9月8日
				WO	2015075557	A2	2015年5月28日
				WO	2015075557	A3	2015年11月26日
				CA	2930973	A1	2015年5月28日
				JP	2016539127	A	2016年12月15日
				JP	6621409	B2	2019年12月18日
				JP	2022008404	A	2022年1月13日
				KR	20160079824	A	2016年7月6日
				KR	102252561	B1	2021年5月20日
				KR	20210047371	A	2021年4月29日
				US	2016298113	A1	2016年10月13日
				US	10202601	B2	2019年2月12日
				AU	2020270508	A1	2020年12月17日
				US	2020318114	A1	2020年10月8日
				AU	2014351482	A1	2016年6月9日
				AU	2014351482	B2	2020年8月20日
				EP	3071696	A2	2016年9月28日
				EP	3071696	B1	2019年8月7日
				CN	112220797	A	2021年1月15日
				SI	3071696	T1	2019年11月29日
US	2019249176	A1	2019年8月15日				
US	10633659	B2	2020年4月28日				
DK	3071696	T3	2019年10月7日				
DK	3594348	T3	2021年10月11日				
US	2019249176	A1	2019年8月15日	JP	2020022513	A	2020年2月13日
				EP	3594348	A1	2020年1月15日
				WO	2015075557	A2	2015年5月28日
				CA	2930973	A1	2015年5月28日
				JP	2016539127	A	2016年12月15日
				JP	2022008404	A	2022年1月13日
				KR	20160079824	A	2016年7月6日
				KR	20210047371	A	2021年4月29日
				US	2016298113	A1	2016年10月13日
				AU	2020270508	A1	2020年12月17日
				US	2020318114	A1	2020年10月8日
				AU	2014351482	A1	2016年6月9日
				EP	3071696	A2	2016年9月28日
				CN	112220797	A	2021年1月15日
				SI	3071696	T1	2019年11月29日
				DK	3071696	T3	2019年10月7日
DK	3594348	T3	2021年10月11日				

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/124412

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
.....				CN	107075515	A	2017年8月18日
W0	2021021713	A1	2021年2月4日	AU	2020322440	A1	2022年2月24日
.....				CA	3148827	A1	2021年2月4日
.....							