



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102112110 A

(43) 申请公布日 2011.06.29

(21) 申请号 200980130361.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.06.05

A61K 9/107(2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 48/00(2006.01)

61/059,620 2008.06.06 US

A61P 35/00(2006.01)

61/092,569 2008.08.28 US

A61K 9/127(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.01.31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/046505 2009.06.05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/149418 EN 2009.12.10

(71) 申请人 米尔纳医疗股份有限公司

地址 美国德克萨斯州

申请人 BIOO 科技公司

(72) 发明人 兰斯·福特 戴维·布朗

安德烈亚斯·G·巴德

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

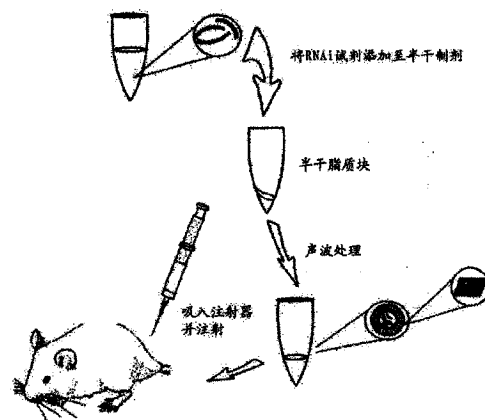
权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 17 页

(54) 发明名称

用于 RNAi 试剂体内递送的新型组合物

(57) 摘要

本专利申请描述了含有用于在活体内递送 RNAi、抗 miRNA 或核酸适体试剂的中性磷脂的乳剂。本专利申请还涉及制备所述制剂的方法以及将所述制剂作为递送试剂的使用。



1. 一种组合物,其包含脂质组分、含水组分和非离子表面活性剂的乳状液,其中所述脂质组分包含 20 重量%至 100 重量%的中性磷脂和 0 至 80 重量%的油脂或蜡;所述含水组分包含水性介质中的 RNAi 试剂;以及所述表面活性剂包含 0.1 重量%至 50 重量%的所述总乳状液。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述中性磷脂为 1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述油脂为角鲨烯。
4. 根据权利要求 3 所述的组合物,其中所述表面活性剂为聚山梨醇酯 20。
5. 根据权利要求 3 所述的组合物,其中所述 RNAi 试剂为 miRNA。
6. 根据权利要求 3 所述的组合物,其中所述 RNAi 试剂为 siRNA。
7. 根据权利要求 1 所述的组合物,进一步包含抗氧化剂。
8. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述脂质组分包含 20 重量%至 40 重量%的磷脂和 60 重量%至 80 重量%的油脂或蜡;并且所述表面活性剂包含 40 重量%至 50 重量%的所述总乳状液。
9. 一种制备乳状液的方法,包括以下步骤:
  - a. 在有机溶剂中混合中性磷脂、油脂和非离子表面活性剂;
  - b. 蒸发所述有机溶剂以形成干燥的脂质组分;以及
  - c. 将所述脂质组分与水性介质中的 RNAi 试剂混合;其中所述脂质组分包含 20 重量%至 100 重量%的中性磷脂和 0 至 80 重量%的油脂或蜡;所述 RNAi 组分包含水性介质中的 RNAi 试剂;以及所述表面活性剂包含 0.1 重量%至 50 重量%的所述总乳状液。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述中性磷脂为 1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱。
11. 根据权利要求 9 或 10 所述的方法,其中所述油脂为角鲨烯。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述表面活性剂为聚山梨醇酯 20。
13. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述 RNAi 试剂为 miRNA。
14. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述 RNAi 试剂为 siRNA。
15. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述脂质组分包含 20 重量%至 40 重量%的磷脂和 60 重量%至 80 重量%的油脂或蜡;并且所述表面活性剂包含 40 重量%至 50 重量%的所述总乳状液。
16. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述蒸发采用冻干法来完成。
17. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述步骤 c 中的混合采用声波降解法来完成。
18. 根据权利要求 9 所述的方法,进一步包括挤压所述步骤 c 中形成的混合物。
19. 根据权利要求 9 所述的方法,进一步包括将抗氧化剂添加至所述步骤 a 中的混合物。
20. 一种将 RNAi 试剂递送至动物的方法,包括将权利要求 1 所述的组合物施用给所述动物。
21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述组合物通过注射给药。
22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述组合物系统地施药。

23. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述 RNAi 试剂为 miRNA。
24. 一种组合物,其包含脂质组分、含水组分和非离子表面活性剂的乳状液;其中所述脂质组分包含 20 重量%至 100 重量%的中性磷脂和 0 至 80 重量%的油脂或蜡;所述含水组分包含水性介质中的抗 miRNA 试剂;以及所述表面活性剂包含 0.1 重量%至 50 重量%的所述总乳状液。
25. 一种组合物,其包含脂质组分、含水组分和非离子表面活性剂的乳状液;其中所述脂质组分包含 20 重量%至 100 重量%的中性磷脂和 0 至 80 重量%的油脂或蜡;所述含水组分包含水性介质中的核酸适体;以及所述表面活性剂包含 0.1 重量%至 50 重量%的所述总乳状液。

## 用于 RNAi 试剂体内递送的新型组合物

[0001] 目前,人们正对将多种类型的核酸用作可能的疗法进行研究,诸如 RNA 干扰试剂、核酸适体、抗 miRNA 或基因替代疗法。RNA 干扰 (RNAi) 通常涉及主要在转录后水平上调节基因表达的细胞途径。科学家使用多种 RNAi 试剂和工具来进行功能基因组筛查、药物开发研究和体内靶标确认,并且 RNAi 试剂能够在体外和体内检测中下调基因的表达。RNAi 试剂的例子包括但不限于短干扰 RNA (siRNA)、微 RNA (miRNA)、Piwi 相互作用 RNA (piRNA)、核酶和反义化合物。多种 RNAi 试剂通过共同的途径起作用,并且通常导致一个或多个靶标 mRNA 分子裂解、翻译减少或其它表达干扰 (图 1)。

[0002] 微 RNA (miRNA) 是一种内源性非编码小分子 RNA,其通过结合至靶标 mRNA 转录本和 (1) 引发转录本降解或 (2) 更改来自转录本的蛋白翻译来调节基因表达。miRNA 经常在癌组织和其它病变组织中有区别地表达,并且当解除调节时会导致各种人类疾病 (包括癌症) 的发生。抗 miRNA 是通过杂交来干扰靶标 miRNA 活性的短核酸。抗 miRNA 的使用致使受靶标 miRNA 调节的 mRNA 的活性增加,而不是减少靶标 mRNA 的表达或活性。

[0003] RNAi 试剂能够从细胞内开始进入 RNAi 途径,或能够被递送至细胞内。尽管 RNAi 试剂是作为基因特效药而进行研发的,但是该技术未来的成功是与递送化学物质、方法和制剂的发展密切联系在一起的,所述化学物质、方法和制剂将 RNAi 试剂递送至植物和动物活体内的细胞和器官,无毒且高效。

[0004] 核酸适体是特异地结合至诸如蛋白质的分子靶标的小核酸分子。与通过杂交至另一核酸靶标进行作用的核酸治疗剂不同,核酸适体形成三维形状从而使得其可特异结合至酶、生长因子、受体、病毒蛋白和免疫球蛋白。

[0005] 对于基于寡核苷酸的试剂来说,有效的递送至靶标器官和与该等递送相关的高成本是治疗剂应用面临的主要限制条件之一。例如,目前在平均大小的小鼠中每次注射所用的 siRNA 量的范围是单位剂量从 0.03mg 至 2.4mg (1-50mg/kg)。人平均体重约 80kg 且按比例将需要约 0.08g 至 4.0g 的 siRNA。目前,0.08g 的研究级 siRNA 的价格超过 3000 美元。在将药物监管批准和药物检测要求的成本考虑进去后,用于制药的核酸成本将大幅增加。其它反义化合物和基于寡核苷酸的药物也面临着同样的问题。因此,例如,增加摄取进靶标细胞的效率或提高 RNAi 制剂的稳定性将降低治疗所需的 RNAi 试剂的量,同时也降低了成本并减小了有害副作用的可能。人们需要改善的 RNAi 试剂组合物以治疗疾病并且还需要制备该等组合物的方法。

[0006] 由阳离子磷脂制成的脂质体和乳状液已在之前用于小分子和核酸的递送和转染。在这些制剂中,阳离子脂质和带负电的核酸通过静电相互作用形成复合物。然而,这些制剂常常具有毒性特征使其不适合体内应用。(请参阅,如 Campbell PI., *Cytobios*, 37(145): 21-6(1983); Senior JH 等人, *Biochim Biophys Acta*, 1070(1): 173-9(1991); Filion MC 等人, *Biochim Biophys Acta*, 1329(2): 345-56(1997)。)

[0007] 本发明涉及 RNAi 试剂、抗 miRNA 或核酸适体的亲脂性制剂。该制剂可被称为磷脂-油脂-RNAi 乳状液 (PORE),其含有中性磷脂、油脂和 RNAi 试剂 (图 2)。在一些实施例中,该制剂包括用于 RNAi 试剂、抗 miRNA 或核酸适体递送的非离子表面活性剂、脂质组分和

含水组分。本文还描述了制备该等制剂和使用该制剂用于治疗之目的的方法。这些方法具有促进 RNAi 试剂的治疗应用和提高 RNAi 试剂体内递送（图 3）能力的功用。

[0008] 在一些实施例中，乳剂包含中性磷脂、油脂和非离子表面活性剂。在其它实施例中，在制剂中使用不止一种中性磷脂。在其它实施例中，在制剂中使用不止一种油脂。在某些实施例中，中性磷脂为 1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DOPC)。在一些实施例中，油脂为角鲨烯。在其它实施例中，聚山梨醇酯 20 (Tween20) 或聚山梨醇酯 80 (Tween 80) 是非离子表面活性剂。在某些实施例中，RNAi 试剂为 miRNA 或 siRNA。乳剂可以包括其它组分，诸如抗氧化剂、蜡、清洁剂或它们的组合。某些实施例包括制备乳剂的方法。在一些实施例中，制备脂质组分而后与含水组分混合以形成乳状液。

[0009] 乳剂可以用于将至少一种 RNAi 试剂、抗 miRNA 试剂或核酸适体递送至活体动物的组织。在某些实施例中，乳剂保护 RNAi 试剂在循环系统中免于降解。此外，乳剂能够促进 RNAi 试剂穿过诸如细胞膜的生理屏障的传递。

[0010] 在一个实施例中，治疗哺乳动物疾病或调节细胞中靶标核酸表达的方法包括：以缓解疾病的某些症状或改变细胞中靶标核酸水平的有效剂量，给哺乳动物受试者施用含有 RNAi 试剂、抗 miRNA 或核酸适体的制剂。在一些实施例中，组合物和方法可以用于治疗以一个或一组基因的表达或过表达为特征的疾病和病症，诸如癌症、代谢性疾病、传染性疾病和免疫失调等等，除了别的以外。

[0011] 本发明的其它实施例在整个本专利申请中进行讨论。本发明的其它目的、特征和优点通过下文的具体实施方式将变得显而易见。就本发明的一个方面所讨论的任何实施例也适用于本发明的其它方面，反之亦然。在实例部分的实施例应理解为适用于本发明所有方面的本发明实施例。

[0012] 然而，应当理解，表示本发明的特定实施例的具体实施方式和特定实例，仅以示例的方式给出，原因是根据本具体实施方式，在本发明的精神和范围内的各种变更和修改对那些本领域的技术人员而言将是显而易见的。

[0013] 本发明的其它方面在以下的描述中进行阐明。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1 示出在转录后水平上用于形成 RNAi 的细胞途径以及用于沉默基因表达的 RNAi 介导的机理。

[0016] 图 2 示出微观层次的磷脂-油脂-RNAi 乳状液 (PORE)。

[0017] 图 3 示出用于制备 PORE 的方法及其在活体内的使用。

[0018] 图 4 示出注射含有 GAPDH siRNA 的 PORE 的小鼠器官内的相对 GAPDH 蛋白水平。将 GAPDH 的相对水平与使用阴性对照 siRNA 治疗的小鼠作比较。

[0019] 图 5 示出注射含有 GAPDH siRNA 的 PORE 的大鼠器官内的相对 GAPDH 蛋白水平。将 GAPDH 的相对水平与使用阴性对照 siRNA 治疗的大鼠作比较。

[0020] 图 6 示出在小鼠已注射含有 GAPDH siRNA 的 PORE 之后，通过免疫组织化学和 ELISA 所估测的小鼠心脏内的相对 GAPDH 蛋白水平。将 GAPDH 的相对水平与使用阴性对照 siRNA 治疗的小鼠作比较。

[0021] 图 7A 示出未感染的小鼠或用 PORE-配制的 RSV siRNA 治疗的、无任何制剂（裸 siRNA）治疗的、或无任何 siRNA 治疗的呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染的小鼠的呼

吸频率。图 7B 示出用 PORE- 配制的 RSV siRNA 治疗的、无任何制剂（裸 siRNA）治疗的、或无任何 siRNA 治疗的小鼠的病理评分。图 7C 是示出测试 4 天后用 PORE- 配制的 RSV siRNA、Infasurf®、TransIT-TKO®或无制剂（裸 siRNA）治疗的小鼠的 RSV 滴定度的图。

[0022] 图 8 是示出通过向含有中性脂质的制剂添加角鲨烯而获得基因减少改善的图。

[0023] 图 9 示出将 PORE- 配制的荧光素酶特异的 siRNA 系统递送至小鼠内原位肺癌移植瘤的结果。携带人 H460 非小细胞肺癌移植瘤（其稳定地表示肺内的荧光素酶及生长情况）的小鼠，以 1 毫克每千克小鼠体重 (1mg/kg) 的最终浓度接受 PORE- 配制的荧光素酶 siRNA (si-luc) (图 9B, 动物 #3 和 #4) 或 PORE- 配制的阴性对照 (NC) 寡核苷酸 (图 9A, 动物 #1 和 #2) 的静脉注射。示出活性荧光素酶的荧光信号的 IVIS® 图像取自临制剂注射之前 (0 时) 和注射后 48 时。

[0024] 图 10 示出用 PORE- 配制的荧光素酶 siRNA 治疗的原位肺肿瘤内的荧光素酶活性。示出了采自图 9 中动物的 IVIS® 数据的定量。在 0 时的总通量设定为 100% 的荧光素酶活性。注射后 48 时的荧光素酶的活性百分比示出在图中。

[0025] 图 11 示出 PORE- 配制的治疗 miRNA 的瘤内递送。携带可触摸的皮下 H460 非小细胞肺癌移植瘤的小鼠用含有 hsa-miR-34a (图 11A, 白色方格)、hsa-miR-124a (图 11B, 白色菱形) 的 PORE 或阴性对照 miRNA (图 11A 和 11B, miR-NC, 黑色圆圈) 进行治疗。单独一组荷瘤动物仅使用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或磷脂-油脂乳状液 (在图 11A 和 11B 中分别为黑色菱形和黑色方格) 进行治疗。在移植瘤移植后的第 12、15 和 18 天 (箭头) 瘤内注射 (i. t.) 制剂。图中示出了 7 只动物 (miR-34a、miR-124、miR-NC) 或 4 只动物 (仅 PBS、磷脂-油脂) 的平均和标准偏差。

[0026] 图 12 示出 PORE- 配制的治疗 miRNA 的系统递送的结果。携带可触摸的皮下 H460 非小细胞肺癌移植瘤的小鼠用含有 hsa-miR-34a (图 12A, 白色方格)、hsa-miR-124a (图 12B, 白色菱形) 的 PORE 或阴性对照 miRNA (图 12A 和 12B, miR-NC, 黑色圆圈) 进行系统地治疗。单独一组荷瘤动物仅用磷脂-油脂乳状液 (图 12A 和 12B, 黑色方格) 进行治疗。在移植瘤移植后的第 12、15 和 18 天 (箭头) 将制剂通过尾静脉注射 (i. v.) 进行给药。图中示出了每组中 4 只动物的平均和标准偏差。

[0027] 图 13 示出 PORE- 配制的治疗 miRNA 各种剂量的系统递送的结果。确诊有皮下人 H460 非小细胞肺癌移植瘤的小鼠用 PORE- 配制的 hsa-miR-34a 寡核苷酸进行静脉注射。图中示出使用的剂量和治疗的天数。作为对照, 给单独一组荷瘤动物注射磷酸缓冲盐水。图中示出了每组中 3 只动物的平均和标准偏差。将数据绘成总肿瘤体积 (图 13A) 或是相对于第一次治疗天数的肿瘤生长百分比 (图 13B, 第 12 天, 100%)。

[0028] 图 14 示出 PORE- 配制的治疗 miRNA 向小鼠内原位生长肺肿瘤的系统递送。携带原位肺癌移植瘤的小鼠通过在第 39 天至第 52 天之间每 2 天一次的系统给药来接受 PORE- 配制的 hsa-miR-124a。作为正常肿瘤生长的参考, 还使用了未经治疗的小鼠。IVIS® 数据如整个小鼠的图像 (图 14A) 或以总通量单位表示的定量 (图 14B) 所示。

## 具体实施方式

[0029] 在某些方面, 乳剂含有用于将 RNAi 试剂递送至细胞的中性磷脂和油脂。在某些

方面,乳剂含有用于将 RNAi 试剂递送至细胞的聚山梨醇酯和中性磷脂。在一些方面,使用 RNAi 制剂来治疗动物或人类的疾病。还包括制备和使用该 RNAi 制剂的方法。

[0030] 为帮助理解本发明,首先对某些术语进行了定义。在整个专利申请中还提供了其它定义。

[0031] 术语“RNAi 试剂”包括短干扰 RNA (siRNA)、微 RNA (miRNA)、与 Piwi 相互作用 RNA (piRNA)、核酶和反义化合物。RNAi 试剂包括含有 RNA、DNA 或两者的核酸。在一些实施例中, RNAi 试剂的长度不到 200 个核苷酸。在其它实施例中, RNAi 试剂的长度不到 50 个核苷酸。在某些实施例中, RNAi 试剂的长度约 15 至约 25 个核苷酸。在一些实施例中, RNAi 试剂是双链的,而其它实施例包括单链的 RNAi 试剂。RNAi 试剂可进行化学改性。

[0032] 如本文所用,术语“siRNA”是指长度约 15 至约 25 个核苷酸的双链 RNA。siRNA 可以具有平端,或可以在一端或两端具有单链悬突。此外, siRNA 可以包括化学改性,诸如主链、糖、碱基或末端 (3' 或 5' 端) 改性。siRNA 可含有完全或部分与一个或多个靶标 mRNA 互补的序列。

[0033] 如本文所用,术语“微 RNA” (miRNA) 包括可以是天然存在的或合成产生的人 miRNA、成熟单链 miRNA、前体 miRNA 以及它们的变体。在某些情况下,术语“miRNA”还包括初级 miRNA 转录本和复式 miRNA。当修饰 miRNA 或诸如 miR-13 的特定 miRNA 时,术语“成熟”是指从存在于生物样本内的对应的前体 miRNA 序列加工的一个或多个成熟序列。当与特定 miRNA 一起使用时 (如, hsa-miR-34a), 前缀“hsa”是指人 miRNA 序列。包括人成熟序列和前体序列的某些 miRNA 序列报告在 miRBase::Sequences Database 中 (<http://microrna.sanger.ac.uk>; Griffiths-Jones 等人, Nucleic Acids Research, 2008, 36, Database Issue, D154-D158; Griffiths-Jones 等人, Nucleic Acids Research, 2006, 34, Database Issue, D140-D144; Griffiths-Jones, Nucleic Acids Research, 2004, 32, Database Issue, D109-D111)。熟练的技术人员将会知道,有关对于给定 miRNA、尤其是对于成熟形式的 miRNA 的精确核酸序列的科学共识,可随着时间的变化而变化。

[0034] 如本文所用“乳状液”是指悬浮于水溶液中不溶解的小脂滴。该脂滴可含有油脂、磷脂、表面活性剂或它们的混合物。

[0035] 在权利要求书和 / 或说明书中所用词“一个”、“一种”或“所述”, 当与术语“含有”一起使用时, 可以是指“一个”, 但也可以是指“一个或多个”、“至少一个”和“一个或一个以上”。

#### [0036] I. 乳剂

[0037] 在某些实施例中, 包括脂质组分、含水组分和非离子表面活性剂的乳状液可用将来将 RNAi 试剂递送至活体动物的组织。在一些实施例中, 乳状液中脂滴的平均直径在 50nm 至 2,000nm 之间。在其它实施例中, 平均直径在 50nm 至 100nm、100nm 至 150nm、150nm 至 200nm、200nm 至 300nm、300nm 至 400nm、400nm 至 500nm、500nm 至 600nm、100nm 至 500nm、100nm 至 1000nm、500nm 至 1000nm 或 1000nm 至 2000nm 之间。本领域的技术人员将会理解, 乳状液制剂包含具有一定大小范围的脂质微粒。在一些实施例中, 乳状液制剂包含与平均粒径相差 10%、15%、20% 或 25% 的脂质微粒。在一些实施例中, 脂滴以较大的脂质球的形式而存在。在某些实施例中, 脂质球具有从约 10  $\mu$ m 至约 1000  $\mu$ m 的直径。本领域的技术人员应认识到, 不同的组织可能需要不同的递送粒径。例如, 不同组织或肿瘤中脉管系统的

特性会影响最佳的递送粒径。

#### [0038] A. 脂质组分

[0039] 制剂的脂质组分包含中性磷脂。在一些实施例中，脂质组分还包含油脂或蜡。脂质组分可包含 20 重量%至 100 重量%的中性磷脂和 0 至 80 重量%的油脂或蜡。在含有油脂或蜡的制剂中，在该制剂中中性磷脂与油脂或蜡的重量比可以从 1 : 2 至 1 : 6。在一些实施例中，磷脂与油脂的比为约 1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5 或 1 : 6。

##### [0040] 1. 磷脂

[0041] 磷脂最常见地是由结合至两个脂肪酸的甘油分子和磷酸基团所构成的双极性分子。在一些磷脂中，磷酸基团结合至另一化学基团，被称为头部基团。如果磷脂的净电荷为零，则其为中性磷脂。带有净正电荷的磷脂为阳离子磷脂，而带有净负电荷的那些为阴离子磷脂。

[0042] 在一些实施例中，磷脂是中性磷脂。中性磷脂包括但不限于磷脂酰胆碱 (PC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DOPC)、卵磷脂、磷酸酰乙醇胺 (PE)、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺 (lysophosphatidylethanolamine)、鞘磷脂 (sphingomyelin) (SM)、心磷脂、磷脂酸 (phosphatidic acid)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DPPE)、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (POPC)、1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DMPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DMPE)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、二棕榈油酰 (dipalmitoleoyl)-PE、二植烷醇 (diphytanoyl)-PE、DSPE、二反油酸-PE、二亚油酰-SM 和二亚油酰-PE。在一些实施例中，中性磷脂 DOPC 和 / 或中性磷脂 DOPE 使用于乳剂中。

##### [0043] 2. 油脂和蜡

[0044] 如本文所使用的“油脂”是指一组异质性的中性、可燃物质，其在室温下为液体，并且特有地可溶于相对非极性溶剂但仅微溶于含水溶剂。主要有三种类型：(1) 动物和植物油脂，其主要包括三酰基甘油，但也可包括不同量的其它醇的脂肪酸酯；(2) 衍生自石油、煤、页岩的矿物油，其包括烃；和 (3) 精油。

[0045] 油脂的实例包括但不限于植物油、棉籽油、油菜籽油、橄榄油、矿物油、甜杏仁油、蓖麻油、椰子油、棕榈油、大麻籽油、亚麻油、鱼油、鲸脂衍生油、鲨鱼肝油、角鲨烯或角鲨烯蜡。在其它实施例中，油脂可以包括油性脂肪醇、山梨醇酯和脂肪酸酯、中链甘油三酯、油性蔗糖酯或衍生自任何植物或动物源的油脂。在一些实施例中，油脂可以是离子或非离子嵌段共聚物、苯乙烯、二乙烯基苯、丙烯酸丁酯、丙烯酸 2-乙基己酯、丙烯酸环己酯、丙烯酸癸酯、丙烯酸月桂酯、丙烯酸十二碳烯醇酯、丙烯酸十四烷基酯、丙烯酸十六烷基酯、丙烯酸十六碳烯醇酯、丙烯酸十八烷基酯、丙烯酸十八碳烯醇酯、丙烯酸二十二烷基酯、甲基丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸 2-乙基己酯、甲基丙烯酸环己酯、甲基丙烯酸癸酯、甲基丙烯酸月桂酯、甲基丙烯酸十二碳烯醇酯、甲基丙烯酸十四烷基酯、甲基丙烯酸十六烷基酯、甲基丙烯酸十六碳烯醇酯、甲基丙烯酸十八烷基酯 (staryl methacrylate)、甲基丙烯酸十八碳烯醇酯 (actadecenyl methacrylate) 或甲基丙烯酸二十二烷基酯。在一些实施例中，角鲨烯可以用于形成乳剂。

[0046] 在某些实施例中，所述制剂含有蜡，所述蜡替代油脂或加成至油脂。本文所用的



“蜡”是指活体有机体或原油的任何脂质部分或长链一羟基醇的任何脂肪酸酯,所述脂质部分是可塑性物质,冷却时变硬,加热时易于模制,且不溶于水。

[0047] 蜡的实例包括但不限于蜂蜡、Stedmans 蜡、白蜡、紫胶蜡、鲸蜡、羊毛脂蜡、耳蜡、蜡果杨梅蜡、小烛树蜡、蓖麻蜡、eapatro 蜡、日本蜡、霍霍巴蜡、小冠巴西棕榈蜡、米糠蜡、纯地蜡、褐煤蜡、纯地蜡、泥煤蜡、石蜡、微晶蜡、聚乙烯蜡、费-托蜡 (fisher-tropsch wax)、化学改性蜡、酰胺替代蜡或聚  $\alpha$  烯烃或它们的组合。

#### [0048] B. 含水组分

[0049] 乳剂的含水组分包含存在于水性介质中的 RNAi 试剂、抗 miRNA 试剂或核酸适体。含水组分可以是任何药用的溶液或缓冲液,诸如磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、盐水、林格氏溶液或水。缓冲含水组分可包括已知的缓冲剂和缓冲系统。在某些实施例中, RNAi 或抗 miRNA 试剂以约 0.1mg/ml 至约 0.2mg/ml 的浓度存在于水溶液中。

[0050] RNAi 试剂包括但不限于短干扰 RNA (siRNA)、微 RNA (miRNA)、与 Piwi 相互作用 RNA (piRNA)、核酶和反义化合物。在一些实施例中, RNAi 试剂为 siRNA 或 miRNA。在一些实施例中, RNAi 试剂通过质粒或其它表达载体进行表达。在其它情况下, RNAi 试剂制备为 PCR 产物。RNAi 试剂可以是单链的或双链的,并且一些 RNAi 试剂包括发夹或其它次生结构。一些 RNAi 试剂包括化学改性的 RNA 或 DNA,诸如主链、糖、碱基、末端 (3' 或 5' 端) 改性。RNAi 试剂可包括抗癌剂、抗病毒剂、抗菌剂、免疫调节剂、抗寄生虫剂以及调节炎症、代谢或可与疾病或感染有关的其它途径的试剂。

[0051] 在一些实施例中,脂质组分与 RNAi 试剂的重量比为约 10 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1 或 100 : 1。在其它实施例中,脂质组分与含水组分的重量比为在 1 : 1 和 1 : 1000 之间。在某些实施例中,脂质与含水的重量比为约 1 : 1、1 : 5、1 : 10、1 : 20、1 : 50、1 : 100、1 : 500 或 1 : 1000。

#### [0052] C. 非离子表面活性剂

[0053] 在一些实施例中,乳剂含有非离子表面活性剂。非离子表面活性剂的例子包括但不限于聚山梨醇酯 20 (Tween20)、聚山梨醇酯 80 (Tween80)、诺乃洗涤剂 P-40 (NP-40)、CHAPS 或它们的组合。非离子表面活性剂的其它的例子包括 TritonX100、TritonX114、NP40、Brij-35、Brij-58、辛基葡糖苷和辛硫基葡糖苷。在一些实施例中,表面活性剂 Tween20 可用于形成乳剂。

[0054] 在某些实施例中,非离子表面活性剂占总制剂的 0.01 重量%至 50 重量%之间。在一些实施例中,表面活性剂占总乳剂按重量计约 0.01%、0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%或 50%。在某些实施例中,表面活性剂占总乳剂按重量计约 0.1%至 5%、1%至 10%、2%至 20%、10%至 33%、20%至 40%、20%至 33%、30%至 50%、30%至 40%或 40%至 50%。在其它实施例中,表面活性剂与脂质组分的比在 1 : 10,000 和 1 : 3,000、1 : 3,000 和 1 : 1,000、1 : 1,000 和 1 : 300、1 : 300 和 1 : 100、1 : 100 和 1 : 10、1 : 30 和 1 : 10、1 : 30 和 1 : 1、1 : 1 和 3 : 1、1 : 1 和 10 : 1、1 : 1 和 15 : 1、15 : 1 和 30 : 1 或 15 : 1 和 50 : 1 之间。

#### [0055] D. 其它组分

[0056] 在一些实施例中,乳剂含有抗氧化剂。抗氧化剂的例子包括但不限于抗坏血酸、生育酚、白藜芦醇、类黄酮、番茄红素、胡萝卜素 L-半胱氨酸和鼠尾草酚。在一些实施例中,抗

坏血酸可用于乳剂。在某些实施例中，抗氧化剂以约 0.01mg/ml 至 10mg/ml 的浓度存在于乳状液中。在一些实施例中，乳状液含有约 0.1-1mg/ml、1-2mg/ml、1-5mg/ml、1-10mg/ml 或 5-10mg/ml 浓度的抗氧化剂。

[0057] 在另一实施例中，磷脂共轭至抗体或其它靶向剂，从而能够将 RNAi 试剂定向递送至特异靶标器官。抗体识别组织特异的靶标，从而集中递送至那些组织。其它靶向剂包括蛋白质、碳水化合物或用于组织或细胞特异的受体、病毒载体以及本领域已知的其它靶向部分的小分子配体。

#### [0058] II. 制备方法

[0059] 在一些实施例中，脂质组分通过将中性磷脂和油脂与有机溶剂（如，氯仿、己烷）混合进行制备。使用本领域已知的标准干燥或蒸发法，将有机溶剂从所得的混合物中移除。在一些实施例中，在干燥或蒸发步骤之前脂质组分在 -80°C 下进行冷冻。在干燥或蒸发步骤之前混合物可以冷冻至少 10 分钟、20 分钟或 30 分钟。在某些实施例中，干燥或蒸发包括冻干法或旋转蒸发。所得的物质也可以通过在其上穿过惰性气流（如，氮气）进行干燥。

[0060] 在一些实施例中，将非离子表面活性剂添加至脂质混合物并与脂质一起干燥。在形成乳状液之前，也可将表面活性剂添加至含水组分，或可将其添加至脂质含水混合物。在一些实施例中，含水组分包含约 0.1mg/ml 至 20mg/ml 之间的 RNAi、抗 miRNA 或核酸适体试剂。在某些实施例中，至少使用 5  $\mu$ l 的脂质组分来配制 100  $\mu$ g 的 RNAi、抗 miRNA 或核酸适体试剂。在其它实施例中，脂质含水乳状液的体积在约 1  $\mu$ l 和 1ml 之间。

[0061] 在某些实施例中，脂质组分与 RNAi、抗 miRNA 或核酸适体试剂在水溶液中结合并混合以形成乳状液。该乳状液可以通过在水溶液中高能量混合脂质、油脂、表面活性剂和核酸来制备。合适的高能混合方法包括声波降解法、挤压、均化、加压、加热、冷冻、破碎、激光照射、搅拌，用其它高能运动或其它本领域的技术人员已知的方法进行处理。在一些实施例中，声波降解法至少进行 5 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟或 30 分钟。在其它采用挤压法的实施例中，挤压膜的孔径可以小于 50nm、100nm、150nm、200nm 或 400nm。可以通过依据粒径，例如，依据粒径、密度或场流分级法或色谱法析出微粒对乳状液进行进一步加工。

[0062] 乳剂可以包括脂质体以及其它脂质载体微粒，所述脂质体为含有具有脂双层的囊泡的脂质，所述脂质载体微粒能够捕集核酸试剂。脂质体能够由中性磷脂制成。合适的磷脂包括 DOPC、DOPE 和本文列出的其它磷脂。脂质体可以是单层、多层或具有不定的层状结构。在一些方面，脂质体捕集、封装和 / 或结合核酸试剂，从而使得所述试剂装入脂质体的一些部分或与其结合。在一些实施例中，脂质微粒形成胶束。胶束可以具有由中性磷脂包围的油脂核。在其它实施例中，脂质微粒可以反胶束的形式存在。核酸可包含在脂质微粒内、表面上和 / 或水相乳状液中。

[0063] 在某些实施例中，脂质组分和含水组分以约 1 : 1 至约 1 : 1000 的重量比进行结合。脂质组分和含水组分的比可以是约 1 : 1、1 : 5、1 : 50、1 : 100、1 : 500 或 1 : 1000。比例的范围也包括在本范围内，诸如具有包括所列出值及其之间的比例的各个子范围。乳剂中核酸的总浓度可以为从约 0.1  $\mu$ g/ml 至约 10mg/ml。在一些实施例中，核酸的浓度为约 0.1-1mg/ml、0.1-2mg/ml、0.5-1mg/ml、1-2mg/ml、1-5mg/ml 或 1-10mg/ml。

[0064] 在一些实施例中，至少 50%、60%、70%、80% 或 90% 的核酸与脂质微粒结合。所

述制剂可以使用本领域已知的方法进行描述。

### [0065] III. 乳剂的使用

[0066] 乳剂用于多种应用,其包括治疗和研究之目的。该制剂适用于脊椎动物,诸如母牛、马、猪、猴、兔、大鼠、小鼠和人类。在其它实施例中,该制剂可用于将 RNAi、抗 miRNA 或核酸适体试剂递送至其它动物,诸如鱼、青蛙、虾、用作食物或用作饲料的动物和植物、虫子(包括但不限于蚂蚁、蜜蜂、苍蝇、蚊子、蚋、爬虫、飞虫、蠕虫或穴居虫)。在其它实施例中,可将制剂施用于草、农作物、野生花草树木。

[0067] 疾病和病理状态包括但不限于增生性疾病、炎症性疾病、免疫性疾病、代谢疾病、传染性疾病和缺血性疾病。疾病还包括神经系统、免疫系统、肌肉、生殖、胃肠道、肺、心血管、肾、增生和 / 或癌症疾病、失调和病症。本领域的技术人员将会理解,沉默或减少与疾病或病症相关的基因表达能够与其它常规疗法相结合。

[0068] 示例性的癌症包括恶性血液病、白血病(包括急性白血病(例如,急性淋巴细胞白血病,包括原粒细胞、早幼粒细胞、粒单核细胞、单核细胞的急性髓细胞白血病和红白血病))和慢性白血病(例如,慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病)、骨髓增生异常综合征真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如,霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、Waldenstrom 巨球蛋白血症、重链病和实体瘤,所述实体瘤包括但不限于肉瘤和癌,诸如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状上皮细胞癌、基底细胞癌、腺癌、腺体癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、甲状腺癌或肉瘤、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、皮肤癌(包括,如上皮癌、肉瘤和黑素瘤)、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤(menangioma)、黑素瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤;和 / 或癌转移,包括在骨、肝脏和肺内的转移。

[0069] 根据本领域的技术人员已知的任何药物施用的方法,可递送并使用最终物质,所述药物施用包括但不限于循环系统、皮肤、眼睛、耳朵、鼻子、咽喉、肛门、阴道和尿道。可能的给药方法包括静脉注射(IV)、皮下注射(sub-Q)、低压尾静脉注射(LPTV)、高压尾静脉注射(HPTV)、吞服、腹腔注射(IP)、吸入、滴鼻、鞘内注射、瘤内注射、经皮给药、肌肉注射、眼球内注射或耳蜗内灌注或它们的组合。例如,PORE 制剂能够系统地或局部地递送至特异的组织或瘤。本领域的技术人员应认识到,哪种给药方法是适当的要取决于正在治疗的疾病或正施用的试剂类型。

[0070] 在一个实施例中,用作乳剂的组合物可包装在试剂盒内。例如,含有中性磷脂、油脂和非离子表面活性剂的组合物可包装在小瓶内。在一些实施例中,组合物包含在第一小瓶中的中性磷脂和油脂以及在第二小瓶中的非离子表面活性剂。试剂盒可包括干燥形式的 RNAi、抗 miRNA 或核酸适体试剂,其中所述试剂可适于注射并不含 RNase。在替代实施例中,表面活性剂可与核酸试剂混合。试剂盒还可包括能够重新构成干燥形式的 RNAi 试剂的缓冲液组合物。试剂盒还可包括用于在与组合物混合后递送治疗剂的递送装置(如,注射器)。

[0071] IV. 实例

[0072] 以下实例示出了本发明的各个实施例,但并非旨在限制本发明的范围。

[0073] 实例 1. 磷脂-油脂 RNAi 乳状液 (PORE) 的制备和显微镜检查

[0074] siRNA 和 miRNA 试剂购自 Qiagen、Sigma、IDT 或 Applied Biosystems。磷脂购自 Sigma Chemical 或 Avanti Lipids。角鲨烯购自 Sigma。

[0075] 100  $\mu$ g 抗坏血酸、3  $\mu$ l 角鲨烯 (油脂)、1mg 2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DOPC) (中性磷脂)、49  $\mu$ l Tween20 和 1ml 氯仿的组合物在含有耐溶剂螺旋瓶盖的 10ml 玻璃小瓶中通过涡旋 30 秒进行混合。角鲨烯与 DOPC 的摩尔比率约为 200 : 1。混合物在  $-80^{\circ}\text{C}$  下培养至少 10 分钟。使用旋转蒸发器将氯仿在  $40^{\circ}\text{C}$  下冻干,并且将混合物恢复至  $-80^{\circ}\text{C}$  保持至少 20 分钟。冻干的组合物进一步通过在其上通过氮气流 (使用稳定气流采用直接吹氮法) 进行干燥。所得的组合物非常粘稠,类似于重油,并使用 TJ-6 离心机 (Beckman ; Fullerton, CA, USA) 以 5,000rpm 的速度旋转离心,从而使得试剂积聚在小瓶的底部。

[0076] 将溶解在 150  $\mu$ l PBS 中的 100  $\mu$ g miRNA 样本直接添加至冻干的磷脂-油脂混合物,并使用 G112SP1 超声清洗器 (Laboratory Supplies Company, New York, USA) 以 80KHz 和 80 瓦特在室温下进行声波处理 10 分钟。角鲨烯与 miRNA 的摩尔比率约为 1 : 1。控制超声清洗器的水温。如果温度上升超过  $40^{\circ}\text{C}$ ,则向水中加冰来降低温度。所得的物质是磷脂-油脂 RNAi 乳状液 (PORE)。

[0077] PORE 用显微镜放大 100 倍进行分析。在多种情况下,发现溶液中存在较大的结构。这些较大的脂质/油脂结构内部包含脂质体。在一些情况下,该结构表现为围绕着许多较小脂质体 (0.1  $\mu$ m 至 10  $\mu$ m) 的大油滴 (100  $\mu$ m 至 1000  $\mu$ m) 的混合物。RNAi 试剂很可能通过不止一个囊泡 (囊泡内的囊泡) 捕集和封装。这种独特的试剂混合物可以保护 RNAi 试剂免受体内核酸酶的影响,并且赋予其更长的循环寿命。

[0078] 实例 2. 使用以中性磷脂配制的 siRNA 的小鼠体内 GAPDH 的减少

[0079] 将 100  $\mu$ g GAPDH siRNA 在 200  $\mu$ l PBS 中的溶液添加至根据实例 1 方法制备的 100  $\mu$ g 抗坏血酸、3  $\mu$ l 角鲨烯、1mg DOPC 和 49  $\mu$ l Tween20 的冻干磷脂-油脂混合物。该混合物使用 112SP1 特殊超声清洗器 (Laboratory Supplies Company, New York) 以 80KHz 和 80 瓦特进行声波处理 5 分钟以制备 PORE。将该 PORE 注射至小鼠的尾静脉。注射后 72 小时,处死动物,移除器官,使用 GAPDH ELISA 试剂盒 (Bioo Scientific, 产品编号 3401) 中提供的蛋白质提取缓冲液提取蛋白质,并采用 Bradford 测定法 (Bioo Scientific, 产品编号 :3440-01) 对蛋白质进行归一化。使用 GAPDH ELISA (Bioo Scientific, 产品编号 3401) 测定 GAPDH 的浓度。蛋白质减少相对于阴性对照 RNAi 试剂治疗的动物 (Qiagen 阴性对照 siRNA, 产品编号 S104381048) 来表示。GAPDH 的活性在心脏和肺内减少一倍 (图 4)。

[0080] 实例 3. 使用以中性和阳离子磷脂配制的 siRNA 的大鼠心脏内的 GAPDH 的减少

[0081] 含有角鲨烯、DOTAP (阳离子磷脂)、0.8DOPE (中性磷脂) 的制剂与 GAPDH siRNA (Qiagen GAPDH 阳性对照, 产品编号 GS14433) 混合。12.5  $\mu$ l 角鲨烯、3.2mg DOTAP、0.8mg DOPE 的混合物溶解于 1ml 氯仿中。混合物在  $-80^{\circ}\text{C}$  下培养至少 10 分钟。使用旋转蒸发器将氯仿在  $40^{\circ}\text{C}$  下冻干,并且将混合物恢复至  $-80^{\circ}\text{C}$  保持至少 20 分钟,然后使用干燥氮气流进行干燥。将 400  $\mu$ g GAPDH siRNA (Qiagen, 产品编号 GS14433) 在 200  $\mu$ l PBS 中的溶液直接添加至磷脂-油脂混合物,并使用 112SP1 超声清洗器 (The Laboratory

Supplies Company, New York) 以 80KHz 和 80 瓦特进行声波处理 5 分钟。每只远系繁殖的大鼠 (Jackson Labs ;Bar Harbor, Maine, USA) 在尾静脉注射 400  $\mu$ g 配制的 siRNA。注射后 72 时,使用二氧化碳气体处死动物,移出心脏并切成 8 等份。还移出单叶肝脏和脾。使用 GAPDH ELISA 试剂盒蛋白质提取缓冲液 (Bioo Scientific, 产品编号 3401) 从组织中提取蛋白质。使用 Bradford 测定法 (Bioo Scientific, 产品编号 3440-01) 对蛋白质进行归一化。使用 GAPDH ELISA (Bioo Scientific, 产品编号 3401) 测定 GAPDH 的浓度。试验动物中每一份的 GAPDH 的浓度降低了 50% 至 60% (图 5)。注射进大鼠尾静脉的物质总体积不得超过 0.5ml 溶液。

[0082] 实例 4. 小鼠心脏内的 GAPDH 蛋白质减少

[0083] 1ml 体积的氯仿与 100  $\mu$ g 抗坏血酸、3  $\mu$ l 角鲨烯、1mg DOPC 和 49  $\mu$ l Tween20 混合。混合物在  $-80^{\circ}\text{C}$  下培养至少 10 分钟。使用旋转蒸发器将氯仿在  $40^{\circ}\text{C}$  下冻干,并且将混合物恢复至  $-80^{\circ}\text{C}$  保持至少 20 分钟,然后使用干燥氮气流进行干燥。将 100  $\mu$ g GAPDH siRNA (Qiagen, 产品编号 GS14433) 在 100  $\mu$ l PBS 中的溶液直接添加至冻干的物质,并进行声波处理 5 分钟。将 GAPDH PORE 注射进 balb/c 小鼠的尾静脉,每只小鼠 100  $\mu$ g。注射后 72 时,处死动物。移出心脏,并将其嵌入石蜡中以用于通过免疫组织化学 (服务提供商为在德州休斯顿的贝勒医学院的 Lester and Sue Smith Breast Center) 进行 GAPDH 蛋白质分析或使用 GAPDH ELISA 试剂盒蛋白质提取缓冲液从组织中提取蛋白质。提取的蛋白质使用 Bradford 测定法 (Bioo Scientific, 产品编号 3440-01) 进行归一化。然后使用 Bioo GAPDH ELISA 试剂盒 (Bioo Scientific, 产品编号 3401) 对 GAPDH 蛋白质水平进行定量。试验动物的 GAPDH 水平在试验动物中减少了 50% (图 6)。免疫组织化学结果证实了 ELISA 结果并表明基于 GAPDH 蛋白质 (褐色) 强度等级试验动物 GAPDH 蛋白质减少。

[0084] 实例 5. PORE- 配制的 RSV siRNA 对病毒测试的功效

[0085] 1ml 体积的氯仿与 100  $\mu$ g 抗坏血酸、3  $\mu$ l 角鲨烯、1mg DOPC 和 49  $\mu$ l Tween20 混合。该混合物在  $-80^{\circ}\text{C}$  下培养至少 10 分钟。使用旋转蒸发器将氯仿在  $40^{\circ}\text{C}$  下冻干,并将混合物恢复至  $-80^{\circ}\text{C}$  保持至少 20 分钟,然后使用干燥氮气流进行干燥。将呼吸道合胞病毒 (RSV) 在 100  $\mu$ l PBS 中的 100  $\mu$ g 溶液直接添加至冻干的物质,并进行声波处理 5 分钟。RSV siRNA 也使用所述 TransIT-TKO® 转染试剂 (Mirus Bio Corporation, Madison, WI) 和 Infasurf® (Forest Pharmaceuticals, Inc) (Bitko 等人, 2005) 进行配制。

[0086] 将 PBS 中三种不同的 RSV siRNA 制剂和未配制的 siRNA 以不同剂量的 siRNA 重复三次地鼻内施用给小鼠来评估每种制剂的效果。siRNA 给药 4 时后,小鼠被感染所述  $1 \times 10^7$  RSV (Bitko 等人, 2005)。在测试后的第 0 天、2 天、4 天和 6 天通过三种不同标准 (呼吸频率、H&E 染色肺病理评分和 RSV 滴定度 (图 7)) 对 RSV 感染效果进行监测。

[0087] 用 5  $\mu$ g RSV PORE 治疗的小鼠具有类似于未感染小鼠的呼吸频率,然而与未经任何治疗的感染小鼠 (图 7A) 相比,用 5  $\mu$ g 未配制的 RSV siRNA 治疗的小鼠具有高很多的呼吸频率 (图 7A)。将呼吸频率降至未感染小鼠的呼吸频率水平需要约 70  $\mu$ g 未配制的 siRNA。因此,RSV PORE 比未配制的 RSV siRNA 或 TransIT-TKO 配制的 RSV siRNA (数据未示出) 的有效性高出约 14 倍。

[0088] 用 5  $\mu$ g RSV PORE 治疗的小鼠具有类似于未感染 (正常) 小鼠的病理评分,然而用 5  $\mu$ g 未配制的 RSV siRNA 治疗的感染小鼠具有类似于未经治疗的感染小鼠的病理评分

(图 7B)。

[0089] 在测试 4 天后(病毒浓度预计达到峰值),RSV 感染的小鼠用 RSV PORE 治疗,在所有的 siRNA 浓度下,小鼠肺内的 RSV 滴定度比未经治疗的感染小鼠低约 100 倍(图 7C)。与未经治疗的感染小鼠相比,其它三种 RNA siRNA 制剂,即使用量达 40  $\mu$ g 滴定度的降低也不会超过 10 倍。

[0090] 实例 6. PORE 和 DOPC 制剂的比较

[0091] 1ml 体积的氯仿与 100  $\mu$ g 抗坏血酸、3  $\mu$ l 角鲨烯、1mg DOPC 和 49  $\mu$ l Tween20 (PORE 制剂)混合,或与 1mg DOPC 和 49  $\mu$ l Tween20 (DOPC)混合。该混合物在  $-80^{\circ}\text{C}$  下培养至少 10 分钟。使用旋转蒸发器将氯仿在  $40^{\circ}\text{C}$  下冻干,并且将混合物恢复至  $-80^{\circ}\text{C}$  保持至少 20 分钟,然后使用干燥氮气流进行干燥。将 100  $\mu$ g GAPDH siRNA(Qiagen,产品编号 GS14433)在 100  $\mu$ l PBS 中的溶液直接添加至冻干的物质,并进行声波处理 5 分钟。将 GAPDH PORE 或 DOPC 制剂注射进 balb/c 小鼠的尾静脉,每只小鼠 100  $\mu$ g。注射后 72 时,处死动物。然后,使用 GAPDH ELISA 试剂盒蛋白质提取缓冲液(Bioo Scientific,产品编号 3401)从组织中提取蛋白质。使用 Bradford 测定法(Bioo Scientific,产品编号 3440-01)对蛋白质进行归一化。使用 GAPDH ELISA(Bioo Scientific,产品编号 3401)测定 GAPDH 的浓度。使用 PORE-配制的 siRNA 而非 DOPC-配制的 siRNA 治疗的小鼠,其肝脏内 GAPDH 的浓度减少了 50%至 60%(图 8)。

[0092] 实例 7. 将 siRNA 递送至正常组织的各种油脂/蜡和中性脂质的作用

[0093] 为评估各种油脂/蜡和中性脂质在静脉注射后将 siRNA 递送至各组织的能力,表 1 所列出的 PORE 制剂用靶向 GAPDH 的 siRNA 或使用标准方法(见实例 1)所获得的阴性对照 siRNA 进行制备。各种制剂 +siRNA 以 5mg/kg 的速率通过尾静脉注射输入 BalbC 小鼠。注射后 2 天,处死小鼠并移出脑、肝、心、脾、左肾、右肾、左肺和右肺。将从各组织制备的蛋白质样本进行 Bradford 分析,并随后对相同质量的蛋白质样本进行 ELISA 测定来定量 GAPDH 蛋白。

[0094] 表 1:使用各种油脂和蜡的基于 DOPC 的油脂乳状液组合物。缩写:N/A,未添加。

组分	变体 1	变体 2	变体 3	变体 4	变体 5
抗坏血酸 10mg/ml	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul
角鲨烯: 100%	0ul	3ul	N/A	N/A	N/A
DOPC: 20mg/ml	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
Tween 20: 100%	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
椰子油	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A
Steedmans 蜡	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A
棕榈油	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul

[0096] 实例 8 :将 siRNA 递送至小鼠内原位肺癌移植瘤

[0097] 先前的实例表明小干扰 RNA 至各正常组织（包括肺）的成功递送和及其活性。在本实例中,发明者证实了在原位肺肿瘤小鼠模型中用作寡核苷酸递送载体的基于中性磷脂的乳状液的功用。稳定地表达萤火虫荧光素酶基因的人 H460 非小细胞肺癌移植瘤在小鼠的肺内（原位肺肿瘤小鼠模型）生长,并使用荧光素酶定向的 siRNA (si-luc) 来显示通过 PORE 至肿瘤细胞的系统递送。在本测定系统中,荧光素酶活性的减少将表明 (i) 荧光素酶定向的 siRNA 成功递送至肺, (ii) siRNA 成功递送至肺内生长的肿瘤细胞, (iii) 肿瘤细胞对 siRNA 的成功细胞内摄取,和 (iv) siRNA 成功进入 RNAi 途径以及下调其预期靶标。因此,以荧光素酶表达肿瘤细胞和荧光素酶定向 siRNA 的使用为寡核苷酸的递送和活性提供精确且灵敏的评估。本模型系统描述了在寡核苷酸显示治疗活性之前系统递送的寡核苷酸必须穿过的所有物理屏障。

[0098] 将 20  $\mu$ g 合成荧光素酶特异的 siRNA (si-luc ;Ambion, Austin, TX, USA) 或 20  $\mu$ g 阴性对照寡核苷酸 (NC ;Dharmacon, Lafayette, CO) 在 200  $\mu$ l PBS 中的溶液添加至冻干的磷脂 - 油脂混合物,所述混合物由 20  $\mu$ g 抗坏血酸、0.6  $\mu$ l 角鲨烯、0.2mg DOPC 和 9.8  $\mu$ l Tween20 根据实例 1 的方法制备。寡核苷酸在 PORE 中的最终浓度为 100ng/ $\mu$ l。

[0099] 通过气管插管将  $3 \times 10^6$  H460 肺癌细胞移植至 4 只免疫失能的 NOD/SCID 小鼠 (Jackson Laboratories ;Bar Harbor, ME, USA) 的肺内。通过 IVIS® 成像系统 (Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) 对小鼠进行定期监测,该系统在荧光素酶基质荧光素的腹膜内注射后测量发光 (荧光素酶活性)。由于 H460 细胞稳定表达荧光素酶,所以发光信号直接地与活肿瘤细胞相关。一旦小鼠形成易于检测的肺肿瘤,则记录下总发光数据 (总通量, 0 时)。测量发光后,立即对两只小鼠进行尾静脉注射含有 20  $\mu$ g si-luc 的 200  $\mu$ l PORE。假定小鼠平均体重为 20g,则该剂量为 1mg/kg 的小鼠体重。作为阴性对照,

对两只小鼠进行尾静脉注射含有 20  $\mu$ g NC 的 200  $\mu$ l PORE 制剂。注射配制的寡核苷酸后 48 时,再次测量发光并表示为相对于每只小鼠在 0 时(100%)总通量的变化百分比。

[0100] 如图 9A 所示,含有 NC 的 PORE 的系统递送对 H460 肿瘤细胞(动物 #1 和 #2)的荧光素酶活性不具有抑制效应。相反,PORE- 配制的 si-luc 的系统给药导致注射后 48 时荧光素酶活性的显著降低(图 9B,动物 #3 和 #4)。相对于 0 时,使用荧光素酶 siRNA 治疗的动物的其余荧光素酶活性为 0.84%和 0.41%,表明荧光素酶 siRNA 被成功地递送至肿瘤细胞(图 10)。

[0101] 所述数据表明 PORE 促进荧光素酶 siRNA 有效递送至肿瘤细胞。

[0102] 实例 9. PORE 制剂中的治疗 miRNA 的瘤内递送抑制小鼠内肿瘤的生长

[0103] 当在基于中性磷脂的油脂乳状液中复合时,hsa-miR-34a 和 hsa-miR-124a 的疗效显示了基于中性磷脂的油脂乳状液的成功递送治疗剂的能力。

[0104] 发明者此前已证实,hsa-miR-34a 和 hsa-miR-124a 参与多数细胞活性的调节,所述细胞活性表示癌症治疗和其它疾病和病症(参见,如美国专利申请 No. 11/141,707、No. 11/273,640、No. 12/134,932 和 No. 12/325,917)治疗的介入点。例如,合成 hsa-miR-34a 或 hsa-miR-124a 的过表达或施用降低了某些正常或癌细胞系的增殖和/或生存力并且干扰了动物内肿瘤的生长。

[0105] 将 100  $\mu$ g 合成 hsa-miR-34a、hsa-miR-124a 或阴性对照 miRNA 寡核苷酸(miR-NC)(Dharmacon, Lafayette, CO)在 200  $\mu$ l PBS 的溶液添加至冻干的磷脂-油脂混合物来达到在 PORE 中寡核苷酸的最终浓度 500ng/ $\mu$ l,所述冻干的磷脂-油脂混合物由 100  $\mu$ g 抗坏血酸、3  $\mu$ l 角鲨烯、1mg DOPC 和 49  $\mu$ l Tween20 根据实例 1 的方法制备。

[0106] 每  $3 \times 10^6$  人 H460 非小肺癌细胞与 BD Matrigel™(BD Biosciences; San Jose, CA, USA; 产品编号 356237)以 1:1 的比例混合,并皮下注射至 28NOD/SCID 小鼠(Jackson Laboratories; Bar Harbor, ME, USA)的后背。一旦动物形成可触摸的肿瘤(异种移植后 12 天),则在第 12、15 和 18 天对多组动物(7 只一组)进行瘤内注射 100  $\mu$ g 用 PORE 配制的 hsa-miR-34a 或 hsa-miR-124a(Dharmacon, Lafayette, CO)(注射量为 200  $\mu$ l 的寡核苷酸,其在 PORE 中的浓度为 500ng/ $\mu$ l)。依据用于 hsa-miR-34a 和 hsa-miR-124a 的相同注射时间表,对对照组的 7 只动物中的每一只进行瘤内注射 100  $\mu$ g 阴性对照 miRNA(miR-NC; Dharmacon, Lafayette, CO)。此外,对一组 4 只 H460 荷瘤小鼠进行瘤内注射无 miRNA 的磷脂-油脂乳状液,并对一组 4 只动物进行瘤内注射磷酸盐缓冲盐水(PBS)。每 1 至 2 天进行卡钳测量,并用下式计算肿瘤的体积:体积=长 x 宽 x 宽/2,其中长大于宽。

[0107] 如图 11 所示,3 剂量配制的 hsa-miR-34a(图 11A,白色方格)或 3 剂量 PORE- 配制的 hsa-miR-124a(图 11B,白色菱形)显著地抑制确诊的 H460 肺肿瘤的生长。相反,用 PORE- 配制的阴性对照 miRNA(miR-NC,黑色圆圈)治疗的肿瘤以稳定的速度生长,并且生成的肿瘤具有类似于仅用 PBS 或磷脂-油脂乳状液(黑色菱形和黑色方格)治疗的动物肿瘤的平均大小。在第 20 天,用配制的 hsa-miR-34a 治疗的肿瘤平均体积为用配制的 miR-NC 治疗的肿瘤平均体积的 22.2%,其 p 值在第 13 天至第 20 天小于 0.01。同样,在第 20 天,用配制的 hsa-miR-124a 治疗的肿瘤平均体积为用配制的 miR-NC 治疗的肿瘤平均体积的 26.9%,示出 p 值在第 14 天至第 20 天小于 0.01。

[0108] 所述数据表明 PORE 促进治疗 miRNA hsa-miR-34a 和 hsa-miR-124a 成功递送至肿



瘤细胞内,从而显著并特异地抑制肿瘤的生长。

[0109] 实例 10 :PORE 制剂中的治疗 miRNA 的系统递送抑制小鼠内肿瘤的生长

[0110] 发明者评估了基于中性磷脂的油脂乳状液通过系统施用向活体内肿瘤细胞成功地递送治疗寡核苷酸的能力。

[0111] 将 100  $\mu$ g 合成 hsa-miR-34a、hsa-miR-124a 或阴性对照 miRNA 寡核苷酸 (miR-NC) (Dharmacon, Lafayette, CO) 在 200  $\mu$ l PBS 中的溶液添加至冻干的磷脂-油脂混合物来达到在 PORE 中寡核苷酸的最终浓度 500ng/ $\mu$ l, 所述冻干的磷脂-油脂混合物由 100  $\mu$ g 抗坏血酸、3  $\mu$ l 角鲨烯、1mg DOPC 和 49  $\mu$ l Tween20 根据实例 1 的方法制备。

[0112] 每  $3 \times 10^6$  人 H460 非小肺癌细胞与 BD Matrigel™ (BD Biosciences ;San Jose, CA, USA ;产品编号 356237) 以 1 : 1 的比例混合, 并皮下注射至 16NOD/SCID 小鼠 (Jackson Laboratories ;Bar Harbor, ME, USA) 的后背。动物形成可触摸的肿瘤之后 (异种移植后 12 天), 则在第 12、15 和 18 天对多组动物 (4 只一组) 中的每一只进行静脉注射 100  $\mu$ g PORE- 配制的 hsa-miR-34a 或 hsa-miR-124a (Dharmacon, Lafayette, CO) (注射量为 200  $\mu$ l 的寡核苷酸, 其在 PORE 中的浓度为 500ng/ $\mu$ l)。依据用于 hsa-miR-34a 和 hsa-miR-124a 的相同注射时间表, 对对照组的 4 只动物中的每一只进行静脉注射 100  $\mu$ g PORE- 配制的阴性对照 miRNA (miR-NC ;Dharmacon, Lafayette, CO)。此外, 对一组 4 只 H460 荷瘤小鼠进行静脉注射无 miRNA 的磷脂-油脂乳状液。每 1 至 2 天进行卡钳测量, 并用下式计算肿瘤的体积: 体积 = 长 x 宽 x 宽 / 2, 其中长大于宽。

[0113] 如图 12 所示, 3 剂量配制的 hsa-miR-34a (图 12A, 白色方格) 或 3 剂量配制的 hsa-miR-124a (图 12B, 白色菱形) 显著地抑制确诊的 H460 肺肿瘤的生长。相反, 用配制的阴性对照 miRNA (miR-NC, 黑色圆圈) 治疗的肿瘤以稳定的速度生长, 并且生成的肿瘤具有类似于仅用磷脂-油脂乳状液 (黑色方格) 治疗的动物肿瘤的平均大小。在第 20 天, 用配制的 hsa-miR-34a 治疗的肿瘤平均体积为用配制的 miR-NC 治疗的肿瘤平均体积的 30.1%, 其 p 值在第 14 天至第 20 天小于 0.01。同样, 在第 20 天, 用配制的 hsa-miR-124a 治疗的肿瘤平均体积为用配制的 miR-NC 治疗的肿瘤平均体积的 30.8%, 示出 p 值在第 15 天至第 20 天小于 0.01。

[0114] 所述数据显示显著和特异肿瘤生长的抑制。

[0115] 实例 11 :PORE 制剂中不同剂量的治疗 miRNA 的系统递送

[0116] 发明者评估了使用中性磷脂油脂乳剂进行系统递送治疗寡核苷酸的活体内剂量响应。

[0117] 合成 hsa-miR-34a (Dharmacon, Lafayette, CO) 用 PORE 依据实例 1 所述的实验步骤进行配制。通过调整 PORE 与寡核苷酸总量的比例和用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 调整所需的浓度来制备各种 hsa-miR-34a 制剂, 该制剂在 PORE 中的浓度为 500ng/ $\mu$ l、100ng/ $\mu$ l、10ng/ $\mu$ l 和 1ng/ $\mu$ l。假定注射量为 200  $\mu$ l, 则采用以下 miRNA 剂量: 100  $\mu$ l、20  $\mu$ l、2  $\mu$ l 和 200ng。假定小鼠平均体重为 20g, 则这些剂量表示 5mg/kg、1mg/kg、0.1mg/kg 和 0.01mg/kg。

[0118] 每  $3 \times 10^6$  人 H460 非小肺癌细胞与 BD Matrigel™ (BD Biosciences ;San Jose, CA, USA ;产品编号 356237) 以 1 : 1 的比例混合, 并皮下注射至 15NOD/SCID 小鼠 (Jackson Laboratories ;Bar Harbor, ME, USA) 的后背。一旦动物形成可触摸的肿瘤 (异种移植后 12

天),则对多组动物(3只一组)中的各只以500ng/ $\mu$ l、100ng/ $\mu$ l、10ng/ $\mu$ l和1ng/ $\mu$ l的浓度进行静脉注射200 $\mu$ g PORE-配制的 hsa-miR-34a。作为阴性对照,单独一组的3只荷瘤动物中的各只接受200 $\mu$ l PBS。在第15天和第19天进行重复治疗。每1至2天进行卡钳测量,并用下式计算肿瘤的体积:体积=长 $\times$ 宽 $\times$ 宽/2,其中长大于宽。

[0119] 如图13A所示,相对于PBS,在使用的所有剂量下 hsa-miR-34a均抑制肿瘤的生长。在最高剂量(5mg/kg)时实现对肿瘤生长最大的抑制,并且0.01mg/kg的 hsa-miR-34a具有最差的疗效。相对于PBS数据, hsa-miR-34a数据的p值范围小于0.05(5mg/kg,第14、15和20天;1mg/kg,第15至21天;0.1mg/kg,第19至21天;0.01mg/kg,第20天)和小于0.01(5mg/kg,第16至19天和第21天),从而表明统计显著性。为直接比较各种剂量 hsa-miR-34a的效果,肿瘤体积以相对于其各自肿瘤体积在第12天的变化百分比进行绘制(开始治疗,100%;图13B)。 hsa-miR-34a的剂量依存性的效果与治疗剂的一般动力学相一致,并表明肿瘤生长的抑制是对治疗剂的特异响应。

[0120] 实例12:将治疗miRNA递送至小鼠内的原位肺癌移植瘤

[0121] 在实例8中,发明者表明了基于中性磷脂的油脂使用荧光素酶定向的siRNA将小寡核苷酸递送至小鼠内的原位生长的肺肿瘤的能力。在本实例中,使用PORE-配制的治疗miRNA寡核苷酸抑制小鼠内的肺肿瘤的原位生长。

[0122] 如实例1所述,合成 hsa-miR-124a(Dharmacon, Lafayette, CO)用PORE制备,其最终浓度为100ng/ $\mu$ l寡核苷酸。

[0123] 通过气管插管将各 $3\times 10^6$ H460肺癌细胞移植至免疫失能的NOD/SCID小鼠(Jackson Laboratories;Bar Harbor, ME, USA)的肺内。通过IVIS®成像系统(Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA)对小鼠进行定期监测,该系统在荧光素酶基质荧光素的腹膜内注射后测量发光(荧光素酶活性)。由于H460细胞稳定表达荧光素酶,所以发光信号直接地与活肿瘤细胞相关。一旦小鼠形成易于检测的肺肿瘤(接种后39天),则对每只小鼠进行尾静脉注射含有20 $\mu$ g PORE-配制的 hsa-miR-124a的200 $\mu$ l溶液。假定小鼠平均体重为20g,则该剂量为1mg/kg的小鼠体重。作为对照,使用具有相似肺肿瘤大小的小鼠,并且其在整个实验过程中未进行治疗。在随后的13天中,每隔一天重复静脉注射PORE-配制的 hsa-miR-124a。频繁地记录下发光,并且在第52天处死两只小鼠。

[0124] 正如预料的那样,未经治疗的小鼠显示出发光随着时间的延长稳定地增加,表明H460肿瘤继续在肺内生长(未经治疗,图14)。相反,第一次注射治疗miRNA后不久,用PORE-配制的 hsa-miR-124a系统地治疗的小鼠显示肺肿瘤的消失。根据发光数据,用 hsa-miR-124a治疗的小鼠的肿瘤体积为未经治疗小鼠的肿瘤体积的0.22%。所述数据表明PORE促进治疗 hsa-miR-124a成功递送至肿瘤细胞,所递送的量足以诱发自然存在部位生长的肺肿瘤内的治疗响应。

[0125] 实例13:活体内siRNA系统递送中的PORE乳状液

[0126] 包含油脂/蜡和中性脂质的制剂影响向动物肿瘤细胞的系统递送。DOPC、DOPE和DPPE在制剂中用作中性脂质,并且角鲨烯、椰子油、steedman蜡、棕榈油、蜂蜡、大麻子油、亚麻油、 $\Omega$ -3-鱼油、植物油和橄榄油用作油脂和蜡。一直不变的组分为抗坏血酸和Tween20。脂质组分与在200 $\mu$ l磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的100 $\mu$ gRNAi试剂混合。组分的详情在表2-4中进行描述。该制剂按照实例1所述的试验方法进行制备。

[0127] 表 2 :使用各种油脂和蜡的基于 DOPC 的油脂乳状液组合物。缩写 :N/A,未添加  
[0128]

组分	变体 1	变体 2	变体 3	变体 4	变体 5	变体 6	变体 7	变体 8	变体 9	变体 10
抗坏血酸 10mg/ml	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul
角鲨烯: 100%	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DOPC: 20mg/ml	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
Tween20: 100%	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
椰子油	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Steedmans 蜡	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
棕榈油	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
蜂蜡	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
大麻子油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A
亚麻油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A
Ω-3-鱼油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A
植物油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A
橄榄油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul

[0129] 表 3 :使用各种油脂和蜡的基于 DOPE 的油脂乳状液组合物。缩写 :N/A,未添加  
[0130]

组分	变体 1	变体 2	变体 3	变体 4	变体 5	变体 6	变体 7	变体 8	变体 9	变体 10
抗坏血酸 10mg/ml	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul
角鲨烯: 100%	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DOPE : 20mg/ml	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
Tween20: 100%	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
椰子油	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Steedmans	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
蜡										
棕榈油	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
蜂蜡	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
大麻子油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A
亚麻油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A
$\Omega$ -3-鱼油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A
植物油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A
橄榄油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul

[0131]

[0132] 表 4 :使用各种油脂和蜡的基于 DPPE 的油脂乳状液组合物。缩写 :N/A,未添加

[0133]

组分	变体 1	变体 2	变体 3	变体 4	变体 5	变体 6	变体 7	变体 8	变体 9	变体 10
抗坏血酸 10mg/ml	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul
角鲨烯: 100%	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DPPE : 20mg/ml	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
Tween20: 100%	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
椰子油	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Steedmans 蜡	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
棕榈油	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
蜂蜡	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
大麻子油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A
亚麻油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A
Ω-3-鱼油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A
植物油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A
橄榄油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul

[0134] 稳定地表达荧光素酶的每  $3 \times 10^6$  人 H460 非小肺癌细胞与 BD Matrigel™ (BO Biosciences; San Jose, CA, USA; 产品编号 356237) 以 1 : 1 的比例混合, 并皮下注射至 NOD/SCID 小鼠 (Jackson Laboratories; Bar Harbor, ME, USA) 的后背。通过 IVIS 成像系统 (Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) 对小鼠进行定期监测, 该系统在荧光素酶基质荧光素的腹膜内注射后测量发光 (荧光素酶活性)。小鼠形成易于检测的肺肿瘤之后, 则记录下总发光数据 (总通量, 0 时)。测量发光后, 立即对小鼠进行尾静脉注射含有  $100 \mu\text{g}$  荧光素酶定向的 siRNA (si-luc) 的  $200 \mu\text{l}$  PORE, 该 PORE 采用表 2-4 所述的组合物。作为阴性对照, 一组小鼠接受 PBS 静脉注射。注射配制的寡核苷酸后 48 时, 再次测量发光并表示为相对于每只小鼠在 0 时 (100%) 总通量的变化百分比。因此, 可以测量荧光素酶沉默的程度。

[0135] 实例 14 : PORE 中的 Tween20

[0136] siRNA 系统递送中各种 Tween20 浓度, 包括油脂与 Tween20 的比例范围从 3 : 0 至 3 : 100, 均在表 5 中进行描述。使用这些不同 Tween20 浓度的 PORE 制剂按照实例 1 所述进行制备。以定量进行添加的组分为抗坏血酸、角鲨烯和 DOPC。如上所述, 脂质组分与在  $200 \mu\text{l}$  PBS 中的  $100 \mu\text{g}$  gRNAi 试剂混合。

[0137] 表 5 : 使用各种 Tween20 浓度的基于 DOPC 的油脂乳状液组合物。缩写 : N/A, 未添加

[0138]

组分	变体 1	变体 2	变体 3	变体 4	变体 5	变体 6	变体 7	变体 8	变体 9	变体 10
抗坏血酸 10mg/ml	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul
角鲨烯: 100% 100%	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul
DOPC: 20mg/ml	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
Tween20: 100%	N/A	0.0005ul	0.001ul	0.01ul	0.05ul	0.1ul	1ul	10ul	50ul	100ul

[0139] 如实例 13 所述,表 5 所述制剂递送 RNAi 试剂的能力使用稳定地表达荧光素酶的 H460 肿瘤模型和作为 RNAi 试剂的荧光素酶定向 siRNA 进行测试。仅在配制 siRNA 的 i.v 注射之前 (0 时) 和注射后 48 时对荧光进行记录。荧光值 (总通量) 被表达为相对于每鼠在 0 时总通量 (100%) 的变化百分比。

[0140] 实例 15 :油脂 / 蜡和中性脂质乳状液

[0141] 将表 6-8 列出的各种油脂 / 蜡和中性脂质 PORE 制剂进行制备、与合成 miRNA 相复合、在原生质中进行培养并测试完整的 miRNA。表 6-8 示出的各种混合物如实例 1 所述进行混合、凝固并干燥。脂质组分与在 200  $\mu$  l 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的 100  $\mu$  gRNAi 试剂混合。

[0142] 表 6 :使用各种油脂和蜡的基于 DOPC 的油脂乳状液组合物。缩写 :N/A, 未添加

[0143]

组分	变体 1	变体 2	变体 3	变体 4	变体 5	变体 6	变体 7	变体 8	变体 9	变体 10
抗坏血酸 10mg/ml	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul
角鲨烯: 100%	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DOPC: 20mg/ml	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
Tween20: 100%	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
椰子油	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Steedmans 蜡	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
棕榈油	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
蜂蜡	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
大麻子油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A
亚麻油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A
Ω-3-鱼油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A
植物油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A
橄榄油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul

[0144] 表 7 :使用各种油脂和蜡的基于 DOPE 的油脂乳状液组合物。缩写 :N/A, 未添加  
[0145]

组分	变体 1	变体 2	变体 3	变体 4	变体 5	变体 6	变体 7	变体 8	变体 9	变体 10
抗坏血酸 10mg/ml	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul
角鲨烯:	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

[0146]

100%										
DOPE : 20mg/ml	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
Tween20: 100%	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
椰子油	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Steedmans 蜡	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
棕榈油	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
蜂蜡	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
大麻子油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A
亚麻油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A
Ω-3-鱼油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A
植物油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A
橄榄油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul

[0147] 表 8 :使用各种油脂和蜡的基于 DPPE 的油脂乳状液组合物。缩写 :N/A,未添加  
[0148]

组分	变体 1	变体 2	变体 3	变体 4	变体 5	变体 6	变体 7	变体 8	变体 9	变体 10
抗坏血酸 10mg/ml	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul
角鲨烯: 100%	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DPPE : 20mg/ml	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
Tween20: 100%	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
椰子油	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Steedmans 蜂蜡	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
棕榈油	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
蜡	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
大麻子油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A	N/A



[0149]

亚麻油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A	N/A
Ω-3-鱼油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A	N/A
植物油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul	N/A
橄榄油	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3ul

[0150] 将 miRNA/ 脂质 / 油脂乳状液添加至 10% 的血浆溶液, 并在室温下培养从 0 至 24 时之间的各种时间段。使用 miRVana RNA 提取试剂盒 (Ambion), 采用制造商推荐的血浆 RNA 提取步骤, 对样本的 RNA 进行回收。使用用于靶标 miRNA 的 TaqMan® 测定法和用于 miR-24 的第二 TaqMan® 测定法对所得的 RNA 样本进行 qRT-PCR 分析。每份样本中完整靶标 miRNA 的相对丰度通过从同一样本的 miR-24 的 Ct 值中减去其 Ct 值进行计算。将每份样本产生的 dCt 值与靶标 miRNA 在无油脂 / 水乳状液的血浆中培养的样本进行对比, 从而来判断各种制剂的相对稳定活性。

[0151] 实例 16 : PORE 中的 Tween20

[0152] Tween20 是稳定在油脂、脂质和 RNAi 试剂之间形成的微粒的乳化剂。在复合溶液中范围从 0 至 50% 的 Tween20 最终浓度在表 9 中进行描述。使用这些不同 Tween20 浓度的 PORE 制剂如实例 1 所述进行制备。以定量添加的组分为抗坏血酸、角鲨烯和 DOPC。如上所述, 脂质组分与 200 μl PBS 中的 100 μg RNAi 试剂混合。

[0153] 表 9 : 使用各种浓度 Tween 20 的基于 DOPC 的油脂乳状液组合物。缩写 : N/A, 未添加

[0154]

组分	变体 1	变体 2	变体 3	变体 4	变体 5	变体 6	变体 7	变体 8	变体 9	变体 10
抗坏血酸 10mg/ml	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul	10ul
角鲨烯: 100%	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul	3ul
DOPC: 20mg/ml	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul
Tween20: 100%	N/A	0.01ul	0.033ul	0.1ul	0.33ul	1ul	3.3ul	10ul	33ul	100ul

[0155] 对表 9 所述制剂在血浆中稳定合成 miRNA 的能力, 如以上实例所述进行测定。为评估随着时间的延长活性微粒的保持情况, 将各种复合物在添加血浆之前在室温下培养 0 至 24 小时。对超过 1 周、1 个月、3 个月、6 个月和 1 年的稳定性进行评估。

[0156] 实例 17 : RNAi 试剂与 PORE 的结合

[0157] 含有 1mg DOPC、3ul 角鲨烯、49ul Tween20 和 100ug siRNA 的 PORE 采用实例 1 所述

的方法进行制备。将该PORE添加至30,000标称分子量极限过滤器装置(Millipore corp., Billerica, Ma),并在室温下以10,000X g进行离心10分钟。在单独的试管中回收流过和截留的物质,并与已用TE(pH7.5)稀释100,000倍的SYBR Gold(Invitrogen)混合。将该溶液在室温下培养5分钟,并且随后通过使用波长为470nm和示值(readout)550nm的光激活染料以评估荧光性。PORE制剂中80%的siRNA通过过滤器被保留,而在没有使用PORE时保留的siRNA不到10%。这表明RNAi试剂与在制剂中由脂质和油脂形成的微粒结合。

[0158] 实例18:RNAi试剂与含有不同量Tween20的PORE的结合

[0159] 含有不同量Tween20(表9,实例16)的PORE制剂根据实例1进行制备。与各PORE制剂结合的RNAi试剂的量采用实例17所述的凝胶柱过滤法和SYBR Gold定量法进行测定。

[0160] 参照本文所公开的本发明的说明书和操作,本发明的其它实施例对本领域的技术人员而言将是显而易见的。说明书和实例仅被视为旨在示例性的,而本发明的真实范围和精神由以下权利要求书进行规定。

[0161] 本文所引用的所有参考文献的全文均以引用的方式并入本文。如果以引用的方式并入的公开和专利或专利申请与说明书所含的本发明内容相矛盾,则本说明书将取代任何相矛盾的内容。

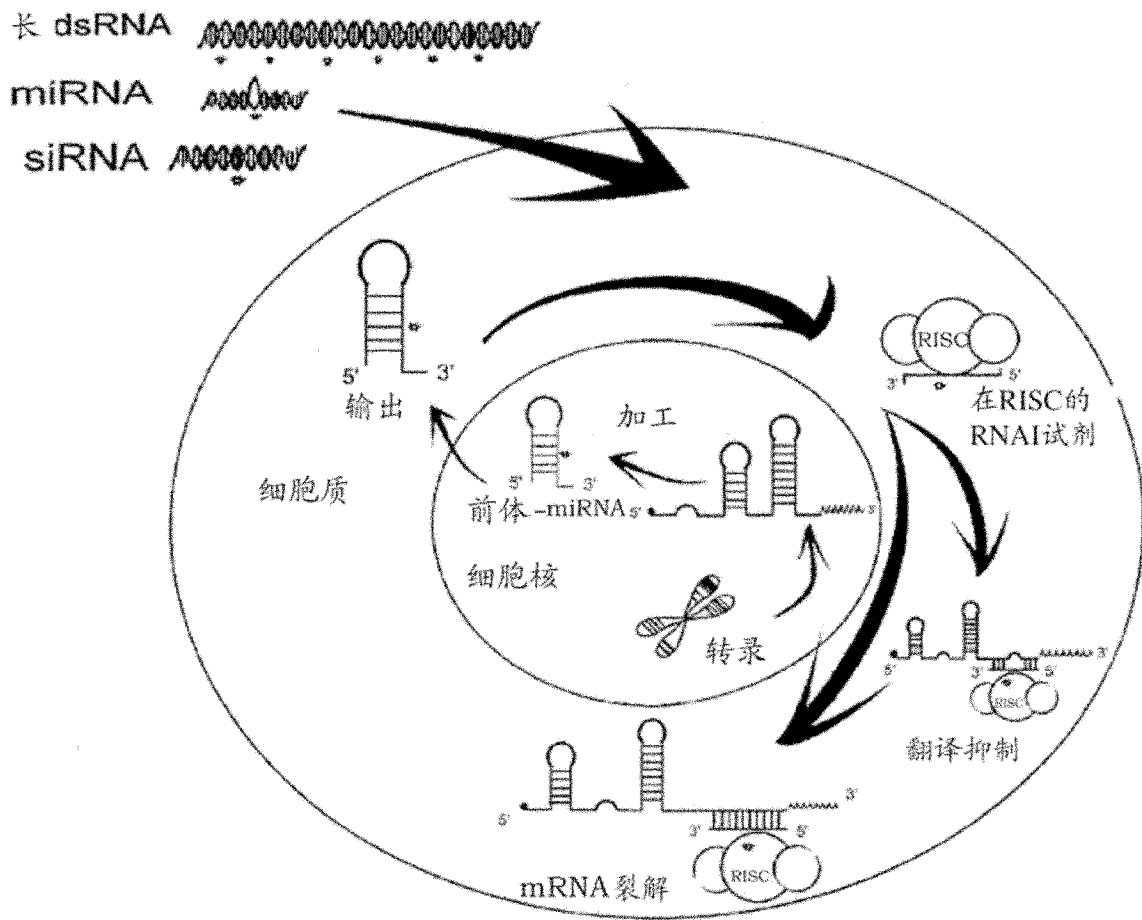


图 1

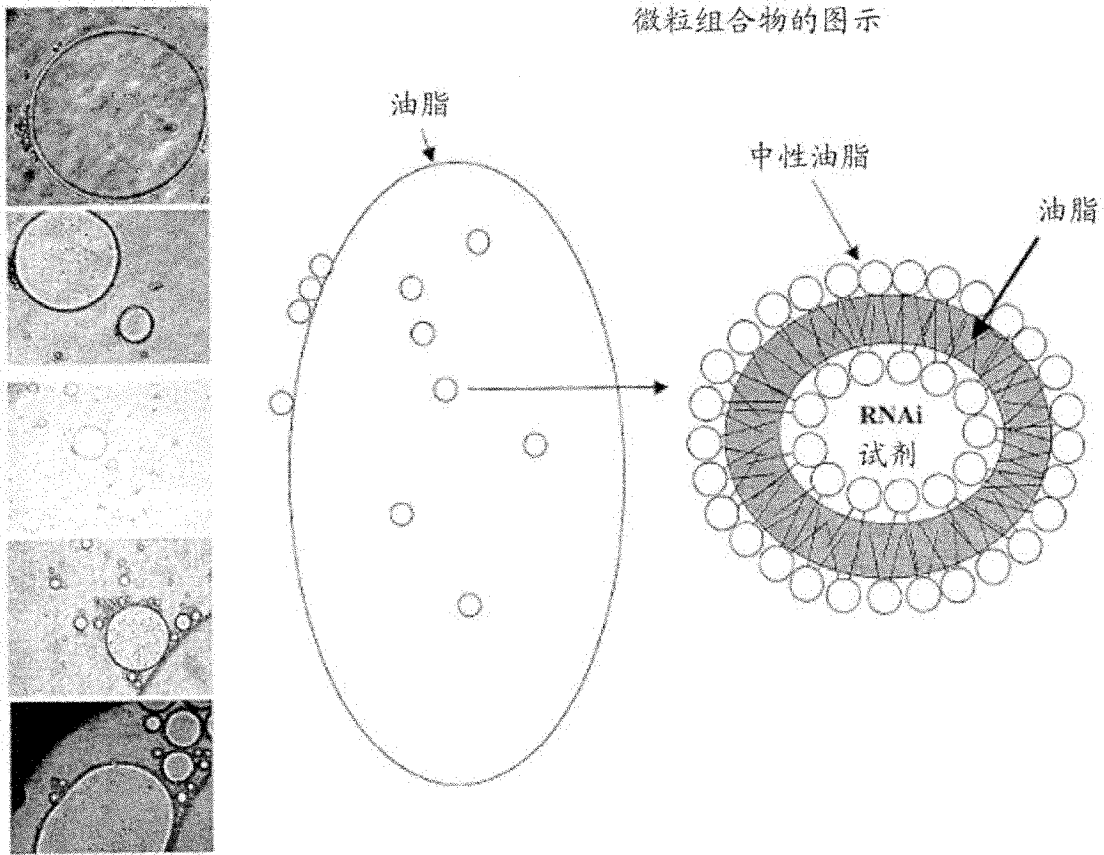


图 2

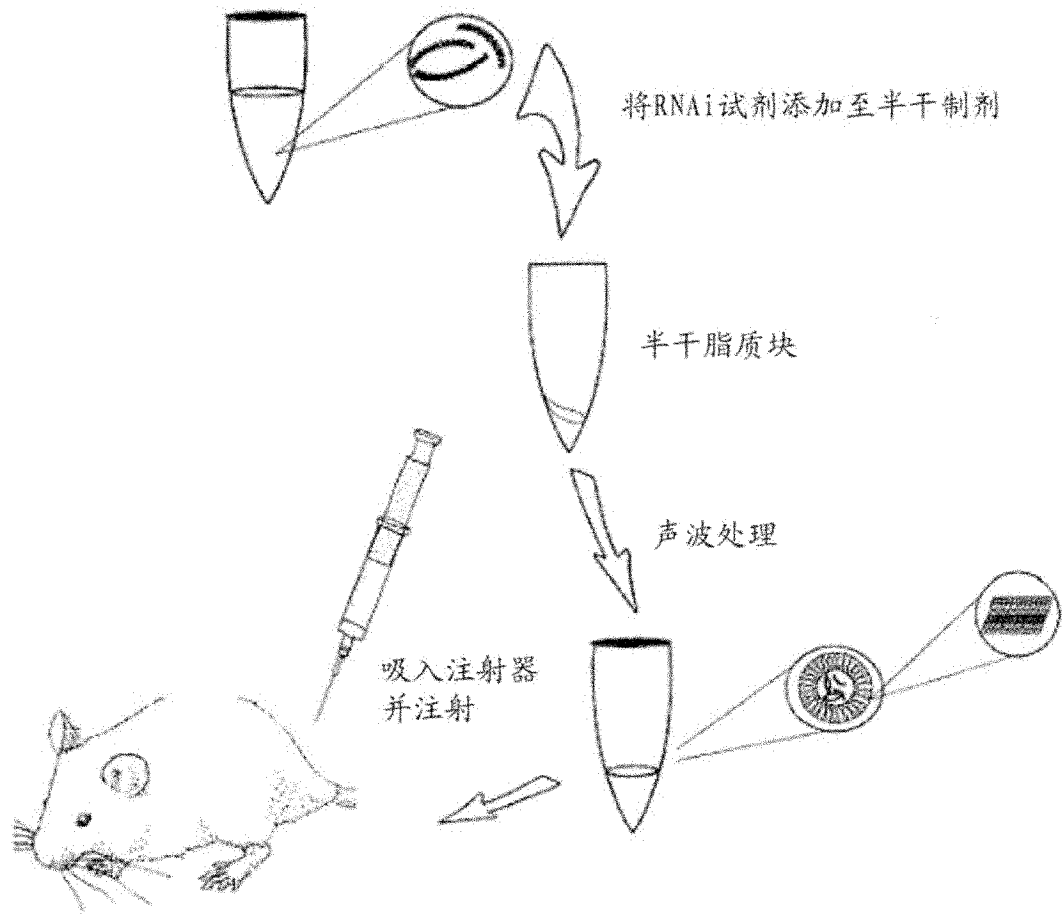


图 3

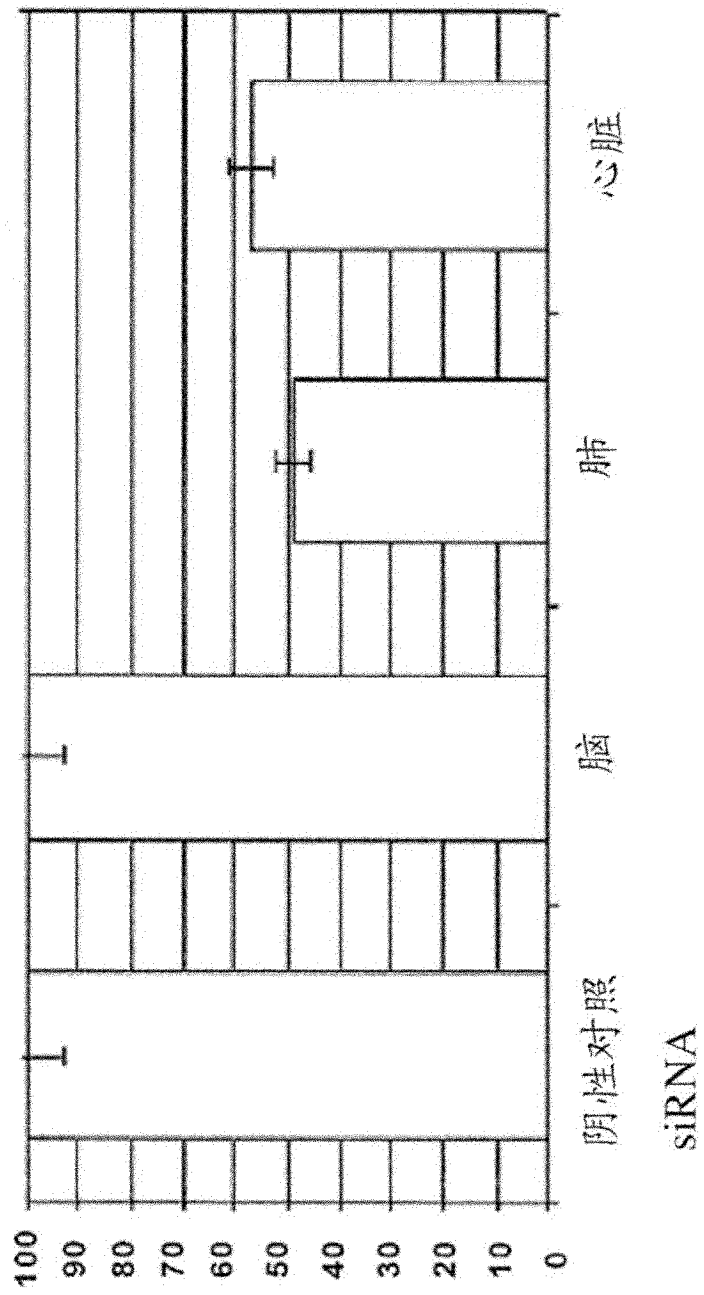


图 4

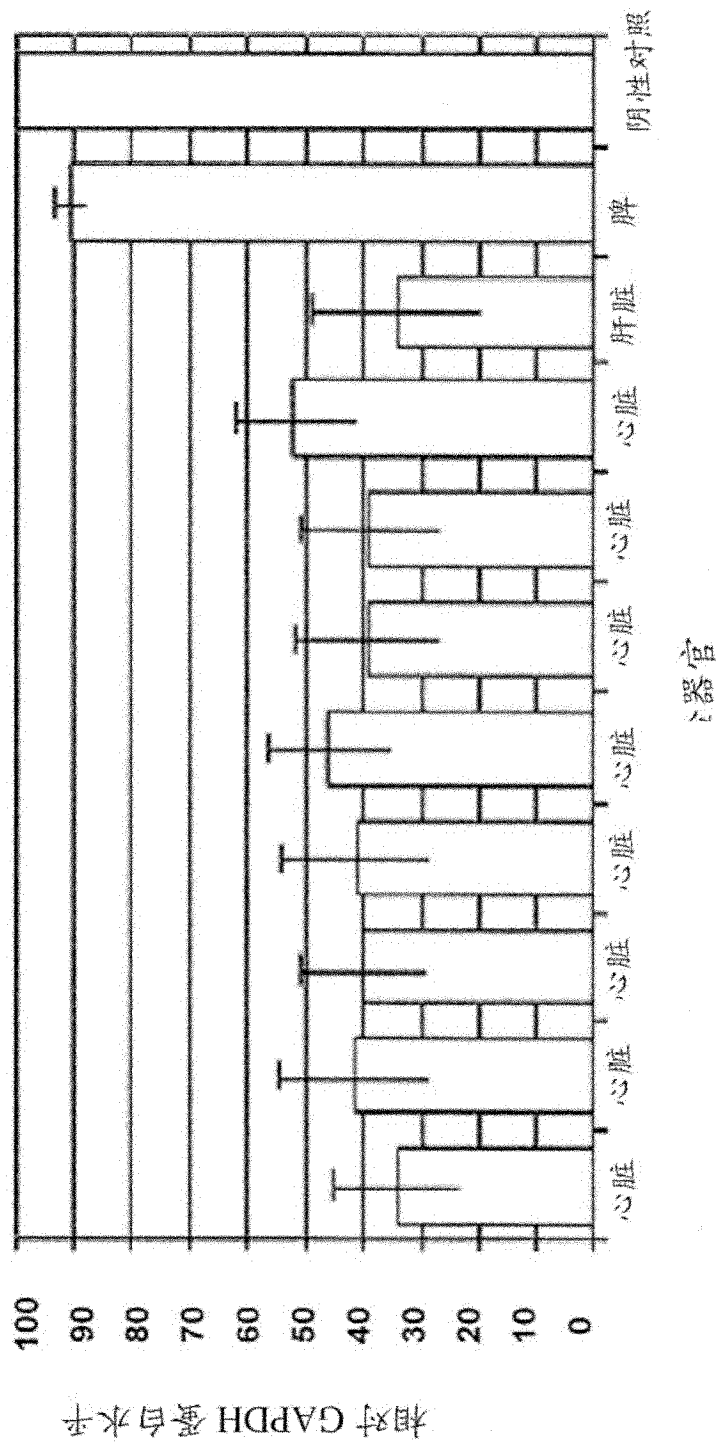


图 5

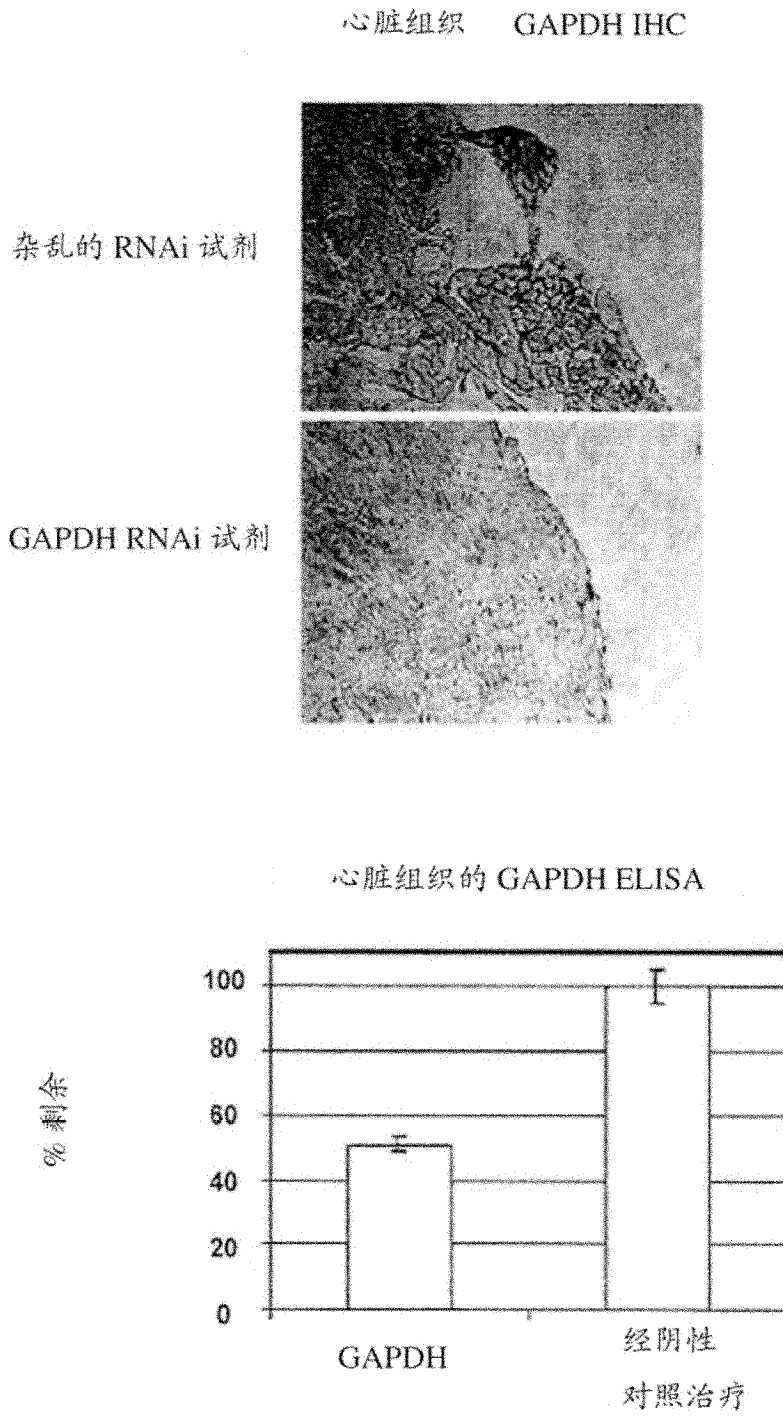


图 6



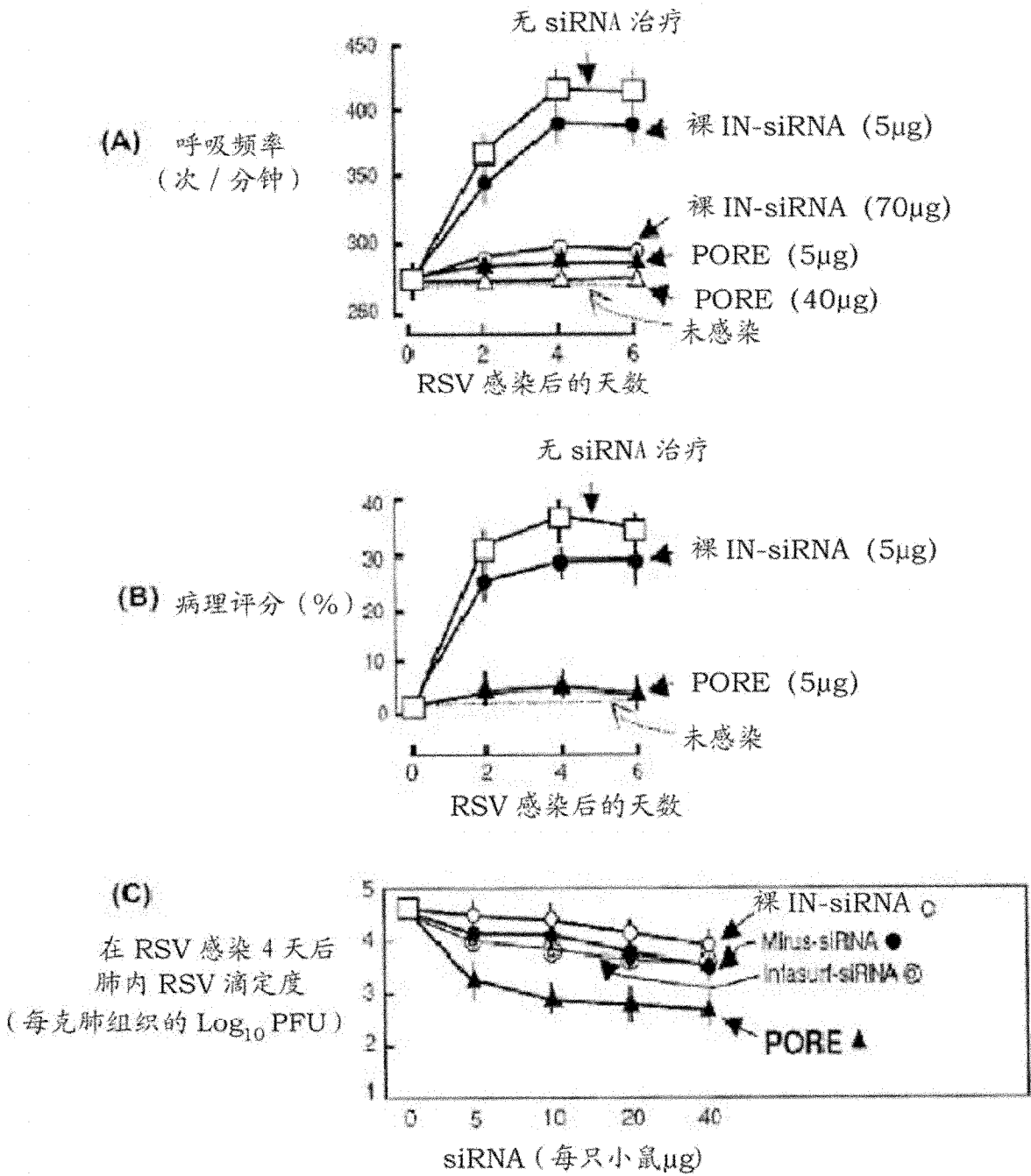


图 7

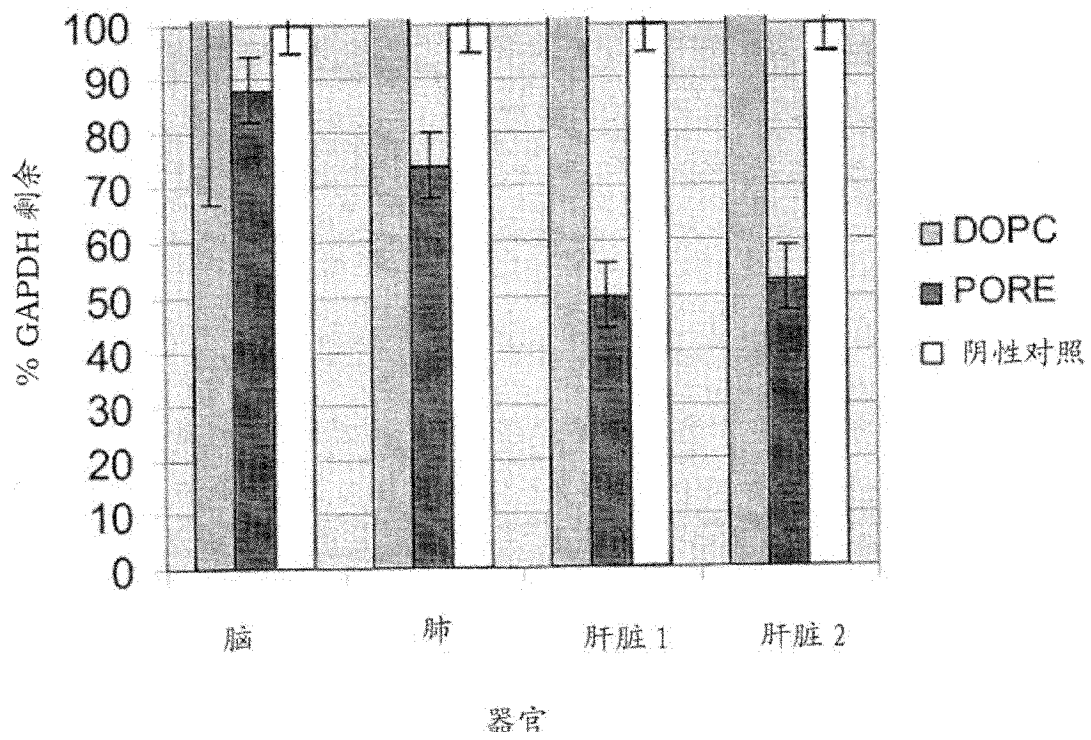


图 8

阴性对照  
(1 mg/kg)

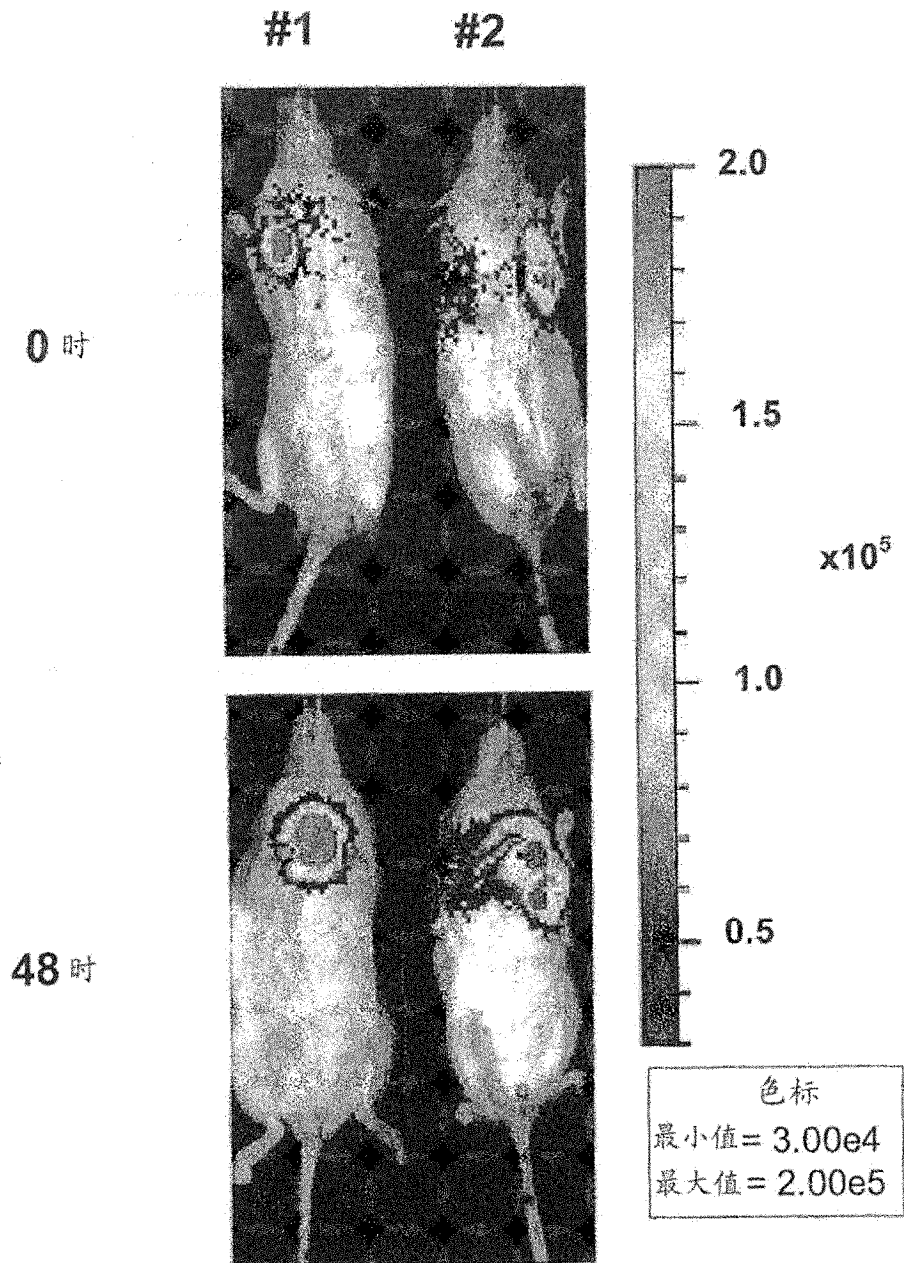


图 9A

si-luc  
(1 mg/kg)

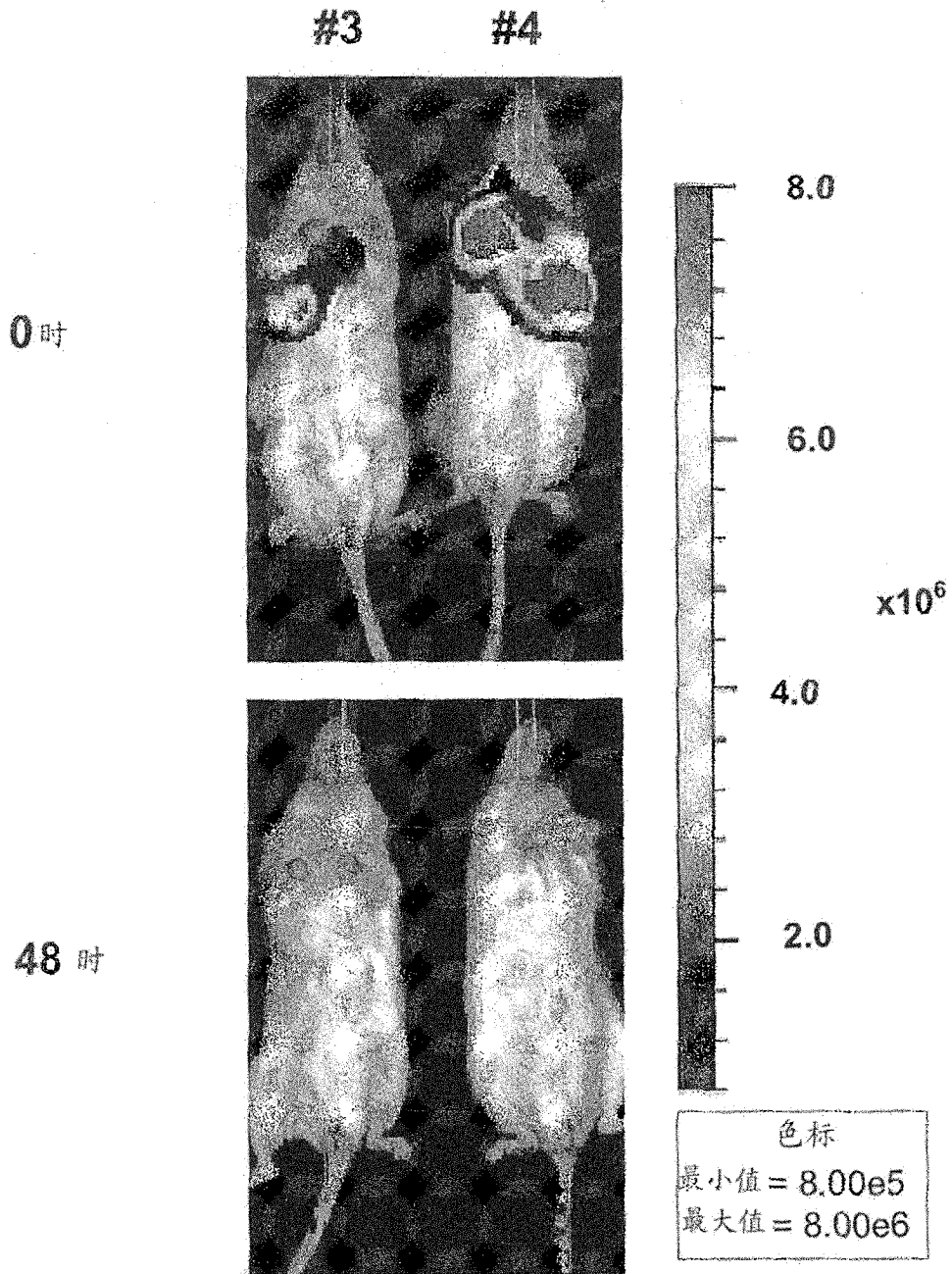


图 9B

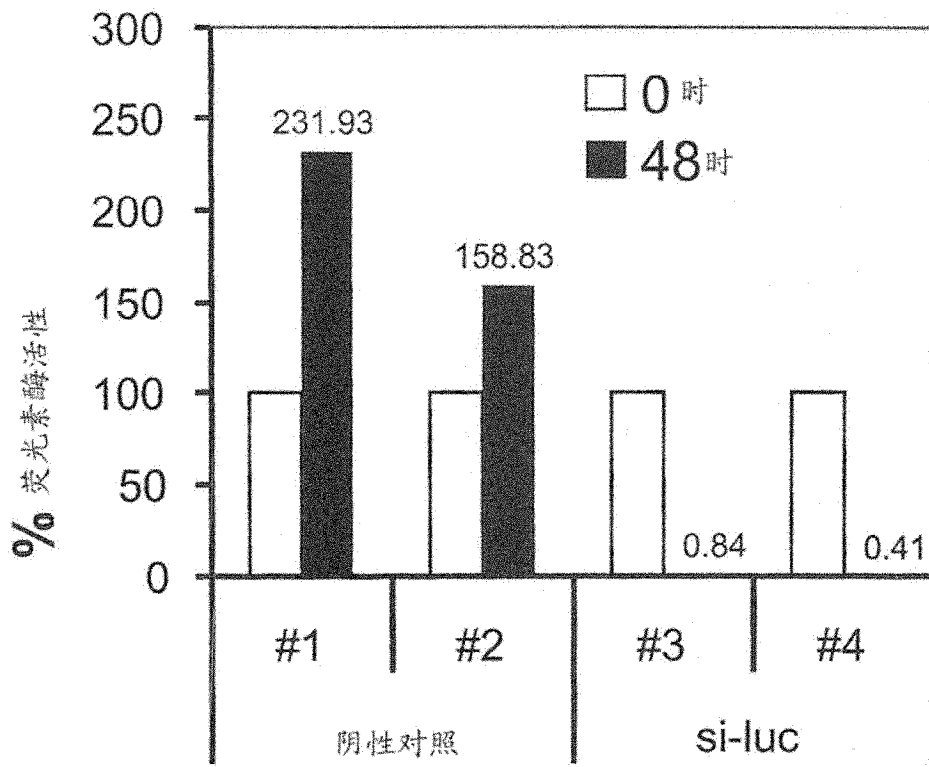


图 10

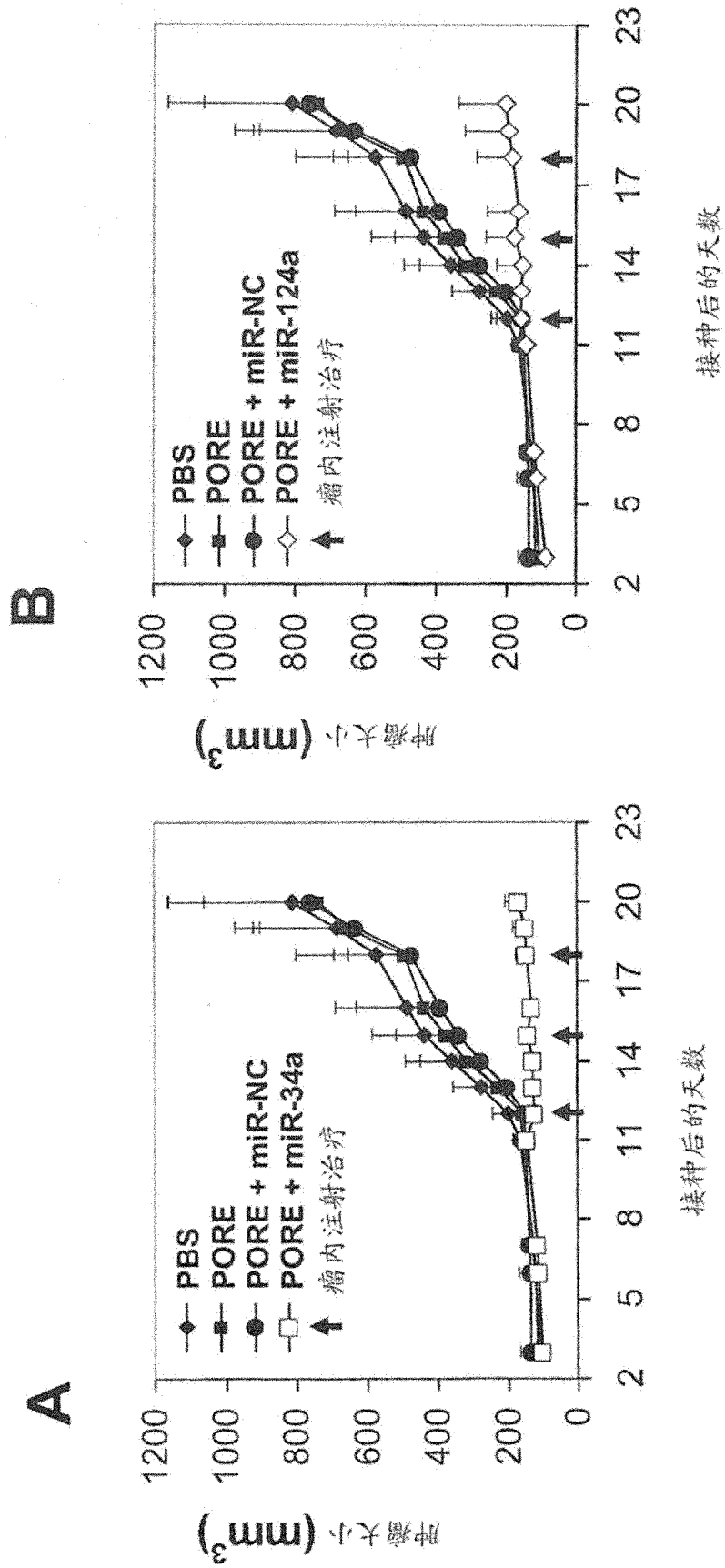


图 11

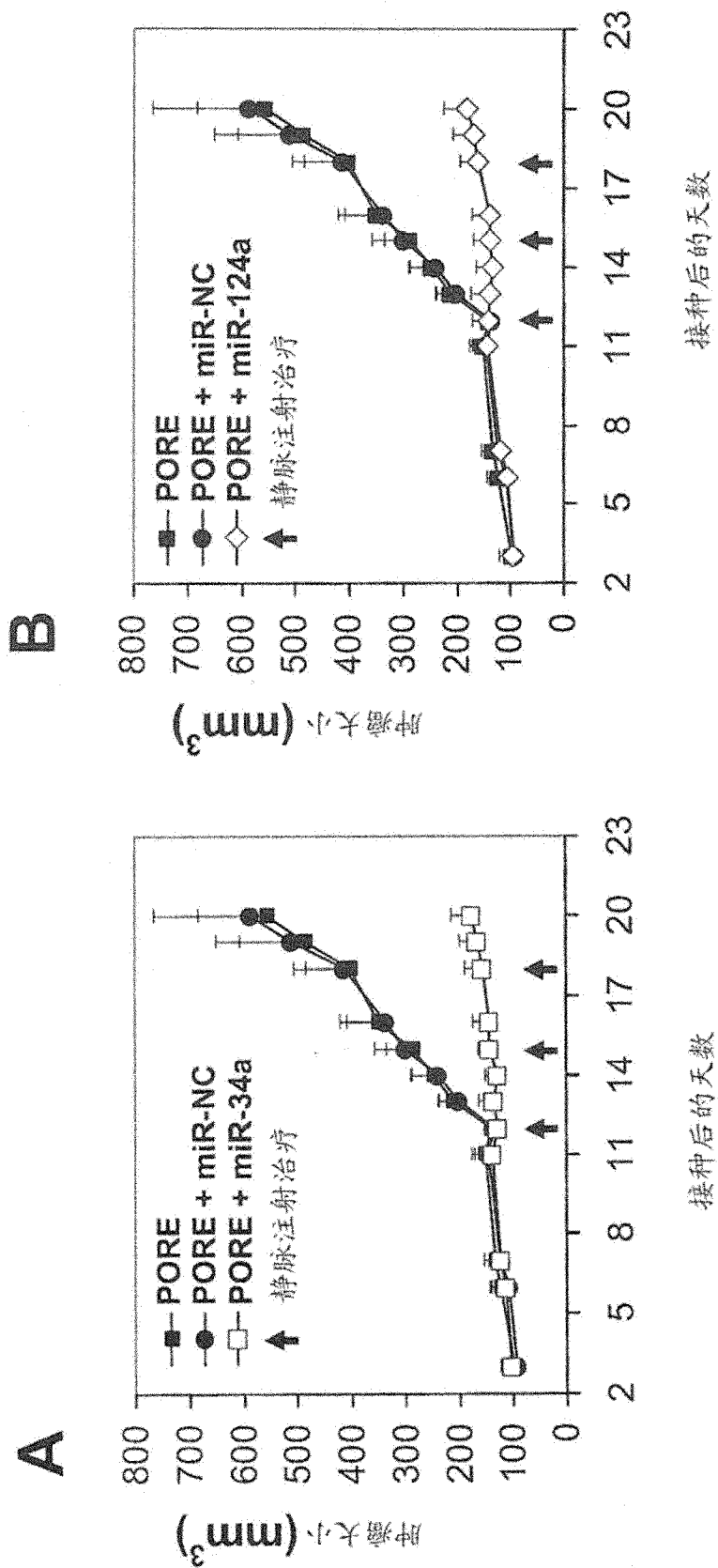


图 12

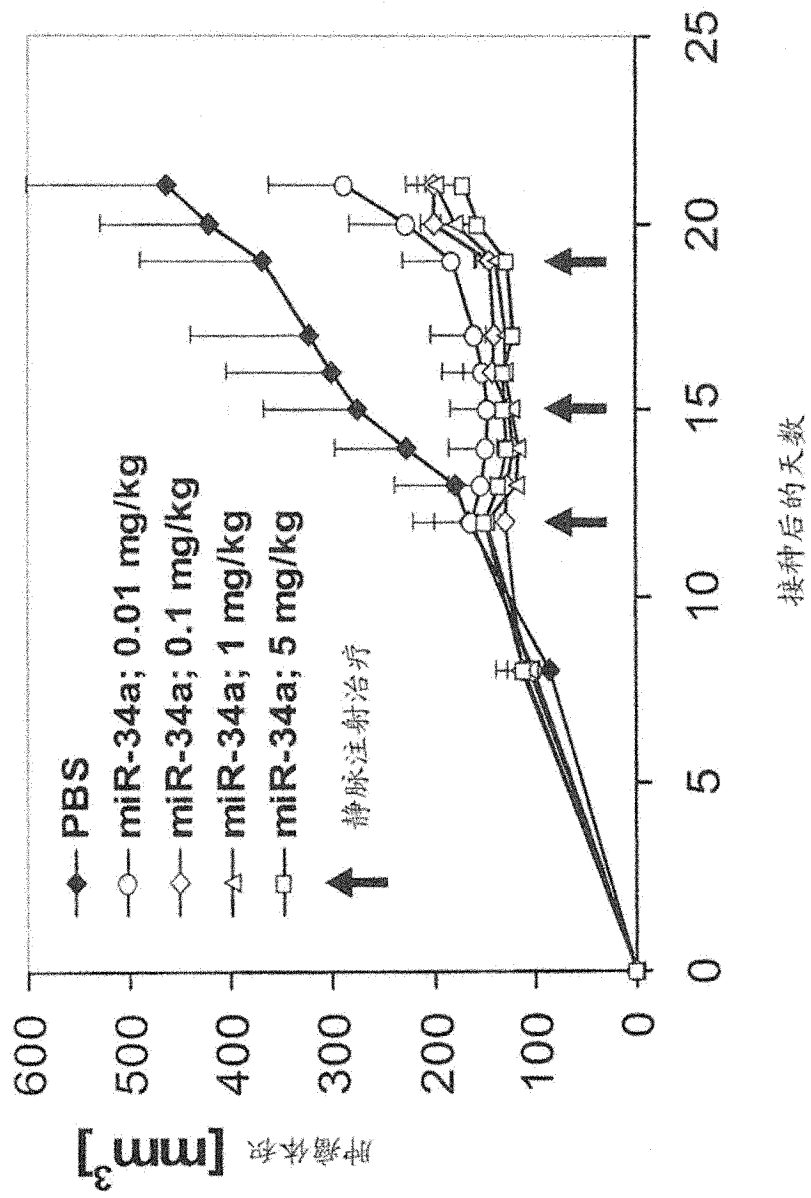


图 13A



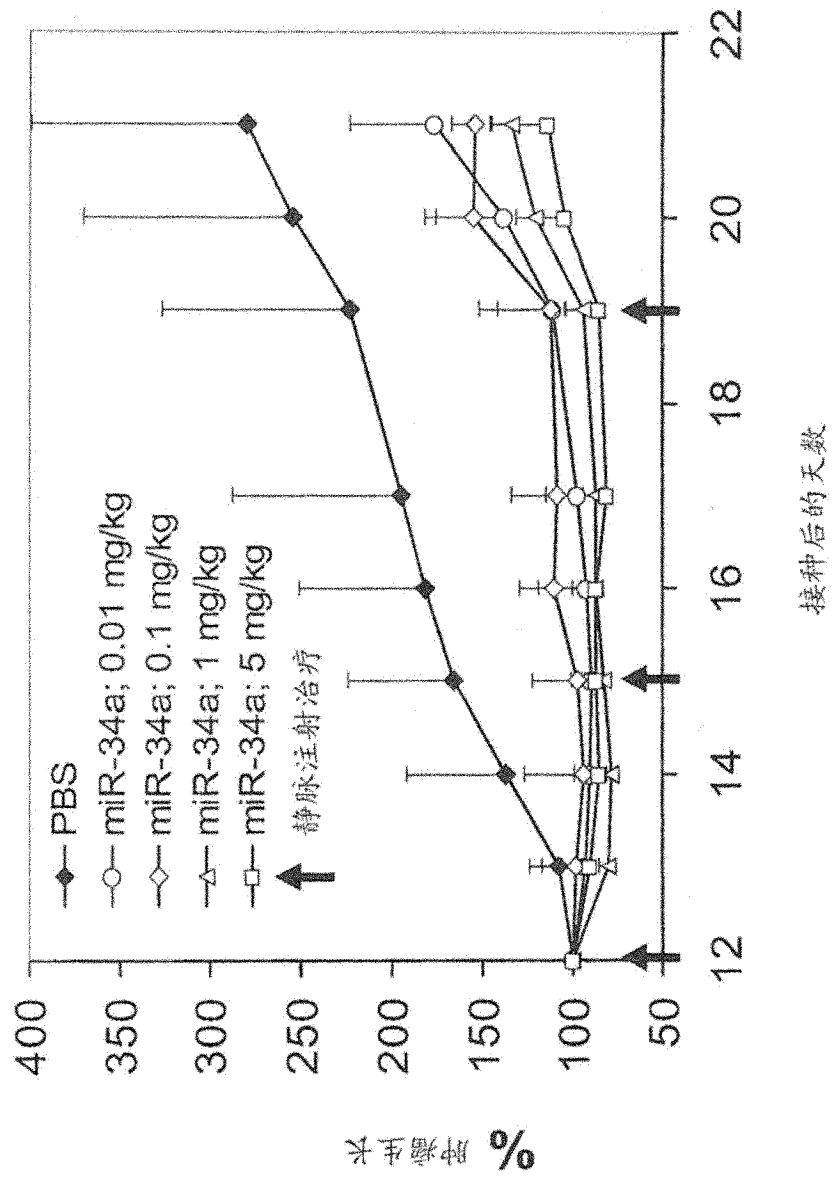


图 13B

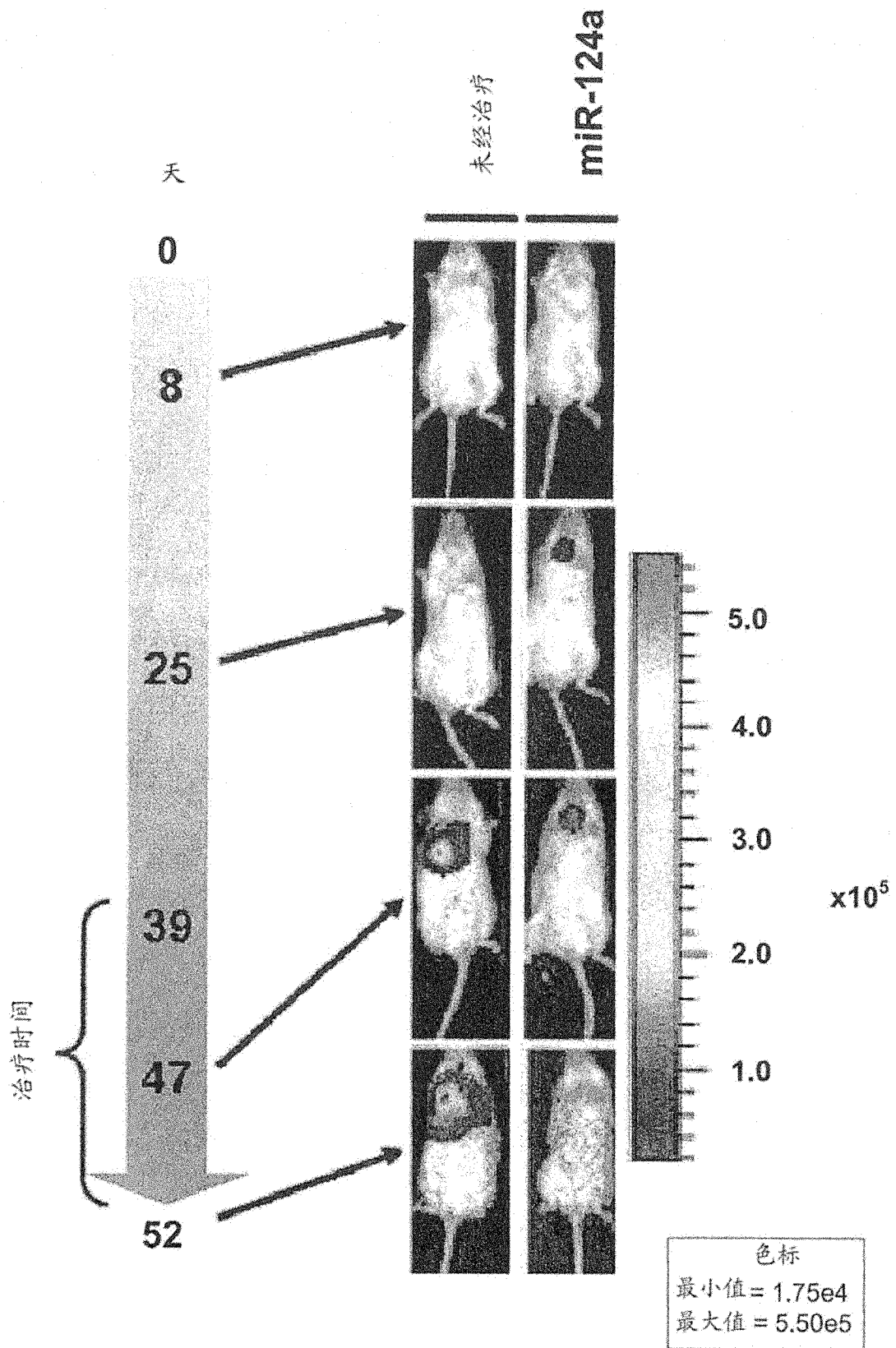


图 14A

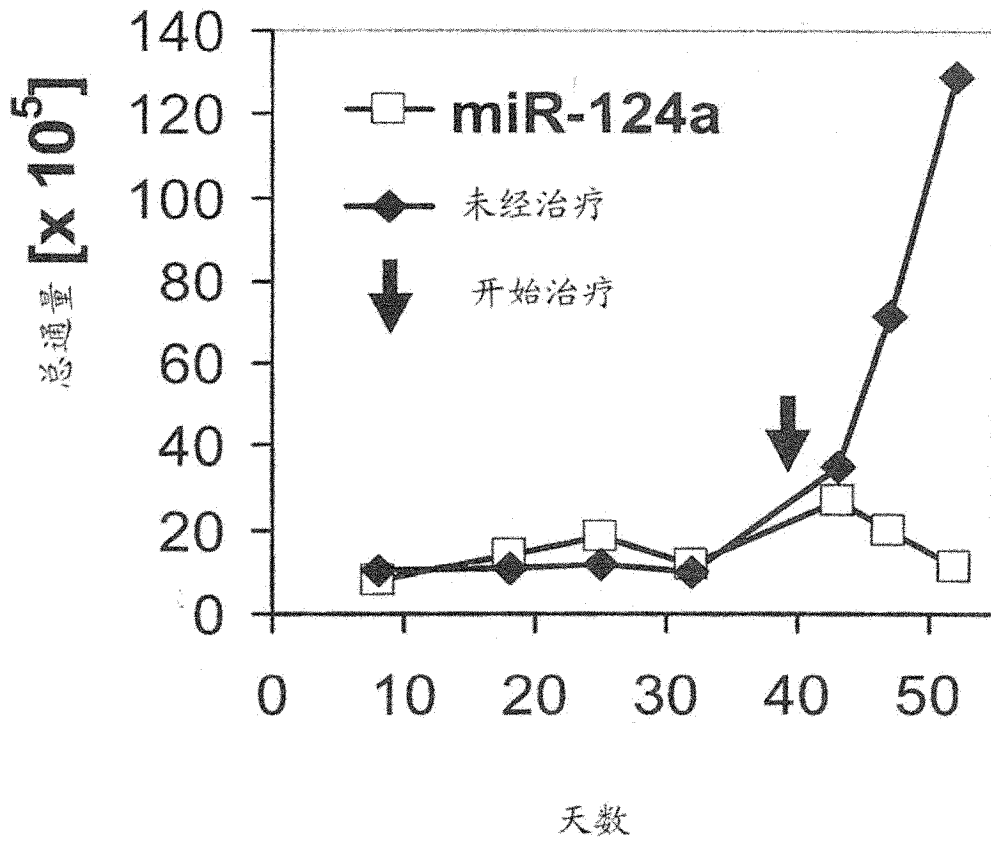


图 14B