



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102639115 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 15

(21) 申请号 201080047889. 9

(22) 申请日 2010. 09. 10

(30) 优先权数据

61/242, 693 2009. 09. 15 US

61/244, 792 2009. 09. 22 US

61/255, 692 2009. 10. 28 US

61/262, 046 2009. 11. 17 US

61/326, 071 2010. 04. 20 US

61/352, 128 2010. 06. 07 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/048512 2010. 09. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02011/034798 EN 2011. 03. 24

(71) 申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·邦克罗特 I·陶德贾斯卡

D·W-Y·萨奇 C·甘姆巴-维塔罗

A·瓦伊奇内夫 J·戈洛布

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

A61K 9/127(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

C12N 5/00(2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 74 页 附图 36 页

(54) 发明名称

脂质配制的组合物及抑制EG5和VEGF基因的
表达的方法

(57) 摘要

本发明涉及在SNALP制剂中包含双链核糖核
酸(dsRNA)的组合物,利用该组合物抑制Eg5/KSP
和VEGF的表达的方法,和利用该组合物来治疗由
Eg5/KSP和VEGF表达介导的病理过程(例如癌
症)的方法。

1. 一种治疗需要治疗的受试者的方法,包括每2周一次地通过静脉内(IV)输注向该受试者施用一剂含有ALN-VSP02的组合物。
2. 权利要求1的方法,其中该受试者患有癌症。
3. 权利要求1的方法,其中该受试者患有累及到肝的晚期癌症。
4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中ALN-VSP02的剂量选自至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.7、1.0、1.25、1.5、1.7、2.0、3.0和至少6.0mg/kg。
5. 权利要求1-3中任一项的方法,其中该剂量选自0.1、0.2、0.4和0.7mg/kg。
6. 权利要求1-3中任一项的方法,其中该剂量为至少0.4mg/kg。
7. 权利要求1-3中任一项的方法,其中该剂量为至少0.7mg/kg。
8. 权利要求1-7中任一项的方法,其中每次静脉内输注的持续时间为15分钟。
9. 权利要求1-7中任一项的方法,其中每次静脉内输注的持续时间为15分钟至3小时。
10. 权利要求1-9中任一项的方法,其中每2周一次地向该受试者施用该组合物持续至少4周。
11. 权利要求1-9中任一项的方法,其中每2周一次地向该受试者施用该组合物持续至少8周。
12. 权利要求1-10中任一项的方法,进一步包括预施用至少一种选自于地塞米松、H1和H2阻滞剂及对乙酰氨基酚的化合物。
13. 一种治疗需要治疗的受试者的方法,包括向该受试者施用含有ALN-VSP02的组合物,该组合物以选自至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.7、1.25、1.5、1.7和6.0mg/kg的剂量通过静脉内输注施用。
14. 权利要求13的方法,其中该受试者患有癌症。
15. 权利要求13的方法,其中该受试者患有累及到肝的晚期癌症。
16. 权利要求13-15中任一项的方法,其中每次输注的持续时间为15分钟。
17. 权利要求13-15中任一项的方法,其中每次静脉内输注的持续时间为15分钟至3小时。
18. 权利要求13-18中任一项的方法,其中每2周一次地向该受试者施用该组合物。
19. 权利要求13-19中任一项的方法,其中每2周一次地向该受试者施用该组合物持续至少4周。
20. 权利要求13-19中任一项的方法,其中每2周一次地向该受试者施用该组合物持续至少8周。
21. 权利要求13-20中任一项的方法,其中该剂量为0.1、0.2、0.4或0.7mg/kg。
22. 权利要求13-20中任一项的方法,其中该剂量为至少0.4mg/kg。
23. 权利要求13-20中任一项的方法,其中该剂量为至少0.7mg/kg。
24. 权利要求13-23中任一项的方法,进一步包括预施用至少一种选自于地塞米松、H1和H2阻滞剂及对乙酰氨基酚的化合物。
25. 一种治疗患有累及到肝的晚期癌症的人的方法,包括在八周内每2周一次地通过15分钟静脉内(IV)输注向该人施用0.1、0.2、0.4或0.7mg/kg的ALN-VSP02。
26. 权利要求25的方法,进一步包括预施用至少一种选自地塞米松、H1和H2阻滞剂及

对乙酰氨基酚的化合物。

27. 权利要求 25-26 中任一项的方法,其中该 ALN-VSP02 提供 10 至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 的平均 KSP siRNA $\text{AUC}_{0-\text{最后}}$, 0.4 到 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均 KSP siRNA C_{max} , 10 到 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 的平均 VEGF siRNA $\text{AUC}_{0-\text{最后}}$ 和 0.4 到 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均 VEGF siRNA C_{max} 。

28. 权利要求 25-26 中任一项的方法,其中 KSP siRNA 的 $\text{AUC}_{0-\text{最后}}$ 在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 30.9 \pm 21.1 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、130.7 \pm 44.9 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、201.3 \pm 38.6 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 或 501.2 \pm 203.9 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 。

29. 权利要求 25-26 中任一项的方法,其中 VEGF siRNA 的 $\text{AUC}_{0-\text{最后}}$ 在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 36.3 \pm 20.8 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、140.3 \pm 56.1 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、207.7 \pm 36.3 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 或 610.9 \pm 223.3 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 。

30. 权利要求 25-26 中任一项的方法,其中 KSP siRNA 的 C_{max} 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 0.76 \pm 0.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.3 \pm 0.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.2 \pm 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 9.8 \pm 4.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

31. 权利要求 25-26 中任一项的方法,其中 VEGF siRNA 的 C_{max} 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 0.86 \pm 0.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 \pm 0.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.7 \pm 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 9.7 \pm 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

32. 权利要求 25-26 中任一项的方法,其中如可在受试者的血浆中测量的,该组合物具有与剂量成比例的最大浓度 (C_{max}) 和曲线下面积 (AUC)。

33. 权利要求 25-32 中任一项的方法,其中该剂量为约 0.1 至约 0.7mg/kg。

34. 权利要求 25-33 中任一项的方法,其中如可在受试者的血浆中测量的, KSP siRNA 的与剂量成比例的 AUC 为 10 至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 。

35. 权利要求 25-34 中任一项的方法,其中如可在受试者的血浆中测量的, VEGF siRNA 的与剂量成比例的 AUC 为 10 至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 。

36. 权利要求 25-35 中任一项的方法,其中如可在受试者的血浆中测量的, KSP siRNA 的与剂量成比例的 C_{max} 为 0.4 至 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

37. 权利要求 25-36 中任一项的方法,其中如可在受试者的血浆中测量的, VEGF siRNA 的与剂量成比例的 C_{max} 为 0.4 至 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

38. 权利要求 25-37 中任一项的方法,其中 KSP siRNA 的 AUC 值在预测的 KSP siRNA 的 AUC 值的 ± 3 至 4 倍误差范围内。

39. 权利要求 25-38 中任一项的方法,其中 VEGF siRNA 的 AUC 值在预测的 VEGF siRNA 的 AUC 值的 ± 3 至 4 倍误差范围内。

40. 权利要求 25-39 中任一项的方法,其中如可在受试者的血浆中测量的,该组合物的清除率 (CL) 是 103mL/min。

41. 一种包含 ALNVSP02 的组合物,其中如可在受试者的血浆中测量的,向受试者施用该组合物后该组合物的 C_{max} 和 AUC 为与剂量成比例的。

42. 权利要求 41 的组合物,其中如可在受试者的血浆中测量的,向受试者施用该组合物后与剂量成比例的 KSP siRNA AUC 为 10 至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 。

43. 权利要求 41 或 42 的组合物,其中如可在受试者的血浆中测量的,与剂量成比例的 VEGF siRNA AUC 为 10 至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 。

44. 权利要求 41-43 的组合物,其中如可在受试者的血浆中测量的,向受试者施用该组合物后与剂量成比例的 KSP siRNA C_{max} 为 0.4 至 13 $\mu\text{g/mL}$ 。

45. 权利要求 41-44 中任一项的组合物,其中如可在受试者的血浆中测量的,向受试者施用该组合物后与剂量成比例的 VEGF siRNA C_{max} 为 0.4 至 13 $\mu\text{g/mL}$ 。

46. 权利要求 41-45 中任一项的组合物,其中向受试者施用该组合物后 KSP siRNA AUC 值在预测的 AUC 值的 ± 3 至 4 倍误差范围内。

47. 权利要求 41-46 中任一项的组合物,其中向受试者施用该组合物后 VEGF siRNA AUC 值在预测的 AUC 值的 ± 3 至 4 倍误差范围内。

48. 权利要求 41-47 中任一项的组合物,其中如可在受试者的血浆中测量的,向受试者施用该组合物后 KSP siRNA 的清除率 CL 为 103mL/min。

49. 权利要求 41-48 中任一项的组合物,其中如可在受试者的血浆中测量的,向受试者施用该组合物后 VEGF siRNA 的清除率 CL 为 103mL/min。

50. 权利要求 41-49 中任一项的组合物,其中向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,ALN-VSP02 提供 10 至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 的平均 KSP siRNA $AUC_{0-\text{最后}}$, 0.4 到 13 $\mu\text{g/mL}$ 的平均 KSP siRNA C_{max} , 10 到 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 的平均 VEGF siRNA $AUC_{0-\text{最后}}$ 和 0.4 到 13 $\mu\text{g/mL}$ 的平均 VEGF siRNA C_{max} 。

51. 权利要求 41-49 中任一项的组合物,其中向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的, KSP siRNA 的 $AUC_{0-\text{最后}}$ 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 30.9 \pm 21.1 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 、130.7 \pm 44.9 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 、201.3 \pm 38.6 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 或 501.2 \pm 203.9 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 。

52. 权利要求 41-49 中任一项的组合物,其中向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的, VEGF siRNA 的 $AUC_{0-\text{最后}}$ 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 36.3 \pm 20.8 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 、140.3 \pm 56.1 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 、207.7 \pm 36.3 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 或 610.9 \pm 223.3 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ 。

53. 权利要求 41-49 中任一项的组合物,其中向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的, KSP siRNA 的 C_{max} 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 0.76 \pm 0.36 $\mu\text{g/mL}$ 、2.3 \pm 0.54 $\mu\text{g/mL}$ 、3.2 \pm 1.2 $\mu\text{g/mL}$ 和 9.8 \pm 4.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

54. 权利要求 41-49 中任一项的组合物,其中向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的, VEGF siRNA 的 C_{max} 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 0.86 \pm 0.43 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 \pm 0.56 $\mu\text{g/mL}$ 、3.7 \pm 1.2 $\mu\text{g/mL}$ 和 9.7 \pm 2.7 $\mu\text{g/mL}$ 。

脂质配制的组合物及抑制 EG5 和 VEGF 基因的表达的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 9 月 15 日提交的 61/242,693 号美国临时申请;2009 年 9 月 22 日提交的 61/244,792 号美国临时申请;2009 年 10 月 28 日提交的 61/255,692 号美国临时申请;2009 年 11 月 17 日提交的 61/262,046 号美国临时申请;2010 年 4 月 20 日提交的 61/326,071 号美国临时申请;和 2010 年 6 月 7 日提交的 61/352,128 号美国临时申请,其中通过引用以其全文引入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包括以 2010 年 XX 月创建的名称为 17331US_sequences_listing.txt 的 XXX, XXX 字节大小的文本文件的方式电子递交的序列表。该序列表通过引用引入。

发明领域

[0005] 本发明涉及施用含有双链核糖核酸 (dsRNA) 的脂质配制的组合物,来抑制人类的驱动蛋白家族成员 11 (Eg5/KSP) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 基因的表达,和利用该组合物来治疗由 Eg5/KSP 和 VEGF 的表达介导的病理过程,例如癌症,如肝癌。

[0006] 发明背景

[0007] 生物体内细胞群的维持是由细胞分裂和细胞程序化死亡的细胞生理过程支配的。在正常的细胞中,与每个过程的启动和完成相关的细胞活动被高度地支配。在增殖性疾病,如癌症中,这些进程中的一个或全部都可能被扰乱。例如,由于正调控的过度表达或者负调控的遗失,也许是通过突变,癌细胞可能已经失去了其对细胞分裂周期的调控(检查点控制)。另外,癌细胞由于负调控因子的过度表达可能已经失去了经受程序性细胞死亡的能力。因此,有必要开发恢复癌症细胞检查点控制和程序性细胞死亡过程的新的化疗药物。

[0008] 治疗人类癌症的途径之一,是靶向一种细胞周期进程必不可少的蛋白质。为了使细胞周期从一个阶段进行到下一个,必须完成某些前提事件。在细胞周期内有执行事件和阶段的正确的顺序的检查点。一个这样的检查点,是发生在有丝分裂中期的纺锤体检查点。靶向在有丝分裂中具有必不可少的功能的蛋白质的小分子,可以起始纺锤体检查点而将细胞阻滞在有丝分裂中。将细胞阻滞在有丝分裂中的小分子当中,那些在临床实验中显示抗肿瘤活性的,也诱导细胞凋亡,形态学的变化与程序性细胞死亡相关。因此用于治疗癌症的有效的化疗可能是引起检查点控制和程序性细胞死亡的。不幸的是,很少有化合物可用于控制这些细胞内的过程。已知会导致有丝分裂阻滞和细胞凋亡的大多数化合物,起微管蛋白结合剂的作用。这些化合物改变微管的动态不稳定性和间接地改变有丝分裂纺锤体的功能/结构,从而导致有丝分裂阻滞。因为这些化合物的大多数具体地靶向属于所有微管的组成部分的微管蛋白,他们也可能影响在其中微管有一定作用的许多正常细胞过程中的一个或更多。因此,也需要更具体地靶向与细胞增殖有关的蛋白质的试剂。

[0009] 人类驱动蛋白家族成员 11,例如 Eg5 或 KSP,是局限于有丝分裂纺锤体的类驱动蛋白的马达蛋白之一和已知是双极有丝分裂纺锤体的形成和/或功能所需要的。有扰乱有丝分裂纺锤体的两极性的小分子的消息(Mayer, T. U. 等 1999. Science 286(5441)971-4,本

文通过引用而引入)。更具体地,小分子诱导异常的有丝分裂纺锤体的形成,其中从两个中心体中央产生微管的 monoastral 排列,有染色体依附在微管的末端。monoastral 阵列后小分子被称为“Monastrol”。monoastral 阵列表现型先前已在 Eg5 马达蛋白被免疫剔除的有丝分裂细胞中观察到。这种独特的 monoastral 阵列型便于 Monastrol 鉴定为潜在的 Eg5 抑制剂。事实上,Monastrol 进一步显示了在体外试验中抑制微管的 Eg5 马达驱动的自动力。Eg5 抑制剂 Monastrol 对有关的驱动蛋白马达或对负责细胞内高尔基体运动的马达没有明显的影响。显示 monoastral 阵列型的细胞通过 Eg5 免疫剔除或者 Eg5 的 Monastrol 抑制在细胞周期的 M 阶段阻滞。然而,由于免疫剔除或者 Eg5 抑制诱导的有丝分裂阻滞是短暂的 (Kapoor, T. M., 2000. J Cell Biol 150(5)975-80)。monoastral 阵列型和 Monastrol 诱导的有丝分裂中的细胞周期阻滞都是可逆的。细胞恢复到形成正常的双极纺锤体,完成有丝分裂,和进行细胞周期和正常的细胞增殖。这些数据表明,引起短暂的有丝分裂阻滞的 Eg5 抑制剂可能治疗癌细胞增殖无效。

[0010] 血管内皮生长因子 (VEGF),又称为血管通透性因子 (VPF),是一种刺激血管生成、上皮细胞增殖、和内皮细胞存活的多功能的细胞因子。VEGF 可以由广泛种类的组织产生,和其过度表达或异常的表达可导致多种疾病,包括癌症和如年龄相关性黄斑变性的视网膜疾病及其它血管原的疾病。

[0011] 因此,有必要探索利用调节 Eg5/KSP 和 VEGF 二者表达的化合物,来治疗人类疾病,例如,癌症。

[0012] 近来,已经证明双链 RNA 分子 (dsRNA) 在一个被称为 RNA 干扰 (RNAi) 的高度保守的调控机制中阻碍基因表达。WO 99/32619 (Fire 等) 公开了利用至少 25 个核苷酸长度的 dsRNA 抑制线虫 (*C. elegans*) 中基因的表达。在其它的生物体,包括植物 (见,例如, WO 99/53050, Waterhouse 等;和 WO 99/61631, Heifetz 等)、果蝇 (*Drosophila*) (见,例如, Yang, D. 等, Curr. Biol. (2000) 10:1191-1200)、和哺乳动物 (见 WO 00/44895, Limmer; 和 DE 101 00 586.5, Kreutzer 等) 中也已经证明 dsRNA 降解靶 RNA。现在这种自然机制已经成为一类新的治疗由异常的或有缺陷的基因调控引起的疾病的药剂的新产品的焦点。

[0013] VEGF 靶向性 siRNA 序列,包括 AD-3133,被描述于 2005 年 3 月 11 日提交的 11/078,073 号美国专利申请 (美国专利公开号 2006-0094032) 和 2006 年 01 月 25 日提交的 12/754,110 号美国部分继续专利申请 (美国专利申请公开号 2006-0223770)。

[0014] 在 2007 年 3 月 30 日提交的 11/694,215 号美国专利申请 (现在的美国专利号 7,718,629) 和 2010 年 4 月 5 日提交的 12/754 号美国分案专利申请 (美国专利申请公开号 20XX/XXXXXX) 中描述了包括 AD-12115 的 Eg5/KSP 靶向性 siRNA 序列。

[0015] 2009 年 9 月 1 日提交的 12/552,207 号美国专利申请 (美国专利公开号 2010/0087508) 和 2009 年 3 月 5 日提交的 PCT/US2009/036223 号国际专利申请 (WO 2009/111658) 中描述了包括包括 AD-3133 的 VEGF 靶向性 siRNA 和包括 AD-12115 的 Eg5/KSP 靶向性 siRNA 的制剂组成的 DLinDMA 的脂质制剂。

[0016] 2010 年 03 月 12 日提交的 12/723,471 号美国专利申请 (美国专利公开号 200X/XXXXXX) 和 2010 年 03 月 12 日提交的 PCT/US2010/027210 号国际专利申请 (WO 20XX/XXXXXX) 中描述了包括 AD-3133 的 VEGF 靶向性 siRNA 和包括 AD-12115 的 Eg5/KSP 靶向性 siRNA 的脂质制剂。

[0017] 为了所有的目的,这些申请的内容通过引用方式引入本文。特别地,为了所有的目的,通过引用引入这些申请中公开的 siRNA 序列,例如,表 1 和 2。

[0018] 发明概述

[0019] 公开了用于治疗需要治疗的受试者的方法,包括每 2 周一次地通过静脉内 (IV) 输注向该受试者施用一剂含有 ALN-VSP02 的组合物。还公开了用于治疗需要治疗的受试者的方法,包括向该受试者施用含有 ALN-VSP02 的组合物,该组合物以选自于至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.7、1.0、1.25、1.5、1.7、2.0、3.0 和 6.0mg/kg 的剂量通过静脉内输注施用。

[0020] 在一个实施方式中,该受试者患有癌症。在进一步的实施方式中,该受试者患有累及到肝的晚期癌症。在一个方面,ALN-VSP02 的剂量选自于例如至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.7、1.0、1.25、1.5、1.7、2.0、3.0 和至少 6.0mg/kg,或例如 0.1、0.2、0.4 和 0.7mg/kg。在另一个方面,该剂量为至少 0.4mg/kg。在再另一个方面,该剂量为至少 0.7mg/kg。

[0021] 如本文所述,在一个实施方式中,每次静脉内输注的持续时间为 15 分钟。在另一个实施方式中,例如,在至少 4 周的时间内每 2 周一次地向受试者施用该组合物或者例如,每两周一次持续至少 8 周。在一个方面,本发明包含预施用至少一种选自于地塞米松、H1 和 H2 阻滞剂和对乙酰氨基酚的化合物。

[0022] 本发明包括包含 ALN-VSP02 的组合物,其中向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,该组合物的 C_{max} 和 AUC 是与剂量成比例的。本发明中还包括治疗患有累及到肝的晚期癌症的人的方法,包含每 2 周一次地通过 15 分钟静脉内 (IV) 输注向该人施用一剂包含至少 0.7mg/kg 的 ALN-VSP02 的组合物,持续八周。

[0023] 在本发明的一个方面,向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,ALN-VSP02 提供了 10 至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 的平均 KSP siRNA $AUC_{0-\text{最后}}$,0.4 到 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均 KSP siRNA C_{max} ,10 到 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 的平均 VEGF siRNA $AUC_{0-\text{最后}}$ 和 0.4 到 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均 VEGF siRNA C_{max} 。在另一个方面,向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,KSP siRNA 的 $AUC_{0-\text{最后}}$ 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 $30.9 \pm 21.1 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、 $130.7 \pm 44.9 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、 $201.3 \pm 38.6 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 或 $501.2 \pm 203.9 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 。在再另一个方面中,向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,VEGF siRNA 的 $AUC_{0-\text{最后}}$ 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 $36.3 \pm 20.8 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、 $140.3 \pm 56.1 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、 $207.7 \pm 36.3 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 或 $610.9 \pm 223.3 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 。在本发明的一个实施方式中,向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,KSP siRNA 的 C_{max} 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 $0.76 \pm 0.36 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2.3 \pm 0.54 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $3.2 \pm 1.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $9.8 \pm 4.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。在本发明的另一实施方式中,向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,VEGF siRNA 的 C_{max} 是在选定值的约 80% 至约 120% 之间,其中所述值是 $0.86 \pm 0.43 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2.5 \pm 0.56 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $3.7 \pm 1.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $9.7 \pm 2.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0024] 在本发明的一个实施方式中,向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,该组合物具有与剂量成比例的 C_{max} 和 AUC。在进一步的实施方式中,剂量为约 0.1 至约 0.7mg/kg。

[0025] 在一些实施方式中,向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,KSP siRNA 或 VEGF siRNA 的与剂量成比例的 AUC 为 10 至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 。在另一个实施方

式中,向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,KSP siRNA 或 VEGF siRNA 的与剂量成比例的 C_{max} 为 0.4 至 13 μ g/kg。在再另一个实施方式中,向受试者施用该组合物后,对于 VEGF siRNA 和对于 KSP siRNA, AUC 值在预测的 AUC 值的 ± 3 至 4 倍误差范围内。在一个方面,向受试者施用该组合物后,如可在受试者的血浆中测量的,该组合物的清除率 (CL) 是 103mL/min。

[0026] 附图简要说明

[0027] 图 1 是显示在 Hep3B 小鼠模型中施用 SNALP-siRNA 后以体重百分比计的肝脏重量的图。

[0028] 图 2A-2D 是显示在 Hep3B 小鼠模型中 SNALP-siRNA 对体重的效应的图。

[0029] 图 3 是显示在 Hep3B 小鼠模型中 SNALP-siRNA 对体重的效应的图。

[0030] 图 4 是显示未处理对照动物的体重的图。

[0031] 图 5 是显示在 Hep3B 小鼠模型中对照的荧光素酶-SNALP siRNA 对体重的效应的图。

[0032] 图 6 是显示在 Hep3B 小鼠模型中 VSP-SNALP siRNA 对体重的效应的图。

[0033] 图 7A 是显示在 Hep3B 小鼠模型中对于小鼠 GAPDH 水平归一化的 SNALP-siRNA 对人 GAPDH 水平的效应的图。

[0034] 图 7B 是显示在 Hep3B 小鼠模型中通过血清 ELISA 测量的 SNALP-siRNA 对血清 AFP 水平的效应的图。

[0035] 图 8 是显示在 Hep3B 小鼠模型中对于小鼠 GAPDH 水平归一化的 SNALP-siRNA 对人 GAPDH 水平的效应的图。

[0036] 图 9 是显示在 Hep3B 小鼠模型中对于人 GAPDH 水平归一化的 SNALP-siRNA 对人 KSP 水平的效应的图。

[0037] 图 10 是显示在 Hep3B 小鼠模型中对于人 GAPDH 水平归一化的 SNALP-siRNA 对人 VEGF 水平的效应的图。

[0038] 图 11A 是显示在 Hep3B 小鼠模型中对于人 GAPDH 水平归一化的 SNALP-siRNA 对小鼠 VEGF 水平的效应的图。

[0039] 图 11B 是一组显示在 Hep3B 小鼠模型中 SNALP-siRNA 对人 GAPDH 水平和血清 AFP 水平的效应的图。

[0040] 图 12A-12C 是显示在 Hep3B 小鼠模型中 SNALP-siRNA 对肿瘤 KSP、VEGF 和 GAPDH 水平的效应的图。

[0041] 图 13A 和图 13B 是显示在具有肝肿瘤的小鼠中 SNALP-siRNA 对生存率的效应的图。在肿瘤细胞接种后 18 天 (图 13A) 和 26 天 (图 13B) 开始治疗。

[0042] 图 14 是显示 SNALP-siRNA 对血清甲胎蛋白 (AFP) 水平的效应的图。

[0043] 图 15A 和图 15B 是施用 2mg/kg 的 SNALP-VSP (A) 或 2mg/kg 的 SNALP-Luc (B) 的荷瘤动物 (Hep3B 细胞植入后 3 周) 的 H&E 染色切片的图象。24 小时后,荷瘤的肝叶进行处理以用于组织学分析。箭头表示单星体。

[0044] 图 16 是表明 ALN-VSPDS01 的制备过程的流程图。

[0045] 图 17 是 ALN-VSP02 的低温透射电子显微镜 (低温-TEM) 图象。

[0046] 图 18 是表明 ALN-VSP02 的制备过程的流程图。

[0047] 图 19 是表明施用 SNALP 配制的 siRNA 和索拉非尼对生存率的效应的图。

[0048] 图 20 是说明腹膜内 HCC 小鼠模型的 ALN-VSP 处理对肿瘤中有丝分裂象（单星体 (monoaster)）形成的影响的图表。

[0049] 图 21 是说明肝内植入 HCT116（结肠直肠癌细胞）的小鼠的 ALN-VSP 处理对肿瘤中 hKSP mRNA 水平的影响的图表。

[0050] 图 22 是说明肝脏内植入 HCT116（结肠直肠癌细胞）的小鼠的 ALN-VSP 处理对肝脏（图 22A）和淋巴结（图 22B）中有丝分裂象（例如，单星体）形成的影响的图表。

[0051] 图 23 是说明荷原位 Hep3B 肿瘤的小鼠的 ALN-VSP 处理对肿瘤出血（图 23A）和肿瘤微血管密度（图 23B）的影响的图表。

[0052] 图 24 是说明荷原位 Hep3B 肿瘤的小鼠的 SNALP-VEGF 单独处理对肿瘤出血（图 24A）和肿瘤微血管密度（图 24B）的影响的图表。

[0053] 图 25 是说明 ALN-VSP 处理肝内结肠直肠癌肿瘤的单星体形成小鼠模型的效应的图表。结果相对于肝脏（图 25A）、肺（图 25B）、淋巴结和皮下转移（图 25C）显示。

[0054] 发明详述

[0055] 本发明提供了通过静脉内输注施用具有两个 siRNA（一个靶向于 Eg5/KSP 基因和一个靶向 VEGF 基因）的脂质配制的组合物的治疗方法，例如，治疗肝癌的方法。在一些实施方式中，该组合物是 ALN-VSP02，如本文所述。可以每两周一次地施用该组合物，例如每两周一次，持续至少 8 周。可以以至少 0.4mg/kg 或至少 0.7mg/kg 的剂量施用该组合物。所描述的治疗方法在患者中耐受性良好。施用该组合物后，血浆中的 siRNA 浓度的测量显示与剂量成比例的 Cmax 和 AUC 而没有药物蓄积的证据。

[0056] I. 定义

[0057] 为方便起见，下面提供用于说明书、实施例和所附的权利要求中的某些术语和短语的含义。如果一个术语在本说明书的其他部分的用法与本节提供的定义之间存在明显的差异，则以本节中的定义为准。

[0058] “G”、“C”、“A”和“U”一般各分别代表包含作为碱基的鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和尿嘧啶的核苷酸。“T”和“dT”在本文可以互换使用，并指脱氧核糖核酸，其中核苷碱基是胸腺嘧啶，如脱氧核糖胸腺嘧啶 (deoxyribothymine)。但是，可以理解：术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”也可以指修饰的核苷酸（如下面进一步详述的）或代用的替换部分。熟练的技术人员清楚地知道：鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和尿嘧啶可以被其他部分替换而基本上不改变包含具有这样的替代部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对性质。例如，但非限制，包含肌苷 (inosine) 作为其碱基的核苷酸可以与包含腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸碱基配对。因此，含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可能在本发明的核苷酸序列中被含有例如肌苷的核苷酸替换。在另一个例子中，寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和胞嘧啶可以分别被鸟嘌呤和尿嘧啶替换，以与目标 mRNA 形成 G-U 摇摆碱基配对。包含这样的替换部分的序列是本发明的实施方式。

[0059] 如本文所用，“Eg5”指人驱动蛋白家族成员 11，也称为 KIF11、Eg5、HKSP、KSP、KNL1 或 TRIP5。Eg5 序列可以作为 NCBI GeneID :3832、HGNC ID :HGNC :6388 和 RefSeq ID 号 :NM_004523 而被找到。术语“Eg5”和“KSP”和“Eg5/KSP”可以互换使用。

[0060] 如本文所用，血管内皮生长因子 (VEGF)，也被称为血管通透性因子，是一种血管

生成生长因子。VEGF 是一种同型二聚的 45kDa 的糖蛋白,其至少以三种不同的同种型(isoform)存在。VEGF 同种型在内皮细胞中表达。VEGF 基因包含表达 189 氨基酸的蛋白质同种型的 8 个外显子。165 个氨基酸的同种型缺乏由外显子 6 编码的残基,而 121 个氨基酸的同种型缺乏由外显子 6 和 7 编码的残基。VEGF₁₄₅ 是预测包含 145 个氨基酸且缺乏外显子 7 的同种型。VEGF 可以通过结合内皮酪氨酸激酶受体(如 Flt-1(VEGFR-1)或 KDR/f1k-1(VEGFR-2))作用于内皮细胞。VEGFR-2 在内皮细胞中表达,并参与内皮细胞分化和血管生成。第三种受体,VEGFR-3,参与淋巴生成(lymphogenesis)。

[0061] 各种同种型具有不同的生物活性和临床意义。例如,VEGF₁₄₅ 诱导血管生成,且类似于 VEGF₁₈₉(但与 VEGF₁₆₅ 不同),VEGF₁₄₅ 通过不依赖于细胞外基质相关的硫酸肝素的机制有效地结合细胞外基质。VEGF 在体外显示作为内皮细胞有丝分裂原和化学引诱物的活性,并在体内诱导血管通透性和血管生成。VEGF 由各种癌细胞类型分泌,并通过诱导肿瘤相关的血管系统的生长促进肿瘤的生长。VEGF 功能的抑制已被证明限制原发实验肿瘤的生长以及免疫功能低下小鼠中转移的发生。

[0062] 如本文所用,“目标序列”指在 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 基因转录过程中形成的 mRNA 分子的核苷酸序列的连续部分,包括作为初级转录产物的 RNA 加工产物的 mRNA。

[0063] 如本文所用,术语“包含序列的链”指包含由使用标准的核苷酸命名法指称的序列描述的核苷酸链的寡核苷酸。

[0064] 如本文所用,除非另有说明,术语“互补的”用来描述与第二核苷酸序列相关的第一核苷酸序列时,指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一定条件下与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并形成双链体结构的能力,这是熟练的技术人员所理解的。这些条件可以是,例如,严格条件,其中,严格条件可能包括:400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、50°C 或 70°C 持续 12-16 小时,接着洗涤。可以应用其他条件,如可能在生物体内遇到的生理相关条件。熟练的技术人员能够根据杂交核苷酸的最终应用确定最适合测试两个序列的互补性的一组条件。

[0065] 其中包括含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在第一和第二核苷酸序列的全长上碱基配对。在此,这种序列可以称为彼此“完全互补”。然而,本文中当第一序列称作与第二序列“基本互补”时,所述两个序列可以为完全互补,或它们可以在杂交时形成一个或多个但通常不超过 4、3 或 2 个错配碱基对,而同时保留在与它们的最终应用最相关条件下杂交的能力。然而,在两个寡核苷酸设计在杂交时形成一个或多个单链突出端的情况中,在确定互补性时这种突出端不应该被认作是错配。例如,根据本发明的目的,包含 21 个核苷酸长度的一个寡核苷酸和 23 个核苷酸长度的另一个寡核苷酸的 dsRNA(其中所述较长的寡核苷酸包含与所述较短寡核苷酸完全互补的 21 个核苷酸的序列)也可以称为“完全互补”。

[0066] 如本文所使用的,“互补”序列也可以包括非 Watson-Crick 碱基对和 / 或由非天然核苷酸和修饰核苷酸形成的碱基对,或完全由非 Watson-Crick 碱基对和 / 或由非天然核苷酸和修饰核苷酸形成的这些碱基对形成,只要满足上述与它们的杂交能力有关的要求。这种非 Watson-Crick 碱基对包括但不限于 G:U Wobble 或 Hoogsteen 碱基配对。

[0067] 如从它们的使用语境里所理解的,本文中术语“互补”、“完全互补”和“基本互补”可以用于 dsRNA 的正义链与反义链之间或 dsRNA 的反义链与靶标序列之间的碱基匹配。

[0068] 如本文所使用的,与信使 RNA(mRNA)的“至少一部分基本互补”的多核苷酸指与感兴趣的 mRNA(如编码 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 的 mRNA)的连续部分(包括 5'UTR、开放阅读框(ORF)或 3'UTR)基本互补的多核苷酸。例如,如果多核苷酸序列与编码 Eg5 的 mRNA 的非间断部分基本互补,则该序列与 Eg5mRNA 的至少一部分互补。

[0069] 如本文所使用的,术语“双链 RNA”或“dsRNA”指具有包含两个反向平行且如上所定义的基本互补的核酸链的双链体结构。形成双链体结构的两条链可以是一个较大 RNA 分子的不同部分,或者它们可以是单独的 RNA 分子。当两条链为一个较大分子的部分且因此通过形成双链体结构的一条链的 3'末端和对应的另一条链的 5'末端之间的不间断核苷酸链连接时,连接 RNA 链被称为“发夹环”。当两条链通过形成双链体结构的一条链的 3'末端和对应的另一条链的 5'末端之间的不间断核苷酸链之外的其他方式共价连接时,此连接结构称为“接头(linker)”。RNA 链可以具有相同或不同的核苷酸数目。碱基对的最大数目为 dsRNA 的最短链的核苷酸数目减去双链体中存在的任何突出端。除了双链体结构外,dsRNA 可以包含一个或多个核苷酸突出端。一般来说,各条链的大多数核苷酸是核糖核苷酸,但如本文详细描述,各条链或两条链也可以包含至少一个非核糖核苷酸,例如,脱氧核糖核酸和 / 或修饰的核苷酸。此外,如在本说明书中所用的,“dsRNA”可能包括对核糖核苷酸的化学修饰,包括多个核苷酸的实质性的(substantial)修饰和包括本文所公开或本领域已知的所有修饰类型。出于本说明书和权利要求的目的,“dsRNA”包括(如在 siRNA 型分子中使用的)任何这样的修饰。

[0070] 如本文所使用,“核苷酸突出端”指未配对的核苷酸或当 dsRNA 的一条链的 3'末端超出另一条链的 5'末端或反之从 dsRNA 的双链体结构突出的核苷酸。“平端”(“Blunt”或“blunt end”)表示在 dsRNA 的该末端没有未配对核苷酸,即没有核苷酸突出端。“平端的”(“blunt ended”)dsRNA 是在其整个长度上都是双链的 dsRNA,即分子的任一端都没有核苷酸突出端。在一些实施方式中,dsRNA 可以在双链体的一端具有突出端和在另一端具有平端。

[0071] 术语“反义链”指包含与靶标序列基本互补的区域的 dsRNA 的链。如本文所使用的,术语“互补区域”指反义链上与本文所定义的序列(如靶标序列)基本互补的区域。当互补区域不与靶标列完全互补时,分子的内部或末端区域中可以存在错配。一般最可容忍的错配通常在末端区域中,例如 5'和 / 或 3'末端的 6、5、4、3 或 2 个核苷酸内。

[0072] 如本文所使用的,术语“正义链”指包含与反义链的区域基本互补的区域的 dsRNA 链。

[0073] 如本文所使用的,术语“SNALP”指稳定的核酸脂质微粒。SNALP 表示包被含核酸(如 iRNA 剂或 iRNA 剂由其转录的质粒)低水性内部的脂质泡囊。

[0074] 当“引入细胞”用于描述 dsRNA 时,其如本领域的技术人员所理解的表示促进摄取或吸收进入细胞。dsRNA 的吸收或摄取可以通过非协助的扩散性或主动的细胞过程进行或通过辅助试剂或装置进行。该术语的意思并不限于体外的细胞;dsRNA 也可以被“引入细胞中”,其中所述细胞是活的生物体的一部分。在这种情况下,引入细胞中包括向生物体的递送。例如,对于体内递送而言,dsRNA 可以被注射到组织位点或全身性地施用。体外引入细胞包括本领域已知的方法,如电穿孔和脂质转染。

[0075] 当术语“沉默”和“阻止表达”、“下调表达”、“抑制表达”等用于描述 Eg5 和 / 或

VEGF 基因时,它们在本文中指 Eg5 和 / 或 VEGF 基因表达的至少部分抑制,如通过与第二细胞或细胞群(与第一细胞或细胞群基本相当但没有进行处理)(对照细胞)相比,可以从第一细胞或细胞群(其中 Eg5 和 / 或 VEGF 基因被转录且已进行处理以使得 Eg5 和 / 或 VEGF 基因的表达被抑制)中分离的 Eg5 mRNA 和 / 或 VEGF mRNA 量的减少所表明的。抑制程度通常用以下式表示:

[0076]

$$\frac{(\text{对照细胞中的 mRNA}) - (\text{处理的细胞中的 mRNA})}{(\text{对照细胞中的 mRNA})} \times 100\%$$

[0077] 可选择地,抑制程度可以以与 Eg5 和 / 或 VEGF 基因的表达功能关联的参数降低的方式给出,例如,细胞所产生的由 Eg5 和 / 或 VEGF 基因编码的蛋白的量,或呈现某种表型(如细胞凋亡)的细胞的数目。理论上,靶标基因沉默可以或者组成性地或者通过基因工程并通过任何合适的检测方法在表达该靶标的任何细胞中测定。然而,当需要参照以确定给定的 dsRNA 是否抑制 Eg5 和 / 或 VEGF 基因的表达达到特定程度并由此是否包括在本发明内时,以下实施例提供的分析将作为这种参照。

[0078] 例如,在某些情况下,通过施用本发明的双链寡核苷酸,Eg5 和 / 或 VEGF 基因的表达至少被抑制大约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45% 或 50%。在一些实施方式中,通过施用本发明的双链寡核苷酸,Eg5 和 / 或 VEGF 基因至少被抑制大约 60%、70% 或 80%。在其他实施方式中,通过施用本发明的双链寡核苷酸,Eg5 和 / 或 VEGF 基因至少被抑制大约 85%、90% 或 95%。下面的实施例提供了利用各种不同浓度的各种不同 Eg5 和 / 或 VEGF dsRNA 分子抑制表达的值。

[0079] 如本文在 Eg5 和 / 或 VEGF 表达的上下文中所使用的,术语“治疗”、“处理”等指由 Eg5 和 / 或 VEGF 表达介导的病理过程的减轻或缓和。在本发明的情况中只要涉及本文以下所列举的其他任意状况(由 Eg5 和 / 或 VEGF 表达介导的病理过程之外的状况),术语“治疗”等表示减轻或缓和至少一种与这种状况相关的症状,或减缓或逆转这种状况的发展,如减缓和逆转肝癌的发展。

[0080] 如本文所使用的,短语“治疗有效量”指在由 Eg5 和 / 或 VEGF 表达介导的病理过程或由 Eg5 和 / 或 VEGF 表达介导的病理过程的外显症状的治疗或控制中产生治疗效益的量。治疗有效的特定量可以由一般的医疗专业人员很容易地确定,并且可以根据本领域已知的因素进行变化,如由 Eg5 和 / 或 VEGF 表达介导的病理过程的类型、患者的病史和年龄、由 Eg5 和 / 或 VEGF 表达介导的病理过程的阶段和施用其他对抗由 Eg5 和 / 或 VEGF 表达介导的病理过程的药剂。

[0081] 如本文所使用的,“药物组合物”包含药学有效量的 dsRNA 和药学上可接受的载体。如本文所使用的,“药学有效量”、“治疗有效量”或简称为“有效量”指有效地产生期望的药理或治疗结果的 RNA 量。例如,如果当与疾病或病症相关的可测量参数降低至少 25% 时给定的临床治疗被认为是有效的,那么用于该疾病或病症治疗的药物的治疗有效量是实现该参数至少 25% 的降低所需的量。

[0082] 术语“药学上可接受的载体”指用于施用治疗剂的载体。如下文详细描述,这类载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。该术语特别地排除细胞培养基。对于口服给药的药物而言,药学上可接受的载体包括但不限于药学上可接受的

赋形剂,如惰性稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、甜味剂、芳香剂、着色剂和防腐剂。合适的惰性稀释剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙以及乳糖,而玉米淀粉和藻酸是合适的崩解剂。粘合剂可以包括淀粉和明胶,而润滑剂(如果存在)通常为硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。如果需要,片剂可以用如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯的物质进行涂覆以延迟在胃肠道中的吸收。

[0083] 如本文所使用的,“转化的细胞”是其中已经引入可以由其表达 dsRNA 分子的载体的细胞。

[0084] 术语“ALN-VSP02”是指 SNALP 配制的组合物,包含两种 siRNA:靶向于 Eg5/KSP 的 siRNA(AD12115)和靶向于 VEGF 的 siRNA(AD3133)。下面在实施例 9 中给出了 ALN-VSP02 的详细说明。各个 ALN-VSP02siRNA 的序列如下:

[0085]

双链体 ID	靶	正义 (5'-3')	反义 (5'-3')
AD12115	Eg5/KSP	ucGAGAAucuAAAcu AAcuTsT (SEQ ID NO: 1)	AGUuAGUUuAGAU UCUCGATsT (SEQ ID NO: 2)
AD3133	VEGF	GcAcAuAGGAGAGA uGAGCUsU (SEQ ID NO: 3)	AAGCUcAUCUCUCC uAuGuGCusG (SEQ ID NO: 4)

[0086] 注:A、G、C、U-核糖核苷酸;c、u-2'-O-Me核糖核苷酸;s-硫逐磷酸酯。

[0087] SNALP 制剂如下:

[0088]

成分	比例 (mg/mL)
AD12115 和 AD3133	2.0*
DLinDMA (1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷),	7.3
DPPC (R-1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)	1.1
胆固醇,合成的	2.8
PEG2000-C-DMA (3-N-[(ω-甲氧基聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻氧基-丙胺)	0.8
磷酸盐缓冲盐水 (PBS)	q.s.

[0089] 用于此表中所述的比例的相应 mol% 如下:57.1/7.1/34.4/1.4(DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG2000-C-DMA)。

[0090] 本文所使用的术语“静脉内 (IV) 输注”是指将组合物直接施用到病人的静脉中的方法。静脉内输注允许将组合物直接施用到病人的血流中。这可以通过例如,皮下或皮内输注进行。可以通过许多方式进行静脉内输注,包括通过使用注射针、或可能地利用输液泵。它能够以例如连续输注、间歇输注、病人自控输注或日周期输注的形式提供。

[0091] 本文所使用的术语“曲线下面积”或者“AUC”是指用药后血流中药物的总体量。其根据施用药物后血浆药浓度的积分计算。通过在施用一剂组合物后直至血浆中组合物的量可以忽略的时间的多个时间点收集血液样品来获得 AUC。

[0092] 术语“ C_{max} ”是指施用组合物后组合物的峰值血浆浓度。

[0093] 本文所使用的术语“与剂量成比例的”描述与向病人施用的组合物的量具有线性关系的量,即依赖于剂量的量的增加或减少幅度与剂量的增加或减少幅度大致是相同的。例如,如果约 2 倍的剂量增加与约 2 倍的 AUC 增加相关联,那么 AUC 是与剂量成比例的。

[0094] 本文所使用的术语“血浆”是指微粒成分例如 ALN-VSP02 组合物悬浮于其中的血液的流体部分。它可以通过血液的沉降或离心而获得。血浆大约占血液总量的 50%,并含有葡萄糖、蛋白质、氨基酸和其它的营养物质;尿素和其它排泄产物;以及激素、酶、维生素、矿物质等。

[0095] 术语“血液血浆浓度”或“血浆浓度”是指受试者或者患者群体的血液的血浆成分中的组合物(如 ALN-VSP02 或 ALN-VSP02 的 dsRNA 中的任何一个)的浓度。应当理解,由于涉及新陈代谢和/或与其它治疗剂的可能的相互作用的变异性,受试者之间的组合物(如 ALN-VSP02)的血浆浓度可能会有明显的不同。

[0096] II、双链核糖核酸(dsRNA)

[0097] 如下文更详细描述,本发明提供用于抑制细胞或哺乳动物中 Eg5 和/或 VEGF 基因表达的双链核糖核酸(dsRNA)分子和使用该 dsRNA 的治疗方法。所述 dsRNA 包含具有与 Eg5 和/或 VEGF 基因表达中形成的 mRNA 的至少一部分互补的互补区域的反义链,并且其中所述互补区域长度小于 30 个核苷酸,通常为 19-24 个核苷酸长度,并且其中所述 dsRNA 在与表达所述 Eg5 和/或 VEGF 基因的细胞接触时抑制所述 Eg5 和/或 VEGF 基因的表达。

[0098] ALN-VSP02 是脂质配制的组合物,其包括两种 dsRNA,一个靶向于 Eg5/KSP 和一个靶向于 VEGF。该两种 dsRNA 的序列如下:

[0099]

双链体 ID	靶	正义 (5'-3')	反义 (5'-3')
AD12115	Eg5/KSP	ucGAGAAucuAAAcu	AGUuAGUUuAGAU
		AAcuTsT (SEQ ID NO: 1)	UCUCGATsT (SEQ ID NO: 2)
AD3133	VEGF	GcAcAuAGGAGAGAu GAGCUsU (SEQ ID NO: 3)	AAGCUcAUCUCUC CuAuGuGCusG (SEQ ID NO: 4)

[0100]

[0101] 注:A、G、C、U-核糖核苷酸;c、u-2'-O-Me 核糖核苷酸;s-硫逐磷酸酯。

[0102] 可以如下文进一步讨论的通过本领域已知的标准方法合成 dsRNA,例如,通过使用自动化的 DNA 合成仪,例如可从 Biosearch, Applied Biosystems, Inc 购买的仪器。另外的合成方法如下所述。

[0103] 也可以设想另外的 siRNA,例如,靶向于 Eg5 和/或 VEGF 的 dsRNA。2005 年 3 月 11 日提交的 11/078,073 号美国专利申请(美国专利公开号 2006-0094032)和 2006 年 01 月

25 日提交的 12/754,110 号美国部分继续专利申请（美国专利申请公开号 2006-0223770）中描述了靶向于 VEGF 的 siRNA 序列,包括 AD-3133。2007 年 3 月 30 日提交的 11/694,215 号美国专利申请（现在的美国专利号 7,718,629）中描述了靶向于 Eg5/KSP 的 siRNA 序列,包括 AD-12115。为了所有的目的,这些申请的内容以引入方式并入本文。特别是,为了所有的目的,在这些申请中公开的 siRNA 序列,例如,表 1 和 2,以引入方式并入本文。

[0104] 另外的 dsRNA 可以被设计并描述如下。

[0105] dsRNA 包含两个充分互补以杂交形成双链体结构的链。dsRNA 的一条链（反义链）包含与源自在 Eg5/KSP 和/或 VEGF 基因的表达过程中形成的 mRNA 序列的靶标序列基本互补和通常完全互补的互补区域,另一条链（正义链）包含与反义链互补的区域,这样当在适当条件下结合时,两条链杂交并形成双链体结构。一般来说,双链体结构的长度为 15 至 30,更通常为 18 至 25,但更通常为 19 至 24,和最通常为 19 至 21 个碱基对。在其他实施方式中,双链体结构的长度为 25-30 个碱基对。

[0106] 在一个实施方式中,双链体的长度为 19 个碱基对。在另一个实施方式中,双链体的长度为 21 个碱基对。当两个不同的 siRNA 结合使用时,双链体长度可以相同或不同。例如,组合物可以包括具有 19 个碱基对的双链体长度的靶向 Eg5 的第一 dsRNA 和具有 21 个碱基对的双链体长度的靶向 VEGF 的第二 dsRNA。

[0107] 类似地,与靶序列互补的区域的长度为 15 至 30,更通常为 18 至 25,但更通常为 19 至 24,最通常为 19 至 21 个核苷酸。在其他实施方式中,互补区域长度为 25-30 个核苷酸。在一个实施方式中,互补区域长度是 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 24 个核苷酸。

[0108] 在一个实施方式中,互补区域的长度为 19 个核苷酸。在另一个实施方式中,互补区域的长度为 21 个核苷酸。当两个不同的 siRNA 结合使用时,互补区域的长度可以相同或不同。例如,组合物可以包括具有 19 个核苷酸的互补区域的靶向 Eg5 的第一 dsRNA 和具有 21 个核苷酸的互补区域的靶向 VEGF 的第二 dsRNA。

[0109] 本发明的 dsRNA 的各链长度一般是 15 至 30、或 18 至 25、或 18、19、20、21、22、23 或 24 个核苷酸。在其他实施方式中,各链的长度为 25-30 个碱基对。双链体的各链可以具有相同或不同的长度。当两个不同的 siRNA 结合使用时,各个 siRNA 的各链的长度可以相同或不同。例如,组合物可以包括具有 21 个核苷酸的正义链和 21 个核苷酸的反义链的靶向 Eg5 的 dsRNA 和具有 21 个核苷酸的正义链和 23 个核苷酸的反义链的靶向 VEGF 的第二 dsRNA。

[0110] 本发明的 dsRNA 可以包含一个或多个核苷酸的一个或多个单链突出端。在一个实施方式中,dsRNA 的至少一个末端具有 1 至 4 个,一般 1 或 2 个核苷酸的单链核苷酸突出端。在另一实施方式中,dsRNA 的反义链各在 3' 端和 5' 端具有超出正义链的 1-10 个核苷酸的突出端。在进一步的实施方式中,dsRNA 的正义链各在 3' 端和 5' 端具有超出反义链的 1-10 个核苷酸的突出端。

[0111] 具有至少一个核苷酸突出端的 dsRNA 与它们的平端对应物相比具有意想不到的优异抑制性能。在一些实施方式中,仅一个核苷酸突出端的存在就可增强 dsRNA 的干扰活性,而不影响它的整体稳定性。已经证明仅具有一个突出端的 dsRNA 在体内以及在各种细胞、细胞培养基、血液和血清中是特别稳定和有效的。通常,单链突出端位于反义链的 3' 末端或者,可选择地,位于正义链的 3' 末端。dsRNA 也可以有平端,通常位于反义链的 5' 端。

这种 dsRNA 可以具有提高的稳定性和抑制活性,因此允许低剂量施用,即少于每天 5mg/kg 接受者体重。通常,dsRNA 的反义链在 3' 端具有核苷酸突出端,且 5' 端为平端。在另一个实施方式中,突出端中的一个或多个核苷酸用核苷硫代磷酸酯 (nucleoside thiophosphate) 替换。

[0112] 如本文更详细地描述的,本发明的组合物包括靶向于 Eg5 的第一 dsRNA 和靶向于 VEGF 的第二 dsRNA。第一和第二 dsRNA 可以具有相同的突出端构成,例如,各链上核苷酸突出端的数目,或者各个 dsRNA 可以具有不同的构成。在一个实施方式中,靶向于 Eg5 的第一 dsRNA 在各链的 3' 端包括 2 个核苷酸的突出端,且靶向于 VEGF 的第二 dsRNA 在反义链的 3' 端包括 2 个核苷酸的突出端和在反义链的 5' 端(例如,正义链的 3' 端)包括平端。

[0113] 熟练的技术人员清楚地知道,包含 20 至 23 个(但特别是 21 个)碱基对的双链体结构的 dsRNA 已被认为在诱导 RNA 干扰方面特别有效(Elbashir 等人,EMBO 2001,20:6877-6888)。然而,其他人发现,更长或更短的 dsRNA 也是有效的。可以合理地预期,包含在一个或两个末端仅减去几个核苷酸的 ALN-VSP02 的一个序列的较短 dsRNA 相比于上述 dsRNA 可以同样有效。因此,本发明考虑包含来自 ALN-VSP02 的一个序列的至少 15、16、17、18、19、20 或更多的连续核苷酸的部分序列,并其在本文所描述的分析中抑制 Eg5 和 / 或 VEGF 基因表达的能力与包含全序列的 dsRNA 相差不超过 5%、10%、15%、20%、25% 或 30% 的抑制的 dsRNA。使用 ALN-VSP02 序列和提供的靶标序列可以很容易地制备在 ALN-VSP02 的靶序列中切割的进一步的 dsRNA。

[0114] 此外,ALN-VSP02 识别对于易受基于 RNAi 的切割的 Eg5mRNA 中的位点和 VEGF 基因中的位点。因此,本发明还包括靶向于作为 ALN-VSP02 的靶标的序列内的 RNAi 剂,例如,dsRNA。如本文所使用的,如果第二 RNAi 剂在与第一 RNAi 剂的反义链互补的 mRNA 中的任何位置剪切该信使 RNA,则说第二 RNAi 剂靶向于第一 RNAi 剂的序列内。这样的第二试剂通常由来自 ALN-VSP02 的一个序列的至少 15 个连续核苷酸与取自 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 基因中邻近于选择序列的区域的另外的核苷酸序列组成。

[0115] 本发明的 dsRNA 可以包含一个或多个与靶标序列的错配。在优选的实施方式中,本发明的 dsRNA 包含不超过 3 个错配。如果 dsRNA 的反义链包含与靶标序列的错配,优选错配的区域不是位于互补区域的中心。如果 dsRNA 反义链包含与靶标序列的错配,优选错配限于距任一末端的 5 个核苷酸,例如,距离互补区域的 5' 或 3' 端的 5、4、3、2 或 1 个核苷酸。例如,对于与 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 基因的区域互补的 23 个核苷酸的 dsRNA 链,该 dsRNA 通常在中间的 13 个核苷酸内不含有任何错配。本发明所述的方法可以用来确定包含与靶标序列的错配的 dsRNA 是否有效抑制 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 基因的表达。考虑具有错配的 dsRNA 在抑制 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 基因的表达中的效果是重要的,特别是如果 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 基因中的特定互补区域已知在群体中具有多态性序列变异。

[0116] 修饰

[0117] ALN-VSP02 序列包括化学修饰。在其它的实施方式中,本方法中所使用的 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 靶向 dsRNA 包括与 ALN-VSP02 相同的一级序列,但或者没有修饰、ALN-VSP02 序列修饰的子集、和 / 或另外的修饰。所述的方法中可以使用具有本文引用的专利申请中找到的序列的靶向于 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 的另外的 dsRNA。这些 dsRNA 可以进行化学修饰。

[0118] 在一些实施方式中,对 dsRNA 进一步进行化学修饰以增强稳定性。本发明的核酸

可以通过本领域已建立的方法合成和/或修饰,如“Current protocols in nucleic acid chemistry”, Beaucage, S. L. 等人(编辑), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA 中所描述的那些方法,该文献通过引用结合入本文。本发明中有用的优选的 dsRNA 化合物的具体例子包括含有修饰的骨架或没有天然的核苷间连接的 dsRNA。如本说明书中所定义的,具有修饰骨架的 dsRNA 包括那些在骨架中保留磷原子的 dsRNA 和那些在骨架中不具有磷原子的 dsRNA。出于本说明书的目的并且如有时在本领域中所指的,在核苷间骨架中不含磷原子的修饰 dsRNA 也可以被认为是寡聚核苷(oligonucleoside)。

[0119] 优选的修饰 dsRNA 骨架包括例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包括 3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、亚磷酸酯(phosphinate)、氨基磷酸酯(包括 3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫代氨基磷酸酯(thionophosphoramidate)、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯,以及具有正常的 3'-5' 键的硼烷磷酸酯(boranophosphate)、它们的 2'-5' 键的类似物和那些具有相反极性的化合物(其中相邻的核苷单元由 3'-5' 改为 5'-3' 键或由 2'-5' 改为 5'-2' 键)。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。

[0120] 教导以上含磷连接制备的代表性的美国专利包括但不限于美国专利 3,687,808、4,469,863、4,476,301、5,023,243、5,177,195、5,188,897、5,264,423、5,276,019、5,278,302、5,286,717、5,321,131、5,399,676、5,405,939、5,453,496、5,455,233、5,466,677、5,476,925、5,519,126、5,536,821、5,541,316、5,550,111、5,563,253、5,571,799、5,587,3615,625,050,其各通过引用结合入本文。

[0121] 优选的其中不含磷原子的修饰 dsRNA 骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间连接、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连接、或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连接形成的骨架。这些包括那些具有吗啉连接(部分地由核苷的糖部分形成)的骨架,硅氧烷骨架,硫化物、亚砷和砷骨架,formacetyl 和 thioformacetyl 骨架,亚甲基 formacetyl 和 thioformacetyl 骨架,含链烯的骨架,氨基磺酸酯(sulfamate)骨架,亚甲基亚胺和亚甲基胍骨架,磺酸酯和磺酰胺(sulfonamide)骨架,酰胺骨架,和其他具有混合的 N、O、S 和 CH₂ 成分部件的骨架。

[0122] 教导制备以上寡聚核苷的代表性的美国专利包括但不限于美国专利 5,034,506、5,166,315、5,185,444、5,214,134、5,216,141、5,235,033、5,264,562、5,264,564、5,405,938、5,434,257、5,466,677、5,470,967、5,489,677、5,541,307、5,561,225、5,596,086、5,602,240、5,608,046、5,610,289、5,618,704、5,623,070、5,663,312、5,633,360、5,677,437 和 5,677,439,其各通过引用结合入本文。

[0123] 在其他优选的 dsRNA 模拟物中,核苷酸单元的糖和核苷间连接(即骨架)被新的基团替换。保持碱基单元以与适当的核酸靶标化合物杂交。一种这样的寡聚化合物(已经证明具有优异的杂交特性的 dsRNA 模拟物)称作肽核酸(PNA)。在 PNA 化合物中,dsRNA 的糖骨架被含酰胺的骨架,尤其氨基乙基氨基乙酸骨架取代。核苷碱基被保留并直接或间接地结合骨架酰胺部分的氮杂氮原子。教导制备 PNA 化合物的代表性的美国专利包括但不限于美国专利 5,539,082、5,714,331 和 5,719,262,其各通过引用结合入本文。PNA 化合物的进一步教导可见于 Nielsen 等人,Science,1991,254,1497-1500 中。

[0124] 本发明最优选的实施方式为具有硫代磷酸酯骨架的 dsRNA 和具有杂原子骨架的

寡聚核苷,尤其是上述引用的美国专利 5,489,677 的 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [称为亚甲基(甲基亚胺)或 MMI 骨架]、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [其中天然的磷酸二酯骨架表示为 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$], 以及上述引用的美国专利 5,602,240 的酰胺骨架。还优选上述引用的美国专利 5,034,506 的含有吗啉骨架结构的 dsRNA。

[0125] 修饰的 dsRNA 还可以包含一个或多个取代的糖部分。优选的 dsRNA 在 2' 位置包含下述基团之一: OH, F, O-、S- 或 N- 烷基, O-、S- 或 N- 链烯基, O-、S- 或 N- 炔基, 或者 O- 烷基 -O- 烷基, 其中烷基、链烯基和炔基可以是取代或未取代的 C_1 至 C_{10} 烷基或 C_2 至 C_{10} 链烯基和炔基。尤其优选的是 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 和 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, 其中 n 和 m 为 1 至大约 10。其他优选的 dsRNA 在 2' 位置包含下述基团之一: C_1 至 C_{10} 低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O- 烷芳基或 O- 芳烷基、SH、 SCH_3 、 OCN 、Cl、Br、CN、 CF_3 、 OCF_3 、 SOCH_3 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA 切割基团、报道基团、嵌入基团 (intercalator)、提高 dsRNA 的药代动力学性质的基团或提高 dsRNA 药效学性质的基团、以及其他具有类似特性的取代基。优选的修饰包括 2' - 甲氧基乙氧基 (2' -O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, 也称作 2' -O-(2-甲氧基乙基) 或 2' -MOE) (Martin 等人, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504), 即烷氧基 - 烷氧基基团。进一步优选的修饰包括如本文以下例子中描述的 2' - 二甲基氨基氧基乙氧基, 即 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基团, 也称作 2' -DMAOE, 以及如本文以下例子中描述的 2' - 二甲基氨基乙氧基乙氧基 (在本领域中也称作 2' -O- 二甲基氨基乙氧基乙基或 2' -DMAEOE), 即 $2' -\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 。

[0126] 其他优选的修饰包括 2' - 甲氧基 (2' - OCH_3)、2' - 氨基丙氧基 (2' - $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) 和 2' - 氟 (2' -F)。类似的修饰也可以在 dsRNA 的其他位置完成, 尤其是 3' 末端核苷酸上糖的 3' 位置或者在 2' -5' 连接的 dsRNA 中, 5' 末端核苷酸的 5' 位置。dsRNA 还可以具有糖模拟物, 如取代呋喃戊糖 (pentofuranosyl sugar) 的环丁基部分。教导这种修饰的糖结构的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利 4,981,957、5,118,800、5,319,080、5,359,044、5,393,878、5,446,137、5,466,786、5,514,785、5,519,134、5,567,811、5,576,427、5,591,722、5,597,909、5,610,300、5,627,053、5,639,873、5,646,265、5,658,873、5,670,633 和 5,700,920, 其中某些是本申请共有的, 并且其各通过引用整体结合入本文。

[0127] dsRNA 也可以包括核苷碱基 (在本领域中通常简称为“碱基”) 修饰或取代。如本文所使用的, “未修饰的”或“天然的”核苷碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤 (A) 和鸟嘌呤 (G), 以及嘧啶碱基胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C) 和尿嘧啶 (U)。修饰的核苷碱基包括其他合成的和天然的核苷碱基如 5'-甲基胞嘧啶 (5-me-C), 5-羟甲基胞嘧啶, 黄嘌呤, 次黄嘌呤, 2-氨基腺嘌呤, 腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基和其他烷基衍生物, 腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其他烷基衍生物, 2-硫尿嘧啶, 2-硫胸腺嘧啶和 2-硫胞嘧啶, 5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶, 5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶, 6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶, 5-尿嘧啶 (假尿嘧啶), 4-硫尿嘧啶, 8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其他 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤, 5-卤代尤其是 5-溴代、5-三氟甲基和其他 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶, 7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤, 8-氮杂鸟嘌呤和 8-氮杂腺嘌呤, 7-脱氮鸟嘌呤和 7-脱氮腺嘌呤以及 3-脱氮鸟嘌呤和

3-脱氮腺嘌呤。其他核苷碱基包括公开于美国专利 3,687,808 中的那些;在 The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,第 858-859 页, Kroschwitz, J.L 编. John Wiley & Sons,1990 中公开的那些;由 Englisch 等人, Angewandte Chemie, International Edition,1991,30,613 中公开的那些;以及由 Sanghvi, Y. S., 第 15 章, DsRNA Research and Applications,第 289-302 页, Crooke, S. T. Lebleu, B. 编, CRC Press, 1993 公开的那些。这些核苷碱基中的某些对提高本发明的寡聚化合物的结合亲和力是特别有利的。它们包括 5- 取代的嘧啶、6- 氮杂嘧啶和 N-2、N-6 以及 O-6 取代的嘌呤,包括 2- 氨基丙基腺嘌呤、5- 丙炔基尿嘧啶和 5- 丙炔基胞嘧啶。已经表明 5- 甲基胞嘧啶取代提高核酸双链体的稳定性 0.6-1.2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. 和 Lebleu, B. 编, DsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton,1993,第 276-278 页),并且是目前优选的碱基取代,甚至更加特别地在与 2' -O- 甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0128] 教导某些以上所提到的修饰核苷碱基以及其他修饰核苷碱基的制备的代表性的美国专利包括但不限于以上提到的美国专利 3,687,808,还有美国专利 4,845,205、5,130,30、5,134,066、5,175,273、5,367,066、5,432,272、5,457,187、5,459,255、5,484,908、5,502,177、5,525,711、5,552,540、5,587,469、5,594,121,5,596,091、5,614,617 和 5,681,941,其各通过引用结合入本文,以及美国专利 5,750,692,其也通过引用结合入本文。

[0129] 偶联物

[0130] 本发明的 dsRNA 的另一种修饰涉及化学性地连接到 dsRNA 上的一个或多个部分或偶联物,其增强 dsRNA 的活性、细胞分布或细胞摄取。这样的部分包括但不限于脂质部分,如胆固醇部分 (Letsinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199,86,6553-6556)、胆酸 (Manoharan 等人, Biorg. Med. Chem. Lett., 1994 4 1053-1060)、硫醚 (如 beryl-S- 三苯甲基硫醇) (Manoharan 等人, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992,660,306-309; Manoharan 等人, Biorg. Med. Chem. Lett., 1993,3,2765-2770)、巯基胆固醇 (Oberhauser 等人, Nucl. Acids Res., 1992,20,533-538)、脂族链 (如十二烷二醇或十一烷基残基) (Saison-Behmoaras 等人, EMBO J, 1991,10,1111-1118; Kabanov 等人, FEBS Lett., 1990,259,327-330; Svinarchuk 等人, Biochimie, 1993,75,49-54)、磷脂 (如二 - 十六烷基 - 外消旋 - 甘油或三乙基 - 铵 1,2- 二 -O- 十六烷基 - 外消旋 - 甘油 -3-H- 磷酸) (Manoharan 等人, Tetrahedron Lett., 1995,36,3651-3654; Shea 等人, Nucl. Acids Res., 1990,18,3777-3783)、聚胺或聚乙二醇链 (Manoharan 等人, Nucleosides & Nucleotides, 1995,14,969-973) 或金刚烷乙酸 (Manoharan 等人, Tetrahedron Lett., 1995,36,3651-3654)、棕榈基 (palmityl) 部分 (Mishra 等人, Biochim. Biophys. Acta, 1995,1264,229-237)、或十八烷基胺或己氨基 - 羰基胆固醇部分 (Crooke 等人, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996,277,923-937)。

[0131] 教导这种 dsRNA 偶联物制备的代表性的美国专利包括但不限于美国专利 4,828,979、4,948,882、5,218,105、5,525,465、5,541,313、5,545,730、5,552,538、5,578,717、5,580,731、5,591,584、5,109,124、5,118,802、5,138,045、5,414,077、5,486,603、5,512,439、5,578,718、5,608,046、4,587,044、4,605,735、4,667,025、4,762,779、4,789,737、4,824,941、4,835,263、4,876,335、4,904,582、4,958,013、5,082,830、5,112,963、5,214,136、5,082,830、5,112,963、5,214,136、5,245,022、

5, 254, 469、5, 258, 506、5, 262, 536、5, 272, 250、5, 292, 873、5, 317, 098、5, 371, 241、5, 391, 723、5, 416, 203、5, 451, 463、5, 510, 475、5, 512, 667、5, 514, 785、5, 565, 552、5, 567, 810、5, 574, 142、5, 585, 481、5, 587, 371、5, 595, 726、5, 597, 696、5, 599, 923、5, 599, 928 和 5, 688, 941, 其各通过引用结合入本文。

[0132] 没有必要对给定化合物中的所有位置进行一致地修饰, 并且事实上前述修饰中多于一种的修饰可以加入到单个化合物中或者甚至是 dsRNA 内的单个核苷上。本发明还包括是嵌合复合物的 dsRNA 复合物。在本发明的上下文中, “嵌合的” dsRNA 化合物或“嵌合体”为含两个或多个化学上截然不同的区域的 dsRNA 复合物, 尤其是 dsRNA, 所述区域各由至少一个单体单元 (即在 dsRNA 复合物的情况中的核苷酸) 构成。这些 dsRNA 通常包含至少一个其中所述 dsRNA 进行修饰以赋予 dsRNA 提高的核酸酶降解抗性、提高的细胞摄取和 / 或提高的与靶标核酸的结合亲和力的区域。dsRNA 的另外的区域可以用作能够剪切 RNA:DNA 或 RNA:RNA 杂合体的酶的底物。例如, RNase H 是剪切 RNA:DNA 双链体的 RNA 链的细胞内切酶。因此 RNase H 的激活引起 RNA 靶标的剪切, 由此极大地增强 dsRNA 抑制基因表达的效率。因此, 与杂交同一靶标区域的硫代磷酸酯脱氧 dsRNA 相比, 当使用嵌合 dsRNA 时通常可以用较短的 dsRNA 获得相当的结果。RNA 靶标的剪切可以通过凝胶电泳且如果需要的话通过本领域已知的相关核酸杂交技术常规地检测。

[0133] 在某些情况下, dsRNA 可以通过非配体基团进行修饰。许多非配体分子已经被偶联至 dsRNA 以增强 dsRNA 的活性、细胞分布或细胞摄取, 并且进行这种偶联的过程可在科学文献中得到。这种非配体部分包括脂质部分, 如胆固醇 (Letsinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86 :6553)、胆 酸 (Manoharan 等人, Bioorg. Med. Chem. Lett. , 1994, 4 :1053)、硫醚 (如己基 -S- 三苯甲基硫醇) (Manoharan 等人, Ann. N. Y. Acad. Sci. , 1992, 660 :306 ;Manoharan 等人, Bioorg. Med. Chem. Lett. , 1993, 3 :2765)、巯基胆固醇 (Oberhauser 等人, Nucl. Acids Res. , 1992, 20, 533)、脂族链 (如十二烷二醇或十一烷基残基) (Saison-Behmoaras 等人, EMBO J, 1991, 10 :111 ;Kabanov 等人, FEBS Lett. , 1990, 259 :327 ;Svinarchuk 等人, Biochimie, 1993, 75 :49)、磷脂 (如二 - 十六烷基 - 外消旋 - 甘油或三乙基 - 铵 1,2- 二 -0- 十六烷基 - 外消旋 - 甘油 -3-H- 磷酸) (Manoharan 等人, Tetrahedron Lett. , 1995, 36 :3651 ;Shea 等人, Nucl. Acids Res. , 1990, 18 :3777)、聚胺或聚乙二醇链 (Manoharan 等人, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14 :969) 或金刚烷乙酸 (Manoharan 等人, Tetrahedron Lett. , 1995, 36 :3651)、棕榈基部分 (Mishra 等人, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264 :229)、或十八烷基胺或己胺基 - 羰基羟胆固醇部分 (Crooke 等人, J. Pharmacol. Exp. Ther. , 1996, 277 :923)。教导这种 dsRNA 偶联物的制备的代表性的美国专利已经在上文列出。典型的偶联方案包括合成在序列的一个或多个位置带有氨基接头 (aminolinker) 的 dsRNA。然后氨基基团利用合适的偶合或活化试剂与将要被偶联的分子反应。偶联反应可以用仍然结合在固体载体上的 dsRNA 进行或者在液相中剪切 dsRNA 后进行。用 HPLC 纯化 dsRNA 偶联物通常提供纯的偶联物。

[0134] 在某些情况下, 配体可以是多功能的和 / 或 dsRNA 可以偶联至多于一个配体。例如, dsRNA 可以偶联到用于提高摄取的一个配体和用于提高释放的第二配体。

[0135] 含有 dsRNA 的药物组合物

[0136] 在一个实施方式中, 本发明提供了包含如本文所述的 dsRNA 和药学上可接受的载

体的药物组合物以及施用该药物组合物的方法。包含 dsRNA 的药物组合物用于治疗与 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 基因的表达或活性相关的疾病或病症,如由 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 表达介导的病理过程(如肝癌)。这类药物组合物根据递送方式进行配制。

[0137] 剂量

[0138] 以足以抑制 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 基因的表达的剂量施用组合物,例如, ALN-VSP02。除非另有说明,剂量是指总 dsRNA 的剂量。如果同时施用多于一种 dsRNA,剂量是指全部 dsRNA 的剂量。例如, ALN-VSP02 包括两种不同的 dsRNA, ALN-VSP02 的剂量是指两种 dsRNA 的总剂量。

[0139] 一般地,适当剂量的 dsRNA 将在每天每千克受体体重 0.01 至 200.0 毫克 dsRNA 的范围内,通常在每天每千克体重 1 至 50 毫克的范围内。在一些实施方式中,合适的 dsRNA 剂量是在 0.1 至 2.0mg/kg 的范围内。

[0140] 例如,可以以 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.05、1.1、1.15、1.2、1.25、1.3、1.35、1.4、1.45、1.5、1.55、1.6、1.65、1.7、1.75、1.8、1.85、1.9、1.95 或者 2.0mg/kg 的剂量施用 dsRNA。

[0141] 该剂量可以是 0.1、0.2、0.3、0.4、0.7、1.0、1.25、1.5、1.7、2.0、3.0 和 6.0mg/kg。

[0142] 该剂量可以是 0.1、0.2、0.3、0.4、0.7、1.25、1.5、1.7 和 6.0mg/kg。

[0143] 在一个实施方式中,该剂量至少是 0.4mg/kg。在另一个实施方式中,该剂量至少是 0.7mg/kg。

[0144] 在一些实施方式中,该方法包括每两周一次施用组合物,例如, ALN-VSP02。施用的疗程可以是 2 周、4 周、6 周、8 周、10 周、12 周、14 周或更长。病人可以接受 1-20、或 1-10、或 1-5 剂。病人可以接受 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 剂或更多剂。

[0145] 在一个实施方式中,组合物每隔一周以单一剂量施用,持续四周,共两剂。在另一个实施方式中,组合物每隔一周以单一剂量施用,持续八周,共四剂。

[0146] 熟练的技术人员可以理解某些因素可能影响有效治疗受试者所需要的剂量和时机,所述因素包括但不限于疾病或病症的严重度、先前的治疗、受试者的一般健康情况和 / 或年龄以及其他存在的疾病。另外,利用治疗有效量的组合物对受试者进行治疗可以包括单一治疗或一系列的治疗。如本文其他地方所阐述的,可以利用常规的方法或者在利用合适的动物模型进行的体内检测的基础上评估本发明所涵盖的单独 dsRNA 的有效量和体内半衰期。

[0147] 施用

[0148] 本发明的组合物可以根据是否需要局部或全身治疗和根据要治疗的区域以多种方式施用。施用可以是局部的、肺部的例如通过吸入或吹入粉末或气溶胶,包括通过喷雾器;气管内、鼻内、表皮和透皮、及皮下、经口或肠道外例如皮下施用。

[0149] 在一个实施方式中,组合物例如 ALN-VSP02 通过肠胃外方式全身施用 dsRNA 分子。肠胃外施用包括静脉内 (IV)、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或灌注;或颅内,如脑实质内 (intraparenchymal)、鞘内或腔室内施用。例如,可以向病人施用 ALN-VSP02。

[0150] 静脉内输注或注射可以进行 15 分钟。也可以在 1-5 分钟、5-10 分钟、10-20 分钟、20-30 分钟或更长的时程内进行静脉内输注或注射。

[0151] 在某些情况下,通过静脉内输注施用 siRNA 治疗可引起急性不良反应。因此,在

本发明的一个实施方式中,如果观察到或预测到病人对 siRNA 治疗已经有或将有急性不良反应,则延长静脉内输注的持续时间。在一个方面,静脉内输注的持续时间被延长至超过 15、30、45 或 60 分钟。在另一个方面,静脉内输注的持续时间被延长至超过 1、2、3 或 4 小时。在特定的实施方式中,在急性输注反应的情况中,静脉内输注的持续时间被延长至最多 3 个小时。为此,可以将 dsRNA 分子配制成组合物,例如,无菌和非无菌的水溶液、在一般溶剂(如醇类)中的非水溶液、或在液体或固体油基质中的溶液。这类溶液还可以包含缓冲剂、稀释剂及其他合适的添加剂。对于肠胃外、鞘内或腔室内施用,dsRNA 分子可以配制成组合物如无菌水溶液,其还可以包含缓冲剂、稀释剂和其他适当的添加剂(例如,渗透增强剂、载体化合物和其他药学上可接受的载体)。本文中更详细地描述了制剂。

[0152] 可以以靶向于特定的组织如肝脏(例如,肝脏的肝细胞)的方式来递送组合物,例如,ALN-VSP02。

[0153] 本领域的技术人员熟知,在某些情况下,siRNA 治疗可以产生非靶向(off-target)的全身性或急性炎性反应,导致可能的有害炎症、毒副作用和不适。当在 siRNA 治疗前使用时,几种化合物能够减轻有害的炎性或疼痛反应。

[0154] 因此,在本发明的一些实施方式中,在组合物,例如,ALN-VSP02 的施用之前,施用至少一种能够减轻炎性反应的化合物。在一个实施方式中,该化合物选自于地塞米松、H1 和 H2 阻滞剂及对乙酰氨基酚组成的组。

[0155] 可以在施用 siRNA 治疗的同时、刚好在此之前或之前几分钟施用用于减轻有害的非靶向效应的化合物。在一个实施方式中,在施用 siRNA 治疗前超过大约 10、15、30、45 或 60 分钟施用化合物以减轻有害的非靶向效应。

[0156] 制剂

[0157] 可以根据制药行业熟知的传统技术制备方便地以单位剂量形式存在的本发明的药物制剂。这些技术包括使活性成分和药用载体或赋形剂结合的步骤。在一般情况下,通过以下步骤制备制剂:使活性成分和液体载体或细分的固体载体或这两种均匀且密切地结合,且然后,如有必要,使产品成形。

[0158] 本发明的组合物可以配制成任意多种可能的剂型,例如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软胶囊、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物还可以制成水性、非水性或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步包含提高悬浮液粘度的物质,包括但不限于羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液还可以包含稳定剂。

[0159] 本发明的药物组合物包括但不限于溶液、乳剂和含脂质体的制剂。这些组合物可以从多种成分生成,所述成分包括但不限于预制液体、自乳化的固体和自乳化的半固体。本发明的一个方面是在治疗肝脏病症(如高脂血症)时靶向于肝脏的制剂。

[0160] 此外,靶向于 EG5/KSP 和/或 VEGF 基因的 dsRNA 可以配制成含有与其他分子、分子结构或核酸混合物混合、包封、偶联或以其他方式结合的 dsRNA 的组合物。例如,含有一种或多种靶向于 EG5/KSP 和/或 VEGF 基因的 dsRNA 剂的组合物可以包含其他治疗剂,例如其他癌症治疗剂或一种或多种靶向于非 EG5/KSP 和/或 VEGF 基因的 dsRNA 化合物。

[0161] 口服、肠胃外、局部和生物制剂

[0162] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末或颗粒、微米颗粒、纳米颗粒、在水或非水性介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、扁囊剂、片剂或微片剂(minitabket)。可能需

要增稠剂、芳香剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。在一些实施方式中，口服制剂是其中本发明描述的 dsRNA 与一种或多种渗透增强剂、表面活性剂和螯合剂一起施用的制剂。合适的表面活性剂包括脂肪酸和 / 或其酯或盐、胆酸和 / 或其盐。合适的胆酸 / 盐包括鹅脱氧胆酸 (CDCA) 和熊脱氧胆酸 (ursodeoxychenodeoxycholic acid, UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、甘胆酸 (glucolic acid)、甘氨酸胆酸 (glycolic acid)、甘氨酸脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺 -24, 25- 二氢 - 梭链孢酸钠和甘氨酸二氢梭链孢酸钠 (sodium glycodihydrofusidate)。合适的脂肪酸包括花生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯 (monoolein)、二月桂精、甘油 1- 单癸酸酯、1- 十二烷基氮杂环庚 -2- 酮、酰基肉毒碱、酰基胆碱、或甘油单酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐 (如钠盐)。在一些实施方式中，可以使用渗透增强剂的组合，如脂肪酸 / 盐与胆酸 / 盐的组合。一个示例性的组合是月桂酸、辛酸和 UDCA 的钠盐。其他渗透增强剂包括聚氧乙烯 -9- 月桂基醚、聚氧乙烯 -20- 十八烷基醚。本发明描述的 dsRNA 可以以包括喷射干燥的颗粒的颗粒形式经口递送或复合以形成微米或纳米颗粒。dsRNA 复合剂包括聚氨基酸，聚亚胺，聚丙烯酸酯，聚烷基丙烯酸酯、聚氧乙烷 (polyoxethane)、聚烷基氰基丙烯酸酯，阳离子化的明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇 (PEG) 和淀粉，聚烷基氰基丙烯酸酯，DEAE 衍生的聚亚胺、短梗霉多糖、纤维素和淀粉。合适的复合剂包括壳聚糖、N- 三甲基壳聚糖、聚 -L- 赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、聚精胺、鱼精蛋白、聚乙烯基吡啶、聚硫代二乙基氨基甲基乙烯 (polythiodiethylaminomethyl ethylene) P (TDAP)、聚氨基苯乙烯 (如 对 - 氨基)、聚 (甲基氰基丙烯酸酯)、聚 (乙基氰基丙烯酸酯)、聚 (丁基氰基丙烯酸酯)、聚 (异丁基氰基丙烯酸酯)、聚 (异己基氰基丙烯酸酯)、DEAE- 甲基丙烯酸酯、DEAE- 己基丙烯酸酯、DEAE- 丙烯酰胺、DEAB- 白蛋白和 DEAE- 葡聚糖、聚甲基丙烯酸酯、聚己基丙烯酸酯、聚 (D, L- 乳酸)、聚 (DL- 乳酸 - 聚乙醇酸共聚物) (PLGA)、藻酸盐和聚乙二醇 (PEG)。dsRNA 的口服制剂以及它们的制备在美国专利 6, 887, 906、美国专利公布 20030027780 和美国专利 6, 747, 014 中进行了详细描述，其各通过引用并入本文中。

[0163] 用于肠胃外、脑实质内 (进入大脑)、鞘内、腔室内或肝内施用的组合物和剂型可以包括无菌水溶液，其还可能包含缓冲剂、稀释剂及其他合适的添加剂 (例如但不限于，渗透增强剂、载体化合物及其他药学上可接受的载体或赋形剂)。

[0164] 用于局部施用的药物组合物和制剂可以包括透皮贴剂、软膏、洗液、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体、水性的、粉末或油性基质、增稠剂等也可能是必需的或想要的。合适的局部制剂包括其中本发明描述的 dsRNA 与局部递送剂 (如脂类、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂) 混合的制剂。合适的脂类和脂质体包括中性的 (如二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴离子的 (如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 DMPG) 和阳离子的 (如二油酰基四甲基氨基丙烷 DOTAP 和二油酰基磷脂酰基乙醇胺 DOTMA)。可以将本发明描述的 dsRNA 包封在脂质体内或者可以与其形成复合物，尤其是与阳离子脂质体形成复合物。可选择地，dsRNA 可以与脂质复合，尤其是与阳离子脂质复合。合适的脂肪酸和酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、花生酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯、二月桂精、甘油 1- 单癸酸酯、1- 十二烷基氮杂环庚 -2- 酮、酰基肉毒

碱、酰基胆碱、或 C₁₋₁₀ 烷基酯（如肉豆蔻酸异丙酯 IPM）、甘油单酯、甘油二酯或它们的药学上可接受的盐。局部制剂在美国专利 6, 747, 014 中进行了详细描述, 其通过引用整体结合入本文。此外, 可以以例如美国专利 6, 271, 359 中所描述的生物或非生物的方法向哺乳动物施用 dsRNA 分子。非生物的递送可以通过包括但不限于以下的多种方法实现: (1) 用本发明提供的 dsRNA 核酸分子加载脂质体, 和 (2) 将 dsRNA 分子与脂质或脂质体复合, 以形成核酸-脂质或核酸-脂质体复合物。脂质体可以由通常用于体外转染细胞的阳离子性和中性脂质构成。阳离子脂质可以与带负电荷的核酸复合（例如, 电结合）以形成脂质体。阳离子脂质体的例子包括但不限于: lipofectin、lipofectamine、lipofectace 和 DOTAP。形成脂质体的方法是本领域公知的。例如, 可以从磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油或二油酰磷脂酰乙醇胺形成脂质体组合物。可商购许多亲脂性物质, 包括 Lipofectin™ (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Calif.) 和 Effectene™ (Qiagen, Valencia, Calif.)。此外, 可以使用可商购的阳离子脂质（如 DDAB 或 DOTAP）优化全身性递送方法, 阳离子脂质可以各与中性脂质（如 DOPE 或胆固醇）混合。在某些情况下, 可以使用如 Templeton 等人 (Nature Biotechnology, 15 :647-652(1997)) 中描述的脂质体。在其他实施方式中, 可以使用聚阳离子（如聚乙烯亚胺）以实现体内和离体递送 (Boletta 等人, J. Am Soc. Nephrol. 7 :1728(1996))。可以在美国专利 6, 271, 359、PCT 公布 WO 96/40964 及 Morrissey, D. 等人 2005. Nat Biotechnol. 23(8) :1002-7 中找到关于脂质体用于递送核酸的进一步的信息。

[0165] 可以通过包括但不限于使用病毒载体的各种方法实现生物递送。例如, 病毒载体（如腺病毒和疱疹病毒载体）可以用于向肝细胞递送 dsRNA 分子。标准分子生物学技术可以用于将本发明提供的一种或多种 dsRNA 引入以前开发的用于将核酸递送至细胞中的许多不同的病毒载体中的一种。这些获得的病毒载体可以用来通过例如感染向细胞递送一种或多种 dsRNA。

[0166] 脂质体制剂

[0167] 在本发明中使用的组合物可以为脂质体制剂的形式。如本发明中所使用的, 术语“脂质体”是指由排列成球形的一个或多个双层的两性脂质组成的囊泡。脂质体是具有由亲脂性物质形成的膜和水性内部的单层的或多层的囊泡。水性部分包含将要递送的组合物。阳离子脂质体具有能够与细胞壁融合的优势。非阳离子脂质体虽然不能同样有效地与细胞壁融合, 但其在体内由巨噬细胞摄取。

[0168] 为了跨越完整的哺乳动物皮肤, 脂质囊泡必须在受合适的透皮梯度的影响下穿过一系列的微细孔, 其各具有小于 50nm 的直径。因此, 理想的是使用高度可变形并能够穿过这种微细孔的脂质体。

[0169] 脂质体的其他优势包括: 由天然磷脂获得的脂质体是生物相容的和生物可降解的; 脂质体可以掺入宽范围的水溶性和脂溶性的药物; 且脂质体能够防止包封在其内腔中的药物被代谢和降解 (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger 和 Banker (主编), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 245 页)。在脂质体制剂的制备中的重要考虑因素是脂质表面电荷、囊泡大小和脂质体的水性容积。

[0170] 脂质体可用于将活性成分转移和递送至作用位点。因为脂质体膜与生物膜在结构上相似, 因此当将脂质体应用于组织时, 脂质体就会开始与细胞膜融合并且随着脂质体和

细胞的融合,脂质体的内容物就会注入活性物质可以发挥作用的细胞中。

[0171] 深入研究的焦点是脂质体制剂作为多种药物的递送模式。越来越多的证据表明对于局部施用,脂质体与其他剂型相比具有几种优势。这些优势包括与所施用药物的高系统性吸收相关的副作用降低,所施用的药物在预期靶标处的积累提高,和向皮肤内施用宽范围的亲水性和疏水性药物的能力。

[0172] 几篇报告已经详细叙述了脂质体向皮肤内递送物质(包括大分子量 DNA)的能力。已经将包括止痛剂、抗体、激素和大分子量 DNA 的化合物向皮肤施用。大多数应用会导致靶向于上表皮。

[0173] 脂质体分成两大类。阳离子脂质体是带正电的脂质体,其与带负电的 DNA 分子相互作用以形成稳定的复合物。带正电的 DNA/脂质体复合物结合带负电的细胞表面,并内化到内体中。由于内体中的酸性 pH,脂质体破裂,从而释放出它们的内容物至细胞质中(Wang 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985)。

[0174] pH 敏感的或带负电荷的脂质体捕获 DNA,而不是与其复合。由于 DNA 和脂质两者具有类似的带电性,它们发生排斥而不是形成复合物。然而,一些 DNA 被捕获至这些脂质体的水性内部中。pH 敏感性脂质体已经用于向培养物中的细胞单层递送编码胸苷激酶基因的 DNA。在靶细胞中检测到外源基因的表达(Zhou 等人, *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274)。

[0175] 脂质体组合物的重要类型包括天然衍生的磷脂酰胆碱以外的磷脂。例如,中性脂质体组合物可以由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)形成。阴离子脂质体组合物通常由二肉豆蔻酰磷脂酰甘油形成,而阴离子融合脂质体主要由二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)形成。另一种类型的脂质体组合物由卵磷脂(PC)形成,如大豆 PC 和蛋黄 PC。另一类型由磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇的混合物形成。

[0176] 几项研究评价了脂质体药物制剂向皮肤的局部递送。包含干扰素的脂质体应用于豚鼠皮肤上导致减轻皮肤疱疹溃疡,而通过其他方式(例如,作为溶液或乳剂)递送干扰素则是无效的(Weiner 等人, *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410)。另外,另一项研究测试了作为脂质体制剂的一部分施用的干扰素相对于利用水性系统施用干扰素的效率,并得出结论:脂质体制剂优于水性施用方式(du Plessis 等人, *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265)。

[0177] 还检验了非离子脂质体系统,尤其是包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统,以确定它们在药物向皮肤递送中的用途。使用包含 Novasome™ I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)和 Novasome™ II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂酰醚)的非离子脂质体制剂向小鼠皮肤的真皮内递送环孢菌素 A。结果表明,这种非离子脂质体系统在促进环孢素 A 沉积到不同的皮肤层中方面是有效的(Hu 等人 *S. T. P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466)。

[0178] 脂质体还包括“空间稳定化的”脂质体,本文使用的该术语指包含一种或多种特殊脂质的脂质体,当其掺入脂质体中时导致与没有这种特殊脂质的脂质体相比具有提高的循环寿命。空间稳定化的脂质体的实例是其中脂质体的形成囊泡的脂质部分的一部分(A)包含一种或多种糖脂(如单唾液酸神经节苷脂 G_M1),或(B)由一种或多种亲水聚合物(如聚乙二醇(PEG)部分)衍生的脂质体。不希望受任何特定理论的限制,在本领域中认为,至少对

于包含神经节苷脂、鞘磷脂或 PEG 衍生的脂质的空间稳定化脂质体,这些空间稳定化的脂质体的循环半衰期增加是由于减少网状内皮系统 (RES) 的细胞中的摄取而产生的 (Allen 等人, FEBS Letters, 1987, 223, 42 ; Wu 等人, Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

[0179] 包含一种或多种糖脂的各种脂质体是本领域已知的。Papahadjopoulos 等人 (Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) 报告了单唾液酸神经节苷脂 G_{M1} 、硫酸半乳糖脑苷脂和磷脂酰肌醇提高脂质体的血液半衰期的能力。Gabizon 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1988, 85, 6949) 对这些发现进行了详细说明。Allen 等人的美国专利 4, 537, 025 和 W055/04924 公开了包含 (1) 鞘磷脂和 (2) 神经节苷脂 G_{M1} 或半乳糖脑苷脂硫酸酯的脂质体。美国专利 5, 543, 152 (webb 等人) 公开了包含鞘磷脂的脂质体。W0 97/13499 (Lim 等人) 中公开了包含 1, 2-sn- 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱的脂质体。

[0180] 本领域内已知许多包含用一种或多种亲水聚合物衍生的脂质的脂质体和它们的制备方法。Sunamoto 等人 (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) 描述了包含非离子去垢剂 $2C_{1215G}$ 的脂质体, 其包含 PEG 部分。Illum 等人 (FEBS Lett., 1984, 167, 79) 指出聚苯乙烯颗粒的聚二醇类的亲水涂层会引起血液半衰期的显著增长。Sears (美国专利 4, 426, 330 和 4, 534, 899) 描述了通过与聚亚烷基二醇 (如 PEG) 的羧基基团结合而修饰的合成磷脂。Klibanov 等人 (FEBS Lett., 1990, 268, 235) 描述了表明包含用 PEG 或 PEG 硬脂酸酯衍生的磷脂酰乙醇胺 (PE) 的脂质体血液循环半衰期显著提高的试验。Blume 等人 (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) 将这种发现扩展至其他 PEG 衍生的磷脂, 如 DSPE-PEG, 其由二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE) 和 PEG 的组合形成。在其外表面上具有共价结合的 PEG 部分的脂质体在 Fisher 的欧洲专利 EP 0 445 131 B1 和 W0 90/04384 中进行了阐述。Woodle 等人 (美国专利 5, 013, 556 和 5, 356, 633) 和 Martin 等人 (美国专利 5, 213, 804 和欧洲专利 EP 0 496 813 B1) 描述了包含用 PEG 衍生的 1-20 摩尔百分比的 PE 的脂质体组合物以及它们的使用方法。包含许多其他脂质-聚合物偶联物 (conjugate) 的脂质体在 W0 91/05545 和美国专利 5, 225, 212 (两者都属于 Martin 等人) 和 W0 94/20073 (Zalipsky 等人) 中进行了描述。在 W0 96/10391 (Choi 等人) 中描述了包含 PEG 修饰的神经酰胺脂类的脂质体。美国专利 5, 540, 935 (Miyazaki 等人) 和美国专利 5, 556, 948 (Tagawa 等人) 描述了包含 PEG 的脂质体, 其还可以在它们表面上进一步用功能部分衍生。

[0181] 本领域已知许多的包含核酸的脂质体。Thierry 等人的 W0 96/40062 公开了将高分子量核酸包封到脂质体中的方法。Tagawa 等人的美国专利 5, 264, 221 公开了蛋白质结合的脂质体并声称这种脂质体的内容物可以包括 dsRNA。Rahman 等人的美国专利 5, 665, 710 描述了将寡聚脱氧核苷酸包封到脂质体中的特定方法。Love 等人的 W097/04787 公开了包含靶向于 raf 基因的 dsRNA 的脂质体。

[0182] 传递体 (transfersome) 是再另一种类型的脂质体, 且是高度变形的脂质聚集体 (它是药物递送媒介的有吸引力的候选物)。传递体可以被描述成脂滴, 其可高度变形以至于它们能够轻易地穿透比该液滴小的小孔。传递体可以适应它们所使用的环境, 例如它们自优化的 (适应皮肤中小孔的形状)、自修复的, 通常不需要碎裂就能到达它们的靶标并且通常为自装载的。为了制备传递体, 有可能要向标准的脂质体组合物中加入表面边界活化剂, 通常为表面活性剂。已经将传递体用于向皮肤递送血清白蛋白。传递体介导的血清白蛋白的递送已经显示为与包含血清白蛋白的溶液的皮下注射一样有效。

[0183] 表面活性剂在制剂如乳剂（包括微乳剂）和脂质体中有广泛应用。对天然的和合成的许多不同类型的表面活性剂的特性进行分类和分级的最常见的方式是使用亲水 / 亲油平衡 (HLB)。亲水基团（也称为“头部”）的性质提供了为在制剂中使用的不同表面活性剂进行分类的最有用的方式 (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, 第 285 页)。

[0184] 如果表面活性剂分子不是离子化的, 则其归类为非离子表面活性剂。非离子表面活性剂在药物和化妆品中有广泛的应用, 并可以在宽范围的 pH 值内使用。通常, 根据它们的结构, 它们的 HLB 值在 2 至大约 18 间变化。非离子表面活性剂包括非离子的酯, 如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、山梨聚糖酯、蔗糖酯和乙氧基化酯。非离子的链烷醇酰胺和醚（如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇和乙氧基化 / 丙氧基化嵌段聚合物）也包括在这一类中。聚氧乙烯表面活性剂是非离子表面活性剂类中最常用的成员。

[0185] 如果表面活性剂分子在溶于水或分散在水中时带有负电荷, 则表面活性剂被归类为阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂包括羧酸酯（如皂类）、酰基乳酰酯、氨基酸的酰基酰胺化合物、硫酸酯类（如烷基硫酸酯和乙氧基化烷基硫酸酯）、磺酸酯（如烷基苯磺酸酯、酰基羟乙磺酸酯、酰基牛磺酸酯和磺基琥珀酸酯以及磷酸酯。阴离子表面活性剂类的最重要的成员为烷基硫酸酯和皂类。

[0186] 如果表面活性剂分子在溶于水或分散在水中时带有正电荷, 则表面活性剂归类为阳离子表面活性剂。阳离子表面活性剂包括季铵盐和乙氧基化胺。季铵盐是这个类别中最常使用的成员。

[0187] 如果表面活性剂分子能够带有正电荷或者负电荷, 则所述表面活性剂归类为两性表面活性剂。两性表面活性剂包括丙烯酸衍生物、取代的烷基酰胺化合物、N- 烷基甜菜碱和磷脂。

[0188] 已经综述了表面活性剂在药物产品、制剂中和乳剂中的应用 (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, 第 285 页)。

[0189] 核酸脂质颗粒

[0190] 在一个实施方式中, 作为本发明特征的 dsRNA 被完全地包封在脂质制剂中, 例如, 形成核酸脂质颗粒。核酸脂质颗粒通常包含阳离子脂质、非阳离子脂质体、固醇和防止微粒（例如, PEG- 脂质偶联物）聚集的脂质。核酸脂质颗粒对全身性应用是非常有用的, 因为他们在静脉 (i. v.) 注射后表现出延长的循环寿命和在远端位点（例如, 与施用位点物理分离的位点）聚集。此外, 当核酸存在于本发明的核酸 - 脂质微粒中时, 核酸在水溶液中对核酸酶的降解有抗性。例如, 美国专利 5, 976, 567、5, 981, 501、6, 534, 484、6, 586, 410、6, 815, 432 和 PCT 公布 WO 96/40964 公开了核酸 - 脂质微粒及其制备方法。

[0191] 核酸脂质颗粒可以进一步包括一种或多种另外的脂质和 / 或其它成分, 如胆固醇。其它脂质可为多种目的而被包括在脂质体组成中, 例如防止脂质氧化或将配体连接到脂质体表面上。可能存在多种脂质的任何一种, 包括两性的、中性的、阳离子的和阴离子的脂质。这些脂质可单独地或组合地使用。本文描述了可以存在的另外的脂质成分的具体实例。

[0192] 核酸脂质颗粒中可能存在的另外的成分包括: 双层稳定成分例如聚酰胺低聚物（见, 例如, 6, 320, 017 号美国专利）、肽、蛋白质、清洁剂、脂质衍生物如与磷脂酰乙醇胺偶

联的 PEG 和与神经酰胺偶联的 PEG (见, 5, 885, 613 号美国专利)。

[0193] 核酸脂质颗粒可以包括一种或多种仲氨基脂质或阳离子脂质、中性脂质、固醇和经选择以减少形成过程中脂质颗粒的聚集的脂质, 这可以导致颗粒的空间稳定性 (其防止形成过程中的电荷诱导的聚集)。

[0194] 核酸脂质颗粒包括, 例如, SPLP、pSPLP 和 SNALP。术语“SNALP”是指稳定的核酸脂质颗粒, 包括 SPLP。术语“SPLP”是指包含包封在脂质囊泡内的质粒 DNA 的核酸脂质颗粒。SPLP 包括“pSPLP”, 其包括如在 PCT 公开号 WO 00/03683 中给出的包封的缩合剂-核酸复合物。

[0195] 本发明的核酸脂质颗粒通常具有约 50nm 至约 150nm 的平均直径, 更通常约 60nm 至约 130nm, 更通常约 70nm 至约 110nm, 最通常约 70nm 至约 90nm, 或约 50、60、70、80、90、100、110、120、130、140 或约 150nm 的平均直径以使得该颗粒基本上是无毒的。

[0196] 在一个实施方式中, 脂质-药物比 (质量/质量比) (例如, 脂质-dsRNA 比) 在从约 1:1 至约 50:1、从约 1:1 至约 25:1、从约 3:1 至约 15:1、从约 4:1 至约 10:1、从约 5:1 至约 9:1 或约 6:1 至约 9:1 的范围内, 或约 6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1 或 33:1。

[0197] 阳离子脂质

[0198] 本发明的核酸-脂质颗粒通常包括阳离子脂质。阳离子脂质可能是, 例如, N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵 (DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵 (DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTAP)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油基氧基)丙胺 (DODMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)、1,2-二亚油基氨基甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷 (DLin-C-DAP)、1,2-二亚油基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷 (DLin-DAC)、1,2-二亚油基氧基-3-吗啉丙烷 (DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷 (DLinDAP)、1,2-二亚油基硫基-3-二甲基氨基丙烷 (DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷 (DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐 (DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐 (DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油基氧基-3-(N-甲基哌嗪)丙烷 (DLin-MPZ) 或 3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇 (DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇 (DOAP)、1,2-二亚油基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷 (DLin-EG-DMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环 (DLin-K-DMA) 或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊二烯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺 (ALNY-100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲氨基)丁酸酯 (MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮烷二基)二-十二烷-2-醇 (C12-200) 或它们的混合物。

[0199] 除了上述具体地描述的那些外, 在大致生理 pH 值下带净正电荷的其它阳离子脂质也可以被包含于本发明的脂质颗粒中。这种阳离子脂质包括但不限于, N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵 (“DODAC”)、N-(2,3-二油基氧基)丙基-N,N,N-三乙基氯化铵 (“DOTMA”)、

N,N-双硬脂基-N,N-二甲基溴化铵 (“DDAB”)、N-(2,3-二油酰氧基)丙基-N,N,N-三甲基氯化铵 (“DOTAP”)、1,2-二油基氧基-3-三甲基氨基丙烷盐酸盐 (“DOTAP.Cl”)、 3β -(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基)胆固醇 (“DC-Chol”)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N-2-(精胺甲酰胺基)乙基)-N,N-二甲基三氟醋酸铵 (“DOSPA”)、二-十八烷基酰胺甘氨酸基羧基精胺 (“DOGS”)、1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺 (“DOPE”)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷 (“DODAP”)、N,N-二甲基-2,3-二油基氧基丙胺 (“DODMA”) 和 N-(1,2-二肉蔻氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵 (“DMRIE”)。此外,可以使用多种阳离子脂质的商业制剂,例如,LIPOFECTIN(包含 DOTMA 和 DOPE,购自 GIBCO/BRL) 和 LIPOFECTAMINE(包含 DOSPA 和 DOPE,购自 GIBCO/BRL)。在特别的实施方式中,阳离子脂质是氨基脂质。

[0200] 本文所使用的术语“氨基脂质”意在包括具有一个或两个脂肪酸或脂族烷基链和氨基头基(包括烷基氨基或二烷基氨基基团)的那些脂质,其可在生理 pH 下质子化以形成阳离子脂质。

[0201] 其它的氨基脂质包括具有可选择的脂肪酸基团和其它的二烷基氨基基团的那些,包括其中的烷基取代基不同(例如,N-乙基-N-甲基氨基-,N-丙基-N-乙基氨基-等等)的那些氨基脂质。对于其中 R^{11} 和 R^{12} 均为长链烷基或酰基基团的那些实施方式,他们可以是相同的或不同的。通常,具有较低饱和的酰基链的氨基脂质更容易被设定大小,尤其是当复合物的大小为了过滤灭菌的目的而必须被设定在约 0.3 微米以下时。含有碳链长度在 C_{14} 至 C_{22} 范围内的不饱和脂肪酸的氨基脂质是优选的。其它骨架也可用于分离氨基脂质的氨基基团和脂肪酸或脂族烷基部分。合适的骨架是本领域的技术人员已知的。

[0202] 在某些实施方式中,本发明的氨基或阳离子脂质具有至少一个可质子化或者可去质子化的基团,以使得脂质在处于或低于生理 pH(如 pH 值 7.4)的 pH 值下带正电,和在第二 pH 值(优选地处于或高于生理 pH)下是中性的。当然可以理解,随 pH 值变化添加或去除质子是一个平衡的过程且提到带电的或中性的脂质是指主要物质的性质,而并不要求所有的脂质都以带电的或中性的形式存在。具有超过一个可质子化或者可去质子化的基团的或为两性的脂质并不排除在本发明的应用之外。

[0203] 在某些实施方式中,根据本发明的可质子化脂质具有约 4 至约 11 范围内的可质子化基团的 pKa。最优选的是约 4 至约 7 的 pKa,因为这些脂质在较低 pH 值的制剂阶段是阳离子性的,而颗粒在 pH 值 7.4 左右的生理 pH 值下主要地(虽然不是完全地)被表面中和。这一 pKa 的益处之一是,至少部分与颗粒外表面结合的核酸在生理 pH 下将失去其静电相互作用,并可以通过简单的透析移除,从而大大降低了颗粒对清除的易感性。

[0204] 在一个实施方式中,阳离子脂质是 1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)。2009 年 4 月 15 日提交的国际申请 PCT/CA2009/00496 号中描述了包含 DLinDMA 的核酸脂质颗粒的合成和制备。

[0205] 在一个实施方式中,使用阳离子脂质 XTC(2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环)制备核酸脂质颗粒。XTC 的合成被描述于 2008 年 10 月 23 日提交的 61/107,998 号美国临时专利申请中,其通过引用引入本文。

[0206] 在另一个实施方式中,使用阳离子脂质 MC3((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯)(例如,DLin-M-C3-DMA)制备核酸脂质颗粒。

粒。MC3 的合成和含 MC3 的制剂被描述于例如,2009 年 9 月 22 日提交的美国临时申请序列号 61/244,834 和 2009 年 6 月 10 日提交的美国临时申请序列号 61/185,800 中,其通过引用引入本文。

[0207] 在另一个实施方式中,使用阳离子脂质 ALNY-100((3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊二烯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺)制备核酸脂质颗粒。2009 年 11 月 10 日提交的国际专利申请 PCT/US09/63933 号中描述了 ALNY-100 的合成,其通过引用引入本文。

[0208] 在另一实施方式中,使用阳离子脂质 1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮烷二基)二-十二烷-2-醇(C12-200)制备核酸脂质颗粒。C12-200 也被称为 Tech G1。C12-200 的合成和使用 C12-200 的制剂被描述于 2010 年 5 月 5 日提交的国际专利申请 PCT/US10/33777 号和 Love 等(Love 等(2010)PNAS 107(5);1864-69)中。

[0209] 阳离子脂质例如 DLinDMA 可以占微粒中存在的总脂质的约 20mol% 至约 70mol% 或约 45-65mol% 或约 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65 或约 70mol%。在一个实施方式中,阳离子脂质占存在的总脂质的约 57.1mol%。

[0210] 非阳离子脂质

[0211] 本发明的核酸脂质颗粒可以包括非阳离子脂质。非阳离子脂质可以是阴离子脂质或中性脂质。其实例包括但不限于,二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰-磷脂酰乙醇胺 4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、16-0-单甲基 PE、16-0-二甲基 PE、18-1-反式 PE、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、胆固醇或其混合物。

[0212] 适合在本发明的脂质颗粒中使用的阴离子脂质包括,但不限于,磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油和与中性脂质结合的其他阴离子修饰基团。

[0213] 当中性脂质存在于脂质颗粒中时,可以是在生理 pH 值下以不带电的或中性的两性形式存在的多种脂质中的任何一种。这些脂质包括,例如,二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、二氢鞘磷脂、脑磷脂和脑苷脂。在本文所述的颗粒中使用的中性脂质的选择通常是以,例如,脂质体的大小和血流中脂质体的稳定性的考虑为依据。优选地,中性脂质成分是具有两个酰基基团的脂质(即二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺)。具有不同链长和饱和度的多种酰基链基团的脂质是可获得的或者可以通过公知的技术分离或合成。在一组实施方式中,含碳链长度在 C₁₄ 至 C₂₂ 范围内的饱和脂肪酸的脂质是优选的。在另一组实施方式中,使用具有碳链长度在 C₁₄ 至 C₂₂ 范围内的单-或二-不饱和脂肪酸的脂质。此外,可以使用具有饱和与不饱和脂肪酸链的混合的脂质。优选地,在本发明中使用中性脂质是 DOPE、DSPC、POPC 或任何相关的磷脂酰胆碱。本发明中使用中性脂质也可以由鞘磷脂、二氢鞘磷脂或者具有其它的头基团,如丝氨酸和肌醇的磷脂组成。

[0214] 在一个实施方式中,非阳离子脂质是二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)。在另一个实施方式中,非阳离子脂质是二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)。

[0215] 非阳离子脂质,例如,DPPC,可以为在颗粒中存在的总脂质的约5mol%至约90mol%、约5mol%至约10mol%、约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85或约90mol%。在一个实施方式中,阳离子脂质,例如,DPPC,占核酸脂质颗粒的7.1mol%。

[0216] 偶联的脂质

[0217] 偶联的脂质可以用于核酸脂质颗粒中以防止聚集,其包括聚乙二醇(PEG)-修饰的脂质、单唾液酸神经节苷酯GM1和聚酰胺低聚物(“PAO”),如(在6,320,017号美国专利中所描述的)。防止制剂过程中聚集的其它具有不带电荷的、亲水性的、立体屏障部分的化合物,如PEG-Gm1或ATTA,也可以与脂质偶联以用于本发明的方法和组合物中。在例如,6,320,017号美国专利中描述了ATTA-脂质,在例如,5,820,873、5,534,499和5,885,613号美国专利中描述了PEG-脂质偶联物。通常情况下,选择的用于减少聚集的脂质成分浓度是约1至15%(以脂质的摩尔百分比计)。

[0218] 可用于本发明中的PEG-修饰的脂质(或脂质-聚氧乙烯偶联物)的具体的实例可以有多种“锚定”脂质部分使PEG部分固定在脂质囊泡的表面上。适合的PEG-修饰的脂质的实例包括PEG-修饰的磷脂酰乙醇胺和磷脂酸、在共同未决的USSN 08/486,214(本文通过引用引入)中所描述的PEG-神经酰胺偶联物(例如,PEG-CerC14或者PEG-CerC20)、PEG-修饰的二烷基胺和PEG-修饰的1,2-二酰氧基丙-3-胺。特别优选的是PEG-修饰的二酰基甘油和二烷基甘油。

[0219] 在其中的空间上的大基团如PEG或ATTA与脂质锚偶联的实施方式中,对脂质锚的选择取决于偶联物与脂质颗粒具有什么类型的结合。众所周知,mePEG(mw2000)-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)保持与脂质体结合直到颗粒从循环中清除,可能几天的时间。其它的偶联物,如PEG-CerC20,具有类似的停留能力。然而在一些实验中,PEG-CerC14在暴露于触血清时以不到60分钟的 $T_{1/2}$ 迅速地交换到制剂外。如在美国专利申请序列号08/486,214中所显示的,至少有三种特性影响交换率:酰基链的长度、酰基链的饱和度和空间屏障头基基团的大小。具有这些特性的适当变化的化合物可以用于本发明。对于一些治疗应用,可能优选的是在体内迅速地与核酸脂质颗粒脱离的PEG-修饰的脂质,且因此PEG-修饰的脂质将具有相对较短的脂质锚。在其它治疗应用中,可能优选的是表现出较长的血浆循环寿命的核酸脂质颗粒,且因此PEG-修饰的脂质将拥有相对较长的脂质锚。示例性的脂质锚包括具有约 C_{14} 至约 C_{22} 、优选地约 C_{14} 至约 C_{16} 的长度的那些脂质锚。在一些实施方式中,PEG部分,例如mPEG-NH₂,具有约1000、2000、5000、10,000、15,000或20,000道尔顿的大小。

[0220] 应当指出,防止聚集的化合物不一定要求脂质偶联以适当地发挥功能。在溶液中的游离PEG或游离ATTA可能足以防止聚集。如果颗粒在配制后是稳定的,PEG或ATTA可以在向受试者施用前被透析掉。

[0221] 抑制颗粒聚集的偶联脂质可以是,例如,聚乙二醇(PEG)-脂质,包括但不限于PEG-二酰基甘油(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)或其混合物。PEG-DAA偶联物可以是,例如PEG-二月桂基氧基丙基(Ci₂)、PEG-二肉豆蔻基氧基

丙基 (Ci₄)、PEG-二棕榈基氧基丙基 (Ci₆) 或 PEG-二硬脂基氧基丙基 (Ci₈)。另外的偶联脂质包括聚乙二醇-二(十四酰基)甘油 (polyethylene glycol-didimyrystoyl glycerol) (C14-PEG 或 PEG-C14, 其中 PEG 平均分子量为 2000Da) (PEG-DMG); (R)-2,3-双(十八烷氧基)丙基 1-(甲氧基聚(乙二醇)2000)丙基氨基甲酸酯 (PEG-DSG); PEG-氨基甲酰基-1,2-二(十四烷氧基)丙胺, 其中 PEG 的平均分子量为 2000Da (PEG-cDMA); N-乙酰半乳糖胺-((R)-2,3-二(十八烷氧基)丙基 1-(甲氧基聚(乙二醇)2000)丙基氨基甲酸酯)) (GalNAc-PEG-DSG); 和聚乙二醇-二棕榈酰基甘油 (PEG-DPG)。

[0222] 在一个实施方式中, 偶联的脂质是 PEG-DMG 或 PEG-DSG。在另一个实施方式中, 偶联的脂质是 PEG-cDMA。在再另一个实施方式中, 偶联的脂质是 PEG-DPG。或者, 偶联的脂质是 GalNAc-PEG-DSG。

[0223] 在一些实施方式中, 防止颗粒聚集的偶联的脂质是颗粒中存在的总脂质的 0mol% 至约 20% 或约 0.5 至约 5.0mol% 或约 1.5mol% 或约 2.0mol%。偶联的脂质可以是颗粒中存在的总脂质的约 0.5、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 或约 5.0mol%。在一个实施方式中, 偶联的脂质如 PEG-cDMA 为 1.4mol%。

[0224] 脂质混合物的固醇成分(当存在时)可以在脂质体、脂质囊泡或脂质颗粒制备领域中常规使用的那些固醇中的任何一种。优选的固醇是胆固醇。

[0225] 在一些实施方式中, 核酸-脂质颗粒还包括固醇, 如胆固醇。固醇可以为核酸-脂质颗粒的约 10 至约 60mol% 或约 25 至约 40mol%。在一些实施方式中, 固醇为颗粒中存在的总脂质的约 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 或约 60mol%。固醇, 如胆固醇, 可以是颗粒中总脂质的约 34.3 或 34.4mol%。

[0226] 脂蛋白

[0227] 在一个实施方式中, 本发明的制剂进一步包含载脂蛋白。本文中使用的术语“载脂蛋白”或“脂蛋白”是指本领域的技术人员已知的载脂蛋白及其变体和片段且指如下所述的载脂蛋白激动剂及其类似物或片段。

[0228] 合适的载脂蛋白包括, 但不限于, ApoA-I、ApoA-II、ApoA-IV、ApoA-V 和 ApoE 及活性多态形式、同种型、变体和突变体及其片段或截断形式。在某些实施方式中, 载脂蛋白是含巯基的载脂蛋白。“含巯基的载脂蛋白”指至少含有一个半胱氨酸残基的载脂蛋白、变体、片段或同种型。最常见的含巯基的载脂蛋白是包含一个半胱氨酸残基的 ApoA-I Milano (ApoA-I_M) 和 ApoA-I Paris (ApoA-I_P) (Jia 等, 2002, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297:206-13; Bielicki 和 Oda, 2002, *Biochemistry* 41:2089-96)。ApoA-II、ApoE2 和 ApoE3 也是含巯基的载脂蛋白。分离的 ApoE 和 / 或其活性片段和多肽类似物(包括其重组产生的形式)被描述于 5,672,685、5,525,472、5,473,039、5,182,364、5,177,189、5,168,045、5,116,739 号美国专利中, 其公开内容通过引用引入本文。Weisgraber 等, "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms," *J. Biol. Chem.* (1981)256:9077-9083 和 Rall 等, "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects," *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1982)79:4696-4700 中公开了 ApoE3(也参见 GenBank 登录号 K00396)。

[0229] 在某些实施方式中, 载脂蛋白可以是其成熟的形式、其预处理载脂蛋白

(preproapolipoprotein) 形式或其前体载脂蛋白 (proapolipoprotein) 形式。前体 ApoA-I 和成熟 ApoA-I (Duverger 等, 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12) : 1424-29)、ApoA-I Milano (Klon 等, 2000, *Biophys. J.* 79 : (3) 1679-87 ; Franceschini 等, 1985, *J. Biol. Chem.* 260 : 1632-35)、ApoA-I Paris (Daum 等, 1999, *J. Mol. Med.* 77 : 614-22)、ApoA-II (Shelness 等, 1985, *J. Biol. Chem.* 260(14) : 8637-46 ; Shelness 等, 1984, *J. Biol. Chem.* 259(15) : 9929-35)、ApoA-IV (Duverger 等, 1991, *Euro. J. Biochem.* 201(2) : 373-83) 和 ApoE (McLean 等, 1983, *J. Biol. Chem.* 258(14) : 8993-9000) 的同型或异型二聚体也可以在本发明的范围内利用。

[0230] 在某些实施方式中, 载脂蛋白可以是载脂蛋白的片段、变体或同种型。术语“片段”是指具有比天然的载脂蛋白短的氨基酸序列的任何载脂蛋白, 且该片段保留了天然的载脂蛋白的活性, 包括脂质结合特性。“变体”表示载脂蛋白的氨基酸序列中的置换或改变, 该置换或改变, 例如, 氨基酸残基的增加和缺失, 不取消天然载脂蛋白的活性, 包括脂质结合特性。因此, 变体可以包含具有与本发明提供的天然载脂蛋白基本上相同的氨基酸序列的蛋白质或肽, 其中的一个或多个氨基酸残基已经被化学上相似的氨基酸保守地置换。保守置换的实例包括将至少一个疏水残基, 如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸置换为另一个。同样地, 本发明考虑, 例如, 至少一个亲水性残基, 例如, 精氨酸和赖氨酸之间、谷氨酰胺和天冬酰胺之间、甘氨酸和丝氨酸之间的置换 (见 6,004,925、6,037,323 和 6,046,166 号美国专利)。术语“同种型”是指具有相同的、更强的或部分的功能和相似的、相同的或部分的序列的蛋白质, 且可以是或不是相同基因的产物和通常为组织特异性的 (见 Weisgraber, 1990, *J. Lipid Res.* 31(8) : 1503-11 ; Hixson 和 Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9) : 1529-35 ; Lackner 等, 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2) : 703-6 ; Hoeg 等, 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9) : 3911-4 ; Gordon 等, 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1) : 468-74 ; Powell 等, 1987, *Cell* 50(6) : 831-40 ; Aviram 等, 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10) : 1617-24 ; Aviram 等, 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8) : 1581-90 ; Billecke 等, 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11) : 1335-42 ; Draganov 等, 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43) : 33435-42 ; Steinmetz 和 Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4) : 2258-64 ; Widler 等, 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21) : 10464-71 ; Dyer 等, 1995, *J. Lipid Res.* 36(1) : 80-8 ; Sacre 等, 2003, *FEBS Lett.* 540(1-3) : 181-7 ; Weers 等, 2003, *Biophys. Chem.* 100(1-3) : 481-92 ; Gong 等, 2002, *J. Biol. Chem.* 277(33) : 29919-26 ; Ohta 等, 1984, *J. Biol. Chem.* 259(23) : 14888-93 和 6,372,886 号美国专利)。

[0231] 在某些实施方式中, 本发明的方法和组合物包括使用载脂蛋白的嵌合结构。例如, 载脂蛋白的嵌合结构可由与含缺血再灌注保护性能的载脂蛋白域结合的具有高脂质结合能力的载脂蛋白域组成。载脂蛋白嵌合结构可以是包括某载脂蛋白内的分离区域的结构 (即同源结构) 或嵌合结构可以是包括不同的载脂蛋白之间的分离区域的结构 (即异源结构)。包含嵌合结构的组合物也可以包括作为载脂蛋白变种的片段或设计为具有特定的性质的片段 (例如, 脂质结合、受体结合、酶学性质、酶激活、抗氧化或氧化还原特性) (参见 Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8) : 1503-11 ; Hixson 和 Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9) : 1529-35 ; Lackner 等, 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2) : 703-6 ; Hoeg 等, 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9) : 3911-4 ; Gordon 等, 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1) : 468-74 ; Powell 等,

1987, *Cell* 50(6) :831-40 ;Aviram 等,1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10) :1617-24 ;Aviram 等,1998, *J. Clin. Invest.* 101(8) :1581-90 ;Billecke 等,2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11) :1335-42 ;Draganov 等,2000, *J. Biol. Chem.* 275(43) :33435-42 ;Steinmetz 和 Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4) :2258-64 ;Widler 等,1980, *J. Biol. Chem.* 255(21) :10464-71 ;Dyer 等,1995, *J. Lipid Res.* 36(1) :80-8 ;Sorenson 等,1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(9) :2214-25 ;Palgunachari 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(2) :328-38 ;Thurberg 等, *J. Biol. Chem.* 271(11) :6062-70 ;Dyer 1991, *J. Biol. Chem.* 266(23) :150009-15 ;Hill 1998, *J. Biol. Chem.* 273(47) :30979-84)。

[0232] 本发明中使用的载脂蛋白还包括重组的、合成的、半合成的或纯化的载脂蛋白。本发明所使用的获得载脂蛋白或其等价物的方法是本领域公知的。例如,载脂蛋白可以通过例如,密度梯度离心法或免疫亲和层析从血浆或天然产物中分离,或者合成地、半合成地或利用该领域的技术人员已知的重组 DNA 技术产生(参见,例如 Mulugeta 等,1998, *J. Chromatogr.* 798(1-2) :83-90 ;Chung 等,1980, *J. Lipid Res.* 21(3) :284-91 ;Cheung 等,1987, *J. Lipid Res.* 28(8) :913-29 ;Persson, 等,1998, *J. Chromatogr.* 711 :97-109 ;5, 059, 528、5, 834, 596、5, 876, 968 和 5, 721, 114 号美国专利 ;和 PCT 公开号 WO 86/04920 和 WO 87/02062)。

[0233] 在本发明中利用的载脂蛋白进一步包括载脂蛋白激动剂,如模仿 ApoA-I、ApoA-I Milano (ApoA-I_M)、ApoA-I Paris (ApoA-I_P)、ApoA-II、ApoA-IV 和 ApoE 活性的肽和肽类似物。例如,载脂蛋白可以是在 6, 004, 925、6, 037, 323、6, 046, 166 和 5, 840, 688 号美国专利中所描述的那些中的任何一种,这些专利的内容以其整体通过引用引入本文。

[0234] 可以使用本领域已知的用于肽合成的任何技术合成或制造载脂蛋白激动剂肽或肽类似物,例如,6, 004, 925、6, 037, 323 和 6, 046, 166 号美国专利中描述的技术。例如,可使用最初由 Merrifield(1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85 :2149-2154) 描述的固相合成技术制备肽。可以在 Bodanszky 等, *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 2d Ed., (1976) 中和本领域的技术人员可方便地获得的其它参考资料中找到其它的肽合成技术。可以在 Stuart 和 Young, *Solid Phase Peptide. Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984) 中找到多肽合成技术的总结。也可以通过如 *The Proteins*, II 卷, 3d Ed., Neurath 等编辑, 105-237 页, Academic Press, New York, N. Y. (1976) 中所描述的溶液方法合成肽。在不同的肽合成中使用的适当的保护基在上述文献以及在 McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, New York, N. Y. (1973) 中描述。本发明的肽也可以通过由例如,载脂蛋白 A-I 的较大部分化学或酶促裂解而制备。

[0235] 在某些实施方式中,载脂蛋白可以是载脂蛋白的混合物。在一个实施方式中,载脂蛋白可以是均质混合物,也就是,单一类型的载脂蛋白。在另一个实施方式中,载脂蛋白可以是载脂蛋白的异质混合物,即两种或更多种不同载脂蛋白的混合物。载脂蛋白的异质混合物的实施方式可以包含,例如,来自动物来源的载脂蛋白和来自半合成来源的载脂蛋白的混合物。在某些实施方式中,异质混合物可以包含,例如,ApoA-I 和 ApoA-I Milano 的混合物。在某些实施方式中,异质混合物可以包含,例如,ApoA-I Milano 和 ApoA-I Paris 的混合物。适合在本发明的方法和组合物中使用的混合物对于本领域的技术人员是显而易见的。

[0236] 如果载脂蛋白是从天然来源获得的,它可以从植物或动物来源获得。如果载脂蛋白是从动物来源获得的,该载脂蛋白可以来自任何物种。在某些实施方式中,载脂蛋白可从动物来源获得。在某些实施方式中,载脂蛋白可以从人类来源获得。在本发明的优选实施方式中,载脂蛋白是源自于与载脂蛋白被施用的个体相同的物种。

[0237] 其它成分

[0238] 在众多的实施方式中,两性脂质被包括在本发明的脂质颗粒中。“两性脂质”是指任何合适的材料,其中该脂质材料的疏水部分定向于疏水相中,而亲水部分朝向水性相定向。这类化合物包括,但不限于,磷脂类、氨基脂类和鞘脂类。代表性的磷脂包括鞘磷脂、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱或二亚油酰磷脂酰胆碱。也可使用其它的无磷化合物,如鞘脂类、鞘糖脂家族、二酰甘油类、 β -酰氧酸(acyloxyacid)。此外,这类两性脂质可以很容易地与其它脂质,如甘油三酯和固醇混合。

[0239] 可编程融合脂质也适于包含在本发明中的脂质颗粒中。这类脂质颗粒几乎没有与细胞膜融合的趋势,并直到给定的信号事件出现才传递其载荷。这使得脂质颗粒在注射到生物体或疾病位点后开始与细胞融合前更均匀地分布。信号事件可以是,例如,pH值、温度、离子环境或时间的变化。在后一种情况下,融合延迟或“掩饰”成分,如 ATTA- 脂质偶联物或 PEG- 脂质偶联物,可以简单地随着时间交换到脂质颗粒膜外。示例性的脂质锚包括长度从约 C_{14} 至约 C_{22} 、优选地约 C_{14} 至约 C_{16} 的那些。在一些实施方式中,PEG 部分,例如 mPEG-NH₂,具有约 1000、2000、5000、10,000、15,000 或 20,000 道尔顿的大小。

[0240] 与核酸试剂偶联的脂质颗粒也可以包括靶向部分,例如,对于细胞类型或组织特异性的靶向部分。在先已经描述了脂质颗粒利用多种靶向部分,如配体、细胞表面受体、糖蛋白类、维生素(如核黄素)和单克隆抗体的靶向(见,例如,4,957,773 和 4,603,044 号美国专利)。靶向部分可以包括整个蛋白质或其片段。靶向机制通常需要靶向剂以使得靶向部分可用于与靶标如细胞表面受体相互作用的方式定位在脂质颗粒的表面上。多种不同的靶向剂和方法是本领域中已知的和可获得的,包括被描述于,例如,Sapra, P. 和 Allen, TM, Prog. Lipid Res. 42(5):439-62(2003);和 Abra, RM 等, J. Liposome Res. 12:1-3, (2002) 中的那些。

[0241] 已经提出利用具有亲水性聚合物链如聚乙二醇(PEG)链的表面涂层的脂质颗粒(即脂质体)用于靶向(Allen 等, Biochimica et Biophysica Acta 1237:99-108(1995); DeFrees 等, Journal of the American Chemistry Society 118:6101-6104(1996); Blume 等, Biochimica et Biophysica Acta 1149:180-184(1993); Klibanov 等, Journal of Liposome Research 2:321-334(1992); 5,013556 号美国专利; Zalipsky, Bioconjugate Chemistry 4:296-299(1993); Zalipsky, FEBS Letters 353:71-74(1994); Zalipsky, 在 Stealth Liposomes Chapter 9(Lasic 和 Martin 编辑)CRC Press, Boca Raton FL(1995)中)。在一种途径中,用于使脂质颗粒靶向的配体,如抗体,被连接到形成脂质颗粒的脂质的极性头基。在另一种途径中,靶向配体连接到形成亲水性聚合物涂层的 PEG 链的远端末端(Klibanov 等, Journal of Liposome Research 2:321-334(1992); Kirpotin 等, FEBS Letters 388:115-118(1996))。

[0242] 可以使用用于偶联靶试剂的标准方法。例如,可以使用磷脂酰乙醇胺,其可以被激活以用于靶试剂的连接,或衍生化的亲脂性化合物,如脂质衍生的博莱霉素。可以使用,例如,整合蛋白 A 的脂质体构建抗体靶向的脂质体(见, Renneisen 等, J. Bio. Chem., 265 : 16337-16342(1990) 和 Leonetti 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87 : 2448-2451(1990)。6, 027, 726 号美国专利中公开了抗体偶联的其它的实例,其教导通过引用引入本文。靶向部分的实例还可以包括对细胞成分特异性的其它蛋白质,包括与赘生物或肿瘤相关的抗原。用作靶向部分的蛋白质可通过共价键连接到脂质体上(参见, Heath, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 149 Methods in Enzymology 111-119(Academic Press, Inc. 1987))。其它的靶向方法包括生物素-抗生物素蛋白系统。

[0243] 核酸-脂质颗粒的制备

[0244] 在一个实施方式中,本发明的核酸-脂质颗粒制剂是通过挤出法或在线混合方法产生的。

[0245] 挤出法(也称为预成型方法或批处理过程)是其中首先制备空脂质体(即无核酸),随后向空脂质体中加入核酸的方法。脂质体组合物通过小孔的聚碳酸酯膜或不对称陶瓷膜挤出导致相对明确定义的粒度分布。通常,悬浮液一次或多次地通过膜循环,直到获得所需的脂质体复合物的粒度分布。脂质体可以被继续地通过更小孔径的膜挤出以获得脂质体大小的逐渐减小。在某些情况下,形成的脂质-核酸组合物可不进行大小调整而使用。这些方法被公开于 US 5, 008, 050、US 4, 927, 637、US 4, 737, 323 ;Biochim Biophys Acta. 1979 Oct 19 ;557(1) :9-23 ;Biochim Biophys Acta. 1980 Oct 2 ;601(3) :559-7 ; Biochim Biophys Acta. 1986 Jun 13 ;858(1) :161-8和 Biochim. Biophys. Acta 1985 812, 55-65, 其以其全文通过引用引入本文。

[0246] 在线混合方法是其中脂质和核酸被平行添加到混合室中的方法。混合室可以是简单的 T 型连接管或本领域技术人员已知的任何其它的混合室。这些方法被公开于 6, 534, 018 号美国专利和 US 6, 855, 277、美国公开号 2007/0042031 和 Pharmaceuticals Research, Vol. 22, No. 3, Mar. 2005, 362-372 页中, 其以其全文通过引用引入本文。

[0247] 还需要了解,可以通过本领域的普通技术人员已知的任何方法制备本发明的制剂。

[0248] 核酸-脂质颗粒的鉴定

[0249] 由标准的或无挤出的方法制备的制剂可以以类似的方式鉴定。例如,制剂通常通过目视检查来鉴定。它们应该是不含聚集体或沉积物的发白的半透明溶液。使用例如 Malvem Zetasizer Nano ZS(Malvem, USA) 通过光散射测量脂质-纳米颗粒的颗粒大小和粒度分布。颗粒大小是约 20-300nm, 如在 40-100nm。颗粒的粒度分布应该是单峰的。使用染料排除法评估制剂中的总 siRNA 浓度以及捕获分数。在制剂破坏表面活性剂(例如, 0.5%的 Triton-X100) 存在或不存在的条件下,配制的 siRNA 的样品可以与 RNA 结合染料如 Ribogreen(Molecular Probe) 一起孵育。可以通过来自含有表面活性剂的样品的信号相对于标准曲线确定制剂中的总 siRNA。通过从总 siRNA 含量减去“游离的”siRNA 含量(如通过不存在表面活性剂的情况下的信号所测量的)确定捕获分数。捕获 siRNA 的百分比通常 > 85%。在一个实施方式中,本发明的制剂捕获至少 75%、至少 80%或至少 90%。

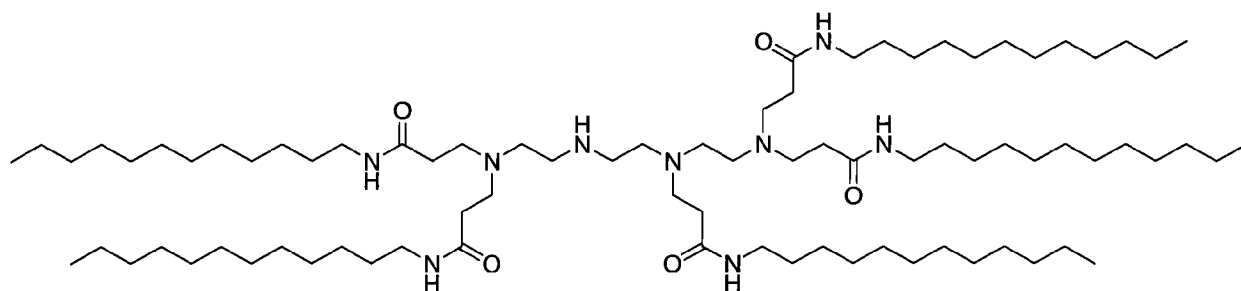
[0250] 对于核酸-脂质颗粒制剂,颗粒大小为至少 30nm, 至少 40nm, 至少 50nm, 至少

60nm, 至少 70nm, 至少 80nm, 至少 90nm, 至少 100nm, 至少 110nm 和至少 120nm。合适的范围通常是大约至少 50nm 至大约至少 110nm、大约至少 60nm 至大约至少 100nm 或约至少 80nm 至约至少 90nm。

[0251] LNP01

[0252] 合成核酸-脂质颗粒的一个实例如下。使用类脂质 (lipidoid) ND98 · 4HCl (MW 1487) (式 1)、胆固醇 (Sigma-Aldrich) 和 PEG-神经酰胺 C16 (Avanti Polar Lipids) 合成核酸-脂质颗粒。这一核酸-脂质颗粒有时也被称为 LNP01 颗粒。可以制备如下的各在乙醇中的原液: ND98, 133 毫克/毫升; 胆固醇, 25 毫克/毫升; PEG-神经酰胺 C16, 100 毫克/毫升。ND98、胆固醇和 PEG-神经酰胺 C16 原液然后可以以例如 42 : 48 : 10 的摩尔比合并。合并后的脂质溶液可与水性 siRNA (例如, 在 pH 值 5 的醋酸钠中) 混合, 以使得最终的乙醇浓度为大约 35-45%, 且最终的醋酸钠浓度为大约 100-300mM。脂质-siRNA 纳米微粒通常在混合时自发形成。根据所需粒度分布, 例如, 产生的纳米微粒混合物可以使用热桶 (thermobarrel) 挤出机 (如 Lipex 挤出机 (Northern Lipids, Inc)) 通过聚碳酸酯膜 (如 100nm 的截止值) 挤出。在某些情况下, 挤出步骤可以省略。例如, 可以通过透析或切向流过滤实现乙醇除去和同时的缓冲液交换。缓冲液可以与例如 pH 值大约 7 如 pH 值大约 6.9、pH 值大约 7.0、pH 值大约 7.1、pH 值大约 7.2、pH 值大约 7.3 或 pH 值大约 7.4 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 交换。

[0253]



ND98 异构体 I

式 I

[0254] 例如, 在国际申请公开 WO 2008/042973 中描述了 LNP01 制剂, 其通过参考引入本文。

[0255] 示例性的核酸-脂质颗粒制剂

[0256] 下表中描述了另外的示例性核酸-脂质颗粒制剂。可以理解, 表中的核酸脂质颗粒的名称并不意味着限制。例如, 本文所使用的术语 SNALP 是指包含阳离子脂质 DLinDMA 的制剂。

[0257]

名称	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇//PEG-脂质偶联物 mol %比率 脂质:siRNA 比率
SNALP	DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质:siRNA ~ 7:1
LNP-S-X	XTC/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质:siRNA ~ 7:1
LNP05	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA ~ 6:1
LNP06	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA ~ 11:1
LNP07	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA ~ 6:1

[0258]

LNP08	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA ~ 11:1
LNP09	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~ 10:1
LNP10	ALNY-100/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~ 10:1
LNP11	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~ 10:1
LNP12	C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~ 10:1
LNP13	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~ 33:1
LNP14	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 40/15/40/5 脂质:siRNA ~11:1
LNP15	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质:siRNA ~11:1
LNP16	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~7:1
LNP17	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~10:1
LNP18	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~12:1
LNP19	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/35/5 脂质:siRNA ~8:1

[0259]

LNP20	MC3/DSPC/胆固醇/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~10:1
LNP21	C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~7:1
LNP22	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA ~10:1

[0260] 在例如 2009 年 4 月 15 日提交的申请号 PCT/CA2009/00496 中描述了包含 DLinDMA 的制剂,如在 ALN-VSP02 中所使用的,该申请通过引用引入本文。

[0261] 在例如 2009 年 9 月 3 日提交的美国临时申请序列号 61/239,686 中描述了包含 XTC 的制剂,其通过引用引入本文。

[0262] 在例如 2009 年 9 月 22 日提交的美国临时申请序列号 61/244,834 和 2009 年 6 月 10 日提交的美国临时申请序列号 61/185,800 中描述了包含 MC3 的制剂,其通过引用引入本文。

[0263] 在例如,2009 年 11 月 10 日提交的国际专利申请号 PCT/US09/63933 中描述了包含 ALNY-100 的制剂,其通过引用引入本文。

[0264] 在 2010 年 5 月 5 日提交的国际专利申请号 PCT/US10/33777 中和在 Love 等 (Love 等 (2010)PNAS 107(5);1864-69) 中描述了包含 C12-200 的制剂,其通过引用引入本文。

[0265] 另外的制剂

[0266] 乳剂

[0267] 本发明的组合物可以制备并配制成乳剂。乳剂一般为一种液体以直径通常超过 0.1 μm 的小液滴形式分散在另一种液体中的异质体系 (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 199 页; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 245 页; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 2 卷, 第 335 页; Higuchi 等人, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, 第 301 页)。乳剂通常是包含彼此紧密混合并相互分散的 2 种不混溶液相的双相系统。通常,乳剂可以为油包水 (w/o) 或水包油 (o/w) 的种类。当水相细分并作为微小液滴分散到大块油相中时,所产生的组合物被称为油包水 (w/o) 乳剂。可选择地,当油相细分并作为微小液滴分散到大块水相中时,所产生的组合物被称为水包油 (o/w) 乳剂。除了分散相和活性药物 (其可以作为在水相、油相中的溶液,或者以其自身作为独立相存在) 外,乳剂还可以包含其他组分。如果需要,乳剂中也可以存在药物赋形剂如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂。药物乳剂也可以为由多于两种的相组成的多重乳剂,如油包水包油 (o/w/o) 和水包油包水 (w/o/w) 乳剂的情况。这种复杂的制剂通常具有某些简单的二相乳剂所不具有的优势。其中 o/w 乳剂的

单个油滴还包有小水滴的多重乳剂形成 w/o/w 乳剂。同样地,在油连续相中稳定的小水珠中包封小油滴的系统构成 o/w/o 乳剂。

[0268] 乳剂特征在于具有较小或没有热力学稳定性。通常,乳剂的分散相或不连续相很好地分散在外相或连续相中并通过乳化剂或制剂的粘性保持这种形式。乳剂的任一相可以为半固体或固体,如在乳剂型软膏基质或乳膏剂的情况中。其他稳定乳剂的方式需要使用可以引入到乳剂的任一相中的乳化剂。乳化剂可以宽泛地分成四种类型:合成的表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收基质和良好分散的固体 (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 199 页)。

[0269] 已经发现合成的表面活性剂,也称为表面活性试剂,在乳剂制剂中有广泛应用,并且已经在文献中进行了综述 (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 285 页; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (编辑), Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, 第 1 卷, 第 199 页)。表面活性剂通常是两性的,且包含亲水部分和疏水部分。表面活性剂的亲水和疏水性的比率称为亲水 / 疏水平衡 (HLB),它是制剂制备过程中分类和选择表面活性剂的重要工具。表面活性剂可以根据亲水基团的性质分成不同的类型:非离子型、阴离子型、阳离子型和两性离子型 (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 285 页)。

[0270] 用于乳剂制剂中的自然存在的乳化剂包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯树胶。吸收基质具有亲水特性,所以它们能够吸取水以形成 w/o 乳剂并仍然保持它们的半固体稠度,如无水羊毛脂和亲水凡士林。细分的固体也已经被用做优良的乳化剂,尤其是与表面活性剂组合和在粘性制品中使用。这些包括极性无机固体如重金属氢氧化物,不溶胀的粘土如斑脱土 (bentonite)、绿坡缕石 (attapulgitite)、锂蒙脱石、高岭土、蒙脱石、胶状硅酸铝和胶状硅酸镁铝,色素和非极性固体如碳或三硬脂酸甘油酯。

[0271] 在乳剂剂型中还包含多种非乳化物质,它们影响乳剂的性质。这些非乳化物质包括脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、湿润剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂 (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 335 页; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 199 页)。

[0272] 亲水胶体或水胶体包括天然存在的树胶和合成的聚合物如多糖 (如阿拉伯树胶、琼脂、褐藻酸、角叉菜胶、瓜耳胶、刺梧桐树胶和黄蓍胶),纤维素衍生物 (如羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)和合成的聚合物 (如卡波姆、纤维素醚和羧基乙烯基聚合物)。这些物质在水中分散或溶胀以形成胶状溶液,其通过在分散相小滴周围形成强的界面膜层并通过增强外相的粘度来稳定乳剂。

[0273] 由于乳剂通常包含多种可以容易地支持微生物生长的成分 (如碳水化合物、蛋白质、甾醇和磷脂),所以这些制剂通常含有防腐剂。乳剂制剂中包括的通常使用的防腐剂包括对羟基苯甲酸甲基酯、对羟基苯甲酸丙基酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸酯和硼酸。

通常也将抗氧化剂加入到乳剂制剂中,以预防制剂的变质。所用的抗氧化剂可以为自由基清除剂如生育酚、没食子酸烷基酯、丁基化的羟基茴香醚、丁基化的羟基甲苯,或还原剂如抗坏血酸和偏亚硫酸氢钠,以及抗氧化剂协同剂如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0274] 乳剂制剂通过皮肤的、口腔的和肠胃外途径的应用和它们的生产方法已经在文献 (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 199 页) 中进行了综述。因为配制简单并且在吸收和生物利用度方面的效能,经口递送的乳剂制剂已经被广泛使用 (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 245 页; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 199 页)。矿物油基的缓泻药、油溶性的维生素和高脂营养制品属于通常作为 o/w 乳剂经口施用的物质。

[0275] 在本发明的一个实施方式中, dsRNA 与核酸的组合物被制成微乳剂。微乳剂可以定义为水、油和两亲物质的体系,它是单一的光学各向同性的和热力学稳定的液体溶液 (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 245 页)。典型地,微乳剂是通过如下方法制备的体系,首先将油分散到水性表面活性剂溶液中,然后加入足量的第四组分(通常为中等链长度的醇)而形成透明体系。因此,微乳剂也被描述成由表面活性分子的界面膜稳定的两种不混溶液体的热力学稳定的各向同性的澄清分散体 (Leung 和 Shah, in: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, 第 185-215 页)。通常微乳剂通过 3 至 5 种组分的组合(包括油、水、表面活性剂、辅助表面活性剂和电解质)来制备。微乳剂是油包水 (w/o) 型还是水包油 (o/w) 型取决于所使用的油和表面活性剂的性质以及表面活性剂分子的极性头部和烃尾部的结构和几何包装 (Schott, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, 第 271 页)。

[0276] 已经广泛地研究了利用相图的现象学方法,并且产生了对于本领域技术人员来说容易理解的关于如何配制微乳剂的知识 (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 245 页; Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger 和 Banker (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 第 1 卷, 第 335 页)。与常规乳剂相比,微乳剂的优点是能将水不溶性药物溶解到同时形成的热力学稳定的液滴制剂中。

[0277] 微乳剂制备中所使用的表面活性剂包括但不限于单独的或与辅助表面活性剂组合使用的离子表面活性剂、非离子表面活性剂、Brij 96、聚氧乙烯油基醚、聚脂肪酸甘油酯、单月桂酸四甘油酯 (ML310)、单油酸四甘油酯 (M0310)、单油酸六甘油酯 (P0310)、五油酸六甘油酯 (P0500)、单癸酸十甘油酯 (MCA750)、单油酸十甘油酯 (M0750)、倍半油酸 (sequioleate) 十甘油酯 (S0750)、十油酸十甘油酯 (DA0750)。所述辅助表面活性剂通常是短链醇(如乙醇、1-丙醇和 1-丁醇),其作用是通过渗透到表面活性剂膜中并因此由于表面活性剂分子间产生的空余空间从而产生无序膜而提高界面流动性。然而,微乳剂可以不用辅助表面活性剂进行制备,并且无醇的自乳化微乳剂体系是本领域已知的。典型地,水相

可以是（但不限于）水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇和乙二醇的衍生物。油相可以包括但不限于如 Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯、中等链（C8-C12）的单、二和三-甘油酯、聚氧乙基化的甘油脂肪酸酯、脂肪醇，聚二醇化的甘油酯、饱和的聚二醇化的 C8-C10 甘油酯、植物油和硅油。

[0278] 从药物溶解度和增强的药物吸收方面看，微乳剂是特别令人感兴趣的。已经提议使用基于脂质的微乳剂（o/w 和 w/o 两者）以增强包括肽在内的药物的口服生物利用度（Constantinides 等人，Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390 ; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205）。微乳剂具有以下优势：提高药物溶解度，防止药物受到酶的水解，可能由于表面活性剂导致的膜流动性和渗透性的改变而增强药物的吸收，制备简单，比固体剂型更容易口服施用，临床效能提高和毒性降低（Constantinides 等人，Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385 ; Ho 等人，J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143）。通常，微乳剂可以在其成分在环境温度下混合在一起时自发地形成。当配制热不稳定的药物、肽或 dsRNA 时，这可能特别有利。在化妆品和药物应用领域，微乳剂有效地用于透皮递送活性组分。我们期望本发明的微乳剂组合物和制剂会有利于提高 dsRNA 和核酸从胃肠道的系统吸收，并提高 dsRNA 和核酸的局部细胞摄取。

[0279] 本发明的微乳剂还可以包含其他成分和添加剂如山梨聚糖单硬脂酸酯（Gri113）、Labrasol 和渗透增强剂，以提高制剂的性能并增强本发明的 dsRNA 和核酸的吸收。本发明的微乳剂中使用的渗透增强剂可以分成五大类中的一种：表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合的非表面活性剂（Lee 等人，Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 第 92 页）。各个类型都已经在以上进行了讨论。

[0280] 渗透增强剂

[0281] 在一个实施方式中，本发明使用各种渗透增强剂以实现核酸尤其是 dsRNA 至动物皮肤的有效递送。大多数药物以离子和非离子的形式存在于溶液中。然而，通常只有脂溶性的或亲脂的药物可容易地穿过细胞膜。已经发现，如果用渗透增强剂处理要穿过的细胞膜，甚至连非亲脂性药物都可以穿过细胞膜。除了帮助非亲脂药物穿过细胞膜的扩散外，渗透增强剂也能增强亲脂性药物的渗透性。

[0282] 渗透增强剂可以归类为属于 5 大类之一，即表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合的非表面活性剂（Lee 等人，Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 第 92 页）。在下面对各类以上提及的渗透增强剂进行详细描述。

[0283] 表面活性剂：在本发明的上下文中，表面活性剂（或“表面活性试剂”）为化学实体，当其溶解在水性溶液中时，它降低溶液的表面张力或者水性溶液和另一种液体之间的界面张力，结果是 dsRNA 通过粘膜的吸收得到增强。除了胆汁盐和脂肪酸之外，这些渗透增强剂还包括例如月桂基硫酸钠、聚氧乙烯基-9-月桂基醚和聚氧乙烯基-20-鲸蜡基醚（Lee 等人，Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 第 92 页），以及全氟化合物乳剂如 FC-43（Takahashi 等人，J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252）。

[0284] 脂肪酸：用作渗透增强剂的各种脂肪酸和它们的衍生物包括，例如油酸、月桂酸、癸酸（正癸酸）、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油一油酸酯（1-单油酰-rac-甘油）、二月桂精、辛酸、花生四烯酸、甘油 1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉毒碱、酰基胆碱、它们的 C₁₋₁₀ 烷基酯（如甲基、异丙基和叔丁基酯）

和它们的甘油单酯和甘油二酯（即油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等）(Lee 等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 第 92 页; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri 等人, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654)。

[0285] 胆汁盐: 胆汁盐的生理作用包括促进脂质和脂溶性维生素的分散和吸收 (Brunton, 第 38 章; Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第 9 版, Hardman 等人编著, McGraw-Hill, New York, 1996, 第 934-935 页)。各种天然胆汁盐和它们的合成衍生物作为渗透增强剂起作用。因此术语“胆汁盐”包括任何胆汁中天然存在的成分和任何它们的合成衍生物。合适的胆汁盐包括例如胆酸（或其药理学上可接受的钠盐, 胆酸钠）、脱氢胆酸（脱氢胆酸钠）、脱氧胆酸（脱氧胆酸钠）、甘胆酸（甘胆酸钠）、甘氨酸胆酸（甘氨酸胆酸钠）、甘氨酸脱氧胆酸（甘氨酸脱氧胆酸钠）、牛磺胆酸（牛磺胆酸钠）、牛磺脱氧胆酸（牛磺脱氧胆酸钠）、鹅脱氧胆酸（鹅脱氧胆酸钠）、熊脱氧胆酸 (UDCA)、牛磺-24, 25-二氢-梭链孢酸钠 (STDHF)、甘氨酸二氢梭链孢酸钠和聚氧乙烯-9-月桂基醚 (POE) (Lee 等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 第 92 页; Swinyard, 第 39 章 In: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版, Gennaro 编辑, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, 第 782-783 页; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto 等人, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita 等人, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583)。

[0286] 螯合剂: 本发明所使用的螯合剂可以定义为通过与金属离子形成复合物将其从溶液中除去的化合物, 结果是加强 dsRNA 通过粘膜的吸收。关于它们在本发明中作为渗透增强剂的应用, 因为大多数鉴定的 DNA 核酸酶需要二价金属离子用于催化反应而因此受到螯合剂的抑制, 螯合剂还具有作为 DNase 抑制剂的附加优势 (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339)。合适的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)、柠檬酸、水杨酸盐（如水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸盐和高香草酸盐）、胶原的 N-酰基衍生物、月桂醇聚醚 (laureth)-9 和 β -二酮的 N-氨基酰基衍生物（烯胺）(Lee 等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 第 92 页; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur 等人, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51)。

[0287] 非整合的非表面活性剂: 如本文所使用的, 非整合的非表面活性剂渗透增强化合物可以定义为显示出不显著的螯合剂或表面活性剂的活性但是仍可增强 dsRNA 通过消化道粘膜的吸收的化合物 (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33)。这类渗透增强剂包括例如不饱和环脲、1-烷基-和 1-链烯基氮杂环-烷酮衍生物 (Lee 等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 第 92 页), 以及非甾族抗炎剂如双氯芬酸钠、吲哚美辛和苯基丁氮酮 (Yamashita 等人, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626)。

[0288] 增强 dsRNA 在细胞水平上的摄取的试剂也可以加入到本发明的药物组合物和其他组合物中。例如, 已知阳离子脂质如 lipofectin (Junichi 等人, 美国专利号 5, 705, 188)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子如聚赖氨酸 (Lollo 等人, PCT 申请 WO 97/30731) 也增强 dsRNA 的细胞摄取。

[0289] 其他试剂也可以用于增强所施用的核酸的渗透,包括二醇类(如乙二醇和丙二醇)、吡咯类(如 2-吡咯)、氮酮类(azones)和萜类(如苧烯和薄荷酮)。

[0290] 载体

[0291] 本发明的 dsRNA 可以配制成药学上可接受的载体或稀释剂。“药学上可接受的载体”(本文也称为“赋形剂”)是药学上可接受的溶剂、悬浮剂或其他任何药用惰性媒介。药学上可接受的载体可以是液体或固体,且可以考虑预计的给药方式对其进行选择以提供理想的体积、稠度以及其他相关的转运和化学性质。典型的药学上可接受的载体包括(举例来说),但不限于:水,盐溶液,粘合剂(例如,聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素),填料(如乳糖和其他糖类、明胶或硫酸钙),润滑剂(例如,淀粉、聚乙二醇或醋酸钠);崩解剂(如淀粉或淀粉乙醇酸钠)和润湿剂(如月桂基硫酸钠)。

[0292] 本发明的某些组合物还在制剂中引入载体化合物。如本文所使用的,“载体化合物”或“载体”可以指核酸或其类似物,它是惰性的(即本身不具有生物活性),但却被降低具有生物活性的核酸的生物利用度(例如通过降解生物活性核酸或促进其从循环系统中除)的体内过程识别为核酸。核酸和载体化合物的共同施用(典型的是后一种物质过量)能够导致从肝、肾或其他循环外脏器中回收的核酸量显著减少,据推测原因是载体化合物和核酸之间竞争共同的受体。例如,当与聚肌苷酸、葡聚糖硫酸酯、聚胞嘧啶核苷酸(polycytidic acid)或 4-乙酰胺基-4'-异硫氰基-芪-2,2-二磺酸共同施用,可以减少部分地硫代磷酸酯化的 dsRNA 在肝组织中的回收(Miyao 等人, *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura 等人, *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183)。

[0293] 赋形剂

[0294] 与载体化合物相比,“药物载体”或“赋形剂”是用于向动物递送一种或多种核酸的药学上可接受的溶剂、悬浮剂或任何其他药学惰性媒介。所述赋形剂可以是液体或固体,且考虑预计的给药方式进行选择以在与核酸和特定药物组合物的其他组分组合时提供理想的体积、稠度等。典型的药物载体包括但不限于粘合剂(如预胶化的玉米淀粉、聚乙烯基吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等),填料(如乳糖和其他糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等),润滑剂(如硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶状二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸金属盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等),崩解剂(如淀粉、淀粉乙醇酸钠等),和湿润剂(如月桂基硫酸钠等)。

[0295] 不与核酸发生有害反应的、适合于肠胃外施用的药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用来配制本发明的组合物。合适的药学上可接受的载体包括但不限于水、盐溶液、醇类、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮等。

[0296] 用于局部施用核酸的制剂可以包括在普通溶剂(如醇类)中的无菌或非无菌的水性溶液、非水性溶液,或者核酸在液体或固体油基质中的溶液。该溶液还可以包含缓冲剂、稀释剂和其他合适的添加剂。可以使用不与核酸发生有害反应的、适合于非肠胃外施用的药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0297] 合适的药学上可接受的赋形剂包括但不限于是:水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮等。

[0298] 其它成分

[0299] 本发明的组合物可以另外包含其他以本领域熟知的使用水平在药物组合物中常用的辅助组分。因此,例如组合物可以包含额外的、相容性的药学活性物质如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可以包含可用于物理配制本发明组合物的各种剂型的其他物质,如染料、芳香剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,当加入这类物质时,它们不应当过度干扰本发明组合物的成分的生物活性。该制剂可以进行灭菌,并且如果需要的话,可以与助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于调节渗透压的盐、缓冲剂、着色物质、调味剂和 / 或芳香物质等混合,它们不与制剂中的核酸发生有害的相互作用。

[0300] 水性悬浮液可以包含提高悬浮液粘性的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和 / 或葡聚糖。悬浮液还可以包含稳定剂。

[0301] 联合治疗

[0302] 一方面,本发明的组合物例如, ALN-VSP02 可以用于联合治疗。术语“联合治疗”包括施用进一步与其他生物活性成分(例如,但不限于,第二和不同的抗肿瘤剂)和非药物治疗法(例如,但不限于手术或放射治疗)结合施用对象化合物。例如,本发明的化合物可以与其他药学活性化合物、优选能够提高本发明的化合物的效果的化合物结合使用。本发明的化合物可以与其他药物治疗同时施用(作为单一制剂或单独的制剂)或顺序施用。一般地,联合治疗包括在治疗的单个周期或疗程中施用两种或多种药物。

[0303] 在本发明的一个方面,对象化合物可以与一种或多种调节涉及各种疾病状态的蛋白激酶的单独药剂结合施用。这种激酶的例子可以包括但不限于:丝氨酸 / 苏氨酸特异性激酶、受体酪氨酸特异性激酶和非受体酪氨酸特异性激酶。丝氨酸 / 苏氨酸激酶包括有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK)、减数分裂特异性激酶 (MEK)、RAF 和极光激酶 (aurora kinase)。受体激酶家族的例子包括表皮生长因子受体 (EGFR) (例如, HER2/neu、HER3、HER4、ErbB、ErbB2、ErbB3、ErbB4、Xmrk、DER、Let23), 成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体 (例如, FGF-R1、GFF-R2/BEK/CEK3、FGF-R3/CEK2、FGF-R4/TKF、KGF-R), 肝细胞生长 / 离散因子受体 (HGFR) (例如, MET、RON、SEA、SEX)、胰岛素受体 (例如, IGF1-R), Eph (例如, CEK5、CEK8、EBK、ECK、EEK、EHK-1、EHK-2、ELK、EPH、ERK、HEK、MDK2、MDK5、SEK), AxI (例如, Mer/Nyk、Rse), RET 和血小板源生长因子受体 (PDGFR) (例如, PDGF α -R、PDGF β -R、CSF1-R/FMS、SCF-R/C-KIT、VEGF-R/FLT、NEK/FLK1、FLT3/FLK2/STK-1)。非受体酪氨酸激酶家族包括但不限于 BCR-ABL (例如, p43^{abl}、ARG), BTK (例如, ITK/EMT、TEC), CSK、FAK、FPS、JAK、SRC、BMX、FER、CDK 和 SYK。

[0304] 在本发明的另一方面,对象化合物可以与一种或多种调节非激酶的生物靶标或过程的试剂结合施用。这些靶标包括组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC)、DNA 甲基转移酶 (DNMT)、热休克蛋白 (例如, HSP90) 以及蛋白体。

[0305] 在一个实施方式中,对象化合物可与抑制一种或多种生物靶标的抗肿瘤药(例如,小分子、单克隆抗体、反义 RNA 和融合蛋白)结合,如伏立诺他胶囊 (Zolinza)、它赛瓦 (Tarceva)、易瑞沙 (Iressa)、泰克泊 (Tykerb)、格列卫 (Gleevec)、索坦 (Sutent)、扑瑞赛 (Sprycel)、多吉美 (Nexavar)、索拉非尼 (Sorafenib)、CNF2024、RG108、BMS387032、Affmitak、阿瓦斯汀 (Avastin)、赫赛汀 (Herceptin)、爱必妥 (Erbix)、AG24322、PD325901、ZD6474、PD 184322、Obatodax、ABT737 和 AEE788 的。这样的组合可以获得与单

独的任何试剂所取得的疗效相比增强的疗效,且可以防止或延缓抗药性突变变种的出现。

[0306] 在某些优选实施方式中,本发明的化合物结合化疗药物施用。化疗药物包括肿瘤领域内的宽范围的治疗性处理。出于缩小肿瘤、消灭手术后剩余的残留癌细胞、诱导症状消退、维持症状消退和/或减轻与癌症或其治疗相关的症状的目的,在疾病的不同阶段施用这些药剂。这类药剂的例子包括但不限于:烷基化剂如芥子气衍生物(氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑、异环磷酰胺)、乙撑亚胺(ethylenimine)(噻替哌、六甲基蜜胺(hexamethylmelanin))、烷基磺酸酯(白消安)、胍和三嗪(克瘤灵(Altretamine)、甲基苄胍、氮烯唑胺和替莫唑胺)、亚硝基脲(卡氮芥、洛莫司汀和链脲菌素)、异环磷酰胺和金属盐(卡铂、顺铂、奥沙利铂);植物生物碱,例如鬼臼毒素(Podophyllotoxin)(依托泊苷和 Tenisopide)、紫杉烷类(紫杉醇和多西紫杉醇)、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨)和喜树碱(Camptothecin)类似物(伊立替康(Irinotecan)和拓扑替康(topotecan));抗肿瘤抗生素,如色霉素(更生霉素和普卡霉素(Plicamycin))、蒽环类(多柔比星、柔红霉素、表柔比星、米托蒽醌、戊柔比星(Valrubicin)和依达比星)和各种抗生素,如丝裂霉素、放线菌素和博莱霉素;抗代谢物,如叶酸拮抗剂(甲氨蝶呤、培美曲塞(Pemetrexed)、雷替曲塞(Raltitrexed)、氨基喋呤(Aminopterin))、嘧啶拮抗剂(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、卡培他滨和吉西他滨)、嘌呤拮抗剂(6-巯基嘌呤和6-巯鸟嘌呤)及腺苷脱氨酶抑制剂(克拉屈滨、氟达拉滨、巯嘌呤、氯法拉滨、巯鸟嘌呤、奈拉滨(nelarabine)和喷司他丁);拓扑异构酶抑制剂如拓扑异构酶 I 抑制剂(伊立替康(irinotecan)、拓扑替康)和拓扑异构酶 II 抑制剂(安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷);单克隆抗体(阿仑单抗、吉妥珠单抗奥唑米星(Gemtuzumab ozogamicin)、美罗华、曲妥珠单抗(trastuzumab)、替伊莫单抗(Ibritumomab Tioxetan)、西妥昔单抗、帕尼单抗(panitumumab)、托西莫单抗(Tositumomab)、贝伐单抗(bevacizumab);和各种抗肿瘤药,如核苷酸还原酶抑制剂(羟基脲);肾上腺皮质类固醇抑制剂(米托坦);酶(天冬酰胺酶和培门冬酶);抗微管药物(雌莫司汀);和类维生素 A(蓓萨罗丁(Bexarotene)、异维 A 酸、维甲酸(ATRA))。在某些优选的实施方式中,本发明的化合物与化疗保护剂结合施用。化疗保护剂发挥作用以保护身体或减少化疗的副作用。这类药剂的例子包括但不限于阿米福汀(amfostine)、美司钠(mesna)和右雷佐生(dexrazoxane)。

[0307] 在本发明的一个方面,对象化合物与放射治疗结合施用。通常利用光子(X射线或伽玛射线)或粒子辐射的机器从内部(靠近癌症位点植入放射性材料)或从外部传送辐射。在联合治疗还包括放射治疗的情况下,可在任何适当的时间进行放射治疗,只要由治疗药物和放射治疗的共同作用实现有益的效果。例如,在合适的情况下,当暂时将放射治疗与治疗药物施用分开(可能数天甚至数周)时,仍然取得有益的作用。

[0308] 可以理解,本发明的化合物可以与免疫治疗剂结合使用。免疫治疗的一种形式是通过在远离肿瘤的位置施用疫苗组合物产生宿主源的主动全身性肿瘤特异性免疫反应。已经提出各种不同类型的疫苗,包括分离的肿瘤抗原疫苗和抗个体基因型疫苗。另一种方法是利用来自待治疗的受试者的肿瘤细胞或者这种细胞的衍生体(Schirrmacher 等人(1995) J. Cancer Res. Clin. Oncol. 121:487 综述)。在美国专利 5,484,596 中, Hanna Jr. 等人要求保护用于处理可切除的癌以防止肿瘤复发或转移的方法:包括手术去除肿瘤,用胶原酶分散细胞,照射细胞,并用至少三次大约 10^7 个细胞的连续剂量对患者进行免疫。

[0309] 可以理解,本发明的化合物可以有利地与一种或多种辅助治疗药物结合使用。合适的用于辅助治疗的药物的例子包括:类固醇类,例如皮质类固醇(安西缩松、倍他米松、倍他米松二丙酸酯、倍他米松戊酸酯、布地奈德、氯倍他索、氯倍他索醋酸酯、氯倍他索丁酸酯、氯倍他索 17-丙酸酯、可的松、地夫可特、去羟米松、二氟米松戊酸酯、地塞米松、地塞米松磷酸钠、地索奈德糠酸酯、醋酸氟轻松、氟轻松、哈西缩松、氢化可的松、氢化可的松丁酸酯、氢化可的松琥珀酸钠、氢化可的松戊酸酯、甲基强的松龙、莫米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、曲安西龙、丙炎松和卤贝他索丙酸酯(Halobetasol Propionate));5HT₁激动剂,如曲坦(triptan)(如舒马曲坦或那拉曲坦);腺苷 A₁激动剂;EP配体;NMDA调节剂,如甘氨酸拮抗剂;钠通道阻滞剂(如拉莫三嗪);P物质拮抗剂(如NK₁拮抗剂);大麻类物质;对乙酰氨基酚或非那西丁;5-脂氧合酶抑制剂;白三烯受体拮抗剂;DMARD(如甲氨蝶呤);加巴喷丁和相关化合物;三环抗抑郁剂(如阿米替林)、神经元稳定抗癫痫药物;单胺能摄取抑制剂(如文拉法辛);基质金属蛋白酶抑制剂;一氧化氮合酶(NOS)抑制剂,如iNOS或nNOS抑制剂;肿瘤坏死因子 α 的释放或活性抑制剂;抗体治疗,如单克隆抗体治疗;抗病毒剂,如核苷抑制剂(如拉米夫定)或免疫系统调节剂(如干扰素);阿片类止痛剂;局部麻醉剂;兴奋剂,包括咖啡因;H₂-拮抗剂(如雷尼替丁);质子泵抑制剂(如奥美拉唑);抗酸剂(如氢氧化铝或氢氧化镁);抗气胀药(antiflatulent)(如二甲基硅油)、减充血剂(如苯肾上腺素、苯丙醇胺、伪麻黄碱、羟甲唑啉、肾上腺素、萘唑啉、丁苄唑啉、丙己君(propylhexedrine)或左旋去氧麻黄碱);镇咳药(如可待因、氢可酮、卡拉米芬(carmiphen)、妥克拉司或右美沙芬);利尿剂;或镇静和非镇静抗组胺药。

[0310] 本发明的化合物可以与靶向于其他基因的siRNA共同施用。例如,本发明的化合物可以与靶向于c-Myc基因的siRNA共同施用。例如,AD-12115可以与c-Myc siRNA共同施用。在美国专利申请12/373,039中公开了靶向c-Myc的siRNAs的例子,其通过引用引入本文中。

[0311] 药代动力学

[0312] 本发明特别地涉及治疗需要治疗的受试者的方法,其中向受试者施用ALN-VSP02的组合物,从而在受试者的血浆中产生可测量的C_{max}和AUC。本发明还涉及用于治疗需要治疗的受试者的ALN-VSP02组合物,其中向受试者施用ALN-VSP02组合物在受试者的血浆中产生可测量的C_{max}和AUC。对于ALN-VSP02组合物的VEGF和KSP siRNA成分,C_{max}和AUC是可测量的。

[0313] C_{max}被定义为施用药剂后药物的峰值血浆浓度。它是将组合物施用于受试者后,组合物或者药物进入受试者血流的血浆中的生物利用度和吸收率的指示。本领域的技术人员应了解,将组合物施用到受试者后,通过在不同时间点获取病人血液的多个样品和测量各样品中组合物的血浆浓度来测定C_{max}。在本发明的一个实施方式中,C_{max}与剂量浓度线性相关。在一个方面,受试者血浆中VEGF或KSP siRNA的平均C_{max}是在0.4至13 μ g/mL之间,该C_{max}范围与0.1至0.7mg/kg范围内的静脉内施用剂量线性相关。在某些情况下,VEGF或KSP siRNA的平均C_{max}在约0.4至1 μ g/mL、1.8至3 μ g/mL、2至5 μ g/mL或5至14 μ g/mL的范围内。在其它情况下,VEGF或KSP siRNA的平均C_{max}值大于13 μ g/mL。下面的表格和实施例提供了平均C_{max}值的值和在ALN-VSP02组合物的不同剂量下的范围。

[0314] AUC是指向病人施用药物后,血流的血浆中药物或组合物的浓度随时间变化的曲

线的曲线下面积。它受药物或组合物吸收到病人血液的血浆中的速率和从其中清除的速率的影响。如本领域的技术人员所知道的,可以在施用组合物后,通过计算血浆组合物浓度的积分测定 AUC。在另一个方面,可以用下列公式预测 AUC:

[0315] 预测的 $AUC = (D \times F) / CL$

[0316] 其中 D 是剂量浓度, F 是生物利用度的量度,和 CL 为预测清除率。在本发明的一个实施方式中,对于静脉内给药的 F 大约为 1,和在正常人体内预测的平均 CL 约是 1.21ml/(min*kg)。本领域的技术人员应理解,预测的 AUC 值有 $\pm 3-4$ 倍范围的误差。

[0317] 在一些实施方式中,施用组合物后,通过以各种不同的时间间隔从病人获取血液样品来获得用于测定 AUC 的数据。在一个方面,施用 ALN-VSP02 组合物后病人血浆中的平均 AUC 在约 10 至 800 $\mu g \cdot \text{min} / \text{mL}$ 的范围内。在某些情况下,ALN-VSP02 组合物的平均 AUC 在约 10 至 50 $\mu g \cdot \text{min} / \text{mL}$ 、85 至 200 $\mu g \cdot \text{min} / \text{mL}$ 、160 至 250 $\mu g \cdot \text{min} / \text{mL}$ 或 300 至 800 $\mu g \cdot \text{min} / \text{mL}$ 的范围内。在其它情况下,ALN-VSP02 组合物的平均 AUC 大于 800 $\mu g \cdot \text{min} / \text{mL}$ 。下面的表格和实施例提供了平均 AUC 值的值和 ALN-VSP02 组合物的各种不同剂量下的范围。

[0318] 应该理解,由于涉及新陈代谢和 / 或与其它治疗药物的可能相互作用方面的变异性,组合物如 ALN-VSP02 的血浆浓度在受试者之间可能会有明显的变化。根据本发明的一个方面,化合物如 ALN-VSP02 的血浆药浓度可能在受试者与受试者之间发生变化。同样,如最大血浆浓度 (C_{max}) 或达到最大血浆浓度的时间 (T_{max}) 或者从时间零点到最后可测量浓度的时间的曲线下面积 ($AUC_{\text{最后}}$) 或血浆浓度时间曲线下的总面积 (AUC) 的值在受试者与受试者之间可能发生变化。由于这种变异性,构成“治疗有效量的”化合物如 ALN-VSP02 所需的量在受试者与受试者之间可能发生变化。

[0319] 用于治疗 Eg5 和 VEGF 基因表达引起的疾病的方法

[0320] 本发明尤其涉及包含至少两种 dsRNA (一种靶向于 Eg5/KSP 基因,和一种靶向于 VEGF 基因) 的组合物如 ALN-VSP02 等用于治疗癌症 (例如肝癌) 的用途,例如用于抑制肿瘤生长和肿瘤转移。例如,组合物 (如药物组合物) 可以用于治疗实体瘤如肝内肿瘤,例如可能发生在肝脏癌症中的肝内肿瘤。

[0321] 包含靶向于 Eg5/KSP 的 dsRNA 和靶向于 VEGF 的 dsRNA 的组合物也可以用于治疗其他肿瘤和癌症,如乳腺癌、肺癌、头颈癌、脑癌、腹腔癌、结肠癌、结肠直肠癌、食管癌、胃肠癌、神经胶质瘤、舌癌、神经母细胞瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、威尔姆氏肿瘤、多发性骨髓瘤,以及用于治疗皮肤癌如黑色素瘤,用于治疗淋巴瘤和血癌。本发明还涉及包含 Eg5 dsRNA 和 VEGF dsRNA 的组合物用于在不同类型的癌症中抑制腹水液体和胸腔积液的聚积的用途,例如肝癌、乳腺癌、肺癌、头部癌、颈部癌、脑癌、腹腔癌、结肠癌、结肠直肠癌、食管癌、胃肠癌、神经胶质瘤、舌癌、神经母细胞瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、威尔姆氏肿瘤、多发性骨髓瘤、皮肤癌、黑色素瘤、淋巴瘤和血癌。由于对 Eg5 和 VEGF 表达的抑制作用,本发明的组合物或由其制备的药物组合物可以提高生活质量。

[0322] 在一个实施方式中,治疗患有与 AFP 的表达相关的肿瘤或分泌 AFP 的肿瘤 (例如肝细胞瘤或畸胎瘤) 的患者。在某些实施方式中,患者患有恶性畸胎瘤、内胚窦瘤 (卵黄囊癌)、神经母细胞瘤、肝胚细胞瘤、肝细胞癌、睾丸癌或卵巢癌。

[0323] 在再另一个方面,本发明提供了一种用于抑制哺乳动物中 Eg5 基因和 VEGF 基因的

表达的方法。该方法包括向哺乳动物施用具有本发明特征的组合以減少靶 Eg5 基因和靶 VEGF 基因的表达。

[0324] 本发明还涉及 dsRNA 或其药物组合物例如, ALN-VSP02 用于例如与其他药物和 / 或其他治疗方法结合 (如与已知的药物和 / 或已知的治疗方法, 如那些目前所应用于治疗癌症和 / 或用于防止肿瘤转移的方法结合) 治疗癌症或用于防止肿瘤转移的用途。优选的是与放射治疗和化疗剂如顺铂、环磷酰胺、5- 氟尿嘧啶、阿霉素、柔红菌素或它莫西芬结合。

[0325] 本发明还可以通过包括特定的 RNAi 剂, 与另一种抗肿瘤化疗剂 (如任何常规化疗剂) 组合实施。特定结合剂与这类其他药剂的组合可以加强化学治疗方案。熟练的技术人员容易想到能引入到本发明的方法中的许多化学治疗方案。可以使用任何化学治疗剂, 包括烷基化剂、抗代谢物、激素和拮抗剂、放射性同位素以及天然物质。例如, 本发明的化合物可以与抗生素 (如阿霉素) 和其他葱环类似物、氮芥类 (如环磷酰胺)、嘧啶类似物 (如 5- 氟尿嘧啶)、顺铂、羟基脲、紫杉醇以及它的天然的和合成的衍生物等一起施用。作为另一个例子, 在其中肿瘤包括促性腺素依赖性细胞和非促性腺素依赖性细胞的混合肿瘤 (如乳腺的腺癌) 的情况下, 化合物可以与亮丙瑞林或戈舍瑞林 (LH-RH 的合成肽类似物) 联合施用。其他抗肿瘤方案包括四环素化合物与另一种治疗方式 (如手术、放射等) (本文也称为“辅助抗肿瘤方式”) 一起使用。因此, 本发明的方法可以与这种常规疗法一起应用而具有降低副作用和增强疗效的效果。

[0326] 当要治疗的生物体为哺乳动物 (如人) 时, 组合物可以通过本领域已知的任意方式施用, 包括但不限于经口或肠胃外途径, 包括静脉内、肌肉内、皮下、透皮、空气 (气溶胶)、鼻、直肠和局部 (包括口含和舌下) 施用。在优选的实施方式中, 组合物通过静脉输注或注射施用。

[0327] 除了抑制 VEGF 和 / 或 Eg5 (KSP) 的表达外, 本发明的组合物和方法可用于实现多种功能终点 (functional endpoint)。这些功能终点包括但不限于, 例如与对照相比时, 延长生存、防止肿瘤形成、减少肿瘤形成、降低肿瘤生长速度、增加肿瘤细胞单星体的形成、增加肿瘤细胞异常有丝分裂象的形成、减少肿瘤内出血和降低肿瘤微血管密度。

[0328] 除非另有定义, 本文所使用的所有技术和科学术语与本发明所属的技术领域中的普通技术人员通常所理解的意思相同。虽然在本发明的实施或检验中可以使用与本文所描述的方法和物质类似或相同的方法和物质, 但是以下描述了合适的方法和物质。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用整体结合入本文。在发生冲突的情况下, 以本说明书 (包括定义) 为准。另外, 物质、方法和实施例仅为说明性的并不意图限制本发明的范围。

实施例

[0329] 实施例 1. dsRNA 的合成

[0330] 试剂来源

[0331] 在本文没有特别给出试剂来源时, 这种试剂可以以分子生物学应用的质量 / 纯度标准从任何分子生物学试剂供应商处获取。

[0332] siRNA 合成

[0333] 为筛选 dsRNA, 利用 Expedite 8909 合成仪 (Applied Biosystems, Applera

Deutschland GmbH, Darmstadt, Germany) 和作为固相载体的可控微孔玻璃 (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany) 以 1 微摩尔的规模通过固相合成产生单链 RNA。通过分别利用相应的亚磷酰胺和 2'-O-甲基亚磷酰胺 (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany) 的固相合成产生 RNA 和包含 2'-O-甲基核苷酸的 RNA。利用标准的核苷亚磷酰胺化学反应 (如在核酸化学的当前方法 (current protocols in nucleic acid chemistry) (Beaucage, S. L. 等人 (编辑), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA) 中所描述的化学反应), 在寡核苷酸链序列内的选定位点处引入这些构建块 (building block)。通过用 Beaucage 试剂 (Chruachem Ltd, Glasgow, UK) 的乙腈 (1%) 溶液替换碘氧化剂溶液引入硫代磷酸酯键。进一步的辅助试剂从 Mallinckrodt Baker (Griesheim, Germany) 获得。

[0334] 根据已知的方法进行通过阴离子交换 HPLC 对粗的寡核糖核苷酸的脱保护和纯化。利用分光光度计 (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Germany) 通过各个 RNA 溶液在 260nm 波长的 UV 吸收确定产量和浓度。通过在退火缓冲液 (20mM 磷酸钠, pH 6.8; 100mM 氯化钠) 中混合等摩尔的互补链产生双链 RNA, 在 85-90°C 的水浴中加热 3 分钟并在 3-4 小时的时间内冷却至室温。退火的 RNA 溶液储存在 -20°C 直至使用。

[0335] 带有 5'-12-十二烷酸双癸酰胺基团 (5'-12-dodecanoic acid bisdecylamide group) (本文称为 "5'-C32-") 或 5'-胆固醇基衍生基团 (本文称为 "5'-Chol-") 的 siRNA 的合成根据 WO 2004/065601 中所述进行, 除了对于胆固醇基衍生物, 氧化步骤利用 Beaucage 试剂进行以在核酸低聚物的 5' 末端引入硫代磷酸酯键。

[0336] 靶向 Eg5 基因的 dsRNA

[0337] 初始筛选组

[0338] 完成 siRNA 的设计以鉴别靶向于 Eg5 (也被称为 KSP、KIF11、HSKP、KNL1 和 TRIP5) 的 siRNA。使用了对于人类 Eg5 基因的 mRNA 序列, NCBI 登录号 NM_004523。

[0339]

Eg5/KSP 人类 mRNA, refNM_004523

```

1  agegcagcca ttggtccggc tactctgtct ctttttcaaa ttgagggcgc gagtcggtgc
61  ttagtttctg gggattcggg cggagacgag attagtgatt tggcggctcc gactggcgcg
121 ggacaaacgc cacggccaga gtaccgggta gagagcgggg acgccgacct gcgtgcgtcg
181 gtcctccagg ccacgccagc gcccgagagg gaccaggagg actccggccc ctgtcggccc
241 ccaagcccct ccgcccctca cagcgcccag gtcccgggcc gggccttgat tttttggcgg
301 ggaccgtcat ggcgtcgcag ccaaattcgt ctgcgaagaa gaaagaggag aaggggaaga
361 acatccaggt ggtggtgaga tgcagaccat ttaatttggc agagcggaaa gctagcgcce
421 attcaatagt agaatgtgat cctgtacgaa aagaagttag tgtacgaact ggaggattgg
481 ctgacaagag ctcaaggaaa acatacactt ttgatatggt gtttggagca tctactaaac
541 agattgatgt ttaccgaagt gttgtttgtc caattctgga tgaagttatt atgggctata
601 attgcactat ctttgcgtat ggccaaactg gcactggaaa aacttttaca atggaaggtg
661 aaaggtcacc taatgaagag tatacctggg aagaggatcc cttggctggg ataattccac
721 gtacccttca tcaaattttt gagaaactta ctgataatgg tactgaattt tcagtcaaag
781 tgtctctggt ggagatctat aatgaagagc tttttgatct tcttaatcca tcatctgatg
841 tttctgagag actacagatg ttgatgatc cccgtaacaa gagaggagtg ataattaaag
901 gtttgaagaa aattacagta cacaacaagg atgaagtcta tcaaatttta gaaaaggggg
961 cagcaaaaag gacaactgca gctactctga tgaatgcata ctctagctgt tcccactcag
1021 ttttctctgt tacaatacat atgaaagaaa ctacgattga tggagaagag cttgttaaaa
1081 tcggaaagtt gaacttggtt gatcttgcag gaagtgaaaa cattggccgt tctggagctg
1141 ttgataagag agctcgggaa gctggaaata taaatcaatc cctgttgact ttgggaaggg
1201 tcattactgc cttgtagaa agaacacctc atgttcctta tcgagaatct aaactaacta
1261 gaatcctcca ggattctctt ggagggcgta caagaacatc tataattgca acaatttctc
1321 ctgcatctct caatcttgag gaaactctga gtacattgga atatgctcat agagcaaaga
1381 acatattgaa taagcctgaa gtgaatcaga aactcaccaa aaaagctctt attaaggagt
1441 atacggagga gatagaacgt ttaaaacgag atcttgctgc agcccgtgag aaaaatggag
1501 tgtatatttc tgaagaaaat ttagagtca tgagtggaaa attaactggt caagaagagc
1561 agattgtaga attgattgaa aaaattggtg ctgttgagga ggagctgaat agggttacag
1621 agttgtttat ggataataaa aatgaacttg accagtgtaa atctgacctg caaaataaaa
1681 cacaagaact tgaaccact caaaaacatt tgcaagaaac taaattacaa cttgttaagg
1741 aagaatatat cacatcagct ttggaaagta ctgaggagaa acttcatgat gctgccagca
1801 agctgcttaa cacagttgaa gaaactacaa aagatgtatc tggctctccat tccaaactgg
1861 atcgtaaгаа ggcagttgac caacacaatg cagaagctca ggatattttt ggcaaaaacc
1921 tgaatagtct gtttaataat atggaagaat taattaagga tggcagctca aagcaaaagg
1981 ccatgctaga agtacataag acctattttg gtaatctgct gtcttccagt gtctctgcat
2041 tagataccat tactacagta gcacttggat ctctcacatc tattccagaa aatgtgtcta
2101 ctcatgtttc tcagattttt aatatgatac taaaagaaca atcattagca gcagaaagta
2161 aaactgtact acaggaattg attaatgtac tcaagactga tcttctaagt tcaactgaaa
2221 tgattttatc cccaactgtg gtgtctatac tgaaaatcaa tagtcaacta aagcatatth
2281 tcaagacttc attgacagtg gccgataaga tagaagatca aaaaaaggaa ctagatggct
2341 ttctcagtat actgtgtaac aatctacatg aactacaaga aaataccatt tgttccttgg
2401 ttgagtcaca aaagcaatgt ggaaacctaa ctgaagacct gaagacaata aagcagaccc
2461 attcccagga actttgcaag ttaatgaatc tttggacaga gagattctgt gctttggagg
2521 aaaagtgatg aaatatacag aaaccactta gtagtgcca ggaaaatata cagcagaat
2581 ctaaggatat agtcaacaaa atgacttttc acagtcaaaa attttgtgct gattctgatg
2641 gcttctcaca ggaactcaga aattttaacc aagaaggtac aaaattggtt gaagaatctg
2701 tgaaacactc tgataaactc aatggcaacc tggaaaaaat atctcaagag actgaacaga

```

[0340]

```

2761 gatgtgaatc tctgaacaca agaacagttt atttttctga acagtgggta tcttccttaa
2821 atgaaagggg acaggaactt cacaacttat tggaggttgt aagccaatgt tgtgaggctt
2881 caagttcaga catcactgag aatcagatg gacgtaaggc agctcatgag aaacagcata
2941 acatttttct tgatcagatg actattgatg aagataaatt gatagcacia aatctagaac
3001 ttaatgaaac cataaaaaatt ggtttgacta agcttaattg ctttctggaa caggatctga
3061 aactggatat cccaacaggt acgacaccac agaggaaaag ttatttatac ccatcaacac
3121 tggtaagaac tgaaccacgt gaacatctcc ttgatcagct gaaaaggaaa cagcctgagc
3181 tgttaatgat gctaaactgt tcagaaaaca acaaagaaga gacaattccg gatgtggatg
3241 tagaagaggc agttctgggg cagtatactg aagaacctct aagtcaagag ccatctgtag
3301 atgctgggtg ggattgttca tcaattggcg gggttccatt tttccagcat aaaaaatcac
3361 atggaaaaga caaagaaaac agaggcatta acacactgga gaggtctaaa gtggaagaaa
3421 ctacagagca cttgggttaca aagagcagat tacctctgcg agcccagatc aacctttaat
3481 tcacttgggg gttggcaatt ttatttttaa agaaaactta aaaataaaaac ctgaaacccc
3541 agaacttgag ccttgtgtat agattttaaa agaataatata tatcagccgg ggcgctggg
3601 tcatgcctgt aatcccagca ctttgggagg ctgaggcggg tggattgctt gagcccagga
3661 gtttgagacc agcctggcca acgtggcaaaa acctcgctc tgttaaaaaat tagccggcg
3721 tggtggcaca ctcctgtaat cccagctact ggggaggctg aggcacgaga atcacttgaa
3781 cccaggaagc ggggttgagc tgagccaaag gtacaccact acactccagc ctgggcaaca
3841 gagcaagact cggctctcaa aacaaaattt aaaaaagata taaggcagta ctgtaaattc
3901 agttgaaatt tgatatctac ccattttctc gtcaccccta tagttcactt tgtattaaat
3961 tgggtttcat ttgggatttg caatgtaaat acgtatttct agttttcata taaagttagt
4021 cttttataac aatgaaaag tatttttctt gtatattatt aagtaatgaa tatataagaa
4081 ctgtactctt ctcagcttga gcttacatag gtaaataatca ccaacatctg tccttagaaa
4141 ggaccatctc atgttttttt tcttgctatg acttgtgtat tttcttgcat cctccctaga
4201 cttccctatt tcgctttctc ctggctcac tttctccctt tttatttttc accaaacct
4261 ttgtagagct acaaaaggta tcctttctta ttttcagtag tcagaatttt tctagaaat
4321 cttttaacac ctttttagtg gttatttcta aatcactgt caacaataaa tctaacccta
4381 gttgtatccc tcctttcagt attttctact tgttgcccca aatgtgaaag catttcattc
4441 ctttaagagg cctaactcat tcaccctgac agagttcaca aaaagcccac ttaagagtat
4501 acattgctat tatgggagac caccagaca tctgactaat ggctctgtgc ccacactcca
4561 agacctgtgc cttttagaga agctcacaat gatttaagga ctgtttgaaa cttccaatta
4621 tgtctataat ttatattctt ttgtttacat gatgaaactt tttgttggtg cttgtttgta
4681 tataatacaa tgtgtacatg tatctttttc tcgattcaaa tcttaaccct taggactctg
4741 gtatttttga tctggcaacc atatttctgg aagttgagat gtttcagctt gaagaaccaa
4801 aacagaagga atatgtacaa agaataaatt ttctgctcac gatgagttta gtgtgtaaag
4861 tttagagaca tctgactttg atagctaaat taaaccaaac cctattgaag aattgaatat
4921 atgctacttc aagaactaa attgatctcg tagaattatc ttaataaaat aatggctata
4981 atttctctgc aaaatcagat gtcagcataa gcgatggata atacctaata aactgcctc
5041 agtaaatcca tggttaataa atgtggtttc tacattaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
5101 a (SEQ ID NO:11)

```

[0341] 靶向于 Eg5/KSP 的 siRNA 序列 (包括 AD-12115) 描述于 2007 年 3 月 30 日提交的美国专利申请号 11/694, 215 (现美国专利号 7, 718, 629) 和 2010 年 4 月 5 日提交的美国分案专利申请号 12/754, 110 (美国专利申请公开号 20XX/XXXXXX) 中。为了所有的目的, 这些申请的内容通过引用并入。特别是, 为了所有的目的, 在这些申请中公开的 siRNA 序列例如表 1 和表 2 通过引用并入。如所描述的合成 siRNA 并进行活性分析。

[0342] 靶向于 VEGF 基因的 dsRNA

[0343] 在 VEGF-A121 的 mRNA 序列的外显子 1-5 中识别出四百个靶序列。该 mRNA 参考序列是 NM_003376。

[0344]

人类 VEGF-A121 mRNA 序列. 参考转录本是: NM_003376.

```

1  augaacuuuc ugcugucuug ggugcauugg agccuugccu ugcugcucua ccuccaccu
61  gccaauguggu cccaggcugc acccauggca gaaggaggag ggcagaauc ucacgaagug
12  gugaaguuca uggaugucua ucagcgcagc uacugccauc caaucgagac ccugguggac
181 aucuuccagg aguaccuga ugagaucgag uacaucuca agccauccug ugugccccug
241 augcgaugcg ggggcugcug caaugacgag ggccuggagu gugugcccac ugaggagucc
301 acaucacca ugcagauuau gcggaucac ccucaccaag gccagcacau aggagagaug
361 agcuuccuac agcacaaca augugaugc agaccacaaga aagauagagc aagacaagaa
421 aaaugugaca agccgaggcg guga (SEQ ID NO:12)

```

[0345] 靶向于 VEGF 的 siRNA 序列 (包括 AD-3133) 如 2005 年 3 月 11 日提交的美国专利申请号 11/078,073 (美国专利公开号 2006-0094032) 和 2006 年 1 月 25 日提交的美国部分继续专利申请号 12/754,110 (美国专利申请书公开号 2006-0223770) 中所描述的。为了所有的目的,这些申请的内容通过引用并入。特别是,为了所有的目的,引用在这些申请中公开的 siRNA 序列,例如表 1 和表 2,通过引用并入。如所描述的合成 siRNA 和进行活性分析。

[0346] 实施例 2. 通过细胞增殖对 Eg5 siRNA 进行体外筛选

[0347] 因为 Eg5 的沉默已被证明引起有丝分裂抑止 (Weil, D 等人, [2002] Biotechniques 33:1244-8), 所以细胞存活力分析用于 siRNA 活性筛选。测试靶向于 Eg5 的 siRNA 双链体对 HeLa 细胞生长抑制作用的影响。在 2007 年 3 月 30 日提交的 11/694215 号 (现美国专利号为 7,718,629) 中提供了结果。双链体 AL-DP-6249 表现出对细胞增殖抑制的最低 IC50 值。

[0348] 实施例 3. 通过 mRNA 的抑制作用对 Eg5 的 siRNA 进行体外筛选

[0349] 测试了靶向于 Eg5 的 siRNA 双链体对 HeLa S3 细胞中 KSP 的 mRNA 水平的影响。在 2007 年 3 月 30 日提交的 11/694215 号专利申请 (现美国专利号 7,718,629) 中提供了结果。双链体 AD-12115 表现出强的 KSP mRNA 反应的降低,具有 0.60 和 0.41 pM 的 IC20 值、3.79 和 3.39 pM 的 IC50 值和 23.45 和 23.45 pM 的 IC80 值。

[0350] 实施例 4. 单次推注施用 LNP01 配制 siRNA 后幼年大鼠中肝 Eg5/KSP 的沉默

[0351] 从出生开始一直到大约 23 天龄,可以在生长的大鼠肝中检测到 Eg5/KSP 表达。使用双链体 AD-6248,在幼鼠中评估配制的 Eg5/KSP siRNA 的靶沉默。2007 年 3 月 30 日提交的美国专利申请号 11/694,215 (现美国专利号 7,718,629) 提供了 AD-6248 的序列和结果。

[0352] 在用 10mg/kg 剂量的配制 AD6248 处理之后,获得肝 Eg5/KSP mRNA 的统计显著性降低。

[0353] 实施例 5. 静脉输注 LNP01 配制 VSP 后大鼠肝 VEGF 的沉默

[0354] 向大鼠施用包含两种 siRNA 的等摩尔混合物的“类脂质”制剂。如本文所用,VSP 指具有两种 siRNA 的组合物,一种针对 Eg5/KSP,一种针对 VEGF。对于这个实验,使用针对 VEGF 的双链体 AD3133 和针对 Eg5/KSP 的 AD12115。由于在成年大鼠肝中几乎检测不到 Eg5/KSP 的表达,因此只测量 siRNA 处理后的 VEGF 水平。

[0355] 施用的 siRNA 双链体 (VSP)

[0356]

双链体 ID	靶	正义 (5'-3')	反义 (5'-3')
AD12115	Eg5/KSP	ucGAGAAucUAAAcuAAcuTsT (SEQ ID NO: 1)	AGUuAGUUuAGAUUCUCGATsT (SEQ ID NO: 2)
AD3133	VEGF	GcAcAuAGGAGAGAuGAGCUsU (SEQ ID NO: 3)	AAGCUcAUCUCUCCuAuGuGCUsG (SEQ ID NO: 4)

[0357] 凡例 :A, G, C, U- 核糖核苷酸 ;u, c-2' -O- 甲基核糖核苷酸 :s- 硫代磷酸酯。

[0358] 各个链的未修饰形式和各个 siRNA 的靶如下

[0359]

Eg5/KSP	未修饰的正义	5'	UCGAGAAUCUAAACUAACUTT	3'	SEQ ID NO: 5
	未修饰的反义	3'	TTAGUCCUUGAUUUGAUUGA	5'	SEQ ID NO: 6
	靶	5'	UCGAGAAUCUAAACUAACU	3'	SEQ ID NO: 7
VEGF	未修饰的正义	5'	GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU	3'	SEQ ID NO: 8
	未修饰的反义	3'	GUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAA	5'	SEQ ID NO: 9
	靶	5'	GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU	3'	SEQ ID NO: 10

[0360] 方法

[0361] 动物的给药。通过向股静脉中的两小时输注向成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠施用类脂质 (“LNP01”) 配制的 siRNA。4 只动物的组接受 5、10 和 15 毫克 / 千克 (mg/kg) 体重剂量的配制 siRNA。剂量水平指在制剂中施用的 siRNA 双链体的总量。第四组接受磷酸盐缓冲盐水。在 siRNA 输注结束后 72 小时处死动物。切除肝, 在液氮中快速冷冻并粉碎成粉末。

[0362] 制剂过程

[0363] 类脂质 ND98 • 4HCl (分子量 1487) (上述式 1)、胆固醇 (Sigma-Aldrich) 和 PEG- 神经酰胺 C16 (Avanti Polar Lipids) 用于制备脂质 -siRNA 纳米微粒。制备在乙醇中的各原液 :ND98, 133 毫克 / 毫升 ;胆固醇, 25 毫克 / 毫升 ;PEG- 神经酰胺 C16, 100 毫克 / 毫升。ND98、胆固醇和 PEG- 神经酰胺 C16 的原液然后以 42 : 48 : 10 的摩尔比混合。合并后的脂质溶液与水性 siRNA (在 pH 值 5 的醋酸钠中) 快速混合, 以使得最终的乙醇浓度为大约 35-45%, 且最终的醋酸钠浓度为 100-300mM。脂质 -siRNA 纳米微粒通常在混合时自发形成。根据所需粒度分布, 在某些情况下, 产生的纳米微粒混合物使用热桶挤出机 (Lipex 挤出机, Northern Lipids, Inc) 通过聚碳酸酯膜 (100nm 的截止值) 挤出。在其它情况下, 挤出步骤省略。通过透析或切向流过滤实现乙醇去除和同时的缓冲液交换。缓冲液与 pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 交换。

[0364] 制剂的鉴定

[0365] 通过标准方法或无挤出法制备的制剂可以以类似的方式鉴定。制剂首先通过目视检查来鉴定。它们应该是不含聚集体或沉积物的发白的半透明溶液。使用 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, USA) 通过动态光散射测量脂质 - 纳米微粒的微粒大小和粒度分布。微粒大小应该是大约 20-300nm, 理想地为 40-100nm。粒度分布应该是单峰的。使用染料排除法评估制剂中的总 siRNA 浓度以及捕获分数。在制剂破坏表面活性剂 (0.5% 的 Triton-X100) 存在或不存在的条件下, 配制的 siRNA 的样品与 RNA 结合染料

Ribogreen(Molecular Probe) 一起孵育。通过来自含表面活性剂的样品的信号相对于标准曲线确定制剂中的总 siRNA。通过从总 siRNA 含量减去“游离的” siRNA 含量(如通过不存在表面活性剂的情况下的信号所测量的)确定捕获分数。捕获 siRNA 的百分比通常 > 85%。对于 SNALP 制剂,微粒大小为至少 30nm,至少 40nm,至少 50nm,至少 60nm,至少 70nm,至少 80nm,至少 90nm,至少 100nm,至少 110nm 和至少 120nm。优选的范围为大约至少 50nm 至大约至少 110nm,优选大约至少 60nm 至大约至少 100nm,最优选大约至少 80nm 至大约至少 90nm。在一个例子中,各微粒大小包含至少大约 1 : 1 比例的 Eg5dsRNA 与 VEGF dsRNA。

[0366] mRNA 的测量。在含有蛋白酶 K 的组织裂解缓冲液中对各肝粉末样品(大约 10 毫克)进行匀浆。对于各个样品,使用 Quantigene 分支 DNA 分析(GenoSpectra)一式三份地测量 VEGF 和 GAPDH mRNA 的水平。对于各个样品,VEGF 的平均值相对于 GAPDH 平均值标准化。确定组平均值,并对于各个实验相对于 PBS 组标准化。

[0367] 蛋白质测量。在 1 毫升 RIPA 缓冲液中,对各个肝粉末样品(大约 60 毫克)进行匀浆。使用 Micro BCA 蛋白质检测试剂盒(Pierce)确定总蛋白浓度。使用 VEGF ELISA 分析(R&D 系统),来自各动物的总蛋白样品用于确定 VEGF 蛋白水平。确定组平均值,并相对于各实验的 PBS 组标准化。

[0368] 统计分析。通过按照 Tukey post-hoc 检验的 ANOVA 确定显著性。

[0369] 结果

[0370] 数据总结

[0371] 对于各处理组给出 mRNA(VEGF/GAPDH)和蛋白质(rel. VEGF)的平均值(± 标准差)。对于各实验,显示相对于 PBS 组的统计显著性(p 值)。

[0372] 表 1.

[0373]

	VEGF/GAPDH	p 值	rel VEGF	p 值
PBS	1.0±0.17		1.0±0.17	
5 mg/kg	0.74±0.12	<0.05	0.23±0.03	<0.001
10 mg/kg	0.65±0.12	<0.005	0.22±0.03	<0.001
15 mg/kg	0.49±0.17	<0.001	0.20±0.04	<0.001

[0374]

[0375] 在所有 3 个 siRNA 剂量水平上,测得肝 VEGF mRNA 和蛋白质的统计显著性减少。

[0376] 实施例 6. 人类肝肿瘤的小鼠模型中 VSP SNALP 的评估。

[0377] 这些研究利用含有靶向于 KSP/Eg5 的 dsRNA 和靶向于 VEGF 的 dsRNA 的 VSP siRNA 混合物(cocktail)。如本文所用,VSP 指具有两种 siRNA 的组合物,一种针对 Eg5/KSP,一种针对 VEGF。对于这个实验,使用双链体 AD3133(指向 VEGF)和 AD12115(指向 Eg5/KSP)。在 SNALP 中配制 siRNA 混合物。

[0378] 最大的研究规模使用 20-25 只小鼠。为了测试 siRNA SNALP 混合物治疗肝癌的疗效,将 1×10^6 肿瘤细胞直接注射到试验小鼠的左侧肝叶中。通过缝合封闭切口,并使得小鼠恢复 2-5 小时。小鼠在 48-72 小时内完全恢复。在接种肿瘤后 8-11 天开始 SNALP siRNA 的处理。

[0379] 采用的 SNALP 制剂是:(i)VSP(KSP+VEGF siRNA 混合物(1 : 1 摩尔比));(ii)

KSP(KSP+Luc siRNA 的混合物)和(iii)VEGF(VEGF+Luc siRNA 的混合物)。所有制剂包含等量(毫克)的各种活性 siRNA。所有小鼠接受总的 siRNA/脂质剂量,且使用初始的柠檬酸缓冲液条件,将各混合物配制成 1 : 57 的 cDMA SNALP(1.4%的 PEG-cDMA ;57.1%的 DLinDMA,7.1%的 DPPC ;和 34.3%的胆固醇),6 : 1 的脂质 : 药物。

[0380] 人 Hep3B 研究 A :VSP-SNALP 的抗肿瘤活性

[0381] 通过肝内接种在 scid/beige 小鼠中建立人肝癌细胞 Hep3B 肿瘤。向组 A(n = 6) 动物施用 PBS ;向组 B(n = 6) 动物施用 VSP SNALP ;向组 C(n = 5) 动物施用 KSP/Luc SNALP ;和向组 D(n = 5) 动物施用 VEGF/Luc SNALP。

[0382] 在肿瘤接种后 8 天开始 SNALP 处理。每周两次(星期一及星期四)以 3mg/kg 的总 siRNA 给予 SNALP,总计 6 个剂量(累计 18mg/kg 的 siRNA)。在第 25 天施用最终剂量,和终点是第 27 天。

[0383] 通过(a)体重;(b)肝重量;(c)在第 27 天的目测+摄影;(d)人特异性的 mRNA 分析;和(e)在第 27 天检测的血液甲胎蛋白水平检测肿瘤负荷。

[0384] 下面的表 2 说明在接种的(左侧)肝叶中测量的肿瘤负荷的视觉评分结果。评分:“-”=没有可见的肿瘤;“+”=注射部位具有肿瘤组织的迹象;“++”=从肝叶突出的离散的肿瘤结节;“+++”=从肝叶两侧突出的大肿瘤;“++++”=大的肿瘤,在整个肝叶上的多个结节。

[0385] 表 2.

[0386]

	小鼠	肿瘤负荷
A 组: PBS, 第 27 天	1	++++
	2	++++
	3	++
	4	+++
	5	++++
	6	++++
B 组: VSP (VEGF + KSP/Eg5), 第 27 天	1	+
	2	-
	3	-
	4	-
	5	++
	6	-
C 组: KSP (Luc + KSP), 第 27 天	1	+
	2	++
	3	-
	4	+
	5	++
D 组: VEGF (Luc + VEGF), 第 27 天	1	++++
	2	-
	3	++++
	4	+++
	5	++++

[0387] 作为体重的百分比的肝脏重量如图 1 所示。

[0388] 体重如图 2A-2D 所示。

[0389] 从该研究得出以下结论。(1)VSP SNALP 在 Hep3B 1H 模型中表现出强的抗肿瘤效果 ;(2)VSP 混合物的抗肿瘤活性似乎在很大程度上与 KSP 成分有关 ;(3) 通过单剂量组织学分析证实了抗 KSP 的活性 ;和 (4)VEGF siRNA 在此模型中没有显示出对于肿瘤生长抑制的可测量的效应。

[0390] 人类 Hep3B 的研究 B :用 VSP 治疗延长存活时间

[0391] 在第二项 Hep3B 研究中,通过向 scid/beige 小鼠肝内接种建立人类肝癌 Hep3B 肿瘤。这些小鼠缺乏淋巴细胞和自然杀伤 (NK) 细胞,这是免疫介导的抗肿瘤作用的最小范围。组 A(n = 6) 小鼠未处理 ;向组 B(n = 6) 小鼠施用荧光素酶 (Luc)1955 SNALP(批号 AP10-02) ;和向组 C(n = 7) 小鼠施用 VSP SNALP(批号 AP10-01)。SNALP 为 1 : 57 的 cDMA SNALP 和 6 : 1 的脂质 : 药物。

[0392] 在肿瘤接种后 8 天开始 SNALP 处理。每周两次 (星期一及星期四) 以 3mg/kg 的

siRNA 给予 SNALP, 总计 6 个剂量 (累计 18mg/kg 的 siRNA)。在第 25 天施用最终剂量, 和研究终点是第 27 天。

[0393] 通过 (1) 体重; (2) 在第 27 天的目视检查 + 摄影; (3) 人特异性 mRNA 分析; 和 (4) 在第 27 天测量的血液甲胎蛋白测量肿瘤负荷。

[0394] 在给药的各天 (第 8、11、14、18、21 和 25 天) 和处死的那天测量体重 (图 3)。

[0395] 表 3.

	小鼠	通过显微镜观察的肿瘤负荷
[0396] A 组: 未处理的 第 27 天	A1R	++
	A1G	++++
	A1W	-
	A2R	++++
	A2G	+++
	A2W	++++
B 组: 1955 Luc SNALP 第 27 天	B1R	++++
	B1G	++++
	B1W	+++
	B2R	++
	B2G	+++
	B2W	++++
C 组:	C1R	-
VSP SNALP 第 27 天	C1G	-
	C1B	-
	C1W	+
	C2R	+
	C2G	+
	C2W	-

[0397]

[0398] 评分: “-” = 没有可见的肿瘤; “+” = 注射部位具有肿瘤组织的迹象; “++” = 从肝叶突出的离散的肿瘤结节; “+++” = 从肝叶两侧突出的大肿瘤; “++++” = 大的肿瘤, 在整个肝叶中的多个结节。

[0399] 体重和肿瘤负荷之间的相关性如图 4、5 和 6 所示。

[0400] 给予 Hep3B 小鼠单剂量的 VSP SNALP (2mg/kg) 也导致在通过组织学染色检验的肝组织样品中形成有丝分裂纺锤体。

[0401] 通过定量 RT-PCR (pRT-PCR) (Taqman) 量化肿瘤负荷。通过物种特异性 Taqman 分析将人 GAPDH 相对于小鼠 GAPDH 标准化。上表中通过肉眼观察表明肿瘤评分与 GAPDH 水平相关 (图 7A)。

[0402] 进行血清 ELISA 以测量肿瘤分泌的甲胎蛋白 (AFP)。如下所述, 如果 AFP 水平在治疗后下降, 则肿瘤没有增长。与对照的处理相比, 一些动物中 VSP 处理降低 AFP 水平 (图 7B)。

[0403] 人 HepB3 研究 C:

[0404] 在第三项研究中,将人 HCC 细胞 (HepB3) 直接注入 SCID/beige 小鼠的肝中,并在 20 天后开始处理。向组 A 动物施用 PBS;向组 B 动物施用 4mg/kg Luc-1955 SNALP;向组 C 动物施用 4mg/kg SNALP-VSP;向组 D 动物施用 2mg/kg SNALP-VSP;和向组 E 动物施用 1mg/kg SNALP-VSP。处理是使用单次静脉 (iv) 给药,并在 24 小时后处死小鼠。

[0405] 通过 qRT-PCR (Taqman) 检测肿瘤负荷和靶沉默。也如上所述,目视地测量肿瘤评分,结果如下表所示。如图 8 所示,hGAPDH 水平与如下表所示的肉眼观察的肿瘤评分相关。

[0406] 表 4.

[0407]

	小鼠	肉眼观察的肿瘤负荷
A 组: PBS	A2	+++
	A3	+++
	A4	+++
Group B 组: 4 mg/kg Luc-1955 SNALP	B1	+
	B2	+++
	B3	+++
	B4	+++
C 组: 4 mg/kg SNALP-VSP	C1	++
	C2	++
	C3	++
	C4	+++
D 组: 2 mg/kg SNALP-VSP	D1	++
	D2	+
	D3	+
	D4	++
E 组: 1 mg/kg SNALP-VSP	E1	+++
	E2	+
	E3	++
	E4	+

[0408]

[0409] 评分:“+”=可变的肿瘤获取量/一些小的肿瘤,“++”=从肝叶突出的离散的肿瘤结节;“+++”=从肝叶两侧突出的大肿瘤。

[0410] 通过 TaqMan 分析检测人 (肿瘤来源的) KSP 沉默,且结果如图 10 所示。hKSP 的表达相对于 hGAPDH 标准化。在 4mg/kg 的 SNALP-VSP 下观察到大约 80% 的肿瘤 KSP 沉默,且在 1mg/kg 下疗效是明显的。图 9 中的透明条代表小 (低 GAPDH) 肿瘤的结果。

[0411] 通过 TaqMan 分析检测人 (肿瘤来源的) VEGF 沉默,且结果如图 10 所示。hVEGF 的表达相对于 hGAPDH 标准化。在 4mg/kg 的 SNALP-VSP 下观察到大约 60% 的肿瘤 VEGF 沉默,且在 1mg/kg 下疗效是明显的。图 10 中的透明条代表小 (低 GAPDH) 肿瘤的结果。

[0412] 通过 TaqMan 分析检测小鼠 (肝源的) VEGF 沉默,且结果如图 11A 所示。mVEGF 的

表达相对于 hGAPDH 标准化。在 4mg/kg 的 SNALP-VSP 下观察到大约 50% 的肝 VEGF 沉默,且在 1mg/kg 下疗效是明显的。

[0413] 人 HepB3 研究 D:各 dsRNA 对肿瘤生长的影响

[0414] 在第四项研究中,将人 HCC 细胞 (HepB3) 直接注射入 SCID/beige 小鼠的肝中,并在 8 天后开始处理。每周两次用静脉 (iv) 推注治疗,总计 6 个剂量。在第 25 天施用最终剂量,且终点是第 27 天。

[0415] 通过总的组织学 (gross histology)、人特异性的 mRNA 分析 (hGAPDH qPCR) 和血液甲胎蛋白水平 (通过 ELISA 的血清 AFP) 检测肿瘤负荷。

[0416] 在研究 1 中,用 PBS 处理组 A,用 SNALP-KSP+Luc (3mg/kg) 处理组 B,用 SNALP-VEGF+Luc (3mg/kg) 处理组 C,和用 ALN-VSP02 (3mg/kg) 处理组 D。

[0417] 在研究 2 中,用 PBS 处理组 A,用 SNALP-KSP+Luc (1mg/kg) 处理组 B,用 ALN-VSP02 (1mg/kg) 处理组 C。

[0418] 在用 ALN-VSP02 处理后,GAPDH mRNA 水平和血清 AFP 水平都显示下降 (图 11B)。

[0419] 组织学研究:

[0420] 通过在小鼠中肝内接种建立人肝癌 Hep3B 肿瘤。在肿瘤接种后 20 天开始 SNALP 处理。以 2mg/kg 的总 siRNA 通过单次静脉 (IV) 给予 (i) VSP SNALP 或 (ii) 对照 (Luc) SNALP 处理荷瘤小鼠 (每组三只)。

[0421] 单次 SNALP 施用后 24 小时收集肝 / 肿瘤样品用于常规 H&E 组织学研究。

[0422] 尸检时,大的肉眼观察的肿瘤结节 (5-10 毫米) 是明显的。

[0423] ALN-VSP 在 Hep3B 小鼠中的效应:

[0424] ALN-VSP (KSP dsRNA 和 VEGF dsRNA 的混合物) 的处理减小肿瘤负荷和肿瘤源性 KSP 和 VEGF 的表达。也观察到 GAPDH mRNA 水平 (作为肿瘤负荷的量度) 在施用 ALN-VSP dsRNA 后下降 (见图 12A-12C)。通过视觉肉眼观察的肿瘤负荷的减少在施用 ALN-VSP 之后也是明显的。

[0425] 单次静脉推注 ALN-VSP 也导致有丝分裂纺锤体的形成,其在 Hep3B 小鼠肝组织标本可明显地检测到。这个现象表明细胞周期抑止。

[0426] 实施例 7a. SNALP-VSP 动物相对于 SNALP-Luc 处理动物的存活

[0427] 为了测试 siRNA SNALP 对于癌症受试者的生存率的影响,通过在小鼠中肝内接种建立肿瘤,并用 SNALP-siRNA 处理小鼠。这些研究利用了含有靶向于 KSP/Eg5 和 VEGF 的 dsRNA 的 VSP siRNA 混合物。对照是靶向于 Luc 的 dsRNA。在 SNALP 中配制 siRNA 混合物。

[0428] 将肿瘤细胞 (人肝癌 Hep3B, 1×10^6) 直接注射到 scid/beige 小鼠的左侧肝叶中。这些小鼠缺乏淋巴细胞和自然杀伤 (NK) 细胞,这是免疫介导的抗肿瘤作用的最小范围。通过缝合封闭切口,并允许小鼠恢复 2-5 小时。小鼠在 48-72 小时内完全恢复。

[0429] 所有小鼠接受总的 siRNA/ 脂质静脉注射 (iv) 剂量,且各混合物使用原始的柠檬酸缓冲条件配制成 1 : 57 的 cDMA SNALP (1.4% 的 PEG-cDMA ;57.1% 的 DLinDMA,7.1% 的 DPPC ;和 34.3% 的胆固醇),6 : 1 的脂质: 药物。

[0430] 肿瘤接种后,在下面指明的天数 (18 或 26 天) 开始 siRNA-SNALP 处理。在 4mg/kg 剂量 18 或 26 天之后,每周两次施用 siRNA-SNALP,进行 3 周。监测存活率,并基于人道满足点 (humane surrogate endpoint) 对动物实施安乐死 (如动物的体重、腹胀 / 变色以

及整体健康)。

[0431] 观察到肿瘤后 18 天开始治疗的生存数据总结于表 5、表 6 和图 13A 中。

[0432] 表 5. Kaplan-Meier (生存) 数据 (%存活)

[0433]

天	SNALP-Luc	SNALP-VSP
18	100%	100%
22	100%	100%
25	100%	100%
27	100%	100%
28	100%	100%
28	86%	100%
29	86%	100%
32	86%	100%
33	86%	100%
33	43%	100%
35	43%	100%
36	43%	100%
36	29%	100%
38	29%	100%
38	14%	100%
38	14%	88%
40	14%	88%
43	14%	88%
45	14%	88%
49	14%	88%
51	14%	88%
51	14%	50%
53	14%	50%
53	14%	25%
55	14%	25%
57	14%	25%
57	0%	0%

[0434]

[0435] 表 6. 各个动物的存活天数.

[0436]

动物	处理组	存活	
1	SNALP-Luc	28	天
2	SNALP-Luc	33	天
3	SNALP-Luc	33	天
4	SNALP-Luc	33	天
5	SNALP-Luc	36	天
6	SNALP-Luc	38	天
7	SNALP-Luc	57	天
8	SNALP-VSP	38	天
9	SNALP-VSP	51	天
10	SNALP-VSP	51	天
11	SNALP-VSP	51	天
12	SNALP-VSP	53	天
13	SNALP-VSP	53	天
14	SNALP-VSP	57	天
15	SNALP-VSP	57	天

[0437] 图 13A 显示 SNALP-VSP 动物和 SNALP-Luc 处理的动物相对于肿瘤接种后的天数的平均存活率。SNALP-VSP 动物的平均存活时间相对于 SNALP-Luc 处理的动物延长大约 15 天。

[0438] 表 7. 对于各动物在处理前和处理结束时的血清甲胎蛋白 (AFP) 的浓度 (浓度以 $\mu\text{g/ml}$ 计)

[0439]

		Rx 前	Rx 结束
1	SNALP-Luc	30.858	454.454
2	SNALP-Luc	10.088	202.082
3	SNALP-Luc	23.736	648.952
4	SNALP-Luc	1.696	13.308
5	SNALP-Luc	4.778	338.688
6	SNALP-Luc	15.004	826.972
7	SNALP-Luc	11.036	245.01
8	SNALP-VSP	37.514	182.35
9	SNALP-VSP	91.516	248.06
10	SNALP-VSP	25.448	243.13
11	SNALP-VSP	24.862	45.514
12	SNALP-VSP	57.774	149.352
13	SNALP-VSP	12.446	78.724
14	SNALP-VSP	2.912	9.61
15	SNALP-VSP	4.516	11.524

[0440] 在实验过程中,使用血清 AFP 水平监测肿瘤负荷。甲胎蛋白 (AFP) 是胎儿期过程中由卵黄囊和肝产生的主要血浆蛋白。这种蛋白质被认为是血清白蛋白的胎儿对应物,且人 AFP 和白蛋白基因按相同的转录方向成串地存在于第 4 染色体上。AFP 被发现以单体以及二聚体和三聚形式存在,并结合铜、镍、脂肪酸和胆红素。AFP 水平在出生后逐渐降低,到 8-12 个月达到成人水平。正常成人的 AFP 水平较低,但可检测到。AFP 在正常成人中没有已知的功能,且在成人中的 AFP 表达通常与肿瘤的子集(如肝癌和畸胎瘤)相关。AFP 是用于监测睾丸癌、卵巢癌和恶性畸胎瘤的肿瘤标志物。分泌 AFP 的原发肿瘤包括内胚窦瘤(卵黄囊癌)、神经母细胞瘤、肝母细胞瘤和肝细胞癌。在患有 AFP 分泌肿瘤的患者中,AFP 的血清水平往往与肿瘤大小关联。血清水平可用于评估对于治疗的反应。通常情况下,如果 AFP 水平在治疗后下降,则肿瘤没有增长。化疗后立即出现的 AFP 的暂时增加可能表明肿瘤并不是在增长而是在缩小(并随着肿瘤细胞死亡而释放 AFP)。切除通常与血清水平下降相关。如图 14 所示,SNALP-VSP 处理的动物中的肿瘤负荷明显降低。

[0441] 实施例 7b. ALN-VSP 延长存活

[0442] 本文中所述的,ALN-VSP 是指脂质配制的靶向于 VEGF 和 KSP(Eg5) 的 siRNA。该 siRNA 是靶向于 KSP 的 ALN-12115 和靶向于 VEGF 的 ALN-3133。脂质制剂是 SNALP 制剂(本文所述)且包括 DLinDMA、DSPC、mPEG2000-C-DMA 和胆固醇。

[0443] 如本文所述的将 Hep3B 细胞肝内植入以建立肿瘤。在肿瘤植入后 26 天开始每周两次施用 4mg/kg 的 ALN-VSP 或 SNALP-Luc,持续三周。根据人道替代终点(humane surrogate endpoint)对动物进行安乐死。如图 13B 中所示,与 SNALP-Luc 处理的动物相比,ALN-VSP 动物的平均存活时间延长了大约 50%。

[0444] 实施例 8a. 原位 HCC 模型中单星体的诱导

[0445] 在分裂的细胞中 KSP 的抑制导致可在组织切片中容易观察到的单星体形成。如本文所述的使用原位小鼠肝肿瘤模型。简单地说,将人肝细胞瘤细胞(Hep3B)或人结肠直肠

癌细胞 (HCT116) 肝内注射到 scid/beige 小鼠的左侧肝叶中。

[0446] 为了确定在 SNALP-VSP 处理的肿瘤中是否出现单星体形成, 向荷瘤动物 (在 Hep3B 细胞植入后 3 周) 经尾静脉注射施用 2mg/kg 的 SNALP-VSP。对照动物接受 2mg/kg 的 SNALP-Luc。24 小时后, 处死动物, 并处理荷瘤肝叶以进行组织学分析。H&E 染色组织切片的典型图像如图 15 中所示。广泛的单星体形成在 ALN VSP02 处理的肿瘤 (图 15A) 中是明显的, 但不是在 SNALP-Luc 处理的肿瘤 (图 15B) 中。在后者中, 正常的有丝分裂象是明显的。单星体的产生是 KSP 抑制的特有特征, 并提供表明 SNALP-VSP 在建立的肝肿瘤中具有显著活性的进一步证据。

[0447] 实施例 8b. 腹膜内 HCC 模型中单星体的诱导

[0448] 建立了小鼠 Hep3B 转移模型并用于分析 ALN-VSP 处理对腹膜内 Hep3B 肿瘤中单星体形成的影响。Hep3B 细胞从 ATCC 获得并经工程化以稳定表达萤火虫荧光素酶。Fox scid beige 小鼠 (8-9 周龄) 从 Charles River 实验室获得。悬浮在 100cc 无菌 PBS 中的 1 毫升细胞注射到腹腔中。使用非侵入性荧光成像监测肿瘤生长。

[0449] 动物接受了单剂量的 8 毫克每千克的 ALN-VSP 或 SNALP-Luc。给药 48h 后对肿瘤进行分析。肿瘤的石蜡包埋切片用 H&E 染色。整个肿瘤切片采用浮点 ROI (目的区域) 成像分析, 并计数简单有丝分裂数或异常有丝分裂像 (单星体)。总计数除以每肿瘤的 ROI 数。如图 20 所示, ALN-VSP 处理导致腹膜内 HCC 模型的肿瘤组织中异常有丝分裂像 (单星体) 的累积。

[0450] 实施例 8c. 在肝脏和肝外位点的结肠直肠癌肿瘤中 mRNA 水平的降低和单星体的诱导

[0451] 分析 ALN-VSP 处理在结肠直肠癌肿瘤中的效力。通过直接向免疫功能低下的小鼠肝脏中 (如 scid/beige 小鼠左肝叶中) 肝内植入 HCT116 细胞建立肿瘤。在一些动物中, 在肝外位点发生了扩散的肿瘤, 包括淋巴结、肺和皮下 (s. c.)。荷瘤动物接受了一剂或多剂。

[0452] 荷瘤动物在肿瘤植入后 14 天接受了单剂的 ALN-VSP (4、2 或 1 毫克 / 千克) 或 SNALP-Luc (4 毫克 / 千克)。源于肿瘤 (人类) 的 KSP 的 mRNA 水平 (相对于 GAPDH 标准化) 在药物施用后 24 小时用物种特异性的 TaqMan 探针进行测量。如图 21 所示, 相对于 4mg/kg 的 SNALP-Luc 对照, ALN-VSP 表现出 hKSP 的 35% 降低。

[0453] 在肿瘤植入后 14 天荷瘤动物接受了多剂的 ALN-VSP 和 SNALP-Luc。ALN-VSP 以 4.0 和 1.0 毫克 / 千克施用和对照 SNALP-Luc 以 4 毫克 / 千克施用, 每周两次, 持续三周。给药后 48 小时, 分析带有肿瘤的肝脏、淋巴结、肺和皮下转移。石蜡包埋的肿瘤切片用 H&E 染色。整个肿瘤切片采用浮点 ROI (目的区域) 分析进行成像, 并计算简单有丝分裂数或异常有丝分裂像 (单星体)。总计数除以每个肿瘤的 ROI 数。

[0454] 如图 25A、25B 和 25C 所示, ALN-VSP 处理导致在肝脏肿瘤、肺、淋巴结和皮下转移中异常有丝分裂像 (单星体) 的累积。图 22A 和 25A (肝脏), $P < 0.05$ (具有 Tukey's 多重比较检验的单因素方差分析); 图 25B (肺), $P = 0.0182$, 与 SNALP-1955 处理动物中的单星体比较, 用非配对 t 检验方法; 图 22B 和 25C (淋巴结); 图 25C (皮下)。

[0455] 结果表明, 各 siRNA 对疗效产生明显不同的贡献。ALN-VSP 处理在原位肝肿瘤以及不同来源的肝外肿瘤这两种类型中都导致异常有丝分裂像 (单星体) 的累积 (KSP 抑制的

标志)。微血管密度明显降低和原位肿瘤的肿瘤内出血显示了治疗性 VEGF 抑制的证据。

[0456] 实施例 8d: ALN-VSP 减少肿瘤内出血和微血管密度

[0457] ALN-VSP 处理与 SNALP-Luc 相比对肿瘤内出血和微血管密度的影响使用本文描述的 Hep3B 原位 HCC 小鼠模型来分析。

[0458] 进行了两项研究。研究 1 比较了 Hep3B 原位肿瘤植入后 26 天开始的 4 毫克 / 千克 ALN-VSP 与 SNALP-Luc 施用, 每周两次, 持续三周。基于人道替代终点, 对动物实行安乐死。研究 2 比较了肿瘤植入后 14 天开始的 6 毫克 / 千克的仅 SNALP-VEGF 与 SNALP-Luc 施用, 每周两次, 持续三周。IP 施用的 5 毫克 / 千克的贝伐单抗用作阳性对照。最后一次给药后 72 小时, 对动物进行安乐死。

[0459] 用 H&E 染色石蜡包埋的肿瘤切片来显示肿瘤出血的区域, 或用 CD34 抗体染色以检测肿瘤脉管系统。两个完整的肿瘤切片采用浮点 ROI (目的区域) 分析成像, 对肿瘤内出血的区域在 H&E 染色的切片中进行描绘和在各个肿瘤中对出血总面积进行定量。为了定量微血管密度, CD34 染色区域量化为肿瘤总面积的百分比。

[0460] 如图 23 所示, ALN-VSP 处理减少了肿瘤内出血和微血管密度。如图 24 所示, ALN-VSP 的血管效应是可归因于 VEGF siRNA, 因为 SNALP-VEGF 减少肿瘤内出血和微血管密度达到与 ALN-VSP 相同的程度。

[0461] 实施例 9. ALN-VSP02 的制造过程和产品说明 (SNALP-VSP)

[0462] ALN-VSP02 产品包含用于通过输注用于 IV 施用的配制成无菌脂质微粒制剂的 2mg/mL 药物物质 ALN-VSPDS01 (称为 SNALP)。药物物质 ALN-VSPDS01 由等摩尔比的两种 siRNA (靶向于 KSP 的 ALN-12115 和靶向于 VEGF 的 ALN-3133) 组成。药品包装于具有 5 毫升填充容积的 10 毫升的玻璃小瓶中。

[0463] 在本文使用下列术语:

[0464]

药物物质	siRNA 双链体	单链中间体
ALN-VSPDS01	ALN-12115*	正义: A-19562
		反义: A-19563
	ALN-3133**	正义: A-3981
		反义: A-3982

[0465] * 又名 = AD-12115, AD12115 ; ** 又名 = AD-3133, AD3133

[0466] 9.1 药物物质 ALN-VSPDS01 的制备

[0467] 使用市售的合成器和原材料化学合成药物物质 ALN-VSPDS01、ALN-12115 和 ALN-3133 的两种 siRNA 成分。制造方法包括通过常规的固相寡核苷酸合成, 使用亚磷酰胺 (phosphoramidite) 化学和具有用叔丁二甲基硅烷基 (TBDMS) 保护的 2' 羟基或用 2' 甲氧基 (2' OMe) 取代的 2' 羟基的 5' -O- 二甲氧基三苯基甲基 (DMT) 保护基合成各双链体的两个单链寡核苷酸 (ALN 12115 的 A19562 正义链和 A19563 反义链及 ALN 3133 的 A3981 正义链和 A3982 反义链)。寡核苷酸链的组装在固体载体 (如可控的微孔玻璃或聚苯乙烯) 上通过亚磷酰胺方法进行。循环由 5' 脱保护、偶合、氧化和加帽 (capping) 组成。通过以下步骤进行各偶合反应: 使用 5(乙硫基)1H 四唑试剂使得适当保护的核糖、2' OMe 或脱氧

核糖核苷亚酰胺 (amidite) 活化,接着偶合载体固定的保护核苷或寡核苷酸的游离 5' 羟基。经过适当次数的循环后,通过酸处理去除最后的 5' 保护基。通过甲胺水溶液处理从固体载体切除粗的寡核苷酸,同时除去氰乙基保护基以及核碱基保护基。然后使用含氟化氢的试剂切割 2' O TBDMS 基团,以产生粗的寡核糖核苷酸,其使用强阴离子交换高效液相色谱 (HPLC) 接着使用超滤脱盐而纯化。对纯化的单链进行分析以在退火成双链体之前确认正确的分子量、分子序列,杂质特征和寡核苷酸含量。退火的双链中间体 ALN 12115 和 ALN 3133 进行冻干并在 20°C 下存储或以 1 : 1 的摩尔比混合,且溶液经冻干以产生药物物质 ALNVSPDS01。如果双链中间体作为干粉储存,它们在混合前在水中重新溶解。通过 HPLC 法监测混合过程来获得等摩尔比率。

[0468] 制造方法流程图如图 16 所示。

[0469] 分析药物物质的储存稳定性(数据未提供)。选择分析方法以评估物理性质(外观、pH 值、水分)、纯度(通过 SEC 和变性阴离子交换色谱法)和效力(通过变性阴离子交换色谱法 [AX-HPLC])。ALN-VSPDS01 表现出在 20 摄氏度下最多 12 个月的稳定储存。

[0470] 9.2 药物产品 ALN-VSP02(SNALP-VSP) 的制备

[0471] ALN VSP02 是两种 siRNA(以 1 : 1 的摩尔比)与等渗缓冲液中的脂质赋形剂的无菌制剂。脂质赋形剂与两种 siRNA 结合,保护它们免于在循环系统中降解,并帮助它们递送到靶组织。通过重复的系列实验比较各种不同制剂的理化性质、稳定性、药效学、药代动力学、毒性和产品可制造性选择具体的脂质赋形剂和各脂质赋形剂的数量比例(如表 9 所示)。赋形剂 DLinDMA 是可滴定的氨基脂,其在低 pH 值下(如在哺乳动物细胞的核内体中存在的 pH 值)带正电,但在全血的更中性的 pH 下相对不带电。这一特征有助于在低 pH 值下高效封装带负电的 siRNA,从而防止空微粒的形成,但仍允许通过在使用前用更中性的存储缓冲液代替制剂缓冲液来调整(减少)微粒的电荷。为了向微粒提供理化稳定性,掺入胆固醇和中性脂质 DPPC。聚乙二醇脂质偶联物 PEG2000 C DMA 有助于药物产品的稳定性,并为预期的应用提供最佳的循环时间。ALN VSP02 脂质微粒具有低多分散性特征的大约 80-90nm 的平均直径。代表性的低温透射电子显微镜(cryo TEM)图像如图 17 中显示。在中性 pH 值下,微粒基本上不带电,且 Zeta 电位值低于 6mV。基于该制造工艺,没有明显的空(非负载的)微粒。

[0472] 表 9 :ALN-VSP02 的定量组成

[0473]

成分, 等级	比例 (mg/mL)
ALN-VSPDS01, cGMP	2.0*
DLinDMA(1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷), cGMP	7.3
DPPC (R-1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱), cGMP	1.1
胆固醇, 合成的, cGMP	2.8
PEG2000-C-DMA (3-N-[(ω -甲氧基聚(乙二醇) 2000)氨基 甲酰基]-1,2-二肉桂基氧基-丙胺), cGMP	0.8
磷酸缓冲盐水, cGMP	q.s.

[0474] * 在药品微粒的整个粒径分布上维持药品中两种 siRNA 的 1 : 1 摩尔比。

[0475] 脂质的溶液 (乙醇中) 和 ALN VSPDS01 药物物质的溶液 (在水性缓冲液中) 混合, 并稀释以形成具有大约 80–90nm 的平均微粒大小的 siRNA 脂质微粒的胶状分散体。这种分散体然后通过 0.45/0.2 微米过滤器过滤, 浓缩, 并通过切向流过滤进行渗滤 (diafilter)。经过在线测试和浓度调整至 2.0mg/mL 后, 产品经无菌过滤, 无菌填充到玻璃小瓶中, 塞住, 加盖, 并在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 下放置。乙醇和所有水性缓冲液成分是 USP 级的; 所有使用的水是 USP 注射级无菌水。代表性的 ALN-VSP02 过程如图 18 中的流程图所示。

[0476] 9.4 容器 / 密封系统

[0477] 在具有 5 毫升填充体积的 10 毫升玻璃小瓶中包装 ALN VSP02 药品。容器密封系统包括 USP/EP I 型硼硅玻璃小瓶、聚四氟乙烯贴面的丁基橡胶瓶塞和铝翻转盖 (flip off cap)。药品储存在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 下。

[0478] 9.5 药品 ALN-VSP02 的稳定性

[0479] 药品的稳定性在储存条件 ($2-8^\circ\text{C}$) 和 $25^\circ\text{C} / 60\%$ 相对湿度下进行分析。药品在 4°C 的储存温度下保持 18 个月时是稳定的 (数据未提供)。

[0480] 实施例 10. ALN-VSP02 在人癌细胞系中的体外效力

[0481] 通过处理后的 KSP mRNA、VEGF mRNA 和细胞活力的测量确定 ALN-VSP02 处理在人类癌细胞系中的效力。在各个细胞系中测定 KSP 和 VEGF 的 IC_{50} (nM) 值。

[0482] 表 11 : 细胞系

[0483]

测试的细胞系	ATCC 分类号
HELA	ATCC Cat N: CCL-2
KB	ATCC Cat N: CCL-17
HEP3B	ATCC Cat N: HB-8064
SKOV-3	ATCC Cat N: HTB-77
HCT-116	ATCC Cat N: CCL-247
HT-29	ATCC Cat N: HTB-38
PC-3	ATCC Cat N: CRL-1435
A549	ATCC Cat N: CCL-185
MDA-MB-231	ATCC Cat N: HTB-26

[0484] 第 1 天,细胞在完全培养基中接种在 96 孔板中,以在第 2 天达到 70%的密度。第 2 天,用 Opti-MEM 降血清培养基 (Invitrogen Cat N:11058-021) 替换培养基,并用开始为 1.8 μ M 降低至 10pM 的浓度范围的 ALN-VSP02 或对照 SNALP-Luc 转染细胞。6 个小时后,培养基改为完全培养基。对于各实验、各细胞系进行 3 个重复培养。

[0485] 转染后 24 小时收获细胞。使用 bDNA 测量 KSP 的水平;使用人 TaqMan 检测测量 VEGF mRNA 水平。

[0486] 按照生产商的说明在 48 和 / 或 72 小时使用细胞滴度蓝试剂 (Cell Titer Blue reagent) (Promega Cat N:G8080) 测量存活力。

[0487] 如表 12 所示,VSP02 的 nM 浓度在多种人类细胞系中有效降低 KSP 和 VEGF 的表达。经过处理的细胞存活率不是

[0488] 表 12 :结果

[0489]

细胞系	IC50 (nM) KSP	IC50 (nM) VEGF
HeLa	8.79	672
SKOV-3	142	1347
HCT116	31.6	27.5
Hep3B	1.3	14.5
HT-29	262	ND
PC3	127	ND
KB	50.6	ND
A549	201	ND
MB231	187	ND

[0490] 实施例 11. 在建立的 Hep3B 肝内肿瘤中 VSP SNALP 相对于索拉非尼的抗肿瘤效力

[0491] 携带建立的 Hep3B 肝内肿瘤的 scid/beige 小鼠中研究多剂量 VSP SNALP 相对于索拉非尼的抗肿瘤效应。索拉非尼是经核准用于治疗肝细胞癌 (HCC) 的蛋白激酶小分子抑制剂。

[0492] 如本文所述,在 scid/beige 小鼠中通过肝内接种建立肿瘤。在接种后 11 天开始处理。用以下对小鼠进行处理:索拉非尼和对照 siRNA-SNALP,索拉非尼和 VSP siRNA-SNALP,或仅 VSP siRNA-SNALP。只用缓冲液(对于索拉非尼为 DMSO,和对于 siRNA-SNALP 为 PBS)处理对照小鼠。从周一至周五腹腔内(intraperitoneally)施用索拉非尼,持续 3 星期,以 15mg/kg 体重总计 15 次注射。在注射 SNALP 之后最短 1 小时施用索拉非尼。根据最近记录的体重,在第 1、4、7、10、14 和 17 天以 3mg/kg 的剂量(10ml/kg)通过侧尾静脉内施用 siRNA-SNALPS,3 周时间(总计 6 个剂量)。

[0493] 根据包括进行性体重减轻的肿瘤负荷及包括状态、腹胀/变色和活动的临床症状的评估对小鼠实施安乐死。

[0494] 生存百分比的数据如图 21 中所示。相比单独施用索拉非尼或 VSP siRNA-SNALP,共施用 VSP siRNA-SNALP 与索拉非尼提高存活比例。相比于索拉非尼,VSP siRNA-SNALP 提高存活比例。

[0495] 实施例 12. 采用 AD-12115 和 AD-3133 变异体的 VSP 体外效力

[0496] 设计并合成靶向于 Eg5/KSP 和 VEGF 的两组双链体。各组包括在 AD-12115 和 AD-3133 的靶位点的各个方向迭铺(tiling)10 个核苷酸的双链体。

[0497] 各个双链体的靶、正义链和反义链的序列列于下表中。

[0498] 使用本文所述的分析方法测试各个双链体的表达抑制。双链体单独和/或组合施用,例如,Eg5/KSP dsRNA 结合 VEGF dsRNA。在一些实施方式中,以如本文所述的 SNALP 制剂施用 dsRNA。

[0499] 表 13:靶向 VEGF 和 Eg5/KSP 的 dsRNA 的序列(迭铺)

[0500]

双链体 ID	靶基因	靶序列 5' 至 3'	SEQ ID NO:	正义链 反义链 5' 至 3'	SEQ ID NO:
AD-20447.1	VEGFA	ACCAAGGCCAGCACAUAGG	14	AccAAGGccAGcAcAuAGGTsT CCuAUGUGCUGGCCUUGGUTsT	54
					55
AD-20448.1	VEGFA	CCAAGGCCAGCACAUAGGA	15	ccAAGGccAGcAcAuAGGATsT UCCuAUGUGCUGGCCUUGGUTsT	56
					57
AD-20449.1	VEGFA	CCAAGGCCAGCACAUAGGA	16	ccAAGGccAGcAcAuAGGATsT CUCCuAUGUGCUGGCCUUGTtT	58
					59
AD-20450.1	VEGFA	AAGGCCAGCACAUAGGAGA	17	AAGGccAGcAcAuAGGAGATsT UCUCCuAUGUGCUGGCCUUTsT	60
					61
AD-20451.1	VEGFA	AGGCCAGCACAUAGGAGAG	18	AGGccAGcAcAuAGGAGAGTtT CUCUCCuAUGUGCUGGCCUTsT	62
					63
AD-20452.1	VEGFA	GGCCAGCACAUAGGAGAGA	19	GGccAGcAcAuAGGAGAGATsT UCUCUCCuAUGUGCUGGCCTsT	64
					65
AD-20453.1	VEGFA	GCCAGCACAUAGGAGAGAU	20	GccAGcAcAuAGGAGAGAuTtT AUCUCUCCuAUGUGCUGGCTsT	66
					67
AD-20454.1	VEGFA	CCAGCACAUAGGAGAGAUG	21	ccAGcAcAuAGGAGAGAuGTtT cAUCUCUCCuAUGUGCUGGTsT	68
					69
AD-20455.1	VEGFA	CAGCACAUAGGAGAGAUGA	22	cAGcAcAuAGGAGAGAuGATsT UcAUCUCUCCuAUGUGCUGTtT	70
					71
AD-20456.1	VEGFA	AGCACAUAGGAGAGAUGAG	23	AGcAcAuAGGAGAGAuGAGTtT CUcAUCUCUCCuAUGUGCUTsT	72
					73
AD-20457.1	VEGFA	CACAUAGGAGAGAUGAGCU	24	cAcAuAGGAGAGAuGAGcuTtT AGCUcAUCUCUCCuAUGUGTtT	74
					75
AD-20458.1	VEGFA	ACAUAGGAGAGAUGAGCUU	25	AcAuAGGAGAGAuGAGcuuTtT AAGCUcAUCUCUCCuAUGUTtT	76
					77
AD-20459.1	VEGFA	CAUAGGAGAGAUGAGCUUC	26	cAuAGGAGAGAuGAGcuucTtT GAAGCUcAUCUCUCCuAUGTtT	78
					79
AD-20460.1	VEGFA	AUAGGAGAGAUGAGCUUCC	27	AuAGGAGAGAuGAGcuuccTtT GGAAGCUcAUCUCUCCuAUTtT	80
					81
AD-20461.1	VEGFA	UAGGAGAGAUGAGCUUCCU	28	uAGGAGAGAuGAGcuuccuTtT AGGAAGCUcAUCUCUCCuATtT	82
					83

[0501]

AD-20462.1	VEGFA	AGGAGAGAUGAGCUUCCUA	29	AGGAGAGAuGAGcuuccuATsT uAGGAAGCUcAUCUCUCCTsT	84 85
AD-20463.1	VEGFA	GGAGAGAUGAGCUUCCUAC	30	GGAGAGAuGAGcuuccuAcTsT GuAGGAAGCUcAUCUCUCCTsT	86 87
AD-20464.1	VEGFA	GAGAGAUGAGCUUCCUACA	31	GAGAGAuGAGcuuccuAcATsT UGuAGGAAGCUcAUCUCUCTsT	88 89
AD-20465.1	VEGFA	AGAGAUGAGCUUCCUACAG	32	AGAGAuGAGcuuccuAcAGTsT CUGuAGGAAGCUcAUCUCUTsT	90 91
AD-20466.1	VEGFA	GAGAUGAGCUUCCUACAGC	33	GAGAuGAGcuuccuAcAGcTsT GCUGuAGGAAGCUcAUCUCTsT	92 93
AD-20467.1	KSP	AUGUCCUUAUCGAGAAUC	34	AuGuuccuuAucGAGAAucTsT GAUUCUCGAuAAGGAACAUTsT	94 95
AD-20468.1	KSP	UGUCCUUAUCGAGAAUCU	35	uGuuccuuAucGAGAAucTsT AGAUCUCGAuAAGGAACATsT	96 97
AD-20469.1	KSP	GUUCCUUAUCGAGAAUCUA	36	GuuccuuAucGAGAAucTsT uAGAUCUCGAuAAGGAACsT	98 99
AD-20470.1	KSP	UUCUUAUCGAGAAUCUAA	37	uuccuuAucGAGAAucTsT UuAGAUCUCGAuAAGGAATsT	100 101
AD-20471.1	KSP	UCCUUAUCGAGAAUCUAAA	38	uccuuAucGAGAAucTsT UUuAGAUCUCGAuAAGGATsT	102 103
AD-20472.1	KSP	CCUUAUCGAGAAUCUAAAC	39	ccuuAucGAGAAucTsT GUUuAGAUCUCGAuAAGGTsT	104 105
AD-20473.1	KSP	CUUAUCGAGAAUCUAAACU	40	cuuAucGAGAAucTsT AGUUuAGAUCUCGAuAAGTsT	106 107
AD-20474.1	KSP	UUAUCGAGAAUCUAAACUA	41	uuAucGAGAAucTsT uAGUUuAGAUCUCGAuAATsT	108 109
AD-20475.1	KSP	UAUCGAGAAUCUAAACUAA	42	uAucGAGAAucTsT UuAGUUuAGAUCUCGAuATsT	110 111
AD-20476.1	KSP	AUCGAGAAUCUAAACUAAC	43	AucGAGAAucTsT GUuAGUUuAGAUCUCGAUTsT	112 113
AD-20477.1	KSP	CGAGAAUCUAAACUAACUA	44	cGAGAAucTsT uAGUUuAGUUuAGAUCUCGTsT	114 115
AD-20478.1	KSP	GAGAAUCUAAACUAACUAG	45	GAGAAucTsT CuAGUUuAGUUuAGAUCUCTsT	116 117
AD-20479.1	KSP	AGAAUCUAAACUAACUAGA	46	AGAAucTsT UCuAGUUuAGUUuAGAUCUTsT	118 119
AD-20480.1	KSP	GAAUCUAAACUAACUAGAA	47	GAAucTsT UUCuAGUUuAGUUuAGAUCTsT	120 121
AD-20481.1	KSP	AAUCUAAACUAACUAGAAU	48	AAucTsT AUUCuAGUUuAGUUuAGAUTsT	122 123
AD-20482.1	KSP	AUCUAAACUAACUAGAAUC	49	AucTsT GAUUCuAGUUuAGUUuAGAUTsT	124 125
AD-20483.1	KSP	UCUAAACUAACUAGAAUCC	50	ucuTsT GGAUUCuAGUUuAGUUuAGATsT	126 127
AD-20484.1	KSP	CUAAACUAACUAGAAUCCU	51	cuTsT AGGAUUCuAGUUuAGUUuAGTsT	128 129
AD-20485.1	KSP	UAAACUAACUAGAAUCCUC	52	uTsT GAGGAUUCuAGUUuAGUUuATsT	130 131
AD-20486.1	KSP	AAACUAACUAGAAUCCUCC	53	AAcTsT GGAGGAUUCuAGUUuAGUUUTsT	132 133

[0502] 实施例 13. 带有单个平端的靶向于 VEGF 的 dsRNA

[0503] 设计并合成靶向于 VEGF 的一组双链体。该组包括在 AD-3133 的靶位点的各个方向迭铺 10 个核苷酸的双链体。各个双链体在对应于反义链的 3' 末端的末端包括 2 个碱基的突出端,和在对应于反义链的 5' 末端的末端没有突出端,例如平端。

[0504] 这些双链体的各个链的序列如下表所示。

[0505] 使用本文所述的分析方法测试各个双链体的表达抑制。单独和 / 或与 Eg5/KSP

dsRNA (例如, AD-12115) 组合施用 VEGF 双链体。在一些实施方式中, 以如本文所述的 SNALP 制剂施用 dsRNA。

[0506] 表 14: 靶向 VEGF 的平端 dsRNA 的靶序列

[0507]

双链体 ID	SEQ ID NO:	VEGF 靶序列 5' 至 3'	VEGF 基因上的 位置
AD-20447.1	134	ACCAAGGCCAGCACAUAGG	1365
AD-20448.1	135	CCAAGGCCAGCACAUAGGA	1366
AD-20449.1	136	CAAGGCCAGCACAUAGGAG	1367
AD-20450.1	137	AAGGCCAGCACAUAGGAGA	1368
AD-20451.1	138	AGGCCAGCACAUAGGAGAG	1369
AD-20452.1	139	GGCCAGCACAUAGGAGAGA	1370
AD-20453.1	140	GCCAGCACAUAGGAGAGAU	1371
AD-20454.1	141	CCAGCACAUAGGAGAGAU	1372
AD-20455.1	142	CAGCACAUAGGAGAGAU	1373
AD-20456.1	143	AGCACAUAGGAGAGAU	1374
AD-20457.1	144	CACAUAGGAGAGAU	1376
AD-20458.1	145	ACAUAGGAGAGAU	1377
AD-20459.1	146	CAUAGGAGAGAU	1378
AD-20460.1	147	AUAGGAGAGAU	1379
AD-20461.1	148	UAGGAGAGAU	1380
AD-20462.1	149	AGGAGAGAU	1381
AD-20463.1	150	GGAGAGAU	1382
AD-20464.1	151	GAGAGAU	1383
AD-20465.1	152	AGAGAU	1384
AD-20466.1	153	GAGAU	1385

[0508] 表 15: 靶向 VEGF 的平端 dsRNA 的链序列

[0509]

双链体 ID	正义链 (5' 到 3')	SEQ ID NO:	反义链 (5' 到 3')	SEQ ID NO:
AD-20447.1	ACCAAGGCCAGCACAUAGGAG	154	CUCCUAUGUGCUGGCCUUGGUGA	155
AD-20448.1	CCAAGGCCAGCACAUAGGAGA	156	UCUCCUAUGUGCUGGCCUUGGUG	157
AD-20449.1	CAAGGCCAGCACAUAGGAGAG	158	CUCUCCUAUGUGCUGGCCUUGGU	159

[0510]

AD-20450.1	AAGGCCAGCACAUAGGAGAGA	160	UCUCUCCUAUGUGCUGGCCUUGG	161
AD-20451.1	AGGCCAGCACAUAGGAGAGAU	162	AUCUCUCCUAUGUGCUGGCCUUG	163
AD-20452.1	GGCCAGCACAUAGGAGAGAUG	164	CAUCUCUCCUAUGUGCUGGCCUU	165
AD-20453.1	GCCAGCACAUAGGAGAGAUGA	166	UCAUCUCUCCUAUGUGCUGGCCU	167
AD-20454.1	CCAGCACAUAGGAGAGAUGAG	168	CUCAUCUCUCCUAUGUGCUGGCC	169
AD-20455.1	CAGCACAUAGGAGAGAUGAGC	170	GCUCAUCUCUCCUAUGUGCUGGC	171
AD-20456.1	AGCACAUAGGAGAGAUGAGCU	172	AGCUCAUCUCUCCUAUGUGCUGG	173
AD-20457.1	CACAUAGGAGAGAUGAGCUUC	174	GAAGCUCAUCUCUCCUAUGUGC	175
AD-20458.1	ACAUAGGAGAGAUGAGCUUCC	176	GGAAGCUCAUCUCUCCUAUGUGC	177
AD-20459.1	CAUAGGAGAGAUGAGCUUCCU	178	AGGAAGCUCAUCUCUCCUAUGUG	179
AD-20460.1	AUAGGAGAGAUGAGCUUCCUA	180	UAGGAAGCUCAUCUCUCCUAUGU	181
AD-20461.1	UAGGAGAGAUGAGCUUCCUAC	182	GUAGGAAGCUCAUCUCUCCUAUG	183
AD-20462.1	AGGAGAGAUGAGCUUCCUACA	184	UGUAGGAAGCUCAUCUCUCCUAU	185
AD-20463.1	GGAGAGAUGAGCUUCCUACAG	186	CUGUAGGAAGCUCAUCUCUCCUA	187
AD-20464.1	GAGAGAUGAGCUUCCUACAGC	188	GCUGUAGGAAGCUCAUCUCUCCU	189
AD-20465.1	AGAGAUGAGCUUCCUACAGCA	190	UGCUGUAGGAAGCUCAUCUCUCC	191
AD-20466.1	GAGAUGAGCUUCCUACAGCAC	192	GUGCUGUAGGAAGCUCAUCUCUC	193

[0511] 实施例 14. 人体中 Eg5/KSP 和 VEGF 表达的抑制

[0512] 人类受试者用具有靶向于 Eg5/KSP 基因的 SNALP 配制的 dsRNA 和靶向于 VEGF 基因的 SNALP 配制的 dsRNA 的药物组合物, 如 ALNVSP02, 治疗以抑制 Eg5/KSP 和 VEGF 基因的表达。

[0513] 选择或确定需要治疗的受试者。受试者可以需要治疗癌症, 如肝癌。

[0514] 在时间的零点, 向受试者皮下施用该组合物的合适的第一剂量。该组合物如本文所述配制。一段时间之后, 评估受试者的状态, 例如, 通过测量肿瘤生长、测量血清 AFP 水平等。测量可以伴随所述受试者中 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 表达, 和 / 或 Eg5/KSP 和 / 或 VEGF 基因的成功 siRNA 靶向的产物的测量。也可以测量其他相关指标。按照受试者的需要调整剂量的数量和强度。

[0515] 治疗后, 受试者的状态与治疗前存在的状态相比, 或者相对于具有类似病症但未经治疗的受试者的状态进行比较。

[0516] 实施例 15. ALN-VSP02 在人类中的临床试验

[0517] 进行临床研究以评估 ALN-VSP02 在患有累及到肝的晚期实体瘤的患者中的安全性和耐受性, 表征 ALN-VSP02 的 PK (药代动力学) 和评估 ALN-VSP02 的抗肿瘤 / 抗血管生成活性的初步证据。该项研究是开放标签的、多中心的、剂量递增的, 利用最多约 55 名患有原发性或继发性肝癌的患者。

[0518] ALN-VSP02 通过每 2 周一次的 15 分钟静脉输注给药, 剂量水平为 :0.1、0.2、0.3、0.4、0.7、1.0、1.25、1.5、1.7、2.0、3.0 和 6.0 毫克 / 千克。

[0519] 每 4 个剂量后对肿瘤进行测量。患者继续治疗直到疾病取得进展 (用 RECIST 标准来定义) 或达到了不可接受的毒性。

[0520] 实施例 16 I 期临床研究的 ALN-12115 的 PK 数据的比较 :ALN-VSP02 在人体中

[0521] 用实施例 15 中所述的参数开始临床研究。每个时间点对单个肿瘤获取三个芯针组织活检样品 :治疗前及第一次给药后 2 和 7 天。各活检样品用 2 种方法处理 :1 :福尔马林固定、石蜡包埋和 2 :在液氮中急冻。肿瘤中 ALN-12115 的 PK 用 qRT-PCR 定量。

[0522] ALN-12115 (ALN-VSP02 中的 KSP 双链体) 的异速生长类比和预测的 AUC (曲线下面积) 如下所述。预测的 C_{max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 具有预测值的 1.5 到 3.4 倍范围的实际反应, 也就是说, 预测剂量的误差不会大于 (±) 3-4 倍 (Mordenti 等人)。

[0523]

	单位	异速生长方程	85kg 人体中的预测
CL	mL/min	$\text{LogCL} = 1.04 \cdot \text{LogBW} + 0.01$	103 (1.21 mL/min/kg)
Vd	mL	$\text{LogVd} = 0.98 \cdot \text{LogBW} + 1.98$	7394 (86.99 mL/kg)

[0524] ● 预测的 $AUC = (D \times F) / CL$ 人体中 (对于 IV 给药 $F = 1$)

[0525]

1 期输注量		预测的人体 Vd	预测的人体 CL	HED 暴露 (AUC)
mg/kg	mg	mL	mL/min	ng*min/mL
0.05	4.25	7394	103	41202
0.1	8.5	7394	103	82404
0.2	17	7394	103	164808
0.4	34	7394	103	329616
0.7	59.5	7394	103	576828

[0526]

[0527] 从 1 期临床研究中获得的 ALN-12115 的 PK 数据的比较显示如下。对于同龄组 1, 预测的 AUC 为 41202 纳克·分钟 / 毫升, 而实际的平均值范围为 30784 至 37280 纳克·分钟 / 毫升。对于同龄组 2, 预测的 AUC 为 82404 纳克·分钟 / 毫升, 而实际的平均值范围从 115469 到 130736 纳克·分钟 / 毫升。AUC 在不超过 (±) 3 至 4 倍的预测值的范围内。

[0528]

同龄组 1: 0.1 mg/kg	C1W1				C2W2		
参数	001-002	002-001	002-003	平均	001-002	002-001	平均
C _{max} (ng/mL)	519	1167	583	756	673	1181	927
AUC _{0-最后} (ng*min/mL)	11407	53178	27766	30784	21198	53363	37280
AUC _{部分(0-135 min)} (ng*min/mL)	11407	42312	22596	25558	21198	45331	33265
t _{1/2α} (min)	18.2	18.6	15.5	17.4	15.6	18.2	16.9

同龄组 2: 0.2 mg/kg	C1W1				C2W2			
参数	002-004	002-006	003-005	平均	002-004	002-006	003-005	平均
C _{max} (ng/mL)	2266	2803	1723	2264	2684	2111	1921	2239
AUC _{0-最后} (ng*min/mL)	173850	134162	84197	130736	181038	110683	54686	115469
AUC _{部分(0-135 min)} (ng*min/mL)	113685	124975	81186	106615	127422	104407	52997	94942
t _{1/2α} (min)	25.2	19.8	14.8	19.9	20.5	17.7	15.0	17.7

[0529] 缩写

[0530] CL- 清除率 - 每单位时间药物从中完全清除的血浆量。消除的量与血液中的药物浓度成比例。

[0531] V_d- 分布容积 - 体内药物的量除以血液中的浓度。

[0532] AUC- 曲线下总面积 - 对于计算不同药品的相对效力是非常有用的。

[0533] C_{max}- 最高浓度

[0534] t_{1/2}- 半衰期 - 给定药物浓度降低 50% 所需的时间。t_{1/2} 通过清除和分布容积来确定。

[0535] C1W1- 周期 1, 第一周。

[0536] C2W2- 周期 2, 第二周。

[0537] 实施例 17. 使用 ALN-VSP02 治疗患有累及到肝的晚期癌症患者

[0538] 进行临床研究以评估 ALN-VSP02 在患有累及到肝的晚期实体瘤患者中的安全性和耐受性, 表征 ALN-VSP02 的 PK (药代动力学) 和评估不同剂量水平下 ALN-VSP02 的抗肿瘤 / 抗血管生成活性的初步证据。该研究集中于患有原发性或继发性肝癌的患者。

[0539] 对于患有累及到肝的晚期癌症的患者, ALN-VSP02 通过每 2 周一次的 15 分钟 IV 输注给药, 剂量水平如下: 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.7 毫克 / 千克。治疗以 2 个剂量的周期 (一个月) 进行, 每 2 个周期后测量肿瘤。在各个剂量的施用后, 以确定的时间间隔采集血浆样品, 并分析 ALN-VSP02 浓度的水平以获得药代动力学信息和观察任何药物蓄积的证据。

[0540] 对于第一次剂量和第三次剂量,患者血浆中 KSP siRNA 的 C_{max} 、 t_{max} 和 AUC 分别如表 16a 和 16b 中所示。对于第一次剂量和第三次剂量,患者血浆中 VEGF siRNA 的 C_{max} 、 t_{max} 和 AUC 分别如表 17a 和 17b 中所示。这些表显示了各个剂量水平入组的前 3 名患者 (即 $N = 3$) 对于 ALN-VSP02 的第一次和第三次剂量的药代动力学数据。ALN-VSP02 治疗导致人血浆中产生与剂量成比例的 ALN-VSP02 的 C_{max} 和 AUC,且第 1 次剂量和第 3 次剂量之间没有药物蓄积的证据。

[0541] 表 16a :通过剂量水平估计的 KSP siRNA 平均血浆浓度参数

[0542]

ALN-VSP 剂 量 1 (mg/kg)	0.1	0.2	0.4	0.7
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.76 ± 0.36	2.3 ± 0.54	3.2 ± 1.2	9.8 ± 4.1
t_{max} (min)	18.3 ± 5.8	16.7 ± 2.9	17 ± 3	20 ± 5
$AUC_{0-最后}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)	30.9 ± 21.1	130.7 ± 44.9	201.3 ± 38.6	501.2 ± 203.9

[0543]

[0544] 表 16b :通过剂量水平估计的 KSP siRNA 平均血浆浓度参数及药物蓄积证据

[0545]

ALN-VSP 剂量 3 (mg/kg)	0.1	0.2	0.4	0.7
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.93	2.2 ± 0.40	4.8	9.3
t_{max} (min)	15	16.7 ± 2.9	18	15
$AUC_{0-最后}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)	37.3	130.7 ± 44.9	252.3	579.3

[0546] 表 17a :通过剂量水平估计的 VEGF siRNA 平均血浆浓度参数

[0547]

ALN-VSP 剂 量 1 (mg/kg)	0.1	0.2	0.4	0.7
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.86 ± 0.43	2.5 ± 0.56	3.7 ± 1.2	9.7 ± 2.7
t_{max} (min)	26.7 ± 5.8	21.7 ± 2.9	15 ± 0	18 ± 6
$AUC_{0-最后}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)	36.9 ± 20.2	140.3 ± 56.1	207.7 ± 36.3	610.9 ± 223.3

[0548] 表 17b :通过剂量水平估计的 VEGF siRNA 平均血浆浓度参数及药物蓄积证据

[0549]

ALN-VSP 剂量 3 (mg/kg)	0.1	0.2	0.4	0.7
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.98	2.2 ± 0.36	5	8.8
t_{\max} (min)	15	18.3 ± 2.9	18	20
$AUC_{0-\text{最后}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)	40.7	114.7 ± 62.9	330.9	622.4

[0550] 各个剂量水平的患者中进行一个或多个可评价的肝肿瘤的 DCE-MRI 评估。治疗前进行一次测量（基线），给药后 3-5 天测量一次和给药后 8-10 天再测量一次。 K_{trans} 与基线相比的平均变化从 2 次给药后扫描后各个可评价肿瘤的 K_{trans} 峰值导出。结果提示在大多数治疗患者中的抗 VEGF 作用。有些病人也有 VEGF 水平的相关降低。

[0551] 在大多数患者中，在 0.1 至 0.7 毫克 / 千克剂量下只观察到轻微的与药物相关的副作用，表明 ALN-VSP02 在提供的剂量下通常有很好的耐受性。

[0552] ALN-VSP02 组合物对治疗诊断患有累及肝的癌症的患者是有效的且在达到最高 0.7 毫克 / 千克剂量时患者具有良好的耐受性。ALN-VSP-2 人血浆药代动力学参数显示与与剂量成比例的 C_{\max} 和 AUC，且无药物蓄积的证据。

[0553] 本领域的技术人员熟悉除了那些在本公开中明确阐述的方法和组合物之外使得他们在所附的权利要求的全部范围内实施本发明的方法和组合物。

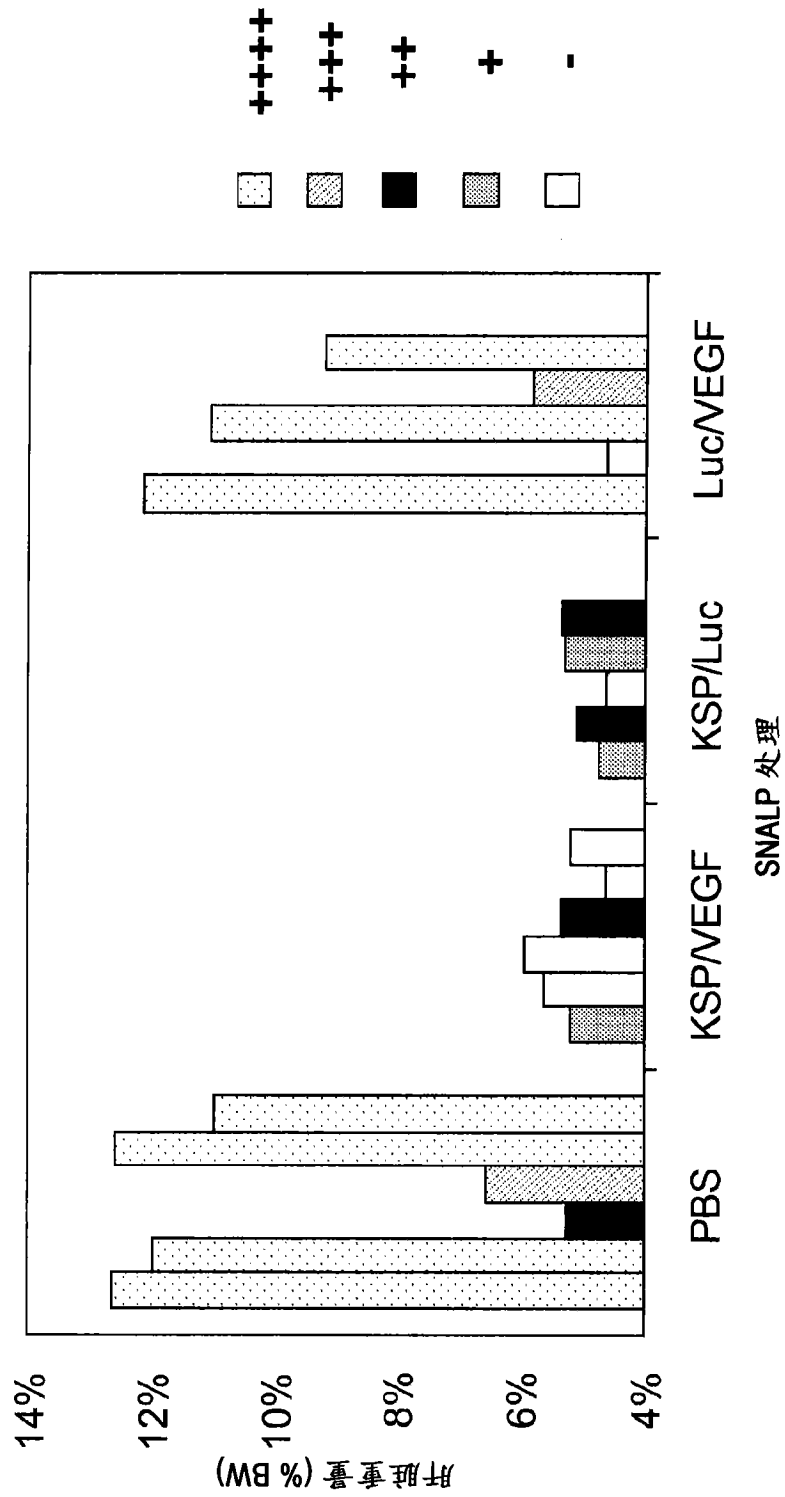


图 1

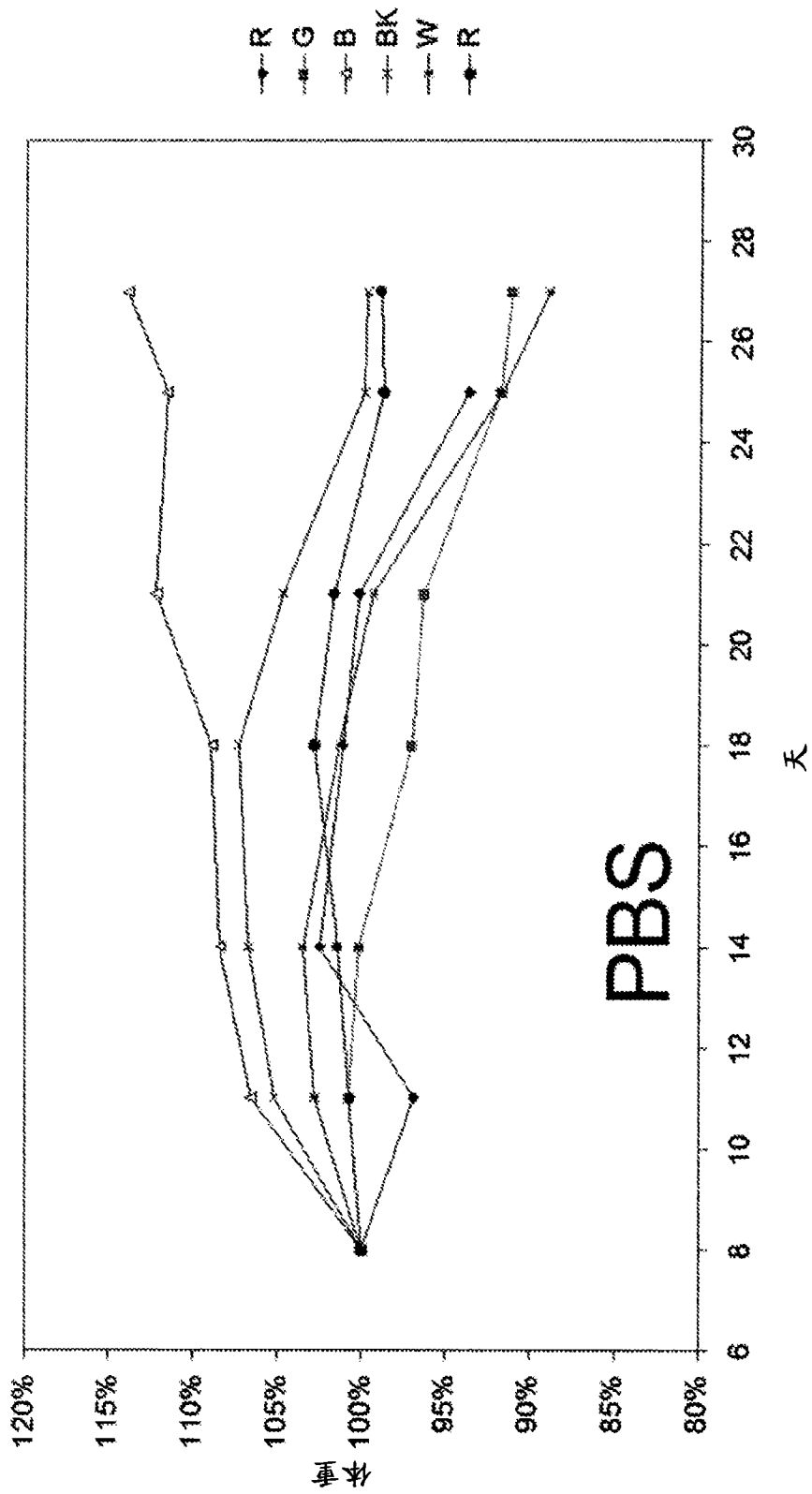


图 2A

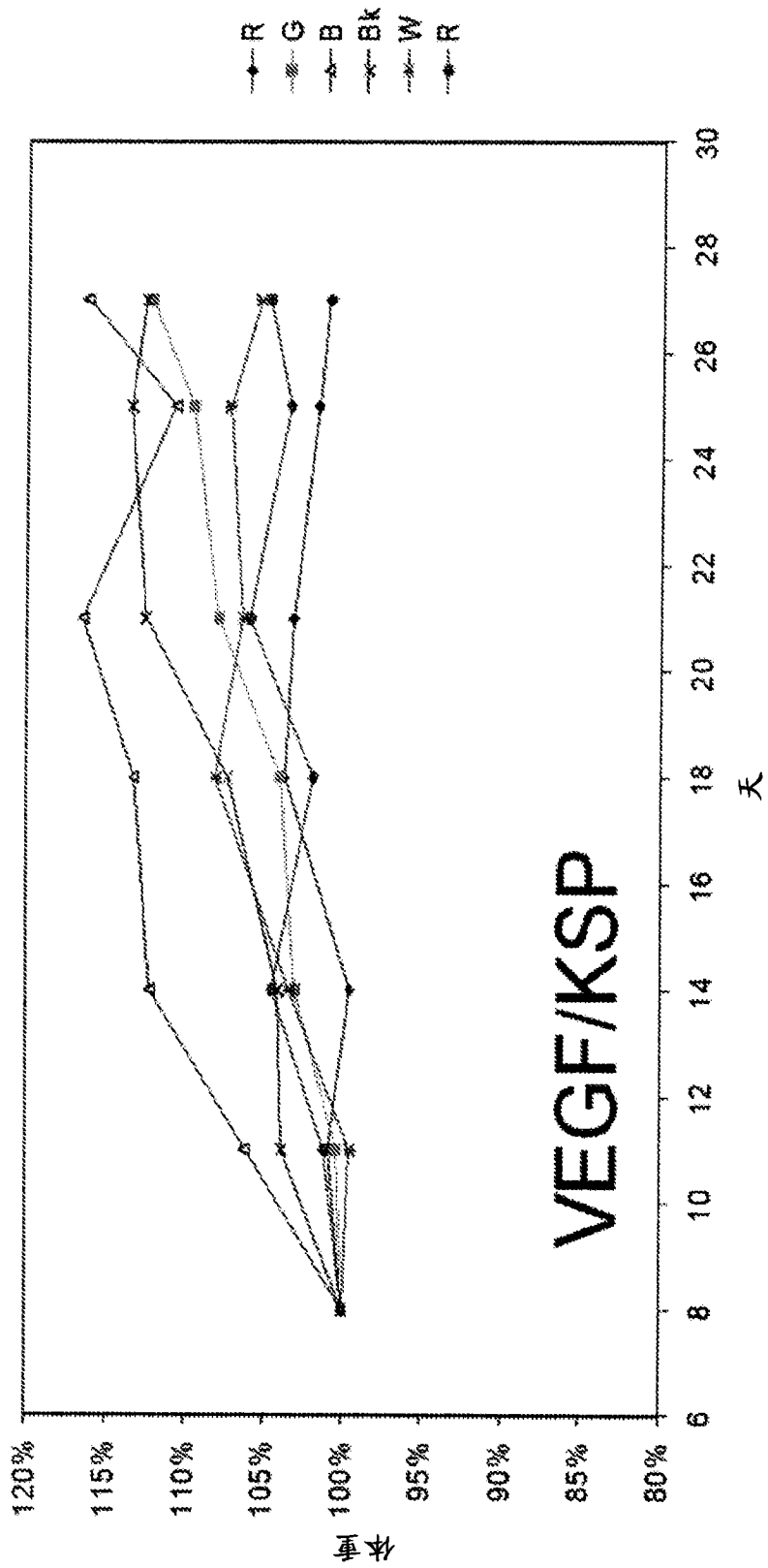


图 2B

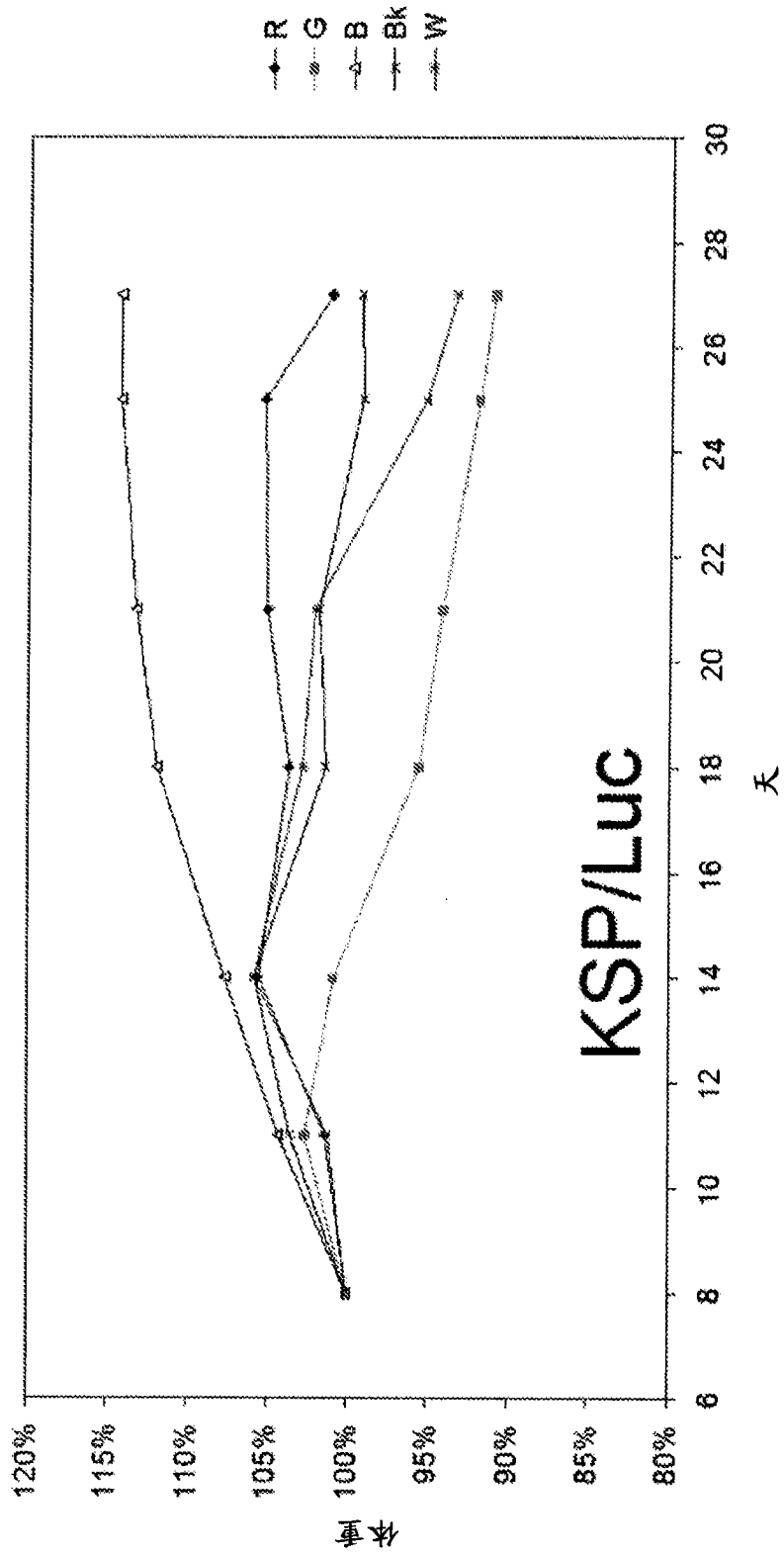


图 2C

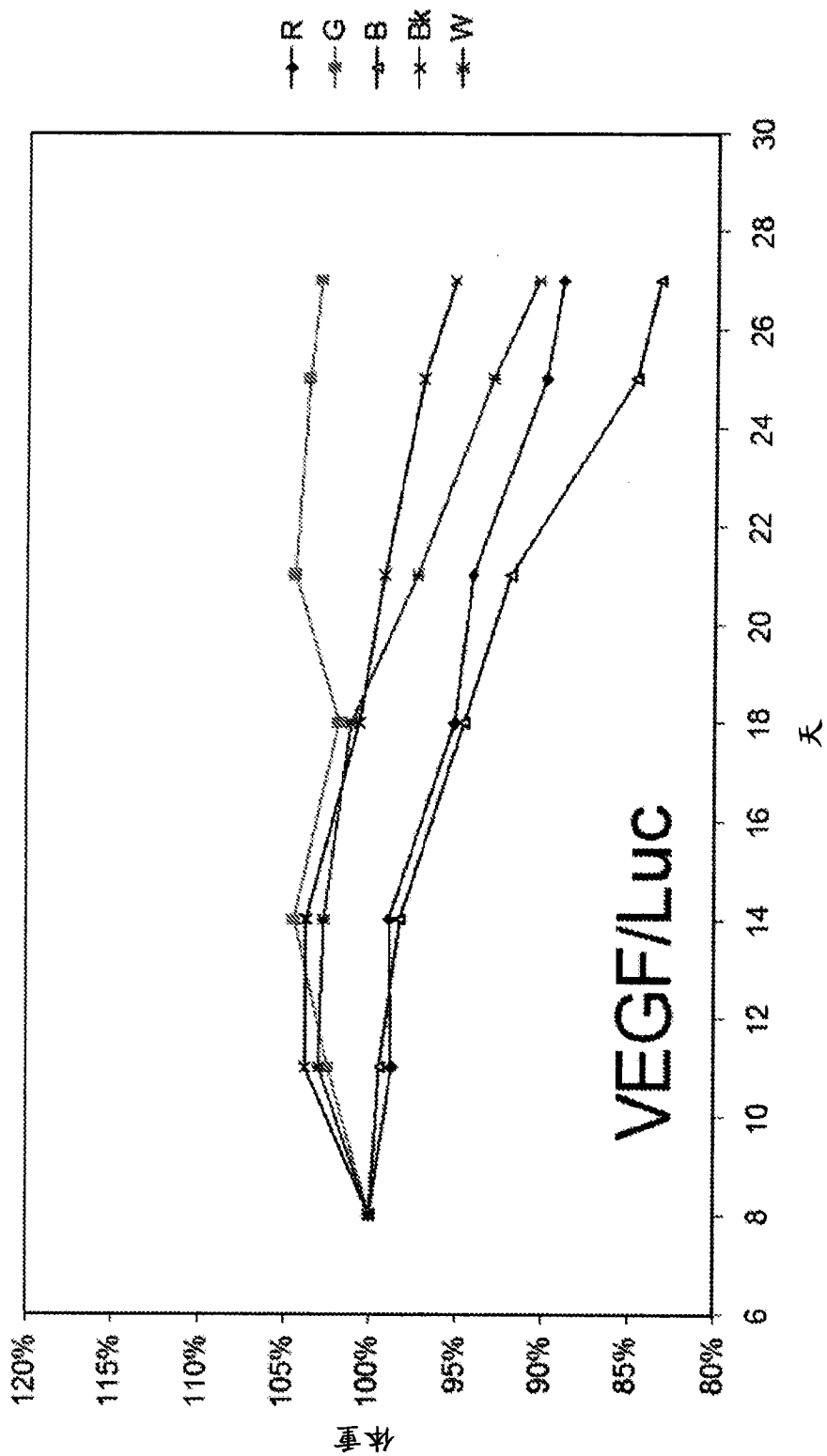


图 2D

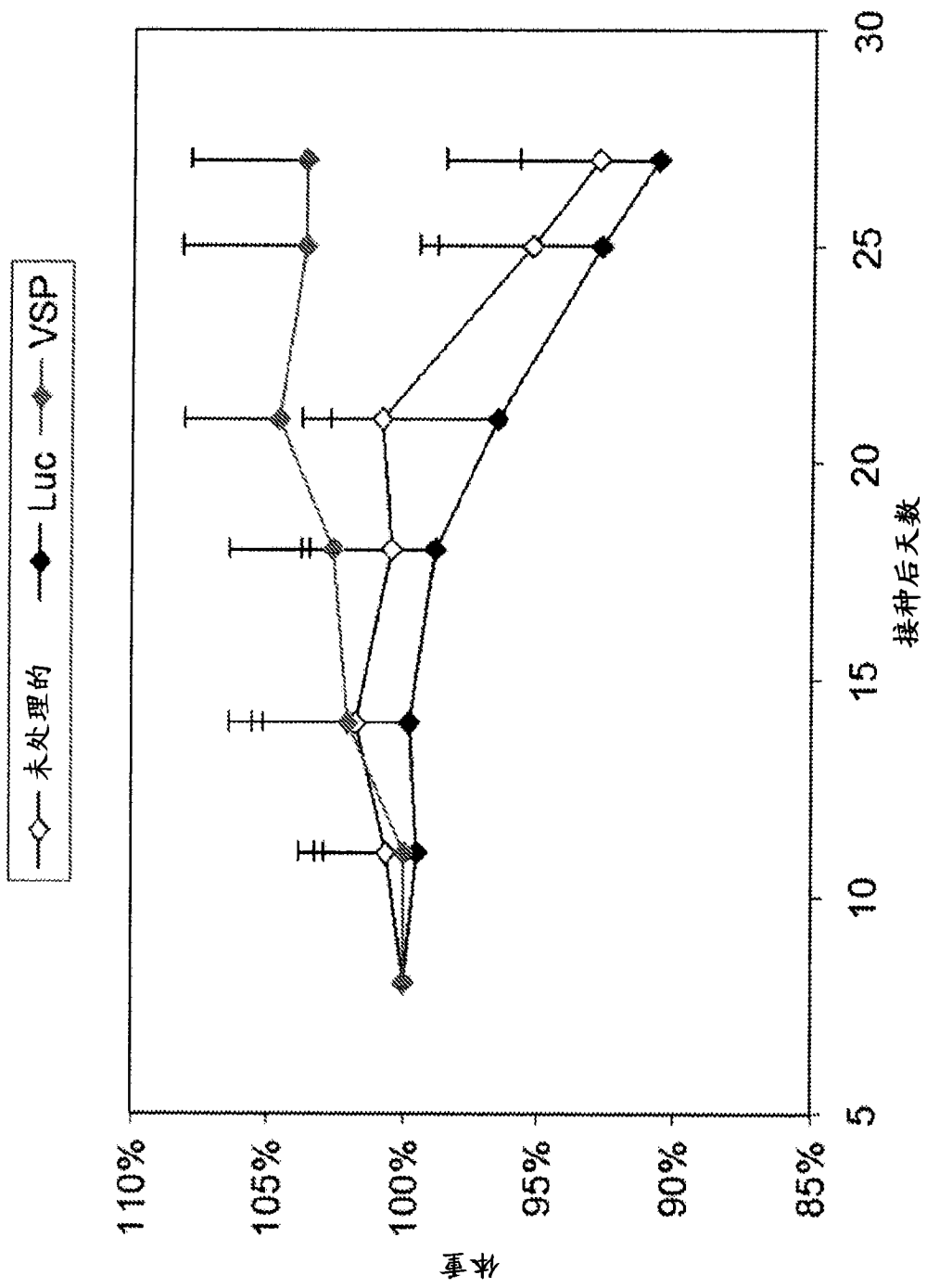


图 3

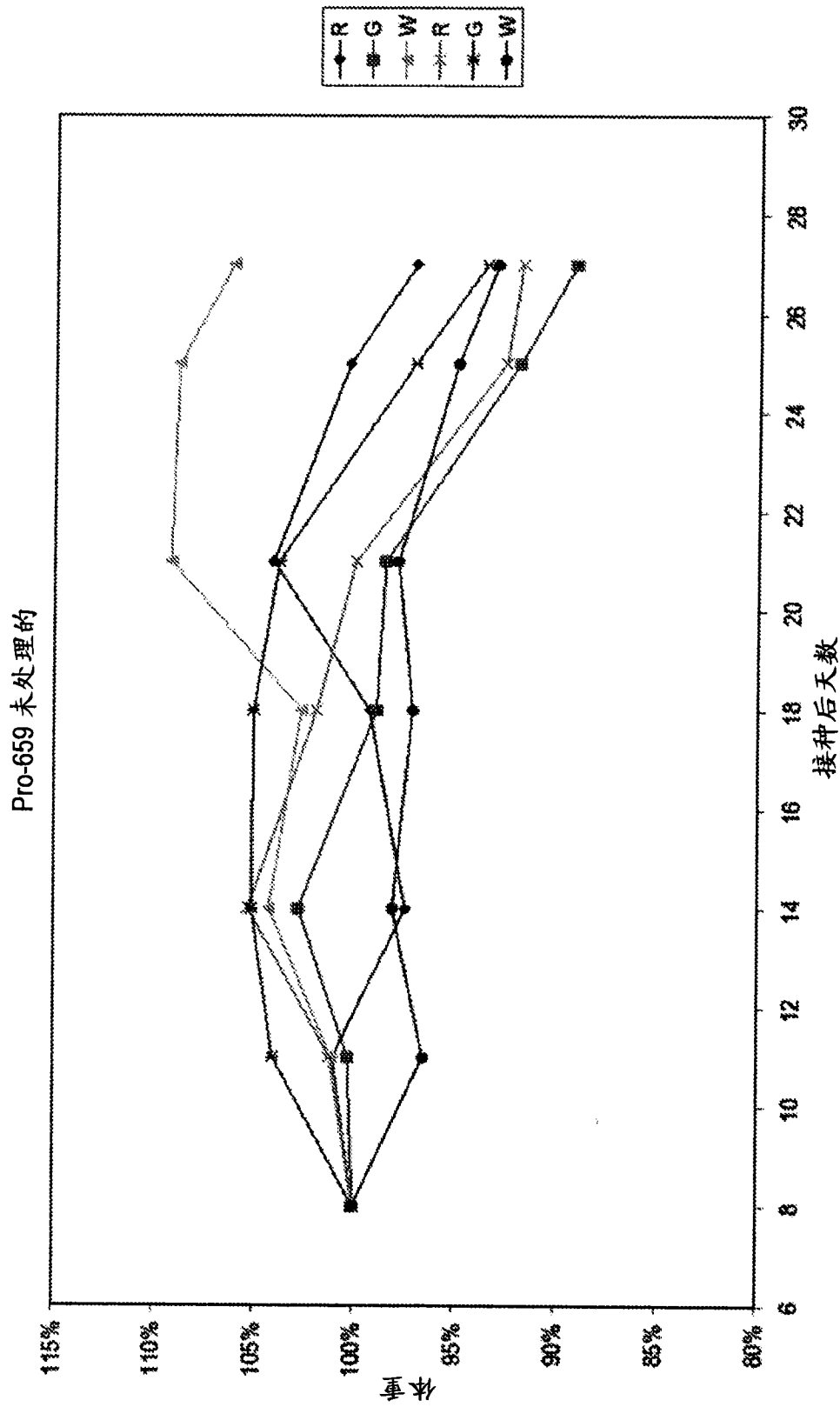


图 4

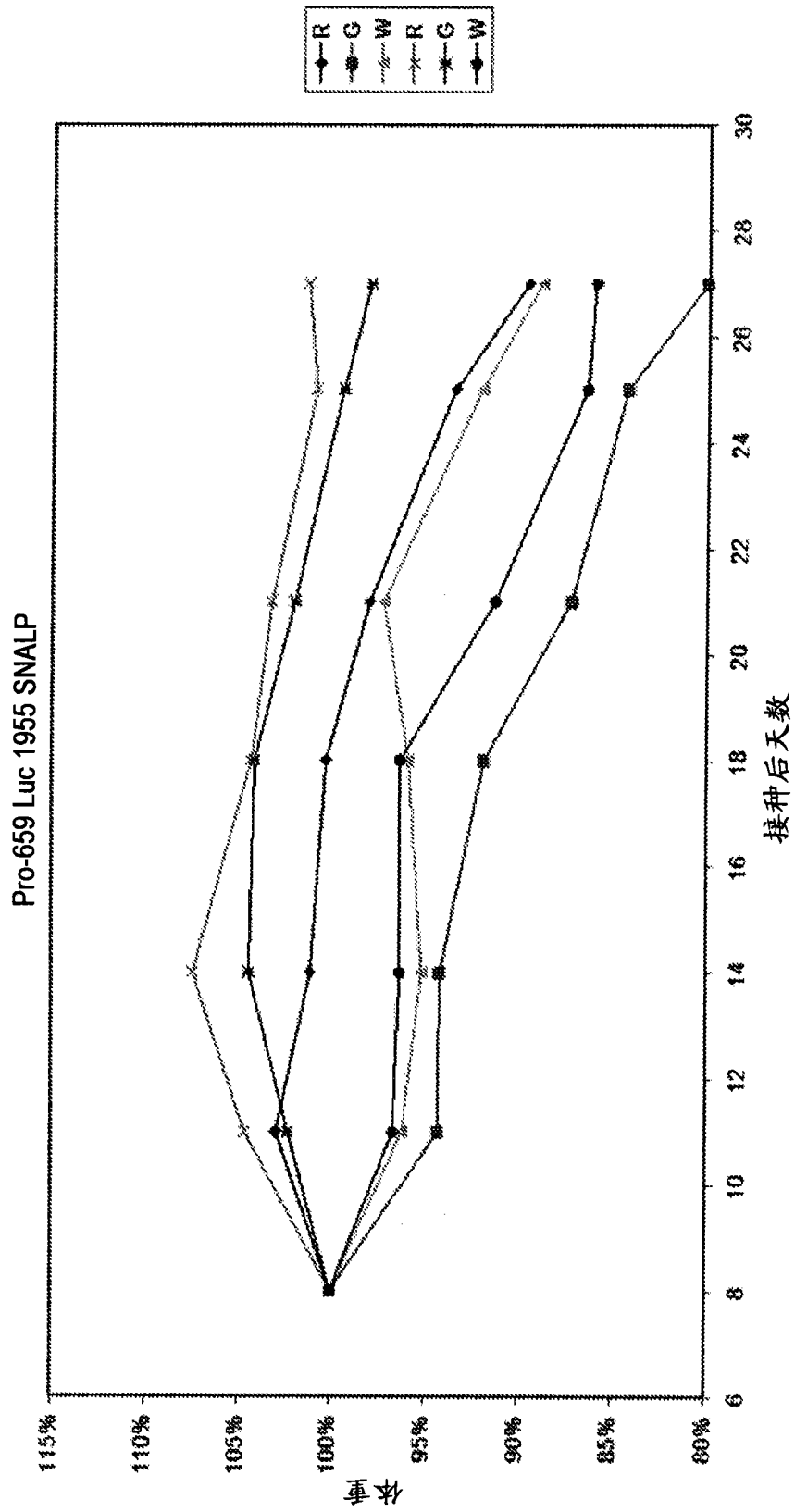


图 5

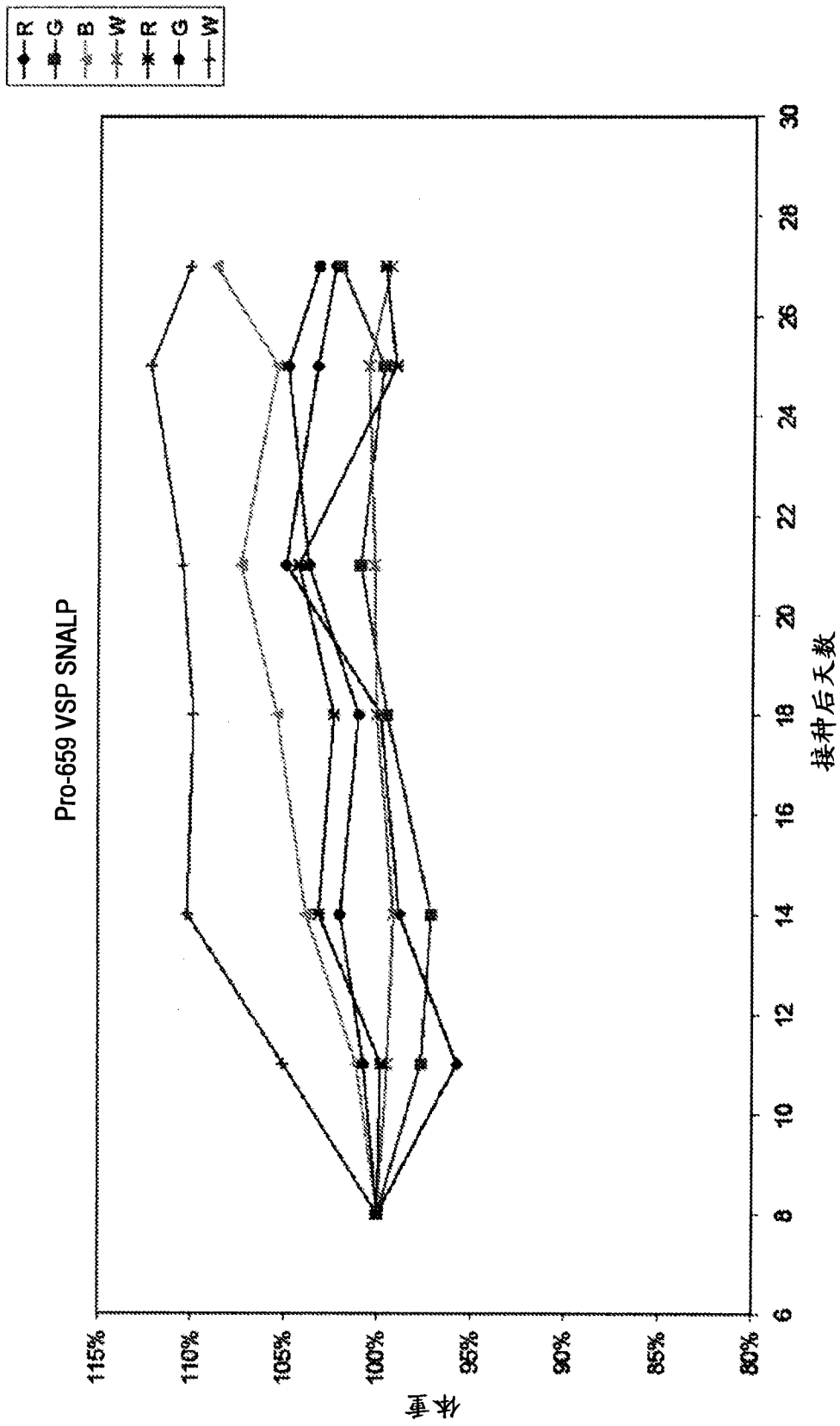


图 6

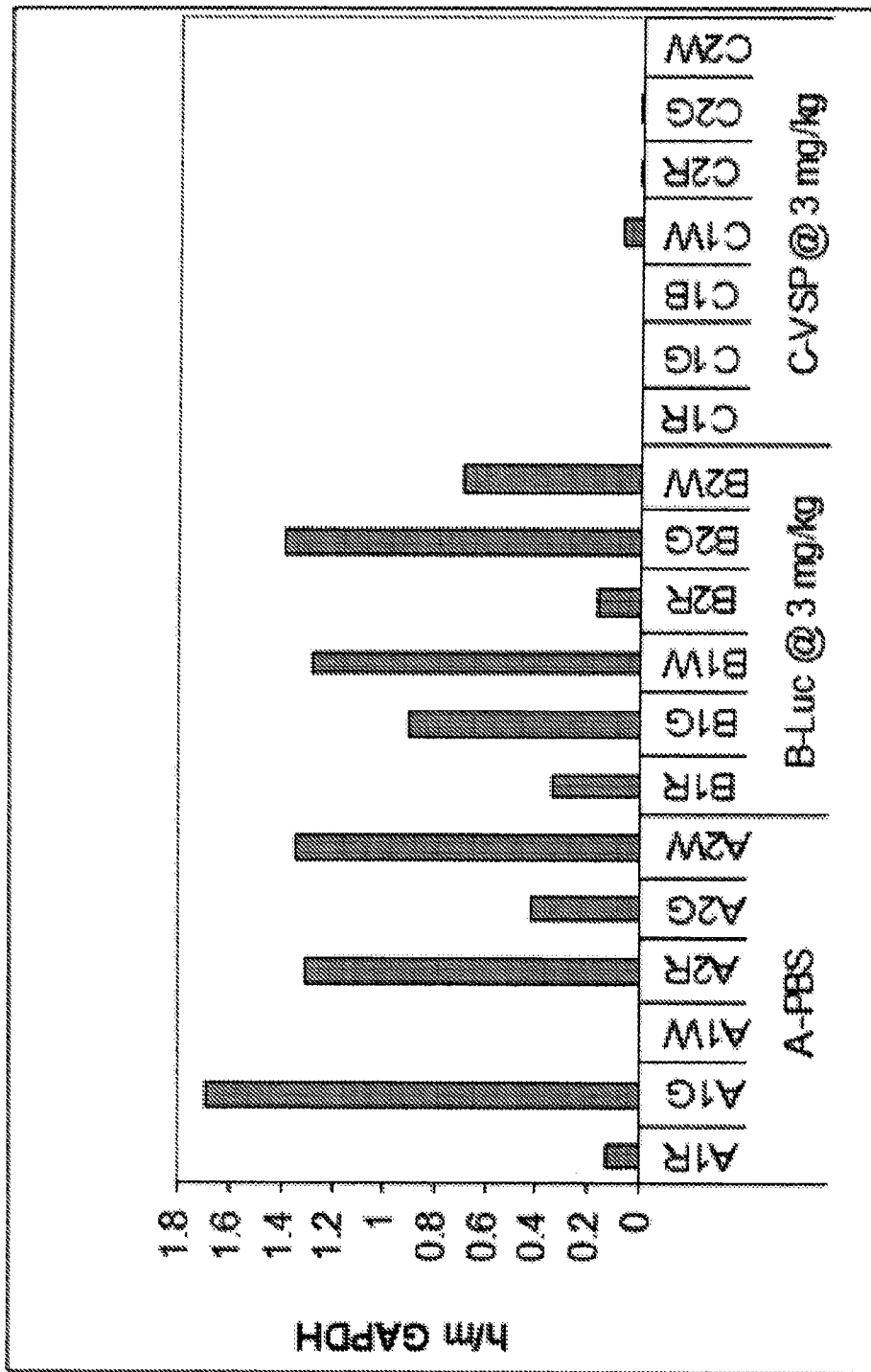


图 7A

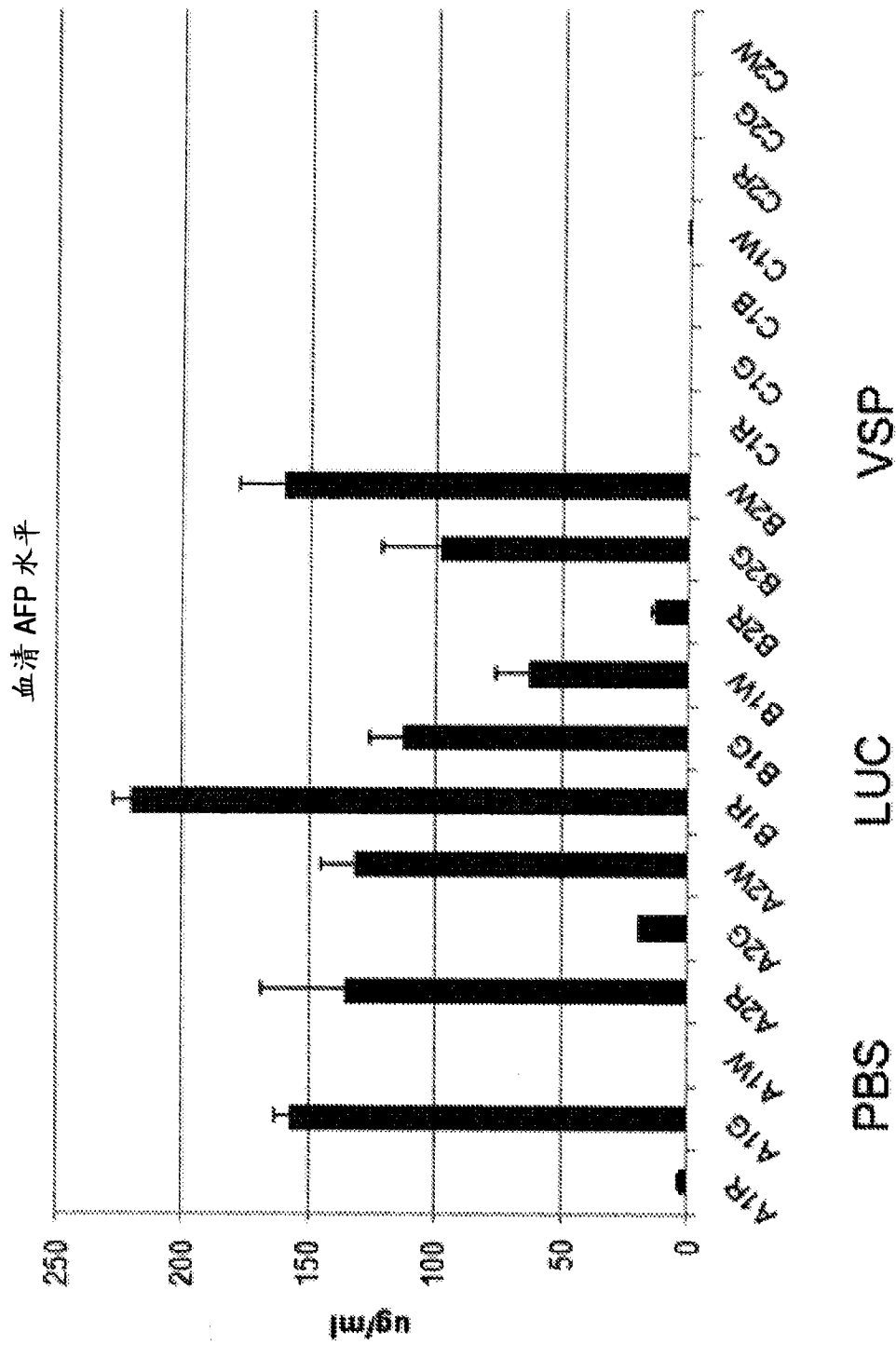


图 7B

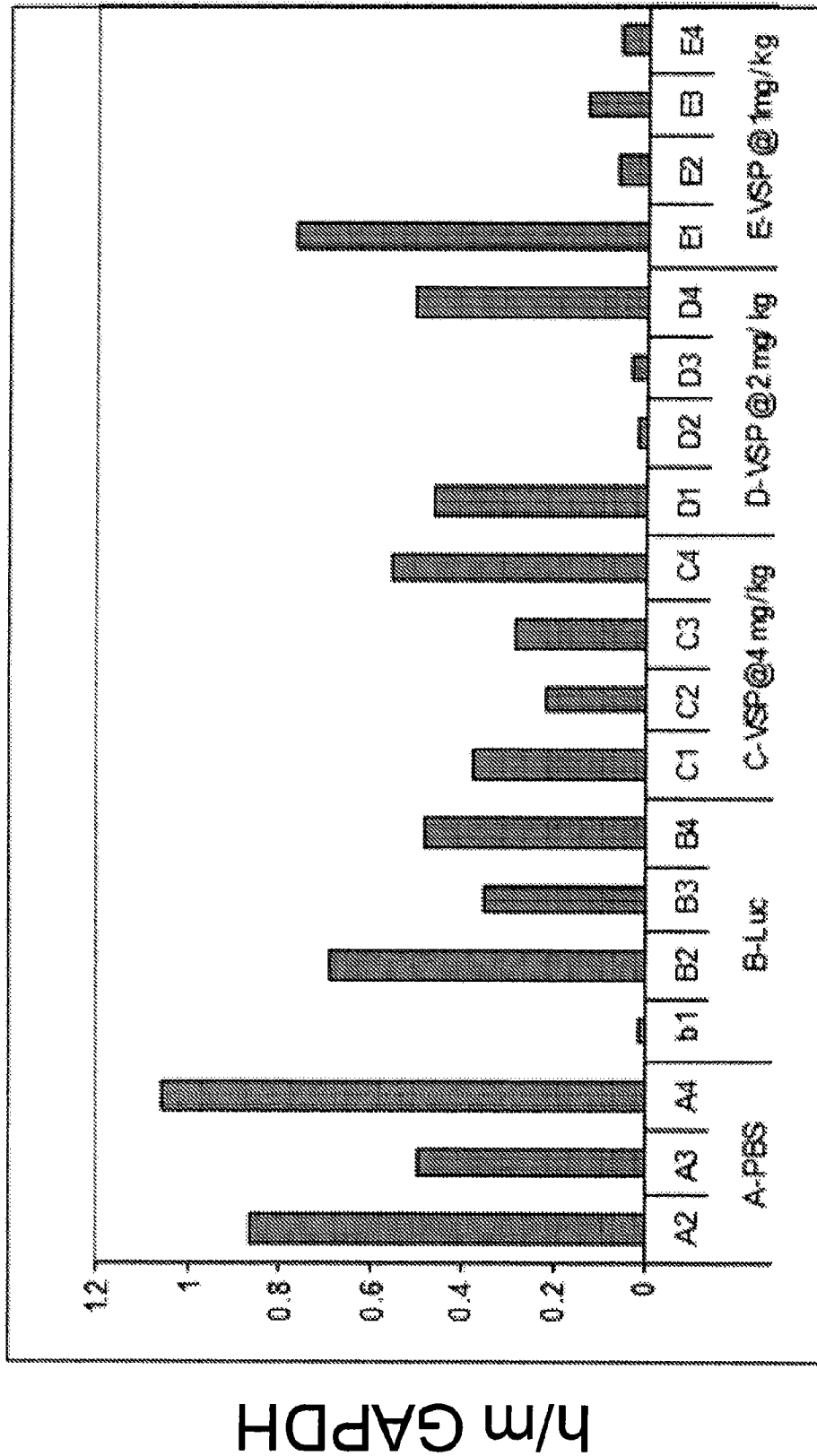


图 8

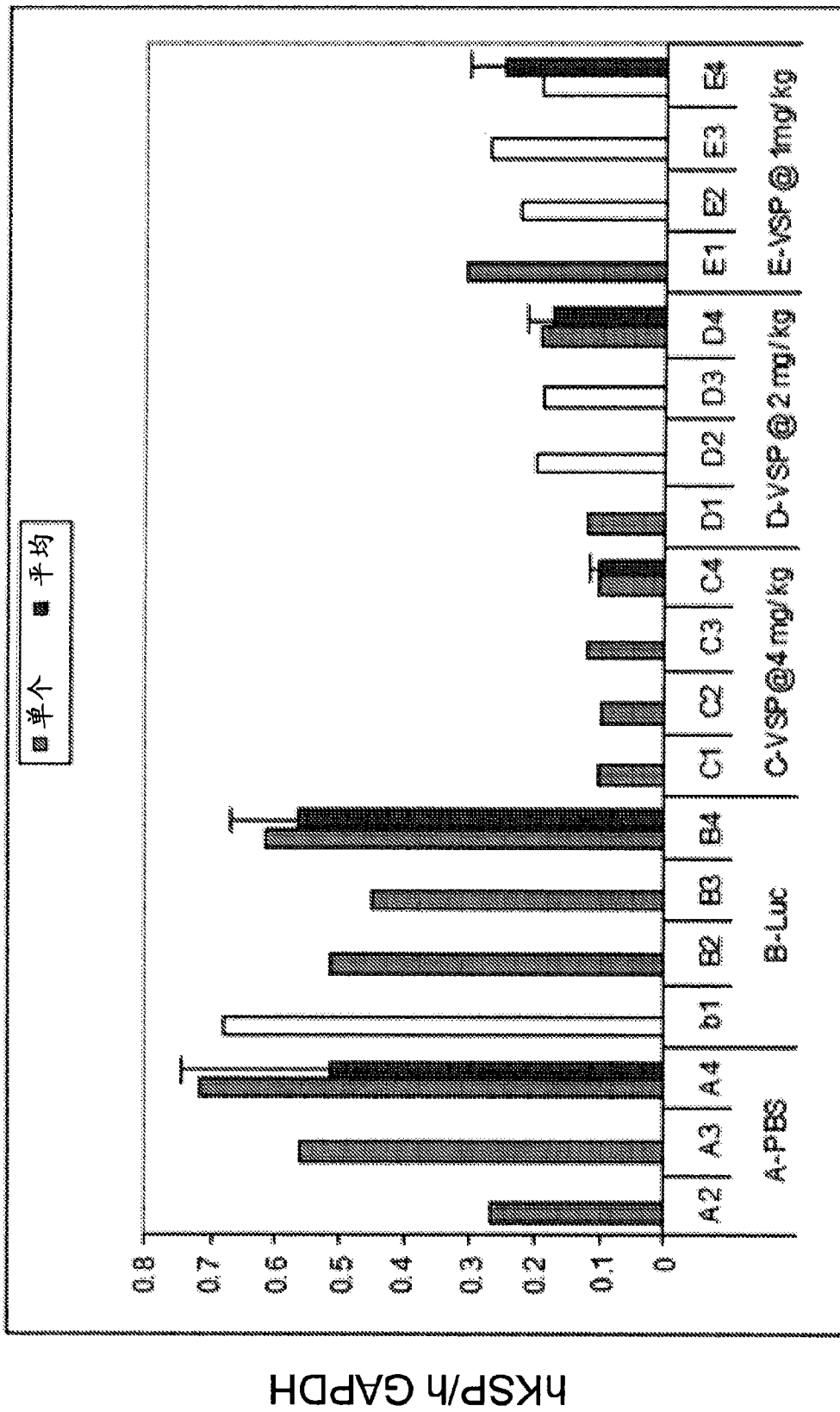


图 9

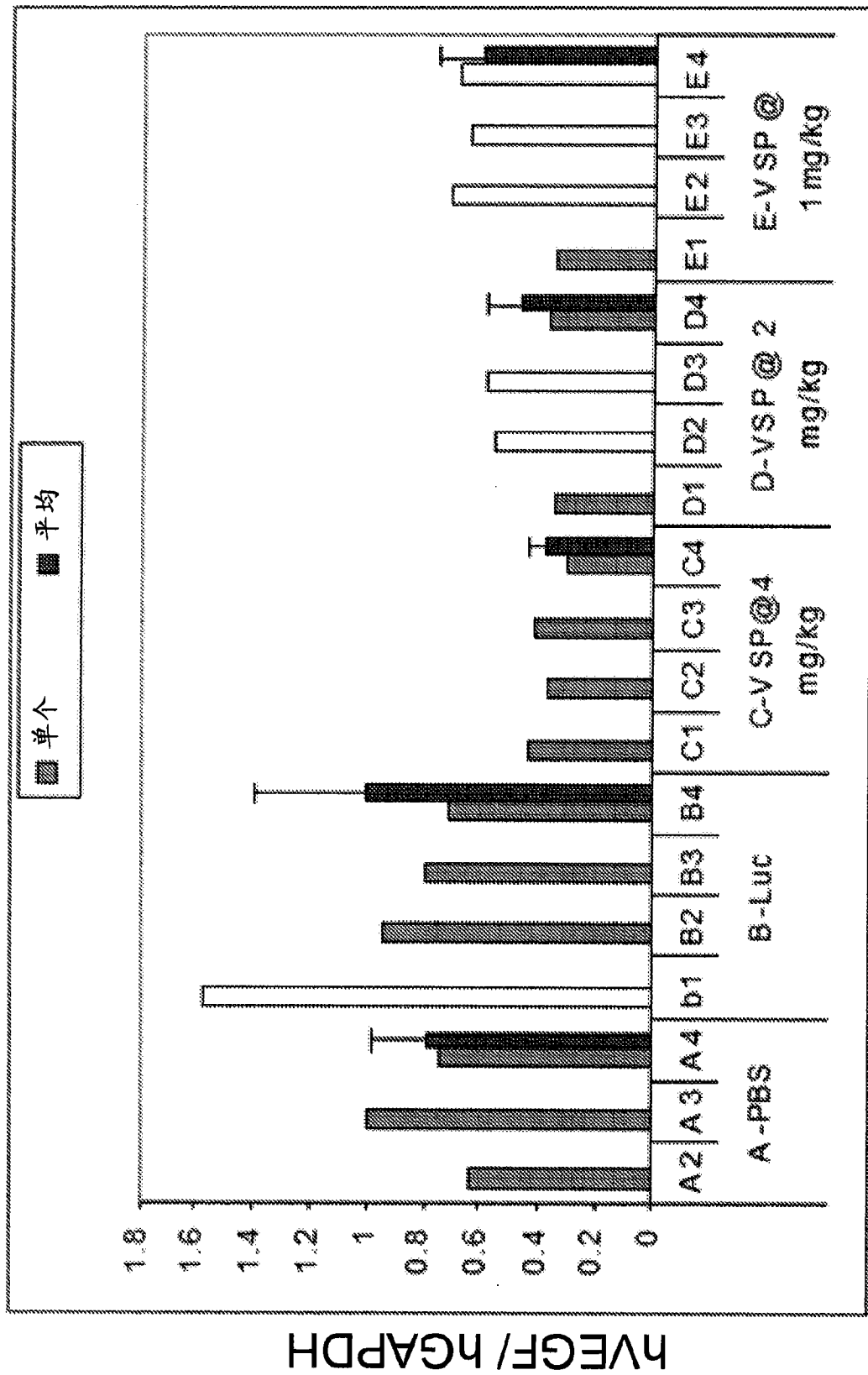


图 10

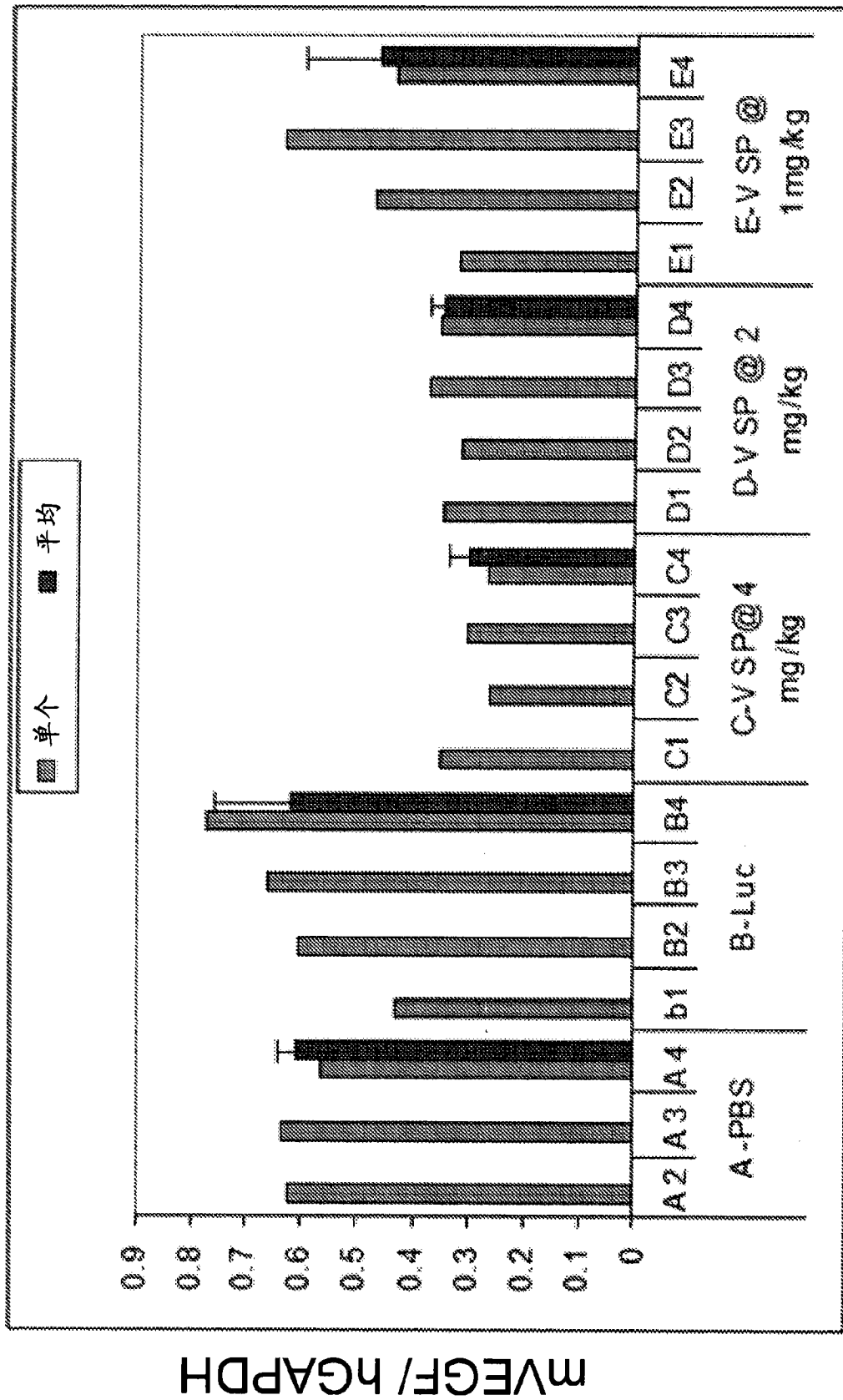


图 11A

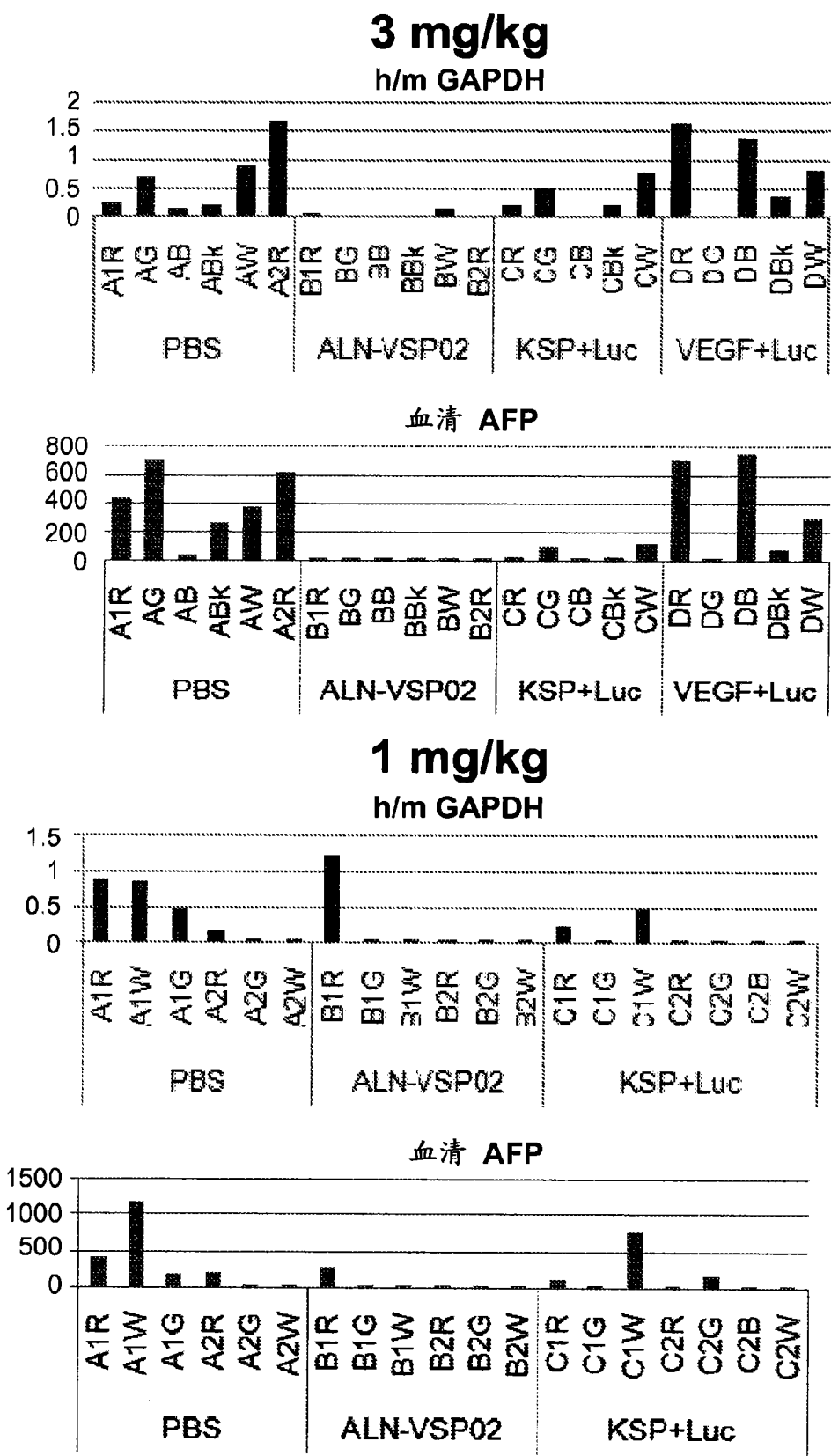


图 11B

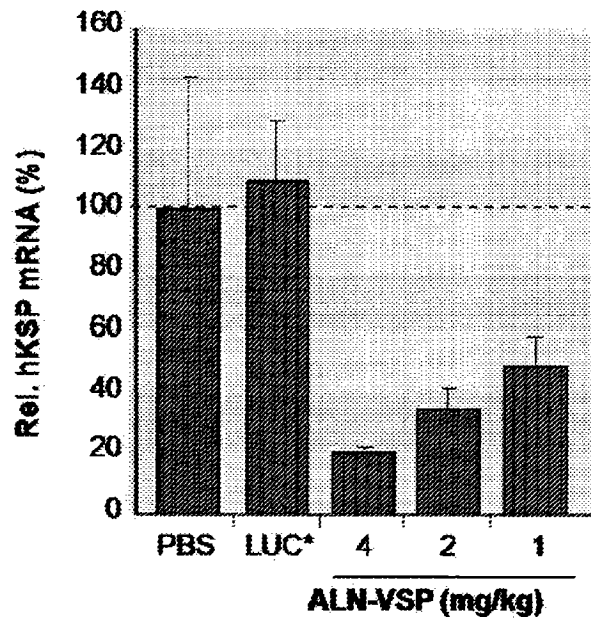


图 12A

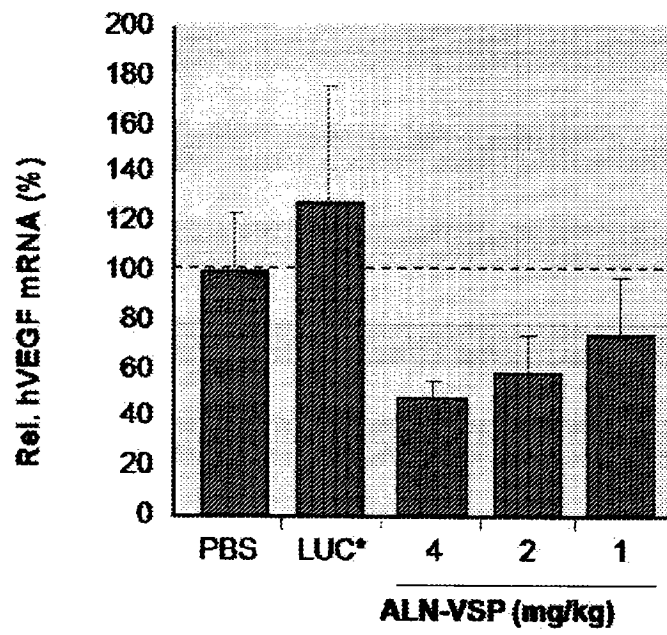


图 12B

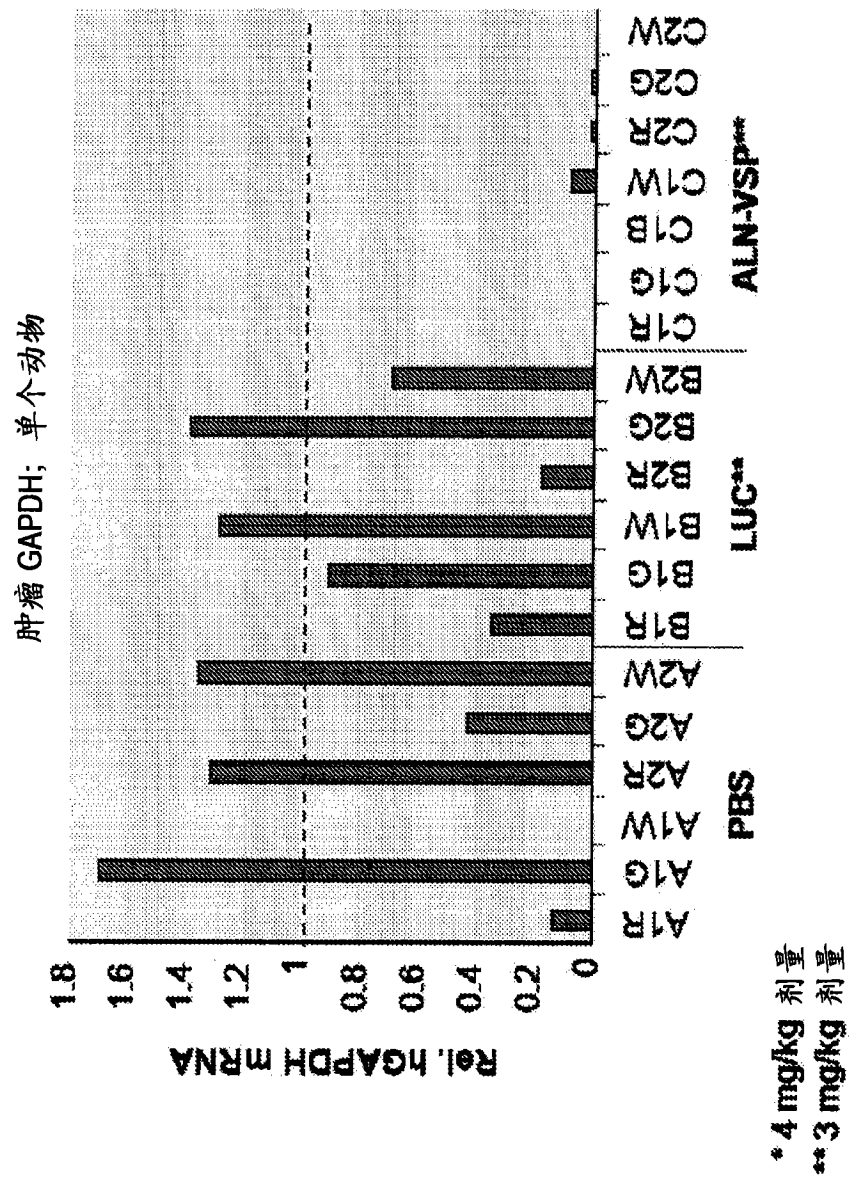


图 12C

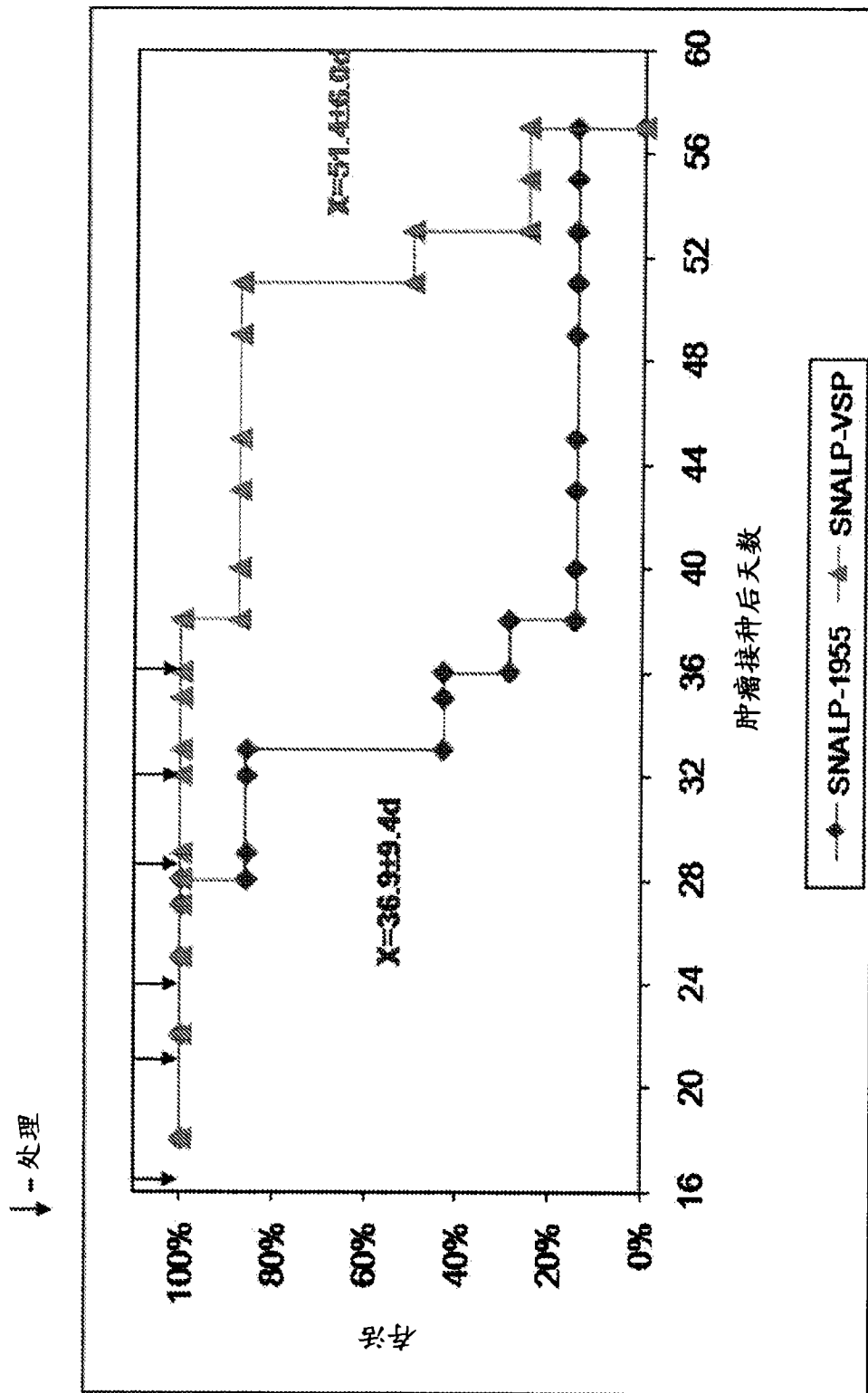
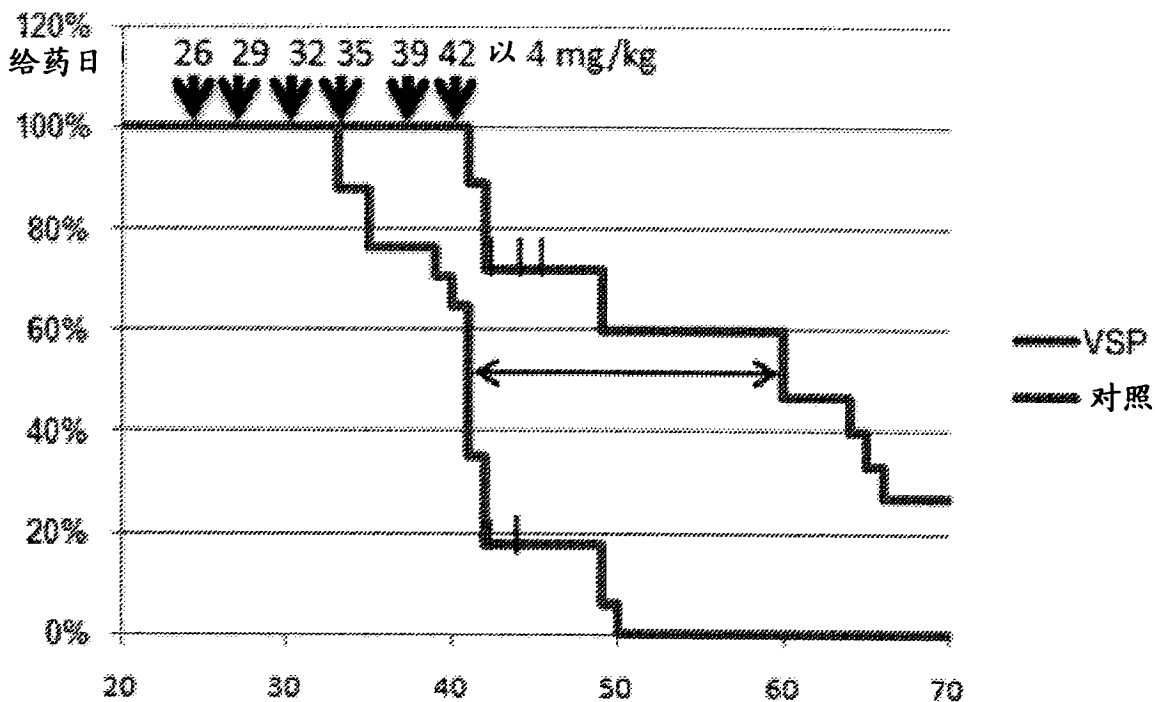


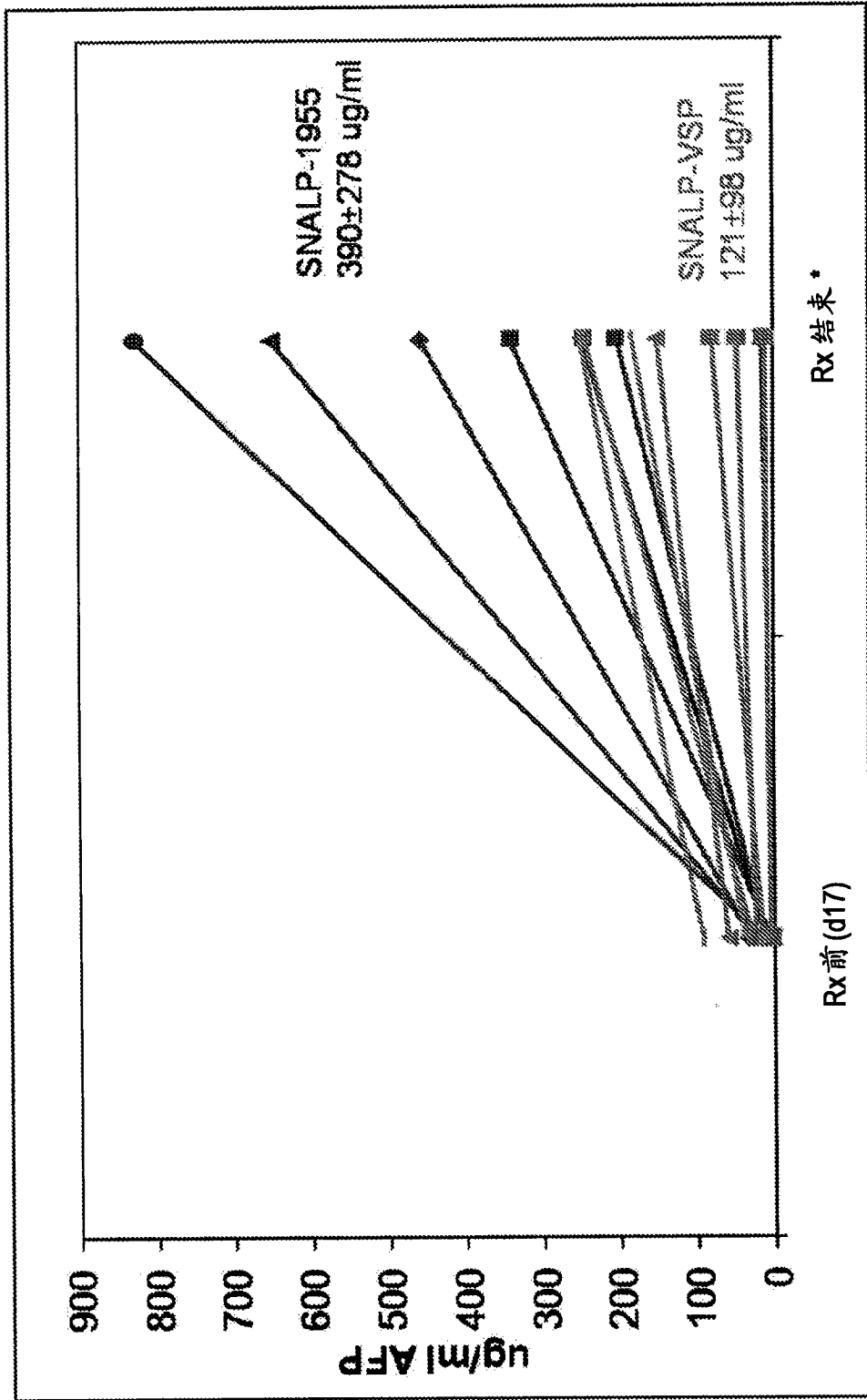
图 13A

VSP02 延长荷瘤小鼠的存活 50%



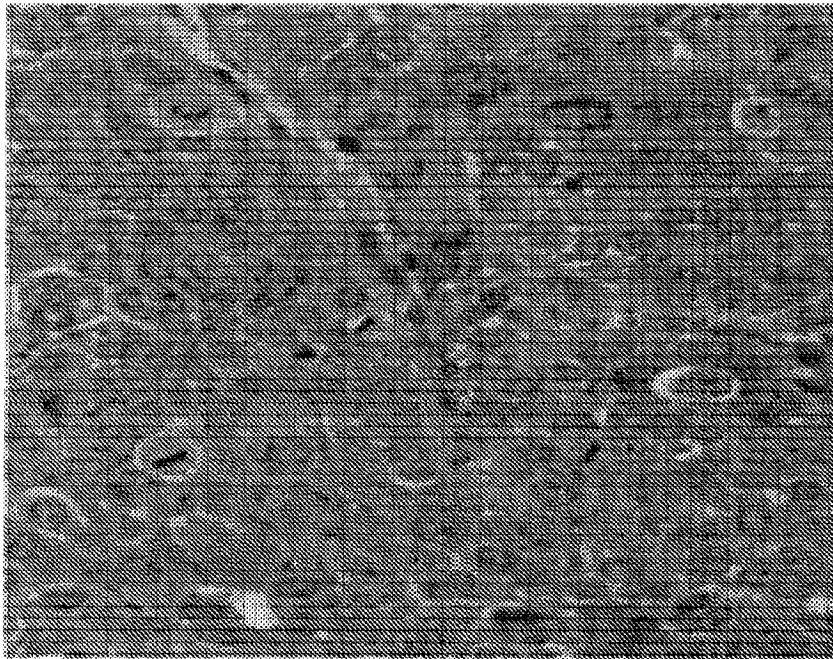
处理	平均存活	中位存活	对数秩
SNALP-Luc	40.8±5.3 天	41 天	p=1.7e-5
ALN-VSP	57.2±11.2 天	60 天	

图 13B

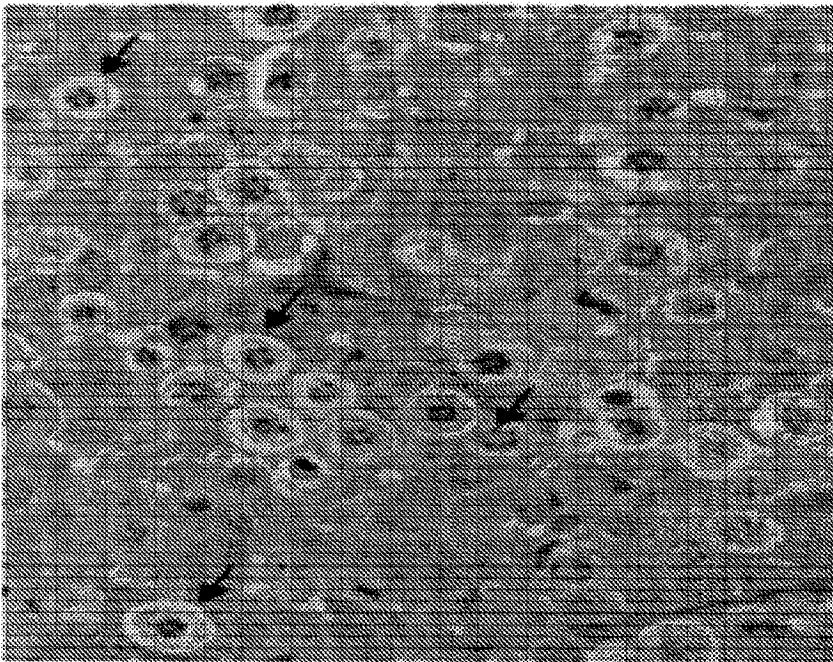


*ALN-VSP02: d32 (n=8)
SNALP-1955: d28 (n=1), d32 (n=3), d33 (n=3)

图 14



B. SNALP-Luc 处理的



A. SNALP-VSP 处理的

图 15

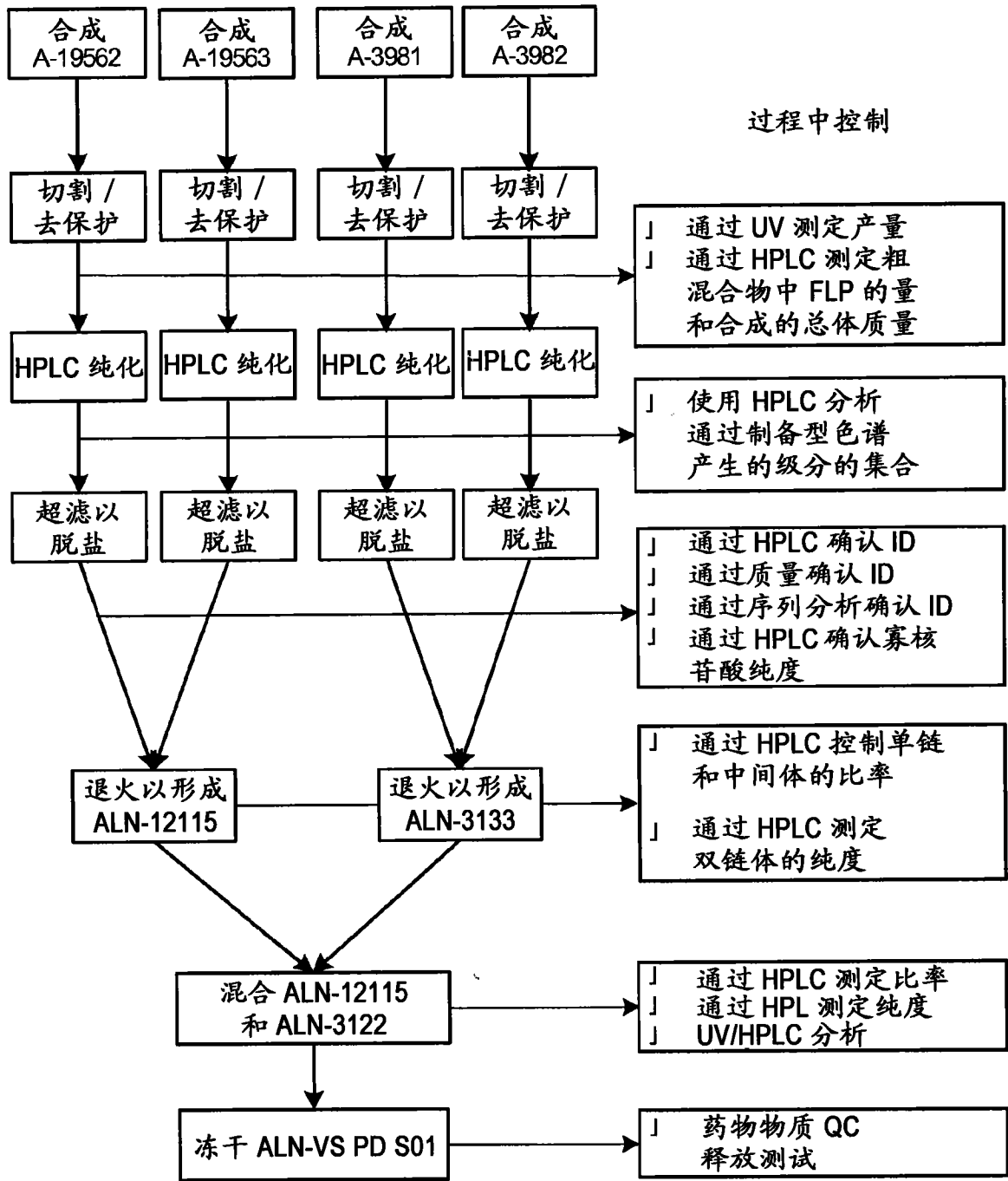


图 16

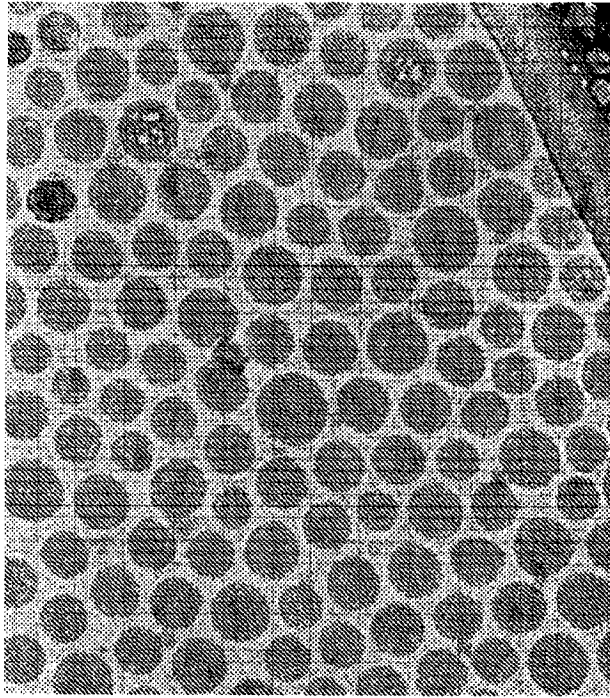


图 17

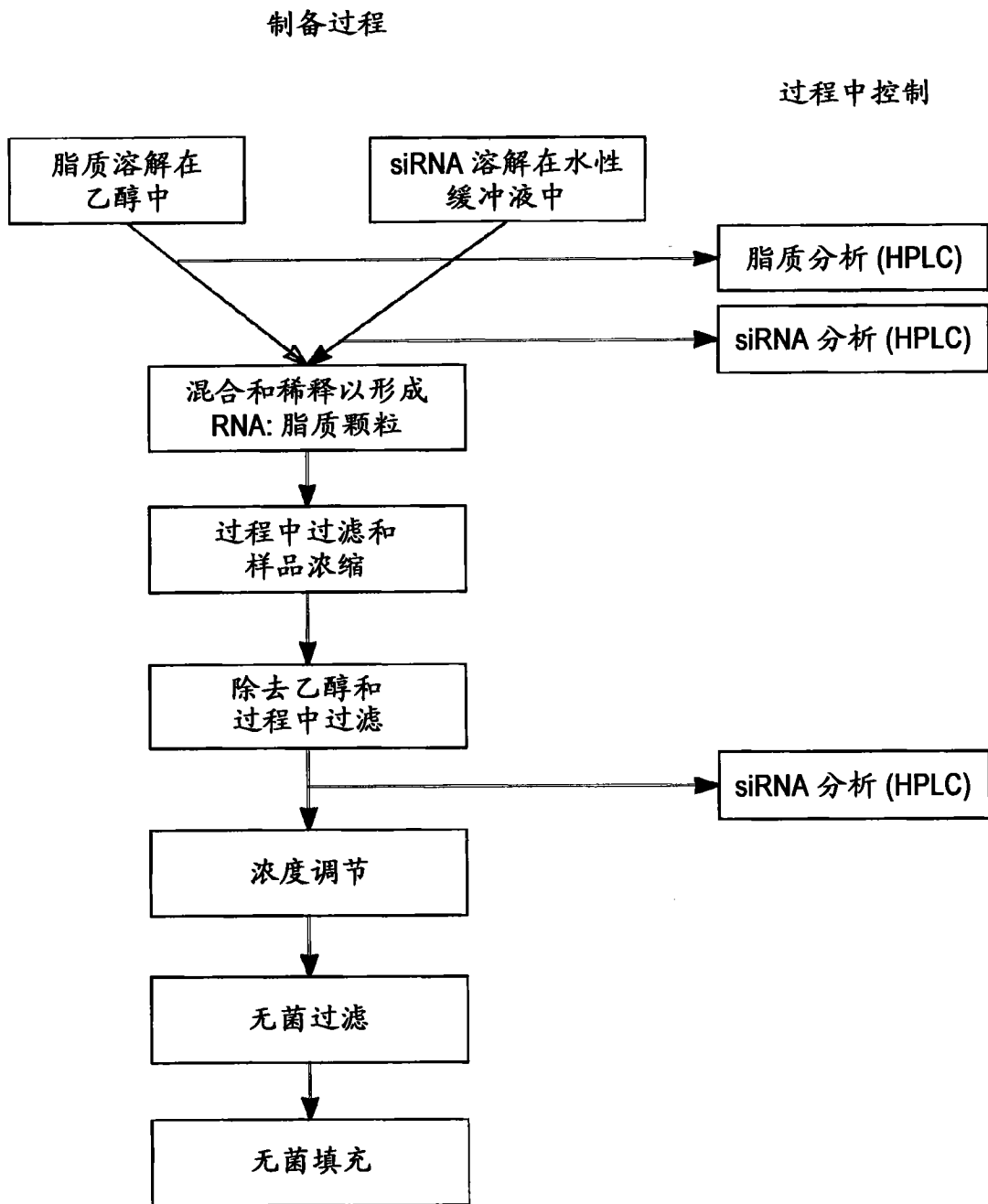


图 18

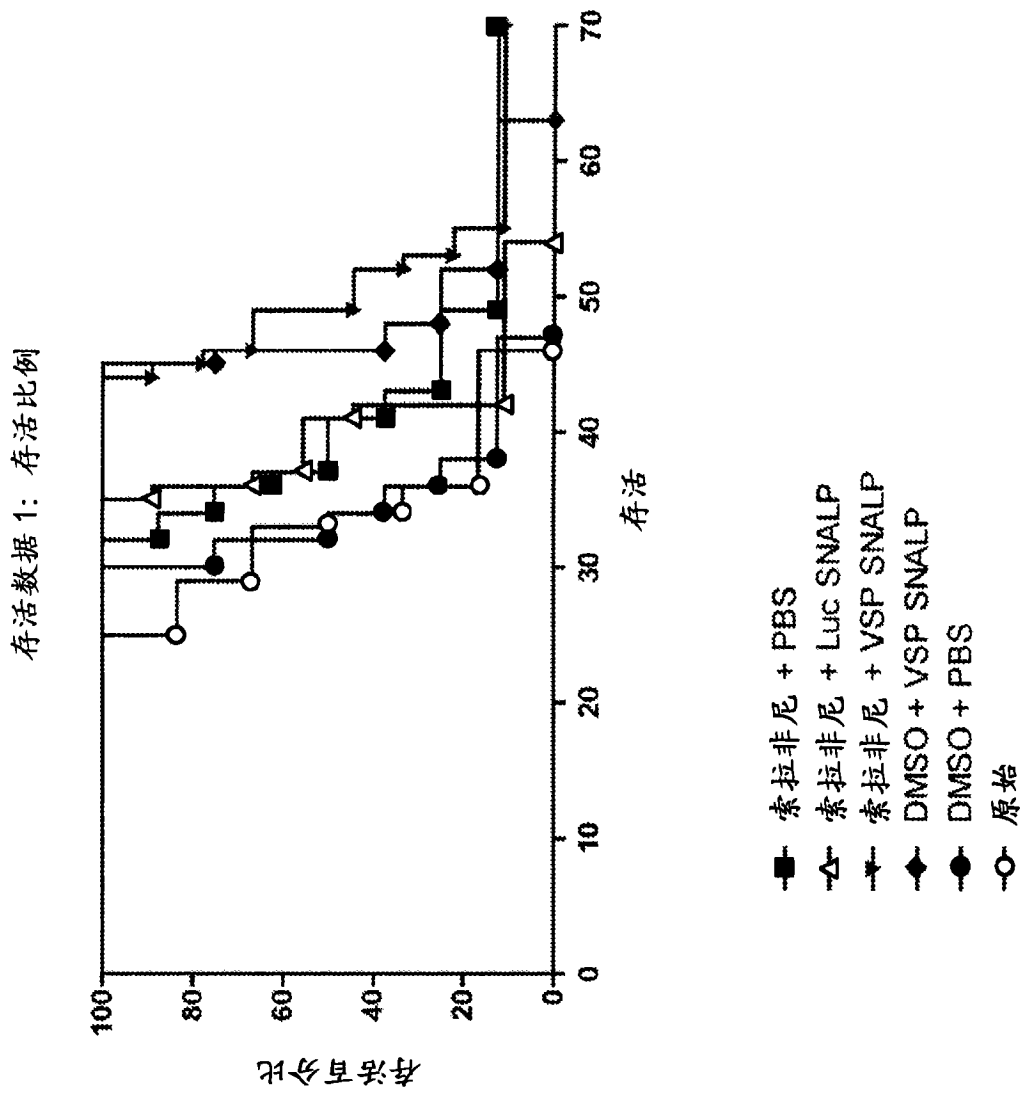


图 19

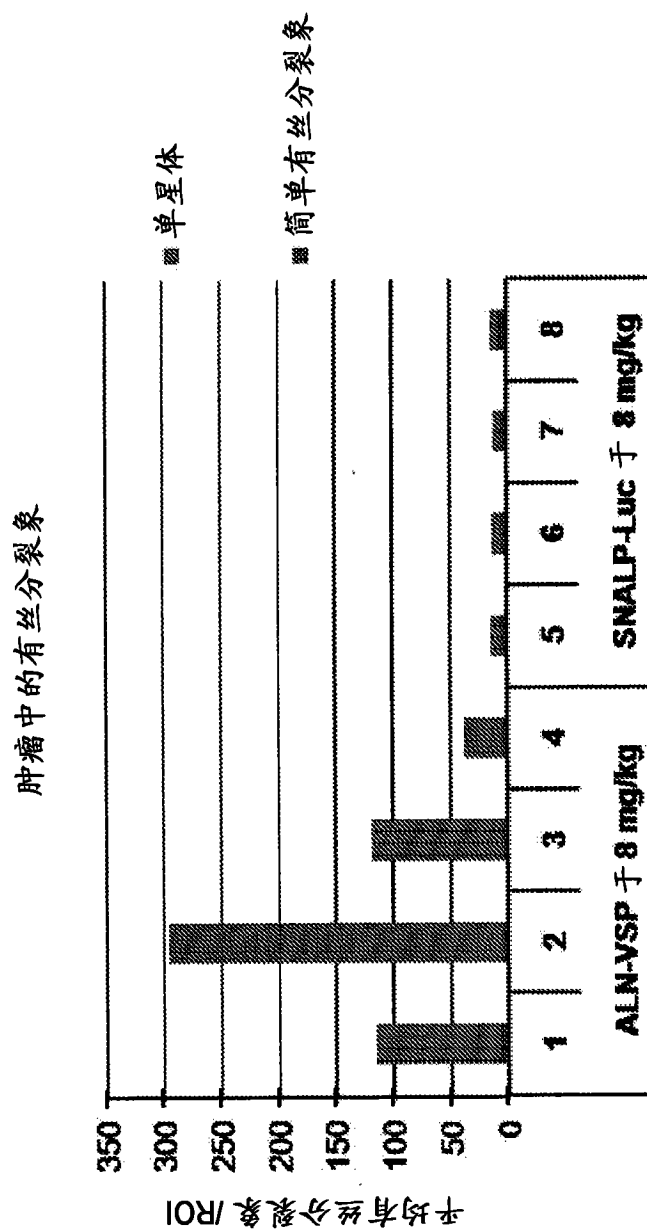


图 20

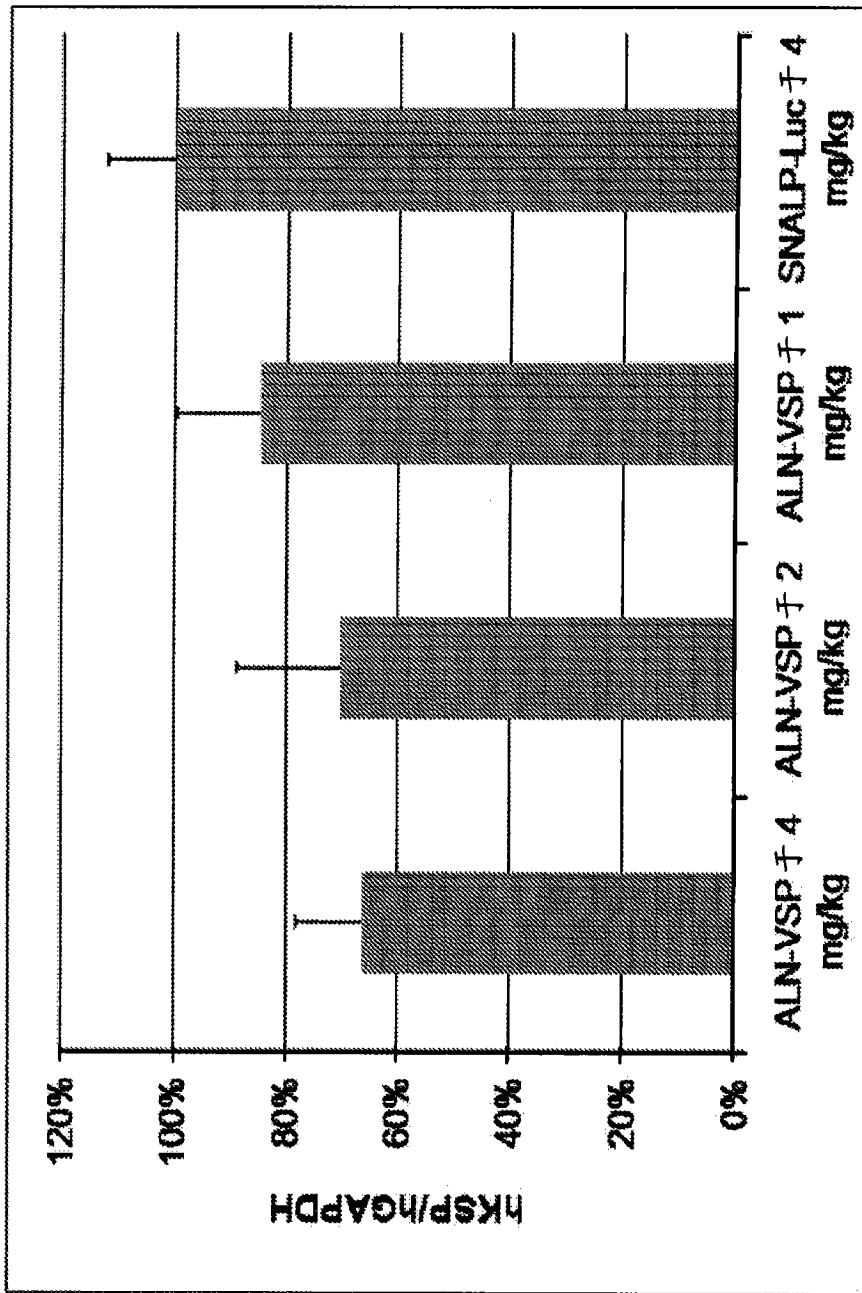


图 21

肝脏中的有丝分裂象

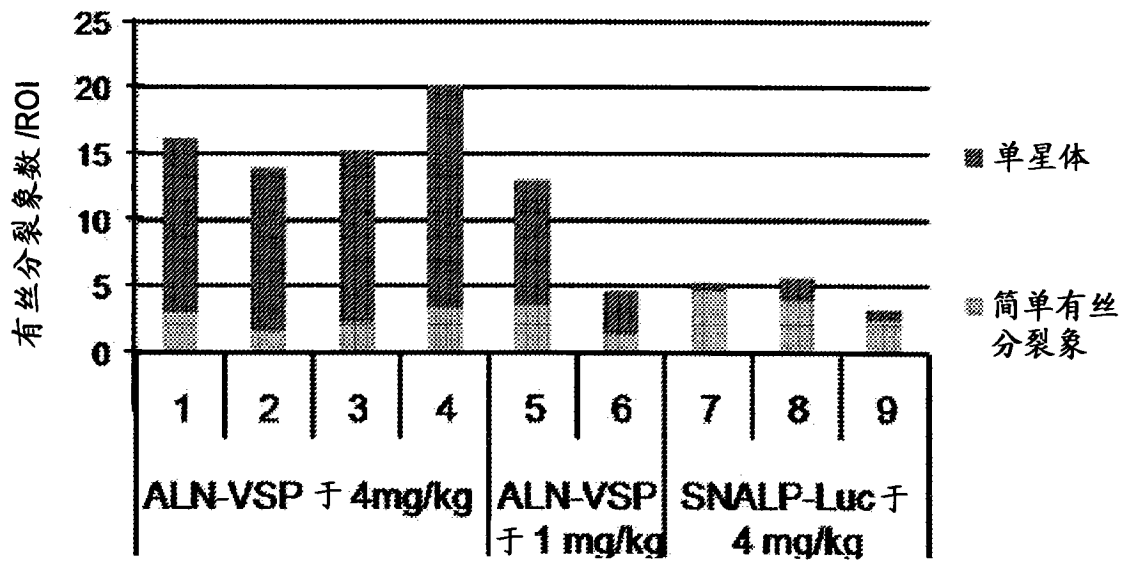


图 22A

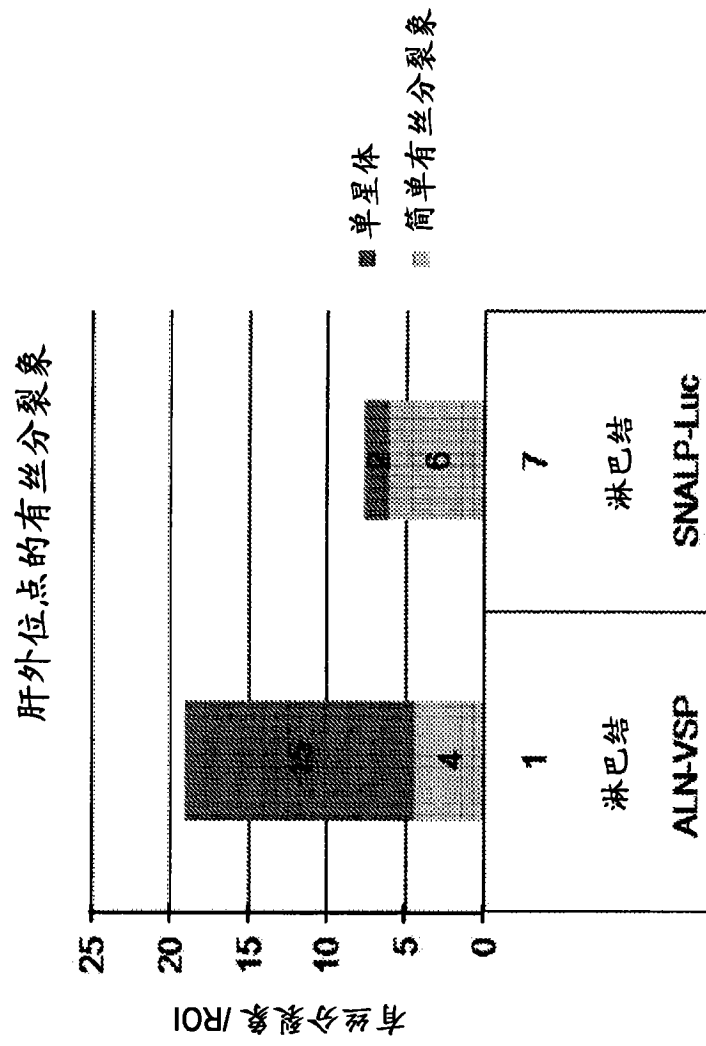


图 22B

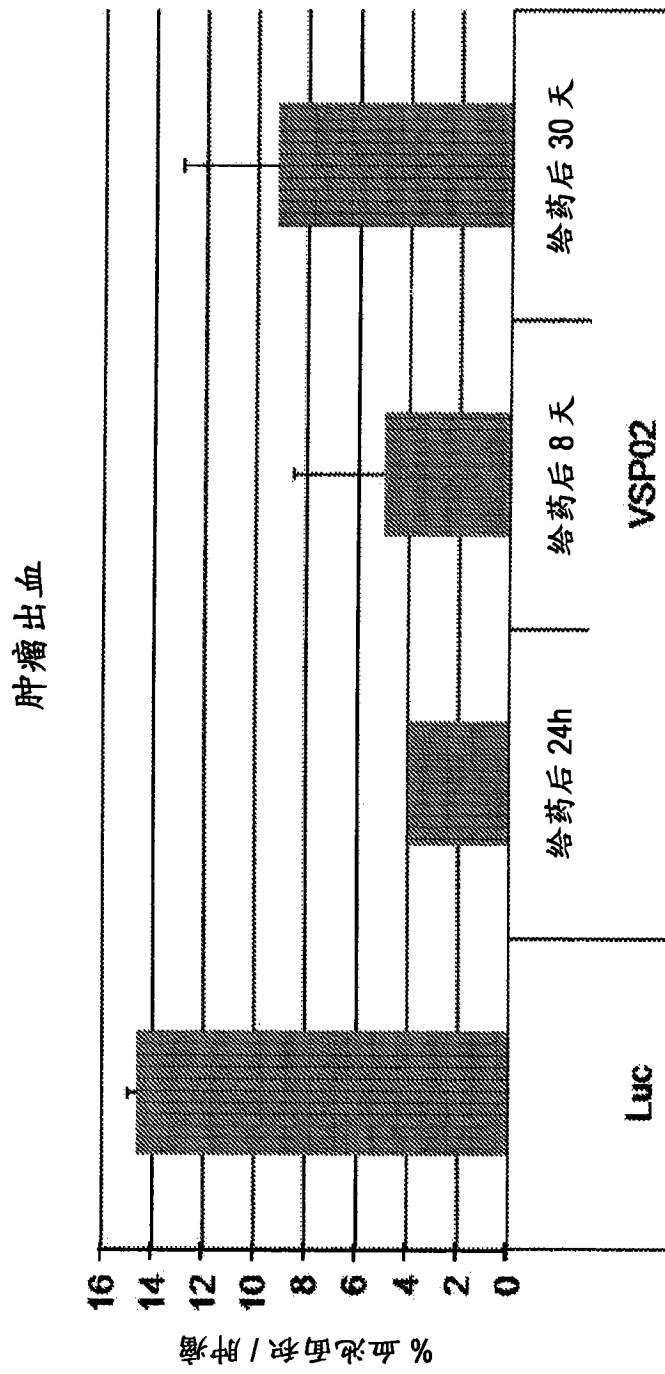


图 23A

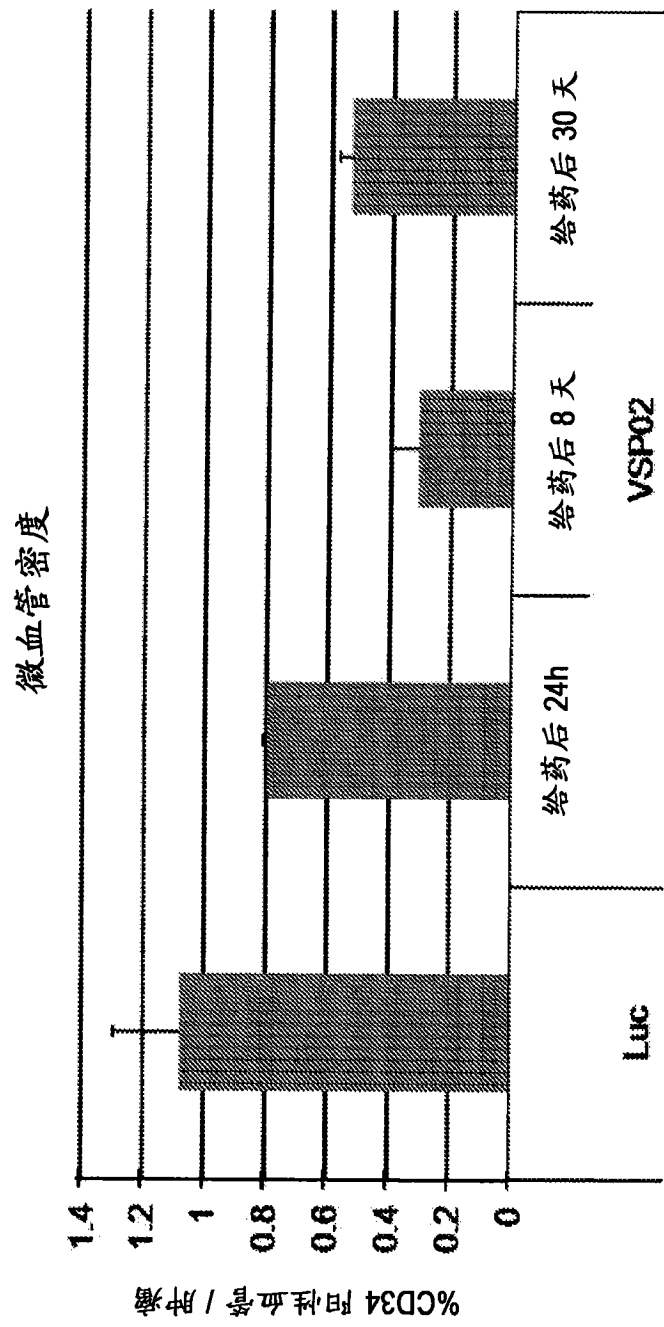


图 23B

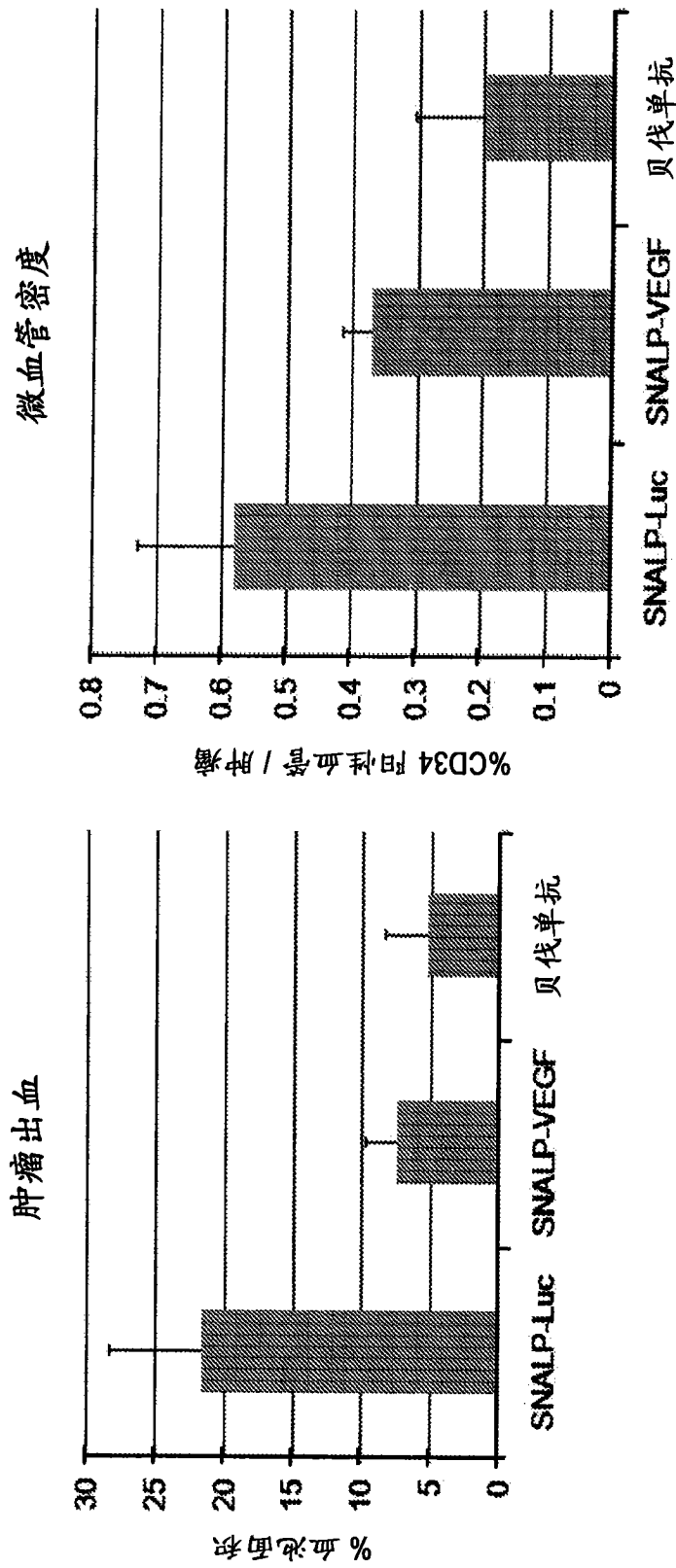
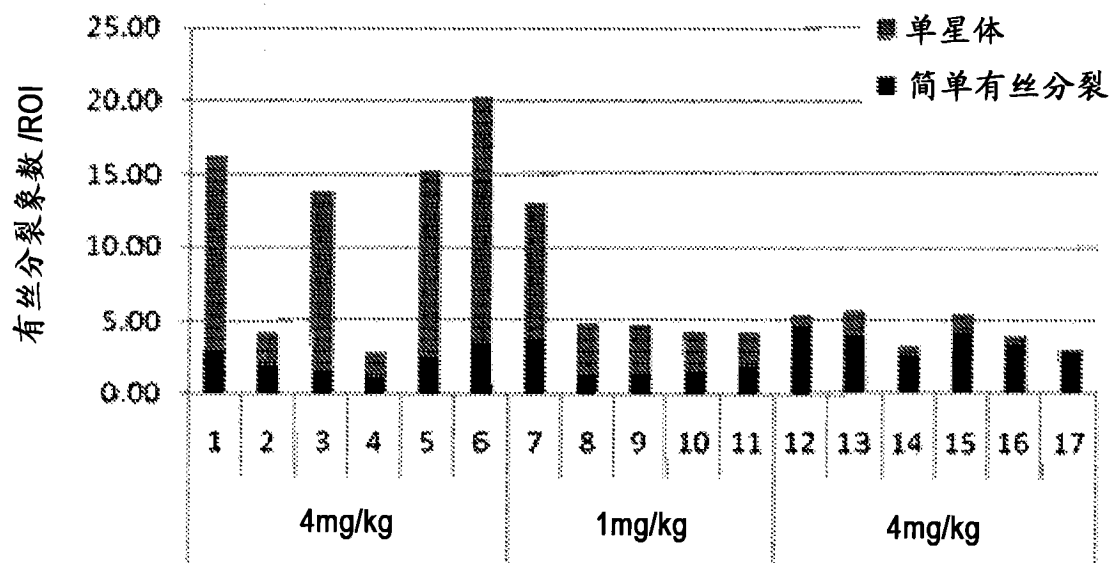


图 24

肝脏肿瘤中的有丝分裂象



肝脏肿瘤中的组平均有丝分裂象

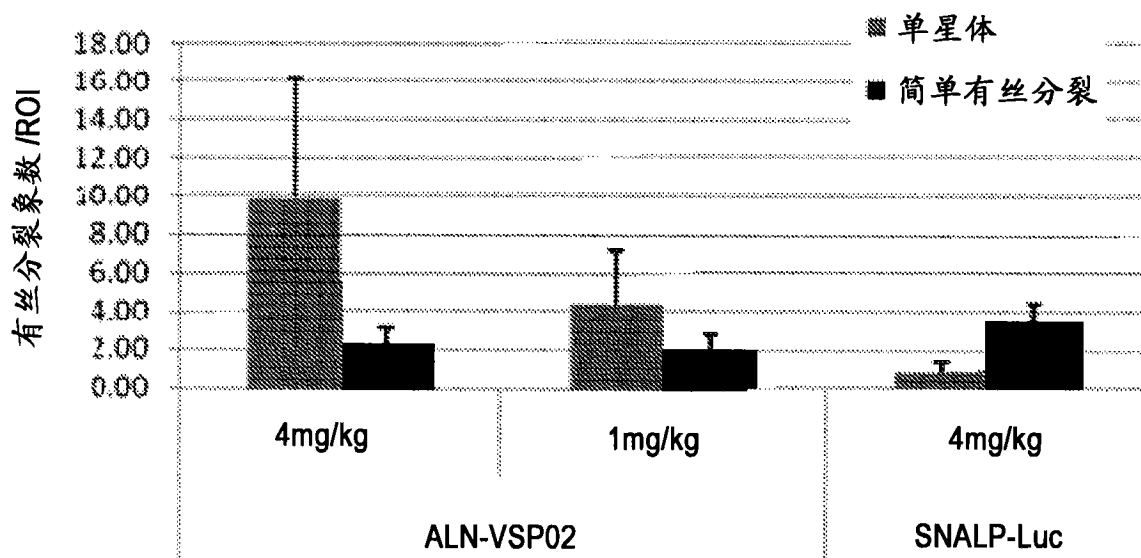


图 25A

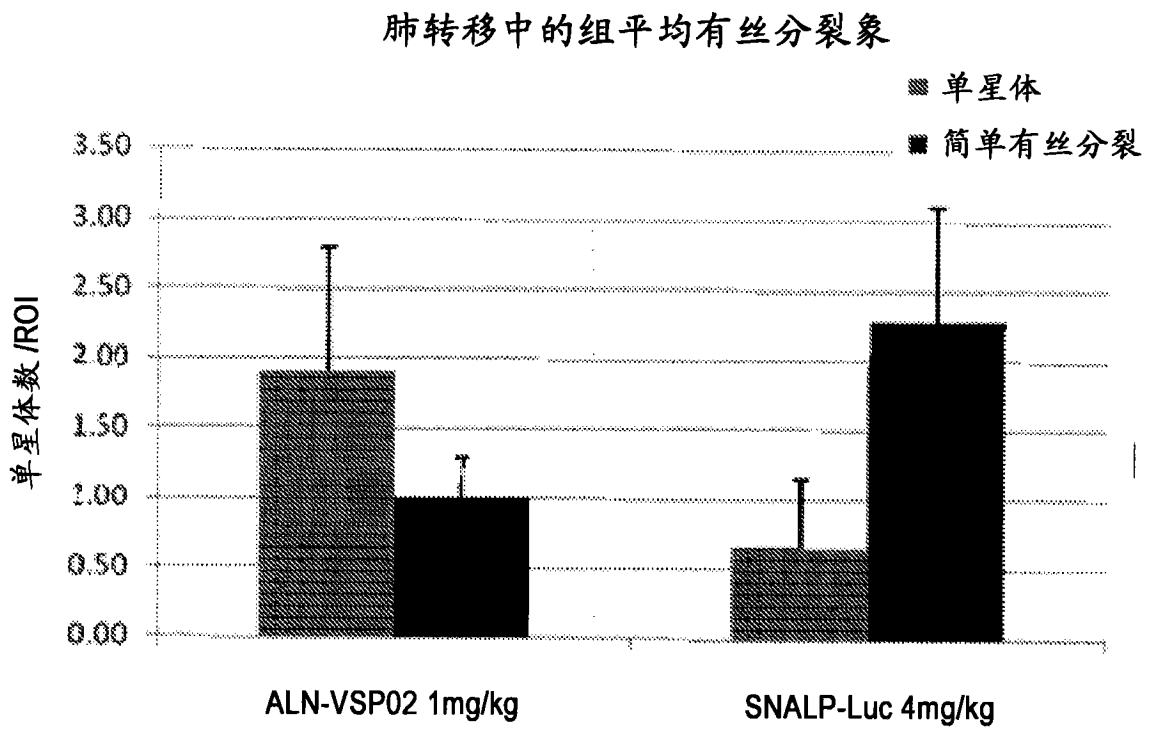
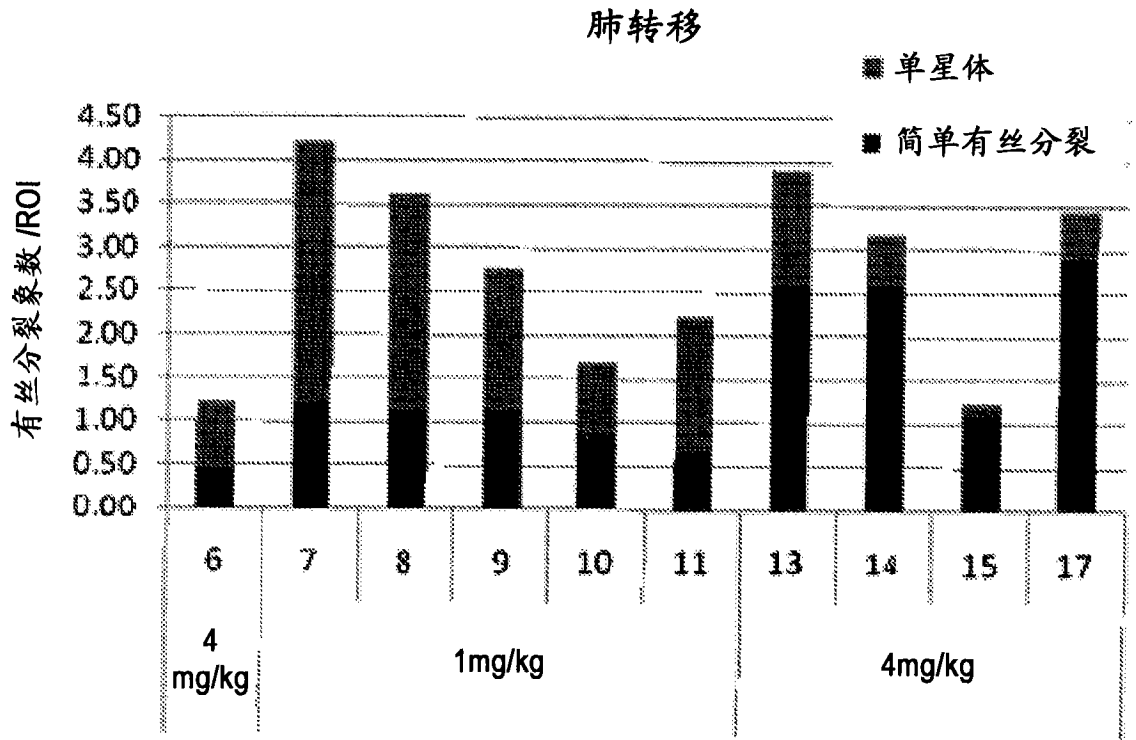
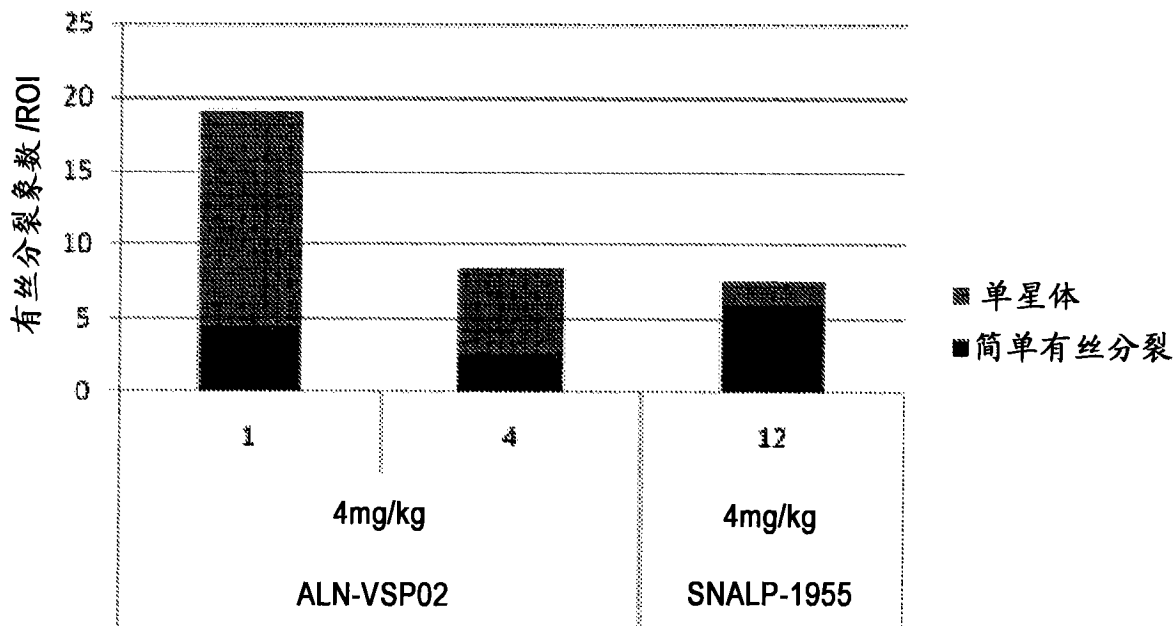


图 25B

淋巴结转移中的有丝分裂象



皮下转移

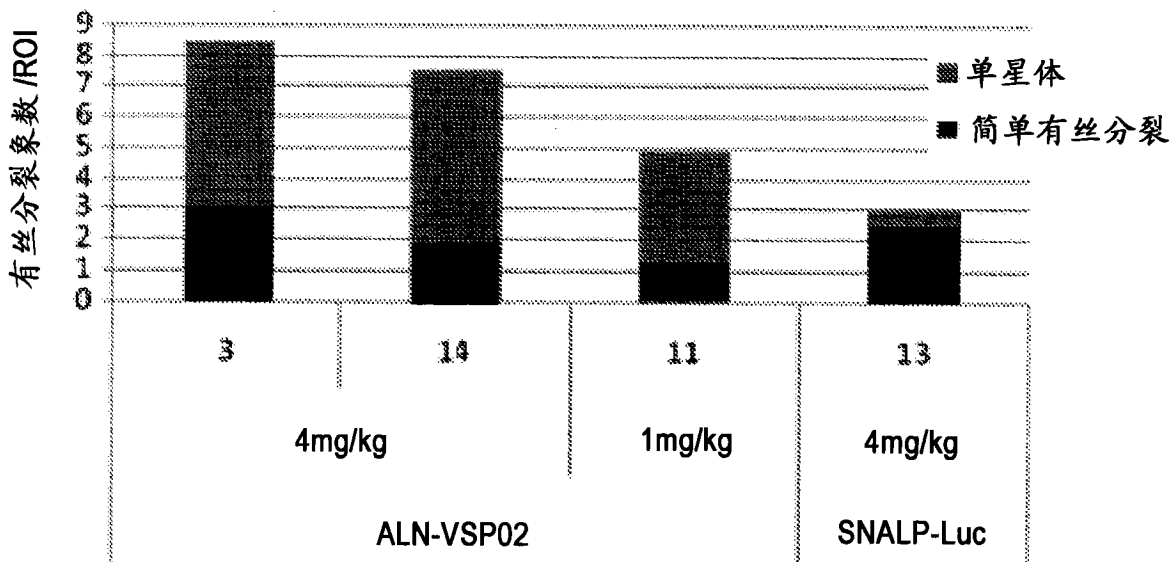


图 25C