



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102203254 A

(43) 申请公布日 2011.09.28

(21) 申请号 200980143026.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.12.11

C12N 15/113(2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 48/00(2006.01)

61/121614 2008.12.11 US

A61P 31/14(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.04.28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2009/001422 2009.12.11

(87) PCT申请的公布数据

W02010/066112 EN 2010.06.17

(71) 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

(72) 发明人 郑伯建 隋洪艳 林勇平

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 郭文洁

权利要求书 1 页 说明书 31 页

序列表 12 页 附图 9 页

(54) 发明名称

有效抑制病毒感染的 siRNA 组合物及方法

(57) 摘要

尚没有抗病毒剂能够成功治疗 H5N1 病毒感染。我们证明一组高效的靶向 H5N1 病毒基因的 siRNAs 共同具有独特基序 GGAGU/ACUCC。我们进一步证明含有此基序的 siRNAs 的有效性不是序列特异性的。结果表明该独特基序的结构对于确定 siRNA-介导的针对病毒感染的保护效果的效力至关重要,以及这种有效的体内保护与该基序诱导的 β - 防卫素和 IL-6 的早期产生有关。提供了用于针对 H5N1 流感病毒和其他病毒感染的方法以及预防剂和治疗剂。

1. 一种 siRNA,其包含基序 GGAGU 或反向基序 ACUCC。
2. 根据权利要求 1 的 siRNA,其包含选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 37 的序列。
3. 根据权利要求 1 或 2 的 siRNA 在制备用于在对象中刺激 IL-6 产生的试剂中的用途。
4. 一种组合物,其包含根据权利要求 1 或 2 的 siRNA 和药学可接受的载体。
5. 一种筛选潜在抗病毒剂的方法,其包括:
获得根据权利要求 1 的 siRNA ;
在所述 siRNA 的抗病毒性质可以被观察的条件下,使所述 siRNA 与培养的细胞接触 ;并将所述 siRNA 的任何抗病毒性质与对照比较 ;其中显示高于对照的抗病毒性质的 siRNA 被确定为潜在抗病毒剂。
6. 根据权利要求 5 的方法,其中所述对照选自阴性对照、未处理细胞培养物和阳性对照。
7. 根据权利要求 6 的方法,其中所述阳性对照为 siRNA,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 37 的序列。
8. 一种筛选潜在抗病毒剂的方法,其包括:
产生一个根据权利要求 1 的 siRNA ;
在所述 siRNA 的抗病毒性质可以被观察的条件下,将所述 siRNA 施用给动物模型,并用病毒攻击所述动物 ;以及
测定所述 siRNA 是否在体内显示抗病毒性质。
9. 根据权利要求 8 的方法,进一步包括将所述 siRNA 的任何抗病毒性质与对照比较 ;其中显示高于所述对照的抗病毒性质的 siRNA 被确定为潜在抗病毒剂。
10. 根据权利要求 9 的方法,其中所述对照选自阴性对照、未处理的动物和阳性对照。
11. 根据权利要求 10 的方法,其中所述阳性对照为 siRNA,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 37 的序列。
12. 根据权利要求 5 的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗甲型流感病毒性质,优选为抗 H5N1 性质。
13. 根据权利要求 6 的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗甲型流感病毒性质,优选为抗 H5N1 性质。
14. 根据权利要求 7 的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗甲型流感病毒性质,优选为抗 H5N1 性质。
15. 根据权利要求 8 的方法,其中所述病毒为甲型流感病毒,优选 H5N1。
16. 根据权利要求 9 的方法,其中所述病毒为甲型流感病毒,优选 H5N1。
17. 根据权利要求 10 的方法,其中所述病毒为甲型流感病毒,优选 H5N1。
18. 根据权利要求 11 的方法,其中所述病毒为甲型流感病毒,优选 H5N1。
19. 根据权利要求 1 或 2 的 siRNA 在制备用于在对象中刺激 β - 防卫素产生的试剂中的用途。

有效抑制病毒感染的 siRNA 组合物及方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求 2008 年 12 月 11 日提交的美国临时申请序列号 61/121614 的权益,其通过引用整体并入本文,包括所有的附图、表格、氨基酸序列和核酸序列。

背景技术

[0002] 最近在家禽和人类中爆发的高致病性 H5N1 禽流感病毒感染已经引起关注,不久的将来可能发生大范围流行的新型流感⁽¹⁾。考虑到 H5N1 禽流感相关的死亡率高达 45% 到 81%^(2,3),以及现有疫苗和药物疗效有限^(4,5),开发用于预防和治疗禽流感 H5N1 病毒感染的新策略迫在眉睫。

[0003] H5N1 禽流感病毒属于甲型流感病毒,是一种包膜的、负链 RNA 病毒。单链 RNA 病毒的独特性质使采用小干扰 RNAs(siRNAs)作为抗禽流感预防剂和治疗剂具有吸引力。siRNA 是双链 RNA,其反义链与 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)结合后,介导 mRNA 序列特异性的降解^(6,7)。已报道针对 H5N1 病毒的 PA 和 NP 基因的 siRNA 在培养的细胞中可以有效抑制病毒复制,并在小鼠模型中提供预防效果,但是不能提供任何显著的治疗效果^(8,9)。因此,对于开发基于 RNA 干扰的抗 H5N1 剂来说,迫切需要设计和鉴定更有效的 siRNAs。

发明内容

[0004] 我们设计和鉴定了 25 个候选 siRNAs,其靶向 H5N1 病毒基因 PB1、PB2、PA、NP、M、NS 和 HA 的相对保守区。有意思的是,几个与任何其他报道过的 siRNAs (8-13)不同的有效 siRNAs 包含新型基序(命名为“siRNA-m”)。与不含此基序的 siRNAs (命名为“siRNA-n”),包括两种已经报道的在培养的细胞和体内最有效的 siRNAs^(8,9)相比,这些 siRNAs 在细胞培养测定中显示出较低的抗病毒效果,但是在被致死量高致病性流感病毒攻击的小鼠模型中,出人意料地提供高得多的保护作用。并且,该强大的体内保护效果可与该基序诱导的 β -防卫素和 IL-6 的早期产生有关。因此提供了新型的病毒抑制剂。提供了新的筛选潜在抗病毒药物的方法。还提供了制备有效的病毒抑制剂的方法,以及预防、抑制和治疗病毒感染和增殖的方法。

[0005] 本发明提供下列技术方案:

1. siRNA,其包含基序 GGAGU 或反向基序 ACUCC。

[0006] 2. 根据第 1 项(item)的 siRNA,其包含选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 37 的序列。

[0007] 3. 在对象中刺激 IL-6 产生的方法,其包括向所述对象施用有效量的如第 1 项所述的 siRNA。

[0008] 4. 在对象中刺激 IL-6 产生的方法,其包括向所述对象施用有效量的如第 2 项所述的 siRNA。

[0009] 5. 组合物,其包含如第 1 项所述的 siRNA 和药学可接受的载体。

- [0010] 6. 组合物,其包含如第 2 项所述的 siRNA 和药学可接受的载体。
- [0011] 7. 在对象中刺激 IL-6 产生的方法,其包括向所述对象施用有效量的如第 5 项所述的 siRNA。
- [0012] 8. 在对象中刺激 IL-6 产生的方法,其包括向所述对象施用有效量的如第 6 项所述的 siRNA。
- [0013] 9. 筛选潜在抗病毒剂的方法,其包括:
获得如第 1 项所述的 siRNA ;
在所述 siRNA 的抗病毒性质可以被观察的条件下,使所述 siRNA 与培养的细胞接触 ;并将所述 siRNA 的任何抗病毒性质与对照比较 ;其中显示高于所述对照的抗病毒性质的 siRNA 被确定为潜在抗病毒剂。
- [0014] 10. 根据第 9 项的方法,其中所述对照为阴性对照或未处理的细胞培养物。
- [0015] 11. 根据第 9 项的方法,其中所述对照为阳性对照。
- [0016] 12. 根据第 11 项的方法,其中所述阳性对照为 siRNA,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 37 的序列。
- [0017] 13. 筛选潜在抗病毒剂的方法,其包括:
获得一个根据第 1 项的 siRNA ;
在所述 siRNA 的抗病毒性质可以被观察的条件下,将所述 siRNA 施用给动物模型,并用病毒攻击所述动物 ;以及
测定所述 siRNA 是否在体内显示抗病毒性质。
- [0018] 14. 根据第 13 项的方法,进一步包括将所述 siRNA 的任何抗病毒性质与对照比较 ;其中显示高于所述对照的抗病毒性质的 siRNA 被确定为潜在抗病毒剂。
- [0019] 15. 根据第 14 项的方法,其中所述对照为阴性对照或未处理的动物。
- [0020] 16. 根据第 14 项的方法,其中所述对照为阳性对照。
- [0021] 17. 根据第 16 项的方法,其中所述阳性对照为 siRNA,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 37 的序列。
- [0022] 18. 根据第 9 项的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗甲型流感病毒性质。
- [0023] 19. 根据第 9 项的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗 H5N1 病毒性质。
- [0024] 20. 根据第 10 项的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗甲型流感病毒性质。
- [0025] 21. 根据第 10 项的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗 H5N1 病毒性质。
- [0026] 22. 根据第 11 项的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗甲型流感病毒性质。
- [0027] 23. 根据第 11 项的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗 H5N1 病毒性质。
- [0028] 24. 根据第 12 项的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗甲型流感病毒性质。
- [0029] 25. 根据第 12 项的方法,其中所要观察的抗病毒性质为抗 H5N1 病毒性质。
- [0030] 26. 根据第 13 项的方法,其中所述病毒为甲型流感病毒。
- [0031] 27. 根据第 13 项的方法,其中所述病毒为 H5N1。
- [0032] 28. 根据第 14 项的方法,其中所述病毒为甲型流感病毒。
- [0033] 29. 根据第 14 项的方法,其中所述病毒为 H5N1。

- [0034] 30. 根据第 15 项的方法,其中所述病毒为甲型流感病毒。
- [0035] 31. 根据第 15 项的方法,其中所述病毒为 H5N1。
- [0036] 32. 根据第 16 项的方法,其中所述病毒为甲型流感病毒。
- [0037] 33. 根据第 16 项的方法,其中所述病毒为 H5N1。
- [0038] 34. 根据第 17 项的方法,其中所述病毒为甲型流感病毒。
- [0039] 35. 根据第 17 项的方法,其中所述病毒为 H5N1。
- [0040] 36. 在对象中刺激 β - 防卫素产生的方法,其包括向所述对象施用有效剂量的根据第 1 项的 siRNA。
- [0041] 37. 在对象中刺激 β - 防卫素产生的方法,其包括向所述对象施用有效剂量的根据第 2 项的 siRNA。
- [0042] 38. 在对象中刺激 β - 防卫素产生的方法,其包括向所述对象施用有效量的根据第 5 项的组合物。
- [0043] 39. 在对象中刺激 β - 防卫素产生的方法,其包括向所述对象施用有效量的根据第 6 项的组合物。

附图说明

[0044] 图 1 为 siRNA 靶序列位置的示意图。25 个 siRNA 针对所示的病毒基因,其包括 4 个 siRNAs-m (黑色箭头)和 21 个 siRNAs-n (白色箭头)。两个报道过的 siRNAs (含向上对角线的箭头)也进行了标示。

[0045] 图 2 图解地描述了在血清样本中检测 siRNA-m 刺激的先天免疫应答。(a) IFN- α 应答的检测。(b) IFN- γ 应答的检测。(c) TNF- α 应答的检测。(d) IL-6 应答的检测。标示的小鼠血清样本中的细胞因子的检测如图 6 的注释所述进行。

[0046] 图 3 表示在细胞培养中抑制 H5N1 甲型流感病毒的有效 siRNAs 的筛选。(a)25 个 siRNAs 在细胞培养中的抗病毒效果。MDCK 细胞用化学合成的 siRNAs 转染 12 小时,然后用 100TCID₅₀ 的 H5N1 A/Vietnam/1194/04 病毒株感染 48 小时。收集细胞上清液进行 RT-PCR 来检测病毒 RNA 拷贝。12 个 siRNAs (包括新设计的 4 个 siRNAs-m (黑色)和 6 个 siRNAs-n (白色),以及 2 个之前报道有效的阳性对照 siRNA_(8,9))显示超过 75% 的抑制效果,用虚线标示。(b)所选择的 siRNAs-m 和 siRNAs-n 的序列以及独特基序的鉴定。siRNAs-m 中鉴定的序列基序在正链(F)中用下划线标示,在负链(R)中用框标示。对小 RNAPB2-1291 中的基序也进行了强调。

[0047] 图 4 图解地描述了 siRNAs-m 和 siRNAs-n 的体内抗病毒效果的评价。(a)、(b)、(c)和(d):评价 4 对分别靶向病毒 PB1、PB2、PA 和 NP 基因的 siRNAs-m 和 siRNAs-n 的预防效果。小鼠气管内(i. t.)施用一个剂量的 100、50 或 25 μ g (括号内标明) siRNAs-m 或 siRNAs-n,16-18 小时后进行病毒攻击。给予对照小鼠(对照)PBS 和 / 或 PEG8-PEI1.8。监测生存率、体重和一般状况至 21 天或直到死亡前。(e)、(f)、(g) (h)和(j):监测 siRNA-m 和 siRNA-n 处理的小鼠体重。监测这些小鼠的体重 21 天或直到死亡。(i)评价 siRNA-m 和 siRNA-n 的治疗效果。小鼠被病毒攻击后 24 小时,鼻内(i. n.)给予 4 个剂量的 NP-1122 (siRNA-m)或 NP-1496 (siRNA-n)。给予对照小鼠(对照)PEG8-PEI1.8。监测生存率、体重和一般状况 21 天或直到死亡前。

[0048] 图 5 表示在用 siRNAs-m 和 siRNAs-n 处理的小鼠肺部中病毒复制和组织损伤的检测。攻击后的第 6 天从用 siRNAs-m (黑色)或 siRNAs-n (白色)处理的小鼠获取肺部组织。给予对照小鼠(对照) PEG8-PEI1.8。(a) 小鼠肺部组织的病毒滴度的检测。通过 TCID₅₀ 确定肺部样品病毒滴度。检测限为 1:10,用虚线标示。(b) 小鼠肺部组织中病毒 RNA 拷贝的检测。通过实时 RT-PCR 测量病毒 RNA 拷贝。(c) 肺部组织中组织病理学的检测。肺部组织典型的组织切片用 H&E 染色(原始放大倍数 100X)。在此放大倍数下,可见炎症浸润和肺泡损伤为肺泡隔加厚,伴有部分肺泡腔的消失。

[0049] 图 6 研究独特基序在体内抗病毒效果的效力方面的作用。(a) 所选择的 siRNA-m (PA-2109) 和在不同 H5N1 病毒株中相应区的序列。通过序列比对发现一个错配核苷酸(nt) (粗体)。(b) siRNA-m 在细胞培养中的交叉株抗病毒效果。使用实时 RT-PCR 通过测量感染后 48 小时收集的培养上清液中病毒 RNA 拷贝来检测 PA-2109 针对完全匹配的病毒株 A/Vietnam/1194/2004 (VN) 以及不完全匹配的病毒株 A/Shenzhen/406H (SZ) 和 A/Hong Kong/156/97 (HK) 的抗病毒效果。结果表示为与它们未处理的对照相比, siRNAs-m 针对不同病毒株的抑制率。(c) 和(d) 在分别用不完全匹配的病毒株攻击的动物中评价 siRNA-m 的交叉保护作用。给予小鼠一个剂量的 25 μ g PA-2109,并在处理后 16-18 小时,分别用 10 LD₅₀ 的 A/Shenzhen/406H 和 A/Hong Kong/156/97 攻击。(e) 含有该基序的小 RNA 的体内抗病毒效果。给予小鼠一个剂量的 PB2-1291 (根据一般接受的标准其不是最优化的 siRNA,但是包含该基序),然后在 16-18 小时后用 H5N1 病毒株 A/Vietnam/1194/2004 感染。给予这些试验(c, d 和 e) 的对照小鼠(对照) PEG8-PEI1.8。监测存活率、体重和一般状况 21 天或直到死亡。

[0050] 图 7 图解地描述了在肺部组织中 siRNA-m 刺激的先天免疫应答的检测。(a) IFN- α 应答的检测。(b) IFN- γ 应答的检测。(c) TNF- α 应答的检测。(d) IL-6 应答的检测。(e) 不同时间点 IL-6 应答的检测。(f) 接受不同剂量 siRNA-m 的小鼠中 IL-6 应答的检测。(g) 在用 siRNA-m 的正义和反义链处理的小鼠中 IL-6 应答的检测。(h) 在用另外一种 siRNA-m (PA-2109) 处理的小鼠中 IL-6 应答的检测。小鼠气管内施用一个剂量的 100 μ g 或所示量的 siRNA-m (PB2-719) 或所示的 siRNAs 及其对照。在处理后 7 小时或所示的时间点收集肺部样本。用 ELISA 检测肺部样本中所示的细胞因子。这些细胞因子的检测限用虚线标示。** 与其他处理相比 $P < 0.005$, * 与其他处理相比 $P < 0.05$ 。

[0051] 图 8 图解地描述了在肺部组织中 siRNA-m 刺激的 β - 防卫素 -4 应答的检测。(a) siRNAs-m (PB2-719 和 PA-2109) 和 siRNAs-n (PB2-696 和 PA-2087) 刺激的 β - 防卫素 -4 (β -D-4) 应答的检测。(b) 用 siRNA-m (PB2-719) 的正义和反义链处理的小鼠中 β -D-4 应答的检测。(c) 不同时间点 β -D-4 应答的检测。(d) 用不同剂量 siRNA-m (PB2-719) 给予的小鼠中 β -D-4 应答的检测。(e) 用 siRNAs-m (PB2-719 和 PA-2109) 和 siRNAs-n (PB2-696 和 PA-2087) 处理的小鼠肺部组织中 β -D-4 产生的检测。肺部组织的代表性组织切片用被合成的 β -D-4 多肽免疫的兔抗血清染色或正常兔血清染色(未染色)(原始放大倍数 100X)。小鼠气管内施用一个剂量的 100 μ g 或所示剂量的 siRNAs-m 或所示剂量的 siRNAs-n 及其对照(PEG/PEI 和 PBS)。在处理后 7 小时或所示的时间点收集肺部样本。** 与其他处理相比 $P < 0.005$, * 与其他处理相比 $P < 0.05$ 。

[0052] 图 9 图解地描述了 β - 防卫素 -4 体外(ex vivo)和体内抗病毒效果的评价。(a)

细胞培养中 β -防卫素-4 (β -D-4) 体外抗病毒效果的评价。所示浓度的 β -D-4 加入到 MDCK 细胞中, 然后用 100 TCID₅₀ 的 H5N1 A/Vietnam/1194/04 株感染细胞 48 小时。收集细胞上清液用于噬菌斑测定来检测释放的病毒滴度。感染率定义为 β -D-4 处理的细胞培养物的病毒滴度相比未处理的细胞培养物的病毒滴度。(b) β -D-4 在 H5N1 病毒感染的小鼠模型中体内抗病毒效果的评价。小鼠鼻内施用一个剂量的 75 μ g β -D-4 或对照蛋白, 然后用 10 LD₅₀ 的 H5N1 A/Vietnam/1194/04 株攻击。监测存活率、体重和一般状况 21 天或直到死亡。

[0053] 序列简述

SEQ ID NO:1 为 siRNA-n"PB1-666" 的正向序列
SEQ ID NO:2 为 siRNA-n"PB1-788" 的正向序列
SEQ ID NO:3 为 siRNA-m"PB1-797" 的正向序列
SEQ ID NO:4 为 siRNA-n"PB1-1688" 的正向序列
SEQ ID NO:5 为 siRNA-n"PB1-1780" 的正向序列
SEQ ID NO:6 为 siRNA-n"PB1-696" 的正向序列
SEQ ID NO:7 为 siRNA-m"PB2-719" 的正向序列
SEQ ID NO:8 为 siRNA-n"PB2-1558" 的正向序列
SEQ ID NO:9 为 siRNA-n"PB2-18318" 的正向序列
SEQ ID NO:10 为 siRNA-n"PA-209" 的正向序列
SEQ ID NO:11 为 siRNA-n"PA-359" 的正向序列
SEQ ID NO:12 为 siRNA-n"PA-2036" 的正向序列
SEQ ID NO:13 为报道的 siRNA"PA-2087" 的正向序列
SEQ ID NO:14 为 siRNA-m"PA-2109" 的正向序列
SEQ ID NO:15 为 siRNA-n"NP-321" 的正向序列
SEQ ID NO:16 为 siRNA-m"NP-1122" 的正向序列
SEQ ID NO:17 为 siRNA-n"NP-1178" 的正向序列
SEQ ID NO:18 为报道的 siRNA"NP-1496" 的正向序列
SEQ ID NO:19 为 siRNA-n"HA-869" 的正向序列
SEQ ID NO:20 为 siRNA-n"HA-855" 的正向序列
SEQ ID NO:21 为 siRNA-n"M-97" 的正向序列
SEQ ID NO:22 为 siRNA-n"M-101" 的正向序列
SEQ ID NO:23 为 siRNA-n"M-925" 的正向序列
SEQ ID NO:24 为 siRNA-n"NS-338" 的正向序列
SEQ ID NO:25 为 siRNA-n"NS-604" 的正向序列
SEQ ID NO:26 为 siRNA-n"NS-677" 的正向序列
SEQ ID NO:27 为 siRNA-n"NS-782" 的正向序列
SEQ ID NO:28 为 siRNA-m"PB1-797" 的反向序列
SEQ ID NO:29 为 siRNA-n"PB1-788" 的反向序列
SEQ ID NO:30 为 siRNA-m"PB2-719" 的反向序列
SEQ ID NO:31 为 siRNA-n"PB2-696" 的反向序列

- SEQ ID NO:32 为 siRNA-m“PA-2109”的反向序列
SEQ ID NO:33 为报道的 siRNA“PA-2087”的反向序列
SEQ ID NO:34 为 siRNA-m“NP-1122”的反向序列
SEQ ID NO:35 为报道的 siRNA“NP-1496”的反向序列
SEQ ID NO:36 为小 RNA“PB2-1291”的正向序列
SEQ ID NO:37 为小 RNA“PB2-1291”的反向序列。

具体实施方式

[0054] 我们已发现了在体内能够有效抑制 H5N1 甲型流感病毒感染的 siRNAs 共同具有的一个独特基序。使用公认的高毒性人 H5N1 病毒株 A/Vietnam/1194/04 (17) 感染的小鼠模型,我们证明 siRNAs-m 具有有效的体内保护效果。关于预防作用,即使给予动物低至 25 μ g 的 siRNAs-m,它们仍然可以完全保护试验动物(100% 存活率)免于 H5N1 病毒的致死攻击,而 siRNAs-n,其包括两条已经报道能够完全保护小鼠免于几种其他流感病毒株致死攻击的 siRNAs₍₉₎,即使动物被给予 100 μ g 的 siRNAs-n,它们也对动物提供很少或没有保护作用(图 4a、b、c 和 d)。关于治疗,我们的研究表明 60% 的在病毒攻击后 24 小时接受 siRNA-m 的动物存活,但是所有给予 siRNA-n 的小鼠均死亡(图 4i)。这是至今报道的由 siRNAs 介导的最好的治疗效果^(8,18,19),很可能的是通过递送系统、施用途径和 siRNAs-m 剂量的常规优化可以获得甚至更好的效果。此外,siRNAs-m 针对两种不完全匹配的 H5N1 病毒株的致死攻击可以提供全面的交叉保护(图 6c 和 6d),表明 siRNAs-m 甚至可以成为能够靶向突变病毒。考虑到甲型流感病毒的快速突变,这些 siRNAs-m 可以是高效的预防和治疗剂。

[0055] 如本文所使用的,术语“分离的”分子(例如,分离的核酸分子)指实质上不含其它细胞物质,或通过重组技术产生时实质上不含培养基,或通过化学合成时实质上不含化学前体或其他化学物质的分子。另外,分离的分子,例如核酸分子,如果其借助人活动处于与其在自然界中发现时不同的条件、背景或成分中,则也认为是“分离的”。

[0056] 如本文所使用的,siRNA 的“有效量”是 siRNA 体外(例如先体外后体内)或体内施用时,有效地在细胞内带来期望的生理变化的量。如本文使用的术语“治疗有效量”指在研究人员、兽医、医生或其他医师尝试的细胞(例如组织)中引发生物学或医学应答(其中包括减轻和 / 或预防和 / 或抑制所治疗的疾病或病症的症状)的单独 siRNA 或与另一种根据本发明的具体方面的试剂组合的量。

[0057] 本发明的各种方法可以包括涉及与“合适的对照”(指本文中可互换的“适当的对照”)比较数值、水平、特征、特点、性质等的步骤。“合适的对照”或“适当的对照”指本领域普通技术人员熟知的用于比较目的的任何对照或标准。在一个实施方式中,“合适的对照”或“适当的对照”是如本文所述在进行 RNAi 方法学之前确定的数值、水平、特征、特点、性质等。例如,在将本发明的 siRNA 引入细胞或生物体之前可以确定转录速率、mRNA 水平、翻译速率、蛋白水平、生物活性、细胞特点或性质、基因型、表型等。在另外一个实施方式中,“合适的对照”或“适当的对照”是细胞或生物体内确定的数值、水平、特征、特点、性质等,例如对照或正常细胞或生物体显示出的例如正常特征。在还另一个实施方式中,“合适的对照”或“适当的对照”是预先确定的数值、水平、特征、特点、性质等。

[0058] 病毒减少(抑制)导致病毒量(viral load)降低(或抑制)。例如,在细胞培养中,

通过施用 siRNA 产生的病毒抑制导致病毒量相比未处理的细胞培养物的降低。抑制可以是部分的。优选的抑制程度为至少 50%，更优选为至少 60%、70%、80%、85% 或 90% 之一，以及最优选在 90% 到 100% 之间。

[0059] 术语“处理”和“治疗”在本文中可互换地使用，并且如本文使用，包括预防和应答处理，可以是急性短期或慢性长期，以及表示患者中病毒感染的抑制或改善。“患者”包括动物，其包括人。术语“治疗有效的”意思是治疗剂(siRNA)的量是足够抑制或改善病毒感染症状的量。

[0060] RNA 干扰

RNAi 是双链 RNA (dsRNA, 本文也称作 siRNAs 或 ds siRNAs, 指双链小干扰 RNAs) 在动物和植物细胞中诱导靶向的单链 RNA 序列特异性降解的高效过程(Hutvagner 和 Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 225-232 (2002); Sharp, *Genes Dev.*, 15:485-490 (2001))。在哺乳动物细胞中, RNAi 可以被小干扰 RNA (siRNA) 的 21 个核苷酸(nt) 的双链体引发(Chiu 等人, *Mol. Cell.* 10:549-561 (2002); Elbashir 等人, *Nature* 411:494-498 (2001)), 或被微 RNAs (miRNA), 功能性小发夹 RNA (shRNA), 或其他可使用 DNA 模板用 RNA 聚合酶 III 启动子在体内表达的 dsRNAs 引发(Zeng 等人, *Mol Cell* 9:1327-1333 (2002); Paddison 等人, *Genes Dev* 16:948-958 (2002); Lee 等人, *Nature Biotechnol* 20:500-505 (2002); Paul 等人, *Nature Biotechnol* 20:505-508 (2002); Tuschl, T., *Nature Biotechnol* 20:440-448 (2002); Yu 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9):6047-6052 (2002); McManus 等人, *RNA* 8:842-850 (2002); Sui 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(6):5515-5520 (2002)), 其中各个通过整体引用而并入本文。

[0061] 科学文献包括很多使用 siRNA 沉默内源性或外源性基因表达的报道, 突出了它们的治疗潜力(Gupta, S. 等人, *PNAS*, 2004, 101:1927-1932; Takaku, H. *Antivir Chem. Chemother*, 2004, 15:57-65; Pardridge, W.M. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2004, 4:1103-1113; Zheng, B.J. *Antivir. Ther.*, 2004, 9:365-374; Shen, W.G. *Chin. Med. J. (Engl)*, 2004, 117:1084-1091; Fuchs, U. 等人, *Curr. Mol. Med.*, 2004, 4:507-517; Wadhwa, R. 等人, *Mutat. Res.*, 2004, 567:71-84; Ichim, T.E. 等人, *Am. J. Transplant*, 2004, 4:1227-1236; Jana, S. 等人, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 65:649-657; Ryther, R.C. 等人, *Gene Ther.*, 2005, 12:5-11; Chae, S-S. 等人, *J. Clin. Invest.*, 2004, 114:1082-1089; Fougerolles, A. 等人, *Methods Enzymol.*, 2005, 392:278-296), 其中各个通过整体引用而并入本文。通过全身施用 siRNAs 治疗性沉默内源基因已在文献中描述((Kim B. 等人, *American Journal of Pathology*, 2004, 165:2177-2185; Soutschek J. 等人, *Nature*, 2004, 432:173-178; Pardridge W.M., *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2004, July, 4(7):1103-1113),) 其中各个通过整体引用而并入本文。

[0062] 相应地, 本发明包括针对病毒、甲型流感病毒尤其是 H5N1 病毒的这种干扰 RNA 分子。干扰 RNA 可以是双链 siRNA。本领域普通技术人员应理解并且如本文进一步解释, siRNA 分子也可以包括短 3'DNA 序列。可选地, 核酸可以是 DNA (通常是双链 DNA), 在细胞内转录时, 其产生具有两个互补区通过间隔区连接的 RNA, 以使当互补部分相互杂交时, 该 RNA 形成发夹形式。在哺乳动物细胞中, 发夹结构可以通过 Dicer 酶从分子中切除, 产生两个不同

的但是杂交的 RNA 分子。

[0063] 在一个实施方式中,本发明提供了干扰 RNA,其当其被适合地引入可被病毒攻击的细胞或在其中表达时,能够通过 RNAi 来抑制病毒载荷表达,其中干扰 RNA 一般针对病毒。优选地,干扰 RNA 序列在大约 19 到 23 个核苷酸范围内。例如,在那些利用 shRNA 的实施方式中,shRNA 针对病毒的部分优选在大约 19 到 23 个核苷酸范围内。

[0064] 如本文所解释,在本发明所述方法中所使用的干扰 RNA 和靶病毒序列之间的完全同一性/互补性虽然有时是优选的,但不是必须的。相应地,与靶病毒序列相比,干扰 RNA 可以包括一些错配。

[0065] siRNA 分子

短干扰 RNAs (siRNAs) 诱导由 RNAi 过程引起的序列特异性抑制或沉默基因(例如减少表达,可以是部分或完全抑制的程度)。因此,siRNA 发挥 RNAi 过程的效应分子的作用。发挥病毒抑制剂作用的 siRNA 分子可以是化学合成,或可以在体外从 DNA 模板转录,或在体内从例如 shRNA 转录。dsRNA 分子可以使用现有技术已知的任何方法设计,例如通过使用下列方法:

1. 使用现有技术任何已知方法,将潜在目标与适当基因组数据库(人类、小鼠、大鼠等)进行比较,并排除任何与其他编码序列具有显著同源性的靶序列。已知的这样一种序列同源性搜索的方法是 BLAST,可美国国立卫生研究院的国家生物技术信息中心(NCBI)网站得到。NCBI 网站上还可利用的是 HomoloGene 数据库,该数据库是公众可利用的系统,用于自动检测几个完全测序的真核基因组中注解的基因之间的同源基因,并且是本领域普通技术人员容易使用的。

2. 选择一个或多个符合你的评价标准的序列。关于 siRNA 的设计和使用的进一步的一般信息可见于“The siRNA User Guide”,在洛克菲勒大学 Dr. Thomas Tuschl 的实验室网站可得到(Elbashir 等人, *EMBO J.*, 2001, 20:6877-6888)。

3. 阴性对照 siRNAs 优选具有与所选择的 siRNA 相同的核酸组成,但是与相应的基因组没有显著的序列互补性。这些阴性对照可以通过随机打乱所选择的 siRNA 的核苷酸序列进行设计;可以进行同源性搜索以保证阴性对照与相应的基因组中任何其他基因缺乏同源性。另外,阴性对照 siRNAs 有时可以通过向序列中引入一个或多个碱基错配来设计。

[0068] 最初,定义了鉴定有效 siRNA 的基本标准,例如 mRNA 内容中靶序列 GC 含量和组成(Elbashir SM. 等人, *Methods*, 2002, 26:199-213)。最近获得了进一步的进展, RNAi 酶复合物的组装被描述为取决于 siRNA 的热力学特征(Khrvorova A. 等人, *Cell*, 2003, 115:209-216; Schwarz D. S. 等人, *Cell*, 2003, 115:199-208)。确定双链体两端的相对稳定性,对于单个链进入 RNAi 途径的程度有影响。另外,报道了在 siRNA 的确定位点的某些序列基序能够影响其效力(Amarzguioui M. 和 H. Prydz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 316:1050-1058; Reynolds A. 等人, *Nature Biotechnol.*, 2004, 22:326-330)。在此基础上,开发了复杂算法来增加 siRNA 设计的成功率,并且这些方法对于本领域普通技术人员是可以获得的(Amarzguioui M. 和 H. Prydz, 2004; Reynolds A. 等人, 2004; 以及 Ui-Tei K. 等人, *Nucl Acids Res.*, 2004, 32:936-948, 其中各个均通过引用整体并入本文)。

[0069] 其他可以用于选择本发明 siRNAs 的计算工具包括在麻省剑桥的生物医药研

究白头研究所(Whitehead Institute)的生物信息学研究组开发的白头 siRNA 选择网络服务器,以及 Yuan, B. 等人(“siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server”, *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, W130-W134, Web Server issue) 和 Bonetta L. (“RNAi: Silencing never sounded better”, *Nature Methods*, October, 2004, 1(1):79-86)中公开的其他工具,其中各个均通过引用整体并入本文。

[0070] 如本文所述,不同 siRNAs 的效果可能有显著差异。但是,存在有效干扰 RNA 的合理设计策略(Gong D. 和 J.E. Ferrell Jr., *TRENDS in Biotechnology*, 2004, 22(9):451; Schubert S. 等人, *J. Mol. Biol.*, 2005, 348:883-893; Pancoska P. 等人, *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(4):1469-1479; Mittal V., *Nat. Rev. Genet.*, 2004, 5(5):355-365, 其中各个均通过引用整体并入本文)。

[0071] 可以进行使用细胞培养筛选最有效的 siRNAs。已经开发了几种基于使用 siRNA 混合物的体外筛选方法,混合物中可含有特别有效的 siRNA (或者几种)。这些方法包括使用 RnaseIII 或 Dicer 酶来消化较长的双链 RNAs,例如 BLOCK-IT 产物,来制备 siRNA 混合物(INVITROGEN, Carlsbad CA) (Yang D. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99:9942-9947; Myers J.W. 等人, *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21:324-328)。已经发现这些消化产生的短 RNAs 在 RNAi 中是有效的。寡核苷酸阵列也可用于有效制备 siRNAs 的确定混合物,以减少外源和内源基因例如 PKC- α 的表达(Oleinikov A.V. 等人, *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(10):e92)。

[0072] 本发明的病毒抑制剂可以包括现有技术中已知的未修饰的 siRNAs 和修饰的 siRNAs。因此,本发明包括 siRNA 衍生物,其包括具有两条互补链核酸的 siRNA,以使两条链交联。例如,其中一条链的 3' OH 端可以被修饰,或者两条链可以交联并在 3' OH 端修饰。siRNA 衍生物可以包含单交联(例如,补骨脂素交联)。在一些实施方式中,siRNA 衍生物在其 3' 端具有生物素分子(例如,可以光裂解的生物素)、多肽(例如, Tat 多肽)、纳米颗粒、拟肽、有机化合物(例如,染料,如荧光染料),或树状高分子。用这种方式修饰 siRNA 衍生物可以改善所产生的 siRNA 衍生物与相应 siRNA 相比的细胞吸收或增强细胞靶向活性,可以用于在细胞中追踪 siRNA 衍生物,或提高 siRNA 衍生物相比相应 siRNA 的稳定性。

[0073] 本发明的病毒抑制剂可以不偶联或可以偶联到另一个部分,例如纳米颗粒,以增强组合物的性质,例如药代动力学参数,例如吸收、有效性、生物可利用度和 / 或半衰期。偶联可以通过本领域已知的方法实现,例如使用 Lambert 等人, *Drug Deliv. Rev.* 47(1):99-112 (2001) (描述了将核酸负载至聚氰基丙烯酸酯(PACA)纳米颗粒); Fattal 等人, *J. Control Release* 53(1-3):137-43 (1998) (描述了核酸结合纳米颗粒); Schwab 等人, *Ann. Oncol.* 5 Suppl. 4:55-8 (1994) (描述了核酸连接到嵌入剂、疏水基团、多聚阳离子或 PACA 纳米颗粒); 以及 Godard 等人, *Eur. J. Biochem.* 232(2):404-10 (1995) (描述了核酸连接到纳米颗粒)所描述的方法。

[0074] 本发明的病毒抑制剂还可以使用任何本领域已知方法进行标记,例如核酸可以用荧光团,例如 Cy3、荧光素或罗丹明标记。可以使用试剂盒进行标记,例如 SILENCER siRNA 标记试剂盒(AMBION)。另外,siRNA 可以被放射性标记,例如使用 ^3H 、 ^{32}P 或其他适当的同位素。

[0075] 因为 RNAi 被认为是通过至少一个单链 RNA 中间体进行加工,本领域普通技术人员

应理解 ss-siRNAs (例如 ds-siRNA 的反义链) 也可以如本文所述进行设计, 并根据要求保护的方法学使用。

[0076] 有大量公司生产针对特定基因的干扰 RNAs。Thermo Electron Corporation (Waltham, MA) 已经开展了客户合成服务用于合成短干扰 RNA (siRNA)。每条链由 18-20 个 RNA 碱基和在 3' 端突出的两个 DNA 碱基组成。Dharmacon, Inc. (Lafayette, CO) 使用 2' -ACE RNA 合成技术提供 siRNA 双链体。Qiagen (Valencia, CA) 使用 TOM- 化学法提供 siRNA, 具有高的个体偶联产率 (Li, B. 等人, *Nat. Med.*, 2005, 11(9), 944-951)。

[0077] 用于长期表达的 siRNA 递送

合成的 siRNA 可以通过本领域已知的方法递送到细胞内, 例如包括阳离子脂质体转染 (例如 LIPOFECTAMINE 2000 试剂) 和电穿孔。但是这些外源 siRNA 通常显示短期持续的沉默效果 (在培养的细胞中 4 到 5 天), 在某些实施方式中可能是有益的。为了获得对病毒表达的长期抑制并为了促进某些环境下的递送, 一种或更多种 siRNA 双链体, 例如 H5N1 ds siRNA-m 可以在细胞内从重组 DNA 构建体表达 (McIntyre G. J. 和 G. C. Fanning, *BMC Biotechnology*, 2006, 6:1-8)。这些在细胞内从重组 DNA 构建体表达 siRNA 双链体以使得在细胞内对靶基因长期抑制的方法在本领域中是已知的, 其包括哺乳动物 Pol III 启动子系统 (例如, H1 或 U6/snRNA 启动子系统 (Tuschl (2002), 如上) 能够表达功能性双链 siRNAs; (Bagella 等人, *J. Cell. Physiol.* 177:206-213 (1998); Lee 等人, (2002), 如上; Miyagishi 等人, (2002), 如上; Paul 等人, (2002), 如上; Yu 等人, (2002), 如上; Sui 等人, (2002), 如上)。RNA Pol III 转录终止发生在运行到 DNA 模板中 4 个连续 T 碱基处, 提供了在特定序列处终止 siRNA 转录的机制。siRNA 在 5' -3' 和 3' -5' 方向与靶基因序列互补, siRNA 的两条链可以在同一个构建体或分开的构建体中表达。H1 或 U6 snRNA 启动子驱动的发夹 siRNA 可以在细胞内表达, 并可抑制靶基因表达 (Bagella 等人, (1998), 如上; Lee 等人, (2002), 如上; Miyagishi 等人, (2002), 如上; Paul 等人, (2002), 如上; Yu 等人, (2002), 如上; Sui 等人, (2002), 如上)。当与表达 T7 RNA 聚合酶的载体共转染到细胞内时, 含有在 T7 启动子控制下的 siRNA 序列的构建体也可以产生功能性 siRNAs (Jacque (2002), 如上)。单个构建体可以含有多个编码 siRNAs 的序列, 例如病毒 RNA 的多个区域, 以及例如可以被分离的 Pol III 启动子位点驱动。

[0078] 动物细胞表达一系列的大约 22 个核苷酸的非编码 RNAs, 称作微 RNA (miRNA), 可以在动物发育过程中在转录后水平或翻译水平调节基因表达。miRNAs 的一个共同特征是它们均从大约 70 个核苷酸前体 RNA 茎-环切割, 可以是被一种 III 型核糖核酸酶 Dicer 酶或其同源物消化。通过使用与靶 mRNA 互补的 miRNA 序列替换 miRNA 前体的茎部序列, 可以使用表达新型 miRNA 的载体构建体产生 siRNAs 以在哺乳动物细胞中启动针对特定 mRNA 靶标的 RNAi (Zeng (2002), 如上)。当被含有聚合酶 III 启动子的 DNA 载体表达时, 微 RNA 产生的发夹结构可以沉默基因表达 (McManus (2002), 如上)。病毒介导的递送机制也可以通过表达 siRNA 用于诱导靶基因的特异性沉默, 例如通过产生含有在 RNA Pol II 启动子转录控制下的 siRNA 的重组腺病毒 (Xia 等人, (2002), 如上)。这些重组腺病毒感染 HeLa 细胞使得减少的内源靶基因表达。将重组腺病毒载体注射进表达 siRNA 靶基因的转基因小鼠中引起在体内靶基因表达的减少。在动物模型中, 全胚胎电穿孔可以有效将合成的 siRNA 递送到移植后的小鼠胚胎中 (Calegari 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(22):14236-40

(2002)。在成年小鼠中, siRNA 的有效递送可以通过“高压”递送技术实现, 其为通过尾静脉将大量含有 siRNA 的溶液快速注射(5 秒内)到动物体内(Liu (1999), 如上; McCaffrey (2002), 如上; Lewis, *Nature Genetics* 32:107-108 (2002))。纳米颗粒、脂质体和其他阳离子脂分子也可以用于将 siRNA 递送到动物体内。已显示在非人类的灵长类中, 以脂质体制剂全身递送 siRNAs 可以沉默疾病靶载脂蛋白 B (ApoB) (Zimmermann T. S. 等人, *Nature*, 2006, 441:111-114)。也可利用基于凝胶的琼脂 / 脂质体 / siRNA 制剂(Jiang M. 等人, *Oligonucleotides*, 2004, Winter, 14(4):239-48)。

[0079] 使用工程化的 RNA 前体来诱导 RNAi

如本文所述, 将工程化的 RNA 前体引入细胞或整个生物体, 将引起所期望的 siRNA 分子的产生。然后, 这种 siRNA 分子与 RNAi 途径的内源性蛋白成分相关, 以结合并靶向特定的 mRNA 序列进行切割和破坏。在此方式下, 工程化的 RNA 前体产生的 siRNA 所靶向的病毒将被从细胞或生物体内清除, 导致细胞或生物体内该 mRNA 所编码的任何翻译产物的浓度降低。RNA 前体是典型的核酸分子, 其能够单独编码 dsRNA 的一条链或编码 RNA 发夹环结构的整个核苷酸序列。

[0080] 药学组合物和施用方法

本发明的病毒抑制剂可以被并入药学组合物中。这些组合物一般包括病毒抑制剂和药学可接受的载体。如本文所使用的, 术语“药学可接受的载体”包括盐水、溶剂、分散介质、涂层(coatings)、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂等, 能够与药学施用相容。补充的活性化合物也可以被并入组合物。制剂(组合物)描述在本领域普通技术人员公知和容易得到的大量来源中。例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Martin E. W., Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19th ed., 1995) 描述了能够与本发明联合使用的制剂。

[0081] 配制了能与其预期的施用途径相容的药学组合物。施用途径的例子包括肠胃外的, 如静脉内、皮内、皮下、口腔(如吸入)、局部、透皮、透粘膜和直肠施用。用于肠胃外的、皮内或皮下应用的溶液或悬液可以包括下列组分: 无菌稀释液, 例如注射用水、盐溶液、非挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂; 抗菌剂, 如苯甲醇或羟苯甲酸甲酯; 抗氧化剂, 如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 螯合剂, 如乙二胺四乙酸; 缓冲液, 如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐; 以及用于调节张力的试剂, 如氯化钠或葡萄糖。pH 值可用酸或碱调节, 如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制备物可以密封在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多个剂量瓶中。

[0082] 适合可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(水可溶的)或分散剂和用于临时制备无菌可注射的溶液或分散剂的无菌粉末。对于静脉内施用, 适合的载体包括生理盐水、抑菌水、CREMOPHOR EL (BASF, Parsippany, N. J.) 或磷酸盐缓冲液(PBS)。在所有情况下, 组合物必须是无菌的, 并且其流动性应为存在简易的注射能力的程度。其应当在制备和储存条件下稳定, 并且保存免于微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质, 其含有例如水、乙醇、多元醇(例如, 甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其适当的混合物。适当的流动性可以例如通过使用如卵磷脂包被, 通过在分散剂的情况下保持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂来保持。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂来防止微生物的作用, 例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。等渗剂, 例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇、氯化钠也可以包括在组合物中。通过在组合物中包含的延缓吸收的试剂, 例

如单硬脂酸铝和明胶,可以引起可注射的组合物的延缓吸收。

[0083] 可以根据需要,在含有上文列举一种成分或其组合的适当溶剂中加入所需量的活性化合物(例如,本发明的多核苷酸),然后过滤除菌,来制备无菌注射液。一般来说,将活性化合物加入无菌容器(其中含有基础分散介质和所需的其他上文列举的成分)来制备分散剂。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下,适当的制备方法包括真空干燥和冻干,其从之前无菌过滤的溶液中产生活性成分与任何另外希望的成分的粉末。

[0084] 口服组合物一般包括惰性稀释液或可食用的载体。对于口服治疗施用的目的,活性化合物可以并入赋形剂并以片剂、锭剂或胶囊例如明胶胶囊的形式使用。口服组合物也可以使用液体载体制备,作为漱口水使用。药学相容的结合剂和/或佐剂材料可以被包含作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有任何下列成分,或类似性质的化合物:粘合剂如微晶纤维素、黄芪胶或明胶;赋形剂如淀粉或乳糖,崩解剂如褐藻酸、PRIMOGE[®]或玉米淀粉;润滑剂如硬脂酸镁或 Sterotes;助流剂如胶态二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;或调味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙香精。

[0085] 对于吸入施用,本发明病毒抑制剂可以从加压容器或含有适合的喷射剂例如气体如二氧化碳的分散器,或喷雾器中以气溶胶喷雾形式递送。这些吸入方法和吸入制剂包括那些在美国专利号 6,468,798 中描述的那些。

[0086] 病毒抑制剂的全身施用也可以通过透粘膜或透皮方式进行。对于透粘膜或透皮施用,在制剂中使用对于所要穿透的屏障适当的渗透剂。这些渗透剂在本领域中公知,并且例如对于透粘膜施用,包括去垢剂、胆酸盐和梭链孢酸衍生物。可以通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂进行透粘膜施用。对于透皮施用,活性化合物(例如,本发明的多核苷酸)被配制成本领域中公知的软膏、油膏、凝胶或乳膏(cream)。

[0087] 药学组合物也可以制备成栓剂的形式(例如,传统的栓剂基质,例如可可脂和其他甘油酯)或保留灌肠用于直肠施用。

[0088] 病毒抑制剂也可以使用本领域中已知的方法通过转染或感染来施用,但是不限于 McCaffrey 等人, *Nature* 418(6893):38-39 (2002) (水动力转染); Xia 等人, *Nature Biotechnol* 20(10):1006-10 (2002) (病毒介导的递送); 或 Putnam, *Am. J. Health Syst. Pharm.* 53(2):151-160 (1996), 在 *Am. J. Health Syst. Pharm.* 53(3):325 (1996) 更正中所描述的方法。

[0089] 多核苷酸病毒抑制剂也可以使用任何适合核酸试剂施用的方法例如 DNA 疫苗进行施用。这些方法包括基因枪、生物注射器和皮肤钳以及无针方法例如美国专利号 US6194389 中公开的微颗粒 DNA 疫苗技术,以及美国专利号 US6168587 中公开的使用粉末形式的疫苗进行哺乳动物透皮无针接种。另外,鼻内递送也是可能的,如 Hamajima 等人, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88(2):205-10 (1998) 中所述。也可以使用脂质体(例如美国专利号 US6,472,375 所述)和微囊化技术。也可以使用生物可降解的可靶向的微颗粒递送系统(例如美国专利号 US6,471,996 所述)。

[0090] 在一个实施方式中,多核苷酸病毒抑制剂使用这样的载体制备,其将保护多核苷酸在体内不会快速清除或降解,例如控释制剂,其包括内植体和微囊化递送系统。可以使用生物可降解、生物相容的聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚羟基乙酸、胶原蛋白、多正酯类和聚乳酸。这些制剂可以使用标准的技术制备。脂质体悬液(包括具有单克隆抗体

的针对抗原呈递细胞的脂质体)也可以用作药学可接受的载体。这些可以根据本领域普通技术人员已知的方法制备,例如美国专利号 4522811 中所述。可以应用抑制 RNase A 家族酶类成员或可另外保护本发明多核苷酸病毒抑制剂免于这些酶作用的策略。例如美国专利号 6,096,720 (Love 等人)描述了针对人 raf mRNA 的寡核苷酸,其被包埋在空间稳定的脂质体中。在一个实施方式中,在 Love 等人中所述的寡核苷酸是嵌合的寡核苷酸,其包含用以增强目标亲合力的第一区域和作为 RNase 底物的第二区域。siSHIELD RNase 抑制剂被设计用于防止 siRNA 被 RNase (MP BIOMEDICALS, Irvine, CA) 降解。将短的寡核苷酸浓缩(compaction)至完好确定(well-defined)的浓缩物的策略也可以用于递送本发明的多核苷酸(Sarkar T. 等人, *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(1):143-151),其通过引用整体并入本文。

[0091] 具体地,在体外或体内将多核苷酸病毒抑制剂例如干扰 RNA 进行细胞施用的合适技术在下列文献中公开:

一般综述:

Borkhardt, A. *Cancer Cell*, 2002, 2:167-8; Hannon, G. J. *Nature*, 2002, 418:244-51; McManus, M. T. and Sharp, P. A. *Nat Rev Genet.*, 2002, 3:737-47; Scherr, M. 等人, *Curr Med. Chem.*, 2003, 10:245-56; Shuey, D. J. 等人, *Drug Discov Today*, 2002, 7:1040-6; Gilmore, I. R. 等人, *J. Drug Target.*, 2004, 12(6):315-340; Dykxhoorn, D. M. and Lieberman J., *Annu. Rev. Med.*, 2005, 56:401-423.

使用脂质体全身施用:

Lewis, D. L. 等人, *Nat Genet.*, 2002, 32:107-8; Paul, C. P. 等人, *Nat Biotechnol.*, 2002, 20:505-8; Song, E. 等人, *Nat Med.*, 2003, 9:347-51; Sorensen, D. R. 等人, *J Mol Biol.*, 2003, 327:761-6.

病毒介导的转移:

Abbas-Terki, T. 等人, *Hum Gene Ther.*, 2002, 13:2197-201; Barton, G. M. and Medzhitov, R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:14943-5; Devroe, E. and Silver, P. A. *BMC Biotechnol.*, 2002, 2:15; Lori, F. 等人, *Am J Pharmacogenomics*, 2002, 2:245-52; Matta, H. 等人, *Cancer Biol Ther.*, 2003, 2:206-10; Qin, X. F. 等人, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:183-8; Scherr, M. 等人, *Cell Cycle*, 2003, 2:251-7; Shen, C. 等人, *FEBS Lett.*, 2003, 539:111-4; Lee S. K. 等人, *Blood*, 2005, 106(3):818-826, epub April 14, 2005.

多肽递送:

Morris, M. C. 等人, *Curr Opin Biotechnol.*, 2000, 11:461-6; Simeoni, F. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31:2717-24.

Song E. 等人描述了通过细胞表面受体的抗体介导的 siRNAs 体内递送 (Song E. 等人, *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23(6):709-717, epub May 22, 2005).

其他可适用于向靶细胞递送多核苷酸病毒抑制剂例如干扰 RNA 的技术基于纳米颗粒或纳米胶囊,例如美国专利号 6,649,192B 和 5,843,509B 所公开。可以用于选择、递送和监测干扰 RNA 分子的最近的技术包括 Raab, R. M. 和 Stephanopoulos, G. *Biotechnol.*

Bioeng., 2004, 88:121-132; Huppi, K. 等人, *Mol. Cell*, 2005, 17:1-10; Spagnou, S. 等人, *Biochemistry*, 2004, 43:13348-13356; Muratovska, A. and Eccles, M.R. *FEBS Lett.*, 2004, 558:63-68; Kumar, R. 等人, *Genome Res.*, 2003, 13:2333-2340; Chen, A.A. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33:e190; Dykxhoorn, D.M. 等人, *Gene Ther.*, 2006, 先于印刷的电子出版; Rodriguez-Lebron, E. 和 Paulson, H.L. *Gene Ther.*, 2005, 先于印刷的电子出版; Pai, S.I. 等人, *Gene Ther.*, 2005, 先于印刷的电子出版; Raoul, C. 等人, *Gene Ther.*, 2005, 先于印刷的电子出版; Manfredsson, F.P. 等人, *Gene Ther.*, 2005, 先于印刷的电子出版; Downward, J. *BMJ*, 2004, 328:1245-1248。

[0092] 相同类型或不同类型的病毒抑制剂混合物可以在体内或体外引入细胞。例如,可以向细胞内引入多核苷酸病毒抑制剂例如干扰 RNA 分子(例如,2-4 种干扰分子或更多)的混合物或库(Oleinikov A.V. 等人, *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(10):e92)。优选地,干扰 RNA 分子靶向病毒 RNA 的不同区域。优选地,这些干扰 RNA 分子之前已经被单独验证具有降低病毒载荷的功能。混合物中单独的干扰 RNAs 可以被化学合成(Elbashir S.M. 等人, *Genes Dev.*, 2001, 15:188-200),或作为含 RNA 多聚酶启动子的短 DNA 模板引入,其在体内或体外在细胞内转录(Yu J.Y. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:6047-6052)。

[0093] 组合物的毒性和疗效可以通过标准的药学方法在细胞培养物或实验动物中进行测定,例如测定 LD₅₀ (50% 群体致死的剂量)和 ED₅₀ (对 50% 群体有治疗效果的剂量)。毒性和疗效的剂量比为治疗指数,可用 LD₅₀/ED₅₀ 的比值表示。可以使用显示出高治疗指数的组合物。当使用显示毒副作用的组合物时,应注意设计这样的递送系统,其将这些化合物靶向到被感染组织位点,以便将对未感染细胞的潜在损伤最小化,以及从而降低副作用。

[0094] 从细胞培养测定和动物研究中获取的数据可以用于设计用于人类的剂量范围。这些组合物的剂量一般在循环浓度范围之内,包括具有很小毒性或没有毒性的 ED₅₀。剂量可以在此范围内变化,取决于使用的剂量形式和利用的施用途径。对于本发明方法中使用的任何组合物,治疗有效剂量最初可以从细胞培养测定中估计。可以在动物模型中设计剂量以获得循环血浆浓度范围,其包括如在细胞培养中测定的 IC₅₀ (即,获得症状最大抑制效果的一半的测试组合物的浓度)。这些信息可以用于更准确地测定用于人体的剂量。血浆水平可以通过例如高效液相色谱测量。

[0095] 病毒抑制剂可以根据任何合适的时间表施用,例如,从每天一次或多次到每周一次或多次,包括隔一天一次,进行任何天数或周数,例如 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、1 周、10 天、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、7 周、8 周、2 个月、3 个月、6 个月或更长,或其任何变化。本领域普通技术人员应理解某些因素可影响有效治疗对象所需的剂量和时间,其包括但不限于疾病或紊乱的严重性、前期治疗、对象的一般健康状况和 / 或年龄、存在的其他疾病。而且,使用治疗有效量的病毒抑制剂来治疗对象可以包括单一治疗或可包括一系列治疗。

[0096] 多核苷酸病毒抑制剂可以在体内或体外使用如本文所述的已知技术引入(施用)至细胞(例如哺乳动物细胞)来抑制病毒。类似地,含有本发明 DNA 的遗传构建体(例如,转录载体)可以在体内或体外使用如本文所述的暂时或稳定表达 RNA 的已知技术引入细胞来抑制病毒。当在体内施用给细胞时,多核苷酸病毒抑制剂可以向对象全身施用(例如,静脉

内施用)。

[0097] 如本文所使用的, 术语“对象”、“患者”和“个体”可以互换施用, 并且意在包括人类和非人类哺乳动物物种。类似地, 本发明的体外方法可以在这些哺乳动物物种的细胞中进行。包含本发明的外源多核苷酸的宿主细胞可以施用给对象, 并且可以是相对于对象例如自体(使用其自身细胞)、异体(从一个人到另一个人)或转基因或异种基因(从一个哺乳动物物种到另一个哺乳动物物种)。

[0098] 本发明的多核苷酸病毒抑制剂可以插入遗传构建体, 例如, 病毒载体、逆转录病毒载体、表达盒或质粒病毒载体, 例如使用本领域已知方法, 包括但不限于那些 Xia 等人, (2002), 如上中描述的方法进行。遗传构建体可以通过例如吸入、口服、静脉内注射、局部施用(参见美国专利号 5, 328, 470)或通过立体定位注射(参见, 例如, Chen 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057 (1994))来递送给对象。递送载体的药学制备物可以包括在可接受的稀释液中的载体, 或可包含其中包埋递送载体的缓释基质。可选地, 在完整的递送载体可从重组细胞中完整地产生的情况下, 例如反转录载体, 药学制备物可以包括产生多核苷酸递送系统的一个或多个细胞。

[0099] 多核苷酸病毒抑制剂可以是小发夹 RNAs (shRNAs) 和工程化表达 shRNAs 的表达构建体。shRNA 的转录在聚合酶 III (pol III) 启动子处起始, 并认为在 4-5- 胸腺嘧啶转录终止位点的第 2 位终止。一旦表达, 认为 shRNAs 折叠成具有 3' UU- 突出的茎-环结构; 然后, 这些 shRNAs 的末端被加工, 将 shRNA 转化成 siRNA 样的大约 21 个核苷酸的分子(Brummelkamp 等人, *Science* 296:550-553 (2002); Lee 等人, (2002), 如上; Miyagishi and Taira, *Nature Biotechnol.* 20:497-500 (2002); Paddison 等人, (2002), 如上; Paul (2002), 如上; Sui (2002), 如上; Yu 等人, (2002), 如上)

针对病毒的 siRNAs 可以融合到其他核酸分子上或多肽上, 以引导它们的递送或者完成其他功能。因此, 例如, 含有能够特异性干扰靶病毒的 siRNA 寡核苷酸的融合蛋白可以包含亲和标签多肽序列, 其指通过与配体的特异性亲和相互作用促进多肽检测和分离的多肽或肽。配体可以是任何分子、受体、反受体、抗体或类似物, 亲和标签可以通过本文提供的特异性结合相互作用与之作用。这些肽包括例如多聚 His 或“FLAG”或类似物, 例如美国专利号 5, 011, 912 和 Hopp 等人 (*Bio/Technology* 6:1204, 1988) 中所述抗原鉴定肽, 或 XPRESS 表位标签 (INVITROGEN, Carlsbad, Calif.)。在细菌宿主的情况下, 亲和序列可以是例如 pBAD/His (INVITROGEN) 或 pQE-9 载体提供的 6 个组氨酸标签, 用于纯化融合到标记上的成熟多肽, 或者, 例如, 当使用哺乳动物宿主例如 COS-7 时, 亲和序列可以是血凝素 (HA) 标签。HA 标签对应来自于流感病毒血凝素蛋白的抗体限定的表位 (Wilson 等人, 1984 *CeII* 37:767)。

[0100] 本发明还涉及载体和包含或编码多核苷酸病毒抑制剂(例如 siRNA) 的构建体, 特别涉及“重组核酸构建体”, 其包含任意核酸例如 DNA 多核苷酸片段, 可以被转录以产生如本文所提供的根据本发明的抗病毒 siRNA 多核苷酸; 涉及宿主细胞, 其被用本发明的载体和 / 或构建体遗传工程化, 以及涉及通过重组技术生产本发明的 siRNA 多核苷酸、多肽和 / 或融合蛋白, 或其片段或变体。本文公开的如 RNA 多核苷酸的 siRNA 序列可以使用已良好确立的方法例如本文中所述方法被工程化以产生相应的 DNA 序列。因此, 例如, DNA 多核苷酸可以产生自本文描述的任意 siRNA 序列, 以使本发明的 siRNA 序列将被认为还提供相应

的 DNA 多核苷酸(及其互补体)。因此,这些 DNA 多核苷酸被包括在本发明预期的范围内,例如,并入到本发明重组核酸构建体中,在构建体中 siRNA 可以被转录。

[0101] 根据本发明,载体可以包含重组核酸构建体,其含有一个或几个启动子用于转录 RNA 分子,例如人 U6 snRNA 启动子(参见,例如 Miyagishi 等人, *Nat. Biotechnol.* 20:497-500 (2002); Lee 等人, *Nat. Biotechnol.* 20:500-505 (2002); Paul 等人, *Nat. Biotechnol.* 20:505-508 (2002); Grabarek 等人, *BioTechniques* 34:73544 (2003); 也可参见 Sui 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5515-20 (2002))。siRNA 多核苷酸的各条链可以单独转录,每一条由单独的启动子控制,然后在细胞内杂交形成 siRNA 多核苷酸双链体。各条链也可以从单独的载体转录(参见 Lee 等人, 如上)。可选地,特异性针对靶病毒序列的正义和反义序列可以在单个启动子的控制下转录,这样 siRNA 多核苷酸形成发夹分子(Paul 等人, 如上)。在这种情况下,siRNA 特异性序列的互补链由间隔区分开,间隔区包含至少 4 个核苷酸,但是可以如本文所述包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、14、16 或 18 或更多个核苷酸。另外,在 U6 启动子控制下被转录的形成发夹的 siRNAs 可以在 3' 末端延伸大约 4 个尿嘧啶,其作为转录终止信号(Miyagishi 等人, 如上; Paul 等人, 如上)。通过说明,如果靶序列为 19 个核苷酸,siRNA 发夹多核苷酸(从 5' 末端起始)具有 19 个核苷酸的正义序列,然后是间隔区(其为靠近 19 个核苷酸正义序列的 3' 端的两个尿嘧啶核苷酸),并且间隔区连接 19 个核苷酸的反义序列,然后是 4 个尿嘧啶的终止序列,形成突出。具有这种突出的 siRNA 多核苷酸有效干扰靶多肽的表达。也可以用另一个 RNA 聚合酶 III 启动子,HI RNA 启动子制备重组构建体,该启动子可以被可操作地连接到 siRNA 多核苷酸特异性序列,可用于转录包含 siRNA 特异性序列的发夹结构,或者单独转录 siRNA 双链体多核苷酸的每条链(参见,例如 Brummelkamp 等人, *Science* 296:550-53 (2002); Paddison 等人, 如上)。可用于插入序列进行转录 siRNA 多核苷酸的 DNA 载体包括 pSUPER 载体(参见,例如 Brummelkamp 等人, 如上);源自 pCWRVSVN 的 pAV 载体(参见,例如 Paul 等人, 如上)和 pIND(参见,例如 Lee 等人, 如上)等。

[0102] 如本文所提供的,多核苷酸病毒抑制剂可以在哺乳动物细胞、酵母、细菌或其他细胞中在适当的启动子的控制下表达,为评价能够抑制病毒载荷的 siRNA 多核苷酸提供现成的系统。在原核和真核宿主中使用的适当的克隆和表达载体在例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., (2001)中描述。

[0103] 适当的 DNA 序列可以通过各种方法插入载体。一般来说,DNA 序列通过本领域已知的方法插入适当的限制性内切酶位点。克隆、DNA 分离、扩增和纯化、涉及 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、限制性内切酶等的酶反应的标准技术,以及各种分离技术是本领域普通技术人员公知和常用的技术。很多标准技术描述在例如 Ausubel 等人, (1993 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, Mass.); Sambrook 等人, (2001 *Molecular Cloning, Third Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y.); Maniatis 等人, (1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y.) 等中。

[0104] 表达载体中的 DNA 序列可操作地连接到至少一个适当的表达控制序列上(例如,启动子或被调节的启动子)以指导 mRNA 合成。这些表达控制序列的代表性实例包括 LTR 或

SV40 启动子, 大肠杆菌 lac 或 trp, λ 噬菌体 P_L 启动子和其他已知的能够在原核或真核细胞或其病毒中控制基因表达的启动子。使用 CAT (氯霉素转移酶) 载体或其他带有选择标记的载体, 启动子区域可以选自任何期望的基因。真核启动子的实例包括 CMV 前早期、HSV 胸腺激酶、早期和晚期 SV40、反转录病毒 LTRs 和小鼠金属硫蛋白 -I。选择适当的载体和启动子是在本领域普通技术人员水平之内熟知的, 本文描述了某些特别优选的重组表达构建体的制备, 其包含至少一个启动子或受调节的启动子可操作地连接到本发明的多核苷酸上。

[0105] 如上文所述, 在某些实施方式中, 载体可以是病毒载体, 例如哺乳动物病毒载体 (如, 反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒)。例如, 可衍生自反转录病毒质粒的反转录病毒包括但不限于, 莫洛尼鼠白血病毒, 脾坏死病毒, 反转录病毒, 如劳斯肉瘤病毒, 哈维肉瘤病毒, 禽白血病毒, 猿长臂猿白血病毒, 人类免疫缺陷病毒, 腺病毒, 骨髓增生肉瘤病毒, 和乳腺肿瘤。

[0106] 病毒载体包含一个或几个启动子。可以使用的适当的启动子包括, 但不限于, 反转录病毒 LTR、SV40 启动子和人巨细胞病毒 (CMV) 启动子, 如 Miller 等人, *Biotechniques* 7:980-990 (1989) 中所述的, 或任何其他启动子 (例如细胞启动子, 例如真核细胞启动子, 包括但不限于组蛋白、pol III 和 β -肌动蛋白启动子)。其他可以使用的病毒启动子包括, 但不限于, 腺病毒启动子、腺相关病毒启动子、胸腺激酶 (TK) 启动子和 B19 细小病毒启动子。合适的启动子的选择对于本领域普通技术人员根据本文所含的教导是显而易见的, 并可以来自受调节的启动子 (例如, 组织特异性的或可诱导的启动子) 或上文所述的启动子。

[0107] 在另一方面, 本发明涉及含有上述重组构建体的宿主细胞。宿主细胞使用本发明的载体和 / 或表达构建体被遗传工程化 / 修饰 (转导、转化或转染), 所述本发明的载体和 / 或表达构建体可以是例如克隆载体、穿梭载体或表达构建体。载体或构建体可以是, 例如, 以质粒、病毒颗粒、噬菌体等形式。工程化的宿主细胞可以在常规的营养培养基中培养, 培养基被修饰为适于活化启动子、选择转化子或扩增特定基因例如编码 siRNA 多核苷酸或其融合蛋白的基因。选择用于表达的特定宿主细胞的培养条件, 例如温度、pH 等对于本领域普通技术人员是显而易见的。

[0108] 宿主细胞可以是高等真核细胞, 例如哺乳动物细胞, 或低等真核细胞, 例如酵母细胞, 或者宿主细胞可以是原核细胞, 例如细菌细胞。根据本发明适当的宿主细胞的代表性实例包括, 但不限于, 细菌细胞, 例如大肠杆菌 (*E. coli*)、链霉菌、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*); 真菌细胞, 例如酵母; 昆虫细胞, 例如果蝇 S2 细胞和夜蛾 Sf9 细胞; 动物细胞, 例如 CHO、COS 或 293 细胞; 腺病毒; 植物细胞或任何已经适于体外增殖的或如此从头建立的适合的细胞。

[0109] 各种哺乳动物细胞培养系统也可以用于从本发明的重组核酸构建体产生多核苷酸病毒抑制剂。因此本发明部分涉及产生多核苷酸例如 siRNA 的方法, 其通过培养含有重组核酸构建体的宿主细胞来进行, 所述构建体包含至少一个可操作连接多核苷酸病毒抑制剂的启动子。在某些实施方式中, 启动子可以是本文提供的受调控的启动子, 例如四环素可抑制性启动子。在某些实施方式中, 重组表达构建体是本文提供的重组病毒表达构建体。哺乳动物表达系统的实例包括 Gluzman, *Cell* 23:175 (1981) 描述的猴肾成纤维细胞 COS-7 细胞系, 以及能够表达相容载体的其他细胞系, 例如 C127、3T3、CHO、HeLa、HEK 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体将包括复制起点、适当的启动子和增强子, 还包括任何必要的核糖体

结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点、转录终止序列和 5' 侧非转录序列,例如,如本文关于重组多核苷酸构建体制备所述的序列。源自 SV40 剪接位点和聚腺苷酸化位点的 DNA 序列可以用于提供所需的非转录遗传元件。将构建体引入宿主细胞可以通过本领域普通技术人员熟知的各种方法实现,其包括但不限于,例如脂质体,其包括阳离子脂质体、磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或电穿孔法(Davis 等人, 1986 Basic Methods in Molecular Biology)或其他适合的技术。

[0110] 表达的多核苷酸可以用于完整的宿主细胞;完整的细胞器、例如细胞膜、胞内囊泡或其他细胞器;或破损的细胞制备物,其包括但不限于细胞匀浆或裂解液、微粒体、单层或多层膜泡或其他制备物。可选地,表达的多核苷酸可以从重组细胞培养物中回收和纯化,采用的方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。最后,高效液相色谱(HPLC)可以用于最终的层析步骤。

[0111] 如本文所用,术语“施用”、“引入”、“应用”、“处理”、“移植”、“植入”、“递送”及其语法上的变化可以互换使用,以在体外(例如,先体外后体内)或体内将病毒抑制剂提供给靶细胞,或者将本发明的遗传修饰(工程化)的细胞提供给对象。

[0112] 如本文所用,术语“共同施用”及其变化是指将两种或更多试剂同时(在一种或多种制备物中)施用或连续施用。例如,一种或多种类型的本发明的遗传修饰的细胞可以与其他试剂共同施用。

[0113] 病毒抑制剂(本文中也称为“活性化合物”)可以加入适合施用的药学组合物中。这些组合物一般包括抑制病毒的核酸分子和药学可接受的载体。如本文所用,术语“药学可接受的载体”旨在包括任何以及所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂等,能够与药学施用相容。用于药学活性物质的这些介质和试剂是本领域公知的。除了任何常规介质或试剂与活性化合物不相容的,其他在组合物中用途都在考虑范围之内。补充的活性化合物也可以被并入组合物。

[0114] 配制了可与其预期的施用途径相容的药物组合物。施用途径的实例包括肠胃外,如静脉内、皮内、皮下、口腔(如吸入)、透皮(局部)、透粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬液可以包括下列组分:无菌稀释液,例如注射用水、生理盐水、非挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲液,如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的试剂,如氯化钠或葡萄糖。pH 值可用酸或碱调节,如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制备物可以密封在安瓿,一次性注射器或玻璃或塑料制成的多个剂量瓶中。

[0115] 适合可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(水可溶的)或分散剂和用于临时制备无菌可注射的溶液或分散剂的无菌粉末。对于静脉内施用,适合的载体包括生理盐水、抑菌水、CREMOPHOR EL (BASF, Parsippany, N. J.) 或磷酸盐缓冲液(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的,并且其流动性应为存在简易的注射能力的程度。其必须在制备和储存条件下稳定,并且必须保存免于微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其适当的混合物。适当的流动性可以例如通过使用如卵磷脂包被,通过在分散的情况下保持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂来保持。可以通过各种抗菌和抗真菌剂来达到防止微生物

物的作用,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下,将优选地包含等渗剂,例如在组合物中的糖、多元醇如甘露醇、山梨醇、氯化钠。通过在组合物中包含的延缓吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以引起可注射的组合物的延缓吸收。

[0116] 可以根据需要,在含有上文列举一种成分或其组合的适当溶剂中加入所需量的活性化合物,然后过滤除菌,来制备无菌注射液。一般来说,将活性化合物加入无菌载体(其中含有基础分散介质和所需的其他上文列举的成分)来制备分散剂。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冻干,其从之前无菌过滤的溶液中产生活性成分与任何另外希望的成分的粉末。

[0117] 口服组合物一般包括惰性稀释液或可食用的载体。它们可以被包裹在明胶胶囊中或压缩成片剂。对于口服治疗施用的目的,活性化合物可以并入赋形剂并以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。口服组合物也可以使用液体载体制备,作为漱口水使用,其中流体载体中的化合物经口腔应用,漱口并吐出或咽下。药学相容的结合剂和/或佐剂材料可以被包含作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有任何下列成分或类似性质的化合物:粘合剂如微晶纤维素、黄芪胶或明胶;赋形剂如淀粉或乳糖,崩解剂如褐藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂如硬脂酸镁或 Sterotes;助流剂如胶态二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;或调味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙香精。对于吸入施用,化合物以从加压容器或含有适合的喷射剂例如气体如二氧化碳的分散器,或喷雾器中以气溶胶喷雾形式递送。

[0118] 全身施用也可以通过透粘膜或透皮方式进行。对于透粘膜或透皮施用,在制剂中使用对于所要穿透的屏障适当的渗透剂。这些渗透剂在本领域中公知,并且例如对于透粘膜施用,包括去垢剂、胆酸盐和梭链孢酸衍生物。可以通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂进行透粘膜施用。对于透皮施用,活性化合物被配制成本领域中公知的软膏、油膏、凝胶或乳膏。

[0119] 化合物也可以制备成栓剂的形式(例如,传统的栓剂基质,例如可可脂和其他甘油酯)或保留灌肠用于直肠施用。

[0120] 在一个实施方式中,使用载体制备活性化合物,所述载体将保护该化合物在体内不会快速清除,例如控释制剂,其包括内植体和微囊化递送系统。可以使用生物可降解、生物相容的聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚羟基乙酸、胶原蛋白、多正酯类和聚乳酸。这些剂型的制备方法对于本领域普通技术人员是显而易见的。材料可以从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 购得。脂质体悬液(包括具有单克隆抗体的针对靶细胞的脂质体)也可以用作药学可接受的载体。这些可以根据本领域普通技术人员已知的方法制备,例如 US4, 522, 811 中所述。

[0121] 尤其有利的是以易于施用和剂量一致的剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物。本文所使用的剂量单位形式指对于所要施用的对象适合单一剂量的离散单位,每个单位含有预先确定量的活性化合物,经计算与所需的药学载体一起可以产生所期望的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格根据活性化合物的独特的特征和期望获得的具体治疗效果,以及本领域中配制这种活性化合物用于治疗个体的固有限制来规定并直接取决于上述因素。

[0122] 药学组合物可以被包含在容器、包装或分散器(dispenser)中,并带有施用说明书。

[0123] 筛选分析。本发明还提供了方法(在本文也称为“筛选分析”),用于鉴定病毒抑制

剂,即对例如病毒增殖尤其是 H5N1 病毒增殖具有抑制效果的候选或测试混合物或试剂。

[0124] 处理方法。本发明提供了对处于病毒感染风险(或易于感染病毒)的对象进行处理的预防性和治疗性方法。

[0125] 预防性方法。在一个方面,本发明提供了用于在对象中预防有关病毒感染的疾病或状况的方法,通过向对象施用递送有效量的本发明 siRNAs 的试剂。

[0126] 治疗性方法。本发明的另一方面涉及用于治疗目的的调节病毒活性的方法。本发明的方法中公开的靶基因表达调节涉及使细胞与试剂接触,所述试剂将有效量的本发明 siRNAs 递送到靶细胞。同样地,本发明提供了治疗经受特征在于病毒感染的疾病或紊乱的个体的方法。

[0127] 本发明的治疗剂的施用剂量范围是对于被治疗的病毒感染症状足以产生所期望效果的剂量范围。剂量不能太大而导致不良副作用,例如不想要的交叉反应、过敏反应等。一般来说,剂量应随患者年龄、条件、性别和症状程度而变化,并可以由本领域普通技术人员所确定。在发生任何禁忌症时,医生个人可以对剂量进行调整。剂量可取决于所治疗的病毒,并且在治疗这些疾病时,可以由具有普通技能的医生使用已知的剂量调整技术很容易的加以确定。剂量一般处于对治疗化合物已经确立的治疗窗内,其应在提供治疗效果的同时将额外的发病率和死亡率最小化。典型地,治疗化合物的施用剂量范围从每个剂量 0.001 mg/kg 到大约 100 mg/kg,优选 0.1-20 mg/kg。优选的大约 0.5-5 mg/kg 的剂量对于含有本文所公开的治疗剂的化合物尤其有用,每天一个或几个剂量施用,施用一天或多天。

[0128] 本文描述的任何组合物可以配制用于对哺乳动物或更优选地对人类的药理学或治疗性施用。同样地,该组合物可以包含在药学可接受的载体中。优选的肽活性剂的施用方式为通过注射,静脉内、动脉内、肌肉内或皮下。其他施用途径也可以是可能的,并且应包括在本发明公开的范围之内。

[0129] 该组合物可以肠胃外的或腹膜内施用。以游离碱或药理学可接受的盐形式的活性化合物的溶液可以在水中制备,并适当混合表面活性剂,例如羟丙纤维素。分散液也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物以及油脂中制备。在普通的储存和使用条件下,这些制备物含有防腐剂以防止微生物生长。

[0130] 如本文所用,术语“药学可接受的载体”包括任何以及所有的溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂等。用于药学活性物质的这些介质和试剂的用途是本领域公知的。除了任何常规介质或试剂与活性化合物不相容的,其他在治疗组合物中用途都在考虑范围之内。补充的活性成分也可以被并入组合物。

[0131] 本发明的治疗剂可以肠道外施用,通过注射或通过缓慢的逐渐灌注进行。本发明的治疗剂可以静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、腔内或透皮施用。

[0132] 肠胃外施用的制备物包括无菌的水溶液或非水溶液、悬液和乳浊液。非水溶剂的实例包括丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油,以及注射用有机酯例如油酸乙酯。含水载体包括水、醇/水溶液、乳浊液或悬液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、任氏葡萄糖(Ringer's dextrose)、葡萄糖和氯化钠、乳酸化任氏液或非挥发油。静脉载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于任氏葡萄糖的)等。也可以存在防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂以及惰性气体等。

[0133] 本发明也涉及制备含有本发明治疗剂的药物或药学组合物的方法,所述药学组合

物用于治疗病毒感染。

[0134] 在本发明某些实施方式中,病毒是分子治疗的靶标。对于这种情况,可以应用小干扰 RNA (siRNA) 作为病毒拮抗剂来抑制或下调病毒复制。

[0135] “抑制”、“下调”、“敲除”或“沉默”意思是靶向的病毒 RNAs 的表达降低到低于不存在本发明 siRNAs 时所观察到的水平。在一个实施方式中,使用本发明的 siRNAs-m 抑制或下调 H5N1 在存在 siRNAs-m 时比其不存在时要明显。

[0136] 本发明涉及使用短干扰核酸(siRNA)分子用于调节病毒例如 H5N1 增殖的化合物、组合物和方法。本发明进一步涉及使用小核酸分子通过 RNA 干扰(RNAi)用于调节 H5N1 和 / 或 H5N1 基因表达和活性的化合物、组合物和方法。具体地,本发明涉及小核酸分子,例如短干扰核酸(siNA)、短干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、微 RNA (miRNA)和短发夹 RNA (shRNA) 分子和方法,用于调节病毒尤其是 H5N1 的增殖。本发明的 siRNA 可以是未修饰的或化学修饰的。本发明的 siRNA 可以被化学合成、载体表达或酶合成。本发明也可以涉及各种化学修饰的合成的短干扰核酸(siNA)分子,能够通过 RNA 干扰(RNAi)在细胞内调节病毒例如 H5N1 的增殖。使用化学修饰的 siNA 通过增加体内对核酸酶降解的抗性和 / 或改善的细胞吸收来改善天然 siNA 分子的各种性质。本发明的 siNA 分子提供有用的试剂和方法,用于各种治疗性、诊断性、靶标确认、基因组发现、遗传工程和药物基因组应用。

[0137] 在一个实施方式中,本发明的特征在于含有本发明 siRNA 分子的药物。

[0138] 在一个实施方式中,本发明的特征在于含有本发明 siRNA 分子的活性成分。

[0139] 在一个实施方式中,本发明的特征在于在药学可接受的载体或稀释剂中含有本发明 siRNA 分子的组合物。

[0140] 但是,应当理解本发明不限于所描述的具体实施方式,同样地,当然其可以变化。也应当理解本文所用的术语目的仅在于描述具体实施方式,不试图限制。

[0141] 如本文所使用的,其包括附加的权利要求,单数“一”和“其”(“a”、“an”和“the”)包括复数,除非文中另有指出。因此,例如“一个多核苷酸”的指代包括超过一个这样的多核苷酸。“一个核酸序列”的指代包括超过一个这样的序列。“一个细胞”的指代包括超过一个这样的细胞。

[0142] 术语“包含”、“由……组成”和“主要包括”根据它们标准的含义来定义。在本申请中,为了给每个术语加上具体含义,术语可以替换成另一个。

[0143] 除非另有说明,所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的含义。虽然与本文所描述类似或等价的任何方法和材料都可以用于实践或测试本发明,但是现仅描述了优选的方法和材料。

[0144] 本文所教导的 siRNAs-m 的出色的体内抗病毒效果主要归因于所鉴定的基序的独特特征。首先,siRNA-m,尤其是与其 siRNA-n 相似物(counterpart)共享 10 个重叠的 nt 残基的 PB1-797,在培养的细胞中在抑制病毒复制上显示出比其相应的 siRNAs-n 更低的效果(图 3a)。截然相反的是,它们在动物中显示出比其 siRNA-n 相似物显著更高的抗病毒效果(图 4 和 5)。其次,siRNAs-m 在培养的细胞中显示较低的株间交叉抗病毒效果(图 6b),但是在体内对两种不完全匹配的 H5N1 病毒株展示出全面的交叉保护效果(图 6c 和 d)。第三,含有基序的小 RNA (根据一般接受的标准被认为是不是最优的选择并且也不能用 Promega 公司的 siRNA target designer 程序鉴定出)在培养的细胞中没有显示出任何抗病毒效

果,但是在体内比大多数 siRNAs-n 都显示更明显的抗病毒效果(图 4 和 6g),而所述大多数 siRNAs-n 在培养的细胞中显示非常高的抗病毒活性(图 3a)。这表明:除了 siRNA- 介导的抗病毒活性,该基序本身也能够刺激宿主产生更强的抗病毒效果。

[0145] siRNAs-m 有效保护动物模型免于高毒性 H5N1 病毒致死攻击的根本机理还不完全理解。但是,本文所鉴定的 siRNAs-m 不同于其他报道的以序列依赖性或非依赖性的方式刺激哺乳动物先天免疫应答的 siRNAs^(14,16,20,21),因为我们的结果显示:在不同时间点收集的小鼠血清样本或肺组织匀浆中,针对 siRNAs-m 处理的应答没有任何 IFN- α 、IFN- γ 和 TNF- α 的产生。有意思的是,siRNAs-m 在肺部急性期刺激局部 IL-6 的产生(图 7d 到 f)。进一步分析揭示,基序的反义序列 5' -GGAGU-3' 与刺激 IL-6 产生有关(图 7g)。这是本研究中鉴定的新序列基序,与先前报道的 siRNA 基序例如 5' -UGUGU-3' 和 5' -GUCCUCAA-3'^(15,16) 不同。虽然已经报道病毒感染诱导的局部 IL-6 产生与急性肺损伤和流感病毒感染严重度有关^(22,23),但是几项研究已经发现局部 IL-6 产生与上皮细胞免疫防御系统上调有关⁽²⁴⁻²⁹⁾。也有报道 IL-6 介导的更直接的抗病毒活性与诱导能够通过破坏病毒特异性 mRNAs、双链 RNAs 和蛋白质积累来抑制病毒复制的蛋白质和酶有关⁽³⁰⁾。无论 siRNA-m 诱导的 IL-6 产生是否直接或间接与 siRNAs-m 的体内抗病毒活性有关,我们的结果表明 IL-6 产生在针对 H5N1 病毒感染的宿主防御中具有保护性。

[0146] 我们的结果进一步显示 siRNAs-m 刺激小鼠肺组织中高水平的局部 β - 防卫素 -4 产生(图 8a 和 b),处理后早达 7 个小时达到最高水平(图 8c)。 β - 防卫素 -4 的产生是剂量依赖性的(图 8d)。使用 β - 防卫素 -4 特异性抗体对肺组织进行免疫染色揭示 siRNA-m 刺激的 β - 防卫素 -4 主要在气管粘膜上皮细胞中表达,在肺泡组织中很少发现(图 8e)。siRNAs-m 在小鼠肺部对 β - 防卫素 -4 的刺激在 mRNA 和蛋白质水平均得到证实。

[0147] 另外,已经发现 β - 防卫素对各种感染性病原,例如细菌、真菌和一些包膜病毒提供第一线的宿主防御⁽³³⁾。重要的是, β - 防卫素在先天和获得性免疫之间还起到桥梁作用⁽³⁴⁾。例如, β - 防卫素作为 Toll 样受体 -4 的配体直接作用于未成熟的树突细胞,从而促进树突细胞的成熟⁽³⁵⁾。对于另一个实例,已经发现人 β - 防卫素 -2 在人体肺部的先天免疫和宿主防御应答中发挥重要作用⁽³⁶⁾。也有报道小鼠 β - 防卫素 -4,人 β - 防卫素 -2 的同源物,在动物模型中可以被结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和甲型流感病毒感染所诱导,并作为针对感染的先天免疫^(37,38)。但是,siRNAs-m 诱导的 β - 防卫素 -4 是否具有抗 H5N1 活性还没有被评价过。

[0148] 为了检查 siRNAs-m 诱导的 β - 防卫素 -4 在先体外后体内和体内系统中的抗 H5N1 活性,对 β - 防卫素 -4 进行了克隆和表达。在先体外后体内系统中, β - 防卫素 -4 显示强的抗 H5N1 活性,具有大约在 45 μ g/ml 水平的 IC₅₀(图 9a)。在体内系统中,一个剂量 75 μ g 的 β - 防卫素 -4 可以保护 40% 的小鼠免于 H5N1 病毒的致死攻击。即使对于 β - 防卫素 -4 处理后没有存活的小鼠,它们也比对照能够多存活 2 天(图 9b)。这些结果显示 siRNAs-m 的有效的抗 H5N1 效果可以归因于,至少部分可以归因于,新型的基序刺激强烈的 β - 防卫素应答,在保护宿主针对高致病性 H5N1 病毒感染中发挥重要作用。

[0149] 因此,我们已经证明含有新型基序的 siRNAs 在体内大大增强了抗 H5N1 活性。此基序与先前报道的 siRNA 相关的基序不同。其他的基序通常靶向宿主基因的特定序列,而我们的新型基序看起来不以序列特异性的方式发挥作用。在本研究中,分别靶向 4 个不同病

毒基因的 siRNAs-m 在保护动物针对高致病性 H5N1 病毒感染的致死攻击中提供了类似的效果。该基序在很多其他重要病毒中也曾发现过,例如 SARS-CoV、RSV、AdV、HIV、HBV 和 HCV,因此可能提供不仅针对 H5N1 流感病毒,而且针对其他重要的病毒病原例如这些病毒的基于 siRNA 的抗病毒剂。

[0150] 本文提及或引用的所有的专利、专利申请、临时申请和公开均通过引用整体并入,其包括所有的附图和表格,其程度为它们不与本说明书的明确教导相矛盾。

[0151] 下面是解释实践本发明的方法的实施例。这些实施例不应解释为限制。除非另有说明,所有百分比都为重量百分比,所有溶剂混合物比例均为体积比。

实施例

[0152] 实施例 1: 在培养的细胞中具有该基序的 siRNAs (siRNA-m) 显示低于不含基序的 siRNAs (siRNA-n) 的抑制效果

设计并合成了 25 个分别靶向甲型流感病毒的 PB1、PB2、PA、NP、M、NS 和 HA 基因的 siRNA 双链体,其包括 4 个含有新型基序的 siRNAs (命名为 siRNAs-m) 和 21 个不含该基序的 siRNAs (命名为 siRNAs-n) (图 1 和表 1)。

[0153] 表 1 本研究中设计和测试的 siRNAs 的序列

名称#	正向序列 (5'-3')	
PB1-666	GACACUGAACACAAUGACAdTdT	SEQ ID NO: 1
PB1-788	GUGAGAAACUUGAGCAAUCdTdT	SEQ ID NO: 2
PB1-797	UUGAGCAAUCUGGACUCCCdTdT	SEQ ID NO: 3
PB1-1688	GAGGGGAUACGCAAUCCAdTdT	SEQ ID NO: 4
PB1-1780	GGAGGACCAAUCUAUACAdTdT	SEQ ID NO: 5
PB2-696	GCAUUUGACUCAAGGGACCdTdT	SEQ ID NO: 6
PB2-719	GGGAACAGAUGUACACUCCdTdT	SEQ ID NO: 7
PB2-1558	GAAACCCAGGGAACAGAGAdTdT	SEQ ID NO: 8
PB2-1831	GAUACUGUCCAGAUAAUAAdTdT	SEQ ID NO: 9
PA-209	GAAACACCGAUUUGAAAUAAdTdT	SEQ ID NO: 10
PA-359	GACACGGAGGGAAGUUCAUdTdT	SEQ ID NO: 11
PA-2036	GCUUAAUGCGUCUUGGUUCdTdT	SEQ ID NO: 12
PA-2087	GCAAUUGAGGAGUGCCUGAdTdT	SEQ ID NO: 13
PA-2109	GGUUCAACUCCUCCUCGCdTdT	SEQ ID NO: 14
NP-321	GCUAAUUCUGUACGACAAAAdTdT	SEQ ID NO: 15
NP-1122	GGACUCCAACACUCUUGAAAdTdT	SEQ ID NO: 16
NP-1178	GAGGAAACACCAACCAGCAdTdT	SEQ ID NO: 17
NP-1496	GGAUCUUAUUUCUUCGGAGdTdT	SEQ ID NO: 18
HA-869	GCAACACCAAGUGUCAAAAdTdT	SEQ ID NO: 19
HA-855	GGAAUAUGGUAACUGCAACdTdT	SEQ ID NO: 20
M-97	GCAGGAAAGAACACCGAUCdTdT	SEQ ID NO: 21
M-101	GAAAGAACACCGAUCUCGAdTdT	SEQ ID NO: 22
M-925	ACAGCAGAGUGCUGUGGAUdTdT	SEQ ID NO: 23
NS-338	AAAUGGACCAGGCAAUAAdTdT	SEQ ID NO: 24
NS-604	GAUGAGGAUGGGAGACUUCdTdT	SEQ ID NO: 25
NS-677	GAAGAAUAAGGUGGCUGAdTdT	SEQ ID NO: 26
NS-782	GUGGAGCAAGAGAUAAAGAGdTdT	SEQ ID NO: 27

[0154] 在培养的 MDCK 细胞中评价了这些针对 H5N1 甲型流感病毒株 A/Vietnam/1194/04 的 siRNAs 的抗病毒效果。实验中包括两个报道的 siRNAs, PA-2087 和 NP-1496^(8,9), 作为阳性对照。除了这两个阳性对照 siRNAs 之外, 25 个新设计的 siRNAs 中的 10 个可以在细胞培养中显著抑制病毒复制。观察到超过未处理的对照 75% 的抑制作用(图 3a)。在所测试的 siRNAs 中, 所有 4 个 siRNAs-m(100%)均有效, 但是 21 个 siRNAs-n 中仅 6 个(28.6%)有效。但是, 除了 PA-2109, siRNAs-m 的抗病毒效果比靶向相同病毒基因的 siRNAs-n 低 10 到 1000 倍(图 3a), 表明如在细胞培养系统中评价的, siRNAs-m 基本上显示低于类似的 siRNAs-n 的抗病毒效果。

[0155] 虽然在培养的细胞中 siRNAs-m 显示较低的抗病毒效果, 但是我们认为体内的环境可能不同。因此, 我们选择 4 对分别靶向病毒基因 PB1、PB2、PA 和 NP 的 siRNAs-m 和 siRNAs-n, 在感染高毒性 H5N1 病毒株 A/Vietnam/1194/04 的小鼠中进一步研究。这些成对 siRNAs 的靶向序列在病毒基因组中非常接近(图 3b)。两个 siRNAs-n PA-2087 和 NP-1496 被包括在内, 因为它们被报道在培养的细胞和体内均显示相当好的抗 H5N1 活性^(8,9)。

[0156] 实施例 2: 在动物模型中 siRNAs-m 显示出比 siRNAs-n 更明显的预防和治疗效果

为了评价预防效果,在病毒攻击前 16-18 小时,小鼠经气管内(i. t.) 给予一个剂量(100、50 或 25 μ g/ 剂量)的 siRNAs(表 2)。结果显示所有用 siRNAs-m(PB1-797、PB2-719、PA-2109 和 NP-1122)处理的小鼠均存活(存活率=100%) (图 4a、b、c 和 d)。相反,在小鼠模型中,siRNAs-n 显示出低得多的保护效果。用 100 μ g/ 剂量 PB1-788 (图 4a) 和 NP-1496 (图 4d) 处理的小鼠存活率分别为 30% 和 10%,但是当给予小鼠 50 或 25 μ g/ 剂量 siRNAs 时,存活率降到 0%。值得注意的是,siRNA-m PB1-797 和 siRNA-n PB1-788 的序列有 10 个核苷酸(nt)的重叠。当用 PB2-696 (图 4b)或 PA-2087 (图 4c)处理小鼠时,所有小鼠均死亡(存活率=0%),尽管它们存活的天数比未处理的小鼠长 1-2 天。一致地,siRNAs-m 处理的小鼠的体重在 14 天的观察期内保持在类似水平,而用 siRNAs-n 处理的小鼠的体重则从攻击后第 6 天下降(图 4e-h) 并显示病态体征。结果表明 siRNAs-m 可提供针对 H5N1 病毒高毒株的有效预防性效果,比包括两个他人已经报道的有效 siRNAs_(8,9) 在内的 siRNAs-n 效果明显的多($P < 0.01 - 0.03$)。

[0157] 表 2. 在小鼠模型中评价 siRNAs-m 和 siRNAs-n 的预防性和治疗性抗病毒效果的处理方案

siRNAs-m		siRNAs-n	
预防性方案	数目	预防性方案	数目
PB1-797 100 μ g \times 1 个剂量	13*	PB1-788 100 μ g \times 1 个剂量	13*
PB1-797 50 μ g \times 1 个剂量	5	PB1-788 50 μ g \times 1 个剂量	5
PB1-797 25 μ g \times 1 个剂量	5	PB1-788 25 μ g \times 1 个剂量	5
PB2-719 100 μ g \times 1 个剂量	13*	PB2-696 100 μ g \times 1 个剂量	13*
PB2-719 50 μ g \times 1 个剂量	5	PB2-696 50 μ g \times 1 个剂量	5
PB2-719 25 μ g \times 1 个剂量	5	PB2-696 25 μ g \times 1 个剂量	5
NP-1122 100 μ g \times 1 个剂量	13*	NP-1496 100 μ g \times 1 个剂量	13*
NP-1122 50 μ g \times 1 个剂量	5	NP-1496 50 μ g \times 1 个剂量	5
NP-1122 25 μ g \times 1 个剂量	5	NP-1496 25 μ g \times 1 个剂量	5
PA-2109 100 μ g \times 1 个剂量	13*	PA-2087 100 μ g \times 1 个剂量	13*
PA-2109 50 μ g \times 1 个剂量	5	PA-2087 50 μ g \times 1 个剂量	5
PA-2109 25 μ g \times 1 个剂量	15 [#]	PA-2087 25 μ g \times 1 个剂量	5
PEG/PEI 30 μ l \times 1 个剂量	13*	PBS 30 μ l \times 1 个剂量	23*
PB2-1291 100 μ g \times 1 个剂量		5	
治疗性方案		治疗性方案	
NP-1122 100 μ g \times 4 个剂量	10	NP-1496 100 μ g \times 4 个剂量	10
PEG/PEI 30 μ l \times 4 个剂量	10	PBS 30 μ l \times 4 个剂量	10

[0158] 为了评价 siRNAs 的治疗效果,小鼠经鼻内(i. n.)以 24 小时的间隔施用 100 μ g/ 剂量,4 个剂量的 siRNA-m NP-1122 和 siRNA-n NP-1496。在攻击后 24 小时开始处理(表 2)。如图 4i 所示,用 siRNA-m (NP-1122) 处理的小鼠存活率为 60%,显著高于 siRNA-n (NP-1496) 处理的小鼠 (0%) ($P < 0.02$)。与此一致的是,前者的体重损失也比后者少(图 4j)。这些结果已证明 siRNAs-m 在动物模型中提供了相当可观的治疗效果,而 siRNAs-n 没有。

[0159] 实施例 3. siRNAs-m 有效抑制肺部病毒复制和组织损伤

为了进一步比较用 siRNAs-m 和 siRNAs-n 处理的小鼠之间肺部病毒复制和组织损伤的抑制作用,接受预防性处理的小鼠在攻击后 6 天被处死,收集它们的肺脏用于检测病毒复

制和病理学变化。通过 TCID₅₀ 测试的病毒滴度在 siRNAs-m 处理的小鼠肺部组织中检测不到, 而用 siRNAs-n 处理的小鼠病毒滴度与未处理的对照类似或甚至更高(图 5a)。一致地, 获自 siRNAs-m 处理的小鼠肺部组织中用实时 RT-PCR 测量的病毒 RNA 拷贝比用 siRNAs-n 处理的小鼠低大约 50- 到 100- 倍(图 3b)。肺部样本的组织病理学检验进一步揭示: 来自于 siRNAs-m 处理的小鼠的肺部切片没有显示明显的病理学变化, 其与来自未感染的小鼠(正常)的肺部切片类似, 而来自于用 siRNA-n 处理的小鼠和来自于未处理的小鼠(对照)的肺部切片显示出肺泡损伤和间质炎症浸润(图 5c)。这些结果已进一步证明: siRNAs-m 相比 siRNAs-n 对于小鼠肺部病毒复制和病理学损伤能够提供更强的抑制作用。

[0160] 实施例 4. 基序对于体内抗病毒活性的重要性

siRNAs-m 在培养的细胞中显示低得多的抗病毒效果但在体内显示更高活性的上述结果表明基序可能在 siRNAs-m 的体内抗病毒效果中发挥重要作用。为了证明这一点, 我们选择了一个 siRNA-m, PA-2109, 用于进一步研究, 其与两种 H5N1 病毒株 A/Shen Zhen/406H 和 A/Hong Kong/156/97 相比具有一个 nt 错配(图 6a)。在培养的细胞中没有检测到 PA-2109 针对这两种不完全匹配的病毒株显著的抗病毒效果(图 6B)。结果显示针对不完全匹配的病毒株的抗病毒效果比针对完全匹配的病毒株 A/Vietnam/1194/04 至少低 8 倍(图 7b)。在小鼠中给予一个剂量 25 μ g 的 PA-2109 预防性处理(表 2), 然后分别用这两种不完全匹配的病毒株攻击, 进一步评价了 PA-2109 针对不完全匹配的病毒株的体内抗病毒效果。如图 6c 和 d 所示, 与其在预防性处理中观察到的针对完全匹配的病毒株的抗病毒效果类似(图 4e 和 f), 所有处理的小鼠均存活(存活率=100%), 并且在 2 周的观察期中它们的体重保持在类似的水平, 表明 siRNA-m 可以保护小鼠免于被不完全匹配的 H5N1 病毒株致死攻击至类似的程度。我们在培养的细胞中和体内进一步测试了小 RNA 双链体 PB2-1291 的抗病毒活性, 其靶向病毒的 PB2 基因。PB2-1291 含有该基序, 但是根据一般接受的标准不是最佳的 siRNA。PB2-1291 在细胞培养中不显示任何抗病毒活性(数据没有显示), 但是小鼠存活率为 20%, 伴随存活时间增加 2 天(图 6e)。一致地, 被处理的小鼠体重损失的发生时间也比未处理的对照小鼠延迟 2 天, 在攻击后 12 天, 存活小鼠的体重增加(图 6e)。虽然 PB2-1291 的体内抗病毒效果不如 siRNAs-m, 但仍然比大部分测试的 siRNAs-n 即 PB2-696、PA-2087 和 NP-1496 更明显。这些结果进一步证实独特的基序在诱导 siRNAs-m 有效的体内抗病毒效果中发挥重要的作用。

[0161] 实施例 5: siRNAs-m 刺激小鼠肺部 IL-6 产生

由于已有报道 siRNAs 可以刺激体内预料不到的非特异性效果, 例如先天免疫应答⁽¹⁴⁻¹⁶⁾, 所以在不同时间点从小鼠中收集的血清样本和肺部匀浆中, 测量了先天免疫应答的重要指示因子 IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-6(表 3)。分别在处理后 7、15、24 和 48 小时收集的血清样本中 IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-6 的水平没有增加(图 2)。IFN- α 、IFN- γ 和 TNF- α 的水平在处理的小鼠的肺部匀浆中也检测不到(图 7a、b 和 c)。有意思的是, 在接受被包裹的(encapsulated) siRNA-m PB2-719(复合体)的小鼠肺部匀浆中检测到高水平的 IL-6, 但是在接受裸 PB2-719、被包裹的 siRNA-n PB2-696、递送聚合物或 PBS 的小鼠样本中没有发现(图 7d)。处理后 3 小时 IL-6 水平增加, 7 小时达到峰值, 然后 10 小时降低到低水平(图 7e)。还观察到剂量依赖性效果(图 7f)。并且, 证明了 siRNA-m 的反义链而不是正义链负责刺激 IL-6 产生(图 7g)。选择可选的靶向另一个病毒基因的 siRNA-m, PA-2109

重复该试验。结果显示被包裹的 siRNA PA-2109 在处理 7 小时后诱导出类似水平的 IL-6 (图 7h), 表明肺部 IL-6 的产生的确由该基序诱导, 而不是由 PB2-719 的特异序列诱导。总之, siRNAs-m 不可能诱导强的先天免疫应答, 但是它们刺激小鼠中 IL-6 的早期产生。

[0162] 实施例 6: siRNAs-m 刺激小鼠肺部强的 β - 防卫素 -4 产生

用 siRNAs-m 和 siRNAs-n 处理小鼠 6 小时后收集肺组织, 然后用 430 2.0 array GeneChip (Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA) 测试 mRNAs 的产生, 使用 Gene-Spring 10 软件 (Agilent Technologies), MA 算法和基因本体注解 (gene ontology annotation) 进行分析。结果显示 siRNA-m 刺激的 β - 防卫素 -4 和 IL-6 的产生分别是 siRNA-n 诱导的大约 29 倍和 14 倍。通过使用实时 RT-PCR 检测 mRNA 产生进一步证实该结果。在接受被包裹的 siRNA-m (PB2-719 和 PA-2109) 处理的小鼠肺部匀浆中检测到高水平的 β - 防卫素 -4 的 mRNA, 但是在接受被包裹的 siRNA-n (PB2-696 和 PA-2087)、递送聚合物 (PEG/PEI) 或 PBS 的小鼠样本中没有检测到 (图 8a)。与 IL-6 刺激类似, siRNA-m 的反义链而非正义链负责刺激 β - 防卫素 -4 产生 (图 8b)。处理后 3 小时 β - 防卫素 -4 水平增加, 7 小时达到峰值, 处理 24 小时后降低到水平 (图 8c)。结果还证明 β - 防卫素 -4 的产生是剂量依赖性 (图 8d)。并且, 证明了 siRNAs-m 比 siRNAs-n 刺激气管膜上皮细胞产生高得多水平的 β - 防卫素 -4 (图 8e)。这些结果证明 siRNAs-m 可以在小鼠中在 mRNA 和蛋白水平上刺激 β - 防卫素 -4 的早期产生。

[0163] 实施例 7: siRNAs-m 诱导的 β - 防卫素 -4 在针对先体外后体内和体内 H5N1 病毒感染中显示出强活性

为了测试 siRNAs-m 诱导的 β - 防卫素 -4 是否在针对 H5N1 病毒感染中发挥重要作用, 我们在基因优化后使用大肠杆菌系统克隆并表达了 β - 防卫素 -4。纯化后, 表达的 β - 防卫素 -4 在 MDCK 细胞培养中显示出强的抗 H5N1 病毒感染, IC_{50} 达到大约 $45 \mu\text{g/ml}$ 水平 (图 9a)。在动物模型中进一步评价了 β - 防卫素 -4 的抗 H5N1 活性。结果显示仅用一个剂量 $75 \mu\text{g}$ 的 β - 防卫素 -4 处理就可以保护 40% 的小鼠免于 H5N1 病毒的致死攻击。即使对于 β - 防卫素 -4 处理后没有存活的小鼠, 它们也比对照能够多存活大约 2 天 (图 9b)。这些先体外后体内和体内结果证明, siRNAs-m 诱导的 β - 防卫素 -4 具有强的抗 H5N1 活性。

[0164] 实施例 8: 材料与方法

细胞培养和病毒

Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞在添加 10% 胎牛血清 (FCS) 和 1% 青霉素和链霉素 (P/S) 的极限必需培养基 (MEM) (GIBCO BRL) 中, 在 37°C 和 5% CO_2 条件下维持。等份的甲型流感病毒株 A/Vietnam/1194/2004、A/Shen Zhen/406H 和 A/Hong Kong/156/97 的储液在 37°C 下的鸡胚中生长。病毒接种 48 小时后收集含病毒的尿囊液并保存在 -80°C 。使用血凝测定和 TCID_{50} 测量病毒滴度。将储液系列稀释之后测定小鼠中 50% 致死剂量 (LD_{50})。所有涉及 H5N1 病毒的实验都在香港大学微生物系的生物安全水平 3 级的设施内进行。

[0165] siRNAs 的制备

使用 Promega (<http://www.promega.com/siRNA Designer/program/>) 的 siRNA target designer 程序设计分别靶向 H5N1 甲型流感病毒 PB1、PB2、PA、NP、M、NS 和 HA 基因的 siRNAs (图 1 和表 1)。BLAST 结果证实所靶向的区域与人类和小鼠基因组没有同源性。本研究所使用的所有 siRNAs 均通过化学合成, 并且以脱盐、预退火或退火双链体形式 (Invitrogen 或

Qiagen, USA) 提供。

[0166] 培养的细胞中抗病毒效果的评价

使用 LIPOFECTAMINE™ RNAiMAX (Invitrogen, USA), 按照供应商的说明书将 siRNAs 转染到 24 孔板中的 MDCK 细胞中。转染细胞在转染后 16–18 小时, 每孔用 100 TCID₅₀ 病毒感染。在 48 小时收集上清, 通过如前所述 TCID₅₀ 和 RT-PCR 检测病毒载荷 (17, 31)。

[0167] PEG8-PEI1.8 的制备

甲氧基 N- 羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇 (mPEG-NHS) 如前所述制备⁽³²⁾。成通过向磷酸缓冲液 (PBS, pH7.4) 中加入 1g 高分支的 PEI (1.8 kDa, Aldrich) 和 8.8g mPEG-NHS 来合成 PEG8-PEI1.8, 并将溶液在室温下磁力搅拌过夜。得到的溶液在蒸馏水中通过膜透析 (分子量截留 3.5kDa) 进行纯化 48 小时, 然后冻干得到白色粉末。根据 ¹H NMR (Varian 300-MHz NMR spectrometer, CA, USA) 在氘化氯仿中的测定, PEI 中的 PEG 嫁接密度为 8。

[0168] 体内抗病毒效果评价

BALB/c 雌性小鼠, 6–8 周龄, 饲养在生物安全 3 级环境, 并允许无限量获得标准颗粒饲料和水。所有实验方案均遵守批准的生物安全 3 级动物设施标准操作规程, 并由动物伦理委员会批准。siRNAs 以氮 / 磷重量比为 7 被包裹到 PEG8-PEI1.8 中。将混合物涡旋 20 秒, 然后在室温下孵育 30min。小鼠气管内给予 1 个剂量的 siRNA 混合物用于预防, 或鼻内给予 4 个剂量的 siRNAs 用于治疗, 并且鼻内接种 10 LD₅₀ 的病毒 (表 2)。对照小鼠给予 PBS 和 / 或 PEG8-PEI1.8。监测存活率、体重和一般状况 21 天或直到死亡。对于病毒学和病理学测试, 小鼠在攻击 6 天后处死。收集血液、肺、脾和大脑样本。

[0169] 先天免疫应答分析

小鼠气管内给予裸的和 / 或被包裹的 siRNAs-m、siRNA-n、PEG8-PEI1.8 和 PBS (附表 3)。在不同时间点处死小鼠, 收集血液和肺部样本。用 ELISA 测定来测试血清样本和肺部匀浆中的 IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-6。

[0170] 统计学分析

存活时间和存活率的统计学分析分别使用 Kaplan-Meier 时序检验和卡方测试进行。在其他情况下, 统计分析使用 Stata 统计学软件通过配对双尾斯氏 t 测试来计算。以 $P \leq 0.05$ 认为结果具有显著性。

[0171] 登录号

A/Vietnam/1194/04、A/Hong Kong/156/97 和 A/Shenzhen/406H H5N1 病毒序列的 GeneBank 登录号分别对于 NP 为 AY651498、AF036359 和 EF137709, 对于 PA 为 AY651610、AF036361 和 EF137711, 对于 PB1 为 AY651664、AF036362 和 EF137712, 对于 PB2 为 AY651718、AF036363 和 EF137713。

[0172] 应当理解本文所述的实施例和实施方式仅用于说明性目的, 其各种修改或变化对于本领域普通技术人员应是可以想到的, 并被包括在本申请的精神和范围之内。另外, 本文所公开的任何发明或其实施方式中的任何元素或限制可以与本文所公开的任何其他发明或其实施方式中的任何和 / 或所有其他元素或限制组合 (单独或以任何组合方式), 并且所有这些组合都被考虑在本发明的范围之内, 但不限于此。

[0173] 参考文献

1. Horimoto, T. & Kawaoka, Y. Influenza: lessons from past pandemics,

warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 3, 591-600 (2005).

2. Yuen, K.Y., *et al.* Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 351, 467-471 (1998).

3. Beigel, J.H., *et al.* Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *The New England journal of medicine* 353, 1374-1385 (2005).

4. Castle, S.C. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis* 31, 578-585 (2000).

5. Luscher-Mattli, M. Influenza chemotherapy: a review of the present state of art and of new drugs in development. *Archives of virology* 145, 2233-2248 (2000).

6. Elbashir, S.M., *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 (2001).

7. Fire, A., *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811 (1998).

8. Ge, Q., *et al.* Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8676-8681 (2004).

9. Tompkins, S.M., Lo, C.Y., Tumpey, T.M. & Epstein, S.L. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8682-8686 (2004).

10. Ge, Q., *et al.* RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2718-2723 (2003).

11. Zhou, H., *et al.* Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. *Antiviral Research* (2007).

12. Hui, E.K., Yap, E.M., An, D.S., Chen, I.S. & Nayak, D.P. Inhibition of influenza virus matrix (M1) protein expression and virus replication by U6 promoter-driven and lentivirus-mediated delivery of siRNA. *J Gen Virol* 85, 1877-1884 (2004).

13. McCown, M., Diamond, M.S. & Pekosz, A. The utility of siRNA transcripts produced by RNA polymerase i in down regulating viral gene expression and replication of negative- and positive-strand RNA viruses. *Virology* 313, 514-524 (2003).

14. Marques, J.T. & Williams, B.R.G. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotech* 23, 1399-1405 (2005).

15. Judge, A.D., *et al.* Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature biotechnology* 23, 457-462 (2005).
16. Hornung, V., *et al.* Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature medicine* 11, 263-270 (2005).
17. Zheng, B.J., *et al.* Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8091-8096 (2008).
18. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature medicine* 11, 50-55 (2005).
19. Li, B.-j., *et al.* Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nature medicine* 11, 944-951 (2005).
20. Schlee, M., Hornung, V. & Hartmann, G. siRNA and isRNA: Two Edges of One Sword. *Mol Ther* 14, 463-470 (2006).
21. Sioud, M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *Journal of molecular biology* 348, 1079-1090 (2005).
22. Imai, Y., *et al.* Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* 133, 235-249 (2008).
23. Salomon, R., Hoffmann, E. & Webster, R.G. Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12479-12481 (2007).
24. Bals, R. & Hiemstra, P.S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 23, 327-333 (2004).
25. Nadeau, W.J., Pistole, T.G. & McCormick, B.A. Polymorphonuclear leukocyte migration across model intestinal epithelia enhances *Salmonella typhimurium* killing via the epithelial derived cytokine, IL-6. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 1379-1387 (2002).
26. Meusel, T.R. & Imani, F. Viral induction of inflammatory cytokines in human epithelial cells follows a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent but NF- κ B-independent pathway. *J Immunol* 171, 3768-3774 (2003).
27. Monick, M.M., *et al.* Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *The Journal of biological*

chemistry 278, 53035-53044 (2003).

28. Wick, M.J., Madara, J.L., Fields, B.N. & Normark, S.J. Molecular cross talk between epithelial cells and pathogenic microorganisms. *Cell* 67, 651-659 (1991).

29. Diamond, G., Legarda, D. & Ryan, L.K. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunological reviews* 173, 27-38 (2000).

30. Dentener, M.A., *et al.* Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 23, 146-153 (2000).

31. Wang, M., *et al.* Food markets with live birds as source of avian influenza. *Emerging infectious diseases* 12, 1773-1775 (2006).

32. Shuai, X., Merdan, T., Unger, F., Wittmar, M. & Kissel, T. Novel Biodegradable Ternary Copolymers hy-PEI-g-PCL-b-PEG: Synthesis, Characterization, and Potential as Efficient Nonviral Gene Delivery Vectors. *Macromolecules* 36, 5751-5759 (2003).

33. Sun, L., *et al.*, Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *J Virol*, 2005. 79(22):14318-29.

34. Klotman ME and Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(6):447-56.

35. Biragyn A, *et al.* Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*, 2002. 298(5595):1025-9.

36. Becker MN, *et al.* CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem*, 2000. 275(38):29731-6.

37. Rivas-Santiago B, *et al.* beta-Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis*, 2006. 194(5):697-701.

38. Chong KT, Thangavel RR, Tang X. Enhanced expression of murine beta-defensins (MBD-1, -2, -3, and -4) in upper and lower airway mucosa of influenza virus infected mice. *Virology*, 2008. 380(1):136-43.

序列表

<110> 香港大学

<120> 有效抑制病毒感染的 siRNA 组合物及方法

<130> IP00295-PCT

<150> US 61/121,614

<151> 2008-12-11

<160> 37

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

GACACUGAAC ACAAUGACdT dT 21

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

GUGAGAAACU UGAGCAAUCdT dT 21

-
- <210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 3
UUGAGCAAUC UGGACUCCCdT dT 21
- <210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 4
GAGGGGAUAC GCAAUCCAdT dT 21
- <210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 5
GGAGGACCAA AUCUAUACAdT dT 21
- <210> 6

- <211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 6
GCAUUUGACU CAAGGGACCdT dT 21
- <210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 7
GGGAACAGAU GUACACUCCdT dT 21
- <210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 8
GAAACCCAGG GAACAGAGAdT dT 21
- <210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>

<400> 9
GAUACUGUCC AGAUAAUAAdT dT 21

<210> 10
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 10
GAAACACCGA UUUGAAAUAAdT dT 21

<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 11
GACACGGAGG GAAGUUCAUdT dT 21

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 12

GCUUAAUGCG UCUUGGUUCdT dT 21

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 13

GCAAUUGAGG AGUGCCUGAdT dT 21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 14

GGUUCAACUC CUUCCUCGdT dT 21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 15

GCUAAUUCUG UACGACAAAdT dT 21

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 16

GGACUCCAAC ACUCUUGAAdT dT 21

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 17

GAGGAAACAC CAACCAGCAdT dT 21

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 18

GGAUCUUAUU UCUUCGGAGdT dT 21

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 19

GCAACACCAA GUGUCAAAACdT dT 21

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 20

GGAAUAUGGU AACUGCAACdT dT 21

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 21

GCAGGAAAGA ACACCGAUCdT dT 21

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 22

GAAAGAACAC CGAUCUCGAdT dT 21

<210> 23

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 23

ACAGCAGAGU GCUGUGGAUdT dT 21

<210> 24

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 24

AAAUGGACCA GGCAAUAAUdT dT 21

<210> 25
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 25
GAUGAGGAUG GGAGACUUCdT dT 21

<210> 26
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 26
GAAGAAUAA GGUGGCUGAdT dT 21

<210> 27
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 27
GUGGAGCAAG AGAUAAAGAdT dT 21

<210> 28
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 28

GGGAGUCCAG AUUGCUCAAdT dT 21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 29

GAUUGCUCAA GUUUCUCACdT dT 21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 30

GGAGUGUACA UCUGUUCCCdT dT 60

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 31
GGUCCCUUGA GUCAAAUGCdT dT 21

<210> 32
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 32
GCGAGGAAGG AGUUGAACCCdT dT 21

<210> 33
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 33
UCAGGCACUC CUCAAUUGCdT dT 21

<210> 34
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 34
UUCAAGAGUG UUGGAGUCCdT dT 21

<210> 35

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 35

CUCCGAAGAA AUAAGAUCcT dT 21

<210> 36

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 36

AUGCAUCAAC UCCUGAGAcT dT 21

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 37

GUCUCAGGAG UUGAUGCAUdT dT 21

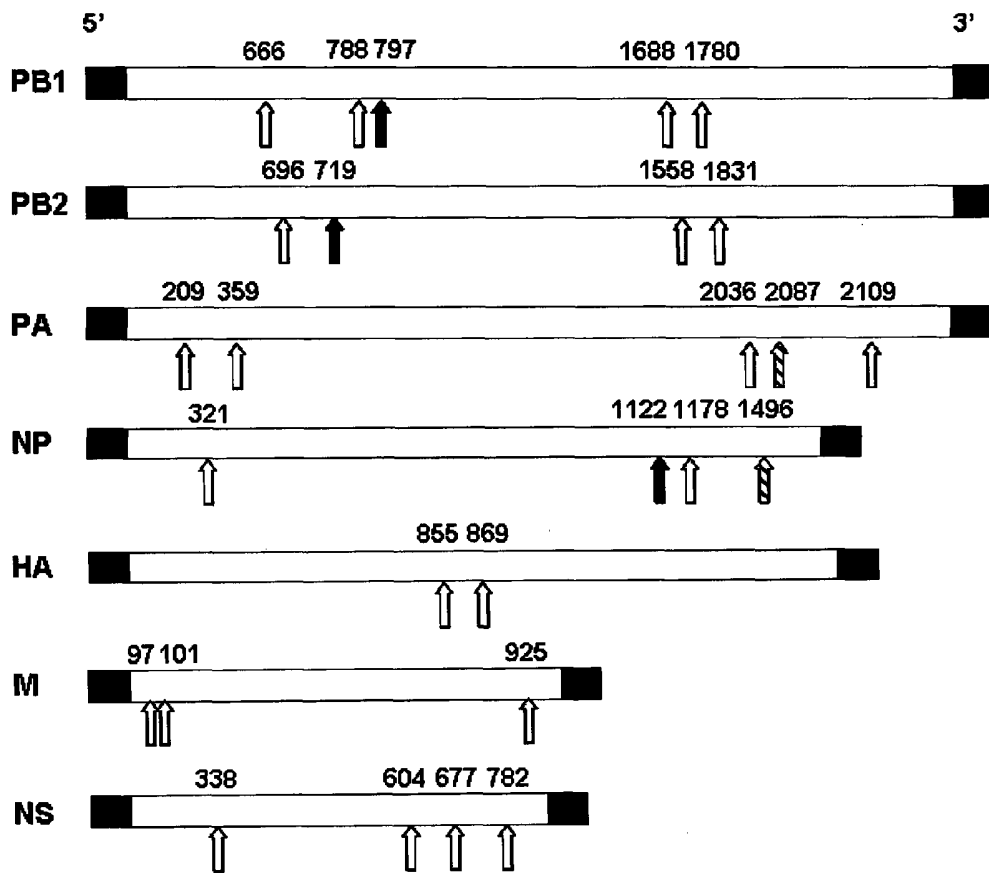


图 1

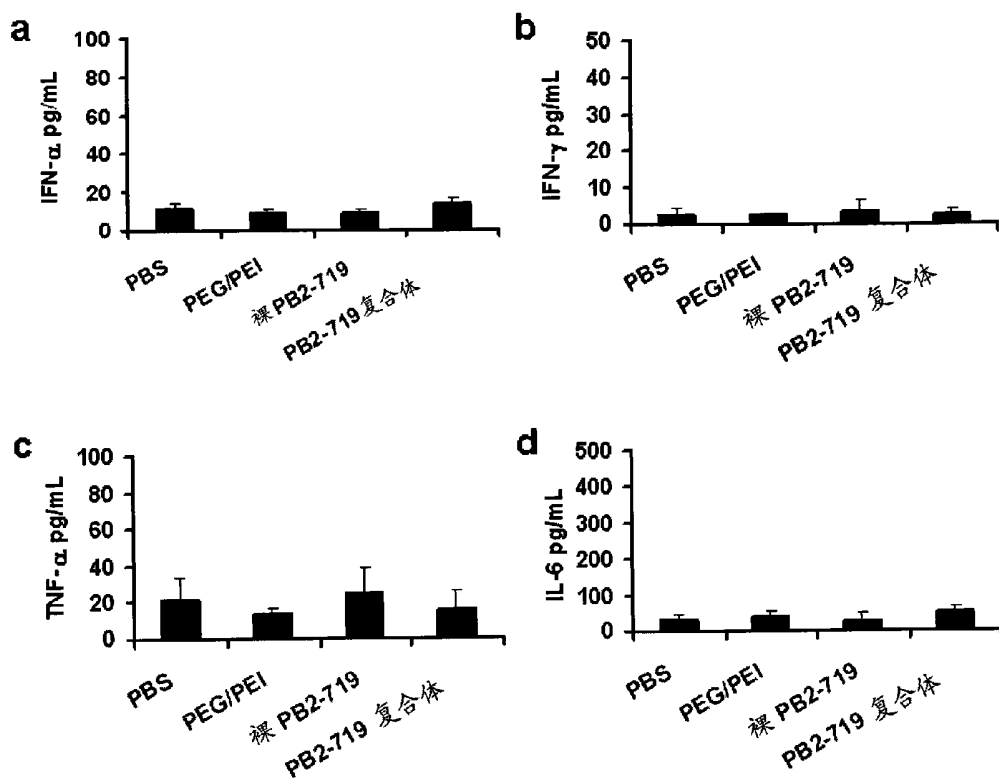


图 2

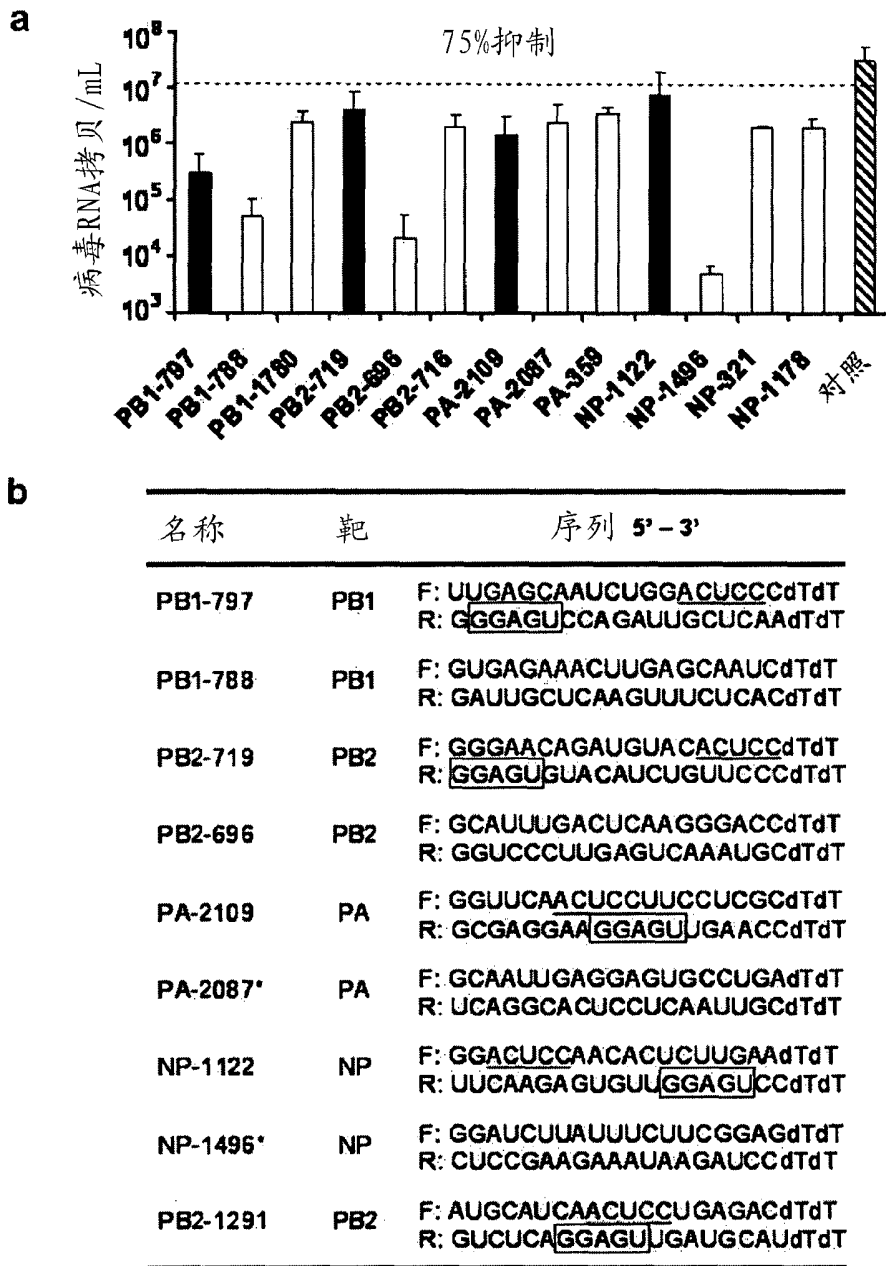


图 3

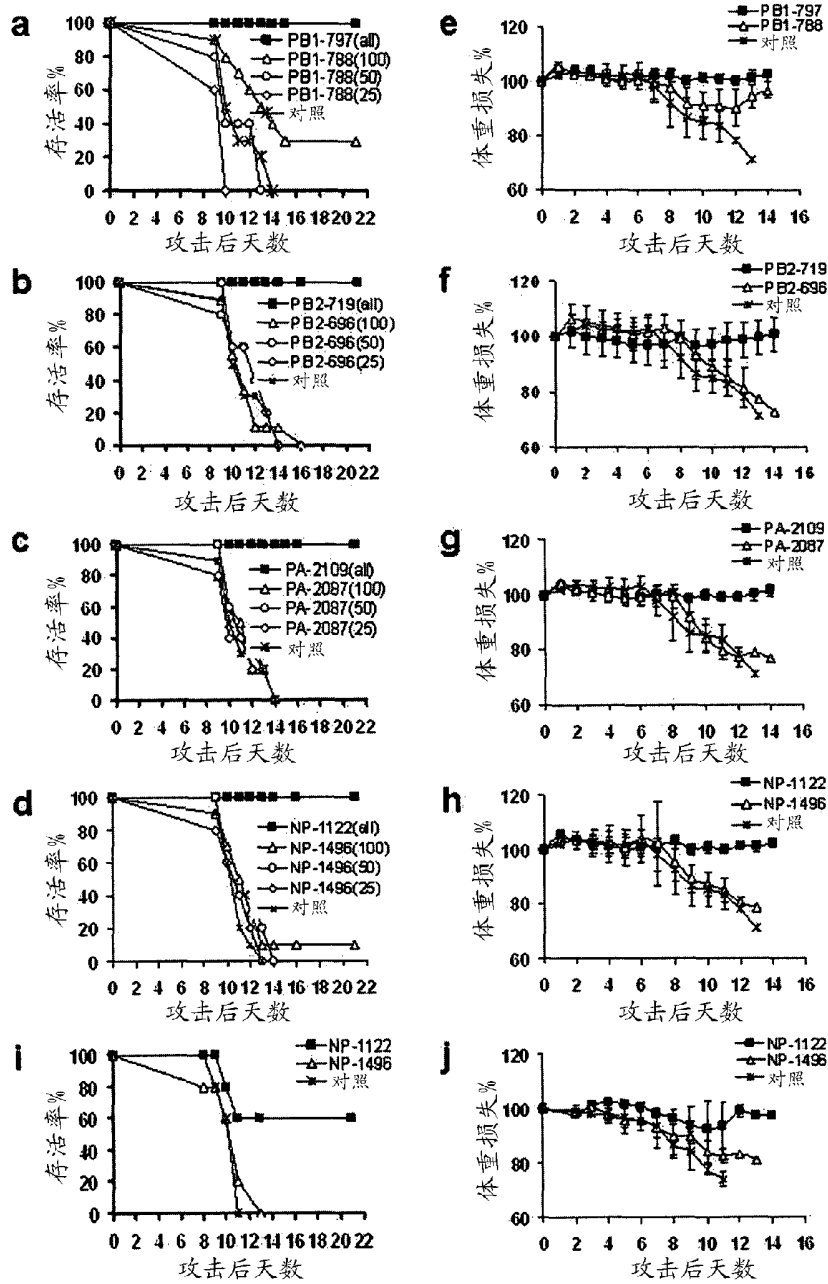


图 4

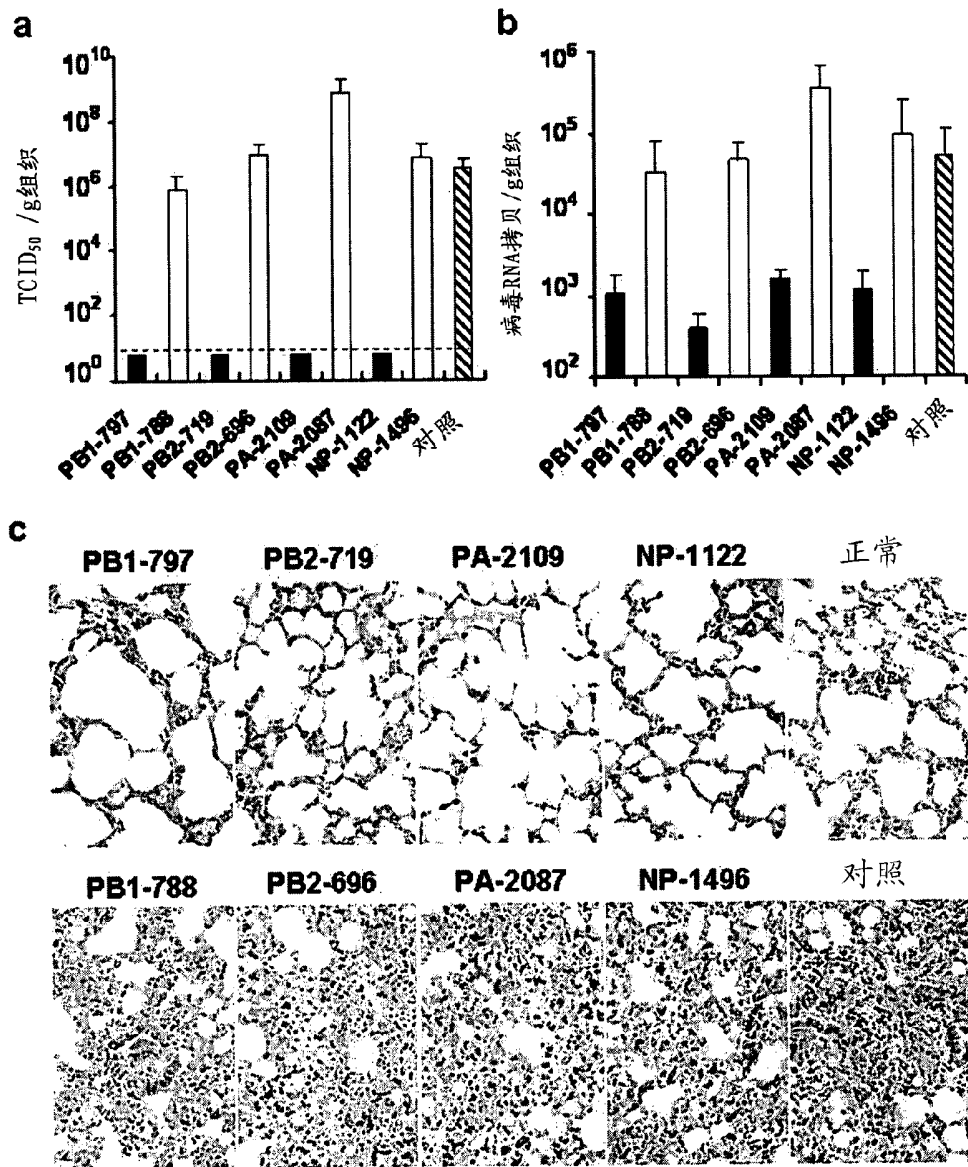


图 5

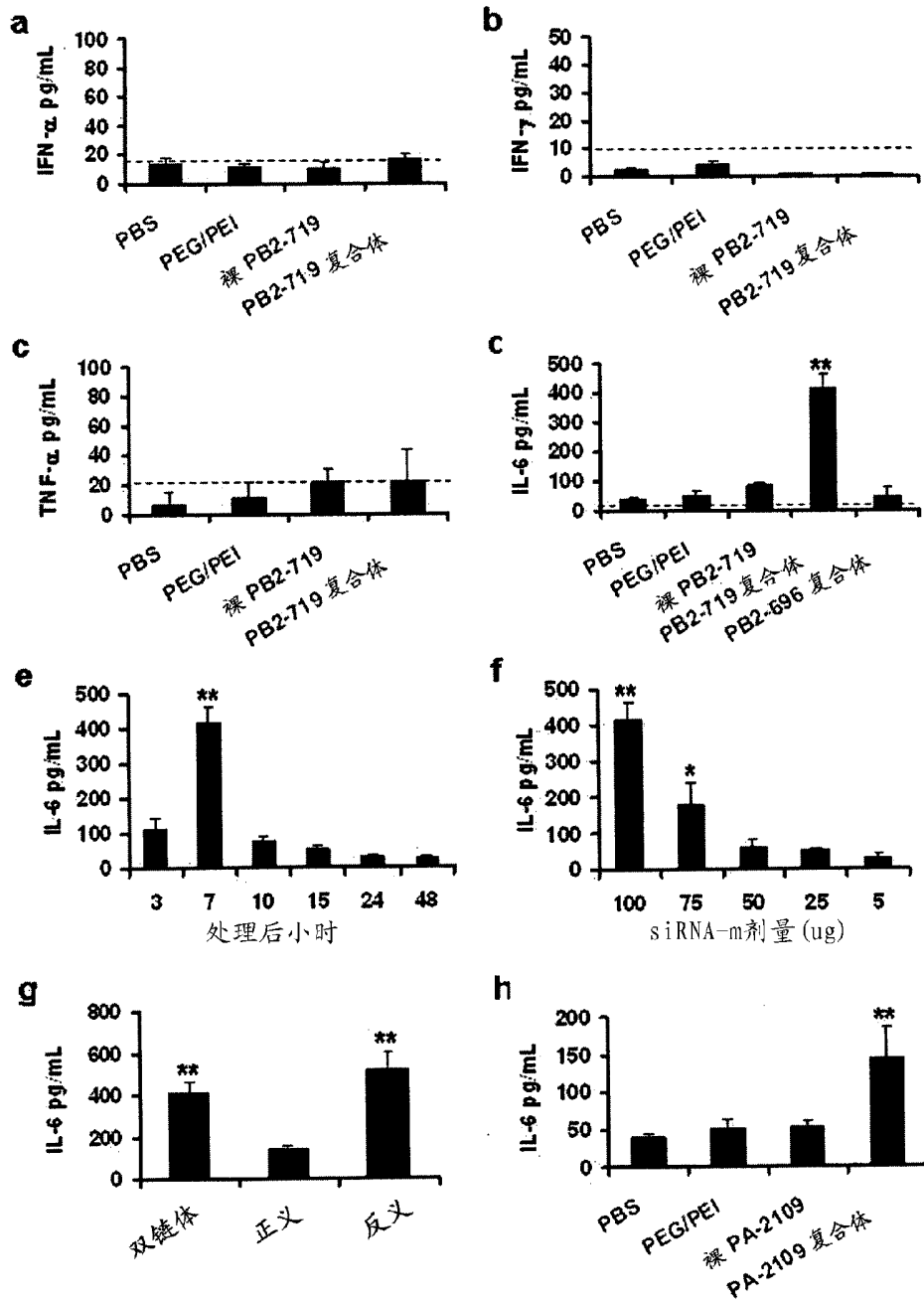


图 7

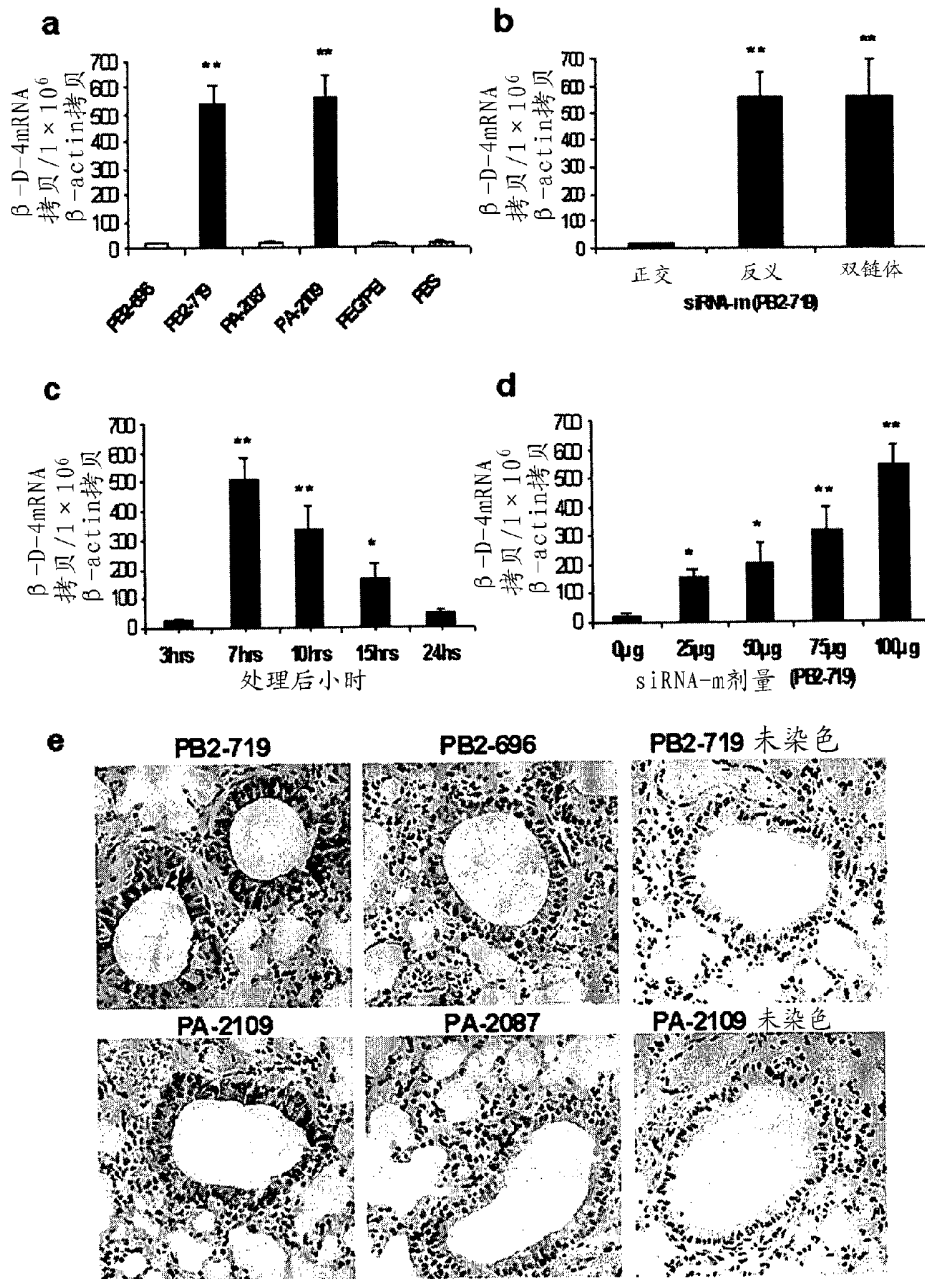


图 8

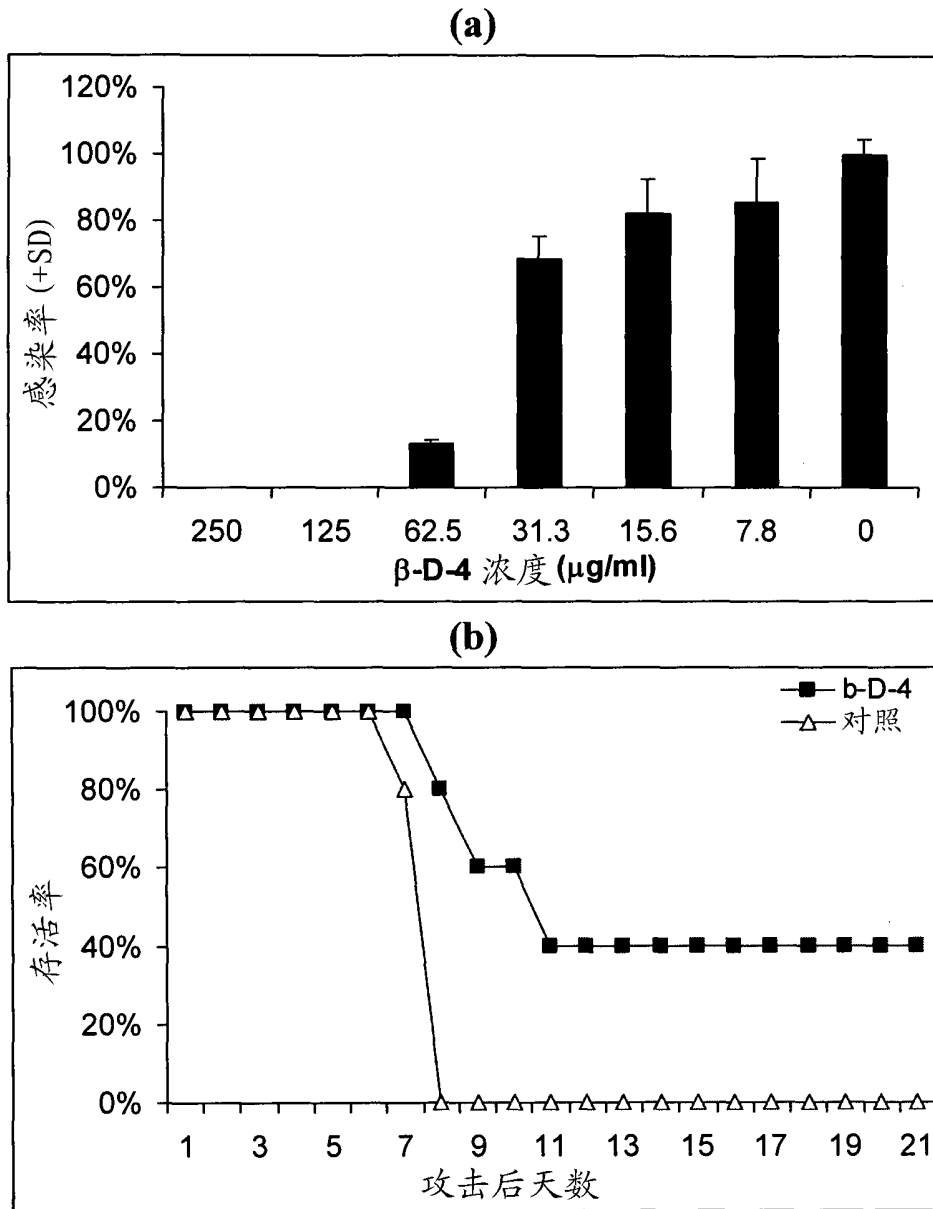


图 9