



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02820560. X

[43] 公开日 2005 年 4 月 6 日

[11] 公开号 CN 1604906A

[22] 申请日 2002.10.16 [21] 申请号 02820560. X  
 [30] 优先权  
 [32] 2001.10.16 [33] US [31] 60/329,815  
 [86] 国际申请 PCT/US2002/032868 2002.10.16  
 [87] 国际公布 WO2003/033657 英 2003.4.24  
 [85] 进入国家阶段日期 2004.4.16  
 [71] 申请人 AVI 生物制药公司  
 地址 美国俄勒冈州  
 [72] 发明人 D·A·斯坦 D·E·斯基林  
 P·L·艾弗森 A·W·史密斯

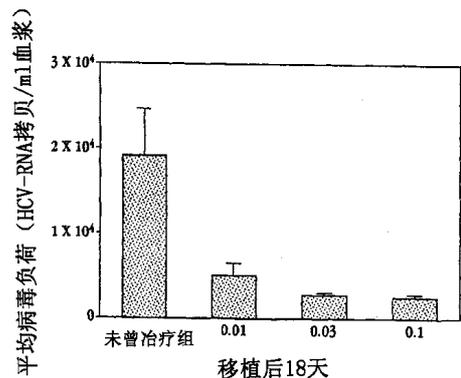
[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司  
 代理人 程 伟

权利要求书 6 页 说明书 37 页 序列表 9 页  
 附图 6 页

[54] 发明名称 用于治疗单链 RNA 病毒感染的抗病毒反义核酸的试剂和方法

### [57] 摘要

本发明提供了一种反义抗病毒化合物和方法，在处理病毒感染时，用于抑制来源于小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒、黄病毒科的病毒的生长。这种反义抗病毒化合物是基本不带电荷的寡聚物，有与跨越了病毒基因组第一开放阅读框的 AUG 起始位点的病毒靶序列基本互补的目标碱基序列。



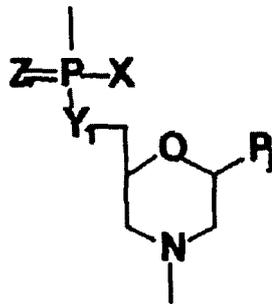
1. 一种针对来源于小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒科的 RNA 病毒抗病毒化合物，所述的病毒有单链、少于 12kb 的正义基因组，和一个编码含多种功能蛋白质的多蛋白的第一开放阅读框，所述的化合物含有：

有 (a) 一条 12-40 个吗啉代亚基的序列，负载一个目标碱基序列与跨越所述的第一开放阅读框的翻译开始区域的病毒靶序列基本互补，和 (b) 一条基本不带电荷的主链的吗啉代寡聚物。

2. 权利要求 1 的化合物，其中的亚基是通过不带电荷的、含磷的亚基间键合将一个亚基的吗啉代的氮与相邻亚基的 5' 外环碳连接起来的。

3. 权利要求 2 的化合物，其中所述的亚基间键合是二氨基磷酸盐连接。

4. 权利要求 3 的化合物，其中所述的吗啉代亚基是根据下面的结构通过二氨基磷酸盐键合连接的：



其中  $Y_1=0$ ,  $Z=0$ ,  $P_j$  是通过碱基特异性氢键有效地与多核苷酸中的一个碱基相结合的嘌呤或嘧啶碱基对部分， $X$  是烷基、烷氧基、硫代烷氧基或烷基氨。

5. 权利要求 4 的化合物，其中  $X=NR_2$ ，其中每一  $R$  是独立的氢或甲基。

6. 权利要求 1 的化合物，其中所述的寡聚物在与所述的病毒靶序列结合后的  $T_m$  超过  $50^\circ\text{C}$ ，且所述的化合物被哺乳动物细胞主动吸收。

7. 权利要求 1 的化合物，直接针对小 RNA 病毒，具有一条至少与序列组中选出的序列有至少 90% 的同源性的目标序列，这个组包括：

- (i) 对脊髓灰质炎病毒的 Mahoney 和 Sabin 株的序列识别号 16,  
(ii) 对甲型肝炎病毒的序列识别号 17,  
(iii) 对鼻病毒 14 的序列识别号 18,  
(iv) 对鼻病毒 16 的序列识别号 19,  
5 (v) 对鼻病毒 1B 的序列识别号 20,  
(vi) 对口疮病毒的序列识别号 21 和 22, 和  
(vii) 对柯萨奇病毒的序列识别号 23、24 和 25。

8. 权利要求 7 的化合物, 直接针对人鼻病毒 16, 具有序列识别号 18 或 19 表示的目标序列。

- 10 9. 权利要求 1 的化合物, 直接针对杯状病毒, 具有一条至少与序列组中选出的序列有 90% 的同源性的目标序列, 这个组包括:

- (i) 对囊病毒的 Pan-1 血清型的序列识别号 27、28 和 29,  
(ii) 对猪的囊病毒的序列识别号 30,  
(iii) 对诺沃克病毒的序列识别号 31, 和  
15 (iv) 对猫的囊病毒的序列识别号 32。

10. 权利要求 9 的化合物, 直接针对囊病毒的 Pan-1 血清型, 其中寡聚物是二氨基磷酸盐键合的吗啉代寡聚物, 有一条是从序列识别号 27, 28 和 29 组成的序列组中选出的目标序列。

11. 权利要求 9 的化合物, 直接针对猫的囊病毒, 其中寡聚物是  
20 二氨基磷酸盐键合的吗啉代寡聚物, 目标序列的序列识别号为 32。

12. 权利要求 1 的化合物, 直接针对戊型肝炎病毒, 有一条至少与选自序列识别号 33 和 34 的序列有 90% 的同源性的目标序列。

13. 权利要求 12 的化合物, 其中寡聚物是二氨基磷酸盐键合的吗啉代寡聚物, 具有一条选自序列识别号 33 和 34 的目标序列。

- 25 14. 权利要求 1 的化合物, 直接针对丙型肝炎黄病毒, 有一条至少与序列识别号为 35 的序列有 90% 的同源性的目标序列。

15. 权利要求 14 的化合物, 其中寡聚物是二氨基磷酸盐键合的目标序列序列识别号为 35 的吗啉代寡聚物。

16. 权利要求 1 的化合物, 其中所述的寡聚物能以由寡聚物与所  
30 述的 RNA 病毒的病毒基因组的互补部分组成的异源双螺旋形式, 其可以在给予所述的受试者寡聚物的几小时后在受试哺乳动物的血清或尿

中发现。

17. 一种抑制来源于小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒科的 RNA 病毒复制的方法，所述的病毒有单链、少于 12kb 的正义基因组，和一个编码含多种功能蛋白质的多蛋白的第一开放阅读框，该方法包括：

将所述的病毒暴露在吗啉代寡聚物中，吗啉代寡聚物有 (a) 一条 12—40 个吗啉代亚基的序列，其负载与跨越所述的第一开放阅读框的翻译开始区域的病毒靶序列基本互补的目标碱基序列，和 (b) 一条基本不带电荷的主链。

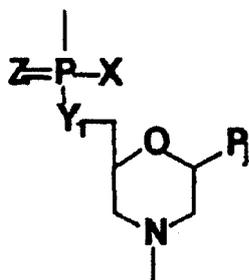
18. 权利要求 17 的方法，其中所述的寡聚物被给予所说病毒感染过的受试哺乳动物。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述的寡聚物能以由寡聚物与所述的 RNA 病毒的病毒基因组的互补部分组成的异源双螺旋形式，在受试哺乳动物的血清或尿中发现，在寡聚物被给予所述的受试者几小时后。

20. 权利要求 17 的方法，其中的寡聚物有不带电荷的、含磷的亚基间键合，其将一个亚基的吗啉代的氮与相邻亚基的 5' 外环碳连接起来。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述的亚基间键合是二氨基磷酸盐键合。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述的吗啉代亚基是按照下面的结构通过二氨基磷酸盐键合连接的：



- 其中  $Y_1=O$ ,  $Z=O$ ,  $P_j$  是通过碱基特异性氢键有效地与多核苷酸中的一个碱基相结合的嘌呤或嘧啶碱基对部分，X 是烷基、烷氧基、硫代烷氧基或烷基氨。

23. 权利要求 22 的方法，其中  $X=NR_2$ ，这里每个 R 独立为氢或甲

基。

24. 权利要求 17 的方法，其用于抑制小 RNA 病毒的复制，其中所述的目标序列至少与由以下组成的组中选择的一条序列有 90% 的同源性，这个组包括：

- 5 (i) 序列识别号 16，对脊髓灰质炎病毒的 Mahoney and Sabin 株，
- (ii) 对甲型肝炎病毒的序列识别号 17，
- (iii) 对鼻病毒 14 的序列识别号 18，
- (iv) 对鼻病毒 16 的序列识别号 19，
- (v) 对鼻病毒 1B 的序列识别号 20，
- 10 (vi) 对口疮病毒的序列识别号 21 和 22，和
- (vii) 对柯萨奇病毒的序列识别号 23、24 和 25。

25. 权利要求 24 的方法，其用于抑制人鼻病毒 16 的复制，其中所述的目标序列是序列识别号 18 或 19，并且寡聚物是二氨基磷酸盐连接的吗啉代寡聚物。

15 26. 权利要求 17 的方法，其用于抑制杯状病毒的复制，其中所述的目标序列至少与序列组中选出的一条序列有 90% 的同源性，这个组包括：

- (i) 对囊病毒的 Pan-1 血清型的序列识别号 27、28 和 29，
- (ii) 对猪的囊病毒的序列识别号 30，
- 20 (iii) 对诺沃克病毒的序列识别号 31，和
- (iv) 对猫的囊病毒的序列识别号 32。

27. 权利要求 26 的方法，其用于抑制囊病毒的 Pan-1 血清型复制，其中目标序列选自序列识别号 27，28 和 29，并且寡聚物是二氨基磷酸盐键合的吗啉代寡聚物。

25 28. 权利要求 26 的方法，其用于抑制猫的囊病毒复制，其中目标序列为序列识别号 32，且寡聚物是二氨基磷酸盐键合的吗啉代寡聚物。

29. 权利要求 17 的方法，其用于抑制戊型肝炎病毒复制，其中目标序列至少与选自序列识别号 33 和 34 的序列有 90% 的同源性，且寡聚物是二氨基磷酸盐键合的吗啉代寡聚物。

30 30. 权利要求 17 的方法，其用于抑制丙型肝炎病毒的复制，其中目标序列至少与序列识别号为 35 的序列有 90% 的同源性，且寡聚物

是二氨基磷酸盐键合的吗啉代寡聚物。

31. 权利要求 17 的方法，其中所述的寡聚物在与所述的病毒靶序列结合后的  $T_m$  超过  $50^\circ\text{C}$ ，且能被哺乳动物细胞主动吸收。

32. 一种证实感染了受试哺乳动物的小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒和针对感染病毒的反义寡聚物间存在有效的相互作用的方法，包括：

(a) 将所述的寡聚物给予受试者，其中所述的寡聚物有一条 12—40 个吗啉代亚基的序列，其负载一个与跨越所述的感染病毒的第一开放阅读框的翻译开始区域的病毒靶序列基本互补的目标碱基序列，

10 (b) 在所述的给予后一个选定的时间，获取受试者的体液样本；并且

(c) 化验样本中是否存在含有反义寡聚物和所说病毒靶序列的互补部分的核酸酶耐受的异源双螺旋。

33. 权利要求 32 的方法，其中寡聚物有不带电荷的、含磷的亚基间键合，其将一个亚基的吗啉代的氮与相邻亚基的 5' 外环碳连接起来。

34. 权利要求 33 的方法，其中的键合是二氨基磷酸盐连接。

35. 权利要求 32 的方法，其用于确定通过给予所述的寡聚物确定治疗小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒感染的效果，其中所述的给予、获取和化验在整个治疗期间是以周期性的间隔来操作的。

20 36. 一种确定感染小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒的科或属的方法，该方法包括：

(a) 提供各种反义寡聚物，每个所述的寡聚物都有一个与多种已知病毒的病毒靶序列基本互补的碱基序列，所述的多种已知病毒选自小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒，其中每个所述的病毒靶序列

25 是 (i) 对一个病毒科或属是共同的，和 (ii) 没有在人类中发现；

(b) 将多种寡聚物中的至少一种给予受试者，

(c) 在所述的给予后一个选定的时间，从受试者身上获取体液样本；

(d) 分析样本中是否存在含有反义寡聚物和病毒靶序列的互补部分

30 分的能抵抗核酸酶的异源双螺旋，和

(e) 根据含有给予的反义寡聚物和所述的病毒靶碱基序列的互补

部分的异源双螺旋的存在或缺如，确定感染病毒的科或属。

37. 权利要求 36 的方法，其用于确定特异的感染的小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒，更进一步包括：

- 5 (a) 提供第二类的反义寡聚物，每个所述的寡聚物都有一个与步骤 (e) 中确定的科或属的多种已知病毒中的一种的病毒靶序列基本互补的碱基序列，其中每个所述的病毒靶序列是 (i) 对一种所述的已知病毒是特异性的，和 (ii) 没有在人类中发现；
- (b) 将多种寡聚物中的至少一种给予受试者，
- (c) 在所述的给予后一个选定的时间，从受试者获取体液样本；
- 10 (d) 分析样本中是否存在含有反义寡聚物和病毒靶序列的互补部分的能抵抗核酸酶的异源双螺旋，和
- (e) 根据含有给予的反义寡聚物和所述的病毒靶碱基序列的互补部分的异源双螺旋的存在或缺如，确定感染的病毒。

## 用于治疗单链 RNA 病毒感染的抗病毒反义核酸的试剂和方法

### 5 发明领域

本发明涉及用于治疗小 RNA 病毒 (picornavirus)、杯状病毒 (calicivirus)、外衣病毒 (togavirus) 或黄病毒 (flavivirus) 感染的反义寡聚物, 用该寡聚物进行抗病毒治疗的方法, 以及监测反义寡聚物与病毒基因组靶位点结合的方法。

10

### 参考文献

- Agrawal, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(4):1401-5 (1990).
- Alt, M. et al., Hepatology 22(3):707-17 (1995).
- 15 Alvarez-Salas, L. et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 9:441-450 (1999).
- Aurelian, L. et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10:77-85 (2000).
- Bloomers, M., Nuc Acids Res, 22(20):4187 (1994).
- 20 Bonham, M. A. et al., Nucleic Acids Res. 23(7):1197-1203 (1995).
- Boudvillain, M. et al., Biochemistry 36(10):2925-31 (1997).
- Clarke, G. E., and Lambden, P., J. Infect. Dis. 181, S309-316 (2000).
- Cottral, G. E., in: Manual of Standard Methods for Veterinary
- 25 Microbiology, Eds., Cornell sity Press, Ithica, N.Y. pp.60-93.
- Cross, V. et al., Biochem 36:4096 (1997).
- Dagle et al., Nuc Acids Res. 28(10):2153 (2000).
- Ding, D. et al., Nuc Acids Res. 24(2):354 (1996).
- Felgner et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:7413 (1987).
- 30 Gait, M. J.; et al., J. Chem. Soc. Perkin I, 1684-1686 (1974).
- Gee, J. E. et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev. 8:103-111

- (1998).
- Green, K. et al., *J. Am. Coll. Surg.* 191:93-105 (2000).
- Gutierrez, A. et al., *Antiviral Research* 22(1):1-13 (1993).
- Hanecak, R. et al., *Journal of Virology* 70(8): 5203-12 (1996).
- 5 Holland, J. in: *Emerging Virus*, Morse, S. S., Ed., Oxford University Press, New York and Oxford pp.203-218 (1993).
- Kusunoki, A. et al., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 19:1709-1719 (2000).
- Lesnikowski, Z. J. et al., *Nucleic Acids Research* 18(8):2109-15  
10 (Apr. 25, 1990).
- Matteucci, M. *Tetrahedron Lett.* 31:2385-2388 (1990).
- McElroy, E. B. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:1071 (1994).
- Mertes, M. P. et al., *J. Med. Chem.* 12:154-157 (1969).
- Miller, P. S. et al., in: *Antisense Research Applications*, Crooke,  
15 S. T. and Lebleu, B., Eds., aton, CRC Press pp.189 (1993).
- Mizuta, T. et al., *Nature Biotechnology* 17:583-587 (1999).
- Mohan, V. et al., *Tetrahedron* 51:8655 (1995).
- Murray, R. et al., in: *Medical Microbiology (Third Edition)* St. Louis Mo., Mosby Press pp.542-543 (1998).
- 20 O'Ryan, M. et al., in: Spector S, Lancz G, Eds., *Clinical Virology Manual*, New York, Elsevier Science pp.361-196 (1992).
- Robbins, I. et al., *Methods in Enzymology* 313:189-203 (1999).
- Roughton, A. L. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 117:7249 (1995).
- Smith, A. et al., *Emerg. Inf. Dis.* 4:13-20 (1998a).
- 25 Smith A. et al., *Clin. Inf. Dis.* 26:43-40 (1998b).
- Stein, C. et al., *Pharmacol & Therapeutics*, 85:231 (2000).
- Toulme, J. J. et al., *Biochimie* 78(7):663-73 (1996).
- Vasseur, J. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 114:4006 (1992).
- Wei, X. et al., *Nucleic Acids Res.* 28:3065-3074 (2000).
- 30 Wu, G. et al., *J. Biol. Chem.* 267:12436-12439 (1992).
- Xu, W., *Revue Scientifique et Technique*, Office of International

des Epizooties 10:2393-2408 (1991).

## 发明背景

RNA 病毒引起多种野生、家养动物及人类的疾病。这些病毒在遗传和抗原性上具有多样性，表现为较宽的组织趋向性和广泛的致病潜力。一些致病力最强的病毒，如杯状病毒，具有较短的潜伏期。病毒复制和毒性因子的表达可以压制宿主早期的防御机制(Xu, 1991)，导致急性的和严重的症状。

对许多病毒感染尚没有特异的治疗方案。感染可能有血清型特异性，因而自然免疫常常是短暂的或缺少(Murray et al., 1998)。由于血清型多样性的存在，通过免疫作用来对抗这些致命的病毒缺乏可行性。RNA 病毒在复制过程中缺乏有效的遗传修复机制，目前，对其复制错误率的估计是认为每次基因组复制发生十分之一的错误，由此产生出很高的遗传变异(Hollan, 1993)。由于各种血清型常常没有交叉保护，以至于任何一种血清型引起的传染并不能保护不被其它血清型传染。例如，抗杯状病毒囊病毒属(vesivirus genus)的疫苗仅提供对约 40 种不同的中和血清型的保护(Smith et al., 1998a)，而疫苗对杯状病毒其它属也被认为有类似的限制。

反义核酸试剂已被提出用于治疗各种类型的病毒感染。一般而言，根据目标病毒的类型、病毒基因组的靶标和反义化合物中寡聚核苷酸主链的种类，可以将目前提出的手段进行分类。被作为治疗靶标的病毒有水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV) (Robbins and Lebleu, 1999)、流感病毒(influenza virus) (Mizuta et al., 1999)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) (Wu and Wu, 1992)、人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV) (Alvarez-Salas et al., 1999)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV) (Aurelian and Smith, 2000)、人体免疫缺陷病毒(HIV) (Kusunoki et al., Wei et al., 2000)和口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus) (Gutierrez et al., 1993)。已被提出作为病毒基因组上靶标的分子包括巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)的 IE-2 基因(Green et al., 2000)，一个 5' 非编码区域的茎-环结构；翻译起始密码，丙型肝炎病毒(hepatitis

C virus, HCV) 编码核心蛋白的序列, 以及口蹄疫病毒的第二个功能性起始密码子 AUG (Hanecak et al., 1996; Alt et al., 1995; Gutierrez et al., 1993)。最后, 提出了各种反义主链结构, 其中包括带负电荷的硫代磷酸脂 (PSO) 主链的寡聚物, 特别是硫代磷酸寡聚脱氧核苷酸 (Hanecak et al., 1996; Alt et al., 1995; Gutierrez et al., 1993) 和均一修饰的 2'-甲氧乙氧磷酸二脂寡聚核苷酸 (2'-methoxyethoxy phosphodiester oligonucleotide) (Hanecak et al., 1996)。

发现和进展通常是在细胞培养中证实抗病毒的活性。表 1 收编了有关在细胞培养中进行的抗病毒实验。

10

表 1. 体外抗病毒反义物研究

病毒	参考文献
单纯疱疹病毒 (Herpes Simplex)	Gao et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 11, 521
单纯疱疹病毒 (Herpes Simplex)	Hoke et al. (1991) Nucl. Acids Res. 19: 5743
单纯疱疹病毒 1 (Herpes Simplex 1)	Smith et al. (1986) Proc. Natl. Acad Sci 83: 2787
人体免疫缺陷病毒-转移活化基因 (HIV-tat)	Stevenson & Iversen (1989) J. Gen. Virol. 70: 2673
人体免疫缺陷病毒-适配子 HIV-适配子	Matsukura et al. (1987) Proc. Natl. Acad Sci 84: 7706
人体免疫缺陷病毒-rev (HIV-rev)	Matsukura et al. (1989) Proc. Natl. Acad Sci 86: 4244
人体免疫缺陷病毒核心蛋白 (HIV-gag)	Agrawal et al. (1989) Proc. Natl. Acad Sci 86: 7790
人体免疫缺陷病毒长末端重复序列 TAR 成分 ( HIV-LTR TAR element)	Vickers et al. (1991) Nucl. Acids Res. 19: 3359
水疱性口炎病毒 (VSV)	Agris et al. (1986) Biochemistry 25: 6268
水疱性口炎病毒 N 蛋白 (VSV-N protein)	Lamaitre et al. (1987) Proc. Natl. Acad Sci 84: 1987
人乳头瘤病毒 E2 基因 (HPV- E2)	Cowsert et al. (1993) Antimic. Agent Chemo. 37:
乙型肝炎病毒表面基因 (HBV surface gene)	Goodarzi et al. (1990) J. Gen Virol. 71: 3021
乙型肝炎病毒 (HBV)	Wu & Wu (1992) J Biol Chem 267: 12, 436-12, 439
猴病毒 40 (SV40)	Graessmann et al. (1991) Nucl. Acids Res. 19: 53
流感病毒 (Influenza)	Kabanov et al. (1990) FEBS Lett. 259: 327
流感病毒 (Influenza)	Leiter et al. (1990) Proc. Natl. Acad Sci 87: 3430
肉瘤病毒 (Rous Sarcoma Virus)	Zamecnik & Stephenson (1978) Proc. Natl. Acad Sci 75: 280
巨细胞病毒 (CMV immed. Early RNA)	Anderson et al. (1996) Antimic. Agent Chemo. 40: 2004

利用反义疗法，对 HIV、HPV、CMV 和 HCV 的临床试验已经启动，且全部都利用硫代磷酸盐连接的寡聚核苷酸（见表 2）。正如所看到的，尽管抗 CMV 感染的反义物（ISIS2922）已经被 FDA 批准，而且是到现在为止唯一被 FDA 批准的反义物，但是已经有临床试验表明存在一些无效的情况。

表 2. 用反义物进行抗病毒治疗的临床试验

名称	公司	病毒	状态
GEM91	Hybridon	HIV-gag	250 例，终止. 1997
ISIS2105	ISIS	人乳头瘤病毒 (6&11)	400 例，三期失败
ISIS2922	ISIS	CMV-IE2	HIV 视网膜炎获得批准
GEM132	Hybridon	CMV	一期
ISIS14803	ISIS	HCV	一期

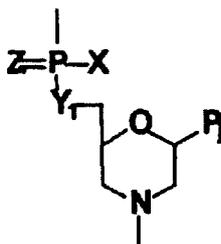
最初那种对反义核酸疗法能有效抵抗病毒所持有的乐观态度在减弱。许多在细胞培养模型中有效的反义核酸策略（如表 1 所列）并没有成功地应用在临床中。研究进展缓慢的部分原因可归究于缺乏可靠的细胞培养模型。例如，从被感染的培养细胞中分离出的 HIV 并不总是反映出被感染人群中发现的情况，而且，细胞培养模型不能包含感染多细胞类型时出现的情况。由于缺乏能够充分研究病毒在体内基因表达和复制情况的临床前动物模型，这个问题变得更加复杂。再次以 HIV 为例，人体中的病毒要么不能感染动物，要么当灵长类被感染时，它们并不表现出与在人类身上所看到的相似的病理情况。在没有可靠的细胞培养模型和适当的动物模型时，发展反义抗病毒制剂具有相当的风险。

因此，仍然需要发展针对几种病毒科的，有效的抗病毒治疗方法，这些病毒类型包括属于小 RNA 病毒科、杯状病毒科、外衣病毒科和黄病毒科的小的、单链的、正义 RNA 病毒。为满足该需要，反义核酸应该具有这些特性：能够基本稳定地抵抗核酸酶的降解，通过化合物投药后，能够容易的被感染的宿主细胞所吸收，并且能够以病毒基因组的有效区域为靶标，即阻断病毒的复制。

## 发明概述

一方面，本发明提供了一种抗病毒化合物，能针对来源于小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒、黄病毒科的 RNA 病毒，这些病毒具有单链、正义的少于 12kb 的基因组，有编码包含多种功能蛋白质的多蛋白的第一开放阅读框。抗病毒化合物包含一个基本不带电荷的寡聚体，  
5 该寡聚体有 (a) 一个长 12-40 个亚基的序列，负载与病毒靶序列基本互补的目标碱基序列，病毒靶序列是指跨越所述的第一开放阅读框的翻译开始区域，和 (b) 一个基本不带电荷的主链。

在一个优选的实施方案中，寡聚体是吗啉代寡聚体，其有一条序列  
10 或吗啉代亚基。亚基通常是由不带电荷的、含磷的亚基间键合连接的，这个键合将一个亚基上的吗啉基氮与邻近亚基上的 5' 外环碳原子连接起来。在一个实施方案中，这些键合是二氨基磷酸盐键。例如，一个吗啉代亚基和二氨基磷酸盐的连接的实施可以由结构 1 表示：



15 其中  $Y_1 = \text{氧}$ ， $Z = \text{氧}$ ， $P_j$  为能通过碱基特异性氢键有效地与多核苷酸（在不同亚基上的碱基对部分可以相同或不同）中的一个碱基相结合的嘌呤或嘧啶碱基对部分， $X$  是烷基、氧烷基、硫代氧烷基或烷基胺。在一个实施方案中， $X$  是  $\text{NR}_2$ ，其中每一  $R$  独立为氢或甲基。在具有这样结构单元的一个寡聚体中，一个单元的磷原子与下一个单元的吗啉代上的氮结合。  
20

基本不带电荷的寡聚体在与病毒靶序列结合后典型地有一个超过  $50^\circ\text{C}$  解旋温度 ( $T_m$ )，以及能够被哺乳动物细胞吸收的能力。另外，在将化合物给予受试哺乳动物几个小时后，可以在受试者的血清或尿中复性以异源双螺旋的形式存在的化合物，这个异源双螺旋含有寡聚体  
25 与 RNA 病毒的病毒基因组的互补部分。

在各种实施方案中，抗病毒化合物是针对特定的病毒或病毒科的。例如，可选择的实施方案包括针对小 RNA 病毒的具体抗病毒化合物。例

证性化合物包括那些含有与以下组中选出的序列有至少 90%同源性的目标序列的化合物，这个组包含：

(i) 序列识别号 16, 针对脊髓灰质炎病毒 (polio virus) 的 Mahoney and Sabin 株,

5 (ii) 序列识别号 17, 针对甲型肝炎病毒 (hepatitis A virus, HAV),

(iii) 序列识别号 18, 针对鼻病毒 (rhinovirus) 14,

(iv) 序列识别号 19, 针对鼻病毒 16,

(v) 序列识别号 20, 针对鼻病毒 1B,

(vi) 序列识别号 21 和 22, 对口疮病毒 (Aphthovirus), 和

10 (vii) 序列识别号 23、24 和 25, 对柯萨奇病毒 (coxsackie virus)。

其它的实施方案包括针对杯状病毒的抗病毒化合物。例证性化合物包括那些有一条与以下组中选出的序列有至少 90%同源性的目标序列的化合物，这个组包含：

(i) 序列识别号 27、28 和 29, 对囊病毒的 Pan-1 血清型,

15 (ii) 序列识别号 30, 针对猪的囊病毒,

(iii) 序列识别号 31, 针对诺沃克病毒 (Norwalk virus), 和

(iv) 序列识别号 32, 针对猫的囊病毒。

其它的实施方案包括针对外衣病毒的抗病毒化合物。用于抑制戊型肝炎病毒的化合物包括与选自序列识别号 33 和 34 的序列有至少 90%同源性的目标序列的寡聚物。其它的具体化合物包括针对外衣病毒的抗病毒化合物。用于抑制丙型肝炎黄病毒 (hepatitis C flavivirus,) 的化合物含有一条与序列识别号为 35 的序列有至少 90%同源性的目标序列的寡聚物。

25 在更特异实施方案中，化合物有确切的目标序列显示，和/或包含二氨基磷酸盐连接吗啉代寡聚物。例如，针对囊病毒的 Pan-1 血清型的化合物包含二氨基磷酸盐连接吗啉代寡聚物 (PMO)，该寡聚物有一条包括序列识别号 27、28 和 29 的序列组中选出的目标序列。针对猫囊病毒的化合物包含有一条其序列识别号为 31 的目标序列的 PMO。

30 在相关的方面，本发明提供了一种抑制来源于小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒、黄病毒科的 RNA 病毒复制的方法，这些病毒具有单链、正义的少于 12kb 的基因组，有第一开放阅读框，编码包含多种功

能蛋白质的多蛋白。该方法包括将病毒或更典型的，被病毒感染的细胞暴露在基本不带电荷的吗啉代寡聚物中，这个寡聚物有(a)一个长12—40个亚基的序列，负载与病毒靶序列基本互补的目标碱基序列，病毒靶序列跨越所述的第一开放阅读框的翻译开始区域，和(b)一个基本不带电荷的主链。在这个方法的一个实施方案中，将寡聚物给予一个被病毒感染的受试哺乳动物。优选的反义化合物的特性和结构的实施方案正如上面所描述的。

在更进一步的方面，本发明提供了一种证实感染了哺乳动物受试者的小RNA病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒与基本无电荷、针对感染病毒的反义寡聚物之间存在有效的相互作用的方法。方法包括：

- (a) 将寡聚物给予受试者，
- (b) 在所述的给予后一个选定的时间，从受试者获取体液样本；

和

(c) 分析样本中是否存在含有反义寡聚物和病毒靶序列的互补部分的能抵抗核酸酶的异源双螺旋。如上所述，这个寡聚物有一个长12—40个亚基的序列，负载与病毒靶序列基本互补的目标碱基序列，病毒靶序列跨越感染病毒的第一开放阅读框(ORF1)的翻译开始区域。优选的寡聚体是吗啉代寡聚体，有不带电荷的，含磷的亚基间键合，将一个亚基上的吗啉基氮与邻近亚基上的5'外环碳原子结合在一起。在一个实施方案中，这些连接是二氨基磷酸盐键合。

通过完成所描述的步骤，这个方法能用于确定治疗小RNA病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒感染的效果，所述的步骤包括给予寡聚物，获取样本和在整个治疗期间定期分析异源双螺旋。

另外，这个方法也被用于确定感染的小RNA病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒的特性。这样一个病毒的科或属能通过以下步骤被确定：

- (a) 提供各种反义寡聚物，每个都有一个与多个已知病毒的病毒靶序列基本互补的碱基序列，已知病毒选自小RNA病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒，其中每个所述的病毒靶序列是(i)对一个病毒科或属是共同的，和(ii)没有在人类中发现；
- (b) 将多种寡聚物中的至少一种给予受试者，
- (c) 在所述的给予后一个选定的时间，从受试者身上获取体液样

本；

(d) 分析样本中是否存在含有反义寡聚物和病毒靶序列的互补部分的能抵抗核酸酶的异源双螺旋，和

5 (e) 根据含有给予的反义寡聚物和所述的病毒靶碱基序列的互补部分的异源双螺旋的存在或缺如，鉴别感染病毒的科或属。

为了确定感染的小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒或黄病毒的种，可以完成下面更进一步的步骤：

(a) 提供第二类的反义寡聚物，每个都有一个与多个已知病毒的病毒靶序列基本互补的碱基序列，病毒来源于从上面 (e) 步中确定的  
10 科或属，其中每个所述的病毒靶序列是 (i) 对一种所述的已知病毒是特异性的，和 (ii) 没有在人类中发现；

(b) 将多种寡聚物中的至少一种给予受试者，

(c) 在所述的给予后一个选定的时间，从受试者获取体液样本；

(d) 分析样本中是否存在含有反义寡聚物和病毒靶序列的互补部  
15 分的能抵抗核酸酶的异源双螺旋，和

(e) 根据含有给予的反义寡聚物和所述的病毒靶碱基序列的互补部分的异源双螺旋的存在或缺如，确定感染病毒。

在阅读了以下关于本发明的详细说明以及附图后，本发明的这些和其它目地及特征将获得深入的理解。。

20

## 附图说明

图 1A-1E 显示了几种优选的吗啉代型亚基，有适合形成聚合物的 5 原子 (A)、6 原子 (B) 和 7 原子 (C-E) 连接基团；

图 2A-E 显示了例证性吗啉代寡核苷酸的重复亚基片段，指定为 A  
25 至 E，分别使用图 1 的亚基 A 至 E 构建；

图 3A-3D 是例证性病毒基因组和病毒靶位点的示意图；

图 4A-4H 显示了寡核苷酸类似物的无电荷连接的例子；

图 5 显示了本发明的反义寡聚物在体外对人鼻病毒的抑制百分比，如实施例 1 所描述的与病毒序列有三个错配；

30 图 6 显示了本发明的反义寡聚物在治疗小鼠 HCV 感染时的剂量效应，如实施例 4 所描述的；剂量按每天/每只鼠给多少 mg 来计量。

## 发明的详细说明

### I. 定义

在此使用的术语，除非另有说明，应具有下述含义：

5 术语“开放阅读框”或者“ORF”指一段核苷酸序列，它包括一个单独的 5' 端起始密码子，编码一种或多种单个蛋白质，并在终止密码子处停止翻译。

术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“寡聚体”可以互换使用，是指一个多聚分子，含有一条负载能用氢键与典型的多核苷酸相结合的主链，聚合物的碱基的主链能使碱基按照特定序列形式，利用氢键使  
10 聚合物分子和典型的多核苷酸（例如：单链 RNA、双链 RNA、单链 DNA 或双链 DNA）结合。“多核苷酸”包括一些具有核苷酸的聚合物，它们是嘌呤或嘧啶碱基的 N 端或 C 端的配糖体，以及含有非标准核苷主链的聚合物，例如用二氨基磷酸吗啉代化学形成的主链，利用聚酰胺连接  
15 接（如，肽核酸或 PNAs）和其它合成的序列特异性核酸分子所形成的主链。

在生理条件下，如果具有第一序列的多核苷酸能够与具有第二序列的多核苷酸特异性地结合或特异性地杂交，则第一序列即为第二序列的“反义序列”。

20 “反义寡核苷酸”和“反义寡聚体”指一段通过亚基与亚基的主链连接起来的序列，其中亚基负载核苷酸碱基对部分，能够有效地与病毒的正义 ssRNA 的靶序列杂交。典型情况下，这样的寡聚体有 8 到大约 40 个核苷酸亚基长；更典型的情况是大约 12 到 40 个核苷酸亚基长；优选大约 12 到 30，或 12 到 25 个亚基长。正如以下定义的那样，寡聚  
25 体应该能与靶序列精确互补或接近于互补。这样的反义寡聚体可以阻止或抑制靶开放阅读框编码的多蛋白的翻译。

寡核苷酸或寡核苷酸类似物的“亚基”是指寡聚体的一个核苷（或核苷类似物）单元。尽管当指“带电亚基”时，电荷往往存在于亚基间键合（如磷酸盐或二硫代磷酸酯）上，这个术语也可以指具有或不  
30 具有亚基间附着连接的核苷单元。

“吗啉代寡聚体”是寡核苷酸类似物，由图 1A-E 所示形式的吗啉

代亚基结构组成，其中 (i) 这个结构由 1-3 个原子长的，含磷的键合，将一个亚基上的吗啉基氮与邻近亚基上的 5' 外环碳原子结合而成，并且 (ii)  $P_i$  和  $P_j$  是嘌呤或嘧啶碱基对部分，通过碱基特异性的氢键与一个多核苷酸上的碱基有效结合。嘌呤和嘧啶碱基对部分往往是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶或胸腺嘧啶。吗啉代寡聚体的合成、结构和结合特性在美国专利 5,698,685、5,217,866、5,142,047、5,034,506、5,166,315、5,521,063 和 5,506,337 中有详细描述，所有这些在此引入以供参考。

显示在图 1B 中的亚基和键合用于 6 个原子的重复单元主链，如图 2B 所示（在此，六个原子包括：一个吗啉基氮原子，连接的磷原子，将磷原子与 5' 外环碳原子连接起来的原子（通常是氧），5' 外环碳原子、和吗啉环上邻近的两个碳原子）。在这些结构中，将 5' 外环吗啉碳原子与磷基团连接起来的  $Y_i$  原子可以是硫、氮、碳，或者最好是氧原子。磷旁的 X 侧基是任何稳定的基团，不会干扰碱基特异性的氢键结合。优选的 X 基团包括氟、烷基、氧烷基、硫代氧烷基、烷基氨基包括环胺，只要碱基特异性结合不被破坏，所有的这些都可以进行各种替换。烷基、氧烷基、硫代氧烷基最好具有 1-6 个碳原子。烷基氨基最好是指低烷基替换 ( $C_1-C_6$ )，环胺最好是有 5-7 元的氮杂环，任选的包含 1-2 个另外的杂环原子，如氧、氮或硫。Z 是硫或氧，最好是氧。

一个优选的吗啉代寡聚物是与二氨基磷酸盐相连的吗啉代寡聚物，在此称为 PMO。这样的寡聚体由图 2B 所示的吗啉代亚基结构组成，其中 X 为  $NH_2$ 、 $NHR$  或  $NR_2$  (R 是低碳烷基，优选甲基) Y 为氧，Z 为氧， $P_i$  和  $P_j$  为能通过碱基特异性的氢键有效地与多核苷酸中的一个碱基相结合的嘌呤或嘧啶碱基对部分。这样一个结构也表示在图 4H 上。还有一个优选的结构是如图 2B 所示的，含有另一种二氨基磷酸盐键合的结构，在此结构上，X 是低碳氧烷基，如甲氧基或乙氧基，Y 是  $NH$  或  $NR$ ，这里 R 是低碳烷基，Z 则代表氧。

术语“取代的”，特别是涉及到烷基、氧烷基、硫代氧烷基和烷基氨基团时，是指用含杂原子取代基的取代碳原子上连接的氢原子，这些含杂原子的取代基包括卤素、羟基、氧烷基、硫醇、烷硫醇、氨基、烷基胺、亚氨基、氧代（酮基）、硝基、氰基或各种酸或酯如羧基、磺

酸基和磷酸。它也可指将一个杂环原子上的氢（如胺上的氢）用烷基、碳酰基或其它包含碳的基团所取代。

当杂交发生在两条反向平行结构的单链多核苷酸之间时，它们被描述为能够彼此“互补”。如果杂交能发生于一个多核苷酸两条链中的第一核苷酸链和另一个多核苷酸之间，则这条双链多核苷酸能与另一条多核苷酸“互补”。“互补率”（即一条多核苷酸与另一条多核苷酸互补的程度）是可以以比率计算的，即按照广泛接受的碱基配对原则，相反链上的碱基可能与另一条链形成氢键的碱基的比率（如百分比）。一条反义寡聚体可以有与靶序列“接近”或“基本”的互补性，而且仍能符合本发明目的。较好的情况是，当与在此所指定的，作为实例的序列识别号（SEQ ID Nos）为 16-35 的寡聚体进行对比时，所使用的反义寡聚体具有 10 个核苷酸中至多只有 1 个错配，最好是 20 个中至多有 1 个错配。可选择地，所使用的反义寡聚体，在与所指定的序列识别号为 16-35 的例证性寡聚体至少要有 90% 的序列同源性，最好至少要有 95% 的序列同源性。

如果寡聚物在生理条件下靶序列杂交，一个寡核苷酸或反义寡聚体能与靶核苷酸特异性杂交，其  $T_m$  完全高于 37°C，较好的是至少 50°C，最好是 60°C—80°C 或更高，则该杂交称为“特异性杂交”。这样的杂交能较好地符合严格的杂交条件。在特定的离子浓度和 PH 值下，解链温度是指有 50% 的靶序列与互补核苷酸发生杂交时的温度。此外，和精确互补时一样，这样的杂交也可以发生在反义寡聚体和靶序列“接近”和“基本”互补时。

无论是以非杂交或杂交形式，或是在体内胞外和胞内核酸酶的共同作用下，“核酸酶耐受”（nuclease-resistance）寡聚分子（寡聚体）是指该寡聚体的主链能基本耐受核酸酶裂解；通常是体内的胞外和胞内核酸酶，也就是说，当寡聚体在体内正常的核酸酶条件下，应该很少或不被核酸酶降解。

“异源双链”是指由反义寡聚体与靶 RNA 的互补部分形成的双链。“核酸酶耐受的异源双链核酸分子”指通过反义寡聚体和它的互补靶序列形成的异源双链核酸分子，能基本耐受活体内胞内和胞外核酸酶的降解，这些酶包括 RNase H，它能够切断双链 RNA/RNA 或 RNA/DNA

复合物。

在此所用的术语“靶”，涉及病毒基因组 RNA 或 mRNA，指一条 mRNA 或病毒的基因组 RNA，其能在一种或多种哺乳动物细胞内以单链形式被表达或存在。

- 5 “碱基特异性的胞内结合靶 RNA 的事件”指一条寡聚体在细胞内与一条靶 RNA 序列特异性地结合。这样的碱基特异性结合是序列特异性。例如，一条单链的多核苷酸能够与一条与之在序列上互补的单链多核苷酸特异性结合。

- 10 “反义寡聚体组合物”指含有一个或多个反义寡聚体的化合物，能用于本发明的 RNA 的检测方法。在有些例子中，这样的“反义寡聚体合成物”包含大量的反义寡聚体。

反义寡聚体针对病毒 ssRNA 感染的“有效数量”是指能有效降低病毒的复制率，和/或病毒载荷，和 / 或病毒感染相关的症状的反义寡聚体的数量。

- 15 在此处所用的术语“体液”包含多种样本类型，这些样本来自包括尿、唾液、血浆、血液、脊髓液，或其它的生物来源的样本，如皮肤细胞或皮肤碎片，也可以指悬浮在那里的细胞或细胞片段，或液体培养基和它的溶质。

- 20 术语“相对数量”用于测试测定和对照测定。在一个反应中，形成复合物的试剂的相对数量是将试验样本反应的数量与对照样本反应的数量进行对比获得的。对照样本可以在相同的试验中单独操作，或者也可以是相同样本的一部分（例如，在组织切片的恶性部分周围的正常组织）

- 25 “处理”一个个体或细胞是任何类型的干预，即提供一种方式来改变个体或细胞的自然过程。处理包括，但并不仅限于给药（如药物组合物），可以是预防性地，或在疾病初起后，或是与病源物联用。与被诊断为被特定病毒感染的患者相关的相关术语“改善治疗结果”指能减慢或减少病毒的增长，或病毒的载荷，或被特定病毒感染相关的可检测的症状。

- 30 当一种试剂不是通过被动扩散的方式穿过细胞膜，则是被“哺乳动物的细胞主动吸收”。试剂可以被转运进入细胞内，例如，通过“主动

运输”方式，这是指通过如 ATP 依赖这样的转运机制转运物质通过细胞膜；或“易化运输”，即通过将反义物质与转运蛋白结合在一起这样的转运机制通过细胞膜，转运蛋白能够使物质穿过细胞膜更容易。正如以下定义的，对主动运输或易化运输而言，反义物质最好具有稳定的，不带电荷的主链。或者，反义化合物也可以以复合物的形式配方，如形成含有活化阳离子脂质或脂质体的，带有阴离子主链的试剂，从而使之能通过内吞作用进入细胞。

## II. 靶病毒

本发明基于这样的发现，即将被病毒感染的细胞暴露在反义化合物中时，反义化合物能有效抑制某一类小的、单链的、正义 RNA 病毒，反义化合物能够 (i) 靶向病毒第一开放阅读框的起始区域和 (ii) 具有反义化合物与宿主细胞中的病毒之间有效相互作用的物理和药代动力学特征。一个方面，寡聚体能够被用于治疗被病毒感染的哺乳动物受试者。

本发明靶向 RNA 病毒，该病毒有如下的基因组：(i) 单链，(ii) 正极性，(iii) 小于 12kb，(iv) 在第一开放阅读框编码多蛋白。特别地，目标病毒科包括小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒和黄病毒。这四个科的每一科和其中各成员的物理的、形态学的和生物学的特性能够在如人类病毒学教科书 (*Textbook of Human Virology*), R. Belshe, ed., 2<sup>nd</sup> Edition, Mosby, 1991 上找到。每个科的关键性生物学特性总结如下：

A. 小 RNA 病毒 (picornavirus). 小 RNA 病毒能感染人类和动物，引起严重的瘫痪 (脊髓灰质炎瘫痪)、表面脑膜炎、肝炎、胸膜炎、心肌炎、皮疹、感冒；无症状感染很普通。几个医学上很重要的成员包括脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、鼻病毒、口疮病毒 (口蹄疫病毒) 和柯萨奇病毒。

鼻病毒被公认是导致人类患普通感冒的原因。血清型分类从 1A 到 100。主要通过浮尘途径传播，并在鼻腔中复制。

与所有的正义 RNA 病毒一样，小 RNA 病毒的基因组 RNA 是有传染性的；也就是说，基因组 RNA 能够直接指导病毒蛋白质的合成，而不需

要宿主的转录过程。

B. 杯状病毒。杯状病毒能感染人类和动物。囊病毒属在哺乳动物上引起的疾病中，包括上皮疱疹，它还被怀疑会导致动物爆发流产及人类的肝炎(非 A 到 E 型) (Smith et al., 1998a and 1998 b). 其它属的杯状病毒包括 Norwalk-like and Sapporo-like 病毒，一起组成了人的杯状病毒，以及 lagoviruses, 这种病毒引起兔的出血病，是一种传播特别迅速和致死性的病毒。

人类杯状病毒是全球性的，引起成人病毒性痢疾的最主要原因，也是婴儿的重要病原体 (O' Ryan et al., 1992)。至少有五种人类的杯状病毒存在于胃肠道内。Norwalk 病毒是一种广泛传播的人类急性传染性胃肠炎的致病因子，约占人类肠胃炎发作的 10 %。

囊病毒现在已公认是一种已知的、具有多种类群的病原，而不是以前认为的有些模糊和具有宿主特异性。例如，单个血清型能感染不同的 16 个种的动物，包括海产鱼（蛋白眼）、海狮、猪和人。

C. 外衣病毒。这个科的成员包括了感染人和动物的蚊媒病毒。这个科包括甲病毒属、红病毒属（风疹）、瘟病毒属（黏膜疾病）、动脉病毒属（马动脉）炎和戊型肝炎病毒（HEV）。

HEV 最开始在 1987 被记录，在美国第一次被报道是 1991 年。最早这个病毒因为具有小、单链 RNA 的性质，而被描述为一种杯状病毒。有些人仍将它分到杯状病毒科，但它也被分为外衣病毒科。其感染看起来更像甲型肝炎病毒。这个病是急性肝炎，感染后大约 20 天显现，病毒在 20 天左右可以在血清中被观察到。通过被污染的水传播，因地理原因，病毒被限制在少数的发展中国家。

D. 黄病毒。这个科的成员包括几种危害极大的人病原物，它们当中有蚊媒传播的黄热病、西尼罗热、丙型肝炎、日本脑炎、圣路易脑炎、默里河谷脑炎和登革热。

黄病毒粒子的直径大约 40-50 纳米。对称的黄病毒粒子还没被充分研究过。据了解，黄病毒的外壳仅仅含有一类糖蛋白。到现在为止，

在黄病毒中既没有发现亚基因组 mRNA，也没发现多蛋白前体。

### III. 病毒靶区域

5 优选的靶序列是以 AUG 开始的，横跨病毒基因组第一开放阅读框的区域。第一 ORF 通常编码多蛋白，含非结构蛋白如聚合酶、解旋酶和蛋白酶。“横跨 AUG 起始位点”的意思是目标序列包括 AUG 起始位点上游至少 3 个碱基，以及下游至少 2 个碱基（总计至少 8 个碱基）。更优选的是，它能包括两侧各至少 4 个碱基（总计至少 11 个碱基）。

10 更普遍地，优选的靶位点包括病毒分离物的变化间的保守位置。其它有利的位点包括 IRES（内部核糖体进入位点）、反作用蛋白结合位点和复制起始位点。复杂、大的病毒基因组可以提供多种冗余的基因，可以通过宿主细胞编码病毒进入的基因和宿主对病毒存在发生反应的基因来有效地识别

15 多种病毒的基因组序列可以从众所周知的来源获得，如美国国立生物技术信息中心的基因库（NCBI Genbank 数据库）。另外，这个领域的熟练技术人员可以在公开的文献中找到许多受试病毒的序列。如通过检索释放指定病毒的序列信息的文献。一旦获得一个完全或部分的病毒序列，就可以确定病毒的 ORF1。典型地，ORF1 可以在基因数据库中或依靠文献得到确定。另外，也可以通过病毒基因组的组织规律获知，如以下描述的这四个科。ORF1 的 AUG 起始位点可以在基因数据库  
20 或所依靠的文献中确定，也可以在预测的 ORF1 序列的起始区域，通过搜索 AUG 密码来确定。

下面给出四个科病毒中每一类基因组的组织形式，以及从每个科中选出的成员（属、种、株系）的例证性靶序列。

25 A. 小 RNA 病毒。图 3A 显示了一个 RNA 病毒的基因组结构 10，这个例子是小 RNA 病毒科中的鼻病毒。作为典型的小 RNA 病毒，鼻病毒基因组 10 是一条单链的、正义聚腺苷酸化 RNA 的单个分子，大约 7.5kb。正如显示的，这个基因组包括一个长的非翻译区（UTR）12，位于第一多蛋白位点的上游，还有一个单独的开放阅读框（ORF），有一个 VPg  
30 （病毒基因组连接）蛋白共价地连接在它的末端。ORF 被分为两个片段（14，16），每个编码一个多蛋白。第一片段 14 编码一个多蛋白，随

后可剪切形成病毒蛋白 VP1 到 VP4，第二片段 16 编码病毒蛋白包括顺式蛋白、蛋白酶和聚合酶的前体。ORF 终止于聚腺苷酸终止序列 18。

靶初始 AUG 起始位点位于碱基位置 615-640 之间，以这个区域为目标可以有效地抑制多蛋白片段 14, 16 的翻译。

5 B. 杯状病毒。图 3B 显示了一个 RNA 病毒的基因组结构 20，这个例子是杯状病毒科的囊病毒。囊病毒基因组是具传染性的单分子，有一条单链的、正义 RNA，长约 7.5kb。正如显示的，这个基因组 20 包括一个非翻译区 22，位于第一开放阅读框 (ORF1) 24 的上游。ORF1 未被修饰。基因组 20 的 3' 末端 26 是多聚腺苷酸化的。基因组 20 包括三个  
10 开放阅读框。第一开放阅读框 24 编码一个多蛋白，能够剪切形成病毒非结构蛋白包括解旋酶、蛋白酶、依赖 RNA 的 RNA 聚合酶和结合在病毒基因组 RNA5' 端的 VPg (Clarke and Lambden, 2000)。第二开放阅读框 28 编码单一的外壳蛋白。第三开放阅读框 29 编码据报道是一个在自然状态很重要的结构蛋白，可能与 RNA 相关 (Green et al., 2000)。

15 靶位点起始 AUG 起始位点位于碱基位置 7-35 之间，以这个区域为目标可以有效地抑制第一开放阅读框 24 的翻译。

C. 外衣病毒。图 3 显示了一个外衣病毒的基因组结构 30，这个例子是外衣病毒科的风疹病毒。基因组 30 是一个单纯线形分子，有单链、正义 RNA，大约 11.7 kb，具有传染性。5' 端 32 被 7-甲基鸟苷戴帽修饰，3' 末端 34 被多聚腺苷酸化。全长和次基因组信使 RNA 已被证明，多蛋白翻译后的切割发生在 RNA 复制期间。基因组 30 包含两个开放阅读框 36, 38。第一开放阅读框 36 编码一个多蛋白，该多蛋白随后裂解为四个功能蛋白质，nsP1 到 nsP4。第二开放阅读框 38 编码病毒外壳蛋白和三个其它的病毒蛋白 PE2, 6K 和 E1。第一开放阅读框 36  
20 的初始 AUG 起始位点位于碱基位置 10-40 之间，以这个区域为目标可以有效地抑制第一开放阅读框 36 的翻译。

D. 黄病毒。图 3D 显示了一个黄病毒科的丙型肝炎病毒的基因组结构 40。丙型肝炎病毒的基因组是一个单纯线形分子，具有单链、正义 RNA，大约 11 kb。5' 末端 42 被 7-甲基鸟苷 ( $m^7GppAmp$ ) 分子戴帽  
30 修饰，3' 末端 44 未被聚腺苷酸化。基因组 40 仅包含一个开放阅读框 46，编码一个多蛋白前体，该多蛋白可剪切为六个结构和功能蛋白质。

初始 AUG 起始位点位于碱基位置 310。

表 3 列出 GenBank 中，包含相应病毒基因组 ORF1 起始位点的病毒核酸序列信息。应予理解的是，这些序列仅只反映了 4 个病毒科中其它成员在 ORF1 起始区域的情况，这些序列可以从基因序列数据库文献或专利资源中获得。序列识别号为 1-15 的序列列于本说明书末尾的表 10 当中。

表 3. 跨越 ORF1 的 AUG 位点的例证性病毒核酸序列

病毒	GenBank Acc. No	核苷酸(靶序列)	序列识别号
小 RNA 病毒科			
脊髓灰质炎病毒 Mahoney 株	NC 002058	735-754	1
脊髓灰质炎病毒 Sabin 株	V01150	735-754	2
甲型肝炎病毒	M14707	731-754	3
鼻病毒 14	NC 00149	621-640	4
鼻病毒 16	NC 001752	618-637	5
鼻病毒 1B	D00239	615-634	6
口疮病毒	NC 003082	711-732	7
	NC 002554	1033-1058	8
柯萨奇病毒	M16560	735-754	9
杯状病毒科			
囊病毒(Pan-1)	AF091736	1-34	10
猪的	AF182760	6-25	11
诺沃克病毒	AF093797	1-19	12
外衣病毒科			
戊型肝炎病毒	NC 001434	5-28	13
		1-18	14
黄病毒科			
丙型肝炎病毒	AF169005	348-330	15

正如以上所示，目标序列，即反义寡聚体的碱基序列，优选针对病毒靶序列的 AUG 起始部分。特别是，正如前面所定义的那样，目标序列与病毒基因组第一开放阅读框的 AUG 起始位点的靶区域是互补的或基本互补的，并且靶序列和目标序列间的互补程度足够形成稳定的双

螺旋。在目标序列至少长 8 个碱基的情况下，目标序列包含一个能够针对密码子 AUG 的 CAT 序列，并且，至少有 3 个碱基在一边，2 个在另一边。反义寡聚体与靶 RNA 序列互补的区域至少有 8-11 个碱基长，但更好是 12-15 个碱基或更多，如 12-20，或 12-25。大约 15 个碱基长的反义寡聚体足够与病毒基因组形成唯一的互补。另外，为了达到结合所需的  $T_m$  需要有一个如下所讨论的最小长度的互补碱基。

40 个碱基长的寡聚体适合与靶序列互补，碱基数最少应达到 8-11 个，较好为 12-15 个。然而，为了促进或激活细胞对寡聚体吸收，寡聚体的长度一般应少于约 30 个碱基，较好是少于 25，更好是 20 或更少。对 PMO 寡聚体，下面进一步说明，一个在结合的稳定性和吸收间的最适宜平衡，是碱基长度为 13-18 个。

寡聚体可以与病毒核酸靶序列 100 %地互补，或为了容纳变异而包括错配，只要病毒核酸靶序列与寡聚体之间形成的异源双螺旋足够稳定，就能够经受胞内核酸酶的作用和体内其它方式的降解。寡聚体的主链较少受到核酸酶的裂解影响，以下进一步讨论。如果存在错配的话，其出现在杂合双链的末端区域比在中间对稳定性的影响要小些。允许的错配数量依赖于公认会影响双螺旋稳定性的因素，比如寡聚体的长度、G:C 碱基对在双螺旋中百分比、以及双螺旋中错配的位置。尽管这样的一条反义寡聚体不会 100 %地与病毒核酸靶序列互补，但它能稳定地和特异性地与靶序列结合，从而有效地调整靶核酸的生物活性，如病毒蛋白的表达。

寡聚体与靶序列之间形成的双螺旋稳定性是由结合的  $T_m$  和双螺旋对胞内酶降解的敏感性决定的。反义化合物与互补 RNA 序列的解旋温度可以用常规方法检测，如 Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IL Press, 1985, pp.107-108. 中所说明的那些。对于互补的 RNA 序列，每条反义寡聚体应当有一个结合的解旋温度，这个温度应高于体温，优选高于 50°C。首选  $T_m$  在 60°C-80°C 或更高。根据众所周知的原则，对于一个碱基互补的 RNA 杂交物，一个寡聚体解链温度能够通过增加双螺旋中的 C:G 碱基对的比例，和/或增加异源双螺旋的长度（增加碱基对）来提高。同时，为了有利于细胞吸收，限制寡聚体的大小会更加有利。为了这个理由，当  $T_m$  值较高时（50°C

或更高), 碱基长度为 15 个或更少的化合物要优于碱基长度大于 20 个的化合物。

表 4 列出了从小 RNA 病毒、杯状病毒、外衣病毒和黄病毒四个科中选出的, 病毒第一开放阅读框的翻译起始位点的例证性序列。正如上面所论述的那样, 这些序列之所以被选择, 是为了构建一个序列, 使其能够与上述靶序列内一个或多个跨越 AUG 起始位点的序列进行互补。

这一普通原则的例外如下: 序列识别号: 26 涉及病毒基因组的起始位置; 序列识别号: 23-25 包含错配和/或插入, 用下划线表示; 序列识别号: 33 仅包括 AUG 起始密码的一个碱基。

10 表 4. 以 ORF1 翻译开始区域为目标的例证性反义序列

病毒	GenBank Acc. No	靶区域	反义寡聚物(5' to 3')	序列识别号
小 RNA 病毒科				
脊髓灰质炎病毒 Mahoney 株 Sabin 株	NC 002058	735-755	CCTGAGCACCCATTATGATAC	16
	V01150	735-755		
甲型肝炎病毒	M14707	731-754	CCTTGTCTAGACATGTCATTATT	17
鼻病毒 14	NC 00149	621-640	CTGAGCGCCCATGATCACAG	18
鼻病毒 16	NC 001752	618-637	TTGAGCGCCCATGATAACAA	19
鼻病毒 1B	D00239	615-634	CTGGGCACCCATGATGCCAA	20
口疮病毒	NC 003082	711-732	AAACAGTCAGTTGTGCTCATTG	21
	NC 002554	1037-1058	AAACAGTCAGTTGTATTTCATAG	22
柯萨奇病毒	M16560	735-754	C <u>TTGAGCT</u> CCCATTTT <u>GCTG</u>	23
			C <u>TTGAG</u> CCCCATTTT <u>TGTTG</u>	24
			C <u>CTGTGCT</u> CCCAT <u>C</u> TTG <u>ATG</u>	25
		1-30	TGGGTGGGATCAACCCACAGGCTG TTTTAA	26
杯状病毒科				
囊病毒(Pan-1)	AF091736	7-26	GAGCCATAGCTCAAATTCTC	27
		1-21	TAGCTCAAATTCTCATTAC	28
		15-34	GAGCGTTTGAGCCATAGCTC	29
猪的囊病毒	AF182760	6-25	GACGCAATTAGCCATCACG	30
诺沃克病毒	AF093797	1-19	CGACGCCATCATCATTAC	31
猫的囊病毒	AF479590	14-34	CAGAGTTTGAGACATTGTCTC	32

外衣病毒科				
戊型肝炎病毒	NC 001434	6-28	CCTTAATAAACTGATGGGCCTCC	33
		1-18	CTGATGGGCCTCCATGGC	34
黄病毒科				
丙型肝炎病毒	AF169005	348-330	GTGCTCATGGTGCACGGTC-3	35

#### IV. 反义寡聚体

##### A. 特性

- 5 正如以上详细说明的，寡聚体具有针对病毒基因组靶部分的碱基序列，优选的是跨越 ORF1 翻译起始位点区域的序列。另外，当把寡聚体给予被感染的宿主细胞，例如被感染的哺乳动物受试者时，寡聚体能够有效地将感染病毒作为目标。

10 达到后一目标的必要条件是寡聚体化合物 (a) 能够被哺乳动物细胞主动吸收；(b) 一旦被吸收，它与靶 ssRNA 形成双螺旋的解旋温度高于约 50°C 的。

15 正如下面将要描述的那样，能够被细胞吸收需要寡聚体的主链不带电荷，而且，最好是寡聚体结构能被主动或易化运输识别为底物，从而能穿过细胞膜。寡聚体能与靶 RNA 形成稳定的双螺旋也依赖于寡聚体的主链，及上面指出的因素，如反义物核苷酸与靶序列互补的程度和长度，G: C 碱基配对与 A: T 配对的比例，以及错配碱基的位置。反义制剂抵抗细胞核酸酶降解的能力能够促使反义物存留下来并最终被运输到细胞的细胞质中。

下面公开测试的方法，用于检测符合这些条件的，不带电荷的主链。

##### 20 A1. 细胞主动或易化吸收

如果给予游离（非-复合）形式的反义化合物，则宿主细胞可以通过主动或易化运输，以穿过宿主细胞膜的方式加以吸收，或给予复合形式的反义化合物，则宿主细胞就通过胞吞机制加以吸收。

25 在以游离形式给予反义制剂的情况下，反义化合物应该基本上是无电荷的，意味着在生理 PH 值条件下，大多数的亚基间连接是无电荷的。用于负载这个发明的所进行的试验表明，带有少量净电荷，如 15-20

个单体的寡聚体带有 1-2 个电荷，实际上能够促进细胞吸收这些寡聚体，它们具有基本上不带电荷的主链。寡聚体可以自己具有电荷，例如在主链连接上，或者可以在末端附加带电的基团。比较可取的带电荷的连接数目，是每四个不带电荷的连接中不要超过有一个带电荷的。更可取的是每十个中不超过一个带电荷连接，或者每二十个中不超过一个带电荷连接。在一个实施方案中，寡聚体是完全不带电荷的。

只要正负电荷保持大致相同的数量，寡聚体既可以包含带负电荷的主链连接，也可以包含带正电荷的主链连接。最好，寡聚体不含有超过连续 3-5 个的亚基带同一种电荷的情况。例如，寡聚体包含有特定数目的阴离子连接，如磷酸二硫代酯或 N3' → P5' 的磷酸酰胺连接，和相当数目的阳离子连接，如 N-N 哌嗪磷酸酰胺 (Dagle, 2000)。净电荷最好是中性的，或每个寡聚体至多有 1-2 个净电荷。

除了基本或完全不带电荷以外，反义制剂最好是一个细胞膜转运系统的底物（如细胞膜蛋白质或蛋白质），能够通过易化转运或主动转运将寡聚体穿过细胞膜。这一特征可以由检测寡聚体相互作用或细胞吸收的试验之一所决定。如下：

第一个检测是估计细胞表面受体的结合。在细胞表面，通过检查寡聚体化合物被所选的带电的寡聚体，如磷酸硫代酯寡聚物，取代或被取代的能力来进行。将细胞与给定数量的试验寡聚物进行共培养，这些寡聚物常常是被荧光标记的，其终浓度为 10-300nM。短一段时间后，例如 10-30 分钟（在试验寡聚物被细胞显著吸收前），将替代化合物加进去，并逐渐增加浓度。如果试验化合物能结合到细胞表面受体，就会观察到试验化合物被替代。如果替代化合物的浓度在试验化合物 10 倍或更少时，产生了 50% 的替代，则试验化合物就被认为能通过细胞转运系统，结合在与替代化合物相同的识别位点上。

第二个检测是测量细胞的转运，通过检测受试化合物转运被标记的报告物（如荧光标记报告物）进入细胞的能力来检测受试化合物。将细胞在标记受试化合物存在的情况下进行培养，化合物的终浓度加到约 10-300 nM。培养 30-120 分钟后，通过显微镜等方式检测细胞内的标记。胞内存在显著的标记就是试验化合物能被易化或主动转运的证据。

反义化合物也可以以复合物的形式给予，这里，这个复合制剂一般

是聚合物，如，阳离子脂质、多肽或非生物阳离子聚合物，带有与反义化合物的净电荷相反的电荷。形成复合物的方法是众所周知的，包括在带阳离子的寡核苷酸与带阴离子的脂质之间，或与其它聚合物成分之间形成双层膜复合物。例如，脂质化合物细胞转染剂 RTM. (Felgner et al., 1987)，包含了阳离子脂质 DOTMA (氮-[1-(2,3-氧代二油基)丙基]-N,N,N-氯化三甲铵，N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) 和中性磷脂 DOPE (二油酰基磷脂酰乙醇胺，dioleoyl phosphatidyl ethanolamine)，有广泛的应用。在给予试剂后，复合物通过细胞内胞吞机制被吸收，常常位于内涵体中，被包封为微粒形式。

另外，根据发明的另一方面，可以通过一个简单的体内试验来检测带有特定主链的寡聚物是否具备所需的特性。在这个试验中，被标记的化合物被给予动物，几个小时后，取动物的体液样本，检测是否存在与靶 RNA 形成的异源双螺旋。这个方法在下面 D 部分进行详细说明。

15

#### A2. 对 RNA 酶 H 的基本的抵抗力

曾经有两种常规的机理被提出，用以说明反义寡聚核苷酸如何抑制基因的表达(见 e.g., Agrawal et al., 1990; Bonham et al., 1995; and Boudvillain et al., 1997). 首先，将寡核苷酸与病毒 RNA 间形成的异源双螺旋作为 RNA 酶 H(RNase H)的底物，会导致病毒 RNA 的降解。属于或推测属于这一类寡核苷酸包括硫代磷酸脂，磷酸三脂，和磷酸二脂(没有被修饰过的“自然”寡核苷酸)。然而，由于这样的化合物会使病毒 RNA 暴露于寡聚物与 RNA 的双螺旋结构之外，从而被 RNaseH 水解，失去双螺旋结构，因此，它们并不适宜用在本发明中。

第二种寡聚核苷酸类似物，被称为“空间阻断剂”，或者是“无 RNaseH 活性”，或者称为“抗 RNaseH”，没有被观察到会被 RNaseH 作为底物，而是在空间上阻断靶 RNA 的核质转运、剪接和翻译。这一种类包括甲基磷酸脂(Toulme et al., 1996)、吗啉代寡聚核苷酸，肽核酸(PNA's)、2-氧-丙烯基或 2-氧-烷基修饰的寡聚核苷酸(Bonham, 1995)，和 N3' → P5' 氨基磷酸脂(Gee, 1998; Ding, 1996)。

可以通过试验来检测寡聚物对 RNaseH 的耐受性：用受试化合物形

成 RNA:寡聚物双螺旋,在标准试验条件下,在有 RNaseH 的情况下温育,如 Stein et al 所描述的那样。当在 RNaseH 作用下时,完整双螺旋的存在与否可以用凝胶电泳或质谱仪进行监控。

### A3. 体内吸收

5 根据发明的另一方面,提供了一种简单、迅速的检测方法,可确定一种给定的反义寡聚物类型具有以上所指出的必要特性,即,高解旋温度,能被宿主细胞主动吸收,以及对 RnaseH 具有基本的抵抗力。该方法基于这样的发现,即将适当设计的反义化合物给予受试哺乳动物后,反义化合物会与病毒 RNA 靶序列的互补部分形成异源双螺旋,随  
10 后异源双螺旋会出现在尿中(或其它体液中)。这个方法的详细说明也在共同拥有的美国专利中给出,其申请序列号为 09/736,920,标题为“检测目标 RNA 的非侵入性诊断方法”(非侵入性诊断方法)。该专利在此引入以供参考。

简要地说,为评估一个包含与已知 RNA 碱基序列相对应的受试寡聚物,该寡聚物将被注入到受试哺乳动物中。反义寡聚物可以针对任何  
15 细胞内的 RNA,包括宿主 RNA 或引起感染的病毒 RNA。给药后几个小时(典型的是 8-72 小时),分析尿样中是否存在由反义物和 RNA 形成的异源双螺旋。如果检测到异源双螺旋,则该主链适合应用于本发明的反义寡聚物上。

20 为了便于随后的分析,可以对受试寡聚物进行标记,如荧光或放射标记。只要这种标记适合受试哺乳动物即可。分析可以在任何适合的固相或液相中进行。通常,固相分析步骤首先是将异源双螺旋分析物结合到固相负载物上,这个负载物可以是离子,或多聚物,或试验带的底物,然后检测结合于其上的异源双螺旋的存在/数量。对液相分析  
25 而言,典型情况下,应先对分析物样本进行预处理,以去掉干扰样本的成分。如果寡聚物已被标记,可以通过检测标记物来证实异源双螺旋的存在。对非标记的化合物,如果是以固相形式进行分析,则可以通过免疫测定来检测异源双螺旋的存在,或者,如果以溶液或悬浮液形式进行分析时,用质谱法或其它已知的方法进行检测。

30 当反义寡聚物与病毒基因组中的病毒特异性区域(如以上所述的 ORF1 的翻译开始区域)互补,这个方法也可以用于检测是否存在特定

的 ssRNA 病毒，或在进行治疗时，用于检测病毒数量的下降。

#### B. 示范性的寡聚物主链

图 4A-4H 显示了用在寡聚核苷酸类似物中非离子键合的例子。在这些图中，B 代表嘌呤或嘧啶碱基对部分，它能通过碱基特异性的氢键与  
5 多核苷酸中的碱基进行有效的结合，优选结合的碱基是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤或尿嘧啶。适宜的主链结构包括碳酸盐(4A, R=O)和氨基甲酸盐(4A, R=NH<sub>2</sub>)键合(Mertes, 1969; Gait, 1974); 烷基磷酸脂和磷酸三脂键合(4B, R=烷基或烷氧基)(Miller, 1993; Lesnikowski, 1990); 酰胺化合物键合(4C)(Bloomers, 1994); 砒和氨磺酰键合(4D, R<sub>1</sub>,  
10 R<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>)(Roughten, 1995; McElroy, 1994); 和硫乙酰键合(thioformacetyl linkage)(4E)(Matteucci, 1990; Cross, 1997)。据报道，后者能够增强硫代反义化合物中双螺旋和三螺旋的稳定性(Cross, 1997)。此外，形如 4F 中的 3'-亚甲基-N-甲基羟基氨(3'-methylene-N-methylhydroxyamino)化合物的结构(Mohan, 1995)  
15 也曾经被报道过。

肽核酸(PNAs)(图 4G)是 DNA 的类似物，其主链与脱氧核糖的主链在结构上同形，包含 N-(2-氨乙基)甘氨酸单元，并与嘧啶或嘌呤碱基相连。PNAs 带有天然的嘧啶和嘌呤碱基，能与互补的寡核苷酸杂交。与 DNA 相类似，其碱基对识别方式服从 Watson-Crick 的碱基配对原则  
20 (Egholm et al., 1993)。PNAs 的主链是通过肽键而不是磷酸二脂键形成，这使它们适合于反义应用。由于其主链不带电荷，使得 PNA/DNA 或 PNA/RNA 双螺旋表现出比普通双螺旋更强的热稳定性。PNAs 不能被核酸酶或蛋白酶识别。

正如以上描述的，优选的寡聚物结构是基于吗啉代的亚基，带有碱  
25 基对部分，由不带电荷的键合结合起来。特别优选的是如图 4H 和 2B-B 所阐述的，基本不带电荷的二氨基磷酸脂键合吗啉代寡聚物。吗啉代寡聚核苷酸，包括反义寡聚物在共有的美国专利 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,521,063, 和 5,506,337 中有详细的说明。在本发明中，所有这些专利都已清楚地编入参考文献。  
30

图 1A-E 显示了基于吗啉代的亚基的重要特性，包括：通过稳定的、

不带电荷的主链连接成寡聚物形式的的能力；负载核酸碱基（如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、鸟嘧啶）的能力，这些使该聚合物能与有互补碱基的靶核酸包括靶 RNA 进行杂交，即使所形成的双螺旋寡聚物只有 10—14 个碱基长度，也具有高的解旋温度；能被主动转运进入哺乳动物细胞内；以及所形成的寡聚物和 RNA 的异源双螺旋能抵抗 RNAse 的降解。

本发明中的反义寡聚核苷酸的示范性主链结构包括图 1A-E 中所显示的  $\beta$ -吗啉代亚基类型，每个结构都是通过不带电荷的含磷亚基连接的。图 1A 表示一个含磷连接，形成五个原子的重复单元主链，在图 2A 中，吗啉代环通过磷酸酰氨 1-原子进行连接。图 1B 表示了一个 6 个原子的重复单元主链连接。在图 2B 的结构中，连接吗啉代 5' 碳原子和磷酸基团的原子 Y 可以是硫、氮、碳或首选是氧。磷下方的 X 部分可以是氟、烷基或被取代的烷基、烷氧基或被取代的烷氧基、硫代烷氧基或被取代的硫代烷氧基、或未取代、单基取代的、双取代氮基团，包括环状结构，如吗啉或哌啶。烷基、烷氧基和硫代烷氧基适宜的是包括 1-6 个碳原子。Z 部分是硫或氧，并且最好是氧。图 1C-E 是为 7 个原子单元长的主链所设计的连接，其结构表示在图 2C-E 中。在结构 2C 中，X 部分与结构 2B 中的一样，Y 部分可以是亚甲基、硫或优选是氧。在结构 2D 中，X 和 Y 部分结构与 2B 是一致的。在结构 2E 中，X 部分和结构 2B 中的一样，Y 部分可以是硫、氧或 NR，其中 R 是氢或低级烷基，首选氢或甲基。在图 2A-E 中描述的所有亚基中，Z 是氧或硫，每个  $P_i$  和  $P_j$  代表一个碱基对部分，最好从腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和尿嘧啶中选择。

特别适宜的吗啉代寡聚核苷酸包括由图 2B 显示的吗啉代亚基结构形式组成，其中 X 为  $\text{NH}_2$  或  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ，Y 为氧，Z 为氧。

正如上面所指出的，包含有限的带电键合的，基本不带电荷的寡聚物更为优越，如可以每 5 个不带电键合有 1 个带电键合，更适宜的可以每 10 个不带电键合有 1 个。因此少量的带电键合，如带电的磷酸酰氨或磷酸硫脂，也可以整合到寡聚物中。在吗啉代寡聚物里，这样的带电键合可以被图 2A-E 中的任一个键合所代表，其中 X 是氧化物 ( $-\text{O}^-$ ) 或硫化物 ( $-\text{S}^-$ )。

反义化合物可以通过逐步固相合成来准备，使用的方法详见以上引

证的参考文献。有些情况下，为了更好的效果，可在反义化合物中加上其它的化学成分，比如为了增进药代动力或为了便于获得或检测化合物。这样的化学成分中，最典型的是按照标准合成方法，以共价的方式结合到寡聚物的末端。例如，加上一个聚乙二醇或其它亲水的聚合物，如一个有 10—100 单节的亚基，可以促进溶解。一个或更多的带电基团，阴离子基团如有机酸，可以促进细胞吸收。为了检测的目的加上一个报告成分，如荧光或放射基团。作为选择，结合到寡聚物上的报告标记可以是一个配体，如能与已标记的抗体或链霉抗生物素蛋白结合的抗原或生物素。在选择一个物质对反义寡聚物进行修饰或附加时，当然应选择生物适应的，试验动物能够忍受，没有不满意的副作用的化学化合物。

#### V. 抑制病毒复制

上面详述的反义化合物在阻断小 RNA 病毒、杯状病毒科、外衣病毒科和黄病毒科的 ssRNA 病毒复制是有效的。在一个实施方案中，这样的阻断在治疗被这些病毒感染的宿主动物时是有效的。因此，方法包括，在一个具体体现中，当反义物接触被病毒感染的细胞时，它能有效地阻断特异病毒的第一开放阅读框编码的多蛋白的翻译。在更进一步的具体体现中，反义制剂给予一个受试哺乳动物，如，被给定病毒感染的人或家养动物，反义制剂含适合的药物载体，可以预期该反义寡聚核苷酸能阻止宿主中 RNA 病毒的生长。减少 RNA 病毒的数量或削弱病毒对于宿主正常生长和发育的有害影响到没有或很少。

#### A. 鉴定感染物质

特定病毒引起的感染可以用这个领域已知的方法来确定，如血清或培养方法，或使用本发明的反义寡聚物的方法。

血清鉴定使用病毒样本或从目标生物的生物样品如大便、尿、脊髓液、血液等获得病毒培养。检测病毒的免疫测定通常是在这个领域的熟练技术人员使用的常规方法，如 ELISA (酶联免疫检测) 或 Western blot (蛋白-抗体杂交)。另外，针对特定病毒株或种进行检测的特异单克隆抗体常常可通过商业途径获得。

培养方法可以用来分离和鉴定特定的病毒类型，所使用的技术包括，但不限于，对比其性状如生长率和在各种培养条件下的形态。

另一种鉴定在被感染的受试者中的病毒感染因子的方法，是使用一种或多种能测定广谱的科和/或属病毒的反义寡聚物，如小 RNA 病毒、杯状病毒科、外衣病毒科和黄病毒科。任何特有病毒 RNA 的序列都可被使用。理想的靶序列首选 (i) 对广泛科/属的病毒是共有的，和  
5 (ii) 没在人类中发现。大多数传染性病毒的特有核酸序列可以在公共数据库中获得，作为特定寡聚物设计的基础。

对于多数寡聚物，可进行下列的步骤：(a) 寡聚物被注入受试者；(b) 在所述的注入后一个选定时间里，从受试者身上提取体液样本；和 (c) 检测样本中是否存在由反义寡聚物和病毒基因组互补部分所形成的，核酸酶耐受的异源双螺旋。步骤 (a)-(c) 至少对一个这样的寡聚物进行，或根据鉴定病毒或病毒的科的需要执行多次。在寡聚物注入后，可以随后就进行化验，或更方便地是同时进行化验。鉴定病毒是根据异源双螺旋的存在或（缺如），该核酸酶耐受的异源双螺旋含有反义寡聚物和已知病毒或已知科病毒的基因组互补部分。  
10

更适宜的是，先利用第一组具有广泛科针对性的寡聚物，然后在广泛的被鉴定的科/属中，选择具有特异属和/或种和/或株互补的寡聚物。第二组寡聚物可在广泛的被鉴定的科/属中与特异的属和/或种和/或株进行作用。通常，可以获得几个不同的第二寡聚物类，每一个都是从第一阶段对广泛的每一类病毒科/属的检测中获得。选择序列的依据是，(i) 是特异的对被试验的单个的属/种/株，和 (ii) 没在人类中发现。  
15  
20

#### B. 反义寡聚物的给予

将反义寡聚物有效地传递至目标核酸是治疗的关键。根据本发明，反义寡聚物的递送途径包括，但不仅限于，各种全身途径，包括口服和非肠道的途径，如静脉、皮下、腹膜内和肌肉给予，及吸入、经皮的和局部递送。只要是在对受试者是适当的治疗条件下，合适的途径由该领域熟练的技术人员决定。如在治疗皮肤的病毒感染时，给予反义寡聚物的适当途径是局部给予，而对病毒引起的呼吸传染进行治疗时，给予反义寡聚物的适当途径是吸入。寡聚物也可以直接用于病毒感染的位置，或给入到血流中。  
25  
30

反义寡聚物可用使用方便的、生理上可接受的载体给予。这样的

化合物可以包括许多这个领域里普通技术人员所使用的，标准的和公认的制药载体。例如，包括，但不仅限于，盐、磷酸盐缓冲液(PBS)，水，水合乙醇，乳剂，如油/水乳剂或甘油三酸脂乳剂，片剂和胶囊剂。选择适合的，生理上可接受的载体是可以变化的，这依赖于选择合适的给药方式。

在有些实例中，脂质体也应用于促进细胞对反义寡聚物的吸收。(如见 Williams, S. A., Leukemia 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen et al., Antiviral Res. 23:119, 1994; Uhlmann et al., ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE, Chemical Reviews, Volume 90, No. 4, pages 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341, Academic Press, 1979)。水凝胶也可被用于给予反义寡聚核苷酸的载体，如在 WO 93/01286 专利中描述的。另外，寡聚核苷酸也可以微球体或微粒的形式给予。(见 Wu, G. Y. and Wu, C. H., J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987)

可以使用持续释放的组合物。包括半透明多聚材料，做成形如膜或微囊的形状。

方法的另一方面，受试者是人受试者，如一个被诊断为局部或全身病毒感染的人。病人的条件表明，本发明的反义寡聚物可以预防地给予。如在这样的情况下，病人是(1)免疫缺陷；(2)是个烧伤病人；(3)有内置的导管；或(4)是将要进行手术或最近进行了手术的。在一个优选的具体体现中，寡聚物是二氨基吗啉代寡聚物，含有一个制药上可接受的载体，并以口服方式给药。在另一个优选的具体体现中，寡聚物是二氨基吗啉代寡聚物，含有一个制药上可接受的载体，以静脉注射方式给药。

在另一个本方法的应用中，受试者是家畜，如鸡、火鸡、猪、牛或山羊等，治疗可以是预防的或治疗性的。本发明也包括在家畜或家禽的饲料成分里加入谷类食物添加剂，其中含有少于上述亚治疗数量的抗病毒反义化合物。可以预期的是，应用上述含亚治疗数量的抗病毒反义核酸化合物的谷类食物添加剂来喂养家畜和家禽，能改善应用含亚治疗数量的抗病毒化合物的谷类食物添加剂喂养家畜和家禽的方

法。

反义化合物一般以一定的数量和有效的方式给药，可导致血液中浓度至少达到 200-400 nM。典型地，一个或更多剂量被给药时，一般以规律的间隔，大概一到两个星期一次。优选的口服剂量是每 70kg1-5 25mg 寡聚物。在有些情况下，对每个病人的剂量使用超过 25mg 寡聚物也是必须的。对静脉注射给药，优选的剂量是每 70kg 使用 0.5mg 到 10mg。反义寡聚物可以在短期内规则地间断给予，例如，在两周内或更少时间内每天给予。然而，在有些情况下，寡聚物要在较长的时间内间断给予。可以在给予抗生素或其它治疗处理后，或同时给予寡聚物。10 治疗方案可以根据需要来调整（剂量、频率、途径等），主要调整依据是受试者在处理条件下的免疫测定、其它生物化学试验和生理检测的结果。

### C. 对处理的监测

按照不同的持续时间、剂量、频率、和给药的途径，及受试者在治疗时的条件（如预防给药相较于局部或全身感染后给药的反应），本15 发明的反义寡聚核苷酸在体内治疗方案的效果会发生变化。因此，为了达到最佳的治疗结果，这样的体内治疗常常需要通过适当的试验，来监测在治疗中特定类型病毒的感染，并针对性地调整剂量或治疗计划。治疗可以被监测，如通过普通的感染指示剂如全血计数（CBC），20 核酸检测方法，免疫诊断试验，病毒培养，或异源双螺旋检测等方法来进行。

可以通过检测生物样本（组织、血、尿等）来决定通过体内注入本发明所述的反义寡聚物阻断或减少一种或多种 RNA 病毒的生长效果，这些样本是从受试者在注入反义寡聚物前，期间和后取出的。对样本25 的分析化验包括（1）应用该领域专业技术人员已知的程序，如通过凝胶电泳迁移试验检测是否存在与靶或非靶序列形成的异源双螺旋，（2）用标准技术如 ELISA 或 Western blotting，检测病毒蛋白质产生的数量，或（3）通过 Spearman-Kärber 方法测量病毒滴度的影响（见，for example, Pari, G. S. et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 39(5):1157-1161, 1995; Anderson, K. P. et al., 30 *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 40(9):2004-2011, 1996,

Cottral, G. E. (ed) in: Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology, pp. 60-93, 1978).

检测反义物治疗效果的首选方法是检测反义物与 RNA 形成的异源双螺旋。注入反义物后，在选择的时间里，收集体液来检测异源双螺旋的存在和/或测量样本中异源双螺旋种类的数量。典型地，体液样本在注入后 3-24 小时收集，更适宜的是注入后约 6-24 小时收集。如以上说明的，体液样本可以是尿、唾液、血浆、血液、脊髓液，或其它生物来源的液体样本，也可以包括细胞或悬浮在那里的细胞碎片，或液体媒介和它的溶质。收集的样本数量一般在 0.1 到 10 ml 范围，首选约 1 ml 到更少。

样本可以先被处理，以去除不需要的成分和/或处理在样本中的异源双螺旋种类，去掉不需要的 ssRNA 突出端区域，如用 RNA 酶进行处理。当然，由于通过电泳或质谱来测定异源双螺旋是根据其在分离中分子的大小来进行的，去掉突出端就特别地重要。

可以使用多种方法从样本中去掉不需要的成分。例如，由于异源双螺旋带净负电荷，电泳或离子交换技术就可以用来将异源双螺旋从中性或阳性物质中分离出来。样本也可以和带有表面结合抗体或其它能特异性结合异源双螺旋物质的固体柱接触。在洗脱掉立柱上未发生结合的物质后，异源双螺旋就能以充分的纯化形式释放，以备通过电泳、质谱分析或免疫测定进行进一步的分析。

## 实施例

以下例子说明但并不打算在任何方面限制该发明。

### 25 材料与amp;方法

标准重组 DNA 技术被用于所有的构建当中，这些技术在以下文献中有详细说明 (Ausubel, FM et al., in CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, Inc., Media, Pa., 1992 and Sambrook, J. et al., in MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., Vol. 2, 1989) .

### 实施例 1: 反义物在体外抑制小 RNA 病毒 (人鼻病毒)

与鼻病毒翻译开始区域 14 序列相对应的二氨基磷酸吗啉代寡聚物 (PMO) 对鼻病毒 16 的抑制效果被用于评价。按 Summerton and Weller, 1997 所描述的方式, 二氨基磷酸吗啉代寡聚物 (PMO) 由 AVI  
5 BioPharma (Corvallis, Oreg.) 合成。全长的寡聚物纯度超过 90%, 用反相高压液体色谱法和 MALDI TOF 质谱法测定。在用于细胞培养前, 将冻干的 PMOs 溶于消毒过的 0.9 % NaCl 溶液中, 并且通过 0.2  $\mu$ m 的 Acrodisc 过滤器 (Gelman Sciences, Ann Arbor, Mich.) 过滤。

PMO 包含有以鼻病毒 14 为靶标的核酸序列, 并且, 相对于鼻病毒  
10 16 的靶序列存在 3 个错配。靶序列 (GenBank NC001752 618-637; SEQ ID NO: 5), 和目标序列 (序列识别号: 18) 如下:

HRV-16: TTGTTATCATGGGCGCTCAA 序列识别号:5

HRV-14 反义物 GACTAGTACCCGCGAGTC 序列识别号:18:

15

在此, 粗体密码是开始密码子, 错配用下划线表示。

将已培养了 24 小时的 HeLa 细胞在六孔平板上再生长 24 小时。在处理前, 用没有加血清的基本培养基 (MEM) 清洗单层细胞两次, 然后将成片单层细胞在加了 5% 牛血清、L-谷氨酸盐、抗生素和重碳酸钠  
20 的基本培养基中培养, 温度为 37°C, 5% 的 CO<sub>2</sub> 和带湿度的空气。

将 PMOs 通过 "scrape-loading" 方法导入培养细胞, 已知这种方法能运输 PMOs 到 80-90% 的培养细胞中 (Partridge et al., 1996)。用没有血清的 MEM 将寡聚物稀释到终浓度为 20  $\mu$ m, 在培养物中加入 0.5 ml 的寡聚物-MEM 溶液, 在室温下 1 分钟后, 用橡皮细胞刮棒刮去细胞。  
25 将细胞放回 CO<sub>2</sub> 恒温箱中培养 10 分钟, 然后, 加入 8 ml 带有小牛血清的 MEM, 并将其分散到已加入到 96 孔板中, 其内已含有对数期生长的鼻病毒 16 的稀释物 (每份稀释物 8 个孔), 每个孔 0.1 ml。平板在 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 度培养 72 小时, 然后, 用 Olympus CK 光学显微镜检查是否存在细胞病理学影响。病毒滴度用 Spearman-Kärber 方法检  
30 测。不同处理组的病毒滴度表示在下面的表 6, 并以图 5 表示。

表. 6

处理	病毒滴度
盐	$4.0 \times 10^7$
HRV-14 AS	$5.32 \times 10^6$

结果表明, 当用 PMO 反义物处理 HRV-14 时, 有超过 75% 的 HRV-16 病毒滴度被抑制, 正如以前研究所证实的那样, 这个效果低于针对鼻病毒 16 的感染的以鼻病毒 16 为靶序列的效果, 符合三个错配碱基对的期望结果, 研究证实了与 HRV-16 基因组翻译开始区域完全互补的 PMOs 的抗病毒效果。

10 实施例 2: 反义物阻断从猪肾 (PK-15) 和非洲绿猴肾 (Vero) 组织培养的病毒: 杯状病毒囊病毒 PCV Pan-1 株和 SMSV-13 株

评估了三个二氨基磷酸吗啉代寡聚物 (PMO) 的抗病毒效果, 它们针对杯状病毒科囊病毒属株系 Pan-1 和 SMSV-13 中的 ORF1 翻译开始区域。PMOs 通过 scrape-loaded 到两种宿主细胞中, 即猪肾细胞 (PK-15) (ATCC No. CCL33) 和非洲绿猴肾细胞 (ATCC No. CCL81) (Vero), 如上所述。宿主细胞随后暴露在囊病毒 Pan-1 和 SMSV-13 中。病毒载荷的测量和培养按照例 1 的步骤进行。

对于这三条 PMOs, 每一条都包括与 Pan-1 序列 (GenBank 登记号. AF091736) ORF1 起始区域互补的序列。PMOs 在没有血清的培养基中浓度为 20.  $\mu$ m。一个盐空白和序列杂乱的 PMO 被用于作为对照实验。PMO 序列被确定为 ORF1.1 (序列识别号 27), ORF1.2 (序列识别号 28), 和 ORF1.3 (序列识别号 29), 靶点位置列在下面的表 7 当中。

表 7. 寡聚体序列和靶位点

寡聚物	在 Pan-1 上的靶位点	序列, 3' 端	序列识别号
ORF1.1	7-26	GAG CCA TAG CTC AAA TTC TC	27
ORF1.2	1-21	TAG CTC AAA TTC TCA TTT AC	28
ORF1.3	15-34	GAG CGT TTG AGC CAT AGC TC	29
混和对照	-	GAC ATA TCT AAT CAT ATA C	30

表 8 展示了 PMOs 对病毒株系 SMSV-13 和 Pan-1 在 PK-15 和 Vero 细胞内的滴度的抑制效果。当两种细胞类型用于检测给定的病毒株时，给出了一个简单的抑制平均百分数。

5 表 8. 反义 PMOs 对囊病毒 SMSV-13 株 和 PVC Pan-1 株在 PK-15 和 Vero 宿主细胞中的病毒滴度的影响

PMO (20 $\mu$ m)	VMK 细胞(TCID <sub>50</sub> /ml)	PK-15 细胞(TCID <sub>50</sub> /ml)	% 抑制 (平均)
病毒株 SMSV-13			
盐	$5.3 \times 10^7$	$7.1 \times 10^5$	0
ORF1.1	$1.7 \times 10^7$	$5.3 \times 10^4$	80
ORF1.2	$3.0 \times 10^7$		43
ORF1.3	$1.7 \times 10^7$	$3.0 \times 10^5$	68
混和对照	$7.1 \times 10^7$	$9.5 \times 10^5$	-33
病毒株 Pan-1			
盐	$7.1 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	0
ORF1.1	$1.3 \times 10^6$	$3.0 \times 10^5$	84
ORF1.2	$2.2 \times 10^6$		68
ORF1.3	$4.0 \times 10^6$		44
混和对照		$2.3 \times 10^6$	-5

在两种细胞系和对两种病毒血清型中,均发现以 ORF1 为靶的 PMOs 具有显著的抑制作用,“ORF1.1”最有效。而作为对照的,序列杂乱的 PMO 则没有抑制效果。

在剂量效应研究中, Vero 细胞中加入了含有以 ORF1.1 和 ORF1.3 为靶的 PMO 序列,随后将其暴露在囊病毒株 SMSV-13 里,接下来的步骤按例 1 所描述的方法进行。用 ORF1.1 PMO 处理都在浓度为 0.2 和 1.0  $\mu$ m 下没有抑制作用,在浓度为 2.0  $\mu$ m 时被中度抑制,在 20  $\mu$ m 15 时被高度抑制。而 ORF1.3 PMO 在浓度为 0.2  $\mu$ m 时对 SMSV-13 的病毒浓度没有抑制作用,但在浓度为 1.0  $\mu$ m 时表现出有高的抑制作用;在浓度为 210, and 20  $\mu$ m 时没有观察到抑制作用的加强。

实施例 3: PMO 反义物对猫科动物杯状病毒的作用

猫科动物的杯状病毒成为猫出血病毒。病毒被分离，并在细胞培养物上繁殖。细胞培养物被暴露于病毒中，接着按例 1 所描述的步骤进行检测，反义 PMO 有下列的靶序列：CAG AGT TTG AGA CAT TGT CTC (序列识别号 32)。在细胞培养物中观察到一个对数级病毒滴度的减少。

5 实施例 4：反义 PMO 在三联小鼠 (trimera mice) 中针对 HCV 病毒血症的作用

研究动物是从 Harlan Inc. 获得的无菌雌性 CB6F1 和重度联合免疫缺陷 (SCID) /米色小鼠 (在 Weizmann 学院动物饲养中心饲养和繁殖)。小鼠居住在特定的无菌环境中；在研究开始前允许给予经过消毒的食物和酸化的水。

CB6F1 小鼠在 7-9 周时做去除胸腺手术。试验在 CB6F1 小鼠 12-18 周 (19-25g/每只) 大时进行。在异体移植前，CB6F1 小鼠接受一份剂量的 gamma 射线的全身照射 (4 Gy 一天后 11 Gy) (戈瑞 Gy=100rad.)，射线由  $^{60}\text{Co}$  产生 (加拿大原子能)，放射率为 0.7 Gy/分钟。在第一次照射后，ciprofloxacin (20  $\mu\text{g/ml}$ ; Bayer) 加入饮用水中 7-10 天。在第二次放射剂量后，立刻给小鼠静脉注射  $4-6 \times 10^6$  的 6-10 周大的 SCID/米色小鼠的骨髓细胞 (在 0.2 ml 磷酸缓冲盐溶液中)。

20 CB6F1 用 10mg/只的 2,2,2 三溴乙醇 (Aldrich) 麻醉，进行剖腹手术。在体外被感染了丙型肝炎病毒 (HCV) 的人肝碎片移植到耳翼后。伤口用 9 毫米的自动伤口夹封闭。

小鼠用 PMO 反义物处理，该反义物有相对于 HCV 核酸序列中从 AUG 起始位点到第一开放阅读框的目标序列 GTG CTC ATG GTG CAG GGT C (序列识别号 35)。在移植后的第 10-第 17 天，用反义物或盐进行处理 (总共 7 天)，小鼠分为 4 个组，每个组大约为 17 只。PMO 的剂量分别为 0.01, 0.03 和 0.1 mg/只/天。在第 16 天 (处理完成后的一天) 和第 21 天取血，对血清进行分析。

30 结果总结在表 9 中，并用图表示在图 6 中。病毒载荷=平均病毒载荷  $\pm$  标准差 (HCV-RNA 份/ml 血清)。对照组和处理组中，小鼠的 HCV 感染阳性的百分比用卡方进行比较分析。对照组和试验组小鼠中病毒

载荷的差异用非参数 Mann-Whitney U 对比检测。

表 9. 体内反义物剂量-效应研究

组	病毒载荷	HCV 阳性动物百分比	P 值
盐	$1.91 \times 10^4 \pm 5.58 \times 10^3$	65	n=17
0.01mg/天	$5.00 \times 10^3 \pm 1.39 \times 10^3$	29	0.03, n=17
0.03mg/天	$2.79 \times 10^3 \pm 2.01 \times 10^2$	12	0.004, n=17
0.10mg/天	$2.64 \times 10^3 \pm 1.39 \times 10^2$	6	0.002, n=18

如前所述，在此描述的本发明的特定具体化是为了更好地阐述发明，但在不偏离本发明的精神和范围内可以进行多种修改。因此，除  
5 非权利要求提及，本发明在权利要求范围内不被限制。

表 10. 序列列表

序列识别号	序列, 5' 端到 3' 端
1	GTATCATAATGGGTGCTCAG
2	GTATCATAATGGGTGCTCAG
3	AATAATGAACATGTCTAGACAAGG
4	CTGTGATCATGGGCGCTCAG
5	TTGTTATCATGGGCGCTCAA
6	TTGGCATCATGGGTGCCAG
7	CAATGAGCACAACACTGACTGTTT
8	GACCCTATGAATACAACACTGACTGTTT
9	CAACAAAATGGGGCTCAAG
10	GTAATGAGAATTTGAGCTATGGCTCAAACGCTC
11	CGTGATGGCTAATTGCCGTC
12	GTGAATGATGATGGCGTCG
13	TGGAGGCCCATCAGTTATTAAGG
14	GCCATGGAGGCCCATCAG
15	GACCGTGCACCATGAGCAC
16	CCTGAGCACCCATTATGATAC
17	CCTTGTCTAGACATGTTTATT
18	CTGAGCGCCCATGATCACAG
19	TTGAGCGCCCATGATAACAA
20	CTGGGCACCCATGATGCCAA
21	AAACAGTCAGTTGTGCTCATTG
22	AAACAGTCAGTTGTATTATAG

---

23	CTTGAGCTCCCATTTTGCTG
24	CTTGAGCCCCATTTTGTTG
25	CCTGTGCTCCCATCTTGATG
26	TGGGTGGGATCAACCCACAGGCTGTTTAA
27	GAGCCATAGCTCAAATTCTC
28	TAGCTCAAATTCTCATTTAC
29	GAGCGTTTGAGCCATAGCTC
30	GACGGCAATTAGCCATCACG
31	CGACGCCATCATCATTAC
32	CAGAGTTTGAGACATTGTCTC
33	CCTTAATAAACTGATGGGCCTCC
34	CTGATGGGCCTCCATGGC
35	GTGCTCATGGTGCACGGT
36	GACATATCTAATCATATAC

<110> AVI 生物制药公司

<120>用于治疗单链 RNA 病毒感染的抗病毒反义核酸的试剂和方法

<130> 504508046W00

<140> Not Yet Assigned

<141> Filed Herewith

<150> US 60/329,815

<151> 2001-10-16

<160> 36

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 脊髓灰质炎病毒 Mahoney 株

<400> 1

gtatcataat gggtgctcag

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 脊髓灰质炎病毒 Sabin 株

<400> 2

gtatcataat gggtgctcag

20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 甲肝病毒

<400> 3

aataatgaac atgtctagac aagg

24

---

<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 鼻病毒 14	
<400> 4	
ctgtgatcat gggcgctcag	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 鼻病毒 16	
<400> 5	
ttgttatcat gggcgctcaa	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 鼻病毒 1B	
<400> 6	
ttggcatcat gggtgcccag	20
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 口疮病毒	
<400> 7	
caatgagcac aactgactgt tt	22
<210> 8	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 口疮病毒	
<400> 8	
gaccctatga atacaactga ctgttt	26
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 柯萨奇病毒	

<400> 9 caacaaaatg ggggctcaag	20
<210> 10 <211> 34 <212> DNA <213> 囊病毒 (Pan-1)	
<400> 10 gtaaagtgaga atttgagcta tggctcaaac gctc	34
<210> 11 <211> 20 <212> DNA <213> 猪肠道杯状病毒	
<400> 11 cgtgatggct aattgccgtc	20
<210> 12 <211> 19 <212> DNA <213> 诺沃克病毒	
<400> 12 gtgaatgatg atggcgtcg	19
<210> 13 <211> 24 <212> DNA <213> 戊肝病毒	
<400> 13 tggaggccca tcagtttatt aagg	24
<210> 14 <211> 18 <212> DNA <213> 丙肝病毒	
<400> 14 gccatggagg cccatcag	18

---

<210> 15	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 15	
gaccgtgcac catgagcac	19
<210> 16	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 16	
cctgagcacc cattatgata c	21
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 17	
ccttgtctag acatgttcat tatt	24
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 18	
ctgagcgccc atgatcacag	20

<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 19	
ttgagcgccc atgataacaa	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 20	
ctgggcaccc atgatgccaa	20
<210> 21	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 21	
aaacagtcag ttgtgctcat tg	22
<210> 22	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 22	
aaacagtcag ttgtattcat ag	22

<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 23	
cttgagctcc cattttgctg	20
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 24	
cttgagcccc catttttggt g	21
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 25	
cctgtgctcc catcttgatg	20
<210> 26	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 26	
tgggtgggat caaccacag gctgttttaa	30

<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 27	
gagccatagc tcaaattctc	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 28	
tagctcaaat tctcatttac	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 29	
gagcgtttga gccatagctc	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 30	
gacggcaatt agccatcacg	20

---

<210> 31	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 31	
cgacgccatc atcattcac	19
<210> 32	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 32	
cagagtttga gacattgtct c	21
<210> 33	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 33	
ccttaataaaa ctgatgggcc tcc	23
<210> 34	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚体	
<400> 34	
ctgatgggcc tccatggc	18

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的反义寡聚体

<400> 35

gtgctcatgg tgcacggtc

19

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 混合对照序列

<400> 36

gacatatcta atcatatac

19

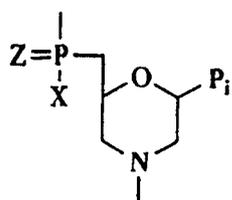


图1A

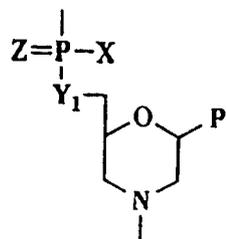


图1B

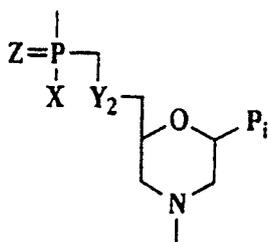


图1C

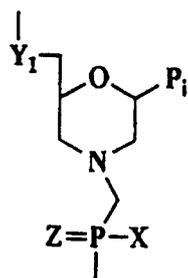


图1D

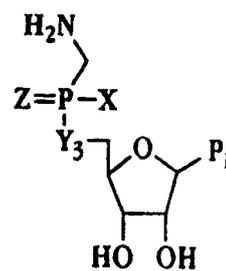


图1E

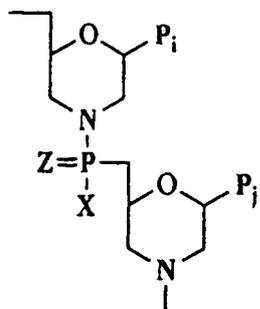


图2A

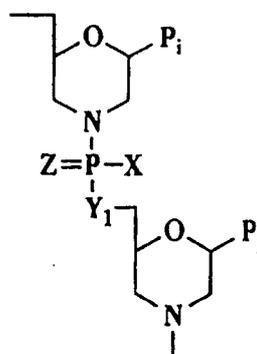


图2B

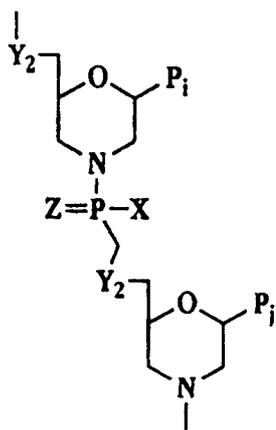


图2C

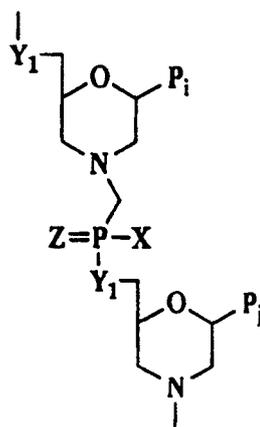


图2D/E

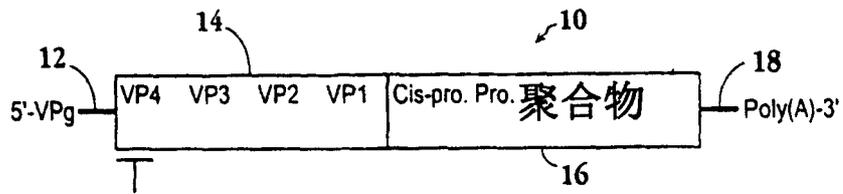


图3A

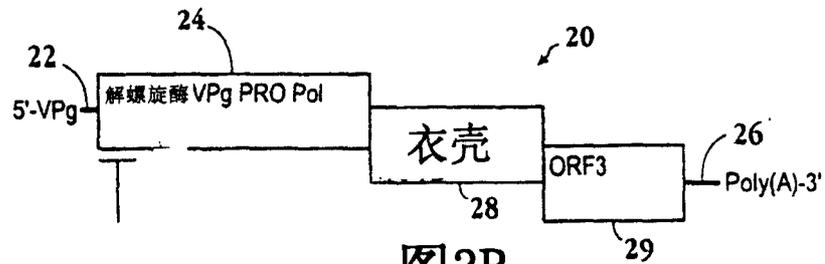


图3B

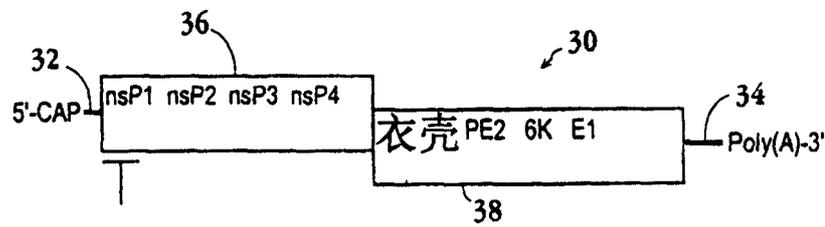


图3C

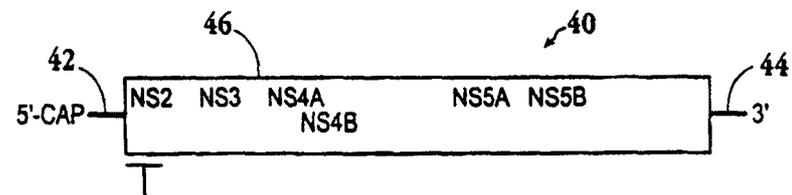


图3D

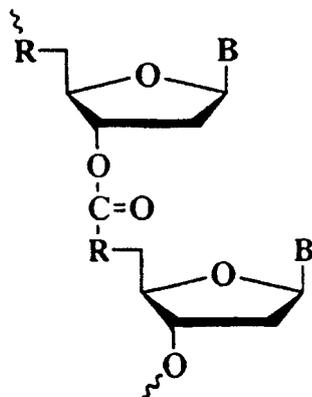


图4A

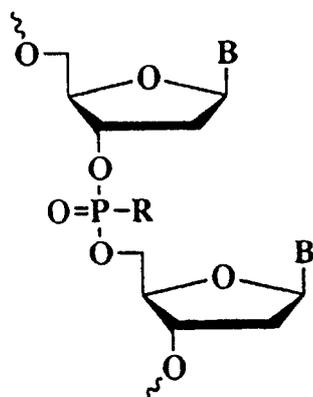


图4B

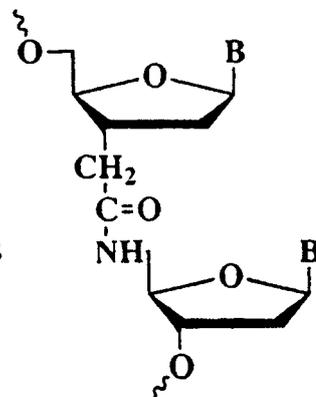


图4C

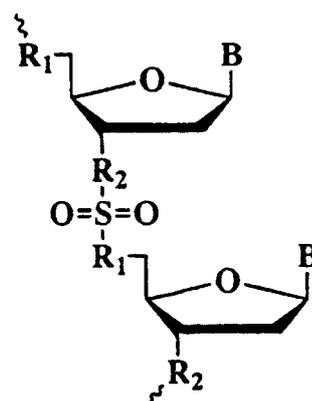


图4D

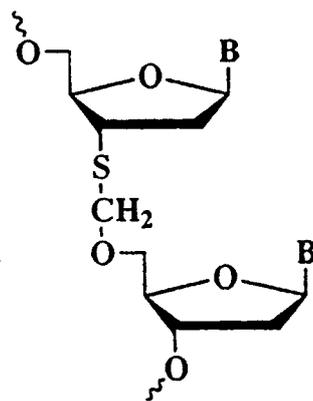


图4E

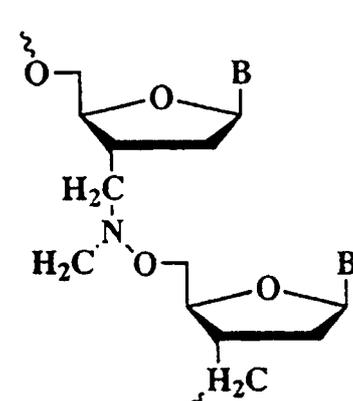


图4F

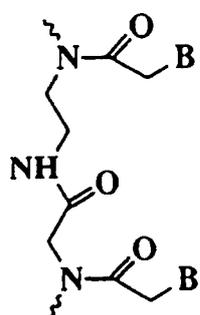


图4G

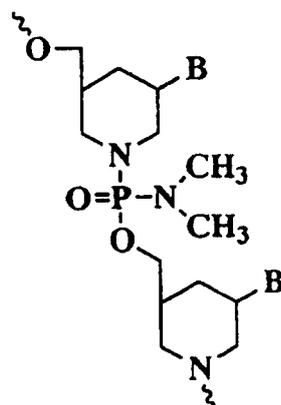


图4H

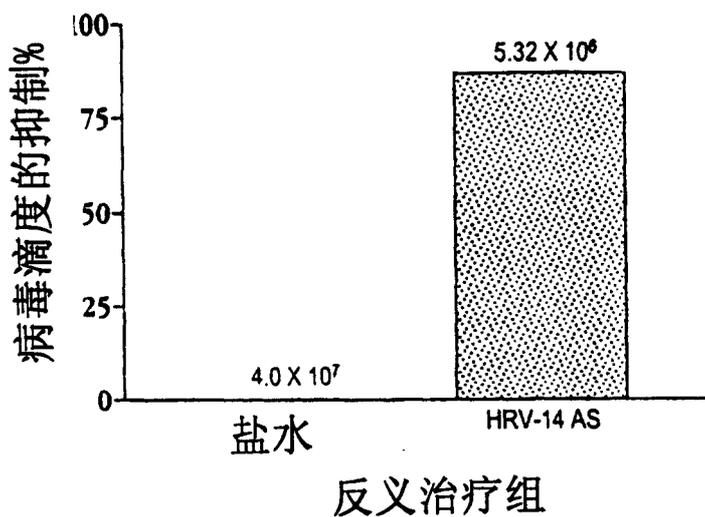


图5

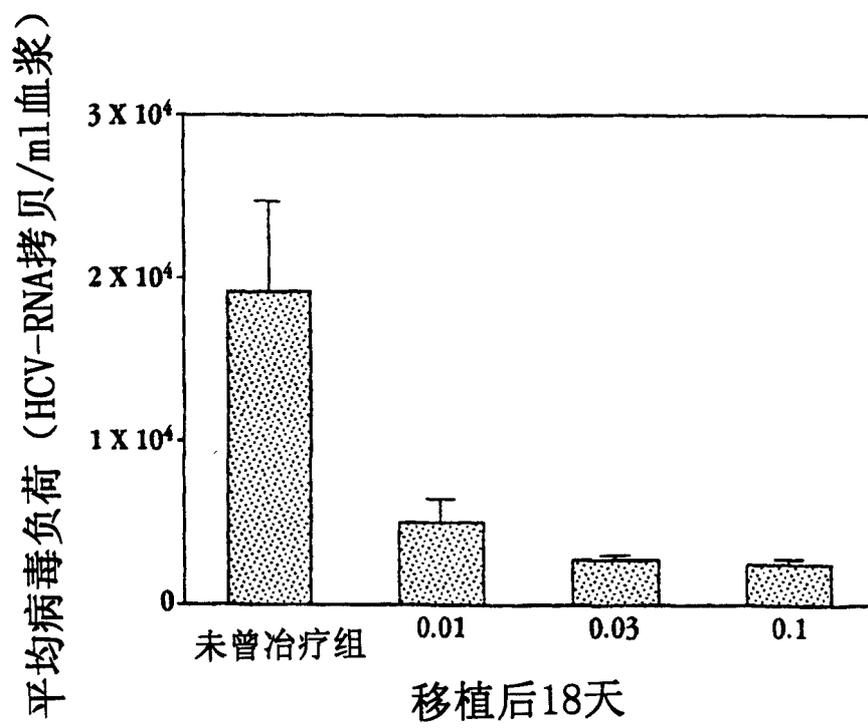


图6

专利名称(译)	用于治疗单链RNA病毒感染的抗病毒反义核酸的试剂和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1604906A</a>	公开(公告)日	2005-04-06
申请号	CN02820560.X	申请日	2002-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	AVI生物制药公司		
申请(专利权)人(译)	AVI生物制药公司		
当前申请(专利权)人(译)	AVI生物制药公司		
[标]发明人	DA斯坦 DE斯基林 PL艾弗森 AW史密斯		
发明人	D·A·斯坦 D·E·斯基林 P·L·艾弗森 A·W·史密斯		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7105 A61K31/712 A61K31/7125 A61K38/00 A61K48/00 A61P31/14 C12N15/09 C12N15/113 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/569 C07H21/04		
CPC分类号	C12N2310/3145 A61K38/00 A61K31/712 C12N2310/3233 C12N15/1131 A61K31/7125 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 Y02A50/463		
代理人(译)	程伟		
优先权	60/329815 2001-10-16 US		
其他公开文献	CN100547071C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种反义抗病毒化合物和方法，在处理病毒感染时，用于抑制来源于小RNA病毒、杯状病毒、外衣病毒、黄病毒科的病毒的生长。这种反义抗病毒化合物是基本不带电荷的寡聚物，有与跨越了病毒基因组第一开放阅读框的AUG起始位点的病毒靶序列基本互补的目标碱基序列。

