



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970662 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200880123455. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 11. 05

C12N 15/11 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07H 21/00 (2006. 01)

60/985, 548 2007. 11. 05 US

A61K 31/7115 (2006. 01)

61/057, 685 2008. 05. 30 US

A61P 31/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FI2008/050633 2008. 11. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/060122 EN 2009. 05. 14

(71) 申请人 波罗的科技发展有限公司

地址 爱沙尼亚塔林

(72) 发明人 马特·萨尔玛 安德烈斯·梅利茨

马蒂·卡拉尔森

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 50 页 序列表 68 页
附图 2 页

(54) 发明名称

带有修饰碱基的寡核苷酸作为抗病毒剂的应用

(57) 摘要

本发明涉及使用具有修饰的核碱基的寡核苷酸在对象中抑制病毒的基因表达和 / 或复制。修饰的核碱基可以是巯基修饰的碱基或羟基修饰的核碱基。考虑到了寡核苷酸还包含核酸酶复合物, 其增强寡核苷酸的抗病毒活性。

1. 一种在对象中抑制病毒复制的方法,包括向对象施用5到150个核碱基的寡核苷酸,其中至少一个核碱基是巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)或羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基)。

2. 寡核苷酸在对象中抑制病毒复制的应用,其中所述寡核苷酸被配制用于向对象施用,并含有5到150个核碱基,其中至少一个核碱基是巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)或羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基)。

3. 一种抑制靶核酸的翻译的方法,所述方法包括将靶核酸与含有寡核苷酸的组合物在允许寡核苷酸与靶核酸杂交的条件下接触,其中杂交的寡核苷酸抑制靶核酸的翻译,其中所述靶核酸与病毒复制相关,并且其中所述寡核苷酸含有至少一个修饰的核碱基,所述修饰的核碱基选自巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)和羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基)。

4. 寡核苷酸在制造用于抑制靶核酸翻译的药物中的应用,其中将靶核酸与含有寡核苷酸的组合物在允许寡核苷酸与靶核酸杂交的条件下接触,其中杂交的寡核苷酸抑制靶核酸的翻译,其中所述靶核酸与病毒复制相关,并且其中所述寡核苷酸含有至少一个修饰的核碱基,所述修饰的核碱基选自巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)和羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基)。

5. 一种在对象中抑制病毒基因组复制的方法,所述方法包括:

预测或测定对象或病毒病原体中靶核酸的核苷酸序列,其中靶核酸与病毒复制相关,以及

向对象施用含有5到150个核碱基的寡核苷酸的组合物,其中至少一个核碱基是巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)或羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基),并且其中在对象的生理条件下,所述化合物与靶序列的核苷酸序列充分互补,从而在对象中与靶序列的核苷酸序列杂交并抑制病毒复制。

6. 寡核苷酸在制造用于在对象中抑制病毒基因组复制的药物中的应用,所述病毒基因组或对象包含预测或测定的与病毒复制相关的靶核酸的核苷酸序列,其中所述寡核苷酸有5到150个核碱基,

其中至少一个核碱基是巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)或羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基),并且其中在对象的生理条件下,所述化合物与靶序列的核苷酸序列充分互补,从而在对象中与靶序列的核苷酸序列杂交并抑制病毒复制。

7. 一种化合物,其含有5到150个核碱基的寡核苷酸,

其中寡核苷酸包含与来自病毒的核苷酸序列至少80%互补的核苷酸序列,

其中至少一个核碱基是巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)或羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基)。

8. 权利要求1-7任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸包含至少一个巯基核碱基。

9. 权利要求8的方法或应用或化合物,其中巯基核碱基选自5-巯基胞嘧啶、5-巯基尿嘧啶、8-巯基鸟嘌呤和8-巯基腺嘌呤。

10. 权利要求1-8任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸包含至少一个羟基修饰的互变异构或离子型碱基。

11. 权利要求 10 的方法或应用或化合物,其中羟基核碱基选自 5- 羟基胞嘧啶、5- 羟基尿嘧啶、8- 羟基腺嘌呤和 8- 羟基鸟嘌呤。

12. 权利要求 1-11 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸还包含与其连接的有机核酸酶。

13. 权利要求 12 的方法或应用或化合物,其中有机核酸酶包含与镧系金属复合的螯合性有机部分。

14. 权利要求 13 的方法或应用或化合物,其中镧系金属选自镧、铈、镨、钕、钷、钆、铽、镱、铒、铕、镱、铥、钆、铈和镨。

15. 权利要求 14 的方法或应用或化合物,其中金属是铕。

16. 权利要求 1-15 任一项的方法或应用或化合物,其中病毒是快速急性病毒。

17. 权利要求 1-15 任一项的方法或应用或化合物,其中病毒是慢性病毒。

18. 权利要求 1-15 任一项的方法或应用或化合物,其中病毒是正链 RNA 病毒。

19. 权利要求 18 的方法或应用或化合物,其中病毒是甲病毒。

20. 权利要求 18 的方法或应用或化合物,其中病毒是塞姆利基森林病毒 (SFV)。

21. 权利要求 18 的方法或应用或化合物,其中病毒是丙型肝炎病毒。

22. 权利要求 1-15 任一项的方法或应用或化合物,其中病毒是 DNA 病毒。

23. 权利要求 22 的方法或应用或化合物,其中病毒是乳头瘤病毒。

24. 权利要求 23 的方法或应用或化合物,其中乳头瘤病毒选自牛 1 型乳头瘤病毒和人乳头瘤病毒。

25. 权利要求 22-24 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸与编码转录或调控因子的病毒基因杂交,并抑制具有 DNA 基因组的病毒的复制。

26. 权利要求 22-24 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸与病毒复制因子杂交,并抑制具有 DNA 基因组的病毒的复制。

27. 权利要求 1-21 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸与在其复制周期中使用反转录的病毒杂交。

28. 权利要求 27 的方法或应用或化合物,其中病毒是反转录病毒。

29. 权利要求 28 的方法或应用或化合物,其中反转录病毒是人类 1 型免疫缺陷病毒。

30. 权利要求 27-29 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸与编码转录或调控因子的病毒基因杂交,以抑制利用反转录进行复制的病毒的复制。

31. 权利要求 1-30 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸长度为 10-100 个核碱基。

32. 权利要求 1-30 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸长度为 10-50 个核碱基。

33. 权利要求 1-30 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸长度为 10-30 个核碱基。

34. 权利要求 1-30 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸长度为 20-30 个核碱基。

35. 权利要求 34 的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸长度为 21 到 23 个核碱基。

36. 权利要求 1 到 35 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸中 1% 到 100% 的核

碱基是修饰的核碱基。

37. 权利要求 36 的方法或应用或化合物,其中 10%到 90%的核碱基是巯基修饰的或羟基修饰的核碱基。

38. 权利要求 36 的方法或应用或化合物,其中 20%到 80%的核碱基是巯基修饰的或羟基修饰的核碱基。

39. 权利要求 36 的方法或应用或化合物,其中 30%到 70%的核碱基是巯基修饰的或羟基修饰的核碱基。

40. 权利要求 36 的方法或应用或化合物,其中 40%到 60%的核碱基是巯基修饰的或羟基修饰的核碱基。

41. 权利要求 36 的方法或应用或化合物,其中 50%的核碱基是巯基修饰的或羟基修饰的核碱基。

42. 权利要求 1 到 41 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸含有至少一个巯基修饰的核碱基和至少一个羟基修饰的核碱基。

43. 权利要求 1 到 42 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸与宿主的与病毒复制相关的因子杂交并抑制病毒复制。

44. 权利要求 1 到 43 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸与病毒基因组的非编码区杂交。

45. 权利要求 1 到 43 任一项的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸与病毒基因组的编码区杂交。

46. 权利要求 45 的方法或应用或化合物,其中寡核苷酸与 RNA 病毒的编码区杂交。

47. 权利要求 1、3、5 和 8-46 任一项的方法,其中将至少两种具有不同序列的寡核苷酸施用于对象,其中所述寡核苷酸与不同的靶序列杂交。

48. 权利要求 2、4、6 和 8-46 任一项的应用,其中使用至少两种不同的所述寡核苷酸,其中所述寡核苷酸与不同的靶序列杂交。

49. 一种组合物,其包含权利要求 7-45 任一项的两种化合物的混合物,其中寡核苷酸与不同的靶序列杂交。

50. 权利要求 49 的组合物,其还包含可药用载体。

51. 权利要求 47-50 任一项的方法或应用或组合物,其中至少两种寡核苷酸对同一个病毒基因组中的不同靶序列是特异性的。

52. 权利要求 47-50 任一项的方法或应用或组合物,其中寡核苷酸对同一个功能单位中的靶序列是特异性的。

53. 权利要求 47-50 任一项的方法或应用或组合物,其中至少两种寡核苷酸对不同功能单位中的靶序列是特异性的。

54. 权利要求 1-6、8-48 和 51-53 任一项的方法或应用,其中组合物还包含药物载体或赋形剂。

55. 一种组合物,其包含权利要求 7-45 任一项的化合物和可药用载体。

56. 至少两种具有不同序列的寡核苷酸在制造向对象施用的药物中的应用,其中所述至少两种寡核苷酸与不同的靶序列杂交。

57. 权利要求 56 的应用,其中两种不同的寡核苷酸被施用于对象。

58. 权利要求 57 的应用,其中寡核苷酸对同一个病毒基因组中的不同靶序列是特异性的。

59. 权利要求 56 的应用,其中寡核苷酸对同一个功能单位中的靶序列是特异性的。

60. 权利要求 56 的应用,其中寡核苷酸对不同功能单位中的靶序列是特异性的。

61. 权利要求 56-60 任一项的应用,其中药物还包含药物载体或赋形剂。

62. 权利要求 1-6、8-48、51-54 和 56-61 任一项的方法或应用,其中对象是哺乳动物。

63. 权利要求 62 的方法或应用,其中对象是人类。

64. 权利要求 1-63 任一项的方法、应用、化合物或组合物,其中寡核苷酸在脂质体中。

65. 权利要求 1-6、8-48、51-54 和 56-64 任一项的方法或应用,其中寡核苷酸与靶序列的杂交诱导靶核酸的切开。

66. 权利要求 1-6、8-48、51-54 和 56-65 任一项的方法或应用,其中寡核苷酸的序列表现出与靶核酸或其互补体至少 70% 的序列同一性。

67. 权利要求 66 的方法或应用,其中寡核苷酸的序列表现出与靶核酸或其互补体至少 90% 的序列同一性。

68. 权利要求 7、49-50、55 和 64 任一项的化合物或组合物,其中寡核苷酸包含与来自病毒的核苷酸序列至少 90% 互补的核苷酸序列。

带有修饰碱基的寡核苷酸作为抗病毒剂的应用

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2008 年 5 月 30 日提交的美国临时申请号 61/057,685 和 2007 年 11 月 5 日提交的美国临时申请号 60/985,548 的优先权,它们每个在此以其全文引为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及使用含有特异修饰的核苷酸碱基的寡核苷酸类似物,来抑制病毒的基因表达和 / 或复制。寡核苷酸任选地与具有高选择性人工核酸酶活性的镧系元素有机复合物结合。

[0004] 发明背景

[0005] 寡核苷酸和修饰的寡核苷酸的应用在现代疗法中是极为重要的,并已有详尽记录 (Uhlmann 等, Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle. (反义寡核苷酸: 新的治疗原理) Chemical Reviews 1990, 90: 543-584; Crooke 等《反义研究和应用》(Antisense Research and Applications), CRC Press (1993); Mesmaekar 等, "Antisense oligonucleotides" (反义寡核苷酸), Acc. Chem. Res. 1995, 28: 366-374; Stein. "The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed." (反义寡核苷酸的实验应用: 困惑指南) J. Clin. Invest. 2001, 108, 641-644)。反义多核苷酸与 DNA 或 RNA 靶的特异性结合,可以使核酸的复制、转录或翻译失活,从而提供了用于控制疾病例如癌症和病毒感染的机制。因此,反义寡核苷酸与靶的结合可用于在各种不同的情况下改变基因的表达,例如干扰病毒的生命周期或癌细胞的生长。

[0006] 许多侵害人类的重要传染病由病毒引起。这些疾病中的许多,包括肝炎、免疫缺陷和各种不同脑炎疾病,通常是致命的。其他这类疾病的重要性在于它们是高度传染性的,引起急性不适,例如流感、麻疹、流行性腮腺炎和水痘,以及呼吸道或胃肠道疾病。其他例如风疹和巨细胞病毒能引起先天性畸形。最后,还有被称为致癌病毒的病毒 (包括人类乳头瘤病毒),能够在人类和动物中引起癌症。

[0007] 病毒基因组可以由 DNA 或 RNA 构成。此外,已知有两类病毒,在它们的复制周期中使用 DNA 和 RNA 两种阶段。病毒的基因组 DNA 可以是双链或单链的,环状或线性的。DNA 的尺寸可以小至 4.5kb,或大至 1.2Mbp;基因的数量在 3 到高达 911 个之间变化。DNA 基因组不用作建议的抗病毒的靶。代替病毒编码的 mRNAs,可以使用对于病毒感染来说关键的微小 RNAs 以及编码宿主因子的 mRNAs,作为反义靶。因此,这种方法不导致病毒基因组的直接破坏,而是能够抑制病毒复制和 / 或基因表达,并最终导致病毒基因组从细胞中清除。此外,靶向编码抑制宿主免疫应答所必需的蛋白的病毒 mRNAs,可以通过宿主免疫系统增强病毒的消除。靶向抑制宿主细胞凋亡所必需的病毒基因产物,可以导致被感染细胞的提前死亡并因此消除病毒感染,而靶向潜伏病毒的维持所必需的病毒基因产物 (mRNAs,或在某些情况下微小 RNAs),可以导致消除被潜伏感染的细胞,并从被感染生物体中除去潜伏病毒。

[0008] 反转录病毒不具有 DNA 基因组,但是在它们感染的第一阶段,它们合成了它们的基因组 RNA 的 cDNA 拷贝,然后将其整合到细胞 DNA 中,从而变成了宿主基因组的一部分 (所

谓的原病毒 DNA)。该 DNA 通常在转录上是沉默的,携带这些原病毒的细胞不能被常规的抗病毒剂或系统被靶向(这是抗 HIV 疗法中的最大难题之一)。尽管原病毒不能通过反义技术被靶向或消除,但感染过程的某些步骤却能。这些步骤包括:在反转录反应发生之前,靶向新被感染细胞中的病毒基因组——在该阶段中基因组 RNA 被病毒蛋白包封在“核心”粒子中;靶向病毒受体或共同受体(在 HIV 的情况中是趋化因子受体)以阻止病毒进入;靶向病毒 cDNA 核运输和整合到宿主基因组中所必需的细胞辅因子(对于 HIV-1 来说许多这样的因子是已知的);靶向从原病毒表达的 mRNAs,从而抑制反转录病毒复制周期;在病毒基因组 RNAs 包衣壳之前靶向它们,并阻止新的病毒粒子的形成。这些策略对于抑制 HIV 基因组可能是有效的,该基因组编码了多个调控蛋白,它们的表达可以被阻断。

[0009] 核糖核酸病毒(具有 RNA 基因组的病毒)的基因组可以用序列特异性抗 RNA 药剂直接靶向。因此由核糖核酸病毒引起的感染可以通过单独使用这些种类的药物完全消除。但是,在实践中,基因组的靶向可能是复杂的,因为病毒基因组通常是受保护的;但即使这样,病毒 mRNAs 和病毒所必需的细胞辅因子的 mRNAs,仍然可以被靶向。

[0010] 具有双链 RNA 基因组的病毒的基因组 RNA,总是包装在蛋白粒子(病毒核心)中,从不释放到被感染细胞的细胞质中。因此,很可能只有 mRNAs 和宿主因子可以用抗 RNA 药剂靶向。具有单链负链 RNA 基因组的病毒的基因组,总是受到病毒核蛋白的保护,但是它不形成特定的核心-粒子。因此,靶向病毒基因组以及它们的必需 mRNAs 二者,将是可能的。

[0011] 具有单链正链 RNA 基因组的病毒,是其中基因组 RNA 被直接用作 mRNA,并且至少在感染的某些阶段采取裸露(未受保护)形式的唯一类型的病毒。但是,在复制过程中,基因组及其互补链通常包装在膜状结构中。因此,可能感染的初始阶段(在复制酶复合物形成之前)可能对 RNA 降解剂更敏感。除了病毒靶的本性(基因组, mRNA, 或二者)之外,其他因素也可能具有非常重要的作用。

[0012] 如果抗病毒剂局限于单一作用,例如阻断一种 RNA 分子(反义寡核苷酸)或切开仅仅一种 RNA 分子(使用抗病毒核酶时通常是这种情况),那么靶 RNA 的丰度是特别重要的。病毒 RNA 的丰度随着病毒的类型和感染阶段变化极大。据假定,在病毒 RNA(基因组或 mRNAs)的拷贝数低的感染阶段(这典型对应于感染的早期阶段),反义剂更加有效。

[0013] 靶的极性对于正义核糖核酸病毒的抑制是重要的,这些病毒具有高度不对称的 RNA 合成,例如,这些病毒的正(基因组)链数量通常比负链数量高 100 倍或以上。这将使负链成为优选的靶,但是,已知这些病毒的负链通常(可能总是)以双链 RNA 中间体的形式存在,并隐藏在膜状复制复合物中。因此,重要的是确定所提出的抗病毒剂是否也结合 dsRNA 复合物(在使用 RNAi 的实验中已报道了负链的特异性降解)。

[0014] 病毒在受感染细胞内部的复制位点取决于病毒的类型,可以在核(反转录病毒,大多数 DNA 病毒和流感病毒)或细胞质(除了流感病毒、玻纳病毒属和胞核弹状病毒属以及 DNA 基因组的痘病毒之外的所有核糖核酸病毒)中进行。对于在细胞质内复制的病毒来说,观察到了不同的病毒特异性结构(通常称为“病毒工厂”或“病毒发生基质”)。在理论上,特定位点(例如核、膜复合物和“病毒工厂”)的用处可以保护病毒基因组不受治疗药剂影响;然而,已报道至少 RNAi 具有抗核 RNA 分子的活性。因此,病毒复制复合物的细胞内定位的重要性可能具有相对次要的影响,特别是如果纳入以下考虑因素:所有病毒使用游离 mRNAs 来表达它们的基因,因此具有能够被 RNA 降解剂靶向的分子,并且所有的正链 RNA 病

毒（其基因组可以被容易地靶向的唯一类型的病毒）都在细胞质中复制。

[0015] 病毒在受感染生物体内复制的位点可能具有大得多的影响。同样，复制位点取决于病毒的类型。大多数病毒具有一定的组织特异性——某些病毒感染上皮细胞，某些病毒感染肝细胞等。许多病毒感染不同的细胞类型。感染可以从外周组织（侵入口）开始，但是疾病由在其他细胞类型（靶细胞）中的复制引起。有许多病毒这两种细胞是完全不同的（麻疹病毒等），但是也有许多例子这些细胞是相同的（流感病毒）。

[0016] 生物体内不同复制位点的结果是不同的。如果病毒在上皮组织（肠上皮细胞，呼吸道）中复制，药物投送方法可以相对简单。这意味着有效但高度不稳定的化合物例如 siRNAs，可用于在体内治疗这些感染。如果病毒在上皮之外的组织中复制，至少对于 siRNA 技术来说需要特殊的药物投送系统。在 HCV 感染的情况下，治疗药剂理论上可以是表达 siRNA 前体 (shRNA) 的肝特异性纳米粒子或肝特异性病毒粒子。在瞬态模型 (transient models) 中，将编码 shRNA 的质粒 DNA 直接注射到血流中，也已经产生了良好结果，但由于缺乏投送特异性，这种技术的治疗性应用将很可能受限。在这些病毒中，稳定得足以通过血液投送并且安全无毒的化合物（例如短的寡核苷酸不能整合到宿主 DNA 中，一般不引起副作用），可能比 siRNA 技术更有优势。

[0017] 如果病毒在特定组织例如神经元组织中复制，可能需要另一种类型的特异性投送系统。如果病毒的靶组织是 CNS，那么也需要穿过血脑屏障的方法，例如抗病毒剂的脑内投送。

[0018] 感染人类和动物的病毒一般采用几种感染策略之一。在“一打即跑 (hit and run)”策略（急性感染）中，病毒进入宿主，快速活跃地复制，并最终被宿主的免疫应答消除；唯一的替代结果是感染宿主的死亡。感染时间典型较短（最多几周），急性感染过程中病毒量非常高。这种策略被许多“经典”病毒（例如流感病毒）采用。

[0019] 在“一打即躲 (hit and hide)”策略（潜伏感染）中，感染以上述的情景开始和发展，但是代替被完全消除的是，病毒建立起了终生的潜伏感染。在潜伏期间，病毒的基因表达最小化，不产生感染性病毒。但是，在某些条件下，病毒重新激活并引起新的疾病（与最初的疾病相同或不同）。这些类型的病毒非常常见，包括例如单纯性疱疹病毒 (HSV)。在许多情况下，由于倾向于在免疫受损患者（例如 AIDS 患者）中导致严重或致命疾病，这些病毒引起了严重问题。

[0020] “慢性”或“持续性”感染一般以短的急性阶段开始。该阶段可以是无症状的，可以以病毒的完全消除作为结束。但是结果取决于病毒和宿主两者：高达 95% 的乙肝病毒 (HBV) 感染在成年人中以病毒的消除作为结束。或者，病毒可能建立起慢性感染（例如高达 70% 的 HCV 感染和可能 100% 的 HIV 感染）。在慢性感染过程中，病毒复制保持活性（与潜伏感染中相反），可以产生大量病毒粒子（HCV 典型地每天形成多达 10¹² 个粒子）。但是，免疫系统不能消除感染。慢性病毒代表了主要的健康护理问题，因为高达 5 亿人感染有 HBV 或 HCV，大约 4 千万人感染有 HIV-1。

[0021] 消除不同类型感染需要的条件可能极为不同。对于急性疾病来说，治疗必须尽可能早地进行，并很可能相当短。在这种情况下，治疗具有明确的目标，减缓病毒的感染，给免疫系统时间来消除病毒（通过治疗完全抑制病毒可能是不可能的，在许多情况下可能也是不必要的）。还不清楚使用药剂的最低效率应该如何——在某些情况下少量抑制复制就可

以提供相当大的保护,而在其他情况下可能需要几乎彻底的抑制。

[0022] 对于潜伏病毒来说,主要问题是消除被潜伏感染的细胞——储存库,新的感染可能由此开始。目前,对病毒潜伏的机制了解得很少,这是为什么目前的疗法不能消除潜伏病毒的原因之一。理论上,这些病毒和潜伏细胞可以用针对病毒辅因子(如果它们已知的话)或针对病毒的必需基因产物的序列特异性 RNA 降解剂来靶向。例如,在 HSV 的研究中,最近已证实病毒编码的微小 RNA 可能是造成潜伏感染的主要因子,这可以为病毒复制的抑制提供理想的靶。

[0023] 对于慢性病毒来说,治疗可以旨在防止感染的扩散(例如在向 HCV 患者进行肝脏移植的情况下),以在所有或在许多细胞中消除感染,或至少将病毒的复制保持在某种控制之下。一般来说,慢性感染的治疗是长期的过程——目前对于 HIV 患者来说是终生的,对于 HBV 和 HCV 患者来说需要许多月。由于这个事实,治疗的副作用是非常重要的,正如在使用抗 HIV、HCV 和 HBV 治疗的长期效应中看到的。

[0024] 所有类型的抗病毒剂的主要问题之一是对药物具有抗性的病毒变异体的出现。这个现象背后的一般分子机制包括靶序列的缺失和靶序列的修饰(点突变,小的缺失)。在许多情况下,完整的基因或其功能可能丢失(使用阿昔洛韦的抗 HSV 疗法通常引起病毒 TK 基因的丢失)。但是,这种抗性机制只有当靶基因编码的功能对于病毒存活来说不是必需的情况下才有可能。在实际的靶之外的序列的修饰,使得它们补偿了失去的功能,促进了 RNA 构象的变化等,是抗病毒治疗一贯的问题。另一个问题是许多重要病原体在遗传上极为可变这一事实。现有的 HIV-1 基因组序列的变异性,与整个小核糖核酸病毒科中的变异性相当;HCV 基因型之间的同源性,能够低至 60%。本质上,这表明 HIV-1 和 HCV 都不代表单一的病原体;相反,它们是用于(主要由于历史原因)相关病原体类群的名称。这种巨大的多样性已经严重地阻碍了针对任何这些病毒的有效疫苗的构建。此外,HCV、HIV 以及其他核糖核酸病毒不具有这样固定的基因组序列,相反,它们具有一种共有序列(因此个体基因组一般不同),并因此作为准种(quasi-species)存在。已经显示,即使在单一患者内,每个 HCV RNAs 的序列彼此之间在 1-3% 的核苷酸位置上存在差异。因此,在任何慢性感染患者中,已经存在相当大的序列变异性。

[0025] 这些序列变异性通常来自于病毒复制和重组事件中发生的突变。病毒复制过程中发生的突变主要是由于缺乏校读功能——反转录酶(HIV-1)和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(HCV)都不能校正在病毒复制过程中发生的错误(错误率估计为每个周期每个核苷酸 10^{-4} 变化,在 HIV 和 HCV 的情况下意味着每个基因组一个变化)。与这些病毒合成的大量基因组合在一起考虑,HIV 和 HCV 能够极快地突变(据报道 HCV 的突变率比 HIV 高 100 倍)。实质上,这意味着这些病毒可以在短时间内克服任何序列特异性治疗药剂的效应。对于 HIV 来说,这种现象已经进行了最深入的研究,因为抗 HIV 疗法已经使用了将近 20 年。结果表明,为了获得任何长期效果,应该组合使用具有不同靶特异性的抑制剂(这是目前的高效抗反转录病毒疗法(Highly Active Anti Retrovirus Therapy):HAART 的原理)。但即使是这种策略,也没有阻止新的药物抗性 HIV 变异株的出现。

[0026] 病毒对基于核酸的疗法(反义寡核苷酸,核酶,siRNA 和 shRNA)的抗性现象,对于 RNAi 系统来说研究得最多。已经证实,反转录病毒(HIV)和核糖核酸病毒(HCV,脊髓灰质炎病毒)都对 RNAi 敏感,但是它们通过在 siRNA 靶位点和/或周围序列中引入突变,快速

发展出了对任何特异性 siRNA 的抗性。也已显示,抗性总是与特异性靶序列相关,而不是与对 RNAi 本身的不敏感性相关。发展出对 siRNAs 的抗性显然相当容易,因为 siRNA 应当与靶具有 100% 的匹配(微小 RNA 耐受几个改变,但是是效率低得多的沉默子)。此外,由于遗传密码的冗余性,核酸序列可以改变而不影响编码的蛋白的序列。病毒蛋白具有相当大的可塑性——可以耐受许多氨基酸的改变(这也可以从关于抗 HIV 药物抗性的数据中找到证据)。改变不仅能够影响 RNA 序列,而且能够影响其二级结构,从而抑制了它被 siRNA 识别。

[0027] 有两种通用方法可用于避免(或最小化)抗性病毒基因组的出现。与 HAART 疗法相似,可以使用几种 siRNAs(或 siRNAs 与其他抑制剂例如核酶的组合)来治疗病毒感染。已经显示,这种治疗比使用单一 siRNA 的治疗更为有效,并显著减少了抗性突变株的出现。因此,对于其他基于核酸的治疗性药剂,也应该强烈推荐类似的策略。

[0028] 可以将 siRNAs 靶向高度保守的序列或具有多个重叠功能的序列。这样的序列不容易被改变而不影响关键功能。这种序列的例子是 HIV-1 基因组中的引物结合区,或 HCV 基因组中带有 IRES 元件的 5' UTR 区。

[0029] 发明概述

[0030] 本发明涉及含有寡核苷酸的组合物,其中所述寡核苷酸含有修饰的核碱基和任选的整合性部分,这增加了它们与互补核酸的结合能力,并表现出抗病毒活性。

[0031] 一方面,本发明提供了在对象中抑制病毒复制的方法,包括向对象施用 5 到 150 个核碱基的寡核苷酸,其中至少一个核碱基是巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)或羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基)。

[0032] 另一方面,本发明考虑到了抑制靶核酸的翻译的方法,包括将靶核酸与含有具有 5 到 150 个核碱基的寡核苷酸的组合物,在允许寡核苷酸与靶核酸杂交的条件下接触,其中杂交的寡核苷酸抑制了靶核酸的翻译,其中靶核酸与病毒复制相关,并且其中寡核苷酸含有至少一个修饰的核碱基,所述碱基选自巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)和羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基)。

[0033] 另一方面,本发明提供了在对象或病毒病原体中抑制病毒基因组的复制的方法,包括预测或测定对象中靶核酸的核苷酸序列,其中靶核酸与病毒复制相关,以及向对象施用含有 5 到 150 个核碱基的寡核苷酸的组合物,其中至少一个核碱基是巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)或羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基),并且其中在对象的生理条件下,所述化合物与靶序列的核苷酸序列充分互补,以便在对象中与其杂交并抑制病毒复制。

[0034] 本发明还考虑到了使用寡核苷酸在对象中抑制病毒复制,其中寡核苷酸被配制成用于向对象施用,并含有 5 到 150 个核碱基,其中至少一个核碱基是巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)或羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基)。

[0035] 在相关方面,本发明提供了寡核苷酸在制造抑制靶核酸翻译的药物中的应用,其中将靶核酸与含有寡核苷酸的组合物在允许寡核苷酸与靶核酸杂交的条件下接触,其中杂交的寡核苷酸抑制了靶核酸的翻译,其中靶核酸与病毒复制相关,并且其中寡核苷酸含有至少一个修饰的核碱基,所述核碱基选自巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)和羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基)。

[0036] 另一方面,本发明提供了寡核苷酸在制造在对象中抑制病毒基因组复制的药物中的应用,所述应用包括预测或测定对象或病毒病原体中靶核酸的核苷酸序列,其中靶核酸与病毒复制相关,以及向对象施用含有具有 5 到 150 个核碱基的寡核苷酸的药物,其中至少一个核碱基是巯基修饰的互变异构或离子型碱基(巯基核碱基)或羟基修饰的互变异构或离子型碱基(羟基核碱基),并且其中在对象的生理条件下,所述化合物与靶序列的核苷酸序列充分互补,以便在对象中与其杂交并抑制病毒复制。

[0037] 在一个实施方案中,可用于本发明的方法或应用或化合物中的寡核苷酸包含至少一个巯基核碱基。在相关实施方案中,巯基核碱基选自 5-巯基胞嘧啶、5-巯基尿嘧啶、8-巯基鸟嘌呤和 8-巯基腺嘌呤。在相关实施方案中,本发明包含至少一个羟基核碱基。在其他实施方案中,羟基核碱基选自 5-羟基胞嘧啶、5-羟基尿嘧啶、8-羟基腺嘌呤和 8-羟基鸟嘌呤。

[0038] 一方面,寡核苷酸还包含与其连接的有机核酸酶。在一个实施方案中,有机核酸酶包含与镧系金属复合的螯合性有机部分。在优选实施方案中,镧系金属选自镧、铈、镨、钕、钐、铕、钆、铽、镱、镱、铟和铊。

[0039] 另一方面,本文描述的寡核苷酸可用于抑制各种不同病毒株的复制。在一个实施方案中,病毒是正链 RNA 病毒。在相关实施方案中,病毒是 DNA 病毒。

[0040] 在另一个实施方案中,病毒是快速急性病毒。在相关实施方案中,快速急性病毒是甲病毒。

[0041] 在另一个实施方案中,病毒是慢性病毒。在相关实施方案中,慢性病毒是丙型肝炎病毒。

[0042] 在另一个实施方案中,病毒是乳头瘤病毒。在相关实施方案中,乳头瘤病毒选自 1 型牛乳头瘤病毒和人乳头瘤病毒。

[0043] 在上面考虑到的方法或应用的一个实施方案中,寡核苷酸与编码转录或调控因子的病毒基因杂交,抑制了具有 DNA 基因组的病毒的复制。在相关实施方案中,寡核苷酸与病毒复制因子杂交,抑制了具有 DNA 基因组的病毒的复制。

[0044] 在另一个实施方案中,寡核苷酸与在其复制周期中使用反转录的病毒杂交。在另一个实施方案中,寡核苷酸与编码转录或调控因子的病毒基因杂交,抑制了利用反转录进行复制的病毒的复制。在优选实施方案中,使用反转录的病毒是反转录病毒。在更优选实施方案中,反转录病毒是人类 1 型免疫缺陷病毒。

[0045] 在相关实施方案中,寡核苷酸与宿主的与病毒复制相关的因子杂交并抑制病毒复制。在另一个实施方案中,寡核苷酸可用于处理未被感染的细胞,以便在这些细胞中减少病毒基因的表达和复制。

[0046] 考虑到了可用于本发明方法的寡核苷酸,其长度为 5 到 150 个核碱基,长度为 10 到 100 个核碱基,长度为 10 到 50 个核碱基,长度为 10 到 30 个核碱基,长度为 20 到 30 个核碱基,长度为或 21 到 23 个核碱基。对于本发明的实践来说,从 5 到 150 个核碱基内所有的整数长度,以及 5 到 150 个核碱基内的子范围,都被具体地考虑到了。

[0047] 此外,考虑到了在修饰的寡核苷酸中 1% 到 100% 的核碱基是修饰的核碱基。在一个实施方案中,10% 到 90% 的核碱基是修饰的核碱基。在相关实施方案中,20% 到 80% 的核碱基是修饰的核碱基。在其他实施方案中,30% 到 70%、40% 到 60% 或 50% 的核碱基是

修饰的核碱基。在其他实施方案中,10、20、30、40、50、60、70、80 或 90% 的核碱基是修饰的核碱基。

[0048] 在相关实施方案中,寡核苷酸包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、多达 30、多达 40、多达 50、多达 100 个或以上修饰的核碱基,其中修饰的核碱基是羟基核碱基或巯基核碱基。例如,考虑到了 150 个碱基的寡核苷酸整体可以全部包含修饰的寡核苷酸。

[0049] 在本发明的实施方案中,寡核苷酸与病毒基因组的非编码区杂交,或与病毒基因组的编码区杂交。在相关实施方案中,寡核苷酸与 RNA 病毒的编码区杂交。

[0050] 一方面,本发明的方法或应用或化合物还提供了将至少两种具有不同序列的寡核苷酸施用于对象,其中所述寡核苷酸与不同的靶序列杂交。本发明还提供了使用至少两种具有不同序列的寡核苷酸来制造用于向对象施用的药物,其中所述寡核苷酸与不同的靶序列杂交。在一个实施方案中,两种不同的寡核苷酸被施用于对象。在另一个实施方案中,所述寡核苷酸特异性针对同一个病毒基因组中的不同靶序列。在另一个实施方案中,寡核苷酸特异性针对同一个功能单位中的靶序列。在另一个实施方案中,寡核苷酸特异性针对不同功能单位中的靶序列。

[0051] 还考虑到了组合物还含有本文描述的药物载体或赋形剂。

[0052] 在一个实施方案中,对象是哺乳动物。在相关实施方案中,对象是人类。

[0053] 一方面,用于本发明的方法或应用或化合物的组合物在脂质体中施用。在相关实施方案中,组合物可以在纳米颗粒药物中施用,例如微胶粒或纳米粒子。

[0054] 考虑到了寡核苷酸与靶序列的杂交诱导了靶核酸的切开。

[0055] 在一个实施方案中,寡核苷酸表现出与靶核酸至少 70% 的同源性。在相关实施方案中,寡核苷酸与靶核酸 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同源。

[0056] 除了上述之外,作为附加的方面,本发明包括了以任何方式在范围上比上面具体提到的变体更窄的本发明的所有实施方案。例如,尽管出于简要的目的已经参考类属或值的范围描述了本发明的方面,但应该理解,类属的每个成员和范围内的每个值或子范围,都意图作为本发明的方面。同样地,本发明的各种不同方面和特点可以组合,产生的附加方面也打算处于本发明的范围之内。

[0057] 以不包括数量词的单数形式描述的本发明的方面,应该被理解为包括了包含一或一以上的实施方案,除非上下文明显需要较狭义的解释。术语“包含”意在允许有附加的要素或特点。

[0058] 尽管申请人发明了本文随附的权利要求书的整个范围,但本文随附的权利要求书不打算在其范围内包含其他人的现有技术的工作。因此,在专利局或其他团体或个人就权利要求范围内法定的现有技术提请申请人注意的情况下,申请人保留在可适用专利法规下行使修改权来重新限定所述权利要求书的主题内容,以便从这样的权利要求的范围内具体排除这些法定现有技术或法定现有技术的明显变体的权利。由这样的修改的权利要求书限定的本发明的变体也打算作为本发明的方面。

[0059] 附图简述

[0060] 图 1 显示了通过靶向 E2mRNA 的反义修饰寡核苷酸抑制含有 BPV 原点的质粒的 E2

依赖性复制。

[0061] 图 2 描述了带有修饰的 5-OH-dC 碱基的反义寡核苷酸对重组病毒的复制的影响。重组病毒复制的抑制通过测量从病毒的基因组 RNA 表达的 Rluc 活性来监测。LF- 脂质转染胺 (lipofectamine) 处理的对照细胞。图中显示了来自可重复的实验之一的结果。

[0062] 图 3 显示了核酸酶复合物对带有修饰的 8-oxo-dG 碱基的寡核苷酸的抗病毒效应的附加效应。重组病毒复制的抑制通过测量从病毒的基因组 RNA 表达的 Rluc 活性来监测。

[0063] 图 4 证明了核酸酶 (命名为 HMO_9E 的化合物) 的存在引起的对 HMO_9 的有效剂量 50 (EC50) 的降低。

[0064] 发明详述

[0065] 本发明涉及含有一个或多个修饰碱基的寡核苷酸的应用,所述寡核苷酸可以任选地与有机核酸酶复合物连接,用于抑制对人类和动物致病的病毒的复制和 / 或基因表达。

[0066] 本发明提供了含有整合性部分和寡核苷酸的化合物,所述寡核苷酸具有用于反义抑制病毒基因表达和 / 或复制的性质。本发明的化合物包含反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸具有 (a) 一个或多个与天然核碱基具有高结合效率的修饰的核碱基,以及任选的 (b) 一个整合性部分。这些化合物可以水解寡核苷酸、RNA 和 / 或 DNA 的磷酸二酯键,可用于反义疗法中。

[0067] 病毒靶

[0068] 下面描述了重要的病毒病原体的例子,它们属于不同的系统类型、利用不同的复制策略和不同的靶组织,并描述了针对这些病毒的抗病毒疗法所具有的问题。

[0069] AIDS (获得性免疫缺陷综合征) 由人类免疫缺陷病毒 (HIV) 引起。通过杀死或损伤身体免疫系统的细胞, HIV 逐步破坏身体对抗感染和某些癌症的能力。目前,全世界大约有四千二百万人携带 HIV/AIDS。2002 年,总共有三百一十万人死于 HIV/AIDS 相关原因。抗 HIV 药物疗法的最终目标是阻止病毒增殖和破坏免疫系统。尽管在过去的 15 年,在对抗 HIV 的战斗中已经取得了显著的进展,但医学仍无法治愈。今天,医生们已经拥有属于三种不同药物类别的超过十几种抗反转录病毒药剂用于控制疾病。典型情况下,来自两种或三种类别的药物以各种不同的组合开出处方,这被称为 HAART (高效抗反转录病毒治疗)。HAART 疗法典型地包含两种核苷反转录酶抑制剂药物以及第三种药物,该第三种药物是蛋白酶抑制剂或非核苷类反转录酶抑制剂。临床研究显示, HAART 是降低病毒载量和最小化药物抗性的可能性的最有效手段。

[0070] 对于开发其他有效对抗 HIV 的抗病毒药剂,这些药剂通过病毒还未发展出抗性的其他作用机制发挥作用,存在着极大的需求。这正变得尤其重要,因为最近的数据显示,在欧洲,在每 10 个新诊断出带有 HIV 的患者中,就有 1 个感染有已经对市场上至少一种批准的药物具有抗性的 HIV 株。

[0071] 丙型肝炎病毒 (HCV) 感染是美国最常见的慢性血源性感染,受感染的患者数量可能超过 4 百万,全世界可能超过 1 亿 5 千万。这种常见的病毒感染是肝硬化和肝癌的主要病因,目前在美国是肝脏移植的主要原因。从感染复原是罕见的,大约 85% 受感染的患者变成病毒的慢性携带者,10 到 20% 发展成肝硬化。据估计,目前全世界有 1 亿 7 千万人是慢性携带者。按照疾病控制和预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention) 的说法,仅在美国,慢性丙型肝炎每年就引起 8,000 到 10,000 例死亡,并导致大约 1,000 例

肝脏移植。丙型肝炎没有疫苗可用。使用 α -干扰素或干扰素与利巴韦林的组合的长期疗法,仅在大约 40% 的患者中有效,并引起严重的副作用。

[0072] 在这个家族中存在一百多种人类感染性病毒(人类乳头瘤病毒,HPVs)。HPV 引起良性皮肤疣,或乳头瘤。许多 HPVs 通过性接触传播。生殖器 HPV 感染非常常见,估算推测高达 75% 的女性在成年期的某些时间点,将被一种或多种性传播类型的 HPV 感染。“高风险”性传播 HPVs (HPV-16、-18 以及某些其他的 HPVs) 的持续感染,可能导致宫颈癌的发生。因此 HPVs 在医学上是重要的(高达 500,000 个癌症病例/年)。在 2006/2007 年,针对四种最流行的 HPV 种的有效疫苗已经可用,但是许多 HPV 株和种没有被这些疫苗覆盖。

[0073] 甲病毒是主要引起急性感染的病毒的代表。该属中有 10 个以上的成员是已知的人类病原体。它们通常分布广泛,但它们的医学重要性被认为是中等的,因此,没有有效的用于人类的抗甲病毒疫苗。在留尼汪岛(Reunion Island)和印度的基孔肯雅病毒(Chikungunya virus)的强烈爆发,彻底改变了这种观点。据估计,仅在留尼汪岛,由基孔肯雅病毒引起的全部经济损失将超过 1 亿欧元(235,000 例感染,大约 200 个死亡病例),而该病毒在印度引起的损害,达到了国家医疗灾难的程度(据估计高达 6 百万例感染)。基孔肯雅病毒仍在快速传播,在 2007 年底,首次在欧洲(意大利)探查到了蚊媒性爆发。考虑到由甲病毒引起的爆发的不可预测性,大规模预防接种似乎是不现实的,因为无法预测哪些病毒将出现,以及下次爆发将在何处发生。相反,理想地有效对抗许多种甲病毒的抗病毒疗法,将更为有用。

[0074] 上面列举的病毒仅仅代表了已知的人类和家畜病毒病原体的一部分,但是它们基本上覆盖了所有种类的不同病毒基因组类型(DNA、RNA、反转录病毒);靶组织(上皮、免疫系统、肝特异性和具有广范围靶细胞的病毒)和复制位点(细胞质或核),特异性和感染类型(急性、慢性或潜伏)。这些病毒也代表了引起细胞死亡(甲病毒, HIV)、没有明显的细胞损伤(HCV)或细胞转化(乳头瘤病毒)的典型病毒。因此,通过研究这些代表性病毒所获得的数据,能够扩展到所有已知类型的人类和动物病毒病原体。

[0075] 显然,对于任何正开发的新出现的抗病毒药物来说,合并下列三个特点将是非常理想的:(1)改进的功效;(2)降低的副作用风险,以及(3)病毒难以通过突变来克服的作用机制。

[0076] 已经进行了通过各种不同的反义手段抑制特定病毒的尝试。

[0077] Zamecnik 等已经使用了特异性靶向反转录酶引物位点和剪接供体/受体位点的寡核苷酸(ONs)(Zamecnik 等, (1986)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-) (Goodchild & Zamecnik(1989), 美国专利 No. 4, 806, 463)。

[0078] Anderson 等(1997)(美国专利 No. 5, 591, 720)报道了靶向 CMV(巨细胞病毒)编码 IE1、IE2 或 DNA 聚合酶的 mRNAs 的寡核苷酸或寡核苷酸类似物。

[0079] Hanecak 等(1999)(美国专利 No. 5, 952, 490)描述了具有保守的 G 四重体序列和足够数量的侧翼核苷酸的修饰的寡核苷酸,它显著抑制了病毒例如 HSV-1(单纯性疱疹病毒)的活性。

[0080] Qi 等(中华实验和临床病毒学杂志(Zhonghua Shi Yan He LinChuang Bing Du Xue Za Zhi)(2000)14:253-256)报道了在科赛奇病毒 B3 中测试反义硫代磷酸酯寡核苷酸(PS-ONs)。

[0081] 国际公布 WO 9203051 (Roizman 和 Maxwell) 描述了与 HSV 病毒基因组的生命区域或其 mRNA 转录本互补的甲基磷酸酯反义寡聚体,它表现出抗病毒活性。

[0082] 已报道鸟苷 / 胸苷或富含鸟苷的硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸 (GT-PS-ONs) 具有抗病毒活性。该研究报告,“几种长度均为 26 或 27nt 的不同的含有 PS 的富含 GT 的 ONs (B106-140, 1100-12 和 G106-57), 在降低 HIV-2 滴度方面与 36 个 (B106-96, B106-97) 或 45 个 nt 组成的富含 GT 的 ONs 同样有效 (表 4)。”(Fennewald 等, Antiviral Res. (1995) 26 : 37-54)。

[0083] Cohen 等 (美国专利 Nos. 5, 264, 423 和 5, 276, 019) 描述了 HIV 复制的抑制,更具体来说涉及 PS-ODN (寡脱氧核苷酸) 类似物,其能够用于在正常活细胞的存在下阻止外来核酸的复制。Cohen 等描述了特异性针对病毒序列的反义 PS-ODNs 的抗病毒活性。他们也描述了 14、18、21 和 28-mers 的 polyA、polyT 和 polyC PS-ODN 序列的试验,并显示了这些 PS-ODNs 的抗病毒效应。

[0084] Gao 等 ((1989) J Biol Chem 264 :11521-11526) 描述了通过对尺寸为 7、15、21 和 28 个核苷酸的 polyA、polyT 和 polyC PS-ODN 序列进行试验,用 PS-ODNs 抑制 HSV-2 的复制。

[0085] Stein 和 Cheng (Stein 等, (1993) Science 261 :1004-1012) 讨论了 28 个核苷酸的非特异性 ODNs 的抗病毒活性,指出了“PS 寡聚物的抗 HIV 性质受到非序列特异性效应的显著影响,也就是说,抑制效应不依赖于碱基序列。”

[0086] 在综述文章中,Lebedeva 和 Stein (Lebedeva 等, (2001) Annul Rev Pharmacol 41 : 403-419) 报道了 PS-ODNs 的各种非特异性蛋白结合活性,包括病毒蛋白。他们指出,“这些分子具有高度生物活性,通常相当容易地误解成反义的假象。”

[0087] Rein 等 (美国专利 No. 6, 316, 190) 报道了与融合配偶体相连并与 HIV 核衣壳结合的富含 GT 的 ON 诱饵 (decoy), 可用作抗病毒化合物。同样地, Campbell 等 (Campbell 等, (1999) J. Virol. 73 :2270-2279) 报道了具有 TGTGT 基序的 PO-ODN, TGTGT 基序与 HIV 的核衣壳特异性结合,但是没有提到抗病毒活性。

[0088] 被开发用作抗癌剂、抗病毒剂或用于治疗其他疾病的反义 ODNs, 典型长度为大约 20 个核苷酸。在综述文章中 (Stein, C A, (2001) J. Clin. Invest. 108 :641-644), 肯定了“反义寡核苷酸的长度必须被最优化:如果反义寡核苷酸太长或太短,将失去特异性的要素。目前,反义寡核苷酸的最适长度看来是大约 16-20 个核苷酸”。同样地,在另一篇综述文章中 (Crooke, S T (2000) Methods Enzymol. 313 :3-45), 指出了“与 RNA 和 RNA 双链体形成相比,硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸具有每个单位低大约 -2.2°C 的 T_m 。这意味着为了在体外有效,硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸的长度典型必须为 17- 到 -20-mer.....”。

[0089] Caruthers 和同事 (Marshall 等, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :6265-6269) 就 12-mer 的聚胞苷-PS2-ODN 和 14-mer 的 PS2-ODN 报道了二硫代磷酸酯 ODNs (PS2-ODNs) 的抗 HIV 活性。没有试验其他尺寸的抗 HIV 活性。他们也报道了 12-、14-、20- 和 28-mer 的聚胞苷-PS2-ODNs 的抑制 HIV 反转录酶 (RT)。后来,该团队 (Marshall 等, (1993) Science 259 :1564-1570) 报道的结果显示了 HIV RT 的序列特异性抑制。同一个团队在几篇专利中公布了 PS2-ODNs 的数据。在美国专利 Nos. 5, 218, 103 和 5, 684, 148 中,描述了 PS2-ODN 的结构和合成。在美国专利 Nos. 5, 452, 496、5, 278, 302 和 5, 695, 979 中,描述了不长于 15 个

碱基的 PS2-ODNs 对 HIV RT 的抑制。在美国专利 Nos. 5, 750, 666 和 5, 602, 244 中, 描述了 PS2-ODNs 的反义活性。所有出版物在此以其全文引为参考。

[0090] 已经评估了在核糖的 2' 位处修饰的寡核苷酸及其在反义策略中的应用, 例如在下面引用的参考文献中描述的。

[0091] Inoue 和同事 (Inoue 等, (1985) *Nucleic Acids Res.* 16 :165168) 描述了寡聚物 (2'-O- 甲基核糖核苷酸) 的合成和性质。同一个团队 (Inoue 等, (1987) *FEBS Letter* 215 : 327-330) 报道了当寡核苷酸含有的全部是 2'-O- 甲基核糖核苷酸时, 没有发生 RNase H 介导的 mRNA 切开。使用混合的寡核苷酸, 即含有未修饰和 2'-O- 甲基核糖核苷酸的寡核苷酸, Inoue 报道了由 RNA 和 2'-O- 甲基核糖核苷酸形成的核酸复合物的序列特异性 RNase H 水解。

[0092] 不支持 RNase H 介导的靶 mRNA 切开的全 2'-O- 甲基化和硫代磷酸酯化的寡核苷酸, 被用于确定活性反义寡核苷酸是否通过 RNase H 依赖性机制抑制 ICAM-1 的表达 (Chiang 等, (1991) *J. Biol. Chem.* 266 :18162-18171)。他们指出, 这些反义寡核苷酸可能可用作治疗药剂。

[0093] 分析了具有 2'-糖修饰、包括 2'-O- 甲基、2'-O- 丙基、2'-O- 戊基和 2'- 氟的寡核苷酸的反义活性。统一 2'- 修饰的寡核苷酸的反义活性评估, 揭示出这些化合物对于抑制基因表达来说完全无效。如果化合物含有一段至少 5 个 2'- 脱氧核糖核苷酸残基, 则活性得到恢复。该最小脱氧核糖核苷酸长度与体外 RNase H 有效活化所需的最小长度全然相关 (Monia 等, 1993, *J. Biol. Chem.* 268 :14514.)。

[0094] Yu 等 ((1996) *Bioorganic. Med. Chem.* 4 :1685-1692) 报道了具有硫代磷酸酯、磷酸二酯或带有一部分 2'-O 甲基修饰的糖的混合骨架的杂合反义寡核苷酸, 通过 p24ELISA 定量来测量, 具有特异性抗 HIV 活性。

[0095] Agrawal ((1999) *Biochem. Biophys. Acta* 1489 :53-68) 的综述文章建议, 为了优化活性, 反义寡核苷酸应该具有各种不同性质的组合, 而不只是对核酸酶的稳定性增加或对靶 RNA 的高亲和性。这样的性质包括 RNase H 活化。在后来的综述中, Agrawal 和 Kandimalla ((2000) *Mol. Med. Today* 6 :72-81) 叙述了包含 2'-O- 甲基修饰的混合骨架寡核苷酸, 由于它们的改进的性质、包括 RNase H 活化, 已经成为第二代反义寡核苷酸的选择。反义寡聚物应该具有某些重要的特性, 例如与靶 RNA 结合后活化 RNase H 的能力。 (Agrawal 和 Kandimalla, 2001, *Current Cancer Drug Target* 1 :197-209)。对于大多数反义方法来说, 为了增加反义效力, 通过 RNase H 的定向 RNA 切开是理想的。 (Kurreck, 2003, *Eur. J. Biochem.* 270 :1628-1644)。

[0096] 许多研究描述了在反义寡核苷酸中使用 2'-O- 甲氧基乙基修饰。一个例子是在 Zellweger 等 ((2001) *J. Pharmacol. Experimental Therapeutics* 298 :934-940) 中描述的使用有缺口的 2'- 修饰的寡核苷酸反义的研究。另一个例子显示了使用 RNase H 不依赖性 2'-O- 甲氧基乙基反义对形成翻译起始复合物的抑制。 (Baker 等, (1997) *J. Biol. Chem.* 272 :1994-2000)。

[0097] Kuwasaki 等, (2003) *J. Antimicrob. Chemother.* 51 :813-819, 描述了高核酸酶抗性的二聚发夹鸟苷四链体的设计, 它在核苷上含有 2'-O- 甲基基团, 在核苷间键上含有硫基团, 并描述了它在培养细胞中的抗 HIV-1 活性。

[0098] Mou 和 Gray (2002) (Nucleic Acids Res. 30 :749-758) 指出, 与典型的硫代磷酸酯-DNA 寡聚物相比, 添加 2'-O- 甲基修饰降低了非特异性蛋白结合性质。对于 36-mer 的寡核苷酸来说, g5p 的蛋白结合亲和性按照 $dA_{36} < rA_{36} < 2'-O-MeA_{36} < S-rA_{36} < S-2'-O-Me-A_{36} < S-dA_{36}$ (其中 d = 脱氧, r = 核糖, 2'-O-Me = 2'-O- 甲基, S = 硫代磷酸酯) 的次序增加。该次序与 Kandimalla 等 ((1998) Bioorganic Med Chem Lett. 8 : 2103-2108) 中报道的这些寡聚物修饰对血浆蛋白例如人血清白蛋白、 γ -球蛋白和纤维蛋白原的非特异性结合的次序 $S-RNA < S-2'-O-MeRNA < S-DNA$ 相一致。

[0099] 在本技术领域中还存在着另外的知识, 涉及与寡核苷酸类似但是具有不同作用机制的药剂的使用, 这些药剂包括小干扰 RNAs (siRNAs)、它们的前体和类似物, 以及被设计用于特异性结合和切开靶核酸的核酶。

[0100] 考虑用于本发明的靶病毒包括但不限于引起急性感染的正链 RNA 病毒 (例如塞姆利基森林病毒 (Semliki Forest virus), SFV, 甲病毒属, 披膜病毒科 (Togaviridae))、引起慢性感染的正链 RNA 病毒 (例如丙型肝炎病毒, HCV, 丙型肝炎病毒属 (Hepacivirus), 黄病毒科 (Flaviviridae))、引起急性感染以及长期持续的慢性疾病的反转录病毒 (例如人类 1 型免疫缺陷病毒, HIV-1, 慢病毒属 (Lentivirus), 反转录病毒科 (Retroviridae)) 和具有 DNA 基因组的病毒 (例如牛 1 型乳头瘤病毒, BPV-1, 乳头瘤病毒科 (Papillomaviridae))。

[0101] 本公开证明了向感染了这些病毒、用它们的基因组转染或含有它们的基因表达单元的细胞培养物单次施用修饰的寡核苷酸, 导致了它们的基因表达和 (在 RNA 病毒和乳头瘤病毒的情况下) 复制的特异性抑制。这些效应与寡核苷酸抑制剂的量成比例, 被化合物中存在的修饰碱基的存在所增强, 并被有机核酸酶复合物的存在进一步增强。

[0102] 本公开还证明, 如果修饰的碱基从羟基核碱基变成巯基核碱基, 则抗病毒效应增加, 抑制剂的有效浓度降低。

[0103] 寡核苷酸

[0104] 在本发明的背景中, 术语“寡核苷酸”是指脱氧核糖核酸 (DNA) 的寡聚物或多聚物, 或其模拟物、嵌合体、类似物和同系物。该术语包括由天然存在的核碱基、糖和共价的核苷间 (骨架) 连键组成的寡核苷酸, 以及具有非天然存在的部分的寡核苷酸, 这些非天然存在的部分在例如与靶核酸杂交或与互补寡核苷酸相互作用时, 以与天然存在的寡核苷酸相似的方式发挥作用。这样的修饰的或取代的寡核苷酸与天然形式相比通常是优选的, 因为它们具有理想的性质, 例如增强细胞摄入、增加对靶核酸的亲和性和在核酸酶存在下的稳定性增加。

[0105] 本发明的化合物与生物学配对物 (例如 RNA 和 / 或 DNA) 结合的效率, 是通过掺入修饰的核碱基或其他具有两性离子或离子互变异构体的类似物来获得的。本发明的化合物有至少一个核碱基具有修饰的核碱基或其他具有两性离子或离子互变异构体的类似物。在优选实施方案中, 修饰的核碱基是选自 5- 羟基胞嘧啶和 8- 羟基鸟嘌呤的羟基核碱基, 或选自 5- 巯基胞嘧啶、5- 巯基尿嘧啶、8- 巯基鸟嘌呤和 8- 巯基腺嘌呤的巯基核碱基。正如在美国专利公布 US 20070259830 和 W02007/125173 中证明的, 羟基核碱基或巯基核碱基与靶核酸的核碱基之间可以发生更稳定的氢键结合, 因此可以被认为与互补核酸链更有效地结合。

[0106] 修饰的核碱基中酸性互变异构基团可以是任何其他的酸性基团, 例

如 -SH、-COOH、-SO₃H 等。

[0107] 在一个实施方案中,寡核苷酸包含 5- 羟基尿嘧啶阴离子的一种或多种互变异构形式。在另一个实施方案中,本发明的化合物包括羟基碱基 5- 羟基胞嘧啶。在另一个实施方案中,羟基碱基是 8- 羟基腺嘌呤及其阴离子的互变异构形式。本发明的另一个实施方案提供了由 8- 羟基鸟嘌呤及其阴离子的互变异构形式修饰的本发明的化合物。这些核碱基的互变异构形式在 WO 2007/125173 中更详细地描述。

[0108] 本文中考虑到的其他修饰的核碱基包括巯基修饰的核碱基。巯基修饰的嘧啶和嘌呤的合成在本技术领域是已知的(参见例如《杂环化合物化学:嘧啶》,增补本 1,第 16 册 (Chemistry of Heterocyclic Compounds: The Pyrimidines, " Supplement 1, Volume 16), D. J. Brown 主编, John Wiley & Sons, Inc., 1970, pp. 202-229; 以及 Khalyullin 等“缩合的嘌呤”(Condensed purines), Pharmaceutical Chemistry Journal, 1992, 26: 270-284)。考虑到的巯基核碱基包括 5- 巯基胞嘧啶、5- 巯基尿嘧啶、8- 巯基鸟嘌呤和 8- 巯基腺嘌呤。

[0109] 在共同拥有和共同待决的申请号 _____ (代理人案号 28113/43435A) 中,以及美国临时申请 60/985,552 中,也已考虑到了在聚合酶链反应 (PCR)、核酸杂交和 siRNA 介导的基因沉默中使用修饰的核碱基,这些申请在此以其全文引为参考。

[0110] 在本文中使用时,每个羟基核碱基当与相对的核碱基稳定地形成氢键时,被认为与该核碱基互补。因此,在某些情况下,5- 羟基尿嘧啶与腺嘌呤互补,5- 羟基胞嘧啶与鸟嘌呤互补,8- 羟基腺嘌呤与尿嘧啶和 / 或胸腺嘧啶互补,和 8- 羟基鸟嘌呤与胞嘧啶互补。羟基核碱基与靶核酸的核碱基可以发生其他稳定的氢键键合,因此羟基核碱基被认为与发生稳定的氢键键合的靶核酸的核碱基互补。

[0111] 在本发明的给定化合物中,羟基核碱基和 / 或巯基核碱基的数量,是化合物寡核苷酸部分的核碱基总数的至少 1% 直至 100%。在本发明的化合物中存在一种以上羟基核碱基或巯基核碱基的情况下,羟基核碱基或巯基核碱基可以是相同的或不同的(以不同碱基和 / 或修饰类型的任何组合)。考虑到了在本文描述的寡核苷酸中,10% 到 90%、20% 到 80%、30% 到 70%、40% 到 60% 或 50% 的核碱基是修饰的核碱基。此外,考虑到了 10、20、30、40、50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 的核碱基是修饰的核碱基。

[0112] 本发明的化合物优选包含大约 5 到大约 150 个核碱基(即从大约 5 到大约 150 个连接的核苷)。本技术领域的普通专业人员将会认识到,本发明包含了长度为 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149 和 150 个核碱基的化合物。

[0113] 在优选实施方案中,本发明的化合物长度为 10 到 100 个核碱基。本技术领域的普通专业人员将会认识到,这包含了长度为 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、

49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100 个核碱基的化合物。

[0114] 在另一个优选实施方案中,本发明的化合物长度为 10 到 50 个核碱基。本技术领域的普通专业人员将会认识到,这包含了长度为 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 个核碱基的化合物。

[0115] 在另一个优选实施方案中,本发明的化合物长度为 20 到 30 个核碱基。本技术领域的普通专业人员将会认识到,这包含了长度为 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核碱基的化合物。

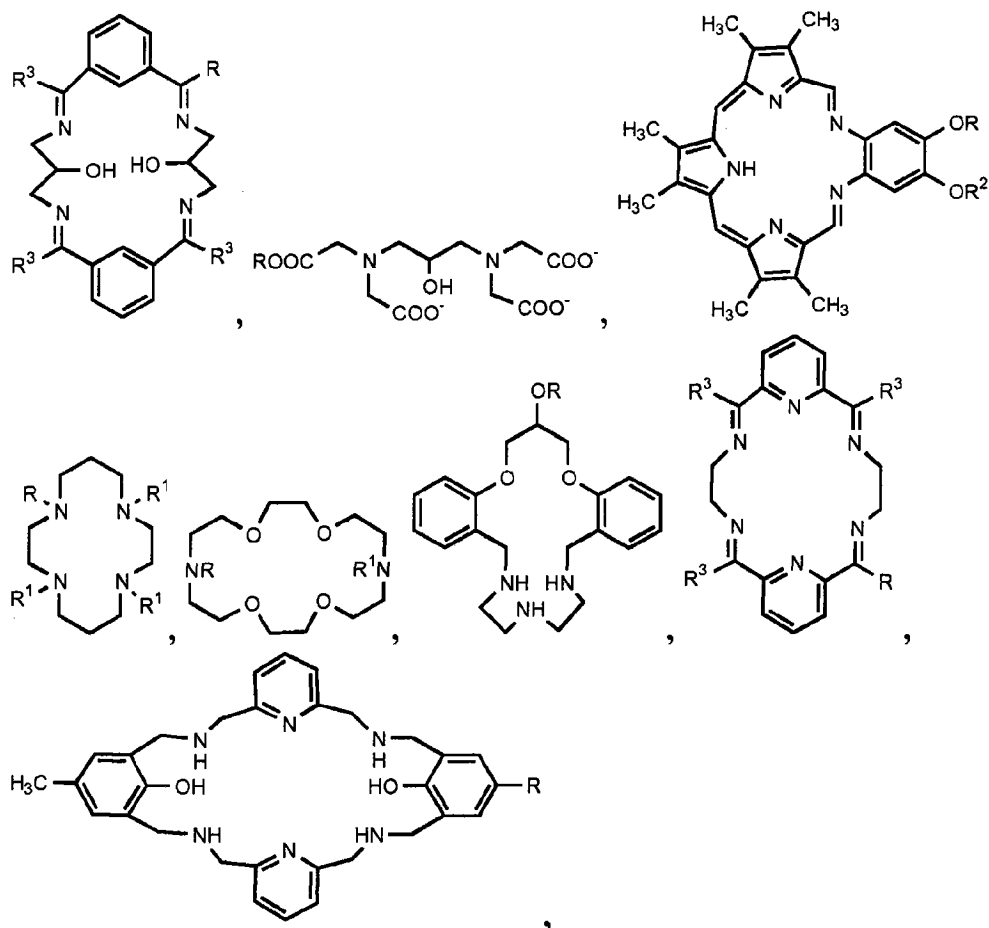
[0116] 特别优选的化合物是大约 10 到大约 50 个核碱基的寡核苷酸,更优选是含有大约 20 到大约 30 个核碱基的寡核苷酸,在样品测试中用作抗病毒剂的化合物由 21 或 23 个核碱基构成。

[0117] 正如上面陈述的,寡核苷酸可以包含 100% 修饰的核碱基。照此,依赖于寡核苷酸的长度,寡核苷酸可以包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149 或 150 个修饰的核碱基,其中修饰的碱基是巯基核碱基或羟基核碱基。

[0118] 本发明的化合物任选还包含螯合性部分。螯合性部分起到金属配体的作用。它们能够稳定地螯合金属离子。某些金属配体复合物已显示出能够有效地切开磷酸二酯键。通过在具有反义活性的寡核苷酸中引入螯合性部分,由于其降解或切开靶核酸的一个或多个磷酸二酯键的能力,增加了寡核苷酸抑制靶核酸的功效。因此,本发明的化合物进一步包含了能够螯合金属离子的螯合性部分。金属离子选自镧、铈、镨、钕、钷、钆、铽、镱、铟、铊、铋和铷。在一个方面,优选的离子是镧或镧离子。金属离子可以是任何稳定的离子,例如 +1、+2、+3、+4 或 +5 离子。优选的离子是 La(III)、Eu(III)、Ho(III) 和 Ce(IV)。

[0119] 考虑到的螯合性部分包括由下面描述的式所表示的螯合性部分:

[0120]



[0121] 其中 R 是寡核苷酸的其余部分；

[0122] R1 选自氢、C1-8 链烷、C2-8 链烯、C2-8 链炔、酰基 C1-8 链烷、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、C1-8 烷基芳基和 C1-8 烷基杂芳基；

[0123] R2 独立地选自 C1-8 烷基、C2-8 链烯、C2-8 链炔、芳基、杂芳基、C1-8 烷基芳基、C1-8 烷基杂芳基和酰基 C1-8 链烷，以及

[0124] R3 独立地选自氢、C1-8 链烷、C2-8 链烯、C2-8 链炔、酰基 C1-8 链烷、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、C1-8 烷基芳基和 C1-8 烷基杂芳基。

[0125] 术语“烷基”包括直链和支链的含有指定碳原子数的烃基，典型为甲基、乙基以及直链和支链丙基和丁基。烃基可以含有多达 16 个碳原子。术语“烷基”包括“桥接的烷基”，例如 C6-C16 双环或多环烃基，例如降冰片基、金刚烷基、双环 [2. 2. 2] 辛基、双环 [2. 2. 1] 庚基、双环 [3. 2. 1] 辛基以及十氢萘基。术语“烷基”还包括任选被例如一个或多个卤原子、一个或多个羟基或一个或多个巯基取代的烷基。术语“环烷基”被定义为环状 C3-C8 烃基，例如环丙基、环丁基、环己基和环戊基。“杂环烷基”与环烷基的定义类似，除了在环状结构中存在至少一个杂原子之外。适合的杂原子包括 N、S 和 O。

[0126] 术语“烯基”和“炔基”的定义与“烷基”相同，除了分别含有碳-碳双键或碳-碳三键之外。“环烯基”的定义与环烷基类似，除了环中存在碳-碳双键之外。

[0127] 术语“亚烷基”是指具有取代基的烷基。例如，术语“C1-3 亚烷基芳基”是指含有 1 到 3 个碳原子并被芳基取代的烷基。

[0128] 术语“卤”或“卤素”在本文中被定义为包括氟、溴、氯和碘。

[0129] 术语“芳基”，单独或组合地，在本文中被定义为单环或多环芳族基团，优选为单环或双环芳族基团，例如苯基或萘基。除非另有指明，否则“芳基”可以是未取代的或取代的，例如被一个或多个、特别是一个到三个下述基团取代：卤素、烷基、羟基、C(=O)OR、羟基烷基、烷氧基、烷氧基烷基、卤代烷基、卤代烷氧基、氰基、硝基、氨基、烷基氨基、酰基氨基、烷硫基、烷基亚硫酰基和烷基磺酰基。示例性的芳基包括苯基、萘基、四氢萘基、2-氯苯基、3-氯苯基、4-氯苯基、2-甲基苯基、4-甲氧基苯基、3-三氟甲基苯基、4-硝基苯基等。术语“芳基 C1-3 烷基”和“杂芳基 C1-3 烷基”被定义为具有 C1-3 烷基取代基的芳基或杂芳基。

[0130] 术语“杂芳基”在本文中被定义为含有一个或两个芳环的单环或双环环状系统，并在芳环中含有至少一个氮、氧或硫原子，它可以是未取代的或取代的，例如被一个或多个、特别是一个到三个取代基取代，所述取代基例如卤素、烷基、羟基、羟基烷基、烷氧基、烷氧基烷基、卤代烷基、硝基、氨基、烷基氨基、酰基氨基、烷硫基、烷基亚硫酰基和烷基磺酰基。杂芳基的例子包括噻吩基、呋喃基、吡啶基、噁唑基、喹啉基、异喹啉基、吡啶基、三唑基、异噻唑基、异噁唑基、咪唑基、苯并噻唑基、吡嗪基、嘧啶基、噻唑基和噻二唑基。

[0131] 术语“Het”被定义为含有一个或多个选自氧、氮和硫杂原子的单环、双环和三环基团。“Het”基团也可以包含与环相连的氧代基团(=O)。Het 基团的非限制性的例子包括 1,3-二氧戊环基、2-吡啶基、吡啶烷基、吡咯烷基、哌嗪基、吡咯基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、吗啉基、硫代吗啉基(thiopholinyl)、哌啶基、1,4-二噻烷基和 1,4-二噁烷。

[0132] 术语“羟基”被定义为 -OH。

[0133] 术语“烷氧基”被定义为 -OR，其中 R 是烷基。

[0134] 术语“烷氧基烷基”被定义为其中氢被烷氧基取代的烷基。术语“(烷硫基)烷基”与烷氧基烷基定义相似，除了存在硫原子而不是氧原子之外。

[0135] 术语“羟基烷基”被定义为附加到烷基上的羟基。

[0136] 术语“氨基”被定义为 -NH₂，术语“烷基氨基”被定义为 -NR₂，其中至少一个 R 是烷基，第二个 R 是烷基或氢。

[0137] 术语“酰基氨基”被定义为 RC(=O)N-，其中 R 是烷基或芳基。

[0138] 术语“烷硫基”被定义为 -SR，其中 R 是烷基。

[0139] 术语“烷基亚硫酰基”被定义为 RSO₂-，其中 R 是烷基。

[0140] 术语“烷基磺酰基”被定义为 RSO₃-，其中 R 是烷基。

[0141] 术语“硝基”被定义为 -NO₂。

[0142] 术语“三氟甲基”被定义为 -CF₃。

[0143] 术语“三氟甲氧基”被定义为 -OCF₃。

[0144] 术语“氰基”被定义为 -CN。

[0145] 根据修饰的核碱基的本质和数量，含有与金属离子络合的螯合性部分的本发明化合物的计算核酸酶效率，与天然存在的核酸酶相比增加了高达 10³-10⁹ 倍，允许相应地降低有效浓度，并在同时保持化合物的高特异性。

[0146] 还考虑到了本发明的化合物的其他修饰。尽管寡核苷酸是本发明的化合物的优选形式，但本发明包含了其他家族的化合物，包括但不限于寡核苷酸类似物和模拟物。

[0147] 其他被考虑用于本发明的组合物和方法的反义化合物，包括但不限于含有修饰的骨架(例如带有或不带有磷原子)或非天然的核苷间连键、寡聚核苷、不包含磷原子的修饰

的寡核苷酸骨架的寡核苷酸,其中骨架不包含磷原子的修饰的寡核苷酸所具有的骨架由短链烷基或环烷基核苷间连键、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连键形成(例如吗啉代连键;硅氧烷骨架;硫醚、亚砷和砷骨架;甲乙酰基(formacetyl)和硫代甲乙酰基骨架;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲乙酰基骨架;核糖乙酰骨架;含有烯的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架,以及其他具有混合的 N、O、S 和 CH_2 组成部分的骨架),具有反向的极性的寡核苷酸,任选其中核苷酸单元的糖和核苷间连键(即骨架)二者都被新的基团取代的寡核苷酸模拟物,肽核酸(PNA),在 2' 位置上具有一个或多个取代的糖部分的寡核苷酸,所述取代包括但不限于下列:OH;F;O-S- 或 N- 烷基;O-S- 或 N- 烯基;O-S- 或 N- 炔基;或 O- 烷基-O- 烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的 C_1 到 C_{10} 烷基或 C_2 到 C_{10} 烯基和炔基,锁核酸(LNAs),其中 2'-羟基连接到糖环的 3' 或 4' 碳原子上,从而形成了双环糖部分,具有合成和天然核碱基的寡核苷酸,这些核碱基包括但不限于 5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和 2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基($-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$)尿嘧啶和胞嘧啶,以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫羟基、8-硫代烷基、8-羟基和其他 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代特别是 5-溴、5-三氟甲基和其他 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和 8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤和 7-脱氮杂腺嘌呤以及 3-脱氮杂鸟嘌呤和 3-脱氮杂腺嘌呤。其他修饰的核碱基包括三环嘧啶,例如吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),G-夹(G-clamps)例如取代的吩噻嗪胞苷(例如 9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),吡唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]吡唑-2-酮),吡啶并吡唑胞苷(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。修饰的核碱基也可以包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环例如 7-脱氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤、2-氨基吡啶和 2-吡啶酮取代的核碱基,与伯或仲羟基包括但不限于螯合性部分、嵌入基团、报告分子、多胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、增强寡聚物的药效动力学性质的基团和增强寡聚物的药代动力学性质的基团化学结合的寡核苷酸。上面提出的修饰在 W02007/125173 中进一步描述。

[0148] 典型的结合基团包括胆固醇、脂类、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。在本发明的背景中增加药效学性质的基团包括改善摄入,增加对降解的抗性,和/或加强与靶核酸的序列特异性杂交的基团。

[0149] 修饰的核苷间连键(骨架)

[0150] 考虑到的可用于本发明的反义化合物的具体例子包括含有修饰的骨架或非天然核苷间连键的寡核苷酸。正如在本说明书中定义的,具有修饰骨架的寡核苷酸包括了在骨架中保留了磷原子的寡核苷酸和骨架中没有磷原子的寡核苷酸。出于本说明书的目的,以及有时在本技术领域中也这样指称,在其核苷间骨架中不具有磷原子的修饰的寡核苷酸也可以被当作是寡核苷。

[0151] 考虑到的其中含有磷原子的修饰的寡核苷酸骨架包括例如:硫代磷酸酯,手性

硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,磷酸三酯,氨基烷基磷酸三酯,甲基和其他烷基磷酸酯包括 3'-亚烷基磷酸酯、5'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯,亚磷酸酯,磷酰胺酯包括 3'-氨基磷酸酰胺酯和氨基烷基磷酸酰胺酯,硫逐磷酸酰胺酯,硫逐烷基磷酸酯,硫逐烷基磷酸三酯,硒代磷酸酯和硼代磷酸酯,它们具有正常的 3'-5' 连键,其 2'-5' 连接的类似物,以及其中一个或多个核苷酸间连键是 3' 到 3'、5' 到 5' 或 2' 到 2' 连键的极性反向的骨架。考虑到的具有反向极性的寡核苷酸,包括在最 3' 端的核苷酸间连键处的单个 3' 到 3' 连键,即单个反向的核苷残基,其可以是无碱基的(核碱基丢失或在其位置上具有羟基)。也包括了各种不同的盐、混合盐和游离酸的形式。

[0152] 讲述了上述含磷连键的制备的代表性美国专利包括但不限于 U.S. :3,687,808, 4,469,863, 4,476,301, 5,023,243, 5,177,196, 5,188,897, 5,264,423, 5,276,019, 5,278,302, 5,286,717, 5,321,131, 5,399,676, 5,405,939, 5,453,496, 5,455,233, 5,466,677, 5,476,925, 5,519,126, 5,536,821, 5,541,306, 5,550,111, 5,563,253, 5,571,799, 5,587,361, 5,194,599, 5,565,555, 5,527,899, 5,721,218, 5,672,697 和 5,625,050, 它们每个在此引为参考。

[0153] 考虑到的其中不包含磷原子的修饰的寡核苷酸骨架,具有由短链烷基或环烷基核苷间连键、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连键形成的骨架。它们包括具有吗啉代连键(一部分从核苷的糖部分形成)的骨架;硅氧烷骨架;硫醚、亚砷和砷骨架;甲乙酰基和硫代甲乙酰基骨架;亚甲基甲乙酰基和硫代甲乙酰基骨架;核糖乙酰基骨架;含有链烯的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架,以及具有混合的 N、O、S 和 CH₂ 组成部分的其他骨架。

[0154] 讲述了上述寡核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于 U.S. :5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,214,134, 5,216,141, 5,235,033, 5,264,562, 5,264,564, 5,405,938, 5,434,257, 5,466,677, 5,470,967, 5,489,677, 5,541,307, 5,561,225, 5,596,086, 5,602,240, 5,610,289, 5,602,240, 5,608,046, 5,610,289, 5,618,704, 5,623,070, 5,663,312, 5,633,360, 5,677,437, 5,792,608, 5,646,269 和 5,677,439, 它们每个在此引为参考。

[0155] 修饰的糖和核苷间连键 - 模拟物

[0156] 在其他考虑到的寡核苷酸模拟物中,核苷酸单元的糖和核苷间连键(即骨架)都被新的基团取代。保留核碱基单元,用于与适合的靶核酸杂交。一种这样的化合物,已被显示出具有出色的杂交性质的寡核苷酸模拟物,被称为肽核酸(PNA)。在 PNA 化合物中,寡核苷酸的糖-骨架被含有酰胺的骨架、特别是氨基乙基甘氨酸骨架代替。核碱基被保留,并直接或间接结合到骨架的酰胺部分的氮杂氮原子上。讲述了 PNA 化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于 U.S. :5,539,082, 5,714,331 和 5,719,262, 它们每个在此引为参考。PNA 化合物的其他讲述内容可以在 Nielsen 等, Science, 1991, 254 :1497-1500 中查到。

[0157] 本发明的某些实施方案是具有硫代磷酸酯骨架的寡核苷酸,和具有杂原子骨架的寡核苷酸,所述杂原子骨架特别是上面引用的美国专利 5,489,677 的 -CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-[被称为亚甲基(甲基亚氨基)或 MMI 骨架]、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- 和 -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (其中天然的磷酸二酯骨架被表示成 -O-P-O-CH₂-)、

以及上面引用的美国专利 5,602,240 的酰胺骨架。还考虑到了具有上面引用的美国专利 5,034,506 的吗啉代骨架结构的寡核苷酸。

[0158] 修饰的糖

[0159] 修饰的寡核苷酸也可以含有一个或多个取代的糖部分。考虑到的寡核苷酸在 2' 位含有下述之一: OH; F; O-、S- 或 N- 烷基; O-、S- 或 N- 烯基; O-、S- 或 N- 炔基, 或 O- 烷基-O- 烷基, 其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的 C₁ 到 C₁₀ 烷基或 C₂ 到 C₁₀ 烯基和炔基。特别优选的是 O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂ 和 O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, 其中 n 和 m 是从 1 到大约 10。其他优选的寡核苷酸在 2' 位包含下述之一: C₁ 到 C₁₀ 低级烷基, 取代的低级烷基, 烯基, 炔基, 烷芳基, 芳烷基, O- 烷芳基或 O- 芳烷基, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 杂环烷基, 杂环烷芳基, 氨基烷基氨基, 聚烷基氨基, 取代的甲硅烷基, RNA 切开基团, 报告基团, 嵌入基团, 用于改进寡核苷酸的药代动力学性质的基团, 或用于改进寡核苷酸的药效动力学性质的基团, 以及其他具有类似性质的取代基。考虑到的修饰包括 2'-甲氧基乙氧基 (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, 也被称为 2'-O-(2-甲氧基乙基) 或 2'-MOE) (Martin 等, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), 即烷氧基烷氧基基团。其他考虑到的修饰包括 2'-二甲基氨基氧基乙氧基, 即 O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ 基团, 也被称为 2'-DMAOE, 正如在本文下面的实施例中描述的, 以及 2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基 (在本技术领域中也称 2'-O-二甲基-氨基-乙氧基-乙基或 2'-DMAEOE), 即 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂, 也在本文下面的实施例中描述。

[0160] 其他考虑到的修饰包括 2'-甲氧基 (2'-O-CH₃)、2'-氨基丙氧基 (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-烯丙基 (2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-烯丙基 (2'-O-CH₂-CH=CH₂) 和 2'-氟 (2'-F)。2'-修饰可以在阿拉伯糖 (上) 位或核糖 (下) 位中。优选的 2'-阿拉伯糖修饰是 2'-F。类似的修饰也可以在寡核苷酸的其他位置上进行, 特别是 3' 末端核苷酸上或 2'-5' 连接的寡核苷酸中糖的 3' 位, 以及 5' 末端核苷酸的 5' 位。寡核苷酸也可以具有糖模拟物, 例如环丁基部分代替呋喃戊糖。讲述了这样的修饰糖结构的制备的代表性美国专利包括但不限于 U. S. : 4,981,957, 5,118,800, 5,319,080, 5,359,044, 5,393,878, 5,446,137, 5,466,786, 5,514,785, 5,519,134, 5,567,811, 5,576,427, 5,591,722, 5,597,909, 5,610,300, 5,627,053, 5,639,873, 5,646,265, 5,658,873, 5,670,633, 5,792,747 和 5,700,920, 它们每个在此以其全文引为参考。

[0161] 糖的其他优选的修饰包括锁核酸 (LNAs), 其中 2'-羟基连接到糖环的 3' 或 4' 碳原子上, 从而形成了双环糖部分。连键优选为桥接 2' 氧原子和 4' 碳原子的亚甲基 (-CH₂-)_n 基团, 其中 n 是 1 或 2。LNAs 及其制备描述在 WO 98/39352 和 WO 99/14226 中。

[0162] 天然和修饰的核碱基

[0163] 寡核苷酸也可以包含核碱基 (通常在本技术领域简称为“碱基”) 修饰或取代。本文中使用的“未修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤 (A) 和鸟嘌呤 (G), 以及嘧啶碱基胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C) 和尿嘧啶 (U)。修饰的核碱基包括其他合成的和天然的核碱基, 例如 5-甲基胞嘧啶 (5-me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和 2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基 (-C≡C-CH₃) 尿嘧啶和胞嘧啶, 以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧

啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶（假尿嘧啶）、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫羟基、8-硫代烷基、8-羟基和其他 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤，5-卤代特别是 5-溴、5-三氟甲基和其他 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶，7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和 8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤和 7-脱氮杂腺嘌呤以及 3-脱氮杂鸟嘌呤和 3-脱氮杂腺嘌呤。其他修饰的核碱基包括三环嘧啶、例如吩噻嗪胞苷（1H-嘧啶并 [5,4-b] [1,4] 苯并噻嗪 -2(3H)-酮）、吩噻嗪胞苷（1H-嘧啶并 [5,4-b] [1,4] 苯并噻嗪 -2(3H)-酮），G-夹例如取代的吩噻嗪胞苷（例如 9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并 [5,4-b] [1,4] 苯并噻嗪 -2(3H)-酮），哇唑胞苷（2H-嘧啶并 [4,5-b] 吡啶 -2-酮），吡啶并吡啶胞苷（H-吡啶并 [3',2':4,5] 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 -2-酮）。修饰的核碱基也可以包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环、例如 7-脱氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤、2-氨基吡啶和 2-吡啶酮取代的核碱基。其他核碱基包括在美国专利 No. 3,687,808 中公开的核碱基，在《聚合物科学和工程简明百科全书》858-859 页 (The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859)，Kroschwitz 主编，John Wiley & Sons, 1990 中公开的核碱基，由 Englisch 等，Angewandte Chemie, 国际版 (International Edition), 1991, 30 : 613 公开的核碱基，以及由 Sanghvi 在《反义研究与应用》第 15 章 289-302 页 (Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302)，Crooke 和 Lebleu 主编，CRC Press, 1993 公开的核碱基。

[0164] 讲述了某些上面提到的修饰的核碱基以及其他修饰的核碱基的制备的代表性美国专利，包括但不限于上面提到的 U.S. 3,687,808，以及 U.S. :4,845,205, 5,130,302, 5,134,066, 5,175,273, 5,367,066, 5,432,272, 5,457,187, 5,459,255, 5,484,908, 5,502,177, 5,525,711, 5,552,540, 5,587,469, 5,594,121, 5,596,091, 5,614,617, 5,645,985, 5,830,653, 5,763,588, 6,005,096 和 5,681,941，它们每个在此引为参考，以及美国专利 5,750,692，也在此引为参考。

[0165] 结合物

[0166] 本发明的寡核苷酸的另一种修饰包括将一个或多个增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的部分或结合物化学连接到寡核苷酸上。这些部分或结合物可以包括与官能团例如伯或仲羟基共价结合的结合基团。本发明的结合基团包括螯合性部分、嵌入基团、报告分子、多胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、增强寡聚物的药效动力学性质的基团和增强寡聚物的药代动力学性质的基团。

[0167] 典型的结合基团包括胆固醇、脂类、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。在本发明的背景中增强药效动力学性质的基团，包括改善摄入、增加对降解的抗性和 / 或加强与靶核酸的序列特异性杂交的基团。在本发明的背景中增强药代动力学性质的基团，包括改善本发明的化合物的摄入、分布、代谢或排泄的基团。代表性的结合基团公开在国际专利申请 PCT/US92/09196 和美国专利 6,287,860 中，其全部公开内容在此引为参考。

[0168] 结合部分包括但不限于脂类部分例如胆固醇部分、胆酸、硫醚例如己基 -S- 三苯甲游基硫醇、硫代胆固醇、脂族链例如十二烷基二醇或十一烷基残基、磷脂例如二 - 十六烷基消旋甘油或三乙基铵 1,2- 二 -O- 十六烷基 - 消旋甘油 -3-H- 磷酸酯、多胺或聚乙二醇链，或金刚烷乙酸、棕榈基部分或十八胺或己基氨基 - 羰基 - 氧基胆固醇部分。本发明的

寡核苷酸还可以结合到活性药物物质上,例如阿司匹林、华法令、苯丁唑酮、布洛芬、舒洛芬、芬布芬、酮洛芬、(S)-(+)-普拉洛芬、卡洛芬、丹磺酰肌氨酸、2,3,5-三碘苯甲酸、氟灭酸、亚叶酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、地尔硫卓、吡啶美辛、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺类药、抗利尿剂、抗菌剂或抗生素。寡核苷酸-药物结合物以及它们的制备描述在美国专利申请 09/334,130 中,在此以其全文引为参考。

[0169] 讲述了这种寡核苷酸结合物的制备的美国专利,包括但不限于 U. S. :4,828,979, 4,948,882, 5,218,105, 5,525,465, 5,541,313, 5,545,730, 5,552,538, 5,578,717, 5,580,731, 5,580,731, 5,591,584, 5,109,124, 5,118,802, 5,138,045, 5,414,077, 5,486,603, 5,512,439, 5,578,718, 5,608,046, 4,587,044, 4,605,735, 4,667,025, 4,762,779, 4,789,737, 4,824,941, 4,835,263, 4,876,335, 4,904,582, 4,958,013, 5,082,830, 5,112,963, 5,214,136, 5,082,830, 5,112,963, 5,214,136, 5,245,022, 5,254,469, 5,258,506, 5,262,536, 5,272,250, 5,292,873, 5,317,098, 5,371,241, 5,391,723, 5,416,203, 5,451,463, 5,510,475, 5,512,667, 5,514,785, 5,565,552, 5,567,810, 5,574,142, 5,585,481, 5,587,371, 5,595,726, 5,597,696, 5,599,923, 5,599,928 和 5,688,941,它们每个在此引为参考。

[0170] 反义抑制

[0171] 本发明的化合物与靶核酸的杂交一般被称为“反义”。这样的杂交可以导致靶核酸翻译的抑制,在本文中称为“反义抑制”。这样的反义抑制典型地是基于寡核苷酸链或区段的基于氢键键合的杂交,使得至少一条链或区段被切开、降解或以其他方式变得不可操作。就此而言,目前优选靶向用于这种反义抑制的特异性核酸分子及其功能。

[0172] 待抑制的 DNA 的功能包括复制和转录。复制和转录可以例如从内源细胞模板、载体、质粒构建物等进行。准备被干扰的 RNA 功能可以包括例如下述功能:RNA 易位到蛋白翻译位点、RNA 易位到细胞内远离 RNA 合成位点的位点、从 RNA 翻译蛋白、剪接 RNA 以产生一种或多种 RNA、和可以由 RNA 从事或促进的 RNA 参与的催化活性或复合物形成。在本发明的背景中,“调节”和“表达的调节”是指编码基因的核酸分子例如 DNA 或 RNA 的量或水平的增加(刺激)或降低(抑制)。抑制通常是优选的表达调节形式,mRNA 通常是优选的靶核酸。

[0173] 在本发明的背景中,“杂交”是指寡聚化合物的互补链的配对。在本发明中,优选的配对机制包括氢键键合,其可以是寡聚化合物链的互补核苷或核苷酸碱基(核碱基)之间的 Watson-Crick、Hoogsteen 或反向 Hoogsteen 氢键键合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是通过形成氢键而配对的互补核碱基。杂交可以在不同情况下发生。

[0174] 当化合物与靶核酸的结合干扰了靶核酸的正常功能从而导致活性丧失,并且具有足够程度的互补性来避免了反义化合物与非靶核酸序列在特异性结合所需条件下的非特异性结合时,反义化合物是可特异性杂交的,所述特异性结合所需条件在体内分析或治疗性处理情况下是生理条件,在体外分析情况下是用于执行分析的条件。

[0175] 在本发明中,词组“严紧杂交条件”或“严紧条件”是指在该条件下本发明的化合物将与其靶序列杂交,但是与最少数量的其他序列杂交。严紧条件是序列依赖性的,在不同环境下将不同,在本发明的背景中,寡聚化合物与靶序列杂交的“严紧条件”由寡聚化合物的本性和组成以及研究它们的分析所决定。一组示例性的条件如下:在 42°C 下在 50%甲酰胺,5X SSC,20mM Na₂PO₄, pH 6.8 中杂交;以及在 55°C 下在 1X SSC 中洗涤 30 分钟。用于

计算等价杂交条件和 / 或选择其他条件用于获得所需严谨性水平的公式,是公知的。在本技术领域,应该理解,等价的严谨条件可以通过改变温度和缓冲液或盐浓度来获得,正如在 Ausubel 等主编的《分子生物学方法》(Protocols in Molecular Biology), John Wiley & Sons(1994), pp. 6. 0. 3 到 6. 4. 10 中描述的。杂交条件的修改可以凭经验确定,或根据探针的长度和鸟嘌呤 / 胞嘧啶 (GC) 碱基配对的长度和百分率精确计算。杂交条件可以按照 Sambrook 等主编的《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning :A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press :Cold Spring Harbor, New York(1989), pp. 9. 47 到 9. 51 中的描述进行计算。

[0176] 本文中使用的“互补”是指寡聚化合物的两个核碱基之间精确配对的能力。例如,如果寡核苷酸(寡聚化合物)某个位置处的核碱基能够与靶核酸某个位置处的核碱基形成氢键,所述靶核酸是 DNA、RNA 或寡核苷酸分子,那么寡核苷酸与靶核酸之间形成氢键的位置被认为是互补的位置。当每个分子中足够数量的互补位置被能够彼此形成氢键的核碱基占据时,寡核苷酸与其他 DNA、RNA 或寡核苷酸分子是彼此互补的。因此,“可特异性杂交”和“互补”是可用于指示在足够数量的核碱基范围内存在足够程度的精确配对或互补性,导致在寡核苷酸和靶核酸之间发生稳定和特异性结合的术语。

[0177] 在本技术领域,应该理解,反义化合物的序列不需与其可特异性杂交的靶核酸 100% 互补。此外,寡核苷酸可以一个或多个区段杂交,使得居间的或相邻的区段不参与杂交事件(例如环结构或发夹结构)。优选,本发明的化合物的寡核苷酸部分与靶核酸中的靶区域具有至少 70% 的序列互补性,更优选它们具有至少 85% 或 90% 的序列互补性,并可以与它们所靶向的靶核酸序列中的靶区域具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列互补性。例如,在本发明的化合物中,化合物的 20 个核碱基中的 18 个与靶区域互补并因此特异性杂交,则表示 90% 的互补性。在该例子中,剩余的未互补核碱基可以是成簇的,或分散在互补的核碱基之间,不是必需彼此或与互补的核碱基连续。因此,化合物长度为 18 个核碱基,具有 4(四)个两侧带有与靶核酸完全互补的两个区域的未互补核碱基,其将与靶核酸具有 77.8% 的总体互补性,因此将落于本发明的范围内。化合物与靶核酸区域的百分互补性可以常规使用本技术领域已知的 BLAST 程序(基本局域比对搜索工具)和 PowerBLAST 程序来确定(Altschul 等, J. Mol. Biol., 1990, 215 :403-410 ;Zhang 等, Genome Res. , 1997, 7 :649-656)。对于本发明的具有羟基核碱基和 / 或合成的类似物(例如其他合成的核碱基)的化合物来说,可以通过合成类似物对靶核酸的特定核碱基的特异性来评估互补性。

[0178] 尽管反义化合物的优选形式是单链反义寡核苷酸,但在许多物种中,已经显示导入双链结构、例如双链 RNA(dsRNA) 分子,诱导了基因功能或其相关基因产物的强有力和特异性的反义介导的降低。这种现象在植物和动物中都有发生,据认为与病毒防御和转座子沉默具有进化关联。

[0179] dsRNA 能够在动物中引起基因沉默的第一个证据,来自于 1995 年在线虫秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) 中的工作(Guo 等, Cell, 1995, 81 :611-620)。Montgomery 等已经显示, dsRNA 的主要干扰效应是转录后的(Montgomery 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95 :15502-15507)。在秀丽隐杆线虫中定义的由暴露于双链 RNA(dsRNA) 所产生的转录后反义机制,从此后被命名为 RNA 干扰(RNAi)。该术语已经被广义化,是指涉及导入 dsRNA 引起内源靶 mRNA 水平的序列特异性降低的反义介导的基因沉默(Fire 等, Nature,

1998, 391 :806-811)。最近, 已经显示, 事实上 dsRNAs 的反义极性的单链 RNA 寡聚物, 是 RNAi 的强有力诱导物 (Tijsterman 等, Science, 2002, 295 :694-697)。

[0180] 本发明的化合物的使用

[0181] 本文描述的化合物可体外或体内用于限制基因的表达和病原体例如病毒的增殖, 病毒包括具有 DNA 基因组、RNA 基因组的病毒和使用反转录的病毒。因此, 化合物可以施用于作为对象或处于疾病状态的生物体。当施用于生物体时, 化合物可用于治疗由各种不同病原体引起的感染。本文使用的“治疗”是指将本发明的寡核苷酸施用于需要的对象, 其剂量 / 量足以对对象的健康状况、病理和疾病产生所需结果, 或用于诊断目的。所需结果可以包括在药剂的接受者中客观性或主观性的改善。“治疗”是指预防性治疗或治疗性治疗或诊断性治疗。诊断或治疗的“对象”是人类或非人类动物, 包括哺乳动物或灵长动物。“治疗有效量”是指有效地产生对健康的目的有益效应的组合物的量。

[0182] 化合物可以用于调节免疫系统细胞的功能, 所述细胞例如特异性 B 细胞 ; 特异性 T 细胞, 例如辅助性细胞、抑制性细胞、细胞毒性 T- 淋巴细胞 (C) 和自然杀伤 (NK) 细胞。使用本发明的化合物调节免疫功能, 可用于治疗各种不同疾病, 例如由病毒病原体引起的慢性疾病。

[0183] 可以选择能够通过任何涉及化合物的寡核苷酸与其靶序列结合的机制来干扰蛋白的转录和 / 或表达的化合物。这些机制包括但不限于干扰加工、抑制跨核膜的运输、被内切核酸酶切割、形成复制酶复合物等。

[0184] 本文描述的化合物可用于感染性疾病的治疗。靶核酸序列包括但不限于病原性病毒例如 HIV、CMV、HSV、HCV 等的基因, 以及编码这些病毒的宿主因子或以其他方式参与疾病发生和 / 或发展的基因。

[0185] 在癌症治疗中, 靶核酸序列可以是与致癌基因或具有致癌性质的病毒、肿瘤抑制基因和相关基因有关的 DNA 或 RNA。此外, 本发明的化合物也可以靶向与药物抗性相关的基因及其基因产物。

[0186] 靶向过程通常还包括在靶核酸内确定至少一个用于发生反义相互作用、以便获得所需效应例如表达的调节的靶区域、区段或位点。在本发明的背景中, 术语“区域”是指靶核酸的具有至少一种可鉴定的结构、功能或特征的部分。区段在靶核酸区域内。“区段”是指靶核酸内较小的区域或区域的子部分。本发明中使用的“位点”是指靶核酸内的位置。

[0187] 此外, 考虑到了组合使用本文描述的组合物, 以杂交相同病毒基因组内两个不同的区域或区段。对于靶的选择来说, 考虑的因素包括 : 在病毒基因组区域中定位对于病毒繁殖来说重要的靶 (靶必须是必需区域)。如果可能, 优选的靶应该在病毒的不同株和基因型之间保守的区域中 (通常这也表明该序列的功能重要性)。编码蛋白的高度保守结构域的区域是良好的靶 ; 含有交叠的功能元件的区域 (与顺式作用元件交叠的编码序列) 也是良好的靶。

[0188] 此外, 考虑到了靶位点应该具有的核苷酸组成能够构建具有所需核苷酸含量和 / 或修饰核碱基组成的寡核苷酸抑制剂, 优选靶不含强的二级结构元件。此外, 靶的序列不应该与必需的宿主基因、特别是宿主 mRNAs 交叠。此外, 修饰的核碱基的位置不应该与宿主序列匹配。应该避免成簇的 C 或 G 核苷酸 (3 个或以上)。实验显示, 编码区内部的靶位点好于非编码区中的靶位点, 在 RNA 病毒的情况下, 正链与负链相比是较好的靶。由于核酸破坏

的独特机制（例如通过 RNase 或 DNase 复合物），不是必需将修饰的寡核苷酸靶向翻译起始序列。这与吗啉代寡核苷酸的情况相反，在那种情况下不能起 RNA 降解，并且在靶向含有翻译起始密码子的区域的情况下最有效（或才有效）。对于本文描述的修饰的寡核苷酸不存在这样的限制。

[0189] 为了靶向两个或多个位点，每个位点应该满足上面提出的几个标准。靶的序列应该是彼此不同并且不互补的，以避免寡核苷酸的聚集，并且靶可以呈现为来自同一个功能单位例如来自同一个酶或来自不同单位的不同序列。在大多数情况下，第二个选择是优选最小化产生抗性突变的可能性。本文中使用的术语“功能单位”是指在病毒复制或基因表达中具有功能的多肽或多核苷酸序列，例如不同的复制因子、转录因子等。结合相同功能单位的寡核苷酸结合不同的、但是位于同一多肽或多核苷酸功能单位中、例如在 HIV Tat 蛋白内的靶序列。本发明考虑到的结合不同功能单位的寡核苷酸，与在病毒复制或基因表达中具有不同功能的多肽或多核苷酸、例如 HIV Tat 和 Rev 基因或蛋白结合。本技术领域的普通专业人员可以容易地理解与病毒复制或基因表达相关的功能单位的含义。

[0190] 翻译起始密码子典型为 5' AUG（在转录的 mRNA 分子中；在相应的 DNA 分子中是 5' ATG），翻译起始密码子也称为“AUG 密码子”、“起始密码子”或“AUG 起始密码子”。少部分基因的翻译起始密码子具有 RNA 序列 5' GUG、5' UUG 或 5' CUG，并且 5' AUA、5' ACG 和 5' CUG 已被显示在体内具有功能。因此，术语“翻译起始密码子”和“起始密码子”可以包含许多密码子序列，尽管在每种情况下典型的起始氨基酸是甲硫氨酸（在真核生物中）或甲酰甲硫氨酸（在原核生物中）。在本技术领域中还已了解，真核和原核基因可以具有两种或多种可变（alternative）起始密码子，任何一种可以优选用于在特定细胞类型或组织中、或在特定的一组条件下起翻译。在本发明的背景中，“起始密码子”和“翻译起始密码子”是指用于在体内起由编码白介素 18 的基因转录而来的 mRNA 的翻译的密码子或多个密码子，无论这些密码子的序列如何。在本技术领域，已经得知，基因的翻译终止密码子（或“终止密码子”）可以具有三种序列中的一种，即 5' UAA、5' UAG 和 5' UGA（相应的 DNA 序列分别是 5' TAA、5' TAG 和 5' TGA）。

[0191] 术语“起始密码子区”和“翻译起始密码子区”是指包含从翻译起始密码子开始在任一方向上（即 5' 或 3'）大约 25 个到大约 50 个连续核苷酸的这样一个 mRNA 或基因部分。同样地，术语“终止密码子区”和“翻译终止密码子区”是指包含从翻译终止密码子开始在任一方向上（即 5' 或 3'）大约 25 个到大约 50 个连续核苷酸的这样一个 mRNA 或基因部分。因此，“起始密码子区”（或“翻译起始密码子区”）和“终止密码子区”（或“翻译终止密码子区”）都是可以使用本发明的反义化合物有效地靶向的区域。

[0192] 开放阅读框架（ORF）或“编码区”在本技术领域已知是指翻译起始密码子与翻译终止密码子之间的区域，也是可以被有效靶向的区域。在本发明的背景中，优选的区域是涵盖了基因的开放阅读框架（ORF）的翻译起始或终止密码子的基因内区域。

[0193] 其他靶区域包括 5' 非翻译区（5' UTR），它在本技术领域已知是指 mRNA 从翻译起始密码子开始的 5' 方向中的部分，因此包含了 mRNA 的 5' 帽位点与翻译起始密码子之间的核苷酸（或基因上的相应核苷酸），以及 3' 非翻译区（3' UTR），它在本技术领域已知是指 mRNA 从翻译终止密码子开始的 3' 方向中的部分，因此包含了 mRNA 的翻译终止密码子与 3' 末端之间的核苷酸（或基因上的相应核苷酸）。mRNA 的 5' 帽位点包含通过 5' -5' 磷酸

三酯键与 mRNA 的最 5' 端残基相连的 N7- 甲基化的鸟苷残基。mRNA 的 5' 帽区域被认为包括 5' 帽结构本身以及与帽子位点相邻的前 50 个核苷酸。靶向 5' 帽区域也是优选的。

[0194] 尽管某些真核 mRNA 转录本被直接翻译,但有许多含有一个或多个被称为“内含子”的区域,它们在翻译前从转录本中切除。剩余的(因此被翻译的)区域被称为“外显子”,被剪接在一起形成了连续的 mRNA 序列。在疾病涉及异常剪接、或疾病涉及特定剪接产物的过量生产的情况下,靶向剪接位点、即内含子-外显子接点或外显子-内含子接点,也可能是特别有用的。由重排或缺失造成的异常融合接点,也是优选的靶位点。通过来自不同基因来源的两个(或多个)mRNAs 的剪接过程产生的 mRNA 转录本,被称为“融合转录本”。也已了解,通过使用靶向例如 DNA 或 mRNA 前体的反义化合物,内含子也能够被有效地靶向。

[0195] 从 DNA 的同样的基因组区域,可以产生可变 RNA 转录本。这些可变转录本一般被称为“变体”。更具体来说,“mRNA 前体变体”是从同样的基因组 DNA 产生的转录本,与从同样的基因组 DNA 产生的其他转录本在它们的起始或终止位置上不同,并包含内含子和外显子序列二者。

[0196] 在剪接过程中,在切除了一个或多个外显子或内含子区域或其部分后, mRNA 前体变体产生了较小的“mRNA 变体”。因此, mRNA 变体是加工过的 mRNA 前体变体,并且每个独特的 mRNA 前体变体必须总是产生独特的 mRNA 变体作为剪接的结果。这些 mRNA 变体也被称为“可变剪接变体”。如果没有发生 mRNA 前体变体的剪接,那么 mRNA 前体变体与 mRNA 变体相同。

[0197] 变体可以通过使用可变信号起始或终止转录来产生, mRNAs 前体和 mRNAs 可以拥有一个以上的起始密码子或终止密码子。源自于使用可变起始密码子的 mRNA 前体或 mRNA 的变体,被称为 mRNA 前体或 mRNA 的“可变起始变体”。使用可变终止密码子的转录本被称为 mRNA 前体或 mRNA 的“可变终止变体”。一种特殊类型的可变终止变体是“polyA 变体”,其中产生的多个转录本来自于转录机制对“polyA 终止信号”之一的可变选择,从而产生了在独特的 polyA 位点处终止的转录本。在本发明的背景中,本文描述的变体类型也是优选的靶核酸。

[0198] 此外,大部分基因组为 DNA 的病毒以及具有 RNA 基因组的病毒,在其基因组中含有用于起动新基因组链合成的片段。它们的区段被命名为复制原点,并随着结构、数量(每个基因组的拷贝)和作用方式而变。对于 RNA 病毒来说,复制原点典型地包含 RNA 分子两个末端的序列。复制原点的序列典型被病毒编码的蛋白、所谓的原点识别因子所识别,该蛋白参与复制的起动,并在许多情况下执行复制过程(在后一种情况下,它们被称为“复制酶复合物的成分”或“病毒复制酶”)。病毒复制酶可以几乎完全由病毒编码的蛋白(如在 HSV 的情况下)、来自宿主和蛋白的亚基构成,或主要由宿主细胞编码。

[0199] 病毒序列的某些区段被病毒、宿主、或病毒和宿主编码的因子所识别。这样的区段是复制原点、启动子、增强子、终止子、剪接和聚腺苷化信号、包装序列等,它们通常被称为“顺式作用元件”。与这些信号相互作用的病毒、宿主或病毒-宿主蛋白复合物,被称为“反式作用因子”。顺式作用序列可以具有它们发挥功能所需的特异性一级和/或二级结构,并且这些元件可以位于病毒基因组的不同位置中(包括编码序列中)。顺式作用元件可以彼此以及与编码相应反式作用因子的编码序列交叠。

[0200] 许多 DNA 以及几乎所有 RNA 病毒只在它们基因组的一条链中(被定义为“正链”)

包含阅读框。在具有单链基因组的 RNA 病毒的情况下,基因组可以表现为编码 mRNA 的序列(正链 RNA 病毒)或包装在核衣壳蛋白中的与该链互补的 RNA(负链 RNA 病毒)。这些病毒在细胞中复制的过程中,合成了具有相反极性、被称为“反基因组”的 RNA,其对于正链 RNA 病毒来说是负链 RNA,对于负链 RNA 病毒来说是正链 RNA。该链可以与基因组 RNA 形成双链体(正链病毒)或不形成双链体(负链 RNA 病毒)。正链与负链之间的双链体被定义为“复制形式”或“复制中间体”,而在被正链 RNA 病毒感染的细胞中,它与复制酶蛋白和细胞膜结合。

[0201] 靶核酸上优选的与反义化合物杂交的位置,在下文中被称为“优选的靶区段”。本文中使用的术语“优选的靶区段”被定义为活性反义化合物所靶向的靶区域的至少 5 个核碱基的部分。尽管不希望受到理论的限制,但目前相信,这些靶区段代表了靶核酸容易获得杂交的部分。

[0202] 尽管在本文中提出了某些优选靶区段的具体序列,但本技术领域的专业人员将会认识到,它们用于说明和描述本发明范围内的特定实施方案。具有普通专业知识的人员可以鉴定出其他优选的靶区段。

[0203] 长度为 5-150 个核碱基、包含从说明性的优选靶区段中选择的一段至少 5 个连续的核碱基的靶区段,也被认为适合用于靶向。

[0204] 靶区段可以包括 DNA 或 RNA 序列,它们包含来自于说明性优选靶区段之一的 5'-末端的至少 5 个连续核碱基(剩余的核碱基是同样的 DNA 或 RNA 中从紧接靶区段的 5'-末端上游开始并延续直到 DNA 或 RNA 包含大约 5 到大约 150 个核碱基的一个连续段)。同样地,优选的靶区段表现为 DNA 或 RNA 序列,它们包含来自于说明性的优选靶区段之一的 3'-末端的至少 5 个连续的核碱基(剩余的核碱基是同样的 DNA 或 RNA 中从紧接靶区段的 3'-末端下游开始并延续直到 DNA 或 RNA 包含大约 5 到大约 150 个核碱基的一个连续段)。本技术领域的专业人员在本文说明的优选靶区段的帮助下,不需过多实验,就能鉴定其他的优选靶区段。

[0205] 在鉴定了一个或多个靶区域、区段或位点后,合成反义化合物,该反义化合物与靶充分互补、即杂交足够好并具有充分特异性以提供所需的效应,并掺入了至少一个与靶区域、区段或位点序列中的核碱基互补的羟基核碱基或巯基核碱基,此外还掺入了本文描述的整合性部分。然后将反义化合物与金属离子接触,允许离子与化合物络合。然后可以将这种由此产生的化合物用于反义疗法机制中。

[0206] 用于评估修饰的寡核苷酸的抗病毒效应的分析

[0207] 甲病毒是引起急性感染的 RNA 病毒的实例。蚊子、鸟类和不同的哺乳动物都可以被塞姆利基森林病毒(SFV)感染。SFV 的基因组是正链 RNA,长度为大约 11.5kb。它包含两个大的开放阅读框(ORFs),一个位于 5' 区域,另一个位于 3' 区域(图 1)。第一个 ORF 编码非结构蛋白——病毒的 RNA 复制系统亚基。第二个 ORF 编码病毒粒子蛋白,本身对于 RNA 复制来说不需要。所有已知甲病毒的基因组以类似的方式组织。SFV 在受感染细胞的细胞质中复制;复制过程发生在内体和溶酶体源的细胞膜上。典型情况下,在哺乳动物细胞中的感染引起细胞 RNA 和蛋白合成的几乎完全停止,在感染后 12-24 小时,导致被感染细胞的死亡。因此,SFV 通常是高细胞毒性和快速的病毒。

[0208] SFV 蛋白的表达可以使用在结构或非结构区域中插入了标志物基因(海肾荧光素

酶, Rluc) 的 SFV 基因组进行监测; 标志物在被感染细胞中的表达水平与被感染细胞中病毒 RNAs (如果标志物插入到非结构区中, 是基因组 RNAs, 如果标志物插入到结构区中, 是亚基因组 RNAs) 的拷贝数成比例 (Kiiver 等, 2008)。因此, 使用 EnduRen 或任何其他适合的底物 (Promega) 监测 Rluc 活性, 提供了关于被感染细胞中病毒复制 (病毒 RNAs 和蛋白的积累) 的适当信息。

[0209] 丙型肝炎病毒是引起慢性感染的 RNA 病毒的实例。HCV 是黄病毒科的非细胞病变性成员。它具有长度为大约 9.6kb 的正义 RNA 基因组。HCV 基因组缺乏 5' 帽结构, 但代之以它在 5'-UTR 内带有内部核糖体进入位点 (IRES)。HCV 基因组编码单一的聚蛋白, 该聚蛋白被蛋白水解切成 10 个独立的蛋白: 4 个结构蛋白和 6 个非结构蛋白。这些非结构蛋白中的 5 个是 HCV 基因组复制所需的。复制发生在受感染细胞的细胞质中, 在那里病毒蛋白和 RNA 与细胞的因子一起形成了“膜状网”, 在复制复合物中用作基因组的支架。HCV 的复制是不对称的 (正链丰度更高)。HCV 病毒粒子在 ER 膜上装配, 通过分泌途径排出细胞。HCV 不诱导宿主细胞代谢的全面停止或细胞死亡; 相反, 它诱导高度特异性的细胞抗病毒机制的停止。

[0210] HCV 的复制可以使用包含瞬时表达系统的代用复制子模型进行监测, 所述瞬时表达系统基于高敏感性细胞系和含有荧光素酶标志物基因的 HCV1b 复制子 (使用复制缺陷基因组作为阴性对照)。

[0211] HCV 感染的初始阶段在细胞培养物中难以重现。只有有限的 HCV 变体能够感染培养的细胞 (来自基因型 2 的 JFH1 以及基于 JFH1 的几个重组体); 迄今为止, 对于医学上最重要的基因型 1b 还没有报道。但是, 通过使用含有 SFV 的非细胞毒性突变株的复制酶部分的杂合病毒 (Tamm 等, 1: J Gen Virol. 89: 676-86, 2008), 该杂交病毒带有在 SFV 的亚基因组启动子控制下的插入的 Rluc 报告基因和克隆的 HCV 复制酶区域片段, 可以模拟 HCV 1b 感染的初始阶段。这些杂合基因组可以用 SFV 结构蛋白包装到类似病毒的粒子中, 并用于感染用抗 HCV 和 / 或抗 SFV 化合物处理的 huh7 细胞。

[0212] HIV-1 作为病原性反转录病毒的实例。 HIV-1 属于反转录病毒科慢病毒属。HIV-1 的基因组组织比简单的反转录病毒更加复杂。HIV 的基因组 RNA 长约 9kb, 包含几个基因。这些基因中的某些直接从基因组尺寸的 RNA 表达, 其他基因通过受到良好调控的可变剪接来表达。HIV 的基因表达受到病毒和宿主因子两者的调控。了解最深的病毒调控子是 Tat (转录激活子) 和 Rev (剪接和核输出调控子)。这些蛋白从剪接的 RNA 转录本表达, 它们的表达激活了后续转录 (Tat 活性) 并改变剪接样式 (Rev 活性)。

[0213] Tat 介导的 HIV 启动子的活化是一种模型系统, 可用于评估抗病毒化合物。当 HIV 原病毒整合到宿主基因组中时, 活化需要 HIV 编码的 Tat 蛋白与病毒 mRNA 中的 Tar 元件的相互作用。没有 Tat 蛋白, 从 HIV 启动子的转录极度失活, 包含 Tat 使启动子活化了 300 倍。结果, 在不存在 Tat 和 Tar 元件的情况下, 不能发生活跃的 HIV 基因表达。用于分析的系统是基于含有 Tar 的 HIV 启动子的 Tat- 活化, 并包含了克隆到 HIV 启动子 (LTR) 控制之下的荧光素酶标志物基因, 这种构建物已被用于构建稳定的 Jurkat 细胞株。在这些细胞中, 以非常低的基础水平发生荧光素酶标志物的表达。使用通过转染投送到这些报告细胞中的来自 B- 分支病毒 (clade virus) HAN-2 的 Tat 基因, 可以激活表达。该过程可以被抗病毒寡核苷酸抑制。

[0214] 乳头瘤病毒作为具有 DNA 基因组的病毒的实例。乳头瘤病毒是一类具有环状双链 DNA 基因组的小的无包膜病毒。乳头瘤病毒的复制周期与上皮组织的发育严格关联；病毒只在成熟的上皮细胞中成熟。在没有发育到终端阶段的细胞中，乳头瘤病毒基因组作为每个细胞高拷贝（50-400 个拷贝）染色体外质粒的形式复制。乳头瘤病毒的 DNA 基因组长约 8kbp，编码 10-12 个蛋白，在受感染细胞的核中复制。复制依赖于两种病毒编码的蛋白 E1 和 E2。E2 也参与病毒基因表达的调控。

[0215] 修饰的寡核苷酸对乳头瘤病毒复制的影响，可以通过监测 E2 介导的基因表达的活化来分析。将报告基因（萤火虫荧光素酶，Luc）克隆到 E2 活化的启动子的控制之下。通过将报告质粒与 E2 编码质粒进行共转染，可以测量活化效果（及其被抗病毒寡核苷酸的调节）。

[0216] BPV 在细胞中的复制的分析，是用于分析抗病毒化合物的效应的另一个模型。病毒的拷贝数可以通过定量 PCR 或 Southern 印迹法来分析。

[0217] 制剂

[0218] 本发明的化合物也可以与其他分子、分子结构或化合物的混合物混合、囊封、结合或以其他方式联合，例如与脂质体、载体、稀释剂、受体靶向分子，成为口服、直肠、局部或其他制剂，用于帮助摄入、分布和 / 或吸收。讲述了这种摄入、分布和 / 或吸收辅助性制剂的制备的代表性美国专利，包括但不限于 U. S. :5, 108, 921, 5, 354, 844, 5, 416, 016, 5, 459, 127, 5, 521, 291, 5, 543, 158, 5, 547, 932, 5, 583, 020, 5, 591, 721, 4, 426, 330, 4, 534, 899, 5, 013, 556, 5, 108, 921, 5, 213, 804, 5, 227, 170, 5, 264, 221, 5, 356, 633, 5, 395, 619, 5, 416, 016, 5, 417, 978, 5, 462, 854, 5, 469, 854, 5, 512, 295, 5, 527, 528, 5, 534, 259, 5, 543, 152, 5, 556, 948, 5, 580, 575 和 5, 595, 756，它们每个在此引为参考。

[0219] 本发明的反义化合物包含任何可药用盐、酯或这些酯的盐、或在施用于动物、包括人类后能够（直接或间接地）提供生物活性代谢物或其残余物的任何其他化合物。因此，例如，本公开也涉及本发明的化合物的前体药物和可药用盐、这些前体药物的可药用盐，以及其他生物等效物。

[0220] 术语“前体药物”是指以无活性形式制备的治疗性药剂，其在身体或身体细胞内，通过内源酶或其他化学物质和 / 或条件的作用转变成活性形式（即药物）。具体来说，本发明的寡核苷酸的前体药物形式，按照 Gosselin 等 1993 年 12 月 9 日公布的 WO 93/24510，或 Imbach 等的 WO 94/26764 和 U. S. 5, 770, 713 中公开的方法，制备成 SATE（（S 乙酰基 -2- 硫代乙基）磷酸酯）衍生物。

[0221] 术语“可药用盐”是指本发明的化合物的生理和药理学可接受的盐：即保留了母体化合物的所需生物活性、并且没有赋予其不需要的毒理效应的盐。对于寡核苷酸来说，可药用盐及其使用的优选例子进一步描述在美国专利 6, 287, 860 中，在此以其全文引为参考。

[0222] 本发明还包括含有本发明的反义化合物的药物组合物和制剂。本发明的药物组合物可以根据需要的是局部还是全身治疗、以及待治疗的区域，以多种方式施用。施用可以是局部（包括眼部和施用到粘膜，包括阴道和直肠投送），肺部，例如通过吸入或吹入粉末或气溶胶，包括通过喷雾器；气管内，鼻内，表皮和透皮），口服或肠胃外。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注；或颅内，例如鞘内或脑室内施用。据认为，具有至少一个 2'-O- 甲氧基乙基修饰的寡核苷酸对于口服施用来说特别有用。用于局部施

用的药物组合物和制剂可以包括透皮贴片、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴液、栓剂、喷剂、液体和粉末。常规的药物载体、水性、粉末或油状基料、增稠剂等，可能是必需的或需要的。涂层避孕套、手套等，也可能是有用的。

[0223] 可以便于以单位剂型存在的本发明的药物制剂，可按照制药业中公知的常规技术进行制备。这样的技术包括将活性成分与药物载体或赋形剂进行结合的步骤。一般来说，通过将活性成分与液体载体或细粉固体载体或两者均匀充分地结合在一起，然后如果需要，对产物进行成型，来制备制剂。

[0224] 本发明的组合物可以配制成许多可能的剂型中的任何一种，例如但不限于在水性、非水性或混合介质中的悬液。水性悬液可以进一步包含增加悬液黏度的物质，包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和 / 或葡聚糖。悬液也可以包含稳定剂。

[0225] 可用于本发明的药物组合物包括但不限于溶液、乳液、泡沫和含有脂质体、微胶粒或纳米粒子的制剂。本发明的药物组合物和制剂可以包含一种或多种穿透增强剂、载体、赋形剂、稀释剂或其他活性或无活性成分。

[0226] 乳液典型是一种液体以直径通常超过 $0.1\mu\text{m}$ 的液滴的形式分散在另一种液体中的非均质系统。乳液除了分散相和活性药物之外可以包含附加的组分，附加的组分可以作为溶液存在于水相、油相中，或本身作为分离相。微乳液作为本发明的实施方案被包括在内。乳液及其应用在本技术领域中公知的，进一步描述在美国专利 6,287,860 中，该专利在此以其全文引为参考。

[0227] 可用于本发明的制剂包括脂质体制剂。本发明中使用的术语“脂质体”是指由排列成球形双层或多个双层的两亲性脂类构成的囊泡。脂质体是单层或多层囊泡，具有由亲脂性材料形成的膜和含有待投送的组合物的水性内部。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体，据认为与带负电荷的 DNA 分子相互作用，形成稳定的复合物。对 pH 敏感的或带负电荷的脂质体，据认为捕集 DNA 而不是与其复合。阳离子和非阳离子脂质体两者都已被用于向细胞投送 DNA，并可用于投送本发明的化合物。

[0228] 脂质体也包括“空间稳定化的”脂质体，该术语在本文中使用时，是指含有一种或多种特殊脂类的脂质体，这些脂类当掺入到脂质体中时，相对于缺乏所述特殊脂类的脂质体，引起了循环寿命的增加。空间稳定化脂质体的例子是其中脂质体的一部分形成囊泡的脂类部分包含一种或多种糖脂、或被一种或多种亲水性聚合物例如聚乙二醇 (PEG) 部分衍生的脂质体。脂质体及其应用进一步描述在美国专利 6,287,860 中，该专利在此以其全文引为参考。含有本文描述的组合物的脂质体也可以与细胞穿透肽结合或以其他方式连接，以便脂质体定向进入组织并穿过细胞膜。细胞穿透肽包括 HIV tat 肽、其抗体或结合片段、生物素和本技术领域已知的其他成分 (Sawant 等, Bioconjug Chem. 17 :943-9 (2006) ; Sapra 等, Curr Drug Deliv. 2 :369-81 (2005))。

[0229] 考虑到了另加的纳米颗粒药物载体例如微胶粒和纳米粒子用于体内投送本文描述的组合物。用于合成和施用这种纳米药物的技术在本技术领域中公知的，描述在例如 Torchilin, VP., (生物聚合物, 2008 年 3 月 31 日 (Biopolymers. March 31, 2008)), Torchilin, VP, (Biochem. Soc. Trans. 35 :816-820 (2007)) 和 Sawant 等 (Bioconjug Chem. 17 :943-9 (2006)) 中。

[0230] 本发明的药物制剂和组合物也可以包含表面活性剂。表面活性剂在药物制品、制

剂和乳液中的使用,在本技术领域是公知的。表面活性剂及其应用进一步描述在美国专利 6, 287, 860 中,在此以其全文引为参考。

[0231] 在一个实施方案中,本发明使用了各种不同的穿透增强剂来影响核酸、特别是寡核苷酸的有效投送。除了帮助非亲脂性药物跨过细胞膜扩散之外,穿透增强剂还增强了亲脂性药物的穿透能力。穿透增强剂可以被分类成属于 5 种大类别之一,即表面活性剂、脂肪酸、胆盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂。穿透增强剂及其应用进一步描述在美国专利 6, 287, 860 中,在此以其全文引为参考。

[0232] 本技术领域的专业人员将会认识到,制剂通常根据它们的意向用法,即施用途径来设计。

[0233] 用于局部施用的优选制剂包括其中本发明的化合物与局部投送剂例如脂类、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的制剂。优选的脂类和脂质体包括中性的(例如二油酰磷脂酰 DOPE 乙醇胺,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 DMPC,二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴离子性的(例如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 DMPG)和阳离子性的(例如二油酰四甲基氨基丙基 DOTAP 和二油酰磷脂酰乙醇胺 DOTMA)。

[0234] 对于局部或其他施用来说,本发明的化合物可以囊封在脂质体内,或可以与脂质体、特别是阳离子脂质体形成复合物。或者,化合物可以与脂类、特别是阳离子脂类复合。优选的脂肪酸和酯、其可药用盐以及它们的使用,进一步描述在美国专利 6, 287, 860 中,在此以其全文引为参考。局部制剂详细描述在 1999 年 5 月 20 日提交的美国专利申请 09/315, 298 中,在此以其全文引为参考。

[0235] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末或颗粒、微粒、纳米粒子、在水或非水性介质中的悬液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、袋剂、片剂或迷你片。可能需要增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或黏合剂。优选的口服制剂是其中本发明的化合物与一种或多种穿透增强剂、表面活性剂和螯合剂共同施用的制剂。优选的表面活性剂包括脂肪酸和 / 或其酯或盐、胆酸和 / 或其盐。优选的胆酸 / 盐和脂肪酸,以及它们的使用,进一步描述在美国专利 6, 287, 860 中,在此以其全文引为参考。穿透增强剂的组合也是优选的,例如脂肪酸 / 盐与胆酸 / 盐组合。特别优选的组合是月桂酸、癸酸和 UDCA 的钠盐。其他穿透增强剂包括聚氧乙烯 -9- 月桂基醚、聚氧乙烯 -20- 鲸蜡基醚。本发明的化合物可以采用颗粒形式、包括喷雾干燥的颗粒,或复合形成微粒或纳米粒子,进行口服投送。复合剂及其使用进一步描述在美国专利 6, 287, 860 中,在此以其全文引为参考。口服制剂及其制备详细描述在美国申请 09/108, 673、09/315, 298 和 10/071, 822 中,它们每个在此以其全文引为参考。

[0236] 用于肠胃外、鞘内或脑室内施用的组合物或制剂,可以包括无菌水溶液,其也可以包含缓冲液、稀释剂和其他适合的添加剂,例如但不限于穿透增强剂、载体化合物和其他可药用载体或赋形剂。

[0237] 本发明的某些实施方案提供了含有一种或多种本发明的化合物和一种或多种通过非反义机制起作用的化疗药剂的药物组合物。这样的化疗药剂的例子包括但不限于癌症化疗药,例如道诺红菌素、道诺霉素、更生霉素、阿霉素、表柔比星、依达比星、依索比星、博来霉素、马磷酰胺、异环磷酰胺、胞嘧啶阿拉伯糖苷、双 - 氯乙基硝基脲、白消安、丝裂霉素 C、放线菌素 D、光辉霉素、泼尼松、羟孕酮、睾酮、它莫西芬、达卡巴肼、丙卡巴肼、六甲基密胺、五甲基密胺、米托蒽醌、安吡啶、苯丁酸氮芥、甲基环己基硝基脲、氮芥子气、米尔法

兰、环磷酰胺、6- 巯基嘌呤、6- 硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5- 氮杂胞苷、羟基脲、脱氧柯福霉素、4- 羟基过氧环磷酰胺、5- 氟尿嘧啶 (5-FU)、5- 氟脱氧尿苷 (5-FUdR)、氮甲蝶呤 (MTX)、秋水仙素、紫杉醇、长春新碱、长春碱、依托泊甙 (VP-16)、三甲曲沙、伊立替康、拓扑替康、吉西他滨、替尼泊甙、顺铂和己烯雌酚 (DES)。当与本发明的化合物一起使用时,这些化疗药剂可以单独地 (例如 5-FU 和寡核苷酸)、相继地 (例如使用 5-FU 和寡核苷酸一段时间后,继以 MTX 和寡核苷酸) 使用,或与一种或多种其他这样的化疗药剂组合使用 (例如 5-FU、MTX 和寡核苷酸,或 5-FU、放疗和寡核苷酸)。抗炎药物、包括但不限于非类固醇消炎药和皮质类固醇,以及抗病毒药物、包括但不限于利巴韦林、阿糖腺苷、阿昔洛韦和更昔洛韦,也可以与本发明的组合物组合。反义化合物与其他非反义药物的组合,也在本发明的范围内。两种或多种组合的化合物可以一起或相继使用。

[0238] 在另一个相关实施方案中,本发明的组合物可以含有靶向第一个核酸靶的一种或多种反义化合物、特别是寡核苷酸,以及靶向第二个核酸靶的一种或多种另外的反义化合物。或者,本发明的组合物可以包含靶向同一个核酸靶的不同区域的两种或多种反义化合物。反义化合物的大量实例在本技术领域是已知的。两种或多种组合的化合物可以一起或相继使用。

[0239] 用药

[0240] 治疗性组合物的制剂以及它们随后的施用 (用药) 相信是在本技术领域专业人员的技术范围之内,并通过例如剂量响应、毒性和药代动力学研究来确定。用药依赖于待治疗疾病状态的严重性和响应性,治疗过程持续几天到几个月,或直到实现治愈或达到疾病状态的缓解。对于慢性疾病状态或达到了缓解但没有治愈的病症来说,用药可以无限期继续。最适的用药时间表可以从患者体内药物积累的测量结果来计算。普通技术人员可以容易地确定最适剂量、用药方法和重复率。最适剂量可能随着个体寡核苷酸的相对效力而变,一般可以根据在体外和体内动物模型发现是有效的 EC₅₀s 来估算。一般来说,剂量为每公斤体重 0.01 μ g 到 100g,可以每天、每周、每月或每年施用一次或多次,或甚至可以每 2 到 20 年施用一次。本技术领域的普通技术人员能够根据在体液或组织中测量到的药物的滞留时间和浓度,容易地估算用药的重复率。在成功的治疗后,可能希望使患者经历维持疗法,以防止疾病状态的复发,其中寡核苷酸以维持剂量施用,范围为每公斤体重 0.01 μ g 到 100g,从每日一次或多次到每 20 年一次。

[0241] 试剂盒和诊断工具

[0242] 本发明的化合物可用于诊断、治疗、预防以及作为研究试剂和试剂盒。此外,能够以极度特异性抑制基因表达的反义寡核苷酸,通常被本技术领域的普通专业人员用于阐明特定基因的功能,或用于辨别生物途径的不同成员的功能。

[0243] 对于在试剂盒和诊断学中的使用来说,单独的或与其他化合物或治疗方法组合的本发明的化合物,可以在差异和 / 或组合分析中用作工具,用于阐明细胞和组织内表达的部分或全套基因的表达图样。

[0244] 作为一个非限制性的例子,将用一种或多种反义化合物处理的细胞或组织中的表达图式,与没有用反义化合物处理的对照细胞或组织进行比较,并分析产生的图式中的基因表达在与所研究的基因的疾病关联性、信号传导途径、细胞定位、表达水平、尺寸、结构或功能相关时的差异水平。这些分析可以在刺激或未刺激的细胞上、在存在或不存在其他影

响表达图式的化合物的情况下进行。

[0245] 本技术领域已知的基因表达分析方法的例子包括 DNA 阵列或微阵列 (Brazma 和 ViLo, FEBS Lett., 2000, 480 :17-24 ;Celis 等, FEBS Lett., 2000, 480 :2-16)、SAGE (基因表达系列分析) (Madden 等, Drug Discov. Today, 2000, 5 :415-425)、READS (消化的 cDNAs 的限制性酶扩增) (Prashar 和 Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303 :258-72)、TOGA (全基因表达分析) (Sutcliffe 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97 :1976-81)、蛋白阵列和蛋白质组学 (Celis 等, FEBS Lett., 2000, 480 :2-16 ;Jungblut 等, Electrophoresis, 1999, 20 :2100-10)、表达序列标签 (EST) 测序 (Celis 等, FEBS Lett., 2000, 480 :2-16 ;Larsson 等, J. Biotechnol., 2000, 80 :143-57)、差减 RNA 指纹法 (SuRF) (Fuchs 等, Anal. Biochem., 2000, 286 :91-98 ;Larson 等, Cytometry, 2000, 41 :203-208)、差减克隆、差异显示 (DD) (Jurecic 和 Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3 :316-21)、比较基因组杂交 (Carulli 等, J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31 :286-96)、FISH (荧光原位杂交) 技术 (Going 和 Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35 :1895-904) 和质谱学方法 (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3 :235-41)。

[0246] 反义的特异性和灵敏性也被本技术领域的专业人员开发用于治疗应用。在动物、包括人类的疾病状态的治疗中,已经使用了反义化合物作为治疗性部分。反义寡核苷酸药物、包括核酶,已经安全有效地施用于人类,大量的临床试验目前正在进行中。因此,确立了反义化合物可以作为有用的治疗形式,可以配置用在治疗细胞、组织和动物、特别是人类的治疗方法中。

[0247] 对于治疗方法来说,通过施用本发明的反义化合物,对怀疑患有能够通过调节靶核酸的表达进行治疗的疾病或病症的对象、优选人类进行治疗。例如,在一个非限制性的实施方案中,方法包括向需要治疗的对象施用治疗有效量的反义化合物的步骤。通过将有效量的化合物添加到适合的可药用赋形剂或载体中,本发明的化合物可用于药物组合物中。使用本发明的化合物和方法在预防上也可能是有用的。例如,组合物可用于处理未感染的细胞,以减少这些细胞中病毒基因的表达和复制。

[0248] 从下面的实施例中,本公开的其他方面和详细情况将变得明了,这些实施例目的在于说明的而不是限制。

实施例

[0249] 实施例 1

[0250] 使用修饰的寡核苷酸抑制寨姆利基森林病毒

[0251] 为了确定修饰的寡核苷酸对病毒基因复制的影响,产生了针对寨姆利基森林病毒 (SFV——来自披膜病毒科甲病毒属的一种快速 (急性) 正链 RNA 病毒的反义寡核苷酸,并测量了病毒基因组复制的抑制。

[0252] SFV 病毒基因组内部的寡核苷酸和靶的名单显示在表 1 中。

[0253] 表 1

[0254]

代码	化合物的序列 (5' -3'), 5' 末端具有氨基	有机 RNase 的存在	SFV 基因组的靶区域	相对于靶的取向
A6	TTAATC TCT CXC GTAGCG GAG XT (SEQ ID NO. 1)	否	5' UTR	反义
A6-N	TTA ATC TCT CXC GTA GCG GAG XT (SEQ ID NO. 1)	是	5' UTR	反义
A7	ATX TTX TCG TCG CCG ATG AAG XC (SEQ ID NO. 2)	否	nsP4	反义
A7-N	ATX TTX TCG TCG CCG ATG AAG XC (SEQ ID NO. 2)	是	nsP4	反义
A8	GCC TTC ATC GXC GAC XAC AAC AT (SEQ ID NO. 3)	否	nsP4	正义
A8-N	GCC TTC ATC GXC GAC XAC AAC AT (SEQ ID NO. 3)	是	nsP4	正义

[0255] X- 修饰的碱基, 8- 氧代 -dG

[0256] nsP4- 病毒 RNA 聚合酶——非结构蛋白 4 的编码区的保守部分

[0257] 将 BHK-21 (幼仓鼠肾) 细胞在 35mm 直径培养皿中生长至合生, 使用脂质转染胺 RNAiMAX (Invitrogen), 用带有或不带有金属核酸酶 (Eu) 的修饰的寡核苷酸转染细胞。转染在感染的时刻或感染之前进行。细胞用 30 皮摩尔寡核苷酸转染 (使用带有或不带有有机核酸酶的无关寡核苷酸作为对照), 并以 0.05 的感染复数 (moi) 用报告病毒 SFV4-stRLuc (自身复制 SFV 载体, 带有插入到 SFV 基因组的结构区中的海肾荧光素酶) 进行感染。一些条件, 例如 moi、转染试剂的量和转染与感染之间的时间间隔, 在不同实验中是可变的。使用 EnduRenLive 细胞底物 (Promega) 检测 R-Luc 活性, 在大多数实验中, 在感染后 1.5、2、3、4、5 和 8 小时进行测量 (在某些实验中也使用了后面的时间点)。实验结果显示在表 2 中。

[0258] 表 2

[0259]

药剂	在用指定药剂处理的细胞中, 与用对照药剂处理的细胞相比, 病毒表达的 RLuc 活性的降低 (倍数)
A6	1.14 (对照药剂不含核酸酶)
A6-N	1.18 (对照药剂含有有机核酸酶)
A7	1.66 (对照药剂不含核酸酶)

A7-N	5.61 (对照药剂含有有机核酸酶)
A8	0.99 (对照药剂不含核酸酶)
A8-N	0.75 (对照药剂含有有机核酸酶)

[0260] 三种靶抑制 SFV 复制的比较显示,寡核苷酸 A8 (正义类型寡聚物,靶是反义 RNA) 对病毒复制没有影响,而 A6 寡核苷酸 (反义,靶是 SFV 的 5'UTR) 具有中度效应,A7 寡核苷酸 (反义,靶是 nsP4 的编码区) 具有显著的抑制效应,当与有机核酸酶 (Eu) 复合时,该抑制效应扩大了 3.4 倍。

[0261] 实施例 2

[0262] 使用修饰的寡核苷酸抑制丙型肝炎病毒

[0263] 为了确定修饰的寡核苷酸对病毒基因复制的影响,产生了针对丙型肝炎病毒 (HCV)——黄病毒科丙型肝炎病毒属的一种缓慢 (慢性) 正链 RNA 病毒的反义寡核苷酸,并测量了病毒基因组复制的抑制。

[0264] HCV 病毒基因组内部的寡核苷酸和靶的名单显示在表 3 中。

[0265] 表 3

[0266]

代码	化合物的序列 (5' -3'), 5' 末端具有氨基	有机 RNase 的存在	HCV 基因组的靶区域	相对于靶的取向
B4	CTTTYACAGATAACGAYAAGGTC (SEQ ID NO. 4)	否	NS5B	反义
B4-N	CTTTYACAGATAACGAYAAGGTC (SEQ ID NO. 4)	是	NS5B	反义
B6	CTTTCACAXATAACGACAAXGTC (SEQ ID NO. 4)	否	NS5B	反义
B6-N	CTTTCACAXATAACGACAAXGTC (SEQ ID NO. 4)	是	NS5B	反义

[0267] X- 修饰的碱基, 8- 氧代 -dG ; Y- 修饰的碱基, 5-OH-dC

[0268] NS5B- 病毒 RNA 聚合酶——非结构蛋白 5B 的编码区的保守部分

[0269] 对 HCV 复制以及抑制剂对该过程的效应的分析, 使用含有 Luc- 标志物基因的 HCV 复制子进行, 并作为 RNA 转录本投送到 Lunet 细胞中。使用了没有选择标记物、含有在 HCV IRES 控制下的 Luc- 标志物以及带有病毒天然 3'UTR 的 HCV 非结构区域 (NS3-NS5B) 的 HCV 复制子 (基因型 1b) 进行分析。来自相应构建物的 cDNAs 在体外进行转录, 并通过电穿孔法与修饰的寡核苷酸化合物一起转染到 huh7/Lunet 细胞。HCV 启动了瞬时复制, 其中荧光素酶的表达与 HCV 基因组的拷贝数成比例。从转染后 4-96 小时起, 在 4 小时、24 小时、48

小时、72 小时和 96 小时时测量了荧光素酶活性（在某些实验中也使用了其他时间点）。在实验过程中，将细胞培养物分开几次，将 luc 表达水平对样品中的总蛋白进行归一化。

[0270] 荧光素酶的表达与 HCV 基因组的拷贝数成比例，并在上面提到的时间点处进行测量。带有或不带有核酸酶复合物 (Eu) 的基于修饰的核苷酸的抑制剂 (100 皮摩尔) 与病毒 RNA 加到一起（共同电穿孔）。实验的结果显示在表 4 中。

[0271] 表 4

[0272]

药剂	在用指定药剂处理的细胞中，与用对照药剂处理的细胞相比，病毒表达的荧光素酶活性的降低（倍数）
B4	2.27（对照药剂不含核酸酶）
B4-N	2.45（对照药剂含有有机核酸酶）
B6	1.71（对照药剂不含核酸酶）
B6-N	2.62（对照药剂含有有机核酸酶）

[0273] 这些结果显示，使用具有 8-氧代 -dG 或 5-OH-dC 的寡核苷酸时，观察到了使用修饰的寡核苷酸对 HCV 复制的抑制。与有机核酸酶复合的修饰的寡核苷酸有助于抗病毒活性，与缺乏核酸酶复合物的寡聚物相比，在低 10 倍的浓度下显示出了抗病毒效应。

[0274] 实施例 3

[0275] 使用修饰的寡核苷酸抑制 1 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的 Tat 激活的的基因表达

[0276] 为了确定修饰的寡核苷酸对病毒基因复制的影响，产生了针对反转录病毒科慢病毒属的 HIV-1 的反义寡核苷酸，并测量了病毒基因组复制的抑制。

[0277] HIV 病毒基因组内部的寡核苷酸和靶的名单在表 5 中给出。

[0278] 表 5

[0279]

代码	化合物的序列 (5' -3'), 5' 末端具有氨基	有机 RNase 的存在	HIV 基因组的靶区域	相对于靶的取向
A11	CTA XCC AGA GAG CTC CCA GXC TC (SEQ ID NO. 6)	否	Tar	反义
A11-N	CTA XCC AGA GAG CTC CCA GXC TC (SEQ ID NO. 6)	是	Tar	反义
A12	TTT CTT XTG AAA GAA ACT TGX CA (SEQ ID NO. 7)	否	Tat	反义

A12-N	TTT CTT XTG AAA GAA ACT TGX CA (SEQ ID NO. 7)	是	Tat	反义
A13	CTA GCC AGA GAG CTC CCA GGC TC (SEQ ID NO. 8)	否	Tar	反义
A14	TTT CTT GTG AAA GAA ACT TGG CA (SEQ ID NO. 9)	否	Tar	反义

[0280] X- 修饰的碱基, 8- 氧代 -dG

[0281] Tar-HIV RNA 的 5' 区域中的保守发夹环 ;Tat-HIV 编码蛋白, 与 Tar 元件结合, 并激活从整合的原病毒转录病毒 mRNAs 和基因组。

[0282] 这些实验使用了带有 HIV 启动子 - 荧光素酶报告基因构建物的 Jurkat 细胞系。将表达激活子 (表达 Tat 的质粒, 5ng) 与寡核苷酸抑制剂 (100 皮摩尔) 一起投送到细胞中。通过比较测量到的荧光素酶活性水平 (诱导后 24 小时), 计算了抑制剂的效应。实验结果显示在表 6 中。

[0283] 表 6

[0284]

药剂	在用指定药剂处理的细胞中, 与从未处理细胞测量到的活性相比, luc 活性的降低倍数
A11	0.89
A11-N	0.96
A12	1.34
A12-N	2.09
A13	0.92
A14	0.84

[0285] HIV-Tat 序列是修饰的反义寡核苷酸的有效靶。只有在寡核苷酸包含修饰碱基时才检测到抑制效应, 并通过存在 RNA 核酸酶活性进一步增强。

[0286] 实施例 4

[0287] 使用 S- 修饰的寡核苷酸抑制 1 型牛乳头瘤病毒的 E2 活化的基因表达和复制

[0288] 以前的结果显示, 具有包含羟基或巯基修饰的修饰碱基的寡核苷酸, 在基因复制的反义抑制中更加有效 (参见 WO 2007/125173, 在此引为参考)。为了确定这些修饰的寡核苷酸对病毒基因复制的影响, 分析了各种不同的修饰寡核苷酸抑制牛乳头瘤病毒 (BPV) E2 致癌基因的能力。

[0289] 基于使用未修饰的寡核苷酸和 siRNA 对可能的靶进行的预筛选, 选择了位于 BPV1

的 E2 蛋白的编码 mRNA 的 5' 区域中的序列 5' TGGAGACAGCATGCGAACGTTTA 3' (SEQ ID NO. 10), 作为基于修饰寡核苷酸的抑制剂的靶。针对这些序列构建了三种抑制剂, 所有三种化合物都在它们的 5' 末端包含具有铈的核酸酶复合物, 如在 W02007/125173 中所描述的。

[0290] BPV_1Eu :5' TAAACGTTTCGCATGCTGTCTCCA 3' (SEQ ID NO. 11)

[0291] BPV2_Eu :5' TAAAXGTTTCGCATGCTGTCTCCA 3', 其中 X = 5-SH-dC (SEQ ID NO :12)

[0292] BPV3_EU :5' TAAACXTTCGCATGCTGTCTCCA 3', 其中 X = 8-SH-dG (SEQ ID NO. 13)

[0293] CHO 细胞系中 E2 介导的荧光素酶表达活化的试验。 CHO 细胞不表达 E2 转基因, 因此, 为了分析寡核苷酸针对 E2 基因的活性, 需要与表达 E2 的质粒共转染。为了避免 E2 过表达, 确定了明显但仍然动态的活化所需的表达 E2 质粒的量。海肾荧光素酶 (Rluc) 的 E2 不依赖性表达被用于结果的归一化。基于以前的剂量响应分析, 选择了 1ngE2 表达质粒用于分析。1ng E2 表达质粒的转染引起了标志物表达的 4 到 5 倍的活化 (标记物表达降低 4 到 5 倍与完全不存在 E2 介导的活化相对应), 在该浓度下, E2 表达水平的小的改变引起标志物表达的总活化的显著变化。

[0294] 将 100 皮摩尔修饰的寡核苷酸抑制剂与 1ng E2 表达质粒和报告质粒一起投送到 CHO 细胞, 并观察 E2 依赖性荧光素酶表达的抑制。BPV1_EU 引起报告基因的表达降低 1.6 倍, 而 BPV2_EU 和 BPV3_EU 两者引起 E2 激活的基因表达降低大约 2 倍。基于以前计算的校正曲线, Luc 与 Rluc 比率降低 1.6 倍对应于 E2 表达降低 2 倍, Luc 与 Rluc 比率降低 2 倍对应于 E2 表达降低 3.5 倍。

[0295] 使用针对 E2mRNA 的修饰的寡核苷酸抑制剂抑制 BPV 复制。在用含有 BPV-1 最小复制原点的质粒以及 E1 和 E2 蛋白的表达质粒共转染的 CHO 细胞中, 测量了 BPV 的复制。使用 Southern 印迹法分析被转染的细胞中重组病毒原点的拷贝数。在该分析中, 分析了所有三种带有核酸酶复合物的抗 E2 修饰的寡核苷酸 (BPV1_EU, BPV2_EU 和 BPV3_EU)。结果显示, 100 皮摩尔 BPV1_EU 在转染后 72 小时引起了复制的轻微抑制。同样量的 BPV2_EU 引起了增加的抑制, 在感染后 48 和 72 小时时都可以检测到。同样量的 BPV3_EU 显示了如果有的话也是非常低的复制抑制。结果显示在图 1 中。

[0296] 这些结果显示, 带有核酸酶复合物的反义修饰寡核苷酸, 能够抑制乳头瘤病毒的 E2 活化的基因表达和 E2 依赖性的复制。与靶向同样位点的未修饰寡核苷酸相比, 反义修饰的寡核苷酸是更有效的抑制剂。具有 5-SH-dC 残基的反义修饰寡核苷酸与具有 8-SH-dG 残基的反义修饰寡核苷酸相比, 是更有效的 PV 复制抑制剂。相反, 在不同的修饰抑制剂之间, 没有观察到抑制 E2 活化的转录能力的差异。

[0297] 实施例 5

[0298] 使用巯基核碱基增加抗病毒功效并降低抑制所需的修饰寡核苷酸的浓度

[0299] 实施例 2 中描述了带有修饰的羟基碱基的寡核苷酸在瞬时表达模型中降低丙型肝炎病毒 (HCV) 的复制的证据。为了确定带有巯基核碱基的寡聚物是否具有同样增加的抗病毒效应, 在与前述相同的复制分析中, 测量了 100 皮摩尔寡核苷酸 B4-N (含有两个 5-OH-dC 碱基) 或 100 皮摩尔药剂 B6-N (含有两个 8-氧代 -dG 碱基) 的抑制效应 (表 7)

[0300] 结果显示, 巯基寡核苷酸引起了 HCV 复制的降低。当使用含有同样的核苷酸序列、只是 B4-N 的 5-OH-dC 碱基被 5-SH-dC 碱基取代而 B6-N 的 8-氧代 -dG 碱基被 8-SH-dG 碱基取代的寡核苷酸 (表 7) 重复同样的实验时, 由 B4S-N 和 B6S-N 引起的抑制效应可以在 40

皮摩尔的量下检测到,证实了用巯基碱基取代羟基碱基,将在瞬时系统中达到 HCV 复制抑制所需的抑制剂的量,降低了大约 2.5 倍。

[0301] 表 7

[0302]

药剂	序列,5' -3'	修饰的碱基	在瞬时系统中检测到对 HCV 复制的影响(最小活性量下),皮摩尔	在 30 皮摩尔下带有 HCV 靶位点的杂合病毒复制的降低(倍数)
B4-N	CTTTYACAGATAACGAYAAGGT C (SEQ ID NO. 4)	5-OH-dC	100	未检测到
B4S-N	CTTTZACAGATAACGAZAAGGT C (SEQ ID NO. 14)	5-SH-dC	40	3.4
B6-N	CTTTCACAXATAACGACAAXGT C (SEQ ID NO. 5)	8-氧代-dG	100	未检测到
B6S-N	CTTTCACAWATAACGACAAWG TC (SEQ ID NO. 15)	8-SH-dG	40	1.5

[0303] 当寡核苷酸 B4S-N 和 B6S-N 被用于抑制含有非细胞毒性 SFV 突变株带有插入的标志物的复制酶部分和具有相应靶位点(NS5A-5B 区域)的 HCV 片段的杂合病毒的复制时,当仅仅使用 30 皮摩尔抑制剂时观察到了杂合病毒复制的强烈抑制。杂合病毒复制的总降低对于 B6S-N 来说为 1.5 倍,对于 B4S-N 来说为 3.4 倍。

[0304] 这些结果证明,使用巯基碱基代替羟基碱基,增加了抗病毒效率,降低了抑制 HCV 瞬时复制所需的修饰寡核苷酸的活性浓度。增强的效应可能来自于这种修饰的寡核苷酸与靶的结合增强、这种修饰的寡核苷酸与膜(病毒复制的地点)的亲水性增加、这些修饰的寡核苷酸本身或与转染试剂组合后穿透细胞膜的能力增加、带有这些修饰的寡核苷酸在细胞环境和/或细胞外部的稳定性增加,或这些机制的任何组合。

[0305] 实施例 6

[0306] 修饰的 8-氧代-dC 核碱基数量的增加降低了抑制病毒复制所需的抑制剂的量

[0307] 为了确定修饰的核碱基的修饰位置和数量/百分率在修饰的寡核苷酸的抗病毒活性中的效应,产生了具有不同数量的修饰的 8' 或 5' 羟基核碱基的构建物,并用在抗病毒抑制分析中。

[0308] 增加每个寡核苷酸的修饰碱基数量的影响,以使用含有增加数量的修饰的 8-氧代-dG 残基的修饰寡核苷酸对 HCV 复制的抑制为例,进行说明。抑制剂的序列与 HCV 1b 基因型的 NS5B 区域反义,并具有序列:5' GGGCGGGTCCCCAGGGGGGGCAG 3' (SEQ ID NO. 16),其中 0、1、5、10 或 13 个 G 残基被 8-氧代-dG 残基取代。使用了这 5 种化合物抑制杂合病毒的复制,该杂合病毒含有非细胞毒性 SFV 突变株带有插入的标志物的复制酶部分和具有相应靶位点(NS5AB 区域)的 HCV 片段。在用杂合病毒粒子感染前 24 小时,将细胞用修饰的寡核苷酸处理,每 1 百万个 huh7 细胞使用 30 皮摩尔抑制剂。在感染后 24 小时,测量对应

于重组病毒基因组的拷贝数的 RLuc 活性。结果提供在表 8 中。

[0309] 表 8

[0310]

化合物名称	化合物中 8-氧代-dG 残基的数量	8-氧代-dG 残基（与总 G 残基相比）的 %	8-氧代-dG 残基（与总残基相比）的 %	抑制剂的序列, 5' -3', X 表示修饰碱基	RLuc 活性降低倍数
HMO_1	0	0	0	GGGGGGTCCCCAGGGGGGGCAG (SEQ ID NO. 16)	无
HMO_2	1	7.7	4.3	GGGCGXGTCCCCAGGGGGGGCAG (SEQ ID NO. 17)	无
HMO_3	5	38.5	21.7	GGXCCXGTCCCCAGGGXXGGCAG (SEQ ID NO. 18)	无到 2
HMO_4	10	76.9	43.5	GXXCXXXTCCCCAXXXXXGGXCAG (SEQ ID NO. 19)	1.4 到 4
HMO_5	13	92.9	56.5	XXCXXXTCCCCAXXXXXXXXXCAG (SEQ ID NO. 20)	2.7 到 4

[0311] 以更高的量使用 HMO_1 显示出与前三种修饰的寡核苷酸类似的抑制。这些结果显示,寡聚物抑制剂中 8'-氧代 dG 碱基数量的增加,导致在每百万个处理细胞 30 皮摩尔下检

测到的抗病毒效应增加。

[0312] 使用含有数量增加的修饰 5-OH-dC 残基的修饰寡核苷酸进行 HCV 复制的抑制, 利用与 HCV 1b 基因型的 NS4B 区域反义并具有以下序列的抑制剂来进行: 5'CTGCACAGCCCCCTCCCCTGGGC 3' (SEQ ID NO. 21), 其中 0、1、5、10 或 12 个 C 残基被 5'-OH-dC 残基取代。这 5 种化合物被用于抑制杂合病毒的复制, 该杂合病毒如上所述含有非细胞毒性 SFV 突变株带有插入的标志物的复制酶部分和具有相应靶位点 (NS3-4B 区域) 的 HCV 片段。结果提供在表 9 和图 2 中。

[0313] 表 9

[0314]

化合物名称	化合物中的 5-OH-dC 残 基	5-OH-dC 残基 (与总 C 残基 相比)的%	5-OH-dC 残基 (与总残基相 比)的%	抑制剂的序列, 5'-3', Y 表示修饰碱 基	RLuc 活性 的降低倍数
HMO_6	0	0	0	CTGCACAGCCCCCTCCCCCTGGGC (SEQ ID NO 21)	0.96
HMO_7	1	7.7	4.3	CTGYACAGCCCCCTCCCCCTGGGC (SEQ ID NO 22)	1.07
HMO_8	5	38.5	21.7	CTGYACAGYCCCTCYCTGGGC (SEQ ID NO 23)	1.3-2.7
HMO_9	10	76.9	43.5	CTGYACAGYYYYTYYYYTGGGC (SEQ ID NO 24)	5.6-9.8
HMO_10	12	92.3	52.2	YTGAYAGYYYYTYYYYTGGGC (SEQ ID NO 25)	8.1-10

[0315] 这些结果显示,与具有单个 5-OH-dC 碱基的寡核苷酸相比,具有 5 个 5-OH-dC 碱基的寡核苷酸的抑制效应增加 2.5 倍,具有 10 个 5-OH-dC 碱基的寡核苷酸的抑制与单碱基取

代相比增加了超过 9 倍。

[0316] 实施例 7

[0317] 核酸酶复合物增加了具有高含量的修饰 8-氧代 -dG、5-氧代 -dC 或 6-OH-dU 碱基的寡核苷酸的抗病毒功效

[0318] 为了评估每个寡核苷酸含有大量修饰碱基的修饰寡核苷酸中核酸酶复合物的存在的效应,分析了含有 0、5 或 10 个修饰的 5-OH-dC 残基的修饰寡核苷酸对 HCV 复制的抑制。

[0319] 抑制剂的序列与 HCV 1b 基因型的 NS4B 区域反义,并具有序列: 5' CTGCACAGCCCCCTCCCCTGGGC 3' (SEQ ID NO. 21),其中 0、1、5 或 10 个 C 残基被 5' -OH-dC 残基取代;寡核苷酸具有或不具有核酸酶复合物。这 6 种化合物被用于抑制杂合病毒的复制,该杂合病毒含有非细胞毒性 SFV 突变株带有插入的标志物的复制酶部分和具有相应靶位点 (NS3-4B 区域) 的 HCV 片段。在用杂合病毒粒子感染前 24 小时,将细胞用修饰的寡核苷酸处理,每 1 百万个 huh7 细胞使用 30 皮摩尔这些抑制剂。在感染后 24 小时,测量对应于重组病毒基因组的拷贝数的 RLuc 活性,并提供在表 10 中。

[0320] 表 10

[0321]

化合物中 5-OH-dC 残基 的数量	5-OH-dC 残基 (与总 C 残基相 比)的%	核酸酶 复合物的 存在	在抑制剂处理的细胞中,与未处理的对照细胞相比,RLuc 活性(杂合病毒的复制)的降低。括号中给出核酸酶引起的增强的倍数。
0	0	否	0.96
0	0	是	1.3(1.38)
5	38.5	否	2.7
5	38.5	是	4.3(1.59)
10	76.9	否	9.8
10	76.9	是	29.9(3.1)

[0322] 这些结果显示,添加核酸酶复合物增加了具有 5 或 10 个 5-OH-dC 碱基的寡核苷酸的抗病毒效应。抑制的增强依赖于不含核酸酶的抑制剂的功效;化合物本身活性越高,核酸酶提供的附加效应越强。

[0323] 对于具有 5 个或 10 个修饰的 8-氧代 -dG 残基的寡核苷酸和具有 9 个 6-OH-dU 残基的寡核苷酸,证实了同样的原理。

[0324] 在附加的分析中,测试了与 HCV 1b 基因型的 NSSB 区域反义的抑制剂,它具有序列:5' GGGCGGGTCCCCAGGGGGGCAG 3' (SEQID NO. 16),其中 5 个或 10 个 G 残基被 8' -氧代 -dG 残基取代,并带有或不带有核酸酶复合物。这 6 种化合物被用于抑制杂合病毒的复制,该杂合病毒含有非细胞毒性 SFV 突变株的带有插入的标志物的复制酶部分,和具有相应靶位点 (NS5AB 区域) 的 HCV 片段。在用杂合病毒粒子感染前 24 小时,将细胞用修饰的

寡核苷酸处理,每 1 百万个 huh7 细胞使用 30 皮摩尔这些抑制剂。在感染后 24 小时,测量对应于重组病毒基因组的拷贝数的 RLuc 活性,并提供在图 3 中。

[0325] 这些结果显示,添加核酸酶复合物增加了具有 5 或 10 个 8'-氧代-dG 残基的寡核苷酸的抗病毒效应,因此结果可以在逻辑上扩展到含有任何数量的任何羟基修饰的核碱基的寡核苷酸上。

[0326] 上述实验可以使用具有 9 个 T 残基被 6-OH-dC 残基取代的寡核苷酸进行重复。预计具有这些取代的寡聚物与具有 8-氧代-dG 残基的寡聚物,将具有类似的抑制活性。

[0327] 实施例 8

[0328] 核酸酶复合物降低了具有高含量羟基修饰的核碱基的修饰核苷酸的有效浓度

[0329] 为了确定每个寡核苷酸含有大量修饰碱基数的寡核苷酸中核酸酶复合物对化合物的有效浓度 50 的影响,检测了带有或不带有核酸酶复合物的、含有 10 个 5-OH-dC 残基的修饰寡核苷酸对 HCV 复制的抑制。

[0330] 在抑制分析中使用了与 HCV 1b 基因型的 NS4B 区域反义的抑制剂,它具有序列 5' CTGCACAGCCCCCTCCCCTGGGC 3' (SEQ ID NO. 21),其中 10 个 C 残基被 5'-OH-dC 残基取代。也检测了带有或不带有核酸酶复合物的寡核苷酸。使用这些化合物的连续稀释液来抑制杂合病毒的复制,该杂合病毒含有非细胞毒性 SFV 突变株的带有插入标志物的复制酶部分,和具有相应靶位点(NS3-4B 区域)的 HCV 片段。在用杂合病毒粒子感染前 24 小时,将细胞用修饰的寡核苷酸处理,每 1 百万个 huh7 细胞使用 30、15、7.5、3.75 或 1.875 皮摩尔这些抑制剂。在感染后 24 小时,测量对应于重组病毒基因组的拷贝数的 RLuc 活性,并提供在表 11 和图 4 中。

[0331] 表 11

[0332]

抑制剂的量(皮摩尔)	在抑制剂处理的细胞中,与未处理的对照细胞相比,RLuc 活性(杂合病毒的复制)的降低	
	无核酸酶	有核酸酶
30	5.7	27.2
15	2.4	19.4
7.5	1.6	6.9
3.75	1.4	3.8
1.875	1	2.1

[0333] 将细胞用抗病毒寡核苷酸的两倍稀释液处理,通过含有相应靶位点的重组病毒复制的降低来分析它们的抗病毒功效(图 4)。重组病毒复制的抑制,通过测量从病毒的基因组 RNA 表达的 RLuc 活性来监测。

[0334] 这些结果显示,添加核酸酶复合物增加了具有 10 个修饰碱基的抑制性寡核苷酸的抗病毒效应,将达到病毒复制的 50%降低所需的抑制剂的量,从大约 10 皮摩尔降低到低于 1.875 皮摩尔。预计同样的原则也适用于具有任何修饰的核碱基或修饰的核碱基的任何

组合的寡核苷酸。

[0335] 为了确定每个寡核苷酸带有多个 6-OH-dU 碱基的寡核苷酸对抑制 HCV 复制的影响,在如上所述的抑制分析中使用了含有 9 个 6-OH-dU 残基的寡核苷酸。抑制剂与 HCV 1b 基因型的 NS3 区域反义,并具有序列:5' AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC 3' (SEQ ID NO. 26),其中 0 或 9 个 T 残基被 6'-OH-dT 残基取代(表 12)。这两种化合物被用于抑制杂合病毒的复制,该杂合病毒如上所述含有非细胞毒性 SFV 突变株带有插入的标志物的复制酶部分和具有相应靶位点(NS3-4B 区域)的 HCV 片段。

[0336] 表 12

[0337]

化合物名称	化合物中 6-OH-dC 残基的数量	6-OH-dU 残基 (与总 T 残基相比)的%	6-OH-dU 残基 (与总残基相比)的%	抑制剂的序列,5'-3',U 表示修饰碱基
HMO_11	0	0	0	AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC (SEQ ID NO. 26)
HMO_12	9	100	39	AGUUGUCUCCUGCCUGCUUAG UC (SEQ ID NO. 27)

[0338] 实施例 9

[0339] 在相同位置含有多个羟基核碱基或巯基核碱基的寡核苷酸的抗病毒效应的比较

[0340] 为了确定巯基核碱基对抗病毒反义寡聚物的抑制活性的影响,产生了每个寡核苷酸具有多个 5-SH-dC 或 8-SH-dG 碱基的寡核苷酸,并将抗病毒活性与在相应位置含有羟基核碱基的寡核苷酸进行了比较。进行了测量 HCV 复制被含有 7 个 5-SH-dC 残基或 5 个 8-SH-dG 残基的修饰寡核苷酸抑制的分析。抑制剂与 HCV 1b 基因型的 NS3 区域反义,并包含序列:5' AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC 3' (SEQ ID NO. 26),并具有 0 个修饰的残基、7 个 5-SH-dC 碱基或 5-OH-dC 残基(取代所有 C 残基)、或 5 个 8-SH-dG 或 8-氧代-dG 残基(取代所有 G 残基)。使用这 5 种化合物(表 13)抑制杂合病毒的复制,该杂合病毒如上所述含有非细胞毒性 SFV 突变株带有插入的标志物的复制酶部分和具有相应靶位点(NS3-4B 区域)的 HCV 片段。

[0341] 表 13

[0342]

化合物名称	化合物中 5-SH-dC 或 5-OH-dC 残基的数量	化合物中 8-SH-dG 或 8-氧代-dG 残基的数量	修饰残基(与总残基相比)的%	抑制剂的序列,5'-3',Y 表示 5-SH-dC,Z 表示 5-OH-dC,X 表示 8-SH-dG,W 表示 8-氧代-dG
HMO_11	0	0	0	AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC (SEQ ID NO. 26)

HMO_13	7	0	30.4	AGTTGTYTYTGYTGYTTAGT Y (SEQ ID NO. 28)
HMO_14	7	0	30.4	AGTTGTZTZZTGZZTGZTTAGTZ (SEQ ID NO. 29)
HMO_15	0	5	21.7	AXTTXTCTCCTXCCTXCCTAXTC (SEQ ID NO. 30)
HMO_16	0	5	21.7	AWTTWTCTCCTWCCTWCCTAW TC (SEQ ID NO. 31)

[0343] 预计到了多取代寡核苷酸的强的抗病毒效应,当存在巯基核碱基时,与使用羟基核碱基时相比,可能具有改进的抗病毒活性。

[0344] 实施例 10

[0345] 使用多个巯基核碱基和羟基核碱基的组合增加了抗病毒功效

[0346] 为了确定多个巯基核碱基和羟基核碱基在寡核苷酸抗病毒活性中的效应,分析了巯基和羟基修饰的核碱基在一个寡核苷酸中的组合使用。这以使用含有 5 个 5-SH-dC 和两个 5-OH-dC 残基、或两个 5-SH-dC 和 5 个 5-OH-dC 残基的修饰寡核苷酸抑制 HCV 复制为例,进行了说明。使用了与 HCV 1b 基因型的 NS3 区域反义的抑制剂,它包含序列: 5' AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC 3' (SEQ ID NO. 26),并具有 0 个修饰的残基,具有 5 个 5-SH-dC 碱基和两个 5-OH-dC 残基,或具有两个 5-SH-dC 和 5 个 5-OH-dC 残基(因此取代了所有 C 残基)。这 3 种化合物与 HMO_13 和 HMO_14 一起(表 14),用于抑制杂合病毒的复制,该杂合病毒如上所述含有非细胞毒性 SFV 突变株带有插入的标志物的复制酶部分和具有相应靶位点(NS3-4B 区域)的 HCV 片段。

[0347] 表 14

[0348]

化合物名称	化合物中 5-SH-dC 残基的数量	化合物中 5-OH-dC 残基的数量	修饰残基(与总残基相比)的%	抑制剂的序列,5' -3', Y 表示 5-SH-dC, Z 表示 5-OH-dC
HMO_11	0	0	0	AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC (SEQ ID NO. 26)
HMO_13	7	0	30.4	AGTTGTYTYTGYTGYTTAGT Y (SEQ ID NO. 32)
HMO_14	7	0	30.4	AGTTGTZTZZTGZZTGZTTAGTZ (SEQ ID NO. 33)

HMO_17	5	2	30.4	AGTTGTYTYZTGYZTGYTTAGT Y (SEQ ID NO. 34)
HMO_18	2	5	30.4	AGTTGTZTZYTGGZTGTAGTZ (SEQ ID NO. 35)

[0349] 使用与 HCV 1b 基因型的 NS3 区域反义的修饰的寡核苷酸抑制剂进行了附加的测定,所述抑制剂具有如下序列:5' AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC 3,含有 7 个 5-SH-dC 和 5 个 8-SH-dG 残基、7 个 5-OH-dC 和 5 个 5-氧代-dG 残基、或 9 个 6-OH-dU 和 7 个 5-OH-dC 残基(表 15)。因此,使用了用修饰的核苷酸取代了所有 C 残基和 G 残基,或取代了所有 T 和 C 核苷酸的寡核苷酸。这四种化合物与 HMO_13、HMO_14、HMO_15 和 HMO_16(前面所述)一起,用于抑制如上所述的杂合病毒的复制。

[0350] 表 15

[0351]

化合物名称	化合物中 5-SH-dC 或 5-OH-dC 残 基的数量	化合物中 8-SH-dG 残基或 8-氧代-dG 残基 的数量	化合物中修饰 的 6-OH-dU 残 基的数量	抑制剂的序列,5'-3',Y 表示 5-SH-dC,Z 表示 5-OH-dC,X 表示 8-SH-dG,W 表示 8-氧代-dG,U 表 示 6-OH-dU 残基
HMO_11	0	0	0	AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC (SEQ ID NO. 26)
HMO_13	7	0	0	AGTTGTYTYTGYTGYTTAGT Y (SEQ ID NO. 28)
HMO_14	7	0	0	AGTTGTZTZTGGZTGTAGTZ (SEQ ID NO. 29)
HMO_15	0	5	0	AXTTXTCTCCTXCCTXTATC (SEQ ID NO. 30)
HMO_16	0	5	0	AWTTWTCTCCTWCCTTAW TC (SEQ ID NO. 31)
HMO_19	7	5	0	AWTTWTZTZZTWZZTWZTTAWT Z (SEQ ID NO. 35)
HMO_20	7	5	0	AXTTXTYTYTXYTXYTTAXT Y (SEQ ID NO. 36)
HMO_21	7	0	9	AGUUGUZUZGZZUGZUAGU Z (SEQ ID NO. 37)

[0352] 预期有强的抗病毒效应,在表达巯基核碱基的寡聚物中可能比具有羟基核碱基的寡聚物中更好。上面的结果表明,任何类型的修饰(巯基/羟基和/或不同核碱基)可以组合,这将导致抗病毒效应增强。考虑到了任何数量的可能组合。

[0353] 实施例 11

[0354] 核酸酶复合物增加了具有任何修饰核碱基的寡核苷酸及其任何组合的抗病毒功效

[0355] 已经显示,向修饰的寡核苷酸添加核酸酶复合物,增加了修饰的寡核苷酸的基因失活(参见 WO 2007/125173)。为了确定与修饰的寡核苷酸复合的核酸酶的效应,分析了与 HCV 1b 基因型的 NS3 区域反义的抑制剂,它具有序列:5' AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC 3' (SEQ ID NO. 26)。带有或不带有核酸酶复合物的寡核苷酸 HMO_11(没有修饰)、HMO_12、HMO_13、HMO_14、HMO_15、HMO_16、HMO_17、HMO_18、HMO_19、HMO_20 和 HMO_21(表 16),被用于抑制杂合病毒的复制。

[0356] 表 16

[0357]

化合物名称	化合物中 5-SH-dC 或 5-OH-dC 残基的数量	化合物中 8-SH-dG 残基或 8-氧代-dG 残基的数量	化合物中修饰的 6-OH-dU 残基的数量	抑制剂的序列,5'-3',Y 表示 5-SH-dC,Z 表示 5-OH-dC,X 表示 8-SH-dG,W 表示 8-氧代-dG,U 表示 6-OH-dU 残基
HMO_11	0	0	0	AGTTGTCTCCTGCCTGCTTAGTC (SEQ ID NO. 26)
HMO_12	0	0	9	AGUUGUCUCCUGCCUGCUUAG UC (SEQ ID NO. 38)
HMO_13	7	0	0	AGTTGTYTYTGYTGYTTAGT Y (SEQ ID NO. 39)
HMO_14	7	0	0	AGTTGTZTZZTGZZTGZTTAGTZ (SEQ ID NO. 40)
HMO_15	0	5	0	AXTTXTCTCCTXCCTXCTTAXTC (SEQ ID NO. 41)
HMO_16	0	5	0	AWTTWTCTCCTWCCTWCCTAW TC (SEQ ID NO. 42)
HMO_17	7	0	0	AGTTGTYTYZTGYZTGYTTAGT Y (SEQ ID NO. 43)
HMO_18	7	0	0	AGTTGTZTYTGZYTGTZTTAGTZ (SEQ ID NO. 44)
HMO_19	7	5	0	AWTTWTZTZZTWZZTWZTTAWT Z (SEQ ID NO. 45)
HMO_20	7	5	0	AXTTXTYTYTYTYTYTYTTAXT Y (SEQ ID NO. 46)

HMO_21	7	0	9	AGUUGUZUZZUGZZUGZUUAGU Z (SEQ ID NO. 47)
--------	---	---	---	---

[0358] 由于核酸酶复合物对具有任何组合和数量的修饰核碱基的高活性反义寡核苷酸的附加效应,预计任何高活性化合物都能通过核酸酶的存在而进一步激活。

[0359] 实施例 12

[0360] 使用不同的修饰寡核苷酸的组合增加这种处理的抗病毒效应

[0361] 将 huh7 细胞用不同的靶向相同位点的修饰的寡核苷酸(样品选自前面描述的化合物 HMO_11 到 HMO_21)或靶向不同靶位点的修饰的寡核苷酸进行处理:一种化合物选自化合物 HMO_11 到 HMO_21 的名单,另一种选自名单 HMO_8 到 HMO_10。测试了其中没有化合物、任何一种化合物或两种化合物包含核酸酶基团的寡核苷酸的组合。用于处理的寡核苷酸的量如下:每种 15 皮摩尔(共 30 皮摩尔),或对应于每种化合物的有效剂量 50 的量。

[0362] 与上面描述的分析中一样,化合物的组合用于抑制杂合病毒的复制。预计使用靶向不同位点的寡核苷酸比使用靶向相同位点的不同修饰的寡核苷酸更为有效,并且用修饰的寡核苷酸处理的抑制效应通过使用几种不同的寡核苷酸而得到增强。此外,用修饰的寡核苷酸处理(类似于本技术领域描述的用 siRNA 处理)将减少在靶区域中出现带有突变的病毒基因组,从而降低了对抗病毒治疗的抗性。

[0363] 实施例 13

[0364] 修饰的寡核苷酸在稳定转染的细胞系中抑制 HCV 复制

[0365] 为了确定修饰的寡核苷酸在 HCV 感染的体外模型中的效应,通过用带有抗生素抗性标记物和海肾荧光素酶报告基因的荧光素酶的 HCV 复制子转染 huh7 细胞系,建立了 HCV 持续感染模型。HCV 复制通过分析报告蛋白表达水平进行监测。将细胞用修饰的反义寡核苷酸进行处理(如果需要,处理多次),并通过在处理后的选定的时间点测量荧光素酶活性来监测它们的功效。

[0366] 该分析与上面提出的类似,使用了在前面的实施例中描述的寡核苷酸组合物。使用具有巯基核碱基、羟基核碱基的寡核苷酸、利用螯合剂和金属离子与核酸酶复合的组合物来进行分析。预计化合物对于已建立慢性感染的病毒(因此它与患者中 HCV 慢性感染相关,而慢性感染是由 HCV 引起的最重要的疾病状况),也具有效应。

[0367] 实施例 14

[0368] 修饰的反义寡核苷酸在瞬时转染的小鼠中抑制 HCV 转基因的表达

[0369] HCV 不在啮齿动物中复制,对于该病毒不存在好的小型动物模型。为了证实修饰的反义寡核苷酸在体内条件中的功效,使用了用水动力冲击方法(hydrodynamic shock method)转染的小鼠作为模型。构建了表达构建物,它转录的 mRNA 含有去稳定化的海肾荧光素酶报告基因的编码区域和 HCV 区域,HCV 区域含有反义修饰寡核苷酸的靶位点。含有该表达单元的 DNA 质粒使用水动力冲击方法(Yeikilis 等,WorldJ Gastroenterol.12: 6149-55.(2006);Andrianaivo 等,J Gene Med.6:877-83(2004))投送到对象小鼠的肝脏中,通过测量肝脏组织中报告基因的活性,对含有 HCV 序列的 mRNAs 的表达进行定量。

[0370] 通过与表达构建物共转染,或通过投送表达构建物之前、一起和/或之后反复地投送化合物,将与表达构建物中的 HCV 特异性区域反义的修饰的抗病毒寡核苷酸,投送

到小鼠的肝脏。在分析中使用了在实施例 3-11 中描述的化合物以及在实施例 12 中描述的它们的组合。

[0371] 预计修饰的寡核苷酸在体内表现出有效的抗病毒活性,并抑制病毒转基因的复制。

[0372] 使用本技术领域公知的适合的动物模型,也针对其他治疗相关病毒测量了修饰的寡核苷酸。

[0373] 本技术领域的专业人员将会预计到,对上面的说明性实施例中提出的本发明可以进行大量的修改和改变。因此,只有在随附的权利要求书中出现的限制,才适用于本发明。

序列表

<110> 波罗的科技发展有限公司

<120> 带有修饰碱基的寡核苷酸作为抗病毒剂的应用

<130>SCT102174-10

<150>60/985.548

<151>2007-11-05

<150>61/057,685

<151>2008-05-30

<160>47

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(11)..(11)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(11)..(11)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(22)..(22)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(22).. (22)

<223>n is a, c, g, or t

<400>1

ttaatctctc ncgtagcgga gnt

23

<210>2

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(3).. (3)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(3).. (3)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(6).. (6)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(22)..(22)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(22)..(22)

<223>n is a, c, g, or t

<400>2

atnttntcgt cgccgatgaa gnc

23

<210>3

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial_Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(11)..(11)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(11)..(11)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(16)..(16)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(16)..(16)

<223>n is a, c, g, or t

<400>3

gccttcacg ncgacnaca cat 23

<210>4

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<400>4

ctttnacaga taacganaag gtc 23

<210>5

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (9)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(20).. (20)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (20)

<223>n is a, c, g, or t

<400>5

ctttcacana taacgacaan gtc

23

<210>6

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(4).. (4)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(4).. (4)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(20).. (20)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (20)

<223>n is a, c, g, or t

<400>6

ctanccagag agctcccagn ctc

23

<210>7

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(21).. (21)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(21).. (21)

<223>n is a, c, g, or t

<400>7

tttcttntga aagaaacttg nca 23

<210>8

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<400>8

ctagccagag agctcccagg ctc 23

<210>9

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<400>9

tttcttgtga aagaaacttg gca 23

<210>10

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<400>10

tggagacagc atgcgaacgt tta 23

<210>11

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<400>11

taaacgttcg catgctgtct cca 23

<210>12

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(5)..(5)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(5)..(5)

<223>n is a, c, g, or t

<400>12

taaangttcg catgctgtct cca 23

<210>13

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(6).. (6)

<223>n is a, c, g, or t

<400>13

taaacnttcg catgctgtct cca 23

<210>14

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17)..(17)

<223>n is a, c, g, or t

<400>14

ctttnacaga taacganaag gtc 23

<210>15

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(9)..(9)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(9)..(9)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(20)..(20)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(20)..(20)

<223>n is a, c, g, or t

<400>15

ctttcacana taacgacaan gtc 23

<210>16

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<400>16

gggcgggtcc ccaggggggg cag 23

<210>17

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(6).. (6)

<223>n is a, c, g, or t

<400>17

gggcgngtcc ccaggggggg cag 23

<210>18

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(3).. (3)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(3).. (3)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (6)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (18)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(18).. (18)

<223>n is 8-oxo-dG

<400>18

ggncnngtcc ccagggngg cag

23

<210>19

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(2).. (2)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(2).. (3)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(3).. (3)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(14).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(15).. (15)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(20).. (20)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(20)..(20)

<223>n is a, c, g, or t

<400>19

gnncnnntcc ccannnnnggn cag

23

<210>20

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(1)..(1)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(1)..(3)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(2)..(2)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(3)..(3)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(5)..(5)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(14).. (20)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(15).. (15)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(18)..(18)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(19)..(19)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(20)..(20)

<223>n is 8-oxo-dG

<400>20

nnncnntcc ccannnnnnn cag 23

<210>21

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<400>21

ctgcacagcc ccctcccctg ggc 23

<210>22

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(4).. (4)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(4).. (4)

<223>n is a, c, g, or t

<400>22

ctgnacagcc ccctcccctg ggc

23

<210>23

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified base

<222>(4).. (4)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(4).. (4)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(16).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<400>23

ctgnacagnn ccctcnnctg ggc 23

<210>24

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(4).. (4)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(4).. (4)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (13)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(11).. (11)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(12).. (12)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(15).. (15)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature
<222>(15)..(18)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(16)..(16)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>modified_base
<222>(17)..(17)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>modified_base
<222>(18)..(18)
<223>n is 5-OH-dC

<400>24
ctgnacagnn nnntnnnntg ggc 23

<210>25
<211>23
<212>DNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>
<221>modified_base
<222>(1)..(1)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>misc_feature
<222>(1)..(1)
<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(4).. (4)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(4).. (4)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(6).. (6)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (13)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(11).. (11)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(12).. (12)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(15).. (15)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(15).. (18)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(18).. (18)

<223>n is 5-OH-dC

<400>25

ntgnanagnn nnntnnnntg ggc

23

<210>26

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<400>26

agttgtctcc tgcctgctta gtc 23

<210>27

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(3)..(3)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature

<222>(3)..(4)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(4)..(4)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(6)..(6)

<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>misc_feature
<222>(6).. (6)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(8).. (8)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>misc_feature
<222>(8).. (8)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(11).. (11)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>misc_feature
<222>(11).. (11)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(15).. (15)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>misc_feature
<222>(15).. (15)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(18).. (18)
<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature

<222>(18)..(19)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(19)..(19)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(22)..(22)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature

<222>(22)..(22)

<223>n is a, c, g, or t

<400>27

agnngncnc ngccngcanna gnc

23

<210>28

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(7)..(7)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7)..(7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>28

agttgtntnn tgnntgntta gtn

23

<210>29

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n i s 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>29

agttgtntnn tgnntgntta gtn 23

<210>30

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Sythetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(2).. (2)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(2).. (2)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(12).. (12)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(12).. (12)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(16).. (16)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(21).. (21)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(21).. (21)

<223>n is a, c, g, or t

<400>30

antttntctcc tncctnctta ntc

23

<210>31

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(2).. (2)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(2).. (2)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(5).. (5)
<223>n is 8-oxo-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(5).. (5)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(12).. (12)
<223>n is 8-oxo-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(12).. (12)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(16).. (16)
<223>n is 8-oxo-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(16).. (16)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(21).. (21)
<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(21).. (21)

<223>n is a, c, g, or t

<400>31

antttntctcc tncctnctta ntc 23

<210>32

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Sythetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n i s 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>32

agttgtntnn tgnntgntta gtn

23

<210>33

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(7)..(7)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7)..(7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9)..(9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9)..(10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10)..(10)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13)..(13)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>33

agttgtntnn tgnntgntta gtn

23

<210>34

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>34

agttgtntnn tgnntgntta gtn

23

<210>35

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(2).. (2)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(2).. (2)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(5).. (5)
<223>n is 8-oxo-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(5).. (5)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(7).. (7)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>misc_feature
<222>(7).. (7)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(9).. (9)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>misc_feature
<222>(9).. (10)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(10).. (10)
<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(12).. (12)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(12).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(16).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(21).. (21)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(21).. (21)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>35

antttntntnn tnnntnntta ntn

23

<210>36

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(2).. (2)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(2).. (2)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(12).. (12)

<223>n is 8-SH-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(12).. (14)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(13).. (13)
<223>n is 5-SH-dC

<220>
<221>modified_base
<222>(14).. (14)
<223>n is 5-SH-dC

<220>
<221>modified_base
<222>(16).. (16)
<223>n is 8-SH-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(16).. (17)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(17).. (17)
<223>n is 5-SH-dC

<220>
<221>modified_base
<222>(21).. (21)
<223>n is 8-SH-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(21).. (21)
<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>36

anttnntntnn tnnntnntta ntn 23

<210>37

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(3).. (3)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature

<222>(3).. (4)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(4).. (4)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature

<222>(6).. (11)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(8).. (8)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(11).. (11)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (15)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(14).. (14)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>modified_base
<222>(15).. (15)
<223>n is 5-OH-dC
<220>
<221>modified_base
<222>(17).. (17)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>misc_feature
<222>(17).. (19)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(18).. (18)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>modified_base
<222>(19).. (19)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>modified_base
<222>(22).. (22)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>misc_feature

<222>(22).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-OH-dC

<400>37

agnngnnnnn ngnnngnnna gnn

23

<210>38

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(3).. (3)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature

<222>(3).. (4)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(4).. (4)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature
<222>(6).. (6)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(8).. (8)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>misc_feature
<222>(8).. (8)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(11).. (11)
<223>n is 6-OH-dU
<220>
<221>misc_feature
<222>(11).. (11)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(15).. (15)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>misc_feature
<222>(15).. (15)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(18).. (18)
<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature
<222>(18).. (19)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(19).. (19)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>modified_base
<222>(22).. (22)
<223>n is 6-OH-dU

<220>
<221>misc_feature
<222>(22).. (22)
<223>n is a, c, g, or t

<400>38
agnngncnc ngccngcna gnc 23
<210>39
<211>23
<212>DNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>
<221>modified_base
<222>(7).. (7)
<223>n is 5-SH-dC

<220>
<221>misc_feature
<222>(7).. (7)
<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>39

agttgtntnn tgnntgntta gtn 23

<210>40

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9)..(10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10)..(10)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13)..(13)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13)..(14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14)..(14)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(17)..(17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17)..(17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23)..(23)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>40

agttgtntnn tgnntgntta gtn 23

<210>41

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(2).. (2)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(2).. (2)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(12).. (12)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(12)..(12)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(16)..(16)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(16)..(16)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(21)..(21)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(21)..(21)

<223>n is a, c, g, or t

<400>41

antttntctcc tncctnctta ntc

23

<210>42

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(2)..(2)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(2).. (2)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(12).. (12)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(12).. (12)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(16).. (16)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(21).. (21)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(21).. (21)

<223>n is a, c, g, or t

<400>42

antnttctcc tncctnctta ntc 23

<210>43

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>43

agttgtntnn tgnntgntta gtn

23

<210>44

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(16).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>44

agttgtntnn tgnntnntta gtn

23

<210>45

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(2).. (2)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(2).. (2)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>misc_feature
<222>(9)..(10)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(10)..(10)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>modified_base
<222>(12)..(12)
<223>n is 8-oxo-dG

<220>
<221>misc_feature
<222>(12)..(14)
<223>n is a, c, g, or t

<220>
<221>modified_base
<222>(13)..(13)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>modified_base
<222>(14)..(14)
<223>n is 5-OH-dC

<220>
<221>modified_base
<222>(16)..(16)
<223>n is 8-oxo-dC

<220>
<221>misc_feature
<222>(16)..(17)
<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (21)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(21).. (21)

<223>n is 8-oxo-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>45

anttnntntnn tnnntnnttn ntn

23

<210>46

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified base

<222>(2).. (2)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(2).. (2)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(9).. (10)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(12).. (12)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(12).. (14)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>misc_feature

<222>(16).. (17)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (21)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(21).. (21)

<223>n is 8-SH-dG

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-SH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(23).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<400>46

anttnntntnn tnnntnnttn ntn 23

<210>47

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotides

<220>

<221>modified_base

<222>(3).. (3)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature

<222>(3).. (4)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(4).. (4)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(6).. (6)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature

<222>(6).. (11)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(8).. (8)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(9).. (9)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(10).. (10)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(11).. (11)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(13).. (13)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(13).. (15)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>modified_base

<222>(15).. (15)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(17).. (17)

<223>n is 5-OH-dC

<220>

<221>misc_feature

<222>(17).. (19)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(18).. (18)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(19).. (19)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>modified_base

<222>(22).. (22)

<223>n is 6-OH-dU

<220>

<221>misc_feature

<222>(22).. (23)

<223>n is a, c, g, or t

<220>

<221>modified_base

<222>(23).. (23)

<223>n is 5-OH-dC

<400>47

agnngnnnnn ngnnngnnna gnn

23

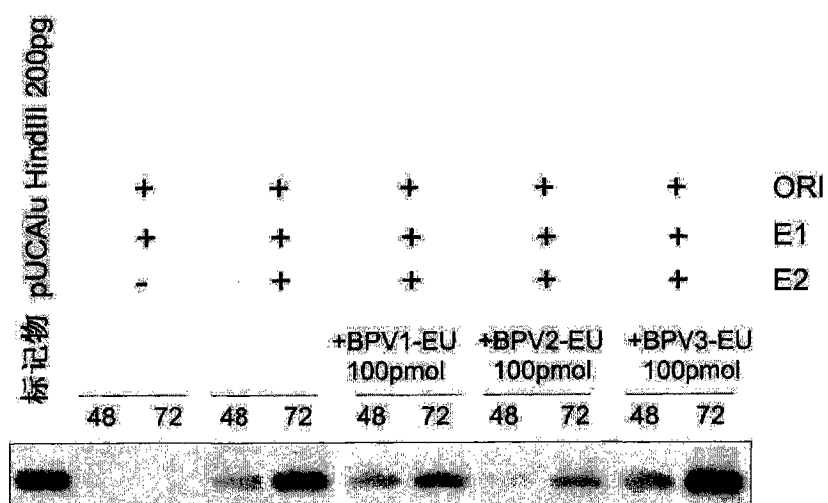


图 1

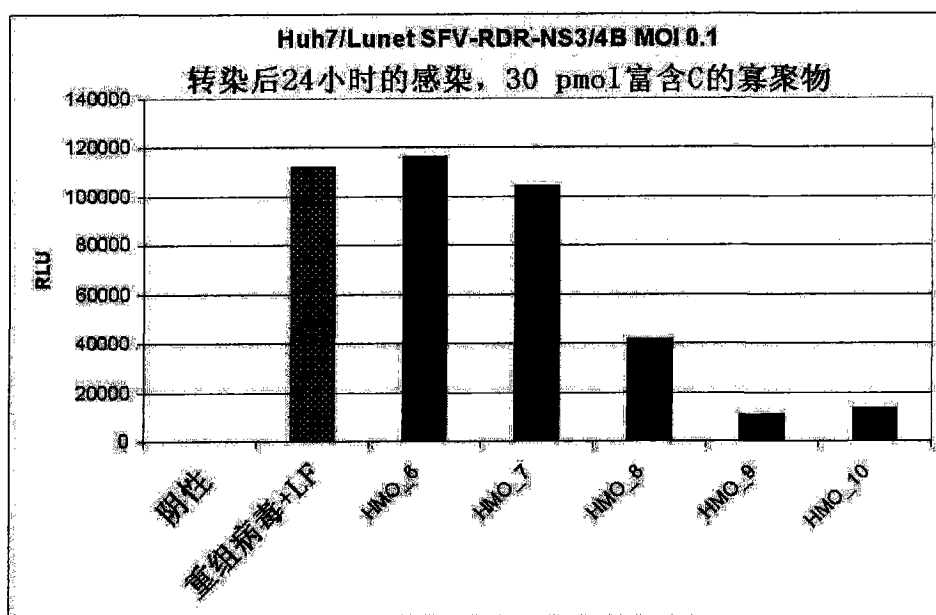


图 2

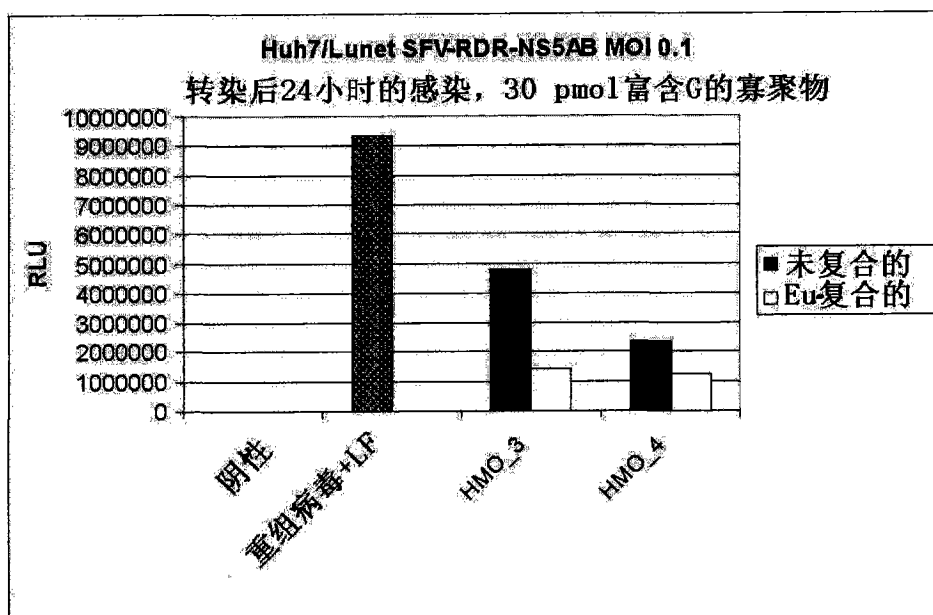


图 3

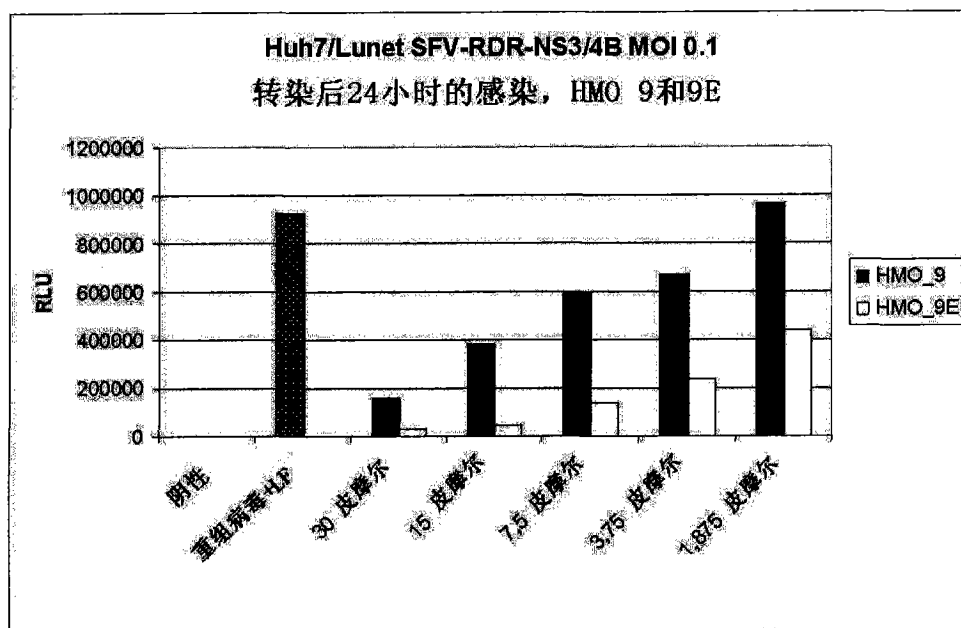


图 4