[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
*A61K 48/00 (2006.01)*
*C12N 15/11 (2006.01)*
*A61P 1/00 (2006.01)*

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480012344.9

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 100556461C

[22] 申请日 2004.3.8
[21] 申请号 200480012344.9
[30] 优先权
[32] 2003.4.2 [33] IT [31] RM2003A000149
[86] 国际申请 PCT/IT2004/000117 2004.3.8
[87] 国际公布 WO2004/087920 英 2004.10.14
[85] 进入国家阶段日期 2005.11.7
[73] 专利权人 吉利亚尼国际有限公司
地址 爱尔兰都柏林
[72] 发明人 G·蒙特里昂
[56] 参考文献
US6159697A 2000.12.12
US 6159397A 2000.12.12
US2002034736A1 2002.3.21
Blocking SMAD7 RESTORES TGF - BETA1 SIGNALING INCHRONIC INFLAMMATORY BOWEL DESEASE.. Monteleone G. J. CLINICAL. INVESTIGATION, Vol. 108 No. 4. 2001
审查员 潘俊宇
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 陶家蓉

权利要求书 2 页 说明书 28 页 附图 5 页

[54] 发明名称

# 抗 Smad7 的反义寡核苷酸(ODN)及其在医药领域中的用途

[57] 摘要

本发明涉及适当修饰的抗 Smad7 的反义寡核苷酸序列(ODN)及其作为治疗性生物制剂在医药领域中的用途，特别是用于治疗慢性炎性肠病，例如克罗恩病和溃疡性结肠炎。

1．抗 Smad7 的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，其长度直至 21 个核苷酸并包含具有以下 SEQ.ID.NO:2 所示序列或其互补序列：

5'-GTXYCCCCTTCTCCCXYCAG-3'

其中 X 是含有选自胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶和 2'-O-甲基胞嘧啶的含氮碱基的核苷酸,并且其中 Y 是含有选自鸟嘌呤、5-甲基鸟嘌呤和 2'-O-甲基鸟嘌呤的含氮碱基的核苷酸，条件是核苷酸 X 或 Y 中至少一个含有甲基化的含氮碱基。

2．如权利要求 1 所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，其特征在于，该序列中至少一个核苷酸是甲基膦酸酯核苷酸。

3．如权利要求 2 所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，其特征在于，所述至少一个甲基膦酸酯核苷酸仅位于 3'或 5'端之一或位于 3'和 5'端或沿着反义寡核苷酸序列。

4．如权利要求 2 所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，其特征在于，所述甲基膦酸酯核苷酸是 Y。

5．如权利要求 2 所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，其特征在于，所述甲基膦酸酯核苷酸是 X。

6．如权利要求 1 所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，其特征在于，该序列中至少一个核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸 5'-单磷酸酯。

7．如权利要求 6 所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，其特征在于，所述至少一个 2'-O-甲基核糖核苷酸 5'-单磷酸酯仅位于 3'或 5'端之一或位于 3'和 5'端或沿着反义寡核苷酸序列。

8．如上述权利要求中任一项所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，其特征在于，2'-脱氧核糖核苷酸被对应的核糖核苷酸取代。

9．如上述 1 到 8 项权利要求中任一项所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，含有以下 SEQ.ID.NO:4 所示序列：

5'-ZTXGCCCCTTCTCCCXGCAZ-3'

其中，X 是 5-甲基 2'-脱氧胞苷 5'-单磷酸酯，并且 Z 是 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯。

10．如上述 1 到 8 项权利要求中任一项所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，具有以下 SEQ.ID.NO:15 所示序列：

5'-ZTXGCCCCTTCTCCCXGCAZC-3'

其中，X 是 5-甲基 2'-脱氧胞苷 5'-单磷酸酯，并且 Z 是 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯。

11. 如权利要求 1 所述的反义寡核苷酸硫代磷酸酯，具有以下 SEQ.ID.NO:3 所示序列：

5'-GTXGCCCCTTCTCCCXGCAG-3'

其中，X 是 5-甲基 2'-脱氧胞苷 5'-单磷酸酯。

12. 一种或多种药学上可接受的佐剂和/或赋形剂的药物组合物，其特征在于，含有作为活性成分的至少一种如权利要求 1 到 11 所定义的反义寡核苷酸硫代磷酸酯。

13. 权利要求 1 到 11 所定义的反义寡核苷酸硫代磷酸酯在制备治疗与 Smad7 的表达相关的病症的药物中的用途。

14. 如权利要求 13 所述的用途，其特征在于，所述与 Smad7 表达相关的病症是慢性炎性疾病。

15. 如权利要求 14 所述的用途，其特征在于，所述慢性炎性疾病是克罗恩病和溃疡性结肠炎。

# 抗 Smad7 的反义寡核苷酸(ODN)及其在医药领域中的用途

本发明涉及抗 Smad7 的反义寡核苷酸(ODN)及其在医药领域中的用途。

本发明特别涉及适当修饰的 Smad7 反义 ODN 序列，该序列显示令人吃惊的特异性抑制 Smad7 表达的生物学活性，因此可作为生物治疗剂用于医药领域，特别是用于治疗慢性炎性肠病(IBD)。

克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)是人的慢性炎性肠病的主要形式。两种疾病均是复合临床实体，其发病机理严格依赖于不同的遗传、环境和免疫因子之间的相互作用。

尽管 CD 和 UC 在病理生理学和临床水平上显示明显差异，对患者的治疗方法却共有许多共同的要素。即使药理治疗是首选方法，临床表现、损害的类型和扩展与并发症类型的易变性影响治疗方法的选择。

水扬酰偶氮磺胺吡啶和 5-氨基水扬酸是已证明在治疗温和型 IBD 和缓解维持疗法中有效的药物。

在具有中等到严重活性的阶段和在与普遍状态有关的情况下，需要使用皮质类固醇。从主要的世界性病史的中长期分析可看出仅三分之二接受皮质类固醇的患者可获得临床缓解，停药后仅 50%的患者未发生任何复发。

皮质类固醇的连续给药除诱导药物依赖现象外，还会由于副作用的高危险性而使情况更糟。

同样，经常伴随或取代皮质类固醇治疗的免疫抑制治疗不能总是确保遏制炎症和控制症状，并且还具有多种禁忌症和严重副作用的缺点(Podolsky，2002)。

二十世纪九十年代可获得的新一代药物是生物制剂。更彻底的了解 IBD 的自然历史和主要病理生理学机制有助于以具体方式控制医学干预。从而产生了旨在控制特殊的炎症“途径”通过使用重组人蛋白质、单克隆嵌合人源化抗体和融合蛋白的生物疗法。文中，在治疗 CD 中显示出较好效力的药物是直接阻断 TNF-α的单克隆嵌合抗体，TNF-α是在 IBD 过程中超量产生的促炎细胞因子(Seegers 等，2002)。目前处于临床试验 IV 期的该化合物在约 60-70%的治疗的患者中有效地遏制炎症。然而，相当大的发病率和可看出潜在微生物感染的复活、过敏现象和形成自身抗体

已指出该化合物有一些副作用。后一个现象可能是基于抗 TNF-α的化合物使得具有多种生物功能的细胞因子 TNF-α失效的事实。

除了炎性作用，TNF-α也参与诱导和维持免疫耐受性的机制。因此，阻断 TNF-α活性反常地促进过量的免疫反应(Sandborn 等，2002)。

所有这些评论说明需要在 IBD 的动物模型上进行新的研究，通过这些研究可能鉴定用于更好且经久的治疗这种病症的新的活性成分(Fiocchi,2001)。

就其它的生物疗法而言，抗 TNF-α治疗，如施用抗炎性细胞因子(例如 IL-10)代表目的在于控制炎性细胞分泌分子的生物效应的治疗性胞外方法。

对细胞因子与其受体相互作用激活的信号-转导途径的研究概括描述了使用能特异性和选择性地调节重要的炎性和非炎性分子胞内表达的新治疗性策略的可能性。

在正常条件下，肠粘膜是“生理”炎性渗透的部位，其在促炎性和抗炎性分子之间维持脆弱的平衡。

能调节生长、分化和许多免疫和非免疫细胞活性的多功能细胞因子 TGF-β1 在与上述有关的情况中扮演了重要角色。

体外和体内的研究证明 TGF-β1 是能控制肠粘膜发炎的强的免疫调节剂，并且抑制其活性导致发生与 CD 或 UC 免疫形态类似的结肠炎(Powrie F.等，1996；Neurath M.F.等，1996；Ludviksson B.R.等，1997)。

事实上，TGF-β1 基因缺乏的小鼠表现出严重的多病灶炎性反应(也包括肠)与由多种类型细胞(包括 T 细胞)产生过量的炎性细胞因子有关(Shull M.M.等，1992；Christ M.等，1994)。

类似地，通过表达 TGF-β1 受体 RII 的显性负突变体形式抑制小鼠中 TGF-β1 信号提高了发生实验性结肠炎的敏感性(Hahm K.B.等，2001)。

最后，通过表达显性负 TGF-β受体 II 型特异性抑制 T 细胞中 TGF-β1 信号导致肺部和结肠中严重的炎性浸润以及存在循环自身免疫抗体为特征的自身免疫疾病(Gorelik L.等，2000)。这些数据表明单个抗炎性分子活性的丧失足够改变肠稳态并发生能导致组织损伤的免疫应答。

TGF-β1 的抗炎性活性始于该分子与异源二聚体跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体复合物的相互作用，该复合物由两个亚基组成，分别命名为 TGF-β1 R1 和 TGF-β1 R2。TGF-β1 结合时，受体在上述复合物内相对旋转，导致反式磷酸化过程，然后通过结构活性的 TGF-β1 R2 激活 TGF-β1 R1 并能自磷酸化。

由属于Smad族的蛋白介导TGF-β1激发的信号传播至核。激活的TGF-β1 R1直接磷酸化 Smad2 和 Smad3 蛋白，使得这两个蛋白可与 Smad4 相互作用，从而使 Smad2-3/Smad4 复合物移位至核，在那里复合物参与一些基因的转录控制(Heldin C-H.等，1997)。

动物模型的研究支持了 Smad 在 TGF-β1 抗炎性活性中的作用，这些研究表明 Smad3 编码基因的缺失与细胞对 TGF-β1 应答性降低和相关炎性疾病的发生有关，这些疾病的特征在于胃肠道水平大量浸润 T-细胞和形成化脓性脓肿(Yang X.等，1999)。

其它的胞内蛋白，例如 Smad7 也属于 Smad 蛋白族。这种占据 TGF-β1 R1 的蛋白干扰 Smad2/Smad3 与受体的结合，从而阻止了磷酸化和激活。因此 Smad7 蛋白表达增加与 TGF-β1 介导的信号抑制有关(Hayashi H.等，1997)。

对 IBD 患者肠粘膜中的 TGF-β1 表达的评估显示与普通患者肠中证实的相比所述分子的产量反而增加了(Lawrance IC.等，2001)。

本发明人在近期的文章中表明 IBD 患者的粘膜样品以高水平的 Smad7 和降低水平的活性 Smad3 为特征，从而说明在 IBD 期间，TGF-β1 介导的信号机制受到损害。本发明人还说明用特异性反义寡核苷酸 5'-GTCGCCCCTTCTCCCCGCAGC-3'(SEQ ID No 1)选择性抵消 Smad7 可恢复固有层单核细胞(LPMC)对 TGF-β1 的应答性，导致促炎性细胞因子(例如 TNF-α)的产量下调。

此外，在 IBD 患者的肠粘膜样品中进行的先体外后体内实验显示施用 Smad7 反义 ODN 可恢复 TGF-β1 信号机制并降低细胞因子的产量(Monteleone.等，2001)。

在 IBD 期间，肠粘膜浸润了大量的 T-细胞。这些细胞被认为是作用在这种疾病中的组织损伤的主要介体。

IBD 患者的肠粘膜中 T 细胞数量的增加部分依赖于这种细胞抗诱导其死亡(细胞凋亡)的刺激的耐受性。

据信，阻断 T 细胞凋亡在维持 IBD 的粘膜炎性应答中起关键作用(Boirivant.等，1999)。实际上，T 细胞死亡的增加与肠炎症的消退有关。IBD 期间 T 细胞抗细胞凋亡的耐受性的确切机制仍不清楚，即使似乎涉及局部释放的细胞因子。

体外细胞培养实验和体内研究的数据表明 TGF-β1 可阻止或激活 T 细胞死亡并且该因子介导两种应答的能力是位点特异的(Han SH.等，1998；Arsura M.等，1996)。

Smad3 敲除的小鼠在肠水平表现出炎性细胞数目大量增加，从而提示 TGF-β1 在肠水平控制肠 T 细胞凋亡中的作用(Yang 等，1999)。

因此，使用合成的 Smad7 反义 ODN 抑制 Smad7 可代表一种新颖和可接受的“内源性”生物治疗慢性炎性疾病的方法，因为如上所述它恢复了 T 细胞对 TGF-β1 的应答性，所以该方法尤其针对 IBD。

反义寡核苷酸(ODN)是与编码特异和定向抑制的靶蛋白的信使 RNA(mRNA)互补的短合成寡核苷酸序列。这种与 mRNA 杂交的序列产生了双链杂交特性并激活普遍存在的催化酶，例如 RNA 酶 H，这种酶降解实质上产生激活 DNA 复制的 DNA/RNA 杂交链，从而阻止蛋白的翻译。

即使与转录起始区域 5’和剪接区域互补的 ODN 通常会导致更有效的结果，选择与 ODN 杂交的最合适的 mRNA 区域和序列是需要经验的。由于近来该领域专门化的公司拥有先进的自动合成技术，在鉴定可能的靶部位后，设计大量的反义 ODN 不会产生困难。

相反，对可能的治疗应用而鉴定更具活性的 ODN 需要长期的筛选工作，该工作通过定量测试中测定效力。与上述相关的针对 Smad7 中的特定靶位的反义 ODN 序列是已知的(美国专利号 6,159,697；受让人 ISIS 制药有限公司)。

由于这些分子的聚阴离子和亲水性特征以及酶的快速降解作用，一些问题阻碍了使用反义 ODN 在体外和体内进行基因调控，例如难于穿过细胞膜。

为克服这些障碍，需要借助反义 ODN 的化学修饰，例如在上述 Smad7 特异序列的情况中磷酸硫代化(Monteleone.等，2001)，或磷酸酰胺化，即以硫或氮原子取代那些磷酸二酯键中非桥原子的氧原子。

与许多生物技术产品一样，生物活性的证明指出了潜在的治疗活性。

实际上，ODN 可用在与不同疾病的发病机制有关的基因和蛋白质功能研究或用于治疗性目的。尽管在前一个应用领域中反义方法对于指导原则的容易是成功的，但由体外转向体内实验更复杂，特别是关于这些新药的药代动力学、药效学和毒理学方面(Maggi A.等，1998)。

例如，本发明人以前进行的体外生物学活性实验中使用的 Smad7 反义 ODN(SEQ ID No 1)在体内显示出不期望效应增加的危险。事实上，这种 ODN 含有两个核苷酸 CG 对在磷酸硫代化后变为 CpG，这是提高 ODN 稳定性的基本方法。后者是具有免疫系统强有力的刺激活性的序列，因此使用上述这种 ODN 会恶化任何免疫疾病的进程，包括克罗恩病和溃疡性结肠炎。

不能假定类似的治疗方法，特别是在克罗恩病的情况下，这是在白介素 12 刺激下由命名为 Th1 的特定类 T 淋巴细胞介导的病理学。实际上作为强有力的 IL-12 合成的诱导物，CpG 分子能进一步诱导 Th1 细胞的发展。

此外，含有 CpG 二核苷酸的反义 ODN 体内给药与不含 CpG 的寡核苷酸相比副作用的危险增加了。特别是已证实脾、肾和肝的网状内皮组织系统增生的危险增加，以及造血细胞增殖的增加(Agrawal S.等，2002)。

由于 ODN 的 5'和 3'端未保护颇易受核酶攻击，使用 ODN 的另一个问题是来自该分子降解的代谢物的作用必然会导致副作用。

因此需要对硫代磷酸反义 ODN 骨架的 CpG 配对和 5'与 3'端进行化学修饰。然而，修饰上述的 ODN 序列可能降低或丧失抑制 Smad7 合成的生物活性，并且有时甚至会逆转体内和体外的所需活性。

同样，处理适合于体内研究的实验性 IBD 模型是重要的，该模型可扩大涉及免疫应答调控丧失的机制和这些机制在 IBD 发作病理学中的作用的知识，以及调节或阻止这种应答的可能性，从而限制在粘膜水平的炎症进程。与上述有关的 TNBS 介导的结肠炎代表了广泛而有效的粘膜炎症模型，该模型与人 CD 显示出惊人的免疫形态学相似性(Neurath M.等，2000)。

由于上述原因，需要使用通过“内源性”生物治疗方法治疗 IBD 的、在体内外均有活性的新治疗性生物制剂，如 Smad7 反义 ODN。

本发明人现在发现适当修饰的反义 ODN 序列，与其体外抑制活性相比它们在 IBD 实验性模型中表现出较高的抑制 Smad7 表达的体内生物活性，并且还高于其它已知的显示相同修饰和在相同模型上测试的序列的活性。

特别是，体内表现出较高生物活性的 ODN 序列是按照靶向人 Smad7 RNA 的位点 403 的硫代磷酸反义 ODN 序列(SEQ ID NO 1)设计的，这是在本发明人以前的实验过程中使用的。

由于这种 Smad7 硫代磷酸反义 ODN 在治疗人类疾病中潜在和将来的用途，所述序列在其中含有的 CpG 二核苷酸处(因为它们已述及的致免疫性)进行修饰，以下称为 XY。

本发明人进行的研究测试了各种已知和新颖的 Smad7 反义 ODN 的体内与体外效力以及可能的毒性，并检测了阻断 Smad7 表达是否导致 IBD 实验性模型中粘膜炎症的消退。

尽管在相同的研究过程中其它序列施用后动物中发生副作用，上述本发明的

适当修饰的反义 ODN 序列除了具有较高的体内生物活性外，还表现出意外的无副作用。此外，本发明的 ODN 序列表现出限制淋巴细胞浸润和以后的炎症传播的功效，这是其它反义 ODN 序列在本文测试中未发现的证据。

实验性模型中的这些研究和对其抑制的可能的疗效可明显看出 Smad7 作为生物靶的作用。

此外，本发明还发现了 Smad7 在 IBD 过程中诱导 T 细胞凋亡的作用。事实上，通过使用一些 Smad7 反义 ODN 已显示 TGF-β1 调控肠 T 细胞凋亡并且缺损因子活性是导致细胞对凋亡刺激的耐受性的原因，这些刺激负责维持粘膜炎性应答。

因此，本发明的目的是长度为 21 个核苷酸的 Smad7 硫代磷酸化的反义寡核苷酸，该寡核苷酸含有至少 10 个核苷酸的部分具有以下序列(SEQ ID No 2)：5'-GTXYCCCCTTCTCCCXYCAG-3'，其中 X 是含有选自胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶和 2'-O-甲基胞嘧啶的含氮碱基的核苷酸并且 Y 是含有选自鸟嘌呤、5-甲基鸟嘌呤和 2'-O-甲基鸟嘌呤的含氮碱基的核苷酸，只要核苷酸 X 或 Y 中至少一个含有甲基化的含氮碱基或其互补序列。

本发明其它的目的是各种反义寡核苷酸立体异构体的寡核苷酸序列，例如非对映异构体和对映异构体，这些立体异构体是对于序列中所包括的核苷酸间连键的磷原子而言的。实际上，核苷酸间连键可是硫代磷酸酯或甲基磷酸酯并且在两种情况下与四个不同的化学基团结合的磷代表一个手性中心。

本发明的反义寡核苷酸可在序列中具有至少一个甲基磷酸酯核苷酸，其位于，例如仅在 5'或 3'端之一或 5'和 3'端，或沿着寡核苷酸序列。

在优选的实施方案中，甲基磷酸酯核苷酸可是 X 或 Y，在这种方式中核苷酸间连键是在所述核苷酸之间的键。

在 5'和 3'端和/或沿着反义 ODN 的核苷酸序列可进行其它的修饰以增加分子稳定性从而阻止核酶的降解并减少从代谢物的作用产生不良效应的危险。

本发明的反义寡核苷酸还可在序列中具有至少一个 2'-O-甲基核糖核苷酸 5'-单磷酸酯，例如其仅位于 5'或 3'端之一或 5'和 3'端，或沿着寡核苷酸序列。

本发明其它的目的是以上所述的反义寡核苷酸，其中 2'-脱氧核糖核苷酸为核糖核苷酸所取代而 2'-脱氧胸苷为尿苷所取代，以此方式将反义脱氧核糖核苷酸序列转为对应的反义核糖核苷酸序列。

本发明优选的实施方案是具有以下序列(SEQ ID No 3)的反义寡核苷酸：5'-GTXGCCCCTTCTCCCXGCAG-3'，其中 X 是 5-甲基 2'-脱氧胞苷 5'-单磷酸酯。

另一个优选的实施方案是具有以下序列(SEQ ID No 4)的反义寡核苷酸：5'-ZTXGCCCCTTCTCCCXGCAZ-3'，其中 X 是 5-甲基 2'-脱氧胞苷 5'-单磷酸酯，Z 是 2'-脱氧鸟苷甲基磷酸酯。

按照另一方面，本发明的优选实施方案是具有以下序列(SEQ ID No 15)的反义寡核苷酸：5'-ZTXGCCCCTTCTCCCXGCAZC-3'，其中 X 是 5-甲基 2'-脱氧胞苷 5'-单磷酸酯，Z 是 2'-脱氧鸟苷甲基磷酸酯。

本发明的反义 ODN 可有利地用于医药领域；因此本发明的其它目的是含有至少一种上述的反义寡核苷酸作为活性成分以及一种或多种本领域技术人员已知的药学上可接受的佐剂和/或赋形剂的药物组合物。

本发明还涉及前述反义寡核苷酸序列在制备用于治疗与 Smad7 表达相关疾病的药物中的用途。特别与是这种 Smad7 表达相关疾病是 IBD，例如 CD 和 UC。

以下将按照优选的实施方案，特别是参考附图对本发明进行阐述性而非限制性的说明，其中：

图 1 显示了用 Smad7 ODN 反义和有义 5'-MePGTMe-dCGCCCCTTCTCCCMe-dCGCAMePG-3'(SEQ ID No 4)处理 CD 患者的粘膜样品 40 小时之后对肠 T 淋巴细胞数目的影响；

图 2 显示了分析 p-Smad2/Smad3 复合物和总的 Smad2/Smad3 复合物在 LPMC 中的表达，LPMC 分离自 TNBS 处理的小鼠(TNBS)、未处理的小鼠(Unt)和作为对照的乙醇处理的小鼠(EtOH)的肠；

图 3 显示了分析 Smad7 在 LPMC 中的表达，LPMC 分离自 TNBS 处理的小鼠(TNBS)、未处理的小鼠(Unt)和作为对照的乙醇处理的小鼠(EtOH)的肠；

图 4 显示了患 TNBS 诱导结肠炎的小鼠的体重变化百分率，这些小鼠分别用 Smad7 反义寡核苷酸 MePGTMe-dCGCCCCTTCTCCCMe-dCGCAMePGC (SEQ. ID No 15)处理或不处理或用作为对照的(有义寡核苷酸)处理；该图代表三个独立的实验，其中每组研究了 14 只小鼠；

图 5 是从患 TNBS 诱导结肠炎的小鼠和患 TNBS 诱导结肠炎并用 Smad7 反义寡核苷酸(SEQ. ID No 15)处理的小鼠中提取的结肠的肉眼可视图；该图代表三个独立的实验，其中每组研究了 14 只小鼠；

图 6 是无结肠炎的小鼠和患 TNBS 诱导结肠炎并用 Smad7 反义寡核苷酸(SEQ. ID No 15)或用对照(有义寡核苷酸)处理的小鼠的结肠切片的组织学图；该图代表三个独立的实验，其中每组研究了 14 只小鼠。放大率 40×。

实施例 1：本发明 Smad7 反义寡核苷酸对肠道 T 细胞凋亡作用的研究

材料与方法

反义 ODN 的合成

所有 Smad7 反义 ODN 由 MWG Biotech AG (MWG Biotech S.r.l.，Florence)采用标准氨基磷酸盐化学方案(Lesiak K.等，1993；Xiao W.等，1996)以标准自动技术使用自动 DNA 合成仪合成。

按照已知的合成方法(Sanghvi.等，1993)使用可市售的氨基磷酸盐合成含有 5-甲基-2'-脱氧胞苷(5-Me-dC)的寡核苷酸，而含有甲基磷酸酯基团(MeP)的修饰的寡核苷酸用已知的方法合成(Maier MA.等，2002)。

用 MWG Biotech 开发的 HPSF 技术纯化寡核苷酸分子。由于这种纯化方法能去除标准经典纯化方法不能去除的自动化学合成过程中的失误序列(例如 n-1、n-2 和 n-x 序列)，所以具有高效率。

上述技术除了能得到 100%的所需长度序列而无不需要的失效产物，还可避免下一个脱盐操作，因为纯化的序列不含有盐和金属离子。

假定不含任何盐，寡核苷酸最终按标准方法(Guerlavais T.等，2002；Ragas JA.等，2000)用 MALDI-TOF 质谱技术分析。然后寡核苷酸灭菌并用紫外/可见分光光度计将所得溶液定量为光密度(OD)。最后，在使用前这些分子重悬浮在无菌的 PBS1×中。

所有使用的反义 ODN 以人和小鼠间具有 100%同源性的 Smad7 mRNA 为靶位。在下列所有寡核苷酸中，核苷酸间连键是硫代磷酸酯键。

用于本项研究的反义 ODN 序列按照以靶向人 Smad7 mRNA 的位点 403 的硫代磷酸酯反义 ODN 序列 5'-GTCGCCCCTTCTCCCCGCAGC-3'(SEQ ID No 1)设计，该序列用于本发明人以前的实验过程中(Monteleone.等，2001)。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-MePGTMe-dCGCCCCTTCTCCCMe-dCGCAMePG-3'(SEQ ID No 4)以人 Smad7 mRNA 的位点 403 为靶位。这是一混合骨架的寡核苷酸，其中属于 SEQ ID NO 1 的 CpG 对的胞嘧啶被 5-甲基胞嘧啶取代(文中用 Me-dC 表示)。此外，甲基磷酸酯键位于分子的两端(文中以 Mep 表示)。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-GTTTGGTCCTGAACATGC-3'(SEQ ID No 5)以人 Smad7 mRNA 的位点 294 为靶位。

粘膜样品取自6位中等到严重的CD患者和4位严重的UC患者的切除标本。此外，肠粘膜样品取自10位因结肠癌进行结肠切除术的未受影响的IBD患者(得到当地委员会的伦理批准)。LPMC用DTT-EDTA-胶原酶方法制备并重悬在补充有血清替换试剂HL-1(Biowhittaker，Wokingham，UK)的RPMI 1640(Sigma-Aldrich S.r.l.，Milan)中。

在有和没有TGF-β1(Sigma-Aldrich，终浓度约为1到5ng/ml)中培养细胞并在接种48小时后分析凋亡的水平。

在其它实验中，分离自IBD患者肠的LPMC重悬浮在补充有HL-1的RPMI 1640中并在有和没有上述Smad7反义ODN(SEQ ID No 4，SEQ ID No 5)以及有对照有义寡核苷酸(使用的浓度均是2μg/ml)中培养。24小时后，LPMC的等份用于抽提蛋白质并评估Smad7的表达。剩余的细胞彻底洗涤并重悬浮在加了HL-1的RPMI 1640中并在有或没有TGF-β1(5ng/ml)中培养48小时，然后分析细胞凋亡。

用流式细胞术分析细胞凋亡

用碘化丙锭(PI)染色然后用流式细胞术分析细胞凋亡。

洗涤细胞，于37℃在5μl核糖核酸酶A(0.6μg/ml，30-60 Kunitz单位，Sigma-Aldrich)中温育15分钟，然后在并冰浴上冷却。在用流式细胞术分析之前加入碘化丙锭(100μg/ml)。

用特定的单克隆抗CD3抗体(DAKO Ltd.，Cambridgeshire，UK)鉴定T细胞。

蛋白质抽提和Western印迹分析

匀质LPMC并在含有10mM Hepes(pH7.9)、10 mM KCl、0.1 mM EDTA和0.2mM EGTA的缓冲液A中抽提总蛋白。缓冲液补充有1mM二硫苏糖醇(DTT)、10μg/ml抑肽酶、10μ/ml亮肽素和1mM苯甲磺酰氟(所有的试剂均来自Sigma-Aldrich)。

使用特定的兔抗人Smad7抗体(终稀释度1:400，Santa Cruz Biotechnology，Inc.，CA；USA)分析Smad蛋白。偶联于辣根过氧化物酶的山羊抗兔抗体(Dako Ltd)以终稀释度1:20,000用于测定一抗结合，免疫反应性用化学发光试剂盒(Pierce，Rockford，IL，USA)目测。

器官培养

取自患者的外科标本的粘膜移植物在有或没有Smad7反义ODN(SEQ ID No 4，SEQ ID No 5；以终浓度10μg/ml使用)培养40小时。

培养在有 Smad7 有义 ODN 中的粘膜移植物作为负对照。

在培养末期收集粘膜移植物并用于通过免疫组织化学分析固有层 T 淋巴细胞的数目。

对于此目的，制备粘膜切片并用单克隆抗 CD3 抗体(DAKO)染色。偶联于碱性磷酸酶的山羊抗鼠抗体(DAKO)用于测定一抗结合。

结果

在不同实验中得到的结果显示了 TGF-β1 如何以剂量依赖方式提高分离自正常受试者肠道的 T 淋巴细胞的凋亡。

表 1 显示了培养 48 小时之后凋亡的 T 淋巴细胞的百分率。数字是 4 个独立实验的结果，其中使用分离自 4 位正常受试者肠的 T 细胞。

表 1

| | 实验 1 | 实验 2 | 实验 3 | 实验 4 |
|---|---|---|---|---|
| 未刺激 | 18% | 17% | 19% | 23% |
| TGF-β1(0.2ng/ml) | 22% | 24% | 23% | 25% |
| TGF-β1(1ng/ml) | 31% | 33% | 28% | 31% |
| TGF-β1(5ng/ml) | 33% | 34% | 32% | 37% |

表 2 显示了培养 48 小时后凋亡 T 淋巴细胞的百分率。相反，如表 2 的重复结果所示，分离自 4 位 IBD 患者的 T 淋巴细胞显示出对 TGF-β1 诱导的凋亡信号的部分耐受性。

Table 2

| | 实验 1 | 实验 2 | 实验 | 实验 4 |
|---|---|---|---|---|
| 未刺激 | 11% | 10% | 9% | 7% |
| TGF-β1(0.2ng/ml) | 12% | 9% | 8% | 5% |
| TGF-β1(1ng/ml) | 10% | 11% | 11% | 8% |
| TGF-β1(5ng/ml) | 16% | 13% | 14% | 15% |

特别是，当 IBD 患者的 T 细胞在有 0.2ng/ml 或 1ng/ml 浓度的 TGF-β1 中培养时，表 2 的数据分析未见凋亡有意义的增加。相反，以 5ng/ml 的 TGF-β1 刺激

IBD 患者的 T 细胞导致凋亡少量增加。

如表 3 重复的 T 淋巴细胞百分率值所示，用 Smad7 反义 ODN SEQ ID NO4 处理分离自 IBD 患者的 T 淋巴细胞恢复了细胞对 TGF-β1 的应答性，导致细胞凋亡增加。数据涉及 T 细胞分离自 4 位 IBD 患者肠的 4 个独立的实验，T 细胞单独用培养基(未刺激)培养或用培养基和有义(对照)或反义寡核苷酸预处理过夜，然后用 TGF-β1(1ng/ml)刺激。

Table 3

| | 实验 1 | 实验 2 | 实验 3 | 实验 4 |
|---|---|---|---|---|
| 未刺激 | 10% | 9% | 8% | 7% |
| 培养基 | 11% | 9% | 8% | 5% |
| ODN 有义 | 12% | 10% | 10% | 8% |
| ODN 反义 | 33% | 32% | 23% | 19% |

此外，如图 1 的免疫组织化学所示，本发明人用先体外后体内器官培养证明用本发明 Smad7 反义 ODN 处理 IBD 活组织检查显著降低了粘膜 CD3+ T 细胞的数量。后者表现出用反义 ODN 处理降低了粘膜 CD3+ T 细胞的数量。

结合这些观察提示高 Smad7 水平在延长 T 细存活中起至关重要的作用，从而有助于 IBD 患者中局部炎症的传播。

因此，阻断 Smad7 是控制这些疾病中粘膜炎症的有希望的方法。

实施例 2：在 TNBS-诱导的结肠炎实验性模型中施用 Smad7 反义和有义寡核苷酸的体内和体外作用的研究

材料与方法

采用前述的标准技术由 MWG Biotech S.r.l.(Firenze)合成所有的 Smad7 反义和有义 ODN。

使用的反义 ODN 以在人和鼠之间具有 100%同源性的 Smad7mRNA 位点为靶位。在以下所有寡核苷酸中，核苷酸间连键是硫代磷酸酯键。以下所有序列用于实验性诱导结肠炎模型上进行实验。

Smad7 反义 ODN SEQ ID No 1(5'-GTCGCCCCTTCTCCCCGCAGC-3')以人 Smad7 mRNA 的位点 403 为靶位，本发明人在公布于以前文章的实验过程中已经使用(Monteleone 等，2001)。

以下反义寡核苷酸序列 SEQ ID No 4 和 SEQ ID No 5 用于进一步研究 Smad7

在调节分离自 IBD 患者肠的 LPMC 中的 T 细胞凋亡中的作用。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-MePGTMe-dCGCCCCTTCTCCCMe-dCGCAMePG-3'(SEQ ID No 4)以人 Smad7 mRNA 的位点 403 为靶位。这是一混合骨架的寡核苷酸，其中在 SEQ ID NO 1 的 3 位和 16 位的 CpG 对的胞嘧啶被 5-甲基胞嘧啶(以 Me-dC 表示)取代。此外，甲基膦酸酯键位于该分子的末端(以 MeP 表示)。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-GTTTGGTCCTGAACATGC-3'(SEQ ID No 5)以人 Smad7 mRNA 的位点 294 为靶位。包括于其中的核苷酸间连键是硫代磷酸酯键。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-GTTTGGTCCTGAACAT-3' (SEQ ID No 6)以人 Smad7 mRNA 的位点 296 为靶位。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-GTTTGGTCCTGAACATG-3' (SEQ ID No 7)以人 Smad7 mRNA 的位点 295 为靶位。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-AGCACCGAGTGCGTGAGC-3' (SEQ ID No 8)以人 Smad7 mRNA 的位点 577 为靶位。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-MePAGCACMedCGAGTGMedCGTGAGCMeP-3'(SEQ ID No 9) 以人 Smad7 mRNA 的位点 577 为靶位。这是一混合骨架的寡核苷酸，其中在 SEQ ID NO 8 6 位和 12 位的胞嘧啶被 5-甲基胞嘧啶取代。此外，甲基膦酸酯键位于该分子的末端。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-CGAACATGACCTCCGCAC (SEQ ID No 10)以人 Smad7 mRNA 的位点 233 为靶位。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-Me-d CGA ACA TGA CCT CMe-d CG CAC-3' (SEQ ID No 11)以人 Smad7 mRNA 的位点 233 为靶位。这是一混合骨架的寡核苷酸，其中在 SEQ ID NO 10 的 1 位和 14 位的胞嘧啶被 5-甲基胞嘧啶取代。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-GTMe-dCGCCCCTTCTCCCMe-dCGCAG-3' (SEQ ID No 12)以人 Smad7 mRNA 的位点 403 为靶位。这是一混合骨架的寡核苷酸，其中在 SEQ ID NO 1 的 3 位和 16 位的 CpG 对的胞嘧啶被 5-甲基胞嘧啶取代(以 Me-dC 表示)。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-GATCGTTTGGTCCTGAA-3' (SEQ ID No 13)以人 Smad7 mRNA 的位点 299 为靶位。

Smad7 反义 ODN 序列 5'-ATCGTTTGGTCCTGAAC-3' (SEQ ID No 14)以人 Smad7 mRNA 的位点 298 为靶位。

Smad7 反义 ODN 序列 MePGTMe-dCGCCCCTTCTCCCMe-dCGCAMePGC (SEQ ID No 15)以人Smad7 mRNA的位点403为靶位。这是一混合骨架的寡核苷酸，其中在 SEQ ID NO 1 的 3 位和 16 位的 CpG 对的胞嘧啶被 5-甲基胞嘧啶取代(以 Me-dC 表示)。此外，甲基膦酸酯键位于该寡核苷酸末端之一端和 20 位的鸟嘌呤残基处。

结肠炎的诱导

5 至 6 周龄的雄性 SJL/J 小鼠供养在特定无病原体的动物设施中。对于结肠炎的诱导，通过 3.5F 导尿管向轻微麻醉的小鼠施加每直肠 2.5mgTNBS(pH1.5–2.0; Sigma Aldrich)的 50%乙醇溶液。导尿管尖插入邻近肛门边缘约 4cm，然后将 100ml 液体(TNBS/乙醇)缓慢注入结肠。

为保证 TNBS 分布于整个结肠和盲肠，小鼠在注射后保持直立姿势 30 秒。用相同方法向一些小鼠单独施加 50%乙醇用作对照。

结肠炎的组织学评价

在指定时间处死小鼠，分离出的组织固定于 10%福尔马林溶液(Sigma Aldrich)，埋植于石蜡中，切成组织切片并用苏木精和曙红染色。使用各种标准检查染色切片的结肠炎证据，所用的标准例如存在淋巴细胞浸润、腺管的伸长和/或畸变、肠壁的侧翼溃疡和增厚。

在结肠的显微截面上炎症的程度按以下 0 到 4 分级：

0：无炎症的证据；

1：在<10%高倍视野(hpf=高倍视野)中观察到低水平淋巴细胞浸润，未观察到结构变化；

2：在<10-25%hpf 中观察到中等淋巴细胞浸润、腺管伸长和未伸出超过粘膜层的肠壁增厚；

3：在<25-50%hpf 中观察到高水平淋巴细胞浸润、伸出超过粘膜层的肠壁增厚；

4：在<25-50%hpf 中观察到明显程度的淋巴细胞浸润、高脉管密度、腺管伸长和畸变与具有溃疡的透壁性肠壁增厚。

分离固有层单核细胞(LPMC)和用 Smad7 反义 ODN 处理细胞

固有层单核细胞(LPMC)分离自结肠样本。样本首先以无钙镁的 HBSS(Hanks' 平衡盐溶液，Sigma-Aldrich)洗涤并切成 0.5cm 小片。这些小片于 37℃在含有 EDTA(0.37mg/ml)和二硫苏糖醇(0.145mg/ml)的 HBSS 中孵育两次各 15 分钟。然后

这些组织在含有胶原酶 D(400U/ml，Boehringer Mannheim Biochemicals，Indianapolis，IN)和 DNA 酶 I(0.01mg/ml，Boehringer Mannheim Biochemicals，Indianapolis，IN)的 RPMI 中消化，于 37℃在振荡培养箱培养。

释放自组织的 LPMC 重悬浮于 100%Percoll，在 40%Percoll 梯度(Pharmacia Biotech AB，Uppsala，Sweden)下分层并以 1,800rpm 离心 30 分钟得到富集淋巴细胞群。

为评价 Smad7 反义 ODN 的体外效力，分离自 TNBS 处理小鼠的 LPMC 以 1x106/ml 的终浓度在 24 孔板上重悬浮于补充有血清取代试剂 HL-1(Biowhittaker)的 RPMI 1640(Sigma-Aldrich)中。为转染反义 ODN，该步骤后每 ml 细胞培养基使用 2μl 的 lipofectamine 2000 试剂(LF，Invitrogen Italia SRL，San Giuliano Milanese)。然后，结合 2μg/ml 的反义 ODN 与 LF 并于室温孵育 20 分钟。然后将得到的混合物直接加入细胞。培养过夜后，细胞从板上移去并用于以 Western 印迹分析 Smad7。

用 Smad7 反义 ODN 处理小鼠

用 TNBS 处理两天后，按每直肠 150μg 将 Smad7 反义或有义寡核苷酸施用于小鼠。至少五只小鼠一组进行检查。在第五天处死小鼠，取出完整的肠粘膜样品并用 Western 印迹分析 Smad7 和 Smad3 含量。此外评价了肠粘膜炎症的程度。

蛋白质抽提和 Western 印迹分析

固有层单核细胞和完整的结肠样本用上述方法匀浆化。然后用 Western 印迹展示 Smad7 表达。

最终，印迹用可市售溶液(Pierce)剥离并用抗肌动蛋白抗体(Sigma-Aldrich)检测以证实在每孔中充满有相同量的蛋白质。使用化学发光试剂盒(Pierce)进行检测。带的强度用光密度计分析。

LPMC 和完整的结肠样品蛋白质也用特异性的可市售抗体(Santa Cruz)以 Western 印迹分析了磷酸化蛋白质和 Smad3 总蛋白质的含量。

为分析磷酸化的 Smad3，使用能识别作为抗原的磷酸化 Smad2/3 蛋白质的特异性兔抗人抗体(1:500 终稀释度)和偶联于辣根过氧化物酶的山羊抗兔抗体(1:20000 稀释度)。免疫反应性用化学发光试剂盒(Pierce)目测。

检测之后，印迹用可市售溶液(Pierce)剥离并与特异性的山羊抗人 Smad3 抗体(1:500 终稀释度)和偶联于辣根过氧化物酶的兔抗山羊抗体(1:20000 稀释度)孵育；然后用上述的化学发光试剂盒(Pierce)目测免疫反应性。

ELISA 测试

活性 TGF-β1 的量在肠粘膜样品中检测。为此目的，抽提如上所述有或没有 TNBS 诱导结肠炎的小鼠粘膜样品的总蛋白质。使用可市售的 ELISA 试剂盒(R&D Systems，Space Import-Export Srl，Milano)分析活性 TGF-β1 的水平。在 Dynatech MR 5000 ELISA 读数器上测量 490nm 波长处的光密度。数据以 pg/100g 总蛋白质表示。

结果

在接受 TNBS 后，小鼠出现腹泻和体重降低等诱导结肠炎的证据。肉眼可见结肠增大并且对其粘膜的组织学分析显示中等到严重的炎性病变。

为检测 TNBS 结肠炎的诱导是否与 TGF-β1 的产量变化有关，从有或没有结肠炎的小鼠取得结肠样本并用 ELISA 分析活性 TGF-β1 的含量。

因为在肠道水平存在几种具有合成 TGF-β1 潜力的细胞类型，它可用于评价整个肠道粘膜而非仅评价 LPMC。

在无结肠炎的情况中，检测到低水平的活性 TGF-β1(未刺激和对照小鼠各为 85±12 和 94±26pg/g 总蛋白质)。在患 TNBS 诱导结肠炎小鼠的粘膜样品中检测到 TGF-β1 水平显著(985±120pg/g 总蛋白质)($p<0.01$)。即使该结果似乎提示在 TNBS 诱导结肠炎期间可增加 TGF-β1 的活性，但对分离自患结肠炎小鼠的肠 LPMC 中活性 Smad3 的胞内水平的分析令人吃惊地表现出降低的 Smad3 磷酸化作用，该磷酸化作用与 Smad7 的诱导量增加相关(图 2 和 3)。特别是图 2 说明了在分离自未受影响肠而非患 TNBS 诱导的结肠炎小鼠的 LPMC 中存在对应于活性(磷酸化)Smad2/3 的带。图 3 显示仅在分离自患 TNBS 诱导结肠炎小鼠的肠的 LPMC 样本中存在两条带，较低的 47Kda 的带对应于游离 Smad7 而较高 102Kda 的带对应于 TGF-β1 R1-Smad7 复合物。这些数据说明局部炎症刺激了 TGF-β1 的合成，但 TGF-β1 未能减弱粘膜炎症。

本发明评价了用 Smad7 反义 ODN 治疗 TNBS 小鼠是否可恢复内源性 TGF-β1 功能并限制正在进行中的炎症。

首先，测试上述 Smad7 反义 ODN(SEQ ID No 1 和 SEQ ID No 4-15)在体外和体内实验中降低 Smad7 表达的效力。

关于体外实验，分离自患 TNBS 诱导结肠炎的小鼠的肠的 LPMC 用各种 Smad7 反义 ODN 转染并孵育过夜。用 Western 印迹分析 Smad7。

关于体内实验，TNBS 处理的小鼠施用 Smad7 反义 ODN 并在 3 天后处死小鼠，取出组织样本并用 Western 印迹分析 Smad7。

表 4 总结了这些实验的结果并显示了各种 Smad7 反义寡核苷酸在体外和体内实验中所得的抑制百分率。数据表明 4 个独立的体外实验的平均±标准偏差(SEM)和 5 个独立的体内实验的平均±SEM。

表 4

| 序列 (5'→3') | 位点 | LPMC 中抑制% | 体内抑制% | SEQ ID No |
|---|---|---|---|---|
| gtcgccccttctccccgcagc | 403 | 29±3 | 33±0.5 | 1 |
| MePgtMedcgccccttctcccMe-dcgcaMePg | 403 | 34±1.5 | 55±3 | 4 |
| gtt tgg tcc tga aca tgc | 294 | 26±2.6 | 25±3.4 | 5 |
| gtt tgg tcc tga acat | 296 | 16±2 | 15±3.2 | 6 |
| gtt tgg tcc tga acatg | 295 | 17±3.1 | 10±1.12 | 7 |
| agc acc gag tgc gtg agc | 577(*) | 27±0.88 | 25±2.7 | 8 |
| MePagcacMedc gag tgMedc gtg agcMeP | 577(*) | 29±1.65 | 30±1.3 | 9 |
| cga aca tga cct ccg cac | 233(**) | 33±2.3 | 32±1.89 | 10 |
| Me-d cga aca tga cct cMe-d cg cac | 233(**) | 36±1.5 | 34±2.2 | 11 |
| gtMedcgccccttctcccMedcgcag | 403 | 32±4.1 | 42±1.8 | 12 |
| gatcgtttggtcctgaa | 299 | | | 13 |
| atcgtttggtcctgaac | 298 | | | 14 |
| MePgtMedcgccccttctcccMedcgcaMePgc | 403 | 34±6 | 56±3 | 15 |

(*)和(**)分别是 ISIS 的专利 US6159697 的第 16 条序列和第 12 条序列。

当在分离自 TNBS 处理的鼠科模型的 LPMC 中体外转染时，所有反义 ODN 有效地降低 Smad7 表达。分析表 4 所示的抑制百分率值可明显发现反义寡核苷酸序列 SEQ ID No 4、10、11、12 和 15 显示主要的效力。

然而，用寡核苷酸序列 SEQ ID No10 和 11 体内处理得到的 Smad7 表达抑制百分率与体外实验所得的没有明显差别。

用反义 ODNSEQ ID No4、12 和 15 处理小鼠得到的 Smad7 抑制百分率明显大于体外试验所得结果，即分别为 55%对 34%、42%对 32%、56%对 34%(P<0.01)。

相反，用反义寡核苷酸 SEQ ID No7 处理小鼠导致体内 Smad7 表达降低，其值低于体外反义寡核苷酸在 LPMC 中转染所得值，即 10%对 17%，P<0.01。

总体而言，这些结果表明只有在 Smad7 反义 ODN 序列中进行特异性修饰能

改善其药代动力学、生物化学和生物物理图谱。

在接受反义寡核苷酸(SEQ ID No 1 和 SEQ ID No 4-15)的小鼠中未证实有急性毒性迹象。1/5 用 TNBS 处理的小鼠在 3 天后死亡(20%)。类似地，1/5 接受 Smad7 有义寡核苷酸的小鼠在 4 天后死亡。

用 Smad7 反义 ODN SEQ ID No1 和 SEQ ID No4-15 处理的小鼠组中无死亡率。

反义序列 SEQ ID No13 和 SEQ ID No14 的用途与合理的体外抑制活性(分别为 11%和 9.5%)相关。然而，这种序列的体内施用出人意料地伴随着显著的结肠炎恶化，直至导致小鼠在治疗 72 小时后全部死亡。

肉眼分析取自这些小鼠的肠样品发现存在严重的结肠炎并且这与肠中 Smad7 表达本质上的增加相关。

如上所述，测试了 Smad7 反义 ODN 限制正在进行中的炎症的效力。对此目的，向诱导结肠炎后的小鼠施用反义寡核苷酸 SEQ ID No1、4、5 和 15 并将 5 只小鼠视为一组。

用 Smad7 反义 ODN 治疗后，发现粘膜炎症减轻。该结果在用反义寡核苷酸 4 和 15 治疗的小鼠中尤其明显。事实上，未接受反义寡核苷酸的患结肠炎小鼠在分别施用了反义寡核苷酸序列 1 或 5 后 3-4 级的结肠炎严重性达到 2 或 3 级，而用反义寡核苷酸序列 4 或 15 治疗的小鼠的炎症未超过 1 级。

未检测 Smad7 口服是否也有效，TNBS 诱导结肠炎的小鼠在诱导结肠炎后一天用 Smad7 反义寡核苷酸 4、5 或 15 或对照(有义寡核苷酸)治疗。

对此目的，寡核苷酸重悬浮在碳酸氢盐溶液中。施用于每只小鼠的溶液的终体积为 350μl 并且含有剂量等于 250、500 或 1000μg 的寡核苷酸，这种溶液通过导管口服给药。

在第 5 天处死小鼠，Smad7 表达和炎症程度的分析按前文所方法评价。所有用反义寡核苷酸而不是用对照有义寡核苷酸治疗的小鼠表现出 Smad7 表达有意义的降低和 Smad3 磷酸化的增加，这些作用均不依赖于所使用的寡核苷酸剂量。

如图 4 所示，抑制 Smad7 基本上与体重恢复相关。图 4 显示了用或不用 Smad7 反义寡核苷酸(SEQ.No.15)或用对照(有义)治疗有 TNBS 诱导结肠炎小鼠的体重变化百分率。两种寡核苷酸在诱导结肠炎后第二天用导管以 250μg 剂量口服给药。第二天 3 组中每一组可证实体重减少表明 TNBS 处理诱导发生结肠炎。此外证实了从第四天开始用 Smad7 反义寡核苷酸而不是用对照治疗的小鼠表现出体重恢复。第五天患 TNBS 诱导结肠炎小鼠体重明显和轻微的恢复是因为 21.4%患结肠炎小鼠

在第四天死亡，因此第五天评价体重时未计入。

如图 5 和 6 所示，Smad7 的抑制与组织炎症的显著抑制相关。图 5 显示了取自有 TNBS 诱导结肠炎的小鼠和用 Smad7 反义寡核苷酸(SEQ.ID.No.15)治疗有 TNBS 诱导结肠炎小鼠的结肠的图像。寡核苷酸在诱导结肠炎后的第二天以 250μg 剂量通过导管口服给药。有 TNBS 结肠炎的小鼠的结肠显示高度发炎、变短和增厚。相反，接受 Smad7 反义寡核苷酸的小鼠显示结肠长度与厚度正常且无肉眼可见的炎症迹象。图 6 显示没有结肠炎的小鼠或用或不用 Smad7 反义寡核苷酸(SEQ.ID.No.15)或对照(有义)治疗有 TNBS 诱导结肠炎的小鼠的结肠切片的组织学状况。两种寡核苷酸在诱导结肠炎后第二天通过导管以 250μg 剂量口服给药。已显示没有结肠炎的小鼠中腺体显现为直线且均匀，具有正常含量的含粘液的细胞和固有层的炎性成分。相反，在接受或未接受对照寡核苷酸的 TNBS 处理小鼠的结肠中，腺结构遭到完全破坏，含粘液的和大量的炎性细胞浸润在固有层中。证明在用 TNBS 处理并接受 Smad7 反义寡核苷酸的小鼠的结肠切片中存在正常的腺结构且无炎症。

反义 ODN 体内给药之后显示较高 Smad7 抑制效力且无副作用，结合这些观察提示，特别是如果将效力和毒性的这些性质与使用在 Smad7 体外抑制中具有相同效力的其它反义 ODN 序列所得的结果比较，表明使用反义 ODN 序列可代表一种控制 IBD 期间粘膜炎症的有希望的治疗方法。

## 参考文献

Podolsky D.K., N.Engl.J. Med., 2002 Ago; Vol.347:No 6

Seegers D等.Aliment.Pharmacol.Ther., 2002; Vol.16:53-58

Sandborn J.等, Gastroenterology, 2002 Mag; Vol.122:No 6

Fiocchi C., J.Clin.Invest., 2001 Ago; Vol.108:523-526

Powrie F.等, J Exp Med., 1996; 183:2669-2674

Neurath M.F.等, J Exp Med., 1996; 183:2605-2616

Ludviksson B.R.等, J Immunol.1997; 159:3622-3628

Shull.M.M.等, Nature., 1992; 359:693-699

Christ.M.等, J Immunol., 1994; 153:1936-1946

HahmK.B.等, Gut., 2001; 49:190-198

Gorelik L.等, Immunity, 2000; 12:171-181

Heldin.C-H.等, Nature, 1997; 390:465-471

Yang X.等, Embo J., 1999; 18:1280-1291

Hayashi H.等, Cell., 1997; 89:1165-1173

Lawrance IC.等, Inflamm Bowel Dis., 2001; 7:16-26

Monteleone G.等, J Clin Invest., 2001, Giu; Vol.108:601-609

Boirivant M.等, Gastroenterology., 1999; 116:557-565

Han SH.等, J Pharmacol Exp Ther., 1998; 287:1105-12

Arsura M.等, Immunity., 1996; 5:31-40

Brevetto statunitense US 6,159,697.

Maggi A, Biotecnologie Farmacologiche, 1998; Cap.8:125-131

Agrawal S., Molecular Medicine Today, 2002; Vol.6:72-81

Neurath M., Fuss I., Strober W., Int Rev Immunol., 2000; Vol.19:51-62

Lesiak K.等, Bioconjugate Chem., 1993; Vol.4:467

Xiao W.等, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 1996; Vol.6:247-258

Sanghvi.等, Nuclei Acids Research, 1993; Vol.21:3197-3203

Maier MA.等, Org Lett., 2002; Vol.2:1819-1822

Guerlavais T.等, Anal Bioanal Chem., 2002; Vol.374:57-63

Ragas J.A.等, Analyst., 2000; Vol.125:575-581

序列表

<110> 吉利亚尼 S. p. A.(Giuliani S.p.A.)

<120> 抗 Smad7 的反义寡核苷酸(ODN)及其在医药领域中的用途

<130> PCT 25572

<140> RM2003A000149
<141> 2003-04-02

<150> RM2003A000149
<151> 2003-04-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 403 的反义硫代磷酸酯序列
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)

<400> 1
gtcgcccctt ctccccgcag c 21

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的修饰的硫代磷酸酯反义寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> "n": c

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> "n": m5c, cm

<220>
<221> misc_feature

<222> (4)..(4)
<223> "n": g

<220>
<221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> "n": gm, 5'-甲基鸟嘌呤

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> "n": c

<220>
<221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> "n": m5c, cm

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> "n": g

<220>
<221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> "n": gm, 5'-甲基鸟嘌呤

<400> 2
gtnnccccctt ctcccnncag 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的修饰的硫代磷酸酯反义寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> "n": 5-甲基 2'-脱氧胞苷 5'-单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)

<223> "n": 5-甲基 2'-脱氧胞苷 5'-单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> m5c

<400> 3
gtngcccctt ctcccngcag 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 403 的修饰的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> "n": 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> "n": 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<400> 4
ntngccccctt ctcccngcan 20

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 294 的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)

<400> 5
gtttggtcct gaacatgc 18

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 296 的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)

<400> 6
gtttggtcct gaacat 16

<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 295 的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)

<400> 7

gtttggtcct gaacatg 17

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 577 的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)

<400> 8
agcaccgagt gcgtgagc 18

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 577 的修饰的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> "n": 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base

<222> (12)..(12)
<223> m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> "n": 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<400> 9
ngcacngagt gngtgagn 18

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 233 的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)

<400> 10
cgaacatgac ctccgcac 18

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 233 的修饰的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)

<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> m5c

<400> 11
ngaacatgac ctcngcac 18

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 403 的修饰的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> m5c

<400> 12
gtngcccctt ctcccngcag 20

<210> 13
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 299 的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)

<400> 13
gatcgtttgg tcctgaa 17

<210> 14
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 298 的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)

<400> 14
atcgtttggt cctgaac 17

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 靶向人 Smad7 mRNA 的位点 403 的修饰的反义硫代磷酸酯寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> "n": 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> m5c

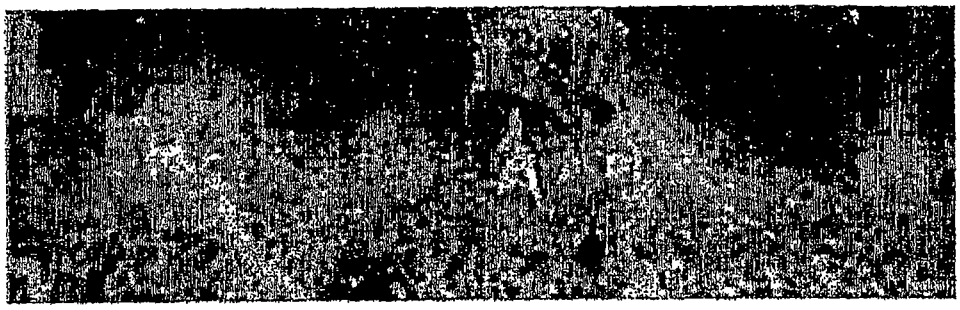
<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> "n": 5-甲基 2'脱氧胞苷 5'单磷酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> m5c

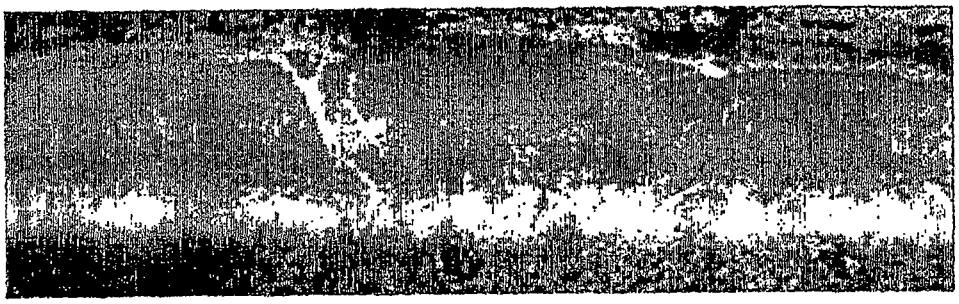
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> "n": 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

<220>
<221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-脱氧鸟苷甲基膦酸酯

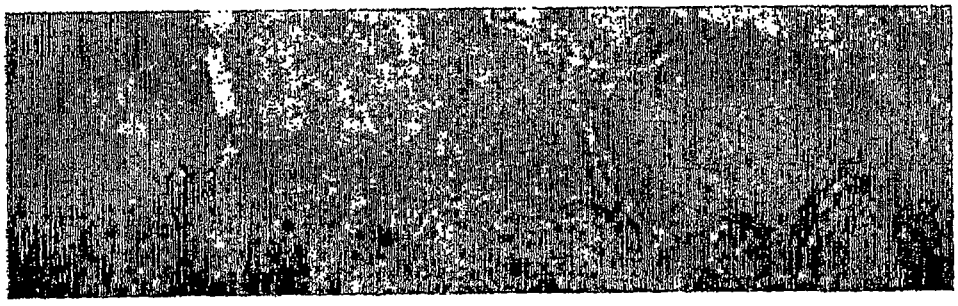
<400> 15
ntngcccctt ctcccngcan c 21



N.S.



ODN 有义



ODN 反义

图 1

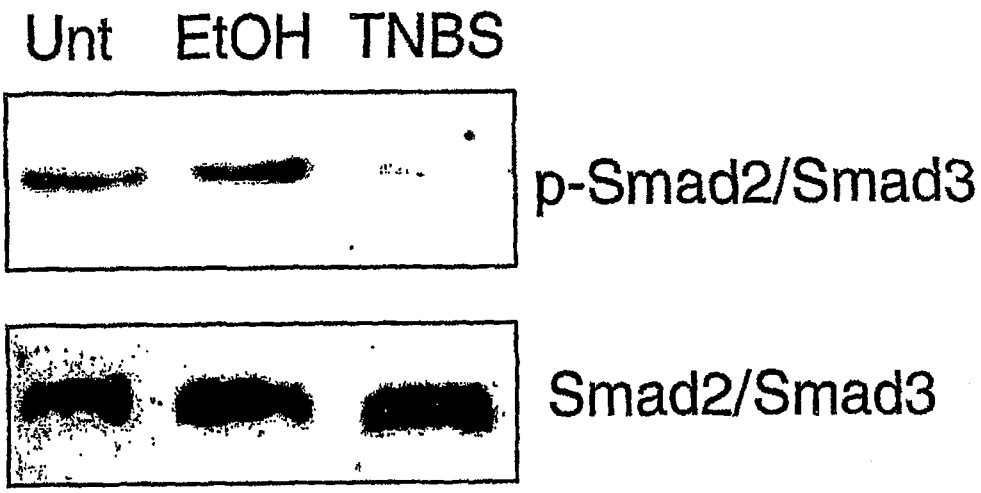

Unt
EtOH
TNBS
p-Smad2/Smad3
Smad2/Smad3

图 2

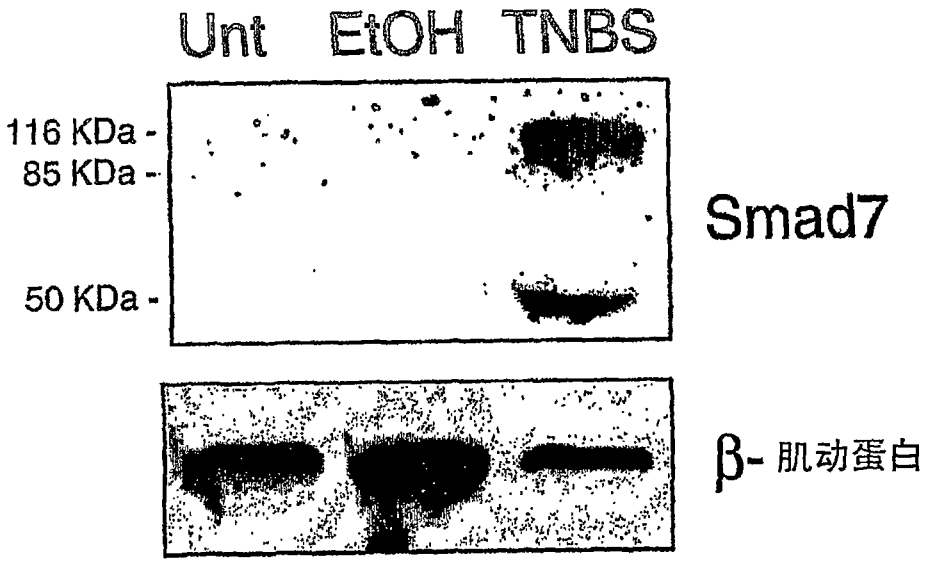

Unt
EtOH
TNBS
116 KDa -
85 KDa -
50 KDa -
Smad7
β- 肌动蛋白

图 3

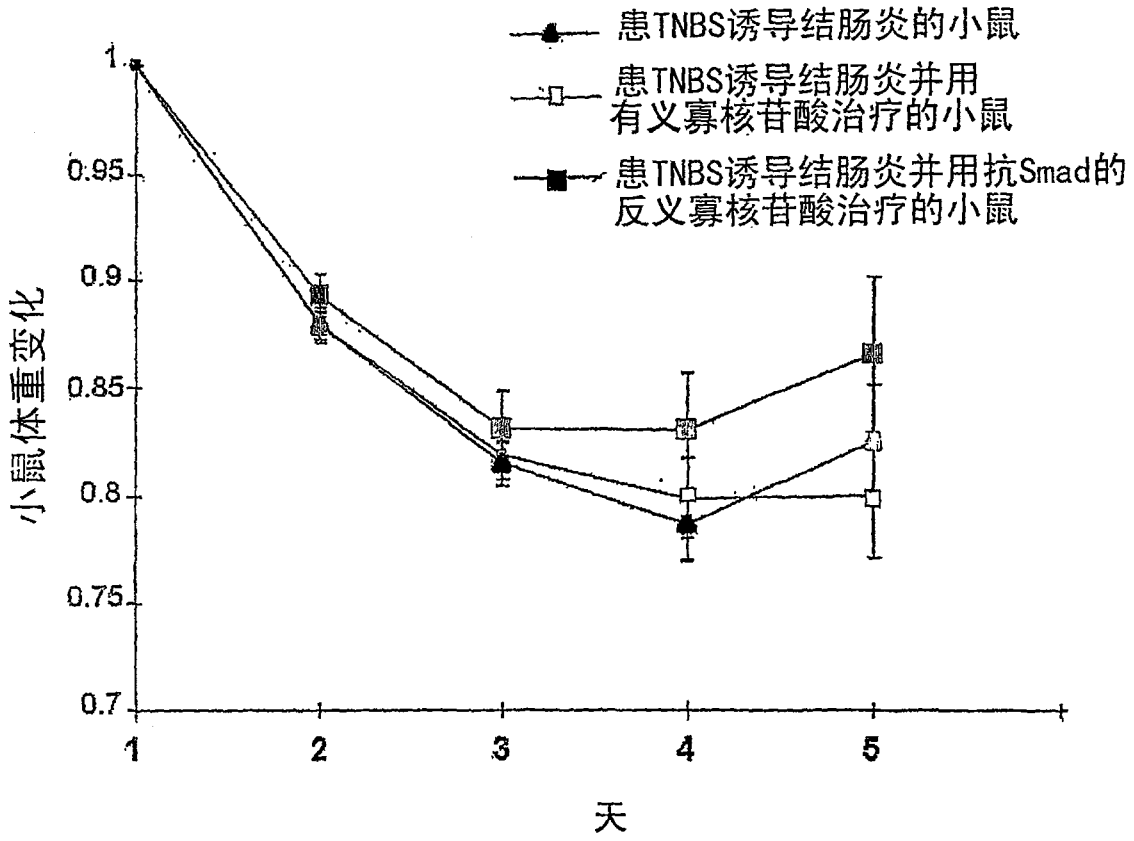

患TNBS诱导结肠炎的小鼠
患TNBS诱导结肠炎并用
有义寡核苷酸治疗的小鼠
患TNBS诱导结肠炎并用抗Smad的
反义寡核苷酸治疗的小鼠
小鼠体重变化
1
0.95
0.9
0.85
0.8
0.75
0.7
1
2
3
4
5
天

图 4

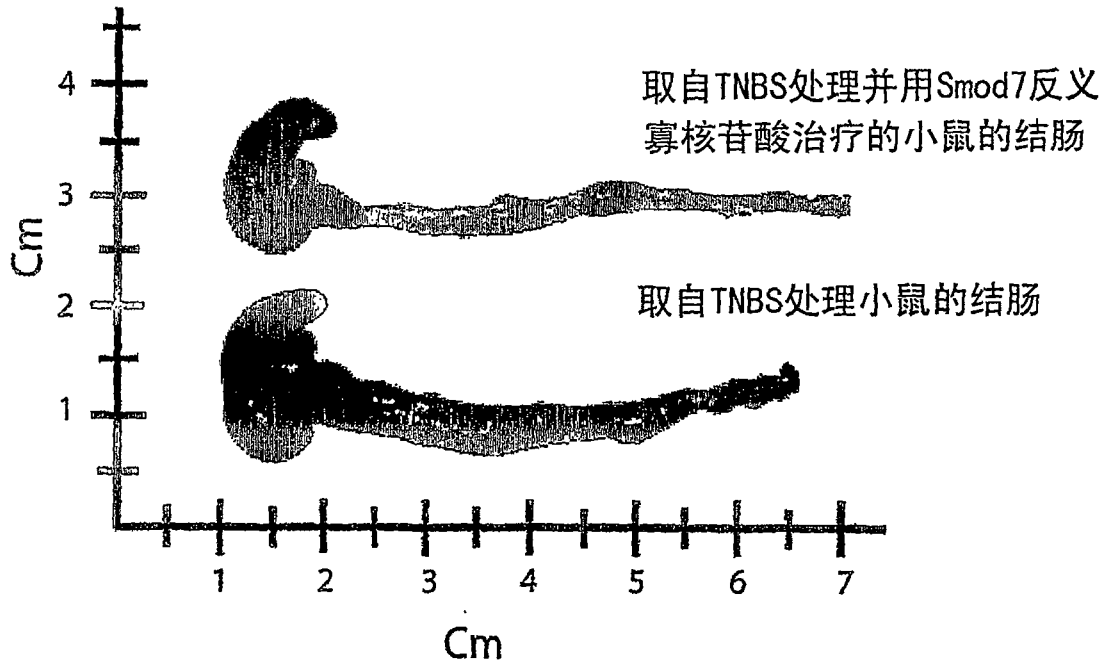
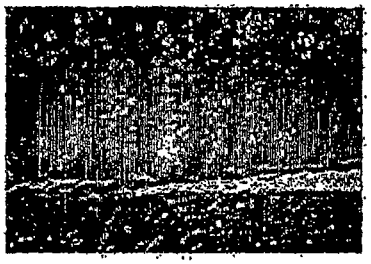
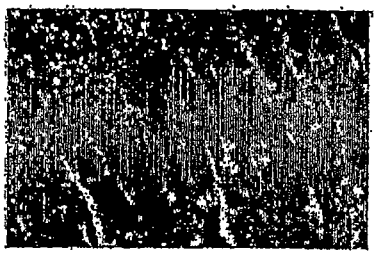

取自TNBS处理并用Smod7反义
寡核苷酸治疗的小鼠的结肠
取自TNBS处理小鼠的结肠
Cm
1
2
3
4
1
2
3
4
5
6
7
Cm

图 5

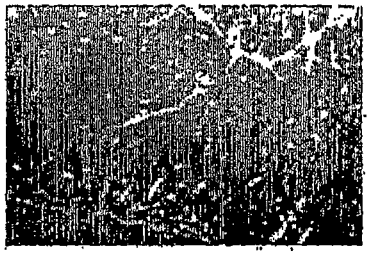
没有结肠炎的小鼠



患TNBS诱导结肠炎的小鼠



患TNBS诱导结肠炎并用
对照寡核苷酸治疗的小鼠



患TNBS诱导结肠炎并用
Smad7寡核苷酸治疗的小鼠



图 6