



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I495473 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：099139112 (22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 12 日

(51)Int. Cl. : A61K31/7125 (2006.01) A61P31/16 (2006.01)

(30)優先權：2009/11/13 美國 61/261,278

2010/01/04 美國 61/292,056

2010/08/26 美國 61/377,382

(71)申請人：薩羅塔治療公司 (美國) SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：艾弗森 派翠克 L IVERSEN, PATRICK L. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 92/03454A1

WO 2006/047683A2

WO 2007/084359A2

Haasnoot J, RNA interference against viruses: strike and counterstrike., Nat Biotechnol., 2007, Vol.25(12), pp:1435-1443.

Rygiel TP, Lack of CD200 enhances pathological T cell responses during influenza infection., J Immunol., 20090801, Vol.183(3), pp: 1990-1996. (網路公開 20090708)

審查人員：黃文延

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：11 共 205 頁

(54)名稱

反義抗病毒化合物及治療流感病毒感染的方法

ANTISENSE ANTIVIRAL COMPOUND AND METHOD FOR TREATING INFLUENZA VIRAL INFECTION

(57)摘要

本發明係關於反義抗病毒化合物，及其在正黏病毒科(Orthomyxoviridae)病毒之生長抑制及病毒感染之治療中之使用方法及產生方法。該等化合物尤其可用於治療哺乳動物之流感病毒感染。實例性反義抗病毒化合物係實質上不帶電或部分帶正電之嗎啉基寡核苷酸，其具有 1) 抗核酸酶骨架，2) 12-40 個核苷酸鹼基，及 3) 至少 12 個鹼基長之靶向序列，與選自以下之靶區域雜交：a) 流感病毒 A、流感病毒 B 及流感病毒 C 之負義病毒 RNA 區段中 5' 或 3' 端之 25 個鹼基；b) 正義 vcRNA 中 5' 或 3' 端之末端 30 個鹼基；c) 流感病毒 mRNA 中 AUG 起始密碼子周圍之 45 個鹼基；及 d) 進行選擇性剪接之流感 mRNAs 中剪接供體或剪接受體位點周圍之 50 個鹼基。

The present invention relates to antisense antiviral compounds and methods of their use and production in inhibition of growth of viruses of the Orthomyxoviridae family and in the treatment of a viral infection. The compounds are particularly useful in the treatment of influenza virus infection in a mammal. Exemplary antisense antiviral compounds are substantially uncharged, or partially positively charged, morpholino oligonucleotides having 1) a nuclease resistant backbone, 2) 12-40 nucleotide bases, and 3) a targeting sequence of at least 12 bases in length that hybridizes to a target region selected from the following: a) the

5' or 3' terminal 25 bases of the negative sense viral RNA segment of Influenzavirus A, Influenzavirus B and Influenzavirus C; b) the terminal 30 bases of the 5' or 3' terminus of the positive sense vcRNA; c) the 45 bases surrounding the AUG start codon of an influenza viral mRNA and; d) 50 bases surrounding the splice donor or acceptor sites of influenza mRNAs subject to alternative splicing.

(無元件符號說明)

M1/M2 病毒效價之劑量依賴性降低

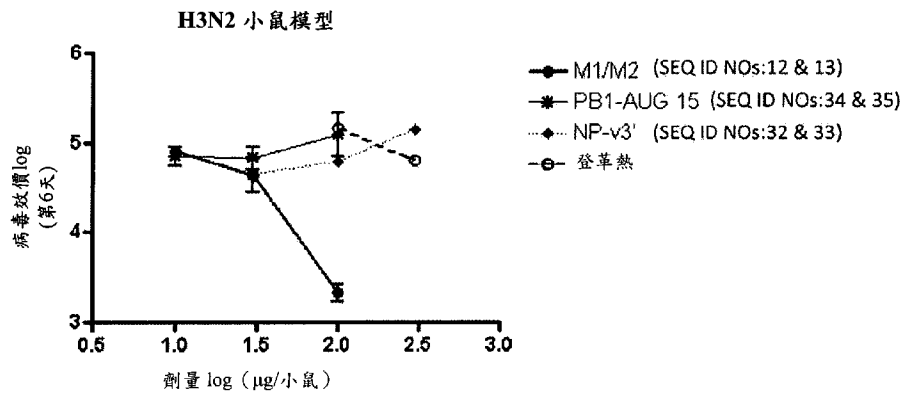


圖6

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99139112

※申請日：99.11.12

※IPC 分類：C07H; A61K; A61P

一、發明名稱：(中文/英文)

A61k 31/7125 (2006.01)

反義抗病毒化合物及治療流感病毒感染的方法

A61p 21/16

ANTISENSE ANTIVIRAL COMPOUND AND METHOD FOR
TREATING INFLUENZA VIRAL INFECTION

(2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明係關於反義抗病毒化合物，及其在正黏病毒科 (Orthomyxoviridae) 病毒之生長抑制及病毒感染之治療中之使用方法及產生方法。該等化合物尤其可用於治療哺乳動物之流感病毒感染。實例性反義抗病毒化合物係實質上不帶電或部分帶正電之嗎啉基寡核苷酸，其具有1)抗核酸酶骨架，2) 12-40個核苷酸鹼基，及3)至少12個鹼基長之靶向序列，與選自以下之靶區域雜交：a)流感病毒A、流感病毒B及流感病毒C之負義病毒RNA區段中5'或3'端之25個鹼基；b)正義vRNA中5'或3'端之末端30個鹼基；c)流感病毒mRNA中AUG起始密碼子周圍之45個鹼基；及d)進行選擇性剪接之流感mRNAs中剪接供體或剪接受體位點周圍之50個鹼基。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to antisense antiviral compounds and methods of their use and production in inhibition of growth of viruses of the Orthomyxoviridae family and in the treatment of a viral infection. The compounds are particularly useful in the treatment of influenza virus infection in a mammal. Exemplary antisense antiviral compounds are substantially uncharged, or partially positively charged, morpholino oligonucleotides having 1) a nuclease resistant backbone, 2) 12-40 nucleotide bases, and 3) a targeting sequence of at least 12 bases in length that hybridizes to a target region selected from the following: a) the 5' or 3' terminal 25 bases of the negative sense viral RNA segment of Influenzavirus A, Influenzavirus B and Influenzavirus C; b) the terminal 30 bases of the 5' or 3' terminus of the positive sense vcRNA; c) the 45 bases surrounding the AUG start codon of an influenza viral mRNA and; d) 50 bases surrounding the splice donor or acceptor sites of influenza mRNAs subject to alternative splicing.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(6)圖。

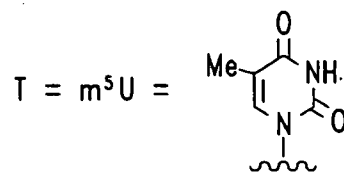
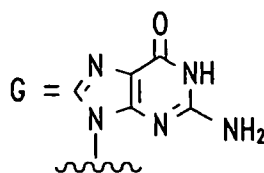
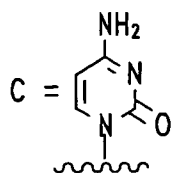
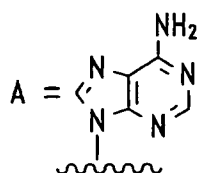
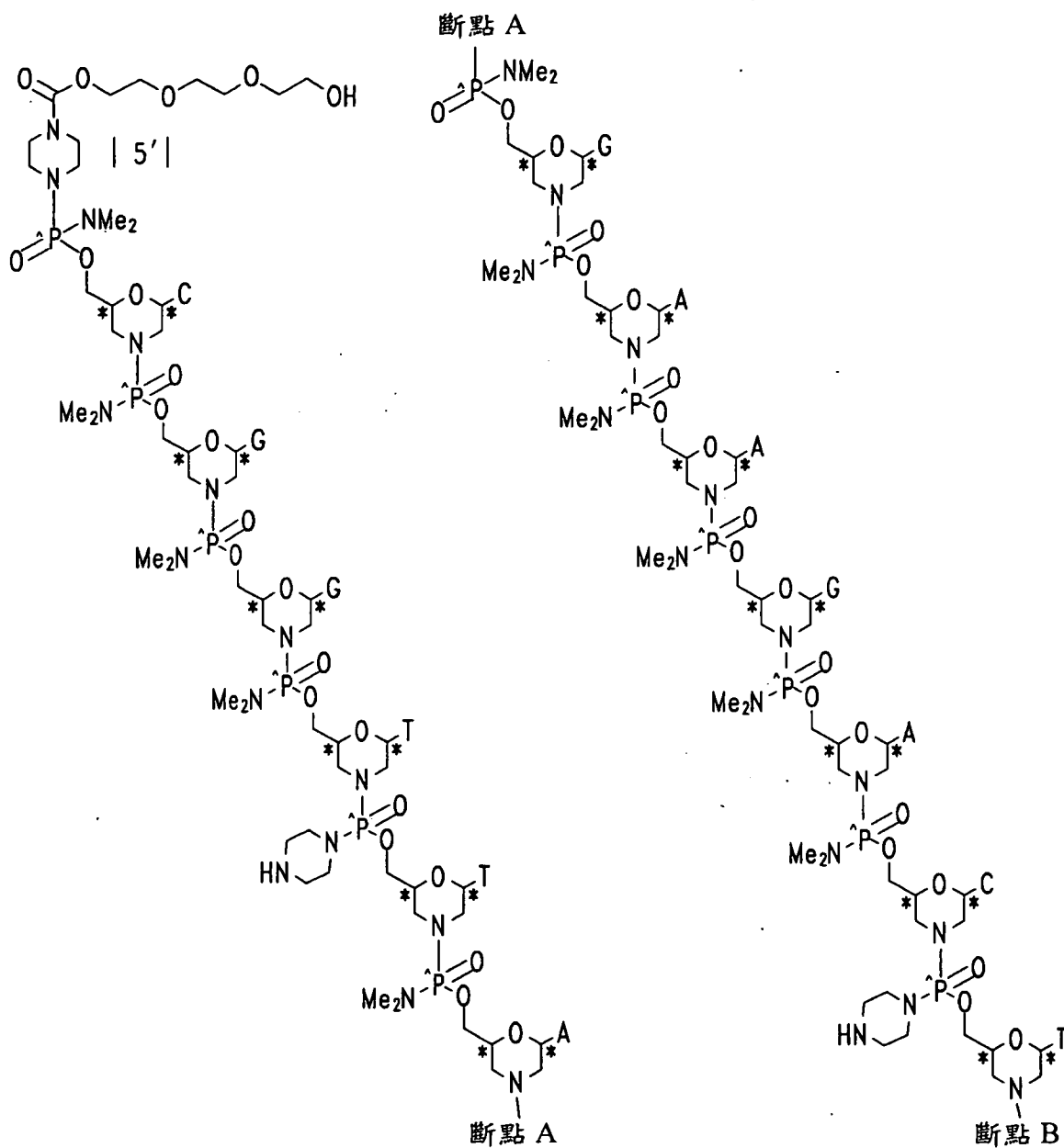
(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

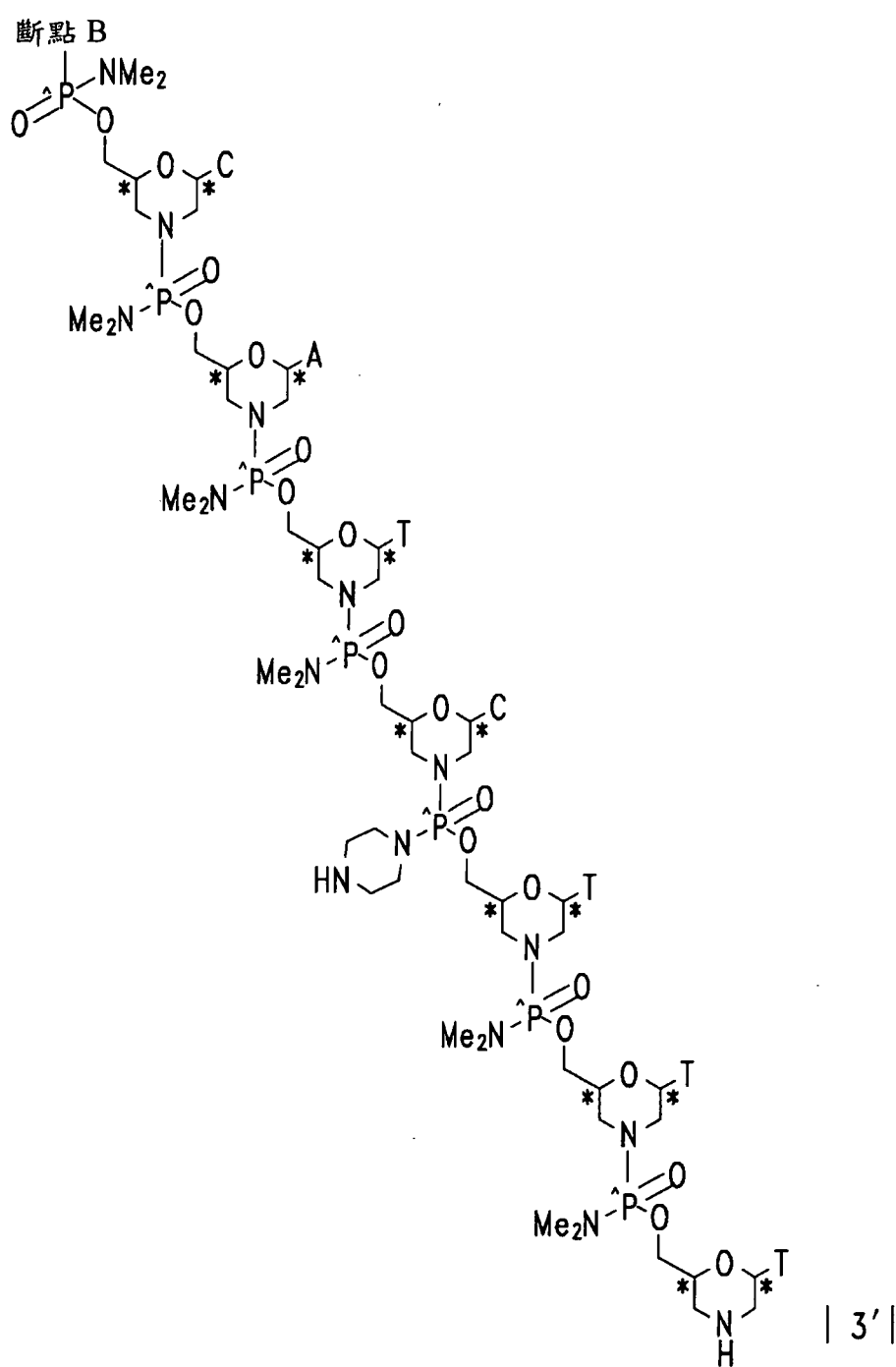
(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

M1/M2-AUG+

SEQID NO:13





六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於治療流感病毒感染之反義寡核苷酸及採用該等寡核苷酸之抗病毒治療方法。

本申請案根據35 U.S.C. § 119(e)主張以下申請案之權益：2009年11月13日申請之美國臨時專利申請案第61/261,278號；2010年1月4日申請之美國臨時專利申請案第61/292,056號；及美國臨時專利申請案第61/377,382號2010年8月26日申請之，其各自係全文以引用方式併入。

【先前技術】

在整個有記錄的歷史中，流感病毒已成為人類死亡及患病之主要原因。在世界範圍內，流感A病毒感染每年引發數百萬例嚴重疾病且使多達500,000人死亡。傳染病之嚴重度顯著不同，但其以固定時間間隔發作且總引起大量人類死亡及患病，最常出現在老年人群中。儘管針對匹配流感株系之疫苗可在60-80%之健康成人中預防疾病，但在高風險人群中保護率顯著較低。此外，疫苗接種不能針對意外株系提供保護，例如在1997年於香港爆發且在2003年及2004年於歐洲及南亞爆發之H5及H7禽流感。當前抗流感藥物提供保護及治療效應之能力有限(Cox及Subbarao 1999；Cox及Subbarao 2000)。

流感A係負極性分節RNA病毒。基因組區段係藉由4個蛋白之複合體來複製：3個聚合酶多肽(PA、PB1及PB2)及NP(核蛋白)。所有8個基因組區段之5'及3'末端序列區在基

因型內高度保守 (Strauss及Strauss 2002)。

流感A病毒可根據其表面糖蛋白之抗原性質及遺傳性質來區分亞型；迄今已確定15種血凝素(HA)及9種神經胺酸酶(NA)亞型。已自禽類宿主分離出具有所有已知HA及NA亞型之病毒，但只有H1N1 (1918)、H2N2 (1957/58)及H3N2 (1968)亞型之病毒與大範圍人類傳染病有關 (Strauss及Strauss 2002)。

自1997年H5N1流感病毒傳播至人類並殺死18名感染者中之6人以來，禽流感病毒已多次傳播至哺乳動物。完整病毒直接傳播，或哺乳動物品系獲得來自禽流感病毒之基因區段。在亞洲，家禽大範圍感染H5N1病毒已使得愈來愈多的人擔心，此亞型可能達成人類間傳播並建立種間傳播。不同類型之流感病毒能感染之物種取決於不同形式之病毒糖蛋白(HA、NA)。此使得在禽類與人類之間存在不易突破的牢固物種障壁。然而，豬提供「混合罐(mixing pot)」 - 其能被兩種類型之病毒感染且由此使得禽類病毒可傳播至人類。在個別豬細胞經禽類及人類流感病毒二者共感染時，可出現攜載禽類HA基因型但易於感染人類之重組形式。禽類HA可感染豬，但不能感染人類。在豬中，在基因組區段包裝期間，可產生具有若干禽類區段及人類HA及/或NA區段之病毒 (Cox及Subbarao 2000)。

流感病毒感染人類及動物(例如豬、禽類、馬)且可引發急性呼吸性疾病。業內已多次嘗試製造可有效抵抗流感病毒之疫苗。然而，尤其自長期效果來看，尚無疫苗獲得完

全成功。此可能至少部分係由於流感病毒基因組之分節特徵所致，其使得可經由區段再分佈而存在多種形式。舉例而言，有人提出，動物與人類流感病毒之間之RNA區段可能發生互換，從而在兩個種群中引入新抗原性亞型。因此，長期疫苗接種方法已因出現新亞型(抗原性「轉變」)而失敗。另外，病毒之表面蛋白、血凝素及神經胺酸酶不斷發生微小抗原性變化(抗原性「漂移」)。此高度變異性闡釋了為何針對特定流感病毒產生之特異性免疫無法建立針對新變體之保護。因此，業內需要替代性抗病毒策略。儘管B及C型流感病毒與A型病毒相比引發較少之臨床疾病，但新抗病毒藥物應亦有助於抑制該等因子引發之感染。

天然出現在禽類中之流感病毒稱作禽流感(禽類流感)。禽類在其腸中攜載病毒，但一般不會因感染而得病。然而，候鳥可攜載禽類流感從而感染飼養的雞、鴨及火雞，導致其生病甚至死亡。禽流感不易感染人類，但在人類暴露(例如接觸飼養的禽類)更頻繁時，人類發生感染。危險的禽類流感(H5N1)首次在1961年在南美於燕鷗中鑒定，且鑒定為流感之可能致死形式。在2003年底及2004年，在8個亞洲國家H5N1發生爆發。當時，該等國家超過1億禽類死亡或被殺死以控制爆發。據報導，自2004年6月開始，在亞洲出現H5N1之新致死性爆發，該爆發在目前仍在繼續。已在泰國、越南及柬埔寨觀察到H5N1之人類感染，死亡率為約50%。該等感染大部分係由於人類接觸受感染

家禽所致，但已出現少量H5N1之人類間傳播病例。

三重配流感 A (H1)病毒自1998年起即已傳播，其具有來自豬(HA、NP、NA、M及NS)、人類(PB1)及禽類(PB2及PA)之區段。新闡述之新穎豬源流感 A (2009H1N1)病毒(S-OIV)引發了正在進行之世界性疾病暴發，其係三重配病毒且包括此先前存在之病毒中已與歐亞豬病毒之神經胺酸酶(NA)及基質(M)區段重配之遺傳元件(S-OIV Investigation Team, 2009)。先前流感 A (H1)三重配病毒偶然傳播至人類但不能有效地進行人類間傳播，但新S-OIV之人類間傳播極有效。最近，已自29個國家報導3440個實驗室確認之S-OIV感染病例。該爆發始於墨西哥，當地總共已記錄1364個病例，導致45人死亡(病死率為3.3%)。在墨西哥以外，據報導僅有三人死亡(病死率為0.1%)。目前此死亡率之地理不均衡之原因仍未可知。

儘管當前S-OIV對神經胺酸酶抑制劑奧司他韋(oseltamivir)及紮那米韋(zanamivir)敏感，但先前已記錄季節性流感可進行突變從而產生神經胺酸酶抑制劑抵抗。S-OIV會替代人類H1成為季節性流感病毒或S-OIV會與另一流感株系重配而產生另一新變體嗎？其會進化變得更致命嗎？該等不確定性在鑒定新病毒至製造及分銷新疫苗期間會同時出現。此外，足夠新穎之病毒血凝素抗原可能需要使用大劑量免疫原及初免-加強免疫方案，從而對大規模疫苗接種運動造成必須迅速誘發保護性免疫之實際困難。鑒於該等因素，業內迫切需要產生針對S-OIV之新穎

預防及治療形式，具體而言，其理想地具有針對多種流感病毒株系、亞型及類型之廣譜活性。

業內迫切需要針對流感A之新治療形式，此係基於(a)已知該病毒傾向於發生連續低程度抗原性漂移及較不頻繁但不可預測且可導致大範圍流行病之重大抗原性轉變，(b)在大部分疫苗接受者中預防流感相關疾病之疫苗接種明確失敗(甚至在病毒株系合理匹配時)，及(c)對流感之已批准治療形式(例如金剛烷衍生物，及更新之神經胺酸酶抑制劑奧司他韋)之抵抗頻率增加。

鑒於流感病毒引發之疾病之嚴重性，業內急切需要治療流感感染之新療法。考慮到缺少有效預防或治療，因此本發明之目標係提供治療感染流感病毒之宿主之治療性化合物及方法。

【發明內容】

在一態樣中，本發明實施例包括可在宿主細胞內有效抑制RNA病毒複製之抗病毒化合物，該RNA病毒具有單鏈負義基因組且選自正黏病毒科(Orthomyxoviridae)，其包括流感病毒A、流感病毒B及流感病毒C屬。該化合物可靶向選自以下之區域內之病毒RNA序列：1)負義病毒RNA區段中5'或3'末端之25個鹼基；2)正義cRNA中5'或3'末端之25個末端鹼基；3)流感病毒mRNA中AUG起始密碼子周圍之45個鹼基；及4)進行選擇性剪接之流感mRNA中剪接供體或受體位點周圍之50個鹼基。

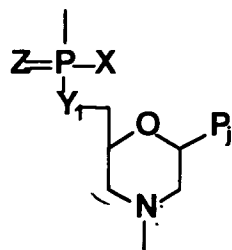
在某些實施例中，抗病毒化合物可包括具有以下特徵之

寡核苷酸：a)抗核酸酶骨架，b)12-40個核苷酸鹼基，及c)長至少10個鹼基之靶向序列，其與選自以下之靶區域雜交：i)流感病毒A、流感病毒B及流感病毒C之負義病毒RNA區段(例如包含M1或M2之區段)中5'或3'末端之25個鹼基，ii)流感病毒A、流感病毒B及流感病毒C之正義cRNA中5'或3'末端之25個末端鹼基，iii)流感病毒mRNA(例如M1或M2 mRNA)之AUG起始密碼子周圍之45個鹼基，及iv)流感病毒A、流感病毒B及流感病毒C進行選擇性剪接之mRNA(例如M1或M2 mRNA)之剪接供體或受體位點周圍之50個鹼基。

寡核苷酸之特徵亦可在於：a)能由哺乳動物宿主細胞主動吸收，及/或b)能與病毒靶區域形成異源雙鏈體結構，其中該異源雙鏈體結構係：i)由病毒之正義或負義鏈與該寡核苷酸化合物組成，且ii)特徵在於解鏈 T_m 為至少45°C。

在另一態樣中，本發明實施例包括可在哺乳動物宿主細胞中抑制感染性流感病毒複製之抗病毒化合物，該病毒具有單鏈分節之負義基因組且選自正黏病毒科。可以特徵在於上述要素之寡核苷酸形式將化合物投與受感染宿主細胞。可將化合物投與感染流感病毒或具有感染流感病毒之風險之哺乳動物個體。

化合物可由藉由不帶電含磷亞單元間鍵聯來連接之嗎啉基亞單元組成，該等鍵聯將一個亞單元之嗎啉基氮連接至相鄰亞單元之5'環外碳上。在一實施例中，亞單元間鍵聯係磷二鹼胺鍵聯，例如彼等具有以下結構者：



其中 $Y_1=O$ ， $Z=O$ ， P_j 係可藉由鹼基特異性氫鍵有效結合多核苷酸中之鹼基之嘌呤或嘧啶或等效鹼基配對部分，且 X 係烷基、烷氧基、硫代烷氧基或烷基胺基，例如，其中 $X=NR_2$ ，其中各 R 獨立地為氫或甲基。

化合物可由經上述不帶電鍵聯來連接之嗎啉基亞單元組成，該等不帶電鍵聯之間散佈有帶正電鍵聯。帶正電鍵聯之總數介於2與不超過鍵聯總數之一半之間。帶正電鍵聯具有上述結構，其中 X 係1-六氫吡嗪。

化合物可包括能與病毒之正義或負義RNA鏈形成此一異源雙鏈體結構之寡核苷酸類似物部分與可有效增強宿主細胞對該化合物之攝取之富精胺酸多肽之共價偶聯物。實例性多肽包含表示為SEQ ID NO: 115-128之序列中之一者。

在一相關態樣中，本發明實施例包括在以下之間形成之異源雙鏈複合體：

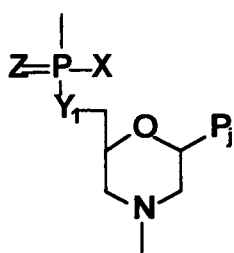
- (a) 負義病毒RNA中5'或3'末端之25個鹼基及/或；
- (b) 正義mRNA之5'或3'末端之25個末端鹼基及/或；
- (c) 病毒mRNA中AUG起始密碼子周圍之45個鹼基及/或；
- (d) 進行選擇性剪接之流感mRNA中剪接供體或受體位點周圍之50個鹼基及；

(e)寡核苷酸，其特徵在於：

- (i)抗核酸酶骨架，
- (ii)能由哺乳動物宿主細胞來攝取，
- (iii)含有12-40個核苷酸鹼基，

其中該異源雙鏈複合體之解鏈 T_m 為至少45°C。

在某些實施例中，實例性寡核苷酸可由藉由不帶電含磷亞單元間鍵聯來連接之嗎啉基亞單元組成，該等鍵聯將一個亞單元之嗎啉基氮連接至相鄰亞單元之5'環外碳上。化合物可具有磷二醯胺鍵聯，例如具有以下結構之鍵聯



其中 $Y_1=O$ ， $Z=O$ ， P_j 係可藉由鹼基特異性氫鍵有效結合多核苷酸中之鹼基之嘌呤或嘧啶鹼基配對部分，且 X 係烷基、烷氧基、硫代烷氧基或烷基胺基。在一較佳化合物中， $X=NR_2$ ，其中各 R 獨立地為氫或甲基。化合物亦可由經上述不帶電鍵聯連接之嗎啉基亞單元組成，該等不帶電鍵聯之間散佈有帶正電鍵聯。帶正電鍵聯之總數介於2與不超過鍵聯總數之一半之間。帶正電鍵聯具有上述結構，其中 X 係1-六氫吡嗪。

化合物可為單獨的寡核苷酸或寡核苷酸與能促進宿主細胞攝取該化合物之富精胺酸多肽之偶聯物。實例性多肽具有表示為SEQ ID NO: 115-128之序列中之一者。

在又一態樣中，本發明實施例包括在哺乳動物宿主細胞中抑制流感病毒複製之反義寡核苷酸及相關方法，該流感病毒具有單鏈分節之負義RNA基因組且選自正黏病毒科。化合物之特徵可為本文所述病毒RNA元件。在某些實施例中，細胞在個體體內，通常係感染流感病毒之個體。

在一些實施例中，該個體患有繼發性細菌感染，且該方法另外包含投與細菌抗生素，其係單獨投與或與抗病毒反義寡核苷酸同時投與。在具體實施例中，繼發性細菌感染係鏈球菌性肺炎感染（例如肺炎鏈球菌（*Streptococcus pneumoniae*））。在某些實施例中，抗生素係 β -內醯胺。在具體實施例中，抗生素選自青黴素（penicillin）、阿莫西林（amoxicillin）、頭孢菌素（cephalosporin）、氯黴素（chloramphenicol）及克林黴素（clindamycin）。

本發明亦包括降低流感病毒複製之方法，其包含投與靶向編碼CD200或CD200受體之RNA分子之反義寡核苷酸，其係單獨投與或與一或多種本文所述抗病毒反義寡核苷酸同時投與。

一種醫藥組合物，其包含本文所述抗病毒反義寡核苷酸及醫藥上可接受之載劑。在一些實施例中，醫藥組合物另外包含細菌抗生素，例如青黴素、阿莫西林、頭孢菌素、氯黴素或克林黴素。在較佳實施例中，細菌抗生素係抑菌劑。在一些實施例中，醫藥組合物另外包含靶向編碼CD200或CD200受體之RNA分子之反義寡核苷酸。

對於諸如流感A病毒等流感病毒之治療而言，靶向序列

可與連接表示為SEQ ID NO: 1-11之序列群中之一者之區域雜交。較佳靶向序列係彼等與SEQ ID NO: 4之負鏈靶或SEQ ID NO: 2之正鏈靶互補者。靶向該兩個區域之實例性反義磷二酯胺嗎啉基寡聚體(「PMO」)分別列示為SEQ ID NO: 23及12。

【實施方式】

定義

除非另有定義，否則本文所用所有技術及科學術語皆具有與熟習本發明所屬領域技術者通常所瞭解相同之意義。儘管在本發明之實踐或測試中可使用彼等與本文所述之方法及材料類似或等效之任一者，但本文闡述較佳方法及材料。出於本發明之目的，以下術語定義於下文中。

本文所用冠詞「一」(「a」及「an」)係指一個或一個以上(即至少一個)之該冠詞之文法受詞。舉例而言，「一元件」意指一個元件或不止一個元件。

「約」意指數量、程度、數值、數字、頻率、百分比、尺寸、大小、量、重量或長度相對於參照數量、程度、數值、數字、頻率、百分比、尺寸、大小、量、重量或長度變化至多30%、25%、20%、25%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

「編碼序列」意指任何有助於編碼基因之多肽產物之核酸序列。相反，術語「非編碼序列」係指任何不促進編碼基因之多肽產物之核酸序列。

在整個此說明書中，除非上下文另有需要，否則詞語

「包含」(「comprise」、「comprises」及「comprising」)可理解為表示包括所述步驟或要素或步驟或要素群，但不排除任何其他步驟或要素或步驟或要素群。

「由...組成」意指包括且受限於片語「由...組成」後之任何要素。因此，片語「由...組成」表示所列示要素係需要的或必需的，且不存在其他要素。「基本上由...組成」意指包括該片語後列示之任何要素，且受限於不干擾或有助於揭示內容中針對所列示要素闡述之活性或作用之其他要素。因此，片語「基本上由...組成」表示所列示要素係需要的或必需的，但其他要素係可選的且可存在或不存在，此取決於該等其他要素是否顯著影響所列示元素之活性或作用。

術語「互補的」及「互補性」係指根據鹼基配對規律相關之多核苷酸(即核苷酸序列)。舉例而言，序列「A-G-T」與序列「T-C-A」互補。互補性可為「部分的」，其中根據鹼基配對規律，核酸中僅部分鹼基匹配。或者，核酸之間可「完全」或「全部」互補。核酸鏈之間之互補性程度對核酸鏈之間雜交之效率及強度具有顯著效應。儘管通常期望完全互補性，但一些實施例可相對於靶RNA包括一或多處(但較佳6、5、4、3、2或1處)錯配。本發明包括寡聚體內任一位置之變異。在某些實施例中，寡聚體末端附近序列中之變異一般優於內部變異，且若存在通常在5'及/或3'末端之約6、5、4、3、2或1個核苷酸內。

術語「細胞穿透肽」或「CPP」可互換使用且係指陽離

子型細胞穿透肽，亦稱作轉運肽、載體肽或肽轉導結構域。本文所示肽能在給定細胞培養群之30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%(包括該等數值之間之所有整數)之細胞內誘導細胞穿透，且在全身性投與後使得體內多種組織可進行大分子易位。

術語「反義寡聚體」或「反義化合物」或「反義寡核苷酸」或「寡核苷酸」可互換使用且係指各自具有鹼基配對部分之環狀亞單元之序列，其係藉由亞單元間鍵聯來連接，使得鹼基配對部分可藉由沃森-克裏克(Watson-Crick)鹼基配對與核酸(通常為RNA)中之靶序列雜交，從而在該靶序列內形成核酸:寡聚體異源雙鏈體。該等環狀亞單元可係基於核糖或另一戊糖；或在某些實施例中，其係基於嗎啉基(參見下文關於嗎啉基寡聚體之說明)。本發明亦涵蓋肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA)、2'-O-甲基寡核苷酸及RNA干擾劑(siRNA劑)及業內已知之其他反義藥劑。

此一反義寡聚體可設計為阻斷或抑制mRNA之轉譯或抑制天然前體mRNA剪接處理，或誘導靶向mRNA降解，且可稱作「針對」或「靶向」與其雜交之靶序列。在某些實施例中，靶序列包括一區域，其包括mRNA之AUG起始密碼子、預處理mRNA之3'或5'剪接位點、分支點。靶序列可位於外顯子或內含子內。剪接位點之靶序列可包括5'端位於預處理mRNA中正常剪接受體接點下游1至約25個鹼基對處之mRNA序列。較佳剪接位點靶序列係預處理mRNA中包括剪接位點或完全含於外顯子編碼序列內或跨越剪接受

體或供體位點之任一區域。在寡聚體以上述方式靶向生物相關靶(例如蛋白質、病毒或細菌)中之核酸時，更通常地稱其「靶向」該靶。

本發明包括包含SEQ ID NO: 12-114中之一或多者、基本上由其組成或由其組成之反義寡核苷酸。亦包括該等反義寡聚體之變體，包括與SEQ ID NO: 12-114中之任一者具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%(包括該等數字之間之所有整數)序列一致性或序列同源性之變體寡聚體，及/或與該等序列相差約1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個核苷酸之變體，較佳係彼等抑制細胞中之流感病毒複製之變體。亦包括SEQ ID NO: 12-114中任何一或多者之寡核苷酸，其包含適當數量之本文所述帶電鍵聯，例如每2-5個不帶電鍵聯包含最多約1個帶電鍵聯，例如每10個不帶電鍵聯包含約4-5個帶電鍵聯，及/或其包含與其附接之亦闡述於本文中之富Arg肽。

術語「嗎啉基寡聚體」或「PMO」(胺基磷酸酯-或磷二酯胺嗎啉基寡聚體)係指由嗎啉基亞單元結構組成之寡核苷酸類似物，其中(i)該等結構係藉由含磷鍵聯連接在一起，該等鍵聯長一至三個原子，較佳長兩個原子，且較佳不帶電或為陽離子，其將一個亞單元之嗎啉基氮連接至相鄰亞單元之5'環外碳上，且(ii)各嗎啉基環具有可藉由鹼基特異性氫鍵有效結合多核苷酸中之鹼基的嘌呤或嘧啶或等效鹼基配對部分。例如，參見圖1A中之結構，其展示較佳磷二酯胺鍵聯類型。只要不干擾結合或活性，可對此鍵聯

進行變異。舉例而言，可用硫取代附接至磷之氧(硫代磷二醯胺)。可用胺基或經低碳烷基取代之胺基來取代5'氧。附接至磷之側基氮可未經取代，經單取代，或經低碳烷基二取代(視需要經取代)。亦參見下文關於陽離子型鍵聯之論述。嘌呤或嘧啶鹼基配對部分通常係腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶或肌苷。嗎啉基寡聚體之合成、結構及結合特徵詳述於以下專利中：美國專利第5,698,685號、第5,217,866號、第5,142,047號、第5,034,506號、第5,166,315號、第5,521,063號及第5,506,337號，及PCT專利申請案第PCT/US 07/11435號(陽離子型鍵聯)及PCT申請案第US 2008/012804號(經改良合成)，所有該等專利皆係以引用方式併入本文中。

術語「寡核苷酸類似物」係指具有以下之寡核苷酸：(i)經修飾骨架結構，例如除在天然寡核苷酸及多核苷酸中發現之標準磷酸二酯鍵以外之骨架，及(ii)視需要經修飾糖部分，例如嗎啉基部分而非核糖或去氧核糖部分。寡核苷酸類似物支持能藉由沃森-克裏克鹼基配對與標準多核苷酸鹼基氫鍵鍵結之鹼基，其中類似物骨架呈現鹼基之方式容許該氫鍵以序列特異性方式存於寡核苷酸類似物分子與標準多核苷酸(例如單鏈RNA或單鏈DNA)中之鹼基之間。較佳類似物係彼等具有實質上不帶電之含磷骨架者。

寡核苷酸類似物中之實質上不帶電之含磷骨架係大部分亞單元鍵聯(例如介於其鍵聯之50%至100%之間，通常為至少60%至100%或75%或80%)不帶電或實質上不帶電且含

有單一磷原子之骨架。反義寡核苷酸及寡核苷酸類似物可含有約8個至40個亞單元，通常約8-25個亞單元，且較佳約12至25個亞單元。在某些實施例中，寡核苷酸可具有與靶序列之精確序列互補性或近似互補性，如下文所定義。

寡核苷酸之「亞單元」係指一個核苷酸(或核苷酸類似物)單元。該術語可意指具有或不具有附接亞單元間鍵聯之核苷酸單元，但在涉及「帶電亞單元」時，電荷通常位於亞單元間鍵聯(例如磷酸酯或硫代磷酸酯鍵聯或陽離子型鍵聯，如圖1B中所示)內。

嘌呤或嘧啶鹼基配對部分通常係腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶或肌苷。亦包括諸如以下等鹼基：吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氫尿苷、萘基、胺基苯基、5-烷基胞苷(例如5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(例如核糖胸苷)、5-鹵代尿苷(例如5-溴尿苷)或6-氮雜嘧啶或6-烷基嘧啶(例如6-甲基尿苷)、丙炔、癩苷(quesosine)、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、懷丁苷(wybutosine)、懷丁氧苷(wybutoxosine)、4-乙酰替丁(4-acetylthidine)、5-(羧基羥甲基)尿苷、5'-羧甲基胺基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基胺基甲基尿苷、 β -D-半乳糖基癩苷、1-甲基腺苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鳥苷、3-甲基胞苷、2-甲基腺苷、2-甲基鳥苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鳥苷、5-甲氧基胺基甲基-2-硫代尿苷、5-甲基胺基甲基尿苷、5-甲基羧基甲基尿苷、5-甲氧基尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷、2-甲硫基-N6-異戊烯基腺苷、 β -D-甘露糖基癩

苷、尿苷-5-氧基乙酸、2-硫代胞苷、蘇胺酸衍生物及其他鹼基(Burgin等人, 1996, *Biochemistry*, 35, 14090; Uhlman & Peyman, 上述文獻)。在此態樣中,「經修飾鹼基」意指除腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)以外之核苷酸鹼基,如上所述;該等鹼基可用於反義分子中之任一位置。熟習此項技術者應瞭解,端視寡聚體之使用,T與U可互換。舉例而言,對於其他反義化學物質(例如2'-O-甲基反義寡核苷酸,其更類似RNA)而言,T鹼基可顯示為U(例如,參見Sequence Listing)。

「胺基酸亞單元」或「胺基酸殘基」可係指 α -胺基酸殘基(-CO-CHR-NH-)或 β -或其他胺基酸殘基(例如-CO-(CH₂)_nCHR-NH-),其中R係側鏈(其可包括氫)且n係1至7,較佳為1至4。

術語「天然胺基酸」係指存於自然界中所發現蛋白質中之胺基酸,例如在蛋白質生物合成期間使用之20個(L)-胺基酸,以及其他胺基酸,例如4-羥脯胺酸、羥離胺酸、鎖鏈素、異鎖鏈素、高半胱胺酸、瓜胺酸及鳥胺酸。術語「非天然胺基酸」係指彼等不存於自然界中所發現蛋白質中之胺基酸,實例包括 β -丙胺酸(β -Ala)、6-胺基己酸(Ahx)及6-胺基戊酸。「非天然胺基酸」之其他實例包括(但不限於)(D)-胺基酸、正白胺酸、正纈胺酸、對氟苯基丙胺酸、乙硫胺酸及諸如此類,其為熟習此項技術者已知。

「分離的」意指材料實質上或基本上不含通常在其天然狀態下與其相伴之成份。舉例而言,本文所用「經分離多

核苷酸」或「經分離寡核苷酸」可係指已自天然狀態下位於兩側之序列純化或移出之多核苷酸，例如已自通常相鄰之序列移出之DNA片段。

「有效量」或「治療有效量」諸如反義寡聚體或RNA干擾劑(例如 siRNA)等治療性化合物作為單一劑量或作為一系列劑量之一部分投與哺乳動物個體之量，該量可有效產生期望治療效應。對於反義寡聚體，此效應通常係藉由抑制所選靶序列之轉譯或天然剪接處理來實現。靶向感染性流感病毒之「有效量」亦係指可有效降低感染性病毒之複製速率及/或病毒載量及/或與病毒感染相關之症狀之量。

「增強」(「enhance」或「enhancing」)或「增加」(「increase」或「increasing」)或「刺激」(「stimulate」或「stimulating」)一般係指一或多種反義或RNAi化合物或組合物與無反義化合物時或由對照化合物引發之反應相比在細胞或個體中產生或引發較強生理反應(即下游效應)。「增加」或「增強」之量通常係「統計學上顯著」之量，且可包括等於無反義化合物時(不存在藥劑)或由對照化合物產生之量之1.1倍、1.2倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍或更多倍(例如500倍、1000倍)(包括該等數字之間且大於1之所有整數及小數)，例如1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍等)之增加。

術語「降低」或「抑制」一般可係關於如根據診斷領域常規技術所量測，一或多種本發明反義或RNAi化合物

「減小」相關生理或細胞反應(例如本文所述疾病或病況之症狀)之能力。相關生理或細胞反應(體內或體外)可為熟習此項技術者所瞭解，且可包括降低流感感染之症狀或病狀，或降低病毒複製或病毒載量。反應之「減小」相對於無反義化合物時或由對照組合物產生之反應可為「統計學上顯著」的，且可包括減小1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包括該等數字之間之所有整數)。

術語「靶序列」係指寡核苷酸或反義藥劑所針對之靶RNA之一部分，亦即寡核苷酸將藉由互補序列之沃森-克里克鹼基配對來雜交之序列。在某些實施例中，靶序列可為病毒負鏈RNA或病毒mRNA之連續(contiguous)區域，或可由病毒基因組RNA或病毒互補RNA之5'及3'末端序列中之區域組成。

術語「靶向序列」或「反義靶向序列」係指寡核苷酸或其他反義藥劑中與RNA基因組中之靶序列互補(另外，意指實質上互補)之序列。反義化合物之整個序列或僅一部分可與靶序列互補。舉例而言，在具有20-30個鹼基之寡核苷酸中，約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29個鹼基可為與靶區域互補之靶向序列。通常，靶向序

列係由連續鹼基形成，但可替代地由非連續序列形成，該等非連續序列在(例如)自寡核苷酸之相對末端置於一起時構成跨越靶序列之序列。

靶序列及靶向序列可經選擇以使得反義化合物與以下範圍內之區域結合：1)負義病毒RNA中5'或3'末端之25個鹼基；2)正義mRNA中5'或3'末端之30個末端鹼基；3)病毒mRNA中AUG起始密碼子周圍之45個鹼基及/或；4)進行選擇性剪接之病毒mRNA中剪接供體或受體位點周圍之50個鹼基。在某些實施例中，靶區域可包括1)負義病毒RNA之M1或M2區域中5'或3'末端之25個鹼基；2)正義M1或M2 mRNA中5'或3'末端之30個末端鹼基；3) M1或M2 mRNA中AUG起始密碼子周圍之45個鹼基及/或；4) M1或M2病毒mRNA中剪接供體或受體位點周圍之50個鹼基。在某些實施例中，靶區域可包含病毒RNA(例如M1或M2 mRNA)之AUG密碼子及剪接供體位點周圍或有助於剪接供體位點之鹼基，例如多聚嘧啶束或套索(lariat)形成序列。在某些實施例中，使用單一反義寡聚體或RNAi劑靶向M1/M2 RNA之AUG起始密碼子及近端剪接供體序列(例如多聚嘧啶束)二者可提供降低靶蛋白表現、降低病毒複製或二者之協同效應。

靶序列及靶向序列在以反向平行構型發生雜交時闡述為彼此「互補」。靶向序列可與靶序列具有「近似」或「實質」互補性且仍可用於本發明之目的，亦即其仍可在功能上「互補」。在某些實施例中，寡核苷酸與靶序列每10個

核苷酸可具有至多一處錯配，且較佳每20個核苷酸具有至多一處錯配。或者，寡核苷酸與本文所述實例性反義靶向序列可具有至少90%序列同源性，且較佳至少95%序列同源性。

若寡核苷酸與靶多核苷酸在生理條件下雜交， T_m 實質上大於45°C，較佳為至少50°C，且通常為60°C-80°C或更高，則該寡聚體與該靶「特異性雜交」。該雜交較佳對應於嚴格的雜交條件。在給定離子強度及pH下， T_m 係50%靶序列與互補多核苷酸雜交之溫度。同樣，該雜交可在反義寡聚體與靶序列之「近似」或「實質」互補性以及精確互補性下進行。

「同源性」係指相同或構成保守性取代之胺基酸之百分比數量。同源性可使用諸如GAP(Deveraux等人，1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395)等序列對比程式來測定。以此方式，可藉由將缺口插入比對序列中來對比本文所述序列與長度類似或顯著不同之序列，該等缺口係藉由(例如)GAP所用之比較算法來測定。

本文所用表述「序列一致性」或(例如)包含「50%一致序列」係指序列基於各核苷酸或基於各胺基酸在對比窗中之一致性程度。因此，「序列一致性百分比」可藉由以下方式來計算：在對比窗中比較兩個最佳比對之序列，測定兩個序列中出現相同核酸鹼基(例如A、T、C、G、I)或相同胺基酸殘基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、

Asn、Gln、Cys及Met)之位置數以產生匹配位置數，用匹配位置數除以對比窗中之總位置數(即窗大小)，且將結果乘以100以產生序列一致性百分比。

用於描述兩個或更多個多核苷酸或多肽之間之序列關係之術語包括「參照序列」、「對比窗」、「序列一致性」、「序列一致性百分比」及「實質一致性」。「參照序列」長至少8或10個單體單元(包括核苷酸及胺基酸殘基)，但通常為15至18個，且經常為至少25個。由於兩個多核苷酸可各自包含(1)該兩個多核苷酸中類似之序列(即完整多核苷酸序列中之僅一部分)，及(2)在該兩個多核苷酸之間不同之序列，故兩個(或更多個)多核苷酸之間之序列對比通常係藉由在「對比窗」中對比兩個多核苷酸之序列以鑒定並比較具有序列類似性之局部區域來實施。「對比窗」係指具有至少6個連續位置、通常約50至約100個連續位置、更通常約100至約150個連續位置之概念性區段，其中在使兩個序列達成最佳比對後比較一序列與具有相同數量連續位置之參照序列。對比窗可包含相對於參照序列(其不包含增加或缺失)約20%或更低之增加或缺失(即缺口)以達成兩個序列之最佳比對。用於比對對比窗之序列最佳比對可藉由電腦化實施算法(Wisconsin Genetics軟體包7.0版中之GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA，Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)或藉由檢查用所選各種方法中之任一種達成之最佳比對(即在對比窗中達成最高同源性百分比)來實施。亦可參照BLAST程式系列，如

例如 Altschul 等人，1997, Nucl. Acids Res. 25:3389 所揭示。序列分析之詳細論述可參見 Ausubel 等人，「Current Protocols in Molecular Biology」，John Wiley & Sons 公司，1994-1998，第15章，第19.3單元。

「抗核酸酶」寡聚分子(寡聚體)係指骨架可以非雜交或雜交形式實質上抵抗體內常見細胞外及細胞內核酸酶之核酸酶裂解之寡聚體；亦即在該寡聚體所暴露之體內正常核酸酶條件下該寡聚體顯示極少或無核酸酶裂解。

「異源雙鏈體」係指反義寡核苷酸與靶RNA之互補部分之間之雙鏈體。「抗核酸酶異源雙鏈體」係指藉由使反義寡聚體與其互補靶結合形成之異源雙鏈體，從而使得該異源雙鏈體實質上可抵抗細胞內及細胞外核酸酶(例如RNA酶H，其能切斷雙鏈RNA/RNA或RNA/DNA複合體)之體內降解。

「涉及靶RNA之鹼基特異性細胞內結合事件」係指反義寡核苷酸與細胞內靶RNA序列之特異性結合。該結合之鹼基特異性具有序列依賴性。舉例而言，單鏈多核苷酸可與具有互補序列之單鏈多核苷酸特異性結合。

本文所用術語「體液」涵蓋得自個體之多種樣品類型，包括尿液、唾液、血漿、血液、脊髓液或其他生物源樣品(例如皮膚細胞或皮膚)，且可係指懸浮於其中之細胞或細胞碎片，或液體介質及其溶質。

術語「相對量」係在測試量測與對照量測之間進行對比時使用。在反應中形成複合體之試劑之相對量係相對於與

對照試樣反應之量與測試試樣反應之量。對照試樣可在相同分析中單獨運行，或其可為相同樣品之一部分(例如組織切片中惡性區域周圍之正常組織)。

對個體或細胞之「治療」係作為改變個體或細胞中疾病或病狀之天然進程之方式提供之任何類型的干預。治療包括(但不限於)投與(例如)醫藥組合物，且可以預防性方式實施，或在病理性事件開始後實施；或與病原體接觸。治療包括對與流感病毒感染有關之疾病或病況之症狀或病狀之任何期望效應。相關術語「經改良治療結果」係關於經診斷感染特定病毒之患者，可係指減慢或減小病毒生長，或病毒載量，或與該特定病毒感染有關之可檢測症狀。

亦包括「預防性」治療，其可係關於降低所治療疾病或病況之進展速率，延遲該疾病或病況之發作，或降低其發作之嚴重度。「治療」或「預防」並不一定係指完全根除、治癒或預防疾病或病況或其相關症狀。

在藥劑可藉由除跨過細胞膜被動擴散以外之機制進入細胞時，該藥劑係「由哺乳動物細胞主動吸收」。藥劑可藉由(例如)以下方式來轉運：「主動轉運」，係指藉由(例如)ATP依賴性轉運機制跨過哺乳動物細胞膜轉運藥劑；或「協助轉運」，係指藉由需要使藥劑與轉運蛋白結合，從而幫助經結合藥劑通過膜之機制跨過細胞膜轉運反義藥劑。對於主動及協助轉運二者，寡核苷酸類似物較佳具有實質上不帶電之骨架，如下文所定義。

或者，可將反義化合物調配為複合形式，例如具有與陽

離子型脂質或脂質體複合之陰離子型骨架之藥劑，其可藉由胞吞機制進入細胞中。反義寡核苷酸亦可在(例如)其5'或3'端與富精胺酸肽(例如HIV TAT蛋白之一部分、聚精胺酸)偶聯，或與精胺酸與其他胺基酸(包括非天然胺基酸6-胺基己酸(Ahx)及 β -丙胺酸(β Ala)之組合偶聯。實例性富精胺酸遞送肽列示為SEQ ID NO: 115-128。該等實例性富精胺酸遞送肽如(Moulton、Nelson等人，2004)所述幫助將藥劑轉運至靶宿主細胞中。

因此，本發明包括藉由將視需要作為醫藥調配物或劑型中一部分之一或多種本發明反義寡聚體(例如SEQ ID NO: 12-114及其變體)投與有需要之個體來治療流感病毒感染之方法。本文所用「個體」可包括表現症狀或具有表現症狀之風險之任一動物，其可用本發明反義化合物來治療，例如患有流感病毒感染或具有流感病毒感染風險之個體。適宜個體(患者)包括實驗室動物(例如小鼠、大鼠、兔、或荷蘭豬)、農場動物及家畜或寵物(例如貓或狗)。其包括非人靈長類動物及較佳人類患者。

亦涵蓋RNA干擾(RNAi)之替代性方法，例如彼等涉及雙鏈RNA分子或dsRNA者。術語「雙鏈」意指兩條單獨核酸鏈，其包含至少一部分鏈與氫鍵充分互補且形成雙鏈體結構之區域。術語「雙鏈體」或「雙鏈體結構」係指雙鏈分子中兩條單獨鏈實質上互補且由此相互雜交之區域。

「dsRNA」係指具有雙鏈體結構之核糖核酸分子，其包含兩條反向平行之互補核酸鏈(即有義及反義鏈)。並非所

有 dsRNA 中之核苷酸皆必須表現為沃森-克裏克鹼基對；兩條 RNA 鏈可實質上互補。RNA 鏈可具有相同或不同數量之核苷酸。術語「dsRNA」亦包括「siRNA」或短干擾 RNA。

應理解，術語「核糖核苷酸」或「核苷酸」在經修飾 RNA 或核苷酸替代物情形下亦可係指一或多個位置處之經修飾核苷酸或替代物替代部分。因此，dsRNA 係或包括至少部分與靶 RNA 互補之區域。在某些實施例中，dsRNA 與靶 RNA 完全互補。在 dsRNA 與靶之間並不一定存在完全互補性，但必須充分對應以使得 dsRNA 或其裂解產物可藉由（例如）靶 RNA 之 RNAi 裂解來引導序列特異性剪接。與靶鏈之互補性或同源性程度在反義鏈中最為重要。儘管通常期望完全互補性（尤其在反義鏈中），但一些實施例可包括一或多處、較佳 6 處、5 處、4 處、3 處、2 處或更少相對於靶 RNA 之錯配。末端區域中對錯配之耐受性最強，且錯配若存在則較佳位於末端區域中，例如位於 5' 及 / 或 3' 末端之 6 個、5 個、4 個或 3 個核苷酸內。有義鏈僅需要與反義鏈實質性互補以維持分子之總體雙鏈特徵。

本文所用「經修飾 dsRNA」係指包含至少一處改變之 dsRNA 分子，該改變使其對核酸酶（例如蛋白激酶）之抵抗強於識別相同靶 RNA 之相同 dsRNA 分子。經修飾 dsRNA 可包括單鏈核苷酸突出及 / 或至少一個經取代核苷酸。

本文所用「核苷酸突出」係指不成對核苷酸，其在一條 RNA 鏈之 3' 端延伸超過另一互補鏈之 5' 端時自雙鏈體結構

凸出，或反之亦然。「鈍頭」或「鈍端」意指在 dsRNA 之該末端無不成對核苷酸，即無核苷酸突出。「鈍端」dsRNA 係在整個長度中皆為雙鏈之 dsRNA，即在分子任一末端皆無核苷酸突出。

本文所用術語「末端鹼基對」係指雙鏈分子中雙鏈體區域一末端上之最後一個核苷酸鹼基對。舉例而言，若 dsRNA 或其他分子具有鈍端(即無核苷酸突出)，則分子兩端之最後一個核苷酸鹼基對係末端鹼基對。倘若 dsRNA 或其他分子在雙鏈體結構之一端或兩端具有核苷酸突出，則與核苷酸突出直接相鄰之最後一個核苷酸鹼基對係分子該(等)末端之末端鹼基對。

亦包括能表現本發明流感病毒寡聚靶向序列之載體遞送系統，例如表現包含本文所述 SEQ ID NO: 12-114 或其變體中任何一或多者之多核苷酸序列的載體，或表現與 SEQ ID NO: 1-11 之靶序列中任何一或多者互補之多核苷酸序列的載體。其包括表現 siRNA 或其他形成雙鏈體之 RNA 干擾分子之載體。

「載體」或「核酸構造物」意指衍生自(例如)質粒、噬菌體、酵母或病毒之多核苷酸分子、較佳 DNA 分子，可將多核苷酸插入或選殖至其中。載體較佳含有一或多個獨特限制性位點且可能能在所界定宿主細胞(包括包括靶細胞或組織或其前體細胞或組織)中自主複製，或可與所界定宿主之基因組整合從而使得可複製所選殖序列。因此，載體可為自主複製載體，即以染色體外實體形式存在之載

體，其複製獨立於染色體複製，例如線性或閉環質粒、染色體外元件、微型染色體、或人工染色體。載體可含有任何構件以確保自我複製。或者，載體可為引入宿主細胞後整合至基因組中或與其已整合之染色體一起複製之載體。

載體或核酸構造物系統可包含單一載體或質粒、兩個或更多個載體或質粒，其共同含有欲引入宿主細胞基因組中之總DNA；或包含轉座子。載體之選擇通常可取決於載體與欲引入該載體之宿主細胞之相容性。在本發明情形下，載體或核酸構造物較佳係在諸如肌細胞等哺乳動物細胞中具有可操作功能者。載體亦可包括諸如抗生素或耐藥基因等選擇標記物或報道基因(即綠色螢光蛋白、螢光素酶)，其可用於選擇或鑑別適宜轉化體或轉染子。實例性遞送系統可包括病毒載體系統(即病毒介導之轉導)，尤其包括(但不限於)業內已知之逆轉錄病毒(例如慢病毒)載體、腺病毒載體、腺病毒相關病毒載體及皰疹病毒載體。

本文所用術語「可操作連接」意指將寡聚體編碼序列置於啟動子之調節控制下，從而控制寡聚體之轉錄。

野生型基因或基因產物係在群體中最常觀察到者，且因此被任意設計為基因之「正常」或「野生型」形式。

「烷基」係指含有碳及氫之完全飽和單價基團，其可為具支鏈、直鏈或環狀(環烷基)。烷基之實例係甲基、乙基、正丁基、第三丁基、正庚基、異丙基、環丙基、環戊基、乙基環戊基及環己基。通常較佳者係具有1至6個碳原子之烷基，稱作「低碳烷基」，且例示為甲基、乙基、正

丁基、異丁基、第三丁基、異戊基(isoamyl)、正戊基及異戊基(isopentyl)。在一實施例中，低碳烷基係指C₁至C₄烷基。

「烯基」係指含有碳及氫之不飽和單價基團，其可為具支鏈、直鏈或環狀。烯基可為單不飽和或多不飽和。通常較佳者係具有1至6個碳原子之烯基，稱作「低碳烯基」。

「炔基」係指含有2至18個碳之不飽和直鏈或具支鏈烴基，其包含至少一個碳碳三鍵。實例包括(但不限於)乙炔基、丙炔基、異丙炔基、丁炔基、異丁炔基、第三丁炔基、戊炔基及己炔基。術語「低碳炔基」係指含有2至8個碳之本文所定義炔基。

「環烷基」係指單環或多環烷基。實例包括(但不限於)環丁基、環戊基、環己基、環庚基及環辛基。

「芳基」係指經取代或未經取代之單價芳香族基團，其一般具有單環(例如苯基)或兩個稠環(例如萘基)。此術語包括雜芳基，其係環中具有一或多個氮、氧或硫原子之芳香族環基，例如呋喃基、吡咯基、吡啶基及吡嗪基。「經取代」意指芳基中之一或多個環氫經諸如氟、氯或溴等鹵素替代；經含有一或兩個碳原子之低碳烷基替代；經硝基、胺基、甲基胺基、二甲基胺基、甲氧基、鹵代甲氧基、鹵代甲基或鹵代乙基替代。較佳取代基包括鹵素、甲基、乙基及甲氧基。通常較佳者係具有單環之芳基。

「芳烷基」係指進一步經芳基取代之烷基、較佳低碳(C₁-C₄，更佳C₁-C₂)烷基取代基；實例係苄基(-CH₂C₆H₅)及

苯乙基(-CH₂CH₂C₆H₅)。

「硫代烷氧基」係指具有式-SR_c之基團，其中R_c係本文所定義之烷基。術語「低碳硫代烷氧基」係指含有1至8個碳之本文所定義之烷氧基。

「烷氧基」係指式-OR_d基團，其中R_d係本文所定義之烷基。術語「低碳烷氧基」係指含有1至8個碳之本文所定義之烷氧基。烷氧基之實例包括(但不限於)甲氧基及乙氧基。

「烷氧基烷基」係指經烷氧基取代之烷基。

「羰基」係指-C(=O)-基團。

「胍基」係指H₂N(C=NH₂)-NH-基團。

「脒基」係指H₂N(C=NH₂)CH-基團。

「胺基」係指-NH₂基團。

「烷基胺基」係指式-NHR_d或-NR_dR_d基團，其中各R_d獨立地為本文所定義之烷基。術語「低碳烷基胺基」係指含有1至8個碳之本文所定義之烷基胺基。

「雜環」意指5-至7-員單環雜環，或7-至10-員二環雜環，其係飽和、不飽和或芳香族，且其含有1至4個獨立選自氮、氧及硫之雜原子，且其中氮及硫雜原子可視需要發生氧化，且氮雜原子可視需要經四級銨化，且包括任一上述雜環與苯環稠合之二環。雜環可經由任一雜原子或碳原子附接。較佳地，環原子包括3至6個碳原子。該等雜環包括(例如)吡咯啉、六氫吡啶、六氫吡嗪及嗎啉。

雜環包括下文所定義之雜芳基。因此，除下文所列示之

雜芳基外，雜環亦包括嗎啉基、吡咯啉酮基、吡咯啉基、六氫吡啶基、六氫吡嗪基、乙內鹽脲基、戊內鹽胺基、環氧乙烷基、環氧丙烷基、四氫呋喃基、四氫吡喃基、四氫吡啶基、四氫苯硫基、四氫硫吡喃基、四氫嘧啶基、四氫硫吡喃基及諸如此類。

「雜芳基」意指具有至少一個選自氮、氧及硫之雜原子且含有至少1個碳原子之5-至10員芳香族雜環，其包括單環及二環環系統。代表性雜芳基係吡啶基、呋喃基、苯并呋喃基、苯硫基、苯并苯硫基、喹啉基、吡咯基、吲哚基、噁唑基、苯并噁唑基、咪唑基、苯并咪唑基、噻唑基、苯并噻唑基、異噁唑基、吡唑基、異噻唑基、噻嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、噌啉基、酞嗪基及喹啉基。

術語關於烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基或烷芳基之「經取代」係指用含雜原子取代基(例如鹵素、羥基、烷氧基、硫氫基、烷硫基、胺基、烷基胺基、亞胺基、側氧基(酮基)、硝基、氰基、或各種酸或酯(例如羧酸、磺酸或膦酸))替代氫原子。

術語尤其關於烷基、烷氧基、硫代烷氧基或烷基胺基之「經取代」係指用含雜原子取代基(例如鹵素、羥基、烷氧基、硫氫基、烷硫基、胺基、烷基胺基、亞胺基、側氧基(酮基)、硝基、氰基、或各種酸或酯(例如羧酸、磺酸或膦酸))替代碳上之氫原子。其亦可係指用烷基、羰基或其他含碳基團替代雜原子上之氫原子(例如胺氫)。

在某些實施例中，術語「視需要經取代之烷基」、「視需要經取代之烯基」、「視需要經取代之烷氧基」、「視需要經取代之硫代烷氧基」、「視需要經取代之烷基胺基」、「視需要經取代之低碳烷基」、「視需要經取代之低碳烯基」、「視需要經取代之低碳烷氧基」、「視需要經取代之低碳硫代烷氧基」、「視需要經取代之低碳烷基胺基」及「視需要經取代之雜環基」意指在取代時至少一個氫原子經取代基替代。在側氧基取代基(=O)之情形下，兩個氫原子被替代。就此而言，取代基包括：氘、視需要經取代之烷基、視需要經取代之烯基、視需要經取代之炔基、視需要經取代之芳基、視需要經取代之雜環、視需要經取代之環烷基、側氧基、鹵素、-CN、-OR_x、NR_xR_y、NR_xC(=O)R_y、NR_xSO₂R_y、-NR_xC(=O)NR_xR_y、C(=O)R_x、C(=O)OR_x、C(=O)NR_xR_y、-SOMR_x及-SOMNR_xR_y，其中m係0、1或2，R_x及R_y相同或不同且獨立地為氫、視需要經取代之烷基、視需要經取代之烯基、視需要經取代之炔基、視需要經取代之芳基、視需要經取代之雜環或視需要經取代之環烷基，且該等視需要經取代之烷基、視需要經取代之烯基、視需要經取代之炔基、視需要經取代之芳基、視需要經取代之雜環及視需要經取代之環烷基取代基可各自經以下中之一或多者進一步取代：側氧基、鹵素、-CN、-OR_x、NR_xR_y、NR_xC(=O)R_y、NR_xSO₂R_y、-NR_xC(=O)NR_xR_y、C(=O)R_x、C(=O)OR_x、C(=O)NR_xR_y、-SOMR_x及-SOMNR_xR_y。

能抑制流感病毒基因組複製之靶向序列的選擇論述於下文中。

所靶向病毒

本發明各實施例部分係基於以下發現：可藉由使感染流感病毒之動物暴露於反義寡核苷酸化合物中來達成對單鏈分節之負義RNA病毒之有效抑制，該等反義寡核苷酸化合物：(i)靶向1)負義病毒RNA中5'或3'末端之25個鹼基；2)正義mRNA中5'或3'末端之30個末端鹼基；3)病毒mRNA中AUG起始密碼子周圍之45個鹼基及/或；4)進行選擇性剪接之流感mRNA中剪接供體或受體位點周圍之50個鹼基，且(ii)其物理及藥代動力學特徵容許反義化合物與病毒在宿主細胞內之有效相互作用。在某些實施例中，寡聚體可用於治療感染流感病毒之哺乳動物個體。

某些實施例靶向基因組為：(i)單鏈，(ii)分節且(iii)負極性之RNA病毒。所靶向病毒亦合成具有正極性之負義病毒粒子RNA (vRNA)之兩種不同形式的基因組補體：1)用作負義病毒粒子RNA複製模板之cRNA，及2)用於轉譯病毒蛋白之互補正義RNA (mRNA)。圖3係實例性示意圖展示該等不同種類RNA及本發明所述反義PMO之靶位置。

所靶向病毒家族包括正黏病毒科之成員，包括流感病毒A、流感病毒B及流感病毒C屬。正黏病毒科中成員之各種物理、形態及生物學特徵可參見(例如)Textbook of Human Virology, R. Belshe編輯，第2版，Mosby, 1991，國際病毒分類學委員會(International Committee on Taxonomy of

Viruses) 之 大 學 病 毒 數 據 庫 (Universal Virus Database) (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm) 及 人 類 病 毒 學 教 材 (例 如 , 參 見 (Strauss 及 Strauss 2002))。正 黏 病 毒 科 病 毒 之 一 些 關 鍵 生 物 學 特 徵 闡 述 於 下 文 中。

流 感 A、流 感 B 及 流 感 C 病 毒 分 別 係 流 感 病 毒 A、流 感 病 毒 B 及 流 感 病 毒 C 屬 之 唯 一 成 員。該 等 病 毒 係 閉 膜 病 毒 , 其 基 因 組 係 分 節 負 義 (即 負 鏈) RNA 鏈 ((-)RNA)。十 種 流 感 病 毒 基 因 存 於 株 系 A 及 B 之 單 鏈 RNA 之 八 個 區 段 上 , 且 存 於 株 系 C 之 七 個 區 段 上。該 等 區 段 大 小 可 變 (長 890 至 2341 個 核 苷 酸) 且 各 自 係 不 同 mRNA 合 成 之 模 板。流 感 病 毒 病 毒 粒 子 含 有 根 據 該 等 模 板 合 成 mRNA 所 需 之 病 毒 特 異 性 RNA 聚 合 酶 , 且 在 不 存 在 該 等 特 異 性 聚 合 酶 時 , 流 感 病 毒 RNA 之 負 鏈 不 具 有 感 染 性。在 流 感 病 毒 mRNA 聚 合 酶 自 細 胞 mRNA 或 mRNA 前 體 之 5' 端 取 得 12 至 15 個 核 苷 酸 時 , mRNA 開 始 轉 錄 並 使 用 引 入 的 寡 核 苷 酸 作 為 引 物。此 過 程 已 稱 作 「 搶 帽 (cap-snatching) 」 , 此 乃 因 其 將 5' 帽 結 構 置 於 病 毒 mRNA 上。一 般 而 言 , 經 由 此 過 程 產 生 之 mRNA 僅 編 碼 一 種 蛋 白。M 基 因 及 NS 基 因 病 毒 RNA 區 段 亦 編 碼 經 剪 接 mRNA , 從 而 使 該 兩 種 區 段 各 自 產 生 兩 種 不 同 蛋 白 質。

流 感 病 毒 RNA 之 複 製 發 生 在 核 中 且 涉 及 合 成 三 種 不 同 種 類 之 RNA。此 過 程 之 示 意 圖 展 示 於 圖 3 中。在 感 染 純 真 細 胞 (naïve cell) 後 , 負 鏈 病 毒 粒 子 RNA (vRNA) 轉 運 至 核 中 , 其 中 使 用 藉 由 病 毒 編 碼 之 酶 自 加 帽 前 體 mRNA 分 子 裂 解 (即 搶 帽) 之 5' 末 端 的 10-13 個 核 苷 酸 引 物 來 合 成 註 定 用 於

轉譯之RNA (mRNA)。各mRNA之合成繼續進行至接近基因組區段之末端，其中遇到寡(U)片段並添加多聚(A)尾。專用病毒mRNA轉運至細胞質中以供轉譯，且在足夠病毒蛋白轉運回核中後，註定用於新生病毒粒子之vRNA開始合成。合成vRNA之精確反基因組拷貝(稱作cRNA)，其係基因組vRNA之完全補體且用作產生新vRNA之模板。在流感病毒複製期間合成之不同RNA示意性展示於圖3中。

代表流感A基因組區段之實例性病毒核酸靶序列之基因庫(GenBank)參照物列示於下表1中。表1中之核苷酸序列編號得自正鏈RNA之基因庫參照物。應瞭解，該等序列僅闡釋正黏病毒科中之其他序列，其可得自文獻或專利來源之可用基因序列數據庫。以下表示為SEQ ID NO: 1-11之序列亦列示於說明書結尾處之序列表中。

表1列示流感A病毒基因之靶，即由基因組區段7編碼之M1及M2。表1中之靶序列代表：1)負義病毒RNA(SEQ ID NO: 4)中3'末端之25個鹼基；2)正義mRNA(SEQ ID NO: 3)中5'末端之25個末端鹼基；3)所示流感病毒基因(SEQ ID NO: 2)中AUG起始密碼子周圍之45個鹼基。所示序列係5'至3'取向之正鏈(即反基因組或mRNA)序列，但SEQ ID NO: 4除外，其係負鏈(即基因組或病毒粒子RNA)序列。應瞭解，除非另外說明，否則在靶為負鏈vRNA時，所靶向序列係表1中所列示序列之補體，例如SEQ ID NO: 4。

M1及M2蛋白分別係病毒基質蛋白及離子通道活性之組份。該兩種蛋白係自採用相同AUG起始位點之區段7

vcRNA的選擇性剪接形式產生。M2蛋白係當前兩種抗流感治療藥金剛烷胺及金剛乙胺之靶。M1/M2基因中AUG起始密碼子區域(-20至+25，相對於AUG起始密碼子)之實例性靶序列表示為SEQ ID NO: 2，其係列示為SEQ ID NO: 1之60個核苷酸之末端區域之子序列。M1/M2區段之3'末端靶序列(25個核苷酸)表示為SEQ ID NO: 3，其亦係60個核苷酸之末端區域之子序列且可靶向在區段之正鏈(vcRNA)及負鏈(vRNA)二者上。5'末端序列(SEQ ID NO: 3)可成功靶向在下文顯示為SEQ ID NO: 4之負鏈上。SEQ ID NO: 1-4來自2009H1N1病毒(S-OIV)且得自該病毒以登錄號GQ332646存於基因庫數據庫中之實例性分離物。其他參照流感A亞型(即H1N1、H5N1、H3N2及H2N2)之60個核苷酸之5'末端區域在表1中分別列示為SEQ ID NO: 5、6、7、8。相應AUG及末端靶區域可使用上述指導原則得自該等病毒序列。

亦可靶向M1/M2區段之剪接供體及受體區域。剪接供體及剪接受體位點分別位於核苷酸51及740處。涵蓋使用本發明反義化合物靶向任一剪接點。此外，亦可使用經適宜設計之反義化合物(例如SEQ ID NO: 12-16及19-22)阻斷AUG起始位點及剪接供體位點二者。下文將2009H1N1 (S-OIV)亞型之剪接受體靶區域展示為SEQ ID NO: 10。H5N1亞型之相應區域在表1中列示為SEQ ID NO: 9。

此外，涵蓋可使用本發明化合物靶向M1/M2區段之任一轉譯敏感性、剪接敏感性或複製敏感性區域。原型H1N1

亞型 (Puerto Rico/8/34) 之參照 M1/M2(區段 7) 序列在表 1 中展示為 SEQ ID NO: 11 且可以 NC_002016 參見基因庫參照序列數據庫。相應 M1/M2 區段序列可得自公用序列數據庫。涵蓋可使本發明反義化合物靶向此區段之其他區域且預期可確定其他轉移敏感性、剪接敏感性及/或複製敏感性靶區域。

表 1：實例性流感病毒核酸靶序列

名稱	NCBI 編號	Nct區域	序列(5'至3')	SEQ ID NO
M1/M2-trgt 2009H1N1	GQ33 2646	1-60	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUAAAGAUGA GUCUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGU UCU	1
M1/M2- AUG	GQ33 2646	6-50	AAGCAGGUAGAUUUUAAAGAUGAGUCU UCUAACCGAGGUCGAAA	2
M1/M2- vc5'trm	GQ33 2646	1-25	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUAAAG	3
M1/M2- v3'trm	GQ33 2646	1072- 1097	CUUUAAAUAUUCUACCUGCUUUUGCU	4
M1/M2-trgt H1N1con	NC_0 02016	1-60	AGCGAAAGCAGGUAGAUUUGAAAGAUGA GUCUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGU UCU	5
M1/M2-trgt H5N1con	NC_0 07363	1-60	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUGAAAGAUGA GUCUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGU UCU	6
M1/M2-trgt H3N2con	NC_0 07367	1-60	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUGAAAGAUGA GCCUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUAUGU UCU	7
M1/M2-trgt H2N2con	NC_0 07377	1-60	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUGAAAGAUGA GUCUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGU UCU	8

M1/M2-SA H5N1	NC_0 07363	730-780	AAAUUUGCAG/GCCUACCAGAAACGAAUG GGAGUGCAGAU GCAGCGAUUCAA	9
M1/M2-SA 2009H1N1	GQ33 2646	730-780	AAAUUUGCAG/GCCUACCAGAAGCGAAUG GGAGUGCAGAU GCAGCGAUUCAA	10
M1/M2 H1N1 區段7	NC_0 02016	1-1027	AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGA GTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTT CTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAA AGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATG TCTTTGCAGGGAAGAACACCGATCTTGAG GTTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACC AATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTT TAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCC AGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTT TGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGG ATCCAAATAACATGGACAAAGCAGTTAAA CTGTATAGGAAGCTCAAGAGGGAGATAAC ATTCCATGGGGCCAAAGAAATCTCACTCA GTTATTCTGCTGGTGCACCTGCCAGTTGT ATGGGCCTCATATACAACAGGATGGGGGC TGTGACCACTGAAGTGGCATTGTCCTGG TATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGAC TCCCAGCATCGGTCTCATAGGCAAATGGT GACAACAACCAACCCACTAATCAGACATG AGAACAGAATGGTTTTAGCCAGCACTACA GCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGATC GAGTGAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGG TTGCTAGTCAGGCTAGGCAAATGGTGCAA GCGATGAGAACCATTGGGACTCATCCTAG CTCCAGTGCTGGTCTGAAAAATGATCTTC TTGAAAATTTGCAGGCCTATCAGAAACGA ATGGGGGTGCAGATGCAACGGTTCAAGTG ATCCTCTCGCTATTGCCGCAAATATCATT GGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCT TGATCGTCTTTTTTTCAAATGCATTACC	11

			GTCGCTTTAAATACGGACTGAAAGGAGGG CCTTCTACGGAAGGAGTGCCAAAGTCTAT GAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGA GTGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTT GTCAGCATAGAGCTGGAGTAAAAAACTAC CTTGTTTCTACT	
--	--	--	---	--

圖 4A 展示來自以下重要流感 A 亞型之 M1/M2 區段中 5' 末端 60 個核苷酸之保守性：H1N1、H1N1(S-OIV)、H5N1、H3N2、H9N2 及 H7N7。圖 4B 展示一種重要流感血清型 H1N1(2009)(亦稱作豬源流感 A (S-OIV))之靶序列(M1/M2-AUG；SEQ ID NO: 12)對較佳 PMO 中每一鹼基之保守性，此係基於基因組序列之 NCBI 流感數據庫 (Bao Y.、P. Bolotov、D. Dernovoy、B. Kiryutin、L. Zaslavsky、T. Tatusova、J. Ostell 及 D. Lipman. The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information. J. Virol. 2008 年 1 月；82(2):596-601)。大寫字母指示靶鹼基，且鹼基後之下標數字指示該鹼基相對於上述序列數據庫中 H1N1(2009)分離物之保守性百分比。該等數據表明，無鹼基位置相對於 H1N1(2009)之 M1/M2-AUG 靶顯示任何顯著變異。

在某些實施例中，反義靶向序列設計為可與表 1 中所列示一或多個靶序列中之區域雜交。可使所選反義靶向序列更短，例如約 12 個鹼基或更長，例如約 40 個鹼基，且其包括少量錯配，只要序列充分互補以在與靶雜交後實現轉譯、剪接及/或複製抑制且與病毒 RNA 形成 T_m 為 45℃ 或更高之異源雙鏈體即可。

在某些實施例中，靶與反義靶向序列之間之互補性程度足以形成穩定雙鏈體。反義寡聚體與靶RNA序列之互補性區域可短至8-11個鹼基，但較佳為12-15個鹼基或更長，例如12-20個鹼基或12-25個鹼基(包括該等範圍之間之所有整數)。具有約14-15個鹼基之反義寡聚體一般長至足以在病毒基因組中具有獨特互補序列。在某些實施例中，可能要求互補鹼基具有最小長度以達成必需結合 T_m ，如下文所論述。

在某些實施例中，長至40個鹼基之寡聚體可係適宜的，其中至少最小數量之鹼基(例如10-12個鹼基)與靶序列互補。然而，一般而言，細胞中之協助或主動攝取在小於約30之寡聚體長度下優化。對於PMO寡聚體而言，如下文進一步闡述，結合穩定性與攝取之最適平衡一般出現在18-25個鹼基之長度下。本發明包括由約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或40個鹼基組成之反義寡聚體(例如PNA、LNA、2'-Ome)及PMO寡聚體，其中至少約6、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或40個連續或非連續鹼基與SEQ ID NO: 1-11之靶序列或其變體互補。

在某些實施例中，反義寡聚體可能與病毒核酸靶序列100%互補，或其可能包括錯配以例如適應變體，只要寡

聚體與病毒核酸靶序列之間形成之異源雙鏈體足夠穩定，可耐受細胞核酸酶之作用及體內可能發生之其他降解模式。下文論述對核酸酶裂解較不易感之寡聚體骨架。若存在錯配，其對雜合雙鏈體末端區域失穩作用弱於對中間區域。根據熟知雙鏈體穩定性原則，所容許之錯配數量取決於寡聚體長度、G:C鹼基對在雙鏈體中之百分比、及錯配在雙鏈體中之位置。儘管此反義寡聚體不一定與病毒核酸靶序列100%互補，但其可有效與靶序列穩定且特異性地結合，從而調節核酸靶之生物學活性(例如表現病毒蛋白)。

寡聚體與靶序列之間所形成雙鏈體之穩定性隨結合 T_m 及雙鏈體對細胞酶裂解易感性而變化。反義化合物相對於互補序列RNA之 T_m 可由習用方法測量，例如Hames等人，Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, 1985，第107-108頁中所述之方法，或如Miyada C.G.及Wallace R.B., 1987, Oligonucleotide Hybridization Techniques, Methods Enzymol., 第154卷第94-107頁中所述。在某些實施例中，反義寡聚體相對於互補序列RNA之結合 T_m 可能高於體溫且較佳高於約45°C或50°C。在60-80°C範圍內或較高之 T_m 較佳。根據熟知原則，寡聚體化合物相對於基於互補之RNA雜合體之 T_m 可由增加C:G鹼基對在雙鏈體中之比率及/或由增加異源雙鏈體之長度(以鹼基對計)來提高。同時，為優化細胞攝取之目的，限制寡聚體之大小可能有利。為此，顯示高 T_m (45-50°C或更高)之25個鹼基或較短

長度之化合物一般優於需要多於25個鹼基以獲得高T_m值者。

在某些實施例中，諸如PMO寡聚體等寡聚體之反義活性可藉由使用不帶電鍵聯與陽離子型磷二鹼胺鍵聯之混合物來增強，如圖1B中所例示。陽離子型鍵聯在寡聚體中之總數可自1至10(包括該等數字之間之所有整數)變化，且散佈於整個寡聚體中。帶電鍵聯之數量較佳至少為2且不超過總骨架鍵聯之一半，例如2、3、4、5、6、7或8個帶正電鍵聯，且每個帶電鍵聯之間較佳沿骨架相隔至少1、2、3、4或5個不帶電鍵聯。各種寡聚體之反義活性可藉由以下方式在體外量測：使寡聚體靶區域與報道基因(例如螢火蟲螢光素酶)之5'端融合，且隨後在無細胞轉譯分析中量測對融合基因mRNA轉錄物之轉譯的抑制。在無細胞轉譯分析中，含有不帶電鍵聯與陽離子型鍵聯之混合物之寡聚體的抑制特性可增強約5至100倍。本發明較佳反義寡聚體(M1/M2-AUG)呈含有三個散佈在整個寡聚體中之陽離子型鍵聯(如圖1B及圖2中所示)之形式，其在下表2中展示為SEQ ID NO: 13。一系列靶向M1/M2 AUG且含有三個散佈陽離子型鍵聯之實例性反義寡聚體展示於SEQ ID NO: 34-47中。

下表2以5'至3'取向展示與流感A病毒互補之實例性靶向序列。所列示序列提供靶向序列集合，可根據上述一般分類規律自其選擇靶向序列。儘管所列示靶向序列可用於任一反義類似物寡核苷酸化學物質(例如PNA、LNA或2'-

Ome)，但表2中之序列較佳用作PMO反義寡聚體。SEQ ID NO: 12-22、25-29及34-47係病毒正鏈(mRNA或vcRNA)之反義序列，而SEQ ID NO: 23及24係負鏈(vRNA)之反義序列。因此，例如，在選擇時，可選擇針對M1/M2編碼區段(流感A之區段7)SEQ ID NO: 4之負鏈3'末端之靶，或有效阻斷負鏈3'末端之功能之序列的一部分。SEQ ID NO: 12-29及34-47靶向流感A亞型H1N1 (S-OIV)之M1/M2區段，而SEQ ID NO: 30-33靶向所示PB1或NP區段。

表2.實例性反義靶向序列

PMO名稱	靶Nct.	反義寡聚體(5'至3')	SEQ. ID. NO.
M1/M2-AUG	22-41	CGGTTAGAAGACTCATCTTT	12
M1/M2-AUG+	22-41	CGGT+TAGAAGAC+TCATC+TTT	13
M1/M2-AUG.20.17	17-36	AGAAGACTCATCTTTCAATA	14
M1/M2-AUG.20.19	19-38	TTAGAAGACTCATCTTTCAA	15
M1/M2-AUG.20.24	24-43	CTCGGTTAGAAGACTCATCT	16
M1/M2-vcTerm.25.3	3-27	ATCTTTCAATATCTACCTGCTTTTG	17
M1/M2-vcTerm.25.6	6-30	CTCATCTTTCAATATCTACCTGCTT	18
M1/M2-AUG.25.19	19-43	CTCGGTTAGAAGACTCATCTTTCAA	19
M1/M2-AUG.25.21	21-45	ACCTCGGTTAGAAGACTCATCTTTC	20
M1/M2-AUG.25.24	24-48	TCGACCTCGGTTAGAAGACTCATCT	21
M1/M2-AUG.25.26	26-50	TTTCGACCTCGGTTAGAAGACTCAT	22
M1/M2-3'vTerm.25.1003	1003-1027	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAA	23
M1/M2-3'vTerm.25.997	997-1021	AGCAGGTAGATATTGAAAAATGAGT	24
M1/M2-SA.24.738	738-761	CTCCCATTCGCTTCTGGTAGGCCT	25
M1/M2-SA.24.740	740-762	CACTCCCATTCGCTTCTGGTAGGC	26
M1/M2-SA.24.742	742-764	TGCACTCCCATTCGCTTCTGGTAG	27
M1/M2-SA.24.744	744-766	TCTGCACTCCCATTCGCTTCTGGT	28

M1/M2-SA.24.746	746-768	CATCTGCACTCCCATTGCTTCTG	29
NP-v3'		AGCAAAAGCAGIGTAGATAATC	30
NP-v3'+		AGCAAAAGCAGIG+TAGA+TAA+TC	31
PB1-AUG+15		CGGATTGACATCCATTCAAATG	32
PB1-AUG+15+		CGGAT+TGACA+TCCAT+TCAAATG	33
M1/M2-AUG.20.6+	6-25	CTT+TCAA+TATCTACC+TGCTT	34
M1/M2-AUG.20.11+	11-30	C+TCA+TCTTTCAA+TATCTACC	35
M1/M2-AUG.20.12+	12-31	AC+TCA+TCTTTCAA+TATCTAC	36
M1/M2-AUG.20.13+	13-32	GAC+TCA+TCTTTCAA+TATCTA	37
M1/M2-AUG.20.14+	14-33	AGAC+TCA+TCTTTCAA+TATCT	38
M1/M2-AUG.20.15+	15-34	AAGAC+TCA+TCTTTCAA+TATC	39
M1/M2-AUG.20.16+	16-35	GAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TAT	40
M1/M2-AUG.20.17+	17-36	AGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TA	41
M1/M2-AUG.20.18+	18-37	TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+T	42
M1/M2-AUG.20.19+	19-38	T+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA	43
M1/M2-AUG.20.20+	20-39	GT+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCA	44
M1/M2-AUG.20.23+	23-42	TCGGT+TAGAAGAC+TCA+TCTT	45
M1/M2-AUG.20.25+	25-44	CCTCGGT+TAGAAGAC+TCA+TC	46
M1/M2-AUG.20.27+	27-46	GACC+TCGGT+TAGAAGAC+TCA	47

反義寡核苷酸化合物

如上文所詳述，反義寡核苷酸(術語「反義」表示化合物靶向病毒之正義鏈RNA或負義鏈或負鏈)通常包含靶向包括以下中之一或多者之區域的鹼基序列：1)負義病毒RNA中5'或3'末端之25個鹼基；2)正義vRNA中5'或3'末端之30個末端鹼基；3)病毒mRNA中AUG起始密碼子周圍之45個鹼基及/或；4)進行選擇性剪接之流感mRNA中剪接供體或受體位點周圍之50個鹼基。另外，在投與(例如)受感染哺乳動物個體中之宿主細胞時，寡聚體能藉由(例如)降低靶蛋白(例如M1或M2或二者)表現、藉由降低病毒複製或二者來有效靶向感染性病毒。若寡聚體化合物(a)能由哺

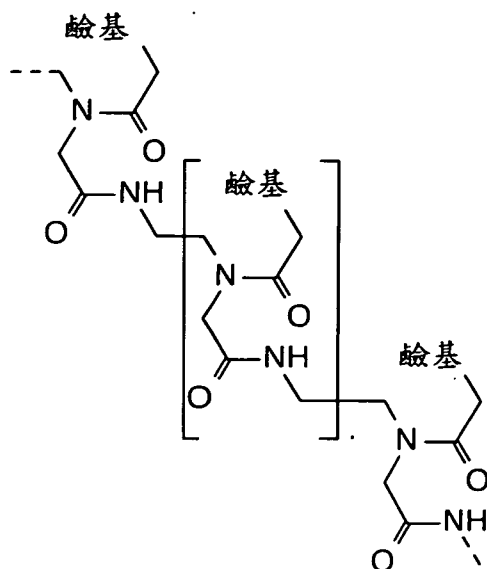
乳動物細胞主動吸收，且(b)在吸收後與靶RNA形成 T_m 大於約45°C之雙鏈體，則通常可滿足此要求。

在某些實施例中，寡聚體骨架可實質上不帶電，且較佳可識別為穿過細胞膜主動或協助轉運之受質。寡聚體與靶RNA形成穩定雙鏈體之能力亦可涉及寡聚體骨架之其他特徵，包括反義寡聚體與靶互補之長度及程度、G:C與A:T鹼基匹配之比率及任一錯配鹼基之位置。反義寡聚體抵抗細胞核酸酶之能力可促進存活及最終將藥劑遞送至細胞質中。本發明使用PMO骨架化學物質之實例性反義寡聚體靶向序列列示於上文表2中。使用替代化學物質、即PNA及LNA化學物質之靶向序列分別列示於下表3及4中。一般而言，PNA及LNA化學物質使用較短靶向寡聚體，此乃因其靶結合強度與PMO及2'-O-Me寡聚體相比相對較高。

肽核酸(PNA)係DNA類似物，其中骨架在結構上與去氧核糖骨架同形，其係由附接有嘧啶或嘌呤鹼基之N-(2-氨基乙基)甘胺酸單元組成。含有天然嘧啶及嘌呤鹼基之PNA按照沃森-克裏克鹼基配對規律與互補寡核苷酸雜交，且在鹼基對識別方面模擬DNA(Egholm、Buchardt等人，1993)。PNA骨架係由肽鍵而非磷酸二酯鍵形成，從而使其非常適於反義應用(參見下文結構)。該骨架不帶電，從而使得PNA/DNA或PNA/RNA雙鏈體表現高於正常之熱穩定性。核酸酶或蛋白酶不識別PNA。

PNA可使用任何業內已知技術以合成方式來產生。PNA係DNA類似物，其中聚醯胺骨架替代DNA之傳統磷酸核糖

環，如下文所示。



儘管相對於天然結構發生顯著結構變化，但PNA能以螺旋形式序列特異性結合DNA或RNA。PNA之特徵包括與互補DNA或RNA之高結合親和性、因單鹼基錯配引發之失穩效應、對核酸酶及蛋白酶之抵抗、與DNA或RNA之雜交獨立於鹽濃度及與同型嘌呤DNA形成三鏈體。PANAGENE™已研發出其專利性Bts PNA單體(Bts；苯并噻唑-2-磺醯基)及專利性寡聚方法。使用Bts PNA單體之PNA寡聚係由去保護、偶合及加帽之重複性循環組成。此技術之實例性專利包括美國專利第6,969,766號、第7,211,668號、第7,022,851號、第7,125,994號、第7,145,006號及第7,179,896號。教示PNA化合物之製備的代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第5,539,082號、第5,714,331號及第5,719,262號，其各自以引用方式併入本文中。關於PNA化合物之其他教示可參見Nielsen等人，Science, 254:1497-

1500, 1991。

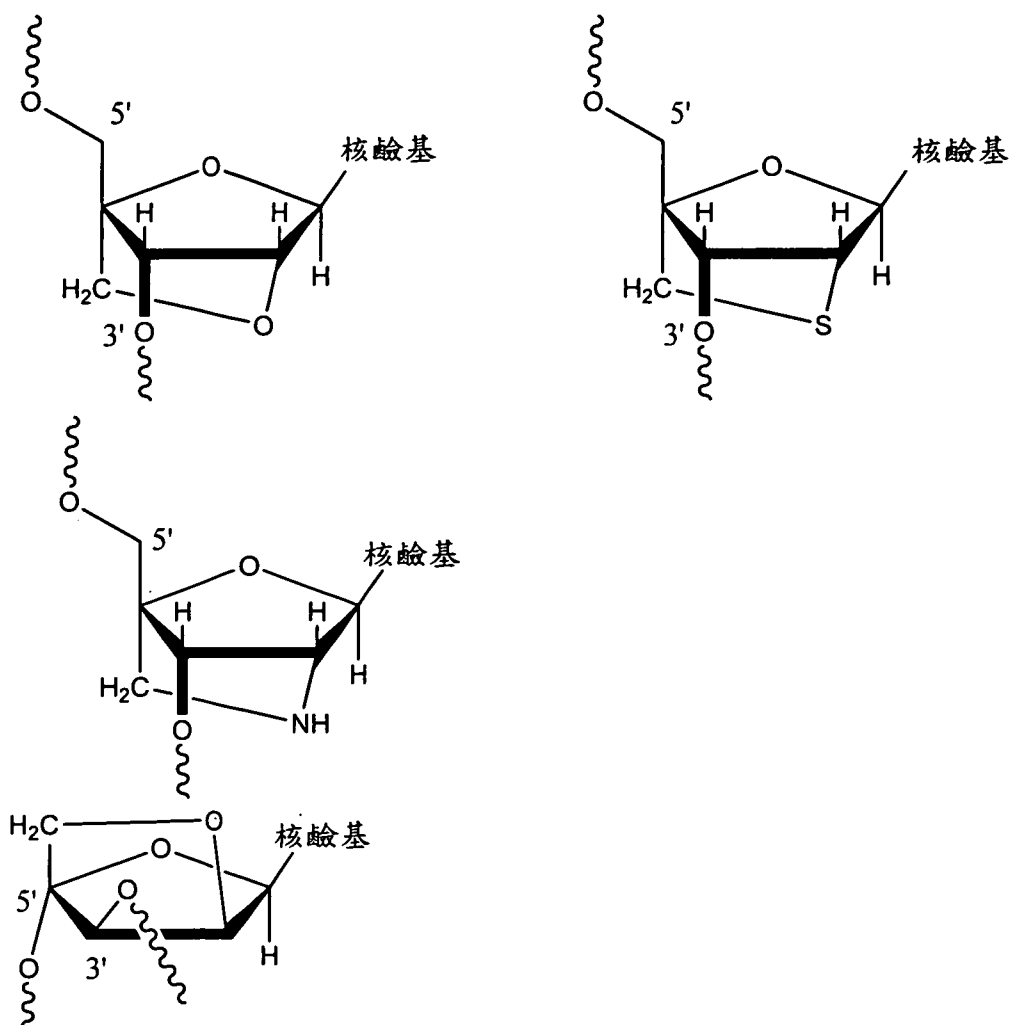
實踐本發明之實例性PNA化合物列示於下表3中。該等寡核苷酸可基本上根據本文所引用參考文獻中所述之程序來製備。

表3.實例性PNA反義靶向序列

PNA名稱	靶Nct.	反義寡聚體(5'至3')	SEQ. ID. NO.
PNA-M1-AUG.20.22	22-41	CGGTTAGAAGACTCATCTTT	48
PNA-M1-AUG.18.24	24-41	CGGTTAGAAGACTCATCT	49
PNA-M1-AUG.16.26	16-41	CGGTTAGAAGACTCAT	50
PNA-M1-AUG.20.17	17-36	AGAAGACTCATCTTTCAATA	51
PNA-M1-AUG.20.19	19-38	TTAGAAGACTCATCTTTCAA	52
PNA-M1-AUG.20.24	24-43	CTCGGTTAGAAGACTCATCT	53
PNA-M1-vcTerm.20.3	3-22	TCAATATCTACCTGCTTTTG	54
PNA-M1-vcTerm.20.6	6-25	CTTTCAATATCTACCTGCTT	55
PNA-M1-3'vTrm.20.1008	1003-1027	AGCAAAAGCAGGTAGATATT	56
PNA-M1-3'vTrm.20.1002	1002-1021	AGCAGGTAGATATTGAAAAA	57
M1-SA.20.738	738-757	CATTCGCTTCTGGTAGGCCT	58
M1/M2-SA.24.740	740-759	CCCATTTCGCTTCTGGTAGGC	59
M1/M2-SA.24.742	742-761	CTCCCATTCGCTTCTGGTAG	60
M1/M2-SA.24.744	744-763	CACTCCCATTCGCTTCTGGT	61
M1/M2-SA.24.746	746-765	TGCACTCCCATTCGCTTCTG	62

本發明寡核苷酸化合物亦可含有「鎖核酸」亞單元(LNA)。LNA之結構可參見(例如)Wengel, 等人, Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54:3607及Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika, 等人, Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; (1998) 39:5401及

Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230。非限制性
實例性LNA結構展示如下：



本發明化合物可納入一或多種LNA；在一些情形下，化合物可完全由LNA組成。個別LNA核苷亞單元之合成方法及將其納入寡核苷酸中之方法為業內已知：美國專利第7,572,582號、第7,569,575號、第7,084,125號、第7,060,809號、第7,053,207號、第7,034,133號、第6,794,499號及第6,670,461號。典型亞單元間連接體包括磷酸二酯部分及硫代磷酸酯部分；或者，可採用不含磷連接體。較佳實施例係含LNA化合物，其中各LNA亞單元係由

DNA亞單元來分隔。其他較佳化合物係由交替之LNA及DNA亞單元組成，其中亞單元間連接體係硫代磷酸酯。

以下化合物基本上係根據上文所引用參考文獻中所述之程序來製備。含有LNA亞單元之實例性化合物(LNA係大寫，DNA係小寫，且序列係自5'向3'讀取)展示於下表4中。

表4.實例性LNA反義靶向序列

LNA名稱	序列(5'-3')	SEQ ID NO
LNA-AUG1	CgGtTaGaAgAcTcAtCtTt	63
LNA-AUG2	GaAgAcTcAt	64
LNA-AUG3	GAaGaCtCAT	65
LNA-AUG4	GAAGACTCAT	66
LNA-AUG5	AGAAGACTCA	67
LNA-AUG6	TAGAAGACTC	68
LNA-AUG7	TTAGAAGACT	69
LNA-AUG8	AAGACTCATC	70
LNA-AUG9	AGACTCATCT	71
LNA-AUG10	gAcTcAtCtT	72
LNA-AUG11	ACTCATCTTT	73
LNA-AUG12	CgGtTaGaAgAcTcAt	74
LNA-AUG13	GtTaGaAgAcTcAt	75
LNA-AUG14	GTTAGAAGACT	76
LNA-AUG15	CATCTTTAAAT	77
LNA-AUG16	CaTcTtTaAaTaTcTaC	78
LNA-AUG17	CGGTTAGAAGACTCAT	79
LNA-AUG18	GGTTAGAAGACTCATC	80
LNA-AUG19	GTTAGAAGACTCATCT	81
LNA-AUG20	TTAGAAGACTCATCTT	82
LNA-AUG21	TAGAAGACTCATCTTT	83
LNA-AUG22	AGAAGACTCATCTTTA	84
LNA-AUG23	GAAGACTCATCTTTAA	85

LNA-AUG24	AAGACTCATCTTTAAA	86
LNA-AUG25	AGACTCATCTTTAAAT	87
LNA-AUG26	GACTCATCTTTAAATA	88
LNA-AUG27	ACTCATCTTTAAATAT	89
LNA-AUG28	CTCATCTTTAAATATC	90
LNA-AUG29	TCATCTTTAAATATCT	91
LNA-AUG30	CATCTTTAAATATCTA	92
LNA-AUG31	ATCTTTAAATATCTAC	93
LNA-AUG32	TCTTTAAATATCTACC	94
LNA-AUG33	CTTTAAATATCTACCA	95
LNA-AUG34	TTTAAATATCTACCAG	96
LNA-AUG35	CgGgTaGaAgAcTcAt	97
LNA-AUG36	GgTtAgAaGaCtCaTc	98
LNA-AUG37	GtTaGaAgAcTcAtCt	99
LNA-AUG38	TtAgAaGaCtCaTcTt	100
LNA-AUG39	TaGaAgAcTcAtCtTt	101
LNA-AUG40	AgAaGaCtCaTcTtTa	102
LNA-AUG41	GaAgAcTcAtCtTtAa	103
LNA-AUG42	AaGaCtCaTcTtTaAa	104
LNA-AUG43	AgAcTcAtCtTtAaAt	105
LNA-AUG44	GaCtCaTcTtTaAaTa	106
LNA-AUG45	AcTcAtCtTtAaAtAt	107
LNA-AUG46	CtCaTcTaTaAaTaTc	108
LNA-AUG47	TcAtCtTtAaAtAtCt	109
LNA-AUG48	CaTcTtTaAaTaTcTa	110
LNA-AUG49	AtCtTtAaAtAtCtAc	111
LNA-AUG50	TcTtTaAaTaTcTaCc	112
LNA-AUG51	CtTtAaAtAtCtAcCa	113
LNA-AUG52	TtTaAaTaTcTaCcAg	114

較佳寡聚體結構採用基於嗎啉基之亞單元，其具有藉由不帶電鍵聯連接之鹼基配對部分，如上文所述。尤佳者係實質上不帶電之磷二鹼胺連接之嗎啉基寡聚體。包括反義寡聚體在內之嗎啉基寡核苷酸詳述於(例如)以下專利中：

共同擁有之美國專利第 5,698,685 號、第 5,217,866 號、第 5,142,047 號、第 5,034,506 號、第 5,166,315 號、第 5,185,444 號、第 5,521,063 號及第 5,506,337 號；及 PCT 申請案第 US 2008/012804 號，所有該等專利皆係明確地以引用方式併入。

基於嗎啉基之亞單元之某些特性包括：以寡聚形式藉由穩定不帶電骨架鍵聯連接之能力；支持核苷酸鹼基(例如腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤或尿嘧啶)從而使得所形成聚合物可與鹼基互補之靶核酸(包括靶 RNA)、甚至與短至 10-14 個鹼基之寡聚體以高 T_m 雜交之能力；寡聚體可主動轉運至哺乳動物細胞中之能力；及寡聚體:RNA 異源雙鏈體抵抗 RNA 酶降解之能力。

具有含磷骨架鍵聯之嗎啉基寡核苷酸之實例展示於圖 1A-1C 中。尤佳者係如圖 1B 中所示之磷二酯胺連接之嗎啉基寡核苷酸，其根據本發明一態樣經修飾而含有較佳佔其骨架鍵聯 10%-50% 之帶正電基團。具有不帶電骨架鍵聯之嗎啉基寡核苷酸(包括反義寡核苷酸)詳述於(例如)以下文獻中：(Summerton 及 Weller, 1997)及共同擁有之美國專利第 5,698,685 號、第 5,217,866 號、第 5,142,047 號、第 5,034,506 號、第 5,166,315 號、第 5,185,444 號、第 5,521,063 號及第 5,506,337 號；及 PCT 申請案第 US 2008/012804 號，所有該等專利皆係以引用方式併入。具有帶電骨架鍵聯及/或經修飾末端基團之實例性嗎啉基寡核苷酸(包括反義寡核苷酸)詳述於以下文獻中：PCT 申請案第 US

2007/011435號；共同待決之美國臨時專利申請案第61/349,783號；及共同待決之美國臨時專利申請案第61/361,878號，其各自係全文以引用方式併入。

基於嗎啉基之亞單元之特性包括：1)以寡聚形式藉由穩定不帶電或帶正電骨架鍵聯連接之能力；2)支持核苷酸鹼基(例如腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、胸苷、尿嘧啶及次黃嘌呤)從而使得所形成聚合物可與鹼基互補之靶核酸(包括靶RNA)雜交之能力，在相對較短之寡核苷酸(例如10-15個鹼基)中T_m值高於約45°C；3)寡核苷酸主動或被動轉運至哺乳動物細胞中之能力；及4)反義寡核苷酸:RNA異源雙鏈體分別抵抗RNA酶及RNA酶H降解之能力。

所主張標的物之反義寡核苷酸之實例性骨架結構包括圖1D-1G中所示之嗎啉基亞單元類型，其各自藉由不帶電或帶正電之含磷亞單元鍵聯來連接。圖1D展示形成五原子重複單元骨架之含磷鍵聯，其中嗎啉基環係由1原子磷醯胺鍵聯來連接。圖1E展示產生6原子重複單元骨架之鍵聯。在此結構中，將5'嗎啉基碳連接至磷基團之原子Y可為硫、氮、碳或較佳氧。作為磷側基之X部分可為氟、烷基或經取代烷基、烷氧基或經取代烷氧基、硫代烷氧基或經取代硫代烷氧基、或未經取代、單取代或二取代氮，包括環狀結構，例如嗎啉或六氫吡啶。烷基、烷氧基及硫代烷氧基較佳包括1-6個碳原子。Z部分係硫或氧，且較佳係氧。

圖1F及1G中所示之鍵聯經設計為單元長度為7原子之骨

架。在結構1F中，X部分係如結構1E所示，且Y部分可為亞甲基、硫、或較佳氧。在結構1G中，X及Y部分係如結構1E中所示。尤佳嗎啉基寡核苷酸包括彼等由圖1E中所示形式之嗎啉基亞單元結構組成者，其中 $X=NH_2$ 、 $N(CH_3)_2$ 或1-六氫吡嗪或其他帶電基團， $Y=O$ ，且 $Z=O$ 。

如上所述，實質上不帶電之寡核苷酸可根據本發明一態樣經修飾而包括帶電鍵聯，例如每2-5個不帶電鍵聯最多包括約1個帶電鍵聯，例如每10個不帶電鍵聯包括約4-5個帶電鍵聯。在某些實施例中，在約25%骨架鍵聯係陽離子型時可觀察到反義活性之最佳改良。在某些實施例中，在含有少量(例如10-20%)陽離子型鍵聯時，或陽離子型鍵聯之量在50-80%範圍內、例如為約60%時可觀察到增強。

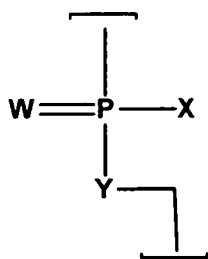
在本發明支持下實施之其他實驗表明， η 在一些情形下，藉由增加陽離子骨架電荷所觀察到之增強可藉由使大部分電荷分佈在反義寡核苷酸之「中心區」骨架鍵聯附近(例如在具有8個陽離子型骨架鍵聯之20聚體寡核苷酸中，該等帶電鍵聯中至少70%位於10個最中心鍵聯處)來進一步增強。

在某些實施例中，反義化合物可藉由逐步式固相合成來製備，其採用上文所引用參考文獻中詳述之方法，且參照下文具有不帶電鍵聯與陽離子型骨架鍵聯之混合物之寡核苷酸的合成。在一些情形下，期望向反義化合物中添加其他化學部分以(例如)增強藥代動力學或有助於該化合物之捕獲或檢測。通常此一部分可根據標準合成方法共價附接

至寡聚體末端。舉例而言，添加聚乙二醇部分或其他親水性聚合物(例如具有10-100個單體亞單元之聚合物)可用於提高溶解度。一或多種帶電基團(例如陰離子型帶電基團，例如有機酸)可增強細胞攝取。

出於檢測目的，可附接報道基因部分，例如螢光素或放射性標記基團。或者，附接至寡聚體之報道基因標記可為能結合經標記抗體或抗生蛋白鏈菌素之配體，例如抗原或生物素。在選擇反義化合物之附接或修飾部分時，一般當然期望選擇具有生物相容性且個體可能耐受而無不期望副作用之群之化學化合物。

如上所述，某些反義化合物可經構造而含有所選數量之陽離子型鍵聯，其中散佈有上述類型之不帶電鍵聯。不帶電及陽離子型亞單元間鍵聯二者較佳係具有以下結構之含磷鍵聯：



其中

W係S或O，且較佳係O，

X=NR¹R²或OR⁶，

Y=O或NR⁷，

且寡聚體中之該鍵聯各自選自：

(a) 不帶電鍵聯(a)，其中R¹、R²、R⁶及R⁷各自獨立地選

自氫及低碳烷基；

(b1)陽離子型鍵聯(b1)，其中 $X=NR^1R^2$ 且 $Y=O$ ，且 NR^1R^2 代表視需要經取代之哌嗪基，從而使得 $R^1R^2=-CHRCHR(N(R^3)(R^4)CHRCHR-$ ，其中

各R獨立地為H或 CH_3 ，

R^4 係H、 CH_3 、或電子對，且

R^3 選自H、低碳烷基(例如 CH_3)、 $C(=NH)NH_2$ 、 $Z-L-NHC(=NH)NH_2$ 及 $[C(O)CHR'NH]_mH$ ，其中：Z係C(O)或直接鍵；L係最多長18個原子、較佳最多長12個原子、且更佳最多長8個原子之可選連接體，其具有選自烷基、烷氧基及烷基胺基之鍵； R' 係天然胺基酸或其一碳或二碳同系物之側鏈；且m係1至6，較佳係1至4；

(b2)陽離子型鍵聯(b2)，其中 $X=NR^1R^2$ 且 $Y=O$ ， $R^1=H$ 或 CH_3 ，且 $R^2=LN(R^3R^4R^5)$ ，其中L、 R^3 及 R^4 係如上文所定義，且 R^5 係H、低碳烷基或低碳(烷氧基)烷基；及

(b3)陽離子型鍵聯(b3)，其中 $Y=NR^7$ 且 $X=OR^6$ ，且 $R^7=LN(R^3R^4R^5)$ ，其中L、 R^3 、 R^4 及 R^5 係如上文所定義，且 R^6 係H或低碳烷基；

且至少一個該鍵聯選自陽離子型鍵聯(b1)、(b2)及(b3)。

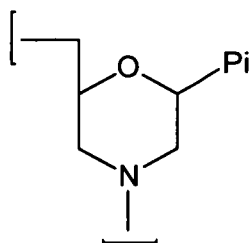
在某些實施例中，寡聚體可包括至少兩個連續的(a)型鍵聯(即不帶電鍵聯)。在其他實施例中，寡聚體中至少5%之鍵聯係陽離子型鍵聯(即(b1)型、(b2)型或(b3)型)；例如10%至60%、且較佳20-50%鍵聯可為陽離子型鍵聯。

在一實施例中，至少一個鍵聯係(b1)型，其中各R較佳

係H， R^4 係H、 CH_3 或電子對，且 R^3 選自H、低碳烷基(例如 CH_3)、 $C(=NH)NH_2$ 及 $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$ 。 R^3 之後兩個實施例分別提供直接附接至六氫吡嗪環或作為連接體基團L之側基之胍基部分。為便於合成， R^3 中之變量Z較佳為所示 $C(O)$ (羰基)。

如上所述，連接體基團L在其骨架中含有選自烷基(例如 $-CH_2-CH_2-$)、烷氧基($-C-O-$)及烷基胺基(例如 $-CH_2-NH-$)之鍵，前提係L中之末端原子(例如彼等與羰基或氮相鄰者)係碳原子。儘管可使用具支鏈鍵聯(例如 $-CH_2-CHCH_3-$)，但連接體較佳無支鏈。在一實施例中，連接體係烴連接體。此一連接體可具有結構 $-(CH_2)_n-$ ，其中n係1-12，較佳係2-8，且更佳係2-6。

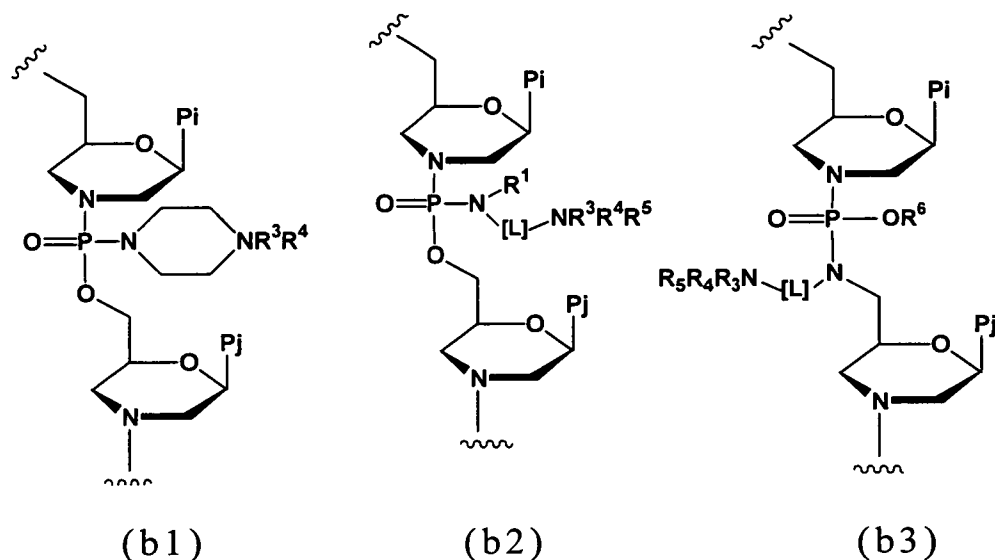
嗎啉基亞單元具有以下結構：



(i)

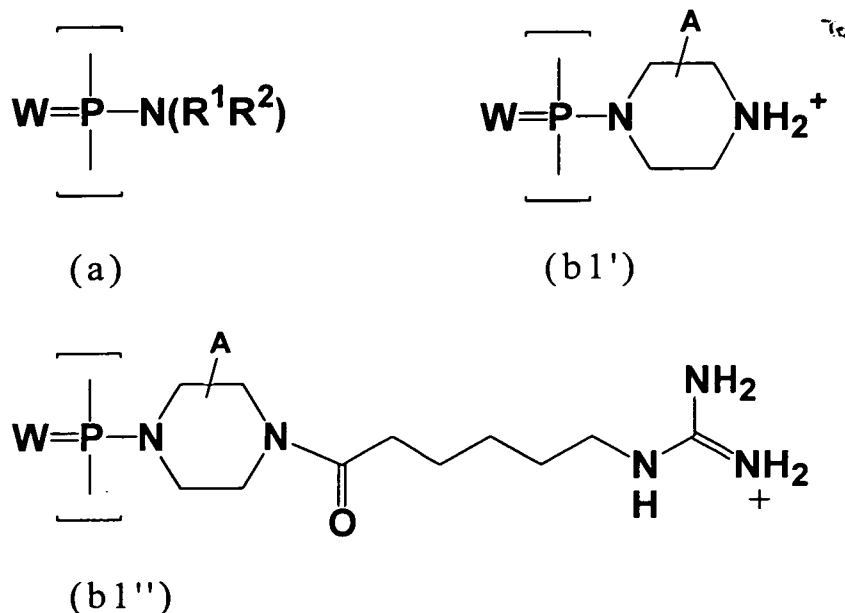
其中Pi係鹼基配對部分，且上文繪示之鍵聯將(i)中之氮原子連接至相鄰亞單元中之5'碳。鹼基配對部分Pi可相同或不同，且一般設計為提供結合靶核酸之序列。

上文(b1)型、(b2)型及(b3)型鍵聯之實施例連接嗎啉基亞單元之應用可以圖示展示如下：



較佳地，寡聚體中之所有陽離子型鍵聯皆具有相同類型；即皆為(b1)型，皆為(b2)型，或皆為(b3)型。

在其他實施例中，陽離子型鍵聯選自下文所示之(b1')及(b1'')鍵聯，其中(b1'')在本文中稱作「Pip」鍵聯且(b1'')在本文中稱作「GuX」鍵聯：



在上述結構中，W係S或O，且較佳係O； R^1 及 R^2 各自獨立地選自氫及低碳烷基，且較佳係甲基；且A代表(b1')及(b1'')中一或多個碳原子上之氫或非阻礙性取代基。較佳地，六氫吡嗪環中之環碳未經取代；然而，其可包括非阻

礙性取代基，例如甲基或氯。較佳地，至多一或兩個碳原子經如此取代。在其他實施例中，至少10%之鍵聯係(b1')型或(b1'')型；例如，10%-60%且較佳20%至50%之鍵聯可為(b1')型或(b1'')型。

在某些實施例中，寡聚體不含上述(b1')型鍵聯。或者，寡聚體不含(b1)型鍵聯(其中各R係H， R^3 係H或 CH_3 ，且 R^4 係H、 CH_3 或電子對)。

嗎啉基亞單元亦可藉由非磷基亞單元間鍵聯來連接，如下文進一步闡述，其中至少一個鍵聯經上述陽離子型側基修飾。

可使用其他寡核苷酸類似物鍵聯，其在未經修飾狀態下不帶電，但亦可具有胺取代基側基。舉例而言，嗎啉基環上之5'氮原子可用於磺醯胺鍵聯或脲鍵聯中(其中分別用碳或硫替代磷)且可以與上述結構(b3)中之5'氮原子類似之方式來修飾。

提供具有任一陽離子型鍵聯數量之寡聚體，包括全陽離子型連接寡聚體。然而，較佳地，寡聚體係部分帶電，例如10%-80%鍵聯帶電。在較佳實施例中，約10%至60%、且較佳20%至50%鍵聯係陽離子型。

在一實施例中，陽離子型鍵聯沿骨架散佈。部分帶電寡聚體較佳含有至少兩個連續的不帶電鍵聯；亦即該寡聚體較佳不具有沿其整個長度之嚴格交替模式。

亦考慮寡聚體具有陽離子型鍵聯區塊及不帶電鍵聯區塊；例如，不帶電鍵聯中央區塊兩側可具有陽離子型鍵聯

區塊，或反之亦然。在一實施例中，寡聚體之5'、3'及中心區域具有大致相等之長度，且陽離子型鍵聯在中心區域中之百分比大於約50%，較佳大於約70%。

用於反義應用之寡聚體之長度一般介於約10至約40個亞單元範圍內，更佳為約10至30個亞單元，且通常具有15-25個鹼基。舉例而言，本發明具有19-20個亞單元(對於反義化合物之有用長度)之寡聚體可理想地具有2至10個(例如4至8個)陽離子型鍵聯，且其餘為不帶電鍵聯。具有14-15個亞單元之寡聚體可理想地具有2至7個(例如3、4或5個)陽離子型鍵聯，且其餘為不帶電鍵聯。

每個嗎啉基環結構支持鹼基配對部分以形成鹼基配對部分之序列，其通常經設計可與細胞中或所治療個體中之所選反義靶雜交。鹼基配對部分可為天然DNA或RNA中發現之嘌呤或嘧啶(例如A、G、C、T或U)或類似物，例如次黃嘌呤(核苷肌苷之鹼基組份)或5-甲基胞嘧啶。

肽轉運蛋白

在某些實施例中，本發明反義化合物可包括與富精胺酸肽轉運部分偶聯之寡核苷酸部分，該轉運部分可有效促進將化合物轉運至細胞中。可使轉運部分附接至寡聚體末端，如例如圖1C中所示。肽轉運部分較佳包含6至16個選自X'亞單元、Y'亞單元及Z'亞單元之亞單元，其中

(a)每個X'亞單元獨立地代表離胺酸、精胺酸或精胺酸類似物，該類似物係陽離子型 α -胺基酸，其包含結構 $R^1N=C(NH_2)R^2$ 之側鏈，其中 R^1 係H或R； R^2 係R、 NH_2 、

NHR 或 NR_2 ，其中 R 係低碳烷基或低碳烯基且可另外包括氧或氮； R^1 及 R^2 可一起形成環；且側鏈經由 R^1 或 R^2 連接至該胺基酸；

(b) 每個 Y' 亞單元獨立地代表中性胺基酸 $-\text{C}(\text{O})-(\text{CHR})_n-\text{NH}-$ ，其中 n 係 2 至 7 且各 R 獨立地為 H 或甲基；且

(c) 各 Z' 亞單元獨立地代表具有中性芳烷基側鏈之 α -胺基酸；

其中該肽包含以下中之一者代表之序列： $(\text{X}'\text{Y}'\text{X}')_p$ 、 $(\text{X}'\text{Y}')_m$ 、 $(\text{X}')_m$ 及 $(\text{X}'\text{Z}'\text{Z}')_p$ ，其中 p 係 2 至 5 且 m 係 2 至 9。某些實施例包括獨立選自以下之不同組合： $(\text{X}'\text{Y}'\text{X}')_p$ 、 $(\text{X}'\text{Y}')_m$ 、 $(\text{X}')_m$ 及 / 或 $(\text{X}'\text{Z}'\text{Z}')_p$ ，包括(例如)具有序列 $(\text{X}'\text{Y}'\text{X}')(\text{X}'\text{Z}'\text{Z}')(\text{X}'\text{Y}'\text{X}')(\text{X}'\text{Z}'\text{Z}')$ (SEQ ID NO: 129) 之肽。

在所選實施例中，對於每個 X' ，側鏈部分係胍基，如在胺基酸亞單元精胺酸(Arg)中。在其他實施例中，各 Y' 係 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CHR}-\text{NH}-$ ，其中 n 係 2 至 7 且 R 係 H。舉例而言，在 n 係 5 且 R 係 H 時， Y' 係 6-胺基己酸亞單元，在本文中縮寫為 Ahx；在 n 係 2 且 R 係 H 時， Y' 係 β -丙胺酸亞單元，在本文中縮寫為 B。某些實施例係關於具有不同中性胺基酸之組合之載體肽，包括(例如)包含序列 $-\text{RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB}-$ (SEQ ID NO: 124) 之肽，其含有 β -丙胺酸及 6-胺基己酸二者。

較佳此類肽包括彼等包含與單一 Y' 亞單元交替存在之精胺酸二聚體者，其中 Y' 較佳係 Ahx。實例包括具有式 $(\text{RY}'\text{R})_p$ 或式 $(\text{RRY}')_p$ 之肽，其中 Y' 較佳係 Ahx。在一實施例

中，Y'係6-胺基己酸亞單元，R係精胺酸且p係4。

某些實施例包括(RY'R)_p及(RRY')_p中至少二者之各種線性組合，包括(例如)具有序列(RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY')(SEQ ID NO: 130)或(RRY')(RY'R)(RRY')(SEQ ID NO: 131)之例示性肽。本發明涵蓋其他組合。在另一說明性實施例中，各Z'係苯基丙胺酸，且m係3或4。

經偶聯肽較佳經由連接體Ahx-B連接至寡聚體末端，其中Ahx係6-胺基己酸亞單元且B係β-丙胺酸亞單元，如例如圖1C中所示。肽與寡聚體之間之交替連接體包括甘胺酸及半胱胺酸。該等及相關連接體可經由醯胺或二硫鍵偶聯。

在所選實施例中，對於各X'，側鏈部分獨立地選自由以下組成之群：胍基(HN=C(NH₂)NH-)、脒基(HN=C(NH₂)C<)、2-胺基二氫嘧啶基、2-胺基四氫嘧啶基、2-胺基吡啶基及2-胺基嘧啶酮基，且其較佳選自胍基及脒基。在一實施例中，側鏈部分係胍基，如在胺基酸亞單元精胺酸(Arg)中。

在某些實施例中，Y'亞單元可連續(其中在Y'亞單元之間無X'亞單元插入)，或單獨散佈在X'亞單元之間。在某些實施例中，連接亞單元可位於Y'亞單元之間。在一實施例中，Y'亞單元位於轉運蛋白末端；在其他實施例中，其兩側為X'亞單元。在其他較佳實施例中，各Y'係-CO-(CH₂)_n-CHR-NH-，其中n係2至7且R係H。舉例而言，在n係5且R係H時，Y'係6-胺基己酸亞單元，在本文中縮寫為Ahx。

在此群之所選實施例中，各X'包含胍基側鏈部分，如在

精胺酸亞單元中。較佳此類肽包括彼等包含與單一Y'亞單元交替存在之精胺酸二聚體者，其中Y'較佳係Ahx。實例包括具有式(RY'R)₄ (SEQ ID NO: 132)或式(RRY')₄ (SEQ ID NO: 133)之肽，其中Y'較佳係Ahx。在後一情形中，核酸類似物較佳與較佳位於C-末端之末端Y'亞單元連接，如例如圖1C中所示。一實例性連接體具有結構AhxB，其中Ahx係6-胺基己酸亞單元且B係β-丙胺酸亞單元。交替連接體包括半胱胺酸及甘胺酸。

已顯示，相對於不存在附接轉運部分時對寡聚體之攝取，且相對於藉助缺少疏水亞單元Y'之附接轉運部分進行之攝取，本文所述轉運部分可顯著促進附接之寡聚體進入細胞。該增強之攝取較佳表現為將化合物攝取至哺乳動物細胞中相對於藉助缺少疏水亞單元Y'之附接轉運部分攝取藥劑增加至少兩倍，且較佳增加四倍。攝取相對於未偶聯化合物較佳增強至少二十倍，且更佳增強四十倍。

轉運部分之另一益處在於其可穩定反義化合物與其靶核酸序列之間之雙鏈體之預期能力，此大概係由於帶正電轉運部分與帶負電核酸之間之靜電相互作用所致。如上所述，轉運蛋白中帶電亞單元之數量少於14，且較佳介於8與11之間。

富精胺酸肽轉運蛋白(即細胞穿透肽)之使用尤其可用於實踐本發明之某些實施例。已顯示某些肽轉運蛋白可高度有效地將反義化合物遞送至初代細胞(包括造血細胞及肌細胞)中(Marshall, Oda等人，2007；Jearawiriyapaisarn,

Moulton等人，2008；Wu, Moulton等人，2008)。此外，與諸如穿膜肽(Penetratin)及Tat肽等其他已知肽轉運蛋白相比，本文所述肽轉運蛋白在與反義PMO偶聯時顯示增強之改變若干基因轉錄物之剪接之能力(Marshall, Oda等人，2007)。該等研究中之實例性肽包括P007 (SEQ ID NO: 118)、CP04057 (SEQ ID NO: 123)及CP06062 (SEQ ID NO: 124)。

包括連接體(B、AhxB、C或G)在內之實例性肽轉運蛋白展示於下表5中。在某些實施例中，表5中所列示實例性肽轉運蛋白可經由二硫鍵或醯胺鍵與PMO偶聯。

表 5. 實例性肽轉運蛋白

肽	序列(N-末端至C-末端)	SEQ ID NO:
rTAT	RRRQRRKKRC	115
R ₉ F ₂ C	RRRRRRRRRFFC	116
R ₅ F ₂ R ₄ C	RRRRRFFRRRRC	117
(RAhxR) ₄ AhxB ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	118
R ₈ C	RRRRRRRRRC	119
R ₉ C	RRRRRRRRRC	120
R ₈ G	RRRRRRRRRG	121
R ₉ G	RRRRRRRRRG	122
(RAhxR) ₅ AhxB (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	123
(RAhxRRBR) ₂ AhxB ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	124
(RAR) ₄ F ₂ C	RARRARRARRRFFC	125
(RGR) ₄ F ₂ C	RGRRGRRGRRGRFFC	126

R ₉ F ₂ G	RRRRRRRRRFFG	127
R ₉ F ₂ XB	RRRRRRRRRFFAhxB	128

RNA 干擾劑

亦可藉由多種基於RNA干擾之方法來靶向本文所述流感靶區域(例如 M1、M2；SEQ ID NO: 1-11)。RNA 干擾(RNAi)係進化中保守之基因沉默機制，最初係在對線蟲漂亮新小杆線蟲(*Caenorhabditis elegans*)之研究中發現(Lee等人，Cell 75:843, 1993；Reinhart等人，Nature 403:901, 2000)。其可藉由將dsRNA引入表現適宜分子機構之細胞中來引發，隨後其降解相應內源mRNA。該機制涉及將dsRNA轉化為短RNA，其將核糖核酸酶引導至同源mRNA靶(例如，概述於Ruvkun, Science 2294:797, 2001中)。

在某些實施例中，本文所提供方法可採用雙鏈核糖核酸(dsRNA)分子作為調節劑藉由(例如)干擾M1或M2蛋白表現來降低流感病毒複製。dsRNA一般包含兩條單鏈。dsRNA中之一條鏈包含與靶基因或靶區域中一部分實質上相同之核苷酸序列(「有義」鏈)，且另一條鏈(「互補」或「反義」鏈)包含與靶區域中一部分實質上互補之序列。該等鏈充分互補以雜交形成雙鏈體結構。在某些實施例中，互補RNA鏈之長度可小於30個核苷酸，小於25個核苷酸，或甚至長19至24個核苷酸。在某些態樣中，互補核苷酸序列可長20-23個核苷酸，或長22個核苷酸。

在某些實施例中，至少一條RNA鏈包含長1至4個核苷酸之核苷酸突出。在其他實施例中，dsRNA可另外包含至少

一個經化學修飾之核苷酸。在某些態樣中，包含具有1至4個核苷酸之單鏈突出之dsRNA可包含一分子，其中單鏈突出中與末端核苷酸對直接相鄰之不成對核苷酸含有嘌呤鹼基。在其他態樣中，dsRNA兩端之最後一個互補核苷酸對係G-C對，或最後四個末端核苷酸對中之至少二者係G-C對。

本發明某些實施例可包含微小RNA。微小RNA代表一大類在有機體中天然產生之小RNA，其中一些可調節靶基因之表現。微小RNA係藉由Dicer自約70個核苷酸之單鏈髮夾前體轉錄物形成(V. Ambros等人，Current Biology 13:807, 2003)。微小RNA不轉譯成蛋白質，而是與特定信使RNA結合，由此阻斷轉譯。人們認為，微小RNA與其靶不精確地鹼基配對以抑制轉譯。某些微小RNA可轉錄為髮夾RNA前體，隨後藉由Dicer酶將其處理為其成熟形式。

在某些實施例中，調節劑或RNAi寡核苷酸係單鏈。在其他實施例中，調節劑或RNAi寡核苷酸係雙鏈。某些實施例亦可採用短干擾RNA (siRNA)。在某些實施例中，雙鏈寡核苷酸之第一鏈所含核苷殘基比第二鏈多兩個。在其他實施例中，第一鏈與第二鏈具有相同核苷數量；然而，第一鏈與第二鏈相互偏離從而使得第一及第二鏈上之兩個末端核苷與互補鏈上之殘基不成對。在某些情形下，兩個不成對核苷係胸苷殘基。

在調節劑包含siRNA之情形下，該藥劑應包括與靶區域具有足夠同源性且具有足夠核苷酸長度之區域，從而使得

siRNA 劑或其片段可介導靶 RNA 之下調。應理解，術語「核糖核苷酸」或「核苷酸」在經修飾 RNA 或核苷酸替代物情形下亦可係指一或多個位置處之經修飾核苷酸或替代物替代部分。因此，siRNA 劑係或包括與靶 RNA 至少部分互補之區域。在 siRNA 劑與靶之間並不一定具有完全互補性，但必須具有足夠對應性以使得 siRNA 劑或其裂解產物可引導序列特異性剪接，例如靶 RNA 之 RNAi 裂解。與靶鏈之互補性或同源性程度在反義鏈中最為重要。儘管通常期望完全互補性(尤其在反義鏈中)，但一些實施例包括一或多處、較佳 10 處、8 處、6 處、5 處、4 處、3 處、2 處或更少相對於靶 RNA 之錯配。末端區域中對錯配之耐受性最強，且錯配若存在則較佳位於末端區域中，例如位於 5' 及/或 3' 末端之 6 個、5 個、4 個或 3 個核苷酸內。有義鏈僅需要與反義鏈充分互補以維持分子之總體雙鏈特徵。

另外，siRNA 調節劑可經修飾或包括核苷替代物。siRNA 劑之單鏈區域可經修飾或包括核苷替代物，例如，髮夾結構之不成對區域(例如連接兩個互補區域之區域)可具有修飾或核苷替代物。亦可使用修飾來針對(例如)外切核酸酶穩定 siRNA 劑之一或多個 3'-或 5'-末端，或促進反義 siRNA 劑進入 RISC 中。修飾可包括 C3(或 C6、C7、C12)胺基連接體、硫氫基連接體、羧基連接體、非核苷酸間隔區(C3、C6、C9、C12、無鹼基間隔區、三乙二醇、六乙二醇)、特殊生物素或螢光素試劑，該等試劑呈亞磷醯胺形式且具有另一經 DMT 保護之羥基從而使得在 RNA 合成期間

可多次偶合。

除了足夠短以不引發干擾素反應之分子(該等分子亦可藉由Dicer來裂解及/或進入RISC中)(例如大小容許進入RISC之分子，例如與Dicer裂解產物類似之分子)外，siRNA劑可包括(例如)長至足以引發干擾素反應之分子(其可藉由Dicer來裂解(Bernstein等人，Nature, 409:363-366, 2001)並進入RISC(RNAi誘導之沉默複合體)中)。在本文中，足夠短以不引發干擾素反應之分子稱作siRNA劑或較短RNAi劑。所用「siRNA劑或較短RNAi劑」係指足夠短以使得不會在人類細胞中誘導有害干擾素反應之siRNA劑，例如其具有小於60個核苷酸對且較佳小於50個、40個或30個核苷酸對之雙鏈體區域。siRNA調節劑或其裂解產物可藉由(例如)誘導針對靶RNA、較佳流感靶RNA(例如M1或M2)之RNAi來下調靶基因。

siRNA調節劑中每一鏈之長度可等於或小於35、30、25、24、23、22、21、或20個核苷酸。鏈較佳長至少19個核苷酸。舉例而言，各鏈長度可介於21與25個核苷酸之間。較佳siRNA劑具有17、18、19、20、21、22、23、24或25個核苷酸對之雙鏈體區域及一或多個突出，較佳具有一個或兩個具有2-3個核苷酸之3'突出。

除了與靶RNA之同源性及下調靶基因之能力以外，siRNA調節劑可具有以下特性中之一或多者：無論是否經修飾，即使絕大部分或所有核苷皆經修飾，但其仍具有可以適宜三維框架呈現鹼基(或經修飾鹼基)之反義鏈，從而

能與同源靶RNA形成正確鹼基配對且形成雙鏈體結構，此足以容許藉由(例如)裂解靶RNA來下調該靶；無論是否經修飾，即使絕大部分或所有核苷皆經修飾，但其仍具有「RNA樣」特性，即，即使並非唯一性地或即使僅部分地含有核糖核苷酸成份，其亦可具有RNA分子之總體結構、化學及物理特性。舉例而言，siRNA劑可含有(例如)有義鏈及/或反義鏈，其中所有核苷酸糖皆含有(例如)2'氟來代替2'羥基。預期此含去氧核糖核苷酸藥劑仍可表現RNA樣特性。儘管不期望受限於理論，負電性氟在附接至核糖之C2'位時偏向軸向取向。此氟之空間偏向繼而可迫使糖呈C_{3'}-內縮攏體(C_{3'}-endo pucker)形式。此係與RNA分子中所觀察到者相同之縮攏模式且產生RNA特徵性A家族類螺旋。此外，由於氟係良好氫鍵受體，其可參與與水分子相同之氫鍵相互作用，已知該等相互作用可穩定RNA結構。一般而言，2'糖位置上之經修飾部分較佳能形成H鍵，其係核糖核苷酸中OH部分而非去氧核糖核苷酸中H部分之特徵。

本文所用「單鏈RNAi劑」係由單一分子構成之RNAi劑。其可包括藉由鏈內配對形成之雙鏈體區域，例如其可係或包括髮夾或鍋柄樣結構。單鏈RNAi調節劑較佳為靶分子之反義分子。單鏈RNAi劑應足夠長從而使其可進入RISC並參與RISC介導之靶mRNA裂解。單鏈RNAi劑長至少14個核苷酸，且更佳長至少15、20、25、29、35、40或50個核苷酸。其長度較佳小於200、100或60個核苷酸。

髮夾 RNAi 調節劑可具有等於或至少為 17、18、19、29、21、22、23、24 或 25 個核苷酸對之雙鏈體區域。雙鏈體區域之長度可較佳等於或小於 200、100 或 50。雙鏈體區域長度之某些範圍係 15 至 30、17 至 23、19 至 23 及 19 至 21 個核苷酸對。髮夾可具有單鏈突出或末端不成對區域，較佳位於髮夾之 3' 側，且較佳位於反義側。在某些實施例中，突出長 2-3 個核苷酸。

本文所提供方法使用之某些調節劑可包含 RNAi 寡核苷酸，例如嵌合寡核苷酸或「嵌合體」，其含有兩個或更多個化學上獨特之區域，各自係由至少一個單體單元(即核苷酸，在寡核苷酸化合物情形下)構成。該等寡核苷酸通常含有至少一個區域，其中對寡核苷酸進行修飾以賦予該寡核苷酸以增強之對核酸酶降解之抵抗，增強之細胞攝取，及/或提高之對靶核酸之結合親和性。因此，在使用嵌合寡核苷酸時，與硫代磷酸酯寡聚去氧核苷酸相比，通常可使用較短寡核苷酸來獲得相當之結果。嵌合寡核苷酸可以兩個或更多個上述寡核苷酸、經修飾寡核苷酸、寡核苷酸及/或寡核苷酸模擬物之複合結構形式來形成。該等寡核苷酸在業內亦稱作雜合體或混和骨架(gapmer)。教示該等雜合結構之製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第 5,013,830 號、第 5,149,797 號、第 5,220,007 號、第 5,256,775 號、第 5,366,878 號、第 5,403,711 號、第 5,491,133 號、第 5,565,350 號、第 5,623,065 號、第 5,652,355 號、第 5,652,356 號、第 5,700,922 號及第

5,955,589號，其各自以引用方式併入本文中。在某些實施例中，嵌合寡核苷酸係RNA-DNA、DNA-RNA、RNA-DNA-RNA、DNA-RNA-DNA或RNA-DNA-RNA-DNA，其中寡核苷酸之長度介於5與60個核苷酸之間。

在本發明一態樣中，諸如RNAi劑等調節劑係關於包含至少一個拴接至經改變或非天然核鹼基之配體之寡核苷酸。大量化合物可用作經改變鹼基。經改變鹼基之結構很重要，即經改變鹼基不應實質上阻礙寡核苷酸與其靶(例如mRNA)之結合。在某些實施例中，經改變鹼基係二氟甲基、硝基吡咯基、硝基咪唑基、硝基吡啶基、萘基、蔥基、吡啶基、喹啉基、茈基或本文所述非天然核鹼基中任一者之二價基團。在某些實施例中，非天然核鹼基係二氟甲基、硝基吡咯基或硝基咪唑基。在某些實施例中，非天然核鹼基係二氟甲基。眾多種配體為業內已知且適用於本發明。舉例而言，配體可為類固醇、膽汁酸、脂質、葉酸、吡哆醛、B12、核黃素、生物素、芳香族化合物、多環化合物、冠醚、嵌入劑、解離分子(cleaver molecule)、蛋白質結合劑或碳水化合物。在某些實施例中，配體係類固醇或芳香族化合物。在某些情形下，配體係膽甾醇基。

在其他實施例中，RNAi劑係拴接至用於改良細胞靶向及攝取之目的之配體的寡核苷酸。舉例而言，可將RNAi劑拴接至抗體或其抗原結合片段。在另一實例中，可將RNAi劑拴接至特異性配體結合分子，例如特異性結合特

定細胞表面受體之多肽或多肽片段。

在其他實施例中，調節劑包含非天然核鹼基。在某些實施例中，非天然核鹼基係二氟甲基、硝基咪唑基、硝基吡啶基或硝基吡咯基。在某些實施例中，本文所提供調節劑係關於雙鏈寡核苷酸序列，其中兩條鏈中僅一條含有非天然核鹼基。在某些實施例中，本文所用調節劑係關於雙鏈寡核苷酸序列，其中兩條鏈獨立地包含至少一個非天然核鹼基。

在某些情形下，核苷中天然存在之核糖部分經己糖替代。在某些態樣中，己糖係阿洛糖(allose)、阿卓糖(altrose)、葡萄糖、甘露糖、古洛糖(gulose)、艾杜糖(idose)、半乳糖、塔羅糖(talose)或其衍生物。在一較佳實施例中，己糖係D-己糖。在某些情形下，核苷中天然存在之核糖部分經多環雜烷基環或環己烯基替代。在某些情形下，多環雜烷基係環中含有一個氧原子之二環。在某些情形下，多環雜烷基係二環[2.2.1]庚烷、二環[3.2.1]辛烷或二環[3.3.1]壬烷。在某些實施例中，寡核苷酸之骨架已經修飾以改良寡核苷酸化合物之治療或診斷特性。在某些實施例中，寡核苷酸中至少一個鹼基或至少一個糖已經修飾以改良寡核苷酸化合物之治療或診斷特性。在寡核苷酸為雙鏈之情形下，兩條鏈互補，部分互補，或為嵌合寡核苷酸。

設想可用於本發明方法中之經修飾RNAi劑之實例包括含有經修飾骨架或非天然核苷間鍵聯之寡核苷酸。如本文

所定義，具有經修飾骨架或核苷間鍵聯之寡核苷酸包括彼等在骨架中保留磷原子者及彼等在骨架中不含磷原子者。在糖間骨架中不含磷原子之經修飾寡核苷酸亦可視為寡核苷酸。具體寡核苷酸化學修飾闡述於下文中。給定化合物中所有位置並不一定經均勻修飾，且事實上可將以下修飾中之不止一者納入單一寡核苷酸化合物中或甚至納入其單一核苷酸中。

經修飾核苷間鍵聯或骨架之實例包括(例如)具有正常3'-5'鍵聯之硫代磷酸酯、對掌性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、甲基及其他烷基磷酸酯(包括3'-伸烷基磷酸酯及對掌性磷酸酯)、次磷酸酯、胺基磷酸酯(包括3'-胺基胺基磷酸酯及胺基烷基胺基磷酸酯)、硫羰基胺基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯、及硼烷磷酸酯、該等之2'-5'連結類似物及彼等具有反極性者，其中相鄰核苷單元對係3'-5'對5'-3'或2'-5'對5'-2'連接。亦包括各種鹽、混合鹽及游離酸形式。

教示上述含磷原子鍵聯之製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第3,687,808號、第4,469,863號、第4,476,301號、第5,023,243號、第5,177,196號、第5,188,897號、第5,264,423號、第5,276,019號、第5,278,302號、第5,286,717號、第5,321,131號、第5,399,676號、第5,405,939號、第5,453,496號、第5,455,233號、第5,466,677號、第5,476,925號、第5,519,126號、第5,536,821號、第5,541,306號、第5,550,111號、第5,563,253號、第5,571,799號、第

5,587,361 號、第 5,625,050 號及第 5,697,248 號，其各自以引用方式併入本文中。

不包括磷原子之經修飾核苷間鍵聯或骨架(即寡核苷酸)之實例具有由短鏈烷基或環烷基糖間鍵聯、混合雜原子及烷基或環烷基糖間鍵聯、或一或多個短鏈雜原子或雜環糖間鍵聯形成之骨架。該等包括彼等具有嗎啉基鍵聯者(部分自核苷之糖部分形成)；矽氧烷骨架；硫化物、亞碲及碲骨架；甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基骨架；亞甲基甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基骨架；含有烯烴之骨架；胺基磺酸酯骨架；亞甲基亞胺基及亞甲基胍基骨架；磺酸酯及磺醯胺骨架；醯胺骨架；及其他具有混合 N、O、S 及 CH₂ 組成部分者。

教示上述寡核苷酸之製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第 5,034,506 號、第 5,166,315 號、第 5,185,444 號、第 5,214,134 號、第 5,216,141 號、第 5,235,033 號、第 5,264,562 號、第 5,264,564 號、第 5,405,938 號、第 5,434,257 號、第 5,466,677 號、第 5,470,967 號、第 5,489,677 號、第 5,541,307 號、第 5,561,225 號、第 5,596,086 號、第 5,602,240 號、第 5,610,289 號、第 5,602,240 號、第 5,608,046 號、第 5,610,289 號、第 5,618,704 號、第 5,623,070 號、第 5,663,312 號、第 5,633,360 號、第 5,677,437 號及第 5,677,439 號，其各自以引用方式併入本文中。

在寡核苷酸模擬物之其他實例中，核苷單元之糖及核苷間鍵聯二者(即骨架)可經新穎基團替代。維持核鹼基單元

以與適宜核酸靶化合物雜交。一種已顯示具有極佳雜交特性之該寡核苷酸(寡核苷酸模擬物)稱作肽核酸(PNA)。在PNA化合物中，寡核苷酸之糖骨架經含醯胺骨架替代，具體而言經胺基乙基甘胺酸骨架替代。保留核鹼基並使其與骨架中醯胺部分中之各原子直接或間接結合。教示PNA化合物之製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第5,539,082號、第5,714,331號及第5,719,262號，其各自以引用方式併入本文中。關於PNA化合物之其他教示可參見Nielsen等人，*Science*, 1991, 254, 1497。

本發明另外涵蓋採用核酶之寡核苷酸。催化高特異性內切核糖核酸酶活性之合成RNA分子及其衍生物稱為核酶。(一般參見頒予Haseloff等人之美國專利第5,543,508號及頒予Goodchild等人之美國專利第5,545,729號)。裂解反應係藉由RNA分子自身來催化。在天然RNA分子中，自催化裂解位點位於RNA二級結構中高度保守之區域內(Buzayan等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:8859-62, 1986；Forster等人，*Cell*. 50:9-16, 1987)。天然自動催化RNA分子已經修飾以生成可以高度特異性靶向特定細胞或致病性RNA分子之核酶。因此，核酶與反義寡核苷酸用於相同之一般目的(即調節特定基因之表現)，且與寡核苷酸類似，係大部分具有單鏈性之核酸。

在某些情形下，用於本文所提供方法之RNAi劑可經非配體基團修飾。已將多種非配體分子與寡核苷酸偶聯以增強寡核苷酸之活性、細胞分佈、細胞靶向或細胞攝取，且

實施該等偶聯之程序可自科學文獻獲得。該等非配體部分包括脂質部分，例如膽固醇(Letsinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6553-56, 1989)、膽酸(Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:1053, 1994)；硫醚，例如己基-5-三苯甲基硫醇(Manoharan等人，Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:306, 1992；Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Lett., 3:2765, 1993)；硫代膽固醇(Oberhauser等人，Nucl. Acids Res., 20:533, 1992)；脂肪族鏈，例如十二烷二醇或十一烷基殘基(Saison-Behmoaras等人，EMBO J. 10:111, 1991；Kabanov等人，FEBS Lett. 259:327, 1990；Svinarchuk等人，Biochimie. 75:49, 1993)；磷脂，例如二-十六烷基-外消旋-甘油或1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸三乙銨(Manoharan等人，Tetrahedron Lett., 36:3651, 1995；Shea等人，Nucl. Acids Res. 18:3777, 1990)；多胺或聚乙二醇鏈(Manoharan等人，Nucleosides & Nucleotides. 14:969, 1995)；或金剛烷乙酸(Manoharan等人，Tetrahedron Lett. 36:3651, 1995)；棕櫚基部分(Mishra等人，Biochim. Biophys. Acta. 1264:229, 1995)；或十八烷基胺或己基胺基-羧基膽固醇部分(Crooke等人，J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:923, 1996)。教示該等寡核苷酸偶聯物之製備之代表性美國專利已列示於上文中。典型偶聯方案涉及合成在序列中一或多個位置處具有胺基連接體之寡核苷酸。隨後使用適宜偶合或活化試劑使該胺基與所偶聯分子反應。偶聯反應可用仍與固體載體結合之寡核苷

酸實施或在寡核苷酸於溶液相中裂解後實施。藉由HPLC純化寡核苷酸偶聯物通常可提供純淨偶聯物。

調節劑之諸如RNAi寡核苷酸等其他實例可參見美國專利申請公開案第2007/0275465號、第2007/0054279號、第2006/0287260號、第2006/0035254號、第2006/0008822號，其係以引用方式併入。

對流感病毒複製之抑制

上文所詳述之反義化合物可用於抑制正黏病毒科之單鏈負義分節RNA病毒之複製。在一實施例中，該抑制可有效治療該等病毒對宿主動物之感染。因此，在一實施例中，方法包含使感染病毒之細胞與可有效抑制該特定病毒複製之反義藥劑接觸。在此實施例中，以適宜醫藥載劑將反義藥劑投與感染給定病毒之哺乳動物個體，例如人類或家畜。預期反義寡核苷酸可阻止RNA病毒在宿主中之生長。可減少RNA病毒之數量或將其清除且對宿主之正常生長或發育幾乎沒有或無有害效應。

如各實例中所述，在本發明中，評估設計為可與流感A病毒之M1/M2基因區段(即區段7)雜交之磷二鹼胺嗎啉基寡聚體(PMO)在兩種動物模型中抑制流感病毒產生之能力。使PMO與短富精胺酸肽偶聯以促使其進入細胞，或將其製備為含有陽離子型鍵聯之PMO⁺™化合物。該等化合物靶向M1基質蛋白(M1)及離子通道蛋白(M2)之AUG轉譯起始位點，兩種蛋白皆係自相同AUG起始密碼子使用M1/M2 mRNA之選擇性剪接形式來表現。

靶向M1/M2-AUG之本發明反義化合物可在H3N2小鼠模型中抑制病毒效價，如實例1中所述。靶向M1/M2-AUG之本發明化合物在2009H1N1 (S-OIV)大範圍流行性豬流感之雪貂模型中亦顯示降低之流感感染臨床體徵及鼻洗劑中降低之病毒效價，如實例2中所述。因此，本文中例示之反義寡核苷酸及RNAi劑可用於治療病毒感染，主要係彼等可歸屬於正黏病毒科中之單鏈負義分節RNA病毒者。

本發明各實施例亦包括組合療法及相關組合物。舉例而言，本文提供之抗病毒(即靶向病毒之)反義寡核苷酸及RNAi劑可與靶向宿主分子之反義寡核苷酸或RNAi劑組合使用。就此而言，可使用靶向宿主免疫反應基因及/或其受體之反義或RNAi來改良免疫反應且由此阻止或降低後續病毒性或細菌性感染(例如繼發性細菌感染)。在一實例中，已顯示CD200/R-/-小鼠在流感感染後不出現膿毒症。CD200係先天免疫反應之負調節劑，其一般導致先天免疫反應下調。因此，某些治療方法可包括投與靶向編碼CD200及/或CD200受體之宿主RNA分子之反義及/或RNAi劑(例如，參見Hatherly等人，Eur J Immunol. 34:1688-94, 2004)以及投與(同時或分開)本文所述靶向流感之反義藥劑中之任何一或多者。亦包括組合物，其包含靶向CD200及/或CD200受體(例如靶向其AUG起始密碼子或剪接位點)之反義或RNAi劑以及本文所述靶向流感病毒之反義或RNAi劑。該等方法及組合物可用於治療獨立的流感病毒感染及/或與流感病毒感染有關之繼發性細菌感染(例如鏈球菌性

肺炎)。

本發明各實施例亦包括治療伴隨繼發性細菌感染之病毒感染(例如流感感染)之組合療法。在1918-1919大範圍流行性流感中大多數死亡可能係由常見上呼吸道細菌(例如肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*))引發之繼發性細菌性肺炎所致，且來自2009年大範圍流行性H1N1之最新證據表明，繼發性細菌感染仍然係重要死因(例如，參見Louie等人，*Clin Infect Disease*. 50:e59-62, 2010；Jain等人，*N Engl J Med*. 361:1935-44, 2009；Jamieson等人，*Cell Host Microbe*. 7:103-14, 2010)。鏈球菌性肺炎之護理標準包括抗生素。主要抗生素包括殺菌性 β -內醯胺藥劑，例如青黴素及阿莫西林，二線藥劑包括頭孢菌素，且三線藥劑包括氯黴素或克林黴素。因此，本發明實施例包括涉及投與(同時或分開)一或多種抑菌性或殺菌性抗生素(例如青黴素、阿莫西林、頭孢菌素、氯黴素、克林黴素)以及一或多種本文所提供靶向流感之反義或RNAi劑之方法及組合物，其主要用於治療或管控與流感病毒感染有關之繼發性細菌感染。

在另一實例中，本發明反義寡核苷酸及RNAi劑可與其他靶向流感病毒之療法(例如磷酸奧司他韋(TAMIFLU®))組合投與(同時或分開)。在某些態樣中，一或多種反義寡核苷酸(例如AVI-7100)與奧司他韋之組合可相對於單獨使用奧司他韋或單獨使用抗病毒反義寡核苷酸在降低流感病毒效價及/或其他流感病毒感染症狀(例如肺泡炎、浸潤性

免疫細胞)時達成協同效應。亦包括組合物，其包含奧司他韋以及本文所述靶向流感病毒之抗病毒反義寡核苷酸或RNAi劑。在具體實施例中，該等組合物及方法可用於治療其他抗奧司他韋流感病毒感染。

感染劑之鑒定

引起感染之具體病毒可藉由業內已知方法來確定，例如血清學或培養方法。

血清學鑒定採用自個體之生物試樣(例如唾液、糞便、尿液、腦脊髓液、血液等)分離之病毒樣品或培養物。檢測病毒之免疫分析一般係藉由熟習此項技術者常用之方法來實施，例如ELISA或蛋白質印跡法(Western blot)。另外，對特定病毒株系或物種具有特異性之單株抗體通常可自市場購得。

培養方法可用於分離及鑒定特定病毒類型，其所用技術包括(但不限於)在各種培養條件下比較諸如生長速率及形態等特徵。

在受感染個體中鑒定病毒感染劑之另一方法採用以下方式：自生物試樣分離RNA，之後使用靶向所懷疑病毒劑(例如季節性H1N1流感、大範圍流行性H1N1 S-OIV、H5N1禽流感或H3N2豬流感)之特異性PCR引物實施核酸擴增。

調配及投與

在某些實施例中，本發明提供適合於治療性遞送本文所述反義寡聚體之調配物或組合物。因此，在某些實施例

中，本發明提供醫藥上可接受之組合物，其包含有效治療量之一或多種本文所述寡聚體，其與一或多種醫藥上可接受之載劑(添加劑)及/或稀釋劑調配在一起。儘管本發明寡聚體可單獨投與，但較佳以醫藥調配物(組合物)形式投與該化合物。

遞送核酸分子之方法闡述於例如以下文獻中：Akhtar等人，1992, Trends Cell Bio., 2:139；及 Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics，Akhtar編輯；Sullivan等人，PCT WO 94/02595。該等及其他方案可用於遞送實際上任一核酸分子，包括本發明經分離寡聚體。

如下文所詳述，可以特別方式調配本發明醫藥組合物以供以固體或液體形式投與，包括彼等適於以下投與方式者：(1)經口投與，例如獸用頓服藥(水性或非水性溶液或懸浮液)、錠劑(例如彼等靶向頰、舌下及全身吸收者)、大丸劑、粉劑、顆粒劑、施用於舌之糊劑；(2)非經腸投與，例如皮下、肌內、靜脈內或硬膜外注射(例如)無菌溶液或懸浮液或持續釋放調配物；(3)局部施用，例如以乳膏、軟膏劑或受控釋放貼劑或噴霧劑形式施用至皮膚；(4)陰道內或直腸內投與，例如陰道栓劑、乳膏或發泡劑；(5)舌下投與；(6)經眼投與；(7)經皮投與；或(8)經鼻投與。

本文所用片語「醫藥上可接受之」係指彼等化合物、材料、組合物及/或劑型在合理醫學診斷範疇內適用於與人類及動物組織接觸，且無過大毒性、刺激性、過敏反應或其他問題或併發症，且與合理效益/風險比相稱。

本文所用片語「醫藥上可接受之載劑」意指醫藥上可接受之材料、組合物或媒劑，例如液體或固體填充劑、稀釋劑、賦形劑、製造助劑(例如潤滑劑、滑石粉、硬脂酸鎂、硬脂酸鈣或硬脂酸鋅、或硬脂酸)或溶劑囊封材料，其參與將標的化合物自一器官或身體一部分運載或轉運至另一器官或身體另一部分。在與調配物中之其他成份相容且對患者無害之意義上，每種載劑必須係「可接受的」。

可用作醫藥上可接受之載劑之材料之一些實例包括：

- (1)糖類，例如乳糖、葡萄糖及蔗糖；
- (2)澱粉，例如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；
- (3)纖維素及其衍生物，例如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素及乙酸纖維素；
- (4)黃蓍膠粉劑；
- (5)麥芽；
- (6)明膠；
- (7)滑石粉；
- (8)賦形劑，例如可可脂及栓劑蠟；
- (9)油類，例如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油及大豆油；
- (10)二醇，例如丙二醇；
- (11)多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇及聚乙二醇；
- (12)酯類，例如油酸乙酯及月桂酸乙酯；
- (13)瓊脂；
- (14)緩衝劑，例如氫氧化鎂及氫氧化鋁；
- (15)海藻酸；
- (16)無致熱源水；
- (17)等滲鹽水；
- (18)林格氏溶液(Ringer's solution)；
- (19)乙醇；
- (20) pH緩衝溶液；
- (21)聚酯、聚碳酸酯及/或聚酸酐；及
- (22)其他用於醫藥調配物之無毒可相容物質。

適合與本發明反義寡聚體一起調配之藥劑之其他非限制性實例包括：PEG偶聯核酸、磷脂偶聯核酸、含有親脂性部分之核酸、硫代磷酸酯、P-糖蛋白抑制劑(例如Pluronic

P85)，其可促使藥物進入各種組織中；生物可降解聚合物，例如聚(DL-交酯-乙交酯)微球體，其用於在植入後持續釋放遞送(Emerich, DF等人，Cell Transplant. 8:47-58, 1999)Alkermes公司，Cambridge, Mass.；及載荷奈米顆粒，例如彼等由聚戊腈丙烯酸酯製備者，其可遞送藥物穿過血腦屏障且可改變神經元攝取機制(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999)。

本發明之特徵亦在於使用組合物，其包含經表面修飾之含有聚(乙二醇)脂質之脂質體(經PEG修飾，具支鏈及無支鏈或其組合，或長循環脂質體或隱形脂質體)。本發明寡聚體亦可包含具有不同分子量之共價附接之PEG分子。該等調配物提供增加藥物在靶組織中之積累之方法。此類藥物載劑抵抗單核巨噬細胞系統(MPS或RES)之調理作用及清除，由此容許更長血液循環時間且提高所囊封藥物之組織暴露(Lasic等人，Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627；Ishiwata等人，Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011)。已顯示該等脂質體可在腫瘤中選擇性積累，此可能係由於在新生成血管之靶組織中外滲及捕獲所致(Lasic等人，Science. 267:1275-1276, 1995；Oku等人，Biochim. Biophys. Acta. 1238:86-90, 1995)。尤其與已知可在MPS組織中積累之習用陽離子型脂質體相比，長循環脂質體增強DNA及RNA之藥代動力學及藥效學(Liu等人，J. Biol. Chem. 42:24864-24870, 1995；Choi等人，國際PCT專利公

開案第 WO 96/10391 號；Ansell 等人，國際 PCT 專利公開案第 WO 96/10390 號；Holland 等人，國際 PCT 專利公開案第 WO 96/10392 號)。長循環脂質體基於其避免在諸如肝及脾等代謝攻擊性 MPS 組織中積累之能力，亦可相對於陽離子型脂質體在更大程度上針對核酸酶降解保護藥物。

在另一實施例中，本發明包括經製備用於遞送之寡聚體組合物，如美國專利第 6,692,911 號、第 7,163,695 號及第 7,070,807 號中所述。就此而言，在一實施例中，本發明在包含離胺酸與組胺酸之共聚物(HK)之組合物中提供本發明寡聚體，如美國專利第 7,163,695 號、第 7,070,807 號及第 6,692,911 號中所述，該寡聚體係單獨存在或與 PEG(例如具支鏈或無支鏈 PEG 或二者之混合物)組合，與 PEG 及靶向部分組合或上述任一者與交聯劑組合。在某些實施例中，本發明在包含經葡萄糖酸修飾之多組胺酸或葡萄糖酸基化多組胺酸/轉鐵蛋白-多離胺酸之組合物中提供反義寡聚體。熟習此項技術者亦應瞭解，在組合物內具有與 His 及 Lys 類似之特性之胺基酸可經取代。

本文所述寡聚體之某些實施例可含有鹼性官能團(例如胺基或烷基胺基)，且因此能與醫藥上可接受之酸形成醫藥上可接受之鹽。在此態樣中，術語「醫藥上可接受之鹽」係指本發明化合物相對無毒性之無機及有機酸加成鹽。該等鹽可在投與媒劑或劑型製程中原位製備，或藉由使本發明之純化化合物以其游離鹼形式與適宜有機或無機酸單獨反應並在後續純化期間分離由此形成之鹽來製備。

代表性鹽包括氫溴酸鹽、鹽酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、乙酸鹽、戊酸鹽、油酸鹽、棕櫚酸鹽、硬脂酸鹽、月桂酸鹽、苯甲酸鹽、乳酸鹽、磷酸鹽、甲苯磺酸鹽、檸檬酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、茶酸鹽、甲磺酸鹽、葡庚糖酸鹽、乳糖酸鹽及月桂基磺酸鹽類及諸如此類。(例如，參見 Berge 等人, J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977)。

標的寡聚體之醫藥上可接受之鹽包括化合物來自(例如)無毒有機或無機酸之習用無毒鹽或四級銨鹽。舉例而言，該等習用無毒鹽包括彼等衍生自諸如以下等無機酸者：鹽酸、氫溴酸、硫酸、胺基磺酸、磷酸、硝酸及諸如此類；及自諸如以下等有機酸製備之鹽：乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、蘋果酸、酒石酸、檸檬酸、抗壞血酸、棕櫚酸、馬來酸、羥基馬來酸、苯基乙酸、麩胺酸、苯甲酸、水楊酸、對胺基苯磺酸、2-乙醯氧基苯甲酸、富馬酸、甲苯磺酸、甲烷磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羥乙磺酸及諸如此類。

在某些實施例中，本發明寡聚體可含有一或多種酸性官能團且因此能夠與醫藥上可接受之鹼形成醫藥上可接受之鹽。在該等情況下，術語「醫藥上可接受之鹽」係指本發明化合物之相對無毒性之無機及有機鹼加成鹽。同樣，該等鹽可在投與媒劑或劑型製程中原位製備，或藉由使純淨化合物以其游離酸形式與適宜鹼(例如，醫藥上可接受之金屬陽離子之氫氧化物、碳酸鹽或碳酸氫鹽)、與氨、或

與醫藥上可接受之有機一級、二級或三級胺單獨反應而製備。代表性鹼金屬鹽或鹼土金屬鹽包括鋰、鈉、鉀、鈣、鎂及鋁鹽及諸如此類。可用於形成鹼加成鹽之代表性有機胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、六氫吡嗪及諸如此類。(例如，參見Berge等人，前述文獻)。

潤濕劑、乳化劑及潤滑劑(例如月桂基硫酸鈉及硬脂酸鎂)以及著色劑、脫模劑、包覆劑、甜味劑、矯味劑及加香劑、防腐劑及抗氧化劑也可存於組合物中。

醫藥上可接受之抗氧化劑之實例包括：(1)水溶性抗氧化劑，例如抗壞血酸、鹽酸半胱胺酸、硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉及諸如此類；(2)油溶性抗氧化劑，例如抗壞血酸棕櫚酸酯、丁基化羥基苯甲醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚及諸如此類；及(3)金屬螯合劑，例如檸檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸及諸如此類。

本發明調配物包括彼等適於經口、經鼻、局部(包括含服及舌下)、經直腸、經陰道及/或非經腸投與者。調配物可以便捷方式存於單位劑型中且可藉由製藥領域熟知之任何方法來製備。可與載劑材料組合產生單一劑型之活性成份之量可隨所治療宿主、具體投與模式而變。可與載劑材料組合產生單一劑型之活性成份之量一般可為產生治療效應之化合物之量。一般而言，以100%計，此量可介於約1%至約99%活性成份之間，優選為約5%至約70%，最佳為約10%至約30%。

在某些實施例中，本發明調配物包含選自以下之賦形劑：環糊精、纖維素、脂質體、膠束形成劑(例如膽汁酸)及聚合載劑(例如聚酯及聚酸酐)；及本發明寡聚體。在某些實施例中，上述調配物使得本發明寡聚體具有經口生物利用性。

製備該等調配物或組合物之方法包括使本發明寡聚體與載劑及(視需要)一或多種輔助成份混合之步驟。一般而言，調配物係藉由以下方式來製備：使本發明化合物與液體載劑或精細固體載劑或二者均勻且充分地混合，且隨後(若需要)使產物成形。

適於經口投與之本發明調配物可呈以下形式：膠囊、扁囊劑、丸劑、錠劑、菱形錠劑(使用矯味基質，通常為蔗糖及阿拉伯膠或黃耆膠)、粉劑、顆粒劑；或作為存於水性或非水性液體中的溶液或懸浮液；或作為水包油型或油包水型液體乳液；或作為酏劑或糖漿；或作為軟錠劑(使用惰性基質，例如明膠及甘油，或蔗糖及阿拉伯膠)及/或作為漱口劑及諸如此類，其各自含有預定量之本發明化合物作為活性成份。本發明寡聚體亦可以大丸劑、藥糖劑或糊劑投與。

在用於經口投與之本發明固體劑型(膠囊、錠劑、丸劑、糖衣錠劑、粉劑、顆粒劑、片劑及諸如此類)中，活性成份可與一或多種醫藥上可接受之載劑(例如檸檬酸鈉或磷酸二鈣)及/或以下組份中之任一者混合：(1)填充劑或膨脹劑，例如澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇及/或

矽酸；(2)黏合劑，例如羧甲基纖維素、藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啉酮、蔗糖及/或阿拉伯膠；(3)保濕劑，例如甘油；(4)崩解劑，例如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、某些矽酸鹽及碳酸鈉；(5)溶液阻滯劑，例如石蠟；(6)吸收促進劑，例如四級銨化合物及表面活性劑(例如泊洛沙姆(poloxamer)及月桂基硫酸鈉)；(7)潤濕劑，例如十六烷醇、單硬脂酸甘油酯及非離子型表面活性劑；(8)吸收劑，例如高嶺土及膨潤土；(9)潤滑劑，例如滑石粉、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉、硬脂酸鋅、硬脂酸鈉、硬脂酸及其混合物；(10)著色劑；及(11)受控釋放劑，例如交聚維酮或乙基纖維素。在膠囊、錠劑及丸劑之情形下，醫藥組合物亦可包含緩衝劑。在使用該等賦形劑(例如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇及諸如此類)之軟殼及硬殼明膠膠囊中，亦可使用相似類型之固體組合物作為填充劑。

可藉由壓製或模製來製備錠劑，其視情況含有一或多種助劑成份。壓製錠劑可使用黏合劑(例如，明膠或羥丙基甲基纖維素)、潤滑劑、惰性稀釋劑、防腐劑、崩解劑(例如，澱粉羥乙酸鈉或交聯羧甲基纖維素鈉)、表面活性劑或分散劑來製備。模製錠劑可藉由在適宜機器中模製經惰性液體稀釋劑潤濕之化合物粉劑混合物來製備。

本發明醫藥組合物之錠劑及其他固體劑型(例如糖衣錠劑、膠囊、丸劑及顆粒劑)可視情況經刻痕或使用諸如腸溶包膜及其他醫藥調配技術中熟知之包膜等包膜及外殼來

製備。其亦可使用(例如)不同比例之羥丙基甲基纖維素(以提供期望釋放特徵)、其他聚合物基質、脂質體及/或微球體來調配,以提供活性成份之緩慢或受控釋放。其可經調配用於迅速釋放,例如冷凍乾燥。其可藉由(例如)經由細菌截留過濾器過濾或藉由納入滅菌劑來滅菌,該等滅菌劑呈無菌固體組合物形式,可在即將使用前將其溶於無菌水或一些其他無菌可注射介質中。該等組合物亦可視需要含有遮光劑且其組成可使得其視需要僅(或優先)在胃腸道之某一部分中以延遲方式釋放活性成份。可用包埋組合物之實例包括聚合物質及蠟。若適宜,活性成份亦可呈含有一或多種上述賦形劑之微囊封形式。

本發明化合物用於經口投與之液體劑型包括醫藥上可接受之乳液、微乳液、溶液、懸浮液、糖漿及酏劑。除活性成份外,液體劑型可含有業內常用之惰性稀釋劑,例如水或其他溶劑;增溶劑及乳化劑,例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(具體而言,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油)、甘油、四氫呋喃醇、聚乙二醇及山梨醇酐脂肪酸酯及其混合物。

除惰性稀釋劑外,經口組合物亦可包括佐劑,例如潤濕劑、乳化及懸浮劑、甜味劑、矯味劑、著色劑、加香劑及防腐劑。

除活性化合物外,懸浮液亦可含有懸浮劑,例如乙氧基化異硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇及山梨醇酐酯、微晶纖維

素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂及黃耆膠及其混合物。

直腸或陰道投與之調配物可以栓劑形式存在，其可藉由使一或多種本發明化合物與一或多種適宜非刺激性賦形劑或載劑混合來製備，該等適宜非刺激性賦形劑或載劑包含(例如)可可脂、聚乙二醇、栓劑蠟或水楊酸酯，且其在室溫下係固體但在體溫下係液體，且因此可在直腸或陰道腔內融化並釋放活性化合物。

本文所提供寡聚體局部或經皮投與之調配物或劑型包括粉劑、噴霧劑、軟膏劑、糊劑、乳膏、洗劑、凝膠、溶液、貼劑及吸入劑。活性寡聚體可在無菌條件下與醫藥上可接受之載劑及與可能需要之任一防腐劑、緩衝劑或推進劑混合。除本發明活性化合物之外，軟膏劑、糊劑、乳膏及凝膠可含有賦形劑，例如動物及植物脂肪、油、蠟、石蠟、澱粉、黃耆膠、纖維素衍生物、聚乙二醇、聚矽氧、膨潤土、矽酸、滑石粉及氧化鋅或其混合物。

除本發明寡聚體之外，粉劑及噴霧劑可含有賦形劑，例如乳糖、滑石粉、矽酸、氫氧化鋁、矽酸鈣及聚醯胺粉劑或該等物質之混合物。噴霧劑可另外含有常用推進劑，例如氯氟烴及未經取代之揮發性烴，例如丁烷及丙烷。

經皮貼劑在額外優點在於可將本發明寡聚體受控遞送至體內。該等劑型可藉由將寡聚體溶於或分散於適宜介質中來製備。亦可使用吸收促進劑來增加該藥劑透過皮膚之通量。在業內已知之方法中，該通量之速率尤其可藉由提供速率控制膜或使藥劑分散於聚合物基質或凝膠中來控制。

適於非經腸投與之醫藥組合物可包含一或多種本發明寡聚體以及一或多種醫藥上可接受之無菌等滲水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳液、或無菌粉劑，該等無菌粉劑可在即將使用前重構為無菌可注射溶液或分散液，該等醫藥組合物可含有糖、醇、抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑、可使調配物與既定接受者之血液等滲之溶質或懸浮劑或增稠劑。可用於本發明醫藥組合物之適宜水性及非水性載劑之實例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇及諸如此類)及其適宜混合物、植物油(例如橄欖油)及可注射有機酯(例如油酸乙酯)。舉例而言，可藉由使用諸如卵磷脂等包覆材料、藉由維持所需粒徑(在分散劑情況下)及藉由使用表面活性劑來維持適當流動性。

該等組合物亦可含有佐劑，例如防腐劑、潤濕劑、乳化劑及分散劑。可藉由包含各種抗細菌及抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸、氯丁醇、苯酚山梨酸及諸如此類)來確保防止標的寡聚體受到微生物影響。亦可期望組合物中包括等滲劑，例如糖、氯化鈉及諸如此類。另外，可藉由引入吸收延遲劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)來實現可注射醫藥形式之長效吸收。

在一些情形下，為延長藥物功效，期望減慢來自皮下或肌內注射之藥物之吸收。在業內已知之方法中，此尤其可藉由使用具有弱水溶性之結晶或非晶型材料之液體懸浮液來達成。則藥物之吸收速率取決於其溶解速率，其溶解速率繼而可取決於晶體粒度及晶形。或者，可藉由將非經腸

投與之藥物形式溶解或懸浮於油媒劑中來達成該藥物之延遲吸收。

可注射儲積形式可藉由在生物可降解聚合物(例如聚交酯-聚乙醇酸交酯)中形成標的寡聚體之微膠囊基質來製備。端視寡聚體與聚合物之比率及所用具體聚合物之性質，可控制寡聚體釋放之速率。其他生物可降解聚合物之實例包括聚(原酸酯)及聚(酸酐)。可注射儲積調配物亦可藉由將藥物包裹於與身體組織相容之脂質體或微乳液中來製備。

在本發明寡聚體係作為藥物投與人類及動物時，其可以原狀或作為含有(例如)0.1-99%(更佳10-30%)活性成份以及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物來給予。

如上所述，本發明調配物或製劑可經口、非經腸、局部或經直腸給予。其通常係以適於每一投與途徑之形式來給予。舉例而言，其係以錠劑或膠囊形式藉由注射、吸入來投與；以眼用洗劑、軟膏劑、栓劑等形式藉由注射、輸注或吸入來投與；以洗劑或軟膏劑形式局部投與；及以栓劑形式經直腸投與。

本文所用片語「非經腸投與」及「以非經腸方式投與」意指除經腸及局部投與以外之投與模式，通常藉由注射來投與且包括(但不限於)靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、莖膜內、眶內、心臟內、皮內、腹膜腔內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、被膜下、蛛網膜下、脊柱內及胸骨內注射及輸注。

本文所用片語「全身性投與」、「以全身方式投與」、「外周性投與」及「以外周方式投與」意指以除了直接進入中樞神經系統以外之方式投與化合物、藥物或其他材料，以使其進入患者全身且由此進行代謝及其他類似過程，例如皮下投與。

不論選擇何種投與途徑，可藉由熟習此項技術者已知之習用方法將可以適宜水合形式使用之本發明寡聚體及/或本發明醫藥組合物調配為醫藥上可接受之劑型。可改變本發明醫藥組合物中活性成份之實際劑量，以針對特定患者、組成及投與模式獲得活性成份可有效達成期望治療反應之量，而不對患者造成不可接受之毒性。

所選擇劑量可取決於多種因素，包括本發明所用特定寡聚體或其酯、鹽或醯胺之活性、投與路徑、投與時間、所用特定寡聚體之排泄或代謝速率、吸收速率及程度、治療持續時間、與所用特定寡聚體組合使用之其他藥物、化合物及/或材料、所治療患者之年齡、性別、體重、身體狀況、健康狀況及先前病史及醫學領域所熟知之類似因素。

具有一般技術之醫師或獸醫可容易地確定並在處方中開出所需醫藥組合物之有效量。舉例而言，醫師或獸醫開始時所用本發明化合物在醫藥組合物中之劑量可低於達成期望治療效應所需量，並逐漸增加該劑量直至達成期望效應。一般而言，本發明化合物之適宜日劑量可為可有效產生治療效應之最低劑量之化合物之量。此一有效劑量通常

可取決於上述多種因素。通常，本發明化合物在用於達成指定效應時用於患者之經口、靜脈內、腦室內及皮下劑量可介於約0.0001 mg/公斤體重/天至約100 mg/公斤體重/天範圍內。

若期望，活性化合物之有效日劑量可以2、3、4、5、6或更多個亞劑量來投與，該等亞劑量係以適宜間隔在全天內視需要以單位劑型分開投與。在某些情況下，藉由每天投與一次來給藥。在某些實施例中，視需要藉由每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個月投與一或多次來給藥以降低流感病毒複製。

核酸分子可藉由多種熟習此項技術者已知之方法來投與細胞，包括(但不限於)囊封在脂質體中，離子透入法，或納入其他媒劑(例如水凝膠、環糊精、生物可降解奈米膠囊及生物黏附性微球體)中，如本文所述及業內已知。在某些實施例中，可採用微乳化技術來提高親脂性(水不溶性)醫藥劑之生物利用度。實例包括托美春(Trimetrine)(Dordunoo, S. K.等人，Drug Development and Industrial Pharmacy, 17:1685-1713, 1991) 及 REV 5901(Sheen, P. C.等人，J Pharm Sci. 80:712-714, 1991)。微乳化之益處尤其在於藉由優先將吸收引導至淋巴系統而非循環系統，從而繞過肝並防止化合物在肝膽管循環中受到破壞而提供增強之生物利用度。

在本發明之一態樣中，調配物含有自本文所提供寡聚體及至少一種兩親性載劑形成之膠束，其中該等膠束之平均直徑小於約100 nm。更佳實施例提供平均直徑小於約50 nm之膠束，且甚至更佳之實施例提供平均直徑小於約30 nm，或甚至小於約20 nm之膠束。

儘管本發明涵蓋所有適宜兩親性載劑，但當前較佳載劑通常係彼等具有普遍認為安全(GRAS)之地位且既可溶解本發明化合物且在後續階段中溶液與複合水相(例如在人類胃腸道中發現者)接觸時使本發明化合物微乳化者。通常，滿足該等要求之兩親性成份之HLB(親水-親脂平衡)值為2-20，且其結構含有介於C-6至C-20之間之直鏈脂肪族基團。實例係聚乙二醇化脂肪酸甘油酯及聚乙二醇。

兩親性載劑之實例係飽和及單不飽和聚乙二醇化脂肪酸甘油酯，例如彼等自各種完全氫化或部分氫化植物油獲得者。該等油可有利地係由相應脂肪酸之三-、二-及單脂肪酸甘油酯及二-及單聚乙二醇酯組成，且尤佳脂肪酸組成包括4-10%癸酸、3-9%癸酸、40-50%月桂酸、14-24%肉豆蔻酸、4-14%棕櫚酸及5-15%硬脂酸。另一類可用兩親性載劑包括部分酯化之山梨醇酐及/或山梨醇以及飽和或單不飽和脂肪酸(SPAN系列)或相應乙氧基化類似物(TWEEN系列)。

市售兩親性載劑可能尤其有用，包括Gelucire系列、Labrafil、Labrasol或Lauroglycol(全部皆由Gattefosse公司，Saint Priest, France製造及配售)、PEG-單油酸酯、

PEG-二油酸酯、PEG-單月桂酸酯及二月桂酸酯、卵磷脂、聚山梨醇酯80等(由USA及世界範圍內之許多公司生產及配售)。

在某些實施例中，可藉由使用脂質體、奈米膠囊、微粒、微球體、脂質顆粒、媒劑及諸如此類來實施遞送以將本發明組合物引入適宜宿主細胞中。具體而言，本發明組合物可經調配用於以囊封於脂質顆粒、脂質體、媒劑、奈米球體、奈米顆粒或類似物中之形式來遞送。該等遞送媒劑之調配及應用可使用已知習用技術來實施。

適用於本發明之親水性聚合物係彼等易溶於水、可共價附接至囊泡形成脂質且體內可耐受而無毒性效應(即具有生物相容性)者。適宜聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚乳酸(亦稱為聚交酯)、聚乙醇酸(亦稱為聚乙醇酸交酯)、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物及聚乙烯醇。在某些實施例中，聚合物之分子量為約100或120道爾頓(至多為約5,000或10,000道爾頓)，或為約300道爾頓至約5,000道爾頓。在其他實施例中，聚合物係分子量為約100至約5,000道爾頓或分子量為約300至約5,000道爾頓之聚乙二醇。在某些實施例中，聚合物係750道爾頓之聚乙二醇(PEG(750))。聚合物亦可藉由其中之單體數量來定義；本發明之一較佳實施例使用至少具有約三個單體之聚合物，該等PEG聚合物係由三個單體組成(約150道爾頓)。

可能適用於本發明之其他親水性聚合物包括聚乙烯吡咯啉酮、聚甲噁唑啉、聚乙噁唑啉、聚羥丙基甲基丙烯酸酯

胺、聚甲基丙烯醯胺、聚二甲基丙烯醯胺及纖維素衍生物(例如羥甲基纖維素或羥乙基纖維素)。

在某些實施例中，本發明調配物包含選自由以下組成之群之生物相容性聚合物：聚醯胺、聚碳酸酯、聚伸烷基、丙烯酸酯與甲基丙烯酸酯之聚合物、聚乙烯基聚合物、聚乙醇酸交酯、聚矽氧烷、聚胺基甲酸酯及其共聚合物、纖維素、聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、乳酸及乙醇酸之聚合物、聚酸酐、聚(原)酸酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(交酯-共-己內酯)、多糖、蛋白質、聚玻璃酸、聚氰基丙烯酸酯及其摻合物、混合物或共聚物。

環糊精係由6、7或8個葡萄糖單元組成之環狀寡糖，分別藉由希臘字母 α 、 β 或 γ 來命名。各葡萄糖單元係藉由 α -1,4-糖苷鍵來連接。由於糖單元具有椅型構象，所有第二醇羥基(C-2、C-3位)皆位於環中一側，同時所有C-6位之第一羥基皆位於另一側。因此，外表面係親水性，從而使得環糊精具有水溶性。與之相比，環糊精之腔係疏水性，此乃因其內襯有C-3及C-5原子之氫及醚樣氧。該等基質使得可與多種相對疏水化合物複合，包括(例如)類固醇化合物，例如17 α -雌二醇。該複合係藉由範德瓦爾斯相互作用(Van der Waals interaction)及氫鍵形成來進行。關於環糊精之化學性質之概述參見Wenz, Agnew, Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822, 1994。

環糊精衍生物之物理化學特性主要取決於取代之種類及程度。舉例而言，其在水中之溶解度介於不溶(例如三乙

鹽基- β -環糊精)至147%溶解度(w/v)(G-2- β -環糊精)範圍內。另外，其可溶於多種有機溶劑中。環糊精之特性使得可藉由提高或減小其溶解度來控制各調配物組份之溶解度。

文獻中已闡述多種環糊精及其製備方法。舉例而言，Parmeter (I)等人(美國專利第3,453,259號)及Gramera等人(美國專利第3,459,731號)闡述電中性環糊精。其他衍生物包括具有陽離子特性之環糊精[Parmeter (II)，美國專利第3,453,257號]、不溶性交聯環糊精(Solms，美國專利第3,420,788號)及具有陰離子特性之環糊精[Parmeter (III)，美國專利第3,426,011號]。在具有陰離子特性之環糊精衍生物中，可將羧酸、亞磷酸、三價膦酸、膦酸、磷酸、硫代膦酸、硫代亞磺酸及磺酸附接至親代環糊精上[參見Parmeter (III)，前述文獻]。此外，Stella等人(美國專利第5,134,127號)已闡述磺基烷基醚環糊精衍生物。

脂質體係由至少一個包封水性內區室之脂質雙層膜組成。脂質體之特徵可在於膜類型及大小。小單層囊泡(SUV)具有單一膜且直徑通常介於0.02與0.05 μm 之間；大單層囊泡(LUVS)通常大於0.05 μm 。寡層大囊泡及多層囊泡具有通常為同心之多個膜層且通常大於0.1 μm 。具有若干個非同心膜(即若干個含於較大囊泡內之較小囊泡)之脂質體稱作多泡性囊泡。

本發明一態樣係關於包含含有本發明寡聚體之脂質體之調配物，其中該脂質體膜經調配以提供攜載能力提高之脂

質體。或者或另外，本發明化合物可含於脂質體之脂質體雙層內或吸附至其上。本發明寡聚體可與脂質表面活性劑聚集在一起且載於脂質體內部空間中；在該等情形下，脂質體膜經調配以抵抗活性劑-表面活性劑聚集體之破裂效應。

根據本發明一實施例，脂質體之脂質雙層含有經聚乙二醇(PEG)衍生之脂質，從而使得PEG鏈自脂質雙層之內表面延伸至脂質體囊封之內部空間中，且自脂質雙層之外部延伸至周圍環境中。

本發明脂質體內所含活性劑呈溶解形式。可使表面活性劑與活性劑之聚集體(例如含有目標活性劑之乳液或膠束)包裹於本發明脂質體之內部空間中。表面活性劑用於分散及溶解活性劑，且可選自任一適宜脂肪族、脂環族或芳香族表面活性劑，包括(但不限於)具有不同鏈長度(例如約C14至約C20)之生物相容性溶血磷脂醯膽鹼(LPC)。諸如PEG-脂質等聚合物衍生脂質亦可用於膠束形成，此乃因其可用於抑制膠束/膜融合，且向表面活性劑分子添加聚合物可減小表面活性劑之CMC並幫助膠束形成。較佳者係CMC在微莫耳範圍內之表面活性劑；CMC較高之表面活性劑可用於製備包裹在本發明脂質體內之膠束。

本發明脂質體可藉由多種業內已知技術中之任一者來製備，例如參見美國專利第4,235,871號；已公開PCT申請案WO 96/14057；New RRC, Liposomes: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1990)，第33-104頁；Lasic

DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993。舉例而言，本發明脂質體可藉由使經親水性聚合物衍生之脂質以對應於經衍生脂質在脂質體中之期望最終莫耳百分比之脂質濃度擴散至預形成脂質體中(例如藉由使預形成脂質體暴露於由脂質接枝聚合物組成之膠束中)來製備。含有親水性聚合物之脂質體亦可藉由業內已知之勻漿化、脂質-域水合(field hydration)或擠出技術來形成。

在另一實例性調配程序中，首先藉由超音波處理使活性劑分散於溶血磷脂醯膽鹼或其他易於溶解疏水分子之低CMC表面活性劑(包括聚合物接枝脂質)中。然後使用活性劑之所得膠束懸浮液再水合以適宜莫耳百分比含有聚合物接枝脂質或膽固醇之乾燥脂質樣品。然後使用業內已知之擠出技術使脂質及活性劑懸浮液形成脂質體，並藉由標準管柱分離來使所得脂質體與未囊封溶液分離。

在本發明一態樣中，所製備脂質體以所選大小範圍具有實質上均勻之大小。一有效定徑方法涉及經由一系列具有所選一致孔徑之聚碳酸酯膜擠出脂質體之水性懸浮液；膜之孔徑可與藉由經由該膜擠出產生之脂質體之最大粒徑大致對應。例如，參見美國專利第4,737,323號。在某些實施例中，可使用諸如DharmaFECT®及Lipofectamine®等試劑來將多核苷酸或蛋白質引入細胞中。

本發明調配物之釋放特徵取決於囊封材料、囊封藥物之濃度及釋放調節劑之存在。舉例而言，可使用例如僅在低

pH(如在胃中)或較高pH(如在腸中)釋放之pH敏感性包膜來控制釋放成pH依賴性。可使用腸溶性包膜來防止在通過胃之前發生釋放。可使用多重包膜或囊封於不同材料中之氫胺混合物來獲得在胃中最初釋放，隨後在腸中後續釋放。控制釋放亦可藉由包含鹽或成孔劑，其可藉由膠囊擴散來增加水攝取或藥物釋放。亦可使用改變藥物溶解度之賦形劑來控制釋放速率。亦可納入促進基質降解或自基質釋放之劑。該等劑可加入藥物中，以各別相(即粒子)加入，或可共溶於聚合物相中，視化合物而定。在大多數情形下，該劑之量應介於0.1%與30%(w/w聚合物)之間。降解促進劑之類型包括無機鹽(例如硫酸銨及氯化銨)、有機酸(例如檸檬酸、苯甲酸及抗壞血酸)、無機鹼(例如碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸鈣、碳酸鋅及氫氧化鋅)及有機鹼(例如硫酸魚精蛋白、精胺、膽鹼、乙醇胺、二乙醇胺及三乙醇胺)及表面活性劑(例如Tween®及Pluronic®)。微結構加入基質(即水溶性化合物，例如無機鹽及糖)中之成孔劑係以粒子形式添加。其範圍通常介於1%與30%(w/w聚合物)之間。

亦可藉由改變顆粒在腸中之停留時間來控制攝取。此可例如藉由黏膜黏附性聚合物包覆顆粒或選擇作為囊封材料來達成。實例包括大多數具有游離羧基之聚合物，例如殼聚糖、纖維素，及尤其聚丙烯酸酯(本文所用聚丙烯酸酯係指包括丙烯酸酯基團及經修飾之丙烯酸酯基團(例如氫基丙烯酸酯及甲基丙烯酸酯)之聚合物)。

寡聚體可經調配以含於外科或醫療器件或植入體內或適

於藉由該器件或植入體來釋放。在某些態樣中，植入體可經包覆或以其他方式經寡聚體處理。舉例而言，可使用水凝膠或其他聚合物(例如生物相容性及/或生物可降解聚合物)來包覆含有本發明組合物之植入體(即可藉由使用水凝膠或其他聚合物來使該組合物適於與醫療器件一起使用)。包覆含有藥劑之醫療器件之聚合物及共聚物為業內所熟知。植入體之實例包括(但不限於)支架、藥物洗脫支架、縫合線、假體、血管導管、透析導管、血管移植物、人工心臟瓣膜、心臟起搏器、可植入心律轉變除顫器、靜脈注射針、用於正骨及骨形成之器件(例如插針、螺絲、板及其他器件)及用於傷口癒合之人工組織基質。

除了本文所提供方法外，根據本發明使用之寡聚體可經調配以供以根據其他藥物類推之用於人類或獸醫醫學之任一便捷方式投與。反義寡聚體及其相應調配物可單獨投與或與流感病毒感染治療中之其他治療策略(例如奧司他韋，其係以商品名TAMIFLU®來銷售)組合投與。

根據本發明，反義寡聚體之遞送途徑包括(但不限於)各種全身性途徑，包括經口及非經腸途徑，例如靜脈內、皮下、腹膜腔內及肌內，以及吸入、經皮、經肺及局部遞送。熟習此項技術者可根據所治療個體之情況來確定適宜途徑。舉例而言，反義寡聚體在皮膚病毒感染治療中之適宜遞送途徑係局部遞送，而反義寡聚體在呼吸道病毒(例如流感A)感染治療中之遞送係吸入、經鼻或經肺遞送。亦可將寡聚體直接遞送至病毒感染部位，或遞送至血流中。

反義寡聚體可以存於生理上可接受之任一便捷媒劑中之形式來投與。此一組合物可包括熟習此項技術者所用多種醫藥上可接受之標準載劑中之任一者。實例包括(但不限於)鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、水、乙醇水溶液、乳液(例如油/水乳液琥珀甘油三酯乳液)、錠劑及膠囊。生理上可接受之適宜載劑之選擇可隨所選投與模式而變。

如上所述，在一些情形下，可採用脂質體來促進細胞攝取反義寡核苷酸。(例如，參見Williams, S.A., Leukemia. 10(12):1980-1989, 1996；Lappalainen等人，Antiviral Res. 23:119, 1994；Uhlmann等人，Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle, Chemical Reviews, 第90卷第4期，第544-584頁，1990；Gregoriadis, G., 第14章，Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, 第287-341頁，Academic Press, 1979)。亦可使用水凝膠作為投與反義寡聚體之媒劑，例如如WO 93/01286或PCT申請案第US 1992/005305號中所述。或者，寡核苷酸可以存於微球體或微粒中之形式來投與。(例如，參見Wu, G.Y.及Wu, C.H., J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987)。或者，使用與反義寡聚體複合之充氣式微氣泡可促進向靶組織之遞送，如美國專利第6,245,747號中所述。

亦可使用持續釋放組合物。該等組合物可包括呈諸如薄膜或微膠囊等成型物件形式之半滲透性聚合基質。

在該方法之一態樣中，個體係人類個體，例如診斷為患有局部或全身性病毒感染之患者。患者之病況亦可能需要

預防性投與本發明反義寡聚體，例如在如下患者之情形下：(1)免疫受損；(2)係燒傷受害者；(3)具有留置導管；或(4)即將進行或近期已進行過手術。在一較佳實施例中，寡聚體係磷二醯胺嗎啉基寡聚體，其含於醫藥上可接受之載劑中，且係經口遞送。在另一較佳實施例中，寡聚體係磷二醯胺嗎啉基寡聚體，其含於醫藥上可接受之載劑中，且係經靜脈內(i.v.)遞送。

反義化合物可以有效產生至少200-400 nM反義寡聚體之峰值血液濃度之量及方式來投與。通常，經約一至兩週之時間一般以規律性間隔投與一或多個劑量之反義寡聚體。經口投與之較佳劑量係每70 kg約1-100 mg寡聚體。在一些情形下，可能需要大於100 mg寡聚體/患者之劑量。對於靜脈內投與，較佳劑量係每70 kg約1 mg至500 mg寡聚體。反義寡聚體經較短時間以規律性間隔來投與，例如經兩週或更短時間每日投與。然而，在一些情形下寡聚體係經較長時間間歇性投與。可在投與後或在投與的同時投與抗生素或其他治療性藥物。可視指示基於對所治療個體之免疫分析、其他生化測試及生理檢查之結果來調整治療方案(劑量、頻率、途徑等)。

治療監測

使用本發明反義寡核苷酸之有效體內治療方案可根據投與之持續時間、劑量、頻率及途徑以及所治療個體之狀況來改變(即預防性投與對因應局部或全身性感染來投與)。因此，該體內療法經常需要藉由適合所治療特定病毒感染

類型之測試進行監測並對劑量或治療方案作出相應調整，以獲得最佳治療結果。可藉由(例如)通用感染指示物來監測治療，例如完全血細胞計數(CBC)、核酸檢測方法、免疫診斷測試、病毒培養或對異源雙鏈體之檢測。

體內投與本發明反義寡聚體在抑制一或多種類型之RNA病毒之生長或清除該等病毒中之效能可在投與反義寡聚體之前、期間或之後用取自個體之生物樣品(組織、血液、尿液等)來測定。對該等樣品之分析包括(1)使用熟習此項技術者已知之程序(例如電泳凝膠遷移率分析)來監測存在或不存在與靶序列及非靶序列形成之異源雙鏈體；(2)監測病毒蛋白產生之量，如藉由諸如ELISA或蛋白質印跡法等標準技術所測定，或(3)藉由Spearman-Karber方法量測對病毒效價之效應(例如，參見Pari, G.S.等人，Antimicrob. Agents and Chemotherapy. 39(5):1157-1161, 1995；Anderson, K.P.等人，Antimicrob. Agents and Chemotherapy. 40:2004-2011, 1996；Cottral, G.E.(編輯)，Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology，第60-93頁，1978)。

參考文獻

Abes, R., H. M. Moulton 等人(2008). 「Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)₄ peptides: structure-activity studies.」 Nucleic Acids Res.

Cox, N. J.及K. Subbarao (1999). 「Influenza.」 Lancet 354(9186): 1277-82。

Cox, N. J. 及K. Subbarao (2000). 「Global epidemiology of influenza: past and present.」 *Annu Rev Med* 51: 407-21。

Egholm, M., O. Buchardt等人(1993). 「PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules.」 *Nature* 365(6446): 566-8。

Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton 等人 (2008). 「Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice.」 *Mol Ther*。

Marshall, N. B., S. K. Oda 等人(2007). 「Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing.」 *Journal of Immunological Methods* 325(1-2): 114-126。

Moulton, H. M., M. H. Nelson 等人(2004). 「Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides.」 *Bioconjug Chem* 15(2): 290-9。

Munster, V. J., E. de Wit 等人(2009). 「Pathogenesis and Transmission of Swine-Origin 2009 A(H1N1)Influenza Virus in Ferrets.」 *Science*。

Stein, C. A., J. B. Hansen 等人(2010). 「Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense

oligonucleotides, unassisted by transfection reagents.」
Nucleic Acids Res 38(1): e3。

Strauss, J. H. 及 E. G. Strauss (2002). Viruses and Human Disease. San Diego, Academic Press。

Summerton, J. 及 D. Weller (1997). 「Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties.」
Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7(3): 187-95。

Wu, B., H. M. Moulton 等人 (2008). 「Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer.」
Proc Natl Acad Sci U S A 105(39): 14814-9。

本說明書中所引用之所有出版物及專利申請案皆係以引用方式併入本文中，如同指明每一個別出版物或專利申請案皆係明確且個別地以引用方式併入一般。

儘管已出於清楚理解之目的藉助說明及實例相當詳細地闡述了前述發明，但熟習此項技術者根據本發明之教示可容易地瞭解，可在不偏離隨附申請專利範圍之精神或範圍之情形下對本發明進行某些改動及修改。提供以下實例以僅用於說明而非加以限制。熟習此項技術者應可容易地識別多種非關鍵參數，可對該等參數進行改變或修改以獲得基本上相同之結果。

實例

A. 材料及方法

所有肽皆係由 Global Peptide Services (Ft. Collins, CO)

或在 AVI BioPharma (Corvallis, OR) 定製合成且純化至 >90% 純度(參見下文實例 2)。PMO 係在 AVI BioPharma 根據已知方法來合成，如例如 (Summerton 及 Weller 1997) 及美國專利第 5,185,444 號中所述且進一步闡述於 PCT 申請案第 US 08/012804 號中。PMO 之實例性結構展示於圖 1A-C 中。2'-OMe 寡聚體係由 Integrated DNA Technologies 公司，Skokie, IL 來合成。LNA 寡聚體係由 Biosynthesis 公司，Lewisville, TX 產生。

一些 PMO 寡聚體係在 3' 端與富精胺酸肽偶聯 ((RAhxRRBR)₂AhxB 或 (RAhxR)₄AhxB；分別為 SEQ ID NO: 124 及 118) 以形成肽偶聯之 PMO (PPMO)，從而增強細胞攝取，如 (美國專利第 7,468,418 號、PCT 申請案第 US 08/008168 號及 (Marshall, Oda 等人，2007；Abes, Moulton 等人，2008)) 中所述。

可用於製備含有 (1-哌嗪基) 氧伸磷基氧基鍵聯之嗎啉基亞單元之合成途徑闡述於 PCT 申請案第 US 07/011435 號中且代表性合成之其他實驗細節闡述於下文中。六氫吡嗪與三苯甲基氯之反應產生三苯甲基六氫吡嗪，其係以琥珀酸鹽形式來分離。在弱鹼 (例如二異丙基乙胺或 DIEA) 存在下與三氟乙酸乙酯之反應提供 1-三氟乙醯基-4-三苯甲基六氫吡嗪，立即使其與 HCl 反應從而以較高產率提供鹽。用存於甲苯中之氧氯化磷來引入二氯磷醯基部分。

使醯氯與嗎啉基亞單元 (moN) (該等嗎啉基亞單元可如美國專利第 5,185,444 號或 Summerton 及 Weller, 1997 (上文所

引用)中所述來製備且進一步闡述於PCT申請案第US 08/012804號中)反應以提供活化亞單元。若需要將適宜保護基團用於核苷鹼基；例如苯甲醯基用於腺嘌呤及胞嘧啶，苯基乙醯基用於鳥嘌呤，且特戊醯基甲基用於肌苷。可將含有(1-哌嗪基)氧伸膦基氧基鍵聯之亞單元納入現有PMO合成方案中，如例如Summerton及Weller (1997)中所述，不進行修改。

實例 1

在鼠類模型系統中抑制流感A病毒

使用流感A病毒感染之鼠類模型來測定感染之代表性反義寡聚體之體內效能。使用流感A亞型H2N3 (Port Chalmers/1/73)經由鼻內投與存於50微升體積中之約 4×10^4 噬菌斑形成單位來感染Balb/c雌性小鼠。研究使用每組12只小鼠，其中在第二天移出六隻以測定病毒效價且在第六天移出六隻以測定病毒效價。次要終點包括防止體重減輕及存活。

以肽偶聯形式(PPMO)及帶正電鍵聯化學物質形式(PMO+™)評估列示於表1及下表6中之三種測試反義寡聚體化合物，即PB1-AUG+15、M1/M2-AUG及NP-v3'(SEQ ID NO: 12、13及30-33)。PPMO係使用與PMO之3'末端偶聯之CP06062肽(SEQ ID NO: 124)來合成。以三種劑量量(10、30及100微克)評估每種測試藥劑以建立劑量依賴性關係。經由鼻內途徑給藥在第0天於感染前4小時開始，且隨後至第4天每日給藥，總計給藥5次。研究之主要終點係肺中以

噬菌斑形成單位/克肺組織量測之病毒效價降低。

表 6.用於 H3N2 鼠類模型中之反義寡聚體

名稱	序列	3'端	SEQ ID NO
NP-v3'	AGC AAA AGC AGI GTA GAT AAT C	CP06062	30
NP-v3'+	AGC AAA AGC AGI G+TA GA+T AA+T C	H	31
M1/M2-AUG	CGG TTA GAA GAC TCA TCT TT	CP06062	12
M1/M2-AUG+ (AVI-7100)	CGG T+TA GAA GAC +TCA TC+T TT	H	13
PB1-AUG+15	CGG ATT GAC ATC CAT TCA AAT G	CP06062	32
PB1-AUG+15+	CGG AT+T GAC A+TC CAT +TCA AAT G	H	33

圖 6 展示在感染後第 6 天對病毒效價之效應。各病毒效價係六個經 PPMO 處理動物及六個經 PMO+™ 處理動物之平均值。靶向 M1/M2-AUG 之化合物 (SEQ ID NO: 12 及 13) 所顯示活性顯著大於所測試其他化合物。來自圖 6 中所示陰性對照登革熱 (Dengue) 治療之病毒效價係使用靶向登革熱病毒之無關 PPMO 及 PMO+™ 序列來獲得。

實例 2

在雪貂模型系統中抑制流感 A 病毒

本發明支持之一觀察係使用新穎 H1N12009 (S-OIV) 病毒證實本發明化合物在飼養之雪貂 (蒙眼貂 (Mustela putorius furo)) 動物模型系統中之抗病毒效能。雪貂模型之優點包括能使用流感病毒之天然人類分離物 (與小鼠適應性株系

相反)及出現在人類中觀察到之大多數臨床體徵(例如發燒及流鼻涕)(Munster, de Wit等人, 2009)。

用2009年得自疾病防治中心(大範圍流行性豬流感)之抗Tamiflu H1N1株系感染六隻雪貂。在第1天經鼻內途徑進行病毒感染(4×10^4 噬菌斑形成單位)並藉由腹膜腔內(ip)注射(PMO+™化合物)或經鼻內(in)(PPMO化合物)給藥。如上文實例1中所述來投與靶向登革熱之陰性對照PMO+™(30 mg/kg腹膜腔內劑量)及PPMO(1.5 mg/kg鼻內劑量)化合物。PMO+™化合物對M1/M2-AUG+ (SEQ ID NO: 13; AVI-7100)之劑量為10及30 mg/kg, 且對在3'端與SEQ ID NO: 124偶聯之M1/M2-AUG PPMO (SEQ ID NO: 12)之劑量為0.5及1.5 mg/kg。在感染前四小時及在第1、3及5天給藥。與反義化合物平行投與Tamiflu(奧司他韋)(10 mg/kg劑量)作為抗病毒陽性對照。亦包括鹽水作為陰性對照。

存活期觀察包括體重增加(圖7A)、噴嚏(圖7B)、流鼻涕(圖7C)及呼吸窘迫(圖7D)。靶向M1/M2-AUG之化合物可防止體重減輕並降低噴嚏、流鼻涕及呼吸窘迫。感染後第1天至第5天之鼻洗劑之病毒效價以曲線下面積(AUC)組織培養感染劑量(TCID)展示於圖7E中。M1/M2-AUG PPMO藥劑顯示相對於鹽水降低2.3 log(降低99.6%)且比Tamiflu多降低1.1 log(多94.4%)。

為進一步評估AVI-7100 (SEQ ID NO: 13)之效能, 在感染非適應性抗奧司他韋H1N1 (SOIV)大範圍流行性流感病毒之雪貂中測試靶向流感M1/M2區段轉譯起始位點之

PMO+。在此研究中使用總計36隻雄性雪貂。在研究開始時具有約700 g匹配體重之雄性雪貂隨機分配至5個治療組中之一組中(展示於下表7中)，且將其飼養在Hepa過濾籠(每籠四隻)中以使籠間病毒傳播降至最低。將各籠維持在Tulane University Medical Center BSL-2實驗室中。

表7.雪貂研究設計

組	藥劑	化學物質	劑量 (mg/kg)	途徑	方案	在第7天 殺死
1	Tamiflu	-	5	經口	-4H、12、24、36、 48、60、72、84、 96、108、120H	8
2	M1/M2	PMO+	30	腹膜 腔內	-4H、1、2、3、4、 5D	8
3	M1/M2	PMO+	10	腹膜 腔內	-4H、1、2、3、4、 5D	8
4	鹽水	-	0.5	鼻內	-4H、1、2、3、4、 5D	6
5	M1/M2及 Tamiflu	PMO+ -	10 5	腹膜 腔內 經口	-4H、1、2、3、4、 5D -4H、12、24、36、 48、60、72、84、 96、108、120H	6
	總計					36

在病毒攻擊前1至4小時用AVI-7100處理雪貂。第2、3及5組之投與途徑係腹膜腔內；且第1組係經口投與。投藥間隔係在病毒攻擊後-4小時、24、48、72、96及120小時。如下所述處理5個組：第1組每12小時藉由經口途徑以5 mg/kg接受奧司他韋，第2組藉由腹膜腔內途徑以10 mg/kg劑量接受AVI-7100(PMO+化合物；5'-CGG T+TA GAA GAC

+TCA TC+T TT-3')，第3組藉由腹膜腔內途徑以30 mg/kg劑量接受AVI-7100(PMO+化合物)，第4組藉由腹膜腔內途徑接受無菌鹽水對照，第5組每日一次藉由腹膜腔內途徑以10 mg/kg接受AVI-7100且每日兩次以5 mg/kg接受奧司他韋。第1-2組(每組8隻雪貂)與第4-5組(每組6隻雪貂)之間之組員數之差異的原因係由於在研究開始時流感A血清陰性雪貂之可用度有限。

此研究中所涉及之所有雪貂在研究結束時(感染後第8天)皆存活，表明該等動物極健康，或此特定病毒在此模型中並不具有極強致病性。然而，如下文所示，該等結果不僅顯示用AVI-7100治療可相對於未治療或經奧司他韋治療之對照顯著降低流感病毒感染之症狀，且亦顯示使用AVI-7100與奧司他韋之組合可達成協同效應。臨床觀察之總結展示於下表8中。

表8：臨床觀察

組	臨床評分	體重變化(g/天)			最高體溫(°F)		
		研究前	研究後	差值	研究前	研究後	差值
Tamiflu	1.17±0.25	15.1±0.4	8.5±3.2	-6.1	104.4	105.7	+1.3
M1-30	1.00±0.00	11.8±0.8	12.6±2.0	+0.8	104.7	104.2	-0.5
M1-10	1.11±0.21	16.6±0.8	10.9±1.5	-5.7	105.4	106.1	+0.7
鹽水	1.19±0.25	14.3±0.6	11.4±2.1	-2.9	105.9	106.2	+0.3
M1+Tamiflu	1.06±0.06	14.4±0.6	14.9±1.0	+0.5	105.0	104.9	-0.1

作為另一指示物，浸潤至上呼吸道中之細胞之觀察結果係感染嚴重度之量度。鼻洗劑中巨噬細胞細胞數之總結展示於下表9中。另外，未治療及僅經奧司他韋治療之雪貂

顯示顯著肺內充血及顯著肺泡炎(肺部炎症)，大量浸潤細胞(包括淋巴細胞及嗜中性粒細胞)，及肺中肺泡壁適度增厚。與之相比，經AVI-7100治療之雪貂(使用或不使用奧司他韋)顯示無肺內充血，僅輕度肺泡炎，及極少量浸潤細胞。

表9.上呼吸道中之巨噬細胞細胞數

組	平均值 ± 標準偏差	第3天峰值
Tamiflu	2.98 ± 2.71	7.91 ± 7.28
M1-30	2.78 ± 2.97	1.59 ± 1.28
M1-10	4.34 ± 3.82	3.88 ± 4.73
鹽水	5.02 ± 3.77	2.41 ± 3.24
M1+Tamiflu	4.27 ± 3.10	0.91 ± 1.25

如下表10中所示，在第1天觀察到鼻洗劑中出現峰值病毒血症。在第2、4、6及7天未收集鼻洗劑以使收集鼻洗劑對病毒感染進展之不良影響降至最低。在AVI-7100治療組中觀察到相對於鹽水或奧司他韋之顯著益處。在使用AVI-7100 (10 mg/kg)與奧司他韋之組合時亦觀察到相對於僅使用AVI-7100 (10 mg/kg)及僅使用奧司他韋治療之協同效應。此處，組合(AVI-7100及奧司他韋)組之鼻洗劑中病毒效價之AUC相對於僅使用tamiflu之組顯示大於4 log之降低且相對於鹽水組顯示大於3 log之降低。組合亦顯示病毒效價之降低遠大於等量單獨AVI-7100(5.515之AUC至2.999之AUC)，表明AVI-7100可增強奧司他韋之抗病毒效應。此結果令人驚訝，此乃因此研究中所用病毒原本可抵抗奧司他韋。

表 10：病毒效價

天	奧司他韋 (n=8)	AVI-7100 30 mg/kg (n=8)	AVI-7100 10 mg/kg (n=8)	鹽水 (n=6)	奧司他韋+AVI- 7100 10 mg/kg (n=6)
1	2.42±0.58	0.57±0.49	1.10±1.11	2.42±0.49	0.82±0.79
3	0.77±0.73	0.81±0.25	1.19±0.80	0.75±0.27	0.69±0.65
5	0.67±0.67	1.13±0.58	0.25±0.38	0.67±0.41	0.13±0.25
8	0.92±0.37	0.44±0.42	0.94±0.82	0.33±0.61	0.31±0.37
AUC	7.015	5.675	5.515	6.090	2.990

實例 3

在組織培養中使用靶向剪接位點之反義寡聚體抑制流感
A 病毒

本發明一態樣係藉由反義靶向 M1/M2 區段內之多個位點來抑制流感 A 病毒複製。除了藉由靶向常見 M1/M2 AUG 起始位點來抑制轉譯外，亦可使用本發明化合物靶向剪接供體及剪接受體位點。兩種靶向 740 位之剪接受體位點之 PMO 係以肽偶聯之 PPMO 形式 (即 SA740 及 SA746，分別為 SEQ ID NO: 26 及 29) 來合成且將其置於 H1N1 株系 PR8 之體外組織培養複製系統中。使 P007 細胞穿透肽 (SEQ ID NO: 118) 與 PMO 之 3' 末端偶聯。

以 0.1 MOI 用 H1N1 (株系 PR8) 感染鼠類肺泡巨噬細胞系 (ATCC; AMJ2-C11) 且在感染後 1 小時添加 PPMO。在 35°C 下將細胞培育過夜。然後取病毒上清液並與 VNAR 蛋白酶一起培育以釋放病毒 RNA。藉由定量實時 PCR (qRT-PCR) 對 HA RNA 進行量化。對細胞進行洗滌、固定及滲透化處理。然後在 37°C 下經 30 min 用單株抗體探測 M1 及 M2 蛋

白。洗滌細胞並在室溫下經15 min添加與Alexa 646偶聯之抗小鼠IgG。然後藉由流式細胞術分析M1及M2。為測定M1及M2蛋白含量，用M1或M2陽性細胞之百分比乘以M1或M2之平均螢光強度。然後用各樣品除以未經處理對照以獲得M1或M2相對於未經處理隨機對照(scramble control)之百分比。

圖8A展示病毒HA RNA含量之降低(使用qRT-PCR來量測)。SA740與SA746二者皆抑制HA RNA產生，表明其可相對於隨機對照抑制病毒複製。在10微莫耳下觀察到最顯著效應，使用SA746降低約2 log且使用SA740降低1 log。圖8B及8C分別展示SA740及SA746對M1及M2蛋白含量之效應。使用上述流式細胞術方法來測定相對蛋白質含量。兩種寡聚體皆抑制M2蛋白之產生而SA740降低M1蛋白含量。

實例4

在組織培養中使用鎖核酸寡聚體抑制流感A病毒

本發明化合物包括由與PMO不同之化學部分組成之寡核苷酸類似物。合成一系列靶向M1/M2區段AUG起始位點區域之鎖核酸(LNA-AUG1、LNA-AUG12、LNA-AUG13及LNA-AUG10；分別為SEQ ID NO: 63、74、75及72)且如上文實例3中所述在相同分析中測試病毒RNA及M2蛋白表現。藉助裸遞送(gymnotic delivery)對LNA寡聚體實施細胞內遞送(Stein, Hansen等人，2010)。經1 h用PR8感染AMJ2-C11細胞且隨後洗滌。然後將細胞平鋪於含有LNA或2'Ome

化合物之96孔板上並在35°C下培育過夜。此時評價病毒RNA含量及M2蛋白表現(總計培育時間為約18小時)。圖9A展示四種不同LNA對病毒RNA含量(HA區段)之效應。在7.5微莫耳下，LNA-AUG1寡聚體使病毒HA RNA含量降低約3-log，與之相比，LNA-AUG12化合物降低約1.5 log(分別為SEQ ID NO: 63及74)。LNA-AUG1係20聚體，而LNA-AUG12係16聚體。有效性根據所有四種LNA寡聚體之長度存在等級次序，顯示較長LNA係本發明之較佳實施例。在圖9B中所示M2蛋白表現之量測中亦觀察到此關係，其中在7.5微莫耳下LNA-AUG1寡聚體相對於LNA-AUG10化合物最有效(分別為SEQ ID NO: 63及72)。相對較短LNA-AUG10化合物係由10鹼基靶向序列組成，其在病毒HA RNA及M2蛋白表現分析中有效性最低。

實例5

在組織培養中使用2'OMe寡聚體抑制流感A病毒

本發明化合物亦包括由經硫代磷酸酯鍵聯連接之2'OMe殘基組成之反義類似物寡聚體。三種2'OMe寡聚體係由IDT製造，即2'OMe-AUG1、2'OMe-AUG2及2'OMe-SA1；分別為SEQ ID NO: 12、20及26。該等寡聚體設計為靶向M1/M2區段之AUG起始密碼子或位於核苷酸740之剪接受體位點。2'OMe-SA1序列(SEQ ID NO: 26)與上文實例3中所述PPMO化合物(SA740)之序列相匹配。如上文實例3及4中所述在相同分析中測試2'OMe化合物抑制病毒HA RNA含量及M2蛋白表現之能力。如上文實例4中針對LNA所述

經由裸遞送來達成細胞內遞送。

所有三種 2'OMe 化合物在 7.5 微莫耳下皆可將病毒 HA RNA 含量有效降低 2.5 至 4.5 log，如圖 10A 中所示。在如圖 10B 中所示之 M2 蛋白量測分析中亦觀察到三種化合物之相對有效性。最有效化合物係 2'OMe-AUG2 24 聚體，其靶向 AUG 起始位點區域 (SEQ ID NO: 20)。有效性類似者係 2'OMe-SA1 寡聚體 (SEQ ID NO: 26)，其靶向下游 M1/M2 剪接受體位點。

實例 6

在體外抑制 M1 及 M2 蛋白表現

使用對經處理受感染 AMJ2-C11 細胞之蛋白質印跡法分析來評估本發明實例性化合物對 M1 及 M2 蛋白表現之效應。使用本發明實例性 PPMO 化合物 (M1/M2 PPMO; P007-M1/M2-AUG; 在 3' 端與 SEQ ID NO: 118 偶聯之 SEQ ID NO: 12) 以 3 微莫耳過夜處理 MDCK 細胞。隨後用 H1N1-PR8 以 0.01 MOI 經 1 小時感染細胞並洗滌。在感染後 18 小時裂解細胞並提取蛋白質。將等量蛋白質載入凝膠中以供藉由標準免疫印跡 (蛋白質印跡) 分析使用可與 M1、M2 及肌動蛋白反應之單株抗體進行後續分析。如圖 11 中所示，M1 及 M2 蛋白二者之表現相對於未處理對照及無關對照 PPMO (登革熱) 有所降低。對信號強度之分析顯示，M1/M2 PPMO 對 M2 蛋白表現之抑制程度大於對 M1 蛋白表現之抑制，如圖 11 中所示 (即將 M2 抑制 9%，而將 M1 抑制 27%)。將 M1 及 M2 之信號對比標準化為肌動蛋白對照。

序列表

靶序列(5'至3')	SEQ ID NO
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU	1
AAGCAGGUAGAUUUUAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAA	2
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUAAAG	3
CUUUAAAUUUCUACCGCUUUUGCU	4
AGCGAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU	5
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU	6
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAGAUGAGCCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUAUGUUCU	7
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU	8
AAAUUUGCAGGCCUACCAGAAACGAAUGGGAGUGCAGAUGCAGCGAUUCA	9
AAAUUUGCAGGCCUACCAGAAGCGAAUGGGAGUGCAGAUGCAGCGAUUCA	10
AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTC TCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCTTTG CAGGGAAGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTC ACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGA CTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAATGCCCTTAATGGGAACGGGGATCCAAATAACATGG ACAAAGCAGTTAACTGTATAGGAAGCTCAAGAGGGAGATAACATTCCATGGGGCCAAAGA AATCTCACTCAGTTATTCTGCTGGTGCACCTGCCAGTTGTATGGGCCTCATATACAACAGG ATGGGGGCTGTGACCACTGAAGTGGCATTGGCCTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTG CTGACTCCCAGCATCGGTCTCATAGGCAAATGGTGACAACAACCAACCCACTAATCAGACA TGAGAACAGAATGGTTTTAGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCG AGTGAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAAATGGTGCAAGCGA TGAGAACCATTGGGACTCATCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAAATGATCTTCTTGAAAA TTTGCAGGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGGTTCAAGTGATCCTCTCGC TATTGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTT TTCAAATGCATTACCGTCGCTTTAAATACGGAAGTGAAGGAGGGCCTTCTACGGAAGGAG TGCCAAAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGA TGGTCATTTTGTGTCAGCATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGTTTCTACT	11

<u>寡聚體靶向序列(5'至3')</u>	
CGGTTAGAAGACTCATCTTT	12
CGGT+TAGAAGAC+TCATC+TTT	13
AGAAGACTCATCTTTCAATA	14
TTAGAAGACTCATCTTTCAA	15
CTCGGTTAGAAGACTCATCT	16
ATCTTTCAATATCTACCTGCTTTTG	17
CTCATCTTTCAATATCTACCTGCTT	18
CTCGGTTAGAAGACTCATCTTTCAA	19
ACCTCGGTTAGAAGACTCATCTTTC	20
TCGACCTCGGTTAGAAGACTCATCT	21
TTTCGACCTCGGTTAGAAGACTCAT	22
AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAA	23
AGCAGGTAGATATTGAAAAATGAGT	24
CTCCCATTCGCTTCTGGTAGGCCT	25
CACTCCCATTCGCTTCTGGTAGGC	26
TGCACTCCCATTCGCTTCTGGTAG	27
TCTGCACTCCCATTCGCTTCTGGT	28
CATCTGCACTCCCATTCGCTTCTG	29
AGCAAAAGCAGIGTAGATAATC	30
AGCAAAAGCAGIG+TAGA+TAA+TC	31
CGGATTGACATCCATTCAAATG	32
CGGAT+TGACA+TCCAT+TCAAATG	33
CTT+TCAA+TATCTACC+TGCTT	34
C+TCA+TCTTTCAA+TATCTACC	35
AC+TCA+TCTTTCAA+TATCTAC	36
GAC+TCA+TCTTTCAA+TATCTA	37
AGAC+TCA+TCTTTCAA+TATCT	38
AAGAC+TCA+TCTTTCAA+TATC	39

GAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TAT	40
AGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TA	41
TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+T	42
T+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA	43
GT+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCA	44
TCGGT+TAGAAGAC+TCA+TCTT	45
CCTCGGT+TAGAAGAC+TCA+TC	46
GACC+TCGGT+TAGAAGAC+TCA	47
PNA靶向序列	
CGGTTAGAAGACTCATCTTT	48
CGGTTAGAAGACTCATCT	49
CGGTTAGAAGACTCAT	50
AGAAGACTCATCTTTCAATA	51
TTAGAAGACTCATCTTTCAA	52
CTCGGTTAGAAGACTCATCT	53
TCAATATCTACCTGCTTTTG	54
CTTTCAATATCTACCTGCTT	55
AGCAAAAGCAGGTAGATATT	56
AGCAGGTAGATATTGAAAAA	57
CATTCGCTTCTGGTAGGCCT	58
CCCATTCGCTTCTGGTAGGC	59
CTCCCATTCGCTTCTGGTAG	60
CACTCCCATTCGCTTCTGGT	61
TGCACTCCCATTCGCTTCTG	62
LNA靶向序列	
CgGtTaGaAgAcTcAtCtTt	63
GaAgAcTcAt	64
GAaGaCtCAT	65
GAAGACTCAT	66

AGAAGACTCA	67
TAGAAGACTC	68
TTAGAAGACT	69
AAGACTCATC	70
AGACTCATCT	71
GACTCATCTT	72
ACTCATCTTT	73
CgGtTaGaAgAcTcAt	74
GtTaGaAgAcTcAt	75
GTTAGAAGACT	76
CATCTTTAAAT	77
CaTcTtTaAaTaTcTaC	78
CGGTTAGAAGACTCAT	79
GGTTAGAAGACTCATC	80
GTTAGAAGACTCATCT	81
TTAGAAGACTCATCTT	82
TAGAAGACTCATCTTT	83
AGAAGACTCATCTTTA	84
GAAGACTCATCTTTAA	85
AAGACTCATCTTTAAA	86
AGACTCATCTTTAAAT	87
GACTCATCTTTAAATA	88
ACTCATCTTTAAATAT	89
CTCATCTTTAAATATC	90
TCATCTTTAAATATCT	91
CATCTTTAAATATCTA	92
ATCTTTAAATATCTAC	93
TCTTTAAATATCTACC	94
CTTTAAATATCTACCA	95
TTTAAATATCTACCAG	96

CgGgTaGaAgAcTcAt	97
GgTtAgAaGaCtCaTc	98
GtTaGaAgAcTcAtCt	99
TtAgAaGaCtCaTcTt	100
TaGaAgAcTcAtCtTt	101
AgAaGaCtCaTcTtTa	102
GaAgAcTcAtCtTtAa	103
AaGaCtCaTcTtTaAa	104
AgAcTcAtCtTtAaAt	105
GaCtCaTcTtTaAaTa	106
AcTcAtCtTtAaAtAt	107
CtCaTcTaTaAaTaTc	108
TcAtCtTtAaAtAtCt	109
CaTcTtTaAaTaTcTa	110
AtCtTtAaAtAtCtAc	111
TcTtTaAaTaTcTaCc	112
CtTtAaAtAtCtAcCa	113
TtTaAaTaTcTaCcAg	114
<u>肽序列</u>	
RRRQRRKKRC	115
RRRRRRRRFFC	116
RRRRFFRRRC	117
RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	118
RRRRRRRC	119
RRRRRRRC	120
RRRRRRRG	121
RRRRRRRG	122
RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxB	123
RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	124

RARRARRARRARFFC	125
RGRRGRRGRRGRFFC	126
RRRRRRRRRFFG	127
RRRRRRRRRFFAhxB	128

【圖式簡單說明】

圖 1A 展示具有磷二鹼胺鍵聯之實例性嗎啉基寡聚體結構；

圖 1B 展示如圖 1A 之嗎啉基寡聚體，但其中骨架鍵聯含有一個呈(哌嗪基)磷二鹼胺鍵聯形式之帶正電基團；

圖 1C 展示本發明一實施例之富精胺酸肽與反義寡聚體之偶聯物；

圖 1D-G 展示命名為 D 至 G 之實例性嗎啉基寡核苷酸之重複亞單元區段；

圖 2 展示呈 PMO+™ 形式之本發明較佳實例性反義化合物之結構(M1/M2-AUG+；SEQ ID NO: 13)。三種(哌嗪基)磷二鹼胺(pip-PDA)鍵聯賦予淨正電荷，因此商標名為 PMO+™；

圖 3 展示受感染細胞中存在之流感病毒 RNA 之三種不同種類，即 vRNA、mRNA 及 vcRNA，以及本文所述靶向 PMO 之靶位置；

圖 4A 展示來自以下重要流感血清型之 M1/M2 區段中 5' 末端之 60 個核苷酸之序列保守性：H1N1、H1N1(S-OIV)、H5N1、H3N2、H9N2 及 H7N7；

圖 4B 展示 M1/M2-AUG 靶 (SEQ ID NO: 12) 之具有所示鹼基之分離物之百分比，該百分比表示為各鹼基後之下標數

字；

圖 5A-5B 展示本發明靶向序列中分別與 AUG 起始密碼子及 vRNA 之 5' 末端相關之位置；

圖 6 在 H3N2 鼠類模型系統中使用本發明 M1/M2-AUG 靶向化合物 (SEQ ID NO: 12 及 13) 來展示病毒效價之劑量依賴性降低；

圖 7A-7D 顯示，在經 2009H1N1 (S-OIV) 大範圍流行性豬流感分離物感染後，經 M1/M2-AUG (SEQ ID NO: 12 及 13) 治療之雪貂之存活期流感臨床體徵降低；

圖 7E 顯示，經 S-OIV 感染且經本發明 M1/M2-AUG 化合物 (SEQ ID NO: 12 及 13) 治療之雪貂對病毒效價產生 2.3 log 之抑制；

圖 8A-C 分別展示靶向剪接受體位點之 PPMO 對病毒 HA RNA、M1 蛋白及 M2 蛋白表現之效應；

圖 9A-B 展示靶向 M1/M2 AUG 起始密碼子之反義 LNA 寡聚體對病毒 HA RNA 及 M2 蛋白表現之效應；

圖 10A-B 展示靶向 M1/M2 AUG 起始密碼子及剪接受體位點之反義 2'OMe 寡聚體對病毒 HA RNA 及 M2 蛋白表現之效應；及

圖 11 展示在感染 H1N1 PR8 之 MDCK 細胞中用靶向 M1/M2 AUG 起始密碼子之 PPMO 處理對 M1 及 M2 蛋白表現之抑制。

序列表

<110> 美商 AVI 生物製藥公司

<120> 反義抗病毒化合物及治療流感病毒感染的方法

<130> 120178.456PC

<140> 099139112

<141> 2010-11-12

<150> 61/261,278

<151> 2009-11-13

<150> 61/292,056

<151> 2010-01-04

<150> 61/377,382

<151> 2010-08-26

<160> 133

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 60

<212> RNA

<213> 流感 A 病毒

<400> 1

agcaaaagca gguagauauu uaaagaugag ucucuaacc gaggucgaaa cguacguucu 60

<210> 2

<211> 45

<212> RNA

<213> 流感 A 病毒

<400> 2
aagcagguag auauuuuaag augagucuuc uaaccgaggu cgaaa 45

<210> 3
<211> 25
<212> RNA
<213> 流感 A 病毒

<400> 3
agcaaaagca gguagauauu uaaag 25

<210> 4
<211> 25
<212> RNA
<213> 流感 A 病毒

<400> 4
cuuuaaaauau cuaccugcuu uugcu 25

<210> 5
<211> 60
<212> RNA
<213> 流感 A 病毒

<400> 5
agcgaaagca gguagauauu gaaagaugag ucuucuaacc gaggucgaaa cguacguucu 60

<210> 6
<211> 60
<212> RNA
<213> 流感 A 病毒

<400> 6
agcaaaagca gguagauauu gaaagaugag ucuucuaacc gaggucgaaa cguacguucu 60

<210> 7

<211> 60

<212> RNA

<213> 流感 A 病毒

<400> 7

agcaaaagca gguagauauu gaaagaugag ccuucuaacc gaggucgaaa cguauguucu 60

<210> 8

<211> 60

<212> RNA

<213> 流感 A 病毒

<400> 8

agcaaaagca gguagauauu gaaagaugag ucuucuaacc gaggucgaaa cguacguucu 60

<210> 9

<211> 51

<212> RNA

<213> 流感 A 病毒

<400> 9

aaauuugcag gccuaccaga aacgaauggg agugcagaug cagcgauuca a 51

<210> 10

<211> 51

<212> RNA

<213> 流感 A 病毒

<400> 10

aaauuugcag gccuaccaga agcgaauggg agugcagaug cagcgauuca a 51

<210> 11

<211> 1027

<212> DNA

<213> 流感 A 病毒

<400> 11

agcgaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgttct 60

ctctatcatc ccgtcaggcc ccttcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt 120
tgcaggggaag aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct 180
gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctaccgtgc ccagtgagcg 240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa 300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc 360
caaagaaatc tcactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata 420
caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatittggc ctggtatgtg caacctgtga 480
acagattgct gactcccagc atcggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaaccact 540
aatcagacat gagaacagaa tggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat 600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctaggcaaat 660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga 720
tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa 780
gtgatcctct cgctattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgata ttgtggattc 840
ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc 900
cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg 960
ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt 1020
ttctact 1027

- <210> 12
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> PMO 反義靶向序列

<400> 12
cggttagaag actcatcttt 20

- <210> 13
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> PMO 反義靶向序列

- <220>
- <221> misc_feature

<222> (4)...(5)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)...(13)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)...(18)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 13
cggttagaag actcatcttt 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<400> 14
agaagactca tctttcaata 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<400> 15
ttagaagact catctttcaa 20

<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PMO 反義靶向序列	
<400> 16	
ctcggttaga agactcatct	20
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PMO 反義靶向序列	
<400> 17	
atctttcaat atctacctgc ttttg	25
<210> 18	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PMO 反義靶向序列	
<400> 18	
ctcatctttc aatatctacc tgctt	25
<210> 19	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223> PMO 反義靶向序列		
<400> 19		
ctcggttaga agactcatct ttcaa		25
<210> 20		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PMO 反義靶向序列		
<400> 20		
acctcggtta gaagactcat ctttc		25
<210> 21		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PMO 反義靶向序列		
<400> 21		
tcgacctcgg ttagaagact catct		25
<210> 22		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PMO 反義靶向序列		
<400> 22		
tttcgacctc ggtagaaga ctcac		25

<210> 23	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PMO 反義靶向序列	
<400> 23	
agcaaaagca ggtagatatt gaaaa	25
<210> 24	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PMO 反義靶向序列	
<400> 24	
agcaggtaga tattgaaaaa tgagt	25
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PMO 反義靶向序列	
<400> 25	
ctcccatcgc cttctggtag gcct	24
<210> 26	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<400> 26
cactccatt cgcttctggt aggc 24

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<400> 27
tgcactcca ttcgcttctg gtag 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<400> 28
tctgcactcc cattcgcttc tggt 24

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<400> 29
catctgcact cccattcgct tctg 24

<210> 30
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PMO 反義靶向序列

<220>
 <221> modified_base
 <222> 12
 <223> I

<400> 30
 agcaaaagca gngtagataa tc

22

<210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PMO 反義靶向序列

<220>
 <221> modified_base
 <222> 12
 <223> I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)...(4)
 <223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)...(18)
 <223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)...(21)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 31
agcaaaagca gngtagataa tc 22

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<400> 32
cggattgaca tccattcaaa tg 22

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)...(6)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)...(11)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature

<222> (15)...(16)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 33
cggattgaca tccattcaaa tg 22

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)...(4)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)...(8)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)...(16)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 34
ctttcaatat ctacctgctt 20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)...(5)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)...(13)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 35
ctcatctttc aatatctacc 20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)...(3)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)...(6)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature

<222> (13)...(14)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 36
actcatcttt caatatctac 20

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)...(4)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(7)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)...(15)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 37
gactcatctt tcaatatcta 20

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)...(5)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)...(8)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)...(16)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 38
agactcatct ttcaatatct 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)...(6)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)...(8)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature

<222> (16)...(17)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 39
aagactcatc tttcaatatc 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(7)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)...(10)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)...(18)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 40
gaagactcat ctttcaatat 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)...(8)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)...(11)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)...(19)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 41
agaagactca tctttcaata 20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)...(9)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)...(12)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature

<222> (19)...(20)	
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯	
<400> 42	
tagaagactc atctttcaat	20
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PMO 反義靶向序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)...(2)	
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (9)...(10)	
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (12)...(13)	
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯	
<400> 43	
ttagaagact catctttcaa	20
<210> 44	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PMO 反義靶向序列	

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)...(3)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)...(11)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)...(14)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 44
gttagaagac tcatctttca 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)...(6)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)...(14)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature

<222> (16)...(17)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 45
tcggttagaa gactcatctt 20

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)...(8)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)...(16)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)...(19)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 46
cctcggttag aagactcatc 20

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PMO 反義靶向序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)...(5)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)...(10)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)...(18)
<223> 鹼基之間之陽離子型鍵聯

<400> 47
gacctcggtt agaagactca 20

<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PNA 反義靶向序列

<400> 48
cggttagaag actcatcttt 20

<210> 49
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PNA 反義靶向序列

<400> 49 cggttagaag actcatct	18
<210> 50 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PNA 反義靶向序列	
<400> 50 cggttagaag actcat	16
<210> 51 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PNA 反義靶向序列	
<400> 51 agaagactca tctttcaata	20
<210> 52 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PNA 反義靶向序列	
<400> 52 ttagaagact catctttcaa	20
<210> 53 <211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PNA 反義靶向序列	
<400> 53	
ctcggttaga agactcatct	20
<210> 54	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PNA 反義靶向序列	
<400> 54	
tcaatatcta cctgcttttg	20
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PNA 反義靶向序列	
<400> 55	
ctttcaatat ctacctgctt	20
<210> 56	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PNA 反義靶向序列	

<400> 56 agcaaaagca ggtagatatt	20
<210> 57 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PNA 反義靶向序列	
<400> 57 agcaggtaga tattgaaaaa	20
<210> 58 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PNA 反義靶向序列	
<400> 58 cattcgcttc tggtaggcct	20
<210> 59 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PNA 反義靶向序列	
<400> 59 cccattcgct tctggtaggc	20
<210> 60 <211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PNA 反義靶向序列	
<400> 60	
ctcccatcgc cttctggtag	20
<210> 61	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PNA 反義靶向序列	
<400> 61	
cactcccatc cgcttctggt	20
<210> 62	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PNA 反義靶向序列	
<400> 62	
tgcactccca ttcgcttctg	20
<210> 63	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	

<400> 63 cggttagaag actcatcttt	20
<210> 64 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LNA 反義靶向序列	
<400> 64 gaagactcat	10
<210> 65 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LNA 反義靶向序列	
<400> 65 gaagactcat	10
<210> 66 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LNA 反義靶向序列	
<400> 66 gaagactcat	10
<210> 67 <211> 10	

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 67
agaagactca 10

<210> 68
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 68
tagaagactc 10

<210> 69
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 69
ttagaagact 10

<210> 70
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 70 aagactcatc	10
<210> 71 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LNA 反義靶向序列	
<400> 71 agactcatct	10
<210> 72 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LNA 反義靶向序列	
<400> 72 gactcatctt	10
<210> 73 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LNA 反義靶向序列	
<400> 73 actcatcttt	10
<210> 74 <211> 16	

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 74
cggttagaag actcat 16

<210> 75
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 75
gttagaagac tcat 14

<210> 76
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 76
gttagaagac t 11

<210> 77
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 77	
catctttaaa t	11
<210> 78	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 78	
catctttaaa tatctac	17
<210> 79	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 79	
cggttagaag actcat	16
<210> 80	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 80	
ggttagaaga ctcac	16
<210> 81	
<211> 16	

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 81
g t t a g a a g a c t c a t c t 16

<210> 82
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 82
t t a g a a g a c t c a t c t t 16

<210> 83
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 83
t a g a a g a c t c a t c t t t 16

<210> 84
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 84	
agaagactca tcttta	16
<210> 85	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 85	
gaagactcat ctttaa	16
<210> 86	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 86	
aagactcatc tttaaa	16
<210> 87	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 87	
agactcatct ttaaat	16
<210> 88	
<211> 16	

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 88
gactcatctt taaata 16

<210> 89
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 89
actcatcttt aaatat 16

<210> 90
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 90
ctcatcttta aatatc 16

<210> 91
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 91 tcaccttttaa atatct	16
<210> 92 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LNA 反義靶向序列	
<400> 92 catcttttaaa tatcta	16
<210> 93 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LNA 反義靶向序列	
<400> 93 atcttttaa atctac	16
<210> 94 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LNA 反義靶向序列	
<400> 94 tcctttaaata tctacc	16
<210> 95 <211> 16	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 95	
ctttaaatat ctacca	16
<210> 96	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 96	
tttaaataatc taccag	16
<210> 97	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 97	
cgggtagaag actcat	16
<210> 98	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	

<400> 98	
ggttagaaga ctcac	16
<210> 99	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 99	
gttagaagac tcac	16
<210> 100	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 100	
ttagaagact catc	16
<210> 101	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 101	
tagaagactc atctt	16
<210> 102	
<211> 16	

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 102
agaagactca tcttta 16

<210> 103
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 103
gaagactcat ctttaa 16

<210> 104
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 104
aagactcatc tttaaa 16

<210> 105
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 105	
agactcatct ttaa	16
<210> 106	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 106	
gactcatctt taaata	16
<210> 107	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 107	
actcatcttt aaatat	16
<210> 108	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LNA 反義靶向序列	
<400> 108	
ctcatctata aatatc	16
<210> 109	
<211> 16	

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 109
tcatcttttaa atatct 16

<210> 110
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 110
catctttaaa tatcta 16

<210> 111
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

<400> 111
atctttaaat atctac 16

<210> 112
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LNA 反義靶向序列

16

<213> 人工序列

<223> LNA 反義靶向序列

16

<213> 人工序列

<223> LNA 反義靶向序列

16

<213> 人工序列

<223> 富精胺酸細胞穿透肽

10

<210> 116
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<400> 116
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys
1 5 10 12

<210> 117
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<400> 117
Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg Cys
1 5 10

<210> 118
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 5, 8, 11, 13
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
<222> 14
<223> bAla

<400> 118
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<400> 119
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys
1 5

<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<400> 120
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys
1 5 10

<210> 121
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<400> 121
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 122
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<400> 122
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 123
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 5, 8, 11, 14, 16
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES

<222> 17
<223> bAla

<400> 123
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Xaa

<210> 124
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 8, 13
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
<222> 5, 11, 14
<223> bAla

<400> 124
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 125
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<400> 125
Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Phe Phe Cys
1 5 10 15

<210> 126
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<400> 126
Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Phe Phe Cys
1 5 10 15

<210> 127
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<400> 127
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Gly
1 5 10

<210> 128
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 富精胺酸細胞穿透肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> 12

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 13

<223> bAla

<400> 128

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Xaa Xaa

1

5

10

<210> 129

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽基序

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 3, 4, 7, 9, 10

<223> Xaa = 離胺酸、精胺酸或精胺酸類似物

<220>

<221> VARIANT

<222> 2, 8

<223> Xaa = 中性胺基酸、-C(O)-(CHR)_n-NH-，其中 n 為 2 至 7 且 R 為 H 或甲基。

<220>

<221> VARIANT

<222> 5, 6, 11, 12
<223> Xaa = 具有中性芳烷基側鏈之 α -胺基酸

<400> 129
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 細胞穿透肽基序

<220>
<221> VARIANT
<222> 2, 6, 8,12
<223> Xaa = 中性胺基酸、-C(O)-(CHR)_n-NH-，其中 n 為 2 至 7 且 R 為 H 或甲基。較佳為 Acp

<400> 130
Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa
1 5 10

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 細胞穿透肽基序

<220>
<221> VARIANT
<222> 3, 5, 9

<223> Xaa = 中性胺基酸、-C(O)-(CHR)_n-NH-，其中 n 為 2 至 7 且 R 為 H 或甲基。較佳為 Acp

<400> 131
Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa
1 5

<210> 132
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽基序

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 5, 8, 11
<223> Acp

<400> 132
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10

<210> 133
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富精胺酸細胞穿透肽基序

<220>
<221> MOD_RES
<222> 3, 6, 9, 12
<223> Acp

<400> 133

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa

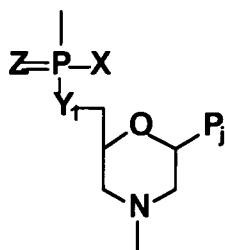
1

5

10

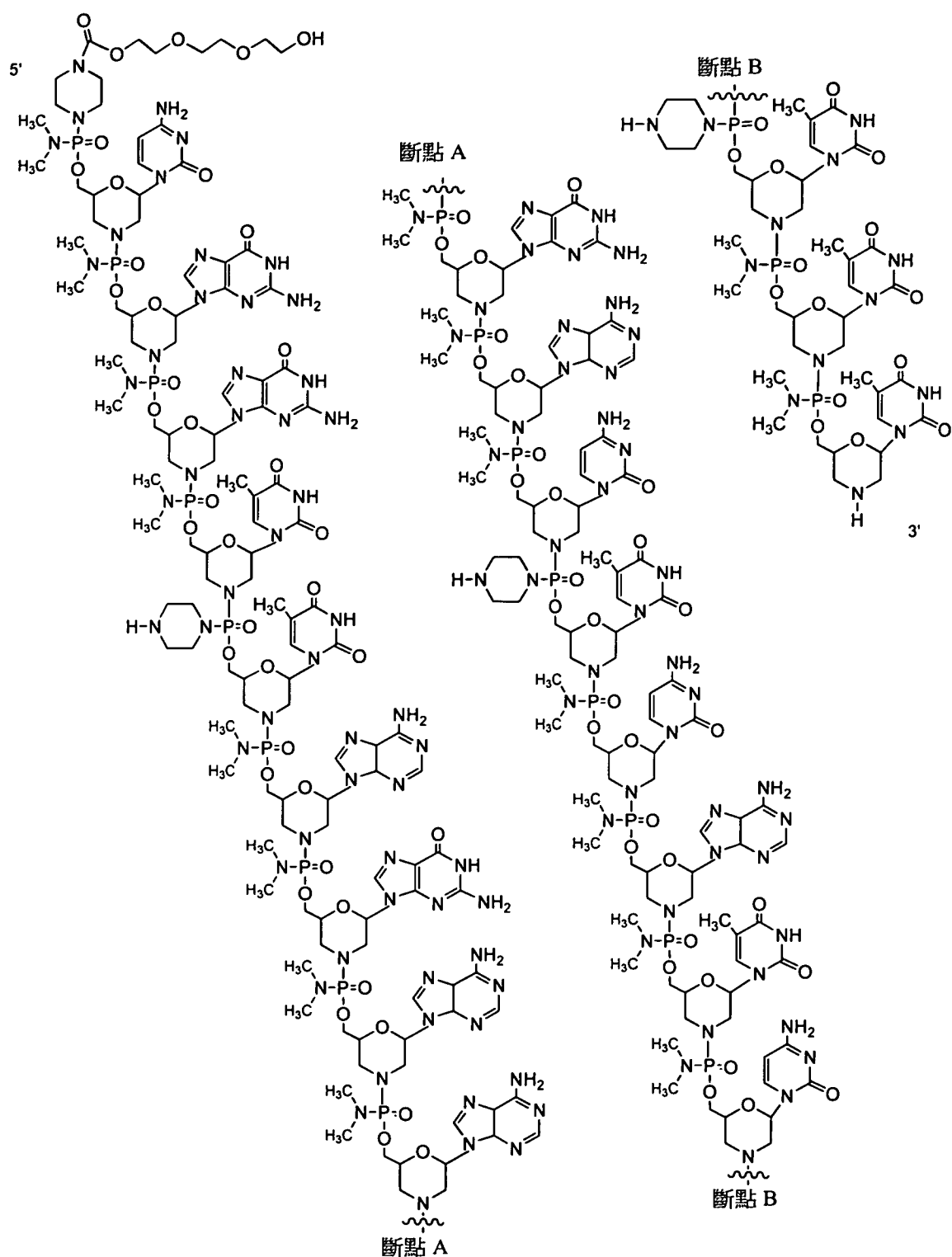
七、申請專利範圍：

1. 一種經分離之抗病毒反義寡核苷酸，其包含
 - a) 抗核酸酶骨架；
 - b) 20-40個核苷酸鹼基，及
 - c) 靶向序列，其與流感病毒 M1 或 M2 mRNA 之 AUG 起始密碼子周圍之 45 個鹼基之靶區域雜交，
其中該寡核苷酸：
 - (i) 為嗎啉基寡核苷酸，其包含由 SEQ ID NO:12 及 13 所組成之靶向序列，
 - (ii) 包含一或多個鎖核酸(LNA)亞單元及包含由 SEQ ID NO:63 所組成之靶向序列，
 - (iii) 係肽核酸(PNA)，其包含由 SEQ ID NO:48 所組成之靶向序列，或
 - (iv) 包含 2'-OMe 殘基及包含由 SEQ ID NO:12 所組成之靶向序列。
2. 如請求項 1 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸之特徵在於能與該病毒靶區域形成異源雙鏈體(heteroduplex)結構，其中該異源雙鏈體結構係：
 - a) 由該病毒之正義鏈與該寡核苷酸組成，且
 - b) 特徵在於解離 T_m 為至少 45°C。
3. 如請求項 1 或 2 之寡核苷酸，其中該等嗎啉基亞單元係由具有以下結構之含磷鍵聯連接：



其中 $Y_1=O$ ， $Z=O$ ， P_j 係嘌呤或嘧啶鹼基配對部分，可由鹼基特異性氫鍵有效結合多核苷酸中之鹼基，且 X 係烷基、烷氧基、硫烷氧基、烷基胺基、二烷基胺基或1-六氫吡嗪。

4. 如請求項3之寡核苷酸，其中該二烷基胺基之各烷基係選自 C_1 - C_6 烷基。
5. 如請求項3之寡核苷酸，其中 X 係1-六氫吡嗪，其代表至少2個且不超過總數一半之含磷鍵聯，且其中其餘之鍵聯係 $X=NR_2$ ，其中各 R 獨立地為氫或甲基。
6. 如請求項5之寡核苷酸，其中該嗎啉基寡核苷酸包含SEQ ID NO: 13之靶向序列，且具有三個含磷鍵聯，其中 X 係如SEQ ID NO: 13中之(+)所示之1-六氫吡嗪。
7. 如請求項1之寡核苷酸，其係由以下結構組成：



8. 如請求項1、2及7中任一項之寡核苷酸，其中該病毒靶區域包含SEQ ID NO: 1、2及5至8中之任一或多者。
9. 如請求項1之寡核苷酸，其中該寡核苷酸係肽核酸(PNA)，其包含基本上由SEQ ID NO: 48所組成之靶向序列。

10. 如請求項1之寡核苷酸，其包含一或多個LNA亞單元且包含基本上由SEQ ID NO: 63所組成之靶向序列。
11. 如請求項1、2、7、9及10中任一項之寡核苷酸，其中該寡核苷酸與可增強宿主細胞攝取該化合物之富精胺酸多肽偶聯(conjugated)。
12. 如請求項11之寡核苷酸，其中該富精胺酸多肽選自由SEQ ID NO: 115-128組成之群。
13. 一種如請求項1至12中任一項之抗病毒反義寡核苷酸之用途，其係用於製造降低流感病毒於流感病毒感染之細胞中複製之藥物。
14. 如請求項13之用途，其中該細胞係於個體中，且該藥物係投與該個體。
15. 如請求項14之用途，其中該個體患有繼發性細菌感染，該藥物係分開地或同時地與細菌抗生素組合投與。
16. 如請求項15之用途，其中該繼發性細菌感染係鏈球菌性肺炎感染。
17. 如請求項15之用途，其中該抗生素係 β -內醯胺。
18. 如請求項15之用途，其中該抗生素選自青黴素(penicillin)、阿莫西林(amoxicillin)、頭孢菌素(cephalosporins)、氯黴素(chloramphenicol)及克林黴素(clindamycin)。
19. 如請求項14至18中任一項之用途，其中該藥物係分開地或同時地與靶向編碼CD200或該CD200受體之RNA分子之反義寡核苷酸組合投與。

20. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至12中任一項之反義寡核苷酸及醫藥上可接受之載劑。
21. 如請求項20之醫藥組合物，其另外包含細菌抗生素。
22. 如請求項20之醫藥組合物，其另外包含靶向編碼CD200或該CD200受體之RNA分子之反義寡核苷酸。

八、圖式：

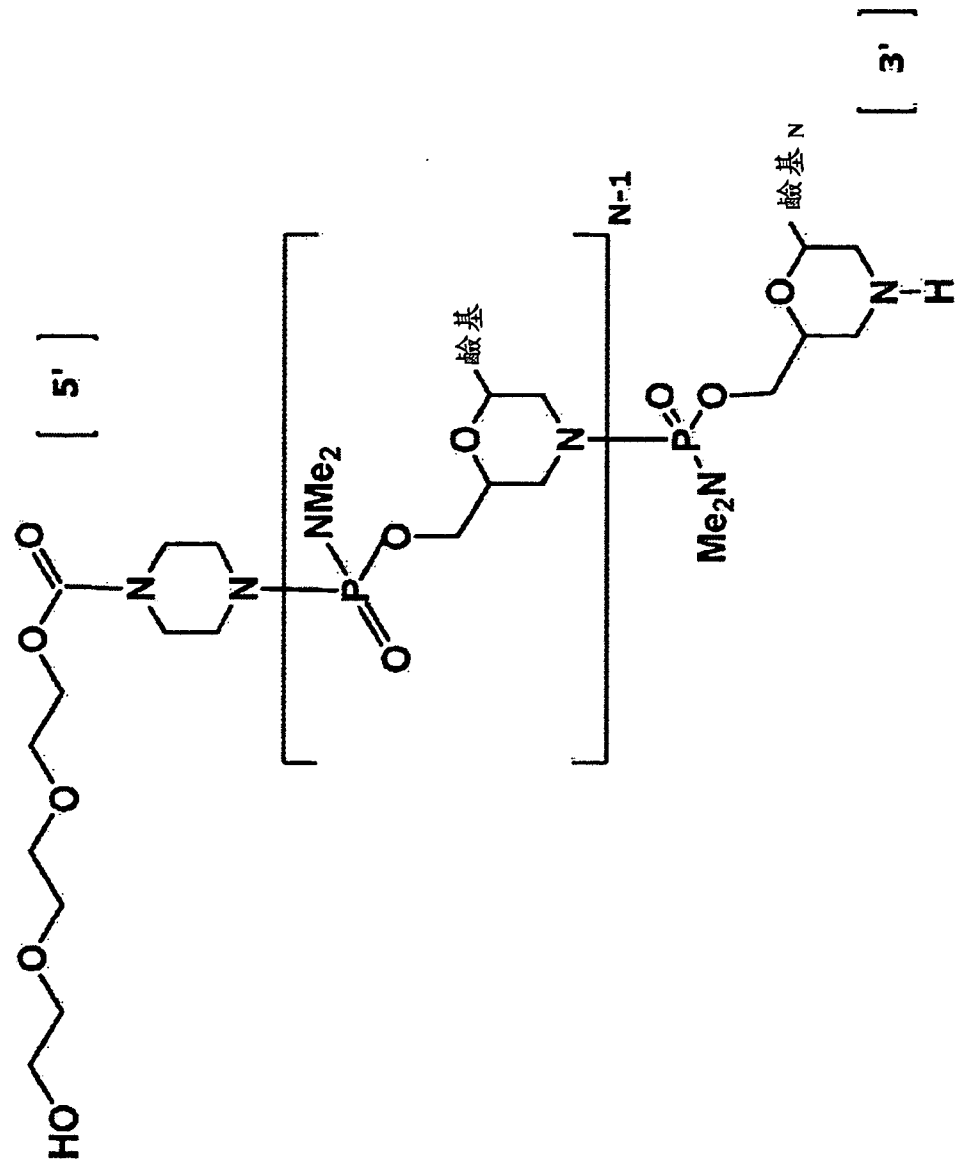
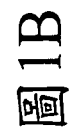


圖1A



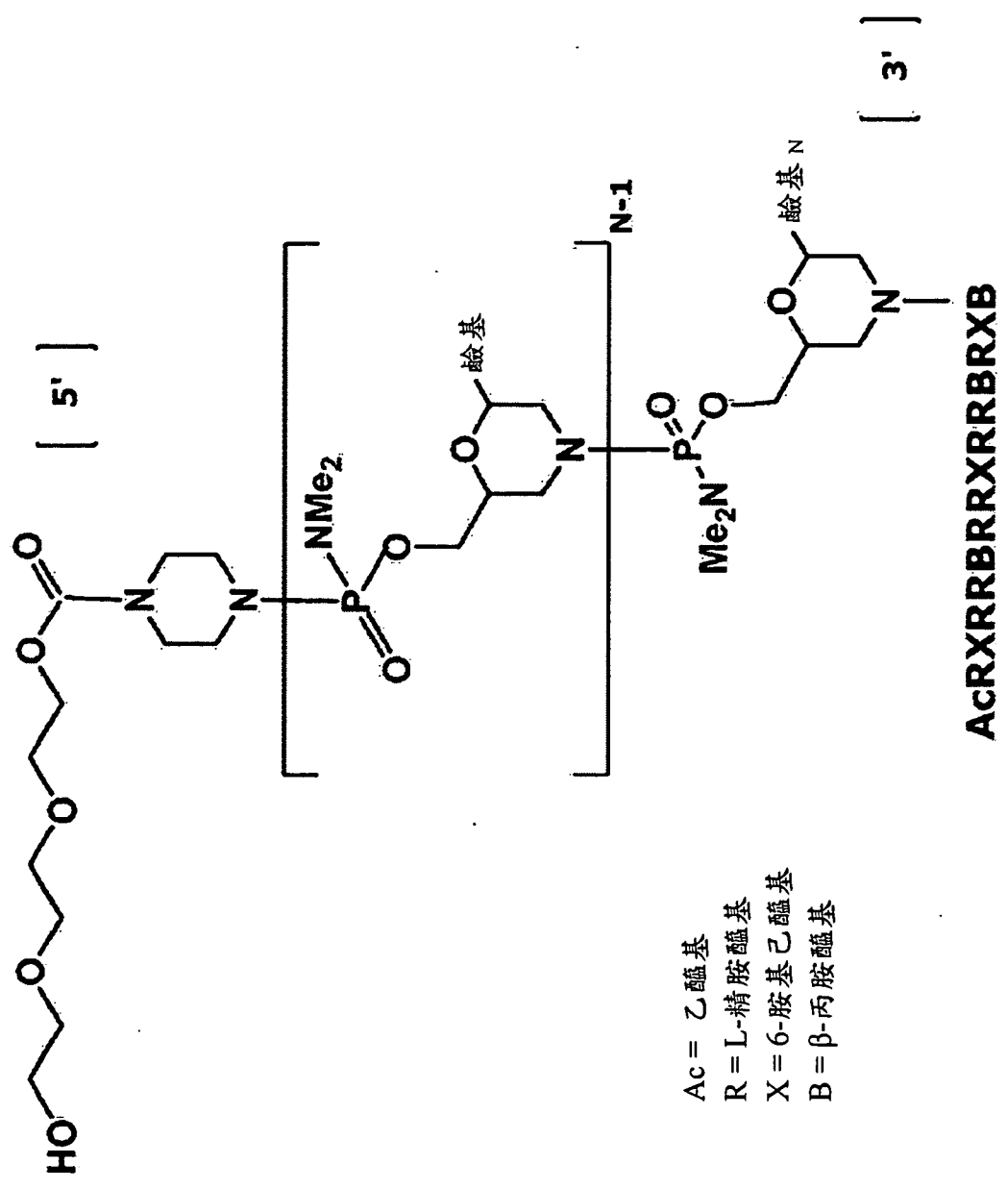


圖 1C

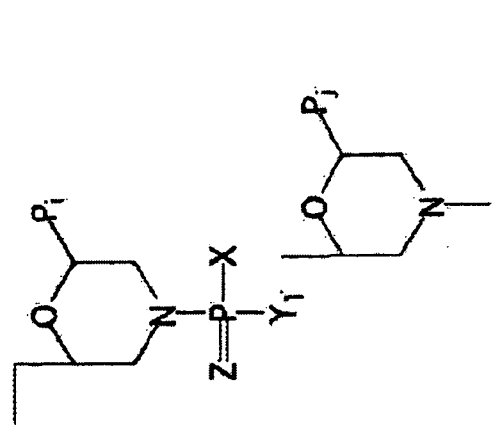


圖 1E

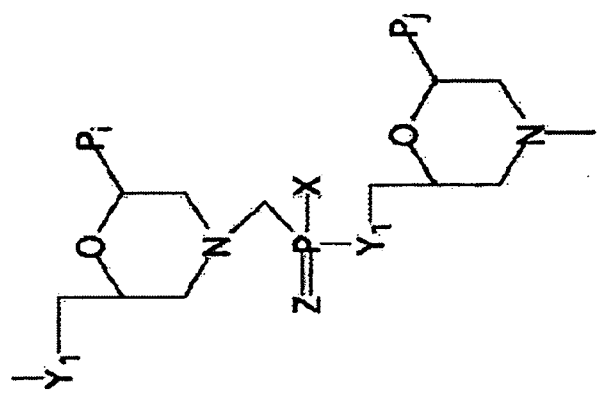


圖 1G

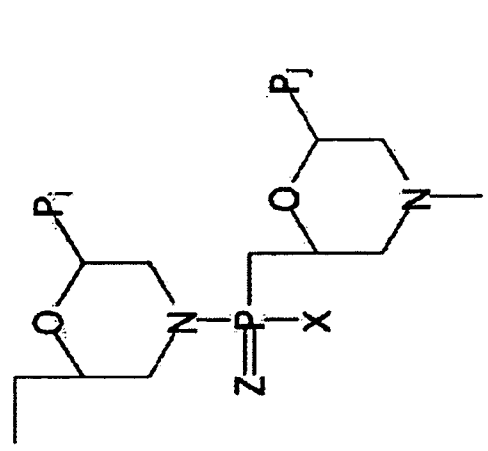


圖 1D

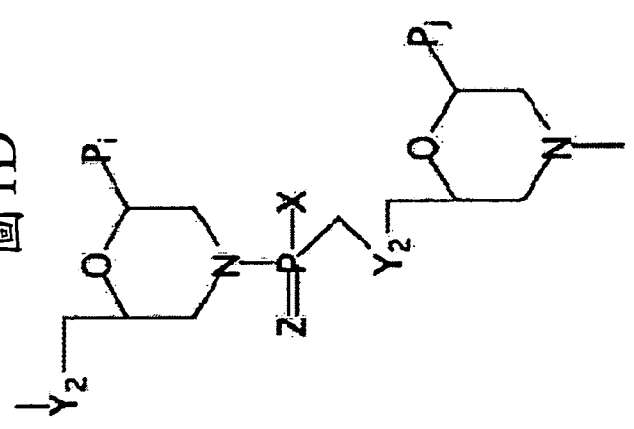


圖 1F

M1/M/-AUG+

SEQ ID NO:13

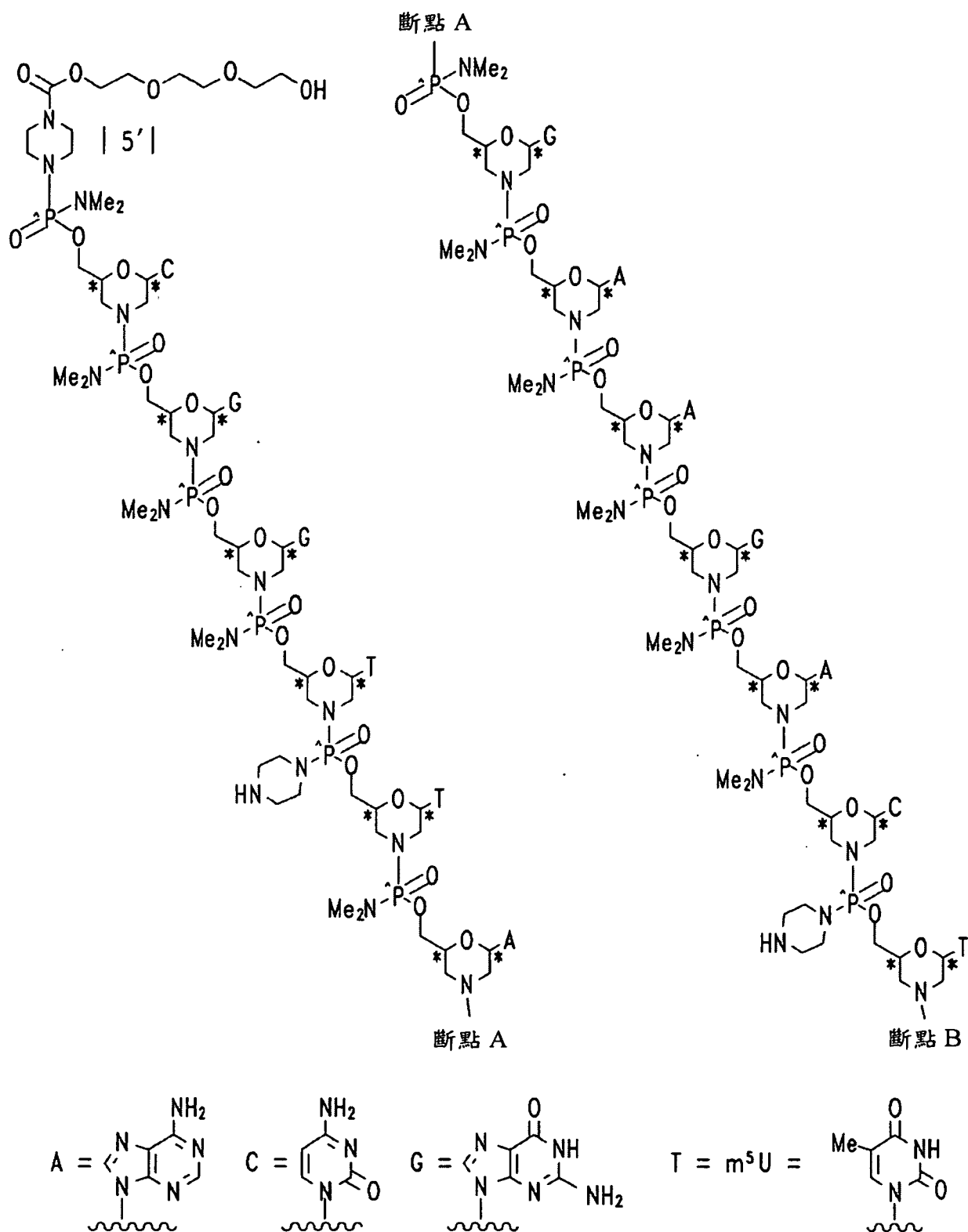


圖2

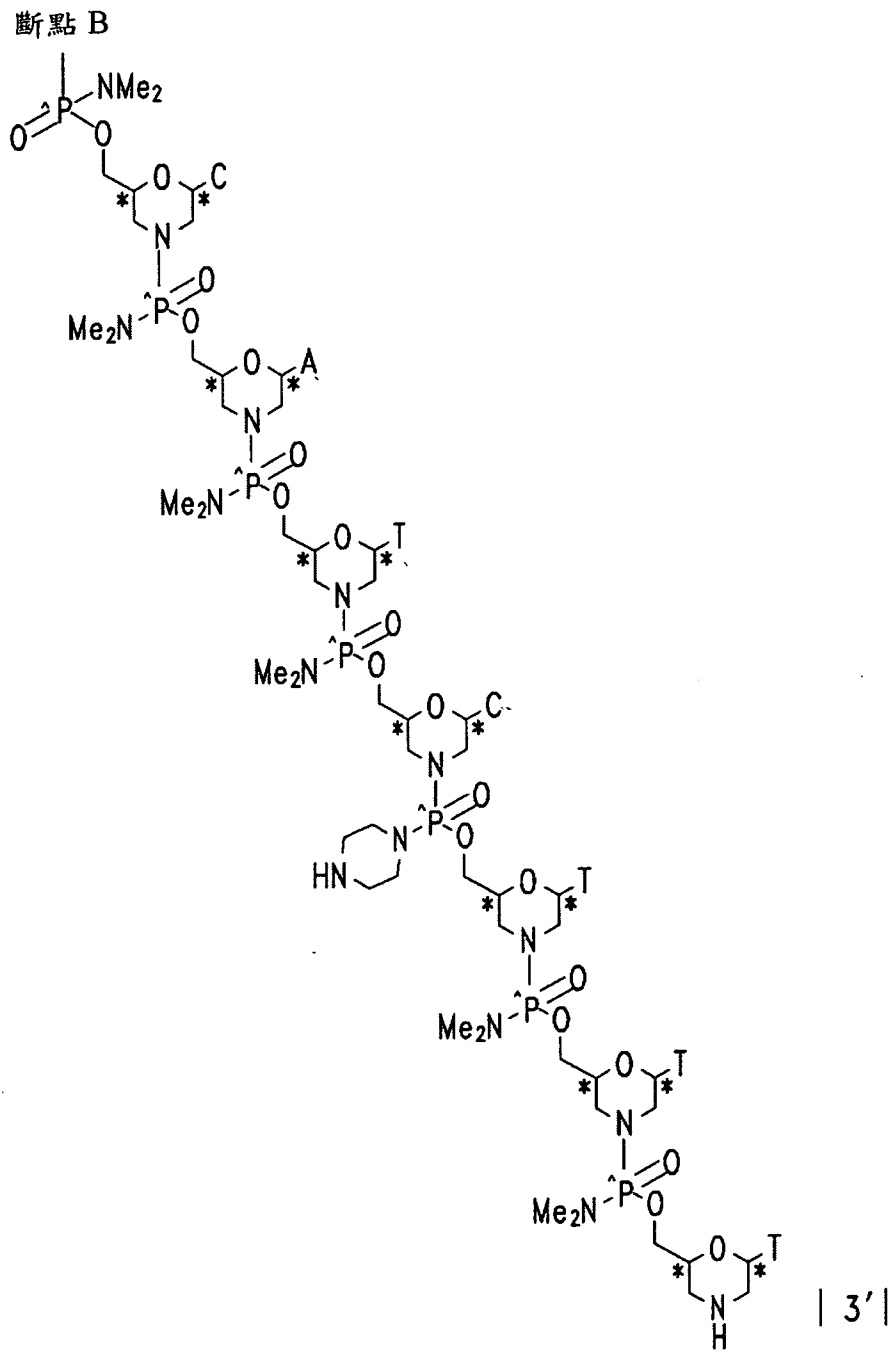


圖2 (續)

流感 RNA 複製及靶向 PMO

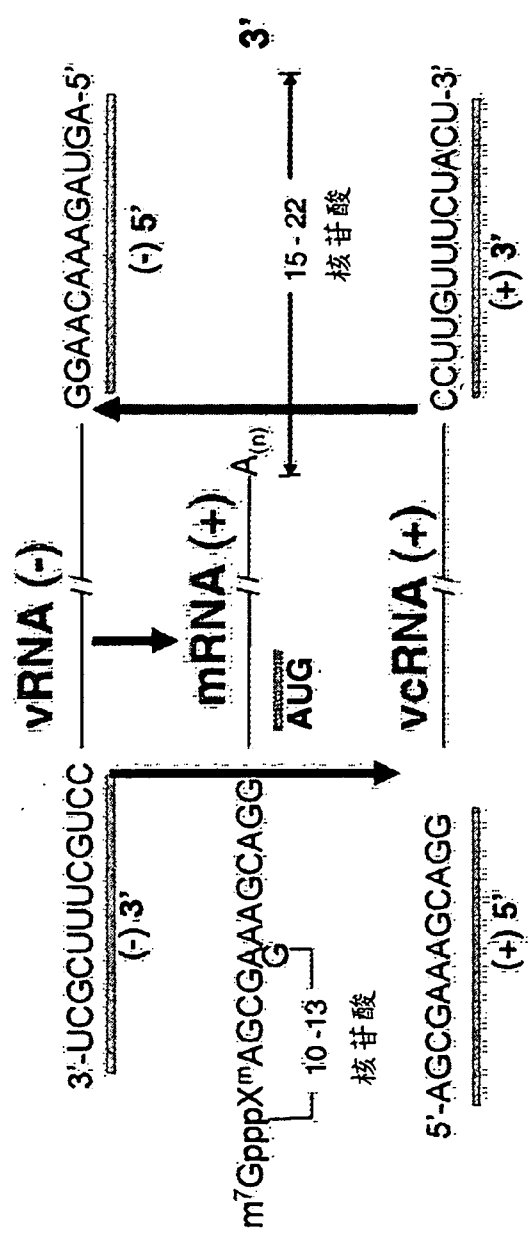
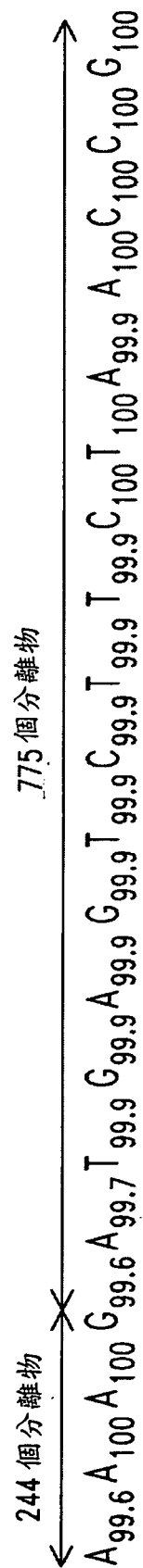


圖 3



H1N1-845 個來自人類之序列
H1N1-(S-OIV)-775 個來自人類之序列
H5N1-947 個來自所有物種之序列
H3N2-835 個來自北美人類之序列
H9N2-348 個來自所有物種之序列
H2N2-107 個來自所有物種之序列
H7N7-35 個來自所有物種之序列

圖 4A



專利序列-AUG 靶

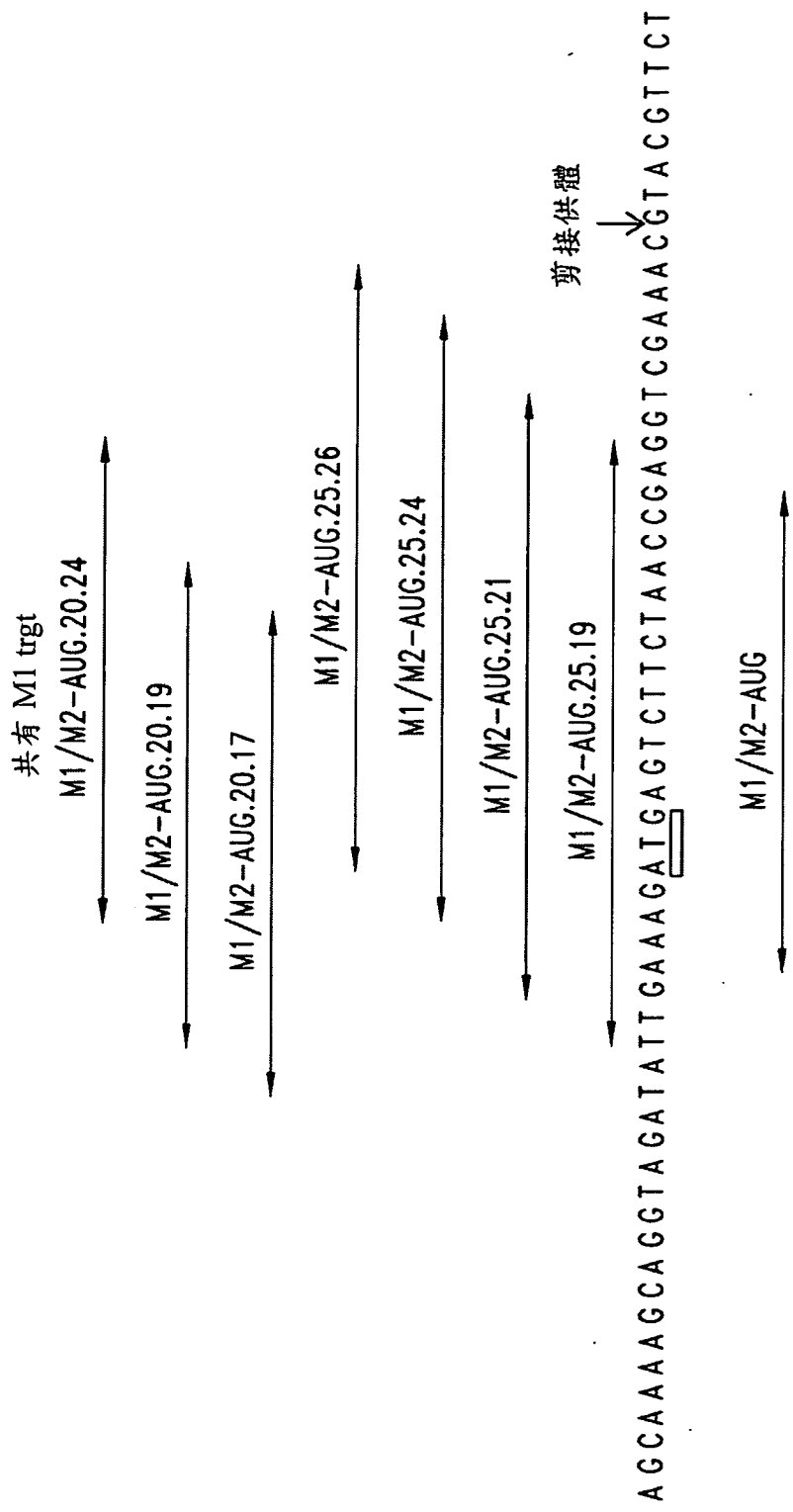


圖5A

專利序列-末端靶

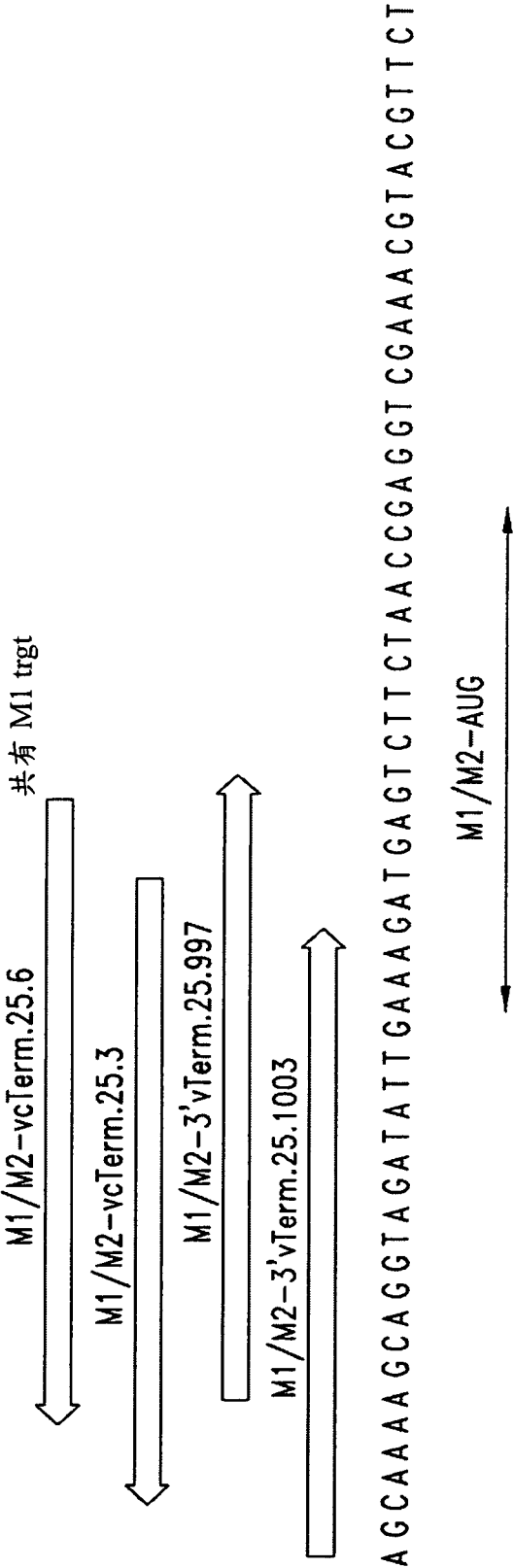


圖 5B

M1/M2 病毒效價之劑量依賴性降低

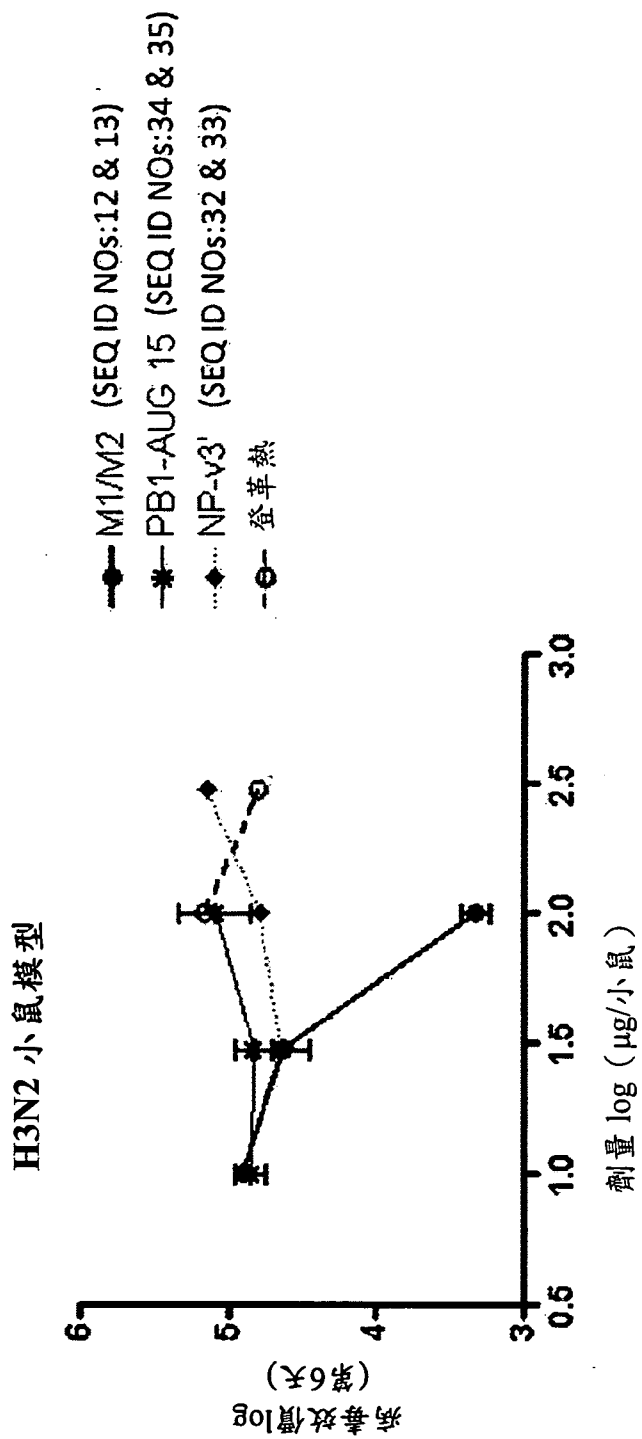


圖6

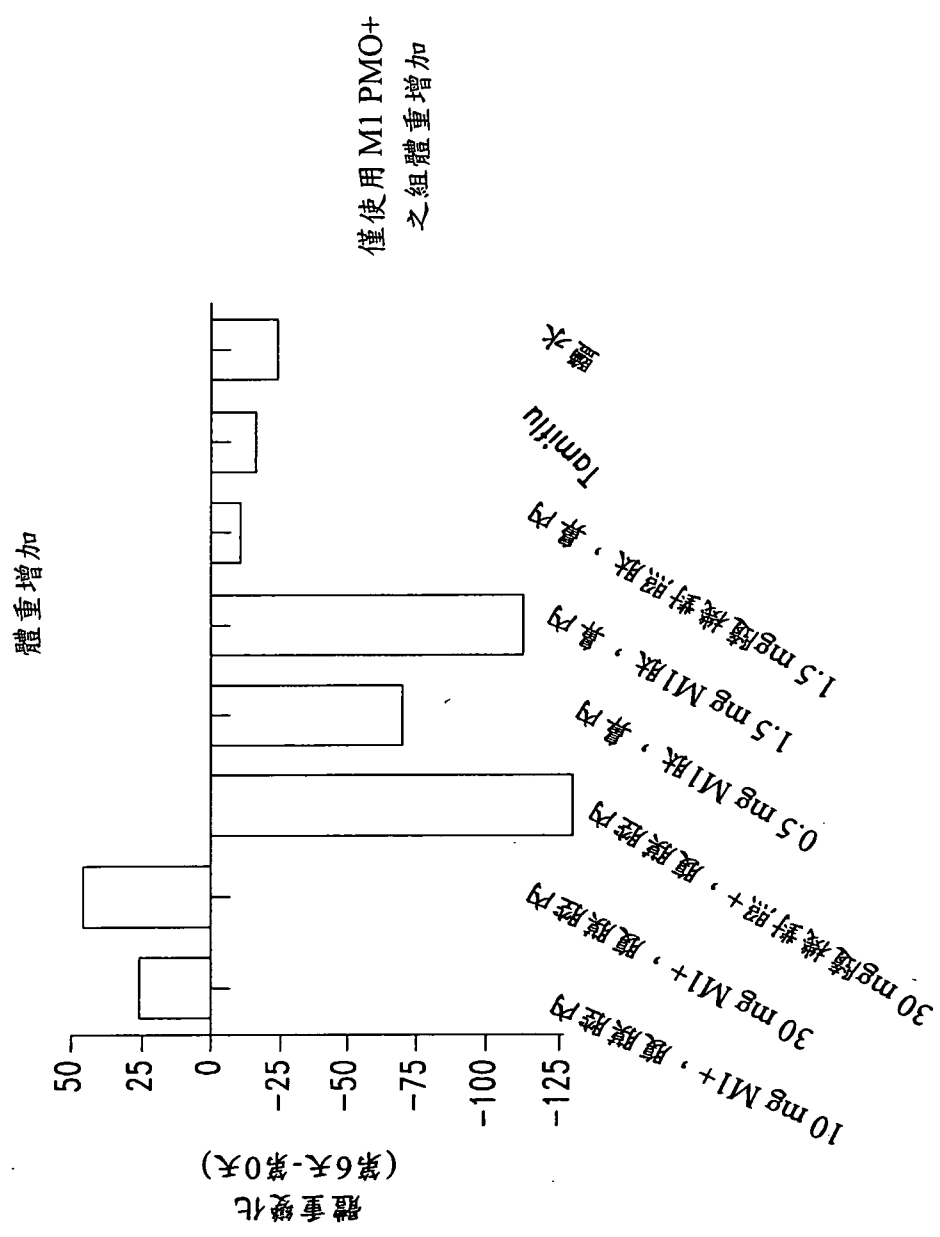


圖7A

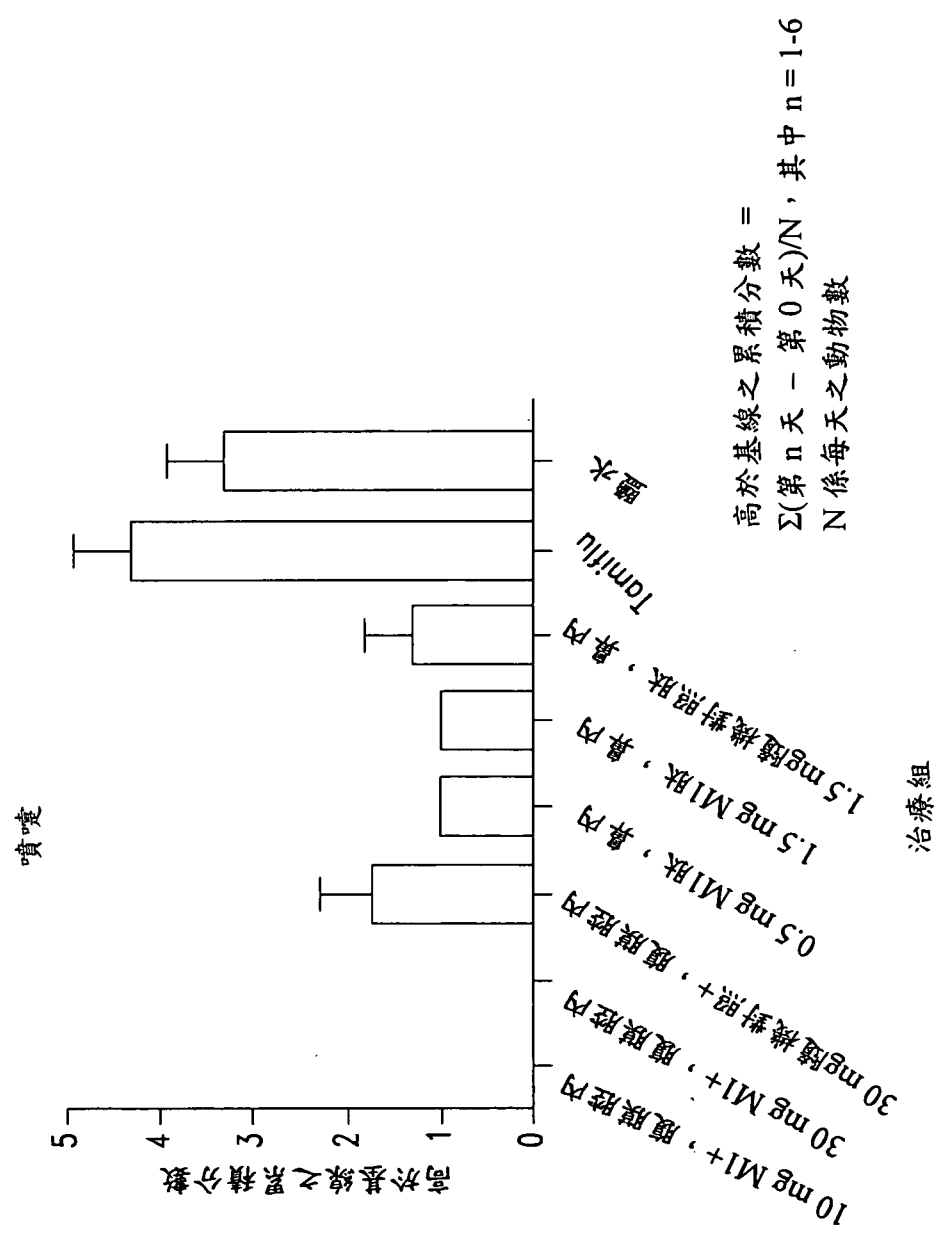


圖7B

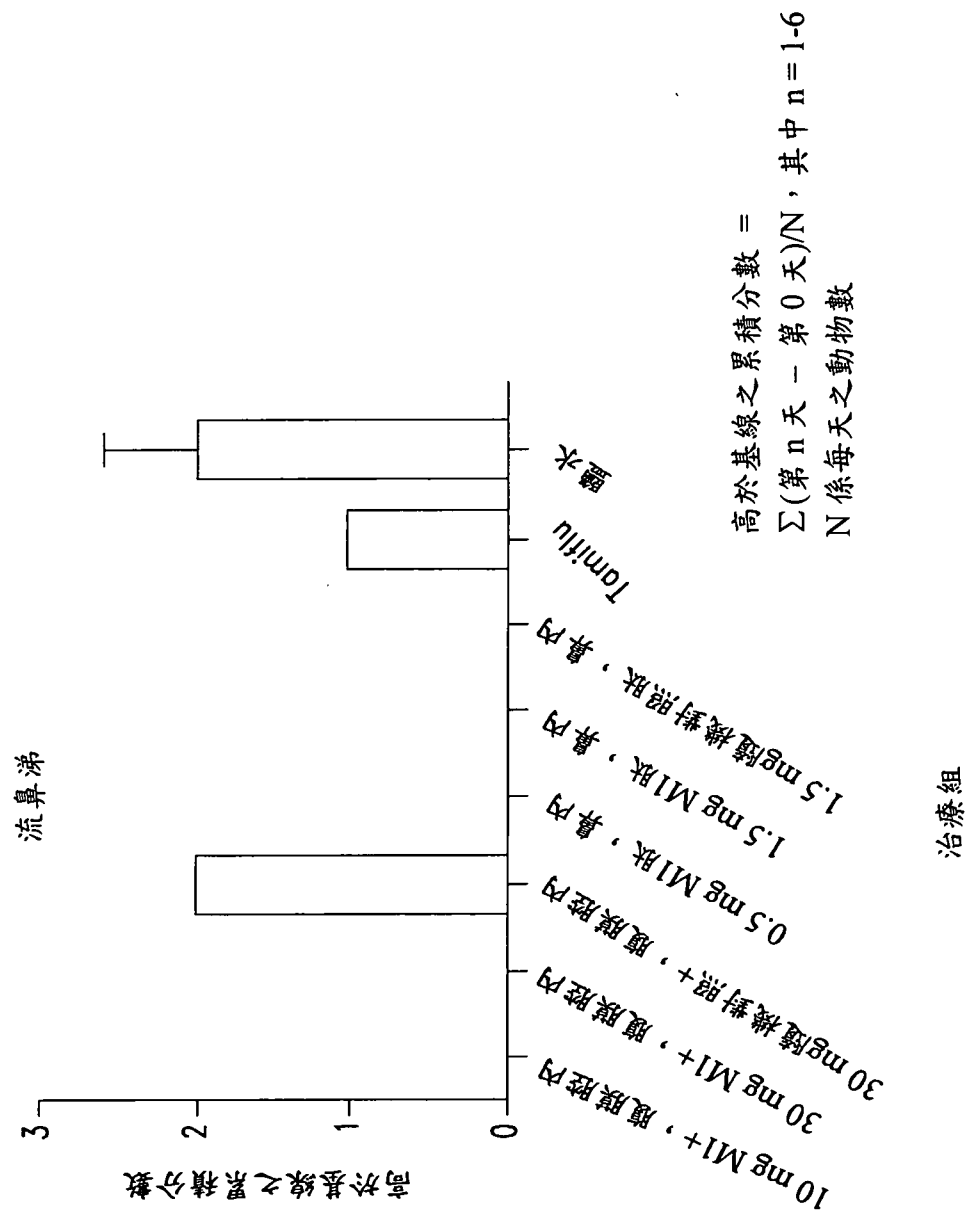


圖7C

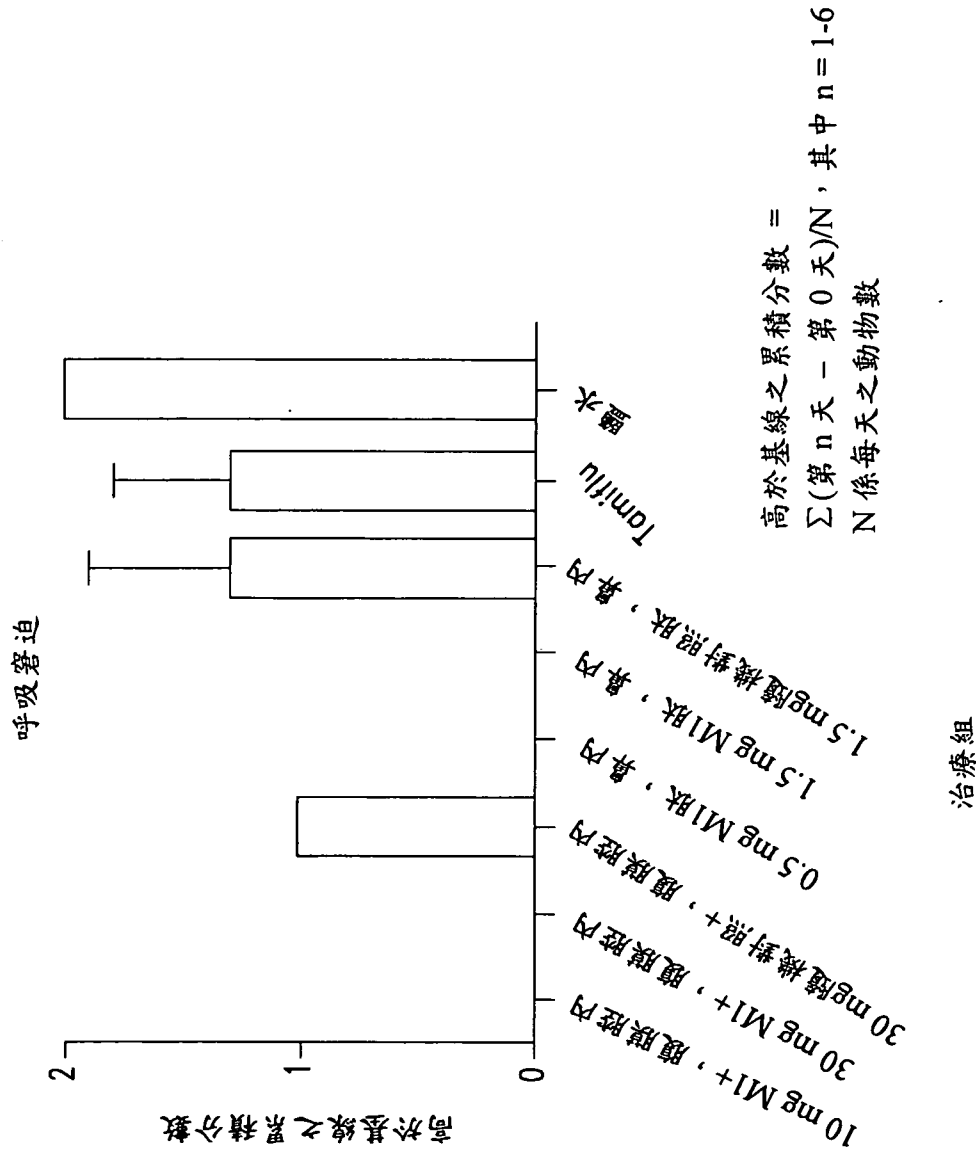
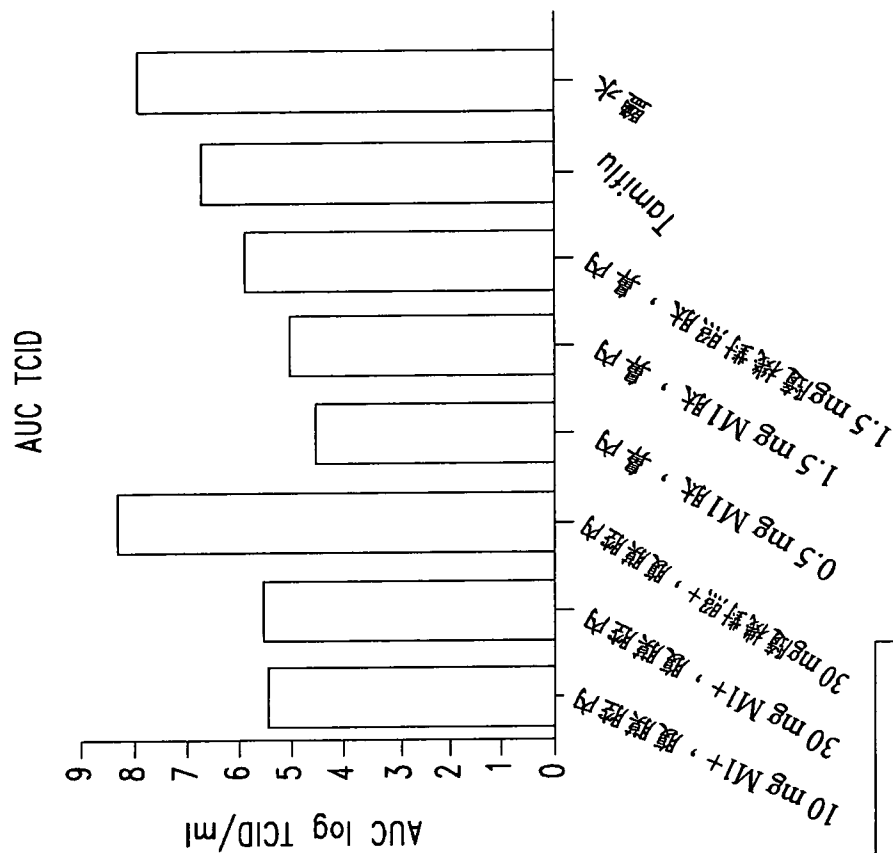


圖7D

病毒效價：每日鼻洗劑



治療組

圖7E

第1天至第5天
相對於鹽水降低2.3至2.4 log
比Tamiflu多降低1.2至1.3 log

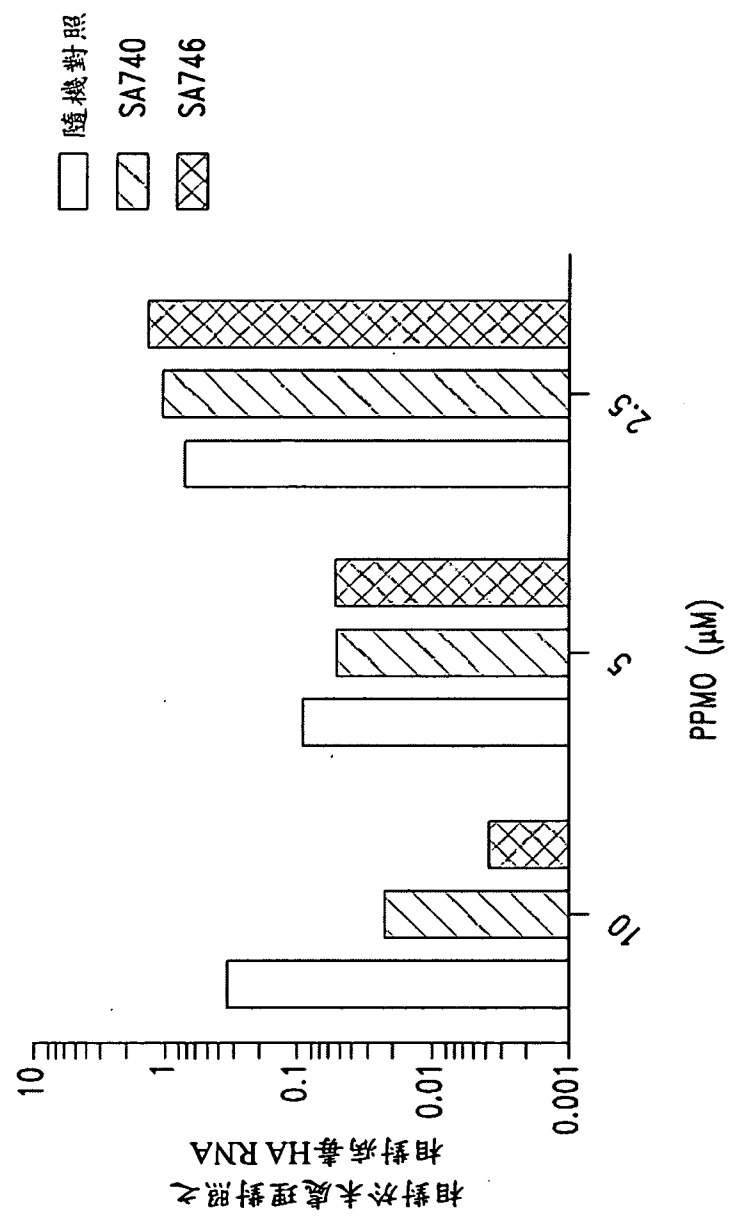


圖8A

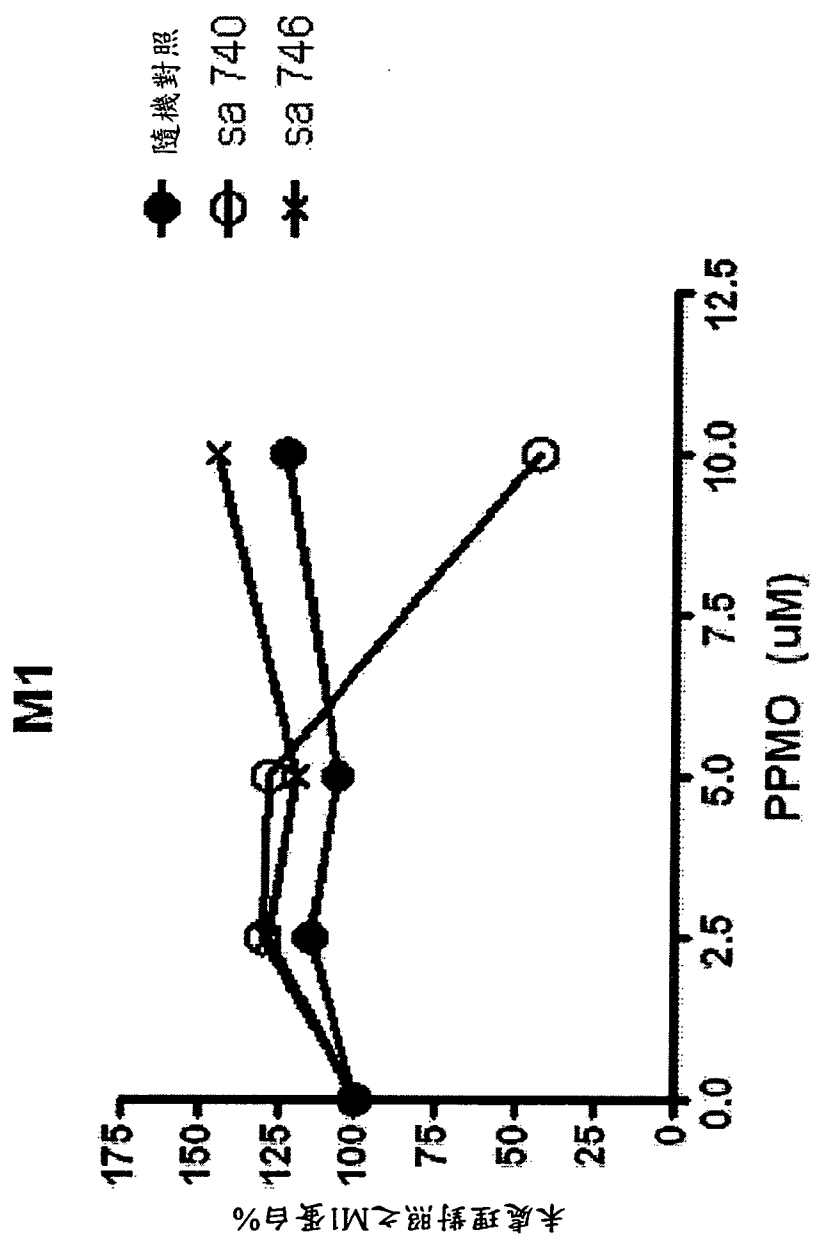


圖 8B

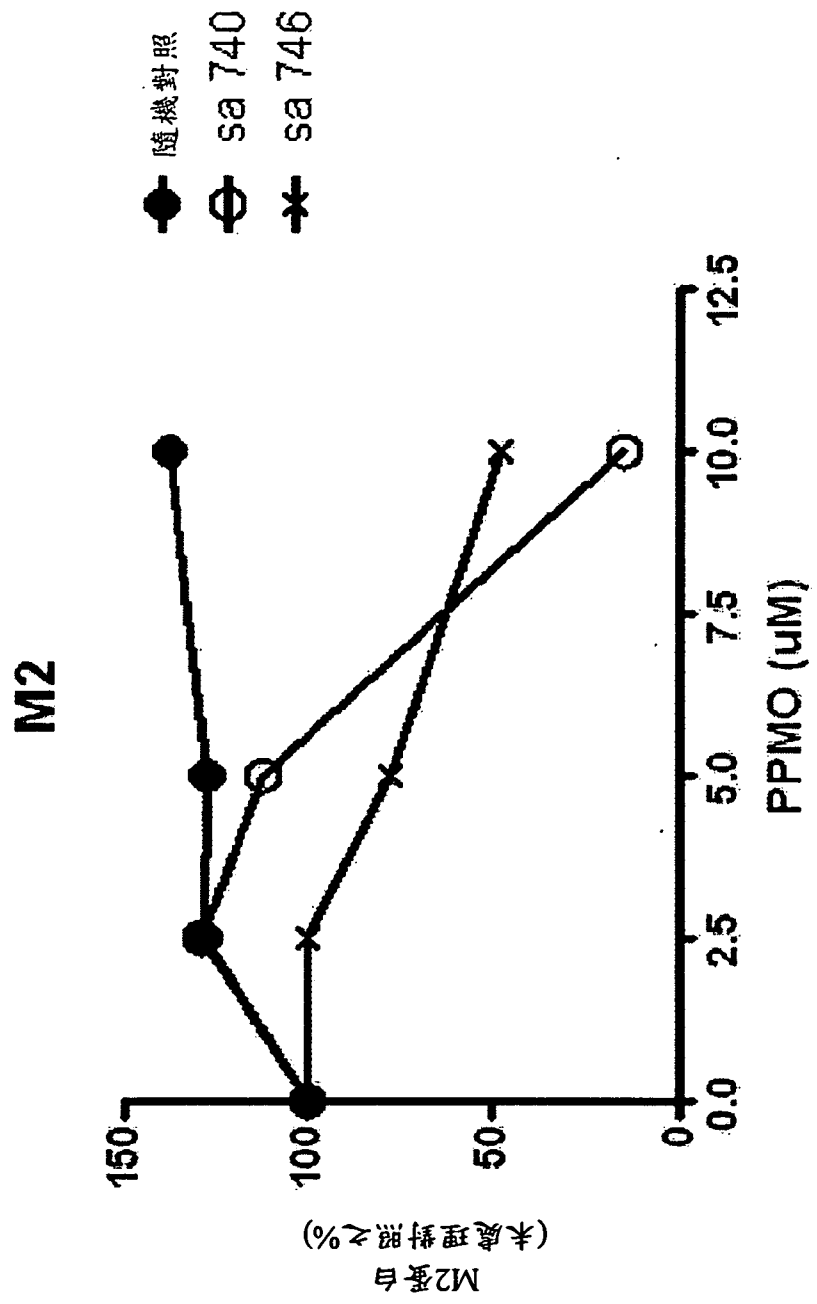


圖8C

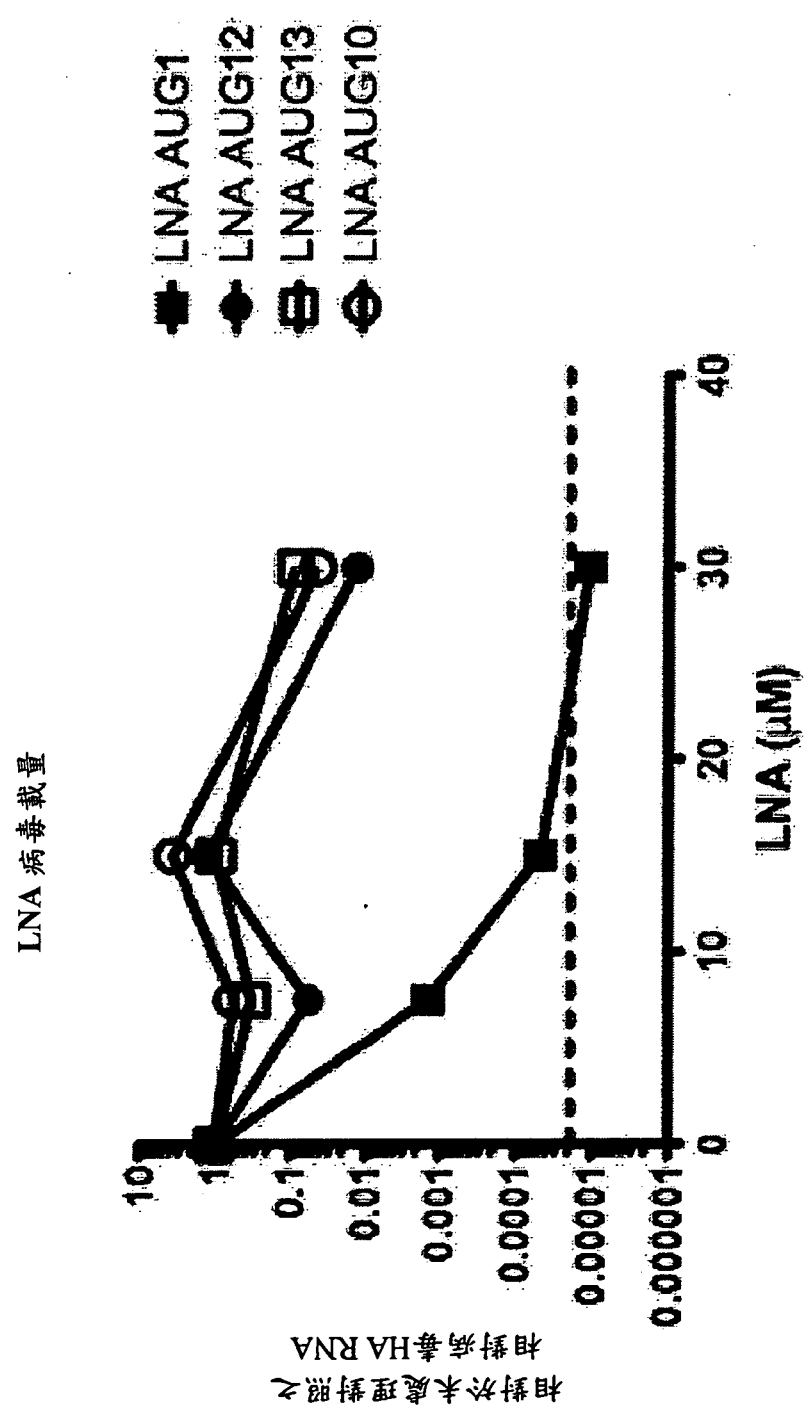


圖9A

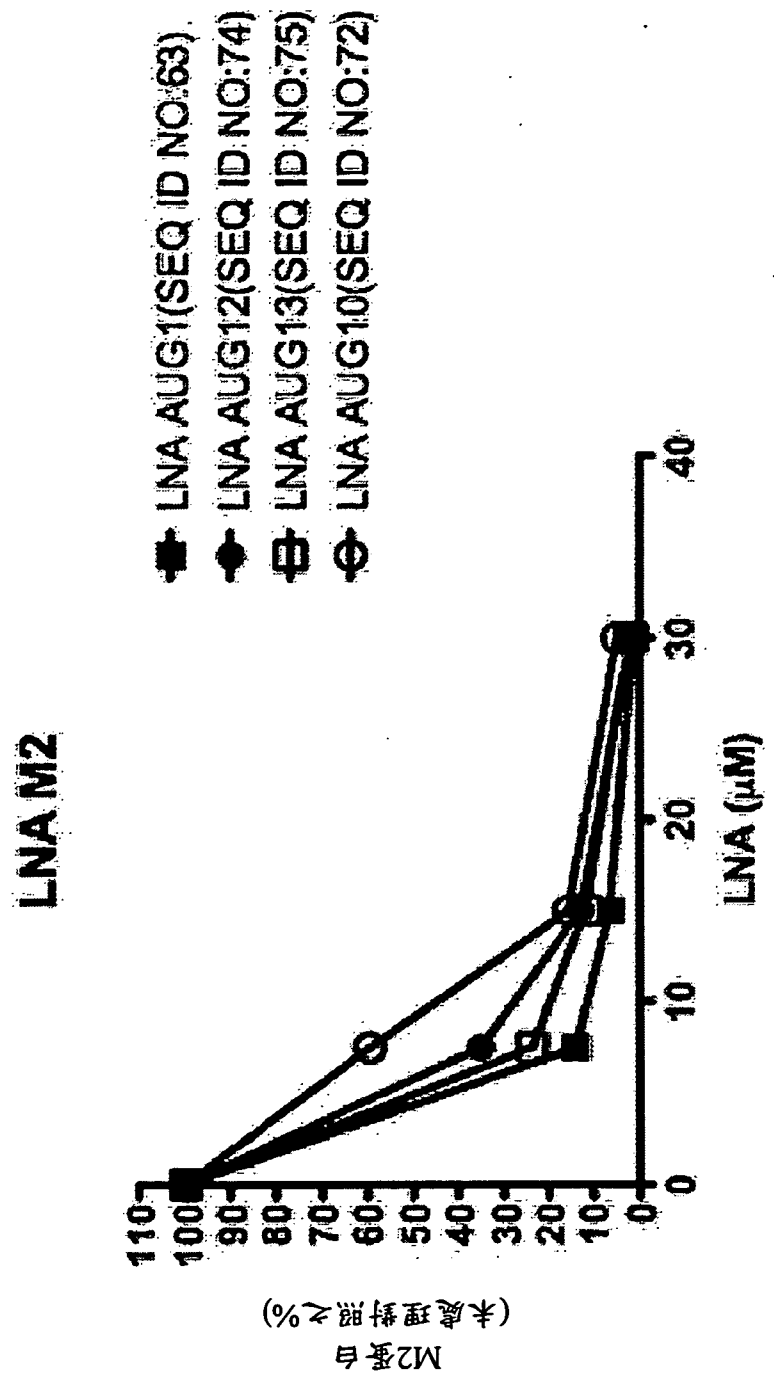


圖9B

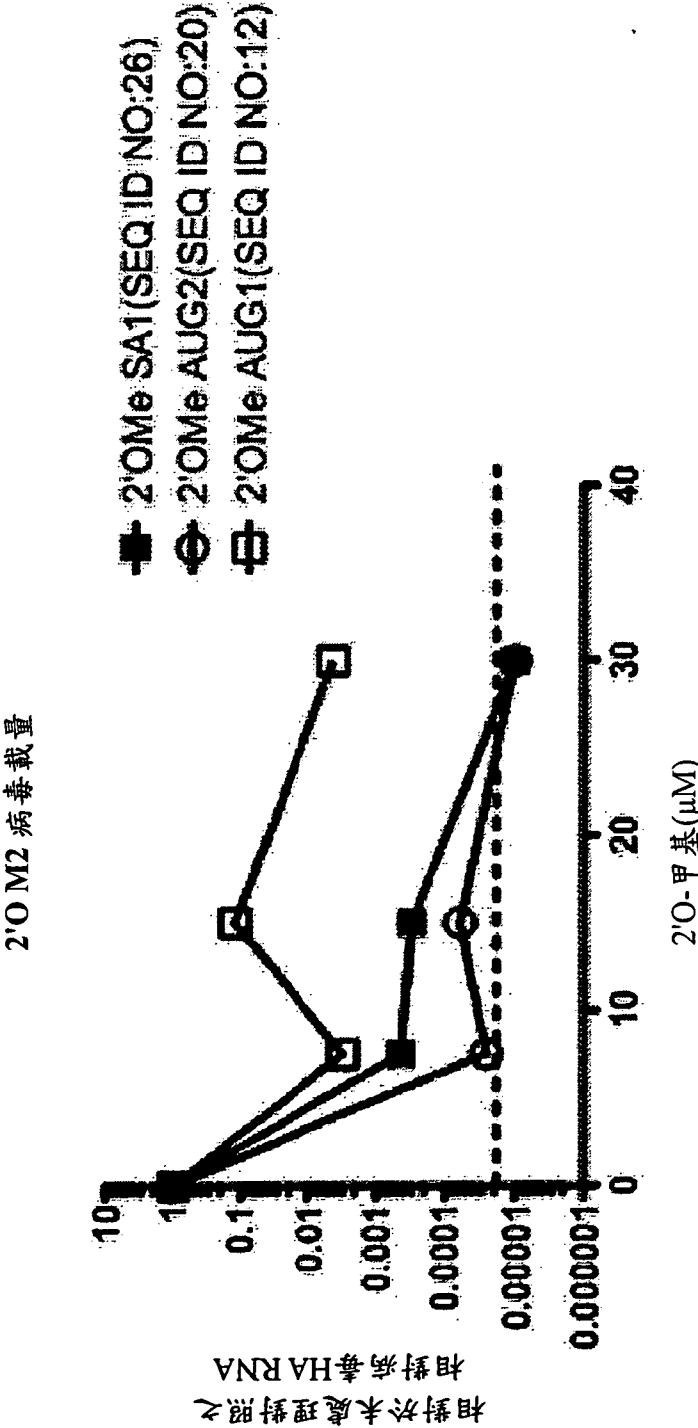
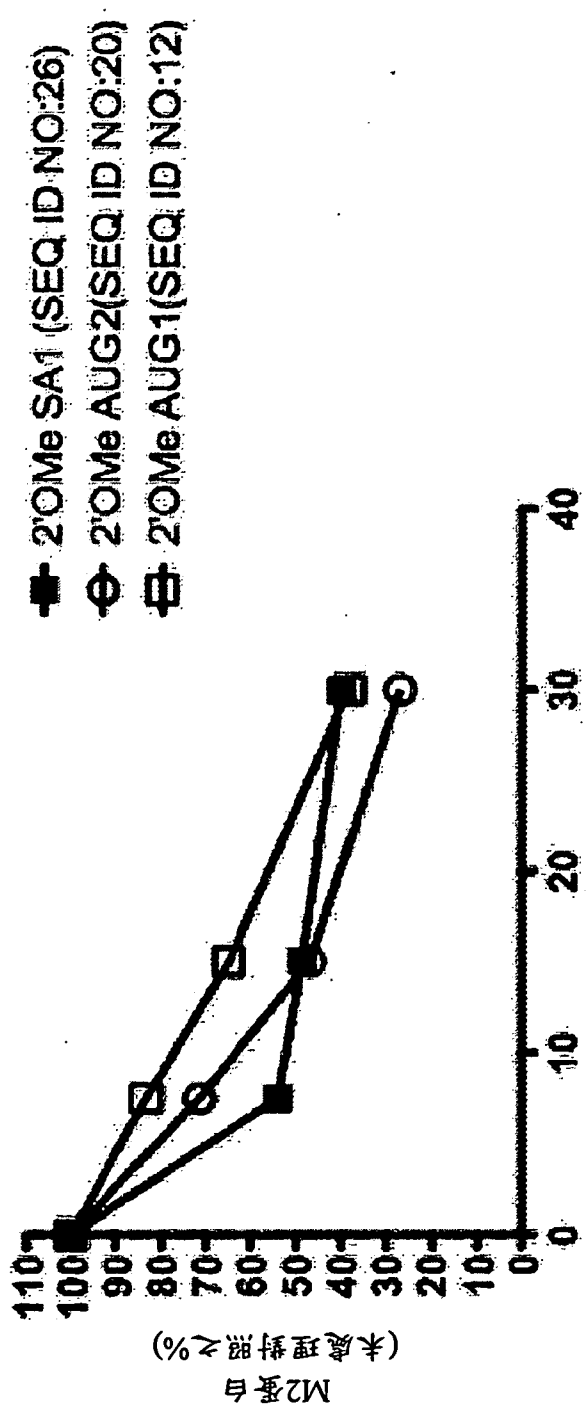


圖10A

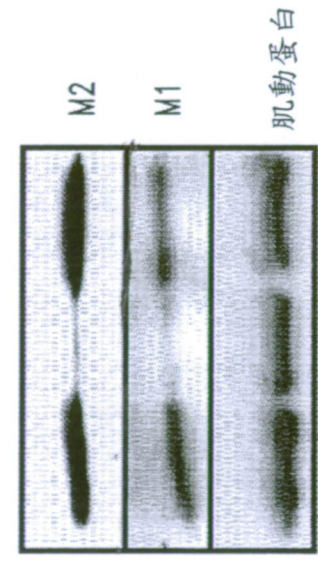
2'O M2



2'O-甲基 (μM)

圖 10B

M1/M2 PPMO (SEQ ID NO:12-SEQ ID NO:119)
登革熱 未處理



相對於未處理對照之信號		
	登革熱	M1/M2
M2	92%	9%
M1	120%	27%

圖11