

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

A61K 48/00

C07H 21/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96195955.X

[43]公开日 1998 年 9 月 2 日

[11] 公开号 CN 1192158A

[22]申请日 96.6.3

[30]优先权

[32]95.6.7 [33]US[31]08 / 472,527

[86]国际申请 PCT / US96 / 08325 96.6.3

[87]国际公布 WO96 / 40266 英 96.12.19

[85]进入国家阶段日期 98.1.26

[71]申请人 东卡罗莱那大学

地址 美国北卡罗莱那州

[72]发明人 J · W · 尼塞

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 杨九昌

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 哮喘治疗方法

[57]摘要

本发明公开了一种减少需要治疗的患者中支气管收缩的方法。该方法包括给患者使用有效减少支气管收缩剂量的反义寡核苷酸分子, 该分子相对应的受体是 A₁ 或 A₃ 腺苷受体。该方法可有效治疗受哮喘痛苦折磨的患者。药物制剂也被公开。

权 利 要 求 书

1. 一种减少需要治疗的患者中腺苷介导的支气管收缩的方法，包括向患者肺部给予有效减少支气管收缩剂量的腺苷受体反义寡核苷酸，所述腺苷受体选自A₁腺苷受体和A₃腺苷受体。

5 2. 根据权利要求1的方法，其中所述腺苷受体是A₁腺苷受体。

3. 根据权利要求1的方法，其中所述腺苷受体是A₃腺苷受体。

4. 根据权利要求1的方法，其中反义寡核苷酸包括其中至少一个磷酸二酯键被其它键取代的核苷酸，其它键选自甲基磷酸酯键、磷酸三酯键、硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键和氨基磷酸酯键。

10 5. 根据权利要求1的方法，其中所述反义寡核苷酸具有SEQ ID NO:1给出的序列。

6. 根据权利要求1的方法，其中所述反义寡核苷酸具有SEQ ID NO:3给出的序列。

15 7. 根据权利要求1的方法，其中所述反义寡核苷酸具有SEQ ID NO:5给出的序列。

8. 根据权利要求1的方法，其中反义寡核苷酸是通过向患者的肺部给予含反义寡核苷酸的可吸入微粒的气雾剂来运送的。

9. 根据权利要求8的方法，其中所述微粒选自固体微粒和液体微粒。

20 10. 根据权利要求9的方法，其中所述雾化剂包含的微粒大小在约0.5到10微米范围内。

11. 根据权利要求8的方法，其中所述微粒是包含反义寡核苷酸的脂质体。

12. 根据权利要求8的方法，其中给予的反义寡核苷酸的量足以使患者体内该反义寡核苷酸的胞内浓度达到大约0.1到10 μM。

25 13. 一种给需要治疗的患者治疗哮喘的方法，包括向患者给予有效治疗哮喘剂量的腺苷受体反义寡核苷酸，所述腺苷受体选自A₁腺苷受体和A₃腺苷受体。

14. 根据权利要求13的方法，其中所述腺苷受体是A₁腺苷受体。

15. 根据权利要求13的方法，其中所述腺苷受体是A₃腺苷受体。

30 16. 根据权利要求13的方法，其中反义寡核苷酸包括其中至少一个磷酸二酯键被其它键取代的核苷酸，其它键选自甲基磷酸酯键、磷酸三酯键、硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键和氨基磷酸酯键。

17.根据权利要求13的方法，其中所述反义寡核苷酸具有SEQ ID NO:1给出的序列。

18.根据权利要求13的方法，其中所述反义寡核苷酸具有SEQ ID NO:3给出的序列。

5 19.根据权利要求13的方法，其中所述反义寡核苷酸具有SEQ ID NO:5给出的序列。

20.根据权利要求13的方法，其中反义寡核苷酸是通过向患者的肺部给予含反义寡核苷酸的可吸入微粒的气雾剂来运送的。

10 21.根据权利要求20的方法，其中所述微粒选自固体微粒和液体微粒。

22.根据权利要求21的方法，其中所述雾化剂包含的微粒大小在约0.5到10微米范围内。

23.根据权利要求20的方法，其中所述微粒是包含反义寡核苷酸的脂质体。

15 24.根据权利要求13的方法，其中给予的反义寡核苷酸的量足以使患者体内该反义寡核苷酸的胞内浓度达到大约0.1到10 μ M。

25.一种药物组合物，包括一种药用载体和：
一种腺苷受体反义寡核苷酸；所述腺苷受体选自A₁腺苷受体和A₃腺苷受体；药物剂量能有效减少腺苷介导的支气管收缩。

20 26.根据权利要求25的方法，其中所述腺苷受体是A₁腺苷受体。

27.根据权利要求25的方法，其中所述腺苷受体是A₃腺苷受体。

28.根据权利要求25的方法，其中反义寡核苷酸包括其中至少一个磷酸二酯键被其它键取代的核苷酸，其它键选自甲基磷酸酯键、磷酸三酯键、硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键和氨基磷酸酯键。

25 29.根据权利要求25的方法，其中所述反义寡核苷酸具有SEQ ID NO:1给出的序列。

30.根据权利要求25的方法，其中所述反义寡核苷酸具有SEQ ID NO:3给出的序列。

31.根据权利要求25的方法，其中所述反义寡核苷酸具有SEQ ID NO:5给出的序列。

32.根据权利要求25的药物组合物，其中所述载体选自固体载体和液体载体。

33. 根据权利要求25的药物组合物，进一步包含一种脂质体，该脂质体含有所述的反义寡核苷酸。

34. 根据权利要求25的药物组合物，其中所述反义寡核苷酸与能被细胞摄取的分子结合。

说明书

哮喘治疗方法

5 本发明是在国立癌症研究所基金RO1CA47217-06资助下完成的。政府对此发明拥有某些权利。

发明领域

此申请涉及一种治疗方法，通过给予对应A₁和A₃腺苷受体的反义寡核苷酸治疗哮喘。

发明背景

10 哮喘是工业化国家中最常见的疾病之一，在美国占大约1%的总卫生费用。K. Weiss等，《新英格兰医学杂志》326, 862-866 (1992)。有报告指出在过去的十年中，哮喘的流行和死亡率都存在值得警惕的增长，哮喘-美国，1980-1990，《发病率和死亡率周报》41, 733-735 (1992)，
15 并且预测在下一个十年里职业性哮喘将成为主要的职业性肺病。M. Chan-Yeung和J. Malo，《欧洲呼吸杂志》7, 346-371 (1994)。尽管在工业化国家中，哮喘死亡率的增加可能归因于治疗这种疾病时依赖β拮抗剂的增加，有关哮喘的深层原因仍知之甚少。J. Gern和R. Lemanske，《北美临床免疫和变态反应》13, Bush, R.K.编辑。W.B. Saunders Company,
20 London, pp. 839-860 (1993)。

腺苷可能是一种介导支气管哮喘的重要天然介质。R. Pauwels等，《临床和实验变态反应》21增刊1, 48-55 (1991); S. Holgate等，《纽约科学院年鉴》629, 227-236 (1991)。腺苷对人体哮喘的潜在作用得到了实验结果的支持，即与正常个体相比，哮喘个体对雾化腺苷产生强烈的支气管收缩反应。M. Church和S. Holgate，《药理科学进展》7, 49-50 (1986);
25 M. Cushley等，《英国临床药理学杂志》15, 161-165 (1983)。与之类似，使用尘螨致敏兔子模型可作为人哮喘的动物模型，哮喘兔子也显示出对雾化的腺苷产生强烈的支气管收缩反应，而无哮喘兔子则没有反应。S. Ali等，《药剂与作用》37, 165-176 (1992)。最近应用此模型系统提示，
30 哮喘中腺苷介导的支气管收缩和支气管过度应答主要是通过刺激腺苷受体来介导的。S. Ali等，《药理学实验治疗杂志》268, 1328-1334 (1994);

S. Ali等,《美国生理杂志》266, L271-277 (1994)。

茶碱作为一种作为治疗哮喘的重要药物,已知是一种腺苷受体拮抗剂(参见 M. Cushley等,《美国呼吸系疾病评论》129, 380-384),可减少哮喘兔子中腺苷介导的支气管收缩(Ali等,同上)。对过敏性兔子预先给予另一种A₁-特异受体拮抗剂, 8-环苯基-1,3-二丙基黄嘌呤(DPCPX),该药可强效地抑制过敏性兔子中腺苷介导的支气管收缩和支气管过度应答。同上。目前可用的腺苷A₁受体-特异拮抗剂虽然具有潜在治疗价值,但由于其毒性而受到限制。H. Klitgaard等,《欧洲药理学杂志》242, 221-228 (1993)。茶碱虽已被广泛用于治疗哮喘,但由于其狭窄的治疗剂量范围,经常伴随明显的毒副作用。E. Powell等,《儿科急症护理》9, 129-133 (1993); S. Nasser和P. Rees,《药物安全》8, 12-18 (1993); P. Epstein,《内科学纪事》119, 1216-1217 (1993)。下调腺苷-介导支气管收缩作为一种可行的替代策略明显地具有治疗意义。

发明概述

15 本发明的第一方面是一种减少需要治疗的患者中腺苷介导的支气管收缩的方法。该方法包括向患者肺部给予有效减少支气管收缩剂量的腺苷受体反义寡核苷酸,在此腺苷受体选自A₁腺苷受体和A₃腺苷受体。

20 本发明的第二方面是一种给需要治疗的患者治疗哮喘的方法。该方法包括向患者肺部给予有效治疗哮喘剂量的腺苷受体反义寡核苷酸,在此腺苷受体选自A₁腺苷受体和A₃腺苷受体。

本发明的第三方面是一种药物组合物,含有腺苷受体反义寡核苷酸,其中腺苷受体选自A₁腺苷受体和A₃腺苷受体,所含反义寡核苷酸的剂量能有效减少腺苷介导的支气管收缩。药物组合物中同时还包括适合用药的载体。

25 本发明的第四方面是使用上述所指的腺苷受体反义寡核苷酸制备药物,用于(a)减少需接受此种治疗的患者中由腺苷介导的支气管收缩,或(b)对需接受此种治疗的患者中哮喘进行治疗。

30 反义寡核苷酸作为治疗人类疾病的潜在有用的药物制剂,在理论上受到了相当的重视。R. Wagner,《自然》372, 333-335 (1994)。然而,有关这些分子对现实人类疾病模型的实际应用尚未实现。对这些分子的药理学应用,值得重要考虑的是它们的用药途径。大部分在体应用反义寡核苷酸的实验,涉及直接应用它到脑(参见C. Wahlestedt,《药理科学进

展》15,42-46 (1994); J. Lai等,《神经报告》5, 1049-1052 (1994); K. Standifer等,《神经元》12,805-810 (1994); A. Akabayashi等,《脑研究》21, 55-61 (1994))或脊髓液(参见L. Tseng等,《欧洲药理学杂志》258, R1-3 (1994); R. Raffa等,《欧洲药理学杂志》258, R5-7 (1994); F. Gillardon等,《欧洲神经科学杂志》6, 880-884 (1994))的有限区域。鉴于这些方法的侵入性,在临床上存在应用局限。

全身性给予反义寡核苷酸也引起药理学应用的明显问题,不只是难以到达疾病侵害的组织。相反,肺脏是应用反义寡核苷酸的极好的潜在靶器官,因为它可能被非侵入性接近,并且具有组织特异性。

附图简述

图1: 阐明了A₁腺苷受体反义寡核苷酸和错配的对照反义寡核苷酸对兔子模型中支气管道的动力顺应性的不同作用。**代表显著性差异p<0.01, Student's t检验。

图2: 以经A₁腺苷受体反义寡核苷酸治疗后的呼吸道组织中A₁和A₂腺苷受体表达数目作为参考,阐明了A₁腺苷受体反义寡核苷酸的特异性。

发明详述

核苷酸序列在此仅以从5'端到3'端方向、从左至右,以单链形式表示。核苷酸和氨基酸表示方式在此按照 IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的方式,或(对氨基酸)按照37CFR §1.822及已建立方法,以三字符表示。参见,例如《专利申请者手册》99-102 (Nov. 1990)(U.S. Patent and Trademark Office, Office of the Assistant commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231); Hudson等的美国专利号 4,871,670 Col. 3 20-43行(申请人明确指出本申请及本文引用的所有其它专利文献的内容在此引入以供参考)。

本发明的方法可被用于减少因任何原因,包括(但不限于)哮喘的病人肺脏中由腺苷介导的支气管收缩。A₁和A₃受体的反义寡核苷酸据证明有下调细胞A₁或A₃的作用。与治疗腺苷介导的支气管收缩的传统方法相比,此种治疗的一个新颖特征是药物直接使用于肺部。另外,受体蛋白不仅只是与药物作用,其本身数量减少,并且毒性被降低了。

在此使用的术语“治疗”哮喘一词特指一种治疗,该种治疗减少接受这种疗法的患者表现出支气管收缩或哮喘症状的可能性。术语“下调”

特指为诱导细胞内A₁或A₃腺苷受体,使之产生、分泌或有效性减少(并因此导致浓度减少)。

本发明主要是关于对人类患者的治疗,但出于兽医应用的目的,也可以用于治疗其它哺乳类动物,如狗和猫。

5 通常术语“反义”一词指使用小的类似单链DNA的合成寡核苷酸,通过抑制目标信使RNA(mRNA)功能来抑制基因表达。Milligan, J.F.等,《医药化学杂志》36(14), 1923 - 1937 (1993)。对于本发明,是期望抑制A₁或A₃腺苷受体的基因表达。基因表达的抑制是通过按照Watson-Crick碱基配对法则,对特定信使RNA (mRNA)的编码(有义)序列进行杂交取得的。
10 反义抑制的机制在于使用外源性的寡核苷酸,减少靶基因mRNA或蛋白的表达,或使细胞生长或形态发生改变。参见Helene, C.和Toulme, J.,《生物物理和生物化学学报》1049, 99 - 125 (1990); Cohen, J.S. 编辑,《脱氧寡核苷酸作为基因表达的反义抑制剂》CRC出版: Boca Raton, FL (1987)。

15 在此应用的术语“腺苷受体反义寡核苷酸”被定义为短序列的人工合成核苷酸。它们(1)按照后面描述的杂交条件与编码A₁或A₃腺苷受体的mRNA的任何编码序列杂交,(2)通过杂交减少A₁或A₃腺苷受体的基因表达。

A₁或A₃腺苷受体的mRNA序列来自A₁或A₃腺苷受体表达基因的DNA
20 碱基序列。人类基因组A₁腺苷受体序列是已知的,并由G. Stiles等的美国专利5,320,963号公开。A₃腺苷受体已经被克隆、测序并在大鼠(参见F. Zhou等,《美国国家科学院院报》89:7432 (1992))和人体(参见M.A. Jacobson等,英国专利申请号9304582.1(1993))中表达。因此,按照标准技术可以生产下调A₁或A₃腺苷受体表达的反义寡核苷酸。

25 本发明一个方面在于,反义寡核苷酸具有一定的序列,能与编码人A₁或A₃腺苷受体的mRNA分子的任何序列特异性结合,从而阻止mRNA分子的转译。反义寡核苷酸可能具有在此公开的序列,它们是SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5。

30 寡核苷酸的化学类似物(例如,寡核苷酸的磷酸二酯键被修饰,形成诸如甲基磷酸酯键、磷酸三酯键、硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键或氨基磷酸酯键,使寡核苷酸在体内更稳定)也是本发明的一个方面。寡核苷酸中的天然磷酸二酯键容易被细胞内源性产生的核酸酶所降解,而

许多类似物的键对核酸酶的降解作用是高度耐受的。参见Milligan等, 和Cohen J.S., 同上。采用“3'末端加帽”的策略, 用抗核酸酶的键去替代寡核苷酸3'端的磷酸二酯键, 可以防止寡核苷酸的降解。参见Tidd D.M. 和Warenius H.M., 《英国癌症杂志》60, 343 - 350 (1989); Shaw J.P.等, 《核酸研究》19, 747 - 750 (1991)。氨基磷酸酯键、硫代磷酸酯键和甲基磷酸酯键都可以此方式产生作用。更广泛地修饰磷酸二酯骨架已显示出可提高稳定性, 并且可能增强寡核苷酸的亲和力和细胞渗透性。参见Milligan等, 同上。许多不同的化学手段被用来将整个磷酸二酯骨架替换为新的键。同上。骨架类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯、甲硼烷磷酸酯、磷酸三酯、甲缩醛、3'-硫甲缩醛、5'-硫甲缩醛、5'-硫醚、碳酸酯、5'-N-氨基甲酸酯、硫酸酯、磺酸酯、氨基磺酸酯、氨磺酰、砒、亚硫酸酯、亚砒、硫化物、羟胺、亚甲基(甲基亚氨基)(MMI)或亚甲氧基(MOMI)键。经硫代磷酸酯键和甲基磷酸酯修饰的寡核苷酸由于可以自动化合成, 所以是特别优选的。同上。适当的情况下, 反义寡核苷酸可采用它们适合药物应用的盐类的形式进行给药。

依照所结合的特定靶目标和因此所采用的输送方式, 反义寡核苷酸可以具有任何适当的长度(例如从大约10至60个核苷酸长度)。反义寡核苷酸优选直接作用于含有内含子与外显子连接部的mRNA区域。反义寡核苷酸直接作用于内含子/外显子连接部时, 它或者可能完全覆盖连接部, 或者可能充分接近连接部, 从而抑制在mRNA前体变为成熟mRNA的加工过程中间插外显子的剪接。(举例来说, 反义寡核苷酸的3'或5'末端覆盖内含子/外显子连接部大约10、5、3或2个核苷酸的范围)。反义寡核苷酸此外还优选与起始编码重叠。

当使用本发明时, 所使用的反义寡核苷酸可能与被给药的生物物种具有相关性。当治疗人类时, 希望使用人类反义寡核苷酸。

本发明的另一方面是包含上述反义寡核苷酸的药物组合物, 该药物组合物可有效减少A₁或A₃腺苷受体的表达, 此过程是通过药物组合物穿过细胞膜并与细胞内编码A₁或A₃腺苷受体的mRNA特异性结合, 从而阻止mRNA转译。这些组合物用适当的药用载体配制(例如无热源的无菌生理盐水)。反义寡核苷酸可用能穿过细胞膜的疏水性载体进行配制(例如使用脂质体, 而脂质体又以药用的含水载体作为载体)。寡核苷酸也可以与

灭活mRNA的物质偶联，如核酶。给予此种寡核苷酸用于抑制患者的A₁或者A₃腺苷受体活化，患者需要接受此种治疗由于任何在此讨论的原因。此外，药物制剂也可能包括嵌合分子，它包含的反义寡核苷酸吸附在一种据知被细胞内化的分子上。这些寡核苷酸结合体利用细胞摄取途径增加细胞内寡核苷酸的浓度。采用这种方式的大分子的实例包括转铁蛋白、去唾液酸糖蛋白(通过聚赖氨酸与寡核苷酸结合)和链亲合素。

对于药物制剂，反义化合物可以包含于脂质微粒或微囊中，例如脂质体或微晶体。微粒可以是任何适合的结构，象单层或多层片状结构，以便反义寡核苷酸可以被容纳于其中。带正电荷的脂类如N-[1-(2,3-二油氧基)丙基]-N,N,N-三甲基-铵甲基硫酸盐，或“DOTAP”，特别优选作为这种微粒或微囊。制备这种脂质微粒的方法是众所周知的。参见 Janoff 等的美国专利号 4,880,635； Kurono 等的 4,906,477； Wallach 的 4,911,928； Wallach 的 4,917,951； Allen 等的 4,920,016； Wheatley 等的 4,921,757 及其它文献。

患者接受有活性组合物的用药可通过各种输送反义核苷酸组合物到达肺部的途径进行。在此公开的反义化合物可经各种适当的方法用于病人的肺脏，但优选的用药方式为产生包括可吸入的微粒的气雾剂，该可吸入的微粒包含有反义化合物，患者吸入该微粒。它们可以是液态或固态的，微粒中还可任选包含其它治疗成分。

本发明使用的含反义化合物的微粒应包括适于吸入的大小的微粒：这意味着，微粒小到足以随吸气通过口腔和咽部进入到肺支气管和肺泡。通常微粒在0.5到10微米大小的范围适于吸入。气雾剂中不适于吸入尺寸的微粒容易沉积在喉部被吞咽掉，优选气雾剂中这种微粒的含量最小。对于鼻吸入法，优选微粒在10-500微米范围内，以使其易于滞留在鼻腔中。

反义化合物与适当的赋形剂，比如无菌无热源的水结合，可做成包含活性化合物用于产生气雾剂的液体药物组合物。也可任选含有其它的治疗用化合物。

固体微粒组合物含有适于吸入的微化反义化合物干颗粒，它可通过下面的方法来制备，即使用臼和杵研磨干燥的反义化合物，然后将细颗粒通过400目筛网进行打碎或分离出大的结块。包含反义化合物的固体微粒组合物可任选地含有分散剂，它具有促进气雾形成的作用。较适合的

分散剂是乳糖，它可与反义化合物按任意适当比例进行混合（比如按重量1:1的比例）。此外，也可添加其它的治疗用化合物。

给予反义化合物的剂量是依据所治疗疾病、患者状况、特定的制剂、用药途径以及用药时间等因素来决定。一般细胞内寡核苷酸浓度应从0.05到50 μM ，或更具体而言从0.2到5 μM 。对于象人体的用药，一般应用的剂量从大约0.01, 0.1或1mg/kg到50, 100或150mg/kg或更高。根据所用的活性物质的特定制剂的可溶性，每日用药剂量可一次或分次完成。给予反义化合物可作为治疗(即作为抢救治疗)或预防目的使用。

含反义化合物液体微粒的气雾剂可用各种相应方法制造，例如使用喷雾器。例如参见美国专利No. 4,501,729。喷雾器是可商购的产品，它将具有活性成分的溶液或悬液转变成可用于治疗的气雾，其原理是使压缩气体加速通过狭窄的喷口，气体一般为空气或氧气；或采用超声振荡的方法。较适合应用于喷雾器的制剂为液相载体包容的活性成分，活性成分占制剂比例可高达40% w/w，但优选小于20% w/w。载体一般为水或是用水稀释的乙醇溶液，优选添加如氯化钠等以使之与体液等渗。如果该制剂不是制备成无菌的，任选的添加物可包括防腐剂，比如甲基羟基苯甲酸盐以及抗氧化剂、调味剂、挥发油、缓冲剂和表面活性剂。

含活性化合物固体微粒的气雾剂可同样用各种固体微粒药物气雾发生器产生。用于给予患者固体微粒药物的气雾发生器可以产生如前所述的可吸入微粒，并产生一定体积的气雾，其中含有预先设定剂量、适于人类用药比例的药物。一种示例性的固体微粒气雾发生器是吹入器。适合吹入给药的制剂中包含磨成细粉的药粉，可以经吹入器导入或通过鼻吸到达鼻腔。在吹入器中，药粉(可有效产生在此表述的治疗作用的一定剂量的药物)被放置于胶囊或药筒中，胶囊或药筒通常用明胶或塑料制成，或被刺破或在原位置被打开，药粉通过吸气随流经该装置的气流传送或通过手动泵传送。吹入器中使用的药粉或者仅含活性成分，或者由包含活性成分、适当的稀释剂(例如乳糖)和可选择添加的表面活性剂的混合药粉组成。活性成分在制剂中所占比例通常从0.1到100 w/w。另一种示例性的气雾发生器由可度量吸入器构成。可度量吸入器是一种气雾加压输送装置，通常在液化推进剂中含有活性成分的悬液或溶液制剂。使用这些装置时，通过控制阀门来调节一定量体积药物的输送，一般为10到150 μl ，从而产生含有活性成分的微粒喷雾。适合使用的推进剂包括某

些氯氟烃化合物，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷和它们的混合物。制剂中可另外含有一种或更多的辅助溶剂，例如乙醇、油酸或脱水山梨醇三硬脂酸酯等表面活性剂、抗氧化剂和合适的调味剂。

气雾剂无论是以固体还是液体微粒的形式存在，均可由气雾发生器以一定速率制造出来，该速率从每分钟大约10至150升，更优选每分钟30至150升，最优选每分钟大约60升。气雾剂中所含药物含量越多，则可被更快速地用药。

以下实例用于解释本发明，不应被理解为限制本发明。在这些实例中， μM 代表微摩尔， mL 代表毫升， μm 代表微米， mm 代表毫米， cm 代表厘米， $^{\circ}\text{C}$ 代表摄氏度， μg 代表微克， mg 代表毫克， g 代表克， kg 代表千克， M 代表摩尔， h 代表小时。

实例1

反义寡核苷酸的设计与合成

设计对应于 A_1 和 A_3 腺苷受体的反义寡核苷酸，可能需要弄清 A_1 和 A_3 靶受体mRNA复杂的二级结构。获得这种结构后，可设计出靶向mRNA的特定区域的反义核苷酸，这些区域被认为决定mRNA的功能活性或稳定性，反义核苷酸最好可覆盖起始密码子。其它的靶位点也是可用的。为证明反义作用的特异性，其它不能与靶mRNA完全互补，但按照w/w比例含有同样的核苷酸组成的寡核苷酸在反义实验中被用来作为对照。

对腺苷 A_1 受体mRNA二级结构进行了分析，并按以上所述用于设计硫代磷酸酯反义寡核苷酸。所合成的反义寡核苷酸被称为HAdA1AS，它具有以下序列：

5'-GAT GGA GGG CGG CAT GGC GGG-3' (SEQ ID NO: 1)

作为对照，合成了称为HAdA1MM的错配的硫代磷酸酯反义核苷酸，其序列如下：

5'-GTA GCA GGC GGG GAT GGG GGC-3' (SEQ ID NO: 2)

每种寡核苷酸都具有同样的碱基含量和通用的序列结构。在GENBANK(85.0版)和EMBL(40.0版)中同源检索结果表明，反义寡核苷酸对人体和兔子的腺苷 A_1 受体基因具有特异性，而错配的对照物与任何已知基因序列不存在杂交特性。

腺苷 A_3 受体mRNA的二级结构同样进行了分析，并如上所述设计出两种硫代磷酸酯反义寡核苷酸。合成的第一种反义寡核苷酸(HAdA3AS1)

具有下面的序列:

5'-GTT GTT GGG CAT CTT GCC-3' (SEQ ID NO: 3)

作为对照, 合成了错配的硫代磷酸酯反义寡核苷酸(HAdA3MM1), 它具有以下序列:

5 5'-GTA CTT GCG GAT CTA GGC-3' (SEQ ID NO: 4)

另一种硫代磷酸酯反义寡核苷酸(HAdA3AS2)也被设计并合成, 它具有以下序列:

5'-GTG GGC CTA GCT CTC GCC-3' (SEQ ID NO: 5)

它的对照寡核苷酸(HAdA3MM2)具有以下序列:

10 5'-GTC GGG GTA CCT GTC GGC-3' (SEQ ID NO: 6)

硫代磷酸酯寡核苷酸是用Applied Biosystems 396 型寡核苷酸合成仪合成, 并采用NENSORB色谱仪(DuPont, MD)纯化。

实例2

A₁-腺苷受体反义寡核苷酸的体外检测

15 通过使用肺腺癌细胞HTB-54作为体外模型, 对前面叙述的抗人A₁受体的反义寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)进行了有效性鉴定。采用标准的northern印迹方法和实验室设计并合成的受体探针, HTB-54肺腺癌细胞被证明表达A₁腺苷受体。

HTB-54人肺腺癌细胞(106/100毫米组织培养皿)用5.0 μM HAdA1AS或HAdA1MM处理24小时, 并在孵育12小时后更换新鲜的培养基和寡核苷酸。寡核苷酸处理24小时后, 细胞被收获并按照标准方法提取它们的RNA。一种相应于反义药物作用的靶mRNA区域的21聚体的探针(因而与反义核苷酸具有同样的序列, 但没有硫代磷酸化)被合成, 并被作为经过HAdA1AS处理、HAdA1MM处理、HAdA1MM处理和无处理的HTB-25 54细胞中所制备RNA的探针, 用于northern印迹。这些印迹清楚地显示, HAdA1AS而非HAdA1MM能有效(>50%)减少人腺苷受体mRNA。该结果表明, HAdA1AS是作为抗哮喘药物的良好候选者, 因为它能减少同哮喘有关的胞内腺苷A₁受体的mRNA。

实例3

A₁腺苷受体反义寡核苷酸的在体功效

30 在覆盖起始密码子的腺苷A₁基因中, 兔与人的DNA序列存在偶然的同源性, 这就允许在兔子模型中使用最初为人腺苷A₁受体而设计的硫代

磷酸酯反义寡核苷酸。

新生的无巴斯德菌新西兰白兔，在出生24小时内用312抗原单位/mL的家居尘螨(*D. farinae*)提取物(Berkeley Biologicals, Berkeley, CA)与10%的白陶土混合，进行腹膜内免疫。在第一个月每周重复免疫一次，而随
5 后的两个月每两周进行一次免疫。在3-4月龄时，8只致敏的兔子经肌肉注射盐酸氯胺酮(44mg/kg)和马来酸乙酰丙嗪(0.4mg/kg)的混合物进行麻醉和松弛。

然后让兔子放松地仰卧于小的动物模块垫板上，并且用4.0-mm气管插管(Mallinkrodt, Inc., Glens Falls, NY)进行插管。将一根外径为2.4mm带有乳胶气囊的聚乙烯导管穿入食管，并在实验的全过程中与口部保持同
10 样的距离(大约16cm)。气管插管与加热式Fleisch呼吸速度描记器(size 00; DOM Medical, Richmond, VA)相连，流量通过由Gould输送放大器(型号11-4113, Gould Electronic, Cleveland, OH)控制的Validyne 差异压力换能器(型号 DP-45161927; Validyne Engineering Corp., Northridge, CA)来计
15 量。食道气囊与差异压力换能器的一端相连，而气管插管的外流口与压力换能器的另一端相接，以便记录通过肺部的压力。流量通过求积分变为连续的波动量，并且全肺耐受性(RL)和动力顺应性(Cdyn)是在等容和流量零点分别进行计算，该计算通过自动呼吸分析仪(型号6; Buxco, Sharon, CT)完成。

实验动物经随机选择，在实验第一天测定实验前雾化腺苷的PC50
20 值。反义(HAdA1AS)或错配对照(HAdA1MM)寡核苷酸溶解于无菌生理盐水，浓度为5000 μ g(5mg)/1.0ml。实验动物随后通过气管插管给予雾化的反义或错配寡核苷酸(大约5000 μ g/1.0ml)，每日两次共两天。雾化的盐水、腺苷、反义或错配寡核苷酸均使用超声喷雾器(DeVilbiliss, Somerset,
25 PA)产生，产生的雾化液滴80%直径都小于5 μ m。

实验的第一部分，随机选择4只致敏兔子给予反义寡核苷酸，另4只给予错配对照寡核苷酸。第三天早晨取得PC50值(与基础值相比减少支气管呼吸道动力顺应性50%所需雾化腺苷以mg/ml表示的浓度)，同这些动物未用寡核苷酸前的PC50值进行比较。

30 间隔一周后动物被互换，以前给予错配对照寡核苷酸的动物现在给予反义寡核苷酸，而那些以前给予反义寡核苷酸的改为使用错配对照寡核苷酸。治疗方法与测量方法同第一部分相同。值得注意的是，8只用反

义寡核苷酸治疗的动物中，有6只在腺苷溶解饱和(20mg/ml)时未出现腺苷介导的支气管收缩。为了便于计算，这些动物的PC50值被设定为20mg/ml。此时的测量值因而体现了反义效应的最小情况。实际效应要高一些。本实验的结果以图1和表1表示。

5

表1. 腺苷A₁受体反义寡核苷酸对哮喘兔子PC50值的作用

错配对照

A₁受体反义寡核苷酸

寡核苷酸治疗前	寡核苷酸治疗后	寡核苷酸治疗前	寡核苷酸治疗后
3.65±1.02	5.16±1.93	2.36±0.68	>19.5±0.34**

结果以平均值(N=8) ± 标准误表示。显著性通过重复测量值方差分析(ANOVA)和Tukey's protected t 检验确定。 **代表与所有其它组相比有显著差异，P<0.01。

10

在实验的两部分中，雾化腺苷剂量为使肺动力顺应性减少50%时，用反义寡核苷酸治疗的动物表现出明显的增加；而错配对照寡核苷酸未发现对PC50值有影响。任何接受反义或对照寡核苷酸吸入的动物也未观察到中毒现象。

15

这些结果清楚地表明，肺脏具有极大潜力可作为基于反义寡核苷酸的介入治疗的靶器官。这些结果进一步说明，在模拟人类哮喘的模型中，下调腺苷A₁受体能在很大程度上消除在哮喘呼吸道中由腺苷介导的支气管收缩。由于参与支气管过度应答的组织接近雾化寡核苷酸的作用位点，所以在人哮喘的过敏性兔子模型中，这种反应是反义物质介入治疗时极好的终点，并且该模型能很好地模仿这种很重要的人类疾病。

20

实例4

A₁-腺苷受体反义寡核苷酸的特异性

25

总结实例3中的互换实验，所有兔子的呼吸道平滑肌都进行了腺苷A₁受体数目的定量分析。作为反义寡核苷酸特异性的对照受体-腺苷A₂受体，其数目也作了定量分析，这种受体不应受到影响。

每只兔子的呼吸道肌肉组织经解剖，其膜部分按以下描述的方法(J. Kleinstein 和H.Glossmann, 《Naunyn-Schmiedeberg's 药理学进展》305, 191 - 200(1978))制备，只作少量的改变。粗质膜制备物储存在-70℃直

30

到分析时使用。蛋白含量采用Bradford(M.Bradford,《分析生物化学》72, 240-254 (1976))方法测定。冷冻的质膜在室温解冻,与0.2U/ml腺苷脱氨酶一起37℃孵育30分钟,以去除内源性的腺苷。按以前描述的方法测定 $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ (A_1 受体特异)或 $[^3\text{H}]\text{CGS-21680}$ (A_2 受体特异)结合,参见S. Ali等,《药理学实验治疗杂志》268, 1328-1334 (1994); S. Ali等,《美国生理学杂志》266, L271-277 (1994)。

如图2和表2所示,利用 A_1 特异拮抗剂DPCPX分析特异性结合,在互换实验中用腺苷 A_1 反义寡核苷酸治疗的动物与对照组相比, A_1 受体数目减少了将近75%,而用 A_2 受体特异拮抗剂2-[对(2-羧乙基)-苯乙氨基]-5'-(N-乙酰氨基)腺苷(CGS-21680)分析,腺苷 A_2 受体数目无变化。

表2. 腺苷 A_1 受体反义寡核苷酸作用的特异性

	错配对照寡核苷酸	A_1 反义寡核苷酸
A_1 -特异结合	1105±48**	293±18
A_2 -特异结合	302±22	442±171

结果以平均值($\text{N}=8$) ± 标准误表示。显著性通过重复测量值方差分析(ANOVA)和Tukey's protected t 检验确定。**代表与错配对照相比有显著差异, $\text{P}<0.01$ 。

前述的实例均用于说明本发明,不应被理解为限制本发明。本发明由下述权利要求定义,包括等同于权利要求的叙述。

序列表

(1)一般资料:

(i) 申请人: Nyce. Jonathan W.

(ii)发明名称: 哮喘治疗方法

5 (iii) 序列数目: 6

(iv) 通信地址:

(A)收件人: Kenneth D. Sibley

(B)街道: Post Office Drawer 34009

(C)城市: Charlotte

10 (D)州: North Carolina

(E)国家: 美国

(F)邮编: 28234

(v) 计算机可读形式:

(A)载体类型: 软盘

15 (B)计算机: IBM PC兼容

(C)操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D)软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi)当前申请资料:

(A)申请号:

20 (B)申请日:

(C)分类:

(viii)代理人/事务所资料:

(A)姓名: Sibley, Kenneth D.

(B)登记号: 31,665

25 (C)参考/摘要号: 5218 - 29

(ix)电讯资料:

(A)电话: (919)881-3140

(B)传真: (919)881-3175

(C)电传: 575102

30

(2) SEQ ID NO:1 资料:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 21碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

5 (ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi)序列表述: SEQ ID NO:1:

GATGGAGGGC GGCATGGCGG G

(2) SEQ ID NO:2资料:

10 (i) 序列特性:

(A) 长度: 21碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

15 (ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi)序列表述: SEQ ID NO:2:

GTAGCAGGCG GGGATGGGGG C

(2) SEQ ID NO:3资料:

20 (i) 序列特性:

(A) 长度: 18碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

25 (ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi)序列表述: SEQ ID NO:3:

GTTGTTGGGC ATCTTGCC

(2) SEQ ID NO:4资料:

30 (i) 序列特性:

(A) 长度: 18碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO:4:

5 GTACTTGCGG ATCTAGGC

(2) SEQ ID NO:5 资料:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 18碱基对

10 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO:5:

15 GTGGGCCTAG CTCTCGCC

(2) SEQ ID NO:6 资料:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 18碱基对

20 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

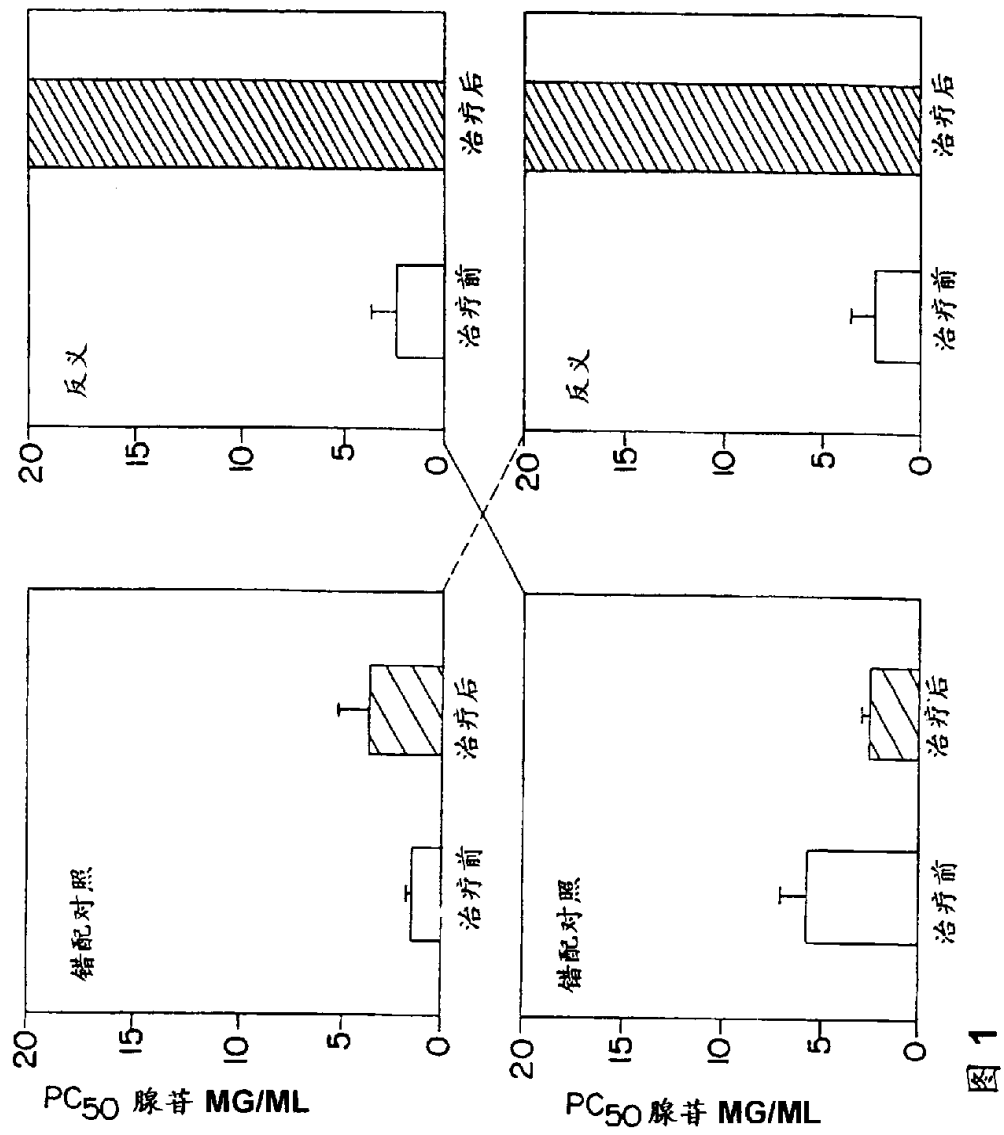
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列表述: SEQ ID NO:6:

25 GTCGGGGTAC CTGTCGGC

说明书附图



1993

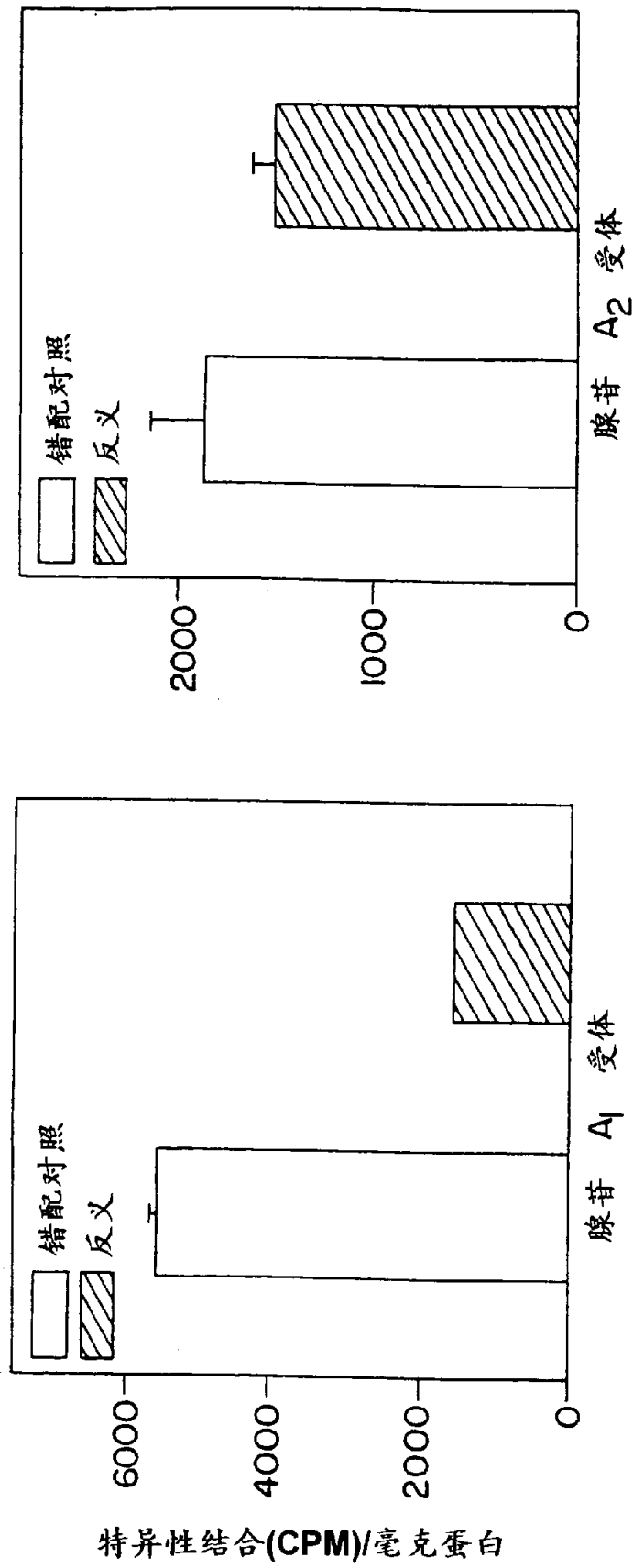


图 2