



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111447922 A

(43)申请公布日 2020.07.24

(21)申请号 201880036079.X

戴维·W·安德鲁斯

(22)申请日 2018.04.19

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(30)优先权数据

代理人 陈知宇

62/487,425 2017.04.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2019.11.29

A61K 9/127(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 31/7125(2006.01)

PCT/US2018/028308 2018.04.19

A61K 47/54(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

A61K 47/69(2006.01)

W02018/195281 EN 2018.10.25

A61P 35/00(2006.01)

C07H 21/02(2006.01)

(71)申请人 拜奥-帕斯控股股份有限公司

地址 美国德克萨斯州

申请人 托马斯杰弗逊大学

(72)发明人 阿纳·阿希萨瓦

权利要求书2页 说明书35页

道格拉斯·克雷格·胡珀

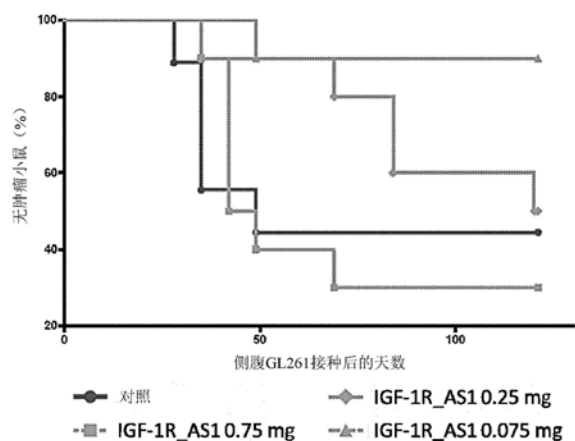
序列表16页 附图1页

(54)发明名称

用于IGF-1R抑制的P-乙氧基核酸

(57)摘要

本文提供了治疗癌症或自身免疫性疾病的方法,其包含施用包含中性磷脂的脂质体和靶向编码IGF-1R的多核苷酸的P-乙氧基寡核苷酸。



1. 一种治疗患有癌症或自身免疫性疾病的个体的方法,其包含向所述个体施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含以下:包含寡核苷酸群、磷脂的组合物,其中所述寡核苷酸与IGF-1R多核苷酸基因产物杂交,其中所述群的寡核苷酸由通过磷酸酯骨架键连接在一起的核苷分子构成,其中每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键中的至少一个是P-乙氧基骨架键,并且其中不超过80%每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;和药学上可接受的载剂,其中所述寡核苷酸和磷脂形成寡核苷酸-脂质复合物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述药物组合物进一步包含化学治疗剂。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述群的寡核苷酸包含根据SEQ ID NO:1或2中的任一个的序列。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述群的寡核苷酸包含根据SEQ ID NO:1的序列。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述群的寡核苷酸包含根据SEQ ID NO:2的序列。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中50%到80%所述磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中60%到75%所述磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中20%到50%所述磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中25%到40%所述磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中磷酸二酯骨架键分布遍及每一个寡核苷酸。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中磷酸二酯骨架键不聚集在每一个寡核苷酸的一部分内。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述寡核苷酸群就存在于所述群的所述寡核苷酸中的P-乙氧基骨架键和磷酸二酯骨架键的数量而言是不均匀的。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述群的所述寡核苷酸的尺寸介于18到30个核苷酸范围内。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述群的所述寡核苷酸的平均尺寸是18个核苷酸,其中每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键中的不超过14个是P-乙氧基骨架键。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述群的所述寡核苷酸的平均尺寸是20个核苷酸,其中每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键中的不超过16个是P-乙氧基骨架键。

16. 根据权利要求13所述的方法,其中所述群的所述寡核苷酸的平均尺寸是25个核苷酸,其中每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键中的不超过20个是P-乙氧基骨架键。

17. 根据权利要求13所述的方法,其中所述群的所述寡核苷酸的平均尺寸是30个核苷酸,其中每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键中的不超过24个是P-乙氧基骨架键。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述寡核苷酸群包含单一类型的寡核苷酸。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述寡核苷酸群包含至少两个种类的寡核苷酸。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中所述寡核苷酸群就所述群的所述寡核苷酸之间的磷酸二酯骨架键的分布而言是不均匀的。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述磷脂在生理pH下不带电荷或具有中性电荷。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述磷脂是中性磷脂。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述中性磷脂是磷脂酰胆碱。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述中性磷脂是二油酰磷脂酰胆碱。

25. 根据权利要求1所述的方法,其中所述磷脂基本上不含胆固醇。

26. 根据权利要求1所述的方法,其中所述磷脂和寡核苷酸以约5:1到约100:1的摩尔比存在。

27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述寡核苷酸-脂质复合物进一步定义为脂质体群。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中至少90%所述脂质体的直径小于5微米。

29. 根据权利要求27所述的方法,其中至少90%所述脂质体的直径小于4微米。

30. 根据权利要求27所述的方法,其中将所述寡核苷酸群并入所述脂质体群中。

31. 根据权利要求15所述的方法,其中所述个体是人类。

32. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌、胰腺癌、乳房癌、前列腺癌、黑素瘤、结肠癌、白血病、淋巴瘤、胶质瘤、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、骨肉瘤、口腔癌、卵巢癌、子宫癌、骨癌、脑癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、食道癌、直肠癌、膀胱癌、睾丸癌或肝癌。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述星形细胞瘤是多形性胶质母细胞瘤。

34. 根据权利要求1所述的方法,其中皮下、静脉内或腹膜内施用所述组合物。

35. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包含向所述个体施用至少第二抗癌疗法。

36. 根据权利要求24所述的方法,其中所述第二抗癌疗法是外科手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法、抗病毒疗法、免疫抑制疗法、抗菌疗法、抗寄生虫疗法、抗真菌疗法或细胞因子疗法。

37. 根据权利要求1所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是Th2显性自身免疫性疾病。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述Th2显性自身免疫性疾病是狼疮、过敏性皮炎、硬皮病、异位性湿疹、窦炎、炎性肠病、哮喘、溃疡性结肠炎或多发性化学过敏症。

39. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用减少了患者中的IGF-1R蛋白的表达。

40. 一种用于降低IGF-1R蛋白在细胞中的表达量的方法,其包含使所述细胞与治疗有效量的药物组合物接触,所述药物组合物包含以下:包含寡核苷酸群、磷脂的组合物,其中所述寡核苷酸与IGF-1R多核苷酸基因产物杂交,其中所述群的寡核苷酸由通过磷酸酯骨架键连接在一起的核苷分子构成,其中每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键中的至少一个是P-乙氧基骨架键,并且其中不超过80%每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;和药学上可接受的载剂,其中所述寡核苷酸和磷脂形成寡核苷酸-脂质复合物。

41. 一种用于向细胞递送治疗有效量的寡核苷酸的方法,其包含使所述细胞与治疗有效量的药物组合物接触,所述药物组合物包含以下:包含寡核苷酸群、磷脂的组合物,其中所述寡核苷酸与IGF-1R多核苷酸基因产物杂交,其中所述群的寡核苷酸由通过磷酸酯骨架键连接在一起的核苷分子构成,其中每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键中的至少一个是P-乙氧基骨架键,并且其中不超过80%每一个寡核苷酸中的所述磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;和药学上可接受的载剂,其中所述寡核苷酸和磷脂形成寡核苷酸-脂质复合物。

用于IGF-1R抑制的P-乙氧基核酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请案要求2017年4月19日提交的美国临时专利申请案第62/487,425号的优先权,所述申请案以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请案含有序列表,遵照37CFR 1.821的计算机可读形式(CRF)文本文件特此与
所述序列表一起提交并在本文中全文被提及。

技术领域

[0005] 本发明大体上涉及医学领域。更明确地说,本发明涉及与IGF-1R多核苷酸基因产物杂交的P-乙氧基寡核苷酸的脂质体制剂,和制造所述制剂并在医学中,甚至更明确地说在具有高IGF-1R基因表达或增加的活性的癌症治疗中使用所述制剂的方法。

背景技术

[0006] 胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)是具有酪氨酸激酶活性的糖蛋白受体。其是异四聚体受体,所述异四聚体受体的每一半一通过双硫桥键连接一由细胞外 α -子单元和跨膜 β -子单元构成。IGF-1R以非常高的亲和力结合IGF I和IGF II。IGF-1R介导促有丝分裂的分化和抗细胞凋亡作用。通过结合配体与受体的细胞外域来激活细胞质酪氨酸激酶蛋白。反过来,激酶激活涉及包括IRS-1、IRS-2、Shc和Grb 10的不同细胞内受质的刺激。

[0007] IGF系统在致癌作用中的作用已经成为深入研究的主题。这种兴趣遵循以下事实的发现:除了其促有丝分裂和抗细胞凋亡性质之外,IGF-1R似乎对于建立和维持转化表型而言是必需的。实际上,已经明确IGF-1R的过度表达或构成性激活在各种各样的细胞中导致不依赖于不含胎牛血清的培养基中的支持的细胞生长,并且在裸小鼠中导致肿瘤形成。IGF-1R在各种各样的肿瘤和肿瘤系中表达,并且IGF通过其与IGF-1R的连接而扩增了肿瘤生长。引起关注地,针对IGF-1R的鼠单克隆抗体抑制培养物中的许多细胞系的增殖和活体内肿瘤细胞的生长(Arteaga等人,1989;Li等人,1993;Zia等人,1996;Scotlandi等人,1998)。另外,IGF-1R的负性显性基因能够抑制肿瘤增殖(Jiang等人,1999)。因此,IGF-1R在致癌作用和肿瘤进展中起重要作用。因此,需要用于有效地抑制IGF-1R表达的组合物和方法。

发明内容

[0008] 本文提供用于使用与防止IGF-1R蛋白表达、因此消除可用IGF-1R蛋白池的中性脂质体组合的靶向编码IGF-1R的多核苷酸的无毒耐核酸酶性寡核苷酸来抑制IGF-1R表达的组合物。

[0009] 在一个实施例中,提供了包含与IGF-1R多核苷酸基因产物杂交的寡核苷酸群的组合物。在一些方面中,所述群的寡核苷酸由通过磷酸酯骨架键连接在一起的核苷分子构成,其中每个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的至少一个是P-乙氧基骨架键,并且其中不超过

80%每个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键。在一些方面中,每个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的至少一个是磷酸二酯骨架键。在一些方面中,所述群的寡核苷酸包含根据SEQ ID NO:1或2中的任一个的序列。在一些方面中,所述群的寡核苷酸包含根据SEQ ID NO:1的序列。在一个方面中,所述群的寡核苷酸包含根据SEQ ID NO:1的序列,并且至少介于所述群的寡核苷酸的核苷酸5与6之间、核苷酸11与12之间和核苷酸16与17之间的磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键。在一些方面中,所述群的寡核苷酸包含根据SEQ ID NO:2的序列。在一个方面中,所述群的寡核苷酸包含根据SEQ ID NO:2的序列,并且至少介于所述群的寡核苷酸的核苷酸5与6之间、核苷酸11与12之间和核苷酸17与18之间的磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键。在各种方面中,所述群的寡核苷酸抑制IGF-1R蛋白的表达。在一些方面中,冻干组合物。

[0010] 在一些方面中,10%到80%磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;20%到80%磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;30%到80%磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;40%到80%磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;50%到80%磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;或60%到70%磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键,或其中可衍生的任何范围是P-乙氧基骨架键。在一些方面中,20%到90%磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键;20%到80%磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键;20%到70%磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键;20%到60%磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键;20%到50%磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键;或30%到40%磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键,或其中可衍生的任何范围是磷酸二酯骨架键。在各种方面中,至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或其中的任何值的磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键。在各种方面中,至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或其中的任何值的磷酸酯骨架键是磷酸二酯骨架键。在某些方面中,磷酸二酯骨架键分布在整个寡核苷酸中。因此,寡核苷酸不是嵌合分子。在一些方面中,寡核苷酸不包含硫代磷酸酯骨架键。

[0011] 在一些方面中,所述群的寡核苷酸的尺寸介于7到30个核苷酸范围内。在某些方面中,所述群的寡核苷酸的尺寸介于12到25个核苷酸范围内。在各种方面中,所述群的寡核苷酸的尺寸是至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。尺寸范围可以是所述群中的寡核苷酸的平均尺寸。

[0012] 在一些方面中,所述群的寡核苷酸的平均尺寸是7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸,其中每个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的不超过5、6、7、8、8、9、10、11、11、12、13、14、15、15、16、17、18、19、20、20、21、22、23或24个分别是P-乙氧基骨架键。在一些方面中,所述群的寡核苷酸的平均尺寸是7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸,并且每个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的至少2、2、2、2、3、3、3、3、4、4、4、4、4、5、5、5、5、5、5、6、6、6、6或6个分别是磷酸二酯骨架键。举例来说,所述群的寡核苷酸的平均尺寸可以是18个核苷酸,其中每个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的不超过14个是P-乙氧基骨架键;所述群的寡核苷酸的平均尺寸可以是20个核苷酸,其中每个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的不超过16个是P-乙氧基骨架键;所述群的寡核苷酸的平均尺寸可以是25个核苷酸,其中每个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的不超过20个是P-乙氧基骨架键;或所述群的寡核苷酸的平均

尺寸可以是30个核苷酸,其中每个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的不超过24个是P-乙氧基骨架键。

[0013] 在一些方面中,寡核苷酸群包含单一种类的寡核苷酸。在其它方面中,寡核苷酸群包含至少两个种类的寡核苷酸。单一种类的寡核苷酸可以具有相同核苷酸序列,但是在分子内的不同位置具有或缺乏P-乙氧基键。因此,所述群在核苷酸序列方面可以是均匀的,而在所述群的寡核苷酸之间的磷酸二酯骨架键的分布方面可以是不均匀的。另外,所述群在所述群的寡核苷酸之间的P-乙氧基骨架键和磷酸二酯骨架键的数量方面可以是不均匀的。作为非限制性实例,所述群的寡核苷酸的第一部分可以具有70%P-乙氧基键和30%磷酸二酯键,而所述群的寡核苷酸的第二部分可以具有60%P-乙氧基键和40%磷酸二酯键。在一些方面中,寡核苷酸群包含反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA) 或piwiRNA (piRNA)。

[0014] 在各种方面中,组合物进一步包含磷脂。在一些方面中,磷脂和寡核苷酸以约5:1到约100:1的摩尔比存在。在一些方面中,寡核苷酸和磷脂形成寡核苷酸-脂质复合物,例如脂质体复合物。在一些方面中,至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%脂质体的直径小于5微米。在一些方面中,至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%脂质体的直径小于4微米。在一些方面中,将寡核苷酸群并入脂质体群中。

[0015] 在一些方面中,磷脂在生理pH下不带电荷或具有中性电荷。在一些方面中,磷脂是中性磷脂。在某些方面中,中性磷脂是磷脂酰胆碱。在某些方面中,中性磷脂是二油酰基磷脂酰胆碱。在一些方面中,磷脂基本上不含胆固醇。

[0016] 在一个实施例中,提供了包含本发明实施例的寡核苷酸与磷脂的组合物和药学上可接受的载剂的药物组合物。在一些方面中,组合物进一步包含化学治疗剂。

[0017] 在一个实施例中,提供了用于降低细胞中的IGF-1R蛋白的表达量的方法,其包含使细胞与本发明实施例的寡核苷酸组合物接触。在一些方面中,在细胞中下调IGF-1R和例如己糖激酶的IGF-1R下游基因的表达。在一些方面中,细胞是哺乳动物细胞。在一些方面中,细胞是癌细胞。在一些方面中,细胞是例如单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、白细胞、自然杀手(NK)细胞、淋巴细胞、T细胞、B细胞、树突状细胞、肥大细胞或巨噬细胞的免疫系统细胞。在某些方面中,巨噬细胞是M2巨噬细胞,其相比于M1巨噬细胞而言产生更高量的IGF-1R并在其细胞表面上表达CD11b、CD14、CD15、CD23、CD64、CD68、CD163、CD204、CD206中的一个或多个。在某些方面中,单核细胞是M2单核细胞,其在其细胞表面上表达CD11b、CD14、CD15、CD23、CD64、CD68、CD163、CD204、CD206中的一个或多个。

[0018] 在一个实施例中,提供了用于向细胞递送治疗有效量的寡核苷酸的方法,所述方法包含使细胞与本发明实施例的药物组合物接触。在一些方面中,所述方法是治疗增生、癌症、自身免疫性疾病或感染性疾病的方法。在一些方面中,所述方法是治疗、预防或延缓阿兹海默症(Alzheimer's disease)、发炎性肠病、2型糖尿病中的耐胰岛素性和牛皮癣的方法。在一个实施例中,提供了用于增强由疫苗接种诱导的免疫反应的方法,其包含向个体施用治疗有效量的本发明实施例的药物组合物。

[0019] 在一个实施例中,提供了用于治疗患有癌症、自身免疫性疾病或感染性疾病的个体的方法,所述方法包含向个体施用治疗有效量的本发明实施例的药物组合物。在一些方面中,个体是人类。在一些方面中,癌症是膀胱癌、血液癌、淋巴瘤、胰腺癌、骨癌、骨髓癌、脑癌、乳房癌、结肠癌、食道癌、胃癌、头颈癌、肾癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、皮肤癌、睾丸癌、舌癌、卵巢癌或子宫癌。可用本发明的方法治疗的肿瘤包括但不限于黑素瘤、前列腺癌、卵巢癌、乳房癌、乳腺癌、头颈鳞状细胞癌、乳头状肾细胞癌、胆囊癌、直肠癌、胰腺癌、肺癌、结肠癌、胶质瘤、星形细胞瘤、经典霍奇金氏淋巴瘤(classical Hodgkin's lymphoma)和平滑肌肿瘤以及胶质母细胞瘤细胞、骨髓干细胞、造血细胞、成骨细胞、上皮细胞、纤维母细胞以及经历细胞凋亡并诱导抗肿瘤细胞或肿瘤细胞消退的任何其它肿瘤细胞。在一些方面中,自身免疫性疾病是Th2显性自身免疫性疾病,这意味着自身免疫性疾病由Th2类别的T辅助细胞的细胞的活性驱动。在一些方面中,自身免疫性疾病是红斑狼疮、过敏性皮炎、硬皮病、异位性湿疹、窦炎、发炎性肠病、哮喘、过敏、溃疡性结肠炎、多发性化学过敏症(multiple chemical sensitivity)、脊柱关节病、休格连氏病(Sjogren's disease)、克罗恩氏病(Crohn's disease)、糖尿病、多发性硬化症或类风湿性关节炎。在一些方面中,感染性疾病是细菌感染、真菌感染、病毒感染或寄生虫感染。在一些方面中,组合物是皮下、静脉内或腹膜内施用的。在一些方面中,所述方法进一步包含向个体施用至少第二抗癌疗法。在一些方面中,第二抗癌疗法是外科疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。在一些方面中,组合物施用减少了患者中的IGF-1R蛋白的表达。在一个实施例中,提供了用于增强由疫苗接种诱导的免疫反应的方法。

[0020] 在一个实施例中,提供了用于降低IGF-1R蛋白在细胞中的表达量的方法,其包含使细胞与治疗有效量的本发明实施例的药物组合物接触,所述本发明实施例的药物组合物包含以下:包含寡核苷酸群、磷脂的组合物,其中寡核苷酸与IGF-1R多核苷酸基因产物杂交,其中所述群的寡核苷酸由通过磷酸酯骨架键连接在一起的核苷分子构成,其中每一个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的至少一个是P-乙氧基骨架键,并且其中不超过80%每一个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;和药学上可接受的载剂,其中寡核苷酸和磷脂形成寡核苷酸-脂质复合物。

[0021] 在一个实施例中,提供了用于向细胞递送治疗有效量的寡核苷酸的方法,其包含使细胞与治疗有效量的本发明实施例的药物组合物接触,所述本发明实施例的药物组合物包含以下:包含寡核苷酸群、磷脂的组合物,其中寡核苷酸与IGF-1R多核苷酸基因产物杂交,其中所述群的寡核苷酸由通过磷酸酯骨架键连接在一起的核苷分子构成,其中每一个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键中的至少一个是P-乙氧基骨架键,并且其中不超过80%每一个寡核苷酸中的磷酸酯骨架键是P-乙氧基骨架键;和药学上可接受的载剂,其中寡核苷酸和磷脂形成寡核苷酸-脂质复合物。

[0022] 寡核苷酸包括与编码靶蛋白或调节靶蛋白表达的核酸分子特异性杂交的反义核酸分子。“特异性杂交(Specific hybridization)”(或这些术语的变型,其包括但不限于“特异性杂交(specifically hybridizes)”)意味着反义核酸分子与靶核酸分子杂交并调节其表达。优选地,“特异性杂交”还意味着没有其它基因或转录物受到影响。寡核苷酸可以是单链核酸,并且可以包含7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个核碱基。在特定方面中,寡核苷酸可以包含15到30个、19到25

个、20到23个或21个连续核碱基。在某些实施例中，寡核苷酸抑制促进癌性或癌前性或增生性哺乳动物细胞(例如人类细胞)生长的基因的转译。寡核苷酸可以诱导细胞中的细胞凋亡，且/或抑制癌基因或其它靶基因的转译。在某些实施例中，寡核苷酸组分包含单一种类的寡核苷酸。在其它实施例中，寡核苷酸组分包含靶向1、2、3、4个或更多个基因的2、3、4种或更多种寡核苷酸。组合物可以进一步包含化学治疗剂或其它抗癌剂，所述药剂可以并入或不并入本发明的脂质组分或脂质体中。在另外的实施例中，将寡核苷酸组分并入脂质体或脂质组分内。

[0023] “捕获”、“包封”和“并入”是指脂质或脂质体通过与所关注的药剂缔合或围绕所关注的药剂而形成无法自由扩散到溶液中的障碍，例如脂质体可以将药剂包封在脂质层内或包封在脂质层内部或之间的含水隔室内。在某些实施例中，药学上可接受的载剂包含组合物。可以将药学上可接受的载剂配制成向人类个体或患者施用。

[0024] 在某些实施例中，脂质组分具有基本上中性的电荷，这是因为其包含中性磷脂或净中性电荷。在某些方面中，中性磷脂可以是磷脂酰胆碱，例如DOPC、蛋磷脂酰胆碱(“EPC”)、二月桂酰磷脂酰胆碱(“DLPC”)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(“DPPC”)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(“DSPC”)、二亚油酰磷脂酰胆碱、1,2-二花生酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(“DAPC”)、1,2-二二十碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(“DEPC”)、1-肉豆蔻基-2-棕榈酰磷脂酰胆碱(“MPPC”)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“PMPC”)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰磷脂酰胆碱(“PSPC”)、1-硬脂酰基-2-棕榈酰磷脂酰胆碱(“SPPC”)、1-棕榈酰基-2-油酰磷脂酰胆碱(“POPC”)、1-油酰基-2-棕榈酰磷脂酰胆碱(“OPPC”)或溶血磷脂酰胆碱。在其它方面中，中性磷脂可以是磷脂酰乙醇胺，例如二油酰磷脂酰乙醇胺(“DOPE”)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(“DSPE”)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(“DMPE”)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(“DPPE”)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(“POPE”)或溶血磷脂酰乙醇胺。在某些实施例中，磷脂组分可以包含1、2、3、4、5、6、7、8或更多种或类型的中性磷脂。在其它实施例中，磷脂组分可以包含2、3、4、5、6或更多种或类型的中性磷脂。

[0025] 在某些实施例中，脂质组分可以具有基本上中性的电荷，这是因为其包含带正电荷的脂质和带负电荷的脂质。脂质组分可以进一步包含带中性电荷的脂质或磷脂。带正电荷的脂质可以是带正电荷的磷脂。带负电荷的脂质可以是带负电荷的磷脂。带负电荷的磷脂可以是磷脂酰丝氨酸，例如二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(“DMPS”)、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸(“DPPS”)或脑磷脂酰丝氨酸(“BPS”)。带负电荷的磷脂可以是磷脂酰甘油，例如二月桂酰磷脂酰甘油(“DLPG”)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)、二棕榈酰磷脂酰甘油(“DPPG”)、二硬脂酰磷脂酰甘油(“DSPG”)或二油酰磷脂酰甘油(“DOPG”)。在某些实施例中，组合物进一步包含胆固醇或聚乙二醇(PEG)。在其它实施例中，组合物基本上不含胆固醇。在某些实施例中，磷脂是天然存在的磷脂。在其它实施例中，磷脂是合成磷脂。

[0026] 脂质体可以由一种或多种磷脂制成，只要脂质材料基本上不带电即可。重要的是，组合物基本上不含阴离子和阳离子磷脂和胆固醇。合适的磷脂包括磷脂酰胆碱和所属领域的技术人员所熟知的其它磷脂。

[0027] 本发明的另一个方面涉及用于将寡核苷酸递送到细胞的方法，其包含使细胞与本发明的中性脂质组合物接触。所述方法将提供有效量的本发明组合物。有效量是减弱、减慢、减少或消除个体中的细胞、病况或疾病状态的治疗组分的量。例如人类的个体或患者可

以包含所述细胞。所述方法可以进一步包含治疗癌症或其它增生性病况的方法。癌症可能起源于膀胱、血液、骨骼、骨髓、大脑、乳房、结肠、食道、胃肠道、牙龈、头部、肾脏、肝脏、淋巴结、肺脏、鼻咽、颈部、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌片、卵巢或子宫。在某些实施例中，所述方法进一步包含治疗非癌性疾病或增生性病况的方法。所述细胞可以是癌前细胞或癌细胞。在某些实施例中，所述组合物和方法抑制细胞生长，诱导细胞中的细胞凋亡，且/或抑制癌基因转译。寡核苷酸可以抑制在癌细胞中过度表达的基因的转译。

[0028] 在某些实施例中，本发明的方法进一步包含向个体施用额外的疗法。所述额外的疗法可以包含施用化学疗法（例如紫杉醇 (paclitaxel) 或多西他赛 (docetaxel)）、外科手术、放射疗法和/或基因疗法。在某些方面中，化学疗法是多西他赛、紫杉醇、顺铂 (CDDP)、卡铂、丙卡巴嗪、甲氯乙胺、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑 (melphalan)、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、放线菌素、柔红霉素、阿霉素、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊苷 (etoposide) (VP16)、他莫昔芬 (tamoxifen)、雷洛昔芬 (raloxifene)、雌激素受体结合剂、紫杉醇 (taxol)、吉西他滨 (gemcitabine)、那韦尔滨 (navelbine)、法呢基蛋白转移酶抑制剂、跨铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱、甲氨蝶呤或其组合。在某些实施例中，化学疗法是例如多西他赛或紫杉醇的紫杉烷。相对于本发明的中性脂质组合物，化学疗法可以在其之前、期间、之后或前述组合递送。化学疗法可以在中性脂质组合物的0、1、5、10、12、20、24、30、48或72小时或更长时间内递送。中性脂质组合物、第二抗癌疗法或中性脂质组合物和抗癌疗法两者可以肿瘤内、静脉内、腹膜内、皮下、经口或通过其各种组合来施用。

[0029] 预期可以相对于本发明的任何方法或组合物来实施本说明书中所讨论的任何实施例，并且反之亦然。此外，本发明的组合物可用于实现本发明的方法。

[0030] 如本文所使用，就指定组分而言，“基本上不含”在本文中用于意味着没有将指定组分故意地配制到组合物中和/或仅以杂质形式或以痕量存在。因此，由组合物的任何意外污染产生的指定组分的总量远低于0.05%，优选低于0.01%。其中用标准分析方法无法检测到任何量的指定组分的组合物是最优选的。

[0031] 如本说明书中所使用，“一个/种 (a/an)”可以意指一个/种或多个/种。如权利要求书中所使用，当与单词“包含”结合使用时，单词“一个/种”可以意指一个/种或超过一个/种。

[0032] 除非明确指示仅指替代方案或替代方案互相排斥，否则在权利要求书中使用术语“或”用于意指“和/或”，但本公开支持仅提及替代方案和“和/或”的定义。如本文所使用，“另一个/种”可以意指至少第二个/种或更多个/种。

[0033] 在整个本申请案中，术语“约”用于指示值包括装置误差的固有变化（所述方法用来测定所述值）或研究个体之间存在的变化。

[0034] 根据以下详细描述，本公开的其它目的、特点和优点将变得显而易见。然而，应当理解，详细描述和具体实例虽然表明了本发明的优选实施例，但仅以说明的方式给出，这是因为根据这项详细描述，本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于所属领域的技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0035] 以下图式形成本说明书的一部分，并且包括在内以进一步展现本发明的某些方

面。通过结合本文所呈现的具体实施例的详细描述来参考这些图式中的一个或多个可以更好地理解本发明。

[0036] 图1-脂质体IGF-1R反义物延迟小鼠中的GL261细胞肿瘤的形成。通过在移植GL261细胞之后14天向小鼠施用对应于SEQ ID NO:1的脂质体IGF-1R反义物来测试脂质体IGF-1R反义物防止植入小鼠中的GL261细胞肿瘤生长的能力。

具体实施方式

[0037] 为了抑制IGF-1R蛋白的表达,本发明提供了用于将抗IGF-1R寡核苷酸(例如基因表达抑制剂)通过脂质组合物递送到细胞的组合物和方法,所述脂质组合物在某些方面是具有约零净电荷的脂质组合物,即中性脂质组合物,这允许其通过静脉内输注来全身性地递送。这些方法可以有效地用于治疗癌症,治疗自身免疫性疾病或增强由疫苗接种诱导的免疫反应。

[0038] I. 脂质和脂质体

[0039] “脂质体”在本文中用于意指具有脂质双层的含脂质囊泡,以及可以捕获或并入反义寡核苷酸的其它脂质载体颗粒。因此,脂质体是涵盖通过生成封闭脂质双层或聚集体而形成的各种单层、多层和多囊泡脂质载体的通用术语。另外,脂质体可以具有未定义的层状结构。脂质体可以被表征为具有带有磷脂双层膜和内部含水介质的囊泡结构。多层脂质体具有通过含水介质间隔开的多个脂质层。其在磷脂悬浮于过量的水溶液中时自发形成。脂质组分在形成封闭结构之前经历自我重排,并在脂质双层之间捕获水和溶解的溶质(Ghosh和Bachhawat,1991)。然而,本发明还涵盖在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。举例来说,脂质可以采取胶束结构或仅以脂质分子的非均一聚集体形式而存在。

[0040] 脂质体是一种形式的纳米颗粒,所述纳米颗粒是将各种药物递送到患病组织的载体。最佳脂质体尺寸取决于靶组织。在肿瘤组织中,血管系统是不连续的,并且孔径在100nm到780nm之间不等(Siwak等人,2002)。相比之下,大多数组织中的正常血管内皮的孔径<2nm,而毛细血管后小静脉的孔径是6nm。认为带负电荷的脂质体比中性或带正电荷的脂质体更快地从循环中去除;然而,最近研究表明带负电荷的脂质的类型会影响网状内皮系统(RES)吸收脂质体的速率。举例来说,含有未被空间屏蔽的带负电荷的脂质(磷脂酰丝氨酸、磷脂酸和磷脂酰甘油)的脂质体比中性脂质体更快被清除。有趣的是,相比于阴离子、中性或空间稳定的中性脂质体,阳离子脂质体(1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷[DOTAP])和阳离子脂质体-DNA复合物更能通过内吞作用被血管生成血管的内皮细胞强烈结合和内化(Thurston等人,1998;Krasneci等人,2003)。阳离子脂质体可能不是理想的肿瘤细胞递送载体,这是因为与肿瘤细胞的表面相互作用产生静电衍生的结合位点屏障效应,抑制了递送系统与肿瘤球体的进一步缔合(Kostarelos等人,2004)。然而,中性脂质体似乎具有更好的肿瘤内渗透。特定脂质体制剂的毒性也已经引起关注。阳离子脂质体通过促进活性氧中间体的释放而引发剂量依赖性毒性和肺部炎症,并且与例如DOTAP的单价阳离子脂质体相比,多价阳离子脂质体的这种作用更为明显(Dokka等人,2000)。中性和阴性脂质体似乎没有展现出肺毒性(Guitierrez-Puente等人,1999)。阳离子脂质体虽然有效地吸收了核酸,但在体内基因下调方面的成功有限,这或许是由于其稳定细胞内本质以及导致无法释放核酸内容物的缘故。在本文中使用具有中性电荷的脂质或具有中性电荷的脂质组合物,例如

1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC),这是因为其具有中性性质并成功地在体内递送反义寡核苷酸。

[0041] 本发明提供用于使例如反义寡核苷酸的寡核苷酸与脂质和/或脂质体缔合的方法和组合物。可以将寡核苷酸并入脂质体的含水内部,散布在脂质体的脂质双层内,通过与脂质体和寡核苷酸两者均缔合的连接分子而与脂质体连接,在脂质体中被捕获,与脂质体复合,将其分散在含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质组合,以悬浮液形式含于脂质中,与胶束一起含在内或与胶束复合,或以其它方式与脂质缔合。本文所提供的脂质体或脂质体/寡核苷酸相关组合物不限于于溶液中的任何特定结构。举例来说,其可以以双层结构形式、以胶束形式或与“塌陷”结构一起存在。其也可以简单地散布在溶液中,可能形成尺寸或形状不均一的聚集体。

[0042] A. 脂质

[0043] 脂质是可以天然存在或合成的脂肪物质。举例来说,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴,以及所属领域的技术人员众所周知的含有长链脂肪族烃和例如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的其衍生物的一类化合物。实例是脂质1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)。

[0044] 本发明的脂质组合物可以包含磷脂。在某些实施例中,可以在例如脂质体的脂质组合物生产中使用单一种类或类型的磷脂。在其它实施例中,可以使用超过一种或超过一个类型的磷脂。

[0045] 磷脂包括甘油磷脂和某些鞘脂。磷脂包括但不限于二油酰磷脂酰胆碱(“DOPC”)、蛋磷脂酰胆碱(“EPC”)、二月桂酰磷脂酰胆碱(“DLPC”)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(“DPPC”)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(“DSPC”)、二亚油酰磷脂酰胆碱、1,2-二花生酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(“DAPC”)、1,2-二二十碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(“DEPC”)、1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰磷脂酰胆碱(“MPPC”)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“PMPC”)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰磷脂酰胆碱(“PSPC”)、1-硬脂酰基-2-棕榈酰磷脂酰胆碱(“SPPC”)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(“POPC”)、1-油酰基-2-棕榈酰磷脂酰胆碱(“OPPC”)、二月桂酰磷脂酰甘油(“DLPG”)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)、二棕榈酰磷脂酰甘油(“DPPG”)、二硬脂酰磷脂酰甘油(“DSPG”)、二油酰磷脂酰甘油(“DOPG”)、二肉豆蔻酰磷脂酸(“DMPA”)、二棕榈酰磷脂酸(“DPPA”)、二硬脂酰磷脂酸(“DSPA”)、二油酰磷脂酸(“DOPA”)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(“DMPE”)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(“DPPE”)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(“DSPE”)、二油酰磷脂酰乙醇胺(“DOPE”)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(“POPE”)、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(“DMPS”)、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸(“DPPS”)、脑磷脂酰丝氨酸(“BPS”)、二硬脂酰鞘磷脂(“DSSP”)、脑鞘磷脂(“BSP”)、二棕榈酰鞘磷脂(“DPSP”)、溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺。

[0046] 磷脂包括例如磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油和磷脂酰乙醇胺;因为磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱在生理条件下(即在约pH 7下)不带电荷,所以这些化合物可以特别适用于生成中性脂质体。在某些实施例中,磷脂DOPC用于产生不带电荷的脂质体或脂质组合物。在某些实施例中,也可以使用非磷脂的脂质(例如胆固醇)

[0047] 磷脂可以来自天然来源或合成来源。然而,在某些实施例中,不使用例如蛋磷脂酰胆碱或大豆磷脂酰胆碱、脑磷脂酸、脑磷脂酰肌醇或植物磷脂酰肌醇、心脏心磷脂和植物磷

脂酰乙醇胺或细菌磷脂酰乙醇胺的来自天然来源的磷脂作为伯磷脂(即占总磷脂组合物50%或更高),这是因为这可能导致所得脂质体不稳定和渗漏。

[0048] B. 中性脂质体

[0049] 如本文所使用,“中性脂质体或脂质组合物”或“不带电荷的脂质体或脂质组合物”定义为具有一种或多种脂质的脂质体或脂质组合物,所述一种或多种脂质产生基本上中性的净电荷(基本上不带电荷)。在某些实施例中,中性脂质体或脂质组合物可以主要包括本身中性的脂质和/或磷脂。在某些实施例中,两亲脂质可以并入或用于生成中性脂质体或脂质组合物。举例来说,可以通过组合带正电荷的脂质和带负电荷的脂质来生成中性脂质体,以使得这些电荷基本上互相抵消,从而产生基本上中性的净电荷。“基本上中性”或“基本上不带电荷”意指很少有给定群体(例如脂质体群体)内的脂质(如果存在的话)包括未与另一种组分的相反电荷抵消的电荷(例如少于10%、更优选少于5%并且最优选少于1%组分包括未抵消的电荷)。在本发明的某些实施例中,可以制备一种组合物,其中组合物的脂质组分是基本上中性的,但不呈脂质体形式。

[0050] 脂质体的尺寸视合成方法而变化。悬浮于水溶液中的脂质体一般呈球形囊泡的形状,并且可以具有脂质双层分子的一个或多个同心层。每一层由平行阵列的由式XY表示的分子组成,其中X是亲水部分,并且Y是疏水部分。在含水悬浮液中,排列同心层以使得亲水部分趋向于保持与水相接触,而疏水区域趋向于自我缔合。举例来说,当脂质体内存在水相时,脂质分子可以形成具有排列XY-YX的双层,称为薄层。当超过一个脂质分子的亲水部分和疏水部分变得彼此缔合时,可能会形成脂质聚集体。这些聚集体的尺寸和形状将取决于许多不同变量,例如溶剂的本质和溶液中的其它化合物的存在。

[0051] 可以根据已知实验室技术制备本发明范围内的脂质体,所述已知实验室技术例如是Bangham等人(1965)的方法,其内容以引用的方式并入本文中;Gregoriadis(1979)的方法,其内容以引用的方式并入本文中;Deamer和Uster(1983)的方法,其内容以引用的方式并入;和Szoka和Papahadjopoulos(1978)所描述的反相蒸发法。前述方法在其相应的捕获含水材料的能力和其相应的含水空间-脂质比方面不同。

[0052] 在某些实施例中,中性脂质体可以用于递送例如反义寡核苷酸的寡核苷酸。中性脂质体可以含有针对单个基因转译抑制的单一类型的寡核苷酸,或中性脂质体可以含有针对多个基因转译抑制的多种寡核苷酸。此外,中性脂质体除寡核苷酸外还可以含有化学治疗剂;因此,在某些实施例中,可以将化学治疗剂和寡核苷酸在相同或独立组合物中递送到细胞(例如人类个体中的癌细胞)。

[0053] 可以使干燥脂质或冻干脂质体脱水,并用合适溶剂(例如DPBS或Hepes缓冲剂)以适当浓度重构。然后,可以在涡旋混合器中剧烈摇晃混合物。可以使脂质体以适当的总磷脂浓度(例如约10-200mM)重新悬浮。可以通过在29,000g下离心来去除未包封的寡核苷酸,并洗涤脂质体集结粒。或者,可以通过针对过量溶剂透析来去除未包封的寡核苷酸。包封的寡核苷酸的量可以根据标准方法来测定。

[0054] II. 抑制基因表达

[0055] 抑制性寡核苷酸可以抑制细胞中的基因的转录或转译。寡核苷酸的长度可以是5到50个或更多个核苷酸,并且在某些实施例中7到30个核苷酸。在某些实施例中,寡核苷酸的长度可以是7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29

或30个核苷酸。寡核苷酸可以包含核酸和/或核酸类似物。通常,抑制性寡核苷酸会抑制细胞内的单个基因的转译;然而,在某些实施例中,抑制性寡核苷酸可以抑制细胞内的超过一个基因的转译。

[0056] 在寡核苷酸内,寡核苷酸的组分不需要始终具有相同类型或均质性(例如寡核苷酸可以包含核苷酸和核酸或核苷酸类似物)。在本发明的某些实施例中,寡核苷酸可以仅包含单个核酸或核酸类似物。抑制性寡核苷酸可以包含5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30或更多个(包括其间的所有范围)连续核碱基,所述连续核碱基与互补核酸杂交以形成双链结构。

[0057] III. 核酸

[0058] 本发明提供用于通过中性脂质体递送寡核苷酸的方法和组合物。因为寡核苷酸由核酸构成,所以就寡核苷酸而言,也可以使用核酸相关方法(例如核酸产生、核酸修饰等)。

[0059] 术语“核酸”在所属领域中众所周知。如本文所使用的“核酸”一般是指包含核碱基的DNA、RNA或其衍生物或类似物的分子(即链)。这些定义是指单链核酸或双链核酸。双链核酸可以通过完全互补的结合而形成;然而,在一些实施例中,双链核酸可以通过部分或基本上互补的结合而形成。如本文所使用,单链核酸可以由前缀“ss”表示,而双链核酸可以由前缀“ds”表示。

[0060] A. 核碱基

[0061] 如本文所使用,“核碱基”是指杂环碱基,例如在至少一种天然存在的核酸(即DNA和RNA)中发现的天然存在的核碱基(即A、T、G、C或U)以及此类核碱基的天然或非天然存在的衍生物和类似物。核碱基一般可以与至少一个天然存在的核碱基一起(即“粘合”或“杂交”)形成一个或多个氢键,其方式可以替代天然存在的核碱基配对(例如A与T、G与C和A与U之间的氢键结)。使用本文所描述或所属领域的普通技术人员所已知的任何化学或天然合成方法可以使核苷或核苷酸包含核碱基。

[0062] “嘌呤”和/或“嘧啶”核碱基涵盖天然存在的嘌呤和/或嘧啶核碱基以及其衍生物和类似物,包括但不限于被烷基、羧基烷基、氨基、羟基、卤素(即氟、氯、溴或碘)、硫醇或烷基硫醇部分中的一个或多个取代的嘌呤或嘧啶。优选烷基(例如烷基、羧基烷基等)部分包含约1、约2、约3、约4、约5到约6个碳原子。嘌呤或嘧啶的其它非限制性实例包括脱氮嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、5-氟尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-氯鸟嘌呤、溴烟胺比林、8-氨基鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤、8-甲基鸟嘌呤、8-硫鸟嘌呤、氮鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、5-乙基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-乙基尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-丙基尿嘧啶、硫尿嘧啶、2-甲基腺嘌呤、甲基硫腺嘌呤、N,N-二甲基腺嘌呤、氮杂腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-羟基腺嘌呤、6-羟基氨基嘌呤、6-硫嘌呤、4-(6-氨基己基/胞嘧啶)等等。嘌呤和嘧啶衍生物或类似物包括但不限于(缩写/修饰碱基描述):ac4c/4-乙酰基胞苷、Mam5s2u/5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿苷、Chm5u/5-(羧基羟基甲基)尿苷、Man q/β、D-甘露糖基腺苷、Cm/2'-O-甲基胞苷、Mcm5s2u/5-甲氧基羧基甲基-2-硫尿苷、Cmm5s2u/5-羧基甲基氨基-甲基-2-硫尿苷、Mcm5u/5-甲氧基羧基甲基尿苷、Cmm5u/5-羧基甲基氨基甲基尿苷、Mo5u/5-甲氧基尿苷、D/二氢尿苷、Ms2i6a、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷、Fm/2'-O-甲基假尿苷、Ms2t6a/N-((9-β-D-呋喃核糖基-2-甲基硫嘌呤-6-基)氨基甲酰基)苏氨酸、Gal q/β、D-半乳糖基腺苷、Mt6a/N-((9-β-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)N-甲基-氨基甲酰基)苏氨酸、Gm/2'-O-甲基鸟

苷、Mv/尿苷-5-氧基乙酸甲酯、I/肌苷、o5u/尿苷-5-氧基乙酸(v)、I6a/N6-异戊烯基腺苷、Osyw/怀丁氧苷、m1a/1-甲基腺苷、P/假尿苷、m1f/1-甲基假尿苷、Q/癸苷、m1g/1-甲基鸟苷、s2c/2-硫胞苷、m1I/1-甲基肌苷、s2t/5-甲基-2-硫尿苷、m22g/2,2-二甲基鸟苷、s2u/2-硫尿苷、m2a/2-甲基腺苷、s4u/4-硫尿苷、m2g/2-甲基鸟苷、T/5-甲基尿苷、m3c/3-甲基胞苷、t6a/N-((9-β-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)氨基甲酰基)苏氨酸、m5c/5-甲基胞苷、Tm/2'-O-甲基-5-甲基尿苷、m6a/N6-甲基腺苷、Um/2'-O-甲基尿苷、m7g/7-甲基鸟苷、Yw/怀丁苷、Mam5u/5-甲基氨基甲基尿苷或X/3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷、(acp3)u。

[0063] B. 核苷

[0064] 如本文所使用,“核苷”是指包含共价连接到核碱基连接子部分的核碱基的单个化学单元。“核碱基连接子部分”的非限制性实例是包含5个碳原子的糖(即“5碳糖”),包括但不限于脱氧核糖、核糖、阿拉伯糖或5碳糖的衍生物或类似物。5碳糖的衍生物或类似物的非限制性实例包括于糖环中的2'-氟-2'-脱氧核糖或碳环糖,其中碳取代了氧原子。如本文所使用,“部分”一般是指较大化学或分子结构的较小化学或分子组分。

[0065] 核碱基与核碱基连接子部分的不同类型的共价连接在所属领域中已知。作为非限制性实例,包含嘌呤(即A或G)或7-脱氮嘌呤核碱基的核苷通常包含嘌呤或7-脱氮嘌呤的9位与5碳糖的1'位共价连接。在另一个非限制性实例中,包含嘧啶核碱基(即C、T或U)的核苷通常包含嘧啶的1位与5碳糖的1'位的共价连接(Kornberg和Baker,1992)。

[0066] C. 核苷酸

[0067] 如本文所使用,“核苷酸”是指进一步包含“骨架键”的核苷。骨架键一般将核苷酸共价连接到包含核苷酸的另一个分子或另一个核苷酸以形成核酸。天然存在的核苷酸中的“骨架键”通常包含共价连接到5碳糖的磷酸酯部分(例如磷酸二酯骨架键)。骨架部分的连接通常发生在5碳糖的3'位或5'位处。然而,其它类型的连接在所属领域中是已知的,特别地当核苷酸包含天然存在的5碳糖或磷酸部分的衍生物或类似物时如此。

[0068] D. 核酸类似物

[0069] 核酸可以包含以下或完全由以下构成:可以存在于天然存在的核酸中的核碱基、核碱基连接子部分和/或骨架键的衍生物或类似物。如本文所使用,“衍生物”是指化学修饰或更改的形式的天然存在的分子,而术语“模拟物”或“类似物”是指在结构上可以或可以不与天然存在的分子或部分相似、但具有类似功能的分子。核碱基、核苷和核苷酸类似物或衍生物在所属领域中众所周知。

[0070] 包含5碳糖和/或骨架键衍生物或类似物的核苷、核苷酸或核酸的非限制性实例包括以下中的核苷、核苷酸或核酸:美国专利第5,681,947号,其描述与dsDNA一起形成三螺旋和/或防止dsDNA表达的包含嘌呤衍生物的寡核苷酸;美国专利第5,652,099号和第5,763,167号,其描述特别地用作荧光核酸探针的结合在DNA或RNA中找到的核苷的荧光类似物的核酸;美国专利第5,614,617号,其描述具有增强的核酸酶稳定性的具有于嘧啶环上的取代的寡核苷酸类似物;美国专利第5,670,663号、第5,872,232号和第5,859,221号,其描述用于核酸检测中的具有修饰的5碳糖(即修饰的2'-脱氧呋喃糖基部分)的寡核苷酸类似物;美国专利第5,446,137号,其描述可用于杂交分析中的包含在4'位处被除氢以外的取代基取代的至少一种5碳糖部分的寡核苷酸;美国专利第5,886,165号,其描述具有带有3'-5'骨架键的脱氧核糖核苷酸和带有2'-5'骨架键的核糖核苷酸两者的寡核苷酸;美国专利第5,

714,606号,其描述修饰的骨架键,其中骨架键的3'位氧被碳置换以增强核酸的耐核酸酶性;美国专利第5,672,697号,其描述含有增强耐核酸酶性的一个或多个5'磷酸亚甲酯骨架键的寡核苷酸;美国专利第5,466,786号和第5,792,847号,其描述可以包含针对寡核苷酸的2'碳的药物或标记以提供增强的核酸酶稳定性和递送药物或检测部分能力的取代基部分的键;美国专利第5,223,618号,其描述具有连接邻接5碳糖部分的4'位和3'位以增强细胞吸收、耐核酸酶性和与靶RNA的杂交的2或3碳骨架键的寡核苷酸类似物;美国专利第5,470,967号,其描述适用作核酸杂交探针的包含至少一种氨基磺酸酯或磺酰胺骨架键的寡核苷酸;美国专利第5,378,825号、第5,777,092号、第5,623,070号、第5,610,289号和第5,602,240号,其描述具有置换用于改善的耐核酸酶性、细胞吸收和调节RNA表现的磷酸二酯骨架键的三个或四个原子骨架键部分的寡核苷酸;美国专利第5,858,988号,其描述连接到寡核苷酸的2'-O位以增强其膜渗透率和稳定性的疏水性载剂;美国专利第5,214,136号,其描述具有增强的与DNA或RNA的杂交、增强的核酸酶稳定性的在5'端处缀合到蒽醌的寡核苷酸;美国专利第5,700,922号,其描述PNA-DNA-PNA嵌合体,其中DNA包含用于增强的耐核酸酶性、结合亲和力和激活RNA酶H能力的2'-脱氧-赤-戊呋喃糖基核苷酸;美国专利第5,708,154号,其描述连接到DNA以形成DNA-RNA杂交体的RNA;美国专利第5,908,845号,其描述聚醚核酸,其中一个或多个核碱基与聚醚骨架中的手性碳原子连接;美国专利第5,786,461号、第5,891,625号、第5,786,461号、第5,773,571号、第5,766,855号、第5,736,336号、第5,719,262号、第5,714,331号、第5,539,082号和WO 92/20702,其描述一般包含一个或多个包含核碱基部分、核碱基连接子部分(非5碳糖(例如氮杂氮原子、酰氨基和/或脲基系栓))和/或骨架键(非磷酸酯骨架键(例如氨基乙基甘氨酸、聚酰胺、聚乙基、聚硫酰胺、聚亚磺酰胺或聚磺酰胺骨架键))的核苷酸或核苷的肽核酸(PNA或肽基核酸类似物;或PENAM);和美国专利第5,855,911号,其描述疏水性耐核酸酶性P-乙氧基骨架键。

[0071] 核酸类似物的其它修饰和用途在所属领域中已知,并且预期这些技术和类型的核酸类似物可以用于本发明。

[0072] E. 制备核酸

[0073] 可以通过例如化学合成、酶促生产或生物生产的所属领域的普通技术人员已知的任何技术来制造核酸。合成核酸(例如合成寡核苷酸)的非限制性实例包括通过使用磷酸三酯、亚磷酸酯或亚磺酰胺化学和固相技术(例如以引用的方式并入本文中的EP 266,032中所描述)进行体外化学合成,或通过各自以引用的方式并入本文中的Froehler等人(1986)和美国专利第5,705,629号所描述的脱氧核苷H-磷酸酯中间体而制造的核酸。在本发明的方法中,可以使用一种或多种寡核苷酸。寡核苷酸合成的各种机制已经在例如美国专利第4,659,774号、第4,816,571号、第5,141,813号、第5,264,566号、第4,959,463号、第5,428,148号、第5,554,744号、第5,574,146号、第5,602,244号中公开,所述专利中的每一个均以引用的方式并入本文中。

[0074] F. 纯化核酸

[0075] 可以在聚丙烯酰胺凝胶、氯化铯离心梯度上或通过所属领域的普通技术人员已知的任何其它手段纯化核酸(参见例如Sambrook等人(2001),以引用的方式并入本文中)。

[0076] 在某些实施例中,本发明涉及作为分离核酸的核酸。如本文所使用,术语“分离核酸”是指已经分离而不含或以其它方式不含一个或多个细胞的总基因组和转录核酸主体的

核酸分子(例如RNA或DNA分子)在某些实施例中,“分离核酸”是指已经分离而不含或以其它方式不含例如巨分子(例如脂质或蛋白质)、小生物分子等等的细胞组分或体外反应组分主体的核酸。

[0077] G. 杂交

[0078] 如本文所使用,“杂交(hybridization/hybridize(s))”或“能够杂交”理解为意味着形成双链或三链分子或具有部分双链或三链本质的分子。如本文所使用的术语“粘合”与“杂交”同义。

[0079] 如本文所使用,“严格条件”或“高严格性”是允许在含有互补序列的一条或多条核酸链之间或之内杂交但排除随机序列杂交的那些条件。严格条件几乎不容许核酸与靶链之间的错配(如果存在的话)。所述条件为所属领域的普通技术人员所熟知,并且对于需要高选择性的应用而言是优选的。

[0080] 严格条件可以包含低盐和/或高温条件,例如在约50℃到约70℃温度下由约0.02M到约0.15M NaCl提供。应当理解,期望严格性的温度和离子强度部分地由特定核酸的长度、靶序列的长度和核碱基含量、核酸的电荷组成以及在杂交混合物中甲酰胺、氯化四甲铵或其它溶剂的存在或浓度决定。

[0081] 还应当理解,仅通过非限制性实例提及杂交的这些范围、组成和条件,并且通常通过与一个或多个阳性对照或阴性对照进行比较来凭经验决定特定杂交反应的期望严格性。取决于所设想的应用,优选采用变化的杂交条件以实现核酸对靶序列的不同程度的选择性。在非限制性实例中,可以通过在低温和/或高离子强度下进行杂交来实现在严格条件下不与核酸杂交的相关靶核酸的鉴定或分离。所述条件称为“低严格性”或“低严格性条件”,并且低严格性的非限制性实例包括在约20℃到约50℃的温度范围下在约0.15M到约0.9M NaCl下执行的杂交。当然,进一步修改低严格性条件或高严格性条件以适合特定应用是在所属领域人员的技术内。

[0082] IV. 制造脂质体P-乙氧基反义物药品的方法

[0083] 与靶mRNA的特定区域互补的反义寡核苷酸(oligos)已经用于抑制内源基因的表达。当反义寡核苷酸与靶mRNA结合时,形成DNA-RNA杂交体。这种杂交体形成抑制了mRNA的转译,并因此抑制了编码蛋白的表达。如果蛋白质对于细胞存活至关重要,则抑制其表达可能会导致细胞死亡。因此,反义寡核苷酸在抗癌和抗病毒治疗中可能是有用的工具。

[0084] 使用反义寡核苷酸抑制基因表达的主要障碍是细胞不稳定、细胞吸收低和细胞间递送差。天然磷酸二酯不耐核酸酶水解;因此,在观察到任何抑制作用之前,需要高浓度的反义寡核苷酸。为了克服这种核酸酶水解问题,已经制造了例如P-乙氧基的修饰的磷酸二酯类似物,但是其没有提供令人满意的问题解决方案。

[0085] 反义寡核苷酸的细胞吸收低。为了解决这个问题,已经使用例如磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖介导或电穿孔的物理技术来增加寡核苷酸的细胞吸收。这些技术难以复制并且在体内不适用。也已经使用例如Lipofectin的阳离子脂质来递送寡核苷酸。在阳离子脂质与带负电荷的寡核苷酸之间形成静电相互作用,这产生随后被靶细胞吸收的复合物。由于这些阳离子脂质无法保护寡核苷酸免受核酸酶消化并且对细胞膜有害,因此其仅可以用于递送耐核酸酶的硫代磷酸酯,而不能用于递送核酸酶可裂解的磷酸二酯。

[0086] 已经制备的另一种修饰的磷酸二酯类似物是P-乙氧基。P-乙氧基反义骨架对出血

和补体激活没有不利影响,所述出血和补体激活是已经针对其它反义类似物所报道的毒性中的一些。P-乙氧基寡核苷酸的修饰是在磷酸酯骨架中进行的,以使得修饰不会干扰这些寡核苷酸与靶mRNA的结合。P-乙氧基寡核苷酸是通过向磷酸酯骨架的非桥接氧原子添加乙基,因此使这些寡核苷酸成为不带电荷的化合物而制得的。尽管其对核酸酶有耐性,但P-乙氧基寡核苷酸的细胞吸收和细胞内递送仍然不良,这是因为在内化之后,这些寡核苷酸仍然被隔离在核内体/溶酶体液泡内部,阻碍其进入靶mRNA的通道。

[0087] A. P-乙氧基反义物药品

[0088] 脂质体P-乙氧基反义物药品由两种cGMP产品构成,这两种产品均具有FDA要求的分析证明以及FDA批准的发布准则。本文描述了原料、溶剂和最终药品。在制造时,药品是包含以下材料的琥珀色或白色冻干晶体或粉末:寡核苷酸(例如P-乙氧基反义原料药)、中性脂质(例如DOPC)和表面活性剂(例如聚山梨酯20)。在准备向患者施用,向小瓶中添加生理盐水,此时形成脂质体并且将P-乙氧基反义物并入内部。

[0089] B. P-乙氧基反义原料药

[0090] 成品的特定物理性质(例如溶解度和疏水性,所述溶解度和疏水性之后会影响药品在盐水中的溶解度、oligo向脂质体中的并入和脂质体粒度)可以在生产P-乙氧基反义原料药期间使用预定P-乙氧基与磷酸二酯亚酰胺原料混合物来界定。虽然在寡核苷酸制造期间随机发生P-乙氧基骨架基团损失,在那些键处产生磷酸二酯键,但是所述损失可能不会在寡核苷酸内产生优选比率的P-乙氧基:磷酸二酯骨架键。在这种情况下,P-乙氧基与磷酸二酯亚酰胺原料混合物补充了P-乙氧基骨架删除的预期值,因此产生具有期望比率的寡核苷酸。增加寡核苷酸骨架中的P-乙氧基分子数量会使分子更具疏水性(这会产生更大的脂质体颗粒;表1),不太具极性并且不太具可溶性(表2)。测试中性电荷的疏水性P-乙氧基原料药的方法包括质谱法以测定寡核苷酸长度的分布,以及分析以测定原料药的溶解度,出于溶解度的实际目的,所述分析是对于盐水中的重构药品的视觉检测。因为寡核苷酸由于更大数量的P-乙氧基骨架键而变得不太具可溶性,当疏水性变得过高时重构溶液变得更白直到微粒形成为止。

[0091] 配制物必须使用粒度,其中90%值在尺寸方面小于5000nm,并且是可溶的,这随着核苷酸组成而变化。举例来说,如果寡核苷酸的长度是18-20个核苷酸,则磷酸酯骨架键中的至少五个应当是磷酸二酯骨架键。提供了18聚体寡核苷酸数据的表1中的以下实验7-10对此提供了清楚支持。其中如果寡核苷酸的长度是25个核苷酸,则磷酸酯骨架键中的至少六个应当是磷酸二酯骨架键。

[0092] 表1. 随18聚体寡核苷酸的反义物骨架组成变化的脂质体粒度变化性

实验	工程改造的反义物骨架	制造后骨架乙基删除		粒度特征： 累积分布函数		
		主峰 ^d	复合删除 ^e	90%值 (nm) **	50%值 (nm)	300 nm 值 (%)
[0093]	1 3 亚酰胺取代	-6	-5.67	2130	911	15.30
	2 3 亚酰胺取代	-6	-5.67	2420	1004	15.50
	3 3 亚酰胺取代	-6	-6.12	3682	943	15.50
	4 3 亚酰胺取代	-7	-6.66	3805	978	14.60
	5 100% P-乙氧基	-5	-5.66	3924	976	16.00
	6 2 亚酰胺取代	-5	-5.32	4387	1888	11.60
	7 ^a 100% P-乙氧基	-4	-4.22	5057	1131	17.70
	8 100% P-乙氧基	-4	-4.52	5659	1359	10.00
	9 ^b 100% P-乙氧基	-4	-4.38	7571	1909	2.60
	10 ^c 100% P-乙氧基	-4	-4.38	7994	1653	14.40

[0094] **药品发布准则针对小于或等于5000nm的90%脂质体颗粒。

[0095] a. 这批由于溶解度差而被丢弃；具体地说，重构溶液中的反义物颗粒。

[0096] b. 这批的DMSO和tBA体积较低，并且在20mL小瓶中具有2mg反义物，为脂质体扩增新增了额外组分。

[0097] c. 这批未发布，这是因为其未通过粒度发布规格。

[0098] d. 主峰代表最常见数量的所述群的寡核苷酸中的P-乙氧基删除。

[0099] e. 复合删除代表平均数量的寡核苷酸群中的P-乙氧基删除。

[0100] 表2. 随反义物骨架组成变化的脂质体颗粒溶解度

实验	工程改造的反义物骨架	制造后骨架乙基删除		药物溶解度	
		主峰	复合删除	视觉观察**	溶解度评估
[0101]	1 3 亚酰胺取代	-6	-5.67	脱脂乳溶液	良好
	2 3 亚酰胺取代	-6	-5.67	脱脂乳溶液	良好
	3 3 亚酰胺取代	-6	-6.12	脱脂乳溶液	良好
	4 3 亚酰胺取代	-7	-6.66	脱脂乳溶液	良好
[0102]	5 100% P-乙氧基	-5	-5.66	脱脂乳溶液	良好
	6 2 亚酰胺取代	-5	-5.32	脱脂乳溶液	良好
	7 100% P-乙氧基	-4	-4.52	白色溶液	合格
	8 ^b 100% P-乙氧基	-4	-4.38	白色溶液	合格
	9 ^c 100% P-乙氧基	-4	-4.38	白色溶液	合格
	10 ^a 100% P-乙氧基	-4	-4.22	白色溶液颗粒	不合格

[0103] **如果药品样品具有颗粒，则这批将被拒绝接受

[0104] a. 这批由于溶解度差而被丢弃；具体地说，重构溶液中的反义物颗粒。

[0105] b. 这批的DMSO和tBA体积较低，并且在20mL小瓶中具有2mg反义物，为脂质体扩增新增了额外组分。

[0106] c. 这批未发布，这是因为其未通过粒度发布规格。

[0107] C. 配制、过滤并冻干脂质体P-乙氧基反义物药品

[0108] 将一克 (1g) pE oligo以10mg寡核苷酸/1mL DMSO的比率溶解于DMSO中。接下来，将DOPC以1g DOPC/1719mL叔丁醇的比率添加到叔丁醇中。将oligo和DOPC以1g寡核苷酸/2.67g DOPC的比率组合并混合。然后，将20mL 0.835% (v/v) 聚山梨酯20溶液添加到混合物

中,产生0.039mg/mL最终浓度。使溶液通过无菌过滤器,之后分配到玻璃瓶中进行冻干。

[0109] 通过滴定一定量的表面活性剂来测定表面活性剂对脂质体粒度的影响(表3)。在不存在聚山梨酯20的情况下,仅2.8%颗粒的直径是300nm或更小。在存在1×聚山梨酯20的情况下,12.5%颗粒的直径是300nm或更小。在添加3×-10×聚山梨酯20的情况下,约20%颗粒的直径是300nm或更小。因此,表面活性剂从1×增加到3×导致粒度减小。

[0110] 表3.随表面活性剂变化的脂质体粒度变化性

实验	表面活性剂的量	粒度特征: 累积分布函数		
		50%值	90%值**	300 nm 值
[0111]	1	0×	5301 nm	10719 nm
	2	1×	1053 nm	4054 nm
	3	3×	785 nm	2926 nm
	4	5×	721 nm	2691 nm
[0112]	5	10×	734 nm	2937 nm
				21.4%

[0113] **药品发布准则针对小于或等于5000nm的90%脂质体颗粒。

[0114] D. 制备施用用脂质体P-乙氧基反义物药品

[0115] 以10-5000μM最终oligo浓度将冻干制剂与生理盐水(0.9%/10mM NaCl)一起水合。通过手摇晃来混合脂质体P-乙氧基oligo。

[0116] E. 测试脂质体P-乙氧基反义物药品的方法

[0117] 视觉检测所制造的药品:在制造之后,选择含有药品的样品小瓶并进行视觉检测。不存在液体是强制性的,并且然后可以接受在小瓶底部的琥珀色晶体,并且对白色絮凝粉末或外观的接受度增加是最好的结果。白色外观指示更佳干燥过程和高表面积与质量比,这非常有利于重构以供使用。

[0118] 视觉检测准备供患者IV使用的重构药物:将生理盐水添加到含有所制造的脂质体P-乙氧基反义药物产品的小瓶中,并摇晃以重构成溶液并且药物晶体或粉末完全溶解。进行三个主要观察:1) 晶体或粉末完全溶解,2) 不存在白色不溶材料块,并且3) 外观是乳白色或脱脂乳外观。重构液体的外观越蓝越好,这是因为这表明脂质体粒度较小,反映蓝色光谱中的光。

[0119] 质谱法:质谱法(Mass spectrometry/mass spec)用于呈现样品中的各种质量块的分布。当生产P-乙氧基反义物材料时,在样品上运行质谱法。结果表明,存在于网格上的材料的峰在右侧的“x”轴上具有渐增的质量,而在“y”轴上具有向上增加的相对质量丰度。分析样品的分布以测定P-乙氧基样品中的P-乙氧基骨架的相对数量,认识到峰的分布代表(从最右边开始)全长材料,其中所有骨架均由P-乙氧基键构成,下一个峰向左移动全长,其中一个骨架具有P-乙氧基删除(并且因此乙基被敲除,并且结果是正常磷酸二酯骨架键),并继续。向右移动的质谱法模式代表具有更多个P-乙氧基骨架并且因此具有较高疏水性和较低溶解度性质的P-乙氧基样品;并且同样地,向左移动具有相反效果。样品质谱图检测也可以用于确定制造程序期间的过滤是否会对所过滤的药品中存在的寡核苷酸组成产生不利影响。

[0120] UV测试:紫外线测试用于测定样品中存在的寡核苷酸的质量。寡核苷酸吸收260纳米范围内的光。结果,成品重构药品的UV测试已经用作测定药品小瓶中的寡核苷酸原料药

的数量方法。就制造发展和创新而言,使用UV测试来确定在制造中的过滤期间是否经受问题或P-乙氧基反义物原料药是否具有不良可溶性,在溶液中产生较少寡核苷酸并且因此产生较低UV读段。所述方法将得到验证并且可能变成最终产品发布测试的一部分。

[0121] 脂质体粒度:重构一小瓶成品药品并测试脂质体粒度。结果通常是具有中心点、尾部和平均值的大致正态分布或大多数颗粒的大致正态分布,而较小脂质体颗粒的较小次级峰则是由二级颗粒形成效应引起的。重要的是,脂质体颗粒不要太大,这是因为其可能对患者产生不良影响(例如在肺部中的较小血管中产生血流问题)。因此,药品发布准则包括表明90%脂质体的尺寸为5微米或更小的粒度测试。另外,较小脂质体是优选的,这是因为其将具有更好的细胞吸收,并且其次,较小脂质体可以穿透血管孔,从而使脂质体穿透内部肿瘤,提高了脂质体P-乙氧基反义物药品的治疗有效性。

[0122] V. 治疗方法

[0123] 本发明的某些方面提供了用于治疗例如癌症、自身免疫性疾病或感染性疾病的疾病的寡核苷酸-脂质复合物(例如并入不带电荷的脂质体中的寡核苷酸)。本发明的某些方面提供了用于增强个体中的免疫反应(例如由疫苗接种诱导的免疫反应)、从而增强治疗免疫性的寡核苷酸-脂质复合物(例如并入不带电荷的脂质体中的寡核苷酸)。明确地说,寡核苷酸可以具有允许与人类核苷酸序列(例如IGF-1R)进行碱基配对并且因此可以抑制由人类核苷酸序列编码的蛋白质的表达的序列。

[0124] 可以在暴露于寡核苷酸的细胞中下调IGF-1R和例如己糖激酶的潜在的IGF-1R下游基因的表达。细胞可以是哺乳动物细胞。细胞可以是癌细胞。细胞可以是例如单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、白细胞、自然杀手(NK)细胞、淋巴细胞、T细胞、B细胞、树突状细胞、肥大细胞或巨噬细胞的免疫系统细胞。巨噬细胞的功能包括吞噬作用、抗原呈递和细胞因子呈递。巨噬细胞可以是M2巨噬细胞,其相比于M1巨噬细胞产生更高量的IGF-1R,并在其细胞表面上表达CD11b、CD14、CD15、CD23、CD64、CD68、CD163、CD204、CD206中的一个或多个。单核细胞可以是M2单核细胞,其在其细胞表面上表达CD11b、CD14、CD15、CD23、CD64、CD68、CD163、CD204、CD206中的一个或多个。抑制未分化单核细胞或巨噬细胞中的IGF-1R的表达可以防止未分化单核细胞或巨噬细胞极化为M2单核细胞或巨噬细胞。抑制M2单核细胞或巨噬细胞中的IGF-1R的表达可能导致M2单核细胞或巨噬细胞丧失其M2表型和功能,且/或经历细胞周期停滞和/或经历细胞死亡,例如细胞凋亡或坏死。相比于M1巨噬细胞而言,抑制巨噬细胞中的IGF-1R的表达可能会选择性地影响M2巨噬细胞,这是因为M2巨噬细胞产生比M1巨噬细胞更高量的IGF-1R。

[0125] “治疗(Treatment/treating)”是指出于获得疾病或健康相关病况的治疗益处的目的而向个体施用或应用治疗剂或对个体执行程序或模态。举例来说,治疗可以包括施用药学有效量的IGF-1R寡核苷酸-脂质复合物。

[0126] “个体”和“患者”是指人类或例如灵长类动物、哺乳动物和脊椎动物的非人类。在特定实施例中,个体是人类。

[0127] 如在本申请通篇使用的术语“治疗益处”或“治疗有效的”是指就这种病况的医学治疗而言促进或增强个体的健康的任何事物。这包括但不限于降低疾病迹象或症状的频率或严重程度。举例来说,癌症治疗可以涉及例如消退肿瘤、减小肿瘤尺寸、降低肿瘤浸润性、降低癌症生长速率、预防转移或消除肿瘤。癌症治疗还可以指延长患有癌症的个体的存活

期。自身免疫性疾病治疗可以涉及例如减少非所期望的免疫反应所针对的自身抗原的表达,诱导非所期望的免疫反应所针对的自身抗原的耐受,或抑制针对自身抗原的免疫反应。感染性疾病治疗可以涉及例如消除感染性因素,减少感染性因素的量,或将感染性因素的量维持在一定水平。

[0128] 本发明治疗方法适用的肿瘤包括任何恶性细胞类型,例如在实体肿瘤、血液肿瘤、转移性癌症或非转移性癌症中找到的恶性细胞类型。示例性实体肿瘤可以包括但不限于选自自由以下组成的组的器官的肿瘤:胰腺、结肠、盲肠、食道、胃肠道、齿龈、肝脏、皮肤、胃、睾丸、舌片、子宫、胃、大脑、头部、颈部、卵巢、肾脏、喉、肉瘤、骨骼、肺脏、膀胱、黑素瘤、前列腺和乳房。示例性血液肿瘤包括骨髓肿瘤、T或B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤(例如弥漫性大B细胞淋巴瘤)、胚细胞瘤、骨髓瘤等等。可以使用本文所提供的方法治疗的癌症的另外实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺脏鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(gastric/stomach cancer)(包括胃肠癌和胃肠基质癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(kidney/renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、不同类型的头颈癌、浅表扩散性黑素瘤黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、肢端雀斑样黑素瘤、结节性黑素瘤以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL);小淋巴细胞性(SL) NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级成免疫细胞NHL;高级成淋巴细胞NHL;高级小非裂解细胞NHL;肿块性病变NHL;弥漫性大B细胞淋巴瘤;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和原发性巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia))、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛状细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病(AML)和慢性成骨髓细胞性白血病。

[0129] 癌症可以特定地具有以下组织学类型,但其不限于这些组织学类型:恶性赘瘤;癌;未分化型癌;巨大且梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;胆管癌;肝细胞癌;合并肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤息肉腺癌;家族性息肉病大肠杆菌腺癌;实体癌;恶性类癌肿瘤;腮裂齿槽状腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱性癌;透明细胞腺癌;粒状细胞癌;滤泡性腺癌;乳头状和滤泡性腺癌;非包膜硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附属器癌;顶泌腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液囊腺癌;黏液性囊腺癌;黏液性腺癌;印戒细胞癌;浸润性管癌;髓质癌;小叶癌;发炎性癌;乳腺佩吉特氏病(paget's disease);腺泡细胞癌;腺鳞癌;伴有鳞状化生的腺癌;恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质瘤;恶性卵泡膜细胞瘤;恶性粒层细胞瘤;恶性睾丸母细胞瘤;塞特利氏细胞癌(sertoli cell carcinoma);恶性莱迪希细胞肿瘤(leydig cell tumor);恶性脂质细胞肿瘤;恶性副神经节瘤;恶性乳腺外副神经节瘤;嗜铬细胞瘤;筋膜纤维肉瘤;恶性黑素瘤;无色素性黑素瘤;浅表扩散性黑素瘤;巨大色素痣中的恶性黑素瘤;上皮样细胞黑素瘤;恶性蓝痣;肉瘤;纤维肉瘤;恶性纤维组织细胞瘤;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎横纹肌肉瘤;腺泡状横纹肌肉瘤;基质肉瘤;恶性混合肿瘤;苗勒管混合肿瘤(mullerian mixed tumor);肾胚细胞瘤;肝胚细胞瘤;癌肉瘤;恶性间叶瘤;恶性布伦纳氏瘤(malignant brenner tumor);恶性叶状肿

瘤;滑膜肉瘤;恶性间皮瘤;无性细胞瘤;胚胎瘤;恶性畸胎瘤;恶性卵巢甲状腺瘤;绒毛膜癌;恶性中肾瘤;血管内皮瘤;恶性血管内皮瘤;卡波西肉瘤(kaposi's sarcoma);恶性血管外皮瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;密质旁骨肉瘤;软骨肉瘤;恶性软骨母细胞瘤;间叶细胞软骨肉瘤;骨骼巨细胞瘤;尤文氏肉瘤(ewing's sarcoma);恶性牙源性肿瘤;成釉细胞性牙肉瘤;恶性成釉细胞瘤;成釉细胞性纤维肉瘤;恶性松果体瘤;脊索瘤;恶性胶质瘤;室管膜瘤;星形细胞瘤(I级、II级、III级或IV级);原浆性星形细胞瘤;肌原纤维性星形细胞瘤;成星形细胞瘤;胶质母细胞瘤;多形性胶质母细胞瘤;少枝胶质母细胞瘤;成少突神经胶质瘤;原始神经外胚层;小脑肉瘤;节细胞性神经母细胞瘤;神经母细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经肿瘤;恶性脑膜瘤;神经纤维肉瘤;恶性神经鞘瘤;恶性粒状细胞肿瘤;恶性淋巴瘤;霍奇金氏病(hodgkin's disease);霍奇金氏;副肉芽肿;小淋巴细胞性恶性淋巴瘤;大细胞弥漫性恶性淋巴瘤;滤泡性恶性淋巴瘤;蕈样真菌病;其它规定的非霍奇金氏淋巴瘤;恶性组织细胞增多症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;淋巴性白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞白血病;骨髓白血病;嗜碱性白血病;嗜酸性粒细胞白血病;单核细胞性白血病;肥大细胞白血病;巨核母细胞白血病;髓系肉瘤;和毛状细胞白血病。

[0130] 本发明治疗方法适用的自身免疫性疾病包括但不限于狼疮、硬皮病、异位性湿疹、窦炎、哮喘、过敏、多发性化学过敏症、1型糖尿病、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、格雷夫氏病(Grave's disease)、扁平苔癣、脊柱关节病、强直性脊柱炎、牛皮癣性关节炎、反应性关节炎、肠病性关节炎、糖尿病、乳糜泻、自身免疫性甲状腺疾病、自身免疫性肝脏疾病、爱迪生氏病(Addison's disease)、移植排斥反应、移植物抗宿主疾病、宿主抗移植物疾病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病(Crohn's disease)、肠易激疾病、炎症性肠病、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、家族性地中海热、肌萎缩侧索硬化、休格连氏综合征(Sjogren's syndrome)、早期关节炎、病毒关节炎、多发性硬化症或牛皮癣。这些疾病的诊断和治疗在文献中有充分记载。

[0131] 本发明治疗方法适用的感染性疾病包括但不限于细菌感染、病毒感染、真菌感染和寄生虫感染。示例性病毒感染包括B型肝炎病毒、C型肝炎病毒、人类免疫缺乏病毒1、人类免疫缺乏病毒2、人类乳头瘤病毒、单纯疱疹病毒1、单纯疱疹病毒2、带状疱疹、水痘带状疱疹、柯萨奇病毒A16(coxsackievirus A16)、巨细胞病毒、埃博拉病毒(ebolavirus)、肠病毒、艾司坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、汉坦病毒(hanta virus)、亨德拉病毒(hendra virus)、病毒脑膜炎、呼吸道合胞病毒、轮状病毒、西尼罗病毒(west nile virus)、腺病毒和流行性感冒病毒感染。示例性细菌感染包括砂眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、单核球增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、分支杆菌属(*Mycobacteria* spp)(例如结核分枝杆菌(*M.tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*M.avium*)、细胞内分枝杆菌(*M.intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M.kansaii*)、戈登分枝杆菌(*M.gordonae*))、金黄色酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎双球菌(*Neisseria meningitidis*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A族链球菌)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) (B族链球菌)、链球菌(*Streptococcus*) (草

绿色族)、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌 (*Streptococcus bovis*)、链球菌 (厌氧菌属 (*anaerobic sp.*))、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、病原性弯曲杆菌属 (*pathogenic Campylobacter sp.*)、肠球菌属 (*Enterococcus sp.*)、流感嗜血杆菌属 (*Haemophilus influenzae*)、炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*)、白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌属 (*corynebacterium sp.*)、猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风杆菌 (*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、克雷伯氏肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、巴斯德氏菌 (*Pasturella multocida*)、拟杆菌属 (*Bacteroides sp.*)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、细弱螺旋体 (*Treponema pertenuis*)、钩端螺旋体 (*Leptospira*)、立克次氏体 (*Rickettsia*)、以色列放线菌 (*Actinomyces israeli*)、志贺氏菌属 (*Shigella sp.*) (例如福氏志贺氏菌 (*S. flexneri*)、索氏志贺氏菌 (*S. sonnei*)、痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*)) 和沙门氏菌属 (*Salmonella spp*) 感染。示例性真菌感染包括白色念珠菌 (*Candida albicans*)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、粗球霉菌 (*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*) 和砂眼衣原体 (*Chlamydia irachomatis*) 感染。

[0132] 寡核苷酸-脂质复合物可以在本文中以任何模式用作抗肿瘤剂、抗病毒剂、抗菌剂、抗真菌剂、抗寄生虫剂或抗自身免疫剂。在一个特定实施例中，本发明考虑了使用寡核苷酸-脂质复合物的方法，所述方法包含使患病细胞群与治疗有效量的寡核苷酸-脂质复合物接触一段足以抑制或逆转疾病的时间。

[0133] 在一个实施例中，通过静脉内、腹膜内、皮下或肿瘤内注射向患者施用治疗有效量的包含本发明的寡核苷酸-脂质复合物的生理上可耐受的组合物来实现体内接触。可以随着时间推移通过注射或通过逐渐输注来肠胃外施用寡核苷酸-脂质复合物。

[0134] 常规地静脉内或皮下施用，例如通过注射单位剂量包含寡核苷酸-脂质复合物的治疗性组合物。当用于提及治疗性组合物时，术语“单位剂量”是指适用作个体单位剂量的物理上离散的单位，每个单位含有与所需稀释剂 (即载剂或媒剂) 联合的预定量的活性物质，所述量经计算以产生所期望的治疗效果。

[0135] 以与剂量配制物相容的方式并以治疗有效量施用组合物。待施用的量取决于待治疗的个体、个体系统利用活性成分的能力以及所期望的治疗效果程度。投与所需的活性成分的精确量取决于医师的判断并且对于每一个个体都是特有的。然而，本文公开了适用于全身应用的剂量范围，并且取决于施途径。还考虑了用于初次施用和加强施用的合适方案，并且其特征在于初次施用，然后以一个或多个小时间隔重复给药，随后进行注射或其它施用。示例性多次施用描述于本文中并且特别优选地维持连续高的多肽血清和组织量。或者，考虑了足以将血液中的浓度维持在针对体内疗法规定的范围内的连续静脉内输注。

[0136] 预期本发明的寡核苷酸可以全身或局部施用以治疗疾病，例如以抑制肿瘤细胞生长或杀死患有局部晚期或转移性癌症的癌症患者中的癌细胞。其可以静脉内、鞘内、皮下和/或腹膜内施用。其可以单独或与抗增殖药组合施用。在一个实施例中，其在外科手术或

其它程序之前施用以减少患者中的癌症负荷。或者,其可以在外科手术之后施用以确保任何剩余的癌症(例如外科手术未能消除的癌症)不能存活。

[0137] 寡核苷酸的治疗有效量是经计算以实现期望效果,即抑制靶蛋白表达的预定量。因此,本发明的寡核苷酸的施用剂量范围是足够大以产生期望效果的施用剂量范围。剂量不应过大而导致不良副作用,例如高黏血症、肺水肿、充血性心力衰竭、神经效应等。一般来说,剂量将随着患者的年龄、病况、性别和疾病程度而变化,并且可以由所属领域的技术人员测定。如果出现任何并发症,则可以由个别医生调整剂量。

[0138] 本发明的组合物优选肠胃外施用到患者,例如静脉内、动脉内、肌内、淋巴内、腹膜内、皮下、胸膜内或鞘内注射施用到患者,或可以离体使用。优选剂量介于5-25mg/kg之间。优选以定时时间表重复施用直到癌症消失或消退为止,并且可以与其它形式的疗法结合。

[0139] VI. 药物制剂

[0140] 包含脂质体的药物组合物通常将包括无菌的药学上可接受的载剂或稀释剂,例如葡萄糖或盐水溶液。

[0141] 在进行含有寡核苷酸的不带电荷的脂质组分(例如呈脂质体形式)的临床应用时,将脂质复合物制备为适合于预期应用的药物组合物一般将是有益的。这通常需要制备基本上不含热原以及可能对人类或动物有害的任何其它杂质的药物组合物。人们还可以采用适当的缓冲液以使复合物稳定并允许被靶细胞吸收。

[0142] 短语“药学上或药理学上可接受的”是指当适当地施用到例如人类的动物时不会产生不利的、过敏的或其它不良反应的分子实体和组合物。根据本公开,所属领域的技术人员将知道含有包含寡核苷酸或额外活性成分的至少一种不带电荷的脂质组分的药物组合物的制备,如由以引用的方式并入本文中的雷明顿的《药学科学与实践(The Science and Practice of Pharmacy)》,第21版,2005年例证。此外,对于动物(例如人类)施用,应当理解制剂应符合FDA生物学标准办公室(FDA Office of Biological Standards)所要求的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0143] 如所属领域的普通技术人员已知的那样,如本文所使用,“药学上可接受的载剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、类似材料和其组合。优选地,将药学上可接受的载剂配制用于向人类施用,但在某些实施例中,可能期望使用被配制用于向非人类动物施用但(例如由于政府法规)不被接受向人类施用的药学上可接受的载剂。除非任何常规载剂与活性成分不相容,否则考虑其在治疗或药物组合物中的使用。

[0144] 施用到患者或个体的本发明组合物的实际剂量可以由例如患者体重、病况严重程度、所治疗疾病的类型、先前或并行治疗性干预、原发症的物理和生理学因素并基于施用途径确定。无论如何,负责施用的医师将确定组合物中的活性成分的浓度和用于个别个体的适当剂量。

[0145] 在某些实施例中,药物组合物可以包含例如至少约0.1%活性化合物。在其它实施例中,活性化合物可以占单元重量的约0.1%与约75%之间,或约25%到约60%之间,以及例如其中可导出的任何范围。在其它非限制性实例中,剂量还可以包含每次施用药约1微克/千克/体重、约5微克/千克/体重、约10微克/千克/体重、约50微克/千克/体重、约100微克/

千克/体重、约200微克/千克/体重、约350微克/千克/体重、约500微克/千克/体重、约1毫克/千克/体重、约5毫克/千克/体重、约10毫克/千克/体重、约50毫克/千克/体重、约100毫克/千克/体重、约200毫克/千克/体重、约350毫克/千克/体重、约500毫克/千克/体重到约1000毫克/千克/体重或更多,以及其中可导出的任何范围。在从本文所列数字中可导出的范围的非限制性实例中,可以施用约5微克/千克/体重到约1000毫克/千克/体重、约5毫克/千克/体重到约500毫克/千克/体重等的范围。

[0146] 本发明实施例的寡核苷酸可以以每剂1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或更多 μg 核酸的剂量来施用。每个剂量的体积可以是1、10、50、100、200、500、1000或更多 μl 或 ml 。

[0147] 治疗性组合物的溶液可以在适当地与例如羟丙基纤维素的表面活性剂混合的水中制备。分散液也可以在甘油、液体聚乙二醇、其混合物中和在油中制备。在普通储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0148] 本发明的治疗性组合物有利地以可注射组合物的形式作为液体溶液或悬浮液施用;还可以制备适合于在注射之前溶解或悬浮在液体中的固体形式。也可以乳化这些制剂。用于所述目的的典型组合物包含药学上可接受的载剂。举例来说,组合物可以含有每毫升磷酸盐缓冲盐水10mg、25mg、50mg或至多约100mg人类血清白蛋白。其它药学上可接受的载剂包括水溶液、包括盐、防腐剂、缓冲剂等无毒赋形剂。

[0149] 非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油和例如油酸乙酯的可注射有机酯。含水载剂包括水、醇/水溶液、盐水溶液、例如氯化钠的肠胃外媒剂、林格氏葡萄糖(Ringer's dextrose)等。静脉内媒剂包括液体营养补充剂。防腐剂包括抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。根据众所周知的参数调整药物组合物的各种组分的pH和准确浓度。

[0150] 本发明的治疗性组合物可以包括经典药物制剂。本发明的治疗性组合物的施用将通过任何普通途径进行,只要靶组织可以通过所述途径获得即可。这包括口腔、鼻腔、颊、直肠、阴道或局部。局部施用对于治疗皮肤癌、预防化学疗法诱发的脱发或其它皮肤过度增殖性病症可能特别有利。或者,可以通过原位、皮内、皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射施用。所述组合物通常以包括生理上可接受的载剂、缓冲剂或其它赋形剂的药学上可接受的组合物的形式施用。为了治疗肺部病况,可以使用气雾剂递送。气雾剂的体积介于约0.01ml到0.5ml之间。

[0151] 基于预期目标确定治疗性组合物的有效量。术语“单位剂量”或“剂量”是指适用于个体中的物理上离散的单位,每个单位含有预定量的治疗性组合物,所述预定量的治疗性组合物经计算以产生上述所期望的反应以及其施用,即适当的途径和治疗方案。根据治疗次数和单位剂量两者的施用量取决于所期望的保护或效果。

[0152] 治疗性组合物的精确量还取决于医师的判断并且对于每个个体是特有的。影响剂量的因素包括患者的身体和临床状态、施用途径、预期治疗目标(例如相对于治愈的症状缓解)以及特定治疗性物质的效力、稳定性和毒性。

[0153] VII. 联合治疗

[0154] 在某些实施例中,本发明的组合物和方法涉及与第二或额外疗法组合的抑制性寡核苷酸或能够表达基因表达抑制剂的寡核苷酸。包括联合疗法的方法和组合物增强了另一种抗癌或抗过度增殖性疗法的治疗或保护效果,和/或提高了治疗效果。治疗和预防方法和

组合物可以以有效地实现期望效果(例如杀死癌细胞和/或抑制细胞过度增殖)的组合量提供。这个过程可能涉及使细胞与基因表达抑制剂和第二疗法两者接触。可以使组织、肿瘤或细胞与包括一种或多种药剂(即基因表达抑制剂或抗癌剂)的一种或多种组合物或药理配制物接触,或通过使组织、肿瘤接触和/或细胞与两种或更多种不同组合物或配制物接触,其中一种组合物提供1)抑制性寡核苷酸;2)抗癌剂,或3)抑制性寡核苷酸和抗癌剂两者。此外,预期此类联合疗法可以与化学疗法、放射疗法、外科手术疗法或免疫疗法结合使用。

[0155] 抑制性寡核苷酸可以在抗癌治疗之前、期间、之后或以与抗癌治疗的各种组合形式施用。施用间隔范围可以是同时到数分钟到数天到数周。在将抑制性寡核苷酸与抗癌剂分开提供给患者的实施例中,一般确保在每次递送时间之间没有明显时间段终止,以使得两种化合物仍然能够对患者发挥有利组合的效果。在所述情况下,预期可以在彼此约12到24或72小时内,更优选在彼此约6-12小时内为患者提供抑制性寡核苷酸疗法和抗癌疗法。在一些情况下,可能期望将治疗时间段明显延长,在所述治疗时间段中在对应投与之间几天(2、3、4、5、6或7)到几周(1、2、3、4、5、6、7或8)间隔时间。

[0156] 在某些实施例中,一个疗程将持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90天或更长。预期可以在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89和/或90天、其任何组合给予一种药剂,并且在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89和/或90天或其任何组合给予另一种药剂。在一天(24小时时段)内,可以给予患者一次或多次药剂施用。此外,在一个疗程之后,预期有一段时间没有施用抗癌治疗。这个时间段可能持续1、2、3、4、5、6、7天和/或1、2、3、4、5周和/或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月或更长,这取决于患者病况,例如其预后、体力、健康状况等。

[0157] 可以采用各种组合。对于以下实例,抑制性寡核苷酸疗法是“A”,而抗癌疗法是“B”:

[0158] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B

[0159] B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A

[0160] B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A

[0161] A/A/B/A

[0162] 考虑药剂(如果存在的话)的毒性,向患者施用本发明的任何化合物或疗法将遵循用于施用所述化合物的通用方案。因此,在一些实施例中,存在监测可归因于联合疗法的毒性的步骤。预期将根据需要重复治疗周期。还预期各种标准疗法以及外科手术干预可以与所描述的疗法组合应用。

[0163] 在特定方面中,预期标准疗法将包括化学疗法、放射疗法、免疫疗法、手术疗法或基因疗法,并且可以与如本文所描述的基因表达抑制剂疗法、抗癌疗法或基因表达抑制剂疗法和抗癌疗法两者组合采用。

[0164] A. 化学疗法

[0165] 根据本发明实施例,可以使用广泛多种的化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物治疗癌症。“化学治疗剂”用于表示在癌症治疗中施用的化合物或组合物。这些药剂或药物按其在细胞内的活动模式,例如其是否影响细胞周期以及在什么阶段影响细胞周期来进行分类。或者,可以基于其直接交联DNA、插入DNA中或通过影响核酸合成来诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来表征药剂。

[0166] 化学治疗剂实例包括烷化剂,例如噻替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐,例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,例如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺;乙酰精宁(尤其布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮);喜树碱(包括合成类似物拓扑替康(topotecan));苔藓虫素;卡利他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻素(特别地念珠藻素1和念珠藻素8);尾海兔素;倍癌霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素;水鬼蕉碱;沙考的汀(sarcodictyin);海绵抑制素;氮芥,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥、二氯甲二乙胺、氧化二氯甲二乙胺盐酸盐、美法仑、新氮芥、胆固醇对苯乙酸氮芥、泼尼氮芥、曲磷胺和尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素,例如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素,尤其卡奇霉素 γ 1I和卡奇霉素 ω 1I);达内霉素,包括达内霉素A;双膦酸盐,例如氯屈膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新抑癌蛋白发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、氮杂丝氨酸、博莱霉素、放线菌素C、卡拉比辛(carabycin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D、道诺霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、小红莓(包括吗啉基-小红莓、氰基吗啉基-小红莓、2-吡咯啉基-小红莓和脱氧小红莓)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素、丝裂霉素(例如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素(nogalarnycin)、橄榄霉素、培洛霉素(peplomycin)、泼非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、奎那霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁(zinostatin)和左柔比星(zorubicin);抗代谢物,例如甲胺喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如迪诺特宁(denopterin)、蝶罗呤和三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、脱氧氟尿苷、依诺他滨(enocitabine)和氟尿苷;雄激素,例如二甲睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷和睾内酯;抗肾上腺,例如米托坦(mitotane)和曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,例如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;贝他布昔(bestrabucil);比生群;艾达曲克(edatraxate);得弗伐胺(defofamine);秋水仙

碱;地吡醌;艾福米辛(elformithine);乙酸依利铵;埃坡霉素;依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;罗尼达宁(lonidainine);类美登素,例如美登素和安丝菌素;丙脒脲;米托蒽醌;莫哌达醇;硝拉维林;喷司他汀(pentostatin);凡那明(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙酰肼;丙卡巴肼;PSK多糖复合物;雷佐生(razoxane);根霉素;西佐糖;螺旋锗;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯(尤其T-2毒素、疣孢菌素A、杆孢菌素A和蛇形菌素);乌拉坦(urethan);长春地辛;达卡巴嗪;甘露氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;甲托辛;阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;类紫杉醇,例如太平洋紫杉醇和多西他赛吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;铂配位络合物,例如顺铂、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂;长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺凡特龙(novantrone);替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基喋呤;希罗达(xeloda);伊班膦酸盐;伊立替康(irinotecan)(例如CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄素,例如视黄酸;卡培他滨(capecitabine);卡铂、丙卡巴肼、普卡霉素、吉西他滨、诺维本(navelbine)、法呢基蛋白转移酶抑制剂、反铂和以上各者中的任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0167] B. 放射疗法

[0168] 导致DNA损伤并已被广泛使用的其它因素包括众所周知的 γ 射线、X射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的直接递送。也考虑了其它形式的DNA损伤因素,例如微波、质子束照射(美国专利第5,760,395号和第4,870,287号)和UV照射。所有这些因素很可能会影响广泛范围的对DNA、DNA前体、DNA复制和修复以及染色体装配和维持的损伤。X射线的剂量范围介于50到200伦琴日剂量持续延长时间段(3到4周)到2000到6000伦琴单次剂量范围内。放射性同位素的剂量范围差异很大,并且取决于同位素的半衰期、所发射的放射线的强度和类型以及增生性细胞吸收。

[0169] 术语“接触”和“暴露”在应用于细胞时在本文中用于描述将治疗性构建体和化学治疗剂或放射治疗剂递送到靶细胞或与靶细胞直接并列放置的过程。为了实现细胞杀死,例如将两种药剂以有效杀死细胞或防止其分裂的组合量递送到细胞。

[0170] C. 免疫疗法

[0171] 在癌症治疗的情形下,免疫疗法一般依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。曲妥珠单抗(HerceptinTM)就是这样的例子。免疫效应子可以是例如对肿瘤细胞表面上的某些标记物具有特异性的抗体。单独抗体可以充当疗法的效应子,或其可以募集其它细胞来实际影响细胞杀死。抗体也可以与药物或毒素(化学疗法、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合,并且仅用作靶向剂。或者,效应子可以是携带表面分子的淋巴细胞,所述表面分子与肿瘤细胞靶标直接或间接相互作用。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。治疗模式(即直接细胞毒性活动和ErbB2抑制或减少)组合将在过度表达ErbB2的癌症的治疗中提供治疗益处。

[0172] 另一种免疫疗法也可以用作与上述基因沉默疗法的联合疗法的一部分。在免疫疗法的一个方面中,肿瘤细胞必须携带适合于靶向,即在大多数其它细胞上不存在的一些标记物。存在许多肿瘤标记物,并且这些标记物中的任一种都可以适用于在本发明的上下文中进行靶向。常见肿瘤标记物包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿肿瘤相关抗原、胎儿抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受

体、层粘连蛋白受体、erb B和p155。免疫疗法的替代方面是组合抗癌效果与免疫刺激性效果。还存在包括以下的免疫刺激性分子：例如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN的细胞因子、例如MIP-1、MCP-1、IL-8的趋化因子和例如FLT3配体的生长因子。已显示以蛋白质形式或与肿瘤抑制剂组合使用基因递送来组合免疫刺激性分子增强抗肿瘤效果。此外，针对这些化合物中的任一种的抗体可以用于靶向本文所讨论的抗癌剂。

[0173] 当前正在研究或使用的免疫疗法的实例是免疫佐剂，例如牛分枝杆菌、恶性疟原虫、二硝基氯苯和芳香族化合物（美国专利第5,801,005号和第5,739,169号；Hui和Hashimoto,1998；Christodoulides等人,1998）；细胞因子疗法，例如干扰素 α 、 β 和 γ ；IL-1、GM-CSF和TNF（Bukowski等人,1998；Davidson等人,1998；Hellstrand等人,1998）基因疗法，例如TNF、IL-1、IL-2、p53（Qin等人,1998；Austin-Ward和Villasaca,1998；美国专利第5,830,880号和第5,846,945号）；和单克隆抗体，例如抗神经节苷脂GM2、抗HER-2、抗p185（Pietras等人,1998；Hanibuchi等人,1998；美国专利第5,824,311号）。预期可以将一种或多种抗癌疗法与本文所描述的基因沉默疗法一起采用。

[0174] 在主动免疫疗法中，一般与不同细菌佐剂一起施用抗原性肽、多肽或蛋白质或自体或同种异体肿瘤细胞组合物或“疫苗”（Ravindranath和Morton,1991；Morton等人,1992；Mitchell等人,1990；Mitchell等人,1993）。

[0175] 在过继免疫疗法中，将患者的循环淋巴细胞或肿瘤浸润的淋巴细胞体外分离，通过诸如IL-2的淋巴因子激活，或用于肿瘤坏死的基因转导，并且重新施用（Rosenberg等人,1988；1989）。

[0176] 在一些实施例中，免疫疗法可以是免疫检查点抑制剂。免疫检查点升高信号（例如共刺激性分子）或降低信号。可以通过免疫检查点阻断物靶向的抑制性免疫检查点包括腺苷A2A受体（A2AR）、B7-H3（也称为CD276）、B和T淋巴细胞减毒剂（BTLA）、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4（CTLA-4，也称为CD152）、吡咯胺2,3-加双氧酶（IDO）、杀手细胞免疫球蛋白（KIR）、淋巴细胞激活基因-3（LAG3）、程序性死亡1（PD-1）、T细胞免疫球蛋白域和黏蛋白域3（TIM-3）和T细胞激活的V域Ig抑制因子（VISTA）。明确地说，免疫检查点抑制剂靶向PD-1轴和/或CTLA-4。

[0177] 免疫检查点抑制剂可以是例如小分子、重组形式的配体或受体的药物，或明确地说是例如人类抗体的抗体（例如国际专利公开W02015016718；Pardoll,《自然综述：癌症（Nat Rev Cancer）》，12（4）：252-64,2012；两者均以引用的方式并入本文中）。可以使用免疫检查点蛋白或其类似物的已知抑制剂，明确地说可以使用嵌合、人源化或人类形式的抗体。如技术人员所已知，替代和/或同等名称可以用于本公开中所提及的某些抗体。所述替代和/或同等名称在本公开的上下文中可互换。举例来说，已知兰洛珠单抗（lambrolizumab）也以替代和同等名称MK-3475和帕博利珠单抗（pembrolizumab）而为人所知。

[0178] 在一些实施例中，PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在具体方面中，PD-1配体结合配偶体是PDL1和/或PDL2。在另一个实施例中，PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合配偶体结合的分子。在具体方面中，PDL1结合配偶体是PD-1和/或B7-1。在另一个实施例中，PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合配偶体结合的分子。在具体方面中，PDL2结合配偶体是PD-1。拮抗剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋

白或寡肽。示例性抗体描述于美国专利第8,735,553号、第8,354,509号和第8,008,449号中,所述专利全部以引用的方式并入本文中。用于本文所提供的方法中的其它PD-1轴拮抗剂在所属领域中已知,例如描述于美国专利公开第20140294898号、第2014022021号和第20110008369号中,所述专利全部以引用的方式并入本文中。

[0179] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体(例如人类抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施例中,抗PD-1抗体选自纳武单抗(nivolumab)、帕博利珠单抗和CT-011组成的组。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如包含与恒定区(例如免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是AMP-224。纳武单抗也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和**OPDIVO**[®],是W02006/121168中所描述的抗PD-1抗体。帕博利珠单抗也称为MK-3475、Merck 3475、兰洛珠单抗、**KEYTRUDA**[®]和SCH-900475,是W02009/114335中所描述的抗PD-1抗体。CT-011也称为hBAT或hBAT-1,是W02009/101611中所描述的抗PD-1抗体。AMP-224也称为B7-DCIg,是W02010/027827和W02011/066342中所描述的PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0180] 在本文所提供的方法中可以靶向的另一种免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),其也称为CD152。人类CTLA-4的完整cDNA序列具有基因库登录号L15006。CTLA-4在T细胞表面上找到,并且在与抗原呈递细胞表面上的CD80或CD86结合时充当“关闭”开关。CTLA4是在辅助T细胞的表面上表达的免疫球蛋白超家族的成员,并向T细胞传递抑制性信号。CTLA4与T细胞共刺激性蛋白CD28类似,并且两个分子均与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(分别也称为B7-1和B7-2)结合。CTLA4向T细胞传递抑制性信号,而CD28传递刺激性信号。细胞内CTLA4也在调节性T细胞中找到,并且可能对其功能至关重要。通过T细胞受体和CD28进行的T细胞激活引起CTLA-4(B7分子的抑制性受体)表达增加。

[0181] 在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如人类抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0182] 适用于本发明方法中的抗人类CTLA-4抗体(或自其衍生的VH域和/或VL域)可以使用所属领域众所周知的方法生成。或者,可以使用所属领域公认的抗CTLA-4抗体。举例来说,抗CTLA-4抗体公开于以下中:美国专利第8,119,129号、第W0 01/14424号、第W0 98/42752号;第W0 00/37504号(CP675,206,也称为曲美木单抗(tremelimumab);以前为替西木单抗(ticilimumab))、美国专利第6,207,156号;Hurwitz等人(1998)《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》95(17):10067-10071;Camacho等人(2004)《临床肿瘤学杂志(J Clin Oncology)》22(145):摘要第2505号(抗体CP-675206);和Mokyr等人(1998)《癌症研究(Cancer Res)》58:5301-5304可以用于本文所公开的方法中。前述公开中的每一个的教导以引用的方式并入在此。也可以使用与这些所属领域公认的抗体竞争与CTLA-4结合的抗体。举例来说,人源化CTLA-4抗体描述于国际专利申请案第W02001014424号、第W02000037504号和美国专利第8,017,114号中,所述申请案全部以引用的方式并入本文中。

[0183] 示例性抗CTLA-4抗体是伊匹木单抗(也称为10D1、MDX-010、MDX-101和**Yervoy**[®])或其抗原结合片段和变体(参见例如W0 01/14424)。在其它实施例中,所述抗体包含伊匹木单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施例中,所述抗体包含伊匹木单抗的VH区的

CDR1域、CDR2域和CDR3域,以及伊匹木单抗的VL区的CDR1域、CDR2域和CDR3域。在另一个实施例中,所述抗体竞争与CTLA-4上的与上述抗体相同的抗原决定基结合和/或与之结合。在另一个实施例中,所述抗体与上述抗体具有至少约90%可变区氨基酸序列同一性(例如与伊匹木单抗具有至少约90%、95%或99%可变区同一性)。

[0184] 用于调节CTLA-4的其它分子包括例如描述于美国专利第5844905号、第5885796号和国际专利申请案第W01995001994号和第W01998042752号中的CTLA-4配体和受体,所述专利全部以引用的方式并入本文中;以及例如描述于美国专利第8329867号中的免疫粘附素,所述专利以引用的方式并入本文中。

[0185] 在一些实施例中,免疫疗法可以是过继性免疫疗法,所述过继性免疫疗法涉及离体生成的自体抗原特异性T细胞的转移。用于过继性免疫疗法的T细胞可以通过抗原特异性T细胞的扩增或通过基因工程改造进行的T细胞重定向而生成(Park, Rosenberg等人, 2011)。已经证明分离和转移肿瘤特异性T细胞成功地治疗黑素瘤。已经通过遗传转移转基因T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)成功地在T细胞中生成了新颖特异性(Jena, Dotti等人, 2010)。CAR是由与单个融合分子中的一个或多个信号传导域缔合的靶向部分组成的合成受体。一般来说,CAR的结合部分由单链抗体(scFv)的抗原结合域组成,所述单链抗体(scFv)的抗原结合域包含通过柔性连接子连接的单克隆抗体的轻可变片段。也已经成功地使用基于受体或配体域的结合部分。第一代CAR的信号传导域衍生自CD3 ζ 的细胞质区或Fc受体 γ 链。CAR已经成功地使T细胞针对在来自包括淋巴瘤和实体肿瘤的各种恶性肿瘤的肿瘤细胞的表面处表达的抗原重定向(Jena, Dotti等人2010)。

[0186] 在一个实施例中,本申请案提供了用于治疗癌症的联合疗法,其中联合疗法包含过继性T细胞疗法和检查点抑制剂。在一个方面中,过继性T细胞疗法包含自体T细胞和/或同种异体T细胞。在另一个方面中,自体T细胞和/或同种异体T细胞靶向肿瘤抗原。

[0187] D. 外科手术

[0188] 约60%癌症患者将接受某种类型的外科手术,包括预防性、诊断性或分期性、治愈性和姑息性外科手术。治愈性外科手术是可以与例如本发明的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法的其它疗法结合使用的癌症治疗。

[0189] 治愈性外科手术包括切除术,其中物理去除、切除和/或破坏全部或部分癌组织。肿瘤切除是指肿瘤的至少一部分的物理去除。除肿瘤切除之外,外科手术治疗还包括激光外科手术、冷冻外科手术、电外科手术和显微控制的外科手术(莫氏外科手术(Mohs' surgery))。进一步预期本发明可以与浅表癌、前期癌或附带量的正常组织的去除结合使用。

[0190] 在切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤后,可能在体内形成空腔。可以通过对区域进行灌注、直接注射或局部应用额外抗癌疗法来完成治疗。所述治疗可以例如每1、2、3、4、5、6或7天或每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12月重复。这些治疗也可以具有不同的剂量。

[0191] E. 其它药剂

[0192] 预期其它药剂可以与本发明实施例的某些方面组合使用以改善治疗的疗效。这些额外药剂包括影响细胞表面受体和GAP结的上调的药剂、细胞生长抑制剂和分化剂、细胞粘附抑制剂、增加过度增殖细胞对细胞凋亡诱导剂的敏感性的药剂或其它生物药剂。通过增

加GAP结的数量而增加细胞间信号传导将增加对邻近过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在其它实施例中,细胞生长抑制剂或分化剂可以与本发明实施例的某些方面结合使用以改善治疗的抗过度增殖功效。预期细胞粘附抑制剂改善本发明实施例的功效。细胞粘附抑制剂的实例是局部粘着斑激酶 (FAK) 抑制剂和洛伐他汀 (Lovastatin)。进一步预期例如抗体 c225 的增加过度增殖细胞对细胞凋亡的敏感性的其它药剂可以与本发明实施例的某些方面组合使用以改善疗效。

[0193] VIII. 试剂盒和诊断

[0194] 在本发明的各个方面中,设想含有治疗剂和/或其它治疗剂和递送剂的试剂盒。在一些实施例中,本发明考虑用于制备和/或施用本发明的疗法的试剂盒。试剂盒可以包含能够用于施用本发明的活性药剂或有效药剂的试剂。试剂盒的试剂可以包括至少一种基因表达抑制剂(例如IGF-1R寡核苷酸)、一种或多种脂质组分、组合疗法的一种或多种抗癌组分以及用于制备、配制和/或施用本发明的组分或执行本发明方法的一个或多个步骤的试剂。

[0195] 在一些实施例中,试剂盒还可以包含合适的容器构件,所述容器构件是不会与试剂盒的组分反应的容器,例如微量离心管、分析盘、注射器、瓶或管。容器可以由例如塑料或玻璃的可灭菌材料制成。

[0196] 试剂盒可以进一步包括概述所述方法的程序步骤的说明书,并将基本上遵循与本文所描述或所属领域的普通技术人员已知的相同程序。

[0197] IX. 实例

[0198] 包括以下实例以展现本发明的优选实施例。所属领域的技术人员应当了解,以下实例中所公开的技术代表发明人所发现的、在本发明实践中很好地起作用的技术,并且因此可以被认为构成用于其实践的优选模式。然而,根据本公开,所属领域的技术人员应当了解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在所公开的具体实施例中作出许多改变并仍然获得相似或类似结果。

[0199] 实例1-靶向IGF-1R的P-乙氧基寡核苷酸

[0200] 设计用于脂质体IGF-1R反义物药品中以抑制IGF-1R蛋白表达的靶向IGF-1R的寡核苷酸。IGF-1R的连续cDNA序列在SEQ ID NO:3中提供,而IGF-1R的蛋白序列在SEQ ID NO:4中提供。表4中提供了寡核苷酸中的每一个的序列。

[0201] 表4. IGF-1R反义物序列

[0202]	反义物名称	序列	SEQ ID NO:
	IGF-1R_AS1	5'-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3'	1
	IGF-1R_AS2	5'-GGA CCC TCC TCC GGA GCC-3'	2

[0203] 根据本文所描述的方法制造脂质体IGF-1R反义物药品。针对IGF-1R_AS1碱基寡核苷酸的质谱法测试表明,超过80%寡核苷酸原料药具有介于三个与七个之间的磷酸二酯骨架键,而超过70%寡核苷酸原料药具有介于4个与七个之间的磷酸二酯骨架键。

[0204] 实例2-脂质体IGF-1R反义物对小鼠中的GL261肿瘤生长的影响

[0205] 测试了脂质体IGF-1R_AS1反义物防止植入小鼠中的GL261细胞肿瘤的生长的能力。在第0天,将GL261细胞(10^5)植入C57BL/6小鼠侧腹中。十四天后,腹膜内施用脂质体IGF-1R_AS1反义物(0.75mg、0.25mg或0.075mg)。跟踪小鼠以追踪肿瘤发展。脂质体IGF-1R_AS1反义物的施用延迟了肿瘤形成(图1)。

[0206] ***

[0207] 根据本公开,可以制造并执行本文所公开并要求保护的所有方法并且无需过度实验。虽然已经就优选实施例而言描述了本发明的组合物和方法,但是对于所属领域的技术人员显而易见的是,可以在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下对本文所描述的方法和步骤或步骤顺序应用改变。更具体地说,显而易见的是,化学上并且生理学上相关的某些药剂可以代替本文所描述的药剂,同时将实现相同或类似结果。对于所属领域的技术人员显而易见的是,所有所述类似替代方案和修改都被认为在由所附权利要求书界定的本发明的精神、范围和概念内。

[0208] 参考文献

[0209] 以下参考文献在其提供与本文所阐述的程序或其它细节互补的示例性程序或其它细节的程度上以引用的方式特定地并入本文中。

[0210] 美国专利第4,659,774号

[0211] 美国专利第4,816,571号

[0212] 美国专利第4,870,287号

[0213] 美国专利第4,959,463号

[0214] 美国专利第5,141,813号

[0215] 美国专利第5,214,136号

[0216] 美国专利第5,223,618号

[0217] 美国专利第5,264,566号

[0218] 美国专利第5,378,825号

[0219] 美国专利第5,428,148号

[0220] 美国专利第5,446,137号

[0221] 美国专利第5,466,786号

[0222] 美国专利第5,470,967号

[0223] 美国专利第5,539,082号

[0224] 美国专利第5,554,744号

[0225] 美国专利第5,574,146号

[0226] 美国专利第5,602,240号

[0227] 美国专利第5,602,244号

[0228] 美国专利第5,610,289号

[0229] 美国专利第5,614,617号

[0230] 美国专利第5,623,070号

[0231] 美国专利第5,652,099号

[0232] 美国专利第5,670,663号

[0233] 美国专利第5,672,697号

[0234] 美国专利第5,681,947号

[0235] 美国专利第5,700,922号

[0236] 美国专利第5,705,629号

[0237] 美国专利第5,708,154号

- [0238] 美国专利第5,714,331号
- [0239] 美国专利第5,714,606号
- [0240] 美国专利第5,719,262号
- [0241] 美国专利第5,736,336号
- [0242] 美国专利第5,739,169号
- [0243] 美国专利第5,760,395号
- [0244] 美国专利第5,763,167号
- [0245] 美国专利第5,766,855号
- [0246] 美国专利第5,773,571号
- [0247] 美国专利第5,777,092号
- [0248] 美国专利第5,786,461号
- [0249] 美国专利第5,792,847号
- [0250] 美国专利第5,801,005号
- [0251] 美国专利第5,824,311号
- [0252] 美国专利第5,830,880号
- [0253] 美国专利第5,846,945号
- [0254] 美国专利第5,855,911号
- [0255] 美国专利第5,858,988号
- [0256] 美国专利第5,859,221号
- [0257] 美国专利第5,872,232号
- [0258] 美国专利第5,886,165号
- [0259] 美国专利第5,891,625号
- [0260] 美国专利第5,908,845号
- [0261] 美国专利第6,541,036号
- [0262] 美国专利第9,744,187号
- [0263] Amin等人,《癌基因(Oncogene)》,22:5399-5407,2013。
- [0264] Arteaga等人,《癌症研究(Cancer Res.)》,49:6237-41,1989。
- [0265] Austin-Ward和Villaseca,《智利医学杂志(Revista Medica de Chile)》,126(7):838-845,1998。
- [0266] Bailey和Sullivan,《生物化学与生物物理学报(Biochimica.Biophys.Acts.)》,239-252,2000。
- [0267] Bangham等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol)》,13(1):253-259,1965。
- [0268] Bukowski等人,《临床癌症研究(Clinical Cancer Res.)》,4(10):2337-2347,1998。
- [0269] Christodoulides等人,《微生物学(Microbiology)》,144(Pt 11):3027-3037,1998。
- [0270] Davidson等人,《免疫治疗杂志(J.Immunother.)》,21(5):389-398,1998。
- [0271] Deamer和Uster,《范围:脂质体制备:方法和机制(In:Liposome Preparation: Methods and Mechanisms)》,Ostro(编),《脂质体(Liposomes)》,1983。

- [0272] Dokka等人,《药学研究 (Pharm Res)》,17:521-25,2000。
- [0273] duBois等人,《临床肿瘤学杂志 (J Clin Oncol)》,17:46-51,1999。
- [0274] Dubey等人,《药物靶向杂志 (J. Drug Target)》,12:257-264,2004。
- [0275] Duxbury等人,《生物化学和生物物理研究通信 (Biochem. Biophys. Res. Commun.)》,311:786-792,2003。
- [0276] Duxbury等人,《癌基因》,23:1448-1456,2004。
- [0277] Egholm等人,《自然 (Nature)》,365 (6446) :566-568,1993。
- [0278] Elbashir等人,《自然》,411 (6836) :494-498,2001。
- [0279] 欧洲申请01219
- [0280] 欧洲申请266,032
- [0281] Fagard等人,《JAKSTAT》,2:e22882,2013。
- [0282] Farhood等人,《生物化学与生物物理学报》,289-295,1995。
- [0283] Fire等人,《自然》,391 (6669) :806-811,1998。
- [0284] Flenniken等人,《发育生物学 (Dev. Biol.)》,179:382-401,1996。
- [0285] Froehler等人,《核酸研究 (Nucleic Acids Res.)》,14 (13) :5399-5407,1986。
- [0286] Gabizon,《癌症调查 (Cancer Invest.)》,19:424-436,2001。
- [0287] Ghosh和Bachhawat,《范围:肝病,使用特异性受体进行的靶向诊断和疗法 (In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors)》和 Ligands, Wu等人 (编), 纽约马塞尔·德克尔 (Marcel Dekker, NY), 87-104, 1991。
- [0288] Gregoriadis,《范围:生物与医学中的药物载剂 (In: Drug Carriers in Biology and Medicine)》, Gregoriadis (编), 287-341, 1979。
- [0289] Gutierrez-Puente等人,《药理学与实验治疗学杂志 (J. Pharmacol. Exp. Ther.)》, 291:865-869, 1999。
- [0290] Halder等人,《临床癌症研究》,11:8829-36,2005。
- [0291] Han等人,《外科肿瘤学年鉴 (Ann Surg Oncol)》,4:264-268,1997。
- [0292] Hanibuchi等人,《国际癌症杂志 (Int. J. Cancer)》,78 (4) :480-485,1998。
- [0293] Hannon和Rossi,《自然》,431:371-378,2004。
- [0294] Hardee等人,《G3 (Bethesda)》3:2173-2185,2013。
- [0295] Hassani等人,《基因医学杂志 (J. Gene Med.)》,7 (2) :198-207,2005。
- [0296] Hecker等人,《癌症研究》,62:2699-2707,2002。
- [0297] Hellstrand等人,《肿瘤学报 (Acta Oncologica)》,37 (4) :347-353,1998。
- [0298] Hortobagyi等人,《临床肿瘤学杂志》,19:3422-3433,2001。
- [0299] Hsia等人,《细胞生物学杂志 (J Cell Biol)》,160:753-67,2003。
- [0300] Hui和Hashimoto,《感染与免疫 (Infection Immun.)》,66 (11) :5329-5336,1998。
- [0301] Jackson等人,《自然-生物技术 (Nat. Biotechnol.)》,21:635-637,2003。
- [0302] Jemal等人,《临床医师癌症杂志 (CA Cancer J. Clin.)》,55 (1) :10-30,2005。
- [0303] Jiang等人,《癌基因》,18:6071-77,1999。
- [0304] Judson等人,《癌症 (Cancer)》,86:1551-56,1999。
- [0305] Kaneda等人,《科学 (Science)》,243:375-378,1989。

- [0306] Kato等人,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》,266:3361-3364,1991。
- [0307] Kim等人,《自然-生物技术》,22:321-325,2004。
- [0308] Kinch等人,《临床与实验转移(Clin.Exp.Metastasis)》,20:59-68,2003。
- [0309] Klein等人,《胃肠病学(Gastroenterology)》,125:9-18,2003。
- [0310] Kohno等人,《国际癌症杂志》,97:336-43,2002。
- [0311] Kornberg和Baker,《DNA复制(DNA Replication)》,第2版,旧金山Freeman,1992。
- [0312] Kornberg等人,《眼科研究与视光学(Invest Ophthalmol Vis Sci)》,45:4463-69,2004。
- [0313] Kornberg,《头与颈(Head Neck)》,20:634-639,1998。
- [0314] Kostarelos等人,《国际癌症杂志》,112:713-21,2004。
- [0315] Krasnici等人,《国际癌症杂志》,105(4):561-567,2003。
- [0316] Landen,《癌症研究》,65:6910-18,2005。
- [0317] Langley等人,《癌症研究》,63:2971-76,2003。
- [0318] Lewis等人,《细胞(Cell)》,115:787-798,2003。
- [0319] Lewis等人,《自然-遗传学(Nat.Genet.)》,32:107-108,2002。
- [0320] Li等人,《生物化学和生物物理研究通信》,196:92-98,1993。
- [0321] Lori等人,《美国药物基因组学杂志(Am.J.Pharmacogenomics)》,2:245-252,2002。
- [0322] Matsuda等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,101:16-22,2004。
- [0323] McCaffrey等人,《自然》,418:38-39,2002。
- [0324] McGuire等人,《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》,334:1-6,1996。
- [0325] McLean等人,《药物治疗专家见解(Expert Opin Pharmacother)》,4:227-34,2003。
- [0326] Miklossy等人,《自然综述:药物发现(Nat.Rev.Drug Discov.)》,12:611-629,2013。
- [0327] Miller等人,《生物化学(Biochemistry)》,37(37):12875-83,1998。
- [0328] Mitchell等人,《纽约科学院年报(Ann.NY Acad.Sci.)》,690:153-166,1993。
- [0329] Mitchell等人,《临床肿瘤学杂志》,8(5):856-869,1990。
- [0330] Mitra等人,《自然综述:分子细胞生物学(Nature Reviews Molecular Cell Biology)》,6:56-68,2005。
- [0331] Mitra等人,《美国癌症研究协会会议录(Proc Am Assoc Cancer Res)》,2005。
- [0332] Morton等人,《外科档案(Arch.Surg.)》,127:392-399,1992。
- [0333] Nemoto等人,《病理学(Pathobiology)》,65:195-203,1997。
- [0334] Nicolau等人,《酶学方法(Methods Enzymol.)》,149:157-176,1987。
- [0335] Noblitt等人,《癌症基因疗法(Cancer Gene Ther.)》,11:757-766,2004。
- [0336] Ogawa等人,《癌基因》,19:6043-6052,2000。
- [0337] Owens等人,《癌症研究》,55:2752-2755,1995。

- [0338] Park等人,《癌症通讯(Cancer Lett.)》,118:153-160,1997。
- [0339] PCT公开W0 92/20702
- [0340] PCT公开W0 02/100435
- [0341] PCT公开W0 03/015757
- [0342] PCT公开W0 04/002453
- [0343] PCT公开W0 04/029213
- [0344] PCT公开W0 2016/164916
- [0345] Pietras等人,《癌基因》,17 (17) :2235-2249,1998.
- [0346] Qin等人,《美国国家科学院院刊》,95 (24) :14411-14416,1998。
- [0347] Ravindranath和Morton,《国际免疫学评论(Intern.Rev.Immunol.)》,7:303-329,1991。
- [0348] Reich等人,《分子视觉(Mol.Vis.)》,9:210-216,2003。
- [0349] 《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第18版麦克印刷公司(Mack Printing Company),1289-1329,1990。
- [0350] Rosenberg等人,《外科学年鉴(Ann.Surg.)》210 (4) :474-548,1989。
- [0351] Rosenberg等人,《新英格兰医学杂志》,319:1676,1988。
- [0352] Ryther等人,《基因疗法(Gene Ther.)》,12 (1) :5-11,2004。
- [0353] Sambrook等人,《范围:分子克隆(In:Molecular cloning)》,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.),2001。
- [0354] Schaller和Parsons,《细胞生物学趋势(Trends in Cell Biology)》,3:258-62,1993。
- [0355] Schaller等人,《细胞分子生物学(Mol Biol Cell)》,10:3489-3505,1999。
- [0356] Schaller,《生物化学与生物物理学报》,1540:1-21,2001。
- [0357] Schaller,《内分泌学杂志(J Endocrinol)》,150:1-7,1996。
- [0358] Schaller,《细胞生物学趋势》,3:258-262,1993。
- [0359] Scheit,《范围:合成与生物功能(In:Synthesis and Biological Function)》,纽约的约翰威立(Wiley-Interscience,NY)》,171-172,1980。
- [0360] Schlaepfer和Hunter,《细胞生物学趋势》,8:151-57,1998。
- [0361] Schlaepfer等人,《生物物理学与分子生物学进展(Prog Biophys Mol Biol)》,71:435-78,1999。
- [0362] Scotlandi等人,《癌症研究》,58:4127-31,1998。
- [0363] Scuto等人,《癌症研究》,71:3182-3188,2011。
- [0364] Sein等人,《癌基因》,19:5539-42,2000。
- [0365] Sheta等人,《国家癌症研究所杂志(J Natl Cancer inst)》,92:1065-73,2000。
- [0366] Shibata等人,《癌症研究》,58:900-903,1998。
- [0367] Sieg等人,《自然-细胞生物学(Nat Cell Biol)》,2:249-56,2000。
- [0368] Sioud和Sorensen,《生物化学和生物物理研究通信》,312:1220-1225,2003。
- [0369] Siwak等人,《临床癌症研究》,8:955-56,2002。

- [0370] Sledz等人,《自然-细胞生物学》,5:834-839,2003。
- [0371] Song等人,《自然-医学 (Nature Med.)》9:347-351,2003。
- [0372] Sonoda等人,《生物化学杂志 (Journal of Biological Chemistry)》,275:16309-15,2000。
- [0373] Sood等人,《美国病理学杂志 (Am J Pathol)》,165:1087-1095,2004。
- [0374] Sood等人,《癌症生物学与疗法 (Cancer Biology&Therapy)》,1:511-17,2002。
- [0375] Sorensen等人,《分子生物学杂志》,327:761-66,2003。
- [0376] Soutschek等人,《自然》,432:173-178,2004。
- [0377] Spagnou等人,《生物化学 (Biochemistry)》,43:13348-13356,2004。
- [0378] Sulman等人,《基因组学 (Genomics)》,40:371-374,1997。
- [0379] Szoka和Papahadjopoulos,《美国国家科学院院刊》75:4194-4198,1978。
- [0380] Thaker等人,佛罗里达州迈阿密的《妇科肿瘤学会第36届年会 (36th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists)》,2005。
- [0381] Thaker等人,《临床癌症研究》,10:5145-5150,2004。
- [0382] Thurston等人,《临床研究杂志 (J.Clin.Invest.)》,101 (7) :1401-1413,1998。
- [0383] Uchida等人,《分子疗法 (Mol.Ther.)》,10:162-171,2004。
- [0384] Voskoglou-Nomikos等人,《临床癌症研究》,9:4227-4239,2003。
- [0385] Walker-Daniels等人,《前列腺 (Prostate)》,41:275-80,1999。
- [0386] Wianny等人,《自然-细胞生物学》,2:70-75,2000。
- [0387] Wong等人,《基因 (Gene)》,10:87-94,1980。
- [0388] Wu等人,《血液学与肿瘤学杂志 (J.Hematol.Oncol.)》,4:31,2011。
- [0389] Xia等人,《自然-生物技术》,20:1006-10,2002。
- [0390] Yang等人,《癌基因》,22:5694-701,2003。
- [0391] Zelinski等人,《癌症研究》,61:2301,2001。
- [0392] Zhang等人,《生物化学杂志》,279:10677-684,2004。
- [0393] Zia等人,《细胞生物学杂志》,24:269-75,1996。

序列表

<110> 拜奥-帕斯控股股份有限公司 (BioPath Holdings, Inc.)

托马斯杰弗逊大学 (Thomas Jefferson University)

<120> 用于IGF-1R抑制的P-乙氧基核酸

<130> 6107-191PCT (409843)

<150> US 62/487,425

<151> 2017-04-19

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 1

tcctccggag ccagactt 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 2

ggaccctcct ccggagcc 18

<210> 3

<211> 12262

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1044) .. (5147)

<400> 3

agtgtgtggc agcggcgggc gcgggcgggc gaggtgggg ctcttgttta ccagcattaa 60
ctccgctgag cggaaaaaaaa aagggaaaaa acccgaggag gagcgagcgc accaggcgaa 120
ctcgagagag gcgggagagc gagagggacg ccgccagcga gcctgcccac ggccggcgct 180
cgcagaccct cggccccgct ccccggatcc ccccgcgccc tccacgcccc tcccgcgcg 240
gggcagctcc acggcgcgcc tcgcctcggc tgtgaccttc agcgagccgg agcccccgcg 300

```

cagagcaggc ggcggcgggc gggggccggg cggggccgg cgcggggcgg gcggcggcgc 360
agagccgggc ggcggcgggc gaggctgag cgcggcgcgg ccggcccgcc gctttgtgtg 420
tgtcctggat ttgggaagga gctcgccgcg gcggcggcgg cgctgaggga ggaggcggcg 480
gcgagcggag ccaggaggag gaggaggagg gggagccgct cattcatttt gactccgcgt 540
ttctgccccct cgccggcctc gcctgtgacc cggacttcgg ggcgatcttg cgaactgcgt 600
cgcgccctcc cgcggcggaa gctcgggcgt ccggccgcct ccgcgcggc cagggccggg 660
cttggtttttc ctcgcctagg cagatttggg ctttgcccc tttctttgca gttttcccc 720
cttcctgcct ctccgggttt gaaaatggag gccgacgac ccgacagccc gccccggcgc 780
gcctcgggtt cccgactccg ccgagccctg ggccgctgct gccggcgctg aggggcccgc 840
ccgcgccgcc cgccccgtcc gcgcacccgg agggccccgg cggcgccgcc ttcggagtat 900
tgtttccttc gcccttgttt ttggaggggg agcgaagact gagtttgaga cttgtttcct 960
ttcatttcct tttttcttt tctttcttt ttttttttt ttttttttt tgagaaaggg 1020
gaatttcac ccaaataaaa gga atg aag tct ggc tcc gga gga ggg tcc ccg 1073
      Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro
              1              5              10
acc tcg ctg tgg ggg ctc ctg ttt ctc tcc gcc gcg ctc tcg ctc tgg 1121
Thr Ser Leu Trp Gly Leu Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp
              15              20              25
ccg acg agt gga gaa atc tgc ggg cca ggc atc gac atc cgc aac gac 1169
Pro Thr Ser Gly Glu Ile Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp
              30              35              40
tat cag cag ctg aag cgc ctg gag aac tgc acg gtg atc gag ggc tac 1217
Tyr Gln Gln Leu Lys Arg Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr
              45              50              55
ctc cac atc ctg ctc atc tcc aag gcc gag gac tac cgc agc tac cgc 1265
Leu His Ile Leu Leu Ile Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg
              60              65              70
ttc ccc aag ctc acg gtc att acc gag tac ttg ctg ctg ttc cga gtg 1313
Phe Pro Lys Leu Thr Val Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val
              75              80              85              90
gct ggc ctc gag agc ctc gga gac ctc ttc ccc aac ctc acg gtc atc 1361
Ala Gly Leu Glu Ser Leu Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile
              95              100              105
cgc ggc tgg aaa ctc ttc tac aac tac gcc ctg gtc atc ttc gag atg 1409
Arg Gly Trp Lys Leu Phe Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met
              110              115              120
acc aat ctc aag gat att ggg ctt tac aac ctg agg aac att act cgg 1457
Thr Asn Leu Lys Asp Ile Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg
              125              130              135

```



```

ggg gcc atc agg att gag aaa aat gct gac ctc tgt tac ctc tcc act 1505
Gly Ala Ile Arg Ile Glu Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr
      140                      145                      150
gtg gac tgg tcc ctg atc ctg gat gcg gtg tcc aat aac tac att gtg 1553
Val Asp Trp Ser Leu Ile Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val
155                      160                      165                      170
ggg aat aag ccc cca aag gaa tgt ggg gac ctg tgt cca ggg acc atg 1601
Gly Asn Lys Pro Pro Lys Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met
                        175                      180                      185
gag gag aag ccg atg tgt gag aag acc acc atc aac aat gag tac aac 1649
Glu Glu Lys Pro Met Cys Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn
                        190                      195                      200
tac cgc tgc tgg acc aca aac cgc tgc cag aaa atg tgc cca agc acg 1697
Tyr Arg Cys Trp Thr Thr Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr
                        205                      210                      215
tgt ggg aag cgg gcg tgc acc gag aac aat gag tgc tgc cac ccc gag 1745
Cys Gly Lys Arg Ala Cys Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu
      220                      225                      230
tgc ctg ggc agc tgc agc gcg cct gac aac gac acg gcc tgt gta gct 1793
Cys Leu Gly Ser Cys Ser Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala
235                      240                      245                      250
tgc cgc cac tac tac tat gcc ggt gtc tgt gtg cct gcc tgc ccg ccc 1841
Cys Arg His Tyr Tyr Tyr Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro
                        255                      260                      265
aac acc tac agg ttt gag ggc tgg cgc tgt gtg gac cgt gac ttc tgc 1889
Asn Thr Tyr Arg Phe Glu Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys
                        270                      275                      280
gcc aac atc ctc agc gcc gag agc agc gac tcc gag ggg ttt gtg atc 1937
Ala Asn Ile Leu Ser Ala Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile
      285                      290                      295
cac gac ggc gag tgc atg cag gag tgc ccc tcg ggc ttc atc cgc aac 1985
His Asp Gly Glu Cys Met Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn
      300                      305                      310
ggc agc cag agc atg tac tgc atc cct tgt gaa ggt cct tgc ccg aag 2033
Gly Ser Gln Ser Met Tyr Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys
315                      320                      325                      330
gtc tgt gag gaa gaa aag aaa aca aag acc att gat tct gtt act tct 2081
Val Cys Glu Glu Glu Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser
                        335                      340                      345

```

```

gct cag atg ctc caa gga tgc acc atc ttc aag ggc aat ttg ctc att 2129
Ala Gln Met Leu Gln Gly Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile
          350                      355                      360
aac atc cga cgg ggg aat aac att gct tca gag ctg gag aac ttc atg 2177
Asn Ile Arg Arg Gly Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met
          365                      370                      375
ggg ctc atc gag gtg gtg acg ggc tac gtg aag atc cgc cat tct cat 2225
Gly Leu Ile Glu Val Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His
          380                      385                      390
gcc ttg gtc tcc ttg tcc ttc cta aaa aac ctt cgc ctc atc cta gga 2273
Ala Leu Val Ser Leu Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly
          395                      400                      405                      410
gag gag cag cta gaa ggg aat tac tcc ttc tac gtc ctc gac aac cag 2321
Glu Glu Gln Leu Glu Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln
          415                      420                      425
aac ttg cag caa ctg tgg gac tgg gac cac cgc aac ctg acc atc aaa 2369
Asn Leu Gln Gln Leu Trp Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys
          430                      435                      440
gca ggg aaa atg tac ttt gct ttc aat ccc aaa tta tgt gtt tcc gaa 2417
Ala Gly Lys Met Tyr Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu
          445                      450                      455
att tac cgc atg gag gaa gtg acg ggg act aaa ggg cgc caa agc aaa 2465
Ile Tyr Arg Met Glu Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys
          460                      465                      470
ggg gac ata aac acc agg aac aac ggg gag aga gcc tcc tgt gaa agt 2513
Gly Asp Ile Asn Thr Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser
          475                      480                      485                      490
gac gtc ctg cat ttc acc tcc acc acc acg tcg aag aat cgc atc atc 2561
Asp Val Leu His Phe Thr Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile
          495                      500                      505
ata acc tgg cac cgg tac cgg ccc cct gac tac agg gat ctc atc agc 2609
Ile Thr Trp His Arg Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser
          510                      515                      520
ttc acc gtt tac tac aag gaa gca ccc ttt aag aat gtc aca gag tat 2657
Phe Thr Val Tyr Tyr Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr
          525                      530                      535
gat ggg cag gat gcc tgc ggc tcc aac agc tgg aac atg gtg gac gtg 2705
Asp Gly Gln Asp Ala Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val
          540                      545                      550

```

```

gac ctc ccg ccc aac aag gac gtg gag ccc ggc atc tta cta cat ggg 2753
Asp Leu Pro Pro Asn Lys Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly
555                    560                    565                    570
ctg aag ccc tgg act cag tac gcc gtt tac gtc aag gct gtg acc ctc 2801
Leu Lys Pro Trp Thr Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu
                    575                    580                    585
acc atg gtg gag aac gac cat atc cgt ggg gcc aag agt gag atc ttg 2849
Thr Met Val Glu Asn Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu
                    590                    595                    600
tac att cgc acc aat gct tca gtt cct tcc att ccc ttg gac gtt ctt 2897
Tyr Ile Arg Thr Asn Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu
                    605                    610                    615
tca gca tcg aac tcc tct tct cag tta atc gtg aag tgg aac cct ccc 2945
Ser Ala Ser Asn Ser Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro
                    620                    625                    630
tct ctg ccc aac ggc aac ctg agt tac tac att gtg cgc tgg cag cgg 2993
Ser Leu Pro Asn Gly Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg
635                    640                    645                    650
cag cct cag gac ggc tac ctt tac cgg cac aat tac tgc tcc aaa gac 3041
Gln Pro Gln Asp Gly Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp
                    655                    660                    665
aaa atc ccc atc agg aag tat gcc gac ggc acc atc gac att gag gag 3089
Lys Ile Pro Ile Arg Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu
                    670                    675                    680
gtc aca gag aac ccc aag act gag gtg tgt ggt ggg gag aaa ggg cct 3137
Val Thr Glu Asn Pro Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro
                    685                    690                    695
tgc tgc gcc tgc ccc aaa act gaa gcc gag aag cag gcc gag aag gag 3185
Cys Cys Ala Cys Pro Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu
                    700                    705                    710
gag gct gaa tac cgc aaa gtc ttt gag aat ttc ctg cac aac tcc atc 3233
Glu Ala Glu Tyr Arg Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile
715                    720                    725                    730
ttc gtg ccc aga cct gaa agg aag cgg aga gat gtc atg caa gtg gcc 3281
Phe Val Pro Arg Pro Glu Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala
                    735                    740                    745
aac acc acc atg tcc agc cga agc agg aac acc acg gcc gca gac acc 3329
Asn Thr Thr Met Ser Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr
                    750                    755                    760

```

```

tac aac atc acc gac ccg gaa gag ctg gag aca gag tac cct ttc ttt 3377
Tyr Asn Ile Thr Asp Pro Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe
      765              770              775

gag agc aga gtg gat aac aag gag aga act gtc att tct aac ctt cgg 3425
Glu Ser Arg Val Asp Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg
      780              785              790

cct ttc aca ttg tac cgc atc gat atc cac agc tgc aac cac gag gct 3473
Pro Phe Thr Leu Tyr Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala
      795              800              805              810

gag aag ctg ggc tgc agc gcc tcc aac ttc gtc ttt gca agg act atg 3521
Glu Lys Leu Gly Cys Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met
      815              820              825

ccc gca gaa gga gca gat gac att cct ggg cca gtg acc tgg gag cca 3569
Pro Ala Glu Gly Ala Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro
      830              835              840

agg cct gaa aac tcc atc ttt tta aag tgg ccg gaa cct gag aat ccc 3617
Arg Pro Glu Asn Ser Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro
      845              850              855

aat gga ttg att cta atg tat gaa ata aaa tac gga tca caa gtt gag 3665
Asn Gly Leu Ile Leu Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu
      860              865              870

gat cag cga gaa tgt gtg tcc aga cag gaa tac agg aag tat gga ggg 3713
Asp Gln Arg Glu Cys Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly
      875              880              885              890

gcc aag cta aac cgg cta aac ccg ggg aac tac aca gcc cgg att cag 3761
Ala Lys Leu Asn Arg Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln
      895              900              905

gcc aca tct ctc tct ggg aat ggg tcg tgg aca gat cct gtg ttc ttc 3809
Ala Thr Ser Leu Ser Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe
      910              915              920

tat gtc cag gcc aaa aca gga tat gaa aac ttc atc cat ctg atc atc 3857
Tyr Val Gln Ala Lys Thr Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile
      925              930              935

gct ctg ccc gtc gct gtc ctg ttg atc gtg gga ggg ttg gtg att atg 3905
Ala Leu Pro Val Ala Val Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met
      940              945              950

ctg tac gtc ttc cat aga aag aga aat aac agc agg ctg ggg aat gga 3953
Leu Tyr Val Phe His Arg Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly
      955              960              965              970

```

```

gtg ctg tat gcc tct gtg aac ccg gag tac ttc agc gct gct gat gtg 4001
Val Leu Tyr Ala Ser Val Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val
          975                      980                      985

tac gtt cct gat gag tgg gag gtg gct cgg gag aag atc acc atg agc 4049
Tyr Val Pro Asp Glu Trp Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser
          990                      995                      1000

cgg gaa ctt ggg cag ggg tcg ttt ggg atg gtc tat gaa gga gtt 4094
Arg Glu Leu Gly Gln Gly Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val
          1005                      1010                      1015

gcc aag ggt gtg gtg aaa gat gaa cct gaa acc aga gtg gcc att 4139
Ala Lys Gly Val Val Lys Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile
          1020                      1025                      1030

aaa aca gtg aac gag gcc gca agc atg cgt gag agg att gag ttt 4184
Lys Thr Val Asn Glu Ala Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe
          1035                      1040                      1045

ctc aac gaa gct tct gtg atg aag gag ttc aat tgt cac cat gtg 4229
Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val
          1050                      1055                      1060

gtg cga ttg ctg ggt gtg gtg tcc caa ggc cag cca aca ctg gtc 4274
Val Arg Leu Leu Gly Val Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val
          1065                      1070                      1075

atc atg gaa ctg atg aca cgg ggc gat ctc aaa agt tat ctc cgg 4319
Ile Met Glu Leu Met Thr Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg
          1080                      1085                      1090

tct ctg agg cca gaa atg gag aat aat cca gtc cta gca cct cca 4364
Ser Leu Arg Pro Glu Met Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro
          1095                      1100                      1105

agc ctg agc aag atg att cag atg gcc gga gag att gca gac ggc 4409
Ser Leu Ser Lys Met Ile Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly
          1110                      1115                      1120

atg gca tac ctc aac gcc aat aag ttc gtc cac aga gac ctt gct 4454
Met Ala Tyr Leu Asn Ala Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala
          1125                      1130                      1135

gcc cgg aat tgc atg gta gcc gaa gat ttc aca gtc aaa atc gga 4499
Ala Arg Asn Cys Met Val Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly
          1140                      1145                      1150

gat ttt ggt atg acg cga gat atc tat gag aca gac tat tac cgg 4544
Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg
          1155                      1160                      1165

```

```

aaa gga ggg aaa ggg ctg ctg ccc gtg cgc tgg atg tct cct gag 4589
Lys Gly Gly Lys Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu
      1170                      1175                      1180

tcc ctc aag gat gga gtc ttc acc act tac tcg gac gtc tgg tcc 4634
Ser Leu Lys Asp Gly Val Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser
      1185                      1190                      1195

ttc ggg gtc gtc ctc tgg gag atc gcc aca ctg gcc gag cag ccc 4679
Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro
      1200                      1205                      1210

tac cag ggc ttg tcc aac gag caa gtc ctt cgc ttc gtc atg gag 4724
Tyr Gln Gly Leu Ser Asn Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu
      1215                      1220                      1225

ggc ggc ctt ctg gac aag cca gac aac tgt cct gac atg ctg ttt 4769
Gly Gly Leu Leu Asp Lys Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe
      1230                      1235                      1240

gaa ctg atg cgc atg tgc tgg cag tat aac ccc aag atg agg cct 4814
Glu Leu Met Arg Met Cys Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro
      1245                      1250                      1255

tcc ttc ctg gag atc atc agc agc atc aaa gag gag atg gag cct 4859
Ser Phe Leu Glu Ile Ile Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro
      1260                      1265                      1270

ggc ttc cgg gag gtc tcc ttc tac tac agc gag gag aac aag ctg 4904
Gly Phe Arg Glu Val Ser Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu
      1275                      1280                      1285

ccc gag ccg gag gag ctg gac ctg gag cca gag aac atg gag agc 4949
Pro Glu Pro Glu Glu Leu Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser
      1290                      1295                      1300

gtc ccc ctg gac ccc tcg gcc tcc tcg tcc tcc ctg cca ctg ccc 4994
Val Pro Leu Asp Pro Ser Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro
      1305                      1310                      1315

gac aga cac tca gga cac aag gcc gag aac ggc ccc ggc cct ggg 5039
Asp Arg His Ser Gly His Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly
      1320                      1325                      1330

gtg ctg gtc ctc cgc gcc agc ttc gac gag aga cag cct tac gcc 5084
Val Leu Val Leu Arg Ala Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala
      1335                      1340                      1345

cac atg aac ggg ggc cgc aag aac gag cgg gcc ttg ccg ctg ccc 5129
His Met Asn Gly Gly Arg Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro
      1350                      1355                      1360

```

cag tct tcg acc tgc tga tccttggatc ctgaatctgt gcaaacagta 5177

Gln Ser Ser Thr Cys

1365

acgtgtgcgc acgcgcagcg gggtaggggg ggagagagag ttttaacaat ccattcacaa 5237
 gcctcctgta cctcagtga tcttcagaac tgcccttgct gcccgcggga gacagcttct 5297
 ctgcagtaaa acacatttgg gatgttcctt ttttcaatat gcaagcagct ttttattccc 5357
 tgcccaaacc cttaactgac atgggccttt aagaacctta atgacaacac ttaatagcaa 5417
 cagagcactt gagaaccagt ctctcactc tgtccctgtc cttccctgtt ctccctttct 5477
 ctctcctctc tgcttcataa cggaaaaata attgccacaa gtccagctgg gaagcccttt 5537
 ttatcagttt gaggaagtgg ctgtccctgt ggccccatcc aaccactgta cacaccgcc 5597
 tgacaccgtg ggtcattaca aaaaaacacg tggagatgga aatttttacc tttatctttc 5657
 acctttctag ggacatgaaa ttacaaaagg gccatcgttc atccaaggct gttaccattt 5717
 taacgtgcc taattttgcc aaaatcctga actttctccc tcacggccc ggcgtgatt 5777
 cctcgtgtcc ggaggcatgg gtgagcatgg cagctggtt ctccatttga gagacacgt 5837
 ggcgacacac tccgtccatc cgactgcccc tgctgtgctg ctcaaggcca caggcacaca 5897
 ggtctcattg cttctgacta gattattatt tgggggaact ggacacaata ggtctttctc 5957
 tcagtgaagg tggggagaag ctgaaccggc ttccctgccc tgcctcccca gcccctgcc 6017
 caacccccaa gaatctggtg gccatgggcc ccgaagcagc ctggcggaca ggcttgagat 6077
 caaggggccc catgcctgct tctctcccag cccagctcc ccgccccgcc cccaaggaca 6137
 cagatgggaa ggggtttcca gggactcagc cccactgttg atgcaggtt gcaaggaaag 6197
 aaattcaaac accacaacag cagtaagaag aaaagcagtc aatggattca agcattctaa 6257
 gctttgttga cattttctct gttcctagga cttcttcatt ggtcttacag ttctatgtta 6317
 gaccatgaaa catttgcata cacatcgtct ttaatgtcac ttttataact tttttacggt 6377
 tcagatattc atctatacgt ctgtacagaa aaaaaaagc tgctattttt tttgttcttg 6437
 atctttgtgg atttaaatcta tgaaaacctt caggtccacc ctctcccctt tctgtcact 6497
 ccaagaaact tcttatgctt tgtactagag tgcgtgactt tcttcctctt ttcccgttaa 6557
 tggatacttc tatcacataa ttgcatga actgttggat gcctttttat aaatacatcc 6617
 cccatccctg ctcccacctg cccctttagt tgttttctaa cccgtaggct ctctgggcac 6677
 gaggcagaaa gcaggccggg caccatcct gagagggccg cgctcctctc cccagcctgc 6737
 cctcacagca ttggagcctg ttacagtga agacatgata caaactcagg tcagaaaaac 6797
 aaagggttaa tatttcacac gtctttgttc agtgtttcca ctcaccgtgg ttgagaagcc 6857
 tcaccctctc tttcccttgc ctttgcctag gttgtgacac acatatatat atattttttt 6917
 aattcttggg tacaacagca gtgttaaccg cagacactag gcatttggat tactattttt 6977
 cttaatggct atttaatcct tccatccac gaaaaacagc tgctgagtcc aaggagcag 7037
 cagagcgtgg tccggcaggg cctgttgttg cctcgcac cccctcacc ggaccgactg 7097
 acctgtcttt ggaaccagaa catcccaagg gaactccttc gcactggcgt tgagtgggac 7157
 cccgggatcc aggctggccc agggcggcac cctcagggt gtgcccgtg gagtgttagg 7217
 tggaggcagc acagacgcca cggtaggcca agagcccctt tgcttcttgc tgggggacca 7277
 gggctgttgt gctggccac tttccctcgg ccaggaatcc aggtccttgg ggcccagggg 7337

tcttgtcttg tttcattttt agcacttctc accagagaga tgacagcaca agagttgctt 7397
 ctgggataga aatgttttagg agtaagaaca aagctgggat acggtgattg ctagttgtga 7457
 ctgaagattc aacacagaaa agaaagtta tacggctttt ttgctgggtca gcagtttgctc 7517
 ccactgcttt ctctagtctc tatcccatag cgtgttcctt ttaaaaaaaa aaaaaaggta 7577
 ttatatgtag gagttttctt ttaattttatt ttgtgataaa ttaccagttt caatcactgt 7637
 agaaaaagccc cattatgaat ttaaatttca aggaaagggt gtgtgtgtgt gtatgtgtgg 7697
 ggtgtgtgtg tgtgagagtg atgggacagt tcttgatttt ttgggttttt tttcccccac 7757
 acatttatct acctcactct tattttttat atgtgtatat agacaaaaga atacatctca 7817
 cctttctcag cacctgacaa taggccgttg atactggtaa cctcatccac gccacaggcg 7877
 ccacacccag gtgatgcagg gggaagccag gctgtattcc ggggtcaaag caacactaac 7937
 tcacctctct gctcatttca gacagcttgc ctttttctga gatgtcctgt tttgtgttgc 7997
 tttttttgtt ttgttttcta tcttggttcc caccaagggt ttagatttct cctcctccta 8057
 gccagggtggc cctgtgaggc caacgagggc accagagcac acctggggga gccaccaggc 8117
 tgtccctggc tggttgtctt tggaacaaac tgcttctgtg cagatggaat gaccaacaca 8177
 tttcgtcctt aagagagcag tggttcctca ggttctgagg agaggaaggt gtccaggcag 8237
 caccatctct gtgcgaatcc ccagggtaaa ggcgtggggc attgggtttg ctccccttgc 8297
 tgctgctcca tccctgcagg aggtctgcgc tgaggcagga ccgtgcggcc atggctgctg 8357
 cattcattga gcacaaaggt gcagctgcag cagcagctgg agagcaagag tccccagcc 8417
 tgtgcgccag aatgcagagg ctcttgacct cacagccagt ccctgataga acacacgcag 8477
 gagcagagtc cctccccct ccaggctgcc ctctcaactt ctccctcacc tccttccta 8537
 ggggtagaca gagatgtacc aaaccttccg gctggaaagc ccagtggccg gcgccaggc 8597
 tcgtggcgct acgccccccc cgccagggt gtacctcgt ctccctggct ctgctgctca 8657
 caggacagac ggctcgtcc cctcttcag cagctgctct tacaggcact gatgatttcg 8717
 ctgggaagtg tggcgggcag ctttgcctaa gcgtggatgg ctctcggca attccagcct 8777
 aagtgaaggc gctcaggagc ctctgctgg aacgcgacct atctctccca ggaccccg 8837
 gatcttaagg tcattgagaa atactgttgg atcagggttt tgttcttcca cactgtaggt 8897
 gaccccttgg aataacggcc tctcctctcg tgcacatacc taccggtttc cacaactgga 8957
 tttctacaga tcattcagct ggttataagg gttttgtta aactgtccga gttactgatg 9017
 tcattttgtt tttgttttat gtaggtagct ttaagtaga aaactaac agtgtagtgc 9077
 ccatcatagc aaatgcttca gaaacacctc aataaaagag aaaacttggc ttgtgtgatg 9137
 gtgcagtcac tttactggac caaccaccc accttgacta taccaaggca tcatctatcc 9197
 acagttctag cctaacttca tgetgatttc tctgctctt gatttttctc tgtgtgttcc 9257
 aaataatctt aagctgagtt gtggcatttt ccatgcaacc tccttctgcc agcagctcac 9317
 actgcttgaa gtcatatgaa ccaactgaggc acatcatgga attgatgtga gcattaagac 9377
 gttctccac acagcccttc cctgaggcag caggagctgg tgtgtactgg agacactgtt 9437
 gaacttgatc aagaccaga ccacccagg tctccttcgt gggatgtcat gacgtttgac 9497
 atacctttgg aacgagctc ctcttgga gatggaagac cgtgttcgtg gccgacctgg 9557
 cctctctgg cctgtttctt aagatgcgga gtcacatttc aatggtacga aaagtggctt 9617
 cgtaaaatag aagagcagtc actgtggaac taccaaattg cgagatgctc ggtgcacatt 9677


```

ggggtgcttt gggataaaag atttatgagc caactattct ctggcaccag attctaggcc 9737
agtttgttcc actgaagctt ttcccacagc agtccacctc tgcaggctgg cagccgaatg 9797
gcttgccagt ggctctgtgg caagatcaca ctgagatcga tgggtgagaa ggctaggatg 9857
cttgtctagt gttcttagct gtcacgttgg ctccctccag ggtggccaga cgggtgttggc 9917
cactcccttc taaaacacag gcgccctcct ggtgacagtg acccgccgtg gtatgccttg 9977
gcccattcca gcagtcccag ttatgcattt caagtttggg gtttgttctt ttcgttaatg 10037
ttcctctgtg ttgtcagctg tcttcatttc ctgggctaag cagcattggg agatgtggac 10097
cagagatcca ctccctaaga accagtggcg aaagacactt tctttcttca ctctgaagta 10157
gctggtggta caaatgagaa cttcaagaga ggatgttatt tagactgaac ctctgttgcc 10217
agagatgctg aagatacaga ccttgacagc gtcagagggt ttcatttttg gccttcatct 10277
tagatgactg gttgcgtcat ttggagaagt gagtgtcctt tgatggtgga atgaccgggt 10337
ggtgggtaca gaaccattgt cacagggatc ctggcacaga gaagagttac gagcagcagg 10397
gtgcagggtc tggaaggaaat gtgggcaagg ttttgaactt gattgttctt gaagctatca 10457
gaccacatcg aggctcagca gtcatccgtg ggcatttggg ttcaacaaag aaacctaaca 10517
tcctactctg gaaactgatc tcggagttaa ggcaattgt tcaagaacac aaactacatc 10577
gcactcgtca gttgtcagtt ctggggcatg actttagcgt tttgtttctg cgagaacata 10637
acgatcactc atttttatgt ccacagtgtg tgtgtccgca tctttctggt caacattgtt 10697
ttaactagtc actcattagc gttttcaata gggctcttaa gtccagtaga ttacgggtag 10757
tcagttgacg aagatctggt ttacaagaac taattaaatg tttcattgca tttttgtaag 10817
aacagaataa ttttataaaa tgttttagt ttataattgc cgaaaataat ttaaagacac 10877
tttttttttc tctgtgtgtg caaatgtgtg tttgtgatcc attttttttt ttttttttta 10937
ggacacctgt ttactagcta gctttacaat atgccaaaaa aggatttctc cctgacccca 10997
tccgtgggtc accctctttt ccccccattg ttttgcctt agtttataac aaaggaatga 11057
tgatgattta aaaagtagtt ctgtatcttc agtatcttgg tcttccagaa ccctctggtt 11117
gggaagggga tcatttttta ctggtcattt cccttggag tgtagctact ttaacagatg 11177
gaaagaacct cattggccat ggaaacagcc gaggtgttgg agcccagcag tgcattggac 11237
cgttcggcat ctggcttgat tggctctggc gccgtcattg tcagcacagt gccatggaca 11297
tggaagact tgactgcaca gccaatggtt ttcattgatg ttacagcata cacagtgatc 11357
acataaacga tgacagctat ggggcacaca ggccatttgc ttacatgcct cgtatcatga 11417
ctgattactg ctttgttaga acacagaaga gacctattt tatttaaggc agaacccga 11477
agatacgtat ttccaataca gaaaagaatt tttaataaaa actataacat acacaaaaat 11537
tggtttttaa gttgactcca ctctctctaa ctccagtgga ttgttggcca tgtctcccca 11597
actccacaat atctctatca tgggaaacac ctggggtttt tgcgctacat aggagaaaga 11657
tctggaaact atttgggttt tgttttcaac ttttcatttg gatgttggc gttgcacaca 11717
cacatccacc ggtggaagag acgcccgtg aaaacacctg tctgctttct aagccagtga 11777
ggttgagggt agaggtttgc cagagtttgt ctacctctgg gtatcccttt gtctgggata 11837
aaaaaaatca aaccagaagg cgggatggaa tggatgcacc gcaaataatg ctttttctga 11897
gttttcttgt taaaaaaaaa tttttttaag taagaaaaaa aaagtaata acatggccaa 11957
tttgttacat aaaatgactt tctgtgtata aattattcct aaaaaatcct gtttatataa 12017

```

aaaatcagta gatgaaaaaa atttcaaaat gtttttgtat attctgttgt aagaatttat 12077
 tcctgttatt gcgataact ctggattctt tacataatgg aaaaaagaaa ctgtctatatt 12137
 tgaatggctg aagctaaggc aacgttagtt tctcttactc tgcttttttc tagtaaagta 12197
 ctacatgggtt taagttaaatt aaaataattc tgtatgcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 12257
 aaaaa 12262

<210> 4

<211> 1367

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Met	Lys	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Leu
1				5					10					15	
Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Trp	Pro	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile
				20					25					30	
Cys	Gly	Pro	Gly	Ile	Asp	Ile	Arg	Asn	Asp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Lys	Arg
				35					40					45	
Leu	Glu	Asn	Cys	Thr	Val	Ile	Glu	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Leu	Leu	Ile
				50					55					60	
Ser	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Arg	Phe	Pro	Lys	Leu	Thr	Val
65					70					75					80
Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu
					85					90					95
Gly	Asp	Leu	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys	Leu	Phe
				100					105					110	
Tyr	Asn	Tyr	Ala	Leu	Val	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Asn	Leu	Lys	Asp	Ile
				115					120					125	
Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala	Ile	Arg	Ile	Glu
				130					135					140	
Lys	Asn	Ala	Asp	Leu	Cys	Tyr	Leu	Ser	Thr	Val	Asp	Trp	Ser	Leu	Ile
145					150					155					160
Leu	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ile	Val	Gly	Asn	Lys	Pro	Pro	Lys
					165					170					175
Glu	Cys	Gly	Asp	Leu	Cys	Pro	Gly	Thr	Met	Glu	Glu	Lys	Pro	Met	Cys
				180					185					190	
Glu	Lys	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Cys	Trp	Thr	Thr
				195					200					205	
Asn	Arg	Cys	Gln	Lys	Met	Cys	Pro	Ser	Thr	Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Cys
				210					215					220	
Thr	Glu	Asn	Asn	Glu	Cys	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser

225	230	235	240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr			
	245	250	255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu			
	260	265	270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala			
	275	280	285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met			
	290	295	300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr			
305	310	315	320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys			
	325	330	335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly			
	340	345	350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn			
	355	360	365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val			
	370	375	380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser			
385	390	395	400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly			
	405	410	415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp			
	420	425	430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe			
	435	440	445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu			
	450	455	460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg			
465	470	475	480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr			
	485	490	495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr			
	500	505	510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys			
	515	520	525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys			
530	535	540	

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys			
545	550	555	560
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln			
	565	570	575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp			
	580	585	590
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala			
	595	600	605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser			
	610	615	620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn			
625	630	635	640
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr			
	645	650	655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys			
	660	665	670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys			
	675	680	685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys			
	690	695	700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys			
705	710	715	720
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu			
	725	730	735
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser			
	740	745	750
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro			
	755	760	765
Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn			
	770	775	780
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg			
785	790	795	800
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser			
	805	810	815
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp			
	820	825	830
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile			
	835	840	845
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met			

850	855	860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val		
865	870	875
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu		
885	890	895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly		
900	905	910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr		
915	920	925
Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val		
930	935	940
Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg		
945	950	955
Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val		
965	970	975
Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp		
980	985	990
Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly		
995	1000	1005
Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys		
1010	1015	1020
Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala		
1025	1030	1035
Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val		
1040	1045	1050
Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val		
1055	1060	1065
Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr		
1070	1075	1080
Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met		
1085	1090	1095
Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile		
1100	1105	1110
Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala		
1115	1120	1125
Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val		
1130	1135	1140
Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg		
1145	1150	1155

Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu		
1160	1165	1170
Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val		
1175	1180	1185
Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp		
1190	1195	1200
Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn		
1205	1210	1215
Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys		
1220	1225	1230
Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys		
1235	1240	1245
Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile		
1250	1255	1260
Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser		
1265	1270	1275
Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu		
1280	1285	1290
Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser		
1295	1300	1305
Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His		
1310	1315	1320
Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala		
1325	1330	1335
Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg		
1340	1345	1350
Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys		
1355	1360	1365

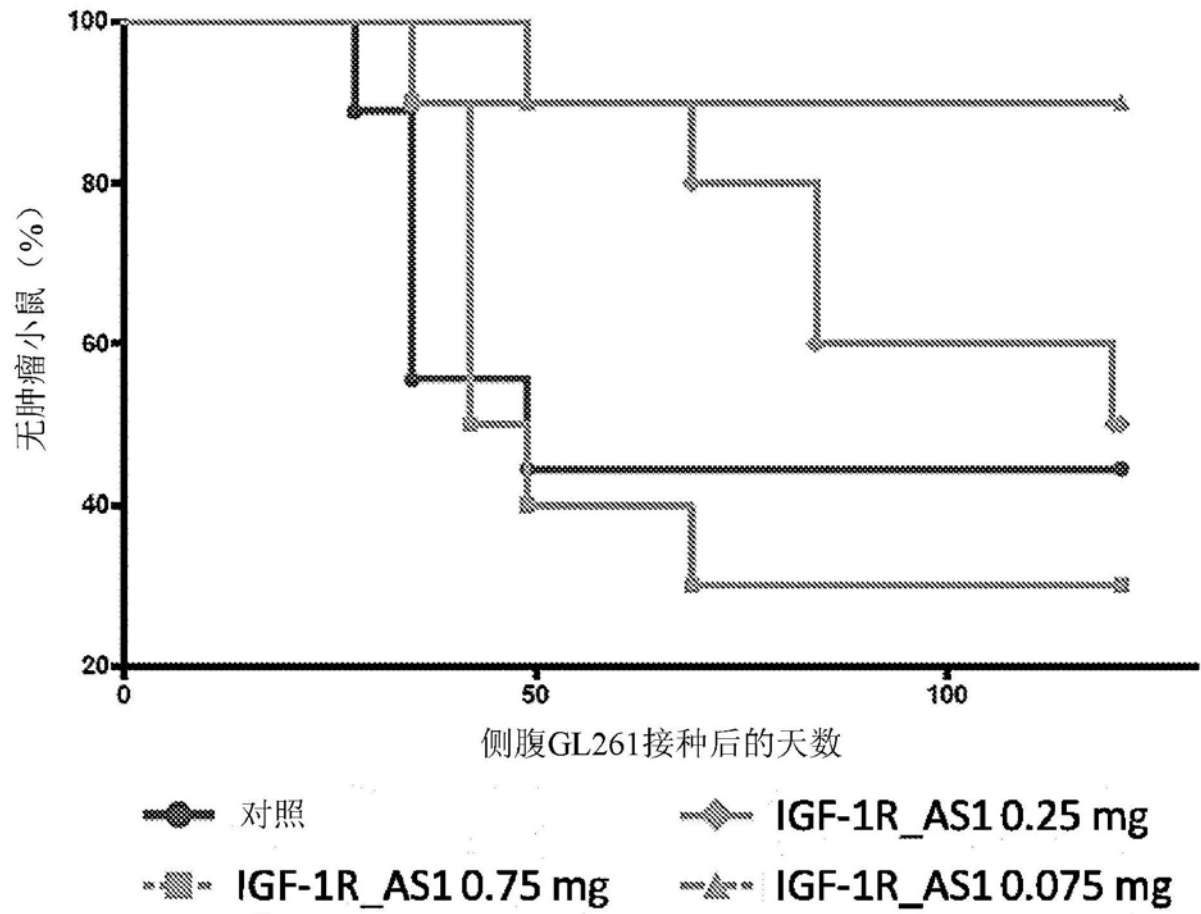


图1