[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
A61K 47/48

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95194366.9

[43]公开日 1997 年 8 月 27 日

[11] 公开号 CN 1158088A

[22]申请日 95.6.1

[30]优先权

[32]94.6.1 [33]US[31]08/252,072

[86]国际申请 PCT/US95/06916 95.6.1

[87]国际公布 WO95/32739 英 95.12.7

[85]进入国家阶段日期 97.1.27

[71]申请人 海布里登公司

地址 美国马萨诸塞州

[72]发明人 苏迪尔·阿格雷瓦尔 赵秋燕

伊万·哈布斯

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

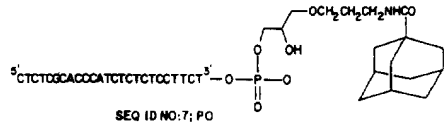
代理人 刘国平

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 寡核苷酸的环糊精细胞输送系统

[57]摘要

本发明公开了一种包括与环糊精复合的寡核苷酸的组合物。该寡核苷酸可以和环糊精非共价结合。另外，寡核苷酸可以共价复合上与环糊精非共价结合的金钢烷。还发现了增强寡核苷酸的细胞吸收，提高其细胞内浓度的方法，提高某一寡核苷酸在细胞内的溶解能力的方法，治疗被病毒感染的细胞或使细胞预防病毒感染的方法。



权 利 要 求 书

1. 一种包括与环糊精非共价复合的寡核苷酸的组合物。

2. 权利要求 1 中的组合物，还包括与寡核苷酸共价连接和与环糊精非共价复合的金钢烷。

3. 权利要求 2 的组合物，其中金钢烷与寡核苷酸的 3’ 羟基或 5’ 氨基共价连接。

4. 权利要求 1 的组合物，其中的寡核苷酸包括至少一种选自如下一组的核苷酸间连接方式：硫代磷酸酯，磷酸二酯，烷基膦酸酯，以及它们的结合。

5. 权利要求 2 的组合物，其中的寡核苷酸包括至少一种选自如下一组的核苷酸间连接方式：硫代磷酸酯，磷酸二酯，烷基膦酸酯，以及它们的结合。

6. 权利要求 1 的组合物，其中的环糊精选自如下一组：β－环糊精，γ－环糊精，甲基取代的环糊精，和它们的衍生物。

7. 权利要求 2 的组合物，其中的环糊精选自如下一组：β－环糊精，γ－环糊精，甲基取代的环糊精，和它们的衍生物。

8. 权利要求 6 的组合物，其中的环糊精是 2－羟丙基－β－环糊精，羟丙基－γ－环糊精，羟乙基－β－环糊精，β－环糊精多硫酸，γ－环糊精多硫酸，以及它们的混合物。

9. 权利要求 7 的组合物，其中的环糊精是 2－羟丙基－β－环糊精，羟丙基－γ－环糊精，羟乙基－β－环糊精，三甲基－β－环糊精，β－环糊精多硫酸酯，γ－环糊精多硫酸酯，以及它们的混合物。

10. 权利要求 1 的组合物，其中的寡核苷酸包括至少一个脱氧核糖核苷酸。

11. 权利要求 2 的组合物，其中的寡核苷酸包括至少一个脱氧核糖核苷酸。

12. 权利要求 1 的组合物，其中的寡核苷酸包括至少一个核糖核苷酸。

13. 权利要求 2 的组合物，其中的寡核苷酸包括至少一个核糖核苷酸。

14. 权利要求 10 的组合物，其中的寡核苷酸包括至少一个核糖核苷酸。

15. 权利要求 11 的组合物，其中的寡核苷酸包括至少一个核糖核苷酸。

16. 权利要求 2 的组合物。其中的寡核苷酸包括至少一个核糖核苷酸而且金钢烷与核糖核苷酸的 2’ 羟基共价连接。

17. 一种包括权利要求 1 的组合物的药物配制品。

18. 一种包括权利要求 2 的组合物的药物配制品。

19. 一种提高某一外源寡核苷酸的细胞吸收以及细胞内浓度的方法，包括用权利要求 17 的药物配制品处理细胞的步骤。

20. 一种提高某一外源寡核苷酸的细胞吸收以及细胞内浓度的方法，包括用权利要求 18 的药物配制品处理细胞的步骤。

21. 一种处理被病毒感染的细胞或使细胞预防病毒感染的方法，包括让细胞接触权利要求 17 的药物配制品，该寡核苷酸中含有一段与病毒核酸的一部分互补的核苷酸序列。

22. 一种处理被病毒感染的细胞或使细胞预防病毒感染的方法，包括让细胞接触权利要求 18 的药物配制品，该寡核苷酸中含有一段与病毒核酸的一部分互补的核苷酸序列。

23. 一种提高某一寡核苷酸在体内的可利用性的方法，包括使环糊精与寡核苷酸非共价复合的步骤。

24. 权利要求 23 的方法，其中的寡核苷酸是与金钢烷共价结合的，而金钢烷是与环糊精非共价复合的。

说　明　书

寡核苷酸的环糊精细胞输送系统

发明背景

本发明涉及反义疗法。更为具体地说，本发明涉及促进反义寡核苷酸的细胞吸收的组合物及方法。

已经研制了那些能够调节细胞及外源基因表达的新的化学治疗试剂。这些试剂，被称为反义寡核苷酸，它们是能够根据 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基配对法则结合靶核酸分子的单链寡核苷酸，并且以这种方式，通过以下数种机制之一摧毁靶的功能：阻止与正常转录，拼接或翻译所需要的因子的结合；引发 RNase H 对 RNA 的酶解性破坏，或者是通过反应基团与反义寡核苷酸的直接结合而破坏靶。因此，它们已成为特异性抑制基因表达序列的广泛使用的研究工具，并已在进行作为治疗性试剂的可行性审查。（见 Agrawal et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:3860-3884; Bayever et al., 1992, Antisense Res. Development 2:109-110）。

为了使反义分子具有治疗价值，必须使其有能力进入细胞内并且接触到靶子的内源性核酸。另外，它们必须能够抵抗细胞内的高度核酸裂解性环境的严峻挑战。

最近的研究已经表明，具有某些修饰，例如人工的核苷酸间的连接的寡核苷酸分子，不仅表现出对核内降解作用的抗性（见 Agrawal et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:7079-7083; Agrawal et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:7790-7794; Gao et al. 1990, Antimicrob. Agents Chem. 34:808; Storey et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19:4109），而且能够增强细胞对其的吸收。例如，具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯类的核苷酸间连接（linkage）的寡核苷酸，已被发现能比具有磷酸二酯连接的寡核苷酸更容易结合上，并被吸收到细胞内。（Zhao et al., 1993, Antisense Res. Dev. 3:53-56）。

寡核苷酸的吸收是可饱和的，序列非依赖性的，以及温度与能量依赖性的。虽然有些证据表明此种吸收可能是通过一种分子量为 80,000 dalton 的膜蛋白发生的（Loke et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3474; Yakubov et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:6454），但这种蛋白的基因还未被克隆或鉴定。有项研究说，寡核苷酸的吸收是通过孔穴式的胞饮机制而非内吞机制（Zamecnick, 1994, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 91: 3156 ）。寡核苷酸的吸收究竟是通过受体介导的内吞途径，还是胞饮机制，或是它们的联合作用，目前仍所知甚少。

为了改善细胞对寡核苷酸的吸收，用不同于上述方法的多种途径对寡核苷酸进行了修饰。例如， WO9323570 揭示了一种具有改善了的细胞吸收作用的寡核苷酸，在其中至少有一个核苷酸残基在其 2'位置共价连接有不同的分子，包括氨基酸，多肽，蛋白质，糖类，磷酸糖类，神经递质，激素，环糊精，淀粉，固醇，或维生素。在抗生物素蛋白存在时生物素化的寡核苷酸的细胞吸收的增强也得到证实（ Partridge et al., 1991, FEBS Lett. 288: 30-32 ）。

另外，磷酸二酯键连接的寡聚脱氧核苷酸已通过成孔试剂 streptolysin O 导入细胞内（ Barry et al., 1993, Biotechniques 15: 1016-1018 ），而且一种包括阳离子脂类的脂质体制剂也显示出能增强靶子为人类细胞间黏附分子的一部分的反义分子的细胞吸收（ Bennett et al., 1992, Mol. Pharmacol. 41: 1023-1033 ）。携带 5' 胆甾醇化修饰的磷酸二酯键连接的寡核苷酸显示了细胞吸收及生物效应的加强（ Krieg et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1048 ）。抗体导向的脂质体也已被用来增强靶子为 HIV 感染的细胞所表达的 HLA - I 分子的寡核苷酸的细胞吸收（ Zelphati et al. (1993) Antisense Res. Dev. 3: 323-338 ）。

然而，无论在体内还是在体外实验中，修饰过的与未经修饰的寡核苷酸的吸收的不足仍然是一个难题。因而需要增强细胞对反义寡核苷酸的吸收的改进组合物及方法。这种增强作用的最终结果是提高了反义寡核苷酸的效能并减少了给药的剂量。理想地说，这种组合物和方法还将用来提高寡核苷酸的一般溶解能力。

发明概述

已经发现，反义寡核苷酸被细胞的吸收作用可以通过使这些寡核苷酸非共价结合环糊精而得到增强。这个发现被开发来生产本发明的各种组合物。

在一个实施方案中，寡核苷酸直接与环糊精非共价结合，优选的环糊精是 β - 环糊精， γ - 2 - 环糊精，甲基取代的环糊精，或是它们的衍生物。优选的衍生物包括 2 - 羟基丙基 - β - 环糊精，羟基丙基 - γ - 环糊精，羟基乙基 - β - 环糊精， β - 环糊精多硫酸酯，三甲基 - β - 环糊精，以及 γ - 环糊精多硫酸酯，及甲基取代的环糊精。

在本发明的一些实施方案中，环糊精所复合的寡核苷酸至少含有一个脱氧核糖核苷酸，一个核糖核苷酸，或是二者都有（即嵌合体寡核苷酸）。在某些实施方案中，寡核苷

酸通过磷酸二酯键相互连接，而在另一些实施方案中，寡核苷酸是经修饰过的。

术语“修饰过的寡核苷酸”用于本文指的是在一个寡核苷酸中至少有两个核苷酸之间是通过一种合成连接方式共价连接起来的，即，在某一核苷酸的 5'末端与另一核苷酸的 3’末端之间是非磷酸二酯键连接的，其 5’核苷酸的磷酸被一些化学基团所取代。优选的合成连接键包括：烷基膦酸酯，磷酸酯，烷基膦酸酯，硫代磷酸酯，二硫代磷酸酯，2－0－甲基碳酸酯，烷基硫代膦酸酯，亚磷酰胺，氨基甲酸酯，磷酸三酯，乙酰胺，以及羧甲基酯。在本发明的一个优选实施方案中，寡核苷酸包括至少一个硫代磷酸酯和/或一个烷基膦酸酯连接。

术语“修饰过的寡核苷酸”也包括带有修饰碱基和/或糖基的寡核苷酸。例如，一种 3’，5’－取代的寡核苷酸是一种修饰过的寡核苷酸，它含有一种糖基，在其 3’和 5’位置都结合了除羟基（在 3’位置）和磷酸基（在 5’位置）以外的其它化学基团。修饰过的寡核苷酸还可能是加帽的。另外，在该分子的每个核苷酸的一个非桥式氧上具有一个取代的未氧化的或部分氧化的寡核苷酸也被认为是修饰过的寡核苷酸。那些在其 3'和/或 5'末端带有抗核酸酶的取代的寡核苷酸以及/或其它一些不经人工介入在体内不存在的带有结构性修饰的寡核苷酸在此也被认为是修饰过的。

在另一个优选的实施方案中，本发明的组合物中的寡核苷酸共价连接着非共价与环糊精结合的金钢烷。这种共价结合是在寡核苷酸的 3'羟基或 5'氨基与金钢烷之间。在其它的寡核苷酸含有核糖核苷酸的实施方案中，金钢烷是与核糖核苷酸的 2'羟基共价结合。

本发明还提供一种药物组合物，它包括复合有环糊精的寡核苷酸组合物，优选的是包含于生理学可接受的载体中的。这样的药剂用于增加外源寡核苷酸的细胞吸收，因而能增加细胞内的浓度的方法中。药剂还用于一种治疗被病毒感染的细胞的方法，或使其抵抗病毒的感染。

本发明还提供了通过使寡核苷酸与环糊精复合从而提高其在体内的可利用性的方法。

在本发明的另一个方面，提供了含有上述的寡核苷酸组合物的药物配制品。这些配剂用于本发明的另一方面，即增加外源寡核苷酸的细胞吸收并提高其细胞内浓度的方法。在这些方法中，细胞用该药剂处理。

而在本发明的另一方面，提供了一种治疗感染有病毒的细胞或是使其预防病毒感染的方法。在这种方法中，使细胞接触一种含有与病毒核酸的某一部分互补的核苷酸序列的寡

核苷酸药物制剂。因而，本发明提供一种用于治疗不可逆性感染的细胞培养株的组合物。使用本发明的组合物可以消除支原体或病毒对细胞株的污染。

本发明还提供提高某种寡核苷酸在体内的可溶性的方法，包括使环糊精与寡核苷酸非共价结合的步骤。在某些实施方案中，寡核苷酸是共价地与金钢烷结合，而金钢烷则非共价地与环糊精结合。

附图简述

根据下面的描述，参阅附图可更好地理解本发明的前述和其他目的，及其它各种特征以及发明本身。

图 1A 是 2 - 羟丙基 - β - 环糊精 ($C_{42}H_{70}O_{35}$) 的结构简式。

图 1B 是 γ - 环糊精 ($C_{48}H_{80}O_{40}$) 的结构简式。

图 2 是一个流式细胞计数器数据输出记录图，显示了对细胞培养物用下列试剂处理后的荧光强度：(A) 无寡核苷酸；(B) PS - 寡核苷酸；(C) 复合环糊精的 PS - 寡核苷酸，4℃，过夜；(D) 复合环糊精的 PS - 寡核苷酸，25℃，1 小时。

图 3A 是一张荧光显微照片，显示用连接有 FITC 的 20 聚体 PS - 寡核苷酸处理过的细胞。

图 3B 是一张荧光显微照片，显示用连接有 FITC 的复合环糊精的 20 聚体 PS - 寡核苷酸处理过的细胞。

图 3C 是一张荧光显微照片，显示用连接有 FITC 的 42 聚体 PS - 寡核苷酸处理过的细胞。

图 3D 是一张荧光显微照片，显示用连接有 FITC 的复合了环糊精的 42 聚体 PS - 寡核苷酸处理过的细胞。

图 4 表示的是在不同的时间里提取的经过 ^{32}P 标记的 (A) 未复合的 (B) 复合上环糊精的 PO - 和 PS - 寡核苷酸处理过的细胞的 SDS 胶的放射自显影。

图 5 是比较经过 ^{32}P 标记的未复合的及复合上环糊精的 PO - 和 PS - 寡核苷酸的相对迁移力的 SDS 胶的放射自显影。

图 6 是分别用 FITC 标记的未复合的，复合了环糊精的，以及复合了环糊精－金钢烷的 PS －寡核苷酸处理后的细胞培养物的荧光强度的图示。

图 7 是有关制备连接有金钢烷的环糊精的过程的图示。

图 8 是荧光素亚磷酸酰胺的结构简式。

图 9A 是共价连接着金钢烷的磷酸二酯键连接的寡核苷酸的结构简式。

图 9B 是共价连接有金钢烷的 PS －寡核苷酸的结构简式。

图 9C 是结合着 FITC 的共价连接有金钢烷的 PS －寡核苷酸的结构简式。

优选实施方案的详细说明

在此所提及的专利和科技文献是本领域熟练技术人员所能得到的。在此引用的参考文献是已颁证的 U.S.专利，已授权的专利申请，以及引用的论文。

本发明提供了促进将寡核苷酸吸入细胞，因而能增强处理的效率及减少要求的剂量的寡核苷酸组合物。该组合物包括一种与环糊精或其它多糖类复合的寡核苷酸。

环糊精，也称为环状直链淀粉，是一组环式多糖，由 6 到 8 个天然存在的 α－(1, 4)键合的 D(+)－葡萄糖吡喃糖单位组成。依其所含有的葡萄糖单位的数目将其分类为：有 6 个葡萄糖单位的 α－环糊精；有 7 个葡萄糖单位的 β－环糊精，而 γ－环糊精有 8 个单位（Brewster et al., 1989, J. Parenteral Sci. Technol. 43: 231-240）。图 1A－1B 显示了这些种类环糊精的结构简式。作为一个集合，环糊精是一些锥状的分子，中间有一稍带极性的小穴，可以容纳多种其它分子进入。其结构的外围带有许多羟基，使其具有水溶性。

某些环糊精及其各种取代的衍生物，例如羟丙基－，羟乙基－，甲基－，或硫酸酯取代的环糊精，具有增强各类药剂的可溶性和可利用性的能力。如，2－羟丙基－β－环糊精(HPCD)能大大增高那些难溶的药物如含疏水蛋白的药物的溶解性和吸收（Brewster et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8: 792-795; Yaksh et al., 1991, Life Sci. 48: 623-633），如胰岛素（Merkus et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8: 588-592），牛生长激素（Simpkins et al., 1991, J. Parenteral Sci. Technol. 45: 266-269），以及甲基睾酮（Muller et al., 1991, J. Pharmaceut. Sci. 80: 599-604）。另外，已将乙基化－β－环糊精用作为亲水药物例如硫氮卓铜的慢释放型载体（Horiuchi et

al., (199) J. Pharmaceut. Sci. 79:128-132)。

其它一些环糊精具有一些独特的生物学功能。例如，环糊精硫酸酯具有抗炎症、抗脂血症及抗病毒活性，并且还发现能通过阻止病毒吸收或是芽殖而抑制 HIV 的复制 (Pitha et al., 1991, J.Pharmaceut. Res. 8: 1151-1154; Anand et al., 1991, Antiviral Chem. Chemother 1:41-46; Moriya etal., 1991, J. Med. Chem. 34:2301-2304; Weiner et al., 1992, Pathobiol. 60:206-212)。另外，环糊精硫酸酯还有一些保护性效应，如对由庆大霉素引起的肾毒症 (Uekama et al., 1993, J. Pharm. Pharmacol. 45:745-747) 以及红细胞的溶血症。(Weisz et al. 1993, Biochem. Pharmacol. 45:1011-1016)。

由于环糊精是由天然的 D - 葡萄糖亚单位组成的生物相容性的多聚体，因而它们在治疗上的应用被认为是相对安全的。实际上，在动物研究中，为促进药物吸收的环糊精的给药量(体内)一般为 5 % - 10 %的浓度，而此时并未有显著的细胞毒性效应。(Gerloczy et al., 1994, J. Pharmaceut. Sci. 83:193-196)。

除了标准的静脉给药方式，环糊精还很容易通过以下途径吸收，鼻 (Merkus et al., 1991, Pharm. Res. 8: 558-592; Shao et al.,1992, Pharm. Res. 9: 1157-1163)；肠道 (Nakanishi et al., 1992, Chem. Pharm. Bull. 40: 1252-1256)；角膜 (Jansen et al., 1990, Lens Eye Tox. Res. 7: 459-468)；直肠上皮 (Arima et al., 1992, J. Pharma. Soc. Japan 112: 65-72)；以及通过透皮注射 (Yoshida et al., 1990, Chem. Pharm. Bull. 38:176-179)。

另外，还发现环糊精能消除所复合的药物的一些不希望发生的副作用。例如，当 2 - 羟丙基 - β - 环糊精作为滴眼制剂的载体时，能够抑制对角膜移植的免疫反应 (Arima et al., 1992, J. Pharmaceut. Soc. Japan 112: 65-72)，而对角膜上皮不具毒性。

环糊精可用本领域技术已知的方法制备，(见 Moriya et al., 1993, J. Med. Chem. 36:1674-1677)，而且可通过商业途径购得。

复合了环糊精的寡核苷酸由脱氧核糖核苷酸，核糖核苷酸，或是二者的结合，通过某一核苷酸的 5'端与另一核苷酸的 3'末端共价连接而组成。这些寡核苷酸长度至少为 6 个核苷酸，但最好是 10 - 50 个核苷酸，而最常见的是 15 - 25 个单体。寡核苷酸可通过本领域已知的方法制备，例如由人工或自动合成仪进行的磷酰胺或 H-膦酸酯化学合成法(见 Brown, A Brief History of Oligonucleotide Synthesis, Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Methods in Molecular Biology. 1994, 20:1-8)。

本组合物的寡核苷酸可用多种方法进行修饰，而且不损害其与靶子核酸分子杂交及与金钢烷和/或环糊精复合的能力。例如，寡核苷酸含有的、位于一个核苷酸的5'末端和另一个核苷酸的3'末端之间的核苷酸间连接可以不是磷酸二酯键，而是将5'磷酸用其它的化学基团取代。这些基团包括烷基膦酸酯，硫代磷酸酯，二硫代磷酸酯，烷基硫代膦酸酯，烷基膦酸酯，2-O-甲基化磷酸铵，磷酸酯，甲胺，乙胺，羧甲基酯，碳酸酯，磷酸三酯。具有这类连接的寡核苷酸的制备可根据已知方法进行。(见Sonveaux "Protecting Groups in Oligonucleotides Synthesis" in Agrawal (1994) Methods in Molecular Biology 26: 1-72; Uhlmann et al., (1990) Chem. Rev. 90: 543-583)

其它的修饰包括在寡核苷酸分子内部或末端进行的修饰，还包括核苷间磷酸酯连接的修饰，例如，在氨基与末端核糖、脱氧核糖和磷酸之间加上不同数目C单位的胆甾醇类或二胺类的化合物，它们能裂解或交联到相反的链上或是到相关酶或其它的能结合到病毒基因组上的蛋白质上。这样修饰的寡核苷酸的例子包括：带有修饰碱基和/或糖基（如用阿拉伯糖替代核糖）的寡核苷酸，或是对寡核苷酸的3'和5'的取代，它所含的糖基在3'和5'都结合有化学基团，在3'位置是非羟基而5'位置是非磷酸基。其它的对寡核苷酸的修饰有，在其3'和/或5'末端加上有核酸酶抗性的帽子，或是在每一核苷的非桥式氧上发生置换。这些修饰可能在核苷酸之间的连接的某处或全部位置进行，也可能在寡核苷酸的某一末端或两端和/或在分子内部进行。

那些自我稳定的寡核苷酸也被认为是修饰过的寡核苷酸而用于本发明中的方法（Tang et al., (1993) Nucleic Acids Res. 20: 2729-2735 ）。这些寡核苷酸包括两个部分：一个靶杂交区域；一个自身互补区域，它具有与自我稳定寡核苷酸内的一段核酸序列互补的寡核苷酸序列。

与环糊精结合的寡核苷酸可以具有想要的任意核苷酸序列，并且能够在目的核酸所在的细胞中所具有的正常生理学与RNA或DNA杂交。这些条件包括pH，温度，以及离子强度等。

这些未经修饰的以及修饰过的寡核苷酸的制备是本领域已知的（ reviewed in Agrawal et al. (1992) Trends Biotechnol. 10: 152-158 ）。例如，核苷酸可以用已知技术如磷酰胺，H-膦酸酯化学法，或甲基磷酰胺化学法(见Uhlmann et al. (1990) Chem. Rev. 90: 543-584; Agrawal et al. (1987) Tetrahedron. Lett. 28: (31): 3539-3542; Caruthers et al. (1987) Meth. Enzymol. 154: 287-313; U.S. Patent 5,149,798 ）使之共价连接。寡聚体的硫代磷酸酯类似物可用本领域已知技术如甲氧基亚磷酸酰胺(见

Agrawal (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7079-7073) 或 H-膦酸酯化学法 (见 Froehler, "Oligonucleotide Synthesis: H-phosphonate Approach" in Agrawal (1994) Methods in Molecular Biology 20: 63-80) 制备。

寡核苷酸可以通过使之与环糊精在诸如细胞生长培养基或其它缓冲液中混合从而使其非共价结合。

或者，寡核苷酸可以与一个金钢烷分子共价结合，而后者则与环糊精非共价连接。金钢烷进入环糊精分子的孔穴内，与其形成一个稳定的、非共价的复合物 (Brinker et al. (1993) Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 32: 1344-1345, Ueno et al. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115: 12575-12576) 。

与金钢烷分子的连接可在含有一个或两个脱氧核糖核苷酸末端残基的寡核苷酸分子的 3'-羟基或 5'-氨基上完成。或者是，金钢烷分子与核糖核苷酸残基的 2'-羟基共价结合。它可以通过在机器辅助的寡核苷酸装配的最后一步使用一个磷酸酰胺或 H - 膦酸酯连接子而完成，如同将一个报道基团附着在合成的寡核苷酸时所用的那样 (Agrawal et al. (1986) Nucleic Acids Res. 14: 6229-6245; Misiura et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 4345-4354; Nelson et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20: 6253-6259) 。

金钢烷与寡核苷酸的共价连接还可以通过氨基连接子的辅助而完成，如同 Misiura et al. 所述 (J. Nucleic Acids Res. (1990) 18: 4345-4353) 。连接金钢烷的寡核苷酸然后通过在液体介质或缓冲液中混合而与环糊精非共价结合 (Simpkins et al. (1991) J. Parental Sci. & Technol. 45: 266) 。

寡核苷酸组合物或含有组合物的药剂用于提高对外源寡核苷酸的细胞吸收因而增高其细胞内浓度的方法中，也用于在体内提高某一寡核苷酸的溶解能力的方法中，还用于治疗被病毒感染细胞，或使其预防病毒感染的方法中。

复合环糊精的寡核苷酸被细胞的吸收可以如下述的那样得到确定。结合荧光素 (FITC) 的硫代磷酸 (PS) - 寡核苷酸与环糊精在 4 ℃，过夜或是在 25 ℃，1 小时复合。培养的 T 细胞白血病细胞株 (CEM) 然后与这种处理过的寡核苷酸接触。通过有计算机分析的流式细胞计数器测定 CEM 细胞的荧光强度。

如图 2 中计算机扫描图所示，当寡核苷酸复合上环糊精后，荧光强度急剧升高，指明复合作用大大地增加了细胞的吸收。

为了确定寡核苷酸的长度是否影响环糊精影响细胞吸收的能力，使 20 聚体和 42 聚体的结合 FITC 的 PS －寡核苷酸在 25 ℃与环糊精接触 1 小时，然后加入到 CEM 细胞中。细胞在荧光显微镜下检查。

如图 3A － 3D 中的荧光显微照片所示，复合了环糊精的 20 聚体与 42 聚体的两种寡核苷酸都被细胞吸收了。而且，与用未复合的寡核苷酸处理过的细胞相比，用复合了环糊精的寡核苷酸处理后，检测到了更多的荧光细胞。它表明与环糊精的复合作用促进了对寡核苷酸的吸收。

为了确定与环糊精的复合作用是否影响了给予细胞的寡核苷酸的稳定性，给细胞培养物中加入了复合环糊精的 ^{32}P －标记的 PS －和 PO －寡核苷酸，并在给药后的不同时间里进行检测。从细胞中提取寡核苷酸并通过电泳和放射自显影进行分析。

如图 4 中所示，仅仅在 15 分钟后， PO －寡核苷酸就会迅速被降解，而 PS －寡核苷酸则几乎在研究的全部时间内保持完整。因此，在细胞内 PS －寡核苷酸比 PO －寡核苷酸要更加稳定。而在复合了环糊精的寡核苷酸与未与环糊精复合的寡核苷酸之间则未见明显差异，指明复合作用不影响寡核苷酸的稳定性。

为了确定与环糊精的复合作用是否影响寡核苷酸的相对迁移力，通过电泳和放射自显影分析了 ^{32}P －标记的未复合的及复合了环糊精的 PO －和 PS －寡核苷酸。

如图 5 中所示，在复合了环糊精和未复合环糊精的寡核苷酸的迁移率之间未见明显的不同。无论是复合了的还是未复合的 PO －寡核苷酸都比复合了的和未复合的 PS －寡核苷酸的迁移要快。

为了确定复合环糊精的寡核苷酸与金钢烷的连接是否对其被细胞吸收有影响，以不同的时间对细胞分别用荧光（ FITC ）标记的寡核苷酸，荧光标记的、复合了环糊精的寡核苷酸，或荧光标记的、共价连接金钢烷/复合环糊精的寡核苷酸处理。然后用流式细胞计数器分析细胞的荧光强度。

如图 6 中所示，在所研究的时间段内， FITC 标记的寡核苷酸在细胞内的吸收在逐渐上升。在环糊精存在时，上升得更快。而上升最为迅速的是与金刚烷连接的寡核苷酸（寡核苷酸－ A ）。因此，使寡核苷酸与金钢烷共价连接促进了复合环糊精的寡核苷酸的细胞吸收。

为了本发明的药剂的给药，复合环糊精的或金钢烷连接的并复合环糊精的寡核苷酸与

生理学可接受的载体混合，然后通过以下方式注射：静脉、肌肉、腹腔或鼻内(Merkus et al. (1991) Pharmaceut. Res. 8:588-592; Shao et al. (1992) Pharmarceut. Res. 9:1157-1163)、口腔、经皮的或皮下。环糊精还很容易通过以下途径吸收：肠道（Nakanishi et al. (1992) Chem. Pharm. Bull. 40:1252-1256)、角膜（Jansen et al. (1990) Lens Eye Toxicity Res. 7:459-468)和直肠（Arima et al. (1992) J. Pharmaceut. Soc. Japan 112:65-72)上皮，以及经皮注射（Yoshida et al. (1990) Chem. Pharmaceut. Bull. 38:176-179 ）。在用寡核苷酸处理某些特定的疾病时可通过常规实验确定寡核苷酸的有效剂量及其给药方式。适于注射或其它用法的药剂的型式包括无菌水溶液或分散剂以及供临用时配成适于注射的无菌溶液或分散剂的无菌的干粉。所有这些类型都必须是无菌的。它必须在生产和储存条件下保持稳定，并能在防止微生物的污染下保存，如细菌或真菌。载体可能是溶剂或分散剂。可以通过加入各类抗菌或抗真菌的试剂来防止微生物的作用。至于注射的药剂的吸收的延长则可通过加入延缓吸收的组分来实现。

以下的实施例阐述了有关本发明的制造和实践的一些优选的方式，但并非意味着对本发明范围的限制，因为替代的方法也能用来得到相似的结果。

实施例

1.寡核苷酸的制备

PO-和 PS-寡核苷酸在自动合成仪（Millipore 8700, Millipore Corp., Bedford, MA ）上用磷酰胺化学法合成（见 Agrawal et al.,1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7790-7794; McBride et al., 1983, Tetrahedron Lett. 24:245 ）。在合成反应中所用的氧化剂对于磷酸二酯键类连接是标准碘溶液，对于磷硫连接，用的是 1g ^{3}H-1,2-二巯基苯-3-酮-1,1-二氧溶于 100ml 的乙腈。甲基膦酸酯的制备根据 Beaucage 的方法："Oligonucleotide Synthesis: Phosphramidite Approach" in Protocols for Oligo nucleotides and Analogs,Methods in Molecular Biology, 1994, 20:33-62 。通过测定 260nm 处的光吸收，考虑在每一序列中的核苷酸的摩尔消光系数，确定寡核苷酸的浓度(Ausubel et al., 1987, Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York))。

2. 寡核苷酸的 FITC -标记

根据 Schubert 的方法（Nucleic Acids Res.,1990, 18:3427 ），通过 5'-羟基使用荧光素亚酰胺(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)使寡核苷酸结合上荧光

素（FITC）。所有的寡核苷酸都用浓氨水在55℃处理12小时除去保护基团。寡核苷酸用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）纯化，用Sep-Pak C18柱（Waters, Milliford, MA）脱盐，并在使用前冻成干粉。

3. 环糊精的制备

2－羟丙基－β－环糊精（HPCD）可根据Pitha et al.（Int. J. Pharm. 1986, 29:73-82）的方法制备或从Sigma Chemical Co.,St. Louis, MO购得。其它的环糊精例如α（$C_{36}H_{60}O_{30}$）环糊精以及γ－（$C_{48}H_{80}O_{40}$）环糊精也可从市场购得（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）。羟丙基－β－环糊精，羟乙基－β－环糊精，三甲基－β－环糊精，羟丙基－环糊精以及硫代－β－环糊精可从Amaizo公司（Hammond, IN）购得。

4. FITC－标记的、结合HPCD的寡核苷酸的制备

1微克结合了FITC的PS－寡核苷酸在75微升的RPMI培养基中与浓度为5－10％的HPCD混合。混合物在4℃过夜或是在25℃保温1小时，以完成非共价复合（Simpkins et al., 1991, J. Parental Sci. & Technol. 45:266）。

5. 寡核苷酸的^{32}P－标记

在终体积为20微升的体系中使200ng寡核苷酸（PO或PS）与2微升多核苷酸激酶（Pharmacia, Piscataway, NJ），以及2微升α－^{32}P ATP(Amersham LIFE Science, Arlington Heights , IL)于37℃保温1小时，对寡核苷酸的5'末端进行标记。混合液通过一个Sephadex G-25柱（5 Prime-3 Prime, Boulder, CO），使^{32}P－标记的寡核苷酸与未标记上的寡核苷酸分离开。

6. ^{32}P－标记的结合环糊精的寡核苷酸的制备

一半^{32}P 标记的寡核苷酸（PO－或PS－）与7微克未标记的相应的寡核苷酸（PO－或PS－）在175微升含10％HPCD的RPMI培养基中于4℃混合过夜，非共价结合。另一半标记的寡核苷酸除了溶液中不加HPCD外作同样的处理，作为对照。

7. 共价连接的寡核苷酸/金钢烷复合物的制备

A. 连接物－金钢烷复合物

根据Misiura et al.（J. Nucleic Acids Res. 1990, 18: 4345-4354）的方法

完成氨基连接物的合成（图 7 ）。简单说来，将商购的 solketal （化合物 1 ） 在四氢呋喃（ THF ）与氢化钠中与乙腈反应生成加成产物 2 －氰乙基 solketa（化合物 2 ）。（化合物 2 ）的腈还原反应在甲醇中在二氯化钴存在时用硼氢化钠完成，生成化合物 3 即 3 －氨基丙基－ solketal ，该产物可用分部蒸馏法纯化。

化合物 3 与 1-金钢烷-羰基氯反应生成化合物 4 即 N-金刚酰-3-氨基丙基 solketal 。具体地，将 5.0g （ 26.42 毫摩尔）化合物 3 在 N_2 惰性气体中溶于 50ml 干燥二氯甲烷。在溶液中用注射器加入三乙胺（ 4.2ml, 3.04g, 30.0mmole ），随后滴加 5.2g, 260mmole 金钢烷羰基氯溶于 10ml 干燥 二氯甲烷的溶液。溶液在室温下搅拌 1 小时然后浓缩。残留物溶于 100ml 二氯甲烷，用饱和碳酸酯氢钠溶液（ 3 × 50ml ）洗涤，合并有机相，搅拌，挥发至干。油样残留物在硅胶柱（ 300g ）上纯化，用 19: 1 的二氯甲烷: 甲醇混合液洗脱，得到 8.84g （ 97%）化合物 4 。

为了制备化合物 5 （ 1-O-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-3-O-(N-adamantoyl-3-aminopropyl glycerol ）， 8.56g （ 24.35 毫摩尔)的化合物 4 溶解于 48.7ml THF 与 48.7ml 1M 的 HCl 混合液中。溶液于室温下搅拌 30 分钟。然后加入 50ml 的无水乙醇。将溶液浓缩，残留物重溶于 50ml 无水乙醇，再次浓缩。产物与吡啶（ 2 × 50ml ）共蒸发后得到一种油，重溶于 150ml 干吡啶。然后分两部分加入 8.25g(24.35mmole)的 4,4'-二甲氧三苯甲基氯并搅拌 15 分钟。得到的溶液放置 1 小时。加入 50ml 无水乙醇，浓缩。浓缩物溶于 200ml 二氯甲烷，用饱和碳酸酯氢钠溶液（ 2 × 60ml ）洗涤。水层用二氯甲烷洗涤（ 2 × 30ml ）并将有机相合并，干燥并蒸发。残留物在硅胶柱（ 300g ）上层析并用 19: 1 的二氯甲烷: 甲醇混合液洗脱，得到白色泡沫状产物（ 9.16g, 61.3%）。

由于羧基基团可以和化合物 5 的自由羟基在 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸存在时发生酯化反应，故可用标准程序（ Damha et al., 1990, Nucleic Acids Res. 8: 3813-3821 ），化合物 5 结合到长链烷基氨基丙酸控制的孔玻璃珠 （ CPG ）上，得到化合物 6 。上样量是 22.1 μ mol/g CPG 。

接近 10mg 的化合物 6 放到一个 10ml 的带刻度的瓶中，用 0.2ml 的 $HClO_4$-EtOH （ 3: 2 ）处理 1 分钟以释放二甲氧三苯甲基。然后，加入 9.8ml 乙腈，测定 498nm 的光吸收，根据下式确定上样效率:

$$A_{498} \times 10 \times 14.3/\text{CPG 重量(mg)} = \mu\ \text{mol/g}$$

B. 标记寡核苷酸与金钢烷的连接

将磷酸二酯键连接的结合金钢烷的寡核苷酸（SEQ ID NO: 1）（图9A），结合金钢烷的PS－寡核苷酸（SEQ ID NO: 1）（图9B），以及结合金钢烷并连接有FITC的PS－寡核苷酸（图9C）从CPG上裂解下来，用浓氨水在室温处理15小时然后在55℃继续处理6小时除去保护。5'-ODMT保护的寡核苷酸在制备型C－18反相柱上纯化，用溶剂A（0.1M乙酸铵）和溶剂B（20％ 0.1M乙酸铵＋80％乙腈）的线性梯度进行洗脱。去三苯甲基化的进行是用80％乙酸在室温处理30分钟。得到的除去全部保护基的寡核苷酸用与在DMT步骤中相同的梯度进行洗脱并在相同的柱子上再次纯化。

8. FITC标记的、HPCD结合的、金钢烷连接的寡核苷酸的制备

1微克FITC结合的、金钢烷连接的PS－寡核苷酸与含10％的HPCD在75微升普通RPMI培养基混合。为完成非共价复合，将混合液在4℃过夜或是在25℃保温1小时。（Simpkins et al., 1991, J. Parental Sci. & Technol. 45: 266）。

9. 细胞培养

在研究中使用了CEM，一种人类T细胞白血病细胞株（Foley et al., 1965, Cancer 4: 522），和H9，一种人类T细胞淋巴癌细胞株（American Type Culture Collection, Rockville, MD, ATCC No. HTB 176）。于37℃，5％ CO_2－95％ O_2增湿的空气培养箱中将其培养于RPMI培养基（JRH Biosciences, Lenexa, KS），所述培养基补充10％的热失活（56℃，30分钟）的胎牛血清，2mM的谷氨酰胺，100U/ml的青霉素/链霉素溶液（JRH Biosciences, Lenexa, KS）。

10. FITC标记的复合环糊精的寡核苷酸的吸收

在实验之前将CEM细胞培养到将融合并重悬于含20％小牛血清(FCS)的RPMI培养基中（如上述还含有青霉素、链霉素、谷氨酰胺）。已复合有10％的HPCD的1微克的FITC－寡核苷酸（在75微升普通RPMI培养基中）或未复合的（对照）寡核苷酸加入到含5×10^5CEM细胞的75微升含有20％FCS的RPMI培养基中。最后的混合液中在150微升含10％FCS的RPMI培养基中含有1微克的FITC寡核苷酸，5％HPCD，5×10^5CEM细胞。细胞在37℃培养4小时，然后用补充有1％BSA，1％叠氮化钠的Hank's平衡盐溶液(HBSS)洗涤。

然后分析CEM细胞的荧光强度，使用流动细胞计数器(FACScan, Beckman-Dickson, Moutain View, CA; or Epics XL, Coulter, Hialeah, FL)，并使用Lysis II软件（使用FACScan时）或Epicks XL软件，1.5版本（使用Epicks XL时）分析（Zhao et al.

(1993) Antisense Res. & Dev. 3:55)。

11.荧光显微镜研究

20聚体和42聚体的结合有荧光素的PS－寡核苷酸在25℃与5％的HPCD接触1小时。然后将1微克寡核苷酸加入到CEM细胞中（每孔 5 × 10^5 ）并在37℃培养4小时。培养4小时后，用FACS洗涤缓冲液（含1％BSA，1％叠氮化钠的HBSS）洗涤细胞，并在荧光显微镜（LH50A, Olympus, Japan）下观察（见图3A－3D）。

12. ^{32}P 标记的复合环糊精的寡核苷酸的吸收及环糊精对寡核苷酸稳定性的影响

在实验之前，将CEM细胞培养至快长满时并用含有20％FCS的RPMI培养基重悬。混合液（体积为175微升的普通RPMI培养基）加入到 10^6CEM细胞中（在175微升含有20％FCS的RPMI培养基中）。最终的混合液中在350微升的含10％FCS的RPMI培养基中含有7微克未标记的寡核苷酸，大约80ng^{32}P标记的寡核苷酸（Sephadex柱的回收率是80％），5％HPCD。经过处理的细胞在37℃培养。每经过15分钟，取出50微升的细胞培养液，用类似于Temsamani et al.的方法（Antisense Res. & Dev. (1994) 4:35）从细胞培养物中提取寡核苷酸。简单地说，细胞培养混合液的等分试样在0.5%SDS存在时用蛋白酶K（终浓度为2mg/ml）37℃处理20分钟，酚－氯仿抽提后乙醇沉淀。^{32}P标记的寡核苷酸用20％PAGE电泳分析，放射自显影。提取物在变性PAGE凝胶上分析（见图4）。

13.环糊精对寡核苷酸的迁移力的影响

为了确定环糊精复合对寡核苷酸的相对迁移力的影响，^{32}P 标记的（Amersham, Arlington Heights, IL）PO－和PS－寡核苷酸通过用Sephadex装填的spin柱纯化，在25℃于普通RPMI培养基中与5％环糊精混合1小时，然后用非变性的15％PAGE电泳并放射自显影分析（见图5）。

14.环糊精对连接金钢烷的寡核苷酸的细胞吸收的影响

为了与环糊精复合，将荧光标记的PS－寡核苷酸或荧光标记的共价连接金钢烷的PS－寡核苷酸在普通RPMI培养基中与1.25%HPCD于4℃混合过夜。在最终体积为1.2ml的含10％胎牛血清的RPMI培养基中，8微克按上述方法复合有1.23％的HPCD的FITC寡核苷酸或未复合的寡核苷酸加到8 × 10^5的H9细胞中。细胞在37℃培养。在不同的时间点，取出细胞培养液，用含1％BSA，1％叠氮化钠的HBSS洗涤。用流式细胞计数器分

析 H9 细胞的荧光强度（见图 6 ）。

本领域熟练技术人员能够在不超过常规实验方法的情况下，认识并确定出上述特定的物质和程序的等价物。这些等价物也被认为属于本发明的范畴，并包括在下述的权利要求中。

序列表

（1）一般信息

（i）申请人：海布里登公司

（ii）发明名称：寡核苷酸的环糊精细胞输送系统

（iii）序列数目:1

（iv）联系地址:

（A）收信人:Lappin & Kusmer

（B）街道:200 State Street

（C）城市:波士顿

（D）州:马萨诸塞州

（E）国家:美国

（F）邮编:02109

（v）计算机可读形式

（A）媒介类型:软盘

（B）计算机:IBM PC 兼容机

（C）操作系统:PC-DOS/MS-DOS

（D）软件:PatentIn Release #1.0, Version #1.25

（vi）本申请资料

（A）申请号:US

（B）申请日:

（C）分类:

（viii）律师/代理人信息

（A）姓名:Kerner, Ann-Louise

（B）注册号:33,523

（C）案号/文档号:HYZ-019PCT

（ix）通讯信息

（A）电话:617-330-1300

（B）传真:617-330-1311

（2）SEQ ID NO:1 的信息:

（i）序列特征

（A）长度:25 碱基对

（B）类型:核酸

（C）链性:单链

（D）拓朴结构:线性

（ii）分子类型:DNA（基因组）

（iii）假设:否

（iv）反义:是

（xi）序列描述:SEQ ID NO:1

CTCTCGCACC CATCTCTCTC CTTCT 25

说 明 书 附 图

图 1A

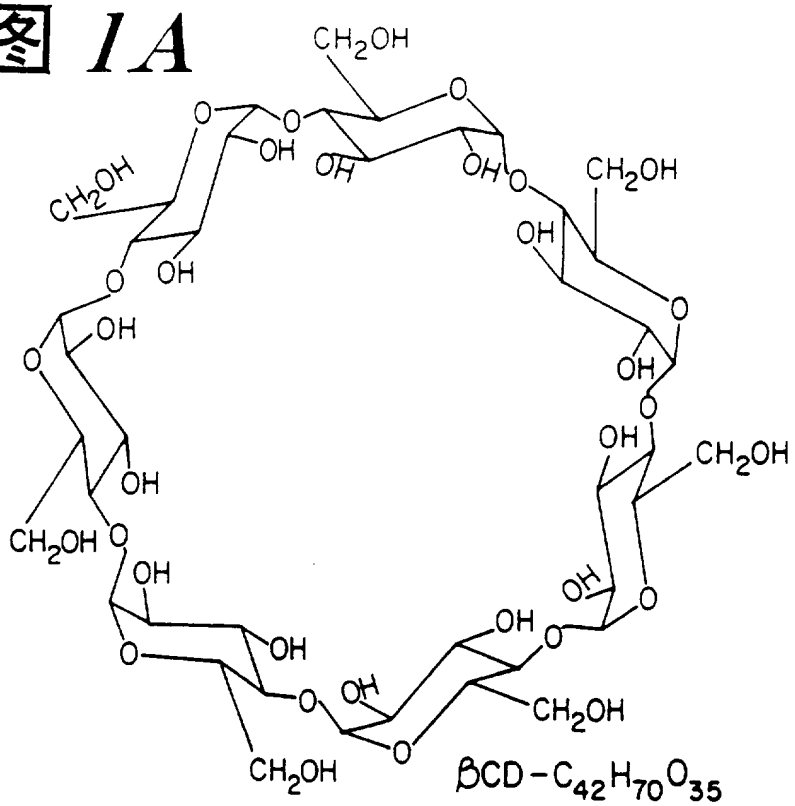
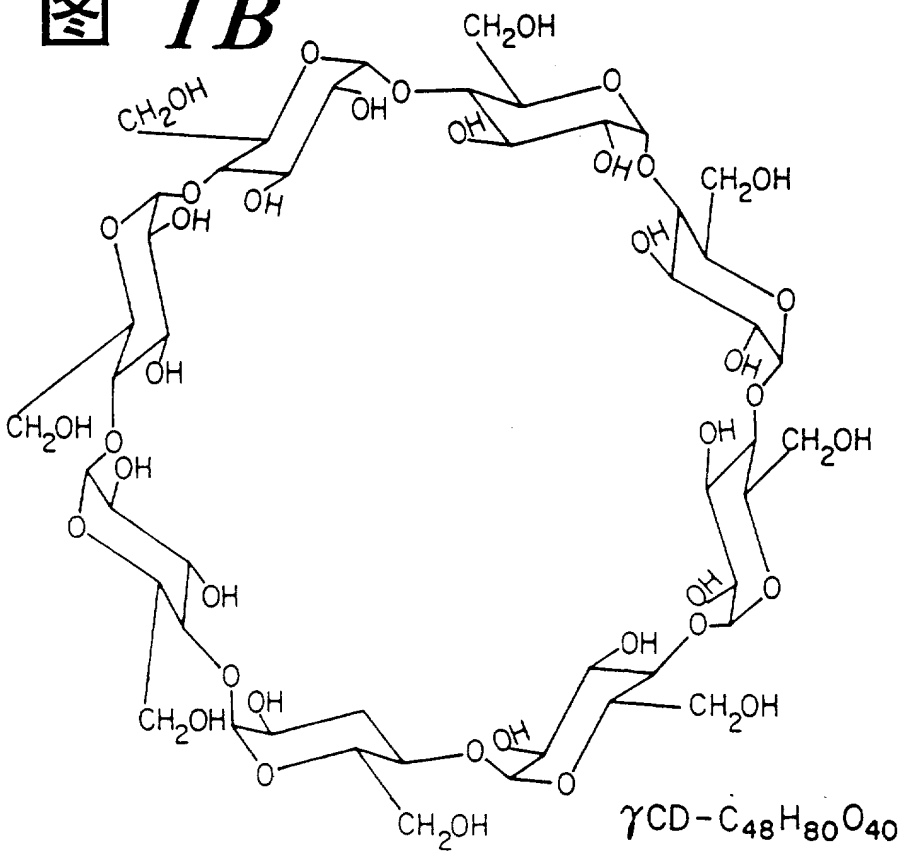


图 1B



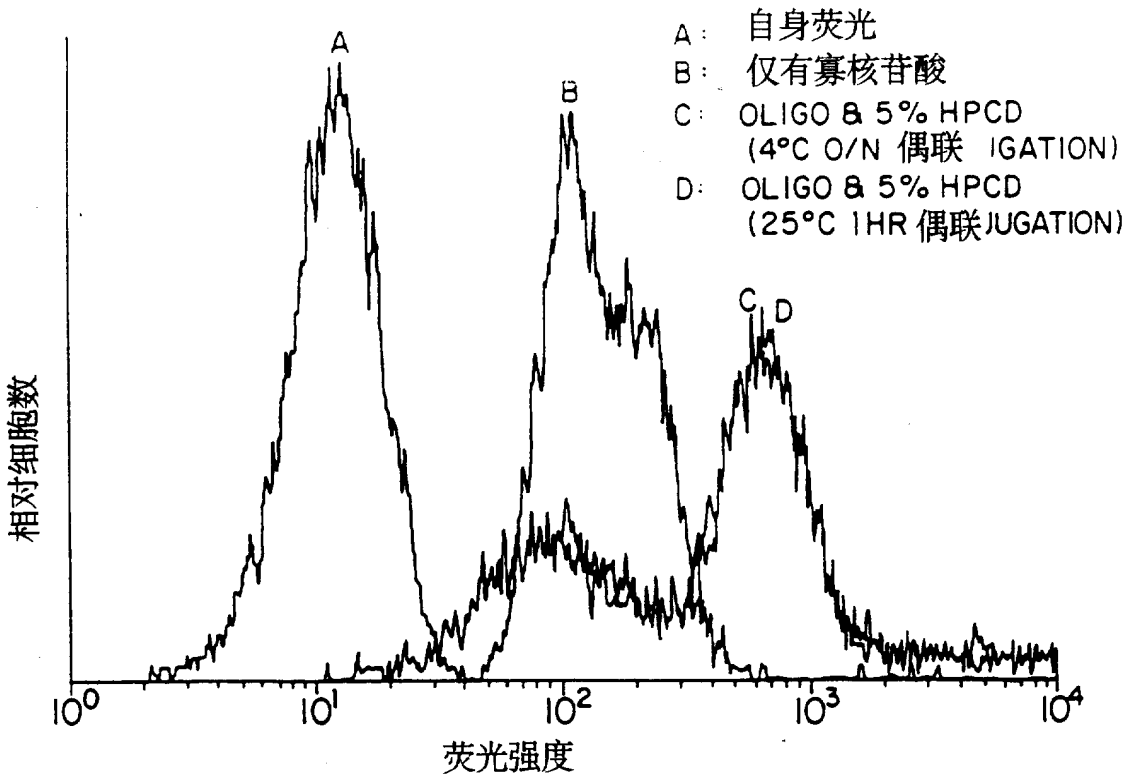

A: 自身荧光
B: 仅有寡核苷酸
C: OLIGO & 5% HPCD
(4°C O/N 偶联 IGATION)
D: OLIGO & 5% HPCD
(25°C 1HR 偶联JUGATION)
A
B
C D
相对细胞数
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
荧光强度

图 2

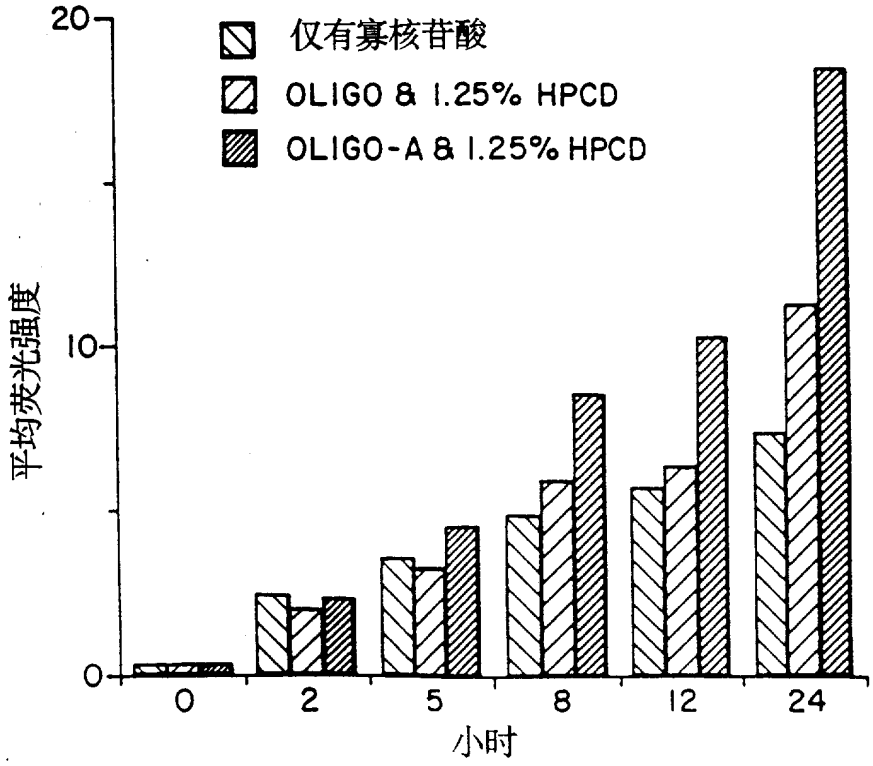

仅有寡核苷酸
OLIGO & 1.25% HPCD
OLIGO-A & 1.25% HPCD
20
10
0
平均荧光强度
0
2
5
8
12
24
小时

图 6

仅有FITC寡核苷酸　　FITC OLIGO & 5% HPCD

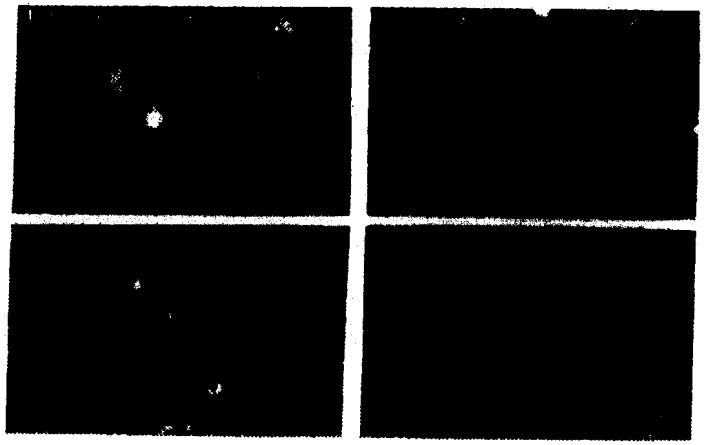


图 3A

图 3B

20 聚体

图 3C

图 3D

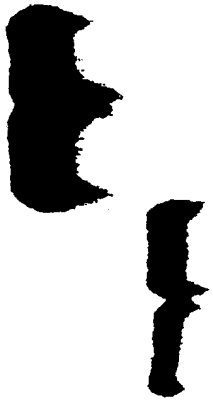
42 聚体

图 4



A: 仅有寡核苷酸

B: OLIGO & 5% HPCD



PO

PO & 5% HPCD

PS

PS & 5% HPCD

图 5

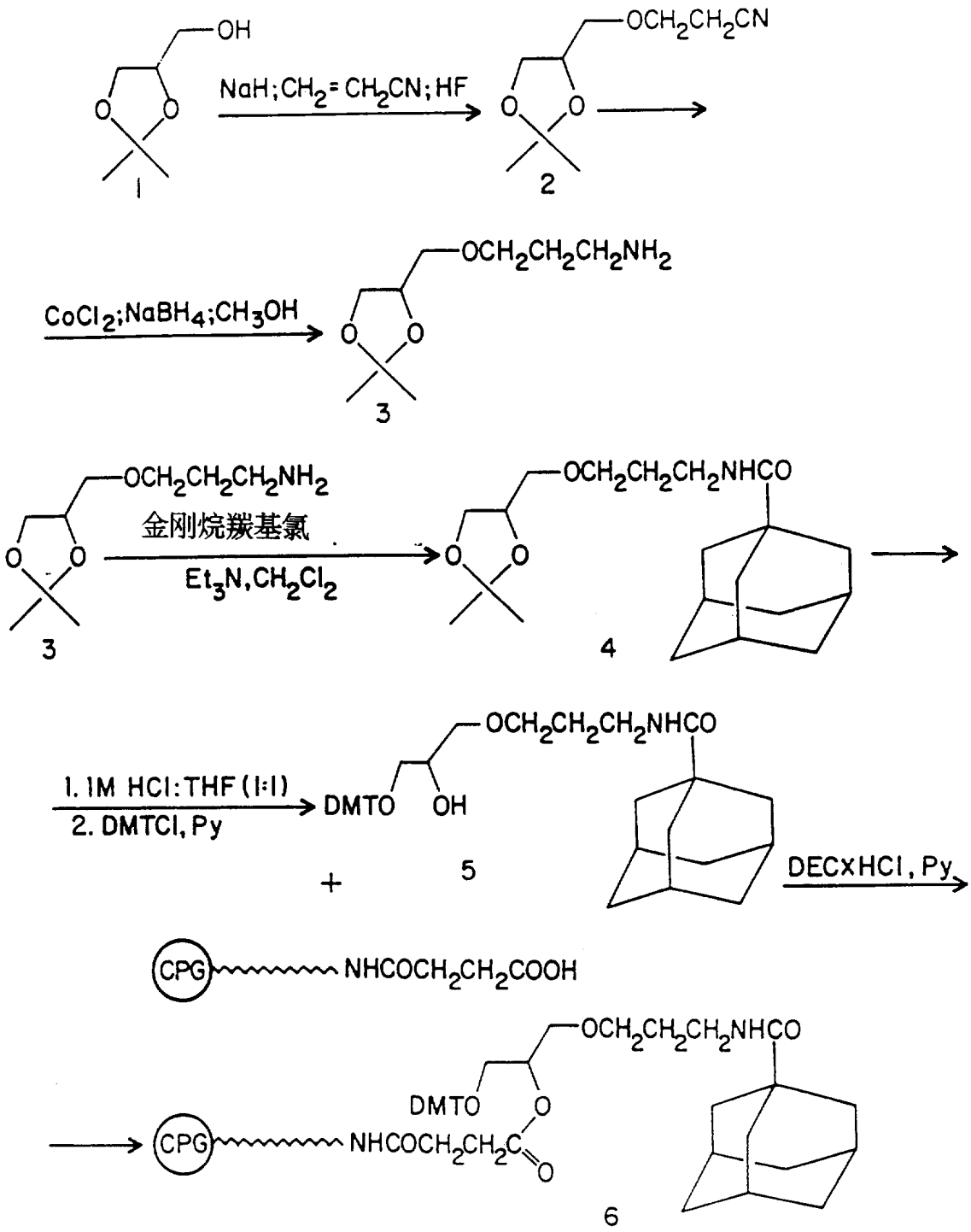

OH
NaH;CH2=CH2CN;HF
OCH2CH2CN
1
2
CoCl2;NaBH4;CH3OH
OCH2CH2CH2NH2
3
金刚烷羰基氯
Et3N,CH2Cl2
OCH2CH2CH2NHCO
4
1.1M HCl:THF(1:1)
2. DMTCl, Py
DMTO
OH
5
DECxHCl, Py
CPG
NHCOCH2CH2COOH
6

图 7

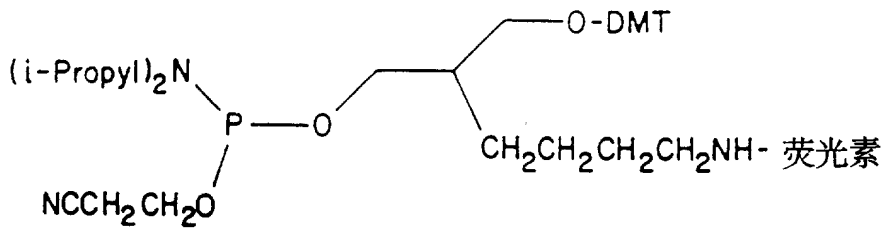
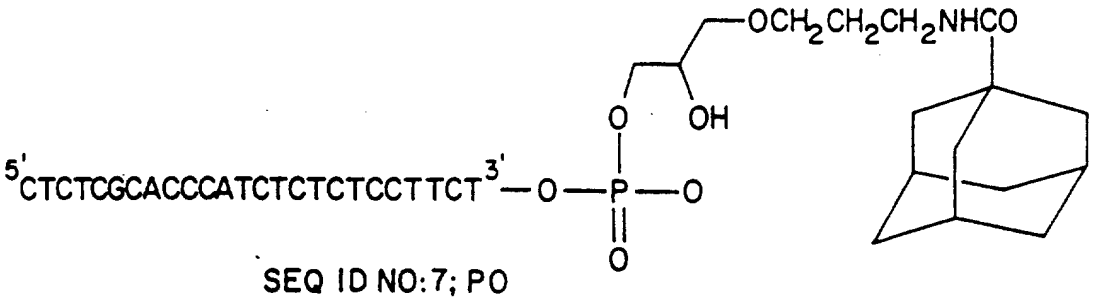
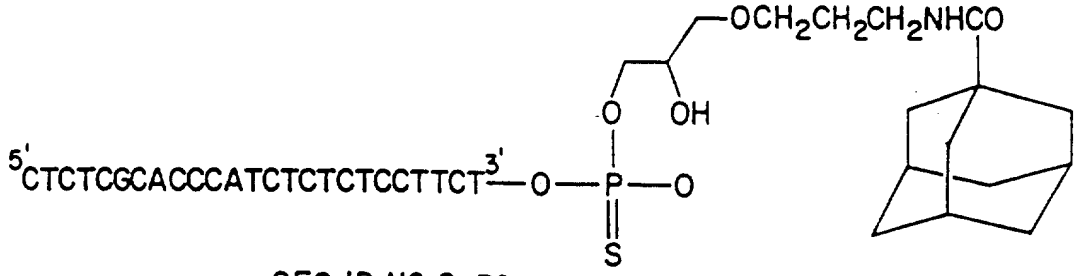


图 8



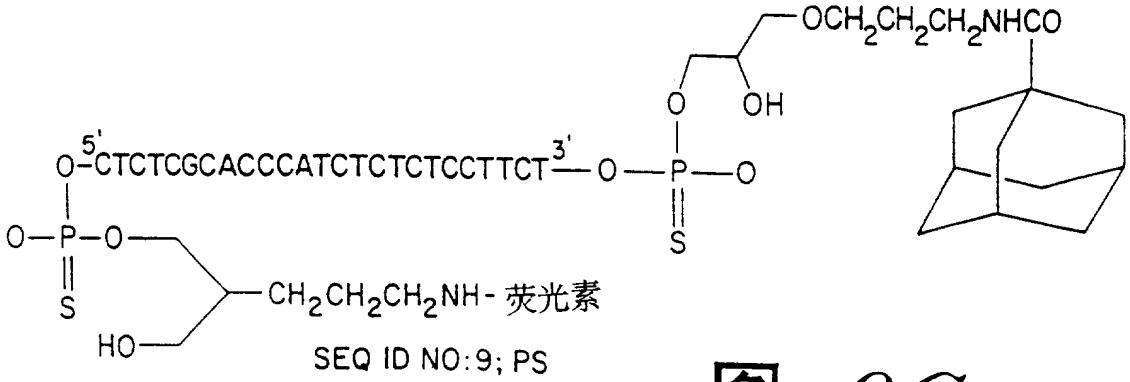
SEQ ID NO:7; PO

图 9A



SEQ ID NO:8; PS

图 9B



SEQ ID NO:9; PS

图 9C