



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107083386 A

(43)申请公布日 2017.08.22

(21)申请号 201610938776.7

(22)申请日 2009.08.25

(30)优先权数据

61/190,121 2008.08.25 US

(62)分案原申请数据

200980133819.2 2009.08.25

(71)申请人 埃克斯雷德制药有限公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 ISIS制药有限公司

(72)发明人 尼古拉斯·M·迪恩

J·戈登·福克斯 尼尔·欧唐奈

C·弗兰克·本尼特

苏珊·M·弗赖尔

(74)专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限

公司 31224

代理人 刘粉宝

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 17/02(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

A61P 19/08(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

A61P 19/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书51页

序列表46页 附图11页

(54)发明名称

阻止结缔组织生长因子的反义核苷酸及其用途

(57)摘要

本发明提供了包含能抑制结缔组织生长因子表达的修饰核苷酸的化合物以及含有同样的修饰核苷酸的组合物,还提供了利用这样的化合物治疗过度增殖病症和纤维变性病的方法,以及减少因伤口愈合引起的瘢痕的方法。

1. 一种化合物,它包含由12-30个连接的核苷所组成的修饰寡核苷酸,在选自SEQ ID NO:9的核苷酸718-751,1388-1423,1457-1689,2040-2069,2120-2147,2728-2797,2267-2301,553-611,1394-1423,1469-1508,1559-1605,1659-1689,2100-2129及1399-1423的区域内至少存在它的一个12个核碱基序列的部分。

阻止结缔组织生长因子的反义核苷酸及其用途

[0001] 在本申请中参考了某些专利和出版物,后者还注明作者,杂志出处和出版日期。这些专利和出版物所披露的内容被全文纳入本申请作为参考以便更加全面地描述与本发明有关的技术的目前动态。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于治疗过度增殖(hyperproliferic)病症和纤维变性病,以及减少因伤口愈合引起的瘢痕的新颖反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides,ASOs)。

背景技术

[0003] 反义技术正在显露出作为一种有效降低特定基因产物的表达的手段,因此,在若干调整结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)的表达方面的治疗,诊断和研究应用上可能证明是异常有用的。(见颁发给Gaarde等人的美国专利U.S.Patent No.6,965,025B2)

[0004] 反义化合物是一种寡聚化合物,能与靶核酸(例如,一种靶标mRNA分子)发生杂交(hybridization)。

[0005] 反义化合物,组合物以及调整CTGF的表达和治疗与CTGF表达有关的疾病的方法被披露在上述的美国专利U.S.Patent No.6,965,025B2中,在此被纳入作为参考。但是,还是需要另外的此类化合物,其能增强对CTGF表达的抑制,提供功能和其他有助的性能。

[0006] 在一实施例中,本发明特别地提供了优选的用于抑制CTGF表达的修饰的反义寡核苷酸。业已证实这些修饰的寡核苷酸比先前描述的靶向CTGF的ASOs更具显著的、出乎意料的潜力。

[0007] 结缔组织生长因子(CTGF;也称之为ctgrofact,可诱导成纤维细胞的分泌蛋白(fibroblast inducible secreted protein),fisp-12,NOV2,类似胰岛素生长因子-结合蛋白有关的蛋白质2,IGFBP-rP2,IGFBP-8,HBGF-0.8,Hcs24,和ecogenin)是模块蛋白质CCN(CTGF/CYR61/NOV)家族的一员,被提名为经识别的第一家族成员,结缔细胞生长因子,富半胱氨酸(cysteine-rich,CYR61),超量表达的肾母细胞瘤(nephroblastoma overexpressed,NOV),但是,该家族还包括蛋白质ELM-1(在低转移性的细胞中表达),WISP-3(Wnt-1-诱导的分泌蛋白),和COP-1(WISP-2)。业已发现CCN蛋白质为分泌的,与细胞外基质有关的蛋白质,它调控细胞的过程,像粘附,移动,有丝分裂发生,分化,存活,血管生成,动脉粥样坏死,软骨形成,伤口愈合,肿瘤发生,以及血管和纤维变性的疾病,像硬皮病(scleroderma)(Lau and Lam,Exp.Cell Res.,1999,248,44-57)。结缔组织生长因子蛋白显示出激发DNA的合成和促进成纤维细胞的趋化性(Bradham et al.,J.Cell Biol.,1991,114,1285-1294)。

[0008] 大多数情况下,在表达的研究中已报导了一种单2.4-千碱基CTGF的转录物,尽管报导了在胶质母细胞瘤中3.5-和7-千碱基的转录物。在正常的分化过程中,结缔组织生长因子在成纤维细胞中表达,分化过程涉及细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的生成

和重建,像植入后的胚胎发生和子宫蜕膜。结缔组织生长因子频繁地在纤维变性的皮肤病中超量表达,像全身硬化,局部皮肤硬化,瘢痕疙瘩,瘢痕组织,嗜酸性筋膜炎(eosinophilic fasciitis),结节性筋膜炎(nodular fasciitis),和掌挛缩病(Dupuytren's contracture)。结缔组织生长因子mRNA或者蛋白水平在包括肝,肾,肺,心血管系统,胰,肠,眼和牙龈的主要器官和组织的纤维变性损害中会升高。在乳房,胰腺和纤维组织细胞的肿瘤中,特征明显地累及结缔组织,结缔组织生长因子在基质区室中超量表达。在许多情况下,结缔组织生长因子的表达空间地和时间地与致纤维化因子转化生长因子- β (transforming growth factor- β)联系在一起(Moussad and Brigstock, Mol.Genet.Metab.,2000,71,276-292)。

[0009] 结缔组织生长因子已经被定位到人类染色体区域6q23.1,邻近c-myc基因,涉及该区域的染色体异常已经与人类的肿瘤有关,像肾母细胞瘤(Wilms'tumor)(Martinerie et al.,Oncogene,1992,7,2529-2534)。

[0010] 带有显著纤维变性和血管成分的肿瘤呈现出CTGF表达升高,CTGF可能涉及到儿科成肌纤维母细胞瘤的发病机制。在考察过的12个儿科肿瘤中,在肿瘤细胞和/或相关脉管系统的内皮细胞中都显示出中等至强烈的CTGF表达(Kasaragod et al., Pediatr.Dev.Pathol.,2001,4,37-45)。

[0011] 结缔组织生长因子mRNA在儿童急性淋巴母细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia,ALL)的恶性人类白血病淋巴母细胞中也特别地被调高(Vorwerk et al., Br.J.Cancer,2000,83,756-760),在Hs578T人类乳腺癌细胞中mRNA和蛋白质水平都以一种剂量依赖性的方式被TGF- β 调高,它表明CTGF是一个重要的神经内分泌因子以及TGF- β 是一个关键性的下游效应子(Yang et al.,J.Clin.Endocrinol.Metab.,1998,83,2593-2596)。

[0012] 在一个鼠的肺纤维化模型中,结缔组织生长因子mRNA表达的升高也是被争光霉素(bleomycin),一个已知的肺纤维发生剂所诱导(Lasky et al.,Am.J.Physiol.,1998,275, L365-371;与健康的不吸烟对照试验人群相比较,在先天性肺纤维化和肺肉状瘤病(pulmonary sarcoidosis)患者的支气管肺泡灌洗细胞中也发现了同样的mRNA表达的升高,它表明结缔组织生长因子被涉及到针对损伤的纤维增生应答反应中(Allen et al., Am.J.Respir.Cell Moll.Biol.,1999,21,693-700)。同样,在一个增生的肾小球肾炎的实验模型中,结缔组织生长因子mRNA的表达在毛细血管外和肾小球膜增生损害以及肾小球外周纤维化(periglomerular fibrosis)区域中强烈地升高。早期肾小球结缔组织生长因子的超量表达与TGF- β 蛋白质的明显向上调控一致,以及结缔组织生长因子的动力学有力地暗示了在该短暂的肾损伤模型中TGF- β 在肾小球的修复,有可能在下游的修复中的角色(Ito et al.,J.Am.Soc.Nephrol.,2001,12,472-484)。

[0013] 美国专利U.S.Pat.No.5,876,730所披露和要求权利的是一种实质上纯的或者分离的多肽,它具有与结缔组织生长因子(CTGF)蛋白的羧基末端氨基酸相对应的氨基酸序列这样的特征,其特征在于该多肽具有一氨基酸序列,其由结缔组织生长因子的N端的氨基酸残基247或248开始,一分离的多聚核苷酸序列编码结缔组织生长因子多肽,一重组表达载体含有所述的多肽,一宿主细胞含有所述的表达载体,一种药用组合物,其在药用可接受的载体中包含有效治疗量的结缔组织生长因子多肽。反义寡核苷酸被一般地披露了(Brigstock and Harding,1999)。

[0014] 美国专利U.S.Pat.No.5,783,187;5,585,270;6,232,064;6,150,101;6,069,006和PCT出版物WO 00/35936所披露和要求权利的是一种分离的多聚核苷酸其编码结缔组织生长因子多肽,表达载体,宿主细胞其被所述载体稳定地转化或转染;分离的多聚核苷酸包含从结缔组织生长因子的上游分离出来的5'未翻译的调控核苷酸序列,其特征在于,所述的未翻译的调控核苷酸序列包含转录和翻译起始区域,其特征还在于,所述序列是一TGF- β 应答成分;分离的核酸结构包含从结缔组织生长因子(CTGF)基因的上游分离出来的非编码调控序列,其特征在于,所述非编码调控序列与表达所关心的蛋白质或者反义RNA的核酸序列可操作地结合,其特征在于,所述核酸相对于所述非编码序列是异源的;以及具有诱导ECM合成,胶原合成和/或成肌纤维细胞分化能力的结缔组织生长因子(CTGF)的多肽片段,包含由所述多肽的至少外显子2或外显子3编码的氨基酸序列。进一步要求权利的是一种识别组合物的方法,该组合物影响TGF- β 诱导的结缔组织生长因子的表达,一种诊断选自纤维变性疾病和动脉粥样硬化症小组的怀疑有病理学的受试者的病理状况的方法,该方法包含获取怀疑含有结缔组织生长因子的样本,通过检测受试者样本中结缔组织生长因子的水平与正常的标准样本中结缔组织生长因子水平的差异诊断受试者的病理学特征为与结缔组织生长因子细胞相关的增生病症。进一步要求权利的是一种改善与结缔组织生长因子有关的细胞增生病症的方法,它包含在病症部位对患有所述病症的受试者给予一种组合物,该组合物包含药用有效量的抗体或片段,与结缔组织生长因子结合,其特征在于组合物中的抗体或片段不与PDGF结合。反义寡核苷酸被一般地披露了(Grotendorst,2000;Grotendorst and Bradham,2001;Grotendorst and Bradham,2000;Grotendorst and Bradham,1996;Grotendorst and Bradham,1998;Grotendorst and Bradham,2000)。

[0015] PCT出版物WO 00/27868所披露和要求权利的是一种实质上纯的结缔组织生长因子多肽或者其中的功能片段,一种编码所述多肽的分离的多聚核苷酸序列,所述多聚核苷酸序列中的T也可以是U,一种与所述多聚核苷酸序列互补的核酸序列,以及所述序列的片段,它们的长度至少为15个碱基,会与对编码结缔组织生长因子蛋白的氨基酸序列的DNA在适度的直至非常严格的条件下杂交。进一步要求权利的是一种包括所述多聚核苷酸的表达载体,一种与所述载体一起稳定地转化的宿主细胞,一种与所述多肽结合的抗体,以及一种制备所述多肽的方法。还进一步要求权利的是一种抑制结缔组织生长因子在细胞中表达的方法,它包含使该细胞与结合了该细胞中的靶核酸的多聚核苷酸接触,其特征在于,该多聚核苷酸抑制了结缔组织生长因子在细胞中的表达,并且,该多聚核苷酸是一种反义寡核苷酸,以及检测结缔组织生长因子表达的试剂盒,该试剂盒包含分成多个格子的置物架子来承放一个或多个容器,至少一个容器中含有至少一种与结缔组织生长因子结合的反义寡核苷酸(Schmidt et al.,2000)。

[0016] PCT出版物WO 00/13706所披露和要求权利的是一种治疗或防止纤维变性的方法,该方法包含对需要的受试者给予有效量的一种试剂,它调整,调控或者抑制结缔组织生长因子或其片段的表达或活性,其特征在于该试剂是一种抗体,一种反义寡核苷酸,或者是一种小分子。该方法直接用于肾纤维化和相关的肾病的治疗,特别是与糖尿病和高血压有关的并发症的治疗(Riser and Denichili,2000)。

[0017] PCT出版物WO 01/29217所披露和要求权利的是一种分离的核酸分子,它包含对编码一多肽的核酸分子,该多肽包含一个氨基酸序列,其选自包括NOV1,NOV2(结缔组织生长

因子),和NOV3这样一组的氨基酸序列,选自所述组的氨基酸序列的成熟形态或变异体,以及一种核酸分子,它包含编码一多肽的核酸序列,该多肽包含一个氨基酸序列,它选自所述的一组,和所述多肽的成熟和变异体形态或片段,和所述核酸分子的补体。反义寡核苷酸被一般地披露过(Prayaga et al.,2001)。

[0018] 肥大性瘢痕的形成,尤其是在临床上消散严重烧伤是个重点难题,它能引起高度增生的瘢痕,造成永久性的功能丧失和外貌损伤的标志特征。每年在美国有超过一百万的人需要治疗烧伤。烧伤后肥大性瘢痕的发病率是个普通的后果,它产生了非常大的问题。因此,像反义寡核苷酸(AOS)那样的CTGF抑制剂应该在防止烧伤后严重的肥大性瘢痕上非常有效。通过局部施涂按预先规定的方法制备的ASO,并且监测烧伤发生后瘢痕发展的严重程度可以来评价它的功效。

[0019] 有若干理由或许让CTGF成为调控肥大性瘢痕成为有吸引力的目标。作为TGF- β 1或TGD- β 2的辅因子和下游介质(downstream mediator),对于针对瘢痕的基因定向分子疗法而言,CTGF可能比TGF- β 1或TGD- β 2代表更加特效的目标,尤其是因为TGF- β 1或TGD- β 2具有与瘢痕形成无关的多能的效果的缘故。另外,CTGF可能具有与TGF- β 1或TGD- β 2无关的保持纤维变性表型的功能,而TGF- β 1或TGD- β 2的策略可能会忽视纤维变性表型。尽管对CTGF在多重器官系统中和在像硬皮病那样的慢性皮肤病中扩大纤维化的作用的了解在深入,但是,CTGF在急性瘢痕和伤口愈合中的作用仍然待大量观察的。

[0020] 目前还没有已知的有效抑制结缔组织生长因子合成的治疗剂,至今针对调控结缔组织生长因子功能的研究策略已经涉及到采用丁酸钠(sodium butyrate,NaB),功能阻滞抗体和反义寡核苷酸。

[0021] 饮食因素被认为在人类癌症,包括乳腺癌的发展和防止上起了重要作用。饮食的微量营养素NaB是饮食淀粉和纤维消化的主要最终产物,它是一种强有力的增长抑制剂,它启动许多类型细胞在体外的细胞分化。NaB,部分地,作为乳腺上皮细胞中的组蛋白脱乙酰酶的抑制剂发挥着它的生物学作用,诱导凋亡细胞在Hs578T雌激素-无应答的人类乳腺癌细胞中的死亡,它能根据不同的细胞类型激活在细胞周期阻滞(cell cycle arrest)中涉及到的不同基因。NaB以剂量依赖的方式特别地上调结缔组织生长因子的表达,在癌性和非癌性的乳房细胞中促进mRNA和蛋白水平的升高(Tsubaki et al.,J.Endocrinol.,2001,169,97-110)。

[0022] TGF- β 具有独特的能力来刺激正常的成纤维细胞在软琼脂中的生长,是转化了的细胞的一种性质。结缔组织生长因子不能诱导这些锚地非依赖的(anchorage-independent)增长的正常鼠肾(normal rat kidney,NRK)的成纤维细胞,但是,结缔组织生长因子的合成和作用对于TGF- β 诱导的锚地非依赖的性是必不可少的。结缔组织生长因子的抗体特定地阻断TGF- β 诱导的锚地非依赖的增长,通过在反义取向中一种表达结缔组织生长因子基因的结构被转化的NRK成纤维细胞不应答在锚地非依赖的增长试验中的TGF- β (替换为:被构建的表达结缔组织生长因子基因通过反义定向转化过的NRK成纤维细胞在锚地非依赖的生长分析中不响应TGF- β)(Kothapalli et al.,Cell Growth.Differ.,1997,8,61-68)。这些CTGF-反义表达NRK细胞也被用于显示TGF- β -刺激的胶原合成是通过结缔组织生长因子介导的,这表明结缔组织生长因子可能是抗纤维化疗法有用的靶(Duncan et al.,Faseb J.,1999,13,1774-1786)。

[0023] 人类结缔组织生长因子cDNA的3'-未翻译的区域(untranslated region,UTR)为调控要素承载了若干个共有序列。当3'-UTR在一个报道基因下游被融合时,发现它作为一个有力的顺式作用阻遏要素在发挥作用,反义3'-UTR具有相同的,但更强有力的效果(Kubota et al.,FEBS Lett.,1999,450,84-88)。对人类和鼠的结缔组织生长因子3'-UTR的比较揭示出保留了一个长91个碱基的小片段。该区域被来自NIH3T3鼠成纤维细胞的RT-PCR放大,并被用于形成一个嵌合的融合结构以分析它的阻遏效果。鼠结缔组织生长因子3'-UTR无论是在正向还是反义定向中都有强力的报道基因转录阻遏效果,这表明该调控要素是非定向依赖性的(Kondo et al.,Biochem.Biophys.Res.Comm.,2000,278,119-124)。

[0024] 长度为16个核苷酸,靶向翻译启动的起始位点的一种硫代磷酸酯(phosphorothioate)反义寡核苷酸被用于抑制结缔组织生长因子的表达,以及抑制牛主动脉血管内皮细胞在培养时的增生和移动(Shimo et al.,J.Biochem.(Tokyo),1998,124,130-140)。该反义寡核苷酸也被用于显示结缔组织生长因子诱导在MCF-7人类乳腺癌细胞中的凋亡,TGF- β -诱导的凋亡部分地是由结缔组织生长因子介导的(Hishikawa et al.,J.Biol.Chem.,1999,274,37461-37466)。还发现同样的反义寡核苷酸抑制TGF- β -介导的凋亡蛋白酶3(caspase 3)的激活,因而抑制在人类主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cells,HASC)中TGF- β -介导的凋亡诱导(Hishikawa et al.,Eur.J.Pharmacol.,1999,385,287-290)。该反义寡核苷酸还被用于阻断结缔组织生长因子的表达,并且证实了高血压上调结缔组织生长因子在肾小球系膜细胞(mesangial cells)中的表达,这就转而增强了ECM蛋白的产生并诱导凋亡,有助于肾小球膜的重塑和最终的肾小球硬化(Hishikawa et al.,J.Biol.Chem.,2001,276,16797-16803)。

[0025] 因此,感到还有长期的需要有另外的能有效抑制结缔组织生长因子功能的试剂。

[0026] 发明综述

[0027] 本发明提供了包含修饰的寡核苷酸的化合物,该寡核苷酸包含12-30个连接的核苷,优选包含20个或者至少12个连接的核苷,更为理想的是包含至少14个核苷,化合物能抑制结缔组织因子的表达。还提供了包含本发明的反义化合物的药用组合物和其他组合物。

[0028] 进一步提供了治疗患有与CTGF有关疾病或症状的动物,特别是人类的方法,该方法是通过给予一定量的这样的化合物来有效地抑制CTGF的表达,其特征在于,该疾病或症状是一种过度增殖病症,像癌症和纤维变性的疾病。进一步还提供了减少伤口愈合所造成的瘢痕的方法,该方法是通过给予一定量的这样的化合物来有效地抑制CTGF的表达。

[0029] 附图的简要说明

[0030] 图1显示CTGF基因组序列上的靶片段或区域,主要是外显子靶片段,以其为对照制备靶向CTGF的反义寡核苷酸

[0031] 图2显示CTGF mRNA序列上的靶片段或区域,以其为对照制备靶向CTGF的反义寡核苷酸。

[0032] 图3提供了试验在CTGF mRNA序列上的反义寡核苷酸靶向外显子序列用以抑制CTGF表达的图解表示。

[0033] 图4显示CTGF基因组序列上的靶片段或区域,主要是内含子靶片段,以其为对照制备靶向CTGF的反义寡核苷酸。

[0034] 图5显示CTGF mRNA序列上的靶片段或区域,以其为对照制备靶向CTGF的反义寡核苷酸。

[0035] 图6提供了在CTGF mRNA序列上的反义寡核苷酸靶向内含子序列用以抑制CTGF表达试验结果的图解表示。

[0036] 图7显示抑制CTGF的高度灵敏的反义寡核苷酸,以及它们与两种以前设计的反义寡核苷酸(ISIS 124238和ISIS 124212)活性的比较,披露于美国专利U.S.Patent No.6,965,025B2中。图7A识别了8种外显子靶向反义寡核苷酸,图7B提供了反义寡核苷酸的优选序列。

[0037] 图8提供了由9种高度活性的新颖的人类CTGF的反义寡核苷酸先导序列用以在培养的人类脐静脉内皮细胞中抑制CTGF所获得的剂量应答的图解表示。序列141923为阴性对照,序列124238和124212为两种以前设计的序列。

[0038] 图9提供了鼠在接受了四星期的25mg/kg或50mg/kg剂量的反义寡核苷酸ISIS412294(SEQ ID NO:39),ISIS 412295(SEQ ID NO:40)或ISIS 418899(SEQ ID NO:166)后的血浆丙氨酸转氨酶(alanine aminotranferease,ALT)(图9A)和血浆天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)(图9B)水平的图解表示。结果表明鼠在接受了25mg/kg或50mg/kg剂量的反义寡核苷酸ISIS 412294(SEQ ID NO:39),ISIS 412295(SEQ ID NO:40)或25mg/kg剂量的ISIS 418899(SEQ ID NO:166)后的ALT和AST水平与盐水(载体)对照组中的水平相似;鼠在接受了50mg/kg剂量的ISIS 418899(SEQ ID NO:166)后的ALT和AST水平明显升高,高于对照组的观测值。

[0039] 图10提供了接受四星期的反义寡核苷酸治疗后,显示50mg/kg剂量的ISIS 412295治疗组的体重增加明显低于对照组体重增加的图解表示

[0040] 图11显示鼠的皮肤伤口真皮内用3.0,1.0,0.3或0.1mg的CTGF反义寡核苷酸治疗结果,对所有的剂量,CTGF和Co11A2mRNA的表达都有统计学上的明显降低。这些结果清楚地证实了利用2' MOE修饰的反义寡核苷酸来抑制CTGF的表达会减少胶原在皮肤上的沉积。

[0041] 图12提供的图解表示说明兔在接受了50mg/mL(总剂量5mg)的真皮内给药至少达14天后存在的CTGF反义寡核苷酸显著的水平。

[0042] 发明的详细说明

[0043] 在一个实施例中,本发明提供了一种化合物,它包含由12-30个连接的核苷所组成的修饰的寡核苷酸,在选自SEQ ID NO:9的核苷酸718-751,1388-1423,1457-1689,2040-2069,2120-2147,2728-2797,2267-2301,553-611,1394-1423,1469-1508,1559-1605,1659-1689,2100-2129及1399-1423的区域内至少存在它的一个12个核碱基序列的部分。

[0044] 在另一个实施例中,本发明提供了一种化合物,它包含由12-30个连接的核苷所组成的修饰寡核苷酸,在选自SEQ ID NO:10的核苷酸2540-2559,2568-2587,2623-2647和2623-2642的区域内至少存在它的一个12个核碱基序列的部分。

[0045] 在一个实施例中,本发明提供了一种化合物,它包含由12-30个连接的核苷所组成的修饰寡核苷酸,在SEQ ID NO:28,30,39,40,43,44,45,50,51,52,56,78,125和166中提出的核碱基序列中至少存在它的一个12个核碱基序列的部分。

[0046] 在本发明一个优选的实施例中,该化合物包含20个或者至少12个连接的核苷,更优选地,包含至少14个连接的核苷,它存在于SEQ ID NO:28,30,39,40,43,44,45,50,51,

52, 56, 78, 125和166中提出的核碱基序列中。

[0047] 这些序列的选择是通过筛选在图1至图7中呈现出的结果以及在人类脐静脉内皮细胞 (HuVEC) 中剂量应答研究的结果所决定的。详细的实验和数据见下面的实施例部分中的实施例8。

[0048] 在图1-6中呈现的靶序列包括内含子和外显子靶向序列。靶区域是核酸结构上定义的一个区域。例如, 一个靶区域可以包含一个3' UTR, 一个5' UTR, 一个外显子, 一个内含子, 一个编码区域, 一个翻译起始区域, 一个翻译终止区域, 或者其他的被定义的核酸区域。靶标包括确定至少一个与反义化合物杂交的靶片段, 这样能产生合乎理想的效果。在该实施例中, 该合乎理想的效果是减低mRNA靶核酸的水平。

[0049] 在外显子和内含子序列中都识别出多个序列的活性明显高于以前设计的序列, 像 SEQ ID NO:15 (ISIS 124238)。若干个新的内含子 (SEQ NO:125) 和外显子 (SEQ NOs. 28, 30, 40, 45, 52, 50和78) 寡核苷酸表现出的活性显著高于其他序列。

[0050] 在最初的ASO活性筛选中SEQ ID NOs. 39和40显示出是高度有效的CTGF表达抑制剂 (在此有数据显示)。为了进一步考察在CTGF mRNA上的这片区域是否代表一个以ASOs为目标的“热点”, 又设计了另一个ASO序列 (SEQ ID NO166), 它被设计成与被SEQ NOs 39和40作为目标的那些序列的上游序列杂交。也发现该ASO (SEQ ID NO166) 是一个对CTGF mRNA表达的十分有效的抑制剂, 表明CTGF mRNA的这一段对于以ASO抑制剂为目标是个有吸引力的区域。

[0051] 在某个实施例中, 反义化合物与一部分的CTGF区域互补, 该区域为将靶位点从1396伸展至1424的活性寡核苷酸的靶标。这是一个作为ISIS 418899, 412295, 和412294 (分别为SEQ ID NOs:166, 40和39) 的靶标的序列空间。

[0052] 本发明还提供了一种化合物, 它包含一种修饰的寡核苷酸, 该寡核苷酸包含至少12个, 优选至少14个连接的核苷, 它的核碱基序列是提出在SEQ ID NO:28, 30, 39, 40, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 56, 78, 125和166之一中的一部分。

[0053] 在此描述的反义化合物可以包含一个具有12至30, 12至20, 优选14至20个连接的核苷的寡核苷酸。

[0054] 在本发明的一个实施例中, 该修饰的寡核苷酸是单链或双链的寡核苷酸。

[0055] 本发明采用寡聚化合物, 特别是反义寡核苷酸, 用以调节核酸分子编码结缔组织生长因子的功能, 最终调节结缔组织生长因子产生的数量。这是通过提供专一地与一个或多个编码结缔组织生长因子的核酸杂交的反义化合物来实现的。在此所使用的术语“靶核酸”和“编码结缔组织生长因子的核酸”包含编码结缔组织生长因子的DNA, 由这样的DNA转录的RNA (包括pre-mRNA和mRNA), 以及从这样的RNA中衍生出来的cDNA。一种寡聚化合物与其靶核酸特定的杂交干扰了该核酸的正常功能。这种通过化合物专一地与靶核酸杂交来调节靶核酸功能的方法通常称之为“反义”。被干扰的DNA功能包括复制和转录。被干扰的RNA功能包括所有维持生命所必需的功能, 像, 例如, RNA移位到蛋白质翻译的位点上, 由RNA翻译蛋白质, 剪接RNA以生成一个或多个mRNA种类, 以及可能是RNA参与的或促进的催化活性。这种干扰靶核酸功能的总效果是调节结缔组织生长因子的表达。在本发明的内容中, “调节”意味着基因表达的升高 (促进) 或者降低 (抑制)。在本发明的内容中, 抑制是调节基因表达的优选方式, mRNA是优选的靶标。

[0056] 靶核酸,靶区域和核苷酸序列

[0057] 优选将特定的核酸作为反义的目标。在本发明的内容中,将反义化合物“靶向”到一种特定的核酸上是一个具有多步的过程。

[0058] 可以理解的是,包含在实施例中的每个SEQ ID NO中提出出来的序列与对糖组成部分,核苷间的连接,或者核碱基的任何修饰无关。同样地,由一个SEQ ID NO确定的反义化合物可以独立地包含一处或多处对糖组成部分,核苷间的连接,或者核碱基的修饰。由Isis号码(Isis No)描述的反义化合物表示了核碱基和模体(motif)的一种结合。

[0059] 在一个实施例中,靶区域是核酸结构上定义出来的。例如,一个靶区域可以包含一个3' UTR,一个5' UTR,一个外显子,一个内含子,一个编码区域,一个翻译起始区域,一个翻译终止区域,或者其他的被定义的核酸区域。核酸结构上定义出的区域通过由序列数据库如NCBI给出的登录编号获得,那些信息在此被引为参考纳入。在一个实施例中,靶区域可包含这样的序列,该序列从靶区域内的一个靶片段的5'靶点至靶区域内的另一个靶片段的3'靶点。

[0060] 靶标包括确定至少一个与反应化合物杂交的靶片段,这样能产生合乎理想的效果。在特定的实施例中,该合乎理想的效果是减低mRNA靶核酸的水平。在其他的实施例中,该合乎理想的效果是由靶核酸编码的蛋白质的水平或者是与靶核酸相关联的表型变化。

[0061] 靶区域可包含一个或者多个靶片段。靶区域内的多个靶片段可以是重叠的。或者,它们也可以是不重叠的。在一个实施例中,在一个靶区域中的靶片段被不超过约300个核苷隔开。在另外的实施例中,在一个靶区域中的靶片段被靶核酸上的不多于约250,200,150,100,90,80,70,60,50,40,30,20或10个核苷隔开。在另一个实施例中,在一个靶区域中的靶片段被靶核酸上的不多于约5个核苷隔开。在别的实施中,靶片段是邻接的。

[0062] 合适的靶片段可以在一个5' UTR,一个编码区,一个3' UTR,一个内含子,或者一个外显子内发现。包含一个开始密码子或者一个终止密码子的靶片段也是合适的靶片段。合适的靶片段可以特异地排除某些结构上定义的区域,像开始密码子或者终止密码子。

[0063] 合适靶片段的确定可以包括将靶核酸的序列在整个基因组中与其他序列相比较。例如,BLAST算法可以用于识别在不同核酸中具有相似性的区域。这种比较能防止选择的反义化合物序列会以非特异的方式与一个不是选出来的靶核酸(即,非靶序列或偏离的靶序列)杂交。

[0064] 在一个活性的靶区域内,反义化合物的活性(例如被定义为靶核酸水平降低的百分数)可以是有变化的。在一个实施例中,CTGF mRNA水平的下降表现出对CTGF表达的抑制。CTGF蛋白水平的下降也表现出对靶mRNA表达的抑制。还有,表型变化是抑制CTGF表达的征兆。例如,CTGF测量值的增加是抑制CTGF表达的征兆。

[0065] 详细地说,靶标过程通常从识别一个其功能要被调节的核酸序列开始。例如,这可以是一个细胞基因(或者从该基因转录的mRNA),它的表达与一种特殊的失调或病症相联系,或者可以是来自传染试剂(infectious agent)的一个核酸分子。在本发明中,靶是一种编码结缔组织生长因子的核酸。靶标过程还包括确定该基因内发生反义相互作用的一个或多个位点,这样来得到理想的结果,例如,蛋白质表达的认识和调节。在本发明的内容之中,优选的基因内的位点是包含该基因的开放阅读框架(open reading frame,ORF)的翻译起始密码子或翻译终止密码子的区域。如业内所知晓的那样,因为典型的翻译起始密码子是

5' -AUG (在转录的mRNA分子中;5' -ATG在相应的DNA分子中),所以,翻译起始密码子也称之为“AUG密码子”,“开始密码子”或者“AUG开始密码子”。少数的基因的翻译起始密码子具有RNA序列5' -GUG,5' -UUG或5' -CUG,而且5' -AUA,5' -ACG,和5' -CUG,已显示出在体内起作用。因而,术语“翻译起始密码子”和“开始密码子”可包含许多的密码子序列,尽管在每种情况下的启动氨基酸典型地是蛋氨酸(在真核生物中)或者甲酰蛋氨酸(formylmethionine)(在原核生物中)。业内也熟知真核生物和原核生物的基因可以具有两种或更多的可选的开始密码子,它们的任何一种可以优先用于在特定细胞类型或组织中,或者在一组特定的条件下的翻译起始。在本发明的内容中,“开始密码子”和“翻译起始密码子”指的是用在体内的,启动由编码结缔组织生长因子基因转录的mRNA分子的翻译,而不论这些密码子的序列。

[0066] 业内也知晓基因的翻译终止密码子(或“终止密码子”)可以具有三种序列中的一种,即5' -UAA,5' -UAG和5' -UGA(相应的DNA序列分别为5' -TAA,5' -TAG和5' -TGA)。术语“开始密码子区域”和“翻译起始密码子区域”指的是这样的mRNA或基因的一个部分,它包含从一个翻译起始密码子算起往任一方向(即,5' 或3')大约25个至大约50个连续的(contiguous)核苷酸。同样,术语“终止密码子区域”和“翻译终止密码子区域”指的是这样的mRNA或基因的一个部分,它包含从一个翻译终止密码子算起往任一方向(即,5' 或3')大约25个至大约50个连续的核苷酸。

[0067] 业内已知晓开放阅读框架(ORF)或者“编码区域”指的是翻译起始密码子与翻译终止密码子之间的区域,它也是个可以被有效定向的区域。其他的靶区域包括5' 未翻译的区域(5' -UTR),业内指的是从翻译起始密码子算起的mRNA沿着5' 方向上的一个部分,因而,它包括一个mRNA或者基因上相应核苷酸的5' -加帽位点(5' cap site)与翻译起始密码子之间的部分;以及3' 未翻译的区域(3' -UTR),业内指的是从翻译终止密码子算起的mRNA沿着3' 方向上的一个部分,因而,它包括一个mRNA或者基因上相应核苷酸的翻译终止密码子与3' 末端之间的部分。mRNA的5' 帽结构包含一个N7-甲基化的鸟嘌呤核苷残基,它通过一个5' -5' 的三磷酸盐(triphosphate)连接与mRNA的5' -most残基结合在一起。mRNA的5' 帽区域被认为是包括5' 帽结构本身以及紧接着该帽的最初50个核苷酸。5' 帽区域可能也是个优选的靶区域。

[0068] 虽然某些真核生物的mRNA转录物直接被翻译,许多含有一个或多个称之为“内含子”的区域,它们在转录物被翻译之前被切除。剩下的(因而被翻译了)区域被称之为“外显子”,被剪接在一起形成一个连续的mRNA序列。mRNA剪接位点,即内含子-外显子的接头也可能是优选的靶区域,当在与疾病相关的异常剪接或者一种特殊的mRNA剪接产物的生产过剩的情况下它们是特别有用处的。由于重排或缺失所造成的异常融合接头也是优选的靶。业已发现内含子也可能是有效的,因而是优选的适合于反义化合物靶向DNA或pre-mRNA的靶区域。

[0069] 业内也知晓从DNA的同一个基因组区域里可以产生出可替代的RNA转录物。这些可替代的转录物统称为“变异体”。更准确地说,“pre-mRNA变异体”产自同一基因组DNA的转录物,它与产自同一基因组DNA的其他转录物的不同之处在于,或者是它们的开始位置或者是它们的终止位置,以及它们含有内含子区域与外显子区域。

[0070] 剪接过程中去除一个或多个外显子或内含子区域或者它们的部分时,pre-mRNA变异体产生出较小的“mRNA变异体”。因此,mRNA变异体是被加工过的pre-mRNA变异体,作为剪

接的结果,每个独特的pre-mRNA变异体一定总是产生出一个独特的mRNA变异体。这些mRNA变异体也称之为“可替代剪接变异体”。如果不存在pre-mRNA变异体的剪接,则该pre-mRNA变异体与mRNA变异体一致。

[0071] 业内也知晓可以通过利用替代的信号来开始或终止转录以生产变异体,而且,pre-mRNA和mRNA可以具有多于一个的开始密码子或终止密码子。来自利用替代开始密码子的pre-mRNA或mRNA的生产处的变异体被称之为该pre-mRNA或mRNA的“替代开始变异体”。那些利用替代终止密码子的转录物被称之为该pre-mRNA或mRNA的“替代终止变异体”。替代终止变异体的一个特殊类型是“多聚腺苷酸变异体”(polyA variant),其中的许多个所产生的转录物是由转录机构替代选择了“polyA 终止信号”的一个信号所引起的,从而生产出在独特的polyA 位点上终止的转录物。

[0072] 反义化合物一般被用作研究试剂和诊断学。例如,反义寡核苷酸能以敏锐的特异性来抑制基因的表达,常被业内人士用于解释特殊基因的功能。反义化合物也被用于,例如区分生物途径中各个成员的功能。因此,反义调整已经被拿来作研究之用。

[0073] 当用于试验盒和诊断学时,本发明的反义化合物既可以单独也可以结合其他的反义化合物或疗法,用作差异和/或组合分析的工具来解释在细胞和组织中表达的基因的一部分或整个补体的表达模式。

[0074] 将在用一种或多种反义化合物处理过的细胞或组织内的表达模式与未经反义化合物处理的对照的细胞或组织进行比较,产生的模式被用于分析它们的基因表达的差异水平是属于,例如,与疾病有关,信号传输途径,细胞定位,表达水平,所检验的基因的大小,结构或功能。这些分析可以在受激的或未受激的细胞上进行,可以有或者没有影响表达模式的其他化合物存在下进行。

[0075] 业内知晓的基因表达分析方法的例子包括DNA阵列或微阵列(Brazma and Vilo, FES Lett., 2000, 480, 17-24; Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16), SAGA (serial analysis of gene expression) (基因表达的系列分析) (Madden, et al., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425), READS (restriction enzyme amplification of digested cDNAs) (消化的cDNAs的限制性酶扩增) (Prashar and Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72), TOGA (total gene expression analysis) (全基因表达分析) (Sutcliffe, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97, 1976-81), 蛋白质阵列和蛋白质组学 (protein arrays and proteomics) (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), 表达序列标记物 (expressed sequence tag) (EST) 测序 (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), 相减RNA指纹图谱 (subtractive RNA fingerprinting) (SuRF) (Fuchs, et al., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson, et al., Cytometry, 2000, 41, 203-208), 相减克隆 (subtractive cloning), 差异显示 (differential display) (DD) (Jurecic and Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21), 比较基因组杂交 (Carrerrrrrulli, et al., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96), FISH (fluorescent in situ hybridization) (荧光原位杂交) 技术 (Going and Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) 以及质谱方法 (reviewed in (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41))。

[0076] 反义化合物

[0077] 在本发明的内容中,术语“寡核苷酸”指的是核糖核酸(RNA)或者脱氧核糖核酸(DNA)或者它们的模拟物的一种寡聚物或聚合物。该术语包括由天然存在的核碱基,糖类和共价核苷间(骨架)键合组成的寡核苷酸,以及具有非天然存在的但功能类似的部分的寡核苷酸。相对于天然形式,由于具有合乎理想的性质,像增强的细胞摄入,与核酸靶之间增强的亲和力,以及核酸酶的存在下的稳定性提高,所以通常优选这种修饰的或取代的寡核苷酸。

[0078] 尽管反义寡核苷酸是反义化合物一种优选的形式,本发明还是包含了其他寡聚反义化合物,包括但不限于寡核苷酸模拟物。

[0079] 反义化合物指的是一种能与靶核酸通过氢键杂交的寡聚化合物。反义化合物包括但不限于寡核苷酸类,寡核苷类,寡核苷酸类似物,寡核苷酸模拟物,反义寡核苷酸类,siRNA, RNAi,核糖酶类(ribozymes),外部指导序列(external guide sequence, EGS)寡核苷酸类(oligozymes),和其他与靶核酸杂交并调控其表达的寡核苷酸类。

[0080] 在某些实施例中,反义化合物具有一种核碱基序列,当在5'至3'的方向上书写时,它包含它被靶向的靶核酸的靶片段的反向补体(reverse complement)。在某些这样的实施例中,反义寡核苷酸具有一种核碱基序列,当在5'至3'的方向上书写时,它包含它被靶向的靶核酸的靶片段的反向补体。

[0081] 在某些实施例中,靶向一种核酸的反义化合物的长度为12-30个亚单位。换言之,反义化合物是从12个至30个连接的亚单位。在其他的实施例中,反义化合物是8-80个,12-50个,15-30个,18-24个,19-22个,或者20个连接的亚单位。在某些这样的实施例中,反义化合物的长度是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,或80个连接的亚单位,或者是由任何两个上述数值定义的范围。在某些实施例中,反义化合物是一种反义寡核苷酸,连接的亚单位是核苷酸。

[0082] 在本发明一个优选的实施例中,该化合物包含20个或者至少14个连接的核苷,其特征在于,修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NOs:28,30,39,40,45,52,56,78,125和166中的所提出的一个序列100%一致。在另一个优选的实施例中,感兴趣的先导化合物具有SEQ ID NO:39中提出的序列(ISIS 412294)。

[0083] 在某些实施例中,一种靶向一种核酸的截短的(shortened)或缺失的(truncated)反义化合物具有一个亚单位从5'端缺失(5' truncation),或者就是从3'端缺失(3' truncation)。一种靶向一种核酸的截短的或缺失的化合物可以有两个亚单位从该反义化合物的5'端,或者有两个亚单位从该反义化合物的从3'端缺失。或者,该缺失的核苷可以分散在整个反义化合物中,例如,在一个反义化合物中,它有一个核苷从5'端缺失,一个核苷从3'端缺失。

[0084] 当一个伸长的反义化合物中存在有一个另外的亚单位时,该另外的亚单位可以位于该反义化合物的5'端或者3'端。当有两个或更多另外的亚单位存在时,增加的亚单位可以相互邻接,例如,在一种有两个加在该反义化合物的5'端上的亚单位(5'加成),或者加在3'端上的亚单位(3'加成)的反义化合物中。或者,该增加的亚单位可以分散在整个反义化

合物中,例如,在一个反义化合物中,它有一个核苷加到5'端上,一个核苷加到3'端上。

[0085] 有可能增加或减少像寡核苷酸那样反义化合物的长度,和/或引入错配(mismatch)碱基而不消除活性。例如,Woolf等(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7305-7309,1992)测试了一系列长度为13-25个核碱基的反义寡核苷酸在注射卵母细胞的模式中诱导一种靶RNA切割的能力。长度为25个核碱基,且在靠近该反义寡核苷酸端点处有8或11个错配的反义寡核苷酸,其能够引导靶mRNA的特异切割,虽然要比不含有错配的反义寡核苷酸的程度低。类似地,采用有13个核碱基的反义寡核苷酸,包括那些有1个或3个错配的反义寡核苷酸,实现了靶向特异切割。

[0086] Gautschi等(J.Natl.Cancer Inst.93:463-471, March 2001)证实了一种寡核苷酸在体外和体内降低bcl-2和bcl-xL表达的的能力,该寡核苷酸100%与该bcl-2mRNA互补,并且对bcl-xL mRNA有3个错配。更进一步,证实了这种寡核苷酸在体内具有强有力的抗癌活性。

[0087] Maher和Dolnick(Nuc.Acid.Res.16:3341-3358,1988)分别试验了一系列串联14个核碱基的反义寡核苷酸,以及有28个和42个核碱基的反义寡核苷酸,后两种反义寡核苷酸由2个或3个该串联反义寡核苷酸的序列组成,用以试验它们阻止人类DHPF在兔网织红细胞试验中转录的能力。这三种14个核碱基反义寡核苷酸中的任意一种单独就能抑制转录,虽然要比28个或42个核碱基的反义寡核苷酸的水平更加适度。

[0088] Bhanot等(PCT/US2007/068401)提供了短反义化合物,包括哪些包含化学修饰的高亲和力单体,其有8-16个单体的化合物。这些短反义化合物显示出可用于减少细胞,组织和动物的靶核酸和/或蛋白,提高了效力,改善了治疗指数。短反义化合物在比上述的那些反义化合物剂量低时就有效果,可以降低毒性和治疗成本。此外,所述的短反义化合物有更大的潜力作为口服药剂。

[0089] 杂交

[0090] 一旦一个或多个靶位点被识别,就会选择与靶足够互补的寡核苷酸,即足够好,足够特异地与靶杂交,以获得理想的效果。

[0091] 在本发明的内容中,“杂交”意指氢键,它们可以是互补核苷或核苷酸碱基之间的Watson-Crick, Hoogsteen或者反向Hoogsteen氢键。例如,腺嘌呤与胸腺嘧啶是互补核碱基,它们通过形成氢键来配对。

[0092] 在某些实施例中,杂交发生在此披露的一种反义化合物与一种核酸之间。杂交最常见的机理涉及核酸分子的互补核碱基之间的氢键。

[0093] 杂交过程可以在各不相同的条件下发生。严格的条件是序列依赖性的,它们是由要杂交的核酸分子的性质和组成来决定的。

[0094] 确定一个序列对于一种靶核酸是否能特异地杂交的方法是业内所熟知的。在一个实施例中,在此提供的一种反义化合物与一种核酸是能特异地杂交的。

[0095] 互补

[0096] 在此说的“互补”指的是两个核苷酸之间精确配对的能力。例如,在寡核苷酸的某一个位置上的核苷酸能与一种DNA或RNA分子同样位置上的核苷酸形成氢键,则该寡核苷酸与DNA或RNA被认为在那个位置上是互补的。当在每个分子中有足够数量的位置被能相互形成氢键的核苷酸占据时,该寡核苷酸与DNA或者RNA是互补的。因而,“特异地可杂交的”和

“互补”是用以表明互补性或者精确配对充分程度的术语,以致于在寡核苷酸与DNA或者RNA靶之间产生稳定,特异的氢键。业内懂得反义化合物的序列不必100%与其特异地可杂交的靶核酸的序列互补。当该化合物结合到靶DNA或RNA分子上去时,干扰了该靶DNA或RNA分子的正常功能,造成失去了效用,并且有充分程度的互补以避免该反义化合物与非靶序列之间在希望有特异结合的条件下,即在体内试验或者治疗处理中的生理条件下,以及在体外的试验中的试验条件下有非特异的结合,则一种反义化合物是特异地可杂交的。

[0097] 本发明的与靶杂交并抑制该靶表达的反义和其他化合物是通过实验来识别的,在下文中这些化合物的序列作为本发明的优选实施例被识别。与这些优选的序列互补的靶位点在下文中被称之为“活性位点”,因此,它们是优选的靶向位点。所以,本发明的另一个实施例包含与这些活性位点杂交的化合物。

[0098] 当反义化合物有足够数量的核碱基能与靶核酸相应的核碱基形成氢键,这样就产生了合乎理想的效果(例如,反义抑制一种像CTGF那样的核酸的靶核酸),则一种反义化合物与一种靶核酸是互补的。

[0099] 在一种反义化合物与一种CTGF核酸之间的非互补的核碱基可以被容许,只要该反义化合物保持能与靶核酸特异地杂交。另外,反义化合物可以越过CTGF核酸的一个或多个片段来进行杂交,这样一来,介于中间的或邻接的片段就不会参与到杂交过程中(例如,一种环结构,错配或者发夹结构)。

[0100] 在一个实施例中,在此提供的反义化合物至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,或至少99%与一种CTGF核酸互补。可以采用常规方法来确定一种反义化合物与一种靶核酸互补的百分程度。

[0101] 例如,一种反义化合物有20个核碱基,其中的18个与一种靶核酸互补,因而,它将会特异地杂交,将会代表了90%的互补度。在该实施例中,剩下的非互补的碱基可以被群集成簇或者与互补的核碱基散布开来,不必相互邻接或者与互补的核碱基邻接。同样地,一种其长度为18个核碱基的反义化合物有4个非互补的核碱基,这4个非互补的核碱基与两个完全与靶核酸互补的区域侧面相接,该反义化合物应当会有77.8%总的互补度,因而位于本发明的范围之内。一种反义化合物与靶核酸的一个区域的百分互补度的确定可以例行采用业内知晓的BLAST程序(basic local alignment search tools)和PowerBLAST程序(Altschul et al., J.Mol.Biol.1990,215,403-410;Zhang and Madden,Genome Res., 1997,7,649-656)。百分同源性,序列一致性或互补度可以通过例如,Gap程序(Wisconsin序列分析软件包,Version 8for Unix,Genetics Computer Group,University Research Park, Madison Wis.),采用默认设置来确定,它是利用Smith和Waterman算法(Adv.Appl.Maath.,1981,2,482-489)。

[0102] 在其他的实施例中,在此提供的反义化合物与靶核酸完全互补(即100%互补)。例如,反义化合物可以完全与CTGF核酸互补,或者是它的一个靶部分,或者一个靶片段或靶序列互补。在此所说的“完全互补”指的是反义化合物的每个核碱基能与靶核酸相应的核碱基精确碱基配对。

[0103] 非互补的核碱基可以位于反义化合物的5'端或3'端。或者,非互补的一个或多个核碱基可以位于反义化合物里边的位置。当有两个或更多个非互补的核碱基存在时,他们可以邻接(即连接的)或者不邻接的。在一个实施例中,一个非互补的核碱基位于gapmer反

义寡核苷酸的翼段。

[0104] 在一个实施例中,长度达20个核碱基的反义化合物包含不多于4个,不多于3个,不多于2个,不多于1个的相对于如CTGF核酸那样的靶核酸的非互补核碱基。

[0105] 在另外一个实施例中,长度达30个核碱基的反义化合物包含不多于6个,不多于5个,不多于4个,不多于3个,不多于2个,不多于1个的相对于如CTGF核酸那样的靶核酸的非互补核碱基。

[0106] 在此提供的反义化合物也包括那些与靶核酸的一部分互补的反义化合物。在此所说的“部分”指的是在靶核酸的一个区域或片段内规定数量的邻接的(即连接的)核碱基。一个“部分”也可以指一种反义化合物的定义数量的邻接核碱基。在一个实施例中,该反义化合物与靶片段的一个至少有8个核碱基的部分互补。在另外一个实施例中,该反义化合物与靶片段的一个至少有12个核碱基的部分互补。在还有一个实施例中,该反义化合物与靶片段的一个至少有15个核碱基的部分互补。还注视到那些反义化合物,其与靶片段的一个至少有9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20个或更多个核碱基的部分,或者由任意两个这些数值所规定的范围互补。

[0107] 一致性

[0108] 在此提供的反义化合物也可以有一个明确表示的对于一个特定核苷酸序列,SEQ ID NO,或者用一个特定Isis号码代表的化合物的百分一致性。如果一种反义化合物具有同样的核碱基配对能力,在在此就说它与在此披露的系列一致。例如,一种RNA含有尿嘧啶代替了披露出的DNA序列中的胸腺嘧啶脱氧核苷,该RNA则应该被认为与该DNA序列一致,因为尿嘧啶和胸腺嘧啶脱氧核苷都与腺嘌呤配对。也注视到在此描述的反义化合物截短的或伸长的版本,以及具有与在此提供的反义化合物不一致的碱基的化合物。不一致的碱基可以互相邻接或者分散在整个反义化合物中。反义化合物的百分一致性是按照具有的同一种碱基配对的碱基数目相对于与之相比较的序列来计算。

[0109] 在一个实施例中,反义化合物至少70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%与在此披露的一个或更多个反义化合物,或者SEQ ID NOs,或者它们得一个部分一致。

[0110] 修饰

[0111] 在本发明的某实施例中,对于反义化合物的修饰包含取代或者对核苷之间的连接,糖组成部分,或核碱基的改变。

[0112] 在本发明的一个实施例中,该化合物包含至少一项修饰,该修饰选自修饰的核苷间连接,修饰的糖,和修饰的核碱基组成的一组。

[0113] 虽然可以采用含有各种各样修饰核苷间连接的反义寡核苷酸,目前优选的修饰核苷间连接是一种在一个或多个核苷之间的硫代磷酸酯(phosphothioate)连接,或者,其中所有的核苷间连接都是硫代磷酸酯核苷间连接。一般地,也优选含有至少一个,而且典型地多于一个的修饰糖的反义寡核苷酸,其特征在于该糖是一种二环糖。尽管可以采用各种各样的修饰糖,现在还是优选采用2'-O-甲氧基乙基糖。

[0114] 更进一步,包含在反义寡核苷酸中的至少一个,而且典型地多于一个的核碱基将是一种修饰的核苷酸,像5-甲基胞嘧啶。

[0115] 核苷是一种碱-糖的结合物。核苷的核碱基(也称之为碱基)部分通常是一个杂环

碱基组成部分。核苷酸是进一步还包括一个共价地键合在核苷的糖的部分的磷酸酯基的核苷。对于那些包括五元呋喃(pentofuranosyl)糖的核苷,该磷酸酯基可以连接在该糖的2', 3' 或5'-位羟基组成部分上。寡核苷酸是通过相邻核苷互相共价连接以形成线性多聚的寡核苷酸来形成的。在寡核苷酸结构内,磷酸酯基通常被称之为形成了寡核苷酸的核苷间的连接。

[0116] 对反义化合物的修饰包含取代或者改变核苷之间的连接,糖组成部分,或核碱基。经过修饰的反义化合物往往优于原来的形态,这是因为具有合乎理想的性质,像增强的细胞摄入,与核酸靶之间增强的亲和力,以及核酸酶(nucleases)的存在下的稳定性提高,或者抑制活性的提高。

[0117] 也可以采用化学修饰核苷来提高截短的或缺失的反义寡核苷酸对于其靶核酸的结合亲和力。因此,经常能获得具有那样的化学修饰核苷的较短的反义化合物的可比较的结果。

[0118] 修饰的核苷酸间连接

[0119] 天然存在的RNA和DNA的核苷间连接是一种3'到5'的磷酸二酯键。通常选择具有一个或多个经修饰的,即非天然存在的核苷间连接的反义化合物,而非选择具有天然存在的核苷间连接的反义化合物,这是由于其合乎理想的性质,像增强的细胞摄入,与核酸靶之间增强的亲和力,以及核酸酶的存在下的稳定性提高。

[0120] 具有修饰的核苷间连接的寡核苷酸包括保留一个磷原子的核苷间连接以及没有一个磷原子的核苷间连接。有代表性的含磷核苷间连接包括,但不限于磷酸二酯,磷酸三酯,甲基磷酸酯(methylphosphonates),氨基磷酸酯(phosphoramidate),和硫代磷酸酯。制备含磷和不含磷的连接的方法是大家熟知的。

[0121] 在一个实施例中,靶向CTGF核酸的反义化合物包含一个或多个修饰核苷间连接。在一些实施例中,修饰核苷间连接是硫代磷酸酯键。在其他实施例中,反义化合物的每个核苷间连接是硫代磷酸酯键。

[0122] 如业内所知,核苷是一种碱-糖的结合物。核苷的碱基部分通常是一个杂环碱基。两类最普通的这样的杂环碱基是嘌呤类和嘧啶类。核苷酸是进一步还包括一个共价地键合在核苷的糖的部分的磷酸酯基的核苷。对于那些包括五元呋喃糖的核苷,该磷酸酯基可以键合在该糖的2', 3' 或5'-位羟基组成部分上。在形成寡核苷酸时,磷酸酯基通过相邻核苷互相共价连接以形成一种线型聚合物。随后,该线型聚合物结构的各端可以连接起来形成一种环状结构,但是,一般优选开放的线型结构。在寡核苷酸结构内,该磷酸酯基常被称之为形成了寡核苷酸的核苷间的骨架。RNA和DNA正常的连接或骨架是一种3'到5'的磷酸二酯键。

[0123] 可用于本发明的优选的反义化合物的特别的例子包括包含有修饰骨架或非天然核苷间连接的寡核苷酸。如在本说明书中所定义,具有修饰骨架的寡核苷酸包括那些骨架中保留有一个磷原子以及骨架中没有一个磷原子的骨架。为了本说明书的目的,以及有时业内所参考,在其核苷间骨架中没有一个磷原子的修饰的寡核苷酸也被认为是寡核苷。

[0124] 优选的修饰寡核苷酸骨架包括但不限于,例如硫代磷酸酯类,手性硫代磷酸酯类,二硫代磷酸酯类,磷酸三酯类,氨基烷基磷酸三酯类(aminoalkylphosphotriesters),磷酸甲酯和其他的烷基酯类,包括3'-亚烷基(alkylene)磷酸酯类,5'-亚烷基磷酸酯类和手性磷

酸酯类,次磷酸酯类(phosphinates),氨基磷酸酯类,包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯类(aminoalkylphosphoramidates),硫羰氨基磷酸酯类(thiono-phosphoramidates),硫羰磷酸烷基酯类(thionoalkylphosphonates),硫羰磷酸烷基三酯类(thionoalkylphospho-triesters),硒代磷酸酯类(selenophosphates)和硼代磷酸酯类(boranophosphates),上述这些酯类具有正常3'-5'连接,这些化合物的2'-5'结合类似物,以及那些具有反转极性的化合物,其特征在于,一个或多个连接是3'-3',5'-5'或者2'-2'连接。优选的具有反转极性的寡核苷酸在3'-most核苷酸间的连接上包含单一的3'-3'连接,即一个单一的反转核苷残基,它可能是脱碱基的(核碱基丢失或者用一个羟基来替代)。各种各样的盐类,混合的盐类和游离酸形式也都包括在其中。

[0125] 讲授上述含磷连接制备方法的有代表性的美国专利包括但不限于,U.S.Pat.Nos:3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,194,599;5,565,555;5,527,899;5,721,218;5,672,697和5,625,050,它们中的某一些本发明所共同,这些专利每篇都被结合于此作为参考。

[0126] 优选的其中不含磷原子的修饰寡核苷酸骨架具有由短链烷基或者环烷基核苷间连接,混合的杂原子和烷基或环烷基的核苷间连接,或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷连接构成的骨架。这些还包括那些具有吗啉代连接(部分地是由核苷的糖部分形成的);硅氧烷骨架(siloxane);硫化物(sulfide),亚砷(sulfoxide)和砷(sulfone)骨架;formacetyl和thioformacetyl骨架;亚甲基(methylene)formacetyl和thioformacetyl骨架;riboacetyl骨架;含烯的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;及其他具有混合的N,O,S和 CH_2 成分部分的骨架。

[0127] 讲授上述寡核苷制备方法的有代表性的美国专利包括但不限于,U.S.Pat.Nos:5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;5,792,608;5,646,269;和5,677,439,它们中的某一些本发明所共有,每个这些专利都被结合于此作为参考。

[0128] 在其他的优选寡核苷酸模拟物中,核苷酸单位的糖和核苷间连接,即骨架,都用新颖的基团替代掉。碱基单位保持下来与合适的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物,一种已经显示出具有优异的杂交性能的寡核苷酸模拟物被称之为肽核酸(peptide nucleic acid,PNA)。在PNA化合物中,寡核苷酸的糖骨架被一个含酰胺的骨架,特别是,被一个氨乙基甘氨酸(aminoethylglycine)骨架所替代。核碱基被保留下来,并直接或间接地与骨架酰胺部分的氮杂氮原子(aza nitrogen atoms)相连。讲授PNA化合物制备方法的有代表性的美国专利包括但不限于,U.S.Pat.Nos:5,539,082;5,714,331;和5,719,262,这些专利每篇都被结合于此作为参考。还可以在Nielsen et al.,Science,1991,254,1497-1500中找到关于PNA化合物的讲授。

[0129] 大多数本发明优选的实施例是具有硫代磷酸酯骨架的寡核苷酸类和具有杂原子骨架的寡核苷类,特别是,上述参考的美国专利U.S.Pat.No.5,489,677的 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$,

CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-[称之为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-和-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-[其中,原本的磷酸酯骨架被表示为-O-P-O-CH₂-],以及上述参考的美国专利U.S.Pat.No.5,602,240的酰胺骨架。还优选的是上述参考的美国专利U.S.Pat.No.5,034,506的具有吗啉代骨架结构的寡核苷酸类。

[0130] 修饰糖组成部分

[0131] 修饰寡核苷酸类也可以含有一个或多个取代的糖组成部分。例如,呋喃糖(furanosyl sugar)环可以利用多种方法来修饰,包括用取代基来取代,桥联以形成一种二环核酸“BNA”(bicyclic nucleic acid),以及如颁授给Seth等的美国专利U.S.Pat.No.:7,399,845中描述的,并全部被结合于此作为参考的,利用像S或N(R)那样的杂原子来取代4'-O。其他关于BNA的例子可见国际专利申请号W0 2007/146511的出版物,全部被结合于此作为参考。

[0132] 本发明的反义化合物可选地可以含有一个或多个具有修饰糖组成部分的核苷酸。糖修饰可以赋予反义化合物核酸酶稳定性,结合亲和力或者一些其他有益的生物特性。核苷的呋喃糖环可以利用多种方法来修饰,包括单不限于:加入一个取代基,特别是在2'位置上;桥接两个不成对(non-geminal)环的原子以形成一种二环核酸(BNA);利用一个原子或者像-S-, -N(R)-或-C(R₁)(R₂)那样的基团来取代环上4'位置的O。修饰糖包括但不限于:取代糖,尤其是具有2'-F, 2'-OCH₂(2'-OMe)或者2'-O(CH₂)₂-OCH₃(2'-O-甲氧基乙基或2'-MOE)取代基的2'-取代糖;以及具有4'-(CH₂)_n-O-2'桥接的二环糖类(BNAs),其中n=1或n=2。制备修饰糖的方法是业内人士所熟知的。

[0133] 在某些实施例中,2'-修饰核苷具有一个二环糖组成部分。在某些这样的实施例中,该二环糖组成部分是一种α-D-糖。在某些这样的实施例中,该二环糖组成部分是一种β-D-糖。在某些这样的实施例中,该二环糖组成部分是一种α-L-糖。在某些这样的实施例中,该二环糖组成部分是一种β-L-糖。

[0134] 在某些这样的实施例中,该二环糖组成部分包含在2'-C原子与4'-C原子间的桥接基团。在某些这样的实施例中,该桥接基团包含从1至8个连接的双自由基(biradical)基团。在某些实施例中,该桥接基团包含从1至4个连接的双自由基基团。在某些实施例中,该桥接基团包含2个或3个连接的双自由基基团。在某些实施例中,该桥接基团包含2个连接的双自由基基团。在某些实施例中,一个连接的双自由基基团选自-O-, -S-, -N(R₁)-, -C(R₁)(R₂)-, -C(R₁)=C(R₁)-, -C(R₁)=N-, -C(=NR₁)-, -Si(R₁)(R₂)-, -S(=O)₂-, -S(=O)-, -C(=O)-和-C(=S)-;式中,每个R₁和R₂是独立的,H,羟基,C₁-C₁₂烷基,取代的C₁-C₁₂烷基,C₂-C₁₂链烯基,取代的C₂-C₁₂链烯基,C₂-C₁₂炔基,取代的C₂-C₁₂炔基,C₅-C₂₀芳基,取代的C₅-C₂₀芳基,杂环自由基(radical),取代的杂环自由基,杂芳基(heteroaryl),取代的杂芳基,C₅-C₇脂环自由基,取代的C₅-C₇脂环自由基,卤素,取代的氧代(-O-),氨基,取代的氨基,叠氮基(azido),羧基,取代的羧基,酰基,取代的酰基,CN,硫羟(thiol),取代的硫羟,磺酰基(S(=O)₂-H),取代的磺酰基,砒基(sulfonyl)(S(=O)-H)或取代的砒基(S(=O)-H);而且,每个取代基各自独立的是卤素,C₁-C₁₂烷基,取代的C₁-C₁₂烷基,C₂-C₁₂链烯基,取代的C₂-C₁₂链烯基,C₂-C₁₂炔基,取代的C₂-C₁₂炔基,氨基,取代的氨基,酰基,取代的酰基,C₁-C₁₂氨烷基,C₁-C₁₂氨代烷氧基,取代的C₁-C₁₂氨烷基,取代的C₁-C₁₂氨代烷氧基或者一种保护基团。

[0135] 在某些实施例中,该二环糖组成部分利用一个双自由基基团被桥接在2'与4'位置

之间,该双自由基基团选自 $-O-(CH_2)_p-$, $-O-CH_2-$, $-O-CH_2CH_2-$, $-O-CH(alkyl)-$, $-NH-(CH_2)_p-$, $-N(alkyl)-(CH_2)_p-$, $-O-CH(alkyl)-$, $-(CH(alkyl))-(CH_2)_p-$, $-NH-O-(CH_2)_p-$, $N(alkyl)-O-(CH_2)_p-$,或者 $-O-N(alkyl)-(CH_2)_p-$,式中的 p 为1,2,3,4或者5,每个烷基(alkyl)还可以被进一步取代。在某些实施例中, p 为1,2或者3。

[0136] 一方面,每个所说的桥接独立地是 $-[C(R_1)(R_2)]_n-$, $-[C(R_1)(R_2)]_n-O-$, $-C(R_1R_2)-N(R_1)-O-$ 或者 $-C(R_1R_2)-O-N(R_1)-$ 。另一方面,每个所说的桥接独立地是 $4'-(CH_2)_3-2'$, $4'-(CH_2)_2-2'$, $4'-CH_2-O-2'$, $4'-(CH_2)_2-O-2'$, $4'-CH_2-O-N(R_1)-2'$ 和 $4'-CH_2-N(R_1)-O-2'$,式中,每个 R_1 独立地是H,一种保护基团或者 C_1-C_{12} 烷基。

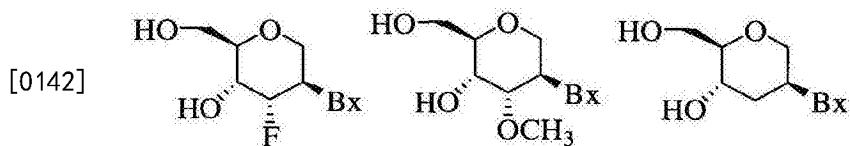
[0137] 在具有修饰糖组成部分的核苷酸中,核碱基组成部分(天然的,修饰的或者它们二者的结合)保持与合适的核酸靶杂交。

[0138] 在一个实施例中,靶向核酸的反义化合物包含一个或多个具有修饰糖组成部分的核苷酸。在一个优选的实施例中,修饰糖组成部分是 $2'$ -MOE。在另外一个实施例中,该 $2'$ -MOE修饰核苷酸被配置在一个gapmer模体中。

[0139] 目前优选的寡核苷酸在 $2'$ 位置上包含有以下基团之一种:OH;F;O-,S-,或N-烷基;O-,S-,或N-链烯基;O-,S-,或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,式中,烷基,链烯基和炔基可以是取代的或未取代的 C_1-C_{10} 烷基或者 C_2-C_{10} 链烯基和炔基。特别优选的是 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$,式中的 n 和 m 为从1至10左右。其他优选的寡核苷酸包含如下的在 $2'$ 位置上的基团之一种: C_1-C_5 低碳烷基,取代的低碳烷基,链烯基,炔基,烷芳基,芳烷基,0-烷芳基或者0-芳烷基,SH,SCH₃,OCN,Cl,Br,CN,CF₃,OCF₃,SOCH₃,SO₂CH₃,ONO₂,NO₂,N₃,NH₂,杂环烷基,杂环烷芳基,氨烷基氨基,多烷基氨基,取代的甲硅烷基,RNA切割基团,报道基团(reporter group),嵌入剂,改善寡核苷酸药物动力学性能的基团,或者改善寡核苷酸药效学性能的基团,以及其他具有相同性质的取代基团。一种优选的修饰包括 $2'$ -甲氧基乙氧基($2'-O-CH_2CH_2OCH_3$,也称为 $2'-O-(2-甲氧基乙基)$ 或者 $2'-MOE$) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504),即一种烷氧基烷氧基基团(alkoxyalkoxy)。还有一种修饰包括 $2'$ -二甲氨基氧乙氧基,即一个 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$,也称为 $2'-DMAOE$,以及 $2'$ -二甲氨基乙氧基乙氧基(业内也称之为 $2'-O-二甲氨基乙氧基乙基$,或者 $2'-DMAEOE$),即 $2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2)_2$ 。还有一个优选的修饰包括二环核酸(也称之为锁定的核酸类(locked nucleic acids, LNAs)),其中 $2'$ -羟基连接在糖环 $3'$ 或 $4'$ 的碳原子上形成一个双环的糖组成部分。键合优选桥接 $2'$ 氧原子与 $4'$ 碳原子的亚甲基($--CH_2--$) $_n$,其中 n 为1或2,包括 α -L-亚甲基氧(α -L-Methyleneoxy)($4'-CH_2-O-2'$)BNA, β -D-亚甲基氧($4'-CH_2-O-2'$)BNA和亚乙基氧(Ethyleneoxy)($4'-(CH_2)_2-O-2'$)BNA。二环修饰糖也包括(6'S)-6'甲基BNA,氨基氧(Aminoxy)($4'-CH_2-O-N(R)-2'$)BNA,氧氨基(Oxyamino)($4'-CH_2-N(R)-O-2'$)BNA,式中, R 独立地是H,一种保护基团,或者 C_1-C_{12} 烷基。LNAs也与互补的DNA,RNA或LNA以高的热亲和力形成双链体。圆二色性(Circular dichroism, CD)光谱显示涉及完全修饰的LNA(特别是LNA:RNA)的双链体在结构上类似一种A型的RNA:RNA双链体。对一种LNA:DNA双链体的核磁共振(Nuclear magnetic resonance, NMR)检验肯定了LNA单体的 $3'$ -内向($3'$ -endo)构象。双链DNA的识别也已经证实了假定的LNA链入侵。关于错配序列的研究显示LNAs遵循Watson-Crick碱基配对规则,与相应的未修饰的参照链相比,它的选择性一般较高。

[0140] LNA中的2'-羟基与糖环的4' 碳原子连接,形成2'-C,4'-C-氧亚甲基连接,如此形成了一个二环糖组成部分。反应应该连接可以是桥接2' 氧原子与4' 碳原子的亚甲基(-CH₂-)_n,其中n为1或2(Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456)。LNA和LNA类似物表现出非常高的与互补的DNA和RNA的双链体热稳定性(T_m=+3-+10°C),抗3'-外切核苷酸(3'-exonucleolytic)降解的稳定性以及良好的溶解性。其他优选桥接集团包括2'-脱氧-2'-CH₂OCH₂-4' 桥接。关于LNAs及其制备可见国际专利申请No. WO 98/39353和W099/14226的出版物。

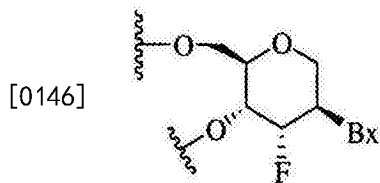
[0141] 其他优选的修饰包括2'-甲氧基(2'-O-CH₃), 2'-氨丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-烯丙基(2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-烯丙基(2'-O-CH₂-CH=CH₂)和2'-氟(2'-F)。2'-修饰可以在阿糖(arabino)(上边)位置或者在核糖(ribo)(下边)位置。优选的2'-阿糖修饰是2'-F。也可以在寡核苷酸的其他位置上进行类似的修饰,尤其是在3' 末端核苷酸上或者在2'-5' 连接的寡核苷酸中的糖的3' 位上,以及5' 末端核苷酸的5' 位置上。寡核苷酸也可以具有糖模拟物或者替代物(有时指的是DNA类似物),像环丁基组成部分来替代五元呋喃糖。讲授这样的修饰糖结构制备方法的有代表性的美国专利包括但不限于,U.S. Pat. Nos: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 和5,700,920,它们中的某一些为本申请所共有,每个这些专利都被结合于此作为参考。在某些实施例中,核苷的修饰是把核糖基环用替代物环系统,像吗啉代环,环己烯基环,环己基环或者四氢吡喃基环来代替,例如有如下结构式中的一种:



[0143] 业内也知晓许多其他的二环和三环的糖替代物环系统可以用于修饰核苷,以结合到反义化合物中去(见综述文章,例如:Leumann, Christian J.,)。这样的环系统可以经历各种各样另外的取代反应来增强其活性。

[0144] 在本发明的一个实施例中,该化合物包含至少一个四氢吡喃修饰核苷,其中,一个四氢吡喃环取代了呋喃糖环。

[0145] 在本发明的另一个实施例中,其中至少一个四氢吡喃修饰核苷的每一个具有结构:



[0147] 式中的Bx是一个可选的保护性杂环碱基组成部分。

[0148] 修饰核碱基

[0149] 寡核苷酸也可以包括核碱基(业内常简称之为“碱基”)修饰或取代。核碱基修饰物或者取代物与天然存在的或合成的未修饰核碱基在结构上是可以辨别的,虽然从功能上讲

是可以互换的。天然的和修饰的核碱基都能参与到氢键中。这样的核碱基修饰可以赋予反义化合物核酸酶稳定性,结合亲和力或者一些其他有益的生物学特性。修饰核碱基包括合成的和天然的核碱基,例如,像5-甲基胞嘧啶(5-me-C)。某些核碱基取代物,包括5-甲基胞嘧啶取代物,对于提高反义化合物与靶核酸的亲和力特别有效。例如,5-甲基胞嘧啶取代物,已经表现出提高了核酸双链体的稳定性0.6-1.2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)。

[0150] 其他的未修饰核碱基包括5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基及其他烷基的衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基及其他烷基的衍生物,2-硫尿嘧啶,2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶,5-丙炔基(-C≡C-CH₃)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物,6-偶氮(6-azo)尿嘧啶,胞嘧啶和胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶(pseudouracil)),4-硫尿嘧啶,8-卤代,8-氨基,8-硫羟,8-硫代烷基,8-羟基和其他的8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代,特别是5-溴,5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤,7-甲基腺嘌呤,2-F-腺嘌呤,2-氨基-腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤(8-azaguanine)和8-氮杂腺嘌呤(8-azaadenine),7-脱氮腺嘌呤(7-deazaguanine)和7-脱氮尿嘌呤(7-deazaadenine)以及3-脱氮腺嘌呤和3-脱氮尿嘌呤。

[0151] 杂环碱基组成部分也可以包括那些其中的嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环替代的组成部分,例如,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤核苷,2-氨基吡啶和2-吡啶酮(pyridone)。对于提高反义化合物的亲和力特别有效的核碱基包括5-取代的嘧啶,6-氮杂嘧啶以及N-2,N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨丙基腺嘌呤,5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。

[0152] 在一个实施例中,靶向CTGF核酸的反义化合物包含一个或多个修饰核碱基。在另外一个实施例中,靶向CTGF核酸的缺口放宽的(gap-widened)反义寡核苷酸包含一个或多个修饰的核碱基。在某些实施例中,修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。在还有的实施例中,每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0153] 如这里所说的,“未修饰的”或者“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T),胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括合成的和天然的核碱基,像5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基及其他烷基的衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基及其他烷基的衍生物,2-硫尿嘧啶,2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶,5-丙炔基(-C≡C-CH₃)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物,6-偶氮尿嘧啶,胞嘧啶和胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤代,8-氨基,8-硫羟,8-硫代烷基(thioalkyl),8-羟基和8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代,特别是5-溴,5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,2-F-腺嘌呤,2-氨基-腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。更多的修饰核碱基包括三环嘧啶类,像吩噻嗪(phenoxazine)胞嘧啶核苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮(1H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-one)),吩噻嗪(phenothiazine)胞嘧啶核苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮(1H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin-2(3H)-one)),G-夹类(G-clamps),像取代的吩噻嗪胞嘧啶核苷(例如9-(2-氨乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮(9-(2-

aminoethoxy)-H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-one), 咔唑(carbazol) 胞嘧啶(2H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-2-酮(2H-pyrimido[4,5-b]indol-2-one)), 吡啶并吡啶(pyridoindole) 胞嘧啶(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮(H-pyrido[3',2':4,5]pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-2-one))。修饰的核碱基类也可以包括那些其中的嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环替代的组成部分,例如,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,2-氨基吡啶和2-吡啶酮。更多的核碱基包括那些披露在美国专利U.S.Pat.No.3,687,808,那些披露在The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,pp 858-859, Kroschwitz,J.I.,ed.John Wiley&Sons,1990,那些披露在Englisch等人的Angewandte Chemie,International Edition,1991,30,613,以及那些披露在Sanghvi,Y.S.,Chapter 15,Antisense Research and Applications,pp 289-302,Crooke,S.T.and Lebleu,B.,eds.,CRC Press,Boca Raton,1993中的核碱基。

[0154] 这些核碱基中的某一些对于提高本发明的寡聚化合物的结合亲和力(binding affinity)是特别有效的。这些碱基包括5-取代的嘧啶,6-氮杂嘧啶以及N-2,N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤,5-丙炔基尿嘧啶和5-炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代物已经表现出提高了核酸双链体的稳定性0.6-1.2°C(Sanghvi,Y.S.,Crooke,S.T.and Lebleu,B.,eds.,Antisense Research and Applications,CRC Press,Boca Raton,1993,pp.276-278),是目前优选的碱基取代物,更具体地是与2'-O-甲氧基乙基糖的修饰物结合在一起时。

[0155] 讲授某些上述修饰核碱基以及其他修饰核碱基制备方法的有代表性的美国专利包括但不限于上述的U.S.Pat.No:3,687,808,以及U.S.Pat.Nos:4,845,205;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121,5,596,091;5,614,617;5,645,985;5,830,653;5,763,588;6,005,096;和5,681,941,这些专利中的某些为本申请所共有,每个这些专利都被结合于此作为参考,U.S.Pat.No:5,750,692的拥有者与本申请的拥有者相同,也被结合于此作为参考。

[0156] 反义化合物模体

[0157] 在本发明的某些实施例中,该化合物包含一种修饰寡核苷酸,它由以下所组成:(a)由连接的脱氧核苷组成的缺口(gap)片段,优选由13个连接的脱氧核苷组成;(b)由连接的修饰核苷组成的5'翼(wing)片段,优选由两个连接的修饰核苷组成;和(c)由连接的修饰核苷组成的3'翼片段,优选由五个连接的修饰核苷组成;其特征在于,该缺口片段位于该5'翼片段与3'翼片段之间,其特征在于,每个翼片段中的每个修饰核苷包含一个修饰糖,优选白2'-O-甲氧基乙基糖;以及其特在在于,每个核苷之间的连接是硫代磷酸酯连接。在反义化合物中修饰核苷的这些类型模式被称之为模体(motifs)。这些模体赋予反义化合物特性以增强抑制活性,提高与靶核酸结合的亲和力,或者增强抵抗在体内由于核酸酶造成的降解。

[0158] 在某些实施例中,靶向一个CTGF核酸的反义化合物具有修饰的亚单位,这些亚单位按照模式或者模体排列,以赋予反义化合物特性如增强抑制活性,提高与靶核酸结合的亲和力,或者抵抗在体内由于核酸酶造成的降解。

[0159] 嵌合反义化合物典型地含有至少一个区域,其被修饰,结果赋予了提高对核酸酶

降解的抵抗力,提高的细胞摄入,提高的对靶核酸的结合亲和力,和/或升高的抑制活性。嵌合反义化合物的第二个区域可选地可以作为一种细胞核酸内切酶RNase H的底物,它切割RNA:DNA双链体的RNA链。

[0160] 具有gapmer模体的反义化合物被认为是嵌合反义化合物。在gapmer中,一个具有多个支持RNase H切割的核苷的内部区域位于具有多个化学上与内部区域中的核苷不同的核苷的外部区域。在具有gapmer模体的反义化合物的情况下,缺口片段通常作为核酸内切酶切割的底物,而翼片段包含修饰核苷。在一个优选的实施例中,gapmer的各区域通过包含每个独特区域的糖组成部分的类型来加以区分。在一些实施例中用来区分gapmer各区域的糖组成部分的类型包括 β -D-核糖核苷, β -D-脱氧核糖核苷,2'-修饰核苷(这样的2'-修饰核苷尤其可以包括2'-MOE,和2'-O-CH₃,除其他的外),和二环糖修饰核苷(这样的二环糖修饰核苷可以包括那些具有4'-(CH₂)_n-O-2'桥接的,n=1或n=2)。优选地,每个独特的区域包含同样的糖组成部分。翼-缺口-翼模体常被描述为“X-Y-Z”,其中“X”表示5'翼区域的长度,“Y”表示缺口区域的长度,“Z”表示3'翼区域的长度。在此所描述的任意反义化合物可以具有gapmer模体。在某些实施例中,X和Z相同,在另一些实施例中,它们是不同的。在一个优选的实施例中,Y为8-15个核苷酸。X,Y或Z可以是1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,25,30任意一个数或更多个核苷酸。这样一来,本发明的gapmer包括,但不限于,例如2-13-5,5-10-5,4-8-4,4-12-3,4-12-4,3-14-3,2-16-2,1-18-1,3-10-3,2-10-2,1-10-1或者2-8-2。

[0161] 在某些实施例中,以一种“wingmer”模体的反义化合物具有翼-缺口或者缺口-翼构型,即如同上述gapmer构型的X-Y或Y-X构型。如此,本发明的wingmer构型包括,但不限于,例如5-10,8-4,4-12,12-4,3-14,16-2,18-1,10-3,2-10,1-10或8-2。

[0162] 在一个实施例中,靶向核酸的反义化合物具有5-10-5的gapmer构型。

[0163] 在某些实施例中,靶向核酸的一种反义化合物具有缺口放宽的模体。在另一个实施例中,靶向核酸的一种反义寡核苷酸具有缺口放宽的模体。

[0164] 在一个实施例中,一种靶向核酸的缺口放宽的反义寡核苷酸具有一个有14个2'-脱氧核糖核酸的缺口片段,它位于有3个化学修饰核苷的两个翼片段之间。在一个实施例中,化学修饰包含2'-糖修饰。在另一个实施例中,化学修饰包含2'-MOE糖修饰。

[0165] 具有gapmer模体的反义化合物被认为是“嵌合的”反义化合物或者“嵌合体”,它含有两个或多个化学的独特区域,每个至少由一个单体单位,即在寡核苷酸化合物的情况下是一个核苷酸,组成。这些寡核苷酸典型地含有至少一个修饰区域以赋予提高对核酸酶降解的抵抗力,细胞摄入的增加,与靶核酸结合亲和力的提高,和/或抑制活性的增加。在一个给定的化合物中无需所有的位置都要一致地被修饰,事实上,一个以上的上述修饰可以被结合进单一化合物中,或者甚至是寡核苷酸内部的单一核苷中。

[0166] 寡核苷酸的另外一个区域可以作为能切割RNA:DNA或者RNA:RNA杂交物的酶的底物。作为实施例,RNase H是一种细胞内切酶,它切割RNA:DNA双链体的RNA链。因此,RNase H的活化导致RNA靶的切割,从而大大地增强了寡核苷酸抑制基因表达的效率。因此,当嵌合寡核苷酸类被采用时,和与相同靶区域的杂交的硫代磷酸酯脱氧寡核苷酸类相比,采用较短的寡核苷酸常可得到可比较的结果。RNA靶的切割可以利用常规的凝胶电泳法来检测,需要时还可以结合业内知晓的核酸杂交技术。

[0167] 本发明的嵌合反义化合物可以被形成两个或多个寡核苷酸,修饰寡核苷酸,寡核苷和/或如上所述的寡核苷酸模拟物的组合结构。这样的化合物也已经被业内称之为杂交物或gapmer。讲授这样的杂交物结构制备方法的有代表性的美国专利包括但不限于U.S.Pat.Nos:5,013,830;5,149,797;5,220,007;5,256,775;5,366,878;5,403,711;5,491,133;5,565,350;5,623,065;5,652,355;5,652,356;和5,700,922,这些专利中的某些为本申请所共有,每个这些专利都被结合于此作为参考。

[0168] 当一种反义寡核苷酸具有gapmer模体时,该缺口片段通常是作为核酸内切酶切割的底物,而翼片段包含修饰核苷。在一个优选的实施例中,gapmer的各个区域通过包含每个独特区域的糖组成部分的类型来加以区分。用来区分gapmer各区域的糖组成部分的类型可以包括 β -D-核糖核苷, β -D-脱氧核糖核苷,2'-修饰核苷(这样的2'-修饰核苷可以包括2'-MOE),和二环糖修饰核苷。

[0169] 本发明寡核苷酸的另外一种修饰涉及在该寡核苷酸上化学地连接上一个或多个能增强该寡核苷酸的活性和细胞分布或细胞摄入的组成部分或共轭物。本发明的化合物可以包含共价地结合在像伯羟基或仲羟基那样的官能团上的共轭物基团。本发明中的共轭物基团包括嵌合剂,报道分子(reporter molecules),聚胺类,聚酰胺类,聚乙二醇类,聚醚类,提高寡聚物药效性能的基团,以及提高寡聚物药物动力学性能的基团。典型的结合物基团包括胆固醇类,类脂类,磷脂类,生物素,吩嗪(phenazine),叶酸酯(folate),菲啶(phenanthridine),蒽醌(anthraquinone),吡啶(acridine),荧光素类,若丹明类(rhodamines),香豆素类(coumarins),以及染料。在本发明的内容中,提高药效性能的基团包括增进寡聚物摄入,增强寡聚物抗降解能力和/或加强与RNA的序列特异性杂交。在本发明的内容中,提高药物动力学性能的基团包括改善寡聚物摄入,分布,代谢或分泌的基团。有代表性的共轭物基团披露在1992年10月23日提交的国际专利申请PCT/US92/09196中,披露的全部内容被纳入在此作为参考。共轭物部分包括但不限于像胆固醇那样的类脂部分(Letsinger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86,6553-6556),胆酸(Manoharan et al.,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4,1053-1060),硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醇(hexyl-S-tritylthiol)(Manoharan et al.,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660,306-309;Manoharan et al.,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1993,3,2765-2770),硫代胆固醇(thiocholesterol)(Oberhauser et al.,Nucl.Acids Res.,1992,20,533-538),脂肪族链,例如,十二烷二醇或十一烷残基(Saison-Behmoaras et al.,EMBO J.,1991,10,1111-1118;Kabanov et al.,FEBS Lett.,1990,259,327-330;Svinarchuk et al.,Biochimie,1993,75,49-54),磷脂,例如双十六烷基-rac-甘油(di-hexadecyl-rac-glycerol)或者三乙基铵,1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油基-3-H-膦酸酯(1,2-di-O-hexadecyl-rac-glycero-3-H-phosphonate)(Manoharan et al.,Tetrahedron Lett.,1995,36,3651-3654;Shea et al.,Nucl.Acids Res.,1990,18,3777-3783),聚胺或聚乙二醇链(Manoharan et al.,Nucleosides&Nucleotides,1995,14,969-973),或者金刚烷乙酸(adamantane acetic acid)(Manoharan et al.,Tetrahedron Lett.,1995,36,3651-3654),棕榈基(palmityl)部分(Mishra et al.,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264,229-237),或者十八胺,或者己氨基-羰基-羟胆固醇(hexylamino-carbonyl-oxycholesterol)部分(Crooke et al.,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277,923-937)。本发明的寡核苷酸也

可以与活性药物成分,例如,阿司匹林,华法林(warfarin),保泰松(phenylbutazone),布洛芬(ibuprofen),舒洛芬(suprofen),芬布芬(fenbufen),酮洛芬(ketoprofen),普拉洛芬((S)-(+)-pranoprofen),卡洛芬(carprofen),丹磺酰肌氨酸(dansylsarcosine),2,3,5-三碘苯甲酸(2,3,5-triiodobenzoic acid),氟芬那酸(flufenamic acid),亚叶酸(folinic acid),苯并噻二嗪(benzothiadiazide),氯噻嗪(chlorothiazide),二氮杂卓(diazepine),吲哚美辛(indomethicin),一种巴比土酸盐(barbiturate),一种头孢菌素(cephalosporin),一种磺胺药(sulfa drug),一种抗糖尿病药,一种抗菌剂或抗生素。美国专利申请U.S.Patent Application Ser.No.09/334,130(1999年6月5日提交)描述了寡核苷酸-药物共轭物 and 他们的制备方法,披露的全部内容被纳入在此作为参考。

[0170] 讲授这样的寡核苷酸共轭物制备方法的有代表性的美国专利包括但不限于U.S.Pat.Nos:4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717,5,580,731;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241,5,391,723;5,416,203,5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941,这些专利中的某些为本申请所共有,每个这些专利都被结合于此作为参考。

[0171] 在本发明的另外一个实施例中,该化合物包含的修饰寡核苷酸由20个连接的核苷组成。

[0172] 在本发明的一个优选实施例中,该化合物包含的核碱基序列为SEQ ID NOs:39,40,45,52和166中提出的序列。

[0173] 在本发明的一个实施例中,该组合物包含一种修饰寡核苷酸,它包含连接的核苷,其核碱基序列为SEQ ID NOs:28,30,39,40,43,44,45,50,51,52,56,78,125和166中提出的序列,或者是它的盐,以及一种药物上可接受的载体或稀释剂。药物上可接受的盐类为业内人士所熟知。

[0174] 在本发明的一个实施例中,该反义化合物在CTGF序列上的一个核苷酸范围内是互补的。在某些实施例中,该反义化合物在SEQ ID NO:9的核苷酸718-751,1388-1423,1457-1689,2040-2069,2120-2147,或2267-2301的范围内是互补的。在某个实施例中,该反义化合物在SEQ ID NO:10的核苷酸2728-2797的范围内是互补的。靶向这些范围的化合物证实了至少50%的抑制(即SEQ ID NOs:15,29,31,42,46-49,53,72,81,82,152-154,164和165)。表1中列出的某些靶位点也证实了至少50%的抑制(即SEQ ID NOs:12,20,33,34,76,107,129,132,134,136和146)。在某些实施例中,该反义化合物在SEQ ID NO:9的核苷酸553-611,1394-1423,1469-1508,1559-1605,1659-1689或2100-2129,以及SEQ ID NO:10的2623-2647的范围内是互补的。靶向其中的化合物证实了至少60%的抑制(即SEQ ID NOs:27,28,38,39,40,43,44,45,50,51,52,54,55,56,77,78,79,138和139)。表1中列出的某些另外的靶位点也证实了至少60%的抑制(即SEQ ID NOs:24,30,61,63,67,69,73,86,125,128和161)。在某些实施例中,该反义化合物在核苷酸1399-1423的范围内是互补的。靶向其

中的化合物证实了至少70%的抑制(即SEQ ID NOs:39和40)。表1中列出的某些另外的靶位点也证实了至少70%的抑制(即SEQ ID NOs:28,30,44,45,51,56,78,128和138)。表中列出的一个靶位点也证实了至少80%的抑制(即SEQ ID NO:44)。在某些实施例中,当该反义化合物以50nm的浓度被输送至HuVec细胞时,实现了该百分抑制率。参照实施例8,以下提供了更多的细节。

[0175] 在该组合物的一个实施例中,该修饰寡核苷酸是一种单链或者双链的寡核苷酸。在本发明的另外一个实施例中,包含修饰寡核苷酸,其由20个连接的核苷组成。

[0176] 在本发明的另外一个实施例中,提供了一种在细胞或组织中抑制结缔组织生长因子表达的方法,它包括使该细胞或组织与该受关注的化合物在结缔组织生长因子的表达受到抑制的条件下接触。

[0177] 组合物以及按配方制备药用组合物的方法

[0178] 反义寡核苷酸可以与药用可接受的活性的和/或惰性的物质掺合以制备药用组合物或制剂。组合物和按配方制备药用组合物的方法取决于一些准则,包括但不限于给药途径,疾病的程度,或者给药的剂量。

[0179] 通过使反义化合物与一种适合的药用可接受的稀释剂或载体结合,靶向核酸的反义化合物可以被用在药用组合物中。药用可接受的稀释剂包括磷酸盐缓冲盐水(phosphate-buffered saline,PBS)。PBS是适用于肠胃外输送组合物的稀释剂。因此,在一个实施例中,用于在此描述的方法的是一种药用组合物,它包含一种靶向核酸的反义化合物和一种药用可接受的稀释剂。在一个实施例中,该药用可接受的稀释剂是PBS。在另外一个实施例中,该药用可接受的稀释剂是药用级盐水或者药用级PBS。在另外一个实施例中,该反义化合物是反义寡核苷酸。

[0180] 包含反义化合物的药用组合物包含任何的药用可接受的盐类,酯类,或者这样的酯类的盐类,或者任何其他寡核苷酸,在给动物,包括人类施药时,它能够直接或间接地提供其有生物活性的代谢产物或残渣。因此,也披露出例如,反义化合物的药用可接受的盐类,前药(prodrugs),这样的前药的药用可接受的盐类,以及其他的生物等效物。合适的药用可接受的盐类包括但不限于钠盐和钾盐。

[0181] 前药可以包括在反义化合物的一个末端或两个末端引入另外的核苷,它们在体内被内源性核酸酶切割形成活性反义化合物。尤其是,本发明的寡核苷酸的前药根据颁发给Gosselin等的WO 93/24510,1993年12月9日出版,或WO 94/26764或者颁发给Imbach等的美国专利U.S.Pat.No.5,770,713中披露的方法,被制备成SATE[(S-乙酰基-2-硫乙基)磷酸酯]衍生物的形式。

[0182] 术语“药用可接受的盐类”指的是本发明的化合物生理学上和药学上可接受的盐类:即保留了母体化合物理想的生物活性,并且不赋予不希望看到的毒理学的效果的盐类。

[0183] 药用可接受的加碱盐类是用金属或胺类形成的,像碱金属和碱土金属或有机胺类。用作阳离子的金属的例子是钠,钾,镁,钙等。适合的胺类的例子有N,N'-二苄基乙二胺,氯代普鲁卡因,胆碱,二乙醇胺,二环己基胺,乙二胺,N-甲葡胺(N-methylglucamine),和普鲁卡因(例如,见Berge et al.,“Pharmaceutical Salts,”J.of Pharma.Sci.,1997,66,1-19)。所述酸性化合物的加碱盐类是通过常规方法使游离酸与足量的碱接触来制取该盐。通过常规方法使该盐形式与酸接触并分离出该自由酸,该自由酸可被重新生成。在某些物理

性质方面,如在极性溶剂中的溶解性,游离酸形式与它相应的盐的形式是有些不同的,但除此之外,对于本发明的目的而言,该盐类是等价于它们各自的游离酸的。在此所说的“药用加成盐”包括本发明的组合物的成分之一的酸式的药用可接受的盐。它们包括胺的有机或无机酸式盐。优选的酸式盐是盐酸盐,醋酸盐,水杨酸盐,硝酸盐和磷酸盐。其他合适的药用可接受的盐类是业内人士所熟知的,包括各种各样无机和有机酸的碱式盐,像,例如与无机酸,如盐酸,氢溴酸,硫酸或磷酸;与有机羧基的,磺酸基的,磺酸或膦酸(sulfo or phosphor acids)或N-取代的氨基磺酸,例如醋酸,丙酸,甘醇酸,琥珀酸,马来酸,羟基马来酸,甲基马来酸,富马酸,苹果酸,酒石酸,乳酸,草酸,葡糖酸,葡糖二酸(glucaric acid),葡醛酸(glucuronic acid),柠檬酸,苯甲酸,肉桂酸,扁桃酸,水杨酸,4-氨基水杨酸,2-苯氧基苯甲酸,2-乙酰氧基苯甲酸(2-acetoxybenzoic acid),亚甲基双羟萘酸(embonic acid),烟酸或异烟酸;与氨基酸,像在自然界中涉及蛋白质合成的20种 α -氨基酸,例如谷氨酸或天冬氨酸,还有与苯乙酸,甲磺酸,乙磺酸,2-羟基乙磺酸,1,2-二磺酸基乙烷(ethane-1,2-disulfonic acid),苯磺酸,4-甲基苯磺酸,萘-2-磺酸(naphthalene-2-sulfonic acid),萘-1,5-二磺酸,2-或3-磷酸甘油酸,葡糖-6-磷酸酯,N-环己基氨基磺酸(生成环己基氨基磺酸酯(cyclamates)),或者与其他酸性有机化合物,像抗坏血酸。化合物的药用可接受的盐类还可以利用药用可接受的阳离子来制备。合适的药用可接受的阳离子为业内人士所熟知,包括碱金属阳离子,碱土金属阳离子,铵和季铵阳离子。碳酸盐或碳酸氢盐也是可能的。

[0184] 对于寡核苷酸,优选的药用可接受的盐类包括但不限于,(a)用阳离子,像钠,钾,铵,镁,钙,用多胺,像精胺(spermine)和亚精胺(spermidine)等形成的盐类;(b)用无机酸,例如盐酸,氢溴酸,硫酸,磷酸,硝酸等形成的酸加成盐类;(c)用有机酸,像醋酸,草酸,酒石酸,琥珀酸,马来酸,富马酸,葡糖酸,柠檬酸,苹果酸,抗坏血酸,苯甲酸,单宁酸,棕榈酸,藻酸,聚谷氨酸,萘磺酸,甲磺酸,对甲苯磺酸,萘二磺酸,聚半乳糖醛酸等形成的盐类;以及(d)由元素阴离子,像氯,溴和碘离子形成的盐类。

[0185] 在本发明的某些实施例中,药用可接受的载体或稀释剂是组合物中一种没有药物活性的成分,但是作为一种溶剂,悬浮剂或者其他药学上惰性的载体工具以输送给人或非人动物一个或多个核酸在药学上是必需的或理想的。药用载体是业内人士所熟知的。

[0186] 载体

[0187] 本发明的某些组合物还在配方中掺合进了载体化合物。在此所说的“载体化合物”或者“载体”可以指一种核酸,或其类似物,它是惰性的(即本身不具备生物活性),但在体内的过程被认为是一种核酸,它通过,例如使有生物活性的核酸降解或者促进有生物活性的核酸从循环中排除出去来降低具有生物活性的核酸的生物利用度。核酸和载体化合物的一起给药,典型地,后者物质是过量的,可以引起在肝,肾或者其他外循环储器中的回收的核酸大大减少,大概是因为载体化合物与核酸之间对于同一个受体的竞争所致。例如,部分硫代磷酸酯寡核苷酸在肝组织中的回收会减少,当它与聚肌苷酸,硫酸葡聚糖(dextran sulfate),聚胞苷酸(polycytidic acid)或者4-乙酰氨基-4'-异硫氰基-均二苯乙烯-2,2'-二磺酸(4-acetamido-4'isothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonic acid)一起给药时(Miyao et al.,Antisense Res.Dev.,1995,5,115-121;Takakura et al.,Antisense Nucl.Acids Drug Dev.,1996,6,177-183)。

[0188] 赋形剂

[0189] 与载体化合物形成对照,“药用载体或赋形剂”是药用可接受的溶剂,悬浮剂或者任何其他的药理学上将一种或多种核酸输送给动物的惰性运载工具。赋形剂可以是液体或者固体,根据计划的给药方式来选择以保证在与核酸和给定药用组合物的其他成分掺合起来时有合乎理想的体积和稠度。典型的药用载体包括但不限于粘结剂(例如预胶凝化的玉米淀粉,聚乙烯吡咯烷酮或者羟丙基甲基纤维素等);填料(例如乳糖和其他糖类,微晶纤维素,果胶,明胶,硫酸钙,乙基纤维素,聚丙烯酸酯类或者磷酸氢钙等);润滑剂(例如硬脂酸镁,滑石,二氧化硅,胶态二氧化硅,硬脂酸,硬脂酸金属盐类,氢化植物油,玉米淀粉,聚乙二醇,苯甲酸钠,醋酸钠等);崩解剂(例如淀粉,羟基乙酸淀粉钠等);以及润湿剂(例如十二烷基硫酸钠等)。

[0190] 也可以采用不与核酸发生有害反应的,适合于经肠道给药的药用可接受有机或无机的赋形剂来配制本发明的组合物。合适的药用可接受的载体包括但不限于水,盐溶液,醇类,聚乙二醇,明胶,乳糖,直链淀粉,硬脂酸镁,滑石,硅酸,粘性石蜡,羟甲基纤维素,聚乙烯吡咯烷酮等。

[0191] 核酸的局部给药剂型可以包括无菌的和不消毒的水溶液,在普通溶剂像醇类中的非水溶液,或者核酸在液体或固体油基中的溶液。这些溶液还可以含有缓冲剂,稀释剂和其他合适的添加剂。可以采用不与核酸发生有害反应的,适合于经肠给药的药用可接受有机或无机的赋形剂。

[0192] 在本发明的一个实施例中,该组合物包含一种修饰管核苷酸,它包含一种单链或双链寡核苷酸,其特征在于,该修饰寡核苷酸由20个连接的核苷组成。

[0193] 本发明的另外一个实施例涉及在细胞或组织中抑制结缔组织生长因子表达的方法,它包括使该细胞或组织在结缔组织生长因子被抑制的条件下任一个上述的化合物接触。

[0194] 本发明的某些实施例涉及治疗患有与结缔组织生长因子表达有关的疾病或症状的动物的方法,它包括对该动物给予一定量的上述化合物,有效地抑制结缔组织生长因子的表达来治疗该动物。

[0195] 在实施本发明的方法中,动物包括人以及非人动物,但优选人类。

[0196] 本发明还包括含有本发明反义化合物的药用组合物和剂型。本发明的药用组合物可以采用多种方法来给药,它取决于想要局部治疗还是系统治疗,以及要处理的面积大小。给药可能是局部的(包括眼的和粘膜的,包括阴道和直肠给药)。肺的,例如吸入或粉末吹入或气雾剂,包括利用喷雾器;气管内的,鼻内的,表皮的和经皮的),口服的或者不经肠道的。不经肠道的给药包括静脉内的,动脉内的(intraarterial),皮下的,腹膜内的或者肌肉的注射或输液;或者颅内的,例如鞘内的或心室内的给药。具有至少一个2'-O-甲氧基乙基修饰的寡核苷酸被认为是对于口服给药特别有效的。

[0197] 用于局部给药的药用组合物和剂型包括经皮肤贴剂,软膏,洗液,乳膏,凝胶,滴剂,栓剂,喷雾剂,液体和粉剂。常规的药用载体,水的,粉末或油基,增稠剂等可能是必需和合乎理想的。涂层的阴茎套或者手套等可能也是有用的。优选的局部用配方包括那些其中本发明的寡核苷酸类与局部输送剂,像类脂,脂质体类,脂肪酸类,脂肪酸酯类,固醇类,螯合剂和表面活性剂掺合。优选的类脂和脂质体类包括中性的(例如二油酰基磷酸酰基DOPE

乙醇胺(dioleoylphosphatidyl DOPE ethanolamine),二肉豆蔻酰基磷酸酰基胆碱(dimyristoylphosphatidyl choline)DMPC,二硬脂酰基磷酸酰基胆碱(distearolyphosphatidyl choline)),阴性的(例如二肉豆蔻基磷酸酰基甘油(dimyristoylphosphatidyl glycerol)DMPG)和阳离子的(例如二油酰基四甲基氨基丙基DOTAP(dioleoyltetramethylaminopropyl DOTAP)和二油酰基磷酸酰基乙醇胺(dioleoylphosphatidyl ethanolamine)DOTMA)。本发明的寡核苷酸可以包在脂质体中间或者与它形成络合物,尤其是与阳离子脂质体。或者,寡核苷酸可以与类脂络合,特别是与阳离子类脂。优选的脂肪酸类和酯类包括但不限于花生四烯酸,油酸,二十烷酸,月桂酸,辛酸,癸酸,肉豆蔻酸,棕榈酸,硬脂酸,亚油酸,亚麻酸,二癸酸酯,三癸酸酯(tricaprate),单甘油一油酸酯(monolein),甘油二月桂酸酯,甘油1-单癸酸酯(glycerol 1-monocaprate),1-十二烷基氮杂环庚-2-酮(1-dodecylazacycloheptan-2-one),一种酰基肉碱,一种酰基胆碱,或者一种C₁₋₁₀烷基酯(例如肉豆蔻酸异丙酯IPM),单酸甘油酯,甘油二酯或者它们的药用可接受的盐类。于1999年5月20日提交的美国专利申请U.S. Patent Application Ser.No.09/315,298详细描述了局部配方,它的全部被结合于此作为参考。

[0198] 用于口服给药的组合物和剂型包括粉剂或颗粒剂,微粒,纳米颗粒,在水或非水介质中的混悬液或溶液,胶囊,凝胶胶囊,香囊,片剂或小型片剂。增稠剂,调味剂,稀释剂,乳化剂,分散助剂或粘结剂可以是合乎需要的。优选的口服剂型是那些其中本发明的寡核苷酸连同一种或多种穿透增强剂,表面活性剂和螯合剂一起给药。优选的表面活性剂包括脂肪酸和/或它们的酯类或盐类,胆汁酸和/或它们的盐类。优选的胆汁酸类/盐类包括鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid,CDCA)和熊去氧胆酸(ursodeoxychenodeoxycholic acid,UCDA),胆酸,脱氢胆酸,脱氧胆酸,谷氨胆酸(glucolic acid),甘氨酸胆酸(glycolic acid),脱氧甘氨酸胆酸(glycoldeoxycholic acid),牛磺胆酸(taurocholic acid),脱氧牛磺胆酸,牛磺-24,25-二氢-梭链孢酸钠(sodium tauro-24,25-dihydro-fusidate),甘油二氢梭链孢酸钠(taurodeoxycholic acid)。优选的脂肪酸类包括花生四烯酸,十一烷酸,油酸,月桂酸,辛酸,癸酸,肉豆蔻酸,棕榈酸,硬脂酸,亚油酸,亚麻酸,二癸酸酯,三癸酸酯,单甘油一油酸酯,甘油二月桂酸酯,甘油1-单癸酸酯,1-十二烷基氮杂环庚-2-酮,一种酰基肉碱,一种酰基胆碱,或者一种单酸甘油酯,甘油二酯或者它们的药用可接受的盐类。也优选掺合穿透增强剂,例如,脂肪酸类/盐类与胆汁酸类/盐类掺合。特别优选的结合是月桂酸的钠盐,癸酸与UCDA的结合。穿透增强剂进一步还包括聚氧化乙烯-9-十二烷基醚(polyoxyethylene-9-lauryl ether),聚氧化乙烯-20-十六烷基醚(polyoxyethylene-20-cetyl ether)。本发明的寡核苷酸可以颗粒剂形式口服,包括喷雾干颗粒,或者络合起来形成微粒或纳米颗粒。寡核苷酸络合剂包括聚氨基酸类;聚亚胺类;聚丙烯酸酯类;聚丙烯酸烷基酯类,氧化聚醚类(polyoxethanes),聚氰基丙烯酸烷基酯类;阳离子化的明胶类,白蛋白类,淀粉类,丙烯酸酯类,聚乙二醇类(PEG)和淀粉类;聚氰基丙烯酸烷基酯类;DEAE-衍生的聚亚胺类,短梗霉多糖类(pollulans),纤维素类和淀粉类。特别优选的络合剂包括壳聚糖,N-三甲基壳聚糖,聚-L-赖氨酸,聚组氨酸,聚鸟氨酸,聚精胺类,精蛋白,聚乙烯吡啶,聚硫代二乙氨基甲基-乙烯(polythiodiethylaminomethyl-ethylene)P(TDAE),聚氨基苯乙烯(例如对-氨基),聚氰基丙烯酸甲酯,聚氰基丙烯酸乙酯,聚氰基丙烯酸丁酯,聚氰基丙烯酸异丁酯,聚氰基丙烯酸异己酯,DEAE-甲基丙烯酸酯,DEAE-丙烯酸己酯,DEAE-丙烯酰胺,

DEAE-白蛋白和DEAE-葡聚糖,聚丙烯酸甲酯,聚丙烯酸己酯,聚(D,L-乳酸),聚(DL-乳酸-共聚-羟基乙酸)(poly(DL-lactic-co-glycolic acid,PLGA),藻酸盐,以及聚乙二醇(PEG)。寡核苷酸的口服剂型及其制备详细地描述在美国专利申请U.S.Application Ser.Nos.08/886,829(1997年7月1日提交),Ser.No.09/108,673(1998年7月1日提交),Ser.No.09/256,515(1999年2月23日提交),Ser.No.09/082,624(1998年5月21日提交)以及Ser.No.09/315,298(1999年5月20日提交)中,这些专利的每一个都被全部结合于此作为参考。

[0199] 不经肠道的,鞘内的或心室内给药的组合物和剂型可以包括无菌的水溶液,它们也可以含有缓冲剂,稀释剂和其他合适的添加剂,像,但不限于,穿透增强剂,载体化合物和其他药用可接受的载体或赋形剂。

[0200] 本发明的药用组合物包括但不限于,溶液,乳剂,和含脂质体的配方。这些组合物可以产生自各种各样的成分,包括但不限于,执行液体类(performed liquids),自乳化固体类和自乳化半固体类。

[0201] 本发明的药用制剂可以方便地以单位剂量的形式提供,它们可以根据制药行业所熟知的常规工艺来制备。这样的工艺包括使活性成分与药用载体或赋形剂结合的步骤。一般而言,通过使活性成分与液体载体或细分散的固体载体或二者兼有之均匀密切地结合来制备制剂,如果需要的话,然后将产品加工成形。

[0202] 本发明的组合物可以被制备成许多可能的剂量形式的任一种形式,像,但不限于,片剂,胶囊,凝胶胶囊,液体糖浆,软胶,栓剂和灌肠剂。本发明的组合物还可以被配制在水,非水或混合介质中的混悬液。水性混悬液还可以再含有增加该混悬液粘度的物质,包括,例如羧甲基纤维素钠,山梨糖醇和/或葡聚糖。该混悬液还可以含有稳定剂。

[0203] 在本发明的一个实施例中,药用组合物可以被配制和用作泡沫。药用泡沫包括,但不限于的剂型,像乳剂,微乳状液,霜剂,胶冻和脂质体。尽管在性质上相似,但这些剂型在成分和最后产品的稠度上是不相同的。配制这样的组合物和剂型对于医药配方行业的业内人士是熟知的,可以把他们用于本发明组合物的配制。

[0204] 乳剂

[0205] 本发明的组合物可以被制备成乳剂。典型地,乳剂是一种液体以通常直径超过0.1 μm 的液滴形式分散在另一种液体中的非均质系统。(Idson,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,volume1,p.199;Rosoff,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,Volume 1,p.245;Block in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,volume 2,p.335;Higuchi et al.,in Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1985,p.301)。乳剂往往是两相的系统,包含两种不溶混的液体相,互相密切混合和分散。通常,乳剂变型要么是油包水(water-in-oil,w/o),要么是水包油(oil-in-water,o/w)。当水相被细分隔成并作为微细的水滴被分散到大部分的油相中去时,所产生的组合物就称为油包水乳液。反过来,当油相被细分隔成并作为微细的油滴被分散到大部分的水相中去时,所产生的组合物就称为水包油乳液。除了分散相和活性药物,乳剂也可含有其他的组分,活性药物可以作为在水相中或者油相中的溶液存在,或者其本身就是一个独立的相。需要时,乳剂中也可以有药用赋形

剂,像乳化剂,稳定剂,染料,和抗氧化剂存在.药用乳剂也可以是多重乳状液,它由两个以上的相组成,比如像油包水包油(oil-in-water-in-oil,o/w/o)和水包油包水(water-in-oil-in-water,w/o/w)乳状液.这样的复杂剂型往往具有了简单的二元乳状液所不具备的优点.在多重乳状液中,o/w乳状液的各个微细的油滴包围住小的微细水滴构成了w/o/w乳状液.同样,被包围在水的液滴中的细微油滴和被稳定在油的连续相中的系统形成了o/w/o乳状液。

[0206] 乳状液的特征是很少或者没有热力学稳定性.乳状液的分散相或不连续相往往很好地分散在外部的或连续相中,利用乳化剂或者该制剂的粘度保持住这种形式.乳状液的任何一个相可以是固体或半固体,比如像乳剂类型的软膏基质和乳膏那样的情形.其他稳定乳剂的手段需要采用乳化剂,它可以结合到乳剂的任何一相中去.乳化剂可以大致分成四种类型:合成的表面活性剂,天然存在的乳化剂,吸收基,和细分散的固体(Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199)。

[0207] 合成的表面活性剂,也称之为表面活性剂,已被发现在乳剂的配方中有广泛的应用范围,在文献中已有综述(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.285; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p.199)。表面活性剂是典型的亲水亲油的,包含一个亲水部分和一个憎水部分.表面活性剂的亲水性质与憎水性质之比被称之为亲水/亲油平衡值(hydrophile/lipophile balance, HLB),在配制制剂时它是表面活性剂分类和选择的有价值的工具.根据亲水基团的性质,表面活性剂可以被分成不同类型:非离子型,阴离子型,阳离子型和两性型(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.285)。

[0208] 用于乳剂配制的天然存在的乳化剂包括羊毛脂,蜂蜡,磷脂,卵磷脂和阿拉伯胶(acacia)。吸收基具有亲水性质,所以它能全部吸收水以形成w/o乳状液仍然保持其半固体的稠度,像无水羊毛脂和亲水矿脂.细分隔的固体也已被用作优良的乳化剂,尤其是与表面活性剂结合起来和在配制粘性制剂时.这些包括极性的无机固体,像重金属的氢氧化物,不溶胀的粘土,像膨润土,凹凸棒土(attapulgitite),锂蒙脱石,高岭土,蒙脱石,胶态硅酸铝和胶态硅铝酸镁,颜料和非极性固体,像碳或者甘油三硬脂酸酯。

[0209] 有相当多种类的非乳化物质也被包括在乳剂的配方中为乳剂的性质献力.这些包括脂肪类,油类,蜡类,脂肪酸类,脂肪醇类,脂肪酯类,湿润剂类,亲水胶体类,防腐剂类和抗氧化剂类(Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199)。

[0210] 亲水胶体类(Hydrophilic colloids or hydrocolloids)包括天然存在的树胶类和合成的聚合物,像多糖类(例如阿拉伯胶,琼脂,藻酸,角叉菜胶(carrageenan),瓜耳豆胶(guar gum),刺梧桐树胶(karaya gum)和黄蓍胶(tragacanth),纤维素衍生物(例如羧甲

基纤维素和羧丙基纤维素),以及合成的聚合物(例如卡波姆(carbomers)类,纤维素醚类,和羧基乙烯基聚合物类)。它们在水中分散或溶胀形成胶体溶液,它通过在分散相液滴周围形成强有力的界面膜,并且增加了外相的粘度来使乳状液稳定。

[0211] 由于乳状液常常包含多种成分,例如碳水化合物类,蛋白质类,甾醇类和磷脂类,这些成分可能易于支持微生物的生长,这些制剂常常加入防腐剂。在乳状液中一般使用的防腐剂包括苯甲酸甲酯防腐剂(methyl paraben),苯甲酸丙酯防腐剂,季铵盐,氯化苯甲羟胺(benzalkonium chlorid),对羟基苯甲酸的醚和硼酸。抗氧化剂也一般被加入到乳状液制剂中以防止制剂变坏。所采用的抗氧化剂可以是自由基清除剂,像生育酚,没食子酸烷基酯,丁基化羟基苯甲醚,丁基化羟基甲苯,或者还原剂,像抗坏血酸和偏亚硫酸氢钠(sodium metabisulfite),以及抗氧化剂增效剂,像柠檬酸,酒石酸和卵磷脂。

[0212] 通过皮肤的,口服的和不经肠道途径的乳剂配方的应用以及它们的制造方法已在文献中有综述(Idson,in Pharmaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,volume 1,p.199)。由于容易配制以及从吸收和生物利用度的角度出发的功效,口服乳液制剂已被广泛采用。(Roseff,in Pharnaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,volume 1,p.245;Idson,in Pharnaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,volume 1,p.199)。矿物油基轻泻剂类,油溶性维生素类和高脂肪营养制剂属于常用的口服给药的o/w乳剂的物质。

[0213] 在本发明的一个实施例中,寡核苷酸和核酸的组合物被配制成微乳状液。微乳状液可以被定义为水,油和两亲物的系统,它是单一的光学各向同性的并且热力学稳定的液体溶液(Roseff,in Pharnaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,volume 1,p.245)。典型地,微乳状液是系统,它的制备是先将一种油分散在一种水相的表面活性剂溶液中,然后,加入足够量的一种第四成分,通常它是一种链长中等的醇以形成一个透明的系统。因此,微乳状液也被描述成两种不溶混的液体热力学稳定的,各向同性的透明分散体,这两种不溶混的液体通过表面活性剂分子的界面膜被稳定化(Leung and Shah,in:Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems,Rosoff,M.,Ed.,1989,VCH Publishers,New York,pp 185-215)。微乳状液通常由结合三至五种成分来制备,它们包括油,水,表面活性剂,助表面活性剂和电解质。微乳状液是油包水(w/o)类型还是水包油(o/w)类型则取决于所采用的油和表面活性剂的性质,以及该表面活性剂分子的结构和极性头与烃尾巴的几何包装(Schott in Remington's Pharmaceutical Science,Mark publishing Co.,Easton,Pa.,1985,p.271)。

[0214] 利用相图的现象学方法已被广泛研究,对于业内人士已获得了如何配制微乳状液全面的知识(Roseff,in Pharnaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,volume 1,p.245;Block,in Pharnaceutical Dosage Forms,Lieberman,Rieger and Banker (Eds.),1988,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,volume 1,p.335)。与常规的乳状液相比,微乳状液的优点在于,在配制自发形成的热力学稳定地液滴时,它使水溶性的药物增溶。

[0215] 制备微乳状液时采用的表面活性剂包括,但不限于,离子型表面活性剂,非离子型表面活性剂,Brij 96,聚氧化乙烯油烯基醚类(polyoxyethylene oleyl ethers),聚甘油脂肪酸酯类,一月桂酸四甘油酯(tetraglycerol monolaurate,ML310),一油酸四甘油酯(tetraglycerol monooleate,ML310),一油酸六甘油酯(P0310),五油酸六甘油酯(P0500),一癸酸十甘油酯(MCA750),一油酸十甘油酯(M0750),sequi油酸十甘油酯(decaglycerol sequioleate,S0750),十油酸十甘油酯(DA0750),单独或者与助表面活性剂掺合。助表面活性剂通常是一种短链的醇,像乙醇,1-丙醇和1-丁醇,它的作用是通过渗透进表面活性剂膜来增加界面的流动度,因而形成了一层无序的膜,这是由于在表面活性剂分子中间产生的空隙空间所造成的缘故。但是,可以不用助表面活性剂来制备微乳状液,无醇的自乳化微乳状液系统是业内知晓的。典型地,水相可以为,但并不限于,水,药物的水溶液,甘油,PEG300,PEG400,聚甘油类,丙二醇类,以及乙二醇的衍生物。油相可以包括,但不限于,像Captex 300,Captex 355,Capmul MCM,脂肪酸酯类,链长中等(C₈-C₁₂)的单-,二-,三-甘油酯类,聚氧化乙烯化甘油脂肪酸酯类,脂肪醇类,聚乙二醇化甘油酯类,饱和聚乙二醇C₈-C₁₂化甘油酯类,植物油类和硅油。

[0216] 从药物增溶作用和提高药物吸收的观点出发,微乳状液受到特别的关注。类脂基的微乳状液(o/w和w/o都有)已经被提议用来增强药物,包括肽类的口服生物利用度(Constantinides et al.,Pharmaceutical Research,1994,11,1385-1390;Ritschel, Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol.,1993,13,205)。微乳状液的优点在于,改善了药物的增溶,保护药物不受酶的水解作用,有可能提高药物的吸收,这是由于表面活性剂引起的膜流动度及渗透性的改变的缘故,容易制备,比固体剂量形式容易口服给药,改进临床效能,降低毒性(Constantinides et al.,Pharmaceutical Research,1994,11,1385;Ho et al., J.Pharm.Sci.,1996,85,138-143)。当它们的成分在室温下被汇集起来时,微乳状液往往可以自发地形成。当配制不耐热的药物,肽类或者寡核苷酸时,这可以成为特别的优势。在美容和药物的应用中,经皮肤输送活性成分时微乳状液也是有效的。期望本发明的微乳状液组合物和制剂会促进从胃肠道增加寡核苷酸和核酸的系统吸收,以及改善在胃肠道,阴道,口腔和其他给药区域内对于寡核苷酸和核酸的局部细胞摄入。

[0217] 本发明的微乳状液也可以含有另外的成分和添加剂,像山梨糖醇单硬脂酸酯(Grill 3),葵酸酯(Labrasol),和渗透增强剂以改进制剂的性能和增强对本发明的寡核苷酸及核酸的吸收。用于本发明的微乳状液的渗透增强剂可以被分成属于五个粗分大类中的一类-表面活性剂类,脂肪酸类,胆汁盐类,螯合剂类,以及非螯合非表面活性剂(Lee et al.,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,1991,p.92)。每一类已在上面对讨论过。

[0218] 脂质体

[0219] 除了微乳状液之外,还有许多有序的表面活性剂结构已被研究并用于药物配制。这些包括单分子层(monolayers),胶束(micelles),双分子层和泡囊。泡囊,像脂质体受到了极大的关注,这是由于从药物输送角度看,它们发挥作用的特异性和持续时间长的缘故。如本发明中所用,术语“脂质体”指的是一种泡囊,它由排列成球形的双分子层或多个双分子层的两亲的类脂组成。

[0220] 脂质体是单薄层状或多薄层状的泡囊,泡囊有一层由亲油物质形成的膜和一个水

相的内部。该水相部分含有要输送的组合物。阳离子型脂质体具有能融合到细胞壁上去的优势。非阳离子型的脂质体虽然不能与细胞壁那样有效地融合,但在体内被巨噬细胞吞噬。

[0221] 为了跨过哺乳动物完整的皮肤,在一个适合的经皮的梯度影响之下,类脂泡囊必须穿越一系列的每个直径都小于50nm的微孔。因此,利用脂质体是合乎理想的,它是高度可变形的,而且能够穿越这样的微孔。

[0222] 脂质体深一层的优点包括:由天然的磷脂获得的脂质体是生物相容的以及生物可降解的;脂质体可以范围广泛地与水溶性和脂溶性药物掺合;脂质体能将包裹在内的药物保护在它们的内部室免受代谢与降解(Roseff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.245)。在制备脂质体制剂时重要的考虑因素是脂质体的类脂表面电荷,泡囊大小以及水相的体积。

[0223] 脂质体有助于将活性成分转移和输送到作用位点。由于脂质体膜的结构与生物膜类似,所以,当脂质体被施加到组织时,脂质体就开始与细胞膜融合。随着脂质体与细胞融合过程的进行,脂质体内容物注入到细胞中去,活性物质可在细胞中发挥作用。

[0224] 脂质体制剂一直是深入研究许多药物传递模式的焦点。有越来越多的证据表明,对于局部给药,脂质体表现出比其他制剂有好些优势。这些优势包括减少了与所给药物的高的系统吸收有关的副作用,提高了所给药物在期望靶点的累积,以及可以给皮肤施用各种各样药物的能力,亲水的和亲油的药物都行。

[0225] 有几份报告详细列举了脂质体输送试剂的能力,包括将高分子量的DNA传递到皮肤中。包括止痛剂,抗体,激素和高分子量的DNA的化合物已经被施药给皮肤。大部分的这些用途导致把上表皮作为靶标。

[0226] 脂质体分为两个大类。阳离子型脂质体是带正电荷的脂质体,它与带负电荷的DNA分子相互作用形成一种稳定的络合物。带正电荷的DNA/脂质体络合物结合在带负电荷的细胞表面,并且在核内体被内在化。由于在核内体中酸性的pH,脂质体被破坏,将里面的物质释放到细胞的胞质中去(Wang et al., *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985)。

[0227] 对pH敏感的或带负电荷的脂质体捕获DNA而不是与其络合。由于DNA与类脂带同样的电荷,所以发生的是排斥而非形成络合物。尽管如此,一些DNA被捕获到这些脂质体的水相的内部室中。对pH敏感的脂质体已被用于将编码胸腺嘧啶核苷激酶基因的DNA传递给培养物中的细胞单分子层。在此靶细胞中探测到了外源基因的表达(Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274)。

[0228] 脂质体组合物的一种主要类型包括磷脂类而不是从天然衍生的磷脂酰胆碱。中性的脂质体组合物,例如可以由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(dimyristoyl phosphatidylcholine, DMPC)或者二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)来形成。而阴离子融合型(fusogenic)的脂质体主要由二油酰磷脂酰乙醇胺(dioleoyl phosphatidylethanolamine, DOPE)来形成。另外一类的脂质体组合物是由磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC),例如像,大豆PC和蛋PC来形成。另外一类是由磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇来形成。

[0229] 有几项研究已经评估了将脂质体药物制剂局部输送给皮肤。将含有脂质体的干扰

素应用在豚鼠皮肤上时导致皮肤疱疹溃疡的减少,而通过其他途径(例如,作为溶液或者乳剂)输送干扰素是无效的(Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410)。又,还有一项研究试验了作为脂质体组合物部分的干扰素的给药功效与采用水相系统的干扰素给药功效的比较,得出的结论是脂质体组合物优于水相的给药(du Plessie et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265)。

[0230] 也已测试了非离子型的脂质体系统以确定其在将药物输送给皮肤时的效用,尤其是包含非离子表面活性剂和胆固醇的系统。含有Novasome™ I(二月桂酸甘油酯/胆固醇/聚氧化乙烯-10-硬脂醇醚)和Novasome™ II(二硬脂酸甘油酯/胆固醇/聚氧化乙烯-10-硬脂醇醚)的非离子型脂质体制剂被用来将环孢霉素A(cyclosporin-A)输送给老鼠皮肤的真皮。结果表明这样的非离子型脂质体系统可以有效地促进环孢霉素A在不同层的皮肤上的沉积(Hu et al., *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466)。

[0231] 脂质体也包括“立体结构稳定的”脂质体,在此所用的术语指的是包含一个或者多个专门的类脂的脂质体,当这些类脂结合到脂质体中去时,相对于那些没有这样的专门的类脂的脂质体而言,结果增强了循环寿命。立体结构稳定的脂质体的例子有那些在脂质体中形成泡囊类脂这部分的一部分(A)包含一个或者多个糖脂(glycolipids),像单唾液神经节苷酯(monosialoganglioside)G_{M1},或者(B)衍生自一个或多个亲水聚合物,像一个聚乙二醇(PEG)组成部分。尽管无意受到任何具体理论的束缚,业内还是认为,至少对于含有神经节苷脂(gangliosides),鞘髓磷脂(sphingomyelin),或者PEG-衍生的类脂的立体结构稳定的脂质体来说,这些立体结构稳定的脂质体的循环半衰期的提高源自于进入到网状内皮系统(RES)的细胞中的摄取量的减少(Allen et al., *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu et al., *Cancer Research*, 1993, 53, 3765)。

[0232] 包含一个或多个糖脂的各种各样的脂质体为业内所知晓。Papahadjopoulos等(*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64)报告了单唾液神经节苷酯G_{M1},半乳糖脑苷脂硫酸酯(galactocerebroside sulfate)和磷脂酰肌醇改善脂质体血液半衰期的能力。这些发现由Gabizon等进行了详细的阐述(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949)。颁授给Allen等人的美国专利U.S. Pat No 4,837,028以及W0 88/04924披露了包含(1)鞘髓磷脂和(2)神经节苷酯G_{M1}或半乳糖脑苷脂硫酸酯的脂质体。美国专利U.S. Pat No 5,543,152(Webb et al.)披露了包含鞘髓磷脂的脂质体。W0 97/13499(Lim et al.)披露了包含1,2-sn-二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱的脂质体。

[0233] 许多包含衍生自一个或多个亲水聚合物的类脂的脂质体,以及它们的制备方法为业内所知晓。Sunamoto等人(*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1980, 53, 2778)描述了包含一种非离子型洗涤剂,2C₁₂-15G的脂质体,其含有一个PEG的组成部分。Illum等人(*FEBS Lett.*, 1984, 167, 79)注意到利用聚甘醇对聚苯乙烯颗粒进行亲水涂布,结果显著地提高了血液半衰期。通过附着聚亚烷基二醇(例如PEG)的羧基来对合成的磷脂进行修饰见Sears(*U.S. Pat. Nos.* 4,426,330和4,534,899)的描述。Klibanov等人(*FEBS Lett.*, 1990, 268, 235)描述了实验证实包含衍生自PEG或硬脂酸PEG酯的磷脂酰乙醇胺(PE)的脂质体显著地提高了血液循环半衰期。Blume等人(*Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1029, 91)将此观察结果延伸到其他PEG-衍生的磷脂,例如DSPE-PEG,它是由二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)与PEG形成的。在其外表面上具有共价结合的PEG组成部分的脂质体见于欧洲专利

European Patent No. EP 0 445 131B1和颁授给Fisher的WO 90/04384。包含1-20mol%的衍生自PEG的PE的脂质体组合物,以及其用途被Woodle等人(美国专利U.S.Pat.Nos.5,013,556和5,356,633)以及Martin等人(美国专利U.S.Pat.No.5,213,804和欧洲专利European Patent No. EP 0 496 813B1)描述。包含数个其他类脂-聚合物结合物的脂质体被披露在WO 91/05545和美国专利U.S.Pat.No.5,225,212(均颁授给Martin et al.)以及WO 94/20073(Zalipsky et al.)中。WO 96/10391(Choi et al.)描述了包含PEG-修饰的神经酰胺类脂。美国专利U.S.Pat.Nos.5,540,935(Miyazaki et al.)和5,556,948(Tagawa et al.)描述了含PEG的脂质体可以进一步在其表面上的官能组成部分被衍生。

[0234] 有限数量的包含核酸的脂质体为业内所知。颁授给Thierry等人的WO 96/40062讲述了将高分子量的核酸包囊在脂质体中的方法。颁授给Tagawa等人的美国专利U.S.Pat.No.5,264,221讲述了与蛋白质结合的脂质体,并且声称这样的脂质体内容物可以包括反义RNA。颁授给Rahman等人的美国专利U.S.Pat.No.5,665,710描述了将寡脱氧核苷酸包囊在脂质体中的方法。颁授给Love等人的WO 97/04787描述了包含靶向raf基因的反义寡核苷酸的脂质体。

[0235] 传递体(transfersomes)是另外一种类型的脂质体,是高度可变形类脂的聚集体,是药物传递工具富有吸引力的选择物。传递体可以被描述成可高度变形的类脂滴,它们能容易地穿透比滴还小的孔。传递体可以适应他们的使用环境,例如它们是自动优化的(适应皮肤上孔的形状),自动恢复,往往到达它们的靶标而无碎裂,经常自动装载。为了制备传递体,可能要往标准的脂质体组合物中加入表面边缘-活化剂(surface edge-activators),通常是表面活性剂。传递体一直被用于将血清白蛋白传递给皮肤。由传递体介导的传递血清白蛋白已经显示出与皮下注射含血清白蛋白的溶液同样有效。

[0236] 表面活性剂在像乳剂(包括微乳状液)和脂质体的制剂中有着广泛的用途。对许多包括天然和合成的不同类型的表面活性剂的性质最通常的分类和评级办法是利用亲水/亲油平衡(HLB)。亲水基团(也叫“头部”)的性质提供了最有力的手段来对用于制剂的不同表面活性剂进行分类(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

[0237] 如果表面活性剂分子未离子化,则它被分类为非离子型表面活性剂。非离子型表面活性剂在医药和美容产品中有着广泛的应用,可以在一个宽的pH范围内使用。通常,根据其结构,它们的HLB值的范围在2至18左右。非离子型表面活性剂包括非离子型酯类,像乙二醇酯类,丙二醇酯类,甘油酯类,聚甘油酯类,山梨糖醇羧酸酯类,蔗糖酯类,以及乙氧基化的酯类。非离子型链烷醇酰胺类和醚类,像脂肪醇乙氧基化物,丙氧基化醇类,以及乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物也包括在这一类型中。聚氧化乙烯表面活性剂是非离子型表面活性剂类型中最受欢迎的成员。

[0238] 如果表面活性剂在溶解或分散在水中时携带负电荷,则它被分类为阴离子型表面活性剂。阴离子型表面活性剂包括羧酸盐类,像肥皂类,酰基乳酸盐(acyl lactylates),氨基酸的酰基酰胺类,硫酸的酯类,像烷基硫酸酯和乙氧基化烷基硫酸酯,磺酸酯类,像烷基苯磺酸类,乙酰基羟乙磺酸盐类(acyl isethionates),乙酰基牛磺酸酯(acyl taurates)和磺基琥珀酸(sulfosuccinates)酯,和磷酸酯。阴离子型表面活性剂类中最重要的成员是烷基硫酸酯类和肥皂类。

[0239] 如果表面活性剂在溶解或分散在水中时携带正电荷,则它被分类为阳离子型表面活性剂。阳离子型表面活性剂包括季铵盐类和乙氧基化胺类。季铵盐类是这一类型中最常用的成员。

[0240] 如果表面活性剂分子能够携带要么是正电荷要么是负电荷,则该表面活性剂被划分为两性的。两性的表面活性剂包括丙烯酸衍生物类,取代的烷基酰胺类,N-烷基甜菜碱和磷脂类。

[0241] 在药物产品,制剂中和乳剂中使用表面活性剂已有综述(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p.285)。

[0242] 促透剂

[0243] 在一个实施例中,本发明使用了各种促透剂以实现将核酸,尤其是寡核苷酸有效地输送给动物皮肤。大多数的药物以离子化的和非离子化的形式存在于溶液中。但是,通常只有脂溶性的或亲油的药物才容易地穿越细胞膜。已经发现,如果要被穿越的膜用促透剂处理过的话,即使非脂溶性药物也可以穿越细胞膜。除了有助于非脂溶性药物的扩散穿过细胞膜,促透剂还提高了非脂溶性药物的渗透性。

[0244] 促透剂可以被分类属于五大类中的一类,即表面活性剂类,脂肪酸类,胆汁酸盐类,螯合剂类,和非螯合剂非表面活性剂类(Lee et al., *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92)。以下详细描述上述促透剂的每一类型。

[0245] 表面活性剂:结合本发明,表面活性剂是化学体,当溶于水溶液中时,它降低了溶液的表面张力或者水溶液与另一种液体之间的界面张力,结果提高了寡核酸穿越粘膜的吸收。除了胆汁酸和脂肪酸,这些促透剂包括,例如十二烷基硫酸钠,聚氧化乙烯-9-十二烷基醚和聚氧化乙烯-20-十六烷基醚(Lee et al., *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92);以及全氟化学乳液,像FC-43(Takahashi et al., *J.Pharm.Pharmacol.*, 1988, 40, 252)。

[0246] 脂肪酸类:充当促透剂的各种脂肪酸及其衍生物包括,例如油酸,月桂酸,癸酸(正癸酸),肉豆蔻酸,棕榈酸,硬脂酸,亚油酸,亚麻酸,二癸酸酯类,三癸酸酯类,一油酸酯(1-油酰基-外消旋-甘油),二月桂酸酯,辛酸,花生四烯酸,甘油1-单癸酸酯,1-十二烷基氮杂庚-2-酮,酰基肉碱类,酰基胆碱类,它们的C₁₋₁₀烷基酯(例如,甲基,异丙基和叔丁基),以及它们的单甘油酯类和二甘油酯类(例如,油酸酯,月桂酸酯,癸酸酯,肉豆蔻酸酯,棕榈酸酯,硬脂酸酯,亚油酸酯等)(Lee et al., *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J.Pharm Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654)。

[0247] 胆汁酸盐类:胆汁的生理功用包括促进类脂和脂溶性维生素的分散和吸收(Brunton, Chapter 38 in: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp.934-935)。各种天然的胆汁酸盐及其合成的衍生物用作促透剂。因此,术语“胆汁酸盐类”包括任何天然存在的胆汁成分以及任何它们的合成衍生物。本发明的胆汁酸盐类包括,例如胆酸(或者其药用可接受的钠盐,胆酸钠),脱氢胆酸(脱氢胆酸钠),脱氧胆酸(脱氧胆酸钠),谷氨胆酸(glucolic acid)(谷氨胆酸钠),甘氨胆酸(甘氨胆酸钠),甘氨脱氧胆酸(甘氨脱氧胆酸钠),牛磺胆酸(牛磺胆酸钠),牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠),鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸

钠), 乌索脱氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA), 牛磺-24, 25-二氢梭链孢酸钠 (sodium tauro-24, 25-dihydro-fusidate, STDHF), 甘油二氢梭链孢酸钠 (sodium glycodihydrofusidate) 及聚氧化乙烯-9-十二烷基醚 (POE) (Lee et al., Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583)

[0248] 螯合剂类: 用于本发明的螯合剂可以被定义为通过与金属离子形成络合物将金属离子从溶液中除去的化合物, 结果提高了寡核苷酸穿过粘膜的吸收。有关将它们用作本发明的促透剂, 螯合剂还具有同时作为 DNase 抑制剂的另一个好处, 因为大多数表征的 DNA 核酸酶需要一个二价金属离子作催化剂, 因而受到螯合剂的抑制 (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339)。本发明的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸二钠 (EDTA), 柠檬酸, 水杨酸盐类 (例如, 水杨酸钠, 5-甲氧基水杨酸盐和高香兰酸盐 (homovanilate)), 骨胶原的 N-乙酰基衍生物, 乙二醇月桂醇聚醚-9 (laureth-9) 和 β -二酮的 N-氨酰基衍生物 (烯胺类) (Lee et al., Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92; Muranishi, Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51)。

[0249] 非螯合剂非表面活性剂类: 在此所说的非螯合剂非表面活性剂促透化合物可以被定义为没有表现出像螯合剂或者表面活性剂那样有效的活性, 但仍然增加了寡核苷酸通过消化的粘膜吸收的一类化合物 (Muranishi, Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33)。这类促透剂包括, 例如, 不饱和环状脲类, 1-烷基-和 1-链烯基氮杂环-烷酮的衍生物 (Lee et al., Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92); 以及非胆固醇抗炎剂, 像双氯芬酸钠, 吲哚美辛和保泰松 (phenylbutazone) (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626)。

[0250] 本发明的药用和其他组合中还可以加入增加寡核苷酸在细胞水平上的吸收的试剂。例如阳离子型的类脂, 像转化脂 (lipofectin) (Junichi et al., U.S. Pat. No. 5, 705, 188), 阳离子型甘油衍生物类, 及聚阳离子分子, 像聚赖氨酸 (Lollo et al., PCT Application WO 97/30731) 都是已知可增加寡核苷酸在细胞中的吸收的。

[0251] 其他可以用来增加给药的核酸的渗透的试剂包括甘醇类, 像乙二醇和丙二醇, 吡咯类, 像 2-吡咯, 氮酮类, 及萜类, 像苧烯和薄荷酮。

[0252] 其他成分

[0253] 本发明的组合物还可以在既定工艺惯例的含量上另外含有药用组合物惯用的其他附加成分。因此, 组合物可以含有, 例如另外的, 相容的, 药学上有活性的物质, 像止痒剂, 收敛剂, 局部麻醉剂或者抗炎剂, 或者可以含有另外的有助于配制本发明组合物各种剂型的材料, 像染料, 调味剂, 防腐剂, 抗氧化剂, 遮光剂, 增稠剂和稳定剂。但是, 这些材料在加入时不应该不适当地干扰本发明组合物中成分的生物活性。制剂可以被消毒, 如果希望的话, 可以与助剂混和, 像润滑剂, 防腐剂, 稳定剂, 湿润剂, 乳化剂, 影响渗透压的盐类, 缓冲剂, 着色剂, 调味和/或芳香物质等, 它们与配方中的核酸不发生有害的相互作用。

[0254] 水相的混悬液可以含有提高混悬液粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠,山梨糖醇和/或葡聚糖。混悬液也可以含有稳定剂。

[0255] 本发明的某些实施例提供了药用组合物,它们含有(a)一种或多种反义化合物和(b)一种或多种其他的通过非反义机理发挥作用的化疗药剂。这样的化疗药剂包括,但不限于柔红霉素,道诺霉素,更生霉素,阿霉素,表柔比星,依达比星,依索比星,平阳霉素,马磷酰胺,异环磷酰胺,阿糖胞苷,双氯乙基亚硝基脲(bis-chloroethylnitrosurea),白消安,丝裂霉素C,放线菌素D,光辉霉素,强的松,羟孕酮,睾酮,他莫昔芬,达卡巴嗪,丙卡巴肼,六甲嘧啶(hexamethylmelamine),五甲嘧啶,米托蒽醌(mitoxantrone),安吡啶,瘤可宁,甲基环己基亚硝基脲,氮芥,左旋溶肉瘤素,环磷酰胺,6-巯基嘌呤,6-巯鸟嘌呤,阿糖胞苷,5-氮杂胞苷,羟基脲,脱氧助间型霉素(deoxycoformycin),4-羟基过氧化环磷酰胺,5-氟尿嘧啶(5-FU),5-氟脱氧尿苷(5-FUdR),甲氨蝶呤(MTX),秋水仙素,紫杉酚,长春新碱,长春碱,依托泊甙(VP-16),三甲曲沙,伊立替康,托泊替康,吉西他滨,替尼泊甙(teniposide),顺铂和己烯雌酚(DES)。一般地,见手册The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,15th Ed.1987,pp.1206-1228,Berkow et al.,eds.,Rathway,N.J.当与本发明的化合物一起使用时,这样的化疗剂可以个别地使用(例如,5-FU与寡核苷酸),按顺序地使用(例如,5-FU与寡核苷酸用一段时间,接着用MTX与寡核苷酸),或者与一个或多个其他的这些化疗剂结合起来使用(例如,5-FU,MTX与寡核苷酸,或者5-FU,放疗与寡核苷酸)。抗炎药物,包括但不限于非胆固醇抗炎药和皮质甾醇类,以及抗病毒药物,包括但不限于,三唑核苷(ribivirin),阿糖腺苷,无环鸟苷和更昔洛韦,也可以与本发明的组合物结合起来。分别见手册The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,15th Ed.1987,Berkow et al.,eds.,Rathway,N.J.pp.2499-2506和pp.46-49。其他的非反义化疗剂也在本发明的范围之内。两种或多种联用的化合物可以一起使用或者按顺序使用。在另外一个相关的实施例中,本发明的组合物可以含有一种或多种反义化合物,特别是寡核苷酸,靶向第一种核酸,一种或多种另外的反义化合物靶向第二种靶核酸。不少反义化合物的例子为业内所知晓。两种或多种联用的化合物可以一起使用或者按顺序使用。

[0256] 依照本发明所使用的反义化合物可以利用熟知的固相合成的工艺便利地按常规制备。有几家供应商出售这样的合成设备,包括,例如Applied Biosystems(Foster City, Calif.)。业内知晓的任何其他合成手段也可以附加地或交替使用。利用相似的工艺来制备寡核苷酸,像硫代磷酸酯类和烷基化的衍生物类是大家所熟知的。

[0257] 本发明的反义化合物在体外被合成,不包括生物来源的反义组合物,或者设计来对准体内合成反义分子的基因载体构建物。本发明的化合物也可以与其他分子,化合物分子结构体或者混合物,例如,脂质体类,受体靶向的分子,口服制剂,直肠制剂,局部制剂或其他的以辅助摄入,分配和/或吸收的制剂混合,包囊,共轭(conjugate)或者取别的方式缔合。有代表性的讲授这样的辅助摄入,分配和/或吸收的制剂制备的美国专利包括,但不限于,U.S.Pat.Nos.:5,108,921;5,354,844;5,416,016;5,459,127;5,521,291;5,543,158;5,547,932;5,583,020;5,591,721;4,426,330;4,534,899;5,013,556;5,108,921;5,213,804;5,227,170;5,264,221;5,356,633;5,395,619;5,416,016;5,417,978;5,462,854;5,469,854;5,512,295;5,527,528;5,534,259;5,543,152;5,556,948;5,580,575;and 5,595,756,这些专利的每一个都被结合于此作为参考。

[0258] 某些适应症

[0259] 反义的特异性和灵敏度也被业内人士用作治疗效力的动力。在处理动物和人的病状时,反义寡核苷酸已经被用作治疗的组成部分。反义寡核苷酸药物,包括核糖酶(ribozymes),已经被安全有效地施用给人类,许多临床试验正在进行之中。如此证实了寡核苷酸能成为有效的治疗模式,它在治疗细胞,组织和动物,特别是人类的领域中可以作为有效的配置。

[0260] 在本发明的某些实施例中提供了一种治疗与CTGF表达有关的疾病或状况,其特征在于,该疾病是一种过度增殖病症,它包括癌症,其特征在于,该癌症是乳腺癌,前列腺癌,肾癌,胰腺癌,头和颈癌,胃癌和多发性骨髓瘤(见Pickles M and Leask A, J Cell Commun Signal. 2007Sep;1(2):85-90. Epub 2007Jul 17; Mullis T.C, Tang X., Chong K.T., J Clin Pathol. 2008May;61(5):606-10; Liu L.Y., et al. World J Gastroenterol. 2008Apr 7;14(13):2110-4; Chintalapudi M.R., et al., Carcinogenesis. 2008Apr;29(4):696-703. Epub 2008Jan 22; Munemasa S., et al. Br J Haematol. 2007Oct;139(1):41-50; Shimo T., et al. J Bone Miner Res. 2006Jul;21(7):1045-59; and Yang F., et al. Cancer Res. 2005Oct1;65(19):8887-95.)

[0261] 在本发明的一个实施例中,该方法包含治疗一种疾病或状况,其特征在于,该疾病或失调是一种纤维变性病。在本发明方法的一个实施例中,该纤维变性病是瘢痕肥大,瘢痕疙瘩,皮肤瘢痕,肝纤维化,肺纤维化,肾纤维化,心纤维化,或者再狭窄。

[0262] 在本发明的另外一个实施例中,该方法还包含治疗上述的疾病或状况,其特征在于,该疾病或失调是关节纤维化(包括冻结肩综合症,腱和周围神经损伤),脊髓损伤,冠状动脉搭桥,腹部和腹膜粘连(包括子宫内膜异位症,子宫平滑肌瘤和纤维瘤),角膜放射状切开术和角膜光反射状切开术,视网膜再附着手术,器械介导的纤维变性(例如在糖尿病中),腱粘连,掌挛缩病,或者硬皮病。

[0263] 本发明的另外一个实施例也提供了一种在需要时减少受试者因皮肤伤口愈合引起的肥厚性瘢痕的方法,它包括给该受试者施加一定量的一种反义寡核苷酸化合物,有效地抑制结缔组织生长因子(CTGF)的表达以减少受试者因伤口愈合引起的瘢痕。所述受试者可包括人或非人类的动物。

[0264] 治疗组合物的配方以及其随之的给药被认为是在业内人士的技艺之中。剂量取决于要医治的病状的严重程度和应答程度,随着治疗的进程,持续几天至数月,或者直至完成一个疗程,或者实现了病状的减轻。优化的投药时间进度可以根据药物在患者体内积累量的测量来计算。有一般本领的人能容易地确定最佳剂量,给药的方法和重复率。最佳剂量随着各个寡核苷酸相对效力的不同而变,一般可以根据在体外和体内动物模型中发现的有效EC₅₀s来估计。通常的剂量为每kg体重从0.01μg到100g,可每天,每周,每月,或每年一次或数次,或者甚至每2-20年一次。根据测得的药物在体液或组织中的停留时间及浓度,有一般本领的业内人士能容易地估计出重复率。遵循成功的疗法,让患者经受维持治疗以防止病状的复发可能是合乎理想的,其特征在于,寡核苷酸以维持剂量给药,每kg体重从0.01μg到100g,每天一次或数次,至每20年一次。

[0265] 在本发明的另外一个实施例中,该方法还包含减少因皮肤伤口愈合引起的肥大瘢痕,其特征在于,伤口愈合为选自由皮肤破损,手术切口,和烧伤组成的这一组的伤口的愈

合。

[0266] 在某些实施例中,本发明提供了治疗个体的方法,它们包含施用一种或多种本发明的药用组合物。在某些实施例中,该个体有上述病症中之一。在某些实施例中,该个体处于上述病症中之一种的危险之中。在某些实施例中,该个体已经被确认需要治疗。在某些实施例中,本发明提供了预防性的降低CTGF在个体中表达的方法。

[0267] 某些实施例包括通过给一个个体施用有效治疗量的靶向CTGF核酸的反义化合物来治疗一个有需要的个体。

[0268] 在一个实施例中,给一个个体施用有效治疗量的靶向CTGF核酸的反义化合物的同时,监视个体血清中CTGF的水平,以确定个体对反义化合物给药的响应。医生利用个体对于反义化合物给药的响应来确定治疗介入的量与持续时间。

[0269] 在一个实施例中,施用靶向CTGF核酸的反义化合物的导致CTGF表达程度的降低了至少15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95或99%,或者由任意两个这些数值规定的范围。在一个实施例中,施用靶向CTGF核酸的反义化合物的导致如标准试验测量例如,但不限于,CTGF那样的CTGF测量值的变化。在某些实施例中,施用CTGF反义化合物增加了该测量值至少15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95或99%,或者由任意两个这些数值规定的范围。在某些实施例中,施用CTGF反义化合物降低了该测量值至少15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95或99%,或者由任意两个这些数值规定的范围。

[0270] 在某些实施例中,包含靶向CTGF的反义化合物的药用组合物被用来制备药物以治疗患有或者疑似患有上述病症之中任意一种的患者。

[0271] 某些联合治疗

[0272] 在某些实施例中,本发明的一种或多种药用组合物与一种或多种其他药剂一起给药。在某些实施例中,这样的一种或多种其他药剂被设计来治疗相同的一种或多种本发明的药用组合物要治疗的疾病或状况。在某些实施例中,这样的一种或多种其他药剂被设计来治疗不同的一种或多种本发明的药用组合物要治疗的疾病或状况。在某些实施例中,这样的一种或多种其他药剂被设计来处理一种或多种本发明的药用组合物所带来的不希望得到的后果。在某些实施例中,一种或多种本发明的药用组合物与另一种其他药剂一起给药,来处理那另一种其他药剂所带来的不希望得到的后果。在某些实施例中,一种或多种本发明的药用组合物与一种或多种其他药剂同时给药。在某些实施例中,一种或多种本发明的药用组合物与一种或多种其他药剂在不同时间给药。在某些实施例中,一种或多种本发明的药用组合物与一种或多种其他药剂一起制备成一个单一配方。在某些实施例中,一种或多种本发明的药用组合物与一种或多种其他药剂分别配制。

[0273] 在某些实施例中,可以与本发明的一种药用组合物一起给药的药剂包括一种第二治疗剂。在某些实施例中,可以与本发明的一种药用组合物一起给药的药剂包括,但不限于第二治疗剂。在某些这样的实施例中,该第二治疗剂在本发明的一种药用组合物给药之前施用。在某些这样的实施例中,该第二治疗剂在本发明的一种药用组合物给药之后施用。在某些这样的实施例中,该第二治疗剂与本发明的一种药用组合物同时施用。在某些这样的实施例中,一起给药的第二治疗剂的剂量与如果该第二治疗剂单独给药时的剂量相同。在某些这样的实施例中,一起给药的第二治疗剂的剂量比如果该第二治疗剂单独给药时的剂

量低。在某些这样的实施例中，一起给药的第二治疗剂的剂量比如果该第二治疗剂单独给药时的剂量大。

[0274] 在某些实施例中，一种第二化合物的共同给药增强了第一化合物的疗效，如此，两种化合物的共同给药导致疗效高于该第一化合物单独给药带来的效果，是一种协同效应。在其他的实施例中，共同给药导致疗效是两种化合物单独给药时效果的叠加。在其他的实施例中，共同给药导致疗效超过两种化合物单独给药时效果的叠加。在一些实施例中，该第一化合物是一种反义化合物。在一些实施例中，该第二化合物是一种反义化合物。

[0275] 在以下的实验细节部分来阐明本发明。提出这部分是为了帮助对于本发明的理解，但无意而且不应该被解释为以任何方式来限制在下面的权利要求书中所提出的本发明。

[0276] 实验

[0277] 实验1:细胞培养及反义化合物处理

[0278] 反义化合物对CTGF核酸的水平，活性或者表达的作用可以在各种细胞类型上进行体外的测试。可以从商业的供应商那里获得用于这样分析的细胞类型(例如，American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC., Clonetics Corporation, Walkersville, MD)，细胞培养采用市售的试剂按照供应商的说明书进行(例如，Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)。例证性的细胞类型包括，但不限于HepG2细胞，Hep3B细胞和原发性肝细胞(primary hepatocytes)。

[0279] 实验2:反义寡核苷酸的体外测试

[0280] 在此描述的是利用反义寡核苷酸处理细胞的方法，在利用其他反义化合物处理细胞时，这些方法可作适当变化。

[0281] 通常，当细胞在培养物中达到约60-80%的克隆率(confluency)时，用反义寡核苷酸来处理细胞。

[0282] 一种常用的将反义寡核苷酸引入到培养的细胞中的试剂包括阳离子型类脂转染试剂LIPOFECTIN[®](Invitrogen, Carlsbad, CA)。反义寡核苷酸与LIPOFECTIN[®]在OPTI-MEM[®]1(Invitrogen, Carlsbad, CA)中混合，达到反义寡核苷酸最后希望的浓度和LIPOFECTIN[®]浓度，典型地，浓度范围为每100nM反义寡核苷酸在2-12 μ g/mL。

[0283] 另一种用于将反义寡核苷酸引入到培养的细胞中的试剂包括LIPOFECTAMIN[®](Invitrogen, Carlsbad, CA)。反义寡核苷酸与LIPOFECTAMINE[®]在OPTI-MEM[®]1还原血清介质(Invitrogen, Carlsbad, CA)中混合，达到反义寡核苷酸最后希望的浓度和LIPOFECTAMINE[®]浓度，典型地，浓度范围为每100nM反义寡核苷酸在2-12 μ g/mL。

[0284] 通过常规方法用反义寡核苷酸处理细胞。典型地，在反义寡核苷酸处理后的16-24小时之后采集细胞，此时，采用业内知晓的和在此描述的方法测量靶核酸的RNA或者蛋白水平。通常，当进行多个重复处理，数据以重复处理的平均值提出。

[0285] 所采用的反义寡核苷酸浓度根据不同的细胞系是变化的。对于一种特定细胞系，确定反义寡核苷酸最佳浓度的方法为业内所熟知。反义寡核苷酸使用浓度的典型范围为1-300nM。

[0286] 实验3:RNA分离

[0287] RNA分析可以在总细胞RNA或者多聚腺苷酸 (poly (A)) +mRNA上进行。分离RNA的方法为业内所熟知。采用业内熟知的方法制备RNA,例如采用**TRIZOL**[®]试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 按照制造商推荐的草案来操作。

[0288] 实验4:目标水平或表达的抑制的分析

[0289] CTGF核酸的水平或表达抑制可以用业内知晓的各种方法来分析。例如,靶核酸水平可以通过Northern印迹分析,竞争聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 或者定量实时PCR来定量。RNA分析可以在总细胞RNA或者多聚腺苷酸 (poly (A)) +mRNA上进行。分离RNA的方法为业内所熟知。Northern印迹分析也是业内的常规手段。利用市售的ABI PRISM 7600, 7700或7900测序系统 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA出品) 按照制造商的说明书操作可以方便地完成定量实时PCR。

[0290] 实验5:靶RNA水平的定量实时PCR分析

[0291] 靶RNA水平的定量可以利用ABI PRISM 7600, 7700或7900测序系统 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA出品) 按照制造商的说明书操作,完成定量实时PCR。定量实时PCR的方法为业内所熟知。

[0292] 在实时PCR进行之前,分离出来的RNA要经历一个逆转录酶 (reverse transcriptase, RT) 反应,其产生互补DNA (cDNA) 作为随后实时PCR扩增的底物。RT和实时PCR反应依次在同样的样品池完成。RT和实时PCR的试剂从Invitrogen (Carlsbad, CA) 购得。RT和实时PCR反应用为业内人士所熟知的方法进行。

[0293] 由实时PCR获得的基因 (或者RNA) 靶的数量利用其表达为常数的基因的表达水平,像亲环蛋白A (cyclophilin A) 的表达水平,或者通过用**RIBOGREEN**[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA) 来定量总RNA的方法被归一化。亲环蛋白A的表达通过实时PCR来定量,通过与靶同时运行,多通道或者分别测。总RNA利用**RIBOGREEN**[®] RNA定量分析试剂 (Invitrogen, Eugene, OR) 来定量。利用**RIBOGREEN**[®] 定量分析RNA的方法见Jones, L. J., et al (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374) 的讲授。可以采用**CYTOFLUOR**[®] 4000仪器 (PE Applied Biosystems) 来测量**RIBOGREEN**[®] 的荧光。

[0294] 探针和引物被设计成与CTGF核酸杂交。设计实时PCR探针和引物的方法为业内所熟知,可以包括运用像**PRIMEREXPRESS**[®] Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) 那样的软件。

[0295] 实验6:蛋白水平分析

[0296] 通过测量CTGF蛋白水平可以评估CTGF核酸的反义抑制。CTGF蛋白水平可以用各种业内熟知的方法,像免疫沉淀法,如下面实验9中描述的Western印迹分析 (免疫印迹),酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 定量蛋白试验,蛋白活性试验 (例如半胱天冬酶 (caspase) 活性试验), 免疫组织化学,免疫细胞化学或者荧光活化的细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 来评估或量化。定向一个靶的抗体可以从各种来源加以识别和获得,像MSRS抗体目录 (Aerie Corporation, Birmingham, MI), 或者可以利用业内熟知的常规的产生单克隆抗体或多克隆抗体的方法来制备。用于检测人和鼠的CTGF的抗体可在市场上买到。

[0297] 实验7:反义化合物在体内的测试

[0298] 反义化合物,例如反义寡核苷酸,在动物身上试验以评估它们抑制CTGF表达和产生表型变化的能力。可以在正常的动物身上进行试验,也可以在实验疾病模型中进行。对动物给药时,反义寡核苷酸被配制在一种药用可接受的稀释剂,像磷酸盐缓冲的盐水中。给药包括不经肠道途径的给药,像腹膜内的,静脉内的,和皮下的给药。反义寡核苷酸剂量和给药频率的计算是在业内人士的技艺能力中的,它取决于像给药途径和动物体重那样的因素。用反义寡核苷酸处理一段时间后,从肝组织中分离出RNA,测量CTGF核酸表达的变化。利用上面实验6中描述的方法还测量CTGF蛋白水平的变化。

[0299] 实验8:人类结缔组织生长因子(CTGF)先导反义寡核苷酸候选物的选择

[0300] 引言

[0301] 依照本发明,采用发表过的序列(GenBank accession number NM_001901.2,并在此的SEQ ID NO:9,以及GenBank accession number NM_025741.14,并在此的SEQ ID NO:10),设计了一系列的寡核苷酸以靶向人结缔组织增生因子RNA的不同区域。

[0302] 该研究分析了可用的序列空间和靶向CTGF的外显子空间及内含子空间的修饰反义寡核苷酸。每个靶约有150个新的序列被合成和评估其阻止CTGF在细胞-培养物中的活性。这些寡核苷酸与表1所示。表1中的所有化合物是长度为20个核苷酸的嵌合型寡核苷酸(“gapmers”),它由中间的“缺口”(“gap”)区域组成,该区域由10个2'-脱氧核苷酸组成,两端(5'和3'方向上)被5个核苷酸“翼”(“wing”)侧面包围住,或者该区域由13个2'-脱氧核苷酸组成,两端(5'和3'方向上)分别被2个和5个核苷酸“翼”侧面包围住。该翼由2'-甲氧基乙基(2'-MOE)核苷酸组成。在整个寡核苷酸中的核苷间(骨架)连接是硫代磷酸酯(P=S)。所有的胞嘧啶核苷残基为5-甲基胞嘧啶核苷。利用在其他例子中描述过的定量实时PCR来分析这些化合物对于人结缔组织增生因子mRNA水平的影响作用。数据为两次实验的平均值。表中如果出现“N.D.”则表示“没有数据”。

[0303] 表1

[0304] 具有2'-MOE翼和脱氧缺口的嵌合型硫代磷酸酯寡核苷酸对人结缔组织增生因子mRNA水平的抑制

[0305]

ISIS #	REGION	TARGET SEQ ID NO	TARGET SITE	SEQUENCE	% INHIB	SEQ ID NO.
124173	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCGCAGACG	35	11
124189	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTGA	57	12
124212	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	47	13
124235	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	47	14
124238	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACFTTGGTCA	53	15
412271	5'-UTR	9	4	GGGAAGACTTGTGTGTGAG	0	16
412272	5'-UTR	9	38	AGGGTGGAGTCGCACTGGCT	46	17
412273	CDS	9	228	ACGAAGGCGACGCGGACGGG	35	18
412274	CDS	9	265	GCCGACGGCCGGCCGGCTGC	40	19
412275	CDS	9	475	GGTGCACACGCCGATCTTGC	52	20
412276	CDS	9	483	TCTTTGGCGGTGCACACGCC	0	21
412277	CDS	9	489	GCACCATCTTTGGCGGTGCA	0	22

[0306]

ISIS #	REGION	TARGET SEQ ID NO	TARGET SITE	SEQUENCE	% INHIB	SEQ ID NO.
412278	CDS	9	496	GCAGGGAGCACCATCTTTGG	16	23
412279	CDS	9	501	AAGATGCAGGGAGCACCATC	63	24
412280	CDS	9	507	CCACCGAAGATGCAGGGAGC	0	25
412281	CDS	9	512	CCGTACCACCGAAGATGCAG	47	25
412282	CDS	9	553	GTACTTGCAGCTGCTCTGGA	68	27
412283	CDS	9	592	GGGCATGCAGGCCACCGCCC	72	28
412284	CDS	9	718	AGGCCCAACCACGGTTTGGT	59	29
412285	CDS	9	723	AGGGCAGGCCCAACCACGGT	79	30
412286	CDS	9	732	TAAGCCGCGAGGGCAGGCC	55	31
412287	CDS	9	829	CCCACAGGTCTTGGAACAGG	30	32
412288	CDS	9	839	AGATGCCCATCCCACAGGTC	55	33
412289	3'-UTR	9	1273	CCAGTCTAATGAGTTAATGT	56	34
412290	3'-UTR	9	1281	TTCAAGTTCAGTCTAATGA	10	35
412291	3'-UTR	9	1361	TTTTCCCCAGTTAGAAAAA	38	36
412292	3'-UTR	9	1388	CACAATGTTTGAATTGGGT	50	37
412293	3'-UTR	9	1394	ACATGGCACAATGTTTGA	67	38
412294	3'-UTR	9	1399	GTTTGACATGGCACAATGTT	73	39
412295	3'-UTR	9	1404	TATTTGTTTGACATGGCACA	74	40
412296	3'-UTR	9	1412	TGATAGACTATTTGTTTGAC	35	41
412297	3'-UTR	9	1457	GTPCCACTGTCAAGTCTTAA	55	42
412298	3'-UTR	9	1469	TGTACTAATGTAGTCCACT	69	43
412299	3'-UTR	9	1482	CATTCGGTGCTGTGACTA	86	44
412300	3'-UTR	9	1489	TAATATACATTCGGTGCTG	76	45
412301	3'-UTR	9	1495	ACACCTAATATACATTCCTG	54	46
412302	3'-UTR	9	1502	TAAAGCCACACCTTAATATA	54	47
412303	3'-UTR	9	1520	GTACCTCCCACCTGCTCCTA	53	48
412304	3'-UTR	9	1554	AAGATGCTATCTGATGATAC	52	49
412305	3'-UTR	9	1559	CGTATAAGATGCTATCTGAT	69	50
412306	3'-UTR	9	1577	AATAGCAGGCATATTACTCG	74	51
412307	3'-UTR	9	1586	TACACTCAAATAGCAGCCA	69	52
412308	3'-UTR	9	1591	TCAATTCACCTCAAAATAGC	50	53
412309	3'-UTR	9	1659	GGAGAATGCACATCCTAGCT	66	54
412310	3'-UTR	9	1665	ATGGCTGGAGAAATGCACATC	60	55
412311	3'-UTR	9	1670	TCTTGATGGCTGGAGAAATGC	71	56
412312	3'-UTR	9	1729	GAATCAGAATGTCAGAGCTG	37	57
412313	3'-UTR	9	1946	CATTGAAATATCAAAGCATT	0	58
412314	3'-UTR	9	1952	GGCTAACATTGAAATATCAA	25	59
412315	3'-UTR	9	1958	AATTGAGGCTAACATTGAAA	1	60
412316	3'-UTR	9	1965	GTTCAAAAATTGAGGCTAAC	65	61
412317	3'-UTR	9	1971	TATGGTGTTCAGAAAATTGAG	13	62
412318	3'-UTR	9	1976	CTACCTATGGTGTTCAGAAA	61	63
412319	3'-UTR	9	1982	TACATCTACCTATGGTGT	38	64
412320	3'-UTR	9	1991	GACAAGCTTTACATTTACC	24	65
412321	3'-UTR	9	1996	GATCAGACAAGCTTTACATT	37	66
412322	3'-UTR	9	2007	ATGCTTGAACGATCAGACA	64	67
412323	3'-UTR	9	2012	ATTTTCATGCTTTGAACGATC	44	68
412324	3'-UTR	9	2018	GTATCCATTTTCATGCTTTGA	60	69
412325	3'-UTR	9	2026	CCATATAAGTATCCATTTC	48	70
412326	3'-UTR	9	2032	GAATTTCCATATAAGTATCC	28	71
412327	3'-UTR	9	2040	TCTGAGCAGAATTTCCATAT	58	72
412328	3'-UTR	9	2050	TGTCATCTATCTGAGCAGA	61	73
412329	3'-UTR	9	2060	TTTGACGGACTGTCATTCTA	47	74
412330	3'-UTR	9	2070	AACAATCTGTTTTCAGCGGAC	48	75
412331	3'-UTR	9	2088	TGATGCCCTCCCCTTTGCAAA	53	76
412332	3'-UTR	9	2100	TGCCAAGGACACTGATGCCCT	68	77
412333	3'-UTR	9	2105	CAGCCTGCCAAGGACACTGA	75	78
412334	3'-UTR	9	2110	GAAATCAGCCTGGCAAGGAC	60	79
412335	3'-UTR	9	2115	ACCTAGAAATCAGCCTGCCA	46	80
412336	3'-UTR	9	2120	TTCCCTACCTAGAAATCAGCC	51	81
412337	3'-UTR	9	2128	TACCACATTTCCCTACCTAGA	59	82
412338	3'-UTR	9	2134	TGAGGCTACCACATTTCCCTA	0	83

[0307]

ISIS #	REGION	TARGET SEQ ID NO	TARGET SITE	SEQUENCE	% INNIB	SEQ ID NO.
412339	3'-UTR	9	2140	TAAAAGTGGGCTACCACAT	48	84
412340	3'-UTR	9	2213	CAAATGCTTCCAGGTGAAAA	49	85
412341	3'-UTR	9	2219	TAGAAACAAATGCTTCCAGG	66	86
412342	3'-UTR	9	2230	TCATATCAAAGTAGAAACAA	12	87
412343	3'-UTR	9	2242	TCCGAAAAACACTCATATCA	24	88
412368	Intron 1	10	1308	ACCCGGCTGCAGAGGCGGAG	0	89
412369	Intron 1	10	1313	CGCTTACCCGGCTGCAGAGG	0	90
412370	Intron 1	10	1410	GACAGGGCGGTCAGCGGCGC	0	91
412371	Intron 2	10	1730	AGTCCGAGCGGTTCTTTTT	0	92
412372	Intron 2	10	1735	AACTCAGTCCGAGCGGTTTC	19	93
412373	Intron 2	10	1740	AAAGAAACTCAGTCCGAGCG	10	94
412374	Intron 2	10	1745	TGGAGAAAGAAACTCAGTCC	45	95
412375	Intron 2	10	1750	CCAGCTGGAGAAAGAAACTC	14	96
412376	Intron 2	10	1755	TGGCAGCAGCTGGAGAAAGA	46	97
412377	Intron 2	10	1887	AGGGAGCACCATCTTTGGCT	20	98
412378	Intron 3	10	2125	TCACCCGCGAGGGCAGGCC	33	99
412379	Intron 3	10	2137	GGAAGACTCGACTCACCCGC	0	100
412380	Intron 3	10	2142	TTAGAGGAAGACTCGACTCA	0	101
412381	Intron 3	10	2150	ACCTTGACTTAGAGGAAGAC	47	102
412382	Intron 3	10	2155	TCACGACCTGACTTAGAGG	31	103
412383	Intron 3	10	2160	GAGAATCACGACCTGACTT	2	104
412384	Intron 3	10	2165	TGGGAGAGAATCACGACCCT	31	105
412385	Intron 3	10	2170	CTCCCTGGGAGAGAATCACG	0	106
412386	Intron 3	10	2191	GGTGGGACAGTTAGGACTC	53	107
412387	Intron 3	10	2196	CGTTCGGTCCGGCACAGTTAG	30	108
412388	Intron 3	10	2216	CCTGGATAAGGTATTTCCCC	0	109
412389	Intron 3	10	2235	ACAACACCATCTAAAACGC	11	110
412390	Intron 3	10	2241	GAGCACACAACACCATGTA	0	111
412391	Intron 3	10	2251	TGCGAGAGCAGAGCACACAA	0	112
412392	Intron 3	10	2256	TAAGCTGCGAGAGCAGAGCA	2	113
412393	Intron 3	10	2261	GTCGGTAAGCTGCGAGAGCA	23	114
412394	Intron 3	10	2266	TTCCAGTCCGCTAAGCTGCCA	15	115
412395	Intron 4	10	2472	ACATGTACCTTAATGTTCTC	0	116
412396	Intron 4	10	2477	GCAGAACATGTACCTTAATG	0	117
412397	Intron 4	10	2482	TAGGAGCAGAACATGTACCT	9	118
412398	Intron 4	10	2487	GTTAATAGGAGCAGAACATG	19	119
412399	Intron 4	10	2496	TGAAAAATAGTTAATAGGAG	0	120
412400	Intron 4	10	2511	CCACTGTTTTCTGTGAAA	10	121
412401	Intron 4	10	2525	AAGTTGGTCCCTATCCACTG	28	122
412402	Intron 4	10	2530	GCCCTAAGTTGGGTCTTATC	20	123
412403	Intron 4	10	2535	CAAGAGCCCTAAGTTGGGTC	0	124
412404	Intron 4	10	2540	CGTGGCAAGAGCCCTAAGTT	64	125
412405	Intron 4	10	2558	CGGGCTTATACTAACAAGCG	6	126
412406	Intron 4	10	2563	GATAACGGCCTTATACTAAC	33	127
412407	Intron 4	10	2568	TTGGAGATAACGGGCTTATA	73	128
412408	Intron 4	10	2573	TAGTTTTGGAGATAACGGGC	51	129
412409	Intron 4	10	2578	TTAGATAGTTTTGGAGATAA	24	130
412410	Intron 4	10	2584	CAATGGTTPAGTAGTTTTGG	36	131
412411	Intron 4	10	2589	CAGCTCAATGGTTAGATAGT	53	132
412412	Intron 4	10	2594	CAAAACAGCTCAATGGTTAG	34	133
412413	Intron 4	10	2599	TCCAGCAAAACAGCTCAATG	59	134
412414	Intron 4	10	2604	CTCATTCAGCAAAACAGCT	42	135
412415	Intron 4	10	2609	AAGCTTCATTCAGCAAAA	57	136
412416	Intron 4	10	2614	TACACAAGCTCTCATTCAG	44	137
412417	Intron 4	10	2623	GGTTGCTATTACACAAGCTC	72	138
412418	Intron 4	10	2628	CTGGTGGTTGCTATFACACA	61	139
412419	Intron 4	10	2633	GAAAACCTGGTGGTTGCTATT	29	140
412420	Intron 4	10	2638	TAGTGGAAAACCTGGTGGTTG	5	141
412421	Intron 4	10	2663	TTAACTAACCTGTGGGAAGA	15	142
412422	Intron 4	10	2672	TGTCTGGAATTAACFAACCC	4	143
412423	Intron 4	10	2677	TGGAATGCTTGAATTAAC	0	144

[0308]

ISIS #	REGION	TARGET SEQ ID NO	TARGET SITE	SEQUENCE	% INHIB	SEQ ID NO.
412424	Intron 4	10	2691	GCCAGAGCCTCTCTGGGAAT	36	145
412425	Intron 4	10	2698	AAAAATAGCCAGAGCCTCTC	59	146
412426	Intron 4	10	2703	TGTCACAAAATAGCCAGAGC	28	147
412427	Intron 4	10	2708	TGCTATGTCCAAAAATAGCC	15	148
412428	Intron 4	10	2713	TCATTTGCTATGTCCAAAA	28	149
412429	Intron 4	10	2718	GAGTCTCATTTGCTATGTCC	20	150
412430	Intron 4	10	2723	AGTTTGAGTCTCATTTGCTA	30	151
412431	Intron 4	10	2728	GAGGAAGTTTGAGTCTCATT	55	152
412432	Intron 4	10	2763	CTTCTGTTGCTGACTTCTG	55	153
412433	Intron 4	10	2778	CCTCTGTGTTTTAGTCTTCT	56	154
412434	Intron 4	10	2788	TTTCTTCAACCCCTCTGTGTT	15	155
412435	Intron 4	10	2796	GGAGTGGCTTTCCTCAACCC	43	156
412436	Intron 4	10	2849	AGGAAGACAAGGAAAAGAG	20	157
412437	Intron 4	10	2854	TTCTAAGGAAGACAAGGGAA	0	158
412438	Intron 4	10	2859	TGCCCTTCTAAGGAAGACAA	31	159
412439	Intron 2	10	1791	GGATGCGAGTTGGATCTGG	0	160
412440	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCCGAGACG	64	161
412441	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTGA	37	162
412442	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	32	163
412443	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAATA	59	164
412444	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACTTTGGTCA	55	165
418899	3'-UTR	9	1391	TGACATGGCACAAATGTTTG	ND*	166

[0309] *ND-即实验中未测定,但在其他的试验中是高度活性的。

[0310] 如表1所示,SEQ ID NOs 11-15,17-20,24,26-34,36-57,59,61,63-82,84-86,88,95,97,99,102,103,105,107,108,122,125,127-140,145,146,149,151-154,156,159,161-165证实了该试验中对于人结缔组织增生因子表达的抑制率至少为24%,因此是优选的。与这些优选序列互补的靶位点在此被称之为“活性位点”,因而是本发明的化合物靶向的优选位点。

[0311] 反义化合物在CTGF序列的一个核苷酸范围内是互补的,即在SEQ ID NO:9的核苷酸718-751,1388-1423,1457-1689,2040-2069,2120-2147,或者2267-2301的范围内是互补的。在某个实施例中,反义化合物在SEQ ID NO:10的核苷酸2728-2797的范围内是互补的。靶向这些范围的化合物证实了至少50%的抑制率(即SEQ ID NOs:15,29,31,42,46-49,53,72,81,82,152-154,164,和165)。表1中的某些靶位点也证实了至少50%的抑制率(即SEQ ID NOs:12,20,33,34,76,107,129,132,134,136,和146)。

[0312] 在某些实施例中,反义化合物在核苷酸553-611,1394-1423,1469-1508,1559-1605,1659-1689或2100-2129的范围内是互补的。靶向这些范围的化合物证实了至少60%的抑制率(即SEQ ID NOs:27,38,43,50,52,54,55,77,79,和86)。表1中的某些靶位点也证实了至少60%的抑制率即SEQ ID NOs:24,61,63,67,69,73,125,139,和161)。

[0313] 反义化合物在核苷酸1399-1423的范围内也是互补的。靶向这些范围的化合物证实了至少70%的抑制率(即SEQ ID NOs:39和40)。表1中的某些靶位点也证实了至少70%的抑制率(即SEQ ID NOs:28,30,45,51,56,78,128,和138)。列于表1中的一个靶位点也证实了至少80%的抑制率(即SEQ ID NO:44)。在某些实施例中,当该反义化合物在50nm的浓度下被传递给HuVec细胞时,实现了百分抑制。

[0314] 多个先导序列在其外显子和内含子序列中都发现它们的活性明显高于过去的ASO先导序列,SEQ ID NO.15 (ISIS 124238)。

[0315] 对9个高活性的序列(SEQ ID NOs:28,30,39,40,45,52,56,78,125)完成了剂量应答研究(见图8)。SEQ NO.13和15(ISIS 124212和ISIS 124238)是先前指定的寡核苷酸,SEQ ID NO:167(ISIS 141923,序列CCTTCCCTGA AGGTTCCCTCC)为阴性对照。

[0316] 材料和方法

[0317] 寡核苷酸在人的脐静脉内皮细胞(HuVEC)中,浓度为50nM下,利用Lipofectin介导的转染被筛选和确认。从Cascade Biologics(Portland,OR)购得的HuVEC细胞被保存在补充有低血清生长添加物(Low Serum Growth Supplement,购自Cascade Biologics)的培养基Medium 200中,HuVEC细胞被铺在96池的平皿上,每池5000个细胞,37°C和5%CO₂存在下培养过夜。第二天,该培养基被吸出(aspirated),被替换成预热过的Opti-MEM I(Invitrogen公司制备),其中含有Oligo-Lipofectamine 2000(Invitrogen公司制备)的混合物(每1ml的Opti-MEM I培养基中含3mg的Lipofectamine 2000)。4小时后,该转染混合物被换成新配制的补充有低血清生长添加物的新鲜培养基Medium 200,在37°C和5%CO₂存在下培养。16-24小时后,约80%的克隆率,细胞用磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffer saline,PBS)洗涤,溶化,用Qiagen RNeasy Kit试剂盒进行RNA提纯。CTGF信息由定量实时聚合酶链反应(RT-PCR)测量(引物/探针组见下面),结果被归一化为总RNA。

[0318] 统计分析

[0319] 每个样品一式两份做分析,竖条表示两个测量值之间的差距。

[0320] 结果与讨论

[0321] 靶向每个靶合成了大约150个新序列,并对评估了其在培养液中阻止CTGF的活性,新的CTGF寡核苷酸(SEQ ID NOs:28,30,39,40,45,52,56,78,125,和166)表现出优异的对人CTGF mRNA表达的抑制。识别出的高度活性的寡核苷酸见图7。

[0322] 若干新的内显子(图4,5和6)以及外显子(图1,2和3)的寡核苷酸令人惊讶地远比过去筛选出来的化合物包括ISIS124238活性要高。

[0323] 反义靶向外显子的功效一般要比那些靶向内含子的高(图7A)。图7B提供了这些外显子核苷酸的序列。

[0324] 利用上述的方法,在HuVEC细胞中通过剂量应答实验确认了10个活性最好的反义寡核苷酸。

[0325] 实验9:结缔组织生长因子蛋白水平的Western印迹分析

[0326] Western印迹分析(免疫印迹分析)用标准方法来进行。在寡核苷酸处理后的16-24小时后收集细胞,用PBS洗涤一次,悬浮在Laemmli缓冲液中(100μL/池),煮沸5分钟,上载到16%SDS-PAGE凝胶上。凝胶在150V下运行1.5个小时,转移到薄膜上作Western印迹。采用了适当的靶向结缔组织生长因子的初级抗体,并使用直接抗初级抗体种类的放射标记的或荧光标记的次级抗体。用PHOSPHORIMAGER™(Molecular Dynamics,Sunnyvale Calif.)使条带可视化。

[0327] 实验10:CTGF反义寡核苷酸实验小鼠毒性研究

[0328] 研究目的

[0329] 该实验毒性研究的目的是评估三种向靶人CTGF的寡核苷酸对正常的雄性BALB/c小鼠的潜在毒性。试验的寡核苷酸是ISIS序列412294(SEQ ID NO:39),412295(SEQ ID NO:40),和418899(SEQ ID NO:166)。

[0330] 方法

[0331] 雄性BALB/c小鼠(约8周大),重约25克,在整个研究过程中喂以一般的饮食实验室食物。通过皮下(SQ)向鼠给药,每周两次25或50mg/kg的反义寡核苷酸,连续4周(n=6)。测量了下述的端点值:

[0332] ●每周体重;

[0333] ●4周时的血浆化学组成;

[0334] ●尸体剖检时的器官重量,体重;和

[0335] ●肝和肾的H&E (hematoxylin-eosi,苏木精-伊红染色) 色斑

[0336] 结果

[0337] 跟随4周给药25或50mg/kg的反义寡核苷酸ISIS序列412294 (SEQ ID NO:39), 412295 (SEQ ID NO:40), 和418899 (SEQ ID NO:166) 的结果表明若干端点值与盐水处理对照组小鼠的有较大不同。这些区别包括:

[0338] 1) 血浆丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平在跟随4周给药25或50mg/kg的412294 (SEQ ID NO:39), 412295 (SEQ ID NO:40), 或者25mg/kg的418899 (SEQ ID NO:166) 后与盐水(媒介物)对照组的水平相似,但是,给药50mg/kg的418899 (SEQ ID NO:166) 的小鼠显示出ALT/AST水平升高,明显高于对照组所观察到的值(见图9A和9B)。这个结果令人感到意外,在以往的研究或基于细胞的试验中没有预期过。

[0339] 2) 50mg/kg的412295处理组的体重增加大大低于对照组的体重增加(见图10)。

[0340] 结论

[0341] 序列SEQ ID NO:39 (ISIS 412294) 没有表现出如序列SEQ ID NO:40 (ISIS 412295) 和序列SEQ ID NO:166 (ISIS 418899) 那样多的毒物学特征。其结果完成出于意料,通过这些寡核苷酸序列的细胞培养液行为而没有预计到。

[0342] 实验11:鼠的CTGF反义寡核苷酸 (SEQ ID NO:163) 对胶原的作用以及CTGF mRNA在受伤的鼠身上的表达

[0343] 目的

[0344] CTGF反义寡核苷酸SEQ ID NO:163 (ISIS 412442) 被用于检验CTGF反义寡核苷酸降低CTGF和Co11A2(一种瘢痕的生物标志物)在瘢痕的鼠动物模型上表达的能力。该反义寡核苷酸与SEQ ID NO:39 (ISIS 412294) 的化学结构相同,但是其序列已稍加修饰,以100%与鼠mRNA序列互补。

[0345] 创伤

[0346] 四支全厚度0.8cm的活组织检查钻被插进10周大(研究项目的第一天)无毛鼠的背部,脊柱中线的每一边有两支。伤口保持开放,但是用消毒咬合绷带敷裹。

[0347] 反义寡核苷酸给药

[0348] 在活检后的第1,5,9,和13天,在动物右侧的两个活检点用3.0,1.0,0.3或0.1mg的反义寡核苷酸作真皮内的处理。动物左侧的活检点用磷酸盐缓冲盐水(PBS)作真皮内的处理。动物在活检后的第15天被处死。总量为200 μ L的反义寡核苷酸或PBS被输送进入每个钻孔器活检点。该200 μ L的体积被分成四份50 μ L的等分注射到伤口的四周围,大约离伤口的左,右,顶部,和底部0.25-0.5cm。

[0349] 样本收集/处死

[0350] 在处死的日子鼠被处以安乐死,从伤口中心得到一块带有0.5cm活检钻的皮肤样本,采用标准步骤从这些样本中提取mRNA。进行鼠CTGF和Co11A2的RT-PCR mRNA分析,采用标准曲线法作数据分析,采用RiboGreen作为内务/正态化基因。

[0351] 结果

[0352] 所有剂量处理鼠的结果在统计学上看出CTGF和Co11A2的表达都有显著降低(见图11)。这些结果清楚地证实了用2'-MOE修饰的反义寡核苷酸对CTGF表达的抑制会减少胶原在皮肤上的沉积,这会导致形成皮肤瘢痕的严重程度得以缓解。

[0353] 实验12:在兔身上CTGF反义寡核苷酸的单剂量真皮内药物动力学研究

[0354] 研究目的

[0355] 在兔子身上的该药物动力学研究的目的是评估CTGF反义寡核苷酸(SEQ ID NO:39, ISIS412294)在单次真皮内(intra-dermally)注射后的不同时间点的兔皮肤中的浓度。

[0356] 研究设计

[0357] 在研究的0天,所有动物通过单次注射100 μ L的CTGF反义寡核苷酸SEQ ID NO:39进行真皮内给药,浓度为50mg/mL(总剂量为5mg)。给动物施用反义寡核苷酸的位置在脊柱中线的左侧,与兔子的肩膀大致平行。将针插进去以使试验材料被朝着身体的底部往下注射进去。在第1,3,7或14天动物被处安乐死,获得两个全厚度为1.0cm的钻孔活检样,一个是在原注射点的中心,另一个是垂直往下距离0.5cm远。在分析反义寡核苷酸药物水平之前,样本被速冻并被保存在-80 $^{\circ}$ C下。结果代表了在显示的时间点上来自两个活检样的平均反义寡核苷酸水平。

[0358] 结果与结论

[0359] 真皮内给药后直至至少14天,反义寡核苷酸显示出显著的水平(见图12)。药物的治疗浓度为1-100 μ g/g组织。这些结果首次证实具有这种化学构型的2'-MOE反义寡核苷酸在皮肤中的停留时间会延长,这些结果清楚地表明这一类的化合物在皮肤中的治疗潜力。

[0360] 实验13:基因组搜索

[0361] SEQ ID NO:39诱发有害的,可能会翻译为“脱靶”(“off-target”)毒性的反义作用的潜力被评估,这是通过搜索人类基因组数据库寻找与SEQ ID NO:39核苷酸序列完全或部分同源或互补的序列来进行的。

[0362] 全面搜索了已经发表的人类DNA序列数据库以评估包含SEQ ID NO:39的序列是否与人类基因的已知阵列充分地同源,以至于不希望发生的反义或其他抑制的活性可能会发挥出来阻止靶标CTGF(结缔组织生长因子)外的人类基因产物的表达,因而诱发“脱靶”的效果。该搜索需要筛选范围在20个核苷酸(即SEQ ID NO:39的全长)下至12个核苷酸的同源序列。

[0363] 在与SEQ ID NO:39同源的有20个,19个或18个碱基的人类基因组中未检出脱靶位点。有18个,19个或20个碱基对而完全没有脱靶位点表明任何推论的脱靶活性的可能性是最低的。识别到有三个17-碱基的SEQ ID NO:39的同源物。其中之一是LRFN2基因在内含子之内。内含子典型地在mRNA到达细胞质,SEQ ID NO:39的作用位点之前就从转录物中被剪接出。因此,SEQ ID NO:39预料到不会影响LRFN2的表达。另外两个17-碱基的同源物位于基因间的间隔区(spacer regions)。基因间的间隔区通常不被转录,但是作为双链DNA存在于细胞核的隔间(nuclear compartment)中,与SEQ ID NO:39的作用位点隔开。因此不必担心

17-碱基的同源物。

[0364] 在发现的16-碱基,15-碱基和14-碱基同源物中间,只有一个是位于一个已知的或怀疑的转录物(即FRMD5,它编码在肝脏中活跃的一种类脂生物合成转移酶)之中。但是,该带有一个mRNA的正向转录物(sense transcript)的14-碱基SEQ ID NO:39同源物可能不会有益于反义活性(即,如果SEQ ID NO:39序列的一部分是与该mRNA转录物的序列互补的,而不是同源的,只可能发生杂交)。因此,序列SEQ ID NO:39不会影响这个转录。所有其他的16-碱基至14-碱基的同源物相应于内含子或者基因间的间隔区,没有重叠的转录物,没有预料的转录物或者被表达的序列标记物。没有13-碱基的同源物。与一个像SEQ ID NO:39有着预定靶标的那样的有20-碱基的寡核苷酸的结合相比,任何基于只有12个或更短的核苷酸同源物的转录物可能会呈现出一个热力学上不利的靶标。因此,12-碱基及更短的同源物不表现出有脱靶反义活性的显著潜力。

[0365] 因此,人基因组数据库搜索表明序列SEQ ID NO:39对于预定靶标具有高度的专一性,而仅有最低的脱靶效应的潜力。

[0366] 实验14:第I阶段单剂量真皮内临床研究以评估一种CTGF反义寡核苷酸(SEQ ID NO:39)的安全性及耐受度

[0367] 研究目的

[0368] 将人类CTGF反义寡核苷酸SEQ ID NO:39(Isis No.412294)通过真皮内给药施用给六个患者(总剂量80mg),作为第I阶段研究计划的一部分以评估单剂量药物的安全性及耐受度。

[0369] 结果

[0370] 除了局部注射点的反应,像红斑,发炎,痒,和硬结之外,没有报告过不利的事件。列出的不利事件报告了有约50%的受试者,在严重程度水平是“最小”上。未提到在血清化学组成,血液学,尿液分析,ECGs,生命体征,体格检查,和补体活化有什么变化。

[0371] 结论

[0372] 人可以很好地耐受CTGF反义寡核苷酸在预期是治疗剂量范围内的给药,证实了该化合物在治疗皮肤瘢痕上的安全性。

[0373] 实验15:真皮内给药后反义寡核苷酸(SEQ ID NO:39)在人皮肤中的药物水平

[0374] 在一项初期的临床研究中,在一同期组群的患者中评估了皮肤药物水平,其中5个患者每人接受了40mg的反义寡核苷酸(ASO)(10份相等剂量给药,每份4mg)。在头一天单剂量给药ASO后的21天在模拟的手术伤口位置上(在皮肤上划一条线作为给药位置的参考)获得了皮肤活检物。钻活检物(punch biopsy)由一块4mm圆柱形组织样本的芯子构成。利用毛细管电泳和荧光标记的序列特异性探针来测定ASO的水平,测得为84.2 μ g/g组织。ASO药物治疗浓度预期为1-100 μ g/g组织。

[0375] 这些结果首次证实了真皮内给药之后,具有这种化学构型的2'-MOE反义寡核苷酸在人类皮肤中的停留时间会延长,这些结果清楚地表明这一类的化合物在皮肤中的治疗潜力。

[0376] 实验16:SEQ ID NO:39在经受选择腹壁整形术的受试者身上降低瘢痕严重程度的第II阶段随机,双盲,受试者内的对照临床功效和安全性研究

[0377] 该项研究是随机的,双盲,受试者内对照的研究以评估CTGF反义寡核苷酸SEQ ID

NO:39 (即该药品) 的功效和安全性。通过真皮内注射到经历可选择的腹壁整形术的受试者, 该药产品被施用到贴近腹壁整形术切口的两侧。

[0378] 在中线两侧的一段腹壁整形术切口, 刚好在阴毛的外侧, 在手术切口关闭之后用药品或安慰剂处理。

[0379] 该研究的延续时间约为24周。受试者接受腹壁整形术在第一天, 接着施用该药品和安慰剂10周以上。每4周观察和评估瘢痕直至第12周, 在第24周时再观察和评估瘢痕。

[0380] 通过对切口的每个匹配对 (matched pair) 评级来确定功效。

[0381] 腹壁整形术后的第12和24周, 采用下述的两种方法对切口瘢痕的严重程度评分以评估功效:

[0382] ●利用视觉类比评分 (visual analog scale, VAS) 的专家组对不知情的照片的评估

[0383] ●调查者瘢痕评估标度, 受试者瘢痕评估标度

[0384] SEQ ID NO:39对这些标准评判是有效的。

[0385] 实验17:SEQ ID NO:39在经受因先前的乳房还原或乳房固定术引起的内侧瘢痕选择修正的受试者身上降低皮肤瘢痕的第II阶段随机, 双盲, 受试者内的对照的临床功效和安全性研究

[0386] 该项研究是随机的, 双盲, 受试者内对照的研究以评估CTGF反义寡核苷酸SEQ ID NO:39 (即该药品) 的功效和安全性。通过真皮内注射, 该药品被给到修正乳房还原瘢痕的内侧部分。手术后切口关闭, 该修正的乳房伤口/瘢痕内侧部分的任意一侧的一段用药产品或安慰剂处理。

[0387] 招募到达40名受试者参与该项研究。该研究的延续时间约为24周。受试者接受瘢痕修正在第一天, 接着10周施用该药品和安慰剂。每4周观察和评估瘢痕直至第12周, 在第24周时再观察和评估瘢痕。

[0388] 通过给每一个切口的匹配对评分来确定功效。在乳房还原瘢痕的内侧部分修正后的第12周和第24周, 采用对切口瘢痕严重程度评分的两种方法来评估功效:

[0389] ●利用视觉类比评分 (VAS) 的专家组对不知情的照片的评估

[0390] ●调查者瘢痕评估标度, 受试者瘢痕评估标度

[0391] SEQ ID NO:39对这些标准评判是有效的。

gtg agc ctc gtg ctg gac ggc tgc ggc tgc tgc cgc gtc tgc gcc aag	315
Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys	
50 55 60	
cag ctg ggc gag ctg tgc acc gag cgc gac ccc tgc gac ccg cac aag	363
Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys	
65 70 75	
ggc ctc ttc tgt gac ttc ggc tcc ccg gcc aac cgc aag atc ggc gtg	411
Gly Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val	
80 85 90	
tgc acc gcc aaa gat ggt gct ccc tgc atc ttc ggt ggt acg gtg tac	459
Cys Thr Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr	
95 100 105 110	
cgc agc gga gag tcc ttc cag agc agc tgc aag tac cag tgc acg tgc	507
Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys	
115 120 125	
ctg gac ggg gcg gtg ggc tgc atg ccc ctg tgc agc atg gac gtt cgt	555
Leu Asp Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg	
130 135 140	
ctg ccc agc cct gac tgc ccc ttc ccg agg agg gtc aag ctg ccc ggg	603
Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly	
145 150 155	
aaa tgc tgc gag gag tgg gtg tgt gac gag ccc aag gac caa acc gtg	651
Lys Cys Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val	
160 165 170	
gtt ggg cct gcc ctc gcg gct tac cga ctg gaa gac acg ttt ggc cca	699
Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro	
175 180 185 190	
gac cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc cag acc aca gag tgg	747
Asp Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp	
195 200 205	
agc gcc tgt tcc aag acc tgt ggg atg ggc atc tcc acc cgg gtt acc	795
Ser Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr	
210 215 220	
aat gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag agc cgc ctg tgc atg	843
Asn Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met	
225 230 235	
gtc agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac att aag aag ggc aaa	891
Val Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys	
240 245 250	

(CTGF)	
<400> 3	
acaagggcct cttctgtgac tt	22
<210> 4	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反向PCR引物	
(CTGF)	
<400> 4	
ggtacaccgt accaccgaag at	22
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的PCR探针	
(CTGF)	
<400> 5	
tgtgcaccgc caaagatggt gct	23
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类GAPDH的正向PCR引物	
<400> 6	
gaaggtgaag gtcggagtc	19
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类GAPDH的反向PCR引物	
<400> 7	
gaagatggtg atgggatttc	20
<210> 8	
<211> 20	

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 针对人类GAPDH的PCR探针
 <400> 8
 caagcttccc gttctcagcc 20
 <210> 9
 <211> 2358
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>
 <221> exon
 <222> (207) .. (1256)
 <400> 9
 aaactcacac aacaactctt ccccgctgag aggagacage cagtgcgact ccaccctcca 60
 gctcgacggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agccccgcegc gtccccgtcc 120
 ccacctccga ccaccgccag cgetccaggc cccgccgctc cccgctcgcc gccaccgcegc 180
 cctccgctcc gcccgagtg ccaacc atg acc gcc gcc agt atg ggc ccc gtc 233
 Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val
 1 5
 cgc gtc gcc ttc gtg gtc ctc ctc gcc ctc tgc agc cgg ccg gcc gtc 281
 Arg Val Ala Phe Val Val Leu Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val
 10 15 20 25
 ggc cag aac tgc agc ggg ccg tgc cgg tgc ccg gac gag ccg gcg ccg 329
 Gly Gln Asn Cys Ser Gly Pro Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro
 30 35 40
 cgc tgc ccg gcg ggc gtg agc ctc gtg ctg gac ggc tgc ggc tgc tgc 377
 Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys
 45 50 55
 cgc gtc tgc gcc aag cag ctg ggc gag ctg tgc acc gag cgc gac ccc 425
 Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro
 60 65 70
 tgc gac ccg cac aag ggc ctc ttc tgt gac ttc ggc tcc ccg gcc aac 473
 Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn
 75 80 85
 cgc aag atc ggc gtg tgc acc gcc aaa gat ggt get ccc tgc atc ttc 521
 Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe
 90 95 100 105
 ggt ggt acg gtg tac cgc agc gga gag tcc ttc cag agc agc tgc aag 569

Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys	
110	115
tac cag tgc acg tgc ctg gac ggg gcg gtg ggc tgc atg ccc ctg tgc	617
Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys	
125	130
135	
agc atg gac gtt cgt ctg ccc agc cct gac tgc ccc ttc ccg agg agg	665
Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg	
140	145
150	
gtc aag ctg ccc ggg aaa tgc tgc gag gag tgg gtg tgt gac gag ccc	713
Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro	
155	160
165	
aag gac caa acc gtg gtt ggg cct gcc ctc gcg gct tac cga ctg gaa	761
Lys Asp Gln Thr Val Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu	
170	175
180	185
gac acg ttt ggc cca gac cca act atg att aga gcc aac tgc ctg gtc	809
Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val	
190	195
200	
cag acc aca gag tgg agc gcc tgt tcc aag acc tgt ggg atg ggc atc	857
Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile	
205	210
215	
tcc acc cgg gtt acc aat gac aac gcc tcc tgc agg cta gag aag cag	905
Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln	
220	225
230	
agc cgc ctg tgc atg gtc agg cct tgc gaa gct gac ctg gaa gag aac	953
Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn	
235	240
245	
att aag aag ggc aaa aag tgc atc cgt act ccc aaa atc tcc aag cct	1001
Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro	
250	255
260	265
atc aag ttt gag ctt tct ggc tgc acc agc atg aag aca tac cga gct	1049
Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala	
270	275
280	
aaa ttc tgt gga gta tgt acc gac ggc cga tgc tgc acc ccc cac aga	1097
Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg	
285	290
295	
acc acc acc ctg ccg gtg gag ttc aag tgc cct gac ggc gag gtc atg	1145
Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met	
300	305
310	
aag aag aac atg atg ttc atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt	1193

Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys
 315 320 325
 ccc gga gac aat gac atc ttt gaa tcg ctg tac tac agg aag atg tac 1241
 Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr
 330 335 340 345
 gga gac atg gca tga agccagagag tgagagacat taactcatta gactggaact 1296
 Gly Asp Met Ala
 tgaactgatt cacatctcat tttccgtaa aatgatttc agtagcacia gttatttaaa 1356
 tctgtttttc taactggggg aaaagattcc cacccaattc aaaacattgt gccatgtcaa 1416
 acaaatagtc tatcaacccc agacactggg ttgaagaatg ttaagacttg acagtggaac 1476
 tacattagta cacagcacca gaatgtatat taagggtgtg ctttaggagc agtgggaggg 1536
 taccagcaga aaggttagta tcatcagata gcattctata cgagtaatat gectgctatt 1596
 tgaagtgtaa ttgagaagga aaatttttagc gtgctcactg acctgectgt agccccagtg 1656
 acagctagga tgtgcattct ccagccatca agagactgag tcaagttgtt ccttaagtca 1716
 gaacagcaga ctgagctctg acattctgat tcgaatgaca ctgttcagga atcggaatcc 1776
 tgtcgattag actggacagc ttgtggcaag tgaatttgcc tgtaacaagc cagatTTTT 1836
 aaaatttata ttgtaaata tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatatatata tatatgtaca 1896
 gttatctaag ttaatttaaa gttgtttgtg cttttttatt tttgttttta atgctttgat 1956
 atttcaatgt tagcctcaat ttctgaacac cataggtaga atgtaaagct tgtctgatcg 2016
 ttcaaagcat gaaatggata cttatatgga aattctgctc agatagaatg acagtccgctc 2076
 aaaacagatt gtttgcaaag gggaggcatc agtgccttg gcaggctgat ttctaggtag 2136
 gaaatgtggg agcctcactt ttaatgaaca aatggccttt attaaaaact gactgactct 2196
 atatagctga tcagtttttt cacctggaag catttgtttc tactttgata tgactgtttt 2256
 tcggacagtt tatttgttga gagtgtgacc aaaagttaca tgtttgcacc tttctagttg 2316
 aaaataaagt gtatattttt tctataaaaa aaaaaaaaa aa 2358
 <210> 10
 <211> 6001
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 10
 tatattattc actgtcaate ttagtttata tccagataca acagggtaca ctgctcttgt 60
 aatggaatca gacttcttat ttaacaaga caaaccaat ccaatccaca tttgaagatt 120
 ataggtttta atataagaaa atgcaactcat ttctcaaaga cctagtgaa gctgtgttta 180
 aatgctccta ggtgaacccc ctttgcatec cagtgttccc acctgacac ccagagcccc 240
 tacctacca acacagaatc atttgetctg atagaacaat ggateccttt ttctggaaac 300
 attgatggcc actcctccct tgccttgcc tatataaac tectacatat attaagagaa 360
 aactaagcaa gagttttgga aatctgcccc aggagactgc atcttgagtc acacgcgtct 420
 ttgttctctt tcttgccca aaaccgttac ctcaagtgc aatgatcaa atctcaaata 480
 tagaattcag ggttttacag gtaggcactc tgaggatttc aatggttaa aagcaactca 540

ctccctttct actctttgga gagtttcaag agcctatage ctctaaaacg caaatcattg 600
 ctaaggggtg ggggggagaa accttttcga attttttagg aattcctgct gtttgccctc 660
 tcagctacct acttcctaaa aaggatgtat gtcagtggac agaacagggc aaacttattc 720
 gaaaaagaaa taagaaataa ttgccagtgt gtttataaat gatatgaatc aggagtgggtg 780
 cgaagaggat agggaaaaaa aaattctatt tgggtgctgga aatactgcmc tttttttttt 840
 cctttttttt tttttctgtg agctggagtg tgccagcttt ttcagacgga ggaatgctga 900
 gtgtcaaggg gtcaggatca atccgggtgtg agttgatgag gcaggaaggt ggggaggaat 960
 gcgaggaatg tccctgtttg tgtaggactc cattcagctc attggcgagc cgcggccgcc 1020
 cggagcgtat aaaagcctcg ggccgccgc cccaaactca cacaacaact ctccccgct 1080
 gagaggagac agccagtgcg actccacct ccagctcgac ggcagccgcc ccggccgaca 1140
 gccccgagac gacagcccgg cgcgtcccgg tccccactc cgaccaccgc cagcgtcca 1200
 ggccccgccg ctccccgctc gccgccaccg cgccctccgc tccgcccga gtgccaacca 1260
 tgaccgccgc cagtatgggc cccgtccgag tcgcttctgt ggtctctctc gccctctgca 1320
 gccgggtaag cgccgggagc ccccgtgag gccggcggt gccagggagg gactcggggc 1380
 cggccgggga gggcgtgcgc gccgaccgag cgccgtgac cgccctgtc tcctgcage 1440
 cggccgtcgg ccagaactgc agcgggcccgt gccggtgccc ggacgagccg gcgccgcgt 1500
 gcccgccggg cgtgagcctc gtgtggagc gctgcggctg ctgccgcgc tgcccaagc 1560
 agctgggcga gctgtgcacc gagcgcgacc catgcgacc gcacaagggc ctattctgtc 1620
 acttcggctc cccggccaac cgcaagatcg gcgtgtgac cggtagacc cgcagcccc 1680
 accgctaggt gtccggccgc ctctccctc acgcccacc gcccgctgga aaaagaaacc 1740
 gctcggactg agtttcttcc tccagctgct gccagcccgc ccctgcage ccagatccca 1800
 actcgcacc ctgacgctct ggatgtgaga gtgcccact gccctgacctc tgcaccccc 1860
 accctctct tcccttctc ttctccagc aaagatgggt ctccctgcat ctccggtggt 1920
 acggtgtacc gcagcggaga gtccttcag agcagctgca agtaccagt cacgtgcctg 1980
 gacggggcgg tgggctgcat gccctgtgc agcatggagc ttcgtctgcc cagccctgac 2040
 tgccccttcc cgaggagggt caagctgccc gggaaatgct gcgaggagt ggtgtgtgac 2100
 gagcccaagg accaaaccgt ggttgggct gccctcgcgg gtgagtcgag tcttctctta 2160
 agtcagggtc gtgattctct cccagggagg gactcctaac tgtgccgacc gaacggggga 2220
 aataccttat ccagcgctt tacatgggtt ttgtgtgctc tgcctctgca gcttaccgac 2280
 tggaagacac gtttgccca gaccacta tgattagac caactgctg gtccagacca 2340
 cagagtggag cgcctgttcc aagacctgt ggatgggcat ctccaccgg gttaccaatg 2400
 acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgctgtg catggtcagg cttgcgaag 2460
 ctgacctgga agagaacatt aaggtacatg ttctgctctc attaactatt tttcacagga 2520
 aaaacagtgg ataggacca acttagggt cttgccaccg ttgttagtat aagcccgtta 2580
 tctccaaaac tatctaacca ttgagctgtt ttgtggaat gagagcttgt gtaatagcaa 2640
 ccaccagtt tccactacga aatcttccac agggttagtt aattcaagac attccaagag 2700
 aggtctggc tatttttggc catagcaaat gagactcaaa ctctctccc tcaaaatata 2760
 aacagaagtc agacaacaga agactaaaac acagagggtt gaagaaagcc actctcttg 2820
 tagagtcgct gattttttt tttctctct ctttccctt gtcttctta gaaggcaaa 2880

aagtgcaccc gtactcccaa aatctccaag cctatcaagt ttgagcttcc tggtgcacc 2940
agcatgaaga cataccgagc taaattctgt ggagtatgta ccgacggccg atgctgcacc 3000
ccccacagaa ccaccaccct gccggtggag ttcaagtgcc ctgacggcga ggtcatgaag 3060
aagaacatga tgttcatcaa gacctgtgcc tgccattaca actgtcccgg agacaatgac 3120
atctttgaat cgctgtacta caggaagatg tacggagaca tggcatgaag ccagagagtg 3180
agagacatta actcattaga ctggaacttg aactgattca catctcattt ttccgtaaaa 3240
atgatttcag tagcacaagt tatttaaate tgtttttcta actgggggaa aagattccca 3300
cccaattcaa aacattgtgc catgtcaaac aatagtgta tcaaccccag aactgggtt 3360
gaagaatggt aagacttgac agtggaaacta cattagtaca cagcaccaga atgtatatta 3420
aggtgtggct ttaggagcag tgggagggtta ccagcagaaa ggttagtata atcagatagc 3480
atcttatacg agtaatatgc ctgctatttg aagtgtatg gagaaggaaa attttagcgt 3540
gctcactgac ctgcctgtag cccagtgac agctaggatg tgcattctcc agccatcaag 3600
agactgagtc aagttgttcc ttaagtcaga acagcagact cagctctgac attctgattc 3660
gaatgacact gttcaggaat cggaatcctg tcgattagac tggacagctt gtggcaagtg 3720
aatttgctg taacaagcca gattttttaa aatttatatt gtaaatttg tgtgtgtgtg 3780
tgtgtgtgta tatatatata tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt tgtttgtgcc 3840
tttttatttt tgtttttaat gctttgatat ttcaatgta gcctcaattt ctgaacacca 3900
taggtagaat gtaaagctg tctgatcgtt caaagcatga aatggatact tatatggaaa 3960
ttctgctcag atagaatgac agtccgtaa aacagattgt ttgcaaaggg gaggcatcag 4020
tgtccttggc aggctgattt ctaggtagga aatgtggtag cctcactttt aatgaacaaa 4080
tggcctttat taaaaactga gtgactctat atagctgac agttttttca cctggaagca 4140
tttgtttcta ctttgatatg actgttttcc ggacagttta ttgttgaga gtgtgaccaa 4200
aagttacatg tttgcacctt tctagttgaa aataaagtgt atatttttcc tataaagggc 4260
ttggttattc atttatcctt ctaaacattt ctgagtttcc ttgagcataa ataggaagtt 4320
cttattaate ataagataat tcaccaataa ttttctaaat atctttaatt attctataca 4380
ttaataaatt gattattcca tagaattttt atgtaaacat acttcacact gaatcaagta 4440
tcacagactt gcaggcatac acaccacatt gactatacag ccattttttt tgttatcttc 4500
acagaacttt atagacactt taaattcaat tctctctaga ttacttcagt ctccattaac 4560
cctgttgtat tacacttggc ctttttggca ttgtacctc tctggccgtt ataggttagt 4620
ttccaaccct tcacatcaca aactagtcta tgtgecttgc acgtggaaaa tgtttacatt 4680
ttttaaaaaat tttatgctct aggtctgttt ctgaacttea ttaccttact gttaaatctg 4740
aaaattatga aatgaaatcc tcatttaaat ggagctattt cataagtctt gttttgtata 4800
attccgtttt tggttgcat gataaccaat gacaaacaga tggcataaat agaaaaggga 4860
ggatgagcaa atcttccatt cattaacatt aatagaaatt tgttttgaaa gtaattcctc 4920
catttgccca agtcttttagc tttatcagac ttccagatta atgcatccta ccttaccag 4980
tggtttatac atgagaaaaat ggaattgttc aagaagcctc atgtggaac aatattgtac 5040
ctaccagggt aggtttttac taaagagtga accaaagtga atggtaaaca aaagcaatac 5100
accaaaggca actagaatct tctccacatg aggatagctg aggattctag gggaaaaaaa 5160
aattgcagac agactaactt ttccaaggt aattagcaac gttgtagtgc caatgtcatt 5220

tggacagaca aaaatacacc tgaaaataaa gactagctct acaaacaact gtccacacca 5280
 caaaccaaag ggaaaacttc ccgtgttcag aatgtgaaaa tttatggtea aaactctggg 5340
 ctttaaggat acaccacat ctgtatatag cagtgtctgcc aggagcagca cccacacctc 5400
 ccaaataaat gcgcatgtac acatacacat aggcacacac acagagtaca ctgttagttc 5460
 acacttcctt tctgtcaatt aattcctaac tgcaaagatg aagggccatg catgataaac 5520
 gagactgact actgaattag agcattctgg aaatatagaa gcagcaggaa aagcatagat 5580
 ttcacatttt ccaaataccc acattaaaga aaaaaaaaaag agtcactaga ttgcaaaaca 5640
 aaaatcccac aggcaatggt tctacaaaaa ttagatggca atgcacactt tcacccccca 5700
 aatatcggag gtaggggggtg ccaaatcatc aaccaccgta agatctgcac cgtgtcagca 5760
 catgtgtgag aaaagcagag aaacaacaag gtatctgatg cttctgagaa cacgagagct 5820
 ctcaaacagc cagcaggtag tcaactagata tatagaaggc caggctgaca gcagctgttg 5880
 aatctagtag gggtttgcc tagcaactcca acaaagctta caagccaggg ctgcctccca 5940
 ggagaagatc ctcatactcc tggaagtgga atctaaattg agcaggteac cagacagatg 6000
 t 6001
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸
 (CTGF)
 <400> 11
 ccagctgctt ggcgagacg 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸
 (CTGF)
 <400> 12
 gccagaaaagc tcaaacttga 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸
 (CTGF)

<400> 13	
ccacaagctg tccagtctaa	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 14	
ggtcacactc tcaacaaata	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 15	
aaacatgtaa cttttggta	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 16	
gggaagagtt gttgtgtgag	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 17	
agggtggagt cgcaactggct	20
<210> 18	

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 18	
acgaaggcga cgcggacggg	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 19	
gccgacggcc ggccggctgc	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 20	
ggtgcacacg ccgatcttgc	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 21	
tctttggcgg tgacacgcc	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 22	
gcaccatctt tggcggtgca	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 23	
gcagggagca ccatctttgg	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 24	
aagatgcagg gagcaccatc	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 25	
ccaccgaaga tgcagggage	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 26	

ccgtaccacc gaagatgcag	20
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 27	
gtacttgcag ctgctctgga	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 28	
gggcatgcag cccaccgccc	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 29	
aggcccaacc acggtttggg	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 30	
agggcaggcc caaccacggt	20
<210> 31	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 31	
taagccgcga gggcaggccc	20
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 32	
cccacaggtc ttggaacagg	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 33	
agatgcccacat cccacaggtc	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 34	
ccagtetaat gaggtaatgt	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

gtttgacatg gcacaatggt	20
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 40	
tatttgtttg acatggcaca	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 41	
tgatagacta tttgtttgac	20
<210> 42	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 42	
gttccactgt caagtcttaa	20
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 43	
tgtactaatg tagttccact	20
<210> 44	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 44	
cattctggtg ctgtgtacta	20
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 45	
taatatacat tctggtgctg	20
<210> 46	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 46	
acaccttaat atacattctg	20
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 47	
taaagccaca ccttaatata	20
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 48	
gtaccctccc actgctccta	20
<210> 49	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 49	
aagatgctat ctgatgatac	20
<210> 50	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 50	
cgtataagat gctatctgat	20
<210> 51	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 51	
aatagcaggc atattactcg	20
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 52	

tacacttcaa atagcaggca	20
<210> 53	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 53	
tcaattacac ttcaaatage	20
<210> 54	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 54	
ggagaatgca catcctagct	20
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 55	
atggctggag aatgcacatc	20
<210> 56	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 56	
tcttgatggc tggagaatgc	20
<210> 57	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 57	
gaatcagaat gtcagagctg	20
<210> 58	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 58	
cattgaaata tcaaagcatt	20
<210> 59	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 59	
ggctaacatt gaaatatcaa	20
<210> 60	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 60	
aattgagget aacattgaaa	20
<210> 61	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

gacaagcttt acattctacc	20
<210> 66	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 66	
gatcagacaa gctttacatt	20
<210> 67	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 67	
atgctttgaa cgatcagaca	20
<210> 68	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 68	
atttcatgct ttgaacgatc	20
<210> 69	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 69	
gatatcattt catgctttga	20
<210> 70	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 70	
ccatataagt atccatttca	20
<210> 71	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 71	
gaatttccat ataagtatcc	20
<210> 72	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 72	
tctgagcaga atttccatat	20
<210> 73	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 73	
tgtcatteta tctgagcaga	20
<210> 74	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

cagcctgcca aggacactga	20
<210> 79	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 79	
gaaatcagcc tgccaaggac	20
<210> 80	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 80	
acctagaaat cagcctgcca	20
<210> 81	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 81	
ttcctaccta gaaatcagcc	20
<210> 82	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 82	
taccacattt cctacctaga	20
<210> 83	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 83	
tgaggctacc acatttccta	20
<210> 84	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 84	
taaaagtgag gctaccacat	20
<210> 85	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 85	
caaatgcttc caggtgaaaa	20
<210> 86	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 86	
tagaaacaaa tgcttccagg	20
<210> 87	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 87	
tcatatcaaa gtagaaacaa	20
<210> 88	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 88	
tccgaaaaac agtcatatca	20
<210> 89	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 89	
acccggctgc agagggcgag	20
<210> 90	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 90	
cgcttaccgg gctgcagagg	20
<210> 91	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 91	

gacagggcgg tcagcggcgc	20
<210> 92	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 92	
agtccgagcg gtttcttttt	20
<210> 93	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 93	
aactcagtcc gagcggtttc	20
<210> 94	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 94	
aaagaaactc agtccgagcg	20
<210> 95	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 95	
tggagaaaga aactcagtcc	20
<210> 96	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 96	
gcagctggag aaagaaactc	20
<210> 97	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 97	
tggcagcagc tggagaaaga	20
<210> 98	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 98	
agggagcacc atctttggct	20
<210> 99	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 99	
tcaccgcga gggcaggccc	20
<210> 100	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

gagaatcacg accctgactt	20
<210> 105	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 105	
tgggagagaa tcacgaccct	20
<210> 106	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 106	
ctccctggga gagaatcacg	20
<210> 107	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 107	
ggtcggcaca gtaggactc	20
<210> 108	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 108	
cgttcggtcg gcacagttag	20
<210> 109	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 109	
cctggataag gtatttcccc	20
<210> 110	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 110	
acaaacacca tgtaaaacgc	20
<210> 111	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 111	
gagcacacaa acacatgta	20
<210> 112	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 112	
tgcgagagca gagcacacaa	20
<210> 113	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 113	
taagctgcga gagcagagca	20
<210> 114	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 114	
gtcggtaagc tgcgagagca	20
<210> 115	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 115	
ttccagtcgg taagctgcga	20
<210> 116	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 116	
acatgtacct taatgttctc	20
<210> 117	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 117	

gcagaacatg taccttaatg	20
<210> 118	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 118	
taggagcaga acatgtacct	20
<210> 119	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 119	
gttaatagga gcagaacatg	20
<210> 120	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 120	
tgaaaaatag ttaataggag	20
<210> 121	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 121	
ccactgtttt tcctgtgaaa	20
<210> 122	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 122	
aagttgggtc ctatccactg	20
<210> 123	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 123	
gccctaagtt gggtcctatc	20
<210> 124	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 124	
caagagccct aagttgggtc	20
<210> 125	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 125	
cgtggcaaga gccctaagtt	20
<210> 126	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 126	
cgggcttata ctaacaagcg	20
<210> 127	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 127	
gataacgggc ttataactaac	20
<210> 128	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 128	
ttggagataa cgggcttata	20
<210> 129	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 129	
tagttttgga gataacgggc	20
<210> 130	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 130	

ttagatagtt ttggagataa	20
<210> 131	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 131	
caatggtag atagttttg	20
<210> 132	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 132	
cagctcaatg gtagatagt	20
<210> 133	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 133	
caaacagct caatggtag	20
<210> 134	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 134	
tccagcaaaa cagctcaatg	20
<210> 135	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 135	
ctcattccag caaaacagct	20
<210> 136	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 136	
aagctctcat tccagcaaaa	20
<210> 137	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 137	
tacacaagct ctcattccag	20
<210> 138	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 138	
ggttgctatt acacaagetc	20
<210> 139	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

tgtcttgaat taactaaccc	20
<210> 144	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 144	
tggaatgtct tgaattaact	20
<210> 145	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 145	
gccagagcct ctcttgaat	20
<210> 146	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 146	
aaaaatagcc agagcctctc	20
<210> 147	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 147	
tgtccaaaaa tagccagagc	20
<210> 148	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 148	
tgctatgtcc aaaaatagcc	20
<210> 149	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 149	
tcatttgcta tgcctcaaaaa	20
<210> 150	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 150	
gagtctcatt tgctatgtcc	20
<210> 151	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 151	
agtttgagtc tcatttgcta	20
<210> 152	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

ggagtggcctt tcttcaaccc	20
<210> 157	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 157	
aggaagacaa gggaaaagag	20
<210> 158	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 158	
ttctaaggaa gacaaggaa	20
<210> 159	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 159	
tgcccttcta aggaagacaa	20
<210> 160	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 160	
ggatgcgagt tgggatctgg	20
<210> 161	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 161	
ccagctgctt ggcgcagacg	20
<210> 162	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 162	
gccagaaagc tcaaacttga	20
<210> 163	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 163	
ccacaagctg tccagtctaa	20
<210> 164	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 164	
ggtcacactc tcaacaaata	20
<210> 165	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 165	
aaacatgtaa ctttttgtca	20
<210> 166	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 166	
tgacatggca caatgttttg	20
<210> 167	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对人类结缔组织生长因子的反义核苷酸 (CTGF)	
<400> 167	
ccttcctga aggttcctcc	20

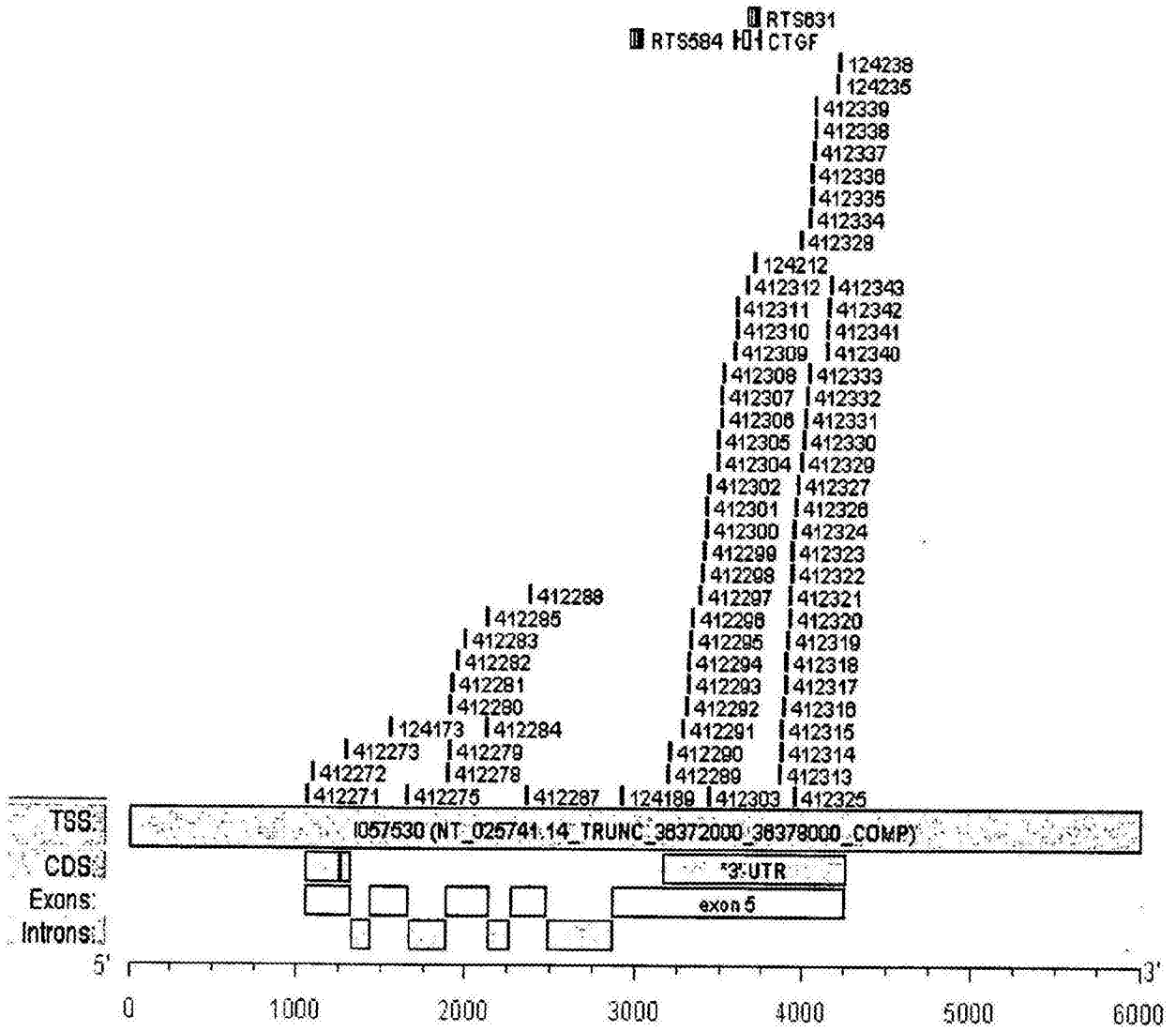


图1

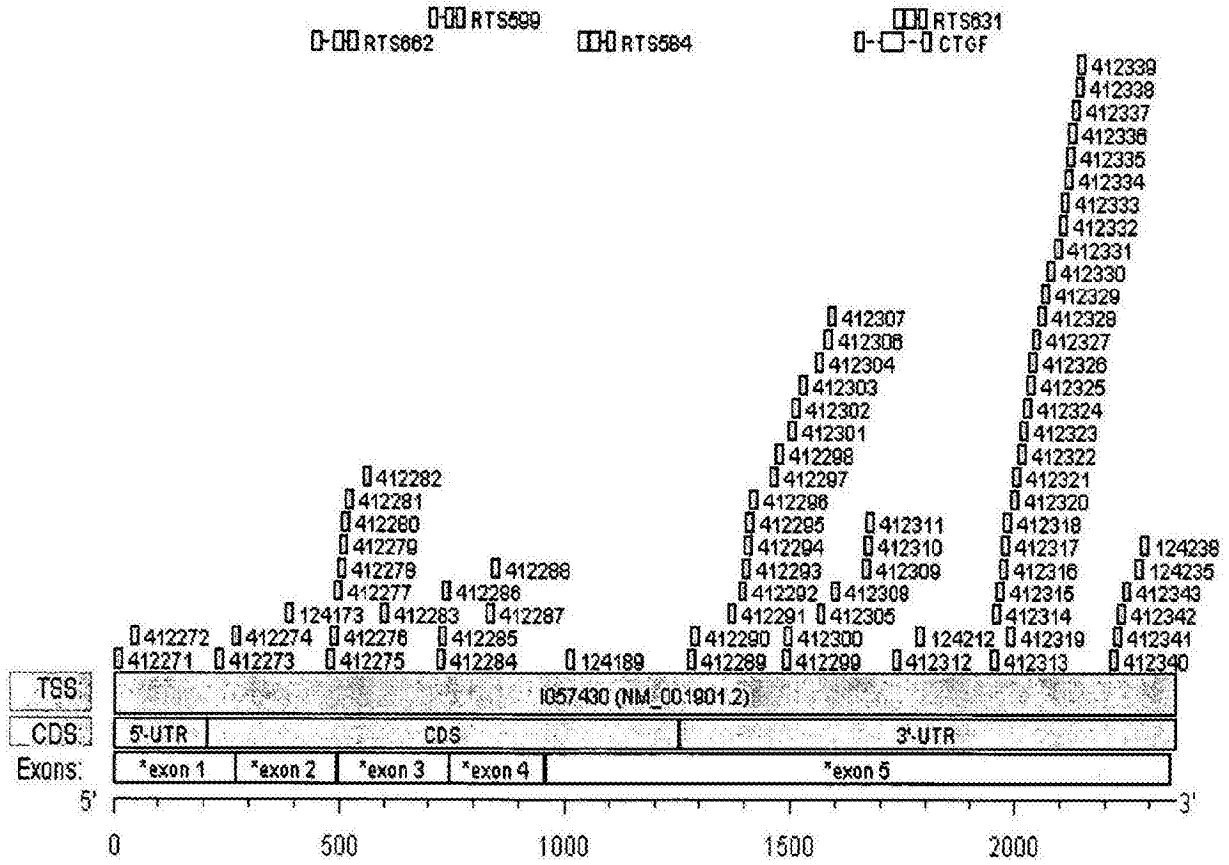


图2

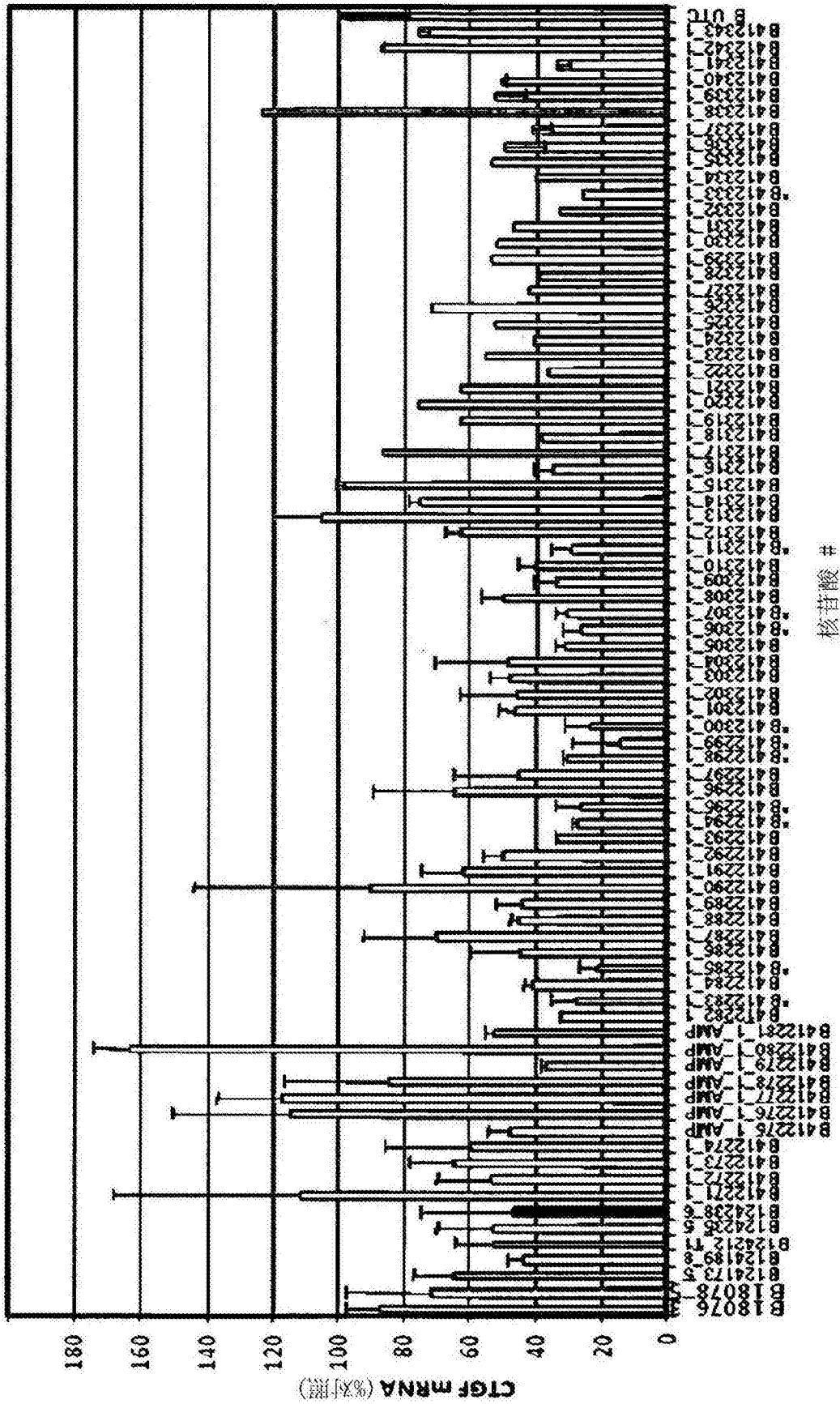


图3

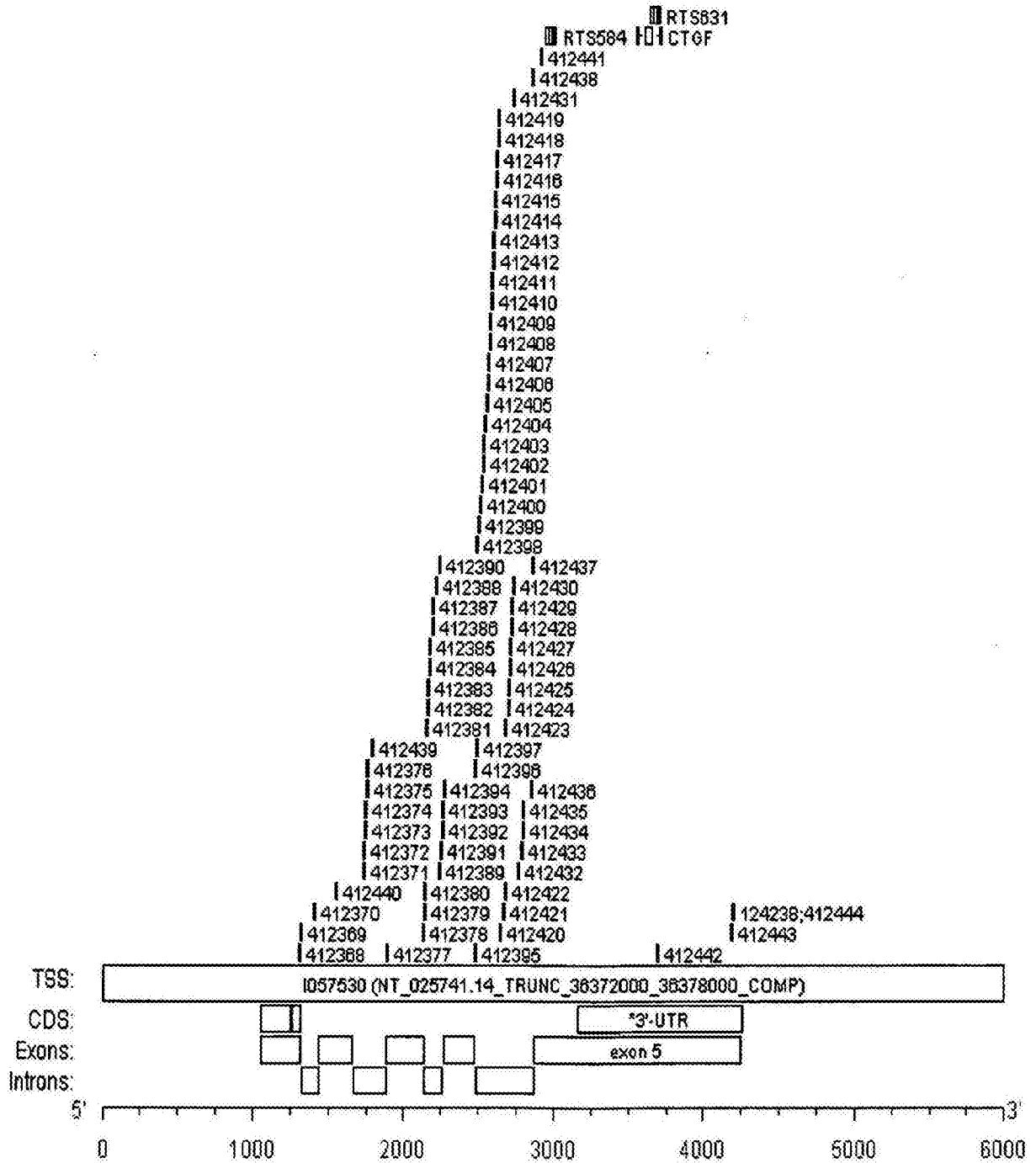


图4

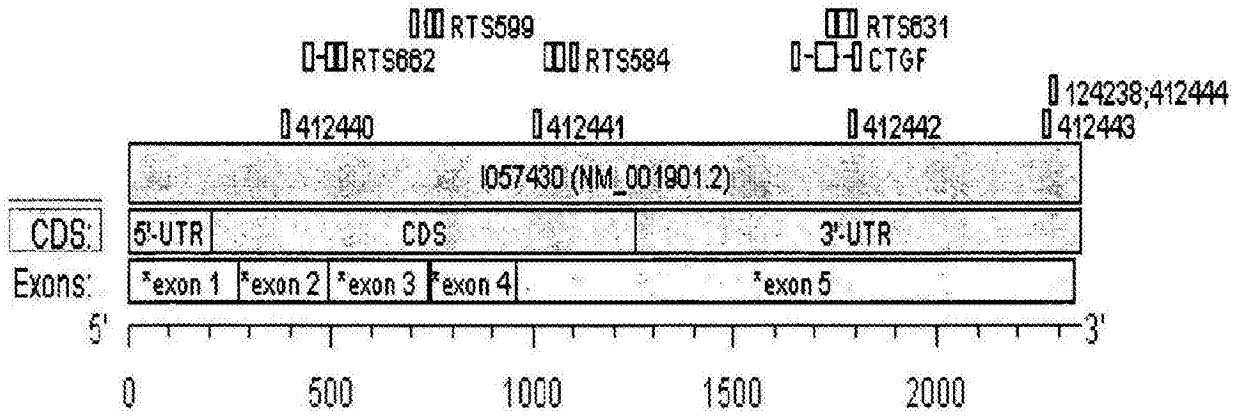


图5

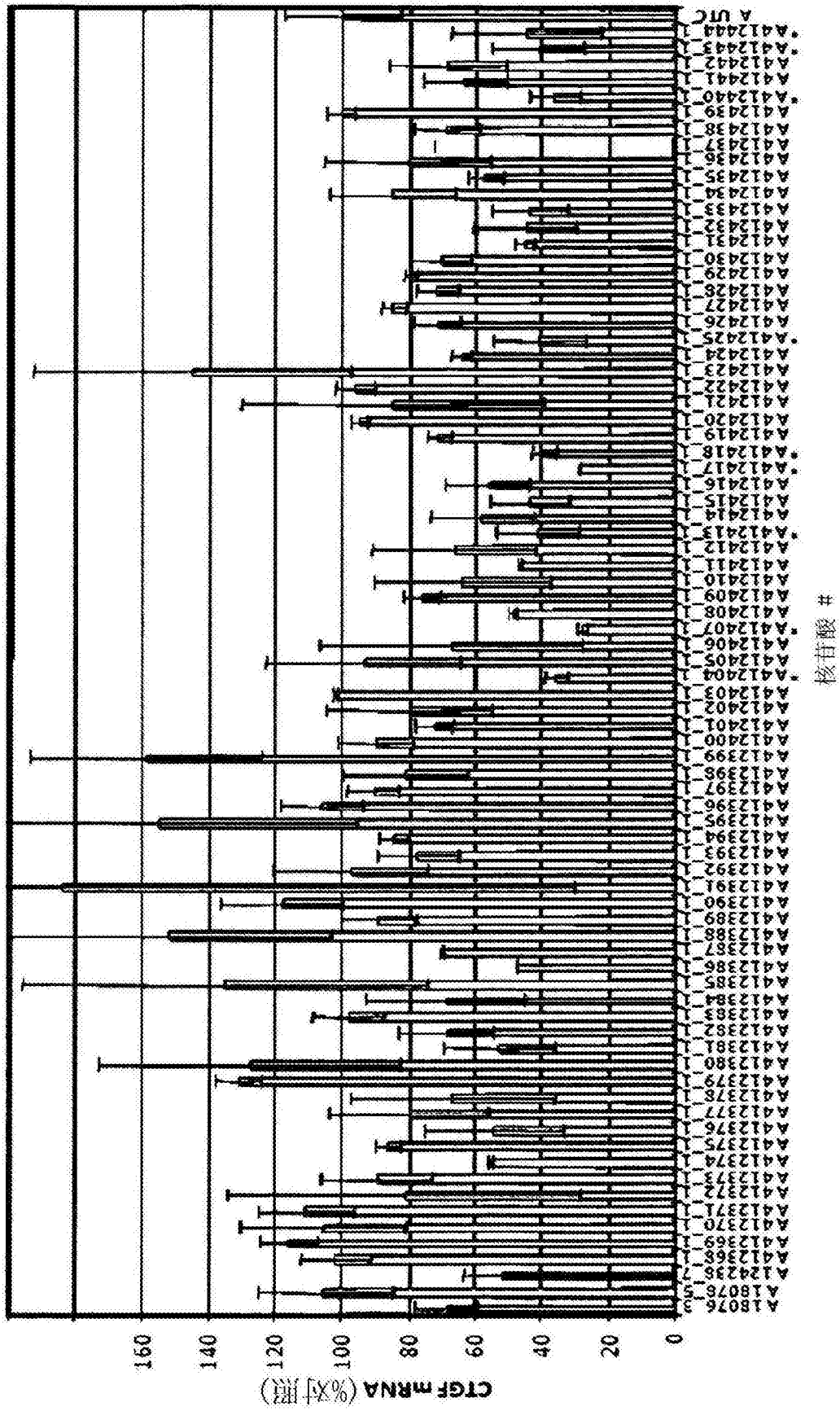


图6

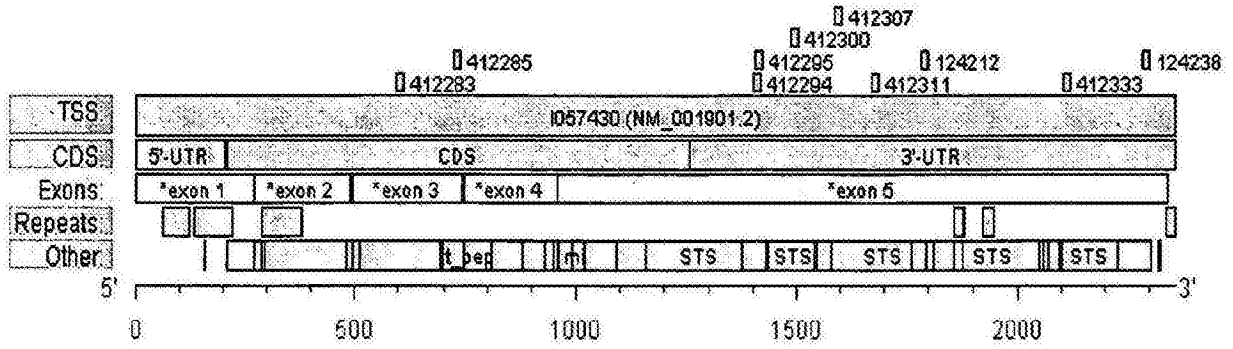


图7A

寡核苷酸 #	序列
412404	CGTGGCAAGAGCCCTAAGTT (INTRON)
412283	GGGCATGCAGCCCACCGCCC (EXON 3)
412285	AGGGCAGGCCCAACCACGGT (EXON 3)
412294	GTTTGACATGGCACAATGTT (EXON 5)
412295	TATTGTTTGACATGGCACA (EXON 5)
412300	TAATATACATTCTGGTGCTG (EXON 5)
412307	TACACTTCAAATAGCAGGCA (EXON 5)
412311	TCTTGATGGCTGGAGAATGC (EXON 5)
412333	CAGCCTGCCAAGGACACTGA (EXON 5)
124238	AAACATGTAACCTTTTGGTCA (Old leads)
124212	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA (Old leads)

图7B

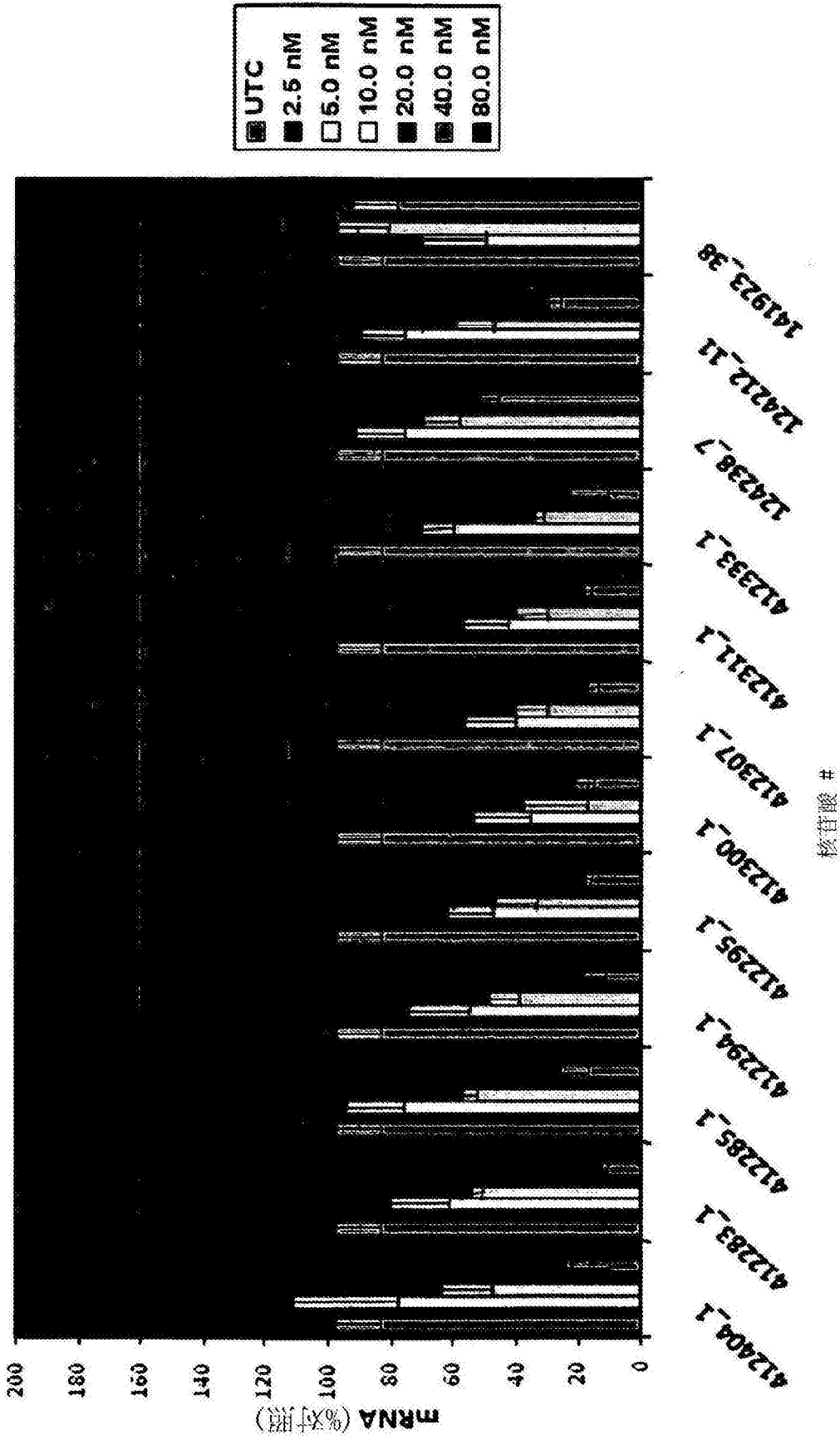


图8

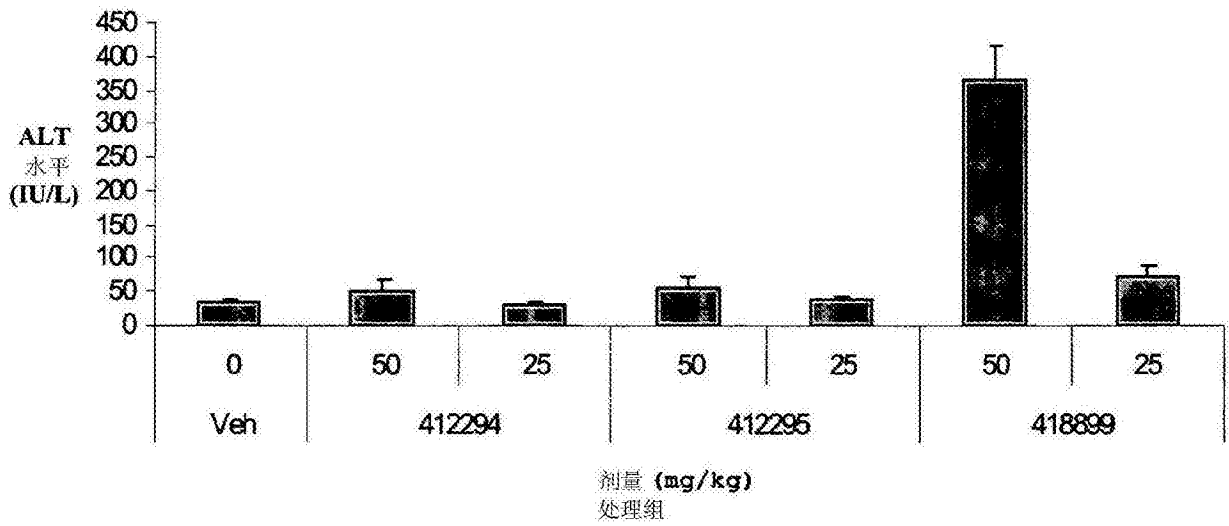


图9A

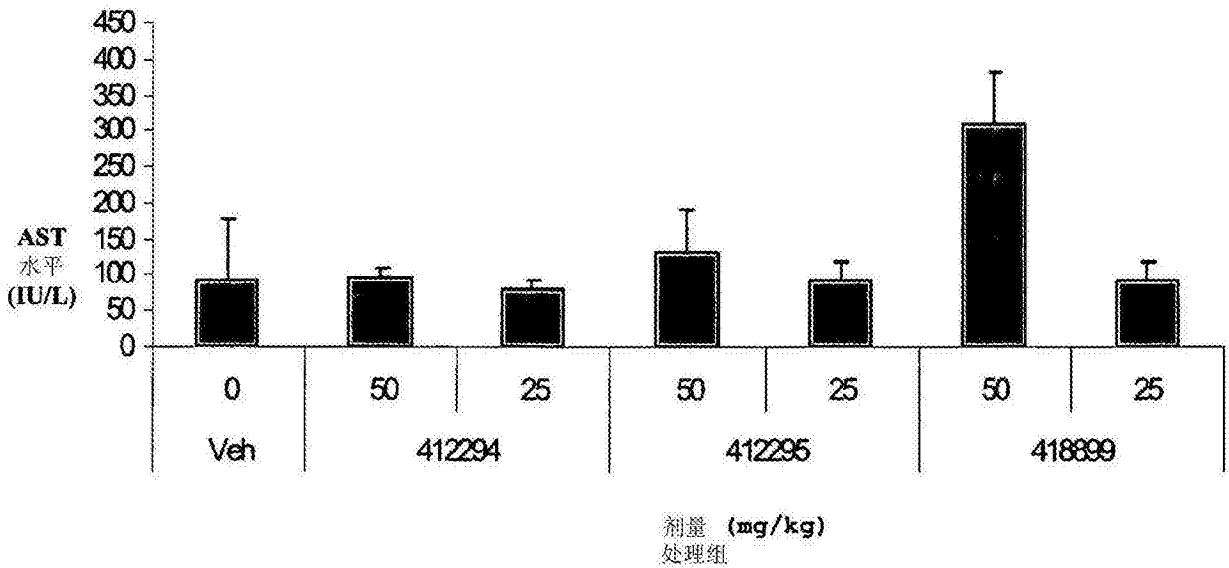


图9B

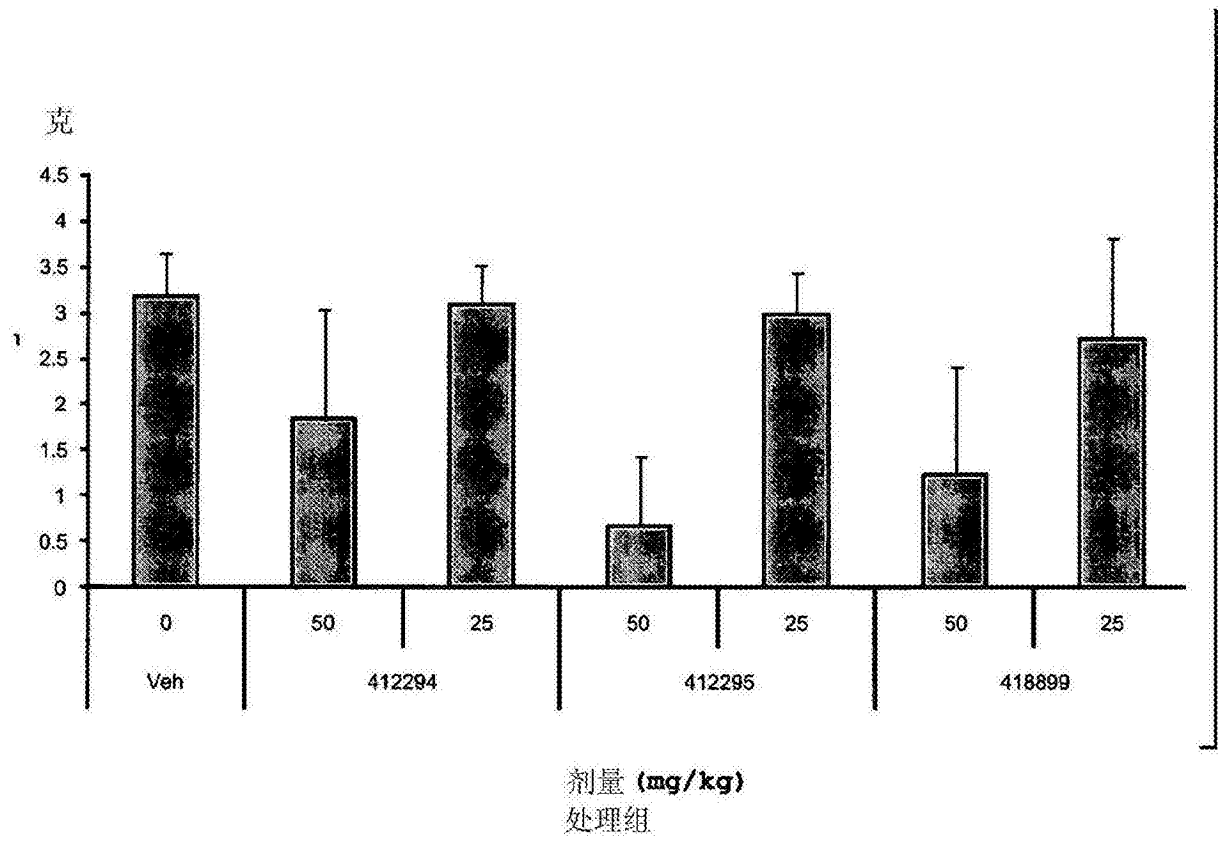


图10

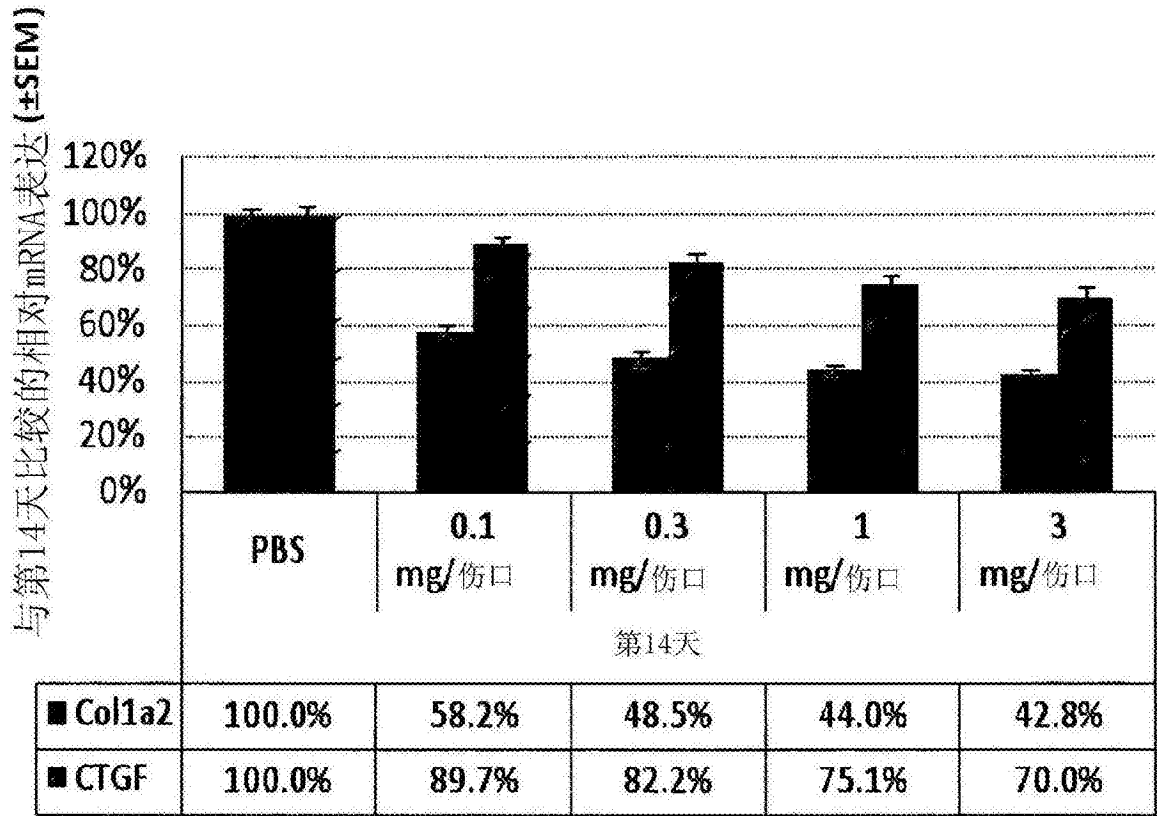


图11

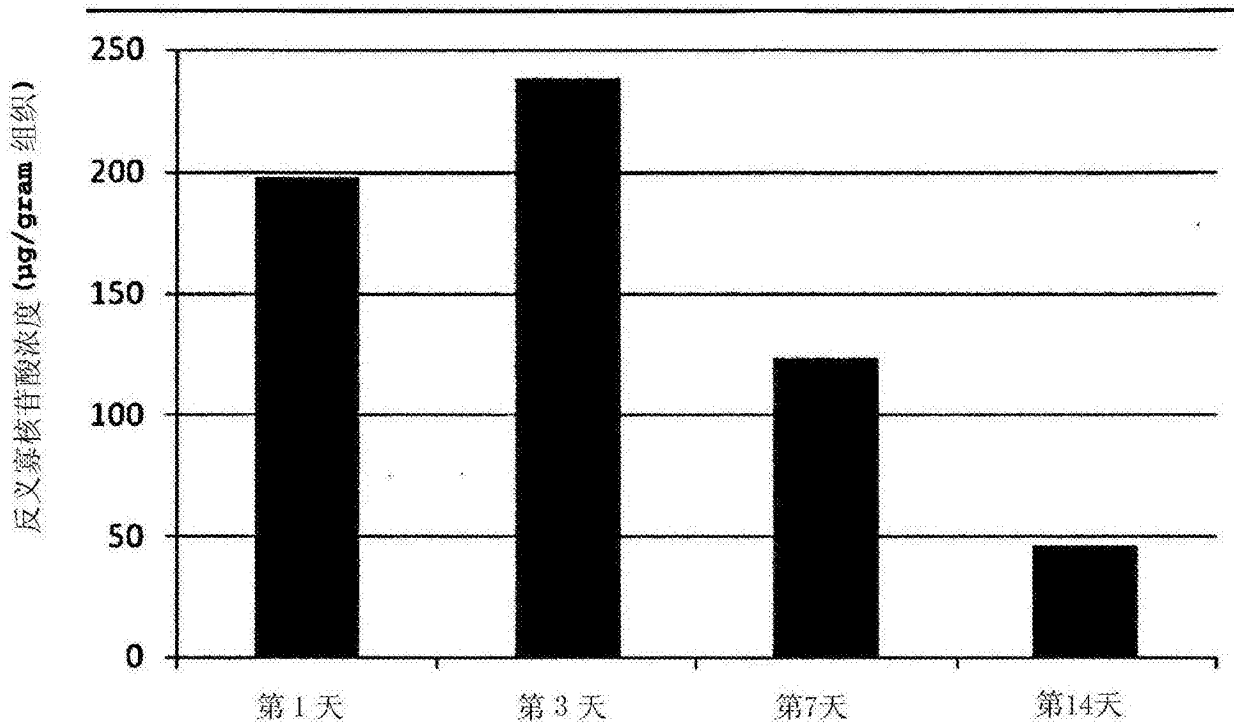


图12