



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101087623 B

(45) 授权公告日 2012.09.26

(21) 申请号 200580044861.9

(22) 申请日 2005.10.27

(30) 优先权数据

60/623,206 2004.10.29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.06.26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2005/001656 2005.10.27

(87) PCT申请的公布数据

W02006/045202 EN 2006.05.04

(73) 专利权人 托皮根药品公司

地址 加拿大魁北克省

(72) 发明人 K·泽姆祖米 P·伦齐

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 刘冬 黄可峻

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006.01)

A61K 31/711(2006.01)

A61K 31/115(2006.01)

(56) 对比文件

WO 9966037 A2, 1999.12.23, 说明书.

WO 03004511 A2, 2003.01.16, 说明书第 11

页第 1 段, 第 16 页第 2 段至第 23 页第 2 段, 第 26
页第 2 段, 第 27 页第 2 段, SEQ ID NO:21, 图 7C.

(54) 发明名称

用于治疗变态反应和肿瘤细胞增殖的反义寡核苷酸

(57) 摘要

本发明提供用于治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、全身性炎症和癌症中的至少一种的反义寡核苷酸。所述寡核苷酸针对编码受体的核酸序列, 所述受体选自 CCR3 受体以及 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同亚基。

Liwen Zhang, et al. functional expression and characterization of macaque C-Cchemokine receptor 3 (CCR3) and generation of potent antagonistic anti-macaque CCR3 monoclonal antibodies. the journal of biological chemistry 277 13. 2002, 277(13), P. 33799-33810.

Bruce L. Dargherty, et al.. cloning, expression, and characterization of the humaneosinophil eotaxin receptor. J. Exp. Med. 183. 1996, 183P. 2349-2354.

Mustapha Allam, et al. inhibition of GM-CSF/IL-3/IL-5 signaling by antisense oligodeoxynucleotides targeting the common beta chain of their receptors. antisense & nucleic acid drug development 11. 2001, 11P. 289-300.

Paul D. Ponath, et al.. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. J. Exp. Med. 183. 1996, 183P. 2437-2448.

审查员 邢振兰

权利要求书 2 页 说明书 33 页
序列表 11 页 附图 19 页

1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.
8.
9.
10.
11.
12.
13.
14.
15.
16.
17.
18.
19.
20.
21.
22.
23.
24.
25.
26.
27.
28.
29.
30.
31.
32.
33.
34.
35.
36.
37.
38.
39.
40.
41.
42.
43.
44.
45.
46.
47.
48.
49.
50.
51.
52.
53.
54.
55.
56.
57.
58.
59.
60.
61.
62.
63.
64.
65.
66.
67.
68.
69.
70.
71.
72.
73.
74.
75.
76.
77.
78.
79.
80.
81.
82.
83.
84.
85.
86.
87.
88.
89.
90.
91.
92.
93.
94.
95.
96.
97.
98.
99.
100.
101.
102.
103.
104.
105.
106.
107.
108.
109.
110.
111.
112.
113.
114.
115.
116.
117.
118.
119.
120.
121.
122.
123.
124.
125.
126.
127.
128.
129.
130.
131.
132.
133.
134.
135.
136.
137.
138.
139.
140.
141.
142.
143.
144.
145.
146.
147.
148.
149.
150.
151.
152.
153.
154.
155.
156.
157.
158.
159.
160.
161.
162.
163.
164.
165.
166.
167.
168.
169.
170.
171.
172.
173.
174.
175.
176.
177.
178.
179.
180.
181.
182.
183.
184.
185.
186.
187.
188.
189.
190.
191.
192.
193.
194.
195.
196.
197.
198.
199.
200.
201.
202.
203.
204.
205.
206.
207.
208.
209.
210.
211.
212.
213.
214.
215.
216.
217.
218.
219.
220.
221.
222.
223.
224.
225.
226.
227.
228.
229.
230.
231.
232.
233.
234.
235.
236.
237.
238.
239.
240.
241.
242.
243.
244.
245.
246.
247.
248.
249.
250.
251.
252.
253.
254.
255.
256.
257.
258.
259.
260.
261.
262.
263.
264.
265.
266.
267.
268.
269.
270.
271.
272.
273.
274.
275.
276.
277.
278.
279.
280.
281.
282.
283.
284.
285.
286.
287.
288.
289.
290.
291.
292.
293.
294.
295.
296.
297.
298.
299.
300.
301.
302.
303.
304.
305.
306.
307.
308.
309.
310.
311.
312.
313.
314.
315.
316.
317.
318.
319.
320.
321.
322.
323.
324.
325.
326.
327.
328.
329.
330.
331.
332.
333.
334.
335.
336.
337.
338.
339.
340.
341.
342.
343.
344.
345.
346.
347.
348.
349.
350.
351.
352.
353.
354.
355.
356.
357.
358.
359.
360.
361.
362.
363.
364.
365.
366.
367.
368.
369.
370.
371.
372.
373.
374.
375.
376.
377.
378.
379.
380.
381.
382.
383.
384.
385.
386.
387.
388.
389.
390.
391.
392.
393.
394.
395.
396.
397.
398.
399.
400.
401.
402.
403.
404.
405.
406.
407.
408.
409.
410.
411.
412.
413.
414.
415.
416.
417.
418.
419.
420.
421.
422.
423.
424.
425.
426.
427.
428.
429.
430.
431.
432.
433.
434.
435.
436.
437.
438.
439.
440.
441.
442.
443.
444.
445.
446.
447.
448.
449.
450.
451.
452.
453.
454.
455.
456.
457.
458.
459.
460.
461.
462.
463.
464.
465.
466.
467.
468.
469.
470.
471.
472.
473.
474.
475.
476.
477.
478.
479.
480.
481.
482.
483.
484.
485.
486.
487.
488.
489.
490.
491.
492.
493.
494.
495.
496.
497.
498.
499.
500.
501.
502.
503.
504.
505.
506.
507.
508.
509.
510.
511.
512.
513.
514.
515.
516.
517.
518.
519.
520.
521.
522.
523.
524.
525.
526.
527.
528.
529.
530.
531.
532.
533.
534.
535.
536.
537.
538.
539.
540.
541.
542.
543.
544.
545.
546.
547.
548.
549.
550.
551.
552.
553.
554.
555.
556.
557.
558.
559.
560.
561.
562.
563.
564.
565.
566.
567.
568.
569.
570.
571.
572.
573.
574.
575.
576.
577.
578.
579.
580.
581.
582.
583.
584.
585.
586.
587.
588.
589.
590.
591.
592.
593.
594.
595.
596.
597.
598.
599.
600.
601.
602.
603.
604.
605.
606.
607.
608.
609.
610.
611.
612.
613.
614.
615.
616.
617.
618.
619.
620.
621.
622.
623.
624.
625.
626.
627.
628.
629.
630.
631.
632.
633.
634.
635.
636.
637.
638.
639.
640.
641.
642.
643.
644.
645.
646.
647.
648.
649.
650.
651.
652.
653.
654.
655.
656.
657.
658.
659.
660.
661.
662.
663.
664.
665.
666.
667.
668.
669.
670.
671.
672.
673.
674.
675.
676.
677.
678.
679.
680.
681.
682.
683.
684.
685.
686.
687.
688.
689.
690.
691.
692.
693.
694.
695.
696.
697.
698.
699.
700.
701.
702.
703.
704.
705.
706.
707.
708.
709.
710.
711.
712.
713.
714.
715.
716.
717.
718.
719.
720.
721.
722.
723.
724.
725.
726.
727.
728.
729.
730.
731.
732.
733.
734.
735.
736.
737.
738.
739.
740.
741.
742.
743.
744.
745.
746.
747.
748.
749.
750.
751.
752.
753.
754.
755.
756.
757.
758.
759.
760.
761.
762.
763.
764.
765.
766.
767.
768.
769.
770.
771.
772.
773.
774.
775.
776.
777.
778.
779.
780.
781.
782.
783.
784.
785.
786.
787.
788.
789.
790.
791.
792.
793.
794.
795.
796.
797.
798.
799.
800.
801.
802.
803.
804.
805.
806.
807.
808.
809.
810.
811.
812.
813.
814.
815.
816.
817.
818.
819.
820.
821.
822.
823.
824.
825.
826.
827.
828.
829.
830.
831.
832.
833.
834.
835.
836.
837.
838.
839.
840.
841.
842.
843.
844.
845.
846.
847.
848.
849.
850.
851.
852.
853.
854.
855.
856.
857.
858.
859.
860.
861.
862.
863.
864.
865.
866.
867.
868.
869.
870.
871.
872.
873.
874.
875.
876.
877.
878.
879.
880.
881.
882.
883.
884.
885.
886.
887.
888.
889.
890.
891.
892.
893.
894.
895.
896.
897.
898.
899.
900.
901.
902.
903.
904.
905.
906.
907.
908.
909.
910.
911.
912.
913.
914.
915.
916.
917.
918.
919.
920.
921.
922.
923.
924.
925.
926.
927.
928.
929.
930.
931.
932.
933.
934.
935.
936.
937.
938.
939.
940.
941.
942.
943.
944.
945.
946.
947.
948.
949.
950.
951.
952.
953.
954.
955.
956.
957.
958.
959.
960.
961.
962.
963.
964.
965.
966.
967.
968.
969.
970.
971.
972.
973.
974.
975.
976.
977.
978.
979.
980.
981.
982.
983.
984.
985.
986.
987.
988.
989.
990.
991.
992.
993.
994.
995.
996.
997.
998.
999.
1000.

1. 一种反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸是选自 SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 14 的序列。
2. 权利要求 1 的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸是 SEQ ID NO. 1。
3. 权利要求 1 的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸是 SEQ ID NO. 14。
4. 权利要求 1-3 任一项定义的至少一种反义寡核苷酸在制备药物中的用途,所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种。
5. 权利要求 4 的用途,其中所述至少一种反义寡核苷酸是 SEQ ID NO. 1。
6. 权利要求 4 的用途,其中所述至少一种反义寡核苷酸是 SEQ ID NO. 14。
7. 权利要求 4 的用途,其中所述至少一种反义寡核苷酸为至少两种反义寡核苷酸,它们为 SEQ ID NO. 13 和 SEQ ID NO. 14。
8. 权利要求 4 的用途,其中所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的哮喘。
9. 权利要求 4 的用途,其中所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的变态反应。
10. 权利要求 4 的用途,其中所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的嗜酸性粒细胞增多症。
11. 权利要求 4 的用途,其中所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的普通炎症。
12. 权利要求 4 的用途,其中所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的癌症。
13. 一种用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种的药物组合物,所述组合物包含至少一种权利要求 1-3 任一项定义的反义寡核苷酸以及药物可接受的载体。
14. 权利要求 13 的药物组合物,其中所述至少一种反义寡核苷酸是 SEQ ID NO. 1。
15. 权利要求 13 的药物组合物,其中所述至少一种反义寡核苷酸是 SEQ ID NO. 14。
16. 权利要求 13 的药物组合物,其中所述至少一种反义寡核苷酸为至少两种反义寡核苷酸,它们为 SEQ ID NO. 13 和 SEQ ID NO. 14。
17. 权利要求 13-16 中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物是局部药物组合物。
18. 权利要求 13-17 中任一项的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种。
19. 权利要求 18 的用途,其中所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的哮喘。
20. 权利要求 18 的用途,其中所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的变态反应。
21. 权利要求 18 的用途,其中所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的嗜酸性粒细胞增多症。
22. 权利要求 18 的用途,其中所述药物用于治疗 and / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关

的普通炎症。

23. 权利要求 18 的用途,其中所述药物用于治疗和 / 或预防与 CCR3 趋化因子受体有关的癌症。

用于治疗变态反应和肿瘤细胞增殖的反义寡核苷酸

发明领域

[0001] 本发明涉及针对特异性细胞受体的、单独或组合的反义寡核苷酸的用途,以便抑制普通炎症 (general inflammation),包括与哮喘和变态反应相关的炎症,和嗜酸性粒细胞增多症。本发明还涉及反义寡核苷酸抑制肿瘤细胞增殖如癌症的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 反义寡核苷酸是一类新的药物。一般来说,反义指小的合成寡核苷酸的用途,所述寡核苷酸与存在于人 DNA 或 RNA 中的寡核苷酸具有相同组成。反义寡核苷酸设计为它们所靶向基因的一部分的互补序列,以便能够附着于该序列并抑制基因表达。通过反义寡核苷酸与特异性信使 RNA (mRNA) 有义靶按照 Watson-Crick 碱基配对的杂交使基因表达受到抑制,在 Watson-Crick 碱基配对中,腺嘌呤和胸腺嘧啶 (在 mRNA 中为尿嘧啶) 或鸟嘌呤和胞嘧啶通过氢键键合相互作用。两种机制可解释这些作用,第一种机制是损害被靶向 mRNA 翻译的杂交,第二种机制是诱导降解 mRNA 的 RNA 酶 H 或类似酶。该策略的主要优势在于作用的特异性以及较少的副作用和毒性,尤其是在施用于作用位点时 (局部治疗)。该治疗策略可潜在地应用于一般认为一种或几种基因的过表达引起疾病发生或迁延的任何疾病。因此,已有众多反义寡核苷酸用作癌症和病毒性疾病治疗剂的研究。

[0004] 反义寡核苷酸可用于抑制白介素 (IL)-6 受体表达,由此抑制急性炎症介导体白介素 -6 对细胞的作用。已进行了几个研究来评价反义寡核苷酸是否可用于抑制涉及炎症 (包括但不限于与哮喘相关的炎症和与特异性疾病和变态反应相关的炎症) 的细胞或癌细胞上的其它受体。

[0005] 哮喘是一种侵袭 5-10% 人群的疾病,在最近的 25 年中发病率已加倍。尤其在病毒感染气管 (细支气管炎) 后的婴儿、儿童和职业诱发性哮喘中注意到这种增加。变应原经常引发与哮喘相关的复发性呼吸问题,但哮喘的确切病因尚不知晓。然而,一般认为病毒之类的因子涉及存在于哮喘患者气管中的异常炎症的永续性,因此涉及病情的迁延。

[0006] 为此,现时推荐的哮喘一线治疗是有效的抗炎药物,例如含皮质类固醇和抗白细胞三烯的药物。尽管该治疗在许多患者中有效,但一些患者对皮质类固醇有抗性。该药物还是具有长期副作用的有效免疫抑制剂,未表明其有效预防变态反应或哮喘。抗白细胞三烯在变态反应和哮喘中有一些作用,但不如皮质类固醇有效。

[0007] 几种炎症介导体在哮喘患者气管中的炎症出现和永续性方面起作用。一些介导体或者通过嗜酸性粒细胞的趋化性 (趋化因子: RANTES、嗜酸性粒细胞趋化因子 1、2、3、MCP-3、4,它们主要通过称为 CCR3 的受体在哮喘性炎症中起作用) 或者通过内皮细胞作用 (IL-4、-13) 吸引炎性细胞进入气管。其它介导体引起气管中炎性细胞的致敏和存活增加 (IL-3、-4、-5、GM-CSF)。这些介导体因此或者由嗜酸性粒细胞的特异性趋化因子构成,或者由 T 辅助淋巴细胞 2 型表型的细胞因子 (Th2: IL-3、-4、-5、-6、-9、-10、-13 和 GM-CSF) 构成 (John AE. 和 Lukacs NW., 2003 Sarcoidosis Vase Diffuse Lung Dis., 20:180-189; Blease 等, 2003, Expert Opin Emerg Drugs. 8:71-81)。业已表明,当气管中的这些炎症介导体减少时,哮喘和普通呼吸道炎症改善。

[0008] 变态反应是一种对引起不需要的免疫应答的变应原的超敏反应。变态反应是一种极为普遍的疾病,例如侵袭约 30% 人群的特应性鼻炎和结膜炎。变态反应的特征在于异常的 IgE 产生和对变应原的炎症。在 IgE 和变应原存在的情况下,效应细胞如肥大细胞脱粒并释放炎症介导体,导致哮喘中可见的相同炎症细胞的募集。在变应性鼻炎(即枯草热)、变应性结膜炎、鼻息肉病、慢性鼻炎和湿疹如特应性皮炎中,人们发现炎症介导体如同哮喘中存在的炎症介导体一样过量。IL-4 和 IL-13 是生产 IgE 和诱导 Th2 表型细胞所必需的(Barnes P.J., 2003, Cytokine Growth Factor Rev. 14 :511-522 ;Schuh 等, 2003, Cytokine Growth Factor Rev. 2003, 14 :503-510)。特应性疾病是通过接触变应原发生的变应疾病的总称,尤其是在具有易于对变应原敏化的遗传倾向性的个体中。具有这些诱病因素的个体容易对食源性抗原和吸入物出现异常免疫应答。变应疾病的一些具体实例为支气管哮喘、特应性皮炎、风疹、变应性鼻炎、变应性结膜炎和变应性胃肠炎。

[0009] 肿瘤是一种不可控和进行性的异常组织生长。恶性肿瘤经常以癌症为特征。癌症在人类中是第二致死病因,是以永生细胞的异常增殖为特征的 100 多种疾病的总称。涉及这些细胞的持久性和增加的机制之一是释放通过受体起作用并导致细胞增殖的生长因子。在这些生长因子中,已表明 GM-CSF 是几种肿瘤细胞的重要生长因子。最近,趋化因子受体 CCR3 被表征为由慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 和毛细胞白血病 (HCL) 患者回收的恶性 B 淋巴细胞,(Trentin 等, 2004, Blood, 104, 502-508)。实际上,已发现表皮生长因子受体 (EGFR) 通过 CCR-3 趋化因子受体的反式激活作用是引起支气管上皮细胞中 MAP 激酶活化和细胞因子产生的关键途径 (Adachi 等, 2004, Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 292-396)。通过阻断生长因子和 / 或趋化因子的受体来抑制癌细胞增殖可能在某些癌症的治疗中很重要。

[0010] 嗜酸性粒细胞是一类白细胞。它们是具有核和胞质的粒性白细胞,所述核通常具有两个通过染色质细线连接的叶,所述胞质包含尺寸均一并可由曙红染色的成层 (course) 圆粒。嗜酸性粒细胞增多症的特征在于嗜酸性粒细胞的数量增加,经常与变态反应、哮喘和感染相关。

[0011] 针对编码受体的特异性核酸序列的寡核苷酸用于抑制炎症反应的某些用途是已知的。Renzi 的 PCT 申请号 W0 99/66037 描述了用于治疗 and / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症的反义寡核苷酸。具体地说, Renzi 的寡核苷酸针对的核酸序列编码 CCR3 受体、IL-4 和 IL-3 受体的共同亚基或 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同亚基。其中还公开了一种鉴别为 107A (5' -GGGTCTGCAGCGGATGGT-3') 的反义寡核苷酸,其针对 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 亚基。

[0012] 对于潜在的临床用途,反义寡核苷酸应当表现出抗血清和细胞核酸酶降解的稳定性,显示出与血清和细胞蛋白的低非特异性结合,具有增强的靶 mRNA 序列识别,表现出细胞膜透过性,并在与互补 mRNA 复合时激发细胞核酸酶。文件已充分证明,含天然糖 (D-核糖和 D-2-脱氧核糖) 和磷酸二酯 (PO) 键的寡核苷酸被血清和胞内核酸酶快速降解,这限制了其作为有效治疗剂的用途。业已描述了对寡核苷酸的化学策略性修饰,以便提升其作为治疗剂的稳定性和效力。主要的化学改变包括糖部分、碱基部分的修饰和 / 或核苷酸间磷酸二酯键的修饰或替代。迄今为止,最广泛研究的类似物是磷酸二酯主链中的其中一个非桥接氧原子被硫取代的硫代磷酸酯 (PS) 寡脱氧核苷酸 (Eckstein F., 1985, Ann. Rev.

Biochem., 54 :367-402)。已开发出几种反义寡核苷酸生产方法,并用于体外和体内研究 (Goodchild J., 2004, Curr. Opin. Mol. Ther., 2004, 6 :120-128 ;Urban E. 和 R. Noe CR., 2003, Farmaco. 58 :243-258)。

[0013] 最近, Renzi 等描述了 2', 6' - 二氨基嘌呤 (DAP) 及其类似物在抗炎组合物核分子中的用途 (PCT 申请号 WO 03/004511A2)。在该文献中还描述了相比于无 DAP 的寡核苷酸体内生理效力增加和毒性降低的核分子的制备。Renzi 等进一步教导 DAP 置换具体用于制备针对肺部 / 呼吸系统疾病的寡核苷酸, 所述疾病例如为囊性纤维化、哮喘、慢性 支气管炎、慢性阻塞性肺病、嗜酸性粒细胞性支气管炎、变态反应、变应性鼻炎、肺纤维化、成人呼吸窘迫综合症、窦炎、呼吸道合胞体病毒或其它病毒性呼吸道感染以及癌症。

[0014] 应当需要具有另外的反义寡核苷酸, 其针对 Th2 细胞因子的至少一种特异性共同受体或介导体 (其吸引响应 Th2 细胞因子的细胞) 的受体, 以便抑制在哮喘或变态反应中存在的炎性反应, 以及抑制肿瘤细胞增殖。

[0015] 还应当高度需要具有另外的反义寡核苷酸, 其针对受体编码核酸序列, 以便通过抑制这些受体使这些寡核苷酸可用于治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明提供反义寡核苷酸的用途, 所述反义寡核苷酸针对细胞受体的至少一种共同亚基 (例如 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 亚基) 或趋化因子受体 CCR3, 以便治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种。

[0018] 在另一方面, 本发明提供针对 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 亚基的编码核酸序列的反义寡核苷酸, 以便通过抑制这些受体使所述反义寡核苷酸可用于治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种。

[0019] 本发明还提供针对趋化因子 CCR3 受体的编码核酸序列的反义寡核苷酸, 以便通过抑制该受体使所述反义寡核苷酸可用于治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种。

[0020] 本发明还提供治疗有效量的组合物, 其包含至少一种针对 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 亚基或 CCR3 受体的编码核酸序列的反义寡核苷酸, 用于治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种。

[0021] 本发明还提供治疗有效量的组合物, 其包含两种各自针对 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 亚基或 CCR3 受体的编码核酸序列的反义寡核苷酸, 用于改善在治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种中的作用。

[0022] 按照另一方面, 本发明提供一种方法, 用于治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、普通炎症和癌症中的至少一种, 所述方法包括给予一种或多种针对细胞受体的至少一种共同亚基 (例如 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 亚基) 或 CCR3 受体的反义寡核苷酸。

[0023] 本发明试图提供任何前述的反义寡核苷酸以及以已知方式修饰的化学修饰反义寡核苷酸, 其在机体内具有改进的稳定性, 同时表现出提升的有效性和降低的毒性。

[0024] 按照本发明的另一方面, 提供用于治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种的反义寡核苷酸。所述寡核苷酸针对编码受体的核酸序列, 所述受体选自 CCR3 趋化因子受体以及 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 亚基,

具有选自 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 13 和 SEQ ID NO. 14 的序列。

[0025] 按照本发明的另一方面,提供至少一种寡核苷酸用于治疗 and / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种的用途。优选地,使用含 SEQ ID NO. 13 和 SEQ ID NO. 14 两个序列的寡核苷酸。

[0026] 按照本发明的另一方面,提供用于治疗 and / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种的药物组合物,其包含至少一种寡核苷酸连同药物可接受的载体。优选地,所述至少一种寡核苷酸含 SEQ ID NO. 13 和 SEQ ID NO. 14 两者。

[0027] 按照本发明的另一方面,提供所述药物组合物用于治疗 and / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种的用途。

[0028] 按照本发明的另一方面,提供一种治疗和 / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种的方法,所述方法包括以下步骤:给予有效量的 (i) 至少一种寡核苷酸或 (ii) 含至少一种寡核苷酸连同药物可接受的载体的药物组合物。

[0029] 本发明在此还涉及对反义寡核苷酸的修饰,所述修饰不显著地不利影响反义寡核苷酸降低靶蛋白活性或抑制靶蛋白表达的能力,但其可增强该能力。

[0030] 附图简述

[0031] 本发明优选实施方案的这些特征和其它特征在以下的详述中将变得更明显,在详述中参考附图,其中:

[0032] 图 1A 显示了由猕猴 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体基因共同 β 链的 PCR 扩增获得的 3 个克隆与人 TOP004 补体序列周围的对应人、黑猩猩、猪、大鼠和小鼠直系同源物的序列比对。

[0033] 图 1B 显示了在克隆的猕猴、人、黑猩猩、猪、大鼠和小鼠共同 β 链 DNA 序列中 TOP004 补体节段周围的翻译区的预测氨基酸序列。

[0034] 图 2A 显示了与未处理的细胞相比,通过改变猕猴 PBMC 中的 TOP004 浓度降低 β 链 (β_c) mRNA 表达的情况。

[0035] 图 2B 显示了与未处理的细胞相比,通过改变猕猴 PBMC 中的 TOP005 浓度降低 CCR3 mRNA 表达的情况。

[0036] 图 3A 显示了与未处理的细胞相比,猕猴 PBMC 中的不同 TOP004 浓度降低 β 链 (β_c) 细胞表面蛋白表达的情况。

[0037] 图 3B 显示了与未处理的细胞相比,猕猴 PBMC 中的不同 TOP005 浓度降低 CCR3 细胞表面蛋白表达的情况。

[0038] 图 4A 显示了与未处理的细胞相比,通过改变猕猴 PBMC 中的 ASM8 浓度降低 β 链 (β_c) mRNA 表达的情况。

[0039] 图 4B 显示了与未处理的细胞相比,通过改变猕猴 PBMC 中的 ASM8 浓度降低 CCR3 mRNA 表达的情况。

[0040] 图 5 显示了寡核苷酸对 HL60 分化细胞中的 CCR3 mRNA 表达

[0041] 图 6 显示了在寡核苷酸处理的 HL-60c1-15 细胞中的钙动员测定。与对照和有义寡核苷酸处理的细胞相比,在 A86 处理细胞中响应于嗜酸性粒细胞趋化因子的动员下降。

[0042] 图 7 显示了寡核苷酸作用于纯化人嗜酸性粒细胞对嗜酸性粒细胞趋化因子的趋化反应的情况。将 A86 处理的嗜酸性粒细胞的相对趋化反应与对照和有义寡核苷酸处理的

细胞对比。

[0043] 图 8 显示了响应于嗜酸性粒细胞趋化因子的寡核苷酸处理嗜酸性粒细胞中的钙动员测定。对比 A86 处理的嗜酸性粒细胞和对照或有义寡核苷酸处理的细胞中的钙动员。

[0044] 图 9 显示了 TOP005 对 CCR3 的细胞表面表达的作用,以 Eo1-1 和 U937 细胞中相对于对照的表达百分率来表示。

[0045] 图 10 显示了 TOP005 对人 PBMC 中的 mRNA 表达的作用。显示 G3PDH 和 CCR3 表达的凝胶示于条图上。CCR3mRNA 表达对 G3PDH 的比率相对于对照标准化,示于底部。

[0046] 图 11A 显示了调节 107A 处理的 TF-1 细胞中的 β 链 (β_c)mRNA 表达,使用 RT-PCR 以检测 β 链 (β_c)mRNA 表达或对照 G3PDH mRNA 表达。

[0047] 图 11B 和 11C 显示了有义寡核苷酸和 107A 处理对 TF-1 细胞的细胞表面上 β 链表达的作用,其通过 FACS 分析测定。

[0048] 图 11D 显示了 TOP004 在 mRNA 和蛋白水平上对 U937 细胞中的共同 β 链表达的作用。

[0049] 图 12 显示了在 GM-CSF、IL-3 或 IL-5 存在下 107A 处理的 TF-1 细胞的增殖。

[0050] 图 13A 显示了 107A 对嗜酸性粒细胞存活率的调节,其使用锥虫蓝染色排除测定来评价。

[0051] 图 13B 显示了 107A 对嗜酸性粒细胞存活率的调节,其通过使用 Annexin-V-FITC 和碘化丙啶方案的流式细胞术分析来评价。

[0052] 图 14 显示了使用 DEAE 阴离子交换层析的 ASM8 单个产物 (TOP004 和 TOP005) 的洗脱谱。

[0053] 图 15 显示了用 CH_3COOH 处理 3 小时并进行碱裂解后,通过 DEAE 阴离子交换层析分级分离后的 ASM8 洗脱谱。

[0054] 图 16 显示了用 CH_3COOH 处理 6 小时并进行碱裂解后,通过 DEAE 阴离子交换层析分级分离后的 ASM8 洗脱谱。

[0055] 图 17A1、17A2、17B1 和 17B2 显示了在不同温度下储存并随后使用 DEAE 阴离子交换层析洗脱后,ASM8 的化学稳定性。

[0056] 图 18 显示了在 $1\times\text{PBS}$ 中 TOP004 和 TOP005 的解链曲线。

[0057] 图 19 显示了基于 $1\times\text{PBS}$ 中 TOP004 和 TOP005 的解链曲线拟合结果的热力学总结。

[0058] 图 20A 和 20B 显示了在用高剂量 ASM8 处理后 1 天,在猴血浆中的 TOP004 和 TOP005 及其代谢物的浓度。

[0059] 图 21A 和 21B 显示了在用高剂量 ASM8 处理后 14 天,在猴血浆中的 TOP004 和 TOP005 及其代谢物的浓度。

[0060] 发明详述

[0061] 几种炎症介导体在哮喘患者气管中的炎症出现和永续性方面起作用。一些介导体通过嗜酸性粒细胞的趋化作用吸引炎性细胞进入气管。这些趋化因子中有许多主要通过 CCR3 受体在哮喘或变应性炎症中起作用。其它介导体在气管或皮肤中引起炎性细胞致敏和存活率增加,例如 IL-3、IL-5 和 GM-CSF。业已表明,当气管中的这些炎症介导体减少时哮喘改善。

[0062] 此外,释放通过受体起作用并导致细胞增殖的炎症介导物和 / 或生长因子,可引起特征为永生化细胞异常增殖的癌症。其中,已表明 GM-CSF 是几种肿瘤细胞的重要生长因子。趋化因子受体 CCR3 表征为由慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 和毛细胞白血病 (HCL) 患者回收的恶性 B 淋巴细胞, (Trentin 等, 2004, Blood, 104, 502-508)。实际上,已发现 EGFR 通过 CCR-3 的反式激活作用是引起支气管上皮细胞中 MAP 激酶活化和细胞因子产生的关键途径 (Adachi 等, 2004, Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 292-396)。通过阻断生长因子受体或趋化因子受体 CCR3 来抑制癌细胞的增殖和转移可能在某些癌症的治疗中很重要。

[0063] 在本发明的一个实施方案中,提供一种鉴别为 828 (5' -GTTACTACTTCCACCTGCCTG-3', (SEQ ID NO. 1)) 并针对 CCR3 趋化因子受体的新反义寡核苷酸。本文公开的实例表明,828 有效降低或阻断人细胞系中的 CCR3mRNA 表达。

[0064] 在本发明的另一个实施方案中,提供基于先前公开的 107A 和上述 828 的新反义寡核苷酸 TOP004 和 TOP005。同 107A 一样, TOP004 (5' -GGGTCTGCXGCGGGXTGGT-3' (SEQ ID NO. 13), 其中 X 代表腺苷残基的 DAP 修饰) 是 19 聚体, 针对 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 链的 mRNA。同 828 一样, TOP005 (5' -GTTXCTXCTTCCXCCTGCCTG-3' (SEQ ID NO. 14), 其中 X 代表腺苷残基的 DAP 修饰) 是 21 聚体, 针对趋化因子受体 CCR3 的 mRNA。含 TOP004 和 TOP005 这二者的组合物被鉴别为 ASM8 的一部分。

[0065] 如本文所公开的, TOP004 和 TOP005 在非人灵长类动物系统中具有活性, 因此验证猕猴对安全性评价的用途。图 1 显示了猕猴共同 β 链基因的测序。与 TOP004 互补的猕猴 β 链序列显示出显著同源性。猕猴和人 β 链序列之间非常高度的同一性提示, TOP004 在猕猴中可能有功能活性。TOP004 和 TOP005 在猴外周血单核细胞中阻断或降低共同 β 链和 CCR3 表达的有效性示于图 2、3 和 4。结果表明, 针对人基因靶的 TOP004 和 TOP005 在猕猴外周血单核细胞 (PBMC) 中均有效降低其对应靶的表达。含 TOP004 和 TOP005 这二者的 ASM8 显著抑制共同 β 链表达和 CCR3 受体, 在较低浓度时程度较高或者程度相同。因此, TOP004 和 TOP005 一起在阻断 β 链和 CCR3mRNA 表达方面表现出协同作用。而且, 在表 7 和 8 中, 分析取自 ASM8 处理猴的气管样品的 mRNA 表达水平。靶基因的表达对炎性细胞因子 (IL-4 和 TNF- α) 的 mRNA 水平标准化。在 ASM8 处理的动物中, 即便在给予 ASM8 后约 24 小时, β_c -亚基和 CCR3mRNA 对 IL-4mRNA 的相对表达分别下降达 29% 和 24%, 相对于 TNF- α 的表达分别下降达 30% 和 24%。

[0066] 在图 5-10 中, 测试针对 CCR3mRNA 的反义寡核苷酸 (包括 A86 和 TOP005) 在人细胞和细胞系中的效力。当通过半定量逆转录 - 聚合酶链反应 ("RT-PCR") 评价时, 反义寡核苷酸引起 CCR3mRNA 表达抑制。此外, 使用 FACS 分析表明, CCR3 蛋白的细胞表面表达同样受到反义寡核苷酸处理的抑制。而且, 通过用嗜酸性粒细胞趋化因子刺激后抑制纯化的嗜酸性粒细胞中的钙 (Ca^{++}) 动员, 证实 CCR3 的功能性抑制。另外, 在趋化性测定中, 所述寡核苷酸抑制嗜酸性粒细胞趋化性达 55%。

[0067] 在图 11-13 中, 107A 和 TOP004 反义寡核苷酸用于处理各种细胞。与 107A 温育的 TF-1 细胞显示降低的 β 链 mRNA 表达。107A 还在 IL-3、IL-5 或 GM-CSF 存在下抑制 TF-1 细胞增殖。而且, 107A 以剂量依赖性方式降低 IL-5 对嗜酸性粒细胞的抗凋亡作用。与 TOP004 温育的 U937 细胞在 mRNA 和蛋白水平上显示降低的共同 β 链表达。因此, 反义 107A 和 TOP004 在阻断 β 链 mRNA、蛋白表达方面高度有效, 在阻断人细胞培养物中相关的细胞反应

方面有功能。

[0068] 在图 14-17B2 中,通过在改变的条件下洗脱组合物显示了 ASM8 的稳定性。使用基于 DEAE 阴离子交换高效液相层析 (HPLC) 的分级分离系统洗脱 ASM8,以评价 ASM8 及其降解产物在不同温度储存后的完整性。ASM8 组分在 -20℃、4℃、30℃或 40℃储存达 2 个月时不经历任何可检测的降解。

[0069] 在图 18-19 中,所提供的 ASM8 的解链曲线和热力学总结表明,两条寡核苷酸链在溶液中不显著相互作用。

[0070] 在图 20-21 中,检测 ASM8 寡核苷酸组分及其初级代谢物 (n-1) 在猴血浆样品中的浓度。在非临床毒性实验中收集样品,其中动物通过吸入处理连续 14 天。

[0071] 因此提供针对 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 的共同 β 亚基和 CCR3 受体并因此针对其编码核酸的反义寡核苷酸。还提供包含所述寡核苷酸和药物可接受载体的药物组合物。描述了所述寡核苷酸的用途和包含给予所述寡核苷酸的方法,用于治疗 and / 或预防哮喘、变态反应、嗜酸性粒细胞增多症、普通炎症和癌症中的至少一种。

[0072] 术语“核酸”和“核酸分子”在本文可互换使用,指由核苷酸(即核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或这两者)组成的分子。该术语包括核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的单体和多聚物,其中在多聚物情况下核糖核苷酸和 / 或脱氧核糖核苷酸经 5' -3' 键而连接在一起。但是,键可以包括核酸合成领域已知的任何键,包括例如含 5' -2' 键的核酸。用于核酸分子的核苷酸可以是天然的,或者可以是能与天然碱基对形成碱基配对关系的合成产生的类似物。能形成碱基配对关系的非天然碱基的实例包括但不限于氮杂和脱氮嘧啶类似物、氮杂和脱氮嘌呤类似物以及其它杂环碱基类似物,其中嘌呤和嘧啶环的一个或多个碳原子和氮原子已经被杂原子如氧、硫、硒、磷等取代。

[0073] 本文所用术语“核酸主链”指连接分子中核苷酸的化学部分的结构。这可以包括由任何方式的化学连接核苷酸形成的结构。本文所用的修饰主链包括对核苷酸间化学键的修饰,以及可用于增强稳定性和亲合性的其它修饰,如对糖结构的修饰。例如可以使用脱氧核糖的 [α]-异头物,其中碱基相对于天然 [β]-异头物是反向的。在一个优选实施方案中,糖基的 2' -OH 可以改变成 2' -O-烷基或 2' -O-烷基 -n(O-烷基),其提供了对降解的抗性而不影响亲合性。

[0074] 本文使用的术语“寡核苷酸”指含约 1 到约 100 个核苷酸、更优选 1 到 80 个核苷酸,甚至更优选约 4 到约 35 个核苷酸的核酸分子。

[0075] 本发明的反义寡核苷酸化合物还包括 siRNA(小干扰 RNA)和由于 RNAi(RNA 干扰)方法而含有它们的 RISC(RNA 诱导的沉默复合物)。RNA 干扰(RNAi)方法最近已有描述,被认为是抑制靶基因表达的新工具。几年前就已经知晓,RNAi 基于低等真核生物中的古老抗病毒防御机制。它由双链 RNA 诱导,双链 RNA 被加工成 21-23nt 的小干扰 RNA(siRNA),其在 RISC 复合物帮助下与单链形式靶 mRNA 杂交后引起同源的内源 mRNA 降解。RNAi 的工作方式仍未完全阐明,但其已在广泛的真核生物物种如线虫、蝇、植物、真菌和哺乳动物中用作产生功能丧失表型的首选方法。

[0076] 本发明的反义寡核苷酸化合物还包括核酶以及单链或双链的 RNA 或 DNA 的短核苷酸序列,其可以掺入如上所述的化学修饰,能体外和 / 或体内抑制基因转录和 / 或翻译。

[0077] 术语“修饰的寡核苷酸”和“修饰的核酸分子”包括例如已通过插入或缺失 1 个或

多个碱基而被修饰但对其活性没有显著不利作用的反义寡核苷酸化合物。具体地说,一般可在与它们针对的基因具有 100% 互补性的寡核苷酸末端实施碱基的加入或缺失,而不显著丧失抑制活性。可实施这样的修饰,以便增加寡核苷酸活性或提供增强的寡核苷酸稳定性。另外,还可在本发明的反义寡核苷酸化合物中实施 1 个或多个碱基的置换,而对活性没有不利作用,例如用另一个嘌呤(腺嘌呤、鸟嘌呤)置换嘌呤,以及用嘧啶(胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶)置换嘧啶。本文使用的修饰的寡核苷酸和修饰的核酸分子还包括含寡核苷酸在内的核酸,其在所有或任意的核酸碱基、糖部分、核苷间磷酸键的天然分子结构的分子水平上具有一个或多个化学修饰,以及包括具有附加取代基(如二胺、胆甾基或其它亲脂性基团)的分子,或在这些位点的修饰的组合。核苷间磷酸酯键可以是磷酸二酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硅氧烷、碳酸酯、羧甲酯、乙酰胺酯、氨基甲酸酯、硫醚、桥联氨基磷酸酯(phosphoranidate)、桥联亚甲基磷酸酯、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、二硫代磷酸酯、桥联硫代磷酸酯和/或砒核苷间键,或 3' -3'、2' -5' 或 5' -5' 键,以及这些相似键的组合(产生混合的主链修饰的寡核苷酸)。修饰可以在寡核苷酸分子的内部(单个的或重复的)或在末端,并且可以包括加到核苷间磷酸酯键的分子上,如胆甾基、在氨基之间具有不同数目碳残基的二胺化合物以及末端核糖、脱氧核糖和磷酸酯修饰,所述修饰切割或交联到相对链或缔合的酶或其它蛋白。亲电基团如核糖二醛可以与这种蛋白的赖氨酰残基的 ϵ -氨基共价连接。亲核基团如束缚至寡聚物的 n -乙基马来酰亚胺可共价连接到 mRNA 的 5' 端或另一个亲电位点。术语修饰的寡核苷酸还包括含有糖部分修饰的寡核苷酸,例如 2' -取代的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸单体,任何它们通过 5' -3' 键连接在一起。修饰的寡核苷酸还可以由 PNA 或吗啉代修饰的主链组成,其中序列的靶特异性得以保持。术语修饰的寡核苷酸还包括如本文定义的反义寡核苷酸化合物,其形式不显著地不利影响反义寡核苷酸降低靶蛋白活性或抑制靶蛋白表达的能力,但其可增强该活性。

[0078] 修饰的寡核苷酸还包括基于阿糖核苷酸或修饰的阿糖核苷酸残基或由其构建的寡核苷酸,包括但不限于基于 β -阿拉伯呋喃糖及其类似物的反义寡核苷酸构建物。阿糖核苷酸是核糖核苷酸的立体异构体,差别仅在于糖环 2' -位的构型。Damha 等 (1) 的 PCT 申请号 W099/67378 公开了阿糖核酸(ANA)寡聚物及其类似物,它们通过结合互补信使 RNA 提升了对基因表达的序列特异性抑制,该文献通过引用整体结合到本文中。Dahma 等进一步教导了糖被修饰的寡核苷酸,其与其靶 RNA 序列形成双链体,产生 RNA 酶 H 的底物。具体地说,公开了包括 β -D-阿糖核苷酸和 2' -脱氧-2' -氟代- β -D-阿糖核苷的寡聚物。也是 Dahma 等 (2) 的 PCT 申请号 W002/20773 公开了用于以序列特异性方式抑制基因转录和表达的寡核苷酸嵌合体,该文献通过引用整体结合到本文中。具体地说,Dahma 等 (2) 教导了由阿糖核苷酸构建的反义寡核苷酸,其位于一系列长度可变的脱氧核糖核苷酸残基的侧翼。如此构建的反义寡核苷酸用于杂交和诱导切割互补 RNA。也是 Dahma 等 (3) 的 PCT 申请号 W003/037909 公开了具有内部无环连接残基的寡核苷酸,该文献通过引用整体结合到本文中。用无环连接基团制备的反义寡核苷酸用于阻止或削弱目标靶核酸如 RNA 的功能。也是 Dahma 等 (4) 的 PCT 申请号 W003/064441 公开了具有糖被修饰的核苷和 2' -脱氧核苷的交替节段、并还具有糖被修饰的核苷酸和 2' -脱氧核苷酸的交替节段的寡核苷酸,该文献通过引用整体结合到本文中。公开了具有这些交替节段的反义寡核苷酸,用于阻止或削弱目标靶核酸如 RNA 的功能。

[0079] 术语“基本抗核酸酶的”指与天然或未修饰的核酸相比抗核酸酶降解的核酸。本发明的修饰核酸的核酸酶降解抗性是其未修饰对应物的至少 1.25 倍,更优选是其未修饰对应物抗性的至少 2 倍,甚至更优选是其未修饰对应物抗性的至少 5 倍,最优选是其未修饰对应物抗性的至少 10 倍。这种基本抗核酸酶的核酸包括但不限于具有修饰主链的核酸,所述修饰主链如硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、乙基磷酸三酯、2'-O-甲基硫代磷酸酯、2'-O-甲基-对-乙氧基核糖核苷酸、2'-O-烷基、2'-O-烷基-n(O-烷基)、3'-O-烷基、3'-O-烷基-n(O-烷基)、2'-氟、2'-脱氧-赤戊呋喃糖基、2'-O-甲基核糖核苷、氨基甲酸甲酯、碳酸甲酯、反向碱基(如反向 T)或这些主链的嵌合形式。

[0080] 本文使用的术语“CCR3 受体和 IL-3/IL-5/GM-CSF 受体的共同 β 链的反义寡核苷酸”各自指分别靶向序列的寡核苷酸,所述序列影响 CCR3 趋化因子受体和 IL-3/IL-5/GM-CSF 受体的共同 β 链的表达和/或活性。这些寡核苷酸包括但不限于 CCR3 趋化因子受体和 IL-3/IL-5/GM-CSF 受体的共同 β 链、DNA 编码序列、DNA 启动子序列、DNA 增强子序列、mRNA 编码序列等。

[0081] 如上所述,本发明的一个实施方案提供靶向序列的反义寡核苷酸,该序列影响 CCR3 趋化因子受体和 IL-3/IL-5/GM-CSF 受体的共同 β 链的表达和/或活性。在一个实施方案中,所述反义寡核苷酸可包含这些序列的片段或变体,本领域技术人员会理解,所述片段或变体可改变寡核苷酸组成和/或长度,但保持或增加寡核苷酸下调基因表达的活性。在另一个实施方案中,本发明提供至少两个反义寡核苷酸的组合,所述两个反义寡核苷酸来自鉴别为 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 13 和 SEQ ID NO. 14 的序列。

[0082] 本文所用术语“处理”、“治疗”、“疗法”等一般表示获得期望的药理和/或生理作用。这种作用可以是预防性的,即完全或部分预防疾病或其症状,和/或可以是治疗性的,即部分或完全治愈疾病和/或减轻疾病引起的不利作用。本文所用“处理”涵盖对如先前定义的对象中疾病的任何处理,所述对象尤其是人,包括:

[0083] (a) 预防对象发生疾病,所述对象可能容易发生该疾病但仍未诊断为具有该疾病;

[0084] (b) 抑制疾病,即停止其发展;或

[0085] (c) 缓解疾病,即引起疾病消退。

[0086] 术语“药物可接受的”在本文中用于载体、表面活性剂和组合物时表示可接受用于治疗患者对象的物质,所述物质无毒或对于通过本文所述任何途径给予来说不是不可接受的。

[0087] 本发明一般涉及通过给予治疗有效量的本发明反义寡核苷酸化合物而治疗对象,所述化合物包括 siRNA、核酶、单链或双链的短核苷酸序列,包括可与靶核酸互补或可任选地如上所述修饰的 RNA 和/或 DNA;具有所述 RNA 寡核苷酸的至少一部分的 RNA 寡核苷酸,所述 RNA 寡核苷酸能与 RNA 杂交形成寡核苷酸-RNA 双链体;或嵌合寡核苷酸,它们将下调或抑制内源性基因体内表达。

[0088] 所述“治疗有效”量指无毒性但足以提供期望治疗效果的反义寡核苷酸化合物的量。在此情况下,该剂量的反义寡核苷酸化合物有效缓解、改善、或预防待治疗病症或疾病(如与变态反应、哮喘、炎性疾病如炎性呼吸道疾病相关的疾病)的症状。

[0089] 本文使用的术语“变态反应”描述了机体对物质的任何不期望的免疫应答,机体对

所述物质已变成超敏性的。

[0090] 本发明的制剂优选直接给予作用部位,因此优选是局部制剂,包括但不限于口服、颊内、肺内、直肠、子宫内、肿瘤内、经鼻、鞘内、可吸入、透皮、皮内、腔内、离子导入、经眼、阴道、关节内、经耳、经粘膜、直肠、缓释或肠溶包衣制剂。不限于任何前述制剂,本发明的制剂还可为颅内、肌内、皮下、血管内、腺体内、器官内、淋巴内、腹膜内、静脉内和可植入制剂。用于制剂的载体可以是例如固体和 / 或液体载体。

[0091] 对于应适于与本发明的寡核苷酸化合物组合,以使组合物 / 制剂适于给予来治疗呼吸系统疾病的其它载体,可以参考“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985。

[0092] 任选地,当前描述的寡核苷酸可与各种生理载体分子配制。当前描述的寡核苷酸还可与增强其进入靶细胞的能力的分子复合。这种分子的实例包括但不限于糖、聚胺、氨基酸、肽、脂质和对细胞生长不可或缺分子。例如,寡核苷酸可与脂质组合,产生的寡核苷酸 / 脂质乳浊液或脂质体悬浮液尤其可有效增加寡核苷酸的体内半寿期。

[0093] 本文提供的药物组合物可包含上述反义寡核苷酸化合物和一种或多种药物可接受的表面活性剂。增强本发明的反义寡核苷酸吸收的适宜表面活性剂或表面活性剂成分先前已描述于美国申请公开第 2003/0087845 号,该申请中关于表面活性剂的内容结合到本文中。该申请提出,合适的表面活性剂“... 包括合成和天然以及全长和截短形式的表面活性蛋白 A、表面活性蛋白 B、表面活性蛋白 C、表面活性蛋白 D、表面活性蛋白 E、二饱和磷脂酰胆碱(除了二棕榈酰以外)、二棕榈酰磷脂酰胆碱、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、泛醌、溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱、棕榈酰溶血磷脂酰胆碱、脱氢表雄酮、多萜醇、硫苷脂酸(sulfatidic acid)、甘油-3-磷酸、磷酸二羟基丙酮、甘油、甘油-3-磷酸胆碱、二羟基丙酮、棕榈酸、胞嘧啶二磷酸(CDP)二酰基甘油、CDP 胆碱、胆碱、磷酸胆碱;以及天然和人工片状体,它们是以下表面活性剂成分的天然载体溶媒: ω -3 脂肪酸、多烯酸(polyenic acid)、多烯酸(polyenoic acid)、卵磷脂、棕榈酸、环氧乙烷或环氧丙烷的非离子性嵌段共聚物、单体和多聚体形式的聚氧丙烯、单体和多聚体形式的聚氧乙烯、具有右旋糖酐和 / 或烷酰基侧链的聚(乙烯胺)、Brij35™、Triton X-100™ 和合成表面活性剂 ALEC™、Exosurf™、Survan™ 和 Atovaquone™ 等。这些表面活性剂可作为制剂中的单一表面活性剂或多组分表面活性剂的一部分使用,或作为对反义寡核苷酸的 5' 和 / 或 3' 末端的共价结合添加物使用。”

[0094] 本发明组合物的反义组分可包含在脂质颗粒或囊泡(如脂质体或微晶)中的药用制剂中。如美国专利 6,025,339 所述,脂质颗粒可以是任何合适的结构,如单层或多层,只要所述反义寡核苷酸包含于其中。带正电的脂质如乙基硫酸 N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N'-三甲基铵或“DOTAP”,对于这样的颗粒和囊泡是特别优选的。这种脂质颗粒的制备是公知的。参见例如 Janoff 等的美国专利第 4,880,635 号、Kurono 等的 4,906,477 号、Wallach 的 4,911,928 号、Wallach 的 4,917,951 号、Allen 等的 4,920,016 号、Wheatley 等的 4,921,757 号;等等。

[0095] 本发明的组合物可以用运输反义寡核苷酸化合物到期望部位如肺的任意方式给予。本文公开的反义化合物可通过任何合适的方式给予患者的肺,但优选通过气溶胶吸入给予,所述气溶胶由包含反义化合物的可呼吸颗粒组成。

[0096] 本发明的组合物可以作为包含可呼吸大小的颗粒的制剂给予呼吸系统,例如颗粒大小小到足以在吸入时通过鼻、口和咽喉并穿过肺的支气管和肺泡。一般来说,可呼吸颗粒大小范围在约 0.5 到 10 微米之间。包含在气溶胶中的不可呼吸大小的颗粒倾向于沉积在咽喉并被吞咽,因此气溶胶中不可呼吸颗粒的量优选最少化。对于经鼻给予,优选 10-500 微米 (μM) 范围的颗粒大小,以确保保留在鼻腔中。

[0097] 可以通过将反义化合物与合适的溶媒如无菌无热源水或磷酸缓冲盐水混合,制备用于产生气溶胶的活性化合物(反义寡核苷酸化合物)的液体药物组合物。

[0098] 含反义化合物的固体颗粒组合物可以任选含有用于辅助形成气溶胶的分散剂以及其它治疗性化合物。合适的分散剂是乳糖,它可以与反义化合物以任意合适的比例混合,如 1:1 的重量比。

[0099] 反义组合物可以抗支气管收缩、抗变态反应和/或抗炎有效量给予,该量取决于待治疗疾病的程度、患者对象的身体状况、具体制剂、给药途径、向对象给药的时间安排等。一般来说,期望寡核苷酸细胞内浓度是 0.05-50 μM ,或更具体的 0.2-5 μM 。对于向哺乳动物患者如人给药,一般使用约 0.001、0.01、0.1 或 1mg/Kg 直至约 50 或 100mg/Kg 或更多的剂量。但是,也考虑了其它剂量。根据活性化合物在任何具体制剂中的溶解性,每日剂量可以分成一个或几个单位剂量给予。

[0100] 含反义化合物的液体颗粒的气溶胶可通过任意合适的手段产生,如用喷雾器。喷雾器是通过使压缩气体(通常是空气或氧气)加速通过狭窄的文丘里喷嘴或者经超声搅动的方式,将活性成分的溶液或悬液转化成治疗性气溶胶雾的商品装置。用于喷雾器的合适制剂包含在液体载体中的活性反义寡核苷酸成分,其量可达制剂的 40% (重量/重量),优选少于制剂的 20% (重量/重量)。载体一般是水或稀的醇水溶液,优选通过加入例如氯化钠而与体液等渗。任选的添加剂包括防腐剂如羟基苯甲酸甲酯(如果制剂不是无菌制备的话)、抗氧化剂、抗菌剂、调味剂、挥发性油、缓冲剂和乳化剂以及其它的制剂表面活性剂。

[0101] 包含活性寡核苷酸化合物和药物可接受表面活性剂的固体颗粒气溶胶同样可用任何固体颗粒药物气溶胶发生器产生。用于向对象给予固体颗粒药物的气溶胶发生器产生可呼吸的颗粒(如上所释),并以适于人给药的速率产生一定体积的气溶胶,其中含预定计量的药物剂量。活性寡核苷酸成分一般占制剂的 0.1-100 重量/重量。第二类示例性气溶胶发生器包括计量剂量吸入器。计量剂量吸入器是加压气溶胶分散器,一般含有活性成分在液化推进剂中的悬液或溶液制剂。使用时这些装置通过适用于递送计量体积(一般为 10-150 μL) 的阀门释放制剂,以产生含活性成分的细颗粒喷雾。合适的推进剂包括某些氯氟碳化合物,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或氢氟烷及其混合物。制剂还可以含有一种或多种助溶剂(如乙醇)、乳化剂和其它制剂表面活性剂(如油酸或失水山梨醇三油酸酯)、抗氧化剂和合适的调味剂。

[0102] 无论是由固体还是液体颗粒形成的气溶胶,都可通过气溶胶发生器以约 1-150 升/分钟的速率产生。

[0103] 在本发明的再一方面,提供一种制品,它包括包装材料,包装材料内含有药物可接受的反义寡核苷酸组合物,该组合物治疗学有效地治疗与变态反应、哮喘、鼻炎和炎症疾病相关的病症。在一个实施方案中,组合物包含可有效抑制 CCR3 趋化因子受体基因或 IL-3/

IL-5/GM-CSF 受体的共同 β 链基因的反义寡核苷酸化合物,所述寡核苷酸化合物与该基因至少 50% 互补。在另一方面,组合物包含至少两种反义寡核苷酸化合物,反义寡核苷酸化合物各自能下调 CCR3 趋化因子受体和 IL-3/IL-5/GM-CSF 受体基因的共同 β 链,每种反义寡核苷酸化合物的存在浓度使得反义寡核苷酸化合物单独使用时实际上不能有效下调所针对基因,而反义寡核苷酸化合物的组合有效下调反义寡核苷酸所针对基因中的至少一种。

[0104] 在一个实施方案中,制品的包装材料包含标签,它指示组合物可用于治疗炎症呼吸系统疾病,并可另外包括所述疾病是变态反应、鼻炎和哮喘之一的说明。

[0105] 在另一个实施方案中,制品的包装材料包含标签,它指示组合物可用于治疗炎性呼吸系统疾病,并可另外包括所述疾病是变态反应、哮喘、嗜酸性粒细胞增多症、支气管炎、鼻炎或窦炎之一的说明。

[0106] 对于本发明目的,包装材料可以是包装本发明的含核苷酸组合物的任何适宜材料,包括瓶或其它容器(塑料或玻璃)、纸盒、管或其它保护性包装材料。人们将会意识到,包装可以根据寡核苷酸组合物的性质而变化,例如液体制剂可以不同于气溶胶制剂的形式包装。

[0107] 参考实施例将更容易理解本发明,给出这些实施例是为了阐述以下的本发明,而不是限制其范围。就这些实施例而言,使用以下的方法和材料。

[0108] 实施例

[0109] 材料和方法

[0110] 材料

[0111] 实验使用以下的材料和试剂:RPMI1640(Wisent,目录号 10040CV);FBS(胎牛血清,Wisent,目录号 80150);青霉素-链霉素(GIBCO,目录号 15140-122);HEPES(Wisent,目录号 26060CI);L-谷氨酰胺(Gibco,目录号 25030-081);丙酮酸钠(Wisent,目录号 25000-Ci);无菌 PBS(GIBCO,目录号 25030-081);Hanks 平衡盐溶液(HBSS, cellgro,目录号 20021-cv);RT-PCR 试剂盒的 Superscript 首链合成系统(Invitrogen,目录号 11904-018);dNTP(Invitrogen,目录号 10297-018);oligo(dT)₁₂₋₁₈(Invitrogen,目录号 11904-018);Qiagen RNAeasy Mini Kit(Qiagen,目录号 74106);Qiagen 凝胶提取试剂盒(Qiagen,目录号 28704);Qiagen PCR 提取试剂盒(Qiagen,目录号 28104); β -巯基乙醇(Sigma,目录号 M-6250);99%乙醇(Commercial alcohols Inc., Brampton, Ontario, Canada);QiaVac24Manifold(Qiagen,目录号 19403);一次性 Vacconnectors(Qiagen,目录号 19407);DNase I 试剂盒(Fermentas;目录号 EN0521);RiboGreen 定量试剂(Invitrogen-1Molecular probes,目录号 R-11490);Taq PCR 核心试剂盒(Qiagen,目录号 201223);Hema-3 染色套装(Fisher scientific Co. 目录号 122-911,批号 999901);Alamar Blue(Biosource,目录号 DAL1100);人 CCR3 引物对(R&D systems,目录号 RDP-209-025);人 GAPE5H 引物对(R&Dsystems,目录号 RDP-39-025);Ficoll(Amersham Biosciences;目录号:17-1440-03);抗-CD16(嗜酸性粒细胞纯化试剂盒,Miltenyi Biotec, Auburn, CA, 目录号 130-045-701);rhEotaxin(Biosource,目录号 PMC1434);趋化室和膜(NeuroProbe, Nucleopore-Neuroprobe, CabinJohn, MD);人血清白蛋白(SIGMA;目录号);抗人 IL-3/IL-5/GM-CSF 受体 β 链(小鼠单克隆 IgG2b;Santa Cruz Biotechnology,目录号 sc-457);抗小鼠 IgG2b(山羊单克隆,Alexa Fluor488, Molecular

Probes, 目录号 A-21141) ; 抗人 CCR3 抗体 (大鼠单克隆, IgG2a, R&D, 目录号 MAB155) ; 抗大鼠 IgG (山羊单克隆, Alexa Fluor633, Molecular Probes, 目录号 A-21094) ; rhGM-CSF (R&D systems, 目录号 215-GM-005) ; rhIL-3 (R&D systems, 目录号 203-IL-010) ; rhIL-5 (R&D systems, 目录号 205-IL-005) ; rhIL-2 (R&D systems, 目录号 202-IL-010) ; TOP004-(n-1) (Biosource, 在 3' 末端少一个核苷酸的寡核苷酸) ; TOP005-(n-1) (Biosource, 在 3' 末端少一个核苷酸的寡核苷酸) ; TOP004-TP (Biosource, 模板探针) ; TOP004-(n-1-TP-T) (Biosource, 模板探针) ; LP (Biosource, 连接探针) ; TOP005-TP (Biosource) ; TOP004-(n-1-LP-A, Biosource) ; Reacti-Bind 中性抗生物素蛋白包被的高结合量平板 (Pierce, 目录号 15508) ; T4DNA 连接酶 5U/mL (Roche, 目录号 799009) ; 抗 DIG-AP 抗体 (Roche, 目录号 1093274) ; SuperBlock Blocking Buffer in PBS (Pierce, 目录号 37515) ; 磷酸甲基伞形酯 (methylumbelliferyl phosphate) 碱性磷酸酶底物 (Molecular Probes, 目录号 M-6491) ; 含 ASM8 的猴血浆样品 ; MW96 板清洗器 (Beckman Coulter) ; 96- 孔大容量聚丙烯板 (Nunc) ; Eppendorf Research Brand 的微量移液器 ; 黑色不透明 96- 孔板 (Costar, 目录号 3915) 。

[0112] 反义寡核苷酸合成和序列鉴别

[0113] 用 Gene Assembler-Plus™ (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 合成寡核苷酸, 硫代磷酸酯化, 并通过 HPLC 纯化。TOP005 用于图 5-7 中阐述的实验, 所述实验用 cGMP 寡核苷酸实施。反义序列和鉴别描述于表 1。

[0114] 表 1

[0115]

反义编号	反义序列 5'-3'	GeneBank 登录号和/或 SEQ ID NO.
828	5-GTTACTACTTCCACCTGCCTG-3	AF224496-SEQ ID NO.1
773	5-TGGAAAAGCGACACCTACCTG-3	AF247360-SEQ ID NO.2
786	5-CCCTTTTCCTGGAAAAGCGACA-3	AF247360-SEQ ID NO.3
788	5-CTCCCTTTTCCTGGAAAAGCG-3	AF247360-SEQ ID NO.4
793	5-TCCACCTCCCTTTTCCTGGA-3	AF247361-SEQ ID NO.5
807	5-CCTCCTTGTTCCACCTCCCTT-3	AF247362-SEQ ID NO.6
RZ1	5-ACCCATTGGCATTGCTCATTT-3	AF247360-SEQ ID NO.7
RZ2	5-TCCTTGCAATTAGTGCTGCTT-3	AF247361-SEQ ID NO.8
RZ3	5-TCGTGCAGTTCTTCTTTTCA-3	AF247362-SEQ ID NO.9
RZ4	5-CAGACTAGCTTCTCAGTTTGTG-3	AF247363-SEQ ID NO.10
RZ5	5-TGCTAATTTAGTGAAGTCCTT-3	AF247364-SEQ ID NO.11
RZ6	5-CTTCTCCCTGAAAATCTCTTCT-3	AF224495-SEQ ID NO.12
107A	5-GGGTCTGCAGCGGGATGGT-3	NM_000398-1
A86	5-CTGGGCCATCAGTGCTCTG-3	NM_178329-SEQ ID NO.29
*TOP004	5-GGGTCTGCXGCGGGXTGGT-3	NM_000395-1-SEQ ID NO.13
*TOP005	5-GTTXCTXCTTCCXCCTGCCTG-3	AF224496-SEQ ID NO.14
*: X =	X 代表腺苷残基的 DAP 修饰	

[0116] 细胞和细胞培养

[0117] 使用以下的细胞系:TF-1(人红白血病细胞系,ATCC#CRL-2003);EOL-1(人急性骨髓“嗜酸性”白血病细胞系;DSMZ#ACC386)和U937(人组织细胞淋巴瘤细胞系;ATCC#CRL-1593.2)。EOL-1和U937在具有2mM L-谷氨酰胺、1.5g/L碳酸氢钠、4.5g/L葡萄糖、10mM Hepes、1mM丙酮酸钠、10%FBS、青霉素100U/mL、链霉素100 μg/mL的RPMI1640中培养。TF-1培养使用相同培养基,只是以2ng/mL加入rhGM-CSF。

[0118] HL-60 克隆 15 细胞培养和分化

[0119] 如 Tiffany 等,1998, J. Immunol 160:1385-1392 所述,将 HL-60 克隆 15 分化为嗜酸性粒细胞。简单地讲,早幼粒细胞细胞系 HL-60 于 37°C 和 5% CO₂ 中保持在具有 L-谷氨酰胺、补加 10% 热失活 FBS 和 25mM N-[2-羟乙基]哌嗪-N'-[2-羟基丙磺酸](Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 的 RPMI1640, pH7.6 中。通过用 0.5 μM 丁酸(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 处理细胞至少 5 天,诱导细胞分化为嗜酸性粒细胞样表型。在细胞分化后使用 FACS 分析评价 IL-3/IL-5/GM-CSF 受体的共同 β 链的存在情况。

[0120] 细胞生存和反义处理

[0121] 使用 AlamarBlue 测试按照生产商的方法系统地测定细胞生存。通过离心(5分钟、1500RPM, 室温)收集 EOL-1、TF-1、HL-60 或 U937 细胞,用 3×HBSS 清洗,以 1×10⁶ 细

胞/mL重悬浮在无血清的RPMI培养基中。一式三份将 1×10^6 细胞与精确浓度的反义物(0–20 μ M)在无菌细管中温育5分钟。然后将各个反应物转移到12孔平板中,于37℃、5% CO₂中温育5小时,用于mRNA定量,或温育12小时,用于蛋白分析。加入RPMI/FBS20%至10%FBS的终浓度,细胞于37℃、5% CO₂中温育过夜。离心(5分钟、1500RPM,室温)收集细胞,用1×HBSS清洗。纳入对照实验,其由没有反义寡核苷酸或存在错配寡核苷酸的细胞处理组成。

[0122] 人嗜酸性粒细胞的纯化

[0123] 通过Ficoll-Hypaque梯度(1.077g/mL,350g,30分钟)离心全血,获得棕黄层,由此获得粒细胞分离级分。用抗CD16包被的免疫磁性微珠于4℃使用磁性细胞分拣系统Miltenyi Biotec(Auburn,CA)通过负选择进一步纯化人嗜酸性粒细胞。通过Giemsa染色估计嗜酸性粒细胞群的纯度一般为92%–100%。

[0124] 人和猕猴PBMC的纯化

[0125] 猕猴的新鲜血得自ITR Laboratories Canada Inc。通过对正常供体的EDTA K3血液进行Ficoll-Hypaque密度梯度离心,分离PBMC。将PBMC以 2×10^6 细胞/mL/孔接种在12孔平板中的RPMI1640细胞培养基中,所述培养基补加10%热失活FBS、青霉素100U/mL、链霉素100 μ g/mL。细胞生存使用Alamar Blue评价,一般为85%–95%。

[0126] 人PBMC和嗜酸性粒细胞转染

[0127] 通过离心(5分钟、1500RPM,室温)收集人PBMC,用3×HBSS清洗,以 2×10^6 细胞/mL重悬浮在含10 μ g/mL PHA的RPMI培养基5%血清中。以一式三份将 2×10^6 细胞与精确浓度的反义物(0–20 μ M)在无菌细管中温育5分钟。然后将各个反应物转移到12孔平板中,于37℃、5% CO₂中温育过夜,用于mRNA定量,或温育48小时或48小时以下(在指明时),用于蛋白分析。通过离心(5分钟、1500RPM,室温)收集细胞,用1×HBSS清洗。纳入对照实验,其由在没有反义寡核苷酸或存在错配寡核苷酸的细胞处理组成。

[0128] 通过离心(5分钟、1500RPM,室温)收集纯化的人嗜酸性粒细胞,用3×HBSS清洗,以 2.5×10^6 细胞/mL重悬浮在2ng/mL rhGM-CSF或rhIL-5的RPMI培养基10%血清中过夜。第二天,用HBSS清洗细胞两次,以 2.5×10^6 细胞/mL重悬浮在RPMI培养基5%血清中,一式三份与精确浓度的反义物(0–20 μ M)在无菌细管中温育5分钟。然后将各个反应物转移到12孔平板中,于37℃、5% CO₂中温育过夜,用于mRNA定量,或温育48小时或48小时以下(在指明时),用于蛋白分析。通过离心(5分钟、1500RPM,室温)收集细胞,用1×HBSS清洗。纳入对照实验,其由在没有反义寡核苷酸或存在错配寡核苷酸的细胞处理组成。

[0129] 猴PBMC转染

[0130] 通过离心(5分钟、1500RPM,室温)收集猕猴PBMC,用3×HBSS清洗,以 2×10^6 细胞/mL重悬浮在RPMI培养基5%血清和10 μ g/mL PHA(或10ng/mL rhIL-2,在指明时)中。以一式三份将 2×10^6 细胞与精确浓度的反义物(0–20 μ M)在无菌细管中温育5分钟。然后将各个反应物转移到12孔平板中,于37℃、5% CO₂中温育过夜,用于mRNA定量,或温育48小时或48小时以下(在指明时),用于蛋白分析。通过离心(5分钟、1500RPM,室温)收集细胞,用1×HBSS清洗。纳入对照实验,其由在没有反义寡核苷酸或存在错配寡核苷酸的细胞处理组成。

[0131] 流式细胞术分析

[0132] 计数细胞,并以 1×10^6 细胞/mL 重悬浮。于 20–25℃ 以 $400 \times g$ 离心细胞 3 分钟,废弃上清液。此后,将细胞沉淀重悬浮在 50 μ L FACS 缓冲液 (1 $\times$ PBS, pH7.2–7.4; 0.5% 人白蛋白; 2.5% 人血清) 中, 37℃ 温育 30 分钟。不废弃上清液, 将一抗直接加入管中并混合。于 4℃ 避光温育 1 小时, (抗人 CCR-3 抗体以 1 μ g/0.5 $\times 10^6$ 细胞使用。抗人共同 β 链以 2 μ g/0.5 $\times 10^6$ 细胞使用)。用 2mL FACS 缓冲液清洗, 以 $400 \times g$ 离心 3 分钟, 废弃上清液。对于同种型对照, 用 300 μ L FACSFix (1 $\times$ PBS, pH7.2–7.4; 4% 多聚甲醛) 重悬浮细胞沉淀, 于 4℃ 避光保持。

[0133] 为标记 CCR3 和共同 β 链, 用 50 μ L FACS 缓冲液重悬浮细胞沉淀, 并加入二抗, (抗大鼠 IgG2a Alexa Fluor633 以 1 μ g/0.5 $\times 10^6$ 细胞使用。抗小鼠 IgG2b Alexa Fluor488 以 2 μ g/0.5 $\times 10^6$ 细胞使用)。4℃ 避光温育 1 小时。用 2mL FACS 缓冲液清洗, 以 $400 \times g$ 离心 3 分钟, 并废弃上清液。用 300 μ L FACSFix 固定标记细胞, 于 4℃ 避光保持。数据在 BD biosciences FACS calibur 中分析, 用 Cell Quest 程序处理。

[0134] 钙动员测定

[0135] 嗜酸性粒细胞以 1×10^7 细胞/mL 重悬浮在含 10% FBS 的 RPMI1640 中, 通过与 5M Fura-2AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 于室温在黑暗中温育 30 分钟而负载。细胞 (1×10^6 细胞/mL) 清洗 3 次, 重悬浮在盐水缓冲液 (138mM NaCl、6mM KCl、1mM CaCl_2 、10mM HEPES、5mM 葡萄糖和 1% BSA, pH7.4) 中。然后将各 2mL 的细胞悬浮液转移至石英比色皿, 将石英比色皿置于发光分光光度计 LS50B (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK) 中。通过记录在趋化因子作用下于 340 和 380nm 顺序激发后于 510nm 发射的荧光比率, 检测细胞的 Ca^{2+} 动员。

[0136] 趋化性测定

[0137] 使用具有 5mm 孔的无聚乙烯吡咯烷酮的聚碳酸酯膜 (Nucleopore-Neuroprobe), 在 48 孔 (NeuroProbe, Cabin John, MD) 室中评价体外趋化性。对照或反义物处理的嗜酸性粒细胞以 1×10^6 细胞/mL 悬浮在含 0.25% BSA 的 RPMI1640 培养基中。上层孔和下层孔分别含 50 μ L 和 31 μ L 细胞悬浮液, 后一悬浮液补加优化浓度的嗜酸性粒细胞趋化因子 (80ng/mL)。在于 37℃、5% CO_2 中温育 1 小时后, 计数存在于下层孔中的迁移细胞。在没有嗜酸性粒细胞趋化因子的情况下测定自发迁移, 并计算入结果中。

[0138] 猴反义物处理和毒性研究

[0139] 该方法由 ITR Laboratories Canada Inc. 的动物关怀委员会 (ACC) 回顾和评价。所有动物都按照 Canadian Council on Animal Care 出版的现行“Guide to the Care and Use of Experimental Animals”和 NIH 出版物“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”概述的原则照料。

[0140] 在连续 14 天内通过每日一次吸入接触, 给予由两种寡核苷酸 (TOP004 和 TOP005) 的 1:1 混合物组成的 ASM8, 在此期间研究所述 ASM8 的毒性, 以表征其单个寡核苷酸组分的毒代动力学模式。还评价 14 天恢复期后 ASM8 的任何作用的可逆性。还评价 14 天吸入接触 ASM8 后的任何系统性超敏状况 (可通过皮内注射 (ID) 检测)。

[0141] 溶媒对照制品是 USP 注射级 0.9% 氯化钠溶液, 按原样使用。通过混合 TOP004 和 TOP005 与 USP 注射级 0.9% 氯化钠溶液, 以获得 1:1 混合物, 制备用于气溶胶化的测试制品 (ASM8) 的液体制剂。目标剂量的溶液浓度基于纯寡核苷酸。因此, 将根据纯度调整的校正

系数应用于测试制品组分的称重和分配。对于 TOP004, 校正系数是 1.15, 对于 TOP005, 校正系数是 1.24。在 14 天接触期开始前, 称出每个每日接触所需要的各相应寡核苷酸的量, 混合 (以粉末形式) 在设计用于每日接触的小瓶中, 于 -80°C 冷冻储存。在每日接触时, 由冷冻储存中取出正确的小瓶, 将内容物溶解在盐水溶媒中, 通过无菌 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤器过滤, 制剂仅用于当天的接触。

[0142] 每组的动物数目和处理陈述于以下的表 2 和 3:

[0143] 表 2

[0144]

组别	处理	动物数目			
		极期		恢复期	
		雄性	雌性	雄性	雌性
1	溶媒对照	3	3	1	1
2	ASM8 低剂量	3	3	-	-
3	ASM8 中剂量	3	3	-	-
4	ASM8 高剂量	3	3	1	1

[0145] 体重范围在 第 1 天处理时为 2-4kg

[0146] 年龄范围 在第 1 天处理时为青年

[0147] 表 3

[0148] ASM8 接触浓度和剂量水平 (4)

[0149]

组别	处理	ASM8 的剂量 (mg/kg/ 天), (1)	ASM8 的气溶胶浓度 (mg/L), (3)
1	溶媒对照, (2)	0	0
2	ASM8 低剂量	0.05	0.00795
3	ASM8 中剂量	0.25	0.0397
4	ASM8 高剂量	2.5	0.3976

[0150] (1): 基于估计的 2.5kg 体重。

[0151] (2): 溶媒对照动物接触由溶媒溶液产生的气溶胶, 其气溶胶浓度就质量而言一般被认为等于高剂量组产生的气溶胶浓度。

[0152] (3): 目标剂量和气溶胶浓度基于测试制品的绝对纯度, 该绝对纯度通过在剂量溶液配制过程中使用纯度的合适校正系数获得。

[0153] (4): 使用下式: $D_L = E_c \times RMV \times T / BW$ 估测接触期当中获得的剂量水平, 其中

[0154] D_L = 获得的剂量水平 (mg/kg/ 天)

[0155] E_c = 传递给动物的实际浓度 (mg/L 空气)

[0156] RMV = 按照 Bide 等, 2000, J. App. Toxicol., 20, 273-290 的公式估测的分钟体积 (mL/min), 该公式详细为: $RMV(L) = 0.499 \times W(kg)^{0.809}$

[0157] T = 时间, 每日接触的持续时间 (分钟)

[0158] BW = 接触期当中的平均体重 (kg)

[0159] 假定此估测的所获剂量 100% 沉积在呼吸道中。

[0160] 对所有动物进行生命观测,包括死亡率、临床检查、体重、食物消耗、心电图、检眼镜检查、临床病理、血浆水平测定、超敏检验。

[0161] 在处理期结束时,麻醉动物,并进行解剖病理学检验、验尸、器官重量检验、组织病理学检验。

[0162] 在给予 ASM8 后 24 小时,使用半定量 RT-PCR 检测对高剂量处理猕猴气管样品的共同 β 链和 CCR3mRNA 表达是否存在任何的 ASM8 抑制作用。

[0163] 用于猴血浆中的寡核苷酸检测的 HL-ELISA

[0164] 在给药前的第 1 天和第 14 天、给药后的 0.5、1、3、6 和 24 小时由各只动物收集猴血样(各约 1mL)。血样于 4℃ 离心,以产生血浆,分离血浆,在干冰上冷冻,直至使用杂交/连接 ELISA 定量测定对 TOP004 和 TOP005(以及近似的 $n-1$ 代谢物)浓度进行测定分析。

[0165] 通过连续稀释猴血浆样品制备寡核苷酸的标准曲线溶液。通常标准曲线的工作范围是 125nM 至 0.007629nM。适当稀释血浆样品,用于检测标准曲线的线性范围,制备一个以上稀释度用于精确检测。

[0166] 将各个标准品或血浆样品等份(200 μ L)分在 96 孔聚丙烯板中,其中将 200 μ L 适宜的模板探针溶液加至 200 μ L 血浆样品中,37℃ 温育 60 分钟。以一式两份将 150 μ L 转移至 NeutrAvidin 包被的板,于 37℃ 温育 30 分钟。使用板清洗器用清洗缓冲液清洗该板 4 次(每次 200 μ L)。加入 150 μ L 连接探针溶液,之后于室温温育 120 分钟。在温育后,使用板清洗器用清洗缓冲液度清洗样品 2 次(每次 200 μ L),之后使用板清洗器用 ddH₂O 清洗 3 次(200 μ L)。加入 150 μ L 1:2000 抗 DIG-AP 稀释液(在 Super block, Pierce 中),之后于室温温育 30 分钟。使用板清洗器用清洗缓冲液清洗样品 4 次(200 μ L)。然后加入 150 μ L 10 μ M MUP 试剂,接着室温温育 60 分钟。读取 355ex/485em 的荧光。用于 HL-ELISA 的溶液:

[0167] 模板探针溶液(0.05 μ M 模板探针、60mM Na₂HPO₄pH7.4、0.9MNaCl、0.24 % Tween-20);10× 连接缓冲液(0.8248M Tris-Cl pH7.5、0.0828M MgCl₂、1.93 % DTT);ATP100mM 溶液(在水中制备,用 NaOH 调节至 pH7 $\pm$ 0.5);连接探针溶液(在 1× 连接缓冲液中的 0.067 μ M 寡核苷酸、0.025 单位/mL T4DNA 连接酶、0.05mM ATP);清洗缓冲液(25mM Tris-Cl pH7.2、0.15M NaCl、0.1% Tween)。

[0168] 猴气管匀浆和 RNA 提取

[0169] 使用 Polytron PT1200(Brinkmann Instruments)匀浆猴气管,使用 Qiagen RNAeasy 小型试剂盒(Qiagen, Mississauga ON, Canada)提取总 RNA,接着进行 DNA 酶 I 消化。使用 Ribogreen 荧光测定(InvitrogenCorporation, Burlington ON, Canada)定量总 RNA。使用 Superscript[™] II RT 试剂盒(Invitrogen Corporation, Burlington ON, Canada),使用首链 cDNA 合成由 1-2 μ g RNA 制备 cDNA。

[0170] RNA 提取、逆转录和聚合酶链反应

[0171] 按照 Qiagen RNAeasy 小型试剂盒方法,使用 Qiagen 的 QiaVac24 歧管由细胞沉淀提取 RNA,按照 Fermentas 方法用 DNA 酶 I 处理 RNA。使用 RiboGreen 试剂按照生产商的方法定量 RNA。或者,使用分光光度计定量 RNA。使用 Invitrogen 的 RT-PCR 试剂盒的 Superscript 首链合成系统以 20 μ L 总反应体积进行首链 cDNA 制备。简单地讲,首先于

65℃使 1-2.5 μ gRNA 和 0.5mM 的每种 dNTP、0.5 μ g oligo(dT)₁₂₋₁₈ 变性 5 分钟,于冰上冷冻至少 1 分钟。混合物 42℃温育 2 分钟,加入第二种预混合物,其含有 1× 首链缓冲液、10mMDTT、40 单位 RNaseOUT 和 40 单位 Superscript II RT。反应物于 42℃温育 10 分钟,于 50℃温育 1 小时,通过于 70℃加热 15 分钟失活。用在 1×PCR 缓冲液 (10×:Tris-HCl、KCl、(NH₄)₂SO₄、15mM MgCl₂;pH8.7) 中的优化量 cDNA (对于 CCR3 为 100-250ng,对于 G3PDH 为 1-10ng)、0.2mM 每种 dNTP、8.5pmol 每种 PCR 引物和 2.5 单位 Taq DNA 聚合酶以总反应体积 50 μ L 进行 PCR。将混合物于 94℃加热 5 分钟,接着进行 30-35 个循环,每个循环包括:94℃温育 1 分钟、60℃温育 45 秒以及 72℃温育 45 秒。补充延伸于 72℃进行 10 分钟。在溴化乙锭存在下通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。使用 Total Lab 软件 (背景扣除采用滚球法;Ultra Lum Inc., Model UC4800) 进行 PCR 产物的定量。PCR 引物是:人 CCR3 引物对 (R&D systems,目录号 RDP-209-025);人 GAPDH 引物对 (R&D systems,目录号 RDP-39-025) 和示于表 4 的引物。系统性地纳入对照实验,其由对非 RT-RNA 进行的 PCR 组成。

[0172] 表 4.

[0173]

引物标识	引物序列:5' -3'	SEQ ID NO.
huBcATG. for	5-ATGGTGTGCGCCAGGG-3	15
huBcATG1. for	5-CCAGGGAGATGGTGCTGG-3	16
huBc6. rev	5-CCGCTTGTAGACCACCTCAAC-3	17
huBc7. rev	5-CCTTGGCTGAACAGAGACGATG-3	18
mkCCR3. for	5-TGCTCTGTGAAAAAGCCGATG-3	19
mkCCR3-2. rev	5-ACCAAAAGTGACAGTCCTGGC-3	20
huBc4. for	5-AAGTCAGGGTTTGAGGGCTATG-3	21
huBc4. rev	5-CAAGGGGGCAGAGACAGGTAG-3	22
G3pdh. for	5-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3	23
G3pdh. rev	5-TCCACCACCCCTGTTGCTGTA-3	24

[0174] [0174] 寡核苷酸化学降解

[0175] 为在分析前诱导 TOP004 和 TOP005 降解 (以便确保分辨完整分子和降解产物),进行以下处理:

[0176] *脱嘌呤:将 ASM8 以 0.5mg/mL 终浓度重悬浮在 30% CH₃COOH 中,于室温温育 3、4 或 6 小时。通过加入 5 体积水终止反应,将混合物置于 -20℃,然后在 Speed-Vac 中冻干,以去除乙酸。

[0177] *切割:将脱嘌呤的寡核苷酸重悬浮在 0.2M NaOH(0.5mg/mL) 中,于 50℃温育 1 小时,储存在 -20℃或通过 HPLC 分析。

[0178] TOP004 和 TOP005 的 HPLC 分级分离

[0179] 称重 ASM8,以 0.5mg/mL 的浓度 (0.25mg/mL TOP004 和 0.25mg/mL TOP005) 溶解在 PBS 中,HPLC 梯度参数示于下表 5。

[0180] 表 5. HPLC 梯度参数:

[0181]

时间 (分钟)	流速 (ml/分钟)	%缓冲液 A	%缓冲液 B
0	1	100	0
5	1	100	0
10	1	93	7

100	1	65	35
102	1	20	80
122	1	20	80
124	1	100	0
144	1	100	0
146	0.1	100	0

[0182] 用联结 Waters2487Dual λ 吸光度检测器并配有在线脱气器、烘箱和 1500 系列手动注射器 Reodyne7725i 的 Waters1500 系列二元 HPLC 泵进行 HPLC 分离。寡核苷酸混合物在 Waters Protein Pak DEAE5PW 阴离子交换柱 (0.5cm $\times$ 75cm) 上分级分离,保持在 60 $^{\circ}$ C,通过 260nm 的 UV 吸收检测。寡核苷酸混合物 (体积= 25 μ L) 在水中上柱 (缓冲液 A:水 (MilliQ 级)),通过逐渐增加缓冲液 B(1M LiClO₄, (0.22 μ m 过滤)) 的比例使液相的离子强度增加,由固相 (柱) 洗脱寡核苷酸,由此进行洗脱。

[0183] 在测定条件下,62.5 μ g 的 TOP004 或 TOP005 中的任一个于 260nm 产生的可检测变化都 >0.15 吸光度单位 (AU)。

[0184] 寡核苷酸储存

[0185] 将等份的 ASM8 (0.5mg/mL) 的 PBS 溶液于 -20 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 和 40 $^{\circ}$ C 温育 2 个月。在第 4 周和第 8 周时建立 ASM8 的 HPLC 谱。对照条件定义为任意储存时间前 (即时间 0) 的 ASM8HPLC 谱。HPLC 系统由 Waters 的 BreezeTM (V3.30) 软件驱动。

[0186] 寡核苷酸解链曲线和热力学总结表

[0187] TOP004 和 TOP005 以在 1 $\times$ PBS (以及其它缓冲系统) 中的等摩尔浓度混合。总寡核苷酸浓度在约 1.2-8.7mM 的范围内。使用带有 Tm 附件的 Beckman DU640 分光光度计进行标准 UV 热变性法。在 10-90 $^{\circ}$ C 的每个温度检测 260nm 的吸光度变化。使用 MELTWINTM3.5 软件拟合解链曲线,以测定热力学参数。产生解链曲线和热力学总表的屏幕图像。

[0188] 实施例 1

[0189] 针对 CCR3 受体的反义寡核苷酸的效力

[0190] 分析几种针对 CCR3 趋化因子受体的反义寡核苷酸抑制受体 mRNA 表达和抑制受体功能的能力。在 Eo1-1 和 U937 细胞系中进行 CCR3 反义初级筛选。这些细胞在上述正常细胞培养条件下表达 CCR3mRNA。表 6 显示了针对人 CCR3 趋化因子受体的反义寡核苷酸。

[0191] 参看表 6, 针对 CCR3 受体的反义寡核苷酸 828 (828: 5' -GTTACTACTTCCACCTGCCTG-3' SEQ ID NO.1) 有效抑制受体的 mRNA 表达,如表 6 中所示。

[0192] 寡核苷酸 828 针对 CCR3 基因,在外显子 1 末端后的 48 个碱基处开始,21 个碱基长。对 828 进行 BLAST 检索,除了针对 CCR3 受体以外,下一个最接近的同源性报告为低于 72% 的同源性。对获得两个互补序列的完全结合来说,这被看作是无意义的同源性。使用错配寡核苷酸 (SEQ ID NO.32) 评价 828 的特异性。错配对 CCR3mRNA 或在这些实验中用作内标的看家基因 G3PDH 没有作用。因此,反义寡核苷酸 828 是特异性的。

[0193] 表 6

[0194]

反义标识	反义序列:5' -3'	CCR3mRNA 抑制的百分率
773	5-TGGAAAAGCGACACCTACCTG-3	73%
828	5-GTTACTACTTCCACCTGCCTG-3	71%

786	5-CCCTTTTCCTGGAAGCGACA-3	45%
788	5-CTCCCTTTTCCTGGAAGCG-3	37%
793	5-TCCACCTCCCTTTTCCTGGA-3	35%
807	5-CCTCCTTGTTCCACCTCCCTT-3	31%

[0195] 实施例 2

[0196] 两个 DAP 取代的寡核苷酸在猴外周血单核细胞 (PBMC) 中的效力

[0197] 如上所述,通过用 DAP 置换腺苷修饰反义寡核苷酸 107A 和 828,以分别产生反义寡核苷酸 TOP004 和 TOP005。同 107A 一样, TOP004 (5' -GGGTCTGCXGCGGGXTGGT-3' (SEQ ID NO. 13), 其中 X 代表腺苷残基的 DAP 修饰) 是 19 聚体, 针对 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 链。同 828 一样, TOP005 (5' -GTTXCTXCTTCCXCCTGCCTG-3' (SEQ ID NO. 14)) 是 21 聚体, 针对趋化因子受体 CCR3。

[0198] 测试 TOP004 和 TOP005 这二者单独的和组合的效力。ASM8 是部分含 TOP004 和 TOP005 这二者的组合物。在猴外周血单核细胞 (PBMC) 中进行效力研究, 以验证该物种研究由 ASM8 药理学活性产生的毒性作用潜力的用途。

[0199] 为使 ASM8 在猕猴中有效, 其与其靶序列必须存在足够的同源性。猕猴 β 链序列不能由公开的数据库获得, 因此克隆并测序包含 TOP004 序列区的节段。但是, 可在相关的体外系统中直接评价灵长类物种间的 TOP004 活性。具体地说, 外周血单核细胞 (PBMC) 制备物是测试 TOP004 功能性的合适系统, 因为在大部分单核白细胞亚群 (T 和 B 细胞、单核细胞和巨噬细胞) 上发现了共同 β 链。

[0200] 仅可获得猕猴 CCR3 受体编码区的序列信息; 在公开的数据库中不能获得 TOP005 结合区的序列信息。TOP005 靶序列在人基因外显子 1 末端后的 48 个碱基处开始; 此内含子跨越超过 20kbp, 使其克隆和测序变得很冗长。文献中的报告已表明, 内含子序列中的某些节段在人和猴之间是保守的 (Rahman 等, 2004. Genomics. 8376-84)。进化研究也表明, 在分类群 (人、鲸和海豹) 间存在同源内含子序列的节段, 发现这些节段更经常地邻近内含子-外显子接合处 (HareMP 和 Palumbi SR., 2003Mol Biol Evol. 20, 969-978.)。在 PBMC 制备物中测试 TOP005 在猴中的功能性, 其中在 T 和 B 细胞亚群上存在 CCR3 受体表达。

[0201] 猕猴共同 β 链的测序

[0202] 人、黑猩猩、猪、小鼠和大鼠的 IL3/IL-5/GM-CSF 受体基因的共同 β 链的分析揭示, 在脊椎动物间有高度的基因序列相似性。设计用于克隆 PCR 的引物序列。引物序列来源于在人、黑猩猩、猪、小鼠和大鼠中高度保守的核苷酸序列, 它们在共同 β 链基因的 TOP004 寡核苷酸区周围。表 2 显示了不同的引物。这些引物用于扩增猕猴 PBMC cDNA 的特异性产物。获得几种 PCR 产物, 这取决于使用的引物组。使用嵌套 PCR 循环评价获得产物的特异性。克隆并测序阳性扩增子。

[0203] 图 1A 显示了得自猕猴 TOP004 区的 PCR 扩增的 3 个克隆 (分别为 SEQ ID NO. 25、26 和 27) 的序列, 其与人序列 (SEQ ID NO. 28) 和黑猩猩 (SEQ ID NO. 33)、猪 (SEQ ID NO. 34)、大鼠 (SEQ ID NO. 35) 和小鼠 (SEQ ID NO. 36) 核苷酸序列中的相应区比对。非同源核苷酸用小写字母显示, 而保守区用大写字母表示。TOP004 区标下划线。与 TOP004 区互补的猕猴 β 链序列在全部 3 个测序克隆中都显示出显著同源性 (19 个碱基中有 18 个相同)。在第 6 位发现差异 (由 TOP004 的 5' 末端开始), 其中“A”和“G”同时存在 (“A”是预期碱基)。图 1B 显示了由克隆的猕猴 (SEQ ID NO. 37) 和人 (SEQ ID NO. 38)、黑猩猩 (emb.

AADA01213660) (SEQ ID NO. 39)、猪 (U94688.1) (SEQ IDNO. 40)、小鼠 (NM_007780.1) (SEQ ID NO. 41) 和大鼠 (NM_133555.1) (SEQ ID NO. 42) 的已知核苷酸序列预测的蛋白序列的比对。在第 6 位 (由 TOP004 的 5' 末端开始, 其中“A”和“G”同时存在) 存在的核苷酸差异对应于公开数据库中可获得的蛋白序列的共同 β 链中的谷氨酰胺 (Q) 或赖氨酸 (K) 密码子的第二个碱基。图 1B 中提供的数据表明, 高度进化物种在 TOP004 互补区中含有谷氨酰胺残基 (在人、黑猩猩、猪中的箭头)。谷氨酰胺由两个密码子 CAA 或 CAG 编码。在低等物种 (小鼠和大鼠) 中, 谷氨酰胺被赖氨酸残基取代。赖氨酸由两个密码子 AAA 或 AAG 编码。在任一种情况下, 第 2 位的腺苷都是保守的。因此, 腺苷残基是有功能的猴序列的可能候选物, 因为其存在于其它高等脊椎动物中。但是, 不能排除 GM-CSF β 链多态性。Freeburn 等公开了 β 链受体的胞质内区中的几个突变, 其可能是易感白血病的原因, (Freeburn 等, 1997, Exp. Hematol., 25 :306-311)。图 1A 中给出的测序数据表明, 鸟苷残基可存在于第 6 位, 第 6 位由标下划线的 TOP004 序列的 5' 末端开始。在此情况下, 密码子将为 CGG, 蛋白序列将在该位置包含精氨酸 (R) 残基。该位置的碱性碱基 (H、K 或 R) 使人联想到低等脊椎动物, 不可能是灵长类动物的情况。

[0204] 尽管有这种差异, 但猴和人 β 链序列之间非常高度的同一性提示, TOP004 在猕猴中有功能。

[0205] TOP004 和 TOP005 在猕猴 PBMC 中的效力

[0206] 在猕猴 PBMC 中分别单独地测试 TOP004 和 TOP005 选择性降低 β 链和 CCR3 表达的能力。将纯化的猴 PBMC 与不同浓度的 TOP004 和 TOP005 温育。

[0207] 参看图 2A 和 2B, 条图 A 和条图 B 中给出了对由猴获得的 10 个以上血样进行的实验结果。条图显示用 TOP004 (A) 和 TOP005 (B) 降低猴 PBMC 中的 β 链和 CCR3 mRNA 表达。抑制是 TOP004 和 TOP005 特异性的, 不是因为 RNA 降解或细胞存活丧失, 以内标为证 (对应于 G3PDH mRNA 的 451-bp 产物和细胞存活检验)。根据 RT-PCR 检测, TOP004 特异性地降低初级猴 PBMC 中的共同 β 链表达 (图 2A)。10-15 μ M 浓度获得最大效力, 其中大部分观察到 >50% 的抑制。TOP004 对猴 β 链的抑制证实了在人和猴 β 链 mRNA 序列之间显示出非常高度的同一性的测序数据 (图 1A)。同样, 根据 RT-PCR 检测, TOP005 转染入猴 PBMC 中降低了 CCR3 mRNA 的表达 (图 2B)。TOP005 对 CCR3 mRNA 表达的最大抑制在低于 β 链所用浓度 (10-15 μ M) 的反义寡核苷酸浓度 (0.05-2.5 μ M) 获得。

[0208] 据 RT-PCR 检测, mRNA 表达抑制还在蛋白水平上得到流式细胞术 (FACS) 的确证。在不同浓度的 TOP004 或 TOP005 存在下, 猴 PBMC 在生长培养基中温育 36 小时。如上所述进行流式细胞术定量。参看图 3A 和 3B, 条图显示了分别在 TOP004 和 TOP005 存在下猕猴 PBMC 中的 β 链和 CCR3 细胞表面表达。所述图表明, 在用 TOP004 或 TOP005 处理后, 观察到在 7.5 μ M 和 0.5 μ M 时表达 β 链和 CCR3 的细胞百分率分别获得 30% 以上的下降。

[0209] 还测试了以 1:1 比率组合 (ASM8) 的 TOP004 和 TOP005 在猕猴 PBMC 中分别选择性降低 β 链和 CCR3 表达的能力。猴 PBMC 在不同浓度的 ASM8 存在下温育过夜, 然后通过 RT-PCR 评价 β 链和 CCR3 的表达。参看图 4A 和 4B, 显示了 5 个以上得自猴的血液的条图, 代表在 ASM8 存在下猕猴 PBMC 中的 β 链和 CCR3 表达。在 2.5-5 μ M 的 ASM8 浓度范围观察到显著的 β 链抑制 (图 4A), 这低于单独的 TOP004 获得最大抑制的最佳浓度范围 (10-15 μ M (图 2A))。这些结果表明, 相比于单独的 TOP004, TOP004 和 TOP005 反义寡核苷

酸的组合在阻断 β 链表达方面提供了增强效力和 ASM8 的协同作用。同样,根据 RT-PCR 的检测,将 ASM8 转染入猴 PBMC 中降低了 CCR3mRNA 表达(图 4B)。TOP005 对 CCR3mRNA 表达的最大抑制在低于 β 链所用浓度(2.5–5 μ M)的反义寡核苷酸浓度(0.05–5 μ M)获得。ASM8 对 CCR3 抑制的作用明显不是浓度依赖性的,该结果可能反映出对 CCR3 来说获得最大抑制(稳定值)的浓度低于 β 链所用浓度。

[0210] 总之,猕猴共同 β 链测序表明了非常高度的同一性(含 TOP004 序列的 19 个碱基中的至少 18 个碱基相同)。预期与人基因的此高度同源性足以使 TOP004 与猴 β 链 mRNA 杂交,以诱导反义活性,由此降低其表达。

[0211] 将 TOP004 转染入纯化的猕猴 PBMC 中,以评价其下调猴 β 链表达的能力。TOP004 有效降低 β 链 mRNA 表达,据 RT-PCR 检测达 30–70%。

[0212] 同样,将 TOP005 转染入猕猴 PBMC 中,通过半定量 RT-PCR 测定 CCR3 表达水平。结果表明, TOP005 以 30%–85% 的范围内下调猕猴 CCR3 表达。

[0213] 同样,根据流式细胞仪检测,在猴 PBMC 中 TOP004 或 TOP005 的转染于 0.5 μ M(>30%) 时诱导 β 链或 CCR3 阳性的细胞数特异性降低。

[0214] 还将 ASM8 转染入纯化的猴 PBMC 中,以评价组合处理(TOP004 和 TOP005)下调猴 β 链和 CCR3mRNA 表达的效力。在这些条件下,根据 RT-PCR 检测,在低至 0.1–0.5 μ M 的 ASM8 浓度时,ASM8 显著降低 β 链和 CCR3 的表达。这也提示,猕猴是在其中检验由于 ASM8 药理学活性引起的潜在毒性作用的适宜物种。

[0215] 实施例 3

[0216] 针对 CCR3 的反义寡核苷酸在人细胞和细胞系中的作用

[0217] 实施进一步的实验,以评价 A86 和 TOP005 在 HL-60 分化的嗜酸性粒细胞样细胞(Lee Tiffany 等, J. Immunol 1998, 160 :1385–92)、U937 和 Eo1-1 细胞以及外周血单核细胞(PBMC)中抑制 CCR3mRNA 表达的能力。还研究了 A86 和 TOP005 在 HL-60 细胞和纯化的人外周血嗜酸性粒细胞这二者中抑制嗜酸性粒细胞迁移和钙动员的能力。A86 是反义寡核苷酸(5' CTG GGC CAT CAG TGC TCT G3' (SEQ ID NO. 29),对应于 CCR3 编码区(外显子 7)的 87–105 核苷酸序列。如早前所论述, TOP005 是 828,但全部 3 个腺苷都被 2,6-二氨基嘌呤取代(5' GTT XCT XCT TCC XCC TGC CTG3' (SEQ ID NO. 14))。828 互补序列在外显子 1 末端后的 48 个碱基处开始,21 个碱基长。互补有义寡核苷酸(5' CAG AGC ACT GAT GGC CCA G3' (SEQ ID NO. 30))和错配寡核苷酸(5' CGT GGC ACT CAG TGT CCT G3' (SEQ ID NO. 31))用作 A86 的对照。错配寡核苷酸(5' CCT TTG ACC TGCCAA TGC TCT3' (SEQ ID NO. 32))用作 828/TOP005 的对照。

[0218] A86 反义寡核苷酸在 HL-60 克隆 15 来源的嗜酸性粒细胞中对 CCR3mRNA 表达的作用

[0219] 已知丁酸处理可诱导 HL-60 细胞的克隆 15 变体分化为具有外周血嗜酸性粒细胞的多种特征的细胞(Lee Tiffany 等, J. Immunol 1998, 160 :1385–92)。使用相同的分化方法,我们证实 CCR3mRNA 在分化的 HL-60 细胞中的表达。然后进行 RT-PCR,以检验合成寡核苷酸在分化为嗜酸性粒细胞的 HL-60 细胞中调节 CCR3 受体编码 mRNA 表达的能力。在用 10 μ M A86 处理细胞后,使用内标 G3PDH 通过半定量 PCR 评价 CCR3mRNA。总 RNA 分离自如上所述新鲜收集的细胞。参看图 5,显示了针对 CCR3 的反义寡核苷酸在 HL60 分化细胞

中对 CCR3mRNA 表达的作用。与有义寡核苷酸和错配寡核苷酸相反,反义寡核苷酸显著抑制 CCR3mRNA 表达。在有义寡核苷酸和错配寡核苷酸处理的细胞中 CCR3mRNA 表达明显不同于在未处理细胞中获得的 CCR3mRNA 表达。而且,所有寡核苷酸在所使用的浓度都不影响 G3PDH mRNA 表达。因此,在此实验中使用的反义寡核苷酸 A86 能够特异性地抑制 CCR3mRNA 的表达。

[0220] A86 对 CCR3 蛋白细胞表面表达的作用

[0221] 进一步研究了 CCR3mRNA 降低是否能反映出 CCR3 细胞表面蛋白密度的降低。就此而言,进行流式细胞术分析来评价用寡核苷酸处理后 HL-60 衍生的嗜酸性粒细胞上的 CCR3 受体表达。在丁酸处理后,表达 CCR3 受体的 HL-60 衍生的嗜酸性粒细胞的百分率为 40%。当用有义和错配寡核苷酸 (10 μ M) 处理时,阳性细胞的百分率稍微且不显著地下降;阳性细胞的百分率分别为 35%和 38%。但是,在 A86 处理细胞上的 CCR3 受体密度显著降低(阳性细胞为 26%,相比之下在未处理细胞中为 40%)。10 μ M 的 A86 能够降低 CCR3 细胞表面表达达 65%。较高浓度的 A86 的作用更显著。具体地说,使用 20 和 30 μ M 的 A86,结果表明 CCR3 细胞表面表达分别降低达 75%和 85%。CCR3 的反义寡核苷酸 A86 能够以剂量依赖性方式抑制 CCR3 细胞表面表达。

[0222] A86 对 HL-60 细胞中嗜酸性粒细胞趋化因子诱导的钙动员的作用

[0223] 当趋化因子刺激表达其特异性受体的白细胞时,通常观察到快速的瞬时钙流动。这种钙动员可通过 Fura-2AM 载荷细胞实时跟踪,是受体活化的便利检测方法。趋化因子嗜酸性粒细胞趋化因子是 CCR3 受体的特异性配体,在连接至受体时诱导快速钙流动和白细胞趋化性。参看图 6,显示了 A86 对 CCR3 活化的作用。与对照和有义寡核苷酸相比,A86 处理细胞中响应于嗜酸性粒细胞趋化因子的钙动员下降。以 10 μ M 浓度的 A86 寡核苷酸处理细胞。用有义寡核苷酸处理的细胞能够响应于嗜酸性粒细胞趋化因子,未处理的细胞也是如此。在这些情况下,嗜酸性粒细胞趋化因子诱导胞内 Ca^{++} 浓度增加。但是,在 A86 处理的细胞中,嗜酸性粒细胞趋化因子诱导少得多的 Ca^{++} 动员。本文给出的结果表明,A86 在 HL-60 细胞系中有效干扰 CCR3 受体活化。

[0224] 用反义寡核苷酸处理纯化的人嗜酸性粒细胞抑制纯化的人嗜酸性粒细胞对嗜酸性粒细胞趋化因子的响应

[0225] 参看图 7,显示了反义寡核苷酸对纯化的人嗜酸性粒细胞对嗜酸性粒细胞趋化因子的趋化反应的作用。将纯化的人嗜酸性粒细胞与 10 μ M 浓度的反义寡核苷酸(方块)或有义寡核苷酸(圆形)在补加 5% FCS 和 IL-5 (1.5ng/mL) 的 RPMI1640 中温育过夜。对照细胞(三角形)在无 ODNS 的相同条件下温育。数据来自代表 3 个样本的单个实验,以每 5 个高倍视野中三份平行迁移细胞测定的迁移细胞平均数 $\pm$ SD 给出。针对 CCR3 的反义寡核苷酸抑制嗜酸性粒细胞迁移,当嗜酸性粒细胞趋化因子浓度增加时这种抑制更显著。在 80ng/mL 嗜酸性粒细胞趋化因子时,嗜酸性粒细胞迁移降低达 55.6%。

[0226] 图 8 显示了反义寡核苷酸处理的嗜酸性粒细胞中的钙动员。当用 A86 (10 μ M) 处理嗜酸性粒细胞时,与对照和有义寡核苷酸相比,嗜酸性粒细胞趋化因子诱导的 Ca^{++} 动员也被抑制。

[0227] 本文给出的结果表明,A86 通过下调 CCR3 受体有效干扰嗜酸性粒细胞对嗜酸性粒细胞趋化因子的趋化性。

[0228] TOP005 的效力

[0229] 使用 TOP005 进行相似的实验。选择 TOP005 是因为 828 的效力、表明 828 与已知基因没有同源性的该序列 BLAST 评价结果、828 与 TOP004 没有杂交（以 DNA 软件进行的实验）及其长度（当混合在一起并通过阴离子交换 HPLC 分离时允许由 TOP004 分化）。

[0230] 图 9 表明了 TOP005 对 CCR3 的细胞表面表达的作用。在 Eo1-1 和 U937 细胞中评价 TOP005 的效力。在用 TOP005 处理后 36 小时通过流式细胞术评价 CCR3 表达。结果以 Eo1-1 和 U937 细胞中相对于对照的表达百分率表示。图 9 中的条图表明，TOP005 抑制 U937 和 Eo1-1 细胞表面上的 CCR3 蛋白表达。

[0231] 图 10A 和 10B 显示了 TOP005 对人外周血单核细胞 (PBMC) 中的 CCR3mRNA 表达的作用。人 PBMC 或者是新鲜分离的，或者在人 IL-2 中培养 (10ng/mL, 24 小时)。然后使它们接触 TOP005, 培养 18 小时。在图 10A 中，显示 G3PDH 和 CCR3 表达的凝胶示于顶部。CCR3mRNA 表达对 G3PDH 的比率相对于对照标准化，示于底部。参看图 10B, 条图表明，TOP005 在低至 1 μ M 浓度的剂量有效降低 PBMCCR3mRNA 表达。

[0232] 因此，反义寡核苷酸 A86 和 TOP005 可在 Eo1-1 细胞（人嗜酸性粒细胞细胞系）、分化为嗜酸性粒细胞的 HL-60 细胞和 U937 细胞中抑制 CCR3mRNA 表达。用这些寡核苷酸抑制 CCR3 还降低 HL-60 分化细胞和人嗜酸性粒细胞这二者中的钙动员，以及降低嗜酸性粒细胞对嗜酸性粒细胞趋化因子的趋化性。对应的有义寡核苷酸和错配寡核苷酸均不能影响对嗜酸性粒细胞趋化因子的响应。

[0233] 实施例 4

[0234] TOP004 降低 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 链亚基表达以及

[0235] 人细胞系中的相关细胞应答的效力

[0236] 进行进一步的实验，以检验 107A 和 TOP004 对 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体的共同 β 链亚基表达的作用。

[0237] TF-1 和 U937 细胞中的 β 链 mRNA 表达的调节

[0238] 参看图 11A、11B 和 11C, 显示了 TF-1 细胞中的 β 链 mRNA 表达的调节。TF-1 细胞用 107A 反义寡核苷酸处理 12 小时。参看图 11A, 进行 RT-PCR 来检测 TF-1 细胞中的 β 链 mRNA 和 G3PDH mRNA 表达。细胞如下处理：泳道 1：对照未处理的；泳道 2：有义寡核苷酸 (10 μ M)；泳道 3：107A (10 μ M)；泳道 4, 错配寡核苷酸 (10 μ M)。在非饱和条件下使用半定量 RT-PCR 评价 β 链和 G3PDH (用作对照) mRNA 的表达。用 107A (10 μ M) 处理几乎完全抑制 TF-1 (图 11A) 和 U937 处理细胞 (数据未显示) 中的 β 链表达。107A 的抑制是特异性的，不是由于 RNA 降解或细胞存活丧失，以内标为证（对应于 G3PDH mRNA 的 450-bp 产物）(图 11A)。相反，在未处理的对照细胞或有义或错配寡核苷酸处理的细胞中， β 链 mRNA 表达不受抑制 (图 11A)。因此，107A 活性对于抑制 β 链 mRNA 的表达是特异性和有效的。

[0239] 参看图 11B 和 11C, 显示了有义寡核苷酸和 107A 处理对 TF-1 细胞的细胞表面上的 β 链表达的作用，如 FACS 分析测定。图 11B 显示了未处理对照 (PC) 对有义寡核苷酸处理的 (S-ODN)，在这里 NC 代表阴性对照。图 11C 显示了 107A (以 5、10 和 20 μ M 的变化浓度) 处理 36 小时的细胞中的细胞表面表达。反义寡核苷酸抑制细胞 β 链蛋白表达的能力在 107A 处理细胞表面上产生对应较低密度的 β 链亚基。使用针对 GM-CSF/IL-3/IL-5 受体的共同 β 链蛋白的单克隆抗体 (MAb)，与 FACS 分析一起检测 TF-1 细胞上的 β 链蛋白

的细胞表面表达。未处理的 TF-1 细胞的 β 链表达水平非常高,不受有义寡核苷酸处理影响。但是,增加 107A 浓度 (5、10 和 20 μ M) 以剂量依赖性方式显著降低 β 链表达水平 (在 FACS 分析中测试阳性的细胞百分率由 69.9% 降低至 27.8%)。

[0240] 图 11D 显示了 TOP004 处理后在 U937 细胞中共同 β 链表达的抑制。U937 细胞在渐增浓度的 TOP004 (0.01、0.1、1 和 10 μ M) 存在下在无血清培养基中温育 12 小时 (之后进行 RT-PCR) 和 48 小时 (之后进行 FACS 分析)。共同 β 链 mRNA 或蛋白抑制的百分率通过与获自未处理细胞的值进行对比来确定。实验平行进行 3 次,数据表示为平均值 $\pm$ SE。图 11D 中给出的结果表明, TOP004 反义寡核苷酸含 DAP 残基并与 107A 反义寡核苷酸同源,在 mRNA 和蛋白水平上有效抑制共同 β 链。而且,发现少量的 TOP004 (例如 1 μ M) 足以敲减 β 链 mRNA 以及对应的蛋白。因此,该数据有利于 DAP 化学物质的效力及其在如上所述的药理学组合物中的用途。

[0241] 细胞存活和功能研究

[0242] 参看图 12,显示了在 GM-CSF、IL-3 或 IL-5 存在下用 107A 反义寡核苷酸处理的 TF-1 细胞的增殖情况。细胞与 107A (10 μ M) 在含 1ng/mL GM-CSF 或 3ng/mL IL-3 或 3ng/mL IL-5 的无血清培养基中温育 5 小时。2 天后终止温育,通过 Alamar Blue 测定 ($n = 3$) 检测细胞增殖。结果表示为吸光度 (570-595) 的平均值 $\pm$ SD。

[0243] TF-1 细胞需要细胞因子 GM-CSF、IL-3 或 IL-5 来增殖,对这些细胞因子的生物反应涉及 β 链信号转导途径。预期抑制 β 链蛋白的细胞表面表达抑制 TF-1 细胞增殖,即便在这些细胞因子存在的情况下。107A (10 μ M) 在 IL-3、IL-5 或 GM-CSF 存在下引起 TF-1 细胞的生长抑制。这些结果表明,107A 对 β 链细胞表面蛋白表达的抑制有效抑制对全部 3 种细胞因子的细胞生物反应。

[0244] 嗜酸性粒细胞表达 GM-CSF、IL-3 和 IL-5 受体,在炎症和变态反应中起关键作用。嗜酸性粒细胞需要 GM-CSF、IL-3 以及尤其是 IL-5 用于其分化、活化和存活 (Oddera 等, 1998, Lung. 176 :237-247 ;Ohnishi 等, 1993, J. Allergy Clin. Immunol., 92 :607-615)。研究了靶向 β 链 mRNA 的反义寡核苷酸抑制响应 IL-5 的嗜酸性粒细胞存活的能力。参看图 13A 和 13B,显示了 107A 对嗜酸性粒细胞存活的调节。

[0245] 参看图 13A,将纯化的人嗜酸性粒细胞在补加 5% FBS 和 1.5ng/mL IL-5 的 RPMI 培养基中与指定浓度 (10、15 和 20 μ M) 的 107A 温育过夜。使用锥虫蓝染色排除测定评价嗜酸性粒细胞存活。结果是 3 个实验的平均结果。用指定浓度的 107A 处理以剂量依赖性方式显著降低嗜酸性粒细胞存活达对照水平的 35% $\pm$ 12% (10 μ M)、43% $\pm$ 2% (15 μ M) 和 54% $\pm$ 7% (20 μ M) ($p < 0.01$)。嗜酸性粒细胞存活未受到作为对照的 20 μ M 浓度有义寡核苷酸处理的影响。因此,即便在含特异性细胞因子 IL-5 的培养基存在下,靶向 β 链的 107A 也抑制嗜酸性粒细胞存活。

[0246] 参看图 13B,在有或没有 107A (15 μ M) 的情况下,将纯化的人嗜酸性粒细胞在补加 5% FBS 和 2ng/mL IL-5 的 RPMI 培养基中温育 48 小时。如材料和方法中所述,使用 Annexin-V-FITC 和碘化丙锭方法通过流式细胞术分析评价嗜酸性粒细胞存活。

[0247] 当用 107A 处理嗜酸性粒细胞时,其存活降低达 64%,41% 归因于凋亡。相反,在未处理细胞和用有义寡核苷酸处理的细胞中,死亡细胞的百分率较低。

[0248] 因此,根据 RT-PCR 和 FACS 的检测,107A 反义寡核苷酸在 mRNA 和蛋白水平上特异

性抑制 TF-1 细胞和初级嗜酸性粒细胞中的共同 β 链表达。在使用的实验条件下,在 20 μ M 浓度观察到对测试的细胞系统获得最大效力。在 107A 存在时,TF-1 细胞的增殖下降,无论是 IL-3、IL-5 还是 GM-CSF 用作营养因子。此结果表明了 107A 反义寡核苷酸对 β 链的特异性和效力。

[0249] 在 IL-5 存在下嗜酸性粒细胞存活受到 107A 抑制,似乎凋亡是这种抑制作用的结果。嗜酸性粒细胞在变应性炎症中起关键作用,需要 GM-CSF、IL-3 和 IL-5 用于其分化、活化和存活 (Adachi 等,1995,Am. J. Respir. Crit. Care Med. 151 :618-623 和 Oddera 等,1998, Lung. 176 :237-247)。在哮喘中,嗜酸性粒细胞累积和存活被认为是炎症和上皮组织损伤的重要引发因素,因为它们释放毒性产物,包括嗜酸性粒细胞阳离子蛋白 (Walsh 等,1997, Clin. Exp. Allergy 27 :482-487)。

[0250] 实施例 5

[0251] 气管样品中的 ASM8 靶基因的 mRNA 分析

[0252] 进行进一步的实验来分析猕猴气管样品中 ASM8 针对的靶基因 (β 链亚基和 CCR3) 的 mRNA 水平。在第 15 天 (最后 1 剂后 1 天),在处死第 1 组 (对照) 和第 4 组 (高剂量组 ;目标剂量水平 2.5mg/kg/ 天) 的全部极期动物后,立即收集气管样品,并在液氮中快速冷冻。通过 RT-PCR 分析冷冻的气管样品的靶 mRNA 水平。

[0253] 使用经验证的半定量 RT-PCR 法测定猴气管样品的目标基因表达水平 (β - 亚基和 CCR3)。对对照和高剂量 ASM8 处理动物的气管提取物进行 β - 亚基和 CCR3- 特异性 PCR 扩增 (表 7)。

[0254] 表 7. RT-PCR 样品分析结果

[0255]

光密度分析法					
剂量 = 0 mg/kg bw/天					
动物	性别	β_c -亚基	CCR3	IL-4	TNF- α
1002A	雄性	21787	28776.5	15312.6	91432.5
1003A	雄性	25339	19986.9	11093.0	99032.7
1004C	雄性	27568	27600.6	13218.8	77107.2
1101A	雄性	21599	22619.4	12450.4	95441.5
1501A	雌性	5452	5053.0	18074.5	80778.5
1502A	雌性	14920	19799.4	15252.2	86741.0
1503B	雌性	9691	15004.8	15200.0	90229.0
1504C	雌性	22800	52842.7	9001.6	102726.5
平均值		20529	26661	13700	90436
剂量 = 5 mg/kg bw/天					
4002B	雄性	22073	22778.3	11034.0	71911.0
4003B	雄性	12652	9109.4	5887.0	86317.4
4101A	雄性	21154	11365.8	15361.0	86526.0
4501A	雌性	14755	2227.0	173.5	57996.7
4502B	雌性	7604	21286.0	14463.4	98144.3
4503B	雌性	3505	29105.0	16711.0	103532.5
平均值		13624	18729	12691	84071

[0256] 备注：阴影值代表未纳入平均值计算的逸出值。

[0257] 尽管甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (G3PDH) 通常在 RT-PCR 反应分析中用作内标, 但观测肺和气管的温和细胞浸润物 (其通常与其它反义寡核苷酸一起在沉积部位被观测到)。因此, 由于细胞浸润物有助于 β_c -亚基和 CCR3 的检测水平 (即表达 β_c -亚基和 CCR3 的免疫细胞), 所以 G3PDH 不被认为是在此情况下用作内标的最合适基因。代之以将靶基因的表达对炎性细胞因子即 IL-4 和 TNF- α 的 mRNA 水平标准化。结果表明, 在 ASM8 处理的动物中 (表 8), 即便在给予 ASM8 后约 24 小时, β_c -亚基和 CCR3mRNA 对 IL-4mRNA 的相对表达分别降低达 29% 和 24%, 相对于 TNF- α 的表达分别降低达 30% 和 24%。

[0258]

表 8 抑制表				
	比率			
	β_c -亚基/IL-4	CCR3/IL-4	β_c -亚基/TNF- α	CCR3/TNF- α
对照	1.50	1.95	0.23	0.29
处理的	1.07	1.48	0.16	0.22
抑制	28.7%	24.1%	30.4%	24.1%

[0259] 因此,尽管猴气管组织复杂以及 ASM8 给药至获得组织样品过去了 24 小时,但相对于炎性细胞因子 IL-4 和 TNF- α , ASM8 处理显著抑制 β_c -亚基和 CCR3mRNA 的表达。

[0260] 实施例 6

[0261] ASM8 的储存稳定性

[0262] 进行稳定性测试,以评价在不同储存温度下 ASM8(TOP004 和 TOP005) 的寡核苷酸组分的完整性。该信息对确定 ASM8 的最优储存、复测和储存期条件很重要。

[0263] 毛细管凝胶电泳 (CGE) 和高效 (压) 液相层析 (HPLC) 已广泛用于反义寡核苷酸的化学分析。由于 ASM8 有两种寡核苷酸组成,所以测试系统必须提供足够分开的两种单独的反义分子。因此,将描述以下内容:1) 基于阴离子交换层析的方法以分离 ASM8 组分 (TOP004 和 TOP005) 及其降解产物,和 2) 储存温度对 ASM8 组分稳定性的作用 (图 14-16)。

[0264] 对 ASM8 称重,并以 0.5mg/mL 浓度溶解在 PBS 中 (0.25mg/mL TOP004 和 0.25mg/mL TOP005)。[TOP004 的纯度因子是 1.15 (即 1.15g 粉末含 1g 活性分子);TOP005 的纯度因子是 1.24 即 1.24g 粉末含 1g 活性分子)。]

[0265] 为在分析前诱导 TOP004 和 TOP005 降解 (以便确保分辨出完整分子的降解产物),进行以下处理:

[0266] • 脱嘌呤:将 ASM8 以 0.5mg/mL 终浓度重悬浮在 30% CH₃COOH 中,于室温温育 3、4 或 6 小时。通过加入 5 体积水终止反应,将混合物置于 -20℃,然后在 Speed-Vac 中冻干,以去除乙酸。

[0267] • 切割:将脱嘌呤的寡核苷酸重悬浮在 0.2M NaOH (0.5mg/mL) 中,于 50℃温育 1 小时,储存在 -20℃或通过 HPLC 分析。

[0268] 将等份的 ASM8 (0.5mg/mL) 的 PBS 溶液于 -20℃、4℃、30℃和 40℃温育 2 个月。在第 4 周和第 8 周时建立 ASM8 的 HPLC 谱。对照条件定义为任意储存时间前 (即时间 0) 的 ASM8HPLC 谱。HPLC 系统由 Waters 的 Breeze (V3.30) 软件驱动 (图 17A1、17A2、17B1 和 17B2)。

[0269] 用联结 Waters2487Dual λ 吸光度检测器并配有在线脱气器、烘箱和 1500 系列手动注射器 Reodyne7725i 的 Waters1500 系列二元 HPLC 泵进行 HPLC 分离。

[0270] 寡核苷酸混合物在 Waters Protein Pak DEAE5PW 阴离子交换柱 (0.5cm×75cm) 上分级分离,保持在 60℃,通过 260nm 的 UV 吸收检测。寡核苷酸混合物 (体积=25 μ L) 在水 (缓冲液 A) 中上柱,通过逐渐增加缓冲液 B (1M LiClO₄) 的比例使液相 (表 9) 的离子强度增加,由固相 (柱) 洗脱寡核苷酸,由此进行洗脱。

[0271] 在测定条件下, 62.5 μg 的 TOP004 或 TOP005 中的任一个于 260 nm 产生的可检测变化都 >0.15 吸光度单位 (AU)。

[0272]

表 9 分离 ASM8 和降解物的 HPLC 梯度			
时间(分钟)	流速(ml/分钟)	缓冲液 A (%)	缓冲液 B (%)
0	1	100	0
5	1	100	0
10	1	93	7
100	1	65	35
102	1	20	80
122	1	20	80
124	1	100	0
144	1	100	0
146	0.1	100	0

[0273] 图 14 中的层析图显示了在 DEAE 阴离子交换层析中 ASM8 (TOP004 和 TOP005) 的单个产物的洗脱谱。25 μL 体积的新鲜制备的 ASM8 (0.5mg/mL) 在 DEAE 阴离子交换柱上分级分离。在上述梯度条件下, TOP004 洗脱早于 TOP005; 这与 TOP004 比 TOP005 少两个核苷酸并具有较少的带负电残基相一致。TOP004 寡核苷酸在 81.3 分钟洗脱下来, 占 260nm 吸收的总材料的 48.0%。TOP005 在 86.8 分钟洗脱下来, 占 260nm 吸收的总材料的 49.3%。

[0274] 为了证实 TOP004、TOP005 和 ASM8 降解产物之间足够分离, 进行 ASM8 的两步化学降解。切割步骤保持不变, 但脱嘌呤步骤的温育期进行 3-6 小时。参看图 15, ASM8 (0.5mg/mL) 用 CH_3COOH 处理 3 小时, 进行碱裂解 (如上所述), 然后通过 DEAE 阴离子交换层析分级分离。TOP004 寡核苷酸在 81.5 分钟洗脱下来, 占 260nm 吸收的总材料的 32.4%。TOP005 产物在 86.9 分钟洗脱下来, 占总材料的 28.0%。较小峰代表 ASM8 的降解产物。参看图 16, ASM8 (0.5mg/mL) 用 CH_3COOH 处理 6 小时, 如上所述进行碱裂解, 然后通过 DEAE 阴离子交换层析分级分离。在 260nm 检测下, TOP004 寡核苷酸在 82.2 分钟洗脱下来, TOP005 在 86.7 分钟洗脱下来。通过增加脱嘌呤时间, TOP004 的比例降低至 20.6%, TOP005 的比例降低至 14.5%。在这些实验条件下 TOP005 的降解程度似乎稍高。如图 15 和 16 中的层析图可见, 增加脱嘌呤时间增加了 ASM8 的降解。

[0275] 参看图 17A1、17A2、17B1 和 17B2, 评价不同储存温度下 ASM8 的化学稳定性。ASM8 (0.5mg/mL 的 PBS 溶液) 于 -20°C 、 4°C 、 30°C 或 40°C 温育 4 周 (图 17A1 和 17A2) 和 8 周 (图 17B1 和 17B2), 并通过 DEAE 阴离子交换层析分析。在该实验中测试的各种储存温度不影响 ASM8 组分的洗脱谱。在 ASM8 储存长达 2 个月的任一个温度都未观察到 ASM8 的显著降解。

[0276] 上文业已描述了 ASM8 的基于 DEAE 阴离子交换 HPLC 的分离方法。因为该产物的性质, 优选 ASM8 组分 (TOP004 和 TOP005 寡核苷酸) 的足够分离。在所述梯度条件下, TOP004

的保留时间比 TOP005 的保留时间早 5 分钟,两个峰几乎没有重叠。

[0277] 该方法还能够检测 ASM8 的降解产物。可通过此 HPLC 法评价在不同温度、湿度和光照条件下的 ASM8 的化学稳定性。

[0278] ASM8 在 PBS 中的制剂是化学稳定的,在一系列温度下储存达 2 个月通过 HPLC 法未检测到显著的降解产物。

[0279] 实施例 7

[0280] ASM8 的热力学评价

[0281] 进行进一步的实验,以确保在使用热力学评价时两条寡核苷酸链 TOP004 和 TOP005 在溶液中不相互作用。

[0282] TOP004 和 TOP005 以在 1×PBS(以及其它缓冲系统)中以等摩尔浓度混合。总寡核苷酸浓度在约 1.2–8.7 μM 的范围内。使用带有 Tm 附件的 Beckman DU640 分光光度计进行标准 UV 热变性法。在 10–90℃ 的每个温度检测 260nm 的吸光度变化。使用 MELTWINTM3.5 软件拟合解链曲线,以测定热力学参数。产生解链曲线和热力学总结表的屏幕图像。

[0283] 参看图 18,显示了在 1×PBS 中的 TOP004 和 TOP005 的解链曲线。图 19 是基于 TOP004 和 TOP005 在 1×PBS 中的解链曲线拟合结果的热力学总结。结果表明,在温度增加时,寡核苷酸组合/条件没有一个在解链谱中产生显著跃迁(吸光度的突升)。这表明,测试的寡核苷酸混合物在测试缓冲条件下不形成显著的二级结构相互作用。

[0284] 实施例 8

[0285] ASM8 在猕猴中的毒性

[0286] 该实施例显示了由 TOP004 和 TOP005 的 1:1 混合物组成的 ASM8 的毒性。还显示了在连续 14 天内通过每日一次吸入接触给予猕猴时,其各个寡核苷酸组分的毒代动力学模式。此外,14 天吸入接触 ASM8 未激发可通过皮内注射(ID)检测的系统性超敏状况。

[0287] 表 10. 估计达到的剂量

[0288]

剂量组/处理	估计达到的剂量(mg/kg/天)		
	雄性	雌性	混合
1: 溶媒对照	0	0	0
2: ASM8 低剂量	0.05	0.05	0.05
3: ASM8 中剂量	0.22	0.23	0.22
4: ASM8 高剂量	2.4	2.5	2.5

[0289] 表 11. 总体接触的气溶胶浓度

[0290]

剂量组 / 处理	平均值 (μg/L)	S. D. (μg/L)	C. V. (%)
1:溶媒对照	0	—	—
2:ASM8 低剂量	7.4	0.89	12.1
3:ASM8 中剂量	34.6	5.68	16.4
4:ASM8 高剂量	380.4	68.43	18.0

[0291] [0291] 进行死亡率、临床征兆、体重、食物消耗、心电图、检眼镜检查和临床病理学的全面评价。在接触的第 1 天和最后 1 天以及恢复期结束时得到系列血样,在完结时收集组织,用于测定个体寡核苷酸含量。另外,在第 25 天时,对设计用于恢复期的动物皮内注射 (ID) 给予 ASM8,以评价潜在的系统性超敏性。所有动物都在接触 14 天后 (第 15 天) 或 14 天恢复期后 (第 29 天) 实施安乐死,进行全尸检,并由每只动物收集一套完整组织。组织病理学评价由高剂量和对照组动物的全部组织以及低剂量组和恢复动物的呼吸道组织的显微镜检查组成。

[0292] ASM8 制剂易于气溶胶化,产生的接触气溶胶始终稳定并可呼吸,组间质量中位直径 (MMAD) 和几何标准偏差 (GSD) 值分别在 1.7-1.8 μm 和 2.12-2.22 之间。对于组 2-4,获得的估计达到剂量分别接近 0.05、0.22 和 2.5mg/kg/ 天的目标,表 7-8。

[0293] 没有死亡,猴对剂量良好耐受。对体重、食物消耗、心电图、检眼镜检查或临床病理学和超敏测试没有影响,揭示 ASM8 给药无作用。在尸检后,器官重量检测未产生毒性证据。所有器官的外观检查揭示,在 ASM8 处理动物中只是肾脏有灰白变色。但是,由于没有已证实的微观变化、临床病理学观察结果或器官重量变化以及在恢复 14 天后未观察到变色的事实,所以认为该观察结果的生物学和毒物学意义不明确。

[0294] TOP004 和 TOP005 的血浆水平以及其近似的 (n-1) 代谢物在血浆中非常低,低和中剂量组在定量限度以下。对于高剂量组 (2.5mg/kg/ 天), TOP004 和 TOP005 浓度通常在给药后 0.5 小时的最早取样时间或 1 小时时间点时最大。在大部分给药后时间点, TOP004 的平均浓度类似于 TOP005 的浓度,图 20A 和图 20B。

[0295] 如图 21A 和图 21B 所示,重复地每日给予达 14 天,血浆中的任一种寡核苷酸组分 (或其 n-1 代谢物) 都没有累积。血浆浓度没有一致性差异。循环寡核苷酸的显著性百分率以 TOP004 和 TOP005 这二者的近似 n-1 代谢物给出,尽管所述百分率往往稍低于 TOP004。对于两种寡核苷酸及其 n-1 代谢物,在 24 小时收集期内明显由血室 (血浆) 中清除出去。在终末期处死时 (最后 1 剂 ASM8 吸入后 1 天),在高剂量动物气管中检测到可感知量的 ASM8 的完整寡核苷酸组分 (TOP004 和 TOP005)。在 14 天恢复期结束时 (第 29 天), TOP004 及其 n-1 代谢物的水平相对于第 15 天时已消除,经检测稍微高于测定的检测限度。相反,在恢复期处死时间点时 TOP005 或其代谢物不可定量。这些结果提示, TOP004 具有高于 TOP005 的组织稳定性。

[0296] 在除呼吸道以外的任何器官中都未观察到处理相关的微观变化。按照 4 点评分,呼吸道中观察到的所有变化都被评为最低 (最小)。对肺观察到的变化包括:以 0.22 或 2.5mg/kg/ 天给药的动物中的泡沫状肺泡巨噬细胞、2.5mg/kg/ 天给药的动物中的肺泡内粒细胞炎症、2.5mg/kg/ 天给药的 2 只动物中的灶性出血和 1 只动物中的病灶性细支气管组织转化;对鼻腔观察到的变化包括:2.5mg/kg/ 天给药的 6 只动物中有 2 只的鼻中隔扁平上皮出现病灶性侵蚀,伴有急性炎症,并在 1 只猴中出现炎症渗出液;对支气管淋巴结观察到的变化包括:2.5mg/kg/ 天给药的动物中有泡沫状巨噬细胞。在中和高剂量动物中观察到的变化的严重性较小,在肺实质中不伴有局部损伤或细胞浸润的证据。炎症细胞稀少,仅在少量 ASM8 高剂量动物中观察到,变化的分布与测试物的吸入相一致。灶性出血非常小,被解读成可能是偶然的。因此,报告的变化一般与和吸入测试物的吞噬作用和清除相关的正常肺部机制相一致。撤消处理 14 天导致持续存在若干泡沫状肺泡巨噬细胞,在两只 ASM 高

剂量动物中有 1 只无炎症。此观察结果与病灶的逐渐退化相一致,表明肺实质没有进行性或迁延性变化。

[0297] 在 14 天恢复期后没有处理作用于鼻组织的证据。关于高剂量动物中的支气管淋巴结观察结果,髓窦中的泡沫状巨噬细胞与通过由肺进行淋巴引流清除测试材料相一致。没有实质损伤的证据,淋巴结似乎未处于活性状态中。

[0298] 总之,以达 2.5mg/kg/ 天的估计达到剂量连续 14 天吸入 ASM8 被良好耐受,对体重、食物消耗、心电图、检眼镜检查或临床病理学参数没有影响,超敏测试揭示 ASM8 给药无作用。大部分最小组织形态学变化有许多在肺(0.22 和 2.5mg/kg/ 天)以及鼻腔和支气管淋巴结(2.5mg/kg/ 天)中观察到。这些变化在恢复 14 天后严重性下降或消失。

[0299] 尽管本文已描述了本发明的优选实施方案,但本领域技术人员会理解,可对这些实施方案进行改变,而不背离本发明的精神或所附权利要求书的范围。

[0001]

序 列 表

<110> Topigen Pharmaceutique Inc.

<120> 用于治疗变态反应和肿瘤细胞增殖的反义寡核苷酸

<130> 13424-10PCT

<140>

<141>

<150> US 60/623, 206

<151> October 29, 2004

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

gttactactt ccacctgcct g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

tggaaaagcg acacctacct g

21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

cccttttccct ggaaaagcga ca

22

<210> 4

<211> 21

[0002]

<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	4	
	ctcccttttc ctggaaaagc g	21
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	5	
	tccacctccc ttttcttgga	20
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	6	
	ctctcttggt ccacctccct t	21
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	7	
	acctattggc attgctcatt t	21
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	8	
	tctttgcaat tagtgcctgc t	21
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	9	

[0003]

tcgtgcagtt ctctcttttc a	21
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 10	
cagactagct tctcagtttt g	21
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 11	
tgcataattta gtgaagtcct t	21
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 12	
cttctccctg aaaatctctt ct	22
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<220>	
<221> misc_feature	----
<222> (9)..(9)	
<223> n 是 2,6-二氨基嘌呤-2'-脱氧核糖核苷	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (15)..(15)	
<223> n 是 2,6-二氨基嘌呤-2'-脱氧核糖核苷	
<400> 13	
gggtctgcng cgggntggf	19

[0004]

<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(4)..(4)	
<223>	n 是 2,6-二氨基嘌呤-2'-脱氧核糖核苷	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(7)..(7)	
<223>	n 是 2,6-二氨基嘌呤-2'-脱氧核糖核苷	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(13)..(13)	
<223>	n 是 2,6-二氨基嘌呤-2'-脱氧核糖核苷	
<400>	14	
	gttctctctt cccctgcct g	21
<210>	15	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	引物	
<400>	15	
	atgggtgctgg ccagg	17
<210>	16	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	引物	
<400>	16	
	ccaggagat ggtgctgg	18
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	引物	

[0005]

<400> 17	
ccgcttgtag accacotcaa c	21
<210> 18	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 引物	
<400> 18	
ccttggetga acagagacga tg	22
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 引物	
<400> 19	
tgcctctgtga aaaagccgat g	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 引物	
<400> 20	
acccaaaagtg acagtcctgg c	21
<210> 21	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 引物	
<400> 21	
aagtcagggt ttgagggeta tg	22
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 引物	
<400> 22	
caagggggca gagacaggta g	21

[0006]

<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	引物	
<400>	23	
	accacagtc atgcatcac	20
<210>	24	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	引物	
<400>	24	
	tccaccacc ctgttgetgt a	21
<210>	25	
<211>	150	
<212>	DNA	
<213>	猕猴(Cynomolgus Monkey)	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(133).. (133)	
<223>	n 是 a、c、g 或 t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(142).. (143)	
<223>	n 是 a、c、g 或 t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(147).. (147)	
<223>	n 是 a、c、g 或 t	
<400>	25	
	ggcagagaa accatccgc tgergacct acgtgetac aatgactaca ccagccacat	60
	cacctgcagg tggcgggaca ccaggatgc ccagcggtt gtcaacgtga cctcagteg	120
	cgggtgaat gangaccctc ennagnagt	150
<210>	26	
<211>	150	

[0007]

<212> DNA

<213> 猕猴(Cynomolgus Monkey)

<220>

<221> misc feature

<222> (133).. (133)

<223> n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221> misc feature

<222> (142).. (142)

<223> n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221> misc feature

<222> (147).. (147)

<223> n 是 a、c、g 或 t

<400> 26

ggcagaagaa accatcccgc tgergacctt acgttcttac aatgactaca ccagccacat 60

cacctgcagg tggggcgaca cccaggatgc ccagcggett gtcaacgtga ccctcagtcg 120

cggggtgaat gangaccctc cncagenagt 150

<210> 27

<211> 150

<212> DNA

<213> 猕猴(Cynomolgus Monkey)

<220>

<221> misc feature

<222> (142).. (143)

<223> n 是 a、c、g 或 t

<220>

<221> misc feature

<222> (147).. (147)

<223> n 是 a、c、g 或 t

<400> 27

ggcagaagaa accatcccgc tgergacctt acgttcttac aatgactaca ccagccacat 60

cacctgcagg tggggcgaca cccaggatgc ccagcggett gtcaacgtga ccctcagtcg 120

cggggtgaat gaggaccctc cnnagenagt 150

[0008]

<210>	28	
<211>	150	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	28	
	ggcagaagaa accatcccgc tgcagacct gcgctgctac aacgactaca ccagccacat	60
	cacctgcagg tgggcagaca cccaggatgc ccagcggctc gtcaacgtga ccctcattcg	120
	cggggtgaat gaggacctcc tggagccagt	150
<210>	29	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	29	
	ctgggacatc agtgccttg	19
<210>	30	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	30	
	cagagcaatg atggccca	18
<210>	31	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	31	
	cgtggcactc agtgccttg	19
<210>	32	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	32	
	cccttgacct gccaatgctc t	21

[0009]

<210>	33	
<211>	132	
<212>	DNA	
<213>	黑猩猩	
<400>	33	
	cttgcagaa accatccgc tgcagaccct gcgtgctac aacgactaca ccagccacat	60
	caccigcagg tgggcagaca ccaggatgc ccagcggtc gtcaacgtga cctcattcg	120
	ccgggtgaat ga	132
<210>	34	
<211>	132	
<212>	DNA	
<213>	猪	
<400>	34	
	ctcagaggac accgtccgc tgcagaccct gcgtgctac aatgactaca ccagcgcct	60
	cgtgigcagc tgggcggcgg aggcggcgc tgagcagctc atcaatgtga cctccatcg	120
	ccatgcagg tt	132
<210>	35	
<211>	132	
<212>	DNA	
<213>	大鼠	
<400>	35	
	ggcagaagaa actgiccctc tgaagactct gcagtgtac aacgactata tcgagcgcct	60
	cattgcagc tgggcagaca cggaggacgc ccaggggtc gttaacctga cctctatca	120
	ciggetagac aa	132
<210>	36	
<211>	132	
<212>	DNA	
<213>	小鼠	
<400>	36	
	ggcagaagaa accgtccctc tgaagactct gcagtgtac aatgactaca ccaaccacat	60

[0010]

cateicgcage fggggggaca cagaggaigc ccaggggcta atcaacatga ccctctatca 120

ccagctagag aa 132

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> 猕猴(Cynomolgus Monkey)

<220>

<221> misc feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa 为 Gln 或 Arg

<400> 37

Ala Glu Glu Thr Ile Pro Leu Xaa Thr Leu Arg Cys

1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 38

Ala Glu Glu Thr Ile Pro Leu Gln Thr Leu Arg Cys

1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> 黑猩猩

<400> 39

Leu Ser Glu Thr Ile Pro Leu Gln Thr Leu Arg Cys

1 5 10

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> 猪

[0011]

<400> 40

Ser Glu Asp Thr Val Pro Leu Gln Thr Leu Arg Cys
1 5 10

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 41

Ala Glu Glu Thr Val Pro Leu Lys Thr Leu Gln Cys
1 5 10

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 42

Ala Glu Glu Thr Val Pro Leu Lys Thr Leu Gln Cys
1 5 10

A.

↓

```

> SEQ. ID. NO.25. 59-GGCAGAAGAA ACCATCCCGC TGCAGACCCT aCGCTGCTAC AATGACTACA
SEQ. ID. NO.26. 56-GGCAGAAGAA ACCATCCCGC TGCAGACCCT aCGCTGCTAC AATGACTACA
SEQ. ID. NO.27. 61-GGCAGAAGAA ACCATCCCGC TGCAGACCCT aCGCTGCTAC AATGACTACA
SEQ. ID. NO.28. 97-GGCAGAAGAA ACCATCCCGC TGCAGACCCT GCGCTGCTAC AAcGACTACA
Pan. ID. NO.33. 1137-cttgtcAGAA ACCATCCCGC TGCAGACCCT GCGCTGCTAC AAcGACTACA
Por. ID. NO.34. 85-ctCAGAgGAc ACCgTCCCGC TGCAGACCCT GCGCTGCTAC AATGACTACA
Rat. ID. NO.35. 243-GGCAGAAGAA ActgTCCCTc TGAAGActCT GCagTGCTAC AAcGACTAtA
Mou. ID. NO.36 368-GGCAGAAGAA ACggtTCCCTc TGAAGActCT GCagTGCTAC AATGACTACA

> SEQ. ID. NO.25. 109-CCAGCCACAT CACCTGCAGG TGGGCGGACA CCCAGGATGC CCAGCGGCTt
SEQ. ID. NO.26. 106-CCAGCCACAT CACCTGCAGG TGGGCGGACA CCCAGGATGC CCAGCGGCTt
SEQ. ID. NO.27. 111-CCAGCCACAT CACCTGCAGG TGGGCGGACA CCCAGGATGC CCAGCGGCTt
SEQ. ID. NO.28. 147-CCAGCCACAT CACCTGCAGG TGGGCaGACA CCCAGGATGC CCAGCGGCTC
Pan. ID. NO.33. 1187-CCAGCCACAT CACCTGCAGG TGGGCaGACA CCCAGGATGC CCAGCGGCTC
Por. ID. NO.34. 135-CCAGCCgCAT CgtgTGCAGc TGGGCGGcgg aggcGGccGC tgAGCaGCTC
Rat. ID. NO.35. 293-tCgagCgCAT CatCTGCAGc TGGGCGGACA CggAGGAcGC CCAGgGGCTC
Mou. ID. NO.36. 418-CCaaCCACAT CatCTGCAGc TGGGCGGACA CagAGGATGC CCAGgGGCTa

> SEQ. ID. NO.25. 159-GTCAACGTGA CCCTCagTCG CCGGGTGAAT GA-190
SEQ. ID. NO.26. 156-GTCAACGTGA CCCTCagTCG CCGGGTGAAT GA-187
SEQ. ID. NO.27. 161-GTCAACGTGA CCCTCagTCG CCGGGTGAAT GA-192
SEQ. ID. NO.28. 197-GTCAACGTGA CCCTCatTCG CCGGGTGAAT GA-228
Pan. ID. NO.33. 1237-GTCAACGTGA CCCTCatTCG CCGGGTGAAT GA-1266
Por. ID. NO.34. 185-aTCAAtGTGA CCCTCaaTCG CCatcgCagg tt-216
Rat. ID. NO.35. 343-GTtAACcTGA CCCTCtaTCa CtGGcTagAc aA-374
Mou. ID. NO.36. 458-aTCAACaTGA CCCTCtaTCa CCaGcTagAg aA-489

```

B.

```

> Hum. b-c pt : A E E T I P L Q T L R C (SEQ ID NO.3 8)
Hum. b-c nt : G GCA GAA GAA ACC ATC CCG CTG CAG ACC CTG CGC TGC T
> Pan. b-c pt : l s E T I P L Q T L R C (SEQ ID NO.3 9)
Pan. b-c nt : C TTG TCA GAA ACC ATC CCG CTG CAG ACC CTG CGC TGC T
> Cyn. b-c pt : A E E T I P L Q/R T L R C (SEQ ID NO.3 7)
Cyn. b-c nt : G GCA GAA GAA ACC ATC CCG CTG CRG ACC CTA CGC TGC T
> Por. b-c pt : s E d T v P L Q T L R C (SEQ ID NO.4 0)
Por. b-c nt : C TCA GAG GAC ACC GTC CCG CTG CAG ACC CTG CGC TGC T
> Rat. b-c pt : A E E T v P L k T L q C (SEQ ID NO.4 2)
Rat. b-c nt : G GCA GAA GAA ACT GTC CCT CTG AAG ACT CTG CAG TGC T
> Mou. b-c pt : A E E T v P L k T L q C (SEQ ID NO.4 1)
Mou. b-c nt : G GCA GAA GAA ACG GTC CCT CTG AAG ACT CTG CAG TGC T

```

缩写和序列登录号:

pt: 蛋白质序列; nt: 核苷酸序列; b-c: β链

Hum.: 人, Seq. ID. NO. 28; Cyn.: 猕猴, Seq. ID. NO. 25、26 和 27 (*Macaca fascicularis*);

Por.: 猪, U94688.1, (*Cavia porcellus*); Rat.: 大鼠, NM_133555.1, (*Rattus norvegicus*);

Mou.: 小鼠, NM_007780.1, (*Mus musculus*); Pan.: 黑猩猩, emb.AADA01213660 (*Pan troglodytes*)

图 1

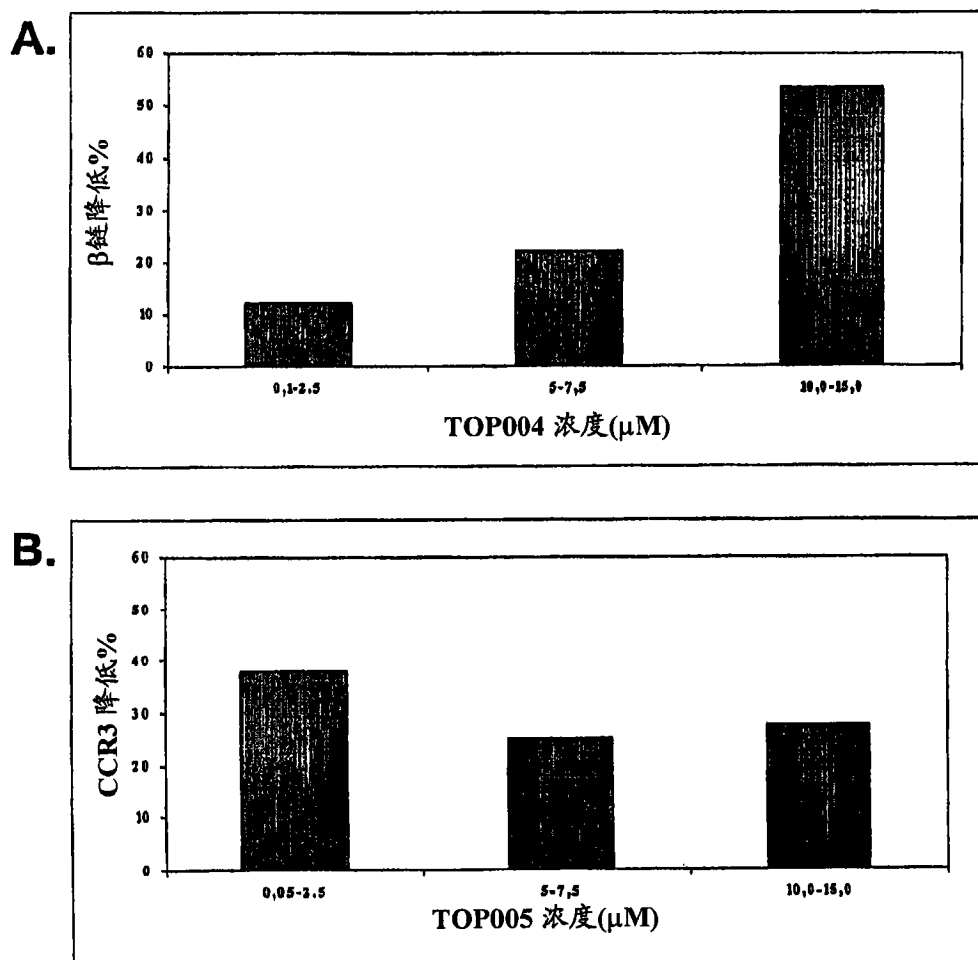


图 2

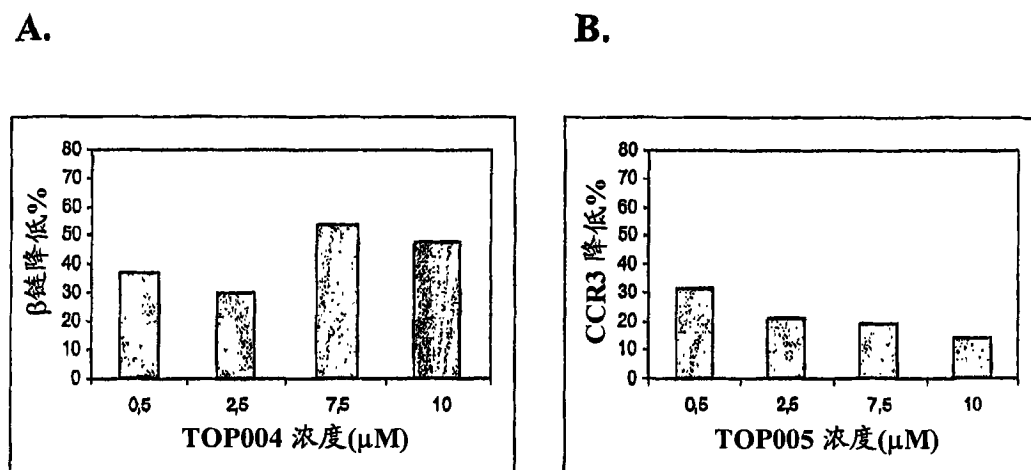


图 3

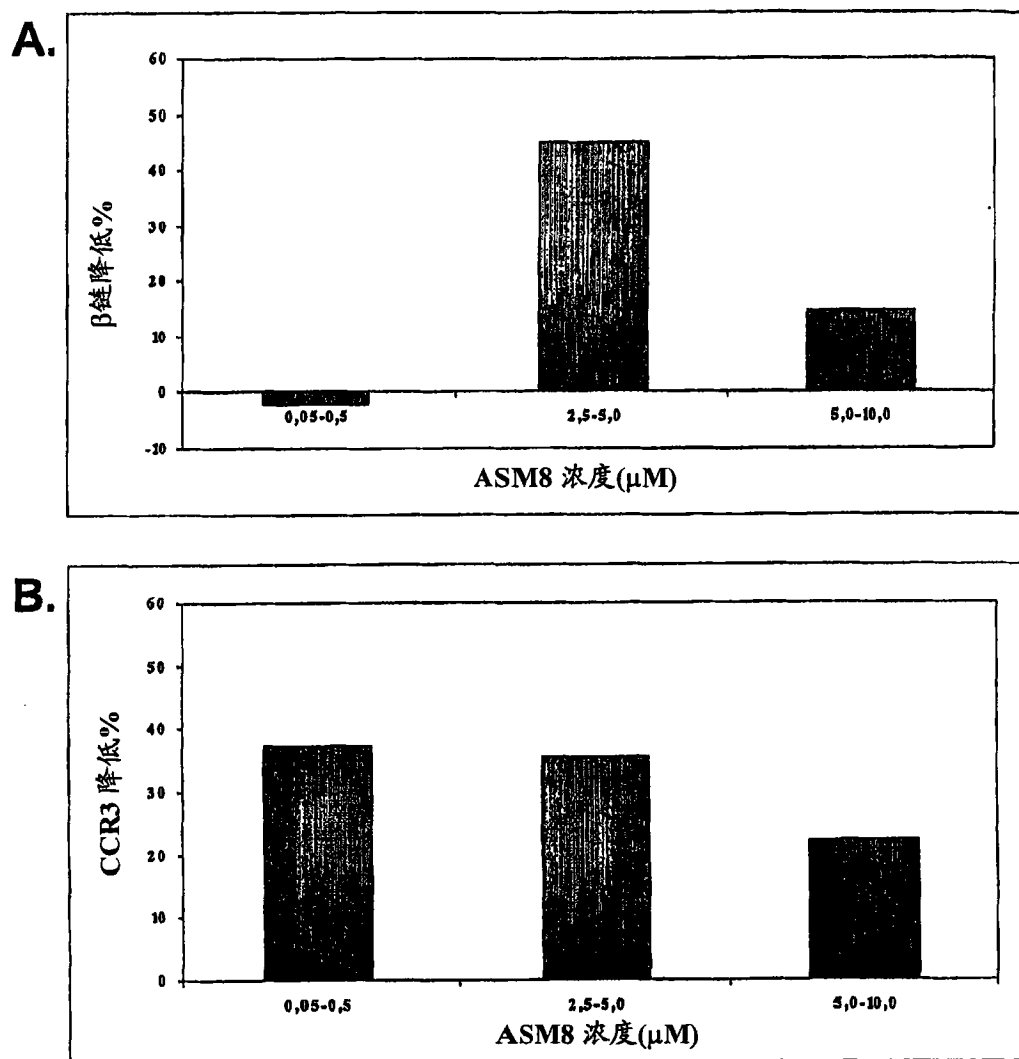


图 4

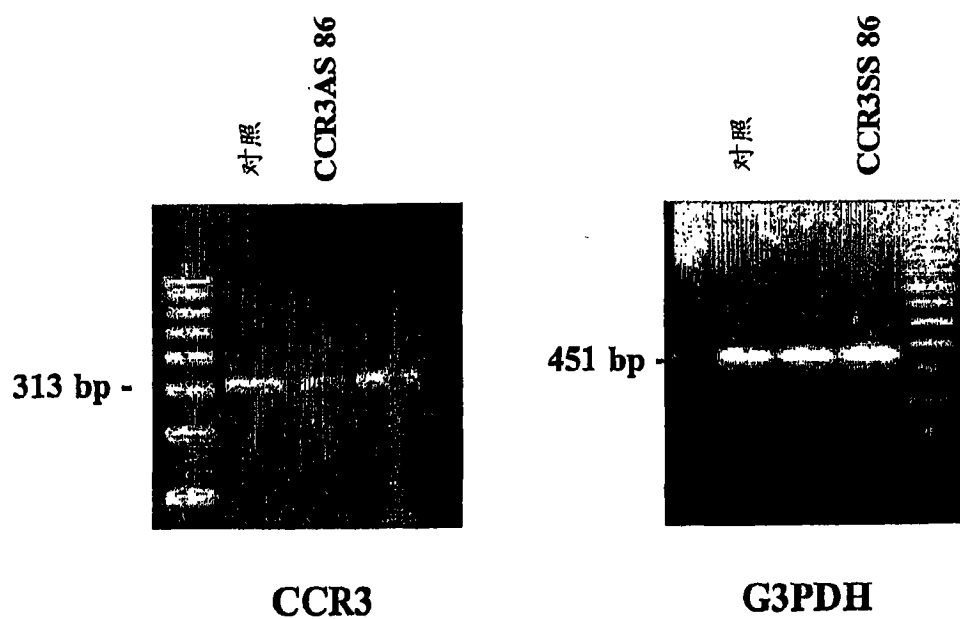


图 5

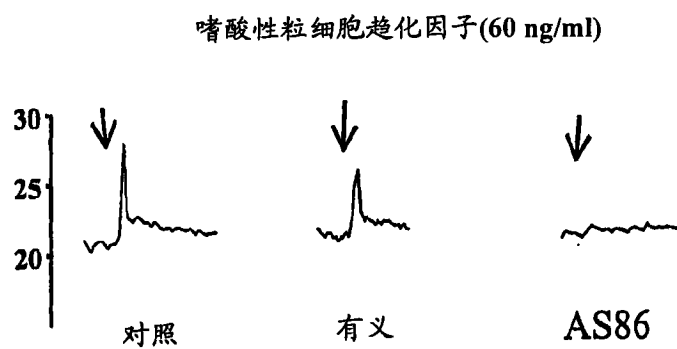


图 6

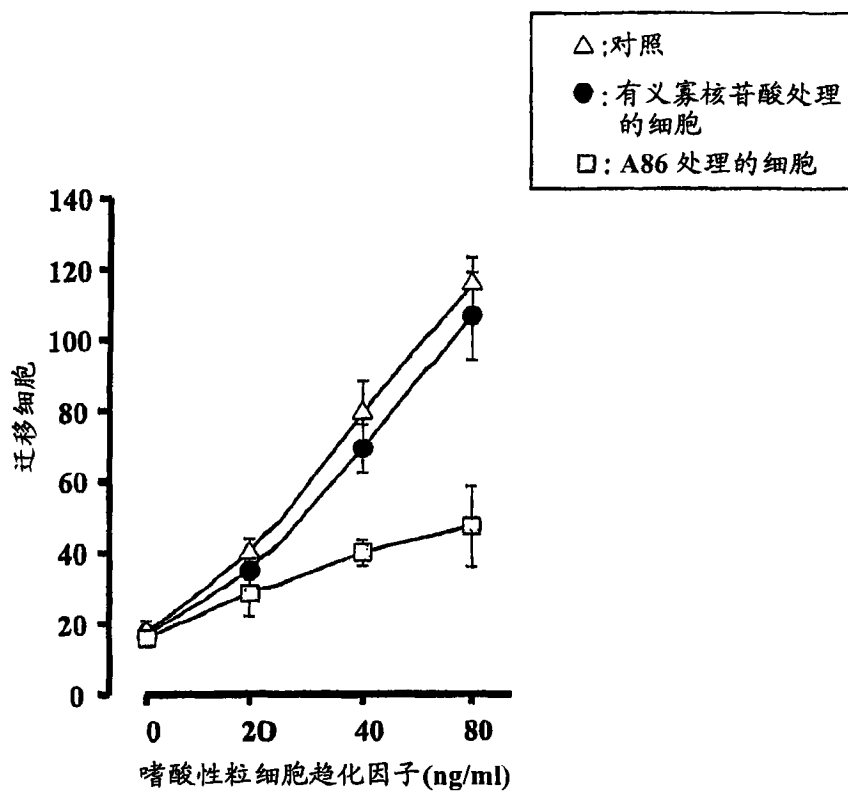


图 7

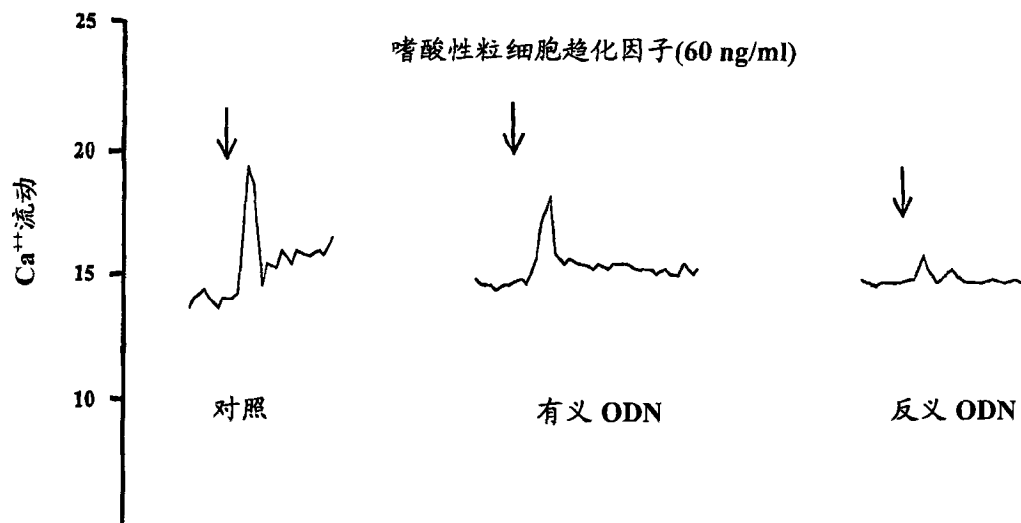


图 8

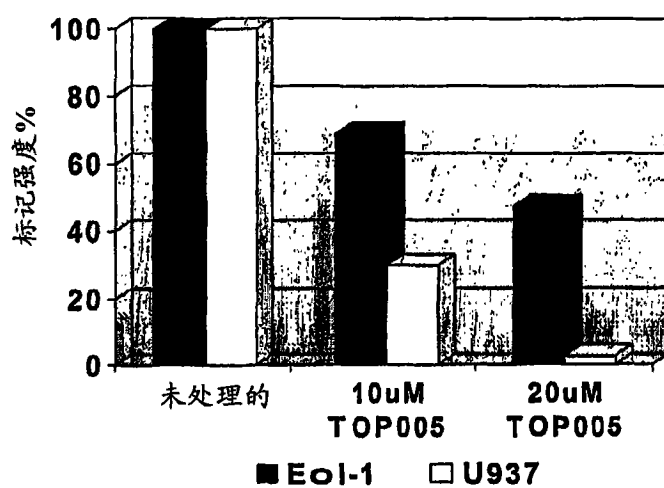


图 9

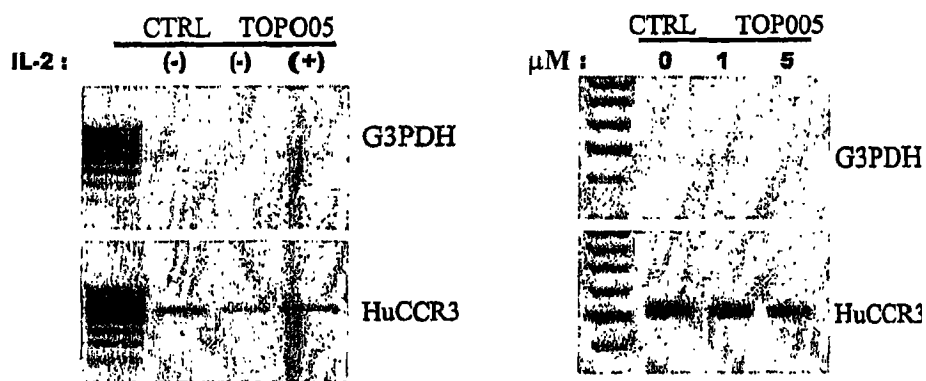


图 10A

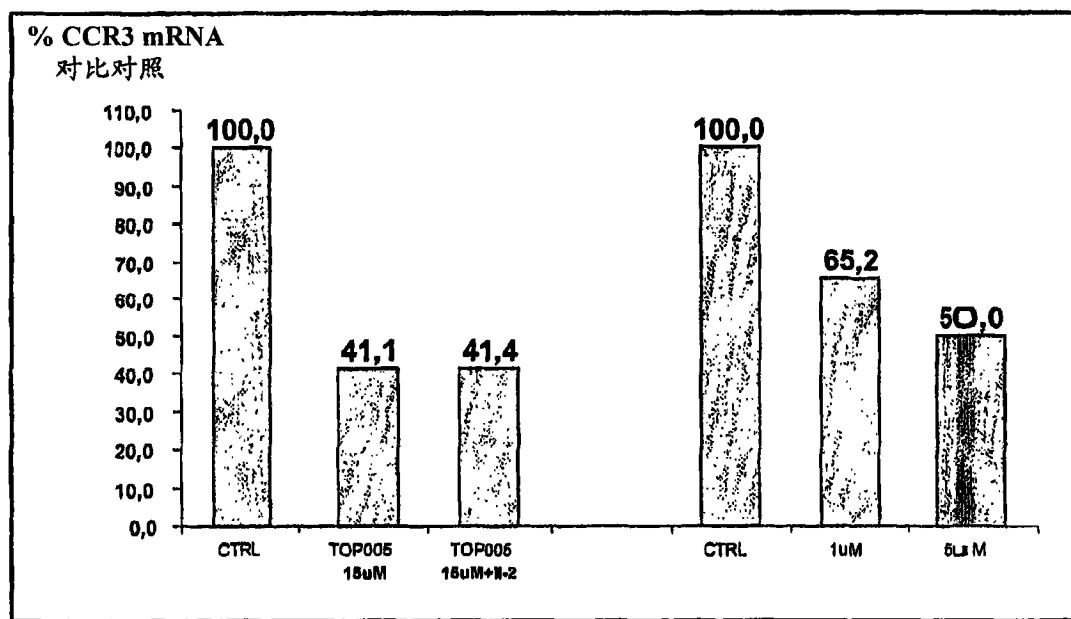


图 10B

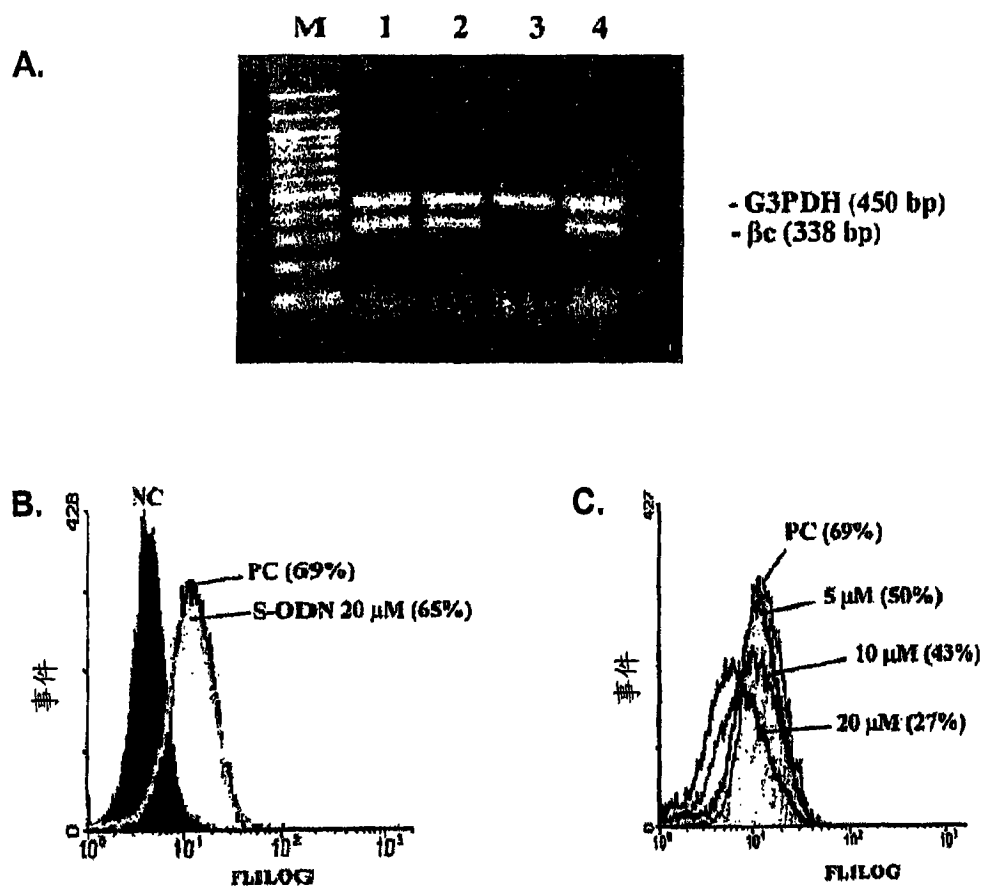


图 11

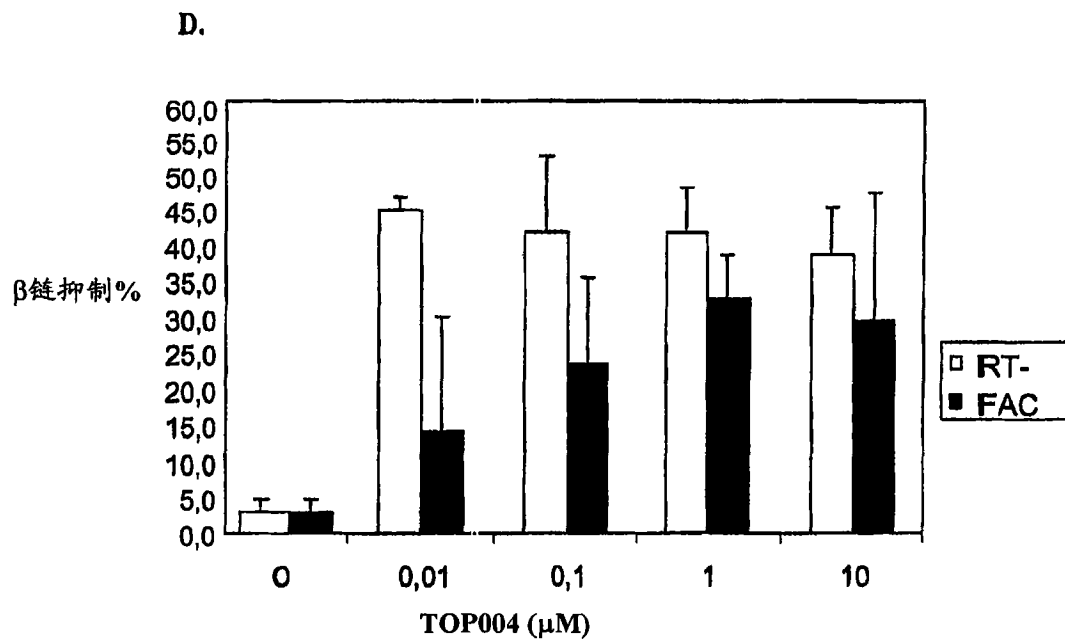


图 11

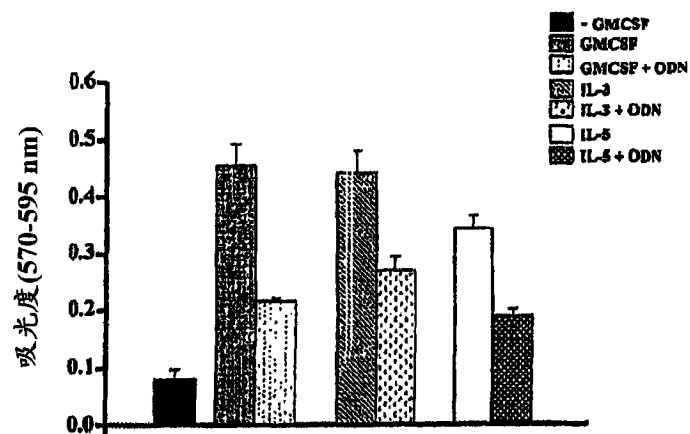


图 12

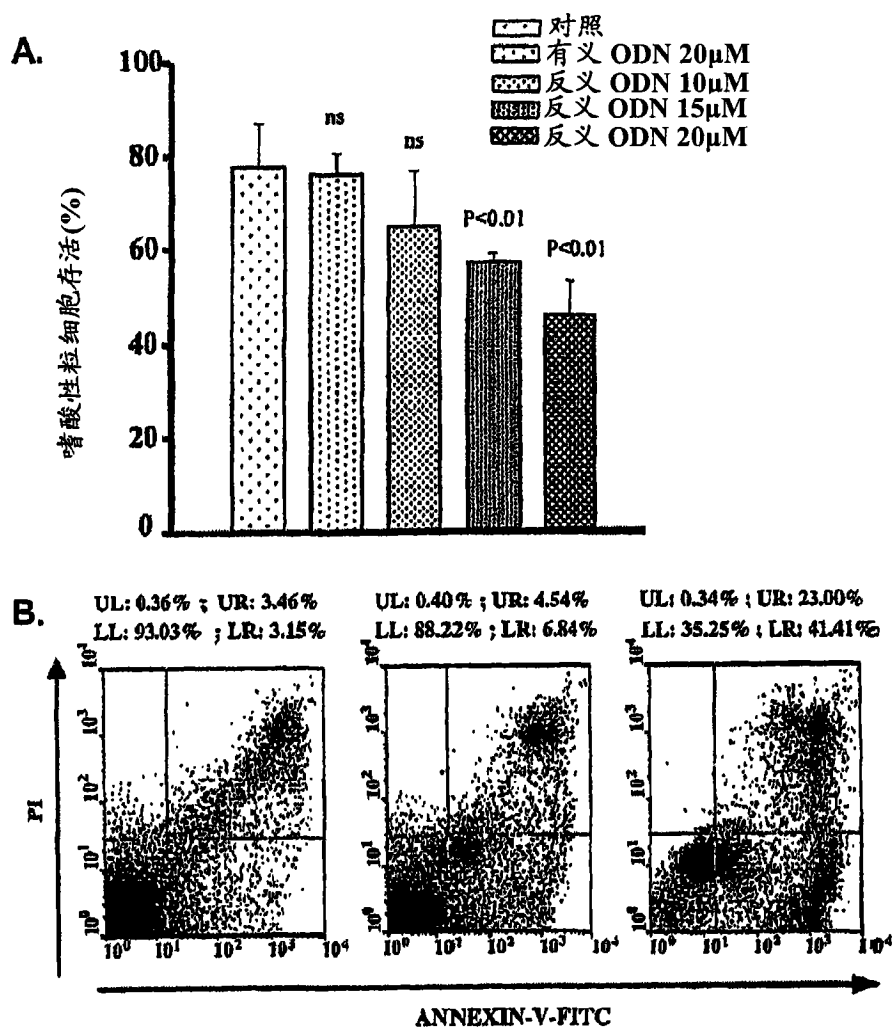


图 13

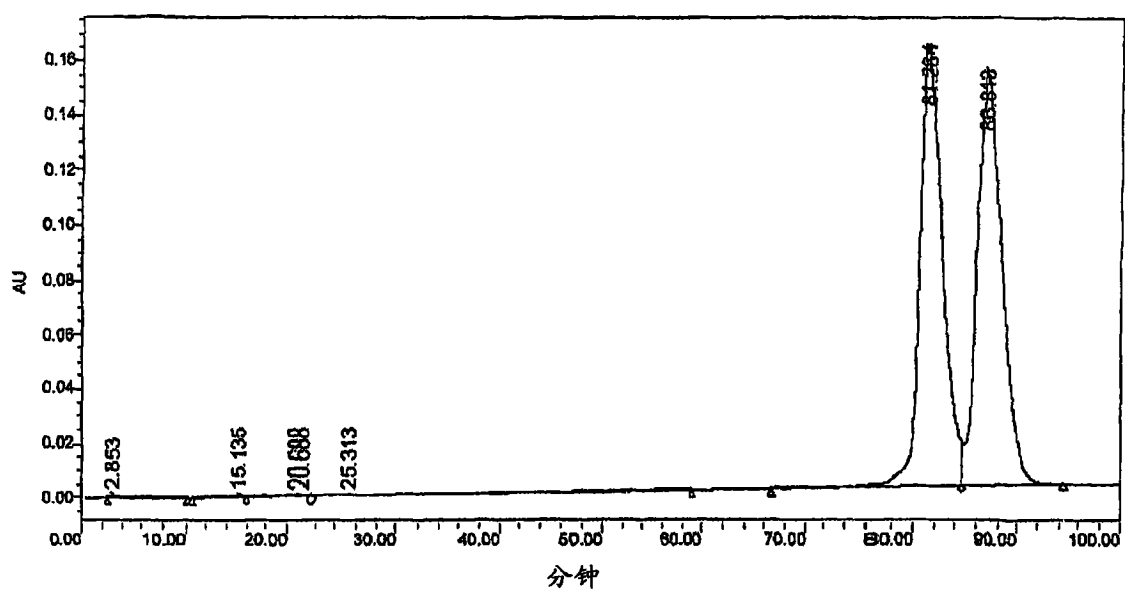


图 14

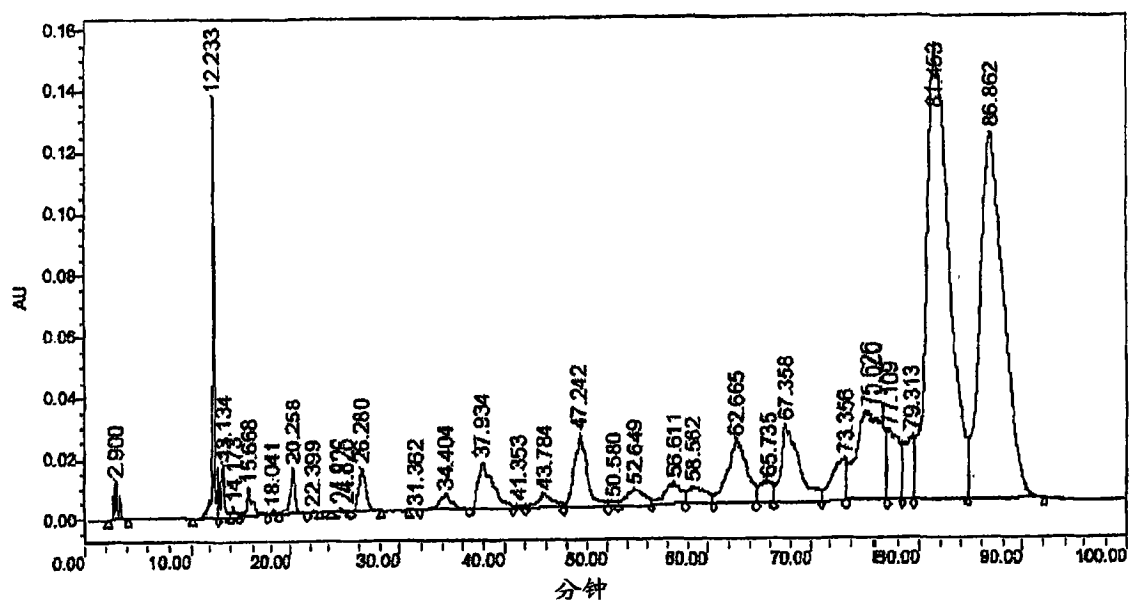


图 15

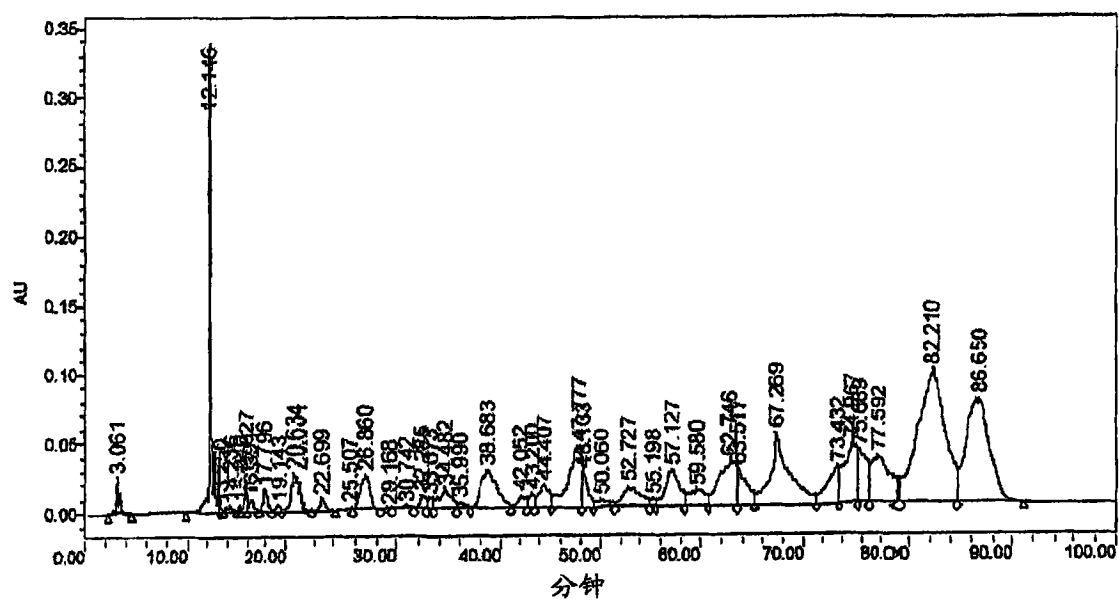


图 16

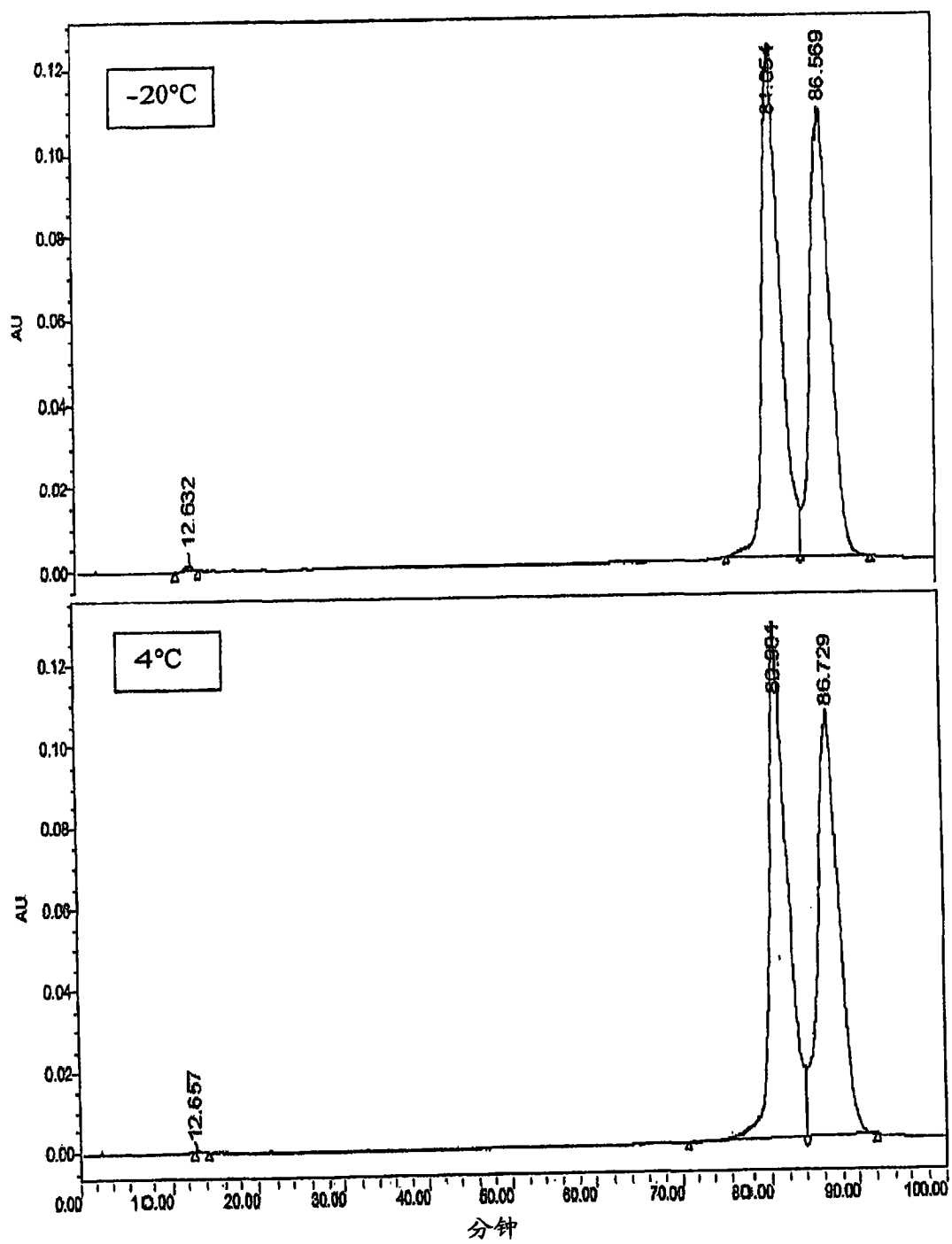


图 17A1

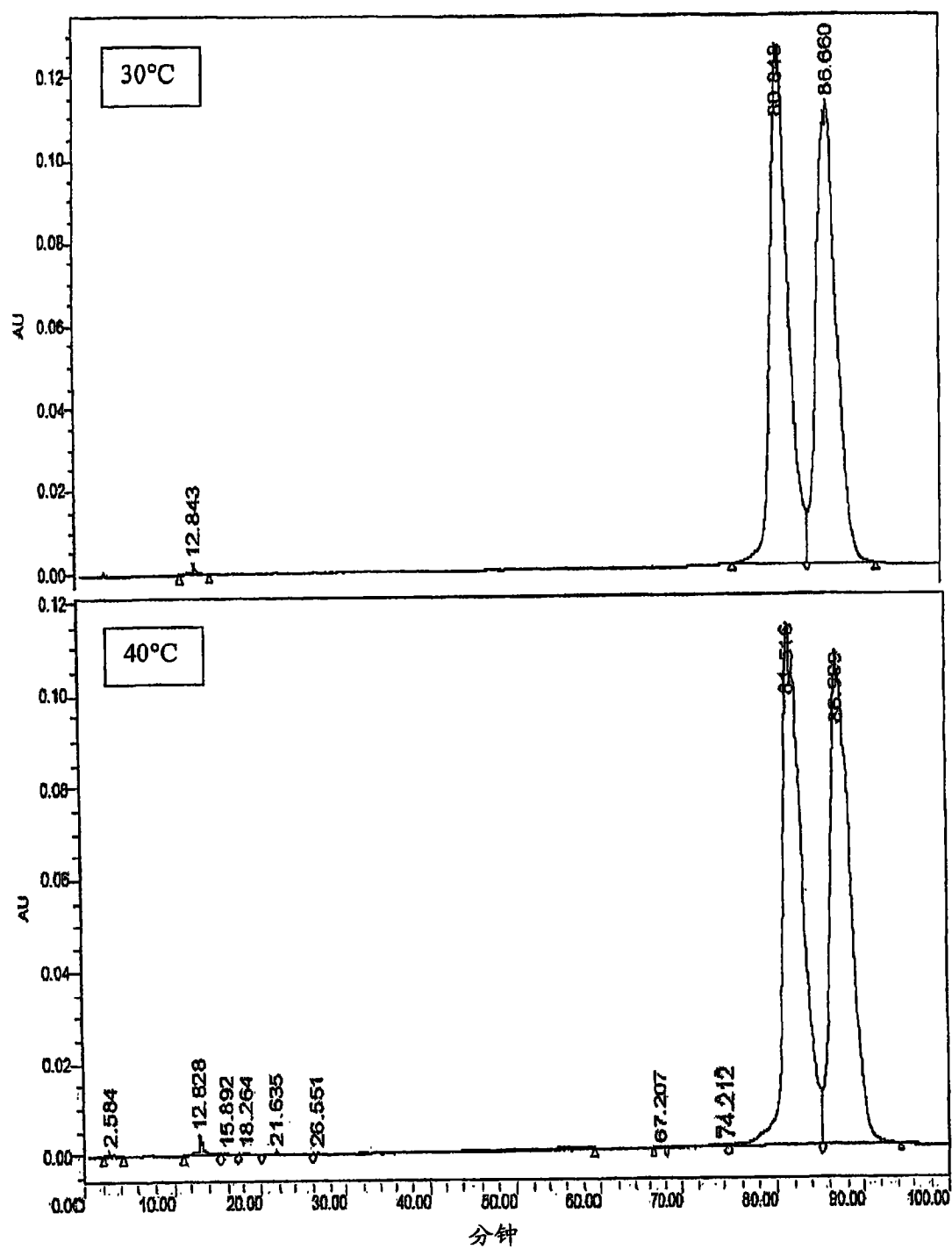


图 17A2

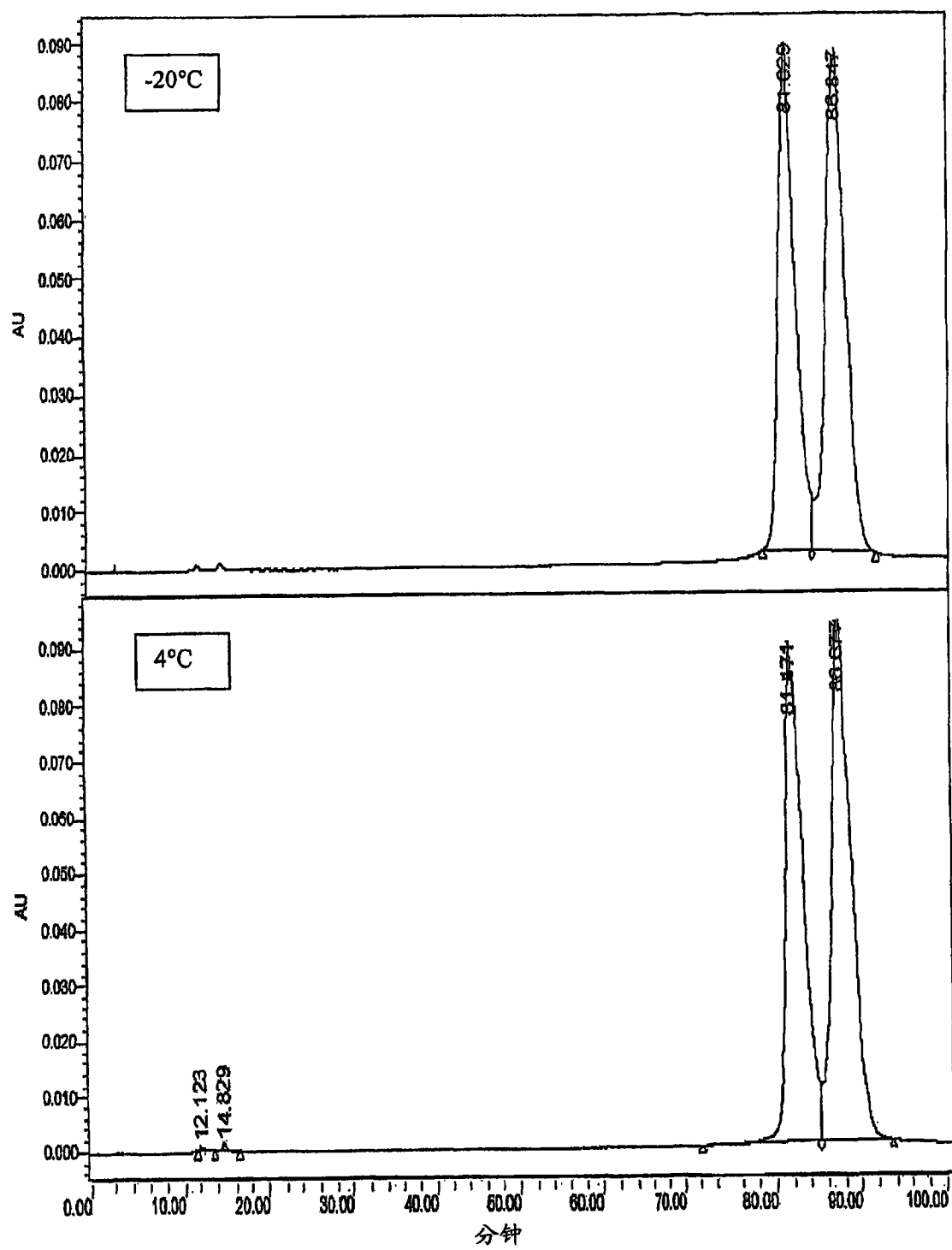


图 17B1

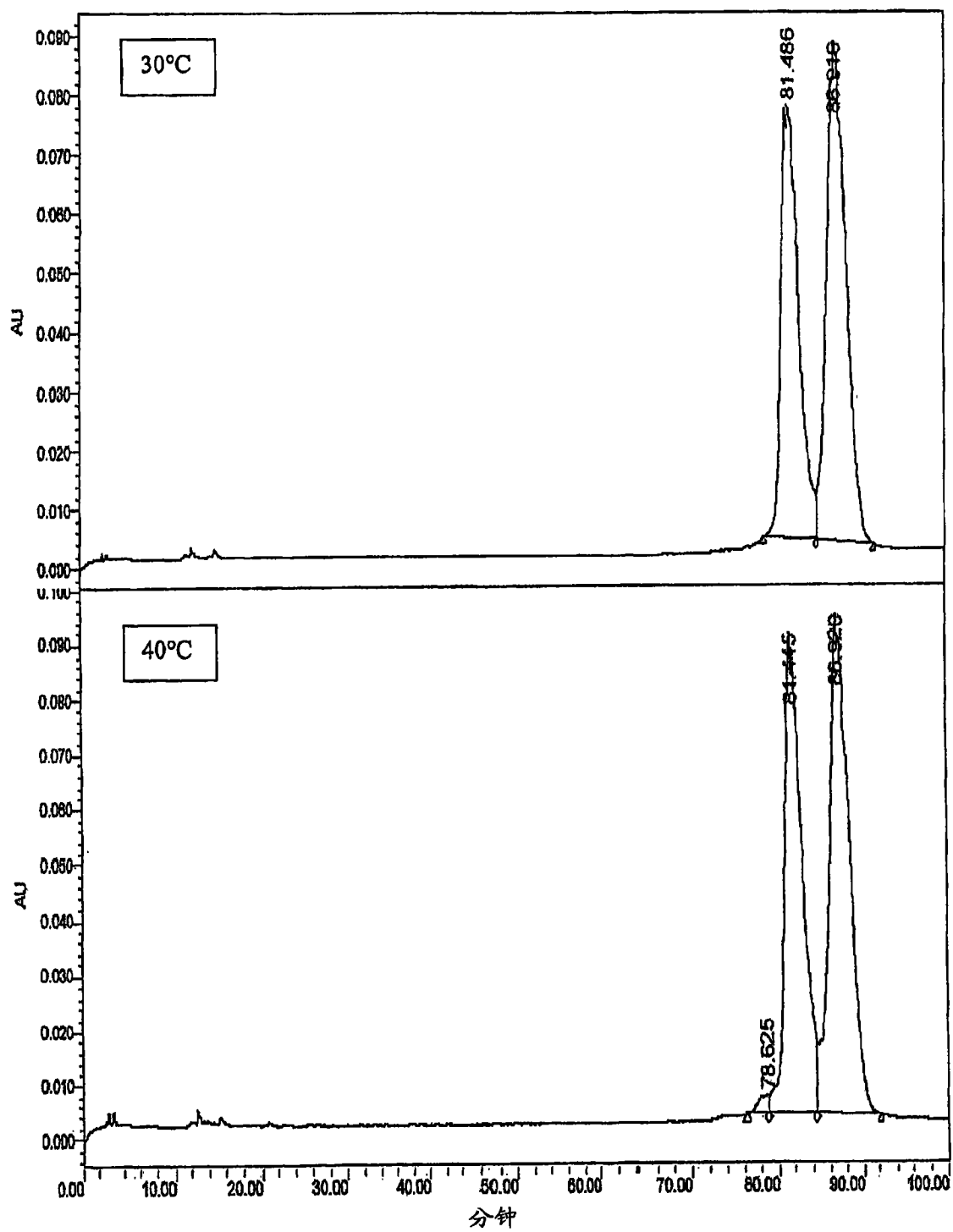


图 17B2

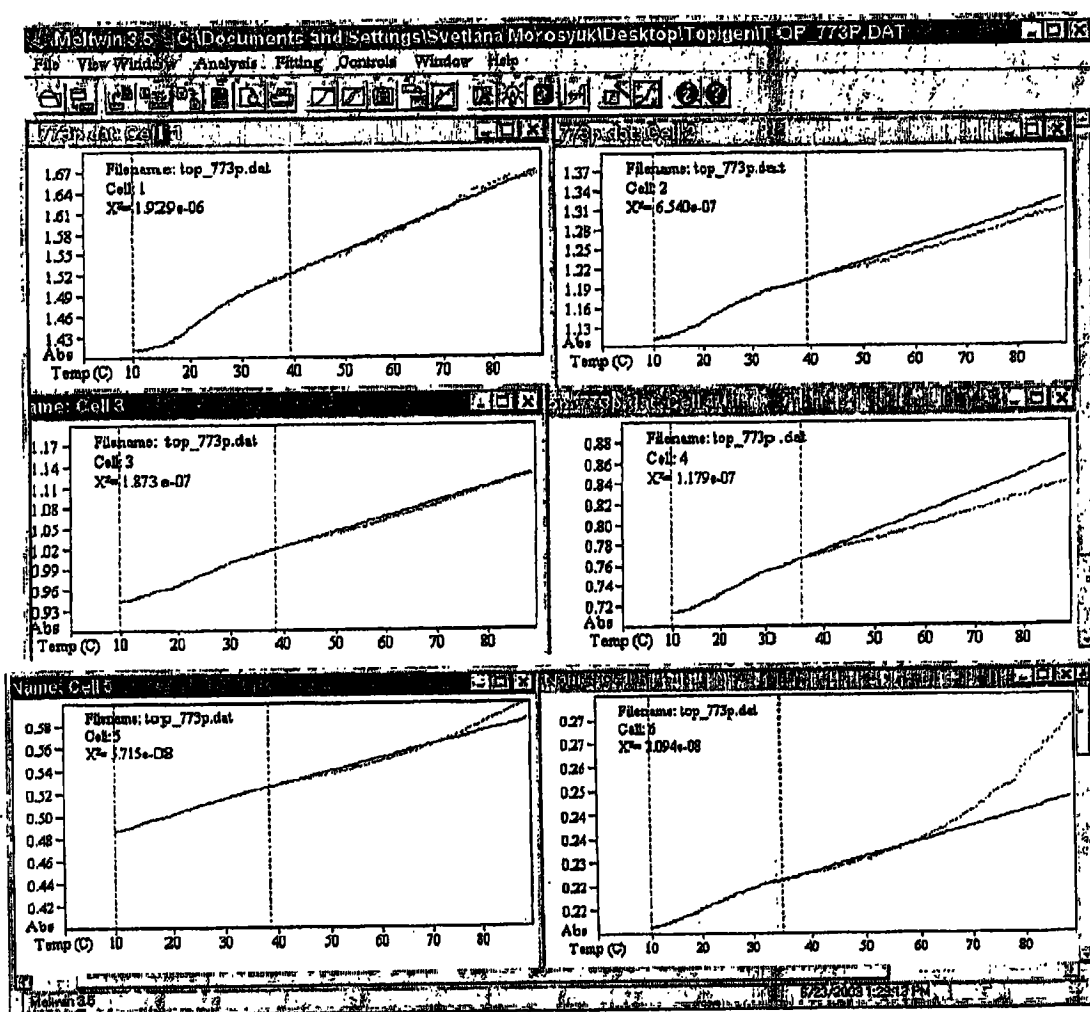


图 18

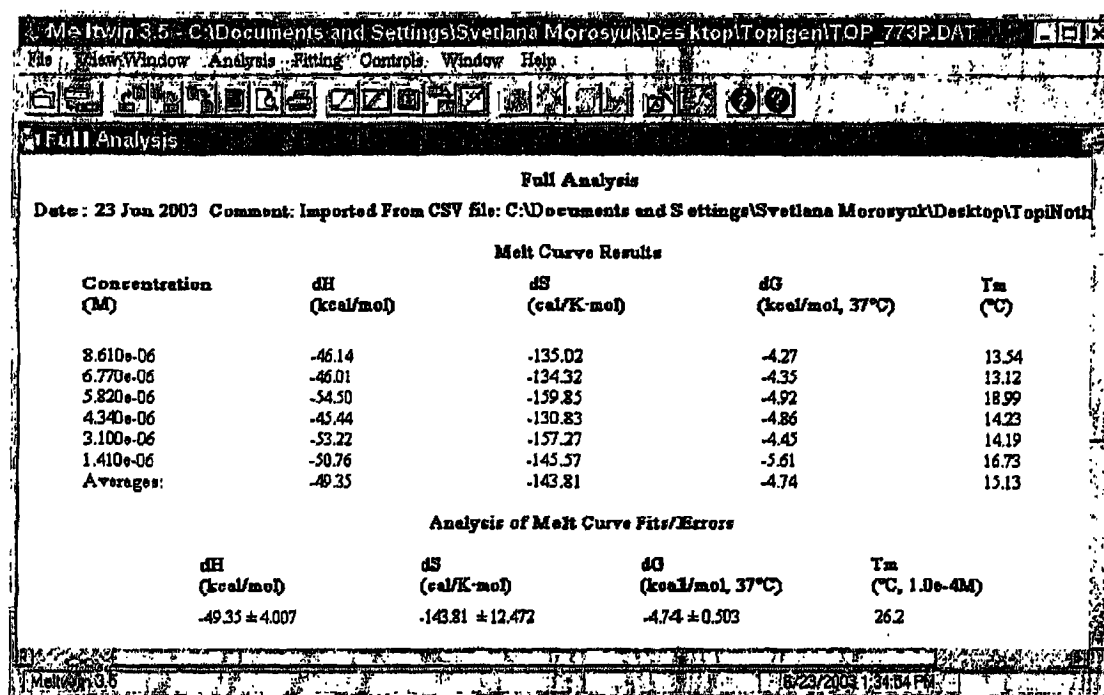


图 19

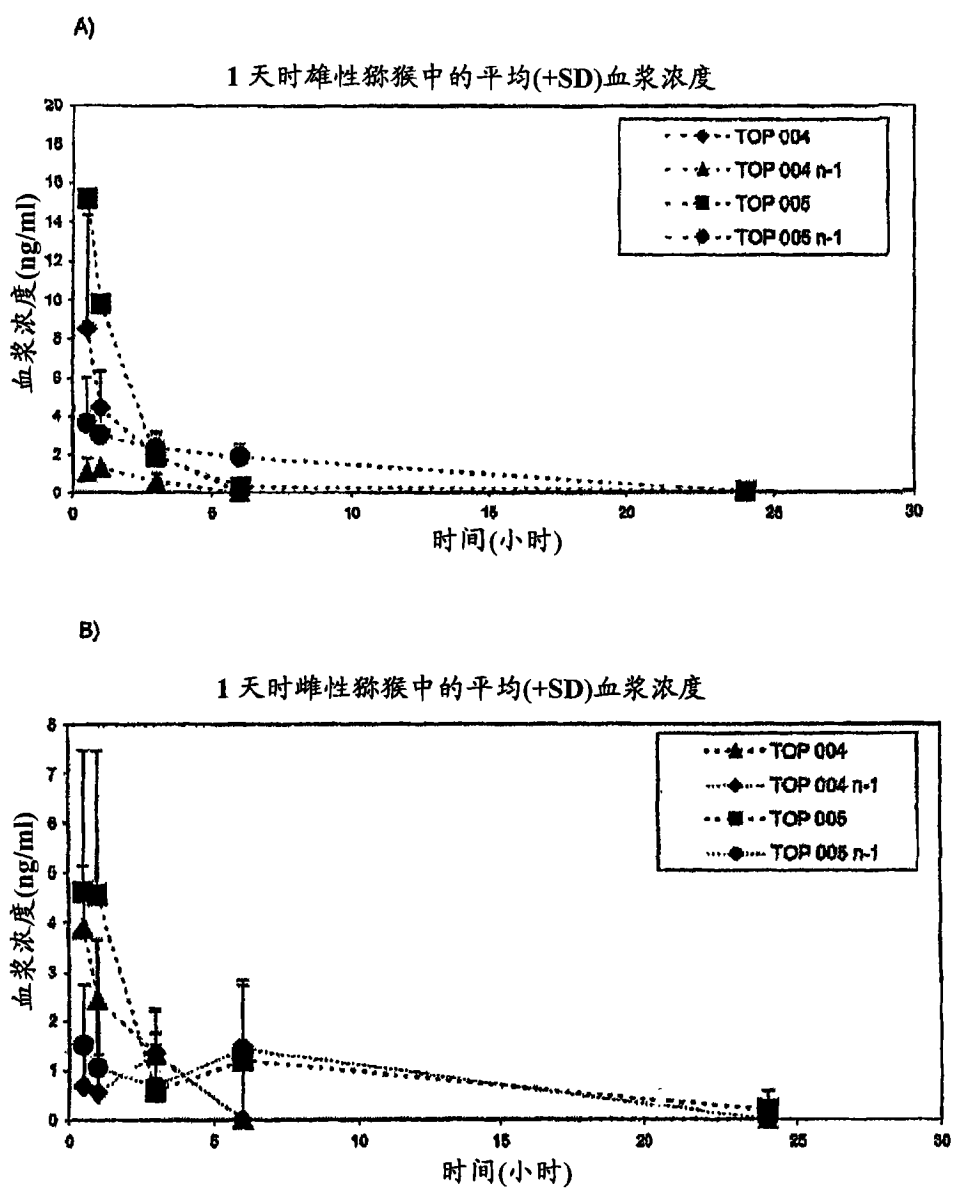


图 20

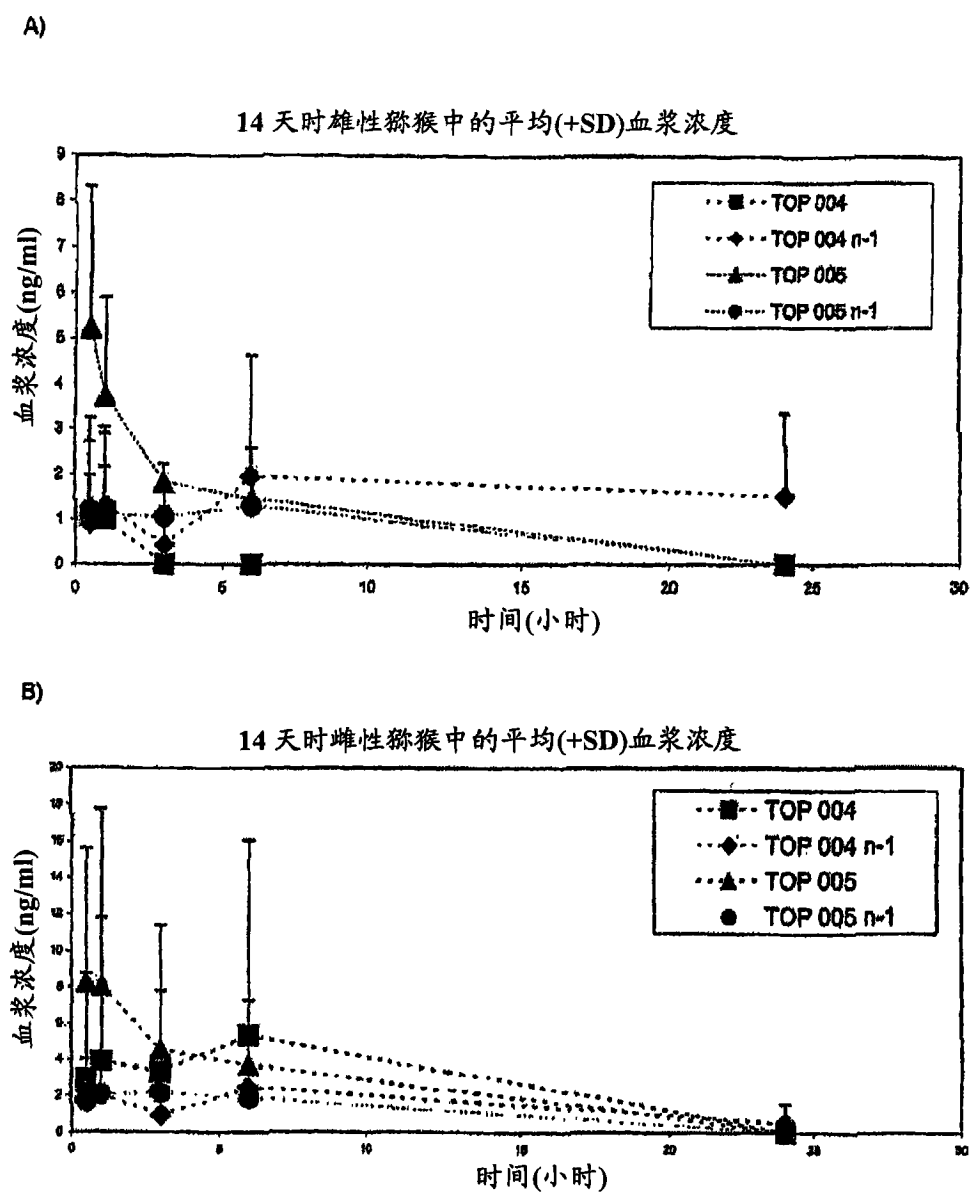


图 21