

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/11
A61K 31/70



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01814084. X

[43] 公开日 2004 年 6 月 2 日

[11] 公开号 CN 1501976A

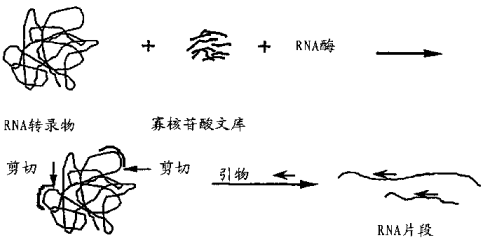
[22] 申请日 2001.7.19 [21] 申请号 01814084. X
[30] 优先权
[32] 2000. 7.19 [33] US [31] 60/219,391
[86] 国际申请 PCT/US2001/022808 2001.7.19
[87] 国际公布 WO02/005749 英 2002.1.24
[85] 进入国家阶段日期 2003.1.17
[71] 申请人 布里斯托尔 - 迈尔斯斯奎布药品公司
地址 美国新泽西州
[72] 发明人 S·P·候

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张广育 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图 11 页

[54] 发明名称 用于联合治疗的 CRF₂ 配体
[57] 摘要

本发明涉及能显著减少 CRF₂ 受体在啮齿类动物脑中表达的针对促肾上腺皮质素释放因子亚型 - 2 (CRF₂) 的 mRNA 的反义寡核苷酸, 以及反义寡核苷酸在基因功能的体内 CNS 研究的用途, 并且涉及治疗包括焦虑症、强迫性神经失调、惊恐性障碍、创伤后应激疾病、恐怖症和抑郁症在内的多种精神疾病。



ISSN 1008-4274

1. 一种治疗与 CRF_1 和 CRF_2 受体活性相关的疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF_1 受体配体和 CRF_2 受体配体或其可以药用的盐或药物前体。

5 2. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 CRF_1 配体受体是 CRF_1 受体的激动剂。

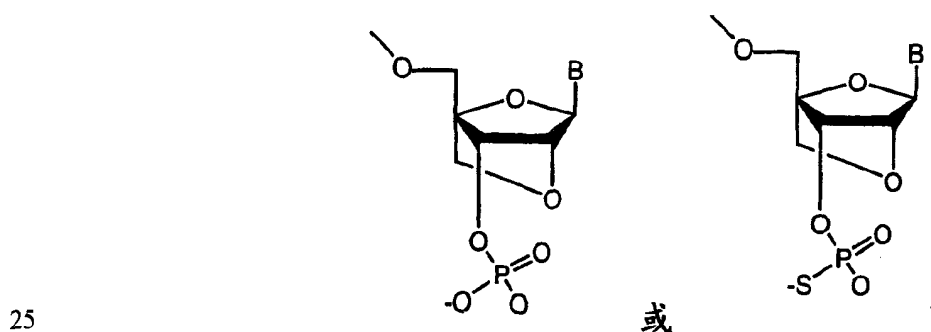
3. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 CRF_1 配体受体是 CRF_1 受体的拮抗剂。

10 4. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 CRF_2 配体受体是 CRF_2 受体的激动剂。

5. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 CRF_2 配体受体是 CRF_2 受体的拮抗剂。

6. 一种治疗与 CRF_1 和 CRF_2 受体活性相关的疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF_1 受体配体和 CRF_2 受体反义寡核苷酸或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述 CRF_2 受体反义寡核苷酸是由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸, 其中, 10-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

7. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述修饰过的核苷酸残基选自下列一组: 2'-甲氧基核糖核苷磷酸二酯、2'-甲氧基-乙氧基核糖核苷磷酸二酯、2'-氟代-核糖核苷磷酸二酯、5-(1-丙炔基)胞嘧啶硫代磷酸酯、5-(1-丙炔基)尿嘧啶硫代磷酸酯、5-甲基胞嘧啶硫代磷酸酯、2'-脱氧核糖核苷-N3'-P5'氨基磷酸酯和聚酰胺核酸, 和具有以下结构式的闭锁核酸;



其中, B 是嘌呤或嘧啶碱。

8. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述寡核苷酸的长度为大约 15-大约 25 个核苷酸。

9. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述反义寡核苷酸的 60-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

5 10. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述反义寡核苷酸包含以下序列:

(a) TGT ACG TGT TGC GCA AGA GG;

(b) GGT GGG CGA TGT GGG AAT G;

(c) GGA TGA AGG TGG TGA TGA GG; 和

10 (d) TGA CGC AGC GGC ACC AGA CC。

11. 如权利要求 1 或 6 的方法, 其中, 所述疾病是精神疾病。

12. 如权利要求 11 的方法, 其中, 所述精神疾病选自下列一组: 焦虑症、强迫性神经失调、惊恐性障碍、创伤后应激疾病、恐怖症、厌食、和抑郁症。

15 13. 如权利要求 1 或 6 的方法, 其中, 所述疾病选自下列一组: 头部创伤、脊髓创伤、缺血性神经元损伤 (例如, 大脑缺血, 如大脑海马缺血)、兴奋性毒性神经元损伤、癫痫、中风、应激诱导的免疫功能障碍、恐怖症、肌肉痉挛、帕金森氏病、亨廷顿氏病、尿失禁、阿尔茨海默型老年痴呆、多梗塞性痴呆、肌萎缩性侧索硬化、化学制
20 品依赖性和成瘾 (例如, 对酒精、可卡因、海洛因、苯并二氮卓类或其他药物的依赖性)、和低血糖症。

14. 如权利要求 1 的方法, 其中, CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体是同时给药的。

25 15. 如权利要求 6 的方法, 其中, CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体是序贯给药的。

16. 一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法, 包括让有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体与一种含有 CRF₁ 受体和 CRF₂ 受体的组合物接触。

30 17. 一种治疗与 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法, 包括让有效量的 CRF₂ 受体配体与一种含有 CRF₂ 受体的组合物接触。

18. 一种药物组合物, 该组合物含有 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体, 以及药用载体。

19. 一种用于治疗或预防与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的药用试剂盒, 所述试剂盒包括多个独立的容器, 其中, 至少有一个所述容器装有 CRF₁ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体, 并且至少有另一个所述容器装有 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体, 并且所述容器选择性地装有一种药用载体。

20. 一种用于治疗精神疾病的具有 CRF₁ 受体配体活性和 CRF₂ 受体配体活性的化合物。

21. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 CRF₁ 受体配体是 DPC904 或 SC-241。

22. 如权利要求 4 的方法, 其中, 所述 CRF₂ 受体配体是蛙皮降压肽、尿皮质素或其他 CRF₂ 肽。

23. 如权利要求 5 的方法, 其中, 所述 CRF₂ 受体配体是抗蛙皮降压肽。

24. 一种增强对精神疾病的治疗的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体。

25. 一种增强对精神疾病的治疗的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的具有 CRF₁ 配体受体和 CRF₂ 配体受体活性的化合物或其可以药用的盐或药物前体。

26. 如权利要求 25 的方法, 其中, 所述化合物是 astressin。

27. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述反义寡核苷酸针对表 1 所示的区域。

用于联合治疗的 CRF₂ 配体

发明领域

5 本发明涉及含有 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体的药物组合物；并且涉及治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，其中，本发明的 CRF 受体配体是所述 CRF 受体的激动剂或拮抗剂。除了作为 CRF 受体的本发明的药物目标之外，本发明还涉及针对 CRF₁ 和 CRF₂ 受体 mRNA 的药用制剂。

发明背景

大量研究业已证实了促肾上腺皮质激素释放因子（CRF）在控制脑垂体-肾上腺皮质系统，以及在调节对应激的行为、自主神经和免疫
15 应答方面的重要性。因此，这种肽被认为参与了影响疾病的病理生理学。目前，业已鉴定了两种能介导 CRF 的作用的两个 7 次跨膜受体 CRF₁ 和 CRF₂。这两种受体在大脑中是普遍表达的，尽管在这两种受体亚型的高度表达部位之间几乎不存在明显的重叠。业已报导了 CRF 过表达转基因小鼠表现出致焦虑（产生焦虑）行为的增加（Stenzel-Poore
20 等，促肾上腺皮质激素释放因子在转基因小鼠体内的超量表达：致焦虑行为的遗传学模型。J. Neuroscience 14, 2579-2584, 1995）。特别重要的问题是，上述致焦虑反应是否是由 CRF 对 CRF₁ 受体、CRF₂ 受体或对这两者的作用而介导的。

促肾上腺皮质激素释放因子（CRF）拮抗剂披露于被以全文形式收
25 作本文参考的以下美国专利中：US4605642，5874227，5962479，5063245，5861398 和 6083948。若干公开的专利申请也披露了促肾上腺皮质激素释放因子拮抗化合物，其中包括杜邦 Merck 公司的 PCT 申请 US94/11050，辉瑞公司的 W095/33750，辉瑞公司的 W095/34563，辉瑞公司的 W095/33727 和 US5424311。在 US5063245 和 Pham. Rev., 43:
30 425-473 (1991) 中，讨论了被认为可以用 CRF 拮抗剂治疗的疾病。

业已推测 CRF 在以下疾病的病因学和病理生理学方面起作用：阿尔茨海默病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、神经性厌食症、渐进性核上

麻痹和肌萎缩性侧索硬化,因为它们与中枢神经系统中的 CRF 神经元的功能障碍相关[有关综述参见 E. B. De Souza, Hosp. Practice 23: 59, 1988, G. N. Smagin, L. A. Howell, D. H. Ryan, E. B. De Souza 和 R. B. S. Harris Neuroreport 9, 1601-1601, 1988; 和 J. Pharmacol. Exp. Therap., 293, 700-806, 2000]。被以全文形式收作本文参考的 US6051578 披露了可用于治疗和预防以下疾病的 (CRF) 受体拮抗剂: 头部创伤、脊髓创伤、缺血性神经元损伤 (例如, 大脑缺血, 如大脑海马缺血)、兴奋性毒性神经元损伤、癫痫、中风、应激诱导的免疫功能障碍、恐怖症、肌肉痉挛、帕金森氏病、亨廷顿氏病、尿失禁、阿尔茨海默型老年痴呆、多梗塞性痴呆、肌萎缩性侧索硬化、化学制品依赖性和成瘾 (例如, 对酒精、可卡因、海洛因、苯并二氮卓类或其他药物的依赖性)、和低血糖症。

被以全文形式收作本文参考的美国专利 US6001807 披露了可用于治疗和预防呕吐的 (CRF) 受体拮抗剂。通过披露于以下文献中的方法进行实验证实了 CRF-拮抗剂的抗呕吐活性: Ueno 等, Life Sciences 41: 513-518, 1987; 和 Rudd 等, British Journal of Pharmacology 119: 931-936, 1996。

另外, 有多份文件披露了 CRF_1 受体拮抗剂, 例如 Chen 等, J. Med. Chem. 39: 4358-4360, 1996; Whitten 等, J. Med. Chem. 39: 4354-4357, 1996; Chen 等, J. Med. Chem. 40 (11) 1749-1754, 1997; Lundkvist 等, Eur. J. Pharmacology 309, 198-200, 1996; 和 Mansbach 等, Eur. J. Pharmacology 323, 21-26, 1997, 以上文献被以全文形式收作本文参考。更具体地讲, Gilligan 等 (BioOrganic Medicinal Chem. 8, 181-189, 2000, 被以全文形式收作本文参考) 披露了 CRF_1 受体配体 DPC904。

另外, 在以下文献中披露了诸如蛙皮降压肽、尿皮质素 (urocortin) 和其他 CRF_2 肽的 CRF_2 受体配体: Ho 等, Mol. Brain Res. 6, 11, 1998; J. Spiess 等, Trends Endocrinology and Metabolism 9, 140-145, 1998 CRF 受体的分子特性; 和 D. P. Behan 等, Mol. Psychiatry 1, 265-277, 1996, 以上文献被以全文形式收作本文参考。

尽管业已在动物上证实通过选择性拮抗剂阻断 CRF_1 受体, 能够产

生抗焦虑（缓解焦虑）和抗抑郁作用，对 CRF₂ 受体的功能进行的研究还不够。原位杂交和受体放射自显影实验证实，所述受体主要位于大脑的边缘和下丘脑部位，这表明它在介导 CRF 的致焦虑和厌食作用方面起作用。最近，业已证实了 CRF₂ 选择性拮抗剂（抗-蛙皮降压肽-30）
5 (Gulyas J. 等, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10575-579)。业已鉴定了一种具有 CRF₁ 和 CRF₂ 的双重活性的肽 Astressin (Ruhmann, A., Bonk, I., Lin, C.R. Rosenfeld, M.G. & Spiess, J., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15264-15269)。在缺乏这种受体的特异性激动剂或拮抗剂的条件下，对 CRF₂ 受体表达的反义抑制可以
10 提供有关该受体在正常生理学中的作用的证据。

反义核苷酸是设计出来的与感兴趣的 mRNA 分子的互补的短的寡核苷酸（长度通常为大约 15-大约 25 个核苷酸）。反义寡核苷酸通过沃森-克里克碱基配对与其 mRNA 靶子的杂交，启动了一连串的事件，这些事件止于所述目标 mRNA 分子的定位于寡核苷酸的降解。这种 mRNA
15 降解的直接后果是，抑制了所编码的蛋白的合成。在存在明显降低了的水平所述靶蛋白的情况下进行研究可以揭示其功能。在缺乏小分子配体（例如 CRF₂ 受体的配体）的情况下，反义寡核苷酸可能是用于蛋白功能研究的非常有用的工具。另外，可以将它们用于以小分子配体通常不可能实现的方式区分蛋白家族的密切相关的成员（如 CRF₁ 和
20 CRF₂）。

有效的反义序列的设计和选择并非是轻而易举的工作。反义寡核苷酸有很大的不同，并且无法预测其活性，因为其 mRNA 靶具有明显的二级和三级结构，这种结构会使得 mRNA 分子的大部分无法进行杂交。仅有 20-35% 的反义序列具有明显的抑制活性（50% 或更高）。使用
25 我们开发的分子技术鉴定了 CRF₂ 受体 mRNA 上的多个可及区（Ho 等，通过用寡核苷酸文库对 RNA 可及位点进行作图合理选择了人多种药物抗性-1mRNA 的高效反义寡核苷酸。Nucl. Acids Res. 24, 1901-1907, 1996; Ho 等，通过寡核苷酸文库对反义实验的 RNA 可及位点进行作图。Nature Biotech. 16, 59-63, 1998）。针对所述可及位点的反义寡核苷酸，能够在体内对 ¹²⁵I-蛙皮降压肽与 CRF₂ 受体的结合产生至少 50%
30 的抑制作用。

业已报导了研究 CRF₂ 受体功能的两个反义研究结果。这两项研究

都没有发现 CRF₂ 受体参与介导 CRF₂ 的致焦虑作用的证据。不过，在一项研究中(Heinrichs 等，促肾上腺皮质素释放因子 CRF₁ 而不是 CRF₂ 受体能介导致焦虑样行为。Reg. Peptides 71, 15-21, 1997)，CRF₂ 受体仅仅减少了 15-20%，而所使用的寡核苷酸产生了毒性副作用(显著的体重下降)，这一结果使得混淆了学实验的结果。在第二项报导中提供了很少的细节(Montkowski 等，Biol. Psychiatry 39, 566, 1996；和 Liebsch, G. Landgraf. R., Engelmann, M., Lorsch, P. & Holsboer, F. 1999, J. Psychiatric Res. 33, 153-163)。

不过，在披露于以其全文形式收作本文参考的国际专利申请号 PCT/US00/0819 和美国专利申请号 09/481981 中披露的使用 CRF₂ 反义寡核苷酸进行的一项研究中，我们发现抑制 CRF₂ 受体表达能在动物体内产生抗焦虑作用。

另外，我们发现当 CRF₂ 受体反义寡核苷酸与 CRF₁ 受体配体同时给药时，可以大大加强抗焦虑作用。

发明概述

本发明涉及一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体。

在一种实施方案中，本发明提供了一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，其中，所述 CRF₁ 受体配体是 CRF₁ 受体的激动剂。

在另一种实施方案中，本发明提供了一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，其中，所述 CRF₁ 受体配体是 CRF₁ 受体的拮抗剂。

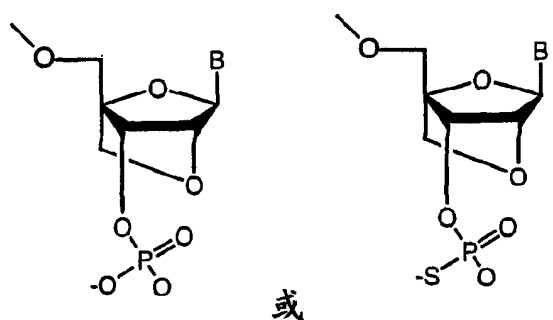
在另一种实施方案中，本发明提供了一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法，包括给予需要治疗的患者服用治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，其中，所述 CRF₂ 受体配体是 CRF₂ 受体的激动剂。

在另一种实施方案中，本发明提供了一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的

CRF₁受体配体和 CRF₂受体配体或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述 CRF₂受体配体是 CRF₂受体的拮抗剂。

在另一种实施方案中, 本发明提供了一种治疗与 CRF₁和 CRF₂受体活性相关的疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的
5 CRF₁受体配体和 CRF₂受体反义寡核苷酸或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述 CRF₂受体反义寡核苷酸是由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸, 其中, 10-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

在另一种实施方案中, 本发明提供了一种治疗与 CRF₁和 CRF₂受体活性相关的疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的
10 CRF₁受体配体和 CRF₂受体反义寡核苷酸或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述 CRF₂受体反义寡核苷酸是由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸, 其中, 10-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被选自下列一组的修饰过的核苷酸残基所取代: 2'-甲氧基核糖核苷磷酸二酯、2'-甲氧基-乙氧基核糖核苷磷酸二酯、2'-氟代-核糖核苷磷酸二酯、5-(1-丙炔基)胞嘧啶硫代磷酸酯、5-(1-丙炔基)尿嘧啶硫代磷酸酯、5-甲基胞嘧啶硫代磷酸酯、2'-脱氧核糖核苷-N3'-P5'氨基磷酸酯和聚酰胺核酸, 和具有以下结构式的闭锁 (locked) 核酸;
15



20

其中, B 是嘌呤或嘧啶碱基。

在另一种实施方案中, 本发明提供了一种治疗与 CRF₁和 CRF₂受体活性相关的疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的
25 CRF₁受体配体和 CRF₂受体反义寡核苷酸或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述 CRF₂受体反义寡核苷酸是由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸, 其中, 10-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰

过的核苷酸残基所取代, 其中, 所述寡核苷酸的长度为大约 15-大约 25 个核苷酸。

在另一种实施方案中, 本发明提供了一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体反义寡核苷酸或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述 CRF₂ 受体反义寡核苷酸是由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸, 其中, 所述反义寡核苷酸的 60-70% 的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

在另一种实施方案中, 本发明提供了一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体反义寡核苷酸或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述 CRF₂ 受体反义寡核苷酸是包含以下序列的反义寡核苷酸:

- (a) TGT ACG TGT TGC GCA AGA GG;
- (b) GGT GGG CGA TGT GGG AAT G;
- (c) GGA TGA AGG TGG TGA TGA GG; 和
- (d) TGA CGC AGC GGC ACC AGA CC。

在另一种实施方案中, 本发明提供了一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体反义寡核苷酸或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述疾病是精神疾病。

在另一种实施方案中, 本发明提供了一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的精神疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述精神疾病选自下列一组: 焦虑症、强迫性神经失调、惊恐性障碍、创伤后应激疾病、恐怖症、神经性厌食、和抑郁症。

在另一种实施方案中, 本发明提供了一种治疗与 CRF₁ 和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的方法, 包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体, 其中, 所述疾病选自下列一组: 头部创伤、脊髓创伤、缺血性神经元损伤(例如, 大脑缺血, 如大脑海马缺血)、兴奋性毒性神经损伤、癫痫、中风、应激诱导的免疫功能障碍、惊恐性障碍、肌肉痉挛、帕金森氏病、

亨廷顿氏病、尿失禁、阿尔茨海默型老年痴呆、多梗塞性痴呆、肌萎缩性侧索硬化、化学制品依赖性和成瘾（例如，对酒精、可卡因、海洛因、苯并二氮卓类或其他药物的依赖性）、和低血糖症。

5 在另一种实施方案中，本发明提供了一种治疗与 CRF_1 和 CRF_2 受体活性相关的疾病的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF_1 受体配体和 CRF_2 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，其中， CRF_1 受体配体和 CRF_2 受体配体是同时给药的。

10 在另一种实施方案中，本发明提供了一种治疗与 CRF_1 和 CRF_2 受体活性相关的疾病的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的 CRF_1 受体配体和 CRF_2 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，其中， CRF_1 受体配体和 CRF_2 受体配体是序贯给药的。

在另一种实施方案中，本发明提供了一种治疗与 CRF_1 和 CRF_2 受体活性相关的疾病的方法，包括让有效量的 CRF_1 受体配体和 CRF_2 受体配体与一种含有 CRF_1 受体和 CRF_2 受体的组合物接触。

15 在另一种实施方案中，本发明提供了一种治疗与 CRF_1 和 CRF_2 受体活性相关的疾病的方法，包括让有效量的 CRF_1 受体配体和 CRF_2 受体反义寡核苷酸与含有 CRF_1 受体的组合物接触，其中， CRF_2 受体反义寡核苷酸是由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸，其中，10-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

20 在另一种实施方案中，本发明涉及治疗与 CRF_2 受体活性相关的疾病，包括让有效量的 CRF_2 受体配体与一种含有 CRF_2 受体的组合物接触。

25 在另一种实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，该组合物含有 CRF_1 受体配体和 CRF_2 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，以及药用载体。

30 在另一种实施方案中，本发明提供了一种用于治疗或预防与 CRF_1 和 CRF_2 受体活性相关的疾病的药用试剂盒，所述试剂盒包括多个独立的容器，其中，至少有一个所述容器装有 CRF_1 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，并且至少有另一个所述容器装有 CRF_2 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，并且所述容器选择性地装有一种药用载体。

在另一种实施方案中，本发明提供了一种用于治疗或预防与 CRF_1

和 CRF₂ 受体活性相关的疾病的药用试剂盒，所述试剂盒包括多个独立的容器，其中，至少有一个所述容器装有 CRF₁ 受体配体或其可以药用的盐或药物前体，并且至少有另一个所述容器装有 CRF₂ 受体反义寡核苷酸或其可以药用的盐或药物前体，并且所述容器选择性地装有一种药用载体。

在另一种实施方案中，本发明提供了一种用于治疗精神疾病的具有 CRF₁ 受体配体活性和 CRF₂ 受体配体活性的化合物。

在另一种实施方案中，本发明提供了针对 CRF₂ 受体的 mRNA 的反义寡核苷酸，它能显著减弱 CRF₂ 受体在啮齿类动物脑中的表达。用上述寡核苷酸抑制 CRF₂ 受体功能，能在动物体内产生明显的抗焦虑（缓解焦虑）的作用。上述资料首次提供了 CRF₂ 受体在介导促肾上腺皮质激素释放因子的致焦虑（产生焦虑）作用方面起着重要作用的功能性证据。另外，以上资料证实了包括小分子在内的 CRF₂ 受体拮抗剂用于有效治疗包括焦虑症、强迫性神经失调、惊恐性障碍、创伤后应激疾病、恐怖症和抑郁症在内的多种精神疾病的潜力。

在另一种实施方案中，本发明提供了一种治疗包括，但不限于患者的焦虑症、强迫性神经失调、惊恐性障碍、创伤后应激疾病、恐怖症和抑郁症的精神疾病的方法，包括给所述需要治疗的患者服用治疗有效量的药用组合物，该组合物包括由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸，其中，10-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

在另一种实施方案中，本发明提供了一种筛选化合物以便确定用于治疗包括，但不限于焦虑症、强迫性神经失调、惊恐性障碍、创伤后应激疾病、恐怖症和抑郁症的精神疾病的活性的方法。

在另一种实施方案中，本发明提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸，其中，10-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

附图简述

业已出于解释和说明目的选择了本发明的某些实施方案，不过，这些实施方案并不是要以任何方式限制本发明的范围。这些实施方案示于下面所介绍的附图中。

图 1a: 反义序列选择的示意图。

图 1b: 嵌合的、半随机的寡核苷酸文库的性质。

图 2a: 在反义研究中最常使用的核苷酸类似物的结构; 硫代磷酸酯的改变会产生 CNS 毒性作用。

图 2b: 修饰过的寡核苷酸类似物结构, 它保留了药物效力, 但消
除了掺入寡核苷酸上用于 CNS 用途时的毒性。

图 2c: 嵌合寡核苷酸的若干种可能的构型之一。

图 3a: 反义寡核苷酸对大鼠冻结行为的影响。

图 3b: 在所述冻结测定中, 反义治疗的大鼠的对侧间隔中的 ^{125}I -蛙皮降压肽结合的抑制作用。

图 4a: 反义治疗对啮齿类动物在抬高的正迷宫中的行为的影响。

图 4b: 在所述较高的正迷宫测定中反义治疗的大鼠侧间隔中对
 ^{125}I -蛙皮降压肽结合的抑制作用。

图 5: 抗蛙皮降压肽-30 对大鼠冻结行为的影响。

图 6: CRF_2 受体反义寡核苷酸与 CRF_1 拮抗剂的结合对大鼠冻结行
为的影响。

发明详述

并不是所有的反义寡核苷酸都能具有强效抑制活性, 针对 CRF_2 受体 mRNA 的寡核苷酸也不例外。活性反义序列的鉴定是一项更重要的参数, 它能决定反义实验的成功。影响反义序列效力的因素是复杂的, 并且对它的了解也不充分; 因此, 只有 20-35% 的测试过的反义寡核苷酸具有对目标蛋白合成产生 50% 抑制作用的足够活性。

活性反义序列的选择在很大程度上是凭经验进行的, 并且相当花费时间。因此, 设计了一种用于定位 mRNA 分子上的最有可能与反义寡核苷酸杂交的位点的方法 (Ho 等, 1996; Ho 等, 1998)。这一目的是通过用化学合成的、半随机的寡核苷酸文库 (图 1b) 探测 RNA 转录物而实现的 (图 1a)。在混合在一起之后, mRNA 上的可及区能够与存在于所述文库中的互补序列杂交。然后用核糖核酸酶 H (RNA 酶 H) 鉴定所述区域, 所述核糖核酸酶只能催化杂合的 RNA-DNA 双链体中的 RNA 链的磷酸二酯主链水解性剪切。对所产生的 RNA 片段进行测序, 可以鉴定特定 mRNA 序列上的能够用作导向于反义寡核苷酸的位点的区域。将该 RNA 作图方法应用于含有 CRF_2 受体 mRNA 的完整编码区的 RNA 转录物, 导致鉴定了可以与反义寡核苷酸杂交的多个 RNA 位点 (表 1)。

表 1

可及位点	位置
A	315-338
B	417-455
C	608-625
D	677-731
E	763-813
F	859-882
G	911-941
H	1018-1031
I	1161-1185
J	1238-1258
K	1385-1417

- 5 表 1: CRF₂ 受体 mRNA 上的寡核苷酸杂交可及位点。序列信息参见 RNU16253.GB__R0 (GenBank 序列, 编号 U16253)。

可以通过将反义寡核苷酸的 5'末端导向于由表 1 中所提供的数据确定的可及位点, 设计长度为 15-25 个核苷酸的反义寡核苷酸。例如, 在下面所披露的研究中所使用的反义寡核苷酸, 是导向于可及位点 E 的 758-777 号位置的 20 个核苷酸的序列 (TGA CGC AGC GGC ACC AGA CC)。

针对上述若干位点的反义序列能在基于细胞的测定中抑制至少 50%的 CRF₂ 受体合成。上述测定是通过使用 ¹²⁵I-蛙皮降压肽进行的 CRF₂ 放射性配体结合测定完成的。所述反义抑制是序列特异性的, 因为反义寡核苷酸的 4 个碱基的错配, 只能导致 ¹²⁵I-蛙皮降压肽结合的很少的降低。另外, 所述序列还能在体内抑制 CRF₂ 受体合成。

在 CNS 体内反义实验中最常使用的寡核苷酸的两种化学形式是 2'-脱氧核糖核苷磷酸二酯寡核苷酸和 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯寡核苷酸 (图 2a)。尽管与基因中的双链 DNA 的化学结构相同, 单链的磷

酸二酯寡核苷酸易受核酸外切和内切降解，其血清半衰期为 20 分钟。即使是在具有较低核酸酶活性水平的大脑的‘特殊’环境中，磷酸二酯寡核苷酸也能被降解，不过被降解的更缓慢一些。其中的一个非桥连磷酸氧分子被硫所取代的硫代磷酸酯寡核苷酸对降解酶的抗性更强。在血清和组织培养实验中，硫代磷酸酯寡核苷酸的半衰期超过 12 小时，并且对从大鼠脑中提取的硫代磷酸酯进行的分析发现，这种寡核苷酸至少在 24 小时之内在化学上都是完整的。不过，在大脑中使用时，能产生化学相关的，但不是序列特异性的毒性作用。最近业已报导了发热反应、炎性介质的诱导、体重减轻和各种临床症状。在我们的实验中，含有硫代磷酸酯的化合物的 CRF₂ 反义序列主要对 CRF₂ 受体产生抑制作用，但能导致显著的体重减轻（类似于 Heinrichs 的报导），并且在接受治疗的动物身上产生了多种病理生理学症状。用很多不同的序列、反义序列和对照序列都观察到了上述作用，这样就排除了它们是靶相关的作用的可能性。

降低所述寡核苷酸中硫代磷酸酯的总体含量的方法在保持寡核苷酸的效力，同时又避免所述毒性作用方面是最有效的。其中最多达 60% 的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核糖核苷磷酸二酯残基所取代的嵌合寡核苷酸消除了体重减轻和所有其他毒性症状（参见图 2b）。其余的 40% 的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基存在于一个连续的片段上，以便有利于 RNA 酶 H 对靶 mRNA 的剪切（图 2a）。掺入诸如 5-丙炔基-2'-脱氧胞苷、5-丙炔基-2'-脱氧尿苷和 5-甲基-2'-脱氧胞苷（但具有硫代磷酸酯键，图 2b）的其他化学类似物，也可明显降低所述毒性作用。除了具有较弱的毒性之外，所述修饰过的核苷酸残基对系统核酸酶降解的抗性，比 2'-脱氧核糖核苷磷酸二酯残基的抗性更强。

由小的反义抑制作用所导致的功能改变的缺乏，通常会导致无法解释的结果。这是由于实验是否产生了真实的阴性结果或者反义抑制是否不足以揭示功能性改变的不确定性。除了反义序列之外，反义抑制作用的强弱还要受反义治疗时间，及其与靶蛋白的半衰期的关系的影响。尽管 CRF₂ 受体的半衰期是未知的，但是啮齿类动物大脑内的其他 7 次跨膜受体（CRF₂ 受体是其中的一页）的半衰期在 2-3 天的级别上。最大抑制作用通常出现在反义治疗之后至少 3 个蛋白半衰期的时

间。尽管 CRF₂ 反义给药 5 天能产生对所述受体 40-50% 的抑制作用，将用药时间延长到 9 天，可以导致对受体结合 70-80% 的抑制作用。另外，对定量原位杂交发现了 CRF₂ 受体 mRNA 的相当的减少。在上述条件下，四碱基错配对照寡核苷酸在受体和 mRNA 结合中都产生了很小的减弱。因此，与 Heinrichs 等的结果不同，该作者的 CRF₂ 反义寡核苷酸只能产生 15-20% 的 CRF₂ 受体减少，同时会导致接受治疗的动物体重的显著下降，我们对反义试剂进行了优化，以便研究 CRF₂ 受体功能。用 RNA 作图方法进行反义序列筛选，同时结合优化的寡核苷酸化学，从而得到了有效的反义序列。在给予啮齿类动物 8-10 天之后，能导致 CRF₂ 受体结合的大幅度的（大约 70%）减少。

将 CRF₂ 反义寡核苷酸脑室内注射到侧间隔部位，该部位是含有大量 CRF₂ 受体和 mRNA 的大脑部位。侧间隔是边缘脑区的一部分，已知该部分参与调节恐惧和情绪。用两种不同的焦虑行为模型测试用盐水、反义和错配对照寡核苷酸处理过的大鼠。啮齿类动物在经历恐惧和焦虑时，都表现出特有的冻结（freezing）行为。在焦虑的冻结模型中，所述行为是通过接触短暂的足电击而诱导的。在经过若干天的干涉之后，将所述大鼠送回到电击盒中时，即使是在不进行进一步的电击处理的情况下，这些大鼠也表现出冻结行为。当预先电击过的动物被送回到电击盒中时，给予诸如苯并二氮卓类和选择性的血清紧张素再吸收抑制剂的抗焦虑药物，能缩短冻结的时间。在反义实验中，在经过 2 天连续的足电击之后开始给予寡核苷酸。在用药第 8 天的最后 1 次给予寡核苷酸之后 2 小时，将大鼠送回到所述电击盒中，并观察 10 分钟。在这一部分实验中，检验了药理学制剂对条件恐惧的作用，所述反义寡核苷酸，而不是其错配对照能将冻结时间减少 50%（图 3a）。在最初的 10 分钟时间之后，对所述大鼠进行 2 次短暂的足底电击，并且再观察 10 分钟时间。同样，与盐水或错配寡核苷酸处理的动物相比，反义处理的大鼠表现出冻结时间降低 50%（图 3a）。上述数据构成了对 CRF₂ 受体功能的首次验证。对所述大鼠的大脑间隔区的受体放射性自显影分析表明，在反义治疗的大鼠中，¹²⁵I-蛙皮降压肽与 CRF₂ 受体的结合减弱了 70%（图 3b）。因此，抑制 CRF₂ 受体会导致焦虑水平的降低，这表明 CRF 致焦虑作用不仅仅是通过 CRF₁ 受体介导的，而且还能通过 CRF₂ 受体介导。另外，有效抑制 CRF₂ 受体，能产

生重要的功能后果，这种后果在较低的 CRF_2 受体抑制水平上可能不明显。以上结果表明， CRF_2 受体在调节恐惧和焦虑反应方面起作用。

5 抬高的正迷宫 (elevated plus maze) (EPM) 被广泛用于测定焦虑或致焦虑药物效果。该装置包括 + - 形式的迷宫，高出地面 50 厘米。将两个相对的臂打开并暴露于环境中，而将另外两个臂用黑色 Plexiglas 侧板封闭。对于啮齿类动物来说，暴露于 EPM 程序会产生接近/规避冲突，这通常会导致这种动物将大部分时间花费在所述迷宫的封闭的臂中。这种接近/规避冲突被认为是导致发生某些类型的人类焦虑疾病的重要因素。重要的是，目前被推荐用于治疗焦虑症的药物，能在 EPM 实验中在啮齿类动物中有效产生抗焦虑反应。

在反义实验中，在对大鼠用药 8 天，然后在最后 1 次注射寡核苷酸之后 2 小时在 EPM 中进行测试。用反义寡核苷酸治疗的大鼠明显将更多的时间花费在所述迷宫开放的、外露的臂中 (图 4a)。这种行为是焦虑减轻状态的指标。从统计学角度来看，错配寡核苷酸治疗的大鼠与盐水治疗的大鼠没有差别。在该实验中，通过反义寡核苷酸治疗，15 可以将侧间隔中 ^{125}I -蛙皮降压肽与 CRF_2 受体的结合减弱 60% (图 4b)。

对进入所述迷宫的开放的和闭合的臂中的总次数进行分析，没有发现在三种治疗组之间有差别 (数据未示出)。另外，在运动器官活性实验中，所有三种处理组同样没有差别 (数据未示出)。综上所述，20 以上结果表明，通过寡核苷酸治疗没有明显改变大鼠的运动功能。

业已证实，反义抑制 7 次跨膜受体系统所产生的生理学效果，类似于通过用选择性小分子拮抗剂抑制受体所获得的效果 (Ho 等，1998)。因此，我们的 CRF_2 反义结果意味着除了反义抑制 CRF_2 受体之外，通过小分子配体抑制该受体同样会导致抗焦虑作用。因此， CRF_2 25 受体的小分子或肽拮抗剂，应当是具有有用的治疗价值的有效抗焦虑制剂。

本文所使用的术语“可以药用的药物前体”表示可用于本发明的化合物的药物前体，这种药物前体属于正确的医学判断范围，适合用于与人类和低等动物的组织接触而又没有过高的毒性、刺激、过敏反应等，与合理的优点/风险比例匹配，并且能实现其预期的用途，以及如果可能的话，是本发明化合物的两性离子形式。术语“药物前体”30 表示在体内能迅速转化成母体化合物的化合物，例如，通过在血液中

水解。能通过代谢解离迅速转变的官能团，在体内形成一种能与本发明化合物的羧基发生反应的基团。其中包括，但不限于诸如烷酰基（如乙酰基、丙酰基、丁酰基等）、未取代的和取代的芳酰基（如苯甲酰基和取代的苯甲酰基）、烷氧基羰基（如乙氧基羰基）、三烷基甲硅烷基（如三甲基-和三乙基甲硅烷基）、与二羧酸形成的单酯（如琥珀酰基）等。由于可用于本发明的所述化合物的可代谢解离的基团在体内很容易解离，具有所述基团的化合物可以用作药物前体。具有可代谢解离基团的化合物的优点是，它们具有改善了的生物利用度，因为由于所述可代谢解离基团的存在，就会使所述母体化合物具有提高了的溶解度和/或吸收速度。在以下文献中提供了对药物前体的充分讨论：Design of Prodrugs, H. Bundgaard, ed., Elsevier, 1985; Methods in Enzymology, K. Widder 等; Ed., Academic Press, 42, p. 309-396, 1985; A Textbook of Drug Design and Development, Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, ed., Chapter 5; “Design and Applications of Prodrugs” p. 113-191, 1991; Advanced Drug Delivery Reviews, H. Bundgaard, 8, p. 1-38, 1992; Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, p. 285, 1988; Chem. Pharm. Bull., N. Nakaya et al; 32, p. 692, 1984; Pro-drugs as Novel Delivery Systems, T. Higuchi and V. Stella, Vol. 14 of the A. C. S. Symposium Series, and Bioreversible Carriers in Drug Design, Edward B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, 以上文献被收作本文参考。

术语“可以药用的盐”表示本发明化合物的相对无毒的无机和有机酸加成盐和碱加成盐。所述盐可以在所述化合物的最终分离和纯化期间在现场制备。具体地讲，酸加成盐可以这样制备：分别让游离碱形式的纯化的化合物与合适的有机或无机酸起反应，并分离由此形成的盐。典型的酸加成盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、茶酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐、氨基磺酸盐、丙二酸盐、水杨酸盐、丙酸盐、亚甲基-双-b-羟基硫代茶酸盐、二羟基苯甲酸盐、

isethionates、二-p-甲苯酰酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯甲磺酸盐、p-甲苯磺酸盐、环己基氨基磺酸盐和奎尼酸月桂基磺酸盐等（例如，参见 S.M.Berge 等，“药用盐”，J.Pharm.Sci.，66: p.1-19,1977，该文献被收作本文参考）。碱加成盐也可以通过以下方法制备：让酸形式的纯化化合物分别与合适的有机或无机碱起反应，并分离由此形成的盐。碱加成盐包括可以药用的金属盐和胺盐。合适的金属盐包括钠、钾、钙、钡、锌、镁和铝盐。优选钠盐和钾盐。合适的无机碱加成盐是用金属碱制备的，其中包括氢化钠、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化锌。合适的胺加成盐是用具有足够形成稳定盐的碱性的胺制备的，并且优选包括通常被用于医药化学领域的胺，因为这种胺具有较低的毒性和可以接受的医疗用途。氨水、乙二胺、N-甲基葡糖胺、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、N-苄基苄胺、二乙胺、哌嗪、三（羟基甲基）-氨基乙烷、四甲基氢氧化铵、三乙胺、二苄胺、ephedrine、脱氢枞胺、N-乙基哌啶、苄胺、四甲基胺盐、四乙基胺盐、甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺、碱性氨基酸，例如，赖氨酸和精氨酸，以及二环己胺等。

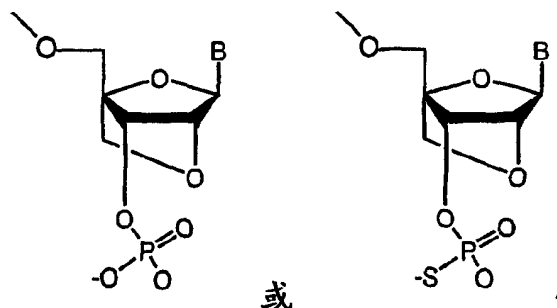
本文所使用的术语“CRF₂反义寡核苷酸”表示被设计成互补于 CRF₂受体 mRNA 的一部分的短的寡核苷酸（其长度通常为大约 15-大约 25 个核苷酸）。反义寡核苷酸通过沃森-克里克碱基配对与其 mRNA 靶位点进行的杂交启动了一连串事件，这些事件止于 CRF₂受体所导向的 mRNA 的寡核苷酸定向降解。

本文所使用的术语“CRF₂受体”表示披露于 1998 年 7 月 28 日授权的美国专利 5786203 中的细胞表面受体，该专利的内容被收作本文参考。

本文所使用的术语“限定的可及位点”表示 CRF₂受体 mRNA 上可用于与反义寡核苷酸杂交的多个位点。这些位点在上面的表 1 中有进一步的说明。

本文所使用的术语“修饰过的核苷酸残基”包括，但不限于 2'-甲氧基核糖核苷酸二酯、2'-甲氧基-乙氧基核糖核苷酸二酯、2'-氟代-核糖核苷酸二酯、5-(1-丙炔基)胞嘧啶硫代磷酸酯、5-(1-丙炔基)尿嘧啶硫代磷酸酯、5-甲基胞嘧啶硫代磷酸酯、2'-脱氧核糖

核苷-N3'-P5'氨基磷酸酯、聚酰胺核酸、和具有以下结构式的闭锁的核酸：



5 其中，B 是嘌呤或嘧啶碱。

本发明的一种实施方案提供了一种用于治疗患者体内的包括，但不限于焦虑症、强迫性神经失调、惊恐性障碍、创伤后应激疾病、恐怖症、神经性厌食、和抑郁症的精神疾病的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的药物组合物，该组合物含有由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸，其中，10-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

提供所述反义寡核苷酸修饰的核苷酸残基的优选实施方案选自下列一组：2'-甲氧基核糖核苷磷酸二酯、2'-甲氧基-乙氧基核糖核苷磷酸二酯、2'-氟代-核糖核苷磷酸二酯、5-(1-丙炔基)胞嘧啶硫代磷酸酯、5-(1-丙炔基)尿嘧啶硫代磷酸酯、5-甲基胞嘧啶硫代磷酸酯、2'-脱氧核糖核苷-N3'-P5'氨基磷酸酯和聚酰胺核酸。

一种更优选的实施方案提供了长度为大约 15-大约 25 个核苷酸的反义寡核苷酸。

另一种实施方案提供了一种治疗患有由 CRF 受体蛋白介导的疾病 20 的患者的方法，包括：

- (a) 设计一种对 CRF 受体 mRNA 特异的嵌合反义寡核苷酸；
- (b) 确定模拟所述反义寡核苷酸的生物学作用的组合物；和
- (c) 给予所述患者能抑制内源配体与其 CRF 受体结合的所述组合物。

25 另一种实施方案提供了一种用于治疗患有由 CRF 受体蛋白介导的疾病的方法，包括：

- (a) 设计一种对 CRF 受体 mRNA 特异的嵌合反义寡核苷酸;
- (b) 确定模拟所述反义寡核苷酸的生物学作用的组合物; 和
- (c) 给予所述患者能模拟内源配体在 CRF 受体上的作用的组合物。

5 本发明的另一种实施方案提供了一种用于治疗患有由 CRF 介导的疾病的患者的方法, 包括给予所述患者能有效抑制 CRF 或其他密切相关的肽与 CRF₂ 受体结合的组合物。

 本发明的另一种实施方案提供了一种设计 CRF₂ 受体抑制剂的方法, 包括以下步骤: 确定所述受体的三维结构, 分析所述三维结构,
10 寻找可能的底物结合位点, 合成一种能结合推测的反应位点的分子, 以及确定所述分子的受体抑制活性。

 本发明的另一种实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列, 其中, 10-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

15 本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列, 其中, 15-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

 本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列, 其中, 20-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。
20

 本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列, 其中, 25-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

 本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列, 其中, 30-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。
25

 本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列, 其中, 35-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

30 本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列, 其中, 40-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列，其中，45-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

5 本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列，其中，50-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列，其中，55-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

10 本发明的一种更优选的实施方案提供了由嵌合寡核苷酸组成的反义寡核苷酸的序列，其中，60-70%的 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基被修饰过的核苷酸残基所取代。

本发明的另一种优选实施方案提供了具有位于特定进入位点内的靶碱基、具有位于所述特定进入位点内的任何碱基上的起始位点、以及具有大约 15-大约 25 个碱基长度的反义寡核苷酸。

15 本发明的一种最优选的实施方案提供了包含以下序列的反义寡核苷酸：

- (a) TGT ACG TGT TGC GCA AGA GG;
- (b) GGT GGG CGA TGT GGG AAT G;
- 20 (c) GGA TGA AGG TGG TGA TGA GG; 和
- (d) TGA CGC AGC GGC ACC AGA CC.

25 本发明的另一种实施方案提供了一种用于利用反义寡核苷酸确定可用于治疗精神疾病的化合物的筛选测定，所述疾病包括，但不限于焦虑症、强迫性神经失调、惊恐性障碍、创伤后应激疾病、恐怖症、和抑郁症。

本发明的另一种实施方案提供了一种确定 CRF₂ 受体的结合区域的结构的方法。

30 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体的联合给药，能够提供超过联合给药 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体单独给药的效力，并且在联合给药时，可以使用较低剂量的每一种配体。较低的剂量减少了副作用的可能性，从而提供了较大的安全范围。本发明化合物与所述其他治疗剂的联合优选是协同联合。例如，正如 Chou 和 Talalay (Adv. Enzyme

Regul. 22: 27-55, 1984) 所披露的, 协同作用是指当所述化合物和制剂联合给药时所产生的治疗效果大于 CRF₁ 受体配体和 CRF₂ 受体配体单独给药时的累加效果的现象。一般, 协同作用在 CRF₁ 受体配体或 CRF₂ 受体配体各自单独的治疗性次最佳水平上表现的最明显, 不过, 在联合以后具有很高效力。

CRF₁ 受体拮抗剂能在若干种焦虑动物模型中起作用 (Lundkvist, J., Chai, Z., Teheranian, R., Hasanvan, H., Bartfai, T., Jenck, F., Widmer, U. & Moreau, J. L., 1996, Eur. J. Pharmacol. 309, 195-200; 和 Weninger, S. C., Dunn, A. J., Muglia, L. J., Dikkes, P. Miczek, K. A., Swiergiel, A. H., Berridge, C. W. & Majzoub, J. A. 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8283-8288)。在条件焦虑实验中测试了 CRF₁ 受体的一种高度选择性的和强效的吡唑-嘧啶拮抗剂 DPC904 (Gilligan, P. J., Baldauf, C., Cocuzza, A., Chidester, D., Zaczek, R., Fitzgerald, L., McElroy, J., Smith, M. A., Shen, H. S. L., Saye, J. A., Christ, D., Trainor, G. L., Robertson, D. W. & Hartig, P. R., 2000, Bioorganic Med. Chem. 8, 181-189, 2000), 并且发现了冻结持续时间的剂量依赖性减少 (图 7a)。由于中枢 CRF₁ 和 CRF₂ 受体在其解剖学分布上没有明显的重叠 (Chalmers, D. T., Lovenberg, T. W. & De Souza, E. B., 1995, J. Neurosci. 15, 6340-6350; 和 Rominger, D. H., Rominger, C. M. Fitzgerald, L. W., Grzanna, R., Largent, B. L. & Zaczek, R., 1998, J. Pharmacol. Exp. Ther. 286, 459-468), 因此设计了一种研究, 以便确定同时抑制这两种受体亚型是否能导致对冻结更有效的减轻。用盐水或反义寡核苷酸通过脑室内注射给动物用药 7 天。在最后一次脑室内注射之后 24 小时, 给大鼠口服载体 (methocel) 或 DPC904。在 DPC904 或反义寡核苷酸单独给药的动物中, 在冻结方面表现出比以前观察到的冻结明显减弱。在同时给予 DPC904 和反义寡核苷酸的动物中, 冻结明显减弱到低于在所述条件焦虑实验中 DPC904 治疗的或反义治疗的动物的水平 (图 7b)。尽管用 DPC904 急性治疗在所述电击再暴露实验中缩短了冻结时间, 但同时抑制这两种受体未能产生与单独使用 CRF₂ 反义寡核苷酸所获得的效果不同的效果 (图 7b)。在两组反义治疗的动物中, CRF₂ 受体结合都降低到类似水平 (盐水/ methocel: 1.20 ± 0.05 nCi/mg, 盐水/DPC904: 1.21

$\pm 0.05\text{nCi/mg}$, 反义寡核苷酸/ methocel: $0.51 \pm 0.08\text{nCi/mg}$, 反义寡核苷酸/ DPC904: $0.45 \pm 0.04\text{nCi/mg}$, 反义组与非寡核苷酸治疗组的 $p < 0.001$).

应当理解的是, 本发明包括本文所提到的特定的和优选的类型或
5 实施方案的所有合适的组合。

通过以下实施例可以进一步理解本发明, 其中, 有关份数和百分比是以重量为基础的, 除非另有说明。

实施例 1

10 合成并纯化用于体内实验的寡核苷酸

使用标准合成方案, 用自动化 ABI 394 RNA/DNA 合成仪合成寡核苷酸。在图 3 和 4 所示实验中所使用的反义寡核苷酸和错配寡核苷酸由以下序列组成:

反义: TGA CGC agc ggc acC AGA CC

15 错配: TGA GGC acc gga acC ACA CC

其中, 大写字母表示 2'-甲氧基核糖核苷磷酸二酯残基, 而小写字母表示 2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯残基。2'-甲氧基核糖核苷亚胺磷酸酯是从 Chem Genes 购买的, 丙炔基和 5-甲基胞苷亚胺磷酸酯是从 Glen Research 获得的, 而 2'-氟代亚胺磷酸酯是从 NeXstar 获得的。
20 用于合成硫代磷酸酯键的 Beaucage 试剂和用于对寡核苷酸进行 5' 标记的荧光素亚磷酰胺是从 Glen Research 购买的。所述试剂是按照生产商的说明使用的。

在 PRP-3 柱 (Hamilton Co.) 上通过反相 HPLC 纯化粗制寡核苷酸混合物, 使用乙腈和 0.1M 三乙基乙酸铵水溶液的梯度洗脱。将从
25 HPLC 柱上采集的级份冻结干燥 2 次, 以便除去多余的三乙基乙酸铵。然后用丁醇提取所述寡核苷酸的水溶液若干次。在存在 0.3M 乙酸钠的条件下, 使用乙醇沉淀完成阳离子交换。然后通过添加 0.01M 氢氧化钠, 将所述寡核苷酸溶液的 pH 调节到 7.0。通过用 NAP-25 柱 (Pharmacia) 进行大小排阻层析, 对所述寡核苷酸做进一步的纯化,
30 以便除去残余的荧光素亚胺磷酸酯试剂。通过用 0.2 微米的乙酸纤维素滤膜 (Rainin) 过滤进行消毒, 并通过紫外线光谱测定进行定量。通过毛细管凝胶电泳 (PACE2100, Beckman Instruments) 测定寡核

苷酸的纯度。将溶解在蒸馏水中的寡核苷酸母液放在-20℃下保存。

实施例 2

动物和手术

5 将在手术时重量为 320-360 克的雄性 Sprague Dawley 大鼠 (Charles River) 单独圈养在不锈钢笼子里, 并且提供能自由接触食物和水的通道。在经过 4 天的适应期之后, 在用 Rompun (100 毫克/公斤) 和氯胺酮 (9 毫克/千克) 麻醉的条件下, 在大鼠双侧定向植入长期的 26 号导管, 导管定位于侧心室。定向坐标为: 切开线位于
10 耳间线下面 3.3 毫米; 卤后 0.2 毫米; 中线侧面 ± 2.7 毫米; 颅骨表面腹侧 3.8 毫米, 和 24° 角。注射器 (33 号) 突出超过所述导管尖 0.5 毫米。在手术后 2 天开始对所述动物进行每日的适应控制。

所有动物护理使用 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) 批准的公开方法。杜邦药物研究实验室得到了实
15 验室动物管理评估和认证联合会 (国际 AAALAC) 的认可。

实施例 3

寡核苷酸给药

寡核苷酸输注是在手术之后第 8 天开始的, 此时大鼠体重高于手术时的重量大约 20 克。每天通过将冻结干燥的寡核苷酸颗粒溶解在
20 无菌盐水中制备新的寡核苷酸溶液。在用寡核苷酸输液之前, 每天上午 9 点对大鼠进行称重。使用微处理器控制的注射泵 (Stoelting) 用 2 分钟时间将 1 微升的溶液注射到每一个心室中。在每天的注射之间, 用乙醇和无菌水清洗用于每一只大鼠的注射器, 并且干燥。

25

实施例 4

焦虑的冻结测定

电击盒由具有壁和盖的黑色的 Plexiglas 室组成。所述盒子的门用透明的 Plexiglas 制成, 在它上面安装了一个用于观察的单向镜子。
30 所述盒子的地板包括一个 Coulbourn 不锈钢电击格栅, 格栅条间隔 1 厘米。在手术置入所述导管之后第 8 天, 将大鼠放入所述盒子, 并让其适应 2 分钟。然后以 20 秒的间隔对所述格栅地板输送总共 3 次不

规则的、随机的、无可逃避的足底电击 (1.0mA, 持续 1 秒钟)。用 15 分钟时间观察所述大鼠的冻结行为, 然后将它送回到它所居住的笼子里。

在刺激处理之后次日开始寡核苷酸治疗。给动物连续用药 7 天。

- 5 将大鼠送回到电击盒中 24 小时之后, 用 10 分钟时间观察冻结行为。然后进行 2 次足底电击 (1.0mA, 持续 1 秒钟, 间隔 20 秒), 然后再用 10 分钟时间观察大鼠的冻结。在紧接着这最后的 10 分钟时间之后, 对所述大鼠实施安乐死。

10

实施例 5

抬高的正迷宫测定

对大鼠的寡核苷酸治疗始于手术后第 8 天。在治疗的第 8 天用药之后 2 小时, 在 EPM 中进行实验。在实验开始时, 将大鼠放在迷宫的中央场地上, 并通过摄象机记录在随后的 10 分钟内大鼠的探询行为。

15 由坐在所述实验室外面的观察者统计大鼠花费在开放的臂和闭合的臂中的时间, 以及大鼠进入迷宫的每一个臂的次数。在该实验结束之后, 马上对所述大鼠实施安乐死。

20

实施例 6

组织制备

通过暴露于二氧化碳将大鼠处死。取出大脑, 并在放在干冰上冷却的甲基丁烷中冻结, 然后在 -80℃ 下保存。在低温恒温器 (Kopf Instruments) 上通过侧间隔切除 20 微米的切片, 用于受体放射自显影。

25

实施例 7

CRF₂ 受体放射自显影

- 在回温到室温 1 小时之后, 将大脑切片放在 50mM Tris-HCl (pH7.5) 中预孵育 5 分钟, 该缓冲液中含有 10mM 氯化镁, 2mM EGTA
- 30 (乙二醇双 (β-氨基乙基醚) N,N,N',N'-四乙酸)、0.1% 卵白蛋白、0.08TIU 抑蛋白酶肽和 0.1mM 杆菌肽。用 0.15nM ¹²⁵I-蛙皮降压肽 (New England Nuclear) 确定总的结合。在存在 1 μM SC-241-CRF₁ 选择性

受体拮抗剂的条件下测定 CRF₂ 特异性结合 (D.H.Rominger 等, J. Pharmacol. Exp. Therap., 286, 459-468, 1998)。用 1 μ M α 螺旋 CRF (American Peptide) 测定非特异性结合。在含有放射性配体和合适的拮抗剂的预孵育缓冲液中进行孵育 150 分钟。然后用含有 0.01% Triton X-100 的 PBS 洗涤组织切片 2 次, 每次 5 分钟。在最后 1 次用水清洗之后, 吸掉多余的水分, 并将所述切片空气风干过夜。让所述切片和 ¹²⁵I 标准条 (Amersham) 对 Hyper 胶片 μ -Max (Amersham) 曝光 72 小时。

用 NIH ImageMG1.44 程序对 CRF₂ 特异性结合进行定量。使用 ¹²⁵I 标准条将光密度读数转换成每克蛋白组织结合的配体的 nCi。对每只大鼠的 7-9 个相邻的切片进行定量。

实施例 8

用 CRF₁ 受体拮抗剂和 CRF₂ 反义寡核苷酸联合治疗

按实施例 4 所述方法 (第一段) 对 32-40 只大鼠进行条件足底电击处理。在足底电击之后, 将所述动物等分成两组。第一组连续 7 天脑室内注射盐水, 而第二组动物连续 7 天脑室内注射反义寡核苷酸 (每一个侧脑室注射 2.5 纳摩尔)。在第 8 天, 将每一组动物再分成两组。用盐水处理的动物的一半以 10 毫克/千克的口服剂量给予 DPC904 (溶解在 methocel 中) (被称为 S/R1 组)。所述盐水处理动物的另一组接受载体 methocel (被称为 S/M 组)。对给予反义寡核苷酸的大鼠作类似处理, 即这些动物的一半以 10 毫克/千克的口服剂量给予 DPC904 (溶解在 methocel 中) (被称为 R2/R1 组)。反义治疗动物的另一半使用载体 methocel (被称为 R2/M 组)。在口服用药 30 分钟之后, 按例 4 所述方法在电击盒中对所述动物进行测试 (第二段)。

在不超出本发明的精神或实质性范围的前提下, 可以用其他具体形式实施本发明。

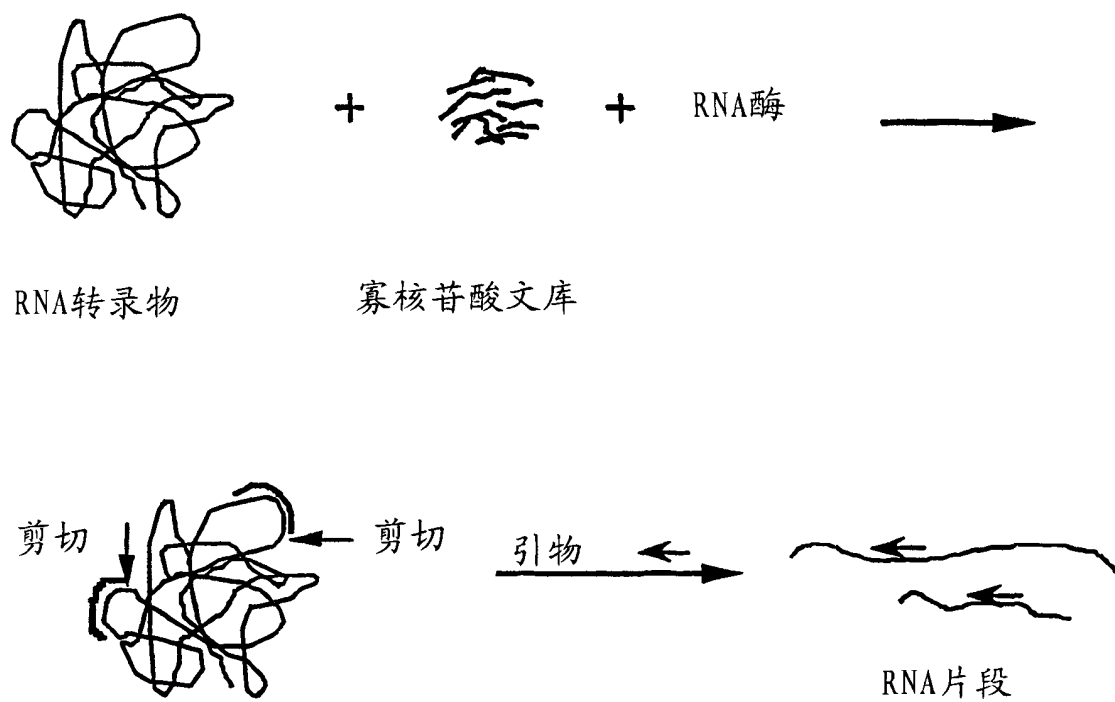


图 1a

5'mmmGNNNmmmm3'	G 文库
5'mmmANNNmmmm3'	A 文库
5'mmmCNNNmmmm3'	C 文库
5'mmmTNNNmmmm3'	T 文库

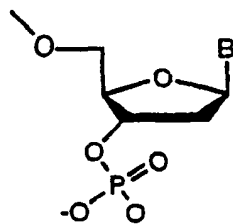
m: 随机化的2'-甲氧基核糖核苷酸

N: 随机化的2'-脱氧核糖核苷酸

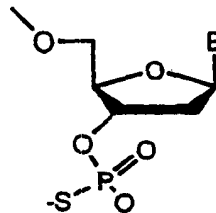
A, G, C, T: 2'-脱氧核糖核苷酸

图 1b

(a)



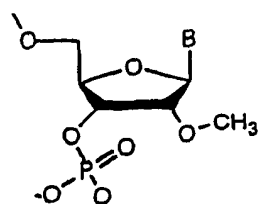
2'-脱氧核糖核苷磷酸二酯



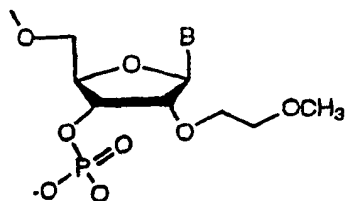
2'-脱氧核糖核苷硫代磷酸酯

图 2a

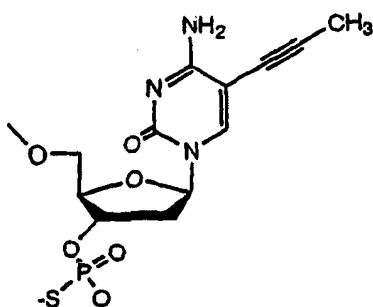
(b)



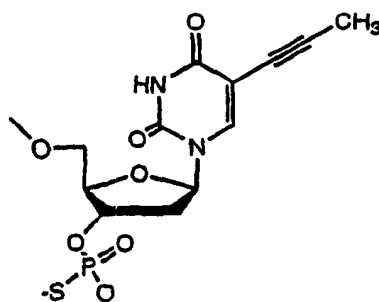
2'-甲氧基核糖核苷
磷酸二酯



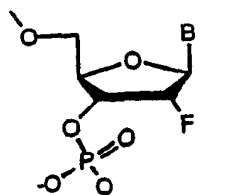
2'-甲氧基-乙氧基核糖
核苷磷酸二酯



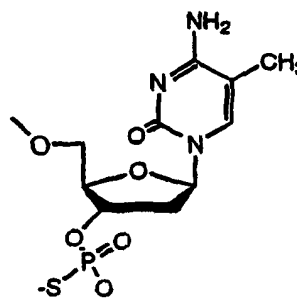
5-(1-丙炔基)
胞嘧啶硫代磷酸酯



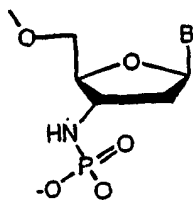
5-(1-丙炔基)
尿嘧啶硫代磷酸酯



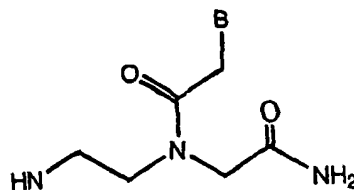
2'-氟代-核糖
核苷磷酸二酯



5-甲基胞嘧啶
硫代磷酸酯



2'-脱氧核糖
核苷-N3'-P5'氨基磷酸酯



聚酰胺核酸

图 2b

(c)

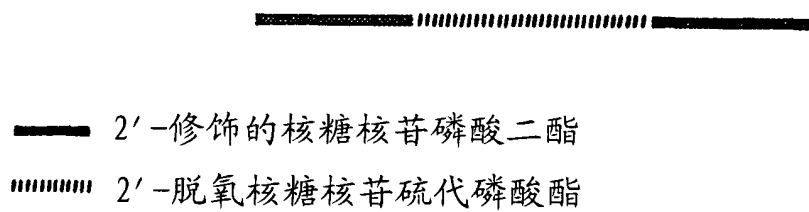


图 2c

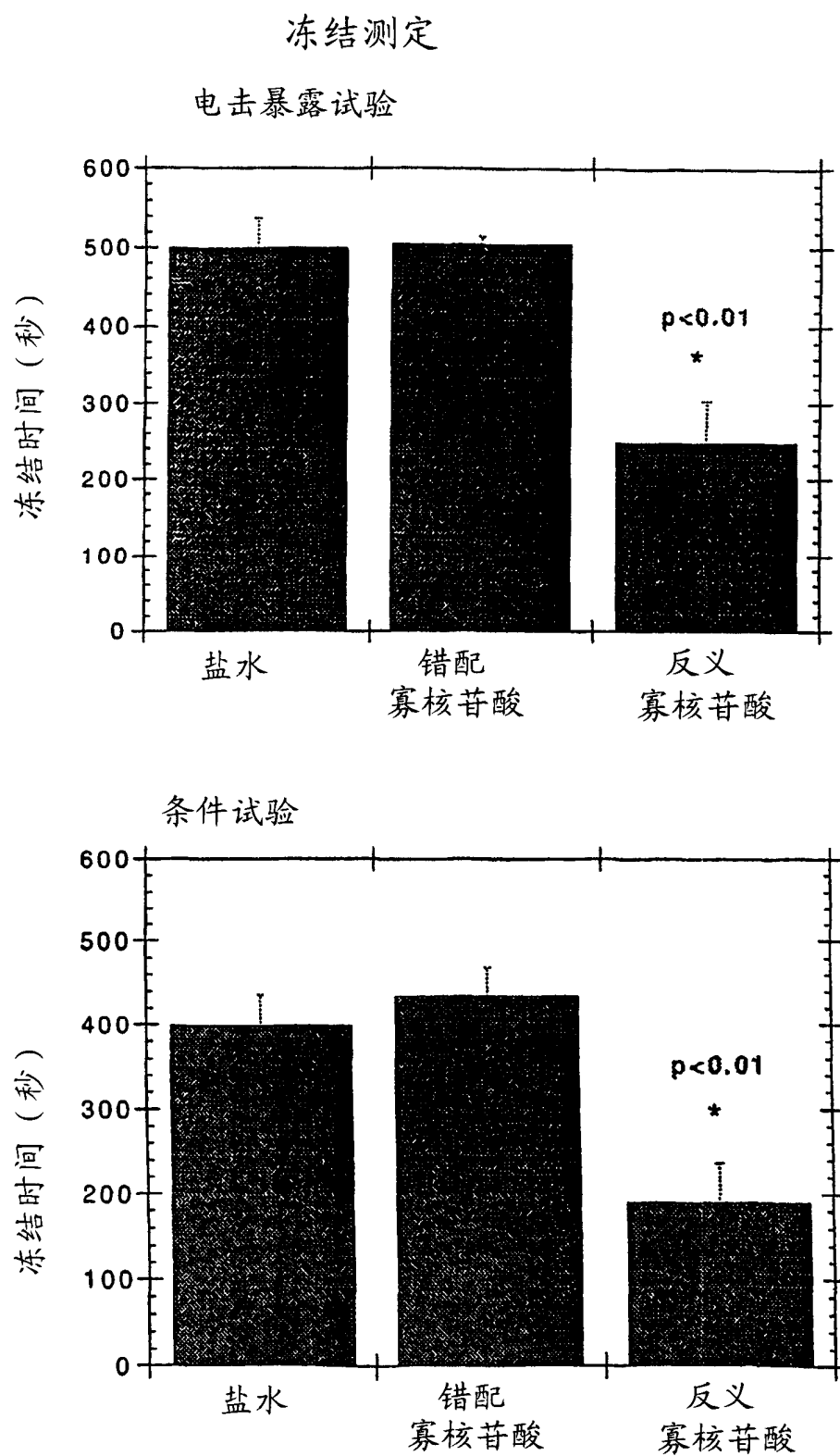


图 3a

在冻结测定中CRF2受体的抑制

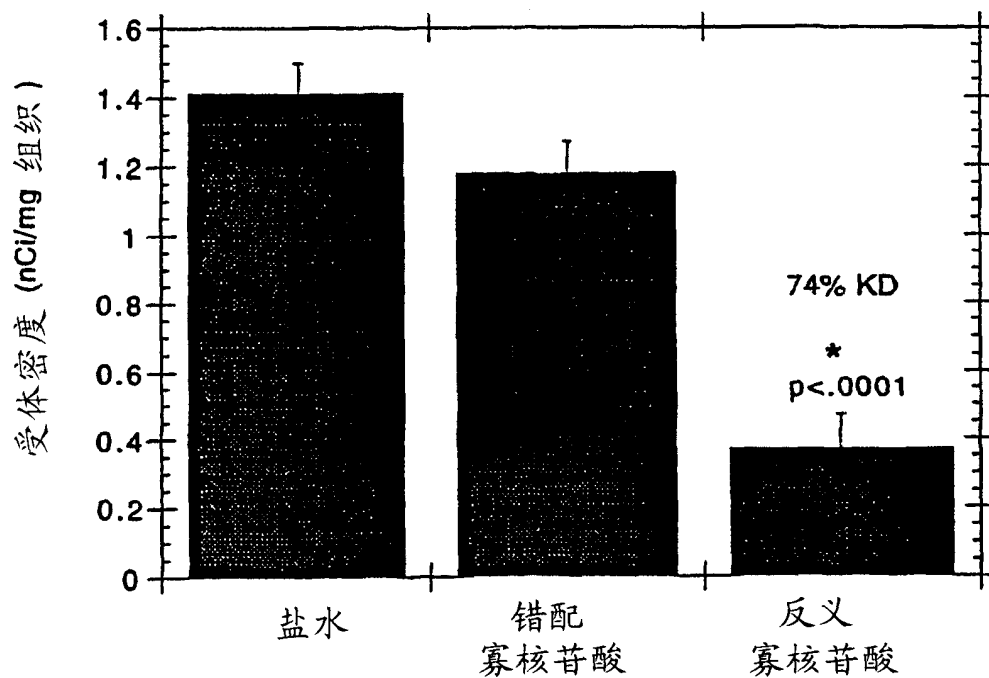


图 3b

抬高的正迷宫测定

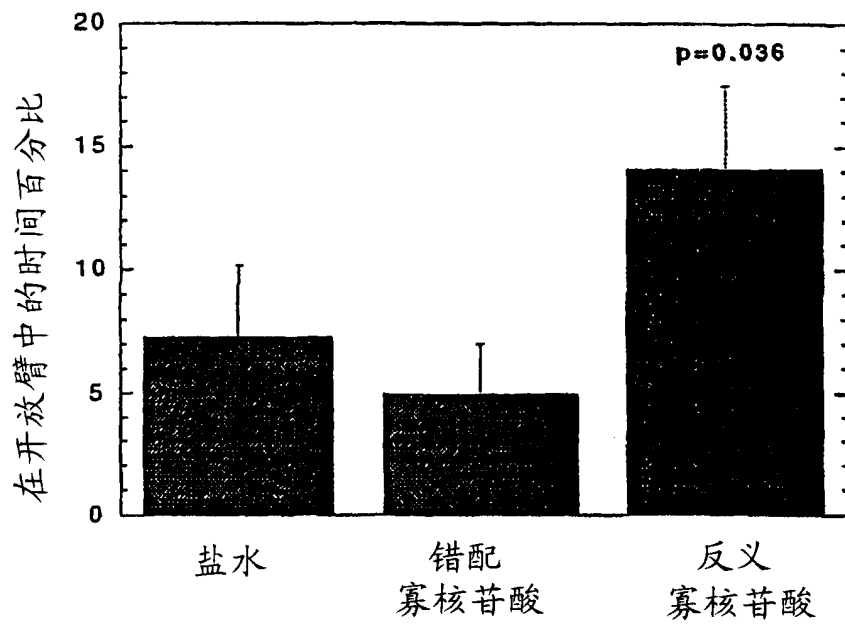


图 4a

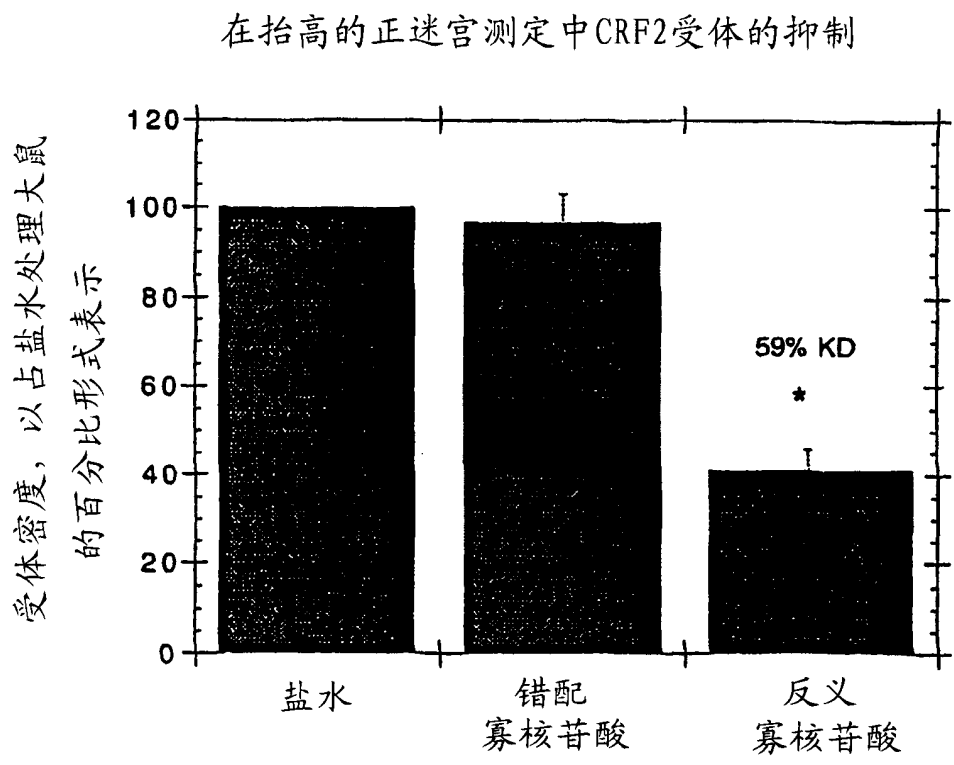
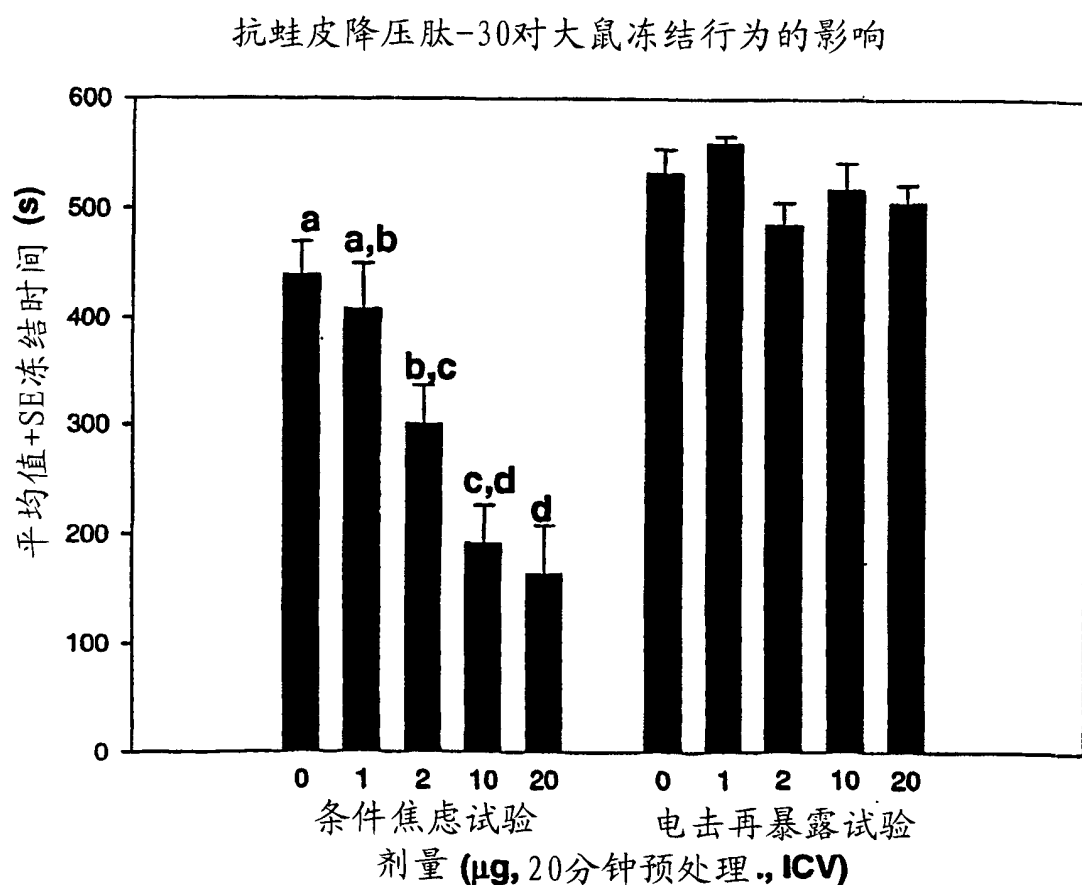


图 4b



在条件焦虑试验和电击再暴露试验中，在第1天对未进行过试验的大鼠进行电击，在第2天进行检验。仅仅在第2天给予蛙皮降压肽-30。在条件焦虑试验中发现了剂量反应抗焦虑作用，而在电击再暴露试验中未发现（每个柱上的不同字母表示显著差异， $P < 0.05$ 或更低）

图 5

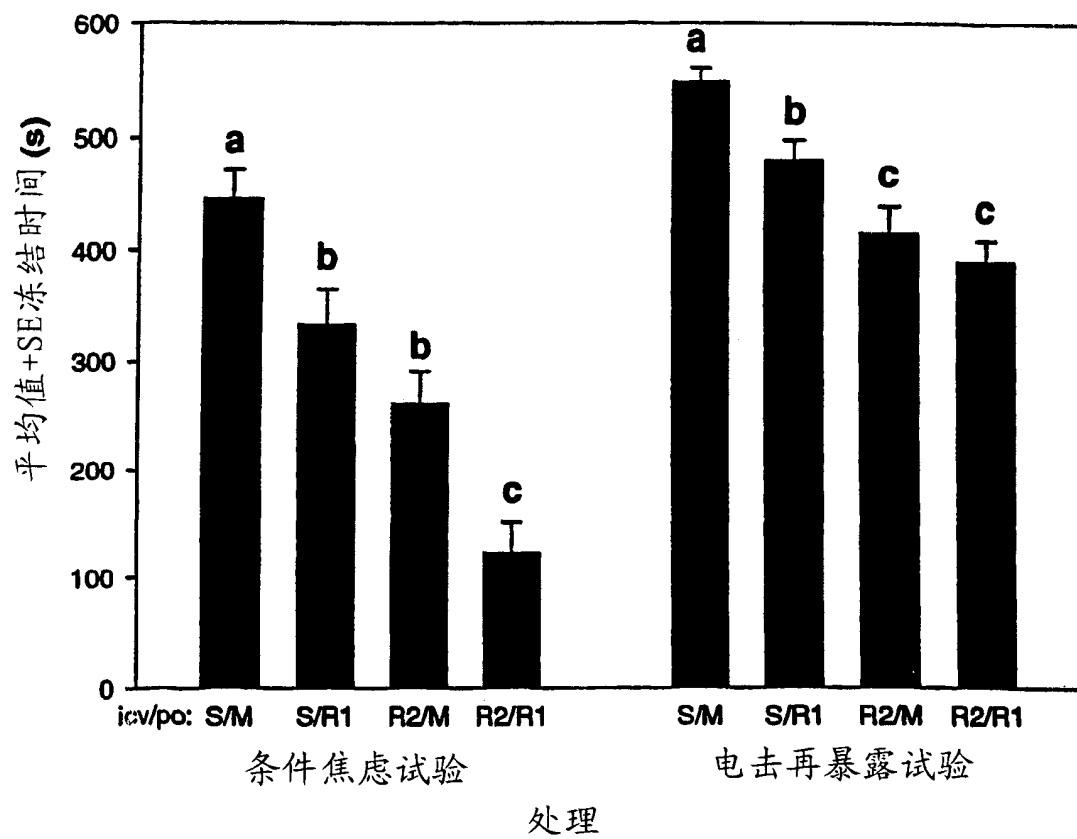


图 6

S=盐水

M=Methocel

R₁=CRF₁拮抗剂

R₂=CRF₂受体反义寡核苷酸