



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1829794 B

(45) 授权公告日 2011.06.08

(21) 申请号 200480021747.X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2004.08.05

C12N 15/11 (2006.01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

60/493,043 2003.08.05 US

60/512,003 2003.10.16 US

WO 02068637 A2, 2002.09.06, 摘要, 权利要求 1、2、14 — 16、24、30、34、52、65、68, 说明书第 5 页倒数第 5 — 3 行、第 6 页第 8 — 10 行、第 51 页第 2 段, 表 6 的 ID:20602, 表 11 的 ID:32671, 附图 1.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2006.01.26

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2004/025335 2004.08.05

审查员 吴汀晨

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/030800 EN 2005.04.07

(73) 专利权人 AVI 生物制药公司

地址 美国俄勒冈州

(72) 发明人 P·L·伊韦森 D·A·斯丹

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

权利要求书 2 页 说明书 25 页  
序列表 8 页 附图 5 页

(54) 发明名称

寡核苷酸类似物和用于治疗黄病毒感染的方法

(57) 摘要

本发明公开了抑制黄病毒在动物细胞中复制的方法, 和用于该方法中的寡核苷酸化合物。该寡核苷酸类似物 (i) 具有核酸酶抗性主链, (ii) 能够被细胞吸收, (iii) 含有 8-40 个核苷酸碱基, (iv) 具有至少 8 个碱基与黄病毒正向链 RNA 基因组区域互补的序列, 该基因组区域包括 SEQ ID NO:1-4 的至少一部分。感染黄病毒的细胞暴露于类似物, 有效地在细胞中形成由病毒 ssRNA 和寡核苷酸构成的异源双链结构, 该异源双链结构通过至少 45°C 的解离 T<sub>m</sub> 来表征, 并在病毒 5' 和 3' 环化序列之间具有断裂的碱基对。

1. 用于抑制动物细胞中黄病毒复制的寡核苷酸类似物,所述寡核苷酸类似物由吗啉代亚基和含磷的亚基间连接物构成,该连接物连接一个亚基的吗啉代氮和邻接亚基的 5' 环外碳,其特征为:

- (i) 核酸酶抗性主链,
- (ii) 能够被病毒感染的动物细胞吸收,
- (iii) 含有 8-40 个核苷酸碱基,

(iv) 具有至少 8 个碱基与黄病毒正向链 RNA 基因组区域的互补,该 RNA 基因组区域包括选自 SEQ ID NO :1-4 的基因组 5' 或 3' 环化序列的至少一部分,和

(v) 能够与黄病毒 ssRNA 基因组形成异源双链结构,该异源双链结构的特征为具有至少 45°C 的解离  $T_m$ ,并在病毒 5' 和 3' 环化序列之间具有断裂的碱基对。

2. 如权利要求 1 的类似物,其含有与选自 SEQ ID NO :3 或 4 的病毒基因组 3' 环化序列的至少一部分互补的序列。

3. 如权利要求 1 的类似物,其含有能够与病毒序列形成异源双链结构的序列,该病毒序列包括选自 SEQ ID NO :1 或 2 的基因组 5' 环化序列的一部分以及选自 SEQ ID NO :3 或 4 的基因组 3' 环化序列的互补部分。

4. 如权利要求 1 的类似物,用于抑制圣路易脑炎病毒、河谷脑炎病毒、西尼罗病毒、库宁病毒、日本脑炎病毒、黄热病毒、登革热病毒-1、2、3 和 4 型、西尼罗病毒中任一种的复制,其具有至少 8 个碱基与病毒正向链 RNA 基因组区域互补的序列,该基因组区域包括分别选自 SEQ ID NO :1 或 3 的基因组 5' 或 3' 环化序列的至少一部分。

5. 如权利要求 4 的类似物,其含有与 SEQ ID NO :3 互补的序列。

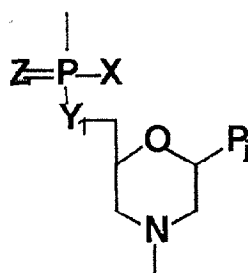
6. 如权利要求 4 的类似物,其含有能够与包括鉴别为 SEQ ID NO :1 的基因组 5' 环化序列的一部分和鉴别为 SEQ ID NO :3 的基因组 3' 环化序列的互补部分的序列形成异源双链结构的序列。

7. 如权利要求 1 的类似物,用于抑制蝉传脑炎病毒、Powassen 病毒、羊跳跃病病毒、森林出血热病毒和 Alkurma 病毒中任一种的复制,其具有至少 8 个碱基与病毒正向链 RNA 基因组区域互补的序列,该基因组区域包括分别选自 SEQ ID NO :2 或 4 的基因组 5' 或 3' 环化序列的至少一部分。

8. 如权利要求 7 的类似物,其含有与 SEQ ID NO :4 的至少一部分互补的序列。

9. 如权利要求 7 的类似物,其含有能够与包括鉴别为 SEQ ID NO :2 的基因组 5' 环化序列的一部分和鉴别为 SEQ ID NO :4 的基因组 3' 环化序列的互补部分的序列形成异源双链结构的序列。

10. 如权利要求 1 的类似物,其中吗啉代亚基通过二氨基磷酸酯连接物来连接,根据结构:



其中  $Y_1 = 0, Z = 0, P_j$  是通过碱基特异性氢键有效结合多核苷酸中碱基的嘌呤和嘧啶碱基对部分, 以及 X 是烷基、烷氧基、硫烷氧基、氨基和烷基氨基。

11. 如权利要求 1 的类似物, 用于治疗西尼罗病毒, 其中细胞暴露于其的寡核苷酸类似物含有鉴别为 SEQ ID NO :22 或 26 的序列。

12. 如权利要求 1 的类似物, 用于治疗 1-4 型登革热病毒, 其中细胞暴露于其的寡核苷酸类似物含有鉴别为 SEQ ID NO :24 或 27 的序列。

13. 如权利要求 10 中所述的类似物, 其中所述烷基氨基是二烷基氨基。

14. 权利要求 1 的寡核苷酸类似物在制备治疗动物细胞中的黄病毒感染的药物组合物中的用途, 其中通过将细胞暴露于该组合物而实现所述治疗。

15. 如权利要求 14 中所述的用途, 其中所述组合物适于口服给药。

16. 如权利要求 14 中所述的用途, 其用于治疗哺乳动物患者中的西尼罗河病毒感染, 其中所述寡核苷酸类似物含有被鉴定为 SEQ IDNO :22 或 26 的序列。

17. 如权利要求 14 中所述的用途, 其用于治疗哺乳动物患者中的 1-4 型登革热病毒感染, 其中所述寡核苷酸类似物含有被鉴定为 SEQ IDNO :24 或 27 的序列。

18. 如权利要求 14 中所述的用途, 其用于治疗人类患者中的黄病毒感染, 其中所述暴露包括将所述寡核苷酸类似物给予到该患者, 并进一步包括监控液体中出现的由寡核苷酸类似物和病毒基因组互补部分组成的异源双链。

## 寡核苷酸类似物和用于治疗黄病毒感染的方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于治疗动物中黄病毒感染的寡核苷酸类似物,使用该类似物的抗病毒方法,以及监控类似物与病毒基因组靶位点结合的方法。

### [0002] 参考文献

[0003] 以下参考文献涉及背景和本发明中使用的方法和实验方案。

[0004] Agrawal, S., S. H. Mayrand 等, (1990). " Site-specific excision from RNA by RNase H and mixed-phosphate-backbone oligodeoxy nucleotides. " (通过 RNA 酶 H 从 RNA 切除特异性位点和混合磷酸酯主链寡脱氧核苷酸) Proc Natl Acad Sci USA 87(4) : 1401-5。

[0005] Blommers, M. J., U. Pieleles 等, (1994). " An approach to the structuredetermination of nucleic acid analogues hybridized to RNA. NMR studies of a duplex between 2' -OMe RNA and an oligonucleotide containing a single amide backbone modification. " (与 RNA 杂交的核酸类似物的结构测定方法。2' -OMe RNA 和含有单个酰胺主链修饰寡核苷酸之间的双链的 NMR 研究) Nucleic Acids Res 22(20) : 4187-94。

[0006] Bonham, M. A., S. Brown 等, (1995). " An assessment of the antisense properties of RNase H-competent and steric-blocking oligomers. " (耐 RNA 酶 H 的反义特性和空间阻断寡聚物的评价) Nucleic Acids Res 23(7) : 1197-203。

[0007] Boudvillain, M., M. Guerin 等, (1997). " Transplatin-modified oligo(2' -O-methyl ribonucleotide)s: a new tool for selective modulation of gene expression. " (反铂修饰的寡(2' -O-甲基核糖核苷酸): 选择性调节基因表达的新工具) Biochemistry 36(10) : 2925-31。

[0008] Brinton, M. A. (2002). " The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. " (西尼罗病毒的分子生物学: 西半球新的入侵者) Annu Rev Microbiol 56 : 371-402。

[0009] Corver, J., E. Lenches 等, (2003). " Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. " (黄热病毒 RNA 中 RNA 复制和环化需要的顺式作用序列的精确图谱) J Virol 77(3) : 2265-70。

[0010] Dagle, J. M., J. L. Littig 等, (2000). " Targeted elimination of zygotic messages in *Xenopus laevis* embryos by modified oligonucleotides possessing terminal cationic linkages. " (通过具有末端阳离子连接物的修饰寡核苷酸来靶向消除 *Xenopus laevis* 胚胎中的合子信息) Nucleic Acids Res 28(10) : 2153-7。

[0011] Ding, D., S. M. Grayaznov 等, (1996) " An oligodeoxyribonucleotide 3' --> 5' phosphoramidate duplex forms an A-type helix in solution. " (寡脱氧核糖核

苷酸 N3' --> P5' 氨基磷酸酯双链在溶液中形成 A-型螺旋) Nucleic Acids Res 24(2) : 354-60。

[0012] Enserink, M. (2002). " INFECTIOUS DISEASE :West Nile ' sSurprisingly Swift Continental Sweep. " ( 传染病 :西尼罗河令人惊讶地快速大陆席卷 ) Science 297(5589) :1988-1989。

[0013] Felgner, P. L., T. R. Gadek 等, (1987). " Lipofection :a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. " ( 脂质转染 :高效、脂质介导的 DNA 转染方法 ) Proc Natl Acad Sci USA 84(21) :7413-7。

[0014] Gait, M. J., A. S. Jones 等, (1974). " Synthetic-analogues of polynucleotides XII. Synthesis of thymidine derivatives containing an oxyacetamido-or an oxyformamido-linkage instead of a phosphodiester group. " ( 多核苷酸的合成类似物 XII. 含有替代磷酸二酯基团的氧乙酰胺基 - 或氧甲酰胺基 - 连接物的胸苷衍生物的合成 ) J Chem Soc [Perkin1] 0(14) :1684-6。

[0015] Gee, J. E., I. Robbins 等, (1998). " Assessment of high-affinity hybridization, RNase H cleavage, and covalent linkage in translation arrest by antisense oligonucleotides. " ( 翻译中通过反义寡核苷酸停止的高亲和性杂交、RNA 酶 H 裂解和共价连接的评定 ) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 8(2) :103-11。

[0016] Gritsun, T. S., V. A. Lashkevich 等, (2003). " Tick-borne encephalitis. " ( 蜱传脑炎 ) Antiviral Res 57(1-2) :129-46。

[0017] Hahn, C. S., Y. S. Hahn 等, (1987). " Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. " ( 黄病毒 RNA 3' 未反义片段中的保守序列和潜在的环化序列 ) J Mol Biol 198(1) :33-41。

[0018] Hayes, E. B. 和 D. J. Gubler (1992). " Dengue and dengue hemorrhagic fever. " ( 登革热和登革热出血热 ) Pediatr Infect Dis J 11(4) :311-7。

[0019] Khromykh, A. A., H. Meka 等, (2001). " Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. " ( 环化序列在黄病毒 RNA 复制中的实质性作用 ) J Virol 75(14) :6719-28。

[0020] Lesnikowski, Z. J., M. Jaworska, (1990). " Octa(thymidine methanephosphonates) of partially defined stereochemistry : synthesis and effect of chirality at phosphorus on binding to pentadecadeoxyriboadenylic acid. " 部分定义立体化学的八 ( 胸苷甲基磷酸酯 ) : 磷结合十五脱氧核糖核酸的手性合成和效果 ) Nucleic Acids Res 18(8) :2109-15。

[0021] Leyssen, P., E. De Clercq 等, (2000). " Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. " ( 治疗黄病毒科感染的远景 ) Clin Microbiol Rev 13(1) :67-82, table of contents ( 目录 )。

[0022] Li, W., Y. Li 等, (2002). " Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and

facilitate virus replication." (与西尼罗病毒互补负链 RNA 相互作用并帮助病毒复制的细胞蛋白 TIA-1 和 TIAR) J Virol 76(23):11989-2000。

[0023] Mertes, M. P. 和 E. A. Coats(1969). " Synthesis of carbonate analogs of dinucleosides. 3' -Thymidinyl 5' -thymidinyl carbonate, 3' -thymidinyl 5' -(5-fluoro-2' -deoxyuridinyl)carbonate, and 3' -(5-fluoro-2' -deoxyuridinyl)5' -thymidinyl carbonate." (二核苷的碳酸酯类似物的合成。3'-胸苷 5' 胸苷碳酸酯, 3'-胸苷 5' -(5-氟-2'-脱氧尿苷)碳酸酯, 和 3'-(5'-氟-2' 脱氧尿苷)5'-胸苷碳酸酯) J Med Chem 12(1):154-7。

[0024] Mongkolsapaya, J., W. Dejnirattisai 等, (2003). " Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever." (登革热出血热中原始抗原的罪过和凋亡) Nat Med 9(7):921-927。

[0025] Morrey, J. D., D. F. Smee 等, (2002). " Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus." (对抗西尼罗病毒纽约分离物的活性抗病毒化合物的鉴定) Antiviral Res 55(1):107-16。

[0026] Mouton, H. M., M. H. Nelson 等, (2004). " Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides." (与富含精氨酸肽缀合的反义吗啉代寡聚物的细胞吸收) Bioconjug Chem 15(2):290-9。

[0027] Proutski, V., E. A. Gould 等, (1997). " Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences." (黄病毒 3' 未反义片段的二级结构:相似性和差异) Nucleic Acids Res 25(6):1194-202。

[0028] Scherret, J. H., M. Poidinger 等, (2001). " The relationships between West Nile and Kunjin viruses." (西尼罗病毒和库宁病毒之间的相互关系) Emerg Infect Dis 7(4):697-705。

[0029] Ternovoi, V. A., G. P. Kurzhukov 等, (2003). " Tick-borne encephalitis with hemorrhagic syndrome, Novosibirsk region, Russia, 1999." (伴随出血症状的蜱传脑炎, 新西伯利亚地区, 俄罗斯, 1999) Emerg Infect Dis 9(6):743-6。

[0030] Toulme, J. J., R. L. Tinevez 等, (1996). " Targeting RNA structures by antisense oligonucleotides." (通过反义寡核苷酸瞄准 RNA 结构) Biochimie 78(7):663-73。

[0031] You, S., B. Falgout 等, (2001). " In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5' - and 3' -terminal regions that influence RNA structure." (从外源登革热病毒 RNA 模板的体外 RNA 合成需要影响 RNA 结构的 5'- 和 3'- 端片段之间远程的相互作用) J Biol Chem 276(19):15581-91。

[0032] Zeng, L., B. Falgout 等, (1998). " Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3' -SL in the dengue type 2 virus genome required for replication." (登革热 2 型病毒基因组中保守 3'-SL 内复制需要的特异性核苷酸的鉴定) J Virol 72(9):7510-22。

[0033] 发明背景

[0034] 黄病毒科 (Flaviviridae) 是一组基因组大小为 9-15kb 的单、正向链的 RNA 病毒。它们是约 40-50nm 的包膜病毒。黄病毒科中是包括原型黄热病毒 (YFV)、四种血清型登革热病毒 (DEN-1、DEN-2、DEN-3 和 DEN-4)、日本脑炎病毒 (JEV)、河谷脑炎病毒 (MVEV)、库宁病毒 (KUN)、圣路易脑炎病毒 (SLEV)、西尼罗病毒 (WNV)、蝉传脑炎病毒 (TBEV) 和约 70 种其它导致疾病病毒的黄病毒属。

[0035] 大多数黄病毒感染用支持性方法来治疗如抗发热来抑制发烧, 流体、抗生素用于二次细菌感染, 按照需要的呼吸支持等。使用病毒唑具有对抗多种 RNA 病毒的显著抗病毒化疗活性并已经证明在流行性感冒病毒、呼吸合胞体病毒、拉萨热病毒和汉坦病毒感染的治疗中是有效的。病毒唑结合各种干扰素药物用于治疗丙肝病毒感染。然而, 病毒唑对抗黄病毒如登革热和黄热的体外和体内活性是非常弱的 (Leyssen, De Clercq 等, 2000)。

[0036] 尽管四十年的研究工作, 仍然没有获得对抗大多数黄病毒如登革热的安全而有效的疫苗。尽管存在有效对抗黄热病毒和日本脑炎病毒的疫苗, 这些病毒仍然导致全世界范围内的重要疾病。病毒的流行病学使发展有效登革热疫苗的工作复杂化。尽管对任何给定登革热血清型进行免疫诱导了对该特定血清型的长期免疫性, 但是不同血清型的第二次感染可以诱导登革出血热和登革热休克综合征 (DHF/DSS), 这是严重形式的登革热感染, 相关的死亡率超过 20% (Mongkolsapaya, Dejnirattisai 等, 2003)。

[0037] 考虑到黄病毒感染相关疾病的严重程度及其在动物尤其是在人类中的渗透力, 需要治疗感染了黄病毒宿主的治疗化合物和方法。

[0038] 发明概述

[0039] 一方面, 本发明包括抑制黄病毒在动物细胞包括哺乳动物和鸟细胞中复制的方法。在该方法实施中, 将细胞暴露于寡核苷酸类似物, 该寡核苷酸类似物是 (i) 具有核酸酶抗性的主链, (ii) 能够被细胞吸收, (iii) 含有 8-40 个核苷酸碱基, 和 (iv) 具有至少 8 个碱基的序列, 该序列与病毒正向链 RNA 基因组区域互补, 该区域包括被鉴定为 SEQ ID NO : 1-4 序列之一的至少一部分, SEQ ID NO : 1-4 中的每个序列表示两个粗类黄病毒之一的病毒基因组 5' 或 3' 环化序列。优选实施方案中, 寡核苷酸类似物具有与病毒基因组正向链中 3' 环化序列 SEQ ID NO : 3 或 4 的至少部分互补的序列。暴露于化合物有效地在细胞中形成由病毒 ssRNA 和寡核苷酸构成的异源双链结构, 该异源双链结构通过至少 45°C 的解离 Tm 来表征, 并在病毒 5' 和 3' 环化序列之间具有断裂的碱基对, 如通过细胞中病毒复制的抑制来证明。

[0040] 一实施方案中, 类似物与 SEQ ID NO : 1-4 序列之一的全部或部分互补。另一实施方案中, 类似物含有能够与病毒序列形成异源双链结构的序列, 该序列包括基因组 5' 环化序列的一部分和基因组 3' 环化序列的互补部分。

[0041] 为了用于抑制圣路易脑炎病毒、河谷脑炎病毒、西尼罗病毒、库宁病毒、日本脑炎病毒、黄热病毒、登革热病毒 -1、2、3 和 4 型, 或西尼罗病毒中任一种的复制, 细胞暴露于其的寡核苷酸类似物具有至少 8 个碱基与包括 SEQ ID NO : 1 或 3 优选 SEQ ID NO : 3 的至少部分的病毒正向链 RNA 基因组互补的序列。另一实施方案中, 寡核苷酸类似物含有能够与包括被鉴定为 SEQ ID NO : 1 的基因组 5' 环化序列的一部分和被鉴定为 SEQ ID NO : 3 的基因组 3' 环化序列的互补部分的序列形成异源双链结构的序列。

[0042] 为了用于抑制蝉传脑炎病毒、Powassan 病毒、羊跳跃病病毒、森林出血热病毒和

Alkhurma 病毒中任一种的复制,细胞暴露于其的寡核苷酸类似物具有至少 8 个碱基与包括 SEQ ID NO:2 或 4 优选 SEQ IDNO:4 的至少部分的病毒正向链 RNA 基因组互补的序列。另一实施方案中,寡核苷酸类似物含有能够与包括被鉴定为 SEQ ID NO:2 的基因组 5' 环化序列的一部分和被鉴定为 SEQ ID NO:4 的基因组 3' 环化序列的互补部分的序列形成异源双链结构的序列。

[0043] 优选的寡核苷酸类似物具有不带电的或基本上不带电的主链,如图 2A-2G 中所示的结构之一,且优选由通过基本上不带电的、含磷的主链连接的 8-25 吗啉代亚基构成,如图 3A-3D 所示的结构。一个优选的类似物具有图 3B 所示的结构,其中 X 是  $\text{NR}_2$ ,其中 R 是 H 或  $\text{CH}_3$ ,以及 Y 和 Z 各自是 O。

[0044] 为了治疗动物患者包括人患者中的黄病毒感染,通过非肠道或口服给药于感染的患者将感染的细胞暴露于寡核苷酸类似物。该方法可以进一步包括监控体液来监控由寡核苷酸类似物与病毒基因组互补部分构成的异源双链的出现。

[0045] 另一方面,本发明包括用于抑制动物细胞中黄病毒复制的寡核苷酸类似物。该类似物通过以下来表征:(i) 核酸酶抗性主链,(ii) 能够被动物细胞吸收,(iii) 含有 8-40 个核苷酸碱基,(iv) 具有至少 8 个碱基与黄病毒正向链 RNA 基因组区域互补的序列,该基因组区域包括被鉴定为 SEQ ID NO:1-4 的病毒基因组序列之一的至少一部分,每个序列表示两大类黄病毒之一中的病毒基因组 5' 和 3' 环化序列,和 (v) 能够与黄病毒 ssRNA 基因组形成异源双链结构,该异源双链结构通过至少 45°C 的解离  $T_m$  来表征,并在病毒 5' 和 3' 环化序列之间具有断裂的碱基对,如通过细胞中病毒复制的抑制来证明。类似物具有各种实施方案,对于类似物在抗病毒治疗中的用途包括上述的那些。

[0046] 当结合附图一起阅读以下本发明的详述时,本发明的这些和其它目的和特征将变得更全面清楚。

[0047] 附图简述

[0048] 图 1 显示了黄病毒基因组的 5' - 端,3' - 端部分,具有所示的二级结构,通过图上部的框符来表示 5' 和 3' 环化序列;和

[0049] 图 2A-2G 显示了各种具有不带电主链的寡核苷酸类似物的主链结构;

[0050] 图 3A-3D 显示了实例吗啉代寡核苷酸的重亚基部分,特指 3A-3D。

[0051] 图 4A 和 4B 是 TBEV 和 WNV 对提高 TBEV 反义(图 4A)和干扰序列反义(图 4B)浓度的响应图;和

[0052] 图 5A-5D 是四种登革热病毒血清型对 DEN 反义(SEQ ID NO:27)的响应图。

[0053] 发明详述

[0054] I. 定义

[0055] 除非另外指出,在此所用的以下术语具有以下的意思:

[0056] 术语“寡核苷酸类似物”指的是具有以下特征的寡核苷酸:(i) 修饰的主链结构,例如,主链不同于天然寡-和多核苷酸中发现的标准磷酸二酯键,和(ii)任意地,修饰的糖部分,例如吗啉代部分,而不是核糖或脱氧核糖部分。类似物支持能够通过 Waston-Crick 碱基将氢键结合至标准多核苷酸碱基的碱基,其中类似物主链存在碱基,允许在寡核苷酸类似物分子和标准多核苷酸(例如,单链 RNA 或单链 DNA)中的碱基之间以序列特异性方式的氢键结合。优选的类似物是具有基本上不带电的、含磷主链的那些。

[0057] 寡核苷酸类似物中基本上不带电的、含磷的主链是一类,其中大部分亚基连接物,例如 60-100%,在生理 pH 下是不带电的,并含有单个磷原子。类似物含有 8 至 40 个亚基,通常约 8-25 个亚基,优选约 12 至 25 个亚基。类似物可以具有与靶序列的确切互补的序列或接近的互补性,如下所限定的。

[0058] 寡核苷酸类似物的“亚基”指的是类似物的一个核苷酸(或核苷酸类似物)单体。术语可以指带有或不带连接的亚基间连接物的核苷酸单体,尽管,当指“带电的亚基”时,电荷通常位于亚基间连接物中(例如,磷酸酯或硫代磷酸酯连接物)。

[0059] “吗啉代寡核苷酸类似物”是由图 3A-3D 所示形式的吗啉代亚基结构构成的寡核苷酸类似物,其中 (i) 结构通过含磷的连接物连接在一起,一至三个原子长,将一个亚基的吗啉代氮连接到邻接亚基的 5' 环外的碳,和 (ii)  $P_i$  和  $P_j$  是通过碱基特异性氢键有效结合至多核苷酸中碱基的嘌呤或嘧啶碱基对部分。嘌呤或嘧啶碱基对部分通常是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶或胸腺嘧啶。吗啉代寡聚物的合成、结构和结合特征详述于 U. S. 专利 No. 5, 698, 685, 5, 217, 866, 5, 142, 047, 5, 034, 506, 5, 166, 315, 5, 521, 063 和 5, 506, 337 中,所有在此引入作为参考。

[0060] 图 3B 所示的亚基和连接物用于六原子重复单体主链,如图 3B 中所示的(其中六个原子包括:吗啉代氮、连接的磷原子、将磷原子连接 5' 环外碳的原子(通常为氧)、5' 环外碳,以及下一个吗啉代环的两个碳原子)。这些结构中,将 5' 环外吗啉代碳原子连接至磷基团的原子  $Y_1$  可以是硫、氮、碳,或优选氧。从磷悬挂的 X 部分是不干扰碱基特异性氢键结合的任何合适基团。优选的 X 基团包括氟、烷基、烷氧基、硫烷氧基和烷基氨基,包括环胺,所有这些都可能是不同取代的,只要碱基特异性氢键没有断裂。烷基、烷氧基和硫烷氧基优选包括 1-6 个碳原子。烷基氨基优选指的是低级烷基(C1 至 C6)取代,环胺优选 5- 至 7- 元氮杂环,任意地含有 1-2 个另外的选自氧、氮和硫的杂原子。Z 是硫或氧,并优选为氧。

[0061] 优选吗啉代寡聚物是二氨基磷酸酯连接的吗啉代寡聚物,在此称为 PMO。这样的寡聚物由图 3B 中所示的吗啉代亚基结构构成,其中  $X = NH_2$ 、NHR 或  $NR_2$ (其中 R 是低级烷基,优选甲基),  $Y = O$ , 以及  $Z = O$ , 且  $P_i$  和  $P_j$  是通过碱基特异性氢键有效结合多核苷酸中碱基的嘌呤或嘧啶碱基对部分。还优选具有交替二氨基磷酸酯连接物的结构,其中图 3B 中,  $X =$  低级烷氧基,如甲氧基或乙氧基,  $Y = NH$  或  $NR$ , 其中 R 是低级烷基,以及  $Z = O$ 。

[0062] 术语“取代的”,尤其对于烷基、烷氧基、硫烷氧基或烷基氨基基团,指的是用含有杂原子的取代基替代碳上的氢原子,如卤素、羟基、烷氧基、硫醇、烷基硫、氨基、烷基氨基、亚氨基、氧(酮)、氮、氰基或各种酸或酯如羧基的、磺基的或磷酸的。还可以指用烷基、羰基或其它含碳基团替代杂原子(如胺氢)上的氢原子。

[0063] 如在此所用的术语“靶”,对于病毒基因组 RNA,指的是病毒基因组 RNA,可以包括是病毒复制链的正向链 RNA,或在产生正向链 RNA 多个新拷贝中形成的负向链或反义链。

[0064] 术语“靶序列”指的是寡核苷酸类似物对准的靶 RNA 的一部分,即寡核苷酸类似物将与其杂交的序列。靶序列包括鉴定为 SEQ IDNO:1-4 序列之一的至少一部分,这些序列表示两大类黄病毒之一的基因组 5' 或 3' 环化序列,如下将进一步讨论。如将看到的,靶序列可以是病毒基因组的邻接区域,或可以由基因组 5' 和 3' 环化序列两者的互补片段构成。

[0065] 术语“靶向序列”是与 RNA 基因组中的靶序列互补或基本上互补的寡核苷酸类似物中的序列。类似物的全部序列或只有一部分可以与靶序列或全部类似物序列的一部分互

补。例如,具有 20 个碱基的类似物中,只有 8-12 个是靶向序列。通常,靶向序列由类似物中邻接的碱基形成,但或者可以由非邻接的序列形成,例如,来自类似物的反向端,当放于一起时构成跨越靶序列的序列。如将看到的,选择靶和靶向序列使得类似物和病毒基因组的结合起作用来破坏或防止通过基因组中 5' - 和 3' - 环化序列来形成的 RNA 二级结构的形成。

[0066] 靶和靶向序列描述为当在反平行的构象中发生杂交时是相互“互补的”。双链多核苷酸可以与另一多核苷酸“互补”。靶向可以具有与靶序列的“接近的”或“基本上的”互补性,且对于本发明的目的仍然起作用。优选,本发明中所用的寡核苷酸类似物与 10 个核苷酸靶序列至多具有一个错配,优选 20 个至多一个错配。或者,所用的反义寡聚物与在此所指的实例靶向序列具有至少 90% 的序列同源性,优选至少 95% 的序列同源性。

[0067] 如果寡聚物在生理条件下与靶杂交,与靶多核苷酸“特异性杂交”的寡核苷酸类似物具有基本上高于 45°C 的  $T_m$ , 优选至少 50°C, 通常 60-80°C 或更高。这样杂交优选对应于严谨杂交条件。在给定的离子强度和 pH,  $T_m$  是 50% 靶序列与互补多核苷酸杂交的温度。再次,这样的杂交可以使用与靶序列“接近”或“基本上”互补的以及具有精确互补性的反义寡聚物来进行。

[0068] “核酸酶抗性”寡聚分子(寡聚物)指的是其主链以非杂交的或杂交的形式对核酸酶裂解基本上是抗性的分子;通过体内普通的胞外和胞内核酸酶;即,在体内寡聚物暴露于其的核酸酶正常条件下,寡聚物显示少的或没有核酸酶裂解。

[0069] “异源双链”指的是寡核苷酸类似物和靶 RNA 互补部分之间的双链体。“核酸酶抗性异源双链”指的是通过反义寡聚物与其互补靶结合形成的异源双链,使得异源双链对体内的胞内和胞外核酸酶降解基本上是抗性的,如 RNA 酶 H, 其能够切割双链 RNA/RNA 或 RNA/DNA 复合物。

[0070] “涉及靶 RNA 的碱基特异性胞内结合”指的是寡核苷酸类似物与细胞内靶 RNA 序列的特异性结合。这样结合的碱基特异性是序列特异性的。例如,单链多核苷酸可以特异性结合序列中互补的单链多核苷酸。

[0071] 瞄准感染 ssRNA 病毒的反义寡聚物的“有效量”,是有效降低感染病毒的复制速率,和 / 或病毒载量,和 / 或与病毒感染相关症状的量。

[0072] 如在此所用的,术语“体液”包括从患者获得的各种样品类型,包括尿液、唾液、血浆、血液、脊髓液或其它生物来源的样品,如皮肤细胞或皮肤碎片,并可以指悬浮于其中的细胞或细胞碎片,或液体介质及其溶质。

[0073] 在测试测量和对照测量之间形成比较时使用术语“相对量”。反应中形成复合物的试剂的相对量是与和对照样本反应的量相比较的和测试样本反应的量。可以在相同测试中分开运行对照样本,或可以是相同样品的一部分(例如,组织切片中围绕恶性部分的正常组织)。

[0074] 个体或细胞的“治疗”是发明提供的任何类型的作为改变个体或细胞天然过程的方式。治疗包括但不限于例如给药药物组合物,可以预防性地进行,或疾病开始或接触病原后进行。相关的术语“提高的治疗结果”对于诊断为感染特定病毒的患者,指的是减缓或减少病毒的生长或病毒载量,或与该特定病毒感染相关的可检测症状。

[0075] 当药剂通过被动扩散以外的机理穿过细胞膜进入细胞时,药剂是“通过哺乳动物

主动吸收的”。药剂可以得到运输,例如,通过“主动运输”,指的是药剂通过例如 ATP- 依赖性运输机理穿过哺乳动物细胞膜的运输,或通过“易化运输”指的是反义药剂通过需要药剂和运输蛋白结合的运输机理穿过细胞膜的运输,运输蛋白然后帮助结合的药剂穿过膜。对于主动运输和易化运输两者,寡核苷酸类似物优选具有基本上不带电的主链,如下所限定的。或者,反义化合物可以配制成复合形式,如具有与阴离子脂质或脂质体复合的阳离子主链的药剂,其可以通过胞吞机理吸收入细胞中。例如类似物在其 5' 或 3' 端可以和富含精氨酸的肽例如 HIV TAT 蛋白质或多精氨酸缀合,来帮助运输进靶宿主细胞中。

#### [0076] II. 靶黄病毒

[0077] 本发明是基于通过将感染黄病毒的细胞暴露于寡聚类似物可以获得黄病毒复制的有效抑制的发现,该寡聚类似物 (i) 瞄准黄病毒 RNA 的 3' -CS (或 5' -CS) 区域,和 (ii) 具有物理和药物动力学特征,其使得在类似物和宿主细胞内的病毒 RNA 之间可以有效地相互作用。一方面,类似物可以用于治疗病毒感染的哺乳动物患者。

[0078] 本发明瞄准包括以下所述病毒的黄病毒科的黄病毒属的成员。黄病毒基因、以及其中的成员的各种物理、形态学和生物学特征,可以发现于,例如, *Textbook of Human Virology*, R. Belshe 编辑,第 2 版, Mosby, 1991, 以及一个或多个上述参考文献中。以下概述每种黄病毒成员的一些关键的生物学、病理和流行病学特征。

#### [0079] 黄病毒复制

[0080] 黄病毒是小的、包膜的病毒,含有单的、正向链基因组 RNA,约 10,500 核苷酸长,含有短的 5' 和 3' 非翻译区域 (NTR),单个长的开放阅读框,5' 帽子,和非多腺苷酸化的 3' 末端。已经报道了多数黄病毒基因组的完整核苷酸序列,包括所有四种登革热血清型,黄热病毒,日本脑炎病毒,西尼罗病毒和蝉传脑炎病毒。所有黄病毒蛋白质通过由宿主以及病毒编码的蛋白酶介导的精确加工过程,来源自单长多蛋白质。单个开放阅读框编码的十个基因产物被翻译成多蛋白质,这些多蛋白质依次由以下组成:壳体 (C)、前膜 (prM, 其就在病毒粒子从细胞释放之前被加工成膜 (M))、包膜 (E) 和七个非结构 (NS) 蛋白: NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5 (Leyssen, De Clercq 等, 2000 ; Brinton 2002)。

[0081] 所有蚊子传播的黄病毒共有保守的 RNA 序列和结构 (Proutski, Gould 等, 1997 ; Zeng, Falgout 等, 1998 ; Li, Li 等, 2002)。黄病毒 3' -NTR 和 5' NTR 的序列比较和 RNA 二级结构预测已经揭示了数个短的、完全保守的序列并表明 3' -端区域 (约 90 个碱基) 可以折叠成保守的茎环结构 (Hahn, Hahn 等, 1987)。保守的茎环结构已经显示在许多正向链 RNA 病毒中对病毒复制是重要的。黄病毒中黄病毒 3' 茎环结构初级序列不是完全保守的,但二级结构是完全保守的。短的保守序列 (3' -CS, SEQ ID NO :3) 已经被鉴定为位于保守茎环结构的上游 (即, 5' 方向中)。已经提出 3' -CS 和基因组 5' 端保守序列 (5' -CS, SEQ ID NO :1) 之间的互补性导致大范围分子内 RNA 相互作用和基因组 RNA 的环化 (Hahn, Hahn 等, 1987 ; You, Falgout 等, 2001 ; Corver, Lenches 等, 2003)。最近的实验表明这些序列间的碱基对对于库宁病毒复制子的 RNA 复制是必需的 (Khromykh, Meka 等, 2001)。计算机产生的预测的登革热病毒 5' -CS 和 3' -CS 之间的二级结构显示于图 1 中 (Khromykh, Meka 等, 2001), 5' -CS 和 3' -CS 显示于图上部的框符中,并在此分别以 SEQ ID NO :1 和 3 来识别。还已经在蝉传脑炎病毒基因组的 5' 和 3' 端区域鉴定了短的互补序列 (分别为 SEQ ID NO :2 和 4), 并提出与潜在环化序列相似的功能 (Khromykh, Meka 等, 2001)。

**[0082] 登革热病毒**

[0083] 尽管在不同的病毒中黄病毒传播和感染的病理学是非常可变的，登革热病毒作为该属的说明性实例。登革热病毒是节肢动物传播的病毒（虫媒病毒）并通过伊蚊属（*Aedes*）的蚊子传播给人，主要是 *A. aegypti* 和 *A. albopictus*。病毒导致呈现高烧、头疼、肌肉和关节酸痛以及皮疹的疾病。一些情况中，通常在儿童中，看到更严重形式的感染，伴随登革热出血热 / 登革热休克综合征（DHF/DSS），以严重出血、血管通透性或两者导致休克为特征。已经感染给定登革热血清型并随后感染不同血清型的个体对于 DHF/DSS 的风险显著更高。没有诊断和迅速的医疗干涉，DHF/DSS 的突然发作和快速进展是致命的。

[0084] 通过四种登革热病毒中的一种或多种引起的地方性登革热在许多热带和亚热带地区是主要的公众健康问题。有时涉及百万个体的突发登革热流行病持续发生。就全球发病率和死亡率而言，登革热病毒是节肢动物传导病毒中最显著的组，估计每年有一亿例登革热发生，包括 500,000 例 DHF/DSS。随着全球人口的增长，尤其遍布热带的人群城市化，以及持续蚊子控制方法的缺乏，登革热的蚊子载体已经将它们的分布扩充至遍布热带、亚热带和一些温带地区，将登革热感染的风险带至超过全世界人口的一半。现代飞机旅行和人移民已经帮助了登革热血清型的全球分布，使得目前登革热的多个血清型在许多地区是地方病。伴随这，在过去 15 年中登革热流行病的频率和 DHF/DSS 的发病率提高。例如，东南亚，DHF/DSS 是儿童住院和死亡的主要原因（Hayes 和 Gubler, 1992）。

[0085] 如下所述的，黄病毒属的许多其它成员也是严重疾病如黄热、日本脑炎、圣路易脑炎、澳大利亚脑炎和蝉传脑炎的病原。

**[0086] 黄热病毒**

[0087] 尽管黄热病毒的有效疫苗已经获得了很多年，该病毒继续是出血热的主要原因，死亡率高达 50%。在世界范围内，每年存在 200,000 估算的黄热病例（30,000 死亡）。在无黄热的国家中还发生少量的输入病例（WHO, Fact Sheet 100, 2001）。

**[0088] 日本脑炎病毒**

[0089] 该虫媒病毒是世界范围内病毒性脑炎的主要原因。在亚洲每年约发生 50,000 病例并导致高死亡率（30%）或存活患者的永久性神经逻辑后遗症（30%）。JEV 导致的流行性发作在亚洲热带和亚热带的人口密集地区继续形成严重的公众健康问题。通过 *Culex* 属的蚊子种传播，疾病临床表现为脑炎，通常是严重的和幼童和老年人中的高死亡率。JEV 还感染家畜如猪和马。最近二十年中，在日本、韩国和台湾使用灭活 JEV 疫苗免疫已经使疾病处于控制下。然而，由于制造疫苗的高成本，在最需要的那些国家不容易获得（CDC, Japanese Encephalitis FactSheet, 2001）。

**[0090] 河谷脑炎病毒和库宁病毒**

[0091] 这些病毒是“澳大利亚脑炎”的病原体，澳大利亚脑炎是通过无菌性脑膜炎和 / 或脑炎来表征的临床综合征。两者都是虫媒病毒，通过 *Culex* 蚊子传播，且在北澳大利亚是地方病。河谷脑炎综合征几乎总是包括发热的突然发作；厌食和头痛。几天后体验到脑机能障碍，接着是昏迷和死亡。很少能从脑炎综合征中恢复而没有发生一些残留的精神或机能残疾。库宁病毒，与西尼罗非常相关的病毒（Scherret, Poidinger 等, 2001），导致与河谷脑炎病毒临床上相似的疾病，但通常严重性较低，报道的人感染频率较少。

**[0092] 西尼罗病毒**

[0093] 近些年出现的西尼罗病毒 (WNV), 另一种节肢动物传播的黄病毒, 不仅对人而且对其它动物物种如马和鸟是致命健康的威胁。1999 年, 纽约是北美第一个报道西尼罗病毒感染病例的地方。之前仅在非洲、中东和东欧发现人的西尼罗病毒感染。通过蚊子将病毒传播给人和几个动物物种, 蚊子从感染的鸟上获得病毒。西尼罗病毒对公众健康仍然是持续的威胁。流行病学和病毒学研究表明活的病毒继续存在于蚊子和鸟群中。在纽约、新泽西和康涅狄格和许多其它东部的州中执行蚊子控制方法, 仍然诊断到新的西尼罗病毒病例。目前, 已经几乎在美国每个州中发现了西尼罗病毒 (Enserink, 2002)。

[0094] 西尼罗病毒感染的人中, 每 150 至 300 个中约 1 个将变成患病的, 伴有发烧、肌痛和可能的皮疹。有症状的那些患者中, 约 10-15% 将具有脑膜炎 (头痛、颈强直) 或脑炎 (精神状态的改变、外周神经异常、肌肉虚弱) 的表现。几乎全部死亡发生在年龄超过 50 岁的人群中。中枢神经系统感染患者中的死亡率为 5% 至 11%。死亡是由于需要供氧支持的中枢神经系统延长的机能障碍并导致继发性并发症。延长的神经症状发生在西尼罗病毒导致的脑炎存活者中。

#### [0095] 圣路易脑炎病毒

[0096] 尽管最近没有圣路易脑炎病毒的流行, 其仍然是美国西部的地方病, 且是严重疾病包括无菌性脑膜炎和 / 或脑炎的诱因。另一种虫媒病毒, SLEV 是 U. S. 最近爆发的 1975 年和 1990 年发生的最大发作的不可预测和间歇流行病的原因。

#### [0097] 蝉传脑炎

[0098] 蝉传脑炎 (TBE) 是发生在欧洲和亚洲大部分的最危险的人感染之一。病原是蝉传脑炎病毒 (TBEV)。相信每年在俄罗斯 TBEV 导致至少 11,000 人病例的脑炎, 包括 89-166 例死亡, 以及欧洲的其它部分每年约 3000 例 (Ternovoi, Kurzhukov 等, 2003)。TBE 病毒通常是剧毒的, 伴随轻度或无症状至严重脑炎的症状, 死亡率达 40%。相同组中的相关病毒, 羊跳跃病病毒 (LIV) 和 Powassan 病毒 (POW), 也导致人脑炎, 但很少达到流行病的规模。相同组中的两种另外病毒, 森林出血热病毒 (KFD) 和 Alkhurma 病毒 (ALK), 和 TBE 复合病毒非常相关, 并易于导致脑炎以外的致命出血热 (Gritsun, Lashkevich 等, 2003)。

#### [0099] III. 病毒靶区域和靶向序列

[0100] 优选的靶序列是邻接的那些并包括正向链黄病毒 RNA 5' -CS 或 3' -CS 序列的至少一部分, 例如, 2-8 个碱基。如上所述的, 为了启动 RNA 复制, 这些保守的环化序列 (CS) 通过紧密结合病毒 RNA 的 3' 和 5' 片段近端在病毒复制中起重要作用 (Hahn, Hahn 等, 1987; Khromykh, Meka 等, 2001)。从公知来源如 NCBI 基因库数据库可以获得各种黄病毒基因组序列。或者, 本领域技术人员可以在公开的文献中发现许多患者病毒的序列, 例如, 寻找公开指定病毒序列信息的参考文献。一旦获得完整或部分病毒序列, 即可鉴定病毒的 5' 和 3' 序列。

[0101] 相应病毒基因组列中含有 5' -CS 和 3' -CS 末端的实例病毒核酸序列的基因库参考列于以下的表 1 中。将认识到这些序列仅仅是黄病毒属中其它序列的说明, 因为可以从文献或专利来源的可获得基因序列数据库中获得的。以下的序列, 如 SEQ ID NO :5-15 识别的, 也列于说明书结尾的表 3 中。保守的 5' -CS 和 3' -CS 以粗体显示于表 1 中并作为 SEQ ID NO :1-4 列于表 1 中。

[0102] 另一组实例靶序列是 SEQ ID NO :5-15 的补体; 即具有识别序列 5-15 之一

的互补反平行序列。例如, SEQ ID NO :5(5'-GUCAAUAUGC UAAAACGCGG-3') 的补体是 5'-CCGCGUUUUAGCAUAUUGAC-3'。

[0103] 表 1. 实例 5'-CS 和 3'-CS 靶序列

[0104]

病毒	基因库登录 No.	5'-CS 靶 Ncts.	SEQ ID NO.	靶序列 (5' 至 3')
圣路易脑炎 河谷脑炎 西尼罗 库宁	M16614 AF161266 M12294 D00246	138-157 135-154 136-155 115-134	5	GUCAAUAUGCUA AAACGCGG
日本脑炎	M18370	135-154	6	AUCAUAUGCUG AAACGCGG

[0105]

黄热	X03700	155-174	7	GUCAAUAUGGUA CGACGAGG
登革热 -1 型 登革热 -2 型 登革热 -4 型	M87512 M19197 M14931	115-135 131-151 133-153	8	CUUCAAUAUGC UGAAACGCG
登革热 -3 型	M93130	129-149	9	CUAUAUAUGC UGAAACGCG
蝉传脑炎 Powassen 羊跳跃病 森林出血热 Alkhurma	U27495 L06436 Y07863 X74111 AF331718	108-129 81-102 105-126 94-115 90-111	10	CAGCUUAGGAGA ACAAGAGCUG
西尼罗	M12294	132-151	11	GGCUGCAAUAU GCUAAAAC

圣路易脑炎 日本脑炎	M18370 AF161266	10861-10882 10899-10920	12	AACAGCAUUAUG ACACCUGGGA
河谷脑炎	M12294	10853-10874		
西尼罗	AY27450	10914-10934		
库宁	5			
黄热	X03700	10745-10767	13	UGGGACCAUAUU GACGCCAGGGA
登革热 -1 型	M87512	10609-10630	14	AAACAGCAUUAU
登革热 -2 型	M19197	10595-10616		GACGCUGGGA
登革热 -3 型	M93130	10588-10609		
登革热 -4 型	M14931	10540-10561		
蝉传脑炎	U27495	11057-11078	15	CGGUUCUUGUUC
Powassen	L06436	10755-10776		CCUGAGCC
羊跳跃病	Y07863	1087-10808		

[0106] 靶序列和靶向序列之间互补性的程度足以形成稳定的双链体。反义寡聚物和靶 RNA 序列的互补型区域可以短为 8-11 个碱基,但是优选 12-15 个碱基或更多,例如 12-20 个碱基,或 12-25 个碱基。约 15 个碱基的反义寡聚物通常足够长来具有病毒基因组中的独特互补序列。此外,需要最小长度的互补碱基来获得必不可少的结合  $T_m$ ,如下所述的。

[0107] 长 40 个碱基的寡聚物是合适的,其中至少最小数量的碱基,例如,8-11 个,优选 12-15 个碱基,是与靶序列互补的。然而,通常,寡聚物长度低于约 30,优选低于 25,更优选 20 或更少碱基时,细胞中的易化吸收或主动吸收是最佳的。对于 PMO 寡聚物,以下进一步描述,结合稳定性和吸收的最佳平衡通常发生在 13-23 个碱基的长度。

[0108] 寡聚物可以是与病毒核酸靶序列 100% 互补的,或可以包括错配,例如,来适应变体,只要寡聚物和病毒核酸靶序列之间形成的异源双链足够稳定来抵抗细胞核酸酶的作用和体内发生的其它方式的降解。以下讨论对核酸酶裂解较少敏感的寡聚物主链。如果存在,错配朝向杂交双链末端的动摇比中间低。根据充分理解的双链稳定性原理,允许的错配数量将取决于寡聚物的长度、双链中 G : C 碱基对的百分比以及双链中错配的位置。尽管这样的反义寡聚物不是必需与病毒核酸靶序列 100% 互补,其有效地与靶序列稳定而特异性地结合,使得核酸靶的生物活性例如病毒 RNA 的环化得到调节。

[0109] 寡聚物和靶序列之间形成的双链体的稳定性是结合  $T_m$  和双链对细胞酶裂解敏感性的函数。可以通过常规方法测量对于互补 - 序列 RNA 的反义化合物的  $T_m$ ,如 Hames 等, Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, 1985, pp. 107-108 中所述的那些。每个反义寡

聚物具有对于互补-序列 RNA 的高于体温优选高于 45°C 的结合  $T_m$ 。优选 60-80°C 或更高的  $T_m$ 。根据公知原理,可以通过提高双链中 C : G 配对碱基的比例和 / 或通过提高异源双链的长度(碱基对)来提高对于基于互补 RNA 杂交的寡聚化合物的  $T_m$ 。同时,为了优化细胞吸收的目的,可以有利地限制寡聚物的大小。出于该原因,通常优选在 15 个或更少碱基的长度显示高  $T_m$ (50°C 或更高)的化合物,胜于对于高  $T_m$  值需要 20+ 碱基的那些。

[0110] 以下的表 2 列出了对准黄病毒属所选病毒的 5'-CS 和 3'-CS 的实例靶向序列。通过 SEQ ID NO :16-27 识别的这些序列,与上述 SEQ IDNO :5-15 的序列是互补和反平行的,(SEQ ID NO :19 与 SEQ ID NO :8 互补,与 SEQ ID NO :9 互补带有一个错配,SEQ ID NO :27 瞄准登革热 2 型病毒 3'-环化序列)。如上所述,寡核苷酸类似物中的实际靶序列可以只与表 1 中相应靶序列的部分互补,包括 SEQ ID NO :1 或其互补的 SEQ ID NO :3,或 SEQ ID NO :2 或其互补的 SEQ ID NO :4 中的部分序列。

[0111] 一般地说,本发明包括,如实例靶向序列,至少 8 个碱基与病毒正向链 RNA 基因组区域互补的序列,该 RNA 基因组区域包括基因组 5' 或 3' 环化序列 SEQ ID NO :1 或其互补的 SEQ ID NO :3 的至少一部分,用该 5'-CS 识别黄病毒组,或该 RNA 基因组包括 SEQ ID NO :2 其互补的 SEQ ID NO :4 的至少一部分,用该 5'-CS 识别黄病毒组。优选实施方案中,靶向序列与用于一组黄病毒的 SEQ ID NO :3 识别的基因组 3' 环化序列和用于另一组黄病毒的 SEQ ID NO :4 的至少一部分互补。靶向序列在 CS 序列中含有足够数量的碱基来破坏病毒 5' 和 3' 环化序列之间的碱基对,即破坏如图 1 中所示环化框符中的配对碱基茎二级结构。破坏该结构需要的靶向序列的数目优选至少 2-4 个碱基与两个互补环化序列之一互补,加上与邻接靶序列碱基互补的碱基。

[0112] 一实施方案中,靶向序列包括与所选病毒全部的 5' 或 3' 环化序列即 SEQ ID NO :1-4 中的任一互补的碱基。

[0113] 另一实施方案中,靶向序列与对应的两个环化序列的互补区域互补。例如,图 1 序列盒上部显示的含有两个环化序列互补 4-碱基部分的 8-碱基靶序列具有不连续的序列 5'CAUA...UAUG3'。有效结合并破坏该序列的靶向序列将具有序列 5'CATA...TATG3',其中“...”可以是直接的 5'-3' 亚基连接,或间隔物,如 PEG 衔接物,用来调整靶序列中的不连续性。

[0114] 后一实施方案表示反义寡核苷酸类似物的特定情况,根据本发明的另一方面,对准在 RNA 中形成“茎”二级结构序列的互补部分,并为了破坏茎结构的目的包括如靶向碱基,与茎结构中两条链互补的碱基。

[0115] 表 2 对抗黄病毒 5'-CS 和 3'-CS 的实例靶向序列

[0116]

病毒	基因库登录 No.	5'-CS 靶向序列 (5' 至 3')	SEQ ID NO.

圣路易脑炎 河谷脑炎 西尼罗  库宁	M16614 AF161266 M12294 D00246	CCGCGTTTTAGCATATTGAC	16
日本脑炎	M18370	CCGCGTTTCAGCATATTGAT	17
黄热	X03700	CCTCGTCGTACCATATTGAC	18
登革热-1型 登革热-2型  登革热-3型  登革热-4型	M87512 M19197 M93130  M14931	CGCGTTTCAGCATATTGAAAG	19
蝉传脑炎 Powassen 羊跳跃病  森林出血热  Alkurma	U27495 L06436 Y07863 X74111  AF331718	CAGCTCTTGTTCTCCTAAGCTG	20
西尼罗	M12294	GTTTTAGCATATTGACAGCC	21

[0117]

病毒	基因库登 录 No.	5' -CS 靶向序列 (5' 至 3')	SEQ ID NO.
圣路易脑炎 日本脑炎 河谷脑炎 西尼罗 库宁	M18370 AF161266 M12294 AY274505	TCCCAGGTGTC AATATGCTGTT	22
黄热	X03700	TCCCTGGCGTCAATATGGTCCCA	23
登革热-1型 登革热-2型 登革热-3型  登革热-4型	M87512 M19197 M93130 M14931	TCCCAGGTCAATATGCTGTTT	24

[0118]

蝉传脑炎 Powassen 羊跳跃病	U27495 L06436 Y07863	GGCTCAGGGAGAACAAGAACCG	25
西尼罗	M12294	CAGGTGTCAATATGCTGTTTTG	26
登革热-2型	M19197	CCCAGCGTCAATATGCTG	27

[0119] 注意到表 1 中的靶序列表示为含有尿嘧啶 (U) 碱基特征的 RNA, 表 2 中的靶向序列为含有胸腺嘧啶碱基特征的 DNA。将理解靶向序列碱基可以是通常的 DNA 碱基或其类似物, 例如, 尿嘧啶, 能够与靶序列 RNA 碱基 Watson-Crick 碱基配对。

#### [0120] IV. 反义寡聚物

##### [0121] A. 性质

[0122] 如上所述, 反义寡聚物具有对准病毒基因组靶部分的碱基序列, 靶部分优选 5'-CS 或 3'-CS。此外, 例如当给药于感染动物患者中感染的宿主细胞时, 寡聚物能够有效瞄准感染病毒。当寡聚化合物 (a) 具有通过哺乳动物细胞主动吸收的能力, 和 (b) 一旦吸收, 与靶 ssRNA 形成具有高于约 50°C T<sub>m</sub> 的双链体时, 就满足了该需要。

[0123] 如以下将讨论的, 通过细胞吸收的能力需要寡聚物主链是基本上不带电的, 且优选, 寡聚物结构作为穿过细胞膜的主动运输或易化运输的底物来识别。寡聚物和靶 RNA 形成稳定双链体的能力还将依赖于寡聚物主链, 以及上述的因素, 反义寡聚物对于靶的长度和互补性程度, G : C 对 A : T 碱基对的比例, 以及任何错配碱基的位置。反义寡聚物抵抗细胞核酸酶的能力提高了存活和药剂至细胞质的最终传送。

[0124] 以下公开了测试任何所给的, 基本上不带电的主链满足这些需要的能力的方法。

##### [0125] A1. 通过细胞的主动吸收或易化吸收

[0126] 如果以游离 (非复合的) 形式给药, 反义化合物通过易化运输或主动运输穿过宿主细胞膜由宿主细胞吸收, 或如果以复合形式给药通过胞吞机制来吸收。

[0127] 在其中以游离形式给药的情况中, 反义化合物应当是基本上不带电的, 意味着其大部分亚基间的连接物在生理 pH 是不带电的。在本发明的支持中进行的实验表明少量的净电荷, 例如, 对于 15- 至 20- 个碱基的寡聚物 1-2 个净电荷, 实际上可以提高细胞吸收特定的具有基本上不带电主链的寡聚物。寡聚物自身可以携带电荷, 例如, 在主链连接物中, 或可以是末端带电的基团附加部分。优选, 带电连接物的数目不高于每四个不带电连接物一个带电连接物。更优选, 数量不多于每十个不带电连接物一个带电连接物, 或不多于每二十个不带电连接物一个带电连接物。一实施方案中, 寡聚物完全不带电。

[0128] 寡聚物还可以含有同时具有负电荷和正电荷的主链连接物, 只要相反的电荷以约相等的数目存在。优选, 寡聚物不包括任一种电荷多于 3-5 连续亚基的溢出。例如, 寡聚物可以具有给定数量的阴离子连接物, 例如, 硫代磷酸酯或 N3' → P5' 氨基磷酸酯连接物, 和相当数量的阳离子连接物, 如 N,N- 二乙二胺氨基磷酸酯 (Dagle, Littig 等, 2000)。净电荷优选是中性的或至多每个寡聚物 1-2 个净电荷。

[0129] 除了基本上或完全不带电, 反义试剂优选是能够将寡聚物易化运输或主动运输穿过细胞膜的膜运输系统的底物 (即, 膜蛋白)。可以通过寡聚物相互作用或细胞吸收的多个

测试之一来测定该特征,如下。

[0130] 第一个测试测定细胞表面受体的结合,通过测定细胞表面上寡聚化合物置换选定电荷的寡聚物或被选定电荷的寡聚物置换的能力,例如硫代磷酸酯寡聚物。用给定数量的测试寡聚物孵育细胞,测试寡聚物通常是荧光标记的,最终寡聚物浓度约 10-300nM。此后简短地,例如 10-30 分钟(测试寡聚物显著内在化可以发生之前),以递增增加的浓度加入置换化合物。如果测试化合物能够结合细胞表面受体,观察到置换化合物置换了测试化合物。如果置换化合物在  $10\times$  测试化合物浓度或更低浓度显示产生了 50% 置换,认为测试化合物作为置换化合物在细胞运输系统的相同识别位点结合。

[0131] 第二个测试测量细胞运输,通过测定测试化合物将标记的指示剂例如荧光指示剂运输进入细胞的能力。在以约 10-300nM 的终浓度加入的标记测试化合物存在下孵育细胞。孵育 30-120 分钟后,例如通过显微镜法检测细胞的胞内标记。显著胞内标记的存在证明测试化合物是通过易化运输或主动运输来运输的。

[0132] 还可以以复合物的形式给药反义化合物,其中复合剂通常是聚合物,例如,阳离子脂质,多肽,或非生物阳离子聚合物,具有与反义化合物上任何净电荷相反的电荷。形成复合物包括阴离子寡核苷酸和阳离子脂质或其它聚合物成分之间的双层复合物的方法是公知的。例如,脂质体组合物 Lipofectin® (Felgner, Gadek 等, 1987) 是广泛使用的,该组合物含有阳离子脂质 DOTMA (N-[1-(2,3-二油烯基氧)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵) 和中性磷脂 DOPE (二油烯基磷脂酰乙醇胺)。给药后,通过胞吞机理细胞吸收复合物,通常包括核内体体内的颗粒包囊。

[0133] 还可以以连接反义寡聚物 5' 或 3' 端的富含精氨酸肽的缀合物形式给药反义化合物。肽通常是 8-16 个氨基酸并由精氨酸和包括苯丙氨酸和半胱氨酸的其它氨基酸的混合物构成。细胞暴露于肽缀合寡聚物导致提高的胞内吸收和至 RNA 靶的传送 (Moulton, Nelson 等, 2004)。

[0134] 或者,并根据本发明的另一方面,可以通过简单体内测试来证实具有任何给定主链的寡聚物的必不可少的特征,其中将标记的化合物给药于动物,给药寡聚物数小时后从动物采取体液样品,测定带有靶 RNA 的异源双链的存在。该方法详述于以下的 D 小节。

#### [0135] A2. 对 RNA 酶 H 的实质性抗性

[0136] 已经提出两个总的机理来解释通过反义寡核苷酸对表达的抑制 (Agrawal, Mayrand 等, 1990 ; Bonham, Brown 等, 1995 ; Boudvillain, Guein 等, 1997)。第一个中,寡核苷酸和病毒 RNA 之间形成的异源双链作为 RNA 酶 H 的底物,导致病毒 RNA 的断裂。属于或提出属于该类别的寡核苷酸包括硫代磷酸酯、磷酸三酯和磷酸二酯(未修饰的“天然”寡核苷酸)。这样的化合物使寡聚物:RNA 双链体结构中的病毒 RNA 暴露于 RNA 酶 H 的水解,并因此失去功能。

[0137] 第二类寡核苷酸类似物,称为“空间阻断剂”或“RNA 酶 H 失活”或“RNA 酶 H 抗性”,没有观察到其作为 RNA 酶 H 的底物,相信其通过空间阻断靶 RNA 核细胞质的运输、间接、翻译或复制来起作用。这类包括甲基磷酸酯 (Toulme, Tinevez 等, 1996)、吗啉代寡核苷酸、肽核酸 (PNA's), 特定 2'-O-烯丙基或 2'-O-烷基修饰的寡核苷酸 (Bonham, Brown 等, 1995), 以及 N3' → P5' 氨基磷酸酯 (Ding, Grayaznov 等, 1996 ; Gee, Robbins 等, 1998)。

[0138] 可以测定测试寡聚物的 RNA 酶 H 抗性,通过与测试化合物形成 RNA:寡聚物双链

体,然后在标准测定条件下用 RNA 酶 H 孵育双链体,如 Stein 等中所述的。暴露于 RNA 酶 H 后,通过凝胶电泳或质谱监控完整双链体的存在或不存在。

### [0139] A3. 体内吸收

[0140] 根据本发明的另一方面,提供了简单、快速的测试来证实给定的反义寡聚物类型提供了上述需要的特征,即,高  $T_m$ , 通过宿主细胞主动吸收的能力以及对 RNA 酶 H 实质性的抗性。该方法是基于发现:当给药于哺乳动物患者时适当设计的反义化合物将与病毒 RNA 靶的互补部分形成稳定的异源双链,且异源双链随后出现在尿中(或其它体液中)。在共有的 U. S. 专利申请系列 No. 09/736, 920 中也给出了该方法的详细内容,发明名称为“检测靶 RNA 的非入侵方法”(非入侵方法),其所公开的在此引入作为参考。

[0141] 简短地,将含有待评价主链的、具有瞄准已知 RNA 的碱基序列的测试寡聚物注射入动物中,例如哺乳动物患者。反义寡聚物可以对准任何胞内 RNA,包括宿主 RNA 和感染病毒的 RNA。给药几个小时后(通常 8-72 小时),测定尿中反义-RNA 异源双链的存在。如果检测到异源双链,该主链适用于本发明的反义寡聚物中。

[0142] 如果适于哺乳动物患者,例如可以通过荧光或放射性标记物标记测试化合物来帮助随后的分析。测试可以在任何合适的固相或流体形式中。通常,固相测试包括首先将异源双链分析物结合固相支持物,例如,颗粒或聚合物或测试条带基质,并检测异源双链结合的存在/含量。流体相测试中,通常将分析物样品预处理来除去干扰样品成分。如果寡聚物是标记的,通过检测标记物来证实异源双链的存在。对于非标记的化合物,如果在固相形式中通过免疫测定来检测异源双链,或如果在溶液或悬浮液形式中通过质谱分析或其它已知方法来检测。

[0143] 当反义寡聚物与病毒基因组的病毒特异性区域(如包括黄病毒 5' -CS 和 3' -CS 的区域)互补时,该方法可被用于检测给定 ssRNA 病毒的存在。该方法还可被用于监控治疗方法过程中病毒量的减少。

### [0144] B. 实例寡聚物主链

[0145] 可以用于寡核苷酸类似物中的非离子连接物的实例显示于图 2A-2G 中。这些图中, B 表示通过碱基特异性氢键有效结合多核苷酸中碱基的嘌呤或嘧啶碱基对部分,优选选自腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和尿嘧啶。合适的主链结构包括碳酸酯(2A, R = O) 和氨基甲酸酯(2A, R = NH<sub>2</sub>) 连接物(Mertes 和 Coats, 1969 ;Gait, Jones 等, 1974) ;烷基膦酸酯和磷酸三酯连接物(2B, R = 烷基或 -O- 烷基)(Lesnikowski, Jaworska 等, 1990) ;酰胺连接物(2C)(Blommers, Pieleles 等, 1994) ;砜和磺胺连接物(2D, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>) (Roughten, 1995 ; McElroy, 1994) ;和硫甲乙酰基连接物(2E)(Matteucci, 1990 ;Cross, 1997)。后者报道了对于硫代磷酸酯反义化合物具有提高的双链体和三链体稳定性(Cross, 1997)。还报道了结构 2F 的 3' - 亚甲基 -N- 甲基羟氨基化合物(Mohan, 1995)。

[0146] 肽核酸(PNA)(图 2G)是 DNA 类似物,其中主链在结构上与脱氧核糖主链同态,由 N-(2- 氨基乙基) 甘氨酸单体构成,嘧啶或嘌呤碱基连接其上。PNA 含有遵照 Watson-Crick 碱基对规则与互补寡核苷酸杂交的天然嘧啶和嘌呤碱基,在碱基对识别方面,模拟 DNA(Egholm 等, 1993)。PNA 的主链通过肽键形成,而不是磷酸二酯键,使其很适于反义应用。主链是不带电的,形成 PNA/DNA 或 PNA/RNA 双链,其呈现高于正常的热稳定性。PNA 不被核酸酶和蛋白质酶识别。

[0147] 优选的寡聚物结构使用带有碱基对部分的基于吗啉代的亚基,通过不带电的连接物来连接,如上所述。特别优选的是基本上不带电的二氨基磷酸酯连接的吗啉代寡聚物,如图 3A-3D 所示的。吗啉代寡核苷酸,包括反义寡聚物,详述于,例如,共有的 U. S. 专利 No. 5,698,685,5,217,866,5,142,047,5,034,506,5,166,315,5,185,444,5,521,063 和 5,506,337 中,所有的在此特意引入作为参考。

[0148] 基于吗啉代亚基的重要特征包括:在寡聚形式中通过稳定的、不带电的主链连接物来连接的能力;支持核苷酸碱基的能力(例如,腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和尿嘧啶)使得形成的聚合物可以与互补碱基靶核酸杂交,包括靶 RNA,具有高  $T_m$ ,甚至 10-14 个碱基短的寡聚物;寡聚物主动运输进入哺乳动物细胞内的能力;以及寡聚物:RNA 异源双链抵抗 RNA 酶降解的能力。

[0149] 本发明反义寡核苷酸的实例主链结构包括图 3A-3D 中所示的  $\beta$ -吗啉代亚基型,每个通过不带电的、含磷的亚基连接物来连接。图 3A 显示了形成五个原子重复单体主链的含磷连接物,其中吗啉环通过 1-原子磷酸胺连接物来连接。图 3B 显示了产生 6-原子重复单体主链的连接物。该结构中,连接 5' 吗啉代碳和磷基团的原子 Y 可以是硫、氮、碳或优选氧。磷悬挂的 X 部分可以是氟、烷基或取代的烷基、烷氧基或取代的烷氧基、硫烷氧基或取代的硫烷氧基,或未取代的、单取代的或双取代的氮,包括环状结构,如吗啉或哌啶。烷基、烷氧基和硫烷氧基优选包括 1-6 个碳原子。Z 部分是硫或氧,且优选为氧。

[0150] 图 3C 和 3D 中所显示的连接物是设计为 7-原子单体长的主链。结构 3C 中, X 部分与结构 3B 中的一样, Y 部分是亚甲基、硫或优选氧。结构 3D 中, X 和 Y 部分与结构 3B 中的一样。特别优选吗啉代寡核苷酸包括由图 3B 中所示的吗啉代亚基结构构成的那些,其中  $X = NH_2$  或  $N(CH_3)_2$ ,  $Y = O$ , 以及  $Z = O$ 。

[0151] 如上所述,基本上不带电的寡聚物可以有利地包括有限数量的带电连接物,例如,每 5 个不带电连接物约 1 个带电连接物,更优选每 10 个不带电连接物约 1 个带电连接物。因此,少量带电的连接物,例如,带电的氨基磷酸酯和硫代磷酸酯,也可以并入寡聚物中。

[0152] 可以通过逐步固相合成来制备反义化合物,使用详述于以上所引参考文献中的方法。一些情况中,理想的是将另外的化学部分加入反义化合物中,例如来提高药物动力学或来帮助捕获或检测化合物。根据标准合成方法,通常将这样的部分共价连接寡聚物的末端。例如,聚乙二醇部分或其他亲水聚合物的加入,例如具有 10-100 单体亚基的聚合物,对提高稳定性是有用的。一个或多个带电基团,例如,阴离子带电基团如有机酸,可以提高细胞吸收。为了检测的目的,可以连接指示剂部分,如荧光素或放射性标记的基团。或者,连接寡聚物的指示剂标记可以是配体,如抗原或生物素,能够结合标记的抗体或抗生物素蛋白链菌素。在连接或修饰反义寡聚物部分的选择中,当然通常希望选择化合物组是生物可相容的和患者耐受的,而没有不良的副作用。

#### [0153] V. 病毒复制的抑制

[0154] 以上详述的反义化合物在抑制动物细胞中黄病毒的复制中是有用的,包括如人细胞的哺乳动物细胞和鸟细胞。一实施方案中,这样的抑制在治疗这些病毒对宿主动物的感染中是有效的。因此,一实施方案中,该方法包括将病毒感染的细胞接触有效抑制特定病毒复制的反义试剂。该实施方案中,将合适药物载体中的反义试剂给药于给定病毒感染的哺乳动物患者,例如,人和家畜动物。考虑到反义寡核苷酸阻止了宿主中 RNA 的生长。RNA 病

毒在数量上得到降低或消除,而对宿主的正常生长或发育具有较小的或没有有害影响。

#### [0155] A. 感染剂的鉴定

[0156] 可以通过本领域已知的方法例如血清学或培养方法,或通过使用本发明反义寡聚物的方法,来确定导致感染的特定病毒。

[0157] 血清学鉴定使用病毒样品或从生物样本分离的培养物,例如,患者的粪便、尿液、脑脊髓流体、血液等。通常通过本领域技术人员常用的方法,例如 ELISA 或蛋白质印迹,来进行检测病毒的免疫测定。此外,特定病毒株或物种特异性的单克隆抗体通常是可购得的。

[0158] 培养方法可以用于分离和鉴定特定类型的病毒,通过使用技术,包括但不限于,比较各种培养条件下的特征如生长速率和形态。

[0159] 鉴定感染患者中病毒感染剂的另一方法使用一种或多种瞄准黄病毒种谱型的反义寡聚物。可以使用瞄准任何特征性病毒 RNA 的序列。理想的靶序列优选 (i) 为主要的病毒科 / 属共有的,和 (ii) 在感染宿主例如人中未发现。大多数感染病毒的特征性核酸序列在公众数据库中可获得,可以作为特异性寡聚物设计的基础。

[0160] 对于每种寡聚物,进行以下的步骤:(a) 将寡聚物给药于患者;(b) 在所述给药后的选定时间,从患者获得体液样品;和(c) 测定样品中包括反义寡聚物和病毒基因组互补部分的核酸酶抗性异源双链的存在。对至少一种这样的寡聚物进行步骤(a)-(c),或根据鉴定病毒和病毒科所需要的进行。可以给药寡聚物并相继测定,或更方便地同时测定。基于包括反义寡聚物和给定已知病毒或病毒科的病毒基因组互补部分的异源双链的存在(或不存在)来鉴定病毒。

[0161] 优选,首先使用瞄准主要科的第一组寡聚物,接着通过与主要科 / 属中的特定属和 / 或种和 / 或菌株互补的选定寡聚物因此得到鉴定,这第二组寡聚物包括对准主要科 / 属中特定属和 / 或种和 / 或菌株的靶向序列。通常提供了数个不同的第二种寡聚物集合,即,用于第一阶段中测试的主要病毒科 / 属的集合。选择的序列是 (i) 对待测定的单个属 / 种 / 菌株是特异性的和 (ii) 在人中未发现。

#### [0162] B. 反义寡聚物的给药

[0163] 反义寡聚物至靶核酸的有效传送是治疗的一个重要方面。根据本发明,反义寡聚物传送的途径包括,但不限于,各种全身途径,包括口服和非肠道途径,例如,静脉内、皮下、腹膜内和肌内,以及吸入、经皮的和局部传送。可以由本领域技术人员来决定合适的途径,因为认识到治疗中患者的条件。例如,在治疗皮肤病毒感染中传送反义寡聚物的合适途径是局部传送,而治疗病毒呼吸感染的反义寡聚物传送是吸入。还可以将寡聚物直接传送到病毒感染的部位或至血流。

[0164] 可以在生理上可接受的任何方便载体中给药反义寡聚物。这样的组合物可以包括本领域技术人员使用的多种标准药物学上可接受载体中的任一种。实例包括但不限于盐水、磷酸盐缓冲的盐水(PBS)、水、含水乙醇、乳浊液,如油 / 水乳浊液或甘油三酸脂乳浊液、片剂和胶囊。合适生理学上可接受载体的选择将根据所选的给药方式而改变。

[0165] 一些情况中,可以使用脂质体来帮助反义寡核苷酸进入细胞的吸收。(参见,例如,Willams, S. A., Leukemia 10(12):1980-1989,1996;Lappalainen 等, Antiviral Res. 23:199,1994;Uhlmann 等, ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES:A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE, Chemical Reviews, Volume 90, No. 4, p. 544-584,1990;Gregoriadis, G., 第 14

章, *Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*, pp. 287-341, Academic Press, 1979)。还可以将水凝胶用作载体用于反义寡聚物给药, 例如, 如 W093/01286 中所述的。还可以在微球体和微粒中给药寡核苷酸。(参见, 例如, Wu, G. Y. 和 Wu, C. H., *J. Biol. Chem.* 262 :4429-4432, 1987)。或者, 使用充满气体的微泡与反义寡聚物复合来提高至靶组织的传送, 如 US 专利 No. 6, 245, 747 中所述的。

[0166] 还可以使用持续释放的组合物。这些可以包括成形物质形式的半透性聚合基质如膜或微胶囊。

[0167] 该方法的一方面中, 患者是人患者, 例如, 诊断为具有局部或全身病毒感染的患者。患者的情况还可以口服预防性给药本发明的反义寡聚物, 例如, 在患者是以下的情况中: (1) 免疫缺失; (2) 烧伤的情况中; (3) 具有留置导管; 或 (4) 将要进行手术或最近已经进行手术。一优选实施方案中, 寡聚物是二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物, 包含于药物学上可接受的载体中, 并口服传送。另一优选实施方案中, 寡聚物是二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物, 包含于药物学上可接受的载体中, 并静脉内传送 (IV)。

[0168] 本发明的另一应用中, 患者是家畜动物, 例如, 鸡、火鸡、猪、牛或山羊等, 且治疗是预防性的或治疗性的。另一应用中, 待治疗的感染动物可以是一种或多种黄病毒感染的动物园动物或野生动物, 例如, 海豹、海豚或鹰。本发明还包括含有补充低剂量上述类型抗病毒反义化合物的食品谷物的家畜和家禽食品组合物。还考虑的是, 用补充低剂量抗病毒的食品谷物喂养家畜和家禽的方法中, 改善是将食品谷物补充如上所述的低剂量抗病毒寡核苷酸组合物。

[0169] 通常以有效导致反义寡聚物血浓度峰值至少为 200-400nM 的量和方式来给药反义化合物。通常, 给药一种或多种剂量的反义寡聚物, 通常以定时的间隔, 约一至两周。优选的口服剂量是约 1-25mg 寡聚物每 70kg。一些情况中, 需要高于 25mg 寡聚物 / 患者的剂量。对于 IV 给药, 优选的剂量是约 0.5mg 至 10mg 寡聚物每 70kg。还可以以定时间隔例如每日给药反义寡聚物短的时间段, 如两周或更短。然而, 一些情况中, 间歇地给药寡聚物较长的时间段。接着给药后或同时, 给药抗生素或其他治疗剂的治疗。基于免疫测定, 其他生化测试和治疗中患者生理检测的结果, 如所述的可以调节治疗方案 (剂量、频率、途径, 等)。

#### [0170] C. 治疗的监控

[0171] 使用本发明反义寡核苷酸的有效体内治疗方案可以根据持续时间、剂量、频率和给药途径, 以及治疗中患者的情况 (即, 预防性给药对响应局部或全身感染的给药) 而改变。因此, 为了获得最佳治疗结果, 这样的体内治疗通常需要通过适于治疗中特定类型病毒感染的测试来监控, 并相应地调节剂量或治疗方案。例如, 通过感染的一般指示剂, 如全血细胞计数 (CBC)、核酸检测方法、免疫诊断测试、病毒培养或异源双链的检测, 来监控治疗。

[0172] 可以在给药反义寡聚物之前、之中和之后从患者采取的生物样品 (组织、血液、尿等) 测定给药的本发明反义寡聚物体内抑制或消除一种或多种 RNA 病毒生长的效用。这样的样品测定包括 (1) 监控与靶和非靶序列形成的异源双链的存在或不存在, 使用本领域技术人员已知的方法, 例如, 电泳凝胶迁移率测定; (2) 监控病毒蛋白产生的量, 通过标准技术来测定如 ELISA 或蛋白质印迹来测定, 或 (3) 测量对病毒滴定度的影响, 例如, 通过 Spearman-Kärber 的方法。(参见, 例如, Pari, G. S. 等, *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 39(5) :1157-1161, 1995; Anderson, K. P. 等, *Antimicrob. Agents*

and Chemotherapy 40 (9) :2004-2011, 1996, Cottral, G. E. ( 编辑 ) :Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology, pp. 60-93, 1978)。

[0173] 监控反义寡聚物治疗效用的优选方法是检测反义 -RNA 异源双链。在反义寡聚物给药后的选定时间,收集体液用于检测样品中异源双链物质的存在和 / 或监控样品中异源双链物质的含量。通常,给药后 3-24 小时,收集体液样品,优选给药后 6-24 小时。如上所述,体液样品可以是尿液、唾液、血浆、血液、脊椎流体或其他生物来源的液体样品,以及包括悬浮于其中的细胞或细胞碎片,或液体介质及其溶质。收集的样品量通常为 0.1 至 10ml,优选约少于 1ml。

[0174] 可以处理样品来除去不需要的成分和 / 或处理样品中的异源双链物质来除去不需要的 ssRNA 悬挂部分,例如用 RNA 酶处理。当然,特别重要的是在异源双链检测依赖大小分离时除去悬挂,例如,质谱分析的电泳。

[0175] 可获得用于从样品除去不需要成分的多种方法。例如,由于异源双链具有净负电荷,可以使用电泳或离子交换技术从中性或正电荷原料中分离出异源双链。还可以将样品接触具有表面结合抗体或能够特异性结合异源双链的其它试剂的固体支持物。洗涤支持物来除去未结合原料后,异源双链可以以基本上纯化形式释放来用于进一步分析,例如,通过电泳、质谱或免疫测定。

[0176] 以下实施例说明了本发明,但是不是以任何方式来限制本发明。

[0177] 实施例 1:西尼罗病毒体外的反义抑制

[0178] 评价了两个 PMO 寡聚物在培养的 Vero 细胞中对抗西尼罗病毒的活性。一个 20 个碱基 (mer) 的 PMO 寡聚物瞄准西尼罗病毒的 3' -CS 片段 (WNV3' CS, SEQ ID NO. 26), 另一个 20 个碱基的 PMO 化合物是“无义”序列 (5' -AGTCTCGACTTGCTACCTCA-3'), 与人、猴子或 WNV 基因组序列 (NC-1) 中的任一没有显著同源性。两个 PMO 寡聚物在 5' 端与肽缀合 (R<sub>9</sub>F<sub>2</sub>C-5-PMO) 来提高体外的细胞吸收。进行两个分开的实验,“两点”和“八点剂量反应”,将每种 PMO 寡聚物与病毒接种物一起加入悬浮于补充 2% 胎牛血清的标准哺乳动物组织培养基中的细胞中。24 小时后,在显微镜下以及用微平板读数器使用如所述的 (Morrey, Smee 等, 2002) ‘中性红染料测定’来计数细胞,评价细胞的细胞病理效应。对本领域技术人员而言,导致病毒滴定度 50% 降低 (EC50) 的有效浓度超过 20 微摩尔浓度 (micromolar) 的认为是低抗病毒活性,而 EC50 为 20 微摩尔浓度下的表明实质性的抗病毒活性。以下的表总结了这些结果。

[0179] 两点剂量反应:

[0180]

PMO 化合物名称	EC50
WNV3' CS (SEQ ID 26)	7 微摩尔浓度
NC-1	> 20 微摩尔浓度

[0181] 八点剂量反应:

[0182]

PMO 化合物名称	EC50
WNV3' CS (SEQ ID 26)	10 微摩尔浓度
阴性 PMO	> 56 微摩尔浓度

[0183] 实施例 2: 蝉传脑炎的反义抑制

[0184] 该实施例描述了设计来测试本发明反义 PMO 化合物抗病毒活性的研究, 对抗两种黄病毒: 蝉传脑炎病毒 (TBE) 和西尼罗病毒 (WN)。评价了两个 PMO 寡聚物的抗病毒活性: TBE3' CS, SEQ ID NO: 25 和 ; 干扰对照序列 DS-scr (5' -AGTCTCGACTTGCTACCTCA-3')。两个 PMO 寡聚物在 5' 端缀合富含精氨酸的肽 ( $R_9F_2C-5'$ -PMO) 来提高细胞吸收, 如所述的 (US 专利申请 60/466, 703 和 Moulton, Nelson 等, 2004)。WN 病毒感染提供了阴性对照感染, 因为 WN 和 TBE 3' CS 靶向 PMO 之间没有同源性。该对照表明了每种 PMO 的非特异性病毒抑制水平。制备 PMO 化合物来提供 2mM 储液, 然后相对于组织培养细胞上病毒的标准剂量将其滴定。用 1 的感染复数 (moi) 感染细胞并测定感染后 18 小时的上清液培养基样品中的病毒产量。

[0185] 该实施例中所用的两个病毒株:

[0186] 1) TC 401 西尼罗 99-34940-31A (纽约株) 传代 2

[0187] 2) TC 339 蝉传脑炎病毒 (Hypr 株) 传代 49

[0188] 传代 130SW13 细胞 (生长于加了 5% FBS 的 RPMI 1640 培养基中的高加索人肾上腺皮质腺棘皮癌细胞系 ECAAC 87031801) 的四个 T175 组织培养烧瓶 (NUNC), 用胰蛋白酶-EDTA (1×) 洗涤两次并在 37°C 孵育 2-3 分钟。将细胞重悬浮于每个烧瓶中的 11.5ml 生长培养基中并合并。在合并的细胞悬浮液上进行细胞计数, 结果是  $1.74 \times 10^6$  细胞/ml, 99% 有生活力。6ml 细胞悬浮液用于接种四个 T175 烧瓶, 并将 40ml 悬浮液稀释至 270ml。将这 15 个六孔板上分配成每孔 3ml 的等份。将平板孵育过夜来形成汇合的细胞单层。

[0189] 将每种 PMO 化合物稀释于 4ml 无血清 RPMI 1640 培养基中至 25、20、15、10 和 5  $\mu$ M。从两个六-孔板中除去培养基。对于两种 PMO 化合物, 将 2ml 适当的化合物稀释液分配于平板的所有孔中并在分开的平板上重复。将平板在 37°C 孵育 5 小时。从 -70°C 冰箱中取出两种病毒并快速解冻。将每种病毒稀释至  $2 \times 10^6$  pfu/ml 来产生 42ml 无血清培养基。从培养箱中取出六-孔平板并从所有孔中吸出预处理的培养基。将 1ml 培养基加入对照平板 (无化合物) 的每个孔中。每套平板接受 1ml/孔的稀释至  $2 \times 10^6$  pfu/ml 的 TBE 或 WN。将平板在室温孵育 1 小时, 然后除去培养基, 并用 2ml RPMI 1640 加 1% FBS 加相同浓度测试化合物来替代, 用于预处理细胞。将平板在 37°C 孵育 18 小时。

[0190] 为了制备用于测定病毒滴定度的 24 孔平板, 将传代 131SW 13 细胞的八个 T175 组织培养烧瓶 (NUNC) 用胰蛋白酶-EDTA (1×) 洗涤两次并在 37°C 孵育 2-3 分钟。将细胞重悬浮于每个烧瓶中的 11.5ml 生长培养基中并合并。在合并的细胞悬浮液上进行细胞计数, 结果是  $1.7 \times 10^6$  细胞/ml, 99% 生活力。将 80ml 细胞悬浮液稀释至 680ml。将这些细胞在八个 24 孔平板中分配成 1ml 每孔等分。将平板孵育过夜来形成连生的单层。

[0191] 感染后 18 小时, 从每个单个孔中收集 PMO- 处理的、病毒感染的六-孔平板的上清液培养基。将每个收集物的 30  $\mu$ l 放入含有 270  $\mu$ l 无血清培养基的 96 孔平板的每个孔中。

将剩余的样品放入冷管中并存储于  $-70^{\circ}\text{C}$ 。从 24 孔平板中取出培养基并将  $250\ \mu\text{l}$  滴定稀释液从 96 孔平板中转移至 24 孔平板中,每个在  $37^{\circ}\text{C}$  孵育一小时。将  $1\text{ml}$  琼脂糖覆盖培养基加入每个孔中并使琼脂糖在室温下凝固后,将平板在  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 5 天。5 天后,将平板从培养箱中取出,将  $1\text{ml}$  的 10% 甲醛盐水加入每个孔中并将平板在室温放置 3 小时。在流动水下洗涤平板来除去琼脂糖培养基并倒转来排出水分,同时保持洗涤平板。然后每个孔接受  $1\text{ml}$  的 0.1% 萘黑染色并在除去染色之前将平板放置 30 分钟,将平板在流动水下洗涤。然后将其放置(倒置)干燥 3 小时。计数病毒斑来测定滴定度。

[0192] 图 4A 和 4B 显示了以未处理对照%的 PMO 处理感染获得的病毒滴定度,使用 TBVE 或 WNV 感染的病毒感染细胞并用 TBE 反义化合物(图 4A,其中化合物具有 SEQ ID NO:25)或对照化合物(图 4B,干扰序列)来处理。从图 24A 和 24B 病毒滴定度的比较可以看到,细胞中的病毒滴定度随着化合物提高的浓度而降低,认为是由于反义和对照化合物两者中存在的连接的富含精氨酸肽的细胞毒性效果。在  $15\ \mu\text{M}$  或更高的化合物浓度,在 TBE 病毒抑制中看到序列特异性增加,同时相对于 WNV(图 24A)和相对于干扰序列对照(比较图 24A 和 24B)。

### [0193] 实施例 3:用反义 PMO 抑制登革热病毒 1-4 血清型

[0194] 在过去 20 年登革热 / 登革热出血热 (DF/DHF) 成为主要的全球健康问题。登革热病毒 (DEN) 的地区分布,其的蚊子载体和疾病负担导致其继续增加。世界卫生组织估算每年有 50-100 百万例的新感染。目前 DF/DHF 在南亚儿童中是住院和死亡的主要原因,以及发病率在美国急剧上升。目前没有疫苗或有效的治疗。成功疫苗或治疗的一个要求是有效对抗 DEN 的所有的 4 种人血清型。该研究的目的是评价瞄准 3'CS 的 PMO 在培养的 Vero 细胞中抑制四种血清型 DEN 复制中的效用和特异性。设计了 5 种 PMO 化合物来瞄准正向链 DEN2RNA 中的序列,已经认识到该序列在病毒转录和 / 或翻译中是重要的 (4,5)。为了帮助进入 Vero E6 细胞中,该研究中的 PMO 与富含精氨酸的肽缀合。

[0195] 设计与登革热 2 病毒 (DEN2) 的 3'-CS 片段杂交的 PMO,评价了它们在哺乳动物培养物中抑制登革热病毒复制的能力。PMO 和短的富含精氨酸的肽缀合 ( $\text{R}_5\text{F}_2\text{C}-5' -\text{PMO}$ ) 来帮助它们进入培养物中的细胞。用 PMO 试剂孵育 Vero E6 细胞,接种 DEN 血清型 1-4,并在 5-8 天后通过斑测定测定病毒滴定度。瞄准 3' 环化序列的化合物 (3'CS PMO),与对照相比较,在 4-6 天的时间段内以剂量依赖性和序列特异性的方式,将 DEN2 的滴定度降低了超过 3 个数量级的大小,如图 5 所示。每种 3'CS PMO 的  $10\ \mu\text{M}$  溶液将所有四种登革热血清型的滴定度降低了超过两个数量级的大小,一些情况中低于可检测的极限,如图 5B-5D 中所示。有效的抗 DEN 化合物没有改变西尼罗病毒 (WNV) 在 Vero E6 细胞中的生长滴定度。这些数据表明 3'CS PMO 化合物是可能的 DEN1-4 治疗剂。

[0196] 从以上所述的,可以认识到是怎样满足本发明的各个目的和特征的。因为靶序列是几种黄病毒交叉保守的,单个寡核苷酸类似物可以用于治疗几种病毒中的每一种。例如,对准 SEQ ID NO:1 或其互补的 SEQ ID NO:3 的单个类似物可以用于抑制圣路易脑炎病毒、河谷脑炎病毒、西尼罗病毒、库宁病毒、日本脑炎病毒、黄热病毒、登革热病毒-1、2、3 和 4 型以及西尼罗病毒的复制,对准 SEQ ID NO:2 或其互补的 SEQ ID NO:4 的单个类似物可以用于治疗蝉传脑炎病毒、Powassen 病毒、羊跳跃病病毒、森林出血热病毒和 Alkhurma 病毒。

[0197] 其中将靶序列限制于一个或互补的环化序列,类似物可以有效破坏基因组正义链

和第一次复制反义链两者中的环化茎二级结构,因此用于在正向和反向链两者的复制水平上抑制病毒复制。

[0198] 类似物在体内是稳定的并由于一些类似物结构,例如,PMO,可以口服给药。此外,类似物和病毒靶之间形成的异源双链可以用于证实黄病毒感染的存在或不存在,和/或证实宿主细胞对治疗剂的吸收。

[0199] 表 3. 序列表

[0200]

靶序列	SEQ IDNO.
5' -UCAUAUG-3'	1
5' -GGAGAACAAGA-3'	2
5' -CAUAUGA-3'	3
5' -UCUUGUUCUC-3'	4
5' -GUCAAUAUGC UAAAACGCGG-3'	5
5' -AUCAAUAUGCUGAAAACGCGG-3'	6
5' -GUCAAUAUGGUACGACGAGG-3'	7
5' -CUUCAAUAUGCUGAAAACGCG-3'	8
5' -CUAUCAAUAUGCUGAAAACGCG-3'	9
5' -CAGCUUAGGAGAACAAGAGCUG-3'	10
5' -ACAGCAUAUUGACACCUGGGA-3'	11
5' -UGGACCAUAUUGACGCCAGGGA-3'	12
5' -AAACAGCAUAUUGACGUGGGA-3'	13
5' -CGGUUCUUGUUCUCCUGAGCC-3'	14
5' -GGCUGCAAUAUGC UAAAAC-3'	15
寡聚物靶向序列	
5' -CCGCGTTTTAGCATATTGAC-3'	16
5' -CCGCGTTTCAGCATATTGAT3'	17
5' -CCTCGTCGTACCATATTGAC-3'	18

5' -CGCGTTTCAGCATATTGAAAG-3'	19
5' -CAGCTCTTGTTCCTAAGCTG-3'	20
5' -GGCTGTCAATATGCTAAAAC-3'	21
5' -TCCCAGGTGTCAATATGCTGTT-3'	22
5' -TCCCTGGCGTCAATATGGTCCCA-3'	23
5' -TCCCAGCGTCAATATGCTGTTT-3'	24
5' -GGCTCAGGGAGAACAAGAACCG-3'	25
5' -CAGGTGTCAATATGCTGTTTTG-3'	26
5' -CCCAGCGTCAATATGCTG-3'	27

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; AVI 生物制药公司

&lt;120&gt;寡核苷酸类似物和用于治疗黄病毒感染的方法

&lt;130&gt; 504508059W00

&lt;140&gt; PCT/US2004/025335

&lt;141&gt; 2004-08-06

&lt;150&gt; US 60/512,003

&lt;151&gt; 2003-10-16

&lt;150&gt; US 60/493,043

&lt;151&gt; 2003-08-05

&lt;160&gt; 31

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 登革热病毒

&lt;400&gt; 1

ucaauaug

8

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 蝉传脑炎病毒

&lt;400&gt; 2

ggagaacaag a

11

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 登革热病毒

[0002]

<400> 3	
cauauuga	8
<210> 4	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 蝉传脑炎病毒	
<400> 4	
ucuuguucuc c	11
<210> 5	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 圣路易脑炎病毒	
<400> 5	
gucaauaugc uaaaacgcgg	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 日本脑炎病毒	
<400> 6	
aucaauaugc ugaaacgcgg	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 黄热病毒	
<400> 7	
gucaauaugg uacgacgagg	20
<210> 8	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 登革热病毒	
<400> 8	
cuuucuuau gcugaaacgc g	21
<210> 9	

[0003]

<211> 21	
<212> RNA	
<213> 登革热病毒	
<400> 9	
cuauc <u>aa</u> uau gcugaaacgc g	21
<210> 10	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 蝉传脑炎病毒	
<400> 10	
cagcuuagga gaacaagagc ug	22
<210> 11	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 西尼罗病毒	
<400> 11	
ggcugucaau augcuaaaac	20
<210> 12	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 圣路易脑炎病毒	
<400> 12	
aacagcauau ugacaccugg ga	22
<210> 13	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 黄热病毒	
<400> 13	
ugggaccaua uugacgccag gga	23
<210> 14	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 登革热病毒	

[0004]

<400> 14	
aaacagcaua uugacgcugg ga	22
<210> 15	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 蝉传脑炎病毒	
<400> 15	
cgguuuuugu ucuccugag cc	22
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 16	
ccgcgtttta gcatattgac	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 17	
ccgcgtttca gcatattgat	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 18	
cctcgtcgta ccatattgac	20

[0005]

<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 19	
cgcgtttcag catattgaaa g	21
<210> 20	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 20	
cagctcttgt tctcctaagc tg	22
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 21	
gttttagcat attgacagcc	20
<210> 22	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 22	
tcccaggtgt caatagctg tt	22

[0006]

<210> 23	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 23	
tccttggcgt caatatggtc cca	23
<210> 24	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 24	
tcccagcgtc aatatgctgt tt	22
<210> 25	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 25	
ggctcaggga gaacaagaac cg	22
<210> 26	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 26	
caggtgtcaa tatgctgttt tg	22

[0007]

<210> 27	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的反义寡聚物	
<400> 27	
cccagcgtca atatgctg	18
<210> 28	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 圣路易脑炎病毒	
<400> 28	
ccgcguuuua gcatauugac	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的靶序列	
<400> 29	
agtctcgaet tgetacctca	20
<210> 30	
<211> 149	
<212> RNA	
<213> 登革热病毒 type 2	
<400> 30	
aguuguuagu cuacguggac cgacaaagac agauucuug agggagcuaa gcucaacgua	60
guucuaacag uuuuuuaau agagagcaga ucucugauga auaaccaacg aaaaaaggcg	120
agaaguacgc cuucaauau gcugaaacg	149
<210> 31	
<211> 112	
<212> RNA	
<213> 登革热病毒 type 2	

[0008]

<400> 31

aaaaaacagc auauugacgc ugggaaagac cagagauccu gcugucuccu cagcaucauu 60  
ccaggcacag aacgccagaa aauggaaugg ugcuguugaa ucaacagguu cu 112



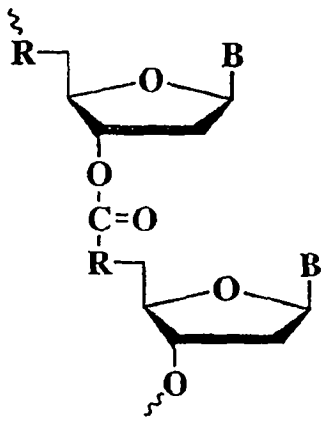


图 2A

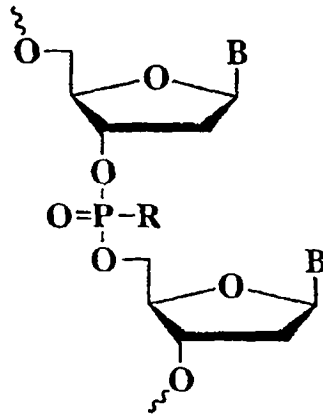


图 2B

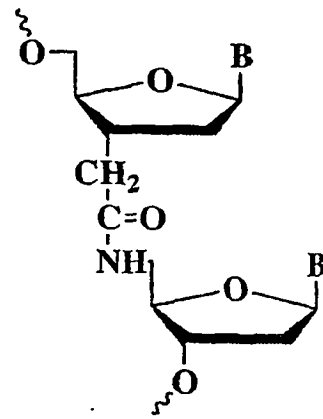


图 2C

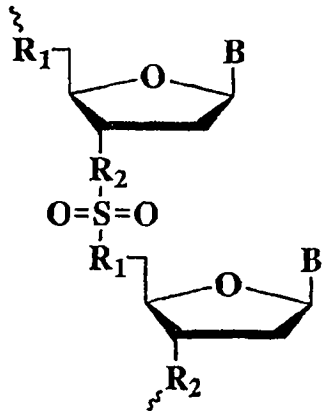


图 2D

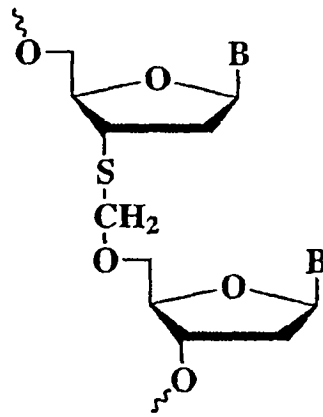


图 2E

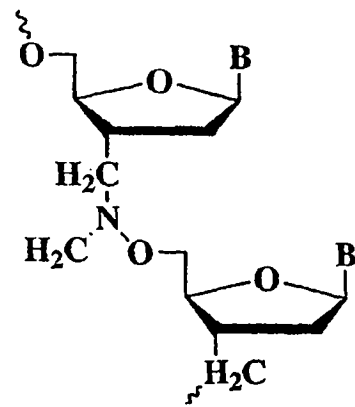


图 2F

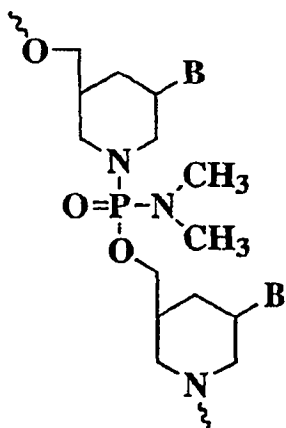


图 2G

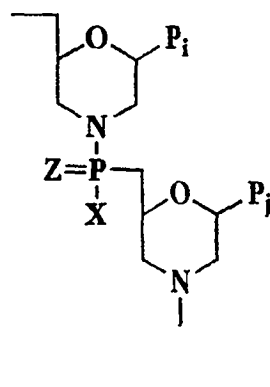


图 3A

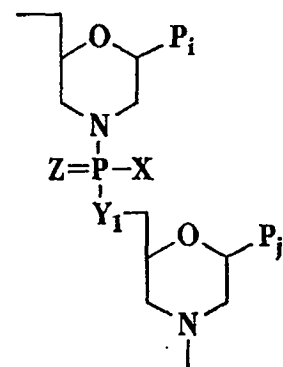


图 3B

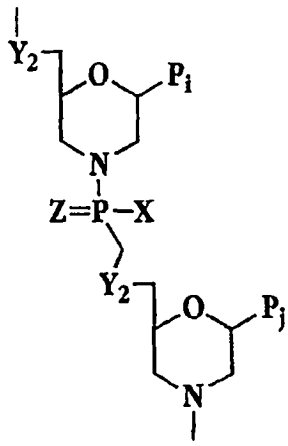


图 3C

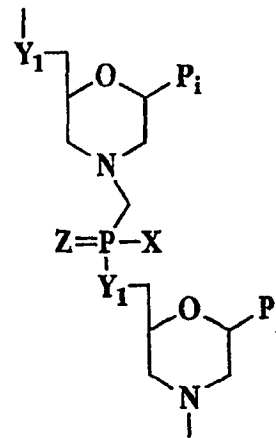


图 3D

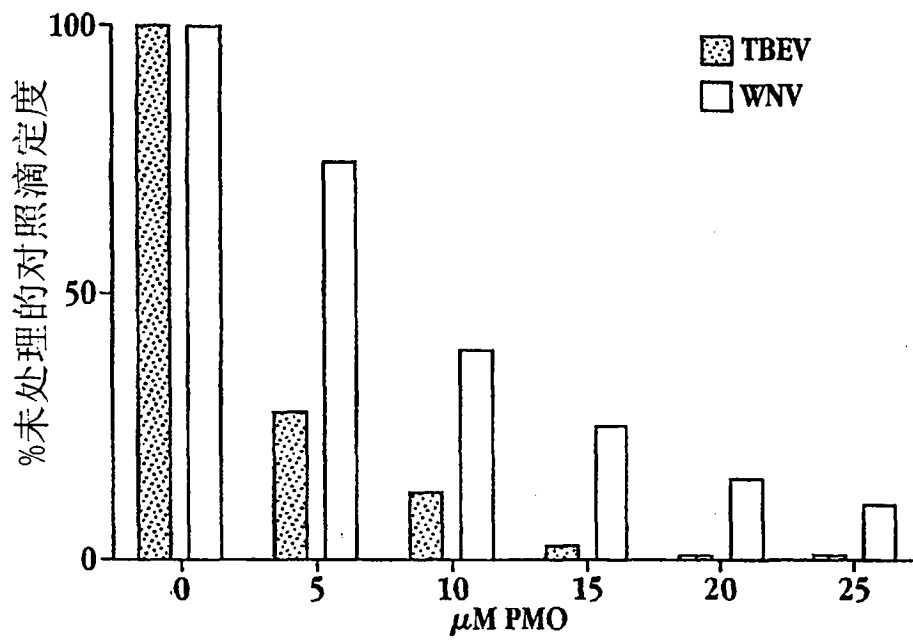


图 4A

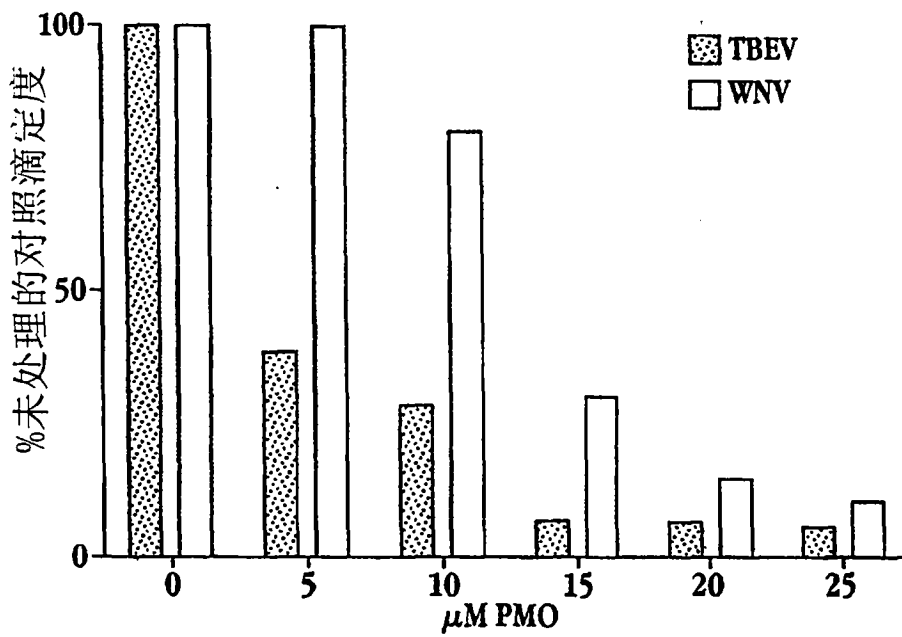


图 4B

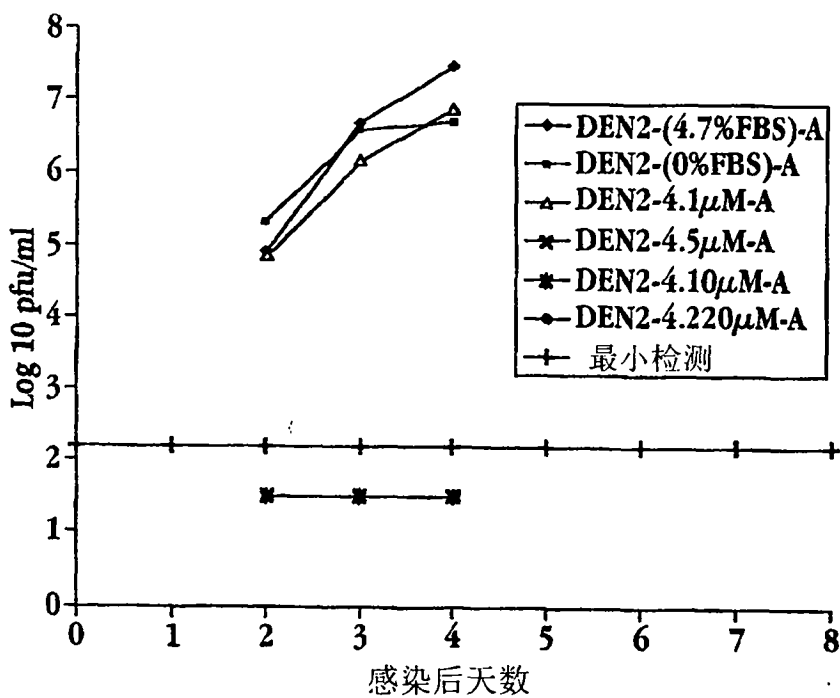


图 5A

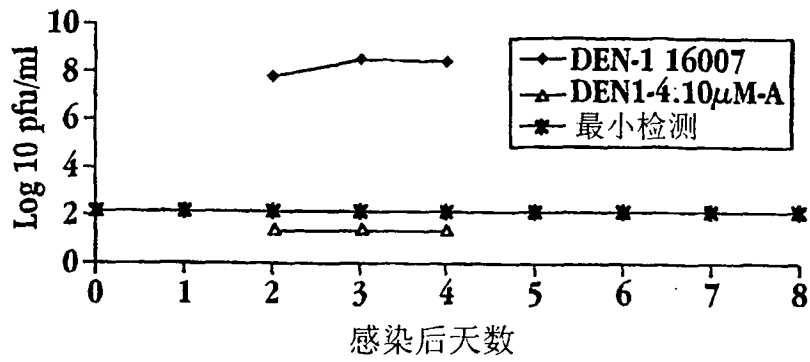


图 5B

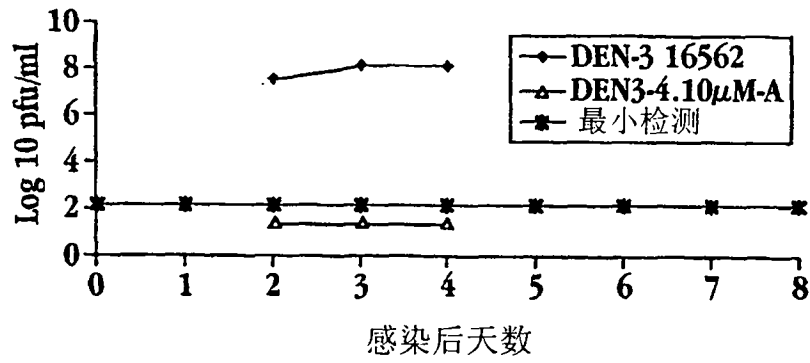


图 5C

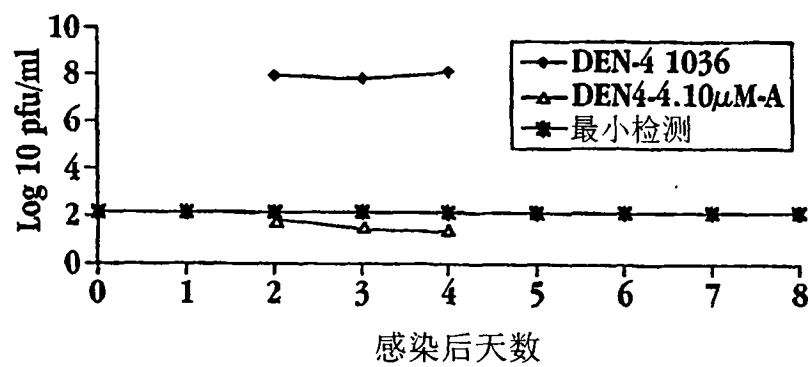


图 5D