



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93117831.2

[51]Int.Cl⁵

C12P 19/34

[43]公开日 1994 年 3 月 30 日

[22]申请日 93.9.22

[30]优先权

[32]92.9.23 [33]US[31]950,531

[71]申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 R·那拉亚南

C·A·罗森

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

C12N 15/12 C12N 15/02

A61K 31/70 A61K 37/02

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 反义多核苷酸

[57]摘要

本发明公开了能与编码 NF-KB 的基因杂交的寡聚物。

权利要求书

1. 包含或由一个核苷酸顺序组成的寡核苷酸，其特征在于：它具有与编码人NF-kB 转录因子的一部分基因杂交的能力，而且当此寡核苷酸与所述的那部分基因杂交后会阻止 NF-kB 转录因子的合成。

2. 根据权利要求 1 的寡核苷酸，其中编码 NF-kB 转录因子的基因是 mRNA。

3. 根据权利要求 1 或 2 的寡核苷酸，其长度为 5 到 50 个核苷酸。

4. 根据权利要求 1-3 中任一权项的寡核苷酸，其中 NF-kB 转录因子的 p65 亚基的部分基因具有与 SEQ ID No: 1 相同的序列或它的互补序列。

5. 根据权利要求 1-4 中任一权项的寡核苷酸，其中该寡核苷酸含有与 SEQ ID No: 3 相同的序列或它的具有 SEQ ID No: 1 序列的互补序列。

6. 根据权利要求 1-3 中任一权项的寡核苷酸，其中 NF-kB 转录因子 p50 亚基的部分基因具有与 SEQ ID No: 2 相同的序列或它的互补序列。

7. 根据权利要求 1、2、3、或 6 中任一权项的寡核苷酸，其中该寡核苷酸含有与 SEQ ID No: 4 相同的序列或它的具有 SEQ ID No: 2 序列的互补序列。

8. 根据权利要求 1-7 中任一权项的寡核苷酸，其中该核苷酸

由分子式为 $-O-P(=O)(Y)-O-$ 的磷酸酯基团连接, 这里的 Y 为甲基、氧或硫。

9. 根据权利要求 1-8 中任一权项的寡核苷酸, 在疾病治疗中用作治疗活性化合物。

10. 制备权利要求 1-8 中任一权项的寡核苷酸的方法, 其特征在于: 将固体支持物连接、保护的通过固相合成的相应核苷酸序列的寡核苷酸脱保护、从固体支持物上解离下来, 和如果需要的话, 再进行修饰。

11. 一种药用组合物, 它至少含有权利要求 1-8 中任一权项的寡核苷酸, 如果合适的话, 还可含有治疗上可接受的载体物质。

12. 将权利要求 1-8 中任一权项的寡核苷酸用于制备药用组合物。

13. 将权利要求 1-8 中任一权项的寡核苷酸用于治疗疾病的药物的制造。

说 明 书

反义多核苷酸

同一个基因的有意义链或由它转录的 mRNA 互补并能杂交的核苷酸寡聚物(寡核苷酸)是反义寡聚物。当一个目标基因的有意义链或一个 mRNA 暴露于它的反义寡聚物,两者将会杂交,其结果是,只要此寡聚物一直杂交着,那么此基因或 mRNA 的转录将受到封闭。因而,该基因编码的蛋白质(如果该基因是编码调节蛋白的,那就是一组蛋白质)就不会产生。反义寡聚物因其性质有许多用途。例如依靠它们与目标核苷酸结合的能力,可用于诊断。而且,它们对蛋白质合成的影响使得反义寡聚物在治疗上也有用。反义寡核苷酸的概念及其组成与化学性质已总结在 Chemical Reviews 90, 544 - 579 (1990) 中。

NF - kB 转录因子复合物是一个多效激活剂,它参与多种细胞和病毒基因的诱导作用参见:

(Baeuerle, P.A., 和 D. Baltimore (1989) Genes Dev. 3: 1689-1698; Lenardo, M.J., 和 D. Baltimore (1989) Cell 58: 227-229).

此活性复合物是由两个亚基组成的,它们称为 P50 和 p65, 参见:

(Baeuerle 和 Baltimore (supra); Ghosh, S. 和 D. Baltimore (1990) Nature (London) 344: 678-682).

编码 p50 的基因已克隆出来,参见:

(Ghosh, S. et al. (1990) Cell 62: 1019-1029 (Ref. 1); Kieran, M. et al. (1990) Cell 62: 1007-1018 (Ref. 2)) 和 p65 (Nolan, G.P. et al. (1991) Cell 64: 961-969 (Ref. 3); Ruben, S. et al. (1991) Science 251: 1490-1493 (Ref. 4)) ;

并且这两个蛋白质的 N-末端显示出与癌基因 rel 的产物有相当大的同源性。上面提到的参考文献 1-4 在表 I (实施例 1) 中以同样的数码被引用。

许多细胞粘合分子, (CAMs), 包括 ICAM-1

(Voraberger, G. et al. (1991) Immunol. 147: 2777-2786), vimentin (Lilienbaum, A. et al. (1990) J. Virol. 64: 256-263) 和 ELAM-1 (Whelan, J. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 2645-2653)

在它们的 5' 调控区内有 NF-kB 结合部位。NF-kB 可以通过调节这些粘合分子而影响细胞粘合, 从而影响细胞生长。

有可能利用细胞的粘合来检测反义功能, 例如用反义寡聚物对公认粘合分子和结肠直肠癌 (DCC) 中缺失的肿瘤抑制基因进行抑制, 导致种种细胞的分离。

(Narayanan, R. et al. (1992) Oncogene 7: 553-561).

细胞与细胞以及细胞与底质间的粘合是通过几个不同的受体家族介导的, 这些受体以特殊的细胞外基质 (ECM) 蛋白和相邻细胞的配基为靶子。

(Albelda, S.M. 和 C.A. Buck (1990) FASEB J. 4: 2868-2880).

这些受体也影响细胞生长、分化、细胞连接形成以及细胞极性的各个方面。

(Albelda 和 Buck, 1990, supra; Hynes, R.O. (1992) Cell 69: 11-25).

在组织培养细胞中, 焦点接触 (细胞结合到 ECM 的特殊膜区)

的形成包括蛋白多糖如肝素硫酸盐以及多种一体蛋白分子。一体蛋白是杂二聚体分子，它具有细胞与基质和细胞与细胞粘合的两种受体的功能 (Albelda 和 Buck, 1990, supra)。免疫球蛋白超基因家族的粘合分子也参与细胞与细胞间粘合。这些分子在胚胎发生、伤口愈合、炎症反应、血凝固和转移中起着重要的作用。

(Albelda 和 Buck, 1990, supra; Hynes 1992, supra).

认识到细胞粘合分子与炎症有关已导致新的治疗方法的产生。特殊细胞粘合分子的单克隆抗体已用于抑制脓毒性休克和局部缺血-再灌注损伤中皮肤炎症区的嗜中性募集。

根据本发明，与编码 NF-kB 转录因子的基因的一部分基本互补并杂交以基本阻止由上述基因决定的 NF-kB 转录因子产生的任何寡聚物，都能用来防止细胞粘合。细胞粘合在诸如炎症、伤口愈合、肿瘤生长的情况中是一个重要的因素。这些寡聚物有减轻这些症状的治疗应用价值。

与 NF-kB 基因部分杂交以基本阻止 NF-kB 复合物形成的寡聚物对防止细胞粘合是有用的。任何与 NF-kB 基因的这部分结合的寡聚物会象所描述的那样阻止 NF-kB 产生。当在暴露于此寡聚物的细胞中 NF-kB 产物被阻断的时候，细胞会失去粘着于表面的能力。NF-kB 基因中所提到的部分，当它们通过杂交封闭时会基本阻止 NF-kB 合成，具有下列序列或基本上是下列序列：

GCC ATG GAC GAA CTG TTC CCC [SEQ ID: 1] 和 AGA ATG
GCA GAA GAT GAT CCA [SEQ ID: 2].

要求授权的寡聚物能同编码 NF-kB 转录因子基因的一部分进行杂交。当这一寡聚物与 NF-kB 基因的一部分杂交时，该基因的

NF-kB 产物将会被基本上阻止。基本阻止意味着 NF-kB 不产生, 或者在不起作用的水平上产生。正如在本文使用的一样, 与基因结合的含义包括与相应的 mRNA 结合。NF-kB 有两个亚基, 叫做 p50 和 p65, 由不同的基因编码。其中每一个基因都被认为是编码 NF-kB 的基因。本文描述的寡聚物能与 p50 基因或 p65 基因结合, 特别是人的基因。如果 p65 或 p50 基因通过与一寡聚物杂交而被封闭, NF-kB 转录因子就不会产生。此寡聚物与它们的靶位点基本互补。它们不必反映出靶部位的准确互补序列, 但必须是足够的互补, 以与靶部位选择性地杂交。

关于寡核苷酸的设计, 特别是有关杂交条件的专一性等需要考虑的一般问题, 能够在本领域的陈述中找到, 例如在 Sambrook 等编写的《分子克隆·实验室手册》, 特别是第二版的第十一章, 此书由冷泉港实验室出版 (1989)。就本发明的目的而言, 应该知道: 只有具目的核苷酸序列特定长度的寡核苷酸才是合适的。这一序列的最短长度能由本专业的技术人员依据有意义的给定靶序列的足够专一性的通常已知的考虑来确定 (见上面 Sambrook 等所述)。这一序列的最大长度也能由专业人员根据技术中已知的需要来考虑确定, 例如, 考虑对细胞膜的足够的穿透效率, 该效率能通过实验来检测。

特别是, 含有或具有 GGG GAA CAG TTC GTC CAT GGC [SEQID: 3] 序列的寡聚物与编码人 p65 亚基的基因的一部分相结合; 含有或具有 TGG ATC ATC TTC TGC CAT TCT [SEQID: 4] 序列的寡聚物与编码人 p50 的基因的一部分相结合。这些寡聚物也能与在那里互补的相应的 mRNA 杂交。

优选的寡聚物长度约是 21 个核苷酸, 然而也可用 5 到 50 的寡

聚物长度。较长寡聚物的一个特点是更高的专一性,然而这一特点应与对稳定性的考虑和易于通过细胞膜相权衡,这样较短的寡聚物更可取。具有根据 [SEQID: 1] 到 [SEQID: 4] 寡核苷酸序列的寡聚物最优选。

当本文公开的一个寡聚物引入一个细胞时,寡聚物通过与 NF - kB 基团或 NF - kB mRNA 的一部分结合,可基本上减少或阻止 NF - kB 合成。令人吃惊的是,结果该细胞失去了粘着到表面的能力。因此,这些寡聚物作为反义寡聚物是有用的,并且阻止暴露于它们的细胞粘着于表面。一个阻断 NF - kB 合成及细胞粘合的寡聚物能通过实施例中所所述的细胞粘合试验来选择。

这是出人意料的,因为 NF - kB 是一个转录因子,因而它介导 DNA 到 mRNA 的转录,这是所有细胞的一个基本功能。如果阻断 NF - kB 的合成预料会扰乱一个细胞的代谢并且破坏或杀死细胞。令人惊奇的是处理过的细胞活了下来,但失去了其完成高度专一功能的能力,即粘着于表面的能力。粘合能力的丧失阻止细胞间或细胞与生理底物的粘合。因此,暴露于寡聚物的细胞会改变它们的特性。因为 NF - kB 是一种在各种细胞和组织中发现的蛋白,本公开的寡聚物将起减低或消除任何能粘着于表面的细胞的粘合作用。

要求授权的寡聚物可以由熟知的方法生产,例如,象实施例中叙述的那样,通过克隆或化学合成生产。寡聚物可以从一个靶基因的序列获得,或从由蛋白序列推断出来的核苷酸序列来获得。

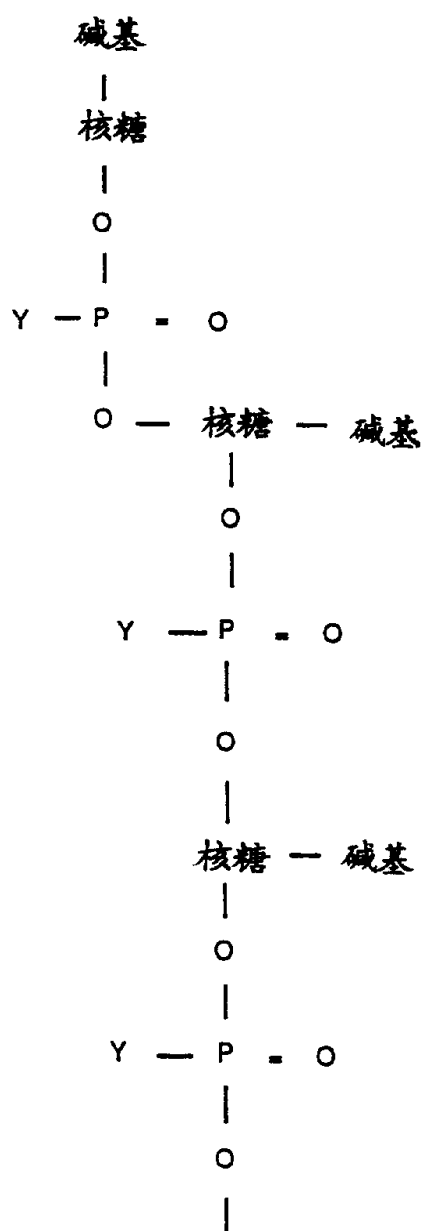
用任何常规的方法生产的寡聚物通过测定它们基本抑制 NF - kB 合成的能力来筛选。能够与编码 NF - kB 基因的一部分杂交,进而基本阻止 NF - kB 合成的寡聚物的测定可通过测定杂交和

细胞粘合的任何常规方法来完成。用于此筛选的细胞粘合检测叙述在实施例1中。简短地说,能粘着到表面的任何类型的细胞可以在常规条件下生长,例如在培养皿(或任何可培养细胞的合适的容器)培养足够长的时间,让细胞粘着在皿的底部。将一层白明胶或任何其它合适的底物在细胞加入前覆盖在培养皿表面,寡聚物随后加入到培养的细胞中,一段时间后当细胞从培养皿的表面分开时,便观察到寡聚物的预期作用。12到24小时是观察丧失粘合的优选培养时间,然而,或许需要几个星期或更长时间。

阻断细胞粘合的寡聚物可以经修饰来增加其稳定性。组成寡聚物核苷酸的磷酸酯基团可以在像天然核苷酸磷酸酯部分的自由单键氧的位置进行修饰,可以是氧、甲基或硫。这样修饰的寡聚物通过实施例中叙述的常规合成得到。这些取代物的任一个都可以用已知方法通过将合适的分子加入一台自动合成仪中来得到。

因此,提供本发明中寡核苷酸的制备及其修饰方法也是本发明的目的之一,其特征在于:将通过固相合成已得到的、经保护的固体支持物结合的相应核苷酸顺序的寡核苷酸脱保护,并从固相裂解下来,如果需要的话,然后进行修饰。脱保护和裂解过程依赖于所合成的寡核苷酸的类型,例如依赖于所用的保护基或如下所示的磷原子上的取代基Y。寡核苷酸,特别是其中的碱基也可以在合成中通过化学修饰或在合成的延长步骤中用已修饰前体(building blocks)在结构上加以修饰。这些过程对专业人员是已知的。

优选的寡聚物有下列简化的结构:



碱基代表核苷碱基 A、T、C、G。Y 选自 O-、S-、或甲基。

优选的修饰的寡聚物正如以上所描述的一样，具有下列的碱基

序列：

GGG GAA CAG TTC GTC CAT GGC [SEQ ID:3] 和
TGG ATC ATC TTC TGC CAT TCT [SEQ ID:4]

所以，要求授权的寡聚物由具有上面提供序列的核苷酸组成，而且它们的核苷酸是通过化学式为 $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{Y})-\text{O}-$ 的磷酸酯基团连接的，其中 Y 选自甲基、氧或硫。

因为阻止细胞粘合,要求授权的寡聚物是有用的。正是此特性赋予寡聚物通过阻止细胞粘合反应在治疗炎症、促进伤口愈合以及分解肿瘤上的用途。

本发明的再一目的是提供一种药物组合物,它含有至少一种本发明的寡核苷酸或其修饰物,如果适当的话,还含有治疗上可接受的载体材料。

而且,利用本发明的寡核苷酸及其修饰物来制备上述的药物组合物,即用于阻止细胞粘合或用于诊断目的的药物组合物,也是本发明的一个目的。

就阻止细胞粘合而言,寡聚物可直接注射到血流或靶组织中,然后通过扩散透过细胞膜或经受体进入细胞内,这时它们与上述靶序列杂交。寡聚物可以与像抗体或受体片段那样的靶载体连接,或通过常规的方法包裹在脂质体或胶囊中,以便更有效地被送入细胞内。像叙述的那样,带有用甲基或硫取代的磷酸酯基的寡聚物的修饰导致对酶降解作用更稳定的寡聚物,因此,就治疗目的而言,修饰的寡聚物比同样序列未修饰的寡聚物更优选。另外,修饰的寡聚物比未修饰的寡聚物更易透过细胞膜。

任何施用一个具生物活性化合物的常规方法都可以用于施用有效量的寡聚物。更具体地讲,经修饰或未经修饰的寡聚物可以单独施用,也可通过与合适的药物载体组合或与载体连接来施用。载体的实例包括肽、免疫球蛋白及其片段、脂质体、受体分子、配基分子(如激素)、酶及任何供药用的常规化合物。

有效剂量的寡聚物的给药可以是口服、肠胃外、静脉、皮肤或通过其它传统给药途径给药。包括有效量寡聚物的常规制剂都是本发

明的一部分。寡聚物可以局部地用于阻止靶组织中细胞粘合。

寡聚物的有效剂量可由专业人员根据实验数据确定。例如, 治疗部位的有效剂量可以通过提供对单个细胞有效剂量的体外实验确定。这些剂量可以被推断以用于治疗部位的细胞群, 并考虑到因部分寡聚物不能到达治疗部位而造成的有效浓度的降低。寡聚物浓度依赖于各种已知的因素, 它们包括寡聚物的稳定性 (它基于寡聚物自身、长度、修饰及载体), 给药途径和给药媒介物 (口服、皮下、胃肠外或静脉给药), 及治疗部位 (它决定于生理屏障, 如血-脑屏障)。治疗的病情也是一个考虑因素。

在治疗部位寡聚物的优选有效剂量是从约 1×10^{-8} M 到约 1×10^{-5} M。在外用组合物中, 所述优选有效量的寡聚物是存在于溶液、乳化液、或带有可接受载体的乳膏或油膏中。

药用赋形剂包括溶液、油膏、片剂、以及任何适合于给定施用模式的常规赋型剂。优选溶液或油膏。除寡聚物和/或它的盐外, 溶液还可包括缓冲剂 (如生理盐水), 稳定剂 (如 BSA), 以及其它常规成分。供局部应用的油膏、乳膏、乳化液、洗剂及香波包括已知的成分。

本发明的寡聚物可被用来治疗与细胞粘合有关的病症。

炎症是由细胞对底物和其它细胞的粘合而介导的。因此, 防止细胞粘合会减轻局部炎症。所以, 治疗炎症的方法包括给病人施用足以减轻炎症的一定量的要求授权的寡聚物。在炎症部位, 寡聚物的优选存放浓度为约 1×10^{-8} M 到 1×10^{-5} M。优选局部给药。伤口愈合也受细胞粘合的影响, 因此, 为了伤口愈合, 要求授权的寡聚物可以完全按提到的治疗炎症的相同方式给药。

要求授权的寡聚物对破坏实体瘤也是有用的。细胞转化常与一

体蛋白所有组成部分的性质改变有关 (Plantefaber, L. C. and R. O. Hynes (1989) Cell 56: 281 - 290)。肿瘤侵入和转移的机制包括在正常的细胞与细胞间以及细胞与底质间的相互作用中发生的复杂变化, 参见: (Juliano, R. (1987) Biochim. Biophys. Acta 907: 261-278; Ruoslahti, E. 和 F.G. Giancotti (1989) Cancer Cells 1: 119-126; Albeda 和 Buck, 1990, supra; Hynes, R.U. (1992) Cell 69: 11-15, supra).

肿瘤发展过程是复杂的并且在肿瘤发展的不同时期需要亚性细胞表现增加或减少粘合的性质, 参见:

(Ruoslahti 和 Giancotti (supra); Edelman, G.M. 和 K.L. Crossin (1991) Annu. Rev. Biochem. 60: 155-190; Edelman, G.M. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci USA 84: 8502-8506).

肿瘤细胞要转移, 必须首先附着在血管的细胞外基质上。要求授权的寡聚物抑制细胞与基质的粘合。因此, 若用寡聚物处理会防止肿瘤细胞相互粘合, 从而使肿瘤分解。然后未粘合的肿瘤细胞被免疫系统消除。而且, 因为未粘合的肿瘤细胞不能附着便不会引起转移, 并可回变为没有肿瘤形成可能性的正常表型。因此, 要求授权的寡聚物可用于治疗实体瘤的方法中, 它包括施用足够能引起实体肿瘤溶解的一定量的要求授权的寡聚物。实体瘤可以是转移肿瘤。

再者, 本发明的寡核苷酸当依照已知的技术方法固定在固体支持物上时, 可用于寡核苷酸分离及其自身对 NF - κ B DNA 或 RNA 的检测。本发明用于诊断的寡核苷酸可根据已知的技术方法用一个作为信号的部分标记, 如放射性同位素、酶、荧光化合物。

本发明用下列实施例进行解释, 这些实施例的目的只是为了解

释而不是以任何方式限制本发明。

实施例

方法 1: 反义寡核苷酸

寡核苷酸的硫类似物根据出版的会议记录

(Matsukura, M. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7706-7710).

已用一台自动合成仪合成 (model 394, Applied Biosystems, foster city, CA)。寡聚物由 Narayanan 等 (1992) (supra) 纯化, 他们作了这样的改变: 寡聚物在用无水乙醇洗涤前使用醚常规反复萃取 (6 次)。细胞经胰蛋白酶消化, 与寡聚物 ($30 \mu\text{m}$) 混合后象前面描述的那样放入不同的 ECM - 覆盖的皿中 24 小时至 2 周 (Ito, E. etd. (1989) Oncogene 4: 1193 - 1199)。在某些实验中每 48 小时加入一次寡聚物。在某些实验中, 在寡聚物加入前先植入细胞并允许其粘合。反义寡聚物实验要用分别制备的寡聚物重复 3 到 4 次。可使用不同代的细胞。

方法 2: 细胞培养

将鼠 ES 细胞 (CCE - 24, L. Robertson, Columbia University) 常规生长在含 15% 加热灭活过的胎牛血清 (FBS)、 $10 \mu\text{g/ml}$ 的人白细胞抑制因子 (LIF) (UBI, Lake Placid, NY) 和 $4.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 的单硫甘油的 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基 (DMEM) 中, 培养皿覆盖有 1% 的明胶。移去 LIF 并在无 LIF 培养基中再培养 6 到 8 天, 细胞开始分化。NIH 3T3、Rat - 1、PC - 12 (ATCC CRL 1721) 和 S - 17 细胞株用 Narayanan 等 [(1992), supra] 描述的方法维持。原代人血管内皮细胞 (HUVECs) 和原代角化细胞从 Clonetech Inc. Palo alto, CA 获得。RHEK - 1 细胞用 Rhim, J. S. 等所述方法 [(1986) Science

232: 385 - 388] 维持。细胞外基质 (ECM) 是从喂养-层成纤维细胞建立的, 它是通过用含 3.5×10^{-4} M NH_4OH 的 0.5% Triton X - 100 溶液在室温溶解融合的培养物 5 分钟, 然后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗三次。

方法 3: PCR 分析

RT - PCR 是用前述方法 (Narayana 等 (1992), Supra) 完成的。

p65 的引物 (1) 5' GCG GCC AAG CTT AAG ATC
TGC CGA GTA AAC 3' 和 (2) 5' CGC TGC TCT AGA GAA CAC AAT GGC
CAC TTG CCG 3'

限定了一个 150bp 的扩增子。p50 的引物 (1) 5' AAA GGT TAT CGT
TCA GTT 3' 和 (2) 5' TTG TAG ATA GGC AAG GTC 3'

限定了一个 250bp 的扩增子。GAPDH 引物已有描述 [Narayanan, et al (1992) Supra]。细胞因子受体顺序也有描述 [Schmitt, R. M. 等 (1991) Genes Dev. 5: 728 - 740]。

方法 4: 质粒构建

m - P65 cDNA 的一个 350bp 片段从 NIH 3T3 细胞 cDNA 中用 RT - PCR 方法克隆, 包含起始密码子 ATG。PCR 引物包括

(1) 5' ACC GCT CGA GCT AGC CCG GGA CCC TGA CCA
TGG AC 3' 和 (2) 5' CCG GAA TTC GCT AGC GCT TCA CAC ACT GGA TCC
CCA GG 3'

并且扩增片段插入 MAM - Neo - CAT 载体 (Narayanan etd. (Supra)) 的 NheI 部位。有意义及反义克隆通过限制性分析来表示其特性并用测序证实。超螺旋质粒 DNAs 用电穿孔的方法转染 PC - 12 细胞 [Reiss et al, Biochem and Biophysical Res. Comm. 137, 244 (1986)]。

方法 5: 分离 RNA

RNA 用 RNazol 用 - B (Cinna Biotech, Friendswood, Texas) 分离。Northern blot 用前述的方法完成 (Narayanan et al, supra)。

实施例 1:

细胞粘合分析证明要求授权的寡聚物的效用。合成了 NF - kB 个别亚基修饰的偶磷 - 硫寡核苷酸 (表 I)。

基因	种类	序列 (5' 至 3')	参考文献
P65-S	鼠	ACC ATG GAC GAT CTG TTT CCC CTC	3
P65-AS	鼠	GAG GGG AAA CAG ATC GTC CAT GGT	3
P65-S	人	GCC ATG GAC GAA CTG TTC CCC	4
P65-AS	人	GGG GAA CAG TTC GTC CAT GGC	4
P50-S	鼠	ACC ATG GCA GAC GAT GAT CCC	1
P50-AS	鼠	GGG ATC ATC GTC TGC CAT GGT	1
P50-S	人	AGA ATG GCA GAA GAT GAT CCA	2
P50-AS	人	TGG ATC ATC TTC TGC CAT TCT	2

表 I 实施例中使用的偶磷 - 硫寡聚物。寡核苷酸顺序相应于各自的 mRNA 的 5' 端并包含起始密码上游区的 3 - 4 个核苷酸。

用鼠 ES 细胞来检测 NF - kB 的 p50 及 p65 亚基的抑制作用。ES 细胞在白血病抑制因子 (LIF) 存在时不分化, 但从培养基中去除 LIF 后开始分化。在分化的和未分化的 ES 细胞中都加入 p65 反义寡聚物会使细胞从覆盖有明胶的培养皿上完全分离, 而对照的有意义 p65 寡聚物对 ES 细胞的粘合无任何影响。实验的细胞消化后与 p65 的寡聚物混合 (30 μ M), 再植入覆盖有明胶的培养皿, 并在培养 72 小时后拍照以观察结果。

p50 反义寡聚物依赖于 ES 细胞的分化状况表现出激动人心的

作用：对 ES 未分化细胞，p50 反义寡聚物没有作用。除去 LIF 六天后使 ES 细胞分化，这时加入 p50 反义寡聚物会引起细胞完全分开，这与 p65 反义寡聚物作用相同。与上面相似，胰酶消化的细胞（分化或未分化的）与 p50 寡聚物 ($30\ \mu\text{M}$) 混合并植入覆盖明胶的培养皿上并拍照。其中分化的 ES 细胞的状况用不同细胞因子受体（如 Epo - R, C - kit, G - CSF - R, 和 CSF - 1R）的上调来检测。与反义寡聚物分离的细胞用台盼兰排斥法可看出细胞的存活，并在反义寡聚物存在的情况下继续生长两至三周（寡聚物每 48 小时换一次）。这些反义寡聚物对 ES 细胞粘合的作用是高度专一性的，并且不是由于非专一性毒性。许多没有关系的反义寡聚物对 ES 细胞粘合没有这样的作用。反义寡聚物处理的 ES 细胞在悬液中长成聚集体，与 ES 细胞在甲基纤维素培养基中生长情况相似。

(Wiles, M.V. 和 G. Keller (1991) Development 111: 259-267).

此外，反义 p50 和 p65 的作用是短暂的，当没有新寡聚物存在时，反义寡聚物处理的 ES 细胞保持其分化或未分化形态。这些结果表明 NF - κ B 在细胞与基质粘合中起重要作用，因此阻止 NF - κ B 使其不能细胞粘合。

实施例 2:

未分化的 ES 细胞在 p65 寡聚物 ($30\ \mu\text{M}$) 存在下进行培养。细胞 72 小时后经胰酶消化，再植入纤粘蛋白 ($10\ \mu\text{g/ml}$) 或层粘连蛋白 ($10\ \mu\text{g/ml}$) 覆盖的培养皿中并拍照作为对照。

在 p65 反义寡聚物存在下，植在纤粘蛋白、层粘连蛋白或胶原蛋白上的 ES 细胞是完全分开的。

但是，当 ES 细胞植在溶解的喂养层细胞产生的 ECM 上时，p65

反义寡聚物的分散作用完全消失。其它一些粘合分子是由喂养细胞的总 ECM 提供的, 而不依赖于 NF - κ B 的作用。未分化的 ES 细胞在 p65 寡聚物 (30 μ M) 存在的情况下培养。细胞 72 小时后经胰酶消化再植在胶原 IV 型 (5 μ g/ml) 或由溶解 3T3 喂养细胞产生的 ECM 上, 并拍照作分析。

P65 反义寡聚物对 ES 细胞粘合的作用是很快的: 仅五小时内, p65 反义处理的细胞便在其粘合性质上发生戏剧性的变化。未分化 ES 细胞在无寡聚物存在下在覆盖有明胶的培养皿上培养 72 小时。然后倾去培养基, 在附着的细胞里加入含有 30 μ M 反义或有意义 p65 的新培养基。标出一个区域立即拍照 (0 时), 5 小时后进行光学分析。最好, 这些细胞在 12 到 14 小时内完全分开, 而 p65 有意义或 p50 反义寡聚物直到二个星期仍对未分的 ES 细胞的粘合没有任何作用。

在另一个实验中, 分离总 RNA 并用 RT - PCR 分析 p65、p50 和 GAPDH 的表达。

RT - PCR 显示未分化和分化的 ES 细胞在 p65 反义存在下培养 72 小时后, p65 反义寡聚物均阻止了 p65 mRNA 的表达, 而在这些细胞中的 p50 和管家酶 GAPDH 的表达却不受影响。相似地, p50 反义寡聚物无论 ES 细胞分化与否均抑制 p50 mRNA 的表达, 而对 p65 或 GAPDH 的 mRNA 表达没有影响。这些结果表明 P65 与 p50 反义寡聚物对 ES 细胞粘合的作用应归于对各自 mRNA 表达的选择性抑制作用。

p65 反义寡聚物可使各种各样的细胞株及原代细胞完全分开, 其作用是顺序的并具种属专一性。反义 p50 对表 II 的细胞没有作用。

这些结果有力地支持了 NF - kB 的多效性作用以及 NF - kB 的 p65 亚基在细胞粘合过程中更特殊的作用。

表 II

细胞株	细胞类型	反义寡聚物 1, 2, 3
<u>鼠</u>		
3T3 喂养物细胞(原)	成纤维	m p65
RAT-1	成纤维	m p65
NIH 3T3	成纤维	m p65
S-17	骨髓基质细胞	m p65
PC-12	嗜铬细胞瘤	m p65
<u>人</u>		
原代	内皮	h p65
RHEK-1	上皮	h p65
原代角化细胞	上皮	h p65

1) 反义寡聚物对细胞粘合的抑制作用是种属特异性的。2) 相应的有意义寡核苷酸没有作用。3) p50 反义或有意义寡聚物不抑制这些细胞的粘合。

表 II p65 的反义寡聚物抑制多个细胞株的粘合。鼠与人的多种细胞株, 包括成纤维细胞、基质细胞、神经元细胞、内皮细胞及上皮细胞, 暴露于 30 μ M 人或鼠的 p65 寡聚物中并于 48 到 72 小时后拍

照。在所列的每一个细胞株中都观察到对细胞粘合的显著作用。

实施例 3:

为了确证 p65 反义寡聚物对细胞粘合的作用, 我们使用了一种能利用 MAM - Neo - CAT 载体 [Narayanan et al, (1992) (supra)] 表达经氟甲强的松龙诱导的 p65 反义寡聚物的稳定 PC - 12 细胞株, 并且建立了反义的和有意义的 (作为对照) 两种 PC - 12 细胞转染体 (transfectant)。在几个独立克隆中发现了高水平的经氟甲强的松龙诱导的 p65 反义 RNA。对照组的有意义克隆在用氟甲强的松龙 (1×10^{-6} M) 处理 72 小时后, 自 24 小时开始重接种并拍照, 发现细胞粘合性质没有改变。反义 p65 克隆在没有氟甲强的松龙存在时表现正常的形态, 但经氟甲强的松龙诱导后, p65 反义 RNA 对细胞与基质的粘合产生重大影响, 这与这些细胞中 p65 反义寡聚物的作用相似。从这些反义克隆中移去氟甲强的松龙后, 细胞又回复正常形态。

P65 反义寡聚物对细胞粘合的抑制作用可用于被试细胞类型的回复, 为 NF - κ B 复合物对细胞粘合的多效性需要提供依据。个别的 ECMs, 如纤连蛋白、层粘连蛋白或胶原蛋白不能克服由 NF - κ B 作用调节的对 CAMs 的需要。然而, 由喂养层细胞溶解产物产生的 ECMs 具有补充细胞粘合中对 NF - κ B 作用的需要的能力。这说明不依赖于 NF - κ B 的 CAMs 也可能介入细胞粘合。

在稳定的 PC - 12 反义转染体中看到依赖于氟甲强的松龙的对细胞与基质间粘合的抑制作用, 此 PC - 12 反义转染体对诱导的 p65 反义 RNA 高表达。反义寡聚物同 p65 反义 RNA 一样使 PC - 12 细胞与基质分离生长成为聚集体。P65 的表达要能对细胞与基质间粘合作用的抑制远大于对细胞与细胞间粘合作用的抑制。

P50 反义寡聚物对 p50 mRNA 的抑制作用除在 ES 细胞系统有明显作用外, 对其它多种细胞型没有作用。未分化 ES 细胞的粘合不受 P50 表达抑制的影响, 但在分化 ES 细胞中, 与反义 p65 的作用相同, 对 p50 mRNA 的抑制导致对粘合的显著抑制。结果表明在分化 ES 细胞中, NF - kB 的 p65 亚基能与除 p50 外的一些亚基复合或作为同一二聚体来起作用。我们的观察进一步证实, 在不同细胞型中只由 p65 表达的抑制能对细胞粘合产生巨大的作用。在这些条件下 p50 表达不受影响。而在正常细胞中, p65 在调节参与细胞粘合的不同基因中起基本作用, 而只与胞浆抑制蛋白 I (Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1988) Science 242: 540 - 546) 复合也不能起作用。

实施例 4:

恶性细胞在肿瘤演进过程中表现粘合下降。(Ruoslathi 和 Giancotti (supra); Edelman et al. (1987 和 1991), supra).

反义 p65 对 NF - kB 的抑制作用也抑制肿瘤细胞生长。体外结果表明, ras 转化的细胞其转化后表型受所用 p65 反义寡聚物的抑制。在这个实验中, K - ras 转化的 BALB/C 3T3 细胞 (ATCC CCL 163. 3) 用 p65 的有意义或反义寡聚物处理, 并在第十天测定其在软琼脂中的生长。

然后, 将 K - ras 转化的 BALB/C 3T3 细胞在体内稳定表达有意义和反义 RNA 的细胞株用来证明对肿瘤的抑制作用, 此细胞株如实施例 3 所述用氟甲强的松龙可诱导的载体来制备。反义克隆显示依赖于氟甲强的松龙的对 P65 mRNA 表达的抑制作用并且在琼脂中不能形成克隆, 而对照组有意义克隆无上述现象。K - ras mRNA 的表达在这些反义克隆中不被抑制。

最后, 这些表达反义 RNA 的克隆植入裸鼠中, 小鼠用或不用氟甲强的松龙处理。当用氟甲强的松龙处理时, 反义克隆表现出完全丧失肿瘤形成能力。此外, 不用氟甲强的松龙处理的带有反义克隆的荷瘤小鼠, 在用氟甲强的松龙处理后肿瘤完全消退。

更特别地是, 对照组有意义克隆在 7 到 10 天内, 在裸鼠的注射区域很快长出肿瘤, 无论氟甲强的松龙存在与否, 在 2 至 4 周内肿瘤不断增大。在氟甲强的松龙存在下, 反义 p65 比有意义 p65 产生的肿瘤生长缓慢得多 (4 到 6 倍)。再者, 在无氟甲强的松龙存在下, 两周内反义克隆产生的肿瘤, 当小鼠用含氟甲强的松龙的水喂养一至两周后, 肿瘤完全消退。并且小鼠在两个月内不长肿瘤。与此相反, 对照组有意义克隆产生的肿瘤继续生长, 在四至六周内杀死宿主。

基于 p65 反义 RNA 对致癌性的结果, 鼠 p65 反义寡聚物可用于对付裸鼠肿瘤。使用两种寡聚物给药方式: 皮下注射, 每次 1.4mg 寡核苷酸, 每周两次; 定时释放 (14 天) 的 Alza 泵 (Alza Corporation, Palo alto, Calif.), 其中含 2.8mg 寡核苷酸。两种小鼠肿瘤细胞株: K-BALB (纤维肉瘤) 细胞和 B-16 (黑色素瘤) 细胞 (ATCC CRL 6322) 被选来在注射部位形成侵入肿瘤。当小鼠用有意义寡聚物处理时, 无论哪种给药方式肿瘤均快速生长。与此相比, 用反义 p65 治疗的小鼠 70% 以上肿瘤体积明显缩小 (3 至 5 倍)。在带有 B-16 黑色素瘤的免疫未受损害的同系小鼠中, 在 p65 反义寡核苷酸治疗下肿瘤体积也明显缩小。p65 mRNA 在用有意义寡聚物治疗的裸鼠的 B-16 黑色素瘤中可看到其表达, 但用反义寡聚物治疗的却看不到 p65 mRNA 表达。NF-kB 样结合活性用对照的有意义 p65 寡核苷酸治疗的 K-B ALB 和 B-16 细胞的核提取物来检测, 此活性能被

超过 30 倍体积克分子浓度的冷寡核苷酸对抗。与之相比, 此活性在 p65 反义寡聚物处理的细胞中受到显著抑制。用放射性标记的 p65 有意义及反义寡聚物进行实验, 注射后 72 小时检测到肿瘤中有 2-4% 的输入放射活性用 p65 反义寡聚物治疗的小鼠进行二周的疗程后未看到明显的血液学 (haematologic) 血清化学或骨髓的变化。

序列表

(1) 一般数据

(i) 申请人:

(A) 姓名: 霍夫曼拉罗奇 AG

(B) 街道: Grenzacherstrasse 124

(C) 城市: Basle

(D) 州: BS

(E) 国家: 瑞士

(F) 邮政编码 (ZIP): CH - 4002

(G) 电话: 061 - 688 25 11

(H) 电传: 061 - 688 13 95

(I) 电报: 962292/965542 hlr c

(ii) 发明题目: F - KappaB 反义多核苷酸

(iii) 序列号: 4

(iv) 计算机可读形式:

(A) 中型号: Floppy 盘

(B) 计算机: IBM PC

(C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS

(D) 软件: PatentIn Release[#]1. 0, Version[#]1. 25 (EPO)

(vi) 优先申请数据

(A) 申请号: US 07\950531

(B) 申请日期: 1992. 9. 23

(2) SEQ ID No. 1 数据:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) 序列说明: SEQ ID No: 1:

GCCATGGACG AACTGTTCCC C

(2) SEQ ID No. 2 数据:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(xi) 序列说明: SEQ ID No: 2:

AGATGGCAG AAGATGATCC A

(2) SEQ ID No. 3 数据:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 有

(xi) 序列说明: SEQ ID No: 3

GGGGAACAGT TCGTCCATGG C

SEQ ID No. 4 的数据:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 有

(xi) 序列说明: SEQ ID No: 4

TGGATCATCT TCTGCCATTC T