



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101014608 B

(45) 授权公告日 2011. 07. 06

(21) 申请号 200580025490. X

代理人 刘冬 黄可峻

(22) 申请日 2005. 06. 01

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

10/858, 013 2004. 06. 01 US

10/858, 094 2004. 06. 01 US

10/858, 145 2004. 06. 01 US

10/858, 146 2004. 06. 01 US

10/858, 164 2004. 06. 01 US

10/858, 341 2004. 06. 01 US

60/611, 974 2004. 09. 22 US

60/637, 212 2004. 12. 17 US

*C12N 15/11* (2006. 01)

*C07H 21/02* (2006. 01)

*C07H 21/04* (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 98/14172 A1, 1998. 04. 09, 全文.

WO 98/14172 A1, 1998. 04. 09, 全文尤其是第 12 页第 2-5 段, 第 28 页第 3 段至第 29 页第 5 段, 第 31-36 页实施例 2、3.

审查员 王少华

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2007. 01. 29

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2005/018993 2005. 06. 01

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/118824 EN 2006. 06. 15

(73) 专利权人 普隆奈治疗公司

地址 美国密执安州

(72) 发明人 G·谢克内亚德 M·P·索奇

N·古德温 D·奥尔森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

权利要求书 1 页 说明书 55 页 附图 73 页

(54) 发明名称

抑制基因表达的方法和组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于抑制基因表达的方法和组合物。具体的说, 本发明提供基于寡核苷酸的治疗药物, 以抑制与癌症相关的癌基因。

1. 一种组合物,所述组合物包含在生理条件下能与 bc1-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸选自 SEQ ID NO :2、3、7 和 1438。
2. 能与 bc1-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸在制备用于减少能表达 bc1-2 基因的细胞的增殖的药物的应用,其中所述寡核苷酸选自 SEQ ID NO :2、3、7 和 1438。
3. 权利要求 2 的应用,其中所述细胞是选自胰腺癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、白血病、前列腺癌、淋巴瘤、卵巢癌和黑素瘤的癌细胞。
4. 权利要求 3 的应用,其中所述细胞在动物中。
5. 权利要求 4 的应用,其中所述动物是人。
6. 权利要求 3 的应用,其中所述药物还包括试验化合物,所述试验化合物选自多西他赛、长春新碱、长春碱、长春地辛和紫杉醇。
7. 权利要求 6 的应用,其中所述试验化合物是多西他赛。
8. 权利要求 3 的应用,其中所述药物还包括药物传递系统以将所述寡核苷酸引入到所述细胞中。
9. 权利要求 8 的应用,其中所述药物传递系统包括脂质体。
10. 一种药物组合物,其包含具有选自 SEQ ID NO :2、3、7 和 1438 的核酸序列的寡核苷酸和脂质体。
11. 权利要求 10 的组合物,其中所述脂质体是基于心磷脂的阳离子脂质体。
12. 权利要求 11 的组合物,其中所述基于心磷脂的阳离子脂质体制剂是 NEOPHECTIN。
13. 权利要求 11 的组合物,其中所述脂质体包含硫酸甲酯 N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N, N, N-三甲基铵 (DOTAP)。
14. 权利要求 12 的组合物,其中所述 NEOPHECTIN 和所述寡核苷酸以 6 : 1 的电荷比存在。

## 抑制基因表达的方法和组合物

[0001] 本申请是 2005 年 6 月 1 日提交的国际申请号 PCT/US2005/018993 的美国国家阶段, 该国际申请要求以下美国专利申请的优先权: 2004 年 6 月 1 日提交的 10/858, 013; 2004 年 6 月 1 日提交的 10/858, 094; 2004 年 6 月 1 日提交的 10/858, 145; 2004 年 6 月 1 日提交的 10/858, 146; 2004 年 6 月 1 日提交的 10/858, 164; 2004 年 6 月 1 日提交的 10/858, 341; 2004 年 9 月 22 日提交的 60/611, 974; 和 2004 年 12 月 17 日提交的 60/637, 212。

[0002] 本申请要求以下共同待审专利申请系列号的优先权: 2004 年 6 月 1 日提交的第 10/858, 164 号、2004 年 6 月 1 日提交的第 10/858, 341 号、2004 年 6 月 1 日提交的第 10/858, 145 号、2004 年 6 月 1 日提交的第 10/858, 094 号、2004 年 6 月 1 日提交的第 10/858, 013 号、2004 年 6 月 1 日提交的第 10/858, 146 号、2004 年 9 月 22 日提交的第 60/611, 974 号和 2004 年 12 月 17 日提交的第 60/637, 212 号。

[0003] 发明领域

[0004] 本发明涉及抑制基因表达的方法和组合物。具体的说, 本发明提供基于寡核苷酸的治疗药物以抑制与癌症相关的癌基因。

[0005] 发明背景

[0006] 癌基因已成为理解癌症生物学的主要概念, 可为治疗药物提供有价值的靶标。所有的癌基因及其产物都在细胞内部起作用。这使得基于蛋白质的药物因其特异性涉及配体-受体识别而无效。

[0007] 反义寡脱氧核苷酸(寡核苷酸)正作为特异性地靶向癌基因的治疗化合物而得到研究(Wickstrom, E. (编辑). *Prospects for antisense nucleic acid therapy of cancer and Aids*. New York: Wiley-Liss, Inc. 1991; Murray, J. A. H. (编辑). *Antisense RNA and DNA* New York: Wiley-Liss, Inc. 1992)。反义药物是修饰的合成寡核苷酸, 通过干扰靶 mRNA 的核糖体翻译而起作用。迄今所开发的反义药物是通过结合靶 mRNA 并触发核糖核酸酶 H (RNA 酶 H) 降解 mRNA 来破坏靶 mRNA。寡核苷酸的半寿期约为 20 分钟, 因此它们在大多数细胞中被快速降解 (Fisher, T. L. 等, *Nucleic Acids Res.* 21 :3857-3865 (1993))。为提高寡核苷酸的稳定性, 通常对它们进行化学修饰, 例如用硫替代其骨架中一个磷酸酯中的氧(硫代磷酸酯)来保护它们 (Milligan, J. F. 等, *J. Med. Chem.* 36 :1923-1937 (1993); Wagner, R. W. 等, *Science* 260 :1510-1513 (1993))。但是, 这种修饰只能减慢反义药物的降解, 因此反义药物需要大剂量才能有效。

[0008] 尽管人们对反义疗法的应用充满乐观, 但反义药物的使用存在许多严重问题, 如难以使足量的反义药物进入细胞中, 存在非序列特异性作用, 因大量含硫的硫代磷酸酯寡核苷酸和它们不能进入其靶细胞而造成毒性, 以及因连续大剂量传递而费用高。反义药物已有的另一问题是它们的活性无特异性。

[0009] 故另外需要不基于蛋白质的靶向癌基因的癌症治疗药物。特别需要在低剂量下有效和对对象无毒的治疗药物。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及抑制基因表达的方法和组合物。具体的说, 本发明提供基于寡核苷酸

的治疗药物以抑制与癌症相关的癌基因。

[0012] 在某些实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 bcl-3 基因启动子区杂交的第一寡核苷酸(例如 SEQ ID NO:1438,3,7,8 或 9)的组合物。在某些实施方案中,第一寡核苷酸中的至少一个胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,第一寡核苷酸中的所有胞嘧啶碱基都是 5-甲基胞嘧啶。在某些优选的实施方案中,第一寡核苷酸与 bcl-2 基因启动子区的杂交抑制 bcl-2 基因的表达。在某些实施方案中,bcl-2 基因在细胞的染色体上,第一寡核苷酸与 bcl-2 基因启动子区的杂交减少细胞的增殖。在某些实施方案中,所述组合物还包含第二寡核苷酸。在某些实施方案中,第二寡核苷酸中的至少一个(例如所有的)胞嘧啶是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,所述第二寡核苷酸包括 SEQ ID NO:3,7,8 或 9,且与第一寡核苷酸不同(例如如果第二寡核苷酸具有 SEQ ID NO:3 的序列,则第一寡核苷酸具有 SEQ ID NO:3 以外的序列等等)。在某些实施方案中,第二寡核苷酸能与第二基因启动子区杂交,其中所述第二基因不是 bcl-2。在某些实施方案中,第二基因是癌基因(例如 c-ki-Ras、c-Ha-Ras、c-myc、Her-2 或 TGF- $\alpha$ )。

[0013] 在其它实施方案中,本发明提供包含寡核苷酸的组合物,所述寡核苷酸能在包括 SEQ ID NO:1 的核苷酸 1-40 之间、SEQ ID NO:1 的核苷酸 161-350 之间、SEQ ID NO:1 的核苷酸 401-590 之间或 SEQ ID NO:1 的核苷酸 1002-1260 之间的位置与 bcl-2 基因启动子区杂交。

[0014] 在另外其它实施方案中,本发明提供方法,该方法包括:提供寡核苷酸(例如 SEQ ID NO:1438,3,7,8 或 9)及能够增殖和包含能够表达的 bcl-2 基因的细胞;将寡核苷酸引入到细胞中。在某些实施方案中,引入的结果导致细胞增殖减少。在某些实施方案中,引入的结果导致 bcl-2 基因表达的抑制。在某些实施方案中,细胞是癌细胞。在其它实施方案中,细胞在宿主动物(例如非人哺乳动物或人)中。在某些实施方案中,寡核苷酸以每公斤体重 0.01  $\mu$ g-100g 的剂量,优选以每公斤体重 1mg-100mg 的剂量引入到宿主动物中。在某些实施方案中,寡核苷酸每天一次或多次引入到宿主动物中。在其它实施方案中,寡核苷酸连续引入到宿主动物中。在还其它实施方案中,细胞在细胞培养物中。在某些实施方案中,该方法还包括将试验化合物引入到细胞中的步骤。在某些实施方案中,试验化合物是公知的化疗药物。在某些实施方案中,癌症是胰腺癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、白血病、前列腺癌、淋巴瘤、卵巢癌或黑素瘤。在某些实施方案中,寡核苷酸中的至少一个(例如所有的)胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。

[0015] 在某些实施方案中,该方法还提供药物传递系统。在某些实施方案中,药物传递系统包含脂质体(例如包含中性脂质或脂质样化合物的脂质体)。在某些实施方案中,药物传递系统包含细胞靶向成分(例如细胞表面受体或核受体的配体或配体样分子)。在某些实施方案中,药物传递系统供在体内使用,寡核苷酸和脂质体存在的比例为 2:1-1:3/ $\mu$ g-100mg 每公斤体重。

[0016] 本发明还提供方法,该方法包括:提供能与 bcl-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸及包含 bcl-2 基因的细胞;将寡核苷酸引入到细胞中。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,核苷酸与 bcl-2 基因启动子区完全互补。在其它实施方案中,寡核苷酸与 bcl-2 基因启动子区部分互补。例如,在某些实施方案中,寡核苷酸含有 bcl-2 基因启动子

区的一个错配。在某些优选的实施方案中,寡核苷酸只与 bcl-2 基因启动子区互补,不与人基因组的其它区域完全互补。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度在 10 至 60 个核苷酸之间,优选在 15 至 35 个核苷酸之间。

[0017] 在某些实施方案中,该方法还提供药物传递系统。在某些实施方案中,药物传递系统包含脂质体(例如包含中性脂质或脂质样化合物的脂质体)。在某些实施方案中,药物传递系统包含细胞靶向成分(例如细胞表面受体或核受体的配体或配体样分子)。在某些实施方案中,药物传递系统供在体内使用,寡核苷酸和脂质体存在的比例为 2 : 1-1 : 3/1  $\mu$ g-100mg 每公斤体重。

[0018] 在还其它实施方案中,本发明提供包含寡核苷酸的组合物,该寡核苷酸能在生理条件下与 bcl-2 基因启动子区杂交。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基是 5- 甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸与 bcl-2 基因启动子区完全互补。在其它实施方案中,寡核苷酸与 bcl-2 基因启动子区部分互补。例如,在某些实施方案中,寡核苷酸含有 bcl-2 基因启动子区的一个错配。在某些优选的实施方案中,寡核苷酸只与 bcl-2 基因启动子区互补,不与人基因组的其它区域完全互补。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度在 10 至 60 个核苷酸之间,优选在 15 至 35 个核苷酸之间。

[0019] 本发明还在使得 bcl-2 基因表达被抑制的条件下提供包含能在生理条件下与 bcl-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0020] 本发明另外在使得细胞增殖减少的条件下提供包含寡核苷酸的组合物,该寡核苷酸能在生理条件下与位于细胞染色体上的 bcl-2 基因启动子区杂交。

[0021] 本发明也提供包含第一寡核苷酸和第二寡核苷酸的组合物,所述第一寡核苷酸能在生理条件下与 bcl-2 基因启动子区杂交,包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基是 5- 甲基胞嘧啶;所述第二寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基是 5- 甲基胞嘧啶。

[0022] 在某些实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 bcl-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸和说明书的试剂盒,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基是 5- 甲基胞嘧啶;所述说明书说明如何使用试剂盒来减少在染色体上包含 bcl-2 基因的细胞的增殖或者抑制基因表达。在某些实施方案中,试剂盒中的组合物用以治疗对象的癌症,所述说明书包括如何使用试剂盒来治疗对象的癌症的说明。在某些实施方案中,说明书是美国食品和药物管理局(U.S. Food and Drug Agency)所要求的医药品标签说明。

[0023] 本发明也提供方法,该方法包括:提供来自确诊患有癌症的对象的生物样品及用以检测样品中是否存在癌基因表达的试剂;检测样品中是否存在癌基因表达;向对象中引入能在生理条件下与生物样品中所表达的癌基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基是 5- 甲基胞嘧啶。

[0024] 本发明另外提供抑制对象中的基因表达的方法(例如用以治疗癌症或其它高增殖性疾病),该方法包括提供能在生理条件下与生物样品中所表达的与癌症或高增殖性疾病相关的基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中

CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶；在使得基因表达被抑制的条件下将寡核苷酸给予对象。在某些实施方案中，对象是人。

[0025] 在又其它实施方案中，本发明提供筛选化合物的方法，所述方法包括提供包含可疑癌基因的细胞及能与该基因启动子区杂交的寡核苷酸；将寡核苷酸引入到细胞中；确定在寡核苷酸存在下相对于寡核苷酸不存在时细胞的增殖是否被抑制。在某些实施方案中，细胞在细胞培养物（例如癌细胞系）中。在其它实施方案中，细胞在宿主动物（例如非人哺乳动物）中。在某些实施方案中，该方法是高通量筛选方法。

[0026] 因此，在某些实施方案中，本发明提供包含能在生理条件下与 c-ki-Ras 基因启动子区杂交的第一寡核苷酸（例如 SEQ ID NO:47,48,50 或 53）的组合物。在某些实施方案中，第一寡核苷酸的至少一个（例如所有的）胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中，第一寡核苷酸与 c-ki-Ras 基因启动子区的杂交能抑制 c-ki-Ras 基因的表达。在某些实施方案中，c-ki-Ras 基因在细胞的染色体上，第一寡核苷酸与 c-ki-Ras 基因启动子区的杂交能减少细胞的增殖。在某些实施方案中，组合物还包含第二寡核苷酸。在某些实施方案中，第二寡核苷酸中的至少一个胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在其它实施方案中，第二寡核苷酸中的所有胞嘧啶碱基都是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中，第二寡核苷酸包括 SEQ ID NO:47,48,50 或 53，其中所述第二寡核苷酸与第一寡核苷酸不同（例如如果第二寡核苷酸具有 SEQ ID NO:47 的序列，则第一寡核苷酸具有 SEQ ID NO:47 以外的序列等等）。在某些实施方案中，第二寡核苷酸能与第二基因启动子区杂交，其中所述第二基因不是 c-ki-Ras。在某些实施方案中，第二基因是癌基因（例如包括但不限于 c-Ha-Ras、c-myc、Her-2、TGF- $\alpha$  和 bcl-2）。

[0027] 在另外其它实施方案中，本发明提供包含寡核苷酸的组合物，该寡核苷酸能在包括 SEQ ID NO:46 的核苷酸 1-289 之间或 SEQ ID NO:46 的核苷酸 432-658 之间的位置与 c-ki-Ras 基因启动子区杂交。

[0028] 在其它实施方案中，本发明提供方法，所述方法包括提供能与 c-ki-Ras 基因启动子区杂交的寡核苷酸（例如包含 SEQ ID NO:47,48,50 或 53 的寡核苷酸）及包含能够表达的 c-ki-Ras 基因的细胞，其中所述细胞能够增殖；将寡核苷酸引入到细胞中。在某些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对，其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。在其它实施方案中，寡核苷酸的 CG 二核苷酸对中的所有胞嘧啶碱基都是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中，寡核苷酸能在包括 SEQ ID NO:46 的核苷酸 1-289 之间或 SEQ ID NO:46 的核苷酸 432-658 之间的位置与 c-ki-Ras 基因启动子区杂交。在某些实施方案中，寡核苷酸的长度在 15-30 个碱基之间。

[0029] 在某些优选的实施方案中，引入的结果导致细胞的增殖减少。在某些实施方案中，引入的结果导致 c-ki-Ras 基因表达的抑制。在某些实施方案中，细胞是癌细胞（例如包括但不限于胰腺癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、白血病、前列腺癌、淋巴瘤、卵巢癌和黑素瘤）。在某些实施方案中，细胞是在宿主动物中。在某些实施方案中，宿主动物是非人哺乳动物。在某些实施方案中，寡核苷酸以每公斤体重 0.01  $\mu$ g-100g 的剂量，优选以每公斤体重 1mg-100mg 的剂量引入到宿主动物中。在某些实施方案中，寡核苷酸每天一次或多次引入到宿主动物中。在其它实施方案中，寡核苷酸连续引入到宿主动物中（例如持续 2 小时至 2 周之间的时间）。在其它实施方案中，细胞在细胞培养物中。在某些实施方案中，该方

法还包括将试验化合物引入到细胞中的步骤。在某些实施方案中,试验化合物是公知的化疗药物。

[0030] 在某些实施方案中,该方法还提供药物传递系统。在某些实施方案中,药物传递系统包含脂质体(例如包含中性脂质或脂质样化合物的脂质体)。在某些实施方案中,药物传递系统包含细胞靶向成分(例如细胞表面受体或核受体的配体或配体样分子)。在某些实施方案中,药物传递系统供在体内使用,寡核苷酸和脂质体存在的比例为 2 : 1-1 : 3/1  $\mu$ g-100mg 每公斤体重。

[0031] 在还其它实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 c-ki-Ras 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物,其中寡核苷酸中的至少一个(例如所有的)胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸与 c-ki-Ras 基因启动子区完全互补。在其它实施方案中,寡核苷酸与 c-ki-Ras 基因启动子区部分互补。例如,在某些实施方案中,寡核苷酸含有 c-ki-Ras 基因启动子区的一个错配。在某些优选的实施方案中,寡核苷酸只与 c-ki-Ras 基因启动子区互补,不与人基因组的其它区域完全互补。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度在 10 至 60 个核苷酸之间,优选在 15 至 35 个核苷酸之间。

[0032] 本发明还在使得 c-ki-Ras 基因表达被抑制的条件下提供包含能在生理条件下与 c-ki-Ras 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0033] 本发明另外在使得细胞增殖减少的条件下提供包含能在生理条件下与位于细胞染色体上的 c-ki-Ras 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0034] 本发明也提供包含第一寡核苷酸和第二寡核苷酸的组合物,所述第一寡核苷酸能在生理条件下与 c-ki-Ras 基因启动子区杂交,包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;所述第二寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。

[0035] 在某些实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 c-ki-Ras 基因启动子区杂交的寡核苷酸和说明书的试剂盒,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;所述说明书说明如何使用试剂盒来减少在染色体上包含 c-ki-Ras 基因的细胞的增殖或者抑制基因表达。在某些实施方案中,试剂盒中的组合物用以治疗对象的癌症,所述说明书包括如何使用试剂盒来治疗对象的癌症的说明。在某些实施方案中,说明书是美国食品和药物管理局所要求的医药品标签说明。

[0036] 本发明也提供方法,该方法包括:提供来自确诊患有癌症的对象的生物样品及用以检测样品中是否存在癌基因表达的试剂;检测样品中是否存在癌基因表达;给予对象能在生理条件下与生物样品中所表达的癌基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。

[0037] 本发明另外提供抑制对象中的基因表达的方法(例如用以治疗癌症或其它高增殖性疾病),该方法包括提供能在生理条件下与生物样品中所表达的与癌症或高增殖性疾病相关的基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶;在使得基因表达被抑制的条件下将寡核苷酸给予对象。在某些实施方案中,对象是人。

[0038] 在又其它实施方案中,本发明提供筛选化合物的方法,所述方法包括提供包含可疑癌基因的细胞及能与该基因启动子区杂交的寡核苷酸;将寡核苷酸给予细胞;确定在寡核苷酸存在下相对于寡核苷酸不存在时细胞的增殖是否被抑制。在某些实施方案中,细胞在细胞培养物(例如癌细胞系)中。在其它实施方案中,细胞在宿主动物(例如非人哺乳动物)中。在某些实施方案中,该方法是高通量筛选方法。

[0039] 在某些实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 c-myc 基因启动子区杂交的第一寡核苷酸(例如 SEQ ID NO:110,111,112,113,114 或 115)的组合物。在某些实施方案中,第一寡核苷酸中的至少一个(例如所有的)胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些优选的实施方案中,第一寡核苷酸与 c-myc 基因启动子区的杂交能抑制 c-myc 基因的表达。在某些实施方案中,c-myc 基因在细胞的染色体上,第一寡核苷酸与 c-myc 基因启动子区的杂交能减少细胞的增殖。在某些实施方案中,组合物还包含第二寡核苷酸。在某些实施方案中,第二寡核苷酸中的至少一个(例如所有的)胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,第二寡核苷酸包括 SEQ ID NO:110,111,112,113,114 或 115,其中所述第二寡核苷酸与第一寡核苷酸不同(例如如果第二寡核苷酸具有 SEQ ID NO:110 的序列,则第一寡核苷酸具有 SEQ ID NO:110 以外的序列等等)。在某些实施方案中,第二寡核苷酸能与第二基因启动子区杂交,其中所述第二基因不是 c-myc。在某些实施方案中,第二基因是癌基因(例如 c-ki-Ras、c-Ha-Ras、bcl-2、Her-2 或 TGF- $\alpha$ )。

[0040] 本发明还提供包含寡核苷酸的组合物,该寡核苷酸能在包括 SEQ ID NO:108 的核苷酸 3-124 之间或 SEQ ID NO:108 的核苷酸 165-629 之间的位置与 c-myc 基因启动子区杂交。

[0041] 本发明还提供方法,该方法包括:提供能在生理条件下与 c-myc 基因启动子区杂交的寡核苷酸(例如 SEQ ID NO:110,111,112,113,114 或 115)及包含 c-myc 基因、能够表达 c-myc 基因的细胞,其中所述细胞能够增殖;将寡核苷酸引入到细胞中。在某些实施方案中,引入的结果导致细胞增殖减少。在某些实施方案中,引入的结果导致 c-myc 基因表达的抑制。在某些实施方案中,细胞是癌细胞。在其它实施方案中,细胞在宿主动物(例如非人哺乳动物或人)中。在某些实施方案中,寡核苷酸以每公斤体重 0.01  $\mu$ g-100g 的剂量,优选以每公斤体重 1mg-100mg 的剂量引入到宿主动物中。在某些实施方案中,寡核苷酸每天一次或多次引入到宿主动物中。在其它实施方案中,寡核苷酸连续引入到宿主动物中。在还其它实施方案中,细胞在细胞培养物中。在某些实施方案中,该方法还包括将试验化合物引入到细胞中的步骤。在某些实施方案中,试验化合物是公知的化疗药物。在某些实施方案中,癌症是胰腺癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、白血病、前列腺癌、淋巴瘤、卵巢癌或黑素瘤。

[0042] 在某些实施方案中,该方法还提供药物传递系统。在某些实施方案中,药物传递系统包含脂质体(例如包含中性脂质或脂质样化合物的脂质体)。在某些实施方案中,药物传递系统包含细胞靶向成分(例如细胞表面受体或核受体的配体或配体样分子)。在某些实施方案中,药物传递系统供在体内使用,寡核苷酸和脂质体存在的比例为 2:1-1:3/ $\mu$ g-100mg 每公斤体重。

[0043] 在某些实施方案中,寡核苷酸中的至少一个、优选所有的胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度在 10 至 60 个核苷酸之间,优选在 15 至 35 个核



核苷酸之间。在某些实施方案中,寡核苷酸在包括 SEQ ID NO:108 的核苷酸 3-124 之间或 SEQ IDNO:108 的核苷酸 165-629 之间的位置与 c-myc 基因启动子区杂交。

[0044] 在还其它实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 c-myc 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物,所述寡核苷酸包含至少一个 GC 二核苷酸对,其中 GC 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸与 c-myc 基因启动子区完全互补。在其它实施方案中,寡核苷酸与 c-myc 基因启动子区部分互补。例如,在某些实施方案中,寡核苷酸含有 c-myc 基因启动子区的一个错配。在某些优选的实施方案中,寡核苷酸只与 c-myc 基因启动子区互补,不与人基因组的其它区域完全互补。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度在 10 至 60 个核苷酸之间,优选在 15 至 35 个核苷酸之间。

[0045] 本发明还在使得 c-myc 基因表达被抑制的条件下提供包含能在生理条件下与 c-myc 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0046] 本发明另外在使得细胞增殖减少的条件下提供包含能在生理条件下与位于细胞染色体上的 c-myc 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0047] 本发明也提供包含第一寡核苷酸和第二寡核苷酸的组合物,所述第一寡核苷酸能在生理条件下与 c-myc 基因启动子区杂交,包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;所述第二寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。

[0048] 在某些实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 c-myc 基因启动子区杂交的寡核苷酸和说明书的试剂盒,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;所述说明书说明如何使用试剂盒来减少在染色体上包含 c-myc 基因的细胞的增殖或者抑制基因表达。在某些实施方案中,试剂盒中的组合物用以治疗对象的癌症,所述说明书包括如何使用试剂盒来治疗对象的癌症的说明。在某些实施方案中,说明书是美国食品和药物管理局所要求的医药品标签说明。

[0049] 本发明也提供方法,该方法包括:提供来自确诊患有癌症的对象的生物样品及用以检测样品中是否存在癌基因表达的试剂;检测样品中是否存在癌基因表达;给予对象能在生理条件下与生物样品中所表达的癌基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。

[0050] 本发明另外提供抑制对象中的基因表达的方法(例如用以治疗癌症或其它高增殖性疾病),该方法包括提供能在生理条件下与生物样品中所表达的与癌症或高增殖性疾病相关的基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;在使得基因表达被抑制的条件下将寡核苷酸给予对象。在某些实施方案中,对象是人。

[0051] 在又其它实施方案中,本发明提供筛选化合物的方法,所述方法包括提供包含可疑癌基因的细胞及能与该基因启动子区杂交的寡核苷酸;将寡核苷酸给予细胞;确定在寡核苷酸存在下相对于寡核苷酸不存在时细胞的增殖是否被抑制。在某些实施方案中,细胞在细胞培养物(例如癌细胞系)中。在其它实施方案中,细胞在宿主动物(例如非人哺乳动物)中。在某些实施方案中,该方法是高通量筛选方法。

[0052] 在某些实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 c-Ha-ras 基因启动子区

杂交的第一寡核苷酸（例如 SEQ ID NO :67, 68, 69, 71, 73, 74, 76, 78, 84, 160, 161 或 162）的组合物。在某些实施方案中，第一寡核苷酸中的至少一个胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中，第一寡核苷酸中的所有胞嘧啶碱基都是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中，第一寡核苷酸能在生理条件下与 c-Ha-ras 基因启动子区杂交。在某些优选的实施方案中，第一寡核苷酸与 c-Ha-ras 基因启动子区的杂交能抑制 c-Ha-ras 基因的表达。在某些实施方案中，c-Ha-ras 基因在细胞的染色体上，第一寡核苷酸与 c-Ha-ras 基因启动子区的杂交能减少细胞的增殖。在某些实施方案中，组合物还包含第二寡核苷酸。在某些实施方案中，第二寡核苷酸中的至少一个（例如所有的）胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中，第二寡核苷酸包括 SEQ ID NO :67, 68, 69, 71, 73, 74, 76, 78, 84, 160, 161 或 162，其中所述第一寡核苷酸与第二寡核苷酸不同（例如如果第二寡核苷酸具有 SEQ ID NO :67 的序列，则第一寡核苷酸具有 SEQ ID NO :67 以外的序列等等）。在某些实施方案中，第二寡核苷酸能与第二基因启动子区杂交，其中所述第二基因不是 c-Ha-ras。在某些实施方案中，第二基因是癌基因（例如 c-ki-Ras、c-myc、bcl-2、Her-2 或 TGF- $\alpha$ ）。

[0053] 在其它实施方案中，本发明提供包含寡核苷酸的组合物，该寡核苷酸能在包括 SEQ ID NO :66 的核苷酸 21-220 之间、SEQ ID NO :66 的核苷酸 233-860 之间、SEQ ID NO :66 的核苷酸 1411-1530 之间或 SEQ ID NO :66 的核苷酸 1631-1722 之间的位置与 c-Ha-ras 基因启动子区杂交。

[0054] 在另外其它实施方案中，本发明提供方法，该方法包括：提供能在生理条件下与 c-Ha-ras 基因启动子区杂交的寡核苷酸（例如 SEQ ID NO :67, 68, 69, 71, 73, 74, 76, 78, 84, 160, 161 或 162）及包含能够表达的 c-Ha-ras 基因的细胞，其中所述细胞能够增殖；将寡核苷酸引入到细胞中。在某些实施方案中，寡核苷酸的长度在 15-30 个碱基之间。在某些实施方案中，寡核苷酸能在包括 SEQ ID NO :66 的核苷酸 21-220 之间、SEQ ID NO :66 的核苷酸 233-860 之间、SEQ ID NO :66 的核苷酸 1411-1530 之间或 SEQ ID NO :66 的核苷酸 1631-1722 之间的位置与 c-Ha-ras 基因启动子区杂交。

[0055] 在某些实施方案中，引入的结果导致细胞的增殖减少。在某些实施方案中，引入的结果导致 c-Ha-ras 基因表达的抑制。在某些实施方案中，细胞是癌细胞。在某些实施方案中，癌症是胰腺癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、白血病、前列腺癌、淋巴瘤、卵巢癌和黑素瘤。在其它实施方案中，细胞是在宿主动物（例如非人哺乳动物或人）中。在某些实施方案中，寡核苷酸以每公斤体重 0.01  $\mu$ g-100g 的剂量，优选以每公斤体重 1mg-100mg 的剂量引入到宿主动物中。在某些实施方案中，寡核苷酸每天一次或多次引入到宿主动物中。在其它实施方案中，寡核苷酸连续引入到宿主动物中（例如持续 2 小时至 2 周之间的时间）。在其它实施方案中，细胞在细胞培养物中。在某些实施方案中，该方法还包括将试验化合物引入到细胞中的步骤。在某些实施方案中，试验化合物是公知的化疗药物。

[0056] 在某些实施方案中，该方法还提供药物传递系统。在某些实施方案中，药物传递系统包含脂质体（例如包含中性脂质或脂质样化合物的脂质体）。在某些实施方案中，药物传递系统包含细胞靶向成分（例如细胞表面受体或核受体的配体或配体样分子）。在某些实施方案中，药物传递系统供在体内使用，寡核苷酸和脂质体存在的比例为 2 : 1-1 : 3/1  $\mu$ g-100mg 每公斤体重。

[0057] 在还其它实施方案中，本发明提供包含能在生理条件下与 c-Ha-ras 基因启动子

区杂交的寡核苷酸的组合物。在某些实施方案中,寡核苷酸中的至少一个(例如所有的)胞嘧啶碱基是 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸与 c-Ha-ras 基因启动子区完全互补。在其它实施方案中,寡核苷酸与 c-Ha-ras 基因启动子区部分互补。例如,在某些实施方案中,寡核苷酸含有 c-Ha-ras 基因启动子区的一个错配。在某些优选的实施方案中,寡核苷酸只与 c-Ha-ras 基因启动子区互补,不与人基因组的其它区域完全互补。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度在 10 至 60 个核苷酸之间,优选在 15 至 35 个核苷酸之间。

[0058] 本发明还在使得 c-Ha-ras 基因表达被抑制的条件下提供包含能在生理条件下与 c-Ha-ras 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0059] 本发明另外在使得细胞增殖减少的条件下提供包含能在生理条件下与位于细胞染色体上的 c-Ha-ras 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0060] 本发明也提供包含第一寡核苷酸和第二寡核苷酸的组合物,所述第一寡核苷酸能在生理条件下与 c-Ha-ras 基因启动子区杂交,包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;所述第二寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。

[0061] 在某些实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 c-Ha-ras 基因启动子区杂交的寡核苷酸和说明书的试剂盒,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;所述说明书说明如何使用试剂盒来减少在染色体上包含 c-Ha-ras 基因的细胞的增殖或者抑制基因表达。在某些实施方案中,试剂盒中的组合物用以治疗对象的癌症,所述说明书包括如何使用试剂盒来治疗对象的癌症的说明。在某些实施方案中,说明书是美国食品和药物管理局所要求的医药品标签说明。

[0062] 本发明也提供方法,该方法包括:提供来自确诊患有癌症的对象的生物样品及用以检测样品中是否存在癌基因表达的试剂;检测样品中是否存在癌基因表达;给予对象能在生理条件下与生物样品中所表达的癌基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。

[0063] 本发明另外提供抑制对象中的基因表达的方法(例如用以治疗癌症或其它高增殖性疾病),该方法包括提供能在生理条件下与生物样品中所表达的与癌症或高增殖性疾病相关的基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;在使得基因表达被抑制的条件下将寡核苷酸给予对象。在某些实施方案中,对象是人。

[0064] 在又其它实施方案中,本发明提供筛选化合物的方法,所述方法包括提供包含可疑癌基因的细胞及能与该基因启动子区杂交的寡核苷酸;将寡核苷酸给予细胞;确定在寡核苷酸存在下相对于寡核苷酸不存在时细胞的增殖是否被抑制。在某些实施方案中,细胞在细胞培养物(例如癌细胞系)中。在其它实施方案中,细胞在宿主动物(例如非人哺乳动物)中。在某些实施方案中,该方法是高通量筛选方法。

[0065] 在某些实施方案中,本发明提供包含包括 SEQ ID NO:31,32,35,36,37 或 38 的寡核苷酸的组合物。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸的所有

CG 二核苷酸对中的所有胞嘧啶碱基都是 5- 甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸能在生理条件下与 Her-2 基因启动子区杂交。在某些优选的实施方案中,寡核苷酸与 Her-2 基因启动子区的杂交能抑制 Her-2 基因的表达。在某些实施方案中,Her-2 基因在细胞的染色体上,寡核苷酸与 Her-2 基因启动子区的杂交能减少细胞的增殖。在某些实施方案中,组合物还包含第二寡核苷酸。在某些实施方案中,第二寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,第二寡核苷酸包括 SEQ ID NO :31,32,35,36,37 或 38。在某些实施方案中,第二寡核苷酸能与第二基因启动子区杂交,其中所述第二基因不是 Her-2。在某些实施方案中,第二基因是癌基因(例如 c-ki-Ras, c-myc, bcl-2, c-Ha-ras 或 TGF- $\alpha$ )。

[0066] 在其它实施方案中,本发明提供包含寡核苷酸的组合物,该寡核苷酸能在包括 SEQ ID NO :29 的核苷酸 205-344 之间或 SEQ ID NO :29 的核苷酸 382-435 之间的位置与 c-myc 基因启动子区杂交。

[0067] 在还其它实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 Her-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0068] 在另外其它实施方案中,本发明还提供方法,该方法包括:提供寡核苷酸(例如 SEQ ID NO :31,32,35,36,37 或 38)及包含 Her-2 基因的细胞;将寡核苷酸给予细胞。在某些实施方案中,给予的结果导致细胞增殖减少。在某些实施方案中,给予的结果导致 Her-2 基因表达的抑制。在某些实施方案中,细胞是癌细胞。在其它实施方案中,细胞在宿主动物(例如非人哺乳动物或人)中。在某些实施方案中,寡核苷酸以每公斤体重 0.01  $\mu$ g-100g 的剂量,优选以每公斤体重 1mg-100mg 的剂量引入到宿主动物中。在某些实施方案中,寡核苷酸每天一次或多次引入到宿主动物中。在其它实施方案中,寡核苷酸连续引入到宿主动物中。在还其它实施方案中,细胞在细胞培养物中。在某些实施方案中,该方法还包括给予细胞试验化合物的步骤。在某些实施方案中,试验化合物是公知的化疗药物。在某些实施方案中,癌症是胰腺癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、白血病、前列腺癌、淋巴瘤、卵巢癌或黑素瘤。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个、优选所有的胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶。

[0069] 本发明还提供方法,所述方法包括提供能与 Her-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸及包含 Her-2 基因的细胞;将寡核苷酸给予细胞。

[0070] 在还其它实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 Her-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸与 Her-2 基因启动子区完全互补。在其它实施方案中,寡核苷酸与 Her-2 基因启动子区部分互补。例如,在某些实施方案中,寡核苷酸含有 Her-2 基因启动子区的一个错配。在某些优选的实施方案中,寡核苷酸只与 Her-2 基因启动子区互补,不与人基因组的其它区域完全互补。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度在 10 至 60 个核苷酸之间,优选在 15 至 35 个核苷酸之间。

[0071] 本发明还在使得 Her-2 基因表达被抑制的条件下提供包含能在生理条件下与 Her-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0072] 本发明另外在使得细胞增殖减少的条件下提供包含能在生理条件下与位于细胞染色体上的 Her-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0073] 本发明也提供包含第一寡核苷酸和第二寡核苷酸的组合物,所述第一寡核苷酸能在生理条件下与 Her-2 基因启动子区杂交,包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶;所述第二寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶。

[0074] 在某些实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 Her-2 基因启动子区杂交的寡核苷酸和说明书的试剂盒,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶;所述说明书说明如何使用试剂盒来减少在染色体上包含 Her-2 基因的细胞的增殖或者抑制基因表达。在某些实施方案中,试剂盒中的组合物用以治疗对象的癌症,所述说明书包括如何使用试剂盒来治疗对象的癌症的说明。在某些实施方案中,说明书是美国食品和药物管理局所要求的医药品标签说明。

[0075] 本发明也提供方法,该方法包括:提供来自确诊患有癌症的对象的生物样品及用以检测样品中是否存在癌基因表达的试剂;检测样品中是否存在癌基因表达;给予对象能在生理条件下与生物样品中所表达的癌基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶。

[0076] 本发明另外提供抑制对象中的基因表达的方法(例如用以治疗癌症或其它高增殖性疾病),该方法包括提供能在生理条件下与生物样品中所表达的与癌症或高增殖性疾病相关的基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶;在使得基因表达被抑制的条件下将寡核苷酸给予对象。在某些实施方案中,对象是人。

[0077] 在又其它实施方案中,本发明提供筛选化合物的方法,所述方法包括提供包含可疑癌基因的细胞及能与该基因启动子区杂交的寡核苷酸;将寡核苷酸给予细胞;确定在寡核苷酸存在下相对于寡核苷酸不存在时细胞的增殖是否被抑制。在某些实施方案中,细胞在细胞培养物(例如癌细胞系)中。在其它实施方案中,细胞在宿主动物(例如非人哺乳动物)中。在某些实施方案中,该方法是高通量筛选方法。

[0078] 在某些实施方案中,本发明提供包含包括 SEQ ID NO:134,136,139,140,141,142,143 或 144 的寡核苷酸的组合物。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸的所有 CG 二核苷酸对中的所有胞嘧啶碱基都是 5- 甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸能在生理条件下与 TGF- $\alpha$  基因启动子区杂交。在某些实施方案中,寡核苷酸与 TGF- $\alpha$  基因启动子区的杂交能抑制 TGF- $\alpha$  基因的表达。在某些实施方案中,TGF- $\alpha$  基因在细胞的染色体上,寡核苷酸与 TGF- $\alpha$  基因启动子区的杂交能减少细胞的增殖。在某些实施方案中,组合物还包含第二寡核苷酸。在某些实施方案中,第二寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5- 甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,第二寡核苷酸选自 SEQ ID NO:134,136,139,140,141,142,143 或 144。在其它实施方案中,第二寡核苷酸能与第二基因启动子区杂交,其中所述第二基因不是 TGF- $\alpha$ 。在还其它实施方案中,第二基因是癌基因(例如 c-ki-Ras, c-Ha-Ras, bcl-2, Her-2 或 c-myc)。

[0079] 在其它实施方案中,本发明提供包含寡核苷酸的组合物,该寡核苷酸能在包括 SEQ ID NO:131 的核苷酸 1-90 之间、SEQ ID NO:131 的核苷酸 175-219 之间、SEQ ID NO:131

的核苷酸 261-367 之间、SEQID NO :131 的核苷酸 431-930 之间或 SEQ ID NO :131 的核苷酸 964-1237 之间的位置与 c-myc 基因启动子区杂交。

[0080] 在另外其它实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 TGF- $\alpha$  基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0081] 在还其它实施方案中,本发明提供方法,该方法包括:提供寡核苷酸(例如 SEQ ID NO :134,136,139,140,141,142,143 或 144)及包含 TGF- $\alpha$  基因的细胞;将寡核苷酸给予细胞。在某些实施方案中,给予的结果导致细胞增殖减少。在某些实施方案中,给予的结果导致 TGF- $\alpha$  基因表达的抑制。在某些实施方案中,细胞是癌细胞。在其它实施方案中,细胞在宿主动物(例如非人哺乳动物或人)中。在某些实施方案中,寡核苷酸以每公斤体重 0.01  $\mu$ g-100g 的剂量,优选以每公斤体重 1mg-100mg 的剂量引入到宿主动物中。在某些实施方案中,寡核苷酸每天一次或多次引入到宿主动物中。在其它实施方案中,寡核苷酸连续引入到宿主动物中。在还其它实施方案中,细胞在细胞培养物中。在某些实施方案中,该方法还包括给予细胞试验化合物的步骤。在某些实施方案中,试验化合物是公知的化疗药物。在某些实施方案中,癌症是胰腺癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、白血病、前列腺癌、淋巴瘤、卵巢癌或黑素瘤。在某些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个、优选所有的胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。

[0082] 本发明还提供方法,所述方法包括提供能与 TGF- $\alpha$  基因启动子区杂交的寡核苷酸及包含 TGF- $\alpha$  基因的细胞;将寡核苷酸给予细胞。

[0083] 在还其它实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 TGF- $\alpha$  基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,寡核苷酸与 TGF- $\alpha$  基因启动子区完全互补。在其它实施方案中,寡核苷酸与 TGF- $\alpha$  基因启动子区部分互补。例如,在某些实施方案中,寡核苷酸含有 TGF- $\alpha$  基因启动子区的一个错配。在某些优选的实施方案中,寡核苷酸只与 TGF- $\alpha$  基因启动子区互补,不与人基因组的其它区域完全互补。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度在 10 至 60 个核苷酸之间,优选在 15 至 35 个核苷酸之间。

[0084] 本发明还在使得 TGF- $\alpha$  基因表达被抑制的条件下提供包含能在生理条件下与 TGF- $\alpha$  基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0085] 本发明另外在使得细胞增殖减少的条件下提供包含能在生理条件下与位于细胞染色体上的 TGF- $\alpha$  基因启动子区杂交的寡核苷酸的组合物。

[0086] 本发明也提供包含第一寡核苷酸和第二寡核苷酸的组合物,所述第一寡核苷酸能在生理条件下与 TGF- $\alpha$  基因启动子区杂交,包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;所述第二寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。

[0087] 在某些实施方案中,本发明提供包含能在生理条件下与 TGF- $\alpha$  基因启动子区杂交的寡核苷酸和说明书的试剂盒,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;所述说明书说明如何使用试剂盒来减少在染色体上包含 TGF- $\alpha$  基因的细胞的增殖或者抑制基因表达。在某些实施方案中,试剂盒中的组合物用以治疗对象的癌症,所述说明书包括如何使用试剂盒来治疗对象的癌症

的说明。在某些实施方案中,说明书是美国食品和药物管理局所要求的医药品标签说明。

[0088] 本发明也提供方法,该方法包括:提供来自确诊患有癌症的对象的生物样品及用以检测样品中是否存在癌基因表达的试剂;检测样品中是否存在癌基因表达;给予对象能在生理条件下与生物样品中所表达的癌基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶。

[0089] 本发明另外提供抑制对象中的基因表达的方法(例如用以治疗癌症或其它高增殖性疾病),该方法包括提供能在生理条件下与生物样品中所表达的与癌症或高增殖性疾病相关的基因启动子区杂交的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含至少一个 CG 二核苷酸对,其中 CG 二核苷酸对中的至少一个胞嘧啶碱基包括 5-甲基胞嘧啶;在使得基因表达被抑制的条件下将寡核苷酸给予对象。在某些实施方案中,对象是人。

[0090] 在又其它实施方案中,本发明提供筛选化合物的方法,所述方法包括提供包含可疑癌基因的细胞及能与该基因启动子区杂交的寡核苷酸;将寡核苷酸给予细胞;确定在寡核苷酸存在下相对于寡核苷酸不存在时细胞的增殖是否被抑制。在某些实施方案中,细胞在细胞培养物(例如癌细胞系)中。在其它实施方案中,细胞在宿主动物(例如非人哺乳动物)中。在某些实施方案中,该方法是高通量筛选方法。

[0091] 在其它实施方案中,本发明涉及用于癌症治疗的方法和组合物。具体的说,本发明提供基于脂质体的癌症治疗药物。

[0092] 因此,在某些实施方案中,本发明提供包含阳离子脂质体、中性脂质体或阴离子脂质体及寡核苷酸(例如由它们组成)的药物组合物。在某些优选的实施方案中,脂质体是基于心磷脂的阳离子脂质体(例如 NEOPHECTIN)。在某些优选的实施方案中,NEOPHECTIN 与寡核苷酸的电荷比是 6 : 1。在其它实施方案中,脂质体包括 N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基铵硫酸甲酯(DOTAP)。

[0093] 在某些实施方案中,本发明提供包含寡核苷酸(例如能与癌基因启动子区杂交的寡核苷酸)和第一药物组合物及包含任意的第二药物组合物的试剂盒,所述第一药物组合物包含阳离子脂质体、中性脂质体或阴离子脂质体(例如由它们组成),其中所述第二药物组合物包含公知的化疗药物(例如 TAXOTERE、TAXOL 或长春新碱),且其中所述公知的化疗药物与第一药物组合物分开配制。在某些实施方案中,化疗药物的存在量小于标准剂量的二分之一,更优选小于三分之一、甚至更优选小于四分之一、还更优选小于十分之一、再更优选小于标准剂量的百分之一。

[0094] 在另外其它实施方案中,本发明提供方法,所述方法包括提供由阳离子脂质体、中性脂质体或阴离子脂质体和寡核苷酸(例如能与癌基因启动子区杂交的寡核苷酸)组成的药物组合物;将药物组合物暴露给癌细胞。在某些优选的实施方案中,脂质体是基于心磷脂的阳离子脂质体(例如 NEOPHECTIN)。在某些优选的实施方案中,NEOPHECTIN 与寡核苷酸的电荷比是 6 : 1。在其它实施方案中,脂质体包含 N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基铵硫酸甲酯(DOTAP)。在某些实施方案中,癌细胞是前列腺癌细胞、卵巢癌细胞、乳腺癌细胞、白血病细胞或淋巴瘤细胞。在某些实施方案中,细胞在宿主动物(例如人)中。在某些实施方案中,药物组合物每天一次或多次引入到宿主动物中(例如连续引入)。在某些实施方案中,该方法还包括给予对象公知的化疗药物(例如 TAXOTERE、TAXOL 或长春

新碱)的步骤,其中所述公知的化疗药物与阳离子脂质体、中性脂质体或阴离子脂质体分开配制。在优选的实施方案中,所述公知的化疗药物与药物组合物分开给予。在某些实施方案中,化疗药物的存在量小于标准剂量的二分之一,更优选小于三分之一、甚至更优选小于四分之一、还更优选小于十分之一、再更优选小于标准剂量的百分之一。

[0095] 附图简述

[0096] 图 1 显示 bcl-2 基因的核酸序列 (SEQ ID NO :1)。

[0097] 图 2 显示用于本发明某些实施方案的 bcl-2 反义基因的序列。X 指甲基化的 C 核苷酸。

[0098] 图 3 显示 c-erbB-2 (Her-2) 基因的核酸序列 (SEQ ID NO :29)。

[0099] 图 4 显示用于本发明某些实施方案的 c-erbB-2 反义基因的序列。X 指甲基化的 C 核苷酸。

[0100] 图 5 显示 c-ki-Ras 基因的核酸序列 (SEQ ID NO :46)。

[0101] 图 6 显示用于本发明某些实施方案的 c-ki-Ras 反义基因的序列。X 指甲基化的 C 核苷酸。

[0102] 图 7 显示 c-Ha-Ras 基因的核酸序列 (SEQ ID NO :66)。

[0103] 图 8 显示用于本发明某些实施方案的 c-Ha-Ras 反义基因的序列。X 指甲基化的 C 核苷酸。

[0104] 图 9 显示 c-myc 基因的核酸序列 (SEQ ID NO :108)。

[0105] 图 10 显示用于本发明某些实施方案的 c-myc 反义基因的序列。X 指甲基化的 C 核苷酸。

[0106] 图 11 显示 TGF- $\alpha$  基因的核酸序列 (SEQ ID NO :131)。

[0107] 图 12 显示用于本发明某些实施方案的 TGF- $\alpha$  反义基因的序列。X 指甲基化的 C 核苷酸。

[0108] 图 13 显示用于本发明某些实施方案的 c-ki-Ras 反义基因对细胞生长的表达的抑制作用。

[0109] 图 14 显示用于本发明某些实施方案的 bcl-2 反义基因对细胞生长的表达的抑制作用。

[0110] 图 15 显示用于本发明某些实施方案的 c-erb-2 反义基因对细胞生长的表达的抑制作用。

[0111] 图 16 显示用于本发明某些实施方案的 c-Ha-Ras 反义基因对细胞生长的表达的抑制作用。

[0112] 图 17 显示用于本发明某些实施方案的 c-myc 反义基因对细胞生长的表达的抑制作用。

[0113] 图 18 显示用于本发明某些实施方案的 TGF- $\alpha$  反义基因对细胞生长的表达的抑制作用。

[0114] 图 19 显示 c-ki-Ras 反义基因对细胞生长的表达的抑制作用的剂量反应曲线。

[0115] 图 20 显示 bcl-2 反义基因对 FSCCL 细胞 (A) 和 MCF-7 细胞 (B) 细胞生长的表达的抑制作用的剂量反应曲线。

[0116] 图 21 显示 c-erb-2 反义基因对细胞生长的表达的抑制作用的剂量反应曲线。



- [0117] 图 22 显示 c-Ha-Ras 反义基因对细胞生长的表达的抑制作用的剂量反应曲线。
- [0118] 图 23 显示 c-myc 反义基因对细胞生长的表达的抑制作用的剂量反应曲线。
- [0119] 图 24 显示 TGF- $\alpha$  反义基因对 T47D 细胞 (A) 和 MDA-MB-231 细胞 (B) 细胞生长的表达的抑制作用的剂量反应曲线。
- [0120] 图 25 显示 c-ki-Ras 反义基因的代表性变体。
- [0121] 图 26 显示 bcl-2 反义基因的代表性变体。
- [0122] 图 27 显示 c-erb-2 反义基因的代表性变体。
- [0123] 图 28 显示 c-ha-ras 反义基因的代表性变体。
- [0124] 图 29 显示 c-myc 反义基因的代表性变体。
- [0125] 图 30 显示 TGF- $\alpha$  反义基因的代表性变体。
- [0126] 图 31 显示靶向 Bcl-2 的非甲基化寡核苷酸对淋巴瘤细胞的抑制作用。
- [0127] 图 32 显示 PC-3GFP 前列腺癌皮下模型中的肿瘤用本发明组合物处理后的平均肿瘤体积。
- [0128] 图 33 显示 PC-3GFP 前列腺癌皮下模型中的肿瘤用本发明组合物处理后的平均重量。
- [0129] 图 34 显示 PC-3GFP 前列腺癌皮下模型中的肿瘤用本发明组合物处理后的平均肿瘤体积。
- [0130] 图 35 显示 PC-3GFP 前列腺癌皮下模型中的肿瘤用本发明组合物处理后的平均最终肿瘤体积。
- [0131] 定义
- [0132] 为帮助理解本发明,以下对许多术语和短语进行定义:
- [0133] 本文所用的术语“其中所述化疗药物的存在量低于标准剂量的二分之一”指低于用以给药于人的标准剂量范围的最低值二分之一(例如低于 50%,优选低于 40%,甚至更优选低于 10%,还更优选低于 1%)的剂量。在某些实施方案中,标准剂量范围是生产商所推荐的剂量范围。在其它实施方案中,标准剂量范围是本领域的医师所采用的范围。在还其它实施方案中,标准剂量范围是本领域认为属常规治疗标准(normal standard of care)的范围。剂量范围内的具体剂量由例如对象的年龄、体重和健康情况以及所治疗癌症的类型来决定。
- [0134] 本文所用的术语“在使得所述基因表达被抑制的条件下”指本发明寡核苷酸能与基因(例如该基因启动子区)杂交,并相对于不存在寡核苷酸时的转录水平能抑制该基因的转录达至少 10%,优选至少 25%,甚至更优选至少 50%,还更优选至少 90%的条件。本发明并不限于对具体基因的表达的抑制作用。代表性的基因包括但不限于 c-ki-Ras、c-Ha-Ras、c-myc、Her-2、TGF- $\alpha$  和 bcl-2。
- [0135] 本文所用的术语“在使得所述细胞增殖减少的条件下”指当将本发明的寡核苷酸给予细胞(例如癌细胞)时,相对于不存在寡核苷酸时的细胞生长速度能减少细胞生长速度达至少 10%,优选至少 25%,甚至更优选至少 50%,还更优选至少 90%的条件。
- [0136] 本文所用的术语“表位”指与特定抗体发生接触的抗原部分。
- [0137] 当用蛋白质或蛋白质的片段来免疫宿主动物时,该蛋白质的许多区域都可诱导产生能特异性结合该蛋白质上的特定区域或三维结构的抗体;这些区域或结构称作“抗原决

定簇”。抗原决定簇可与完整抗原（即用以引起免疫反应的“免疫原”）一起竞争与抗体的结合。

[0138] 本文所用的术语“对象”指将成为特定治疗的接受者的任何动物（例如哺乳动物），包括但不限于人类、非人灵长类动物、啮齿类动物等。通常，在本文中当指人类对象时，术语“对象”和“患者”可互换使用。

[0139] 本文所用的术语“计算机存储器”和“计算机存储设备”指计算机处理器可读的任何存储介质。计算机存储器的实例包括但不限于 RAM、ROM、计算机芯片、数字视频光盘 (DVD)、压缩光盘 (CD)、硬盘驱动器 (HDD) 和磁带。

[0140] 本文所用的术语“计算机可读介质”指用以存储和向计算机处理器提供信息（例如数据和指令）的任何设备或系统。计算机可读介质的实例包括但不限于 DVD、CD、硬盘驱动器、磁带和网络上流式传输媒体的服务器。

[0141] 本文所用的术语“处理器”和“中央处理器”或“CPU”可互换使用，指能够从计算机存储器（例如 ROM 或其它计算机存储器）读取程序并按程序执行一组步骤的设备。

[0142] 本文所用的术语“非人动物”指所有的非人动物，包括但不限于脊椎动物如啮齿类动物、非人灵长类、绵羊、牛、反刍动物、兔、猪、山羊、马、犬、猫、猿 (ave) 等，以及无脊椎动物如果蝇和线虫。在某些实施方案中，“非人动物”还指原核生物和病毒，如细菌病原体 and 病毒病原体。

[0143] 本文所用的术语“核酸分子”指任何含核酸的分子，包括但不限于 DNA 或 RNA。该术语涵括了包含任何公知的 DNA 和 RNA 碱基类似物的序列，所述碱基类似物包括但不限于 4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、吡丙啶基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基 Q 核苷 (mannosylqueosine)、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫代-N6-异戊烯基腺苷、尿嘧啶-5-羟基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-羟基乙酸、oxybutoxosine、假尿嘧啶、Q 核苷 (queosine)、2-硫代胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-羟基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-羟基乙酸、假尿嘧啶、Q 核苷、2-硫代胞嘧啶和 2,6-二氨基嘌呤。

[0144] 术语“基因”指包含为产生多肽、前体或 RNA（例如 rRNA、tRNA）所必需的编码序列的核酸（例如 DNA）序列。多肽可由全长编码序列编码，或者由编码序列的任何部分编码，只要全长多肽或其片段的所需活性或功能特性（例如酶活性、配体结合力、信号转导、免疫原性等）得以保留。该术语还涵括结构基因的编码区和在 5' 和 3' 末端上位于编码区附近、距离任一末端约 1kb 或更长以使该基因符合全长 mRNA 的长度的各序列。位于编码区的 5' 且存在于 mRNA 上的序列称为 5' 非翻译序列。位于编码区的 3' 且存在于 mRNA 上的序列称为 3' 非翻译序列。术语“基因”涵括 cDNA 形式和基因组形式两者的基因。基因组形式或克隆的基因含有被称为“内含子”或“间插区 (intervening region)”或“间插序列”的非编码序列隔开的编码区。内含子是被转录成核 RNA (hnRNA) 的基因区段；内含子可含有调节元件如增强子。内含子被移出或“剪接出”核转录物或者说初级转录物；因此内含子在

信使 RNA (mRNA) 转录物中不存在。mRNA 在翻译过程中起到确定新生多肽的氨基酸序列或顺序的作用。

[0145] 本文所用的术语“异源基因”指不在其天然环境中的基因。例如,异源基因包括从一个物种引入到另一物种中的基因。异源基因还包括生物天然所有、但已被以某种方式改变(例如突变、以多重拷贝添加、连接到非天然调节序列等)的基因。异源基因与内源基因的区别在于,异源基因序列通常连接的 DNA 序列没有发现与染色体中的基因序列有天然联系,或者与在自然界没有发现的染色体的某些部分有联系(例如在通常不表达基因的基因座中表达的基因)。

[0146] 本文所用的术语“基因表达”指将编码于基因中的遗传信息通过基因的“转录”(例如通过 RNA 聚合酶的酶促作用)转变成 RNA(例如 mRNA、rRNA、tRNA 或 snRNA)的过程,对于蛋白质编码基因来说指通过 mRNA 的“翻译”转变成蛋白质的过程。基因表达可在过程中的许多阶段进行调节。“上调”或“激活”指能增加基因表达产物(即 RNA 或蛋白质)的产生的调节,而“下调”或“阻遏”指能减少产生的调节。参与上调或下调的分子(例如转录因子)通常分别称作“激活物”和“阻遏物”。

[0147] 基因组形式的基因除含有内含子外,还可包含位于出现在 RNA 转录物上的序列的 5' 和 3' 两末端上的序列。这些序列称为“侧翼”序列或区域(这些侧翼序列位于出现在 mRNA 转录物上的非翻译序列的 5' 或 3')。5' 侧翼区可含有控制或影响基因转录的调节序列如启动子和增强子。3' 侧翼区可含有指导转录的终止、翻译后切割和聚腺苷酸化 的序列。

[0148] 术语“野生型”指从天然来源分离的基因或基因产物。野生型基因是种群中最常观察到的基因,因此被人为指定为“正常”或“野生型”形式的基因。相反,术语“修饰的”或“突变的”指当与野生型基因或基因产物比较时显示出序列或功能特性上的修改(即改变的特征)的基因或基因产物。应指出的是,天然突变体可被分离;这些突变体可通过与野生型基因或基因产物比较时发现它们具有改变的特征(包括改变的核酸序列)这一事实来鉴定。

[0149] 本文所用的术语“核酸分子编码的”、“DNA 序列编码的”和“DNA 编码的”指脱氧核糖核酸链上的脱氧核糖核苷酸的顺序或序列。这些脱氧核糖核苷酸的顺序决定了多肽(蛋白质)链上的氨基酸的顺序。因此 DNA 序列编码氨基酸序列。

[0150] 本文所用的术语“具有编码基因的核苷酸序列的寡核苷酸”和“具有编码基因的核苷酸序列的多核苷酸”指包含基因的编码区的核酸序列,或者换句话说指编码基因产物的核酸序列。编码区可以以 cDNA、基因组 DNA 或 RNA 的形式存在。寡核苷酸或多核苷酸当以 DNA 形式存在时可以是单链(即有义链)或双链。如有需要,可将合适的调控元件如增强子/启动子、剪接点、聚腺苷酸化信号等置于基因编码区的近邻,以便于转录的适当引发和/或初级 RNA 转录物的正确加工。或者,本发明的表达载体所采用的编码区可含有内源增强子/启动子、剪接点、间插序列、聚腺苷酸化信号等,或含有内源和外源控制元件的组合。

[0151] 本文所用的术语“寡核苷酸”指短长度的单链多核苷酸链。寡核苷酸的长度通常不到 200 个残基(例如 8-100 个),但是本文所用的该术语也有意涵括更长的多核苷酸链(例如长至 5000 个残基)。寡核苷酸通常按其长度来称谓。例如 24 个残基的寡核苷酸称为“24 聚体”。寡核苷酸能通过自身杂交或通过与其它多核苷酸杂交形成二级结构和三级

结构。这种结构可包括但不限于双链体、发夹结构、十字形结构、转角结构和三链体。

[0152] 在某些实施方案中,寡核苷酸是“反义基因”。本文所用的术语“反义基因”指能与基因启动子区杂交的寡核苷酸。在某些实施方案中,反义基因与启动子的杂交抑制该基因的表达。

[0153] 本文所用的术语“互补”或“互补性”用于指按碱基配对规则发生联系的多核苷酸(即核苷酸的序列)。例如序列“A-G-T”与序列“T-C-A”互补。互补性可以是“部分的”,其中只有某些核酸碱基根据碱基配对规则进行配对。或者,核酸之间可存在“完全的”或“总体的”互补性。核酸链之间互补的程度对核酸链之间杂交的效率和强度具有显著的影响。这在依赖于核酸之间的结合的扩增反应以及检测方法中特别重要。

[0154] 本文所用的术语“完全互补”例如当用以指本发明的寡核苷酸时,指其中所有的核苷酸都与靶序列(例如基因)互补的寡核苷酸。

[0155] 本文所用的术语“部分互补”例如当用以指本发明的寡核苷酸时,指其中至少有一个核苷酸不与靶序列互补的寡核苷酸。优选的部分互补寡核苷酸是在生理条件下仍可与靶序列杂交的寡核苷酸。术语“部分互补”指在其内部或任一端具有一个或多个非互补核苷酸的区域的寡核苷酸。在两端有错配的寡核苷酸仍可与靶序列杂交。

[0156] 术语“同源性”指互补的程度。可存在部分同源性或完全同源性(即同一性)。部分互补序列是至少部分抑制完全互补核酸分子与靶核酸杂交的核酸分子,是“基本同源的”。完全互补序列与靶序列杂交的抑制情况可用杂交试验(DNA 印迹法或 RNA 印迹法、溶液杂交等)在低严格条件下来检查。基本同源的序列或探针在低严格条件下会与完全同源的核酸分子竞争与靶标的结合(即杂交)并抑制后者与靶标的结合。这并不是说低严格条件是允许发生非特异性结合的条件;低严格条件要求两个序列相互间的结合是特异型(即选择性)相互作用。可用基本不互补(例如同源性低于约 30%)的第二靶标来测试非特异性结合的不存在;在不存在非特异性结合时探针不会与第二不互补靶标杂交。

[0157] 术语“基本同源”当用以指双链核酸序列如 cDNA 或基因组克隆时,指可在上述低严格条件下与双链核酸序列的任一链或两条链杂交的任何探针。

[0158] 基因可产生多种 RNA 类型,这是通过初级 RNA 转录物的差别剪接而产生的。属相同基因的剪接变体的各 cDNA 会含有具序列同一性或完全同源性的区域(意味着两条 cDNA 上存在相同外显子或相同外显子的部分)和具完全非同一性的区域(例如意味着在 cDNA 1 上存在外显子“A”,而 cDNA 2 却含有外显子“B”)。由于两条 cDNA 含有具序列同一性的区域,它们可能都会与衍生自整个基因或基因部分、含有两种 cDNA 上发现的序列的探针杂交;两种剪接变体因此与这种探针基本同源,且互相基本同源。

[0159] 术语“基本同源”当用以指单链核酸序列时,指能在上述低严格条件下与单链核酸序列杂交的任何探针(即它与单链核酸序列互补)。

[0160] 本文所用的术语“杂交”用于指互补核酸的配对。杂交和杂交的强度(即核酸之间发生关联的强度)受核酸之间的互补程度、所涉及的条件的严格性、所形成的杂交体的  $T_m$  和核酸内部的 G : C 比等因素的影响。将在其结构内部具有互补核酸配对现象的单个分子称作是“自杂交的”。

[0161] 本文所用的术语“ $T_m$ ”用于指“解链温度”。解链温度是双链核酸分子群体有一半解离成单链的温度。计算核酸的  $T_m$  的方程式是本领域公知的。如标准的参考文献所指出,

当核酸在 1 M NaCl 水溶液中时,通过以下方程式: $T_m = 81.5 + 0.41(\% G+C)$ ,可简单计算  $T_m$  值的估计值(参见例如 Anderson 和 Young, Quantitative FilterHybridization, Nucleic Acid Hybridization[1985])。其它的参考文献涉及更为复杂的计算法,在  $T_m$  的计算中考虑了结构特性以及序列特性。

[0162] 本文所用术语“严格”用于指进行核酸杂交的温度、离子强度、其它化合物如有机溶剂的存在等条件。在“低严格条件”下目的核酸序列会与其精确互补序列、有单个碱基错配的序列、紧密相关序列(例如有 90%或更高同源性的序列)和只有部分同源性的序列(例如有 50-90%同源性的序列)杂交。在“中等严格条件”下,目的核酸序列只会与其精确互补序列、有单个碱基错配的序列和紧密相关序列(例如有 90%或更高同源性)杂交。在“高严格条件”下,目的核酸序列只会与其精确互补序列和(取决于温度等条件)有单个碱基错配的序列杂交。换句话说,在高严格条件下,可提高温度以排除与有单个碱基错配的序列的杂交。

[0163] “高严格条件”当用以指核酸杂交时,包括相当于以下的条件:在由 5X SSPE(43.8g/l NaCl、6.9g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和 1.85g/l EDTA, pH用 NaOH调至 7.4)、0.5% SDS、5X Denhardt 试剂和 100  $\mu\text{g/ml}$  变性鲑精 DNA 组成的溶液中于 42°C 下进行结合或杂交,然后在包含 0.1X SSPE、1.0% SDS 的溶液中于 42°C 下进行洗涤,使用的探针长度约为 500 个核苷酸。

[0164] “中等严格条件”当用以指核酸杂交时,包括相当于以下的条件:在由 5X SSPE(43.8g/l NaCl、6.9g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和 1.85g/l EDTA, pH用 NaOH调至 7.4)、0.5% SDS、5X Denhardt 试剂和 100  $\mu\text{g/ml}$  变性鲑精 DNA 组成的溶液中于 42°C 下进行结合或杂交,然后在包含 1.0X SSPE、1.0% SDS 的溶液中于 42°C 下进行洗涤,使用的探针长度约为 500 个核苷酸。

[0165] “低严格条件”包括相当于以下的条件:在由 5X SSPE(43.8g/l NaCl、6.9g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和 1.85g/l EDTA, pH用 NaOH调至 7.4)、0.1% SDS、5X Denhardt 试剂 [50X Denhardt 试剂每 500 ml 含:5g Ficoll(Type 400, Pharamcia)、5 g BSA(Fraction V; Sigma)] 和 100  $\mu\text{g/ml}$  变性鲑精 DNA 组成的溶液中于 42°C 下进行结合或杂交,然后在包含 5 XSSPE、0.1% SDS 的溶液中于 42°C 下进行洗涤,使用的探针长度约为 500 个核苷酸。

[0166] 本发明不限于长度约 500 个核苷酸的探针的杂交。本发明还设想使用长度在大约 8 个核苷酸到数千个(例如至少 5000 个)核苷酸之间的探针。相关领域的技术人员懂得,可改变严格条件用于其它大小的探针(参见例如 Anderson 和 Young, Quantitative FilterHybridization, Nucleic Acid Hybridization[1985] 及 Sambrook 等, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY[1989])。

[0167] 本领域熟知,可采用多种等价条件来组成低严格条件;要考虑诸如探针的长度和性质(DNA、RNA、碱基组成)、靶标的性质(DNA、RNA、碱基组成、在溶液中存在或固定化等)以及盐和其它成分(例如是否存在甲酰胺、硫酸葡聚糖、聚乙二醇)的浓度之类的因素,可对杂交溶液加以改变,以产生不同于但等价于以上所列条件的低严格杂交条件。另外,本领域知道能促进在高严格条件下的杂交的条件(例如提高杂交和/或洗涤步骤的温度、在杂交溶液中使用甲酰胺等)(参见上文对“严格”的定义)。

[0168] 本文所用的术语“生理条件”指近似于或就是动物(例如人)体内条件的具体严格

条件。代表性的体外用生理条件包括但不限于 37°C、95% 空气、5% CO<sub>2</sub>、哺乳动物细胞培养用的市售培养基（例如可获自美国马里兰州 Gibco 公司的 DMEM 培养基）、5-10% 血清（例如牛血清或马血清）、另外的缓冲液和任选的激素（例如胰岛素和表皮生长因子）。

[0169] 术语“分离的”当用以指核酸，如在“分离的寡核苷酸”或“分离的多核苷酸”中时，指鉴别并与其天然来源中通常相关的至少一种成分或污染物分离的核酸序列。分离核酸所存在的形式或环境不同于其在自然界中发现的形式或环境。相反，非分离核酸作为核酸如 DNA 和 RNA 以它们在自然界中存在的状态被发现。例如，特定 DNA 序列（例如基因）被发现在宿主细胞染色体上靠近邻近的基因；RNA 序列，如编码特定蛋白质的特定 mRNA 序列被发现在细胞中作为与编码众多蛋白质的许多其它 mRNA 的混合物。但是，编码特定蛋白质的分离核酸举例来说包括细胞中通常表达特定蛋白质的核酸，该核酸所在的染色体位置与其在天然细胞中所在的位置不同，或者其侧翼核酸序列不同于天然所见的侧翼核酸序列。分离核酸、分离寡核苷酸或分离多核苷酸可以以单链或双链的形式存在。当分离核酸、分离寡核苷酸或分离多核苷酸要用来表达蛋白质时，寡核苷酸或多核苷酸须至少含有有义链或编码链（即寡核苷酸或多核苷酸可以是单链的），但可以同时含有有义链和反义链（即寡核苷酸或多核苷酸可以是双链的）。

[0170] 本文所用的术语“纯化的”或“纯化”指从样品中除去某些成分（例如污染物）。例如，抗体可通过除去污染性非免疫球蛋白的蛋白质来纯化；也可通过除去不能与靶分子结合的免疫球蛋白来纯化。非免疫球蛋白的蛋白质的除去和 / 或不能与靶分子结合的免疫球蛋白的除去，导致样品中靶标反应性免疫球蛋白的百分比提高。在另一个实例中，重组多肽在细菌宿主细胞中表达，该多肽通过除去宿主细胞蛋白质来纯化；样品中重组多肽的百分比因而提高。

[0171] “氨基酸序列”和例如“多肽”或“蛋白质”的术语并不意在将氨基酸序列限制于与列举到的蛋白质分子有关的完全、天然氨基酸序列。

[0172] 术语“天然蛋白质”在本文中用于表示蛋白质不含载体序列所编码的氨基酸残基；也就是说，天然蛋白质只含见于天然出现的蛋白质的氨基酸。天然蛋白质可通过重组方法产生，或者可从天然来源分离。

[0173] 术语“部分”在本文中当用以指蛋白质时（如在“特定蛋白质的部分”），指该蛋白质的片段。片段的大小可在从四个氨基酸残基到整个氨基酸序列减去一个氨基酸的范围。

[0174] 术语“DNA 印迹”指如下的 DNA 分析：将 DNA 在琼脂糖凝胶或丙烯酰胺凝胶上按其大小进行分级，接着将其从凝胶转移到固相载体如硝基纤维素或尼龙膜上。然后将固定化的 DNA 用标记探针进行探测，以检测与所用探针互补的 DNA 类型。DNA 在进行电泳之前可先用限制酶切割。DNA 电泳后可在转移到固相载体之前或转移过程中进行部分脱嘌呤和变性。DNA 印迹是分子生物学家的一种标准工具（J. Sambrook 等，Molecular Cloning :A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Press, NY, 第 9.31-9.58 页 [1989]）。

[0175] 本文所用术语“RNA 印迹”指如下的 RNA 分析：将 RNA 在琼脂糖凝胶上按其大小进行分级，接着将 RNA 从凝胶转移到固相载体如硝基纤维素或尼龙膜上。然后将固定化的 RNA 用标记探针进行探测，以检测与所用探针互补的 RNA 类型。RNA 印迹是分子生物学家的一种标准工具（J. Sambrook 等，出处同上，第 7.39-7.52 页 [1989]）。

[0176] 术语“蛋白质印迹”指对固定化到载体如硝基纤维素和尼龙膜上的蛋白质（或多

肽)的分析。将蛋白质在丙烯酰胺凝胶上跑胶以分离蛋白质,接着将蛋白质从凝胶转移到固相载体如硝基纤维素或尼龙膜上。然后将固定化的蛋白质暴露于对目的抗原具有反应性的抗体。抗体的结合情况可通过各种方法来检测,包括使用放射性标记的抗体。

[0177] 本文所用的术语“细胞培养物”指细胞的任何体外培养物。这一术语包括传代细胞系(例如具有永生表型)、原代细胞培养物、转化细胞系、有限细胞系(例如非转化细胞)和体外维持的其它任何细胞群。

[0178] 本文所用术语“真核生物”指可与“原核生物”区别开来的生物。该术语意在涵括所有具有显示出真核生物的通常特性的细胞的生物,所述通常特性如存在被核膜包围、内含染色体的真细胞核,存在被细胞膜包围的细胞器,以及在真核生物中通常观察到的其它特性。因此,该术语包括但不限于真菌、原生动物和动物(例如人类)。

[0179] 本文所用的术语“体外”指人工环境和指人工环境中发生的过程和反应。体外环境可包括但不限于试管和细胞培养物。“体内”指自然环境(例如动物或细胞)和指自然环境中发生的过程和反应。

[0180] 术语“试验化合物”和“候选化合物”指作为候选者供用以治疗或预防身体功能疾病、病症、障碍或失调(例如癌症)的任何化学实体(chemical entity)、药品、药物等。试验化合物包括已知和潜在的治疗化合物两者。试验化合物可通过用本发明的筛选方法进行筛选来确定具有治疗作用。在本发明的某些实施方案中,试验化合物包括反义化合物。

[0181] 本文所用的术语“已知的化疗药物”指已知可用于治疗疾病(例如癌症)的化合物。对癌症有效的代表性化疗药物包括但不限于柔红霉素、放线菌素 D、多柔比星、博来霉素、丝裂霉素、氮芥、苯丁酸氮芥、美法仑、环磷酰胺、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷(CA)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷(5-FuR)、甲氨喋呤(MTX)、秋水仙碱、长春新碱、长春碱、依托泊苷、替尼泊苷、顺铂和乙烯雌酚(DES)。

[0182] 本文所用的术语“样品”以其最广泛的意义使用。在一个意义上,它意在包括从任何来源获得的样本或培养物,以及生物样品和环境样品。生物样品可从动物(包括人类)获得,涵括液体、固体、组织和气体。生物样品包括血液制品如血浆、血清等。环境样品包括环境材料如表面物质、土壤、水、晶体和工业样品。但这些样品不能被解释为对适用于本发明的样品类型的限制。

[0183] 发明详述

[0184] 本发明涉及治疗癌症的方法和组合物。具体的说,本发明提供基于寡核苷酸的治疗药物以抑制与多种癌症有关的癌基因。本发明并不限于治疗特定的癌症。可靶向任何癌症都,包括但不限于乳腺癌。本发明也不限于靶向癌症或癌基因。本发明的方法和组合物适合用于需要抑制其表达的任何基因(例如供治疗用或研究用)。

[0185] I. 癌基因靶标

[0186] 在某些实施方案中,本发明提供癌基因的反义基因抑制剂。本发明并不限于抑制特定的癌基因。实际上,本发明涵括许多癌基因(包括但不限于本文所公开的癌基因)的反义基因抑制剂。

[0187] A. Ras

[0188] 一个已引起许多科学家注意的基因是人原癌基因 c-Ha-ras。c-H-ras 启动子区的核酸序列在图 7 中显示。这个基因充当中心调度者的角色,向细胞中传播化学信号和

控制细胞分裂。Ras 基因的改变可造成该基因停留在“开”的位置。据认为多达 30% 的癌症是由 ras 癌基因造成的,包括结肠癌、肺癌、膀胱癌和乳腺癌 (Bos, *Cancer Res.* 49 : 4682-4689[1989])。因此 ras 癌基因已成为治疗药物的靶标。

[0189] 有几份报告显示,与 ras mRNA 的多个不同位点互补的寡核苷酸可抑制 ras 蛋白 (p 21) 的合成,造成细胞培养物中细胞增殖速度下降 (美国专利第 5, 576, 208 号;美国专利第 5, 582, 986 号;Daska 等, *Oncogene Res.* 5 :267-275[1990];Brown 等, *Oncogene Res.* 4 : 243-252[1989];Saison-Behmoaras 等, *EMBO J.* 10 :1111-1116[1991])。已证实与 c-Ha-ras RNA 转录物的 5' 侧翼区互补的寡核苷酸能抑制裸鼠的肿瘤生长长达 14 天 (Gray 等, *Cancer Res.* 53 :577-580[1993])。最近有报告指出,导向 c-Ha-ras mRNA 的密码子 12 中的点突变 (G > C) 的反义寡核苷酸抑制细胞增殖,当皮下注射时抑制裸鼠中的肿瘤生长 (美国专利第 5, 576, 208 号;美国专利第 5, 582, 986 号;Schwab 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 10460-10464[1994];以上各文献通过引用结合到本文中)。研究者们还报告,在小型临床试验中反义药物能使卵巢肿瘤缩小 (Roush 等, *Science* 276 :1192-1194[1997])。

[0190] B. Her-2

[0191] HER-2 (也称 neu 癌基因或 erbB-2) 癌基因编码受体样酪氨酸激酶 (RTK),该激酶因其在几种人类癌症 (Hynes 和 Stern, *Biochim. et Biophys. Acta* 1198 :165-184[1994];Dougall 等, *Oncogene* 9 :2109-2123[1994]) 和在哺乳动物发育 (Lee 等, *Nature* 378 : 394-398[1995]) 中的作用而得到广泛的研究。Her-2 的启动子区的核酸序列在图 3 中显示。HER-2 蛋白的序列由 cDNA 测定,该 cDNA 通过与来自胎盘 (Coussens 等, *Science* 230 : 1132-1139[1985]) 和胃癌细胞系 (Yamamoto 等, *Nature* 319 :230-234[1986]) 的表皮生长因子受体 (EGFR) mRNA 的同源性而得到克隆。已显示 HER-2 mRNA 长约 4.5kb (Coussens 等, *Science* 230 :1132-1139[1985];Yamamoto 等, *Nature* 319 :230-234[1986]), 编码正常和恶性人组织中的 185kDa 的跨膜糖蛋白 (p185HER-2) (Hynes 和 Steen, *Biochim. et Biophys. Acta* 1198 :165-184[1994];Dougall 等, *Oncogene* 9 :2109-2123[1994])。HER-2 的过量表达会引起培养细胞的表型转化 (DiFiore 等, *Science* 237 :178-182[1987];Hudziak 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 :7159-7163[1987]), 且已将其与乳腺癌和卵巢癌的侵略性临床进展相关联 (Slamon 等, *Science* 235 :177-182[1987];Slamon 等, *Science* 244 : 707-712[1989])。

[0192] HER-2 是癌症中最常发生改变的基因之一。它编码具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体 (也称 p185), 是表皮生长因子 (EGF) 家族成员之一, 因此与表皮生长因子受体 (EGFR 或 HER-1) 相关。异常 HER-2 基因表达在很多癌症中都存在, 在乳腺癌、卵巢癌和胃癌中最为常见。在所有的人类乳腺癌和卵巢癌中有 25-30% 存在 HER-2 过量表达。HER-2 过量表达水平与乳腺癌临床阶段、预后和转移潜能的相关性良好。HER-2 过量表达与存活率较低、复发率增高和转移潜能增加有关。Tan 等 (*Cancer Res.* ,57 :1199[1997]) 证实,HER-2 基因的过量表达会增加乳腺癌细胞的转移潜能而不提高它们的转化能力。

[0193] HER-2 的异常表达包括正常 HER-2 表达的增加和突变型 HER-2 的表达这两方面。HER-2 原癌基因的激活可通过以下三种机制之任一种而发生:点突变、基因扩增和过量表达。基因扩增是最常见的机制。与还需要配体激活以促进转化的其它 EGF 家族成员不同, 单独的 HER-2 过量表达就足以进行转化 (Cohen 等, *J. Biol. Chem.* , 271 :30897[1996])。



[0194] 已采用几种治疗方法来降低 HER-2 基因产物水平。已用裸鼠乳腺癌模型将 5 型腺病毒基因产物 E1A 作为潜在的治疗药物进行研究。该基因产物能通过阻遏 HER-2/neu 启动子活性来阻遏 HER-2/neu 过量表达,并抑制过量表达 HER-2/neu 的卵巢癌细胞的致癌潜能。在带有过量表达 HER-2/neu 的乳腺癌异种移植物的老鼠中,与对照老鼠相比,通过腺病毒或脂质体传递的 E1A 能显著抑制肿瘤生长,延迟老鼠存活时间 (Chang 等, *Oncogene* 14 : 561 [1997])。

[0195] 已进行临床试验,评估靶向 HER-2/neu 蛋白产物和 Fc  $\gamma$  RIII (CD16) 两者的胞外域的双特异性抗体, Fc  $\gamma$  RIII (CD16) 是由人天然杀伤细胞、嗜中性粒细胞和分化的单核吞噬细胞表达的 Fc  $\gamma$  受体 (Weiner 等, *J. Hematotherapy*, 4 : 471 [1995])。

[0196] 已发现 HER-2 的过量表达与对化疗抗性的提高有关。因此, HER-2 水平高的患者对许多药物的反应都很差。已将用以抑制 HER-2 表达的方法与常用的化疗药物结合起来 (Ueno 等, *Oncogene* 15 : 953 [1997])。将 5 型腺病毒基因产物 E1A 与紫杉醇结合,在人乳腺癌细胞中显示出协同作用。Zhang 等 (*Oncogene*, 12 : 571 [1996]) 证明大黄素 (酪氨酸特异性抑制剂) 能使非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞对多种化疗药物敏感,包括顺铂、多柔比星和依托泊苷。发现 HER-2 抗体可提高他莫昔芬在人乳腺癌细胞中的效力 (Witters 等, *Breast Cancer Res. and Treatment*, 42 : 1 [1997])。

[0197] 也使用寡核苷酸来研究 HER-2 的功能。发现靶向 HER-2 启动子 (mRNA 转录起始位点上游的 42-69 个核苷酸) 的三链形成寡核苷酸在体外抑制 HER-2 表达 (Ebbinghaus 等, *J. Clin. Invest.*, 92 : 2433 [1993])。Porumb 等 (*Cancer Res.*, 56 : 515 [1996]) 也使用了靶向相同的 HER-2 启动子区的三链形成寡核苷酸。在培养细胞中观察到 HER-2 mRNA 和蛋白质水平下降。Juhl 等 (*J. Biol. Chem.*, 272 : 29482 [1997]) 使用靶向正好位于蛋白质跨膜区下游的 HER-2 RNA 中心区域的抗 HER-2 核酶,表现出人卵巢癌细胞中 HER-2 mRNA 和蛋白质水平下降。还观察到裸鼠的肿瘤生长减少。

[0198] 已将反义方法用作过量表达 HER-2 的癌症的潜在治疗方法。Pegues 等 (*Cancer Lett.*, 117 : 73 [1997]) 将反义方向的 1.5 kb HER-2 片段克隆到表达载体中;将此构建物转染到卵巢癌细胞中导致贴壁不依赖性生长减少。Casalini 等 (*Int. J. Cancer* 72 : 631 [1997]) 使用几种含有长度在 151 bp-415 bp 之间的 HER-2 片段的人 HER-2 反义载体构建物,证明肺腺癌细胞中 HER-2 蛋白水平和贴壁不依赖性生长得以减少。Colomer 等 (*Br. J. Cancer*, 70 : 819 [1994]) 证实,靶向翻译起始密码子或其紧接下游的磷酸二酯反义寡核苷酸能抑制人乳腺癌细胞的增殖达 60%。Wiechen 等 (*Int. J. Cancer* 63 : 604 [1995]) 证明,靶向 HER-2 编码区 (位于翻译起始密码子下游 33 个核苷酸) 的 18 核苷酸的硫代磷酸酯寡核苷酸能减少卵巢癌细胞的贴壁不依赖性生长。Bertram 等 (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200 : 661 [1994]) 使用靶向翻译起始区和 mRNA 翻译区 3' 部分序列 (其与酪氨酸激酶共有序列具有高度同源性) 的反义硫代磷酸酯寡核苷酸,证明人乳腺癌细胞中 HER-2 蛋白水平下降 75%。Liu 等 (*Antisense and Nucleic Acid Develop.*, 6 : 9 [1996]) 使用了靶向 5' 加帽位点和编码区的反义硫代磷酸酯寡核苷酸。靶向 5' 加帽位点的最有效寡核苷酸使 HER-2 蛋白表达减少 90%。细胞增殖的减少量也相当。Vaughn 等 (*Nuc. Acids. Res.*, 24 : 4558 [1996]) 使用了靶向 HER-2 翻译起始区或其邻近 (在任一侧) 的硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和嵌合反义寡核苷酸。靶向翻译起始区的交替二硫代酯 / 二酯寡核苷酸的效果

比全部硫代磷酸酯寡核苷酸稍好。Brysch 等 (CancerGene Ther., 1:99[1994]) 使用靶向 HER-2 的翻译起始密码子的化学修饰反义寡核苷酸, 以减少蛋白质水平并造成人乳腺癌细胞系的生长停滞。

#### [0199] C. C-Myc

[0200] c-myc 基因产物由即时早期应答基因编码, 该基因的表达可由多种不同的促细胞分裂剂诱导。c-myc 基因启动子区的核酸序列在图 9 中显示。C-myc 表达与导致细胞分裂的信号转导途径相关。研究证明, 增殖细胞的 c-myc mRNA 和 c-myc 蛋白水平比休眠细胞更高。导向人 c-myc 蛋白的抗体已知能抑制从人细胞分离的细胞核中的 DNA 合成。相反, 基因转移产生的 c-myc 组成型表达抑制几种细胞系的诱导分化。c-myc 的组成型表达会使转基因小鼠易于产生肿瘤。

[0201] 某些研究提示, c-myc 基因产物可能在 SMC 中起促增殖作用。已知大鼠主动脉球囊 (balloon) 去内皮和损伤会增加血管 SMC 的 c-myc mRNA 表达, 之后血管 SMC 才增殖和迁移。同样, 培养物中的 SMC 当暴露于几种促细胞分裂剂 (包括 PDGF、FGF、EGF、IGF-I) 和血清时会发生增殖。已发现这些促细胞分裂剂的每一种都能够增加 c-myc 蛋白、c-myc mRNA 或其两者在其它细胞系中的表达。另外, 已发现血清能提高 SMC 中的 c-myc mRNA 水平。

[0202] Harel-Bellan 等 (J. Immun. 140 :2431-2435 (1988)) 证明, 与 c-myc mRNA 互补的反义寡核苷酸能有效抑制其在人 T 细胞中的翻译。这些 T 细胞被妨碍进入细胞分裂的 S 期。c-myc 原癌基因序列在 Marcu 等, Ann. Rev. Biochem., 61 :809-860 [1992]; Watt 等, Nature, 303 :725-728 [1983]; Battey 等, Cell, 34 :779-787 (1983) 和 Epstein 等, NTIS 出版物 PB93-100576 中有描述。

#### [0203] D. Bcl2

[0204] 在许多类型的人肿瘤中, 包括淋巴瘤和白血病, 人 bcl-2 基因过量表达, 且可能与致癌性有关 (Tsujiimoto 等, Science 228 :1440-1443 [1985])。bcl-2 启动子区的核酸序列在图 1 中显示。在所有存在 t(14;18) 染色体易位的淋巴瘤中, 包括大多数滤泡型 B 细胞淋巴瘤和许多大细胞非何杰金氏淋巴瘤, 已发现人 bcl-2 基因的表达水平很高。在某些不存在 t(14;18) 染色体易位的白血病中, 包括大多数情形的慢性淋巴细胞性白血病, 许多前 B 细胞类型的淋巴细胞性白血病, 成神经细胞瘤, 鼻咽癌以及前列腺、乳腺和结肠的许多腺癌, 也已发现 bcl-2 基因的表达水平很高。(Reed 等, Cancer Res. 51 :6529 [1991]; Yunis 等, New England J. Med. 320 :1047; Campos 等, Blood 81 :3091-3096 [1993]; McDonnell 等, Cancer Res. 52 :6940-6944 [1992]; Lu 等, Int. J Cancer 53 :29-35 [1993]; Bonner 等, Lab Invest. 68 :43A [1993])。

#### [0205] E. TGF- $\alpha$

[0206] 转化生长因子- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) 是 50 个氨基酸的多肽。TGF- $\alpha$  启动子的核酸序列在图 11 中显示。它最初从反转录病毒转化的小鼠细胞系中分离出来, 随后在人肿瘤细胞、在大鼠早期胚胎细胞中和在来自人脑垂体的细胞培养物中鉴定出来。TGF- $\alpha$  与表皮生长因子 (EGF) 在结构上和功能上两方面都密切相关, 两者都能结合相同的受体, 即表皮生长因子受体 (EGFR)。

[0207] 已测定了 EGF 和 TGF- $\alpha$  两者的序列和三维结构 (Campbell 等, Prog. Growth Factor Res. 1 :13 [1989])。TGF- $\alpha$  是 50 个氨基酸多肽, 与 EGF 具有约 40% 的残基同源性。

这两种肽的特征都是有三个完好的环（分别表示为 A、B 和 C），且具有三个分子内二硫键。

[0208] 据认为几种生长因子（包括 TGF- $\alpha$  和 EGF）通过与表皮生长因子受体（EGF 受体）的相互作用来发挥其生物作用。EGF 受体属 I 型受体酪氨酸激酶。EGF 受体及其配体因它们在正常生理过程以及在高增殖性疾病和肿瘤病中的作用而备受关注。

[0209] TGF- $\alpha$  的体内前体是 160 个氨基酸残基的膜结合蛋白（pro-TGF- $\alpha$ ），其被切割可产生可溶性化合物（Massague, J. Biol. Chem., 265 :21393-21396[1990]）。这种切割作用能切除由 50 个氨基酸组成、分子量为 6 Kd 的胞外部分，被认为是一种重要的调节事件（Pandiella 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 :1726-1730[1990]），该事件可由佛波酯通过蛋白激酶 C 作用来刺激（Pandiella 等, J. Biol. Chem., 266 :5769-5773[1991]）。

[0210] 培养的人前列腺肿瘤系含有高水平的 TGF- $\alpha$  mRNA，能响应 TGF- $\alpha$  而增殖（Wilding 等, The Prostate, 15 :1-12[1989]）。TGF- $\alpha$  似乎同时具有自分泌和旁分泌功能，能刺激生理活动如细胞分裂和血管发生。当在转基因小鼠中被诱导时，TGF- $\alpha$  能产生类似原位癌的上皮增生和病灶性发育异常变化（focal dysplastic change）（Sandgren 等, Cell, 61 :1121-1135[1990]）。

[0211] F. c-ki-RAS

[0212] c-Ki-RAS (KRAS) 癌基因是遍在表达的。长度超过 30 kb 的 KRAS 比 HRAS 或 NRAS 大得多。c-ki-ras 启动子区的序列在图 5 中显示。虽然 HRAS、KRAS 和 NRAS 这三个 ras 基因具有不同的遗传结构，但它们都编码 189 个氨基酸残基的蛋白质（一般叫做 p21 蛋白）。这些基因通过影响它们各自 p21 的第 12 个或第 61 个氨基酸残基掺入的单个突变来取得恶性特性。KRAS 涉及恶性肿瘤比 HRAS 更为普遍。在一项于 NIH 3T3 转化系统对 96 个人肿瘤或肿瘤细胞系进行的研究中，（Pulciani 等, Nature 300 :539(1982)）只在 T24 膀胱癌细胞中发现突变的 HRAS 基因座，而转化 KRAS 基因在 8 种不同的癌和肉瘤中得到鉴定。

[0213] Feig 等（Science 223 :698(1984)）证实在卵巢浆液性囊腺癌中存在激活的 KRAS 癌基因，该基因在同一患者的正常细胞中不被激活。该转化基因产物在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上显示的电泳迁移率与其它肿瘤中的 KRAS 转化蛋白的迁移率不同。因此，之前未被描述过的突变是造成这一卵巢癌中 KRAS 激活的原因。为研究癌基因在肺癌中的作用，Rodenhuis 等（New Eng. J. Med. 317 :929(1987)）在体外扩增步骤之后使用了基于寡核苷酸杂交的试验。对由胸廓切开术获得的 39 个肿瘤样本的基因组 DNA 进行了检查。发现 KRAS 基因在 10 个腺癌样本中有 5 个是通过密码子 12 的点突变激活的。这些肿瘤中有两个大小在 2cm 以下，不发生转移。在 15 个鳞状细胞癌、10 个大细胞癌、1 个类癌、2 个肺外原发肿瘤的转移腺癌和 1 个小细胞癌中，都没有观察到 HRAS、KRAS 或 NRAS 突变。在证明是直肠癌的单独肺转移的肿瘤中观察到未突变 KRAS 基因有大约 20 倍的扩增。Yanez 等（Oncogene 1 :315(1987)）在 16 例结肠癌中的 4 例、27 例肺癌中的 2 例和 8 例乳腺癌中的 1 例中发现了 KRAS 基因的密码子 12 突变；在位置 61 没有发现突变。密码子 12 的 6 个可能的氨基酸置换除一个外其它都在鉴定出的 7 个突变有体现。

[0214] G. 其它癌基因靶标

[0215] 本发明并不限于上述癌基因。本发明的方法适合用于有公知启动子区的任何癌基因。代表性的癌基因包括但不限于 BCR/ABL、ABL1/BCR、ABL、BCL1、CD24、CDK4、EGFR/ERBB-1、HSTF1、INT1/WNT1、INT2、MDM2、MET、MYB、MYC、MYCN、MYCL1、RAF1、NRAS、REL、AKT2、

APC、BCL2-ALPHA、BCL2-BETA、BCL3、BCR、BRCA1、BRCA2、CBL、CCND1、CDKN1A、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CRK、CRK-II、CSF1R/FMS、DBL、DDOST、DCC、DPC4/SMAD4、E-CAD、E2F1/RBAP、ELK1、ELK3、EPH、EPA1、E2F1、EPA3、ERG、ETS1、ETS2、FER、FGR、FLI1/ERGB2、FOS、FPS/FES、FRA1、FRA2、FYN、HCK、HEK、HER3/ERBB-2、ERBB-3、HER4/ERBB-4、HST2、INK4A、INK4B、JUN、JUNB、JUND、KIP2、KIT、KRAS2A、KRAS2B、LCK、LYN、MAS、MAX、MCC、MLH1、MOS、MSH2、MYBA、MYBB、NF1、NF2、P53、PDGFB、PIM1、PTC、RB1、RET、ROS1、SKI、SRC1、TAL1、TGFB2、THRA1、THRB、TIAM1、TRK、VAV、VHL、WAF1、WNT2、WT1、YES1、ALK/NPM1、AMI1、AXL、FMS、GIP、GLI、GSP、HOX11、HST、IL3、INT2、KS3、K-SAM、LBC、LMO-1、LMO-2、L-MYC、LYL1、LYT-10、MDM-2、MLH1、MLL、MLM、N-MYC、OST、PAX-5、PMS-1、PMS-2、PRAD-1、RAF、RHOM-1、RHOM-2、SIS、TAL2、TAN1、TIAM1、TSC2、TRK、TSC1、STK11、PTCH、MEN1、MEN2、P57/KIP2、PTEN、HPC1、ATM、XPA/XPG、BCL6、DEK、AKAP13、CDH1、BLM、EWSR1/FLI1、FES、FGF3、FGF4、FGF6、FANCA、FLI1/ERGB2、FOSL1、FOSL2、GLI、HRAS1、HRX/MLLT1、HRX/MLLT2、KRAS2、MADH4、MAS1、MCF2、MLLT1/MLL、MLLT2/HRX、MTG8/RUNX1、MYCLK1、MYH11/CBFB、NFKB2、NOTCH1、NPM1/ALK、NRG/REL、NTRK1、PBX1/TCF3、PML/RARA、PRCA1、RUNX1、RUNX1/CBFA2T1、SET、TCF3/PBX1、TGFB1、TLX1、P53、WNT1、WNT2、WT1、 $\alpha$  v -  $\beta$  3、PKC  $\alpha$ 、TNF  $\alpha$ 、簇蛋白、存活蛋白、TGF  $\beta$ 、c-fos、c-SRC 和 INT-1。

#### [0216] II. 非癌基因靶标

[0217] 本发明并不限于对癌基因的靶向。本发明的方法和组合物可在需要下调其表达的任何基因的靶向中。例如，在某些实施方案中，要靶向的基因包括但不限于免疫球蛋白或抗体基因、凝血因子基因、蛋白酶、垂体激素、蛋白酶抑制剂、生长因子、生长调节素 (somatomedin)、促性腺素、趋化因子 (chemotactin)、趋化因子 (chemokine)、血浆蛋白质、血浆蛋白酶抑制剂、白介素、干扰素、细胞因子、转录因子或病原体靶标 (例如病毒基因、细菌基因、微生物基因、真菌基因)。

[0218] 具体基因的实例包括但不限于 ADAMTS4、ADAMTS5、APOA1、APOE、APP、B2M、COX2、CRP、DDX25、DMC1、FKBP8、GH1、GHR、IAPP、IFNA1、IFNG、IL1、I110、IL12、IL13、IL2、IL4、IL7、IL8、IPW、MAPK14、Mei1、MMP13、MYD88、NDN、PACE4、PRNP、PSEN1、PSEN2、RAD51、RAD51C、SAP、SNRPN、TLR4、TLR9、TTR、UBE3A、VLA-4 以及 PTP-IB、c-RAF、m-TOR、LDL、VLDL、ApoB-100、HDL、VEGF、rhPDGF-BB、NADs、ICAM-1、MUC1、2-dG、CTL、PSGL-1、E2F、NF-kB、HIF 和 GPCRs。

[0219] 在其它实施方案中，靶向病原体的基因。代表性的病原体包括但不限于人免疫缺陷病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、甲肝病毒、呼吸道合胞病毒、与严重急性呼吸综合征相关的病原体、西尼罗病毒和食物病原体 (例如大肠杆菌)。

#### [0220] III. DNA 甲基化

[0221] 在某些实施方案中，本发明提供在特定位置被甲基化的寡核苷酸治疗药物。本发明并不限于具体的机制。实际上，实施本发明并不需要了解有关机制。但尽管如此，还是设想基因活性调节的一种机制是 DNA 中胞嘧啶残基的甲基化。5-甲基胞嘧啶 (5-MeC) 是 DNA 中检测出的唯一一种天然修饰碱基 (Ehrlick 等, Science 212:1350-1357(1981))。虽然不是所有的基因都通过甲基化进行修饰，但许多基因中特定位置或特定区域的低甲基化与活性转录相关 (Doerfler, Annu. Rev. Biochem. 52:93-124[1984]; Christman, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 108:49-78[1988]; Cedar, Cell 34:5503-5513[1988])。体外 DNA 甲基化能防止无细胞系统中的基因的有效转录或转染基因的瞬时表达。某些特定顺式调节

区中的胞嘧啶残基甲基化还可阻断或增强转录因子或阻遏物的结合 (Doerfler, 出处同上; Christman, 出处同上; Cedar, Cell 34 :5503-5513 (1988); Tate 等, Curr. Opin. Genet. Dev. 3 :225-231 [1993]; Christman 等, Virus Strategies, Doerfler, W. 和 Bohm, P. (编辑) (VCH, Weinheim, N. Y.) 第 319-333 页 [1993])。

[0222] 已将正常模式的 DNA 甲基化的破坏与癌症的发展联系起来 (Christman 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :7347-7351 [1995])。肿瘤和肿瘤衍生细胞系的 DNA 的 5-MeC 含量通常比正常组织要低 (Jones 等, Adv. Cancer Res 40 :1-30 [1983])。在多种人肿瘤和动物肿瘤中已检测出特定癌基因如 c-myc、c-Ki-ras 和 c-Ha-ras 的低甲基化现象 (Nambu 等, Jpn. J. Cancer (Gann) 78 :696-704 [1987]; Feinberg 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 111 :47-54 [1983]; Cheah 等, JNCI 73 :1057-1063 [1984]; Bhave 等, Carcinogenesis (Lond) 9 :343-348 [1988]。在有关人肿瘤进展的一个研究得最多的实例中,证实 DNA 的低甲基化是结肠癌发展中的早期事件 (Goetz 等, Science 228 :187-290 [1985])。对体内甲基化的干扰会导致肿瘤形成。已有报告说,给大鼠喂食甲基化抑制剂如 L-甲硫氨酸或 5-氮杂胞苷 (cytosine), 或者通过喂食缺乏 lipotrope 的饮食造成大鼠 5-腺苷甲硫氨酸严重不足,会引起大鼠中肝肿瘤的形成 (Wainfan 等, Cancer Res. 52 :2071s ~ 2077s [1992])。研究表明, lipotrope 极端不足的饮食会造成 c-myc、ras 和 c-fos 等基因中的特定位点失去甲基 (Dizik 等, Carcinogenesis 12 :1307-1312 [1991])。尽管存在着高水平的 DNA MT 酶活性,但仍会发生低甲基化 (Wainfan 等, Cancer Res. 49 :4094-4097 [1989])。持续活性增殖所需的基因在分化过程中随着甲基化的发生而变得无活性,而组织特异型基因发生低甲基化而有活性。这样,低甲基化作用可以移动无活性和有活性这两种状态之间的平衡。在某些实施方案中,本发明因此利用这种天然现象来提供用以进行特定基因启动子的位点特异性甲基化的组合物和方法,从而防止某些基因的转录和翻译。在其它实施方案中,本发明提供通过改变基因的甲基化型式来上调目的基因 (例如肿瘤抑制基因) 的表达的方法和组合物。

[0223] 本发明并不限于使用甲基化寡核苷酸。实际上,本发明也特地设想使用非甲基化寡核苷酸来抑制基因表达。在开发本发明的过程中进行的实验 (参见例如实施例 8) 证明,靶向 Bcl-2 的未甲基化寡核苷酸对淋巴瘤细胞生长的抑制水平与甲基化寡核苷酸相当。

#### [0224] IV. 寡核苷酸

[0225] 在某些实施方案中,本发明提供反义基因寡核苷酸以抑制癌基因的表达。反义基因的代表性设计和生产策略在下文描述。以下描述并不意在限制适合于本发明的反义基因化合物的范围。相关领域的技术人员会认识到,其它另外的反义基因也在本发明的范围之内。

##### [0226] A. 寡核苷酸设计

[0227] 在某些实施方案中,寡核苷酸根据优选的设计标准进行设计。然后可用本文公开的方法测试这种寡核苷酸的效力。例如,在某些实施方案中,寡核苷酸在至少一个、优选至少两个、甚至更优选所有的 CpG 岛发生甲基化。在其它实施方案中,寡核苷酸不被甲基化。本发明并不限于具体的机制。实际上,实施本发明并不需要了解有关机制。但尽管如此,还是设想优选的寡核苷酸是具有至少 50% GC 含量和至少 2 个 GC 二核苷酸的寡核苷酸。优选寡核苷酸不发生自杂交。在某些实施方案中,寡核苷酸设计成具有至少 1 个 A 或 T,以使自杂交现象减至最低。在某些实施方案中,用市售的计算机程序来调查寡核苷酸自杂交的能

力。优选的寡核苷酸长度为至少 10 个、优选至少 15 个核苷酸,且不超过 100 个核苷酸。特别优选的寡核苷酸长度为 18-24 个核苷酸。在某些实施方案中,寡核苷酸包含通用蛋白质结合序列 CGCCC 和 CGCG 或其互补序列。

[0228] 也优选寡核苷酸与位于启动子 TATA 框上游的基因启动子区杂交。还优选寡核苷酸化合物与人基因组的其它区域不完全同源。本发明寡核苷酸化合物与基因组其它区域的同源性可使用可获得的搜索工具(例如 BLAST,可获自 NCBI 的因特网站点)来测定。

[0229] 在某些实施方案中,寡核苷酸设计成可与已知被蛋白质(例如转录因子)结合的癌基因启动子区杂交。本发明的代表性寡核苷酸化合物在图 2、4、6、8、10 和 12 中显示。本发明并不限于本文描述的寡核苷酸。也可鉴定其它合适的寡核苷酸(例如使用上述标准)。本文所公开寡核苷酸的代表性寡核苷酸变体在图 25-30 中显示。可用任何合适的方法,包括但不限于以下说明性实施例所述的方法,来测试候选寡核苷酸的效力。使用以下实施例 1 和 2 中描述的体外试验,可评估候选寡核苷酸在各个浓度下防止细胞增殖的能力。特别优选的寡核苷酸是能在低浓度下(例如在本文公开的体外试验中低于 20  $\mu$ M,优选低于 10  $\mu$ M)抑制细胞增殖的基因表达的寡核苷酸。

[0230] B. 优选的寡核苷酸区

[0231] 在某些实施方案中,癌基因启动子区当中的某些区域还进一步确定为用于寡核苷酸杂交的优选区域。在某些实施方案中,这些优选区域称为“热区(hot zone)”。

[0232] 在某些优选的实施方案中,根据被证明为有效(参见上文关于寡核苷酸的节)的寡核苷酸化合物和根据上述寡核苷酸优选标准被设想为有效的寡核苷酸化合物,确定热区。优选的热区包括包含在各热区中的各化合物的上游和下游 10bp,在各化合物的再上游或下游 40bp 增量中具有至少 1 个或多个 CG。在优选的实施方案中,热区包括包含在热区中的各寡核苷酸化合物上游和下游的最多 100bp。在另外的实施方案中,热区确定在在各启动子的开始区域。这些热区根据有效序列或设想序列来确定,优选的最大长度为 200bp。根据上述标准,设计了代表性的热区。这些热区在表 1 中显示。编号基于本发明各图中描述的序列。

[0233]

基因	热区
Bcl-2	1-40 161-350 401-590 1002-1260
c-erbB-2	205-344 382-435
c-K-Ras	1-289 432-658
c-Ha-Ras	21-220 233-860

[0234]

	1411-1530 1631-1722
c-myc	3-124 165-629
TGF- $\alpha$	1-90 175-219 261-367 431-930 964-1237

[0235] C. 寡核苷酸的制备和配制

[0236] 任何公知的寡核苷酸合成方法都可用于制备本发明的修饰寡核苷酸。如本发明所教导,在某些实施方案中,在适当情况下通过使用甲基化寡核苷酸将核苷酸 dC 用 5-甲基-dC 置换。本发明的修饰或未修饰寡核苷酸可最方便地用任何市售的自动核酸合成仪制备。它们也可从按照客户规格合成定制寡核苷酸的商业渠道获得。

[0237] 虽然寡核苷酸是优选的化合物形式,但本发明还包括其它寡聚寡核苷酸化合物,包括但不限于如下文所描述的寡核苷酸模拟物。根据本发明的寡核苷酸化合物优选包含约 18 至约 30 个核碱基(即约 18 至约 30 个连接在一起的碱基),不过更长或更短的序列也都可用于本发明。

[0238] 可用于本发明的优选化合物的具体实例包括含有修饰骨架或非天然核苷酸间键的寡核苷酸。如本说明书所定义,具有修饰骨架的寡核苷酸包括骨架中保留磷原子的寡核苷酸和骨架中没有磷原子的寡核苷酸。对于本说明书的目的,在其核苷间骨架中没有磷原子的修饰寡核苷酸也认为是寡核苷酸。

[0239] 优选的修饰寡核苷酸骨架包括例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯(包括 3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、亚磷酸酯、氨基磷酸酯(包括 3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫羰基氨基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常 3'-5' 键的硼烷磷酸酯,这些骨架的 2'-5' 链接类似物以及具有反极性即其中邻近的核苷单元对以 3'-5' ~ 5'-3' 或 2'-5' ~ 5'-2' 连接的骨架。还包括各种盐形式、混合盐形式和游离酸形式。

[0240] 其中不包含磷原子的优选修饰寡核苷酸骨架,具有通过短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键、或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键所形成的骨架。这些骨架包括具有吗啉代键(部分由核苷的糖部分形成)的骨架;硅氧烷骨架;硫化物、亚砷和砷骨架;formacetyl 和 thioformacetyl 骨架;methyleneformacetyl 和 thioformacetyl 骨架;含有烯烃的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚胺和亚甲基胍骨架;磺酸酯和氨磺酰骨架;酰胺骨架;以及具有混合 N、O、S 和 CH<sub>2</sub> 组成部分的其它骨架。

[0241] 在其它优选的寡核苷酸模拟物中,核苷酸单元的糖和核苷间键(即骨架)均被新型基团所置换。碱基单元被保留,以供与适当的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物——一种已证实具有优异的杂交性能的寡核苷酸模拟物,被称为肽核酸(PNA)。在 PNA 化合物中,寡核苷酸的糖-骨架被含酰胺的骨架特别是氨基乙基甘氨酸骨架所置换。核碱基

被保留,且与骨架的酰胺部分的氮杂氮原子直接或间接结合。教导如何制备 PNA 化合物的代表性美国专利包括但不限于美国专利第 5,539,082 号;第 5,714,331 号和第 5,719,262 号,所述每一个都通过引用结合到本文中。PNA 化合物的更多教导可参见 Nielsen 等, Science 254:1497(1991)。

[0242] 在某些实施方案中,本发明的寡核苷酸是具有硫代磷酸酯骨架的寡核苷酸和具有杂原子骨架的寡核苷酸,具体的说是以上引用的美国专利第 5,489,677 号的  $--CH_2--NH--O--CH_2--$ 、 $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$  [称为亚甲基(甲基亚胺)或 MMI 骨架]、 $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$ 、 $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$  和  $--O--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$  [其中天然磷酸二酯骨架表示为  $--O--P--O--CH_2--$ ], 以及以上引用的美国专利第 5,602,240 号的酰胺骨架。还优选的是具有以上引用的美国专利第 5,034,506 号的吗啉代骨架结构的寡核苷酸。

[0243] 修饰寡核苷酸还可含有一个或多个取代的糖部分。优选的寡核苷酸在 2' 位包含以下之一:OH;F;O-烷基、S-烷基或 N-烷基;O-烯基、S-烯基或 N-烯基;O-炔基、S-炔基或 N-炔基;或 O-烷基-O-烷基,其中所述烷基、烯基和炔基可为取代或未取代的  $C_1-C_{10}$  烷基或者  $C_2-C_{10}$  烯基和炔基。特别优选  $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$  和  $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ , 其中 n 和 m 为 1 至约 10。其它优选的寡核苷酸在 2' 位包含以下之一: $C_1-C_{10}$  低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或 O-芳烷基、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA 切割基团、报道基团、嵌入剂、用以改善寡核苷酸的药物动力学性能的基团或者用以改善寡核苷酸的药效学性能的基团以及具有类似性能的其他取代基。优选的修饰包括 2' - 甲氧基乙氧基 (2' -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 也称 2' -O-(2-甲氧基乙基) 或 2' -MOE) (Martin 等, Helv. Chim. Acta 78:486[1995]), 即烷氧基烷氧基基团。另外优选的修饰包括 2' - 二甲基氨基氧基乙氧基 (即  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$  基团, 也称 2' -DMAOE) 和 2' - 二甲基氨基乙氧基乙氧基 (本领域也称 2' -O-二甲基氨基乙氧基乙基或 2' -DMAEOE, 即  $2' -O--CH_2--O--CH_2--N(CH_2)_2$ )。

[0244] 其它优选的修饰包括 2' - 甲氧基 (2' -O-CH<sub>3</sub>)、2' - 氨基丙氧基 (2' -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) 和 2' - 氟 (2' -F)。还可在寡核苷酸上的其它位置,特别是在 3' 末端核苷酸上的糖的 3' 位置,或者在 2' -5' 连接寡核苷酸和在 5' 末端核苷酸的 5' 位置,造成类似的修饰。寡核苷酸还可具有替换呋喃戊糖 (pentofuranosyl sugar) 的糖类似物如环丁基部分。

[0245] 寡核苷酸还可包含核碱基 (本领域通常简称为“碱基”) 修饰或取代。本文所用的“未修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基即腺嘌呤 (A) 和鸟嘌呤 (G) 以及嘧啶碱基即胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C) 和尿嘧啶 (U)。修饰的核碱基包括其它合成核碱基和天然核碱基,如 5-甲基胞嘧啶 (5-me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和 2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-氮杂尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶 (假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫羟、8-硫代烷基、8-羟基和其它 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代特别是 5-溴、5-三氟甲基和其它 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和 8-氮杂腺嘌呤、7-去氮杂鸟嘌呤和 7-去氮杂腺嘌呤以及 3-去氮杂鸟嘌呤



呤和 3- 去氮杂腺嘌呤。另外的核碱基包括美国专利第 3,687,808 号中公开的核碱基。这些核碱基中有某些对于提高本发明的寡聚化合物的结合亲和力特别有用。这些核碱基包括 5- 取代的嘧啶、6- 氮杂嘧啶以及 N-2、N-6 和 O-6 取代的嘌呤,包括 2- 氨基丙基腺嘌呤、5- 丙炔基尿嘧啶和 5- 丙炔基胞嘧啶。5- 甲基胞嘧啶取代已证实能提高核酸双链体稳定性达 0.6-1.2°C,是目前优选的碱基取代,当与 2'-O- 甲氧基乙基糖修饰作用结合时尤为如此。

[0246] 本发明寡核苷酸的另一种修饰涉及将一种或多种能增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的部分或缀合物化学连接到寡核苷酸上。这种部分包括但不限于脂质部分如胆固醇部分、胆酸、硫醚(例如己基-S-三苯甲基硫醇)、硫代胆固醇、脂族链(例如十二烷二醇残基或十一烷基残基)、磷脂(例如二-十六烷基-rac-甘油或 1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油基-S-H-膦酸三乙铵)、聚胺或聚乙二醇链或者金刚烷乙酸、棕榈基部分、或者十八胺或己基氨基-羰基-羟胆甾醇部分。

[0247] 相关领域的技术人员熟知如何产生含有上述修饰的寡核苷酸。本发明并不限于上述反义寡核苷酸。可采用任何合适的修饰或取代。

[0248] 没有必要让特定化合物中的所有位置被一致地修饰,事实上,在单个寡核苷酸化合物中乃至在寡核苷酸当中的单个核苷上都可掺入不止一种的上述修饰。本发明还包括包含如下所述的本发明反义化合物的药物组合物和制剂。

#### [0249] D. 鸡尾酒药物

[0250] 在某些实施方案中,本发明提供包含两种或更多种导向基因(例如癌基因)启动子区的寡核苷酸的鸡尾酒药物。在某些实施方案中,所述两种寡核苷酸与同一基因的启动子的不同区域杂交。在其它实施方案中,所述两种或更多种寡核苷酸与两种不同的基因的启动子杂交。本发明并不限于具体的机制。实际上,实施本发明并不需要了解有关机制。但尽管如此,还是设想两种或更多种本发明化合物的组合所提供的抑制作用比单独给予各化合物所累积的抑制作用要高。

#### [0251] V. 研究用途

[0252] 本发明并不限于治疗应用。例如,在某些实施方案中,本发明提供将寡核苷酸用作研究工具的组合物和方法。

#### [0253] A. 试剂盒

[0254] 例如,在某些实施方案中,本发明提供试剂盒,其包含能特异性抑制目的基因的寡核苷酸和任选的已知能表达该基因的细胞系(例如癌细胞系)。这种试剂盒在例如对代谢途径或对基因在疾病(例如癌症)中的涉及的鉴定上以及在诊断应用上有用。在某些实施方案中,试剂盒还包含缓冲剂和其它必需的试剂以及使用说明书。

#### [0255] B. 靶标确认

[0256] 在某些实施方案中,本发明提供用于确认基因靶标(例如怀疑与疾病相关的基因)的方法和组合物。例如,在某些实施方案中,用本发明的方法和组合物来下调在大规模筛选应用(例如基因表达阵列)中被鉴定为与疾病相关的基因的表达。对于靶标确认的目的,本发明的方法和组合物适合在体外和体内(例如在非人动物中)使用。在其它实施方案中,本发明化合物在移植研究(例如 HLA 抑制)中 useful。

#### [0257] C. 药物筛选

[0258] 在其它实施方案中,本发明的方法和组合物用于药物筛选应用。例如,在某些实施方案中,将本发明的寡核苷酸给予细胞(例如在培养物中或在非人动物中),以抑制目的基因的表达。在某些实施方案中,对目的基因的抑制是对生理或疾病状况的模拟。在其它实施方案中,抑制癌基因。然后将试验化合物(例如小分子药物或寡核苷酸模拟物)给予试验细胞并测试试验化合物的作用。

[0259] 本发明的试验化合物可用本领域公知的组合文库方法中的任何方法来获得,所述组合文库方法包括生物文库;拟肽文库(具有肽的官能度、可是却有新型非肽骨架的分子的文库,所述分子能抵抗酶促降解而仍保持生物活性;参见例如 Zuckermann 等, *J. Med. Chem.* 37 :2678-85[1994]);空间可定位平行固相或溶液相文库;需要重叠合(deconvolution)的合成文库方法;‘一珠一化合物’文库方法;和使用亲和层析选择的合成文库方法。生物文库和拟肽文库方法优选用于肽文库,而其它四种方法则适用于肽、非肽寡聚物或小分子化合物文库(Lam(1997) *Anticancer Drug Des.* 12 :145)。

[0260] 分子文库的合成方法的实例可在本领域中找到,例如在以下文献中找到:DeWitt 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. SA.* 90 :6909[1993];Erb 等, *Proc. Nad. Acad. Sci. USA* 91 :11422[1994];Zuckermann 等, *J. Med. Chem.* 37 :2678[1994];Cho 等, *Science* 261 :1303[1993];Carrell 等, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33. 2059[1994];Carell 等, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33 :2061[1994];和 Gallop 等, *J. Med. Chem.* 37 :1233[1994]。

[0261] 化合物文库可存在在溶液中(例如 Houghten, *Biotechniques* 13 :412-421[1992]),或者在珠(Lam, *Nature* 354 :82-84[1991])、芯片(Fodor, *Nature* 364 :555-556[1993])、细菌或孢子(美国专利第 5, 223, 409 号;通过引用结合到本文中)、质粒(Cull 等, *Proc. Nad. Acad. Sci. USA* 89 :18651869[1992])或噬菌体(Scott 和 Smith, *Science* 249 :386-390[1990];Devlin *Science* 249 :404-406[1990];Cwirla 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 :6378-6382[1990];Felici, *J. Mol. Biol.* 222 :301[1991])上。

#### [0262] VI. 组合物和传递

[0263] 在某些实施方案中,本发明的寡核苷酸化合物配制成药物组合物,以作为药物传递给对象。本发明的新型抗原化合物在治疗各种需要抑制基因表达或细胞生长的疾病状态和状况中 useful。在某些优选的实施方案中,所述化合物用来治疗由失控细胞生长导致的疾病状态,例如包括但不限于癌症。本发明并不限于治疗具体的癌症。本发明的寡核苷酸化合物适合于治疗各种癌症,包括但不限于乳腺癌、结肠癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、白血病和淋巴瘤。以下讨论提供了剂型和剂量的代表性、非限制性实例。

#### [0264] A. 药物组合物

[0265] 本发明还提供药物组合物(例如包含上述寡核苷酸化合物)。根据需要进行局部治疗还是全身治疗以及根据待治疗的区域,本发明的药物组合物可以以多种方式给药。给药可以是局部给药(包括眼内给药和黏膜给药,包括阴道和直肠传递)、肺部给药(例如通过吸入或吹入粉末或气雾剂给药,包括通过喷雾器给药;气管内、鼻内、表皮和透皮给药)、口服给药或胃肠外给药。胃肠外给药包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内给药或者肌肉内注射或输注;或者颅内(例如鞘内)或心室内的给药。

[0266] 用于局部给药的药物组合物和制剂可包括透皮贴剂、软膏剂、洗剂、乳膏剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体剂和散剂。常规的药物载体、含水基料、粉末基料、含油基料、增

稠剂等也是必需或适宜的。

[0267] 用于口服给药的组合物和制剂包括散剂或颗粒剂、水介质或非水介质中的混悬剂或溶液剂、胶囊剂、扁囊剂 (sachet) 或片剂。增稠剂、矫味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂也是适宜的。

[0268] 用于胃肠外、鞘内或心室内给药的组合物和制剂可包括无菌水溶液剂,其中可含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂,例如但不限于渗透促进剂、载体化合物和其它药物可接受的载体或赋形剂。

[0269] 本发明的药物组合物包括但不限于溶液剂、乳剂和含脂质体的制剂。这些组合物可由多种成分形成,包括但不限于预配液体、自乳化固体和自乳化半固体。

[0270] 本发明的药物制剂可按照医药工业公知的常规技术制备,可方便的以单位剂量形式存在。这种技术包括使活性成分与药物载体或赋形剂结合的步骤。一般如下制备制剂:使活性成分与液体载体或微细固体载体或两者均匀地和紧密地结合,然后如有需要则使产品成型。

[0271] 本发明的组合物可配制成任何多种可能的剂型,例如但不限于片剂、胶囊剂、液体糖浆剂、软胶囊剂、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物还可配制成在水介质、非水介质或混合介质中的混悬剂。水混悬剂还可含有能增加混悬剂的粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和 / 或葡聚糖。混悬剂也可含有稳定剂。

[0272] 在本发明的一个实施方案中,药物组合物可配制成泡沫剂并以泡沫剂形式使用。药物泡沫剂包括例如但不限于以下制剂:乳剂、微乳剂、乳膏剂、胶冻剂和脂质体剂。这些制剂虽然在性质上基本相似,但在最终产品的成分和稠度上不同。

[0273] 也可将能增强寡核苷酸在细胞水平的摄取的物质加入到本发明的药物和其它组合物中。例如,阳离子脂质如 Lipofectin(美国专利第 5,705,188 号)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子如聚赖氨酸 (W097/30731) 也能增强细胞对寡核苷酸的摄取。

[0274] 本发明的组合物还可另外含有其它通常见于药物组合物中的辅助成分。因此,例如,组合物可含有其它另外的相容性药物活性材料,如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可含有其它另外的可用于物理配制本发明组合物各种不同剂型的材料,如染料、矫味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。但这种材料加入时不应对本发明组合物各成分的生物活性造成不适当的干扰。各制剂可进行灭菌,且如有需要可与例如以下不会与制剂中的核酸发生有害相互作用的助剂混合:润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用以影响渗透压的盐类、缓冲剂、着色剂、矫味剂和 / 或芳香物质等。

[0275] 供口服给药的组合物和制剂包括散剂或颗粒剂、微颗粒剂、纳米颗粒剂、水介质或非水介质中的混悬剂或溶液剂、胶囊剂、凝胶胶囊剂、扁囊剂、片剂或小片剂。增稠剂、矫味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂也是适宜的。优选的口服制剂是其中本发明的寡核苷酸与一种或多种渗透促进剂、表面活性剂和螯合剂一起给药的制剂。优选的表面活性剂包括脂肪酸和 / 或其酯或盐、胆汁酸和 / 或其盐。优选的胆汁酸 / 盐包括鹅脱氧胆酸 (CDCA) 和熊脱氧鹅脱氧胆酸 (UDCA)、胆酸、去氢胆酸、脱氧胆酸、丙烯醇酸 (glucholic acid)、甘氨酸胆酸 (glycholic acid)、甘氨酸脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺-24,25-二氢-夫西地酸钠、乙二醇二氢夫西地酸钠。优选的脂肪酸包括花生四烯酸、十一烷酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸、三癸酸、一油精、二月桂精、甘

油-1-癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或单甘油酯、甘油二酯或其药物可接受的盐(例如钠盐)。还优选的几种渗透促进剂的组合,例如脂肪酸/盐与胆汁酸/盐的组合。特别优选的组合是月桂酸、癸酸和 UDCA 的钠盐。更多的渗透促进剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-鲸蜡基醚。本发明的寡核苷酸可以颗粒形式(包括喷干颗粒)口服传递,或者可络合形成微颗粒或纳米颗粒。寡核苷酸络合剂包括聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚丙烯酸烷酯;polyoxethane;聚氰基丙烯酸烷酯;阳离子化明胶;白蛋白;淀粉;丙烯酸酯;聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚氰基丙烯酸烷酯;DEAE 衍生化聚亚胺;普鲁兰多糖(pollulan);纤维素和淀粉。特别优选的络合剂包括壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、聚-L-赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、聚精胺、鱼精蛋白、聚乙烯吡啶、聚硫代二乙氨基-甲基乙烯(PTDAE)、聚氨基苯乙烯(例如p-氨基)、聚(氰基丙烯酸乙酯甲酯)、聚(氰基丙烯酸乙酯)、聚(氰基丙烯酸丁酯)、聚(氰基丙烯酸异丁酯)、聚(氰基丙烯酸异己酯)、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酸己酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白和 DEAE-葡聚糖、聚丙烯酸甲酯、聚丙烯酸己酯、聚(D,L-乳酸)、聚DL-乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)、海藻酸盐和聚乙二醇(PEG)。

[0276] 本发明的某些实施方案提供含有(a)一种或多种寡核苷酸化合物和(b)一种或多种通过非寡核苷酸机制起作用的其它化疗药物的药物组合物。这种化疗药物的实例包括但不限于抗癌药物如柔红霉素、放线菌素D、多柔比星、博来霉素、丝裂霉素、氮芥、苯丁酸氮芥、美法仑、环磷酰胺、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷(CA)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷(5-FUdR)、甲氨喋呤(MTX)、秋水仙碱、长春新碱、长春碱、依托泊苷、替尼泊苷、顺铂和乙烯雌酚(DES)。抗炎药物(包括但不限于甾体类抗炎药物和皮质类固醇)及抗病毒药物(包括但不限于利巴韦林(ribivirin)、阿糖腺苷、阿昔洛韦和更昔洛韦)也可结合到本发明的组合物中。其它的非寡核苷酸化疗药物也在本发明的范围之内。两种或更多种组合的化合物可一起使用或依次使用。

#### [0277] B. 传递

[0278] 本发明的寡核苷酸化合物可用任何合适的方法传递。在某些实施方案中,给予的是裸DNA。在其它实施方案中,采用脂质转染法将核酸传递给对象。在还其它实施方案中,寡核苷酸用硫代磷酸酯(phosphothiolate)修饰以便传递(参见例如美国专利第6,169,177号,该专利通过引用结合到本文中)。

[0279] 在某些实施方案中,压缩所要传递的核酸,以帮助其摄取。(参见例如美国专利第6,008,366号、第6,383,811号,其通过引用结合到本文中)。在某些实施方案中,将压缩的核酸通过靶细胞结合部分(参见例如美国专利第5,844,107号、第6,077,835号,其各自通过引用结合到本文中)靶向特定细胞类型(例如癌细胞)。

[0280] 在某些实施方案中,将寡核苷酸缀合到其它化合物上,以帮助其传递。例如,在某些实施方案中,将核酸缀合到聚乙二醇上帮助传递(参见例如美国专利第6,177,274号、第6,287,591号、第6,447,752号、第6,447,753号和第6,440,743号,其各自通过引用结合到本文中)。在另外其它实施方案中,将核酸缀合到保护的接枝共聚物上,该接枝共聚物是可充电的药物纳米载体(PharmaIn)。在还其它实施方案中,通过将寡核苷酸缀合到维生素上来促进寡核苷酸向细胞内的运输(Endocyte, Inc; West Lafayette, IN; 参见例如美国专利第5,108,921号、第5,416,016号、第5,635,382号、第6,291,673号和WO 02/085908;其

各自通过引用结合到本文中)。在其它实施方案中,将寡核苷酸缀合到纳米颗粒上(例如 NanoMed Pharmaceuticals ;Kalamazoo, MI)。

[0281] 在优选的实施方案中,将寡核苷酸包封入脂质(例如脂质体或胶束)中帮助传递(参见例如美国专利第 6,458,382 号、第 6,429,200 号;其各自通过引用结合到本文中)。优选的脂质体包括但不限于基于心磷脂的阳离子脂质体(例如 NEOPHECTIN,可获自 NeoPharm, ForestLake, IL)。在某些优选的实施方案中,NEOPHECTIN 与寡核苷酸的电荷比是 6 : 1。在还其它实施方案中,将寡核苷酸与其它另外的聚合物络合,以帮助传递(参见例如美国专利第 6,379,966 号、第 6,339,067 号、第 5,744,335 号,其各自通过引用结合到本文中;及 IntradigmCorp., Rockville, MD)。

[0282] 在还其它实施方案中,采用 Minis(Madison, WI) 开发的可控高压传递系统来传递寡核苷酸。

### [0283] C. 剂量

[0284] 给药根据所要治疗的疾病状态的严重程度和反应来进行,疗程可持续几天到几个月,或者直到达到治愈目的或实现疾病状态的消减为止。最佳给药方案可从对患者体内的药物积累的测量结果计算得出。给药医师能容易地确定最佳剂量、给药方法和重复给药次数。最佳剂量可根据各单个寡核苷酸的相对效价、传递方式而变化,通常可根据在体外和体内动物模型中发现有效的  $EC_{50}$  或根据本文描述的实施例来估计。一般来说,剂量为每公斤体重  $0.01 \mu\text{g}$ -100g,且可每天、每周、每月或每年一次或多次给予。在某些实施方案中,剂量连续给予(例如静脉内给予),持续几个小时到几天或几周的时间。在某些实施方案中,治疗连续进行确定的时间,接着是无治疗时间。在某些实施方案中,将连续给药后跟着无治疗时间的这种治疗模式重复几次(例如直到疾病状态消减)。

[0285] 主治医师能根据测出的药物在体液或组织中的停留时间和浓度估计重复给药速度。治疗获得成功,需要让对象进行维持治疗,以防止疾病状态的复发,在维持治疗中寡核苷酸以维持剂量给予,为每公斤体重  $0.01 \mu\text{g}$ -100g,优选 1mg-50mg,甚至更优选 6mg-30mg,每天一次或多次至每 20 年一次。

### [0286] VII. 联合疗法

[0287] 在某些实施方案中,本发明的组合物与现有治疗一起联合提供。在其它实施方案中,两种或更多种本发明化合物联合提供。在某些实施方案中,本发明的化合物与公知的癌症化疗药物一起联合提供。本发明并不限于具体的化疗药物。

[0288] 设想将各种不同类别的抗肿瘤药(例如抗癌)药物用于本发明的某些实施方案中。适合用于本发明的抗癌药物包括但不限于诱导凋亡的药物、抑制腺苷脱氨酶功能的药物、抑制嘧啶生物合成的药物、抑制嘌呤环生物合成的药物、抑制核苷酸相互转化的药物、抑制核糖核苷酸还原酶的药物、抑制一磷酸胸苷(TMP)合成的药物、抑制二氢叶酸还原的药物、抑制 DNA 合成的药物、与 DNA 形成加合物的药物、损害 DNA 的药物、抑制 DNA 修复的药物、嵌入 DNA 的药物、使天冬酰胺脱氨的药物、抑制 RNA 合成的药物、抑制蛋白质合成或稳定性的药物、抑制微管合成或功能的药物等。

[0289] 在某些实施方案中,适合用于本发明组合物和方法中的代表性抗癌药物包括但不限于 1) 生物碱,包括微管抑制剂(例如长春新碱、长春碱和长春地辛等)、微管稳定剂(例如紫杉醇(TAXOL)和多西他赛等)及染色质功能抑制剂,包括拓扑异构酶抑制剂如表鬼白

毒素（例如依托泊苷（VP-16）和替尼泊苷（VM-26）等）和靶向拓扑异构酶 I 的药物（例如喜树碱和伊立替康（CPT-11）等）；2) 共价 DNA 结合药物（烷化剂），包括氮芥（例如氮芥、苯丁酸氮芥、磷酰胺、异环磷酰胺和白消安（MYLERAN）等）、亚硝基脲（例如卡莫司汀、洛莫司汀和司莫司汀等）及其它烷化剂（例如达卡巴嗪、羟基甲基蜜胺、塞替派和丝裂霉素等）；3) 非共价 DNA 结合药物（抗肿瘤抗生素），包括核酸抑制剂（例如更生霉素（放线菌素 D）等）、蒽环霉素（例如柔红霉素（道诺霉素和 Cerubidine）、多柔比星（阿霉素）和伊达比星（Idamycin）等）、蒽二酮（例如蒽环霉素类似物如米托蒽醌等）、博来霉素（BLENOXANE）等及普卡霉素（光辉霉素）等；4) 抗代谢物，包括叶酸抗代谢物（例如甲氨喋呤、FOLEX 和 MEXATE 等）、嘌呤抗代谢物（例如 6- 巯基嘌呤（6-MP, PURINETHOL）、6- 硫代鸟嘌呤（6-TG）、硫唑嘌呤、阿昔洛韦、更昔洛韦、氯脱氧腺苷、2- 氯脱氧腺苷（CdA）和 2' - 脱氧考福霉素（喷司他丁）等）、嘧啶拮抗剂（例如氟嘧啶（例如 5- 氟尿嘧啶（ADRUCIL）、5- 氟脱氧尿苷（FdUrd）（氟尿苷）等）及胞嘧啶阿拉伯糖苷（例如 CYTOSAR(ara-C) 和氟达拉滨等）；5) 酶类，包括 L- 天冬酰胺酶和羟基脲等；6) 激素，包括糖皮质类固醇、抗雌激素药（例如他莫昔芬等）、非甾体类抗雄激素药（例如氟他胺等）及芳化酶抑制剂（例如阿那曲唑（ARIMIDEX）等）；7) 铂化合物（例如顺铂和卡铂等）；8) 与抗癌药物、毒素和 / 或放射性核素等缀合的单克隆抗体；9) 生物反应调节物（例如干扰素（例如 IFN- $\alpha$  等）及白介素（例如 IL-2 等）等）；10) 过继免疫治疗；11) 造血生长因子；12) 诱导肿瘤细胞分化的药物（例如全反式维 A 酸等）；13) 基因治疗技术；14) 反义治疗技术；15) 肿瘤疫苗；16) 导向肿瘤转移的治疗（例如巴马司他等）；17) 血管发生抑制剂；18) 蛋白体抑制剂（例如 VELCADE）；19) 乙酰化作用和 / 或甲基化作用抑制剂（例如 HDAC 抑制剂）；20) NF  $\kappa$  B 调节剂；21) 细胞周期调节抑制剂（例如 CDK 抑制剂）；22) p53 蛋白功能调节剂；以及 23) 辐射。

[0290] 日常用于癌症治疗场合的任何溶瘤细胞药物均可用于本发明的组合物和方法。例如，美国食品和药物管理局保持着被批准在美国使用的溶瘤细胞药物的处方集。美国食品和药物管理局的国际对等机构也保持着类似的处方集。表 3 提供被批准在美国使用的代表性抗肿瘤药列表。本领域技术人员会意识到，所有美国批准的化疗药物上要求贴附的“产品标签”，均对所述代表性药物描述了适应症、给药信息、毒性数据等。

[0291] 表 3

[0292]

阿地白介素 (脱丙氨酰-1, 丝氨酸-125人白介素-2)	Proleukin	Chiron Corp., Emeryville, CA
阿仑单抗 (IgG1 $\kappa$ 抗CD52抗体)	Campath	Millennium and ILEX Partners, LP, Cambridge, MA
阿利维 A 酸 (9-顺式维 A 酸)	Panretin	Ligand Pharmaceuticals, Inc., San Diego CA
别嘌醇 (1,5-二氢-4H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-酮一钠盐)	Zyloprim	GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC
六甲蜜胺 (N,N,N',N'',N''',-六甲基-1,3,5-三嗪-2,4,6-三胺)	Hexalen	US Bioscience, West Conshohocken, PA

[0293]

氮磷汀 (乙硫醇, 2-[(3-氨基丙基)氨基]-, 磷酸二氢酯)	Ethyol	US Bioscience
阿那曲唑 (1,3-苯二乙腈, a, a, a', a'-四甲基-5-(1H-1,2,4-三唑-1-基甲基))	Arimidex	AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, DE
三氧化二砷	Trisenox	Cell Therapeutic, Inc., Seattle, WA
天冬酰胺酶 (L-天冬酰胺酰胺水解酶, EC-2型)	Elspar	Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
卡介苗(活) (Mycobacterium bovis(Bacillus Calmette-Guérin [BCG] Montreal亚株减毒株的冻干制剂)	TICE BCG	Organon Teknika, Corp., Durham, NC
贝沙罗汀胶囊剂 (4-[1-(5,6,7,8-四氢-3,5,5,8,8-五甲基-2-萘基)乙烯基]苯甲酸)	Targretin	Ligand Pharmaceuticals
贝沙罗汀凝胶剂	Targretin	Ligand Pharmaceuticals
博来霉素 (Streptomyces verticillus所产细胞毒性糖肽抗生素; 博来霉素A2和博来霉素B2)	Blenoxane	Bristol-Myers Squibb Co., NY, NY
卡培他滨 (5'-脱氧-5-氟-N-[(戊氧基)羰基]-胞苷)	Xeloda	Roche
卡铂 ([1,1-环丁烷二羧酸(2-)-0,0']-, (SP-4-2))二氨铂	Paraplatin	Bristol-Myers Squibb
卡莫司汀 (1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脲)	BCNU, BiCNU	Bristol-Myers Squibb
具有聚苯丙生20的卡莫司汀植入片	Gliadel Wafer	Guilford Pharmaceuticals, Inc., Baltimore, MD
塞来考昔 (为4-[5-(4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺)	Celebrex	Searle Pharmaceuticals, England
苯丁酸氮芥 (4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酸)	Leukeran	GlaxoSmithKline
顺铂 (PtCl <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> )	Platinol	Bristol-Myers Squibb
克拉屈滨 (2-氯-2'-脱氧-b-D-腺苷)	Leustatin, 2- CdA	R. W. Johnson Pharmaceutical Research Institute, NJ
环磷酰胺 (2-[双(2-氯乙基)氨基]四氢-2H-13,2-氧氮杂磷-2-氧化物一水合物)	Cytosan, Neosar	Bristol-Myers Squibb
阿糖胞苷 (1-b-D-阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶, C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> )	Cytosar-U	Pharmacia & Upjohn Company

[0294]

阿糖胞苷脂质体剂	DepoCyt	Skye Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA
达卡巴嗪(5-(3,3-二甲基-1-氮烯)-咪唑-4-甲酰胺(DTIC))	DTIC-Dome	Bayer AG, Leverkusen, Germany
更生霉素, 放线菌素D (Streptomyces parvullus所产放线菌素, C <sub>62</sub> H <sub>86</sub> N <sub>12</sub> O <sub>16</sub> )	Cosmegen	Merck
阿法达贝泊汀 (重组肽)	Aranesp	Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA
柔红霉素脂质体剂 ([(8S-顺式)-8-乙酰-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- $\alpha$ -L-来苏-己吡喃糖基)氧基]-7,8,9,10-四氢-6,8,11-三羟基-1-甲氧基-5,12-并四苯二酮盐酸盐])	DanuoXome	Nexstar Pharmaceuticals, Inc., Boulder, CO
盐酸柔红霉素, 道诺霉素 ([(1S,3S)-3-乙酰-1,2,3,4,6,11-六氢-3,5,12-三羟基-10-甲氧基-6,11-二氧代-1-并四苯基-3-氨基-2,3,6-三脱氧-( $\alpha$ )-L-来苏-己吡喃糖苷盐酸盐])	Cerubidine	Wyeth Ayerst, Madison, NJ
地尼白介素-毒素连接物 (重组肽)	Ontak	Seragen, Inc., Hopkinton, MA
右雷佐生 ([(S)-4,4'-(1-甲基-1,2-乙烷二基)双-2,6-哌嗪二酮])	Zinecard	Pharmacia & Upjohn Company
多西他赛 ([(2R,3S)-N-羧基-3-苯基异丝氨酸, N-叔丁酯, 13-酯与5b-20-环氧-12a,4,7b,10b,13a-六羟基紫杉烷-11-烯-9-酮-4-乙酸酯-2-苯甲酸酯, 三水合物])	Taxotere	Aventis Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ
盐酸多柔比星 ([(8S,10S)-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- $\alpha$ -L-来苏-己吡喃糖基)氧基]-8-乙醇酰-7,8,9,10-四氢-6,8,11-三羟基-1-甲氧基-5,12-并四苯二酮盐酸盐])	Adriamycin, Rubex	Pharmacia & Upjohn Company
多柔比星	Adriamycin PFS Intravenous injection	Pharmacia & Upjohn Company
多柔比星脂质体剂	Doxil	Sequus Pharmaceuticals, Inc., Menlo park, CA
丙酸屈他雄酮(17b-羟基-2a-甲基-5a-雄甾烷-3-酮丙酸酯)	Dromostanol-one	Eli Lilly & Company, Indianapolis, IN

[0295]



丙酸屈他雄酮	Masterone injection	Syntex, Corp., Palo Alto, CA
Elliott's B溶液	Elliott's B Solution	Orphan Medical, Inc
表柔比星 ((8S-顺)-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- $\alpha$ -L-阿拉伯-己吡喃糖基)氧基]-7,8,9,10-四氢-6,8,11-三羟基-8-(羟基乙酰)-1-甲氧基-5,12-并四苯二酮盐酸盐)	Ellence	Pharmacia & Upjohn Company
阿法达贝泊汀 (重组肽)	Epogen	Amgen, Inc
雌莫司汀 (雌-1,3,5(10)-三烯-3,17-二醇(17 $\beta$ )-, 3-[双(2-氯乙基)氨基甲酸酯] 17-(磷酸二氢), 二钠盐一水合物, 或雌二醇 3-[双(2-氯乙基)氨基甲酸酯] 17-(磷酸二氢), 二钠盐一水合物)	Emcyt	Pharmacia & Upjohn Company
磷酸依托泊苷 (4'-去甲基表鬼臼毒素 9-[4,6-O-(R)-亚乙基-( $\beta$ )-D-吡喃葡萄糖苷], 4'-(磷酸二氢酯))	Etopophos	Bristol-Myers Squibb
依托泊苷, VP-16 (4'-去甲基表鬼臼毒素 9-[4,6-O-(R)-亚乙基-( $\beta$ )-D-吡喃葡萄糖苷])	Vepesid	Bristol-Myers Squibb
依西美坦 (6-亚甲基雄烷-1,4-二烯-3, 17-二酮)	Aromasin	Pharmacia & Upjohn Company
非格司亭 (r-metHuG-CSF)	Neupogen	Amgen, Inc
氟尿苷(动脉内给药) (2'-脱氧-5-氟尿苷)	FUDR	Roche
氟达拉滨 (抗病毒药阿糖腺苷的氟话类似物, 9-b-D-阿拉伯呋喃糖基腺嘌呤(ara-A))	Fludara	Berlex Laboratories, Inc., Cedar Knolls, NJ
氟尿嘧啶, 5-FU (5-氟-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮)	Adrucil	ICN Pharmaceuticals, Inc., Humacao, Puerto Rico
氟维司群 (7- $\alpha$ -[9-(4,4,5,5,5-五氟戊基亚磺酰)壬基]雌-1,3,5-(10)-三烯-3,17- $\beta$ -二醇)	Faslodex	IPR Pharmaceuticals, Guayama, Puerto Rico
吉西他滨 (2'-脱氧-2', 2'-二氟胞苷一盐酸盐(b-异构体))	Gemzar	Eli Lilly
吉姆单抗奥佐米星 (抗CD33 hP67.6)	Mylotarg	Wyeth Ayerst
醋酸戈舍瑞林 ([D-Ser(But) <sup>6</sup> , Azgly <sup>10</sup> ]LHRH的醋酸盐;	Zoladex Implant	AstraZeneca Pharmaceuticals

[0296]

醋酸pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH2 [C <sub>59</sub> H <sub>84</sub> N <sub>18</sub> O <sub>14</sub> ·(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>x</sub>		
羟基脲	Hydrea	Bristol-Myers Squibb
替伊莫单抗 (单克隆抗体替伊莫单抗和衔接物-螯合物 tiuxetan [N-[2-双(羧基甲基)氨基]-3-(p-异硫氰酸苯基)-丙基]-[N-[2-双(羧基甲基)氨基]-2-(甲基)-乙基]甘氨酸之间的硫脲共价键形成的免疫连接物)	Zevalin	Biogen IDEC, Inc., Cambridge MA
伊达比星 (5, 12-并四苯二酮, 9-乙酰-7-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧-(α)-L-来苏-己吡喃糖基)氧基]-7,8,9,10-四氢-6,9,11-三羟基盐酸盐,(7S-顺式))	Idamycin	Pharmacia & Upjohn Company
异环磷酰胺 (3-(2-氯乙基)-2-[(2-氯乙基)氨基]四氢-2H-1,3,2-噁嗪磷-2-氧化物)	IFEX	Bristol-Myers Squibb
甲磺酸伊马替尼 (4-[(4-甲基-1-哌嗪基)甲基]-N-[4-甲基-3-[[4-(3-吡啶基)-2-嘧啶基]氨基]-苯基]苯甲酰胺甲磺酸盐)	Gleevec	Novartis AG, Basel, Switzerland
干扰素α-2a (重组肽)	Roferon-A	Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ
干扰素α-2b (重组肽)	Intron A (Lyophilized Betaseron)	Schering AG, Berlin, Germany
盐酸伊立替康 (4S)-4,11-二乙基-4-羟基-9-[(4-哌啶子基哌啶子基)羧基氧基]-1H-吡喃并[3', 4': 6,7]中氮茛并[1,2-b]喹啉-3,14(4H, 12H)二酮盐酸盐三水合物)	Camptosar	Pharmacia & Upjohn Company
来曲唑 (4,4'-(1H-1,2,4-三唑-1-基亚甲基)二苄腈)	Femara	Novartis
亚叶酸 (L-谷氨酸, N[4][(2氨基-5-甲酰-1,4,5,6,7,8-六氢-4-氧代-6-蝶啶基)甲基]氨基]苯甲酰], 钙盐(1:1))	Wellcovorin , Leucovorin	Immunex, Corp., Seattle, WA
盐酸左旋咪唑 ((-)-(S)-2,3,5,6-四氢-6-苯基咪唑并[2,1-b]三唑-1-盐酸盐 C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S·HCl)	Ergamisol	Janssen Research Foundation, Titusville, NJ
洛莫司汀 (1-(2-氯-乙基)-3-环己基-1-亚硝基脲)	CeeNU	Bristol-Myers Squibb
Meclorothamine, 氮芥	Mustargen	Merck

[0297]

(2-氯-N-(2-氯乙基)-N-甲基乙胺盐酸盐)		
醋酸甲地孕酮 17 $\alpha$ (乙酰氧基)-6-甲基孕-4,6-二烯-3,20-二酮	Megace	Bristol-Myers Squibb
美法仑, L-PAM (4-[双(2-氯乙基)氨基]-L-苯丙氨酸)	Alkeran	GlaxoSmithKline
巯嘌呤, 6-MP (1,7-二氢-6 H-嘌呤-6-硫酮一水合物)	Purinethol	GlaxoSmithKline
美钠 (2-巯基乙磺酸钠)	Mesnex	Asta Medica
甲氧喋呤 (N-[4-[[[(2,4-二氨基-6-蝶啶基)甲基]甲基氨基]苯甲酰]-L-谷氨酸)	Methotrex- ate	Lederle Laboratories
甲氧沙林 (9-甲氧基-7H-咪唑并[3,2-g][1]-苯并吡喃-7-酮)	Uvadex	Therakos, Inc., Way Exton, Pa
丝裂霉素C	Mutamycin	Bristol-Myers Squibb
丝裂霉素C	Mitozytrex	SuperGen, Inc., Dublin, CA
米托坦 (1,1-二氯-2-(o-氯苯基)-2-(p-氯苯基)乙烷)	Lysodren	Bristol-Myers Squibb
米托蒽醌 (1,4-二羟基-5,8-双[[2-[(2-羟基乙基)氨基]乙基]氨基]-9,10-蒽二酮二盐酸盐)	Novantrone	Immunex Corporation
苯丙酸诺龙	Durabolin- 50	Organon, Inc., West Orange, NJ
诺莫单抗	Verluma	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Germany
奥普瑞白介素 (IL-11)	Neumega	Genetics Institute, Inc., Alexandria, VA
奥沙利铂 (顺式-[(1R,2R)-1,2-环己烷二胺-N,N']][草酸 (2-)-O,O']合铂)	Eloxatin	Sanofi Synthelabo, Inc., NY, NY
紫杉醇 (5 $\beta$ , 20-环氧-1,2 $\alpha$ , 4,7 $\beta$ , 10 $\beta$ , 13 $\alpha$ -六羟基紫杉 烷-11-烯-9-酮-4,10-二乙酸酯-2-苯甲酸酯13- 酯与(2R, 3 S)-N-苯甲酰-3-苯基异丝氨酸)	TAXOL	Bristol-Myers Squibb
帕米膦酸 (膦酸(3-氨基-1-羟基亚丙基)双-, 二钠盐, 五 水合物,(APD))	Aredia	Novartis
培加酶 ([(一甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺基)11-17-腺 苷脱氨酶])	Adagen(Peg ademase Bovine)	Enzon Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ
培门冬酶	Oncaspar	Enzon

[0298]

(一甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺基L-天冬酰胺酶)		
乙二醇化非格司亭 (重组甲硫磺酰人G-CSF(非格司亭)和一甲氧基聚乙二醇的共价连接物)	Neulasta	Amgen, Inc
喷司他丁	Nipent	Parke-Davis Pharmaceutical Co., Rockville, MD
派泊溴烷	Vercyte	Abbott Laboratories, Abbott Park, IL
普卡霉素, 光辉霉素 (Streptomyces plicatus所产抗生素)	Mithracin	Pfizer, Inc., NY, NY
叶吩姆钠	Photofrin	QLT Phototherapeutics, Inc., Vancouver, Canada
丙卡巴肼 (N-异丙基-μ-(2-甲肼)-p-甲苯甲酰胺一盐酸盐)	Matulane	Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc., Gaithersburg, MD
米帕林 (6-氯-9-(1-甲基-4-二乙胺)丁基氨基-2-甲氧基吡啶)	Atabrine	Abbott Labs
拉布立酶 (重组肽)	Elitek	Sanofi-Synthelabo, Inc.,
利妥昔单抗 (重组抗CD20抗体)	Rituxan	Genentech, Inc., South San Francisco, CA
沙格司亭 (重组肽)	Prokine	Immunex Corp
链佐星 (链佐星2-脱氧-2-[[[(甲基亚硝基氨基)羧基]氨基]-a(和b)-D-吡喃葡萄糖和220 mg无水柠檬酸)	Zanosar	Pharmacia & Upjohn Company
滑石粉 (Mg <sub>3</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> )	Sclerosol	Bryan, Corp., Woburn, MA
他莫昔芬 (Z)-2-[4-(1,2-二苯基-1-丁烯基)苯氧基]-N,N-二甲基乙胺 2-羟基-1,2,3-丙三羧酸盐(1:1))	Nolvadex	AstraZeneca Pharmaceuticals
替莫唑胺 (3,4-二氢-3-甲基-4-氧代咪唑并[5,1-d]-as-四嗪-8-甲酰胺)	Temodar	Schering
替尼泊苷, VM-26 (4'-去甲基表鬼臼毒素 9-[4,6-O-(R)-2-噻吩亚甲基-(β)-D-吡喃葡萄糖苷])	Vumon	Bristol-Myers Squibb
睾内酯	Teslac	Bristol-Myers Squibb

[0299]

(13-羟基-3-氧代-13,17-断雄甾-1,4-二烯-17-酸[dgr]-内酯)		
硫鸟嘌呤, 6-TG (2-氨基-1,7-二氢-6H-嘌呤-6-硫酮)	Thioguanine	GlaxoSmithKline
塞替派 (吡丙啶, 1,1',1''-硫次磷基三-, 或三(1-吡丙啶基)硫化磷)	Thioplex	Immunex Corporation
盐酸托泊替康 ( <i>(S)</i> -10-[(二甲基氨基)甲基]-4-乙基-4,9-二羟基-1H-吡喃并[3', 4': 6, 7]中氮茚并[1,2-b]喹啉-3,14-(4H,12H)-二酮一盐酸盐)	Hycamtin	GlaxoSmithKline
托瑞米芬 (2-( <i>p</i> -[( <i>Z</i> )-4-氯-1,2-二苯基-1-丁烯基]-苯氧基)- <i>N,N</i> -二甲基乙胺柠檬酸盐(1:1))	Fareston	Roberts Pharmaceutical Corp., Eatontown, NJ
托西莫单抗, I 131 托西莫单抗 (重组鼠免疫治疗单克隆IgG2a λ抗CD20抗体(I 131 是放射免疫治疗抗体))	Bexxar	Corixa Corp., Seattle, WA
曲妥单抗 (重组单克隆IgG1 κ抗HER2抗体)	Herceptin	Genentech, Inc
维A酸, ATRA (全反式维A酸)	Vesanoid	Roche
乌拉莫司汀	Uracil Mustard Capsules	Roberts Labs
戊柔比星 N-三氟乙酰阿霉素-14-戊酸酯 ( <i>(2S-顺式)</i> -2-[1,2,3,4,6,11-六氢-2,5,12-三羟基-7-甲氧基-6,11-二氧代-[[4,2,3,6-三脱氧-3-[(三氟乙酰)-氨基- $\alpha$ -L-来苏-己吡喃糖基]氧基]-2-并四苯基]-2-氧代戊酸乙酯)	Valstar	Anthra--> Medeva
长春碱, 长春新碱 ( $C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$ )	Velban	Eli Lilly
长春新碱 ( $C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$ )	Oncovin	Eli Lilly
长春瑞滨 (3',4'-二脱氢-4'-脱氧-C'-去甲长春花碱[R-(R*,R*)-2,3-二羟基丁二酸盐(1:2)])	Navelbine	GlaxoSmithKline
唑来膦酸盐, 唑来膦酸 ( <i>(1-羟基-2-咪唑-1-基-磷酰基乙基)磷酸一水合物</i> )	Zometa	Novartis

## [0300] VIII. 定制患者护理

[0301] 在某些实施方案中, 本发明提供定制患者护理。可将本发明的组合物靶向患者疾病(例如癌症)所独有的特定基因。例如, 在某些实施方案中, 首先获得患者癌症组织或其

它受疾病侵袭的组织（例如活检组织）的样本。分析活检组织是否存在特定基因（例如癌基因）的表达。在某些优选的实施方案中，对患者中的基因表达水平进行分析。可通过监测是否存在与特定癌基因对应的 RNA 或 DNA 来检测表达情况。可采用任何合适的检测方法，包括但不限于下文描述的方法。

[0302] 鉴定了患者的目的基因的基因表达模式后，可为每一位患者产生定制治疗方案。在优选的实施方案中，将对患者中（例如肿瘤中）异常表达的基因具有特异性的各寡核苷酸化合物与鸡尾酒疗法联合。在某些实施方案中，鸡尾酒疗法还包括其它另外的化疗药物（例如上述化疗药物）。然后如上所述将鸡尾酒药物给予患者。

[0303] 在某些实施方案中，癌症样本的分析和挑选寡核苷酸用作治疗化合物是自动进行的。例如，在某些实施方案中，采用能分析一系列癌基因的表达水平以获得寡核苷酸的最佳选择方案和浓度的软件程序。在某些实施方案中，由临床实验室分析患者样本来进行所述分析，然后将分析结果传输到另一治疗提供者以制定鸡尾酒治疗方案。在某些实施方案中，信息通过因特网传输，从而使诊断与治疗开始之间的时间尽可能最短。

#### [0304] A. RNA 的检测

[0305] 在某些实施方案中，癌基因（例如包括但不限于本文所公开的癌基因）通过测量组织样本（例如癌组织）中的相应 mRNA 的表达来检测。在其它实施方案中，对体液中的 mRNA 表达进行测量，所述体液包括但不限于血液、血清、黏液和尿液。在某些优选的实施方案中，对 mRNA 的表达水平进行定量测量。RNA 表达可通过任何合适的方法测量，包括但不限于下文公开的方法。

[0306] 在某些实施方案中，RNA 通过 RNA 印迹分析来检测。RNA 印迹分析涉及 RNA 的分离和互补标记探针的杂交。在其它实施方案中，RNA 表达通过对特定结构的酶促切割来检测（INVADER 测定法，ThirdWave Technologies；参见例如美国专利第 5,846,717 号；第 6,090,543 号；第 6,001,567 号；第 5,985,557 号和第 5,994,069 号，其各自通过引用结合到本文中）。INVADER 测定法通过用结构特异性酶类切割重叠寡核苷酸探针的杂交所形成的复合物来检测特定的核酸（例如 RNA）。

[0307] 在还其它实施方案中，RNA（或相应的 cDNA）通过与寡核苷酸探针杂交来检测。可获得多种使用各种杂交和检测技术的杂交测定。例如，在某些实施方案中，采用了 TaqMan 测定法（PE Biosystems, Foster City, CA；参见例如美国专利第 5,962,233 号和第 5,538,848 号，其各自通过引用结合到本文中）。该分析方法在 PCR 反应过程中进行。TaqMan 测定法利用了 AMPLITAQ GOLD DNA 聚合酶的 5' -3' 外切核酸酶活性。将由寡核苷酸及 5' - 报道染料（例如荧光染料）和 3' - 猝灭染料组成的探针纳入到 PCR 反应中。在 PCR 过程中，如果探针与其靶标发生结合，AMPLITAQ GOLD DNA 聚合酶的 5' -3' 溶核活性将切割报道染料和猝灭染料之间的探针。报道染料与猝灭染料的分离导致荧光增强。该信号随 PCR 的每一个循环而累积，可用荧光计来监测。

[0308] 在另外其它实施方案中，用反转录酶 PCR (RT-PCR) 来检测 RNA 的表达。在 RT-PCR 中，用反转录酶将 RNA 酶促转化成互补 DNA 或“cDNA”。然后将 cDNA 用作 PCR 反应的模板。PCR 产物可用任何合适的方法来检测，包括但不限于凝胶电泳及用 DNA 特异性染料染色或与标记探针杂交。在某些实施方案中，采用了美国专利第 5,639,606 号、第 5,643,765 号和第 5,876,978 号（其各自通过引用结合到本文中）所描述的定量反转录酶 PCR 加标准化竞

竞争性模板混合物的方法。

#### [0309] B. 蛋白质的检测

[0310] 在其它实施方案中,癌基因的基因表达通过测量相应的蛋白质或多肽的表达来检测。在某些实施方案中,对组织样本中的蛋白质表达进行检测。在其它实施方案中,对体液中的蛋白质表达进行检测。在某些实施方案中,对蛋白质表达水平进行定量。蛋白质表达可用任何合适的方法来检测。在某些实施方案中,蛋白质通过其与针对其产生的抗体的结合来检测。抗体的产生方法是本领域技术人员公知的。

[0311] 抗体结合通过本领域公知的技术来检测,例如放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定(例如使用胶体金、酶或放射性同位素标记)、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集试验(例如凝胶凝集试验、血细胞凝集试验等)、补体结合试验、免疫荧光测定、A 蛋白试验及免疫电泳试验等。

[0312] 在一个实施方案中,抗体结合通过检测第一抗体上的标记来检测。在另一个实施方案中,第一抗体通过检测第二抗体或试剂与第一抗体的结合来检测。在又一实施方案中,第二抗体被标记。许多用以在免疫测定中检测结合情况的方法是本领域公知的,也落入本发明的范围之内。

[0313] 在某些实施方案中,采用了自动检测方法。免疫测定自动化的方法包括美国专利第 5,885,530 号、第 4,981,785 号、第 6,159,750 号和第 5,358,691 号中描述的方法,其各自通过引用结合到本文中。在某些实施方案中,结果的分析 and 展示也自动进行。例如,在某些实施方案中,采用了能根据一系列对应于癌基因的蛋白质的存在或不存在情况来生成表达型的软件。

[0314] 在其它实施方案中,采用了美国专利第 5,599,677 号和第 5,672,480 号中描述的免疫测定;其各自通过引用结合到本文中。

#### [0315] 实验

[0316] 提供以下实施例是为了证明和进一步说明本发明某些优选的实施方案和方面,这些实施例不应被解释为限制本发明的范围。

[0317] 在下文的实验公开内容中,应用了以下缩写:N(当量);M(摩尔浓度);mM(毫摩尔浓度); $\mu$ M(微摩尔浓度);mol(摩尔);mmol(毫摩尔); $\mu$ mol(微摩尔);nmol(纳摩尔);pmol(皮摩尔);g(克);mg(毫克); $\mu$ g(微克);ng(纳克);l 或 L(升);ml(毫升); $\mu$ l(微升);cm(厘米);mm(毫米); $\mu$ m(微米);nm(纳米);和 $^{\circ}$ C(摄氏度)。

#### [0318] 实施例 1

##### [0319] 材料和方法

[0320] 本实施例描述以下实施例中采用的实验方法。

##### [0321] A. 细胞系

[0322] 以下描述用于本发明实验的细胞系。

##### [0323] MDA-MB-231

[0324] 组织: 腺癌;乳腺;乳房;胸腔积液

[0325] 致癌潜能: 形成 III 级腺癌

[0326] 所表达的受体: 表皮生长因子(EGF)和转化生长因子(TGF- $\alpha$ )

- [0327] 癌基因： wnt3+ 和 wnt7h+
- [0328] 参考文献：
- [0329] Siciliano MJ, Barker PE, Cailleau R. Mutually exclusive geneticsignatures of human breast tumor cell lines with a common chromosomal marker (带共同染色体标记的人乳腺肿瘤细胞系的互斥基因签名)。
- [0330] Cancer Res. 1979年3月;39(3):919-22。
- [0331] Calleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma celllines of metastatic origin: preliminary characterization (转移来源的长期人乳腺癌细胞系:初步鉴定)。
- [0332] In vitro. 1978年11月;14(11):9115。
- [0333] Cruciger QV, Pathak S, Calleau R. Human breast carcinomas: marker chromosomes involving 1q in seven cases (人乳腺癌:七个病例中涉及1q的标记染色体)。
- [0334] Cytogenet Cell Genet. 1976年;17(4):231-5。
- [0335] Satya-Prakash KL, Pathak S, Hsu TC, Olive M, Cailleau R. Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes (对八个人乳腺肿瘤细胞系的细胞遗传学分析:1q、11q 和 HeLa 标记染色体)。
- [0336] Cancer Genet Cytogenet 1981年1月;3(11):61-73。
- [0337] MCF7
- [0338] 组织： 腺癌;乳腺;乳房
- [0339] 转移部位： 胸腔积液
- [0340] 受体： 雌激素受体+
- [0341] 癌基因： wnt7h+
- [0342] 还已知该细胞系能适度表达 c-erbB-2 癌基因和过量表达 c-myc 癌基因
- [0343] 细胞产物： 胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP)
- [0344] 参考文献：
- [0345] Soule HD 等, A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma (来自衍生于乳腺癌的胸腔积液的人细胞系). J. Natl. Cancer Inst. 51:1409-1416, 1973 Landers JE 等, Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cell containing a stabilized wild-type p53 protein (含稳定化野生型 p53 蛋白的人肿瘤细胞中 mdm2 癌基因表达的翻译增强)。
- [0346] Cancer Res. 57:3562-3568, 1997
- [0347] Bacus SS 等, Differentiation of cultured human cancer cells (AU-565 and MCF7) associated with loss of cell surface HER-2/neu oligonucleotide (与细胞表面 HER-2/neu 寡核苷酸损失有关的培养人癌细胞 (AU-565 和 MCF7) 的分化). Mol. Carcinog. 3:350-362, 1990
- [0348] MCF10CA1
- [0349] MCF10 细胞衍生自患纤维囊肿病妇女的良性乳腺组织。MCF10 细胞系由几种细



胞系组成,其中之一是 MCF10A,这是一种无限增殖化的正常人乳腺细胞系。MCF10A 用 T24 Ha-ras 转化产生 MCF10AneoT 细胞。具有瘤形成进展潜力的 MCF10AT 衍生自异种移植传代的 MCF10-AneoT。MCF10AT 在大约 25% 的异种移植物中产生癌。完全恶性的 MCF10CA1 细胞系衍生自几次异种移植传代的 MCF10AT。MCF10CA1a 会 100% 形成肿瘤并发生转移。MCF10CA1a 的核型显示染色体 1 存在额外拷贝。MCF10CA1a 会在静脉注射细胞 36 天后转移到肺部中。

[0350] 参考文献:

[0351] Santner SJ 等, Malignant MCF10CA1 cell lines derived from premalignant human breast epithelial MCF10AT cells (衍生自恶化前乳腺上皮 MCF10AT 细胞的恶性 MCF10CA1 细胞系). Breast Cancer Research and treatment 65:101-110, 2001.

[0352] MYC-MT-1

[0353] 一雌性 MMTV-C-MYC 转基因小鼠发展了乳腺肿瘤。将肿瘤分离,取少量新鲜组织放入由卡马诺斯癌症学会 (Karmanos Cancer Institute) 的 Joshua Liao 博士调理的培养基中培养。此肿瘤细胞系在 10 次传代后得以建立。

[0354] NMuMG

[0355] 组织: 小鼠正常乳腺, 上皮

[0356] 品系: NAMRU, 雌性

[0357] 致瘤潜能: 在小鼠中产生良性肿瘤

[0358] 参考文献:

[0359] Owens RB. Glandular epithelial cells from mice: a method for selective cultivation (小鼠腺上皮细胞: 选育方法). J. Natl. Cancer Inst. 52: 1375-1378, 1974

[0360] Owens RB 等, Epithelial cell cultures from normal glandular tissue of mice (来自小鼠正常腺组织的上皮细胞培养物). J. Natl. Cancer Inst. 53:261-269, 1974

[0361] Yingling JM 等, Mammalian dwarfins are phosphorylated in response to transforming, growth factor beta and are implicated in control of cell growth (哺乳动物侏蛋白响应转化生长因子- $\beta$  发生磷酸化并牵连到对细胞生长的控制). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8940-8944, 1996

[0362] BxPC-3

[0363] 组织: 腺癌; 胰腺

[0364] 细胞产物: 黏蛋白, 胰腺癌特异性抗原; CEA, 癌胚抗原

[0365] 来源: 61 岁女性

[0366] 致瘤潜能: 有

[0367] 癌基因: c-Ki-ras

[0368] 参考文献:

[0369] Tan MH 等, Characterization of a new primary human pancreatic tumor line (新初级人胰腺肿瘤系的鉴定). Cancer Invest. 4:15-23, 1986 Loo R 等, Use of pancreas-specific antigen in immunodiagnosis of pancreatic cancer (胰腺特异性抗原在胰腺癌的免疫诊断中的应用).

- [0370] Clin. Lab. Med. 2 :567-578, 1982
- [0371] Lan MS等, Polypeptide core of a human pancreatic tumor mucin antigen(人胰腺肿瘤黏蛋白抗原的多肽核心). Cancer Res. 50 :2997-3001, 1990 Chambers JA and Harris A. Expression of the cystic fibrosis gene and the major pancreatic mucin gene, MUC1, in human ductal epithelial cells(人导管上皮细胞中囊性纤维变性基因和主要胰黏蛋白基因 MUC1 的表达). J. Cell Sci. 105 :417-422, 1993
- [0372] T-47D
- [0373] 组织: 导管癌, 乳腺, 乳房, 导管
- [0374] 转移部位: 胸腔积液
- [0375] 来源: 患乳腺浸润性导管癌的 54 岁女性的胸腔积液
- [0376] 受体表达: 雌激素、雄激素、降钙素、孕酮、糖皮质激素和
- [0377] 催乳素阳性
- [0378] 癌基因: wnt3+ 和 wnt7h+
- [0379] 还已知此细胞系过量表达 c-erbB-2
- [0380] 参考文献:
- [0381] Keydar I 等, Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin(人乳腺癌来源的细胞系的建立和鉴定). Eur. J. Cancer 15 :659-670, 1979
- [0382] Judge SM and Chatterton RT Jr. Progesterone-specific stimulation of triglyceride biosynthesis in a breast cancer cell line(T-47D)(对乳腺癌细胞系(T-47D)中甘油三酯生物合成的孕酮特异性刺激). Cancer Res. 43 :4407-4412, 1983
- [0384] Lamp SJ 等 Calcitonin induction of a persistent activated state of adenylate cyclase in human breast cancer cell(T-47D)(人乳腺癌细胞(T-47D)中腺苷酸环化酶的持久激活状态的降钙素诱导). J. Biol. Chem. 256 :12269-12274, 1981
- [0385] Sher E 等, Whole-cell uptake and nuclear localization of 1, 25-dihydroxy-cholecalciferol by breast cancer cell(T-47D) in culture(培养物中乳腺癌细胞(T-47D)对 1, 25-二羟基-胆钙化甾醇的全细胞摄取和核定位)
- [0386] Biochem. J. 200 :315-320, 1981
- [0387] Freake HC 等, 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> specifically binds to a breast cancer cell line(T-47D) and stimulates growth(1, 25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 能特异性结合人乳腺癌细胞系(T-47D)并刺激生长). Biochem. Biophys. Res. Commun. 101 :1131-1138, 1981
- [0388] Faust JB and Meeker TC. Amplification and expression of the bcl-1 gene in human solid tumor cell line(人实体瘤细胞系中 bcl-1 基因的扩增和表达). Cancer Res. 52 :2460-2463, 1992 RF33514 :Huguet EL 等, Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell line and normal and disease states of human breast tissue(人乳腺癌细胞系中人 Wnt 基因 2、3、4 和 7B 的分化表达与人乳腺组织的正常和疾病状态). Cancer Res. 54 :2615-2621, 1994

- [0391] BT-474
- [0392] 组织： 导管癌, 乳腺, 乳房
- [0393] 来源： 60 岁女性
- [0394] 癌基因： c-erbB-2
- [0395] 参考文献：
- [0396] Lasfargues EY 等, Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas (从实体乳腺癌分离两个人肿瘤上皮细胞系). J. Natl. Cancer Inst. 61 :967-978, 1978
- [0397] Natl. Cancer Inst. 61 :967-978, 1978
- [0398] Lasfargues EY 等, A human breast tumor cell line (BT-474) that supports mouse mammary tumor virus replication (支持小鼠乳腺肿瘤病毒复制的人乳腺肿瘤细胞系 (BT-474)). In vitro 15 :723-729, 1979 Littlewood-Evans AJ 等, The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma (破骨细胞相关组织蛋白酶 K 在人乳腺癌中表达). Cancer Res. 57 :5386-5390, 1997
- [0399] WSU-FSCCL
- [0400] 1993 年建立的人 B 细胞系
- [0401] 来源： 来自患白血病阶段的低度滤泡性小裂细胞性淋巴瘤
- [0402] 的男性患者的外周血
- [0403] 癌基因： 对于 c-myc 和 bcl-2 都显示染色体易位
- [0404] 参考文献：
- [0405] Mohammad RM, Mohamed AN, Smith MR, Jawadi NS, AL-Khatib A. A unique EBV-Negative Low Grade Lymphoma Line (WSU-FSCCL) Exhibiting both t(14;18) and t(8;11) (显示 t(14;18) 和 t(8;11) 的独特 EBV 阴性低度淋巴瘤系 (WSU-FSCCL)). Cancer Genet Cytogenet 70 :62-67, 1993
- [0406] B. 细胞培养
- [0407] 人乳腺癌细胞 MCF7、MCF10CA1a、MDA-MB 231、MDA-MB 435. eB 和人正常乳腺细胞 MCF10A 均获自 Karmanos Cancer Institute。所有细胞都在补加 10mM HEPES、29mM 碳酸氢钠、青霉素 (100 单位/ml) 和链霉素 (100  $\mu$ g/ml) 的 DMEM/F12 培养基 (Gibco, MD) 中培养。另外, 还将 10% 牛血清、10  $\mu$ g/ml 胰岛素 (Sigma Chemical, St Louis, MO) 和 0.5nM 雌二醇用于 MCF7 培养基中。将 5% 马血清和胰岛素 (10  $\mu$ g/ml) 用于 MCF10CA1a, 10% 胎牛血清用于 MDA-MB 231 和 435 细胞系。MCF 1.0A 培养物补加 5% 马血清、胰岛素 (10  $\mu$ g/ml)、100ng/ml 霍乱肠毒素 (Calbiochem, CA)、0.5  $\mu$ g/ml 氢化可的松 (Sigma Chemical) 和 20ng/ml 表皮生长因子 (Sigma Chemical)。所有的烧瓶和培养板都 37 $^{\circ}$ C 下 95% 空气和 5% CO<sub>2</sub> 的湿润环境中温育。
- [0408] 还将 MYC-MT-1 细胞培养于含有 10ng/ml EGF (上皮生长因子)、1nM 雌二醇、10  $\mu$ g/ml 胰岛素和 10% FBS (胎牛血清) 的 DMEM/F12 培养基中。将 BxPC-3 胰腺癌细胞系和 BT-474 乳腺肿瘤细胞系培养于补加 10% FBS 的 RPMI 1640 中。将乳腺肿瘤细胞系 T-47D 培养于与 BT-474 相同的培养基, 但补加 2.5  $\mu$ g/ml 胰岛素。将 NMuMG (正常小鼠乳腺细胞) 细胞系生长于补加 4.5g/l 葡萄糖、10  $\mu$ g/ml 胰岛素和 10% FBS 的 DMEM 培养基中。

[0409] 将所有上述细胞都以 2500–5,000 细胞 / 孔的密度接种于 96 孔板中。细胞接种 24 小时后用溶于新鲜培养基 (100  $\mu$ l 总体积) 的寡核苷酸化合物处理。在处理 24 小时及每隔 48 小时连续 6–7 天或直到对照细胞达到 80–100% 铺满, 用不含寡核苷酸的新鲜培养基替换培养基。使用 MTT 染色技术评估寡核苷酸的抑制作用。

[0410] 用人滤泡性淋巴瘤细胞系 WSU-FSCCL 评估抗 c-myc 寡核苷酸及抗 Bcl-2 寡核苷酸的作用。FSCCL 细胞在组织培养中生长成单细胞悬液。培养物维持在补加 10% 胎牛血清、1% L-谷氨酰胺、100 单位 /ml 青霉素和 1.00  $\mu$ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 中。FSCCL 细胞在 24 孔板 ( $2 \times 10^5$  细胞 / 孔 / ml) 中用寡核苷酸化合物处理, 并在 37°C 下 95% 空气和 5% CO<sub>2</sub> 的湿润环境中温育。每隔 24 小时用血细胞计数器对细胞进行计数。

[0411] C. 寡核苷酸制备

[0412] 所有的寡核苷酸均由 BIOSYNTHESIS (Lewisville, Texas) 或 Qiagen (Valencia, CA) 进行合成、凝胶纯化和冻干。甲基化寡核苷酸在所有的 CpG 位点进行甲基化。将甲基化寡核苷酸溶于纯无菌水 (Gibco, Invitrogen Corporation) 中, 用以处理培养物中的细胞。

[0413] D. Lipofectin 封装

[0414] 将 20  $\mu$ g lipofectin (Invitrogen) 和 16  $\mu$ g 寡核苷酸各自用 200  $\mu$ l Opti-MEM (Invitrogen) 培养基在单独的无菌管中室温下温育 45 分钟。接着将它们合并, 再温育 15 分钟。然后加入 1.6ml Opti-MEM 培养基, 至 2ml 的最终体积和 1  $\mu$ M 寡核苷酸的最终浓度。lipofectin 和寡核苷酸的浓度可根据它们的分子量和所需的化合物浓度来调整。在此浓度水平下不存在细胞毒性作用。

[0415] E. 细胞生长抑制的测定

[0416] 细胞生长抑制情况用购自 Sigma Chemical (St Louis, MO) 的溴化 3-[4,5-二甲基-噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑鎓 (MTT) 进行评估。将细胞以 50,000 个细胞 / ml 的密度重悬于培养基中, 向 96 孔平底培养板 (Costar Corning, NY, USA) 的每一个孔分配 100  $\mu$ l, 温育 24 小时。将培养基改成 100  $\mu$ l 含所需浓度的寡核苷酸的新鲜培养基, 温育 24 小时。对照培养物的培养基为与寡核苷酸溶液等体积的纯无菌水。每隔 24 小时更换培养基, 但不再添加寡核苷酸, 直到对照培养物铺满 (6–7 天)。之后除去培养基, 培养板用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤两次, 向每孔加入 100  $\mu$ l 含 0.5 mg/ml MTT 染料的无血清培养基, 37°C 下温育 1 小时。除去含染料的培养基, 用 PBS 洗涤, 加入 100  $\mu$ l 二甲亚砜 (DMSO) 使活性染料增溶。用自动多孔分光光度计 (Bio-Tek Microplate Autoreader, Winooski, VT, USA) 读取吸光值。每个处理每次用 8 个独立的孔重复至少 3 次。

[0417] F. 蛋白质提取和蛋白质印迹分析

[0418] 将细胞以 200,000 个细胞 / 烧瓶的密度接种和培养于 T25 组织培养烧瓶 (Costar, Coming, NY, USA) 中。让细胞进行贴壁 24 小时。培养基用含有 10–20  $\mu$ M 寡核苷酸的新鲜培养基替换, 温育 24 小时。每隔 48 小时更换培养基, 但不再添加抑制剂, 继续进行细胞培养, 直到对照烧瓶铺满 (6–7 天)。用 1x 胰蛋白酶 : EDTA (Invitrogen, Gibco, MD) 收获细胞, 2000rpm 离心 5 分钟进行收集。将细胞重悬于 125mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.8) 中, 超声处理得 10–20% 产量, 然后在等体积的 8% SDS 中 (使 SDS 终浓度为 4%) 裂解。将细胞提取物煮沸 10 分钟, 置冰上冷却, 2000rpm 离心 5 分钟, 然后收集上清液。用 BCA 蛋白质测定试剂盒 (Pierce, Rockford, IL) 对蛋白质进行定量。取 50–100  $\mu$ g 蛋白质进行 10–15% 凝

胶（取决于每种蛋白质的分子量）电泳，然后转移到硝基纤维素膜（Schleicher&Schuell, Kence, NH）上。每张膜用溶于 TBSTe(Tris 缓冲盐水,吐温 20) 的 10%乳粉封闭 2 小时，然后与第一抗体一起在 TBST 中温育过夜。抗人 c-myc、c-ha-ras 和 erbB-2 的抗体是小鼠 IgG(Pharmingen, San Diego, CA)。将膜在 TBST 中洗涤 3 次，每次 15 分钟，然后与用过氧化酶缀合的第二抗体一起温育 1 小时。将膜在 TBST 中洗涤 5 次，每次 10 分钟，然后与各 2ml 的 Lumino/Enhancer 和 Stable Peroxide Solution(PIERCE) 一起温育 1 分钟。将膜曝光于 X 射线片 2 分钟（如有必要，曝光时间在 10 秒直至 24 小时之间调整），

[0419] 实施例 2

[0420] c-ki-RAS

[0421] 本实施例描述靶向 c-ki-Ras 基因启动子的寡核苷酸化合物抑制癌细胞系生长的能力。实验按实施例 1 的描述进行。结果在图 13 和 19 中显示。靶向 c-ki-Ras 的寡核苷酸的序列以及 c-ki-Ras 基因的序列在图 5 和 6 中显示。

[0422] 实施例 3

[0423] Bcl-2

[0424] 本实施例描述靶向 bcl-2 基因启动子的寡核苷酸化合物抑制癌细胞系生长的能力。实验按实施例 1 的描述进行。结果在图 14 和 20 中显示。靶向 bcl-2 的寡核苷酸的序列以及 bcl-2 基因的序列在图 1 和 2 中显示。

[0425] 实施例 4

[0426] c-ha-RAS

[0427] 本实施例描述靶向 c-ha-Ras 基因启动子的寡核苷酸化合物抑制癌细胞系生长的能力。实验按实施例 1 的描述进行。结果在图 16 和 22 中显示。靶向 c-ha-Ras 的寡核苷酸的序列以及 c-ha-Ras 基因的序列在图 7 和 8 中显示。

[0428] 实施例 5

[0429] c-erbB-2

[0430] 本实施例描述靶向 c-erbB-2 基因启动子的寡核苷酸化合物抑制癌细胞系生长的能力。实验按实施例 1 的描述进行。结果在图 15 和 21 中显示。靶向 c-erbB-2 的寡核苷酸的序列以及 c-erbB-2 基因的序列在图 3 和 4 中显示。

[0431] 实施例 6

[0432] c-myc

[0433] 本实施例描述靶向 c-myc 基因启动子的寡核苷酸化合物抑制癌细胞系生长的能力。实验按实施例 1 的描述进行。结果在图 17 和 23 中显示。靶向 c-myc 的寡核苷酸的序列以及 c-myc 基因的序列在图 9 和 10 中显示。

[0434] 实施例 7

[0435] TGF- $\alpha$

[0436] 本实施例描述把向 TGF- $\alpha$  基因启动子的寡核苷酸化合物抑制癌细胞系生长的能力。实验按实施例 1 的描述进行。结果在图 18 和 24 中显示。靶向 TGF- $\alpha$  的寡核苷酸的序列以及 TGF- $\alpha$  基因的序列在图 11 和 12 中显示。

[0437] 实施例 8

[0438] 非甲基化寡核苷酸对细胞生长的抑制

[0439] 本实施例描述靶向 Bcl-2 的非甲基化寡核苷酸对淋巴瘤细胞系生长的抑制作用。在  $t = -24$  小时, 将 WSU-FSCCL 细胞以  $2 \times 10^5$  个细胞 / 孔的密度接种于 24 孔板中。对于每个收获时间点, 在  $t = 0$  用指示浓度的寡核苷酸处理三个重复孔。对照样本接种三份。将各板在  $37^\circ\text{C}$  下温育。用台盼蓝染色法和血细胞计数器, 通过连续 4 天每隔 24 小时的细胞计数和生存力, 监测实验过程中的所有培养物。

[0440] MABL2 寡核苷酸靶向 Bcl-2 的启动子区 [5' -CAX GCA XGX GCATCC CXG CCX GTG-3' (SEQ ID NO :3)]。Pho-Mab1-2 是未甲基化形式的 MABL-2 [5' -CAC GCA CGC GCA TCC CCG CCC GTG-3' (SEQ IDNO :1438)]。WSU-FSCCL 从人 B 细胞淋巴瘤 (低度滤泡性小裂细胞性淋巴瘤) 衍生。实验方案显示于表 2。

[0441]

组别	靶基因	化合物	细胞	浓度	制剂	生存力试验	甲基的收获
1	Bcl-2	MABL2	FSCCL	10uM	无	n=3 @ 24, 48 & 72 hr	n=3 @ 72 hr
2	Bcl-2	MABL2	FSCCL	3uM	无	n=3 @ 24, 48 & 72 hr	n=3 @ 72 hr
3	Bcl-2	PhoMABL2	FSCCL	10uM	无	n=3 @ 24, 48 & 72 hr	n=3 @ 72 hr
4	无	无	FSCCL	n/a	无	n=3 @ 24, 48 & 72 hr	n=3 @ 72 hr

[0442] 结果在图 31 中显示。结果证明, 导向 Bcl-2 的未甲基化寡核苷酸与甲基化寡核苷酸一样能有效抑制细胞生长。

[0443] 实施例 9

[0444] 肿瘤生长的体内抑制

[0445] 本实施例描述本发明寡核苷酸在人前列腺癌模型中对肿瘤生长的抑制作用。

[0446] 动物: 采用了人 PC-3 GFP 前列腺癌皮下模型 (参见例如 Yang 等, Cancer Research 59, 781-786, [1999]; Glinskii 等, Cancer Research 63, 4239-4243, [2003] 和 Kalikin 等, Cancer Biology and Therapy 2:6, 17-21 [2003])。使用 5-6 周龄的雄性无胸腺 NCr 裸鼠。将动物饲养和维持在 HEPA 过滤环境中, 笼子、食物和草垫均高压灭菌。繁殖对获自 Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research (Germantown, NY)。动物食物 (5010 可高压灭菌啮齿动物饲料) 获自 PMI nutrition International Inc. (Brentwood, MO)。本研究共使用了 60 只雄性动物。

[0447] 研究用药物: 基于核酸的寡核苷酸化合物 PNT100 和杂 (scrambled) 寡核苷酸对照 PNT-C 用阳离子脂质体传递系统 (LDV) 配制。

[0448] GFP 表达载体: pLEIN 购自 Clontech (Palo Alto, CA)。该载体根据含有内部核糖体进入位点的双顺反子信息表达增强型 GFP (绿色荧光蛋白) 和新霉素抗性基因。

[0449] 细胞培养、载体产生、转染和亚克隆: 表达 10 AI 病毒包膜的 NIH3T3 衍生包装细胞系 PT67 购自 Clontech。将 PT67 细胞培养于补加 10% 胎牛血清的 DMEM 中。为进行载体产生, 将 70% 铺满的包装细胞 (PT67) 与硫酸甲酯 N-[1-(2, 3-二油酰氧基) 丙基]-N, N, N-三甲基铵试剂和饱和量的 pLEIN 质粒的沉淀混合物一起温育 18 小时。在此时补充新鲜培养

基。转染后 48 小时通过荧光显微镜检术检查细胞。将细胞在 200-1000  $\mu\text{g/ml}$  G418 存在下培养 7 天,以进行选择。

[0450] PC-3-GFP 细胞的 GFP 基因转导:为进行 GFP 基因转导,将 20% 铺满的 PC-3 细胞(ATCC, CRL 1435) 与 PT67 细胞的反转录病毒上清液和含 7% 胎牛血清的 Ham' s F-12 K 的 1 : 1 沉淀混合物一起温育 72 小时。在此时再装满新鲜培养基。PC-3 细胞在转导后 72 小时用胰蛋白酶 EDTA 收获,以 1 : 15 的比例传代培养于含 200  $\mu\text{g/ml}$  6418 的选择性培养基中。将 6418 水平逐步增加至 1000 Ng/ml。挑选出表达 GFP 的最亮 PC-3 细胞克隆,合并,然后通过常规的培养方法扩增和转移。

[0451] 皮下肿瘤生长:将 PC-3-GFP 细胞以  $5 \times 10^6$  个细胞 /200  $\mu\text{l}$  的浓度皮下注射入裸鼠肋腹,产生瘤株。在收获前先确认生长于小鼠皮下组织的肿瘤强烈表达 GFP。对在裸鼠皮下生长后收获的肿瘤组织进行检查,除去任何明显坏死或怀疑坏死的或者非 GFP 的肿瘤组织。随后将肿瘤组织切成大约  $2\text{mm}^3$  的小碎片。

[0452] 皮下组织碎片移植:通过将 PC-3 GFP 细胞皮下注射入裸鼠肋腹,建立前列腺癌瘤株 PC-3 GFP。该肿瘤在使用前作为瘤株维持在裸鼠皮下。在移植前,先用荧光确认 PC-3 GFP 肿瘤组织强烈表达 GFP。在移植当天,从裸鼠皮下部位收获肿瘤,放入 RPMI-1640 培养基中。除去坏死组织,活组织切成  $2\text{mm}^3$  小块。然后将组织碎片皮下移植到裸鼠的右侧肋腹。

[0453] 对表达绿色荧光蛋白的肿瘤及其转移的整体光学成像:使用了装有汞灯电源的 Leica LZ 12 型立体荧光显微镜。通过 D425/60 带通滤波器和 470 DCXR 二向色镜产生 GFP 的选择性激发。在带  $1317 \times 1035$  像素芯片的 ST-133 Micromax 高速 TEA/CCD-1317K1 热电冷却照相机 (Princeton Instruments, Trenton, NJ) 上通过长通滤波器 GG475 (Chroma Technology, Brattleboro, VT) 收集发射荧光。同时进行对照实验,图像作对比度和亮度处理,借助 Image Pro Plus 3.1 软件 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland) 进行分析。高分辨率图像直接捕捉到计算机上,或者通过视频输出连续进行捕捉。

[0454] 研究用动物:本研究共使用 60 只小鼠,在外科手术后 12 天分成 6 组。随机选择各同期条件的组。

[0455] 治疗的开始:当估计初级肿瘤达到  $50-100\text{mm}^3$  的体积时开始。

[0456] 研究的设计方案在表 4 中显示。

[0457] 表 4

[0458]

组号	次组号	说明	剂量(mg/kg)	方案	途径	数量
1	A	PBS对照	200 $\mu$ l	每日X 5	皮下	10
1	B	PNT-C (5'- NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNN-3'; SEQ ID NO:1439) + LDV	5	每日X 5	皮下	10
1	C	PNT-100 (PhoMab12; SEQ ID NO:1438) + LDV	2.5	每日X 5	皮下	10
1	D	PNT-100 + LDV	5	每日X 5	皮下	10
1	E	TAXOTERE	10和5	第2和5日	静脉内	10
1	F	TAXOTERE + PNT- 100/LDV	10和5 + 5	第2和5日 + 每日X 5	静脉内 +皮下	10

[0459] 数据收集

[0460] 肿瘤大小 :每周一次通过卡尺测量检查每只动物的肿瘤生长情况,直到研究结束。进行为时 40 天的测量工作,以计算肿瘤体积随时间的变化。用公式  $1/2(axb)$  计算肿瘤的近似体积,其中 b 是两个相互垂直的直径较小者。肿瘤的近似体积通过公式  $(W \times L) \times 1/2$  计算。

[0461] GFP 成像 :移植后 12 天,对表达 GFP 的肿瘤每周进行一次整体光学成像。

[0462] 体重 :在研究过程中所有动物每周称重一次。用电子天平进行体重测量。

[0463] 结束 :在研究的第 46 天将动物处死后获得最终肿瘤重量。用电子天平称量每个肿瘤的重量。

[0464] 效力评估所用的统计方法 :所有 6 个组的肿瘤体积和最终肿瘤重量均用 Student  $t^2$  检验进行分析,  $p = 0.05$  (双侧)。

[0465] 结果 :结果在图 32-35 中显示。图 32 显示 PC-3GFP 前列腺癌皮下模型中的肿瘤用 PNT-100 和 / 或 TAXOTERE 处理后的平均肿瘤体积。图 33 显示 PC-3GFP 前列腺癌皮下模型中的肿瘤用 PNT-100 和 / 或 TAXOTERE 处理后的平均体重。图 34 显示 PC-3GFP 前列腺癌皮下模型中的肿瘤用 PNT-100 和 / 或 TAXOTERE 处理后的平均肿瘤体积。图 35 显示 PC-3GFP 前列腺癌皮下模型中的肿瘤用 PNT-100 和 / 或 TAXOTERE 处理后的平均最终肿瘤体积。结果表明 PNT-100 能使肿瘤大小降低。该作用在 TAXOTERE 存在下得到增强。

[0466] 实施例 10

[0467] 肿瘤生长的体内抑制

[0468] 本实施例描述人前列腺癌模型中体内传递本发明寡核苷酸对肿瘤生长的抑制作用。

[0469] 1) 用在不同新生血管化状态的随机化异种移植,研究了 PC-3 前列腺癌异种移植肿瘤对静脉内给药的 PNT100 的反应。本实验用两步 Neoplectin 制剂进行,分五个 1mg/kg PNT100 的日剂量。所有小鼠对给药方案均能存活,无明显的毒性反应。

[0470] II) WSU-DLCL2 异种移植静脉内注射 PNT100 研究 :进行了第二项研究,以确定



PNT100-Neophectin 在非何杰金氏淋巴瘤模型 (NHL) 中的静脉内传递和效力。本研究设计为给予五个 5mg/kgPNT100 的日剂量,在某些同期组中,与长春新碱进行联合治疗。观察到注射 PNT100 和 PNT-C(杂对照)的动物在一剂量的 PNT100 后体重显著减轻。数据证实 PNT100 和 PNT-C 联合治疗作用甚大。结果显示 WSU-DLCL2 移植 20 天后的肿瘤负荷,表明 PNT-100 单独及与长春新碱联合能使小鼠肿瘤缩小。

[0471] 以上说明书提到的所有出版物和专利都通过引用结合到本文中。本发明所描述的方法和系统的各种修改和变化对本领域技术人员来说会是显而易见的,而不偏离本发明的范围和精神。虽然已通过具体的优选实施方案对本发明进行了描述,但应认识到,要求保护的本发明不应不适当地受限于这种具体实施方案。实际上,已描述的本发明实施方式的各种修改方案对相关领域的技术人员来说是显而易见的,有意将其纳入以下权利要求书的范围内。

SEQ ID NO :1

ctcgagccct attaagtaag ccgctgtgct tctagaagac ctttttcttt tcttggtgct ttttgtcaaa  
gactcttggg gataaaaata cacacgtgca acttgtttgt cctcttgtcc ttttttgcta ggggctattc  
atgctgatta atttaaaact gtctgcttgc gcgtacacac gtctgcgagt gtgaatgtgt atgtgtgtat  
ctatgtacct catttgagaa agtgcggcca actaggattg gctacgaggc aaaggtggag accttagga  
gcccaccac cccagcgta ggaocggtggg cctgaaagtt actatatgga agtcctcacc gtgtagcact  
aaaccagtgt aaaaggtggt agggacagag ggaaaacatt gacttaaact gtcgtaaagc ccttgataaa  
ccccttccc tggagctgct gagttctgca tggcctgggc acggactagg tgttcagggtg gacacgggcg  
gggatgogcg tgcgtgtgta gtgcgoggac acctaggaag ctacttgaaa gtaaacacca cgctcggggc  
gtccctagac attgcttaaa acgtgcagag tcacctgtct tcacagcagg gcagcgtga ggtctcactg  
ctggggggcg tggggggcgg cattggcctg ggtcttccgc gcgocgagcg ccggtaacac aacgtgtgtg  
tgttagcgc gtgtacacac tctcatacac ggctagaaag ggtccaggcg acacacacac tcccacatac  
acggccagaa aaggtccagg cgagacacac acacacacac acacacacac actccacaca cactcacacg  
gccagaaagg gtccaggcgg ttggcggcgc ttttcagcc cttccgccc gccggcggcg tcttttcatg  
gcgaccctc ccgccagccg cccccctccg cactccgtcg tgcgattccc cgggagcccc caccocgtcg  
cggaccccag cgaccaccaa gtgcaccgg cctccgagg cctgagcaga aggcccccg caccaccag  
cgcggggccc gcgggggaggc ctgtgcgcc cgcgccccc actggcggg ccccgcgggc gcagcggagc  
gggcgggtgg ccggcccga ggcccccctc ccggcccggc ccgcgcgcc atgtgcccc ggccggacgg  
cactcccg gctgcogcg gcgcctttaa cccgggccag ggagcggggc ggagggggcg gtcgggggtg  
ctcagaggag ggctctttct ttcttctttt tttgaatgaa ccgtgtgacg ttacgcacag gaaaccggtc  
ggctgtgca gagaatgaag taagaggaca ggcaccacag ccccgctccc gccccctcc tccc

图 1

代表性的 bcl-2 反基因

- BI1 168-190  
5'- ACTXG CAGAX GTGTG TAXGX GCA -3' (SEQ ID NO:2)
- BI2 483-506\*\*  
5'- CAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTG -3' (SEQ ID NO:3)
- BI3 666-685  
5'- ACXGG XGCTX GGXGX GXGGA -3' (SEQ ID NO:4)
- BI4 883-902  
5'- GAXGX GCXGG GCXGG GXGGA -3' (SEQ ID NO:5)
- BI5 1035-1056  
5'- CCXGX GXGTG GGTGT GXGXG GG -3'(SEQ ID NO:6)
- BI6 1102-1127  
5'- CCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG G -3'(SEQ ID NO:7)
- BI7 1150-1170  
5'- GGXGX GXGGG GCXGG GCXGG G -3' (SEQ ID NO:8)
- BI8 1148-1174  
5'- ACATG GXGXG XGGGG CXGGG CXGGG GA-3' (SEQ ID NO:9)

图 2

- NBL1 1-24  
5'- GCGG CTTACTTAAT AGGGCTCGAG -3' (SEQ ID NO:10)
- NBL2 232-259  
5'- CCTCGTAGCCAATCCTAGTTGGCCGCAC -3' (SEQ ID NO:11)
- NBL3 291-314  
5'- CAGGCCACCGTCCTAACGCTGGG -3' (SEQ ID NO:12)
- NBL4 546-570  
5'- GTCTAGGGAC GCCCCGAGCGTGGTG -3' (SEQ ID NO:13)
- NBL5 614-649  
5'- CGCCCCCA CCGCCCCAG CAGTGAGACCTCAGCGC -3' (SEQ ID NO:14)
- NBL6 707-732  
5'- CCGTGTATGAGAGTGTGTACACGCGC -3' (SEQ ID NO:15)
- NBL7 839-870  
5'- GCGCCGCCAA CCGCCTGGAC CCTTTCTGGCCG -3' (SEQ ID NO:16)

图2(续)

- NBL8 921-954  
5'- CGCA CGACGGAGTG CGGAGGGGGG CGGCTGGCGG -3' (SEQ ID NO:17)
- NBL9 961-983  
5'- CCG CGACGGGGTG GGGGCTCCCG -3' (SEQ ID NO:18)
- NBL10 991-1017  
5'- CCG CGACGGGGTG GGGGCTCCCG -3' (SEQ ID NO:19)
- NBL11 1057-1098  
5'- CGGCCAGTGGGTGGCGCGGGCGGCACAG GCCTCCCCGCGGGC -3' (SEQ ID NO:20)
- NBL12 1180-1214  
5'- GCGCCGCGGCAGGCCCGGGAGTGG CCGTCCCGCCG -3' (SEQ ID NO:21)
- NBL13 1223-1258  
5'- ACCCCGAC CGCCCCCTCC GCCCCGCTCC CTGGCCCG -3' (SEQ ID NO:22)
- NBL14 1301-1334  
5'- GCCCGACCGGTTTCCTGTGCGTAA CGTCACACGG -3' (SEQ ID NO: 23)

图 2(续)

- NBL15 91-120  
5'- GGACAAGAGG ACAACAAGT TGCACGTGTG -3' (SEQ ID NO: 24)
- NBL16 328-357  
5'- CTGGTTT AGTGCTACAC GATGAGGACT TCC -3' (SEQ ID NO: 25)
- NBL17 401-432  
5'- CA GGGAAAGGGG TTTATCAAGG GCTTTACGAC -3' (SEQ ID NO: 26)
- NBL18 452-480  
5'- CACCTGAACA CCTAGTCCGT GCCCAGGCC -3' (SEQ ID NO: 27)
- NBL19 1131-1149  
5'- GAGGGCGCC TCCGGGCCGG -3' (SEQ ID NO: 28)

图 2(续)

SEQ ID NO :29

```

1   cccgggggtc ctggaagcca caaggtaaac acaacacate cccctccttg actatcaatt
61  ttactagagg atgtggtggg aaaaccatta tttgatatta aaacaaatag gcttgggatg
121 gagtaggatg caagctcca ggaagttta agataaaacc tgagacttaa aagggtgtta
181 agagtggcag cctaggaat ttatccogga ctccggggga gggggcagag tcaccagcct
241 ctgcatttag ggattctccg aggaaaagtg tgagaacggc tgcaggcaac ccagcttccc
301 ggcgctagga gggacgcacc caggcctgcg cgaagagagg gagaaagtga agctgggagt
361 tgccactccc agacttggtg gaatgcagtt ggagggggcg agctgggagc gcgcttgctc
421 ccaatcacag gagaaggagg aggtggagga ggagggctgc ttgaggaagt ataagaatga
481 agttgtgaag ctgagattcc cctccattgg gaccggagaa accagggagc cccccggg

```

图 3

- HR1 393-416  
5'-AAGXG XGCTC CCAGC TXGCC CCCT-3' (SEQ ID NO:30)
- HR2 298-322  
5'-TGGGT GXGTC CCTCC TAGXG CXGGG-3' (SEQ ID NO:31)
- HR3 310-334  
5'-TTXGC XGCAG GCCTG GGTGX GTCCC T-3' (SEQ ID NO:32)
- HR4 300-332  
5'-XGXGC AGGCC TGGGT GXGTC CCTCC TAGXG CXG-3' (SEQ ID NO:33)
- HR5 257-281  
5'-AGCXG TTCTC AACT TTTCC TXGGA-3' (SEQ ID NO:34)
- HR6 204-227  
5'-TGCCC CCTCC CCXGG AGTCX GGGA-3' (SEQ ID NO:35)
- HR11 393-425  
5'-ATTGG GAGCA AGXGX GCTCC CAGCT XGCCC CCT-3' (SEQ ID NO:36)
- HR23 299-333  
5'-TXGXG CAGGC CTGGG TGXGT CCCTC CTAGX GCXGG-3' (SEQ ID NO:37)
- HR23\* 299-333  
5'-TXGXG CAGGC CTGGG TXGT CCCTC CTAGX GCXGG-3' (SEQ ID NO:38)

图 4

- HR-New1 1-21  
5'-G TGGCT TCCAG GACCC CCGGG-3' (SEQ ID NO:39)
- HR6 204-227  
5'-TGCCC CCTCC CCXGG AGTCX GGGA-3' (SEQ ID NO:40)
- HR11 394-425  
5'-ATTGG GAGCA AGXGX GCTCC CAGCT XGCCC CCT-3' (SEQ ID NO:41)
- HR23 299-333  
5'-TXGXG CAGGC CTGGG TGXGT CCCTC CTAGX GCXGG-3' (SEQ ID NO:42)
- HR23\* 299-333  
5'-TXGXG CAGGC CTGGG TXGT CCCTC CTAGX GCXGG-3' (SEQ ID NO:43)
- HR23-New 18-mer 299-317  
5'-GXGT CCCTC CTAGX GCXGG -3' (SEQ ID NO:44)
- HR-New2 511-539  
5'-CCCG GGGGG GCTCC CTGGT TTCTC CGGTC-3' (SEQ ID NO:45)

图 4(续)

SEQ ID NO :46

```

1 cctgaggggtg gcggggtgct cttcgcagct tctctgtgga gaccggtcag cggggcggcg
61 tggcogctog cggcgtctcc ctgtggcacc cgcacagccc gccgoggtcc ggtccogctc
121 cgggtcagaa ttggcggctg cggggacagc cttgoggtta ggcagggggc gggccggcgc
181 gtgggtccgg cagtccctcc tcccgccaaag ggcgcgccca gaccogctct ccagccggcc
241 cggtcgcaca cctagaccg ccccagccac ccttctctcc gccggocccg cccccgctcc
301 tccccggccg gcccgggccc gcccctctct tctccccgcc ggcgctogct gctccccct
361 cttccctctt cccacaccgc cctcagccgc tccctctcgt acgcccgtct gaagaagaat
421 cgagcgcgga acgcatcgat agctctgcc tctgcgcccg ccggccccg aactcatcgg
481 tgtctcggga gctcatttt cctaggcggc ggccgcggcg gcggaggcag cagcggcggc
541 ggcagtggcg gcggcgaagg tggcggcggc tcggccagta ctcccggccc ccgccatttc
601 ggactgggag cgagcgcggc gcaggcactg aaggcggcgg cggggccaga ggctcagcgg
661 ctcccaggtg cgggagagag gtacggagcg gaccaccct cctgggcccc tgccccgg

```

图 5



- Kr1 102-124  
5' - CCXGG AGXGG GACXG GACXG XGG -3' (SEQ ID NO:47)
- Kr2 168-191  
5' - GCXGG ACCCA XGXGG XGGCC XGCC -3' (SEQ ID NO:48)
- Kr3 505-527  
5' - CCTCX GCXGC XGXGG CXGXC GCC -3' (SEQ ID NO:49)
- Kr4 532-558  
5' - TTXGC XGXCX CCACT GCXGC XGXCX CT -3' (SEQ ID NO:50)
- Kr5 547-574  
5' - CXGAG CXGXC GCCAC CTTXG CXGXC GC -3' (SEQ ID NO:51)
- Kr6 598-623  
5' - TGXGX GXGCT XGCTC CCAGT CXGAA -3' (SEQ ID NO:52)
- Kr7 40-67  
5' - GCGGC CACGC CGCCC CGCTG ACCGG TCT -3' (SEQ ID NO:53)

图 6

- NKr1 11-39  
5' - CCACAGAGA AGCTGCGAAG AGCACCCCGC -3' (SEQ ID NO:54)
- NKr2 69-102  
5' - GC GGGCTGTGCG GATGCCACAG GGAGACGCCGCG -3' (SEQ ID NO:55)
- NKr3 133-158  
5' - GCCGCAAGGCTGTCCCCGCAGCCGCC -3' (SEQ ID NO:56)
- NKr4 203-227  
5' - GCGGGTCTGGGCGGCGCCTTGGCGG -3' (SEQ ID NO:57)
- NKr5 234-260  
5' - CGGTCTAGGG TGGCGAGCCGGGCCGGC -3' (SEQ ID NO:58)
- NKr6 280-312  
5' - GC CGGCGGGGA GGAGCGGGG CCGGGCCGGCG -3' (SEQ ID NO:59)
- NKr7 313-349  
5' - GCGAGCGCC GGCGGGGAGA AGGAGGGGGC CGGGCCGG -3' (SEQ ID NO:60)

图 6(续)

- NKr8 421-443  
5' - GCT ATCGATGCGT TCCGCGCTCG -3' (SEQ ID NO:61)
- NKr9 454-495  
5' - CGAGC TCCGAGCACA CCGATGAGTT CGGGGCCGGG  
CGGCCGC -3' (SEQ ID NO:62)
- NKr10 377-409  
5' - GACGGGCGT ACGAGAGGGA GCGGCTGAGG GCGG -3'(SEQ  
ID NO:63)
- NKr11 630-660  
5' - CCGCTGAGCC TCTGGCCCCG CCGCCGCCTT C -3' (SEQ ID  
NO:64)
- NKr12 670-690  
5' - CGCTCCGTAC CTCTCTCCCG C -3' (SEQ ID NO:65)

图6(续)

SEQ ID NO :66

```

ggatcccagc ctttcccag cccgtagccc cgggacctcc gcggtgggcg gcgccgcgct
gccgggcgag ggagggcctc tgggtcaccc gaaccgctga gtccgggttct ctccgggcc
tgttcccggg agagcccggg gccctgctcg gagatgccgc cccgggcccc cagacaccgg
ctccctggcc ttctctgagc aaccccagac tccgctccgg tctccagcca agcccaacct
cgagaggccg cggccctact ggctccgcct ccgcggttgc tcccgggaagc cccgcccgac
cgggctcct gacagacggg ccgctcagcc aaccgggggtg gggcggggcc cgatggcgcg
cagccaatgg taggcgcgcg ctggcagacg gacgggcccg gggcggggcg tgcgcaggcc
cgcccagatc tccgcgcgcc gtgccctgog cccgcaacct gagccgcacc cggcgcggac
ggagcccatt cgcggggcga accgcgcgcc cccgcccccg ccccgcccg gcctcggccc
cggccctggc cccgggggca gtgcgcctg tgaacgggtg gtgcggggcag ggatcggccg
ggccgcgcgc cctctcgcgc cccaggcggc agcaatacgc gcggcgcggg cggggggcgc
ggggccggcg ggcgtaagcg gcggcggcgg cggcgggttg gtggggccgg gcggggcccg
cgggcacagg tgagcggcg tccggggctg cggcggcggg gggcccttc ctccctgggg
cctgcgggaa tccgggcccc acccgtggcc tccgcctggg cacggtcccc acgcccggct
accggggagc ctccggcccc gcgccctcac acccgggggc gtctgggagg aggcggccgc
ggccacggca cggccgggca ccccgatc agcatcacag gtccgggacc aggcgggggg
cctcagcccc agtgctttt ccctctcgg gtctcccgcg ccgcttctcg gcccttctct
gtcgtcagc cctgcttcc caggagctcc tctgttctt ccagcttctt gtggctgaaa
gatgcccccg gttccccgc gggggtgcgg ggcgctgcc gggtctgcc tcccctggc
ggcgcctagt acgcagtagg cgtcagcaa atacttctg gagcaccag cggcggggg
cotgcaggct ggcaactagc tgcccgggca cggcgtggcg cgtcccgcg tggccagacc
tgttctggag gacgtaacc tcagccctcg ggcgcctccc tttagcctt ctcccgacc
agcagcttct aatttgggtg cgtggttgag agcgtcagc tgtcagccct gcctttgagg
gctgggtccc ttttccatc actgggtcat taagagcaag tgggggcgag gcgacagccc
tcccgcagc tgggttgca ctgcacaggt aggcacgctg cagtccttgc tgctggcgt
tggggcccag ggaccgctgt gggtttgccc ttcagatggc cctgccagca gctgccctgt
ggggcctggg gctgggcctg ggctggctg agcaggcccc tccctggcag gtggggcagg
agacctgta ggaggacccc gggccgagc cccctgagga gcgatgacgg aatataagct
ggtggtgggt ggccggcgcg gtgtgggcaa gactgcgctg accatccagc tgatccagaa

```

图 7

- RZ1X\*\* 485-510  
5'-GGXGX GXGGT TXGCC CXGXG CATGG G-3' (SEQ ID NO:67)
- rZ1 485-510  
5'-GGCGC GCGGT TCGCC CCGCG CATGG G-3' (SEQ ID NO:68)
- rZ4x 1641-1672  
5' -TTCXG TCATX GCTCC TCAGG GGCCT GXGGC CC-3' (SEQ ID NO:69)
- rZx\*\* 388-415  
5' -GXGCA XGCCC XGCCC XGXGC CXGTC XGT - 3' (SEQ ID NO:70)
- rZ2x\*\* 501-533  
5' -GGXGG GGXGG GGGXG GGGGX GXGXG GT - 3' (SEQ ID NO:71)
- rZ3x 1271-1290  
5' -GGGAG GXGCC XGAGG GCTGA GGTTA CXGTC-3' (SEQ ID NO:72)
- erZ1x\*\* 481-510  
5'-CGGGG GCGGG GGXGX GXGGT TXGCC CXGXG CATGG GCTCC-3' (SEQ ID NO:73)
- srZ1x 491-510  
5'-GGXGX GXGGT TXGCC CXGXG-3' (SEQ ID NO:74)
- rZ5x 333-361  
5' -GXGXG CCATX GGGCC CXGCC CCACC CXGG-3' (SEQ ID NO:75)

图 8

- RZ6x\*\* 665-696  
5'- CXGCGX GCXGC XGCGX CXGCT TAXGC CXGCGX GG- 3'  
(SEQ ID NO:76)
- RZ7x 1224-1251  
5'- AXGGX GGAGX GXGCC AXGGX GTGCC XGG -3' (SEQ  
ID NO:77)
- RZ8x 1421-1451  
5'- AGXGT GXGGG AGGGC TGTXG CCTCG CCCCC A-3'  
(SEQ ID NO:78)
- RZ4X(New) 1639-1672  
5'- CXGTC ATXGC TCCTC AGGGG CCTGX GGCCX GG -3'  
(SEQ ID NO:79)
- RZ9X\*\* 733-760  
5'- CXGCC XGCGX CAGCC CCXGA XGCCX GCT -3' (SEQ ID  
NO:80)
- RZ10X\*\* 333-361  
5'- GXGXX CCATX GGGCC CXGCC CCACC CXGG -3' (SEQ  
ID NO:81)
- LRZ1X 485-539  
5'- GGCGX AGGCX GGGGX GGGGX GGGGG XGGGG  
GXGXX XGGTT XGCC XGXGC  
ATGGG -3' (SEQ ID NO:82)
- RZ1uX 468-500  
5'- TXGCC CXGXX CATGG GCTCX GTCXX XGGXX GGT -3'  
(SEQ ID NO:83)
- RZ11X 442-467  
5'- GXGGC TXGGG TTGXG GGXGC AGGGC A -3' (SEQ ID  
NO:84)

图8(续)

- *Nras-1 31-68*  
5'-GCGCCGGC AGCGCGGCGC CGCCCACCGC GGAGGTCCCG -3'  
(SEQ ID NO:85)
- *N-ras-2 85-117*  
5'-CGGCGAG AGAACCCGAC TCAGCGGTGC CGGTGC -3' (SEQ ID  
NO:86)
- *Nras-3 127-160*  
5' -GCGGCATCTC CGAGCAGGGC CCCGGGCTCT CCCG -3' (SEQ  
ID NO:87)
- *Nras-4 196-220*  
5' -CCGGAGCCGA GCTCGGGGTT GCTCG - 3' (SEQ ID NO:88)
- *Nras-5 241-268*  
5' -GCGGAGCC AGTAGGGCCG CGGCCTCTCG - 3' (SEQ ID NO:89)
- *Nras-6 273-294*  
5' -CGGG GCTTCCGGGA GCAACGCG -3' (SEQ ID NO:90)
- *Nras-7 297-323*  
5'-CGG CCCGTCTGTC AGGAGCCGCG GTCG -3' (SEQ ID NO:91)
- *Nras-8 418-441*  
5'-C GGGCGGCGGA GACTCGGGCG GGC -3' (SEQ ID NO:92)
- *Nras-9 540-577*  
5' -CCGTTCA CAGGCGCGAC TGCCCCGGG GCCAGGGCCG G -  
3'(SEQ ID NO:93)

图8(续)

- *Nras-10 595-618*  
5'- CGAGGAGG GCGCGCGGCC CGGCCG - 3' (SEQ ID NO:94)
- *Nras-11 781-815*  
5'- CGCGA GGCCACGGGT GGGGCCCGGA TTCCCGCAGG -  
3'(SEQ ID NO:95)
- *Nras-12 820-845*  
5'- CGGGT ACGCCGGCGT GGGGACCGTG C -3' (SEQ ID NO:96)
- *Nras-13 851-881*  
5'- C GCCCCCGGGT GTGAGGGCGC CGGGCCCGAG -3' (SEQ ID  
NO:97)
- *Nras-14 892-916*  
5'- CGGGCG TGCCGTGGCC GCGGCCGCC -3' (SEQ ID NO:98)
- *Nras-15 981-1010*  
5'- CGAGAAGCGG CGCGGGAGAC CCGGAGAGGG -3' (SEQ ID  
NO:99)
- *Nras-16 1088-1115*  
5'- GCGCC CCGCACCCCC GCGGGGAAC CGG -3' (SEQ ID  
NO:100)
- *Nras-17 1120-1154*  
5'- GCGT ACTAGGCGCC GCCGAGGGGA GGGCAGACCC G -3'  
(SEQ ID NO:101)
- *Nras-18 1160-1197*  
5'- CGCGGCG CTGGTGCCTC CGACAAGTAT TTGCTGAGCG C -  
3'(SEQ ID NO:102)

图8(续)



- *Nras-19 161-185*  
5'- GGGAG CCGGTGTCTG GGGGCCCGGG - 3' (SEQ ID NO:103)
- *Nras-20 363-387*  
5'- CTGCCAG GCGCGGCCTA CCATTGGC -3' (SEQ ID NO:104)
- *Nras-21 706-729*  
5'- CTGTGCCCG CGGGCCCCGC CCGGC -3' (SEQ ID NO:105)
- *Nras-22 918-956*  
5'- CGGCCT GGTCCGCGAC CTGTGATGCT GAATCGGGGG TGC -  
3' (SEQ ID NO:106)
- *Nras-23 1691-1720*  
5'- CAGCGCACTC TTGCCACAC CGCCGGCGCC -3' (SEQ ID  
NO:107)

图8(续)

SEQ ID NO :108

1 ctgcagcctg gtacgcgcgt ggctggcggg gggcgcgcag tggttctcgg tgtggagggc  
61 agctgttccc cctgcgatga ttatactca caggacaagg atgcgatttg tcaaacacta  
121 cgaggagtag cagagaaagg gagagggttt gaaagggagc aaaagaaaat ggtaggcgcg  
181 cgtagttaat tcatgoggct ctcttactct gtttacctcc tagaggtaga gtgctcggct  
241 gcccggtga gtctctccc cacctcccc accctcccc cctccccat aagcgcctc  
301 ccgggttccc aaagcagagg gcgtggggga aaagaaaaa gatcctctct cgctaattct  
361 cgcccaccgg ccctttataa tgcgagggtc tggacggctg aggaccccc agctgtgctg  
421 ctgcgggcgc ccaccgggg ccccggcggt ctttggtctc cctcctgct cgagaagggc  
481 agggcttctc agaggcttgg cgggaaaaag aacggaggga gggatcgtc tgagtataa  
541 agccgatttt cggggcttta tctaactcgc thtagtaatt ttaccgagag gcagagggag  
601 cgagcgggcg gccgcctagg gtggaagagc cgggcgagta gaggtgact tgggaagggg  
661 gatccggagc gaatcggggg cttcgcctct ggcccagccc tcccgctgat ccccaggca  
721 gtggtcgcga atccttgccg cattcacgaa aatttgcca taacacgggg oggtcacttt  
781 acactggaac gtccaacacc cgagcaagga cgcgagtctc ccgancgcga ggagactatt  
841 gagatgtgtc gattggctac atagggtgtc tttctccca ctctgccc atogacagtt  
901 ttctcagaat acctttggta agtggggctg ggggtggcgt tatttcagaa ctgtatcggg  
961 caaattgtat tcctcaccgc cacctcccgc ggcttcttaa gggcgcagg gccgctttcg  
1021 attcctctgc cgtgcgggg ccgacgttcg ggactgagca ctgcgcgctg cgcaggttt  
1081 ccgcaccaag acccctttaa ctcaagactg cctcccgtt tgtgtgcccc gctccagcag

图 9

- cm1 423-449  
5'-XGGCX GGGGC CXGX GGTGG XGGCX GXG-3' (SEQ ID NO:109)
- cm2 175-199  
5'-GCXGC ATGA ATTAA CTAXG XGXGC C-3' (SEQ ID NO:110)
- cm3\*\* 349-371  
5'-GCXGG TGGGX GGAGA TTAG XGAG-3' (SEQ ID NO:111)
- cm4\*\* 501-529  
5'-AGXGA TCCCT CCCTC XGTTC TTTTT CCXG-3' (SEQ ID NO:112)
- cm5 47-77  
5'-TXGCA GGGGG AACAG CTGCC CTCCA CACXG A -3' (SEQ ID NO:113)
- cm6 13-39  
5'-TGXGX GCCCA CXGCC AGCC AXGXG XGT -3' (SEQ ID NO:114)
- cm7  
5'-GGGXG CCTXG CTAAG GCTGG GGAAA GGGCX GXGC -3' (SEQ ID NO:115)

图 10

- *Ncm1 101-130*  
5'-CTACTCCTCG TAGTGTTTGA CAAATCGCAT -3' (SEQ ID NO:116)
- *Ncm2 225-251*  
5'-C TCAGCCGGGC AGCCGAGCAC TCTACC -3' (SEQ ID NO:117)
- *Ncm3 293-326*  
5'-CCACGC CCTCTGCTTT GGGAACCCGG GAGGGCGC -3' (SEQ ID NO:118)
- *Ncm4 542-569*  
5'-CGAGTTAGA TAAAGCCCCG AAAATCGGC -3' (SEQ ID NO:119)
- *Ncm5 600-632*  
5'-CG GCTCTTCCAC CCTAGGCGGC CGCCCGCTCG C -3' (SEQ ID NO:120)
- *Ncm6 664-687*  
5'-GGCGAAG CCCCCGATTC GCTCCGG -3' (SEQ ID NO:121)
- *Ncm7 800-836*  
5'-GTCTCC TCGCGNTCGG GAGACTCGCG TCCTTGCTCG G -3' (SEQ ID NO:122)

图 10(续)

- *Ncm8 957-993*  
5'-GCC GCGGGAGGTG GCGGTGAGGA ATACAATTTG CCCG -  
3' (SEQ ID NO:123)
- *Ncm9 1011-1046*  
5'-CGTCGG CCCC GCAGCG GCAGAGGAAT CGAAAGCGGC -3'  
(SEQ ID NO:124)
- *Ncm10 1061-1090*  
5'-CTTGGTGCGG AACCTGGCG CAGCGCGCAG -3' (SEQ ID  
NO:125)
- *Ncm11 396-420*  
5'-CAGCACAGCT CGGGGGTCCT CAGCC-3' (SEQ ID NO:126)
- *Ncm12 721-748*  
5'-CGTGAATG CGGCAAGGAT TGCGGACCAC-3' (SEQ ID  
NO:127)
- *Ncm13 758-777*  
5'-GTGACCG CCCC GTGTTA TGG-3' (SEQ ID NO:128)
- *Ncm14 875-896*  
5'-GTCGAT GCGCAGGAG TGGGAG-3' (SEQ ID NO:129)
- *Ncm15 1110-1140*  
5'- CTGCTGGAGC GGGGCACACA AAGCGGGAGG C-3' (SEQ ID  
NO:130)

图 10(续)

SEQ ID NO :131

gagctccggg tacctggaga acatgaatct cccgggtgta ctgtcccat gagggtcacc  
gaggaacctt tggatcttcc actcttcgcc cagaatgtct tccctctatc cctccacct  
ccccaaattc cagcaccagg ggccacctca gagccacaaa tcttgaagg accaccagg  
tgactcgggc ccacacacc ctctttcggg gtacacttgg tggcaggcta ggagcttttg  
gcctcagctg gtggtgccac acaccagatt cgtcacagag accoattttt tatcagtccc  
aggccagaag tacgaagact gatottaacg atgtggcctg cctgggagggt aaggcggcag  
gcgttgacaga attgatggga actgtggcac aggtgggaaa cctggtttaa caaattcttc  
attgattcag gggaccactt tctttgagcc aagtcttggc aagcggccgg cgaaactcac  
aggcccttt cctggctgcg tcccagcct ccagcctcc ccgcccaga gatccccag  
gagcggcccc tcggtgtagg taacgggtgc ccggcggtc cgtccgccc cctagagcct  
ggaagccgcc actgcggccc aggacaatcc ggctacgcgg ccggcgccga cccgcacgc  
tggagtccgc tgcgcacgg cgctggcagt cgggggtggt gtctgaagtc aggcgcttc  
tgcttttcg tcggccggg tgcccggctc gcgccccag gctctgggat cccaggtcgc  
cccgccagc agcccgcgc ctgctcgggt cgctcagcgt cccgccctt taccctaac  
ccccaccctc tgtgccctca ggggggcacc cccatcgggg cgggaggggg gggtcagctg  
tgcccggctc gccgagtggc gaggaggtga cggtagccgc cttctatatt ccgcccggcg  
ggcagcgtg cggggcgagt gccagcagag aggcgctcgg tctcctcc gcctcccgc  
gccgggggca ggccctgcct agtctgcgtc ttttcccc gcaccgcggc gccgctccgc  
cactcgggca ccgcaggtag ggcaggaggc tggagagcct gctgccgccc cgcctgtaa  
atggtcccct cggtggaca gctcgcctg ttcgctctgg gtattgtgtt ggctcgtgc  
caggccttgg agaacagcac gtcccgcgtg agtgcagacc cgcctgtggc tgcagcagtg  
gtgtcccatt ttaatgactg cccagattcc cacactcagt tctgcttcca tgga

图 11

- tg1 997-1025  
5'- CXGGX GXGGG AGGGX GGAGG GAGGA CXGT -3' (SEQ ID NO:132)
- tg2 951-978  
5'- TXGCC CXGCA GXGCT GCCXG CXGGG XGG -3' (SEQ ID NO:133)
- tg3 805-830  
5'- AGGGG XGGGG AXGCT GAGXG CACXG A -3' (SEQ ID NO:134)
- tg4 777-802  
5'- AGGGX GXGGG CTGCT GGGXG GGXGA -3' (SEQ ID NO:135)
- tg5 728-762  
5'- GCCTG GXGGX GXGAG CXGGG CACCX GGGCX GAXGA -3' (SEQ ID NO:136)
- tg6 641-661  
5'- AGXGT GXGGG GTXGG XGCXG GCXGX GTA-3' (SEQ ID NO:137)
- tg7 563-591  
5'- GXGGX GGAXG GAGCX GCCXG GGCAC CXGT -3' (SEQ ID NO:138)
- tg8\*\* 754-787  
5'- GGGXG GGGXG ACCTG GGATC CCAGG CCTGG XGG -3' (SEQ ID NO:139)
- tg9 521-546  
5'- GXGCT CCTGG GGCAT CTCTG GGGXG G -3' (SEQ ID NO:140)

图 12

- tg10\*\* 1111-1137  
5'- AXGGG XGGGX GGGCA GCAGG CTCTC CA -3' (SEQ ID NO:141)
- tg11\*\* 328-357  
5'-CXGCC TTACC TCCCA GGCAG GCCAC ATXGT -3' (SEQ ID NO:142)
- tg12\*\* 185-209  
5'- CXGAA AGAGG GGTGT GTGGG CCXGA -3' (SEQ ID NO:143)
- tg13\*\* 1064-1094  
5'- GXGGT GCCXG AGTGG XGGAG XGGXG CXGXG G -3' (SEQ ID NO:144)

图 12(续)



- Ntq1 1-25  
5'-CATGT TCTCCAGGTA CCCGGAGCTC -3' (SEQ ID NO:145)
- Ntq2 31-60  
5'-C GGTGACCCTC ATGGGGACAG TACACCCGGG -3' (SEQ ID NO:146)
- Ntq3 81-110  
5'-GATAGAGGGA AGACATTCTG GGCGAAGAGT -3' (SEQ ID NO:147)
- Ntq4 453-480  
5'-GTGAGTTTCG CCGGCCGCTT GCCAAGAC -3' (SEQ ID NO:148)
- Ntq5 614-640  
5'- CCGCGTAGCC GGATTGTCCT GGGCCGC -3' (SEQ ID NO:149)
- Ntq6 662-682  
5'- CG CCGTGCGGCA GCGGACTCC -3' (SEQ ID NO:150)
- Ntq7 691-716  
5'- GCGCCT GACTTCAGAC ACCACCCCCG -3' (SEQ ID NO:151)
- Ntq8 876-912  
5'- GC GACCGGGGCA CAGCTGACCC CCCCTCCCG CCCCG -3' (SEQ ID NO:152)
- Ntq9 913-940  
5'- GCGGCTACCG TCACCTCCTC GCCACTCG -3' (SEQ ID NO:153)

图 12(续)

- Ntg10 1151-1175  
5'- GCGAA CAGGGCGAGC TGTCCAGCCG -3' (SEQ ID NO:154)
- Ntg11 1226-1250  
5'- GCCACGGGCG GGTCTGCACT CAGCG -3'(SEQ ID NO:155)
- Ntg12 257-284  
5'-GGGT CTCTGTGACG AATCTGGTGT GTGG -3' (SEQ ID NO:156)
- Ntg13 361-384  
5'-CAGT TCCCATCAAT TCTGCAACGC -3' (SEQ ID NO:157)
- Ntg14 1038-1062  
5'-GC GGGGGAAAAA GACGCAGACT AGG -3' (SEQ ID NO:158)
- Ntg15 1193-1223  
5'-GAC GTGCTGTTCT CCAAGGCCTG GCACGCAG -3'(SEQ ID NO:159)

图 12(续)

前导物 浓度		<b>BxPC3</b>	
		平均百分抑制率	1 标准偏差
kr1	5 $\mu$ M	93%	1.6%
kr1	15 $\mu$ M	99%	0.4%
kr1	30 $\mu$ M	99%	0.1%
kr2	5 $\mu$ M	12%	5.9%
Kr2	10 $\mu$ M	14%	10.2%
Kr2	10 $\mu$ M	20%	6.9%
kr2	15 $\mu$ M	87%	6.0%
Kr2	20 $\mu$ M	87%	1.7%
Kr2	20 $\mu$ M	91%	1.7%
kr2	30 $\mu$ M	99%	0.1%
Kr3	10 $\mu$ M	14%	5.0%
Kr3	20 $\mu$ M	49%	14.3%
kr3	50 $\mu$ M	99%	0.1%
kr4	5 $\mu$ M	53%	2.6%
Kr4	10 $\mu$ M	18%	4.5%
kr4	15 $\mu$ M	99%	0.1%
Kr4	20 $\mu$ M	93%	1.4%
kr4	30 $\mu$ M	99%	0.1%
Kr5	10 $\mu$ M	16%	4.5%
Kr5	20 $\mu$ M	17%	3.9%
kr5	50 $\mu$ M	99%	0.4%
Kr6	10 $\mu$ M	15%	3.9%
Kr6	10 $\mu$ M	16%	6.5%
Kr6	20 $\mu$ M	25%	6.9%
Kr6	20 $\mu$ M	18%	6.8%
kr6	50 $\mu$ M	68%	3.9%
前导物 浓度		<b>Myc-MT-1</b>	
		平均百分抑制率	1 标准偏差
kr1	10 $\mu$ M	77%	2.5%

图 13

图 14

前导物	浓度	平均百分抑制率	重复次数	1 标准偏差
BL1	10 uM	12%	8	6%
BL2	10 uM	76%	8	3%
BL2	20 uM	94%	4	3%
BL3	10 uM	20%	8	4%
BL4	10 uM	9%	8	7%
BL5	10 uM	26%	8	5%
BL6	10 uM	47%	8	2%
BL7	10 uM	15%	8	8%
BL8	20 uM	81%	4	4%

**M14**

前导物	浓度	平均百分抑制率	重复次数	1 标准偏差
BL1	10 uM	27%	4	2%
BL2	10 uM	65%	4	3%
BL2	10 uM	35%	4	6%
BL2	20 uM	98%	4	2%
BL3	10 uM	20%	4	10%
BL4	10 uM	21%	4	11%
BL5	10 uM	18%	4	5%
BL6	10 uM	60%	4	1%
BL7	10 uM	97%	4	1%
BL7	10 uM	98%	4	0%
BL7	20 uM	98%	4	0%

**BT474**

BL1	10 uM	45%	4	5%
BL2	10 uM	67%	4	6%
BL3	10 uM	85%	4	6%
BL4	10 uM	45%	4	14%
BL5	10 uM	84%	4	6%
BL6	10 uM	71%	4	5%
BL7		76%	4	2%

**T47D**

BL2	10 uM	42%	4	10%
BL2	20 uM	88%	4	3%
BL7	10 uM	95%	4	1%
BL7	20 uM	96%	4	1%
BL8	2 uM	25%	4	12%
BL8	6 uM	33%	4	7%
BL8	20 uM	59%	4	24%

**FSCCL**

BL2	10 uM 8 小时后	60%	4	7%
BL2	10 uM 16 小时后	86.50%	4	6%
BL2	10 uM 24 小时后	95%	4	4%
BL2	10 uM 32 小时后	98.90%	4	2%
BL2	10 uM 40 小时后	100%	4	0%

BL2	10 uM	48 小时后	100%	4	0%
BL6	10 uM		40%	4	13%
BL6	10 uM		71.60%	4	8%
BL6	10 uM		96.30%	4	5%
BL6	10 uM		100%	4	0%
BL6	10 uM		100%	4	0%
BL6	10 uM		100%	4	0%
BL7	1 uM	8 小时后	-14%	4	9%
BL7	3 uM	8 小时后	14%	4	16%
BL7	10 uM	8 小时后	5%	4	26%
BL7	1 uM	16 小时后	6%	4	11%
BL7	3 uM	16 小时后	54%	4	7%
BL7	10 uM	16 小时后	86%	4	6%
BL7	1 uM	24 小时后	28%	4	21%
BL7	3 uM	24 小时后	76%	4	5%
BL7	10 uM	24 小时后	100%	4	0%
BL7	1 uM	32 小时后	37%	4	12%
BL7	3 uM	32 小时后	93%	4	4%
BL7	10 uM	32 小时后	100%	4	0%
BL7	1 uM	48 小时后	40%	4	16%
BL7	3 uM	48 小时后	100%	4	0%
BL7	10 uM	48 小时后	100%	4	0%
BL8	1 uM	8 小时后	3.80%	4	10%
BL8	3 uM	8 小时后	19%	4	16%
BL8	10 uM	8 小时后	38%	4	14%
BL8	1 uM	16 小时后	13.40%	4	10%
BL8	3 uM	16 小时后	18%	4	3%
BL8	10 uM	16 小时后	57%	4	6%
BL8	1 uM	24 小时后	31.30%	4	8%
BL8	3 uM	24 小时后	42%	4	7%
BL8	10 uM	24 小时后	82%	4	7%
BL8	1 uM	32 小时后	33%	4	9%
BL8	3 uM	32 小时后	42.50%	4	4%
BL8	10 uM	32 小时后	95.70%	4	3%
BL8	1 uM	40 小时后	36%	4	3%
BL8	3 uM	40 小时后	45.40%	4	8%
BL8	10 uM	40 小时后	100%	4	0%
BL8	1 uM	48 小时后	35%	4	3%
BL8	3 uM	48 小时后	49%	4	9%
BL8	10 uM	48 小时后	100%	4	0%

**NMuMG**

BL2	10 uM		4%	4	6%
BL2	20 uM		5.50%	4	6%
BL7	无浓度		52%	8	14%
BL8	20 uM		27%	4	6%

**MCF7**

BL8	5 uM		41%	4	4%
BL8	10 uM		61%	4	1%
BL8	20 uM		83%	4	5%

		<b>Myc-MT-1</b>			
<b>BL2</b>	1 $\mu$ M		4%	4	8%
<b>BL2</b>	3 $\mu$ M		6%	4	2%
<b>BL2</b>	10 $\mu$ M		37%	4	8%

图 15

前导物 浓度		MCF10a		
前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
HR3	10 $\mu$ M	12%	8%	8
HR4	10 $\mu$ M	-5%	8%	8

前导物 浓度		MDA-MB-231		
前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
HR23	1 $\mu$ M	18%	4%	4
HR23	2.5 $\mu$ M	19%	4%	4
HR23	5 $\mu$ M	32%	2%	4
HR23	10 $\mu$ M	98%	1%	4
HR23	10 $\mu$ M	74%	4%	4
HR23	20 $\mu$ M	78%	1%	4

前导物 浓度		T47D		
前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
HR2	10 $\mu$ M	92%	1%	5
HR2	10 $\mu$ M	86%	3%	4
HR2	10 $\mu$ M	58%	2%	4
HR2	20 $\mu$ M	88%	4%	4
HR3	10 $\mu$ M	89%	5%	4
HR3	10 $\mu$ M	45%	5%	4
HR3	20 $\mu$ M	97%	2%	4
HR5	10 $\mu$ M	-15%	18%	5
HR6	10 $\mu$ M	66%	28%	5
HR11	10 $\mu$ M	46%	7%	5
HR23	1 $\mu$ M	0%	3%	4
HR23	1 $\mu$ M	26%	15%	4
HR23	2.5 $\mu$ M	37%	6%	4
HR23	3 $\mu$ M	22%	9%	4
HR23	5 $\mu$ M	75%	2%	4
HR23	10 $\mu$ M	96%	2%	2
HR23	10 $\mu$ M	92%	1%	4
HR23	10 $\mu$ M	99%	1%	4
HR23	10 $\mu$ M	68%	2%	4
HR23	20 $\mu$ M	94%	3%	4
HR23	20 $\mu$ M	69%	2%	4
HR23*	10 $\mu$ M	89%	1%	4
HR23*	20 $\mu$ M	91%	0%	4

前导物 浓度		BT-474		
前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
HR2	10 $\mu$ M	84%	2%	5
HR5	10 $\mu$ M	37%	13%	5
HR6	10 $\mu$ M	71%	1%	4
HR11	10 $\mu$ M	75%	7%	4
HR23	10 $\mu$ M	98%	1%	4

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
HR6	无浓度	94%	2%	4
HR11	无浓度	96%	2%	4

前导物	浓度	<b>NMuMG</b> 平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
HR2	10 $\mu$ M	19%	10%	4
HR2	20 $\mu$ M	35%	12%	4
HR23	无浓度	75%	4%	8



图 16

先导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X	5 uM:2159-5	80%	4%	4
RZ1X	5 uM:2159-6	76%	4%	4
RZ1X	5 uM:2159-5	49%	7%	4
RZ1X	5 uM:2159-6	61%	11%	4
RZ1X	10 uM	96%	2%	7
RZ1X	10 uM:2159-1	97%	1%	4
RZ1X	10 uM:2159-1	86%	2%	4
RZ1X	20 uM	88% N/A		
RZ1X	20 uM:2159-5	97%	3%	4
RZ1X	20 uM:2159-6	98%	1%	4
RZ1X	20 uM:2159-5	95%	1%	4
RZ1X	20 uM:2159-6	97%	1%	4
rz1	20 uM	67% N/A		
rz4x	20 uM	-3% N/A		
rh1x	20 uM	0% N/A		
rzmx / rmx	20 uM	-2% N/A		
rz6x	10 uM	91%	2%	4
RZ9X	10 uM	88%	4%	4
RZ10X	10 uM	58%	3%	4
RZ1**X	10 uM	20%	6%	4

先导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X	10 uM	78%	1%	8
RZ1X	10 uM:1979-1	91%	5%	4
RZ1X	10 uM:1979-1	97%	2%	3
RZ1X	10 uM:2159-6	92%	3%	4
RZ1X	20 uM:2159-1	82%	5%	4
RZ1X	20 uM:2159-6	93%	1%	4
RZ1X	20 uM:2159-1	99%	0%	4
RZ1X	20 uM:2159-6	99%	0%	4
rz6x	10 uM	60%	3%	4
rz6x	20 uM	72%	22%	4
RZ9X	10 uM	86%	1%	4
RZ9X	10 uM	98%	1%	4
RZ9X	20 uM	93%	2%	4
RZ10X	10 uM	44%	32%	4
RZ10X	20 uM	83%	2%	4
RZ1**X	10 uM	23%	14%	4
RZ1**X	20 uM	60%	11%	4

先导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X	10 uM	-1%	9%	8
RZ1X	10 uM	12%	6%	8

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X	1 uM	0.40%	2%	4
RZ1X	3 uM	2.70%	2%	4
RZ1X	10 uM	95%	3%	8
RZ1X	10 uM:1979-1	97%	1%	3
RZ1X	10 uM:1979-1	90%	3%	4
RZ1X	10 uM:1979-1	65%	3%	4
RZ1X	10 uM:2159-6	99%	0%	4
RZ1X	20 uM:1979-1	90%	7%	3
RZ1X	20 uM:1979-1	97%	1%	4
RZ1X	20 uM:2159-6	99%	0%	4
ARZ1X	10 uM	9%	4%	4
G5RZ1X	10 uM	52%	6%	4
G21RZ1X	10 uM	14%	5%	4
RZ1*X	10 uM	1%	1.2%	4
RZ1*X	20 uM	4%	2.9%	4
RZ1**X	10 uM	35%	10%	4
RZ1**X	10 uM	65%	33%	3
RZ1**X	20 uM	89%	5%	3
RZ1-X	10 uM	70%	6.2%	4
RZ1-X	20 uM	99%	0.2%	4
RZ1uX	10 uM	1%	6.8%	4
RZ1uX	20 uM	-1%	3.4%	4
rx	10 uM	77%	2%	8
rxmx / rmx	10 uM	29%	9%	8
erz1x	10 uM	87%	1%	8
srz1x	10 uM	65%	5%	8
drz1x	10 uM	-5%	12%	8
rz2x	10 uM	77%	2%	8
rz2x	10 uM	79%	1%	8
rz3x	10 uM	3%	6%	8
rz3x	10 uM	11%	6%	8
rz4x	10 uM	43%	4%	4
rz4x	10 uM	21%	8.6%	4
rz4x	20 uM	99%	0.1%	4
rz5x	10 uM	55%	4%	8
rz5x	10 uM	32%	3%	8
rz5x	10 uM	65%	8%	4
rz5x	20 uM	47%	25%	8
rz6x	1 uM	2%	11%	8
rz6x	2.5 uM	12%	11%	8
rz6x	5 uM	35%	10%	8
rz6x	5 uM	42%	11%	8
rz6x	10 uM	81%	3%	8
rz6x	10 uM	97%	2%	3
rz6x	10 uM	94%	4%	4
rz6x	20 uM	97%	3%	3
rz6x	36 uM	114%	8%	8
RZ6RX	10 uM	2%	3.3%	4
RZ6RX	20 uM	82%	1.6%	4

RZ6LX	10 uM	-5%	4.4%	4
RZ6LX	20 uM	99%	0.1%	4
RZ6UX	10 uM	-1%	5.9%	4
RZ6UX	20 uM	99%	0.2%	4
rz7x	10 uM	16%	23%	8
rz7x	10 uM	22%	2%	4
rz7x	10 uM	0%	5.2%	4
rz7x	20 uM	31%	1.5%	4
rz7x	20 uM	51%	12.7%	4
rz7x	40 uM	99%	0.1%	4
rz8x	10 uM	5%	8%	8
rz8x	10 uM	-3%	6.8%	4
rz8x	10 uM	15%	7.2%	4
rz8x	20 uM	98%	0.5%	4
rz8x	20 uM	97%	0.6%	4
RZ9X	10 uM	98%	0%	8
RZ9X	10 uM	99%	0%	4
RZ9X	10 uM	95%	0%	3
RZ9X	20 uM	93%	0%	3
RZ10X	10 uM	86%	14%	8
RZ10X	10 uM	96%	1%	3
RZ10X	10 uM	80%	7%	4
RZ10X	20 uM	94%	3%	3
RZ11X	10 uM	5%	5.0%	4
RZ11X	20 uM	99%	0.3%	4

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X	10 uM	22%	11%	8

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X	1 uM 8 小时后	3.28%	16%	4
RZ1X	1 uM 16 小时后	1.96%	5%	4
RZ1X	1 uM 24 小时后	-0.81%	14%	4
RZ1X	1 uM 32 小时后	5.20%	6%	4
RZ1X	1 uM 40 小时后	5.51%	6%	4
RZ1X	1 uM 48 小时后	6.49%	6%	4
RZ1X	3 uM 8 小时后	9.84%	16%	4
RZ1X	3 uM 16 小时后	6.86%	12%	4
RZ1X	3 uM 24 小时后	5.65%	14%	4
RZ1X	3 uM 32 小时后	5.20%	7%	4
RZ1X	3 uM 40 小时后	6.99%	9%	4
RZ1X	3 uM 48 小时后	11.36%	3%	4
RZ1X	5 uM 1 天	53% N/A		1
RZ1X	10 uM 8 小时后	29.51%	3%	4
RZ1X	10 uM 16 小时后	35.29%	10%	4
RZ1X	10 uM 24 小时后	28.23%	14%	4
RZ1X	10 uM 32 小时后	38.15%	6%	4
RZ1X	10 uM 40 小时后	56.99%	5%	4
RZ1X	10 uM 48 小时后	62.01%	4%	4
RZ1**X	10 uM	-8% N/A		
rz6x	10 uM	79% N/A		

RZ9X	10 uM	90% N/A
------	-------	---------

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
<i>erzlx</i>	10 uM	83%	1%	8

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X	10 uM: 1979-1	95%	4%	4
RZ1X	20 uM: 1979-1	98%	1%	4
RZ1**X	10 uM	15%	13%	4
RZ1**X	20 uM	37%	5%	4
RZ9X	10 uM	97%	1%	4
RZ9X	20 uM	98%	1%	4

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X	10 uM:1979-1	77%	4%	4
RZ1**X	10 uM	2%	2%	4
<i>rz6x</i>	10 uM	56%	4%	4
<i>rz6x</i>	10 uM	91%	1%	4
RZ9X	10 uM	62%	4%	4
RZ10X	10 uM	21%	2%	4

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
-----	----	---------	--------	------

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X at 10 uM	10 uM	3.70%	7%	8
RZ1X	10 uM:2159-5	14%	7%	4
RZ1X	20 uM:2159-5	36%	24%	4
RZ1X	10 uM:2159-5, 2i	13.00%	47%	4
RZ1X	10 uM:2159-5, 9i	36.00%	24%	4

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
RZ1X	1 uM	7%	2%	4
RZ1X	3 uM	23%	4%	4
RZ1X	10 uM	66%	4%	4

图 17

前导物	浓度	MCF7 平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
cm1	10 $\mu$ M	21%	15%	7
cm1	10 $\mu$ M	38%	12%	8
cm2	10 $\mu$ M	75%	17%	7
cm2	10 $\mu$ M	54%	4%	8
cm3	10 $\mu$ M	86%	3%	7
cm3	10 $\mu$ M	71%	2%	8
cm3	10 $\mu$ M	70%	2%	4
cm4	1 $\mu$ M	6%	5%	4
cm4	3 $\mu$ M	-9%	4%	4
cm4	6 $\mu$ M	7%	17%	4
cm4	10 $\mu$ M	87%	6%	7
cm4	10 $\mu$ M	71%	2%	8
cm4	10 $\mu$ M	84%	2%	4
cm4	10 $\mu$ M	24%	9%	4
cm4	20 $\mu$ M	45%	5%	4
cm5	10 $\mu$ M	27%	9%	4
cm5	20 $\mu$ M	57%	6%	4
cm6	10 $\mu$ M	88%	2%	4
cm6	20 $\mu$ M	93%	1%	4
cm7	10 $\mu$ M	88%	4%	4
cm7	20 $\mu$ M	93%	0%	4

前导物	浓度	MCF10a 平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
cm1	10 $\mu$ M	13%	16%	8
cm2	10 $\mu$ M	69%	2%	8
cm3	10 $\mu$ M	58%	5%	8
cm3	10 $\mu$ M	73%	1%	8
cm4	10 $\mu$ M	56%	4%	8
cm4	10 $\mu$ M	74%	1%	8

前导物	浓度	MCF10ca1a 平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
cm3	10 $\mu$ M	55%	6%	4
cm3	20 $\mu$ M	75%	9%	4
cm4	10 $\mu$ M	83%	4%	4
cm4	10 $\mu$ M	93%	4%	4
cm4	20 $\mu$ M	89%	3%	4

前导物	浓度	MDA-MB-231 平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
cm1	10 $\mu$ M	-8%	10%	8
cm3	10 $\mu$ M	17%	7%	4
cm3	20 $\mu$ M	95%	1%	4
mac3G	5 $\mu$ M	5%	4.9%	4
mac3G	10 $\mu$ M	26%	4.5%	4
mac3G	20 $\mu$ M	99%	0.1%	4
cm4	1 $\mu$ M#3	6%	2%	4

cm4	3 uM#3	9%	4%	4
cm4	10 uM	33%	6%	4
cm4	10 uM#3	62%	6%	4
cm4	10 uM	12%	6.2%	4
cm4	20 uM#3	78%	3%	4
cm4	20 uM	64%	3.9%	4
cm5	10 uM	9%	9.0%	4
cm5	20 uM	80%	2.3%	4
cm6	10 uM	19%	2.6%	4
cm6	20 uM	100%	0.0%	4
cm7	10 uM	84%	9.2%	4
cm7	20 uM	100%	0.1%	4

前导物	浓度	MDA-MB 435 erb 平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
cm3	10 uM	11%	4%	8

前导物	浓度	FSCCL 平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
cm3	无浓度	66% N/A		1
cm4	无浓度	71% N/A		1
MAC-M4	1 uM 8 小时后	-8%	10%	4
MAC-M4	1 uM 16 小时后	22%	16%	4
MAC-M4	1 uM 24 小时后	17%	16%	4
MAC-M4	1 uM 32 小时后	19%	9%	4
MAC-M4	1 uM 48 小时后	24%	13%	4
MAC-M4	3 uM 8 小时后	-15%	15%	4
MAC-M4	3 uM 16 小时后	29%	8%	4
MAC-M4	3 uM 24 小时后	50%	8%	4
MAC-M4	3 uM 32 小时后	49%	2%	4
MAC-M4	3 uM 48 小时后	51%	8%	4
MAC-M4	10 uM 8 小时后	8%	32%	4
MAC-M4	10 uM 16 小时后	94%	5%	4
MAC-M4	10 uM 24 小时后	100%	0%	4
MAC-M4	10 uM 32 小时后	100%	0%	4
MAC-M4	10 uM 48 小时后	100%	0%	4

前导物	浓度	T47D 平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
cm3	无浓度	42%	5%	4
cm4	无浓度	61%	5%	4

前导物	浓度	Myc-mt-1 平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
mac3G	5 uM	18%	7.6%	
mac3G	10 uM	42%	15.6%	
mac3G	20 uM	80%	1.2%	
cm4	1 uM#3	14.7%	6%	
cm4	3 uM#3	22.3%	5%	
cm4	10 uM#3	54.6%	2%	
cm4	20 uM#3	88.4%	1%	
cm7	20 uM	86%	1.2%	

图 18

先导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
tga1	10 uM	-3%	5%	8
tga2	10 uM	1%	2%	8
tga3	10 uM	63%	8%	8
tga3	10 uM	94%	1%	2
tga4	10 uM	-9%	9%	8
tga4	10 uM	-3%	1%	4
tga5	10 uM	-2%	3%	8
tga5	10 uM	69%	8.7%	4
tga5	20 uM	100%	0.1%	4
tga6	10 uM	-5%	2%	8
tga7	10 uM	7%	2%	8
tga8	1 uM	-7%	17%	8
tga8	1 uM	13%	10%	8
tga8	2.5 uM	0%	14%	8
tga8	5 uM	12%	10%	8
tga8	5 uM	79%	14%	8
tga8	10 uM	89%	5%	8
tga8	10 uM	88%	1%	3
tga8	10 uM	78%	6.1%	4
tga8	20 uM	94%	3%	3
tga8	20 uM	100%	0.1%	4
tga9	10 uM	67%	3%	8
tga10	1 uM	20%	3%	4
tga10	2.5 uM	27%	3%	4
tga10	5 uM	36%	2%	4
tga10	10 uM	84%	2%	8
tga10	10 uM	95%	2%	3
tga10	10 uM	61%	2%	4
tga10	20 uM	96%	2%	3
tga10	20 uM	79%	2%	4
tga11	1 uM	-1%	10%	8
tga11	1 uM	-3%	17%	8
tga11	1 uM	-19%	7%	8
tga11	2 uM	-12%	13%	8
tga11	2.5 uM	-3%	15%	8
tga11	5 uM	-4%	10%	8
tga11	5 uM	50%	23%	8
tga11	5 uM	-29%	20%	8
tga11	10 uM	86%	3%	8
tga11	10 uM	93%	6%	3
tga11	10 uM	98%	1%	4
tga11	20 uM	97%	2%	3
tga11	20 uM	99%	0.4%	4
tga12	10 uM	59%	2%	8
tga12	10 uM	99%	1%	2
tga13	10 uM	71%	17%	8
tga13	10 uM	99%	1%	3

先导物 浓度 平均百分抑制率 1 标准偏差 重复次数

<b>tga5</b>	20 $\mu$ M	92%	1%	4
<b>tga5</b>	40 $\mu$ M	99%	0%	4
<b>tga8</b>	10 $\mu$ M	17%	2%	4
<b>tga8</b>	20 $\mu$ M	93%	1%	4
<b>tga8</b>	40 $\mu$ M	99%	0%	4
<b>tga10</b>	1 $\mu$ M	6%	9%	4
<b>tga10</b>	2.5 $\mu$ M	16%	6%	4
<b>tga10</b>	5 $\mu$ M	53%	2%	4
<b>tga10</b>	10 $\mu$ M	95%	2%	4
<b>tga10</b>	10 $\mu$ M	76%	2%	4
<b>tga10</b>	20 $\mu$ M	76%	2%	4
<b>tga10</b>	40 $\mu$ M	84%	1%	4
<b>tga11</b>	2 $\mu$ M	26%	7%	4
<b>tga11</b>	6 $\mu$ M	24%	1%	4
<b>tga11</b>	10 $\mu$ M	79%	5%	4
<b>tga11</b>	20 $\mu$ M	61%	16%	4
<b>tga11</b>	20 $\mu$ M	53%	7%	4
<b>tga11</b>	40 $\mu$ M	93%	1%	4

前导物	浓度	平均百分抑制率	1 标准偏差	重复次数
<b>tga10</b>	10 $\mu$ M	73%	11%	8

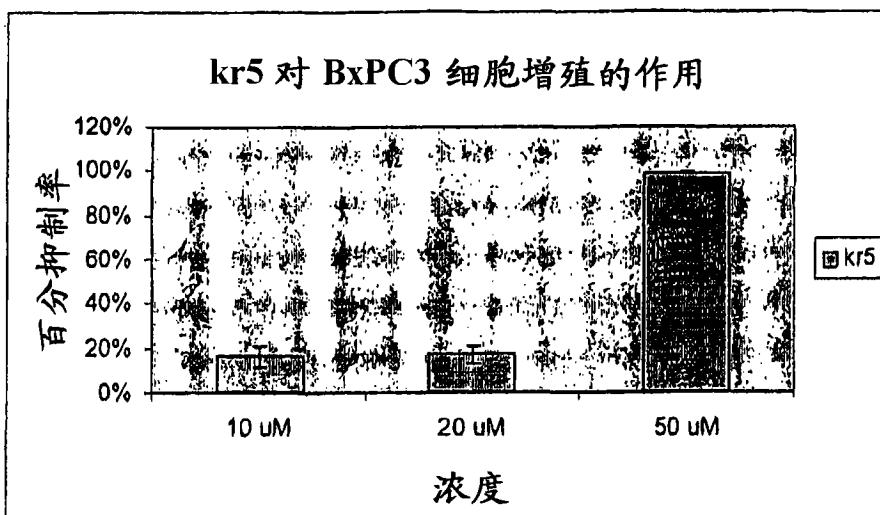


图 19



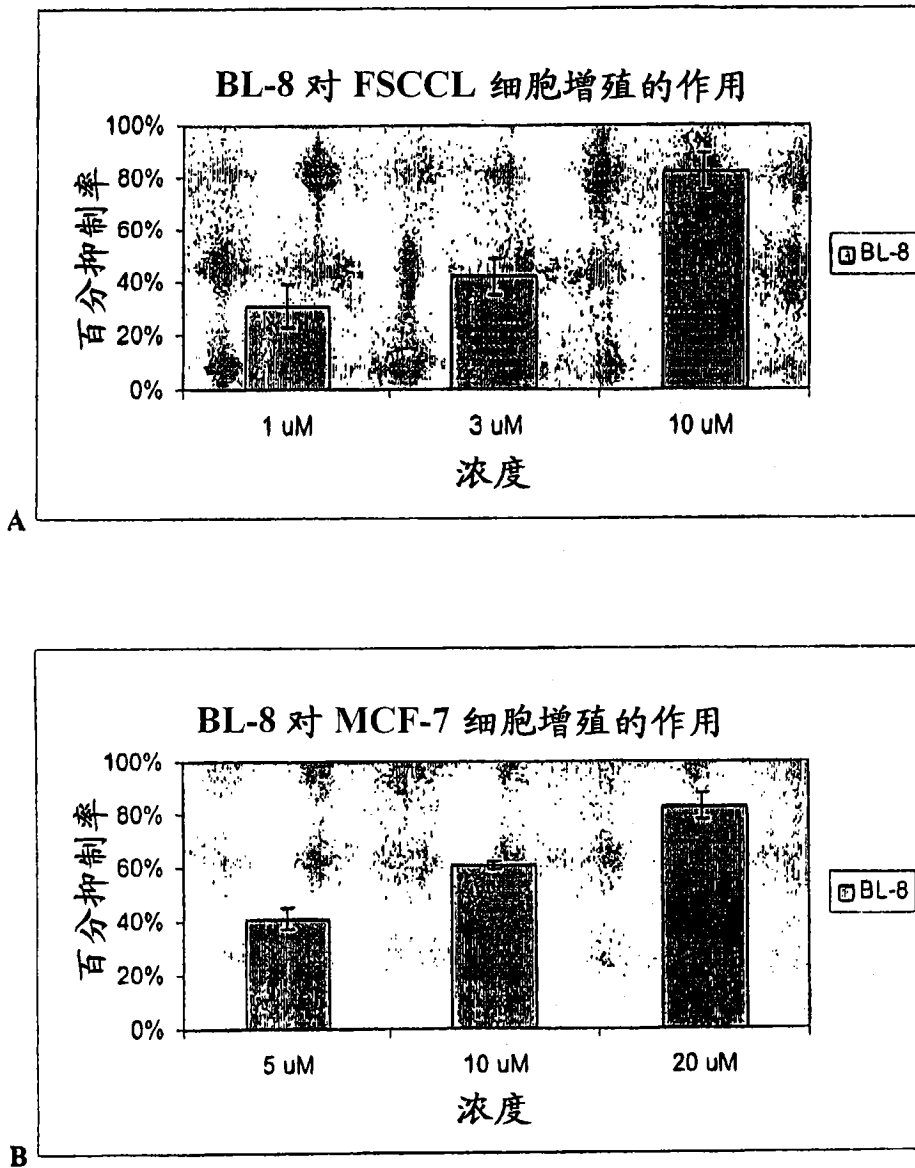


图 20

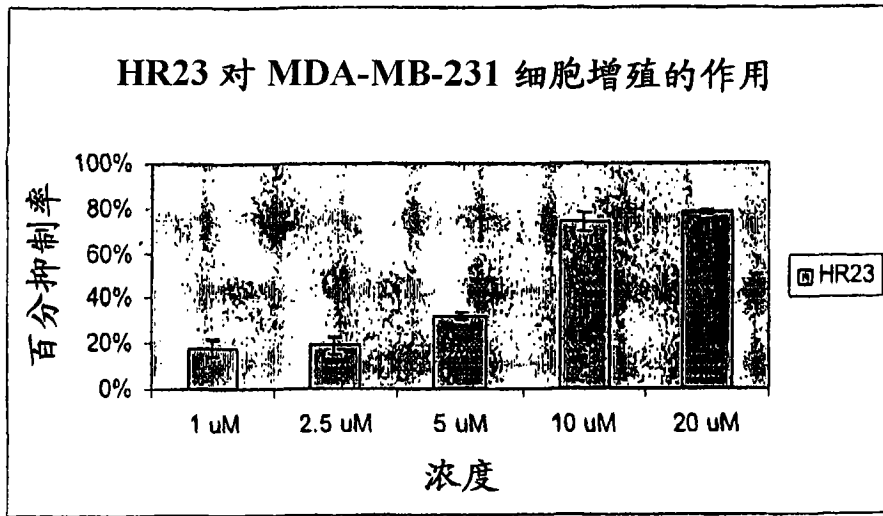


图 21

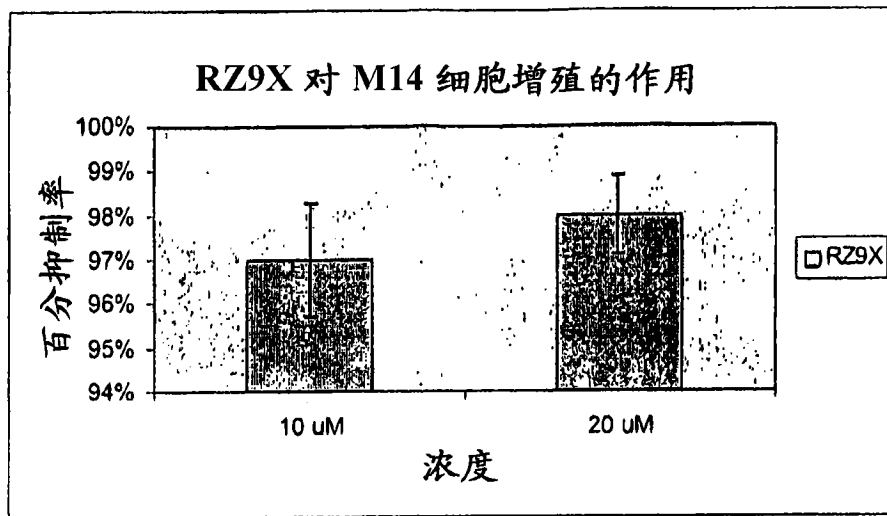


图 22

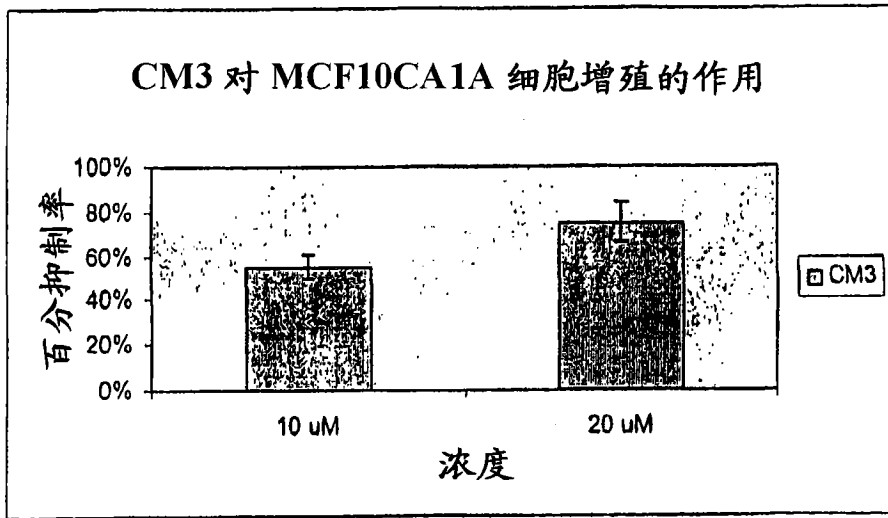


图 23

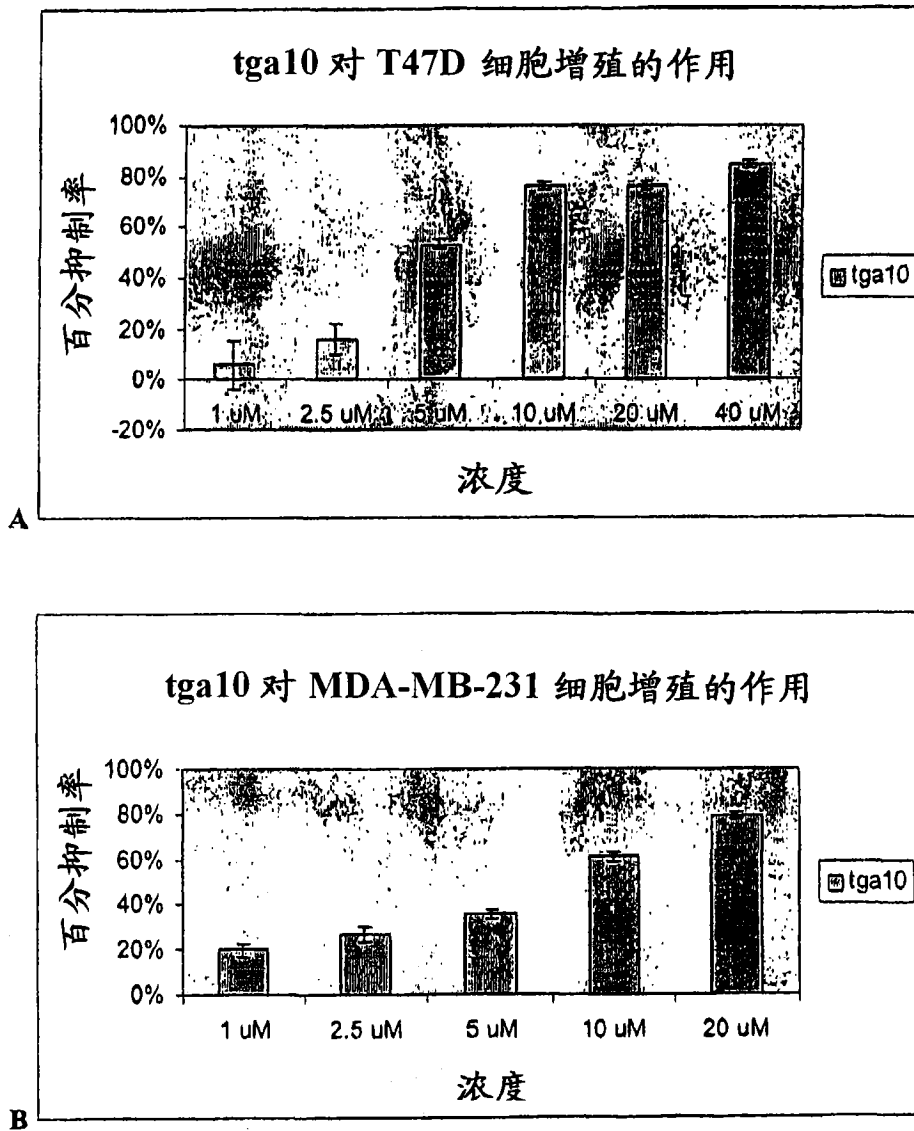


图 24

## 图 25

## KR1 102-124

5'-CCXGGAGXGGGACXGGACXGXGG-3' (SEQ ID NO:707)  
ACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:708)  
GACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:709)  
TGACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:710)  
CTGACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:711)  
TCTGACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:712)  
CCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGC (SEQ ID NO:713)  
CCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGCG (SEQ ID NO:714)  
CCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGCGG (SEQ ID NO:715)  
CCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGCGGG (SEQ ID NO:716)  
CCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGCGGGC (SEQ ID NO:717)  
ACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGC (SEQ ID NO:718)  
GACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGCG (SEQ ID NO:719)  
TGACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGCGG (SEQ ID NO:720)  
CTGACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGCGGG (SEQ ID NO:721)  
TCTGACCXGGAGXGGGACXGGACXGXGGCGGGC (SEQ ID NO:722)  
TGACCXGGAGXGGGACXGGACXGX (SEQ ID NO:723)  
TTCTGACCXGGAGXGGGACXGGA (SEQ ID NO:724)  
CAATTCTGACCXGGAGXGGGACX (SEQ ID NO:725)  
CGCCAATTCTGACCXGGAGXGGG (SEQ ID NO:726)  
AGCCGCCAATTCTGACCXGGAGX (SEQ ID NO:727)  
GGAGXGGGACXGGACXGXGGCGG (SEQ ID NO:728)  
GXGGGACXGGACXGXGGCGGGCT (SEQ ID NO:729)  
GGACXGGACXGXGGCGGGCTGTG (SEQ ID NO:730)  
CXGGACXGXGGCGGGCTGTGCGG (SEQ ID NO:731)  
GACXGXGGCGGGCTGTGCGGATG (SEQ ID NO:732)  
XGGAGXGGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:733)  
GAGXGGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:734)  
GXGGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:735)  
GGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:736)  
CCXGGAGXGGGACXGGACXGX (SEQ ID NO:737)  
CCXGGAGXGGGACXGGACX (SEQ ID NO:738)  
CCXGGAGXGGGACXGGA (SEQ ID NO:739)  
CCXGGAGXGGGACXG (SEQ ID NO:740)  
CCXGGAGXCGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:741)  
CCXGGAGXGGGACXGGACXAXGG (SEQ ID NO:742)  
CCXTGAGXGGGACXGGACXGXGG (SEQ ID NO:743)

## KR2 168-191

5'-GCXGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC-3' (SEQ ID NO:744)  
TGXGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:745)  
CTGCGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:746)  
ACTGCGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:747)  
GACTGCGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:748)  
GGACTGCGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:749)  
GCXGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:750)  
GCXGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:751)  
GCXGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:752)  
GCXGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:753)  
GCXGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:754)  
TGXGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:755)  
CTGCGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:756)  
ACTGCGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:757)  
GACTGCGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:758)  
GGACTGCGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:759)  
ACTGCGGACCCAXGXGGXGGCCX (SEQ ID NO:760)

GGGACTGCXGGACCCAXGXGGXGG (SEQ ID NO:761)  
GGAGGGACTGCXGGACCCAXGXGG (SEQ ID NO:762)  
GGAGGAGGGACTGCXGGACCCAXG (SEQ ID NO:763)  
GCGGGAGGAGGGACTGCXGGACCC (SEQ ID NO:764)  
GGACCCAXGXGGXGGCCXGCCCTCC (SEQ ID NO:765)  
CCCAXGXGGXGGCCXGCCCTGCTC (SEQ ID NO:766)  
AXGXGGXGGCCXGCCCTGCCTA (SEQ ID NO:767)  
XGGXGGCCXGCCCTGCCTAGCC (SEQ ID NO:768)  
XGGCCXGCCCTGCCTAGCCGCA (SEQ ID NO:769)  
XGGACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:770)  
GACCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:771)  
CCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:772)  
CAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:773)  
AXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:774)  
GCXGGACCCAXGXGGXGGCCXG (SEQ ID NO:775)  
GCXGGACCCAXGXGGXGGCC (SEQ ID NO:776)  
GCXGGACCCAXGXGGXG (SEQ ID NO:777)  
GCXGGACCCAXGXGGX (SEQ ID NO:778)  
GCXGGACCCAXGXGG (SEQ ID NO:779)  
GCXGGGCCAXGXGGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:780)  
GCXGGACCCAXGXGTGXGGCCXGCC (SEQ ID NO:781)  
GCXGGACCCAXGXGGXGGTCCXGCC (SEQ ID NO:782)

**KR4 532-558**

5'-TTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCT-3' (SEQ ID NO:783)  
CTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:784)  
CCTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:785)  
ACCTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:786)  
CACCTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:787)  
CCACTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:788)  
TTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTG (SEQ ID NO:789)  
TTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGC (SEQ ID NO:790)  
TTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGCT (SEQ ID NO:791)  
TTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGCTG (SEQ ID NO:792)  
TTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGCTGC (SEQ ID NO:793)  
CTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTG (SEQ ID NO:794)  
CCTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGC (SEQ ID NO:795)  
ACCTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGCT (SEQ ID NO:796)  
CACCTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGCTG (SEQ ID NO:797)  
CCACTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGCTGC (SEQ ID NO:798)  
ACCTTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCX (SEQ ID NO:799)  
GCCACCTTXGCXGCXGCCACTGCXGCX (SEQ ID NO:800)  
GCCGCCACCTTXGCXGCXGCCACTGCX (SEQ ID NO:801)  
GCCGCCGCCACCTTXGCXGCXGCCACT (SEQ ID NO:802)  
CGAGCCGCCGCCACCTTXGCXGCXGCC (SEQ ID NO:803)  
GCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGCT (SEQ ID NO:804)  
GCXGCCACTGCXGCXGCXGCTGCTGCC (SEQ ID NO:805)  
GCCACTGCXGCXGCXGCTGCTGCCCTCC (SEQ ID NO:806)  
ACTGCXGCXGCXGCTGCTGCCCTCCGCC (SEQ ID NO:807)  
GCXGCXGCXGCTGCTGCCCTCCGCC (SEQ ID NO:808)  
XGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:809)  
CXGCXGCCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:810)  
GCXGCCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:811)  
XGCCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:812)  
CCACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:813)  
ACTGCXGCXGCXGCT (SEQ ID NO:814)  
TTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGCXG (SEQ ID NO:815)  
TTXGCXGCXGCCACTGCXGCXGC (SEQ ID NO:816)  
TTXGCXGCXGCCACTGCXGCX (SEQ ID NO:817)  
TTXGCXGCXGCCACTGCXG (SEQ ID NO:818)  
TTXGCXGCXGCCACTGC (SEQ ID NO:819)

TTXGXCXGCGCCACT (SEQ ID NO:820)  
TTXACXGXCXGCCACTGXCXGXCXGCT (SEQ ID NO:821)  
TTXGXCXGCGCCACTCCXGXCXGCT (SEQ ID NO:822)  
TTXGXCXGCGTCACTGXCXGXCXGCT (SEQ ID NO:823)

**KR7 40-67**

5'-GCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCT-3' (SEQ ID NO:824)  
AGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:825)  
GAGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:826)  
CGAGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:827)  
GCGAGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:828)  
CGCGAGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:820)  
GCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTC (SEQ ID NO:830)  
GCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTCC (SEQ ID NO:831)  
GCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTCCA (SEQ ID NO:832)  
GCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTCCAC (SEQ ID NO:833)  
GCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTCCACA (SEQ ID NO:834)  
AGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTC (SEQ ID NO:835)  
GAGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTCC (SEQ ID NO:836)  
CGAGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTCCA (SEQ ID NO:837)  
GCGAGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTCCAC (SEQ ID NO:838)  
CGCGAGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGTCTCCACA (SEQ ID NO:839)  
CGAGCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGG (SEQ ID NO:840)  
CCGCGAGCGGCCACGCCGCCCGCTGAC (SEQ ID NO:841)  
ACGCCCGGAGCGGCCACGCCGCCCGCT (SEQ ID NO:842)  
GAGACGCCCGGAGCGGCCACGCCGCC (SEQ ID NO:843)  
AGGGAGACGCCCGGAGCGGCCACGCCGC (SEQ ID NO:844)  
GCCACGCCCGCCCGCTGACCGGTCTCCA (SEQ ID NO:845)  
ACGCCCGCCCGCTGACCGGTCTCCACAG (SEQ ID NO:846)  
CCGCCCGCTGACCGGTCTCCACAGAGA (SEQ ID NO:847)  
CCCCGCTGACCGGTCTCCACAGAGAAGC (SEQ ID NO:848)  
CGCTGACCGGTCTCCACAGAGAAGCTGC (SEQ ID NO:849)  
GGCCACGCCCGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:850)  
CCACGCCCGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:851)  
ACGCCCGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:852)  
GCCGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:853)  
CGCCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:854)  
CCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:855)  
CCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:856)  
GCGGCCACGCCGCCCGCTGACCGGT (SEQ ID NO:857)  
GCGGCCACGCCGCCCGCTGACCG (SEQ ID NO:858)  
GCGGCCACGCCGCCCGCTGAC (SEQ ID NO:858)  
GCGGCCACGCCGCCCGCTG (SEQ ID NO:860)  
GCGGCCACGCCGCCCGC (SEQ ID NO:861)  
GCGGCCACGCCGCC (SEQ ID NO:862)  
GCGGCCACGCCGCC (SEQ ID NO:863)  
GCGGCCACGACGCCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:864)  
GCGGCCACGCCCGCTCCGCTGACCGGTCT (SEQ ID NO:865)  
GCGGCCACGCCGCCCGCGACCGGTCT (SEQ ID NO:866)

## 图 26

BL2 483-506\*\*

5'- CAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTG -3' (SEQ ID NO:163)  
ACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTG (SEQ ID NO:164)  
CACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTG (SEQ ID NO:165)  
ACACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTG (SEQ ID NO:166)  
TACACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTG (SEQ ID NO:167)  
CTACACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTG (SEQ ID NO:168)  
CAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGT (SEQ ID NO:169)  
CAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGTC (SEQ ID NO:170)  
CAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGTCC (SEQ ID NO:171)  
CAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGTCCA (SEQ ID NO:172)  
CAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGTCCAC (SEQ ID NO:173)  
ACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGT (SEQ ID NO:174)  
CACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGTC (SEQ ID NO:175)  
ACACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGTCC (SEQ ID NO:176)  
TACACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGTCCA (SEQ ID NO:177)  
CTACACAXGC AXGXG CATCC CXGCC XGTGTCCAC (SEQ ID NO:178)  
ACACAXGCAXGXGCATCCCXGCCX (SEQ ID NO:179)  
ACTACACAXGCAXGXGCATCCCXG (SEQ ID NO:180)  
CGCACTACACAXGCAXGXGCATCC (SEQ ID NO:181)  
CCGCGCACTACACAXGCAXGXGCA (SEQ ID NO:182)  
TGTCGCGCACTACACAXGCAXGX (SEQ ID NO:183)  
GCAXGXGCATCCCXGCCXGTGTCC (SEQ ID NO:184)  
XGXGCATCCCXGCCXGTGTCCACC (SEQ ID NO:185)  
GCATCCCXGCCXGTGTCCACCTGA (SEQ ID NO:186)  
TCCCXGCCXGTGTCCACCTGAACA (SEQ ID NO:187)  
CXGCCXGTGTCCACCTGAACACCT (SEQ ID NO:188)  
XGCAXGXGCATCCCXGCCXGTG (SEQ ID NO:189)  
CAXGXGCATCCCXGCCXGTG (SEQ ID NO:190)  
XGXGCATCCCXGCCXGTG (SEQ ID NO:191)  
XGCATCCCXGCCXGTG (SEQ ID NO:192)  
GCATCCCXGCCXGTG (SEQ ID NO:193)  
CAXGCAXGXGCATCCCXGCCXG (SEQ ID NO:194)  
CAXGCAXGXGCATCCCXGCC (SEQ ID NO:195)  
CAXGCAXGXGCATCCCXG (SEQ ID NO:196)  
CAXGCAXGXGCATCCC (SEQ ID NO:197)  
CAXGCAXGXGCATCC (SEQ ID NO:198)  
CAXGCAXGXGTATCCCXGCCXGTG (SEQ ID NO:199)  
CAXGCGXGXGCATCCCXGCCXGTG (SEQ ID NO:200)  
CAXGCAXGXGCATCCCXGACXGTG (SEQ ID NO:201)

BL6 1102-1127

5'-CCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG G-3' (SEQ ID NO:202)  
ACCCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG G (SEQ ID NO:203)  
CACCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG G (SEQ ID NO:204)  
CCACCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG G (SEQ ID NO:205)  
GCCACCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG G (SEQ ID NO:206)  
GGCCACCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG G (SEQ ID NO:207)  
CCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GG (SEQ ID NO:208)  
CCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GGC (SEQ ID NO:209)  
CCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GGCC (SEQ ID NO:210)  
CCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GGCCC (SEQ ID NO:211)  
CCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GGCCCC (SEQ ID NO:212)  
ACCCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GG (SEQ ID NO:213)  
CACCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GGC (SEQ ID NO:214)  
CCACCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GGCC (SEQ ID NO:215)



GCCACCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GCGCC (SEQ ID NO:216)  
GGCCACCXGC CXGCT CXGCT GXGCC XGXGG GCGCCG (SEQ ID NO:217)  
CCACCXGCCXGCTCXGCTGXGCCXGX (SEQ ID NO:218)  
CGGCCACCXGCCXGCTCXGCTGXGCC (SEQ ID NO:219)  
GGCCGGCCACCXGCCXGCTCXGCTGX (SEQ ID NO:220)  
CCGGCCGGCCACCXGCCXGCTCXGCT (SEQ ID NO:221)  
CCTCCGGGCCGGCCACCXGCCXGCTC (SEQ ID NO:222)  
GCCXGCTCXGCTGXGCCXGXGGGGCC (SEQ ID NO:223)  
XGCTCXGCTGXGCCXGXGGGGCCCGG (SEQ ID NO:224)  
TCXGCTGXGCCXGXGGGGCCCGGCCA (SEQ ID NO:225)  
GCTGXGCCXGXGGGGCCCGGCCAGTG (SEQ ID NO:226)  
GXGCCXGXGGGGCCCGGCCAGTGGGT (SEQ ID NO:227)  
XGCCXGCTCXGCTGXGCCXGXGGG (SEQ ID NO:228)  
CCXGCTCXGCTGXGCCXGXGGG (SEQ ID NO:229)  
XGCTCXGCTGXGCCXGXGGG (SEQ ID NO:230)  
CTCXGCTGXGCCXGXGGG (SEQ ID NO:231)  
CXGCTGXGCCXGXGGG (SEQ ID NO:232)  
XGCTGXGCCXGXGGG (SEQ ID NO:233)  
CCXGCCXGCTCXGCTGXGCCXGXG (SEQ ID NO:234)  
CCXGCCXGCTCXGCTGXGCCXGX (SEQ ID NO:235)  
CCXGCCXGCTCXGCTGXGCC (SEQ ID NO:236)  
CCXGCCXGCTCXGCTGXG (SEQ ID NO:237)  
CCXGCCXGCTCXGCTG (SEQ ID NO:238)  
CCXGCCXGCTCXGCT (SEQ ID NO:239)  
CCXGCCXGCCXGCTGXGCCXGXGGG (SEQ ID NO:240)  
CCXGCTCXGCTCXGCTGXGCCXGXGGG (SEQ ID NO:241)  
CCXGCCXGCTCXGCTGXGCCXGXGGG (SEQ ID NO:242)

BL7 1150-1170

5'- GGXGX GXGGG GCXGG GCXGG G -3' (SEQ ID NO:243)  
TGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG G (SEQ ID NO:244)  
ATGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG G (SEQ ID NO:245)  
CATGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG G (SEQ ID NO:246)  
ACATGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG G (SEQ ID NO:247)  
CACATGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG G (SEQ ID NO:248)  
GGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GG (SEQ ID NO:249)  
GGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GGA (SEQ ID NO:250)  
GGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GGAG (SEQ ID NO:251)  
GGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GGAGG (SEQ ID NO:252)  
GGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GGAGGG (SEQ ID NO:253)  
TGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GG (SEQ ID NO:254)  
ATGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GGA (SEQ ID NO:255)  
CATGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GGAG (SEQ ID NO:256)  
ACATGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GGAGG (SEQ ID NO:257)  
CACATGGXGX GXGGG GCXGG GCXGG GGAGGG (SEQ ID NO:258)  
CATGGXGXGXGGGGCXGGGGCX (SEQ ID NO:259)  
GCACATGGXGXGXGGGGCXGG (SEQ ID NO:260)  
GGGGCACATGGXGXGXGGGGC (SEQ ID NO:261)  
CCGGGGCACATGGXGXGXGG (SEQ ID NO:262)  
GGCCCCGGGGCACATGGXGXG (SEQ ID NO:263)  
GXGXGGGGCXGGGCXGGGGAG (SEQ ID NO:264)  
XGGGGCXGGGCXGGGGAGGGC (SEQ ID NO:265)  
GGCXGGGCXGGGGAGGGCGCC (SEQ ID NO:266)  
XGGGCXGGGGAGGGCGCCTCC (SEQ ID NO:267)  
GCXGGGGAGGGCGCCTCCGGG (SEQ ID NO:268)  
XGXGXGGGGCXGGGCXGGG (SEQ ID NO:269)  
XGXGGGGCXGGGCXGGG (SEQ ID NO:270)  
XGGGGCXGGGCXGGG (SEQ ID NO:271)  
GGXGXGXGGGGCXGGGCXG (SEQ ID NO:272)  
GGXGXGXGGGGCXGGGC (SEQ ID NO:273)  
GGXGXGXGGGGCXGG (SEQ ID NO:274)

GGXGXAXGGGGCXGGGCXGGG (SEQ ID NO:275)  
GGXGXGXGGGGCXGGTCXGGG (SEQ ID NO:276)  
GGXGXGXCGGGCXGGGCXGGG (SEQ ID NO:277)

**BL8 1148-1174**

5'-ACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGA-3' (SEQ ID NO:278)  
CACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:279)  
GCACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:280)  
GGCACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:281)  
GGGCACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:282)  
GGGGCACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:283)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAG (SEQ ID NO:284)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGG (SEQ ID NO:285)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGGG (SEQ ID NO:286)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGGGC (SEQ ID NO:287)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGGGCG (SEQ ID NO:288)  
CACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAG (SEQ ID NO:289)  
GCACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGG (SEQ ID NO:290)  
GGCACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGGG (SEQ ID NO:291)  
GGGCACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGGGC (SEQ ID NO:292)  
GGGGCACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGGGCG (SEQ ID NO:293)  
GGCACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGG (SEQ ID NO:294)  
GGGGGCACATGGXGXGXGGGGCXGGGC (SEQ ID NO:295)  
GCCGGGGGCACATGGXGXGXGGGGCXG (SEQ ID NO:296)  
CCCGCCGGGGGCACATGGXGXGXGGGG (SEQ ID NO:297)  
CGTCCCGCCGGGGGCACATGGXGXGXG (SEQ ID NO:298)  
TGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGGG (SEQ ID NO:299)  
XGXGXGGGGCXGGGCXGGGAGGGCGC (SEQ ID NO:300)  
GXGGGGCXGGGCXGGGAGGGCGCCTC (SEQ ID NO:301)  
GGGCXGGGCXGGGAGGGCGCCTCCGG (SEQ ID NO:302)  
CXGGGCXGGGAGGGCGCCTCCGGGCC (SEQ ID NO:303)  
ATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:304)  
GGXGXGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:305)  
XGXGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:306)  
XGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:307)  
XGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:308)  
GGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:309)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXGGG (SEQ ID NO:310)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGGGCXG (SEQ ID NO:311)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGGGC (SEQ ID NO:312)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGG (SEQ ID NO:313)  
ACATGGXGXGXGGGGCX (SEQ ID NO:314)  
ACATGGXGXGXGGGG (SEQ ID NO:315)  
ACATGGXTXGXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:316)  
ACATGGXGXGXGGGGCXGGCCXGGGA (SEQ ID NO:317)  
ACATGGXGXAXGGGGCXGGGCXGGGA (SEQ ID NO:318)

图 27

## HR2 298-322

5'-TGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG-3' (SEQ ID NO:441)  
CTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:442)  
CCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:443)  
GCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:444)  
GGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:445)  
AGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:446)  
TGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGA (SEQ ID NO:447)  
TGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAA (SEQ ID NO:448)  
TGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAG (SEQ ID NO:449)  
TGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGC (SEQ ID NO:450)  
TGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCT (SEQ ID NO:451)  
CTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGA (SEQ ID NO:452)  
CCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAA (SEQ ID NO:453)  
GCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAG (SEQ ID NO:454)  
GGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGC (SEQ ID NO:455)  
AGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCT (SEQ ID NO:456)  
GCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCX (SEQ ID NO:457)  
CAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGX (SEQ ID NO:458)  
GGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCT (SEQ ID NO:459)  
TTCGCGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:460)  
CTCTTCGCGCAGGCCTGGGTGXGTC (SEQ ID NO:461)  
GTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAG (SEQ ID NO:462)  
XGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCTG (SEQ ID NO:463)  
CCCTCCTAGXGCXGGGAAGCTGGGT (SEQ ID NO:464)  
TCCTAGXGCXGGGAAGCTGGGTTC (SEQ ID NO:465)  
TAGXGCXGGGAAGCTGGGTTCCTG (SEQ ID NO:466)  
GGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:467)  
TGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:468)  
XGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:469)  
TCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:470)  
CCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:472)  
TGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXG (SEQ ID NO:473)  
TGGGTGXGTCCCTCCTAGXGC (SEQ ID NO:474)  
TGGGTGXGTCCCTCCTAGX (SEQ ID NO:475)  
TGGGTGXGTCCCTCCTA (SEQ ID NO:476)  
TGGGTGXGTCCCTCC (SEQ ID NO:477)  
TGGGTGXATCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:478)  
TGTGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:479)  
TGGGTGXGTCCCTCCTACXGCXGGG (SEQ ID NO:480)

## HR3 310-334

5'-TTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT-3' (SEQ ID NO:481)  
CTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:482)  
TCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:483)  
CTCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:484)  
TCTCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:485)  
CTCTCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:486)  
TTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTC (SEQ ID NO:487)  
TTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCC (SEQ ID NO:488)  
TTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCT (SEQ ID NO:489)  
TTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTA (SEQ ID NO:490)  
CTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAG (SEQ ID NO:491)  
CTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTC (SEQ ID NO:492)  
TCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCC (SEQ ID NO:493)  
CTCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCT (SEQ ID NO:494)  
TCTCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTA (SEQ ID NO:495)

CTCTCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAG (SEQ ID NO:496)  
CTCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTGTC (SEQ ID NO:497)  
CCTCTCTTXGCXGCAGGCCTGGGTGX (SEQ ID NO:498)  
CTCCCTCTCTTXGCXGCAGGCCTGGG (SEQ ID NO:499)  
TTTCTCCCTCTCTTXGCXGCAGGCCT (SEQ ID NO:500)  
CACTTTCTCCCTCTCTTXGCXGCAGG (SEQ ID NO:501)  
GCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCT (SEQ ID NO:502)  
GCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGC (SEQ ID NO:503)  
GGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGCGCC (SEQ ID NO:504)  
CTGGGTGXGTCCCTCCTAGCGCCGGG (SEQ ID NO:505)  
GGTGXGTCCCTCCTAGCGCCGGGAAG (SEQ ID NO:506)  
XGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:507)  
CXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:508)  
GCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:509)  
AGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:510)  
GCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:511)  
CCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:512)  
TTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTCC (SEQ ID NO:513)  
TTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGT (SEQ ID NO:514)  
TTXGCXGCAGGCCTGGGTGX (SEQ ID NO:515)  
TTXGCXGCAGGCCTGGGT (SEQ ID NO:516)  
TTXGCXGCAGGCCTGG (SEQ ID NO:517)  
TTXGCXGCAGGCCTG (SEQ ID NO:518)  
TTXACXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:519)  
TTXGCXGCAGGCCTGTGTGXGTCCCT (SEQ ID NO:520)  
TTXGCXGCAGGCCTGGGTGXGTACCT (SEQ ID NO:521)

**HR6 204-227**

5'-TGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGA-3' (SEQ ID NO:522)  
CTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:523)  
TCTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:524)  
CTTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:525)  
ACTCTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:526)  
GACTCTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:527)  
TGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGAT (SEQ ID NO:528)  
TGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGATA (SEQ ID NO:529)  
TGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGATAA (SEQ ID NO:530)  
TGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGATAAA (SEQ ID NO:531)  
TGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGATAAAT (SEQ ID NO:532)  
CTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGAT (SEQ ID NO:533)  
TCTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGATA (SEQ ID NO:534)  
CTTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGATAA (SEQ ID NO:535)  
ACTCTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGATAAA (SEQ ID NO:536)  
GACTCTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGATAAAT (SEQ ID NO:537)  
CTTGCCCCCTCCCCXGGAGTCXG (SEQ ID NO:538)  
TGACTCTGCCCCCTCCCCXGGAGT (SEQ ID NO:539)  
TGGTGA CTCTGCCCCCTCCCCXGG (SEQ ID NO:540)  
GGCTGGTGA CTCTGCCCCCTCCCC (SEQ ID NO:542)  
AGAGGCTGGTGA CTCTGCCCCCTC (SEQ ID NO:543)  
CCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGATAA (SEQ ID NO:544)  
CTCCCCXGGAGTCXGGGATAAATT (SEQ ID NO:545)  
CCCXGGAGTCXGGGATAAATTCCC (SEQ ID NO:546)  
XGGAGTCXGGGATAAATTCCCTAG (SEQ ID NO:547)  
AGTCXGGGATAAATTCCCTAGGCT (SEQ ID NO:548)  
CCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:549)  
CCCTCCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:550)  
CTCCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:551)  
CCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:552)  
CCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:553)  
TGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGG (SEQ ID NO:554)  
TGCCCCCTCCCCXGGAGTCX (SEQ ID NO:555)

TGCCCCCTCCCCXGGAGT (SEQ ID NO:556)  
TGCCCCCTCCCCXGGA (SEQ ID NO:557)  
TGCCCCCTCCCCXGG (SEQ ID NO:558)  
TGCCCCCTCTCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:559)  
TGCCCCCTCCCCXGGAGTAXGGGA (SEQ ID NO:560)  
TGCCCCCTCCCCXGGAGTCXGGGA (SEQ ID NO:561)

**HR11 393-425**

5'-ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT-3' (SEQ ID NO:562)  
GATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:563)  
TGATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:564)  
GTGATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:565)  
TGTGATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:566)  
CTGTGATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:567)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCTC (SEQ ID NO:568)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCTCC (SEQ ID NO:569)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCTCCA (SEQ ID NO:570)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCTCAA (SEQ ID NO:571)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCTCAAC (SEQ ID NO:572)  
GATTGGGAGCAAGCGCGCTCCCAGCTCGCCCCCTC (SEQ ID NO:573)  
TGATTGGGAGCAAGCGCGCTCCCAGCTCGCCCCCTCC (SEQ ID NO:574)  
GTGATTGGGAGCAAGCGCGCTCCCAGCTCGCCCCCTCCA (SEQ ID NO:575)  
TGTGATTGGGAGCAAGCGCGCTCCCAGCTCGCCCCCTCAA (SEQ ID NO:576)  
CTGTGATTGGGAGCAAGCGCGCTCCCAGCTCGCCCCCTCCAAC (SEQ ID NO:577)  
GTGATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCC (SEQ ID NO:578)  
CCTGTGATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXG (SEQ ID NO:579)  
TCTCCTGTGATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGC (SEQ ID NO:580)  
CCTTCTCCTGTGATTGGGAGCAAGXGXGCTCCC (SEQ ID NO:581)  
CCTCCTTCTCCTGTGATTGGGAGCAAGXGXGCT (SEQ ID NO:582)  
GGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCTCCA (SEQ ID NO:583)  
AGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCTCCAAC (SEQ ID NO:584)  
AAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCTCCAAC (SEQ ID NO:585)  
XGXGCTCCCAGCTXGCCCCCTCCAAC (SEQ ID NO:586)  
GCTCCCAGCTXGCCCCCTCCAAC (SEQ ID NO:587)  
TGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:588)  
GGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:589)  
AGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:590)  
CAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:591)  
AGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:592)  
XGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:593)  
XGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:594)  
CTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:595)  
CCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:596)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCC (SEQ ID NO:597)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCC (SEQ ID NO:598)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXG (SEQ ID NO:599)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCT (SEQ ID NO:600)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAG (SEQ ID NO:601)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCC (SEQ ID NO:602)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTC (SEQ ID NO:603)  
ATTGGGAGCAAGXGXG (SEQ ID NO:604)  
ATTGGGAGCAAGXGX (SEQ ID NO:605)  
GTTGGGAGCAAGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:606)  
ATTGGGAGCAAGXGXGCTCCCTGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:607)  
ATTGGGAGCACGXGXGCTCCCAGCTXGCCCCCT (SEQ ID NO:608)

**HR23 299-333**

5'-TXGXGAGGCTGGGTGXGCTCCCTCCTAGXGCGXGG-3' (SEQ ID NO:609)  
TTXGXGAGGCTGGGTGXGCTCCCTCCTAGXGCGXGG (SEQ ID NO:610)  
CTTXGXGAGGCTGGGTGXGCTCCCTCCTAGXGCGXGG (SEQ ID NO:611)  
TCTTXGXGAGGCTGGGTGXGCTCCCTCCTAGXGCGXGG (SEQ ID NO:612)

CTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:613)  
TCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:614)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:615)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGA (SEQ ID NO:616)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAA (SEQ ID NO:617)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAAG (SEQ ID NO:618)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGC (SEQ ID NO:619)  
TTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:620)  
CTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGA (SEQ ID NO:621)  
TCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAA (SEQ ID NO:622)  
CTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAAG (SEQ ID NO:623)  
TCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGC (SEQ ID NO:624)  
TCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGC (SEQ ID NO:625)  
CTCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAG (SEQ ID NO:626)  
TCCCTCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCC (SEQ ID NO:627)  
TTCTCCCTCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCC (SEQ ID NO:628)  
ACTTCTCCCTCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGT (SEQ ID NO:629)  
XGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAA (SEQ ID NO:630)  
AGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCT (SEQ ID NO:631)  
CCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCTGGC (SEQ ID NO:632)  
GGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCTGGGTTG (SEQ ID NO:633)  
TGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCTGGGTGCTCCT (SEQ ID NO:634)  
GXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:635)  
GCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:636)  
AGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:637)  
GCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:638)  
CTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:639)  
GGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:640)  
GTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:641)  
GXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:642)  
GTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:643)  
CCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:644)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCX (SEQ ID NO:645)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXG (SEQ ID NO:646)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAG (SEQ ID NO:647)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCT (SEQ ID NO:648)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTC (SEQ ID NO:649)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCC (SEQ ID NO:650)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTC (SEQ ID NO:651)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXG (SEQ ID NO:652)  
TXGXGCAGGCCTGGGTG (SEQ ID NO:653)  
TXGXGCAGGCCTGGG (SEQ ID NO:654)  
TXGXACAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:655)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:656)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCGAGXGCXGG (SEQ ID NO:657)

**HR23\* 299-333**

5'-TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG-3' (SEQ ID NO:658)  
TTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:659)  
CTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:660)  
TCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:661)  
CTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:662)  
TCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:663)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:664)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGA (SEQ ID NO:665)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAA (SEQ ID NO:666)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAAG (SEQ ID NO:667)  
TXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGC (SEQ ID NO:668)  
TTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGG (SEQ ID NO:669)  
CTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGA (SEQ ID NO:670)  
TCTTXGXGCAGGCCTGGGTGXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAA (SEQ ID NO:671)

CTCTTXGXGCAGGCCTGGGTXTCCCTCCTAGXGCXGGGAAG (SEQ ID NO:672)  
TCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTXTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGC (SEQ ID NO:673)  
TCTTXGXGCAGGCCTGGGTXTCCCTCCTAGXGC (SEQ ID NO:674)  
CTCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTXTCCCTCCTAG (SEQ ID NO:675)  
TCCCTCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTXTCCCTCC (SEQ ID NO:676)  
TTCTCCCTCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTXTCCC (SEQ ID NO:677)  
ACTTTCTCCCTCTCTTXGXGCAGGCCTGGGTXTGT (SEQ ID NO:678)  
XGCAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGGGAA (SEQ ID NO:679)  
AGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCT (SEQ ID NO:680)  
CCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCTGGG (SEQ ID NO:681)  
GGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCTGGGTTG (SEQ ID NO:682)  
TXGTCCCTCCTAGXGCXGGGAAGCTGGGTTGCCT (SEQ ID NO:683)  
GXGCAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:684)  
GCAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:685)  
AGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:686)  
GCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:687)  
CTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:688)  
GGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:689)  
GTXTGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:690)  
XGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:691)  
TCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:692)  
CCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:693)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCX (SEQ ID NO:694)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXG (SEQ ID NO:695)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAG (SEQ ID NO:696)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCT (SEQ ID NO:697)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTGTCCCTC (SEQ ID NO:698)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTGTCCC (SEQ ID NO:699)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTGTCT (SEQ ID NO:700)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTG (SEQ ID NO:701)  
TXGXGCAGGCCTGGGT (SEQ ID NO:702)  
TXGXGCAGGCCTGGG (SEQ ID NO:703)  
TXGXACAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:704)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCTAGXGCXGG (SEQ ID NO:705)  
TXGXGCAGGCCTGGGTXTGTCCCTCCGAGXGCXGG (SEQ ID NO:706)

## 图 28

## R21X\*\* 485-510

5'-GGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG-3' (SEQ ID NO:867)  
GGGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:868)  
GGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:869)  
GGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:870)  
CGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:871)  
CGGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:872)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGC (SEQ ID NO:873)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCT (SEQ ID NO:874)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTC (SEQ ID NO:875)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:876)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCG (SEQ ID NO:877)  
GGGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGC (SEQ ID NO:878)  
GGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCT (SEQ ID NO:879)  
GGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTC (SEQ ID NO:880)  
CGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:881)  
CGGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCG (SEQ ID NO:882)  
GGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCAT (SEQ ID NO:883)  
GGCGGGGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:884)  
GGGGCGGGGXGXGGTTXGCCCX (SEQ ID NO:885)  
GGCGGGGGGGGGGXGXGGTTXGC (SEQ ID NO:886)  
CGGGCGGGGGGGGGGXGXGGTT (SEQ ID NO:887)  
GXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTC (SEQ ID NO:888)  
XGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGT (SEQ ID NO:889)  
TTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGTCCG (SEQ ID NO:890)  
GCCXGXGCATGGGCTCCGTCCGCGG (SEQ ID NO:891)  
CXGXGCATGGGCTCCGTCCGCGGGC (SEQ ID NO:892)  
XGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:893)  
XGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:894)  
XGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:895)  
GTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:896)  
TXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:897)  
XGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:898)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATG (SEQ ID NO:899)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCA (SEQ ID NO:900)  
GGGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:901)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXG (SEQ ID NO:902)  
GGXGXGXGGTTXGCCC (SEQ ID NO:903)  
GGXGXGXGGTTXGCC (SEQ ID NO:904)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:905)  
GGXGXGXGGTTXGCTCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:906)  
GGGXGXAGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:907)

## R22X\*\* 501-533

5'-GGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGT-3' (SEQ ID NO:908)  
AGGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGT (SEQ ID NO:909)  
GAGGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGT (SEQ ID NO:910)  
CGAGGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGT (SEQ ID NO:911)  
CCGAGGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGT (SEQ ID NO:912)  
GCCGAGGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGT (SEQ ID NO:913)  
GGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGTT (SEQ ID NO:914)  
GGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGTTC (SEQ ID NO:915)  
GGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGTTCC (SEQ ID NO:916)  
GGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGTTCCG (SEQ ID NO:917)  
GGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGTTCCG (SEQ ID NO:918)  
AGGXGGGGXGGGGGXGGGGGXGXGGTT (SEQ ID NO:919)



GAGGXGGGGXGGGGXGGGGXGXGXGGTTC (SEQ ID NO:920)  
 CGAGGXGGGGXGGGGXGGGGXGXGXGGTTCG (SEQ ID NO:921)  
 CCCGAGGXGGGGXGGGGXGGGGXGXGXGGTTCGC (SEQ ID NO:922)  
 GCGGAGGXGGGGXGGGGXGGGGXGXGXGGTTCGCC (SEQ ID NO:923)  
 CGAGGXGGGGXGGGGXGGGGXGXGX (SEQ ID NO:924)  
 GGCCAGGXGGGGXGGGGXGGGGXGX (SEQ ID NO:925)  
 CGGGCCGAGGXGGGGXGGGGXGGGG (SEQ ID NO:926)  
 GGCCGGGGCCGAGGXGGGGXGGGGXGX (SEQ ID NO:927)  
 CAGGGCCGGGGCCGAGGXGGGGXGGGG (SEQ ID NO:928)  
 GGGGXGGGGXGGGGXGXGXGGTTCG (SEQ ID NO:929)  
 GXGGGGXGGGGXGXGXGGTTCGCCC (SEQ ID NO:930)  
 GGGGXGGGGXGXGXGGTTCGCCCCG (SEQ ID NO:931)  
 GXGGGGXGXGXGGTTCGCCCCGCGCA (SEQ ID NO:932)  
 GGGGXGXGXGGTTCGCCCCGCGCATGG (SEQ ID NO:933)  
 XGGGXGGGGXGGGGXGXGXGGT (SEQ ID NO:934)  
 GGGXGGGGXGGGGXGXGXGGT (SEQ ID NO:935)  
 GXGGGGXGGGGXGXGXGGT (SEQ ID NO:936)  
 GGGGXGGGGXGXGXGGT (SEQ ID NO:937)  
 GGGXGGGGXGXGXGGT (SEQ ID NO:938)  
 GXGGGGXGXGXGGT (SEQ ID NO:939)  
 GGXGGGXGGGGXGGGGXGXGXG (SEQ ID NO:940)  
 GXXGGGXGGGGXGGGGXGXGXG (SEQ ID NO:941)  
 GGXGGGXGGGGXGGGGXGXGXG (SEQ ID NO:942)  
 GXXGGGXGGGGXGGGGXGGGG (SEQ ID NO:943)  
 GXXGGGXGGGGXGGGG (SEQ ID NO:944)  
 GGXGGGXGGGGXGXG (SEQ ID NO:945)  
 GXXGAGGXGGGGXGGGGXGXGXGGT (SEQ ID NO:946)  
 GXXGGGGXGGGGXGGGGTXXGXGXGGT (SEQ ID NO:947)  
 GXXGGGXGCCGGXGGGGXGXGXGGT (SEQ ID NO:948)

**RZ6X\*\* 665-696**  
 5'-CXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG-3' (SEQ ID NO:949)  
 CCXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG (SEQ ID NO:950)  
 ACCXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG (SEQ ID NO:951)  
 CACXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG (SEQ ID NO:952)  
 CCACXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG (SEQ ID NO:953)  
 CCCACXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG (SEQ ID NO:954)  
 CXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGC (SEQ ID NO:955)  
 CXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCC (SEQ ID NO:956)  
 CXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCC (SEQ ID NO:957)  
 CXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCCC (SEQ ID NO:958)  
 CXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCCCG (SEQ ID NO:959)  
 CCXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGC (SEQ ID NO:960)  
 ACCXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCC (SEQ ID NO:961)  
 CACXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCC (SEQ ID NO:962)  
 CCACXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCCC (SEQ ID NO:963)  
 CCCACXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCCCG (SEQ ID NO:964)  
 CACXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCG (SEQ ID NO:965)  
 ACCACXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCC (SEQ ID NO:966)  
 CCCACCCACXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAX (SEQ ID NO:967)  
 GGCCCCACCCACXGCGXGCGXGCGXGCGCT (SEQ ID NO:968)  
 CCCGGCCCCACCCACXGCGXGCGXGCGXGCGX (SEQ ID NO:969)  
 CXGCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCC (SEQ ID NO:970)  
 CXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCCCG (SEQ ID NO:971)  
 CXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCCCGCGCC (SEQ ID NO:972)  
 CXGCGCTTAXGCCXGCGXGGCCCCGCGCCCC (SEQ ID NO:973)  
 CXGCTTAXGCCXGCGXGGCCCCGCGCCCCGCG (SEQ ID NO:974)  
 GCGXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG (SEQ ID NO:975)  
 XGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG (SEQ ID NO:976)  
 CXGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG (SEQ ID NO:977)  
 GCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGXGG (SEQ ID NO:978)

XGCGXGCTTAXGCCXGCGG (SEQ ID NO:979)  
 CXGCGCTTAXGCCXGCGG (SEQ ID NO:980)  
 GCXGCTTAXGCCXGCGG (SEQ ID NO:981)  
 XGCTTAXGCCXGCGG (SEQ ID NO:982)  
 GCTTAXGCCXGCGG (SEQ ID NO:983)  
 CXGCGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCG (SEQ ID NO:984)  
 CXGCGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXG (SEQ ID NO:985)  
 CXGCGCGXGCGXGCGCTTAXGCC (SEQ ID NO:986)  
 CXGCGCGXGCGXGCGCTTAXG (SEQ ID NO:987)  
 CXGCGCGXGCGXGCGCTTA (SEQ ID NO:988)  
 CXGCGCGXGCGXGCGCT (SEQ ID NO:989)  
 CXGCGCGXGCGXGCG (SEQ ID NO:990)  
 CXGCGCGXGCGXGCG (SEQ ID NO:991)  
 CXGCGCGXGCGXGCG (SEQ ID NO:992)  
 CXGCGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGG (SEQ ID NO:993)  
 CXGCGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGG (SEQ ID NO:994)  
 CXGCGCGXGCGXGCGCTTAXGCCXGCGG (SEQ ID NO:995)

RZ9X\*\* 733-760

5'-CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT-3' (SEQ ID NO:996)  
 CCCGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:997)  
 CXXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:998)  
 CCCCXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:999)  
 GCCCCXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1000)  
 GGCCCCXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1001)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTC (SEQ ID NO:1002)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCA (SEQ ID NO:1003)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCAC (SEQ ID NO:1004)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCACC (SEQ ID NO:1005)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCACCT (SEQ ID NO:1006)  
 CXXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTC (SEQ ID NO:1007)  
 CCCCXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCA (SEQ ID NO:1008)  
 CCCCXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCAC (SEQ ID NO:1009)  
 GCCCCXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCACC (SEQ ID NO:1010)  
 GGCCCCXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCACCT (SEQ ID NO:1011)  
 CCCCXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCX (SEQ ID NO:1012)  
 GGGCCCCXGCCXGCGCAGCCCCXGAXG (SEQ ID NO:1013)  
 AAGGGCCCCXGCCXGCGCAGCCCCXG (SEQ ID NO:1014)  
 AGGAAGGGCCCCXGCCXGCGCAGCCC (SEQ ID NO:1015)  
 GGGAGGAAGGGCCCCXGCCXGCGCAG (SEQ ID NO:1016)  
 CCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCAC (SEQ ID NO:1017)  
 GCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCTCACCTG (SEQ ID NO:1018)  
 GCAGCCCCXGAXGCCXGCTCACCTGTGC (SEQ ID NO:1019)  
 GCCCCXGAXGCCXGCTCACCTGTGCCCG (SEQ ID NO:1020)  
 CCXGAXGCCXGCTCACCTGTGCCCGGG (SEQ ID NO:1021)  
 GCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1022)  
 CXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1023)  
 GCGXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1024)  
 XGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1025)  
 CAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1026)  
 GCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1027)  
 CCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1028)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXG (SEQ ID NO:1029)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCC (SEQ ID NO:1030)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXG (SEQ ID NO:1031)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGA (SEQ ID NO:1032)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCX (SEQ ID NO:1033)  
 CXGCCXGCGCAGCCC (SEQ ID NO:1034)  
 CXGCCXGCGCAGCC (SEQ ID NO:1035)  
 CXGCGXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1036)  
 CXGCCXGCGCAGCCCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1037)

CXGCCXGCXGCAGCGCCXGAXGCCXGCT (SEQ ID NO:1038)

RZ10X\*\* 333-361

5'-GXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG-3' (SEQ ID NO:1039)  
TGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1040)  
CTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1041)  
GCTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1042)  
GGCTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1043)  
TGGCTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1044)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGT (SEQ ID NO:1045)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTT (SEQ ID NO:1046)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTTG (SEQ ID NO:1047)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTTGG (SEQ ID NO:1048)  
TGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTTGGC (SEQ ID NO:1049)  
CTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTT (SEQ ID NO:1051)  
GCTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTTG (SEQ ID NO:1052)  
GGCTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTTGG (SEQ ID NO:1053)  
TGGCTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTTGGC (SEQ ID NO:1054)  
GCTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCC (SEQ ID NO:1055)  
TTGGCTGXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCA (SEQ ID NO:1056)  
CCATTGGCTGXGXGCCATXGGGCCCXGCC (SEQ ID NO:1057)  
CTACCATGGCTGXGXGCCATXGGGCCCX (SEQ ID NO:1058)  
GGCCTACCATGGCTGXGXGCCATXGGGC (SEQ ID NO:1059)  
XGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTTG (SEQ ID NO:1060)  
CATXGGGCCCXGCCCCACCCXGGTTGGCT (SEQ ID NO:1061)  
XGGGCCCXGCCCCACCCXGGTTGGCTGAG (SEQ ID NO:1062)  
GCCCXGCCCCACCCXGGTTGGCTGAGCGG (SEQ ID NO:1063)  
CXGCCCCACCCXGGTTGGCTGAGCGGCC (SEQ ID NO:1064)  
GXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1065)  
GCCATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1066)  
CATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1067)  
TXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1068)  
GGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1069)  
GCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1070)  
CCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1071)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACCCX (SEQ ID NO:1072)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCACC (SEQ ID NO:1073)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGCCCCA (SEQ ID NO:1074)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGCCC (SEQ ID NO:1075)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGC (SEQ ID NO:1076)  
GXGXGCCATXGGGCCCX (SEQ ID NO:1077)  
GXGXGCCATXGGGCC (SEQ ID NO:1078)  
GXGXGCCATXGGGCACXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1079)  
GXGXGCCATXGGGCCCXGCCCTACCCXGG (SEQ ID NO:1080)  
GXGXCGATXGGGCCCXGCCCCACCCXGG (SEQ ID NO:1081)

ERZ1X\*\* 481-510

5'-CGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCC-3' (SEQ ID NO:1082)  
GCGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1083)  
GGCGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1084)  
GGGCGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1085)  
CGGGCGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1086)  
GCGGGCGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1087)  
CGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCCG (SEQ ID NO:1088)  
CGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCCGT (SEQ ID NO:1089)  
CGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCCGTC (SEQ ID NO:1090)  
CGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCCGTCC (SEQ ID NO:1091)  
CGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCCGTCG (SEQ ID NO:1092)  
GCGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCCG (SEQ ID NO:1093)  
GGCGGGGCGGGGGGXGXGGTTXGCCXGXGCATGGGCTCCGT (SEQ ID NO:1094)

GGGCGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGTC (SEQ ID NO:1095)  
 CGGGCGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGTCC (SEQ ID NO:1096)  
 GCGGGCGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGTCCG (SEQ ID NO:1097)  
 GGGCGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGC (SEQ ID NO:1098)  
 GGCGGGCGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATG (SEQ ID NO:1099)  
 GGGGCGGGGCGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGC (SEQ ID NO:1100)  
 GGCGGGGCGGGGCGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXG (SEQ ID NO:1101)  
 CGGGGCGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCC (SEQ ID NO:1102)  
 GGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGTC (SEQ ID NO:1103)  
 CGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGTCCGC (SEQ ID NO:1104)  
 GGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGTCCGCGGC (SEQ ID NO:1105)  
 XGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGTCCGCGGCGGG (SEQ ID NO:1106)  
 GXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCCGTCCGCGGCGGGTGC (SEQ ID NO:1107)  
 GGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1108)  
 GGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1109)  
 CGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1110)  
 GGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1111)  
 GGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1112)  
 XGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1113)  
 XGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1114)  
 XGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1115)  
 GTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1116)  
 TXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1117)  
 GCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1118)  
 CCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1119)  
 CCXGXGCATGGGCTC (SEQ ID NO:1120)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCT (SEQ ID NO:1121)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:1122)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATG (SEQ ID NO:1123)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCA (SEQ ID NO:1124)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1125)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXG (SEQ ID NO:1126)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCC (SEQ ID NO:1127)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGC (SEQ ID NO:1128)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTX (SEQ ID NO:1129)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGT (SEQ ID NO:1130)  
 CGGGGGCGGGGGXGXG (SEQ ID NO:1131)  
 CGGGGGCGGGGGXGXG (SEQ ID NO:1132)  
 CGGGGGCGGGGGXGX (SEQ ID NO:1133)  
 CGGGGGCAGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1134)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1135)  
 CGGGGGCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXACATGGGCTCC (SEQ ID NO:1136)

SRZ1X 491-510

5'-GGXGXGGTTXGCCCXGXG-3' (SEQ ID NO:1137)  
 GGGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1138)  
 GGGGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1139)  
 GGGGGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1140)  
 CGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1141)  
 GCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1142)  
 GGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1143)  
 GGXGXGGTTXGCCCXGXGCA (SEQ ID NO:1144)  
 GGXGXGGTTXGCCCXGXGCAT (SEQ ID NO:1145)  
 GGXGXGGTTXGCCCXGXGCATG (SEQ ID NO:1146)  
 GGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGG (SEQ ID NO:1147)  
 GGGXGXGGTTXGCCCXGXGC (SEQ ID NO:1148)  
 GGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCA (SEQ ID NO:1149)  
 GGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCAT (SEQ ID NO:1150)  
 CGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATG (SEQ ID NO:1151)  
 GCGGGGGXGXGGTTXGCCCXGXGCATGG (SEQ ID NO:1152)  
 GGGGGXGXGGTTXGCCCX (SEQ ID NO:1153)

GGCGGGGGXGXGGTTXGC (SEQ ID NO:1154)  
GGGGCGGGGGXGXGGTT (SEQ ID NO:1155)  
GGCGGGGGCGGGGGXGXGXG (SEQ ID NO:1156)  
CGGGGGCGGGGGCGGGGGXGX (SEQ ID NO:1157)  
GXGXGGTTXGCCCXGXGCAT (SEQ ID NO:1158)  
XGGTTXGCCCXGXGCATGGG (SEQ ID NO:1159)  
TTXGCCCXGXGCATGGGCTC (SEQ ID NO:1160)  
GCCCXGXGCATGGGCTCCGT (SEQ ID NO:1161)  
CXGXGCATGGGCTCCGTCCG (SEQ ID NO:1162)  
XGXGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1163)  
XGXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1164)  
GXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1165)  
GGXGXGXGGTTXGCCCXG (SEQ ID NO:1166)  
GGXGXGXGGTTXGCC (SEQ ID NO:1167)  
GGXGXGXGGTTXGCC (SEQ ID NO:1168)  
GGXGXAXGGTTXGCCCXGXG (SEQ ID NO:1169)  
GGXGXGXGGTTXGTCCGXGXG (SEQ ID NO:1170)  
GGXGXGXGGTTXGCCGXGXG (SEQ ID NO:1171)

## RZ1 485-510

5'-GGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGG-3' (SEQ ID NO:1172)  
GGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1173)  
GGGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1174)  
GGGGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1175)  
CGGGGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1176)  
CGGGGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1177)  
GGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGC (SEQ ID NO:1178)  
GGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGCT (SEQ ID NO:1179)  
GGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGCTC (SEQ ID NO:1180)  
GGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1181)  
GGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGCTCCG (SEQ ID NO:1182)  
GGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGC (SEQ ID NO:1183)  
GGGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGCT (SEQ ID NO:1184)  
GGGGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGCTC (SEQ ID NO:1185)  
CGGGGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGCTCC (SEQ ID NO:1186)  
GGGGGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGCTCCG (SEQ ID NO:1187)  
GGGGGCGCGCGGTTGCCCCGCGCAT (SEQ ID NO:1188)  
GGCGGGGGCGCGGTTGCCCCGCG (SEQ ID NO:1189)  
GGGGGCGGGGGCGCGGTTGCCCC (SEQ ID NO:1190)  
GGCGGGGGCGGGGGCGCGGTTGCG (SEQ ID NO:1191)  
CGGGGCGGGGGCGGGGGCGCGGTT (SEQ ID NO:1192)  
GCGCGGTTGCCCCGCGCATGGGCTC (SEQ ID NO:1193)  
CGGTTGCCCCGCGCATGGGCTCCGT (SEQ ID NO:1194)  
TTCGCCCCGCGCATGGGCTCCGTCCG (SEQ ID NO:1195)  
GCCCGCGCATGGGCTCCGTCCGCGG (SEQ ID NO:1196)  
CGCGCATGGGCTCCGTCCGCGGGCC (SEQ ID NO:1197)  
CGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1198)  
CGCGGTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1199)  
CGGTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1200)  
GTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1201)  
TCGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1202)  
CGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1203)  
GGCGCGCGGTTGCCCCGCGCATG (SEQ ID NO:1204)  
GGCGCGCGGTTGCCCCGCGCA (SEQ ID NO:1205)  
GGCGCGCGGTTGCCCCGCG (SEQ ID NO:1206)  
GGCGCGCGGTTGCCCCG (SEQ ID NO:1207)  
GGCGCGCGGTTGCCCC (SEQ ID NO:1208)  
GGCGCGCGGTTGCGC (SEQ ID NO:1209)  
GGCGCGGTTGCCCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1210)  
GGCGCGCGGTTGCCCCGCGCTGGG (SEQ ID NO:1211)  
GGCGCGCGGTTGACCCGCGCATGGG (SEQ ID NO:1212)

**RZ8X 1421-1451**

5'-AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA-3' (SEQ ID NO:1213)  
CAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1214)  
CCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1215)  
CCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1216)  
ACCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1217)  
AACCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1218)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCAC (SEQ ID NO:1219)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACT (SEQ ID NO:1220)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACTT (SEQ ID NO:1221)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACTTG (SEQ ID NO:1222)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACTTGC (SEQ ID NO:1223)  
CAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCAC (SEQ ID NO:1224)  
CCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACT (SEQ ID NO:1225)  
CCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACTT (SEQ ID NO:1226)  
ACCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACTTG (SEQ ID NO:1227)  
AACCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACTTGC (SEQ ID NO:1228)  
CCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCC (SEQ ID NO:1229)  
CAACCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCG (SEQ ID NO:1230)  
CTGCAACCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCC (SEQ ID NO:1231)  
CAGCTGCAACCCAGXGTGXGGGAGGGCTGTX (SEQ ID NO:1232)  
GTGCAGCTGCAACCCAGXGTGXGGGAGGGCT (SEQ ID NO:1233)  
GTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACTT (SEQ ID NO:1234)  
XGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCACTTGCT (SEQ ID NO:1235)  
GAGGCTGTXGCCTCGCCCCCACTTGCTCTT (SEQ ID NO:1236)  
GGCTGTXGCCTCGCCCCCACTTGCTCTTAAT (SEQ ID NO:1237)  
TGTXGCCTCGCCCCCACTTGCTCTTAATGAC (SEQ ID NO:1238)  
XGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1239)  
TXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1240)  
XGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1241)  
GGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1242)  
AGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1243)  
GGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1244)  
CTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1245)  
GTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1246)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCC (SEQ ID NO:1247)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCC (SEQ ID NO:1248)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCG (SEQ ID NO:1249)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCT (SEQ ID NO:1250)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGC (SEQ ID NO:1251)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTX (SEQ ID NO:1252)  
AGXGTGXGGGAGGGCTG (SEQ ID NO:1253)  
AGXGTGXGGGAGGGC (SEQ ID NO:1254)  
AGXGAGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1255)  
AGXGTGXGGGAGGGATGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1256)  
AGXGTGXGGGAGGGCTGTXGCCTCGCCCCCA (SEQ ID NO:1257)

**RZ11X 442-467**

5'-GXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA-3' (SEQ ID NO:1258)  
TGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1259)  
GTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1260)  
GGTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1261)  
GGGTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1262)  
CGGGTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1263)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCAC (SEQ ID NO:1264)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCACG (SEQ ID NO:1265)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCACGG (SEQ ID NO:1266)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCACGGG (SEQ ID NO:1267)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCACGGGC (SEQ ID NO:1268)  
TGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCAC (SEQ ID NO:1269)

GTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCACG (SEQ ID NO:1270)  
GGTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCACGG (SEQ ID NO:1271)  
GGGTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCACGGG (SEQ ID NO:1272)  
CGGGTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCACGGGC (SEQ ID NO:1273)  
GGTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGG (SEQ ID NO:1274)  
GCCGGTGXGGCTXGGGTTGXGGGXGC (SEQ ID NO:1275)  
GCCGGCGGCTGXGGCTXGGGTTGXGGG (SEQ ID NO:1276)  
TCCGGCGGGTGXGGCTXGGGTTGX (SEQ ID NO:1277)  
CCGTCCGGCGGGTGXGGCTXGGGT (SEQ ID NO:1278)  
GCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCACGG (SEQ ID NO:1279)  
XGGGTTGXGGGXGCAGGGCACGGGCG (SEQ ID NO:1280)  
GTTGXGGGXGCAGGGCACGGGCGGCG (SEQ ID NO:1281)  
GXGGGXGCAGGGCACGGGCGGCGGAG (SEQ ID NO:1282)  
GGXGCAGGGCACGGGCGGCGGAGACT (SEQ ID NO:1283)  
GGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1284)  
CTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1285)  
XGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1286)  
GGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1287)  
TTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1288)  
TGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1289)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGG (SEQ ID NO:1290)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAG (SEQ ID NO:1291)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGXGC (SEQ ID NO:1292)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGX (SEQ ID NO:1293)  
GXGGCTXGGGTTGXGG (SEQ ID NO:1294)  
GXGGCTXGGGTTGXG (SEQ ID NO:1295)  
GXGACTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1296)  
GXGGCTXGGGTTGXGGTXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1297)  
GXGGCTXGGGTTGXGGGXGCAGGGCA (SEQ ID NO:1298)

## 图 29

## CM2 175-199

5'-GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC-3' (SEQ ID NO:319)  
AGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:320)  
GAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:321)  
AGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:322)  
GAGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:323)  
AGAGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:324)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:325)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:326)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:327)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:328)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:329)  
AGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:330)  
GAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:331)  
AGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:332)  
GAGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:333)  
AGAGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:334)  
AGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:335)  
AAGAGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:336)  
AGTAAGAGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:337)  
CAGAGTAAGAGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:338)  
AAACAGAGTAAGAGAGCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:339)  
GCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:340)  
TTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:341)  
AATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:342)  
TAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:343)  
CTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:344)  
XGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:345)  
CATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:346)  
TTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:347)  
GAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:348)  
ATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:349)  
TTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:350)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:351)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:352)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:353)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:354)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:355)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:356)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:357)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:358)  
GCXGCATTGAATTAAGTAACTAXGXGXGCC (SEQ ID NO:359)

## CM3\*\* 349-371

5'-GCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG-3' (SEQ ID NO:360)  
GGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:361)  
GGGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:362)  
AGGGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:363)  
AAGGGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:364)  
AAAGGGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:365)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:366)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:367)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:368)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:369)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:370)



GGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAGA (SEQ ID NO:371)  
GGGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAGAG (SEQ ID NO:372)  
AGGGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAGAGA (SEQ ID NO:373)  
AAGGGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAGAGAG (SEQ ID NO:374)  
AAAGGGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAGAGAGG (SEQ ID NO:375)  
AGGGCXGGTGGGXGGAGAGTTAGX (SEQ ID NO:376)  
TAAAGGGCXGGTGGGXGGAGAGTT (SEQ ID NO:377)  
TTATAAAGGGCXGGTGGGXGGAGAG (SEQ ID NO:378)  
GCATTATAAAGGGCXGGTGGGXGGA (SEQ ID NO:379)  
CTCGCATTATAAAGGGCXGGTGGGX (SEQ ID NO:380)  
GGTGGGXGGAGAG (A) TTAGXGAGAGA (SEQ ID NO:381)  
GGGXGGAGAGTTAGXGAGAGAGGA (SEQ ID NO:382)  
XGGAGAGTTAGXGAGAGAGGATCT (SEQ ID NO:383)  
AGAGTTAGXGAGAGAGGATCTTTT (SEQ ID NO:384)  
CTTAGXGAGAGAGGATCTTTTTTC (SEQ ID NO:385)  
XGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:386)  
CTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:387)  
GGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:388)  
GXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:389)  
GGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:390)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXG (SEQ ID NO:391)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTTAG (SEQ ID NO:392)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTT (SEQ ID NO:393)  
GCXGGTGGGXGGAGAG (SEQ ID NO:394)  
GCXGGTGGGXGGAGA (SEQ ID NO:395)  
GCXGGTGGGXGGTGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:396)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXGAG (SEQ ID NO:397)  
GCXGGTGGGXGGAGAGTTAGXTAG (SEQ ID NO:398)

**CM6 13-39**

5'-TGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGT-3' (SEQ ID NO:399)  
CTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:400)  
ACTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:401)  
CACTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:402)  
CCACTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:403)  
ACCACTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:404)  
TGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTA (SEQ ID NO:405)  
TGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTAC (SEQ ID NO:406)  
TGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTACC (SEQ ID NO:407)  
TGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTACCA (SEQ ID NO:408)  
TGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTACCAG (SEQ ID NO:409)  
CTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTA (SEQ ID NO:410)  
ACTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTAC (SEQ ID NO:411)  
CACTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTACC (SEQ ID NO:412)  
CCACTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTACCA (SEQ ID NO:413)  
ACCACTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTACCAG (SEQ ID NO:414)  
CACTGXGXGCCACXGCCAXGCCAXGXG (SEQ ID NO:415)  
AACCACCTGXGXGCCACXGCCAXGCCAX (SEQ ID NO:416)  
GAGAACCACCTGXGXGCCACXGCCAXGC (SEQ ID NO:417)  
ACCGAGAACCACCTGXGXGCCACXGCCA (SEQ ID NO:418)  
CACACCGAGAACCACCTGXGXGCCACXG (SEQ ID NO:419)  
GXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTACC (SEQ ID NO:420)  
CCCACXGCCAXGCCAXGXGXGTACCAGG (SEQ ID NO:421)  
ACXGCCAXGCCAXGXGXGTACCAGGCTG (SEQ ID NO:422)  
GCCAGCCAXGXGXGTACCAGGCTGCAG (SEQ ID NO:423)  
XGXGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:424)  
XGCCACXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:425)  
CCCACXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:426)  
CACXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:427)  
CXGCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:428)  
GCCAXGCCAXGXGXGT (SEQ ID NO:429)

CCAXGCCAXGXGXT (SEQ ID NO:430)  
TGXGXGCCCACXGCCAXGCCAXGXG (SEQ ID NO:431)  
TGXGXGCCCACXGCCAXGCCAXGX (SEQ ID NO:432)  
TGXGXGCCCACXGCCAXGCCAX (SEQ ID NO:433)  
TGXGXGCCCACXGCCAXGCC (SEQ ID NO:434)  
TGXGXGCCCACXGCCAXG (SEQ ID NO:435)  
TGXGXGCCCACXGCCA (SEQ ID NO:436)  
TGXGXGCCCACXGCC (SEQ ID NO:437)  
TGXGXGCCCACXGCCGXGCCAXGXGXT (SEQ ID NO:438)  
TGXGXGTCCACXGCCAXGCCAXGXGXT (SEQ ID NO:439)  
TGXGXGCCCACXGCCAXGCCAXGXGXT (SEQ ID NO:440)

图 30

## TG3 805-830

5'-AGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGA-3' (SEQ ID NO:1299)  
AAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1300)  
TAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1301)  
GTAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1302)  
GGTAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1303)  
GGGTAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1304)  
AGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAG (SEQ ID NO:1305)  
AGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAGC (SEQ ID NO:1306)  
AGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAGCA (SEQ ID NO:1307)  
AGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAGCAG (SEQ ID NO:1308)  
AGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAGCAGG (SEQ ID NO:1309)  
AAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAG (SEQ ID NO:1310)  
TAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAGC (SEQ ID NO:1311)  
GTAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAGCA (SEQ ID NO:1312)  
GGTAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAGCAG (SEQ ID NO:1313)  
GGGTAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAGCAGG (SEQ ID NO:1314)  
GTAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCAC (SEQ ID NO:1315)  
GGGGTAAGGGGXGGGGAXGCTGAGXG (SEQ ID NO:1316)  
TTTGGGGTAAGGGGXGGGGAXGCTGAG (SEQ ID NO:1317)  
GGGTTTGGGGTAAGGGGXGGGGAXGCT (SEQ ID NO:1318)  
TGGGGTTTGGGGTAAGGGGXGGGGAX (SEQ ID NO:1319)  
GGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGAGCA (SEQ ID NO:1320)  
GGGGAXGCTGAGXGCACXGAGCAGGG (SEQ ID NO:1321)  
GAXGCTGAGXGCACXGAGCAGGGCGC (SEQ ID NO:1322)  
GCTGAGXGCACXGAGCAGGGCGCGGG (SEQ ID NO:1323)  
GAGXGCACXGAGCAGGGCGCGGGCTG (SEQ ID NO:1324)  
GGXGGGGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1325)  
GXGGGGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1326)  
GGGGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1327)  
GGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1328)  
AXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1329)  
GCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1330)  
AGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCACX (SEQ ID NO:1331)  
AGGGGXGGGGAXGCTGAGXGCA (SEQ ID NO:1332)  
AGGGGXGGGGAXGCTGAGXG (SEQ ID NO:1333)  
AGGGGXGGGGAXGCTGAGX (SEQ ID NO:1334)  
AGGGGXGGGGAXGCTGA (SEQ ID NO:1335)  
AGGGGXGGGGAXGCT (SEQ ID NO:1336)  
AGGGGXGAGGAXGCTGAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1337)  
AGGGGXGGGGAXGCTGATXGCACXGA (SEQ ID NO:1338)  
AGGGGXGGGGAXGCTCAGXGCACXGA (SEQ ID NO:1339)

## TG5 728-762

5'-GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGA-3' (SEQ ID NO:1340)  
AGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGA (SEQ ID NO:1341)  
GAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGA (SEQ ID NO:1342)  
AGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGA (SEQ ID NO:1343)  
CAGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGA (SEQ ID NO:1344)  
CCAGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGA (SEQ ID NO:1345)  
GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGAA (SEQ ID NO:1346)  
GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGAAA (SEQ ID NO:1347)  
GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGAAAA (SEQ ID NO:1348)  
GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGAAAAAG (SEQ ID NO:1349)  
GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGAAAAAGG (SEQ ID NO:1350)  
AGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGAA (SEQ ID NO:1351)  
GAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXGAXGAAA (SEQ ID NO:1352)

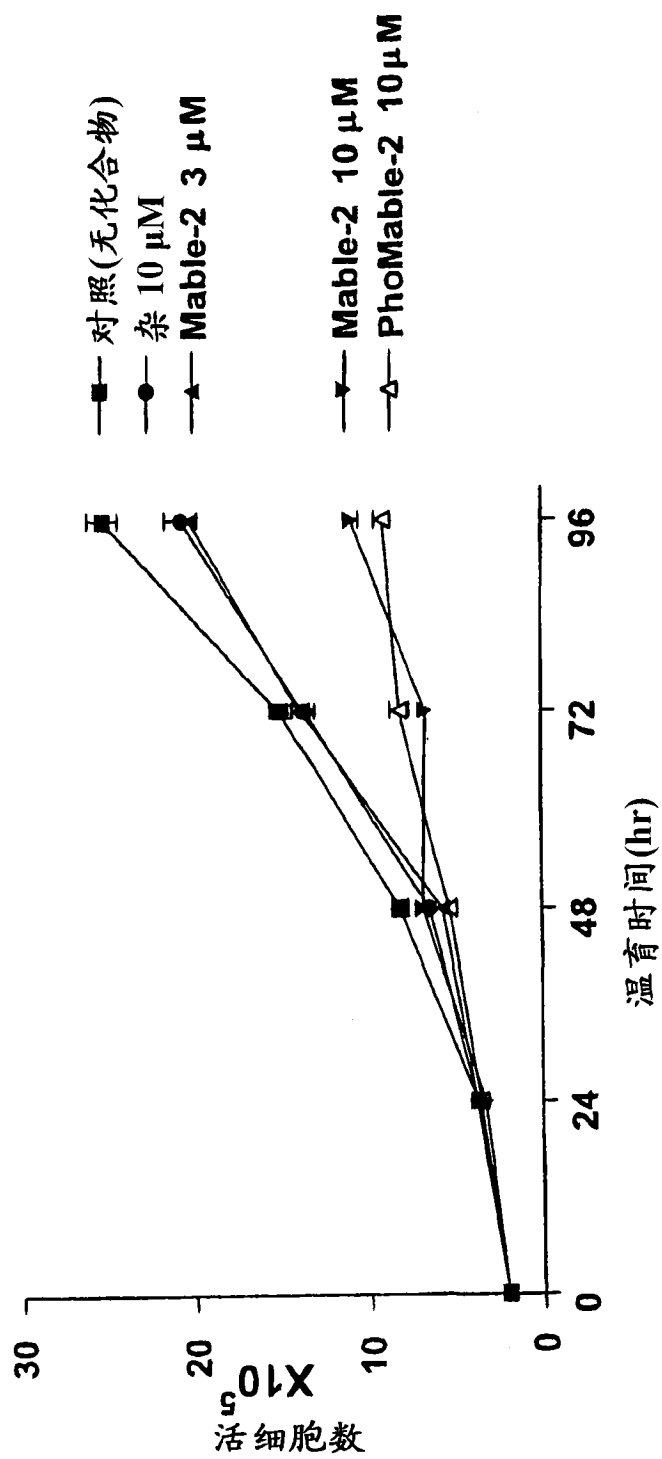
AGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGAAAA (SEQ ID NO:1353)  
 CAGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGAAAAG (SEQ ID NO:1354)  
 CCAGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGAAAAGG (SEQ ID NO:1355)  
 AGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGA (SEQ ID NO:1356)  
 CCCAGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGC (SEQ ID NO:1357)  
 GATCCCAGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXG (SEQ ID NO:1358)  
 TGGGATCCCAGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCAC (SEQ ID NO:1359)  
 ACCTGGGATCCCAGAGCCTGGXGGXGXGAGCXGGG (SEQ ID NO:1360)  
 TGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGAAAA (SEQ ID NO:1361)  
 XGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGAAAAGGC (SEQ ID NO:1362)  
 XGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGAAAAGGCAGG (SEQ ID NO:1363)  
 GAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGAAAAGGCAGGAAG (SEQ ID NO:1364)  
 CXGGGCACCCXGGGCGXGAXGAAAAGGCAGGAAGCGC (SEQ ID NO:1365)  
 CTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1366)  
 GGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1367)  
 XGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1368)  
 GXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1369)  
 GAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1370)  
 GAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1371)  
 GCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1372)  
 XGGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1373)  
 GGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1374)  
 CACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1375)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAX (SEQ ID NO:1376)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXG (SEQ ID NO:1377)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGC (SEQ ID NO:1378)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGG (SEQ ID NO:1379)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCX (SEQ ID NO:1380)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCAC (SEQ ID NO:1381)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGC (SEQ ID NO:1382)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGG (SEQ ID NO:1383)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCX (SEQ ID NO:1384)  
 GCCTGGXGGXGXGAG (SEQ ID NO:1385)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXAGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1386)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCGXGAXGA (SEQ ID NO:1387)  
 GCCTGGXGGXGXGAGCXGGGCACCCXGGGCXTAXGA (SEQ ID NO:1388)

TG8\*\* 754-787

5'-GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG-3' (SEQ ID NO:1389)  
 TGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1390)  
 CTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1391)  
 GCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1392)  
 TGCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1393)  
 CTGCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1394)  
 GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGC (SEQ ID NO:1395)  
 GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCG (SEQ ID NO:1396)  
 GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGC (SEQ ID NO:1397)  
 GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGCG (SEQ ID NO:1398)  
 GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGCGA (SEQ ID NO:1399)  
 TGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGC (SEQ ID NO:1400)  
 CTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCG (SEQ ID NO:1401)  
 GCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGC (SEQ ID NO:1402)  
 TGCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGCG (SEQ ID NO:1403)  
 CTGCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGCGA (SEQ ID NO:1404)  
 GCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGG (SEQ ID NO:1405)  
 GCTGCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCC (SEQ ID NO:1406)  
 CGGGCTGCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAG (SEQ ID NO:1407)  
 GCGCGGGCTGCTGGGXGGGGXGACCTGGGATCCC (SEQ ID NO:1408)  
 AGGGCGGGCTGCTGGGXGGGGXGACCTGGGAT (SEQ ID NO:1409)  
 XGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGC (SEQ ID NO:1410)  
 GGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGCGAG (SEQ ID NO:1411)

GACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGCGAGCCG (SEQ ID NO:1412)  
CTGGGATCCCAGGCCTGGXGGCGCGAGCCGGGC (SEQ ID NO:1413)  
GGATCCCAGGCCTGGXGGCGCGAGCCGGGCACC (SEQ ID NO:1414)  
GXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1415)  
GGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1416)  
GGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1417)  
XGACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1418)  
ACCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1419)  
CTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1420)  
GGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1421)  
GATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1422)  
TCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1423)  
CCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1424)  
GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGGX (SEQ ID NO:1425)  
GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTG (SEQ ID NO:1426)  
GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCC (SEQ ID NO:1427)  
GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGG (SEQ ID NO:1428)  
GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAG (SEQ ID NO:1429)  
GGGXGGGGXGACCTGGGATCCC (SEQ ID NO:1430)  
GGGXGGGGXGACCTGGGATC (SEQ ID NO:1431)  
GGGXGGGGXGACCTGGGA (SEQ ID NO:1432)  
GGGXGGGGXGACCTGG (SEQ ID NO:1433)  
GGGXGGGGXGACCTG (SEQ ID NO:1434)  
GGGXGGGGXGACCTGGCATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1435)  
GGGXGGGGXGATCTGGGATCCCAGGCCTGGXGG (SEQ ID NO:1436)  
GGGXGGGGXGACCTGGGATCCCAGGCCTGCXGG (SEQ ID NO:1437)

图 31



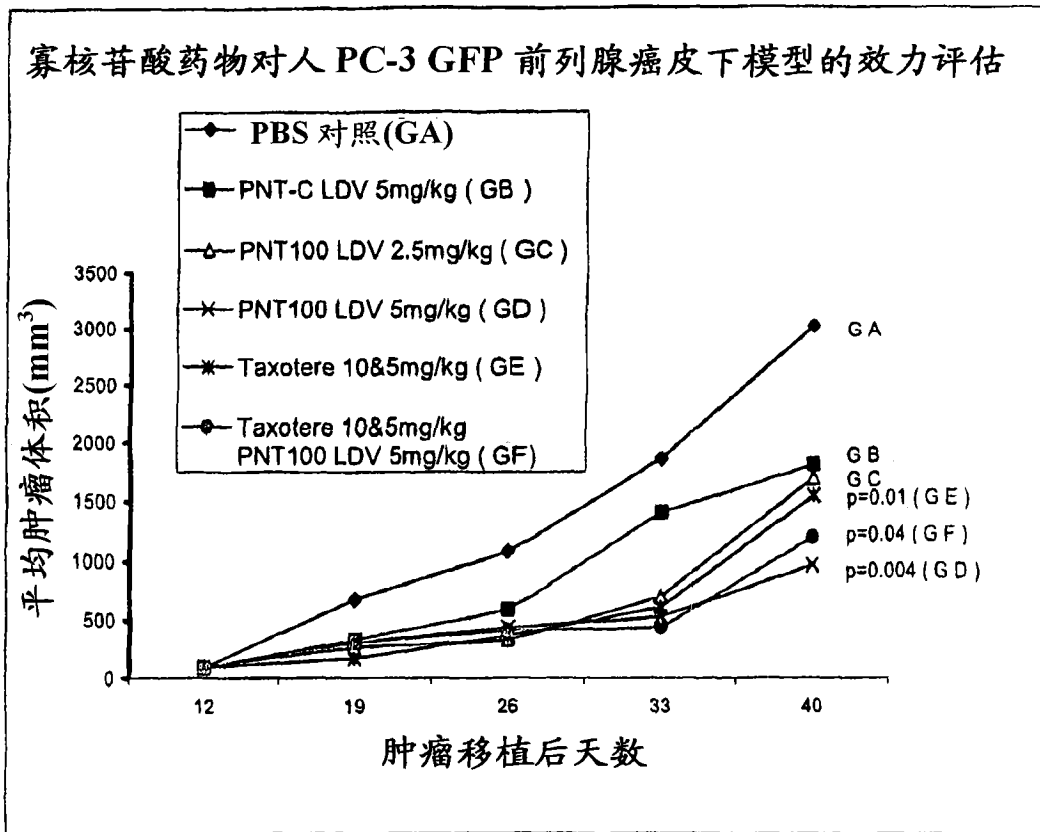


图 32

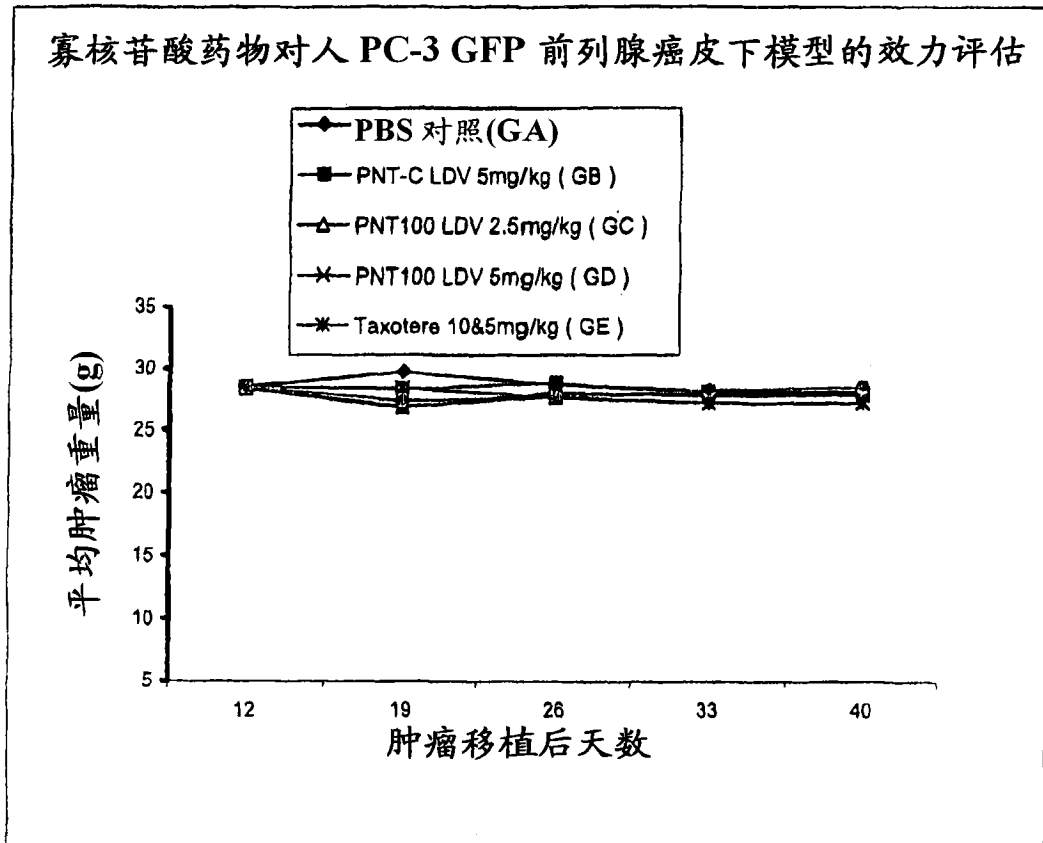


图 33



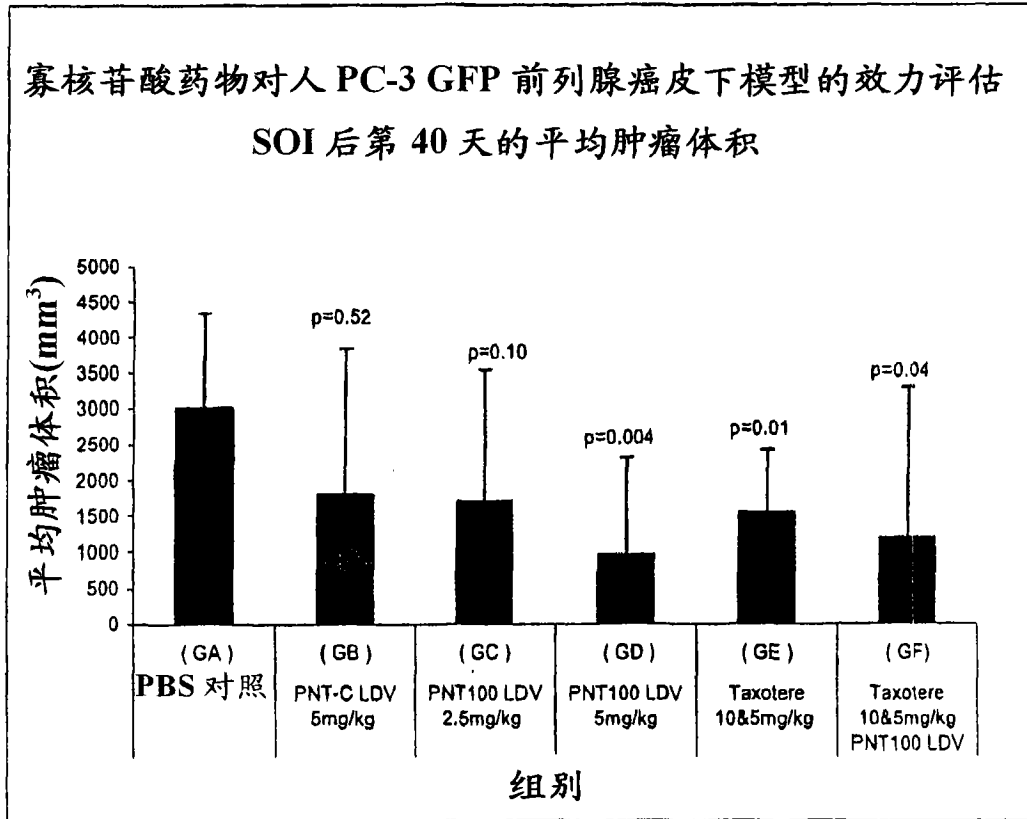


图 34

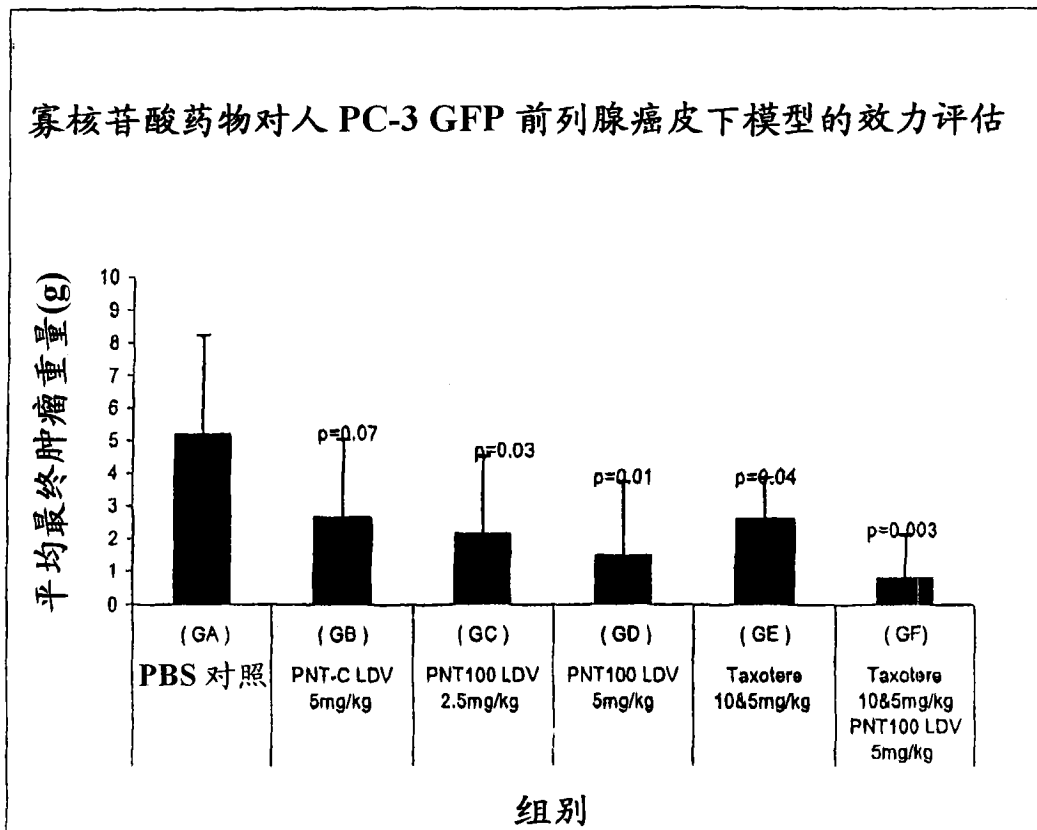


图 35