



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201209163 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：100124653

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 12 日

(51)Int. Cl. : *C12N15/113 (2010.01)*

A61K31/7105(2006.01)

C07H21/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/07/12 美國

61/363,535

(71)申請人：歐科可娜有限責任公司 (美國) OPKO CURNA, LLC. (US)

美國

(72)發明人：柯拉德 約瑟夫 COLLARD, JOSEPH (US)；寇可維 薛曼 歐嘉 KHORKOVA
SHERMAN, OLGA (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：64 項 圖式數：3 共 115 頁

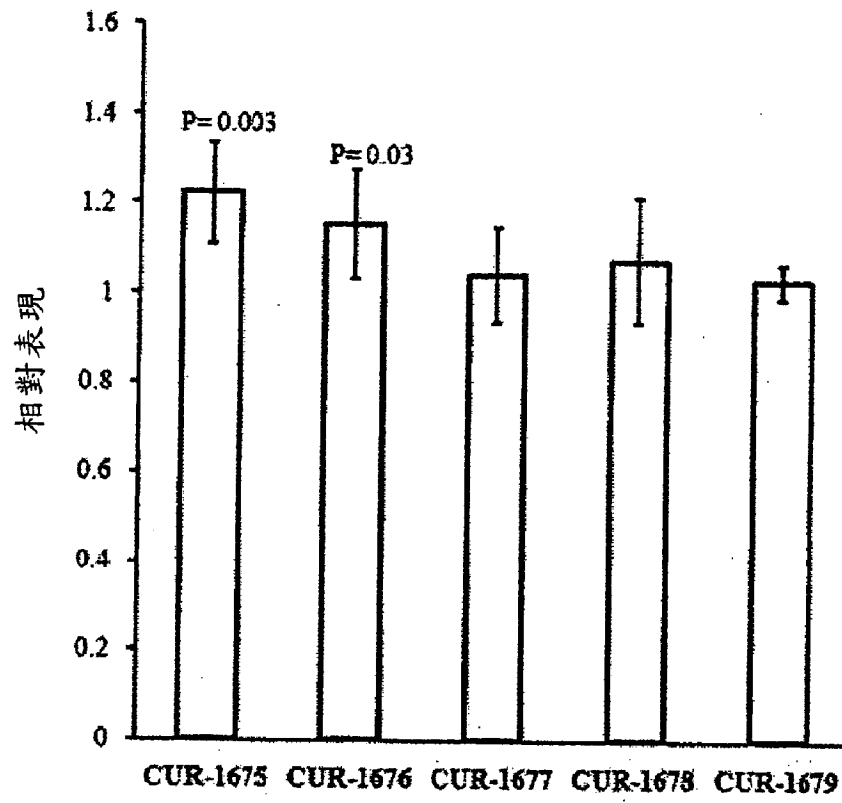
(54)名稱

藉由抑制 B C L 2 結合部分 3 (B B C 3) 之天然反義轉錄物以治療 B B C 3 相關疾病

TREATMENT OF BCL2 BINDING COMPONENT 3 (BBC3) RELATED DISEASES BY INHIBITION
OF NATURAL ANTISENSE TRANSCRIPT TO BBC3

(57)摘要

本發明係關於調節 BCL2 結合部分 3(BBC3)之表現及/或功能之反義寡核苷酸，特定而言，該等反義寡核苷酸係藉由靶向 BCL2 結合部分 3(BBC3)之天然反義聚核苷酸來進行調節。本發明亦係關於該等反義寡核苷酸之鑑別及其在治療與 BBC3 表現有關之疾病及病症中的用途。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201209163 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：100124653

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 12 日

(51)Int. Cl. : *C12N15/113 (2010.01)*

A61K31/7105(2006.01)

C07H21/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/07/12 美國

61/363,535

(71)申請人：歐科可娜有限責任公司 (美國) OPKO CURNA, LLC. (US)

美國

(72)發明人：柯拉德 約瑟夫 COLLARD, JOSEPH (US)；寇可維 薛曼 歐嘉 KHORKOVA
SHERMAN, OLGA (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：64 項 圖式數：3 共 115 頁

(54)名稱

藉由抑制 B C L 2 結合部分 3 (B B C 3) 之天然反義轉錄物以治療 B B C 3 相關疾病

TREATMENT OF BCL2 BINDING COMPONENT 3 (BBC3) RELATED DISEASES BY INHIBITION
OF NATURAL ANTISENSE TRANSCRIPT TO BBC3

(57)摘要

本發明係關於調節 BCL2 結合部分 3(BBC3)之表現及/或功能之反義寡核苷酸，特定而言，該等反義寡核苷酸係藉由靶向 BCL2 結合部分 3(BBC3)之天然反義聚核苷酸來進行調節。本發明亦係關於該等反義寡核苷酸之鑑別及其在治療與 BBC3 表現有關之疾病及病症中的用途。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明實施例包括調節BBC3之表現及/或功能之寡核苷酸及有關分子。

本申請案主張2010年7月12日提出申請之美國臨時專利申請案第61/363,535號之優先權，其全部內容皆以引用方式併入本文中。

【先前技術】

DNA-RNA及RNA-RNA雜交對核酸功能之許多態樣(包含DNA複製、轉錄及轉譯)較為重要。雜交對於檢測特定核酸或改變其表現之各種技術亦甚為重要。舉例而言，反義核苷酸藉由與靶RNA雜交、由此干擾RNA剪接、轉錄、轉譯及複製來破壞基因表現。反義DNA具有額外特徵，亦即DNA-RNA雜合體用作核糖核酸酶H消化之受質，該活性存在於大部分細胞類型中。反義分子可遞送至細胞中，如寡去氧核苷酸(ODN)之情形，或其可自內源基因表現為RNA分子。FDA最近批准了反義藥物VITRAVENE™(用於治療巨細胞病毒視網膜炎)，此表明該反義藥物具有治療用途。

【發明內容】

提供本概述以呈現本發明之概述從而簡要顯示本發明之性質及物質。提交本概述係基於下列理解：其並非用於解釋或限制本申請專利範圍之範疇或含義。

在一個實施例中，本發明提供抑制天然反義轉錄物之作

用之方法，其係藉由使用靶向天然反義轉錄物之任一區域的反義寡核苷酸從而上調相應正義基因來達成。本文亦涵蓋，可藉由siRNA、核糖酶及小分子來抑制天然反義轉錄物，此視為屬於本發明範疇內。

一個實施例提供在活體內或活體外調節患者細胞或組織中BBC3聚核苷酸之功能及/或表現之方法，其包括使該等細胞或組織與長度為5至30個核苷酸之反義寡核苷酸接觸，其中該寡核苷酸與聚核苷酸之反向補體具有至少50%之序列一致性，該聚核苷酸包括SEQ ID NO: 2中核苷酸1至689內之5至30個連續核苷酸，由此在活體內或活體外調節患者細胞或組織中BBC3聚核苷酸之功能及/或表現。

在一實施例中，寡核苷酸靶向BBC3聚核苷酸之天然反義序列(例如，SEQ ID NO: 2中所述之核苷酸)、及其任一變體、等位基因、同系物、突變體、衍生物、片段及互補序列。將反義寡核苷酸之實例闡述為SEQ ID NO: 3至8。

另一實施例提供在活體內或活體外調節患者細胞或組織中BBC3聚核苷酸之功能及/或表現之方法，其包括使該等細胞或組織與長度為5至30個核苷酸之反義寡核苷酸接觸，其中該寡核苷酸與BBC3聚核苷酸反義轉錄物之反向補體具有至少50%的序列一致性；由此在活體內或活體外調節患者細胞或組織中BBC3聚核苷酸之功能及/或表現。

另一實施例提供在活體內或活體外調節患者細胞或組織中BBC3聚核苷酸之功能及/或表現之方法，其包括使該等細胞或組織與長度為5至30個核苷酸之反義寡核苷酸接

觸，其中該寡核苷酸與BBC3反義聚核苷酸之反義寡核苷酸具有至少50%的序列一致性；由此在活體內或活體外調節患者細胞或組織中BBC3聚核苷酸之功能及/或表現。

在一實施例中，組合物包括一或多種結合至正義及/或反義BBC3聚核苷酸之反義寡核苷酸。

在一實施例中，寡核苷酸包括一或多個經修飾或取代之核苷酸。

在一實施例中，寡核苷酸包括一或多個經修飾鍵。

在又一實施例中，經修飾核苷酸包括含有以下之經修飾鹼基：硫代磷酸酯、磷酸甲酯、肽核酸、2'-O-甲基、氟-或碳、亞甲基或其他鎖核酸(LNA)分子。較佳地，經修飾核苷酸係鎖核酸分子，包含 α -L-LNA。

在一實施例中，經皮下、肌內、靜脈內或腹膜腔內將寡核苷酸投與患者。

在一實施例中，以醫藥組合物形式投與寡核苷酸。治療方案包括向患者投與至少一次反義化合物；然而，此治療可經改變以在一定時間內包含多個劑量。該治療可與一或多種其他類型之療法組合。

在一實施例中，將寡核苷酸囊封於脂質體中或附接至載體分子(例如膽固醇、TAT肽)。

其他態樣闡述於下文中。

【實施方式】

下文參照闡釋用實例應用來闡述本發明之若干態樣。應理解，本文列舉各種具體細節、關係及方法以提供對本發

明之完全理解。然而，熟習相關技術者易於認識到，可在不使用一或多個具體細節或使用其他方法之情形下來實踐本發明。本發明並不限於各個動作或事件之順序，此乃因一些動作可以不同順序發生及/或與其他動作或事件同時發生。另外，未必需要所有所闡釋動作或事件來實施本發明方法。

本文所揭示所有基因、基因名稱及基因產物意欲對應於可應用本文所揭示組合物及方法之來自任一物種的同系物。因此，該等術語包含但不限於人類及小鼠之基因及基因產物。應理解，在揭示來自特定物種之基因或基因產物時，除非在上下文中明確指出，否則此揭示內容意欲僅具有實例性，且不應解釋為限制意義。因此，舉例而言，對於在一些實施例中係關於哺乳動物核酸及胺基酸序列之本文所揭示基因而言，其意欲涵蓋來自其他動物之同源及/或直系同源基因及基因產物，該等其他動物包含但不限於其他哺乳動物、魚、兩棲動物、爬行動物及鳥。在一實施例中，基因或核酸序列係人類。

定義

本文所用之術語僅用於闡述特定實施例之目的而並非意欲限定本發明。如本文中所使用，單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該(the)」亦意欲包含複數形式，除非上下文另外明確指明。另外，在詳細闡述及/或申請專利範圍中使用術語「包含(including)」、「包含(includes)」、「具有(having)」、「具有(has)」、「具有(with)」或其變化形式時，

該等術語意欲以類似於術語「包括(comprising)」之方式來表示包含範圍。

術語「約」或「近似地」意指熟習此項技術者所測定之特定值的可接受誤差範圍，其部分地取決於該值之量測或測定方式，亦即，量測系統之侷限性。舉例而言，根據業內實踐，「約」可意指在1個或1個以上之標準偏差內。另一選擇為，「約」可意指與給定值相差至多20%、較佳至多10%、更佳至多5%、及更佳至多1%的範圍。另一選擇為，尤其對於生物系統或過程而言，該術語可意指在一數值之一個數量級內、較佳在5倍內、及更佳在2倍內。在申請案及申請專利範圍中闡述特定值時，除非另有闡述，否則應假設術語「約」意指在該特定值之可接受誤差範圍內。

本文所用之術語「mRNA」意指靶向基因之當前已知mRNA轉錄物、及可闡釋之任一其他轉錄物。

「反義寡核苷酸」或「反義化合物」意指結合至另一RNA或DNA(靶RNA、DNA)之RNA或DNA分子。舉例而言，若其係RNA寡核苷酸，則其藉助RNA-RNA相互作用結合至另一RNA靶並改變靶RNA之活性。反義寡核苷酸可上調或下調特定聚核苷酸之表現及/或功能。該定義意欲包含自治療、診斷或其他觀點來看有用之任一外來RNA或DNA分子。該等分子包含(例如)反義RNA或DNA分子、干擾RNA (RNAi)、微小RNA、誘餌RNA分子、siRNA、酶RNA、治療性編輯RNA及RNA激動劑與拮抗劑、反義寡聚

化合物、反義寡核苷酸、外部引導序列(EGS)寡核苷酸、交替剪接體、引物、探針及與靶核酸之至少一部分雜交之其他寡聚化合物。因此，該等化合物可以單鏈、雙鏈、部分單鏈或環狀寡聚化合物形式引入。

在本發明之上下文中，術語「寡核苷酸」係指核糖核酸(RNA)或去氧核糖核酸(DNA)之寡聚物或聚合物或其模擬物。術語「寡核苷酸」亦包含天然及/或經修飾單體或鏈聯之直鏈或環狀寡聚物，包含去氧核糖核苷、核糖核苷、其經取代及 α -變旋異構形式、肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA)、硫代磷酸酯、膦酸甲酯及諸如此類。寡核苷酸能夠藉助單體與單體相互作用之規則模式(例如 Watson-Crick 型鹼基配對、Hoögsteeen型鹼基配對或反向 Hoögsteeen型鹼基配對、或諸如此類)特異性結合至靶聚核苷酸。

寡核苷酸可為「嵌合」寡核苷酸，亦即，由不同區域組成。在本發明之上下文中，「嵌合」化合物係寡核苷酸，其含有兩個或更多個化學區域，例如 DNA 區域、RNA 區域、PNA 區域等。在寡核苷酸化合物之情形下，每一化學區域係由至少一個單體單元(亦即，核苷酸)組成。該等寡核苷酸通常包括至少一個對寡核苷酸進行修飾以顯示一或多種期望性質之區域。寡核苷酸之期望性質包含但不限於(例如)增加對核酸酶降解之抗性、增加細胞攝取、及/或增加對靶核酸之結合親和力。寡核苷酸之不同區域可由此具有不同性質。本發明之嵌合寡核苷酸可形成為兩種或更多種上述寡核苷酸、經修飾寡核苷酸、寡核苷及/或寡核苷

酸類似物的混合結構。

寡核苷酸可由可在「記錄(register)」中連接之區域組成，亦即，單體係連續連接(如天然DNA中)、或經由間隔體連接。間隔體意欲在區域之間構成共價「橋」且在較佳情形下具有不超過約100個碳原子之長度。間隔體可具有不同功能，例如具有正電荷或負電荷，具有特異性核酸結合性質(嵌合劑、槽溝黏合劑、毒素、螢光團等)，具有親脂性，誘導特異性二級結構(例如，誘導 α 螺旋之含有丙氨酸之肽)。

本文所用之「BBC3」及「BCL2結合部分3」包含所有家族成員、突變體、等位基因、片段、物種、編碼及非編碼序列、正義及反義聚核苷酸鏈等。

本文所用詞語「BCL2結合部分3」、「Bcl-2-結合部分3」、BBC3、FLJ42994、JFY1、JFY-1、細胞凋亡之p53上調調節劑、PUMA在文獻中被視為相同且在本申請案中互換使用。

本文所用之術語「對...具有特異性之寡核苷酸」或「靶向...之寡核苷酸」係指具有如下序列之寡核苷酸：(i) 能夠與靶向基因之一部分形成穩定複合物，或(ii) 能夠與靶向基因之mRNA轉錄物的一部分形成穩定雙鏈體。複合物及雙鏈體之穩定性可藉由理論計算及/或活體外分析進行測定。測定雜交複合物及雙鏈體之穩定性的實例性分析闡述於下文實例中。

本文所用之術語「靶核酸」涵蓋DNA、自該DNA轉錄之

RNA(包括 mRNA 前體及 mRNA)、以及源自該 RNA 之 cDNA、編碼序列、非編碼序列、正義或反義聚核苷酸。寡聚化合物與其靶核酸之特異性雜交會干擾該核酸之正常功能。與靶核酸特異性雜交之化合物對該靶核酸功能的此調節通常稱為「反義」。擬干擾之 DNA 功能包含(例如)複製及轉錄。擬干擾之 RNA 功能包含所有重要功能,例如, RNA 至蛋白質轉譯位點之易位、蛋白質自 RNA 之轉譯、使 RNA 產生一或多種 mRNA 物質之剪接、及 RNA 可參與或促進之催化活性。對於靶核酸功能之該干擾的總體效應係調節編碼產物或寡核苷酸之表現。

RNA 干擾(「RNAi」)係藉由與「靶」核酸序列具有序列特異性同源性之雙鏈 RNA(dsRNA)分子來調介。在本發明某些實施例中,介體係具有 5 至 25 個核苷酸之「小干擾」RNA 雙鏈體(siRNA)。siRNA 源自稱為 Dicer 之 RNase 酶對於 dsRNA 之處理。siRNA 雙鏈體產物募集至稱為 RISC(RNA 誘導之沉默複合物)之多蛋白 siRNA 複合物中。不期望受限於任一特定理論,由此據信,RISC 可引導至靶核酸(mRNA 較為適宜),在此 siRNA 雙鏈體以序列特異性方式發生相互作用從而以催化方式來調介裂解。可用於本發明中之小干擾 RNA 可根據業內所熟知且為熟習此項技術者所習知的程序來合成及使用。用於本發明方法中之小干擾 RNA 適宜地包括約 1 至約 50 個核苷酸(nt)。在非限制性實施例之實例中,siRNA 可包括約 5 至約 40 個 nt、約 5 至約 30 個 nt、約 10 至約 30 個 nt、約 15 至約 25 個 nt、或約 20 至 25 個核苷酸。

藉由使用自動對準核酸序列並指示一致性或同源性區域之電腦程式來促進適當寡核苷酸的選擇。使用該等程式藉由(例如)搜索諸如 GenBank 等數據庫或藉由對 PCR 產物測序來比較所獲得的核酸序列。對於來自各種物種之核酸序列之比較使得可選擇顯示適當物種間一致性程度的核酸序列。在並未測序之基因情形下，實施南方印跡(Southern blot)以測定靶物種及其他物種之基因間的一致性程度。藉由在不同嚴格度下實施南方印跡(如業內所熟知)，可大致量測一致性。該等程序使得可選擇如下寡核苷酸：其對欲控制個體中之靶核酸序列呈現高互補性程度且對其他物種中之相應核酸序列呈現較低互補性程度。熟習此項技術者應認識到，可在較大範圍中選擇適用於本發明中之基因區域。

「酶 RNA」意指具有酶活性之 RNA 分子(Cech, (1988) J. American. Med. Assoc. 260, 3030-3035)。酶性核酸(核酶)藉由首先結合至靶 RNA 而發揮作用。該結合經由酶性核酸之靶結合部分來進行，該靶結合部分緊鄰分子中用於裂解靶 RNA 之酶性部分。因此，酶性核酸首先識別靶 RNA 且然後經由鹼基配對與靶 RNA 結合，且在結合至確切位點後以酶促方式發揮作用以切割靶 RNA。

「誘餌 RNA」意指模擬配體之天然結合結構域之 RNA 分子。誘餌 RNA 由此與天然結合靶競爭結合特異性配體。舉例而言，已顯示 HIV 反式活化反應(TAR) RNA 之過度表現可用作「誘餌」並有效結合 HIV tat 蛋白，由此預防其結合

至在HIV RNA中編碼之TAR序列。此意欲係一具體實例。彼等熟習此項技術者應認識到，此僅為一實例，且可易於使用業內通常已知之技術來產生其他實施例。

本文所用之術語「單體」通常表示藉由磷酸二酯鍵或其類似物連接以形成尺寸介於數個單體單元(例如，約3-4個)至約數百個單體單元之寡核苷酸的單體。磷酸二酯鍵聯之類似物包含：硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、膦酸甲酯、硒代磷酸酯、胺基磷酸酯及諸如此類，如下文更全面所述。

術語「核苷酸」涵蓋天然核苷酸以及非天然核苷酸。熟習此項技術者應明瞭，先前視為「非天然」之各種核苷酸後來已在自然界中發現。因此，「核苷酸」不僅包含含有已知嘌呤及嘧啶雜環之分子，且亦包含其雜環類似物及互變異構體。其他類型核苷酸之闡釋性實例係含有以下部分之分子：腺嘌呤、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、嘌呤、黃嘌呤、二胺基嘌呤、8-側氧基-N6-甲基腺嘌呤、7-去氫黃嘌呤、7-去氫鳥嘌呤、N4,N4-乙醇胞嘧啶、N6,N6-乙醇-2,6-二胺基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-(C3-C6)-炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、假異胞嘧啶、2-羥基-5-甲基-4-三唑并吡啶、異胞嘧啶、異鳥嘌呤、肌苷及Benner等人之美國專利第5,432,272號中所述之「非天然」核苷酸。術語「核苷酸」意欲涵蓋每一及所有該等實例以及其類似物及互變異構體。尤其關注之核苷酸係彼等含有腺嘌呤、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、及尿嘧啶者，其被視為與人類之治療及診斷應用有關之天然核苷酸。核

苷酸包含天然 2'-去氧及 2'-羥基糖(例如, 如 Kornberg 及 Baker, DNA Replication, 第2版(Freeman, San Francisco, 1992)中所述)以及其類似物。

涉及核苷酸之「類似物」包含具有經修飾鹼基部分及/或經修飾糖部分之合成核苷酸(參見(例如)由以下所概述: Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429-4443, Toulmé, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997) Nucl. Acid Research, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213, Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); 2'-O、3'-C連接之[3.2.0]二環阿糖核苷。該等類似物包含經設計以增強結合性質(例如, 雙鏈體或三鏈體穩定性、特異性、或諸如此類)之合成核苷酸。

本文所用之「雜交」意指寡聚化合物之實質上互補鏈之配對。一種配對機制涉及寡聚化合物鏈之互補核苷或核苷酸鹼基(核苷酸)之間的氫鍵結, 其可為 Watson-Crick、Hoögsteeen或反向 Hoögsteeen 氫鍵結。舉例而言, 腺嘌呤及胸腺嘧啶係經由形成氫鍵配對之互補核苷酸。雜交可在不同情形下發生。

在以下情形時反義化合物係「可特異性雜交」: 化合物與靶核酸之結合可干擾靶核酸之正常功能以調節功能及/

或活性，且存在足夠互補性程度以避免反義化合物與非靶核酸序列在期望發生特異性結合之條件下(亦即，在活體內分析或治療性治療情形中之生理條件下，及在活體外分析情形中實施分析之條件下)發生非特異性結合。

本文所用之片語「嚴格雜交條件」或「嚴格條件」係指本發明化合物與其靶序列發生雜交、但與最少數量之其他序列發生雜交的條件。嚴格條件具有序列依賴性且在不同情況及本發明上下文中有所不同，藉由寡聚化合物之性質及組成及研究其之分析來測定寡聚化合物與靶序列進行雜交的「嚴格條件」。一般而言，嚴格雜交條件包括低濃度($<0.15\text{M}$)含有無機陽離子(例如 Na^+ 或 K^+)之鹽(亦即，低離子強度)，溫度高於 20°C 至 25°C 但低於寡聚化合物:靶序列複合物之 T_m ，及存在變性劑(例如甲醯胺、二甲基甲醯胺、二甲基亞砷)或洗滌劑十二烷基硫酸鈉(SDS)。舉例而言，對於每一1%甲醯胺而言，雜交速率降低1.1%。高嚴格度雜交條件之實例係0.1X氯化鈉-檸檬酸鈉緩衝液(SSC)/0.1% (w/v) SDS(在 60°C 下，保持30分鐘)。

本文所用之「互補」係指一個或兩個寡聚鏈上之兩個核苷酸之間精確配對的能力。舉例而言，若反義化合物某一位置處之核鹼基能夠與靶核酸(該靶核酸係DNA、RNA、或寡核苷酸分子)某一位置處之核鹼基發生氫鍵結，則該寡核苷酸與該靶核酸之間發生氫鍵結之位置視為互補位置。在每一分子中有足夠數量之互補位置由可彼此氫鍵結之核苷酸佔據時，寡聚化合物及其他DNA、RNA、或寡核

苷酸分子彼此互補。因此，「可特異性雜交」及「互補」係用於指示以下情形之術語：足夠數量之核苷酸中具有足夠程度之精確配對或互補性從而寡聚化合物及靶核酸之間發生穩定及特異性結合。

業內應理解，寡聚化合物序列無需與擬特異性雜交之其靶核酸序列100%互補。另外，寡核苷酸可在一或多個區段中雜交從而插入或相鄰區段並不參與雜交事件(例如，環路結構、失配或髮夾結構)。本發明寡聚化合物包括與其所靶向靶核酸序列內靶區域之至少約70%、或至少約75%、或至少約80%、或至少約85%、或至少約90%、或至少約95%、或至少約99%的序列互補性。舉例而言，反義化合物之20個核苷酸中有18個與靶區域互補且由此特異性雜交之反義化合物將代表90%的互補性。在此實例中，剩餘非互補核苷酸可與互補核苷酸群集或散開且無需彼此鄰近或與互補核苷酸鄰近。因此，長度為18個核苷酸且具有4(四)個非互補核苷酸(由兩個與靶核酸完整互補之區域側接)之反義化合物與靶核酸具有77.8%之總體互補性且由此屬於本發明範疇內。具有靶核酸區域之反義化合物的互補性百分比通常可使用業內已知之BLAST程式(鹼基局部對準檢索工具)及PowerBLAST程式測得。同源性、序列一致性或互補性百分比可藉由(例如)Gap程式(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)使用默認設置(其使用Smith及Waterman算法)測得(Adv.

Appl. Math., (1981) 2, 482-489)。

本文所用之術語「熱熔點(T_m)」係指在界定離子強度、pH及核酸濃度下與靶序列互補之寡核苷酸中之50%在平衡下與靶序列雜交的溫度。通常，對於短寡核苷酸(例如，具有10至50個核苷酸)而言，嚴格條件係彼等以下條件：鹽濃度在pH 7.0至8.3下為至少約0.01至1.0 M之Na離子濃度(或其他鹽)且溫度為至少約30°C。嚴格條件亦可藉由添加諸如甲醯胺等去穩定劑來達成。

本文所用之「調節」意指增加(刺激)或降低(抑制)基因之表現。

在用於聚核苷酸序列之背景中時，術語「變體」可涵蓋與野生型基因有關之聚核苷酸序列。此定義亦可包含(例如)「等位基因」、「剪接」、「物種」或「多態性」變體。剪接變體可與參考分子具有顯著一致性，但在mRNA加工期間因外顯子之交替剪接而通常具有較大或較小數量之聚核苷酸。相應多肽可擁有額外功能結構域或不存在結構域。物種變體係在物種之間有所變化之聚核苷酸序列。在本發明中尤其有用者係野生型基因產物之變體。變體可源自核酸序列中之至少一個突變，且可產生改變之mRNA或產生結構或功能可改變或不改變的多肽。任一給定天然或重組基因可不具有等位基因形式、具有一種或許多種等位基因形式。產生變體之常見突變變化通常歸因於核苷酸之天然缺失、添加或取代。該等變化類型中之每一者可在給定序列中單獨、或與其他者組合發生一或多次。

所得多肽通常彼此之間具有顯著之胺基酸一致性。多態性變體係給定物種個體間特定基因之聚核苷酸序列中的變化。多態性變體亦可涵蓋「單一核苷酸多態性」(SNP)或單鹼基突變，其中聚核苷酸序列之一個鹼基有所變化。SNP之存在可指示(例如)某一群體具有疾病狀態傾向(亦即相對於抗性之易感性)。

衍生聚核苷酸包含經受化學修飾(例如，氫由烷基、醯基或胺基代替)之核酸。衍生物(例如，衍生寡核苷酸)可包括非天然部分，例如改變之糖部分或糖間鍵聯。該等實例性衍生物係硫代磷酸酯及業內已知之其他含硫物質。衍生核酸亦可含有標記，包含放射性核苷酸、酶、螢光劑、化學發光劑、發色劑、受質、輔因子、抑制劑、磁性顆粒及諸如此類。

「衍生」多肽或肽係(例如)藉由以下方式進行修飾者：糖基化、聚乙二醇化、磷醯化、硫酸化、還原/烷基化、醯基化、化學偶合或輕度福馬林(formalin)處理。衍生物亦可經修飾以含有可檢測標記(直接或間接)，包含但不限於放射性同位素、螢光及酶標記。

本文所用之術語「動物」或「患者」意欲包含(例如)人類、綿羊、麋鹿、鹿、長耳鹿、水貂、哺乳動物、猴子、馬、牛、豬、山羊、狗、貓、大鼠、小鼠、鳥、雞、爬行動物、魚、昆蟲及蜘蛛。

「哺乳動物」涵蓋通常處於醫學護理下之溫血哺乳動物(例如，人類及家養動物)。實例包含貓、犬、馬、牛、及

人類、以及僅指人類。

「治療(treating或treatment)」涵蓋對哺乳動物之疾病狀態之治療，且包含：(a)在哺乳動物中、特定而言在該哺乳動物易患有疾病狀態但尚未被診斷出患有該疾病狀態時預防該疾病狀態發生；(b)抑制疾病狀態，例如阻止其發展；及/或(c)減緩疾病狀態，例如使疾病狀態減退直至達到期望端點為止。治療亦包含改善疾病症狀(例如，減輕疼痛或不適)，其中該改善可直接影響或可能並不直接影響疾病(例如，起因、傳染、表現等)。

本文所用之「癌症」係指在哺乳動物中發現之所有類型癌症或贅瘤或惡性腫瘤，其包含但不限于：白血病、淋巴瘤、黑素瘤、癌及肉瘤。癌症自身表現為包括癌症之惡性細胞之「腫瘤」或組織。腫瘤之實例包含肉瘤及癌，例如但不限于：纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管內皮肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤因氏腫瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、結腸癌、胰腺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、囊腺癌、髓樣癌、枝氣管原癌、腎細胞癌、肝細胞瘤、膽管癌、絨毛膜癌、精原細胞瘤、胚胎性癌、維爾姆斯氏腫瘤(Wilms' tumor)、宮頸癌、睪丸腫瘤、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、膠質瘤、星形細胞瘤、髓母細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽

神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、黑素瘤、神經母細胞瘤及視網膜母細胞瘤。可藉由本發明所揭示組合物治療之其他癌症包含但不限於(例如)霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、非霍奇金氏淋巴瘤(Non-Hodgkin's Lymphoma)、多發性骨髓瘤、神經母細胞瘤、乳癌、卵巢癌、肺癌、橫紋肌肉瘤、原發性血小板增多症、原發性巨球蛋白血症、小細胞肺腫瘤、原發性腦腫瘤、胃癌、結腸癌、惡性胰腺胰島素瘤、惡性類癌、膀胱癌、胃癌、惡化前皮膚損傷、睪丸癌、淋巴瘤、甲狀腺癌、神經母細胞瘤、食管癌、泌尿生殖道癌症、惡性高鈣血症、宮頸癌、子宮內膜癌症、腎上腺皮質癌症及前列腺癌。

本文所用之「神經疾病或病症」係指神經系統及/或視覺系統之任一疾病或病症。「神經疾病或病症」包含涉及中樞神經系統(腦、腦幹及小腦)、周邊神經系統(包含顱神經)、及自主神經系統(位於中樞及周邊神經系統二者中之部分)之疾病或病症。神經疾病或病症包含但不限於後天性癲癇失語症；急性播散性腦脊髓炎；腎上腺腦白質營養不良；老年性黃斑退化症；胼胝體發育不全；失認症；艾卡迪症候群(Aicardi syndrome)；亞歷山大病(Alexander disease)；阿爾珀斯病(Alpers' disease)；交叉性肢體癱瘓；阿爾茨海默氏病(Alzheimer's disease)；血管性癡呆；肌萎縮側索硬化；無腦畸形；天使症候群(Angelman syndrome)；血管瘤病；缺氧症；失語症；失用症；蛛網膜囊腫；蛛網膜炎；阿-蔡二氏畸形(Arnold-Chiari

malformation)；動靜脈畸形；阿斯佩格症候群(Asperger syndrome)；運動失調性毛細血管擴張症；注意力缺陷伴多動病症；自閉症；自主神經功能障礙；背痛；巴登氏病(Batten disease)；貝切特氏病(Behcet's disease)；貝爾麻痺(Bell's palsy)；良性本質瞼痙攣；良性局部肌萎縮；良性顱內高壓；賓斯旺格病(Binswanger's disease)；眼瞼痙攣；布洛克-蘇茲貝克症候群(Bloch Sulzberger syndrome)；臂叢神經損傷；腦膿腫；腦損傷；腦腫瘤(包含多形性膠質母細胞瘤)；脊髓腫瘤；布朗-塞卡爾症候群(Brown-Sequard syndrome)；卡納萬病(Canavan disease)；腕道症候群；灼性神經痛；中樞性疼痛症候群；腦橋中央髓鞘溶解；頭部病症；腦動脈瘤；腦動脈硬化症；大腦萎縮；大腦性巨人症；大腦性麻痺；夏-馬-圖三氏病(Charcot-Marie-Tooth disease)；化學療法誘導性神經病變及神經性疼痛；恰裏畸形(Chiari malformation)；舞蹈病；慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經病變；慢性疼痛；慢性區域性疼痛症候群；科-勒二氏症候群(Coffin Lowry syndrome)；昏迷，包含持續性植物人狀態；先天性面癱；皮質基底退化；顱動脈炎；顱縫早閉；克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)；積累性創傷病症；庫興氏症候群(Cushing's syndrome)；巨細胞包涵體病；巨細胞病毒感染；舞蹈眼-舞蹈足症候群；丹-沃二氏症候群(Dandy Walker syndrome)；道森病(Dawson disease)；德摩西埃症候群(De Morsier's syndrome)；克隆普克-克隆普克

症候群(Dejerine-Klumke palsy)；癡呆；皮膚炎；糖尿病
 神經病變；彌漫性硬化；自主神經機能異常；書寫困難；
 誦讀困難；張力失常；早期幼兒癲癇性腦病；空蝶鞍症候
 群；腦炎；腦疝；腦三叉神經血管瘤病；癲癇症；歐勃麻
 痹(Erb's palsy)；特發性震顫；法布裏病(Fabry's
 disease)；法爾症候群(Fahr's syndrome)；昏厥；家族性痙
 攣性癱瘓；發熱性驚厥；菲希爾症候群(Fisher
 syndrome)；弗裏德賴希共濟失調症(Friedreich's ataxia)；
 額顳骨癡呆症及其他「tau病變」；高歇氏病(Gaucher's
 disease)；格斯特曼症候群(Gerstmann's syndrome)；巨細
 胞動脈炎；巨細胞性包涵體病；球樣細胞腦白質營養不
 良；格-巴二氏症候群(Guillain-Barre syndrome)；HTLV-1
 有關脊髓病；哈-斯二氏病(Hallervorden-Spatz disease)；
 頭部損傷；頭痛；半面痙攣；遺傳性痙攣性截癱；遺傳病
 性多神經炎樣共濟失調；耳部帶狀皰疹；帶狀皰疹；平山
 症候群(Hirayama syndrome)；HIV有關癡呆及神經病變(以
 及AIDS之神經表現)；前腦無裂畸形；亨廷頓病
 (Huntington's disease)及其他聚麩胺醯胺重複疾病；積水
 性無腦畸形；腦積水；皮質醇增多症；缺氧；免疫介導性
 腦脊髓炎；包涵體肌炎；色素失調症；嬰兒植烷酸貯積
 病；嬰兒雷弗蘇姆病(infantile refsum disease)；嬰兒痙
 攣；炎性肌病；顱內囊腫；顱內高壓；朱伯特症候群
 (Joubert syndrome)；科姆斯-塞爾症候群(Keams-Sayre
 syndrome)；肯尼迪氏病(Kennedy disease)；金斯布林納症

候群(Kinsboume syndrome)；克-費二氏症候群(Klippel Feil syndrome)；克拉伯病(Krabbe disease)；庫格爾貝格-韋蘭德病(Kugelberg-Welander disease)；庫魯病(kuru)；拉福拉病(Lafora disease)；朗-愛二氏肌無力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)；蘭達-克萊夫納症候群(Landau-Kleffner syndrome)；延髓外側(瓦倫貝克(Wallenberg))症候群；學習失能；利氏病(Leigh's disease)；倫諾克斯-加斯托症候群(Lennox-Gustaut syndrome)；萊-蔡二氏症候群(Lesch-Nyhan syndrome)；腦白質營養不良症；路易體癡呆(Lewy body dementia)；無腦回；閉鎖症候群；盧-格裏格病(Lou Gehrig's disease)(亦即，運動神經元病或肌萎縮側索硬化)；腰椎間盤病；萊姆病(Lyme disease)－神經後遺症；馬-約病(Machado-Joseph disease)；腦肥大；巨腦；邁-羅二氏症候群(Melkersson-Rosenthal syndrome)；美尼爾症(Menieres disease)；髓膜炎；門克斯病(Menkes disease)；異染性腦白質營養不良；小頭畸型；偏頭痛；米勒·費希爾症候群(Miller Fisher syndrome)；小中風；粒線體肌病；默比烏斯症候群(Mobius syndrome)；單肢肌萎縮；運動神經元病；腦底異常血管網病；黏多糖累積病；多發梗塞性癡呆；多灶性運動神經病變；多發性硬化及其他去髓鞘病症；具有位置性低血壓之多系統萎縮；肌營養不良症；重症肌無力；去髓鞘彌漫性硬化；嬰兒肌陣攣性腦病；肌陣攣；肌病；肌強直；嗜眠症；神經纖維瘤病；神經阻滯劑

惡性症候群；AIDS之神經表現；狼瘡之神經後遺症；神經性肌強直；神經元臘樣脂褐質症；腦神經元移行異常；尼曼皮克病(Niemann-Pick disease)；奧沙利文-麥克勞德病症(O'Sullivan-McLeod syndrome)；枕部神經痛；隱性脊柱神經管閉合不全序列徵；大田原症候群(Ohtahara syndrome)；橄欖體腦橋小腦萎縮；斜視性眼陣攣；視神經炎；直立性低血壓；過度使用症候群；感覺異常；神經退化性疾病或病症(帕金森氏病(Parkinson's disease)、亨廷頓病、阿爾茨海默氏病、肌萎縮側索硬化(ALS)、癡呆、多發性硬化及與神經元細胞死亡有關之其他疾病及病症)；先天性副肌強直症；副腫瘤性疾病；陣發性發作；帕-羅二氏症候群(Parry Romberg syndrome)；佩-梅二氏病(Pelizaeus-Merzbacher disease)；週期性癱瘓；周邊神經病變；疼痛性神經病變及神經性疼痛；持續性植物人狀態；全身性發育遲緩；旋光性噴嚏反射；植烷酸貯積病；匹克病(Pick's disease)；神經挾捏；垂體瘤；多肌炎；腦穿通畸形；小兒麻痺症後期症候群；帶狀皰疹後神經痛；感染後腦脊髓炎；體位性低血壓；帕-魏二氏症候群(Prader-Willi syndrome)；原發性側索硬化症,；朊病毒病；進行性一側面萎縮；進行性多灶性白質腦病；進行性硬化性灰質萎縮；進行性核上麻痺；假腦瘤；拉姆齊-亨特症候群(Ramsay-Hunt syndrome)(I及II型)；羅斯默森氏腦炎(Rasmussen's encephalitis)；反射性交感神經營養不良症候群；雷夫敘姆病(Refsum disease)；重複性運動病症；重複

性壓迫損傷；不寧腿症候群；反轉錄病毒相關性脊髓病；
 蕾特氏症候群(Rett syndrome)；雷依氏症候群(Reye's syndrome)；舞蹈病(Saint Vitus dance)；山德霍夫氏病(Sandhoff disease)；謝耳德病(Schilder's disease)；腦裂；
 透明隔-視神經發育不良；驚嚇嬰兒症候群；帶狀皰疹；
 夏伊-德雷格症候群(Shy-Drager syndrome)；薛格連氏症候群(Sjogren's syndrome)；睡眠呼吸暫停；索托斯症候群(Soto's syndrome)；痙攣狀態；脊柱裂；脊髓損傷；脊髓腫瘤；
 脊髓性肌萎縮；僵人症候群(Stiff-Person syndrome)；中風；斯特奇-韋伯二氏症候群(Sturge-Weber syndrome)；亞急性硬化性全腦炎；皮層下動脈硬化性腦病；
 西德納姆舞蹈病(Sydenham chorea)；暈厥；脊髓空洞症；遲發性運動障礙；泰-薩克斯病(Tay-Sachs disease)；顳動脈炎；
 脊髓牽扯症候群；湯姆森病(Thomsen disease)；胸廓出口症候群；三叉神經痛症(Tic Douloureux)；託德氏麻痺(Todd's paralysis)；多動穢語症候群；
 短暫性腦缺血發作；傳播性海綿狀腦病；橫貫性脊髓炎；外傷性腦損傷；顫抖；三叉神經痛；熱帶痙攣性輕截癱；
 結節性硬化症；血管性癡呆(多發梗塞性癡呆)；血管炎，包含顳動脈炎；希林二氏病(Von Hippel-Lindau disease)；瓦倫伯格氏症候群(Wallenberg's syndrome)；韋德尼希-霍夫曼病(Werdnig-Hoffman disease)；韋斯特病(West syndrome)；
 頸椎戳傷；威廉斯症候群(Williams syndrome)；威爾森氏病(Wildon's disease)；及澤韋格症候

群(Zellweger syndrome)。

「增殖性疾病或病症」包含但不限於涉及以下細胞之造血腫瘤性病變：源於骨髓樣、淋巴樣或紅血球譜系之造血源的增生性/腫瘤性細胞、或其前體細胞。該等疾病包含但不限於成紅細胞白血病、急性前骨髓性白血病(APML)、慢性髓性白血病(CML)、淋巴樣惡性腫瘤(包含但不限於急性成淋巴細胞性白血病(ALL)，其包含B-譜系ALL及T-譜系ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、幼淋巴細胞白血病(PLL)、多毛細胞白血病(HLL)及沃爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia) (WM)。惡性淋巴瘤之其他形式包含但不限於非霍奇金氏淋巴瘤及其變體、周邊T細胞淋巴瘤、成人T細胞白血病/淋巴瘤(ATL)、皮膚T細胞淋巴瘤(CTCL)、巨粒淋巴細胞白血病(LGL)、霍奇金氏病及裏德-斯藤伯格病(Reed-Sternberg disease)。

「發炎」係指全身性發炎病狀及局部與單核細胞、白血球及/或嗜中性球遷移及吸引有關之病狀。發炎之實例包含但不限於因感染病原性有機體(包含格蘭氏(gram)陽性細菌、格蘭氏陰性細菌、病毒、真菌、及諸如原生動物及蠕蟲等寄生蟲)、移植排斥(包含實體器官(例如，腎、肝、心臟、肺或角膜)之排斥、以及骨髓移植(包含移植物抗宿主疾病(GVHD))之排斥)、或局部慢性或急性自體免疫或過敏反應引起之發炎。自體免疫性疾病包含腎小球腎炎；類風濕性或反應性關節炎；慢性腎小球腎炎；發炎性腸病，例

如克隆氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎及壞死性小腸結腸炎；肝炎；敗血症；酒精性肝病；非酒精性脂肪變性；顆粒球輸注有關之症候群；發炎性皮膚，例如，接觸性皮炎、異位性皮炎、牛皮癬；全身性紅斑狼瘡(SLE)、自體免疫性甲狀腺炎、多發性硬化、及一些形式之糖尿病、或由個體之自身免疫系統攻擊產生病變組織損壞的任一其他自體免疫性狀態。過敏反應包含過敏性哮喘、慢性支氣管炎、急性及遲發性過敏。全身性發炎疾病狀態包含與創傷、燒傷、再灌注後缺血性事件(例如心臟、腦、腸或外周血管中之血栓形成性事件，包含心肌梗塞及中風)、敗血症、ARDS或多器官功能障礙症候群有關之發炎。發炎性細胞募集亦發生在動脈粥樣硬化斑塊中。發炎包含但不限於非霍奇金氏淋巴瘤、韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、肝細胞癌、胸腺萎縮、慢性胰腺炎、類風濕性關節炎、反應性淋巴增生、骨關節炎、潰瘍性結腸炎、乳頭狀癌、克隆氏病、潰瘍性結腸炎、急性膽囊炎、慢性膽囊炎、硬化、慢性涎腺炎、腹膜炎、急性胰腺炎、慢性胰腺炎、慢性胃炎、子宮肌腺症、子宮內膜異位、急性宮頸炎、慢性宮頸炎、淋巴增生、多發性硬化、急性特發性血小板減少紫癜繼發性肥大、原發性IgA腎病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、肺氣腫、慢性腎盂腎炎及慢性膀胱炎。

聚核苷酸及寡核苷酸組合物及分子

靶：在一個實施例中，靶包括BCL2結合部分3(BBC3)之

核酸序列，包含(不限於)與BBC3有關之正義及/或反義非編碼及/或編碼序列。

BCL2結合部分3(BBC3)或PUMA最初識別為DNA損傷後誘導之p53調控基因。隨後發現Puma負責許多p53誘導之促細胞凋亡效應，但Puma亦可以p53非依賴方式引起細胞凋亡。將Puma指定為敏感劑或活化劑一直有些爭議。唯BH3蛋白之BH3結構域係必需的且足以與Bcl-2家族成員相互作用且看似在很大程度上重現完整蛋白之功能。舉例而言，Bid及Bim之BH3結構域可活化脂質體或粒線體中之Bax及Bak。在若干研究中，Puma BH3結構域無此功能，導致許多人將Puma歸類為敏感劑。然而，利用在活體外轉譯之全長蛋白的實驗顯示與Bim及Bid相當之活化Bax之能力。

傳統上將Puma視為細胞死亡之p53誘導型調節劑，但其亦在p53非依賴性細胞死亡途徑、例如彼等由生長因子缺失或利用糖皮質激素治療誘導者中起關鍵作用。Puma之促細胞凋亡作用機制歸因於其以高親和力結合且因此抑制所有抗細胞凋亡Bcl-2家族成員(包含Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w、Mcl-1及A1)的能力。亦已報導Puma可藉由直接結合至Bax來活化內在細胞凋亡途徑。

在一實施例中，使用反義寡核苷酸來預防或治療與BBC3家族成員有關之疾病或病症。實例性BCL2結合部分3(BBC3)調介之疾病及病症(其可用自使用反義化合物獲得之幹細胞再生之細胞/組織治療)包括：與BBC3之異常功能及/或表現有關之疾病或病症、癌症、增殖性疾病或病

症、與細胞增殖有關或特徵在於細胞增殖之疾病或病狀、與BBC3之突變或異常表現或功能有關之疾病或病症、神經疾病或病症、發炎、以發炎關節成為病變之一部分的病狀(例如,骨關節炎、關節炎、牛皮癬性關節炎、幼年型關節炎、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)、與潰瘍性結腸炎有關之關節炎、惠伯爾病(Whipple's disease)、與肉芽腫回腸結腸炎有關之關節炎、貝切特氏病(Behcet's disease)、全身性紅斑狼瘡、乾燥症候群(Sjogren's syndrome)及混合型結締組織病等)、與粒線體細胞凋亡途徑損傷有關之疾病或病症、自體免疫性疾病或病症及與神經元細胞死亡有關之疾病或病症、衰老或特徵在於不期望細胞損失之其他病狀。

在本發明實施例中,為需要皮膚治療或處於發生可需要皮膚治療之病狀風險的個體提供治療及或美容方案及相關個性化治療。可基於(例如)個體之BBC3狀態進行診斷。患者給定組織(例如皮膚)中之BBC3表現量可藉由彼等熟習此項技術者已知且在本文中別處闡述之方法,例如藉由使用PCR或抗體基檢測方法分析組織來測定。

在一實施例中,對有需要之患者實施藉由一或多種反義寡核苷酸來調節BBC3,以預防或治療與BBC3異常表現、功能、活性(與正常對照組相比)相關的任一疾病或病症。

在一實施例中,寡核苷酸對BBC3之聚核苷酸具有特異性,其包含(不限於)非編碼區域。BBC3靶包括BBC3之變體;BBC3之突變體,包含SNP;BBC3之非編碼序列;等

位基因、片段及諸如此類。較佳地，寡核苷酸係反義RNA分子。

根據本發明實施例，靶核酸分子並不僅限於BBC3聚核苷酸而是擴展至BBC3之任一同種型、受體、同系物、非編碼區域及諸如此類。

在一實施例中，寡核苷酸靶向BBC3靶之天然反義序列(編碼及非編碼區域之天然序列)，其包含(不限於)其變體、等位基因、同系物、突變體、衍生物、片段及互補序列。較佳地，寡核苷酸係反義RNA或DNA分子。

在一實施例中，本發明之寡聚化合物亦包含在該化合物中之一或多個核苷酸位置存在不同鹼基的變體。舉例而言，若第一核苷酸係腺嘌呤，則可產生在此位置含有胸苷、鳥苷、胞苷或其他天然或非天然核苷酸之變體。此可發生於反義化合物之任一位置。然後使用本文所述方法測試該等化合物以測定其抑制靶核酸表現之能力。

在一些實施例中，反義化合物與靶之間之同源性、序列一致性或互補性為約50%至約60%。在一些實施例中，同源性、序列一致性或互補性為約60%至約70%。在一些實施例中，同源性、序列一致性或互補性為約70%至約80%。在一些實施例中，同源性、序列一致性或互補性為約80%至約90%。在一些實施例中，同源性、序列一致性或互補性為約90%、約92%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%。

在以下情形時反義化合物可特異性雜交：化合物與靶核

酸之結合可干擾靶核酸之正常功能而導致活性損失，且存在足夠互補性程度以避免反義化合物與非靶核酸序列在期望發生特異性結合之條件下發生非特異性結合。該等條件包含(亦即)活體內分析或治療性治療情形下之生理條件、及在活體外分析情形下實施分析之條件。

在以下情形下反義化合物(不論係DNA、RNA、嵌合化合物、或經取代化合物等)可特異性雜交：該化合物與靶DNA或RNA分子之結合可干擾靶DNA或RNA之正常功能而導致實用性損失，且存在足夠互補性程度以避免反義化合物與非靶序列在期望發生特異性結合之條件下(亦即，在活體內分析或治療性治療情形下之生理條件下，或在活體外分析情形下實施分析之條件下)發生非特異性結合。

在一實施例中，靶向BBC3(包含(不限於)使用(例如)PCR、雜交等鑑別及擴展之反義序列、闡述為SEQ ID NO: 2之序列之一或多者及諸如此類)可調節BBC3之表現或功能。在一個實施例中，與對照組相比上調表現或功能。在一實施例中，與對照組相比下調表現或功能。

在一實施例中，寡核苷酸包括闡述為SEQ ID NO: 3至8之核酸序列，包含使用(例如)PCR、雜交等鑑別及擴展之反義序列。該等寡核苷酸可包括一或多個經修飾核苷酸、較短或較長片段、經修飾鍵及諸如此類。經修飾鍵或核苷酸間鍵聯之實例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或諸如此類。在一實施例中，核苷酸包括磷衍生物。可附接至本發明經修飾寡核苷酸中之糖或糖類似物部分之磷衍生物(或

經修飾磷酸酯基團)可為單磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、磷酸烷基酯、烷磷酸酯、硫代磷酸酯及諸如此類。上述磷酸酯類似物之製備、及其在核苷酸、經修飾核苷酸及寡核苷酸中之納入本身亦已知且無需闡述於本文中。

彼等熟習此項技術者亦在治療應用中利用反義寡核苷酸之特異性及敏感性。採用反義寡核苷酸作為治療部分來治療動物及人類之疾病狀態。反義寡核苷酸已安全且有效地投與人類且當前正實施許多臨床試驗。由此確定，寡核苷酸可為可經設置用於治療細胞、組織及動物(尤其人類)之治療方案中的有用治療方式。

在本發明實施例中，寡聚反義化合物、尤其寡核苷酸會結合至靶核酸分子並調節由靶基因編碼之分子的表現及/或功能。擬干擾之DNA功能包括(例如)複製及轉錄。擬干擾之RNA功能包括所有重要功能，例如，RNA至蛋白質轉譯位點之易位、蛋白質自RNA之轉譯、使RNA產生一或多種mRNA物質之剪接、及RNA可參與或促進之催化活性。可端視期望功能來上調或抑制功能。

反義化合物包含反義寡聚化合物、反義寡核苷酸、外部引導序列(EGS)寡核苷酸、交替剪接體、引物、探針及與靶核酸之至少一部分雜交的其他寡聚化合物。因此，該等化合物可以單鏈、雙鏈、部分單鏈或環狀寡聚化合物形式引入。

在本發明之上下文中，反義化合物至特定核酸分子之靶向可為多步過程。該過程通常始於鑑別欲調節功能之靶核

酸。舉例而言，此靶核酸可為表現與特定病症或疾病狀態有關之細胞基因(或自該基因轉錄之mRNA)或來自傳染原之核酸分子。在本發明中，靶核酸編碼BCL2結合部分3(BBC3)。

靶向過程通常亦包含測定靶核酸內發生反義相互作用從而產生期望效應(例如，調節表現)的至少一個靶區域、區段或位點。在本發明之上下文中，術語「區域」定義為靶核酸中具有至少一種可鑑別結構、功能或特性的一部分。靶核酸之區域內具有區段。「區段」定義為靶核酸內區域之較小或子部分。本發明所用之「位點」定義為靶核酸內之位置。

在一實施例中，反義寡核苷酸結合至BCL2結合部分3(BBC3)之天然反義序列並調節BBC3 (SEQ ID NO: 1)之表現及/或功能。反義序列之實例包含EQ ID NO: 2至8。

在一實施例中，反義寡核苷酸結合至BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之一或多個區段並調節BBC3之表現及/或功能。區段包括BBC3正義或反義聚核苷酸之至少5個連續核苷酸。

在一實施例中，反義寡核苷酸對BBC3之天然反義序列具有特異性，其中寡核苷酸與BBC3之天然反義序列之結合可調節BBC3的表現及/或功能。

在一實施例中，寡核苷酸化合物包括闡述為SEQ ID NO: 3至8之序列、使用(例如)PCR、雜交等鑑別及擴展之反義序列。該等寡核苷酸可包括一或多個經修飾核苷酸、較短

或較長片段、經修飾鍵及諸如此類。經修飾鍵或核苷酸間鍵聯之實例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或諸如此類。在一實施例中，核苷酸包括磷衍生物。可附接至本發明經修飾寡核苷酸中之糖或糖類似物部分之磷衍生物(或經修飾磷酸酯基團)可為單磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、磷酸烷基酯、烷磷酸酯、硫代磷酸酯及諸如此類。上述磷酸酯類似物之製備、及其在核苷酸、經修飾核苷酸及寡核苷酸中之納入本身亦已知且無需闡述於本文中。

如業內已知，因轉譯起動密碼子通常係5'-AUG(在轉錄mRNA分子中；在相應DNA分子中係5'-ATG)，轉譯起動密碼子亦稱為「AUG密碼子」、「起始密碼子」或「AUG起始密碼子」。少數基因具有轉譯起動密碼子，其具有RNA序列5'-GUG、5'-UUG或5'-CUG；且已顯示5'-AUA、5'-ACG及5'-CUG可在活體內發揮作用。因此，即使起動胺基酸在每一情形中通常係甲硫胺酸(在真核生物中)或甲醯甲硫胺酸(在原核生物中)，術語「轉譯起動密碼子」及「起始密碼子」亦可涵蓋多種密碼子序列。真核生物及原核生物基因可具有兩個或更多個替代性起始密碼子，其中之任一者可優先用於在特定細胞類型或組織中或在特定條件組下之轉譯起動。在本發明之上下文中，「起始密碼子」及「轉譯起動密碼子」係指用於在活體內起動自編碼BCL2結合部分3(BBC3)之基因轉錄之mRNA之轉譯的一或多個密碼子，不管該等密碼子之序列如何。基因之轉譯終止密碼子(或「停止密碼子」)可具有三種序列(亦即，5'-UAA、5'-

UAG及5'-UGA，相應DNA序列分別係5'-TAA、5'-TAG及5'-TGA)中之一者。

術語「起始密碼子區域」及「轉譯起動密碼子區域」係指此一mRNA或基因中在來自轉譯起動密碼子之任一方向(亦即，5'或3')上涵蓋約25至約50個鄰近核苷酸的一部分。類似地，術語「停止密碼子區域」及「轉譯終止密碼子區域」係指此一mRNA或基因中在來自轉譯終止密碼子之任一方向(亦即，5'或3')上涵蓋約25至約50個鄰近核苷酸的一部分。因此，「起始密碼子區域」(或「轉譯起動密碼子區域」)及「停止密碼子區域」(或「轉譯終止密碼子區域」)係本發明反義化合物可有效靶向之所有區域。

業內已知之開放讀碼框(ORF)或「編碼區域」係指轉譯起動密碼子與轉譯終止密碼子之間之區域，其亦係可有效靶向之區域。在本發明之上下文中，靶向區域係涵蓋基因之開放讀碼框(ORF)之轉譯起動或終止密碼子的基因內區域。

另一靶區域包含業內已知之5'非轉譯區域(5'UTR)，其係指在來自轉譯起動密碼子之5'方向上之mRNA部分，且由此包含mRNA之5'加帽位點與轉譯起動密碼子間之核苷酸(或基因上之相應核苷酸)。另一靶區域包含業內已知之3'非轉譯區域(3'UTR)，其係指在來自轉譯終止密碼子之3'方向上之mRNA部分，且由此包含mRNA之轉譯終止密碼子與3'端間之核苷酸(或基因上之相應核苷酸)。mRNA之5'加帽位點包括經由5'-5'三磷酸酯鍵聯接合至mRNA之5'-最殘

基之N7-甲基化鳥苷殘基。mRNA之5'加帽區域視為包含5'加帽結構本身以及與加帽位點相鄰之前50個核苷酸。本發明之另一靶區域係5'加帽區域。

儘管一些真核生物mRNA轉錄物可直接轉譯，但許多真核生物mRNA轉錄物含有一或多個在轉譯之前自轉錄物切割且稱為「內含子」的區域。剩餘(且由此轉譯)區域稱為「外顯子」且一起剪接以形成連續mRNA序列。在一個實施例中，靶向剪接位點(亦即，內含子-外顯子結點或外顯子-內含子結點)尤其可用於異常剪接與疾病有關、或特定剪接產物之過度產生與疾病有關之情形中。因重排或缺失產生之異常融合結點係靶位點之另一實施例。經由自不同基因源剪接兩個(或更多)mRNA之過程產生之mRNA轉錄物稱為「融合轉錄物」。可使用靶向(例如)DNA或mRNA前體之反義化合物來有效靶向內含子。

在一實施例中，反義寡核苷酸結合至靶聚核苷酸之編碼及/或非編碼區域並調節靶分子之表現及/或功能。

在一實施例中，反義寡核苷酸結合至天然反義聚核苷酸並調節靶分子之表現及/或功能。

在一實施例中，反義寡核苷酸結合至正義聚核苷酸並調節靶分子之表現及/或功能。

替代性RNA轉錄物可自DNA之相同基因組區域產生。該等替代性轉錄物通稱為「變體」。更特定而言，「mRNA前體變體」係自相同基因組DNA產生之轉錄物，其與自相同基因組DNA產生之其他轉錄物在起始或停止位置方面有所

不同且含有內含子及外顯子序列。

在剪接期間切割一或多個外顯子或內含子區域、或其部分時，mRNA前體變體會產生較小「mRNA變體」。因此，mRNA變體係經處理之mRNA前體變體且每一唯一mRNA前體變體必須始終藉由剪接而產生唯一mRNA變體。該等mRNA變體亦稱為「交替剪接變體」。若mRNA前體變體未發生剪接，則mRNA前體變體與mRNA變體相同。

變體可經由使用起始或停止轉錄之交替信號來產生。mRNA前體及mRNA可具有一個以上之起始密碼子或停止密碼子。源自使用替代性起始密碼子之mRNA前體或mRNA的變體稱為mRNA前體或mRNA之「替代性起始變體」。彼等使用替代性停止密碼子之轉錄物稱為mRNA前體或mRNA之「替代性停止變體」。替代性停止變體之一種具體類型係「polyA變體」，其中所產生之多個轉錄物源自轉錄機對於「polyA停止信號」中之一者之替代性選擇，由此產生在唯一polyA位點終止之轉錄物。在本發明之上下文中，本文所述變體之類型亦係靶核酸之實施例。

靶核酸上與反義化合物雜交之位置定義為至少靶區域中由活性反義化合物靶向之長5個核苷酸的部分。

儘管本文中闡述了某些實例性靶區段之特異性序列，但熟習此項技術者應認識到，該等序列用於闡釋及闡述本發明範疇內之特定實施例。熟習此項技術者根據本揭示內容可容易地鑑別其他靶區段。

人們認為長度為5至100個核苷酸且包括一段至少五(5)

個選自較佳闡釋性靶區段之連續核苷酸之靶區段亦適於靶向。

靶區段可包含DNA或RNA序列，其包括至少5個來自較佳闡釋性靶區段中之一者之5'-末端之連續核苷酸(剩餘核苷酸係同一DNA或RNA中之連續的一段，其緊接靶區段之5'-末端上游開始並持續至該DNA或RNA含有約5至約100個核苷酸為止)。類似地，較佳靶區段表示為DNA或RNA序列，其包括至少5個來自較佳闡釋性靶區段中之一者之3'-末端之連續核苷酸(剩餘核苷酸係同一DNA或RNA中之連續的一段，其緊接靶區段之3'-末端下游開始並持續至該DNA或RNA含有約5至約100個核苷酸為止)。瞭解本文所示靶區段之熟習此項技術者無需過多實驗即能鑑別其他較佳靶區段。

鑑別一或多個靶區域、區段或位點後，即可選擇與靶充分互補(亦即雜交足夠充分且具有足夠特異性)之反義化合物以得到期望效應。

在本發明實施例中，寡核苷酸結合至特定靶之反義鏈。寡核苷酸之長度為至少5個核苷酸且可經合成以使每一寡核苷酸皆靶向重疊序列，從而寡核苷酸經合成以覆蓋靶聚核苷酸之整個長度。靶亦包含編碼以及非編碼區域。

在一個實施例中，反義寡核苷酸較佳靶向特異性核酸。反義化合物至特定核酸之靶向係多步過程。該過程通常始於鑑別欲調節功能之核酸序列。此可(例如)係表現與特定病症或疾病狀態有關之細胞基因(或自基因轉錄之

mRNA)、或非編碼聚核苷酸(例如,非編碼RNA(ncRNA))。

RNA可分類為(1)信使RNA(mRNA),其轉譯成蛋白質;及(2)非蛋白編碼性RNA(ncRNA)。ncRNA包括微小RNA、反義轉錄物及含有高密度停止密碼子且缺乏任一廣泛性(extensive)「開放讀碼框」的其他轉錄單元(TU)。許多ncRNA似乎始於編碼蛋白質之基因座之3'非轉譯區域(3'UTR)中之起動位點。ncRNA通常較罕見且FANTOM聯盟已測序之ncRNA中至少一半似乎未經聚腺苷酸化。大部分研究者出於明顯原因而著重關注經處理並輸出至細胞質中之聚腺苷酸化mRNA。最近,顯示非聚腺苷酸化核RNA之組可能極大,且許多該等轉錄物源自所謂的基因間區域。ncRNA可調控基因表現之機制係與靶轉錄物之鹼基配對。藉由鹼基配對發揮作用之RNA可分組為:(1)順式編碼之RNA,其在其發揮作用之相同遺傳位置、但在RNA之相對鏈處編碼且由此顯示與其靶之完全互補性;及(2)反式編碼之RNA,其在與其發揮作用之RNA不同的染色體位置處編碼且通常並不顯示與其靶之完全鹼基配對潛力。

不期望受限於理論下,本文所述反義寡核苷酸對反義聚核苷酸之干擾可改變相應正義信使RNA之表現。然而,此調控可為不協調(反義擊弱(knockdown)造成信使RNA增加)或協調(反義擊弱造成伴隨信使RNA減少)。在該等情形下,反義寡核苷酸可靶向反義轉錄物之重疊或非重疊部分,以產生擊弱或隔絕(sequestration)。可以相同方式靶向

編碼以及非編碼反義轉錄物，且任一種類皆能以協調或不協調方式調控相應正義轉錄物。用於鑑別針對標靶之新寡核苷酸的策略可基於藉由反義寡核苷酸來擊弱反義RNA轉錄物或調節所計畫標靶的任一其他方式。

策略1：在不協調調控之情形下，擊弱反義轉錄物會增加習用(正義)基因之表現。若後一基因編碼已知或假定藥物靶，則可設想擊弱其反義對等部分來模擬受體激動劑或酶刺激物之作用。

策略2：在協調調控之情形下，可同時擊弱反義及正義轉錄物且由此協同降低習用(正義)基因表現。舉例而言，若使用反義寡核苷酸來達成擊弱，則可使用此策略來應用一種靶向正義轉錄物之反義寡核苷酸及靶向相應反義轉錄物之另一反義寡核苷酸、或同時靶向重疊正義及反義轉錄物之單一能量對稱性反義寡核苷酸。

根據本發明，反義化合物包含反義寡核苷酸、核酶、外部引導序列(EGS)寡核苷酸、siRNA化合物、單-或雙鏈RNA干擾(RNAi)化合物(例如siRNA化合物)、及與靶核酸之至少一部分雜交並調節其功能之其他寡聚化合物。因此，其可為DNA、RNA、類DNA、類RNA、或其混合物，或可為該等物質中一或多者之模擬物。該等化合物可為單鏈、雙鏈、環狀或髮夾型寡聚化合物，且可含有諸如內部或末端膨脹、失配或環路等結構要素。反義化合物通常製成直鏈形式，但可經接合或以其他方式製成環狀及/或具支鏈形式。反義化合物可包括諸如以下構成物：經雜交以

形成完全或部分雙鏈化合物之兩條鏈，或具有足夠自體互補性以進行雜交並形成完全或部分雙鏈化合物之單鏈。兩條鏈可在內部連接以產生游離3'或5'末端或可連接形成連續髮夾結構或環路。髮夾結構可在5'或3'末端含有懸垂部分以延長單鏈特徵。雙鏈化合物視需要可在末端包含懸垂部分。其他修飾可包含附接至一個末端、所選核苷酸位置、糖位置或附接至一個核苷間鍵聯之偶聯基團。另一選擇為，兩條鏈可經由非核酸部分或連接體基團進行連接。當僅由一條鏈形成時，dsRNA可呈自體互補髮夾型分子形式，其自身對折以形成雙鏈體。因此，dsRNA可為完全或部分雙鏈。可藉由在轉基因細胞系中穩定表現dsRNA髮夾來特異性調節基因表現，然而，在一些實施例中，基因表現或功能經上調。在自兩條鏈、或呈自體互補髮夾型分子形式(自身對折以形成雙鏈體)之單鏈形成時，兩條鏈(或單鏈中形成雙鏈體之區域)係以Watson-Crick方式鹼基配對之互補RNA鏈。

引入系統中之後，本發明化合物可引發一或多種酶或結構蛋白質之作用以實現靶核酸之裂解或其他修飾或可經由基於佔據之機制進行作用。一般而言，核酸(包含寡核苷酸)可闡述為「類DNA」(亦即，通常具有一或多個2'-去氧糖及(通常)T而非U鹼基)或「類RNA」(亦即，通常具有一或多個2'-羥基或2'-修飾糖及(通常)U而非T鹼基)。核酸螺旋可採用一種以上之結構類型，最通常係A型及B型。據信，一般而言，具有B型樣結構之寡核苷酸係「類DNA」

且彼等具有A型樣結構者係「類RNA」。在一些(嵌合)實施例中，反義化合物可含有A-及B型區域。

在一實施例中，期望寡核苷酸或反義化合物包括以下中之至少一者：反義RNA、反義DNA、嵌合反義寡核苷酸、包括經修飾鍵聯之反義寡核苷酸、干擾RNA(RNAi)、短干擾RNA (siRNA)；微小干擾RNA (miRNA)；小時序RNA (stRNA)；或短髮夾RNA (shRNA)；小RNA誘導之基因活化(RNAa)；小活化RNA(saRNA)、或其組合。

dsRNA亦可活化基因表現，此機制稱為「小RNA誘導之基因活化」或RNAa。靶向基因啟動子之dsRNA可誘導有關基因之有效轉錄活化。在使用合成dsRNA(稱為「小活化RNA」(saRNA))之人類細胞中顯示RNAa。當前尚未瞭解，在其他有機體中RNAa是否保守。

已發現，小雙鏈RNA (dsRNA)(例如小干擾RNA (siRNA)及微小RNA (miRNA))係稱為RNA干擾(RNAi)之進化保守機制的觸發物。RNAi通常經由重塑染色質以由此阻抑轉錄來引起基因沉默，從而降解互補mRNA、或阻斷蛋白質轉譯。然而，在詳細闡述於下文實例部分之情形下，顯示寡核苷酸可增強BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸及其編碼產物之表現及/或功能。dsRNA亦可用作小活化RNA(saRNA)。不期望受限於理論，藉由靶向基因啟動子中之序列，saRNA可誘導靶基因表現，此現象稱為dsRNA誘導之轉錄活化(RNAa)。

在另一實施例中，本文所鑑別之「較佳靶區段」可用於

篩選調節BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之表現之額外化合物。「調節劑」係彼等如下化合物：可降低或增加編碼BBC3之核酸分子之表現，且至少包括與較佳靶區段互補之5-核苷酸部分。篩選方法包括以下步驟：使編碼BBC3之正義或天然反義聚核苷酸之核酸分子的較佳靶區段與一或多種候選調節劑接觸，及選擇一或多種可降低或增加編碼BBC3聚核苷酸之核酸分子(例如SEQ ID NO: 3至8)之表現的候選調節劑。若顯示一或多種候選調節劑能夠調節(例如降低或增加)編碼BBC3聚核苷酸之核酸分子的表現，則該調節劑可用於BBC3聚核苷酸功能之其他調查性研究，或用作本發明之研究、診斷、或治療藥劑。

靶向天然反義序列較佳地可調節靶基因之功能。例如，BBC3基因(例如，登錄號為NM_001127242)。在一實施例中，靶係BBC3基因之反義聚核苷酸。在一實施例中，反義寡核苷酸靶向BBC3聚核苷酸(例如，登錄號為NM_001127242)之正義及/或天然反義序列、其變體、等位基因、同種型、同系物、突變體、衍生物、片段及互補序列。較佳地，寡核苷酸係反義分子且靶包含反義及/或正義BBC3聚核苷酸之編碼及非編碼區域。

本發明之較佳靶區段亦可與本發明之其相應互補反義化合物組合以形成穩定雙鏈(雙鏈體)寡核苷酸。

業內已顯示，該等雙鏈寡核苷酸部分可調節靶表現並經由反義機制調控轉譯以及RNA處理。另外，雙鏈部分可經受化學修飾。舉例而言，已顯示該等雙鏈部分可藉由雙鏈

體之反義鏈與靶之典型雜交來抑制靶，由此觸發靶之酶降解。

在一實施例中，反義寡核苷酸靶向BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸(例如，登錄號為NM_001127242)、其變體、等位基因、同種型、同系物、突變體、衍生物、片段及互補序列。較佳地，寡核苷酸係反義分子。

根據本發明實施例，靶核酸分子並不僅限於BBC3而是擴展至BBC3分子之任一同種型、受體、同系物及諸如此類。

在一實施例中，寡核苷酸靶向BBC3聚核苷酸之天然反義序列(例如，闡述為SEQ ID NO: 2之聚核苷酸)、及其任一變體、等位基因、同系物、突變體、衍生物、片段及互補序列。將反義寡核苷酸之實例闡述為SEQ ID NO: 3至8。

在一個實施例中，寡核苷酸與BBC3反義分子之核酸序列(包含(不限於)與BBC3聚核苷酸有關之非編碼正義及/或反義序列)互補或結合並調節BBC3分子之表現及/或功能。

在一實施例中，寡核苷酸與BBC3天然反義分子之核酸序列(闡述為SEQ ID NO: 2)互補或結合並調節BBC3分子之表現及/或功能。

在一實施例中，寡核苷酸包括SEQ ID NO: 3至8中至少5個連續核苷酸之序列並調節BBC3分子之表現及/或功能。

聚核苷酸靶包括BBC3(包含其家族成員)、BBC3之變體；BBC3之突變體，包含SNP；BBC3之非編碼序列；

BBC3之等位基因；物種變體、片段及諸如此類。較佳地，寡核苷酸係反義分子。

在一實施例中，靶向BBC3聚核苷酸之寡核苷酸包括：反義RNA、干擾RNA (RNAi)、短干擾RNA (siRNA)；微小干擾RNA (miRNA)；小時序RNA (stRNA)；或短髮夾RNA (shRNA)；小RNA誘導之基因活化(RNAa)；或小活化RNA (saRNA)。

在一實施例中，靶向BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸(例如SEQ ID NO: 2至8)可調節該等靶之表現或功能。在一個實施例中，與對照組相比上調表現或功能。在一實施例中，與對照組相比下調表現或功能。

在一實施例中，反義化合物包括闡述為SEQ ID NO: 3至8之序列。該等寡核苷酸可包括一或多個經修飾核苷酸、較短或較長片段、經修飾鍵及諸如此類。

在一實施例中，SEQ ID NO: 3至8包括一或多個LNA核苷酸。表1顯示用於本發明方法中之實例性反義寡核苷酸。

表1：

序列編號	反義序列名稱	序列
SEQ ID NO: 3	CUR-1675	C*C*A*C*C*A*A*G*C*C*A*G*A*T*T*C*C*C*A*C
SEQ ID NO: 4	CUR-1676	A*T*C*C*A*C*C*C*A*T*C*T*C*G*G*C*C*T*T*C
SEQ ID NO: 5	CUR-1677	A*G*G*C*T*C*A*A*G*C*G*T*T*C*C*T*C*C*C*A
SEQ ID NO: 6	CUR-1678	C*C*C*A*G*T*T*A*G*G*T*T*T*C*C*G*C*A*T*G*T
SEQ ID NO: 7	CUR-1679	T*C*T*G*T*C*G*C*C*C*A*A*G*C*T*G*G*A*G*T
SEQ ID NO: 8	CUR-1505	T*C*T*G*T*C*G*C*C*C*A*A*G*C*T*G*G*A*G*T

可以業內已知之若干方式來調節期望靶核酸。舉例而言，使用反義寡核苷酸、siRNA等。酶性核酸分子(例如，核酶)係能夠催化一或多種不同反應之核酸分子，包含能夠以核苷酸鹼基序列特異性方式重複裂解其他單獨核酸分子。該酶性核酸分子可用於(例如)靶向實質上任一RNA轉錄物。

因具有序列特異性，故反式裂解之酶性核酸分子可顯示用作人類疾病之治療劑的前景。可設計酶性核酸分子來裂解細胞RNA背景內之特異性RNA靶。此一裂解事件使得mRNA失去功能性並去除來自該RNA之蛋白質表現。以此方式可選擇性抑制與疾病狀態有關之蛋白質的合成。

一般而言，具有RNA裂解活性之酶性核酸藉由首先結合至靶RNA來發揮作用。該結合經由酶性核酸之靶結合部分來進行，該靶結合部分緊鄰分子中用於裂解靶RNA之酶性部分。因此，酶性核酸首先識別靶RNA且然後經由互補鹼基配對與靶RNA結合，且在結合至確切位點後以酶促方式發揮作用以切割靶RNA。此一靶RNA之裂解策略將破壞其引導合成所編碼蛋白之能力。酶性核酸已結合且裂解其RNA靶之後，其自該RNA釋放以尋找另一靶且可重複結合及裂解新靶。

已使用諸如活體外選擇(演變)策略(Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435)等若干方式來產生能夠催化各種反應(例如磷酸二酯鍵聯及醯胺鍵聯之裂解及連接)的新核酸觸媒。

對於具有最適催化活性之核酶之研發將顯著有助於採用RNA裂解性核酶來調控基因表現的任一策略。舉例而言，錘頭狀核酶在飽和(10 mM)濃度之 Mg^{2+} 輔因子存在下以約 1 min^{-1} 之催化速率(kcat)發揮作用。已顯示人工「RNA連接酶」核酶可以約 100 min^{-1} 之速率催化相應自修飾反應。此外，已知某些經修飾錘頭狀核酶具有由DNA構成之受質結合臂，其可以接近 100 min^{-1} 之多倍周轉速率催化RNA裂解。最後，使用某些核苷酸類似物代替錘頭狀核酶催化核心內之特定殘基可產生經修飾核酶，其催化速率顯示提高多達10倍。該等發現表明，核酶可以顯著大於大部分天然自裂解核酶在活體外所顯示之催化速率的催化速率來促進化學轉化。然後可優化某些自裂解核酶之結構以得到最大催化活性，或可製備顯示顯著較快之RNA磷酸二酯裂解速率之全新RNA基序。

符合「錘頭」模型之RNA觸媒催化之RNA受質的分子間裂解首次顯示於1987年(Uhlenbeck, O. C. (1987) *Nature*, 328: 596-600)。回收RNA觸媒並使其與多個RNA分子進行反應，從而表明其確實具有催化性。

基於「錘頭」基序設計之催化RNA已用於裂解特異性靶序列，其係藉由在催化RNA中作出適當鹼基改變以維持與靶序列之必需鹼基配對來達成。此使得可使用催化RNA來裂解特異性靶序列，且表明根據「錘頭」模型設計之催化RNA可在活體內裂解特異性受質RNA。

RNA干擾(RNAi)已成為調節哺乳動物及哺乳動物細胞中

之基因表現之有效工具。此方式需要使用表現質粒或病毒及用於處理成 siRNA 之小髮夾 RNA 的編碼序列以 RNA 自身或 DNA 形式來遞送小干擾 RNA (siRNA)。此系統使得能夠將 siRNA 前體有效輸送至其具有活性之細胞質中且容許使用用於基因表現之經調控及組織特異性啟動子。

在一實施例中，寡核苷酸或反義化合物包括核糖核酸 (RNA) 及 / 或去氧核糖核酸 (DNA) 之寡聚物或聚合物、或其模擬物、嵌合體、類似物或同系物。此術語包含由天然核苷酸、糖及共價核苷間 (主鏈) 鍵聯組成之寡核苷酸；以及具有非天然部分且以相似方式發揮作用之寡核苷酸。該等經修飾或經取代寡核苷酸通常優於天然形式，此乃因諸如增強之細胞攝取、對於靶核酸之增強之親和力及在核酸酶存在下之增加之穩定性等期望性質。

根據本發明，寡核苷酸或「反義化合物」包含反義寡核苷酸 (例如 RNA、DNA、其模擬物、嵌合體、類似物或同系物)、核酶、外部引導序列 (EGS) 寡核苷酸、siRNA 化合物、單鏈或雙鏈 RNA 干擾 (RNAi) 化合物 (例如 siRNA 化合物)、saRNA、aRNA、及其他與靶核酸之至少一個部分雜交並調節其功能之寡聚化合物。因此，其可為 DNA、RNA、類 DNA、類 RNA、或其混合物，或可為該等物質中一或多者之模擬物。該等化合物可為單鏈、雙鏈、環狀或髮夾寡聚化合物，且可含有諸如內部或末端膨脹、失配或環路等結構要素。反義化合物通常製成直鏈形式，但可經接合或以其他方式製成環狀及 / 或具支鏈形式。反義化合

物可包含諸如以下構成物：經雜交以形成完全或部分雙鏈化合物之兩條鏈，或具有足夠自體互補性以進行雜交並形成完全或部分雙鏈化合物之單鏈。兩條鏈可在內部連接以產生游離3'或5'末端或可連接形成連續髮夾結構或環路。髮夾結構可在5'或3'末端含有懸垂部分以延長單鏈特徵。雙鏈化合物視需要可在末端包含懸垂部分。其他修飾可包含附接至一個末端、所選核苷酸位置、糖位置或附接至一個核苷間鍵聯之偶聯基團。另一選擇為，兩條鏈可經由非核酸部分或連接體基團進行連接。在自僅一條鏈形成時，dsRNA可呈自體互補髮夾型分子形式，其自身對折以形成雙鏈體。因此，dsRNA可為完全或部分雙鏈。可藉由穩定表現轉基因細胞系中之dsRNA髮夾來特異性調節基因表現。在自兩條鏈、或呈自體互補髮夾型分子形式(自身對折以形成雙鏈體)之單鏈形成時，兩條鏈(或單鏈中形成雙鏈體之區域)係以Watson-Crick方式鹼基配對之互補RNA鏈。

引入系統中之後，本發明化合物可引發一或多種酶或結構蛋白質之作用以實現靶核酸之裂解或其他修飾或可經由基於佔據之機制進行作用。一般而言，核酸(包含寡核苷酸)可闡述為「類DNA」(亦即，通常具有一或多個2'-去氧糖及(通常)T而非U鹼基)或「類RNA」(亦即，通常具有一或多個2'-羥基或2'-修飾糖及(通常)U而非T鹼基)。核酸螺旋可採用一種以上之結構類型，最通常係A型及B型。據信，一般而言，具有B型樣結構之寡核苷酸係「類DNA」

且彼等具有A型樣結構者係「類RNA」。在一些(嵌合)實施例中，反義化合物可含有A-及B型區域。

本發明之反義化合物可包括長度為約5至約80個核苷酸(亦即，約5至約80個連接核苷)的反義部分。此係指反義化合物之反義鏈或部分之長度。換言之，本發明之單鏈反義化合物包括5至約80個核苷酸，且本發明之雙鏈反義化合物(例如，dsRNA)包括長度為5至約80個核苷酸之正義及反義鏈或部分。熟習此項技術者應瞭解，此涵蓋長度為5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80個核苷酸、或其任一範圍之反義部分。

在一個實施例中，本發明之反義化合物具有長度為10至50個核苷酸之反義部分。熟習此項技術者應瞭解，此展現反義部分長度為10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50個核苷酸、或其任一範圍之寡核苷酸。在一些實施例中，寡核苷酸之長度為15個核苷酸。

在一個實施例中，本發明之反義或寡核苷酸化合物具有

長度為12或13至30個核苷酸的反義部分。熟習此項技術者應瞭解，此展現反義部分長度為12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個核苷酸、或其任一範圍之反義化合物。

在一實施例中，本發明之寡聚化合物亦包含在該化合物中之一或多個核苷酸位置存在不同鹼基的變體。舉例而言，若第一核苷酸係腺嘌呤，則可產生在此位置含有胸苷、鳥苷或胞苷之變體。此可發生於反義或dsRNA化合物之任一位置。然後使用本文所述方法測試該等化合物以測定其抑制靶核酸表現之能力。

在一些實施例中，反義化合物與靶之間之同源性、序列一致性或互補性為約40%至約60%。在一些實施例中，同源性、序列一致性或互補性為約60%至約70%。在一些實施例中，同源性、序列一致性或互補性為約70%至約80%。在一些實施例中，同源性、序列一致性或互補性為約80%至約90%。在一些實施例中，同源性、序列一致性或互補性為約90%、約92%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%。

在一實施例中，反義寡核苷酸(例如，SEQ ID NO: 3至8中所述之核酸分子)包括一或多個取代或修飾。在一個實施例中，核苷酸經鎖核酸(LNA)取代。

在一實施例中，寡核苷酸靶向與BBC3有關之編碼及/或非編碼序列及闡述為SEQ ID NO: 1及2之序列之正義及/或反義核酸分子之一或多個區域。寡核苷酸亦靶向SEQ ID

NO: 1及2之重疊區域。

本發明之某些較佳寡核苷酸係嵌合寡核苷酸。本發明上文中之「嵌合寡核苷酸」或「嵌合體」係含有兩個或更多個化學上不同之區域之寡核苷酸，每個區域皆由至少一個核苷酸構成。該等寡核苷酸通常含有至少一個經修飾核苷酸區域，該區域賦予一或多種有益性質(例如增加核酸酶抗性，增加細胞攝取，增加與靶之結合親和力)；及係能夠裂解RNA:DNA或RNA:RNA雜合體之酶受質的區域。舉例而言，RNase H係可裂解RNA:DNA雙鏈體之RNA鏈之細胞內切核酸酶。因此，活化RNase H可裂解RNA靶，由此大大提高基因表現之反義調節的效率。因此，同與相同靶區域雜交之硫代磷酸酯去氧寡核苷酸相比，在使用嵌合寡核苷酸時利用較短寡核苷酸通常可獲得相當之結果。通常可藉由凝膠電泳及(若需要)業內已知之有關核酸雜交技術來檢測RNA靶之裂解。在一個實施例中，嵌合寡核苷酸包括至少一個經修飾以增加靶結合親和力之區域、及(通常)用作RNase H受質之區域。通常藉由量測寡核苷酸/靶配對之 T_m 來測定寡核苷酸與其靶(在此情形下係編碼ras之核酸)之親和力， T_m 係寡核苷酸與靶離解之溫度；使用分光光度法來檢測離解。 T_m 愈高，則寡核苷酸與靶之親和力愈大。

本發明之嵌合反義化合物可以兩個或更多個如上所述之寡核苷酸、經修飾寡核苷酸、寡核苷及/或寡核苷酸模擬物之複合結構形式形成。因此，化合物在業內亦稱為雜合

體或結合體。教示該等雜合體結構之製備的代表性美國專利包括但不限於美國專利第5,013,830號、第5,149,797號、第5,220,007號、第5,256,775號、第5,366,878號、第5,403,711號、第5,491,133號、第5,565,350號、第5,623,065號、第5,652,355號、第5,652,356號、及第5,700,922號，每一者皆以引用方式併入本文中。

在一實施例中，寡核苷酸之經修飾區域包括至少一個在糖之2'位處修飾的核苷酸，最佳係經2'-O-烷基、2'-O-烷基-O-烷基或2'-氟修飾之核苷酸。在另一實施例中，RNA修飾包含對於嘧啶之核糖、無鹼基殘基或RNA中3'端之反向鹼基之2'-氟、2'-胺基及2'-O-甲基修飾。通常將該等修飾納入寡核苷酸中且已顯示該等寡核苷酸相對於2'-去氧寡核苷酸對於給定靶具有較高T_m(亦即，較高靶結合親和力)。該增加之親和力效應大大增強了RNAi寡核苷酸對基因表現之抑制。RNase H係裂解RNA:DNA雙鏈體中RNA鏈之細胞內切核酸酶；因此，活化此酶可裂解RNA靶，且由此可大大增強RNAi抑制之效率。對RNA靶之裂解通常可藉由凝膠電泳來顯示。在一實施例中，亦對嵌合寡核苷酸進行修飾以增強核酸酶抗性。細胞含有多種可降解核酸之外切核酸酶及內切核酸酶。已顯示多種核苷酸及核苷修飾可使納入該等修飾之寡核苷酸對核酸酶消化之抗性強於天然寡去氧核苷酸。核酸酶抗性通常藉由將寡核苷酸與細胞提取物或分離核酸酶溶液一起培育並在一段時間後通常藉由凝膠電泳量測剩餘完整寡核苷酸之含量來進行量測。已經修飾以

增強其核酸酶抗性之寡核苷酸保持完整之時間長於未經修飾之寡核苷酸。已證實多種寡核苷酸修飾可增強或賦予核酸酶抗性。當前，含有至少一個硫代磷酸酯修飾之寡核苷酸更佳。在一些情形下，增強靶結合親和力之寡核苷酸經修飾亦能獨立地增強核酸酶抗性。

擬用於本發明之一些較佳寡核苷酸的具體實例包含彼等包括經修飾主鏈者，該等經修飾主鏈係(例如)硫代磷酸酯、磷酸三酯、磷酸甲酯、短鏈烷基或環烷基糖間鍵聯或短鏈雜原子或雜環糖間鍵聯。最佳者係具有硫代磷酸酯主鏈之寡核苷酸及彼等具有雜原子主鏈者，該等雜原子主鏈尤其係 $\text{CH}_2\text{--NH--O--CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--O--CH}_2$ [稱為亞甲基(甲基亞胺基)或 MMI 主鏈]、 $\text{CH}_2\text{--O--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ 及 $\text{O--N(CH}_3\text{)--CH}_2\text{--CH}_2$ 主鏈，其中天然磷酸二酯主鏈表示為 O--P--O--CH_2 。由 De Mesmaeker 等人(1995) *Acc. Chem. Res.* 28:366-374 所揭示之鹽胺主鏈亦較佳。亦較佳者係具有嗎啉基主鏈結構之寡核苷酸(Summerton 及 Weller，美國專利第 5,034,506 號)。在另一實施例中(例如肽核酸(PNA)主鏈)，寡核苷酸之磷酸二酯主鏈由聚鹽胺主鏈代替，核苷酸直接或間接結合至聚鹽胺主鏈之氮雜氮原子。寡核苷酸亦可包括一或多個經取代糖部分。較佳寡核苷酸在 2' 位包括下列基團中之一者： OH 、 SH 、 SCH_3 、 F 、 OCN 、 OCH_3 、 OCH_3 、 OCH_3 、 $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ 或 $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$ (n 為 1 至約 10)； C_1 至 C_{10} 低碳烷基、烷氧基烷氧基、經取代低碳烷

基、烷芳基或芳烷基；Cl；Br；CN；CF₃；OCF₃；O--、S--、或N-烷基；O--、S--、或N烯基；SOCH₃；SO₂CH₃；ONO₂；NO₂；N₃；NH₂；雜環烷基；雜環烷芳基；胺基烷基胺基；聚烷基胺基；經取代甲矽烷基；RNA裂解基團；報導子基團；遷入劑；用於改良寡核苷酸之藥物代謝動力學性質之基團；或用於改良寡核苷酸之藥效動力學性質之基團及其他具有相似性質之取代基。較佳修飾包含2'-甲氧基乙氧基[2'-O-CH₂CH₂OCH₃，亦稱為2'-O-(2-甲氧基乙基)]。其他較佳修飾包含2'-甲氧基(2'-O--CH₃)、2'-丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₃)及2'-氟(2'-F)。亦可在寡核苷酸上之其他位置進行類似修飾，尤其係3'末端核苷酸上糖之3'位及5'末端核苷酸之5'位。寡核苷酸亦可具有糖模擬物，例如使用環丁基來代替戊呋喃醯基。

寡核苷酸亦可另外或作為另一選擇包含核鹼基(業內通常簡寫為「鹼基」)修飾或取代。本文所用之「未經修飾」或「天然」核苷酸包含腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。經修飾核苷酸包含僅偶爾或短暫在天然核酸中發現之核苷酸，例如次黃嘌呤、6-甲基腺嘌呤、5-Me嘧啶、尤其5-甲基胞嘧啶(亦稱為5-甲基-2'去氧胞嘧啶且業內通常稱為5-Me-C)、5-羥甲基胞嘧啶(HMC)、糖基HMC及龍膽二糖基HMC；以及合成核苷酸，例如，2-胺基腺嘌呤、2-(甲基胺基)腺嘌呤、2-(咪唑基烷基)腺嘌呤、2-(烷基烷基胺基)腺嘌呤或其他雜取代烷基腺嘌呤、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-

羥甲基尿嘧啶、8-氮雜鳥嘌呤、7-去氮鳥嘌呤、N6 (6-胺基己基)腺嘌呤及2,6-二胺基嘌呤。可包含業內已知之「常用」鹼基(例如肌苷)。已顯示5-Me-C取代可將核酸雙鏈體穩定性增加0.6°C至1.2°C且係當前之較佳鹼基取代。

對本發明寡核苷酸之另一修飾涉及使一或多種可增強寡核苷酸之活性或細胞攝取之部分或偶聯物以化學方式連接至寡核苷酸。該等部分包含但不限於脂質部分(例如膽固醇部分)、膽固醇基部分、脂肪族鏈(例如，十二烷二醇或十一烷基殘基)、聚胺或聚乙二醇鏈、或金剛烷乙酸。業內已知包括親脂性部分之寡核苷酸、及製備該等寡核苷酸之方法，例如，美國專利第5,138,045號、第5,218,105號及第5,459,255號。

給定寡核苷酸中之所有位置並不需要經一致性修飾，且事實上可將上述修飾中之一種以上納入單一寡核苷酸中或甚至納入寡核苷酸內之單一核苷中。本發明亦包含係上文所定義嵌合寡核苷酸之寡核苷酸。

在另一實施例中，本發明之核酸分子與另一部分偶聯，該另一部分包含但不限於無鹼基核苷酸、聚醚、聚胺、聚醯胺、肽、碳水化合物、脂質、或聚烴化合物。彼等熟習此項技術者應認識到，該等分子可連接至在糖、鹼基或磷酸酯基團上之若干位置包括核酸分子之任一核苷酸中的一或多者上。

本發明所用之寡核苷酸可以便捷常規方式經由熟知之固相合成技術來製備。包含Applied Biosystems在內之若干

供貨商出售實施該合成之設備。亦可採用用於該合成之任一其他方式，熟習此項技術者熟知寡核苷酸之現行合成。亦熟知使用相似技術來製備諸如硫代磷酸酯及烷基化衍生物等其他寡核苷酸。業內亦熟知使用相似技術及市售經修飾DNA合成核苷酸(amidite)及定孔玻璃(CPG)產品(例如經生物素、螢光素、吡啶或補骨脂素修飾之DNA合成核苷酸及/或CPG(可自Glen Research, Sterling, VA購得))來合成經螢光標記、經生物素化或經其他修飾之寡核苷酸，例如經膽固醇修飾之寡核苷酸。

根據本發明，使用修飾(例如使用LNA單體)來增強作用之功效、特異性及持續時間並拓寬寡核苷酸之投與途徑包括諸如MOE、ANA、FANA、PS等當前化學方式。此可藉由使用LNA單體代替當前寡核苷酸中之一些單體來達成。經LNA修飾之寡核苷酸可具有類似於母體化合物之尺寸或可較大或較佳地較小。較佳地，經LNA修飾之寡核苷酸含有小於約70%、更佳小於約60%、最佳小於約50%之LNA單體，且其尺寸介於約5與25個核苷酸、更佳約12與20個核苷酸之間。

較佳經修飾寡核苷酸主鏈包括但不限於硫代磷酸酯、對掌性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、膦酸甲酯及其他膦酸烷基酯(包括膦酸3'-伸烷基酯及對掌性膦酸酯)、次膦酸酯、胺基磷酸酯(包括胺基磷酸3'-胺基酯及胺基磷酸胺基烷基酯)、硫羰基胺基磷酸酯、膦酸硫羰基烷基酯、硫羰基烷基磷酸三酯、及具有常

見3'-5'鍵聯之硼烷磷酸酯、該等主鏈之2'-5'連接類似物、及彼等具有反極性者(其中相鄰核苷單元對之連接由3'-5'變為5'-3'或由2'-5'變為5'-2')。亦包含各種鹽、混合鹽及游離酸形式。

教示上述含磷鍵聯之代表性美國專利包括但不限於美國專利第3,687,808號、第4,469,863號、第4,476,301號、第5,023,243號、第5,177,196號、第5,188,897號、第5,264,423號、第5,276,019號、第5,278,302號、第5,286,717號、第5,321,131號、第5,399,676號、第5,405,939號、第5,453,496號、第5,455,233號、第5,466,677號、第5,476,925號、第5,519,126號、第5,536,821號、第5,541,306號、第5,550,111號、第5,563,253號、第5,571,799號、第5,587,361號及第5,625,050號，每一者皆以引用方式併入本文中。

不含磷原子之較佳經修飾寡核苷酸主鏈具有藉由以下形成之主鏈：短鏈烷基或環烷基核苷間鍵聯、混合雜原子及烷基或環烷基核苷間鍵聯、或一或多個短鏈雜原子或雜環核苷間鍵聯。該等主鏈包括彼等具有嗎啉基鍵聯者(部分自核苷之糖部分形成)；矽氧烷主鏈；硫化物、亞碲及碲主鏈；甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基主鏈；亞甲基甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基主鏈；含有烯烴之主鏈；胺基磺酸酯主鏈；亞甲基亞胺基及亞甲基胍基主鏈；磺酸酯及磺醯胺主鏈；醯胺主鏈；及其他具有混合N、O、S及CH₂組成部分者。

教示上述寡核苷之代表性美國專利包括但不限於美國專利第 5,034,506 號、第 5,166,315 號、第 5,185,444 號、第 5,214,134 號、第 5,216,141 號、第 5,235,033 號、第 5,264,562 號、第 5,264,564 號、第 5,405,938 號、第 5,434,257 號、第 5,466,677 號、第 5,470,967 號、第 5,489,677 號、第 5,541,307 號、第 5,561,225 號、第 5,596,086 號、第 5,602,240 號、第 5,610,289 號、第 5,602,240 號、第 5,608,046 號、第 5,610,289 號、第 5,618,704 號、第 5,623,070 號、第 5,663,312 號、第 5,633,360 號、第 5,677,437 號、及第 5,677,439 號，每一者皆以引用方式併入本文中。

在其他較佳寡核苷酸模擬物中，核苷酸單元中之糖及核苷間鍵聯(亦即主鏈)二者經新基團代替。保留鹼基單元以與適宜核酸靶化合物雜交。一種該寡聚化合物(已顯示具有極佳雜交性質之寡核苷酸模擬物)稱為肽核酸(PNA)。在 PNA 化合物中，寡核苷酸中之糖-主鏈經含醯胺主鏈、特定而言胺基乙基甘胺酸主鏈代替。保留核鹼基且其與主鏈中醯胺部分之氮雜氮原子直接或間接結合。教示 PNA 化合物之製備之代表性美國專利包括但不限於美國專利第 5,539,082 號、第 5,714,331 號、及第 5,719,262 號，每一者皆以引用方式併入本文中。PNA 化合物之其他教示內容可參見 Nielsen 等人，(1991) Science 254, 1497-1500。

本發明一實施例係具有硫代磷酸酯主鏈之寡核苷酸及具有雜原子主鏈之寡核苷，且特定而言係上文所提及美國專

利第 5,489,677 號中之 $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$ [稱為亞甲基(甲基亞胺基)或 MMI 主鏈]、 $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ 及 $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ [其中天然磷酸二酯主鏈表示為 $-\text{O-P-O-CH}_2-$]，及上文所提及美國專利第 5,602,240 號中之醯胺主鏈。亦較佳者係上文所提及美國專利第 5,034,506 號中之具有嗎啉基主鏈結構之寡核苷酸。

經修飾寡核苷酸亦可含有一或多個經取代糖部分。較佳寡核苷酸在 2' 位包括以下中之一者： OH ； F ； O- 、 S- 或 N- 烷基、 O- 、 S- 或 N- 烯基； O- 、 S- 或 N- 炔基；或 O 烷基- O -烷基，其中烷基、烯基及炔基可係經取代或未經取代之 C_1 至 C_{10} 烷基或 C_2 至 C_{10} 烯基及炔基。尤佳者係 $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{O}^m\text{CH}_3$ 、 $\text{O(CH}_2\text{)}_n$ 、 OCH_3 、 $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{ONH}_2$ 、及 $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{ON(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3)_2$ ，其中 n 及 m 可為 1 至約 10。其他較佳寡核苷酸在 2' 位包括以下中之一者： C_1 至 C_{10} 低碳烷基、經取代低碳烷基、烷芳基、芳烷基、 O- 烷芳基或 O- 芳烷基、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 CF_3 、 OCF_3 、 SOCH_3 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、雜環烷基、雜環烷芳基、胺基烷基胺基、聚烷基胺基、經取代甲矽烷基、 RNA 裂解基團、受體基團、嵌入劑、改良寡核苷酸之藥物代謝動力學性質之基團、或改良寡核苷酸之藥效動力學性質之基團、及其他具有相似性質之取代基。較佳修飾包括 2'-甲氧基乙氧基 (2'- $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ，亦稱為 2'- O-(2-甲氧基乙基) 或 2'-MOE)，

亦即，烷氧基烷氧基。其他較佳經修飾包括2'-二甲基胺基氧基乙氧基(亦即， $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基團，亦稱為2'-DMAOE，如下文實例中所述)、及2'-二甲基胺基乙氧基乙氧基(業內亦稱為2'-O-二甲基胺基乙氧基乙基或2'-DMAEOE，亦即， $2'\text{-O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)_2$)。

其他較佳修飾包括2'-甲氧基($2'\text{-OCH}_3$)、2'-胺基丙氧基($2'\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)及2'-氟($2'\text{-F}$)。亦可在寡核苷酸上之其他位置進行相似修飾，尤其係3'末端核苷酸上或2'-5'連接寡核苷酸中糖之3'位及5'末端核苷酸之5'位。寡核苷酸亦可具有糖模擬物，例如使用環丁基部分來代替戊呋喃糖基糖。教示該等經修飾糖結構之製備之代表性美國專利包括但不限於美國專利第4,981,957號、第5,118,800號、第5,319,080號、第5,359,044號、第5,393,878號、第5,446,137號、第5,466,786號、第5,514,785號、第5,519,134號、第5,567,811號、第5,576,427號、第5,591,722號、第5,597,909號、第5,610,300號、第5,627,053號、第5,639,873號、第5,646,265號、第5,658,873號、第5,670,633號及第5,700,920號，每一者皆以引用方式併入本文中。

寡核苷酸亦可包括核鹼基(業內通常簡寫為「鹼基」)修飾或取代。本文所用之「未經修飾」或「天然」核苷酸包括嘌呤鹼基(腺嘌呤(A)及鳥嘌呤(G))及嘧啶鹼基(胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U))。經修飾核苷酸包括其他合成及天然核苷酸，例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羥甲基

胞嘧啶、黃嘌呤、次黃嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤及鳥嘌呤之6-甲基及其他烷基衍生物、腺嘌呤及鳥嘌呤之2-丙基及其他烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶及2-硫代胞嘧啶、5-鹵代尿嘧啶及胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶及胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶及胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-鹵代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羥基及其他8-取代腺嘌呤及鳥嘌呤、5-鹵代、尤其5-溴、5-三氟甲基及其他5-取代尿嘧啶及胞嘧啶、7-甲基鳥嘌呤及7-甲基腺嘌呤、8-氮雜鳥嘌呤及8-氮雜腺嘌呤、7-去氮鳥嘌呤及7-去氮腺嘌呤及3-去氮鳥嘌呤及3-去氮腺嘌呤。

另外，核苷酸包括彼等揭示於美國專利第3,687,808號中者、彼等揭示於'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering'，第858-859頁，Kroschwitz, J.I. 編輯，John Wiley & Sons, 1990中者、彼等由Englisch等人，'Angewandte Chemie, International Edition'，1991, 30，第613頁揭示者、及彼等由Sanghvi, Y.S.，第15章，'Antisense Research and Applications'，第289-302頁，Crooke, S.T.及Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993揭示者。某些該等核苷酸尤其用於增加本發明之寡聚化合物之結合親和力。該等核苷酸包括5-取代嘧啶、6-氮雜嘧啶及N-2、N-6及O-6取代嘌呤，包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶及5-丙炔基胞嘧啶。已顯示5-甲基胞嘧啶取代可將核酸雙鏈體穩定性增加0.6°C至1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke,

S.T. 及 Lebleu, B. 編輯, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, 第276-278頁) 且係當前較佳之鹼基取代, 甚至更尤其在與2'-O甲氧基乙基糖修飾組合時。

教示上述經修飾核苷酸以及其他經修飾核苷酸之製備之代表性美國專利包括但不限於美國專利第3,687,808號、以及第4,845,205號、第5,130,302號、第5,134,066號、第5,175,273號、第5,367,066號、第5,432,272號、第5,457,187號、第5,459,255號、第5,484,908號、第5,502,177號、第5,525,711號、第5,552,540號、第5,587,469號、第5,596,091號、第5,614,617號、第5,750,692號及第5,681,941號, 每一者皆以引用方式併入本文中。

對本發明寡核苷酸之另一修飾涉及使一或多種可增強寡核苷酸之活性、細胞分佈或細胞攝取之部分或偶聯物以化學方式連接至寡核苷酸。

該等部分包括但不限於脂質部分(例如膽固醇部分)、膽酸、硫醚(例如, 己基-S-三苯甲基硫醇)、硫代膽固醇、脂肪族鏈(例如, 十二烷二醇或十一烷基殘基)、磷脂(例如, 二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基銨1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯)、聚胺或聚乙二醇鏈、或金剛烷乙酸、棕櫚基部分、或十八胺或己基胺基-羰基-氧基膽固醇部分。

教示該等寡核苷酸偶聯物之製備之代表性美國專利包括

但不限於美國專利第4,828,979號、第4,948,882號、第5,218,105號、第5,525,465號、第5,541,313號、第5,545,730號、第5,552,538號、第5,578,717號、第5,580,731號、第5,580,731號、第5,591,584號、第5,109,124號、第5,118,802號、第5,138,045號、第5,414,077號、第5,486,603號、第5,512,439號、第5,578,718號、第5,608,046號、第4,587,044號、第4,605,735號、第4,667,025號、第4,762,779號、第4,789,737號、第4,824,941號、第4,835,263號、第4,876,335號、第4,904,582號、第4,958,013號、第5,082,830號、第5,112,963號、第5,214,136號、第5,082,830號、第5,112,963號、第5,214,136號、第5,245,022號、第5,254,469號、第5,258,506號、第5,262,536號、第5,272,250號、第5,292,873號、第5,317,098號、第5,371,241號、第5,391,723號、第5,416,203號、第5,451,463號、第5,510,475號、第5,512,667號、第5,514,785號、第5,565,552號、第5,567,810號、第5,574,142號、第5,585,481號、第5,587,371號、第5,595,726號、第5,597,696號、第5,599,923號、第5,599,928號及第5,688,941號，每一者皆以引用方式併入本文中。

藥物研究：亦可將本發明化合物加至藥物研究及靶驗證之區域中。本發明涵蓋本文所鑑別化合物及較佳靶區段在藥物研究中之用途，該藥物研究試圖闡釋BCL2結合部分

3(BBC3)聚核苷酸與疾病狀態、表現型、或病狀之間所存在之關係。該等方法包含檢測或調節BBC3聚核苷酸，其包括使試樣、組織、細胞、或有機體與本發明化合物接觸，在治療後某一時間量測BBC3聚核苷酸之核酸或蛋白質含量及/或相關表現型或化學端點，及視需要比較量測值與未處理試樣或經本發明中另一化合物處理之試樣。該等方法亦可與其他實驗並行或組合實施以測定用於靶驗證過程之未知基因的功能，或用以測定特定基因產物作為用於治療或預防特定疾病、病狀或表現型之靶的有效性。

評價基因表現之上調或抑制：

可藉由直接檢測細胞或有機體中核酸之存在來評價外源核酸向宿主細胞或有機體中的轉移。該檢測可藉由業內熟知之若干方法來達成。例如，可藉由南方印跡或藉由聚合酶鏈反應(PCR)技術使用特異性擴增與核酸有關之核苷酸序列之引物來檢測外源核酸的存在。亦可使用包含基因表現分析在內之習用方法來量測外源核酸之表現。舉例而言，可使用北方印跡及逆轉錄PCR (RT-PCR)來檢測及量化自外源核酸產生之mRNA。

亦可藉由量測酶活性或報導子蛋白活性來檢測外源核酸中RNA之表現。舉例而言，可根據靶核酸表現之降低或增加來間接量測反義調節活性，從而指示外源核酸在效應子RNA中產生。基於序列保守性，可設計引物並用於擴增靶基因之編碼區域。最初，可使用來自每一基因之最高表現編碼區域來建立對照基因模型，但可使用任一編碼或非編

碼區域。藉由將每一編碼區域插入報導子編碼區域與其 poly(A)信號之間來組裝每一對照基因。該等質粒將產生在基因上游部分具有報導子基因且在3'非編碼區域中具有潛在RNAi靶之mRNA。藉由調節報導子基因來分析個別反義寡核苷酸之有效性。用於本發明方法中之報導子基因包含乙醯羧酸合酶(AHAS)、鹼性磷酸酶(AP)、 β 半乳糖苷酶(LacZ)、 β 葡糖醛酸糖苷酶(GUS)、氯黴素乙醯轉移酶(CAT)、綠色螢光蛋白(GFP)、紅色螢光蛋白(RFP)、黃色螢光蛋白(YFP)、青色螢光蛋白(CFP)、辣根過氧化物酶(HRP)、螢光素酶(Luc)、胭脂鹼合酶(NOS)、章魚肉鹼合酶(OCS)及其衍生物。可使用賦予以下物質抗性之多種可選擇標記物：胺苄西林(ampicillin)、博來黴素(bleomycin)、氯黴素(chloramphenicol)、慶大黴素(gentamycin)、潮黴素(hygromycin)、卡那黴素(kanamycin)、林可黴素(lincomycin)、甲胺蝶呤(methotrexate)、草胺磷(phosphinothricin)、嘌呤黴素(puromycin)及四環素(tetracycline)。測定報導子基因之調節的方法在業內已眾所周知，且包含但不限於螢光方法(例如螢光光譜法、螢光活化細胞分選(FACS)、螢光顯微術)、抗生素抗性測定。

可使用彼等熟習此項技術者已知及闡述於本文其他處之方法來分析BBC3蛋白及mRNA表現。舉例而言，可使用諸如ELISA等免疫分析來量測蛋白質含量。BBC3 ELISA分析套組有市售，例如，購自R&D Systems (Minneapolis,

MN)。

在實施例中，藉由與對照組試樣中之BBC3表現進行比較來評估使用本發明反義寡核苷酸處理之試樣(例如，活體內或活體外中之細胞或組織)中的BBC3表現(例如，mRNA或蛋白質)。舉例而言，可使用彼等熟習此項技術者已知之方法來對蛋白質或核酸之表現與模擬處理或未處理試樣進行比較。另一選擇為，可端視期望資訊來比較所處理試樣與對照組反義寡核苷酸(例如，具有經改變或不同序列者)。在另一實施例中，可使用經處理試樣與未處理試樣中不同核酸(包含研究者認為適宜之任一標準，例如，持家基因)表現之差異來比較經處理試樣與未處理試樣中BBC3蛋白質或核酸表現之差異。

可根據需要(例如)以比率或份數形式來表示所觀察之差異以用於與對照組進行比較。在實施例中，相對於未處理試樣或經對照組核酸處理之試樣，經本發明反義寡核苷酸處理之試樣中BBC3 mRNA或蛋白質之含量增加或降低約1.25倍至約10倍或更高。在實施例中，BBC3 mRNA或蛋白質之含量增加或降低至少約1.25倍、至少約1.3倍、至少約1.4倍、至少約1.5倍、至少約1.6倍、至少約1.7倍、至少約1.8倍、至少約2倍、至少約2.5倍、至少約3倍、至少約3.5倍、至少約4倍、至少約4.5倍、至少約5倍、至少約5.5倍、至少約6倍、至少約6.5倍、至少約7倍、至少約7.5倍、至少約8倍、至少約8.5倍、至少約9倍、至少約9.5倍、或至少約10倍或更高。

套組、研究試劑、診斷及治療

本發明化合物可用於診斷、治療及預防，且可用作套組之研究試劑及組份。另外，彼等熟習此項技術者通常使用能夠以強烈特異性抑制基因表現之反義寡核苷酸來闡釋特定基因之功能或區別生物途徑之各個成員的功能。

對於在套組及診斷及各種生物系統中之應用而言，本發明化合物(單獨或與其他化合物或治療劑組合)可用作差值及/或組合分析中之工具以闡釋細胞及組織內所表現基因之一部分或整個補體的表現模式。

本文所用之術語「生物系統」或「系統」定義為表現、或使其足以表現BCL2結合部分3(BBC3)基因產物的任一有機體、細胞、細胞培養物或組織。該等系統包含但不限於人類、轉基因動物、細胞、細胞培養物、組織、異種移植物、移植物及其組合。

根據一非限制性實例，對經一或多種反義化合物處理之細胞或組織內的表現模式與未經反義化合物處理之對照組細胞或組織進行比較，且分析所得模式關於(例如)疾病相關性、信號傳導途徑、細胞定位、表現程度、所檢驗基因之尺寸、結構或功能之基因表現的差異程度。該等分析可在經刺激或未經刺激細胞中且在影響表現模式之其他化合物存在或不存在下實施。

業內已知之基因表現分析之方法實例包含DNA陣列或微陣列、SAGE(基因表現之系列分析)、READS(消化cDNA之限制性酶擴增)、TOGA(總體基因表現分析)、蛋白質陣列

及蛋白組學、已表現序列標誌(EST)測序、消滅RNA指紋技術(SuRF)、消滅選殖、差異顯示(DD)、比較基因組雜交、FISH(螢光原位雜交)技術及質譜方法。

本發明化合物可用於研究及診斷中，此乃因該等化合物可與編碼BCL2結合部分3(BBC3)之核酸雜交。舉例而言，在如本文所揭示可用作有效BBC3調節劑之該效率及該等條件下雜交之寡核苷酸在分別有利於基因擴增或檢測之條件下係有效引物或探針。該等引物及探針可用於需要特異性檢測編碼BBC3之核酸分子及擴增該等核酸分子以用於檢測或用於其他BBC3研究的方法中。本發明之反義寡核苷酸(尤其引物及探針)與編碼BBC3之核酸的雜交可藉由業內已知方式進行檢測。該等方式可包含使酶與寡核苷酸偶聯、放射性標記寡核苷酸、或任一其他適宜檢測方式。亦可製造使用該等檢測方式檢測試樣中之BBC3含量的套組。

彼等熟習此項技術者亦在治療應用中利用反義化合物之特異性及敏感性。反義化合物已用作治療部分來治療動物(包含人類)之疾病狀態。反義寡核苷酸藥物已安全且有效地投與人類且當前正實施許多臨床試驗。由此確定，反義化合物可為可經設置用於治療細胞、組織及動物(尤其人類)之治療方案中的有用治療方式。

在治療時，藉由投與本發明反義化合物來治療懷疑患有可藉由調節BBC3聚核苷酸之表現進行治療之疾病或病症的動物(較佳係人類)。舉例而言，在一非限制性實施例

中，該等方法包括向需要治療之動物投與治療有效量之BBC3調節劑之步驟。本發明之BBC3調節劑可有效調節BBC3之活性或調節BBC3蛋白質之表現。在一個實施例中，與對照組相比，使BBC3在動物中之活性或表現抑制約10%。較佳地，使BBC3在動物中之活性或表現抑制約30%。更佳地，使BBC3在動物中之活性或表現抑制50%或更高。因此，與對照組相比，寡聚化合物可將BCL2結合部分3(BBC3)mRNA之表現調節至少10%、至少50%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、或100%。

在一個實施例中，與對照組相比，使BCL2結合部分3(BBC3)及/或在動物中之活性或表現增加約10%。較佳地，使BBC3在動物中之活性或表現增加約30%。更佳地，使BBC3在動物中之活性或表現增加50%或更高。因此，與對照組相比，寡聚化合物可將BBC3 mRNA之表現調節至少10%、至少50%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、或100%。

舉例而言，可量測動物之血清、血液、脂肪組織、肝或任一其他體液、組織或器官中BCL2結合部分3(BBC3)之表現的增大或減小。較佳地，所分析之該等流體、組織或器官內所含之細胞含有編碼BBC3肽及/或BBC3蛋白質本身的

核酸分子。

可藉由將有效量之本發明化合物添加至適宜醫藥上可接受之稀釋劑或載劑中來將該化合物用於醫藥組合物中。本發明之化合物用途及方法亦可用於預防目的。

偶聯物

對本發明寡核苷酸之另一修飾涉及使一或多種可增強寡核苷酸之活性、細胞分佈或細胞攝取之部分或偶聯物以化學方式連接至寡核苷酸。該等部分或偶聯物可包含共價結合至諸如一級或二級羥基等官能團之偶聯基團。本發明之偶聯基團包含嵌入劑、報導子分子、聚胺、聚醯胺、聚乙二醇、聚醚、增強寡聚物之藥效動力學性質之基團、及增強寡聚物之藥物代謝動力學性質之基團。典型偶聯基團包含膽固醇、脂質、磷脂、生物素、吩嗪、葉酸酯、菲啶、蔥醌、吡啶、螢光素、若丹明(rhodamine)、香豆素及染料。在本發明之上下文中，增強藥效動力學性質之基團包含可改良攝取、增強降解抗性、及/或增強與靶核酸之序列特異性雜交的基團。在本發明之上下文中，增強藥物代謝動力學性質之基團包含可改良本發明化合物之攝取、分佈、代謝或分泌的基團。代表性偶聯基團揭示於1992年10月23日提出申請之國際專利申請案第PCT/US92/09196號、及美國專利第6,287,860號中，其以引用方式併入本文中。偶聯部分包含但不限於脂質部分(例如膽固醇部分)、膽酸、硫醚(例如，己基-5-三苯甲基硫醇)、硫代膽固醇、脂肪族鏈(例如，十二烷二醇或十一烷基殘基)、磷脂(例如，

二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基銨1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H磷酸酯)、聚胺或聚乙二醇鏈、或金剛烷乙酸、棕櫚基部分、或十八胺或己基胺基-羰基-氧基膽固醇部分。本發明之寡核苷酸亦可偶聯至活性藥物物質，例如，阿司匹林(aspirin)、華法林(warfarin)、保泰松(phenylbutazone)、布洛芬(ibuprofen)、舒洛芬(suprofen)、芬布芬(fenbufen)、酮洛芬(ketoprofen)、(S)-(+)-普拉洛芬((S)-(+)-pranoprofen)、卡洛芬(carprofen)、丹肌胺酸(dansylsarcosine)、2,3,5-三碘苯甲酸、氟芬那酸(flufenamic acid)、亞葉酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、二氮呋、吲哚美辛(indomethicin)、巴比妥酸鹽、頭孢菌素(cephalosporin)、磺胺藥、抗糖尿病藥、抗菌劑或抗生素。

教示該等寡核苷酸偶聯物之製備之代表性美國專利包含但不限於美國專利第4,828,979號、第4,948,882號、第5,218,105號、第5,525,465號、第5,541,313號、第5,545,730號、第5,552,538號、第5,578,717號、第5,580,731號、第5,580,731號、第5,591,584號、第5,109,124號、第5,118,802號、第5,138,045號、第5,414,077號、第5,486,603號、第5,512,439號、第5,578,718號、第5,608,046號、第4,587,044號、第4,605,735號、第4,667,025號、第4,762,779號、第4,789,737號、第4,824,941號、第4,835,263號、第4,876,335號、第4,904,582號、第4,958,013號、第

5,082,830 號 、 第 5,112,963 號 、 第 5,214,136 號 、 第 5,082,830 號 、 第 5,112,963 號 、 第 5,214,136 號 、 第 5,245,022 號 、 第 5,254,469 號 、 第 5,258,506 號 、 第 5,262,536 號 、 第 5,272,250 號 、 第 5,292,873 號 、 第 5,317,098 號 、 第 5,371,241 號 、 第 5,391,723 號 、 第 5,416,203 號 、 第 5,451,463 號 、 第 5,510,475 號 、 第 5,512,667 號 、 第 5,514,785 號 、 第 5,565,552 號 、 第 5,567,810 號 、 第 5,574,142 號 、 第 5,585,481 號 、 第 5,587,371 號 、 第 5,595,726 號 、 第 5,597,696 號 、 第 5,599,923 號 、 第 5,599,928 號 及 第 5,688,941 號 。

調配物

本發明化合物亦可與其他分子、分子結構或化合物混合物(例如，脂質體、靶向受體之分子、經口、直腸、局部或其他調配物)混合、囊封、偶聯或以其他方式結合以有助於攝取、分佈及/或吸收。教示該等有助於攝取、分佈及/或吸收之調配物之製備的代表性美國專利包含但不限於美國專利第 5,108,921 號、第 5,354,844 號、第 5,416,016 號、第 5,459,127 號、第 5,521,291 號、第 5,543,165 號、第 5,547,932 號、第 5,583,020 號、第 5,591,721 號、第 4,426,330 號、第 4,534,899 號、第 5,013,556 號、第 5,108,921 號、第 5,213,804 號、第 5,227,170 號、第 5,264,221 號、第 5,356,633 號、第 5,395,619 號、第 5,416,016 號、第 5,417,978 號、第 5,462,854 號、第 5,469,854 號、第 5,512,295 號、第 5,527,528 號、第

5,534,259 號、第 5,543,152 號、第 5,556,948 號、第 5,580,575 號及第 5,595,756 號，每一者皆以引用方式併入本文中。

儘管為調節靶表現及/或功能不需要在載體背景中投與反義寡核苷酸，但本發明實施例係關於用於表現反義寡核苷酸之表現載體構成物，其包括啟動子、雜合啟動子基因序列且具有較強組成型啟動子活性，或可在期望情形下誘導之啟動子活性。

在一實施例中，本發明實踐涉及使用適宜核酸遞送系統投與上述反義寡核苷酸中之至少一者。在一個實施例中，該系統包含可操作地連接至聚核苷酸之非病毒載體。該等非病毒載體之實例包含僅寡核苷酸(例如，SEQ ID NO: 3 至 8 之任一者或多者)或與適宜蛋白質、多糖或脂質調配物之組合。

另外，適宜核酸遞送系統包含病毒載體，其通常係來自腺病毒、腺病毒有關病毒(AAV)、輔助細胞依賴性腺病毒、逆轉錄病毒、或日本脂質體血凝病毒(HVJ)複合物中之至少一者之序列。較佳地，病毒載體包括可操作地連接至聚核苷酸之強真核生物啟動子(例如，巨細胞病毒(CMV)啟動子)。

另外，較佳載體包含病毒載體、融合蛋白及化學偶聯物。逆轉錄病毒載體包含 Moloney 鼠類白血病毒及基於 HIV 的病毒。一種較佳之基於 HIV 的病毒載體包括至少兩種載體，其中 gag 及 pol 基因來自 HIV 基因組且 env 基因來自

另一病毒。DNA病毒載體較佳。該等載體包含pox載體(例如正痘病毒或鳥痘病毒載體)、皰疹病毒載體(例如單純皰疹I病毒(HSV)載體)、腺病毒載體及腺有關病毒載體。

本發明之反義化合物涵蓋任一醫藥上可接受之鹽、酯、或該等酯之鹽、或在投與動物(包含人類)後能夠提供(直接或間接)生物活性代謝物或其殘基的任一其他化合物。

術語「醫藥上可接受之鹽」係指本發明化合物之生理上及醫藥上可接受之鹽：亦即，可保留母體化合物之期望生物活性且並不賦予其不期望毒理學效應之鹽。對於寡核苷酸而言，醫藥上可接受之鹽及其應用之較佳實例進一步闡述於美國專利第6,287,860號中，其以引用方式併入本文中。

本發明亦包含含有本發明之反義化合物之醫藥組合物及調配物。端視期望局部抑或全身性治療及擬治療區域，本發明之醫藥組合物可以各種方式投與。投與可為局部(包含眼部投與及投與至黏膜，包含陰道及直腸遞送)、肺部(例如，藉由吸入或噴射粉末或氣溶膠，包含藉由霧化器)；氣管內、鼻內、表皮及經皮、經口或非經腸投與。非經腸投與包含靜脈內、動脈內、皮下、腹膜腔內或肌內注射或輸注；或顱內(例如，鞘內或腦室內)投與。

為治療中樞神經系統中之組織，可藉由(例如)注射或輸注至腦脊髓液中來進行投與。反義RNA在腦脊髓液中之投與闡述於(例如)美國專利申請公開案第2007/0117772號之

「Methods for slowing familial ALS disease progression」

中，其全部內容以引用方式併入本文中。

在意欲將本發明之反義寡核苷酸投與中樞神經系統之細胞中時，可投與一或多種能夠促進標的反義寡核苷酸滲透經過血腦障壁之藥劑。可在(例如)內嗅皮層或海馬區中進行注射。藉由向肌肉組織中之運動神經元投與腺病毒載體來遞送神經營養因子闡述於(例如)美國專利第6,632,427號之「Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons」中，其以引用方式併入本文中。業內已知將載體直接遞送至腦(例如，紋狀體、丘腦、海馬區或黑質)中並闡述於(例如)美國專利第6,756,523號之「Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain」中，其以引用方式併入本文中。可藉由注射快速投與或經一定時間藉由緩慢輸注或投與緩釋調配物進行投與。

標的反義寡核苷酸亦可與提供期望醫藥或藥效動力學性質之藥劑連接或偶聯。舉例而言，反義寡核苷酸可與業內已知的促進滲透或輸送跨過血腦障壁之任一物質(例如鐵傳遞蛋白受體之抗體)偶合，並藉由靜脈內注射投與。反義化合物可與病毒載體連接，該病毒載體可(例如)使反義化合物更有效及/或促進反義化合物輸送跨過血腦障壁。亦可藉由(例如)輸注以下物質來破壞滲透性血腦障壁：糖，包含但不限於內消旋赤藻糖醇、木糖醇、D(+)半乳糖、D(+)乳糖、D(+)木糖、衛矛醇、肌-肌醇、L(-)果糖、

D(-)甘露醇、D(+)葡萄糖、D(+)阿拉伯糖、D(-)阿拉伯糖、纖維二糖、D(+)麥芽糖、D(+)棉子糖、L(+)鼠李糖、D(+)蜜二糖、D(-)核糖、核糖醇、D(+)阿糖醇、L(-)阿糖醇、D(+)岩藻糖、L(-)岩藻糖、D(-)來蘇糖、L(+)來蘇糖及L(-)來蘇糖；或胺基酸，包含但不限於麩醯胺酸、離胺酸、精胺酸、天門冬醯胺、天門冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、甘胺酸、組胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、纈胺酸及牛磺酸。用於增強血腦障壁滲透之方法及材料闡述於(例如)美國專利第4,866,042號之「Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier」、第6,294,520號之「Material for passage through the blood-brain barrier」及第6,936,589號之「Parenteral delivery systems」中，其全部內容皆以引用方式併入本文中。

本發明標的之反義化合物可與其他分子、分子結構或化合物混合物(例如，脂質體、靶向受體之分子、經口、直腸、局部或其他調配物)混合、囊封、偶聯或以其他方式結合，以有助於攝取、分佈及/或吸收。舉例而言，陽離子型脂質可包含於調配物中以促進寡核苷酸攝取。一種顯示可促進攝取之該組合物係LIPOFECTIN(購自GIBCO-BRL, Bethesda, MD)。

據信，具有至少一個2'-O-甲氧基乙基修飾之寡核苷酸尤其適用於經口投與。用於局部投與之醫藥組合物及調配物可包括經皮貼片、軟膏、洗劑、乳膏、凝膠、滴劑、栓

劑、噴霧劑、液體及粉末。可能需要或期望習用醫藥載劑、水性、粉末或油性基質、增稠劑及諸如此類。經過塗覆之避孕套、手套及諸如此類可能亦適用。

可便利地以單位劑型呈現之本發明醫藥調配物可根據醫藥工業中熟知之習用技術製得。該等技術包括使活性成份與醫藥載劑(群)或賦形劑(群)結合之步驟。一般而言，調配物可藉由使活性成份與液體載劑或微細固體載劑或二者均勻且充分結合，且然後(若必要)使該產物成型來製備。

可將本發明組合物調配成許多可能劑型中之任一者，例如但不限於錠劑、膠囊、凝膠膠囊、液體糖漿、軟質凝膠、栓劑、及灌腸劑。本發明組合物亦可調配成存於水性、非水性或混合介質中之懸浮液。水性懸浮液可進一步含有可增加懸浮液黏度之物質，其包含(例如)羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇及/或右旋糖酐。懸浮液亦可含有穩定劑。

本發明之醫藥組合物包括但不限於溶液、乳液、發泡體及含有脂質體之調配物。本發明之醫藥組合物及調配物可包括一或多種滲透增強劑、載劑、賦形劑或其他活性或無活性成份。

乳液通常係一種液體分散於另一液滴形式液體(直徑通常超過0.1 μm)的不均相系統。乳液除分散相外亦可含有額外組份、及可存於水相、油相中呈現溶液形式或自身作為分離相的活性藥物。本發明一實施例包含微乳液。乳液及其應用在業內已眾所周知且進一步闡述於美國專利第

6,287,860號中。

本發明調配物包含脂質體調配物。本發明所用之術語「脂質體」意指由兩親性脂質佈置成一或多個球形雙層所組成的囊泡。脂質體係單層或多層囊泡，其具有自親脂性材料形成之膜及含有擬遞送組合物之水性內部結構。陽離子型脂質體係帶正電之脂質體，據信其可與帶負電之DNA分子相互作用以形成穩定複合物。對pH敏感或帶負電之脂質體據信可捕獲DNA而非與其複合。陽離子型及非陽離子型脂質體皆可用於向細胞遞送DNA。

脂質體亦包含「空間穩定」之脂質體，本文所用之該術語係指包括一或多種特定脂質之脂質體。在納入脂質體中時，該等特定脂質會產生相對於缺乏該等特定脂質之脂質體具有延長之循環壽命的脂質體。空間穩定脂質體之實例係彼等脂質體中形成囊泡之脂質部分包括一或多種糖脂或衍生自一或多種親水性聚合物(例如聚乙二醇(PEG)部分)者。脂質體及其應用進一步闡述於美國專利第6,287,860號中。

本發明之醫藥調配物及組合物亦可包含表面活性劑。表面活性劑在藥物產物、調配物及乳液中之應用在業內已眾所周知。表面活性劑及其應用進一步闡述於美國專利第6,287,860號中，其以引用方式併入本文中。

在一個實施例中，本發明採用各種滲透增強劑來實現核酸、尤其寡核苷酸之有效遞送。除有助於非親脂性藥物在細胞膜中之擴散外，滲透增強劑亦增強親脂性藥物之滲透

性。滲透增強劑可歸類為屬於5大類中之一者：亦即，表面活性劑、脂肪酸、膽汁鹽、螯合劑及非螯合性非表面活性劑。滲透增強劑及其應用進一步闡述於美國專利第6,287,860號中，其以引用方式併入本文中。

熟習此項技術者應認識到，調配物通常根據其預期應用(亦即投與途徑)來進行設計。

用於局部投與之較佳調配物包含彼等本發明寡核苷酸與局部遞送劑混合者，該局部遞送劑係(例如)脂質、脂質體、脂肪酸、脂肪酸酯、類固醇、螯合劑及表面活性劑。較佳脂質及脂質體包含中性脂質及脂質體(例如二油醯基-磷脂醯基 DOPE 乙醇胺、二肉豆蔻醯基磷脂醯基膽鹼 DMPC、二硬脂醯基磷脂醯基膽鹼)、負脂質及脂質體(例如二肉豆蔻醯基磷脂醯基甘油 DMPG)及陽離子型脂質及脂質體(例如二油醯基四甲基胺基丙基 DOTAP 及二油醯基-磷脂醯基乙醇胺 DOTMA)。

對於局部或其他投與而言，本發明之寡核苷酸可囊封於脂質體內或可與其形成複合物(尤其陽離子型脂質體)。另一選擇為，寡核苷酸可與脂質、尤其陽離子型脂質複合。較佳脂肪酸及酯、其醫藥上可接受之鹽、及其應用進一步闡述於美國專利第6,287,860號中。

用於經口投與之組合物及調配物包含粉末或粒子、微顆粒、奈米顆粒、存於水或非水性介質中之懸浮液或溶液、膠囊、凝膠膠囊、藥囊、錠劑或微錠劑。可能期望使用增稠劑、矯味劑、稀釋劑、乳化劑、分散助劑或黏合劑。較

佳口服調配物係彼等本發明寡核苷酸與一或多種滲透增強劑、表面活性劑及螯合劑聯合投與者。較佳表面活性劑包含脂肪酸及/或其酯或鹽、膽汁酸及/或其鹽。較佳膽汁酸/鹽及脂肪酸及其應用進一步闡述於美國專利第6,287,860號中，其以引用方式併入本文中。亦較佳者係滲透增強劑之組合，例如，脂肪酸/鹽與膽汁酸/鹽之組合。尤佳之組合係月桂酸之鈉鹽、癸酸及UDCA。其他滲透增強劑包含聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-鯨蠟基醚。本發明之寡核苷酸可以粒子形式(包含噴霧乾燥顆粒、或經複合以形成微顆粒或奈米顆粒)經口遞送。寡核苷酸複合劑及其應用進一步闡述於美國專利第6,287,860號中，其以引用方式併入本文中。

用於非經腸、鞘內或心室內投與之組合物及調配物可包含亦可含有緩衝劑、稀釋劑及其他適宜添加劑之無菌水溶液，該等其他適宜添加劑係(例如)但不限於滲透增強劑、載劑化合物及其他醫藥上可接受之載劑或賦形劑。

本發明某些實施例提供含有一或多種寡聚化合物及一或多種藉由非反義機制發揮作用之其他化學治療劑之醫藥組合物。該等化學治療劑之實例包含但不限於癌症化學治療藥物，例如柔紅黴素(daunorubicin)、道諾黴素(daunomycin)、更生黴素(dactinomycin)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊達比星(idarubicin)、依索比星(esorubicin)、博來黴素、馬磷醯胺(mafosfamide)、異環磷醯胺(ifosfamide)、胞嘧啶阿糖核苷

(cytosine arabinoside)、亞硝脲氮芥(bischloroethyl-nitrosurea)、白消安(busulfan)、絲裂黴素 C(mitomycin C)、放線菌素 D(actinomycin D)、光輝黴素(mithramycin)、潑尼松(prednisone)、羥孕酮(hydroxyprogesterone)、睪酮(testosterone)、他莫昔芬(tamoxifen)、達卡巴嗪(dacarbazine)、丙卡巴肼(procarbazine)、六甲三聚氰胺(hexamethylmelamine)、五甲三聚氰胺(pentamethylmelamine)、米托蒽醌(mitoxantrone)、安吖啶(amsacrine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、環己亞硝脲(methylcyclohexylnitrosurea)、氮芥(nitrogen mustards)、美法侖(melphalan)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、6-巯嘌呤(6-mercaptopurine)、6-硫鳥嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氮雜胞苷(5-azacytidine)、羥基脲(hydroxyurea)、噴司他丁(deoxycoformycin)、4-羥基過氧環磷醯胺、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil) (5-FU)、5-氟去氧尿苷(5-fluorodeoxyuridine) (5-FUdR)、甲胺蝶呤(MTX)、秋水仙鹼(colchicines)、紫杉醇(taxol)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊甙(etoposide)(VP-16)、三甲曲沙(trimetrexate)、伊立替康(irinotecan)、托泊替坎(topotecan)、吉西他濱(gemcitabine)、替尼泊甙(teniposide)、順鉑(cisplatin)及己烯雌酚(diethylstilbestrol)(DES)。在與本發明化合物一起使用時，該等化學治療劑可單獨(例如，5-FU及寡核苷酸)、依序(例如，5-FU及寡核苷酸，隨後在一定時間之後

係MTX及寡核苷酸)、或與一或多種其他該等化學治療劑組合(例如, 5-FU、MTX及寡核苷酸, 或5-FU、放射療法及寡核苷酸)使用。抗炎藥(包含但不限于非類固醇抗炎藥及皮質類固醇, 以及抗病毒藥, 包含但不限于利巴韋林(ribivirin)、阿糖腺苷(vidarabine)、阿昔洛韋(acyclovir)及更昔洛韋(ganciclovir))亦可組合於本發明組合物中。反義化合物及其他非反義藥物之組合亦屬於本發明範疇內。兩種或更多種組合之化合物可一起或依序使用。

在另一相關實施例中, 本發明組合物可含有一或多種靶向第一核酸之反義化合物(尤其寡核苷酸)及一或多種靶向第二核酸靶之額外反義化合物。舉例而言, 第一靶可為BCL2結合部分3(BBC3)之特定反義序列, 且第二靶可為來自另一核苷酸序列之區域。另一選擇為, 本發明組合物可含有兩種或更多種靶向同一BCL2結合部分3(BBC3)核酸靶之不同區域的反義化合物。反義化合物之諸多實例闡釋於本文中且其他實例可選自業內已知之適宜化合物。兩種或更多種組合之化合物可一起或依序使用。

投藥：

據信, 彼等熟習此項技術者應瞭解治療性組合物之調配及其隨後之投與(投藥)。投藥取決於欲治療疾病狀態之嚴重程度及反應性, 其中治療過程可持續數天至數月, 或直至實現治癒或減輕疾病狀態為止。可藉由量測患者體內之藥物積累來計算最適投藥方案。熟習此項技術者可容易地確定最適劑量、投藥方法及重複速率。最適劑量可端視個

別寡核苷酸之相對功效而有所變化，且通常可基於發現在活體外及活體內動物模型中有效之EC50進行估計。一般而言，劑量為0.01 $\mu\text{g/kg}$ 體重至100 mg/kg 體重，且可每日、每週、每月或每年給予一次或更多次，或甚至每2至20年給予一次。熟習此項技術者可容易地基於體液或組織中藥物之所量測滯留時間及濃度來估計投藥的重複速率。成功治療後，可期望使患者維持該療法以預防疾病狀態復發，其中以介於0.01 $\mu\text{g/kg}$ 體重至100 mg/kg 體重之間之維持劑量投與寡核苷酸，且每日投與一次或更多次至每20年投與一次。

在實施例中，使用以下劑量之藥物來治療患者：至少約1 mg/kg 體重、至少約2 mg/kg 體重、至少約3 mg/kg 體重、至少約4 mg/kg 體重、至少約5 mg/kg 體重、至少約6 mg/kg 體重、至少約7 mg/kg 體重、至少約8 mg/kg 體重、至少約9 mg/kg 體重、至少約10 mg/kg 體重、至少約15 mg/kg 體重、至少約20 mg/kg 體重、至少約25 mg/kg 體重、至少約30 mg/kg 體重、至少約35 mg/kg 體重、至少約40 mg/kg 體重、至少約45 mg/kg 體重、至少約50 mg/kg 體重、至少約60 mg/kg 體重、至少約70 mg/kg 體重、至少約80 mg/kg 體重、至少約90 mg/kg 體重或至少約100 mg/kg 體重。反義寡核苷酸之某些注射劑量闡述於(例如)美國專利第7,563,884號之「Antisense modulation of PTP1B expression」中，其全部內容以引用方式併入本文中。

儘管上文已闡述本發明之各個實施例，然而，應理解，

該等實施例僅係以實例方式而非限制方式提供。可根據本文之揭示內容對所揭示實施例作出諸多改變，此並不背離本發明之精神或範疇。因此，本發明之廣度及範疇不應受上述實施例中之任一者限制。

本文所提及之所有文件皆以引用方式併入本文中。出於所有目的，在本申請案中引用之所有出版物及專利文件皆係以引用方式併入，其併入程度如同每一個別出版物或專利文件係單獨闡述一般。對於此文件中引用之各個參考文獻，申請者不承認任一特定參考文獻係其發明之「先前技術」。本發明組合物及方法之實施例闡釋於下列實例中。

實例

以下非限制性實例用於闡釋本發明之所選實施例。應瞭解，所示組份之元素之比率變化及代替物已為彼等熟習此項技術者所明瞭且屬於本發明實施例之範疇內。

實例 1：對 *BCL2* 結合部分 3(*BBC3*) 之反義核酸分子及/或 *BBC3* 聚核苷酸之正義鏈具有特異性之反義寡核苷酸的設計

如上所述，術語「對...具有特異性之寡核苷酸」或「靶向...之寡核苷酸」係指具有如下序列之寡核苷酸：(i) 能夠與靶向基因之一部分形成穩定複合物，或(ii) 能夠與靶向基因之 mRNA 轉錄物之一部分形成穩定雙鏈體。

藉由使用電腦程式(例如 IDT AntiSense Design, IDT OligoAnalyzer)來促進適當寡核苷酸之選擇，該等電腦程式自動鑑別每一給定序列中之 19-25 個核苷酸之子序列，該等子序列與靶聚核苷酸序列形成雜合體且具有期望熔融

溫度(通常為 50°C 至 60°C)，且不會形成自身二聚體或其他複雜二級結構。

藉由使用自動對準核酸序列並指示一致性或同源性區域之電腦程式來進一步促進適當寡核苷酸的選擇。使用該等程式藉由(例如)搜索諸如 GenBank 等數據庫或藉由對 PCR 產物測序來比較所獲得的核酸序列。對來自給定基因組中一定範圍基因及基因間區域之核酸序列進行比較使得可選擇對目標基因顯示適當特異性程度的核酸序列。該等程序使得可選擇對給定基因組中之靶核酸序列顯示高互補性程度且對其他核酸序列顯示較低互補性程度的寡核苷酸。熟習此項技術者應認識到，可在較大範圍中選擇適用於本發明中之基因區域。

在以下情形時反義化合物係「可特異性雜交」：化合物與靶核酸之結合可干擾靶核酸之正常功能以調節功能及/或活性，且存在足夠互補性程度以避免反義化合物與非靶核酸序列在期望發生特異性結合之條件下(亦即，在活體內分析或治療性治療情形中之生理條件下，及在活體外分析情形中實施分析之條件下)發生非特異性結合。

本文所述寡核苷酸之雜交性質可藉由業內已知之一或多個活體外分析進行測定。舉例而言，可藉由使用熔融曲線分析測定靶天然反義分子與潛在藥物分子間之結合強度來獲得本文所述寡核苷酸之性質。

可使用量測分子間相互作用之強度之已確立方法中的任一者(例如，熔融曲線分析)來估計靶天然反義分子與潛在

藥物分子(分子)間之結合強度。

熔融曲線分析可測定對於天然反義分子/分子複合物自雙鏈快速轉變成單鏈形態時之溫度。此溫度已廣泛接受作為兩個分子間相互作用強度之可靠量度。

可使用實際天然反義RNA分子之cDNA拷貝或對應於分子結合位點之合成DNA或RNA核苷酸來實施熔融曲線分析。可使用含有所有必需試劑以實施此分析之多個套組(例如Applied Biosystems公司, MeltDoctor套組)。該等套組包含含有雙鏈DNA (dsDNA)結合染料(例如ABI HRM染料、SYBR Green、SYTO等)中之一者的適宜緩衝溶液。dsDNA染料之性質在於其幾乎不發射游離形式之螢光,但在與dsDNA結合時具有高螢光性。

為實施分析,以由特定製造商方案界定之濃度將cDNA或相應寡核苷酸與分子混合。將混合物加熱至95°C以離解所有預形成之dsDNA複合物,然後緩慢冷卻至室溫或由套組製造商界定之其他較低溫度以使DNA分子退火。然後將新形成複合物緩慢加熱至95°C,同時繼續收集關於反應中所產生螢光之量的數據。螢光強度與反應中存在之dsDNA量成反比。可使用與套組相容之實時PCR儀器(例如ABI's StepOne Plus實時PCR系統或lightTyper儀器, Roche Diagnostics, Lewes, UK)來收集數據。

藉由使用適當軟體(例如lightTyper (Roche)或SDS Dissociation Curve, ABI)繪製螢光相對於溫度之負導數($-d(\text{螢光})/dT$, y軸)與溫度(x軸)的圖線來構建熔融峰。分

析數據以確定自dsDNA複合物快速轉變成單鏈分子時之溫度。此溫度稱為 T_m 且與兩個分子間之相互作用強度成正比。通常， T_m 高於 40°C 。

實例2：BBC3聚核苷酸之調節

使用反義寡核苷酸處理MCF-7細胞

實例2中所用之所有反義寡核苷酸皆如實例1中所述進行設計。指示製造商(IDT公司，Coralville, IA)來製造所設計之硫代磷酸酯鍵寡核苷酸並提供表1中所示之所設計硫代磷酸酯類似物。核苷酸間之星形符號表示存在硫代磷酸酯鍵。實例2中之實驗所需的寡核苷酸可使用任一適當技術狀態之方法來合成，例如IDT所用之方法：在固體載體(例如5微米定孔玻璃珠(CPG))上使用亞磷醯胺單體(常見核苷酸，其所有活性基團皆經保護基團保護，例如糖上之三苯甲基、A及C上之苯甲醯基及G上之N-2-異丁醯基)。保護基團在寡核苷酸合成期間可防止發生不期望之反應。在合成過程結束時去除保護基團。經由3'碳使初始核苷酸連接至固體載體且在3'至5'方向上進行合成。在以下4步中向生長之寡核苷酸鏈中添加新鹼基：1)使用三氯乙酸自固定核苷酸之5'氧處去除保護基團；2)使用四唑使經固定核苷酸與序列中之下一個核苷酸偶合至一起；經由四唑基亞磷醯胺中間體使反應繼續進行；3)洗滌除去未反應之游離核苷酸及反應副產物且將未反應之固定寡核苷酸封端以防止其參與下一輪合成；藉由使用乙酸酐及N-甲基咪唑對游離5'羥基實施乙醯化來達成封端；4)為穩定核苷酸間之鍵，使

用碘及水(若欲產生磷酸二酯鍵)、或Beaucage試劑(3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物)(若期望硫代磷酸酯鍵)來氧化磷。藉由交替使用兩種氧化劑，可構建嵌合主鏈。對於序列中之每一核苷酸而言，皆重複上述4步循環。合成完整序列時，在高溫下使用氫氧化銨自固體載體解離寡核苷酸並實施去保護。藉由去鹽來洗滌除去保護基團且將剩餘寡核苷酸凍乾。為實施實例2中所設計之實驗，在37°C及5% CO₂下於生長培養基(MEM/EBSS(Hyclone目錄編號：SH30024，或Mediatech目錄編號：MT-10-010-CV)+10% FBS(Mediatech目錄編號：MT35-011-CV)+青黴素(penicillin)/鏈黴素(streptomycin)(Mediatech目錄編號：MT30-002-CI))中生長來自ATCC之MCF-7細胞(目錄編號：HB-22)。在實驗前一天，以 1.5×10^5 個細胞/ml之密度將細胞再次平鋪於6孔板中並在37°C及5% CO₂下培育過夜。在實驗當天，將6孔板中之培養基更換為新鮮生長培養基。

將由製造商以凍乾形式運送之寡核苷酸在不含RNase/DNase之去離子水中稀釋至濃度為20 μM。將2 μl此溶液與400 μl OptiMEM培養基(Gibco目錄編號：31985-070)及4 μl Lipofectamine 2000 (Invitrogen目錄編號：11668019)在室溫下一起培育20 min，然後逐滴施加至6孔板中具有MCF-7細胞之一個孔中。使用包含2 μl水代替寡核苷酸溶液之相似混合物作為模擬轉染對照組。在37°C及5% CO₂下培育3至18 h之後，將培養基更換為新鮮生長培養基。添加反義寡核苷酸48 h後，去除培養基，且使用來

自 Promega 之 SV Total RNA 分離系統(目錄編號：Z3105)或來自 Qiagen 之 RNeasy Total RNA 分離套組(目錄編號：74181)根據製造商說明書自細胞提取 RNA。將 600 ng 提取之 RNA 添加至使用來自 Thermo Scientific 之 Verso cDNA 套組(目錄編號：AB1453B)或高容量 cDNA 逆轉錄套組(目錄編號：4368813)實施的逆轉錄反應中，如製造商方案中所述。使用來自此逆轉錄反應之 cDNA 藉由實時 PCR 使用 ABI Taqman Gene Expression Mix(目錄編號：4369510)及由 ABI 設計之引物/探針(Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assay：Hs00248075_m1，Applied Biosystems 公司，Foster City CA)來監測基因表現。使用 StepOne Plus 實時 PCR 機器(Applied Biosystems)來實施下列 PCR 循環：在 50°C 下保持 2 min，在 95°C 下保持 10 min，40 個循環之(在 95°C 下保持 15 秒，在 60°C 下保持 1 min)。基於經處理及模擬轉染試樣間 18S 標準化 dCt 值之差值來計算使用反義寡核苷酸處理後基因表現的變化倍數。

結果：實時 PCR 結果顯示，在使用設計為 BBC3 反義 mRNA CA306306 之寡核苷酸處理 48 h 之後，MCF-7 細胞中之 BBC3 mRNA 之含量顯著增加(圖 1)。

實例 3：用靶向 PUMA 特異性天然反義轉錄物之反義寡核苷酸處理後原代人類纖維母細胞中的細胞凋亡程度增大

在實例 3 中，在原代人類纖維母細胞中以 20 nM 之最終濃度測試靶向 PUMA 特異性天然反義轉錄物之反義寡核苷酸。以下數據確認，經由調節 PUMA 特異性天然反義轉錄

物之功能來上調PUMA mRNA與如由TUNEL分析測定之細胞凋亡程度增大有關。

材料及方法

用靶向PUMA特異性天然反義轉錄物之反義寡核苷酸處理原代人類纖維母細胞。於37°C及5% CO₂下使由Dr. N.Kenyon (University of Miami)引入培養基中之原代人類皮膚纖維母細胞在由a-MEM(Gibco, 目錄號: 12561-056)+10% FBS(Mediatech, 目錄號: 35-015 CV)+1% Antimycotic-Antibiotic(Gibco, 目錄號: 15240-062)組成之生長培養基中生長。使用Next Day方法用反義寡核苷酸處理細胞。在實驗前一天, 以約 2×10^5 個細胞/孔之密度將細胞平鋪於生長培養基中之6孔板中並在37°C及5% CO₂下培育過夜。第二天, 將6孔板中之培養基更換為新鮮培養基(1.5 ml/well)並對細胞投與反義寡核苷酸。所有反義寡核苷酸均係由IDT公司(Coralville, IA)製造。所有寡核苷酸之序列列於表1中。將寡核苷酸之儲存溶液於不含DNase/RNase之無菌水中稀釋至20 uM之濃度。向一個孔中投與2 ul此溶液與400 ul Opti-MEM培養基(Gibco目錄編號: 31985-070)及4 ul Lipofectamine 2000 (Invitrogen目錄編號: 11668019), 將其在室溫下一起培育20 min, 且逐滴施加至6孔板中具有細胞之一個孔中。使用包含2 ul水代替寡核苷酸溶液之相似混合物作為模擬轉染對照組。使用相同濃度之無活性寡核苷酸CUR-1505作為無活性對照組。在37°C及5% CO₂下培育約18 h之後, 將培養基更換為新鮮

生長培養基。添加反義寡核苷酸48小時後，去除培養基並使細胞胰蛋白酶化並以約70,000個細胞/孔之密度重新平鋪於96孔板中。在37℃及5% CO₂下培育24小時後，使用細胞進行TUNEL細胞凋亡分析。

TUNEL細胞凋亡分析。使用HT Titer TACS分析套組根據製造商之說明書(Trevigen目錄編號：4822-96-K)檢測細胞中之細胞凋亡程度。簡言之，將細胞固定於3.7%緩衝甲醛溶液(Sigma-252549)中，用PBS及100%甲醇(Sigma-M1775-1GA)沖洗並在用於分析之前在+4℃下儲存於80%乙醇(Sigma-493511)中。為標記DNA斷裂，去除乙醇，且使用PBS洗滌細胞並與蛋白酶K溶液在室溫下一起培育15分鐘，在水及PBS中沖洗，然後與TACS核酸酶溶液在37℃下一起培育10分鐘。培育後，使用PBS沖洗細胞，且添加過氧化氫溶液(Sigma-MKBD1394)。在室溫培育5分鐘後，於室溫下將細胞與1x TdT標記緩衝液一起培育5分鐘，然後丟棄緩衝液。隨後將細胞與標記反應混合物在37℃下一起培育一小時，然後添加1x TdT終止緩衝液並保持5分鐘。標記反應停止後，使用PBS洗滌細胞，與Strep-HRP溶液在室溫下一起培育10分鐘，使用PBS/Tween洗滌且與TACS蘭寶石在暗處一起培育30分鐘。藉由添加0.2N HCl (Fluka-343102)來停止反應，且在450 nm下於板讀數儀中讀取吸光度。除非另有說明，否則上述所有溶液均係以HT Titer TACS分析套組供應。

結果：如圖2中所示，在用20 nM靶向PUMA特異性天然

反義轉錄物之反義寡核苷酸處理後，原代人類纖維母細胞中之細胞凋亡程度增大超過5倍，該反義寡核苷酸先前顯示可上調PUMA mRNA含量(圖1，實例2)。與經具有類似化學性質之無活性寡核苷酸處理的對照組試樣相比，此上調顯著。結果指示，使用靶向PUMA特異性天然反義轉錄物之寡核苷酸上調PUMA mRNA可上調功能PUMA蛋白並增大細胞凋亡程度。

實例4：用靶向PUMA特異性天然反義轉錄物之反義寡核苷酸處理的原代人類纖維母細胞中的降低增殖能力

在實例4中，測試靶向PUMA特異性天然反義轉錄物之反義寡核苷酸抑制原代人類纖維母細胞之菌落形成的能力。以下數據確認，經由調節PUMA特異性天然反義轉錄物之功能來上調PUMA mRNA可使寡核苷酸處理之細胞中的增殖降低。

材料及方法

選殖發生分析。於37°C及5% CO₂下使由Dr. N.Kenyon (University of Miami)引入培養基中之原代人類皮膚纖維母細胞在由a-MEM(Gibco，目錄號：12561-056)+10% FBS(Mediatech，目錄號：35-015 CV)+1% Antimycotic-Antibiotic(Gibco，目錄號：15240-062)組成之生長培養基中生長。使用Next Day方法用反義寡核苷酸處理細胞。在實驗前一天，以約2x10⁵個細胞/孔之密度將細胞平鋪於生長培養基中之6孔板中並在37°C及5% CO₂下培育過夜。第二天，將6孔板中之培養基更換為新鮮培養基(1.5 ml/well)

並對細胞投與反義寡核苷酸。所有反義寡核苷酸均係由 IDT 公司 (Coralville, IA) 製造。所有寡核苷酸之序列列於表 1 中。將寡核苷酸之儲存溶液於不含 DNase/RNase 之無菌水中稀釋至 20 uM 之濃度。向一個孔中投與 2 ul 此溶液與 400 ul Opti-MEM 培養基 (Gibco 目錄編號：31985-070) 及 4 ul Lipofectamine 2000 (Invitrogen 目錄編號：11668019)，
○ 將其在室溫下一起培育 20 min，且逐滴施加至 6 孔板中具有細胞之一個孔中。使用包含 2 ul 水代替寡核苷酸溶液之相似混合物作為模擬轉染對照組。使用相同濃度之無活性寡核苷酸 CUR-1505 作為對照組。在 37°C 及 5% CO₂ 下培育約 18 h 之後，將培養基更換為新鮮生長培養基。添加反義寡核苷酸 48 小時後，去除培養基並使細胞胰蛋白酶化並以約 5000 個細胞/孔之密度重新平鋪於 6 孔板中。將板於 37°C、5% CO₂ 下培育 5 至 7 天直至形成 3 至 10 個細胞之菌落。
○ 固定菌落並為具有更好可視性而使用存於 95% 乙醇中之 0.25% 1,9-二甲基-亞甲基藍 (Sigma Aldrich，目錄號 34,108.8) 染色並用 PBS 沖洗。對菌落進行計數並將其數量與經無活性寡核苷酸處理之對照孔及經模擬轉染對照組進行比較。

結果：如圖 3 中所示，與經無活性寡核苷酸及模擬轉染對照組處理之細胞相比，由經靶向 PUMA 特異性天然反義轉錄物之反義寡核苷酸處理之原代纖維母細胞形成的菌落的數量減少。結果指示，由反義寡核苷酸上調之 PUMA mRNA 產生功能蛋白並減少活體外細胞增殖。

儘管已根據一或多個實施方案闡釋及闡述了本發明，但熟習此項技術者在閱讀並理解本說明書及附圖後可作出等效改變及修改。此外，儘管可能只根據多種實施方案中之一者揭示了本發明之特定特徵，但該特徵可與其他實施方案之一或多個其他特徵組合，此對於任何給定或特定之應用而言可能係合乎要求且有利的。

本揭示內容之摘要使得讀者可快速地確定技術揭示內容之性質。提交本摘要係基於以下理解：其並非用於解釋或限制下列申請專利範圍之範疇或含義。

【圖式簡單說明】

圖1顯示藉由投與MCF7細胞靶向PUMA特異性天然反義轉錄物之反義寡核苷酸的PUMA mRNA之上調。對MCF7乳腺癌細胞系投與20 nM靶向PUMA特異性天然反義轉錄物之不同反義寡核苷酸(CUR-1675、CUR-1676、CUR-1677、CUR-1678及CUR-1679)。投與48h後，藉由逆轉錄(RT)實時聚合酶鏈反應(PCR)對PUMA mRNA進行定量。基於經投與細胞(向細胞中添加CUR寡核苷酸)與模擬細胞(未向細胞中添加寡核苷酸)之間之18S標準化差值計算因PUMA mRNA之寡核苷酸處理的相對表現變化。表示為CUR-1675、CUR-1676、CUR-1677、CUR-1678及CUR-1679之條形分別對應於經SEQ ID NO: 3至7處理之試樣。

圖2顯示用靶向PUMA特異性天然反義轉錄物之反義寡核苷酸處理後之原代人類纖維母細胞中的細胞凋亡程度的增大，如由TUNEL分析所測定。CUR-1675-先前顯示上調

PUMA mRNA之靶向PUMA天然反義轉錄物的寡核苷酸；CUR-1505-具有類似化學性質之無活性寡核苷酸。表示為CUR-1675及CUR-1505之條形分別對應於使用SEQ ID NO: 3及8處理之試樣。***指示 $P < 0.001$

圖3顯示用靶向PUMA特異性天然反義轉錄物之反義寡核苷酸處理之原代人類纖維母細胞中的降低增殖能力，如由選殖發生分析所測定。CUR-1675-先前顯示上調PUMA mRNA之靶向PUMA天然反義轉錄物的寡核苷酸；CUR-1505-具有類似化學性質之無活性寡核苷酸。表示為CUR-1675及CUR-1509之條形分別對應於使用SEQ ID NO: 3及8處理之試樣。*指示 $P < 0.05$ 。

序列表說明-SEQ ID NO: 1：智人(Homo sapiens) BCL2 結合部分3(BBC3)，轉錄物變體3，mRNA(NCBI登錄號：NM_001127242)；SEQ ID NO: 2：天然BBC3反義序列(CA306306)；SEQ ID NO: 3至8：反義寡核苷酸。*表示硫代磷酸酯鍵。

序列表

<110> 美商歐科可娜有限責任公司

<120> 藉由抑制BCL2結合部分3 (BBC3)之天然反義轉錄物以治療BBC3相關疾病

<130> BBC3

<140> 100124653

<141> 2011-07-12

<150> 61/363,535

<151> 2010-07-12

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1347

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

gaggcgattg cgattgggtg agacccagta aggatggaaa gtgtagagga gacaggaatc      60
cacggctttg gaaaaaggaa ggacaaaact caccaaacca gagcagggca ggaagtaaca      120
atgagaaact gaaaaagaaa cggaatggaa agctatgaga caggatgaaa tttagcatgg      180
ggtctgcccc ggcatgtcca tggcaggcgc ccaggggctgc ttccacgacg tgggtccctt      240
gccagatttg tgagacaaga ggagcagcag cggcaccgcc cctcaccctg gagggctcctg      300
tacaatctca tcatgggact cctgccctta ccagggggcc acagagcccc cgagatggag      360
cccaattagg tgcctgcacc cgcccggttg acgtcaggga ctcggggggc aggccctcc      420
cacctcctga caccctggcc agcgcggggg actttctctg caccatgtag catactggac      480
tcccagccct gcctgtcccg ggggcggggc ggggcagcca ctccagcccc agcccagcct      540
gggggtgact gacggagatg cggactcctg ggtccctggc caagaagcca ggagagggac      600
ggctgatgga ctgagcatcg gaaggtggcg gtgaccgagg ggggtgggac tgagccgccc      660
gcctctgccg ccaccacca tctcaggaaa ggcgtgtgtg ctggtgcccg ttccagctgc      720
aggggtgaca ctgggagggg ggggctctcc tctcgggtgt ccttactctt gggcctggcc      780
tcaggccctt ggtgcttccc cccctcctcc tgggaggggg ccggtgaaga gcaaatgagc      840
caaacgtgac cactagcttc ctggagccag agagtggggc tcgtttgccg gttgctccag      900
cccgcgcccc agccatcttc cctgagccag ccggcgggtg gtgggcatgc ctgcctcacc      960
ttcatcaggg ggtggccagg agggggccag actgtgaatc ctgtgctctg ccggtgaccg      1020
ccccccgcc catcaatccc attgcatagg tttagagaga gcacgtgtga ccactggcat      1080
tcatttgggg ggtgggagat tttagctgaa gccgccccag ccttagtccc cagggccaaag      1140
cgctgggggg aagacgggga gtcaggaggg gggggaaaac tcggaagagg gaggagictg      1200
ggagtgggga gggatggccc agcctgtaag atactgtata tgcgtgctg tagataccgg      1260
aatgaatttt ctgtacatgt ttggttaatt tttttgtac atgatttttg tatgtttcct      1320
tttcaataaa atcagattgg aacagtg      1347

```

<210> 2

<211> 689

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

```

cttttctttt ctttttttag taaagatggg gtctcattat gtggccagg ttggtctcaa      60
actcctgggc tcaagtgatc ctccctcctt ggccctccaa agtgccctgga ttatggatc      120

```

gaggcaccat gccagcccc ggaatgttct tatttgtttg ttgttttgta gagacagggt 180
 ctacactatgt tgcccaggct ggtctcaaat tccagacctc aagcaatcgt tcatccttga 240
 cctcccaaaa tgctgggatt acagggttga gccaccacac cggcctataa tgttcttttg 300
 agaagaaaat gagtgtgaag gatagtggga atctggcttg gtggctggag gtagaaaaga 360
 tggggagagg ccaagagtct atttggccat aagcgttatc actagtcaaa atcctcccca 420
 cagctgggagc tgggtggctca cgtctgcaat cccagtatca cgggaaggccg agatgggtgg 480
 atcacctgag cccaggagtt ccagaccagc ctgggcaaca tgcggaaacc taactgggga 540
 ggctgggggtg ggaggaacgc ttgagcctgt gaggctgagg ctgcagtagg ctgtgatcgc 600
 acattgcact ccagctiggg cgacagagcg agacccttcc tcaaaaaaaaa aaaaaacggc 660
 atggccgcgg ccctcgtgcc gaattcttg 689

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反义寡核苷

<400> 3 20
 ccaccaagcc agattccac

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反义寡核苷

<400> 4 20
 atccacccat ctgggcttc

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反义寡核苷

<400> 5 20
 aggtcaagc gttcctccca

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反义寡核苷

<400> 6 21
 cccagttagg ttccgcatg t

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反义寡核苷

<400> 7
tctgtcgccc aagctggagt

20

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡核苷

<400> 8
cctctccacg cgagtagat t

21

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100124653

C12N 15/113 (2006.01)

※申請日：100.7.12

※IPC 分類：

A61K 31/7105 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

藉由抑制BCL2結合部分3(BBC3)之天然反義轉錄物以治療BBC3相關疾病

TREATMENT OF BCL2 BINDING COMPONENT 3 (BBC3) RELATED DISEASES BY INHIBITION OF NATURAL ANTISENSE TRANSCRIPT TO BBC3

二、中文發明摘要：

本發明係關於調節BCL2結合部分3(BBC3)之表現及/或功能之反義寡核苷酸，特定而言，該等反義寡核苷酸係藉由靶向BCL2結合部分3(BBC3)之天然反義聚核苷酸來進行調節。本發明亦係關於該等反義寡核苷酸之鑑別及其在治療與BBC3表現有關之疾病及病症中的用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to antisense oligonucleotides that modulate the expression of and/or function of BCL2 binding component 3 (BBC3), in particular, by targeting natural antisense polynucleotides of BCL2 binding component 3 (BBC3). The invention also relates to the identification of these antisense oligonucleotides and their use in treating diseases and disorders associated with the expression of BBC3.

七、申請專利範圍：

1. 一種在活體外調節生物系統中BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現的方法，其包括：使該系統與至少一種長度為5至30個核苷酸之反義寡核苷酸接觸，其中該至少一種寡核苷酸與BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之天然反義轉錄物的反向補體具有至少50%的序列一致性；由此調節該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現。
2. 如請求項1之調節生物系統中BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現的方法，其包括：使該生物系統與至少一種長度為5至30個核苷酸之反義寡核苷酸接觸，其中該至少一種寡核苷酸與聚核苷酸之反向補體具有至少50%的序列一致性，該聚核苷酸包括SEQ ID NO: 2之天然反義轉錄物核苷酸1至689內之5至30個連續核苷酸；由此調節該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現。
3. 一種在活體外調節患者細胞或組織中BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現的方法，其包括：使該等細胞或組織與至少一種長度為5至30個核苷酸之反義寡核苷酸接觸，其中該寡核苷酸與該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義寡核苷酸具有至少50%的序列一致性；由此在活體外調節患者細胞或組織中該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現。
4. 如請求項3之調節患者細胞或組織中BCL2結合部分

- 3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現的方法，其包括：使該生物系統與至少一種長度為5至30個核苷酸之反義寡核苷酸接觸，其中該至少一種寡核苷酸與聚核苷酸之反向補體具有至少50%的序列一致性，該聚核苷酸包括SEQ ID NO: 2之天然反義轉錄物核苷酸1至689內之5至30個連續核苷酸；由此調節該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現。
5. 一種在活體外調節生物系統中BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現的方法，其包括：使該系統與至少一種靶向該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之天然反義寡核苷酸中區域之反義寡核苷酸接觸；由此調節該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現。
 6. 如請求項5之方法，其中該BCL2結合部分3(BBC3)在活體外之功能及/或表現比對照組增加。
 7. 如請求項5之方法，其中該至少一種反義寡核苷酸靶向BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之天然反義序列。
 8. 如請求項5之方法，其中該至少一種反義寡核苷酸靶向核酸序列，該核酸序列包括BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之編碼及/或非編碼核酸序列。
 9. 如請求項5之方法，其中該至少一種反義寡核苷酸靶向BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之重疊及/或非重疊序列。
 10. 如請求項5之方法，其中該至少一種反義寡核苷酸包括一或多個選自以下之修飾：至少一個經修飾糖部分、至

少一個經修飾核苷間鍵聯、至少一個經修飾核苷酸及其組合。

11. 如請求項10之方法，其中該一或多個修飾包括至少一個選自以下之經修飾糖部分：經2'-O-甲氧基乙基修飾之糖部分、經2'-甲氧基修飾之糖部分、經2'-O-烷基修飾之糖部分、二環糖部分及其組合。
12. 如請求項10之方法，其中該一或多個修飾包括至少一個選自以下之經修飾核苷間鍵聯：硫代磷酸酯、2'-O甲氧基乙基(MOE)、2'-氟、磷酸烷基酯、二硫代磷酸酯、硫代磷酸烷基酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、胺基乙酸酯、羧甲基酯及其組合。
13. 如請求項10之方法，其中該一或多個修飾包括至少一個選自以下之經修飾核苷酸：肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA)、阿糖核酸(FANA)、其類似物、衍生物及組合。
14. 如請求項1之方法，其中該至少一種寡核苷酸包括至少一個闡述為SEQ ID NO: 3至8之寡核苷酸序列。
15. 一種在活體外調節哺乳動物細胞或組織中BCL2結合部分3(BBC3)基因之功能及/或表現的方法，其包括：使該等細胞或組織與至少一種長度為5至30個核苷酸之短干擾RNA (siRNA)寡核苷酸接觸，該至少一種siRNA寡核苷酸對BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義聚核苷酸具有特異性，其中該至少一種siRNA寡核苷酸與該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義及/或正義核酸分子中至少約5個連續核酸之互補序列具有至少50%的序列一致性；

及在活體外調節哺乳動物細胞或組織中之BCL2結合部分3(BBC3)之功能及/或表現。

16. 如請求項15之方法，其中該寡核苷酸與具有至少約5個連續核酸之序列具有至少80%的序列一致性，該序列與該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義及/或正義核酸分子互補。
17. 一種在活體外調節哺乳動物細胞或組織中BCL2結合部分3(BBC3)之功能及/或表現的方法，其包括：使該等細胞或組織與至少一種長度為約5至30個核苷酸之反義寡核苷酸接觸，該反義寡核苷酸對BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之正義及/或天然反義鏈之非編碼及/或編碼序列具有特異性，其中該至少一種反義寡核苷酸與至少一個闡述為SEQ ID NO: 1及2之核酸序列具有至少50%的序列一致性；及在活體外調節哺乳動物細胞或組織中該BCL2結合部分3(BBC3)之功能及/或表現。
18. 一種反義寡核苷酸之用途，其用以製造用於調節生物系統中BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現的藥劑，其中該寡核苷酸之長度為5至30個核苷酸且與BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之天然反義轉錄物之反向補體具有至少50%的序列一致性。
19. 如請求項18之用途，其中該寡核苷酸與包括SEQ ID NO: 2之天然反義轉錄物核苷酸1至689內之5至30個連續核苷酸之聚核苷酸之反向補體具有至少50%的序列一致性。
20. 一種反義寡核苷酸之用途，其用以製造用於調節患者細

胞或組織中BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現的藥劑，其中該反義寡核苷酸之長度為5至30個核苷酸且與該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義寡核苷酸具有至少50%的序列一致性。

21. 如請求項20之用途，其中該寡核苷酸與包括SEQ ID NO: 2之天然反義轉錄物核苷酸1至689內之5至30個連續核苷酸之聚核苷酸之反向補體具有至少50%的序列一致性。
22. 一種反義寡核苷酸之用途，其用以製造用於調節生物系統中BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之功能及/或表現的藥劑，其中該反義寡核苷酸靶向該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之天然反義寡核苷酸的區域。
23. 如請求項22之用途，其中該BCL2結合部分3(BBC3)在活體內之功能及/或表現比對照組增加。
24. 如請求項22之用途，其中該反義寡核苷酸靶向BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之天然反義序列。
25. 如請求項22之用途，其中該反義寡核苷酸靶向包括BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之編碼及/或非編碼核酸序列之核酸序列。
26. 如請求項22之用途，其中該反義寡核苷酸靶向BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之重疊及/或非重疊序列。
27. 如請求項22之用途，其中該反義寡核苷酸包括一或多個選自以下之修飾：至少一個經修飾糖部分、至少一個經修飾核苷間鍵聯、至少一個經修飾核苷酸及其組合。
28. 如請求項27之用途，其中該一或多個修飾包括至少一個

選自以下之經修飾糖部分：經2'-O-甲氧基乙基修飾之糖部分、經2'-甲氧基修飾之糖部分、經2'-O-烷基修飾之糖部分、二環糖部分及其組合。

29. 如請求項27之用途，其中該一或多個修飾包括至少一個選自以下之經修飾核苷間鍵聯：硫代磷酸酯、2'-O甲氧基乙基(MOE)、2'-氟、磷酸烷基酯、二硫代磷酸酯、硫代磷酸烷基酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、胺基乙酸酯、羧甲基酯及其組合。
30. 如請求項27之用途，其中該一或多個修飾包括至少一個選自以下之經修飾核苷酸：肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA)、阿糖核酸(FANA)、其類似物、衍生物及組合。
31. 如請求項18之用途，其中該寡核苷酸包括至少一個闡述為SEQ ID NO: 3至8之寡核苷酸序列。
32. 一種短干擾RNA (siRNA)寡核苷酸之用途，其用以製造用於調節哺乳動物細胞或組織中BCL2結合部分3(BBC3)基因之功能及/或表現的藥劑，其中該siRNA寡核苷酸之長度為5至30個核苷酸且對BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義聚核苷酸具有特異性，其中該siRNA寡核苷酸與該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義及/或正義核酸分子中之至少約5個連續核酸之互補序列具有至少50%的序列一致性。
33. 如請求項32之用途，其中該寡核苷酸與具有至少約5個連續核酸之序列具有至少80%的序列一致性，該序列與該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義及/或正義核酸

分子互補。

34. 一種反義寡核苷酸之用途，其用以製造用於調節哺乳動物細胞或組織中BCL2結合部分3(BBC3)之功能及/或表現的藥劑，其中該反義寡核苷酸之長度為約5至30個核苷酸且對BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之正義及/或天然反義鏈之非編碼及/或編碼序列具有特異性，其中該反義寡核苷酸與至少一個闡述為SEQ ID NO: 1及2之核酸序列具有至少50%的序列一致性。

35. 一種包括至少一個修飾之合成的經修飾寡核苷酸，其中該至少一個修飾選自：至少一個經修飾糖部分、至少一個經修飾核苷酸間鍵聯、至少一個經修飾核苷酸及其組合；其中該寡核苷酸係在活體內或活體外與BCL2結合部分3(BBC3)基因雜交且與正常對照組相比，可調節該BCL2結合部分3(BBC3)基因之功能及/或表現之反義化合物，且其中該寡核苷酸與至少約5個連續核酸之序列具有至少50%的序列一致性，該序列與該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義及/或正義核酸分子及其等位基因、同系物、同種型、變體、衍生物、突變體、片段或組合互補。

36. 如請求項35之寡核苷酸，其中該寡核苷酸之長度為5至30個核苷酸，且與該BBC3基因之天然反義轉錄物內5至30個連續核苷酸之反向補體具有至少50%的序列一致性。

37. 如請求項36之寡核苷酸，其中該至少一個修飾包括選自

由以下組成之群之核苷酸間鍵聯：硫代磷酸酯、膦酸烷基酯、二硫代磷酸酯、硫代膦酸烷基酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、胺基乙酸酯、羧甲基酯及其組合。

38. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括至少一個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯。
39. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯之主鏈。
40. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括至少一個經修飾核苷酸，該經修飾核苷酸選自：肽核酸、鎖核酸(LNA)、其類似物、衍生物及組合。
41. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括複數個修飾，其中該等修飾包括選自以下之經修飾核苷酸：硫代磷酸酯、膦酸烷基酯、二硫代磷酸酯、硫代膦酸烷基酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、胺基乙酸酯、羧甲基酯及其組合。
42. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括複數個修飾，其中該等修飾包括選自以下之經修飾核苷酸：肽核酸、鎖核酸(LNA)、其類似物、衍生物及組合。
43. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括至少一個選自以下之經修飾糖部分：經2'-O-甲氧基乙基修飾之糖部分、經2'-甲氧基修飾之糖部分、經2'-O-烷基修飾之糖部分、二環糖部分及其組合。
44. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括複數個修

飾，其中該等修飾包括選自以下之經修飾糖部分：經2'-O-甲氧基乙基修飾之糖部分、經2'-甲氧基修飾之糖部分、經2'-O-烷基修飾之糖部分、二環糖部分及其組合。

45. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸之長度為至少約5至30個核苷酸且與BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義及/或正義鏈雜交，其中該寡核苷酸與該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義及/或正義編碼及/或非編碼核酸序列中至少約5個連續核酸之互補序列具有至少約60%的序列一致性。
46. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸與該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之反義及/或正義編碼及/或非編碼核酸序列之至少約5個連續核酸之互補序列具有至少約80%的序列一致性。
47. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸在活體內或活體外與至少一種BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸雜交，並相對於正常對照組，可調節該BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之表現及/或功能。
48. 如請求項36之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括闡述為SEQ ID NO: 3至8之序列。
49. 一種醫藥組合物，其包括一或多種如請求項35之對一或多種BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸具有特異性之寡核苷酸及醫藥上可接受之賦形劑。
50. 如請求項49之組合物，其中該等寡核苷酸與闡述為SEQ ID NO: 3至8之核苷酸序列中之任一者比對，具有至少約

40%的序列一致性。

51. 如請求項49之組合物，其中該等寡核苷酸包括闡述為SEQ ID NO: 3至8之核苷酸序列。
52. 如請求項51之組合物，其中該等闡述為SEQ ID NO: 3至8之寡核苷酸包括一或多個修飾或取代。
53. 如請求項52之組合物，其中該一或多個修飾選自：硫代磷酸酯、膦酸甲酯、肽核酸、鎖核酸(LNA)分子及其組合。
54. 一種反義寡核苷酸之用途，其用以製造用於預防或治療與至少一種BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸及/或其至少一種編碼產物有關之疾病的藥劑，其中該反義寡核苷酸與該至少一種BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸之天然反義序列結合並調節該至少一種BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸的表現。
55. 如請求項54之用途，其中與該至少一種BCL2結合部分3(BBC3)聚核苷酸有關之疾病選自：與BBC3之異常功能及/或表現有關之疾病或病症、癌症、增殖性疾病或病症、與細胞增殖有關或特徵在於細胞增殖之疾病或病狀、與BBC3之突變或異常表現或功能有關之疾病或病症、神經疾病或病症、發炎、以發炎關節成為病變之一部分的病狀(例如，骨關節炎、關節炎、牛皮癬性關節炎、幼年型關節炎、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)、與潰瘍性結腸炎有關之關節炎、惠伯爾病(Whipple's disease)、與肉芽腫回腸結腸炎有關之關節

炎、貝切特氏病(Behcet's disease)、全身性紅斑狼瘡、乾燥症候群(Sjogren's syndrome)及混合型結締組織病等)、與粒線體細胞凋亡途徑損傷有關之疾病或病症、自體免疫性疾病或病症,及與神經元細胞死亡有關之疾病或病症、衰老或特徵在於不期望細胞損失之其他病狀。

56. 一種活體外誘導生物系統中之細胞凋亡的方法,其包括向該系統投與寡核苷酸,該寡核苷酸之長度為5至30個核苷酸且與BBC3聚核苷酸之天然反義轉錄物之反向補體內的5至30個連續核苷酸至少50%一致。

57. 如請求項56之方法,其中該天然反義轉錄物具有SEQ ID NO: 2。

58. 如請求項56之方法,其中該生物系統係患者細胞或組織。

59. 一種活體外誘導生物系統中之細胞凋亡的方法,其包括向該系統投與長度為約5至30個核苷酸之寡核苷酸,其中該寡核苷酸藉由靶向靶基因之天然反義轉錄物來上調該基因,且其中該寡核苷酸與該經上調基因之天然反義轉錄物的反向補體至少50%一致。

60. 一種寡核苷酸之用途,其用以製造用於誘導生物系統中之細胞凋亡之藥劑,其中該寡核苷酸之長度為5至30個核苷酸且與BBC3聚核苷酸之天然反義轉錄物之反向補體內的5至30個連續核苷酸至少50%一致。

61. 如請求項60之用途,其中該天然反義轉錄物具有SEQ ID NO: 2。

62. 如請求項 60 之用途，其中該生物系統係患者細胞或組織。
63. 一種寡核苷酸之用途，其用以製造用於誘導生物系統中之細胞凋亡之藥劑，其中該寡核苷酸之長度為約 5 至 30 個核苷酸且藉由靶向靶基因之天然反義轉錄物來上調該基因，且其中該寡核苷酸與該經上調基因之天然反義轉錄物之反向補體至少 50% 一致。
64. 一種鑑別及選擇至少一種對作為選定靶聚核苷酸之 BBC3 基因之天然反義轉錄物具有選擇性之寡核苷酸供於活體內投與之方法，該方法包括：鑑別至少一種包括至少 5 個連續核苷酸的寡核苷酸，該等至少 5 個連續核苷酸與該選定靶聚核苷酸之反義聚核苷酸至少部分互補；在嚴格雜交條件下量測反義寡核苷酸與該靶聚核苷酸或該選定靶聚核苷酸之反義聚核苷酸之雜合體的熱熔點；及基於所獲得資訊選擇至少一種寡核苷酸用於活體內投與。

八、圖式：

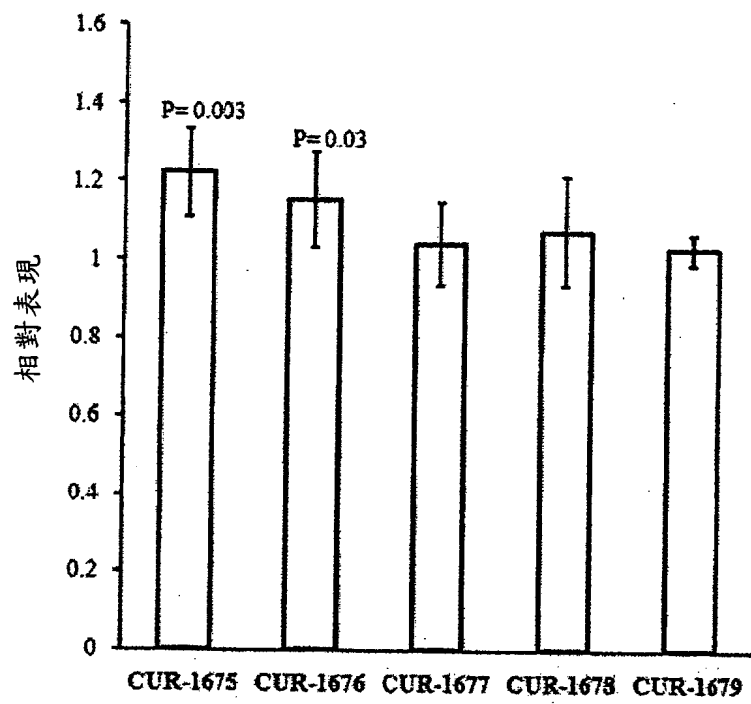


圖 1

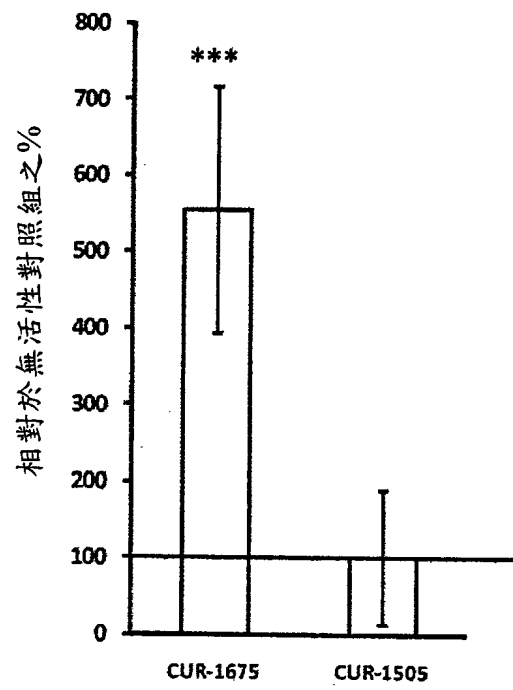


圖 2

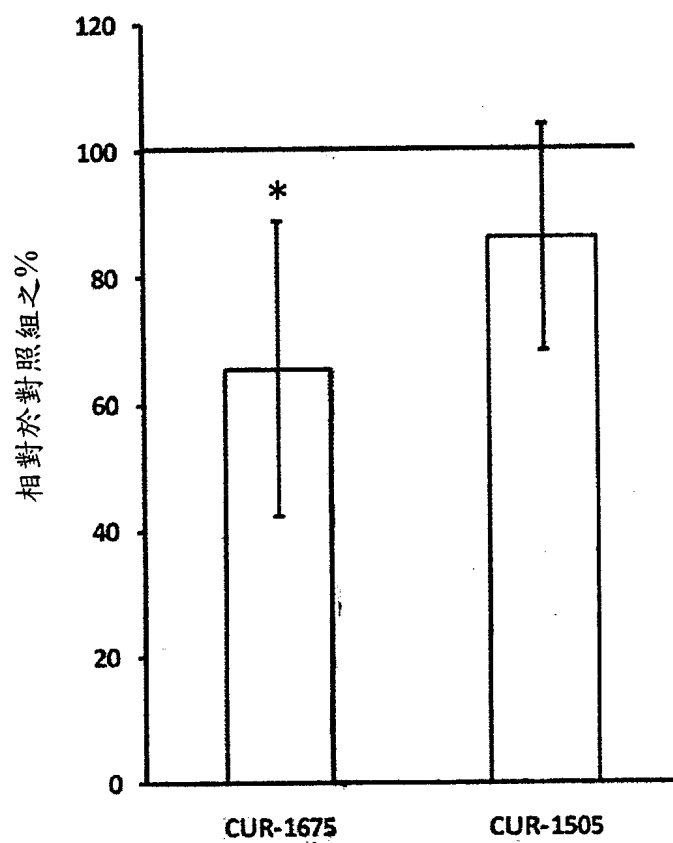


圖 3