



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106146591 B

(45)授权公告日 2020.07.31

(21)申请号 201610643333.5

(22)申请日 2011.01.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106146591 A

(43)申请公布日 2016.11.23

(30)优先权数据

61/293,604 2010.01.08 US

(62)分案原申请数据

201180008657.7 2011.01.07

(73)专利权人 IONIS制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 R·M·克鲁克 M·J·格雷厄姆

R·李 K·W·多比

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 赵昊 吴瑜

(51)Int.Cl.

C07H 21/02(2006.01)

A61K 31/7115(2006.01)

A61P 3/00(2006.01)

A61P 3/08(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 3/04(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

(56)对比文件

US 2007/0054856 A1,2007.03.08,

US 2008/0177045 A1,2008.07.24,

US 2008/0255030 A1,2008.10.16,

CN 101589143 A,2009.11.25,

审查员 马永涛

权利要求书5页 说明书59页

序列表43页

(54)发明名称

血管生成素样3表达的调节

(57)摘要

本文提供的是用于减少动物中ANGPTL3 mRNA和蛋白的表达的方法、化合物和组合物。本文还提供的是用于在动物中减少血浆脂质、血浆葡萄糖和动脉粥样硬化斑块的方法、化合物和组合物。此类方法、化合物和组合物可用于治疗、预防、延缓或减轻任何一种或多种心血管疾病或代谢疾病或其症状。

1. 由经修饰的寡核苷酸或与缀合物基团缀合的经修饰寡核苷酸组成的化合物在制备用于减轻动物中的代谢疾病或心血管疾病的药物中的用途, 其中所述经修饰的寡核苷酸长度为15至30个连接核苷, 其中如对所修饰的寡核苷酸的整体性所测量, 所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO:1-5中任一序列至少95%互补的核碱基序列, 其中所述经修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键、修饰的糖部分和/或修饰的核碱基, 其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

- a. 由连接脱氧核苷组成的缺口区段;
- b. 由连接核苷组成的5' 翼区段;
- c. 由连接核苷组成的3' 翼区段;

其中所述缺口区段位于5' 翼区段与3' 翼区段之间并且每个翼区段中的每个核苷包含经修饰的糖, 其中所述修饰的寡核苷酸能够在动物中减少 $\geq 40\%$ 的ANGPTL3的表达, 其中所述代谢疾病或心血管疾病与动物中的胆固醇水平、甘油三酯水平和/或葡萄糖水平的变化有关。

2. 由经修饰的寡核苷酸或与缀合物基团缀合的经修饰寡核苷酸组成的化合物在制备用于减少动物中的甘油三酯水平的药物中的用途, 其中所述经修饰的寡核苷酸长度为15至30个连接核苷, 其中如对所修饰的寡核苷酸的整体性所测量, 所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO:1-5中任一序列至少95%互补的核碱基序列, 其中所述经修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键、修饰的糖部分和/或修饰的核碱基, 其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

- a. 由连接脱氧核苷组成的缺口区段;
- b. 由连接核苷组成的5' 翼区段;
- c. 由连接核苷组成的3' 翼区段;

其中所述缺口区段位于5' 翼区段与3' 翼区段之间并且每个翼区段中的每个核苷包含经修饰的糖, 其中所述修饰的寡核苷酸能够在动物中减少 $\geq 40\%$ 的ANGPTL3的表达。

3. 由经修饰的寡核苷酸或与缀合物基团缀合的经修饰寡核苷酸组成的化合物在制备用于减少动物中的胆固醇水平的药物中的用途, 其中所述经修饰的寡核苷酸长度为15至30个连接核苷, 其中如对所修饰的寡核苷酸的整体性所测量, 所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO:1-5中任一序列至少95%互补的核碱基序列, 其中所述经修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键、修饰的糖部分和/或修饰的核碱基, 其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

- a. 由连接脱氧核苷组成的缺口区段;
- b. 由连接核苷组成的5' 翼区段;
- c. 由连接核苷组成的3' 翼区段;

其中所述缺口区段位于5' 翼区段与3' 翼区段之间并且每个翼区段中的每个核苷包含经修饰的糖, 其中所述修饰的寡核苷酸能够在动物中减少 $\geq 40\%$ 的ANGPTL3的表达。

4. 由经修饰的寡核苷酸或与缀合物基团缀合的经修饰寡核苷酸组成的化合物在制备用于减少动物中的低密度脂蛋白 (LDL) 水平的药物中的用途, 其中所述经修饰的寡核苷酸长度为15至30个连接核苷, 其中如对所修饰的寡核苷酸的整体性所测量, 所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO:1-5中任一序列至少95%互补的核碱基序列, 其中所述经修

饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键、修饰的糖部分和/或修饰的核碱基,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

- a. 由连接脱氧核苷组成的缺口区段;
- b. 由连接核苷组成的5' 翼区段;
- c. 由连接核苷组成的3' 翼区段;

其中所述缺口区段位于5' 翼区段与3' 翼区段之间并且每个翼区段中的每个核苷包含经修饰的糖,其中所述修饰的寡核苷酸能够在动物中减少 $\geq 40\%$ 的ANGPTL3的表达。

5. 由经修饰的寡核苷酸或与缀合物基团缀合的经修饰寡核苷酸组成的化合物在制备用于减少动物中的葡萄糖水平的药物中的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸长度为15至30个连接核苷,其中如对所经修饰的寡核苷酸的整体性所测量,所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO:1-5中任一序列至少95%互补的核碱基序列,其中所述经修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键、修饰的糖部分和/或修饰的核碱基,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

- a. 由连接脱氧核苷组成的缺口区段;
- b. 由连接核苷组成的5' 翼区段;
- c. 由连接核苷组成的3' 翼区段;

其中所述缺口区段位于5' 翼区段与3' 翼区段之间并且每个翼区段中的每个核苷包含经修饰的糖,其中所述修饰的寡核苷酸能够在动物中减少 $\geq 40\%$ 的ANGPTL3的表达。

6. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述缀合物基团是碳水化合物缀合物基团。

7. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述动物是人。

8. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸是第一活性剂,并且还包括施用第二活性剂。

9. 权利要求8所述的用途,其中共施用所述第一活性剂和第二活性剂。

10. 权利要求8中任一项所述的用途,其中所述第二活性剂是葡萄糖降低剂。

11. 权利要求10所述的用途,其中所述葡萄糖降低剂是PPAR激动剂、二肽基肽酶IV抑制剂、GLP-1类似物、胰岛素或胰岛素类似物、胰岛素促泌素、SGLT2抑制剂、人胰淀素类似物、双胍类、 α -糖苷酶抑制剂或其组合。

12. 权利要求10所述的用途,其中所述葡萄糖降低剂是二甲双胍、磺酰脲、罗格列酮或其组合。

13. 权利要求10所述的用途,其中所述葡萄糖降低剂是选自以下的磺酰脲:醋酸己脲、氯磺丙脲、甲苯磺丁脲、妥拉磺脲、格列美脲、格列吡嗪、格列本脲或格列奇特。

14. 权利要求10所述的用途,其中所述葡萄糖降低剂是二甲双胍。

15. 权利要求10所述的用途,其中所述葡萄糖降低剂是选自那格列奈或瑞格列奈的美格列奈(meglitinide)。

16. 权利要求10所述的用途,其中所述葡萄糖降低剂是选自吡格列酮或罗格列酮的噻唑烷二酮类。

17. 权利要求10所述的用途,其中所述葡萄糖降低剂是选自阿卡波糖或米格列醇的 α -糖苷酶抑制剂。

18. 权利要求8所述的用途,其中所述第二活性剂是降脂剂。

19. 权利要求18所述的用途,其中所述降脂质剂是HMG-CoA还原酶抑制剂、胆固醇吸收抑制剂、MTP抑制剂、靶向于ApoB的反义化合物或其任何组合。

20. 权利要求18所述的用途,其中所述降脂质剂是选自以下的HMG-CoA还原酶抑制剂:阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、罗苏伐他汀或辛伐他汀。

21. 权利要求18所述的用途,其中所述降脂质剂是胆固醇吸收抑制剂依泽替米贝。

22. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述药物的施用包含胃肠外施用。

23. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸由单链经修饰的寡核苷酸组成。

24. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO: 1-5中任一个100%互补的核碱基序列,如对所述经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的。

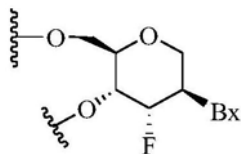
25. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷间键合是经修饰的核苷间键合。

26. 权利要求25所述的用途,其中每个核苷间键合是硫代磷酸酯核苷间键合。

27. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷包含经修饰的糖。

28. 权利要求27所述的用途,其包含至少一个经四氢吡喃修饰的核苷,其中四氢吡喃环代替呋喃糖环。

29. 权利要求28所述的用途,其中至少一个经四氢吡喃修饰的核苷中的每一个具有以下结构:



其中Bx是任选保护的杂环碱基部分。

30. 权利要求27所述的用途,其中至少一种经修饰的糖是双环糖。

31. 权利要求27所述的用途,其中至少一种经修饰的糖包含2'-O-甲氧基乙基或4'-(CH₂)_n-O-2' 桥,其中n是1或2。

32. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷包含经修饰的核碱基。

33. 权利要求32所述的用途,其中所述经修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。

34. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸由10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连接核苷组成。

35. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸具有包含如SEQ ID NO: 41、34-40和42-182中任一个序列的至少15个连续核碱基的核碱基序列。

36. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成,具有包含选自SEQ ID NO: 41、34-40和42-182中任一个的核碱基序列的至少15个连续核碱基的核碱基序列,并且包含:

- a. 由10个连接脱氧核苷组成的缺口区段;
- b. 由5个连接核苷组成的5' 翼区段;

c. 由5个连接核苷组成的3'翼区段;

其中所述缺口区段位于5'翼区段与3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中每个核苷间键合是硫代磷酸酯键合,并且其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

37. 经修饰的寡核苷酸在制备用于治疗患有代谢疾病或心血管疾病的动物的药物中的用途,

其中鉴定患有代谢疾病或心血管疾病的所述动物,

其中所述药物包含治疗有效量的经修饰的寡核苷酸,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有与SEQ ID NO:1-5至少95%互补的核碱基序列,如对经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

a. 由连接脱氧核苷组成的缺口区段;

b. 由连接核苷组成的5'翼区段;

c. 由连接核苷组成的3'翼区段;

其中所述缺口区段位于5'翼区段与3'翼区段之间并且每个翼区段中的每个核苷包含经修饰的糖,且其中所述代谢疾病或心血管疾病与动物体内的胆固醇水平、甘油三酯水平和/或葡萄糖水平的变化有关。

38. 权利要求37所述的用途,其中向所述动物施用所述包含治疗有效量的经修饰的寡核苷酸的药物减少所述动物中的代谢疾病或心血管疾病。

39. 权利要求1或37的用途,其中所述代谢疾病或心血管疾病是肥胖症、糖尿病、动脉粥样硬化、血脂障碍、冠心病、非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD)、高脂肪酸血症或代谢综合征或其组合。

40. 权利要求39所述的用途,其中所述血脂障碍是高脂血症。

41. 权利要求40所述的用途,其中所述高脂血症是高胆固醇血症、高甘油三酯血症、高胆固醇血症和高甘油三酯血症两者。

42. 权利要求39所述的用途,其中所述NAFLD是肝脂肪变性或脂肪肝。

43. 权利要求39所述的用途,其中所述糖尿病是2型糖尿病或具有血脂障碍的2型糖尿病。

44. 权利要求2所述的用途,其中所述药物的施用导致脂质水平减少,包括甘油三酯水平、胆固醇水平、胰岛素抵抗、葡萄糖水平或其组合。

45. 权利要求44所述的用途,其中所述水平独立地减少5%、10%、20%、30%、35%或40%。

46. 权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述药物的施用导致提高的胰岛素敏感性。

47. 权利要求46所述的用途,其中所述药物的施用导致提高的肝胰岛素敏感性。

48. 包含经修饰的寡核苷酸的ANGPTL3抑制剂在制备用于减少人中ANGPTL3水平、LDL水平、apoC-III水平、甘油三酯水平、胆固醇水平、葡萄糖水平、脂肪垫重、心血管疾病和代谢疾病中的一者或多者的药物中的用途,其中所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有与SEQ ID NO:1-5至少95%互补的核碱基序列,如对所述经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

- a. 由连接脱氧核苷组成的缺口区段；
- b. 由连接核苷组成的5'翼区段；
- c. 由连接核苷组成的3'翼区段；

其中所述缺口区段位于5'翼区段与3'翼区段之间并且每个翼区段中的每个核苷包含经修饰的糖,其中所述代谢疾病或心血管疾病与动物体内的胆固醇水平、甘油三酯水平和/或葡萄糖水平的变化有关。

49. 权利要求1-5或48中任一项所述的用途,其中所述药物的施用导致动脉粥样硬化斑块减少。

50. 权利要求1-5或48中任一项所述的用途,其中所述药物的施用导致肥胖程度减少。

51. 权利要求1-5或48中任一项所述的用途,其中所述药物的施用导致葡萄糖减少。

52. 权利要求1-5或48中任一项所述的用途,其中所述药物的施用导致脂质减少。

53. 权利要求1-5或48中任一项所述的用途,其中所述药物的施用导致葡萄糖抗性减少。

54. 权利要求1-5或48中任一项所述的用途,其中所述药物的施用导致胆固醇减少。

55. 权利要求1-5或48中任一项所述的用途,其中所述药物的施用导致胰岛素敏感性增加。

血管生成素样3表达的调节

[0001] 本申请是申请号为201180008657.7、申请日为2011年1月7日、发明名称为“血管生成素样3表达的调节”的中国发明专利申请的分案申请，原申请为国际申请号为PCT/US2011/020606的国家阶段申请，该国际申请要求申请日为2010年1月8日，申请号为61/293,604的美国申请的优先权。

[0002] 序列表

[0003] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表以于2011年1月7日创建的标题为BIOL0120W0SEQ.txt的文件形式提供，该文件大小为56KB。序列表的电子格式的信息通过引用整体并入本文。

发明领域

[0004] 本文提供的是减少血管生成素样3 (ANGPTL3) mRNA和蛋白在动物中的表达的方法、化合物和组合物。同时，本文提供的是具有用于减少动物的ANGPTL3相关疾病或疾患的ANGPTL3抑制剂的方法、化合物和组合物。此类方法、化合物和组合物例如用于治疗、预防、延缓或减轻动物的一种或多种心血管疾病或代谢综合征或其症状。

[0005] 发明背景

[0006] 糖尿病和肥胖症(有时统称为“糖尿病-肥胖症(diabesity)”)是相关的,因为已知肥胖症加重糖尿病的病理学并且大于60%的糖尿病是肥胖的。大多数人肥胖症与胰岛素抵抗和瘦素抵抗相关。实际上,已提出肥胖症可对胰岛素作用的影响比糖尿病本身更大(Sindelka等人,Physiol Res.,2002,51,85-91)。此外,市场上用于治疗糖尿病的数种化合物已知诱导体重增加,这对疾病的治疗而言是一种极不受欢迎的副作用。

[0007] 心血管疾病也是与肥胖症和糖尿病相关。心血管疾病包括多种病因学并且具有同样广泛的致病因子和相关利益相关者。很多致病因子有助于症状例如升高的胆固醇(包括非-HDL胆固醇)血浆水平以及其它脂质相关病症。此类脂质相关病症(通常称为血脂障碍)除了包括其它适应症之外,还包括高脂血症、高胆固醇血症和高甘油三酯血症。升高的非-HDL胆固醇与动脉粥样硬化及其后遗症(包括心血管疾病例如动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗塞、缺血性休克及其它心脏病形式相关。这些在工业化国家中是最普遍的疾病类型。实际上,美国中估计有1200万人罹患冠心病并且约3600万人需要用于升高胆固醇水平的治疗。

[0008] 流行病和实验证据已显示高水平的循环甘油三酯(TG)可有助于心血管疾病和多种代谢病症(Valdivielso等人,2009,Atherosclerosis.207(2):573-8;Zhang等人,2008,Circ Res.1;102(2):250-6)。在来自小肠的乳糜颗粒中或在来自肝的极低密度脂蛋白(VLDL)中并入且分泌从外源性或内源性来源衍生的TG。一旦在循环中,TG被脂蛋白脂酶(LpL)水解并且所得游离脂肪酸然后可被局部组织吸收并且用作能源。由于通常LpL对血浆TG和代谢具有极高的效应,发现和开发影响LpL活性的化合物是非常感兴趣。

[0009] 代谢综合征是增加个人患上心血管疾病和糖尿病的风险的医学病症的组合。症状(包括高血压、高甘油三酯、降低的HDL和肥胖症)在某些个体中趋向于一起出现。其以集聚方式影响许多人。在一些研究中,在USA的患病率被计算成高达25%的人口。代谢综合征以

各种其它名称广为人知,例如(代谢)综合征X、胰岛素抵抗综合征、Reaven综合征或CHAOS。在心血管病症和代谢病症的高患病率下,仍保持对治疗这些疾患的改进方法的需求。

[0010] 血管生成素是分泌型生长因子的家族。与其相应内皮特异性受体一起,血管生成素在血管发生中起着重要的作用。一个家族成员血管生成素样3(也称为ANGPT5、ANGPTL3或血管生成素5)主要在肝中表达,并且被认为在调节脂质代谢中起作用(Kaplan等人,J.脂质Res.,2003,44,136-143)。

[0011] 作为检索组合的EST数据库的结果,血管生成素样3的人基因被鉴定且被克隆。全长人cDNA编码460氨基酸的多肽,该多肽具有血管生成素的特有结构特征:信号肽、延长的螺旋状结构域、短接头肽和球状纤维蛋白原同源性结构域(FHD)。发现小鼠血管生成素样3cDNA编码与人多肽具有76%同一性的455氨基酸多肽。血管生成素的对准显示血管生成素样3不像其它家庭成员,不包含决定钙结合位点的酸性残基的基序。Northern印迹分析揭示主要在成人组织的肝中的表达,而鼠胚胎Northern印迹显示早在第15天就存在转录物,表明血管生成素样3在肝发育期间的早期被表达且成年肝中维持表达。小鼠基因定位于染色体4,而人基因定位于1p31区域(Conklin等人,Genomics,1999,62,477-482)。

[0012] KK肥胖小鼠具有中度肥胖症的多基因综合征和类似人遗传性2型糖尿病的糖尿病表型。这些小鼠显示高胰岛素血症、高血糖症和高脂血症的征兆。称为KK/San的KK小鼠品系具有显著低的血浆脂质水平,尽管具有高胰岛素血症和高血糖症的征兆。突变表型被隐性遗传,并且基因座被称为高脂质血症(hyp1)。基因座定位于染色体4的中间,并且该基因通过定位克隆被鉴定为血管生成素样3。包含突变体KK/San小鼠中的全长小鼠或人血管生成素样3cDNA的重组腺病毒的注射引起甘油三酯、总胆固醇和非酯化脂肪酸(NEFA)的血浆水平的增加。类似地,将重组血管生成素样3蛋白注射到突变体小鼠中增加了甘油三酯和非酯化脂肪酸的水平(Koishi等人,Nat.Genet.,2002,30,151-157)。

[0013] 在另一项专注于甘油三酯在KK/San小鼠中的代谢途径的研究中,血管生成素样3的过表达导致富集甘油三酯的极低密度脂蛋白(VLDL)的显著增加。肝VLDL甘油三酯分泌率的差异在野生型KK与KK/San小鼠之间不显著。然而,用标记VLDL的研究表明KK/San小鼠中的低血浆甘油三酯水平主要归因于增加的VLDL甘油三酯的酯解而不是增加的整颗粒摄取。KK/San小鼠的血浆apoB100和apoB48水平与野生型KK小鼠类似。ApoCIII缺陷型小鼠与KK/San小鼠具有类似的表型,并且认为ApoCIII通过抑制VLDL甘油三酯的脂酶介导的水解的调节VLDL甘油三酯代谢。重组蛋白的体外分析揭示,血管生成素样3直接抑制脂蛋白脂酶(LPL)活性(Shimizu等人,J.Biol.Chem.,2002,277,33742-33748)。

[0014] 与脂质代谢中的作用一致,发现血管生成素样3mRNA在正常饲料饮食和4%胆固醇喂养的C57BL/6J小鼠和在用肝X受体(LXR)激动剂T0901317处理的鼠中上调。LXR是配体激活的转录因子,其在调节在肝和外周组织中支配胆固醇体内稳态的基因方面起作用。除胆固醇代谢之外,LXR还可在调节脂肪酸代谢的方面起作用。用激活LXR的天然或合成活性剂处理HepG2细胞导致增加的血管生成素样3表达。发现人血管生成素样3基因的启动子含有LXR反应元件。此外,对于其它转录因子(包括HNF-1、HNF-4和C/EBP)而言,启动子包含数种蛋白结合位点(Kaplan等人,J.Lipid Res.,2003,44,136-143)。

[0015] 用T0901317处理啮齿类动物与肝和血浆中的甘油三酯蓄积相关。肝甘油三酯蓄积通过增加的甾醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP1c)和脂肪酸合酶(FAS)(两者均为LXR的靶)

的表达来解释。T0901317未能增加血管生成素样3缺陷型小鼠中的血浆甘油三酯浓度,而经刺激的肝甘油三酯蓄积与在经处理的野生型小鼠中观察到的类似。用T0901317处理的野生型小鼠中的血浆甘油三酯的升高类似血管生成素样3mRNA在肝中的诱导和增加的蛋白血浆浓度(Inaba等人,J.Biol.Chem.,2003,278,21344-21351)。

[0016] 更多的研究解决在用外源性血管生成素样3处理的KK/Snk小鼠中观察到的血浆游离脂肪酸(FFA)水平的增加。用荧光标记的血管生成素样3蛋白固定的人组织的探针证实,仅在脂肪组织上具有强结合。而且,在3T3-L1脂肪细胞中检查放射性标记的蛋白结合并且发现是可饱和的且特异性的。用血管生成素样3孵育3T3-L1脂肪细胞导致增加的FFA和甘油进入培养基中的释放(Shimamura等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.,2003,301,604-609)。

[0017] 在使用链脲霉素处理的小鼠(STZ)模拟胰岛素缺陷型状态并且使用db/db小鼠模拟胰岛素抗性糖尿病状态的研究中,相比于对照动物,在糖尿病小鼠中观察到大量肝血管生成素样3。糖尿病的两种模型显示高甘油三酯血症,且由增加的血管生成素样3表达则可至少部分地解释观察到的高脂血症。这些结果表明,血管生成素样3是糖尿病与血脂障碍之间的连接,升高将促进高脂血症(Inukai等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.,2004,317,1075-1079)。

[0018] 随后研究检查了瘦素和胰岛素对血管生成素样3的调节,两者均是代谢综合征的关键参与者。相比于对照,在瘦素抗性db/db和瘦素缺陷型ob/ob小鼠中的血管生成素样3表达和血浆蛋白水平增加。用瘦素补充ob/ob小鼠减少血管生成素样3水平。表达的变化与血浆甘油三酯和游离脂肪酸水平的变化相关。在胰岛素缺陷型的STZ处理的小鼠中的基因表达和血浆蛋白水平也增加(Shimamura等人,Biochem Biophys Res Commun,2004,322,1080-1085)。

[0019] 根据其血管生成素家族中的成员,发现重组血管生成素样3蛋白与 $\alpha_v\beta_3$ 整合素结合以及诱导的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 依赖性趋触性内皮细胞粘着和迁移。其也刺激对整合素激活特有的信号转导途径。血管生成素样3在大鼠角膜血管发生试验中强烈地诱导血管发生(Camenisch等人,J.Biol.Chem.,2002,277,17281-17290)。

[0020] 通过数个组进行测量基因组的与HDL、LDL和甘油三酯的血浆浓度相关的共有变体的基因组相关性扫描(GWAS)。GWAS研究发现甘油三酯与邻近ANGPTL3的单核苷酸多态现象(SNP)之间的联系(Willer等人,Nature Genetics,2008,40(2):161-169)。

[0021] U.S.专利7,267,819、申请USSN 12/128,545和申请USSN 12/001,012通常描述血管生成素样3激动剂和拮抗剂。

[0022] PCT公布W0/02101039(EP02733390)和W0/0142499(USSN 10/164,030)公开了与小鼠血管生成素样3互补的核酸序列(Ryuta,2002;Ryuta,2001)。

[0023] 目前缺乏用于治疗心血管和代谢病症的可接受的选择。因为,本文的目的是提供用于治疗此类疾病和病症的化合物和方法。

[0024] 血管生成素样3在脂质代谢中的潜在作用使其成为对于研究有吸引力的靶。反义技术作为用于减少某些基因产物的表达的有效方法出现并且由此可证明其可独特地用于多种调节血管生成素样3的治疗、诊断和研究应用。

[0025] 发明概述

[0026] 本文提供的是可用于经由作用反义机理例如RNA酶H、RNAi和dsRNA酶,以及其它基于靶降解或靶占有的反义机理来调节基因表达和相关途径的反义化合物。

[0027] 本文提供的是用于抑制ANGPTL3表达并且治疗、预防、延缓或减轻ANGPTL3相关疾病、疾患或其症状的方法、化合物和组合物。在某些实施方案中,ANGPTL3相关疾病或疾患是心血管疾病或代谢疾病。

[0028] 在某些实施方案中,本发明的化合物和组合物包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸。ANGPTL3靶可具有选自SEQ ID NO:1-5中任一个的序列。靶向ANGPTL3的经修饰的寡核苷酸可具有包含与SEQ ID NO:1-5的等长部分互补的至少8个连续核碱基的核碱基序列。靶向ANGPTL3的经修饰的寡核苷酸可具有包含选自SEQ ID NO:34-182中任一个的核碱基序列的至少8个连续核碱基的核碱基序列。经修饰的寡核苷酸可具有包含选自SEQ ID NO:34-182中任一个的核碱基序列的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的核碱基序列。经修饰的寡核苷酸的连续核碱基部分可与选自SEQ ID NO:1-5中任一个的ANGPTL3区域的等长部分互补。ANGPTL3区域可选自以下区域的一个或多个:22-52、116-145、637-720、953-983、1333-1469和1463-1489。

[0029] 某些实施方案提供了减少动物中ANGPTL3表达的方法,其包括向所述动物施用包含靶向本文描述的ANGPTL3的经修饰的寡核苷酸的化合物。

[0030] 某些实施方案提供了减少动物中的apoC-III表达、甘油三酯水平、胆固醇水平、低密度脂蛋白(LDL)或葡萄糖水平的方法,其包括向所述动物施用包含靶向本文描述的ANGPTL3的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中经修饰的寡核苷酸减少动物中的ANGPTL3表达。

[0031] 某些实施方案提供了减轻动物中的心血管疾病或代谢疾病的方法,其包括向所述动物施用包含靶向本文描述的ANGPTL3的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中经修饰的寡核苷酸减少动物中的ANGPTL3表达。

[0032] 某些实施方案提供了用于治疗患有心血管疾病或代谢疾病的动物的方法,其包括:1) 鉴定患有代谢疾病或心血管疾病的所述动物,和2) 向所述动物施用治疗有效量的包含经修饰的寡核苷酸的化合物,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有与SEQ ID NO:1-5至少90%互补(如对经修饰的寡核苷酸的整体性所测量)的核碱基序列,由此治疗患有心血管疾病或代谢疾病的动物。在某些实施方案中,向动物施用的治疗有效量的化合物减少动物中的心血管疾病或代谢疾病。

[0033] 某些实施方案提供了通过施用包含经修饰的寡核苷酸的ANGPTL3抑制剂减少人中ANGPTL3水平、LDL水平、apoC-III水平、甘油三酯水平、胆固醇水平、葡萄糖水平、脂肪垫重、心血管疾病和代谢疾病中的一者或多者的方法。

[0034] 发明详述

[0035] 应理解,前述一般描述和以下详细描述仅仅是示例性的且说明性的,并不限制如要求保护的本发明。在本文,使用的单数包括复数,除非另有明确指出。如本文所用的,使用的“或”意指“和/或”,除非另有指出。而且,使用的术语“包括”以及其它形式例如“包括”和“被包括”并不是限制性的。同时,术语例如“要素”或“组分”包含要素和组分两者,包含一个单元和要素以及包含一个以上亚单元的组分,除非另有明确指出。

[0036] 本文所述的部分标题仅仅是为了组织的目的并不应理解为限制所述的主题。本申

请引用的所有文件、或文件的一部分(包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和书籍)据此通过引用清楚(针对本文所述的文件以及其整体)并入。

[0037] 定义

[0038] 除非提供了明确定义,否则结合本文所述的分析化学、合成有机化学、以及医药和制药化学所用的命名法、以及它们的方法和技术是本领域熟知且常用的。标准技术可用于化学合成以及化学分析。当允许时,所有专利、申请、公布的申请和其它公布、GENBANK登记号及可通过数据库例如National Center for Biotechnology Information (NCBI) 和其它在本整个公开中提及的数据获得的相关序列信息通过引用(针对本文所论述的文件的部分以及其整体)并入本文。

[0039] 除非另有指出,下列术语具有以下含义:

[0040] “2'-O-甲氧基乙基”(也称为2'-MOE和2'-O(CH₂)₂-OCH₃)是指呋喃糖基环的2'位的O-甲氧基-乙基修饰。2'-O-甲氧基乙基修饰的糖是经修饰的糖。

[0041] “2'-O-甲氧基乙基核苷酸”意指包含2'-O-甲氧基乙基修饰的糖部分的核苷酸。

[0042] “3'靶位点”是指与特定反义化合物的3'最末端核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0043] “5'靶位点”是指与特定反义化合物的5'最末端核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0044] “5-甲基胞嘧啶”意指用与5'位连接的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是经修饰的核碱基。

[0045] “约”意指在值的±10%内。例如,如果提及“标记可增加约50%”,则暗示标记可增加45%-55%。

[0046] “活性药用剂(Active pharmaceutical agent)”意指当施用于个体时提供了治疗益处的药物组合物中的物质。例如,在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3的反义寡核苷酸是活性药用剂。

[0047] “活性靶区域”或“靶区域”意指靶向一个或多个活性反义化合物的区域。“活性反义化合物”意指减少靶核酸水平或蛋白水平的反义化合物。

[0048] “脂肪形成”意指脂肪细胞自前脂肪细胞的发展。“脂肪形成”意指脂肪的产生或形成,脂肪变性或脂肪浸润。

[0049] “肥胖症”或“肥胖症”是指肥胖或与去脂肪体重有关的过度高量的体脂肪或脂肪组织的状态。体脂肪的量包括关心脂肪遍及身体的分布和脂肪组织沉积的大小和质量。体脂肪分布可通过皮肤褶测量、腰臀围比或技术例如超声、计算机断层摄影术或核磁共振成像来评价。根据疾病控制和预防中心,体重指数(BMI)为30或以上的个体被认为是肥胖的。本文所用的术语“肥胖症”包括由于在体内脂肪组织的过度积累而使体脂肪的增加超过身体需要的疾患。术语“肥胖症”包括但不限于以下疾患:成年型肥胖症;营养性肥胖症;内源性或代谢肥胖症;内分泌性肥胖症;家族性肥胖症;胰岛功能亢进性肥胖症;增生性-肥大性肥胖症;性腺机能衰退性肥胖症;甲状腺功能减退性肥胖症;终身性肥胖症;病态肥胖症和外源性肥胖症。

[0050] “伴随施用(Administered concomitantly)”是指两种活性剂的药理学作用在患者中同时出现的任何方式两种活性剂的共施用。伴随施用不需要两种活性剂以单一药物组合物、以相同剂量形式或通过相同施用途径施用。两种活性剂的效应不需要同时显示它们自身。效应仅需要在一定时段内重叠并且不需要共存。

[0051] “施用”意指给动物提供活性剂,并且包括但不限于通过医学专业人员施用和自身施用。

[0052] “活性剂 (Agent)”意指当施用于动物时可提供治疗益处的活性物质。“第一活性剂”意指本发明的治疗化合物。例如,第一活性剂可以是靶向ANGPTL3的反义寡核苷酸。“第二活性剂”意指本发明的第二治疗化合物 (例如靶向ANGPTL3的第二反义寡核苷酸) 和/或非-ANGPTL3治疗化合物。

[0053] “减轻”是指减轻相关疾病、病症或疾患的至少一个指标、症状或症候。指标的严重程度可通过本领域技术人员已知的主观或客观量度来确定。

[0054] “ANGPTL3”意指ANGPTL3的任何核酸或蛋白。

[0055] “ANGPTL3表达”意指从编码ANGPTL3的基因转录的mRNA的水平或从mRNA翻译的蛋白的水平。ANGPTL3表达可通过本领域已知的方法例如Northern或Western印迹来测定。

[0056] “ANGPTL3核酸”意指任何编码ANGPTL3的核酸。例如,在某些实施方案中,ANGPTL3核酸包括编码ANGPTL3的DNA序列、从编码ANGPTL3的DNA转录的RNA序列 (包括包含内含子和外显子的基因组DNA) 和编码ANGPTL3的mRNA序列。“ANGPTL3mRNA”意指编码ANGPTL3蛋白的mRNA。

[0057] “动物”是指人或非-人动物,包括但不限于小鼠、大鼠、兔、狗、猫、猪和非-人灵长类,包括但不限于猴和猩猩。

[0058] “反义活性”意指归因于反义化合物与其靶核酸的杂交的任何可检测或可测量的活性。在某些实施方案中,反义活性是由此类靶核酸编码的靶核酸或蛋白的量或表达的减少。

[0059] “反义化合物”意指能够通过氢键合经受与靶核酸杂交的寡聚化合物。

[0060] “反义抑制”意指在与靶核酸互补的反义化合物的存在下靶核酸水平或靶蛋白水平相比于在反义化合物存在下的靶核酸水平或靶蛋白水平的减少。

[0061] “反义寡核苷酸”意指具有允许与相应的靶核酸区域或区段杂交的核碱基序列的单链寡核苷酸。如本文所用的,术语“反义寡核苷酸”包括本文所述的化合物的药学上可接受的衍生物。

[0062] “含有ApoB的脂蛋白”意指具有载脂蛋白B作为其蛋白组分的任何脂蛋白,并且应理解为包括LDL、VLDL、IDL和脂蛋白,且可通常由脂质降低剂和疗法靶向。“含有ApoB-100的LDL”意指含有ApoB-100同种型的LDL。

[0063] “动脉粥样硬化”意指影响大型和中型动脉的动脉硬化并且其特征存在于脂肪沉积物。脂肪沉积物被称为“动脉粥样化”或“斑块”,其主要由胆固醇和其它脂肪、钙和瘢痕脂肪,以及动脉内层的损伤组成。

[0064] “双环糖”意指通过两个非季位环原子的桥接修饰的呋喃糖基环。双环糖是经修饰的糖。

[0065] “双环核酸”或“BNA”是指核苷或核苷酸,其中该核苷或核苷酸的呋喃糖部分包括连接呋喃糖环上的两个碳原子的桥,由此形成双环系统。

[0066] “帽结构”或“端帽部分”意指已在反义化合物的任一末端并入的化学修饰。

[0067] “心血管疾病”或“心血管病症”是指一组涉及心、血管或循环的疾患。心血管疾病的实例包括但不限于,动脉瘤、心绞痛、心律不齐、动脉粥样硬化、脑血管疾病 (中风)、冠心

病、高血压、血脂障碍、高脂血症和高胆固醇血症。

[0068] “化学上不同的区域”是指以某种方式化学上不同于同一反义化合物的另一区域的反义化合物的区域。例如,具有2'-O-甲氧基乙基核苷酸的区域化学上不同于具有无2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸的区域。

[0069] “嵌合反义化合物”意指具有至少两个化学上不同的区域的反义化合物。

[0070] “共施用”意指给个体施用两种或更多种活性剂。两种或更多种活性剂可以在单一药物组合物中,或可以在分开的药物组合物中。两种或更多种活性剂中的每一种可通过相同或不同的施用路径施用。共施用包括平行或相继施用。

[0071] “胆固醇”是存在于所有动物组织的细胞膜中的甾醇分子。胆固醇必须经由脂蛋白在动物的血浆中进行转运,所述脂蛋白包括极低密度脂蛋白(VLDL)、中等密度脂蛋白(IDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。“血浆胆固醇”是指存在于血浆或血清中的所有脂蛋白(VLDL、IDL、LDL、HDL)酯化的和/或非酯化的胆固醇的总和。

[0072] “胆固醇吸收抑制剂”意指抑制由饮食获得的外源性胆固醇的吸收的活性剂。

[0073] “互补性”意指第一核酸与第二核酸的核碱基之间配对的能力。在某些实施方案中,第一核酸与第二核酸之间的互补性可在两条DNA链之间、在两条RNA链之间,或在DNA和RNA链之间。在某些实施方案中,一条链上的一些核碱基基于其它链与互补氢键合匹配。在某些实施方案中,一条链上的所有核碱基基于其它链与互补氢键匹配。在某些实施方案中,第一核酸是反义化合物且第二核酸是靶核酸。在某些此类实施方案中,反义寡核苷酸是第一核酸且靶核酸是第二核酸。

[0074] “连续核碱基”意指彼此直接相邻的核碱基。

[0075] “冠心病(CHD)”意指供应血和氧至心脏的小血管的狭窄,其通常是动脉粥样硬化的结果。

[0076] “脱氧核糖核苷酸”意指在核苷酸的糖部分的2'位具有氢的核苷酸。脱氧核糖核苷酸可被多种取代基中的任一种修饰。

[0077] “糖尿病(Diabetes mellitus)”或“糖尿病”是特征在于紊乱的代谢和异常高的血糖(高血糖症)的综合征,这是由胰岛素水平不足或胰岛素敏感性降低引起的。特有症状是由于高血糖水平导致的过量尿生成(多尿症)、过度口渴和试图补偿排尿增加的流体摄取的增加(烦渴)、由于高血糖对眼光学的效应导致的视力模糊、不明体重减轻和嗜睡。

[0078] “糖尿病性血脂障碍”或“具有血脂障碍的2型糖尿病”意指特征在于2型糖尿病、减少的HDL-C、升高的甘油三酯和升高的小且致密LDL颗粒的疾患。

[0079] “稀释剂”意指组合物中缺少药理学活性但是药学上必需或期望的成分。例如,注射型组合物中的稀释剂可以是液体,例如盐水溶液。

[0080] “血脂障碍”是指脂质和/或脂蛋白代谢的病症,包括脂质和/或脂蛋白过度生成或缺乏。血脂障碍可表现为脂质例如胆固醇和甘油三酯以及脂蛋白例如低密度脂蛋白(LDL)胆固醇的升高。

[0081] “剂量单位”意指提供药用剂的形式,例如丸剂、片剂或其它本领域中已知的剂量单位。在某些实施方案中,剂量单位是含有冻干的反义寡核苷酸的小瓶。在某些实施方案中,剂量单位是含有复原的反义寡核苷酸的小瓶。

[0082] “剂量”意指在单个施用中或在指定时间内提供的指定量的药用剂。在某些实施方

案中,剂量可在一个、两个或多个大丸剂(bolus)、片剂或注射剂中施用。例如,在某些实施方案中,当期望皮下施用时,所需剂量需要不易由单次注射调节的体积,因此,两个或更多个注射可用于实现所需剂量。在某些实施方案中,药用剂通过在延长的时段内或连续地输注来施用。剂量可被陈述为每小时、每天、每周或每月药用剂的量。剂量可以mg/kg或g/kg表示。

[0083] “有效量”或“治疗有效量”意指足以在需要活性剂的个体中实现所需生理学结果的活性药用剂的量。有效量可在个体间变化,取决于待治疗个体的健康和身体条件、待治疗个体的分类群、组合物的制剂、个体的医疗条件的评价、以及其它相关因素。

[0084] “完全互补”或“100%互补”意指第一核酸的核碱基序列的每个核碱基在第二核酸的第二核碱基序列中具有互补核碱基。在某些实施方案中,第一核酸是反义化合物且靶核酸是第二核酸。

[0085] “缺口基体(Gapmer)”意指其中具有多个支持RNA酶H切割的核苷的内部区域位于具有一个或多个核苷的外部区域的嵌合反义化合物,其中包含内部区域的核苷化学上不同于包含外部区域的核苷。内部区域可被称为“缺口区段”且外部区域可被称为“翼区段”。

[0086] “缺口加宽的”意指具有12或更多个连续2'-脱氧核糖核苷的缺口区段的嵌合反义化合物的位置在具有1至6个核苷的5'和3'翼区段之间和与所述5'和3'翼区段直接相邻。

[0087] “葡萄糖”是被细胞用作能量和代谢中间体的来源的单糖。“血浆葡萄糖”是指存在于血浆中的葡萄糖。

[0088] “高密度脂蛋白-C(HDL-C)”意指与高密度脂蛋白颗粒相关的胆固醇。HDL-C在血清(或血浆)中的浓度通常以mg/dL或nmol/L量化。“HDL-C”和“血浆HDL-C”是指分别在血清和血浆中的HDL-C。

[0089] “HMG-CoA还原酶抑制剂”意指通过抑制酶HMG-CoA还原酶起作用的活性剂,例如阿托伐他汀、罗苏伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀和辛伐他汀。

[0090] “杂交”意指互补核酸分子的退火。在某些实施方案中,互补核酸分子包括反义化合物和靶核酸。

[0091] “高胆固醇血症”意指这样的疾患,其特征存在于升高的胆固醇或循环(血浆)胆固醇、LDL-胆固醇和VLDL-胆固醇,如根据Expert Panel Report of the National Cholesterol Educational Program(NCEP) of Detection, Evaluation of Treatment of high Cholesterol in adults的指南(参见,Arch.Int.Med.(1988)148,36-39)。

[0092] “高脂血症”或“血脂过多(hyperlipemia)”是特征存在于升高的血清脂质或循环(血浆)脂质的疾患。这种疾患显示异常高的脂肪浓度。循环血液中的脂质部分是胆固醇、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和甘油三酯。

[0093] “高甘油三酯血症”意指特征存在于升高的甘油三酯水平的疾患。

[0094] “鉴定”或“选择患有代谢疾病或心血管疾病的受试者”意指鉴定或选择已诊断有代谢疾病、心血管疾病的受试者;或,鉴定或选择患有代谢疾病、心血管疾病或代谢综合征的受试者包括但不限于高胆固醇血症、高血糖症、高脂血症、高甘油三酯血症、高血压、增加的胰岛素抵抗、减少的胰岛素敏感性、超过正常体重、和/或超过正常体脂肪含量或其任何组合。此类鉴定可通过任何方法实现,包括但不限于标准临床试验或评价,例如测量血清或循环(血浆)胆固醇、测量血清或循环(血浆)血液-葡萄糖、测量血清或循环

(血浆)甘油三酯、测量血压、测量体脂肪含量、测量体重等。

[0095] “鉴定”或“选择糖尿病受试者”意指鉴定或选择已被鉴定为糖尿病的受试者或鉴定或选择具有糖尿病(1型或2型)的任何症状例如但不限于空腹葡萄糖为至少110mg/dL、糖尿、多尿症、烦渴、增加的胰岛素抵抗和/或降低的胰岛素敏感性的受试者。

[0096] “鉴定”或“选择肥胖受试者”意指鉴定或选择已被诊断为肥胖的受试者或鉴定或选择BMI超过30和/或腰围男性大于102cm或女性大于88cm的受试者。

[0097] “鉴定”或“选择患有血脂障碍的受试者”意指鉴定或选择诊断有脂质和/或脂蛋白代谢的病症,包括脂质和/或脂蛋白过度生成或缺乏。血脂障碍可表现为脂质例如胆固醇和甘油三酯以及脂蛋白例如低密度脂蛋白(LDL)胆固醇的升高。

[0098] “鉴定”或“选择”患有增加的脂肪过多(adiposity)的受试者”意指鉴定或选择具有增加量的体脂肪(或脂肪过多)的受试者,包括关心脂肪遍及身体的分布和脂肪组织沉积物的大小与质量的一者或两者。体脂肪分布可通过皮肤褶测量、腰臀围比或技术例如超声、计算机断层摄影术或核磁共振成像来评价。根据疾病控制和预防中心,体重指数(BMI)为30或以上的个体被认为是肥胖的。

[0099] “提高的心血管结果”意指不良心血管事件或其风险发生的减少。不良心血管事件的实例包括但不限于死亡、再梗塞、中风、心源性休克、肺水肿、心跳停止和房性心律失常。

[0100] “直接相邻”意指在直接相邻的要素之间没有插入要素。

[0101] “个体”或“受试者”或“动物”意指对于治疗或疗法所选定的人或非-人动物。

[0102] “抑制表达或活性”是指表达或活性的减少或阻断并且不一定指示表达或活性的完全消除。

[0103] “胰岛素抵抗”被定义为其中正常量的胰岛素不足以从细胞例如脂肪细胞、肌细胞和/或肝细胞产生正常胰岛素响应的疾患。脂肪细胞中的胰岛素抵抗导致所存贮甘油三酯的水解,其升高血浆中的游离脂肪酸。肌肉中的胰岛素抵抗减少葡萄糖摄取而肝中的胰岛素抵抗减少葡萄糖存贮,两种效应用于升高血糖。胰岛素和葡萄糖的高血浆水平由于胰岛素抵抗而常引起代谢综合征和2型糖尿病。

[0104] “胰岛素敏感性”是个体如何有效地加工葡萄糖的量度。具有高胰岛素敏感性的个体有效地加工葡萄糖,而具有低胰岛素敏感性的个体不能有效地加工葡萄糖。

[0105] “核苷间键合”是指核苷之间的化学键。

[0106] “静脉内施用”意指进入静脉的施用。

[0107] “连接核苷”意指键合在一起的相邻核苷。

[0108] “脂质降低”意指受试者中的一种或多种脂质的减少。脂质降低可用一个或多个剂量随时间流逝而发生。

[0109] “脂质降低剂”意指给受试者提供以实现受试者中脂质的降低的活性剂例如ANGPTL3-特异性调节剂。例如,在某些实施方案中,给受试者提供脂质降低剂减少受试者中的apoB、apoC3、总胆固醇、LDL-C、VLDL-C、IDL-C、非-HDL-C、甘油三酯、小且致密LDL颗粒和Lp(a)中的一者或多者。“降脂质治疗”意指给受试者提供以减少受试者中的一种或多种脂质的治疗方案。在某些实施方案中,提供降脂质治疗以减少受试者中的apoB、apoC3、总胆固醇、LDL-C、VLDL-C、IDL-C、非-HDL-C、甘油三酯、小且致密LDL颗粒和Lp(a)中的一者或多者。

[0110] “脂蛋白”例如VLDL、LDL和HDL是指一组存在于血清、血浆和淋巴且对于脂质转运

重要的蛋白质。每种脂蛋白的化学组成不同,因为HDL具有较高的蛋白与脂质的比例,而VLDL具有较低的蛋白与脂质的比例。

[0111] “低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C)”意指低密度脂蛋白颗粒中携带的胆固醇。LDL-C在血清(或血浆)中的浓度通常以mg/dL或nmol/L量化。“血清LDL-C”和“血浆LDL-C”是指分别在血清和血浆中的LDL-C。

[0112] “主要风险因子”是指归因于特定疾病或疾患的高风险的因子。在某些实施方案中,冠心病的主要风险因子包括但不限于吸烟、高血压、低HDL-C、冠心病的家族史、年龄和其它本文公开的因子。

[0113] “代谢病症”或“代谢疾病”是指特征在于代谢功能改变或紊乱的疾患。“代谢”和“新陈代谢”是本领域熟知的术语并且一般包括在活器官内发生的一系列生物过程。代谢病症包括但不限于,高血糖症、糖尿病前期、糖尿病(I型和2型)、肥胖症、胰岛素抵抗、代谢综合征和由于2型糖尿病引起的血脂障碍。

[0114] “代谢综合征”意指特征在于代谢来源的脂质和非-脂质心血管风险因子的聚类的疾病。在某些实施方案中,代谢综合征通过存在以下因素的任何3个来鉴定:腰围男性大于102cm或女性大于88cm;血清甘油三酯为至少150mg/dL;HDL-C男性低于40mg/dL或女性低于50mg/dL;血压为至少130/85mmHg;和空腹葡萄糖为至少110mg/dL。这些决定子可在临床实践中容易测量(JAMA,2001,285:2486-2497)。

[0115] “错配”或“非-互补核碱基”是指当第一核酸的核碱基不能与第二靶核酸相应核碱基配对的情况。

[0116] “混合型血脂障碍”意指特征在于升高的胆固醇和升高的甘油三酯的疾患。

[0117] “经修饰的核苷间键合”是指来自天然存在核苷间键(即磷酸二酯核苷间键)的取代或任何变化。

[0118] “经修饰的核碱基”是指不是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸苷或尿嘧啶的任何核碱基。“未经修饰的核碱基”意指嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。

[0119] “经修饰的核苷”意指独立地具有一个或多个经修饰的糖部分或经修饰的核碱基的核苷。

[0120] “经修饰的核苷酸”意指不独立地具有一个或多个经修饰的糖部分、经修饰的核苷间键合或经修饰的核碱基的核苷酸。“经修饰的核苷”意指独立地具有一个或多个经修饰的糖部分或经修饰的核碱基的核苷。

[0121] “经修饰的寡核苷酸”意指包含至少一个经修饰的核苷酸的寡核苷酸。

[0122] “经修饰的糖”是指天然糖的取代或变化。

[0123] “基序”意指反义化合物中化学上不同区域的模型。

[0124] “MTP抑制剂”意指抑制酶、微粒体甘油三酯转移蛋白的活性剂。

[0125] “天然存在核苷间键合”意指3'至5'磷酸二酯键合。

[0126] “天然糖部分”意指发现于DNA(2'-H)或RNA(2'-OH)中的糖。

[0127] “非酒精性脂肪肝疾病”或“NAFLD”意指特征在于不是由于过度酒精(例如,超过20g/天的酒精消耗)使用引起的肝的脂肪炎症的疾患。在某些实施方案中,NAFLD与胰岛素抵抗和代谢综合征相关。NAFLD包括范围为肝细胞(肝脂肪变性)中的单一甘油三酯蓄积到

具有炎症的肝脂肪变性(脂肪肝)、纤维化和肝硬化的疾病谱。

[0128] “非酒精性脂肪肝”(NASH)从NAFLD的进展发生,迟于甘油三酯的沉积。能够诱导坏死、炎症和纤维化的“第二次打击(second hit)”对于NASH的发展是必需的。用于第二次打击的候选可分为以下大类:引起氧化性应激增加的因素和促进促炎性细胞因子的表达的因素。已提出增加的肝甘油三酯导致动物和人的肝细胞中增加的氧化应激,表明肝甘油三酯蓄积、氧化应激和肝脂肪变性向NASH的进展之间的潜在因果关系(Browning和Horton,J Clin Invest,2004,114,147-152)。高甘油三酯血症和高脂肪酸血症可引起外周组织中的甘油三酯蓄积(Shimamura等人,Biochem Biophys Res Commun,2004,322,1080-1085)。

[0129] “核酸”是指由单体核苷酸组成的分子。核酸包括核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、单链核酸、双链核酸、小干扰核糖核酸(siRNA)和微RNA(miRNA)。核酸还可以包含这些要素在单个分子中的组合。

[0130] “核碱基”意指能够与另一个核酸的碱基配对的杂环部分。

[0131] “核碱基序列”意指不依赖于任何糖、键合或核碱基修饰的连续核碱基的次序。

[0132] “核苷”意指与糖连接的核碱基。

[0133] “核苷模拟物”包括用于替换糖或糖和碱基并且不一定在寡聚化合物的一个或多个位置连接的那些结构;例如具有吗啉代、环己烯基、环己基、四氢呋喃基、二环或三环糖模拟物例如非呋喃糖单元的核苷模拟物。

[0134] “核苷酸”意指具有共价连接于核苷的糖部分的磷酸基的核苷。

[0135] “核苷酸模拟物”包括用于替代核苷且寡聚化合物的一个或多个位置连接的那些结构,例如肽核酸或吗啉代(通过-N(H)-C(=O)-O-或其它非-磷酸二酯键合连接的吗啉代)。

[0136] “寡聚化合物”或“寡聚物”是指包含两个或更多个子结构并且能够与核酸分子的区域杂交的聚合结构。在某些实施方案中,寡聚化合物是寡核苷。在某些实施方案中,寡聚化合物是寡核苷酸。在某些实施方案中,寡聚化合物是反义化合物。在某些实施方案中,寡聚化合物是反义寡核苷酸。在某些实施方案中,寡聚化合物是嵌合寡核苷酸。

[0137] “寡核苷酸”意指连接核苷的聚合物,每个连接核苷可经修饰或未经修饰,彼此无关。

[0138] “胃肠外施用”意指以除消化道之外的方式的施用。胃肠外施用包括局部施用、皮下施用、静脉内施用、肌肉内施用、动脉内施用、腹膜内施用或颅内施用,例如鞘内或脑室内施用。施用可以是连续的、或慢性的、或短期或间歇的。

[0139] “肽”意指通过连接至少两个氨基酸经由酰胺键形成的分子。肽是指多肽和蛋白质。

[0140] “药用剂”意指当施用于个体时提供治疗益处的物质。例如,在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3的反义寡核苷酸是药用剂。

[0141] “药物组合物”意指适用于给个体施用的物质的混合物。例如,药物组合物可包含一种或多种活性剂和无菌水溶液。

[0142] “药学上可接受的载体”意指不干扰寡核苷酸的结构或功能的介质或稀释剂。某些此类载体能使药物组合物配制成例如片剂、丸剂、糖丸、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆液、混悬液和锭剂以给受试者口服摄入。某些此类载体能使药物组合物配制成注射或输注。例

如,药学上可接受的载体可以是无菌水溶液。

[0143] “药学上可接受的盐”意指反义化合物的生理学和药学上可接受的盐,即保留母体寡核苷酸的所需生物活性并且不赋予其不想要的毒理学效应的盐。

[0144] “硫代磷酸酯键合”意指核苷之间的键合,其中磷酸二酯键通过用硫原子替代非桥接氧原子之一来修饰。硫代磷酸酯键合是经修饰的核苷间键合。

[0145] “部分”意指核酸的确定数量的连续(即连接)核碱基。在某些实施方案中,部分是靶核酸的确定数量的连续核碱基。在某些实施方案中,部分是反义化合物的确定数量的连续核碱基。

[0146] “预防”是指延缓或阻止疾病、病症或疾患的发作或发展达到从数分钟至无限期的时段。预防还意指减少疾病、病症或疾患发展的风险。

[0147] “前药”意指以无活性形式制备的治疗剂,其在体内或其细胞内通过内源性酶或其它化学品或条件的作用被转化为活性形式。

[0148] “副作用”意指可归因于治疗而不是所需效应的生理学反应。在某些实施方案中,副作用包括注射部位反应、肝功能试验异常、肾功能异常、肝毒性、肾毒性、中枢神经系统异常、肌病和不适。例如,增加的血清氨基转移酶水平可指示肝毒性或肝功能异常。例如,增加的胆红素可包括肝毒性或肝功能异常。

[0149] “单链寡核苷酸”意指不与互补链杂交的寡核苷酸。

[0150] “特异性杂交”是指与靶核酸具有足够的互补性程度以诱导所需效应同时在体内测定和治疗性处理的情况下在需要特异性结合的条件即在生理学条件下对非-靶核酸表现出最低效应或无效应的反义化合物

[0151] “抑制素(Statin)”意指抑制HMG-CoA还原酶活性的活性剂。

[0152] “皮下施用”意指在皮肤正下方的施用。

[0153] “靶向”或“被靶向”意指设计和选择与靶核酸特异性杂交并且诱导所需效应的反义化合物的方法。

[0154] “靶核酸”、“靶RNA”和“靶RNA转录物”均是指能够通过反义化合物靶向的核酸。

[0155] “靶区域”被定义为具有至少一个可识别的结构、功能或特征的靶核酸的一部分。

[0156] “靶区段”意指反义化合物所靶向的靶核酸的核苷酸的序列。“5'靶位点”是指靶区段的5'最末端核苷酸。“3'靶位点”是指靶区段的3'最末端核苷酸。

[0157] “治疗有效量”意指给个体提供了治疗益处的活性剂的量。

[0158] “治疗性生活方式变化”意指旨在降低脂肪/脂肪组织质量/或胆固醇的饮食和生活方式变化。此类变化可减少发展心脏病的危险,并且可包括每天总卡路里、总脂肪、饱和脂肪、多不饱和脂肪、单不饱和脂肪、碳水化合物、蛋白质、胆固醇、不溶纤维的饮食摄取的推荐以及体力活动的推荐。

[0159] “甘油三酯”意指由与三个脂肪酸分子组合的甘油的脂质或中性脂肪。

[0160] “2型糖尿病”(也称为“2型糖尿病”或“糖尿病,2型”,并且之前称为“糖尿病2型”、“非-胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)”、“肥胖症相关性糖尿病”或“成人型糖尿病”)是主要特征在于胰岛素抵抗、相对胰岛素缺乏和高血糖症的代谢病症。

[0161] “治疗”是指施用药物组合物以实现疾病、病症或疾患的改变或提高。

[0162] “未经修饰的核苷酸”意指由天然存在核碱基、糖部分和核苷间键合组成的核苷

酸。在某些实施方案中,未经修饰的核苷酸是RNA核苷酸(即 β -D-核糖核苷)或DNA核苷酸(即 β -D-脱氧核糖核苷)。

[0163] 某些实施方案

[0164] 在某些实施方案中,本发明的化合物和组合物包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸。ANGPTL3靶可具有选自SEQ ID NO:1-5中任一个的序列。

[0165] 在某些实施方案中,本发明的化合物和组合物包含经修饰的寡核苷酸,所述经修饰的寡核苷酸由10至30个核苷组成并且具有包含与SEQ ID NO:1-5的等长部分互补的至少8个连续核碱基的核碱基序列。

[0166] 本发明的化合物和组合物包含经修饰的寡核苷酸,所述经修饰的寡核苷酸由10至30个核苷组成并且具有包含选自SEQ ID NO:34-182中任一个的核碱基序列的至少8个连续核碱基的核碱基序列。

[0167] 本发明的化合物和组合物包含经修饰的寡核苷酸,所述经修饰的寡核苷酸由10至30个核苷组成并且具有包含选自SEQ ID NO:34-182中任一个所述的核碱基序列的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的核碱基序列。

[0168] 在某些实施方案中,本发明的化合物和组合物包含经修饰的寡核苷酸的盐。

[0169] 在某些实施方案中,本发明的化合物和组合物还包含药学上可接受的载体或稀释剂。

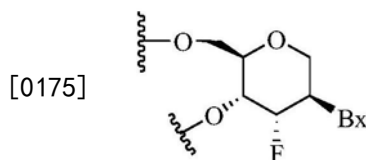
[0170] 在某些实施方案中,经修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1-5中任一个至少70%、80%、90%、95%或100%互补,如对经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的。

[0171] 在某些实施方案中,本发明的化合物由单链的经修饰的寡核苷酸组成。

[0172] 在某些实施方案中,经修饰的寡核苷酸由8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连接核苷组成。在某些实施方案中,经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成。

[0173] 在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷间键合是经修饰的核苷间键合。在某些实施方案中,每个核苷间键合是硫代磷酸酯核苷间键合。

[0174] 在某些实施方案中,经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷包含经修饰的糖。在某些实施方案中,经修饰的寡核苷酸包含至少一个经四氢吡喃修饰的核苷,其中四氢吡喃环代替呋喃糖环。在某些实施方案中,每一个经四氢吡喃修饰的核苷具有以下结构:



[0176] 其中Bx是任选保护的杂环碱基部分。在某些实施方案中,至少一种经修饰的糖是双环糖。在某些实施方案中,至少一种经修饰的糖包含2'-O-甲氧基乙基或4'-(CH₂)_n-O-2'桥,其中n是1或2。

[0177] 在某些实施方案中,所述经修饰的寡核苷酸中的至少一个核苷包含经修饰的核碱基。在某些实施方案中,经修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。

[0178] 在某些实施方案中,经修饰的寡核苷酸包含:a) 由连接脱氧核苷组成的缺口区段;

b) 由连接核苷组成的5'翼区段;和c) 由连接核苷组成的3'翼区段。缺口区段位于5'翼区段与3'翼区段之间并且每个翼区段中的每个核苷包含经修饰的糖。在某些实施方案中,经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成,缺口区段由10个连接脱氧核苷组成,5'翼区段由5个连接核苷组成,3'翼区段由5个连接核苷组成,每个翼区段的每个核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖并且每个核苷间键合是硫代磷酸酯键合,

[0179] 在某些实施方案中,本发明的化合物和组合物包含经修饰的寡核苷酸,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有包含与SEQ ID NO:1-5的等长部分互补的至少8个连续核碱基的核碱基序列,其中经修饰的寡核苷酸包含:a) 由10个连接脱氧核苷组成的缺口区段;b) 由5个连接核苷组成的5'翼区段;和c) 由5个连接核苷组成的3'翼区段。缺口区段位于5'翼区段与3'翼区段之间,每个翼区段的每个核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,每个核苷间键合是硫代磷酸酯键合且每个胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。

[0180] 在某些实施方案中,本发明的化合物和组合物包含经修饰的寡核苷酸,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有包含与SEQ ID NO:34-182中任一个的至少8个连续核碱基的核碱基序列,其中经修饰的寡核苷酸包含:a) 由10个连接脱氧核苷组成的缺口区段;b) 由5个连接核苷组成的5'翼区段;和c) 由5个连接核苷组成的3'翼区段。缺口区段位于5'翼区段与3'翼区段之间,每个翼区段的每个核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,每个核苷间键合是硫代磷酸酯键合且每个胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。

[0181] 某些实施方案提供了用于抑制ANGPTL3表达的方法、化合物和组合物。

[0182] 某些实施方案提供了减少动物中的ANGPTL3表达的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物。

[0183] 某些实施方案提供了减少动物中的ApoC-III表达的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸,由此减少动物中的ApoC-III表达。

[0184] 某些实施方案提供了减少动物中的甘油三酯水平的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸,由此减少动物中的甘油三酯水平。

[0185] 某些实施方案提供了减少动物中的胆固醇水平的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸,由此减少动物中的胆固醇水平。

[0186] 某些实施方案提供了减少动物中的低密度脂蛋白 (LDL) 水平的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸,由此减少动物中的低密度脂蛋白 (LDL) 水平。

[0187] 某些实施方案提供了减少动物中的葡萄糖水平的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸,由此减少动物中的葡萄糖水平。

[0188] 某些实施方案提供了减轻动物中的代谢疾病或心血管疾病的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸,由此减轻动物中的代谢疾病或心血管疾病。

[0189] 某些实施方案提供了用于治疗患有ANGPTL3相关疾病或疾患的动物的方法,包括:

a) 鉴定患有ANGPTL3相关疾病或疾患的所述动物,和b) 向所述动物施用治疗有效量的化合物,所述化合物包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,施用于动物的治疗有效量的化合物减轻动物中的ANGPTL3相关疾病或疾患。

[0190] 某些实施方案提供了用于治疗患有代谢疾病或心血管疾病的动物的方法,包括:

a) 鉴定患有代谢疾病或心血管疾病的所述动物,和b) 向所述动物施用治疗有效量的包含经修饰的寡核苷酸的化合物,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有与SEQ ID NO:1-5至少90%互补(如对经修饰的寡核苷酸的整体性测量)的核碱基序列,由此治疗患有代谢疾病或心血管疾病的动物。在某些实施方案中,施用于动物的治疗有效量的化合物减轻动物中的代谢疾病或心血管疾病。

[0191] 某些实施方案提供了通过施用包含经修饰的寡核苷酸的ANGPTL3抑制剂减少人中ANGPTL3水平、LDL水平、apoC-III水平、甘油三酯水平、胆固醇水平、葡萄糖水平、脂肪垫重、心血管疾病和代谢疾病中的一者或多者的方法,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有与SEQ ID NO:1-5至少90%互补的核碱基序列,如对所述经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的。

[0192] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于抑制ANGPTL3表达的用途。

[0193] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于减少动物中的ANGPTL3表达。某些实施方案包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物。

[0194] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于减少动物中的ApoC-III表达的用途。某些实施方案包括向动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,由此减少动物中的ApoC-III表达。

[0195] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于减少动物中的甘油三酯水平的用途。某些实施方案包括给动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,由此减少动物中的甘油三酯水平。

[0196] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于减少动物中的胆固醇水平的用途。某些实施方案包括给动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,由此减少动物中的胆固醇水平。

[0197] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于减少动物中的低密度脂蛋白(LDL)水平的用途。某些实施方案包括给动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,由此减少动物中的低密度脂蛋白(LDL)水平。

[0198] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于减少动物中的葡萄糖水平的用途。某些实施方案包括给动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,由此减少动物中的葡萄糖水平。

[0199] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于减轻动物中的代谢疾病或心血管疾病的用途。某些实施方案包括给动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,由此减轻动物中的代谢疾病或心血管疾病。

[0200] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于治疗的用途。某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于治疗患有ANGPTL3相关疾病或疾患的动物的用途。在某些实施方案中,ANGPTL3相关疾病或疾患是代谢疾病或心血管疾病。某些实施方案包

括:a) 鉴定患有ANGPTL3相关疾病或疾患的所述动物,和b) 向所述动物施用治疗有效量的化合物,所述化合物包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,施用于动物的治疗有效量的化合物减轻动物中的ANGPTL3相关疾病或疾患。

[0201] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于治疗患有代谢疾病或心血管疾病的动物的用途。包括:a) 鉴定患有代谢疾病或心血管疾病的所述动物,和b) 向所述动物施用包含经修饰的寡核苷酸的化合物,由此治疗患有代谢疾病或心血管疾病的动物,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有与SEQ ID NO:1-5至少90%互补的核碱基序列,如对所述经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的。在某些实施方案中,施用于动物的治疗有效量的化合物减轻动物中的代谢疾病或心血管疾病。

[0202] 某些实施方案提供了本文所述的化合物和组合物用于减少人中ANGPTL3水平、LDL水平、apoC-III水平、甘油三酯水平、胆固醇水平、葡萄糖水平、脂肪垫重、心血管疾病和代谢疾病中的一者或多者的用途,通过施用包含经修饰的寡核苷酸的ANGPTL3抑制剂,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有与SEQ ID NO:1-5至少90%互补的核碱基序列,如对所述经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的。

[0203] 在某些实施方案中,ANGPTL3具有如GenBank登记号BG400407.1中所述的mRNA序列(以SEQ ID NO:1并入本文)。在某些实施方案中,ANGPTL3具有如GenBank登记号BG562555.1中所述的mRNA序列(以SEQ ID NO:2并入本文)。在某些实施方案中,ANGPTL3具有如GenBank登记号BG562798.1中所述的mRNA序列(以SEQ ID NO:3并入本文)。在某些实施方案中,ANGPTL3具有如GenBank登记号NM_014495.1中所述的mRNA序列(以SEQ ID NO:4并入本文)。在某些实施方案中,ANGPTL3具有如GenBank登记号NT_032977.5的核苷酸15511702至15521082中所述的序列(以SEQ ID NO:5并入本文)。在某些实施方案中,ANGPTL3具有如GenBank登记号AF162224.1中所述的mRNA序列(以SEQ ID NO:6并入本文)。在某些实施方案中,ANGPTL3具有如GenBank登记号AI195524.1中所述的mRNA序列(以SEQ ID NO:7并入本文)。在某些实施方案中,ANGPTL3具有如GenBank登记号BB717501.1中所述的mRNA序列(以SEQ ID NO:8并入本文)。

[0204] 表1基因靶名称和序列

[0205]

靶名称	物种	Genbank#	SEQ ID NO
血管生成素样3	人	BG400407.1	1
血管生成素样3	人	BG562555.1	2
血管生成素样3	人	BG562798.1	3
血管生成素样3	人	NM_014495.1	4
血管生成素样3	人	NT_032977.5的核苷酸15511702至15521082	5
血管生成素样3	小鼠	AF162224.1	6
血管生成素样3	小鼠	AI195524.1	7
血管生成素样3	小鼠	BB717501.1	8

[0206] 在某些实施方案中,该动物是人。

[0207] 在某些实施方案中,本发明的化合物和组合物被称为第一活性剂,并且本发明的方法或使用还包括施用第二活性剂。在某些实施方案中,共施用第一活性剂和第二活性剂。

在某些实施方案中,相继或伴随共施用第一活性剂和第二活性剂。

[0208] 在某些实施方案中,第二活性剂是葡萄糖降低剂。葡萄糖降低剂可包括但不限于治疗性生活方式改变、PPAR激动剂、二肽基肽酶(IV)抑制剂、GLP-1类似物、胰岛素或胰岛素类似物、胰岛素促泌素、SGLT2抑制剂、人胰淀素类似物、双胍类、 α -糖苷酶抑制剂或其组合。葡萄糖降低剂可包括但不限于二甲双胍、磺酰脲、罗格列酮、美格列奈、噻唑烷二酮类、 α -糖苷酶抑制剂或其组合。磺酰脲可以是醋酸己脲、氯磺丙脲、甲苯磺丁脲、妥拉磺脲、格列美脲、格列吡嗪、格列本脲或格列奇特。美格列奈可以是那格列奈或瑞格列奈。噻唑烷二酮类可以是吡格列酮或罗格列酮。 α -糖苷酶可以是阿卡波糖或米格列醇。

[0209] 在某些实施方案中,第二活性剂是降脂质治疗。在某些实施方案中,降脂质治疗可包括但不限于治疗性生活方式改变、HMG-CoA还原酶抑制剂、胆固醇吸收抑制剂、MTP抑制剂、靶向于ApoB的反义化合物或其任何组合。胆固醇吸收抑制剂可以是依泽替米贝。

[0210] 在某些实施方案中,施用包含胃肠外施用。

[0211] 在某些实施方案中,代谢疾病或心血管疾病包括但不限于肥胖症、糖尿病、动脉粥样硬化、血脂障碍、冠心病、非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)、高脂肪酸血症或代谢综合征或其组合。血脂障碍可以是高脂血症。高脂血症可以是高胆固醇血症、高甘油三酯血症或高胆固醇血症和高甘油三酯血症两者。NAFLD可以是肝脂肪变性或脂肪肝。糖尿病可以是具有2型糖尿病或血脂障碍的2型糖尿病。

[0212] 在某些实施方案中,施用发明化合物导致脂质水平的减少,包括甘油三酯水平、胆固醇水平、胰岛素抵抗、葡萄糖水平或其组合。一个或多个水平可独立地减少5%、10%、20%、30%、35%或40%。施用本发明化合物可导致提高的胰岛素敏感性或肝胰岛素敏感性。施用本发明化合物可导致动脉粥样硬化斑块、肥胖症、葡萄糖、脂质、葡萄糖抵抗、胆固醇的减少或胰岛素敏感性的提高或其任何组合。

[0213] 某些实施方案提供了本文描述的化合物在制备用于治疗、减轻、延缓或预防一种或多种代谢疾病或心血管疾病的药物中的用途。

[0214] 某些实施方案提供了用于治疗、预防或减轻一种或多种本文所述的代谢疾病或心血管疾病的试剂盒,其中所述试剂盒包含:a)本文描述的化合物;和任选的b)本文描述的其他活性剂或治疗。该试剂盒还可包括使用该试剂盒来治疗、预防或减轻一种或多种代谢疾病或心血管疾病的说明或标签。

[0215] 反义化合物

[0216] 寡聚化合物包括但不限于,寡核苷酸、寡核苷、寡核苷酸类似物、寡核苷酸模拟物、反义化合物、反义寡核苷酸和siRNA。寡聚化合物可以与靶核酸“反义”,意指能够通过氢键合与靶核酸经受杂交。

[0217] 在某些实施方案中,反义化合物具有这样的核碱基序列,当其以5'至3'方向书写时包含其所靶向的靶核酸的靶区段的反向补体序列。在某些此类实施方案中,反义寡核苷酸具有这样的核碱基序列,当其以5'至3'方向书写时包含其所靶向的靶核酸的靶区段的反向补体序列。

[0218] 在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物的长度为10至30个核苷酸。换句话说,反义化合物为10至30个连接核碱基。在其它实施方案中,反义化合物包含由8至80、10至80、12至50、15至30、18至24、19至22个或20个连接核碱基组成的经修饰的寡核苷

酸。在某些此类实施方案中,反义化合物包含经修饰的寡核苷酸,所述经修饰的寡核苷酸由长度为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个连接核碱基、或由上述值中的任何两个所定义的范围组成。

[0219] 在某些实施方案中,反义化合物包含缩短的或截短的经修饰的寡核苷酸。缩短的或截短的经修饰的寡核苷酸可具有从5'端(5'截短)、或可选地从3'端(3'截短)缺失的单一核苷。缩短的或截短的寡核苷酸可具有两个或更多个从5'端缺失的核苷、或可选地可具有两个或更多个从3'端缺失的核苷。可选地,缺失的核苷可遍及经修饰的寡核苷酸分散,例如在具有一个或多个从5'端缺失的核苷和一个或多个从3'端缺失的核苷的反义化合物中。

[0220] 当单个额外的核苷存在于延长的寡核苷酸中时,额外的核苷可位于寡核苷酸的5'、3'端或中央部分。当存在两个或更多个额外的核苷时,添加的核苷可彼此相邻,例如在具有两个添加至寡核苷酸的5'端(5'添加)或可选地至3'端(3'添加)或中央部分的核苷的寡核苷酸中。可选地,所添加的核苷可遍及反义化合物分散,例如在具有一个或多个添加至5'端的核苷,一个或多个添加至3'端的核苷和/或一个或多个添加中央部分的核苷的寡核苷酸中。

[0221] 可能增加或减少反义化合物例如反义寡核苷酸的长度,和/或可能引入错配碱基而消除活性。例如,在Woolf等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7305-7309,1992)中,测试长度为13-25个核碱基的一系列反义寡核苷酸诱导靶RNA在卵母细胞注射模型中的切割的能力。在邻近反义寡核苷酸的末端处具有8或11个错配碱基的长度为25个核碱基的反义寡核苷酸能够指导靶mRNA的特异性切割,尽管达到比不含错配的反义寡核苷酸小的程度。同样地,使用13个核碱基反义寡核苷酸(包括具有1或3个错配的那些)实现靶特异性切割。

[0222] Gautschi等人(J.Natl.Cancer Inst.93:463-471,2001年3月)证明了与bcl-2mRNA具有100%互补性并且具有与bcl-xL mRNA的3个错配的寡核苷酸减少在体外和体内表达bcl-2和bcl-xL两者的能力。而且,该寡核苷酸在体内证明了有效的抗-肿瘤活性。

[0223] Maher和Dolnick(Nuc.Acid.Res.16:3341-3358,1988)分别测试了一系列串联14个核碱基反义寡核苷酸以及由2个或3个串联反义寡核苷酸的序列组成的28和42核碱基反义寡核苷酸阻止人DHFR在兔网状细胞测定中的翻译的能力。三个14核碱基反义寡核苷酸中的每一个单独地能够抑制翻译,尽管以比28或42核碱基反义寡核苷酸更适度的水平抑制翻译。

[0224] 反义化合物基序

[0225] 在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物具有排列在模型或基序中的经化学修饰的亚单位以赋予反义化合物性质例如增强的抑制活性、增加的对靶核酸的结合亲和力或体内核酸酶对降解的抵抗。

[0226] 嵌合反义化合物通常包含至少一个经修饰的区域以赋予增加的对核酸酶降解的抵抗、增加在细胞摄取、增加的对靶核酸的结合亲和力和/或增加的抑制活性。嵌合反义化合物的第二区域可任选地用作细胞内切核酸酶RNA酶H的底物,其切割RNA:DNA双链体的RNA链。

[0227] 具有缺口基体基序的反义化合物被认为是嵌合反义化合物。在缺口基体中,具有

多个支持RNAeH切割的核苷酸的内部区域位于具有在化学上不同于内部区域的核苷的多个核苷酸的外部区域之间。在具有缺口基体基序的反义寡核苷酸的情况下,缺口区段通常用作内切核酸酶切割的底物,尽管翼区段包含经修饰的核苷。在某些实施方案中,缺口基体的区域通过包含每个不同区域的糖部分类型来区分。用于区分缺口基体的区域的糖部分类型可在一些实施方案中包括 β -D-核糖核苷、 β -D-脱氧核糖核苷、2'-修饰的核苷(此类2'-修饰的核苷此外还可包括2'-MOE和2'-O-CH₃)和经双环糖修饰的核苷(此类经双环糖修饰的核苷可包括具有4'-(CH₂)_n-O-2'桥的那些,其中n=1或n=2)。优选地,每个不同区域包含一致的糖部分。翼-缺口-翼基序常被称为“X-Y-Z”,其中“X”表示5'翼区域的长度,“Y”表示缺口区域的长度,以及“Z”表示3'翼区域的长度。如本文所用的,称为“X-Y-Z”的缺口基体具有这样的构型以使缺口区段的位置与5'翼区段与3'翼区段中的每个直接相邻。因此,没有插入核苷酸存在于5'翼区段与缺口区段、或缺口区段与3'翼区段之间。本文描述的任何反义化合物可具有缺口基体基序。在一些实施方案中,X和Z相同,在其它实施方案中,它们是不同的。在优选的实施方案中,Y为8至15个核苷酸。X、Y或Z可以是1、2、3、4、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个或更多个核苷酸中的任一个。因此,缺口基体包括但不限于,例如5-10-5、4-8-4、4-12-3、4-12-4、3-14-3、2-13-5、2-16-2、1-18-1、3-10-3、2-10-2、1-10-1、2-8-2、6-8-6、5-8-5、1-8-1、2-6-2、6-8-6、5-8-5、1-8-1、2-6-2、2-13-2、1-8-2、2-8-3、3-10-2、1-18-2或2-18-2。

[0228] 在某些实施方案中,作为“翼基体(wingmer)”基序的反义化合物具有翼-缺口或缺口-翼构型,即本文对于缺口基体构型所述的X-Y或Y-Z构型。因此,翼基体构型包括但不限于,例如5-10、8-4、4-12、12-4、3-14、16-2、18-1、10-3、2-10、1-10、8-2、2-13或5-13。

[0229] 在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物具有5-10-5缺口基体基序。

[0230] 在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物具有缺口加宽的基序。

[0231] 靶核酸、靶区域和核苷酸序列

[0232] 编码ANGPTL3的核苷酸序列包括但不限于以下:如GenBank登记号BG400407.1所列的人序列(以SEQ ID NO:1并入本文)、GenBank登记号BG562555.1(以SEQ ID NO:2并入本文)、GenBank登记号BG562798.1(以SEQ ID NO:3并入本文)、GenBank登记号NM_014495.1(以SEQ ID NO:4并入本文)、GenBank登记号NT_032977.5核苷酸15511702至15521082(以SEQ ID NO:5并入本文)、GenBank登记号AF162224.1(以SEQ ID NO:6并入本文)、GenBank登记号AI195524.1(以SEQ ID NO:7并入本文)和GenBank登记号BB717501.1(以SEQ ID NO:8并入本文)。应理解,本文所含的实施例中每个SEQ ID NO所列的序列与糖部分、核苷间键合或核碱基的任何修饰无关。照这样,由SEQ ID NO定义的反义化合物可独立地包含糖部分、核苷间键合或核碱基的一或多个修饰。由Isis号(Isis No)所述的反义化合物指示核碱基序列和基序的组合。

[0233] 在某些实施方案中,靶区域是靶核酸的结构上限定的区域。例如,靶区域可包含3' UTR、5' UTR、外显子、内含子、外显子/内含子接头、编码区、翻译起始区、翻译终止区或其它定义的核酸区域。ANGPTL3的结构上定义的区域可通过序列数据库例如NCBI的登记号获得并且此类信息通过引用并入本文。在某些实施方案中,靶区域可包含靶区域内的一个靶区段的5'靶位点的序列至靶区域内的另一靶区段的3'靶位点。

[0234] 在某些实施方案中,“靶区段”是较小的、核酸内的靶区域的亚部分。例如,靶区段

可以是一个或多个反义化合物所靶向的靶核酸的核苷酸的序列。“5' 靶位点”是指靶区段的5' 最末端核苷酸。“3' 靶位点”是指靶区段的3' 最末端核苷酸。

[0235] 靶向包括确定反义化合物与其杂交以使所需效应发生的至少一个靶区段。在某些实施方案中,所需效应是mRN靶核酸水平减少。在某些实施方案中,所需效应是通过靶核酸或与靶核酸相关的表型改变编码的蛋白的水平的降低。

[0236] 靶区域可包含一个或多个靶区段。靶区域内的多个靶区段可以重叠。可选地,它们可以是非重叠的。在某些实施方案中,靶区域内的靶区段被最多约300个核苷酸间隔。在某些实施方案中,靶区域内的靶区段被多个核苷酸(为、约为、最多、最多为靶核酸上的250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20或10个核苷酸)间隔,或为由任何两个前述值定义的范围。在某些实施方案中,靶区域内的靶区段被靶核酸上的最多或最多约5个核苷酸间隔。在某些实施方案中,靶区段是连续的。考虑的是通过具有起始核酸(为本文所列的5' 靶位点或3' 靶位点的任一个)的范围定义的靶区域。

[0237] 可在5' UTR、编码区、3' UTR、内含子、外显子或外显子/内含子接头内发现适合的靶区段。包含起始密码子或终止密码子的靶区段也是适合的靶区段。适合的靶区段可明确地排除某种结构上定义的区域例如起始密码子或终止密码子。

[0238] 适合的靶区段的确定可包括靶核酸序列与其它序列通过基因组的比较。例如, BLAST算法可用于在不同核酸中鉴定相似性区域。这种比较可防止可以与序列而不是所选靶核酸(即,非-靶或脱-靶序列)以非特异性方式杂交的反义化合物序列的选择。

[0239] 可存在反义化合物在活性靶区域内的活性(例如,由靶核酸水平减少百分比所定义的)的变化。在某些实施方案中,ANGPTL3 mRNA水平的减少指示ANGPTL3蛋白表达的抑制。ANGPTL3蛋白水平的减少也指示靶mRNA表达的抑制。此外,表型改变例如胆固醇、LDL、甘油三酯或葡萄糖的水平减少可指示ANGPTL3 mRNA和/或蛋白表达的抑制。

[0240] 杂交

[0241] 在一些实施方案中,杂交在本文公开的反义化合物与ANGPTL3核酸之间发生。最为常见的杂交机理包括核酸分子的互补核碱基之间的氢键合(例如,Watson-Crick、Hoogsteen或反向Hoogsteen氢键合)。

[0242] 杂交可在不同条件下发生。严格条件是序列依赖性的并且由待杂交的核酸分子的性质和组分决定。

[0243] 确定序列是否可特异性与靶核酸杂交的方法是本领域所熟知的(Sambrooke和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,2001)。在某些实施方案中,本文提供的反义化合物可与ANGPTL3核酸特异性杂交。

[0244] 互补性

[0245] 当反义化合物的足够量的核碱基可与靶核酸的相应核碱基发生氢键合,反义化合物和靶核酸彼此互补以使所需效应发生(例如,靶核酸例如ANGPTL3核酸的反义抑制)。

[0246] 反义化合物可在ANGPTL3核酸的一个或多个区段上杂交以使插入或相邻区段不参与杂交事件(例如,环结构、错配或发夹结构)。

[0247] 在某些实施方案中,本文提供的反义化合物或其特定部分与ANGPTL3核酸、靶区域、靶区段或其特定部分具有或至少具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在某些实施方案中,本

文提供的反义化合物或其特定部分与SEQ ID NO:1-5的一个或多个的序列具有或至少具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。具有靶核酸的反义化合物的互补性百分比可使用常规方法来测定。

[0248] 例如,反义化合物的18至20个核碱基与靶区域互补并且将由此特异性杂交的反义化合物代表90%互补性。在此实例中,剩余的非-互补核碱基可与互补核碱基簇生或散开并且不需彼此连续或与互补核碱基连续。照这样,长度为18个核碱基的具有4(4)个非-互补核碱基(其通过完全互补性的两个区域与靶核酸侧翼连接)的反义化合物将与靶核酸具有77.8%全互补性并且因此在本发明的范围内。反义化合物与靶核酸区域的互补性百分比可常规地使用本领域已知的BLAST程序(基础定点校准研究工具)和PowerBLAST程序(Altschul等人,J.Mol.Biol.,1990,215,403-410;Zhang和Madden,Genome Res.,1997,7,649-656)来测定。同源性、序列同一性或互补性的百分比可通过例如,Gap程序(Wisconsin序列分析包,Version 8for Unix,Genetics Computer Group,University Research Park,Madison Wis.)、利用使用Smith和Waterman的算法(Adv.Appl.Math.,1981,2,482-489)的缺省设定来测定。

[0249] 在某些实施方案中,本文提供的反义化合物或其特定部分与靶核酸、或其特定部分完全互补(即100%互补)。例如,反义化合物可与ANGPTL3核酸、或靶区域、或靶区段或其靶序列完全互补。如本文所用的,“完全互补”意指反义化合物的每个核碱基能够与靶核酸的相应核碱基精确碱基配对。例如,20核碱基反义化合物与400核碱基长的靶序列完全(100%)互补,只要存在与反义化合物完全互补的靶核酸的相应20核碱基部分。提及第一和/或第二核酸的特定部分时,还可使用完全互补。例如,30核碱基反义化合物的20核碱基部分可与400核碱基长的靶序列“完全互补”。30核碱基寡核苷酸的20核碱基部分与靶序列“完全互补”,如果靶序列具有相应的20核碱基部分,其中每个核碱基与反义化合物的20核碱基部分互补。同时,整个30核碱基反义化合物可与靶序列完全互补,取决于反义化合物的剩余10核碱基是否也与靶序列互补。

[0250] 非-互补核碱基的位置可在反义化合物的5'端或3'端。可选地,非-互补核碱基或核碱基可以在反义化合物的内部位置。当存在两个或更多个非-互补核碱基时,它们可以是连续(即连接)或非连续的。在一个实施方案中,非-互补核碱基位于缺口基体反义寡核苷酸的翼区段。

[0251] 在某些实施方案中,长度为或至多为10、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核碱基的反义化合物包含相对于与靶核酸例如ANGPTL3核酸或其特定部分的最多4个、最多3个、最多2个或最多1个非-互补核碱基。

[0252] 在某些实施方案中,长度为或至多为10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核碱基的反义化合物包含相对于靶核酸例如ANGPTL3核酸或其特定部分的最多6个、最多5个、最多4个、最多3个、最多2个或最多1个非-互补核碱基。

[0253] 本文提供的反义化合物还包括与靶核酸的一部分互补的那些。如本文所用的,“部分”是指在靶核酸的区域或区段内的确定数量的连续(即连接)核碱基。“部分”还可以是指反义化合物中确定数量的连续核碱基。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段的至少8核碱基部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段的至少10核碱基部分互补。在某些

实施方案中,与靶区段的至少15核碱基部分互补。还考虑的是与靶区段的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个核碱基部分、或由这些值中的任何两个所定义的范围互补的反义化合物。

[0254] 同一性

[0255] 本文提供的反义化合物还可与特定核苷酸序列、SEQ ID NO或由特定Isis号所示的化合物的序列或其部分具有确定的同一性百分比。如本文所用的,反义化合物与本文公开的序列具有同一性,如果其具有相同的核碱基配对能力。例如,公开的DNA序列中包含替代胸苷的尿嘧啶的RNA将被认为与DNA序列具有同一性,因为尿嘧啶和胸苷两者与腺嘌呤配对。还考虑本文所述的反义化合物以及具有与本文提供的反义化合物相关的非-相同碱基的化合物的缩短的和延长的形式。非-相同碱基可彼此相邻或遍及反义化合物分散。根据具有与其所相比较的序列相关的相同碱基配对的碱基数计算反义化合物的同一性百分比。

[0256] 在某些实施方案中,反义化合物或其部分与一个或多个反义化合物或SEQ ID NO或其本文公开的部分具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0257] 修饰

[0258] 核苷是碱基-糖组合。核苷的核碱基(也称为碱基)部分通常为杂环碱基部分。核苷酸还包括共价连接于核苷的糖部分的磷酸基的核苷。对于那些包括戊呋喃糖基糖的核苷,磷酸基可连接于糖的2'、3'或5'羟基部分。寡核苷酸通过相邻核苷彼此的共价键合而形成,以形成线性聚合寡核苷酸。在寡核苷酸结构内,磷酸基通常被称为形成寡核苷酸的核苷间键合。

[0259] 对反义化合物的修饰包括对核苷间键合、糖部分或核碱基的取代或改变。因为所需性质例如,例如增加的细胞摄取、增强的对核酸靶的亲合力以及增加的在核酸酶存在下的稳定性、或增加的抑制活性,与天然形式相比,通常优选经修饰的反义化合物。

[0260] 还可以比较经化学修饰的核苷以增加缩短的或截短的反义寡核苷酸对于其靶核酸的结合亲合力。因此,通常可用具有此类经化学修饰的核苷的较短的反义化合物获得类似的结果。

[0261] 经修饰的核苷间键合

[0262] RNA和DNA的天然存在核苷间键合是3'至5'磷酸二酯键合。因为所需的性质例如,增加的细胞摄取、增强的对靶核酸的亲合力以及增加的在核酸酶存在下的稳定性,与具有天然存在核苷间键合的反义化合物相比,通常选择具有一个或多个修饰的即非-天然存在的核苷间键合的反义化合物。

[0263] 寡核苷酸具有经修饰的核苷间键合,包括保留磷原子的核苷间键合以及不具有磷原子的核苷间键合。代表性含磷核苷间键合包括但不限于,磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯、和硫代磷酸酯。制备含磷和非-含磷键合的方法是熟知的。

[0264] 在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物包含一个或多个经修饰的核苷间键合。在某些实施方案中,经修饰的核苷间键合是硫代磷酸酯键合。在某些实施方案中,反义化合物的每个核苷间键合是硫代磷酸酯核苷间键合。

[0265] 经修饰的糖部分

[0266] 反义化合物可任选地包含一个或多个核苷,其中糖基团已被修饰。此类经糖修饰

的核苷可赋予反义化合物增强的核酸酶稳定性、增加的结合亲和力或一些其它有益的生物性质。在某些实施方案中,核苷包含经化学修饰的呋喃核糖环部分。经化学修饰的呋喃核糖环的实例包括但不限于添加取代基基团(包括5'和2'取代基基团、桥接非孪位环原子以形成双环核酸(BNA)、用S、N(R)或C(R1)(R)2(R=H、C₁-C₁₂烷基或保护基团)替代核糖基环氧原子及其组合。经化学修饰的糖的实例包括2'-F-5'-甲基取代核苷(参见,于2008年8月21日公布的PCT国际申请W0 2008/101157,对于其它公开的5'、2'-双取代的核苷)或用S替代核糖基环氧原子并且在2'-位进一步取代(参见,公布的U.S.专利申请US20050130923,于2005年6月16日公布)或可选地5'-取代BNA(参见,于2007年11月22日公布的PCT国际申请W0 2007/134181,其中LNA被例如5'-甲基或5'-乙烯基基团取代)。

[0267] 具有经修饰的糖部分的核苷的实例包括不但不限于,包含5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃、和2'-O(CH₂)₂OCH₃取代基基团的核苷。2'位的取代基还可以选自烷基、氨基、叠氮基、硫代、O-烷基、O-C₁-C₁₀烷基、OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)和O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n),其中每个R_m和R_n独立地是H或取代的或未取代的C₁-C₁₀烷基。

[0268] 双环核酸(BNA)的实例包括不但不限于,包含4'和2'核糖基环原子之间的桥的核苷。在某些实施方案中,本文提供了包括一个或多个BNA核苷的反义化合物,其中桥包含下式之一:4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-C(CH₃)₂-O-2'(参见PCT/US2008/068922);4'-CH(CH₃)-O-2'和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(参见U.S.专利7,399,845,于2008年7月15日授权);4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(参见PCT/US2008/064591);4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(参见公布的U.S.专利申请US2004-0171570,于2004年9月2日公布);4'-CH₂-N(R)-O-2'(参见U.S.专利7,427,672,于2008年9月23日授权);4'-CH₂-CH(参见Chattopadhyaya等人,J.Org.Chem,2009,74,118-134)(CH₃)-2'和4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(参见PCT/US2008/066154);并且其中R独立地是H、C₁-C₁₂烷基、或保护基团。前述BNA每一个包括各种立体化学糖构型,包括例如 α -L-呋喃核糖和 β -D-呋喃核糖(参见PCT国际申请PCT/DK98/00393,于1999年3月25日以W0 99/14226公布)。先前, α -L-亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2')BNA's也已被并入显示反义活性的反义寡核苷酸中(Frieden等人,Nucleic acids Research,2003,21,6365-6372)。

[0269] 涉及双环核苷的更多报道可发现于公布的文献(参见例如:Srivastava等人,J.Am.Chem.Soc.,2007,129,8362-8379;U.S.专利No.7,053,207;6,268,490;6,770,748;6,794,499;7,034,133;和6,525,191;Elayadi等人,Curr.Opinion Inven.S.Drugs,2001,2,558-561;Braasch等人,Chem.Biol.,2001,8,1-7;和Orum等人,Curr.Opinion Mol.Ther.,2001,3,239-243;和U.S.6,670,461;国际申请W0 2004/106356;W0 94/14226;W0 2005/021570;U.S.专利申请No.US2004-0171570;US2007-0287831;US2008-0039618;U.S.专利No.7,399,845;U.S.专利序列No.12/129,154;60/989,574;61/026,995;61/026,998;61/056,564;61/086,231;61/097,787;61/099-,844;PCT国际申请No.PCT/US2008/064591;PCT/US2008/066154;PCT/US2008/068922;和公布的PCT国际申请W0 2007/134181)。

[0270] 在某些实施方案中,BNA核苷的双环糖部分包括但不限于,在戊呋喃糖基糖部分的4'位与2'位之间具有至少一个桥的化合物,其中此类桥独立地包含1或2至4个独立地选自以下的连接基团:-[C(R_a)(R_b)]_n-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=O)-, -C(=NR_a)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x-和-N(R_a)-;

[0271] 其中:

[0272] x是0、1或2;

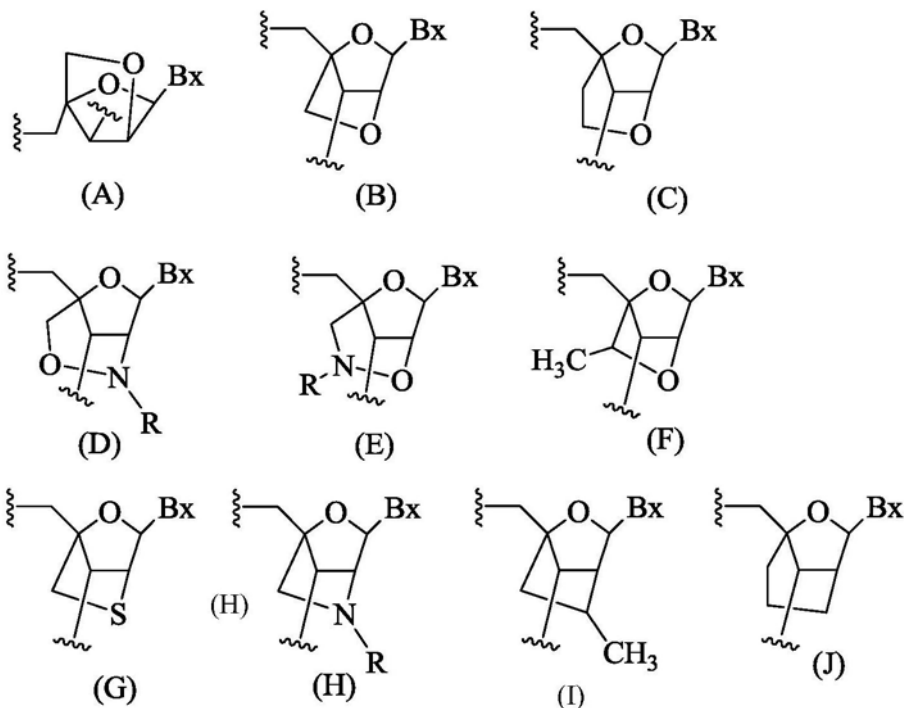
[0273] n是1、2、3或4;

[0274] R_a 和 R_b 各自独立地是H、保护基团、羟基、 C_1 - C_{12} 烷基、取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_5 - C_{20} 芳基、取代的 C_5 - C_{20} 芳基、杂环自由基、取代的杂环自由基、杂芳基、取代的杂芳基、 C_5 - C_7 脂环族自由基、取代的 C_5 - C_7 脂环族自由基、卤素、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $COOJ_1$ 、酰基($C(=O)-H$)、取代的酰基、CN、磺酰基($S(=O)_2-J_1$)或磺酰氧基($S(=O)-J_1$);并且

[0275] J_1 和 J_2 各自独立地是H、 C_1 - C_{12} 烷基、取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_5 - C_{20} 芳基、取代的 C_5 - C_{20} 芳基、酰基($C(=O)-H$)、取代的酰基、杂环自由基、取代的杂环自由基、 C_1 - C_{12} 氨基烷基、取代的 C_1 - C_{12} 氨基烷基或保护基团。

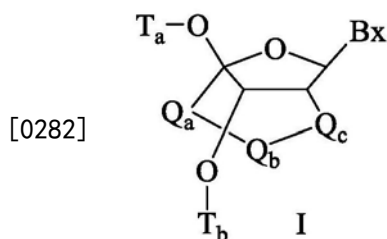
[0276] 在某些实施方案中,双环糖部分的桥是 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ 、 $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ 或 $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ 。在某些实施方案中,桥是 $4'-CH_2-2'$ 、 $4'-(CH_2)_2-2'$ 、 $4'-(CH_2)_3-2'$ 、 $4'-CH_2-O-2'$ 、 $4'-(CH_2)_2-O-2'$ 、 $4'-CH_2-O-N(R)-2'$ 和 $4'-CH_2-N(R)-O-2'$,其中每一个R独立地是H、保护基团或 C_1 - C_{12} 烷基。

[0277] 在某些实施方案中,双环核苷包括但不限于,(A) α -L-亚甲基氧基($4'-CH_2-O-2'$)BNA、(B) β -D-亚甲基氧基($4'-CH_2-O-2'$)BNA、(C) 亚乙基氧基($4'-(CH_2)_2-O-2'$)BNA、(D) 氨基氧基($4'-CH_2-O-N(R)-2'$)BNA、(E) 氧基氨基($4'-CH_2-N(R)-O-2'$)BNA和(F) 甲基(亚甲基氧基)($4'-CH(CH_3)-O-2'$)BNA、(G) 亚甲基-硫基($4'-CH_2-S-2'$)BNA、(H) 亚甲基-氨基($4'-CH_2-N(R)-2'$)BNA、(I) 甲基碳环($4'-CH_2-CH(CH_3)-2'$)BNA和(J) 亚丙基碳环($4'-(CH_2)_3-2'$)BNA,如下所述。



[0280] 其中Bx是碱基部分且R独立地是H、保护基团或 C_1 - C_{12} 烷基。

[0281] 在某些实施方案中,具有式I的双环核苷:



[0283] 其中：

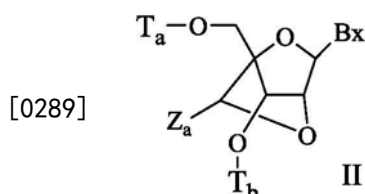
[0284] Bx是杂环碱基部分；

[0285] $-Q_a-Q_b-Q_c-$ 是 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_c)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_c)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{R}_c)-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_c)-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}_c)-\text{O}-\text{CH}_2-$ ；

[0286] R_c 是 C_1-C_{12} 烷基或氨基保护基团；并且

[0287] T_a 和 T_b 各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分、或支持介质的共价连接。

[0288] 在某些实施方案中，具有式II的双环核苷：



[0290] 其中：

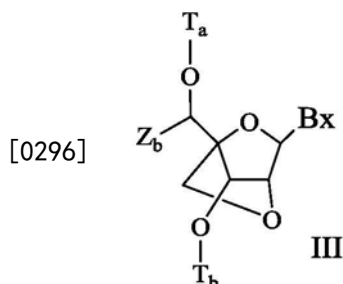
[0291] Bx是杂环碱基部分；

[0292] T_a 和 T_b 各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分、或支持介质的共价连接；

[0293] Z_a 是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、取代的 C_1-C_6 烷基、取代的 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 炔基、酰基、取代的酰基、取代的酰胺、巯基、或取代的巯基。

[0294] 在一个实施方案中，取代的基团中的每一个独立地被选自以下的取代基基团单取代或多取代：卤素、氧代、羟基、 OJ_c 、 NJ_cJ_d 、 SJ_c 、 N_3 、 $\text{OC}(=\text{X})\text{J}_c$ 和 $\text{NJ}_e\text{C}(=\text{X})\text{NJ}_c\text{J}_d$ ，其中每一个 J_c 、 J_d 和 J_e 独立地是H、 C_1-C_6 烷基或取代的 C_1-C_6 烷基且X是O或 NJ_c 。

[0295] 在某些实施方案中，具有式III的双环核苷：



[0297] 其中：

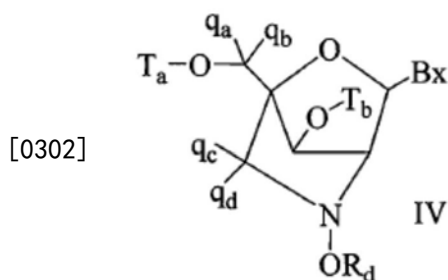
[0298] Bx是杂环碱基部分；

[0299] T_a 和 T_b 各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分、或支持介质的共价连接；

[0300] Z_b 是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、取代的 C_1-C_6 烷基、取代的 C_2-C_6 烯基、取

代的C2-C6炔基、或取代的酰基 (C(=O)-)。

[0301] 在某些实施方案中,具有式IV的双环核苷:



[0303] 其中:

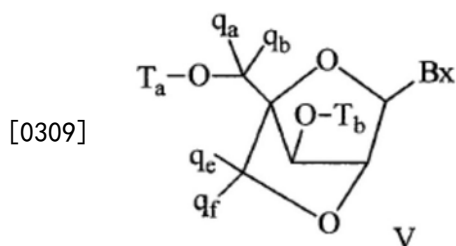
[0304] Bx是杂环碱基部分;

[0305] T_a和T_b各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分、或支持介质的共价连接;

[0306] R_d是C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、或取代的C₂-C₆炔基;

[0307] q_a、q_b、q_c和q_d各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、或取代的C₂-C₆炔基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、酰基、取代的酰基、C₁-C₆氨基烷基、或取代的C₁-C₆氨基烷基;

[0308] 在某些实施方案中,具有式V的双环核苷:



[0310] 其中:

[0311] Bx是杂环碱基部分;

[0312] T_a和T_b各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分、或支持介质的共价连接;

[0313] q_a、q_b、q_e和q_f各自独立地是氢、卤素、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₁-C₁₂烷氧基、取代的C₁-C₁₂烷氧基、OJ_j、SJ_j、SOJ_j、SO₂J_j、NJ_jJ_k、N₃、CN、C(=O)OJ_j、C(=O)NJ_jJ_k、C(=O)J_j、O-C(=O)NJ_jJ_k、N(H)C(=NH)NJ_jJ_k、N(H)C(=O)NJ_jJ_k或N(H)C(=S)NJ_jJ_k;

[0314] 或q_e和q_f一起=C(q_g)(q_h);

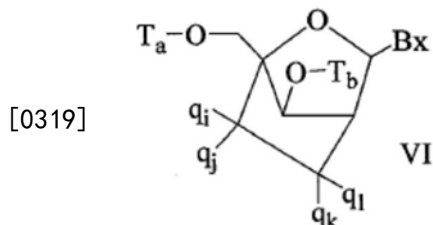
[0315] q_g和q_h各自独立地是H、卤素、C₁-C₁₂烷基、或取代的C₁-C₁₂烷基。

[0316] 亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2')BNA单体腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶的合成和制备与其寡聚化,以及核酸识别性质已被描述(Koshkin等人, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630)。BNA及其制备也描述于WO 98/39352和WO 99/14226中。

[0317] 亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2')BNA和2'-硫代-BNA的类似物已被制备(Kumar等人, Bioorg.Med.Chem.Lett., 1998, 8, 2219-2222)。包含作为核酸聚合酶的底物的寡脱氧核糖

核苷酸双链体的锁定核苷类似物的制备还已被描述 (Wengel等人, WO 99/14226)。而且, 2'-氨基-BNA (一种新型的构象上受限的高亲和力寡核苷酸类似物) 的合成已在本领域中被描述 (Singh等人, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039)。此外, 2'-氨基-和2'-甲基氨基-BNA's 已被制备并且其具有互补RNA和DNA链的双链体的热稳定性已被先前报道。

[0318] 在某些实施方案中, 具有式VI的双环核苷:



[0320] 其中:

[0321] Bx是杂环碱基部分;

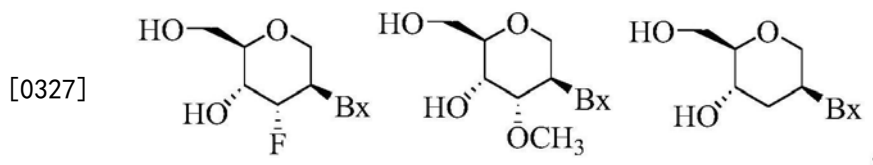
[0322] Ta和Tb各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分、或支持介质的共价连接;

[0323] qi、qj、qk和ql各自独立地是H、卤素、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₁-C₁₂烷氧基、取代的C₁-C₁₂烷氧基、OJ_j、SJ_j、SOJ_j、SO₂J_j、NJ_jJ_k, N₃、CN、C(=O)OJ_j、C(=O)NJ_jJ_k、C(=O)J_j、O-C(=O)NJ_jJ_k、N(H)C(=NH)NJ_jJ_k、N(H)C(=O)NJ_jJ_k或N(H)C(=S)NJ_jJ_k; 并且

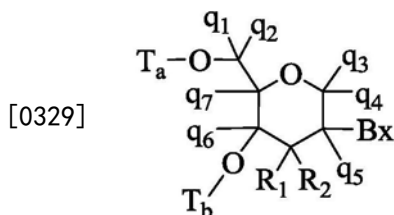
[0324] qi和qj或qj和qk一起=C(q_g)(q_h), 其中q_g和q_h各自独立地是H、卤素、C₁-C₁₂烷基、或取代的C₁-C₁₂烷基。

[0325] 一种具有4'-(CH₂)₃-2'桥和烯基类似物、桥4'-CH=CH-CH₂-2'的碳环双环核苷已被描述 (Freier等人, Nucleic acids Research, 1997, 25 (22), 4429-4443和Albaek等人, J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740)。碳环双环核苷的合成和制备及其寡聚化以及生化研究已被描述 (Srivastava等人, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (26), 8362-8379)。

[0326] 在某些实施方案中, 核苷通过用糖代用品替代核糖基环来修饰。此类修饰包括但不限于用替代环系统 (有时称为DNA类似物) 例如吗啉代环、环己烯基环、环己基环或四氢吡喃基环例如具有下式之一的环系统替代核糖基环:



[0328] 很多其它二环和三环替代环系统也是本领域已知的, 可用于修饰核苷以并入反义化合物中 (参见例如综述文章: Leumann, Christian J., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854)。此类环系统可经受各种额外取代以增强活性。参见例如具有式VII的化合物:



[0330] 其中对于式VII的所述至少一个四氢吡喃核苷类似物中的每一个独立地:

[0331] Bx是杂环碱基部分;

[0332] Ta和Tb各自独立地是连接四氢吡喃核苷类似物与反义化合物的核苷间连接基团或Ta和Tb之一是连接四氢吡喃核苷类似物与反义化合物的核苷间连接基团并且Ta和Tb中的另一个是H、羟基保护基团、连接的缀合物基团、或5'或3'-末端基团;

[0333] q1、q2、q3、q4、q5、q6和q7各自独立地是H、C1-C6烷基、取代的C1-C6烷基、C2-C6烯基、取代的C2-C6烯基、C2-C6炔基或取代的C2-C6炔基;并且R1和R2中的每一个选自氢、羟基、卤素、取代的或未取代的烷氧基、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J1、OC(=X)NJ1J2、NJ3C(=X)NJ1J2和CN,其中X是O、S或NJ1,并且J1、J2和J3中每一个独立地是H或C1-C6烷基。

[0334] 在某些实施方案中,提供了式VII的经修饰的THP核苷,其中q1、q2、q3、q4、q5、q6和q7各自是H(M)。在某些实施方案中,q1、q2、q3、q4、q5、q6和q7中的至少一个不是H。在某些实施方案中,q1、q2、q3、q4、q5、q6和q7中的至少一个是甲基。在某些实施方案中,提供了式VII的THP核苷,其中R1和R2之一是F(K)。在某些实施方案中,提供了式VII的THP核苷,其中R1和R2之一是甲氧基乙氧基。在某些实施方案中,R1是氟且R2是H;R1是H且R2是氟;R1是甲氧基且R2是H,且R1是H且R2是甲氧基乙氧基。用于制备经修饰的糖的方法对于本领域技术人员而言是熟知的。

[0335] 在具有经修饰的糖部分的核苷酸中,维持核碱基部分(天然的、经修饰的或其组合)以与适当的核酸靶杂交。

[0336] 在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物包含一个或多个具有经修饰的糖部分的核苷酸。在某些实施方案中,经修饰的糖部分是2'-MOE。在某些实施方案中,布置2'-MOE修饰的核苷酸在缺口基体基序中。在某些实施方案中,经修饰的糖部分是具有(4'-CH(CH3)-O-2')桥接基团的双环核苷。在某些实施方案中,布置经(4'-CH(CH3)-O-2')修饰的核苷酸遍及缺口基体基序的翼。

[0337] 用于制备经修饰的糖的方法对于本领域技术人员而言是熟知的。

[0338] 在具有经修饰的糖部分的核苷酸中,维持核碱基部分(天然的、经修饰的或其组合)以与适当的核酸靶杂交。

[0339] 在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物包含一个或多个具有经修饰的糖部分的核苷酸。在某些实施方案中,经修饰的糖部分是2'-MOE。在某些实施方案中,布置2'-MOE修饰的核苷酸在缺口基体基序中。

[0340] 经修饰的核碱基

[0341] 核碱基(或碱基)修饰或取代结构上可区别于天然存在的或合成的未经修饰的核碱基,但功能上可与其互换。天然的和经修饰的核碱基均能够参与氢键合。此类核碱基修饰可赋予反义化合物核酸酶稳定性、结合亲和力或一些其它有益的生物学性质。经修饰的核碱基包括合成的和天然的核碱基如,例如,5-甲基胞嘧啶(5-me-C)。某些核碱基取代,包括

5-甲基胞嘧啶取代,特别可用于增加反义化合物对靶核酸的结合亲和力。例如,已显示5-甲基胞嘧啶取代增加核酸双链体稳定性0.6-1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 编, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)。

[0342] 其它经修饰的核碱基包括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-硫代尿嘧啶、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(-C≡C-CH₃)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其它炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、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、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-去氮鸟嘌呤和7-去氮腺嘌呤和3-去氮鸟嘌呤和3-去氮腺嘌呤。

[0343] 杂环碱基部分还可以包括其它嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环例如7-去氮-腺嘌呤、7-去氮鸟苷、2-氨基吡啶和2-吡啶酮代替的那些。特别可用于增加反义化合物的结合亲和力的核碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和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。

[0344] 在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物包含一个或多个经修饰的核碱基。在某些实施方案中,缩短的或缺口加宽的靶向于ANGPTL3核酸的反义寡核苷酸包含一个或多个经修饰的核碱基。在某些实施方案中,经修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0345] 组合物和用于配制药物组合物的方法

[0346] 反义寡核苷酸可与药学上可接受的活性或惰性物质混合以用于制备药物组合物或制剂。组合物和用于配制药物组合物的方法取决于多种标准,包括但不限于施用途径、疾病程度或所施用的剂量。

[0347] 靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物可通过将反义化合物与适合的药学上可接受的稀释剂或载体组合来用于药物组合物。

[0348] 药学上可接受的稀释剂包括磷酸盐缓冲盐水(PBS)。PBS是适用于组合物进行胃肠外递送的稀释剂。因此,在一个实施方案中,本文所述的方法所用的是包含靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物和药学上可接受的稀释剂的药物组合物。在某些实施方案中,药学上可接受的稀释剂是PBS。在某些实施方案中,反义化合物是反义寡核苷酸。

[0349] 包含反义化合物的药物组合物包含任何药学上可接受的盐、酯或此类酯的盐、或任何其它寡核苷酸,其在施用于动物(包括人)时,能够提供(直接或间接)生物学活性的代谢物或其残基。因此,例如,本公开涉及反义化合物的药学上可接受的盐、前药、此类前药的药学上可接受的盐、及其它生物等效形式。适合的药学上可接受的盐包括但不限于,钠盐和盐。

[0350] 前药可包括在反义化合物的一端或两端并入另外的核苷,其在体内通过内源核酸酶被切割,以形成活性反义化合物。

[0351] 缀合的反义化合物

[0352] 反义化合物可共价连接于一个或多个部分或缀合物,其增强所得反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。典型缀合物基团包括胆固醇部分和脂质部分。另外的缀合物基

团包括碳水化合物、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸盐、菲啉、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。

[0353] 反义化合物还可被修饰以具有一个或多个通常连接于反义化合物的一端或两端的稳定基团,从而增强性质例如,例如核酸酶稳定性。稳定基团中包括帽结构。这些末端修饰防止具有末端核酸的反义化合物从外切核酸酶降解,并且可有助于在细胞内递送和/或定域。帽可存在于5'-末端(5'-帽)或3'-末端(3'-帽)或可存在于两端。帽结构是本领域所熟知的并且包括例如倒置的脱氧脱碱基帽。更多的3'和5'-稳定基团(其用于覆盖反义化合物的一端或两端的顶部以赋予核酸酶稳定性)包括在于2003年1月16日公布的W0 03/004602公开的那些。

[0354] 细胞培养物和反义化合物处理

[0355] 可在多种细胞类型中体外测试反义化合物对ANGPTL3核酸的水平、活性或表达的效应。用于此类分析的细胞类型可从商业贩售商(例如American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD)得到并且细胞根据贩售商的技术说明使用市售可得的试剂(例如Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)来培养。示例性细胞类型包括但不限于,HepG2细胞、Hep3B细胞、Huh7(肝细胞癌)细胞、原代肝细胞、A549细胞、GM04281成纤维细胞和LLC-MK2细胞。

[0356] 反义寡核苷酸的体外试验

[0357] 本文所述的是用反义寡核苷酸处理细胞的方法,该反义寡核苷酸可经适当地修饰以用其它反义化合物处理。

[0358] 一般而言,当细胞在培养中达到约60-80%汇合时用反义寡核苷酸处理细胞。

[0359] 一种通常用于将反义寡核苷酸引入所培养的细胞中的试剂包括阳离子转染试剂LIPOFECTIN®(Invitrogen, Carlsbad, CA)。将反义寡核苷酸与LIPOFECTIN®在OPTI-MEM®1(Invitrogen, Carlsbad, CA)中混合以实现反义寡核苷酸的所需最终浓度和LIPOFECTIN®浓度,其通常为2至12ug/mL每100nM反义寡核苷酸。

[0360] 另一种通常用于将反义寡核苷酸引入所培养的细胞中的试剂包括LIPOFECTAMINE 2000®(Invitrogen, Carlsbad, CA)。将反义寡核苷酸与LIPOFECTAMINE 2000®在OPTI-MEM®1低血清培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA)中混合以实现反义寡核苷酸的所需最终浓度和LIPOFECTAMINE®浓度,其通常为2至12ug/mL每100nM反义寡核苷酸。

[0361] 另一种通常用于将反义寡核苷酸引入所培养的细胞中的试剂包括Cytofectin®(Invitrogen, Carlsbad, CA)。将反义寡核苷酸与Cytofectin®在OPTI-MEM®1低血清培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA)中混合以实现反义寡核苷酸的所需浓度和Cytofectin®浓度,其通常为2至12ug/mL每100nM反义寡核苷酸。

[0362] 另一种通常用于将反义寡核苷酸引入所培养的细胞中的试剂包括Oligofectamine™(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)。将反义寡核苷酸与Oligofectamine™在Opti-MEM™-1低血清培养基(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)中混合以实现寡核苷酸的所需浓度,其具有约0.2至0.8μL每100nM的

Oligofectamine™:寡核苷酸比。

[0363] 另一种通常用于将反义寡核苷酸引入所培养的细胞中的试剂包括FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN)。将反义寡聚物化合物与FuGENE 6混合在1mL无血清RPMI中混合以实现寡核苷酸的所需浓度,其具有1至4μL FuGENE 6每100nM的FuGENE 6:寡聚化合物比。

[0364] 另一种通常用于将反义寡核苷酸引入所培养的细胞中的技术包括电穿孔 (Sambrooke和Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., 2001)。

[0365] 通过常规方法用反义寡核苷酸处理细胞。通常在反义寡核苷酸处理16-24小时收获细胞,此时靶核酸的RNA或蛋白水平通过本领域已知的和本文所述的方法来测量。一般而言,当以多个复制进行处理时,该数据以复制处理的平均值显示。

[0366] 所用的反义寡核苷酸浓度随细胞系而变化。测定特定细胞系的最佳反义寡核苷酸浓度的方法是本领域所熟知的。当用 **LIPOFECTAMINE2000®**、Lipofecti或Cytofectin转染时,通常以1nM至300nM范围的浓度使用反义寡核苷酸。当利用电穿孔转染时,以625至20,000nM范围的较高浓度使用反义寡核苷酸。

[0367] RNA分离

[0368] 可在总细胞RNA或poly (A) +mRNA上进行RNA分析。RNA分离的方法是本领域所熟知的 (Sambrooke和Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, 2001)。RNA根据生产厂商的推荐方案,使用本领域所熟知的方法例如使用 **TRIZOL®** 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 来制备。

[0369] 抑制靶水平或表达的分析

[0370] ANGPTL3核酸的水平或表达的抑制可用多种本领域已知的方法 (Sambrooke和Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 第3版. 2001) 来测定。例如,靶核酸水平可通过例如Northern印迹分析、竞争聚合酶链反应 (PCR) 或定量实时PCR来定量。RNA分析可在总细胞RNA或poly (A) +mRNA上进行。RNA分离的方法是本领域所熟知的。Northern印迹分析也在本领域中是常规的。定量实时PCR可使用市售可得的ABI **PRISM®** 7600、7700或7900序列Detection System (可由PE-Applied Biosystems, Foster City, CA得到) 方便地实现并且根据生产厂商的技术说明来使用。

[0371] 靶RNA水平的定量实时PCR分析

[0372] 靶RNA水平的定量可根据生产厂商的技术说明通过定量实时PCR使用ABI **PRISM®** 7600、7700或7900序列检测系统 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) 来实现。定量实时PCR的方法是本领域所熟知的。

[0373] 在实时PCR前,将分离的RNA经受逆转录酶 (RT) 反应,其产生互补DNA (cDNA),然后cDNA用作实时PCR扩增的底物。在相同的样品孔中相继进行RT和实时PCR反应。RT和实时PCR试剂由Invitrogen (Carlsbad, CA) 获得。RT和实时-PCR反应通过本领域技术人员所熟知的方法来进行。

[0374] 通过实时PCR获得的基因 (或RNA) 靶数量可使用表达恒定的基因 (例如亲环蛋白A) 的表达水平,或通过使用 **RIBOGREEN®** (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA) 定量总RNA来进行标准化。亲环蛋白A表达通过实时PCR,通过与靶、多路技术同时运行或单独地来定量。

总RNA使用**RIBOGREEN®** RNA定量试剂 (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA) 来定量。通过**RIBOGREEN®** 进行RNA定量的方法教导于Jones, L. J. 等人 (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374) 中。**CYTOFLUOR®** 4000仪器 (PE Applied Biosystems) 用于测量**RIBOGREEN®** 荧光。

[0375] 设计探针和引物以与ANGPTL3核酸杂交。用设计实时PCR探针和引物的方法是本领域所熟知的, 并且可包括使用软件例如**PRIMER EXPRESS®** 软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

[0376] 通过RT、实时PCR获得的基因靶数量可使用GAPDH (一种表达恒定的基因) 的表达水平, 或通过定量总RNA 使用RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) 来标准化。GAPDH表达通过RT、实时PCR, 通过与靶、多路技术同时运行或单独地来定量。总RNA使用RiboGreen™ RNA定量试剂 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) 来定量。

[0377] 表2中所示的是用于在本文所述的细胞类型中测量GAPDH表达的引物和探针。GAPDH PCR探针具有共价连接于5' 端的JOE和共价连接于3' 端的TAMRA或MGB, 其中JOE是荧光报道基因染料且TAMRA或MGB是淬灭剂染料。在一些细胞类型中, 从不同物种被设计至GAPDH序列的引物和探针用于测量GAPDH表达。例如, 人GAPDH引物和探针组用于测量猴源性细胞和细胞系中的GAPDH表达。

[0378] 表2

[0379] 用于实时PCR的GAPDH引物和探针

[0380]

靶名称	物种	序列描述	序列 (5' 至 3')	SEQ ID NO
GAPDH	人	正向引物	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	15
GAPDH	人	反向引物	GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT	16
GAPDH	人	探针	CGCCTGGTCACCAGGGCTGCT	17
GAPDH	人	正向引物	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	18
GAPDH	人	反向引物	GAAGATGGTGATGGGATTTC	19
GAPDH	人	探针	CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC	20
GAPDH	人	正向引物	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	18
GAPDH	人	反向引物	GAAGATGGTGATGGGATTTC	19
GAPDH	人	探针	TGGAATCATATTGGAACATG	21
GAPDH	小鼠	正向引物	GGCAAATTCAACGGCACAGT	22
GAPDH	小鼠	反向引物	GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT	23
GAPDH	小鼠	探针	AAGGCCGAGAATGGGAAGCTTGTCATC	24
GAPDH	大鼠	正向引物	TGTTCTAGAGACAGCCGCATCTT	25
GAPDH	大鼠	反向引物	CACCGACCTTACCATCTTGT	26
GAPDH	大鼠	探针	TTGTGCAGTGCCAGCCTCGTCTCA	27

[0381] 设计用于实时PCR的探针和引物以与靶特异性序列杂交。探针和引物以及它们所杂交的靶核酸序列示于表3中。靶特异性PCR探针具有共价连接于5' 端的FAM和共价连接于3' 端的TAMRA或MGB, 其中FAM是荧光染料且TAMRA或MGB是淬灭剂染料。

[0382] 表3

[0383] 用于实时PCR的基因靶特异性引物和探针

物种	靶 SEQ ID NO	序列描述	序列(5'至 3')	SEQ ID NO
人	4	正向引物	CTTCAATGAAACGTGGGAGAACT	28
人	4	反向引物	TCTCTAGGCCCAACCAAAATTC	29
[0384] 人	4	探针	AAATATGGTTTTGGGAGGCTTGAT	30
小鼠	6	正向引物	CAGAAGTAACATCACTCAAAAGTTTTGTAG	31
小鼠	6	反向引物	GACTTAATTGTTTATACTGTTCTTCCACACT	32
小鼠	6	探针	CAGCAAGACAACAGCATAAGAGAACTCCTCCA	33

[0385] 蛋白水平的分析

[0386] ANGPTL3核酸的反义抑制可通过测量ANGPTL3蛋白水平来评估。ANGPTL3的蛋白水平可用多种本领域熟知的方法,例如免疫沉淀、Western印迹分析(免疫印迹)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、定量蛋白质测定法、蛋白质活性测定法(例如,半胱天冬酶活性测定法)、免疫组织化学、免疫细胞化学或荧光激活细胞分选法(FACS)来评价或定量(Sambrooke和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,2001)。针对靶的抗体可被鉴定且由多种来源例如抗体的MSRS目录(Aerie Corporation,Birmingham,MI)获得,或可经由本领域熟知的常规单克隆或多克隆抗体产生方法来制备。

[0387] 反义化合物的体内试验

[0388] 在动物中测试反义化合物例如反义寡核苷酸以评估其抑制ANGPTL3表达并且产生表型改变的能力。试验可在正常动物中或在实验疾病模型中进行。对于给动物施用,在药学上可接受的稀释剂例如磷酸盐缓冲溶液中配制反义寡核苷酸。施用包括胃肠外施用途径。在用反义寡核苷酸处理的时段后,从组织中分离RNA并且测量ANGPTL3核酸表达的变化。ANGPTL3蛋白水平的变化也被测量。

[0389] 某些适应症

[0390] 在某些实施方案中,本文提供的是治疗个体的方法,其包括施用一种或多种本文所述的药物组合物。在某些实施方案中,个体患有代谢疾病和/或心血管疾病。在某些实施方案中,个体患有动脉粥样硬化、肝脂肪变性或高脂血症。

[0391] 因此,本文提供的是用于减轻与代谢疾病或心血管疾病相关的症状的方法。本文还提供的是用于减轻在需要其的受试者中与动脉粥样硬化、肝脂肪变性或高脂血症相关的症状的方法。在某些实施方案中,提供的是用于减少与代谢疾病或心血管疾病相关的症状的发作的速率的方法。在某些实施方案中,提供的是用于减少与动脉粥样硬化、肝脂肪变性或高脂血症相关的症状的发作的速率的方法。在某些实施方案中,提供的是用于减少与代谢疾病或心血管疾病相关的症状的严重度的方法。在某些实施方案中,提供的是用于减少与动脉粥样硬化、肝脂肪变性或高脂血症相关的症状的严重度的方法。在此类实施方案中,该方法包括给需要其的个体施用治疗有效量的靶向于ANGPTL3核酸的化合物。

[0392] 在某些实施方案中,靶向于ANGPTL3核酸的反义化合物的施用导致ANGPTL3表达减少至少约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或99%,或由这些值的

任意两个所限定的范围。

[0393] 在某些实施方案中,包含靶向于ANGPTL3的反义化合物的药物组合物可用于制备用于治疗罹患或易感于代谢疾病或心血管疾病的患者的药物。在某些实施方案中,包含靶向于ANGPTL3的反义化合物的药物组合物可用于制备用于治疗罹患或易感于动脉粥样硬化、肝脂肪变性或高脂血症的患者的药物。

[0394] 在某些实施方案中,本文所述的方法包括施用包含具有本文所述的SEQ ID NO: 34-182中所述的序列的8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基部分的经修饰的寡核苷酸的化合物。

[0395] 施用

[0396] 在某些实施方案中,胃肠外施用本文所述的化合物和组合物。

[0397] 在某些实施方案中,胃肠外施用是通过输注。输注可以是长期的或连续的或短时间的或间歇的。在某些实施方案中,用泵递送经输注的药剂。

[0398] 在某些实施方案中,胃肠外施用是通过注射。注射可用注射器或泵来递送。在某些实施方案中,注射是弹丸注射。在某些实施方案中,将注射直接施用于组织或器官。

[0399] 某些联合疗法

[0400] 在某些实施方案中,第一活性剂包含本发明的经修饰的寡核苷酸与一种或多种第二活性剂共施用。在某些实施方案中,设计此类第二活性剂以治疗与本文所述的第一活性剂相同的疾病、病症或疾患。在某些实施方案中,设计此类第二活性剂来治疗与本文所述的第一活性剂不同的疾病、病症或疾患。在某些实施方案中,设计此类第二活性剂来治疗一种或多种本文所述的药物组合物的不期望的副作用。在某些实施方案中,第二活性剂与第一活性剂共施用以治疗第一活性剂的不期望的效应。在某些实施方案中,第二活性剂与第一活性剂共施用来产生组合效应。在某些实施方案中,第二活性剂与第一活性剂共施用来产生协同效应。

[0401] 在某些实施方案中,第一活性剂和一种或多种第二活性剂在相同时间施用。在某些实施方案中,第一活性剂和一种或多种第二活性剂在不同时间施用。在某些实施方案中,第一活性剂和一种或多种第二活性剂被制备在单一药物制剂中。在某些实施方案中,第一活性剂和一种或多种第二活性剂被分开制备。

[0402] 在某些实施方案中,第二活性剂包括但不限于抗坏血酸。

[0403] 本发明提供的各个方面的实施方案也通过以下任意一个段落进行了描述。

[0404] 1. 一种减少动物中的ANGPTL3表达的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中减少所述动物中的ANGPTL3表达。

[0405] 2. 一种减少动物中的apoC-III表达的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中减少所述动物中的apoC-III表达。

[0406] 3. 一种减少动物中的甘油三酯水平的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中减少所述动物中的甘油三酯水平。

[0407] 4. 一种减少动物中的胆固醇水平的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于

ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中减少所述动物中的胆固醇水平。

[0408] 5.一种减少动物中的低密度脂蛋白 (LDL) 水平的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中减少所述动物中的低密度脂蛋白 (LDL) 水平。

[0409] 6.一种减少动物中的葡萄糖水平的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中减少所述动物中的葡萄糖水平。

[0410] 7.一种减轻动物中的代谢疾病或心血管疾病的方法,其包括向所述动物施用包含靶向于ANGPTL3的长度为10至30个连接核苷的经修饰的寡核苷酸的化合物,其中减轻所述动物中的代谢疾病或心血管疾病。

[0411] 8.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO: 1-5至少90%互补的核碱基序列,如对所述经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的。

[0412] 9.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述经修饰的寡核苷酸具有包含SEQ ID NO: 34-182中任一个所述的序列的至少8个连续核碱基的核碱基序列。

[0413] 10.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述动物是人。

[0414] 11.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述化合物是第一活性剂,并且还包括施用第二活性剂。

[0415] 12.段落11所述的方法,其中共施用所述第一活性剂和第二活性剂。

[0416] 13.段落11中任一项所述的方法,其中所述第二活性剂是葡萄糖降低剂。

[0417] 14.段落13所述的方法,其中所述葡萄糖降低剂是治疗性生活方式改变、PPAR激动剂、二肽基肽酶 (IV) 抑制剂、GLP-1类似物、胰岛素或胰岛素类似物、胰岛素促泌素、SGLT2抑制剂、人胰淀素类似物、双胍类、 α -糖苷酶抑制剂或其组合。

[0418] 15.段落13所述的方法,其中所述葡萄糖降低剂是二甲双胍、磺酰脲、罗格列酮或其组合。

[0419] 16.段落13所述的方法,其中所述葡萄糖降低剂是选自以下的磺酰脲:醋酸己脲、氯磺丙脲、甲苯磺丁脲、妥拉磺脲、格列美脲、格列吡嗪、格列本脲或格列奇特。

[0420] 17.段落13所述的方法,其中所述葡萄糖降低剂是二甲双胍。

[0421] 18.段落13所述的方法,其中所述葡萄糖降低剂是选自那格列奈或瑞格列奈的美格列奈。

[0422] 19.段落13所述的方法,其中所述葡萄糖降低剂是选自吡格列酮或罗格列酮的噻唑烷二酮类。

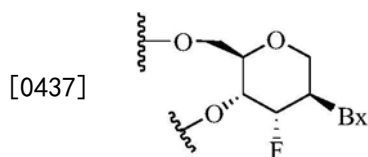
[0423] 20.段落13所述的方法,其中所述葡萄糖降低剂是选自阿卡波糖或米格列醇的 α -糖苷酶抑制剂。

[0424] 21.段落11所述的方法,其中所述第二活性剂是降脂质治疗。

[0425] 22.段落21所述的方法,其中所述降脂质治疗是治疗性生活方式改变、HMG-CoA还原酶抑制剂、胆固醇吸收抑制剂、MTP抑制剂、靶向于ApoB的反义化合物或其任何组合。

[0426] 23.段落21所述的方法,其中所述降脂质治疗是选自以下的HMG-CoA还原酶抑制剂:阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、罗苏伐他汀或辛伐他汀。

- [0427] 24.段落21所述的方法,其中所述降脂质治疗是胆固醇吸收抑制剂依泽替米贝。
- [0428] 25.段落1-7中任一项所述的方法,其中施用包含胃肠外施用。
- [0429] 26.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述化合物由单链经修饰的寡核苷酸组成。
- [0430] 27.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO: 1-5中任一个至少95%互补的核碱基序列,如对所述经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的。
- [0431] 28.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述经修饰的寡核苷酸具有与SEQ ID NO: 1-5中任一个至少100%互补的核碱基序列,如对所述经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的。
- [0432] 29.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷间键合是经修饰的核苷间键合。
- [0433] 30.段落29所述的方法,其中每个核苷间键合是硫代磷酸酯核苷间键合。
- [0434] 31.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷包含经修饰的糖。
- [0435] 32.段落31所述的方法,其包含至少一个经四氢吡喃修饰的核苷,其中四氢吡喃环代替呋喃糖环。
- [0436] 33.段落32所述的方法,其中至少一个经四氢吡喃修饰的核苷中的每一个具有以下结构:



- [0438] 其中Bx是任选保护的杂环碱基部分。
- [0439] 34.段落31所述的方法,其中至少一种经修饰的糖是双环糖。
- [0440] 35.段落31所述的方法,其中至少一种经修饰的糖包含2'-O-甲氧基乙基或4'-(CH₂)_n-O-2' 桥,其中n是1或2。
- [0441] 36.段落1-7中任一项所述的方法,其中经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷包含经修饰的核碱基。
- [0442] 37.段落36所述的方法,其中所述经修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。
- [0443] 38.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成。
- [0444] 39.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:
- [0445] a.由连接脱氧核苷组成的缺口区段;
- [0446] b.由连接核苷组成的5'翼区段;
- [0447] c.由连接核苷组成的3'翼区段;
- [0448] 其中所述缺口区段位于5'翼区段与3'翼区段之间并且每个翼区段中的每个核苷包含经修饰的糖。
- [0449] 40.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成,具有包含选自SEQ ID NO:34-182中任一个的核碱基序列的至少8个连续核碱基的核碱

基序列,并且包含:

[0450] a.由10个连接脱氧核苷组成的缺口区段;

[0451] b.由5个连接核苷组成的5'翼区段;

[0452] c.由5个连接核苷组成的3'翼区段;

[0453] 其中所述缺口区段位于5'翼区段与3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中每个核苷间键合是硫代磷酸酯键合,并且其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0454] 41.一种用于治疗患有代谢疾病或心血管疾病的动物的方法,其包括

[0455] a.鉴定患有代谢疾病或心血管疾病的所述动物,

[0456] b.向所述动物施用治疗有效量的包含经修饰的寡核苷酸的化合物,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有与SEQ ID NO:1-5至少90%互补的核碱基序列,如对经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的,

[0457] 其中患有代谢疾病或心血管疾病的所述动物被治疗。

[0458] 42.段落41所述的方法,其中向所述动物施用所述治疗有效量的化合物减少所述动物中的代谢疾病或心血管疾病。

[0459] 43.段落7或41的方法,其中所述代谢疾病或心血管疾病是肥胖症、糖尿病、动脉粥样硬化、血脂障碍、冠心病、非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD)、高脂肪酸血症或代谢综合征或其组合。

[0460] 44.段落43所述的方法,其中所述血脂障碍是高脂血症。

[0461] 45.段落44所述的方法,其中所述高脂血症是高胆固醇血症、高甘油三酯血症、高胆固醇血症和高甘油三酯血症两者。

[0462] 46.段落43所述的方法,其中所述NAFLD是肝脂肪变性或脂肪肝炎。

[0463] 47.段落43所述的方法,其中所述糖尿病是2型糖尿病或具有血脂障碍的2型糖尿病。

[0464] 48.段落1所述的方法,其中所述施用导致脂质水平减少,包括甘油三酯水平、胆固醇水平、胰岛素抵抗、葡萄糖水平或其组合。

[0465] 49.段落48所述的方法,其中所述水平独立地减少5%、10%、20%、30%、35%或40%。

[0466] 50.段落1-7中任一项所述的方法,其中所述施用导致提高的胰岛素敏感性。

[0467] 51.段落50所述的方法,其中所述施用导致提高的胰岛素敏感性。

[0468] 52.一种通过施用包含经修饰的寡核苷酸的ANGPTL3抑制剂减少人中ANGPTL3水平、LDL水平、apoC-III水平、甘油三酯水平、胆固醇水平、葡萄糖水平、脂肪垫重、心血管疾病和代谢疾病中的一者或多者的方法,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且具有与SEQ ID NO:1-5至少90%互补的核碱基序列,如对所述经修饰的寡核苷酸的整体性所测量的。

[0469] 53.段落1-52中任一项所述的方法,其中所述施用导致动脉粥样硬化斑块、肥胖症、葡萄糖、脂质、葡萄糖抗性、胆固醇减少或胰岛素敏感性增加或其任何组合。

[0470] 54.一种包含经修饰的寡核苷酸的化合物,所述经修饰的寡核苷酸由10至30个连接核苷组成并且具有包含选自SEQ ID NO:34-182中任一个的核碱基序列的至少8个连续核

碱基的核碱基序列。

[0471] 55.段落54所述的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1-5至少95%互补。

[0472] 56.段落54所述的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1-5至少100%互补。

[0473] 57.段落54所述的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸是单链寡核苷酸。

[0474] 58.段落54所述的化合物,其中至少一个核苷间键合是经修饰的核苷间键合。

[0475] 59.段落58所述的化合物,其中每个核苷间键合是硫代磷酸酯核苷间键合。

[0476] 60.段落54所述的化合物,其中至少一个核苷包含经修饰的糖。

[0477] 61.段落60所述的化合物,其中至少一种经修饰的糖是双环糖。

[0478] 62.段落60所述的化合物,其中至少一种经修饰的糖包含2'-O-甲氧基乙基或4'-(CH₂)_n-O-2' 桥,其中n是1或2。

[0479] 63.段落54所述的化合物,其中至少一个核苷包含经修饰的核碱基。

[0480] 64.段落63所述的化合物,其中所述经修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。

[0481] 65.段落54所述的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸包含:

[0482] 由连接脱氧核苷组成的缺口区段;

[0483] 由连接核苷组成的5' 翼区段;

[0484] 由连接核苷组成的3' 翼区段;

[0485] 其中所述缺口区段位于5' 翼区段与3' 翼区段之间,并且其中每个翼区段的每个核苷包含经修饰的糖。

[0486] 66.段落54所述的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成并且包含:

[0487] 由10个连接脱氧核苷组成的缺口区段;

[0488] 由5个连接核苷组成的5' 翼区段;

[0489] 由5个连接核苷组成的3' 翼区段;

[0490] 其中所述缺口区段位于5' 翼区段与3' 翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖;且其中每个核苷间键合是硫代磷酸酯键合。

[0491] 67.段落54所述的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成。

[0492] 68.一种包含经修饰的寡核苷酸的化合物或其盐和药学上可接受的载体或稀释剂,所述经修饰的寡核苷酸由10至30个连接核苷组成并且具有包含选自SEQ ID NO:34-182中任一个所述的序列的核碱基序列的至少8个连续核碱基的核碱基序列。

[0493] 69.段落68所述的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸是单链寡核苷酸。

[0494] 70.段落68所述的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成。

[0495] 71.一种包含经修饰的寡核苷酸的化合物,所述经修饰的寡核苷酸由20个连接核苷组成,并且具有包含选自SEQ ID NO:34-182中任一个的核碱基序列的至少8个连续核碱基的核碱基序列,其中经修饰的寡核苷酸包含:

[0496] 由10个连接脱氧核苷组成的缺口区段;

[0497] 由5个连接核苷组成的5' 翼区段;

[0498] 由5个连接核苷组成的3' 翼区段;

[0499] 其中所述缺口区段位于5'翼区段与3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中每个核苷间键合是硫代磷酸酯键合,并且其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

实施例

[0500] 非限定性公开且通过引用并入

[0501] 尽管根据某些实施方案已选择性描述本文所述的某些化合物、组合物和方法,但是下列实施例仅用于举例说明本文所述的化合物并且不旨在限制于此。本申请引用的每篇参考文献通过引用整体并入本文。

[0502] 实施例1:寡聚化合物对人血管生成素样3的反义抑制

[0503] 设计一系列寡聚化合物靶向人血管生成素样3的不同区域,使用公布的表1中所述的序列。化合物示于表4中。表4中的所有化合物是长度为20个核苷酸的嵌合寡核苷酸(“缺口基体”),其由包括10个2'-脱氧核苷酸的中央“缺口”区域组成,该区域经由5个核苷酸“翼”侧翼连接在两侧(5'和3')。翼由2'-O-(2-甲氧基乙基)核苷酸(也称为2'-MOE核苷酸)组成。核苷间(主链)键合是遍及寡核苷酸的硫代磷酸酯。所有胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。表4中的寡聚化合物与编码血管生成素样3的靶核酸分子特异性杂交并且包含增加结合亲和力的区域,该区域为寡聚化合物的“翼”。寡聚化合物各包含引发RNA酶H活性的区域,该区域为“缺口”区域。

[0504] 通过如在本文其它实施例中所述的定量实时PCR、使用表3中所示的靶特异性引物和探针(SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30)分析化合物对基因靶mRNA水平的效应。根据实验对数据求平均值,该实验中Huh7细胞用150nM公开的寡聚化合物使用OLIGOFECTAMINE™来处理。表4所示的是每一个寡聚化合物所靶向的序列的SEQ ID NO。

[0505] 表达减少被表示为表4中的抑制百分比。如果存在,“N.D.”指示“未测定”。这些寡聚化合物对其具有抑制性的靶区域在本文被称为“验证的靶区段”。

[0506] 表4

[0507] 具有2'-MOE翼和脱氧缺口的嵌合寡核苷酸对人血管生成素样3mRNA水平的抑制

[0508]

ISIS #	靶 SEQ ID NO	靶位	序列(5'至 3')	抑制%	SEQ ID NO
337529	1	548	ATCTGTTGTGATGTCGATAA	66	34
337527	2	336	GTATTTAGTCAAGTTTAGAG	39	35
337528	2	429	TATTACAGATTTTACACAT	21	36
337526	3	33	CGTGGAAGTGTTCCTTCTG	63	37
337459	4	22	AGCTTAATTGTGAACATTTT	73	38
337460	4	61	ATTCTGGAGGAAATAACTAG	34	39
233675	4	116	AAATCTTGATTTTGGCTCTG	61	40
233676	4	121	ATAGCAAATCTTGATTTTGG	52	41
337461	4	126	CTAACATAGCAAATCTTGAT	53	42
337462	4	131	ATCGTCTAACATAGCAAATC	43	43
337463	4	154	AGGCCATTGGCTAAAATTTT	37	44
337464	4	171	CATGTCCCAACTGAAGGAGG	41	45
337465	4	180	CTTTAAGACCATGTCCCAAC	0	46
337466	4	203	GCCCTTCGTCTTATGGACAA	28	47
337467	4	214	TCATTAATTTGGCCCTTCGT	38	48
337468	4	223	TGAAATATGTCATTAATTTG	0	49
233690	4	247	GACTGATCAAATATGTTGAG	53	50
337469	4	271	GTTTGCAGCGATAGATCATA	56	51
337470	4	277	TCACTGGTTTGCAGCGATAG	62	52
337471	4	364	AGTTCAAGTGACATATTCTT	52	53
337472	4	496	AGTGAAGTTACTTCTGGGTG	59	54
337473	4	502	GTTTTAAGTGAAGTACTTC	50	55
337474	4	510	CTACAAAAGTTTTAAGTGAA	25	56
337475	4	558	GGTCTTCACGGTCTGGAGA	70	57
337476	4	624	TAGTCCTTCTGAGCTGATTT	66	58
337477	4	637	GGTCTTGAATACTAGTCCT	80	59
337478	4	648	AAATTTCTGTGGGTCTTGA	74	60
337479	4	665	TGGCTTGAAGATAGAGAAA	77	61
233710	4	683	AGTAGTTCTTGGTGCTCTTG	82	62
337480	4	694	TGAAGAAAGGGAGTAGTTCT	60	63
337481	4	701	ATTCAACTGAAGAAAGGGAG	59	64
337482	4	710	TCTTATTTCAATCAACTGAA	32	65
337483	4	734	AGGAATGCCATCATGTTTTA	39	66
337484	4	762	CTCTGTTATAAATGGTGGA	65	67
337485	4	767	TTCACCTCTGTTATAAATGG	31	68
337486	4	772	GTATGTTACCTCTGTTATA	47	69
337487	4	777	CACTTGTATGTTACCTCTG	75	70

[0509]

ISIS #	靶 SEQ ID NO	靶位	序列(5'至 3')	抑制%	SEQ ID NO
337488	4	782	CATGCCACTTGTATGTTTAC	44	71
337489	4	806	AGAGTTGCTGGGTCTGATGG	52	72
337490	4	840	CTGATATAACATCACAGTAG	54	73
337491	4	850	CATGGACTACCTGATATAAC	60	74
233717	4	862	TGAATTAATGTCCATGGACT	85	75
337492	4	874	TCTATTCGATGTTGAATTAA	13	76
337493	4	909	AGTTCTCCACGTTTCATTG	80	77
337494	4	918	CATATTTGTAGTTCTCCAC	62	78
337495	4	923	AAAACCATATTTGTAGTTCT	25	79
337496	4	930	GCCTCCCAAAACCATATTTG	35	80
337497	4	953	GCCCAACCAAAATTCTCCAT	70	81
233721	4	959	CTCTAGGCCCAACCAAAATT	73	82
233722	4	964	ATCTTCTCTAGGCCCAACCA	91	83
337498	4	995	AACATAATTAGATTGCTTCA	26	84
337499	4	1016	GTCTTCCAACCTCAATTCGTA	56	85
337500	4	1023	CTTCCAGTCTTCCAACCTCA	38	86
337501	4	1094	AACTAGATGTAGCGTATAGT	65	87
337502	4	1162	TGATCCCAAGTAGAAAACAC	33	88
337503	4	1213	CACCAGCCTCCTGAATAACC	32	89
337504	4	1245	TTAGGTTGTTTTCTCCACAC	68	90
337505	4	1301	TAATCCTCTCTCCTCTCTG	32	91
337506	4	1315	TGAGACTTCCAAGATAATCC	63	92
337507	4	1320	CATTTTGAGACTTCCAAGAT	48	93
337508	4	1333	GAGTATAACCTTCCATTTTG	54	94
337509	4	1364	TGGATGGATCAACATTTTGG	67	95
337510	4	1385	TTCAAAGCTTTCTGAATCTG	62	96
337511	4	1397	TGCCTCAGTTCATTCAAAGC	58	97
337512	4	1410	TGCCTTTTAAATTTGCCTCA	64	98
337513	4	1443	ATTAACCTGGAATGAGGTTA	65	99
337514	4	1450	AGACCACATTAACCTGGAAT	62	100
337515	4	1458	AGATTATTAGACCACATTAA	44	101
337516	4	1463	ATACCAGATTATTAGACCAC	65	102
337517	4	1470	GGATTTAATACCAGATTATT	64	103
337518	5	1678	ACTGACTTACCTGATTTTCT	0	104
337519	5	2294	ACCTTGTAAGTCTTCATTGG	52	105
337520	5	3809	CAGTGTTATTCAGATTGTAC	56	106
337521	5	4068	AGTGTCTTACCATCATGTTT	56	107
337522	5	5100	ACAGATGTAAATAACACTTT	19	108
337523	5	5252	GTCCCCTTACCATCAAGCCT	49	109
337524	5	7150	GGGAAGATACTTTGAAGATA	50	110
337525	5	7504	CACCAGCCTCCTAAAGGAGA	27	111

[0510] 实施例2:寡聚化合物对小鼠血管生成素样3的反义抑制

[0511] 设计一系列寡聚化合物靶向小鼠血管生成素样3的不同区域,使用公布的表1中所

述的序列。化合物示于表5中。表5中的所有化合物是长度为20个核苷酸的嵌合寡核苷酸(“缺口基体”),其由包括10个2'-脱氧核苷酸的中央“缺口”区域组成,该区域经由5个核苷酸“翼”侧翼连接在两侧(5'和3')。翼由2'-O-(2-甲氧基乙基)核苷酸(也称为2'-MOE核苷酸)组成。核苷间(主链)键合是遍及寡核苷酸的硫代磷酸酯。所有胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。表5中的寡聚化合物与编码血管生成素样3的靶核酸分子特异性杂交并且包含增加结合亲和力的区域,该区域为寡聚化合物的“翼”。寡聚化合物各包含引发RNA酶H活性的区域,该区域为“缺口”区域。

[0512] 通过如在本文其它实施例中所述的定量实时PCR、使用表3中所示的靶特异性引物和探针(SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33)分析化合物对基因靶mRNA水平的效应。根据实验对数据求平均值,该实验中小鼠原代肝细胞用150nM公开的寡聚化合物使用OLIGOFECTAMINE™来处理。使用的对照寡聚化合物是SEQ ID NO:9和10。表5所示的是每一个寡聚化合物所靶向的序列的SEQ ID NO。

[0513] 表达减少被表示为表5中的抑制百分比。如果存在,“N.D.”指示“未测定”。这些寡聚化合物对其具有抑制性的靶区域在本文被称为“验证的靶区段”。表5的反义寡核苷酸也可与人ANGPTL3 mRNA (GENBANK Accession NM_014495.1,以SEQ ID NO:4并入本文),取决于鼠寡核苷酸与人ANGPTL3序列错配的核碱基的数目。“人靶起始位点”指示反义寡核苷酸所靶向的人mRNA中的5'最末端核苷酸。“人靶终止位点”指示反义寡核苷酸所靶向的人mRNA中的3'最末端核苷酸。‘错配’指示鼠寡核苷酸与人基因序列错配的核碱基的数目。称呼“n/a”指示鼠寡核苷酸与人基因序列之间存在3个以上错配。鼠寡核苷酸与人基因序列之间的互补性越大,鼠寡核苷酸越有可

[0514] 能与人基因序列杂交反应。

[0515] 表5

[0516] 具有2'-MOE翼和脱氧缺口的嵌合寡核苷酸对小鼠血管生成素样3mRNA水平的抑制

[0517]

ISIS #	靶 SEQ ID NO	靶位	序列(5'至 3')	抑 制%	SEQ ID NO	人靶起 始位点	与人靶错 配
233671	6	19	AATAATTTAATTGTGTGCAT	13	112	n/a	n/a
233672	6	56	CACTCTGGATGCAATTACTA	66	113	n/a	n/a
233673	6	68	AAGGTCTGGATCCACTCTGG	74	114	n/a	n/a
233674	6	100	TTTGGCTCTGAAGGTGCAGA	66	115	n/a	n/a
233675	6	110	AAATCTTGATTTTGGCTCTG	80	40	116	0
233676	6	115	ATAGCAAATCTTGATTTTGG	49	41	121	0
233677	6	124	TCATCCAACATAGCAAATCT	24	116	130	2
233678	6	129	TGACATCATCCAACATAGCA	66	117	135	3
233679	6	134	AATTTTGACATCATCCAACA	76	118	140	3
233680	6	139	GCTAAAATTTTGACATCATC	72	119	145	2
233681	6	148	AGGCCATTTCGCTAAAATTTT	52	120	154	1
233682	6	160	CCCAGCTGCAGGAGGCCATT	77	121	166	2
233683	6	165	CATGACCCAGCTGCAGGAGG	51	122	171	3
233684	6	172	TTAAGTCCATGACCCAGCTG	71	123	178	3
233685	6	182	GACAAAATCTTTAAGTCCAT	27	124	188	2
233686	6	187	TTATGGACAAAATCTTTAAG	29	125	193	1
233687	6	226	TTGAGCTTCTGAAATATGTC	56	126	232	2
233688	6	231	ATATGTTGAGCTTCTGAAAT	53	127	237	2
233689	6	236	ATCAAATATGTTGAGCTTCT	47	128	242	2
233690	6	241	GACTGATCAAATATGTTGAG	73	50	247	0
233691	6	266	GGTTCGAAGTGATAGGTCAT	63	129	n/a	n/a
233692	6	317	TAGTGTAGATGTAGTTCTTC	44	130	323	2
233693	6	349	GACATGTTCTTCACCTCCTC	80	131	355	3
233694	6	365	TGAGTTCAGTTCTACTGACA	78	132	371	3
233695	6	373	TCAAGCTTTGAGTTCAGTTC	71	133	379	2
233696	6	394	GTCTTCTCTTCCAGCAGACT	71	134	n/a	n/a
233697	6	405	GTTGAAGGGCTGTCTTCTCT	75	135	n/a	n/a
233698	6	415	CTGACCTTGTGTTGAAGGGC	92	136	n/a	n/a
233699	6	423	CCAAAGCCCTGACCTTGTGT	60	137	n/a	n/a
233700	6	435	TTAGCTGCTCCTCCAAAGCC	68	138	n/a	n/a

[0518]

233701	6	451	CTTAGAATTAAGTTGGTTAG	49	139	457	3
233702	6	474	GGTGCTCCTGAGCCCCAGCT	82	140	n/a	n/a
233703	6	488	TGATGTTACTTCTGGGTGCT	63	141	494	2
233704	6	511	TGCTGTTCTACAAAACCTTTT	79	142	517	3
233705	6	535	AGGAGTTCTCTTATGCTGTT	86	143	n/a	n/a
233706	6	540	TCTGGAGGAGTTCTCTTATG	58	144	n/a	n/a
233707	6	545	CACACTCTGGAGGAGTTCTC	77	145	n/a	n/a
233708	6	632	GGGTTCTTGAATACCAGTCT	58	146	638	2
233709	6	649	GAAAGAGAATTTTCTGAGGG	29	147	655	3
233710	6	677	AGTAGTTCTTGGTGCTCTTG	68	62	683	0
233711	6	730	GCAGGAAGGTCATCTTGTC	62	148	n/a	n/a
233712	6	739	GAGCAGTCGGCAGGAAGGTC	62	149	n/a	n/a
233713	6	778	TACACGCCACTTGTATGTC	55	150	784	1
233714	6	787	TTAATAGTGACACGCCACT	62	151	n/a	n/a
233715	6	816	AGACATTAAACCCTTGGGAG	47	152	n/a	n/a
233716	6	838	CTGCCTGATTGGGTATCACA	76	153	n/a	n/a
233717	6	856	TGAATTAATGTCCATGGACT	61	75	862	0
233718	6	871	CCATCTTCCGGTGTTGAAT	64	154	877	3
233719	6	884	GAAGTCCTGTGAGCCATCTT	69	155	n/a	n/a
233720	6	935	TTCTCCATCGAGCCTCCCAA	56	156	941	1
233721	6	953	CTCTAGGCCCAACCAAAATT	67	82	959	0
233722	6	958	ATCTTCTCTAGGCCCAACCA	63	83	964	0
233723	6	975	GTTGGACTATAGCATAGATC	70	157	n/a	n/a
233724	6	988	ATGTAGTTAGACTGTTGGAC	57	158	n/a	n/a
233725	6	1033	ACGTAGTGCTTGCTGTCTTT	81	159	n/a	n/a
233726	6	1055	GCCCAGGTGAAAGGAGTATT	70	160	n/a	n/a
233727	6	1081	TGTAGCGTGTAGTTGGTTTC	38	161	1087	1
233728	6	1086	CCACATGTAGCGTGTAGTTG	59	162	1092	3
233729	6	1091	CTCAGCCACATGTAGCGTGT	57	163	n/a	n/a
233730	6	1096	GCAATCTCAGCCACATGTAG	62	164	n/a	n/a
233731	6	1138	ATCAGGTCTGTGTGCTCTGG	75	165	n/a	n/a
233732	6	1149	ATGTAGAAAACATCAGGTCT	66	166	n/a	n/a
233733	6	1160	TCTGTGATTCCATGTAGAAA	61	167	1166	3
233734	6	1186	TCTGGACAGTAGAGCTGTCC	46	168	1192	3
233735	6	1191	AACTTTCTGGACAGTAGAGC	58	169	n/a	n/a
233736	6	1209	ACCACCAGCCACCTGAGTAA	60	170	1215	2
233737	6	1229	TTCTCCACATATGTCATTCC	56	171	n/a	n/a
233738	6	1236	GGTTGTTTTCTCCACATATG	70	172	n/a	n/a
233739	6	1277	TGGTCTGGATTTGGTTCTGG	71	173	n/a	n/a
233740	6	1283	TCTCTCTGGTCTGGATTTGG	73	174	n/a	n/a
233741	6	1324	TAGAGCTTCTGCTCTGAGG	64	175	n/a	n/a

[0519]	233742	6	1363	GTGGTGGGCTGGAGCATCAT	57	176	n/a	n/a
	233743	6	1376	TGAAGCTTCTTAGGTGGTGG	55	177	n/a	n/a
	233744	6	1390	TGTCTCAGTTCAGTTGAAGC	60	178	n/a	n/a
	233745	6	1430	TCGGGAGGACTTTAATATTT	50	179	n/a	n/a
	233746	7	13	GGAAGTCTCCCTCCTGTCC	49	180	n/a	n/a
	233747	8	202	TAACAATGAGTTTAAACCTA	17	181	n/a	n/a
	233748	8	210	TCTGATCTTAACAATGAGTT	0	182	n/a	n/a

[0520] 实施例3:靶向血管生成素样3的双链寡聚化合物的设计和筛选

[0521] 根据本发明,包含本发明的寡聚化合物及其互补序列的一系列双链体(包括dsRNA及其模拟物)可被设计成靶向血管生成素样3。双链体的反义链的核碱基序列包含靶向于本文公开的血管生成素样3的寡核苷酸的至少一部分。链的末端可通过添加一个或多个天然或经修饰的核碱基来修饰以形成悬突。然后核酸双链体的有义链被设计并且被合成为反义链的互补序列并且还可包含任一末端的修饰或添加。双链体的反义和有义链包含约17至25个核苷酸或约19至23个核苷酸。可选地,反义和有义链包含20、21或22个核苷酸。

[0522] 例如,在一个实施方案中,dsRNA双链体的两条链均在中央核碱基上互补,每一条在一个或两个末端具有悬突。

[0523] 例如,包含具有序列CGAGAGGCGGACGGGACCG(以SEQ ID NO:183并入本文)并且具有脱氧胸苷(dT)的两-核碱基悬突的反义链的双链体将具有以下结构:

cgagaggcggacgggaccgTT 反义链(SEQ ID NO: 184)

[0524] |||||

TTgctctccgcctgccctggc 互补序列(SEQ ID NO: 185)

[0525] 悬突可为2至6个核碱基并且这些核碱基可以或不可以与靶核酸互补。在另一个实施方案中,双链体可仅在一个末端上具有悬突。

[0526] 在另一个实施方案中,包含具有相同序列例如CGAGAGGCGGACGGGACCG(SEQ ID NO: 183)的反义链的双链体可被制备具有如下钝性末端(无单链悬突):

cgagaggcggacgggaccg 反义链(SEQ ID NO: 183)

[0527] |||||

gctctccgcctgccctggc 互补序列(SEQ ID NO: 186)

[0528] RNA双链体可以是单分子或双分子的;即,两条链可以是单分子的一部分或可以是单独的分子。

[0529] 双链体的RNA链可通过技术人员熟知的方法来合成或购自Dharmacon Research Inc. (Lafayette, CO)。一旦合成,则对互补链退火。将单链等份并稀释至50μM的浓度。一旦被稀释,则将30μL每条链与15μL 5X退火缓冲液溶液组合。所述缓冲液的终浓度为100mM醋酸钠、30mM HEPES-KOH pH 7.4和2mM硬脂酸镁。终体积为75μL。将溶液在90℃孵育1分钟,然后离心15秒。将管在37℃搅拌1小时,此时在实验中使用dsRNA双链体。dsRNA双链体的终浓度

为20μM。

[0530] 一旦被制备,评价双链化合物调节血管生成素样3的能力。当细胞达到80%汇合时,它们用本发明的双链化合物处理。对于生长在96孔板中的细胞,将孔用200μL OPTI-MEM-1™低血清培养基(Gibco BRL)洗涤一次,然后用含有12μg/mL LIPOFECTIN™(Gibco BRL)和终浓度为200nM的所需双链体反义化合物(6μg/mL LIPOFECTIN™每100nM双链体反义化合物的比率)的130μL OPTI-MEM-1™处理。处理5小时后,将培养基用新鲜培养基替换。在处理16小时后收获细胞,此时分离RNA并且通过RT-PCR测量靶减少。

[0531] 实施例4:寡聚化合物对小鼠血管生成素样3的反义抑制:剂量响应研究

[0532] 在本发明的另一个实施方案中,选择这些寡核苷酸用于另外的剂量-响应研究。将小鼠原代肝细胞用6.25、25、100或400nM ISIS 233693 (SEQ ID NO:131)、ISIS 233698 (SEQ ID NO:136)或ISIS 233725 (SEQ ID NO:159)处理或错义对照寡核苷酸ISIS 113529 (5'-10-5缺口基体,CTCTTACTGTGCTGTGGACA,以SEQ ID NO:11并入本文)和mRNA水平如在本文其它实施例中所述进行测量。未处理的细胞用作对照,将该数据标准化成对照。

[0533] 这些研究的结果示于表6中。根据三个实验对数据求平均,并且以相对于未处理对照的抑制百分比表示。

[0534] 表6

[0535] 小鼠原代肝细胞中血管生成素样3mRNA表达的抑制

处理	抑制%			
	剂量(nM)			
	6.25	25	100	400
[0536] ISIS233693	45	77	87	87
ISIS233698	0	13	33	52
ISIS233725	28	65	66	79
ISIS113529	0	0	0	0

[0537] 如示于表6中,ISIS 233693、233698和233725以剂量依赖性方式降低血管生成素样3mRNA水平。

[0538] 实施例5:C57BL/6小鼠的体内研究中对血管生成素样3的反义抑制的效应

[0539] 根据本发明,选择靶向小鼠血管生成素样3的两个寡核苷酸用于体内研究。用ISIS 233693 (SEQ ID NO:131)或ISIS 233698 (SEQ ID NO:136) 50mg/kg注射喂养正常饲料的雄性C57BL/6小鼠,每周两次,持续2周。每一个处理组包含5只动物。一组动物接受注射研究,每周两次,持续2周。盐水注射组用作对照组,将寡核苷酸处理组与其相比较。

[0540] 2周处理期后,处死小鼠,评价肝中的血管生成素样3mRNA水平。通过实时PCR定量mRNA表达水平,如本文其它实施例中所述。相对于盐水处理的小鼠,ISIS 233693引起血管生成素样3mRNA水平减少44%。ISIS 233698引起血管生成素样3mRNA水平减少41%。该数据证明血管生成素样3反义寡核苷酸处理可有效地抑制肝中的靶mRNA表达。

[0541] 在研究结束时测量脾重、体重和肝重。在处理期结束时测量的平均组织重量和体

重(以克计)示于表7中。如示于表7,体重、肝重和脾重不受寡核苷酸处理影响。

[0542] 表7

[0543] 血管生成素样3表达的反义抑制对无脂肪小鼠的组织重量和体重的效应

处理	体重	肝重	脾重
盐水	24	1.1	0.1
ISIS 233693	23	1.1	0.1
ISIS 233698	22	1.0	0.1

[0545] 在研究结束时,使用Olympus临床分析仪(Olympus America Inc.,Melville,NY)通过常规分析评价动物的血清胆固醇、HDL、LDL、甘油三酯和葡萄糖水平。还测量血清转氨酶ALT和AST(其增加可指示肝毒性)。未观察到与肝毒性相关的AST或ALT的水平。测量的血清葡萄糖(GLUC)、胆固醇(CHOL)、LDL、HDL和甘油三酯(TRIG)的水平示于表8中,以每个处理组的平均结果(以mg/dL计)表示。

[0546] 表8

[0547] 血管生成素样3表达的反义抑制对无脂肪小鼠中的血清葡萄糖、脂质和转氨酶的效应

处理	CHOL	GLU	HDL	TG	LDL
盐水	80	172	58	109	14
ISIS 233693	70	251	53	72	10
ISIS 233698	87	266	67	84	12

[0549] 如示于表8,用ISIS 233693和ISIS 233698的处理降低血清甘油三酯。用ISIS 233693的处理降低总胆固醇。

[0550] 实施例6:血管生成素样3的反义抑制的效应:高脂肪喂养的小鼠中的体内剂量-响应研究

[0551] 报道称C57BL/6小鼠品系对高脂血症诱导的动脉粥样硬化斑块形成敏感。因此,这些小鼠进行高脂肪饮食喂养并用于以下研究,以评价血管生成素样3反义寡核苷酸对mRNA表达的效应。

[0552] 将雄性C57BL/6小鼠置于含有来自脂肪的60%卡路里的的高脂肪饮食中(例如,Research Diets D12492,Research Diets s Inc.,New Brunswick,NJ)。将接受高脂肪饮食的小鼠分成处理组。三组接受注射ISIS 233693(SEQ ID No:131),以10mg/kg、25mg/kg或50mg/kg的剂量每周两次,持续6周。三个其它组接受注射ISIS 233698(SEQ ID No:136),以10mg/kg、25mg/kg或50mg/kg的剂量每周两次,持续6周。

[0553] 一组高脂肪喂养的动物接受注射盐水,两周两次,持续6周。盐水注射组用作对照组,将其与寡核苷酸处理组相比较。

[0554] 6周处理期后,处死小鼠,评价肝中的血管生成素样3mRNA水平。通过实时PCR定量mRNA表达水平,如本文其它实施例中所述。结果示于表9中,以相对于盐水处理的对照的平均抑制百分比表示。

[0555] 表9

[0556] 来自高脂肪喂养的小鼠的肝中血管生成素样3表达的反义抑制:剂量-响应研究

[0557]	处理	抑制%
	ISIS 233693,10mg/kg	73
	ISIS 233693,25mg/kg	88
	ISIS 233693,50mg/kg	93
	ISIS 233698,10mg/kg	17
	ISIS 233698,25mg/kg	39
	ISIS 233698,50mg/kg	55

[0558] 这些数据显示靶向于血管生成素样3mRNA的反义寡核苷酸以剂量依赖性方式有效地降低肝中的靶mRNA表达。

[0559] 在整个研究中监测体重。在研究结束时测量脾重、脂肪垫重和肝重。在治疗期结束时测量的平均组织重量和体重示于表10中。

[0560] 表10

[0561] 血管生成素样3表达的反义抑制对高脂肪喂养的小鼠的组织重量和体重的效应：剂量-响应研究

[0562]	处理	体重	肝	脾	脂肪垫
	盐水	36	1.2	0.1	2.1
	ISIS 233693,10mg/kg	37	1.5	0.1	2.0
	ISIS 233693,25mg/kg	34	1.4	0.1	1.3
	ISIS 233693,50mg/kg	32	1.5	0.1	1.1
	ISIS 233698,10mg/kg	38	1.4	0.1	1.8
	ISIS 233698,25mg/kg	33	1.2	0.1	1.5
	ISIS 233698,50mg/kg	33	1.5	0.1	1.5

[0563] 这些数据证明体重、脾重和肝重未受影响。脂肪垫重通过用ISIS 233698的处理以剂量依赖性方式减少。用ISIS 233698的处理也减少脂肪垫重。

[0564] 在研究结束时,使用Olympus临床分析仪 (Olympus America Inc.,Melville,NY) 通过常规分析评价动物的血清胆固醇、甘油三酯和葡萄糖水平。使用Olympus临床分析仪 (Olympus America Inc.,Melville,NY) 还测量血清转氨酶ALT和AST (其增加可指示肝毒性)。测量的血清胆固醇 (CHOL) 和甘油三酯 (TRIG) 水平示于表11中,以每个处理组的平均结果 (以mg/dL计) 表示。还示出HDL和LDL的平均水平以及平均葡萄糖水平 (GLUC)。ALT和AST (也示于表11中) 同样以每个处理组的平均结果表示,以国际单位/L (IU/L) 计。

[0565] 表11

[0566] 血管生成素样3的反义抑制对高脂肪喂养的小鼠中血清葡萄糖、胆固醇、甘油三酯和肝转氨酶的效应

[0567]	处理	ALT	AST	CHOL	HDL	LDL	TRIG	GLUC
	盐水	22	47	177	143	31	120	244
	ISIS 233693,10mg/kg	23	60	151	127	23	81	263
	ISIS 233693,25mg/kg	21	62	125	106	18	57	254
	ISIS 233693,50mg/kg	52	79	147	125	22	44	206

ISIS 233698,10mg/kg	28	55	151	120	27	101	285
ISIS 233698,25mg/kg	16	53	135	110	23	89	248
ISIS 233698,50mg/kg	192	175	158	126	31	77	215

[0568] 如示于表11,与盐水处理相比较,用ISIS 233693或ISIS 233698处理导致降低的胆固醇水平和血清甘油三酯的剂量依赖性减少。ISIS 233693和ISIS 233698也导致HDL的轻微减少,其通常在小鼠中观察到,当由于这样的事实—小鼠(不像人和其它物种)以HDL颗粒形式携带90%其血清胆固醇—对抗高脂血症药进行测试时。而且,用ISIS 233693的处理降低LDL。

[0569] 实施例7:血管生成素样3水平的反义抑制对体内肝甘油三酯的效应

[0570] 肝脂肪变性是指脂质在肝中的蓄积或“脂肪肝”,其通常由酒精消耗、糖尿病和高脂血症引起并且可发展成末期肝损伤。考虑到脂肪肝疾患的有害结果,有用的是鉴定预防或改善肝脂肪变性的化合物。可通过测量组织甘油三酯含量和通过肝组织的组织学检查评价肝脂肪变性。

[0571] 在又一个实施方案中,如实施例6中所述地评价动物中的肝组织甘油三酯含量。使用甘油三酯GPO测定(Roche Diagnostics,Indianapolis,IN)测量肝组织甘油三酯含量。每个处理组的结果被标准化成盐水处理的对照并且示于表12中。

[0572] 表12

[0573] 血管生成素样3的反义抑制对高脂肪喂养的小鼠中肝甘油三酯的效应

处理	对照%
ISIS 233693,10mg/kg	82
ISIS 233693,25mg/kg	54
ISIS 233693,50mg/kg	31
ISIS 233698,10mg/kg	55
ISIS 233698,25mg/kg	41
ISIS 233698,50mg/kg	47

[0575] 如示于表12,用靶向于血管生成素样3的反义寡核苷酸的处理导致肝甘油三酯的剂量依赖性减少。

[0576] 实施例8:血管生成素样3的反义抑制的效应:高脂肪喂养的小鼠中的用ISIS 233693的体内研究

[0577] 在与实施例6中所述的研究类似的研究中,将雄性C57BL/6小鼠置于含有来自脂肪的60%卡路里的脂肪饮食中(例如,Research Diets D12492,Research Diets s Inc., New Brunswick,NJ)。将接受高脂肪饮食的小鼠分成处理组。一组接受注射ISIS 233693 (SEQ ID No:131),以50mg/kg的剂量每周两次,持续6周。

[0578] 将寡核苷酸溶于盐水用于注射。一组高脂肪喂养的动物接受注射盐水,每周两次,持续6周。盐水注射组用作对照组,将其与寡核苷酸处理组相比较。

[0579] 6周处理期后,处死小鼠,评价肝中的血管生成素样3mRNA水平。通过实时PCR定量mRNA表达水平,如本文其它实施例中所述。ISIS 233693引起靶mRNA水平的88%减少。

[0580] 在整个研究中监测体重。在研究结束时测量脾重、脂肪垫重和肝重。仅用盐水处理的动物的平均体重、肝重、脾重和脂肪垫重分别为33g、1.2g、0.1g、0.7g。用ISIS 233693处

理的动物的平均体重、肝重、脾重和脂肪垫重分别为31g、1.6g、0.2g和0.2g。用ISIS 233693的处理减少脂肪垫重71%。

[0581] 在研究结束时,通过常规临床分析(例如在临床试验设施例如BTS, Lab Corp, San Diego, CA的部门)评价动物的血清胆固醇、甘油三酯和葡萄糖水平。还测量血清转氨酶ALT和AST与血清蛋白(其增加可指示肝毒性),以及胆红素水平(其增加可指示肾脏毒性)。用ISIS 233693处理未观察到毒性增加(作为异常肾或肝功能的指示剂)。ISIS 233693引起血清甘油三酯和葡萄糖水平的减少,但未改变血清胆固醇、LDL或HDL水平。

[0582] 肝脂肪变性是指脂质在肝中的蓄积或“脂肪肝”,其通常由酒精消耗、糖尿病和高脂血症引起并且可发展成末期肝损伤。考虑到脂肪肝疾患的有害结果,有用的是鉴定预防或改善肝脂肪变性的化合物。可通过测量组织甘油三酯含量和通过肝组织的组织学检查评价肝脂肪变性。

[0583] 使用甘油三酯GPO测定(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)测量肝组织甘油三酯含量。ISIS 233693处理组的平均结果被标准化成盐水处理的对照。ISIS 233693的处理引起肝甘油三酯水平的75%减少。

[0584] 通过常规程序进行组织学分析。简言之,获得肝样品,固定在10%中性缓冲的福尔马林中,进行H&E染色,评价肝形态学。可选地,获得肝组织,冷冻,切片,随后用油红O染色法染色以使脂质沉积物可见,用曙红复染色以标记细胞质。通过光学显微法评价所制备的样品。

[0585] 如通过油红O染色法和组织学分析评价,来自用ISIS 233693处理的肝所显示的脂肪含量与盐水处理的对照肝相比减少。

[0586] 因此,靶向于血管生成素样3的寡聚化合物改善肝脂肪变性,如通过测量组织甘油三酯含量和通过肝组织的组织学检查两者来评价。

[0587] 综上所述,本文所示的体内研究指示血管生成素样3的反义寡核苷酸减少导致肝靶mRNA的剂量依赖性减少以及血清和肝甘油三酯水平减少。此外,靶向于血管生成素样3的反义寡核苷酸引起无脂肪喂养的小鼠和高脂肪喂养的小鼠两者中的血清胆固醇水平减少。而且,观察到脂肪垫重的减少而没有类似的体重或器官重量的减少,这表明脂肪含量的靶特异性减少。因此,本发明的另一方面是对于疾患例如高脂血症减少血清胆固醇、血清甘油三酯、肝甘油三酯或脂肪垫重的方法。

[0588] 实施例9:血管生成素样3的反义抑制对动脉粥样硬化的效应:LDLr^{-/-}小鼠中用ISIS 233693的处理

[0589] 以高胆固醇血症饮食喂养的LDL受体敲除小鼠(一种用于研究动脉粥样硬化的模型)中评价ISIS 233693作为抗-动脉粥样硬化药的效应(Ishibashi等人, J Clin. Invest. 1994 May; 93:1885-93)。

[0590] 处理

[0591] 给具有LDL受体基因敲除的C57Bl/6小鼠(Jackson Labs, #2207)喂养Harlan Tekland饮食, TD 94059 (37%千卡脂肪,一半来自可可脂,1.25%胆固醇)。起始饮食后4周,将小鼠分成两组用于处理,每组包含6-8只小鼠。第一组接受皮下注射ISIS 233693 (SEQ ID No:131),以25mg/kg的剂量每周两次,持续16周。第二组接受皮下注射错配的对照寡核苷酸、ISIS 141923 (CCTCCCTGAAGGTTCTCC,以SEQ ID NO:187并入本文),以25mg/kg的剂量

每周两次,持续16周。

[0592] 将寡核苷酸溶于盐水用于注射。一组高脂肪喂养的动物接受注射盐水,每周两次,持续16周。盐水注射组用作对照组,将其与寡核苷酸处理组相比较。

[0593] 每4周采集血样。在处理期结束时,对小鼠实施安乐死,收集肝和主动脉以用于进一步分析。

[0594] RNA分析

[0595] 从肝组织萃取RNA,并且使用ANGPTL3引物探针组(前向序列CACCTGGGCAGTCACGAAA,在本文被称为SEQ ID NO:188;反向序列GGAGGGCCCCAGGGATAT,在本文被称为SEQ ID NO:189;探针序列CACGCTACATGTGGCTGAGATTCGTGG,在本文被称为SEQ ID NO:190)进行ANGPTL3的实时PCR分析。结果以相对于PBS对照的鼠ANGPTL3抑制百分比呈示。如示于表13中,用ISIS 233693的处理导致ANGPTL3mRNA相比于PBS对照的显著减少。用对照寡核苷酸、ISIS 141923处理并未导致ANGPTL3的显著减少,如所期望的。

[0596] 表13

[0597] LDLr^{-/-}小鼠肝中相对于PBS对照的ANGPTL3 mRNA抑制

	抑制%
ISIS 141923	13
ISIS 233693	90

[0599] 胆固醇和脂质水平

[0600] 通过Bligh和Dyer的方法(Bligh,E和Dyer,W,Can J Biochem Physiol,37,911-917,1959)萃取血浆和肝甘油三酯以及胆固醇,并且借助于市售可得的甘油三酯试剂盒(DCL甘油三酯试剂;Diagnostic Chemicals Ltd.)测量。结果示于表14-17中。表14表明,第16周时用ISIS 233693的处理导致胆固醇水平相比于PBS对照显著减少58%。总胆固醇水平的减少是LDL胆固醇水平相比于对照显著减少58%的结果,如示于表15中。表16显示HDL减少,这有可能是小鼠模型依赖性的,如前文详述的。类似地,表17表明,第16周时用ISIS 233693的处理相对于PBS对照减少甘油三酯水平75%。

[0601] 表14

[0602] 对LDLr^{-/-}小鼠中的总胆固醇水平(mg/dL)的效应

	第0周	第4周	第8周	第12周	第16周
PBS	1,313	1,618	1,398	1,083	1,629
ISIS 141923	1262	1710	1624	1102	1167
ISIS 233693	1353	1070	930	558	683

[0604] 表15

[0605] 对LDLr^{-/-}小鼠中的LDL胆固醇水平(mg/dL)的效应

	第0周	第4周	第8周	第12周	第16周
PBS	1,031	1,120	1,001	909	1,204
ISIS 141923	1022	1185	1116	902	843
ISIS 233693	1075	731	648	453	511

[0607] 表16

[0608] 对LDLr^{-/-}小鼠中的HDL胆固醇水平(mg/dL)的效应

	第0周	第4周	第8周	第12周	第16周
PBS	154	166	169	145	300
ISIS 141923	139	171	179	171	278
ISIS 233693	153	116	103	97	159

[0610] 表17

[0611] 对LDLr^{-/-}小鼠中的甘油三酯水平(mg/dL)的效应

	第 0 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
PBS	230	177	134	140	268
ISIS 141923	180	154	164	156	159
ISIS 233693	191	68	61	72	67

[0613] 粥样硬化病变评估

[0614] 评价在用PBS、接着用福尔马林PBS溶液(5%福尔马林于PBS中)灌注后自小鼠收获的主动脉中的粥样硬化病变严重程度。通过使用解剖显微镜从升主动脉近端至额动脉的分叉解剖整个小鼠主动脉。除去外膜脂肪,然后纵向打开主动脉,平直地钉在黑解剖蜡(black dissecting wax)上,用Sudan IV染色,以固定放大倍数照相。将照片数字化,通过使用Adobe Photoshop version 7.0和NIH Scion Image软件(<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/Default.html>)计算总主动脉区和病变区。结果示于表18中,被报告为含有病变的总主动脉区的百分比。如所示,用ISIS 233693的处理导致主动脉病变的显著减少和动脉粥样硬化疾患的改善。

[0615] 表18

[0616] 对LDLr^{-/-}小鼠中的病变区(总主动脉区%)的效应

	病变区 (%)
PBS	44
ISIS 141923	40
ISIS 233693	18

[0618] 肝功能

[0619] 为了评价ISIS寡核苷酸对肝功能,使用自动临床化学分析仪(Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)测量转氨酶血浆浓度。测量ALT(丙氨酸转氨酶)和AST(天冬氨酸转氨酶)的血浆浓度并且结果示于表19和20中,以IU/L表示。每4周进行测量值。第0周为处理的起点和起始高脂肪饮食后4周。

[0620] 表19

[0621] 对LDLr^{-/-}小鼠中的肝ALT(IU/L)的效应

	第0周	第4周	第8周	第12周	第16周
PBS	29	35	39	36	36

ISIS 141923	30	32	32	33	60
ISIS 233693	20	48	70	83	91

[0623] 表20

[0624] 对LDLr^{-/-}小鼠中的肝AST (IU/L) 的效应

	第 0 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
PBS	49	63	61	82	73
ISIS 141923	57	57	61	60	81
ISIS 233693	51	60	90	95	108

[0627] 实施例10:血管生成素样3的反义抑制对人apoB100转基因LDLr^{-/-}小鼠的效应

[0628] 评价在以高胆固醇血症饮食喂养的人apoB-100转基因LDL受体敲除小鼠中ISIS 233693作为脂质降低剂的效应。这些研究中所用的小鼠已描述于先前的公布Sanan等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA.95:4544-4549) 中。简言之,该小鼠品系是最初由Ishibashi等人 (J.Clin.Invest.92:883-893) 所述的LDLr^{-/-}小鼠 (其是129sv和C57BL/6品系的杂种) 与人 apoB-100转基因小鼠 (Linton等人,J.Clin.Invest.92:3029-3037) (其是SJL和C57BL/6B品系的杂种) 之间杂交的杂种。繁殖显示LDLr^{-/-}和apoB过表达性状是纯合的,并且小鼠展示出含有apoB-100的LDL大量增加。

[0629] 处理

[0630] 将小鼠喂养Harlan Tekland饮食、TD 88137或‘Western饮食’ (21%无水乳脂 (butterfat)、34%蔗糖和总计0.2%的胆固醇)。起始饮食1周后,将小鼠分组以用于处理,每组包括5只小鼠。第一队列接受皮下注射ISIS 233693 (SEQ ID No:131),以12.5mg/kg、25mg/kg或50mg/kg的剂量每周两次,持续4周。第二队列接受皮下注射对照寡核苷酸、ISIS 141923 (SEQ ID NO:187),以12.5mg/kg或50mg/kg的剂量每周两次,持续4周。

[0631] 将寡核苷酸溶于盐水用于注射。一组高脂肪喂养的动物接受注射盐水,每周两次,持续4周。盐水注射组用作对照组,将其与寡核苷酸处理组相比较。

[0632] 每周对小鼠称重。在处理期结束时,对小鼠实施安乐死,收集血样、肝、肾、脾和脂肪垫以用于进一步分析。

[0633] RNA分析

[0634] 从肝组织萃取RNA,并且使用ANGPTL3引物探针组 (前向序列CACCTGGGCAGTCACGAAA,在本文被称为SEQ ID NO:187;反向序列GGAGGGCCCCAGGGATAT,在本文被称为SEQ ID NO:188;探针序列CACGCTACATGTGGCTGAGATTCGTGG,在本文被称为SEQ ID NO:189) 进行ANGPTL3的实时PCR分析以及使用ApoCIII引物探针组 (前向: TGCAGGGCTACATGGAACAA,以SEQ ID NO:12并入本文;反向:CGGACTCCTGCACGCTACTT,以SEQ ID NO:13并入本文;探针:CTCCAAGACGGTCCAGGATGCGC,以SEQ ID NO:14并入本文) 进行ApoCIII mRNA的实时PCR分析。结果以相对于PBS对照的鼠ANGPTL3和鼠ApoCIII的抑制百分比呈示。如示于表21中,用ISIS 233693和ISIS 233725的处理导致ANGPTL3mRNA相比于PBS对照的显著的剂量依赖性减少。以50mg/kg/周用ISIS 233693的处理也导致ApoCIII mRNA

的抑制。

[0635] 肝脂肪酸结合蛋白 (LFABP) 的RNA水平也通过实时PCR测量。结果示于表21中,并且表明ISIS寡核苷酸对ANGPTL3的抑制也通过抑制LFABP来影响脂肪酸在肝中的转运。用寡核苷酸、ISIS 141923的处理并未导致ANGPTL3、LFABP或apoCIII的显著减少,如所期望的。

[0636] 表21

[0637] 小鼠肝中相对于PBS对照的ANGPTL3和LFABP mRNA的抑制百分比

[0638]	ISIS No	剂量 (mg/kg)	ANGPTL3	ApoCIII	LFABP
	233693	50	95	39	53
[0639]		25	90	25	12
		12.5	77	8	10
	233725	50	91	27	80
		25	79	27	51
		12.5	62	12	11

[0640] 胆固醇和脂质水平

[0641] 通过Bligh和Dyer的方法 (Bligh,E和Dyer,W,Can J Biochem Physiol,37,911-917,1959) 萃取血浆和肝甘油三酯以及胆固醇,并且借助于市售可得的甘油三酯试剂盒 (DCL甘油三酯试剂;Diagnostic Chemicals Ltd.)。结果示于表22中。研究表明,以25mg/kg/周用ISIS 233693和ISIS 233725的处理分别使胆固醇水平相比于PBS对照减少63%和37%。总胆固醇水平的减少主要是LDL胆固醇水平相比于对照分别显著减少63%和34%的结果,如所示的。HDL的轻微减少可能是小鼠模型依赖性的,如先前详述当在小鼠中测试高脂血症药时通常在小鼠中观察到HDL降低。研究表明,以25mg/kg/周用ISIS 233693和ISIS 233725的处理使甘油三酯水平相对于PBS分别减少82%和70%。

[0642] 因此,用靶向ANGPTL3的ISIS寡核苷酸的处理引起该小鼠模型中血浆脂质特性的显著提高。

[0643] 表22

[0644] 对血浆脂质水平 (mg/dL) 的效应

[0645]		剂量 (mg/kg)	总胆固醇	HDL	LDL	甘油三酯
	PBS		2534	430	1591	1022
	ISIS 141923	50	1730	347	998	945
		12.5	2489	412	1512	1168
	ISIS 233693	50	982	256	585	243
		25	944	245	596	184
		12.5	1480	307	990	281

[0646]

ISIS 233725	50	1407	325	862	403
	25	1587	312	1052	309
	12.5	2060	370	1366	522

[0647] 葡萄糖

[0648] 为了评价ISIS寡核苷酸对葡萄糖生成的效应,血浆葡萄糖值使用Beckman葡萄糖分析仪II (Beckman Coulter) 通过葡萄糖氧化酶法来测量。结果示于表23中,并且表明以50mg/kg/周用ISIS 233693和ISIS 233725的处理导致血浆葡萄糖水平相比于PBS对照均减少40%。

[0649] 表23

[0650] 对血浆葡萄糖水平 (mg/dL) 的效应

[0651]

	剂量 (mg/kg)	葡萄糖
PBS		341
ISIS 141923	50	334
	12.5	315
ISIS 233693	50	203
	25	261
	12.5	255
ISIS 233725	50	203
	25	280
	12.5	284

[0652] 肝功能

[0653] 为了评价ISIS寡核苷酸对肝功能的效应,使用自动临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量转氨酶血浆浓度。测量ALT (丙氨酸转氨酶) 和AST (天冬氨酸转氨酶) 的血浆浓度并且结果示于表24中,以IU/L表示。

[0654] 如本研究所示,用ISIS 233693的处理未引起转氨酶水平的任何显著增加,因此未导致对肝功能的任何副作用。该测定以及RNA分析确立ISIS 233693是有效且可耐受的靶向ANGPTL3的反义寡核苷酸。

[0655] 表24

[0656] 对血浆转氨酶 (IU/L) 的效应

	剂量 (mg/kg)	ALT	AST
PBS		57	80
[0657]	ISIS 141923	50	61
		12.5	43
	ISIS 233693	50	138
		25	43
		12.5	45
	ISIS 233725	50	1443
		25	217
		12.5	88

[0658] 体重和器官重量

[0659] 为了评价ISIS寡核苷酸对器官重量的效应,在研究结束后收获器官并且称重。结果示于表25中,并且表明用ISIS寡核苷酸的处理对肝重、脾重或肾重没有影响。以50mg/kg/周用ISIS 233693的处理确实使小鼠的脂肪垫重相比于PBS对照减少77%。

[0660] 表25

[0661] 对器官重量(g)的影响

	剂量 mg/kg/ 周)	肝	肾	脾	Fat
PBS		1.45	0.35	0.09	1.49
[0663]	ISIS 141923	50	1.42	0.33	0.11
		12.5	1.39	0.32	0.09
	ISIS 233693	50	1.65	0.33	0.15
		25	1.42	0.32	0.13
		12.5	1.49	0.35	0.11

[0664] 实施例11:C57BL/6小鼠中ANGPTL3的反义抑制相比于非诺贝特抑制的效应

[0665] 通过与非诺贝特比较在首次接受试验的C57BL/6小鼠中评价靶向小鼠ANGPTL3的ISIS 233693。非诺贝特是市售可得的用于受试者中的高胆固醇血症和高甘油三酯血症的治疗,并且已知可减少胆固醇、低密度脂蛋白(LDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)和甘油三酯水平以及增加高密度脂蛋白(HDL)水平。

[0666] 用ISIS 233693(SEQ ID NO:131)注射一组喂养正常饲料的5只雄性C57BL/6小鼠,以50mg/kg的剂量每周两次,持续6周。第二组小鼠用非诺贝特处理,每日管饲施用50mg/kg/周。一组动物接受注射PBS,每周两次,持续6周。PBS注射组用作对照组,将其与寡核苷酸处理组相比较。

[0667] 6周处理期后,处死小鼠,并且评价肝中的ANGPTL3 mRNA水平。通过实时PCR定量mRNA表达水平,如本文其它实施例中所述。相对于PBS处理的小鼠,ISIS 233693引起

ANGPTL3 mRNA水平减少85%。数据表明,ANGPTL3反义寡核苷酸处理可有效地抑制肝中的靶mRNA表达。

[0668] 胆固醇和脂质水平

[0669] 通过Bligh和Dyer的方法(Bligh,E和Dyer,W,Can J Biochem Physiol,37,911-917,1959)萃取血浆和肝甘油三酯以及胆固醇,并且借助于市售可得的甘油三酯试剂盒(DCL甘油三酯试剂;Diagnostic Chemicals Ltd.)。结果示于表26中。研究表明,以50mg/kg/周用ISIS 233693的处理使胆固醇水平相比于PBS对照减少23%。研究表明,以50mg/kg/周用ISIS 233693的处理使甘油三酯水平相比于PBS对照减少38%。用非诺贝特的处理对胆固醇或甘油三酯水平没有影响。

[0670] 因此,用靶向ANGPTL3的ISIS寡核苷酸的处理引起该小鼠模型中血浆脂质特性的显著提高。

[0671] 表26

[0672] 对血浆脂质水平(mg/dL)的效应

	总胆固醇	HDL	LDL	甘油三酯
PBS	87	75	17	90
ISIS 233693	67	54	16	56
非诺贝特	96	85	16	94

[0674] 葡萄糖

[0675] 为了评价ISIS寡核苷酸对葡萄糖生成的效应,血浆葡萄糖值使用Beckman葡萄糖分析仪II(Beckman Coulter)通过葡萄糖氧化酶法来测量。结果示于表27中,并且表明以50mg/kg/周用ISIS 233693的处理导致血浆葡萄糖水平相比于PBS对照减少19%。用非诺贝特的处理对葡萄糖水平没有影响。

[0676] 表27

[0677] 对血浆葡萄糖水平(mg/dL)的效应

	葡萄糖
PBS	242
ISIS 233693	196
非诺贝特	228

[0679] 肝功能

[0680] 为了评价ISIS寡核苷酸对肝功能的效应,使用自动临床化学分析仪(Hitachi Olympus AU400e,Melville,NY)测量转氨酶血浆浓度。测量ALT(丙氨酸转氨酶)和AST(天冬氨酸转氨酶)的血浆浓度并且结果示于表28中,以IU/L表示。

[0681] 如本研究所示,用ISIS 233693或非诺贝特的处理未引起转氨酶水平的任何显著增加,因此未导致对肝功能的任何副作用。

[0682] 表28

[0683] 对血浆转氨酶(IU/L)的效应

[0684]

	ALT	AST
PBS	23	83
ISIS 233693	38	70
非诺贝特	34	70

[0685] 对血浆NEFA和3HB水平的效应

[0686] 测定小鼠组中的NEFA和3-HB水平,并且示于表29中。作为脂肪氧化指示剂的NEFA和3-HB水平未被用ISIS寡核苷酸的处理显著影响。用非诺贝特的处理增加脂肪氧化,如NEFA和3HB两者的水平增加所示。

[0687] 表29

[0688] 对NEFA和3HB水平的效应

[0689]

	NEFA	3HB
PBS	0.90	393
ISIS 233693	0.98	447
非诺贝特	1.20	641

[0690] 器官重量

[0691] 为了评价ISIS寡核苷酸对器官重量的效应,在研究结束后收获器官并且称重。结果示于表30中,并且表明用ISIS 233693的处理对肝重、脾重或肾重没有影响。以50mg/kg/周用ISIS 233693的处理确实使小鼠的白脂肪组织重量相比于PBS对照减少45%。

[0692] 表30

[0693] 对器官重量(g)的影响

[0694]

	肝	脾	肾	白脂肪组织
PBS	1.1	0.12	0.35	0.53
ISIS 233693	1.3	0.1	0.35	0.29
非诺贝特	1.3	0.08	0.37	0.39

[0695] 实施例12:Sprague-Dawley大鼠中ANGPTL3的反义抑制的效应

[0696] 评价Sprague Dawley大鼠中的ISIS 360363 (GTGACATATTCTTCACCTCT;SEQ ID NO:191)和ISIS 360382 (TTTAAGTGACGTTACCTCTG;SEQ ID NO:192),两个5-10-5 MOE缺口基体分别在起始位置333和476靶向大鼠mRNA序列SEQ ID NO:193 (Genbank登记号XM_233218.1)。

[0697] 用ISIS 360363或ISIS 360382注射两组喂养正常饲料的Sprague Dawley大鼠,以50mg/kg每周一次,持续6周。一组动物接受注射PBS,每周两次,持续6周。PBS注射组用作对照组,将其与寡核苷酸处理组相比较。

[0698] RNA分析

[0699] 从肝组织萃取RNA,以用于ANGPTL3的实时PCR分析。结果以相对于PBS对照的大鼠ANGPTL3抑制百分比表示。如示于表31中,用ISIS 360363和ISIS 360382的处理导致

ANGPTL3 mRNA相比于PBS对照的显著减少。

[0700] 表31

[0701] Sprague Dawley大鼠肝中相对于PBS对照的ANGPTL3 mRNA抑制

[0702]	ISIS No	抑制%
	360363	70
	360382	89

[0703] 胆固醇和脂质水平

[0704] 通过Bligh和Dyer的方法(Bligh,E和Dyer,W,Can J Biochem Physiol,37,911-917,1959)萃取血浆和肝甘油三酯以及胆固醇,并且借助于市售可得的甘油三酯试剂盒(DCL甘油三酯试剂;Diagnostic Chemicals Ltd.)。结果示于表26中。研究表明,以50mg/kg/周用ISIS 360363和360382的处理使胆固醇水平相比于PBS对照分别减少67%和81%。因此,用靶向ANGPTL3的ISIS寡核苷酸的处理引起该大鼠模型中的血浆甘油三酯特性的显著改善。该模型中用ISIS寡核苷酸的处理对总胆固醇或LDL水平没有影响。

[0705] 表32

[0706] 对血浆甘油三酯水平(mg/dL)的效应

[0707]	PBS	136
	ISIS 360363	45
	ISIS 360382	26

序列表

<110> ISIS制药公司
R · M · 克鲁克
M · J · 格雷厄姆
R · 李
K · W · 多比

<120> 血管生成素样3表达的调节

<130> 036502-8016CN02

<150> 61/293, 604

<151> 2010-01-08

<160> 193

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 833

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

[0001]

```

attaatttca aaactaaaaa tcgtcagcac agagtatgtg taaaaatctg taatacaaat 60
ttttaaactg atgcttcatt ttgctacaaa ataatttgga gtaaatgttt gatatgattt 120
atztatgaaa cctaatagaag cagaattaaa tactgtatta aaataagttc gctgtcttta 180
aacaaatgga gatgactact aagtcacatt gactttaaca tgaggatatca ctataacctta 240
tttgttaaaa tatatactgt atacatttta tatattttta cacttaatac tatgaaaaca 300
aataattgta aaggaatctt gtcagattac agtaagaatg aacatatttg tggcatcgag 360
ttaaagttta tttttcccct aaatatgctg tgattctaata acattcgtgt aggttttcaa 420
gtagaaataa acctcgtaac aagttactga acgtttaaac agcctgacaa gcatgtatat 480
atgtttaaaa ttcaataaac aaagaccag tccctaaatt atagaaattt aaattattct 540
tgcattgtta tcgacatcac aacagatccc taaatcccta aatccctaaa gattagatac 600
aaatttttta ccacagtatc acttgtcaga atttattttt aacatatgat tttttaaaac 660
tgccagtaag aaatttttaa ttttaacccat ttgttaagga tatagtgcc aagttaattg 720
gtgacctacc tttgtcaata cttagcataa tgtatttcaa aattatccaa tatacctgtc 780
atattaatct attatgtcca cttttttaag atatgtatga cctatgtgaa tct 833

```

<210> 2

<211> 795

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

```

gggtctaataa tcttggtatta aatcccttaag agaaagcttg agaaatagat tttttttatc 60
ttaaagtcac tgtctattta agattaaaca tacaatcaca taaccttaaa gaataccgtt 120
tacattttctc aatcaaaaatt cttataatac tattttgttt aaattttgtg atgtgggaat 180
caatttttaga tggtcacaaat ctagattata atcaataggt gaacttatta aataactttt 240
ctaaataaaaa aattttagaga cttttatttt aaaaggcatc atatgagcta atatcacaaac 300
tttcccagtt taaaaaacta gtactcttgt taaaactcta aacttgacta aatacagagg 360
actggtaatt gtacagttct taaatgttgt agtattaatt tcaaaaactaa aaatcgtcag 420
cacagagtat gtgtaaaaat ctgtaatata aattttttaa ctgatgcttc attttgctac 480
aaaataattt ggagtaaatg ttgatatga tttatttatg aaacctaattg aagcagaatt 540

```

aaatactgta	ttaaaataag	ttcgcgtgct	ttaaacaat	ggagatgact	actaagtcac	600
attgacttta	acatgaggt	tcactatacc	ttattgttaa	acatatatac	tgtatacatt	660
ttatatattt	taacacttaa	tactatgaaa	acaaataatt	gtaaggaatc	ttgtcagatt	720
acagtaagaa	tgaacatatt	tgtggcatcg	agttaaagtt	tatatattcc	ctaaaatatt	780
cttgtgattc	taata					795

<210> 3
 <211> 743
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 3						
atatatagag	ttaagaagtc	taggtctgct	tccagaagaa	aacagttcca	cgttgcttga	60
aattgaaaat	caagataaaa	atgttcacaa	ttaagctcct	tctttttatt	gttcctctag	120
ttatttcctc	cagaattgat	caagacaatt	catcatttga	ttctctatct	ccagagccaa	180
aatcaagatt	tgctatgtta	gacgatgtaa	aaatttttagc	caatggcctc	cttcagttgg	240
gacatggtct	taaagacttt	gtccataaga	cgaaggggcc	aaattttattg	gacatatctc	300
aaaaactcaa	catatttgat	cagtcctttt	atgatctatc	gctgcaaacc	agtgaatca	360
aagaagaaga	aaaggaactg	agaagaacta	catataaact	acaagtcaaa	aatgaagagg	420
taaagaatat	gtcacttgaa	ctcaactcaa	aacttgaaaag	cctcctagaa	gaaaaaattc	480
tacttcaaca	aaaagtgaag	tatttagaag	agcaactaac	taacttaatt	caacaatcaa	540
cctgaaactc	cagaacaccc	agaagtaact	tcacttaaaa	ctttgtagaa	aaacaagata	600
atagcatcaa	agaccttctc	cagaccgtgg	aagaccaata	taaacaatta	aaccaacagc	660
aaaaaacaaa	caatcacaca	cacacacaca	ccaacacaac	tcttttttggc	gccccattgc	720
cctccaaaaa	aattttttaa	cac				743

<210> 4
 <211> 1496
 <212> DNA
 <213> 智人

[0002]

<400> 4						
ggcacgagga	aatcaagat	aaaaatgttc	acaattaage	tccttctttt	tattgttctc	60
ctagttattt	cctccagaat	tgatcaagac	aattcatcat	ttgattctct	atctccagag	120
ccaaaatcaa	gatttgctat	gttagacgat	gtaaaaattt	tagccaatgg	cctccttcag	180
ttgggacatg	gtcttaaaga	ctttgtccat	aagacgaagg	gccaaattaa	tgacatatatt	240
caaaaactca	acatatattga	tcagtccttt	tatgatctat	cgctgcaaac	cagtgaatc	300
aaagaagaag	aaaaggaact	gagaagaact	acatataaac	tacaagtcaa	aatgaagag	360
gtaaagaata	tgctacttga	actcaactca	aaacttgaaa	gcctcctaga	agaaaaaatt	420
ctacttcaac	aaaaagtga	atatttagaa	gagcaactaa	ctaacttaat	tcaaaatcaa	480
cctgaaactc	cagaacaccc	agaagtaact	tcacttaaaa	ctttttaga	aaaacaagat	540
aatagcatca	aagaccttct	ccagaccgtg	gaagaccaat	ataaacaatt	aaaccaacag	600
catagtcaaa	taaaagaaat	agaaaatcag	ctcagaagga	ctagtattca	agaaccacac	660
gaaatttctc	tatcttccaa	gccaaagaca	ccaagaacta	ctccctttct	tcagttgaat	720
gaaataagaa	atgtaaaaca	tgatggcatt	cctgctgaat	gtaccaccat	ttataacaga	780
ggtgaacata	caagtggcat	gtatgccatc	agaccagaca	actctcaagt	ttttcatgtc	840
tactgtgatg	ttatatcagg	tagtccatgg	acattaattc	aacatcgaat	agatggatca	900
caaaacttca	atgaaacgtg	ggagaactac	aaatatgggt	ttgggaggct	tgatggagaa	960
ttttggttgg	gcctagagaa	gatatactcc	atagtgaagc	aatctaatta	tgttttacga	1020
attgagttgg	aagactggaa	agacaacaaa	cattatattg	aatattcttt	ttacttggga	1080
aatcacgaaa	ccaactatac	gctacatcta	gttgcgatta	ctggcaatgt	ccccaatgca	1140
atcccggaaa	acaaagattt	ggtgttttct	acttgggac	acaaagcaaa	aggacacttc	1200
aactgtccag	agggttattc	aggaggtcgg	tggtggcatg	atgagtgtgg	agaaaacaac	1260
ctaaatggta	aatataacaa	accaagagca	aaatctaagc	cagagaggag	aagaggatta	1320
tcttgggaag	ctcaaaatgg	aaggttatcc	tctataaaaat	caaccaaaaat	gttgatccat	1380
ccaacagatt	cagaaagctt	tgaatgaact	gaggcaaat	taaaaggcaa	taattttaaac	1440

attaacctca ttccaagtta atgtggtcta ataatctggt attaaatcct taagag 1496

<210> 5

<211> 9381

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

[0003]

```

ttccaaaaga actaaagtac agtttgagaa atgcatactt aattcattac ttttttcccc 60
tcaactttta taataaattt acccaacaaa aaagttttatt tttgacttgt aaatctctta 120
aaatcataaa aaagtaaaat tagcttttta aaacaggtag tcaccatagc attgaatgtg 180
tagttttata tacagcaaag ttaaatacaa tttcaaatta cctattaagt tagttgtcga 240
tttctttgat ttcathtagc attgatctaa ctcaatgtgg aagaaggtta cattcgtgca 300
agttaacacg gcttaatgat taactatggt cacctaccaa ccttaccttt tctgggcaaa 360
tattggtata tatagagtta agaagtctag gtctgcttcc agaagaaaac agttccacgt 420
tgcttgaaat tgaaaatcaa gataaaaatg ttcacaatta agctccttct ttttattgtt 480
cctctagtta tttctccag aattgatcaa gacaattcat catttgattc tctatctcca 540
gagccaaaat caagatttgc tatgttagac gatgtaaaaa ttttagccaa tggcctcctt 600
cagttgggac atggtcttaa agactttgtc cataagacga agggccaaat taatgacata 660
tttcaaaaac tcaacatatt tgatcagtct ttttatgata tatcgtgca aaccagtga 720
atcaaagaag aagaaaagga actgagaaga actacatata aactacaagt caaaaatgaa 780
gaggtaaaga atatgtcact tgaactcaac tcaaaacttg aaagcctcct agaagaaaaa 840
attctacttc aacaaaaagt gaaatattta gaagagcaac taactaactt aattcaaaaat 900
caacctgaaa ctccagaaca cccagaagta acttcactta aagtaagtag aaaataaaga 960
gggttcatgt ttatgttttc aatgtggatc ttttaaaaaa aatatttcta aggcatgcc 1020
tttgaaatac ttgttgcat gtgtgaaata cttttttttc caagaaaaat aatctccaga 1080
aaataaaaat tctattata atttcaagtt agttttttgt ttccctaagt ttatatatga 1140
aaacactgaa aatttgcatt ttatatgaaa attacaaatc ggtaaatta tacaatctag 1200
aacactatgt cattacacta ttgtaaatta ctgaaggtaa gtaaaaagtt aaaaaaaatt 1260
taaaactatt ctccagtgtt taaaacagat taaataatac agtaaatgga aaagatttat 1320
tcatatgaaa atatgctggg ctttttcttt taattgaagt tcagaaaatc aaattttaga 1380
gatagtacaa tttaaataaa atgttaagga caaaaatat tgctatttga aagaagcata 1440
caagggaag gaattgccaa tattcatttt tcaaatccat tattagttaa aaaatttaga 1500
ttatgatagt gttacaggaa attaatagaa aagaaagagg aaagcaactt ataaccaacc 1560
tactctctat atccagactt ttgtagaaaa acaagataat agcatcaaag accttctcca 1620
gaccgtggaa gaccaatata aacaattaaa ccaacagcat agtcaaataa aagaaataga 1680
aaatcaggta agtcagtatt ttaatggtat gtcccatctt tcacacaggt ctgtaaaaac 1740
actgaatcct aaaattattt acaagcttta actggatcat gagtaaaatt atcacatcag 1800
cataactgtt aaaattgcag gctctgaagc taataaacta cctgcattta aaccatggct 1860
ctaaaacttt gtgtgacctt gaataaatta cttcaccctt ttatctctca gtttcctcac 1920
atatactaca aagataataa cagaacttat aggattattg taagaaaaaa aattaattca 1980
tagcagccaa tgtcatctta ctaaaattca aattagatca tgtttctctt tgctcaaaac 2040
cacacaatag ctttccattt cactcatatt ggctctttag accaagatta cccaaccctt 2100
cgtcatctca ctgacttcac ctctctact ctagtatttc tgaccgcttt accagtattc 2160
aaacacatca aacatactgc cacctcaaag ctttgcctt tgttgtttcc tctaactgga 2220
acgtctttct gccctggtat ctacgtggcc cactctctga tttcccttag ggctgttata 2280
aaacaaaaaa ttcccaatga agacttacaa ggctacttaa ccaaaaatca caaccgctg 2340
gtcccatccc tgaaaacttc tacttcttta gctacttttc tcctgcacac tcacctttat 2400
ttaacataac ataaatttta gttattttat tcttctattc ctgcactaaa atgtaagctc 2460
tgtgaataca gggatttttt ccattatctt catattttcc attatttgta tatactccag 2520
aatatagaat actgtatggc acacagtagg catttctgtt gaattaataa atgtaatgtc 2580
atattcacac agaagcgtgt gctatgatta ttattacttg gattactaga aatagtgtgc 2640
ctcataatta aaggtcaaca ttcaacaatg taattaatct acaatgtaaa catctggtga 2700
agtgcagag ggaagcactt gtttagaaaa aagctatgtc agaatccatg tattctaata 2760
tgcagtacaa tagtttaaaa atattaataa tactctcaaa cagctattca agaggattca 2820
aaaaacataa tataaactca gagaaactgg taacaaaaat cattttcaag agatataaaa 2880

```


[0004]

caaatattat	taccaatttc	cactaaacaa	acataatgtt	agtagtgctg	ctaaaagggt	2940
ttttatcaac	tacttttggt	ttccatactt	tccttcttat	gatgttatta	ttctaaattc	3000
ttttcaatta	tatctttttac	tatgattaaa	tgaacctgct	ccccaaagca	aaatgttact	3060
atagtaatat	acatttgtgtc	taaaaataaa	aatgtgtgaa	gaaaccaaaa	caatgaattt	3120
ctgagttgga	agaagagtta	gatcatttaa	ctttctcata	tttaaattaa	aaaaacaaaa	3180
ctctaaaaat	ttaagtaact	ttaagatcac	atagttactt	agtagaaaag	agtaataccc	3240
agcaagcaaa	ctttacaata	gatcctttta	aataagggtcc	taggaaatat	cattcatgcc	3300
agcatcaaaa	aactaacact	aataatgcaa	gatattatat	attctgcttt	tcttactgtc	3360
aatgagaaaa	actatcattc	aataaattgc	aaaccaacaa	cacttaataa	aaaataaaat	3420
gttactgcta	aactaacgat	aaactactga	atatatagaa	agtaagcaaa	caaacttgcc	3480
aacctgccaa	catctacaga	tatgtttaca	ggtcaaaaaat	tatcaaatta	tcaagaaagc	3540
ctggttcaaa	ttatgtatta	tgtctttatc	acaggtctga	agatcagtaa	gacctaaaac	3600
tgaaaattat	taaacttaaa	atctgaacag	aatatcaaat	atattttatt	catataaata	3660
aaagaataca	ttacaatatt	ctaagcaaag	cagtctctac	ttttggcctt	gctctgtttt	3720
ccgaccaatg	tctgcttttt	tgctttgctt	tattttttta	tcttattaaa	taatgtccct	3780
gattaaatat	tttgagaaca	ggtaatctgt	acaatctgaa	taacactggt	tatctaaata	3840
tcaaacaccg	ttataacatt	atgaactgaa	agacaaactg	tacttctgac	atccttactc	3900
agatttcccc	taattgtata	ttcagtatca	ttttaaaaaa	cagatttata	ttctttttatc	3960
agctcagaag	gactagtatt	caagaacca	cagaaatttc	tctatcttcc	aagccaagag	4020
caccaagaac	tactcccttt	cttcagttga	atgaaataag	aaatgtaaaa	catgatggta	4080
agacactttg	gtgggtttcc	ttcttgaagc	tattattatc	aaattcccta	ttcttaggac	4140
ttgttctaga	ctaaaagata	gttaagagat	atccatcaaa	tacaatgtat	caacctaaac	4200
tggtatgctg	ggttcttttt	acaccctata	aaagacatac	ctaagacaat	cagagaaata	4260
caaatatgga	cttgattatt	agataatata	gaaggtttat	taattttctt	agatgtgatc	4320
atggtattgc	agtttttaaag	gagaacaatc	tcctgtttta	gagatacatg	ctgaaatatt	4380
tacggagtta	aaggctactg	gactccagac	tggtgataga	acaagactct	gtctctaaaa	4440
aataattaat	tttttaaaaag	aaaatagttt	ggtaagatga	ttcttacatt	cttaaaataac	4500
acgccatcta	agaaaaatgc	tttaacataa	acattactga	aaaaatgcta	catttgccac	4560
aacttcataa	aatgtcaagt	gaaatctcaa	gtcccaaaga	tattattcct	attactaaat	4620
ctgatgtaat	aacatttttat	tgattctagg	cattcctgct	gaatgtacca	ccattttataa	4680
cagaggtgaa	catacaagtg	gcatgtatgc	catcagaccc	agcaactctc	aagtttttca	4740
tgtctactgt	gatgtttatat	caggtaaaac	ctgtctaagg	agaatagaca	gtagttagtt	4800
caacttactc	attacgtatt	aggaagatta	acctggttat	cattgtttta	tacatatata	4860
tatgaaatat	atatgagtat	tcgtataaat	ataatacttt	taccttggtt	atgtattttac	4920
tcaatattct	ccttttcttc	taaaataaat	tgaagtgact	attatcaata	agttttactat	4980
gccaaaattc	attaattgcc	tttcaactaa	cttttgggac	cataataaat	aataaaatgt	5040
attgccataa	cattaataaa	ctaccttaca	aaaccaccaa	ttaaaatcaa	acaaacaaaa	5100
aagtgttatt	tacatctgtc	aacataaatc	tactaaaaat	acatgatttc	attcattata	5160
ttcaggtagt	ccatggacat	taattcaaca	tcgaatagat	ggatcacaaa	acttcaatga	5220
aacgtgggag	aactacaaat	atggtttttg	gaggcttgat	ggtaagggga	ctacattcaa	5280
tcattcattc	acttgctaatt	ctacaaatat	ttactgagaa	cctcttatgg	accaggtatt	5340
aggaaaagta	gtaacgaacg	agaagcagtc	tcagccttca	tataatttat	tatcaaacaa	5400
ttacacattt	gttagtaaat	tacacttatt	acaactgtta	ttatttgaat	tatattttatc	5460
acaattacat	gtctgttctt	aaatataact	atcacaattt	aattccacgg	cttacaatga	5520
tcataactat	aattatttaa	gacaattttg	attaaatgtt	atgtcataag	tagtaactgt	5580
tacaaataag	ctgtgaaaag	aaccactcct	agcatttagtc	actctattct	ctcattaacg	5640
ttttacatat	caattaattg	gaagttaaaa	ggaccaggaa	actcagacat	acagtataca	5700
ttttaaaatt	tcaattattt	aaatataata	tatagaatgt	atggcttata	atgaattagt	5760
taactcaatg	caaattatc	tattttgatt	acaaatagta	aaataagcaa	gataaaataa	5820
cagatgttta	aaatccaaaa	agcacataca	aaaatccatg	aatgatgtct	aagtactcac	5880
ttataaagta	gaagacattc	attattatat	caaattttta	aatgctcagt	actatttgac	5940
catttaaaaa	ttttgtattc	aaactaccag	tgaaagccct	acctagaagg	tatactcagt	6000
gataagtttt	gtagctccaa	atcttctaatt	agtgagtgtg	accccaaaat	aaaaggctga	6060
caggtaagtc	gagaatactc	acttaattct	ggtaagaaag	caaccatttt	gtacttgtat	6120
ttaccagcaa	tccttaaaat	gaagcttcc	actaactcaa	tagcaataag	acaatagtga	6180
atgtttaatg	aaaacagtat	tttataaata	ctttaataaa	aaggattgtg	atgaagaaca	6240

[0005]

```

atctatttat atttgttatt tgtttttaat tccaataaaa ataattttta aaattacaga 6300
aaaaagttat taagaacccat gcttttaaat ttaaaatgat tttttaaat ttttcctgtc 6360
tttttctaca aagaaaagcat acattaagca aataccaaag gccaggttta catttgaaga 6420
aagtgcattt attattactc aagtctctag gaatacttaa cacatctctt gactgtatat 6480
ggatgttaat aaatagctga cagtaaagtt tatccatata aagacttgca aatattcctc 6540
taccaatgac gagactttta aatatctata ataatgtaac acatttcact ggtgaaacat 6600
gtcttgtcat atgcattata gaaaggataa tcagactttc agttatatta atatttttaa 6660
catttttgtg cacatagcta tcttcaataa aattgtttta aaaggatatta ttttaagata 6720
cactaaaatg atcaagggat tcaagactaa acaactcaat tagttgcacc aataaaaaaac 6780
acttaaaaaa actgtcagtg tccaacctgt acttaataac tcacagattt ttaaaacttt 6840
tcttttcagg agaatttttg ttgggcctag agaagatata ctccatagtg aagcaatcta 6900
attatgtttt acgaattgag ttggaagact ggaaagacaa caaacattat attgaatatt 6960
ctttttactt gggaaatcac gaaaccaact atacgctaca tctagttgcg attactggca 7020
atgtcccaa tgcaatcccg gaaaacaaag atttgggtgt ttctacttgg gatcacaaag 7080
caaaaggaca cttcaactgt ccagagggtt attcaggtat ctttttctga taccaatact 7140
ttattttcat atcttcaaag tatcttccca cattattagc tattatctgc aatgacaact 7200
tttaaaaatc cgaatcccaa ataagcgttt tctctctaga cgaaaacctc ttaactataa 7260
tgaaagtgtt cattctagtt caatcaggtt ttttacctct aatcttctc agattttcta 7320
ttttttggta gtgtatagat tatttataca gattatttaa aattgggact tatacagatt 7380
atttaaaact gggatacatg catctaaaac actgtaatat ttataagaaa ggaagataaa 7440
cttacgggga aatacagtaa cagtaactac atacgagtct gtaccatta aattgcatat 7500
ctatctcctt taggaggctg gtggtggcat gatgagtgtg gagaaaacaa cctaaatggt 7560
aaatataaca aaccaagagc aaaatctaag ccagagagga gaagaggatt atcttggag 7620
tctcaaaatg gaaggttata ctctataaaa tcaacccaaa tgttgatcca tccaacagat 7680
tcagaaagct ttgaatgaac tgaggcaaat ttaaaaggca ataattttaa cattaacctc 7740
attccaagtt aatgtggtct aataatctgg tattaatccc ttaagagaaa gcttgagaaa 7800
tagatttttt ttatctttaa gtcactgtct atttaagatt aaacatacaa tcacataacc 7860
ttaaagaata cegttttacat ttctcaatca aaattcttat aatactattt gttttaaatt 7920
ttgtgatgtg ggaatcaatt ttagatggtc acaatctaga ttataatcaa taggtgaact 7980
tattaaataa cttttctaaa taaaaaattt agagactttt attttaaaag gcatcatatg 8040
agctaataac acaactttcc cagtttaaaa aactagtact cttgttaaaa ctctaaactt 8100
gactaaatac agaggactgg taattgtaca gttcttaaat gttgtagtat taatttcaaa 8160
actaaaaate gtcagcacag agtatgtgta aaaatctgta atacaaattt ttaactgat 8220
gcttcatttt gctacaaaat aatttggagt aaatgtttga tatgatttat ttatgaaacc 8280
taattgaaga gaattaaata ctgtatttaa ataagttcgc tgtctttaaa caaatggaga 8340
tgactactaa gtcacattga ctttaacatg aggtatcact atacctattt tgttaaaata 8400
tatactgtat acattttata tattttaaca cttaatacta tgaaaacaaa taattgtaaa 8460
ggaatcttgt cagattacag taagaatgaa catatttgtg gcatcgagtt aaagtttata 8520
tttcccctaa atatgctgtg attctaatac attcgtgtag gttttcaagt agaaataaac 8580
ctcgtaacaa gttactgaac gtttaaacag cctgacaagc atgtatatat gtttaaaatt 8640
caataaacaa agaccagtc cctaaattat agaaatttaa attattcttg catgtttatc 8700
gacatcacaa cagatcccta aatccctaaa tccctaaaga ttagatacaa attttttacc 8760
acagtatcac ttgtcagaat ttatttttaa atatgatttt ttaaaactgc cagtaagaaa 8820
ttttaaatta aaccattttg ttaaaggata tagtgcccaa gttatatggt gacctacctt 8880
tgtcaatact tagcattatg tatttcaaat tatccaatat acatgtcata tatattttta 8940
tatgtcacat atataaaaga tatgtatgat ctatgtgaat cctaagtaaa tattttgttc 9000
cagaaaagta caaaataata aaggtaaaaa taatctataa ttttcaggac cacagactaa 9060
gctgtcgaaa ttaacgctga tttttttagg gccagaatac caaaatggct cctctcttcc 9120
cccaaaattg gacaatttca aatgcaaaat aattcattat ttaatatatg agttgcttcc 9180
tctatttggg ttctttaaaa aaaaaaaaaa ctctcatagg acatgtttca ttttgttcc 9240
ttcaggagta gtaaattaga cgttttcccc atataaagct tttttctacc agaaagatac 9300
ttctggtaga agaagagaaa ggagctcttt atggttcaca cgactgtctc ctgtcctaac 9360
tactttgctt aaagtgtca a

```

<210> 6

<211> 1449

<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 6

```
aataattgag acaaaaaaat gcacacaatt aaattattcc tttttgttgt tccttttagta 60
attgcatcca gaggatgcc agacctttca tcatttgatt ctgcaccttc agagccaaaa 120
tcaagatttg ctatgttggg tgatgtcaaa atttttagcga atggcctcct gcagctgggt 180
catggactta aagattttgt ccataagact aaggggacaaa ttaacgacat atttcagaag 240
ctcaacatat ttgatcagtc tttttatgac ctatcacttc gaaccaatga aatcaaagaa 300
gaggaaaagg agctaagaag aactacatct acactacaag ttaaaaacga ggaggtgaag 360
aacatgtcag tagaactgaa ctcaaagctt gagagtctgc tggaaagagaa gacagccctt 420
caacacaagg tcagggcttt ggaggagcag ctaaccaact taattctaag cccagctggg 480
gctcaggagc acccagaagt aacatcactc aaaagttttg tagaacagca agacaacagc 540
ataagagaac tcctccagag tgtggaagaa cagtataaac aattaagtca acagcacatg 600
cagataaaag aaatagaaaa gcagctcaga aagactggta ttcaagaacc ctcagaaaat 660
tctctttctt ctaaatacaag agcaccaaga actactcccc ctcttcaact gaacgaaaca 720
gaaaatacag aacaagatga ctttctgcc gactgctctg ccgtttataa cagaggcgaa 780
catacaagtg gcgtgtacac tattaaacca agaaactccc aagggtttta tgtctactgt 840
gatacccaat caggcagtc atggacatta attcaacacc ggaaagatgg ctcacaggac 900
ttcaacgaaa catgggaaaa ctacgaaaag ggctttggga ggctcgatgg agaatttttg 960
ttgggcctag agaagatcta tgctatagtc caacagctcta actacatttt acgactcgag 1020
ctacaagact ggaaagacag caagcactac gttgaatact cctttcacct gggcagtcac 1080
gaaaccaact acacgctaca tgtggctgag attgctggca atatccctgg ggccctccca 1140
gagcacacag acctgatgtt ttctacatgg aatcacagag caaagggaca gctctactgt 1200
ccagaaagtt actcaggtgg ctggtggtgg aatgacatat gtggagaaaa caacctaaat 1260
ggaaaataca acaaaccag aaccaaattc agaccagaga gaagaagagg gatctactgg 1320
agacctcaga gcagaaagct ctatgctatc aaatcatcca aaatgatgct ccagcccacc 1380
acctaagaag cttcaactga actgagacaa aataaaagat caataaatta aatattaaag 1440
tcctcccgaa 1449
```

[0006]

<210> 7
<211> 510
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 7

```
tggtggccta ctggacagga gggagaagtt ccaaattgct taaaattgaa taattgagac 60
aaaaaatgca cacaattaaa ttattccttt ttgttgttcc tttagtaatt gcatccagag 120
tggtatccaga cctttcatca tttgattctg caccttcaga gccaaaatca agatttgcta 180
tggtggatga tgtcaaaatt ttagcgaatg gcctcctgca gctgggtcat ggacttaaag 240
attttgtcca taagactaag ggacaaatta acgacatatt tcagaagctc aacatatttg 300
atcagtcttt ttatgacctc tcaattcgaa ccaatgaaat caaagaagag gaaaaggagc 360
taagaagaac tacatctaca ctacaagtta aaaacgagga ggtgaagaac acttcagtag 420
aactgaactc aaagcttgag agtctgctgg aagagaagac agcccttcaa cacaaggtca 480
gggctttgga ggagcagcta accaacttaa 510
```

<210> 8
<211> 271
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 8

```
gagggatcta ctggagacct cagagcagaa agctctatgc tatcaaatca tccaaattga 60
tgctccaccc caccacctaa gaagcttcaa ctgaactgag acaaaataaa agatcaataa 120
attaaatatt aaattcctcc cgatcactgt agtaatctgg tattaaaatt ttaatggaaa 180
gcttgagaat tgaatttcaa ttaggtttta actcattgtt aagatcagat atcaccgaat 240
```

	caacgtaaac aaaatttatc tttttcaatc t	271
	<210> 9	
	<400> 9	
	000	
	<210> 10	
	<400> 10	
	000	
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 11	
	ctcttactgt gctgtggaca	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0007]	<220>	
	<223> Primer	
	<400> 12	
	tgcagggcta catggaacaa	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 13	
	cggactcctg cacgtactt	20
	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 14	
	ctccaagacg gtccaggatg cgc	23

	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 15	
	caacggattt ggtcgtattg g	21
	<210> 16	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 16	
	ggcaacaata tccactttac cagagt	26
	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 17	
	cgcctgggtca ccagggtgc t	21
	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 18	
	gaaggtgaag gtcggagtc	19
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 19	
	gaagatggtg atgggatttc	20
	<210> 20	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 20	
	caagcttccc gttctcagcc	20
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 21	
	tggaatcata ttggaacatg	20
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0009]	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 22	
	ggcaaattca acggcacagt	20
	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 23	
	gggtctcgct cctggaagat	20
	<210> 24	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 24	
	aaggccgaga atgggaagct tgtcac	27
	<210> 25	
	<211> 23	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 25	
	tgttctagag acagccgcat ctt	23
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 26	
	caccgacctt caccatcttg t	21
	<210> 27	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 探针	
[0010]	<400> 27	
	ttgtgcagtg ccagcctcgt ctca	24
	<210> 28	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 28	
	cttcaatgaa acgtgggaga act	23
	<210> 29	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 29	
	tctctaggcc caaccaaatt tc	22
	<210> 30	
	<211> 24	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 30	
	aaatatggtt ttgggaggct tgat	24
	<210> 31	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 31	
	cagaagtaac atcactcaaa agttttgtag	30
	<210> 32	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
[0011]	<400> 32	
	gacttaattg tttatactgt tcttccacac t	31
	<210> 33	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 33	
	cagcaagaca acagcataag agaactcctc ca	32
	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 34	
	atctgttgtg atgtcgataa	20
	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 35	
	gtatttagtc aagtttagag	20
	<210> 36	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 36	
	tattacagat ttttacacat	20
	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
[0012]	<400> 37	
	cgtggaactg ttttcttctg	20
	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 38	
	agcttaattg tgaacatttt	20
	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 39	
	attctggagg aaataactag	20
	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 40	
	aaatcttgat tttggctctg	20
	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 41	
	atagcaaadc ttgatttttg	20
	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 42	
	ctaacaatgc aaatcttgat	20
[0013]	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 43	
	atcgtctaac atagcaaadc	20
	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 44	
	aggccattgg ctaaaatttt	20
	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 45 catgtcccaa ctgaaggagg	20
	<210> 46 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 46 ctttaagacc atgtcccaac	20
	<210> 47 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 47 gcccttcgtc ttatggacaa	20
[0014]	<210> 48 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 48 tcattaattt ggcccttcgt	20
	<210> 49 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 49 tgaaatatgt cattaatttg	20
	<210> 50 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	

[0015]	<400> 50 gactgatcaa atatgttgag	20
	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 51 gtttgcagcg atagatcata	20
	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 52 tcactggttt gcagcgatag	20
	<210> 53	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 53 agttcaagtg acatattctt	20
	<210> 54	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 54 agtgaagtta cttctgggtg	20
	<210> 55	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	

[0016]	<400> 55 gttttaagtg aagttacttc	20
	<210> 56	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 56 ctacaaaagt tttaagtgaa	20
	<210> 57	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 57 ggtcttccac ggtctggaga	20
	<210> 58	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 58 tagtccttct gagctgattt	20
	<210> 59	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 59 ggttcttgaa tactagtcct	20
	<210> 60	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 60	

	aaatttctgt gggttcttga	20
	<210> 61	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 61	
	tggcttggaa gatagagaaa	20
	<210> 62	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 62	
	agtagttctt ggtgctcttg	20
	<210> 63	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0017]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 63	
	tgaagaaagg gagtagttct	20
	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 64	
	attcaactga agaaaggag	20
	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 65	
	tcttatttca ttcaactgaa	20

	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 66	
	aggaatgccca tcatgtttta	20
	<210> 67	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 67	
	ctctgttata aatggtggta	20
	<210> 68	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0018]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 68	
	ttcacctctg ttataaatgg	20
	<210> 69	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 69	
	gtatgttcac ctctgttata	20
	<210> 70	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 70	
	cacttgtatg ttcacctctg	20

	<210> 71	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 71	
	catgccactt gtatgttcac	20
	<210> 72	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 72	
	agagttgctg ggtctgatgg	20
	<210> 73	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0019]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 73	
	ctgatataac atcacagtag	20
	<210> 74	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 74	
	catggactac ctgatataac	20
	<210> 75	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 75	
	tgaattaatg tccatggact	20
	<210> 76	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 76	
	tctattcgat gttgaattaa	20
	<210> 77	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 77	
	agttctccca cgtttcattg	20
	<210> 78	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0020]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 78	
	catatttgta gttctccac	20
	<210> 79	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 79	
	aaaaccatat ttgtagttct	20
	<210> 80	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 80	
	gcctcccaa accatatttg	20
	<210> 81	
	<211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 81	
	gcccaaccaa aattctccat	20
	<210> 82	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 82	
	ctctaggccc aaccaaatt	20
	<210> 83	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
[0021]	<400> 83	
	atcttctcta ggcccaacca	20
	<210> 84	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 84	
	aacataatta gattgcttca	20
	<210> 85	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 85	
	gtcttccaac tcaattcgta	20
	<210> 86	
	<211> 20	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 86	
	ctttccagtc ttccaactca	20
	<210> 87	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 87	
	aactagatgt agcgtatagt	20
	<210> 88	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
[0022]	<400> 88	
	tgatccaag tagaaaacac	20
	<210> 89	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 89	
	caccagcctc ctgaataacc	20
	<210> 90	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 90	
	ttaggttggtt ttctccacac	20
	<210> 91	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 91	
	taatcctctt ctcctctctg	20
	<210> 92	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 92	
	tgagacttcc aagataatcc	20
	<210> 93	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
[0023]	<400> 93	
	cattttgaga cttccaagat	20
	<210> 94	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 94	
	gagtataacc ttccattttg	20
	<210> 95	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 95	
	tggatggatc aacattttgg	20
	<210> 96	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 96	
	ttcaaagctt tctgaatctg	20
	<210> 97	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 97	
	tgccctcagtt cattcaaagc	20
	<210> 98	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 98	
	tgcccttttaa atttgccctca	20
[0024]	<210> 99	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 99	
	attaacttgg aatgaggtta	20
	<210> 100	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 100	
	agaccacatt aacttggaat	20
	<210> 101	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成寡核苷酸 <400> 101 agattattag accacattaa	20
	<210> 102 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 102 ataccagatt attagaccac	20
	<210> 103 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 103 ggattttaata ccagattatt	20
[0025]	<210> 104 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 104 actgacttac ctgattttct	20
	<210> 105 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 105 accttgtaag tcttcattgg	20
	<210> 106 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸	

[0026]	<400> 106 cagtgttatt cagattgtac	20
	<210> 107	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 107 agtgtcttac catcatgttt	20
	<210> 108	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 108 acagatgtaa ataacacttt	20
	<210> 109	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 109 gtcccccttac catcaagcct	20
	<210> 110	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 110 gggaagatac tttgaagata	20
	<210> 111	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	

	<400> 111 caccagcctc ctaaaggaga	20
	<210> 112 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 112 aataatttaa ttgtgtgcat	20
	<210> 113 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 113 cactctggat gcaattacta	20
[0027]	<210> 114 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 114 aaggtctgga tccactctgg	20
	<210> 115 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 115 tttggtcttg aaggtgcaga	20
	<210> 116 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 116	

	tcatccaaca tagcaaattct	20
	<210> 117	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 117	
	tgacatcatc caacatagca	20
	<210> 118	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 118	
	aattttgaca tcatccaaca	20
	<210> 119	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0028]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 119	
	gctaaaattt tgacatcatc	20
	<210> 120	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 120	
	aggccattcg ctaaaatttt	20
	<210> 121	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 121	
	cccagctgca ggaggccatt	20

	<210> 122	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 122	
	catgacccag ctgcaggagg	20
	<210> 123	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 123	
	ttaagtccat gacccagctg	20
	<210> 124	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0029]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 124	
	gacaaaatct ttaagtccat	20
	<210> 125	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 125	
	ttatggacaa aatctttaag	20
	<210> 126	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 126	
	ttgagcttct gaaatatgtc	20

	<210> 127	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 127	
	atatgttgag cttctgaaat	20
	<210> 128	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 128	
	atcaaatatg ttgagcttct	20
	<210> 129	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0030]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 129	
	ggttcgaagt gataggtcat	20
	<210> 130	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 130	
	tagtgtagat gtagttcttc	20
	<210> 131	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 131	
	gacatgttct tcacctctc	20
	<210> 132	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 132	
	tgagttcagt tctactgaca	20
	<210> 133	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 133	
	tcaagctttg agttcagttc	20
	<210> 134	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0031]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 134	
	gtcttctctt ccagcagact	20
	<210> 135	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 135	
	gttgaagggc tgtcttctct	20
	<210> 136	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 136	
	ctgaccttgt gttgaagggc	20
	<210> 137	
	<211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 137	
	ccaaagccct gaccttgtgt	20
	<210> 138	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 138	
	ttagctgctc ctccaaagcc	20
	<210> 139	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
[0032]	<400> 139	
	cttagaatta agttggttag	20
	<210> 140	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 140	
	ggtgctcctg agccccagct	20
	<210> 141	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 141	
	tgatgttact tctgggtgct	20
	<210> 142	
	<211> 20	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 142	
	tgctgttcta caaaactttt	20
	<210> 143	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 143	
	aggagttctc ttatgctgtt	20
	<210> 144	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
[0033]	<400> 144	
	tctggaggag ttctcttatg	20
	<210> 145	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 145	
	cacactctgg aggagttctc	20
	<210> 146	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 146	
	gggttcttga ataccagtct	20
	<210> 147	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 合成寡核苷酸		
	<400> 147		
	gaaagagaat tttctgaggg		20
	<210> 148		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成寡核苷酸		
	<400> 148		
	gcaggaaggt catcttggtc		20
	<210> 149		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成寡核苷酸		
[0034]	<400> 149		
	gagcagtcgg caggaaggtc		20
	<210> 150		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成寡核苷酸		
	<400> 150		
	tacacgccac ttgtatgttc		20
	<210> 151		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成寡核苷酸		
	<400> 151		
	ttaatagtgt acacgccact		20
	<210> 152		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		

	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 152	
	agacattaaa cccttgggag	20
	<210> 153	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 153	
	ctgcctgatt gggtatcaca	20
	<210> 154	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 154	
	ccatctttcc ggtgttgaat	20
[0035]	<210> 155	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 155	
	gaagtcctgt gagccatctt	20
	<210> 156	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 156	
	ttctccatcg agcctcccaa	20
	<210> 157	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成寡核苷酸 <400> 157 gttggactat agcatagatc	20
	<210> 158 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 158 atgtagttag actgttgac	20
	<210> 159 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 159 acgtagtgct tgctgtcttt	20
[0036]	<210> 160 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 160 gccaggtga aaggagtatt	20
	<210> 161 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 161 tgtagcgtgt agttggttc	20
	<210> 162 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸	

[0037]	<400> 162 ccacatgtag cgtgtagttg	20
	<210> 163	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 163 ctcagccaca tgtagcgtgt	20
	<210> 164	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 164 gcaatctcag ccacatgtag	20
	<210> 165	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 165 atcaggtctg tgtgctctgg	20
	<210> 166	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 166 atgtagaaaa catcaggtct	20
	<210> 167	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	

[0038]	<400> 167 tctgtgattc catgtagaaa	20
	<210> 168	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 168 tctggacagt agagctgtcc	20
	<210> 169	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 169 aactttctgg acagtagagc	20
	<210> 170	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 170 accaccagcc acctgagtaa	20
	<210> 171	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 171 ttctccacat atgtcattcc	20
	<210> 172	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 172	

	ggttggttttc tccacatatg	20
	<210> 173	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 173	
	tggtctggat ttggttctgg	20
	<210> 174	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 174	
	tctctctggg ctggatttgg	20
	<210> 175	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0039]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 175	
	tagagctttc tgctctgagg	20
	<210> 176	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 176	
	gtggtgggct ggagcatcat	20
	<210> 177	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 177	
	tgaagcttct taggtggtgg	20

	<210> 178	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 178	
	tgtctcagtt cagttgaagc	20
	<210> 179	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 179	
	tcgggaggac tttaatatatt	20
	<210> 180	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0040]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 180	
	ggaacttctc cctcctgtcc	20
	<210> 181	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 181	
	taacaatgag tttaaaccta	20
	<210> 182	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 182	
	tctgatctta acaatgagtt	20

	<210> 183	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 183	
	cgagaggcgg acgggaccg	19
	<210> 184	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 184	
	cgagaggcgg acgggaccgt t	21
	<210> 185	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0041]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 185	
	ttgctctcgg cctgccctgg c	21
	<210> 186	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 186	
	gctctcggcc tgccctggc	19
	<210> 187	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 187	
	ccttcctga aggttcctcc	20
	<210> 188	

	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 188	
	cacctgggca gtcacgaaa	19
	<210> 189	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 189	
	ggagggcccc agggatat	18
	<210> 190	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0042]	<223> 探针	
	<400> 190	
	cacgctacat gtggctgaga ttcgtgg	27
	<210> 191	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 191	
	gtgacatatt cttcacctct	20
	<210> 192	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 192	
	tttaagtgac gttacctctg	20
	<210> 193	
	<211> 1272	

<212> DNA

<213> 褐家鼠

<400> 193

[0043] atgcacacaa ttaagctgct cttttttggt gttcctctag taatttcgtc cagagttgat 60
 ccagaccttt cgccatttga ttctgtaccg tcagagccaa aatcaagatt tgctatgttg 120
 gatgatgtca aaatttttagc caatggcctc ctgcagctgg gtcattggtct taaagatttt 180
 gtccataaga caaagggaca aattaatgac atatttcaga agctcaacat atttgatcag 240
 tgtttttatg acctatcact tcaaaccaat gaaatcaaag aagaggaaaa ggagctaaga 300
 agaaccacat ctaaactaca agttaaaaaac gaagaggtga agaatatgtc acttgaactg 360
 aactcaaagc ttgaaagtct actggaggag aagatggcgc tccaacacag agtcagggct 420
 ttggaggaac agctgaccag cttggttcag aaccgcctg gggctcgga gcaccagag 480
 gtaacgtcac ttaaaagttt tgtagaacag caagataaca gcataagaga actcctccag 540
 agtgtggaag aacaatataa acaactaagt caacagcaca ttcagataaa agaaatagaa 600
 aatcagctca gaaagactgg cattcaagaa cccactgaaa attctcttta ttctaaacca 660
 agagcaccaa gaactactcc cctcttccat ctgaaggaag caaaaaatat agaacaagat 720
 gatctgcctg ctgactgctc tgccatttat aacagaggtg aacatacaag tggcgtgtat 780
 actattagac caagcagctc tcaagtgttt aatgtctact gtgacacca atcaggagaa 840
 ttctggttgg gcctagagaa gatctacgt atagtcaaac agtctaacta catcttacga 900
 ctggagctac aagactggaa ggacagcaag cactatgctg aatattcctt tcactctggc 960
 aatcatgaaa ccaactacac gctacatgtg gctgagattg ctgccaatat cctgaggcc 1020
 ctaccagaac acagagacct gatgttttct acatgggatc acagagcaaa gggacagctc 1080
 tactgtccag aaagttattc aggtggctgg tggttcagtg acatgtgttg agaaaacaac 1140
 ctaaattggt aatacaacaa acccagagcc aaatccaaac cagagcggag aagagggatc 1200
 tcttgagggc ctgggggcgg aaagctctac tctatcaaat catctaaat gatgctccag 1260
 ccgaccacct aa 1272