



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96193361.5

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1177615C

[22] 申请日 1996.4.19 [21] 申请号 96193361.5

[30] 优先权

[32] 1995. 4. 19 [33] US [31] 08/424,991

[86] 国际申请 PCT/US1996/005334 1996. 4. 19

[87] 国际公布 WO1996/032966 英 1996. 10. 24

[85] 进入国家阶段日期 1997. 10. 17

[71] 专利权人 托马斯杰斐逊大学

地址 美国宾夕法尼亚

[72] 发明人 A·扎柳斯基 史毅

审查员 周静

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李璜

权利要求书 2 页 说明书 51 页 附图 31 页

[54] 发明名称 动静脉和静脉移植物处理的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供了一种抑制胞外基质蛋白质合成的方法和化合物。本发明的化合物包括对核原癌基因特异性的寡核苷酸。优选地，本发明的寡核苷酸选自自由 c - myc 和 c - myb 组成的组并局部施用。本发明在治疗包括巩膜病症和再狭窄在内的与胞外基质蛋白质(尤其是胶原)的不适当合成有关的各种疾病中是有用的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种对 c-myb 或 c-myc 特异的反义寡核苷酸在制备用于处理血管移植物的药物组合物中的用途。

2. 按照权利要求 1 的寡核苷酸的用途, 该寡核苷酸用于制备处理血管移植物的组合物, 所述血管移植物选自由修复瘻、动静脉分流器、天然静脉瘻、静脉移植物、免疫抑制的异源移植物、免疫抑制的异种移植物和静脉自体组织移植物组成的组。

3. 按照权利要求 1 的寡核苷酸的用途, 其中所述血管移植物提供了血液透析接近位点。

4. 按照权利要求 1 的寡核苷酸的用途, 其中所述血液透析接近位点选自由布-西瘻、鼻咽盒瘻、头臂瘻、聚四氟乙烯血液透析移植物、牛颈动脉移植物和自体移植物组成的组。

5. 按照权利要求 1-4 中任一项的寡核苷酸的用途, 其中所说的寡核苷酸是对 c-myc 特异性的寡核苷酸。

6. 按照权利要求 1-4 中任一项的寡核苷酸的用途, 其中所说的寡核苷酸是对 c-myb 特异性的。

7. 按照权利要求 1-4 中任一项的寡核苷酸的用途, 其中所说的寡核苷酸选自由 SEQ ID NO: 1、5、6 和 7 组成的组。

8. 按照权利要求 1 的寡核苷酸的用途, 其中所说的寡核苷酸包含在用于插入血管周围组织的移植物或贮器中。

9. 按照权利要求 1 的寡核苷酸的用途, 其中所说的寡核苷酸是抗核酸酶的, 其长度为 12 至 60 个核苷酸。

10. 按照权利要求 1 的反义寡核苷酸的用途, 其中所述反义寡核苷酸可抑制纤维结缔组织形成。

11. 一种体外预防由静脉制成的血管移植物衰竭的方法, 该方法包括:

在体外把静脉与对 c-myb 或 c-myc 特异性的反义寡核苷酸相接触。

12. 按照权利要求 11 的方法, 其中所说的接触包括把所说的静脉和

所说的寡核苷酸在无菌的、生理学上可接受的缓冲液中温育至少 10 分钟。

13. 按照权利要求 12 的方法，其中所说的生理学上可接受的缓冲液在 20 至 37℃ 下。

14. 按照权利要求 11 至 13 之任一的方法，其中所说的反义寡核苷酸的浓度为 1 至 100 μ M。

15. 按照权利要求 11 的方法，其中所说的静脉选自隐静脉、头静脉、贵要静脉、臂静脉和股静脉组成的组。

16. 按照权利要求 15 的方法，其中所说的寡核苷酸是对 c-myc 特异性的。

17. 按照权利要求 15 的方法，其中所说的寡核苷酸是对 c-myb 特异性的。

18. 按照权利要求 11 的方法，其中所说的寡核苷酸选自 SEQ ID NO: 1、5、6 和 7 组成的组。

19. 一种组合物，该组合物包含：

一条切除的与人相容的静脉和位于所说的与人相容的静脉的血管壁中的反义寡核苷酸，其中所说的反义寡核苷酸是对 c-myb 或 c-myc 特异性的。

20. 按照权利要求 19 的组合物，其中所说的切除的与人相容的静脉选自隐静脉、头静脉、贵要静脉、臂静脉和股静脉组成的组。

21. 按照权利要求 19 或 20 的组合物，其中所说的寡核苷酸位于选自内皮层、血管中层和外膜组成的组的所说血管壁的至少一层中。

22. 按照权利要求 21 的组合物，其中所说的寡核苷酸在至少一个所说的层中的浓度至少为 10 μ M。

23. 按照权利要求 19 的组合物，其中所说的寡核苷酸是对 c-myc 特异性的。

24. 按照权利要求 19 的组合物，其中所说的寡核苷酸是对 c-myb 特异性的。

25. 按照权利要求 19 的组合物，其中所说的寡核苷酸选自 SEQ ID NO: 1、5、6 和 7 组成的组。

动静脉和静脉移植处理的方法和组合物

相关申请的交叉参见

本申请是 1994 年 10 月 17 日申请的指定美国的 PCT 申请 US 94/11853(本文一并参考)的部分继续申请, US 94/11853 是 1993 年 10 月 15 日提交的申请 08/138,637(本文一并参考)的部分继续申请。

发明所属技术领域

本发明总的来说涉及寡核苷酸及其用作治疗剂的用途,更具体地说是使用寡核苷酸反义和反基因化合物来抑制胞外基质蛋白质合成,特别是从成纤维细胞和平滑肌细胞合成。

引 言

动静脉分流器和瘘管给血液透析患者的循环系提供血液透析接近位点(access sites)。遗憾地是,动静脉分流器和瘘管衰竭很普遍,其能够产生 300,000 个以上的世界范围的血液透析患者的严重医学并发症(Newman, G. E., 血管病: 外科和插入疗法, E. Srranciness, Ed. (1994))。研究发现,12%至 45%的动静脉分流器和瘘管在第一年之内衰竭(Newman, G. E., (1994) 此处引用)。接近位点衰竭的主要原因是侵入性的静脉狭窄(Sedberg 等, 循环, 80: 1726-1736(1989))。衰竭或机能障碍的血液透析接近位点需要治疗,或通过外科取代动静脉分流器或转导管插入(例如,气囊血管成形术或斯坦特固定模)以扩大流出分流术或瘘的静脉血管(Newman, G. E., (1994) 此处引用)。因而,动静脉分流器和瘘并发症的慢性血液透析患者每年在医院花费大约 30 天以保持他们的接近位点的开放。

这样,血液透析接近位点已知为血液透析患者的“唯一致命的弱点”,尽管动静脉分流器或瘘的形成对方便的血液透析来说是必要的。动静脉分流器和瘘通常作为布-西(Brescia-Cimino)动静脉瘘或聚四氟乙烯

(PTFE, Gor-Tex) 移植物形成。在大多数例子中, 经由 PTFE 移植物在前臂区域、肩区域或腿区域静脉直接或间接地通过手术与动脉连接。

动静脉瘘仅是逐渐变得有时衰竭的动静脉移植物的一个例子。造成需要治疗的医学疾病的其它类型的移植物(即静脉移植物)包括: 主动脉冠状旁路移植物、颈动脉移植物、髂股移植物和 femoropopliteal 移植物。在这些移植物中, 把静脉片断置于动脉系统中。影响所有类型的动静脉移植物或置于动脉系统中的静脉移植物的主要医学疾病是血管内部随时间直径减少。这通常发生于流出静脉之中, 或移植体的形成部分(本文作为移植物的“静脉部分”)。人们相信: 静脉和高的动脉压的接触改变了静脉的形态学; 移植物的静脉部分的内部直径在直径上显著减少。移植物也受血栓形成和其它医学病症, 如感染的影响。

在本发明之前, 动静脉和静脉移植物治疗效能有限, 通常需要攻击性的治疗。曾把努力集中于加厚的血管壁的段中机械地增加移植物的内部直径, 如在衰竭的血液透析接近位点。其它方法简单地依赖于衰竭的移植物位点的外科修正, 如在动静脉分流器取代中。这些类型的现有技术治疗需要大量的医疗监督, 常需要治疗, 而且在某些血液透析接近位点的情况下可最终导致不能找到适合的血液透析接近位点, 如本文讨论的。

有几个集中于在衰竭的移植物中的静脉形态学的研究(如动静脉移植物和静脉移植物(例如, 主动脉冠状旁路)提供了这些病症的疾病机理的信息。薄壁静脉和动脉血流和压力接触作出的反应很早。静脉开始产生新内膜。这种对高动脉压和流速的反应最终导致了腔的狭窄, 造成静脉的开放缩小。血管平滑肌细胞主要在血管中层与新内膜中发现。成纤维细胞在外膜和血管周围组织中发现。成纤维细胞在静脉的创伤修复期间对血管周围组织的粒化有作用。作为对伤害的反应, 平滑肌细胞和成纤维细胞增加了在血管壁和血管周围组织中基质蛋白质的合成。因而, 由于血管壁厚度的增加和在血管周围组织中瘢痕形成的增加, 静脉变得狭窄和僵硬, 这导致移植物不可逆转的衰竭, 如在动静脉瘘或静脉移植物的情况下。

胞外基质蛋白质的不适当合成和/或这样的蛋白质的异常形式的合成和较宽范围的有害条件相关, 这些条件包括许多很少可遗传的疾病以及更常

见的获得性病症，如失去动静脉和静脉移植物的开放(Sedberg 等，循环，80：1726-1736(1989))、纤维变性的皮肤疾病、肺部纤维变性、骨关节炎、血管再狭窄等，例如，Weiss 和 Jayson，编者，健康和疾病中的胶原(Churchill Livingstone，爱丁堡，1982)；Gardner，编者，结缔组织疾病的病理基础(Lea Febiger，费城，1992)。胞外基质主要由胶原、蛋白多糖、弹性蛋白和纤连蛋白组成。

许多这样的疾病和对物理、化学和/或生物损伤的十分复合物的生物反应有关。这样的反应包括各种类型细胞的增殖和对反应起作用或修饰反应的生长因子的合成。例如，血管病症(如动脉粥样硬化和血管再狭窄)与局部细胞增殖和迁移以及几种结构蛋白和许多生长因子(包括血小板衍生生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子、肿瘤坏死因子 α 、白介素-1、前列腺素和各种各样的原癌基因)的产生有关，例如，Ross，自然，362：801-809(1993)；Morishita 等，美国科学院学报，90：8474-8478(1993)。很遗憾，在各种疾病过程中的这些因素的精确作用还没有充分了解。

与胞外基质蛋白质的不适当产生相关的病症(具体来说是血管病症)的巨大经济影响对开发药物或其它治疗以医治或改善其衰弱影响的方法具有强大的推动力。在这种以及其它疾病中，疾病状况和内源基因的明显的异常表达相关，所谓的反义化合物的使用有许多优点，例如，Milligan 等，医疗化学期刊，36：1923-1937(1993)；Uhlmann 和 Peyman，化学回顾，90：543-584(1990)；Goodchild，生物缀合物化学，1：165-187(1990)；Crooke，药物毒理学年评，32：329-376(1992)；Stein 等，科学，261：1004-1012(1993)等。

反义方法的特别令人注目的优点是：不必实施一种或多种初始的筛选步骤以鉴别能和治疗靶结合的候选化合物。如果已知基因的异常表达可引起药物治疗的疾病，然后候选反义药物的结构可从异常表达的基因的核苷酸序列自动测定。该方法仅需要提供寡核苷酸或其能以这样的基因形成稳定的双螺旋或三螺旋的类似物，或相关的靶多核苷酸，它们分别基于 Watson Crick 或 Hoogsteen 结合。将会认识到：本发明不限于特定的作用机制。这样的化合物可以具有另外的非反义链，该序列特异性地作用于依赖于其它

机制的病症，如但不限于 aptameric 作用。然后，特异性结合的反义化合物或使其各自的靶对酶促降解更敏感，或封闭翻译或加工，或以其它方式封闭或抑制靶多核苷酸的功能。

如果特定的基因被鉴别为其表达与结构蛋白质(如胶原)的合成(其对疾病状况有作用)因果相关将是十分有利的。这样的鉴别将立即导致期望通过反义方法治疗一些和这样的蛋白质过量合成有关的疾病。

发 明 概 述

本发明提供了一种治疗和胞外基质蛋白质(具体来说是胶原)的不适当合成有关的疾病的方法。该方法包括给需要这种治疗的个人施用有效量的对核原癌基因特异性的一种或多种反义寡核苷酸的步骤。如下面更完全的定义，“对核原癌基因特异性的反义寡核苷酸”是具有下列序列的寡核苷酸：(i)能和核原癌基因或细胞周期基因的 mRNA 转录物的部分形成稳定的双螺旋的序列，或(ii)能和核原癌基因或细胞周期基因的 mRNA 转录物的部分形成稳定的三螺旋的序列。优选地，本发明的反义寡核苷酸和核原癌基因或细胞周期基因的 mRNA 转录物的部分形成稳定的双螺旋。更优选地，本发明的反义寡核苷酸是对 *c-myc* 或 *c-myb* 原癌基因的 mRNA 转录物特异性的。最优选地，本发明的反义寡核苷酸是对 *c-myc* 原癌基因的 mRNA 转录物特异性的。

优选地，*c-myc* 反义寡核苷酸被局部施用到发生胞外基质蛋白质不适当合成的位点。

本发明包括用于在人的体外或体内通过把血液透析接近位点或血管移植与互补于核原癌基因 mRNA 的寡核苷酸相接触来预防血液透析接近位点和血管移植植物衰竭的方法。本发明还包括由血液透析接近位点、血管移植植物或切除的与人相容的静脉以及在这种结构的组份和组织中的本发明的寡核苷酸组成的组合物。

本发明还包括通过对组织施用治疗有效量的原癌基因反义寡核苷酸在人组织中降低瘢痕形成的方法。

本发明也包括通过施用治疗有效量的原癌基因反义寡核苷酸在人体中抑制纤维结缔组织形成的方法。

附图简要描述

图 1 描述了在动脉化之前和之后动静脉移植的例子和移植物的静脉部分的开放闭合。

图 2a 是用维尔赫夫氏染剂染色的正常猪静脉的横切面照片(放大倍数×10)。

图 2b 是用维尔赫夫氏染剂染色的动脉化的猪静脉的横切面(放大倍数×5)。

图 3a 是用 Sirius 红染色的正常猪静脉的横切面照片(放大倍数×5)。

图 3b 是用 Sirius 红染色的动脉化的猪静脉的横切面照片(放大倍数×5)。

图 4a 是用 α -肌动蛋白抗体染色的正常猪静脉的横切面照片(放大倍数×10)。

图 4b 是用 α -肌动蛋白抗体染色的动脉化的猪静脉的横切面照片(放大倍数×10)。

图 4c 是用 desmin 抗体染色的正常猪静脉的横切面照片(放大倍数×10)。

图 5a 是用增殖细胞核抗原(PCNA)染色的动脉化的猪静脉的横切面照片(放大倍数×25)。

图 5b 是以维尔赫夫氏染剂染色的动脉化的猪静脉的横切面照片(放大倍数×25)。

图 5c 是以 Sirius 红染色的动脉化的猪静脉的横切面照片(放大倍数×25)。

图 6a 是以维尔赫夫氏染剂染色的得自主动脉冠状移植物的入静脉的横切面照片(放大倍数×5)。

图 6b 是以 Sirius 红染色的得自主动脉冠状移植物的入静脉的横切面照片(放大倍数×5)。

图 6c 是以 α -肌动蛋白的抗体染色的得自主动脉冠状移植物的入静脉的横切面照片(放大倍数×5)。

图 6d 是以抗 PCNA 的抗体染色的得自主动脉冠状移植物的人静脉的横切面照片(放大倍数×50)。

图 7a 是用 PDG(血小板来源的生长因子)处理、用抗 PCNA(增殖细胞核抗原)的抗体染色并用苏木精和曙红对染的的猪静脉器官培养物的横切面照片(放大倍数×50)。

图 7b 是没有用 PDGF 处理、用抗 PCNA(增殖细胞核抗原)的抗体染色并用苏木精和曙红对染的的猪静脉器官培养物的横切面照片(放大倍数×25)。

图 7c 是用 PDGF 和寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)处理、用具有 PCNA 的抗体染色并以苏木精和曙红对染的猪动脉化的静脉的横切面照片(放大倍数×50)。

图 8a 是人静脉器官培养物与荧光素末端标记的寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)接触 2 秒后的横切面照片(放大倍数×25)。

图 8b 是人静脉器官培养物与荧光素末端标记的寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)接触 30 分钟后的横切面照片(放大倍数×25)。

图 8c 是人静脉器官培养物与荧光素末端标记的寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)接触 1 小时后的横切面照片(放大倍数×25)。

图 8d 是人静脉器官培养物与荧光素末端标记的寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)接触 2 小时后的横切面照片(放大倍数×25)。

图 9a 是以荧光素末端标记的寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)血管周围组织注射 2 小时的猪静脉横切面照片(放大倍数×50)。

图 9b 是以荧光素末端标记的寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)经皮注射 30 分钟的猪静脉横切面照片(放大倍数×50)。

图 9c 是以荧光素末端标记的寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)经皮注射 2 小时的猪静脉横切面照片(放大倍数×50)。

图 10 是损伤一个月后猪冠状动脉的例证性对照的横切面照片(即, 接收有义低聚物的注射)。

图 11 是反义处理的猪冠状动脉的例证性的横切面照片。

图 12 说明为伤害程度函数的最大新内膜区域。

图 13 描述了以在融合后的人平滑肌细胞中的原胶原 I、原胶原 III 以

及纤连蛋白的胞外水平上的 *c-myc* mRNA 的翻译起始区为靶的反义寡核苷酸的作用。

图 14 描述了 *c-myc* 反义寡核苷酸对 I 型胶原的序列特异性作用。把人平滑肌细胞和不同的对照寡核苷酸温育 (16 μ M) 24 小时, 这些寡核苷酸包括有义的 4bp 错配的和混杂的序列以及以 *c-myc* mRNA 的各种区域为靶的反义寡核苷酸 (16 μ M)。在血管中层中 I 型胶原水平在使用 Western 印迹有条件的胃蛋白酶消化之后测定。上部一组: 印迹显示出胶原 α 链。泳道 1: 无寡核苷酸; 泳道 2: 有义寡核苷酸; 泳道 3: 4 bp 错配的 ODN (称作“寡核苷酸”); 泳道 4: 混杂的寡核苷酸; 泳道 5: 以 *c-myc* mRNA 的翻译起始区 (位置 559-573, AS1) 为靶的反义链; 泳道 6: 以外显子 1 (位置 400-419, AS2) 为靶的反义链; 泳道 7: 以外显子 3 中的翻译区 (位置 1264-1283, AS3) 为靶的反义链。下部一组: 描述了从 3 个分离的试验 (平均值 \pm SEM) 的比重测定获得的对照值 (无寡核苷酸) 变化的百分比的直方图。Mis: 4bp 错配的寡核苷酸; Scr: 混杂的寡核苷酸。

图 15 描述了通过反义寡核苷酸 (AS1) 对 *c-myc* 蛋白质的抑制。融合后的平滑肌细胞在有或无反义寡核苷酸时培养 24 小时。p62 *c-myc* 通过 [³⁵S] 甲硫氨酸标记的核提取物的免疫沉淀测定, 显示出 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的放射自显影照片。

图 16 描述了寡核苷酸之后平滑肌细胞的代谢状态。把细胞在有或无寡核苷酸 (16 μ M) 时预培养 4 小时并以 [³⁵S] 甲硫氨酸标记 16 小时。在 TCA 沉淀之后测定放射性标记的蛋白质。反义寡核苷酸显示出对甲硫氨酸掺入蛋白质没有作用, 这说明了平滑肌细胞的正常代谢活动。数据说明了 dpm/10⁵ 细胞 (2 个分离试验的平均值 \pm SEM), S: 有义; MIS: 错配的; SCR: 混杂的; AS1: 以 *c-myc* mRNA 的翻译起始区为靶的反义寡核苷酸。

图 17 描述了除去 *c-myc* 反义寡核苷酸 (AS1) 之后 I 型胶原的回收。平滑肌细胞在有或无寡核苷酸 (16 μ M) 时培养 24 小时。3 次洗涤之后, 添加无寡核苷酸的血管中层, 此后收集 24 小时。I 型胶原通过胃蛋白酶消化之后以 Western 印迹测定。在除去 *c-myc* 反义寡核苷酸后测定 I 型胶原的完全回收。

图 18 描述了原 α_1 (I) 和原 α (I) mRNA 水平 *c-myc* 反义寡核苷酸的作用。

从与或不与寡核苷酸(16 μ M)温育的平滑肌细胞分离总 RNA 24 小时并通过 Northern 印迹分析(10 μ g/泳道)。反义寡核苷酸(AS1)对原胶原 α_1 (I)和原胶原 α_2 (I) mRNA 水平无作用。在反义链处理 6 小时之后进行实验产生了类似的结果。7S RNA 无变化。

图 19 描述了胞外和胞内 [14 C] 脯氨酸标记的蛋白质。使人平滑肌细胞在有或无寡核苷酸时培养 16 小时,然后在无血清的培养基中以 [14 C] 脯氨酸再标记 4 小时。在聚丙烯酰胺 SDS 凝胶上分析 [14 C] 脯氨酸标记的蛋白质。可以观察到在条件培养基中标记的蛋白质的抑制,这与在 *c-myc* 反义治疗之后胞内原胶原 α_1 (I)和 α_2 (I)增加的水平相伴随。

图 20 描述了在反义处理的和对照的人平滑肌细胞中羟脯氨酸的含量。

图 21 描述了 *c-myc* 反义处理之后对在人皮肤成纤维细胞中的胞外 I 型胶原水平的作用。

图 22 描述了与 *c-myc* 反义处理和对照的人皮肤成纤维细胞有关的胞内和胞外原胶原水平。

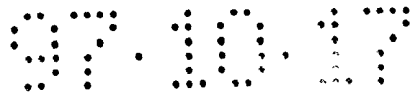
图 23 描述了在人皮肤成纤维细胞中的胞内原胶原的热稳定性。使来源于用或不用寡核苷酸处理的细胞的胃蛋白酶纯化的原胶原与胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶一起在指定的温度下温育 2 分钟,并在聚丙烯酰胺 SDS 凝胶上电泳。不管是什么处理都可观察到类似的解链温度(即大约 41 $^{\circ}$ C),这说明在 *c-myc* 反义寡核苷酸之后的原胶原 α 链的三螺旋构型。

图 24 描述了在 *c-myc* 反义处理的和对照人皮肤成纤维细胞中的原胶原 α_1 (I) mRNA 水平。

图 25 描述了用寡核苷酸处理并接触无寡核苷酸的新鲜培养基之后 24 小时 *c-myc* 反义处理的和对照人皮肤成纤维细胞中的 I 型胶原的回收。

图 26 描述了猪冠状动脉和血管周围组织的横切面图。在血管壁和邻近的血管周围组织之内评价 *c-myc* 反义寡核苷酸(SEQ ID NO: 1)的分布(放大倍数) $\times 20$ 。

图 27A-F 描述了转导管施用 30 分钟之后在冠状动脉中的 *c-myc* 反义(SEQ ID NO: 1)ODN 的分布方式。图 A 和图 B: 相同切面的相衬(Phase-contrast)和荧光显微照相证明荧光素标记的寡核苷酸的透壁定位。反义寡核苷酸存在于培养基、外膜和血管周围组织中。图 C 和 D: 相衬和荧光显



微照相显示内膜下和非透壁 ODN 分布。寡核苷酸仅可在培养基中检测到。图 E 和 F：相衬和荧光显微照相表现出中壁、非透壁的 ODN 的存在，放大倍数×62.5。

图 28A 和 B 描述了在转导管施用之后 3 天后动脉壁之内 *c-myc* 反义寡核苷酸的持续性。图 A 和 B：相同切面的各自的相衬和荧光显微照相(放大倍数×62.5)。

图 29 是一种条形图，该图描述了在壁内施用 ³⁵S-标记的硫代磷酸酯 *c-myc* 反义寡核苷酸之后和血管有关的和血管周围的放射性。在其施用后 30 分钟(空条; n=6)和 3 天(闭合条; n=4)由于 ODN 从血管周隙朝血管壁运输，可以注意到相似的总 ODN 含量。结果表现出平均值±SEM。

图 30 A-D 描述了 *c-myc* 反义寡核苷酸的转导管施用之后的血管结构的保持情况。图 A：注射 30 分钟之后，在冠状动脉壁之内荧光标记的寡核苷酸清楚可见。图 B：邻近的切片显示了保持的内部的弹性薄片和没有破坏的弹性组织的正常定位(维尔赫夫氏染剂染色)。图 C：在 ODN 截留位点出现细胞质染色和核固缩的轻微减少(苏木精和曙红染色)。图 D：与图 19 所示的切片邻近的切片，显示施用寡核苷酸 3 天之后上述变化的消退(resolution)(苏木精和曙红染色，放大倍数×50)。

图 31 描述了通过体外血管平滑肌细胞的共聚焦显微镜评价的荧光素标记的 *c-myc* 反义寡核苷酸的胞内定位。

图 32 描述了在体内壁内施用 30 分钟之后荧光素标记的 *c-myc* 的胞内定位，核定位在中层平滑肌细胞中可以观察到。

图 33 描述了在体内壁内施用 30 分钟之后荧光素标记的 *c-myc* 的胞内定位，核定位在外膜细胞中可以观察到。

定 义

本文所使用的术语“胶原”指从原胶原合成的一类分子。胶原通过细胞外部 N-和 C-末端裂解从原胶原胞外合成。抗胶原的三螺旋区域的抗体也可识别在原胶原中的三螺旋状区域。本文所用的抗体对胶原 I 和原胶原 I 或胶原 III 和原胶原 III 是特异性的。胶原也可通过胃蛋白酶消化在体外通过原胶原合成。

本文所使用的术语“移植物”指血管移植物，如动静脉或静脉移植物。

本文所使用的术语“核苷”包括天然核苷(包括2-脱氧和2-羟基形式，例如，在 Kornberg 和 Baker, DNA 复制, 第二版(Freeman, 旧金山, 1992)中所描述的)。有关核苷的“类似物”包括具有修饰的碱基部分和/或修饰的糖部分的合成核苷，例如，由 Scheit, 核苷酸类似物(John Wiley, 纽约, 1980)中一般描述的。这样的类似物包括设计用于提高结合性质的合成核苷，例如，双或三螺旋的稳定性、特异性等。

本文所使用的术语“寡核苷酸”包括能通过单体-单体相互作用的有规律的方式(如 Watson-Crick 型的碱基配对, Hoogsteen 或逆 Hoogsteen 型的碱基配对等)特异性地结合到靶多核苷酸上的天然或修饰单体或结合的线性低聚物，包括脱氧核苷、核苷、其 α -端基异构形式、聚酰胺核酸等。通常单体由磷酸二酯键或其类似物连接以形成大小从几个单体单元(例如，3-4个)到数百单体单元的寡核苷酸。除非特别指出，无论何时，寡核苷酸由字母序列代表(如“ATGCCTG”)，就可以理解为核苷酸是从左至右的5 \rightarrow 3顺序，“A”指脱氧腺苷，“C”指脱氧胞苷，“G”指脱氧鸟苷，“T”指胸苷。磷酸二酯键连接的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、砷代磺酸磷酸酯、砷代磺酸二磷酸酯、phosphoroanilothioate、偶磷酰苯胺酯、氨基磷酸酯、3 \rightarrow 5氨基磷酸酯等，以下有更完整的描述。

有关双或三螺旋形成的“稳定性”大致的意思是指反义寡核苷酸和其预期的靶序列结合得多紧；更精确地说，它是指在生理条件下双或三螺旋形成的自由能。在一组标准的条件(例如，如下所述的)之下的解链温度是双和/或三螺旋稳定性的方便的测定。优选地，选择本发明的寡核苷酸使其在下述的标准条件下其解链温度至少为50 $^{\circ}$ C；这样，在生理条件和优选的浓度下，双或三螺旋的形成实质上对反义寡核苷酸和它的靶解离的状态是有利的。可以理解：在某些实施方案中稳定的双或三螺旋包括在三螺旋的情况下碱基对之间和/或在碱基密码子中的错配。如在 SEQ ID NO: 1 的情况下，它是与可比较的猪序列相比在最后核苷酸中有一个碱基错配的人序列。优选地，本发明的反义寡核苷酸与其靶多核苷酸形成完美地匹配的双和/或三螺旋。

在生物学领域中的所使用的术语“合成”指参与生物分子(具体来说是

胞外基质分子和胞外基质蛋白质)产生的过程。在细胞内部和外部,术语“合成”包括形成生物分子的过程,例如但不限于 mRNA 转录、mRNA 翻译、翻译后蛋白质修饰、糖基化、肽酶裂解、细胞外肽酶裂解、细胞内肽酶裂解、蛋白质运输、蛋白质分泌和蛋白质磷酸化。优选地,本发明抑制胞外基质分子的蛋白质翻译、翻译后蛋白质加工、蛋白质分泌或胞内肽酶裂解。

发 明 详 述

本发明涉及使用某些反义化合物抑制组织中胞外基质蛋白质(具体来说是胶原,更具体来说是 I 型和 III 型胶原)的不适当合成。胞外基质蛋白质的不适当和/或过量合成可导致表现出形成,例如,不需要的纤维结缔组织的疾病。这样的疾病包括通常在受治疗者中发现的骨质疾病、血管再狭窄、动脉粥样硬化、arogenesis、瘢痕瘤疾病、肝脏硬化、关节风湿病疾病、动静脉和静脉移植物开放的衰竭、手术后的伤痕、重建性的手术等。一系列的组织类型都可以是这样的不适当合成的位点,包括血管平滑肌细胞、内皮细胞、皮肤和器官成纤维细胞,例如,在瘢痕瘤疾病或创伤后或手术后瘢痕形成中以及滑液细胞和其它关节组分中。本发明的一个实施方案在预防动静脉和静脉移植物开放的衰竭或封闭上是尤其有用的。本发明的另一个实施方案在治疗再狭窄、急性血管损伤中是特别有用的,典型地在受治疗者血管成形术之后。再狭窄和平滑肌细胞迁移至血管内膜、增殖以及胞外基质组分的合成有关,例如, Holmes 等,在 Vlietstra 等中的第 12 章,编者, PTCA (Davis 公司, 费城, 1987)。

通过对具有靶多核苷酸的组织施用治疗有效量的反义化合物可抑制胞外蛋白质的不适当(即过量)合成。靶多核苷酸可以是单链或双链 DNA 或 RNA; 然而,单链 DNA 或 RNA 靶是优选的。本发明的核致癌基因的基因组核苷酸序列和 mRNA 转录物在本领域中是已知的,包括 *c-myc*、*c-myb*、*c-fos*、*N-myc*、*L-myc*、*p53*、*c-rel*、*c-Ski*、*c-ets-1*、*c-ets-2* 等,例如, Glover 编辑的《致癌基因》(IRL 出版社, 牛津大学, 1989)。更具体地说, *c-myc* 和 *c-myb* 序列在下列参考文献中描述: *c-myc* 原癌基因序列在 Marcu 等, 生物化学年评, 61: 809-860(1992); Watt 等, 自然, 303: 725-728(1983); Battey 等, 细胞, 34: 779-787(1983); 和 Epstein

等, NTIS 出版物 PB93-100576 中描述; *c-myb* 原癌基因在 Gewirtz 等, 美国专利 5,098,890 和 Majello 等, 美国科学院学报, 79: 9636-9640(1986) 中描述。此外, 增殖细胞核抗原、细胞周期蛋白(D₁和 B₁)、cdc2 激酶、cdk 激酶和 E2F 可作为靶(本文称作“细胞周期基因”)。优选地, 通过作为本发明的反义寡核苷酸靶的核原癌基因是 *c-myc* 和/或 *c-myb*。

可以理解: 本发明的 *c-myc* 反义寡核苷酸指导的靶包括原癌基因的等位形式。如果已知靶多核苷酸的序列, 在文献中有选择反义寡核苷酸的特定序列的指导, 例如, Ulmann 等(以上引用); Crooke(以上引用); Zamecnik 和 Stephenson, 美国科学院学报, 75: 280-284(1974)。优选地, 选择 *c-myc* 反义化合物的序列以使 G-C 含量至少为 60%。优选的寡核苷酸序列选自 SEQ ID No. 1, 5-7 或 8-11 的 12 至 15 个邻接的碱基。优选的 mRNA 靶包括 5' 帽位点、tRNA 引物结合位点、起始密码子位点、mRNA 供体接合位点、mRNA 受体接合位点等, 例如, Goodchild 等, 美国专利 4,806,463。当选择以在第二外显子中的人 *c-myc* ATG 起始位点为靶的反义寡核苷酸时, 可以使用长度为 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 个碱基对并选自在 ATG 位点任一侧的二十五个碱基区(5' cccgc tccagcagcc tcccgcgacg ATG cccctcaacg ttagcttcac caaca 3')的寡核苷酸施用具有连续序列的反义寡核苷酸(人序列得自 Gazin 等, E.M.B.O. 杂志: 3: 2: 383-387(1984), 本文一并参考了其序列)。优选地反义寡核苷酸包含 ATG 位点。在 SEQ ID NO: 6 和 7 的任何一侧的区域也用于选择在本段中讨论的大小的寡核苷酸。

本发明的反义寡核苷酸可包括任何能够通过单体-核苷相互作用的有规律的方式(如 Watson-Crick 型的碱基配对、Hoogsteen 或逆 Hoogsteen 型的碱基配对等)特异性地结合到靶多核苷酸上的多聚化合物。本发明的反义化合物也可包含侧基或部分, 它们或作为聚合物的基本重复单位的部分或从其分离以提高特异性、核酸酶抗性、运送或其它与效能有关的性质, 例如, 胆甾醇部分, 双嵌入物(intercalators)(如吡啶、聚-L-赖氨酸), 具有一种或多种核酸酶抗性的连接基团的“末端帽”如硫代磷酸酯等。在本发明中有用的某些代表性的寡核苷酸序列包括在本文所附的序列表中。

本发明的反义化合物包括其药理学上可接受的盐，包括碱土金属（例如，钠或镁）、铵或 NX_4^+ ，其中 X 是 C_1-C_4 烷基。其它药理学上可接受的盐包括有机羧酸（如酒石酸、苹果酸、羟乙磺酸、乳糖酸和琥珀酸）、有机磺酸（如甲磺酸、乙烷磺酸和苯磺酸）、无机酸（如盐酸、硫酸、磷酸）和氨基磺酸的盐。具有羟基的化合物的药理学上可接受的盐包括与适合的阳离子（如 Na^+ 、 NH_4^+ 等）组合的这种化合物的阴离子。

优选地通过提供核酸酶抗性的内核苷连接键把核酸酶抗性转移给本发明的反义化合物。许多这样的连接键在本领域中是已知的，例如，硫代磷酸酯：Zon 和 Geiser，抗癌药物设计，6：539-568(1991)；Stec 等，美国专利 5,151,510；Hirschbein，美国专利 5,166,387；Bergot，美国专利 5,183,885；二硫代磷酸酯：Marshall 等，科学，259：1564-1570(1993)；Caurars 和 Nielsen，国际申请 PCT/US89/02293；氨基磷酸酯 (phosphoramidates)，例如，具有 R^1 和 R^2 氢或 C_1-C_3 烷基的 $-OP(=ONR^1IR^2)-O-$ ：Jager 等，生物化学，27：7237-7246(1988)；Froehler 等，国际申请 PCT/US90/03138；3 \rightarrow 5 氨基磷酸酯（如在 Gryaznov 等 PCT 申请 PCT/US95/03585 中所述的，本文一并参考了其化合物和方法）；肽核酸：Nielsen 等，抗癌药物设计，8：53-63(1993)，国际申请 PCT/EP92/01220；甲基磷酸酯：Miller 等，美国专利 4,507,433，Ts o 等，美国专利 4,469,863，Miller 等，美国专利 4,757,055；以及各种类型的 P-手性连接键，特别是硫代磷酸酯，Stec 等，欧洲专利申请 92301950.9 和 Lesnikowski，生物有机化学，21：127-155(1993)。其它的核酸酶连接键包括硒代磺酸硒代磺酸磷酸酯、硒代磺酸二磷酸酯、phosphoroanilothioate、偶磷酰苯胺酯、烷基磷酸三酯（如甲基和乙基磷酸三酯）、碳酸盐（如羧甲酯、氨基甲酸、吗啉氨基甲酸、3-thioformacetal、甲硅烷基如二烷基 (C_1-C_6)-或二苯甲硅烷基、氨基磺酸酯等。这样的将其导入寡核苷酸的连接和方法在许多参考文献中有描述，例如，通常由 Peyman 和 Ulmann 综述（以上引用）；Milligan 等（以上引用）；Matteucci 等，国际申请 PCT/US91/06855。优选地，磷酸二酯键连接的磷类似物用于本发明的化合物，如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酸酯或甲基磷酸酯。更优选地，硫代磷酸酯用作为核酸酶抗性的连接键。可以

理解：除了优选的连接基团之外，本发明的化合物可以包含其它的修饰，例如，硼酸化的碱基，Spielvogel 等，5,130,302；胆甾醇部分，Shea 等，核酸研究，18：3777-3783(1990)或 Letsinger 等，美国科学院学报，86：6553-6556(1989)；嘧啶的 5-丙烯基修饰，Froehler 等，Tetrahedron Lett., 33：5307-5310(1992)等。

优选地，通过常规方式在市售的自动 DNA 合成仪上合成本发明的反义化合物，例如，Applied Biosystem(Foster 市，CA) 380B，392 或 394 型 DNA/RNA 合成仪。优选地，使用亚磷酰胺化学法，例如，在下列参考中公开的：Beaucage 和 Iyer，Tetrahedron，48：2223-2311(1992)；Molko 等，美国专利 4,980,4601；Koster 等，美国专利 4,725,677；Carurs 等，美国专利 4,415,732；4,458,066；和 4,973,676 等。

在需要三螺旋形式的实施方案中，对靶序列的选择有限制。通常，提高 Hoogsteen 型结合的第三链和在双链靶中的同嘧啶-同嘌呤途径结合最稳定。通常，在 T-A*T 或 C-G*C 基元(其中“-”表示 Watson-Crick 配对，“*”表示 Hoogsteen 型结合)中形成碱性三螺旋；然而，其它基元也可能形成。例如，基于条件和链的组合，Hoogsteen 碱基配使得可以在第三链(Hoogsteen 链)和第三链结合的双螺旋中富含嘌呤的链之间的方向是平行的和反平行的。在文献中对选择适当的序列、方向、条件、核苷类型(例如，不论使用核糖或脱氧核糖核苷)、碱基修饰(例如，甲基化的胞嘧啶等)有广泛的指导以便例如在特定的实施方案中充分发挥或以其它方式调节所要求的三螺旋的稳定性，例如，Roberts 等，美国科学院学报，88：9397-9401(1991)；Roberts 等，科学，258：1463-1466(1992)；Distefano 等，美国科学院学报，90：1179-1183(1993)；Mergny 等，生物化学，30：9791-9798(1991)；Cheng 等，I. Am. Chem. Sec., 114：4465-4474(1992)；Beal 和 Dervan，核酸研究，20：2773-2776(1992)；Beal 和 Dervan，I. Am. Chem. Sec., 114：4976-4982(1992)；Giovannangeli 等，美国科学院学报，89：8631-8635(1992)；Moser 和 Dervan，科学，238：645-650(1987)；McShan 等，生物化学杂志，267：5712-5721(1992)；Yoon 等，美国科学院学报，89：3840-3844(1992)；Blume 等，核酸研究，20：1777-1784(1992)等。

寡核苷酸部分的长度足够大以确保特异性结合仅发生在所需的靶多核苷酸上而非其它偶然的位点上，如在许多参考文献中所解释的，例如，Rosenberg 等，国际申请 PCT/US92/05305；或 Szostak 等，Meth. Enzymol. 68: 419-429 (1979)。长度的上限取决于几个因素，包括合成和纯化长度大于大约 30-40 核苷酸的低聚物的不便和花费、更长寡核苷酸比较短的寡核苷酸对错配的更大耐受力、增强结合或特异性的修饰是否存在、双或三螺旋的结合是否是所需的等。通常，本发明的反义化合物的长度范围大约是 12 至 60 个核苷酸、例如 20-60 个核苷酸。优选地，本发明的反义化合物的长度范围在大约 15 至 40 个核苷酸；更优选地，它们的长度范围大约是 18 至 30 个核苷酸。

优选地，本发明的反义化合物的热稳定性取决于解链或链解离曲线。50% 链解离的温度作为解链温度 T_m ，它反过来提供了测定稳定性的方便方法。 T_m 测量典型地在中性 pH 值下的盐溶液中进行，靶和反义寡核苷酸的浓度大约是 1.0-2.0 μM 。典型的条件如下：在 10mM 磷酸钠缓冲液中 (pH 7.0) 或 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 或类似的条件中的 150mM NaCl 和 10mM MgCl_2 。通过把反义寡核苷酸/靶多核苷酸复合物的样品从室温加热至大约 85-90 $^{\circ}\text{C}$ 积累解链曲线的数据。在样品温度增加时，以 1 $^{\circ}\text{C}$ 间隔监测 260nm 光的吸光度，例如，使用 Cary (澳大利亚) 1E 型或 Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) 型 HP 8459 UV/VIS 分光光度计和 HP 型 89100A 温度控制仪或类似的仪器。这样的技术提供了测定和比较不同长度和组合的反义寡核苷酸的结合强度的方便的方法。

本发明的另一个方面是用于抑制胞外基质蛋白质合成的药物组合物，该组合物包含药学上可接受的赋形剂和对核原癌基因特异性的反义寡核苷酸，在施用到需要它的受治疗者中时，这种反义寡核苷酸以足以抑制胞外基质蛋白质合成的量存在。这样，本发明的反义寡核苷酸用作这样的药物组合物的一种或多种组分。本发明的药物组合物的组分取决于几个因素，包括所治疗的疾病或病症的性质、疾病损伤的位置、药物施用的方式和/或所考虑的施用，后者可包括通过导管进入靶损伤部位或器官的体内施用、局部应用、鼻内施用、提供移植或经眼的持续释放系统的施用等。

本发明的药物组合物包括药物载体，该载体可包含提供各种功能 (包括药物浓度的调节、溶解性的调节、化学稳定性、粘性的调节、吸收增强、

pH 值的调节等) 的各种组分。例如, 在水溶性制剂中, 药物组合物优选地包括缓冲液(如磷酸缓冲液)或其它有机酸盐, pH 值优选地在大约 7 和 8 之间。对包含微溶性反义化合物的制剂, 可以使用微乳剂, 例如通过使用非离子表面活性剂如 0.04-0.05% (w/v) 量的 Tween 80 以增加溶解性。其它组分可包括抗氧化剂, 如抗坏血酸、亲水聚合物(如单糖、二糖和其它碳水化合物, 包括纤维素或其衍生物、糊精)、螯合剂(如 EDTA) 以及那些在药学科学中已知的组分, 例如, Remington 药学科学, 最新版(Mack 出版公司, Easton, PA)。

适用于本发明的药物组合物的持续释放系统包括片状、微囊体等形式的半渗透的聚合物基质, 它包含聚交酯、L-谷氨酸的和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物、聚(2-羟乙基异丁烯酸)以及类似的物质, 例如, Rosenberg 等, 国际申请 PCT/US92/05305。持续释放系统也包括进入微脂粒的反义化合物。例如, 在脂质体技术, 第 II 卷, 药物、蛋白质和遗传物质掺入(CRC 出版社)中所述的。

特定应用的 *c-myc* 反义寡核苷酸的有效量取决于几个因素, 包括反义寡核苷酸的化学性质、所治疗的疾病、施用的方法等。优选地, 有效量对靶多核苷酸提供浓度大约在 1 至 100 μ M 之间的 *c-myc* 反义寡核苷酸; 更优选地, 有效的量对靶多核苷酸提供浓度大约在 1 至 10 μ M 之间的 *c-myc* 反义寡核苷酸。

对于血管疾病, 如再狭窄, 对核原癌基因特异性的反义寡核苷酸优选地通过导管局部施用到受损伤的动脉中。优选地, 施用到再狭窄损伤的反义寡核苷酸对 *c-myc* 和/或 *c-myb* 是特异性的; 更优选地, 可使用对 *c-myc* 和/或 *c-myb* 特异性的反义寡核苷酸的组合以减少和再狭窄相关的胞外基质蛋白质的合成。典型地, 再狭窄发生在引起动脉壁的局部破坏或损伤的方法(如经皮透照冠状血管成形术(PTCA))之后。对这样的损伤发生反应, 堵塞损伤常引起下列现象: 在损伤位点动脉的发炎、血栓形成、通过迁移和增殖的平滑肌细胞的积累、胞外基质的平滑肌细胞和成纤维细胞合成。

对于血管移植疾病, 优选地把寡核苷酸施用到移植物周围的结缔组织中以预防移植物衰竭。通常, 当移植物的开放减少到 50% 或更多时衰竭发生。可以认识到: 寡核苷酸的运送(如本文的技术所述)可以靶向到动静脉移植

物(例如但不限于, 修复的瘘(包括 PTEE (Gortex 或 Impra)、聚(醚尿烷)、涤纶、人脐带、遗传过程的静脉和免疫抑制的牛或猪血管)、动静脉分流器、天然静脉瘘(包括辐射状动脉-头静脉(Brescia-Cimino)、尺骨或辐射状动脉-贵要静脉、臂动脉-头或臂脉和股动脉-隐移植))以及静脉移植(例如但不限于, 使用免疫抑制的隐静脉异源移植物的静脉移植、免疫抑制的脐静脉异源移植、遗传工程的静脉、免疫抑制的异种移植、静脉自体组织移植以及任何其它与人相容的静脉, 即, 可移植到人组织中的移植组织和物质)。

对于以预防血管移植衰竭(特别是动静脉移植衰竭)的寡核苷酸的血管周围施用, 通常把本发明的寡核苷酸注射进预期使用的位点周围的血管周围组织中。在实例中是持续地注入指明的寡核苷酸, 如注入具有动静脉移植开放严重和迅速封闭的已知历史的患者中, 也可以使用其它类型的施用系统如皮下注入泵、铸模进移植并优选地与人血清蛋白以 1:10 至 1:100 的蛋白质和寡核苷酸的比例混合的凝胶和生物可降解基质、凝胶(如 pluronic、Hydron 或 乙烯-乙烯醋酸盐凝胶)、凝胶(由 Edelman 等, 循环研究, 76: 176-182(1995) 和 Edelman 等, 美国科学院学报, 87: 3773-3777(1990) 描述, 本文一并参考了其方法)、内在的导管系统(如 Broviac 导管或完全内在的导管贮器系统, 如由 Poletti 等, J. Neurosurg., 55: 581-584 描述的, 本文一并参考了其方法)、灌输的 PTFE 管、其它灌输的生物相容的物质或本文所述的其它药物施用组合物和系统。可以认识到: 为了延长寡核苷酸的施用期限, 可以建造贮器以在和位点极其接近处释放寡核苷酸。可以简单地通过在手术期间或之后、但在创伤愈合之前把寡核苷酸注射进血管周围组织或通过触诊动静脉移植之后经皮注射以建造贮器, 如同在动静脉瘘的情况下, 例如, 通过在本领域中已知的方法, 例如, 声波图指导注射。为了进一步治疗可重复注射(如在血液透析接近位点中)。不必要也不需要从血管中取下外膜, 因为血管周围组织可作为寡核苷酸的贮器, 这种贮器具有较慢的扩散速率。在贮器的寡核苷酸在通过循环系统进行时比管腔内导管施用更缓慢。对于经皮或血管周围施用, 施用的剂量在每血管.1 mg 至 100 mg 的范围内, 优选地是.25mg 至 50mg, 更优选地是每次施用.5mg 至 10mg。

除了预防移植衰竭的寡核苷酸的血管周围组织施用之外, 其它构造上的结构(如内皮层、血管中层和外膜)可用作贮器位点, 特别是当寡核苷酸

不从血管管腔中应用时。本发明提供了一种组合物，该组合物包含一条切除的与人相容的静脉和位于所说的与人相容的静脉的血管壁中的反义寡核苷酸，其中所说的反义寡核苷酸是对核原癌基因特异性的，并且位于选自内皮层、血管中层和外膜组成的组的所说血管壁的至少一层中。

这样天然产生的贮器位点(包括血管周围组织)具体来说对治疗动静脉移植物有用，更具体来说是动静脉分流器(其中血管中层或弹性层是完整而非切开的，即使是外科损伤。使用邻近动静脉移植物的静脉部分的位点是特别有利的，特别是动静脉瘘管的静脉部分或分流器。动静脉瘘的静脉部分形成静脉部分瘘，如在图 1 中用箭头说明的。可以认识到：非天然产生的贮器也可应用具有寡核苷酸的衰竭移植物，如图 1 中灰色区域所示的。本文讨论了其实例。当使用非天然产生的贮器时，优选地是它们是生物可降解的或可再充填的。可再充填贮器优选地是两种类型：1) 可固定在动静脉移植物的静脉部分的上游并在用于形成动静脉移植物的 PTFE 管或其它生物相容的物质中或沿着它们的可再充填贮器，2) 固定在动静脉移植物周围的血管周围组织中的贮器，优选地是在动静脉移植物的静脉部分的 5cm 之内，更优选地是在 2cm 之内，而且可以经皮注射的针再充填。这样的非天然产生的血管周围贮器可在手术期间移植以形成动静脉移植物。可再充填的血管周围的贮器可以由用于胸部移植物的物质构成，并且优选地用于和允许寡核苷酸扩散至血管周围组织中的半透膜结合。

对于体外应用寡核苷酸的防止静脉制成的血管移植物衰竭(特别是旁路过程)而言，将静脉在体外与互补于核原癌基因 mRNA 的寡核苷酸接触。通常将静脉在 20℃ 至 37℃ 的温度下于无菌的和生理上可接受的缓冲液中温育至少 10 分钟。在特别高的浓度下可以进行更短的时间。30 至 90 分钟的更长时间的温育也是适合的，并与在这样的方法中实验的除去静脉和移植之间的时滞是相容的。也可以使用更低的温育温度，如 4℃，尤其是当静脉必须从远程的供体部位运输时，它通常和更高浓度的寡核苷酸结合。依赖于温育时间长度、寡核苷酸的类型和温度，通常寡核苷酸的浓度变化在 5 到 500 μ M 之间。优选地，温育时间在 22 至 37℃ 的温度范围内是 30 至 60 分钟。优选的寡核苷酸浓度是从 10 至 100 μ M，更优选的是 25 至 100 μ M。可以认识到：可以使用许多类型的缓冲液，只要它们是生理上可接受的，如 0.9% 的盐水(NaCl)或磷酸缓冲液盐水以及本文所述的其它缓冲液和盐。

可以认识到：许多类型的静脉（包括非人静脉、遗传工程哺乳动物（具体来说是猪）静脉以及许多人静脉）可以与本发明一起使用以形成异源移植物和自体组织移植物（如隐静脉、头静脉、贵要静脉、臂脉和股静脉）。

对于血管内应用（例如，预防血管成形术后的再狭窄），反义寡核苷酸优选地经由导管从腔内部在损伤部位附近施用，或通过外膜（即血管壁的最外层）和帮助反义化合物缓慢释放的物质施用，例如，由 Simons 等，自然，359：67-70(1992)描述的 pluronic 凝胶系统或 Fernandez-Ortiz, A. 等，循环，89：1518-1522(1994)描述的多孔囊或离子电渗囊，本文一并参考了其方法。其它用于局部施用的缓慢释放技术包括具有反义化合物的包衣斯坦特固定模，例如，使用结合剂或凝胶，在 Wilensky 等，心血管医疗趋势，3：163-170(1993)中描述的。在靶损伤部位施用的剂量是用于药物组合物的每种或两种反义化合物 $1\mu\text{g}$ 到 10mg 。优选的剂量范围在 $1\mu\text{g}$ 和 1mg 之间；更优选地，剂量范围在 $1\mu\text{g}$ 和 $10\mu\text{g}$ 之间。优选地，施用时间在大约 30 秒到 60 分钟的范围内，更优选地是在大约 30 秒至大约 1-2 分钟的范围中，例如，Zalewski 等，Goldberg，79-87 页，编辑，冠状血管成形术 (Davis，费城，1988)。

对于导管施用，施用的剂量在每动脉 1mg 至 10mg 的范围内，优选地是每动脉 5mg 至 4mg ，更优选地是每动脉 5mg 至 2mg 。施用剂量是施用到组织中的药物的量，但是“在靶损伤部位施用的剂量”是施用到组织之后在组织中的药物的量。

冠状血管成形术技术对本领域技术人员来说是熟知的，并在这样的综合性论文中详尽地描述，Clark，冠状血管成形术 (Liss，纽约，1987)，Vlietstra 等(以上引用)等。

对于皮肤中过量瘢痕的形成，例如，手术后瘢痕、瘢痕瘤疾病等，优选地是局部或真皮内应用以抑制胞外基质蛋白质合成，具体来说是通过皮肤成纤维细胞的胶原合成。

对于局部施用，施用剂量(施用到组织的药物的量)通常在每 cm^2 $0.01\mu\text{g}$ 到 10mg 药物之间，优选地每 cm^2 $2\mu\text{g}$ 至 7mg 药物之间，更优选地是每 cm^2 0.5 至 4mg 药物之间。用于手术后敷裹的施用剂量优选地是每 cm^2 2mg 至 4mg 药物。用于治疗皮肤擦伤、皮肤损害、痤疮和外科后治疗的局部乳油所用

的施用剂量优选地是每 cm^2 .05mg 至 3mg 药物。

对于泌尿学疾病(这些疾病导致尿道、输尿管或膀胱伤痕或狭窄), 经由导管的局部施用或用反义寡核苷酸包衣的移植物是优选的。

对于包含平滑肌细胞和成纤维细胞的内部器官(如胃肠器官、胆汁管、肺脏和肝脏)的过量伤痕, 可全身或局部施用反义化合物。局部施用包括把反义寡核苷酸直接注射进靶器官, 通过移植的凝胶或聚合物施用, 或从包衣斯坦特固定模或其它修复物质缓慢释放。

对于以上所述的每种疾病, 选择治疗的患者的标准和评价治疗终点的方法在涉及特定疾病的领域中是熟知的。例如, 就血管再狭窄而言, 与对条件的敏感性有关的因素包括男性、旁路移植物狭窄的扩张、在基线的 3 或 4 级加拿大心脏以及心肌梗塞的历史, Holmes 等, Vlietstra 等, 第 12 章, 编辑, PTCA(Davis 公司, 费城, 1987)。治疗的效果以和任何 PTCA 技术相同的方式评价。通常, 目视评价结果, 但是可以使用其它技术。血液透析接近位点衰竭的评价包括颜色多普勒超声, 反差血管造影照片和超声(例如, Dousset 等, 发射学, 181: 89(1991)。Nonnast-Daniel 等, Lancet, 339(8786): 143(1992)和 Davidson 等, 国际肾杂志 40: 91-95(1991), 本文一并参考了其方法)以及体格检查结果(如在接近位点上的高度杂音或水锤脉搏)。狭窄或再狭窄严重度的评价(测定 PTCA 的候选者或 PTCA 的结果)从损伤的可视性观察至所说的动脉的尺寸的基于计算机的分析的复合物, 例如, 从 tomographical 数据、在远侧的血管床上的流动、狭窄的光密度特征, 或在损伤区改变的区域壁运动, 例如, Bove, Vlietstra 等, 第 9 章(以上引用)。

实施例 1. 动脉化的猪静脉的重铸模 - 动静脉移植物开放封闭的体内模型

为了证明本发明的寡核苷酸在降低动静脉移植物的静脉部分中的胞外基质蛋白质产生的效能, 首先在猪中开发了体内模型。该模型使得可以监控动静脉移植物(包括移植物的静脉部分)的开放。

在猪动脉化的静脉模型中, 切除隐静脉然后使其末端-对-末端地和颈动脉吻合。手术完成后, 使动脉血流恢复正常的动脉压(Violaris 等, Ann.

Thorac. Surg., 53 : 667-71(1995) 和 Angelini 等, J. Thorac. Cardiovas. Surg, 99 : 433-9(1990), 本文一并参考了其方法)。在末端-对-末端隐静脉移植物的动脉压模拟静脉在动静脉或静脉移植中接触动脉压。除非特别指出, 移植形成 8 天后, 除去静脉移植物的静脉部分并切片进行组织分析。正常的冠状静脉(不和动脉压接触, 也不移植)用于比较。

正常的静脉(不和动脉压接触, 也不移植)没有显示出变厚的血管周围组织、具有少量结缔组织和松散的脂肪组织的血管周围空间以及稀薄而未破的血管中层, 如图 2a 所示(维尔赫夫氏染剂染色)。移植物的静脉部分表现出血管周围组织的增加, 这种组织作为具有大量肉芽组织的环围绕在血管中层的周围。这是通过维尔赫夫氏染剂染色显示的, 在图 2b 中显示。相同的切面也显示出没有解剖的完整而未破的血管中层。在某些切面与手术之后 8 天和 14 天后观察到了新内膜。

正常的静脉(不和动脉压接触, 也不移植)显示出以 Sirius 红染色的少量松散的血管周围和血管中层, 如在图 3a 中所示的。相对而言, 早在八天时, 移植物的静脉部分就在血管周围组织中显示出胶原沉积的增加。Sirius 红可染色大量稠密的血管周围胶原, 纤丝胶原(包括 I 和 III 型)的特异性染色如图 3b 所示。血管中层显示出比血管周围组织染色少。在有新内膜的切面中, 胶原清楚地存在。

正常的静脉(不和动脉压接触, 也不移植)没有显示在血管周围的 α -肌动蛋白以及使用 α -肌动蛋白抗体的外膜层。仅在血管中层的平滑肌细胞被 α -肌动蛋白染色为阳性, 如图 4a 所示。相对而言, 移植物的静脉部分显示出在血管中层和外膜中 α -肌动蛋白合成的增加。 α -肌动蛋白抗体特异性染色在血管中层的大量 α -肌动蛋白, 如图 4b 所示。在血管中层的染色表明在血管中层存在着合成 α -肌动蛋白的平滑肌细胞。外膜也显示出 α -肌动蛋白染色, 这表明肌纤维细胞合成 α -肌动蛋白。血管周围组织也显示出一些 α -肌动蛋白染色。

静脉也染色结蛋白, 这通过血管平滑肌细胞使用抗结蛋白抗体表示。正常的静脉(不和动脉压接触, 也不移植)仅显示出在血管中层有结蛋白染色, 如图 4c 所示。相似地, 静脉移植物的静脉部分仅在血管中层的平滑肌

细胞显示出结蛋白染色。血管中层的大量平滑肌细胞用结蛋白抗体染色为阳性(数据未显示)。在血管周围组织或外膜中没有观察到结蛋白染色,这表明了两组 α -肌动蛋白合成细胞;一组位于血管中层(平滑肌细胞;结蛋白阳性, α -肌动蛋白阳性),一组位于外膜(成纤维细胞和肌纤维细胞;结蛋白阴性, α -肌动蛋白阳性)。

移植物的静脉部分显示出在血管中层和血管周围组织中细胞增殖的增加。在血管中层和血管周围组织中大量的增殖细胞用对增殖细胞核抗原(PCNA)——细胞增殖的标志——特异性的抗体染色,如图5a所示。比较而言,以维尔赫夫氏染剂染色(图5b)和Sirrius红染色(图5c)类似的切片。在这张切片中,在图5b中可观察到早期新内膜从移植物静脉腔的一些细胞作为薄的黑层的形成。新内膜通常无静脉。和血管中层比较,在高放大倍数下在血管周围组织中的胶原的染色更深是更明显的,如图5c所示。PCNA染色也可定量表示:在移植静脉的细胞中的30%被PCNA染色为阳性,而非移植静脉的细胞中不到百分之一被PCNA染色为阳性。

这些结果证明:在结缔组织和移植静脉的血管壁中通过成纤维细胞、肌纤维细胞和平滑肌细胞产生胞外基质的较早的增加对高动脉压有反应。在静脉周围的组织厚度和细胞增殖的增加(包括在血管周围空间中的结缔组织(瘢痕形成))可以阻止静脉对动脉血压的有利扩张。

在血管细胞(例如,平滑肌细胞和成纤维细胞)中抑制胞外基质的产生(例如,胶原合成)在实施例6,9和13中也具体显示出。

实施例2. 人动脉化的静脉—动静脉移植物的开放封闭模型

为了证明在人体中由于静脉的动脉化胞外基质产生的增加,研究了从旁路手术动脉化的人静脉。得自人体的静脉是另人惊奇的,因为根本没有检测到细胞增殖,然而,在血管壁中存在显著的胶原染色。

把作为主动脉冠状旁路移植物的入隐静脉在诊断到闭塞大约两年之后从患者体内除去。动脉血流使静脉接触正常的动脉压。对主动脉冠状移植物的静脉部分切片进行组织学分析。

人主动脉冠状移植物的静脉部分表现出血管周围组织和新内膜厚度的增加。这通过维尔赫夫氏染剂染色显示,如图6a所示。注意变厚的新内膜取代血管中层和静脉开放的封闭。由于静脉内部直径的减小,这种特殊的

静脉被部分堵塞。相对而言，正常的人隐静脉(不和动脉压接触，也不移植)没有显示出变厚的血管周围组织和稀薄的、未受损伤的和未解剖的血管中层(数据未显示)。

在血管周围组织与血管中层中，主动脉冠状移植的人静脉部分也显示出大量的胶原。在血管周围组织与血管中层中的大量的胶原以 Sirrius 红染色(纤丝胶原(包括 I 和 III 型)的特异性染色)呈阳性，如图 6b 所示。

用对 α -肌动蛋白特异性的抗体染色时，除了在血管滋养管中染色呈阳性外，移植的人静脉部分在新内膜中显示出少量 α -肌动蛋白，而在血管周围组织中没有 α -肌动蛋白，如图 6c 所示。在血管中层与血管周围组织中没有染色表明极少有细胞产生 α -肌动蛋白。代替 α -肌动蛋白染色的阳性，这些切片在对胶原染色更深的图 6b 中显示，这表明瘢痕组织填充在血管周围组织和血管壁中。

在血管中层与血管周围组织中，动静脉移植的人静脉部分没有显示出细胞增殖。在血管中层与血管周围组织中没有细胞被对增殖细胞核抗原(PCNA)——细胞增殖的标志——特异性的抗体染色，如图 6d 所示。即使在 $\times 25$ 的放大倍数下也极少发现阳性染色的细胞。也对 PCNA 染色定量测定，在移植的人静脉中少于百分之一对 PCNA 染色呈阳性。

实施例 3. 人和猪血管器官培养 - 非腔施用寡核苷酸的效果和抑制血管对损伤反应的模型

为了证明在动静脉分流器或旁路过程之后本发明的寡核苷酸在降低胞外基质蛋白质产生和血管危害的结果，首先开发了器官培养模型。该模型使得可以监测本发明的寡核苷酸的摄取、通过血小板衍生的生长因子 B-链(本文作为“PDGF”)刺激血管细胞并通过本发明的寡核苷酸抑制血管细胞的 PDGF 刺激作用。

为进行猪血管器官培养，切除内部乳房的或颈动脉($n=3$)，并把厚度大约 5-15mm 的环切下来。该环在器官培养条件下培养如下指出的不同时间。对于人血管培养模型，从经历旁路手术的患者中除去隐静脉。在完成切除后，把未用过静脉片断厚度大约 5-15mm 的环切下来。

要评价 *c-myc* 寡核苷酸对细胞增殖的效果，除非特别指出，于 37 °C 下在无血清的培养基(具有抗生素和 1%Neutrodoma 的 DMEM(Dulbecco s 改良的

Eagle 培养基)) 中培养每 ml PDGF 有或无 100ng 的猪血管环四天。PDGF 通常刺激血管细胞(例如, 平滑肌细胞和成纤维细胞)增殖并已知在组织损伤之后由血小板释放以促进创伤愈合。PDGF 诱导的细胞增殖通过本文讨论的 PCNA 染色测定。即使在四天后, 环仍保持其形态。

在器官培养中, 猪血管对 PDGF 刺激有反应。在器官培养中的猪血管显示出在外膜和血管中层被 PCNA 染色呈阳性的细胞, 如图 7a 所示。棕色核染色代表了 PCNA 染色的细胞, 而紫色染色的细胞以苏木精和曙红作为复染剂染色。细胞被 PCNA 染色呈阳性的百分比是 $15 \pm 5\%$ ($n=3$)。对照(血管仅在不含 PDGF 的无血清培养基中培养)没有显示出明显的 PCNA 染色。少于 1% 的细胞被 PCNA 染色呈阳性, 如图 7b 所示。

本发明的寡核苷酸抑制了 PDGF-诱导的猪血管器官培养的刺激。寡核苷酸以 $16 \mu\text{M}$ 添加 (SEQ ID NO: 1) 抑制了 PDGF 诱导的细胞增殖, 如图 7c 所示。与寡核苷酸培养四天之后, PCNA 染色是 $2 \pm 2\%$ 的细胞 ($n=3$; 相对于仅 PDGF $P < 0.001$)。

为使寡核苷酸扩散至人静脉的血管壁之中, 将人隐静脉和寡核苷酸一起培养。本发明的寡核苷酸迅速地扩散进入静脉器官培养物之中。把荧光素末端标记的寡核苷酸 (SEQ ID NO: 1) 以 $100 \mu\text{M}$ 添加至器官培养培养基中产生在培养时间 2 秒(室温)、30 分钟 (37°C)、1 小时 (37°C) 和 3 小时 (37°C) 标记的寡核苷酸迅速、时间依赖性地扩散进入静脉之中, 如图 8a-8d 中分别显示的。标记的寡核苷酸扩散通过静脉的腔表面和静脉的血管周围表面。寡核苷酸随时间定位在细胞和细胞核中。即使是在比寡核苷酸培养的静脉的快门曝光时间长 2-3 倍的快门曝光时间下, 对照(不与寡核苷酸培养的人静脉)显示出很少的自发荧光。

该数据和本发明的寡核苷酸抑制在血管壁中 PDGF-诱导的血管细胞的刺激一致。该数据也证明了寡核苷酸从血管的血管周围组织中施用而非使用寡核苷酸的腔施用的效果。具体来说, 血管周围组织寡核苷酸施用可在体外使用以把寡核苷酸施用到用于静脉移植物和其它类型的血管移植物的切除的静脉或动脉中。此外, 为了预防血管壁和血管周围组织变厚, 血管周围组织可使用本发明的寡核苷酸体内处理以使寡核苷酸转移至血管壁中。

实施例 4. 两个体内猪模型说明血管周围的寡核苷酸运送

患者将接受和 SEQ ID NO: 1, 5 或 6 序列的寡核苷酸。寡核苷酸包含硫代磷酸酯连接或酰胺化连接。把具有硫代磷酸酯连接的冻干的寡核苷酸悬浮在本文所述的缓冲液中。具有硫代磷酸酯或酰胺化连接的寡核苷酸按照本文所讨论的方法合成并保持在无菌条件下。不同序列的寡核苷酸分别施用, 患者在治疗期间只接收一种序列。

在血液透析接近位点手术时对患者施用 1-10mg 的寡核苷酸。使用 22 量规或更小的针把寡核苷酸注射进动静脉分流器的静脉侧面上的血管周围组织中。手术在注射之后完成。患者以一周的间隔使用经皮注射重复施用 1-10mg 寡核苷酸六个月。在有困难心悸静脉的患者中的经皮注射使用声波图指导。其它注射通过动静脉分流的触诊指导, 尤其是分流器的静脉部分。

在第一年期间监测患者的血液透析接近位点的功能开放。位点的声波图或 angiograms 在 1 周和三、六与十二个月采取。流速使用本文讨论的多普勒和超声波技术测定。

用于施用的寡核苷酸如本文所讨论和本领域已知的方法选择和合成。在这个实施例与其它实施例中所讨论的顺序和方法不应该解释为限制本发明的范围, 而应作为本发明的特异性实施方案。而且, 寡核苷酸仅需要与本文所建议的结构一致。只要寡核苷酸试验在本文所使用的体外和体内模型中顺利地进行, 对寡核苷酸来说, 没有必要通过本文所建议的特定的机制操作。

实施例 6. 在人平滑肌细胞中胶原合成的抑制

在这个实施例中, 使用 *c-myc* 或 *c-myb* 反义寡核苷酸处理进行胶原合成的外植人平滑肌细胞并与未处理的和/或“有义”处理的对照相比较。

人平滑肌细胞(SMCs)来源于经历通常的旁路手术的患者们的隐静脉。细胞通过外植方法分离。把外植体放置到包含 Dulbecco's 改良的 Eagle 培养基(DMEM)的培养皿中, 该培养基用 20%热灭活的小牛血清(FBS)、100IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 2mM/ml 谷氨酰胺(CM-20)补充。培养物保持在 37 $^{\circ}$ C 下有 5% CO₂ 的潮湿恒温箱中。细胞显示出血管平滑肌细胞的典型的形态特征, 即纺锤形状和峰谷模式。血管平滑肌细胞的鉴别进一步通过原位平滑肌 α -肌动蛋白染色确认。细胞融合生长, 每 7 天继代培养一次。仅第 3 或第 4 代人平滑肌细胞用于实验。

实验在亚融合(subconfluent)和融合后(postconfluent)人平滑肌细胞中进行。把细胞以 10,000/cm²(亚融合)或 25,000/cm²(融合后)接种于用 CM-20 补充的平板上。接种三天后,添加新鲜的包含抗坏血酸(50μg/ml)CM-20。在不同的实验中把下列寡核苷酸添加(16μM)至培养物中:

反义 (5'-AACGTTGAGG GGCAT) (SEQ ID NO: 1);

有义低聚物 (5'-ATGCCCTCA ACGTT) (SEQ ID No: 2);

4bp 错配低聚物 (5' AACGTGGATT GGCAG) (SEQ ID No: 3);

混杂低聚物 (5'-GAACGGAGAC GGTTT) (SEQ ID No: 4);

c-myb 反义 (5'-TATGCTGTGC CGGGTCTTC GGGC) (SEQ ID No: 5)。

二十四小时后,收集培养基进行 Western 印迹,收获细胞用于 RNA 分析。每一实验进行锥虫蓝排除测定。

胶原测定如下:使胃蛋白酶处理(胶原 I 的三螺旋部分)的或非胃蛋白酶处理的样品进行用于胶原测定的 Western 印迹。简言之,把样品于 4℃下在胃蛋白酶(1mg/ml)和醋酸(0.5mol)中温育过夜。使样品的等体积等分试样在高速真空离心机中浓缩,在把其样品溶解在 SDS 凝胶加样缓冲液中(50mM tris · HCl pH 6.8, 100mM 二硫苏糖醇, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝和 10% 甘油)之后煮沸 10 分钟。在 11,000g 下离心 10 分钟之后,使样品通过 7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移到硝化纤维素滤膜上。在封闭溶液中温育之后,把包含滤膜的样品和生物素标记的抗人胶原 I 和 III (Southern Biotech. SC.) 的第一抗体在室温下温育 1 小时。洗涤过滤物并与以辣根过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白温育。在添加反应底物之后,使滤膜对 X 光胶卷曝光。在分离的场合下,实验至少重复两次。

用于所有实验的人平滑肌细胞进行 3-4 次继代移植。这些细胞的表型被认为是不可逆地合成的并与各种疾病状态相关。已经证明:血管壁上的异常胶原积累主要由这些合成细胞产生。亚融合和融合后平滑肌细胞在血清刺激下产生 I 型和 III 胶原。

在亚融合平滑肌细胞中,在 *c-myc* 反义寡核苷酸处理之后与对照(不添加寡核苷酸)和 *c-myc* 有义寡核苷酸处理的细胞相比较, I 型胶原的合成减少了 80%。在融合的平滑肌细胞中,在 Coulter 计数器中计算的细胞数目在

对照、反义和有义处理的细胞中是类似的。使用锥虫蓝排除测定，细胞的生存能力在对照、反义和有义处理的细胞中位 97%、96%和 95%。I 型胶原在 *c-myc* 反义处理的细胞中检测不到。用 *c-myc* 有义低聚物处理的细胞与对照相比较 I 型胶原蛋白质的水平没有显示出差别。在消化后测定了三螺旋 I 型胶原的水平，结果与非胃蛋白酶处理的样品显示出相同的趋势。

在亚融合平滑肌细胞中，在 *c-myc* 反义寡核苷酸处理 (16 μ M) 之后与对照 (不添加寡核苷酸) 和 *c-myc* 有义寡核苷酸处理相比较，I 型原胶原的合成减少了 80%。在融合后的平滑肌细胞中，在 *c-myc* 反义处理的细胞中检测不到 I 型胶原。用有义 *c-myc* 寡核苷酸和 4bp 错配寡核苷酸处理的细胞与对照 (不添加寡核苷酸) 相比没有显示出 I 型胶原蛋白质水平的降低。I 型胶原在增殖和融合后平滑肌细胞中的降低表明胶原合成的抑制独立于通过反义化合物对细胞生长的抑制。不同剂量 (4、8 和 16 μ M) 的反义寡核苷酸产生了 I 型原胶原合成的剂量依赖性降低。在不同的寡核苷酸处理后细胞生存能力是可比较的，如通过锥虫蓝排除测定分析一样。在所有的小组中，大于 90% 的细胞保持着生存力。

在融合后人平滑肌细胞中，I 型胶原的合成通过 16 μ M 浓度的 *c-myb* 反义寡核苷酸取消。在对照 (无寡核苷酸) 和使用混杂序列寡核苷酸处理的细胞中，I 型胶原的水平是类似的。

这些结果也在实施例 9、13 和 17 中进一步确证。

实施例 7. 在人皮肤成纤维细胞中胶原合成的抑制

在这个实施例中，使用 *c-myc* 或 *c-myb* 反义寡核苷酸处理外植的人皮肤成纤维细胞 (人 FBCs) 并与未处理的和/或“有义”处理的对照相比较。通过从经历皮肤移植的患者获得人 FBCs 并用外植体方法分离。以与如上所述的人平滑肌细胞相同的方法培养外植体 FBCs，并以相同的方式应用反义和对照寡核苷酸。得自第 3 到第 10 代的培养物的人 FBCs 用于实验。胶原合成如实施例 6 所述的测定。

在融合人 FBC 中，*c-myc* 反义寡核苷酸 (8 和 16 μ M) 以剂量依赖性方式减少了 I 型原胶原的合成。用 *c-myc* 有义、4bp 错配或混杂的寡核苷酸处理的细胞与对照细胞 (无寡核苷酸) 相比较显示出相似水平的 I 型胶原蛋白质。

这些结果也在实施例 13 中进一步确证。

实施例 8. 在无冠状的猪模型中新内膜形成的减弱

c-myc 反义化合物对新内膜形成抑制的效果通过在标准的猪模型中使用常规的方案把 *c-myc*-特异性的反义 (SEQ ID NO: 1) 和无效对照剂 (SEQ ID NO: 21) 寡核苷酸硫代磷酸酯施用到冠状血管成形术的位点进行试验, 例如, 参见 Karas 等, J. Am. Coll. Card., 20: 467-474 (1992); 和 Schwartz 等, 循环, 82: 2190-2200 (1990)。在研究之前, 对家养的杂种猪 (*Sus scrofa*) 前驱给药阿斯匹林 (650mg)。通常的全身麻醉由肌内注射氯胺酮 (12mg/kg) 和赛拉嗪 (8mg/kg) 组成。在整个实验中其它剂量的麻醉通过静脉内施用。在右颈外动脉手术露置 (expose) 之后, 对猪静脉内施用肝素 (10,000U), 向颊施用硝苯地平 (10mg)。使用 8 French SAL 1 指引导管 (Medtronic Interventional Vascular 公司, Danvers, MA) 在荧光透视法指导下对冠状口套管。在冠内注射甘油三硝酸酯 (100 μ g) 之后以及 *c-myc* 反义和无效对照剂施用之前, 使用过大的血管成形术囊以损伤动脉壁的内膜和中间层, 按照动脉的大小 (在 2.0 至 3.5mm 之间) 使血管成形术囊在 6-10atm 下膨胀持续三次保持 30 秒。在除去血管成形术囊之后, 立即使用分离的多孔囊对冠状动脉进行壁内注射 (1mg/血管)。当注射压力不超过 4atm, 灌注液体积是 2ml, 囊-动脉比大约是 1.4 比 1 时, 预测壁内药物施用是安全的。把 *c-myc* 反义 (13 个重复) 或无效对照剂 (12 个重复) 低聚物在 4atm 的压力下注射, 施用在 27 秒的平均时间内完成。低聚物的剂量是每受损伤的冠状动脉 1mg。没有和低聚物的施用相关的不利影响。施用一个月之后, 杀死动物, 通过形态测定法测定损伤位点的最大新内膜区域 (NA max)、新内膜厚度 (NT max) 和剩余腔 (RL)。结果 (平均值 \pm SEM) 在以下表 I 中显示:

表 I

低聚物 (%)	重复	NAmax (mm ²)	NTmax (mm)	RL
无效对照剂 \pm 6	12	0.80 \pm 0.17	0.48 \pm 0.09	64
反义 \pm 5	13	0.24 \pm 0.06	0.20 \pm 0.04	81
P<0.05		<0.01	0.01	

图 10 是例证性对照(即接收有义低聚物注射)的损伤一个月后冠状动脉的横切面照片。明显的新内膜厚度是显著的(箭头)。图 11 是例证性的反义处理的冠状动脉的横切面照片。显著减少的新内膜是显著的。当最大的新内膜区域作为损伤程度的函数分析时(图 12),代表新内膜和损伤评价(即损伤的严重度)之间关系的回归线在斜率上有显著的差异($p < 0.01$)。如图 12 所示,反义低聚物显著地减少了新内膜的形成,尤其是对更在前的损伤。

实施例 9. 在人平滑肌细胞中通过 *C-MYC* 反义寡核苷酸处理抑制胞外基质的产生

该实施例进一步证明了 *c-myc* 反义寡核苷酸处理以通过人平滑肌细胞抑制胞外基质蛋白质合成的效果,具体来说是原胶原 I 和 III。该实施例也进一步确证了实施例 6 的研究结果。在受刺激的人平滑肌细胞中(使用 20% FBS 处理),反义处理大大地减少了细胞外原胶原的水平。

A. 通过 Western 印迹测定原胶原 I 和原胶原 III。

为了进一步确证 *c-myc* 反义寡核苷酸抑制胞外基质蛋白质的合成,从人平滑肌细胞测定原胶原 I 和 III 的合成。

使用 Western 印迹测定胞内和胞外原胶原(I型和 III型)。使人平滑肌细胞保持在含 5%FBS(小牛血清)的培养基 DMEM(Dulbecco's 改良的 Eagle 培养基)中。人平滑肌细胞在包含 20% FBS 和抗坏血酸(50 μ g/ml)的培养基中有或无寡核苷酸刺激。已知 FBS 在人平滑肌细胞中可刺激原胶原合成。在添加寡核苷酸 20 小时之后,细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)和包含 0.1%BSA 的无血清培养基洗涤三次;把抗坏血酸和寡核苷酸添加到培养基中 4 小时。收集条件培养基(接触细胞和寡核苷酸的培养基),添加包括氟化苯甲磺酰(PMSF, 0.5 mM)、胃蛋白酶抑制剂(1 μ g/ml)和亮抑蛋白酶肽(1 μ g/ml)的蛋白酶抑制因子。用冷 PBS 洗涤相应的细胞层三次并在 4 $^{\circ}$ C 小于包含 62.5mM Tris-HCl pH 6.8、20%甘油、2%SDS、5 β -巯基乙醇的 SDS-PAGE 样品缓冲液中溶解 30 分钟。然后煮沸细胞溶胞产物 5 分钟以灭活蛋白酶,4 $^{\circ}$ C 下在 10,000rpm 下离心 10 分钟之后收集上清液。在所选择的实验中,细胞在 20%FBS-DMEM 中与寡核苷酸继续培养 24 小时,然后使培养物的样品在 4 $^{\circ}$ C 下于存在于 0.5M 醋酸中的胃蛋白酶消化液中(0.1mg/ml)过夜。通过 Microcon-30 柱(Amicon, Beverly, MA)离心并在 -20 $^{\circ}$ C 下存储使单个样

品浓缩 10 倍。使等分试样在具有 4% 堆叠区 (stacking regions) 的 65 (w/v) 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶上电泳。然后把分级分离的蛋白质电转移到在包含 192mM 甘氨酸、25mM Tris、0.01% SDS 以及 20% 甲醇的转移缓冲液中的 PolyScreen PVDF 膜 (DuPont NEN, MA) 上。把印迹在 5%-无脂牛奶中封闭并与在 2.5% BSA 中的抗 I 型胶原 (生物素标记的多克隆抗体, Southern Biotech. Associates 公司, AL) 和抗 III 型胶原 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 的抗体温育。以 PBST (包含 0.1% Tween 的 PBS) 洗涤膜三次并与生物素化的第二抗体 (抗 III 型) 温育。洗涤印迹并与 streptavidin-过氧化物酶缀合物 (Boehringer Mannheim, 德国) 温育 30 分钟。在洗涤之后, 使印迹与 Renaissance 化学发光试剂 (DuPont NEN, MA) 温育 10 秒并对柯达 X-Omat 胶卷曝光 30 秒至 2 分钟。形成的荧光照片通过激光光密度测定法分析 (Pharmacia LKB Biotech. 公司, Piscataway, NJ)。

除非特别指出, 在所有的实施例中使用相应于 SEQ ID NO: 1 的 *c-myc* 反义寡核苷酸。

B. 通过 *c-myc* 反义寡核苷酸抑制胞外原胶原 I 和原胶原 III 分泌

为了最大限度地减少在实验小群之间不同生长速率的影响, 在融合后 (即密度停止的平滑肌细胞) 测定原胶原的水平。在通过 Western 所示 (图 13) *c-myc* 反义寡核苷酸处理后, 在条件培养基中观察到了胞外原胶原 I 和原胶原 III 的显著减少 (90%)。这种作用是在 4-16 μ M 的范围内是浓度依赖性的, 它早在平滑肌细胞和 *c-myc* 反义寡核苷酸培养 3 小时后就产生 (数据未显示)。

除了反义促进胶原的交联之外, 在反义寡核苷酸之后胞外原胶原 I 的减少不受添加 β -氨基丙腈的影响 (数据未显示)。

C. 外显子 1、2 和 3 的 *c-myc* 反义硫代磷酸酯寡核苷酸是胞外基质蛋白质合成的有效抑制因子。

为了进一步确证 *c-myc* 反义硫代磷酸酯寡核苷酸的序列特异性作用, 用几个对照序列 (包括有义、4bp 错配以及混杂寡核苷酸) 处理平滑肌细胞 (除非特别指出, 使用硫代磷酸酯寡核苷酸)。把其在条件培养基中对原胶原 I 水平的作用和指导抗 *c-myc* mRNA 不同区域的三个反义序列之后的作用相比较。如图 14 所示, 在用不同的反义寡核苷酸处理之后观察到了胞外原胶原

I 的一致减少, 但对照序列无此作用。

表 III

SEQ ID. NO.	寡核苷酸序列 (5 → 3)	人 <i>c-myc</i> 核苷位置; 寡核苷酸类型
1	AACGTTGAGG+GGCAT	559-573; 反义
2	ATGCCCCTCA+ACGTT	559-573; 有义
3	AACGTGGATT+GGCAG	559-573; 四碱基 错配
4	GAACGGAGAC+GGTTT	混杂 +
5	TATGCTGTGC+CGGGTCTTC+GGGC	<i>c-myb</i> ; 反义
6	GGGAGAGTCG+CGTCCTTGCT	400-419; 反义
7	TCATGGAGCA+CCAGGGGCTC	1264-1383; 反义

D. 胞外纤连蛋白和核 *c-myc* 蛋白质的免疫沉淀

为了确定寡核苷酸序列对细胞外纤连蛋白和 *c-myc* 蛋白质的蛋白质合成的作用, 使融合后的平滑肌细胞与或不与寡核苷酸在无甲硫氨酸的培养基中培养 4 小时。此后, 添加 [³⁵S] 甲硫氨酸 (25 μCi/ml, DuPont NEN, MA) 16 小时, 在 Coulter 计数器上计数细胞数目。在条件培养基中的胞外纤连蛋白和在细胞核提取物中 *c-myc* 蛋白质通过代谢标记后的免疫沉淀测定。

在添加蛋白酶抑制剂后收集条件培养基, 使包含等分 (counters) 的等分试样和抗纤连蛋白的抗体 (Becton Dickinson, Bedford, MA) 温育 4 小时, 之后再与葡萄球菌蛋白质丙烯酰胺小珠温育 2 小时。在离心之后, 洗涤沉淀三次, 在 SDS-PAGE 样品缓冲液中煮沸 5 分钟并在 6% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶上电泳。在标记和溶解在 0.1% NP-40、10mM Tris (pH 7.9)、10mM MgCl₂、15mM NaCl、5mM EDTA、1mM PMSF、1 μg/ml 亮抑蛋白酶肽和 1 μg/ml 胃蛋白酶抑制剂之后, 用冷 PBS 洗涤标记的细胞层三次。

在和胞外纤连蛋白平行的测定中, 按照本领域未知的方法通过离心提取细胞核。测定在核提取物中的蛋白质浓度, 使包含 500 μg 蛋白质的等分试样与抗 *c-myc* 抗体、pan-*myc* (G. I. Evan 所赠) 温育 12 小时, 然后再与葡萄球菌蛋白质丙烯酰胺小珠温育 90 分钟。在洗涤之后, 收集小珠并在

SDS-PAGE 样品缓冲液中煮沸, 在 SDS-PAGE 上电泳可溶性片断。干燥凝胶并在 -70°C 下对柯达-Omat 胶卷曝光 5-7 天。

E. 通过 *c-myc* 反义寡核苷酸没有改变胞外纤连蛋白的水平, 而 *c-myc* 蛋白质水平降低

相对于胞外原胶原的明显减少, 在条件培养基中的胞外纤连蛋白水平没有受到明显的影响(图 13), 这说明了反义寡核苷酸的选择性作用。融合后的平滑肌细胞与 *c-myc* 反义寡核苷酸的温育导致 *c-myc* 蛋白质在核提取物中的负调节(图 15)。

实施例 10. *c-myc* 反义寡核苷酸不改变人平滑肌细胞的全面代谢

为了进一步保证寡核苷酸不产生其它在平滑肌细胞功能方面的变化, 实施了与胶原合成或降解途径有关的细胞膜完整性测定、细胞代谢和基因诱导的测定。

使用锥虫蓝测定人平滑肌细胞的细胞膜完整性。在用各种寡核苷酸 ($16\mu\text{M}$) 处理后, 通过锥虫蓝排除评价, 大于 95% 的细胞可保持生存能力。

为了确定总蛋白质的合成, 使条件培养基的等分试样于 4°C 下在冷 10% 三氯醋酸(TCA)中沉淀 30 分钟, 以 5%TCA 洗涤沉淀两次。然后把沉淀溶解在 Solvable (DuPont NEN, MA) 中, 在闪烁计数器(Pharmacia LKB Biotechnology 公司, Piscataway, NJ)上测定结合的放射性。总蛋白质合成(通过本文所讨论的 [^{35}S] 甲硫氨酸掺入测定)在与或不与反义(SEQ ID NO: 1)寡核苷酸(图 16)培养的平滑肌细胞中是可比较的。注意到以 20%FBS 刺激的细胞与仅用 5%FBS 处理的未受刺激的细胞相比显示了增加的蛋白质合成。*C-myc* 反义寡核苷酸处理与有义、错配和无寡核苷酸对照相比没有减少蛋白质合成。

此外, 在除去 *c-myc* 反义寡核苷酸 24 小时之后, 使在条件培养基中的原胶原 I 水平恢复到对照水平(图 17)。这些结果表明: 反义(SEQ ID NO: 1)寡核苷酸产生了胞外原胶原的选择性的但可逆的减少, 同时保持血管平滑肌细胞的正常代谢活动。

因为反义寡核苷酸可减少非靶基因的表达, 测定在用 *c-myc* 反义寡核苷酸处理后溶胶原活性以及干扰素- γ 水平以排除这些非特异性作用。

使融合后的平滑肌细胞与或不与寡核苷酸在无血清培养基中培养。此后

24 小时收集培养基的等分试样。在通过二硫苏糖醇和碘乙酰胺选择性地破坏金属蛋白酶的组织抑制剂之后,测定了基质金属蛋白酶活性。用氨苯醋酸汞活化由人平滑肌细胞产生的潜在的胶原酶,然后与 I 型胶原或明胶温育,通过 SDS-PAGE 评价裂解产物(D. D. Dean 等, 临床研究杂志, 84 : 678-685(1989)和 P. E. Desrochers 等, 生物化学杂志, 267 : 5005-5012(1992)的方法, 本文一并参考)。金属蛋白酶的特征通过使用作为底物的 β -酪蛋白或明胶在非变性条件之下的 SDS-底物凝胶电泳(即酶图(zymography))确定。在得自对照、有义和反义(SEQ ID NO: 1)处理的平滑肌细胞的条件培养基中显示出抗 I 型胶原和明胶的可比较的溶胶原活性(数据未显示), 这表明: *c-myc* 反义寡核苷酸不增加内源溶胶原活性。

为了确定 *c-myc* 干扰素- γ (I 型胶原合成的高效抑制剂) 是否是非特异的诱导, 在培养基和人平滑肌细胞中测定了干扰素- γ 。使用 ELISA 方法和 *c-myc* 反义(SEQ ID NO: 1)寡核苷酸培养后, 在条件培养基和细胞溶胞产物中检测不到干扰素- γ 。

实施例 11. 在人平滑肌细胞中 *C-MYC* 反义寡核苷酸对原胶原 A_1 (I)、 A_2 (I) 和 A_1 (III) MRNAS 无作用

本实施例证明了在人平滑肌细胞中 *c-myc* 反义寡核苷酸处理不减少原胶原的 mRNA。

为了测定得自原胶原的 mRNA, 使融合后的平滑肌细胞与或不与寡核苷酸培养 24 小时, 用冷 PBS 洗涤三次并溶解在 4M 异硫氰酸胍中。通过酚-三氯甲烷抽取和其后的异丙醇沉淀分离总 RNA。总 RNA 通过在 260nm 的分光光度法的吸光度定量测定。使等量的 RNA 样品(10 μ g) 变性, 并在 0.8% 琼脂糖/甲醛凝胶上分离并印迹到硝化纤维膜上。使用 UV 交联剂(Stratagene, CA) 使 RNA 和硝化纤维膜交联。印迹在 42 $^{\circ}$ C 下和人原胶原 α_1 (I) (ATCC) 与人原胶原 α_2 (I) (H. Kuivaniemi 所赠) cDNA 探针杂交 24 小时。7S 核糖体 RNA 的探针用作对照。通过断口翻译成大于 10⁸cpm/ μ g DNA 的比活, 用 ³²P-CTP 标记探针。印迹与 42 $^{\circ}$ C 下在 2 \times 、1 \times 、0.5 和 0.1 \times SSC-0.1%SDS 依次洗涤两次 15 分钟。每次洗涤重复两次。使印迹在-70 $^{\circ}$ C 以强化拍摄对柯达-Omat 胶卷曝光 6 小时至 3 天。

在反义处理后 *c-myc* 蛋白质的负调节提出了胶原表达转录调节的可能

性。因此，在使用 Northern 印迹分析在与或不与寡核苷酸培养之后测定了平滑肌细胞中的原胶原 $\alpha_1(I)$ 和原胶原 $\alpha_2(I)$ mRNA 水平。如图 18 所示，反义寡核苷酸不影响原胶原 $\alpha_1(I)$ 和原胶原 $\alpha_2(I)$ mRNA 水平。同样，与或不与 *c-myc* 反义寡核苷酸可观察到原胶原 $\alpha_1(III)$ mRNA 的类似水平。7S RNA 在所有三个实验条件中保持不变。

实施例 12. 原胶原在用 *C-MYC* 反义寡核苷酸处理的人平滑肌细胞中的胞内积累

本实施例证明了 *c-myc* 反义寡核苷酸处理增加了在人平滑肌细胞内部的原胶原。这些结果与在 *c-myc* 反义寡核苷酸存在下胞外基质原胶原合成的降低是一致的。

A. 通过 *c-myc* 反义处理增加的胞内原胶原水平。

为了研究参与通过 *c-myc* 反义寡核苷酸减少胞外原胶原的机制，在 [^{14}C] 脯氨酸标记 4 小时之后测定分泌的和胞内的原胶原。

要在 *c-myc* 反义寡核苷酸处理之后测定胞内原胶原，使细胞在 20% FBS-DMEM 中与或不与寡核苷酸培养 20 小时。再把包含抗坏血酸 (50 μ g/ml)、 [^{14}C] 脯氨酸 (2.5 μ CI/ml, DuPont NEN, MA) 以及寡核苷酸的无血清培养基添加到细胞 4 小时。收集培养基并和添加蛋白酶抑制剂。通过 Microcon-30 柱离心培养基的等分试样以除去未掺入的放射性同位素并浓缩样品以用于电泳。然后相应的细胞层以冷 PBS 洗涤 3 次，溶解 PAGE-SDS 样品缓冲液中并煮沸 5 分钟以灭活蛋白酶。使从人皮肤成纤维细胞 (W. Arnold 所赠) 纯化的浓缩培养基的等分试样、细胞溶胞产物 (得自相等的细胞数目) 和原胶原 I 在具有 3% 堆叠区的 6% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶上电泳。凝胶在 10% 醋酸、20% 甲醇中固定 30 分钟，干燥并在 -70 $^{\circ}C$ 下对胶卷曝光 7 天。

c-myc 反义处理降低了分泌的 [^{14}C] 脯氨酸标记的原胶原，类似于 Western 印迹 DNA。与未处理的细胞和用混杂寡核苷酸处理的细胞相比，*c-myc* 反义处理显著地增加了原胶原 I 的胞内浓度 (图 19)。

B. 在胞内原胶原水平的增加不是由于 *c-myc* 反义寡核苷酸处理之后人平滑肌细胞不能羟基化脯氨酸

原胶原的胞内积累可以反映对原胶原 α 链装配成三螺旋状构象所需的翻译后修饰。因此，要排除这种可能性，测定了丙基-4-羟化酶活性和羟脯氨酸

酸含量对 *c-myc* 反义处理的影响。

如上所述把融合后的平滑肌细胞在有或无寡核苷酸的 20% FBS-DMEM 中培养 24 小时。以冷 PBS 洗涤细胞层 3 次并在 0.2M NaCl、20mM Tris-HCl, pH 7.4、0.1% Triton X-100、0.1 M 甘氨酸以及 10 μ M 二硫苏糖醇中溶解 (K. J. Kivirikko 等, 酶学方法, 82: 245-364 (1982) 的方法, 本文一并参考)。然后对溶胞产物在冰上声处理 30 秒并测定蛋白质浓度。余下的细胞溶胞产物于 4 $^{\circ}$ C 下以 13,000rpm 离心 20 分钟。

通过测定使用 [14 C]-脯氨酸标记的原胶原 I 作为底物的放射性的 4-羟脯氨酸的形成测定上清液的等分试样的丙基 4-羟化酶活性 (K. J. Kivirikko 等, 分析生物化学, 19: 249-255 (1967) 的方法, 本文一并参考)。水解细胞裂解物的等分试样, 通过特定的化学方法测定羟脯氨酸。

丙基 4-羟化酶活性是控制三螺旋形成的关键酶, 它在实验小群中是类似的。在未使用寡核苷酸处理的对照平滑肌细胞中它是 11.7 \pm 0.1 (dpm/ μ g 蛋白质, 2 个分离实验的平均值 \pm SD), 在与混杂寡核苷酸 (16 μ M) 培养的细胞中是 12. \pm 2.3, 在用 *c-myc* 反义寡核苷酸 (16 μ M) 处理之后为 10.5 \pm 2.0。

在 *c-myc* 反义 (SEQ ID NO: 1) 细胞中的羟脯氨酸含量比未处理或混杂寡核苷酸处理的细胞高 (图 20)。羟脯氨酸含量的增加反映了作为丙基 4-羟化酶底物的原胶原水平的增加。

实施例 13. 使用 *C-MYC* 反义寡核苷酸抑制人成纤维细胞人皮肤成纤维细胞细胞中胞外基质的产生

本实施例进一步证明了 *c-myc* 反义寡核苷酸处理以抑制人皮肤成纤维细胞合成胞外基质蛋白质, 具体来说原胶原 I 和 III。在受刺激的人皮肤成纤维细胞中 (用 20% FBS 处理), 反义大大地减少了胞外原胶原的水平。本实施例也进一步确证了实施例 7 的研究结果。

A. 使用 Western 印迹测定胞外和胞内胶原 I 和 III

为了进一步确定 *c-myc* 反义寡核苷酸是否抑制在人皮肤成纤维细胞中的胞外和胞内原胶原 I 和 III 的合成, 如在实施例 9 和 12 中所讨论的对人平滑肌细胞一样, 测定了原胶原水平。融合用于人皮肤成纤维细胞实验的人皮肤成纤维细胞。如在实施例 7 中和本领域已知的方法获得和培养细胞。

B. 通过 *c-myc* 反义寡核苷酸处理迅速抑制胞外胶原 I 和 III 的分泌

本实验显示了 *c-myc* 反义寡核苷酸通过人皮肤成纤维细胞以剂量-依赖性方式、反义序列依赖性方式与用抑制的快速时程抑制胞外胶原 I 和 III 的分泌。

为了进一步确定 *c-myc* 反义寡核苷酸抑制胞外基质产生的剂量反应和反义特异性, 使用分离自经受不同处理的人成纤维细胞的人成纤维细胞蛋白质的 Western 印迹, 测定胞外胶原 I。使人成纤维细胞和混杂寡核苷酸 (SEQ ID NO: 4; 16 μ M)、错配寡核苷酸 (SEQ ID NO: 3; 16 μ M)、反义寡核苷酸 (SEQ ID NO: 1, 4, 8 和 16 μ M) 或没有寡核苷酸如本文所讨论的接触 24 小时, 在图 21, 泳道 1-5 分别显示的 Western 印迹中测定这些细胞的蛋白质中的胶原 I。双带反映了胶原 α_1 (I) 和 α_2 (I) 链, 分别在上部和下部带中。反义处理的细胞显示了随着 *c-myc* 反义寡核苷酸水平的增加, 胶原 I 的量成适当比例地减少, 而同时对照处理 (没有混杂和错配的处理) 比所用的 *c-myc* 反义寡核苷酸的最低浓度显示出了更高的胶原的量。寡核苷酸 (SEQ ID NO: 1; 16 μ M) 也抑制新平板接种的成纤维细胞中的细胞增殖; 与 20%FBS 和有义对照相比, 细胞增殖在四天之后分别抑制大约 25% 和 50%。这些结果与其它本文所讨论的结果一道, 尤其是通过 *c-myc* 反义处理无胶原和原胶原降解途径的正调节表明: 通过 *c-myc* 反义处理抑制了胞外基质产生, 具体来说原胶原 I 的分泌。

人皮肤成纤维细胞细胞胶原 I 分泌的 *c-myc* 反义寡核苷酸处理的时程显示了从新合成的胶原 I 分泌的快速抑制。在零时间, 使人皮肤成纤维细胞和具有无寡核苷酸、混杂寡核苷酸或反义寡核苷酸的新鲜培养基 (本文所使用的“新鲜培养基包含 20%FBS 和抗坏血酸 50 μ g/ml 以及所指出的其它组分) 接触 24 小时 (寡核苷酸的浓度是 16 μ M; SEQ ID NO: 1 和 3)。在三、六和二十四小时, 采取每种培养基的等分试样并如本文所讨论的通过 Western 印迹测定胶原 I 的存在。在反义处理的细胞中与对照细胞 (未处理的和混杂处理的) 相比观察到了胶原 I 水平的减少。在二十四小时, 反义处理的细胞与对照细胞相比显示出少至少 5 至 10 倍的分泌的胶原 I。六小时的值产生了中间性的结果。

通过人成纤维细胞分泌胶原 III 也受 *c-myc* 反义寡核苷酸的抑制。用包含无寡核苷酸、16 μ M 混杂寡核苷酸或 16 μ M *c-myc* 反义寡核苷酸的新鲜培

培养基处理人成纤维细胞二十四小时，在二十四小时的最后测定培养基中胞外胶原 III 的存在。在反义处理的细胞中没有观察到胞外胶原 III 的存在，而同时对照细胞（未处理的和混杂处理的）显示出胞外胶原 III 的存在（与反义处理的细胞相比，胶原 III 的水平高至少 10-100 倍）。

这样，这些结果与本文所讨论的其它结果一道表明：通过 *c-myc* 反义处理可抑制胞外基质产生，具体来说就是原胶原 I 和 III 的分泌。

C. 通过 *c-myc* 反义寡核苷酸处理聚集胞外原胶原 I 并减少胞外原胶原 I

通过 *c-myc* 反义处理人成纤维细胞抑制原胶原分泌和胞内原胶原 I 的积累有关。用包含无寡核苷酸、 $16\mu\text{M}$ 混杂寡核苷酸或 $16\mu\text{M}$ *c-myc* 反义寡核苷酸的新鲜培养基处理人成纤维细胞二十四小时，在培养基和相应的人成纤维细胞中使用如本文所讨论的分离的 ^{14}C 脯氨酸标记的蛋白质合成产物测定胞外原胶原 I 和胞内原胶原 I 的存在。在图 22 中，泳道 1-3 中的主要带显示出原胶原 $\alpha_1(\text{I}, \text{III})$ 和 $\alpha_2(\text{I})$ 链。与对照细胞（未处理、混杂的处理，分别为泳道 1 和 2）相比，在反义处理的细胞中分泌的原胶原 I 的量减少至少 10-20 倍。在泳道 1-3 中上部的带大约是 116Kd（“上部带”），它对应于原胶原 $\alpha_1(\text{I}, \text{III})$ ；在泳道 1-3 中的下部带（从左至右）大约是 100Kd，它对应于 $\alpha_2(\text{I})$ 。在图 22 中，泳道 4-6 显示出了在反义处理的细胞（泳道 6）中胞内原胶原 I 比对照细胞（泳道 4 和 5）至少大五倍。在图 22 中，泳道 7 显示了分子量标记。

这样，这些结果证明：*c-myc* 反义处理减少了通过人成纤维细胞分泌的原胶原的量并增加细胞中原胶原的量。

实施例 14. *c-myc* 反义寡核苷酸不改变在人皮肤成纤维细胞中的胞内原胶原的热稳定性

c-myc 反义处理不改变胞内原胶原的三级结构。用包含无寡核苷酸、 $16\mu\text{M}$ 混杂寡核苷酸或 $16\mu\text{M}$ *c-myc* 反义寡核苷酸的新鲜培养基处理人成纤维细胞二十四小时。每种试验条件下原胶原的解链温度如本文所讨论的和本领域已知的测定。图 23 显示了对照细胞（未处理的和混杂处理的）的解链曲线图形和反义处理的类似。这些结果证明：在反义处理的细胞内部存在的原胶原保持了正常的三螺旋构象，这与对照处理的细胞是相同的。

这样，*c-myc* 反义处理不导致原胶原结构的可检测的改变，这一改变可

导致增加的胞内降解或降低的蛋白质从细胞运出。

实施例 15. *c-myc* 反义寡核苷酸处理不改变在人皮肤成纤维细胞中的原胶原 $\alpha_1(I)$ mRNA 水平

本实施例证明 *c-myc* 反义寡核苷酸处理不通过降低原胶原 mRNA 水平由人皮肤成纤维细胞抑制胞外基质蛋白质的合成, 具体来说是原胶原 I 的合成。反义处理在受刺激的人皮肤成纤维细胞(用 20% FBS 处理)中不减少 mRNA 原胶原水平。

A. 原胶原 $\alpha_1(I)$ mRNA 的测定

分离 RNA 并进行 Northern 分析如下: 以冷 PBS 缓冲液洗涤细胞三次并溶解在 4M 异硫氰酸胍中。通过酚/三氯甲烷提取 RNA 并通过在 260/280nm 的分光光度的吸光度定量测定。通过电泳在 0.8% 琼脂糖-甲醛凝胶上分离 RNA 样品 (20 μ g)。在把 RNA 转移到硝化纤维素滤膜上后, 通过紫外光照射固定印迹。印迹在 5 \times 标准的柠檬酸盐、2 \times Denhardt s 溶液、0.1% SDS 和 0.2mg/ml 变性的鲑精 DNA 在 65 $^{\circ}$ C 下预杂交至少 4 小时。杂交通过比活大约为 108-109cpm/ μ g 的切口翻译使用包含以 32 P dCTP 放射性标记的 cDNA 的相同缓冲液进行过夜。印迹于 65 $^{\circ}$ C 下在 0.5 \times 标准的柠檬酸盐和 0.1% SDS 中洗涤。使滤膜对柯达 X-Omat 胶卷在 -70 $^{\circ}$ C 下以强化拍摄曝光 1-5 天。形成的 Northern 印迹的放射自显影通过扫描光密度测定法和高峰区域的完整性定量测定。用于该研究的探针如下: 1.8Kb 的原 $\alpha_1(I)$ (HF-677) cDNA, 该 cDNA 对应于人 I 型原胶原的原 $\alpha_1(I)$ 链的 COOH-端前肽和三螺旋区域的羧基端部分 (Chu 等, 核酸研究, 10: 5925-5934, 1982)。

B. *c-myc* 反义处理不降低原胶原 $\alpha_1(I)$ mRNA 水平

在人成纤维细胞中的原胶原 $\alpha_1(I)$ 的 mRNA 水平不受 *c-myc* 反义处理的影响。用包含无寡核苷酸、16 μ M 混杂寡核苷酸或 16 μ M *c-myc* 反义寡核苷酸的新鲜培养基处理人成纤维细胞二十四小时。如本文所讨论的和本领域已知的, 从每种试验条件下纯化 mRNA 并分析原胶原 $\alpha_1(I)$ mRNA 的存在。图 24 显示了对照细胞原胶原 I mRNA (未处理的和混杂处理的; 分别在泳道 1 和 2) 水平类似于反义处理的细胞的原胶原 $\alpha_1(I)$ mRNA 水平 (泳道 3)。这些结果证明: *c-myc* 反义处理人成纤维细胞不负调节原胶原 $\alpha_1(I)$ 基因 mRNA 的转录。

这样, 与本文所讨论的其它结果一道, mRNA 结果显示了 *c-myc* 反义处

理减少了原胶原 I 和 III 的分泌，它们是导致胞外基质中胶原合成的蛋白质。

实施例 16. 在人皮肤成纤维细胞的 *C-MYC* 反义寡核苷酸处理终止之后反义寡核苷酸不改变胞外基质蛋白质合成的回收

在除去 *c-myc* 反义寡核苷酸处理之后不削弱人成纤维细胞合成胶原 I 的能力。用包含无寡核苷酸、 $16\mu\text{M}$ 混杂寡核苷酸或 $16\mu\text{M}$ *c-myc* 反义寡核苷酸的新鲜培养基处理人成纤维细胞二十四小时。然后如本文所讨论的使每种试验条件下的人成纤维细胞接触无任何寡核苷酸添加物的新鲜培养基并测定胞外胶原 I 的存在。图 25 显示了对照细胞(未处理的和混杂预处理的)和反义处理的细胞在处理消除之后二十四小时产生了相似的胞外胶原 I 的水平。这些结果表明：在二十四小时之后，在 *c-myc* 反义处理的人成纤维细胞中可完全回收胶原产生。

这样，*c-myc* 反义处理不产生任何导致细胞不能恢复到原胶原的预处理分泌水平的细胞毒素的影响。

实施例 17. 在猪冠状动脉中胞外基质合成的抑制

本实施例进一步证明了定位的 *c-myc* 反义寡核苷酸处理以减少组织创伤之后胞外基质合成进行的体内效果。本实施例也进一步证明了 *c-myc* 反义处理在减少内部器官伤痕进行以及减少和胞外基质分子合成(如胶原)相关的组织伤痕的进行的体内效果。

A. 通过 *c-myc* 反义寡核苷酸处理抑制胞外基质纤维物质的产生

为了确定 *c-myc* 反义处理对组织创伤之后的胞外基质合成的进行的效果，用实施例 8 中所讨论的寡核苷酸处理体内损伤猪心脏(除非特别指出)，在寡核苷酸施用三天、七天、二十和二十八天之后杀死。相同的 *c-myc* 反义和有义寡核苷酸(SEQ ID NO: 1 和 2)和剂量(每动脉 1mg)如实施例 8 使用。

得自反义处理的猪的受损伤(损伤)的冠状横切面与有义处理的受损伤的冠状相比在显微胞外体系结构上显示出差别。得自每个实验组的受损伤的冠状检查为光学显微镜的遮暗(blind)样品，放大倍数 20-62 \times 。组织如本领域中已知的以维尔赫夫氏染剂-van-Gieson 染料染色以突出细胞和胞外基质，如本领域已知的 sirius 红染色以突出胶原。*C-myc* 反义处理的血管(和对照血管相比显示出更小的新内膜区域)比对照血管(有义处理的)显示

出更少的红染色。反义处理的冠状与有义处理的冠状相比显示出更少的胞外纤维物质；反义处理的冠状显示出在细胞之间更少的胞外空间。在囊剥离和 *c-myc* 有义 (S) 或反义 (AS) 寡核苷酸 (1mg) 转导管施用进猪冠状动脉之后，使用针对 PCNA (增殖细胞核抗原) 的免疫染色也评价了新内膜平滑肌细胞增殖，参见表 IV。与冠状的有义处理相比，冠状的反义处理抑制了由组织创伤引起的平滑肌细胞增殖的进行。PCNA 染色使得可以在给定的新内膜横切面中评价增殖细胞的数目。通常可数出 200-1,000 个细胞，确定增殖的平滑肌细胞的百分比并表达为增殖指数。增殖指数 (PI)、新内膜/血管中层 (I/M) 比率和 I/M 比率的减少 ($\Delta I/M$) 如下：

表 IV

天	R _x	n	P* (%)	I/M 比	$\Delta I/M$ (%)
3	S	4	5±2	0.09±0.03	
	AS	8	3±5	0.05±0.02	↓44
7	S	4	47±13	0.28±0.04	
	AS	8	11±13**	0.12±0.05*	↓57
*					
28	S	6	N/A	1.19±0.51	
	AS	4	N/A	0.47±0.30*	↓61

P* - 增殖细胞/总细胞数×100，*p<0.05，**p<0.01

具有减小的 I/M 比的冠状具有改良的腔直径。这些结果证明定位的 *c-myc* 反义处理抑制了随时间的平滑肌细胞生长和胞外基质形成。

这样，定位的 *c-myc* 反义处理抑制了在受损伤的组织中瘢痕形成的进行，如在由平滑肌细胞增殖和胞外基质形成引起的囊血管成形术创伤之后的冠状中的瘢痕形成。

实施例 18. 在猪冠状动脉中 *C-MYC* 反义寡核苷酸的快速定位

本实施例证明了使用局部施用器械时 *c-myc* 反义寡核苷酸在穿透性血管和结缔组织中的体内效果。结合本文所讨论的其它的结果，这些结果证明

了 *c-myc* 反义处理在 30 分钟之内和 *c-myc* 诱导开始之前(发生超过三至四小时)在细胞核中定位的能力。在局部施用到冠状动脉的血管壁之后, *c-myc* 反义寡核苷酸的局部分布减少了囊血管成形术之后的瘢痕形成。

A. 用羧基荧光素活 ^{35}S 硫代磷酸酯标记的 *c-myc* 反义寡核苷酸的局部施用

用于本实施例的 *c-myc* 反义寡核苷酸如本文所讨论的方法制备。如以前在 Iverson 等, 反义研究进展, 2: 211-222 (1992) 所述, 硫代磷酸酯反义寡核苷酸 (SEQ ID NO: 1) 指导抗用于以羧基荧光素标记的分布研究的人 *c-myc* 基因的翻译起始区 (480nm 激发光, 520nm 激发, 分子探针公司), 本文一并参考了其方法。对于定量研究, 寡核苷酸在每个核苷酸之间的连接以比活为 $1.8 \times 10^8 \text{cpm}/\mu\text{mol}$ 的 ^{35}S 标记。

如本文所讨论的使用家养杂种猪 (*Sus scrofa*) 并准备来用于实验。使用 9 French SAL 1 指引导管 (Cordis 公司, 迈阿密, FL) 插管的冠状口在荧光透视指导下进行。在向冠状注射甘油三硝酸酯 (100 μg) 之后, 获得了基线冠状血管造影术。然后使选择的冠状动脉部分经受用过大的囊膨胀 3 次 (6atm) 30 秒而使之受损伤 (使受损伤)。然后, 把施用器械 Kaplan-Simpson Infusasleeve (LocalMed, Palo Alto, CA) 推进到越过标准的血管成形术的囊 (“支持”囊) 至目的区。该器械由包含多个侧孔 (40 μm) 的多腔注入区 (18mm) 组成, 其中的侧孔通过使支持囊膨胀而与血管壁并排放置。用于研究的器械使用坚硬的、不易坏的管道注入溶液。这种设计使药物损失到血液中最大限度地减少并使得可以分别控制药物注入和药物施用器械在血管中的放置。在内部的囊导管完全膨胀之后, 注入部通过荧光透视确认, 施用 *c-myc* 反义寡核苷酸。壁内注射在外部 100PSI 的压力下进行。注射的总体积是 5-6ml, 通过外部泵以 40ml/分钟施用。施用的剂量是每动脉 1mg。在注射完成之后, 取下器械并记录最后的 angiograms。为了检验寡核苷酸施用的适当条件, 使用连续的定量冠状血管造影术以测定选择的冠状动脉的初始腔直径、在寡核苷酸施用之前 (即, 在剥露损伤之后) 的腔直径和寡核苷酸施用之后的腔直径。此外, 原位测定了剥露和支持囊的直径。指引导管用作血管造影术测定的刻度器械。在指定的时间时, 给动物施用致死剂量的戊巴比妥钠 (100mg/kg iv)。

如表 V 所示, 平均腔血管直径是在基线的 $2.5 \pm 0.1 \text{ mm}$ 。有过大的囊产生冠状动脉损伤(也作为剥露)(平均囊: 动脉比为 1.1)。在囊以 $2.6 \pm 0.1 \text{ mm}$ 的平均腔直径过份伸展之后, 所有血管保持开放。使 *c-myc* 反义寡核苷酸通过直接与腔内表面或血管接触的膨胀的施用器械施用(平均囊: 动脉比为 1.0)。

表 V

基于定量的冠状血管造影术的血管造影术特征(n=14)。

初始的腔直径 (mm)	2.5 ± 0.1
剥露囊/动脉比	1.1 ± 0.0
剥露后的腔直径 (mm)	2.6 ± 0.1
施用囊/动脉比	1.0 ± 0.0
施用后腔直径 (mm)	2.6 ± 0.1

B. 寡核苷酸施用的定量测定

为了确定转导管施用之后荧光标记的寡核苷酸的分布, 切除冠状动脉和邻近的组织。在以 PBS 充满血管腔之后, 动脉在 10% 缓冲的福尔马林中固定 6 小时并在石蜡中包埋。把动脉切成 $4\text{-}\mu\text{m}$ -厚连续切片(每血管 50 mm, 包括 18mm 的注射部分)。血管的注射位点以及接近的和远离的部分的检查提供了关于纵向的寡核苷酸分布的信息。此外, 得自同一动物的非注射冠状动脉作为另外的对照。使切片脱蜡并以 SlowFade-Light 抗衰老剂(分子探针公司, Eugene, OR)覆盖。各载玻片包含血管、外膜周组织以及邻近的心肌(图 17), 这就可以确定寡核苷酸渗透的深度。在装备具有 XF-22 滤光片的落射荧光器械的 Nikon Optiphot 显微镜下可观察到荧光标记的反义寡核苷酸。照片在柯达 Ektachrome P1600 胶卷上拍摄。

为了分析荧光标记的寡核苷酸在体外和体内的胞内定位, 使用了用 MRC-600 氦-氩激光(Bio-Rad)改装的扫描激光共聚焦显微镜(型号为 Zeiss Axiovert 100)。氦-氩激光发射激发波长 488nm 的激光线。使诱导的荧光扫描通过 $63\times$ 物镜, 并转化成在计算机显示器上显示的视频信号。图象通过柯达 Ektachrome 100 胶卷在计算机荧屏上拍照。对于体外试验, 为了测定通过血管平滑肌细胞摄取的寡核苷酸的时程, 细胞在带小室的载玻片上于

包含 10% 小牛血清的培养基中生长 2 天，在 2、30 分钟和 2 小时添加荧光素标记的寡核苷酸 (8 μ M)。然后，以 PBS 洗涤细胞 3 次，固定在 50% 丙酮和 50% 甲醇中。对于体内研究，如上所述获得的冠状动脉的切片通过共聚焦显微镜在 0.4-0.5 μ m 的光学厚度下分析。

C. 反义寡核苷酸在动脉壁中的分布

为了确定寡核苷酸在血管壁中的分布，在壁内施用 30 分钟和 3 天之后检查其在冠状动脉中的定位 (n=4)。荧光素标记的寡核苷酸仅在注射区中检测到，但在远离的切片或在非注射的冠状动脉中没有检测到。在 30 分钟时，寡核苷酸分布的三个明显的聚集方式在曾经历囊剥离的注射片断内是显著的。包括血管中层的全部厚度的密集的透壁定位与更稀少的外膜和血管周围分布有关 (图 27A 和 27B)。在每张切片中，寡核苷酸仅聚集在动脉圆周的部分。内膜下的非透壁方式是常见的；它分散在透壁的定位之间或在注射片断的边缘 (图 27C 和 27D)。中壁非透壁方最不常见，它在与透壁定位的邻近处有发现 (图 27E 和 27F)。在显示出非透壁分布的切片中血管外膜中没有反义寡核苷酸。

本发明也检查了前述的在动脉壁中的 *c-myc* 反义寡核苷酸分布的血管破坏作用。对连续切片的分析显示了在寡核苷酸定位扩展至最邻近的解剖区域中透壁分布是最常见的。内膜下的非透壁方式和保存的血管完整性有关。在 3 天时，寡核苷酸在透壁定位中清晰可见 (图 28A 和 28B)。内膜下的非透壁分布作为寡核苷酸破坏处结果的可能很不明显。关于线性的“喷射式”定位，在 30 分钟或 3 天时都没有证据。

这些数据共同表明了压力驱动的转变管施用之后寡核苷酸壁内分布的聚集方式。由于先前囊剥离的冠状动脉解剖看来有利于寡核苷酸的进入和透壁分布。非透壁方式常与完整的内部弹性薄片有关。

D. 在冠状动脉内寡核苷酸的壁内运输

本发明测定了寡核苷酸的原位居留时间以确定反义处理是否导致寡核苷酸停留。因此，要定量确定这个问题，使用转导管把 ³⁵S 标记的 *c-myc* 反义寡核苷酸施用到猪冠状动脉中。如图 29 所示，在位点特异性施用后 30 分钟，测定组织放射性，这种组织放射性反映了与 17 \pm 4cpm 的组织背景相比在血管壁中的 2510 \pm 1436cpm (n=6) 和在血管周围组织中的

2163±966cpm (n=6) 寡核苷酸含量。三天后，与寡核苷酸有关的放射性在血管壁中增加至 3595±1672cpm (n=4)，而在外膜周组织水平中降低至 432±201cpm (n=4)。尽管快速的血浆清除率 ($t_{1/2}$ 15±2 分钟)，达到了上述寡核苷酸的保持水平。在 30 分钟和 3 天可检测的寡核苷酸的量和大约 1% 的总施用剂量相对应。这些结果表明：压力驱动的转导管施用导致反义寡核苷酸在中层和外膜组织以及血管周围组织中沉积。

E. 寡核苷酸壁内施用后的血管完整性

因为压力驱动的转导管注射任何治疗剂至动脉壁会引起血管破坏，本发明测定了血管破坏的程度。首先，使用定性的冠状血管造影术，在猪冠状动脉中的 1/14 壁内注射再观察到了非流速限制冠状解剖，纵使在用过大的囊损伤之前。第二，我们使用了定量冠状血管造影术以评价在壁内寡核苷酸施用之后的腔直径 (n=14)。在转导管寡核苷酸施用之后的腔直径没有明显的变化 (表 V)。第三，我们评价了使用光学显微镜进行转导管寡核苷酸注射的效果。最后，为了评价血管壁在细胞和胞外基质组分的细妙变化，评价了具有寡核苷酸透壁分布和没有可见的解剖的冠状动脉切片。如图 30 所示，寡核苷酸的透壁分布 (图 30A) 和遍及血管壁的完整内部弹性薄片和弹性组织有关 (图 30B)。细胞质染色和核固缩的轻微减少有时在 30 分钟的寡核苷酸保持位点是明显的 (图 30C)。在施用 3 天后没有发现这些变化 (图 30D)。

实施例 19. 体外人平滑肌细胞和体内猪平滑肌细胞中 *C-MYC* 反义寡核苷酸的快速核定位

本实施例通过显示 *c-myc* 反义寡核苷酸在体外 (人) 和体内 (猪) 平滑肌细胞核中的快速定位进一步证明了 *c-myc* 反义寡核苷酸体内处理的效果。这种快速的时程使得可以抑制先前按小时顺序建立 (3 至 4 小时) 的 *c-myc* 基因的活化。

A. 羧基荧光素标记的 *c-myc* 反义寡核苷酸的胞内定位

为了分析荧光标记的寡核苷酸在体外的胞内定位，使用了用 MRC-600 氦-氩激光 (Bio-Rad) 改装的扫描激光共聚焦显微镜 (型号为 Zeiss Axiovert 100)。氦-氩激光发射激发波长 488nm 的激光线。使诱导的荧光扫描通过 63× 物镜，并转化成在计算机显示器上显示的视频信号。图象通过柯达

Ektachrome 100 胶卷在计算机荧屏上拍照。对于体外试验，为了测定通过血管平滑肌细胞摄取的寡核苷酸的时程，细胞在带小室的载玻片上于包含 10% 小牛血清的培养基中生长 2 天，在 2、30 分钟和 2 小时添加荧光素标记的寡核苷酸 (8 μ M)。然后，以 PBS 洗涤细胞 3 次，固定在 50% 丙酮和 50% 甲醇中。

B. 反义寡核苷酸的细胞摄取

为了使得可以抑制靶基因的表达 (在 *c-myc* 的情况下)，反义寡核苷酸的壁内施用应该跟随寡核苷酸的快速细胞摄取。如图 31 所示，血管平滑肌细胞证明了在和荧光素标记的寡核苷酸培养 30 分钟后体外荧光的优先核定位。同样地，在猪体内转导管施用 30 分钟后，寡核苷酸的核定位在血管中层 (图 32) 和外膜 (图 33) 内是显著的，这证明反义寡核苷酸在体内的快速摄取。因此，血管平滑肌细胞的反义寡核苷酸体外和体内胞内摄取在 *c-myc* 原癌基因调节有效的关键时间窗口期间发生，所说的 *c-myc* 原癌基因是在血管壁损伤后调节平滑肌细胞增殖的重要可诱导基因。

序 列 表

(1) 一般信息:

- (i) 申请人: Yi Shi 和 Andrew Zalewski
- (ii) 发明名称: 动静脉和静脉移植物处理的方法和组合物
- (iii) 序列数: 11
- (iv) 通讯地址:
 - (A) 收信人: John D. Mendlein, Ph. D.
 - (B) 街道: Five Palo Alto Square
 - (C) 城市: Palo Alto
 - (D) 州: 加利福尼亚
 - (E) 国家: 美国
 - (F) 邮区代码: 94306
- (v) 计算机可读形式:
 - (A) 介质类型: 3.5 英寸软盘
 - (B) 计算机: IBM 兼容机
 - (C) 操作系统: Windows 3.1/DOS 5.0
 - (D) 软件: 用于 Windows 的微软 Word, 2.0 版
- (vi) 当前申请的数据:
 - (A) 申请号:
 - (B) 申请日:
 - (C) 分类号:
- (vii) 在先申请的数据:
 - (A) 申请号: PCT 申请 US 94/11853
 - (B) 申请日: 1994 年 10 月 17 日
- (viii) 律师/代理人信息:
 - (A) 姓名: John D. Mendlein, Ph. D.
 - (B) 登记号: 38,770
 - (C) 参考/档案号: LYNX-014/02US
- (ix) 电信信息:

- (A) 电话: (415) 843 5020
- (B) 传真: (415) 857 0663

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 15 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

AACGTTGAGG GGCAT 15

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 15 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

ATGCCCTCA ACGTT 15

(2) SEQ ID NO: 3 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 15 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

AACGTGGATT GGCAG 15

(2) SEQ ID NO: 4 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 15 个核苷酸

- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

GAACGGAGAC GGTTT 15

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 24 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

TATGCTGTGC CGGGTCTTC GGGC 24

(2) SEQ ID NO: 6 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 19 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

GCGAGAGTCG CGTCCTTGCT 20

(2) SEQ ID NO: 7 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 20 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

TCATGGAGCA CCAGGGGCTC 20

(2) SEQ ID NO: 8 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 20 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

TCATGGAGCA CCAGGGGCTC 20

(2) SEQ ID NO: 9 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 20 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

GGCCTTTTCA TTGTTTCCCA 20

(2) SEQ ID NO: 10 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 17 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 10:

CATTGTTTTC CAACTCC 17

(2) SEQ ID NO: 11 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 17 个核苷酸
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11:

TTCATTGTTT TCCAATT

17

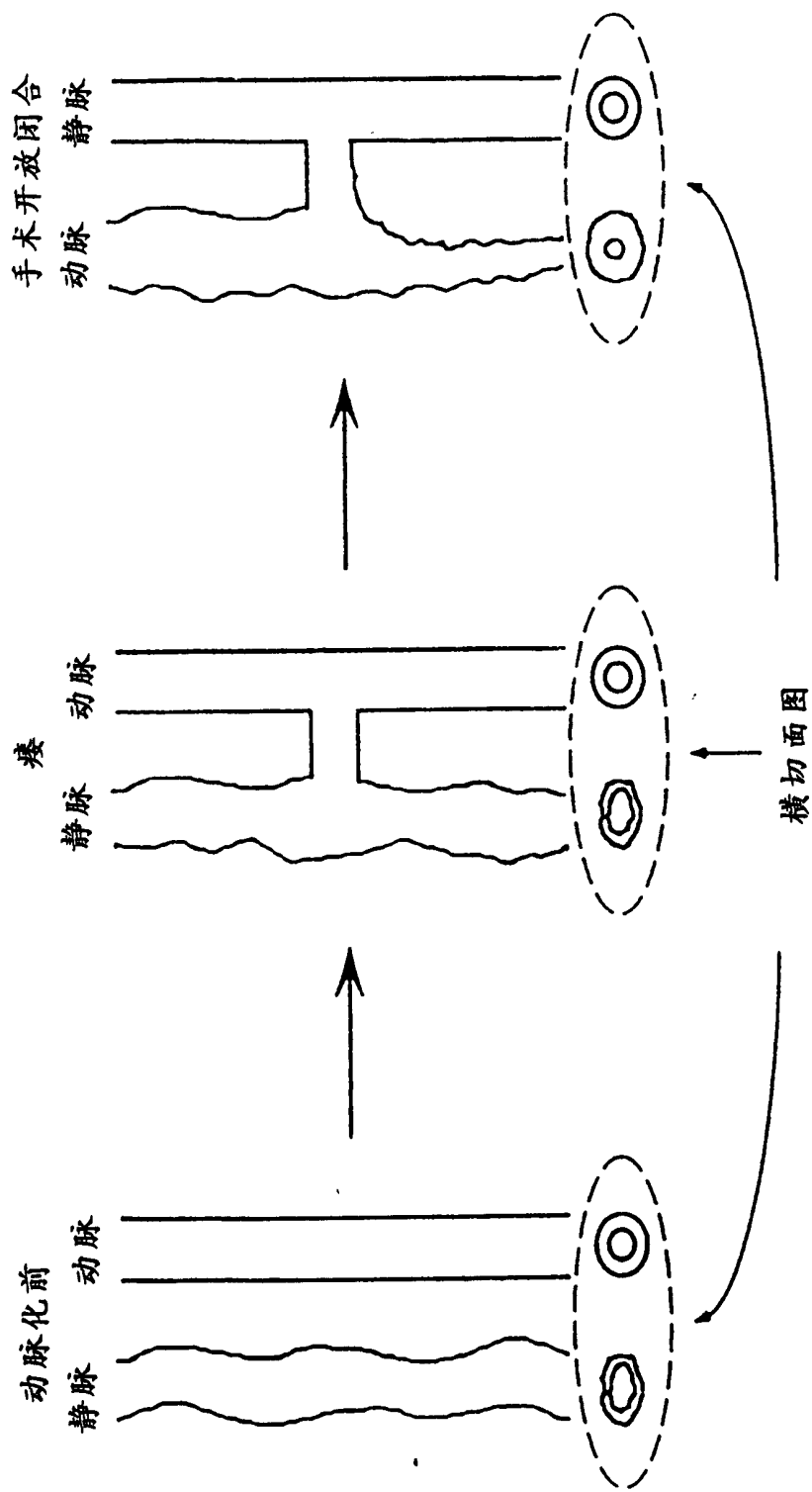


图 1



图 2A

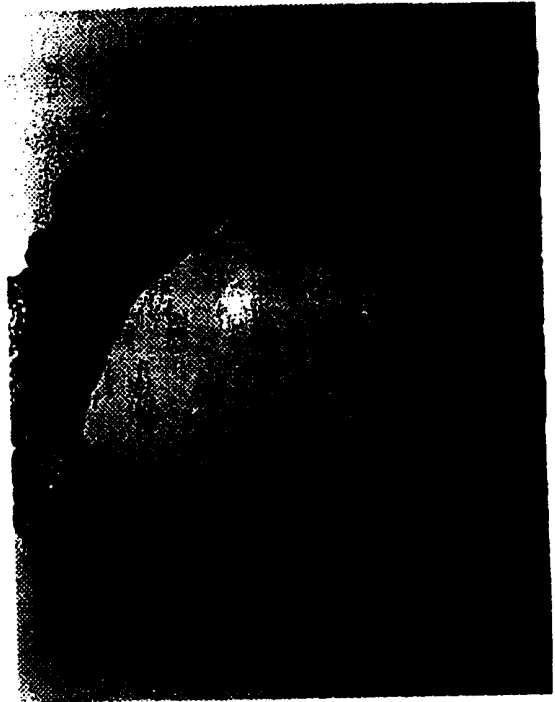


图 2B



图 3A



图 3B



图 4A

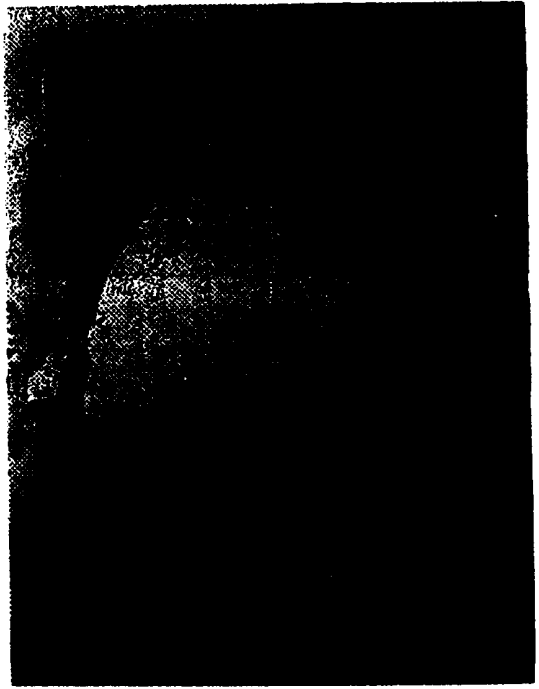


图 4B

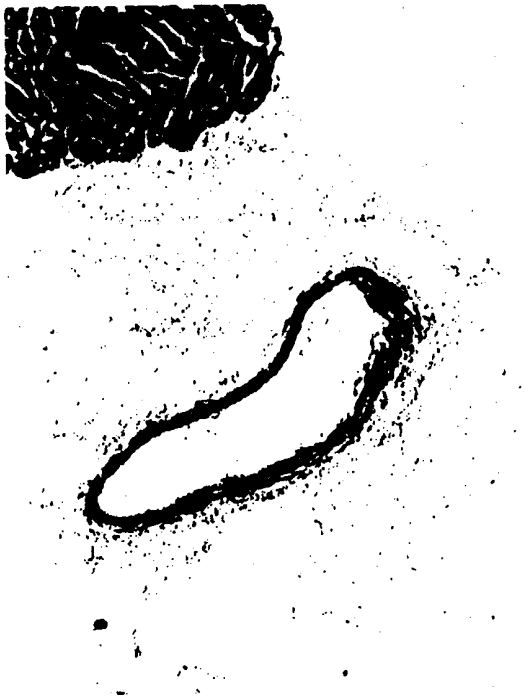


图 4C

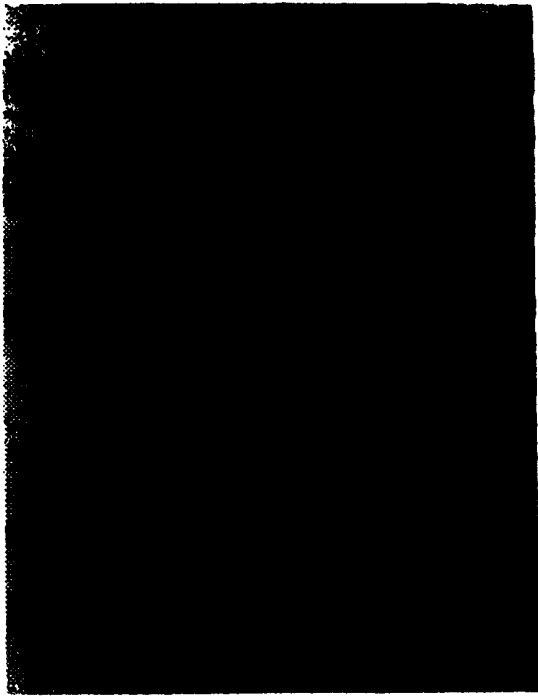


图 5A



图 5B



图 5C



图 6A



图 6B

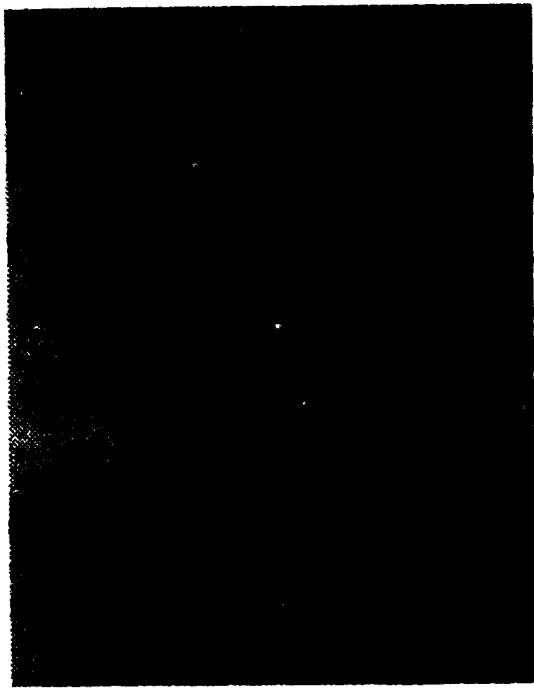


图 6C

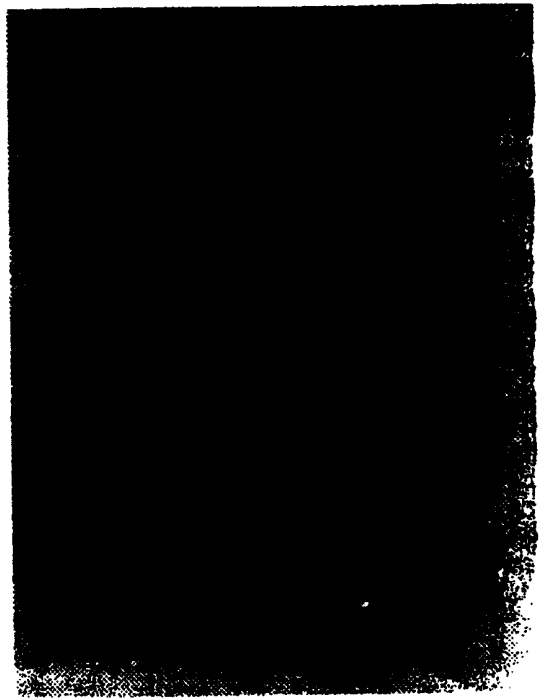


图 6D

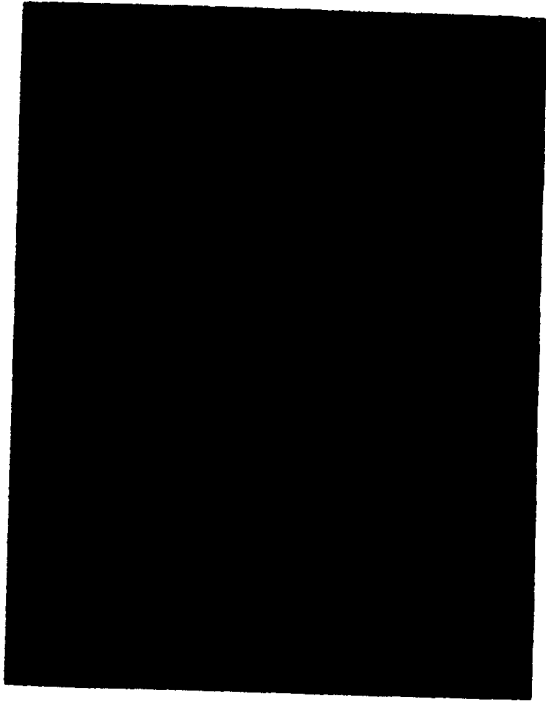


图 7A



图 7B

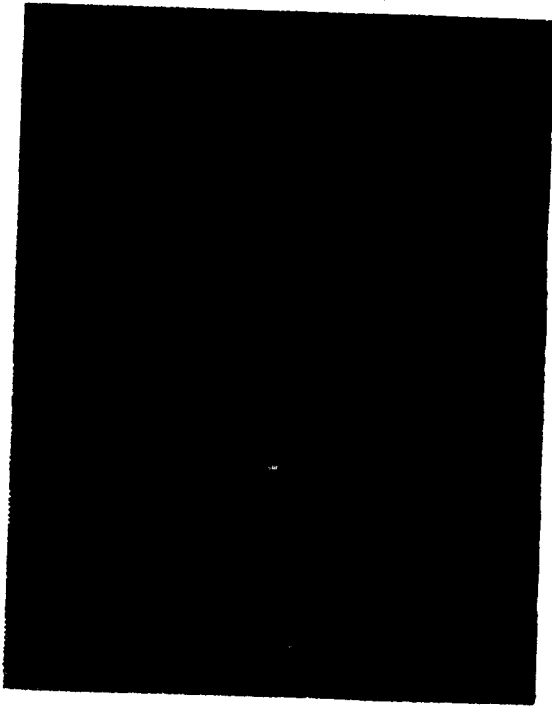


图 7C



图 8A



图 8B



图 8C

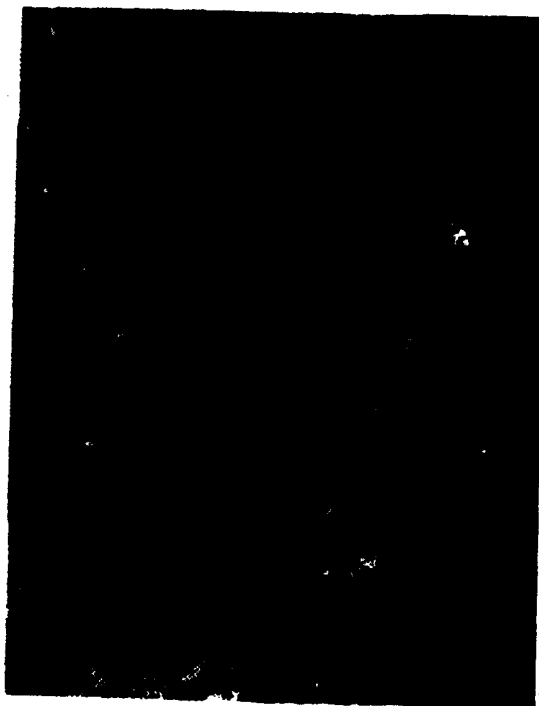


图 8D

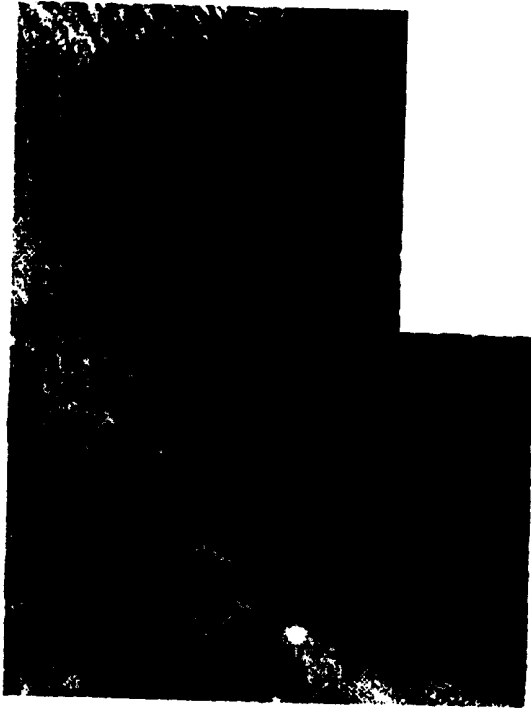


图 9A



图 9B



图 9C

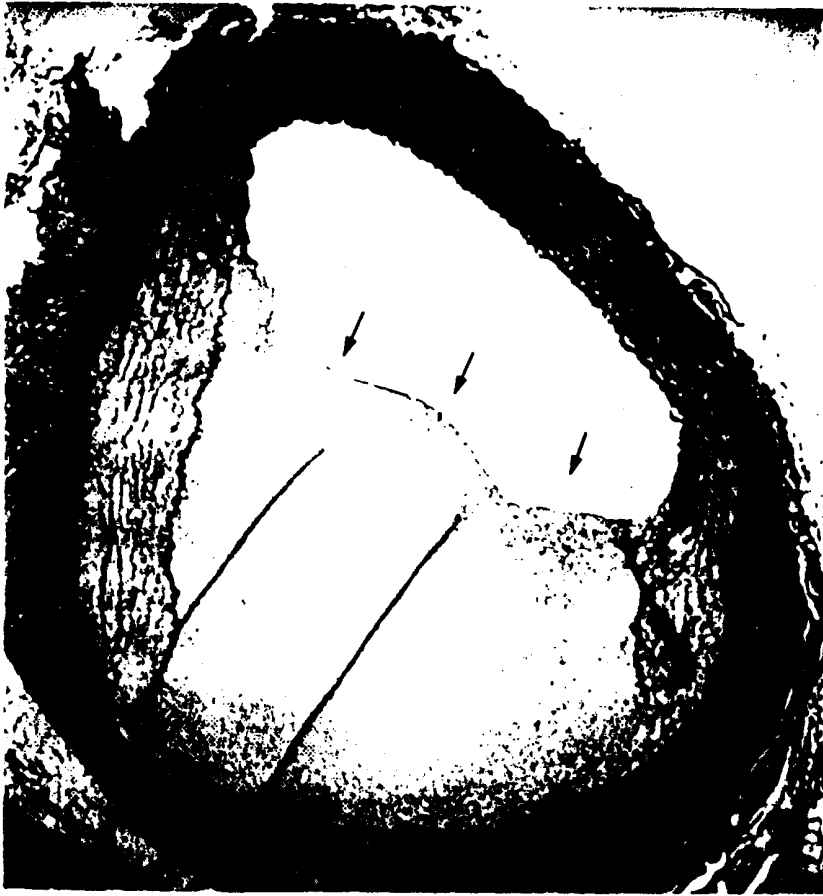


图 10



图 11

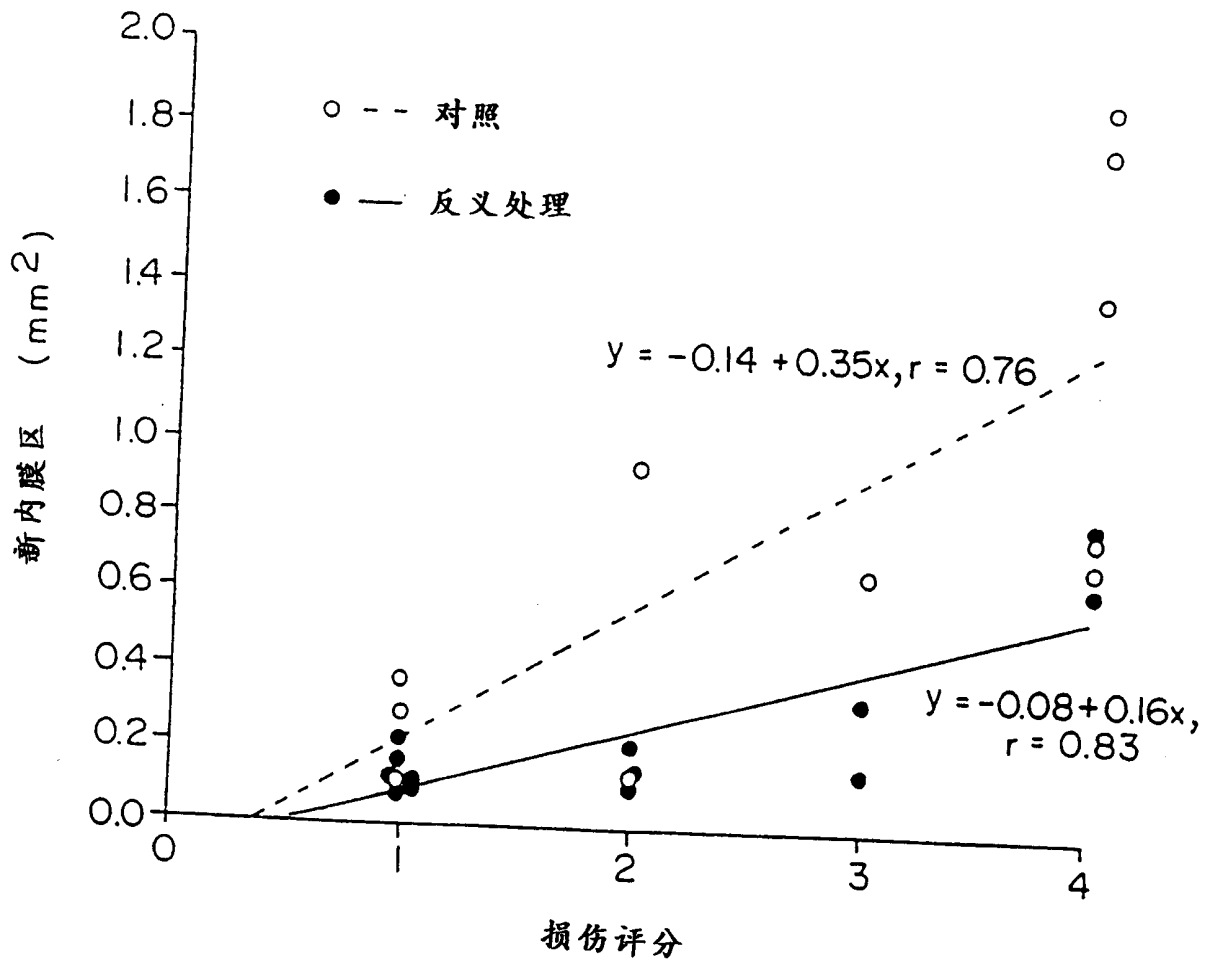


图 12

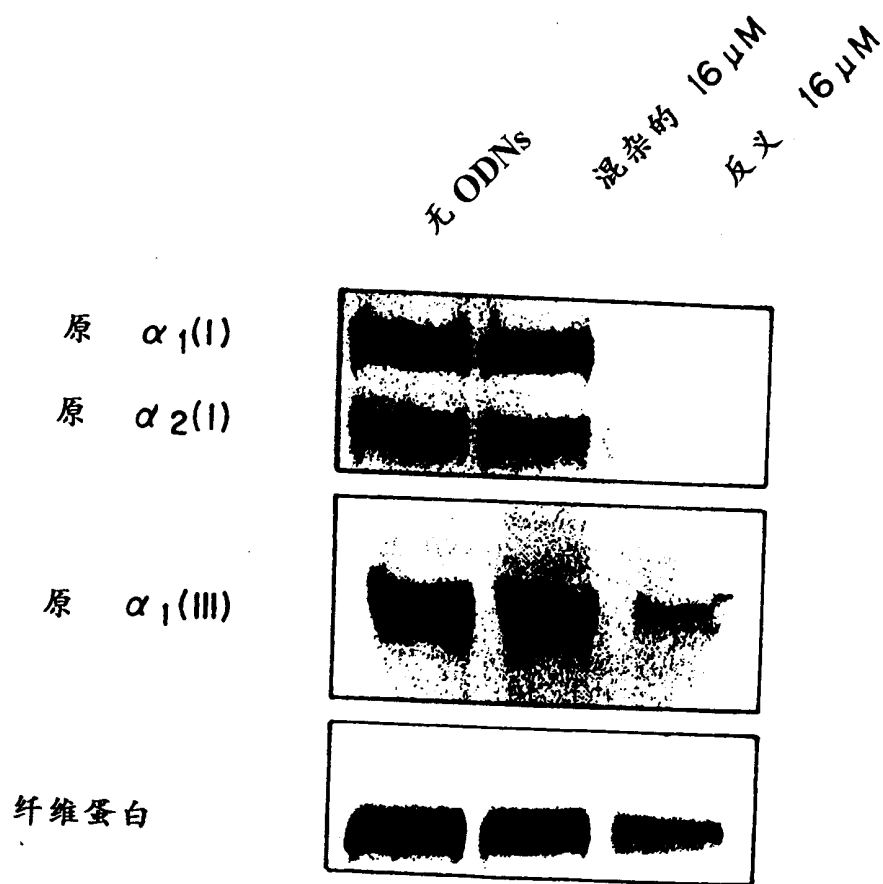


图 13

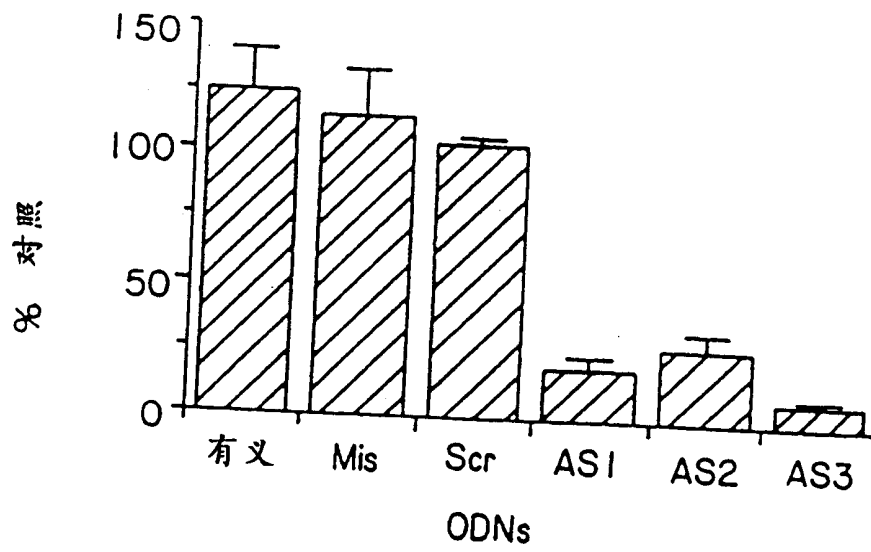
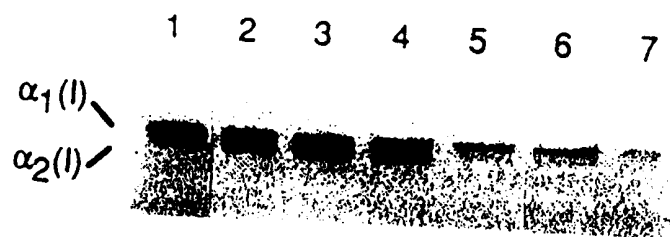


图 14

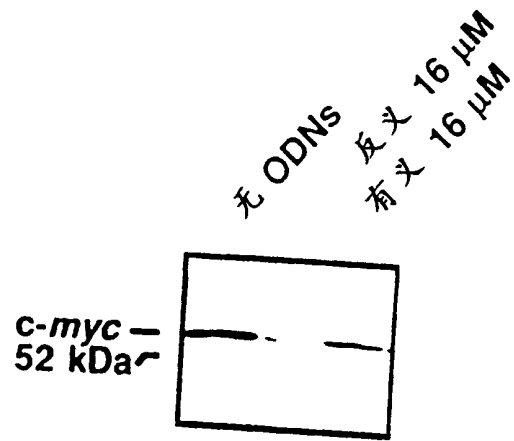


图 15

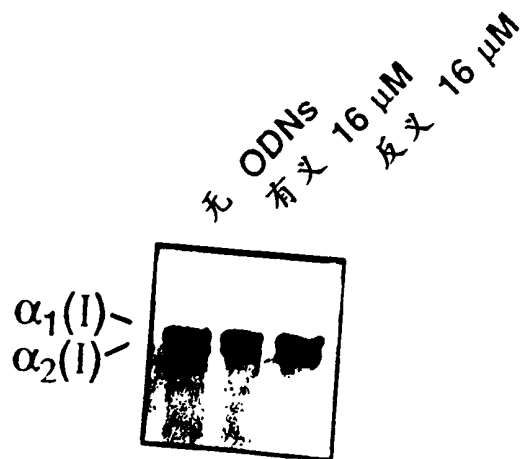


图 17

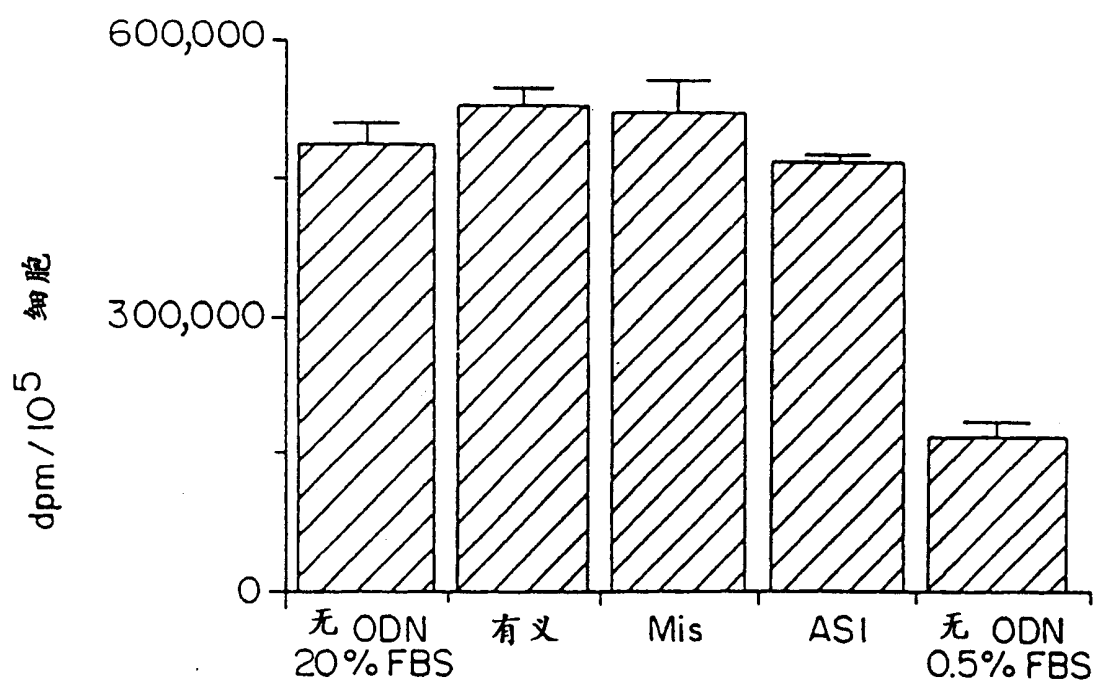
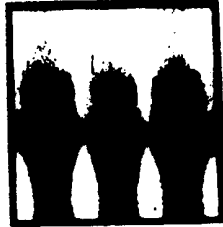


图 16

无 ODNS
混杂的 16 μM
反义 16 μM

原 $\alpha_1(I)$



原 $\alpha_2(I)$



7S

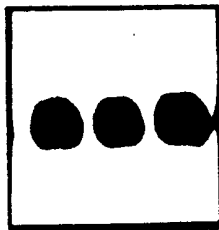


图 18

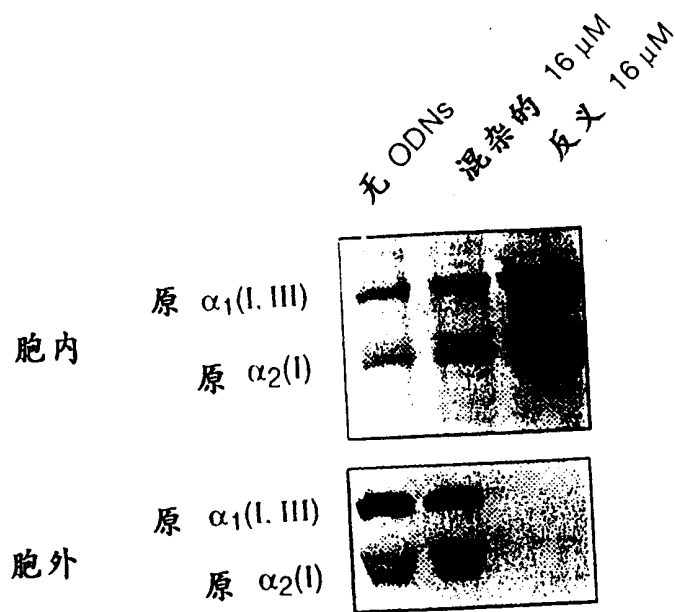


图 19

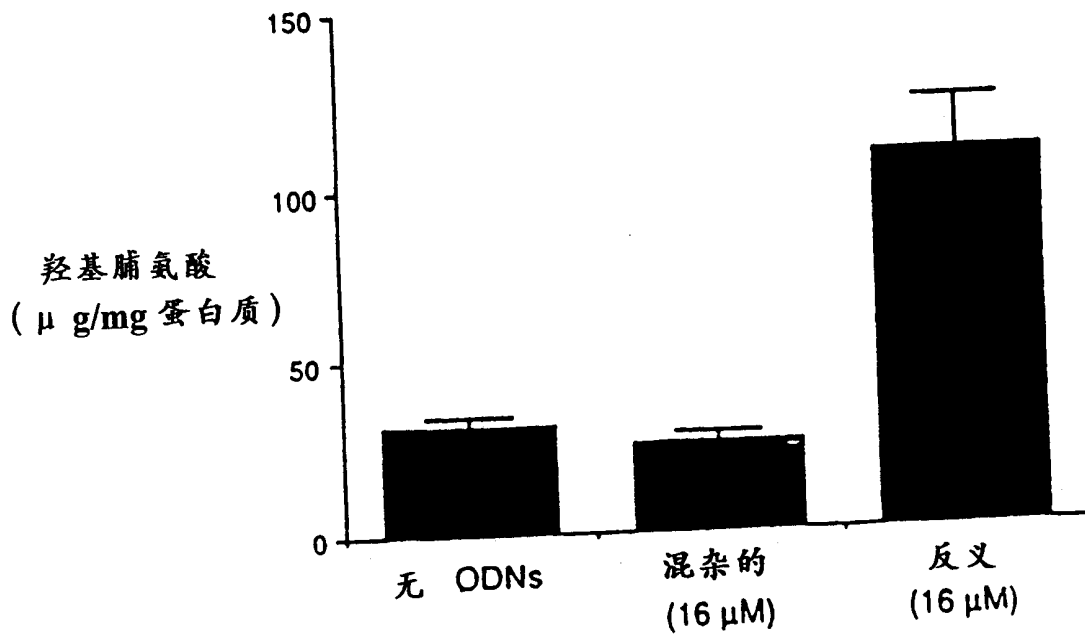


图 20

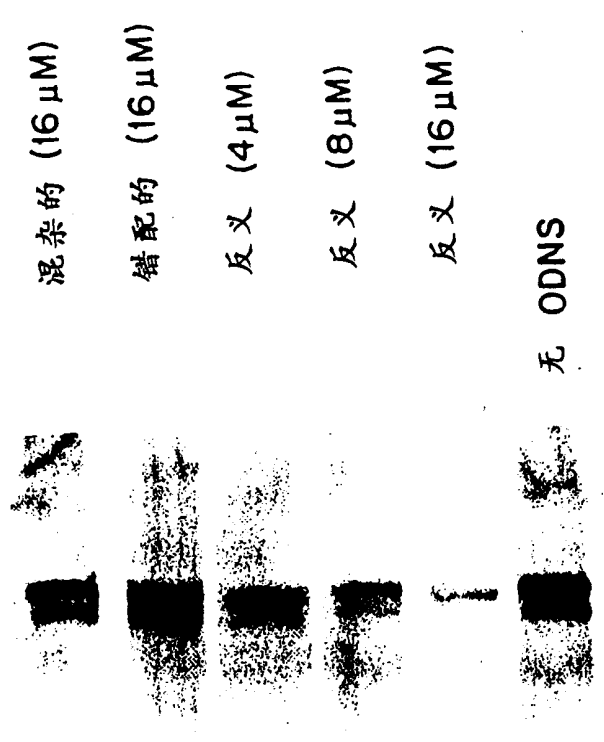


图 21

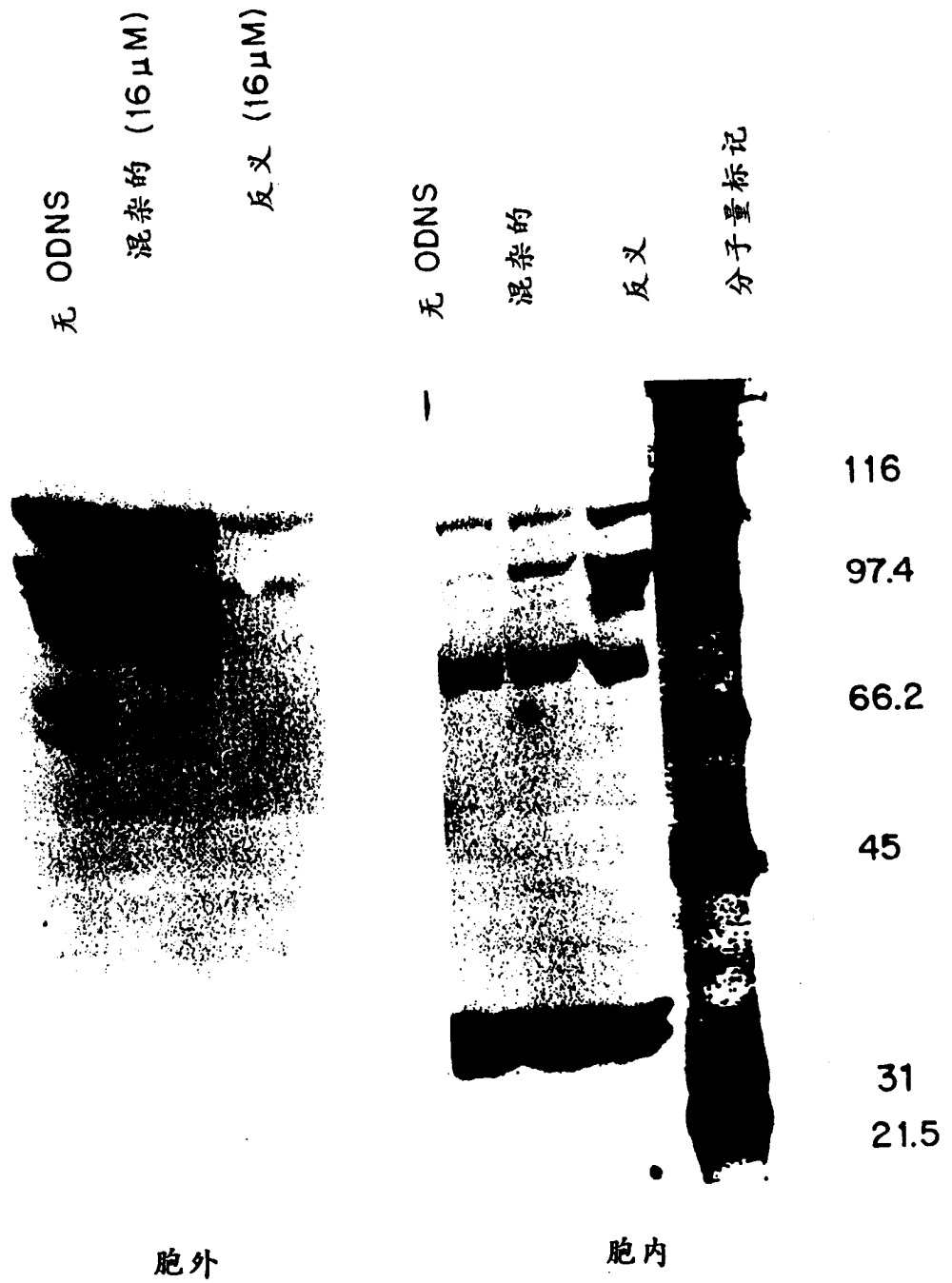


图 22

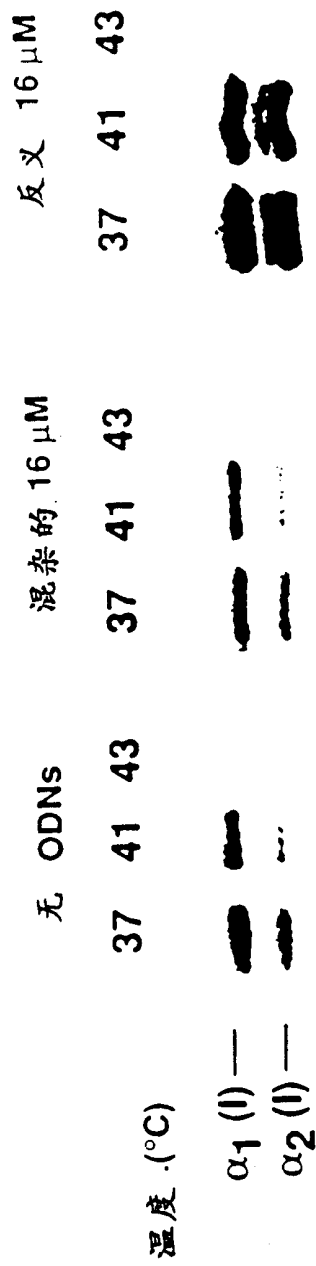


图 23

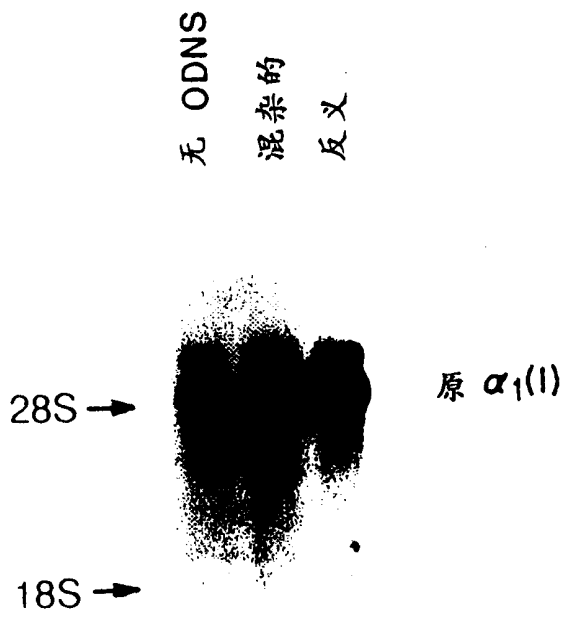


图 24

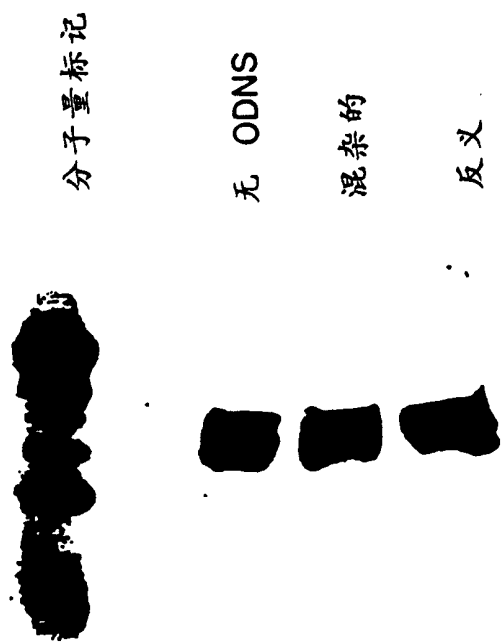


图 25



图 26

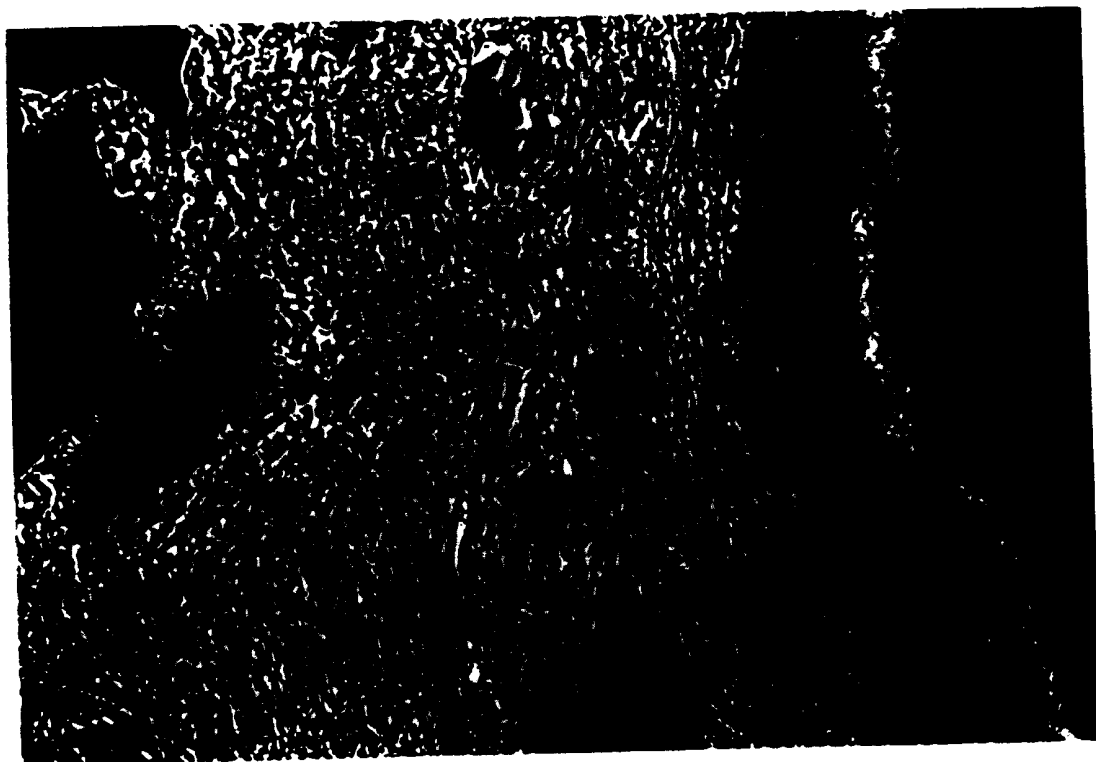


图 27A

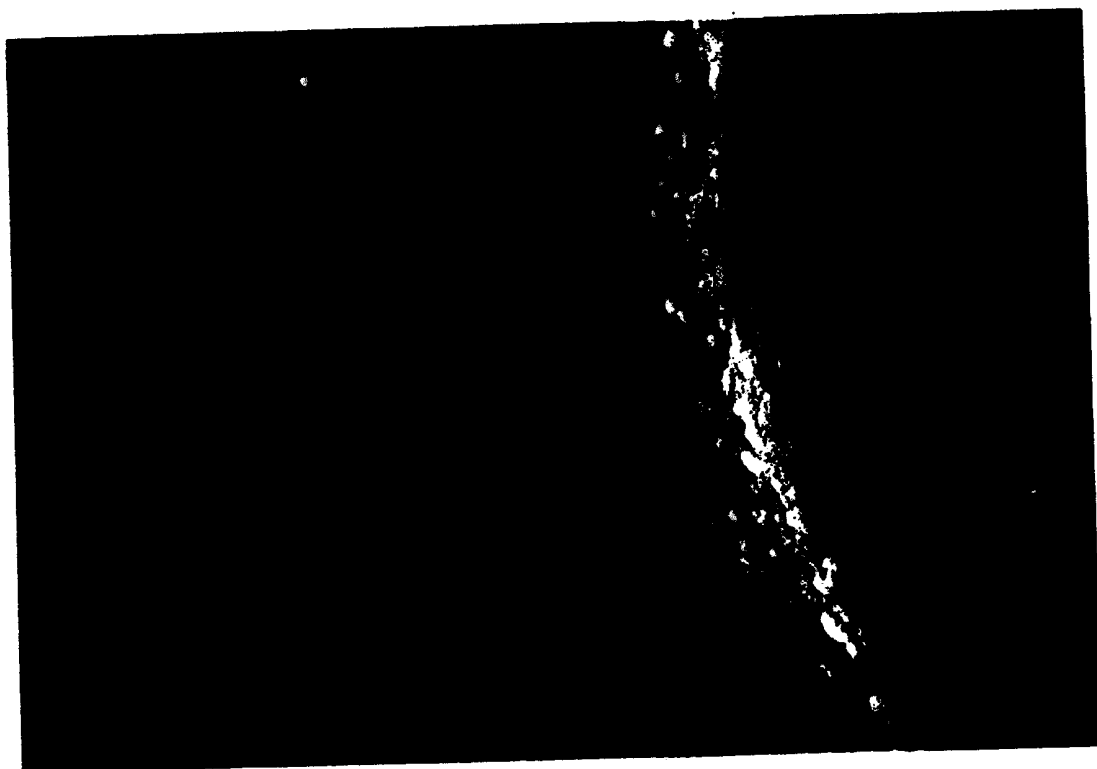


图 27B

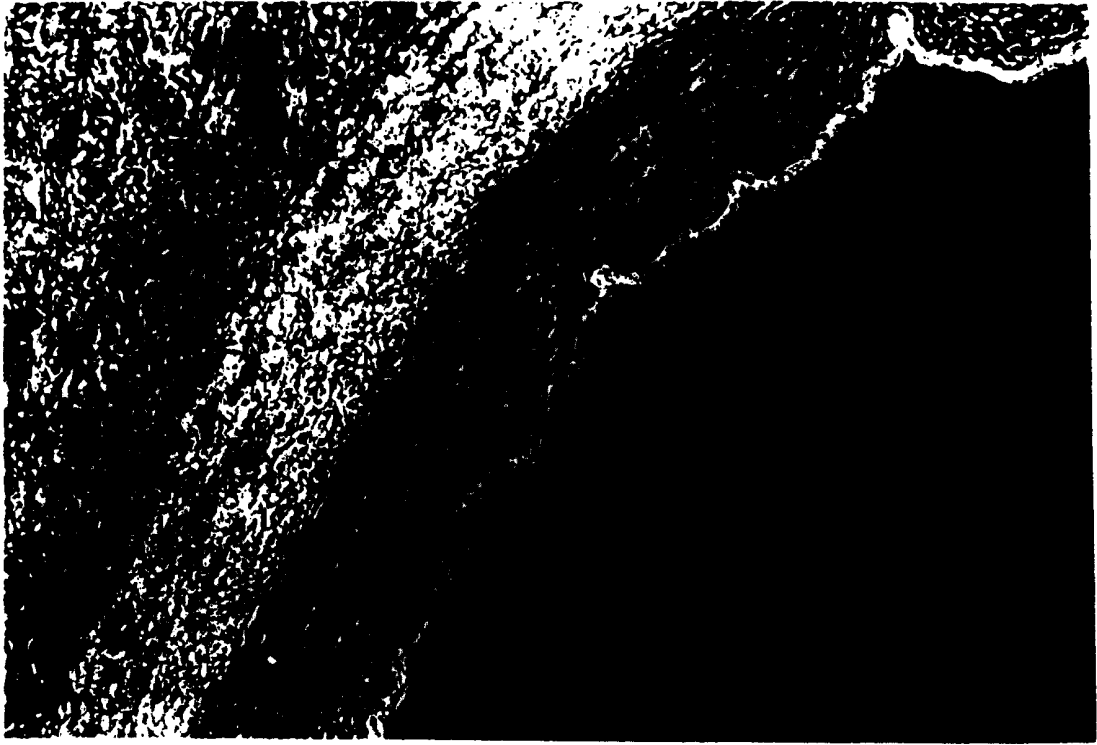


图 27C

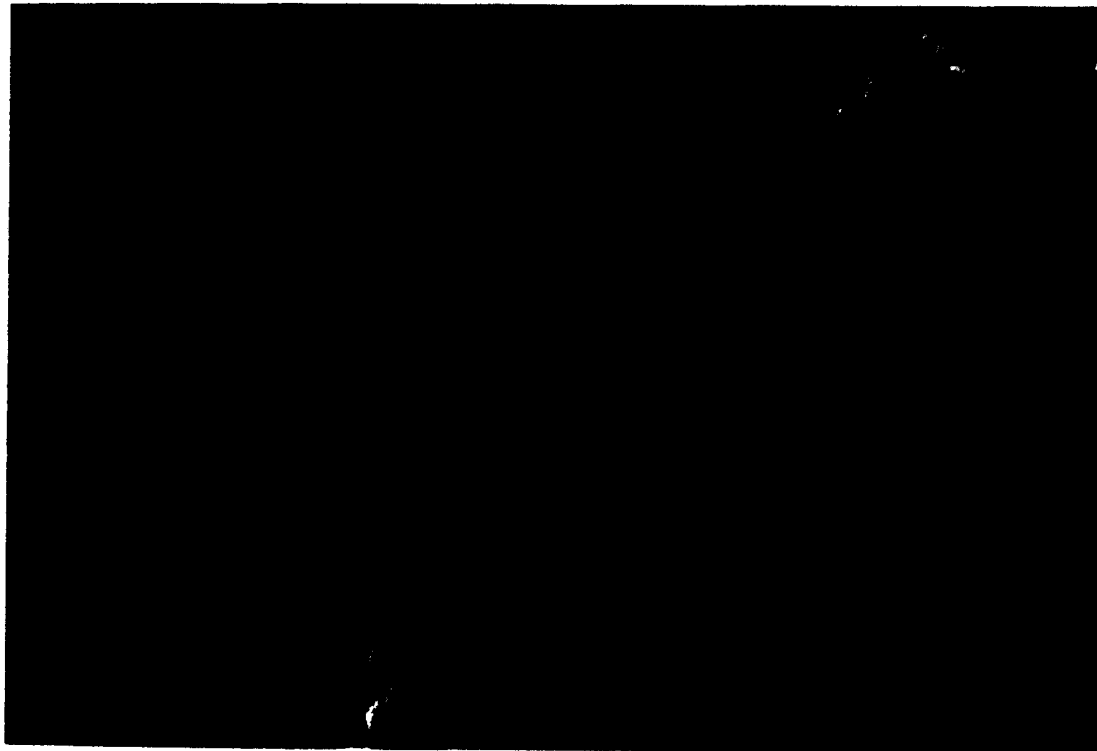


图 27D

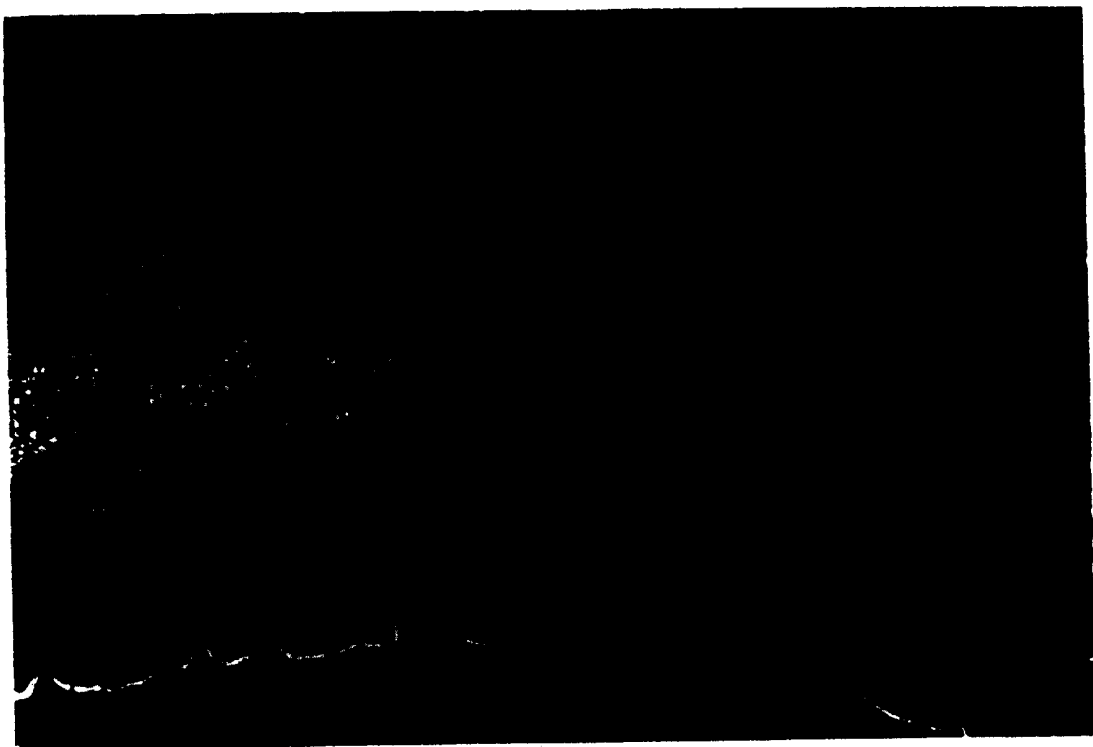


图 27E

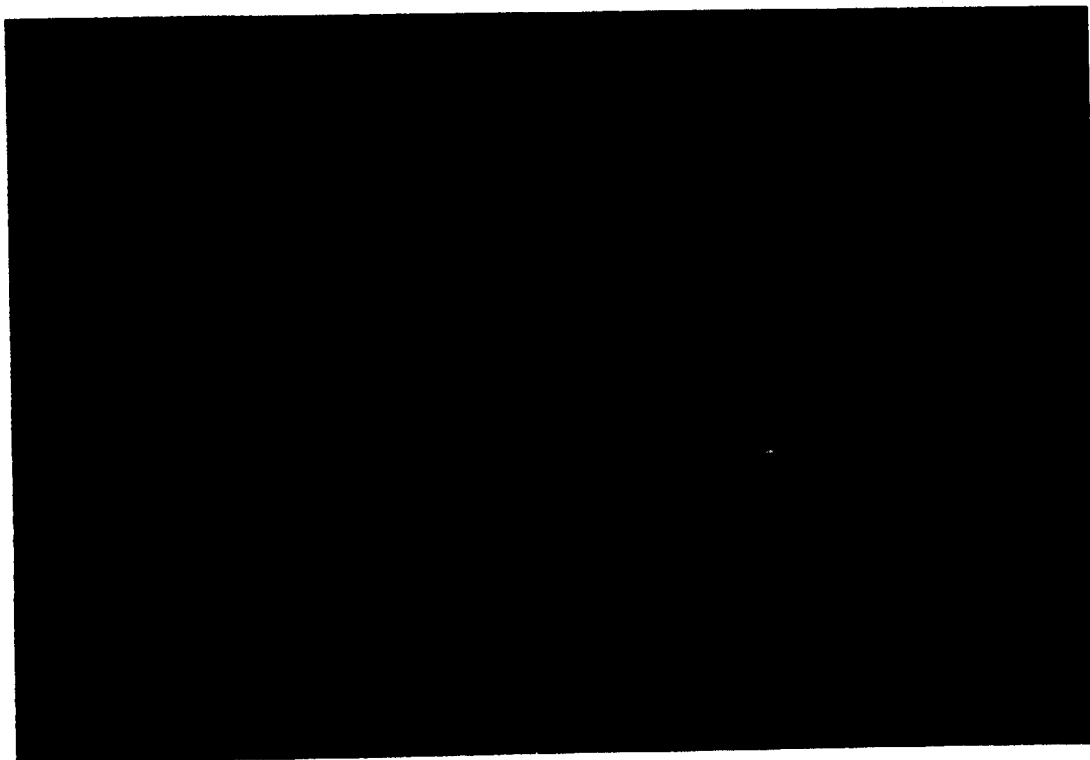


图 27F

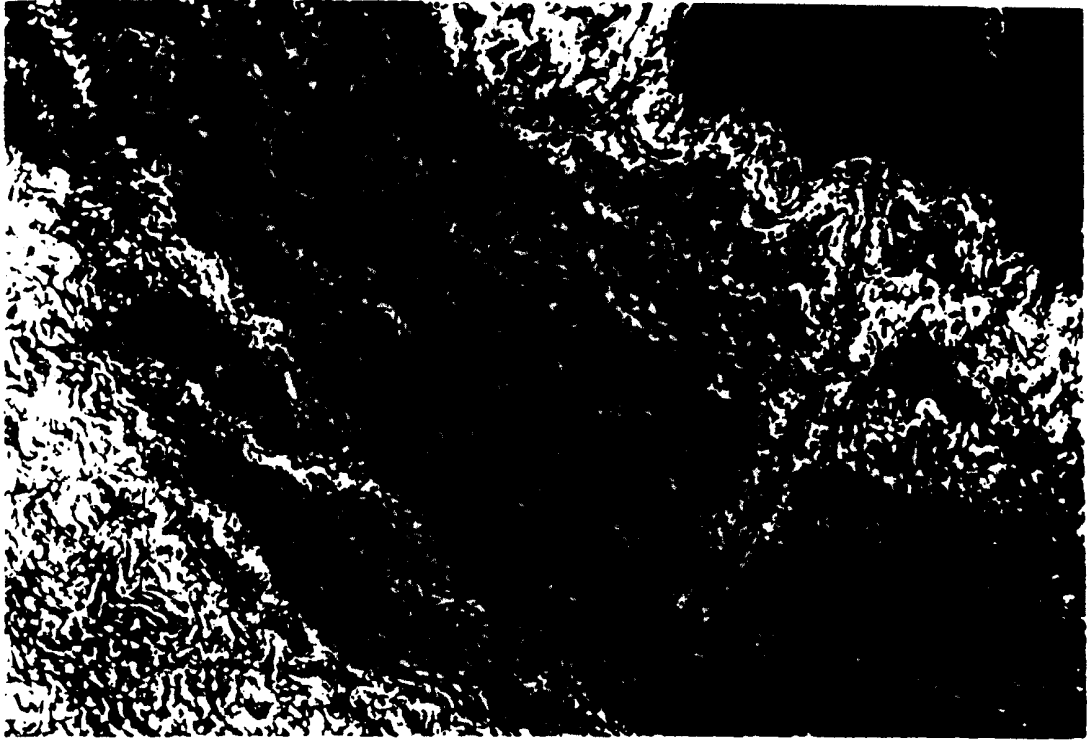


图 28A

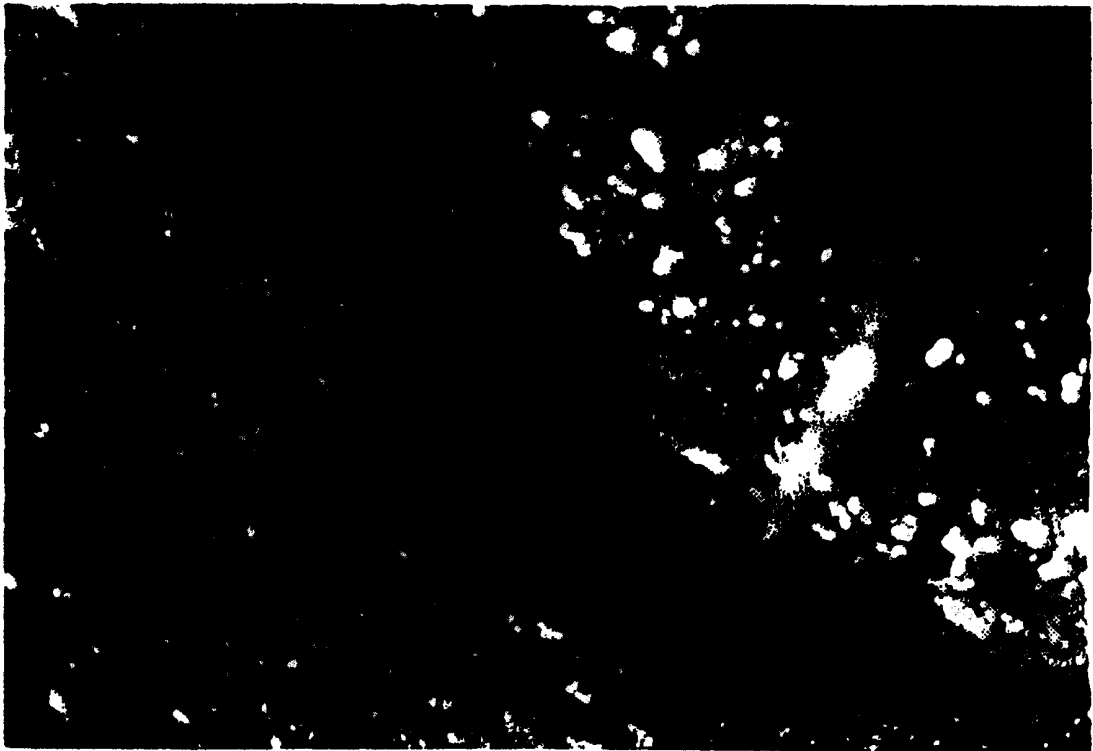


图 28B

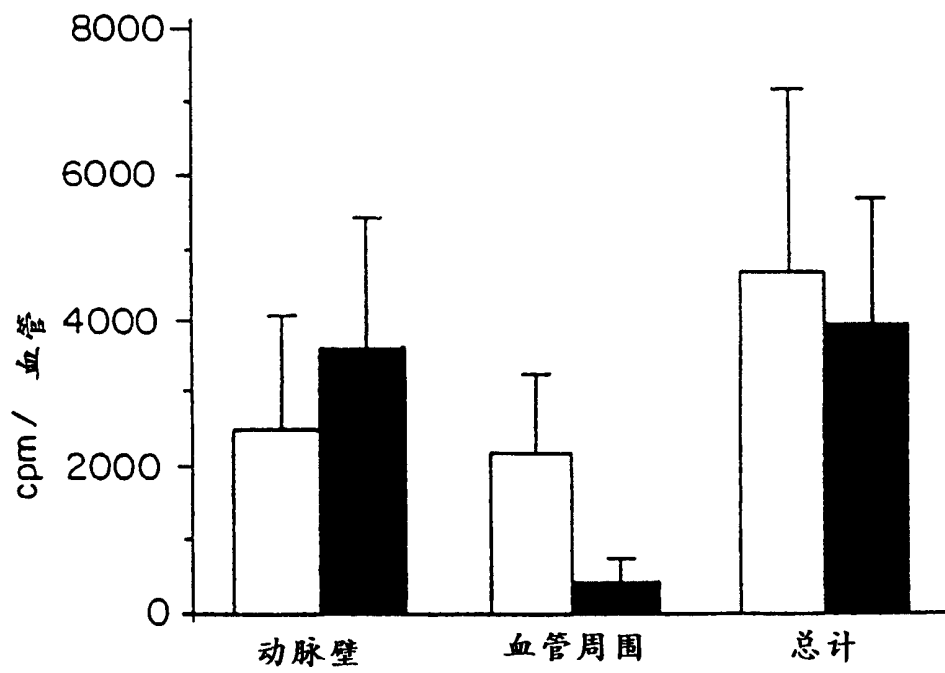


图 29

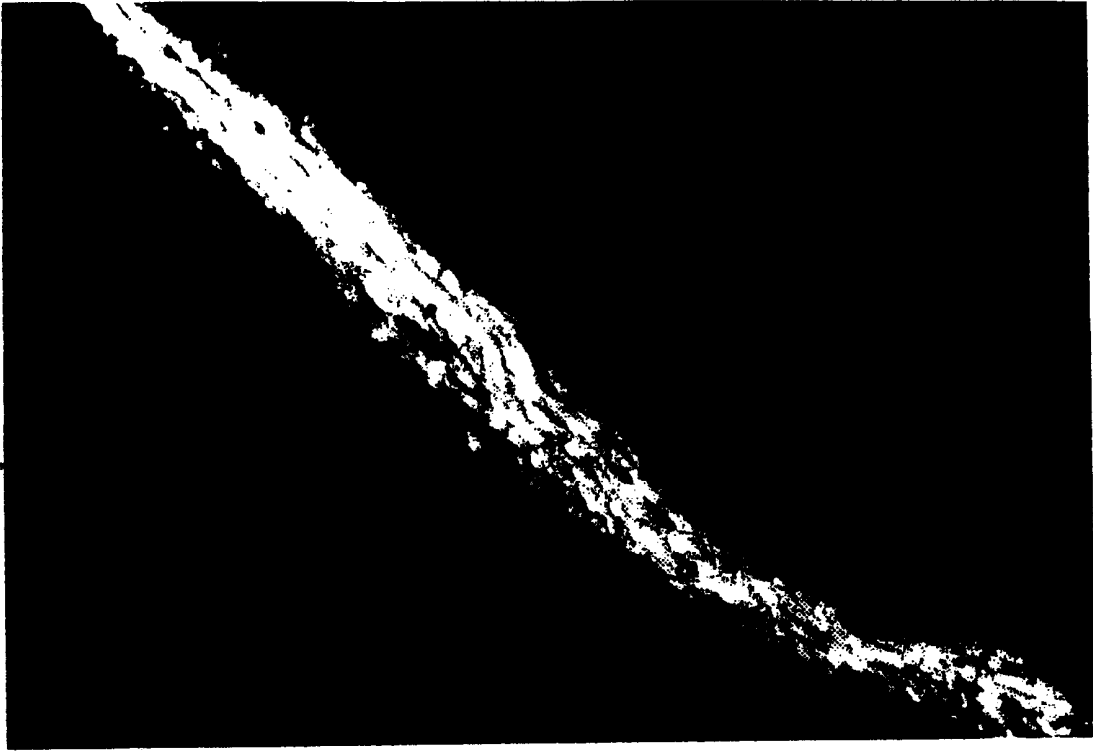


图 30A



图 30B



图 30C

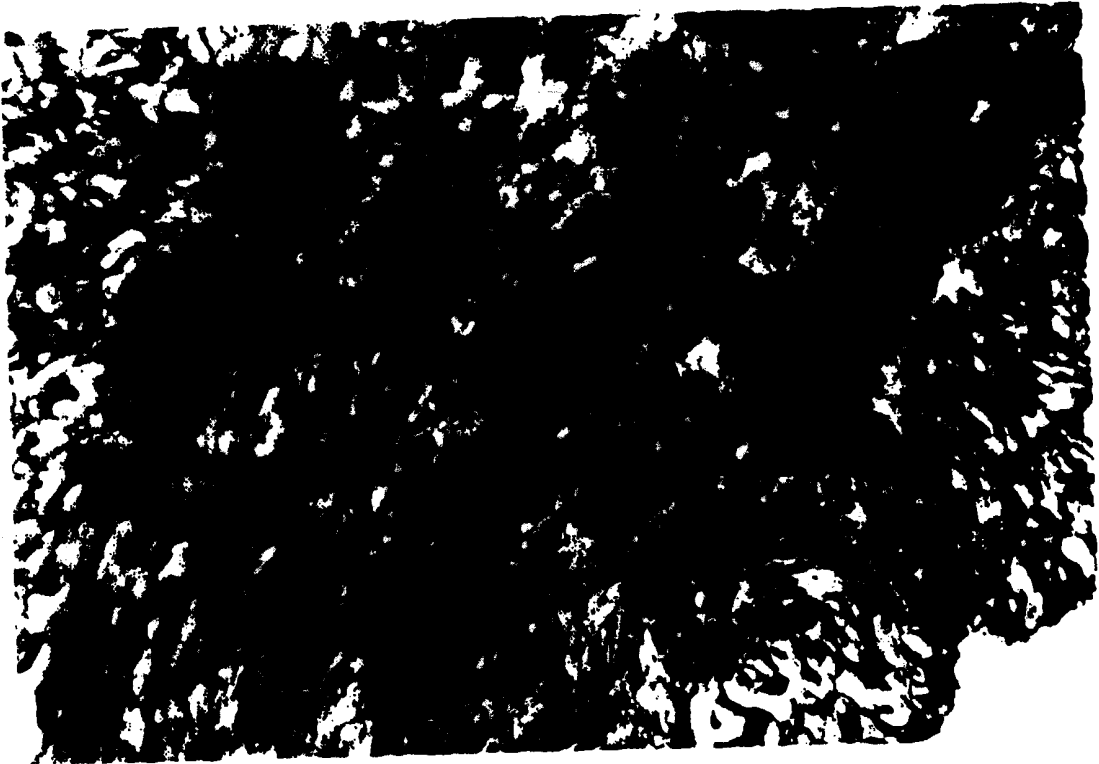


图 30D



图 31

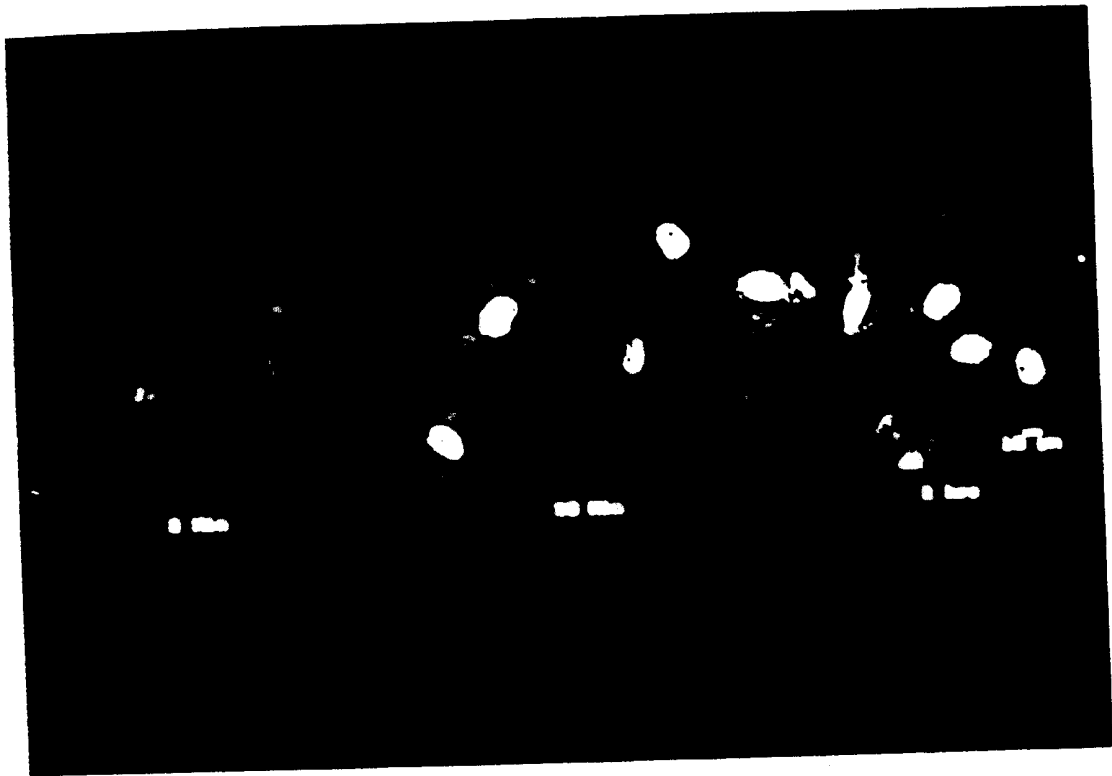


图 32

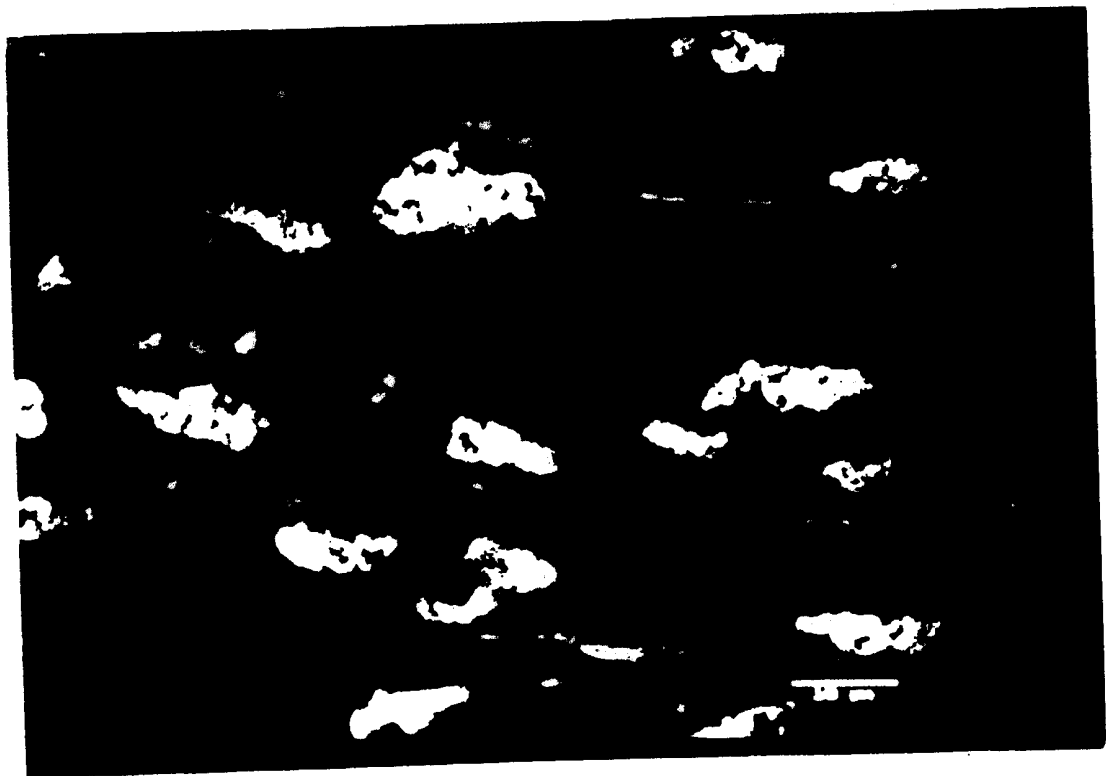


图 33