(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107002082 B
(45)授权公告日 2021.02.02

(21)申请号 201580056200.1
(22)申请日 2015.11.16
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107002082 A
(43)申请公布日 2017.08.01
(30)优先权数据
14193368.9 2014.11.16 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.04.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/076730 2015.11.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/075339 EN 2016.05.19

(73)专利权人 神经视觉医药有限公司
地址 德国格林瓦尔德
(72)发明人 M·霍斯巴赫 M·克兰普特 H-L·阿尔斯
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
代理人 李程达

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2010.01)
A61K 31/7125(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

审查员 杨燕燕

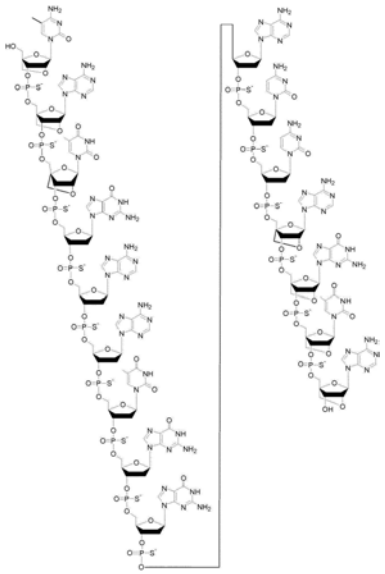
权利要求书7页 说明书278页
序列表106页 附图25页

(54)发明名称

反义寡核苷酸作为TGF-R信号传导的抑制剂

(57)摘要

本发明涉及长度至少为10个核苷酸的反义寡核苷酸，其中至少两个核苷酸是LNA，它们作为TGF-R信号传导的抑制剂的用途，含有该反义寡核苷酸的药物组合物以及用于预防和治疗神经系统、神经变性、纤维化和过度增殖性疾病的用途。



CN 107002082 B

1.由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体，所述10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，所述LNA位于3'末端和/或5'末端，并且所述反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或与编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)，并且所述反义寡核苷酸包含能够与所述序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)互补的序列。

2.权利要求1的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体，其中所述反义寡核苷酸选择性地仅与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域的序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)杂交。

3.权利要求1的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体，其中所述反义寡核苷酸具有12至20个核苷酸的长度和/或其中所述反义寡核苷酸具有在3'末端具有1至5个LNA单元和在5'末端具有1至5个LNA单元的GAPmer结构，和/或其中所述反义寡核苷酸具有磷酸酯、硫代磷酸酯和/或二硫代磷酸酯作为核苷酸间键联。

4.权利要求1的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体，其中所述反义寡核苷酸由以下序列表示：

5'-N^7-AATGGACC-N^8-3' (Seq.ID No.100)

其中

N^7表示:GAATCTTGAATATCTCATG-,AATCTTGAATATCTCATG-,ATCTTGAATATCTCATG-,TCTTGAATATCTCATG-,CTTGAATATCTCATG-,TTGAATATCTCATG-,TGAATATCTCATG-,GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-；

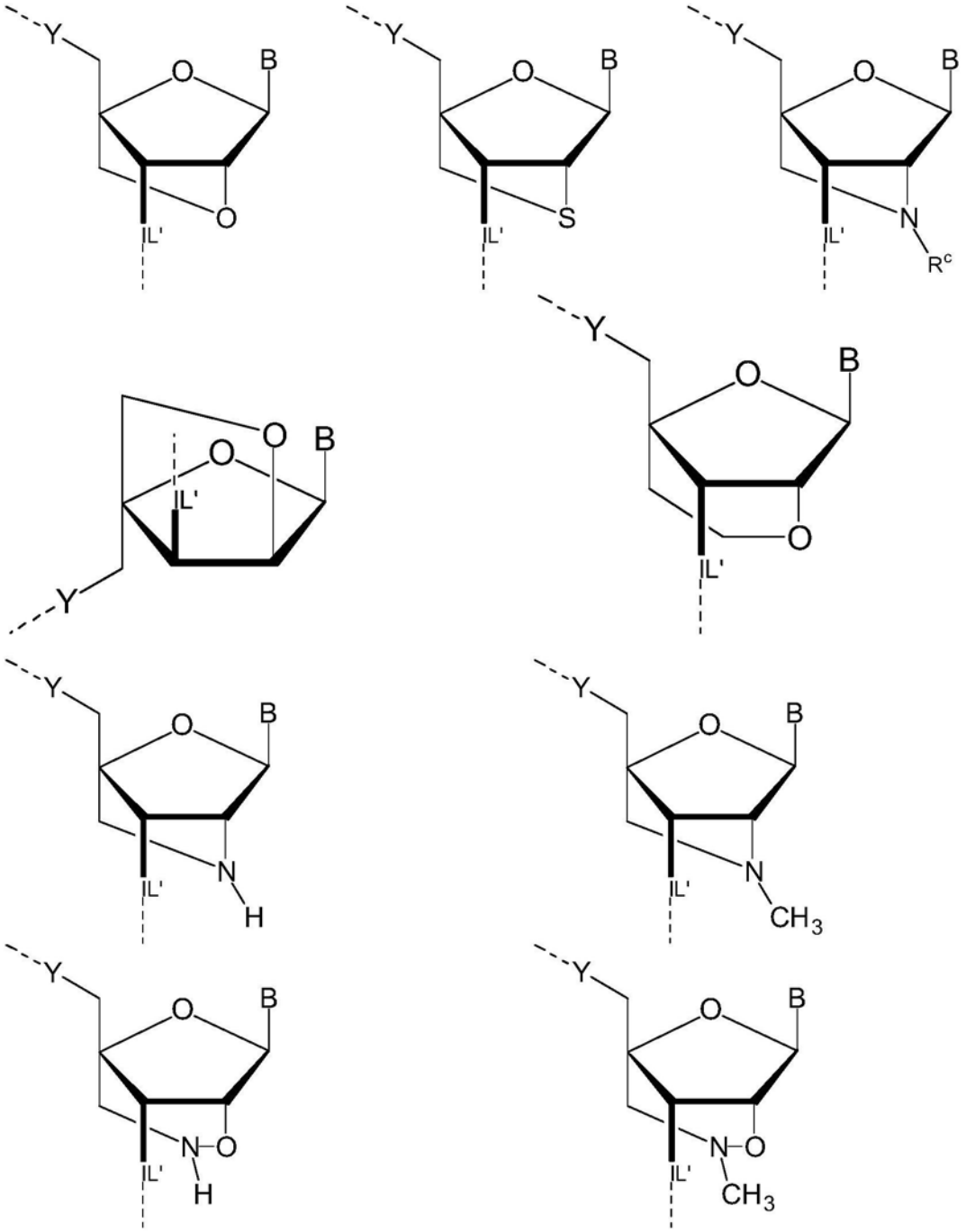
以及

N^8选自:-AGTATTCTAGAAACTCACC,-AGTATTCTAGAAACTCAC,-AGTATTCTAGAAACTCA,-AGTATTCTAGAAACTC,-AGTATTCTAGAAACT,-AGTATTCTAGAAAC,-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A。

5.权利要求1-4中任一项的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体，其中所述反义寡核苷酸的5'末端的最后2至4个核苷酸为LNA核苷酸，并且3'末端的最后2至4个核苷酸为LNA核苷酸，在5'末端的LNA核苷酸和3'末端的LNA核苷酸之间存在至少6个连续核苷酸，其是非LNA核苷酸或是DNA核苷酸。

6.权利要求1-4中任一项的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体，其中所述LNA通过硫代磷酸酯基团或二硫代磷酸酯基团彼此连接，或其中所有核苷酸通过磷酸基团或硫代磷酸酯基团或二硫代磷酸酯基团彼此连接。

7.权利要求1-4中任一项的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体，其中所述LNA选自：



其中

IL'表示-X"-P(=X')(X⁻)-;

X'表示=O或=S;

X⁻表示-O⁻,-OH,-OR^H,-NHR^H,-N(R^H)₂,-OCH₂CH₂OR^H,-OCH₂CH₂SR^H,-BH₃⁻,-R^H,-SH,-SR^H,或-S⁻;

X"表示-O-,-NH-,-NR^H-,-CH₂-,或-S-;

Y是-O-,-NH-,-NR^H-,-CH₂-或-S-;

R^C和R^H彼此独立地选自氢和C₁₋₄-烷基;和

B表示选自以下的核碱基:

腺嘌呤,胸腺嘧啶,鸟嘌呤,胞嘧啶,尿嘧啶,5-甲基胞嘧啶,5-羟甲基胞嘧啶,N⁴-甲基胞

嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,7-脱氮黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,6-甲基腺嘌呤,6-甲基鸟嘌呤,6-乙基腺嘌呤,6-乙基鸟嘌呤,2-丙基腺嘌呤,2-丙基鸟嘌呤,6-羧基尿嘧啶,5,6-二氢尿嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,6-氮杂尿嘧啶,6-氮杂胞嘧啶,6-氮杂胸腺嘧啶,5-尿嘧啶,4-硫尿嘧啶,8-氟腺嘌呤,8-氯腺嘌呤,8-溴腺嘌呤,8-碘腺嘌呤,8-氨基腺嘌呤,8-硫代腺嘌呤,8-硫代烷基腺嘌呤,8-羟基腺嘌呤,8-氟鸟嘌呤,8-氯鸟嘌呤,8-溴鸟嘌呤,8-碘鸟嘌呤,8-氨基鸟嘌呤,8-硫代鸟嘌呤,8-硫代烷基鸟嘌呤,8-羟基鸟嘌呤,5-氟尿嘧啶,5-溴尿嘧啶,5-氯尿嘧啶,5-碘尿嘧啶,5-三氟甲基尿嘧啶,5-氟胞嘧啶,5-溴胞嘧啶,5-氯胞嘧啶,5-碘胞嘧啶,5-三氟甲基胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤,7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤,8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤,3-脱氮鸟嘌呤,3-脱氮腺嘌呤,2-硫尿嘧啶,2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶。

8.权利要求1-4中任一项的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体,其中所述反义寡核苷酸具有以下GAPmer结构之一:3-8-3,4-8-2,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3。

9.权利要求1-4中任一项的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体,其中所述反义寡核苷酸以100%的互补性与编码TGF-RII的mRNA结合,并且不结合人转录组中的任何其它区域。

10.选自下列组的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体:

Seq ID No.	序列 5'-3'
219a	**Gb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdCs**C*b^{1}sAb^1**
219b	**Gb^{1}Ab^1**dAdTdGdGdAdC**C*b^{1}Ab^1**
220a	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1**
220b	**Tb^{1}Gb^{1}Ab^1**dAdTdGdGdAdC**C*b^{1}Ab^{1}Gb^1**
220c	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*s**Ab^{1}sGb^1**
220d	**Tb^{1}s**dGsdA*sdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCs**Ab^{1}sGb^1**
220e	**Tb^{1}sGb^{1}s**dA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*sdAs**Gb^1**
221a	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}sAb^{1}s**dTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^1**
221b	**Tb^{1}Gb^{1}Ab^{1}Ab^1**dUdGdGdAdCdC**Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**
221c	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}sAb^{1}s**dTsdGsdGsdAsdCsdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^1**
221d	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdA*sdCsdC*sdAs**Gb^{1}sTb^1**
221e	**Tb^{1}sGb^{1}s**dA*sdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCsdAsdGs**Tb^1**
221f	**Tb^{1}s**dGsdAsdA*sdTsdGsdGsdAsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^1**
222a	**Ab^{1}sTb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^1**
222b	**Ab^{1}Tb^{1}Gb^{1}Ab^1**dAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*s**Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**
222c	**Ab^{1}Tb^1**dGdA*dAdTdGdGdA*dC**C*b^{1}Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**
222d	**Ab^{4}sTb^{4}sGb^{4}s**dA*sdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*sAbs**Gb^{4}sTb^4**

222e	**Ab^{1}s**dTsdGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*sdA*sdGs**Tb^1**
222f	**Ab^{2}sTb^{2}sGb^{2}s**dA*sdAsdUsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{2}sGb^{2}sTb^2**
222g	**Ab^{4}ssTb^{4}ss**dGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCss**Ab^{4}ssGb^{4}ssTb^4**
223a	**Ab^{1}sTb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAdTdGdGdAdCdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
223b	**Ab^{1}ssTb^{1}ss**dGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssdTss**Ab^1**
223c	**Ab^1**dTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdT**Ab^1**
223d	**Ab^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdUsdGsdGsdA*sdCsdCsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sAb^1**
223e	**Ab^{6}Tb^{6}Gb^6**dA*dAdTdGdGdAdCdC*dA**Gb^{6}Tb^{6}Ab^6**
223f	**Ab^{1}Tb^1**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
223g	**Ab^{4}sTb^{4}sGb^{4}s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb^{4}sAb^4**
223h	**Ab^{1}sTb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAsdGsdTs**Ab^1**
223i	**Ab^{1}ssTb^{1}ss**dGssdAssdAssdUssdGssdGssdA*ssdCssdCssdAssdGss**Tb^{1}ssAb^1**
218y	**C*b^{2}sAb^{2}sTb^{2}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{2}sGb^{2}sTb^{2}sAb^2**
218z	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218aa	**C*b^{1}ssAb^{1}ssTb^{1}ss**dGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCss**Ab^{1}ssGb^{1}ss Tb^{1}ssAb^1**
218ab	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^1**dGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
218ac	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^1**dGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdCsdCs**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
218ad	**C*b^{6}sAb^{6}sTb^{6}s**dGdAdAdTdGdGdAdCdC**Ab^{6}sGb^{6}sTb^{6}sAb^6**
218ae	**C*b^{7}sAb^{7}sTb^{7}sGb^{7}s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{7}sTb^{7}sAb^7**
218af	**C*bs^{1}Ab^{1}s**dUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdUsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218b	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^1**sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218m	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218n	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^1**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
218o	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218p	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218q	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218c	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218r	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^1**dGdAdAdTdGdGdAdCdC**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
218s	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGdAdAdTdGdGdAdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218t	**/5SpC3s/C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218u	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1/3SpC3s/**
218v	**/5SpC3s/C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1 /3SpC3s/**
218ag	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdA*sdA*sdUsdGsdGsdA*sdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
218ah	**C*b^{4}ssAb^{4}ssTb^{4}ss**dGssdA*ssdA*ssdTssdGssdGssdA*ssdCssdCssdAssdGss

	Tb⁴ssAb⁴
218ai	**C*b²ssAb²ssTb²ssGb²ss**dAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssdTssAb²
218aj	**C*b¹Ab¹Tb¹Gb¹**dAdAdUdGdGdAdCdC**Ab¹Gb¹Tb¹Ab¹**
218ak	**C*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sAb¹s**dA*sdUsdGsdGsdAsdCsdCsdA*s**Gb¹sTb¹sAb¹**
218am	**C*b¹sAb¹s**dUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdCs**C*b¹sAb¹sGb¹sTb¹sAb¹**
218an	**C*b⁶sAb⁶sTb⁶sGb⁶s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb⁶sTb⁶sAb⁶**
218ao	**C*b⁷sAb⁷sTb⁷s**dGsdA*sdA*sdUsdGsdGsdAsdCsdCsdA*s**Gb⁷sTb⁷sAb⁷**
218ap	**C*b⁴sAb⁴sTb⁴sGb⁴s**dA*sdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*sdAsdGs**Tb⁴sAb⁴**
218aq	**C*b⁴Ab⁴Tb⁴Gb⁴**dAdAdTdGdGdAdCdCdAdG**Tb⁴Ab⁴**
218ar	**C*b¹sAb¹sTb¹**sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb¹sTb¹sAb¹**
224a	**C*b¹sAb¹sTb¹sGb¹sAb¹s**dAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹**
224b	**C*b²sAb²sTb²s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab²sGb²sTb²sAb²sTb²**
224c	**C*b¹sAb¹sTb¹sGb¹s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb¹sAb¹sTb¹**
224d	**C*b¹s**dAsdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹**
224e	**C*b¹sAb¹sTb¹s**dGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*s**Ab¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹**
224f	**C*b¹Ab¹**dTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdA**Gb¹Tb¹Ab¹Tb¹**
224g	**C*b¹s**dAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb¹sAb¹sTb¹**
224h	**C*b¹Ab¹Tb¹Gb¹Ab¹**dA*dTdGdGdA*dC*dC*dAdGdT**Ab¹Tb¹**
224i	**C*b¹ssAb¹ssTb¹ssGb¹ssAb¹ss**dAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssTb¹ssAb¹ssTb¹
224j	**C*b⁴Ab⁴Tb⁴**dGdA*dA*dTdGdGdA*dCdCdA**Gb⁴Tb⁴Ab⁴Tb⁴**
224k	**C*b⁶sAb⁶sTb⁶s**dGsdA*sdA*sdUsdGsdGsdA*sdC*sdC*sdAsdGs**Tb⁶sAb⁶sTb⁶**
224m	**C*b⁷sAb⁷sTb⁷sGb⁷s**dAdAdTdGdGdAdC*dC*dAs**Gb⁷sTb⁷sAb⁷sTb⁷**
225a	**Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹sGb¹s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab¹sGb¹sTb¹sAb¹sTb¹**
225b	**Tb⁷sC*b⁷sAb⁷sTb⁷sGb⁷s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTsdAs**Tb⁷**
225c	**Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAs**Gb¹sTb¹sAb¹sTb¹**
225d	**Tb¹sC*b¹sAb¹s**dTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb¹sTb¹sAb¹sTb¹**
225e	**Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb¹sAb¹sTb¹**
225f	**Tb¹C*b¹**dA*dTdGdAdAdUdGdGdAdCdC***Ab¹Gb¹Tb¹Ab¹Tb¹**
225g	**Tb⁴C*b⁴Ab⁴Tb⁴s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab⁴Gb⁴Tb⁴Ab⁴Tb⁴**
225h	**Tb¹ssC*b¹ssAb¹ss**dTssdGssdA*ssdA*ssdTssdGssdGssdAssdCssdC*ssdA*ssdGss**Tb¹ssAb¹ssTb¹**
225i	**Tb²C*b²Ab²**dTdGdAdAdTdGdGdAdC*dC***Ab²Gb²Tb²Ab²Tb²**
226a	**Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹sGb¹s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb¹sTb¹sAb¹sTb¹sTb¹**

226b	**Tb⁶C*b⁶Ab⁶Tb⁶Gb⁶**dAdAdTdGdGdAdCdCdA**Gb⁶Tb⁶Ab⁶Tb⁶Tb⁶**
226c	**Tb¹sC*b¹sAb¹sTb¹s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTs**Ab¹sTb¹ sTb¹**
226d	**Tb¹s**dCsdAsdTsdGsdAsdA*sdUsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb¹sTb¹sAb¹sTb¹sTb¹**
226e	**Tb⁴sC*b⁴s**dAsdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdCsdC*sdAsdGs**Tb⁴sAb⁴sTb⁴ sTb⁴**
226f	**Tb²ssC*b²ssAb²ssTb²ssGb²ss**dAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssd TssdAss**Tb²ssTb²**
227a	**C*b¹sTb¹sC*b¹sAb¹sTb¹s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb¹sTb¹sAb¹ sTb¹sTb¹**
227b	**C*b²sTb²sC*b²s**dAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb²sTb²sAb² sTb²sTb²**
227c	**C*b¹Tb¹C*b¹**dAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdC*dAdG**Tb¹Ab¹Tb¹Tb¹**
227d	**C*b¹s**dUsdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb¹sTb¹sAb¹sTb¹ sTb¹**
227e	**C*b⁴sTb⁴sC*b⁴sAb⁴s**dTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb⁴sAb⁴ sTb⁴sTb⁴**
228a	**Tb¹sC*b¹sTb¹sC*b¹sAb¹s**dTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb¹ sAb¹sTb¹sTb¹sC*b¹**
228b	**Tb¹C*b¹Tb¹C*b¹Ab¹**dTdGdAdAdTdGdGdAdC*dC*dAdG**Tb¹Ab¹Tb¹Tb¹C*b¹**
228c	**Tb⁶sC*b⁶sTb⁶s**dCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTs**Ab⁶ sTb⁶sTb⁶sC*b⁶**
229a	**Ab¹sTb¹sC*b¹sTb¹sC*b¹s**dAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCsdAsdGsdTs**A b¹sTb¹sTb¹sC*b¹sTb¹**
229b	**Ab¹Tb¹C*b¹Tb¹C*b¹**AdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdT**Ab¹Tb¹Tb¹C*b¹Tb¹**
230a	**Tb¹sAb¹sTb¹sC*b¹sTb¹s**dCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdT sdAs**Tb¹sTb¹sC*b¹sTb¹sAb¹**
230a	**Tb¹sAb¹sTb¹sC*b¹sTb¹s**dCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdT sdAs**Tb¹sTb¹sC*b¹sTb¹sAb¹**
230b	**Tb¹Ab¹Tb¹C*b¹Tb¹**dCdAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTdA**Tb¹Tb¹C*b¹Tb¹ Ab¹**
231a	**Ab¹sTb¹sAb¹sTb¹sC*b¹s**dTsdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdG sdTsdAsdTs**Tb¹sC*b¹sTb¹sAb¹sGb¹**
231b	**Ab¹Tb¹Ab¹Tb¹C*b¹**dTdCdAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTdAdT**Tb¹C*b¹ Tb¹Ab¹Gb¹**

其中b,d,C*,A*,s,ss意义如下：

b^1 β-D-氧基-LNA

b^2 β-D-硫基-LNA

b^3 β-D-氨基-LNA

b^4 α-L-氧基-LNA

b^5 β-D-ENA

b^6 β-D-(NH)-LNA

b^7 β-D-(NCH_3)-LNA

d 2-脱氧

C* 甲基-C(5-甲基胞嘧啶)

A* 2-氨基腺嘌呤

s 核苷酸间键联是硫代磷酸酯基团(-O-P(O)(S⁻)-O-)

ss 核苷酸间键联是二硫代磷酸酯基团(-O-P(S)(S⁻)-O-)

/5SpC3/ 在反义寡核苷酸5'末端基团的-O-P(O)(O⁻)OC_3H_6OH

/3SpC3/ 在反义寡核苷酸3'末端基团的-O-P(O)(O⁻)OC_3H_6OH

/5SpC3s/ 在反义寡核苷酸5'末端基团的-O-P(O)(S⁻)OC_3H_6OH

/3SpC3s/ 在反义寡核苷酸3'末端基团的-O-P(O)(S⁻)OC_3H_6OH

粗体核苷酸是LNA核苷酸

非粗体核苷酸是非LNA核苷酸。

11.权利要求1-4或10中任一项的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体在制备用于促进受损神经通路的再生和功能重新连接和/或用于治疗和补偿年龄诱导的神经元干细胞更新的减少的药物中的用途。

12.权利要求1-4或10中任一项的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体在制备用于预防和治疗神经变性疾病,神经炎性病症,创伤或创伤后病症,神经血管病症,缺氧病症,感染后中枢神经系统病症,纤维化疾病,过度增殖疾病,老年性耳聋和老花眼的药物中的用途。

13.根据权利要求12的用途,其中过度增殖疾病是癌症。

14.根据权利要求12的用途,其中过度增殖疾病是肿瘤。

15.根据权利要求12的用途,其中所述神经变性疾病和神经炎性病症选自:阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、克-雅病、克-雅病的新变型、哈勒沃登-施帕茨病、亨廷顿氏舞蹈症、多系统萎缩、痴呆、额颞叶痴呆、运动神经元病症、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓性肌肉萎缩症、脊髓小脑萎缩、精神分裂症、情感障碍、重性抑郁症、脑膜脑炎、细菌性脑膜脑炎、病毒性脑膜脑炎、中枢神经系统自身免疫性病症、多发性硬化症、急性缺血/缺氧损伤、中风、中枢神经系统和脊髓创伤、头部和脊柱外伤、脑创伤性损伤、动脉硬化、动脉粥样硬化、微血管病痴呆、宾斯旺格病、视网膜变性、耳蜗退化、黄斑变性、耳蜗性聋、艾滋病相关的痴呆、视网膜色素变性、脆性X相关的震颤/共济失调综合征、进行性核上性麻痹、纹状体黑质变性、橄榄体脑桥小脑变性、Shy Drager综合征、年龄依赖记忆缺陷、与痴呆相关的神经发育障碍、唐氏综合症、共核蛋白病、三核苷酸重复病症、创伤、血管疾病、血管炎症和中枢神经系统老化,并且其中纤维化疾病选自:肺纤维化、囊性纤维化、肝硬化、心内膜心肌纤维化、陈旧性心肌梗死、心房纤维化、纵隔纤维化、骨髓纤维化、腹膜后纤维化、进行性大块纤维化、肾性系统性纤维化、克罗恩病、瘢痕疙瘩、系统性硬化症、关节纤维性粘连、纤维性海绵体炎、Dupuytren挛缩和红斑狼疮后的残留物。

16.药物组合物,其含有至少一种根据权利要求1-4或10中任一项的反义寡核苷酸及其盐和光学异构体以及至少一种药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂、溶剂或稀释剂。

反义寡核苷酸作为TGF-R信号传导的抑制剂

[0001] 说明书

[0002] 本发明涉及反义寡核苷酸,它们作为TGF-R信号传导的抑制剂的用途,含有此类反义寡核苷酸的药物组合物以及用于预防和治疗神经系统、神经变性和过度增殖性包括肿瘤疾病的用途。

[0003] TGF-β以三种已知亚型(TGF-β1,TGF-β2和TGF-β3)存在于人中。这些在神经变性疾病如ALS和一些人类癌症中上调,并且已经证明了该生长因子在神经变性疾病、急性创伤和神经炎症和衰老的病理状况中的表达增加。转化生长因子-β(TGF-β1)的同种型也被认为参与先兆子痫的发病机制。

[0004] 活化的TGF-β通过三种不同的受体类型对靶细胞发挥作用:I型(TGFRI),也称为激活素样激酶(ALK;53kDa),II型(TGFRII;70-100kDa)和III型(TGFRIII;200-400kDa)。TGF-β受体是单程丝氨酸/苏氨酸激酶受体。而II型受体激酶是组成型活性的,I型受体需要被激活。该过程通过将配体结合到TGFRII来启动;这触发包含配体和I型和II型受体的复合物的瞬时形成。考虑到配体的二聚体组成,受体复合物最有可能由两对每种受体类型形成的四聚体结构组成。

[0005] TGF-β信号传导通过其受体和下游通过Smad蛋白发生。通过将TGF-β同种型与特异性TGFRI/II受体对结合引发的Smad依赖性细胞信号传导导致细胞内Smad的磷酸化,随后将活化的Smad复合体转移到细胞核中以影响特异性靶基因表达。信号发散到其它途径和来自相邻信号通路的收敛产生高度复杂的网络。取决于环境和细胞环境,TGF-β信号传导导致多种不同的细胞应答,如肿瘤细胞中的细胞增殖、分化、运动和细胞凋亡。在癌症中,通过促进肿瘤生长、诱导上皮-间质转化(EMT)、阻止抗肿瘤免疫反应、增加肿瘤相关纤维化、调节细胞外基质(ECN)和细胞迁移、并最终增强血管发生,TGF-β可直接(称为TGF-β信号传导的内在作用)或间接(称为外在作用)影响肿瘤生长。确定TGF-β信号传导是否具有肿瘤启动或抑制功能的因子(例如浓度,时间,局部暴露)是主要研究和讨论的问题。目前,推测TGF-β信号传导的肿瘤抑制功能在早期癌症阶段中丧失,类似于其它肿瘤抑制因子的隐性功能丧失突变。因此,存在几种用于通过阻断TGF-β信号传导途径治疗潜在癌症的药理学方法,如Galunisertib和TEW-7197的研究,其都是TGFRI的小分子抑制剂并正在进行临床研究,以及抗TGFRII抗体的LY3022859。

[0006] 由转化生长因子(TGF-β)家族的蛋白提供的信号代表在生理条件下控制神经干细胞的系统,但类似于其它细胞类型,神经干细胞在转化至癌症干细胞后从该控制释放。TGF-β是参与脑的各种生理和病理生理过程的多功能细胞因子。在损伤或缺氧后和在神经变性过程中,当其调节和抑制炎症反应时其在成人脑中被诱导。损伤后,虽然TGF-β通常是神经保护的,但其通过抑制神经干细胞增殖并诱导瘢痕形成的纤维化/神经胶质增生来限制脑的自我修复。类似于其对神经干细胞的效应,TGF-β显示出对大多数细胞类型的抗增殖控制;然而,矛盾的是,许多肿瘤逃避TGF-β控制。此外,这些肿瘤发展出将TGF-β的抗增殖作用改变为致癌信号的机制,主要是通过编排大量TGF-β介导的对基质、迁移和侵袭、血管发生和最重要地免疫逃逸机制的效应。因此,TGF-β参与肿瘤进展(参见图3)。

[0007] 因此，TGF受体II(转化生长因子，β受体II；同义使用的符号：TGF-βII型受体，TGFBR2；AAT3；FAA3；LDS1B；LDS2；LDS2B；MFS2；RIIC；TAAD2；TGFR-2；TGFβ-RII，TGF-RII，TGF-R_{II})(特别是其抑制)被验证为治疗神经变性疾病如ALS和过度增殖性疾病如癌症和纤维化疾病的靶标。

[0008] 因此，本申请的目的是提供能够抑制TGF受体II(TGF-R_{II})表达并因此减少TGF受体II(TGF-R_{II})的量并减少TGF-β下游信号传导的活性的药学活性化合物。

[0009] 本发明的目的通过独立权利要求的教导内容来解决。本发明的进一步有利的特征、方面和细节根据本申请的从属权利要求、说明书、附图和实施例是明显的。

[0010] 令人惊讶的是，在数千种候选物质中，例如蛋白-核苷酸复合物，siRNA，微小RNA(miRNA)，核酶，适体，CpG寡聚物，DNA-酶，核糖开关，脂质，肽，小分子，筏或细胞膜穴样内陷的修饰剂，高尔基体的修饰剂，抗体及其衍生物，特别是嵌合体，Fab片段和Fc片段，含有LNA(**LNA®**：Locked Nucleic Acids)的反义寡核苷酸是用于本文公开的用途的最有希望的候选物。

[0011] 因此，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或与编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)或序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)或序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)或序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)或序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)或序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)，并且反义寡核苷酸分别包含能够与所述序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)或序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)或序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)或序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)或序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)或序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)杂交的序列。

[0012] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个核苷酸是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域杂交或与编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)或序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)或序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)或序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)或序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)或序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)，并且反义寡核苷酸分别包含能够与所述序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)或序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)或序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)或序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)或序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)或序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)杂交的序列。

[0013] 或者，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)或序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)或序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)或序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)或序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)或序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)，并且反义寡核苷酸分别包含与所述序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)或序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)或序列

ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)或序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)或序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)或序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)互补的序列。

[0014] 稍微换一种说法,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个核苷酸是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域杂交或与编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)或序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)或序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)或序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)或序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)或序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9),并且反义寡核苷酸分别包含与序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)或序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)或序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)或序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)或序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)或序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)互补的序列。

[0015] 优选地,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)杂交的序列。

[0016] 稍微换一种说法,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)杂交的序列。

[0017] 或者,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)互补的序列。

[0018] 稍微换一种说法,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TGGTCCATTC(Seq.ID No.4)互补的序列。

[0019] 优选地,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)杂交的序列。

[0020] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)杂交的序列。

[0021] 或者，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)互补的序列。

[0022] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CCCTAAACAC(Seq.ID No.5)互补的序列。

[0023] 优选地，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)杂交的序列。

[0024] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)杂交的序列。

[0025] 或者，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)互补的序列。

[0026] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列ACTACCAAAT(Seq.ID No.6)互补的序列。

[0027] 优选地，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)杂交的序列。

[0028] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)杂交的序列。

[0029] 或者，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)互补的序列。

[0030] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GGACGCGTAT(Seq.ID No.7)互补的序列。

[0031] 优选地，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)杂交的序列。

[0032] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)杂交的序列。

[0033] 或者，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)互补的序列。

[0034] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反

义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GTCTATGACG(Seq.ID No.8)互补的序列。

[0035] 优选地，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)杂交的序列。

[0036] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)杂交的序列。

[0037] 或者，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)互补的序列。

[0038] 稍微换一种说法，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的开放阅读框的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TTATTAATGC(Seq.ID No.9)互补的序列。

[0039] 本发明的反义寡核苷酸优选包含2至10个LNA单元，更优选3至9个LNA单元，更优选包含4至8个LNA单元，并且还优选包含至少6个非LNA单元，更优选至少7个非LNA单元，最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称为3'末端)和5'末端(也称为5'末端)。优选地，在3'末端和/或5'末端存在至少一个更优选至少两个LNA单元。

[0040] 因此，优选本发明的反义寡核苷酸含有3至10个LNA单元，并且特别地在反义寡核苷酸的5'末端含有1至5个LNA单元，和在反义寡核苷酸的3'末端含有1至5个LNA单元，并且在LNA单元之间含有至少7个，更优选至少8个DNA单元。

[0041] 此外，反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基，例如腺嘌呤，鸟嘌呤，胞嘧啶，胸腺嘧啶和尿嘧啶以及其常见的衍生物。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中，或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。

[0042] 因此，本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且12至24个核苷酸中的至少3个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CTGGTCCATTC(Seq.ID No.296)，TGGTCCATTCA(Seq.ID No.297)，CTGGTCCATTCA(Seq.ID No.298)，TCCCTAAACAC(Seq.ID No.299)，CCCTAAACACT(Seq.ID No.300)，TCCCTAAACACT(Seq.ID No.301)，CACTACCAAAT(Seq.ID No.302)，ACTACCAAATA(Seq.ID No.303)，CACTACCAAATA(Seq.ID No.304)，TGGACGCGTAT(Seq.ID No.305)，GGACGCGTATC(Seq.ID No.306)，TGGACGCGTATC(Seq.ID No.307)，GGTCTATGACG(Seq.ID No.308)，GTCTATGACGA(Seq.ID No.309)，GGTCTATGACGA(Seq.ID No.310)，TTTATTAATGC(Seq.ID No.311)，TTATTAATGCC(Seq.ID No.312)，或TTTATTAATGCC(Seq.ID No.313)，并且反义寡核苷酸分别包含能够与所述序列CTGGTCCATTC(Seq.ID No.296)，TGGTCCATTCA(Seq.ID No.297)，CTGGTCCATTCA(Seq.ID No.298)，TCCCTAAACAC(Seq.ID No.299)，CCCTAAACACT(Seq.ID No.300)，TCCCTAAACACT(Seq.ID No.301)，CACTACCAAAT(Seq.ID No.302)，ACTACCAAATA(Seq.ID No.303)，CACTACCAAATA(Seq.ID No.304)，TGGACGCGTAT(Seq.ID No.305)，GGACGCGTATC(Seq.ID No.306)，TGGACGCGTATC(Seq.ID No.307)，GGTCTATGACG(Seq.ID No.308)，GTCTATGACGA(Seq.ID No.309)，GGTCTATGACGA(Seq.ID No.310)，TTTATTAATGC(Seq.ID No.311)，TTATTAATGCC(Seq.ID No.312)，或TTTATTAATGCC(Seq.ID No.313)杂交的序列。

[0043] 或者，本发明涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且12至24个核苷酸中的至少3个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CTGGTCCATTC(Seq.ID No.296)，TGGTCCATTCA(Seq.ID No.297)，CTGGTCCATTCA(Seq.ID No.298)，TCCCTAAACAC(Seq.ID No.299)，CCCTAAACACT(Seq.ID No.300)，TCCCTAAACACT(Seq.ID No.301)，CACTACCAAAT(Seq.ID No.302)，ACTACCAAATA(Seq.ID No.303)，CACTACCAAATA(Seq.ID No.304)，TGGACGCGTAT(Seq.ID No.305)，GGACGCGTATC(Seq.ID No.306)，TGGACGCGTATC(Seq.ID No.307)，GGTCTATGACG(Seq.ID No.308)，GTCTATGACGA(Seq.ID No.309)，GGTCTATGACGA(Seq.ID No.310)，TTTATTAATGC(Seq.ID No.311)，TTATTAATGCC(Seq.ID No.312)，或TTTATTAATGCC(Seq.ID No.313)，并且反义寡核苷酸分别包含能够与所述序列CTGGTCCATTC(Seq.ID No.296)，TGGTCCATTCA(Seq.ID No.297)，CTGGTCCATTCA(Seq.ID No.298)，TCCCTAAACAC(Seq.ID No.299)，CCCTAAACACT(Seq.ID No.300)，TCCCTAAACACT(Seq.ID No.301)，CACTACCAAAT(Seq.ID No.302)，ACTACCAAATA(Seq.ID No.303)，CACTACCAAATA(Seq.ID No.304)，TGGACGCGTAT(Seq.ID No.305)，GGACGCGTATC(Seq.ID No.306)，TGGACGCGTATC(Seq.ID No.307)，GGTCTATGACG(Seq.ID No.308)，GTCTATGACGA(Seq.ID No.309)，GGTCTATGACGA(Seq.ID No.310)，TTTATTAATGC(Seq.ID No.311)，TTATTAATGCC(Seq.ID No.312)，或TTTATTAATGCC(Seq.ID No.313)互补的序列。

[0044] 优选地，本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的

区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CTGGTCCATTC(Seq.ID No.296),TGGTCCATTCA(Seq.ID No.297),或CTGGTCCATTCA(Seq.ID No.298),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CTGGTCCATTC(Seq.ID No.296),TGGTCCATTCA(Seq.ID No.297),或CTGGTCCATTCA(Seq.ID No.298)杂交的序列。

[0045] 稍微换一种说法,本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至24个核苷酸中的至少三个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CTGGTCCATTC(Seq.ID No.296),TGGTCCATTCA(Seq.ID No.297),或CTGGTCCATTCA(Seq.ID No.298),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CTGGTCCATTC(Seq.ID No.296),TGGTCCATTCA(Seq.ID No.297),或CTGGTCCATTCA(Seq.ID No.298)互补的序列。

[0046] 优选地,本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TCCCTAAACAC(Seq.ID No.299),CCCTAAACACT(Seq.ID No.300),或TCCCTAAACACT(Seq.ID No.301),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TCCCTAAACAC(Seq.ID No.299),CCCTAAACACT(Seq.ID No.300),或TCCCTAAACACT(Seq.ID No.301)杂交的序列。

[0047] 稍微换一种说法,本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TCCCTAAACAC(Seq.ID No.299),CCCTAAACACT(Seq.ID No.300),或TCCCTAAACACT(Seq.ID No.301),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TCCCTAAACAC(Seq.ID No.299),CCCTAAACACT(Seq.ID No.300),或TCCCTAAACACT(Seq.ID No.301)互补的序列。

[0048] 优选地,本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CACTACCAAAT(Seq.ID No.302),ACTACCAAATA(Seq.ID No.303),或CACTACCAAATA(Seq.ID No.304),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CACTACCAAAT(Seq.ID No.302),ACTACCAAATA(Seq.ID No.303),或CACTACCAAATA(Seq.ID No.304)杂交的序列。

[0049] 稍微换一种说法,本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CACTACCAAAT(Seq.ID No.302),ACTACCAAATA(Seq.ID No.303),或CACTACCAAATA(Seq.ID No.304),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CACTACCAAAT(Seq.ID No.302),ACTACCAAATA(Seq.ID No.303),或CACTACCAAATA(Seq.ID No.304)互补的序列。

[0050] 优选地，本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGACGCGTAT(Seq.ID No.305)，GGACGCGTATC(Seq.ID No.306)，或TGGACGCGTATC(Seq.ID No.307)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TGGACGCGTAT(Seq.ID No.305)，GGACGCGTATC(Seq.ID No.306)，或TGGACGCGTATC(Seq.ID No.307)杂交的序列。

[0051] 稍微换一种说法，本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TGGACGCGTAT(Seq.ID No.305)，GGACGCGTATC(Seq.ID No.306)，或TGGACGCGTATC(Seq.ID No.307)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TGGACGCGTAT(Seq.ID No.305)，GGACGCGTATC(Seq.ID No.306)，或TGGACGCGTATC(Seq.ID No.307)互补的序列。

[0052] 优选地，本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GGTCTATGACG(Seq.ID No.308)，GTCTATGACGA(Seq.ID No.309)，或GGTCTATGACGA(Seq.ID No.310)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GGTCTATGACG(Seq.ID No.308)，GTCTATGACGA(Seq.ID No.309)，或GGTCTATGACGA(Seq.ID No.310)杂交的序列。

[0053] 稍微换一种说法，本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GGTCTATGACG(Seq.ID No.308)，GTCTATGACGA(Seq.ID No.309)，或GGTCTATGACGA(Seq.ID No.310)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GGTCTATGACG(Seq.ID No.308)，GTCTATGACGA(Seq.ID No.309)，或GGTCTATGACGA(Seq.ID No.310)互补的序列。

[0054] 优选地，本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TTTATTAATGC(Seq.ID No.311)，TTATTAATGCC(Seq.ID No.312)，或TTTATTAATGCC(Seq.ID No.313)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TTTATTAATGC(Seq.ID No.311)，TTATTAATGCC(Seq.ID No.312)，或TTTATTAATGCC(Seq.ID No.313)杂交的序列。

[0055] 稍微换一种说法，本发明还涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且2至24个核苷酸中的至少三个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列TTTATTAATGC(Seq.ID No.311)，

TTATTAATGCC(Seq.ID No.312),或TTTATTAATGCC(Seq.ID No.313),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列TTTATTAATGC(Seq.ID No.311),TTATTAATGCC(Seq.ID No.312),或TTTATTAATGCC(Seq.ID No.313)互补的序列。

[0056] 本发明的反义寡核苷酸优选包含3至10个LNA单元,更优选3至9个LNA单元,还更优选包含4至8个LNA单元,并且还优选包含至少6个非LNA单元,更优选至少7个非LNA单元,和最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称为3'末端)和5'末端(也称为5'末端)。优选地,在3'末端和/或5'末端存在至少一个或更多个,更优选至少两个LNA单元。

[0057] 因此,优选本发明的反义寡核苷酸含有3至10个LNA单元,并且特别地在反义寡核苷酸的5'末端含有1至5个LNA单元,和在反义寡核苷酸的3'末端含有1至5个LNA单元,并且在LNA单元之间含有至少7个,更优选至少8个DNA单元。

[0058] 此外,反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基,例如腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸腺嘧啶和尿嘧啶以及其常见的衍生物。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中,或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。

[0059] 因此,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACTGGTCCATTC(Seq.ID No.314),TGGTCCATTCAT(Seq.ID No.315),CTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.316),ACTGGTCCATTCA(Seq.ID No.317),ACTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.318),CTCCCTAAACAC(Seq.ID No.319),CCCTAAACACTA(Seq.ID No.320),TCCCTAAACACTA(Seq.ID No.321),CTCCCTAAACACT(Seq.ID No.322),CTCCCTAAACACTA(Seq.ID No.323),ACACTACCAAAT(Seq.ID No.324),ACTACCAAATAG(Seq.ID No.325),CACTACCAAATAG(Seq.ID No.326),ACACTACCAAATA(Seq.ID No.327),ACACTACCAAATAG(Seq.ID No.328),GTGGACGCGTAT(Seq.ID No.329),GGACGCGTATCG(Seq.ID No.330),TGGACGCGTATCG(Seq.ID No.331),GTGGACGCGTATC(Seq.ID No.332),GTGGACGCGTATCG(Seq.ID No.333),CGGTCTATGACG(Seq.ID No.334),GTCTATGACGAG(Seq.ID No.335),GGTCTATGACGAG(Seq.ID No.336),CGGTCTATGACGA(Seq.ID No.337),CGGTCTATGACGAG(Seq.ID No.338),CTTTATTAATGC(Seq.ID No.339),TTATTAATGCCT(Seq.ID No.340),TTTATTAATGCCT(Seq.ID No.341),CTTTATTAATGCC(Seq.ID No.342),或CTTTATTAATGCCT(Seq.ID No.343),并且反义寡核苷酸分别包含能够与所述序列ACTGGTCCATTC(Seq.ID No.314),TGGTCCATTCAT(Seq.ID No.315),CTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.316),ACTGGTCCATTCA(Seq.ID No.317),ACTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.318),CTCCCTAAACAC(Seq.ID No.319),CCCTAAACACTA(Seq.ID No.320),TCCCTAAACACTA(Seq.ID No.321),CTCCCTAAACACT(Seq.ID No.322),CTCCCTAAACACTA(Seq.ID No.323),ACACTACCAAAT(Seq.ID No.324),ACTACCAAATAG(Seq.ID No.325),CACTACCAAATAG(Seq.ID No.326),ACACTACCAAATA(Seq.ID No.327),ACACTACCAAATAG(Seq.ID No.328),GTGGACGCGTAT(Seq.ID No.329),GGACGCGTATCG(Seq.ID No.330),TGGACGCGTATCG(Seq.ID No.331),GTGGACGCGTATC(Seq.ID No.332),

GTGGACGCGTATCG(Seq.ID No.333),CGGTCTATGACG(Seq.ID No.334),GTCTATGACGAG(Seq.ID No.335),GGTCTATGACGAG(Seq.ID No.336),CGGTCTATGACGA(Seq.ID No.337),CGGTCTATGACGAG(Seq.ID No.338),CTTTATTAATGC(Seq.ID No.339),TTATTAATGCCT(Seq.ID No.340),TTTATTAATGCCT(Seq.ID No.341),CTTTATTAATGCC(Seq.ID No.342),或CTTTATTAATGCCT(Seq.ID No.343)杂交的序列。

[0060] 或者,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACTGGTCCATTC(Seq.ID No.314),TGGTCCATTCAT(Seq.ID No.315),CTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.316),ACTGGTCCATTCA(Seq.ID No.317),ACTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.318),CTCCCTAAACAC(Seq.ID No.319),CCCTAAACACTA(Seq.ID No.320),TCCCTAAACACTA(Seq.ID No.321),CTCCCTAAACACT(Seq.ID No.322),CTCCCTAAACACTA(Seq.ID No.323),ACACTACCAAAT(Seq.ID No.324),ACTACCAAATAG(Seq.ID No.325),CACTACCAAATAG(Seq.ID No.326),ACACTACCAAATA(Seq.ID No.327),ACACTACCAAATAG(Seq.ID No.328),GTGGACGCGTAT(Seq.ID No.329),GGACGCGTATCG(Seq.ID No.330),TGGACGCGTATCG(Seq.ID No.331),GTGGACGCGTATC(Seq.ID No.332),GTGGACGCGTATCG(Seq.ID No.333),CGGTCTATGACG(Seq.ID No.334),GTCTATGACGAG(Seq.ID No.335),GGTCTATGACGAG(Seq.ID No.336),CGGTCTATGACGA(Seq.ID No.337),CGGTCTATGACGAG(Seq.ID No.338),CTTTATTAATGC(Seq.ID No.339),TTATTAATGCCT(Seq.ID No.340),TTTATTAATGCCT(Seq.ID No.341),CTTTATTAATGCC(Seq.ID No.342),或CTTTATTAATGCCT(Seq.ID No.343),并且反义寡核苷酸分别包含能够与所述序列ACTGGTCCATTC(Seq.ID No.314),TGGTCCATTCAT(Seq.ID No.315),CTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.316),ACTGGTCCATTCA(Seq.ID No.317),ACTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.318),CTCCCTAAACAC(Seq.ID No.319),CCCTAAACACTA(Seq.ID No.320),TCCCTAAACACTA(Seq.ID No.321),CTCCCTAAACACT(Seq.ID No.322),CTCCCTAAACACTA(Seq.ID No.323),ACACTACCAAAT(Seq.ID No.324),ACTACCAAATAG(Seq.ID No.325),CACTACCAAATAG(Seq.ID No.326),ACACTACCAAATA(Seq.ID No.327),ACACTACCAAATAG(Seq.ID No.328),GTGGACGCGTAT(Seq.ID No.329),GGACGCGTATCG(Seq.ID No.330),TGGACGCGTATCG(Seq.ID No.331),GTGGACGCGTATC(Seq.ID No.332),GTGGACGCGTATCG(Seq.ID No.333),CGGTCTATGACG(Seq.ID No.334),GTCTATGACGAG(Seq.ID No.335),GGTCTATGACGAG(Seq.ID No.336),CGGTCTATGACGA(Seq.ID No.337),CGGTCTATGACGAG(Seq.ID No.338),CTTTATTAATGC(Seq.ID No.339),TTATTAATGCCT(Seq.ID No.340),TTTATTAATGCCT(Seq.ID No.341),CTTTATTAATGCC(Seq.ID No.342),或CTTTATTAATGCCT(Seq.ID No.343)互补的序列。

[0061] 优选地,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACTGGTCCATTC(Seq.ID No.314),TGGTCCATTCAT(Seq.ID No.315),CTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.316),

ACTGGTCCATTCA(Seq.ID No.317),ACTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.318),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列ACTGGTCCATTC(Seq.ID No.314),TGGTCCATTCAT(Seq.ID No.315),CTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.316),ACTGGTCCATTCA(Seq.ID No.317),ACTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.318)杂交的序列。

[0062] 稍微换一种说法,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACTGGTCCATTC(Seq.ID No.314),TGGTCCATTCAT(Seq.ID No.315),CTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.316),ACTGGTCCATTCA(Seq.ID No.317),ACTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.318),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列ACTGGTCCATTC(Seq.ID No.314),TGGTCCATTCAT(Seq.ID No.315),CTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.316),ACTGGTCCATTCA(Seq.ID No.317),ACTGGTCCATTCAT(Seq.ID No.318)互补的序列。

[0063] 优选地,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CTCCCTAAACAC(Seq.ID No.319),CCCTAAACACTA(Seq.ID No.320),TCCCTAAACACTA(Seq.ID No.321),CTCCCTAAACACT(Seq.ID No.322),或CTCCCTAAACACTA(Seq.ID No.323),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CTCCCTAAACAC(Seq.ID No.319),CCCTAAACACTA(Seq.ID No.320),TCCCTAAACACTA(Seq.ID No.321),CTCCCTAAACACT(Seq.ID No.322),或CTCCCTAAACACTA(Seq.ID No.323)杂交的序列。

[0064] 稍微换一种说法,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CTCCCTAAACAC(Seq.ID No.319),CCCTAAACACTA(Seq.ID No.320),TCCCTAAACACTA(Seq.ID No.321),CTCCCTAAACACT(Seq.ID No.322),或CTCCCTAAACACTA(Seq.ID No.323),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CTCCCTAAACAC(Seq.ID No.319),CCCTAAACACTA(Seq.ID No.320),TCCCTAAACACTA(Seq.ID No.321),CTCCCTAAACACT(Seq.ID No.322),或CTCCCTAAACACTA(Seq.ID No.323)互补的序列。

[0065] 优选地,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACACTACCAAAT(Seq.ID No.324),ACTACCAAATAG(Seq.ID No.325),CACTACCAAATAG(Seq.ID No.326),ACACTACCAAATA(Seq.ID No.327),或ACACTACCAAATAG(Seq.ID No.328),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列ACACTACCAAAT(Seq.ID No.324),ACTACCAAATAG(Seq.ID No.325),CACTACCAAATAG(Seq.ID No.326),ACACTACCAAATA(Seq.ID No.327),或ACACTACCAAATAG

(Seq.ID No.328)杂交的序列。

[0066] 稍微换一种说法,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列ACACTACCAAAT(Seq.ID No.324),ACTACCAAATAG(Seq.ID No.325),CACTACCAAATAG(Seq.ID No.326),ACACTACCAAATA(Seq.ID No.327),或ACACTACCAAATAG(Seq.ID No.328),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列ACACTACCAAAT(Seq.ID No.324),ACTACCAAATAG(Seq.ID No.325),CACTACCAAATAG(Seq.ID No.326),ACACTACCAAATA(Seq.ID No.327),或ACACTACCAAATAG(Seq.ID No.328)互补的序列。

[0067] 优选地,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GTGGACGCGTAT(Seq.ID No.329),GGACGCGTATCG(Seq.ID No.330),TGGACGCGTATCG(Seq.ID No.331),GTGGACGCGTATC(Seq.ID No.332),或GTGGACGCGTATCG(Seq.ID No.333),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GTGGACGCGTAT(Seq.ID No.329),GGACGCGTATCG(Seq.ID No.330),TGGACGCGTATCG(Seq.ID No.331),GTGGACGCGTATC(Seq.ID No.332),或GTGGACGCGTATCG(Seq.ID No.333)杂交的序列。

[0068] 稍微换一种说法,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列GTGGACGCGTAT(Seq.ID No.329),GGACGCGTATCG(Seq.ID No.330),TGGACGCGTATCG(Seq.ID No.331),GTGGACGCGTATC(Seq.ID No.332),或GTGGACGCGTATCG(Seq.ID No.333),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列GTGGACGCGTAT(Seq.ID No.329),GGACGCGTATCG(Seq.ID No.330),TGGACGCGTATCG(Seq.ID No.331),GTGGACGCGTATC(Seq.ID No.332),或GTGGACGCGTATCG(Seq.ID No.333)互补的序列。

[0069] 优选地,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CGGTCTATGACG(Seq.ID No.334),GTCTATGACGAG(Seq.ID No.335),GGTCTATGACGAG(Seq.ID No.336),CGGTCTATGACGA(Seq.ID No.337),或CGGTCTATGACGAG(Seq.ID No.338),并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CGGTCTATGACG(Seq.ID No.334),GTCTATGACGAG(Seq.ID No.335),GGTCTATGACGAG(Seq.ID No.336),CGGTCTATGACGA(Seq.ID No.337),或CGGTCTATGACGAG(Seq.ID No.338)杂交的序列。

[0070] 稍微换一种说法,本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且14至20个更优选14至18个核苷酸中

的至少4个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CGGTCTATGACG(Seq.ID No.334)，GTCTATGACGAG(Seq.ID No.335)，GGTCTATGACGAG(Seq.ID No.336)，CGGTCTATGACGA(Seq.ID No.337)，或CGGTCTATGACGAG(Seq.ID No.338)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CGGTCTATGACG(Seq.ID No.334)，GTCTATGACGAG(Seq.ID No.335)，GGTCTATGACGAG(Seq.ID No.336)，CGGTCTATGACGA(Seq.ID No.337)，或CGGTCTATGACGAG(Seq.ID No.338)互补的序列。

[0071] 优选地，本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CTTTATTAATGC(Seq.ID No.339)，TTATTAATGCCT(Seq.ID No.340)，TTTATTAATGCCT(Seq.ID No.341)，CTTTATTAATGCC(Seq.ID No.342)，或CTTTATTAATGCCT(Seq.ID No.343)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CTTTATTAATGC(Seq.ID No.339)，TTATTAATGCCT(Seq.ID No.340)，TTTATTAATGCCT(Seq.ID No.341)，CTTTATTAATGCC(Seq.ID No.342)，或CTTTATTAATGCCT(Seq.ID No.343)杂交的序列。

[0072] 稍微换一种说法，本发明还涉及由14至20个更优选14至18个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且14至20个更优选14至18个核苷酸中的至少4个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域包含序列CTTTATTAATGC(Seq.ID No.339)，TTATTAATGCCT(Seq.ID No.340)，TTTATTAATGCCT(Seq.ID No.341)，CTTTATTAATGCC(Seq.ID No.342)，或CTTTATTAATGCCT(Seq.ID No.343)，并且反义寡核苷酸包含能够与所述序列CTTTATTAATGC(Seq.ID No.339)，TTATTAATGCCT(Seq.ID No.340)，TTTATTAATGCCT(Seq.ID No.341)，CTTTATTAATGCC(Seq.ID No.342)，或CTTTATTAATGCCT(Seq.ID No.343)互补的序列。

[0073] 本发明的反义寡核苷酸优选包含4至11个LNA单元，更优选4至10个LNA单元，更优选4至8个LNA单元，并且还优选包含至少6个非LNA单元，更优选至少7个非LNA单元，最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称为3'末端)和5'末端(也称为5'末端)。优选地，在3'末端和/或5'末端存在至少一个更优选至少两个LNA单元。

[0074] 因此，优选本发明的反义寡核苷酸含有3至10个LNA单元，并且特别地在反义寡核苷酸的5'末端含有1至5个LNA单元，和在反义寡核苷酸的3'末端含有1至5个LNA单元，并且在LNA单元之间含有至少7个，更优选至少8个DNA单元。

[0075] 此外，反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基，例如腺嘌呤，鸟嘌呤，胞嘧啶，胸腺嘧啶和尿嘧啶以及其常见的衍生物。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中，或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。

[0076] 因此，本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编

码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中所述反义寡核苷酸由以下序列表示：5'-N^1-GTCATAGA-N^2-3'(Seq.ID No.12)或5'-N^3-ACGCGTCC-N^4-3'(Seq.ID No.98)或5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3'(Seq.ID No.10)或5'-N^5-TTTGGTAG-N^6-3'(Seq.ID No.11)或5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'(Seq.ID No.100)或5'-N^9-ATTAATAA-N^{10}-3'(Seq.ID No.101)，其中

[0077] N^1表示：CATGGCAGACCCCGCTGCTC-，ATGGCAGACCCCGCTGCTC-，TGGCAGACCCCGCTGCTC-，GGCAGACCCCGCTGCTC-，GCAGACCCCGCTGCTC-，CAGACCCCGCTGCTC-，AGACCCCGCTGCTC-，GACCCCGCTGCTC-，ACCCCGCTGCTC-，CCCCGCTGCTC-，CCCGCTGCTC-，CCGCTGCTC-，CGCTGCTC-，GCTGCTC-，CTGCTC-，TGCTC-，GCTC-，CTC-，TC-，或C-；

[0078] N^2表示：-C，-CC，-CCG，-CCGA，-CCGAG，-CCGAGC，-CCGAGCC，-CCGAGCCC，-CCGAGCCCC，-CCGAGCCCCC，-CCGAGCCCCCA，-CCGAGCCCCCAG，-CCGAGCCCCCAGC，-CCGAGCCCCCAGCG，-CCGAGCCCCCAGCGC，-CCGAGCCCCCAGCGCA，-CCGAGCCCCCAGCGCAG，-CCGAGCCCCCAGCGCAGC，-CCGAGCCCCCAGCGCAGCG，或-CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG；

[0079] N^3表示：GGTGGGATCGTGCTGGCGAT-，GTGGGATCGTGCTGGCGAT-，TGGGATCGTGCTGGCGAT-，GGGATCGTGCTGGCGAT-，GGATCGTGCTGGCGAT-，GATCGTGCTGGCGAT-，ATCGTGCTGGCGAT-，TCGTGCTGGCGAT-，CGTGCTGGCGAT-，GTGCTGGCGAT-，TGCTGGCGAT-，GCTGGCGAT-，CTGGCGAT-，TGGCGAT-，GGCGAT-，GCGAT-，CGAT-，GAT-，AT-，或T-；

[0080] N^4表示：-ACAGGACGATGTGCAGCGGC，-ACAGGACGATGTGCAGCGG，-ACAGGACGATGTGCAGCG，-ACAGGACGATGTGCAGC，-ACAGGACGATGTGCAG，-ACAGGACGATGTGCA，-ACAGGACGATGTGC，-ACAGGACGATGTG，-ACAGGACGATGT，-ACAGGACGATG，-ACAGGACGAT，-ACAGGACGA，-ACAGGACG，-ACAGGAC，-ACAGGA，-ACAGG，-ACAG，-ACA，-AC，或-A；

[0081] N^5表示：GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-，CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-，CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-，CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-，AGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-，GCCTGCCCCAGAAGAGCTA-，CCTGCCCCAGAAGAGCTA-，CTGCCCCAGAAGAGCTA-，TGCCCCAGAAGAGCTA-，GCCCCAGAAGAGCTA-，CCCCAGAAGAGCTA-，CCCAGAAGAGCTA-，CCAGAAGAGCTA-，CAGAAGAGCTA-，AGAAGAGCTA-，GAAGAGCTA-，AAGAGCTA-，AGAGCTA-，GAGCTA-，AGCTA-，GCTA-，CTA-，TA-，或A-；

[0082] N^6表示：-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA，-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA，-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG，-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAG，-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCA，-TGTTTAGGGAGCCGTCTTC，-TGTTTAGGGAGCCGTCTT，-TGTTTAGGGAGCCGTCT，-TGTTTAGGGAGCCGTC，-TGTTTAGGGAGCCGT，-TGTTTAGGGAGCCG，-TGTTTAGGGAGCC，-TGTTTAGGGAGC，-TGTTTAGGGAG，-TGTTTAGGGA，-TGTTTAGGG，-TGTTTAGG，-TGTTTAG，-TGTTTA，-TGTTT，-TGTT，-TGT，-TG，或-T；

[0083] N^7表示：TGAATCTTGAATATCTCATG-，GAATCTTGAATATCTCATG-，AATCTTGAATATCTCATG-，ATCTTGAATATCTCATG-，TCTTGAATATCTCATG-，CTTGAATATCTCATG-，TTGAATATCTCATG-，TGAATATCTCATG-，GAATATCTCATG-，AATATCTCATG-，ATATCTCATG-，TATCTCATG-，ATCTCATG-，TCTCATG-，CTCATG-，TCATG-，CATG-，ATG-，TG-，或G-；

[0084] N^8表示：-AGTATTCTAGAAACTCACCA，-AGTATTCTAGAAACTCACC，-AGTATTCTAGAAACTCAC，-AGTATTCTAGAAACTCA，-AGTATTCTAGAAACTC，-AGTATTCTAGAAACT，-

AGTATTCTAGAAAC,-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A;

[0085] N^9表示:ATTCATATTTATATACAGGC-,

[0086] TTCATATTTATATACAGGC-,TCATATTTATATACAGGC-,CATATTTATATACAGGC-,ATATTTATATACAGGC-,TATTTATATACAGGC-,ATTTATATACAGGC-,TTTATATACAGGC-,TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;

[0087] N^{10}表示:-AGTGCAAATGTTATTGGCTA,-AGTGCAAATGTTATTGGCT,-AGTGCAAATGTTATTGGC,-AGTGCAAATGTTATTGG,-AGTGCAAATGTTATTG,-AGTGCAAATGTTATT,-AGTGCAAATGTTAT,-AGTGCAAATGTTA,-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A;

[0088] N^{11}表示:TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,GCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CAGAAGAGCTATTTGGTAG-,AGAAGAGCTATTTGGTAG-,GAAGAGCTATTTGGTAG-,AAGAGCTATTTGGTAG-,AGAGCTATTTGGTAG-,GAGCTATTTGGTAG-,AGCTATTTGGTAG-,GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-,

[0089] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTC,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTT,-GAGCCGTCTTCAGGAATCT,-GAGCCGTCTTCAGGAATC,-GAGCCGTCTTCAGGAAT,-GAGCCGTCTTCAGGAA,-GAGCCGTCTTCAGGA,-GAGCCGTCTTCAGG,-GAGCCGTCTTCAG,-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G。

[0090] 因此,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中所述反义寡核苷酸由以下序列表示5'-N^1-GTCATAGA-N^2-3'(Seq.ID No.12)或5'-N^3-ACGCGTCC-N^4-3'(Seq.ID No.98)或5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3'(Seq.ID No.10)或5'-N^5-TTTGGTAG-N^6-3'(Seq.ID No.11)或5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'(Seq.ID No.100)或5'-N^9-ATTAATAA-N^{10}-3'(Seq.ID No.101),其中残基N^1至N^{12}具有如本文所公开的特别限定的含义。

[0091] 此外,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中所述反义寡核苷酸由以下序列5'-N^1-GTCATAGA-N^2-3'(Seq.ID No.12)表示,其中

[0092] N^1表示:CATGGCAGACCCCGCTGCTC-,ATGGCAGACCCCGCTGCTC-,TGGCAGACCCCGCTGCTC-,GGCAGACCCCGCTGCTC-,GCAGACCCCGCTGCTC-,CAGACCCCGCTGCTC-,AGACCCCGCTGCTC-,GACCCCGCTGCTC-,ACCCCGCTGCTC-,CCCCGCTGCTC-,CCCGCTGCTC-,CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-;

[0093] N^2表示:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-CCGAGCCC,-

CCGAGCCCC,-CCGAGCCCCC,-CCGAGCCCCCA,-CCGAGCCCCCAG,-CCGAGCCCCCAGC,-CCGAGCCCCCAGCG,-CCGAGCCCCCAGCGC,-CCGAGCCCCCAGCGCA,-CCGAGCCCCCAGCGCAG,-CCGAGCCCCCAGCGCAGC,-CCGAGCCCCCAGCGCAGCG,或-CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG。

[0094] 式S1(Seq.ID No.12)的反义寡核苷酸优选包含2至10个LNA单元,更优选3至9个LNA单元,更优选4至8个LNA单元,并且还优选包含至少6个非LNA单元,更优选至少7个非LNA单元,最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称为3'末端)和5'末端(也称为5'末端)。优选地,在3'末端和/或5'末端存在至少一个或更多个更优选至少两个LNA单元。

[0095] 因此,优选本发明的反义寡核苷酸被设计为含有2至10个LNA单元的GAPmer,并且特别地在反义寡核苷酸的5'末端含有1至5个LNA单元,和在反义寡核苷酸的3'末端含有1至5个LNA单元,并且在LNA单元之间含有至少7个,更优选至少8个DNA单元。更优选地,反义寡核苷酸在5'末端包含2至4个LNA单元,在3'末端包含2至4个LNA单元,还更优选在5'末端包含3至4个LNA单元和在3'末端包含3至4个LNA单元,并且优选含有至少7个非-LNA单元,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA区段之间的DNA单元。

[0096] 此外,反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基,例如腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及它们的常见衍生物,例如5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥,例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中,或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。LNA单元特别是本文公开的残基b^1至b^9是优选的。

[0097] 因此,优选的是式(S1)的反义寡核苷酸:

[0098] 5'-N^1-GTCATAGA-N^2-3'(Seq.ID No.12)

[0099] 其中

[0100] N^1表示:CATGGCAGACCCCGCTGCTC-,ATGGCAGACCCCGCTGCTC-,TGGCAGACCCCGCTGCTC-,GGCAGACCCCGCTGCTC-,GCAGACCCCGCTGCTC-,CAGACCCCGCTGCTC-,AGACCCCGCTGCTC-,GACCCCGCTGCTC-,ACCCCGCTGCTC-,CCCCGCTGCTC-,CCCGCTGCTC-,CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-;

[0101] 和

[0102] N^2选自:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-CCGAGCCC,-CCGAGCCCC,-CCGAGCCCCC,-CCGAGCCCCCA,-CCGAGCCCCCAG,-CCGAGCCCCCAGC,-CCGAGCCCCCAGCG,-CCGAGCCCCCAGCGC,-CCGAGCCCCCAGCGCA,-CCGAGCCCCCAGCGCAG,-CCGAGCCCCCAGCGCAGC,-CCGAGCCCCCAGCGCAGCG,或-CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG。

[0103] 优选地,通式(S1)的反义寡核苷酸具有10至28个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选的LNA"章节中所公开的那些是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些是合适的。

[0104] 更优选通式(S1)的反义寡核苷酸具有11-24个核苷酸,并且在3'末端具有至少两个LNA核苷酸,在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0105] 还更优选地,通式(S1)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,并且在3'末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5'末端

具有2至5个，优选3个和5个，更优选3至4个LNA单元。优选地，反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地，反义寡核苷酸含有至少6个，更优选至少7个，最优选至少8个非LNA单元，例如在两个LNA区段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在“核碱基”章节中公开。

[0106] 还优选的是式(S1)的反义寡核苷酸：

[0107] 5’-N^1-GTCATAGA-N^2-3’

[0108] 其中

[0109] N^1表示:TGGCAGACCCCGCTGCTC-,GGCAGACCCCGCTGCTC-,GCAGACCCCGCTGCTC-,CAGACCCCGCTGCTC-,AGACCCCGCTGCTC-,GACCCCGCTGCTC-,ACCCCGCTGCTC-,CCCCGCTGCTC-,CCCGCTGCTC-,CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-；

[0110] 和

[0111] N^2选自:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-CCGAGCCC,-CCGAGCCCC,-CCGAGCCCCC,-CCGAGCCCCCA,-CCGAGCCCCCAG,-CCGAGCCCCCAGC,-CCGAGCCCCCAGCG,-CCGAGCCCCCAGCGC,-CCGAGCCCCCAGCGCA,-CCGAGCCCCCAGCGCAG,或-CCGAGCCCCCAGCGCAGC。

[0112] 还优选的是式(S1)的反义寡核苷酸：

[0113] 5’-N^1-GTCATAGA-N^2-3’

[0114] 其中

[0115] N^1表示:GACCCCGCTGCTC-,ACCCCGCTGCTC-,CCCCGCTGCTC-,CCCGCTGCTC-,CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-；

[0116] 和

[0117] N^2选自:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-CCGAGCCC,-CCGAGCCCC,-CCGAGCCCCC,-CCGAGCCCCCA,-CCGAGCCCCCAG,或-CCGAGCCCCCAGC。

[0118] 还优选的是式(S1)的反义寡核苷酸：

[0119] 5’-N^1-GTCATAGA-N^2-3’

[0120] 其中

[0121] N^1表示:CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-；

[0122] 和

[0123] N^2选自:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,或-CCGAGCCC。

[0124] 优选地，本发明涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且12至24个核苷酸中的至少3个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中所述反义寡核苷酸由以下序列5’-N^{1A}-CGTCATAGAC-N^{2A}-3’(Seq.ID No.69)表示，其中

[0125] N^{1A}表示:CATGGCAGACCCCGCTGCT-,ATGGCAGACCCCGCTGCT-,TGGCAGACCCCGCTGCT-,GGCAGACCCCGCTGCT-,GCAGACCCCGCTGCT-,CAGACCCCGCTGCT-,AGACCCCGCTGCT-,GACCCCGCTGCT-,ACCCCGCTGCT-,CCCCGCTGCT-,CCCGCTGCT-,CCGCTGCT-,CGCTGCT-,GCTGCT-,CTGCT-,TGCT-,GCT-,CT-,或T-；

[0126] N^{2A}表示:-C,-CG,-CGA,-CGAG,-CGAGC,-CGAGCC,-CGAGCCC,-CGAGCCCC,-CGAGCCCCC,-CGAGCCCCCA,-CGAGCCCCCAG,-CGAGCCCCCAGC,-CGAGCCCCCAGCG,-

CGAGCCCCCAGCGC,-CGAGCCCCCAGCGCA,-CGAGCCCCCAGCGCAG,-CGAGCCCCCAGCGCAGC,-CGAGCCCCCAGCGCAGCG,或-CGAGCCCCCAGCGCAGCGG。

[0127] 优选N^{1A}表示:TGGCAGACCCCGCTGCT-,GGCAGACCCCGCTGCT-,GCAGACCCCGCTGCT-,CAGACCCCGCTGCT-,AGACCCCGCTGCT-,GACCCCGCTGCT-,ACCCCGCTGCT-,CCCCGCTGCT-,CCCGCTGCT-,CCGCTGCT-,CGCTGCT-,GCTGCT-,CTGCT-,TGCT-,GCT-,CT-,或T-;

[0128] 和

[0129] N^{2A}表示:-C,-CG,-CGA,-CGAG,-CGAGC,-CGAGCC,-CGAGCCC,-CGAGCCCC,-CGAGCCCCC,-CGAGCCCCCA,-CGAGCCCCCAG,-CGAGCCCCCAGC,-CGAGCCCCCAGCG,-CGAGCCCCCAGCGC,-CGAGCCCCCAGCGCA,-CGAGCCCCCAGCGCAG,或-CGAGCCCCCAGCGCAGC.

[0130] 更优选N^{1A}表示:GACCCCGCTGCT-,ACCCCGCTGCT-,CCCCGCTGCT-,CCCGCTGCT-,CCGCTGCT-,CGCTGCT-,GCTGCT-,CTGCT-,TGCT-,GCT-,CT-,或T-;和

[0131] N^{2A}表示:-C,-CG,-CGA,-CGAG,-CGAGC,-CGAGCC,-CGAGCCC,-CGAGCCCC,-CGAGCCCCC,-CGAGCCCCCA,-CGAGCCCCCAG,或-CGAGCCCCCAGC。

[0132] 更优选N^{1A}表示:CGCTGCT-,GCTGCT-,CTGCT-,TGCT-,GCT-,CT-,或T-;和

[0133] N^{2A}表示:-C,-CG,-CGA,-CGAG,-CGAGC,-CGAGCC,或-CGAGCCC。

[0134] 优选地,通式(S1A/Seq.ID No.69)的反义寡核苷酸具有12至24个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选LNA"章节中所公开的LNA核苷酸(LNA单元)是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些)是合适的。

[0135] 更优选通式(S1A)的反义寡核苷酸具有12至22个核苷酸并且在3'末端具有至少2个LNA核苷酸和在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0136] 还更优选地,通式(S1A)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,以及在3'末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5'末端具有2至5个,优选3个和5个,更优选3至4个LNA单元。优选地,反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地,反义寡核苷酸含有至少6个,更优选至少7个,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在"核碱基"章节中公开。

[0137] 此外,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中所述反义寡核苷酸由以下序列5'-N^{3}-ACGCGTCC-N^{4}-3'(SEQ ID NO:98)表示,其中

[0138] N^{3}表示:GGTGGGATCGTGCTGGCGAT-,GTGGGATCGTGCTGGCGAT-,TGGGATCGTGCTGGCGAT-,GGGATCGTGCTGGCGAT-,GGATCGTGCTGGCGAT-,GATCGTGCTGGCGAT-,ATCGTGCTGGCGAT-,TCGTGCTGGCGAT-,CGTGCTGGCGAT-,GTGCTGGCGAT-,TGCTGGCGAT-,GCTGGCGAT-,CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-;

[0139] N^{4}表示:-ACAGGACGATGTGCAGCGGC,-ACAGGACGATGTGCAGCGG,-ACAGGACGATGTGCAGCG,-ACAGGACGATGTGCAGC,-ACAGGACGATGTGCAG,-ACAGGACGATGTGCA,-ACAGGACGATGTGC,-ACAGGACGATGTG,-ACAGGACGATGT,-ACAGGACGATG,-ACAGGACGAT,-ACAGGACGA,-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A。

[0140] 式S2(Seq.ID No.98)的反义寡核苷酸优选包含2至10个LNA单元，更优选3至9个LNA单元，更优选4至8个LNA单元，并且还优选包含至少6个非LNA单元，更优选至少7个非LNA单元，最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称为3'末端)和5'末端(也称为5'末端)。优选地，在3'末端和/或5'末端存在至少一个，更优选至少两个LNA单元。

[0141] 因此，优选本发明的反义寡核苷酸被设计为含有2至10个LNA单元的GAPmer，并且特别地在反义寡核苷酸的5'末端含有1至5个LNA单元，和在反义寡核苷酸的3'末端含有1至5个LNA单元，并且在LNA单元之间含有至少7个，更优选至少8个DNA单元。更优选地，反义寡核苷酸在5'末端包含2至4个LNA单元，在3'末端包含2至4个LNA单元，还更优选在5'末端包含3至4个LNA单元和在3'末端包含3至4个LNA单元，并且优选含有至少7个非-LNA单元，最优选至少8个非LNA单元，例如在两个LNA区段之间的DNA单元。

[0142] 此外，反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基，例如腺嘌呤，鸟嘌呤，胞嘧啶，胸腺嘧啶和尿嘧啶，以及它们的常见衍生物，例如5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥，例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中，或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。LNA单元特别是本文公开的残基b^1至b^9是优选的。

[0143] 因此，优选的是式(S2)的反义寡核苷酸：

[0144] 5'-N^3-ACGCGTCC-N^4-3' (Seq.ID No.98)

[0145] 其中

[0146] N^3表示：GGTGGGATCGTGCTGGCGAT-，GTGGGATCGTGCTGGCGAT-，TGGGATCGTGCTGGCGAT-，GGGATCGTGCTGGCGAT-，GGATCGTGCTGGCGAT-，GATCGTGCTGGCGAT-，ATCGTGCTGGCGAT-，TCGTGCTGGCGAT-，CGTGCTGGCGAT-，GTGCTGGCGAT-，TGCTGGCGAT-，GCTGGCGAT-，CTGGCGAT-，TGGCGAT-，GGCGAT-，GCGAT-，CGAT-，GAT-，AT-，或T-；

[0147] 和

[0148] N^4表示：-ACAGGACGATGTGCAGCGGC，-ACAGGACGATGTGCAGCGG，-ACAGGACGATGTGCAGCG，-ACAGGACGATGTGCAGC，-ACAGGACGATGTGCAG，-ACAGGACGATGTGCA，-ACAGGACGATGTGC，-ACAGGACGATGTG，-ACAGGACGATGT，-ACAGGACGATG，-ACAGGACGAT，-ACAGGACGA，-ACAGGACG，-ACAGGAC，-ACAGGA，-ACAGG，-ACAG，-ACA，-AC，或-A。

[0149] 优选地，通式(S2)的反义寡核苷酸具有10至28个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元)，特别是“锁核酸(LNA®)”和“优选的LNA”章节中所公开的那些是合适的，并且核苷酸桥，尤其是“核苷酸间键联(IL)”章节中所公开的那些是合适的。

[0150] 更优选通式(S2)的反义寡核苷酸具有11-24个核苷酸，并且在3'末端具有至少两个LNA核苷酸，在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0151] 还更优选地，通式(S2)的反义寡核苷酸具有12至20个，更优选13至19个，更优选14至18个核苷酸，并且在3'末端具有2至5个，优选3至5个，更优选3至4个LNA单元和在5'末端具有2至5个，优选3个和5个，更优选3至4个LNA单元。优选地，反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地，反义寡核苷酸含有至少6个，更优选至少7个，最优选至少8个非LNA单元，例如在两个LNA区段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核

碱基在“核碱基”章节中公开。

[0152] 还优选的是式(S2)的反义寡核苷酸：

[0153] 5’-N^3-ACGCGTCC-N^4-3’

[0154] 其中

[0155] N^3表示:TGGGATCGTGCTGGCGAT-,GGGATCGTGCTGGCGAT-,GGATCGTGCTGGCGAT-,GATCGTGCTGGCGAT-,ATCGTGCTGGCGAT-,TCGTGCTGGCGAT-,CGTGCTGGCGAT-,GTGCTGGCGAT-,TGCTGGCGAT-,GCTGGCGAT-,CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-；

[0156] 和

[0157] N^4表示:-ACAGGACGATGTGCAGCG,-ACAGGACGATGTGCAGC,-ACAGGACGATGTGCAG,-ACAGGACGATGTGCA,-ACAGGACGATGTGC,-ACAGGACGATGTG,-ACAGGACGATGT,-ACAGGACGATG,-ACAGGACGAT,-ACAGGACGA,-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A。

[0158] 还优选的是式(S2)的反义寡核苷酸：

[0159] 5’-N^3-ACGCGTCC-N^4-3’

[0160] 其中

[0161] N^3表示:TCGTGCTGGCGAT-,CGTGCTGGCGAT-,GTGCTGGCGAT-,TGCTGGCGAT-,GCTGGCGAT-,CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-；

[0162] 和

[0163] N^4表示:-ACAGGACGATGTG,-ACAGGACGATGT,-ACAGGACGATG,-ACAGGACGAT,-ACAGGACGA,-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A。

[0164] 还优选的是式(S2)的反义寡核苷酸：

[0165] 5’-N^3-ACGCGTCC-N^4-3’

[0166] 其中

[0167] N^3表示:CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-；

[0168] 和

[0169] N^4表示:-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A。

[0170] 优选地,本发明涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且12至24个核苷酸中的至少3个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中所述反义寡核苷酸由以下序列5’-N^{3A}-TACGCGTCCA-N^{4A}-3’(Seq.ID No.70)表示,其中

[0171] N^{3A}表示:GGTGGGATCGTGCTGGCGA-,GTGGGATCGTGCTGGCGA-,TGGGATCGTGCTGGCGA-,GGGATCGTGCTGGCGA-,GGATCGTGCTGGCGA-,GATCGTGCTGGCGA-,ATCGTGCTGGCGA-,TCGTGCTGGCGA-,CGTGCTGGCGA-,GTGCTGGCGA-,TGCTGGCGA-,GCTGGCGA-,CTGGCGA-,TGGCGA-,GGCGA-,GCGA-,CGA-,GA-,或A-；

[0172] N^{4A}表示:-CAGGACGATGTGCAGCGGC,-CAGGACGATGTGCAGCGG,-CAGGACGATGTGCAGCG,-CAGGACGATGTGCAGC,-CAGGACGATGTGCAG,-CAGGACGATGTGCA,-CAGGACGATGTGC,-CAGGACGATGTG,-CAGGACGATGT,-CAGGACGATG,-CAGGACGAT,-CAGGACGA,-CAGGACG,-CAGGAC,-CAGGA,-CAGG,-CAG,-CA,或-C。

[0173] 优选N^{3A}表示:TGGGATCGTGCTGGCGA-,GGGATCGTGCTGGCGA-,GGATCGTGCTGGCGA-,GATCGTGCTGGCGA-,ATCGTGCTGGCGA-,TCGTGCTGGCGA-,CGTGCTGGCGA-,GTGCTGGCGA-,

TGCTGGCGA-,GCTGGCGA-,CTGGCGA-,TGGCGA-,GGCGA-,GCGA-,CGA-,GA-,或A-;

[0174] 和

[0175] N^{4A}表示:-CAGGACGATGTGCAGCG,-CAGGACGATGTGCAGC,-CAGGACGATGTGCAG,-CAGGACGATGTGCA,-CAGGACGATGTGC,-CAGGACGATGTG,-CAGGACGATGT,-CAGGACGATG,-CAGGACGAT,-CAGGACGA,-CAGGACG,-CAGGAC,-CAGGA,-CAGG,-CAG,-CA,或-C。

[0176] 更优选N^{3A}表示:TCGTGCTGGCGA-,CGTGCTGGCGA-,GTGCTGGCGA-,TGCTGGCGA-,GCTGGCGA-,CTGGCGA-,TGGCGA-,GGCGA-,GCGA-,CGA-,GA-,或A-;和

[0177] N^{4A}表示:-CAGGACGATGTG,-CAGGACGATGT,-CAGGACGATG,-CAGGACGAT,-CAGGACGA,-CAGGACG,-CAGGAC,-CAGGA,-CAGG,-CAG,-CA,或-C。

[0178] 更优选N^{3A}表示:CTGGCGA-,TGGCGA-,GGCGA-,GCGA-,CGA-,GA-,或A-;和

[0179] N^{4A}表示:-CAGGACG,-CAGGAC,-CAGGA,-CAGG,-CAG,-CA,或-C。

[0180] 优选地,通式(S2A/Seq.ID No.70)的反义寡核苷酸具有2至4个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选的LNA"章节中所公开的那些是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些是合适的。

[0181] 更优选通式(S2A)的反义寡核苷酸具有12至22个核苷酸并且在3'末端具有至少两个LNA核苷酸,在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0182] 还更优选地,通式(S2A)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,并且在3'末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5'末端具有2至5个,优选3个和5个,更优选3至4个LNA单元。优选地,反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地,反义寡核苷酸含有至少6个,更优选至少7个,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在"核碱基"章节中公开。

[0183] 此外,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中所述反义寡核苷酸由以下序列5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3'(Seq.ID No.10)表示,其中:

[0184] N^{11}表示:TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,GCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CAGAAGAGCTATTTGGTAG-,AGAAGAGCTATTTGGTAG-,GAAGAGCTATTTGGTAG-,AAGAGCTATTTGGTAG-,AGAGCTATTTGGTAG-,GAGCTATTTGGTAG-,AGCTATTTGGTAG-,GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-,

[0185] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC,

[0186] -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTC,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTT,-GAGCCGTCTTCAGGAATCT,-GAGCCGTCTTCAGGAATC,-GAGCCGTCTTCAGGAAT,-GAGCCGTCTTCAGGAA,-GAGCCGTCTTCAGGA,-GAGCCGTCTTCAGG,-GAGCCGTCTTCAG,-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G。

[0187] 式S3(Seq.ID No.10)的反义寡核苷酸优选包含2至10个LNA单元,更优选3至9个LNA单元,更优选4至8个LNA单元,并且还优选包含至少6个非LNA单元,更优选至少7个非LNA单元,最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称为3'末端)和5'末端(也称为5'末端)。优选地,在3'末端和/或5'末端存在至少一个,更优选至少两个LNA单元。

[0188] 因此,优选本发明的反义寡核苷酸被设计为含有2至10个LNA单元的GAPmer,并且特别地在反义寡核苷酸的5'末端含有1至5个LNA单元,和在反义寡核苷酸的3'末端含有1至5个LNA单元,并且在LNA单元之间含有至少7个,更优选至少8个DNA单元。更优选地,反义寡核苷酸在5'末端包含2至4个LNA单元,在3'末端包含2至4个LNA单元,还更优选在5'末端包含3至4个LNA单元和在3'末端包含3至4个LNA单元,并且优选含有至少7个非-LNA单元,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA区段之间的DNA单元。

[0189] 此外,反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基,例如腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及它们的常见衍生物,例如5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥,例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中,或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。LNA单元特别是本文公开的残基b^1至b^9是优选的。

[0190] 因此,优选的是式(S3)的反义寡核苷酸:

[0191] 5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3' (Seq.ID No.10)

[0192] 其中

[0193] N^{11}表示:TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,GCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CAGAAGAGCTATTTGGTAG-,AGAAGAGCTATTTGGTAG-,GAAGAGCTATTTGGTAG-,AAGAGCTATTTGGTAG-,AGAGCTATTTGGTAG-,GAGCTATTTGGTAG-,AGCTATTTGGTAG-,GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-,

[0194] 和

[0195] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC,

[0196] -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTC,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTT,-GAGCCGTCTTCAGGAATCT,-GAGCCGTCTTCAGGAATC,-GAGCCGTCTTCAGGAAT,-GAGCCGTCTTCAGGAA,-GAGCCGTCTTCAGGA,-GAGCCGTCTTCAGG,-GAGCCGTCTTCAG,-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G。

[0197] 优选地,通式(S3)的反义寡核苷酸具有10至28个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选的LNA"章节中所公开的那些是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些是合适的。

[0198] 更优选通式(S3)的反义寡核苷酸具有11-24个核苷酸,并且在3'末端具有至少两个LNA核苷酸,在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0199] 还更优选地,通式(S3)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14

至18个核苷酸，并且在3’末端具有2至5个，优选3至5个，更优选3至4个LNA单元和在5’末端具有2至5个，优选3个和5个，更优选3至4个LNA单元。优选地，反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地，反义寡核苷酸含有至少6个，更优选至少7个，最优选至少8个非LNA单元，例如在两个LNA区段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在“核碱基”章节中公开。

[0200] 还优选的是式(S3)的反义寡核苷酸：

[0201] 5’-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3’

[0202] 其中

[0203] N^{11}表示:AGAAGAGCTATTTGGTAG-,GAAGAGCTATTTGGTAG-,AAGAGCTATTTGGTAG-,AGAGCTATTTGGTAG-,GAGCTATTTGGTAG-,AGCTATTTGGTAG-,GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-；

[0204] 和

[0205] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCAGGAATC,-GAGCCGTCTTCAGGAAT,-GAGCCGTCTTCAGGAA,-GAGCCGTCTTCAGGA,-GAGCCGTCTTCAGG,-GAGCCGTCTTCAG,-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G。

[0206] 还优选的是式(S3)的反义寡核苷酸：

[0207] 5’-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3’

[0208] 其中

[0209] N^{11}表示:AGCTATTTGGTAG-,GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-；

[0210] 和

[0211] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCAG,-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G。

[0212] 还优选的是式(S3)的反义寡核苷酸：

[0213] 5’-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3’

[0214] 其中

[0215] N^{11}表示:TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-；和

[0216] N^{12}表示:-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G。

[0217] 优选地，本发明涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且12至24个核苷酸中的至少3个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中所述反义寡核苷酸由以下序列5’-N^{11A}-GTGTTTAGGG-N^{12A}-3’(Seq.ID No.71)表示，其中：

[0218] N^{11A}表示:TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA-,GCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA-,CCCCAGAAGAGCTATTTGGTA-,CCCAGAAGAGCTATTTGGTA-,CCAGAAGAGCTATTTGGTA-,CAGAAGAGCTATTTGGTA-,AGAAGAGCTATTTGGTA-,GAAGAGCTATTTGGTA-,AAGAGCTATTTGGTA-,AGAGCTATTTGGTA-,GAGCTATTTGGTA-,AGCTATTTGGTA-,GCTATTTGGTA-,CTATTTGGTA-,TATTTGGTA-,ATTTGGTA-,TTTGGTA-,TTGGTA-,TGGTA-,GGTA-,GTA-,TA-,或A-,

[0219] N^{12A}表示:-AGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC,-AGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC,-AGCCGTCTTCAGGAATCTTCT,-AGCCGTCTTCAGGAATCTTC,-AGCCGTCTTCAGGAATCTT,-

AGCCGTCTTCAGGAATCT,-AGCCGTCTTCAGGAATC,-AGCCGTCTTCAGGAAT,-AGCCGTCTTCAGGAA,-AGCCGTCTTCAGGA,-AGCCGTCTTCAGG,-AGCCGTCTTCAG,-AGCCGTCTTCA,-AGCCGTCTTC,-AGCCGTCTT,-AGCCGTCT,-AGCCGTC,-AGCCGT,-AGCCG,-AGCC,-AGC,-AG,或-A。

[0220] 优选N^{11A}表示:AGAAGAGCTATTTGGTA-,GAAGAGCTATTTGGTA-,AAGAGCTATTTGGTA-,AGAGCTATTTGGTA-,GAGCTATTTGGTA-,AGCTATTTGGTA-,GCTATTTGGTA-,CTATTTGGTA-,TATTTGGTA-,ATTTGGTA-,TTTGGTA-,TTGGTA-,TGGTA-,GGTA-,GTA-,TA-,或A-;和

[0221] N^{12A}表示:-AGCCGTCTTCAGGAATC,-AGCCGTCTTCAGGAAT,-AGCCGTCTTCAGGAA,-AGCCGTCTTCAGGA,-AGCCGTCTTCAGG,-AGCCGTCTTCAG,-AGCCGTCTTCA,-AGCCGTCTTC,-AGCCGTCTT,-AGCCGTCT,-AGCCGTC,-AGCCGT,-AGCCG,-AGCC,-AGC,-AG,或-A。

[0222] 更优选N^{11A}表示:AGCTATTTGGTA-,GCTATTTGGTA-,CTATTTGGTA-,TATTTGGTA-,ATTTGGTA-,TTTGGTA-,TTGGTA-,TGGTA-,GGTA-,GTA-,TA-,或A-;和

[0223] N^{12A}表示:-AGCCGTCTTCAG,-AGCCGTCTTCA,-AGCCGTCTTC,-AGCCGTCTT,-AGCCGTCT,-AGCCGTC,-AGCCGT,-AGCCG,-AGCC,-AGC,-AG,或-A。

[0224] 更优选N^{11A}表示:TTTGGTA-,TTGGTA-,TGGTA-,GGTA-,GTA-,TA-,或A-;和

[0225] N^{12A}表示:-AGCCGTC,-AGCCGT,-AGCCG,-AGCC,-AGC,-AG,或-A。

[0226] 优选地,通式(S3A/Seq.ID No.71)的反义寡核苷酸具有12至24个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选LNA"章节中所公开的LNA核苷酸(LNA单元)是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些)是合适的。

[0227] 更优选通式(S3A)的反义寡核苷酸具有12至22个核苷酸并且在3'末端具有至少2个LNA核苷酸和在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0228] 还更优选地,通式(S3A)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,以及在3'末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5'末端具有2至5个,优选3个和5个,更优选3至4个LNA单元。优选地,反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地,反义寡核苷酸含有至少6个,更优选至少7个,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在"核碱基"章节中公开。

[0229] 此外,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中所述反义寡核苷酸由以下序列5'-N^5-TTTGGTAG-N^6-3'(Seq.ID No.11)表示,其中:

[0230] N^5表示:GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,AGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,GCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CTGCCCCAGAAGAGCTA-,TGCCCCAGAAGAGCTA-,GCCCCAGAAGAGCTA-,CCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGAAGAGCTA-,CCAGAAGAGCTA-,CAGAAGAGCTA-,AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;

[0231] N^6表示:-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAG,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCA,-

TGTTTAGGGAGCCGTCTTC,-TGTTTAGGGAGCCGTCTT,-TGTTTAGGGAGCCGTCT,-TGTTTAGGGAGCCGTC,-TGTTTAGGGAGCCGT,-TGTTTAGGGAGCCG,-TGTTTAGGGAGCC,-TGTTTAGGGAGC,-TGTTTAGGGAG,-TGTTTAGGGA,-TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T。

[0232] 式S4(Seq.ID No.11)的反义寡核苷酸优选包含2至10个LNA单元,更优选3至9个LNA单元,更优选4至8个LNA单元,并且还优选包含至少6个非LNA单元,更优选至少7个非LNA单元,最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称为3'末端)和5'末端(也称为5'末端)。优选地,在3'末端和/或5'末端存在至少一个,更优选至少两个LNA单元。

[0233] 因此,优选本发明的反义寡核苷酸被设计为含有2至10个LNA单元的GAPmer,并且特别地在反义寡核苷酸的5'末端含有1至5个LNA单元,和在反义寡核苷酸的3'末端含有1至5个LNA单元,并且在LNA单元之间含有至少7个,更优选至少8个DNA单元。更优选地,反义寡核苷酸在5'末端包含2至4个LNA单元,在3'末端包含2至4个LNA单元,还更优选在5'末端包含3至4个LNA单元和在3'末端包含3至4个LNA单元,并且优选含有至少7个非-LNA单元,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA区段之间的DNA单元。

[0234] 此外,反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基,例如腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及它们的常见衍生物,例如5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥,例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中,或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。LNA单元特别是本文公开的残基b^1至b^9是优选的。

[0235] 因此,优选的是式(S4)的反义寡核苷酸:

[0236] 5'-N^5-TTTGGTAG-N^6-3'(Seq.ID No.11)

[0237] 其中

[0238] N^5表示:GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,AGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,GCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CTGCCCCAGAAGAGCTA-,TGCCCCAGAAGAGCTA-,GCCCCAGAAGAGCTA-,CCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGAAGAGCTA-,CCAGAAGAGCTA-,CAGAAGAGCTA-,AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;

[0239] 和

[0240] N^6选自:-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA,

[0241] -TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAG,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCA,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTC,-TGTTTAGGGAGCCGTCTT,-TGTTTAGGGAGCCGTCT,-TGTTTAGGGAGCCGTC,-TGTTTAGGGAGCCGT,-TGTTTAGGGAGCCG,-TGTTTAGGGAGCC,-TGTTTAGGGAGC,-TGTTTAGGGAG,-TGTTTAGGGA,-TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T。

[0242] 优选地,通式(S4)的反义寡核苷酸具有10至28个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选的LNA"章节中所公开的那些是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸

间键联(IL)”章节中所公开的那些是合适的。

[0243] 更优选通式(S4)的反义寡核苷酸具有11-24个核苷酸，并且在3’末端具有至少两个LNA核苷酸，在5’末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0244] 还更优选地，通式(S4)的反义寡核苷酸具有12至20个，更优选13至19个，更优选14至18个核苷酸，并且在3’末端具有2至5个，优选3至5个，更优选3至4个LNA单元和在5’末端具有2至5个，优选3个和5个，更优选3至4个LNA单元。优选地，反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地，反义寡核苷酸含有至少6个，更优选至少7个，最优选至少8个非LNA单元，例如在两个LNA区段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在“核碱基”章节中公开。

[0245] 还优选的是式(S4)的反义寡核苷酸：

[0246] 5’-N^5-TTTGGTAG-N^6-3’

[0247] 其中

[0248] N^5表示:CCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CTGCCCCAGAAGAGCTA-,TGCCCCAGAAGAGCTA-,GCCCCAGAAGAGCTA-,CCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGAAGAGCTA-,CCAGAAGAGCTA-,CAGAAGAGCTA-,AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;和

[0249] N^6选自:-TGTTTAGGGAGCCGTCTT,-TGTTTAGGGAGCCGTCT,-TGTTTAGGGAGCCGTC,-TGTTTAGGGAGCCGT,-TGTTTAGGGAGCCG,-TGTTTAGGGAGCC,-TGTTTAGGGAGC,-TGTTTAGGGAG,-TGTTTAGGGA,-TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T。

[0250] 还优选的是式(S4)的反义寡核苷酸：

[0251] 5’-N^5-TTTGGTAG-N^6-3’

[0252] 其中

[0253] N^5表示:CCCAGAAGAGCTA-,CCAGAAGAGCTA-,CAGAAGAGCTA-,AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;和

[0254] N^6选自:-TGTTTAGGGAGCC,-TGTTTAGGGAGC,-TGTTTAGGGAG,-TGTTTAGGGA,-TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T。

[0255] 还优选的是式(S4)的反义寡核苷酸：

[0256] 5’-N^5-TTTGGTAG-N^6-3’

[0257] 其中

[0258] N^5表示:AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;和

[0259] N^6选自:-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T。

[0260] 优选地，本发明涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且12至24个核苷酸中的至少3个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中所述反义寡核苷酸由以下序列5’-N^{5A}-ATTTGGTAGT-N^{6A}-3’(Seq.ID No.72)表示，其中

[0261] N^{5A}表示:GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT-,CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT-,CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT-,CAGCCTGCCCCAGAAGAGCT-,AGCCTGCCCCAGAAGAGCT-,GCCTGCCCCAGAAGAGCT-,CCTGCCCCAGAAGAGCT-,CTGCCCCAGAAGAGCT-,TGCCCCAGAAGAGCT-,GCCCCAGAAGAGCT-,CCCCAGAAGAGCT-,CCCAGAAGAGCT-,CCAGAAGAGCT-,CAGAAGAGCT-,

AGAAGAGCT-,GAAGAGCT-,AAGAGCT-,AGAGCT-,GAGCT-,AGCT-,GCT-,CT-,或T-;和

[0262] N^{6A}表示:-GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA,-GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA,-GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG,-GTTTAGGGAGCCGTCTTCAG,-GTTTAGGGAGCCGTCTTCA,-GTTTAGGGAGCCGTCTTC,-GTTTAGGGAGCCGTCTT,-GTTTAGGGAGCCGTCT,-GTTTAGGGAGCCGTC,-GTTTAGGGAGCCGT,-GTTTAGGGAGCCG,-GTTTAGGGAGCC,-GTTTAGGGAGC,-GTTTAGGGAG,-GTTTAGGGA,-GTTTAGGG,-GTTTAGG,-GTTTAG,-GTTTA,-GTTT,-GTT,-GT,或-G。

[0263] 优选N^{5A}表示:CCTGCCCCAGAAGAGCT-,CTGCCCCAGAAGAGCT-,TGCCCCAGAAGAGCT-,GCCCCAGAAGAGCT-,CCCCAGAAGAGCT-,CCCAGAAGAGCT-,CCAGAAGAGCT-,CAGAAGAGCT-,AGAAGAGCT-,GAAGAGCT-,AAGAGCT-,AGAGCT-,GAGCT-,AGCT-,GCT-,CT-,或T-;和

[0264] N^{6A}表示:-GTTTAGGGAGCCGTCTT,-GTTTAGGGAGCCGTCT,-GTTTAGGGAGCCGTC,-GTTTAGGGAGCCGT,-GTTTAGGGAGCCG,-GTTTAGGGAGCC,-GTTTAGGGAGC,-GTTTAGGGAG,-GTTTAGGGA,-GTTTAGGG,-GTTTAGG,-GTTTAG,-GTTTA,-GTTT,-GTT,-GT,或-G。

[0265] 更优选N^{5A}表示:CCCAGAAGAGCT-,CCAGAAGAGCT-,CAGAAGAGCT-,AGAAGAGCT-,GAAGAGCT-,AAGAGCT-,AGAGCT-,GAGCT-,AGCT-,GCT-,CT-,或T-;和

[0266] N^{6A}表示:-GTTTAGGGAGCC,-GTTTAGGGAGC,-GTTTAGGGAG,-GTTTAGGGA,-GTTTAGGG,-GTTTAGG,-GTTTAG,-GTTTA,-GTTT,-GTT,-GT,或-G。

[0267] 更优选N^{5A}表示:AAGAGCT-,AGAGCT-,GAGCT-,AGCT-,GCT-,CT-,或T-;和

[0268] N^{6A}表示:-GTTTAGG,-GTTTAG,-GTTTA,-GTTT,-GTT,-GT,或-G。

[0269] 优选地,通式(S4A/Seq.ID No.72)的反义寡核苷酸具有2至4个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选的LNA"章节中所公开的那些是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些是合适的。

[0270] 更优选通式(S4A)的反义寡核苷酸具有12至22个核苷酸并且在3'末端具有至少两个LNA核苷酸,在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0271] 还更优选地,通式(S4A)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,并且在3'末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5'末端具有2至5个,优选3个和5个,更优选3至4个LNA单元。优选地,反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地,反义寡核苷酸含有至少6个,更优选至少7个,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在"核碱基"章节中公开。

[0272] 此外,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中所述反义寡核苷酸由以下序列5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'(Seq.ID No.100)表示,其中

[0273] N^7表示:TGAATCTTGAATATCTCATG-,GAATCTTGAATATCTCATG-,AATCTTGAATATCTCATG-,ATCTTGAATATCTCATG-,TCTTGAATATCTCATG-,CTTGAATATCTCATG-,TTGAATATCTCATG-,TGAATATCTCATG-,GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-;

[0274] N^8表示:-AGTATTCTAGAAACTCACCA,-AGTATTCTAGAAACTCACC,-

AGTATTCTAGAAACTCAC,-AGTATTCTAGAAACTCA,-AGTATTCTAGAAACTC,-AGTATTCTAGAAACT,-AGTATTCTAGAAAC,-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A。

[0275] 式S6(Seq.ID No.100)的反义寡核苷酸优选包含2至10个LNA单元,更优选3至9个LNA单元,更优选4至8个LNA单元,并且还优选包含至少6个非LNA单元,更优选至少7个非LNA单元,最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称为3'末端)和5'末端(也称为5'末端)。优选地,在3'末端和/或5'末端存在至少一个,更优选至少两个LNA单元。

[0276] 因此,优选本发明的反义寡核苷酸被设计为含有2至10个LNA单元的GAPmer,并且特别地在反义寡核苷酸的5'末端含有1至5个LNA单元,和在反义寡核苷酸的3'末端含有1至5个LNA单元,并且在LNA单元之间含有至少7个,更优选至少8个DNA单元。更优选地,反义寡核苷酸在5'末端包含2至4个LNA单元,在3'末端包含2至4个LNA单元,还更优选在5'末端包含3至4个LNA单元和在3'末端包含3至4个LNA单元,并且优选含有至少7个非-LNA单元,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA区段之间的DNA单元。

[0277] 此外,反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基,例如腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及它们的常见衍生物,例如5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥,例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中,或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。LNA单元特别是本文公开的残基b^1至b^9是优选的。

[0278] 因此,优选的是式(S6)的反义寡核苷酸:

[0279] 5'-N^7-AATGGACC-N^8-3' (Seq.ID No.100)

[0280] 其中

[0281] N^7表示:TGAATCTTGAATATCTCATG-,GAATCTTGAATATCTCATG-,AATCTTGAATATCTCATG-,ATCTTGAATATCTCATG-,TCTTGAATATCTCATG-,CTTGAATATCTCATG-,TTGAATATCTCATG-,TGAATATCTCATG-,GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-;

[0282] 和

[0283] N^8选自:-AGTATTCTAGAAACTCACCA,-AGTATTCTAGAAACTCACC,-AGTATTCTAGAAACTCAC,-AGTATTCTAGAAACTCA,-AGTATTCTAGAAACTC,-AGTATTCTAGAAACT,-AGTATTCTAGAAAC,-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A。

[0284] 优选地,通式(S6)的反义寡核苷酸具有10至28个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选的LNA"章节中所公开的那些是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些是合适的。

[0285] 更优选通式(S6)的反义寡核苷酸具有11-24个核苷酸,并且在3'末端具有至少两个LNA核苷酸,在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0286] 还更优选地,通式(S6)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,并且在3'末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5'末端

具有2至5个，优选3个和5个，更优选3至4个LNA单元。优选地，反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地，反义寡核苷酸含有至少6个，更优选至少7个，最优选至少8个非LNA单元，例如在两个LNA区段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在“核碱基”章节中公开。

[0287] 还优选的是式(S6)的反义寡核苷酸：

[0288] 5’-N^7-AATGGACC-N^8-3’

[0289] 其中

[0290] N^7表示:AATCTTGAATATCTCATG-,ATCTTGAATATCTCATG-,TCTTGAATATCTCATG-,CTTGAATATCTCATG-,TTGAATATCTCATG-,TGAATATCTCATG-,GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-；和

[0291] N^8选自:-AGTATTCTAGAAACTCAC,-AGTATTCTAGAAACTCA,-AGTATTCTAGAAACTC,-AGTATTCTAGAAACT,-AGTATTCTAGAAAC,-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A。

[0292] 还优选的是式(S6)的反义寡核苷酸：

[0293] 5’-N^7-AATGGACC-N^8-3’

[0294] 其中

[0295] N^7表示:TGAATATCTCATG-,GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-；和

[0296] N^8选自:-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A。

[0297] 还优选的是式(S6)的反义寡核苷酸：

[0298] 5’-N^7-AATGGACC-N^8-3’

[0299] 其中

[0300] N^7表示:ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-；和

[0301] N^8选自:-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A。

[0302] 优选地，本发明涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，并且12至24个核苷酸中的至少3个是LNA，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中所述反义寡核苷酸由以下序列5’-N^{7A}-GAATGGACCA-N^{8A}-3’(Seq.ID No.73)表示，其中

[0303] N^{7A}表示:TGAATCTTGAATATCTCAT-,GAATCTTGAATATCTCAT-,AATCTTGAATATCTCAT-,ATCTTGAATATCTCAT-,TCTTGAATATCTCAT-,CTTGAATATCTCAT-,TTGAATATCTCAT-,TGAATATCTCAT-,GAATATCTCAT-,AATATCTCAT-,ATATCTCAT-,TATCTCAT-,ATCTCAT-,TCTCAT-,CTCAT-,TCAT-,CAT-,AT-,或T-；

[0304] N^{8A}表示:-GTATTCTAGAAACTCACCA,-GTATTCTAGAAACTCACC,-GTATTCTAGAAACTCAC,-GTATTCTAGAAACTCA,-GTATTCTAGAAACTC,-GTATTCTAGAAACT,-GTATTCTAGAAAC,-GTATTCTAGAAA,-GTATTCTAGAA,-GTATTCTAGA,-GTATTCTAG,-GTATTCTA,-GTATTCT,-GTATTC,-GTATT,-GTAT,-GTA,-GT,或-G。

[0305] 优选N^{7A}表示:AATCTTGAATATCTCAT-,ATCTTGAATATCTCAT-,TCTTGAATATCTCAT-,

CTTGAATATCTCAT-,TTGAATATCTCAT-,TGAATATCTCAT-,GAATATCTCAT-,AATATCTCAT-,ATATCTCAT-,TATCTCAT-,ATCTCAT-,TCTCAT-,CTCAT-,TCAT-,CAT-,AT-,或T-；

[0306] 和

[0307] N^{8A}表示:-GTATTCTAGAAACTCAC,-GTATTCTAGAAACTCA,-GTATTCTAGAAACTC,-GTATTCTAGAAACT,-GTATTCTAGAAAC,-GTATTCTAGAAA,-GTATTCTAGAA,-GTATTCTAGA,-GTATTCTAG,-GTATTCTA,-GTATTCT,-GTATTC,-GTATT,-GTAT,-GTA,-GT,或-G。

[0308] 更优选N^{7A}表示:TGAATATCTCAT-,GAATATCTCAT-,AATATCTCAT-,ATATCTCAT-,TATCTCAT-,ATCTCAT-,TCTCAT-,CTCAT-,TCAT-,CAT-,AT-,或T-;和

[0309] N^{8A}表示:-GTATTCTAGAAA,-GTATTCTAGAA,-GTATTCTAGA,-GTA TTCTAG,-GTATTCTA,-GTATTCT,-GTATTC,-GTATT,-GTAT,-GTA,-GT,或-G。

[0310] 更优选N^{7A}表示:ATCTCAT-,TCTCAT-,CTCAT-,TCAT-,CAT-,AT-,或T-;和

[0311] N^{8A}表示:-GTATTCT,-GTATTC,-GTATT,-GTAT,-GTA,-GT,或-G。

[0312] 优选地,通式(S6A/Seq.ID No.73)的反义寡核苷酸具有12至24个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选LNA"章节中所公开的LNA核苷酸(LNA单元)是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些)是合适的。

[0313] 更优选通式(S6A)的反义寡核苷酸具有12至22个核苷酸并且在3'末端具有至少2个LNA核苷酸和在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0314] 还更优选地,通式(S6A)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,以及在3'末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5'末端具有2至5个,优选3个和5个,更优选3至4个LNA单元。优选地,反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地,反义寡核苷酸含有至少6个,更优选至少7个,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在"核碱基"章节中公开。

[0315] 此外,本发明涉及由10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且10至28个核苷酸中的至少两个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中所述反义寡核苷酸由以下序列5'-N^{9}-ATTAATAA-N^{10}-3'(Seq.ID No.101)表示,其中

[0316] N^{9}表示:ATTCATATTTATATACAGGC-,TTCATATTTATATACAGGC-,TCATATTTATATACAGGC-,CATATTTATATACAGGC-,ATATTTATATACAGGC-,TATTTATATACAGGC-,ATTTATATACAGGC-,TTTATATACAGGC-,TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;

[0317] N^{10}表示:-AGTGCAAATGTTATTGGCTA,-AGTGCAAATGTTATTGGCT,-AGTGCAAATGTTATTGGC,-AGTGCAAATGTTATTGG,-AGTGCAAATGTTATTG,-AGTGCAAATGTTATT,-AGTGCAAATGTTAT,-AGTGCAAATGTTA,-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A。

[0318] 式S7(Seq.ID No.101)的反义寡核苷酸优选包含2至10个LNA单元,更优选3至9个LNA单元,更优选4至8个LNA单元,并且还优选包含至少6个非LNA单元,更优选至少7个非LNA单元,最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称

为3’末端)和5’末端(也称为5’末端)。优选地,在3’末端和/或5’末端存在至少一个,更优选至少两个LNA单元。

[0319] 因此,优选本发明的反义寡核苷酸被设计为含有2至10个LNA单元的GAPmer,并且特别地在反义寡核苷酸的5’末端含有1至5个LNA单元,和在反义寡核苷酸的3’末端含有1至5个LNA单元,并且在LNA单元之间含有至少7个,更优选至少8个DNA单元。更优选地,反义寡核苷酸在5’末端包含2至4个LNA单元,在3’末端包含2至4个LNA单元,还更优选在5’末端包含3至4个LNA单元和在3’末端包含3至4个LNA单元,并且优选含有至少7个非-LNA单元,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA区段之间的DNA单元。

[0320] 此外,反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基,例如腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及它们的常见衍生物,例如5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥,例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中,或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。LNA单元特别是本文公开的残基b^1至b^9是优选的。

[0321] 因此,优选的是式(S7)的反义寡核苷酸:

[0322] 5’-N^9-ATTAATAA-N^{10}-3’(Seq.ID No.101)

[0323] 其中

[0324] N^9表示:ATTCATATTTATATACAGGC-,

[0325] TTCATATTTATATACAGGC-,TCATATTTATATACAGGC-,CATATTTATATACAGGC-,ATATTTATATACAGGC-,TATTTATATACAGGC-,ATTTATATACAGGC-,TTTATATACAGGC-,TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;

[0326] 和

[0327] N^{10}选自:-AGTGCAAATGTTATTGGCTA,-AGTGCAAATGTTATTGGCT,-AGTGCAAATGTTATTGGC,-AGTGCAAATGTTATTGG,-AGTGCAAATGTTATTG,-AGTGCAAATGTTATT,-AGTGCAAATGTTAT,-AGTGCAAATGTTA,-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A。

[0328] 优选地,通式(S7)的反义寡核苷酸具有10至28个核苷酸并且在3’末端具有至少1个LNA核苷酸和在5’末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是“锁核酸(LNA®)”和“优选的LNA”章节中所公开的那些是合适的,并且核苷酸桥,尤其是“核苷酸间键联(IL)”章节中所公开的那些是合适的。

[0329] 更优选通式(S7)的反义寡核苷酸具有11-24个核苷酸,并且在3’末端具有至少两个LNA核苷酸,在5’末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0330] 还更优选,通式(S7)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,并且在3’末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5’末端具有2至5个,优选3个和5个,更优选3至4个LNA单元。优选地,反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地,反义寡核苷酸含有至少6个,更优选至少7个,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA区段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在“核碱基”章节中公开。

[0331] 还优选的是式(S7)的反义寡核苷酸:

[0332] 5’-N^{9}-ATTAATAA-N^{10}-3’

[0333] 其中

[0334] N^{9}表示:TCATATTTATATACAGGC-,CATATTTATATACAGGC-,ATATTTATATACAGGC-,TATTTATATACAGGC-,ATTTATATACAGGC-,TTTATATACAGGC-,TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;和

[0335] N^{10}选自:-AGTGCAAATGTTATTGGC,-AGTGCAAATGTTATTGG,-AGTGCAAATGTTATTG,-AGTGCAAATGTTATT,-AGTGCAAATGTTAT,-AGTGCAAATGTTA,-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A。

[0336] 还优选的是式(S7)的反义寡核苷酸:

[0337] 5’-N^{9}-ATTAATAA-N^{10}-3’

[0338] 其中

[0339] N^{9}表示:TTTATATACAGGC-,TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;和

[0340] N^{10}选自:-AGTGCAAATGTTA,-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A。

[0341] 还优选的是式(S7)的反义寡核苷酸:

[0342] 5’-N^{9}-ATTAATAA-N^{10}-3’

[0343] 其中

[0344] N^{9}表示:ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;和

[0345] N^{10}选自:-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A。

[0346] 优选地,本发明涉及由12至24个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且12至24个核苷酸中的至少3个是LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中所述反义寡核苷酸由以下序列5’-N^{9A}-CATTAATAAA-N^{10A}-3’(Seq.ID No.74)表示,其中

[0347] N^{9A}表示:ATTCATATTTATATACAGG-,TTCATATTTATATACAGG-,TCATATTTATATACAGG-,CATATTTATATACAGG-,ATATTTATATACAGG-,TATTTATATACAGG-,ATTTATATACAGG-,TTTATATACAGG-,TTATATACAGG-,TATATACAGG-,ATATACAGG-,TATACAGG-,ATACAGG-,TACAGG-,ACAGG-,CAGG-,AGG-,GG-,或G-;

[0348] N^{10A}表示:-GTGCAAATGTTATTGGCTA,-GTGCAAATGTTATTGGCT,-GTGCAAATGTTATTGGC,-GTGCAAATGTTATTGG,-GTGCAAATGTTATTG,-GTGCAAATGTTATT,-GTGCAAATGTTAT,-GTGCAAATGTTA,-GTGCAAATGTT,-GTGCAAATGT,-GTGCAAATG,-GTGCAAAT,-GTGCAAA,-GTGCAA,-GTGCA,-GTGC,-GTG,-GT,或-G。

[0349] 优选N^{9A}表示:TCATATTTATATACAGG-,CATATTTATATACAGG-,ATATTTATATACAGG-,TATTTATATACAGG-,ATTTATATACAGG-,TTTATATACAGG-,TTATATACAGG-,TATATACAGG-,ATATACAGG-,TATACAGG-,ATACAGG-,TACAGG-,ACAGG-,CAGG-,AGG-,GG-,或G-;

[0350] 和

[0351] N^{10A}表示:-GTGCAAATGTTATTGGC,-GTGCAAATGTTATTGG,-GTGCAAATGTTATTG,-GTGCAAATGTTATT,-GTGCAAATGTTAT,-GTGCAAATGTTA,-GTGCAAATGTT,-GTGCAAATGT,-

GTGCAAATG,-GTGCAAAT,-GTGCAAA,-GTGCAA,-GTGCA,-GTGC,-GTG,-GT,或-G。

[0352] 更优选N^{9A}表示:TTTATATACAGG-,TTATATACAGG-,TATATACAGG-,ATATACAGG-,TATACAGG-,ATACAGG-,TACAGG-,ACAGG-,CAGG-,AGG-,GG-,或G-;和

[0353] N^{10A}表示:-GTGCAAATGTTA,-GTGCAAATGTT,-GTGCAAATGT,-GTGCAAATG,-GTGCAAAT,-GTGCAAA,-GTGCAA,-GTGCA,-GTGC,-GTG,-GT,或-G。

[0354] 更优选N^{9A}表示:ATACAGG-,TACAGG-,ACAGG-,CAGG-,AGG-,GG-,或G-;和

[0355] N^{10A}表示:-GTGCAAA,-GTGCAA,-GTGCA,-GTGC,-GTG,-GT,或-G。

[0356] 优选地,通式(S7A/Seq.ID No.74)的反义寡核苷酸具有2至4个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选的LNA"章节中所公开的那些是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些是合适的。

[0357] 更优选通式(S7A)的反义寡核苷酸具有12至22个核苷酸并且在3'末端具有至少两个LNA核苷酸,在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0358] 还更优选地,通式(S7A)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,并且在3'末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5'末端具有2至5个,优选3个和5个,更优选3至4个LNA单元。优选地,反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地,反义寡核苷酸含有至少6个,更优选至少7个,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在"核碱基"章节中公开。

[0359] 此外,本发明涉及由8至18个,优选10至28个核苷酸组成的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,并且8至28个,优选10至28个核苷酸中的至少两个为LNA,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-$(N^{13})_m$-GTAGTGTT-$(N^{14})_n$-3'(Seq.ID No.99),其中

[0360] N^{13}表示:CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-,CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-,CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-,AGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-,GCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-,CCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-,CTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-,TGCCCCAGAAGAGCTATTTG-,GCCCCAGAAGAGCTATTTG-,CCCCAGAAGAGCTATTTG-,CCCAGAAGAGCTATTTG-,CCAGAAGAGCTATTTG-,CAGAAGAGCTATTTG-,AGAAGAGCTATTTG-,GAAGAGCTATTTG-,AAGAGCTATTTG-,AGAGCTATTTG-,GAGCTATTTG-,AGCTATTTG-,GCTATTTG-,CTATTTG-,TATTTG-,ATTTG-,TTTG-,TTG-,TG-,或G-;

[0361] 和

[0362] N^{14}选自:-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC,

[0363] -TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTC,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTT,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCT,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATC,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAAT,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAA,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGA,-TAGGGAGCCGTCTTCAGG,-TAGGGAGCCGTCTTCAG,-TAGGGAGCCGTCTTCA,-TAGGGAGCCGTCTTC,-TAGGGAGCCGTCTT,-TAGGGAGCCGTCT,-TAGGGAGCCGTC,-TAGGGAGCCGT,-TAGGGAGCCG,-TAGGGAGCC,-TAGGGAGC,-TAGGGAG,-TAGGGA,-TAGGG,-TAGG,-TAG,-TA,或-T;

[0364] m表示0或1;

[0365] n表示0或1；

[0366] 和n+m＝1或2。

[0367] 式S5(Seq.ID No 99)的反义寡核苷酸优选包含2至10个LNA单元，更优选3至9个LNA单元，更优选4至8个LNA单元，并且还优选包含至少6个非LNA单元，更优选至少7个非LNA单元，最优选至少8个非LNA单元。非LNA单元优选为DNA单元。LNA单元优选位于3'末端(也称为3'末端)和5'末端(也称为5'末端)。优选地，在3'末端和/或5'末端存在至少一个，更优选至少两个LNA单元。

[0368] 因此，优选本发明的反义寡核苷酸被设计为含有2至10个LNA单元的GAPmer，并且特别地在反义寡核苷酸的5'末端含有1至5个LNA单元，和在反义寡核苷酸的3'末端含有1至5个LNA单元，并且在LNA单元之间含有至少7个，更优选至少8个DNA单元。更优选地，反义寡核苷酸在5'末端包含2至4个LNA单元，在3'末端包含2至4个LNA单元，还更优选在5'末端包含3至4个LNA单元和在3'末端包含3至4个LNA单元，并且优选含有至少7个非-LNA单元，最优选至少8个非LNA单元，例如在两个LNA区段之间的DNA单元。

[0369] 此外，反义寡核苷酸可以含有常见的核碱基，例如腺嘌呤，鸟嘌呤，胞嘧啶，胸腺嘧啶和尿嘧啶，以及它们的常见衍生物，例如5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤。本发明的反义寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间桥，例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯来代替磷酸酯桥。这样的修饰可以仅存在于反义寡核苷酸的LNA区段中，或仅存在于反义寡核苷酸的非LNA区段中。LNA单元特别是本文公开的残基b^1至b^9是优选的。

[0370] 因此，优选的是式(S5)的反义寡核苷酸：

[0371] $5'-(N^{13})_m$-GTAGTGTT-$(N^{14})_n$-3'

[0372] 其中

[0373] N^{13}表示：GCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-，CCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-，CTGCCCCAGAAGAGCTATTTG-，TGCCCCAGAAGAGCTATTTG-，GCCCCAGAAGAGCTATTTG-，CCCCAGAAGAGCTATTTG-，CCCAGAAGAGCTATTTG-，CCAGAAGAGCTATTTG-，CAGAAGAGCTATTTG-，AGAAGAGCTATTTG-，GAAGAGCTATTTG-，AAGAGCTATTTG-，AGAGCTATTTG-，GAGCTATTTG-，AGCTATTTG-，GCTATTTG-，CTATTTG-，TATTTG-，ATTTG-，TTTG-，TTG-，TG-，或G-；和

[0374] N^{14}选自：-TAGGGAGCCGTCTTC，-TAGGGAGCCGTCTT，-TAGGGAGCCGTCT，-TAGGGAGCCGTC，-TAGGGAGCCGT，-TAGGGAGCCG，-TAGGGAGCC，-TAGGGAGC，-TAGGGAG，-TAGGGA，-TAGGG，-TAGG，-TAG，-TA，或-T；和

[0375] m表示0或1；n表示0或1；和n+m＝1或2。

[0376] 优选地，通式(S5)的反义寡核苷酸具有10至28个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元)，特别是“锁核酸(LNA®)”和“优选的LNA”章节中所公开的那些是合适的，并且核苷酸桥，尤其是“核苷酸间键联(IL)”章节中所公开的那些是合适的。

[0377] 更优选通式(S5的反义寡核苷酸具有11-24个核苷酸，并且在3'末端具有至少两个LNA核苷酸，在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0378] 还更优选地，通式(S5)的反义寡核苷酸具有12至20个，更优选13至19个，更优选14至18个核苷酸，并且在3'末端具有2至5个，优选3至5个，更优选3至4个LNA单元和在5'末端具有2至5个，优选3个和5个，更优选3至4个LNA单元。优选地，反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA

区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地，反义寡核苷酸含有至少6个，更优选至少7个，最优选至少8个非LNA单元，例如在两个LNA区段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在“核碱基”章节中公开。

[0379] 还优选的是式(S5)的反义寡核苷酸：

[0380] 5’-$(N^{13})_m$-GTAGTGTT-$(N^{14})_n$-3’

[0381] 其中

[0382] N^{13}表示:CCCCAGAAGAGCTATTTG-,CCCAGAAGAGCTATTTG-,CCAGAAGAGCTATTTG-,CAGAAGAGCTATTTG-,AGAAGAGCTATTTG-,GAAGAGCTATTTG-,AAGAGCTATTTG-,AGAGCTATTTG-,GAGCTATTTG-,AGCTATTTG-,GCTATTTG-,CTATTTG-,TATTTG-,ATTTG-,TTTG-,TTG-,TG-,或G-;和

[0383] N^{14}选自:-TAGGGAGCCG,-TAGGGAGCC,-TAGGGAGC,-TAGGGAG,-TAGGGA,-TAGGG,-TAGG,-TAG,-TA,或-T;和

[0384] m表示0或1;n表示0或1;和n+m＝1或2。

[0385] 还优选的是式(S5)的反义寡核苷酸：

[0386] 5’-$(N^{13})_m$-GTAGTGTT-$(N^{14})_n$-3’

[0387] 其中

[0388] N^{13}表示:GAAGAGCTATTTG-,AAGAGCTATTTG-,AGAGCTATTTG-,GAGCTATTTG-,AGCTATTTG-,GCTATTTG-,CTATTTG-,TATTTG-,ATTTG-,TTTG-,TTG-,TG-,或G-;和

[0389] N^{14}选自:-TAGGG,-TAGG,-TAG,-TA,或-T;和

[0390] m表示0或1;n表示0或1;和n+m＝1或2。

[0391] 还优选的是式(S5)的反义寡核苷酸：

[0392] 5’-$(N^{13})_m$-GTAGTGTT-$(N^{14})_n$-3’

[0393] 其中

[0394] N^{13}表示:CAGAAGAGCTATTTG-,AGAAGAGCTATTTG-,GAAGAGCTATTTG-,AAGAGCTATTTG-,AGAGCTATTTG-,GAGCTATTTG-,AGCTATTTG-,GCTATTTG-,CTATTTG-,TATTTG-,ATTTG-,TTTG-,TTG-,TG-,或G-;和

[0395] N^{14}选自:-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCT,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATC,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAAT,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGAA,-TAGGGAGCCGTCTTCAGGA,-TAGGGAGCCGTCTTCAGG,-TAGGGAGCCGTCTTCAG,-TAGGGAGCCGTCTTCA,-TAGGGAGCCGTCTTC,-TAGGGAGCCGTCTT,-TAGGGAGCCGTCT,-TAGGGAGCCGTC,-TAGGGAGCCGT,-TAGGGAGCCG,-TAGGGAGCC,-TAGGGAGC,-TAGGGAG,-TAGGGA,-TAGGG,-TAGG,-TAG,-TA,或-T;和

[0396] m表示0或1;n表示0或1;和n+m＝1或2。

[0397] 还优选的是式(S5)的反义寡核苷酸：

[0398] 5’-$(N^{13})_m$-GTAGTGTT-$(N^{14})_n$-3’

[0399] 其中

[0400] N^{13}表示:GAGCTATTTG-,AGCTATTTG-,GCTATTTG-,CTATTTG-,TATTTG-,ATTTG-,TTTG-,TTG-,TG-,或G-;和

[0401] N^{14}选自:-TAGGGAGCCGTCTTCAGG,-TAGGGAGCCGTCTTCAG,-TAGGGAGCCGTCTTCA,-TAGGGAGCCGTCTTC,-TAGGGAGCCGTCTT,-TAGGGAGCCGTCT,-TAGGGAGCCGTC,-TAGGGAGCCGT,-

TAGGGAGCCG,-TAGGGAGCC,-TAGGGAGC,-TAGGGAG,-TAGGGA,-TAGGG,-TAGG,-TAG,-TA,或-T;和

[0402] m表示0或1;n表示0或1;和n+m=1或2。

[0403] 还优选的是式(S5)的反义寡核苷酸:

[0404] 5'-$(N^{13})_m$-GTAGTGTT-$(N^{14})_n$-3'

[0405] 其中

[0406] N^{13}表示:ATTTG-,TTTG-,TTG-,TG-,或G-;和

[0407] N^{14}选自:-TAGGGAGCCGTCT,-TAGGGAGCCGTC,-TAGGGAGCCGT,-TAGGGAGCCG,-TAGGGAGCC,-TAGGGAGC,-TAGGGAG,-TAGGGA,-TAGGG,-TAGG,-TAG,-TA,或-T;和

[0408] m表示0或1;n表示0或1;和n+m=1或2。

[0409] 优选地,通式(S5/Seq.ID No.99)的反义寡核苷酸具有12至24个核苷酸并且在3'末端具有至少1个LNA核苷酸和在5'末端具有至少1个LNA核苷酸。LNA核苷酸(LNA单元),特别是"锁核酸(LNA®)"和"优选LNA"章节中所公开的LNA核苷酸(LNA单元)是合适的,并且核苷酸桥,尤其是"核苷酸间键联(IL)"章节中所公开的那些)是合适的。

[0410] 更优选通式(S5)的反义寡核苷酸具有12至22个核苷酸并且在3'末端具有至少2个LNA核苷酸和在5'末端具有至少两个LNA核苷酸。

[0411] 还更优选地,通式(S5)的反义寡核苷酸具有12至20个,更优选13至19个,更优选14至18个核苷酸,以及在3'末端具有2至5个,优选3至5个,更优选3至4个LNA单元和在5'末端具有2至5个,优选3个和5个,更优选3至4个LNA单元。优选地,反义寡核苷酸是LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer。优选地,反义寡核苷酸含有至少6个,更优选至少7个,最优选至少8个非LNA单元,例如在两个LNA段之间的DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在"核碱基"章节中公开。

[0412] 本发明的另一方面涉及长度为10至28个核苷酸,优选10至24个核苷酸,更优选11至22个核苷酸或12至20个核苷酸,更优选13至19个核苷酸以及最优选14至18个核苷酸的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,其中至少两个核苷酸,优选至少三个核苷酸,更优选至少四个核苷酸是LNA,10至28个核苷酸,优选10至24个核苷酸,更优选11至22个核苷酸或12至20个核苷酸,更优选13至19个核苷酸以及最优选14至18个核苷酸的反义寡核苷酸序列选自包含在选自以下的序列中的10至28个核苷酸,优选10至24个核苷酸的序列组,更优选11至22个核苷酸或12至20个核苷酸,更优选13至19个核苷酸以及最优选14至18个核苷酸:

[0413] GAATCTTGAATATCTCATGAATGGACCAGTATTCTAGAAAC(Seq.ID No.75:383-423of Seq.ID No.1),

[0414] TTCATATTTATATACAGGCATTAATAAAGTGCAAATGTTAT(Seq.ID No.77:2245-2285 of Seq.ID No.1),

[0415] TGAGGAAGTGCTAACACAGCTTATCCTATGACAATGTCAAAG(Seq.ID No.78:2315-2356 of Seq.ID No.1),

[0416] GCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAGTGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG(Seq.ID No.79:2528-2576 of Seq.ID No.1),

[0417] CGCAGGTCCTCCCAGCTGATGACATGCCGCGTCAGGTACTCCTGTAGGT(Seq.ID No.81:3205-

3253 of Seq.ID No.1)，

[0418] ATGTCGTTATTAACCGACTTCTGAACGTGCGGTGGGATCGTGCTGGCGATACGCGTCCACAGGACGATGTGCAGCGGC(Seq.ID No.83:4141-4218 of Seq.ID No.1)，

[0419] GGCCACAGGCCCCTGAGCAGCCCCCGACCCATGGCAGACCCCGCTGCTCGTCATAGACCGAGCCCCCAGCGCAG(Seq.ID No.84:4216-4289 of Seq.ID No.1)，

[0420] ATGTCGTTATTAACCGACTTCTGAACGTGCGGTGGGATCGTGCTGGCGATACGCGTCCACAGGACGATGTGCAGCGGCCACAGGCCCCTGAGCAGCCCCCGACCCATGGCAGACCCCGCTGCTCGTCATAGACCGAGCCCCCAGCGCAG(Seq.ID No.86:4141-4289 of Seq.ID No.1)，

[0421] TTGAATATCTCATGAATGGACCAGTATTCTA(Seq.ID No.87:388-418 of Seq.ID No.1)，

[0422] CAAGTGGAATTTCTAGGCGCCTCTATGCTACTG(Seq.ID No.88:483-515 of Seq.ID No.1)，

[0423] ATTTATATACAGGCATTAATAAAGTGCAAAT(Seq.ID No.89:2250-2280 of Seq.ID No.1)，

[0424] AAGTGCTAACACAGCTTATCCTATGACAATGT(Seq.ID No.90:2320-2351 of Seq.ID No.1)，

[0425] CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAGTGTTTAGGGAGCCGTCT(Seq.ID No.91:2533-2571 of Seq.ID No.1)，

[0426] CTGGTCGCCCTCGATCTCTCAACACGTTGTCCTTCATGCTTTCGACACAGGGGTGCTCCCGCACCTTGGAACCAAATG(Seq.ID No.92:2753-2830of Seq.ID No.1)，

[0427] GTCCTCCCAGCTGATGACATGCCGCGTCAGGTACTCCTG

[0428] (Seq.ID No.93:3210-3248of Seq.ID No.1)，

[0429] CTCAGCTTCTGCTGCCGGTTAACGCGGTAGCAGTAGAAGA(Seq.ID No.94:3655-3694of Seq.ID No.1)，

[0430] GTTATTAACCGACTTCTGAACGTGCGGTGGGATCGTGCTGGCGATACGCGTCCACAGGACGATGTGCA(Seq.ID No.95:4146-4213of Seq.ID No.1)，

[0431] CAGGCCCCTGAGCAGCCCCCGACCCATGGCAGACCCCGCTGCTCGTCATAGACCGAGCCCCCAG(Seq.ID No.96:4221-4284of Seq.ID No.1)，

[0432] CACGCGCGGGGGTGTCGTCGCTCCGTGCGCGCGAGTGACTCACTCAACTTCA(Seq.ID No.97:4495-4546of Seq.ID No.1)，

[0433] 其中所述反义寡核苷酸能够在全人转录组上仅与编码TGF-R_{II}的基因或编码TGF-R_{II}的mRNA选择性杂交。

[0434] 具有序列号75、77、78、79、81、83、84、86-97中所含序列的所述反义寡核苷酸在3’末端具有2至5个，优选3至5个，更优选3至4个LNA单元，并且在5’末端具有2至5个，优选3至5个，更优选3至4个LNA单元，并且优选具有LNA区段A-DNA区段-LNA区段B形式的GAPmer的结构。LNA核苷酸(LNA单元)特别是在“锁核酸(LNA)”章节中所公开的那些是合适的，并且核苷酸间桥特别是“核苷酸间键联(IL)”章节中公开的那些是合适的。优选地，所述反义寡核苷酸在两个LNA片段之间含有至少6个，更优选至少7个，最优选至少8个非LNA单元，例如DNA单元。适用于非LNA单元和LNA单元的核碱基在“核碱基”章节中公开。所述反义寡核苷酸的合适实例由式(S1)至(S7)，(S1A)至(S4A)，(S6A)和(S7A)表示。

[0435] Seq.ID No.1表示智人转化生长因子β受体II(TGF-R_{II})转录变体2的cDNA的反义链(cDNA)(5'-3'反义序列)。

[0436] Seq.ID No.2表示智人转化生长因子β受体II(70/80kDa)(TGF-R_{II})转录变体2的cDNA的有义链(5'-3'有义序列)。或者,也可以认为Seq.ID No.2的序列表示智人转化生长因子β受体II(TGF-R_{II})转录物变体2的mRNA的序列(Seq.ID No.3),但是写在DNA代码中,即以G、C、A、T代码而不是RNA代码表示。

[0437] Seq.ID No.3表示智人转化生长因子β受体II(TGF-R_{II})转录变体2的mRNA(5'-3'有义序列)。显然,在Seq.ID No.3中显示的mRNA以RNA代码书写,即用G、C、A、U代码表示。

[0438] 应当理解,本文所用的"编码DNA链"是指与mRNA相同的DNA链(除了写在DNA代码中),并且其包含用于蛋白翻译的密码子。它不被用作转录成mRNA的模板。因此,术语"编码DNA链","有义DNA链"和"非模板DNA链"可以互换使用。此外,本文所用的"非编码DNA链"是指与"编码DNA链"互补的DNA链,并且用作mRNA转录的模板。因此,术语"非编码DNA链","反义DNA链"和"模板DNA链"可以互换使用

[0439] 术语"反义寡核苷酸"是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的寡聚物或聚合物或其模拟物或其变体,例如具有修饰的核苷酸间键联例如硫代磷酸酯键和/或一个或多个修饰的核碱基例如5-甲基胞嘧啶和/或一个或多个修饰的核苷酸单元,例如LNA,如β-D-氧-LNA的反义寡核苷酸。术语"反义寡核苷酸"包括由天然存在的核碱基、糖和共价核苷酸(主链)键联组成的寡核苷酸,以及具有类似功能的非天然存在部分的寡核苷酸。这种修饰或取代的寡核苷酸由于所需的性质例如增强的细胞摄取、对核酸靶的增强的亲和力以及在核酸酶存在下增加的稳定性而通常优于天然形式。反义寡核苷酸是与靶核酸杂交并抑制其表达的短的催化RNA或催化寡核苷酸。

[0440] 术语"核苷"是本领域技术人员公知的,并且是指戊糖部分诸如核糖,脱氧核糖或修饰或锁定的核糖,或如下面详细公开的修饰或锁定的脱氧核糖如LNA。核碱基连接到糖苷碳原子(戊糖的1'位),并且在核苷的3'氧或硫原子优选3'氧原子与相邻核苷的5'氧或硫原子优选5'氧原子之间形成核苷酸间键联,而核苷酸间键联不属于核苷(见图2)。

[0441] 术语"核苷酸"是本领域技术人员公知的,并且是指戊糖部分,诸如核糖,脱氧核糖或修饰或锁定的核糖或修饰或锁定的脱氧核糖,如下文详细公开的LNA。核碱基连接到糖苷碳原子(戊糖的1'位),并且在核苷酸的3'氧或硫原子优选3'氧原子与相邻核苷酸的5'氧或硫原子优选5'氧原子之间形成核苷酸间键联,而核苷酸间键联是核苷酸的一部分(参见图2)。

[0442] 核碱基

[0443] 术语"核碱基"在本文中缩写为"B",并且是指五个标准核苷酸碱基腺嘌呤(A),胸腺嘧啶(T),鸟嘌呤(G),胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)以及其修饰物或类似物或具有在互补链中与碱基形成沃森-克里克碱基对的能力的类似物。修饰的核碱基包括其它合成和天然核碱基,例如5-甲基胞嘧啶(C*),5-羟甲基胞嘧啶,N^4-甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,7-脱氮黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,6-甲基腺嘌呤,6-甲基鸟嘌呤,6-乙基腺嘌呤,6-乙基鸟嘌呤,2-丙基腺嘌呤,2-丙基鸟嘌呤,6-羧基尿嘧啶,5-卤尿嘧啶,5,6-二氢尿嘧啶,5-胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,6-氮杂尿嘧啶,6-氮杂胞嘧啶,6-氮杂胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-氟腺嘌呤,8-氯腺嘌呤,8-溴腺嘌呤,8-碘腺嘌呤,8-氨基腺嘌呤,8-

硫代腺嘌呤,8-硫烷基腺嘌呤,8-羟基腺嘌呤,8-氟鸟嘌呤,8-氯鸟嘌呤,8-溴鸟嘌呤,8-碘鸟嘌呤,8-氨基鸟嘌呤,8-硫代鸟嘌呤,8-硫代烷基鸟嘌呤,8-羟基鸟嘌呤,5-氟尿嘧啶,5-溴尿嘧啶,5-氯尿嘧啶,5-碘尿嘧啶,5-三氟甲基尿嘧啶,5-氟胞嘧啶,5-溴胞嘧啶,5-氯胞嘧啶,5-碘胞嘧啶,5-三氟甲基胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤,7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤,8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤,3-脱氮鸟嘌呤,3-脱氮腺嘌呤,2-硫尿嘧啶,2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶等,5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤取代是优选的,因为这些修饰具有已显示增加核酸双链稳定性。

[0444] 本发明优选的反义寡核苷酸可以包含核碱基的类似物。反义寡核苷酸的仅一个核苷酸单元的核碱基可以被核碱基的类似物替代,或者反义寡核苷酸中的两个,三个,四个,五个或甚至所有核碱基可以被核碱基的类似物(例如5-甲基胞嘧啶,或N^6-甲基腺嘌呤或2-氨基腺嘌呤)替代。优选地,LNA单元可以连接到诸如5-甲基胞嘧啶的核碱基的类似物。

[0445] 应当认识到,当提及核苷酸或单体的序列时,所指的是碱基(例如A,T,G,C或U)的序列。然而,除了表3至8中公开的具体实例以外,反义寡核苷酸通过字母代码A、T、G、C和U的表示需要被理解为所述反义寡核苷酸可以含有本文公开的任何核碱基,本文公开的任何3'末端基团,本文公开的任何的5'末端基团,以及本文公开的任何核苷酸间键联(也称为核苷酸间桥)。核苷酸A、T、G、C和U还应被理解为是LNA核苷酸或非LNA核苷酸,例如优选DNA核苷酸。

[0446] 只有在表4至9所公开的具体实例中,核碱基、LNA单元、非LNA单元、核苷酸间键联和末端基团被进一步规定为如表2前的"文字说明"章节所述的。

[0447] 已证明本文公开的反义寡核苷酸以及反义寡核苷酸的盐与靶(编码TGF-R_{II}的基因或编码TGF-R_{II}的mRNA)互补,即充分良好地杂交并具有足够的特异性和特别是选择性以产生所需的抑制作用。

[0448] 术语"盐"是指本发明的反义寡核苷酸的生理学和/或药学上可接受的盐。反义寡核苷酸含有核碱基如腺嘌呤,鸟嘌呤,胸腺嘧啶,胞嘧啶或其衍生物,其是碱性的并且形成盐如氯化物或甲磺酸盐。核苷酸间键联优选含有形成盐如钠、锂或钾盐的带负电荷的氧或硫原子。因此,药学上可接受的碱加成盐用无机碱或有机碱形成。合适的有机和无机碱的实例是衍生自金属离子的碱,例如铝、碱金属离子如钠或钾,碱土金属离子如钙或镁,或胺盐离子或碱金属或碱土氢氧化物,-碳酸盐或-碳酸氢盐。实例包括水性LiOH,NaOH,KOH,NH_4OH,碳酸钾,氨和碳酸氢钠,铵盐,伯、仲和叔胺,例如氢氧化四烷基铵,低级烷基胺如甲胺,叔丁胺,普鲁卡因,乙醇胺,芳基烷基胺如二苄胺和N,N-二苄基乙二胺,低级烷基哌啶如N-乙基哌啶,环烷基胺如环己胺或二环己基胺,吗啉,葡糖胺,N-甲基-和N,N-二甲基葡糖胺,1-金刚烷胺,苄星青霉素或衍生自氨基酸如精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸或原始中性或酸性氨基酸的酰胺的盐,氯普鲁卡因,胆碱,普鲁卡因等。

[0449] 由于反义寡核苷酸是碱性的,它们与有机和无机酸形成药学上可接受的盐。用于这种酸加成盐形成的合适的酸的实例是盐酸,氢溴酸,硫酸,磷酸,乙酸,柠檬酸,草酸,丙二酸,水杨酸,对氨基水杨酸,苹果酸,富马酸,琥珀酸酸,抗坏血酸,马来酸,磺酸,膦酸,高氯酸,硝酸,甲酸,丙酸,葡萄糖酸,乳酸,酒石酸,羟基马来酸,丙酮酸,苯乙酸,苯甲酸,对氨基苯甲酸酸,对羟基苯甲酸,甲磺酸,乙磺酸,亚硝酸,羟基乙磺酸,乙磺酸,对甲苯磺酸,萘磺酸,磺胺酸,樟脑磺酸,瓷酸,扁桃酸,邻甲基扁桃酸,氢-苯磺酸,苦味酸,己二酸,D-o-甲苯

基酒石酸,丙醇二酸,-甲苯酸,(o,m,p)-甲苯酸,萘胺磺酸和本领域技术人员已知的其它矿物酸或羧酸。通过使游离碱形式与足量的所需酸接触以用常规方式产生盐来制备盐。

[0450] 在本发明的上下文中,“杂交”是指核酸杂交,其中单链核酸(DNA或RNA)与具有非常相似或甚至互补序列的另一单链核酸相互作用。因此,相互作用通过特定核碱基之间的氢键(碱基配对)发生。

[0451] 如本文所用,术语“互补性”(DNA和RNA碱基对互补性)是指两种核酸之间精确配对的能力。当它们的形状允许它们通过氢键键合在一起时,碱基对中的核苷酸是互补的。由此一对腺嘌呤和胸苷(或尿嘧啶)形成两个氢键和胞嘧啶-鸟嘌呤对形成三个氢键。本文所用的“互补序列”是指DNA或RNA序列,使得当它们彼此反平行对齐时,序列中每个位置处的核苷酸碱基将是互补的,非常像在镜子中观看且看到相反的事物。

[0452] 本文所用的术语“可特异性杂交”表示反义寡核苷酸与靶序列的互补性或精确的碱基配对的足够程度,以使得反义寡核苷酸和DNA或RNA靶标之间发生稳定和特异性结合。尽管优选100%的互补性,但根据本发明的寡核苷酸的序列不需要与其可特异性杂交的靶核酸的序列具有100%的互补性。因此,“100%互补性”是指反义寡核苷酸与靶标在其完全或整个长度上杂交而无错配。换句话说,在本发明中,当化合物与靶DNA或RNA分子在生理或病理条件下结合但反义寡核苷酸与非-靶序列的非特异性结合是极不可能或甚至不可能的时,定义反义化合物是可特异性杂交的。

[0453] 因此,本发明优选涉及反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸与编码TGF RII的mRNA以100%的互补性结合,并且不与完整的人转录组中的任何其它区域结合。进一步优选的是本发明涉及反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸在其完整长度上与编码TGF RII的mRNA具有100%的互补性,并且不具有脱靶效应。或者,本发明优选涉及与编码TGF RII的mRNA具有100%互补性但与人转录组的另一mRNA没有互补性的反义寡核苷酸。因此,术语“人转录组”是指人类生物体中转录物的总集合,这意味着所有细胞类型和环境条件(在任何给定的时间)的转录物。

[0454] 特异性

[0455] 本发明的反义寡核苷酸共同的是它们对于它们所结合的编码TGF-R_{II}的基因或mRNA的区域具有特异性。根据本发明,优选的是,在人转录组中,反义寡核苷酸在其全长上仅与编码TGF-R_{II}的mRNA具有100%的互补性。此外,本发明的一个目的是在除猴之外的哺乳动物的转录组内找到没有交叉反应性的反义寡核苷酸;特别地,反义寡核苷酸仅与大猿的转录组具有交叉反应性。这应该避免失效。因此,本发明的反义寡核苷酸在与编码TGF-R_{II}的基因或mRNA的杂交上具有高度的特异性。本发明的反义寡核苷酸优选在其完整长度上以100%互补性特异性结合编码TGF-R_{II}的基因或编码TGF-R_{II}的mRNA,并且不与完整人转录组中的任何其它区域结合。这意味着,本发明的反义寡核苷酸与靶标(TGF-R_{II} mRNA)杂交而没有错配。

[0456] 如本文所用,术语“mRNA”可以包含含有内含子的mRNA(也称为前体mRNA)以及不含任何内含子的mRNA。

[0457] 本发明的反义寡核苷酸能够与前体mRNA和/或mRNA结合或杂交。这意味着反义寡核苷酸可以在前体mRNA的内含子区域处或内含子区域内结合或杂交,或者可以在前体mRNA的重叠的内含子-外显子区域处结合或杂交,或者可以在前体mRNA的外显子区域处或外显

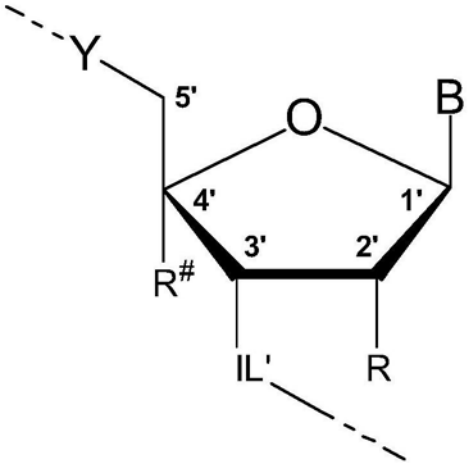
子区域内和mRNA的外显子区域处或外显子区域内结合或杂交(参见图1)。优选的是能够与前体mRNA和mRNA结合或杂交的反义寡核苷酸。反义寡核苷酸(ASO)与前体mRNA的结合或杂交抑制5'帽形成,抑制前体mRNA的剪接以获得mRNA并激活切割前体mRNA的RNA酶H。反义寡核苷酸(ASO)与mRNA的结合或杂交激活RNA酶H,其切割mRNA并抑制核糖体亚基的结合。

[0458] 本发明的反义寡核苷酸由至少10个且不多于28个,优选不多于24个,更优选不多于20个核苷酸组成,因此由10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,或20个核苷酸组成,优选由11至20个,或11至19个,或12至19个,或13至19个,或13至18个核苷酸组成,和更优选由14至18个核苷酸组成,其中这些核苷酸中的至少两个,优选三个是锁核酸(LNA)。较短的反义寡核苷酸,即具有少于10个核苷酸的反义寡核苷酸也是可能的,但是反义寡核苷酸越短,杂交不再不够强的风险就越高,并且选择性将减少或将会丧失。非选择性反义寡核苷酸具有结合人转录组中不期望的区域和编码非TGF-R_{II}的其它蛋白的不期望的mRNA的风险,从而引起不期望的副作用。具有超过20个核苷酸的更长的反义寡核苷酸也是可能的,但是进一步增加长度使得这种反义寡核苷酸的合成更加复杂和昂贵,而没有增加杂交的选择性或强度或关于降解的更好稳定性的任何进一步的益处。

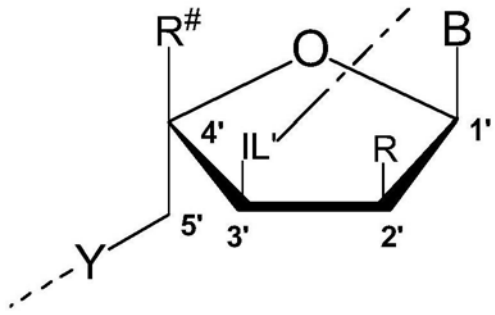
[0459] 因此,本发明涉及由10至20个核苷酸组成的反义寡核苷酸,其中至少两个核苷酸和优选3'和5'末端核苷酸是LNA。因此,优选至少末端3'核苷酸是LNA,并且至少5'末端核苷酸是LNA。在存在多于2个LNA的情况下,优选的是,另外的LNA连接到3'或5'末端LNA,就像本文所公开的gapmer一样。

[0460] 存在于本发明的反义寡核苷酸中的一个核苷酸结构单元可以由以下通式(B1)和(B2)表示:

[0461]



(B1)



(B2)

[0462] 其中

[0463] B表示核碱基;

[0464] IL'表示-X"-P(=X')(X^-)-;

[0465] R表示-H,-F,-OH,$-NH_2$,$-OCH_3$,$-OCH_2CH_2OCH_3$和$R^{\#}$表示-H;

[0466] 或R和$R^{\#}$一起形成桥-$R^{\#}$-R-,其选自$-CH_2-O-$,$-CH_2-S-$,$-CH_2-NH-$,$-CH_2-N(CH_3)-$,$-CH_2-N(C_2H_5)-$,$-CH_2-CH_2-O-$,$-CH_2-CH_2-S-$,$-CH_2-CH_2-NH-$,$-CH_2-CH_2-N(CH_3)-$,或$-CH_2-CH_2-N(C_2H_5)-$;

[0467] X'表示=O或=S;

[0468] X^-表示$-O^-$,-OH,$-OR^H$,$-NHR^H$,$-N(R^H)_2$,$-OCH_2CH_2OR^H$,$-OCH_2CH_2SR^H$,$-BH_3^-$,$-R^H$,-SH,$-SR^H$,或$-S^-$;

[0469] X”表示-O-,-NH-,$-NR^H-$,$-CH_2-$,或-S-;

[0470] Y是-O-,-NH-,$-NR^H-$,$-CH_2-$或-S-;

[0471] R^H选自氢和C_{1-4}-烷基和优选$-CH_3$或$-C_2H_5$和最优选$-CH_3$。

[0472] 优选X^-表示$-O^-$,-OH,$-OCH_3$,$-NH(CH_3)$,$-N(CH_3)_2$,$-OCH_2CH_2OCH_3$,$-OCH_2CH_2SCH_3$,$-BH_3^-$,$-CH_3$,-SH,$-SCH_3$,或$-S^-$;和更优选$-O^-$,-OH,$-OCH_3$,$-N(CH_3)_2$,$-OCH_2CH_2OCH_3$,$-BH_3^-$,-SH,$-SCH_3$,或$-S^-$。

[0473] IL’表示优选$-O-P(O)(O^-)-$,$-O-P(O)(S^-)-$,$-O-P(S)(S^-)-$,$-S-P(O)(O^-)-$,$-S-P(O)(S^-)-$,$-S-P(S)(S^-)-$,$-O-P(O)(O^-)-$,$-O-P(O)(S^-)-$,$-S-P(O)(O^-)-$,$-O-P(O)(R^H)-$,$-O-P(O)(OR^H)-$,$-O-P(O)(NHR^H)-$,$-O-P(O)[N(R^H)_2]-$,$-O-P(O)(BH_3^-)-$,$-O-P(O)(OCH_2CH_2OR^H)-$,$-O-P(O)(OCH_2CH_2SR^H)-$,$-O-P(O)(O^-)-$,$-NR^H-P(O)(O^-)-$,其中R^H选自氢和C_{1-4}-烷基。

[0474] 基团$-O-P(O)(R^H)-O-$优选为$-O-P(O)(CH_3)-O-$或$-O-P(O)(C_2H_5)-O-$和最优选$-O-P(O)(CH_3)-O-$。

[0475] 基团$-O-P(O)(OR^H)-O-$优选为$-O-P(O)(OCH_3)-O-$或$-O-P(O)(OC_2H_5)-O-$和最优选$-O-P(O)(OCH_3)-O-$。

[0476] 基团$-O-P(O)(NHR^H)-O-$优选为$-O-P(O)(NHCH_3)-O-$或$-O-P(O)(NHC_2H_5)-O-$和最优选$-O-P(O)(NHCH_3)-O-$。

[0477] 基团$-O-P(O)[N(R^H)_2]-O-$优选为$-O-P(O)[N(CH_3)_2]-O-$或$-O-P(O)[N(C_2H_5)_2]-O-$和最优选$-O-P(O)[N(CH_3)_2]-O-$。

[0478] 基团$-O-P(O)(OCH_2CH_2OR^H)-O-$优选为$-O-P(O)(OCH_2CH_2OCH_3)-O-$或$-O-P(O)(OCH_2CH_2OC_2H_5)-O-$和最优选$-O-P(O)(OCH_2CH_2OCH_3)-O-$。

[0479] 基团$-O-P(O)(OCH_2CH_2SR^H)-O-$优选为$-O-P(O)(OCH_2CH_2SCH_3)-O-$或$-O-P(O)(OCH_2CH_2SC_2H_5)-O-$和最优选$-O-P(O)(OCH_2CH_2SCH_3)-O-$。

[0480] 基团$-O-P(O)(O^-)-NR^H-$优选为$-O-P(O)(O^-)-NH-$或$-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-$和最优选$-O-P(O)(O^-)-NH-$。

[0481] 基团$-NR^H-P(O)(O^-)-O-$优选为$-NH-P(O)(O^-)-O-$或$-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-$和最优选$-NH-P(O)(O^-)-O-$。

[0482] 更优选IL’表示$-O-P(O)(O^-)-$,$-O-P(O)(S^-)-$,$-O-P(S)(S^-)-$,$-O-P(O)(NHR^H)-$,或$-O-P(O)[N(R^H)_2]-$,和更优选IL’表示$-O-P(O)(O^-)-$,$-O-P(O)(S^-)-$,或$-O-P(S)(S^-)-$,和最优选IL’表示$-O-P(O)(S^-)-$,或$-O-P(S)(S^-)-$。

[0483] 优选Y表示-O-。

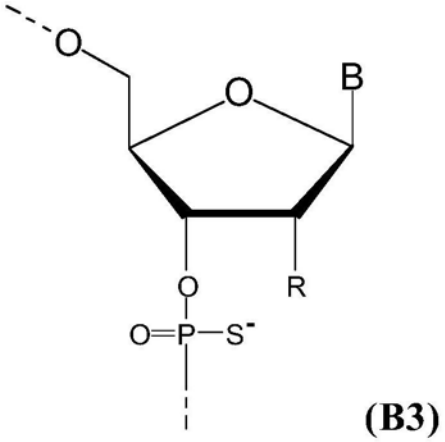
[0484] 优选B表示选自A,T,G,C,U的链核碱基。

[0485] 优选IL表示$-O-P(=O)(S^-)-$或$-O-P(=S)(S^-)-$。

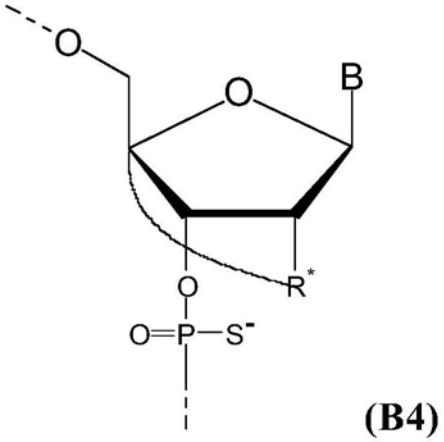
[0486] B,Y和IL’的上述定义也适用于式b^1至b^9。

[0487] 因此,以下通式(B3)至(B6)是优选的:

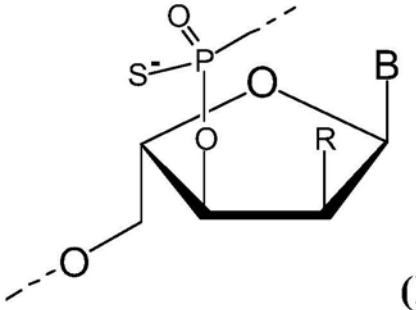
[0488]



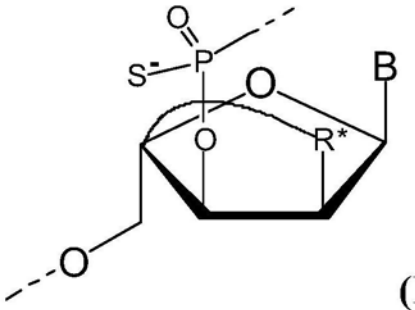
(B3)



(B4)



(B5)



(B6)

[0489] 其中

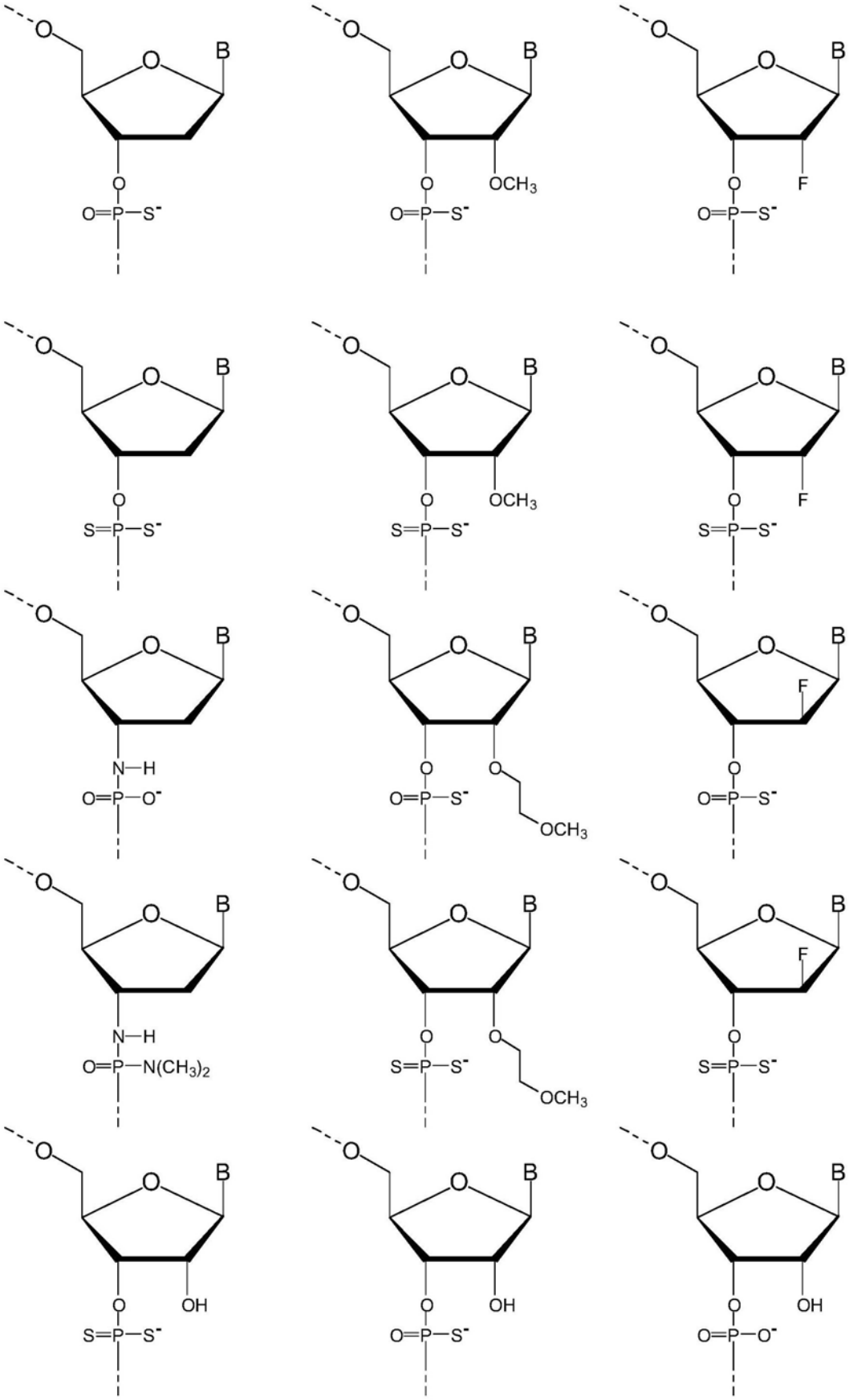
[0490] B表示核碱基和优选A,T,G,C,U;

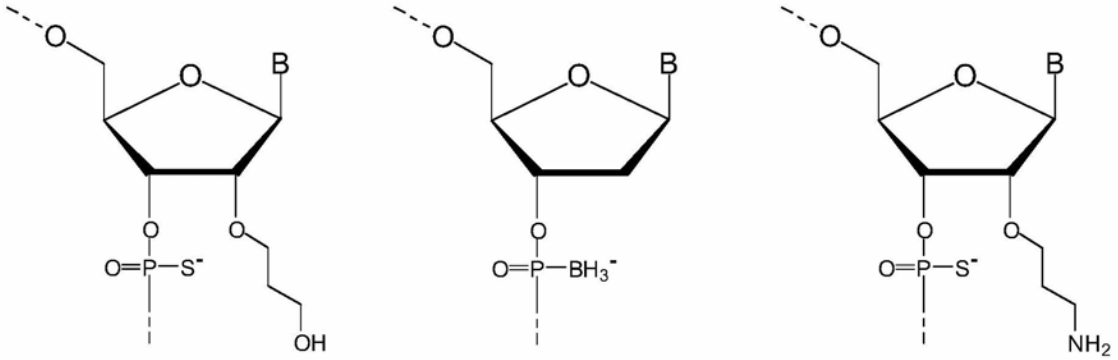
[0491] R表示-H,-F,-OH,-NH_2,-$N(CH_3)_2$,-OCH_3,-$OCH_2CH_2OCH_3$,-$OCH_2CH_2CH_2OH$,-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$和优选-H;

[0492] R^*表示如下定义的部分-$R^\#$-R-并且例如优选选自-$C(R^aR^b)$-O-,-$C(R^aR^b)$-NR^c-,-$C(R^aR^b)$-S-,和-$C(R^aR^b)$-$C(R^aR^b)$-O-,其中取代基R^a、R^b和R^c具有如本文所定义的含义。更优选R^*选自-CH_2-O-,-CH_2-S-,-CH_2-NH-,-CH_2-$N(CH_3)$-,-CH_2-CH_2-O-,或-CH_2-CH_2-S-,和更优选-CH_2-O-,-CH_2-S-,-CH_2-CH_2-O-,或-CH_2-CH_2-S-,和更优选-CH_2-O-,-CH_2-S-,或-CH_2-CH_2-O-,和更优选-CH_2-O-或-CH_2-S-,和最优选-CH_2-O-。

[0493] 非LNA单元的优选核苷酸的实例如下：

[0494]



[0495] 

[0496] 核苷酸间键联(IL)

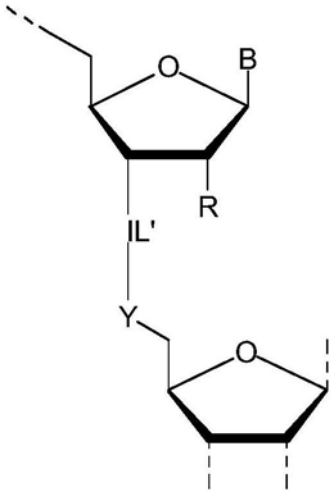
[0497] 本文所述的反义寡核苷酸的单体通过核苷酸间键联偶联在一起。适当地,每个单体通过核苷酸间键联连接到3'相邻的单体上。本领域普通技术人员将理解,在本发明的上下文中,寡聚体末端的5'单体不包含5'核苷酸间键联,尽管它可以包含或可以不包含5'末端基团。术语"核苷酸间键联"旨在表示能够将两个核苷酸、两个核苷酸类似物如两个LNA以及核苷酸与核苷酸类似物如LNA共价偶联的基团。具体和优选的实例包括磷酸基团和硫代磷酸酯基团。

[0498] 本发明的反义寡核苷酸的核苷酸或其连续核苷酸序列通过核苷酸间键联偶联接在一起。每个核苷酸适当地通过核苷酸间键联通过5'位与3'相邻的核苷酸连接。

[0499] 反义寡核苷酸可以通过几种不同的方式进行修饰。主链内的修饰是可能的,并且是指反义寡核苷酸,其中其核苷酸间主链中的磷酸基团(也称为磷酸二酯基团)被其它基团部分或完全替代。优选的修饰的反义寡核苷酸主链包括具有正常3'-5'键联的例如硫代磷酸酯,手性硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,磷酸三酯,氨基烷基磷酸酯,甲基、乙基和C_3-C_{10}烷基膦酸酯,包括3'-亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯,次膦酸酯,氨基磷酸酯,包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基磷酰胺化物,硫代磷酰胺酸酯,硫代烷基磷酸酯,硫代烷基磷酸三酯和硼烷磷酸酯,这些的2'-5'连接的类似物,以及具有相反极性的那些,其中相邻的核苷酸单元对在3'-5'连接至5'-3'或在2'-5'连接至5'-2'。本文还进一步详细包括并公开了其各种盐、混合盐和游离酸形式。

[0500] 合适的核苷酸间键联连接包括在WO2007/031091中列出的那些,例如WO2007/031091的第34页第一段所列的核苷酸间键联(通过引用并入本文)。在一些实施方案中,优选将核苷酸间键联从其正常的磷酸二酯修饰为对核酸酶攻击更具抗性的核苷酸间键联,例如修饰为硫代磷酸酯或硼磷酸酯,这两个耐受RNA酶H介导的切割,并且还允许在减少靶基因的表达中的反义抑制途径。

[0501] 核苷酸间键联由与核糖部分的3'碳原子结合的基团IL'和与连续核糖部分的5'碳原子结合的基团Y组成,如下式(IL'Y)所示的。

[0502] 

[0503] 核苷酸间键联IL由-IL'-Y-表示。IL'表示-X"-P(=X')(X⁻)-,以使得使得IL由-X"-P(=X')(X⁻)-Y-表示,其中取代基X⁻,X',X"和Y具有如本文所公开的含义。

[0504] 核苷酸间键联IL=-X"-P(=X')(X⁻)-Y-优选选自:

[0505] -O-P(O)(O⁻)-O-,-O-P(O)(S⁻)-O-,-O-P(S)(S⁻)-O-,-S-P(O)(O⁻)-O-,-S-P(O)(S⁻)-O-,-S-P(S)(S⁻)-O-,-O-P(O)(O⁻)-S-,-O-P(O)(S⁻)-S-,-S-P(O)(O⁻)-S-,-O-P(O)(R^H)-O-,-O-P(O)(OR^H)-O-,-O-P(O)(NHR^H)-O-,-O-P(O)[$N(R^H)_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OR^H$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SR^H$)-O-,-O-P(O)(O⁻)-NR^H-,-NR^H-P(O)(O⁻)-O-,其中R^H选自氢和C_{1-4}-烷基。

[0506] 基团-O-P(O)(R^H)-O-优选为-O-P(O)(CH_3)-O-或-O-P(O)(C_2H_5)-O-和最优选-O-P(O)(CH_3)-O-。

[0507] 基团-O-P(O)(OR^H)-O-优选为-O-P(O)(OCH_3)-O-或-O-P(O)(OC_2H_5)-O-和最优选-O-P(O)(OCH_3)-O-。

[0508] 基团-O-P(O)(NHR^H)-O-优选为-O-P(O)($NHCH_3$)-O-或-O-P(O)(NHC_2H_5)-O-和最优选-O-P(O)($NHCH_3$)-O-。

[0509] 基团-O-P(O)[$N(R^H)_2$]-O-优选为-O-P(O)[$N(CH_3)_2$]-O-或-O-P(O)[$N(C_2H_5)_2$]-O-和最优选-O-P(O)[$N(CH_3)_2$]-O-。

[0510] 基团-O-P(O)($OCH_2CH_2OR^H$)-O-优选为-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-或-O-P(O)($OCH_2CH_2OC_2H_5$)-O-和最优选-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-。

[0511] 基团-O-P(O)($OCH_2CH_2SR^H$)-O-优选为-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-或-O-P(O)($OCH_2CH_2SC_2H_5$)-O-和最优选-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-。

[0512] 基团-O-P(O)(O⁻)-NR^H-优选为-O-P(O)(O⁻)-NH-或-O-P(O)(O⁻)-N(CH_3)-和最优选-O-P(O)(O⁻)-NH-。

[0513] 基团-NR^H-P(O)(O⁻)-O-优选为-NH-P(O)(O⁻)-O-或-N(CH_3)-P(O)(O⁻)-O-和最优选-NH-P(O)(O⁻)-O-。

[0514] 更优选IL表示-O-P(O)(O⁻)-O-,-O-P(O)(S⁻)-O-,-O-P(S)(S⁻)-O-,-O-P(O)(NHR^H)-O-,或-O-P(O)[$N(R^H)_2$]-O-,和更优选IL表示-O-P(O)(O⁻)-O-,-O-P(O)(S⁻)-O-,或-O-P(S)(S⁻)-O-,和最优选IL表示-O-P(O)(S⁻)-O-,或-O-P(O)(O⁻)-O-。

[0515] 因此,IL优选为磷酸基团(-O-P(O)(O⁻)-O-)、硫代磷酸酯基团(-O-P(O)(S⁻)-O-)或

二硫代磷酸酯基团(-O-P(S)(S⁻)-O-)。

[0516] 反义寡核苷酸的核苷酸单元或核苷通过核苷酸间键联彼此连接,使得在一个反义寡核苷酸之内可以存在不同的核苷酸间键联。LNA单元优选通过非磷酸基团的核苷酸间键联连接。LNA单元通过优选选自-O-P(O)(S⁻)-O-,-O-P(S)(S⁻)-O-,-O-P(O)(NHR^H)-O-,和-O-P(O)[N(R^H)$_2$]-O-和更优选选自-O-P(O)(S⁻)-O-和-O-P(S)(S⁻)-O-的IL基团彼此连接。

[0517] 非LNA单元通过优选选自-O-P(O)(O⁻)-O-,-O-P(O)(S⁻)-O-,-O-P(S)(S⁻)-O-,-O-P(O)(NHR^H)-O-,和-O-P(O)[N(R^H)$_2$]-O-和更优选选自-O-P(O)(O⁻)-O-,-O-P(O)(S⁻)-O-和-O-P(S)(S⁻)-O-的IL基团彼此连接。

[0518] 非LNA单元通过优选选自-O-P(O)(S⁻)-O-,-O-P(S)(S⁻)-O-,-O-P(O)(NHR^H)-O-,和-O-P(O)[N(R^H)$_2$]-O-和更优选选自-O-P(O)(S⁻)-O-和-O-P(S)(S⁻)-O-的IL基团连接至LNA单元。

[0519] 本文所用的术语“LNA单元”是指被锁定的核苷酸,即具有双环结构,特别是双环核糖结构,更特别是通式(II)所示的双环核糖结构的核苷酸。桥“锁定”3’-endo(北)构象中的核糖。LNA核苷酸的核糖部分用连接2’氧和4’碳的额外桥修饰。可选择地,用于LNA的术语是双环核苷酸或桥连的核苷酸,因此,LNA单元的替代术语是双环核苷酸单元或桥连的核苷酸单元。

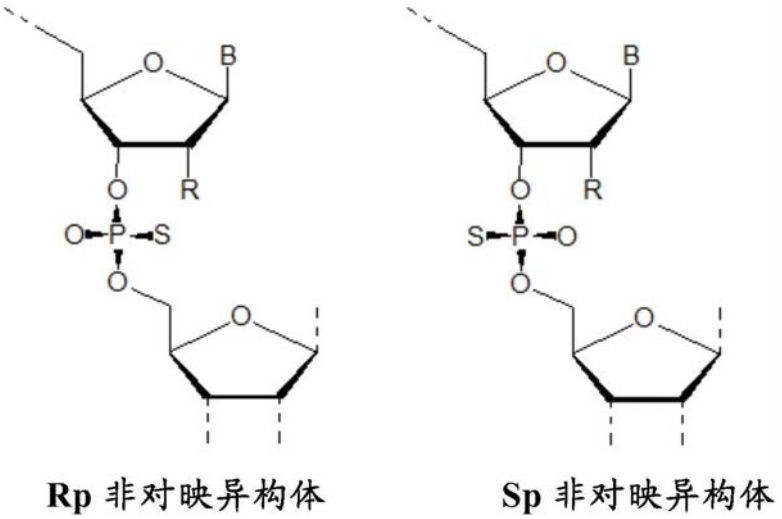
[0520] 本文所用的术语“非-LNA单元”是指未被锁定的核苷酸,即不具有双环糖部分,特别是没有双环核糖结构,更特别地没有如通式(II)所示的双环核糖结构的核苷酸。非LNA单元最优选是DNA单元。

[0521] 本文所用的术语“DNA单元”是指含有作为糖的2-脱氧核糖的核苷酸。因此,核苷酸由核碱基和2-脱氧核糖制成。

[0522] 本文所用的术语“单元”是指本发明的反义寡核苷酸的区段或片段或部分。因此,“单元”不是完整的分子,它是反义寡核苷酸的区段或片段或部分,其具有用于与反义寡核苷酸的另一区段或片段或部分共价键联的至少一个位置。例如,一般结构(B1)至(B6)是单元,因为它们可以分别通过基团Y和IL’或-O-和-O-P(O)(S⁻)-共价连接。优选地,单元是由戊糖结构、与戊糖结构连接的核碱基、5’基团和IL’基团组成的部分。

[0523] 本文所用的术语“结构单元”或“单体”是指分子,特别是用于合成本发明的反义寡核苷酸的核苷。实例是通式(I)的LNA分子,其中Y表示5’-末端基团,IL’表示3’末端基团。

[0524] 此外,优选的是纯的非对映异构反义寡核苷酸。如右图所示,优选的是Sp-和Rp-非对映异构体:



Rp 非对映异构体 Sp 非对映异构体

[0525] 合适的含有本文提供的核苷酸间键联的硫(S)是优选的。

[0526] 主链中优选的是硫代磷酸酯部分,其中至少50%的核苷酸间键联是硫代磷酸酯基团。还优选的是,LNA单元(如果存在)通过硫代磷酸酯作为核苷酸间键联连接。最优选的是完整的硫代磷酸酯主链,即最优选的是当所有核苷酸单元和LNA单元(如果存在)通过如下定义的硫代磷酸酯基团彼此连接时:-O-P(O)(S⁻)-O-,其与-O-P(O,S)-O-或-O-P(O⁻)(S)-O-同义。

[0527] 在反义寡核苷酸是gapmer的情况下,优选LNA区域具有选自-O-P(O)(S⁻)-O-和-O-P(S)(S⁻)-O-的核苷酸间键联,并且非LNA区域(中间部分)具有选自-O-P(O)(O⁻)-O-,-O-P(O)(S⁻)-O-和-O-P(S)(S⁻)-O-的核苷酸间键联,并且LNA区域通过选自-O-P(O)(O⁻)-O-,-O-P(O)(S⁻)-O-和-O-P(S)(S⁻)-O-的核苷酸间键联连接到非LNA区域。

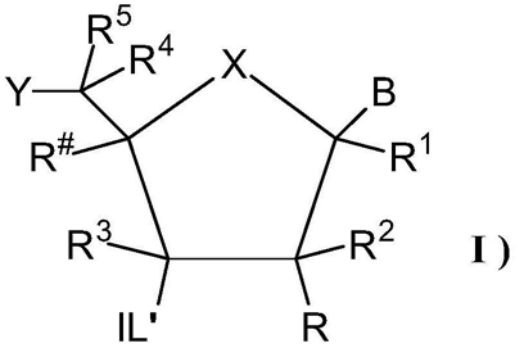
[0528] 甚至更优选的是,在10聚体中为9且在20聚体中为19的所有核苷酸间键联选自-O-P(O)(S⁻)-O-和-O-P(S)(S⁻)-O-。更优选的是所有的核苷酸间键联是硫代磷酸酯基团(-O-P(O)(S⁻)-O-)或是二硫代磷酸酯基团(-O-P(S)(S⁻)-O-)。

[0529] 锁核酸(**LNA®**)

[0530] 特别优选的是,反义寡核苷酸中通式(B1)或(B2)的一些核苷酸被所谓的LNA(锁核酸)所代替。缩写LNA是注册商标,但在本文中,术语"LNA"仅以描述性方式使用。

[0531] 优选地,末端核苷酸被LNA替代,更优选在3'末端的最后1至4个核苷酸和/或5'末端的最后1至4个核苷酸被LNA替代。还优选至少在3'末端和5'末端的末端核苷酸各自被LNA替换。

[0532] 本文所用的术语"LNA"是指被称为"锁核酸"的双环核苷酸类似物。它可以指LNA单体,或者当在"LNA反义寡核苷酸"或"含有LNA的反义寡核苷酸"的上下文中使用时,LNA是指含有一个或多个这样的双环核苷酸类似物的寡核苷酸。LNA核苷酸的特征在于核糖糖环的C2'和C4'之间的连接基团(如桥)的存在,例如如下所述的双基$R^{\#}$-R所示。在本发明的反义寡核苷酸中使用的LNA优选具有通式(I)的结构,

[0533] 

I)

[0534] 其中对于所有手性中心,可以以R或S取向找到不对称基团;

[0535] 其中X选自-O-,-S-,-N(R^N)-,-C(R^6R^7)-,优选X为-O-;

[0536] B选自氢,任选取代的C_{1-4}-烷氧基,任选取代的C_{1-4}-烷基,任选取代的C_{1-4}-酰氧基,核碱基和核碱基类似物,优选B是核碱基或核碱基类似物,最优选是标准核碱基。

[0537] 在通式(I)的部分是本发明的反义寡核苷酸的LNA单元的情况下,Y表示与相邻核苷酸的核苷酸间键联的一部分,或者在通式(I)的部分是用于合成本发明的反义寡核苷酸的单体或结构单元的情况下,Y表示5'末端基团。5'碳原子任选地包括取代基R^4和R^5;

[0538] 在通式(I)的部分是本发明的反义寡核苷酸的LNA单元的情况下，IL'表示与相邻核苷酸的核苷酸间键联的一部分，或者在通式(I)的部分是用于合成本发明的反义寡核苷酸的单体或结构单元的情况下，IL'表示3'末端基团。

[0539] $R^{\#}$和R一起表示由选自-C(R^aR^b)-,-C(R^a)=C(R^b)-,-C(R^a)=N-,-O-,-Si(R^a)$_2$-,-S-,-SO_2-,-N(R^c)-,和>C=Z的1-4个基团或原子组成的双价连接基团，其中Z选-O-,-S-,和-N(R^a)-，R^a、R^b和R^c彼此独立地选自氢，任选取代的C_{1-12}-烷基，任选取代的C_{2-6}-烯基，任选取代的C_{2-6}-炔基，羟基，任选取代的C_{1-12}-烷氧基，C_{1-6}-烷氧基-C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯氧基，羧基，C_{1-12}-烷氧基羰基，C_{1-12}-烷基羰基，甲酰基，芳基，芳氧基-羰基，芳氧基，芳基羰基，杂芳基，杂芳氧基-羰基，杂芳基氧基，杂芳基羰基，氨基，单和二(C_{1-6}-烷基)氨基，氨基甲酰基，单和二(C_{1-6}-烷基)-氨基-羰基，氨基-C_{1-6}-亚烷基-氨基羰基，单和二(C_{1-6}-烷基)氨基-C_{1-6}-亚烷基-氨基羰基，C_{1-6}-烷基-羰基氨基，氨基甲酰基，C_{1-6}-烷酰氧基，磺酰基，C_{1-6}-烷基磺酰氧基，硝基，叠氮基，硫烷基，C_{1-6}-烷硫基，卤素，其中芳基和杂芳基可以任选被取代，其中两个孪位取代基R^a和R^b可以一起表示任选取代的亚甲基(=CH 2)，其中对于所有手性中心，可以以R或S取向找到非对称基团；

[0540] 存在的取代基R^1,R^2,R^3,R^4,R^5,R^6和R^7各自独立地选自氢，任选取代的C_{1-12}-烷基，任选取代的C_{2-6}-烯基，任选取代的C_{2-6}-炔基，羟基，C_{1-12}-烷氧基，C_{1-6}-烷氧基-C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯氧基，羧基，C_{1-12}-烷氧基羰基，C_{1-12}-烷基羰基，甲酰基，芳基，芳氧基-羰基，芳氧基，芳基羰基，杂芳基，杂芳氧基羰基，杂芳氧基，杂芳基羰基，氨基，单和二(C_{1-6}-烷基)氨基，氨基甲酰基，单-和二(C_{1-6}-烷基)-氨基-羰基，氨基-C_{1-6}-烷基-氨基羰基，单-和二(C_{1-6}-烷基)氨基-C_{1-6}-烷基-氨基羰基，C_{1-6}-烷基-羰基氨基，氨基甲酰基，C_{1-6}-烷酰氧基，磺酰基，C_{1-6}-烷基磺酰氧基，硝基，叠氮基，硫烷基，C_{1-6}-烷硫基，卤素，其中芳基和杂芳基可以任选被取代，并且其中两个孪位取代基一起可以表示氧代，硫氧代，亚氨基或任选取代的亚甲基；

[0541] 其中R^N选自氢和C_{1-4}-烷基，并且其中两个相邻(非孪位)取代基可以表示导致双键的另外的键；并且当存在且不参与双基时，R^N选自氢和C_{1-4}-烷基；以及其碱盐及其酸加成盐。对于所有手性中心，可以以R或S取向找到不对称基团。

[0542] 在优选的实施方案中，$R^{\#}$和R一起表示由选自-C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-,-C(R^aR^b)-O-,-C(R^aR^b)-NR^c-,-C(R^aR^b)-S-,和-C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-的基团组成的双基，其中每个R^a,R^b和R^c可以任选地独立地选择。

[0543] 在一些实施方案中，R^a和R^b可以任选地独立地选自氢和C_{1-6}-烷基，例如甲基，优选的是氢。

[0544] 在优选的实施方案中，R^1,R^2,R^3,R^4和R^5独立地选自氢，卤素，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基或取代的C_{2-6}-炔基，C_{1-6}烷氧基，取代的C_{1-6}烷氧基，酰基，取代的酰基，C_{1-6}-氨基烷基或取代的C_{1-6}-氨基烷基。对于所有手性中心，可以以R或S取向找到不对称基团。

[0545] 在优选的实施方案中，R^1,R^2,R^3,R^4和R^5是氢。

[0546] 在一些实施方案中，R^1,R^2和R^3独立地选自氢，卤素，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基，或取代的C_{2-6}-烯基，C_{1-6}-烷氧基，取代的C_{1-6}-烷氧基，酰基，取代的酰基，C_{1-6}-氨基烷基或取代的C_{1-6}-氨基烷基。对于所有手性中心，可以以R或S取向找到不对称基团。在优选的实施方案中，R^1,R^2和R^3是氢。

[0547] 在优选的实施方案中，R^4和R^5各自独立地选自-H，$-CH_3$，$-CH_2-CH_3$，$-CH_2-O-CH_3$和$-CH=CH_2$。适当地，在一些实施方案中，R^4或R^5为氢，而另一基团(分别为R^4或R^5)选自C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基，取代的C_{2-6}-炔基，取代的C_{2-6}-炔基或取代的酰基(-C(=O)-)。其中每个取代基团是单取代或多取代的取代基独立地选自卤素，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基，取代的C_{2-6}-炔基，$-OJ_1$，$-SJ_1$，$-NJ_1J_2$，$-N_3$，$-COOJ_1$，-CN，$-O-C(=O)NJ_1J_2$，$-N(H)C(=NH)NJ_1J_2$或$-N(H)C(=X)N(H)J_2$，其中X是O或S；并且每个J_1和J_2独立地为-H，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基，取代的C_{2-6}-炔基，C_{1-6}-氨基烷基，取代的C_{1-6}-氨基烷基或保护基。在一些实施方案中，R^4或R^5为取代的C_{1-6}-烷基。在一些实施方案中，R^4或R^5为取代的亚甲基，其中优选的取代基包括一个或多个独立地选自-F，$-NJ_1J_2$，$-N_3$，-CN，$-OJ_1$，$-SJ_1$，$-O-C(=O)NJ_1J_2$，$-N(H)C(=NH)NJ_1J_2$或$-N(H)C(=O)N(H)J_2$的基团。在一些实施方案中，每个J_1和J_2独立地为-H或C_{1-6}-烷基。在一些实施方案中，R^4或R^5为甲基，乙基或甲氧基甲基。在一些实施方案中，R^4或R^5为甲基。在另一个实施方案中，R^4或R^5是亚乙基。在一些实施方案中，R^4或R^5为取代的酰基。在一些实施方案中，R^4或R^5为$-O-C(=O)NJ_1J_2$。对于所有手性中心，可以以R或S取向找到不对称基团。这种5'修饰的双环核苷酸公开在WO 2007/134181A中，其全部内容通过引用并入本文。

[0548] 在一些实施方案中，B是核碱基，包括核碱基类似物和天然存在的核碱基，例如嘌呤或嘧啶，或取代的嘌呤或取代的嘧啶，例如本文所述的核碱基，例如选自腺嘌呤，胞嘧啶，胸腺嘧啶，腺嘌呤，尿嘧啶的核碱基和/或修饰或取代的核碱基，例如5-噻唑烷-尿嘧啶，2-硫代-尿嘧啶，5-丙炔基-尿嘧啶，2'-硫代胸腺嘧啶，5-甲基胞嘧啶，5-噻唑并-胞嘧啶，5-丙炔基-胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

[0549] 在优选的实施方案中，$R^{\#}$和R一起表示选自$-C(R^aR^b)-O-$，$-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-O-$，$-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-O-$，$-C(R^aR^b)-O-C(R^dR^e)-$，$-C(R^aR^b)-O-C(R^dR^e)-O-$，$-C(R^aR^b)-C(R^dR^e)-$，$-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-$，$-C(R^a)=C(R^b)-C(R^dR^e)-$，$-C(R^aR^b)-N(R^c)-$，$-C(R^aR^b)-C(R^dR^e)-N(R^c)-$，$-C(R^aR^b)-N(R^c)-O-$，$-C(R^aR^b)-S-$，和$-C(R^aR^b)-C(R^dR^e)-S-$的双基，$R^a$，$R^b$，$R^c$，$R^d$，$R^e$，和$R^f$各自独立地选自氢，任选取代的$C_{1-12}$-烷基，任选取代的$C_{2-6}$-烯基，任选取代的$C_{2-6}$-炔基，羟基，$C_{1-12}$-烷氧基，$C_{1-6}$-烷氧基-$C_{1-6}$-烷基，$C_{2-6}$-烯氧基，羧基，$C_{1-12}$-烷氧羰基，$C_{1-12}$-烷基羰基，甲酰基，芳基，芳氧基-羰基，芳氧基，芳基羰基，杂芳基，杂芳氧羰基，杂芳氧基，杂芳基羰基，氨基，单和二(C_{1-6}-烷基)氨基，氨基甲酰基，单-和二(C_{1-6}-烷基)-氨基-羰基，氨基-C_{1-6}-烷基-氨基羰基，单-和二(C_{1-6}-烷基)氨基-C_{1-6}-烷基-氨基羰基，C_{1-6}-烷基-羰基氨基，氨基甲酰基，C_{1-6}-烷酰氧基，磺酰基，C_{1-6}-烷基磺酰氧基，硝基，叠氮基，硫烷基，C_{1-6}-烷硫基，卤素，其中芳基和杂芳基可以任选被取代，其中两个孪位取代基R^a和R^b一起可以表示任选取代的亚甲基(=CH_2)。对于所有手性中心，可以以R或S取向找到不对称基团。

[0550] 在另一个实施方案中，$R^{\#}$和R一起表示选自$-CH_2-O-$，$-CH_2-S-$，$-CH_2-NH-$，$-CH_2-N(CH_3)-$，$-CH_2-CH_2-O-$，$-CH_2-CH(CH_3)-$，$-CH_2-CH_2-S-$，$-CH_2-CH_2-NH-$，$-CH_2-CH_2-CH_2-$，$-CH_2-CH_2-CH_2-O-$，$-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$，$-CH=CH-CH_2-$，$-CH_2-O-CH_2-O-$，$-CH_2-NH-O-$，$-CH_2-N(CH_3)-O-$，$-CH_2-O-CH_2-$，$-CH(CH_3)-O-$，$-CH(CH_2-O-CH_3)-O-$，$-CH_2-CH_2-$，和-CH=CH-的双基(二价基团)。对于所有手性中心，可以以R或S取向找到不对称基团。

[0551] 在一些实施方案中，$R^{\#}$和R一起表示双基$-C(R^aR^b)-N(R^c)-O-$，其中R^a和R^b独立地选自氢，卤素，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基或取代的

C_{2-6}-炔基，C_{1-6}-烷氧基，取代的C_{1-6}-烷氧基，酰基，取代的酰基，C_{1-6}-氨基烷基或取代的C_{1-6}-氨基烷基，例如氢，以及其中R^c选自氢，卤素，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基或取代的C_{2-6}-炔基，C_{1-6}-烷氧基，取代的C_{1-6}-烷氧基，酰基，取代的酰基，C_{1-6}-氨基烷基或取代的C_{1-6}-氨基烷基，优选为氢。

[0552] 在优选的实施方案中，$R^{\#}$和R一起代表双基-C(R^aR^b)-O-C(R^dR^e)-O-，其中R^a，R^b，R^d，和R^e独立地选自氢，卤素，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基或取代的C_{2-6}-炔基，C_{1-6}-烷氧基，取代的C_{1-6}-烷氧基，酰基，取代的酰基，C_{1-6}-氨基烷基或取代的C_{1-6}-氨基烷基，和优选氢。

[0553] 在优选的实施方案中，$R^{\#}$和R形成双基-CH(Z)-O-，其中Z选自C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基，取代的C_{1-6}-烷基，取代的C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-炔基，酰基，取代的酰基，取代的酰胺，硫醇或取代的硫醇；并且其中每个取代基独立地被任选受保护的取代基单或多取代，其中取代基独立地选自卤素，氧代，羟基，-OJ_1，-NJ_1J_2，-SJ_1，-N_3，-OC(=X)J_1，-OC(=X)NJ_1J_2，-NJ^3C(=X)NJ_1J_2和-CN，其中每个J_1，J_2和J_3独立地为-H或C_{1-6}-烷基，X为O，S或NJ_1。在优选的实施方案中，Z是C_{1-6}-烷基或取代的C_{1-6}-烷基。在进一步优选的实施方案中，Z是甲基。在优选的实施方案中，Z是取代的C_{1-6}-烷基。在优选的实施方案中，所述取代基是C_{1-6}-烷氧基。在一些实施方案中，Z是CH_3OCH_2-。对于所有手性中心，可以以R或S取向找到不对称基团。这种双环核苷酸公开在US 7,399,845中，其全部内容通过引用并入本文。在优选的实施方案中，R^1，R^2，R^3，R^4和R^5是氢。在优选的实施方案中，R^1，R^2和R^3是氢，R^4、R^5中的一个或两个可以不是如上所述的和WO 2007/134181中所述的氢。

[0554] 在优选的实施方案中，$R^{\#}$和R一起表示在桥中包含取代的氨基的双基，例如双基-CH_2-N(R^c)-，其中R^c是C_{1-12}-烷氧基。在优选的实施方案中，$R^{\#}$和R一起表示双基-Cq_3q_4-NOR-，其中q_3和q_4独立地选自氢，卤素，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基或取代的C_{2-6}-炔基，C_{1-6}-烷氧基，取代的C_{1-6}-烷氧基，酰基，取代的酰基，C_{1-6}-氨基烷基或取代的C_{1-6}-氨基烷基；其中每个取代基独立地由独立地选自以下的取代基单取代或多取代：卤素，-OJ_1，-SJ_1，-NJ_1J_2，-$COOJ_1$，-CN，-OC(=O)NJ_1J_2，-NH-C(=NH)NJ_1J_2或-NH-C(=X)NHJ_2，其中X是O或S；J_1和J_2各自独立地为-H，C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基，C_{1-6}-氨基烷基或保护基。对于所有手性中心，可以以R或S取向找到不对称基团。这样的双环核苷酸公开在WO2008/150729中，其全部内容通过引用并入本文。在优选的实施方案中，R^1，R^2，R^3，R^4和R^5独立地选自氢，卤素，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基或取代的C_{2-6}-炔基，C_{1-6}-烷氧基，取代的C_{1-6}-烷氧基，酰基，取代的酰基，C_{1-6}-氨基烷基或取代的C_{1-6}-氨基烷基。在优选的实施方案中，R^1，R^2，R^3，R^4和R^5是氢。在优选的实施方案中，R^1，R^2和R^3是氢，R^4、R^5中的一个或两个可以不是上述和WO 2007/134181中所述的氢。

[0555] 在优选的实施方案中，$R^{\#}$和R一起表示双基(二价基)-C(R^aR^b)-O-，其中R^a和R^b各自独立地为卤素，C_{1-12}-烷基，取代的C_{1-12}-烷基，C_{2-6}-链烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基，取代的C_{2-6}-炔基，C_{1-12}-烷氧基，取代的C_{1-12}-烷氧基，-OJ_1，-SJ_1，-S(O)J_1，-SO_2-J_1，-NJ_1J_2，-N_3，-CN，-C(=O)OJ_1，-C(=O)NJ_1J_2，-C(=O)J_1，-OC(=O)NJ_1J_2，-NH-C(=NH)NJ_1J_2，-NH-C(=O)NJ_1J_2，或，-NH-C(=S)NJ_1J_2；或R^a和R^b一起为=C(q_3)(q_4)；q_3和q_4.各自独立地为-H，卤素，C_{1-12}-烷基或取代的C_{1-12}-烷基；每个取代基独立地由独立地选自卤素，C_{1-6}-烷基，取代的C_{1-6}-烷基，C_{2-6}-烯基，取代的C_{2-6}-烯基，C_{2-6}-炔基，取代的C_{2-6}-炔基，-OJ_1，-SJ_1，-NJ_1J_2，-N_3，-

CN,-C(=O)OJ$_1$,-C(=O)NJ$_1$J$_2$,-C(=O)J$_1$,-OC(=O)NJ$_1$J$_2$,-NH-C(=O)NJ$_1$J$_2$,或-NH-C(=S)NJ$_1$J$_2$;每个J$_1$和J$_2$独立地是-H,C$_{1-6}$-烷基,取代的C$_{1-6}$-烷基,C$_{2-6}$-烯基,取代的C$_{2-6}$-烯基,C$_{2-6}$-炔基,取代的C$_{2-6}$-炔基,C$_{1-6}$-氨基烷基,取代的C$_{1-6}$-氨基烷基或保护基。这样的化合物公开在WO2009006478A中,其全部内容通过引用并入本文。

[0556] 在优选的实施方案中,R#和R形成双基-Q-,其中Q是-C(q$_1$)(q$_2$)C(q$_3$)(q$_4$)-,-C(q$_1$)=C(q$_3$)-,-C[=C(q$_1$)(q$_2$)]-C(q$_3$)(q$_4$)-或-C(q$_1$)(q$_2$)-C[=C(q$_3$)(q$_4$)]-;

[0557] q$_1$,q$_2$,q$_3$,q$_4$各自独立地为-H,卤素,C$_{1-12}$-烷基,取代的C$_{1-12}$-烷基,C$_{2-6}$-烯基,取代的C$_{1-12}$-烷氧基,-OJ$_1$,-SJ$_1$,-S(O)J$_1$,-SO$_2$-J$_1$,-NJ$_1$J$_2$,-N$_3$,-CN,-C(=O)OJ$_1$,-C(=O)NJ$_1$J$_2$,-C(=O)J$_1$,-OC(=O)NJ$_1$J$_2$,-NH-C(=NH)NJ$_1$J$_2$,-NH-C(=O)NJ$_1$J$_2$,或-NH-C(=S)NJ$_1$J$_2$;每个J$_1$和J$_2$彼此独立地为-H,C$_{1-6}$-烷基,C$_{2-6}$-烯基,C$_{2-6}$-炔基,C$_{1-6}$-氨基烷基或保护基;并且任选地当Q是-C(q$_1$)(q$_2$)C(q$_3$)(q$_4$)-且q$_3$或q$_4$中的一个是-CH$_3$时,则q$_3$或q$_4$中的至少一个或q$_1$和q$_2$中的一个不是-H。在优选的实施方案中,R^1,R^2,R^3,R^{4}和R^{5}是氢。对于所有手性中心,可以以R或S取向找到不对称基团。这样的双环核苷酸公开在WO2008/154401中,其全部内容通过引用并入本文。在优选的实施方案中,R^1,R^2,R^3,R^{4}和R^{5}彼此独立地选自氢,卤素,C$_{1-6}$-烷基,取代的C$_{1-6}$-烷基,C$_{2-6}$-烯基,取代的C$_{2-6}$-烯基,C$_{2-6}$-炔基或取代的C$_{2-6}$-炔基,C$_{1-6}$-烷氧基,取代的C$_{1-6}$-烷氧基,酰基,取代的酰基,C$_{1-6}$-氨基烷基或取代的C$_{1-6}$-氨基烷基。在优选的实施方案中,R^1,R^2,R^3,R^{4}和R^{5}是氢。在优选实施方案中,R^1,R^{2}和R^{3}是氢,R^4,R^{5}中的一个或两个可以不是上述和WO2007/134181或WO2009/067647(αL双环核酸类似物)中所述的氢。

[0558] 本文所用的术语"C$_1$-C$_6$-烷基"是指-CH$_3$,-C$_2$H$_5$,-C$_3$H$_7$,-CH(CH$_3$)$_2$,-C$_4$H$_9$,-CH$_2$-CH(CH$_3$)$_2$,-CH(CH$_3$)-C$_2$H$_5$,-C(CH$_3$)$_3$,-C$_5$H$_{11}$,-CH(CH$_3$)-C$_3$H$_7$,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-C$_2$H$_5$,-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)$_2$,-C(CH$_3$)$_2$-C$_2$H$_5$,-CH$_2$-C(CH$_3$)$_3$,-CH(C$_2$H$_5$)$_2$,-C$_2$H$_4$-CH(CH$_3$)$_2$,-C$_6$H$_{13}$,-C$_3$H$_6$-CH(CH$_3$)$_2$,-C$_2$H$_4$-CH(CH$_3$)-C$_2$H$_5$,-CH(CH$_3$)-C$_4$H$_9$,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-C$_3$H$_7$,-CH(CH$_3$)-CH$_2$-CH(CH$_3$)$_2$,-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)-C$_2$H$_5$,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)$_2$,-CH$_2$-C(CH$_3$)$_2$-C$_2$H$_5$,-C(CH$_3$)$_2$-C$_3$H$_7$,-C(CH$_3$)$_2$-CH(CH$_3$)$_2$,-C$_2$H$_4$-C(CH$_3$)$_3$,-CH$_2$-CH(C$_2$H$_5$)$_2$,和-CH(CH$_3$)-C(CH$_3$)$_3$。术语"C$_1$-C$_6$-烷基"还应包括"C$_1$-C$_6$-环烷基",如环-C$_3$H$_5$,环-C$_4$H$_7$,环-C$_5$H$_9$,和环-C$_6$H$_{11}$。

[0559] 优选的是-CH$_3$,-C$_2$H$_5$,-C$_3$H$_7$,-CH(CH$_3$)$_2$,-C$_4$H$_9$,-CH$_2$-CH(CH$_3$)$_2$,-CH(CH$_3$)-C$_2$H5,-C(CH$_3$)$_3$,和-C$_5$H$_{11}$。特别优选的是-CH$_3$,-C$_2$H$_5$,-C$_3$H$_7$,和-CH(CH$_3$)$_2$。

[0560] 术语"C$_1$-C$_6$-烷基"还应包括"C$_1$-C$_6$-环烷基",如环-C$_3$H$_5$,环-C$_4$H$_7$,环-C$_5$H$_9$,和环-C$_6$H$_{11}$。

[0561] 本文所用的术语"C$_{1-12}$-烷基"是指C$_1$-C$_6$-烷基,-C$_7$H$_{15}$,-C$_8$H$_{17}$,-C$_9$H$_{19}$,-C$_{10}$H$_{21}$,-C$_{11}$H$_{23}$,-C$_{12}$H$_{25}$。

[0562] 如本文所用,术语"C$_1$-C$_6$-亚烷基"是指-CH$_2$-,-C$_2$H$_4$-,-CH(CH$_3$)-,-C$_3$H$_6$-,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-,-CH(CH$_3$)-CH$_2$-,-C(CH$_3$)$_2$-,-C$_4$H$_8$-,-CH$_2$-C(CH$_3$)$_2$-,-C(CH$_3$)$_2$-CH$_2$-,-C$_2$H$_4$-CH(CH$_3$)-,-CH(CH$_3$)-C$_2$H$_4$-,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-CH$_2$-,-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)-,-C$_5$H$_{10}$-,-CH(CH$_3$)-C$_3$H$_6$-,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-C$_2$H$_4$-,-C$_2$H$_4$-CH(CH$_3$)-CH$_2$-,-C$_3$H$_6$-CH(CH$_3$)-,-C$_2$H$_4$-C(CH$_3$)$_2$-,-C(CH$_3$)$_2$-C$_2$H$_4$-,-CH$_2$-C(CH$_3$)$_2$-CH$_2$-,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)-,-CH(CH$_3$)-CH$_2$-CH(CH$_3$)-,-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)-CH$_2$-,-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)-,-C(CH$_3$)$_2$-C$_3$H$_6$-,-CH$_2$-C(CH$_3$)$_2$-C$_2$H$_4$-,-C$_2$H$_4$-C(CH$_3$)$_2$-CH$_2$-,-C$_3$H$_6$-C(CH$_3$)$_2$-,-CH(CH$_3$)-C$_4$H$_8$-,-C$_6$H$_{12}$-,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-C$_3$H$_6$-,-C$_2$H$_4$-CH(CH$_3$)-C$_2$H$_4$-,-C$_3$H$_6$-CH(CH$_3$)-CH$_2$-,-C$_4$H$_8$-CH(CH$_3$)-,-C$_2$H$_4$-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)-,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-CH(CH$_3$)-CH$_2$-,-CH$_2$-CH(CH$_3$)-

$CH_2-CH(CH_3)-$,$-CH(CH_3)-C_2H_4-CH(CH_3)-$,$-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$,和$-CH(CH_3)-CH(CH_3)-C_2H_4-$。

[0563] 如本文所用,术语"C_2-C_6-烯基"是指$-CH=CH_2$,$-CH_2-CH=CH_2$,$-C(CH_3)=CH_2$,$-CH=CH-CH_3$,$-C_2H_4-CH=CH_2$,$-CH_2-CH=CH-CH_3$,$-CH=CH-C_2H_5$,$-CH_2-C(CH_3)=CH_2$,$-CH(CH_3)-CH=CH$,$-CH=C(CH_3)_2$,$-C(CH_3)=CH-CH_3$,$-CH=CH-CH=CH_2$,$-C_3H_6-CH=CH_2$,$-C_2H_4-CH=CH-CH_3$,$-CH_2-CH=CH-C_2H_5$,$-CH=CH-C_3H_7$,$-CH_2-CH=CH-CH=CH_2$,$-CH=CH-CH=CH-CH_3$,$-CH=CH-CH_2-CH=CH_2$,$-C(CH_3)=CH-CH=CH_2$,$-CH=CH-C(CH_3)=CH_2$,$-C_2H_4-C(CH_3)=CH_2$,$-CH_2-CH(CH_3)-CH=CH_2$,$-CH(CH_3)-CH_2-CH=CH_2$,$-CH_2-CH=C(CH_3)_2$,$-CH_2-C(CH_3)=CH-CH_3$,$-CH(CH_3)-CH=CH-CH_3$,$-CH=CH-CH(CH_3)_2$,$-CH=C(CH_3)-C_2H_5$,$-C(CH_3)=CH-C_2H_5$,$-C(CH_3)=C(CH_3)_2$,$-C(CH_3)_2-CH=CH_2$,$-CH(CH_3)-C(CH_3)=CH_2$,$-C(CH_3)=CH-CH=CH_2$,$-CH=C(CH_3)-CH=CH_2$,$-CH=CH-C(CH_3)=CH_2$,$-C_4H_8-CH=CH_2$,$-C_3H_6-CH=CH-CH_3$,$-C_2H_4-CH=CH-C_2H_5$,$-CH_2-CH=CH-C_3H_7$,$-CH=CH-C_4H_9$,$-C_3H_6-C(CH_3)=CH_2$,$-C_2H_4-CH(CH_3)-CH=CH_2$,$-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH=CH_2$,$-CH(CH_3)-C_2H_4-CH=CH_2$,$-C_2H_4-CH=C(CH_3)_2$,$-C_2H_4-C(CH_3)=CH-CH_3$,$-CH_2-CH(CH_3)-CH=CH-CH_3$,$-CH(CH_3)-CH_2-CH=CH-CH_3$,$-CH_2-CH=CH-CH(CH_3)_2$,$-CH_2-CH=C(CH_3)-C_2H_5$,$-CH_2-C(CH_3)=CH-C_2H_5$,$-CH(CH_3)-CH=CH-C_2H_5$,$-CH=CH-CH_2-CH(CH_3)_2$,$-CH=CH-CH(CH_3)-C_2H_5$,$-CH=C(CH_3)-C_3H_7$,$-C(CH_3)=CH-C_3H_7$,$-CH_2-CH(CH_3)-C(CH_3)=CH_2$,$-CH(CH_3)-CH_2-C(CH_3)=CH_2$,$-CH(CH_3)-CH(CH_3)-CH=CH_2$,$-CH_2-C(CH_3)_2-CH=CH_2$,$-C(CH_3)_2-CH_2-CH=CH_2$,$-CH_2-C(CH_3)=C(CH_3)_2$,$-CH(CH_3)-CH=C(CH_3)_2$,$-C(CH_3)_2-CH=CH-CH_3$,$-CH(CH_3)-C(CH_3)=CH-CH_3$,$-CH=C(CH_3)-CH(CH_3)_2$,$-C(CH_3)=CH-CH(CH_3)_2$,$-C(CH_3)=C(CH_3)-C_2H_5$,$-CH=CH-C(CH_3)_3$,$-C(CH_3)_2-C(CH_3)=CH_2$,$-CH(C_2H_5)-C(CH_3)=CH_2$,$-C(CH_3)(C_2H_5)-CH=CH_2$,$-CH(CH_3)-C(C_2H_5)=CH_2$,$-CH_2-C(C_3H_7)=CH_2$,$-CH_2-C(C_2H_5)=CH-CH_3$,$-CH(C_2H_5)-CH=CH-CH_3$,$-C(C_4H_9)=CH_2$,$-C(C_3H_7)=CH-CH_3$,$-C(C_2H_5)=CH-C_2H_5$,$-C(C_2H_5)=C(CH_3)_2$,$-C[C(CH_3)_3]=CH_2$,$-C[CH(CH_3)(C_2H_5)]=CH_2$,$-C[CH_2-CH(CH_3)_2]=CH_2$,$-C_2H_4-CH=CH-CH=CH_2$,$-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH_2$,$-CH=CH-C_2H_4-CH=CH_2$,$-CH_2-CH=CH-CH=CH-CH_3$,$-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_3$,$-CH=CH-CH=CH-C_2H_5$,$-CH_2-CH=CH-C(CH_3)=CH_2$,$-CH_2-CH=C(CH_3)-CH=CH_2$,$-CH_2-C(CH_3)=CH-CH=CH_2$,$-CH(CH_3)-CH=CH-CH=CH_2$,$-CH=CH-CH_2-C(CH_3)=CH_2$,$-CH=CH-CH(CH_3)-CH=CH_2$,$-CH=C(CH_3)-CH_2-CH=CH_2$,$-C(CH_3)=CH-CH_2-CH=CH_2$,$-CH=CH-CH=C(CH_3)_2$,$-CH=CH-C(CH_3)=CH-CH_3$,$-CH=C(CH_3)-CH=CH-CH_3$,$-C(CH_3)=CH-CH=CH-CH_3$,$-CH=C(CH_3)-C(CH_3)=CH_2$,$-C(CH_3)=CH-C(CH_3)=CH_2$,$-C(CH_3)=C(CH_3)-CH=CH_2$,和$-CH=CH-CH=CH-CH=CH_2$。

[0564] 优选的是$-CH=CH_2$,$-CH_2-CH=CH_2$,$-C(CH_3)=CH_2$,$-CH=CH-CH_3$,$-C_2H_4-CH=CH_2$,$-CH_2-CH=CH-CH_3$。特别优选的是$-CH=CH_2$,$-CH_2-CH=CH_2$,和$-CH=CH-CH_3$。

[0565] 如本文所用,术语"C_2-C_6-炔基"是指$-C\equiv CH$,$-C\equiv C-CH_3$,$-CH_2-C\equiv CH$,$-C_2H_4-C\equiv CH$,$-CH_2-C\equiv C-CH_3$,$-C\equiv C-C_2H_5$,$-C_3H_6-C\equiv CH$,$-C_2H_4-C\equiv C-CH_3$,$-CH_2-C\equiv C-C_2H_5$,$-C\equiv C-C_3H_7$,$-CH(CH_3)-C\equiv CH$,$-CH_2-CH(CH_3)-C\equiv CH$,$-CH(CH_3)-CH_2-C\equiv CH$,$-CH(CH_3)-C\equiv C-CH_3$,$-C_4H_8-C\equiv CH$,$-C_3H_6-C\equiv C-CH_3$,$-C_2H_4-C\equiv C-C_2H_5$,$-CH_2-C\equiv C-C_3H_7$,$-C\equiv C-C_4H_9$,$-C_2H_4-CH(CH_3)-C\equiv CH$,$-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-C\equiv CH$,$-CH(CH_3)-C_2H_4-C\equiv CH$,$-CH_2-CH(CH_3)-C\equiv C-CH_3$,$-CH(CH_3)-CH_2-C\equiv C-CH_3$,$-CH(CH_3)-C\equiv C-C_2H_5$,$-CH_2-C\equiv C-CH(CH_3)_2$,$-C\equiv C-CH(CH_3)-C_2H_5$,$-C\equiv C-CH_2-CH(CH_3)_2$,$-C\equiv C-C(CH_3)_3$,$-CH(C_2H_5)-C\equiv C-CH_3$,$-C(CH_3)_2-C\equiv C-CH_3$,$-CH(C_2H_5)-CH_2-C\equiv CH$,$-CH_2-CH(C_2H_5)-C\equiv CH$,$-C(CH_3)_2-CH_2-C\equiv CH$,$-CH_2-C(CH_3)_2-C\equiv CH$,$-CH(CH_3)-CH(CH_3)-C\equiv CH$,-

$CH(C_3H_7)$-C≡CH,-C(CH_3) (C_2H_5)-C≡CH,-C≡C-C≡CH,-CH_2-C≡C-C≡CH,-C≡C-C≡C-CH_3,-$CH(C{\equiv}CH)_2$,-C_2H_4-C≡C-C≡CH,-CH_2-C≡C-CH_2-C≡CH,-C≡C-C_2H_4-C≡CH,-CH_2-C≡C-C≡C-CH_3,-C≡C-CH_2-C≡C-CH_3,-C≡C-C≡C-C_2H_5,-C≡C-$CH(CH_3)$-C≡CH,-$CH(CH_3)$-C≡C-C≡CH,-CH(C≡CH)-CH_2-C≡CH,-$C(C{\equiv}CH)_2$-CH_3,-CH_2-$CH(C{\equiv}CH)_2$,-CH(C≡CH)-C≡C-CH_3。优选的是-C≡CH和-C≡C-CH_3。

[0566] 术语“C_{1-6}-烷氧基”是指“C_1-C_6-烷基-O-”。

[0567] 术语“C_{1-12}-烷氧基”是指“C_{1-12}-烷基-O-”。

[0568] 术语“C_{1-6}-氨基烷基”是指“H_2N-C_1-C_6-烷基-”。

[0569] 术语“C_2-C_6-烯氧基”是指“C_2-C_6-烯基-O-”。

[0570] 术语“C_{1-6}-烷基羰基”是指“C_1-C_6-烷基-CO-”。也称为“酰基”。

[0571] 术语“C_{1-12}-烷基羰基”是指“C_{1-12}-烷基-CO-”。也称为“酰基”。

[0572] 术语“C_{1-6}-烷氧基羰基”是指“C_1-C_6-烷基-O-CO-”。

[0573] 术语“C_{1-12}-烷氧基羰基”是指“C_{1-12}-烷基-O-CO-”。

[0574] 术语“C_1-C_6-烷酰氧基”是指“C_1-C_6-烷基-CO-O-”。

[0575] 术语“C_{1-6}-烷硫基”是指“C_1-C_6-烷基-S”。

[0576] 术语“C_{1-6}-烷基磺酰氧基”是指“C_1-C_6-烷基-SO_2-O-”。

[0577] 术语“C_{1-6}-烷基羰基氨基”是指“C_1-C_6-烷基-CO-NH-”。

[0578] 术语“C_{1-6}-烷基氨基”是指“C_1-C_6-烷基-NH-”。

[0579] 术语“$(C_{1-6}-)_2$烷基氨基”是指如“[C_1-C_6-烷基][C_1-C_6-烷基]N-”的二烷基氨基。

[0580] 术语“C_{1-6}-烷基氨基羰基”是指“C_1-C_6-烷基-NH-CO-”

[0581] 术语“$(C_{1-6}-)_2$烷基氨基羰基”是指如“[C_1-C_6-烷基][C_1-C_6-烷基]N-CO-”的二烷基氨基羰基。

[0582] 术语“氨基-C_{1-6}-烷基氨基羰基”是指“H_2N-[C_1-C_6-亚烷基]-NH-CO-”。

[0583] 术语“C_{1-6}-烷基-氨基-C_{1-6}-烷基氨基羰基”是指“C_{1-6}-烷基-NH-(C_1-C_6-亚烷基)-NH-CO-”。

[0584] 术语“$(C_{1-6}-)_2$烷基-氨基-C_{1-6}-烷基氨基羰基”是指“[C_1-C_6-烷基][C_1-C_6-烷基]N-[C_1-C_6-亚烷基]-NH-CO-”。

[0585] 术语“芳基”是指苯基,甲苯酰基,取代的苯基和取代的甲苯酰基。

[0586] 术语“芳氧基”是指“芳基-O-”。

[0587] 术语“芳基羰基”是指“芳基-CO-”。

[0588] 术语“芳氧基羰基”是指“芳基-O-CO-”。

[0589] 术语“杂芳基”是指具有4至9个环原子的取代或未取代的杂芳基,其中1至4个源自选自O,N和/或S。优选的“杂芳基”基团在5或6元芳香环中具有1或2个杂原子。包括了单环和双环系统。典型的“杂芳基”基团是吡啶基,呋喃基,噻吩基,吡咯基,恶唑基,噻唑基,咪唑基,异恶唑基,异噻唑基,恶二唑基,哒嗪基,嘧啶基,吡嗪基,1,3,5-三嗪基,1,2,3-三唑基,1,3,4-噻二唑基,吲嗪基,吲哚基,异吲哚基,苯并呋喃基,苯并噻吩基,吲唑基,苯并咪唑基,苯并噻唑基,嘌呤基,喹嗪基,喹啉基,异喹啉基,喹唑啉基,喹喔啉基,1,8-二氮杂萘基,四氢喹啉基,苯并恶唑基,2-色原基(chrom-2-onyl),吲唑基等。

[0590] 术语“杂芳基氧基”是指“杂芳基-O-”。

[0591] 术语“杂芳基羰基”是指“杂芳基-CO-”。

[0592] 术语“杂芳氧基羰基”是指“杂芳基-O-CO-”。

[0593] 术语“取代的”是指其中一个或多个氢原子被一个或多个以下取代基取代的基团:-OH,-OCH_3,-OC_2H_5,-OC_3H_7,-O-环-C_3H_5,-$OCH(CH_3)_2$,-OCH_2Ph,-F,-Cl,-$COCH_3$,-COC_2H_5,-COC_3H_7,-CO-环-C_3H_5,-$COCH(CH_3)_2$,-COOH,-$CONH_2$,-NH_2,-$NHCH_3$,-NHC_2H_5,-NHC_3H_7,-NH-环-C_3H_5,-$NHCH(CH_3)_2$,-$N(CH_3)_2$,-$N(C_2H_5)_2$,-$N(C_3H_7)_2$,-N(环-C_3H_5)$_2$,-$N[CH(CH_3)_2]_2$,-SO_3H,-OCF_3,-OC_2F_5,环-C_3H_5,-CH_3,-C_2H_5,-C_3H_7,-$CH(CH_3)_2$,-CH=CH_2,-CH_2-CH=CH_2,-C≡CH和/或-C≡C-CH_3。

[0594] 在通式(I)表示用于合成本发明的反义寡核苷酸的单体或结构单元的情况下,端基Y和IL’彼此独立地选自氢,叠氮基,卤素,氰基,硝基,羟基,PG-O-,AG-O-,巯基,PG-S-,AG-S-,C_{1-6}-烷硫基,氨基,PG-N(R^H)-,AG-N(R^H)-,单或二(C_{1-6}-烷基)氨基,任选取代的C_{1-6}-烷氧基,任选取代的C_{1-6}-烷基,任选取代的C_{2-6}-烯基,任选取代的C_{2-6}-烯氧基,任选取代的C_{2-6}-炔基,任选取代的C_{2-6}-炔氧基,单磷酸酯,一硫代磷酸酯,二磷酸酯,二硫代磷酸酯,三磷酸酯,三硫代磷酸酯,羧基,磺酰基,羟甲基,PG-O-CH_2-,AG-O-CH_2-,氨基甲基,PG-N(R^H)-CH_2-,AG-N(R^H)-CH_2-,羧甲基,磺酰基甲基,其中PG分别是-OH、-SH和-NH(R^H)的保护基,AG是-OH、-SH和-NH(R^H)的活化基团以及R^H选自氢和C_{1-6}-烷基。

[0595] 羟基取代基的保护基PG包括取代的三苯甲基,例如4,4’-二甲氧基三苯甲基(DMT),4-单甲氧基三苯甲基(MMT),任选取代的9-(9-苯基)呫吨基(pixyl),任选取代的甲氧基四氢吡喃基(mthp),甲硅烷基例如三甲基甲硅烷基(TMS),三异丙基甲硅烷基(TIPS),叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS),三乙基甲硅烷基和苯基二甲基甲硅烷基,叔丁基醚,缩醛(包括两个羟基),酰基如乙酰基或卤素取代的乙酰基,例如氯乙酰基或氟乙酰基,异丁酰基,新戊酰基,苯甲酰基和取代的苯甲酰基,甲氧基甲基(MOM),苄基醚或取代的苄基醚,如2,6-二氯苄基(2,6-Cl_2BzI)。或者,当Y或IL’是羟基时,它们可以通过任选地通过接头连接到固相支持物来保护。

[0596] 当Y或IL’为氨基时,氨基保护基的示例性实例是芴基甲氧基羰基(Fmoc),叔丁氧基羰基(BOC),三氟乙酰基,烯丙氧基羰基(alloc或AOC),苄氧羰基(Z或Cbz),取代的苄氧羰基例如2-氯苄氧羰基(2-ClZ),单甲氧基三苯甲基(MMT),二甲氧基三苯甲基(DMT),邻苯二甲酰基和9-(9-苯基)呫吨基(pixyl)。

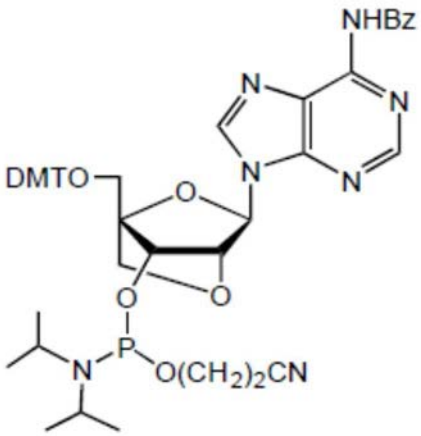
[0597] Act分别表示-OH,-SH,和-NH(R^H)的活化基团。这样的活化基团例如选自任选取代的O-亚磷酰胺,任选取代的O-磷酸三酯,任选取代的O-磷酸二酯,任选取代的H-膦酸酯和任选取代的O-膦酸酯。

[0598] 在本文中,术语“亚磷酰胺”是指式-P(OR^x)-N(R^y)$_2$的基团,其中R^x表示任选取代的烷基,例如,甲基,2-氰基乙基或苄基,并且每个R^y表示任选取代的烷基,例如乙基或异丙基,或基团-N(R^y)$_2$形成吗啉基(-N(CH_2CH_2)$_2$O)。R^x优选表示2-氰基乙基,并且两个R^y优选是相同的并且表示异丙基。因此,特别相关的亚磷酰胺是N,N二异丙基-O-(2-氰基乙基)-亚磷酰胺。

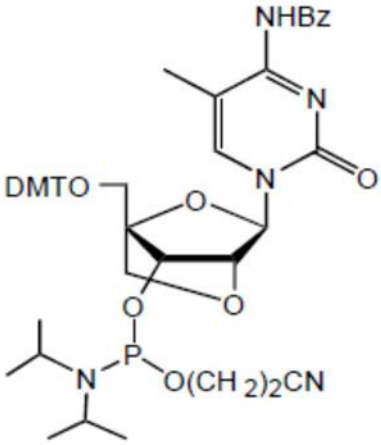
[0599] LNA单体或LNA结构单元

[0600] 在本发明的反义寡核苷酸的合成中用作原料的LNA单体或LNA结构单元优选为以下通式的LNA核苷:

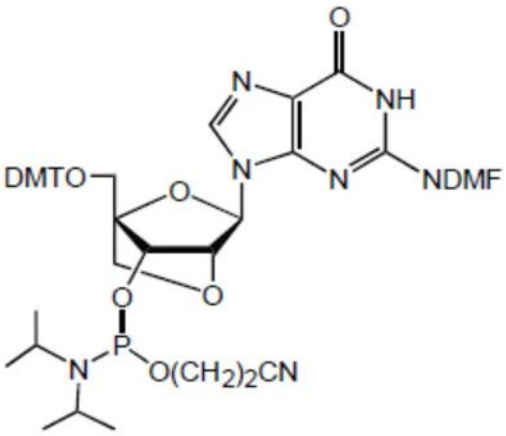
[0601]



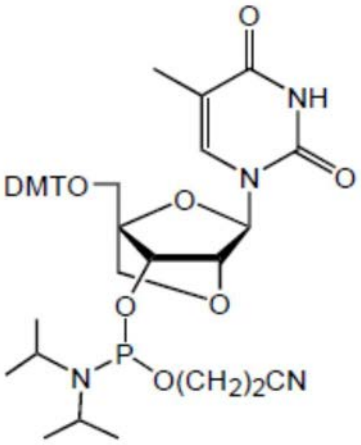
LNA-A^{Bz}



LNA-C*^{Bz}



LNA-G^{DMF}



LNA-T

[0602] 通常，LNA结构单元作为具有四种不同核碱基(腺嘌呤(A)，鸟嘌呤(G)，5-甲基-胞嘧啶(C*)和胸腺嘧啶(T))的LNA亚磷酰胺提供。含有LNA单元的本发明的反义寡核苷酸由标准亚磷酰胺化学合成。在LNA结构单元中，核碱基是受保护的。嘌呤碱基的氨基的优选保护基是苯甲酰基(Bz)，表示为A^{Bz}。5-甲基嘧啶酮碱基的氨基的优选保护基是苯甲酰基(Bz)，表示为C^{*Bz}。嘌呤酮碱基的氨基的优选保护基是二甲基甲脒(DMF)基团，二乙基甲脒(DEF)，二丙基甲脒(DPF)，二丁基甲脒(DBF)或异丁酰基(-CO-CH$(CH_3)_2$)基团，表示为G^{DMF}，G^{DEF}，G^{DPF}，G^{DBF}，或G^{iBu}。因此，-NDMF基团是指-N=CH-N$(CH_3)_2$。DMT是指4,4'-二甲氧基三苯甲基。

[0603] 因此，LNA-T是指5'-O-(4,4'二甲氧基三苯甲基)-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)-亚磷酰胺-胸苷LNA。LNA-C^{*Bz}是指5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺-4-N-苯甲酰基-5-甲基-2'-胞苷LNA。LNA-A^{Bz}是指5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)-亚磷酰胺-6-N-苯甲酰基-2'-腺苷LNA。LNA-G^{DMF}是指5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)-亚磷酰胺-2-N-二甲基甲脒-2'-鸟苷LNA。LNA-G^{iBu}是指5'-O-(4,4'-二甲氧基-三苯甲基)-3'-O-(2-氰基乙基-N,N二异丙基)-亚磷酰胺-2-N-丁酰-2'-鸟苷LNA。

[0604] 末端基团

[0605] 在Y表示本发明的反义寡核苷酸的5'末端基团的情况下，残基Y也称为$Y^{5'}$，并且表

示：

[0606] -OH,-O-C_{1-6}-烷基,-S-C_{1-6}-烷基,-O-C_{6-9}-苯基,-O-C_{7-10}-苄基,-NH-C_{1-6}-烷基,-N(C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-C_{2-6}-烯基,-S-C_{2-6}-烯基,-NH-C_{2-6}-烯基,-N(C_{2-6}-烯基)$_2$,-O-C_{2-6}-炔基,-S-C_{2-6}-炔基,-NH-C_{2-6}-炔基,-N(C_{2-6}-炔基)$_2$,-O-C_{1-6}-亚烷基-O-C_{1-6}-烷基,-O-[C_{1-6}-亚烷基-O]$_m$-C_{1-6}-烷基,-O-CO-C_{1-6}-烷基,-O-CO-C_{2-6}-烯基,-O-CO-C_{2-6}-炔基,-O-S(O)-C_{1-6}-烷基,-O-SO_2-C_{1-6}-烷基,-O-SO_2-O-C_{1-6}-烷基,-O-P(O)(O^-)$_2$,-O-P(O)(O^-)(O-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(S^-)$_2$,-O-P(O)(S-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(S^-)(O-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O^-)(NH-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O-C_{1-6}-烷基)(NH-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O^-)[N(C_{1-6}-烷基)$_2$],-O-P(O)(O-C_{1-6}-烷基)[N(C_{1-6}-烷基)$_2$],-O-P(O)(O^-)(BH_3^-),-O-P(O)(O-C_{1-6}-烷基)(BH_3^-),-O-P(O)(O^-)(O-C_{1-6}-亚烷基-O-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O-C_{1-6}-亚烷基-O-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(O^-)(O-C_{1-6}-亚烷基-S-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O-C_{1-6}-亚烷基-S-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(O^-)(OCH_2CH_2O-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(OCH_2CH_2O-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(O^-)(OCH_2CH_2S-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(OCH_2CH_2S-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(O^-)OC_3H_6OH,-O-P(O)(S^-)OC_3H_6OH,-O-P(S)(S^-)OC_3H_6OH,

[0607] 其中C_{1-6}-烷基,C_{2-6}-烯基,C_{2-6}-炔基,-O-C_{6-9}-苯基或-O-C_{7-10}-苄基可以进一步被-F,-OH,C_{1-4}-烷基,C_{2-4}-烯基和/或C_{2-4}-炔基取代,其中m选自1,2,3,4,5,6,7,8,9或10。

[0608] 更优选的是:-OCH_3,-OC_2H_5,-OC_3H_7,-O-环-C_3H_5,-OCH(CH_3)$_2$,-OC(CH_3)$_3$,-OC_4H_9,-OPh,-OCH_2-Ph,-O-$COCH_3$,-O-COC_2H_5,-O-COC_3H_7,-O-CO-环-C_3H_5,-O-COCH(CH_3)$_2$,-OCF_3,-O-S(O)CH_3,-O-S(O)C_2H_5,-O-S(O)C_3H_7,-O-S(O)-环-C_3H_5,-O-SO_2CH_3,-O-$SO_2C_2H_5$,-O-$SO_2C_3H_7$,-O-SO_2-环-C_3H_5,-O-SO_2-OCH_3,-O-SO_2-OC_2H_5,-O-SO_2-OC_3H_7,-O-SO_2-O-环-C_3H_5,-O(CH_2)$_n$N[(CH_2)$_n$OH],-O(CH_2)$_n$N[(CH_2)$_n$-H],-O-P(O)(O^-)OC_3H_6OH,-O-P(O)(S^-)OC_3H_6OH,

[0609] 甚至更优选的是：

[0610] -OCH_3,-OC_2H_5,-$OCH_2CH_2OCH_3$(也称为MOE),-OCH_2CH_2-N(CH_3)$_2$(也称为DMAOE),-O[(CH_2)$_n$O]$_m$$CH_3$,-O($CH_2$)$_n$$OCH_3$,-O($CH_2$)$_n$$NH_2$,-O($CH_2$)$_n$N($CH_3$)$_2$,,-O-P(O)($O^-$)$OC_3H_6OH$,-O-P(O)($S^-$)$OC_3H_6OH$,

[0611] 其中n选自1,2,3,4,5或6;和

[0612] 其中m选自1,2,3,4,5,6,7,8,9或10。

[0613] 在IL'表示本发明的反义寡核苷酸的3'末端基团的情况下,残基IL'也称为IL'$^{3'}$,表示：

[0614] -OH,-O-C_{1-6}-烷基,-S-C_{1-6}-烷基,-O-C_{6-9}-苯基,-O-C_{7-10}-苄基,-NH-C_{1-6}-烷基,-N(C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-C_{2-6}-烯基,-S-C_{2-6}-烯基,-NH-C_{2-6}-烯基,-N(C_{2-6}-烯基)$_2$,-O-C_{2-6}-炔基,-S-C_{2-6}-炔基,-NH-C_{2-6}-炔基,-N(C_{2-6}-炔基)$_2$,-O-C_{1-6}-亚烷基-O-C_{1-6}-烷基,-O-[C_{1-6}-亚烷基-O]$_m$-C_{1-6}-烷基,-O-CO-C_{1-6}-烷基,-O-CO-C_{2-6}-烯基,-O-CO-C_{2-6}-炔基,-O-S(O)-C_{1-6}-烷基,-O-SO_2-C_{1-6}-烷基,-O-SO_2-O-C_{1-6}-烷基,-O-P(O)(O^-)$_2$,-O-P(O)(O^-)(O-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(S^-)$_2$,-O-P(O)(S-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(S^-)(O-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O^-)(NH-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O-C_{1-6}-烷基)(NH-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O^-)[N(C_{1-6}-烷基)$_2$],-O-P(O)(O-C_{1-6}-烷基)[N(C_{1-6}-烷基)$_2$],-O-P(O)(O^-)(BH_3^-),-O-P(O)(O-C_{1-6}-烷基)(BH_3^-),-O-P(O)(O^-)(O-C_{1-6}-亚烷基-O-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O-C_{1-6}-亚烷基-O-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(O^-)(O-C_{1-6}-亚烷基-S-C_{1-6}-烷基),-O-P(O)(O-C_{1-6}-亚烷基-S-C_{1-6}-烷基)$_2$,-O-P(O)(O^-)

(OCH2CH2O-C1-6-烷基),-O-P(O)(OCH2CH2O-C1-6-烷基)2,-O-P(O)(O-)(OCH2CH2S-C1-6-烷基),-O-P(O)(OCH2CH2S-C1-6-烷基)2,-O-P(O)(O-)OC3H6OH,-O-P(O)(S-)OC3H6OH,

[0615] 其中C1-6-烷基,C2-6-烯基,C2-6-炔基,-O-C6-9-苯基或-O-C7-10-苄基可以进一步被-F,-OH,C1-4-烷基,C2-4-烯基和/或C2-4-炔基取代,其中m选自1,2,3,4,5,6,7,8,9或10。

[0616] 更优选的是:-OCH3,-OC2H5,-OC3H7,-O-环-C3H5,-OCH(CH3)2,-OC(CH3)3,-OC4H9,-OPh,-OCH2-Ph,-O-COCH3,-O-COC2H5,-O-COC3H7,-O-CO-环-C3H5,-O-COCH(CH3)2,-OCF3,-O-S(O)CH3,-O-S(O)C2H5,-O-S(O)C3H7,-O-S(O)-环-C3H5,-O-SO2CH3,-O-SO2C2H5,-O-SO2C3H7,-O-SO2-环-C3H5,-O-SO2-OCH3,-O-SO2-OC2H5,-O-SO2-OC3H7,-O-SO2-O-环-C3H5,-O(CH2)nN[(CH2)nOH],-O(CH2)nN[(CH2)n-H],,-O-P(O)(O-)OC3H6OH,-O-P(O)(S-)OC3H6OH,

[0617] 甚至更优选的是:

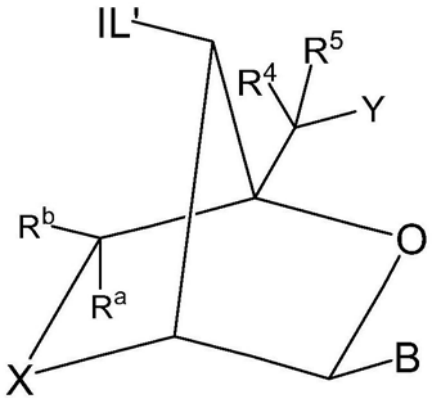
[0618] -OCH3,-OC2H5,-OCH2CH2OCH3(也称为MOE),-OCH2CH2-N(CH3)2(也称为DMAOE),-O[(CH2)nO]mCH3,-O(CH2)nOCH3,-O(CH2)nNH2,-O(CH2)nN(CH3)2,-O-P(O)(O-)OC3H6OH,-O-P(O)(S-)OC3H6OH,

[0619] 其中n选自1,2,3,4,5或6;和

[0620] 其中m选自1,2,3,4,5,6,7,8,9或10。

[0621] 优选的LNA

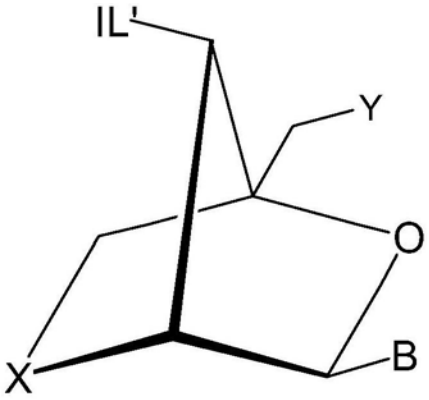
[0622] 在优选实施方案中,用于本发明的反义寡核苷酸的LNA单元优选具有通式(II)的结构:

[0623] 

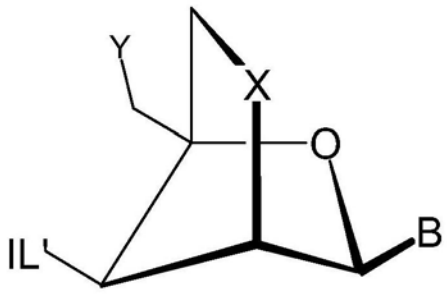
(II)

[0624] -C(RaRb)-X-部分优选表示-C(RaRb)-O-,-C(RaRb)-NRc-,-C(RaRb)-S-,和-C(RaRb)-C(RaRb)-O-,其中取代基Ra、Rb和Rc具有如本文所定义的含义,优选为C1-6-烷基,更优选为C1-4-烷基。更优选-C(RaRb)-X-选自-CH2-O-,-CH2-S-,-CH2-NH-,-CH2-N(CH3)-,-CH2-CH2-O-,或-CH2-CH2-S-,和更优选-CH2-O-,-CH2-S-,-CH2-CH2-O-,或-CH2-CH2-S-,和更优选-CH2-O-,-CH2-S-,或-CH2-CH2-O-,和更优选-CH2-O-或-CH2-S-,和最优选-CH2-O-。

[0625] 所有手性中心和不对称取代基(如果有的话)可以是R或S取向。例如,两个示例性的立体化学异构体是如下所示的β-D和α-L同工型:

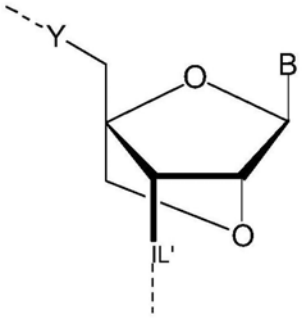
[0626] 

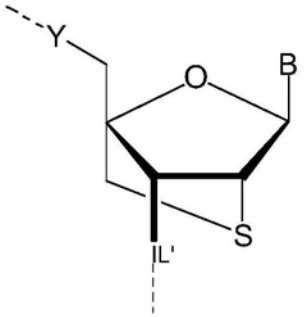
式（IIA）

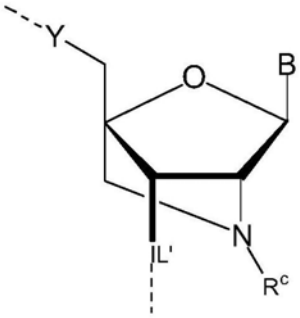


式（IIB）

[0627] 优选的LNA单元选自通式(b^1)至(b^9)：

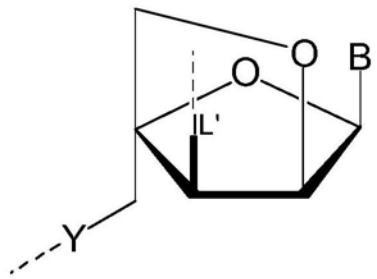
[0628] 



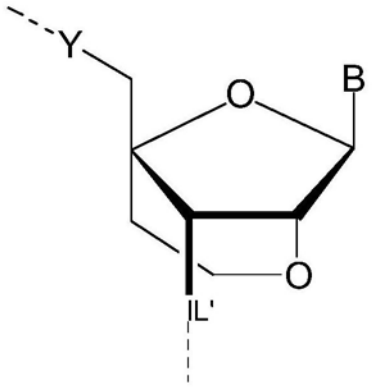


[0629] β-D-氧基-LNA(b^1)β-D-硫基-LNA(b^2)β-D-氨基-LNA(b^3)

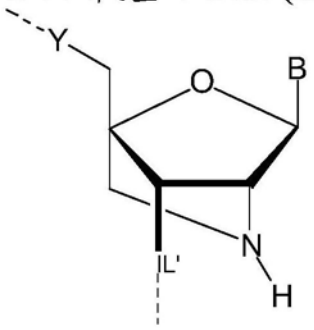
[0630]



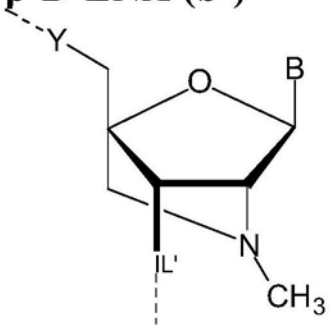
α-L-氧基-LNA (b^4)



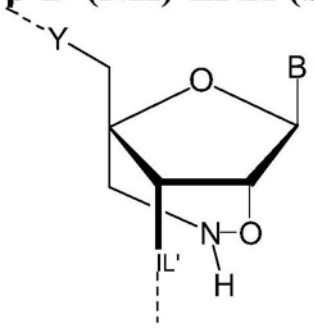
β-D-ENA (b^5)



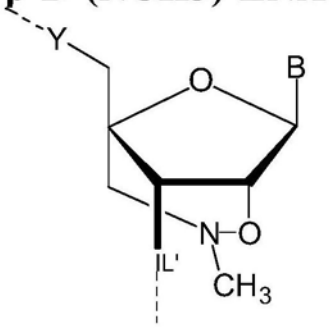
β-D-(NH)-LNA (b^6)



β-D-(NCH3)-LNA (b^7)



β-D-(ONH)-LNA (b^8)



β-D-(ONCH3)-LNA (b^9)

[0631] 术语“硫基-LNA”包含锁定的核苷酸，其中通式(II)中的X选自-S-或-CH_2-S-。硫基-LNA可以在β-D和α-L-构型中。

[0632] 术语“氨基-LNA”包含锁定的核苷酸，其中通式(II)中的X选自-NH-，-N(R)-，-CH_2-NH-和-CH_2-N(R)-，其中R选自氢和C_{1-4}-烷基。氨基-LNA可以在β-D和α-L-构型中。

[0633] 术语“氧基-LNA”包含其中通式(II)中的X为-O-的锁定的核苷酸。氧基-LNA可以在β-D和α-L-构型中。

[0634] 术语“ENA”包括锁定的核苷酸，其中通式(II)中的X为-CH_2-O-(其中-CH_2-O-的氧原子相对于碱基B附着至2’位置)。R^a和R^b彼此独立地为氢或甲基。

[0635] 在优选的示例性实施方案中，LNA选自β-D-氧基-LNA，α-L-氧基-LNA，β-D-氨基-LNA和β-D-硫基-LNA，特别是β-D-氧基-LNA。

[0636] 更优选的是以下反义寡核苷酸(表1)：

[0637]

SP	L	Seq ID No.	序列，5'-3'
89	17	102a	GCGAGTGACTCACTCAA
90	15	103a	CGAGTGACTCACTCA
90	16	104a	GCGAGTGACTCACTCA
90	17	105a	CGCGAGTGACTCACTCA
91	14	106a	CGAGTGACTCACTC
91	16	107a	CGCGAGTGACTCACTC
91	17	108a	GCGCGAGTGACTCACTC
92	14	109a	GCGAGTGACTCACT
92	16	110a	GCGCGAGTGACTCACT
92	17	111a	CGCGCGAGTGACTCACT
93	12	112a	CGAGTGACTCAC
93	13	113a	GCGAGTGACTCAC
93	14	114a	CGCGAGTGACTCAC
93	16	115a	CGCGCGAGTGACTCAC
93	17	116a	GCGCGCGAGTGACTCAC
94	13	117a	CGCGAGTGACTCA
94	14	118a	GCGCGAGTGACTCA
94	15	119a	CGCGCGAGTGACTCA

[0638]

94	16	120a	GCGCGCGAGTGACTCA
94	17	121a	TGCGCGCGAGTGACTCA
95	14	122a	CGCGCGAGTGACTC
95	16	123a	TGCGCGCGAGTGACTC
95	17	124a	GTGCGCGCGAGTGACTC
96	13	125a	CGCGCGAGTGACT
97	14	126a	TGCGCGCGAGTGAC
97	16	127a	CGTGCGCGCGAGTGAC
98	13	128a	TGCGCGCGAGTGA
107	16	129a	GTCGTCGCTCCGTGCG
108	15	130a	GTCGTCGCTCCGTGC
108	17	131a	GTGTCGTCGCTCCGTGC
109	13	132a	TCGTCGCTCCGTG
109	15	133a	TGTCGTCGCTCCGTG
110	12	134a	TCGTCGCTCCGT
110	13	135a	GTCGTCGCTCCGT
110	14	136a	TGTCGTCGCTCCGT
110	15	137a	GTGTCGTCGCTCCGT
110	16	138a	GGTGTCGTCGCTCCGT
351	16	139a	CGTCATAGACCGAGCC
351	12	140a	ATAGACCGAGCC
354	16	141a	GCTCGTCATAGACCGA
354	13	142a	CGTCATAGACCGA
355	14	143a	CTCGTCATAGACCG
355	15	144a	GCTCGTCATAGACCG
356	14	145a	GCTCGTCATAGACC
381	17	146a	CAGCCCCCGACCCATGG
382	16	147a	CAGCCCCCGACCCATG
383	14	148a	AGCCCCCGACCCAT

[0639]

384	14	149a	CAGCCCCCGACCCA
422	17	150a	CGCGTCCACAGGACGAT
425	14	151a	CGCGTCCACAGGAC
429	15	152a	CGATACGCGTCCACA
431	13	153a	CGATACGCGTCCA
431	16	154a	TGGCGATACGCGTCCA
432	12	155a	CGATACGCGTCC
432	13	156a	GCGATACGCGTCC
432	17	157a	GCTGGCGATACGCGTCC
433	15	158a	CTGGCGATACGCGTC
433	12	159a	GCGATACGCGTC
433	16	160a	GCTGGCGATACGCGTC
433	14	161a	TGGCGATACGCGTC
434	13	162a	TGGCGATACGCGT
434	14	163a	CTGGCGATACGCGT
434	12	164a	GGCGATACGCGT
435	13	165a	CTGGCGATACGCG
435	12	166a	TGGCGATACGCG
437	17	167a	ATCGTGCTGGCGATACG
449	16	168a	CGTGCGGTGGGATCGT
449	17	169a	ACGTGCGGTGGGATCGT
450	17	170a	AACGTGCGGTGGGATCG
452	15	171a	AACGTGCGGTGGGAT
452	17	172a	TGAACGTGCGGTGGGAT
459	17	173a	CGACTTCTGAACGTGCG
941	17	174a	TTAACGCGGTAGCAGTA
941	16	175a	TAACGCGGTAGCAGTA
942	17	176a	GTTAACGCGGTAGCAGT
943	15	177a	TTAACGCGGTAGCAG

[0640]

944	13	178a	TAACGCGGTAGCA
945	12	179a	TAACGCGGTAGC
945	13	180a	TTAACGCGGTAGC
946	12	181a	TTAACGCGGTAG
946	13	182a	GTTAACGCGGTAG
946	15	183a	CGGTTAACGCGGTAG
946	16	184a	CCGGTTAACGCGGTAG
947	14	185a	CGGTTAACGCGGTA
947	13	186a	GGTTAACGCGGTA
947	15	187a	CCGGTTAACGCGGTA
947	16	188a	GCCGGTTAACGCGGTA
947	17	189a	TGCCGGTTAACGCGGTA
948	13	190a	CGGTTAACGCGGT
949	13	191a	CCGGTTAACGCGG
949	14	192a	GCCGGTTAACGCGG
949	15	193a	TGCCGGTTAACGCGG
950	13	194a	GCCGGTTAACGCG
950	15	195a	CTGCCGGTTAACGCG
950	16	196a	GCTGCCGGTTAACGCG
1387	16	197a	ATGCCGCGTCAGGTAC
1392	13	198a	ACATGCCGCGTCA
1393	16	199a	GATGACATGCCGCGTC
1394	12	200a	GACATGCCGCGT
1394	15	201a	GATGACATGCCGCGT
1395	13	202a	ATGACATGCCGCG
1805	17	203a	TCCCGCACCTTGGAACC
1851	16	204a	CGATCTCTCAACACGT
1851	17	205a	TCGATCTCTCAACACGT
1852	15	206a	CGATCTCTCAACACG

[0641]

1852	16	207a	TCGATCTCTCAACACG
1852	17	208a	CTCGATCTCTCAACACG
2064	16	209a	GTAGTGTTTAGGGAGC
2072	16	210a	GCTATTTGGTAGTGTT
2284	15	211a	AGCTTATCCTATGAC
2285	14	212a	AGCTTATCCTATGA
2355	17	213a	CAGGCATTAATAAAGTG
4120	16	214a	CTAGGCGCCTCTATGC
4121	14	215a	TAGGCGCCTCTATG
4121	15	216a	CTAGGCGCCTCTATG
4122	13	217a	TAGGCGCCTCTAT
4217	16	218a	CATGAATGGACCAGTA

[0642] SP:Seq.ID No.2上的起始位置或起始核苷酸。

[0643] L:序列长度

[0644] 本文公开的反义寡核苷酸例如表1-3的反义寡核苷酸,特别是表4至9的反义寡核苷酸由不是LNA单元的核苷酸(也称为非LNA核苷酸)以及是LNA单元的核苷酸(也称为LNA核苷酸),优选DNA核苷酸组成。

[0645] 虽然没有明确指出,但表1的序列Seq.ID No.102a-218a的反义寡核苷酸在3'末端包含2至4个LNA核苷酸(LNA单元)和在5'末端包含2至4个LNA核苷酸(LNA单元)。虽然没有明确指出,但表2中的"C"表示LNA单元优选含有5-甲基胞嘧啶(C*)作为核碱基。

[0646] 这意味着,只要没有明确指出,本发明的或本文以字母代码A、C、G、T和U公开的反义寡核苷酸可以含有本文所公开的任何核苷酸间键联、任何末端基团和任何核碱基。此外,本发明或本文公开的反义寡核苷酸是本文公开的在3'末端具有至少一个LNA单元和在5'末端具有至少一个LNA单元的任何gapmer结构的gapmer。此外,本文公开的任何LNA单元可以在本发明或本文公开的反义寡核苷酸内中使用。因此,例如,反义寡核苷酸GCTCGTCATAGACCGA(Seq.ID No.13)或CGATACGCGTCCACAG(Seq.ID No.14)或GTAGTGTTTAGGGAGC(Seq.ID No.15)或GCTATTTGGTAGTGTT(Seq.ID No.16)或CATGAATGGACCAGTA(Seq.ID No.17)或AGGCATTAATAAAGTG(Seq.ID No.18)在5'末端含有至少一个LNA单元和在3'末端含有至少一个LNA单元,任何核碱基,任何3'末端基,任何5'末端基团,任何gapmer结构和本文公开的任何核苷酸间键联,并且还涵盖该反义寡核苷酸的盐和光学异构体。

[0647] LNA单元特别是在3'末端和5'末端的LNA单元的使用是优选的。因此,优选的是,如果在特别地本文公开的序列,特别是表1的Seq.ID No.102a-218a的3'末端的最后1-5个核苷酸以及在5'末端的最后1-5个核苷酸是LNA单元(也称为LNA核苷酸),则在3'和5'末端的1至5个LNA单元之间存在2-14,优选3-12,更优选4-10,更优选5-9,还更优选6-8个非LNA单元

(也称为非LNA核苷酸)。这种反义寡核苷酸被称为gapmer,并在下面更详细地公开。更优选的是3'末端的2-5个LNA核苷酸和5'末端的2-5个LNA核苷酸,或3'末端的1-4个LNA核苷酸和5'末端的1-4个LNA核苷酸,更优选的是在反义寡核苷酸的3'末端的2-4个LNA核苷酸,和在5'末端的2-4个LNA核苷酸,优选4-10个,更优选5-9个,更优选6-8个非LNA单元存在于3'和5'末端的LNA单元之间。

[0648] 此外,作为LNA单元之间和LNA单元与非LNA单元之间的核苷酸间键联,优选使用硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯和优选硫代磷酸酯。

[0649] 因此,进一步优选的是反义寡核苷酸,其中核苷酸间键联的多于50%,优选多于60%,更优选多于70%,还更优选多于80%,最优选多于90%是硫代磷酸酯或磷酸酯,更优选硫代磷酸酯键联,其中3'末端的最后1-4个或2-5个核苷酸是LNA单元,5'末端的最后1-4个或2-5个核苷酸是LNA单元,并且在末端的LNA单元之间存在6-14个核苷酸,优选7-12个,优选8-11个,更优选8-10个核苷酸的序列,其是非LNA单元,优选DNA单元。此外,优选gapmer形式的这些反义寡核苷酸由总共12至20个,优选12至18个核苷酸组成。

[0650] Gapmer

[0651] 本发明的反义寡核苷酸可以由包含非LNA单元的DNA核苷酸以及LNA核苷酸的核苷酸序列组成,并且可以以间隔子的形式排列。

[0652] 因此,本发明的反义寡核苷酸优选为gapmer。gapmer由不被锁定的DNA核苷酸单元(因此其是非LNA单元)的中间部分组成。该中间部分的DNA核苷酸可以通过如本文公开的核苷酸间键联(IL)彼此连接,其优选可以是磷酸基团、硫代磷酸酯基团或二硫代磷酸酯基团,并且其可以含有核碱基类似物,例如5-丙炔基胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤,7-甲基腺嘌呤,2-氨基腺嘌呤,2-硫代胸腺嘧啶,2-硫代胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶。DNA单元或DNA核苷酸不是双环戊糖结构。非LNA单元的中间部分在3'末端和5'末端通过由LNA单元组成的序列侧接。因此,gapmer具有以下通式:

[0653] LNA序列1-非LNA序列-LNA序列2

[0654] 或

[0655] 区域A-区域B-区域C

[0656] 由非LNA单元的DNA核苷酸单元组成的反义寡核苷酸的中间部分,当在与互补靶RNA的双链体中形成时,能够招募RNA酶。3'和5'末端核苷酸单元是优选为α-L构型的LNA单元,特别优选的是β-D-氧基-LNA和α-L-氧基LNA。

[0657] 因此,gapmer是一种反义寡核苷酸,其包含能够招募RNA酶(例如RNA酶H)的连续的DNA核苷酸片段,例如至少6或7个DNA核苷酸的区域,其是非LNA单元,在本文中被称为中间部分或区域B,其中区域B由亲和增强的核苷酸类似物的区域在5'和3'侧接,所述亲和增强的核苷酸类似物是LNA单元,例如在能够招募RNA酶的DNA核苷酸的连续片段的5'和3'的1-6个LNA单元,这些侧翼区域分别被称为区域A和C。

[0658] 优选地,gapmer包含式(5'至3')A-B-C或任选地A-B-C-D或D-A-B-C的(多)核苷酸序列,其中;区域A(5'区域)由至少一个核苷酸类似物,例如至少一个LNA单元,例如1-6个LNA单元组成,并且区域B由至少五个连续的DNA核苷酸组成,它们是非LNA单元,并且能够招募RNA酶(当与互补RNA分子例如mRNA靶形成双链体时),并且区域C(3'区域)由至少一个核苷酸类似物(例如至少一个LNA单元,例如1至6个LNA单元)组成,以及区域D(当存在时)由1、

2或3个非LNA单元的DNA核苷酸单元组成。

[0659] 在一些实施方案中，区域A由1,2,3,4,5或6个LNA单元组成，例如2-5个LNA单元，例如3或4个LNA单元；和/或区域C由1,2,3,4,5或6个LNA单元组成，例如2-5个LNA单元，例如3或4个LNA单元。

[0660] 在一些实施方案中，区域B由能够招募RNA酶的5,6,7,8,9,10,11或12个连续的DNA核苷酸或能够招募RNA酶的6-10个或7-9个例如8个连续核苷酸组成。在一些实施方案中，区域B由至少一个DNA核苷酸单元，例如1-12个DNA核苷酸单元，优选4-12个DNA核苷酸单元，更优选6-10个DNA核苷酸单元，更优选例如7-10个DNA核苷酸单元，和最优选8、9或10个DNA核苷酸单元组成，它们是非LNA单元。

[0661] 在一些实施方案中，区域A由3或4个LNA组成，区域B由7,8,9或10个DNA核苷酸单元组成，区域C由3或4个LNA单元组成。这些设计包括(A-B-C)：1-7-2,2-7-1,2-7-2,3-7-1,3-7-2,1-7-3,2-7-3,3-7-3,2-7-4,3-7-4,4-7-2,4-7-3,4-7-4,1-8-1,1-8-2,2-8-1,2-8-2,1-8-3,3-8-1,3-8-3,2-8-3,3-8-2,4-8-1,4-8-2,1-8-4,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,1-9-1,1-9-2,2-9-1,2-9-2,2-9-3,3-9-2,3-9-3,1-9-3,3-9-1,4-9-1,1-9-4,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,1-10-1,1-10-2,2-10-1,2-10-2,1-10-3,3-10-1,2-10-2,2-10-3,3-10-2,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,1-11-1,1-11-2,2-11-1,2-11-2,1-11-3,3-11-1,2-11-2,2-11-3,3-11-2,3-11-3,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3,4-11-4，并且可以进一步包括可以具有一个或两个非LNA单元的DNA核苷酸单元的区域D。

[0662] WO2004/046160A中公开了其它gapmer设计，并通过引用并入本文。美国临时申请60/977409(通过引用并入本文)涉及也适用于本发明的“shortmer”gapmer反义寡核苷酸。

[0663] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸由总共10,11,12,13或14个核苷酸单元(LNA单元和非LNA单元一起)的连续核苷酸序列组成，其中连续核苷酸序列具有式(5’-3’)A-B-C或任选地A-B-C-D或D-A-B-C，其中A由1、2或3个LNA单元组成，B由7、8或9个连续的非LNA单元且当在与互补RNA分子(例如mRNA靶)的双链体中形成时能够招募RNA酶的DNA核苷酸单元组成，C由1、2或3个LNA单元组成。当存在时，D由单个非LNA单元的DNA核苷酸单元组成。

[0664] 在一些实施方案中，A由1个LNA单元组成。在一些实施方案中，A由2个LNA单元组成。在一些实施方案中，A由3个LNA单元组成。在一些实施方案中，C由1个LNA单元组成。在一些实施方案中，C由2个LNA单元组成。在一些实施方案中，C由3个LNA单元组成。在一些实施方案中，B由7个非LNA单元的DNA核苷酸单元组成。在一些实施方案中，B由8个DNA核苷酸单元组成。在一些实施方案中，B由9个DNA核苷酸单元组成。在一些实施方案中，B由1-9个DNA核苷酸单元组成，例如2,3,4,5,6,7或8个DNA核苷酸单元。DNA核苷酸单元始终是非LNA单元。在一些实施方案中，B包含1、2或3个LNA单元，其优选为α-L构型，更优选为α-L-氧基LNA单元。在一些实施方案中，存在于A-B-C中的核苷酸数目选自(LNA单元-区域B-LNA单元，更优选α-L-氧基LNA单元(区域A)-区域B-(区域C)α-L-氧基LNA单元)：1-8-1,1-8-2,2-8-1,2-8-2,1-8-3,3-8-1,3-8-3,2-8-3,3-8-2,4-8-1,4-8-2,1-8-4,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,1-9-1,1-9-2,2-9-1,2-9-2,2-9-3,3-9-2,3-9-3,1-9-3,3-9-1,4-9-1,1-9-4,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,1-10-1,1-10-2,2-10-1,2-10-2,1-10-3,3-10-1,2-10-2,2-10-3,3-10-2,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,1-11-1,1-11-2,2-11-1,2-11-2,1-11-3,3-11-1,2-11-2,2-11-3,3-11-2,3-11-3,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3,4-11-4。

在进一步优选的实施方案中，A-B-C中的核苷酸数目选自:3-8-3,4-8-2,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3，更优选为:3-8-3,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,3-10-4,4-10-3,4-10-4,3-11-4,和4-11-3。

[0665] 硫代磷酸酯、磷酸酯或二硫代磷酸酯，特别是硫代磷酸酯核苷酸间键联也是优选的，特别是对于gapmer区域B。硫代磷酸酯、磷酸酯或二硫代磷酸酯键，特别是硫代磷酸酯核苷酸间键联也可用于侧翼区(A和C，以及用于连接A或C到D，并且在区域D(如果存在)内)。

[0666] 然而，区域A、B和C可以包括除硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯之外的核苷酸间键联，例如磷酸二酯键联，特别是例如当核苷酸类似物的使用保护区域A和C内的核苷酸间键联不受内切核酸酶降解时，例如当区域A和C由LNA单元组成时。

[0667] 反义寡核苷酸中的核苷酸间键联可以是磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或硼磷酸酯，以便允许靶向的RNA的RNA酶H切割。优选的是硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯，用于改善核酸酶抗性和其它原因，例如容易制造。在本发明的寡聚物的一个方面，LNA单元和/或非LNA单元通过硫代磷酸酯基团连接在一起。

[0668] 应当认识到，将磷酸二酯键联(例如一个或两个键联)包含在原本为硫代磷酸酯的反义寡核苷酸中，特别是在LNA单元之间或与其相邻(通常在区域A和/或C中)，可以改变反义寡核苷酸的生物利用度和/或生物分布(参见WO2008/053314A，其通过引用并入本文)。

[0669] 在一些实施方案中，例如在本文公开的反义寡核苷酸的序列中，并且在适当且未具体指出的情况下，所有剩余的核苷酸间键联基团是磷酸二酯基团或硫代磷酸酯基团或其混合物。

[0670] 在一些实施方案中，所有核苷酸间键联基团是硫代磷酸酯基团。当提及具体的gapmer反义寡核苷酸序列(例如本文提供的那些)时，应当理解，在各种实施方案中，当键联是硫代磷酸酯键联时，可以使用替代键联，例如本文公开的那些，例如磷酸酯(也称为磷酸二酯)键联，特别是用于核苷酸类似物(例如LNA单元)之间的键联。同样，当提及特定的gapmer反义寡核苷酸序列(例如本文提供的那些)时，当C残基被注释为5'-甲基修饰的胞嘧啶时，在各种实施方案中，寡聚物中存在的一个或多个C可以是未修饰的C残基。

[0671] 文字说明

[0672] 如本文所用，缩写b，d，s，ss具有以下含义：

[0673] b LNA单元或LNA核苷酸(选自b^1-b^7的任一个)

[0674] b^1β-D-氧基-LNA

[0675] b^2β-D-硫基-LNA

[0676] b^3β-D-氨基-LNA

[0677] b^4α-L-氧基-LNA

[0678] b^5β-D-ENA

[0679] b^6β-D-(NH)-LNA

[0680] b^7β-D-(NCH_3)-LNA

[0681] d 2-脱氧，这意指2-脱氧核糖单元(例如具有R＝-H的式B3或B5)

[0682] C*甲基-C(5-甲基胞嘧啶)；[因此dC*是5-甲基-2'-脱氧胞苷]

[0683] A*2-氨基腺嘌呤[因此dA*是2-氨基-2'-脱氧腺苷]

[0684] s核苷酸间键联是硫代磷酸酯基团(-O-P(O)(S⁻)-O-)

[0685] ss核苷酸间键联是二硫代磷酸酯基团(-O-P(S)(S⁻)-O-)

[0686] /5SpC3/在反义寡核苷酸5'末端基团的-O-P(O)(O⁻)OC_3H_6OH

[0687] /3SpC3/在反义寡核苷酸3'末端基团的-O-P(O)(O⁻)OC_3H_6OH

[0688] /5SpC3s/在反义寡核苷酸5'末端基团的-O-P(O)(S⁻)OC_3H_6OH

[0689] /3SpC3s/在反义寡核苷酸3'末端基团的-O-P(O)(S⁻)OC_3H_6OH

[0690] 粗体核苷酸是LNA核苷酸

[0691] 非粗体核苷酸是非LNA核苷酸

[0692] Gapmer序列

[0693] 表2至表9中更优选表4至9中列出的以下的gapmer形式的反义寡核苷酸形式是特别优选的。

[0694] 表2

[0695]

SP	L	Seq ID No.	序列 5'-3'
89	17	102b	**GbsCbsGbsAb**sdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsdCs**TbsCbsAbsAb**
90	15	103b	**CbsGbsAb**sdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsdCs**TbsCbsAb**
90	16	104b	**GbsCbsGb**sdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAsdCs**TbsCbsAb**
90	17	105b	**CbsGbsCbsGb**sdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAs**CbsTbsCbsAb**
91	14	106b	**CbsGbsAb**sdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAs**CbsTbsCb**
91	16	107b	**CbsGbsCb**sdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCsdAs**CbsTbsCb**
91	17	108b	**GbsCbsGbsCb**sdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCs**AbsCbsTbsCb**
92	14	109b	**GbsCbsGb**sdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCs**AbsCbsTb**
92	16	110b	**GbsCbsGb**sdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCs**AbsCbsTb**
92	17	111b	**CbsGbsCbsGb**sdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTs**CbsAbsCbsTb**
93	12	112b	**CbsGb**sdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCs**AbsCb**
93	13	113b	**GbsCbsGb**sdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTsdCs**AbsCb**
93	14	114b	**CbsGbsCb**sdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTs**CbsAbsCb**
93	16	115b	**CbsGbsCb**sdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTs**CbsAbsCb**
93	17	116b	**GbsCbsGbsCb**sdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCs**TbsCbsAbsCb**
94	13	117b	**CbsGbsCb**sdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCsdTs**CbsAb**
94	14	118b	**GbsCbsGb**sdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCs**TbsCbsAb**
94	15	119b	**CbsGbsCb**sdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCs**TbsCbsAb**
94	16	120b	**GbsCbsGb**sdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAsdCs**TbsCbsAb**
94	17	121b	**TbsGbsCbsGb**sdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAs**CbsTbsCbsAb**
95	14	122b	**CbsGbsCb**sdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAs**CbsTbsCb**
95	16	123b	**TbsGbsCb**sdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAs**CbsTbsCb**
95	17	124b	**GbsTbsGbsCb**sdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGs**AbsCbsTbsCb**
96	13	125b	**CbsGbsCb**sdGsdCsdGsdAsdGsdTsdGsdAs**CbsTb**
97	14	126b	**TbsGbsCb**sdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTs**GbsAbsCb**
97	16	127b	**CbsGbsTb**sdGsdCsdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTs**GbsAbsCb**
98	13	128b	**TbsGbsCb**sdGsdCsdGsdCsdGsdAsdGsdTs**GbsAb**
107	16	129b	**GbsTbsCb**sdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsdGsdTs**GbsCbsGb**
108	15	130b	**GbsTbsCb**sdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsdGs**TbsGbsCb**
108	17	131b	**GbsTbsGbsTb**sdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCs**GbsTbsGbsCb**
109	13	132b	**TbsCbsGb**sdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCsdGs**TbsGb**

[0696]

109	15	133b	**TbsGbsTb**sdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCs**GbsTbsGb**
110	12	134b	**TbsCb**sdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCs**GbsTb**
110	13	135b	**GbsTbsCb**sdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCsdCs**GbsTb**
110	14	136b	**TbsGbsTb**sdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCs**CbsGbsTb**
110	15	137b	**GbsTbsGb**sdTsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCs**CbsGbsTb**
110	16	138b	**GbsGbsTb**sdGsdTsdCsdGsdTsdCsdGsdCsdTsdCs**CbsGbsTb**
351	16	139b	**CbsGbsTb**sdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsdGsdAs**GbsCbsCb**
351	12	140b	**AbsTb**sdAsdGsdAsdCsdCsdGsdAsdGs**CbsCb**
354	16	141b	**GbsCbsTb**sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCs**CbsGbsAb**
354	13	142b	**CbsGbsTb**sdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCs**GbsAb**
355	14	143b	**CbsTb**sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAs**CbsCbsGb**
355	14	143c	**CbsTbsCb**sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCs**CbsGb**
355	14	143d	**CbsTbsCb**sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAs**CbsCbsGb**
355	15	144b	**GbsCbsTb**sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAs**CbsCbsGb**
356	14	145b	**GbsCbsTb**sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGs**AbsCbsCb**
381	17	146b	**CbsAbsGbsCb**sdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCs**AbsTbsGbsGb**
382	16	147b	**CbsAbsGb**sdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCs**AbsTbsGb**
382	16	147c	**CbsAbsGb**sdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCs**AsTsG**
382	16	147d	**CbsAbsGb**sdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCs**CbsAbsTbsGb**
382	16	147e	**CbsAbsGbsCb**sdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCs**AbsTbsGb**
382	16	147f	**CbsAbsGbsCb**sdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCs**CbsAbsTbsGb**
383	14	148b	**AbsGb**sdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCs**CbsAbsTb**
383	14	148c	**AbsGbsCb**sdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCs**AbsTb**
383	14	148d	**AbsGbsCb**sdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCs**CbsAbsTb**
384	14	149	**CbsAbsGb**sdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCs**CbsCbsAb**
422	17	150b	**CbsGbsCbsGb**sdTsdCsdCsdAsdCsdAsdGsdGsdAs**CbsGbsAbsTb**
425	14	151b	**CbsGbsCb**sdGsdTsdCsdCsdAsdCsdAsdGs**GbsAbsCb**
429	15	152b	**CbsGbsAb**sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCs**AbsCbsAb**
429	15	152c	**CbsGbsAb**sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCs**CbsAbsCbsAb**
429	15	152d	**CbsGbsAbsTb**sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCs**AbsCbsAb**
432	12	155b	**CbsGb**sdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTs**CbsCb**
431	13	153b	**CbsGbsAb**sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCs**CbsAb**
431	13	153c	**CbsGb**sdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTs**CbsCbsAb**
431	16	154b	**TbsGbsGb**sdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTs**CbsCbsAb**
432	12	155c	**CbsGb**sdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCs**Cb**
432	12	155d	**Cb**sdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTs**CbsCb**
432	13	156b	**GbsCbsGb**sdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTs**CbsCb**
432	17	157b	**GbsCbsTbsGb**sdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCs**GbsTbsCbsCb**

[0697]

433	15	158b	**CbsTbsGb**sdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCs**GbsTbsCb**
433	12	159b	**GbsCb**sdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGs**TbsCb**
433	16	160b	**GbsCbsTb**sdGsdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCs**GbsTbsCb**
433	14	161b	**TbsGbsGb**sdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCs**GbsTbsCb**
434	12	164b	**GbsGb**sdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCs**GbsTb**
434	13	162b	**TbsGbsGb**sdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCs**GbsTb**
434	13	162c	**TbsGb**sdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGs**CbsGbsTb**
434	14	163b	**CbsTbsGb**sdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGs**CbsGbsTb**
435	13	165b	**CbsTbsGb**sdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGs**CbsGb**
435	12	166b	**TbsGb**sdGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGs**CbsGb**
437	17	167b	**AbsTbsCbsGb**sdTsdGsdCsdTsdGsdGsdCsdGsdAs**TbsAbsCbsGb**
449	16	168b	**CbsGbsTb**sdGsdCsdGsdGsdTsdGsdGsdGsdAsdTs**CbsGbsTb**
449	17	169b	**AbsCbsGbsTb**sdGsdCsdGsdGsdTsdGsdGsdGsdAs**TbsCbsGbsTb**
450	17	170b	**AbsAbsCbsGb**sdTsdGsdCsdGsdGsdTsdGsdGsdGs**AbsTbsCbsGb**
452	15	171b	**AbsAbsCb**sdGsdTsdGsdCsdGsdGsdTsdGsdGs**GbsAbsTb**
452	17	172b	**TbsGbsAbsAb**sdCsdGsdTsdGsdCsdGsdGsdTsdGs**GbsGbsAbsTb**
459	17	173b	**CbsGbsAbsCb**sdTsdTsdCsdTsdGsdAsdAsdCsdGs**TbsGbsCbsGb**
941	17	174b	**TbsTbsAbsAb**sdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsdCs**AbsGbsTbsAb**
941	16	175b	**TbsAbsAb**sdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGsdCsdAs**GbsTbsAb**
942	17	176b	**GbsTbsTbsAb**sdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGs**CbsAbsGbsTb**
943	15	177b	**TbsTbsAb**sdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGs**CbsAbsGb**
944	13	178b	**TbsAbsAb**sdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAsdGs**CbsAb**
945	12	179b	**TbsAb**sdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAs**GbsCb**
945	13	180b	**TbsTbsAb**sdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTsdAs**GbsCb**
946	12	181b	**TbsTb**sdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTs**AbsGb**
946	13	182b	**GbsTbsTb**sdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGsdTs**AbsGb**
946	15	183b	**CbsGbsGb**sdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGs**TbsAbsGb**
946	16	184b	**CbsCbsGb**sdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGs**TbsAbsGb**
947	14	185b	**CbsGbsGb**sdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGs**GbsTbsAb**
947	13	186b	**GbsGbsTb**sdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGsdGs**TbsAb**
947	15	187b	**CbsCbsGb**sdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGs**GbsTbsAb**
947	16	188b	**GbsCbsCb**sdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGs**GbsTbsAb**
947	17	189b	**TbsGbsCbsCb**sdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCs**GbsGbsTbsAb**
948	13	190b	**CbsGbsGb**sdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCsdGs**GbsTb**
949	13	191b	**CbsCbsGb**sdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGsdCs**GbsGb**
949	14	192b	**GbsCbsCb**sdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGs**CbsGbsGb**
949	15	193b	**TbsGbsCb**sdCsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGs**CbsGbsGb**
950	13	194b	**GbsCbsCb**sdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCsdGs**CbsGb**

[0698]

950	15	195b	**CbsTbsGb**sdCsdCsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCs**GbsCbsGb**
950	16	196b	**GbsCbsTb**sdGsdCsdCsdGsdGsdTsdTsdAsdAsdCs**GbsCbsGb**
1387	16	197b	**AbsTbsGb**sdCsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdAsdGsdGs**TbsAbsCb**
1392	13	198b	**AbsCbsAb**sdTsdGsdCsdCsdGsdCsdGsdTs**CbsAb**
1393	16	199b	**GbsAbsTb**sdGsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsdCs**GbsTbsCb**
1393	16	199c	**GbsAbsTb**sdGsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGs**CbsGbsTbsCb**
1393	16	199d	**GbsAbsTbsGb**sdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsdCs**GbsTbsCb**
1393	16	199e	**GbsAbsTbsGb**sdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGs**CbsGbsTbsCb**
1394	12	200b	**GbsAb**sdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGsdCs**GbsTb**
1394	15	201b	**GbsAbsTb**sdGsdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGs**CbsGbsTb**
1395	13	202b	**AbsTbsGb**sdAsdCsdAsdTsdGsdCsdCsdGs**CbsGb**
1805	17	203b	**TbsCbsCbsCb**sdGsdCsdAsdCsdCsdTsdTsdGsdGs**AbsAbsCbsCb**
1851	16	204b	**CbsGbsAb**sdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCsdAs**CbsGbsTb**
1851	17	205b	**TbsCbsGbsAb**sdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCs**AbsCbsGbsTb**
1852	15	206b	**CbsGbsAb**sdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCs**AbsCbsGb**
1852	16	207b	**TbsCbsGb**sdAsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAsdCs**AbsCbsGb**
1852	17	208b	**CbsTbsCbsGb**sdAsdTsdCsdTsdCsdTsdCsdAsdAs**CbsAbsCbsGb**
2064	16	209b	**GbsTb**sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAbs**GbsCb**
2064	16	209c	**GbsTbsAbsGb**sdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**AbsGbsCb**
2064	16	209d	**GbsTbsAb**sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**AbsGbsCb**
2064	16	209e	**GbsTbsAb**sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAs**GbsCb**
2064	16	209f	**GbsTbsAb**sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGs**GbsAbsGbsCb**
2064	16	209g	**GbsTbsAbsGb**sdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGs**GbsAbsGbsCb**
2064	16	209h	**GbsTb**sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**AbsGbsCb**
2064	16	209i	**GbsTbsAbsGbsTb**sdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGs**GbsAbsGbsCb**
2064	16	209j	**GbsTbsAbsGb**sdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGs**GbsGbsAbsGbsCb**
2064	16	209k	**GbsTbsAbsGbsTb**sdGsdTsdTsdTsdAsdGs**GbsGbsAbsGbsCb**
2072	16	210b	**GbsCb**sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**GbsTbsTb**
2072	16	210c	**GbsCbsTb**sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**TbsTb**
2072	16	210d	**GbsCbsTb**sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**GbsTbsTb**
2072	16	210e	**GbsCbsTbsAb**sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**GbsTbsTb**
2072	16	210f	**GbsCbsTb**sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs**TbsGbsTbsTb**
2072	16	210g	**GbsCbsTbsAb**sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs**TbsGbsTbsTb**
2284	15	211b	**AbsGbsCb**sdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsdTs**GbsAbsCb**
2284	15	211c	**AbsGbsCb**sdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAs**TbsGbsAbsCb**
2284	15	211d	**AbsGbsCbsTb**sdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsdTs**GbsAbsCb**
2285	14	212b	**AbsGb**sdCsdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAs**TbsGbsAb**
2285	14	212c	**AbsGbsCb**sdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAsdTs**GbsAb**

[0699]

2285	14	212d	**AbsGbsCb**sdTsdTsdAsdTsdCsdCsdTsdAs**TbsGbsAb**
2355	17	213b	**CbsAbsGb**sdGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**GbsTbsGb**
2355	17	213c	**CbsAbsGbsGb**sdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**GbsTbsGb**
2355	17	213d	**CbsAbsGb**sdGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**AbsGbsTbsGb**
2355	17	213e	**CbsAbsGbsGb**sdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**AbsGbsTbsGb**
4217	16	218d	**CbsAbsTb**sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**GbsTbsAb**
4217	16	218e	**CbsAbsTb**sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**AbsGbsTbsAb**
4217	16	218f	**CbsAbsTbsGb**sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**GbsTbsAb**
4217	16	218g	**CbsAbsTbsGb**sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**AbsGbsTbsAb**
4120	16	214	**CbsTbsAb**sdGsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTsdAs**TbsGbsCb**
4121	14	215b	**TbsAbsGb**sdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTs**AbsTbsGb**
4121	15	216b	**CbsTbsAb**sdGsdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTs**AbsTbsGb**
4122	13	217b	**TbsAbsGb**sdGsdCsdGsdCsdCsdTsdCsdTs**AbsTb**

[0700] 表3

SP	L	Seq ID No.	序列 5'-3'
2064	16	209m	**GbsTbsAbsGb**sdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**AbsGbsC*b**
2064	16	209n	**GbsTbsAb**sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**AbsGbsC*b**
2064	16	209o	**GbsTbsAb**sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAs**GbsC*b**
2064	16	209p	**GbsTbsAb**sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGs**GbsAbsGbsC*b**
2064	16	209q	**GbsTbsAbsGb**sdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGs**GbsAbsGbsC*b**
2064	16	209r	**GbsTb**sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**AbsGbsC*b**
429	15	152e	**C*bsGbsAbsTb**sdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sdC*s**AbsC*bsAb**
4217	16	-218j	**C*bsAbsTb**sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**AbsGbsTbsAb**
2355	17	213f	**C*bsAbsGb**sdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**AbsGbsTbsGb**
2355	17	213g	**C*bsAbsGb**sdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**GbsTbsGb**
432	12	155e	**C*bsGb**sdAsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTs**C*bsC*b**
4217	16	218h	**C*bsAbsTbsGb**sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**AbsGbsTbsAb**
2072	16	210h	**GbsC*bsTbsAb**sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**GbsTbsTb**
2072	16	210i	**GbsC*b**sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**GbsTbsTb**
432	12	155f	**C*bsGb**sdAsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*s**C*b**
2072	16	210j	**GbsC*bsTb**sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**TbsTb**
432	12	155g	**C*b**sdGsdAsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTs**C*bsC*b**
431	13	153d	**C*bsGbsAb**sdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*s**C*bsAb**
429	15	152f	**C*bsGbsAb**sdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sdC*s**AbsC*bsAb**
4217	16	218i	**C*bsAbsTbsGb**sdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAs**GbsTbsAb**
1393	16	199f	**GbsAbsTb**sdGsdAsdC*sdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsdC*s**GbsTbsC*b**
2285	14	212e	**AbsGbsC*b**sdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsdTs**GbsAb**
355	14	143e	**C*bsTb**sdC*sdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAs**C*bsC*bsGb**

[0702]

2072	16	210k	**GbsC*bsTb**sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**GbsTbsTb**
1393	16	199g	**GbsAbsTb**sdGsdAsdC*sdAsdTsdGsdC*sdC*sdGs**C*bsGbsTbsC*b**
2355	17	213h	**C*bsAbsGbsGb**sdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**AbsGbsTbsGb**
429	15	152g	**C*bsGbsAb**sdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*s**C*bsAbsC*bsAb**
2285	14	212f	**AbsGbsC*b**sdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAs**TbsGbsAb**
355	14	143f	**C*bsTbsC*b**sdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAs**C*bsC*bsGb**
1393	16	199h	**GbsAbsTbsGb**sdAsdC*sdAsdTsdGsdC*sdC*sdGs**C*bsGbsTbsC*b**
1393	16	199i	**GbsAbsTbsGb**sdAsdC*sdAsdTsdGsdC*sdC*sdGsdC*s**GbsTbsC*b**
4217	16	218k	**C*bsAbsTb**sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAs**GbsTbsAb**
2285	14	212g	**AbsGb**sdC*sdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAs**TbsGbsAb**
434	13	162d	**TbsGbsGb**sdC*sdGsdAsdTsdAsdC*sdGsdC*s**GbsTb**
383	14	148e	**AbsGbsC*b**sdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sdC*s**AbsTb**
431	13	153e	**C*bsGb**sdAsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTs**C*bsC*bsAb**
2284	15	211e	**AbsGbsC*b**sdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsdTs**GbsAbsC*b**
355	14	143g	**C*bsTbsC*b**sdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsdC*s**C*bsGb**
2284	15	211f	**AbsGbsC*b**sdTsdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAs**TbsGbsAbsC*b**
383	14	148f	**AbsGbsC*b**sdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*s**C*bsAbsTb**
383	14	148g	**AbsGb**sdC*sdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*s**C*bsAbsTb**
382	16	147g	**C*bsAbsGb**sdC*sdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sdC*s**AbsTbsGb**
2072	16	210m	**GbsC*bsTb**sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs**TbsGbsTbsTb**
2072	16	210n	**GbsC*bsTbsAb**sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs**TbsGbsTbsTb**
434	13	162e	**TbsGb**sdGsdC*sdGsdAsdTsdAsdC*sdGs**C*bsGbsTb**
2284	15	211g	**AbsGbsC*bsTb**sdTsdAsdTsdC*sdC*sdTsdAsdTs**GbsAbsC*b**
382	16	147h	**C*bsAbsGb**sdC*sdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*s**C*bsAbsTbsGb**
382	16	147i	**C*bsAbsGbsC*b**sdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sdC*s**AbsTbsGb**
382	16	147j	**C*bsAbsGb**sdC*sdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*sdC*s**AbsTbsGb**
2355	17	213i	**C*bsAbsGbsGb**sdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**GbsTbsGb**
382	16	147k	**C*bsAbsGbsC*b**sdC*sdC*sdC*sdC*sdGsdAsdC*sdC*s**C*bsAbsTbsGb**

[0703] 优选的反义寡核苷酸

[0704] 下面公开了本发明的优选反义寡核苷酸。

[0705] 因此，本发明优选涉及由10至28个核苷酸，优选11至24个核苷酸，更优选12至20个，更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，以及在5'末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3'末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸，并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在至少6个，优选7个，更优选8个DNA核苷酸的序列，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^1-GTCATAGA-N^2-3'(Seq.ID No.12)或5'-N^3-ACGCGTCC-N^4-3'(Seq.ID No.98)或5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3'(Seq.ID No.10)或5'-N^5-TTTGGTAG-N^6-3'(Seq.ID No.11)或5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'(Seq.ID No.100)或5'-N^9-ATTAATAA-N^{10}-3'(Seq.ID No.101)表示，其中

[0706] N^1表示：CATGGCAGACCCCGCTGCTC-，ATGGCAGACCCCGCTGCTC-，TGGCAGACCCCGCTGCTC-，GGCAGACCCCGCTGCTC-，GCAGACCCCGCTGCTC-，CAGACCCCGCTGCTC-，AGACCCCGCTGCTC-，GACCCCGCTGCTC-，ACCCCGCTGCTC-，CCCCGCTGCTC-，CCCGCTGCTC-，

CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-；

[0707] N^2表示:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-C CGAGCCC,-CCGAGCCCC,-CCGAGCCCCC,-CCGAGCCCCCA,-CCGAGCCCCCAG,-CCGAGCCCCCAGC,-CCGAGCCCCCAGC G,-CCGAGCCCCCAGCGC,-CCGAGCCCCCAGCGCA,-CCGAG CCCCCAGCGCAG,-CCGAGCCCCCAGCGCAGC,-CCGAGCCCC CAGCGCAGCG,或-CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG；

[0708] N^3表示:GGTGGGATCGTGCTGGCGAT-,GTGGGATCGTGCTGGCGAT-,TGGGATCGTGCTGGCGAT-,GGGATCGTGCTGGCGAT-,GGATCGTGCTGGCGAT-,GATCGTGCTGGCGAT-,ATCGTGCTGGCGAT-,TCGTGCTGGCGAT-,CGTGCTGGCGAT-,GTGCTGGCGAT-,TGCTGGCGAT-,GCTGGCGAT-,CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-；

[0709] N^4表示:-ACAGGACGATGTGCAGCGGC,-ACAGGACGATGTGCAGCGG,-ACAGGACGATGTGCAGCG,-ACAGGACGATGTGCAGC,-ACAGGACGATGTGCAG,-ACAGGACGATGTGCA,-ACAGGACGATGTGC,-ACAGGACGATGTG,-ACAGGACGATGT,-ACAGGACGATG,-ACAGGACGAT,-ACAGGACGA,-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A；

[0710] N^5表示:GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,AGCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,GCCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CCTGCCCCAGAAGAGCTA-,CTGCCCCAGAAGAGCTA-,TGCCCCAGAAGAGCTA-,GCCCCAGAAGAGCTA-,CCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGAAGAGCTA-,CCAGAAGAGCTA-,CAGAAGAGCTA-,AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-；

[0711] N^6表示:-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGA,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGG,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAG,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTCA,-TGTTTAGGGAGCCGTCTTC,-TGTTTAGGGAGCCGTCTT,-TGTTTAGGGAGCCGTCT,-TGTTTAGGGAGCCGTC,-TGTTTAGGGAGCCGT,-TGTTTAGGGAGCCG,-TGTTTAGGGAGCC,-TGTTTAGGGAGC,-TGTTTAGGGAG,-TGTTTAGGGA,-TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T；

[0712] N^7表示:TGAATCTTGAATATCTCATG-,GAATCTTGAATATCTCATG-,AATCTTGAATATCTCATG-,ATCTTGAATATCTCATG-,TCTTGAATATCTCATG-,CTTGAATATCTCATG-,TTGAATATCTCATG-,TGAATATCTCATG-,GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-；

[0713] N^8表示:-AGTATTCTAGAAACTCACCA,-AGTATTCTAGAAACTCACC,-AGTATTCTAGAAACTCAC,-AGTATTCTAGAAACTCA,-AGTATTCTAGAAACTC,-AGTATTCTAGAAACT,-AGTATTCTAGAAAC,-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A；

[0714] N^9表示:ATTCATATTTATATACAGGC-,

[0715] TTCATATTTATATACAGGC-,TCATATTTATATACAGGC-,CATATTTATATACAGGC-,ATATTTATATACAGGC-,TATTTATATACAGGC-,ATTTATATACAGGC-,

[0716] TTTATATACAGGC-,TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,

[0717] ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-；

[0718] N^{10}表示:-AGTGCAAATGTTATTGGCTA,-AGTGCAAATGTTATTGGCT,-AGTGCAAATGTTATTGGC,-AGTGCAAATGTTATTGG,-AGTGCAAATGTTATTG,-AGTGCAAATGTTATT,-AGTGCAAATGTTAT,-AGTGCAAATGTTA,-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A;

[0719] N^{11}表示:TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,GCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CCAGAAGAGCTATTTGGTAG-,CAGAAGAGCTATTTGGTAG-,AGAAGAGCTATTTGGTAG-,GAAGAGCTATTTGGTAG-,AAGAGCTATTTGGTAG-,AGAGCTATTTGGTAG-,GAGCTATTTGGTAG-,AGCTATTTGGTAG-,GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-,

[0720] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC,

[0721] -GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCT,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTTC,-GAGCCGTCTTCAGGAATCTT,-GAGCCGTCTTCAGGAATCT,-GAGCCGTCTTCAGGAATC,-GAGCCGTCTTCAGGAAT,-GAGCCGTCTTCAGGAA,-GAGCCGTCTTCAGGA,-GAGCCGTCTTCAGG,-GAGCCGTCTTCAG,-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G;

[0722] 或其中N^{1}至N^{12}表示本文公开的任何限制性残基列表。

[0723] 此外,本发明优选涉及由10至28个核苷酸,优选11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3'末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在至少6个,优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^{1}-GTCATAGA-N^{2}-3'(Seq.ID No.12)表示,其中

[0724] N^{1}表示:GGCAGACCCCGCTGCTC-,GCAGACCCCGCTGCTC-,CAGACCCCGCTGCTC-,AGACCCCGCTGCTC-,GACCCCGCTGCTC-,ACCCCGCTGCTC-,CCCCGCTGCTC-,CCCGCTGCTC-,CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-;

[0725] N^{2}表示:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-CCGAGCCC,-CCGAGCCCC,-CCGAGCCCCC,-CCGAGCCCCCA,-CCGAGCCCCCAG,-CCGAGCCCCCAGC,-CCGAGCCCCCAGCG,-CCGAGCCCCCAGCGC,-CCGAGCCCCCAGCGCA,或-CCGAGCCCCCAGCGCAG。

[0726] N^{1}和/或N^{2}也可以表示本文公开的3'和5'残基的其它限制性列表中的任何一个。

[0727] 落入通式S1的gapmer反义寡核苷酸是特别优选的:

[0728] 5'-N^{1}-GTCATAGA-N^{2}-3'(Seq.ID No.12)S1

[0729] 这样的gapmer反义寡核苷酸是:

[0730] CCGCTGCTCGTCATAGAC(Seq.ID No.19)

[0731] CGCTGCTCGTCATAGACC(Seq.ID No.20)

[0732] GCTGCTCGTCATAGACCG(Seq.ID No.21)

[0733] CTGCTCGTCATAGACCGA(Seq.ID No.22)

[0734] TGCTCGTCATAGACCGAG(Seq.ID No.23)

[0735] GCTCGTCATAGACCGAGC(Seq.ID No.24)

[0736] CTCGTCATAGACCGAGCC(Seq.ID No.25)

[0737] TCGTCATAGACCGAGCCC(Seq.ID No.26)

[0738] CGTCATAGACCGAGCCCC(Seq.ID No.27)

[0739] CGCTGCTCGTCATAGAC(Seq.ID No.28)

[0740] GCTGCTCGTCATAGACC(Seq.ID No.29)

[0741] CTGCTCGTCATAGACCG(Seq.ID No.30)

[0742] TGCTCGTCATAGACCGA(Seq.ID No.31)

[0743] GCTCGTCATAGACCGAG(Seq.ID No.32)

[0744] CTCGTCATAGACCGAGC(Seq.ID No.33)

[0745] TCGTCATAGACCGAGCC(Seq.ID No.34)

[0746] CGTCATAGACCGAGCCC(Seq.ID No.35)

[0747] GCTGCTCGTCATAGAC(Seq.ID No.36)

[0748] CTGCTCGTCATAGACC(Seq.ID No.37)

[0749] TGCTCGTCATAGACCG(Seq.ID No.38)

[0750] GCTCGTCATAGACCGA(Seq.ID No.39)

[0751] CTCGTCATAGACCGAG(Seq.ID No.40)

[0752] TCGTCATAGACCGAGC(Seq.ID No.41)

[0753] CGTCATAGACCGAGCC(Seq.ID No.42)

[0754] CTGCTCGTCATAGAC(Seq.ID No.43)

[0755] TGCTCGTCATAGACC(Seq.ID No.44)

[0756] GCTCGTCATAGACCG(Seq.ID No.45)

[0757] CTCGTCATAGACCGA(Seq.ID No.46)

[0758] TCGTCATAGACCGAG(Seq.ID No.47)

[0759] CGTCATAGACCGAGC(Seq.ID No.48)

[0760] TGCTCGTCATAGAC(Seq.ID No.49)

[0761] GCTCGTCATAGACC(Seq.ID No.50)

[0762] CTCGTCATAGACCG(Seq.ID No.51)

[0763] TCGTCATAGACCGA(Seq.ID No.52)

[0764] CGTCATAGACCGAG(Seq.ID No.53)

[0765] 以gapmer形式(LNA区段1-DNA区段-LNA区段2)的式S1的反义寡核苷酸包含5'末端的LNA区段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且包含在3'末端的LNA片段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且在两个LNA区段之间包含一个DNA区段,其由6至14个,优选7至12个,更优选8至11个DNA单元组成。

[0766] 式S1的反义寡核苷酸含有本文公开的LNA核苷酸(LNA单元),特别是在"锁核酸(LNA®)"章节中公开的那些,优选在"优选的LNA"章节中公开的那些。LNA单元和DNA单元可以包含标准核碱基,例如腺嘌呤(A),胞嘧啶(C),鸟嘌呤(G),胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U),但也可以含有修饰的核碱基,如"核碱基"章节中公开的。式S1的反义寡核苷酸或反义寡核苷酸的LNA片段和DNA片段可以包含本文公开的任何核苷酸间键联,特别是在"核苷酸

间键联(IL)”章节中公开的那些。式S1的反义寡核苷酸还可以任选地在3’末端和/或5’末端含有末端基团,特别是在“末端基团”章节中公开的那些。

[0767] 实验已经显示,在测试的神经和肿瘤学适应症方面,修饰的核碱基不显著增加或改变本发明的反义寡核苷酸的活性。已经证明修饰的核碱基5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤进一步增加式S1的反义寡核苷酸的活性,特别是如果仅在LNA核苷酸中或在LNA核苷酸和DNA核苷酸中使用5-甲基胞嘧啶时和/或者如果在DNA核苷酸中而不是在LNA核苷酸中使用2-氨基腺嘌呤时。

[0768] 式S1的反义寡核苷酸的优选的gapmer结构如下:3-8-3,4-8-2,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3,更优选的3-8-3,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,3-10-4,4-10-3,4-10-4,和4-11-3。

[0769] 式S1的反义寡核苷酸的LNA单元,特别是β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-ENA(b^5),β-D-(NH)-LNA(b^6),β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9)是优选的。实验已经显示,所有这些LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6,b^7,b^8和b^9可以以所需的努力合成并导致具有可比较的稳定性和活性的反义寡核苷酸。然而,基于实验,更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6和b^7。更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^6和b^7,甚至更优选的是LNA单元b^1和b^4,关于化学合成的复杂性最优选的是β-D-氧基-LNA(b^1)。

[0770] 到目前为止,没有发现特别的3’末端基团或5’末端基团显著地改变或增加了关于肿瘤学或神经病学适应症的稳定性或活性,以使得3’和5’末端基团是可能的,但不是明确优选的。

[0771] 各种核苷酸间桥或核苷酸间键联是可能的。在本文公开的式中,核苷酸间键联IL由-IL’-Y-表示。因此,IL=-IL’-Y-=-X”-P(=X’)(X^-)-Y-,其中IL优选选自:

[0772] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-。优选的是选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,最优选选自-O-P(O)(O^-)-O-和-O-P(O)(S^-)-O-的核苷酸间键联IL。

[0773] 因此,本发明优选涉及由10至28个核苷酸,优选11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5’末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3’末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5’末端和3’末端的LNA核苷酸之间存在至少6个,优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5’-N^1-GTCATAGA-N^2-3’(Seq.ID No.12)表示,其中

[0774] N^1表示:GGCAGACCCCGCTGCTC-,GCAGACCCCGCTGCTC-,CAGACCCCGCTGCTC-,AGACCCCGCTGCTC-,GACCCCGCTGCTC-,ACCCCGCTGCTC-,CCCCGCTGCTC-,CCCGCTGCTC-,CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-;

[0775] N^2表示:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-CCGAGCCC,-CCGAGCCCC,-CCGAGCCCCC,-CCGAGCCCCCA,-CCGAGCCCCCAG,-CCGAGCCCCCAGC,-CCGAGCCCCCAGCG,-CCGAGCCCCCAGCGC,-CCGAGCCCCCAGCGCA,或-CCGAGCCCCCAGCGCAG;和

[0776] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-ENA(b^5),β-D-(NH)-LNA(b^6),β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9);和优选选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7)和

[0777] 核苷酸间键联选自

[0778] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)($NH(CH_3)$)-O-,-O-P(O)[$N(CH_3)_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-$N(CH_3)$-,-$N(CH_3)$-P(O)(O^-)-O-;

[0779] 并且优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[0780] 更优选N^1表示:CAGACCCCGCTGCTC-,AGACCCCGCTGCTC-,GACCCCGCTGCTC-,ACCCCGCTGCTC-,CCCCGCTGCTC-,CCCGCTGCTC-,CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-;和

[0781] N^2表示:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-CCGAGCCC,-CCGAGCCCC,-CCGAGCCCCC,-CCGAGCCCCCA,-CCGAGCCCCCAG,-CCGAGCCCCCAGC,-CCGAGCCCCCAGCG,或-CCGAGCCCCCAGCGC。

[0782] 进一步优选的是,本发明涉及由11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的2至5个核苷酸和反义寡核苷酸的3'末端的2至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^1-GTCATAGA-N^2-3'(Seq.ID No.12),其中

[0783] N^1表示:ACCCCGCTGCTC-,CCCCGCTGCTC-,CCCGCTGCTC-,CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-;优选N^1表示:CCCGCTGCTC-,CCGCTGCTC-,CGCTGCTC-,GCTGCTC-,CTGCTC-,TGCTC-,GCTC-,CTC-,TC-,或C-;和

[0784] N^2表示:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-CCGAGCCC,-CCGAGCCCC,或-CCGAGCCCCC,-CCGAGCCCCCA,或-CCGAGCCCCCAG;优选N^2表示:-C,-CC,-CCG,-CCGA,-CCGAG,-CCGAGC,-CCGAGCC,-CCGAGCCC,-CCGAGCCCC,或-CCGAGCCCCC;

[0785] 并且LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7);和

[0786] 核苷酸间键联选自

[0787] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-;优选选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[0788] 特别优选的是Seq.ID No.19至Seq.ID No.53的gapmer反义寡核苷酸,其包含在3'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在5'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在LNA单元的两个区段之间的至少6个,优选7个,更优选8个DNA单元的区段,其中LNA单元选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),核苷酸间键联选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以在LNA单元优选所有LNA单元中含有5-甲基胞嘧啶作为修饰的核碱基,和/或在一些或所有DNA单元中含有2-氨基腺嘌呤和/或在一些或所有DNA单元中含有5-甲基胞嘧啶。

[0789] 特别优选的是表4的gapmer反义寡核苷酸(Seq.ID No.232a至244b)。

[0790] 此外,本发明优选涉及由10至28个核苷酸,优选11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3'末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在至少6个,优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^3-ACGCGTCC-N^4-3'(Seq.ID No.98)表示,其中

[0791] N^3表示:GGGATCGTGCTGGCGAT-,GGATCGTGCTGGCGAT-,GATCGTGCTGGCGAT-,ATCGTGCTGGCGAT-,TCGTGCTGGCGAT-,CGTGCTGGCGAT-,GTGCTGGCGAT-,TGCTGGCGAT-,GCTGGCGAT-,CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-;

[0792] N^4表示:-ACAGGACGATGTGCAGC,-ACAGGACGATGTGCAG,-ACAGGACGATGTGCA,-ACAGGACGATGTGC,-ACAGGACGATGTG,-ACAGGACGATGT,-ACAGGACGATG,-ACAGGACGAT,-ACAGGACGA,-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A。

[0793] N^3和/或N^4也可以表示本文公开的3'和5'残基的另外限制性列表中的任何一个。

[0794] 落入通式S2的gapmer反义寡核苷酸是特别优选的:

[0795] 5'-N^3-ACGCGTCC-N^4-3'(Seq.ID No.98)S2

[0796] 这样的gapmer反义寡核苷酸是:

[0797] GCTGGCGATACGCGTCCA(Seq.ID No.54)

[0798] CTGGCGATACGCGTCCAC(Seq.ID No.55)

[0799] TGGCGATACGCGTCCACA(Seq.ID No.56)

[0800] GGCGATACGCGTCCACAG(Seq.ID No.57)

[0801] GCGATACGCGTCCACAGG(Seq.ID No.58)

[0802] CGATACGCGTCCACAGGA(Seq.ID No.59)

[0803] GATACGCGTCCACAGGAC(Seq.ID No.60)

[0804] ATACGCGTCCACAGGACG(Seq.ID No.61)

[0805] TACGCGTCCACAGGACGA(Seq.ID No.62)

[0806] CTGGCGATACGCGTCCA(Seq.ID No.63)

[0807] TGGCGATACGCGTCCAC(Seq.ID No.64)

[0808] GGCGATACGCGTCCACA(Seq.ID No.65)

[0809] GCGATACGCGTCCACAG(Seq.ID No.66)

[0810] CGATACGCGTCCACAGG(Seq.ID No.67)

[0811] GATACGCGTCCACAGGA(Seq.ID No.68)

[0812] ATACGCGTCCACAGGAC(Seq.ID No.349)

[0813] TACGCGTCCACAGGACG(Seq.ID No.350)

[0814] TGGCGATACGCGTCCA(Seq.ID No.351)

[0815] GGCGATACGCGTCCAC(Seq.ID No.352)

[0816] GCGATACGCGTCCACA(Seq.ID No.353)

[0817] CGATACGCGTCCACAG(Seq.ID No.354)

[0818] GATACGCGTCCACAGG(Seq.ID No.355)

[0819] ATACGCGTCCACAGGA(Seq.ID No.356)

[0820] TACGCGTCCACAGGAC(Seq.ID No.357)

[0821] GGCGATACGCGTCCA(Seq.ID No.358)

[0822] GCGATACGCGTCCAC(Seq.ID No.359)

[0823] CGATACGCGTCCACA(Seq.ID No.360)

[0824] GATACGCGTCCACAG(Seq.ID No.361)

[0825] ATACGCGTCCACAGG(Seq.ID No.362)

[0826] TACGCGTCCACAGGA(Seq.ID No.363)

[0827] GCGATACGCGTCCA(Seq.ID No.364)

[0828] CGATACGCGTCCAC(Seq.ID No.365)

[0829] GATACGCGTCCACA(Seq.ID No.366)

[0830] ATACGCGTCCACAG(Seq.ID No.367)

[0831] TACGCGTCCACAGG(Seq.ID No.368)

[0832] 以gapmer形式(LNA区段1-DNA区段-LNA区段2)的式S2的反义寡核苷酸包含5'末端的LNA区段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且包含在3'末端的LNA片段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且在两个LNA区段之间包含一个DNA区段,其由6至14个,优选7至12个,更优选8至11个DNA单元组成。

[0833] 式S2的反义寡核苷酸含有本文公开的LNA核苷酸(LNA单元),特别是在"锁核酸(LNA®)"章节中公开的那些,优选在"优选的LNA"章节中公开的那些。LNA单元和DNA单元可以包含标准核碱基,例如腺嘌呤(A),胞嘧啶(C),鸟嘌呤(G),胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U),但也可以含有修饰的核碱基,如"核碱基"章节中公开的。式S2的反义寡核苷酸或反义寡核苷酸的LNA片段和DNA片段可以包含本文公开的任何核苷酸间键联,特别是在"核苷酸

间键联(IL)”章节中公开的那些。式S2的反义寡核苷酸还可以任选地在3’末端和/或5’末端含有末端基团,特别是在“末端基团”章节中公开的那些。

[0834] 实验已经显示,在测试的神经和肿瘤学适应症方面,修饰的核碱基不显著增加或改变本发明的反义寡核苷酸的活性。已经证明修饰的核碱基5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤进一步增加式S2的反义寡核苷酸的活性,特别是如果仅在LNA核苷酸中或在LNA核苷酸和DNA核苷酸中使用5-甲基胞嘧啶时和/或者如果在DNA核苷酸中而不是在LNA核苷酸中使用2-氨基腺嘌呤时。

[0835] 式S2的反义寡核苷酸的优选的gapmer结构如下:3-8-3,4-8-2,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3,更优选的:3-8-3,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,3-10-4,4-10-3,4-10-4,3-11-4,和4-11-3。

[0836] 式S2的反义寡核苷酸的LNA单元,特别是β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-ENA(b^5),β-D-(NH)-LNA(b^6),β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9)是优选的。实验已经显示,所有这些LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6,b^7,b^8和b^9可以以所需的努力合成并导致具有可比较的稳定性和活性的反义寡核苷酸。然而,基于实验,更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6和b^7。更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^6和b^7,甚至更优选的是LNA单元b^1和b^4,关于化学合成的复杂性最优选的是β-D-氧基-LNA(b^1)。

[0837] 到目前为止,没有发现特别的3’末端基团或5’末端基团显著地改变或增加了关于肿瘤学或神经病学适应症的稳定性或活性,以使得3’和5’末端基团是可能的,但不是明确优选的。

[0838] 各种核苷酸间桥或核苷酸间键联是可能的。在本文公开的式中,核苷酸间键联IL由-IL’-Y-表示。因此,IL=-IL’-Y-=-X”-P(=X’)(X^-)-Y-,其中IL优选选自:

[0839] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-。优选的是选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,最优选选自-O-P(O)(O^-)-O-和-O-P(O)(S^-)-O-的核苷酸间键联IL。

[0840] 因此,本发明优选涉及由10至28个核苷酸,优选11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5’末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3’末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5’末端和3’末端的LNA核苷酸之间存在至少6个,优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5’-N^3-ACGCGTCC-N^4-3’(Seq.ID No.98)表示,其中

[0841] N^3表示:GGGATCGTGCTGGCGAT-,GGATCGTGCTGGCGAT-,GATCGTGCTGGCGAT-,ATCGTGCTGGCGAT-,TCGTGCTGGCGAT-,CGTGCTGGCGAT-,GTGCTGGCGAT-,TGCTGGCGAT-,GCTGGCGAT-,CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-;和

[0842] N^4表示:-ACAGGACGATGTGCAGC,-ACAGGACGATGTGCAG,-ACAGGACGATGTGCA,-ACAGGACGATGTGC,-ACAGGACGATGTG,-ACAGGACGATGT,-ACAGGACGATG,-ACAGGACGAT,-ACAGGACGA,-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A,和

[0843] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-ENA(b^5),β-D-(NH)-LNA(b^6),β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9);和优选选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7)和

[0844] 核苷酸间键联选自

[0845] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)($NH(CH_3)$)-O-,-O-P(O)[$N(CH_3)_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-$N(CH_3)$-,-$N(CH_3)$-P(O)(O^-)-O-;

[0846] 并且优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[0847] 更优选N^3表示:GATCGTGCTGGCGAT-,ATCGTGCTGGCGAT-,TCGTGCTGGCGAT-,CGTGCTGGCGAT-,GTGCTGGCGAT-,TGCTGGCGAT-,GCTGGCGAT-,CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-;和

[0848] N^4表示:-ACAGGACGATGTGCA,-ACAGGACGATGTGC,-ACAGGACGATGTG,-ACAGGACGATGT,-ACAGGACGATG,-ACAGGACGAT,-ACAGGACGA,-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A。

[0849] 进一步优选的是,本发明涉及由11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的2至5个核苷酸和反义寡核苷酸的3'末端的2至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^3-ACGCGTCC-N^4-3'(Seq.ID No.98),其中

[0850] N^3表示:CGTGCTGGCGAT-,GTGCTGGCGAT-,TGCTGGCGAT-,GCTGGCGAT-,CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-;优选N^3表示:TGCTGGCGAT-,GCTGGCGAT-,CTGGCGAT-,TGGCGAT-,GGCGAT-,GCGAT-,CGAT-,GAT-,AT-,或T-;

[0851] 和

[0852] N^4表示:-ACAGGACGATGT,-ACAGGACGATG,-ACAGGACGAT,-ACAGGACGA,-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A;优选N^4表示:-ACAGGACGAT,-

ACAGGACGA,-ACAGGACG,-ACAGGAC,-ACAGGA,-ACAGG,-ACAG,-ACA,-AC,或-A;和

[0853] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7)和

[0854] 核苷酸间键联选自

[0855] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-;优选选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[0856] 特别优选的是Seq.ID No.54至Seq.ID No.68和Seq.ID No.349至Seq.ID No.368的gapmer反义寡核苷酸,其包含在3'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在5'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在LNA单元的两个区段之间的至少6个,优选7个,更优选8个DNA单元的区段,其中LNA单元选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),核苷酸间键联选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以在LNA单元优选所有LNA单元中含有5-甲基胞嘧啶作为修饰的核碱基,和/或在一些或所有DNA单元中含有2-氨基腺嘌呤和/或在一些或所有DNA单元中含有5-甲基胞嘧啶。

[0857] 还特别优选的是表5的gapmer反义寡核苷酸(Seq.ID No.245a至257b)。

[0858] 此外,本发明优选涉及由10至28个核苷酸,优选11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3'末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在至少6个,优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3'(Seq.ID No.10)表示,其中

[0859] N^{11}表示:GAAGAGCTATTTGGTAG-,AAGAGCTATTTGGTAG-,AGAGCTATTTGGTAG-,GAGCTATTTGGTAG-,AGCTATTTGGTAG-,GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-,

[0860] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCAGGAAT,-GAGCCGTCTTCAGGAA,-GAGCCGTCTTCAGGA,-GAGCCGTCTTCAGG,-GAGCCGTCTTCAG,-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G。

[0861] N^{11}和/或N^{12}也可以表示本文公开的3'和5'残基的另外限制性列表中的任何一个。

[0862] 落入通式S3的gapmer反义寡核苷酸是特别优选的:

[0863] 5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3'(Seq.ID No.10)S3

[0864] 这样的gapmer反义寡核苷酸是:

[0865] ATTTGGTAGTGTTTAGGG(Seq.ID No.369)

[0866] TTTGGTAGTGTTTAGGGA(Seq.ID No.370)

[0867] TTGGTAGTGTTTAGGGAG(Seq.ID No.371)

[0868] TGGTAGTGTTTAGGGAGC(Seq.ID No.372)

[0869] GGTAGTGTTTAGGGAGCC(Seq.ID No.373)

[0870] GTAGTGTTTAGGGAGCCG(Seq.ID No.374)

[0871] TAGTGTTTAGGGAGCCGT(Seq.ID No.375)

[0872] AGTGTTTAGGGAGCCGTC(Seq.ID No.376)

[0873] GTGTTTAGGGAGCCGTCT(Seq.ID No.377)

[0874] TTTGGTAGTGTTTAGGG(Seq.ID No.378)

[0875] TTGGTAGTGTTTAGGGA(Seq.ID No.379)

[0876] TGGTAGTGTTTAGGGAG(Seq.ID No.380)

[0877] GGTAGTGTTTAGGGAGC(Seq.ID No.381)

[0878] GTAGTGTTTAGGGAGCC(Seq.ID No.382)

[0879] TAGTGTTTAGGGAGCCG(Seq.ID No.383)

[0880] AGTGTTTAGGGAGCCGT(Seq.ID No.384)

[0881] GTGTTTAGGGAGCCGTC(Seq.ID No.385)

[0882] TTGGTAGTGTTTAGGG(Seq.ID No.386)

[0883] TGGTAGTGTTTAGGGA(Seq.ID No.387)

[0884] GGTAGTGTTTAGGGAG(Seq.ID No.388)

[0885] GTAGTGTTTAGGGAGC(Seq.ID No.389)

[0886] TAGTGTTTAGGGAGCC(Seq.ID No.390)

[0887] AGTGTTTAGGGAGCCG(Seq.ID No.391)

[0888] GTGTTTAGGGAGCCGT(Seq.ID No.392)

[0889] TGGTAGTGTTTAGGG(Seq.ID No.393)

[0890] GGTAGTGTTTAGGGA(Seq.ID No.394)

[0891] GTAGTGTTTAGGGAG(Seq.ID No.395)

[0892] TAGTGTTTAGGGAGC(Seq.ID No.396)

[0893] AGTGTTTAGGGAGCC(Seq.ID No.397)

[0894] GTGTTTAGGGAGCCG(Seq.ID No.398)

[0895] GGTAGTGTTTAGGG(Seq.ID No.399)

[0896] GTAGTGTTTAGGGA(Seq.ID No.400)

[0897] TAGTGTTTAGGGAG(Seq.ID No.401)

[0898] AGTGTTTAGGGAGC(Seq.ID No.402)

[0899] GTGTTTAGGGAGCC(Seq.ID No.403)

[0900] 以gapmer形式(LNA区段1-DNA区段-LNA区段2)的式S3的反义寡核苷酸包含5'末端的LNA区段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且包含在3'末端的LNA片段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且在两个LNA区段之间包含一个DNA区段,其由6至14个,优选7至12个,更优选8至11个DNA单元组成。

[0901] 式S3的反义寡核苷酸含有本文公开的LNA核苷酸(LNA单元),特别是在"锁核酸(LNA®)"章节中公开的那些,优选在"优选的LNA"章节中公开的那些。LNA单元和DNA单元可以包含标准核碱基,例如腺嘌呤(A),胞嘧啶(C),鸟嘌呤(G),胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U),但也可以含有修饰的核碱基,如"核碱基"章节中公开的。式S3的反义寡核苷酸或反义

寡核苷酸的LNA片段和DNA片段可以包含本文公开的任何核苷酸间键联，特别是在“核苷酸间键联(IL)”章节中公开的那些。式S3的反义寡核苷酸还可以任选地在3’末端和/或5’末端含有末端基团，特别是在“末端基团”章节中公开的那些。

[0902] 实验已经显示，在测试的神经和肿瘤学适应症方面，修饰的核碱基不显著增加或改变本发明的反义寡核苷酸的活性。已经证明修饰的核碱基5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤进一步增加式S3的反义寡核苷酸的活性，特别是如果仅在LNA核苷酸中或在LNA核苷酸和DNA核苷酸中使用5-甲基胞嘧啶时和/或者如果在DNA核苷酸中而不是在LNA核苷酸中使用2-氨基腺嘌呤时。

[0903] 式S3的反义寡核苷酸的优选的gapmer结构如下：3-8-3,4-8-2,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3，更优选的：3-8-3,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,3-10-4,4-10-3,4-10-4,3-11-4,和4-11-3。

[0904] 式S3的反义寡核苷酸的LNA单元，特别是β-D-氧基-LNA(b^1)，β-D-硫基-LNA(b^2)，α-L-氧基-LNA(b^4)，β-D-ENA(b^5)，β-D-(NH)-LNA(b^6)，β-D-(NCH_3)-LNA(b^7)，β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9)是优选的。实验已经显示，所有这些LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6,b^7,b^8和b^9可以以所需的努力合成并导致具有可比较的稳定性和活性的反义寡核苷酸。然而，基于实验，更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6和b^7。更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^6和b^7，甚至更优选的是LNA单元b^1和b^4，关于化学合成的复杂性最优选的是β-D-氧基-LNA(b^1)。

[0905] 到目前为止，没有发现特别的3’末端基团或5’末端基团显著地改变或增加了关于肿瘤学或神经病学适应症的稳定性或活性，以使得3’和5’末端基团是可能的，但不是明确优选的。

[0906] 各种核苷酸间桥或核苷酸间键联是可能的。在本文公开的式中，核苷酸间键联IL由-IL’-Y-表示。因此，IL＝-IL’-Y-＝-X”-P(＝X’)(X^-)-Y-，其中IL优选选自：

[0907] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-。优选的是选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-，更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-，更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-，最优选选自-O-P(O)(O^-)-O-和-O-P(O)(S^-)-O-的核苷酸间键联IL。

[0908] 因此，本发明优选涉及由10至28个核苷酸，优选11至24个核苷酸，更优选12至20个，更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，以及在5’末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3’末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸，并且在5’末端和3’末端的LNA核苷酸之间存在至少6个，优选7个，更优选8个DNA核苷酸的序列，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中反义寡核苷酸由以下序列5’-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3’

(Seq.ID No.10)表示,其中

[0909] N^{11}表示:GAAGAGCTATTTGGTAG-,AAGAGCTATTTGGTAG-,AGAGCTATTTGGTAG-,GAGCTATTTGGTAG-,AGCTATTTGGTAG-,GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-,

[0910] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCAGGAAT,-GAGCCGTCTTCAGGAA,-GAGCCGTCTTCAGGA,-GAGCCGTCTTCAGG,-GAGCCGTCTTCAG,-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G;

[0911] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-ENA(b^5),β-D-(NH)-LNA(b^6),β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9);和优选选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7);和

[0912] 核苷酸间键联选自

[0913] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-;

[0914] 和优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[0915] 更优选N^{11}表示:AGAGCTATTTGGTAG-,GAGCTATTTGGTAG-,AGCTATTTGGTAG-,GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-;和

[0916] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCAGGA,-GAGCCGTCTTCAGG,-GAGCCGTCTTCAG,-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G。

[0917] 进一步优选的是,本发明涉及由11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的2至5个核苷酸和反义寡核苷酸的3'末端的2至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^{11}-TGTTTAGG-N^{12}-3'(Seq.ID No.10)表示,其中

[0918] N^{11}表示:GCTATTTGGTAG-,CTATTTGGTAG-,TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-;优选N^{11}表示:TATTTGGTAG-,ATTTGGTAG-,TTTGGTAG-,TTGGTAG-,TGGTAG-,GGTAG-,GTAG-,TAG-,AG-或G-;和

[0919] N^{12}表示:-GAGCCGTCTTCA,-GAGCCGTCTTC,-GAGCCGTCTT,-GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G;优选N^{12}表示:-GAGCCGTCTT,-

GAGCCGTCT,-GAGCCGTC,-GAGCCGT,-GAGCCG,-GAGCC,-GAGC,-GAG,-GA,或-G;和

[0920] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7);和

[0921] 核苷酸间键联选自

[0922] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-;和优选选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[0923] 特别优选的是Seq.ID No.369至Seq.ID No.403的gapmer反义寡核苷酸,其包含在3'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在5'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在LNA单元的两个区段之间的至少6个,优选7个,更优选8个DNA单元的区段,其中LNA单元选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),核苷酸间键联选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以在LNA单元优选所有LNA单元中含有5-甲基胞嘧啶作为修饰的核碱基,和/或在一些或所有DNA单元中含有2-氨基腺嘌呤和/或在一些或所有DNA单元中含有5-甲基胞嘧啶。

[0924] 还特别优选的是表6的gapmer反义寡核苷酸(Seq.ID No.258a至270b)。

[0925] 此外,本发明优选涉及由10至28个核苷酸,优选11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3'末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在至少6个,优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^5-TTTGGTAG-N^6-3'(Seq.ID No.11)表示,其中

[0926] N^5表示:CTGCCCCAGAAGAGCTA-,TGCCCCAGAAGAGCTA-,GCCCCAGAAGAGCTA-,CCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGAAGAGCTA-,CCAGAAGAGCTA-,CAGAAGAGCTA-,AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;

[0927] N^6表示:-TGTTTAGGGAGCCGTCT,-TGTTTAGGGAGCCGTC,-TGTTTAGGGAGCCGT,-TGTTTAGGGAGCCG,-TGTTTAGGGAGCC,-TGTTTAGGGAGC,-TGTTTAGGGAG,-TGTTTAGGGA,-TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T。

[0928] N^5和/或N^6也可以表示本文公开的3'和5'残基的另外限制性列表中的任何一个。

[0929] 落入通式S4的gapmer反义寡核苷酸是特别优选的:

[0930] 5'-N^5-TTTGGTAG-N^6-3'(Seq.ID No.11)S4

[0931] 这样的gapmer反义寡核苷酸是:

[0932] GAAGAGCTATTTGGTAGT(Seq.ID No.404)

[0933] AAGAGCTATTTGGTAGTG(Seq.ID No.405)

[0934] AGAGCTATTTGGTAGTGT(Seq.ID No.406)

[0935] GAGCTATTTGGTAGTGTT(Seq.ID No.407)

[0936] AGCTATTTGGTAGTGTTT(Seq.ID No.408)

[0937] GCTATTTGGTAGTGTTTA(Seq.ID No.409)

[0938] CTATTTGGTAGTGTTTAG(Seq.ID No.410)

[0939] TATTTGGTAGTGTTTAGG(Seq.ID No.411)

[0940] ATTTGGTAGTGTTTAGGG(Seq.ID No.412)

[0941] AAGAGCTATTTGGTAGT(Seq.ID No.413)

[0942] AGAGCTATTTGGTAGTG(Seq.ID No.414)

[0943] GAGCTATTTGGTAGTGT(Seq.ID No.415)

[0944] AGCTATTTGGTAGTGTT(Seq.ID No.416)

[0945] GCTATTTGGTAGTGTTT(Seq.ID No.417)

[0946] CTATTTGGTAGTGTTTA(Seq.ID No.418)

[0947] TATTTGGTAGTGTTTAG(Seq.ID No.419)

[0948] ATTTGGTAGTGTTTAGG(Seq.ID No.420)

[0949] AGAGCTATTTGGTAGT(Seq.ID No.421)

[0950] GAGCTATTTGGTAGTG(Seq.ID No.422)

[0951] AGCTATTTGGTAGTGT(Seq.ID No.423)

[0952] GCTATTTGGTAGTGTT(Seq.ID No.424)

[0953] CTATTTGGTAGTGTTT(Seq.ID No.425)

[0954] TATTTGGTAGTGTTTA(Seq.ID No.426)

[0955] ATTTGGTAGTGTTTAG(Seq.ID No.427)

[0956] GAGCTATTTGGTAGT(Seq.ID No.428)

[0957] AGCTATTTGGTAGTG(Seq.ID No.429)

[0958] GCTATTTGGTAGTGT(Seq.ID No.430)

[0959] CTATTTGGTAGTGTT(Seq.ID No.431)

[0960] TATTTGGTAGTGTTT(Seq.ID No.432)

[0961] ATTTGGTAGTGTTTA(Seq.ID No.433)

[0962] AGCTATTTGGTAGT(Seq.ID No.434)

[0963] GCTATTTGGTAGTG(Seq.ID No.435)

[0964] CTATTTGGTAGTGT(Seq.ID No.436)

[0965] TATTTGGTAGTGTT(Seq.ID No.437)

[0966] ATTTGGTAGTGTTT(Seq.ID No.438)

[0967] 以gapmer形式(LNA区段1-DNA区段-LNA区段2)的式S4的反义寡核苷酸包含5'末端的LNA区段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且包含在3'末端的LNA片段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且在两个LNA区段之间包含一个DNA区段,其由6至14个,优选7至12个,更优选8至11个DNA单元组成。

[0968] 式S4的反义寡核苷酸含有本文公开的LNA核苷酸(LNA单元),特别是在"锁核酸(LNA®)"章节中公开的那些,优选在"优选的LNA"章节中公开的那些。LNA单元和DNA单元可以包含标准核碱基,例如腺嘌呤(A),胞嘧啶(C),鸟嘌呤(G),胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U),但也可以含有修饰的核碱基,如"核碱基"章节中公开的。式S4的反义寡核苷酸或反义寡核

苷酸的LNA片段和DNA片段可以包含本文公开的任何核苷酸间键联，特别是在“核苷酸间键联(IL)”章节中公开的那些。式S4的反义寡核苷酸还可以任选地在3’末端和/或5’末端含有末端基团，特别是在“末端基团”章节中公开的那些。

[0969] 实验已经显示，在测试的神经和肿瘤学适应症方面，修饰的核碱基不显著增加或改变本发明的反义寡核苷酸的活性。已经证明修饰的核碱基5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤进一步增加式S4的反义寡核苷酸的活性，特别是如果仅在LNA核苷酸中或在LNA核苷酸和DNA核苷酸中使用5-甲基胞嘧啶时和/或者如果在DNA核苷酸中而不是在LNA核苷酸中使用2-氨基腺嘌呤时。

[0970] 式S4的反义寡核苷酸的优选的gapmer结构如下：3-8-3,4-8-2,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3，更优选的：3-8-3,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,3-10-4,4-10-3,4-10-4,3-11-4,和4-11-3。

[0971] 式S4的反义寡核苷酸的LNA单元，特别是β-D-氧基-LNA(b^1)，β-D-硫基-LNA(b^2)，α-L-氧基-LNA(b^4)，β-D-ENA(b^5)，β-D-(NH)-LNA(b^6)，β-D-(NCH_3)-LNA(b^7)，β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9)是优选的。实验已经显示，所有这些LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6,b^7,b^8和b^9可以以所需的努力合成并导致具有可比较的稳定性和活性的反义寡核苷酸。然而，基于实验，更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6和b^7。更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^6和b^7，甚至更优选的是LNA单元b^1和b^4，关于化学合成的复杂性最优选的是β-D-氧基-LNA(b^1)。

[0972] 到目前为止，没有发现特别的3’末端基团或5’末端基团显著地改变或增加了关于肿瘤学或神经病学适应症的稳定性或活性，以使得3’和5’末端基团是可能的，但不是明确优选的。

[0973] 各种核苷酸间桥或核苷酸间键联是可能的。在本文公开的式中，核苷酸间键联IL由-IL’-Y-表示。因此，IL＝-IL’-Y-＝-X”-P(＝X’)(X^-)-Y-，其中IL优选选自：

[0974] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-。优选的是选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-，更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-，更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-，最优选选自-O-P(O)(O^-)-O-和-O-P(O)(S^-)-O-的核苷酸间键联IL。

[0975] 因此，本发明优选涉及由10至28个核苷酸，优选11至24个核苷酸，更优选12至20个，更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，以及在5’末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3’末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸，并且在5’末端和3’末端的LNA核苷酸之间存在至少6个，优选7个，更优选8个DNA核苷酸的序列，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中反义寡核苷酸由以下序列5’-N^5-TTTGGTAG-N^6-3’

(Seq.ID No.11)表示,其中

[0976] N^5表示:CTGCCCCAGAAGAGCTA-,TGCCCCAGAAGAGCTA-,GCCCCAGAAGAGCTA-,CCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGAAGAGCTA-,CCAGAAGAGCTA-,CAGAAGAGCTA-,AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;和

[0977] N^6表示:-TGTTTAGGGAGCCGTCT,-TGTTTAGGGAGCCGTC,-TGTTTAGGGAGCCGT,-TGTTTAGGGAGCCG,-TGTTTAGGGAGCC,-TGTTTAGGGAGC,-TGTTTAGGGAG,-TGTTTAGGGA,-TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T;和

[0978] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-ENA(b^5),β-D-(NH)-LNA(b^6),β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9);和优选选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7);和

[0979] 核苷酸间键联选自

[0980] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-;

[0981] 和优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[0982] 更优选N^5表示:GCCCCAGAAGAGCTA-,CCCCAGAAGAGCTA-,CCCAGAAGAGCTA-,CCAGAAGAGCTA-,CAGAAGAGCTA-,AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;和

[0983] N^6表示:-TGTTTAGGGAGCCGT,-TGTTTAGGGAGCCG,-TGTTTAGGGAGCC,-TGTTTAGGGAGC,-TGTTTAGGGAG,-TGTTTAGGGA,-TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T。

[0984] 进一步优选的是,本发明涉及由11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的2至5个核苷酸和反义寡核苷酸的3'末端的2至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^5-TTTGGTAG-N^6-3'(Seq.ID No.11)表示,其中

[0985] N^5表示:CCAGAAGAGCTA-,CAGAAGAGCTA-,AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;优选N^5表示:AGAAGAGCTA-,GAAGAGCTA-,AAGAGCTA-,AGAGCTA-,GAGCTA-,AGCTA-,GCTA-,CTA-,TA-,或A-;和

[0986] N^6表示:-TGTTTAGGGAGC,-TGTTTAGGGAG,-TGTTTAGGGA,-TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T;优选N^6表示:-TGTTTAGGGA,-

TGTTTAGGG,-TGTTTAGG,-TGTTTAG,-TGTTTA,-TGTTT,-TGTT,-TGT,-TG,或-T;和

[0987] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7);和

[0988] 核苷酸间键联选自

[0989] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-;和优选选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[0990] 特别优选的是Seq.ID No.404至Seq.ID No.438的gapmer反义寡核苷酸,其包含在3'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在5'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在LNA单元的两个区段之间的至少6个,优选7个,更优选8个DNA单元的区段,其中LNA单元选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),核苷酸间键联选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以在LNA单元优选所有LNA单元中含有5-甲基胞嘧啶作为修饰的核碱基,和/或在一些或所有DNA单元中含有2-氨基腺嘌呤和/或在一些或所有DNA单元中含有5-甲基胞嘧啶。

[0991] 还特别优选的是表7的gapmer反义寡核苷酸(Seq.ID No.271a至283b)。

[0992] 此外,本发明优选涉及由10至28个核苷酸,优选11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3'末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在至少6个,优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'(Seq.ID No.100),表示,其中

[0993] N^7表示:ATCTTGAATATCTCATG-,TCTTGAATATCTCATG-,CTTGAATATCTCATG-,TTGAATATCTCATG-,TGAATATCTCATG-,GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-;

[0994] N^8表示:-AGTATTCTAGAAACTCA,-AGTATTCTAGAAACTC,-AGTATTCTAGAAACT,-AGTATTCTAGAAAC,-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A。

[0995] N^7和/或N^8也可以表示本文公开的3'和5'残基的其它限制性列表中的任何一个。

[0996] 落入通式S6的gapmer反义寡核苷酸是特别优选的:

[0997] 5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'(Seq.ID No.100)S6

[0998] 这样的gapmer反义寡核苷酸是:

[0999] TATCTCATGAATGGACCA(Seq.ID No.439)

[1000] ATCTCATGAATGGACCAG(Seq.ID No.440)

[1001] TCTCATGAATGGACCAGT(Seq.ID No.441)

[1002] CTCATGAATGGACCAGTA(Seq.ID No.442)

[1003] TCATGAATGGACCAGTAT(Seq.ID No.443)

[1004] CATGAATGGACCAGTATT(Seq.ID No.444)

[1005] ATGAATGGACCAGTATTC(Seq.ID No.445)

[1006] TGAATGGACCAGTATTCT(Seq.ID No.446)

[1007] GAATGGACCAGTATTCTA(Seq.ID No.447)

[1008] ATCTCATGAATGGACCA(Seq.ID No.448)

[1009] TCTCATGAATGGACCAG(Seq.ID No.449)

[1010] CTCATGAATGGACCAGT(Seq.ID No.450)

[1011] TCATGAATGGACCAGTA(Seq.ID No.451)

[1012] CATGAATGGACCAGTAT(Seq.ID No.452)

[1013] ATGAATGGACCAGTATT(Seq.ID No.453)

[1014] TGAATGGACCAGTATTC(Seq.ID No.454)

[1015] GAATGGACCAGTATTCT(Seq.ID No.455)

[1016] TCTCATGAATGGACCA(Seq.ID No.456)

[1017] CTCATGAATGGACCAG(Seq.ID No.457)

[1018] TCATGAATGGACCAGT(Seq.ID No.458)

[1019] CATGAATGGACCAGTA(Seq.ID No.459)

[1020] ATGAATGGACCAGTAT(Seq.ID No.460)

[1021] TGAATGGACCAGTATT(Seq.ID No.461)

[1022] GAATGGACCAGTATTC(Seq.ID No.462)

[1023] CTCATGAATGGACCA(Seq.ID No.463)

[1024] TCATGAATGGACCAG(Seq.ID No.464)

[1025] CATGAATGGACCAGT(Seq.ID No.465)

[1026] ATGAATGGACCAGTA(Seq.ID No.466)

[1027] TGAATGGACCAGTAT(Seq.ID No.467)

[1028] GAATGGACCAGTATT(Seq.ID No.468)

[1029] TCATGAATGGACCA(Seq.ID No.469)

[1030] CATGAATGGACCAG(Seq.ID No.470)

[1031] ATGAATGGACCAGT(Seq.ID No.471)

[1032] TGAATGGACCAGTA(Seq.ID No.472)

[1033] GAATGGACCAGTAT(Seq.ID No.473)

[1034] 以gapmer形式(LNA区段1-DNA区段-LNA区段2)的式S6的反义寡核苷酸包含5'末端的LNA区段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且包含在3'末端的LNA片段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且在两个LNA区段之间包含一个DNA区段,其由6至14个,优选7至12个,更优选8至11个DNA单元组成。

[1035] 式S6的反义寡核苷酸含有本文公开的LNA核苷酸(LNA单元),特别是在"锁核酸(LNA®)"章节中公开的那些,优选在"优选的LNA"章节中公开的那些。LNA单元和DNA单元可以包含标准核碱基,例如腺嘌呤(A),胞嘧啶(C),鸟嘌呤(G),胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U),但也可以含有修饰的核碱基,如"核碱基"章节中公开的。式S6的反义寡核苷酸或反义

寡核苷酸的LNA片段和DNA片段可以包含本文公开的任何核苷酸间键联，特别是在“核苷酸间键联(IL)”章节中公开的那些。式S6的反义寡核苷酸还可以任选地在3’末端和/或5’末端含有末端基团，特别是在“末端基团”章节中公开的那些。

[1036] 实验已经显示，在测试的神经和肿瘤学适应症方面，修饰的核碱基不显著增加或改变本发明的反义寡核苷酸的活性。已经证明修饰的核碱基5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤进一步增加式S6的反义寡核苷酸的活性，特别是如果仅在LNA核苷酸中或在LNA核苷酸和DNA核苷酸中使用5-甲基胞嘧啶时和/或者如果在DNA核苷酸中而不是在LNA核苷酸中使用2-氨基腺嘌呤时。

[1037] 式S6的反义寡核苷酸的优选的gapmer结构如下：3-8-3,4-8-2,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3，更优选的：3-8-3,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,3-10-4,4-10-3,4-10-4,3-11-4,和4-11-3。

[1038] 式S6的反义寡核苷酸的LNA单元，特别是β-D-氧基-LNA(b^1)，β-D-硫基-LNA(b^2)，α-L-氧基-LNA(b^4)，β-D-ENA(b^5)，β-D-(NH)-LNA(b^6)，β-D-(NCH_3)-LNA(b^7)，β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9)是优选的。实验已经显示，所有这些LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6,b^7,b^8和b^9可以以所需的努力合成并导致具有可比较的稳定性和活性的反义寡核苷酸。然而，基于实验，更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6和b^7。更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^6和b^7，甚至更优选的是LNA单元b^1和b^4，关于化学合成的复杂性最优选的是β-D-氧基-LNA(b^1)。

[1039] 到目前为止，没有发现特别的3’末端基团或5’末端基团显著地改变或增加了关于肿瘤学或神经病学适应症的稳定性或活性，以使得3’和5’末端基团是可能的，但不是明确优选的。

[1040] 各种核苷酸间桥或核苷酸间键联是可能的。在本文公开的式中，核苷酸间键联IL由-IL’-Y-表示。因此，IL＝-IL’-Y-＝-X”-P(＝X’)(X^-)-Y-，其中IL优选选自：

[1041] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-。优选的是选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-，更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-，更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-，最优选选自-O-P(O)(O^-)-O-和-O-P(O)(S^-)-O-的核苷酸间键联IL。

[1042] 因此，本发明优选涉及由10至28个核苷酸，优选11至24个核苷酸，更优选12至20个，更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，以及在5’末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3’末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸，并且在5’末端和3’末端的LNA核苷酸之间存在至少6个，优选7个，更优选8个DNA核苷酸的序列，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中反义寡核苷酸由以下序列5’-N^7-AATGGACC-N^8-3’

(Seq.ID No.100)表示,其中

[1043] N^7表示:ATCTTGAATATCTCATG-,TCTTGAATATCTCATG-,CTTGAATATCTCATG-,TTGAATATCTCATG-,TGAATATCTCATG-,GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-;和

[1044] N^8表示:-AGTATTCTAGAAACTCA,-AGTATTCTAGAAACTC,-AGTATTCTAGAAACT,-AGTATTCTAGAAAC,-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A;和

[1045] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-ENA(b^5),β-D-(NH)-LNA(b^6),β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9);和优选选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7);和

[1046] 核苷酸间键联选自

[1047] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-;

[1048] 和优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[1049] 更优选N^7表示:CTTGAATATCTCATG-,TTGAATATCTCATG-,TGAATATCTCATG-,GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-;和

[1050] N^8表示:-AGTATTCTAGAAACT,-AGTATTCTAGAAAC,-AGTATTCTAGAAA,-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A。

[1051] 进一步优选的是,本发明涉及由11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的2至5个核苷酸和反义寡核苷酸的3'末端的2至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^7-AATGGACC-N^8-3'(Seq.ID No.100),其中

[1052] N^7表示:GAATATCTCATG-,AATATCTCATG-,ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-;优选N^7表示:ATATCTCATG-,TATCTCATG-,ATCTCATG-,TCTCATG-,CTCATG-,TCATG-,CATG-,ATG-,TG-,或G-;和

[1053] N^8表示:-AGTATTCTAGAA,-AGTATTCTAGA,-AGTATTCTAG,-AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A;优选N^8表示:-AGTATTCTAG,-

AGTATTCTA,-AGTATTCT,-AGTATTC,-AGTATT,-AGTAT,-AGTA,-AGT,-AG,或-A;和

[1054] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7);和

[1055] 核苷酸间键联选自

[1056] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-;和优选选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[1057] 特别优选的是Seq.ID No.439至Seq.ID No.473的gapmer反义寡核苷酸,其包含在3'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在5'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在LNA单元的两个区段之间的至少6个,优选7个,更优选8个DNA单元的区段,其中LNA单元选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),核苷酸间键联选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以在LNA单元优选所有LNA单元中含有5-甲基胞嘧啶作为修饰的核碱基,和/或在一些或所有DNA单元中含有2-氨基腺嘌呤和/或在一些或所有DNA单元中含有5-甲基胞嘧啶。

[1058] 还特别优选的是表8的gapmer反义寡核苷酸(Seq.ID No.219a至231b)。

[1059] 此外,本发明优选涉及由10至28个核苷酸,优选11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3'末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在至少6个,优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^9-ATTAATAA-N^{10}-3'(Seq.ID No.101)表示,其中

[1060] N^9表示:CATATTTATATACAGGC-,ATATTTATATACAGGC-,TATTTATATACAGGC-,ATTTATATACAGGC-,TTTATATACAGGC-,TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;

[1061] N^{10}表示:-AGTGCAAATGTTATTGG,-AGTGCAAATGTTATTG,-AGTGCAAATGTTATT,-AGTGCAAATGTTAT,-AGTGCAAATGTTA,-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A。

[1062] N^9和/或N^{10}也可以表示本文公开的3'和5'残基的其它限制性列表中的任何一个。

[1063] 落入通式S7的gapmer反义寡核苷酸是特别优选的:

[1064] 5'-N^9-ATTAATAA-N^{10}-3'(Seq.ID No.101)S7

[1065] 这样的gapmer反义寡核苷酸是:

[1066] TATACAGGCATTAATAAA(Seq.ID No.474)

[1067] ATACAGGCATTAATAAAG(Seq.ID No.475)

[1068] TACAGGCATTAATAAAGT(Seq.ID No.476)

[1069] ACAGGCATTAATAAAGTG(Seq.ID No.477)

[1070] CAGGCATTAATAAAGTGC(Seq.ID No.478)

[1071] AGGCATTAATAAAGTGCA(Seq.ID No.479)

[1072] GGCATTAATAAAGTGCAA(Seq.ID No.480)

[1073] GCATTAATAAAGTGCAAA(Seq.ID No.481)

[1074] CATTAATAAAGTGCAAAT(Seq.ID No.482)

[1075] ATACAGGCATTAATAAA(Seq.ID No.483)

[1076] TACAGGCATTAATAAAG(Seq.ID No.484)

[1077] ACAGGCATTAATAAAGT(Seq.ID No.485)

[1078] CAGGCATTAATAAAGTG(Seq.ID No.486)

[1079] AGGCATTAATAAAGTGC(Seq.ID No.487)

[1080] GGCATTAATAAAGTGCA(Seq.ID No.488)

[1081] GCATTAATAAAGTGCAA(Seq.ID No.489)

[1082] CATTAATAAAGTGCAAA(Seq.ID No.490)

[1083] TACAGGCATTAATAAA(Seq.ID No.491)

[1084] ACAGGCATTAATAAAG(Seq.ID No.492)

[1085] CAGGCATTAATAAAGT(Seq.ID No.493)

[1086] AGGCATTAATAAAGTG(Seq.ID No.494)

[1087] GGCATTAATAAAGTGC(Seq.ID No.495)

[1088] GCATTAATAAAGTGCA(Seq.ID No.496)

[1089] CATTAATAAAGTGCAA(Seq.ID No.497)

[1090] ACAGGCATTAATAAA(Seq.ID No.498)

[1091] CAGGCATTAATAAAG(Seq.ID No.499)

[1092] AGGCATTAATAAAGT(Seq.ID No.500)

[1093] GGCATTAATAAAGTG(Seq.ID No.501)

[1094] GCATTAATAAAGTGC(Seq.ID No.502)

[1095] CATTAATAAAGTGCA(Seq.ID No.503)

[1096] CAGGCATTAATAAA(Seq.ID No.504)

[1097] AGGCATTAATAAAG(Seq.ID No.505)

[1098] GGCATTAATAAAGT(Seq.ID No.506)

[1099] GCATTAATAAAGTG(Seq.ID No.507)

[1100] CATTAATAAAGTGC(Seq.ID No.508)

[1101] 以gapmer形式(LNA区段1-DNA区段-LNA区段2)的式S7的反义寡核苷酸包含5'末端的LNA区段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且包含在3'末端的LNA片段,其由2至5个,优选2至4个LNA单元组成,并且在两个LNA区段之间包含一个DNA区段,其由6至14个,优选7至12个,更优选8至11个DNA单元组成。

[1102] 式S7的反义寡核苷酸含有本文公开的LNA核苷酸(LNA单元),特别是在"锁核酸(LNA®)"章节中公开的那些,优选在"优选的LNA"章节中公开的那些。LNA单元和DNA单元可以包含标准核碱基,例如腺嘌呤(A),胞嘧啶(C),鸟嘌呤(G),胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U),但也可以含有修饰的核碱基,如"核碱基"章节中公开的。式S7的反义寡核苷酸或反义寡核

苷酸的LNA片段和DNA片段可以包含本文公开的任何核苷酸间键联，特别是在“核苷酸间键联(IL)”章节中公开的那些。式S7的反义寡核苷酸还可以任选地在3’末端和/或5’末端含有末端基团，特别是在“末端基团”章节中公开的那些。

[1103] 实验已经显示，在测试的神经和肿瘤学适应症方面，修饰的核碱基不显著增加或改变本发明的反义寡核苷酸的活性。已经证明修饰的核碱基5-甲基胞嘧啶或2-氨基腺嘌呤进一步增加式S7的反义寡核苷酸的活性，特别是如果仅在LNA核苷酸中或在LNA核苷酸和DNA核苷酸中使用5-甲基胞嘧啶时和/或者如果在DNA核苷酸中而不是在LNA核苷酸中使用2-氨基腺嘌呤时。

[1104] 式S7的反义寡核苷酸的优选的gapmer结构如下：3-8-3,4-8-2,2-8-4,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-2,2-9-4,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,2-10-4,4-10-2,3-10-4,4-10-3,4-10-4,2-11-4,4-11-2,3-11-4,4-11-3，更优选的：3-8-3,3-8-4,4-8-3,4-8-4,3-9-3,4-9-3,3-9-4,4-9-4,3-10-3,3-10-4,4-10-3,4-10-4,3-11-4,和4-11-3。

[1105] 式S7的反义寡核苷酸的LNA单元，特别是β-D-氧基-LNA(b^1)，β-D-硫基-LNA(b^2)，α-L-氧基-LNA(b^4)，β-D-ENA(b^5)，β-D-(NH)-LNA(b^6)，β-D-(NCH_3)-LNA(b^7)，β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9)是优选的。实验已经显示，所有这些LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6,b^7,b^8和b^9可以以所需的努力合成并导致具有可比较的稳定性和活性的反义寡核苷酸。然而，基于实验，更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^5,b^6和b^7。更优选的是LNA单元b^1,b^2,b^4,b^6和b^7，甚至更优选的是LNA单元b^1和b^4，关于化学合成的复杂性最优选的是β-D-氧基-LNA(b^1)。

[1106] 到目前为止，没有发现特别的3’末端基团或5’末端基团显著地改变或增加了关于肿瘤学或神经病学适应症的稳定性或活性，以使得3’和5’末端基团是可能的，但不是明确优选的。

[1107] 各种核苷酸间桥或核苷酸间键联是可能的。在本文公开的式中，核苷酸间键联IL由-IL’-Y-表示。因此，IL＝-IL’-Y-＝-X”-P(＝X’)(X^-)-Y-，其中IL优选选自：

[1108] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-。优选的是选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-，更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-，更优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-，最优选选自-O-P(O)(O^-)-O-和-O-P(O)(S^-)-O-的核苷酸间键联IL。

[1109] 因此，本发明优选涉及由10至28个核苷酸，优选11至24个核苷酸，更优选12至20个，更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体，以及在5’末端的这些核苷酸中的1至5个和反义寡核苷酸的3’末端的1至5个核苷酸是LNA核苷酸，并且在5’末端和3’末端的LNA核苷酸之间存在至少6个，优选7个，更优选8个DNA核苷酸的序列，并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交，其中反义寡核苷酸由以下序列5’-N^9-ATTAATAA-N^{10}-3’

(Seq.ID No.101),表示,其中

[1110] N^9表示:CATATTTATATACAGGC-,ATATTTATATACAGGC-,TATTTATATACAGGC-,ATTTATATACAGGC-,TTTATATACAGGC-,TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;

[1111] N^{10}表示:-AGTGCAAATGTTATTGG,-AGTGCAAATGTTATTG,-AGTGCAAATGTTATT,-AGTGCAAATGTTAT,-AGTGCAAATGTTA,-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A;和

[1112] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-ENA(b^5),β-D-(NH)-LNA(b^6),β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),β-D-(ONH)-LNA(b^8)和β-D-($ONCH_3$)-LNA(b^9);和优选选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7);和

[1113] 核苷酸间键联选自

[1114] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(CH_3)-O-,-O-P(O)(OCH_3)-O-,-O-P(O)(NH(CH_3))-O-,-O-P(O)[N(CH_3)$_2$]-O-,-O-P(O)(BH_3^-)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2OCH_3$)-O-,-O-P(O)($OCH_2CH_2SCH_3$)-O-,-O-P(O)(O^-)-N(CH_3)-,-N(CH_3)-P(O)(O^-)-O-;

[1115] 和优选选自-O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[1116] 更优选N^9表示:TATTTATATACAGGC-,ATTTATATACAGGC-,TTTATATACAGGC-,TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;和

[1117] N^{10}表示:-AGTGCAAATGTTATT,-AGTGCAAATGTTAT,-AGTGCAAATGTTA,-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A。

[1118] 进一步优选的是,本发明涉及由11至24个核苷酸,更优选12至20个,更优选13至19个或14至18个核苷酸组成的gapmer形式的反义寡核苷酸以及所述反义寡核苷酸的盐和光学异构体,以及在5'末端的这些核苷酸中的2至5个核苷酸和反义寡核苷酸的3'末端的2至5个核苷酸是LNA核苷酸,并且在5'末端和3'末端的LNA核苷酸之间存在优选7个,更优选8个DNA核苷酸的序列,并且反义寡核苷酸能够与编码TGF-R_{II}的基因的区域或编码TGF-R_{II}的mRNA的区域杂交,其中反义寡核苷酸由以下序列5'-N^9-ATTAATAA-N^{10}-3'(Seq.ID No.101)表示,其中

[1119] N^9表示:TTATATACAGGC-,TATATACAGGC-,ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;优选N^9表示:ATATACAGGC-,TATACAGGC-,ATACAGGC-,TACAGGC-,ACAGGC-,CAGGC-,AGGC-,GGC-,GC-,或C-;和

[1120] N^{10}表示:-AGTGCAAATGTT,-AGTGCAAATGT,-AGTGCAAATG,-AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A;优选N^{10}表示:-AGTGCAAATG,-

AGTGCAAAT,-AGTGCAAA,-AGTGCAA,-AGTGCA,-AGTGC,-AGTG,-AGT,-AG,或-A;和

[1121] LNA核苷酸选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7);和

[1122] 核苷酸间键联选自

[1123] -O-P(O)(O^-)-O-,-O-P(O)(S^-)-O-,-O-P(S)(S^-)-O-,-S-P(O)(O^-)-O-,-S-P(O)(S^-)-O-,-O-P(O)(O^-)-S-,-O-P(O)(S^-)-S-,-S-P(O)(O^-)-S-;和优选选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以含有5-甲基胞嘧啶和/或2-氨基腺嘌呤作为修饰的核碱基。

[1124] 特别优选的是Seq.ID No.474至Seq.ID No.508的gapmer反义寡核苷酸,其包含在3'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在5'末端的2至5个,优选2至4个,更优选3至4个LNA单元的区段,以及在LNA单元的两个区段之间的至少6个,优选7个,更优选8个DNA单元的区段,其中LNA单元选自β-D-氧基-LNA(b^1),β-D-硫基-LNA(b^2),α-L-氧基-LNA(b^4),β-D-(NH)-LNA(b^6),和β-D-(NCH_3)-LNA(b^7),核苷酸间键联选自磷酸酯,硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯。这种优选的反义寡核苷酸可以不含任何修饰的3'和5'末端,或不含任何3'和5'末端基团,并且可以在LNA单元优选所有LNA单元中含有5-甲基胞嘧啶作为修饰的核碱基,和/或在一些或所有DNA单元中含有2-氨基腺嘌呤和/或在一些或所有DNA单元中含有5-甲基胞嘧啶。

[1125] 还特别优选的是表9的gapmer反义寡核苷酸(Seq.ID No.284a至236b)。

[1126] 表4

[1127]

SP	L	Seq ID No.	序列 5'-3'
357	10	232a	**C*b^{1}sGb^{1}s**dTsdC*sdAsdTsdAsdGs**Ab^{1}sC*b^1**
357	10	232b	**C*b^{1}Gb^1**dTdC*dAdTdAdG**Ab^{1}C*b^1**
356	12	233a	**Tb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}s**dTsdC*sdAsdTsdAsdGs**Ab^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
356	12	233b	**Tb^{1}C*b^{1}Gb^1**dTdC*dAdTdAdG**Ab^{1}C*b^{1}C*b^1**
356	12	233c	**Tb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}s**dTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAs**C*b^{1}sC*b^1**
356	12	233d	**Tb^{1}s**dC*sdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAs**C*b^{1}sC*b^1**
356	12	233e	**Tb^{1}sC*b^{1}s**dGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC*s**C*b^1**
355	13	234a	**Tb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dCsdAsdTsdAsdGsdAs**C*b^{1}sC*b^{1}sGb^1**
355	13	234b	**Tb^{1}C*b^{1}Gb^{1}Tb^1**dCdAdUdAdGdA**C*b^{1}C*b^{1}Gb^1**
355	13	234c	**Tb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dC*sdAsdTsdAsdGsdAs**C*b^{1}sC*b^{1}sGb^1**
355	13	234d	**Tb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}s**dTsdC*sdA*sdTsdA*sdGsdA*sdC*s**C*b^{1}sGb^1**
355	13	234e	**Tb^{1}sC*b^{1}s**dGsdTsdC*sdAsdTsdA*sdGsdA*sdC*sdCs**Gb^1**
355	13	234f	**Tb^{1}s**dCsdGsdTsdC*sdA*sdTsdAsdGs**Ab^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^1**
354	13	142c	**C*b^{1}sGb^{1}sTb^1**sdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCs**Gb^{1}sAb^1**

	355	14	143i	C*b¹sTb¹sC*b¹sGb¹sdTsdCsdAsdTsdAsdGsAb¹sC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143j	C*b⁴ssTb⁴ssC*b⁴ssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdA*ssC*b⁴ssC*b⁴ssGb⁴
	355	14	143h	C*b¹sTb¹sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143k	C*b²ssTb²ssC*b²ssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAssC*b²ssC*b²ssGb²
	355	14	143m	C*b¹Tb¹C*b¹Gb¹dUsdCsdAsdTsdAsdGsAb¹C*b¹C*b¹Gb¹
	355	14	143n	C*b¹sTb¹sC*b¹sGb¹sTb¹sdCsdA*sdTsdA*sdGsdA*sC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143o	C*b¹sTb¹sdCsdGsdUsdCsdAsdUsdAsGb¹sAb¹sC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143p	C*b⁶sTb⁶sC*b⁶sGb⁶sdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC*b⁶sC*b⁶sGb⁶
	355	14	143q	C*b⁷sTb⁷sC*b⁷sdGsdUsdCsdA*sdUsdA*sdGsdA*sC*b⁷sC*b⁷sGb⁷
	355	14	143r	C*b⁴sTb⁴sC*b⁴sGb⁴sdTsdC*sdA*sdTsdAsdGsdAsdC*sC*b⁴sGb⁴
	355	14	143s	C*b⁴Tb⁴C*b⁴Gb⁴dTdCdAdTdAdGdAdCC*b⁴Gb⁴
	355	14	143t	C*b¹ssTb¹ssC*b¹ssdGssdTssdC*ssdAssdTssdAssdGssdAssC*b¹ssC*b¹ssGb¹
	355	14	143u	C*b¹Tb¹sdCsdGsdUsdC*sdAsdUsdAsdGsdAsC*b¹C*b¹Gb¹
	355	14	143v	C*b¹Tb¹sdC*sdGsdTsdC*sdA*sdTsdAsdGsdAsC*b¹C*b¹Gb¹
	355	14	143w	C*b⁶sTb⁶sdC*dGdTdC*dAdTdAdGdAsC*b⁶sC*b⁶sGb⁶
[1128]	355	14	143x	C*b⁷sTb⁷sC*b⁷sGb⁷sdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsC*b⁷sC*b⁷sGb⁷
	355	14	143y	C*b⁷sTb⁷sdC*sdGsdTsdCsdAsdUsdAsdGsAb⁷sC*b⁷sC*b⁷sGb⁷
	355	14	143z	C*b¹sTb¹sdC*sdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143aa	C*b¹Tb¹sdC*sdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsC*b¹C*b¹Gb¹
	355	14	143ab	C*b¹sTb¹sdC*sdGsdTsdC*sdA*sdTsdAsdGsdA*sC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143ac	C*b¹sTb¹sdC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143ad	C*b¹Tb¹dC*dGdTdCdAdTdAdGdAC*b¹C*b¹Gb¹
	355	14	143ae	C*b¹sTb¹sdC*dGdTdC*dAdTdAdGdAsC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143af	/5SpC3s/C*b¹sTb¹sdC*dGdTdC*dA*dTdAdGdA*sC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143ag	C*b¹sTb¹sdC*dGdTdC*dA*dTdAdGdA*sC*b¹sC*b¹sGb¹/3SpC3s/
	355	14	143ah	/5SpC3s/C*b¹sTb¹sdC*dGdTdC*dA*dTdAdGdA*sC*b¹sC*b¹sGb¹/3SpC3s/
	355	14	143ai	C*b¹sTb¹sdC*sdGsdUsdC*sdA*sdUsdA*sdGsdA*sC*b¹sC*b¹sGb¹
	355	14	143aj	C*b¹sTb¹sC*b¹sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC*b¹sC*b¹sGb¹
	356	14	145c	Gb¹sC*b¹sTb¹sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsAb¹sC*b¹sC*b¹
	354	15	235i	C*b¹sTb¹sC*b¹sGb¹sdTdC*dAdTdAdGdAsC*b¹sC*b¹sGb¹sAb¹
	354	15	235a	C*b¹ssTb¹ssdCssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAssdCssdCssdGssAb¹
	354	15	235b	C*b¹Tb¹dCdGdTdCdAdTdAdGdAdCdCdGAb¹
	354	15	235c	C*b¹sTb¹sdCsdGsdTsdCsdA*sdUsdAsdGsdAsdCsC*b¹sGb¹sAb¹
	354	15	235d	C*b¹Tb¹sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC*b¹C*b¹Gb¹Ab¹

[1129]

354	15	235e	**C*b^{4}sTb^{4}sC*b^{4}s**dGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCs**Gb^{4}sAb^4**
354	15	235f	**C*b^{6}sTb^{6}sC*b^{6}s**dGdTdCdA*dTdAdGdAdC*s**C*b^{6}sGb^{6}sAb^6**
354	15	235g	**C*b^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}s**dTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsdC*sdC*sdGs**Ab^1**
354	15	235h	**C*b^{1}ssTb^{1}ss**dCssdGssdUssdCssdAssdUssdAssdGssdAssdCssdCss**Gb^{1}ssAb^1**
355	15	144c	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^1**sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAs**C*b^{1}sC*b^{1}sGb^1**
354	16	141c	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sC*b^{1}s**dGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAs**C*b^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^1**
354	16	141d	**Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}C*b^{1}s**dGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsdCs**C*b^{1}Gb^{1}Ab^1**
354	16	141e	**Gb^{4}sC*b^{4}sTb^{4}sC*b^{4}s**dGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdA*sdC*sdC*s**Gb^{4}sAb^4**
354	16	141f	**Gb^{1}s**dC*sdTsdCsdGsdTsdC*sdA*sdTsdAsdGsdA*sdC*sdC*sdGs**Ab^1**
354	16	141g	**Gb^{2}sC*b^{2}sTb^{2}s**dCsdGsdUsdCsdAsdTsdA*sdGsdAsdCs**C*b^{2}sGb^{2}sAb^2**
354	16	141h	**Gb^{4}ssC*b^{4}ssTb^{4}ss**dCssdGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAss**C*b^{4}ssC*b^{4}ssGb^{4}ssAb^4**
354	16	141i	**Gb^{1}C*b^1**dTdCdGdTdCdA*dTdA*dGdA*dC**C*b^{1}Gb^{1}Ab^1**
354	16	141j	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^1**sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCs**C*b^{1}sGb^{1}sAb^1**
351	16	139c	**C*b^{1}sGb^{1}sTb^1**sdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsdGsdAs**Gb^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
354	17	237a	**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sC*b^{1}s**dGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGs**Ab^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^1**
354	17	237b	**Tb^{2}sGb^{2}sC*b^{2}s**dTsdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGs**Ab^{2}sC*b^{2}sC*b^{2}sGb^{2}sAb^2**
354	17	237c	**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC*s**C*b^{1}sGb^{1}sAb^1**
354	17	237d	**Tb^{1}s**dGsdCsdUsdC*sdGsdTsdC*sdAsdUsdAsdGs**Ab^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^1**
354	17	237e	**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dTsdGsdTsdC*sdA*sdTsdA*sdGs**Ab^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^1**
354	17	237f	**Tb^{1}Gb^1**dC*dTdGdTdC*dAdTdAdGdA**C*b^{1}C*b^{1}Gb^{1}Ab^1**
354	17	237g	**Tb^{1}s**dGsdC*sdTsdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsdC*s**C*b^{1}sGb^{1}sAb^1**
354	17	237h	**Tb^{1}Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}C*b^1**dGdTdC*dA*dTdA*dGdA*dC*dC***Gb^{1}Ab^1**
354	17	237i	**Tb^{1}ssGb^{1}ssC*b^{1}ssTb^{1}ssC*b^{1}ss**dGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAssdCss**C*b^{1}ssGb^{1}ssAb^1**
354	17	237j	**Tb^{4}sGb^{4}sC*b^{4}s**dTdGdTdCdA*dTdA*dGdA*s**C*b^{4}sC*b^{4}sGb^{4}sAb^4**
354	17	237k	**Tb^{6}sGb^{6}sC*b^{6}s**dUsdGsdUsdC*sdA*sdUsdA*sdGsdA*sdC*s**C*b^{6}sGb^{6}sAb^6**
354	17	237m	**Tb^{7}sGb^{7}sC*b^{7}sTb^{7}s**dC*dGdTdC*dAdTdAdGdAs**C*b^{7}sC*b^{7}sGb^{7}sAb^7**
353	18	238a	**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sC*b^{1}s**dGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAs**C*b^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^1**
353	18	238b	**Tb^{7}sGb^{7}sC*b^{7}sTb^{7}sC*b^{7}s**dGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsdC*sdC*sdGsdAs**Gb^7**
353	18	238c	**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC*s**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^1**
353	18	238d	**Tb^{1}sGb^{1}s**dC*sdTsdC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC*sdC*s**Gb^{1}sAb^{1}sGb^1**

353	18	238e	**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC*sdC*s**Gb^{1}sAb^{1}sGb^1**
353	18	238f	**Tb^{1}Gb^1**dC*dUdC*dGdTdC*dAdTdAdGdA***C*b^{1}C*b^{1}Gb^{1}Ab^{1}Gb^1**
353	18	238g	**Tb^{4}Gb^{4}C*b^{4}Tb^{4}s**dCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAs**C*b^{4}C*b^{4}Gb^{4}Ab^{4}Gb^4**
353	18	238h	**Tb^{1}ssGb^{1}ssC*b^{1}ss**dTssdC*ssdGssdTssdC*ssdAssdTssdA*ssdGssdAssdC*ssdC*ss**Gb^{1}ssAb^{1}ssGb^1**
353	18	238i	**Tb^{2}Gb^{2}C*b^2**dTdCdGdTdC*dAdTdAdGdA**C*b^{2}C*b^{2}Gb^{2}Ab^{2}Gb^2**
352	19	239a	**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sC*b^{1}s**dGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC*s**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
352	19	239b	**Tb^{6}Gb^{6}C*b^{6}Tb^{6}C*b^6**dGdTdC*dAdTdAdGdAdC***C*b^{6}Gb^{6}Ab^{6}Gb^{6}C*b^6**
352	19	239c	**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
352	19	239d	**Tb^{1}s**dGsdCsdTsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdA*sdC*s**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
352	19	239e	**Tb^{4}sGb^{4}s**dCsdUsdCsdGsdUsdCsdAsdTsdAsdGsdA*sdC*sdC*s**Gb^{4}sAb^{4}sGb^{4}sC*b^4**
352	19	239f	**Tb^{2}ssGb^{2}ssC*b^{2}ssTb^{2}ssC*b^{2}ss**dGssdTssdCssdAssdTssdAssdGssdAssdCssdCssdGssdAss**Gb^{2}ssC*b^2**
352	20	240a	**C*b^{1}sTb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC*s**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
352	20	240b	**C*b^{2}sTb^{2}sGb^{2}s**dC*sdTsdC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC*s**C*b^{2}sGb^{2}sAb^{2}sGb^{2}sC*b^2**
352	20	240c	**C*b^{1}Tb^{1}Gb^1**dC*dTdC*dGdTdCdAdTdAdGdAdC*dC***Gb^{1}Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**
352	20	240d	**C*b^{1}s**dUsdGsdCsdUsdC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdC*s**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
352	20	240e	**C*b^{4}sTb^{4}sGb^{4}sC*b^{4}s**dTsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCs**Gb^{4}sAb^{4}sGb^{4}sC*b^4**
351	22	241a	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dTsdC*sdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdC*sGb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
351	22	241b	**Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Gb^{1}C*b^1**dTdC*dGdTdC*dAdTdAdGdAdC*dC***Gb^{1}Ab^{1}Gb^{1}C*b^{1}C*b^1**
351	22	241c	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dTsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdCs**Gb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
350	24	242a	**C*b^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sGb^{1}s**dCsdTsdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsdCsdC*sdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
350	24	242b	**C*b^{1}Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Gb^1**dC*dTdCdGdTdCdAdTdAdGdAdCdC*dG**Ab^{1}Gb^{1}C*b^{1}C*b^{1}C*b^1**
349	26	243a	**C*b^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dGsdC*sdTsdCsdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsdCsdC*sdGsdAs**Gb^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
349	26	243b	**C*b^{1}C*b^{1}Gb^{1}C*b^{1}Tb^1**dGdC*dTdCdGdTdC*dAdTdAdGdAdCdC*dGdA**Gb^{1}C*b^{1}C*b^{1}C*b^{1}C*b^1**

[1130]

348	28	244a	**C*b^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dTsdGsdCsdTsdCsdGsdTsdC*sdAsdTsdAsdGsdAsdC*sdCsdGsdAsdGs**C*b^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
348	28	244b	**C*b^{1}C*b^{1}C*b^{1}Gb^{1}C*b^1**dTdGdC*dTdCdGdTdC*dAdTdAdGdAdC*dCdGdAdG**C*b^{1}C*b^{1}C*b^{1}C*b^{1}C*b^1**

[1131]

[1132] 表5

[1133]

SP	L	Seq ID No.	序列 5'-3'
431	10	245a	**Tb^{1}sAb^{1}s**dC*sdGsdCsdGsdTsdC*s**C*b^{1}sAb^1**
431	10	245b	**Tb^{1}Ab^1**dCdGdC*dGdTdC**C*b^{1}Ab^1**
430	12	246a	**Ab^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dC*sdGsdCsdGsdTsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sC*b^1**
430	12	246b	**Ab^{1}Tb^{1}Ab^1**dCdGdCdGdTdC***C*b^{1}Ab^{1}C*b^1**
430	12	246c	**Ab^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dCsdGsdCsdGsdTsdC*sdC*s**Ab^{1}sC*b^1**
430	12	246d	**Ab^{1}sTb^{1}s**dA*sdC*sdGsdCsdGsdTsdC*sdC*sdA*s**C*b^1**
430	12	246e	**Ab^{1}s**dTsdA*sdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sdC*s**Ab^{1}sC*b^1**
430	13	247a	**Gb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dCsdGsdCsdGsdTsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sC*b^1**
430	13	247b	**Gb^{1}Ab^{1}Tb^{1}Ab^1**dCdGdCdGdUdC**C*b^{1}Ab^{1}C*b^1**
430	13	247c	**Gb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dC*sdGsdCsdGsdTsdC*s**C*b^{1}sAb^{1}sC*b^1**
430	13	247d	**Gb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dA*sdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC*s**Ab^{1}sC*b^1**
430	13	247e	**Gb^{1}sAb^{1}s**dTsdA*sdCsdGsdC*sdGsdTsdCsdC*sdA*s**C*b^1**
430	13	247f	**Gb^{1}s**dA*sdTsdA*sdC*sdGsdCsdGsdTs**C*b^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sC*b^1**
431	13	153f	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^1**sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCs**C*b^{1}sAb^1**
429	14	248a	**Gb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dC*sdGsdC*sdGsdTsdC*s**C*b^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sAb^1**
429	14	248b	**Gb^{1}Ab^{1}Tb^{1}Ab^{1}s**dC*sdGsdCsdGsdTsdC*sdC*s**Ab^{1}C*b^{1}Ab^1**
429	14	248c	**Gb^{4}sAb^{4}sTb^{4}sAb^{4}s**dC*sdGsdCsdGsdTsdC*sdC*sdA*s**C*b^{4}sAb^4**
429	14	248d	**Gb^{1}s**dA*sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC*sdA*sdCs**Ab^1**
429	14	248e	**Gb^{2}sAb^{2}sTb^{2}s**dA*sdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCs**Ab^{2}sC*b^{2}sAb^2**
429	14	248f	**Gb^{4}ssAb^{4}ss**dTssdAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCss**Ab^{4}ssC*b^{4}ssAb^4**
429	14	248g	**Gb^{1}Ab^1**dTdA*dCdGdCdGdTdC**C*b^{1}Ab^{1}C*b^{1}Ab^1**
429	15	152h	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCs**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**
429	15	152i	**C*b^{1}Gb^{1}Ab^{1}Tb^{1}s**dAsdCsdGsdCsdGsdUsdCsdC*s**Ab^{1}C*b^{1}Ab^1**
429	15	152j	**C*b^{1}Gb^{1}Ab^{1}Tb^{1}s**dA*sdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCs**Ab^{1}C*b^{1}Ab^1**
429	15	152k	**C*b^{6}sGb^{6}sAb^{6}sTb^{6}s**dAdC*dGdCdGdTdCdC*s**Ab^{6}sC*b^{6}sAb^6**
429	15	152m	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAsdCsdGsdCsdGsdTsdC*sdC*s**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**
429	15	152n	**C*b^{1}Gb^{1}Ab^{1}Tb^{1}s**dAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sdC*s**Ab^{1}C*b^{1}Ab^1**
429	15	152o	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dA*sdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC*s**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**
429	15	152p	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC*s**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**
429	15	152q	**C*b^{1}Gb^{1}Ab^{1}Tb^1**dAdCdGdC*dGdTdCdC***Ab^{1}C*b^{1}Ab^1**
429	15	152r	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAdC*dGdC*dGdTdC*dC*s**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**

[1134]

429	15	152s	/5SpC3s/C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdCsdCs**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**
429	15	152t	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAsdC*sdGsdCsdGsdTsdCsdC*s**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1/3SpC3s/**
429	15	152u	/5SpC3s/C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdCsdCs**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**/3SpC3s/
429	15	152v	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dA*sdC*sdGsdC*sdGsdUsdC*sdC*s**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**
429	15	152w	**C*b^{7}sGb^{7}sAb^{7}s**dTsdAsdCsdGsdC*sdGsdTsdCs**C*b^{7}sAb^{7}sC*b^{7}sAb^7**
429	15	152z	**C*b^{7}sGb^{7}s**dAsdUsdAsdCsdGsdC*sdGsdUsdCs**C*b^{7}sAb^{7}sC*b^{7}sAb^7**
429	15	152aa	**C*b^{1}ssGb^{1}ssAb^{1}ss**dTssdAssdC*ssdGssdCssdGssdTssdCssdC*ss**Ab^{1}ssC*b^{1}ssAb^1**
429	15	152ab	**C*b^{4}ssGb^{4}ssAb^{4}ss**dTssdA*ssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdA*ss**C*b^{4}ssAb^4**
429	15	152ac	**C*b^{2}ssGb^{2}ssAb^{2}ssTb^{2}ss**dAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAssdCss**Ab^2**
429	15	152ad	**C*b^{1}Gb^{1}Ab^{1}Tb^1**dAdCdGdCdGdUdC**C*b^{1}Ab^{1}C*b^{1}Ab^1**
429	15	152ae	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dCsdGsdCsdGsdUsdCsdCs**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**
429	15	152af	**C*b^{1}sGb^{1}s**dA*sdTsdA*sdCsdGsdCsdGsdTs**C*b^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sAb^1**
429	15	152ag	**C*b^{6}sGb^{6}sAb^{6}s**dTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCs**C*b^{6}sAb^{6}sC*b^{6}sAb^6**
429	15	152ah	**C*b^{7}sGb^{7}sAb^{7}s**dUsdA*sdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCs**Ab^{7}sC*b^{7}sAb^7**
429	15	152ai	**C*b^{4}sGb^{4}sAb^{4}sTb^{4}s**dA*sdCsdGsdCsdGsdTsdC*sdC*sdA*s**C*b^{4}sAb^4**
429	15	152aj	**C*b^{4}Gb^{4}Ab^{4}Tb^4**dAdCdGdCdGdTdCdCdA**C*b^{4}Ab^4**
429	15	152ak	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCs**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1**
428	16	249a	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAdCdGdCdGdTdCdC*s**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sGb^1**
428	16	249b	**C*b^{1}ssGb^{1}ss**dAssdTssdAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAssdCssdAss**Gb^1**
428	16	249c	**C*b^{1}Gb^1**dAdTdAdCdGdCdGdTdCdCdAdCdA**Gb^1**
428	16	249d	**C*b^{1}sGb^{1}s**dAsdUsdAsdC*sdGsdCsdGsdUsdCsdC*sdAs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1**
428	16	249e	**C*b^{1}Gb^{1}s**dAsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdCsdC*s**Ab^{1}C*b^{1}Ab^{1}Gb^1**
428	16	249f	**C*b^{4}sGb^{4}sAb^{4}s**dTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCs**Ab^{4}sGb^4**
428	16	249g	**C*b^{6}Gb^{6}Ab^6**dTdA*dCdGdCdGdTdC*dCdA***C*b^{6}Ab^{6}Gb^6**
428	16	249h	**C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAsdC*sdGsdCsdGsdTsdCsdC*sdAsdC*sdAs**Gb^1**
428	16	249i	**C*b^{1}ssGb^{1}ss**dAssdUssdAssdCssdGssdCssdGssdUssdCssdCssdAssdCss**Ab^{1}ssGb^1**
428	17	250a	**Gb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAsdCsdGsdC*sdGsdTsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sGb^1**
428	17	250b	**Gb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*sdC*sdAs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1**
428	17	250c	**Gb^{1}s**dC*sdGsdAsdUsdAsdCsdGsdC*sdGsdUsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sGb^1**
428	17	250d	**Gb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}s**dA*sdTsdA*sdC*sdGsdC*sdGsdTsdC*s**C*b^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sAb^1**

[1135]

			sGb^1
428	17	250e	**Gb^{1}C*b^1**dGdAdTdAdCdGdC*dGdTdCdC***Ab^{1}C*b^{1}Ab^{1}Gb^1**
428	17	250f	**Gb^{1}s**dC*sdGsdAsdTsdAsdCsdGsdC*sdGsdTsdCsdCsdAs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1**
428	17	250g	**Gb^{2}sC*b^{2}sGb^{2}s**dAsdTsdAsdCsdGsdC*sdGsdTsdC*s**C*b^{2}sAb^{2}sC*b^{2}sAb^2 sGb^2**
428	17	250h	**Gb^{1}C*b^{1}Gb^{1}Ab^{1}Tb^1**dA*dCdGdC*dGdTdC*dCdA*dC***Ab^{1}Gb^1**
428	17	250i	**Gb^{1}ssC*b^{1}ssGb^{1}ssAb^{1}ssTb^{1}ss**dAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAss **C*b^{1}ssAb^{1}ssGb^1**
428	17	250j	**Gb^{4}sC*b^{4}sGb^{4}s**dA*sdTsdA*sdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCs**Ab^{4}sC*b^{4}sAb^{4}sGb^4**
428	17	250k	**Gb^{6}sC*b^{6}sGb^{6}s**dA*sdUsdAsdCsdGsdCsdGsdUsdC*sdCsdA*s**C*b^{6}sAb^{6}sGb^6**
428	17	250m	**Gb^{7}sC*b^{7}sGb^{7}sAb^{7}s**dTdAdCdGdCdGdTdC*dCs**Ab^{7}sC*b^{7}sAb^{7}sGb^7**
427	18	251a	**Gb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdC*s**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^1 sGb^{1}sGb^1**
427	18	251b	**Gb^{7}sC*b^{7}sGb^{7}sAb^{7}sTb^{7}s**dAsdC*sdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCsdAsdGs **Gb^7**
427	18	251c	**Gb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dTsdAsdC*sdGsdCsdGsdTsdCsdC*sdAs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1 sGb^1**
427	18	251d	**Gb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}s**dAsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdCsdC*sdAs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1 sGb^1**
427	18	251e	**Gb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dTsdAsdC*sdGsdCsdGsdTsdCsdC*sdAsdC*s**Ab^{1}sGb^1 sGb^1**
427	18	251f	**Gb^{1}C*b^1**dGdAdUdA*dCdGdCdGdTdC*dC***Ab^{1}C*b^{1}Ab^{1}Gb^{1}Gb^1**
427	18	251g	**Gb^{4}C*b^{4}Gb^{4}Ab^4**sdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCs**Ab^{4}C*b^{4}Ab^{4}Gb^{4}Gb^4**
427	18	251h	**Gb^{1}ssC*b^{1}ssGb^{1}ss**dA*ssdTssdA*ssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdA* ssdC*ss**Ab^{1}ssGb^{1}ssGb^1**
427	18	251i	**Gb^{2}C*b^{2}Gb^2**dAdTdAdCdGdC*dGdTdCdC***Ab^{2}C*b^{2}Ab^{2}Gb^{2}Gb^2**
426	19	252a	**Gb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dAsdC*sdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1 sGb^{1}sAb^1**
426	19	252b	**Gb^{6}C*b^{6}Gb^{6}Ab^{6}Tb^6**dAdC*dGdCdGdTdCdC*dA**C*b^{6}Ab^{6}Gb^{6}Gb^{6}Ab^6**
426	19	252c	**Gb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}s**dAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdC*s**Ab^{1}sGb^1 sGb^{1}sAb^1**
426	19	252d	**Gb^{1}s**dC*sdGsdA*sdTsdA*sdC*sdGsdCsdGsdTsdCsdCsdA*s**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1 sGb^{1}sAb^1**
426	19	252e	**Gb^{4}sC*b^{4}s**dGsdAsdUsdAsdCsdGsdCsdGsdUsdCsdCsdAsdC*s**Ab^{4}sGb^{4}sGb^4 sAb^4**
426	19	252f	**Gb^{2}ssC*b^{2}ssGb^{2}ssAb^{2}ssTb^{2}ss**dAssdCssdGssdCssdGssdTssdCssdCssdAss dCssdAssdGss**Gb^{2}ssAb^2**
426	20	253a	**Gb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdC*sdC*sdAs**C*b^{1}sAb^1 sGb^{1}sGb^{1}sAb^1**
426	20	253b	**Gb^{2}sGb^{2}sC*b^{2}s**dGsdAsdTsdAsdC*sdGsdCsdGsdTsdC*sdC*sdAs**C*b^{2}sAb^2 sGb^{2}sGb^{2}sAb^2**

426	20	253c	**Gb^{1}Gb^{1}C*b^1**dGdAdTdAdCdGdCdGdTdCdCdAdC***Ab^{1}Gb^{1}Gb^{1}Ab^1**
426	20	253d	**Gb^{1}s**dGsdCsdGsdAsdTsdAsdCsdGsdC*sdGsdUsdCsdCsdAs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1 sGb^{1}sAb^1**
426	20	253e	**Gb^{4}sGb^{4}sC*b^{4}sGb^{4}s**dAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCs**Ab^{4}sGb^4 sGb^{4}sAb^4**
425	22	254a	**Tb^{1}sGb^{1}sGb^{1}sC*Gb^{1}s**dAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdC*s**Ab^1 sGb^{1}sGb^{1}sAb^{1}sC*b^1**
425	22	254b	**Tb^{1}Gb^{1}Gb^{1}C*b^{1}Gb^1**dAdTdAdC*dGdCdGdTdCdC*dAdC**Ab^{1}Gb^{1}Gb^{1}Ab^{1}C*b^1**
425	22	254c	**Tb^{6}sGb^{6}sGb^{6}sC*b^{6}s**dGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdAsdCsdA sdGs**Gb^{6}sAb^{6}sC*b^6**
424	24	255a	**C*b^{1}sTb^{1}sGb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dGsdAsdTsdAsdCsdGsdC*sdGsdTsdCsdC*sdA sdCsdAs**Gb^{1}sGb^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sGb^1**
424	24	255b	**C*b^{1}Tb^{1}Gb^{1}Gb^{1}C*b^1**dGdAdTdAdCdGdC*dGdTdCdC*dAdC*dA**Gb^{1}Gb^{1}Ab^1 C*b^{1}Gb^1**
423	26	256a	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dC*sdGsdAsdTsdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsdA sdCsdAsdGs**Gb^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^1**
423	26	256b	**Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Gb^{1}Gb^1**dC*dGdAdTdAdCdGdCdGdTdCdCdAdC*dAdG**Gb^{1}Ab^1 C*b^{1}Gb^{1}Ab^1**
422	28	257a	**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sGb^{1}s**dGsdCsdGsdAsdTsdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdCsdC sdAsdCsdAsdGs**Gb^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sAb^1**
422	28	257b	**Tb^{1}Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Gb^1**dGdCdGdAdTdAdCdGdCdGdTdCdC*dAdC*dAdG**Gb^{1}Ab^1 C*b^{1}Gb^{1}Ab^1**

[1136]

[1137] 表6

SP	L	Seq ID No.	序列 5'-3'
2067	10	258a	**Gb^{1}sTb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdA*sdGs**Gb^{1}sGb^1**
2067	10	258b	**Gb^{1}sTb^{1}s**dGsdUsdTsdTsdA*sdGs**Gb^{1}sGb^1**
2066	12	259a	**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdA*sdGs**Gb^{1}sGb^{1}sAb^1**
2066	12	259b	**Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**dGdUdUdUdA*dG**Gb^{1}Gb^{1}Ab^1**
2066	12	259c	**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGs**Gb^{1}sAb^1**
2066	12	259d	**Ab^{1}sGb^{1}s**dTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^1**
2066	12	259e	**Ab^{1}s**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGs**Gb^{1}sAb^1**
2066	13	260a	**Tb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdAsdGs**Gb^{1}sGb^{1}sAb^1**
2066	13	260b	**Tb^{1}Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**dGdUdUdUdAdG**Gb^{1}Gb^{1}Ab^1**
2066	13	260c	**Tb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdA*sdGs**Gb^{1}sGb^{1}sAb^1**
2066	13	260d	**Tb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dUsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGs**Gb^{1}sAb^1**
2066	13	260e	**Tb^{1}sAb^{1}s**dGsdUsdGsdUsdUsdUsdA*sdGsdGsdGs**Ab^1**
2066	13	260f	**Tb^{1}s**dA*sdGsdTsdGsdTsdTsdUsdA*s**Gb^{1}sGb^{1}sGb^{1}sAb^1**
2065	14	261a	**Tb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdA*sdGs**Gb^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^1**
2065	14	261b	**Tb^{1}Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdA*sdGsdG**Gb^{1}Ab^{1}Gb^1**

[1138]

[1139]

2065	14	261c	**Tb^{4}sAb^{4}sGb^{4}sTb^{4}s**dGsdUsdTsdUsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{4}sGb^4**
2065	14	261d	**Tb^{1}s**dA*sdGsdUsdGsdTsdTsdUsdA*sdGsdGsdGsdA*s**Gb^1**
2065	14	261e	**Tb^{2}sAb^{2}sGb^{2}s**dUsdGsdUsdUsdTsdAsdGsdGs**Gb^{2}sAb^{2}sGb^2**
2065	14	261f	**Tb^{4}sAb^{4}s**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGs**Gb^{4}sAb^{4}sGb^4**
2065	14	261g	**Tb^{1}Ab^1**dGdTdGdTdTdTdA*dG**Gb^{1}Gb^{1}Ab^{1}Gb^1**
2064	15	262a	**Tb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dGdTdTdTdA*dGdGs**Gb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	15	262b	**Tb^{1}ssAb^{1}ss**dGssdTssdGssdTssdTssdTssdAssdGssdGssdGssdGssdAssdGss**C*b^1**
2064	15	262c	**Tb^{1}sAb^{1}s**dGsdUsdGsdUsdUsdUsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	15	262d	**Tb^1**dAdGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdAdG**C*b^1**
2064	15	262e	**Tb^{1}Ab^1**sdGsdUsdGsdUsdTsdUsdAsdGsdGs**Gb^{1}Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**
2064	15	262f	**Tb^{4}sAb^{4}sGb^{4}s**dTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdsdGsdAs**Gb^{4}sC*b^4**
2064	15	262g	**Tb^{6}Ab^{6}Gb^6**dUdGdTdTdUdAdGdGdG**Ab^{6}Gb^{6}C*b^6**
2064	15	262h	**Tb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAsdGs**C*b^1**
2064	15	262i	**Tb^{1}ssAb^{1}ss**dGssdTssdGssdUssdUssdUssdAssdGssdGssdGssdAss**Gb^{1}ssC*b^1**
2064	16	209s	**Gb^{1}Tb^1**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**
2064	16	209t	**Gb^{1}sTb^{1}s**dA*sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209u	**Gb^{1}Tb^1**dAdGdTdGdTdTdTdAdGdGdG**Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**
2064	16	209v	/5SpC3s/**Gb^{1}sTb^{1}s**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209w	**Gb^{1}sTb^{1}s**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**/s3SpC3/
2064	16	209x	/5SpC3s/**Gb^{1}sTb^{1}s**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**/3SpC3s/
2064	16	209y	**Gb^{1}sTb^{1}s**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209aa	**Gb^{1}Tb^1**dA*sdGsdUsdGsdUsdUsdUsdAsdGsdGsdGs**Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**
2064	16	209ab	**Gb^{1}Tb^1**dA*sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**
2064	16	209ac	**Gb^{6}sTb^{6}s**dA*dGdTdGdTdTdTdA*dGdGdG**Ab^{6}sGb^{6}sC*b^6**
2064	16	209ad	**Gb^{1}sTb^{1}s**dA*sdGsdUsdGsdUsdUsdUsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209ae	**Gb^{1}sTb^{1}s**dA*sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209af	**Gb^{1}sTb^{1}s**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209ag	**Gb^{1}Tb^1**dA*dGdTdGdTdTdTdA*dGdGdG**Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**
2064	16	209ah	**Gb^{1}Tb^1**dAdGdTdGdTdTdTdA*dGdGdG**Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**
2064	16	209ai	**Gb^{6}sTb^{6}s**dA*dGdTdGdTdTdTdAdGdGdG**Ab^{6}sGb^{6}sC*b^6**
2064	16	209aj	**Gb^{1}sTb^{1}s**dA*sdGsdUsdGsdTsdTsdUsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209ak	**Gb^{7}sTb^{7}sAb^{7}sGb^{7}s**dTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{7}sGb^{7}sC*b^7**
2064	16	209am	**Gb^{7}sTb^{7}s**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdUsdA*sdGsdGs**Gb^{7}sAb^{7}sGb^{7}sC*b^7**
2064	16	209an	**Gb^{1}ssTb^{1}ssAb^{1}ss**dGssdTssdGssdTssdTssdTssdA*ssdGssdGssdGss**Ab^{1}ssGb^{1}ssC*b^1**
2064	16	209ao	**Gb^{4}ssTb^{4}ssAb^{4}ss**dGssdTssdGssdTssdTssdTssdAssdGssdGssdGssdA*ss

			Gb^{4}ssC*b^4
2064	16	209ap	**Gb^{2}ssTb^{2}ssAb^{2}ssGb^{2}ss**dTssdGssdTssdTssdTssdAssdGssdGssdGssdGssdAssd Gss**C*b^2**
2064	16	209aq	**Gb^{1}Tb^{1}Ab^{1}Gb^1**dUdGdUdUdUdAdGdG**Gb^{1}Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**
2064	16	209ar	**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209as	**Gb^{1}sTb^{1}s**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdUsdAsdGs**Gb^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209at	**Gb^{6}sTb^{6}sAb^{6}sGb^{6}s**dTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**Ab^{6}sGb^{6}sC*b^6**
2064	16	209au	**Gb^{7}sTb^{7}sAb^{7}s**dGsdUsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{7}sGb^{7}sC*b^7**
2064	16	209av	**Gb^{4}sTb^{4}sAb^{4}sGb^{4}s**dUsdGsdTsdUsdTsdA*sdGsdGsdGsdA*s**Gb^{4}sC*b^4**
2064	16	209aw	**Gb^{4}Tb^{4}Ab^{4}Gb^4**dTdGdTdTdTdAdGdGdGdA**Gb^{4}C*b^4**
2064	16	209ax	**Gb^{1}sTb^{1}sAb^1**sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209az	**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGs**Gb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209ba	**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGs**Gb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2064	16	209bb	**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAs**Gb^{1}sC*b^1**
2063	17	263a	**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGs**Gb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1 sC*b^1**
2063	17	263b	**Gb^{2}sTb^{2}sAb^{2}s**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGs**Gb^{2}sAb^{2}sGb^{2}sC*b^{2}sC*b^2**
2063	17	263c	**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
2063	17	263d	**Gb^{1}s**dUsdA*sdGsdUsdGsdUsdTsdTsdA*sdGsdGs**Gb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
[1140] 2063	17	263e	**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dGsdTsdGsdUsdTsdTsdA*sdGsdGs**Gb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
2063	17	263f	**Gb^{1}Tb^1**dA*dGdTdGdTdTdTdA*dGdGdG**Ab^{1}Gb^{1}C*b^{1}C*b^1**
2063	17	263g	**Gb^{1}s**dTsdA*sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGsdA*s**Gb^{1}sC*b^{1}sC*b^1**
2063	17	263h	**Gb^{1}Tb^{1}Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**dGdTdUdTdAdGdGdGdA*dG**C*b^{1}C*b^1**
2063	17	263i	**Gb^{1}ssTb^{1}ssAb^{1}ssGb^{1}ssTb^{1}ss**dGssdTssdTssdTssdAssdGssdGssdGssdAss **Gb^{1}ssC*b^{1}ssC*b^1**
2063	17	263j	**Gb^{4}Tb^4**dA*dGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdA***Gb^{4}C*b^{4}C*b^4**
2063	17	263k	**Gb^{6}sTb^{6}sAb^{6}s**dGsdTsdGsdUsdUsdTsdAsdGsdGsdGsdA*s**Gb^{6}sC*b^{6}sC*b^6**
2063	17	263m	**Gb^{7}sTb^{7}sAb^{7}sGb^{7}s**dTdGdTdTdTdA*dGdGdGs**Ab^{7}sGb^{7}sC*b^{7}sC*b^7**
2063	18	264a	**Gb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGs**Gb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^1 sC*b^1**
2063	18	264b	**Gb^{7}sGb^{7}sTb^{7}sAb^{7}sGb^{7}s**dTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAsdGsdC*s**C*b^7**
2063	18	264c	**Gb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdA*sdGsdC*s **C*b^1**
2063	18	264d	**Gb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dUsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdA*sdGsdC*s **C*b^1**
2063	18	264e	**Gb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1 sC*b^1**
2063	18	264f	**Gb^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dA*sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1 sC*b^1**
2063	18	264g	**Gb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGsdA*s**Gb^{1}sC*b^1**

			sC*b^1
2063	18	264h	**Gb^{1}Gb^1**dUdA*dGdTdGdTdTdTdAdGdG**Gb^{1}Ab^{1}Gb^{1}C*b^{1}C*b^1**
2063	18	264i	**Gb^{4}Gb^{4}Tb^{4}Ab^4**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGs**Gb^{4}Ab^{4}Gb^{4}C*b^{4}C*b^4**
2063	18	264j	**Gb^{1}ssGb^{1}ssTb^{1}ss**dA*ssdGssdTssdGssdUssdTssdTssdA*ssdGssdGssdGssdA*ss**Gb^{1}ssC*b^{1}ssC*b^1**
2063	18	264k	**Gb^{2}Gb^{2}Tb^2**dA*dGdTdGdTdTdTdAdGdG**Gb^{2}Ab^{2}Gb^{2}C*b^{2}C*b^2**
2062	19	265a	**Gb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^1**
2062	19	265b	**Gb^{6}Gb^{6}Tb^{6}Ab^{6}Gb^6**dTdGdTdTdTdA*dGdGdG**Ab^{6}Gb^{6}C*b^{6}C*b^{6}Gb^6**
2062	19	265c	**Gb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGsdA*sdGs**C*b^{1}sC*b^{1}sGb^1**
2062	19	265d	**Gb^{1}s**dGsdTsdA*sdGsdUsdGsdTsdUsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^1**
2062	19	265e	**Gb^{4}sGb^{4}s**dUsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdA*s**Gb^{4}sC*b^{4}sC*b^{4}sGb^4**
2062	19	265f	**Gb^{2}ssGb^{2}ssTb^{2}ssAb^{2}ssGb^{2}ss**dTssdGssdTssdTssdTssdAssdGssdGssdGssdAssdGssdCss**C*b^{2}ssGb^2**
2062	20	266a	**Tb^{1}sGb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^1**
2062	20	266b	**Tb^{2}sGb^{2}sGb^{2}s**dTsdA*sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{2}sGb^{2}sC*b^{2}sC*b^{2}sGb^2**
2062	20	266c	**Gb^{1}Gb^{1}Tb^1**dA*dGdTdGdTdTdTdA*dGdGdGdA***Gb^{1}C*b^{1}C*b^{1}Gb^1**
2062	20	266d	**Tb^{1}s**dGsdGsdUsdA*sdGsdTsdGsdTsdUsdTsdA*sdGsdGsdGs**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^1**
2062	20	266e	**Tb^{4}sGb^{4}sGb^{4}sTb^{4}s**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAs**Gb^{4}sC*b^{4}sC*b^{4}sGb^4**
2061	22	267a	**Tb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sGb^{1}sTb^{1}s**dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdA*s**Gb^{1}sC*b^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sTb^1**
2061	22	267b	**Tb^{1}Tb^{1}Gb^{1}Gb^{1}Tb^1**dA*dGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdA***Gb^{1}C*b^{1}C*b^{1}Gb^{1}Tb^1**
2061	22	267c	**Tb^{6}sTb^{6}sGb^{6}s**dGsdTsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAs**Gb^{6}sC*b^{6}sC*b^{6}sGb^{6}sTb^6**
2060	24	268a	**Tb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dTsdA*sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAsdG**C*b^{1}sC*b^{1}sGb^{1}sTb^{1}sC*b^1**
2060	24	268b	**Tb^{1}Tb^{1}Tb^{1}Gb^{1}Gb^1**dTdA*dGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdA*dG**C*b^{1}C*b^{1}Gb^{1}Tb^{1}C*b^1**
2059	26	269a	**Ab^{1}sTb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sGb^{1}s**dGsdTsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAsdGsdC*s**C*b^{1}sGb^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sTb^1**
2059	26	269b	**Ab^{1}Tb^{1}Tb^{1}Tb^{1}Gb^1**dGdTdAdGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdAdGdC***C*b^{1}Gb^{1}Tb^{1}C*b^{1}Tb^1**
2058	28	270a	**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sTb^{1}s**dGsdGsdTsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAsdGsdC*sdCs**Gb^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sTb^1**
2058	28	270b	**Tb^{1}Ab^{1}Tb^{1}Tb^{1}Tb^1**dGdGdTdAdGdTdGdTdTdTdAdGdGdGdAdGdC*dC***Gb^{1}Tb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Tb^1**

[1141]

[1142] 表7

[1143]

SP	L	Seq ID No.	序列 5'-3'
2075	10	271a	**Ab^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*s**Gb^{1}sTb^1**
2075	10	271b	**Ab^{1}Tb^1**dTdTdGdGdTdA***Gb^{1}Tb^1**
2074	12	272a	**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*s**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2074	12	272b	**Tb^{1}Ab^{1}Tb^1**dTdTdGdGdTdA***Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2074	12	272c	**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGs**Tb^{1}sGb^1**
2074	12	272d	**Tb^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdUs**Gb^1**
2074	12	272e	**Tb^{1}s**dAsdTsdUsdTsdGsdGsdUsdA*sdGs**Tb^{1}sGb^1**
2073	13	273a	**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sTb^1**
2073	13	273b	**Tb^{1}Ab^{1}Tb^1**dUdUdGdGdUdA**Gb^{1}Tb^{1}Gb^{1}Tb^1**
2073	13	273c	**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*s**Gb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sTb^1**
2073	13	273d	**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdUs**Gb^{1}sTb^1**
2073	13	273e	**Tb^{1}sAb^{1}s**dUsdUsdUsdGsdGsdUsdA*sdGsdUsdGs**Tb^1**
2073	13	273f	**Tb^{1}s**dA*sdTsdTsdUsdGsdGsdTsdA*s**Gb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sTb^1**
2073	14	274a	**C*b^{1}Tb^{1}Ab^{1}s**dUsdTsdTsdGsdGsdTsdA*s**Gb^{1}Tb^{1}Gb^{1}Tb^1**
2073	14	274b	**C*b^{4}sTb^{4}sAb^{4}sTb^{4}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdUs**Gb^{4}sTb^4**
2073	14	274c	**C*b^{1}s**dUsdA*sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**Tb^1**
2073	14	274d	**C*b^{2}sTb^{2}sAb^{2}s**dTsdTsdUsdGsdGsdTsdA*sdGs**Tb^{2}sGb^{2}sTb^2**
2073	14	274e	**C*b^{4}ssTb^{4}ss**dAssdTssdTssdTssdGssdGssdTssdAssdGss**Tb^{4}ssGb^{4}ssTb^4**
2073	14	274f	**C*b^{1}Tb^{1}Ab^1**dTdTdTdGdGdTdA***Gb^{1}Tb^{1}Gb^{1}Tb^1**
2073	14	274g	**C*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*s**Gb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sTb^1**
2072	15	275a	**C*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTsdGsdTs**Tb^1**
2072	15	275b	**C*b^{1}sTb^{1}s**dA*sdUsdTsdUsdGsdGsdTsdAsdGsdUs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	15	275c	**C*b^{4}sTb^{4}sAb^{4}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**Tb^{4}sTb^4**
2072	15	275d	**C*b^{1}ssTb^{1}ss**dAssdTssdTssdTssdGssdGssdTssdAssdGssdTssdGssdTss**Tb^1**
2072	15	275e	**C*b^{1}ssTb^{1}ss**dAssdUssdTssdTssdGssdGssdTssdAssdGssdUssdGss**Tb^{1}ssTb^1**
2072	15	275f	**C*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTdTdGdGdTdA*dGs**Tb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	15	275g	**C*b^{1}Tb^{1}s**dAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGs**Tb^{1}Gb^{1}Tb^{1}Tb^1**
2072	15	275h	**C*b^{6}Tb^{6}Ab^6**dUdTdTdGdGdTdA*dGdU**Gb^{6}Tb^{6}Tb^6**
2072	15	275i	**C*b^1**dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdT**Tb^1**
2072	16	210o	**Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Ab^1**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**Gb^{1}Tb^{1}Tb^1**
2072	16	210p	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	16	210q	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	16	210r	**Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Ab^1**dTdTdTdGdGdTdA*dGdT**Gb^{1}Tb^{1}Tb^1**

[1144]

2072	16	210s	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dUsdUsdTdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	16	210t	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dUsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdUs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	16	210u	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dUsdUsdUsdGsdGsdUsdA*sdGsdUs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	16	210v	**/5SpC3s/Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**Gb^{1}sTb^1 sTb^1**
2072	16	210w	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1 /3SpC3s/**
2072	16	210x	**/5SpC3s/Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**Gb^{1}sTb^1 sTb^1/3SpC3s/**
2072	16	210y	**Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Ab^{1}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}Tb^{1}Tb^1**
2072	16	210z	**Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Ab^{1}s**dUsdTsdTsdGsdGsdUsdA*sdGsdTs**Gb^{1}Tb^{1}Tb^1**
2072	16	210aa	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dTdTdTdGdGdTdA*dGdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	16	210ab	**Gb^{6}sC*b^{6}sTb^{6}sAb^{6}s**dTdTdTdGdGdTdA*dGdTs**Gb^{6}sTb^{6}sTb^6**
2072	16	210ac	**Gb^{6}sC*b^{6}sTb^{6}s**dAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs**Tb^{6}sGb^{6}sTb^{6}sTb^6**
2072	16	210ad	**Gb^{7}sC*b^{7}sTb^{7}s**dA*sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGs**Tb^{7}sGb^{7}sTb^{7}sTb^7**
2072	16	210ae	**Gb^{7}sC*b^{7}s**dUsdAsdTsdTsdUsdGsdGsdUsdA*sdGs**Tb^{7}sGb^{7}sTb^{7}sTb^7**
2072	16	210af	**Gb^{1}ssC*b^{1}ssTb^{1}ss**dAssdTssdTssdTssdGssdGssdTssdA*ssdGssdTss**Gb^1 ssTb^{1}ssTb^1**
2072	16	210ag	**Gb^{4}ssC*b^{4}ssTb^{4}ss**dA*ssdTssdTssdTssdGssdGssdTssdAssdGssdTssdGss **Tb^{4}ssTb^4**
2072	16	210ah	**Gb^{2}ssC*b^{2}ssTb^{2}ssAb^{2}ss**dTssdTssdTssdGssdGssdTssdAssdGssdTssdGss dTss**Tb^2**
2072	16	210ai	**Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Ab^1**dUsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs**Tb^{1}Gb^{1}Tb^{1}Tb^1**
2072	16	210aj	**Gb^{4}C*b^{4}Tb^{4}Ab^4**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTdG**Tb^{4}Tb^4**
2072	16	210ak	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	16	210am	**Gb^{4}sC*b^{4}sTb^{4}sAb^{4}s**dTsdTsdUsdGsdGsdTsdA*sdGsdTsdGs**Tb^{4}sTb^4**
2072	16	210an	**Gb^{7}sC*b^{7}sTb^{7}s**dA*sdTsdTsdUsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{7}sTb^{7}sTb^7**
2072	16	210ao	**Gb^{1}sC*b^{1}s**dUsdAsdUsdUsdTsdGsdGsdUsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	16	210ap	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^1**sdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2072	16	210aq	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**Tb^{1}sTb^1**
2071	17	276a	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGs**Tb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2071	17	276b	**Gb^{2}sC*b^{2}sTb^{2}s**dAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGs**Tb^{2}sGb^{2}sTb^{2}sTb^{2}sTb^2**
2071	17	276c	**Gb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2071	17	276d	**Gb^{2}s**dC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs**Tb^{2}sGb^{2}sTb^{2}sTb^{2}sTb^2**
2071	17	276e	**Gb^{6}sC*b^{6}sTb^{6}s**dA*sdUsdUsdUsdGsdGsdUsdA*sdGsdUsdGs**Tb^{6}sTb^{6}sTb^6**
2071	17	276f	**Gb^{1}s**dC*sdTsdA*sdUsdUsdUsdGsdGsdUsdAsdGsdUsdGs**Tb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2071	17	276g	**Gb^{1}C*b^1**dTdA*dTdTdTdGdGdTdA*dGdT**Gb^{1}Tb^{1}Tb^{1}Tb^1**

[1145]

2071	17	276h	**Gb^{4}C*b^{4}Tb^{4}Ab^4**dTdTdTdGdGdTdA*dGdTdG**Tb^{4}Tb^{4}Tb^4**
2071	17	276i	**Gb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Ab^{1}Tb^1**dUdTdGdGdTdA*dGdTdGdU**Tb^{1}Tb^1**
2071	17	276j	**Gb^{1}ssC*b^{1}ssTb^{1}ssAb^{1}ssTb^{1}ss**dTssdTssdGssdGssdTssdAssdGssdTssdGss **Tb^{1}ssTb^{1}ssTb^1**
2071	17	276k	**Gb^{7}sC*b^{7}sTb^{7}sAb^{7}s**dTdTdTdGdGdTdA*dGdTs**Gb^{7}sTb^{7}sTb^{7}sTb^7**
2071	18	277a	**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGs**Tb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sTb^1 sTb^1**
2071	18	277b	**Ab^{7}sGb^{7}sC*b^{7}sTb^{7}sAb^{7}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTsdGsdTsdTs**Tb^7**
2071	18	277c	**Ab^{1}sGb^{1}s**dC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs**Tb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2071	18	277d	**Ab^{1}sGb^{1}s**dC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGs**Tb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2071	18	277e	**Ab^{1}Gb^1**dC*dTdAdUdTdTdGdGdTdA*dG**Tb^{1}Gb^{1}Tb^{1}Tb^{1}Tb^1**
2071	18	277f	**Ab^{2}Gb^{2}C*b^2**dTdAdTdTdTdGdGdTdA*dG**Tb^{2}Gb^{2}Tb^{2}Tb^{2}Tb^2**
2071	18	277g	**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dA*sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1 sTb^1**
2071	18	277h	**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dA*sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**Tb^{1}sTb^{1}sTb^1**
2071	18	277i	**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dTsdA*sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1 sTb^1**
2071	18	277j	**Ab^{4}Gb^{4}C*b^{4}Tb^{4}s**dAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs**Tb^{4}Gb^{4}Tb^{4}Tb^{4}Tb^4**
2071	18	277k	**Ab^{1}ssGb^{1}ssC*b^{1}ss**dTssdA*ssdTssdTssdTssdGssdGssdTssdA*ssdGssdUssd Gss**Tb^{1}ssTb^{1}ssTb^1**
2070	19	278a	**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1 sTb^{1}sAb^1**
2070	19	278b	**Ab^{2}ssGb^{2}ssC*b^{2}ssTb^{2}ssAb^{2}ss**dTssdTssdTssdGssdGssdTssdAssdGssdTss dGssdTssdTss**Tb^{2}ssAb^2**
2070	19	278c	**Ab^{1}s**dGsdC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sTb^1 sAb^1**
2070	19	278d	**Ab^{1}s**dGsdC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdUsdA*sdGsdUs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sTb^1 sAb^1**
2070	19	278e	**Ab^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTsdGs**Tb^{1}sTb^{1}sTb^1 sAb^1**
2070	19	278f	**Ab^{4}sGb^{4}s**dC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**Tb^{4}sTb^{4}sTb^4 sAb^4**
2070	19	278g	**Ab^{6}Gb^{6}C*b^{6}Tb^{6}Ab^6**dTdTdTdGdGdTdA*dGdT**Gb^{6}Tb^{6}Tb^{6}Tb^{6}Ab^6**
2070	20	279a	**Gb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^1 sTb^{1}sTb^{1}sAb^1**
2070	20	279b	**Gb^{2}sAb^{2}sGb^{2}s**dC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs**Gb^{2}sTb^{2}sTb^2 sTb^{2}sAb^2**
2070	20	279c	**Gb^{1}s**dAsdGsdC*sdUsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTs**Gb^{1}sTb^{1}sTb^1**

[1146]

			sTb^{1}sAb^1
2070	20	279d	**Gb^{4}sAb^{4}sGb^{4}sC*b^{4}s**dTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**Tb^{4}sTb^4 sTb^{4}sAb^4**
2070	20	279e	**Gb^{1}Ab^{1}Gb^1**dC*dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdG**Tb^{1}Tb^{1}Tb^{1}Ab^1**
2069	22	280a	**Ab^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**Tb^1 sTb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^1**
2069	22	280b	**Ab^{1}Gb^{1}Ab^{1}Gb^{1}C*b^1**dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdG**Tb^{1}Tb^{1}Tb^{1}Ab^{1}Gb^1**
2069	22	280c	**Ab^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs**Tb^1 sTb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^1**
2069	22	280d	**Ab^{6}sGb^{6}sAb^{6}sGb^{6}s**dC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdA*sdGsdTsdGsdTsd Ts**Tb^{6}sAb^{6}sGb^6**
2068	24	281a	**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsdGs dTs**Tb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sGb^1**
2068	24	281b	**Ab^{1}Ab^{1}Gb^{1}Ab^{1}Gb^1**dC*dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdT**Tb^{1}Tb^{1}Ab^{1}Gb^{1}Gb^1**
2067	26	282a	**Gb^{1}sAb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dGsdC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTs dGsdTsdTs**Tb^{1}sAb^{1}sGb^{1}sGb^{1}sGb^1**
2067	26	282b	**Gb^{1}Ab^{1}Ab^{1}Gb^{1}Ab^1**dGdC*dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTdT**Tb^{1}Ab^{1}Gb^1 Gb^{1}Gb^1**
2066	28	283a	**Ab^{1}sGb^{1}sAb^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dAsdGsdC*sdTsdAsdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGs dTsdGsdTsdTsdTs**Ab^{1}sGb^{1}sGb^{1}sGb^{1}sAb^1**
2066	28	283b	**Ab^{1}Gb^{1}Ab^{1}Ab^{1}Gb^1**dAdGdC*dTdAdTdTdTdGdGdTdAdGdTdGdTdTdT**Ab^{1}Gb^1 Gb^{1}Gb^{1}Ab^1**

[1147] 表8

[1148]

SP	L	Seq ID No.	序列 5'-3'
4220	10	219a	**Gb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdCs**C*b^{1}sAb^1**
4220	10	219b	**Gb^{1}Ab^1**dAdTdGdGdAdC**C*b^{1}Ab^1**
4219	12	220a	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^1**
4219	12	220b	**Tb^{1}Gb^{1}Ab^1**dAdTdGdGdAdC**C*b^{1}Ab^{1}Gb^1**
4219	12	220c	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*s**Ab^{1}sGb^1**
4219	12	220d	**Tb^{1}s**dGsdA*sdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCs**Ab^{1}sGb^1**
4219	12	220e	**Tb^{1}sGb^{1}s**dA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*sdAs**Gb^1**
4218	13	221a	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}sAb^{1}s**dTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^1**
4218	13	221b	**Tb^{1}Gb^{1}Ab^{1}Ab^1**dUdGdGdAdCdC**Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**
4218	13	221c	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}sAb^{1}s**dTsdGsdGsdAsdCsdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^1**
4218	13	221d	**Tb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdA*sdCsdC*sdAs**Gb^{1}sTb^1**
4218	13	221e	**Tb^{1}sGb^{1}s**dA*sdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCsdAsdGs**Tb^1**

4218	13	221f	**Tb^{1}s**dGsdAsdA*sdTsdGsdGsdAsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^1**
4218	14	222a	**Ab^{1}sTb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^1**
4218	14	222b	**Ab^{1}Tb^{1}Gb^{1}Ab^1**dAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*s**Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**
4218	14	222c	**Ab^{1}Tb^1**dGdA*dAdTdGdGdA*dC**C*b^{1}Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**
4218	14	222d	**Ab^{4}sTb^{4}sGb^{4}s**dA*sdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*sAbs**Gb^{4}sTb^4**
4218	14	222e	**Ab^{1}s**dTsdGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*sdA*sdGs**Tb^1**
4218	14	222f	**Ab^{2}sTb^{2}sGb^{2}s**dA*sdAsdUsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{2}sGb^{2}sTb^2**
4218	14	222g	**Ab^{4}ssTb^{4}ss**dGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCss**Ab^{4}ssGb^{4}ssTb^4**
4217	15	223a	**Ab^{1}sTb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAdTdGdGdAdCdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	15	223b	**Ab^{1}ssTb^{1}ss**dGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssdTss**Ab^1**
4217	15	223c	**Ab^1**dTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdT**Ab^1**
4217	15	223d	**Ab^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdUsdGsdGsdA*sdCsdCsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	15	223e	**Ab^{6}Tb^{6}Gb^6**dA*dAdTdGdGdAdCdC*dA**Gb^{6}Tb^{6}Ab^6**
4217	15	223f	**Ab^{1}Tb^1**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
4217	15	223g	**Ab^{4}sTb^{4}sGb^{4}s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb^{4}sAb^4**
4217	15	223h	**Ab^{1}sTb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAsdGsdTs**Ab^1**
4217	15	223i	**Ab^{1}ssTb^{1}ss**dGssdAssdAssdUssdGssdGssdA*ssdCssdCssdAssdGss**Tb^{1}ssAb^1**
4217	16	218y	**C*b^{2}sAb^{2}sTb^{2}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{2}sGb^{2}sTb^{2}sAb^2**
4217	16	218z	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218aa	**C*b^{1}ssAb^{1}ssTb^{1}ss**dGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCss**Ab^{1}ssGb^{1}ssTb^{1}ssAb^1**
4217	16	218ab	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^1**dGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
4217	16	218ac	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^1**dGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdCsdCs**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
4217	16	218ad	**C*b^{6}sAb^{6}sTb^{6}s**dGdAdAdTdGdGdAdCdC**Ab^{6}sGb^{6}sTb^{6}sAb^6**
4217	16	218ae	**C*b^{7}sAb^{7}sTb^{7}sGb^{7}s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{7}sTb^{7}sAb^7**
4217	16	218af	**C*bs^{1}Ab^{1}s**dUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdUsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218b	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^1**sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218m	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218n	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^1**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
4217	16	218o	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218p	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218q	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218c	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218r	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^1**dGdAdAdTdGdGdAdCdC**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
4217	16	218s	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGdAdAdTdGdGdAdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218t	**/5SpC3s/C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^1**

[1149]

[1150]

			sAb^1
4217	16	218u	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1 /3SpC3s/**
4217	16	218v	**/5SpC3s/C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^1 sAb^1/3SpC3s/**
4217	16	218ag	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdA*sdA*sdUsdGsdGsdA*sdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218ah	**C*b^{4}ssAb^{4}ssTb^{4}ss**dGssdA*ssdA*ssdTssdGssdGssdA*ssdCssdCssdAssdGss **Tb^{4}ssAb^4**
4217	16	218ai	**C*b^{2}ssAb^{2}ssTb^{2}ssGb^{2}ss**dAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGss dTss**Ab^2**
4217	16	218aj	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^{1}Gb^1**dAdAdUdGdGdAdCdC**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^1**
4217	16	218ak	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dA*sdUsdGsdGsdAsdCsdCsdA*s**Gb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218am	**C*b^{1}sAb^{1}s**dUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdCs**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4217	16	218an	**C*b^{6}sAb^{6}sTb^{6}sGb^{6}s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{6}sTb^{6}sAb^6**
4217	16	218ao	**C*b^{7}sAb^{7}sTb^{7}s**dGsdA*sdA*sdUsdGsdGsdAsdCsdCsdA*s**Gb^{7}sTb^{7}sAb^7**
4217	16	218ap	**C*b^{4}sAb^{4}sTb^{4}sGb^{4}s**dA*sdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*sdAsdGs**Tb^{4}sAb^4**
4217	16	218aq	**C*b^{4}Ab^{4}Tb^{4}Gb^4**dAdAdTdGdGdAdCdCdAdG**Tb^{4}Ab^4**
4217	16	218ar	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^1**sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sAb^1**
4216	17	224a	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sAb^{1}s**dAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^1**
4216	17	224b	**C*b^{2}sAb^{2}sTb^{2}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{2}sGb^{2}sTb^{2}sAb^{2}sTb^2**
4216	17	224c	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sGb^{1}s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb^{1}sAb^{1}sTb^1**
4216	17	224d	**C*b^{1}s**dAsdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^1**
4216	17	224e	**C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*s**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1 sTb^1**
4216	17	224f	**C*b^{1}Ab^1**dTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdA**Gb^{1}Tb^{1}Ab^{1}Tb^1**
4216	17	224g	**C*b^{1}s**dAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb^{1}sAb^{1}sTb^1**
4216	17	224h	**C*b^{1}Ab^{1}Tb^{1}Gb^{1}Ab^1**dA*dTdGdGdA*dC*dC*dAdGdT**Ab^{1}Tb^1**
4216	17	224i	**C*b^{1}ssAb^{1}ssTb^{1}ssGb^{1}ssAb^{1}ss**dAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGss **Tb^{1}ssAb^{1}ssTb^1**
4216	17	224j	**C*b^{4}Ab^{4}Tb^4**dGdA*dA*dTdGdGdA*dCdCdA**Gb^{4}Tb^{4}Ab^{4}Tb^4**
4216	17	224k	**C*b^{6}sAb^{6}sTb^{6}s**dGsdA*sdA*sdUsdGsdGsdA*sdC*sdC*sdAsdGs**Tb^{6}sAb^{6}sTb^6**
4216	17	224m	**C*b^{7}sAb^{7}sTb^{7}sGb^{7}s**dAdAdTdGdGdAdC*dC*dAs**Gb^{7}sTb^{7}sAb^{7}sTb^7**
4216	18	225a	**Tb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sGb^{1}s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^1 sTb^1**
4216	18	225b	**Tb^{7}sC*b^{7}sAb^{7}sTb^{7}sGb^{7}s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTsdAs**Tb^7**
4216	18	225c	**Tb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sdAs**Gb^{1}sTb^{1}sAb^1 sTb^1**
4216	18	225d	**Tb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^1**

[1151]

4216	18	225e	**Tb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb^{1}sAb^{1}sTb^1**
4216	18	225f	**Tb^{1}C*b^1**dA*dTdGdAdAdUdGdGdAdCdC***Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^{1}Tb^1**
4216	18	225g	**Tb^{4}C*b^{4}Ab^{4}Tb^{4}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCs**Ab^{4}Gb^{4}Tb^{4}Ab^{4}Tb^4**
4216	18	225h	**Tb^{1}ssC*b^{1}ssAb^{1}ss**dTssdGsssdA*ssdA*ssdTssdGsssdGsssdAssdCssdC*ssdA*ssdGss**Tb^{1}ssAb^{1}ssTb^1**
4216	18	225i	**Tb^{2}C*b^{2}Ab^2**dTdGdAdAdTdGdGdAdC*dC***Ab^{2}Gb^{2}Tb^{2}Ab^{2}Tb^2**
4215	19	226a	**Tb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sGb^{1}s**dAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sTb^1**
4215	19	226b	**Tb^{6}C*b^{6}Ab^{6}Tb^{6}Gb^6**dAdAdTdGdGdAdCdCdA**Gb^{6}Tb^{6}Ab^{6}Tb^{6}Tb^6**
4215	19	226c	**Tb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTs**Ab^{1}sTb^{1}sTb^1**
4215	19	226d	**Tb^{1}s**dCsdAsdTsdGsdAsdA*sdUsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sTb^1**
4215	19	226e	**Tb^{4}sC*b^{4}s**dAsdUsdGsdAsdAsdUsdGsdGsdAsdCsdC*sdAsdGs**Tb^{4}sAb^{4}sTb^{4}sTb^4**
4215	19	226f	**Tb^{2}ssC*b^{2}ssAb^{2}ssTb^{2}ssGb^{2}ss**dAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssdAssdGssdTssdAss**Tb^{2}ssTb^2**
4215	20	227a	**C*b^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sTb^1**
4215	20	227b	**C*b^{2}sTb^{2}sC*b^{2}s**dAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{2}sTb^{2}sAb^{2}sTb^{2}sTb^2**
4215	20	227c	**C*b^{1}Tb^{1}C*b^1**dAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdC*dAdG**Tb^{1}Ab^{1}Tb^{1}Tb^1**
4215	20	227d	**C*b^{1}s**dUsdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sTb^1**
4215	20	227e	**C*b^{4}sTb^{4}sC*b^{4}sAb^{4}s**dTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb^{4}sAb^{4}sTb^{4}sTb^4**
4214	22	228a	**Tb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGs**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sTb^{1}sC*b^1**
4214	22	228b	**Tb^{1}C*b^{1}Tb^{1}C*b^{1}Ab^1**dTdGdAdAdTdGdGdAdC*dC*dAdG**Tb^{1}Ab^{1}Tb^{1}Tb^{1}C*b^1**
4214	22	228c	**Tb^{6}sC*b^{6}sTb^{6}s**dCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTs**Ab^{6}sTb^{6}sTb^{6}sC*b^6**
4213	24	229a	**Ab^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sC*b^{1}s**dAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCsdAsdGsdTs**Ab^{1}sTb^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sTb^1**
4213	24	229b	**Ab^{1}Tb^{1}C*b^{1}Tb^{1}C*b^1**AdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdT**Ab^{1}Tb^{1}Tb^{1}C*b^{1}Tb^1**
4212	26	230a	**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTsdAs**Tb^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^1**
4212	26	230a	**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}s**dCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTsdAs**Tb^{1}sTb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^1**

[1152]

4212	26	230b	**Tb^{1}Ab^{1}Tb^{1}C*b^{1}Tb^1**dCdAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTdA**Tb^{1}Tb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Ab^1**
4211	28	231a	**Ab^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sC*b^{1}s**dTsdCsdAsdTsdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsdAsdGsdTsdAsdTs**Tb^{1}sC*b^{1}sTb^{1}sAb^{1}sGb^1**
4211	28	231b	**Ab^{1}Tb^{1}Ab^{1}Tb^{1}C*b^1**dTdCdAdTdGdAdAdTdGdGdAdCdCdAdGdTdAdT**Tb^{1}C*b^{1}Tb^{1}Ab^{1}Gb^1**

[1153] 表9

[1154]

SP	L	Seq ID No.	序列 5'-3'
2358	10	284a	**C*b^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdAsdAsdTsdA*s**Ab^{1}sAb^1**
2358	10	284b	**C*b^{1}Ab^1**dTdTdA*dAdTdA***Ab^{1}Ab^1**
2357	12	285a	**Gb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdA*sdA*sdTsdAs**Ab^{1}sAb^{1}sGb^1**
2357	12	285b	**Gb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdA*sdA*sdTsdAsdA*s**Ab^{1}sGb^1**
2357	12	285c	**Gb^{1}sC*b^{1}s**dAsdTsdTsdA*sdA*sdUsdAsdA*sdA*s**Gb^1**
2357	12	285d	**Gb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**Ab^{1}sGb^1**
2357	12	285e	**Gb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdA*s**Ab^{1}sGb^1**
2357	12	285f	**Gb^{1}C*b^{1}Ab^1**dTdTdA*dA*dTdA**Ab^{1}Ab^{1}Gb^1**
2356	13	286a	**Gb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdAsdAsdTsdAsdAs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^1**
2356	13	286b	**Gb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}s**dTsdA*sdA*sdTsdAsdAs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^1**
2356	13	286c	**Gb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dUsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdA*s**Gb^{1}sTb^1**
2356	13	286d	**Gb^{1}sC*b^{1}s**dAsdTsdTsdAsdA*sdUsdAsdAsdAsdGs**Tb^1**
2356	13	286e	**Gb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAs**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^1**
2356	13	286f	**Gb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdA*s**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^1**
2356	13	286g	**Gb^{1}C*b^{1}Ab^{1}Tb^1**dUdAdAdUdAdA**Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**
2356	14	287a	**Gb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdA*sdAsdTsdAs**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^1**
2356	14	287b	**Gb^{4}sGb^{4}sC*b^{4}sAb^{4}s**dTsdTsdA*sdAsdUsdAsdAsdA*s**Gb^{4}sTb^4**
2356	14	287c	**Gb^{1}s**dGsdCsdAsdUsdUsdAsdAsdTsdA*sdA*sdA*sdGs**Tb^1**
2356	14	287d	**Gb^{2}sGb^{2}sC*b^{2}s**dA*sdUsdTsdA*sdAsdTsdAsdA*s**Ab^{2}sGb^{2}sTb^2**
2356	14	287e	**Gb^{1}Gb^{1}C*b^{1}Ab^{1}s**dTsdTsdAsdAsdTsdA*sdA*s**Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**
2356	14	287f	**Gb^{1}sGb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAs**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^1**
2356	14	287g	**Gb^{1}sGb^{1}s**dC*sdA*sdTsdTsdA*sdA*sdTsdA*s**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^1**
2356	14	287h	**Gb^{1}Gb^1**dC*dAdTdTdAdAdTdA**Ab^{1}Ab^{1}Gb^{1}Tb^1**
2356	14	287i	**Gb^{4}ssGb^{4}ss**dCssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAss**Ab^{4}ssAb^{4}ssGb^{4}ssTb^4**
2356	14	287j	**Gb^{4}ssGb^{4}ss**dC*ssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAss**Ab^{4}ssAb^{4}ssGb^{4}ssTb^4**
2355	15	288a	Gb^{1}sGb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}s**Gb^1**
2355	15	288b	Gb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdA*sdA*sdTsdAsdAsdAsdGsdTsGb^1**
2355	15	288c	Gb^{4}sGb^{4}sC*b^{4}s**dAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGsTb^{4}sGb^4**

[1155]

2355	15	288d	**Gb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dTdTdAdAdTdAdAs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	15	288e	**Gb^{1}Gb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2355	15	288f	Gb^1**ss**Gb^1**ss**dCssdAssdUssdUssdAssdAssdUssdAssdAssdAssdGss**Tb^{1}ssGb^1**
2355	15	288g	Gb^1**ss**Gb^1**ss**dCssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssdAssdAssdGssdTss**Gb^1**
2355	15	288h	**Gb^{6}Gb^{6}C*b^6**dA*dTdTdAdAdUdA*dA*dA**Gb^{6}Tb^{6}Gb^6**
2355	15	288i	**Gb^{1}Gb^{1}C*b^1**dAdTdTdAdAdUdAdAdA**Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2355	16	289a	**Ab^{1}sGb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dTsdTsdA*sdA*sdTsdA*s**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	16	289b	**Ab^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAs**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	16	289c	**Ab^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dC*sdA*sdTsdTsdA*sdA*sdTsdA*s**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	16	289d	**Ab^{2}sGb^{2}sGb^{2}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAs**Ab^{2}sAb^{2}sGb^{2}sTb^{2}sGb^2**
2355	16	289e	**Ab^{1}s**dGsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAs**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	16	289f	**Ab^{1}s**dGsdGsdC*sdAsdTsdUsdAsdAsdUsdAs**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	16	289g	**Ab^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	16	289h	**Ab^{1}sGb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dA*sdTsdTsdA*sdA*sdTsdA*sdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	16	289i	**Ab^{6}sGb^{6}sGb^{6}s**dC*sdA*sdUsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{6}sTb^{6}sGb^6**
2355	16	289j	**Ab^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	16	289k	**Ab^{1}s**dGsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	16	289m	**Ab^{1}Gb^{1}Gb^{1}C*b^{1}Ab^1**dUdTdA*dA*dTdAdAdAdG**Tb^{1}Gb^1**
2355	16	289n	**Ab^{1}Gb^1**dGdC*dAdTdTdAdAdTdAdA**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2355	16	289o	**Ab^{4}Gb^{4}Gb^4**dCdA*dTdTdAdAdTdAdA***Ab^{4}Gb^{4}Tb^{4}Gb^4**
2355	16	289p	**Ab^{1}ssGb^{1}ssGb^{1}ssC*b^{1}ssAb^{1}ss**dTssdTssdAssdAssdTssdAssdAssdAss**Gb^{1}ssTb^{1}ssGb^1**
2355	16	289q	**Ab^{7}sGb^{7}sGb^{7}sC*b^{7}s**dA*dTdTdAdAdTdAdA*s**Ab^{7}sGb^{7}sTb^{7}sGb^7**
2355	17	213j	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	17	213k	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	17	213m	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdA*sdA*s**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	17	213n	**C*b^{1}Ab^{1}Gb^1**dGdC*dAdTdTdAdAdTdAdAdA**Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2355	17	213o	**/5SpC3s/C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	17	213p	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1 /3SpC3s/**
2355	17	213q	**/5SpC3s/C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1/3SpC3s/**
2355	17	213r	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdUsdAsdAsdA*s**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	17	213s	**C*b^{6}sAb^{6}sGb^{6}s**dGdC*dAdTdTdAdAdTdAdAdAs**Gb^{6}sTb^{6}sGb^6**
2355	17	213t	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGdC*dAdTdTdAdAdTdAdAdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1**

[1156]

2355	17	213u	**C*b^{1}Ab^{1}Gb^{1}s**dGsdC*sdAsdUsdUsdAsdAsdUsdAsdAsdAs**Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2355	17	213v	**C*b^{1}Ab^{1}Gb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdA*sdTsdAsdAsdA*s**Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2355	17	213w	**C*b^{1}Ab^{1}Gb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2355	17	213x	**C*b^{7}sAb^{7}sGb^{7}sGb^{7}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{7}sTb^{7}sGb^7**
2355	17	213y	**C*b^{6}sAb^{6}sGb^{6}sGb^{6}s**dCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{6}sTb^{6}sGb^6**
2355	17	213z	**C*b^{7}sAb^{7}sGb^{7}s**dGsdCsdA*sdUsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**Ab^{7}sGb^{7}sTb^{7}sGb^7**
2355	17	213aa	**C*b^{4}sAb^{4}sGb^{4}sGb^{4}s**dC*sdA*sdTsdTsdAsdAsdTsdAsdA*sdAsdGs**Tb^{4}sGb^4**
2355	17	213ab	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dA*sdTsdTsdTsdA*sdA*sdTsdAsdA*sdA*s**Gb^{1}sTb^1 sGb^1**
2355	17	213ac	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdCsdAsdTsdTsdA*sdA*sdTsdAs**Ab^{1}sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	17	213ad	**C*b^{1}sAb^{1}s**dGsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdUsdAsdAs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2355	17	213ae	**C*b^{1}ssAb^{1}ssGb^{1}ss**dGssdC*ssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssdAss**Ab^1 ssGb^{1}ssTb^{1}ssGb^1**
2355	17	213af	**C*b^{4}ssAb^{4}ssGb^{4}ss**dGssdCssdAssdTssdTssdA*ssdAssdTssdAssdAssdAss dGss**Tb^{4}ssGb^4**
2355	17	213ag	**C*b^{2}ssAb^{2}ssGb^{2}ssGb^{2}ss**dCssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssdAssdAss dGssdTss**Gb^2**
2355	17	213ah	**C*b^{1}Ab^{1}Gb^{1}Gb^1**dCdAdTdTdAdAdUdAdA**Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2355	17	213ai	**C*b^{4}Ab^{4}Gb^{4}Gb^4**dCdAdTdTdAdAdTdAdAdAdG**Tb^{4}Gb^4**
2355	17	213aj	**C*b^{1}Ab^{1}Gb^1**dGdCdAdTdTdAdAdUdAdAdA**Gb^{1}Tb^{1}Gb^1**
2355	17	213ak	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sGb^1**sdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2354	18	290a	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}s**dAsdTsdTsdAsdAsdTsdA*sdAs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^1 sC*b^1**
2354	18	290b	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1 sC*b^1**
2354	18	290c	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGs**Tb^{1}sGb^1 sC*b^1**
2354	18	290d	**C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^1 sC*b^1**
2354	18	290e	**C*b^{7}sAb^{7}sGb^{7}sGb^{7}sC*b^{7}s**dA*sdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGsdTsdG **sC*b^7**
2354	18	290f	**C*b^{4}Ab^{4}Gb^{4}Gb^{4}s**dCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdA*sdAs**Ab^{4}Gb^{4}Tb^{4}Gb^{4}C*b^4**
2354	18	290g	**C*b^{1}ssAb^{1}ssGb^{1}ss**dGssdC*ssdAssdTssdTssdA*ssdAssdTssdA*ssdAssdA* ssdGss**Tb^{1}ssGb^{1}ssC*b^1**
2354	18	290h	**C*b^{2}Ab^{2}Gb^2**dGdC*dAdTdTdAdAdTdAdA**Ab^{2}Gb^{2}Tb^{2}Gb^{2}C*b^2**
2354	18	290i	**C*b^{1}Ab^1**dGdGdC*dA*dUdUdAdAdUdA*dA***Ab^{1}Gb^{1}Tb^{1}Gb^{1}C*b^1**
2354	19	291a	**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^1 sGb^{1}sC*b^1**

2354	19	291b	**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGs**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2354	19	291c	**Ab^{4}sC*b^{4}s**dAsdGsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdUsdAsdAsdAs**Gb^{4}sTb^{4}sGb^{4}sC*b^4**
2354	19	291d	**Ab^{1}s**dC*sdAsdGsdGsdC*sdA*sdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAs**Ab^{1}sGb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sC*b^1**
2354	19	291e	**Ab^{2}ssC*b^{2}ssAb^{2}ssGb^{2}ssGb^{2}ss**dCssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssdAssdAssdGssdTss**Gb^{2}ssC*b^2**
2354	19	291f	**Ab^{6}C*b^{6}Ab^{6}Gb^{6}Gb^6**dC*dAdTdTdAdAdTdAdA**Ab^{6}Gb^{6}Tb^{6}Gb^{6}C*b^6**
2353	20	292a	**Ab^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sGb^{1}s**dC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sAb^1**
2353	20	292b	**Ab^{2}sC*b^{2}sAb^{2}s**dGsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAs**Gb^{2}sTb^{2}sGb^{2}sC*b^{2}sAb^2**
2353	20	292c	**Ab^{1}s**dC*sdAsdGsdGsdC*sdAsdUsdUsdAsdAsdUsdAsdAsdAs**Gb^{1}sTb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sAb^1**
2353	20	292d	**Ab^{4}sC*b^{4}sAb^{4}sGb^{4}s**dGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGs**Tb^{4}sGb^{4}sC*b^{4}sAb^4**
2353	20	292e	**Ab^{1}C*b^{1}Ab^1**dGdGdC*dAdTdTdAdAdTdAdAdAdG**Tb^{1}Gb^{1}C*b^{1}Ab^1**
2352	22	293a	**Tb^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}s**dGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGs**Tb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sAb^1**
2352	22	293b	**Tb^{1}Ab^{1}C*b^{1}Ab^{1}Gb^1**dGdC*dAdTdTdAdAdTdAdAdAdG**Tb^{1}Gb^{1}C*b^{1}Ab^{1}Ab^1**
2352	22	293c	**Tb^{6}sAb^{6}sC*b^{6}s**dAsdGsdGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGs**Tb^{6}sGb^{6}sC*b^{6}sAb^{6}sAb^6**
2351	24	294a	**Ab^{1}sTb^{1}sAb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}s**dGsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGsdTs**Gb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}sAb^{1}sAb^1**
2351	24	294b	**Ab^{1}Tb^{1}Ab^{1}C*b^{1}Ab^1**dGdGdC*dAdTdTdAdAdTdAdAdAdGdT**Gb^{1}C*b^{1}Ab^{1}Ab^{1}Ab^1**
2350	26	295a	**Tb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sAb^{1}sC*b^{1}s**dAsdGsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGsdTsdGs**C*b^{1}sAb^{1}sAb^{1}sAb^{1}sTb^1**
2350	26	295b	**Tb^{1}Ab^{1}Tb^{1}Ab^{1}C*b^1**dAdGdGdC*dAdTdTdAdAdTdAdAdAdGdTdG**C*b^{1}Ab^{1}Ab^{1}Ab^{1}Tb^1**
2349	28	236a	**Ab^{1}sTb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s**dC*sdAsdGsdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsdGsdTsdGsdC*s**Ab^{1}sAb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sGb^1**
2349	28	236b	**Ab^{1}Tb^{1}Ab^{1}Tb^{1}Ab^1**dC*dAdGdGdCdAdTdTdAdAdTdAdAdAdGdTdGdC***Ab^{1}Ab^{1}Ab^{1}Tb^{1}Gb^1**

[1157]

[1158] 药物组合物

[1159] 本发明的反义寡核苷酸优选以其药学活性盐的形式施用，任选使用基本上无毒的药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂、溶剂或稀释剂。本发明的药物在常规的固体或液体载体或稀释剂和常规药学上制备的佐剂中以合适的剂量水平以已知方式制备。优选的制备物和制剂在合适于以下的可施用的形式中：输注或注射(鞘内，脑室内，颅内，静脉内，实质内，肿瘤内，眼内或眼外，腹膜内，肌内，皮下)、局部施用于大脑，吸入，局部施用至实体瘤中或口服应用。然而，其它应用形式也是可能的，例如通过上皮或粘膜皮肤衬里(口腔粘膜，直肠和阴道上皮衬里，鼻咽粘膜，肠粘膜)，直肠，经皮，局部，皮内，胃内，皮内，阴道内，脉管内，

鼻内，口腔内，经皮，舌下施用或制药领域中可获得的任何其它手段。

[1160] 可施用的制剂例如包括可注射液体制剂，延迟制剂，粉剂，特别是用于吸入的粉剂，丸剂，片剂，膜片剂，包衣片剂，可分散颗粒剂，糖衣丸，凝胶剂，糖浆剂，浆液，悬浮液，乳剂，胶囊和沉淀剂。其它可施用的盖仑制剂也是可能的，例如通过可植入泵或导管进入脑的连续注射。

[1161] 如本文所用，术语“药学上可接受的”是指不影响反义寡核苷酸作为制剂中的活性成分的生物活性的有效性并且对其所施用的宿主无毒性的任何载体。合适的药物载体的实例是本领域公知的，并且包括磷酸缓冲盐溶液，水，乳液，例如油/水乳液，各种类型的润湿剂，无菌溶液等。这样的载体可以通过常规方法配制，活性化合物可以以有效剂量施用于受试者。

[1162] “有效剂量”是指反义寡核苷酸作为活性成分的量，其足以影响疾病的进程和严重程度，从而导致这种病理学的减轻或缓解。用于治疗和/或预防这些疾病或病症的“有效剂量”可以使用本领域技术人员已知的方法来确定。此外，本发明的反义寡核苷酸可以与脂质体、复合物形成剂、受体靶向分子、溶剂、防腐剂和/或稀释剂一起混合并施用。

[1163] 优选的是输注溶液或固体基质形式的药物制剂，其用于连续释放活性成分，特别是用于本发明的至少一种反义寡核苷酸的鞘内施用，脑室内施用或颅内施用的连续输注。还优选的是适用于局部施用至脑的溶液或固体基质形式的药物制剂。对于肺的纤维化疾病，吸入制剂是特别优选的。

[1164] 即用无菌溶液包含例如至少一种浓度范围为1至10mg/ml，优选5-10mg/ml的反义寡核苷酸和选自例如糖诸如蔗糖、乳糖、甘露醇或山梨醇的等渗剂。也可以包括将溶液pH控制在6至8(优选7-8)的合适的缓冲剂。制剂的另一种任选成分可以是非离子表面活性剂，例如吐温20或吐温80。

[1165] 待重构的无菌冻干粉末包含至少一种反义寡核苷酸，以及任选地填充剂(例如甘露醇，海藻糖，山梨醇，甘氨酸)和/或冷冻保护剂(例如海藻糖，甘露醇)。用于重构的溶剂可以是用于可注射化合物的水，具有或不具有缓冲盐以将pH控制在6至8。

[1166] 适用于吸入的气溶胶制剂可包括粉末形式的溶液和固体，其可与药学上可接受的载体例如惰性压缩气体例如氮组合。

[1167] 特别优选的药物组合物是适合用于通过吸入施用或用于静脉内施用的冻干(冷冻干燥)制剂(冻干物)。为了制备优选的冻干制剂，将本发明的至少一种反义寡核苷酸溶解在4至5％(w/v)甘露醇溶液中，然后将溶液冻干。甘露醇溶液也可以如上所述在合适的缓冲溶液中制备。

[1168] 合适的冷冻/冻干保护剂(另外称为填充剂或稳定剂)的其它实例包括无硫醇白蛋白，免疫球蛋白，聚亚烷基氧化物(例如PEG，聚丙二醇)，海藻糖，葡萄糖，蔗糖，山梨醇，葡聚糖，麦芽糖，棉子糖，水苏糖和其它糖(参见例如WO 97/29782)，而优选使用甘露醇。这些可以以常规量用于常规的冻干技术。冷冻干燥的方法在制备药物制剂的领域中是熟知的。

[1169] 对于通过吸入施用，冻干制剂的粒径优选为2至5μm，更优选为3至4μm。冻干制剂特别适用于使用吸入器(例如**OPTINEB®**或VENTA-**NEB®**吸入器(NEBU TEC，Elsenfeld，Germany))进行施用。冻干产品可以在无菌蒸馏水或用于吸入施用的任何其它合适的液体中再水合。或者，为了静脉内施用，可将冻干产品在无菌蒸馏水或用于静脉内施用的任何其

它合适的液体中再水合。

[1170] 在用于在无菌蒸馏水或另一种合适的液体中的施用的再水化后，冻干制剂应具有用于再水合肽制剂的靶组织(即用于静脉内施用的血液或用于吸入施用的肺组织)的近似生理摩尔渗透压浓度。因此，优选的是，再水合的制剂基本上是等渗的。

[1171] 静脉注射、口服施用或吸入施用的优选剂量浓度为10至2000μmol/ml，更优选为200至800μmol/ml。

[1172] 对于片剂或胶囊形式的口服施用，至少一种反义寡核苷酸可与任何口服无毒的药学上可接受的惰性载体如乳糖、淀粉、蔗糖、纤维素、硬脂酸镁、磷酸氢钙、硫酸钙、滑石、甘露醇、乙醇(液体形式)等组合。此外，当期望或需要时，也可以在混合物中掺入合适的粘合剂，润滑剂，崩解剂和着色剂。粉末和片剂可以包含约5至约95％的本发明的组合物。

[1173] 合适的粘合剂包括淀粉，明胶，天然糖，玉米甜味剂，天然和合成树胶如阿拉伯胶，藻酸钠，羧甲基纤维素，聚乙二醇和蜡。提及的可用于这些剂型的润滑剂包括硼酸，苯甲酸钠，乙酸钠，氯化钠等。崩解剂包括淀粉，甲基纤维素，瓜尔胶等。

[1174] 另外，本发明的组合物可以配制成持续释放形式以提供至少一种反义寡核苷酸的速率控制释放以优化治疗效果。用于持续释放的合适剂型包括含有至少一种反义寡核苷酸的用于持续释放的可植入的生物可降解基质，含有不同崩解速率层的层压片剂或用至少一种反义寡核苷酸浸渍的控释聚合物基质。

[1175] 液体形式的制剂包括溶液，悬浮液和乳液。作为一个例子，可以提及用于肠胃外注射的水或丙二醇水溶液或添加用于口服溶液、悬浮液和乳液的甜味剂和遮光剂。

[1176] 合适的稀释剂是通常构成组合物或剂型的主要部分的物质。合适的稀释剂包括糖如乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨醇，衍生自小麦、玉米、稻和马铃薯的淀粉，以及纤维素如微晶纤维素。组合物中稀释剂的量可以为总组合物的约5重量％至约95重量％，优选约25重量％至约75重量％。

[1177] 术语“崩解剂”是指添加到组合物中以帮助其分解(瓦解)并释放药物的材料。合适的崩解剂包括淀粉，“冷水可溶的”改性淀粉例如羧甲基淀粉钠，天然和合成树胶如刺槐豆，刺梧桐，瓜尔胶，黄蓍胶和琼脂，纤维素衍生物如甲基纤维素和羧甲基纤维素钠，微晶纤维素和交联的微晶纤维素如交联羧甲纤维素钠，藻酸盐如藻酸和海藻酸钠，粘土如膨润土和泡腾混合物。组合物中崩解剂的量可以为组合物的约1至约40重量％，优选组合物的2至约30重量％，更优选为组合物的约3至20重量％，并且最优选约5至约10重量％。

[1178] 粘合剂表征将粉末粘合或“胶合”在一起并通过形成颗粒使其凝聚的物质，从而用作制剂中的“粘着剂”。粘合剂增加稀释剂或填充剂中已经可用的凝聚强度。合适的粘合剂包括糖如蔗糖，衍生自小麦、玉米和马铃薯的淀粉；天然树胶如阿拉伯胶，明胶和黄蓍胶；海藻衍生物如海藻酸，海藻酸钠和藻酸铵钙；纤维素材料如甲基纤维素和羧甲基纤维素钠和羟丙基甲基纤维素；聚乙烯吡咯烷酮和无机物如硅酸镁铝。组合物中的粘合剂的量可以为组合物的约1-30重量％，优选为组合物的约2-约20重量％，更优选约3-约10重量％，甚至更优选约3至约6重量％。

[1179] 润滑剂是指加入到剂型中以使片剂、颗粒等在压片后能够通过减少摩擦或磨损而从模具或冲模中释放的物质。合适的润滑剂包括金属硬脂酸盐，例如硬脂酸镁，硬脂酸钙或硬脂酸钾，硬脂酸；高熔点蜡；和水溶性润滑剂，如氯化钠，苯甲酸钠，乙酸钠，油酸钠，聚乙

二醇和D,L-亮氨酸。润滑剂通常在压制前的最后一个步骤中加入,因为它们必须存在于颗粒表面以及它们与压片机的部件之间。组合物中润滑剂的量可以为组合物的约0.05至约15重量%,优选为组合物的0.2至约5重量%,更优选约0.3至约3重量%,最优选约0.3至约1.5重量%。

[1180] 助流剂是防止结块并改善颗粒的流动特性以使流动平滑均匀的材料。合适的助流剂包括二氧化硅和滑石。组合物中助流剂的量可以为组合物的约0.01至10重量%,优选为总组合物的0.1重量%至约7重量%,更优选为约0.2至5重量%,最优选为约0.5至约2重量%。

[1181] 在本文公开的药物组合物中,反义寡核苷酸优选以其盐的形式并入并任选与其它增加反义寡核苷酸稳定性、增加RNA酶H的招募、增加靶发现性质、增强细胞摄取等的组分一起并入。为了实现这些目的,反义寡核苷酸可以被化学修饰,从而替代或附加于可用于实现这些目的的其它组分的使用。因此,本发明的反义寡核苷酸可以化学连接到增强反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取等的部分或组分。这样的部分包括脂质部分,例如胆固醇部分,胆酸,硫醚,己基-S-三苯甲硫醇,硫代胆固醇,脂族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基,磷脂如二十六烷基外消旋甘油或三乙基铵-1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油基-3H-膦酸酯,多胺或聚乙二醇链,或金刚烷乙酸,棕榈基部分或十八胺或己基氨基羰基氧胆固醇部分。本发明还包括作为嵌合化合物的反义寡核苷酸。本发明上下文中的“嵌合”反义寡核苷酸是含有两个或更多个化学不同区域的反义寡核苷酸,一个是本文所公开的寡核苷酸序列,其连接到用于增加细胞摄取、增加对核酸酶降解的抗性、增加对靶核酸的结合亲和力、增加RNA酶H的招募等的部分或组分。例如,反义寡核苷酸的附加区域或部分或组分可以用作能够切割RNA:DNA杂交体或RNA:RNA分子的酶的底物。作为实例,RNA酶H是切RNA:DNA双链体的RNA链的细胞内核糖核酸酶。因此,RNA酶H的激活导致作为编码TGF-R_{II}的mRNA的RNA靶的切割,从而大大提高了反义寡核苷酸抑制基因表达的效率。因此,当使用嵌合寡核苷酸时,通常可以用较短的寡核苷酸获得可比较的结果。

[1182] 适应症

[1183] 本发明涉及本文所公开的反义寡核苷酸用于预防和治疗神经变性疾病、神经创伤、神经血管和神经炎性疾病(包括中枢神经系统(CNS)的感染后和炎性疾病)的用途。

[1184] 本发明的反义寡核苷酸可特别用于促进损伤的神经通路的再生和功能重新连接和/或用于治疗和补偿年龄诱导的神经元干细胞更新的减少。

[1185] 因此,本发明的另一方面涉及本文公开的反义寡核苷酸用于通过再激活神经发生、允许神经元分化和迁移以及诱导将新神经元整合到解剖和功能性神经元回路来促进再生神经元组织的用途。

[1186] 本发明的另一方面涉及本文公开的反义寡核苷酸用于促进具有神经系统损伤或由纤维化引起的其它器官系统的损伤或干细胞周转损失的患者中的再生和临床(结构)修复的用途。

[1187] 此外,反义寡核苷酸可用于补偿和治疗由年龄、炎症或基因缺陷诱导的神经元干细胞更新的减少。

[1188] 本发明的反义寡核苷酸抑制TGF-R_{II}表达,因此用于治疗与上调或增强的TGF-R_{II}和/或TGF-R_{II}水平相关的疾病。

[1189] 因此，本发明的另一方面涉及反义寡核苷酸在预防和治疗神经变性疾病，神经炎性疾病，创伤性或创伤后病症，血管或更精确的地神经血管病症，缺氧性疾病，感染后中枢神经系统疾病，纤维化疾病，过度增生性疾病，癌症，肿瘤，老年性耳聋和老花眼中的用途。

[1190] 术语“神经变性疾病”或“神经系统疾病”或“神经炎性疾病”是指影响中枢或外周神经系统的任何疾病、病症或病况，包括ADHD，AIDS-神经系统并发症，透明膈的不存在，获得性癫痫样失语症，急性播散性脑脊髓炎，肾上腺脑白质营养不良，胼胝体发育不全，失认症，艾卡迪综合征，亚历山大病，阿尔卑斯病，交替性偏瘫，阿尔茨海默病，肌萎缩性侧索硬化(ALS)，无脑畸形动脉瘤，安格曼综合征，血管瘤病，缺氧症，失语症，失用症，蛛网膜囊肿，蛛网膜炎，Arnold-Chiari畸形，动静脉畸形，阿司帕坦，阿斯伯格综合征，共济失调毛细血管扩张，共济失调，注意力缺陷多动障碍，自闭症，自律性功能障碍，背痛，Barth综合征，Batten病，贝科氏病，贝尔麻痹，良性特发性眼睑痉挛，良性局限性肌萎缩，良性颅内高血压，Bernhardt-Roth综合征，宾斯旺格病，眼睑痉挛，Bloch-Sulzberger综合征，臂丛产伤，臂丛损伤，Bradbury-Eggleston综合征，脑动脉瘤，脑损伤，脑和脊髓肿瘤，Brown-Sequard综合征，球茎肌萎缩，Canavan疾病，腕管综合征，疝气，海绵体瘤，海绵状血管瘤，海绵体畸形，中枢性颈椎综合征，中心核综合征，中枢性疼痛综合征，头部疾病，小脑变性，小脑发育不全，脑动脉瘤，脑动脉硬化，脑萎缩，脑气道炎，脑组织障碍，脑缺氧，脑性麻痹，脑脊液眼骨骼综合征，Charcot-Marie牙齿障碍，Chiari畸形，舞蹈病，舞蹈细胞增多症，慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)，慢性直肠不耐症，慢性疼痛，Cockayne综合征II型，Coffin Lowry综合征，昏迷，包括持续植物状态，复杂区域性疼痛综合征，先天性面瘫，先天性肌无力，先天性肌病，先天性血管性海绵体畸形，皮质基底膜变性，颅动脉炎，颅内动脉炎，Creutzfeldt-Jakob综合症，累积性创伤障碍，库兴氏综合症，巨细胞病毒包涵体疾病(CIBD)，巨细胞病毒感染，跳舞眼舞蹈综合症，Dandy-Walker综合征，道森病，德莫西氏症综合征，德杰克兰克氏麻痹，痴呆多发梗死，痴呆皮质下，路易体痴呆，皮肌炎，发育性运动障碍，Devic综合征，糖尿病性神经病，弥漫性硬化症，Dravet综合征，家族性自主神经异常，书写困难，阅读困难，吞咽困难，运动障碍，张力障碍，早期婴儿癫痫性脑病，空肠综合征，昏睡性脑炎，脑炎和脑膜炎，脑疝，脑病，脑源性血管瘤病，癫痫，Erb’s麻痹，Erb-Duchenne和Dejerine-Klumpke麻痹，法布里病，Fahr综合征，昏厥，家族性异体，家族性血管瘤，家族性特发性基底神经节钙化，家族性痉挛性麻痹，发热性癫痫发作(例如，GEFS和GEFS plus)，Fisher综合征，Floppy Infant综合征，弗里德里希共济失调，戈谢病，格斯特曼氏综合征，Gerstmann-Straussler-Scheinker病，巨细胞性动脉炎，巨细胞包涵体病，球样细胞白质营养不良，舌咽神经痛，格林巴氏综合征，HTLV-1相关性脊髓病，霍尔伏登斯特斯病，头部损伤，头痛，连续偏头痛，半面痉挛，偏瘫，遗传性神经病，遗传性痉挛性截瘫，多神经炎型遗传性运动失调，耳部带状疱疹，带状疱疹，平山综合征，前脑无裂畸形，亨廷顿舞蹈病，积水性无脑畸形，正常颅压脑积水，脑积水(特别是TGFβ诱导的脑积水)，脊髓积水，皮质醇增多症，睡眠过度，高血压，低血压，缺氧，免疫介导性脑脊髓炎，包涵体肌炎，失禁性色素沉着症，婴儿期低压症，婴儿植烷酸蓄积病，婴儿雷弗苏姆病，婴儿痉挛，炎症性肌病，肠原性脂质营养不良，颅内囊肿，颅内高血压，Isaac综合征，Joubert综合征，Kearns-Sayre综合征，肯尼迪氏病，舞蹈眼综合征，Kippine-Levin综合征，Klippel-Feil综合征，Klippel-Trenaunay综合征(KTS)，Klüver-Bucy综合征，Korsakoff遗忘综合征，Krabbe病，Kugelberg-Welander

病，库鲁病，朗-爱二氏肌无力综合征，Landau-Kleffner综合征，股外侧皮神经卡压，延髓外侧综合征，学习失能，Leigh病，Lennox-Gastaut综合征，Lesch-Nyhan综合征，脑白质营养不良症，Levine-Critchley综合征，Lewy体痴呆，无脑回畸形，闭锁综合征，Lou Gehrig氏病，狼疮神经系统后遗症，莱姆病-神经系统并发症，Machado-Joseph病，脑肥大，巨脑病，Melkersson-Rosenthal综合征，脑膜炎，梅克斯病，感觉异常性股痛，异染色性脑白质营养不良，小头畸形，偏头痛，Miller Fisher综合征，迷你中风，线粒体肌病，莫比乌综合征，单肢肌萎缩，运动神经元疾病，脑底异常血管网病，粘脂质累积病，粘多糖累积病，多发性梗死性痴呆，多病灶运动神经病，多发性硬化症(MS)，多系统萎缩(MSA-C和MSA-P)，伴随直立性低血压的多系统萎缩，肌营养不良症，先天性肌无力，重症肌无力，髓鞘性弥漫性硬化症，婴幼儿肌阵挛性脑病，肌阵挛，先天性肌病，甲状腺毒性肌病，肌病，先天性肌强直，肌强直，发作性睡病，神经棘红细胞增多症，脑铁积聚神经变性，神经纤维瘤病，精神安定药恶性综合征，艾滋病神经系统并发症，庞贝病神经病学表现，神经性脊髓炎，神经肌肉瘤，神经元蜡样脂褐质沉积，神经元迁移障碍，遗传性神经病，神经类肉瘤病，神经毒性，海绵体痣，尼曼皮克病，O'Sullivan-McLeod综合征，枕骨神经痛，隐性脊柱神经管闭合不全序列征，大田原综合症，橄榄体脑桥小脑萎缩，斜视性眼阵挛，直立性低血压，过度使用综合征，慢性疼痛，类肿瘤综合征，感觉异常，帕金森氏病，parmyotonia congenita，发作性舞蹈手足徐动症，发作性偏头痛，Parry-Romberg，Pelizaeus-Merzbacher疾病，Pena Shokeir II综合征，神经束囊肿，周期性麻痹，周围神经病变，脑室周围白质软化症，持续植物状态，广泛性发育障碍，植烷酸贮积病，Pick病，梨状肌综合征，垂体瘤，多发性肌炎，庞培病，脑穿通畸形，小儿麻痹症后期综合征，带状疱疹后神经痛，感染后脑脊髓炎，姿势性低血压，姿势性直立性心动过速综合征，姿势性心动过速综合征，原发性侧索硬化，朊病毒疾病，进行性半面萎缩，进行性运动共济失调，进行性多灶性脑白质病，进行性硬化性灰质萎缩，进行性核上性麻痹，假性脑瘤，吡哆辛依赖性和吡哆辛应答性疾病，Ramsay Hunt综合征I型，Ramsay Hunt综合征II型，Rasmussen脑炎和其它自身免疫性癫痫，反射交感神经营养不良综合征，婴儿雷弗苏姆病，雷弗苏姆病，重复性运动障碍，重复性压力损伤，不宁腿综合症，逆转录病毒相关性脊髓病，Rett综合征，Reye综合征，Riley-Day综合征，SUNCT头痛，荐神经根囊肿，圣维特舞蹈病，唾液腺疾病，Sandhoff病，Schilder氏病，脑裂畸形，癫痫发作，视隔发育不良，婴幼儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)，惊吓婴儿综合征，带状疱疹，Shy-Drager综合征，干燥综合征，睡眠呼吸暂停，睡眠病，索托综合征，痉挛状态，脊柱裂，脊髓梗死，脊髓损伤，脊髓肿瘤，脊髓性肌萎缩症，脊髓性小脑萎缩症，Steele-Richardson-Olszewski综合征，僵人综合征，纹状体黑质变性，中风，Sturge-Weber综合征，亚急性硬化性全脑炎，皮质下动脉硬化性脑病，吞咽障碍，西德纳姆舞蹈病，晕厥，梅毒性脊髓硬化，脊髓积水痿，脊髓空洞症，系统性红斑狼疮，脊髓痨，迟发性运动障碍，Tarlov囊肿，Tay-Sachs病，颞动脉炎，拴系脊髓综合征，Thomsen病，胸廓出口综合征，甲状腺毒性肌病，三叉神经痛症，Todd麻痹，Tourette综合征，短暂性脑缺血发作，传播性海绵状脑病，横纹性脊髓炎，创伤性脑损伤，震颤，三叉神经痛，热带痉挛性瘫痪，结节性硬化症，血管性勃起性肿瘤，包括颞动脉炎的血管炎，Von Economo氏病，Von Hippel-Lindau病(VHL)，Von Recklinghausen氏病，Wallenberg氏综合征，Werdnig-Hoffinan病，Wernicke-Korsakoff综合征，West综合征，Whipple病，威廉综合征，威尔逊氏病，伴X染色体脊髓延髓肌肉萎缩症以及Zellweger综合征。

[1191] 神经变性疾病和神经炎性疾病的优选实例选自包含以下或由以下组成的组：

[1192] 阿尔茨海默氏病，帕金森病，克雅氏病(CJD)，克雅氏病(nvCJD)，霍氏病，亨廷顿舞蹈病，多系统萎缩，痴呆，额颞痴呆，多发性或遗传背景的运动神经元疾病，肌萎缩侧硬化症(ALS)，脊髓性肌萎缩症，脊髓小脑萎缩症(SCA)，精神分裂症，情感障碍，主要抑郁症，脑膜脑炎，细菌性脑膜脑炎，病毒性脑膜脑炎，CNS自身免疫性疾病，多发性硬化(MS)，急性缺血/缺氧性损害，中风脊髓创伤，头部和脊髓创伤，脑创伤性损伤，动脉硬化，动脉粥样硬化，微血管病变性痴呆，Binswanger病(白细胞变性)，视网膜变性，耳蜗变性，黄斑变性，耳蜗性耳聋，艾滋病相关性痴呆，色素性视网膜炎，脆弱X相关震颤/共济失调综合症(FXTAS)，进行性sup脑脊髓性退化症(SND)，橄榄体脑血肿变性(OPCD)，Shy Drager综合征(SDS)，年龄依赖记忆缺陷，与痴呆相关的神经发育障碍，唐氏综合征，突触核蛋白病，超氧化物歧化酶突变，三核苷酸重复病症如亨廷顿病，创伤，缺氧，血管疾病，血管炎，CNS老化。还可以解决干细胞更新的年龄依赖性减少。

[1193] 神经变性疾病和神经炎性疾病的特别引用的实例选自包括或由以下组成的组：

[1194] 阿尔茨海默病，帕金森病，亨廷顿病，肌萎缩性侧索硬化(ALS)，脑积水(特别是TGFβ诱导的脑积水)，CNS和脊髓创伤如脊髓损伤，头部和脊柱创伤，脑创伤性损伤，视网膜变性，黄斑变性，耳蜗性耳聋，艾滋病相关性痴呆，如亨廷顿病的三核苷酸重复病症和CNS老化。

[1195] 反义寡核苷酸也可用于预防和治疗纤维化疾病。纤维化或纤维变性疾病是在修复或反应过程中在器官或组织中形成过量纤维结缔组织。这可能是反应性、良性或病理状态。对于损伤，这被称为瘢痕形成，并且如果纤维化来自单细胞细胞系，则称为纤维瘤。从生理上讲，这作用于沉积细胞外基质，可以消除涉及的器官或组织的结构和功能。纤维化可用于描述纤维组织过度沉积的病理状态，以及在愈合中结缔组织沉积的过程。纤维化是涉及刺激细胞形成结缔组织的过程，包括胶原和糖胺聚糖。随后间质之间的巨噬细胞和损伤组织释放TGF-β。TGF-β刺激沉积结缔组织的成纤维细胞的增殖和活化。减少TGF-β水平可防止和减少结缔组织的形成，从而预防和治疗纤维化。

[1196] 纤维化疾病的例子是

[1197] 肺：• 肺纤维化

[1198] • 特发性肺纤维化(特发性意味着原因未知)

[1199] • 囊性纤维化

[1200] 肝脏：• 多源性肝硬化

[1201] 心脏：• 心内膜纤维化

[1202] • 老年心肌梗死

[1203] • 心房纤维化

[1204] 其它:纵隔纤维化(纵隔软组织)

[1205] • 青光眼(眼睛，视觉)

[1206] • 骨髓纤维化(骨髓)

[1207] • 腹膜后纤维化(腹膜后软组织)

[1208] • 进行性大量纤维化(肺)；煤矿工人肺尘埃沉着病的并发症

[1209] • 肾源性全身性纤维化(皮肤)

[1210] • 克罗恩病(肠)

[1211] • 瘢痕疙瘩(皮肤)

[1212] • 硬皮病/系统性硬化症(皮肤,肺部)

[1213] • 关节纤维化(膝盖,肩部,其它关节)

[1214] • 佩罗尼病(阴茎)

[1215] • Dupuytren挛缩(手,手指)

[1216] • 某些形式的粘膜囊炎(肩)

[1217] • 红斑狼疮后的残留物

[1218] 因此,本发明的另一方面涉及反义寡核苷酸用于预防和/或治疗以下疾病的用途或反义寡核苷酸用于制备用于预防和/或治疗以下疾病的药物组合物的用途:肺纤维化,囊性纤维化,肝硬化,心内膜纤维化,老年心肌梗塞,心房纤维化,纵隔纤维化,骨髓纤维化,腹膜后纤维化,进行性大量纤维化,肾源性全身性纤维化,青光眼,如原发性开角型青光眼,克罗恩病,瘢痕疙瘩,系统性硬化症,关节纤维化,佩罗氏病,Dupuytren挛缩,以及红斑狼疮后的残留物。

[1219] 本发明的另一个方面涉及反义寡核苷酸用于预防和/或治疗过度增殖性疾病、癌症、肿瘤及其转移的用途,或反义寡核苷酸用于制备用于预防和/或治疗过度增殖性疾病、癌症、肿瘤及其转移的药物的用途。

[1220] 过度增殖性疾病、癌症、肿瘤的实例选自:腺癌,黑素瘤,急性白血病,听神经瘤,壶腹癌,肛门癌,星形细胞瘤,基底细胞癌,胰腺癌,硬纤维瘤,膀胱癌,支气管癌,非小细胞肺癌(NSCLC),乳腺癌,布基特氏淋巴瘤,子宫体癌,CUP综合征(未知原发灶的癌),结肠直肠癌,小肠癌,小肠肿瘤,卵巢癌,子宫内膜癌,室管膜瘤,上皮癌类型,尤因肿瘤,胃肠肿瘤,胃癌,胆囊肿瘤,胆囊癌,子宫癌,子宫颈癌,宫颈癌,成胶质细胞瘤,妇科肿瘤,耳鼻喉肿瘤,血液肿瘤,多毛细胞白血病,尿道癌,皮肤癌,皮肤睾丸癌,脑肿瘤(胶质瘤,例如星形细胞瘤,少突胶质细胞瘤,成神经管细胞瘤,PNET's,混合神经胶质瘤),脑转移瘤,睾丸癌,垂体肿瘤,类癌,卡波西氏肉瘤,喉癌,生殖细胞肿瘤,骨癌,结直肠癌,头颈部肿瘤(耳、鼻和喉部肿瘤),结肠癌,颅咽管瘤,口腔癌(口腔区域和嘴唇上的癌症),中枢神经系统癌症,肝癌,肝转移,白血病,眼睑肿瘤,肺癌,淋巴结癌(Hodgkin/非Hodgkin),淋巴瘤,胃癌,恶性黑素瘤,恶性肿瘤,恶性胃肠道肿瘤,乳腺癌,直肠癌,髓母细胞瘤,黑素瘤,脑膜瘤,霍奇金病,蕈样真菌病,鼻癌,神经鞘瘤,成神经细胞瘤,肾癌,肾细胞癌,非霍奇金淋巴瘤,少突胶质细胞瘤,食管癌,溶骨性癌和成骨癌,骨肉瘤,卵巢癌,胰腺癌,阴茎癌,浆细胞瘤,头部和颈部鳞状细胞癌(SCCHN),前列腺癌,咽癌,直肠癌,视网膜母细胞瘤,阴道癌,甲状腺癌,Schneeberger病,食道癌,脊髓瘤,T细胞淋巴瘤(蕈样真菌病),胸腺瘤,管癌,眼/视觉肿瘤,尿道癌,泌尿系肿瘤,尿路上皮癌,外阴癌,疣外观,软组织肿瘤,软组织肉瘤,Wilm肿瘤,子宫颈癌和舌癌。

[1221] 术语"癌症"优选地指选自包含以下或由以下组成的组的癌:肺肿瘤(例如肺癌),肝癌如肝细胞癌,黑素瘤或恶性黑素瘤,胰腺癌如胰腺上皮样癌或胰腺腺癌,结肠癌,如结肠直肠腺癌,胃肿瘤或胃癌,乳腺癌,恶性星形细胞瘤,前列腺癌如胃癌,白血病如急性骨髓性白血病,慢性骨髓性白血病,单核细胞白血病,前髓细胞白血病,淋巴细胞白血病,急性淋巴细胞白血病,淋巴细胞性白血病和急性淋巴细胞性白血病,以及淋巴瘤,如组织细胞淋巴

瘤。

[1222] 为了治疗过度增殖性疾病、癌症、肿瘤及其转移，反义寡核苷酸可以以3天至2周之间的定期间隔(剂量间隔，DI)施用，例如4,5,6,7,8,9,10,11,12或13天，如约1周，如6、7或8天。适当地，至少两个剂量以两个剂量之间的DI期提供，例如3,4,5,6,7,8,9或10个剂量，每个剂量具有在每剂量的反义寡核苷酸之间的剂量间隔(DI)。每次剂量之间的DI期可以相同，例如3天至2周，例如4,5,6,7,8,9,10,11,12,13天，如约1周，如6、7或8天。

[1223] 优选地，每个剂量的反义寡核苷酸可以为约0.25mg/kg-约10mg/kg，例如约0.5mg/kg，约1mg/kg，约2mg/kg，约3mg/kg，约4mg/kg，约5mg/kg，约6mg/kg，约7mg/kg，约8mg/kg，约9mg/kg。在一些实施方案中，每个剂量的反义寡核苷酸可以为约2mg/kg至约8mg/kg，或约4至约6mg/kg或约4mg/kg至约5mg/kg。在一些实施方案中，每个剂量的反义寡核苷酸为至少2mg/kg，例如2,3,4,5,6,7或8mg/kg，如6mg/kg。在一些实施方案中，反义寡核苷酸的剂量方案可以在初始剂量方案之后重复，例如在其中未施用反义寡核苷酸的休息期后。例如休息期可以持续超过2周，例如约3周或约4周，或约5周或约6周。在一些实施方案中，反义寡核苷酸的剂量方案是一周剂量，重复三次、四次或五次。然后可以在例如约3至5周，例如约4周的休息期之后重复该剂量方案。在一些实施方案中，反义寡核苷酸在第一次剂量方案期间的2-10次施用之间以规定的4至13天的剂量间隔(DI)施用。

[1224] 反义寡核苷酸的施用通常通过肠胃外施用如皮下、肌肉内、静脉内或腹膜内施用进行。

附图说明

[1225] 图1显示了反义寡核苷酸(ASO)的抑制作用。DNA被转录至Pre-mRNA，在细胞核中，反义寡核苷酸(ASO)可以与外显子内(如来自右侧的第一ASO所示和来自左侧的第一ASO所示)或者内含子内(如来自右侧的第二ASO所示)或在由外显子的区域和相邻内含子的区域组成的所有位置(如来自左侧的第二ASO所示)的互补序列结合或杂交。通过转录后修饰，即剪接，形成mRNA，ASO可以在细胞的细胞质中与其结合或杂交，以便抑制mRNA向蛋白序列的翻译。因此，ASO选择性地敲低靶基因和蛋白表达。

[1226] 图2显示了在本发明的反义寡核苷酸的情况下，其为非LNA单元并且可包含在本发明的反义寡核苷酸中的核苷单元(不具有核苷酸间键联)或核苷酸单元(具有核苷酸间键联)，特别是B区中的。

[1227] 图3显示TGF-β及其对神经干细胞，癌症干细胞和肿瘤的影响。TGFβ抑制神经干细胞增殖。它可能影响转变至可能逃避TGF-β生长控制的癌症干细胞。肿瘤进展后期，TGF-β作为癌基因；它通过促进血管发生和抑制免疫系统进一步促进肿瘤生长。此外，它促进细胞迁移，从而驱动细胞转移。

[1228] 图4显示了Seq ID No 218b的反义寡核苷酸，其形式为由在5'末端具有3个LNA单元(C*b^{1}和Ab^{1}和Tb^{1})和在3'末端具有4个LNA单元(Ab^{1}和Gb^{1}和Tb^{1}和Ab^{1})和在LNA区段之间具有9个DNA核苷酸(dG,dA,dA,dT,dG,dG,dA,dC和dC)的16个核苷酸组成的gapmer，其中存在硫代磷酸酯核苷酸间键联并且在从5'末端的第一个LNA单元中存在核碱基5-甲基胞嘧啶(C*)。SP L Seq序列,5'-3'ID No 421C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb^{1}s716 218b Gb^{1}sTb^{1}sAb^{1}

[1229] 图5:ASO(Seq.ID No.218b)处理导致细胞内pSmad2蛋白的减少。分别在用ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后72小时或96小时用针对pSmad2的抗体(左栏,红色)对A549(图5A)和ReNcell CX®图5B)细胞进行标记。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b。

[1230] 图6:ASO(Seq.ID No.218c)处理导致细胞内pSmad2蛋白的减少。分别在用ASO Seq.ID No.218c无转染试剂转移后72小时或96小时用针对pSmad2的抗体(左栏,红色)对A549(图5A)和ReNcell CX® (图6B)细胞进行标记。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218c。

[1231] 图7:在TGF-β1存在下,ASO(Seq.ID No.218b)处理导致TGF-R_{II} mRNA的下调。TGF-R_{II}特异性ASO在TGF-β1预孵育(48h)的A549(图7A)和ReNcell CX® (图7B)细胞中无转染试剂转移后TGF-R_{II} mRNA的强力下调。在TGF-β1存在下分别将ASO孵育72小时或96小时。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,E=TGF-β1,±=SEM,*$p<0.05$,参考A**$p<0.01$,参考E+$B^{++}p<0.01$。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"事后比较来计算统计数据。

[1232] 图8:在TGF-β1存在下,ASO(Seq.ID No.218c)处理导致TGF-R_{II} mRNA的下调。TGF-R_{II}特异性ASO在TGF-β1预孵育(48h)的A549(图8A)和ReNcell CX® (图8B)细胞中无转染试剂转移后TGF-R_{II} mRNA的强力下调。在TGF-β1存在下分别将ASO孵育72小时或96小时。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,D=Seq.ID No.218c,E=TGF-β1,±=SEM,*$p<0.05$,参考A**$p<0.01$,参考E+$B^{++}p<0.01$。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"事后比较来计算统计数据。

[1233] 图9显示了Seq ID No 209y的反义寡核苷酸,其形式为由在5'末端具有2个LNA单元(Gb^l和Tb^l)和在3'末端具有3个LNA单元(Ab^l和Gb^l和$C*b^l$)和在LNA区段之间具有11个DNA核苷酸(dA,dG,dT,dG,dT,dT,dT,dA,dG,dG,和dG)的16个核苷酸组成的gapmer,其中存在硫代磷酸酯核苷酸间键联并且在从5'末端的最后一个LNA单元中存在核碱基5-甲基胞嘧啶(C*)。

[1234] Seq ID SP L No序列,5'-3'206 209Gb^lsTb^lsdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb 4 16 y $^lsGb^lsC*b^l$

[1235] 图10显示了Seq ID No 210q的反义寡核苷酸,其形式为由在5'末端具有4个LNA单元(Gb^l和$C*b^l$和Tb^l和Ab^l)和在3'末端具有3个LNA单元(Gb^l和Tb^l和Tb^l)和在LNA区段之间具有9个DNA核苷酸(dT,dT,dT,dG,dG,dT,dA,dG,和dT)的16个核苷酸组成的gapmer,其中存在硫代磷酸酯核苷酸间键联并且在从5'末端的第二个LNA单元中存在核碱基5-甲基胞嘧啶(C*)。

[1236] Seq ID SP L No序列,5'-3'207$Gb^lsC*b^lsTb^lsAb^l$sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsd

Ts 2 16 210q $Gb_1sTb_1sTb_1$

[1237] 图11:在TGF-β1存在下,ASO(Seq.ID No.218b)处理导致CTGF mRNA的下调。TGF-R_{II}特异性ASO在TGF-β1预孵育(48h)的A549(图11A)和ReNcell**CX®**(图11B)细胞中无转染试剂转移后CTGF mRNA的强力下调。在TGF-β1存在下分别将ASO孵育72小时或96小时。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,E=TGF-β1,±=SEM,*p<0.05,参考A**p<0.01,参考E+B^{++}p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"事后比较来计算统计数据。

[1238] 图12:在TGF-β1存在下,ASO(Seq.ID No.218b)处理导致CTGF细胞蛋白的减少。TGF-R_{II}特异性ASO在TGF-β1预孵育(48h)的A549(图12A)和ReNcell**CX®**(图12B)细胞中无转染试剂转移后CTGF蛋白表达减少。在TGF-β1存在下分别将ASO孵育72小时或96小时。用CTGF抗体(左栏,红色)标记细胞。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss**Axio®** Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和**CorelDRAW®X7**软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID.218b,E=TGF-β1。

[1239] 图13:在TGF-β1存在下,ASO(Seq.ID No.218b)处理导致细胞内pSmad2蛋白的减少。TGF-R_{II}特异性ASO在TGF-β1预孵育(48h)的A549(图13A)和ReNcell**CX®**(图13B)细胞中无转染试剂转移后pSmad2蛋白表达减少。在TGF-β1存在下分别将ASO孵育72小时或96小时。用pSmad2抗体(左栏,红色)标记细胞。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss**Axio®** Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和**CorelDRAW®X7**软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID.218b,E=TGF-β1。

[1240] 图14:在TGF-β1存在下,ASO(Seq.ID No.218c)处理导致CTGF mRNA的下调。TGF-R_{II}特异性ASO在TGF-β1预孵育(48h)的A549(图14A)和ReNcell**CX®**(图14B)细胞中无转染试剂转移后CTGF mRNA的强力下调。在TGF-β1存在下分别将ASO孵育72小时或96小时。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,D=Seq.ID No.218c,E=TGF-β1,±=SEM,*p<0.05,参考A**p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Dunnett"事后比较来计算统计数据。注意不同的比例尺。

[1241] 图15:在TGF-β1存在下,ASO(Seq.ID No.218c)处理导致CTGF细胞蛋白的减少。TGF-R_{II}特异性ASO在TGF-β1预孵育(48h)的A549细胞中无转染试剂转移后CTGF蛋白表达减少。在TGF-β1存在下分别将ASO孵育72小时。用CTGF抗体(左栏,红色)标记细胞。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss**Axio®** Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和**CorelDRAW®X7**软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,D=Seq.ID.218c,E=TGF-β1。

[1242] 图16:在TGF-β1存在下,ASO(Seq.ID No.218c)处理导致细胞内pSmad2蛋白的减少。TGF-R_{II}特异性ASO在TGF-β1预孵育(48h)的A549(图16A)和ReNcell**CX®**(图16B)细胞中无转染试剂转移后pSmad2蛋白表达减少。在TGF-β1存在下分别将ASO孵育72小时或96小时。用pSmad2抗体(左栏,红色)标记细胞。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微

镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,D=Seq.ID.218c,E=TGF-β1。

[1243] 图17:ASO(Seq.ID No.218b)预处理和随后的TGF-β1共暴露导致TGF-R_{II}膜蛋白的减少。在无转染试剂转移TGF-R_{II}特异性ASO随后共暴露TGF-β1(48h)A549(图17A)和ReNcell CX®(图17B)细胞后TGF-R_{II}蛋白减少。将ASO分别预孵育72小时或96小时,在48小时TGF-β1共暴露之前。用针对TGF-R_{II}的抗体标记细胞(左栏,红色)。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID.218b,E=TGF-β1。

[1244] 图18:ASO(Seq.ID No.218b)预处理和随后的TGF-β1共暴露导致细胞内pSmad3蛋白的减少。在无转染试剂转移TGF-R_{II}特异性ASO随后共暴露TGF-β1(48h)A549(图17A)和ReNcell CX®(图17B)细胞后pSmad3蛋白表达减少。将ASO分别预孵育72小时或96小时,在48小时TGF-β1共暴露之前。用针对pSmad3的抗体标记细胞(左栏,红色)。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID.218b,E=TGF-β1。

[1245] 图19:ASO(Seq.ID No.218b)增强人神经前体ReNcell CX®细胞中的神经发生,TGF-β1减少人神经前体ReNcell CX®细胞中的神经发生。重复的无转染试剂转移(2×96h)本发明的ASO后,神经发生标志物DCX mRNA在ReNcell CX®细胞中上调。在8天的TGF-β1暴露后,确认了DCX mRNA表达的强烈减少。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218c,E=TGF-β1,±=SEM,参考C 2.5μM+P<0.05,参考C10μM#p<0.05。

[1246] 图20:ASO(Seq.ID No.218b)增强人神经前体ReNcell CX®细胞中的增殖,和TGF-β1减少人神经前体ReNcell CX®细胞中的增殖。重复的无转染试剂转移(2×96h)本发明的ASO后,增殖标志物Ki67蛋白表达在ReNcell CX®细胞中增加。在8天的TGF-β1暴露后,观察到Ki67蛋白表达减少。用抗Ki67抗体(左栏,绿色)标记细胞。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID.218b,E=TGF-β1。

[1247] 图21:无论增殖条件如何,ASO(Seq.ID No.218b)增强人神经前体ReNcellCX®细胞的分化。观察到ReNcell CX®中的神经标志物NeuN(图23A,左栏,红色)和βIII-微管蛋白(图23B,左栏,红色)。在增殖条件下进行ASO处理初始4天,然后在增殖(+EGF/FGF)或分化条件(-EGF/FGF)下再进行4天。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss

Axio®Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID.218b,E＝TGF-β1,+EGF/FGF＝增殖,-EGF/FGF＝分化。

[1248] 图22:ASO介导的(Seq.ID No.218b)从TGF-β诱导的神经干细胞增殖抑制的拯救。在有或没有7天的TGF-β1暴露下和随后的8天ASO处理后,观察到人神经前体ReNcell CX®细胞增殖。TGF-β1预孵育7天后GFAP(图24A)、Ki67(图24B)和DCX(图24C)mRNA的上调表明干细胞增殖恢复。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b,E＝TGF-β1,±＝SEM,参考A*p<0.05,使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"事后多重比较来计算统计数据。

[1249] 图23:ASO减少人肺癌细胞(A549)的增殖。在无转染试剂转移(72小时)本发明的ASO后,A549细胞中增殖标志物Ki67蛋白表达减少。观察到减少的Ki67蛋白表达(左栏,绿色)。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID.218b,E＝TGF-β1。

[1250] 图24:ASO减少几种人类肿瘤细胞系的增殖。将HPAFII,K562,MCF-7,Panc-1和HTZ-19细胞暴露于本发明的ASO 4×72小时,并通过光学显微镜(Nikon,TS-100®F LED)分析增殖。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b。

[1251] 图25:ASO处理介导神经抗纤维化作用并改善细胞应激。在TGF-β1预孵育(48小时)和随后无转染试剂转移本发明的ASO并与TGF-β1处理共暴露96小时后观察ReNcell CX®细胞。用CTGF抗体(图29A,左栏,红色),FN抗体(图29B,左栏,绿色)和鬼笔环肽抗体(肌动蛋白-细胞骨架,图29C,左栏,红色)标记细胞。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID.218b,E＝TGF-β1。

[1252] 图26:ASO处理介导肿瘤抗纤维化作用并改善细胞应激。用TGF-β1或本发明的ASO无转染试剂转移(72小时)处理后观察A549细胞。用FN抗体(图30A,左栏,绿色),鬼笔环肽抗体(肌动蛋白-细胞骨架,图30B,左柱,红色)标记细胞。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID.218b,E＝TGF-β1。

[1253] 图27:ASO处理介导肿瘤抗纤维化作用。在TGF-β1预孵育(48小时)和随后无转染试剂转移本发明的ASO并与TGF-β1处理共暴露72小时后观察A549人肺癌细胞。用CTGF抗体(图31A,左栏,红色)和FN抗体标记细胞(图31B,左栏,绿色)。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss Axio® Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID.218b,E＝TGF-β1。

[1254] 图28:ASO治疗介导肿瘤的抗纤维化作用。在TGF-β1预孵育(48小时)后观察A549人肺癌细胞,然后体外转移本发明的ASO并与TGF-β1共同暴露处理72小时。用CTGF抗体(图32A,左栏,红色)和FN标记细胞(图32B,左栏,绿色)。核DNA用DAPI(中心栏,蓝色)染色。通过荧光显微镜(Zeiss **Axio®** Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和**CorelDRAW®X7**软件分析图像。A=未处理对照,B=Ref.1,D=Seq.ID.218c,E=TGF-β1。

[1255] 图29显示Seq ID No 209x的反义寡核苷酸,其形式为由在5'末端具有2个LNA单元(Gb^{1}和Tb^1)和在3'末端具有3个LNA单元(Ab^{1}和Gb^{1}和C*b^1)和在LNA区段之间具有11个DNA核苷酸(dA,dG,dT,dG,dT,dT,dT,dA,dG,dG,和dG)的16个核苷酸组成的gapmer,其中存在硫代磷酸酯核苷酸间键联并且在从5'末端的最后一个LNA单元中存在核碱基5-甲基胞嘧啶(C*),以及在5'末端和3'末端具有-O-P(O)(S$^-$)OC$_3$H$_6$OH作为末端基团。

[1256] Seq ID SP L No序列5'-3'2064 16 209x/5SpC3s/Gb^{1}sTb^{1}sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGs Ab^{1}sGb^{1}sC*b^1/3SpC3s/

[1257] 图30显示了Seq ID No 152h的反义寡核苷酸,其形式为由在5'末端具有4个LNA单元(C*b^{1}和Gb^{1}和Ab^{1}和Tb^1)和在3'末端具有3个LNA单元(Ab^{1}和C*b^{1}和Ab^1)和在LNA区段之间具有8个DNA核苷酸(dA,dC,dG,dC,dG,dT,dC,和dC)的15个核苷酸组成的gapmer,其中存在硫代磷酸酯核苷酸间键联并且在从5'末端的第一个和倒数第二个LNA单元中存在核碱基5-甲基胞嘧啶(C*)。

[1258] Seq ID

[1259] SP L No序列5'-3'429 15 152h C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb^{1}sC*b^{1}sAb^1

[1260] 图31显示Seq ID No 143h的反义寡核苷酸,其形式为由在5'末端具有2个LNA单元(C*b^{1}和Tb^{1}s)和在3'末端具有3个LNA单元(C*b^{1}和C*b^{1}和Gb^1)和在LNA区段之间具有9个DNA核苷酸(dC,dG,dT,dC,dA,dT,dA,dG,和dA)的14个核苷酸组成的gapmer,其中存在硫代磷酸酯核苷酸间键联并且在从5'末端的第一个、倒数第三个和第二个LNA单元中存在核碱基5-甲基胞嘧啶(C*)。

[1261] SP L Seq ID序列5'-3'No 355 14 143h C*b^{1}sTb^{1}sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC*b^{1}sC*b^{1}sGb^1

[1262] 图32显示了Seq ID No 213k的反义寡核苷酸,其形式为由在5'末端具有3个LNA单元(C*b^{1}和Ab^{1}和Gb^1)和在3'末端具有3个LNA单元(Gb^{1}和Tb^{1}和Gb^1)和在LNA区段之间具有11个DNA核苷酸(dG,dC,dA,dT,dT,dA,dA,dT,dA,dA,和dA)的17个核苷酸组成的gapmer,其中存在硫代磷酸酯核苷酸间键联并且在从5'末端的第一个LNA单元中存在核碱基5-甲基胞嘧啶(C*)。

[1263] Seq ID SP L No序列5'-3'2355 17 213k C*b^{1}sAb^{1}sGb^{1}sdGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb^{1}sTb^{1}sGb^1

实施例

[1264] 材料与方法

[1265] 根据发明人/申请人的需要,本文使用的大多数反义寡核苷酸以及对照或参考寡

核苷酸由EXIQON合成为定制的寡核苷酸。使用具有以下序列的寡核苷酸作为参考：

[1266] Ref.0＝dCsdAsdGsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsdAsdTsdG(Seq.ID No.147c)；

[1267] Ref.1＝Ab1sAb1sC*b1sdAsdCsdGsdTsdCsdTsdAsdTsdAsC*b1sGb1sC*b1(Seq.ID No.76)；

[1268] Ref.2＝C*b1sAb1sGb1sdCsdCsdCsdCsdCsdGsdAsdCsdCsdCsAb1sTb1sGb1(Seq.ID No.147m)；

[1269] Ref.3＝TTGAATATCTCATGAATGGA;具有2'-MOE-翼(5'和3'的5个单元)和硫代磷酸酯键联(Seq.ID No.80)；

[1270] Ref.4＝;CAGAAGAGCTATTTGGTAGT,具有2'-MOE-翼(5'和3'的5个单元)和硫代磷酸酯键联(Seq.ID No.82)；

[1271] Ref.5＝TGGTAGTGTTTAGGGAGCCG(Seq.ID No.85)，

[1272] Ref.6＝GTGCAGGGGAAAGATGAAAA(Seq.ID No.344)，

[1273] Ref.7＝GAGCTCTTGAGGTCCCTGTG(Seq.ID No.345)，

[1274] Ref.8＝AGCCTCTTTCCTCATGCAAA(Seq.ID No.346)，

[1275] Ref.9＝CCTTCTCTGCTTGGTTCTGG(Seq.ID No.347),和

[1276] Ref.10＝GCCATGGAGTAGACATCGGT(Seq.ID No.348)

[1277] 标准程序方案

[1278] 细胞培养：

[1279] 表10:以下人类细胞系用于反义寡核苷酸实验值：

[1280]

描述	细胞系	CO_2-含量	培养基
黑色素瘤	HTZ-19	5%	DMEM F12 (Gibco 31331-018) + 1 % dM-混合物(转铁蛋白(在 835µl 水中 30 mg/ml, 非必需 AS (100x) 10 ml, 亚硒酸钠(水中 0.2 mg/ml) 70µl, 10ml PBS), 1% P/S
肺癌	A549	5%	Kaighn´s F12 K + 10% FCS + 1% P/S
肝细胞癌	Hep G2	5%	DMEM (Sigma D6429) + 10% FCS + 1% P/S
肝细胞癌	Hep3 B	5%	DMEM (Sigma D6429) + 10% FCS + 1% P/S
胰腺上皮样癌	Panc-1	5%	DMEM (Sigma D6429) + 10% FCS + 1% P/S
胰腺腺癌	HPAFII	5%	DMEM (Sigma D5796) + 15 % FCS, 1 % P/S, 1%抗生素/抗真菌药, 1% MEM 维生素溶液, 1% 非必需 AS (100x)
胰腺腺癌	BxPC-3	5%	RPMI (Gibco A10491-01) + 10% FCS + 1% P/S + 1% 抗生素/抗真菌

[1281]

			药, 1% MEM 维生素溶液
胰腺癌肝转移	L3.6pl	5%	DMEM (Sigma D5796) + 15 % FCS, 1% P/S, 1% 抗生素/抗真菌药, 1% 维生素, 1% 非必需 AS (100x)
结直肠腺癌	HT-29	5%	DMEM (Sigma D5796) + 15 % FCS, 1% P/S, 1% 抗生素/抗真菌药, 1% MEM 维生素溶液, 1% 非必需 AS (100x)
上皮性结肠直肠腺癌	CaCo2	5%	DMEM (Sigma D5796) + 20 % FCS + 1% P/S
胃癌	TMK-1	5%	DMEM (Sigma D5796) + 10% FCS + 1% P/S, 1% 抗生素/抗真菌药, 1% MEM 维生素溶液
恶性星形细胞瘤	HTZ-243	5%	DMEM (Sigma D6046) + 10% FCS + 1% P/S + 1% 非必需 AS + 1% MEM 维生素溶液
乳腺癌	MCF-7	5%	DMEM (Sigma D6046) + 10 % FCS + 1% P/S
前列腺腺癌	PC-3M	5%	RPMI (Gibco #61870-010), 10 % FCS, 1%丙酮酸钠, 1%碳酸氢钠, 1 % P/S
急性骨髓性白血病	KG-1	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 %FCS + 1% P/S
慢性骨髓性白血病	K562	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 1% P/S
单核细胞白血病	THP-1	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S
早幼粒细胞白血病	HL60	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S

[1282]

淋巴细胞白血病	CEM-C7H2	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S
急性淋巴细胞白血病	Pre-B697	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S
组织细胞淋巴瘤	U937	5%	RPMI (Gibco #61870-010) + 10 % FCS + 0.5 % P/S
神经元前体或皮层脑区的细胞	ReNcell CX	5%	ReNcell 神经干细胞维持培养基 (Millipore #SCM005) +基本人 FGF +人 EGF + N2 补充物

[1283] 材料：

[1284] FCS(ATCC#30-2020)

[1285] 丙酮酸钠(Sigma#S8636)

[1286] 碳酸氢钠(Sigma#S8761-100ML)

[1287] 转铁蛋白(Sigma#T8158-100MG)

[1288] 亚硒酸钠(Sigma#S5261-10G)

[1289] 青霉素/链霉素(P/S)(Sigma-Aldrich#P4458)

[1290] 非必需氨基酸(AS)100x(Sigma#M7145)

[1291] 抗生素/抗真菌药(Sigma#A5955)

[1292] MEM维生素溶液(Sigma#M6895)

[1293] PBS(Sigma#D8537)

[1294] 基本人FGF(Millipore#GF003)

[1295] 人EGF(Millipore#GF144)

[1296] N-2补充物(Life Technologies#17502048)

[1297] ReNcell神经干细胞维持培养基(Millipore#SCM005)

[1298] 培养和分配细胞：

[1299] 除去培养基后，用PBS洗涤细胞，并用细胞消化液(Sigma-Aldrich#P4458)孵育(5分钟，RT)。孵育后，用锥尖敲打细胞，并加入完全培养基(3ml，公司：参见表10中的各自的细胞系)。然后将细胞转移到5ml的Eppendorf杯中并离心(5分钟，1000rpm，RT)。将来自1个T75瓶(Sarstedt#833.910.302)的沉淀重新悬浮于2.5ml新鲜培养基中。通过用吖啶橙/碘化丙啶测定活性试剂盒(Biozym#872045)染色，用Luna-FL™自动细胞计数器(Biozym#872040)测定细胞悬液的细胞数。培养皿的层粘连蛋白涂布(Millipore#CC095)对于ReNcell CX®细胞在以2μg/cm^{2}的浓度接种细胞用于实验之前的粘附是必需的。将层粘连蛋白-PBS溶液以相应的量直接给予至孔和烧瓶，并在37℃下孵育1.5小时。对于实验，如相应实验章节的方法部分所述的，将细胞接种并收获。在37℃和5％CO_2下过夜孵育细胞后，如相应的实验描述中所述处理细胞。将500μl剩余的细胞悬浮液给予至装有10ml新鲜全培养基的新T75瓶中用

于培养细胞。

[1300] RNA分析

[1301] 根据制造商的说明书，使用**innuPREP®**RNA Mini试剂盒(Analytik Jena# 845-KS-2040250)分离用于cDNA合成的总RNA。为了合成cDNA，使用光度计(Eppendorf，BioPhotometer D30#6133000907)测定总RNA含量，用不含核酸酶的水进行稀释。之后，根据制造商的建议，用iScript™ cDNA合成试剂盒(BioRad#170-8891)制备第一链cDNA。对于mRNA分析，使用CFX96Touch™实时PCR检测系统(BioRad#185-5196)进行实时RT-PCR。

[1302] 所有引物对均是即用标准化的，并根据制造商的说明书(BioRad Prime PCR Quick Guide)与相应的即用型Mastermix溶液(SsoAdvanced™ Universial **SYBR®** Green Supermix(BioRad#172-5271)混合。用于体内实验的引物对根据个体物种进行调整。

[1303] 表11:用于mRNA分析的引物对

[1304]

引物对	公司	独特的测定 ID
人 CDKN1A	BioRad	qHsaCID0014498
人 CDNK1B	BioRad	qHsaCID0012509
人 CFLAR	BioRad	qHsaCID0038905
人 Col4A1	BioRad	qHsaCID0010223

[1305]

人 CTGF	BioRad	qHsaCED0002044
人 DCX	BioRad	qHsaCID0010869
人 FN1	BioRad	qHsaCID0012349
人 GFAP	BioRad	qHsaCID0022307
人 GNB2L1	BioRad	qHsaCEP0057912
人 ID-2	BioRad	qHsaCED0043637
人 MKi67	BioRad	qHsaCID0011882
人 Nestin	BioRad	qHsaCED0044457
人 SERPINE1	BioRad	qHsaCED0043144
人 SOX2	BioRad	qHsaCED0036871
人 TGFβ-RII	BioRad	qHsaCID0016240
人 TP53	BioRad	qHsaCID0013658

[1306] 作为模板，使用1μl的各自cDNA。未逆转录的RNA用作实时RT-PCR的阴性对照。对于相对定量，使用管家基因鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基β-2样1(GNB2L1)。使用以下方案进行实时RT-PCR：

[1307] 表12:实时RT-PCR的方案。

[1308]

起始时期	2 分钟	95 °C	1x
变性	5 s	95 °C	40x
退火，延伸	30 s	60 °C	40x
解链曲线		65 °C – 95 °C (0.5 °C 梯度)	1x

[1309] 之后，将BioRad CFX Manager 3.1用于相对于GNB2L1mRNA的各自mRNA水平的定量，然后针对未处理的对照进行标准化。

[1310] Western印迹：

[1311] 对于蛋白分析，分别使用M-PER®哺乳动物蛋白提取试剂/T-PER®组织蛋白提取试剂(Thermo Scientific，#78501/#78510)根据制造商说明书裂解细胞/组织。根据制造商的说明，使用TGX Stain Free™ Fast Cast™丙烯酰胺试剂盒(BioRad#161-0183)制备SDS-丙烯酰胺凝胶(10％)。将蛋白样品(20μl)用Lämmli缓冲液(6.5μl，Roti®Load1，Roth#K929.1)以1:5稀释，在60℃下孵育30分钟，并以整个体积的蛋白溶液加载到凝胶上。使用PowerPac™ Basic Power Supply(Biorad#164-5050SP)和Mini-PROTEAN® Tetra细胞电泳室(BioRad#165-8001-SP)进行电泳(200V，45分钟)，以进行蛋白分离。电泳后，使用Trans-Blot®Turbo转移系统(BioRad#170-4155SP)印迹蛋白。用于Western印迹的所有材料均包含在Trans-Blot®Turbo RTA PVDF-Midi试剂盒(BioRad#170-4273)中。

[1312] 用于印迹方法的PVDF膜在甲醇(Merck#1.06009.2511)中活化并在1x转移缓冲液中平衡。在印迹(25V，1A，30分钟)后，用含有0.5ml吐温-20(Roth#9127.1)的1x TBS(Roth#10.60.1)洗涤膜(3x，10分钟，RT)。然后在RT用以TBS-T稀释的5％BSA(Albumin-IgG-free，Roth#3737.3)封闭膜1小时，将一抗(TBS-T中的0.5％BSA稀释的，表13)加入并在4℃下孵育2天。相应地就物种特异性选择用于体内实验的抗体。

[1313] 表13：用于Western印迹分析的抗体。

[1314]

一抗	稀释	公司	订单号
α-微管蛋白 HRP 连接的(兔)	1:2000	Cell Signaling	cs12351s
ColIV (兔)	1:1000	Abcam	ab6586
CTGF (兔)	1:1000	Genetex	GTX-26992
FN (兔)	1:250	Proteintech	15613-1-AP
GAPDH XP HRP-连接的(兔)	1:1000	Cell Signaling	cs8884s
Ki67 (兔)	1:500	Abcam	ab15580
pAkt (兔)	1:1000	Cell signaling	cs4060s

[1315]

pErk1/2 (兔)	1:1000	Cell signaling	cs4370s
pSmad2 (兔)	1:500	Cell Signaling	cs3104
TGF-βRII (兔)	1:400	Aviva	ARP44743-T100
二抗	稀释	公司	订单号
抗兔 IgG，HRP-连接的	1:10000	Cell signaling	cs#12351S

[1316] 在下一步中，在TBS-T中洗涤膜(3×10分钟，RT)并用二抗孵育(1小时，RT，表13)。孵育后，用TBS-T洗涤印迹，使用Luminata™Forte Western HRP底物(Millipore#WBLUF0500)显现印迹，并用发光图像分析仪(ImageQuant™ LAS 4000，GE Healthcare)检测条带。然后将印迹在TBS-T中洗涤(3×10分钟，RT)，并用在TBS-T中稀释的5％BSA封闭(1小时，室温)。对于管家基因比较，将膜用HRP缀合的抗α-微管蛋白孵育(0.5％BSA中的1:2000，4℃，过夜)。第二天使用Luminata™Forte Western HRP底物(Millipore#WBLUF0500)显现印迹，并用发光图像分析仪检测条带。最后，用TBS-T(3x，5分钟)洗涤印迹，并使用1X **Roti®**-Blue溶液(Roth#A152.2)染色，并在室温下干燥。

[1317] 免疫细胞化学

[1318] 如前所述处理和收获细胞。在于8孔上用**Roti®**-Histofix 4％(Roth#P087.4)固定细胞后，用PBS洗涤细胞培养载玻片(6分钟，RT)3次。用封闭溶液(Zytomed#ZUC007-100)在室温下封闭细胞1小时后，将细胞与表14中列出的各一抗一起孵育，并在4℃孵育过夜。

[1319] 然后，用二抗孵育(1小时，室温)后，用PBS洗涤细胞培养载玻片三次。所有抗体稀释液均用抗体稀释剂(Zytomed#ZUC025-100)制备。

[1320] 表14:用于免疫细胞化学的抗体

[1321]

一抗	稀释	公司	订单号
ColIV (兔)	1:50	Abcam	ab6586
CTGF (兔)	1:50	Genetex	GTX26992
βIII-微管蛋白(兔)	1:100	cell signaling	cs5568
FN (兔)	1:50	Proteintech	15613-1-AP
Ki67 (兔)	1:100	Abcam	ab15580
NeuN (兔)	1:250	Abcam	Ab104225
鬼笔环肽 Alexa Fluor 55	1:20	Cell signaling	cs8953
pSmad2 (兔)	1:50	Cell signaling	cs3104s
pSmad3 (兔)	1:50	Cell signaling	cs9520s
TGF-R_{II} (兔)	1:50	Millipore	06-227
二抗	稀释	公司	订单号
Alexa Fluor 488	1:750	Life Technologies	A21441
Cy3 山羊抗兔	1:1000	Life Technologies	A10520

[1322] 用二抗孵育后，用PBS洗涤细胞三次，从细胞培养皿中分离盖玻片，并用DAPI(Biozol#VEC-H-1500)用**VECTASHIELD®** HardSet™装载。在荧光显微术(Zeiss，**Axio®** Observer.Z1)之前，将载玻片在4℃下干燥过夜。使用Image J软件和**CorelDRAW®X7**软件分析图像。

[1323] 体内实验

[1324] 外周血单核细胞(PBMC)测定

[1325] 从对应于500ml全血输血单位的血沉棕黄层中分离PBMC。每个单位是从健康志愿者获得的，并且使用葡萄糖-柠檬酸盐作为抗凝集剂。血沉棕黄色血液由Blood Bank Suhl of the Institutefor Transfusion Medicine,Germany制备和交付。监测每个献血的HIV抗体，HCV抗体，HBs抗原，TPHA，HIV RNA和SPGT(ALAT)。仅将就感染原检测为阴性并具有正常的SPGT值的血液样品用于通过低速离心分离白细胞和红细胞。通过使用Ficoll-**Histopague®** 1077(Heraeus™ Multifuge™ 3SR)的梯度离心，在献血后约40小时分离PBMC。对于IFNα测定，在100μl完全培养基+添加剂(RPMI1640，+L-Glu，+10％FCS，+PHA-P(5μg/ml)，+IL-3(10μg/ml))中以100,000细胞/96孔接种PBMC，并且添加测试化合物(5μl)用于

直接孵育(24小时,37℃,5%CO_2)。对于TNFα测定,将PBMC在100μl完全培养基w/o添加剂(RPMI1640,+L-Glu,+10%FCS)中以100,000个细胞/96孔接种,并加入测试化合物(5μl)用于直接孵育(24小时,37℃,5%CO_2)。根据制造商的方案,对huIFNα(eBioscience,#BMS216INSTCE)进行ELISA(从合并的20μl上清液中重复测定)。根据制造商的方案,对huTNFα(eBioscience,#BMS223INSTCE)进行ELISA(从合并的20μl上清液中重复测定)。

[1326] bDNA测定

[1327] 根据制造商的说明书(**QuantiGene®**kit,Panomics/Affimetrix),通过bDNA测定在肝、肾和肺裂解物中测定TGF-R_{II} mRNA水平。

[1328] 免疫荧光

[1329] 将石蜡包埋的脊髓和脑组织切成5μm切片(每个对象板3-4个载玻片)。将石蜡切片通过在微波炉中在柠檬酸盐缓冲液(10mM,40分钟)中加热来脱蜡和去掩膜。然后,将脱蜡切片与0.3%H_2O_2一起孵育(30分钟,RT),用PBS洗涤(10分钟,RT)并用封闭溶液(Zytomed#ZUC007-100)封闭30分钟。用封闭溶液(Zytomed)在室温封闭1小时后,将载玻片与150μl的各自一抗孵育,并在4℃下孵育过夜。用PBS洗涤(3次,5分钟RT)后,将切片与二抗在室温下孵育1小时。用抗体稀释剂(Zytomed#ZUC025-100)制备所有抗体稀释液。然后用PBS再次洗涤切片(3次,5分钟,RT),并使用带有DAPI的**VECTASHIELD®**装载介质(Vector)进行装载。用于免疫荧光的抗体与细胞培养实验是可比较的,并且被调整用于每个物种。

[1330] 电化学发光

[1331] 对于免疫学和血液学改变,使用电化学发光技术(**MesoScaleDiscovery®**,Maryland,United States)。对于每个测定,使用25μl蛋白、血液和液体样品,并根据制造商的说明书进行该程序。

[1332] BrdU测定

[1333] 通过腹膜内注射50mg/kg体重的胸腺嘧啶类似物BrdU(Sigma,Steinheim,Germany)进行分离细胞的标记,使用溶解在0.9%(w/v)NaCl溶液中的10mg/ml BrdU的无菌溶液。在最后一个实验周内每天进行BrdU注射。

[1334] 手术

[1335] 对于慢性中枢输注,动物接受用于连接到**Alzet®**渗透微型泵(小鼠,大鼠,输注速率:0.25μl/h,**Alzet®**,Model 2004,Cupertino,USA)或气体压力泵(食蟹猴,输注速率0.25ml/24h,**Tricumed®**,Model IP 2000V,Germany)的icv插管的手术。在氯胺酮/木脂素麻醉(Baxter,GmbH,Germany)和半无菌条件下立体定向植入插管和泵。将每个渗透性微型泵/气体压力泵通过皮肤切口在动物颈部皮下植入腹部,并通过硅胶管与icv插管连接。将动物置于立体定向框架中,将icv插管减少到右侧脑室。插管使用牙科水泥(Kallocryl,**Speiko®**-Dr.Speier GmbH,Münster,Germany)用两个不锈钢螺钉固定。颈部的皮肤用缝合线封闭。在手术过程中,体温通过加热垫保持。为了避免手术后感染,动物用**betaisodona®**(Mundipharma GmbH,Limburg,Germany)局部处理,并接受抗生素(sc,**Baytril®**2.5%Bayer Vital GmbH,Leverkusen,Germany)。管道用相应的溶液填充。收集血液、液体和组织进行分析。在40μm冠状、甲酚紫染色的脑切片处进行icv植入部位的组织

学验证。

[1336] 结果参数和功能分析

[1337] 症状性疾病的发作、第一次麻痹和存活的发作被用作体内终点。症状性疾病的发作被定义为在尾巴悬浮反应方面缺乏腿部伸展。首先检测到步态障碍(例如,跛行或蹒跚)的时间点被归类为第一次麻痹的发作。从40天年龄每天开始测定这些参数。

[1338] 为了监测疾病进展,进行了跑步轮测试(LMTB,Berlin,Germany)。动物分开笼养,从33天年龄开始进入跑步轮。运动活动与跑步轮中每只动物产生的每分钟转数直接相关。车轮的每一回合都会触发两个电磁信号,直接送入计算机,其最多连接到120个轮子。跑步轮数据用"Maus Vital"软件(Laser-und Medizin-Technologie,Berlin,Germany)进行记录和分析。评估时间从下午6:00至上午6:00持续12小时。

[1339] 空间学习测试(Morris-Water-Maze)

[1340] 行为测试在8:00至13:00之间进行。

[1341] 大鼠在一个黑色的圆形泳池(直径1.4米,高50厘米,充满20摄氏度的温水,高度为30厘米)中训练,以找到可见的白色靶标(直径10厘米,高于水面上方大约1厘米),其在整个研究中位于同一虚象象限的中心(近端提示)。在3个连续时期中训练每只动物经过平台,每时期12次试验,每天1个时期,试验间隔10-20秒。

[1342] 微生物分析

[1343] 反义寡核苷酸样品根据关于总有机微生物计数(TAMC)和总合并酵母和霉菌技术(TYMC)的Ph.Eur.2.6.12,USP 30<61>进行微生物分析。

[1344] 阴离子交换高效液相色谱(AEX-HPLC)

[1345] 通过使用**ÄKTAexplorer™** 系统(GE Healthcare,Freiburg,Germany)的AEX-HPLC测定反义寡核苷酸(ASO)样品的完整性和稳定性。纯化的ASO样品通过乙醇沉淀脱盐。通过电喷雾-离子化-质谱(ESI-MS)证实ASO的身份,并通过AEX-HPLC用Dionex DNAPac™ 200(4×250mm)柱测定纯度。

[1346] 实施例1:本发明的反义寡核苷酸对mRNA水平的抑制活性的测定

[1347] 1.1反义寡核苷酸的转染

[1348] 在人上皮性肺癌细胞(A549)中测试了几种针对TGF-R_{II}的反义寡核苷酸的抑制活性。通过分支DNA测定来定量从用TGF-R_{II}特异性寡核苷酸孵育的细胞分离的总mRNA中的TGF-R_{II} mRNA。

[1349] 方法说明:

[1350] 获得细胞并如上所述进行培养。在96孔板上接种10,000个A549细胞/孔后,直接进行反义寡核苷酸的转染,并按照制造商的描述用**Lipofectamine®** 2000(Invitrogen GmbH,Karlsruhe,Germany,目录号11668-019)进行。在一式四份进行的两次独立的单剂量实验中,以20nM的浓度转染寡核苷酸。转染后,将细胞在37℃和5%CO_2的湿度培养箱(Heraeus GmbH,Hanau,Germany)中孵育24小时。为了测量TGF-R_{II} mRNA,收集细胞,并按照**QuantiGene®** Explore试剂盒(Panomics,Fremont,Calif.,USA,目录号QG0004)的制造商推荐的步骤在53℃下裂解以分离分支DNA(bDNA)。对于管家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)mRNA的定量,使用**QuantiGene®** Explore试剂盒,而使用**QuantiGene®** 2.0

(Axolabs GmbH,Kulmbach,Germany定制)进行TGF-R_{II} mRNA的定量。孵育和裂解后,将10μl裂解物与人TGF-R_{II}和人GAPDH特异性的探针组一起孵育。两种反应类型均按照相应**QuantiGene®**试剂盒的制造商方案进行处理。在$Victor^{2}{}_{TM}$多标记计数器(Perkin Elmer,W iesbaden,Germany)中测量化学发光,作为RLU(相对光单位),并且用TGF-R_{II}探针组获得的值被标准化为每孔的各自的GAPDH值,然后针对来自模拟处理的细胞的相应mRNA读出进行标准化。

[1351] 结果

[1352] 结果显示转染A549细胞后,几种ASO对TGF-R_{II}的有效下调。参考寡核苷酸Ref.6-Ref.10转染后的下调效率不高,导致>60%的下调。

[1353] 表15:TGF-R_{II} mRNA的下调。在人上皮性肺癌细胞(A549)中用TGF-R_{II}特异性反义寡核苷酸(ASO)转染。使用**QuantiGene®**试剂盒,相对于管家基因GAPDH进行mRNA表达水平的定量。然后将探针针对来自模拟处理的细胞的相应mRNA读出进行标准化。

[1354]

	A549 (c= 20 nM)			
	GAPDH		$TGF\text{-}R_{II}$	
	平均值	SD	平均值	SD
ASO				
Seq. ID No. 141j	1.41	0.05	0.02	0.01
Seq. ID No. 143aj	0.76	0.03	0.02	0.01
Seq. ID No. 139c	0.9	0.03	0.02	0.01
Seq. ID No. 145c	0.91	0.05	0.03	0.01
Seq. ID No. 209ax	1.52	0.58	0.03	0.01
Seq. ID No. 152ak	0.88	0.03	0.04	0
Seq. ID No. 218ar	1.08	0.03	0.04	0
Seq. ID No. 144c	0.5	0.07	0.05	0.03
Seq. ID No. 210ap	0.92	0.05	0.05	0.01
Seq. ID No. 142c	1.33	0.05	0.06	0.03
Seq. ID No. 213ak	1.2	0.03	0.07	0.01
Seq. ID No. 153f	1.09	0.07	0.08	0.03

[1355] 结论

[1356] $TGF\text{-}R_{II}$ mRNA被本发明的ASO有效地靶向。命名的ASO在转染A549细胞后实现了有效的靶mRNA下调。

[1357] 1.2反义寡核苷酸的无转染试剂摄取(gymnotic uptake)

[1358] 1.2.1a通过A549和Panc-1细胞中的无转染试剂转移,本发明的ASO和先前技术序列之间的靶敲低的比较

[1359] 通过直接摄取而无转染试剂(“无转染试剂摄取”),在人上皮肺肿瘤细胞(A549)中测试了几种针对$TGF\text{-}R_{II}$的反义寡核苷酸的下调活性。通过分支DNA测定来定量从用$TGF\text{-}R_{II}$

特异性寡核苷酸孵育的细胞分离的总mRNA中的TGF-R_{II} mRNA。

[1360] 方法说明：

[1361] 获得细胞并如上所述进行培养。通过用相应的反义寡核苷酸制备96孔板并随后接种10,000个细胞(Panc-1)或8,000个细胞(A549)/孔，进行反义寡核苷酸的吸收转移。实验一式四份进行，寡核苷酸的终浓度为5μM(Panc-1)和7.5μM(A549)。将细胞在37℃和5％CO_2的湿度培养箱(Heraeus GmbH,Hanau,Germany)中孵育72小时。对于TGF-R_{II} mRNA的测量，收获细胞，并按照**QuantiGene®** Explore试剂盒(Panomics,Fremont,Calif.,USA,目录号QG0004)制造商对于分支DNA(bDNA)推荐的在53℃下裂解。对于管家基因GAPDH mRNA的定量，使用**QuantiGene®** Explore试剂盒，而用**QuantiGene®** 2.0(Axolabs GmbH,Kulmbach,Germany定制)进行TGF-R_{II} mRNA的定量。孵育和裂解后，将10μl裂解物与人TGF-R_{II}和人GAPDH特异性的探针组一起孵育。两种反应类型均按照相应**QuantiGene®**试剂盒的制造商协议进行处理。在Victor$^{2}{}_{TM}$多标记计数器(Perkin Elmer,Wiesbaden,Germany)中测量化学发光，作为RLU(相对光单元)，并且用TGF-R_{II}探针组获得的值被标准化为每孔的各自的GAPDH值，然后针对来自PBS处理的细胞的相应mRNA读出进行标准化。

[1362] 所选结果如表16a所示。Seq.ID No.209ay,Seq.ID No.209ax和Seq.ID No.209y的进一步修饰物，即说明书表6中列出的ASO，显示与这三种反义寡核苷酸的可比值。另外，Seq.ID No.152h的修饰物，即说明书的表5中列出的ASO，显示与该反义寡核苷酸的可比值。Seq.ID No.218b的修饰物，即本说明书的表8中列出的ASO，显示与反义寡核苷酸Seq.ID No.218b的可比值。Seq.ID No.213k的修饰物，即说明书表9中列出的ASO，显示与反义-寡核苷酸Seq.ID No.213k相当的值。Seq.ID No.210q的修饰物，即本说明书表7中列出的ASO，显示与反义-寡核苷酸Seq.ID No.210q的可比值。最后，Seq.ID No.143h的修饰，即说明书表4中列出的ASO，显示与反义-寡核苷酸Seq.ID No.143h的可比值。与测试的参考序列(A549：下调<0.5;Panc1细胞：下调<0.4)相比，表4-9中列出的反义寡核苷酸的转移导致靶TGF-R_{II} mRNA更有效的下调。

[1363] 表16a通过无转染试剂转移的靶mRNA下调的功效。在A549和Panc-1细胞中，选择的TGF-R_{II}特异性ASO的吸收摄取后，剩余的TGF-R_{II} mRNA。使用**QuantiGene®**试剂盒，相对于管家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)测定mRNA表达水平，并与作为参考对照的PBS处理的细胞进行比较(＝1)。

[1364]

ASO	TGF-R_{II} 的剩余 mRNA (处理的细胞= 1)			
	A549 cells		Panc1 cells	
	平均值	SD	平均值	SD
Seq. ID No. 209ay	0.11	0.01	0.07	0.02
Seq. ID No. 209ax	0.14	0.02	0.08	0.01
Seq. ID No. 209bb	0.19	0.01	0.11	0.01
Seq. ID No. 209az	0.19	0.03	0.13	0.02
Seq. ID No. 209ba	0.23	0.02	0.18	0.03
Seq. ID No. 209y	0.27	0.04	0.17	0.01
Seq. ID No. 152h	0.29	0.04	0.12	0.02
Seq. ID No. 218b	0.30	0.02	0.07	0.01
Seq. ID No. 213k	0.34	0.04	0.17	0.04
Seq. ID No. 210q	0.37	0.05	0.18	0.02
Seq. ID No. 210aq	0.39	0.03	0.18	0.02
Seq. ID No. 143h	0.43	0.04	0.35	0.05
Ref. 2	0.59	0.05	0.40	0.04
Ref. 0	0.89	0.06	1.10	0.07

[1365]

Ref. 3	0.68	0.03	0.62	0.03
Ref. 4	0.74	0.04	0.71	0.01

[1366] 结论

[1367] 本发明ASO的无转染试剂转移导致目标TGF-R_{II} mRNA比测试的参考序列的转移持续更强的下调。所要求保护的反义寡核苷酸优于现有技术中已知的所有测试序列，独立于选择的人细胞系。然而，通常，具有12-20个核苷酸长度的反义寡核苷酸导致比更短或更长的反义寡核苷酸更有效地减少靶TGF-R_{II} mRNA的下调。对于长度为14-18个核苷酸的反义寡核苷酸，这种效果更为显著，这通常表现出最强的作用。

[1368] 1.2.1b通过分支DNA测定分析A549细胞无转染试剂转移

[1369] 来自转染筛选的针对TGF-R_{II}的最有效的反义寡核苷酸进一步通过在A549细胞中的无转染试剂摄取来表征。通过分支DNA测定来定量从用TGF-R_{II}特异性寡核苷酸孵育的细胞分离的总mRNA中的TGF-R_{II} mRNA。

[1370] 方法说明：

[1371] 如前所述，在标准条件下培养A549细胞。对于单剂量和剂量反应实验，将80,000个A549细胞/孔接种在6孔培养皿中，并用7.5μM浓度的寡核苷酸直接孵育。为了测量TGF-R_{II} mRNA，收集细胞，在53℃下裂解，并通过QuantiGene® Explore试剂盒(Panomics，Fremont，Calif.，USA，目录号QG0004)制造商推荐的步骤通过分支DNA测定进行分析，如上所述(见1.1)。

[1372] 结果

[1373] 表16b中列出的ASO在A549细胞中显示相对于管家基因GAPDH的TGF-R_{II}的靶mRNA水平减少。还测试了十种最有效的ASO的抑制浓度50(IC_{50})。总的来说Seq.ID No.209t，Seq.ID No.218b，Seq.ID No.218c和Seq.ID No.209y导致低浓度水平下最合适的TGF-R_{II}敲低。

[1374] 表16b：A549细胞中TGF-R_{II}特异性ASO的无转染试剂摄取后TGF-R_{II} mRNA的下调。使用QuantiGene®Kit测定相对于管家基因GAPDH的mRNA水平。IC_{50}＝50％下调的抑制浓度，Pos.Ctrl:aha-1＝热休克90kDa蛋白ATP酶同源物1(Aha1)的激活剂引导的LNA作为阳性对照，Ref.1＝打乱对照。

[1375]

ASO	$TGF\text{-}R_{II}$ n=4	SD	GAPDH n=4	SD	IC_{50} n=4
Seq. ID No. 209t	0.19	0.05	1.13	0.11	1.63
Seq. ID No. 218c	0.25	0.04	0.94	0.18	1.17
Seq. ID No. 218b	0.26	0.08	1.08	0.28	2.54
Seq. ID No. 218q	0.27	0.07	1.11	0.08	2.39
Seq. ID No. 209y	0.34	0.06	0.96	0.06	1.57
Seq. ID No. 218t	0.36	0.12	0.76	0.04	2.57
Seq. ID No. 218m	0.41	0.06	1.16	0.29	1.66
Seq. ID No. 209w	0.44	0.07	1.00	0.11	5.76
Seq. ID No. 218p	0.46	0.12	0.88	0.07	
Seq. ID No. 209v	0.48	0.25	0.96	0.07	3.10
Seq. ID No. 209x	0.52	0.02	0.87	0.06	5.60

[1376]

Seq. ID No. 218u	0.53	0.20	0.79	0.05	
Seq. ID No.218v	0.54	0.13	0.77	0.04	
Seq. ID No. 210q	0.60	0.23	1.11	0.11	
Seq. ID No. 218o	0.61	0.15	0.96	0.06	
Seq. ID No. 210p	0.65	0.24	1.01	0.23	
Seq. ID No.218n	0.89	0.36	1.07	0.22	
Seq. ID No. 210o	0.95	0.08	0.97	0.14	
Seq. ID No. 209s	0.96	0.31	1.14	0.24	
pos. Ctrl aha-1	0.22	0.04	0.77	0.02	
Ref.1	1.43	0.40	1.27	0.18	

[1377] 结论

[1378] 最有效的本发明ASO的靶下调在没有转染试剂的情况下再次是优异的。因此，无转染试剂转移是可行的，是进一步药物开发的优选方法。

[1379] 1.2.2A549和ReNcell**CX®**细胞的无转染试剂摄取分析

[1380] 在来自皮质脑区域的人神经元祖细胞(ReNcell**CX®** cells,Millipore#SCM007)中测定反义寡核苷酸(ASO)对靶mRNA的抑制活性。关于成人神经发生作为治疗靶标的问题通过使用最有效的ASO的无转染试剂转移研究进行评估。A549细胞用作参考细胞系。

[1381] 方法说明：

[1382] 如上所述培养A549和ReNcell**CX®**细胞。对于处理研究，将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(50,000个细胞/孔)中，并在37℃和5％CO_2下孵育过夜。为了处理A549细胞和ReNcell**CX®**细胞，移除培养基并用新鲜的全培养基替代(用于24孔的0.5ml)。Ref.1、ASO与Seq.ID No.218b和ASO与Seq.ID No.218c以2.5和10μM的浓度加入到培养基中，用于在37℃和5％CO_2分析不同时间点的靶下调(A549细胞：18h，72h，6d，ReNcell**CX®**细胞：18h，96h，8d)。为了收获，将细胞用PBS洗涤两次并在-20℃冷冻。为了通过实时

RT-PCR分析mRNA，如上所述处理细胞。使用即用型和标准化的实时RT-PCR引物对(见表11)，并与各自的即用Mastermix溶液(SsoAdvanced™UniversialSYBR®Green Supermix (BioRad#172-5271))混合，根据制造商的说明书(BioRad Prime PCR Quick Guide)进行。使用BioRad CFX Manager™ 3.1对探针进行一式三份的分析，相对于GNB2L1mRNA进行定量，然后针对未处理的对照进行标准化，使用普通单因子ANOVA随后"Dunnett"事后比较计算统计数据。

[1383] 结果：

[1384] 结果表明，使用Seq.ID No.218b和218c的无转染试剂转移以剂量和时间依赖的方式导致A549和ReNcell CX®细胞中TGF-R_{II} mRNA的适当下调(表17)。18h后A549细胞中的靶mRNA表达明显减少，72h和6d后更加高效减少。在ReNcell CX®中18小时后，可以观察到无转染试剂摄取10μM后的TGF-R_{II} mRNA的抑制，但两个测试浓度下72小时后靶标下调显著，稳定至第8天。

[1385] 表17：在A549和ReNcell CX®细胞中用TGF-R_{II}特异性ASO进行无转染试剂转移后，TGF-R_{II} mRNA的剂量和时间依赖性下调。使用定量实时RT-PCR，相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平，然后针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b，D＝Seq.ID No.218c，±＝SEM，参考A*p<0.05，**p<0.01；参考B+p<0.05，++p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Dunnett"事后比较来计算统计数据。

[1386]

细胞系	A549		
靶 时间点	TGF-R_{II} 18 h, n=3	TGF-R_{II} 72 h, n=3	TGF-R_{II} 6 d, n=3
A	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.38
B 2.5 μM	1.17 ± 0.06	0.87 ± 0.21	0.88 ± 0.14
B 10 μM	0.98 ± 0.10	0.77 ± 0.06	1.03 ± 0.10
C 2.5 μM	0.60*++ ± 0.09	0.41* ± 0.07	0.13 ± 0.03
C 10 μM	0.49**++ ± 0.02	0.15** ± 0.02	0.02*+ ± 0.00
D 2.5 μM		0.46** ± 0.09	
D 10 μM		0.21* ± 0.04	

[1387]

细胞系	ReNcell CX		
靶 时间点	TGF-R_{II} 18 h, n=3	TGF-R_{II} 96 h, n=3	TGF-R_{II} 8 d, n=3
A	1.00 ± 0.41	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.18
B 2.5 μM	1.38 ± 0.58	0.89 ± 0.09	0.80 ± 0.33
B 10 μM	1.70 ± 0.68	0.81 ± 0.10	1.16 ± 0.43
C 2.5 μM	1.04 ± 0.36	0.32** ± 0.06	0.42 ± 0.16
C 10 μM	0.64 ± 0.24	0.16** ± 0.02	0.21 ± 0.09
D 2.5 μM		0.53 ± 0.07	
D 10 μM		0.23** ± 0.03	

[1388] 结论：

[1389] 即使在长期施用中也可以通过无转染试剂吸收ASO来实现有效和稳定的靶mRNA的下调。因此，可以使用ReNcell**CX**®细胞。用于实现成人神经发生恢复的实验，作为患者的治疗选择。这同样适用于A549实验所示的其它适应症。

[1390] 总之，TGF-R_{II}的有效下调独立于转移方法和细胞类型而是合适的。ASO的无转染试剂摄取是优选的转移方法，因为在临床应用中，不存在另外的转染剂对患者具有高度的安全性。

[1391] 实施例2：针对TGF-R_{II}的反义寡核苷酸对蛋白水平的抑制活性的测定

[1392] 进行Western印迹分析和免疫细胞化学以确定人肺癌细胞(A549)和人神经元前体细胞(ReNcell**CX**®)中由本发明的反义寡核苷酸(ASO)介导的TGF-R_{II} mRNA水平的减少是否导致靶蛋白的减少。

[1393] 方法说明：

[1394] 如上所述培养细胞。对于处理，将细胞接种在6孔培养皿(Sarstedt#83.3920.300，80,000个细胞/孔)和8孔细胞培养载玻片(Sarstedt#94.6140.802，10,000个细胞/孔)中，并在37℃和5％CO_2孵育过夜。对于A549和ReNcell**CX**®细胞培养基的无转染试剂转移，移除培养基并用新鲜的完全培养基(6孔1ml，8孔0.5ml)代替。然后将Ref.1(打乱对照)、各自的本发明的ASO以2.5和10μM的浓度加入到培养基中，用于在A549细胞中72小时和在ReNcell**CX**®细胞中96小时后的靶下调的蛋白分析。将细胞裂解并通过Western印迹检查，如一般方法部分中所述。将一抗抗TGF-R_{II}在TBS-T中的0.5％BSA中稀释，并在4℃下孵育2天。随后将膜用在TBS-T中的0.5％BSA中稀释的二抗HRP连接的抗兔IgG孵育(1小时，室温)。孵育后，用TBS-T洗涤印迹，用Luminata™Forte Western HRP底物(Millipore#WBLUF0500)显影，并用发光图像分析仪(ImageQuant™ LAS 4000,GE Healthcare)检测条带。对于管家基因比较，将膜与HRP缀合的抗GAPDH(0.5％Blotto中1:1000，4℃，过夜)一起孵育。相对于GAPDH计算密度定量，然后用Image Studio™ Lite软件针对未处理的对照进行标准化。

[1395] 如标准方案所述进行免疫细胞化学的程序。为了验证靶下调，抗TGF-R_{II}被稀释，并

在4℃孵育过夜。Cy3山羊抗兔用作二抗。所有抗体稀释液均用抗体稀释剂(Zytomed®# ZUC025-100)制备。通过荧光显微镜(Zeiss Axio®Observer.Z1)进行细胞检查。使用Image J软件和CorelDRAW®X7软件分析图像。

[1396] 无转染试剂转移后的结果：

[1397] Western印迹分析和免疫细胞化学用于验证TGF-R_{II}蛋白水平的减少。无转染试剂转移后72小时，与A549细胞中未处理的对照相比，使用本发明的高浓度的不同ASO后TGF-R_{II}蛋白显著减少(表18)。在ReNcell CX®细胞中也观察到减少的TGF-R_{II}水平(表18)。对于两种细胞系，Western印迹分析显示TGF-R_{II}蛋白水平的减少。与未处理的细胞和打乱对照处理的细胞相比，免疫细胞化学显示两种细胞系中TGF-R_{II}蛋白的强烈的剂量依赖性减少。

[1398] 表18:TGF-R_{II} Western印迹后的密度计量分析。分别在72小时或96小时后，可以观察到在A549细胞和ReNcell CX®细胞中TGF-R_{II}特异性ASO的无转染试剂转移后TGF-R_{II}蛋白的减少。使用Image Studio™ Lite软件测定相对于管家基因GAPDH的蛋白水平，并将其针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b，D＝Seq.ID No.218c，F＝Seq.ID No.210q，G＝Seq.ID No.213k，H＝Seq.ID No.143h，I＝Seq.ID No.152h，J＝Seq.ID No.209az，K＝Seq.ID No.209y，±＝SEM，参考A*p<0.05。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett”事后比较来计算统计数据。

[1399]

细胞系	A549	ReNcell CX
靶 时间点	TGF-R_{II} 72 h, n=3	TGF-R_{II} 96 h, n=2
A	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
B 2.5 μM	0.85 ± 0.13	0.91 ± 0.12
B 10 μM	1.06 ± 0.47	1.23 ± 0.16
C 2.5 μM	0.34 ± 0.11	0.59 ± 0.05
C 10 μM	0.39* ± 0.11	0.63 ± 0.17
D 2.5 μM	0.68 ± 0.14	1.21 ± 0.28
D 10 μM	0.39* ±	0.77 ± 0.10

[1400]

	0.07	
F 2.5 μM	0.51 ± 0.08	0.71 ± 0.16
F 10 μM	0.45 ± 0.09	0.57 ± 0.12
G 2.5 μM	0.41 ± 0.13	0.61 ± 0.10
G 10 μM	0.40* ± 0.06	0.58 ± 0.08
H 2.5 μM	0.75 ± 0.12	0.83 ± 0.13
H 10 μM	0.51 ± 0.07	0.77 ± 0.06
I 2.5 μM	0.58 ± 0.14	0.91 ± 0.21
I 10 μM	0.38* ± 0.14	0.67 ± 0.09
J 2.5 μM	0.42 ± 0.15	0.75 ± 0.23
J 10 μM	0.34* ± 0.05	0.59 ± 0.08
K 2.5 μM	0.45 ± 0.17	0.69 ± 0.16
K 10 μM	0.36* ± 0.09	0.49 ± 0.09

[1401] 结论：

[1402] 除了靶mRNA下调外，Seq.ID No.218b，Seq.ID No.218c，Seq.ID No.210q，Seq.ID No.213k，Seq.ID No.143h，Seq.ID No.152h，Seq.ID No.209az，和Seq.ID No.209y的无转染试剂转移导致A549和ReNcell CX®细胞中蛋白水平的显著减少。TGF-R_{II}的染色显示在两种细胞系中用这些ASO处理后，TGF-R_{II}蛋白的剂量依赖性减少。

[1403] 用其它ASO无转染试剂转移后的结果：

[1404] 蛋白分析显示A549细胞和ReNcell CX®细胞中测试的ASO(10μM，表19)的无转染试剂转移后TGF-R_{II}的量减少。这也通过免疫细胞化学证实。对于两种细胞系，与未处理的细胞和打乱对照处理的细胞相比，可以检测到通过测试的ASO的无转染试剂转移导致TGF-R_{II}蛋白水平的减少。

[1405] 表19：TGF-R_{II} Western印迹后的密度计量分析。在A549和ReNcell CX®细胞中，用其它TGF-R_{II}特异性反义寡核苷酸(ASO)无转染试剂转移后TGF-R_{II}蛋白的减少可分别在72小时或96小时后观察到。使用Studio™ Lite软件测定相对于管家基因GAPDH的蛋白水平，然后将其针对未处理的对照进行标准化。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett”事后比较来计算统计数据。对于ASO1-25的蛋白水平的减少用以下关键字表示：A＝比SEQ ID No.143h

低小于10%;B=比SEQ ID No.143h低多于10%但小于20%;C=比SEQ ID No.143h低多于20%但小于30%。对于ASO 26-48的蛋白水平的减少用以下关键字表示:A=比SEQ ID No.152h低小于10%;B=比SEQ ID No.152h低多于10%但小于20%;C=比SEQ ID No.152h低多于20%但小于30%。对于ASO 49-74的蛋白水平的减少用以下关键字表示:A=比从Seq.ID No.209az和Seq.ID No.209y得到的平均值低小于10%;B=比从Seq.ID No.209az和Seq.ID No.209y得到的平均值低多于10%但小于20%;C=比从Seq.ID No.209az和Seq.ID No.209y得到的平均值低多于20%但小于30%。对于ASO 75-100的蛋白水平的减少用以下关键字表示:A=比SEQ ID No.210q低小于10%;B=比SEQ ID No.210q低多于10%但小于20%;C=比SEQ ID No.210q低多于20%但小于30%。对于ASO 101-124的蛋白水平的减少用以下关键字表示:A=比从Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c得到的平均值低小于10%;B=比从Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c得到的平均值低多于10%但小于20%;C=比从Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c得到的平均值低多于20%但小于30%。对于ASO 125-152的蛋白水平的减少用以下关键字表示:A=比SEQ ID No.213k低小于10%;B=比SEQ ID No.213k低多于10%但小于20%;C=比SEQ ID No.213k低多于20%但小于30%。

[1406]

测试中的ASP编号	Seq ID No.	结果
1	233d	B

[1407]

2	234d	A
3	143j	C
4	143p	A
5	143q	A
6	143r	A
7	143w	A
8	143af	C
9	143ag	C
10	143ah	C
11	235b	B
12	235d	A
13	141d	A
14	141g	A
15	141i	A
16	237b	A
17	237c	A
18	237i	C
19	237m	A
20	238c	A
21	238f	A
22	239e	B
23	240c	B
24	241b	C
25	242a	C
26	246e	C
27	247d	A
28	248b	A
29	248e	B
30	248g	A

[1408]

31	152k	B
32	152s	B
33	152t	B
34	152u	B
35	152ab	C
36	152ag	B
37	152ah	C
38	152ai	C
39	249c	A
40	249e	A
41	250b	A
42	250g	B
43	251c	A
44	251f	A
45	252e	B
46	253c	A
47	254b	C
48	255a	C
49	259e	C
50	260d	B
51	261b	A
52	261e	B
53	261g	A
54	262d	B
55	262e	A
56	209s	A
57	209v	B
58	209w	B
59	209x	C

[1409]

60	209ai	B
61	209an	C
62	209at	A
63	209au	B
64	209av	B
65	263b	B
66	263c	A
67	263i	B
68	263m	A
69	264e	A
70	264h	A
71	265e	B
72	266c	A
73	267b	B
74	268a	B
75	272e	B
76	273d	A
77	274a	A
78	274d	B
79	274f	A
80	275g	A
81	275i	B
82	210o	A
83	210v	B
84	210w	B
85	210x	C
86	210ab	B
87	210ac	A
88	210ad	B

[1410]

89	210af	A
90	210am	B
91	276b	B
92	276c	A
93	276j	B
94	276k	B
95	277d	A
96	277e	A
97	278f	B
98	279c	B
99	280b	C
100	281a	C
101	220d	C
102	221d	B
103	222b	A
104	222c	A
105	222f	B
106	223c	B
107	223f	A
108	218ad	B
109	218n	A
110	218t	B
111	218u	B
112	218v	C
113	218ah	C
114	218an	A
115	218ao	B
116	218ap	B
117	224i	B

[1411]

118	224m	B
119	225c	A
120	225f	A
121	226e	B
122	227c	A
123	228b	C
124	229a	C
125	285d	C
126	286d	A
127	287d	B
128	287e	A
129	287f	A
130	288e	A
131	288i	A
132	289d	B
134	289h	A
135	289o	B
136	289p	B
137	289q	B
138	213o	B
139	213p	B
140	213q	B
141	213s	B
142	213y	B
143	213z	B
144	213aa	B
145	213af	B
146	290c	A
147	290f	B

[1412]

148	290i	A
149	291c	B
150	292c	C
151	293b	C
152	294a	C

[1413] 结论：

[1414] 总之，在A549和ReNcell CX®细胞中通过无转染试剂转移的TGF-R_{II} mRNA的剂量依赖性下调导致蛋白水平的剂量依赖性减少。如A549和ReNcell CX®细胞所证明的，本发明的ASO在蛋白靶下调中是有效的。

[1415] 实施例3：反义寡核苷酸对TGF-R_{II}的下游信号通路的影响的分析。

[1416] 在人肺癌细胞(A549)和人神经元前体细胞(ReNcell CX®)中进行功能分析。分析TGF-β下游信号通路，观察到通过本发明的ASO的无转染试剂转移的TGF-R_{II} mRNA的有效下调和蛋白水平的减少。因此，评估了称为TGF-β的下游介质的结缔组织生长因子(CTGF)的mRNA和蛋白水平。此外，检查Smad2(mothers against decapentaphlegic homolog 2)的磷酸化。Smad2的磷酸化是活性TGF-β通路和随后下游靶基因CTGF的上调的标志物。

[1417] 方法说明：

[1418] 如前所述培养细胞。对于处理，将细胞接种在6孔培养皿(Sarstedt#83.3920.300)(80,000个细胞/孔)和8孔细胞培养载玻片(Sarstedt#94.6140.802)(10,000个细胞/孔)中，并孵育在37℃和5％CO_2下过夜。对于无转染试剂转移，移除A549和ReNcell CX®细胞培养基，并用新鲜的完全培养基(6孔1ml，8孔0.5ml)代替。然后将Ref.1(打乱对照)、具有序列识别号218b(Seq.ID No.218b)、218c(Seq.ID No.218c)的ASO以2.5和10μM的浓度加入到培养基中，并在A549细胞中72小时和在ReNcell CX®细胞中96小时后进行各自的分析。为了评估对CTGF mRNA水平的影响，如前所述进行实时RT-PCR。用于CTGF分析的引物对是即用的和标准化的。为了检查CTGF和pSmad2蛋白水平，如前所述使用Western印迹和免疫细胞化学。各自方法的抗体的类型和使用的稀释度列于表13和14中。

[1419] 3.1.Seq.ID No.218b的结果

[1420] 3.1.1对CTGF mRNA和蛋白水平的影响

[1421] 在用ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后A549(72h)和ReNcell CX® (96h)中的CTGF mRNA显著地和剂量依赖性地减少。在用10μM Seq.ID No.218b无转染试剂转移后，TGF-β的下游介质在ReNcell CX®细胞中减少至52％±0.02，并且在A549细胞中减少至39％±0.03(表20)。根据这些下调的CTGF mRNA水平，在A549细胞中观察到CTGF蛋白表达的强烈减少(表21)。

[1422] 表20：使用Seq.ID No.218b无转染试剂转移后A549和ReNcell CX®细胞中CTGF mRNA的剂量依赖性和显著下调。

[1423] 使用定量实时RT-PCR定量相对于管家基因GNB2L1的mRNA表达水平，并针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b。±＝SEM，参考A*p<

0.05,**p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett”事后比较来计算统计数据。

[1424]

细胞系	A549	ReNcell CX
靶 时间点	CTGF 72 h, n=3	CTGF 96 h, n=3
A	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.04
B 2.5 μM	0.87 ± 0.06	0.97 ± 0.06
B 10 μM	0.80 ± 0.03	0.86 ± 0.17
C 2.5 μM	0.60** ± 0.04	0.66** ± 0.02
C 10 μM	0.39** ± 0.03	0.52** ± 0.02

[1425] 表21:CTGF Western印迹的密度计量分析。用ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后72小时在A549中观察到CTGF蛋白下调。使用Studio™ Lite软件测定相对于管家基因α-微管蛋白的蛋白水平,并将其针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b。

[1426]

细胞系	A549
靶 时间点	CTGF 72 h, n=1
A	1.00
B 2.5 μM	0.91
B 10 μM	1.31
C 2.5 μM	0.05
C 10 μM	0.086

[1427] 结论:

[1428] 通过Seq.ID No.218b的无转染试剂转移实现TGF-β信号传导的功能抑制,如A549和ReNcell CX®细胞中靶CTGF mRNA的下调和减少的CTGF蛋白水平所显示的。

[1429] 3.1.2对pSmad2蛋白水平的影响

[1430] 分析pSmad2蛋白水平以证明作为ASO介导的TGF-β信号传导抑制的具体结果的CTGF下调。

[1431] 在ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后,在A549中72小时和在ReNcell CX®细胞96小时后的针对pSmad2的染色显示Smad2磷酸化的剂量依赖性抑制(图5)。此外,ASO

Seq.ID No.218b对pSmad2表达水平的减少通过Western印迹分析在A549细胞中验证(表22)。

[1432] 表22:pSmad2蛋白印迹的密度计量分析。在ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后72小时后在A549中观察到pSmad2蛋白下调。使用Studio™ Lite软件测定相对于管家基因GAPDH的蛋白水平,并针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b。

[1433]

细胞系	A549

[1434]

靶 时间点	pSmad2 72 h, n=1
A	1.00
B 2.5 μM	1.81
B 10 μM	1.79
C 2.5 μM	0.66
C 10 μM	0.72

[1435] 结论:

[1436] A549和ReNcell CX®细胞中Seq.ID No.218b的无转染试剂转移导致TGF-β信号传导的下游介质的剂量依赖性抑制。CTGF和Smad2的磷酸化被ASO Seq.ID No.218b减少,都表明抑制的TGF-β通路。

[1437] 3.2Seq.ID No.218c的结果

[1438] 3.2.1对CTGF mRNA和pSmad2蛋白水平的影响

[1439] ASO Seq.ID No.218c的无转染试剂转移下调A549和ReNcell CX细胞中的CTGF mRNA(表23)。针对pSmad2的免疫细胞化学证实了TGF-β信号传导的抑制(图6)。因此,CTGF mRNA的下调是减少的TGF-β信号传导的直接作用。

[1440] 表23:在A549和ReNcell CX®细胞中观察到CTGF mRNA的显著下调。使用定量实时RT-PCR定量相对于管家基因GNB2L1的mRNA表达水平,并针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,D=Seq.ID No.218c。±=SEM,参考A**p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Dunnett"事后比较来计算统计数据。

[1441]

细胞系	A549	ReNcell CX
靶 时间点	CTGF 72 h, n=4	CTGF 96 h, n=3
A	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10
B 2.5 μM	0.97 ± 0.07	0.88 ± 0.08
B 10 μM	0.85 ± 0.06	0.89 ± 0.07
D 2.5 μM	0.49** ± 0.05	1.10 ± 0.08

[1442]

D 10 μM	0.31** ± 0.03	0.82 ± 0.02

[1443] 结论：

[1444] ASO Seq.ID No.218c在靶TGF-R_{II} mRNA下调后有效抑制TGF-β信号传导。这通过测定下调的CTGF mRNA和减少的pSmad2蛋白水平作为TGF-β信号传导的标志物来检查。

[1445] 总之，本发明的ASO有效用于通过TGF-R_{II}的下调来介导TGF-β信号传导的功能性抑制。因此，本发明的ASO将有益于涉及升高的TGF-β水平的医学适应症，例如神经系统疾病、纤维化和肿瘤进展。

[1446] 实施例4：本发明的ASO对TGF-β1处理的细胞中靶mRNA水平的抑制活性。

[1447] 4.1在TGF-β1预处理后，A549和ReNcell CX®细胞中ASO的无转染试剂吸收。

[1448] 为了分析反义寡核苷酸(ASO)在病理条件下来自皮质脑区域的人神经元祖细胞(ReNcell CX®)中的抑制活性，用转化生长因子-β1(TGF-β1)预处理细胞。从以前的研究中，已知TGF-β1以高浓度发现于所有神经障碍(例如ALS)的脑脊液(CSF)中。因此，在预处理后和在TGF-β1存在下，检查了ASO对TGFβ信号传导的抑制作用。A549细胞用作参考细胞系。

[1449] 方法说明：

[1450] 如上所述培养A549和ReNcell CX®。对于处理研究，将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(50,000个细胞/孔)中，并在37℃和5％CO_2下孵育过夜。对于处理A549细胞和ReNcell CX细胞，移除培养基并用新鲜的全培养基替代(用于24孔的0.5ml)。在TGF-β1(10ng/ml，PromoCell#C-63499)暴露48小时后，改变培养基，结合Ref.1(打乱对照，10μM)、ASO Seq.ID No.218b(10μM)或ASO Seq.ID No.218c(10μM)进行TGF-β1再处理。将A549细胞孵育另外72小时，而在96小时后收获ReNcell CX®细胞。因此，细胞用PBS洗涤两次，随后如前所述用于RNA分离(24孔培养皿)。表11列出了用于实时RT-PCR的引物对。

[1451] 4.1.1Seq.ID No.218b的结果

[1452] A549和ReNcell CX®细胞中ASO Seq.ID No.218b对TGF-R_{II}的mRNA下调的功效不受TGF-β1预孵育的影响(表24，图7)。用ASO单独处理后(剩余mRNA：15％±0.05)，在TGF-β1存在下处理后，预处理后(剩余mRNA：7％±0.01)，A549细胞中的靶mRNA显著下调。在ReNcell CX®细胞中，ASO Seq.ID No.218b在不存在TGF-β1(25％±0.01)或存在TGF-β1的情况下，在TGF-β1预处理后(17％±0.02)显示出相似的抑制TGF-R_{II} mRNA的效力。

[1453] 表24:在TGF-β1存在下,ASO Seq.ID No.218b导致在A549和ReNcell CX®细胞中无转染试剂转移后TGF-R_{II} mRNA的有效下调。使用定量实时RT-PCR定量相对于管家基因GNB2L1的mRNA表达水平,并针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,E=TGF-β1,±=SEM,*p<0.05,**p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Dunnett"事后比较来计算统计数据。

[1454]

靶 时间点	TGF-R_{II} 48 h TGF-β1 -> 72 h / 96 h TGF-β1 + ASO/单一治疗	
细胞系	A549 n= 4	ReNcell CX n= 3
A	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.11
B 10 μM	0.90 ± 0.17	0.89 ± 0.26
C 10 μM	0.15** ± 0.05	0.25 ± 0.01
E 10 ng/ml	0.71 ± 0.05	0.79 ± 0.34
E 10 ng/ml + B 10 μM	0.74 ± 0.05	0.89 ± 0.25
E 10 ng/ml + C 10 μM	0.07** ± 0.01	0.27 ± 0.02

[1455] 结论:

[1456] 在两种测试的细胞系中预孵育后,在存在TGF-β1的情况下,靶mRNA有效地下调至通过无转染试剂吸收本发明的ASO的约20%。

[1457] 4.1.2Seq.ID No.218c的结果

[1458] ASO Seq.ID No.218c对TGF-R_{II} mRNA的下调在A549和ReNcell CX®细胞中在TGF-β1的存在下有效(表25,图8)。两种测试细胞系中的靶mRNA均显著下调,无论使用ASO Seq.ID No.218c进行单次处理或是在TGF-β1的存在下。

[1459] 表25:在TGF-β1存在下,ASO Seq.ID No.218c导致在A549和ReNcell CX®细胞中无转染试剂转移后TGF-RII mRNA的有效下调。使用定量实时RT-PCR定量相对于管家基因GNB2L1的mRNA表达水平,并针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,D=Seq.ID No.218c,E=TGF-β1,±=SEM,*p<0.05,参考A**p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Dunnett"事后比较来计算统计数据。

[1460]

靶 时间点	TGF-R_{II} 48 h TGF-β1 -> 72 h / 96 h TGF-β1 + ASO/单一治疗	
细胞系	A549 n= 2	ReNcell CX n= 2
A	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.18
B 10 μM	0.92 ± 0.06	0.51 ± 0.14
D 10 μM	0.31** ± 0.04	0.05** ± 0.01
E 10 ng/ml	0.68 ± 0.05	0.88 ± 0.73
E 10 ng/ml + B 10 μM	0.86 ± 0.04	0.45 ± 0.09
E 10 ng/ml + D 10 μM	0.16** ± 0.05	0.03** ± 0.01

[1461] 结论：

[1462] 总之，本发明的ASO在TGF-β1的存在下有效下调TGF-R_{II} mRNA，表明ASO在病理条件下起作用。

[1463] 实施例5：本发明的ASO对TGF-β1处理的细胞中靶蛋白水平的抑制活性。

[1464] 为了分析反义寡核苷酸(ASO)在病理条件下来自皮质脑区域的人神经元祖细胞(ReNcell**CX®**)中的抑制活性，用转化生长因子-β1(TGF-β1)预处理细胞。从以前的研究中，已知TGF-β1以高浓度发现于所有神经障碍(例如ALS)的脑脊液(CSF)中。因此，在预处理后和在TGF-β1存在下，检查了ASO对TGFβ信号传导的抑制作用。A549细胞用作参考细胞系。

[1465] 方法说明：

[1466] 如前所述，在标准方案中培养细胞。对于处理，将细胞接种在6孔培养皿(Sarstedt#83.3920.300)(80,000个细胞/孔)和8孔细胞培养载玻片(Sarstedt#94.6140.802)(10,000个细胞/孔)中，并在37℃和5％CO_2下孵育过夜。为了研究无转染试剂转移效应(A549和ReNcell CX)，在与TGF-β1(Promocell#C-63499)预孵育后，移除培养基并用新鲜的完全培养基(1ml用于6孔培养皿和8-孔细胞培养皿)。在暴露于TGF-β1(10ng/ml，48h)后，改变培养基，将TGF-β1(10ng/ml)、Ref.1(打乱对照，10μM)和本发明的ASO(10μM)组合地和在单次处理中加入细胞。将A549细胞孵育另外72小时，而在96小时后收获ReNcell**CX®**细胞。因此，细胞用PBS洗涤两次，随后在Western印迹分析或细胞的免疫细胞化学检测(在8孔细胞培养载玻片中)后用于蛋白分离(6孔培养皿)。如前所述进行所使用的技术的程序。用于各种方法的抗体和稀释液列于表13和14中。

[1467] 无转染试剂转移的结果

[1468] A549细胞的Western印迹和免疫细胞化学分析显示，具有Seq.ID No.218b,Seq.ID No.218c,Seq.ID No.210q,Seq.ID No.213k,Seq.ID No.143h,Seq.ID No.152h,Seq.ID No.209az,Seq.ID No.209y的ASO在TGF-β1存在下产生有效的靶向下调(表26)。在固定的ReNcell CX®细胞上染色TGF-R_{II}证实在A549细胞中观察到的结果。测试的ASO在单次处理后显示强烈的靶下调，但也在TGF-β1存在下显示出强烈的靶下调。

[1469] 表26:TGF-R_{II} Western印迹的密度计量分析。观察到TGF-β1预孵育随后A549中不同ASO的无转染试剂转移后TGF-R_{II}蛋白的减少。使用Studio™ Lite软件测定相对于管家基因GAPDH的蛋白水平，然后将其针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b,C＝Seq.ID No.218b,D＝Seq.ID No.218c,F＝Seq.ID No.210q,G＝Seq.ID No.213k,H＝Seq.ID No.143h,I＝Seq.ID No.152h,J＝Seq.ID No.209az,K＝Seq.ID No.209y,E＝TGF-β1。

[1470]

靶 时间点	TGF-R_{II} 48 h TGF-β1 -> 72 h TGF-β1 + ASO/单一治疗
细胞系	A549 n= 1
A	1.00
B 10 μM	1.20
C 10 μM	0.31
D 10 μM	0.42
F 10 μM	0.45
G 10 μM	0.35
H 10 μM	0.47
I 10 μM	0.33
J 10 μM	0.27
K 10 μM	0.30
E 10 ng/ml	2.03
E 10 ng/ml + B 10 μM	1.50
E 10 ng/ml + C 10 μM	0.78

[1471]

E 10 ng/ml + D 10 μM	**1.16**
E 10 ng/ml + F 10 μM	**1.21**
E 10 ng/ml + G 10 μM	**0.83**
E 10 ng/ml + H 10 μM	**1.02**
E 10 ng/ml + I 10 μM	**0.76**
E 10 ng/ml + J 10 μM	**0.69**
E 10 ng/ml + K 10 μM	**0.77**

[1472] 结论：

[1473] TGF-β1预孵育然后无转染试剂转移Seq.ID No.218b,Seq.ID No.218c,Seq.ID No.210q,Seq.ID No.213k,Seq.ID No.143h,Seq.ID No.152h,Seq.ID No.209az,和Seq.ID No.209y除了导致靶mRNA下调之外，还导致A549和ReNcell**CX®**细胞中蛋白水平的减少。

[1474] 用其它ASO的无转染试剂转移后的结果：

[1475] Western印迹分析显示，与未处理的细胞和用打乱对照处理的细胞相比，无转染试剂转移72小时后A549细胞中TGF-R_{II}蛋白的量减少(表27)。TGF-β1的预孵育和随后测试的ASO的无转染试剂转移诱导与用TGF-β1预处理随后用打乱对照进行无转染试剂转移的细胞相比的减少。在针对TGF-R_{II}染色后对A549和ReNcell**CX®**的免疫细胞化学检查显示，使用或不使用TGF-β1预处理的无转染试剂转移后，测试的ASO介导了靶蛋白的强烈减少。

[1476] 表27TGF-R_{II} Western印迹的密度计量分析。可以检测TGF-β1预孵育然后其它TGF-R_{II}特异性反义寡核苷酸(ASO)在A549中的无转染试剂转移后TGF-R_{II}蛋白的减少。使用Studio™ Lite软件测定相对于管家基因GAPDH的蛋白水平，然后将其针对未处理的对照进行标准化。对于ASO1-25的蛋白水平的减少用以下关键字表示：A＝比SEQ ID No.143h低小于10％；B＝比SEQ ID No.143h低多于10％但小于20％；C＝比SEQ ID No.143h低多于20％但小于30％。对于ASO 26-48的蛋白水平的减少用以下关键字表示：A＝比SEQ ID No.152h低小于10％；B＝比SEQ ID No.152h低多于10％但小于20％；C＝比SEQ ID No.152h低多于20％但小于30％。对于ASO 49-74的蛋白水平的减少用以下关键字表示：A＝比从Seq.ID No.209az和Seq.ID No.209y得到的平均值低小于10％；B＝比从Seq.ID No.209az和Seq.ID No.209y得到的平均值低多于10％但小于20％；C＝比从Seq.ID No.209az和Seq.ID No.209y得到的平均值低多于20％但小于30％。对于ASO 75-100的蛋白水平的减少用以下关键字表示：A＝比SEQ ID No.210q低小于10％；B＝比SEQ ID No.210q低多于10％但小于20％；C＝比SEQ ID No.210q低多于20％但小于30％。对于ASO 101-124的蛋白水平的减少用以下关键字表示：A＝比从Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c得到的平均值低小于10％；B＝比从Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c得到的平均值低多于10％但小于20％；C＝比从Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c得到的平均值低多于20％但小于30％。对于ASO 125-152的蛋白水平的减少用以下关键字表示：A＝比SEQ ID No.213k低小于10％；B＝比SEQ ID No.213k低多于10％但小于20％；C＝比SEQ ID No.213k低多于20％但小于30％。

[1477]

测试中的ASO编号	Seq ID No.	结果
1	233d	B
2	234d	A
3	143j	C
4	143p	A
5	143q	A
6	143r	A
7	143w	A
8	143af	B
9	143ag	C
10	143ah	C

[1478]

11	235b	B
12	235d	A
13	141d	A
14	141g	A
15	141i	B
16	237b	A
17	237c	A
18	237i	C
19	237m	A
20	238c	A
21	238f	A
22	239e	B
23	240c	B
24	241b	C
25	242a	C
26	246e	C
27	247d	A
28	248b	A
29	248e	B
30	248g	A
31	152k	B
32	152s	B
33	152t	B
34	152u	B
35	152ab	C
36	152ag	B
37	152ah	A
38	152ai	A
39	249c	A

[1479]

40	249e	A
41	250b	A
42	250g	B
43	251c	A
44	251f	A
45	252e	B
46	253c	A
47	254b	C
48	255a	C
49	259e	C
50	260d	B
51	261b	A
52	261e	B
53	261g	A
54	262d	B
55	262e	A
56	209s	A
57	209v	B
58	209w	A
59	209x	C
60	209ai	B
61	209an	C
62	209at	B
63	209au	B
64	209av	B
65	263b	B
66	263c	A
67	263i	B
68	263m	A

[1480]

69	264e	A
70	264h	A
71	265e	B
72	266c	A
73	267b	B
74	268a	B
75	272e	B
76	273d	B
77	274a	A
78	274d	B
79	274f	A
80	275g	A
81	275i	B
82	210o	A
83	210v	B
84	210w	B
85	210x	C
86	210ab	B
87	210ac	A
88	210ad	B
89	210af	A
90	210am	B
91	276b	B
92	276c	A
93	276j	B
94	276k	B
95	277d	A
96	277e	A
97	278f	B

[1481]

98	279c	B
99	280b	C
100	281a	C
101	220d	C
102	221d	B
103	222b	A
104	222c	A
105	222f	B
106	223c	B
107	223f	A
108	218ad	B
109	218n	A
110	218t	B
111	218u	B
112	218v	C
113	218ah	C
114	218an	A
115	218ao	B
116	218ap	B
117	224i	B
118	224m	B
119	225c	A
120	225f	A
121	226e	B
122	227c	B
123	228b	C
124	229a	C
125	285d	C
126	286d	A

[1482]

127	287d	B
128	287e	A
129	287f	A
130	288e	A
131	288i	A
132	289d	B
134	289h	A
135	289o	B
136	289p	A
137	289q	B
138	213o	B
139	213p	B
140	213q	B
141	213s	B
142	213y	B
143	213z	B
144	213aa	B
145	213af	C
146	290c	A
147	290f	B
148	290i	A
149	291c	B
150	292c	C
151	293b	C
152	294a	C
125	285d	C

[1483] 结论：

[1484] 即使在TGF-β1预孵育后，本发明的ASO的无转染试剂转移导致A549和ReNcell CX®细胞中TGF-RII蛋白的减少。

[1485] 实施例6：TGF-β1预孵育后本发明的ASO对TGF-RII的下游信号通路的影响的分析

[1486] 在人肺癌细胞(A549)和人神经元前体细胞(ReNcell CX®)中进行功能分析。分

析TGF-β1下游信号通路，观察到在TGF-β1存在下通过本发明的ASO的无转染试剂转移对TGF-R_{II} mRNA的有效下调和蛋白水平的减少。因此，评估了称为TGF-β的下游介质的结缔组织生长因子(CTGF)的mRNA和蛋白水平。此外，检查Smad2(mothers against decapentaphlegic homolog 2)的磷酸化。Smad2的磷酸化是活性TGF-β通路和随后下游靶基因CTGF的上调的标志物。

[1487] 方法说明：

[1488] 如前所述，在标准方案中培养细胞。对于处理，将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(50,000个细胞/孔)，6孔培养皿(Sarstedt#83.3920.300)(80,000个细胞/孔)和8孔细胞培养物载玻片(Sarstedt#94.6140.802)(10,000个细胞/孔)，并在37℃和5％CO_2下孵育过夜。为了研究无转染试剂转移效应(A549和ReNcell CX®细胞)，在与TGF-β1预孵育后，移除培养基并用新鲜的完全培养基(1ml用于6孔培养皿和8孔细胞培养皿)。在暴露于TGF-β1(10ng/ml，48h)后，改变培养基，将TGF-β1(10ng/ml)、Ref.1(打乱对照，10μM)具有Seq.ID No.218b的ASO(10μM)和具有Seq.ID No.218c的ASO(10μM)，加入Seq.ID No.218c(10μM)组合地和在单次处理中加入细胞。将A549细胞再孵育72小时，96小时后收获ReNcell CX®细胞。因此，细胞用PBS洗涤两次，随后用于RNA(24孔培养皿)和蛋白分离(6孔培养皿)或细胞的免疫细胞化学检查(在8孔细胞培养皿中)。为了评估对CTGF mRNA水平的影响，如前所述进行实时RT-PCR。用于CTGF分析的引物对是即用的和标准化的。为了检查CTGF和pSmad2蛋白水平，如前所述使用Western印迹和免疫细胞化学。用于各种方法的抗体和稀释液列于表13和14中。

[1489] 6.1.Seq.ID No.218b的结果

[1490] 6.1.1对CTGF mRNA和蛋白水平的影响

[1491] 用ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后在A549(72小时，0.52±0.05)和ReNcell CX®(96小时，0.70±0.25)细胞中CTGF mRNA下调，而TGF-β1孵育5天(A549：48小时+72小时，6.92±2.32)或6天(ReNcell CX：48h+96h，1.60±015)分别引起CTGF mRNA的显著上调。ASO Seq.ID No.218b足够有效地通过在TGF-β1的存在下阻断TGF-β1的作用来引起CTGF mRNA下调(表28，图11)。根据mRNA水平的观察，针对CTGF的免疫化学染色也证实了对蛋白水平的这些观察(图12)。

[1492] 表28：A549和ReNcell CX®细胞中在TGF-β1的存在下用Seq.ID No.218b进行无转染试剂转移后CTGF mRNA的下调。使用实时RT-PCR定量相对于管家基因GNB2L1的mRNA表达水平，并针对未处理对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b，E＝TGF-β1，±＝SEM，*$p<0.05$，参考A**$p<0.01$，参考$E+B^{++}p<0.01$。使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”事后比较来计算统计数据。

[1493]

靶 时间点	CTGF 48 h TGF-β1 -> 72 h / 96 h TGF-β1 + ASO/单一治疗	
细胞系	A549 n= 5	ReNcell CX n= 3
A	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.04
B 10 μM	0.89 ± 0.19	0.85 ± 0.01
C 10 μM	0.52 ± 0.05	0.70* ± 0.25
E 10 ng/ml	6.92* ± 2.32	1.60** ± 0.15
E 10 ng/ml + B 10 μM	8.79** ± 2.72	1.71** ± 0.03
E 10 ng/ml + C 10	2.53^{++} ± 0.59	1.19^{++} ± 0.04

[1494]

μM		

[1495] 结论：

[1496] 在TGF-β1的存在下和随后ASO Seq.ID No.218b的处理，在A549和ReNcell**CX®**细胞中首先导致TGF-R_{II} mRNA的下调，并且减少CTGF mRNA和蛋白水平。这表示ASO Seq.ID No.218b足够有效地在TGF-β1病理条件下具有活性，并且能够拯救TGF-β1介导的作用。

[1497] 6.1.2对pSmad2蛋白水平的影响

[1498] 为了验证CTGF下调是否是在TGF-β1的存在下由ASO Seq.ID No.218b介导的特异性TGF-β信号传导抑制的结果，分析了pSmad2蛋白水平。

[1499] 在TGF-β1预孵育随后ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移同时平行的TGF-β1暴露后染色pSmad2，导致两个测试的细胞系中Smad2磷酸化的抑制(图13)。此外，通过A549和ReNcell**CX®**细胞中的Western印迹分析验证了pSmad2蛋白水平的减少(表29)。

[1500] 表29:pSmad2Western印迹的密度计量分析。用ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后观察到pSmad2蛋白下调。当比较组合处理时，发现由本发明的ASO引起的TGF-β1介导的作用的逆转。使用Studio™ Lite软件测定相对于管家基因GAPDH的蛋白水平，然后将其针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b，E＝TGF-β1。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett”事后比较来计算统计数据。

[1501]

靶 时间点	pSmad2 48 h TGF-β1-> 72 h / 96 h TGF-β1 + ASO/单一治疗	
细胞系	A549 n= 2	ReNcell CX n= 2
A	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
B 10 μM	1.23 ± 0.47	0.89 ± 0.22

[1502]

C 10 μM	0.58 ± 0.08	0.66 ± 0.14
E 10 ng/ml	1.40 ± 0.31	1.19 ± 0.61
E 10 ng/ml + B 10 μM	1.27 ± 0.46	2.19 ± 0.76
E 10 ng/ml + C 10 μM	0.81 ± 0.31	1.55 ± 0.42

[1503] 结论：

[1504] ASO Seq.ID No.218b导致在TGF-β1存在下A549和ReNcell CX®细胞中TGF-β信号的功能性抑制，通过Smad2的磷酸化减少证实。

[1505] 6.2Seq.ID No.218c

[1506] 6.2.1对CTGF mRNA和蛋白水平的影响

[1507] 数据显示与使用打乱对照和TGF-β1(A549:5.89，ReNcell CX®:1.25)的组合处理(表30和图14)相比，在使用ASO Seq.ID No.218c和TGF-β1(A549:0.86，ReNcell CX®:0.23)的组合处理后CTGF mRNA下调。除了这些观察以外，CTGF的免疫化学染色还证实了ASO Seq.ID No.218c防止TGF-β1介导的对蛋白水平的影响(图15)。

[1508] 表30:A549和ReNcell CX®细胞中在TGF-β1预孵育随后Seq.ID No.218c的无转染试剂转移同时平行的TGF-β1处理后的CTGF mRNA水平。数据证实ASO Seq.ID No.218c有效防止TGF-β1对CTGF mRNA水平的影响。使用实时RT-PCR定量相对于管家基因GNB2L1的mRNA表达水平，并针对未处理对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，D＝Seq.ID No.218c，E＝TGF-β1，±＝SEM，参考A**$p<0.01$，参考E+$B^{++}$$p<0.01$。使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”事后比较来计算统计数据。

[1509]

靶 时间点	CTGF 48 h TGF-β1 -> 72 h / 96 h TGF-β1

[1510]

	+ ASO/单一治疗	
细胞系	A549 n= 3	ReNcell CX n= 2
A	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.03
B 10 μM	0.86 ± 0.11	0.85 ± 0.01
D 10 μM	0.53 ± 0.10	0.17* ± 0.02
E 10 ng/ml	4.71 ± 1.76	1.39 ± 0.08
E 10 ng/ml + B 10 μM	5.89* ± 2.16	1.25 ± 0.44
E 10 ng/ml + D 10 μM	0.86^{++} ± 0.06	0.23^{*++} ± 0.02

[1511] 结论：

[1512] 数据证实ASO Seq.ID No.218c有效防止TGF-β1诱导的对CTGF mRNA和蛋白水平的影响。

[1513] 6.2.2对pSmad2蛋白水平的影响

[1514] 为了验证CTGF下调(6.2.1)是否是由ASO Seq.ID No.218c介导的TGF-β1信号传导抑制的结果(即使存在TGF-β1预孵育)，分析了pSmad2蛋白水平。

[1515] Smad2的磷酸化由TGF-β1孵育(1.52±0.19)诱导，而ASO无转染试剂转移介导A549细胞中pSmad2的减少(0.89±0.05)。TGF-β1预孵育与随后的组合处理一起导致抑制TGF-β1对Smad2磷酸化的影响(Western印迹分析，表31)。免疫细胞化学支持Western印迹分析观察到的数据(图16)。

[1516] 表31:pSmad2Western印迹的密度计量分析。用ASO Seq.ID No.218c无转染试剂转移后测量pSmad2蛋白下调。当比较组合处理时，显示本发明的ASO抑制TGF-β1介导的作用。使用Studio™ Lite软件测定相对于管家基因GAPDH的蛋白水平，并针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，D＝Seq.ID No.218c，E＝TGF-β1。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett”事后比较来计算统计数据。

[1517]

靶 时间点	pSmad2 48 h TGF-β1 -> 72 h TGF-β1 + ASO/单一治疗
细胞系	A549 n= 2
A	1.00 ± 0.00
B 10 μM	1.23 ± 0.27
D 10 μM	0.89 ± 0.05
E 10 ng/ml	1.52 ± 0.19
E 10 ng/ml + B 10 μM	1.27 ± 0.29
E 10 ng/ml + D 10 μM	0.93 ± 0.35

[1518] 结论：

[1519] ASO Seq.ID No.218c在TGF-β1预孵育随后ASO无转染试剂转移后有效抑制TGF-β信号传导。这通过检测下游pSmad2蛋白水平显示。

[1520] 总之，本发明的ASO特别地能够通过有效地下调TGF-R_{II} mRNA，在病理学的高TGF-β1水平的存在下介导TGF-β信号传导的功能性抑制。因此，本发明的ASO将有益于涉及升高的TGF-β水平的医学适应症，例如神经系统疾病，纤维化，肿瘤进展等。

[1521] 实施例7：反义寡核苷酸对mRNA水平(TGF-β1后处理)的预防活性的测定

[1522] 为了分析来自皮质脑区域的人类神经元祖细胞(ReNcell CX®)中反义寡核苷酸(ASO)的预防活性，通过转化生长因子-β1(TGF-β1)处理后的无转染试剂摄取将ASO转移至细胞。

[1523] 方法说明：

[1524] 如上所述培养A549和ReNcell CX®细胞。对于预防性治疗研究，将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(50,000个细胞/孔)中，并在37℃和5％CO_2下孵育过夜。之后，将Ref.1(打乱对照，10μM)或具有Seq.ID No.218b的ASO(10μM)加入培养基中72小时(A549)或96小时(ReNcell CX®)。在无转染试剂转移后的孵育时间后，将TGF-β1(10ng/ml，Promocell#C-63499)加入到细胞中进行另外48小时。对于收获，细胞用PBS洗涤两次，随后在通过实时RT-PCR进行mRNA分析后用于RNA分离(24孔培养皿)。使用用于实时RT-PCR的即用型和标准化引物对，并根据制造商的说明书(BioRad Prime PCR Quick Guide)与相应的即用型Mastermix溶液(SsoAdvanced™ Universial SYBR®Green Supermix(BioRad#172-5271)混合。如上所述进行方法。

[1525] 7.1Seq.ID No.218b的结果

[1526] A549和ReNcell CX®细胞中ASO Seq.ID No.218b对TGF-R_{II} mRNA下调的功效不受TGF-β1孵育后的影响(表32)。在用ASO Seq.ID No.218b进行单次处理(0.33*0.11)后显示ReNcell CX®细胞中靶mRNA的显著减少。ASO无转染试剂转移与TGF-β1处理后强烈减少了靶TGF-R_{II} mRNA。在A549细胞中,Seq.ID No.218b在单次(0.25±0.07)或与TGF-β1(0.24±0.06)孵育后的组合处理中显示出相似的抑制TGF-R_{II} mRNA的效力。

[1527] 表32:A549和ReNcell CX®细胞中在TGF-β1处理后本发明ASO的无转染试剂转移后的TGF-R_{II} mRNA的下调。使用实时RT-PCR定量相对于管家基因GNB2L1的mRNA表达水平,并针对未处理对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,E=TGF-β1。±=SEM,参考A*p<0.05,**p<0.01;参考E+B^{++}p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"事后比较来计算统计数据。

[1528]

靶 时间点	TGF-R_{II} 72 h / 96 h ASO -> 48 h TGF-β1

[1529]

细胞系	A549 n= 3	ReNcell CX n= 3
A	1.00 ± 0.44	1.00 ± 0.19
B 10 µM	0.95 ± 0.22	1.42 ± 0.14
C 10 µM	0.25 ± 0.07	0.33* ± 0.11
E 10 ng/ml	1.96 ± 0.16	1.42 ± 0.08
E 10 ng/ml + B 10 µM	1.14 ± 0.39	1.25 ± 0.14
E 10 ng/ml + C 10 µM	0.24^{++} ± 0.06	0.56^{++} ± 0.10

[1530] 结论:

[1531] 无转染试剂转移ASOSeq.ID No.218b和随后的TGF-β1孵育后在靶TGF-R_{II} mRNA下调中有效,表明ASO Seq.ID No.218b可用于医疗适应症的预防性治疗。

[1532] 实施例8:测定TGF-β1处理后本发明的ASO对蛋白水平的抑制活性

[1533] 为了分析来自皮质脑区域的人神经元祖细胞(ReNcell CX®)中本发明ASO的预防活性,在TGF-β1处理后通过无转染试剂摄取将ASO转移到细胞中。

[1534] 方法说明:

[1535] 如前所述,在标准方案中培养细胞。将处理细胞接种在8孔细胞培养载玻片(Sarstedt#94.6140.802)(10,000个细胞/孔)中,并在37℃和5%CO_2下孵育过夜。然后将Ref.1(打乱对照,10μM)或ASO序列识别号218b(Seq.ID No.218b,10μM)加入到培养基中72小时(A549)或96小时(ReNcell CX®)。在无转染试剂转移后,将TGF-β1(10ng/ml,Promocell#C-63499)加入到细胞中进行另外48小时。对于收获,细胞用PBS洗涤两次,随后

用于免疫细胞化学分析。如前所述进行程序。用于各种方法的抗体和稀释液列于表13和14中。

[1536] 8.1在TGF-β1处理后使用Seq.ID No.218b进行无转染试剂转移后TGF-R_{II}蛋白减少的结果。

[1537] 针对A549和ReNcell CX®细胞的TGF-R_{II}的免疫细胞化学分析显示ASO Seq.ID No.218b在TGF-β1处理后产生有效的TGF-R_{II} mRNA靶下调(图17)。

[1538] 结论：

[1539] 在TGF-β1处理后ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移导致A549和ReNcell CX®细胞中靶mRNA下调，以及TGF-R_{II}蛋白水平的强烈减少。

[1540] 总之，ASO Seq.ID No.218b与TGF-β1的后处理组合介导下调TGF-R_{II}蛋白的功效，表明本发明的ASO对于预防性应用是有效的。

[1541] 实施例9：在TGF-β1处理后，ASO处理对TGF-RII的下游信号通路的作用。

[1542] 对人肺癌细胞(A549)和人类神经元前体细胞(ReNcell CX®)中TGF-β1处理随后无转染试剂转移，评估了本发明ASO介导TGF-β信号传导抑制作用的功效。因此，分析了TGF-β信号传导的下游分子，Smad3(mothers against decapentaphlegic homolog 3)和结缔组织生长因子(CTGF)。

[1543] 方法说明：

[1544] 如前所述，在标准方案中培养细胞。对于处理，将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(50,000个细胞/孔)和8孔细胞培养载玻片(Sarstedt#94.6140.802)(10,000个细胞/孔)中并孵育过夜在37℃和5％CO_2。之后，将Ref.1(打乱对照，10μM)或ASO Seq.ID No.218b(10μM)加入培养基中72小时(A549)或96小时(ReNcell CX®)。在无转染试剂转移后，加入TGF-β1(10ng/ml，Promocell#C-63499)而不进行培养基替换，进一步进行48小时。为了收获，将细胞用PBS洗涤两次，随后用于RNA分离(24孔培养皿)或细胞的免疫细胞化学检查(在8孔细胞培养载玻片中)。为了评估对CTGF mRNA水平的影响，如前所述进行实时RT-PCR。用于CTGF分析的引物对是即用和标准化的。为了确定pSmad3蛋白水平，如前所述使用免疫细胞化学。用于各种方法的抗体和稀释液列于表13和14中。

[1545] 9.1.Seq.ID No.218b的结果

[1546] 9.1.1对CTGF mRNA和pSmad3蛋白水平的影响

[1547] 用ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后A549(5天：0.67±0.02)和ReNcell CX(6天：0.70±0.02)细胞中CTGF mRNA减少。通过在72h或96h后分别添加TGF-β1，细胞与CTGF mRNA的增加反应，但与TGF-β1处理后打乱对照的无转染试剂转移相比，CTGF mRNA的诱导被强烈减少(表33)。为了验证CTGF mRNA下调是否是由ASO Seq.ID No.218b介导的TGF-β信号传导抑制的结果，同样在随后的TGF-β1处理后，检查pSmad3蛋白水平。图18表明，A549(图18A)和ReNcell CX细胞(图18B)中的TGF-β信号传导事实上被ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移阻断。TGF-β1处理后测试的ASO的无转染试剂转移后也出现这种作用。

[1548] 表33：A549和ReNcell CX®细胞中ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移随后TGF-β1处理后CTGF mRNA的下调。使用实时RT-PCR定量相对于管家基因GNB2L1的mRNA表达水平，并针对未处理对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b，E＝

TGF-β1。±＝SEM,*p<0.05,参考A**p<0.01,参考E+B^{++}p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”事后比较来计算统计数据。

[1549]

靶 时间点	CTGF 72 h /96 h ASO -> +/- 48 h TGF-β1	
细胞系	A549 n= 3	ReNcell CX n= 3
A	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.09
B 10 μM	0.80 ± 0.03	1.07 ± 0.07
C 10 μM	0.67 ± 0.02	0.70 ± 0.02
E 10 ng/ml	4.54** ± 0.68	1.56* ± 0.08
E 10 ng/ml + B 10 μM	4.07** ± 0.38	1.62* ± 0.09
E 10 ng/ml + C 10 μM	1.90^{+} ± 0.03	0.97^{++} ± 0.10

[1550]

[1551] 结论：

[1552] 独立于TGF-β1处理,ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移导致A549和ReNcell CX®细胞中的TGF-R_{II} mRNA和蛋白的下调,以及CTGF mRNA和pSmad3蛋白水平的减少。

[1553] 这表明ASO Seq.ID No.218b足以在预防条件下也能起作用以恢复或减少正在进行的TGF-β1介导的作用。

[1554] 实施例10:反义寡核苷酸的潜在促炎和毒理作用的分析

[1555] 10.1外周血单核细胞(PBMC)检测

[1556] 为了分析反义寡核苷酸(ASO)的免疫刺激性质,将外周血单核细胞(PBMC)与对照ASO和测试化合物一起孵育,随后进行用于IFNα和TGFα的ELISA。

[1557] 方法说明：

[1558] 从对应于500ml全血输血单位的血沉棕黄层中分离PBMC。每个单位是从健康志愿者获得的,并且使用葡萄糖-柠檬酸盐作为抗凝集剂。血沉棕黄色血液由Blood Bank Suhl of the Institutefor Transfusion Medicine,Germany制备和交付。监测每个献血的HIV抗体,HCV抗体,HBs抗原,TPHA,HIV RNA和SPGT(ALAT)。仅将就感染原检测为阴性并具有正常的SPGT值的血液样品用于通过低速离心分离白细胞和红细胞。通过使用Ficoll-Histopague® 1077(Heraeus™ Multifuge™ 3SR)的梯度离心,在献血后约40小时分离PBMC。对于IFNα测定,在100μl完全培养基+添加剂(RPMI1640,+L-Glu,+10％FCS,+PHA-P(5μg/ml),+IL-3(10μg/ml))中以100,000细胞/96孔接种PBMC,并且添加测试化合物(5μl)用于直接孵育(24小时,37℃,5％CO_2)。对于TNFα测定,将PBMC在100μl完全培养基w/o添加剂

(RPMI1640,+L-Glu,+10％FCS)中以100,000个细胞/96孔接种,并加入测试化合物(5μl)用于直接孵育(24小时,37℃,5％CO_2)。根据制造商的方案,对huIFNα(eBioscience,#BMS216INSTCE)进行ELISA(从合并的20μl上清液中重复测定)。根据制造商的方案,对huTNFα(eBioscience,#BMS223INSTCE)进行ELISA(从合并的20μl上清液中重复测定)。

[1559] 结果:

[1560] ASO处理对PBMC无免疫刺激作用,由在ASO孵育后无可检测的IFNα(表34)和TNFα(表35)分泌指示。通过免疫刺激性的胆固醇缀合的siRNA(XD-01024;IFNα)和聚肌苷酸:聚胞苷酸(poly I:C;TNFα;InvivoGen#tlrl-pic)(其是双链RNA的合成类似物,与TLR3结合并刺激免疫系统)的免疫刺激效应证实测定功能性。

[1561] 表34针对本发明的ASO暴露的IFNα应答:显示在ASO孵育时PBMC的IFNα应答。使用ELISA测定法测定针对阳性对照(ODN2216[A类CpG寡核苷酸;被TLR9识别并导致强免疫刺激作用;InvivoGen tlrl-2216],poly I:C,XD-01024)的表达水平的定量。

[1562]

测试候选物	重复的平均值[pg/ml]	
	捐献者 1	捐献者 2
模拟	- 0.084	0.720
Seq. ID No. 209y	- 0.061	- 0.039
Seq. ID No. 209t	- 0.308	- 0.520
Seq. ID No. 209v	- 0.191	- 1.252
Seq. ID No. 218b	- 0.001	- 0.093
Seq. ID No. 218m	- 0.140	- 0.163
Seq. ID No. 218q	- 0.755	0.005
Seq. ID No. 218c	- 0.852	- 0.805
Seq. ID No. 218t	- 0.469	0.450
ODN2216	0.300	1.311
poly I:C	- 1.378	2.053

[1563]

XD-01024	13.961	26.821
除阳性对照（XD-01024）以外的所有值低于定量限度		

[1564] 表35针对本发明的ASO暴露的TNFα应答:使用ELISA测定法针对对照候选物(ODN2216,poly I:C,XD-01024)的表达水平的定量。

[1565]

测试候选物	重复的平均值[pg/ml]	
	捐献者 1	捐献者 2
模拟	0.647	-0.137
Seq. ID No. 209y	2.397	-0.117
Seq. ID No. 209t	0.734	0.193
Seq. ID No. 209v	0.360	0.063
Seq. ID No. 218b	0.670	0.183
Seq. ID No. 218m	0.594	0.519
Seq. ID No. 218q	0.049	0.194
Seq. ID No. 218c	-0.212	0.029
Seq. ID No. 218t	0.593	0.758
ODN2216	0.085	0.894
poly I:C	115.026	102.042
XD-01024	1.188	1.418
除阳性对照（poly I:C）以外的所有值低于定量限度		

[1566] 10.2.本发明的反义寡核苷酸的体内毒理学

[1567] 为了分析反义寡核苷酸(ASO)的毒理学特性,C57/B16N小鼠接受三次静脉ASO注射,处死后,检查血清、肝脏和肾脏内的转氨酶水平。

[1568] 方法说明:

[1569] 用测试化合物(Seq.ID No.218b,Seq.ID No.218c)处理6周龄的雌性C57/BL6N小鼠7天。在治疗期的第一天,第二天和第三天静脉内注射ASO(200μl,15mg/kg/BW)。每隔一天监测体重发育(Seq.ID No.218c),第四天从腔静脉收集血清。在第八天,处死动物(CO_2)并收集来自腔静脉的血清、肝脏(～50mg的块)、肾脏和肺,用于mRNA和转氨酶定量。通过bDNA测定(**QuantiGene®**试剂盒,Panomics/Affimetrix)测定肝脏、肾脏和肺裂解液中的TGF-R_{II} mRNA水平。天冬氨酸转氨酶(ASP)和丙氨酸转氨酶(ALT)用Cobas **Integra®**400从1:10稀释的血清中测量。

[1570] 表36:在重复的ASO静脉内注射后C57/BL6N小鼠的丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶的血清表达水平。通过与盐水处理的动物的表达水平进行比较来实现表达水平的定量。±＝SEM。

[1571]

测试化合物	血清转氨酶[U/L]			
	注射后 3 天		注射后 7 天	
	ALT	AST	ALT	AST
Seq. ID No. 209ax	13.87 ± 1.44	47.33 ± 15.88	64.91 ± 21.01	108.99 ± 13.56
Seq. ID No. 143h	13.68 ± 3.33	53.50 ± 6.99	12.47 ± 1.64	33.35 ± 8.17
Seq. ID No. 152h	16.66 ± 6.29	67.23 ± 29.91	17.49 ± 2.81	45.75 ± 17.14
Seq. ID No. 209ay	18.29 ± 6.37	69.96 ± 35.44	287.29 ± 65.39	273.45 ± 101.33
Seq. ID No. 210q	11.70 ± 3.80	36.44 ± 5.36	11.11 ± 6.31	40.81 ± 13.32
Seq. ID No. 218b	19.60 ± 8.62	67.61 ± 42.75	18.38 ± 4.60	48.91 ± 17.86
Seq. ID No. 213k	13.59 ± 3.28	54.47 ± 36.15	96.00 ± 46.74	89.12 ± 21.82
盐水	9.52 ± 9.21	67.18 ± 28.60	9.99 ± 2.29	28.29 ± 2.23

[1572] 表37:在重复的ASO静脉内注射后C57/B16N小鼠肝脏、肾脏和肺组织中TGF-R_{II}的表达水平。通过与盐水处理的动物的表达水平进行比较来实现表达水平的定量。±＝SEM。

[1573]

测试化合物	TGF-RII mRNA/GAPDH mRNA 表达		
	肝	肾	肺
Seq. ID No. 209ax	0.64 ± 0.03	1.31 ± 0.11	13.25 ± 0.67
Seq. ID No. 143h	0.26 ± 0.02	0.65 ± 0.22	11.10 ± 0.11
Seq. ID No. 152h	0.58 ± 0.10	0.87 ± 0.17	13.42 ± 0.69
Seq. ID No. 209ay	0.62 ± 0.06	1.30 ± 0.10	13.93 ± 0.57
Seq. ID No.210q	0.39 ± 0.06	0.83 ± 0.15	13.53 ± 1.23
Seq. ID No. 218b	0.72 ± 0.08	0.97 ± 0.06	15.63 ± 1.45
Seq. ID No. 213k	0.42 ± 0.01	1.20 ± 0.04	14.44 ± 1.03
Saline	0.66 ± 0.04	1.10 ± 0.08	15.14 ± 0.65

[1574] 表38:在重复的ASO静脉内注射后C57/B16N小鼠的丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶的血清表达水平。通过与盐水处理的动物的表达水平进行比较来实现表达水平的定量。±＝SEM。

[1575]

测试化合物	血清转氨酶[U/L]			
	注射后 3 天		注射后 7 天	
	ALT	AST	ALT	AST
Seq. ID No. 218c	24.63 ± 2.10	51.87 ± 5.99	18.10 ± 4.01	39.99 ± 2.09
盐水	28.68 ± 3.23	79.95 ± 30.24	14.52 ± 4.89	36.08 ± 3.32

[1576] 表39:在重复的ASO静脉内注射后C57/BL6N小鼠肝和肾组织中TGF-R_{II}的表达水平。通过与盐水处理的动物的表达水平进行比较来实现表达水平的定量。±＝SEM。

[1577]

测试化合物	TGF-RII mRNA/GAPDH mRNA 表达	
	肝	肾
Seq. ID No. 218c	0.21 ± 0.03	0.16 ± 0.02
盐水	0.35 ± 0.05	0.24 ± 0.03

[1578] 表40:7天ASO治疗范例期间的体重发展。体重增加量相对于第0天的体重(其设定为100%)进行定量。

[1579]

测试化合物	体重发育[%]					
	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 7 天
Seq. ID No. 218c	100%	99%	99%	99%	102%	104%
盐水	100%	99%	100%	100%	101%	103%

[1580] 结论:相关的本发明的ASO对PBMC或C57/BL6N小鼠没有炎性或毒性作用。因此,靶向TGF-R_{II}的ASO治疗反映了治疗各种TGF-β相关疾病的安全方法。

[1581] 实施例11:测定本发明的ASO对TGF-β诱导的神经干细胞抑制和体内神经祖细胞增殖的脑室内输注

[1582] 本研究的目的是评估本发明ASO对TGF-R_{II}的潜力,i)预防和ii)治疗TGF-β1诱导的对神经干细胞和体内祖细胞增殖的影响。

[1583] 方法说明:

[1584] 11.1预防TGF-β1相关的神经发生的下调

[1585] 将两个月大的雌性Fischer-344大鼠(n=32)通过连接到不锈钢插管的渗透微型泵(型号2002,Alzet)接受脑室内输注。使用肌内注射在深度麻醉下进行微型泵的手术植入。用根据本发明的本发明的ASO(存在于泵中的1.64mM浓度)、打乱的ASO(存在于泵中的1.64mM浓度)或aCSF(人造脑脊髓液)输注动物7天。在第8天,更换泵,并用i)aCSF,ii)TGF-β1(存在于泵中的500ng/ml),iii)TGF-β1(存在于泵中的500ng/ml))加打乱的ASO(存在于泵中的1,64mM浓度),或iv)TGF-β1(存在于泵中的500ng/ml)加本发明的ASO(存在于泵中的1.64mM浓度)输注动物14天。在输液期结束时,所有动物用4%多聚甲醛经心脏灌注。对脑进行套管道定位分析,并从分析中排除具有不正确插管位置的动物。在泵期的最后24小时期间,动物接受腹膜内注射200mg/kg溴-脱氧尿苷(BrdU)。

[1586] 处理组织用于在40μm的弓形切片中的BrdU阳性细胞的显色免疫检测。BrdU阳性细胞在每个位于室下区的最低、中部和上部的切片的三个50μm×50μm的计数框内进行计数。不计算与计数框的最上面的焦平面(排除平面)或横向排除边界相交的正剖面。对于海马分析,确定海马体积,并计数边界内和邻近边界的所有阳性细胞。将阳性曲线的总计数乘以参

考体积与采样体积的比率，以获得每个结构的BrdU阳性细胞的估计数量。所有外推均针对一个脑半球计算，并且应加倍以代表总的脑数值。数据以平均值±标准偏差(SD)表示。使用TGF-β1处理组和对照组之间的不成对的双侧t检验比较-学生氏t检验进行统计学分析(GraphPad Prism 4软件，USA)。假设显著性水平为$p<0.05$。

[1587] 11.2 TGF-β1相关的神经发生下调的治疗

[1588] 动物接受aCSF或重组人TGF-β1(泵中存在的500ng/ml)，流速为0.5μl/小时，持续14天。14天后，更换泵，并将动物输注i)aCSF，ii)重组人TGF-β1(泵中存在的500ng/ml)或共输注iii)本发明的ASO(存在于泵中的1.64mM浓度)加重组人TGF-β1(泵中存在的500ng/ml)或iv)打乱的ASO(存在于泵中的1.64mM浓度)加重组人TGF-β1(泵中存在的500ng/ml)。在输液期结束时，所有动物用4％多聚甲醛经心脏灌注。对脑进行套管道定位分析，并从分析中排除具有不正确插管位置的动物。在泵期的最后24小时期间，动物接受腹膜内注射200mg/kg溴-脱氧尿苷(BrdU)。

[1589] 组织学分析如上所述进行(11.1)。

[1590] 结果：

[1591] 用Seq.ID No.143aj，Seq.ID No.143h和Seq.ID No.210q的ASO的处理特异性地和部分地减少了TGF-β1对海马区和心室壁中的细胞增殖的影响。用本发明的ASO进行的处理特异性地和部分地拯救TGF-β1对神经发生的抑制作用。

[1592] 结论：在该体内实验中，显示与啮齿动物的交叉反应性的本发明的ASO诱导神经发生。本发明的不显示交叉反应性的ASO在体外实验中发挥更多的潜在作用。因此，假设这些本发明的ASO在非人类灵长类和人类的体内环境中也更加有效，因此用作预防或治疗TGF-β1诱导的神经干细胞和祖细胞增殖抑制的高效药物。

[1593] 实施例12：分析本发明的反义寡核苷酸对人神经祖细胞的增殖和特异性标志物的作用

[1594] 肌萎缩性侧索硬化(ALS)是迄今为止没有有效治疗的神经变性致死性疾病。目前的分子遗传运动越来越多地阐明了这种致命疾病的分子发病机制，从以前的研究中已知TGF-β在ALS患者的脑脊髓液(CSF)中以高浓度存在。已知这些高水平的循环TGF-β促进干细胞静默，因此引起脑室下区(SVZ)内成体神经发生的抑制。因此，退化神经元的再生似乎被增强的TGF-β信号传导阻止。

[1595] 为了确定本发明的反义寡核苷酸介导的TGF-β信号的选择性抑制是否可能允许成体神经发生的再活化，必须证明TGF-β介导的细胞周期停滞的证据。

[1596] 方法说明：

[1597] 细胞周期停滞研究：如前所述，在标准方案中培养细胞。对于实验，将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(30,000个细胞/孔)中，并在37℃和5％CO_2下孵育过夜。为了测定在增殖(+EGF/FGF)(Millipore:EGF#GF144，bFGF#GF003)或分化(-EGF/FGF)条件下TGF-β1介导的对细胞周期的影响，将细胞用TGF-β1(PromoCell#C-63499，10或50ng/ml)处理4天，取出和更换各自的培养基。在第4天，将培养基更新，并重复TGF-β1处理直到第7天。在第7天，通过用PBS洗涤两次收获细胞，随后如上所述用于分离RNA(24孔培养Ⅲ)。为了通过实时RT-PCR评估TGF-β1介导的对细胞周期的影响，分析了增殖标志物Ki67，肿瘤抑制基因p53，细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1(p21)和神经发生标志物双皮质素(DCX)的

mRNA。各自的引物对列于表11。

[1598] mRNA分析用于ASO Seq.ID No.218b对人神经祖细胞的影响:如前所述在标准方案中培养细胞。对于实验,将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(30,000个细胞/孔)中,并在37℃和5%CO_2下孵育过夜。对于本实验,改变细胞培养基,并将Ref.1(打乱对照,2.5和10μM)、具有Seq.ID No.218b的ASO(2.5和10μM)或TGF-β1(10ng/ml,Promocell#C-63499)加入细胞96小时。孵育后,再次改变培养基,进一步处理96小时。处理8天后,收获细胞。细胞用PBS洗涤两次,随后用于分离RNA(24孔培养皿)。为了评估对祖细胞的影响,如前所述,通过实时RT-PCR测定巢蛋白(早期神经元标记),Sox2(早期神经元标记),DCX(神经发生指标)和Ki67(增殖标志物)的mRNA水平。各自的引物对列于表11。

[1599] $TGFR_{II}$特异性ASO通过无转染试剂转移对ReNcell CX®细胞的增殖和分化作用:下一个目的是研究TGF-R_{II}特异性ASO是否影响ReNcell CX®细胞的增殖。因此,如前所述培养细胞并接种于24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(30,000细胞/孔)或8孔细胞培养载玻片(Sarstedt#94.6140.802)中(10,000个细胞/孔)并在37℃和5%CO_2下孵育过夜。为了获得增殖曲线,在培养基改变后用Ref.1(打乱对照,2.5和10μM)和ASO Seq.ID No.218b(2.5和10μM)处理细胞72小时。在孵育时间后,将培养基改变和处理重复2次。收集上清液后,从24孔培养皿中收集剩余的细胞以测定细胞数。为此,将剩余的细胞用PBS(2x)洗涤,用反应液(500μl/孔)处理,并在37℃下孵育5分钟。然后加入500μl培养基,根据制造商的说明书使用Luna FL™自动细胞计数荧光和明视野(Biozym,#872040)测定细胞数。简言之,将18μl细胞悬浮液加入到2μl吖啶橙/碘化丙啶测定活力试剂盒(Biozym#872045)中。沉降1分钟后,将10μl加入到细胞计数载玻片(Biozym#872011)中,对细胞进行计数,以总细胞/ml和活细胞百分比与死细胞相比的百分比对细胞进行计数和计算。在Ref.1(10μM)和Seq.ID No.218b(10μM)和相应的TGF-β1(10ng/ml)无转染试剂转移8天后,固定8孔细胞培养载玻片的细胞,用针对Ki67的抗体染色。为了研究无转染试剂转移后ReNcell CX®细胞的分化能力,将其它8孔细胞培养载玻片在增殖条件(+EGF/FGF)下用Ref.1(10μM)、Seq.ID No.218b(10μM)和相应的TGF-β1(10ng/ml)处理96小时。然后,一部分细胞在增殖条件下再处理96小时,而细胞的另一部分在分化条件(-EGF/FGF)下处理并保持。细胞染色后,通过荧光显微镜测定神经丝N(NeuN)和βIII-微管蛋白的表达水平。上文描述了收获、固定和染色细胞的方案,并且各自的抗体稀释度列于表14中。

[1600] 在TGF-β1预孵育后的无转染试剂转移后增殖和神经发生的标志物的mRNA分析:如前所述在标准方案中培养细胞。对于实验,将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(30,000个细胞/孔)中,并在37℃和5%CO_2下孵育过夜。为了诱导细胞周期停滞,用TGF-β1处理ReNcell CX®细胞4天。然后改变培养基,新鲜加入TGF-β1(10ng/ml)。多次更换一天8次培养基,通过加入Ref.1(10μM)、Seq.ID No.218b(10μM)与TGF-β1(10ng/ml)组合进行无转染试剂转移96小时。孵育后通过用PBS洗涤两次收获细胞。通过实时RT-PCR如所述地进行随后的RNA分离和mRNA分析。

[1601] 12.1.1人神经祖细胞中TGF-β1的细胞周期阻滞调节

[1602] 干细胞静息标志物的检测显示TGF-β1介导细胞暴露7天后的细胞周期停滞。增殖标志物Ki67mRNA表达呈剂量依赖性减少。肿瘤抑制基因p53的mRNA表达下调与TGF-β1浓度

相关。相比之下，细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1(p21)被TGF-β1显著上调。总之，这些结果表明TGF-β1诱导的干细胞静息。有趣的是，DCX(一种神经发生的标志物)被TGF-β1强烈减少(表41)。

[1603] 表41:ReNcell CX®细胞中TGF-β1处理后7天Ki67、p27、p21和DCX的mRNA表达。使用定量实时RT-PCR，相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平，然后针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，E＝TGF-β1。±＝SEM，参考A*p<0.05。统计学是使用普通单向方差ANOVA分析，然后是“Tukey's”多重事后比较。

[1604]

细胞系	ReNcell CX TGF-β1 暴露后 7 天的 mRNA 水平			
靶	Ki67 n = 3	p53 n = 3	p21 n = 3	DCX n = 3
A + EGF/FGF	1.00 ± 0.38	1.00 ± 0.38	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.49
E 10 ng/ml + EGF/FGF	0.67 ± 0.20	0.66 ± 0.18	1.90* ± 0.22	0.37 ± 0.06
E 50 ng/ml + EGF/FGF	0.43 ± 0.09	0.42 ± 0.06	1.45 ± 0.16	0.16 ± 0.01
A - EGF/FGF	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.31
E 10 ng/ml - EGF/FGF	0.87 ± 0.08	0.97 ± 0.10	1.00 ± 0.04	0.72 ± 0.14
E 50 ng/ml - EGF/FGF	0.93 ± 0.11	0.93 ± 0.09	0.90 ± 0.09	0.71 ± 0.24

[1605] 结论

[1606] ReNcell CX®细胞的增殖被TGF-β1阻断。

[1607] 12.1.2反义寡核苷酸对人类神经元干细胞标志物的影响

[1608] 为了了解ASO Seq.ID No.218b对干细胞标志物的影响，在ReNcell CX®细胞中重复无转染试剂转移(2×96h)后8天，测试了早期神经祖细胞的不同标志物(表42)。Nestin和Sox2的基因表达水平不受ASO Seq.ID No.218b的影响。用10μM ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后，GFAP mRNA略有上调。相比之下，体外摄入ASO Seq.ID No.218b后，DCX明显诱导。TGF-β1处理(8d)后，所有测试标记物的表达均显著减少(表42，图19)。

[1609] 表42:Seq.ID No.218b的无转染试剂转移后8天ReNcell CX®细胞中Nestin，Sox2，GFAP和DCX的mRNA表达。使用定量实时RT-PCR，相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平，然后对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b，E

＝TGF-β1，±＝SEM，参考C 2.5μM，+p<0.05，参考C10μM，#p<0.05。统计学是使用普通单向方差ANOVA分析，然后是“Tukey's”多重事后比较。

[1610]

细胞系	ReNcell CX 无转染试剂转移或 TGF-β1 暴露后 8 天的 mRNA 水平			
靶	Nestin n = 4	Sox2 n = 4	GFAP n = 4	DCX n = 4
A	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.32
B 2.5 μM	0.97 ± 0.32	0.88 ± 0.33	0.78 ± 0.13	1.31 ± 0.42
B 10 μM	0.89 ± 0.16	0.79 ± 0.13	1.02 ± 0.20	1.44 ± 0.48
C 2.5 μM	1.09 ± 0.21	0.93 ± 0.09	0.99 ± 0.14	1.67 ± 0.46
C 10 μM	0.90 ± 0.09	0.89 ± 0.11	1.21 ± 0.11	1.95 ± 0.37
E 10 ng/ml	0.48 ± 0.12	0.32 ± 0.06	0.41# ± 0.13	0.05+# ± 0.01

[1611] 结论：

[1612] mRNA分析结果表明，ASO Seq.ID No.218b将ReNcell CX®细胞引导到更加干细胞样状态(GFAP上调)的方向。此外，DCX的诱导表示升高的神经发生。TGF-β1治疗导致相反的方向。

[1613] 12.1.3反义寡核苷酸对人神经元干细胞增殖的影响

[1614] 通过在重复的无转染试剂转移(3×72小时)后9天后计数细胞并且在无转染试剂摄取(2×96小时)后8天测定Ki67蛋白水平，来进一步分析了ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移是否对增殖率具有真正的影响。

[1615] 结果

[1616] 无转染试剂摄取ASO Seq.ID No.218b后细胞数量增加，根据在细胞的免疫化学染色中观察到的增殖标志物Ki67的蛋白表达增加(表43，图20)。免疫细胞化学染色的荧光分析也显示由TGF-β1介导的增殖停止。

[1617] 表43:ReNcell CX®细胞的重复无转染试剂转移(3x 72h)后9天增加的细胞数。根据制造商的说明书，使用LunaFL™自动细胞计数荧光和明视野(Biozym，#872040)测定细

胞数。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b,±＝SEM。

[1618]

细胞系	ReNcell CX	
细胞编号	活细胞 x 10^5, n = 2	死细胞 x 10^5, n = 2
A	3.34 ± 0.09	0.51 ± 0.05
B 2.5 μM	4.34 ± 0.56	0.60 ± 0.09
B 10 μM	4.36 ± 0.96	0.58 ± 0.09
C 2.5 μM	4.63 ± 1.28	0.47 ± 0.02
C 10 μM	5.24 ± 0.42	0.37 ± 0.02

[1619] 结论

[1620] ReNcell**CX**®细胞中ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移的导致增加的细胞数,与增强的Ki67蛋白表达平行,一起指示增加的神经元前体增殖。

[1621] 12.1.3反义寡核苷酸对人类神经元干细胞分化能力的影响

[1622] 为了排除ASO Seq.ID No.218b对细胞分化能力的影响,通过在增殖条件(+EGF/FGF)下的无转染试剂摄取96小时将ASO Seq.ID No.218b转移至细胞。在孵育时间后,改变培养基,向一部分细胞加入增殖培养基,而向另一部分细胞添加分化培养基(-EGF/FGF)。之后,再进行96小时的无转染试剂转移。通过神经元标志物神经丝N(NeuN)和βIII-微管蛋白的表达水平分析细胞。

[1623] 结果

[1624] 针对NeuN(图23A)和βIII-微管蛋白(图23B)的免疫化学染色显示,在增殖条件下的无转染试剂ASO转移随后分化条件下的无转染试剂转移后,分化能力不受影响。βIII微管蛋白(人类神经元特异性蛋白)的信号不受增殖条件下ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂的影响,并且与未处理对照相当。在分化条件下,无转染试剂转移后,NeuN表达也不受影响。因此,细胞仍然能够分化成神经细胞。令人瞩目的是,在增殖条件下无转染试剂转移ASO(2x96h)两个时期之后,ReNcell**CX**®细胞表达神经元标志物NeuN和βIII-微管蛋白,表明ASO的无转染试剂转移可以促进特定的转移到神经元的分化,甚至在增殖条件下也如此。此外,观察到神经前体细胞的增殖率升高(表43,图20)。此外,针对NeuN的染色显示用ASO Seq.ID No.218b处理的细胞看起来与所有其它治疗相比更具活力(图21A)。显然,用TGF-β1处理的细胞的增殖显著减少。

[1625] 结论

[1626] 分化能力不受本发明的ASO Seq.ID No.218b的影响。有趣的是,ReNcell**CX**®细胞在增殖和分化条件下的无转染试剂转移后显示出分化为神经元。这表明在增加增殖率的观察中,本发明的ASO Seq.ID No.218b促进具有升高的神经元分化趋势的神经发生。

[1627] 12.1.4本发明的反义寡核苷酸对TGF-β1预孵育后人神经元干细胞增殖的结果

[1628] 为了分析是否ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移在逆转TGF-β1介导的对ReNcell**CX**®细胞的作用方面是有效的,进一步的研究是用TGF-β1预孵育7天,然后进行

无转染试剂转移8天(2×96小时)。

[1629] 结果

[1630] 作为早期神经元标志物的GFAP(表44,图22A)、作为增殖标志物的Ki67(表44,图22B)和作为神经发生标志物的DCX(表44,图22C)的基因表达在单次ASO处理后升高,而TGF-β1导致相反的结果。此外,TGF-β1预孵育后7天,本发明的ASO治疗逆转了TGF-β1诱导的作用。因此分析表明ASO Seq.ID No.218b对于恢复TGF-β1介导的对干细胞和增殖标记的作用是有效的

[1631] 表44:ReNcell**CX®**细胞中TGF-β1预孵育7天,随后2×96h的Seq.ID No.218b的无转染试剂转移后的GFAP,Ki67和DCX的mRNA表达。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,E=TGF-β1,±=SEM,统计学是使用普通单向方差ANOVA分析,然后是"Tukey's"多重事后比较。

[1632]

细胞系	ReNcell CX TGF-β1 预孵育 7 天随后 2×96 小时的无转染试剂转移之后的 mRNA 水平		
靶	GFAP n = 2	Ki67 n = 1	DCX n = 2
A	1.00 ± 0.20	1.00	1.00 ± 0.16
B 10 μM	1.62 ± 0.15	0.91	1.52 ± 0.24
C 10 μM	2.23 ± 0.52	1.52	4.82 ± 1.15
E 10 ng/ml	0.76 ± 0.01	0.48	0.68 ± 0.03
E 10 ng/ml + B 10 μM	0.58 ± 0.07	0.61	0.83 ± 0.10
E 10 ng/ml + C 10 μM	2.04 ± 1.04	7.40	1.55 ± 0.24

[1633] 结论

[1634] 结果表明,成体神经发生可以通过本发明的TGF-R_{II}特异性ASO介导的TGF-β信号传导阻断来再活化。

[1635] 总之,TGF-R_{II}特异性ASO Seq.ID No.218b从TGF-β介导的干细胞静息中拯救细胞并促进成体神经发生而不影响分化。这使它成为脑修复的理想治疗药物。

[1636] 实施例13:测定SOD1小鼠中ALS的本发明的反义寡核苷酸疾病进展的治疗活性

[1637] 为了分析ASO作为用于肌萎缩性侧索硬化(ALS)的药物的治疗潜力,经由渗透性**ALZET®**微型泵将不同剂量的本发明的ASO通过icv施用到侧脑室中来治疗雄性和雌性转基因SOD1G93A小鼠。此外,使用利鲁唑作为参考。利鲁唑是用于治疗肌萎缩性侧索硬化的

药物，由赛诺菲制药公司销售。它延迟选择的患者的呼吸机依赖或气管造口术的发生，并可能将生存期提高约两三个月

[1638] 方法说明：

[1639] 对于持久的中枢输注，在异氟醚麻醉(Baxter,GmbH,Germany)和半无菌条件下立体定位地植入连接到**Alzet®**渗透微型泵(输注速率:0.25μl/h，**Alzet®**,Model 2004，Cupertino,USA)的icv插管。每个渗透性微型泵通过1cm长的皮肤切口在小鼠颈部皮下植入腹部，并与icv插管通过硅胶套管连接。将动物置于立体定位框架中，并将icv插管(23G,3mm长度)下降到右侧脑室(后0.3mm，侧向1mm，相对于前囟的深度3mm)。使用牙科水泥(Kallocryl，**Speiko®** Dr.Speier GmbH,Münster,Germany)用两个不锈钢螺丝固定插管。颈部的皮肤用缝合线封闭。在手术过程中，体温通过加热垫保持。为了避免手术后感染，用**betaisodona®** (Mundipharma GmbH,Limburg,Germany)局部处理小鼠，并接受0.1ml抗生素(sc，**Baytril®**2.5%Bayer Vital GmbH,Leverkusen,Germany)。套管用相应的溶液填充。为了确定ASO对ALS发展和进展的影响，将症状发作、麻痹和生存用作体内终点。在9周龄时，处死小鼠，取出脑部用于神经病理学分析。在40μm冠状、甲酚紫染色的脑切片处进行icv植入部位的组织学验证。

[1640] 本发明的ASO在体外实验中发挥潜在的作用。相当一致地，啮齿动物交叉反应性的本发明的具有Seq.ID No.143aj,Seq.ID No.143h和Seq.ID No.210q的ASO在上述证明了对ALS模型动物的治疗效果的实验中也有效。证明不具有交叉反应性的本发明的ASO在体外实验中发挥更多的潜在作用。因此，假设这些本发明的ASO在非人类灵长类和人类的体内环境中也更有效，因此用作预防或治疗TGF-β1诱导的神经干细胞和祖细胞增殖抑制的高效药物，从而治疗ALS等神经变性疾病。

[1641] 实施例14:针对TGF-R_{II}的本发明的反义ASO在R6/2小鼠的亨廷顿氏病的疾病发展和进展中的治疗活性的测定

[1642] 为了分析作为亨廷顿氏病(HD)药物的ASO的治疗潜力，经由渗透性微型泵将不同剂量的本发明的TGF-R_{II}特异性ASO通过icv施用到侧脑室中来治疗雄性和雌性转基因R6/2小鼠。

[1643] 方法说明:对于慢性中枢输注，小鼠在5周龄时接受用于连接于**Alzet®**渗透微量泵(输注速率:0.25μl/h，**Alzet®**,Model 2004,Cupertino,USA)的icv插管的手术。在氯胺酮/木脂素麻醉(Baxter,GmbH,Germany)和半无菌条件下立体定位植入插管和泵。每个渗透性微型泵通过在小鼠颈部的1cm长的皮肤切口皮下植入腹部，并与icv插管通过硅胶套管连接。将动物置于立体定位框架中，并将icv插管(23G,3mm长度)下降到右侧脑室(后0.3mm，侧向1mm，相对于前囟的深度3mm)。使用牙科水泥(Kallocryl，**Speiko®**-Dr.Speier GmbH,Münster,Germany)用两个不锈钢螺钉固定插管。颈部的皮肤用缝合线封闭。在手术过程中，体温通过加热垫保持。为了避免手术后感染，用**betaisodona®** (Mundipharma GmbH,Limburg,Germany)局部治疗小鼠，并接受0.1ml抗生素(sc，**Baytril®**2.5%Bayer Vital GmbH,Leverkusen,Germany)。套管用相应的溶液填充。为了确定ASO对HD的发展和进展的影响，使用症状发作、握力、一般运动和生存作为体内终点。在9周龄时，处死小鼠，取出脑进行

组织学分析。在40μm冠状、甲酚紫染色的脑切片处进行icv植入部位的组织学验证。

[1644] 本发明的ASO在体外实验中发挥潜在的作用。相当一致地，啮齿动物交叉反应性的本发明的具有Seq.ID No.143aj，Seq.ID No.143h和Seq.ID No.210q的ASO在上述证明了对亨廷顿模型动物的治疗效果的实验中也有效。证明不具有交叉反应性的本发明的ASO在体外实验中发挥更多的潜在作用。因此，假设这些本发明的ASO在非人类灵长类和人类的体内环境中也更有效，因此用作预防或治疗TGF-β1诱导的神经干细胞和祖细胞增殖抑制的高效药物，从而治疗HD等神经变性疾病。

[1645] 实施例15：确定本发明的ASO对Fischer-344大鼠中TGFβ诱导的脑积水和相关认知缺陷的疾病进展的治疗活性

[1646] 本研究的目的是通过以剂量依赖性方式脑室内输注本发明的ASO治疗患有TGFβ诱导的对i)神经干细胞增殖和神经发生，ii)脑积水的形成，以及iii)空间学习缺陷的效应的动物。

[1647] 方法说明：将用于脑室内输注的渗透性微型泵植入体重180至200g的雌性Fischer-344大鼠(n总数＝70，n小组＝10)。注入a)人造脑脊液(aCSF:148.0mM NaCl,3.0mM KCl,1.4mM $CaCl_2$,0.8mM $MgCl_2$,1.5mM Na_2HPO_4,0.2mM NaH_2PO_4,100μg/ml大鼠血清白蛋白，50μg/ml庆大霉素，pH 7.4)作为对照，或b)aCSF中TGF-β11μg/mL，使用**Alzet®**渗透泵2004，流速为0.25μl/h，持续14天。14天后，更换泵，并使用**Alzet®**渗透泵2004(流速0.25μl/h)进行以下输注：输注aCSF或TGF-β1(1μg/ml)与不同浓度的TGF-R_{II} ASO(1.1mmol/L，3.28mmol/l,9.84mmol/l)或打乱的ASO(3.28mmol/l)的组合(2×4周)。在输液期的最后四天，动物每天腹膜内注射BrdU(50mg/kg体重)来标记增殖细胞。移除泵，两周后，动物在空间学习测试(Morris-Water-Maze)中功能性分析14天。一天后，用0.9％的NaCl灌注动物，除去脑，将同侧半球后置于4％多聚甲醛中，用于PCNA，BrdU，DCX，BrdU/NeuN和BrdU/GFAP的定量组织学分析，和用于立体分析侧脑室的体积作为脑积水的量度。进一步解剖对侧半球，处理不同区域(脑室壁，海马，皮质)进行定量RT-PCR以分析TGF-R_{II}表达水平。在泵植入前4天，在第一次泵变化的那一天，然后从每2周直到输液期结束，获得第1组、第3组和第6组的的4只动物的MR图像。在40μm冠状、甲酚紫染色的脑切片处进行icv植入部位的组织学验证。

[1648] 表46：脑积水实验的处理方案和组分类。

[1649]

组	1. aCSF	2. aCSF + ASO	3. TGF-β1	4. TGF-β1 + 混杂-ASO	5.-7. TGF-β1 + ASO
治疗	aCSF-输注	aCSF 加 ASO 输注	TGF-β1-输注	TGF-β1 加 ASO 输注	TGF-β1 加 ASO 输注
治疗方案	第 1 周至第 10 周	第 1 周和第 2 周: aCSF 第 3 周至第 10 周: ASO: 3.28 mmol/l	第 1 周和第 2 周: 1 μg/ml 第 3 周至第 10 周: 1 μg/ml	第 1 周和第 2 周: TGF-β1: 1 μg/ml 第 3 周至第 10 周: TGF-β1: 1 μg/ml 打乱 -ASO: 3.28 mmol/l	第 1 周和第 2 周: TGF-β1: 1 μg/ml 第 3 周至第 10 周: TGF-β1: 1 μg/ml ASO: 1.1 mmol/l 3.28 mmol/l 9.84 mmol/l
n	10	10	10	10	10/剂量
n-总计	10	10	10	10	30

[1650] 本发明的ASO在体外实验中发挥潜在的作用。相当一致地,啮齿动物交叉反应性的本发明的具有Seq.ID No.143aj,Seq.ID No.143h和Seq.ID No.210q的ASO在上述证明了对脑积水模型动物的治疗效果的实验中也有效。证明不具有交叉反应性的本发明的ASO在体外实验中发挥更多的潜在作用。因此,假设这些本发明的ASO在非人类灵长类和人类的体内环境中也更有效,因此用作预防或治疗TGF-β1诱导的神经干细胞和祖细胞增殖抑制的高效药物,从而治疗脑积水和其它神经变性疾病。

[1651] 实施例16:针对TGF-R_{II}的反义寡核苷酸对Fischer 344大鼠脊髓损伤康复的治疗活性的测定

[1652] 为了分析ASO作为脊髓损伤(SCI)药物的治疗潜力,经由渗透性微型泵将不同剂量的本发明的ASO通过icv施用到侧脑室中来治疗雄性和雌性Fischer-344大鼠。

[1653] 方法说明:以C3水平通过宫颈钨丝刀背侧柱横切模拟SCI。在下一步中,对于慢性中枢输注,大鼠(180-200g体重)接受用于连接于**Alzet®**渗透微量泵(输注速率:0.25μl/h,**Alzet®**,Model 2004,Cupertino,USA)的icv插管的手术。在氯胺酮/木脂素麻醉(Baxter,GmbH,德国)和半无菌条件下立体定位植入插管和泵。将每个渗透性微型泵通过大鼠颈部的1cm长的皮肤切口皮下植入腹部,并通过硅胶管与icv插管连接。将动物置于立体

定位框架中，并将icv插管(23G，3mm长度)下降到右侧脑室(后1.0mm，外侧1.0mm，相对于前囟的深度1.8mm)。使用牙科水泥(Kallocryl，**Speiko®**-Dr.Speier GmbH，Münster，Germany)用两个不锈钢螺钉固定插管。颈部的皮肤用缝合线封闭。在手术过程中，体温通过加热垫保持。为了避免手术后感染，用**betaisodona®** (Mundipharma GmbH，Limburg，Germany)局部治疗小鼠，并接受0.5ml抗生素(sc，**Baytril®**2.5％Bayer Vital GmbH，Leverkusen，Germany)。套管用相应的溶液填充。为了确定ASO对SCI后康复过程的影响，手术后4周进行体内MRI结构分析(3T MRI，Allegra Siemens，相控阵-小动物线圈)。手术后6周，处死动物，取出脊髓进行组织学和免疫组织化学分析。在40μm冠状、甲酚紫染色的脑切片处进行icv植入部位的组织学验证。

[1654] 本发明的ASO在体外实验中发挥潜在的作用。相当一致地，啮齿动物交叉反应性的本发明的具有Seq.ID No.143aj，Seq.ID No.143h和Seq.ID No.210q的ASO在上述证明了对Fischer-344-大鼠脊髓截瘫模型的治疗效果的实验中也有效。在MRI图像和神经病理学分析中，本发明的ASO显示出高的治疗效果。证明不具有交叉反应性的本发明的ASO在体外实验中发挥更多的潜在作用。因此，假设这些本发明的ASO在非人类灵长类和人类的体内环境中也更有效，因此作为预防或治疗TGF-β1诱导的神经干细胞和祖细胞增殖抑制的高效药物，从而治疗脊髓损伤和其它神经变性疾病。

[1655] 实施例17:ASO介导的对人肺癌细胞系A549增殖的作用。

[1656] 将Ki67，p53，Caspase 8(Casp8)和DNA结合蛋白抑制剂2(ID2)的mRNA分析为几种肿瘤细胞增殖的代表性标志物。从以前的研究中已知，肿瘤组织中肿瘤抑制基因p53和ID2的表达通常显著升高。Ki67是增殖标志物，Casp8是细胞凋亡的指标。此外，无转染试剂转移后测定细胞数。

[1657] 方法说明：

[1658] 如上所述培养A549。为了处理细胞，移除并替换24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(30,000细胞/孔)，6孔培养皿(Sarstedt#83.3920.300)(50,000细胞/孔)中的新鲜全培养基)或8-x孔细胞培养载玻片(Sarstedt#94.6140.802)(20,000细胞/孔)中的培养基(用于24孔和8孔细胞培养载玻片为0.5ml，6孔培养皿为1ml)，并分别在37℃和5％CO_2下孵育过夜。为了分析mRNA表达和对增殖的影响，用Ref.1(打乱对照)和ASO Seq.ID No.218b(浓度为2.5μM和10μM)处理细胞，并在37℃和5％CO_2下孵育72小时。每72小时重复处理包括替换培养基3次，共12天。对于增殖的免疫细胞化学分析(Ki67)，ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移限于72小时。然后用PBS洗涤细胞两次，随后用于蛋白分离(6孔培养皿)，免疫细胞化学(8孔细胞培养载玻片)，增殖曲线和RNA分离(24孔培养皿)。如上所述进行RNA，蛋白和免疫细胞化学方案。对于增殖曲线，从24孔培养皿中收集剩余的细胞以确定细胞数量。为此，用PBS(2x)洗涤剩余的细胞，用细胞消化液(500μl/孔)处理，并在37℃下孵育7分钟。然后加入500μl培养基，根据制造商的说明书，使用LunaFL™自动细胞计数荧光和明视野(Biozym，#872040)测定细胞数。简言之，将18μl细胞悬浮液加入到2μl吖啶橙/碘化丙啶测定活力试剂盒(Biozym#872045)中。沉降1分钟后，将10μl加入细胞计数载玻片(Biozym#872011)。对活细胞和死细胞进行细胞计数和计算。

[1659] 17.1ASO Seq.ID No.218b的结果

[1660] mRNA分析显示无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后12天Ki67,p53和ID2表达减少。相比之下,Casp8在低水平的ASO Seq.ID No.218b下升高(表46)。这些观察结果表明,减少的肿瘤生长与凋亡细胞的轻微增加相关。此外,Western印迹分析显示,在无转染试剂转移本发明的ASO后12天,Ki67和pAkt的蛋白水平减少(表47)。对于使用的两个浓度,无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后A549细胞的免疫化学检查与打乱对照相比,显示出减少的Ki67信号水平(图23)。最后,无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后12天A549细胞的细胞数减少约近50%(表48)。

[1661] 表46:A549细胞中无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后12天,Ki67,p53,Casp8和ID2的mRNA表达。检查的基因的调控表明,无转染试剂转移本发明的ASO后,增殖率减少。减少的ID2mRNA水平有利于抑制肿瘤细胞的扩张。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1662]

细胞系	A549 重复的无转染试剂转移后 12 天的 mRNA 水平(4x 72 h)			
靶	Ki67 n = 2	p53 n = 2	Casp8 n = 2	ID2 n = 2
A	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.31	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.03
B 2.5 μM	0.92 ± 0.05	1.06 ± 0.02	1.36 ± 0.37	0.73 ± 0.01
B 10 μM	0.96 ± 0.03	1.11 ± 0.92	1.52 ± 0.15	0.82 ± 0.15
C 2.5 μM	0.55 ± 0.33	0.27 ± 0.04	1.59 ± 0.48	0.59 ± 0.01
C 10 μM	0.57 ± 0.20	0.53 ± 0.07	0.98 ± 0.17	0.35 ± 0.02

[1663]

[1664] 表47:Ki67和pAkt Western印迹的密度计量分析。无转染试剂转移TGF-R_{II}特异性ASO Seq.ID No.218b后12天在A549细胞中观察到Ki67和pAkt蛋白的下调。使用Image Studio™ Lite软件相对于管家基因GAPDH测定蛋白水平,然后将其针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM。

[1665]

细胞系	A549 重复的无转染试剂转移后 12 天的蛋白水平(4x 72 h)	
靶	Ki67 n = 1	pAKT n = 1
A	1.00	1.00
B 10 μM	1.18	0.80
C 10 μM	0.57	0.39

[1666] 表48:重复无转染试剂转移后12天的细胞数。根据制造商的说明书,使用LunaFL™自动细胞计数荧光和明视野(Biozym,#872040)测定A549细胞中重复无转染试剂转移(4×72小时)12天后的细胞数。A=未处理对照,C=Seq.ID No.218b,±=SEM。

[1667]

细胞系	A549 重复的无转染试剂转移后 12 天的细胞数(4x 72 h)	
细胞编号	活细胞 x 10^5 n = 3	死细胞 x 10^5 n = 3
A	4.25 ± 0.50	0.47 ± 0.09

[1668]

B 10 μM	3.88 ± 0.95	0.31 ± 0.11
C 10 μM	2.35 ± 0.07	0.35 ± 0.16

[1669] 结论

[1670] 这些观察结果表明,减少的肿瘤生长与凋亡细胞的增加有关。值得注意的是,在无转染试剂转移TGF-R_{II}特异性ASO Seq.ID No.218b后,ID2是肿瘤中可能的治疗靶基因。

[1671] 总之,ASO Seq.ID No.218b在使增殖率最小化并减少肿瘤促进基因表达方面是有效的。

[1672] 实施例18:ASO无转染试剂转移对几种肿瘤细胞系的增殖的影响

[1673] TGF-β信号传导是癌症发展的关键途径。一方面,TGF-β促进作用于肿瘤抑制的因子,但另一方面,这种生长因子导致细胞迁移,细胞侵袭,细胞增殖,免疫调节的刺激,并促进对肿瘤细胞的进展和转移有利的环境重组。因此,TGF-β是癌症治疗的关键靶标。在无转染试剂吸收本发明的ASO后,测定增殖标志物(Ki67)的mRNA和蛋白水平以及细胞数量作为肿瘤细胞增殖率的标志物。此外,检测了肿瘤抑制基因p53和DNA结合蛋白抑制剂2(ID2)的mRNA水平。

[1674] 方法说明

[1675] 如上所述培养若干肿瘤细胞系(表10)。为了处理细胞,移除培养基并在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(30,000细胞/孔),6孔培养皿(Sarstedt#83.3920.300)(50,000细胞/孔)中替换新鲜全培养基(对于24孔为0.5ml,对于6孔培养皿为1ml),并在37℃和

5％CO_2下孵育过夜。为了分析mRNA表达和对增殖的影响，用Ref.1(打乱对照)和ASO Seq.ID No.218b(浓度为2.5μM和10μM)处理细胞，并在37℃和5％CO_2下孵育72小时。每72小时重复处理包括替换培养基3次，共12天。为了收获，将细胞用PBS洗涤两次，随后用于RNA分离(24孔培养皿)，蛋白分离(6孔培养皿)或增殖曲线。如上所述进行RNA和蛋白分离的方案。在计数细胞用于增殖曲线之前，使用光学显微镜(Nikon，TS-100F LED#MFA33500)分析细胞。然后从24孔培养皿中收获剩余的细胞以确定细胞数。为了这个目的，用PBS(2x)洗涤剩余的细胞，用细胞消化液(500μl/孔)处理，并在37℃下孵育5-7分钟。然后加入500μl培养基，根据制造商的说明书，使用LunaFL™自动细胞计数荧光和明视野(Biozym，#872040)测定细胞数。简言之，将18μl细胞悬浮液加入到2μl吖啶橙/碘化丙啶测定活力试剂盒(Biozym#872045)中。沉降1分钟后，将10μl加入细胞计数载玻片(Biozym#872011)。对活细胞和死细胞进行细胞计数和计算。

[1676] 18.1Seq.ID No.218b的结果

[1677] 无转染试剂转移后12天，独立于(A549，L3.6pl，Panc-1)或依赖于(HT-29，Panc-1，CaCo2)使用的ASO浓度，Ki67mRNA水平有效减少(表40)。A549，HT-29，K562，KG-1，CaCo2和TMK-1的p53基因表达水平也受到测试的ASO的影响(表50)。A549，L3.6pl，TMK-1，HT-29和K562的Ki67蛋白表达减少的检测结果见表51。值得注意的是，ID2mRNA表达显示出由ASO Seq.ID No.218b介导的A549，HT-29，K562和TMK-1细胞的一致有效和剂量依赖性的下调(表51)。另外，ASO Seq.ID No.218b导致几种肿瘤细胞系的增殖率减少(表53)。对于HPAFII，MCF-7，KG1，K562，U937和HTZ-19细胞，确认了细胞数量的剂量依赖性减少。肺癌细胞(A549)显示由ASO Seq.ID No.218b引发的约50％的细胞数减少。在无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后12天，通过光学显微镜检查HPAFII，K562，MCF-7，Panc-1和HTZ-1的细胞数量的减少(图24)。

[1678] 对于Seq.ID No.s 141d,141g,141i,143r,143w,143af,143ag,143ah,143j,143p,143q,233d,234d,235b,235d,237b,237c,237i,237m,238c,238f,239e,240c,241b,242a,246e,247d,248b,248e,248g,152k,152s,152t,152u,152ab,152ag,152ah,152ai,249c,249e,250b,250g,251c,251f,252e,253c,254b,255a,259e,260d,261b,261e,261g,262d,262e,209s,209v,209w,209x,209ai,209an,209at,209au,209av,210o,210v,210w,210x,210ab,210ac,210ad,210af,210am,263b,263c,263i,263m,264e,264h,265e,266c,267b,268a,272e,273d,274a,274d,274f,275g,275i,276b,276c,276j,276k,277d,277e,278f,279c,280b,281a,218ad,218n,218t,218u,218v,218ah,218an,218ao,218ap,220d,221d,222b,222c,222f,223c,223f,224i,224m,225c,225f,226e,227c,213o,213p,213q,213s,213y,213z,213aa,213af,228b,229a,285d,286d,287d,287e,287f,288e,288i,289d,289h,289o,289p,289q,290c,290f,290i,291c,292c,293b,和294a的反义寡核苷酸可获得相当的结果。大多数上述反义寡核苷酸不能优于Seq.ID No.218b和218c，但仍比现有技术的反义寡核苷酸更有利。因此，本发明的反义寡核苷酸对于治疗过度增殖性疾病如癌症和肿瘤是非常有用的。

[1679] 表49：增殖标志物Ki67的mRNA表达。无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后12天A549，HT-29，L3.6pl，KG1，Panc-1和CaCo2细胞中的Ki67mRNA在所有细胞系中分别减少。使用定量实时RT-PCR，相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平，然后针对未处理的对照进

行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b,±＝SEM,使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”多重事后比较来计算统计数据。

[1680]

靶	Ki67 重复无转染试剂转移后 12 天的 mRNA 水平(4x 72 h)					
细胞系	A549 n = 2	HT-29 n = 2	L3.6pl n = 2	KG1 n = 1	Panc-1 n = 1	CaCo 2 n = 1
A	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.25	1.00	1.00	1.00
B 2.5 μM	0.92 ± 0.05	0.89 ± 0.46	0.93 ± 0.03	0.72	0.76	1.21
B 10 μM	0.96 ± 0.03	0.60 ± 0.11	0.96 ± 0.16	0.76	0.79	1.07
C 2.5 μM	0.55 ± 0.33	0.34 ± 0.11	0.42 ± 0.03	0.16	0.68	0.99

[1681]

C 10 μM	0.57 ± 0.20	0.17 ± 0.02	0.64 ± 0.05	0.33	0.37	0.37

[1682] 表50:肿瘤抑制基因p53的mRNA表达。无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后12天A549,HT-29,K562,KG1,CaCo2和TMK-1细胞中的p53mRNA在所有细胞系中分别减少。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b,±＝SEM,参考A*p<0.05,使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”多重事后比较来计算统计数据。

[1683]

靶	p53 重复无转染试剂转移后 12 天的 mRNA 水平(4x 72 h)					
细胞系	A549 n = 2	HT-29 n = 1	K562 n = 1	KG1 n = 1	TMK-1 n = 1	CaCo2 n = 1
A	1.00 ± 0.31	1.00	1.00	1.00	1.00 ± 0.04	1.00
B 2.5 μM	1.06 ± 0.02	0.72	0.90	1.37	0.74 ± 0.11	0.82
B 10 μM	1.11 ± 0.92	0.68	1.35	0.87	0.71 ± 0.15	1.25
C 2.5 μM	0.27 ± 0.04	0.51	0.27	0.65	0.14*± 0.14	0.99
C 10 μM	0.53 ± 0.07	0.32	0.46	0.67	0.21* ± 0.05	0.30

[1684] 表51:ID2的mRNA表达。无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后12天A549,HT-29,K562和TMK-1细胞中的ID2mRNA分别在所有细胞系中剂量依赖性下调。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,参考A*p<0.05,使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"事后多重比较来计算统计数据。

[1685]

靶	ID2 重复无转染试剂转移后 12 天的 mRNA 水平 (4x 72 h)			
细胞系	A549 n = 2	HT-29 n = 1	K562 n = 1	TMK-1 n = 1
A	1.00 ± 0.03	1.00	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.23
B 2.5 μM	0.73 ± 0.01	0.93	0.97 ± 0.15	0.88 ± 0.15
B 10 μM	0.82 ± 0.15	1.00	0.82 ± 0.05	0.82 ± 0.05
C 2.5 μM	0.59 ± 0.01	0.31	0.70 ± 0.10	0.70 ± 0.10
C 10 μM	0.35 ± 0.02	0.25	0.29* ± 0.09	0.30* ± 0.09

[1686] 表52:Ki67Western印迹的密度计量分析。无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后Ki67蛋白下调。使用Image Studio™ Lite软件相对于管家基因α-微管蛋白定量蛋白水平,并针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"事后比较来计算统计数据。

[1687]

靶	Ki67 重复无转染试剂转移后 12 天的蛋白水平 (4x 72 h)				
细胞系	A549 n = 1	L3.6pl n = 2	TMK-1 n = 2	HT29 n = 2	K562 n = 1
A	1.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00
B 10 μM	1.18	0.59 ± 0.00	0.75 ± 0.00	1.19 ± 0.68	1.05
C 10 μM	0.57	0.19 ± 0.17	0.53 ± 0.26	0.69 ± 0.05	0.35

[1688] 表53:重复的无转染试剂转移后12天的几种癌细胞系中的细胞数(4×72小时)。将ASO Seq.ID No.218b转移到几种癌细胞系。根据制造商的说明书,使用LunaFL™自动细胞计数荧光和明视野(Biozym,#872040)测定细胞数。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,a=活细胞,d=死细胞。±=SEM。使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”事后比较来计算统计数据。

[1689]

细胞系	处理												
	A		B 2.5 μM		B 10 μM		C 2.5 μM		C 10 μM				
	细胞数目 x 10^5												
	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	n	p=	
A549	4.25 ± 0.50	0.47 ± 0,09			3.88 ± 0,95	0.31 ± 0,11			2.35 ± 0.07	0.35 ± 0.16	3		
HPAFII	2.80 ± 0.33	0.35 ± 0.11	2.88 ± 2.04	0.36 ± 0.06	2.56 ± 0.45	0.39 ± 0.06	0.66 ± 0.47	0.25 ± 0.07	0.20 ± 0.09	0.06 ± 0.02	2		
KG1	17.40 ± 3.00	0.43 ± 0.16	16.5 ± 0.85	0.58 ± 0.24	13.80 ± 0.80	0.26 ± 0.17	10.90 ± 0.20	0.59 ± 0.18	7.63 ± 3.08	**0.48*+** ± **0.14**	3	A vs. C 10 μM *p < 0.01 B 2.5 μM vs. C 10 μM +p < 0.01 C 10 μM vs. D 10 μM #p < 0.01	
K562	10.93 ± 1.58	1.37 ± 0.40	7.44 ± 1.05	2.40 ± 0.62	6.40 ± 0.38	2.36 ± 0.30	5.60 ± 0.08	2.66 ± 0.41	3.33 ± 0.54	**0.62*** ± **0.07**	3	A vs. C 10 μM *p < 0.01	
MCF-7	6.73	2.37	6.51	1.57	6.51	3.35	5.21	1.64	2.47	0.73	1		
U937	26.43 ± 2.05	7.04 ± 0.28	14.5 ± 2.73	2.88 ± 0.37	17.67 ± 0.50	2.36 ± 0.30	**11.34*** ± **2.85**	3.07 ± 0.97	**7.56*** ± **1.49**	2.25 ± 0.44	3	A vs. C 2.5 μM *p < 0.01 A vs. C 10 μM *p < 0.01	
Panc-1	2.16 ±	0.11 ±	1.82 ±	0.15 ±	2.98 ±	0.16 ±	**1.15*** ±	0.07 ±	**1.20*+** ±	0.36 ±	3	A vs. C 2.5 μM *p < 0.05 A vs. C 10 μM *p < 0.05	

[1690]

											B 10μM vs. C 10 μM +p < 0.01
	0.08	0.02	0.36	0.04	0.27	0.02	**0.51**	0.02	**0.23**	0.02	B 10μM vs. C 10 μM +p < 0.05
HTZ-19	2.06 ± 0.02	3.05 ± 0.36	2.57 ± 0.16	1.78 ± 0.15	2.55 ± 0.22	1.22 ± 0.15	1.78 ± 0.25	0.88 ± 0.09	**1.17+ ± 0.14**	0.49 ± 0.05	3

[1691] 结论

[1692] 通过ASO Seq.ID No.218b调节Ki67,p53和ID2mRNA指示抑制几个器官和不同来源

的肿瘤扩张的有益效果。已知Ki67,ID2和p53被上调并促进不同癌症类型的细胞增殖。增殖标志物Ki67,p53和ID2有效下调。无转染试剂转移后12天,多个肿瘤细胞的细胞计数和光学显微镜显示ASO Seq.ID No.218b作为减少细胞增殖的有效剂。

[1693] 总之,TGF-R_{II}特异性ASO Seq.ID No.218b有效地减少增殖率,与识别的Ki67,p53和ID2的mRNA调节平行。这些数据表明,本发明的ASO是有希望的用于抑制肿瘤细胞进展和肿瘤细胞转移的候选药物。

[1694] 实施例19:在几种肿瘤细胞系中分析反义寡核苷酸对血管发生的作用

[1695] 血管发生的调节对于器官生长和修复至关重要。血管生长失衡有助于不同的疾病,如:肿瘤生长,缺血,炎症和免疫疾病。已知TGF-β是促血管生成因子。当超量血管发生负责疾病进展时,这可能与炎症和肿瘤过程最相关。这些作用可能与TGF-β1诱导的纤维化有关。因此,$TGFR_{II}$特异性ASO对TGF-β信号传导的抑制可能代表了足够的治疗方法。

[1696] 为了测试这一假设,这些ASO通过无转染试剂摄取转移到几个肿瘤细胞系。重复无转染试剂转移后12天,通过多重分析分析细胞上清液中促血管生成因子的蛋白水平。该技术允许通过电化学发光研究多种前血管生成蛋白(VEGF,Tie-2,FLt-1,PIGF和bFGF)。血管内皮生长因子(VEGF)是促进血管发生和从而肿瘤增殖的有效的肿瘤分泌细胞因子。Tie-2是由活跃生长的血管表达的蛋白。Fms样酪氨酸激酶1(Flt-1)(也称为血管内皮生长因子受体1(VEGFR1))是跨膜酪氨酸受体激酶,其在血管内皮细胞中高度表达,胎盘生长因子(PlGF)与VEGF一起作用并在病理条件(例如肿瘤形成)下上调。此外,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)也是诱导血管发生的生长因子。PAI-1是TGF-β的靶基因,介导TGF-β的瘢痕形成和血管生成作用。因此,PAI-1也是肿瘤侵袭和转移的关键因子。显示高PAI-1浓度水平的患者被认为是例如在乳腺癌,肺癌,结肠直肠癌和胃癌中的不良预后因子。高PAI-1浓度也是血栓形成起作用的疾病(例如心肌梗塞,中风)的危险因子。因此,还测试了TGF-β特异性反义寡核苷酸的PAI-1mRNA调节。

[1697] 方法说明:

[1698] 如上所述培养肿瘤细胞系(表10)。为了处理细胞,除去培养基并在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(30,000个细胞/孔)中替换新鲜全培养基,在37℃和5%CO_2下孵育过夜。第二天,Ref.1(打乱对照)和ASO Seq.ID No.218b(以2.5和10μM的浓度)加入到更新的培养基中,并在37℃和5%CO_2下孵育72小时,每72小时重复处理包括替换培养基3次,共12天,然后收集细胞上清液并通过MesoScale**Discovery®**测定(MSD Discovery)进行分析,该技术允许通过电化学发光研究多种前血管生成蛋白(VEGF,Tie-2,FLt-1,PIGF和bFGF)。通过制造商说明书(MSD MesoScale**Discovery®**,#K15198G)提取关于个体生长因子的性能和信息。通过GraphPad**Prism®**6.0软件评估结果。

[1699] 然后用PBS洗涤细胞两次,随后用于RNA分离(24孔培养皿)以通过实时RT-PCR分析,ASO的无转染试剂转移是否可以调节纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)的mRNA水平。如前所述使用和列出方案和引物。

[1700] 19.1Seq.ID 218b的结果

[1701] 表54表明,在ASO Seq.ID No.218b的反复无转染试剂转移后,PAI-1mRNA的表达在几个测试癌细胞(A549:肺癌,HPAFII:胰腺腺癌,HT-29:结肠直肠腺癌,HTZ-19:黑色素瘤,

TMK-1:胃癌,THP-1:单核细胞白血病)中以剂量依赖性方式下调。此外,刺激的细胞上清液中的VEGF蛋白水平也显示A549,HTZ-19,HPAFII和PC3M(前列腺腺癌)的剂量依赖性减少。对于HPAFII和PC3M细胞下调是显著的(表55)。ASO Seq.ID No.218b对bFGF的影响证实了对于VEGF的观察,这意味着ASO Seq.ID No.218b有效抑制血管生成(表56)。在A549和PC3M中,结果显示bFGF也显著减少。在细胞上清液PIGF的蛋白量在A549和HTZ-19细胞中只稍微但剂量依赖性地抑制。在PC3M细胞中内源性基本PIGF水平比所有其它测试的细胞更高并且ASO效果也更强(表57)。最后,HT-29细胞中的Flt-1蛋白的下调(表58)和HTZ-19(ASO Seq.ID 218b 2.5μM)和MCF-7(乳腺癌,10μM)中的Tie-2抑制可能被检测到(表59)。

[1702] 对于Seq.ID No.141d,141g,141i,143r,143w,143af,143ag,143ah,143j,143p,143q,152k,152s,152t,152u,152ab,152ag,152ah,152ai,209s,209v,209w,209x,209ai,209an,209at,209au,209av,210o,210v,210w,210x,210ab,210ac,210ad,210af,210am,213o,213p,213q,213s,213y,213z,213aa,213af,218ad,218n,218t,218u,218v,218ah,218an,218ao,218ap,220d,221d,222b,222c,222f,223c,223f,224i,224m,225c,225f,226e,227c,228b,229a,233d,234d,235b,235d,237b,237c,237i,237m,238c,238f,239e,240c,241b,242a,246e,247d,248b,248e,248g,249c,249e,250b,250g,251c,251f,252e,253c,254b,255a,259e,260d,261b,261e,261g,262d,262e,263b,263c,263i,263m,264e,264h,265e,266c,267b,268a,272e,273d,274a,274d,274f,275g,275i,276b,276c,276j,276k,277d,277e,278f,279c,280b,281a,285d,286d,287d,287e,287f,288e,288i,289d,289h,289o,289p,289q,290c,290f,290i,291c,292c,293b,和294a的反义寡核苷酸可获得相当的结果。大多数上述反义寡核苷酸不能优于Seq.ID No.218b和218c,但仍比现有技术的反义寡核苷酸更有利。因此,本发明的反义寡核苷酸对于治疗过度增殖性疾病如癌症和肿瘤是非常有用的。

[1703] 表54:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天A549,HPAFII,HT-29,HTZ-19,TMK-1和THP-1细胞中PAI-1的mRNA表达。PAI-1基因表达的调节以改善疾病预后的方式受ASO Seq.ID No.218b的剂量依赖性影响。使用定量实时RT-PCR,相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”多重事后比较来计算统计数据。

[1704]

靶	PAI-1 重复无转染试剂转移后 12 天的 mRNA 水平 (4x 72 h)					
细胞系	A549 n = 3	HPA FII n = 1	HT-29 n = 2	HTZ-19 n = 2	TMK-1 n = 2	THP-1 n = 2
A	1.00 ± 0.10	1.00	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.11
B 2.5 μM	1.28 ± 0.03	1.48	0.88 ± 0.27	0.99 ± 0.34	0.89 ± 0.04	1.14 ± 0.79
B 10 μM	1.03 ± 0.27	1.05	0.81 ± 0.08	1.30 ± 0.00	1.16 ± 0.00	1.21 ± 0.37
C 2.5 μM	0.91 ± 0.28	0.62	0.60 ± 0.13	1.13 ± 0.10	0.56 ± 0.04	0.83 ± 0.20
C 10 μM	0.56 ± 0.13	0.32	0.50 ± 0.18	0.77 ± 0.10	0.45 ± 0.23	0.09 ± 0.02

[1705] 表55:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天A549,HPAFII,HTZ-19,PC3M细胞中细胞上清液中的通过MesoScale**Discovery®**测定(MSD Mesoscale Discovery,#K15198G)测量的VEGF蛋白水平。通过测量电化学发光测定蛋白水平。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,参考A*p<0.05和**p<0.01,参考B2.5μM+p<0.05和$^{++}$p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1706]

靶	VEGF 重复无转染试剂转移后 12 天的蛋白 (pg/ml) (4x 72 h)			
细胞系	A549 n = 1	HPAFII n = 2	HTZ-19 n = 2	PC3M n = 2
A	8186	23266 ± 876	4411 ± 66	2657 ± 103

[1707]

B 2.5 μM	8387	22278 ± 5711	3385 ± 57	1993 ± 5.4
B 10 μM	8623	20776 ± 497	4044 ± 21	813 ± 0.8
C 2.5 μM	8846	15479**++ ± 512	3444 ± 197	1266*+ ± 20.5
C 10 μM	6842	11214** ± 898	2882 ± 90	442** ± 14.3

[1708] 表56:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天A549和PC3M细胞中细胞上清液中的通过MesoScale**Discovery®**测定(MSD Mesoscale Discovery,#K15198G)测量的bFGF蛋白水平。通过测量电化学发光测定蛋白水平。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,参考A*p<0.05和**p<0.01,参考B 2.5μM+p<0.05和$^{++}$p<0.01,参考B 10μM#p<0.05和##p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1709]

靶	bFGF 重复无转染试剂转移后 12 天的蛋白(pg/ml) (4x 72 h)	
细胞系	A549 n = 2	PC3M n = 2
A	50.7 ± 2.9	21.2 ± 0.2
B 2.5 μM	54.4 ± 3.1	16.8 ± 0.1
B 10 μM	51.8 ± 2.7	14.7 ± 0.2
C 2.5 μM	26.7**++ ± 2.1	11.3**+ ± 0.0
C 10 μM	24.2 ± 3.4	7.6**++ ± 0.0

[1710] 表57:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天A549,HTZ-19和PC3M细胞中细胞上清液中的通过MesoScale**Discovery®**测定(MSD Mesoscale Discovery,#K15198G)测量的PIGF蛋白水平。通过测量电化学发光测定蛋白水平。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,参考A**p<0.01,使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1711]

靶	PIGF 重复无转染试剂转移后 12 天的蛋白(pg/ml) (4x 72 h)		
细胞系	A549 n = 2	HTZ-19 n = 1	PC3M n = 2
A	9.9 ± 0.4	11.6	61.7 ± 2.1
B 2.5 μM	9.6 ± 0.2	8.1	54.1 ± 1.9
B 10 μM	8.6 ± 0.1	8.4	59.5 ± 3.2
C 2.5 μM	8.2 ± 0.8	8.2	69.4 ± 2.4
C 10 μM	6.3** ± 0.9	6.5	45.0 ± 3.5

[1712] 表58:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天HTZ-19细胞中细胞上清液中的通过MesoScale**Discovery®**测定(MSD Mesoscale Discovery,#K15198G)测量的Flt-1蛋白水平。通过测量电化学发光测定蛋白水平。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,参考A**p<0.01,使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1713]

靶	Flt-1 重复无转染试剂转移后 12 天的蛋白(pg/ml) (4x 72 h)
细胞系	HT-29 n = 1
A	33.9
B 2.5 µM	27.7
B 10 µM	27.7
C 2.5 µM	18.2
C 10 µM	18.7

[1714] 表59:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天HTZ-19和MCF-7细胞中细胞上清液中的通过MesoScale**Discovery®**测定(MSD Mesoscale Discovery,#K15198G)测量的Tie-2蛋白水平。通过测量电化学发光测定蛋白水平。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,参考A**p<0.01,使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1715]

靶	Tie-2 重复无转染试剂转移后 12 天的蛋白(pg/ml) (4x 72 h)	
细胞系	HTZ-19 n = 1	MCF-7 n = 1
A	13.5	98.1
B 2.5 µM	6.2	
B 10 µM		149.2
C 2.5 µM	3.2	
C 10 µM		76.9

[1716] 结论

[1717] 所有分析的促血管生成因子(VEGF,bFGF,PIGF,Flt-1和Tie-2)可以由ASO Seq.ID No.218b以具有对抑制肿瘤进展和依赖于增强的血管发生的其它病理机制有利的影响的方

式进行调节。此外,PAI-1mRNA由ASO Seq.ID No.218b剂量依赖性地减少。该因子、TGF-β靶基因和例如在乳腺癌中的一个认可的预后标志物也是剂量依赖性下调的。

[1718] 总之,所有测试的本发明的ASO在减少有利于肿瘤进展、转移、炎症和血栓形成的血管发生过程中是有效的。因此,针对TGF-R_{II}的本发明的ASO是不同类型的癌症和血栓形成相关疾病中的有效治疗候选者。

[1719] 实施例20:分析本发明的ASO对纤维化的作用

[1720] TGF-β参与许多过程,例如细胞增殖,迁移,伤口愈合,血管发生和细胞-细胞相互作用。从几项研究中可以看出,在几种疾病(包括原发性开角型青光眼,阿尔茨海默氏病,肺性纤维化和糖尿病性肾病)的发病机制中,这个因子通常升高。这些疾病与细胞外基质(ECM)和肌动蛋白-细胞骨架的病理修饰有关。通常,这些观察到的改变与严重性疾病进展和治疗抗性(肿瘤中的上皮间质转化-EMT)相关。结缔组织生长因子(CTGF)是TGF-β的下游介质,介导TGF-β的纤维化作用。因此,显示CTGF介导ECM的沉积并调节肌动蛋白-细胞骨架的重组。为了研究本发明的ASO是否有助于通过抑制TGF-β信号传导来解决纤维化过程,除了在几种不同的癌细胞中代表ECM的两个主要成分的纤连蛋白(FN)和胶原IV(ColIV)之外还评估了CTGF水平。此外,在神经前体(ReNcell CX)和人肺癌(A549)细胞中检查了ASO对CTGF、FN和对肌动蛋白-细胞骨架的影响。

[1721] 20.1神经变性中的纤维化

[1722] 方法说明

[1723] 如前所述,在标准方案中培养细胞。对于处理,将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(50,000个细胞/孔),6孔培养皿(Sarstedt#83.3920.300)(80,000个细胞/孔)和8孔细胞培养载玻片(Sarstedt#94.6140.802)(10,000个细胞/孔),并在37℃和5%CO_2下孵育过夜。为了研究ReNcell**CX®**细胞对TGF-β1的反应,在更新培养基之后用TGF-β1(2和10ng/ml,PromoCell#C63499)处理细胞48小时,然后进行CTGF的mRNA分析。为了找出对CTGF和FN、ReNcell**CX®**细胞的ASO作用,移除培养基,并用新鲜的完全培养基替代(1ml用于6孔,0.5ml用于8孔)。随后将Ref.1(打乱对照),ASO Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218b(以2.5和10μM的浓度)加入培养基中,并在96小时后进行各自的分析(实时RT-PCR,Western印迹分析和免疫细胞化学)。为了检查ASO的影响,在研究了与TGF-β1的预孵育后,移除培养基,并用新鲜的完全培养基(1ml用于6孔培养皿和8孔细胞培养载玻片)代替。暴露于TGF-β1(10ng/ml,48h)后,改变培养基,将TGF-β1(10ng/ml),Ref.1(10μM),具有Seq.ID No.218b的ASO(10μM)和具有Seq.ID No.218c的ASO(10μM)组合地或在单次处理中加入至细胞。然后在无转染试剂转移后96小时收获ReNcell**CX®**细胞。因此,细胞用PBS洗涤两次,随后用于RNA(24孔培养皿)和蛋白分离(6孔培养皿)或细胞的免疫细胞化学检查(在8孔细胞培养皿中)。如前所述使用方案、抗体、稀释液和引物。

[1724] 20.1.1TGF-β1对神经前体细胞(ReNcell CX)的影响

[1725] 关于ReNcell**CX®**对TGF-β1暴露的反应仍一无所知。因此,用两种不同浓度的TGF-β1b处理ReNcell**CX®**细胞48小时(表60)。实时RT-PCR的评估显示CTGF-和TGF-β1基因表达的剂量依赖性诱导。

[1726] 表60:用TGF-β1刺激48小时后CTGF和TGF-β1的mRNA表达。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,E

＝TGF-β1。±＝SEM,使用普通单因子ANOVA随后“Tukey’s”多重事后比较来计算统计数据。

[1727]

细胞系	ReNcell CX 48 小时 TGF-β1 处理后的 mRNA 水平	
靶 时间点	CTGF 48 h n=3	TGF-β1 48 h n=3
A	1.00 ± 0.43	1.00 ± 0.10
E 2 ng/ml	1.73 ± 0.92	1.34 ± 0.45
E 10 ng/ml	2.15 ± 1.14	1.85 ± 0.65

[1728] 结论

[1729] ReNcell**CX®**细胞显示出对TGF-β1暴露的反应,其呈现TGF-β1的自身诱导和TGF-β1靶基因CTGF的升高。综合来说,ReNcell**CX®**细胞是研究解决TGF-β效应的问题的理想选择。

[1730] 20.1.2 Seq.ID No.218b的结果

[1731] 20.1.2.1无转染试剂转移的影响

[1732] 无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b导致CTGF和FN的剂量依赖性和显著减少(表61)。ASO Seq.ID No.218b的这个影响对于FN蛋白水平进行验证。FN蛋白水平在测试的ASO的无转染试剂转移后96小时下降约70％,而ReNcell**CX®**细胞的TGF-β1处理导致FN的3.4倍诱导(表62)。

[1733] 表61:用Seq.ID No.218b无转染试剂转移后ReNcell**CX®**细胞中CTGF mRNA的剂量依赖性和显著下调。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b。±＝SEM,*p<0.05,**p<0.01,相对于A。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett”事后比较来计算统计数据。

[1734]

细胞系	ReNcell CX 无转染试剂转移后的 mRNA 水平	
靶 时间点	CTGF 96 h, n=3	FN 96 h, n=3
A	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.00
B 2.5 μM	0.97 ± 0.06	0.81 ± 0.14
B 10 μM	0.86 ± 0.17	0.67 ± 0.07
C 2.5 μM	0.66** ± 0.02	0.59 ± 0.02
C 10 μM	0.52** ± 0.02	0.39* ± 0.03

[1735] 表62:Western印迹后纤连蛋白的密度计量分析。无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b后96小时可以观察到ReNcell CX® 细胞中的FN蛋白下调。使用Image Studio™ Lite软件相对于管家基因α-微管蛋白测定蛋白水平,然后将其针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b。

[1736]

细胞系	ReNcell CX 无转染试剂转移后的蛋白水平
靶 时间点	FN 96 h, n=1
A	1.00
B 2.5 μM	1.06
B 10 μM	0.60
C 2.5 μM	0.46
C 10 μM	0.30
E 10 ng/ml	3.43

[1737] 结论

[1738] ASO Seq.ID No.218b在人神经元前体细胞中下调CTGF和FN的mRNA水平是有效的。无转染试剂转移后96小时，ASO Seq.ID No.218b处理减少FN蛋白。因此，TGF-R_{II}特异性ASO介导ReNcell CX®细胞中TGF-β诱导的纤维化作用的阻断。

[1739] 20.1.2.2TGF-β预孵育后无转染试剂转移的影响

[1740] 为了分析ASO Seq.ID No.218b是否也有效抑制病理条件下由TGF-β介导的纤维化作用，ReNcell CX®细胞与TGF-β预先孵育，然后进行无转染试剂转移96小时。之后，确定的CTGF和FN的mRNA水平表明在TGF-β诱导CTGF和FN基因表达后ASO Seq.ID No.218b也具有很强的抗纤维化作用(表63)。CTGF(图25A)和FN(图25B)的免疫细胞化学染色证实了mRNA分析的数据。此外，用鬼笔环肽染色肌动蛋白-细胞骨架的分析显示TGF-β处理后应激纤维的诱导，而ASO Seq.ID No.218b有效阻断TGF-β介导的应激纤维诱导(图25C)。

[1741] 表63:TGF-β1预孵育随后用Seq.ID No.218b进行无转染试剂转移后ReNcell CX®细胞中CTGF和FN mRNA的下调(与打乱对照相比)。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平，然后将其针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b，E＝TGF-β，±＝SEM，*p<0.05，参考A**p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett's”事后比较来计算统计数据。

[1742]

细胞系	ReNcell CX 48 h TGF-β1 后 mRNA 水平-> 96 h TGF-β1+ ASO/单一治疗	
靶 时间点	CTGF 96 h, n=3	FN 96 h, n=3
A	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.10
B 10 μM	0.85 ± 0.01	0.78 ± 0.20
C 10 μM	0.70* ± 0.25	0.44 ± 0.04
E 10 ng/ml	1.60** ± 0.15	2.25 ± 0.31
E 10 ng/ml + B 10 μM	1.71** ± 0.03	4.08*++ ± 0.90
E 10 ng/ml + C 10 μM	1.19++ ± 0.04	1.74++ ± 0.61

[1743] 结论

[1744] ASO Seq.ID No.218b在模拟病理条件(TGF-β1预孵育)下显示出强的抗纤维化作用。除了作为ECM的主要成分的FN的下调之外,肌动蛋白细胞骨架也以可能有益于纤维化疾病的更好的结果的方式受到本发明的ASO的影响。

[1745] 20.1.3 Seq.ID No.218c的结果

[1746] 20.1.3.1无转染试剂转移的影响

[1747] 无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218c导致无转染试剂转移10μM ASO Seq.ID No.218c后CTGF mRNA的强烈和显著减少(表64)。

[1748] 表64:无转染试剂转移Seq.ID No.218c后ReNcell CX®细胞中CTGF mRNA的下调。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后中的未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,D=Seq.ID No.218c。±=SEM,参考A*p<0.05。使用普通单因子ANOVA随后"Dunnett's"事后比较来计算统计数据。

[1749]

细胞系	ReNcell CX 无转染试剂转移后的 mRNA 水平
靶 时间点	CTGF 96 h, n=3
A	1.00±0.10
B 2.5 μM	0.88±0.08
B 10 μM	0.89±0.07
D 2.5 μM	0.48±0.08
D 10 μM	0.17*±0.02

[1750] 结论

[1751] ASO Seq.ID No.218c对于CTGF mRNA的剂量依赖性减少是有效的。

[1752] 20.1.3.2 TGF-β预孵育后无转染试剂转移的影响

[1753] ASO Seq.ID No.218c的无转染试剂转移随后进行TGF-β1预孵育的结果验证了TGF-β1诱导的对CTGF mRNA水平的作用的有效阻断(表65)。ASO在阻断TGF-β1对CTGF的作用方面具有很强的作用,以至于组合处理与ASO Seq.ID No.218c的单一处理相当。

[1754] 表65:无转染试剂转移Seq.ID No.218c后进行TGF-β1预孵育后以及平行的TGF-β1处理ReNcell CX®细胞中的的CTGF mRNA水平。数据证实了与组合处理相比,ASO Seq.ID No.218c有效阻断TGF-β1对CTGF mRNA水平的作用。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后中的未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,D=Seq.ID No.218c,E=TGF-β1。±=SEM,参考A*p<0.05。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett's”事后比较来计算统计数据。

[1755]

靶 时间点	ReNcell CX 48 h TGF-β1 后 mRNA 水平-> 96 h TGF-β1+ ASO/单一治疗
细胞系	CTGF n= 3
A	1.00±0.03
B 10 μM	0.85±0.01
D 10 μM	0.17*±0.02
E 10 ng/ml	1.39±0.08
E 10 ng/ml + B 10 μM	1.25±0.44
E 10 ng/ml + D 10 μM	0.23*±0.02

[1756] 结论

[1757] ASO Seq.ID No.218c即使在人工病理条件下(TGF-β1预孵育)也显示出CTGF mRNA和蛋白的强烈下调。

[1758] 总之,除强烈的抗纤维化作用外,TGF-R_{II}特异性ASO还显示肌动蛋白-细胞骨架的调节。应力纤维的诱导可导致细胞刚度和硬度的升高,这可能例如在阿尔茨海默病和其它神经变性疾病中起作用。ECM沉积也可以介导快速致病性修饰,例如在原发性开角型青光眼中。因此,减少ECM沉积和抑制应激纤维形成可能有利于在纤维化相关的神经障碍中更好的预后。因此,TGF-R_{II}特异性ASO是用于治疗例如阿尔茨海默病和原发性开角型青光眼的有效治疗剂。

[1759] 20.2。肺纤维化

[1760] 方法说明

[1761] 为了研究ASO对肺组织ECM和肌动蛋白-细胞骨架的影响,如前所述检测和培养人肺癌(A549)细胞。对于处理,将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(50,000个细胞/孔),6孔培养皿(Sarstedt#83.3920.300)(80,000个细胞/孔)和8孔细胞培养物载玻片(Sarstedt#94.6140.802)(10,000个细胞/孔),并在37℃和5%CO_2下孵育过夜。为了研究A549细胞对TGF-β1的反应,在更换培养基后用TGF-β1(2和10ng/ml,PromoCell#C63499)处理细胞48小时,随后对CTGF进行mRNA分析。为了研究ASO对CTGF和FN A549细胞的作用,移除培养基并用新鲜的完全培养基(1ml用于6孔,0.5ml用于8-x-孔)替换。随后将Ref.1(打乱对照),ASO Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218b(以2.5和10μM的浓度)加入培养基中,并在ReNcell**CX®**细胞中72小时后进行相应分析(实时RT-PCR,Western印迹分析和免疫细胞化学)。为了显示用TGF-β1预孵育后可能的ASO影响,移除培养基并用新鲜的完全培养基(1ml用于6孔培养皿和8孔细胞培养载玻片)代替。暴露于TGF-β1(10ng/ml,48h)后,改变培养基,将TGF-β1(10ng/ml),Ref.1(10μM),具有Seq.ID No.218b的ASO(10μM)和具有Seq.ID No.218c的ASO(10μM)组合地或在单次处理中加入至细胞。然后在无转染试剂转移后72小时

收获A549细胞。因此，细胞用PBS洗涤两次，随后用于RNA(24孔培养皿)和蛋白分离(6孔培养皿)或细胞的免疫细胞化学检查(在8孔细胞培养皿中)。如前所述使用方案、抗体、稀释液和引物。

[1762] 20.2.1 TGF-β1对肺癌细胞(A549)的影响

[1763] 为了研究A549细胞对TGF-β1暴露反应的能力，细胞用两种不同浓度的TGF-β1处理48小时(表66)。实时RT-PCR的评估显示CTGF和TGF-β1本身是基因表达的剂量依赖性诱导。

[1764] 表66：用TGF-β1刺激48小时后A549细胞中诱导的CTGF和TGF-β1的mRNA表达。使用定量实时RT-PCR，相对于管家基因GNB2L1测定mRNA表达水平，然后中的未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，E＝TGF-β1。±＝SEM，参考A*p<0.05和**p<0.01，参照E 2ng/ml^{++}p<0.05。使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”多重事后比较来计算统计数据。

[1765]

细胞系	A549 48 小时 TGF-β1 处理后的 mRNA 水平	
靶 时间点	CTGF 48 h, n=3	TGF-β1 48 h, n=3
A	1.00±0.23	1.00±0.31
E 2 ng/ml	2.44*±0.18	1.60±0.34
E 10 ng/ml	11.35**++±0.52	2.37±0.36

[1766] 结论

[1767] A549细胞在TGF-β1暴露后显示CTGF的剂量依赖性和显著的mRNA上调。此外，观察到TGF-β1的自身诱导。综合来看，A549细胞是检查解决肺癌和肺癌中TGF-β作用的问题的良好模型。

[1768] 20.2.2 Seq.ID No.218b的结果

[1769] 20.2.2.1无转染试剂转移效果的结果

[1770] 无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218b导致CTGF基因表达的剂量依赖性和高度显著减少(表67)。FN mRNA水平也受到测试的ASO的影响，但不是剂量依赖性的。相反，针对FN的染色显示与打乱对照相比，FN的剂量依赖性减少(图260A)。此外，检查ASO和TGF-β对肌动蛋白-细胞骨架的影响。图26B显示了在TGF-β1处理后在A549细胞中以依赖性方式诱导肌动蛋白纤维包括应激纤维形成，而A549细胞中ASO Seq.ID No.218b的无转染试剂转移后的信号显著下调，平行于识别的TGF-β1介导的效应的逆转。对于蛋白分析，可以显示与CTGF通过其介导纤维化作用的pErk1/2的抑制平行的CTGF的适当下调(表68)。此外，ASO Seq.ID No.218b无转染试剂转移后72小时，两个ECM主要组分FN和ColIV的减少是显著的(表68)。

[1771] 表67：使用Seq.ID No.218b的无转染试剂转移后A549细胞中CTGF mRNA的剂量依

赖性和显著下调。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平，然后中的未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b。±＝SEM，参考A** p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett's”事后比较来计算统计数据。

[1772]

细胞系	A549 无转染试剂转移后的 mRNA 水平	
靶 时间点	CTGF 72 h, n=3	FN 72 h, n=3
A	1.00±0.08	1.00±0.07
B 2.5 μM	0.87±0.06	1.08±0.02
B 10 μM	0.80±0.03	0.87±0.08
C 2.5 μM	0.60**±0.04	0.77±0.17

[1773]

C 10 μM	0.39**±0.03	0.74±0.16

[1774] 表68：CTGF，FN，ColIV和pErk1l/2Western印迹后的密度计量分析：A549中用ASO Seq.ID No 218b无转染试剂转移后72小时。使用Image Studio™ Lite软件相对于管家基因α-微管蛋白测定蛋白水平，然后将其针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照，B＝Ref.1，C＝Seq.ID No.218b。

[1775]

细胞系	A549 无转染试剂转移后的蛋白水平			
靶 时间点	CTGF 72 h n = 1	FN 72 h n = 1	ColIV 72 h n = 1	pErk1/2 72 h n=2
A	1.00	1.00	1.00	1.00±0.00
B 2.5 μM	0.91	0.89	1.19	1.00±0.14
B 10 μM	1.31	0.76	0.87	0.98±0.02
C 2.5 μM	0.05	0.81	1.16	0.67±0.26
C 10 μM	0.09	0.46	0.65	0.61±0.13

[1776] 结论

[1777] 无转染试剂转移Seq.ID No.218b在调节参与人肺细胞中ECM沉积和肌动蛋白-细胞骨架重组的因子中是有效的。

[1778] 20.2.2.2 TGF-β1预孵育后无转染试剂转移的效应的结果

[1779] TGF-β1预孵育后ASO Seq.ID 218b的无转染试剂转移结果的验证了有效阻断TGF-β1诱导的对CTGF和FN mRNA水平的强作用(表69)。中的CTGF(图27A)和FN(图27B)的免疫细胞化学染色证实了蛋白水平的mRNA检测。

[1780] 表69:A549细胞中无转染试剂Seq.ID No.218b后TGF-β1预孵育后的和平行的TGF-β1处理后的CTGF和FN mRNA水平。数据证实了ASO Seq.ID No.218b有效阻断TGF-β1对CTGF和FN mRNA水平的作用。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后中的未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,E=TGF-β1。±=SEM,*p<0.05,参考A**p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett's”事后比较来计算统计数据。

[1781]

靶 时间点	A549 mRNA 水平 48 h TGF-β1 -> 72 h TGF-β1 + ASO/单一治疗	
细胞系	CTGF n= 5	FN n= 3
A	1.00±0.22	1.00±0.45
B 10 μM	0.89±0.19	1.02±0.37
C 10 μM	0.52±0.05	0.35±0.06
E 10 ng/ml	6.92*±2.32	2.92±1.02
E 10 ng/ml + B 10 μM	8.79**±2.72	2.90±0.56
E 10 ng/ml + C 10 μM	2.53±0.59	1.18±0.28

[1782] 结论

[1783] ASO Seq.ID No.218b在模拟过量浓度的TGF-β1的人造病理条件下在A549细胞中有效介导抗纤维化作用。

[1784] 20.2.3 Seq.ID No.218c的结果

[1785] 20.2.3.1无转染试剂转移的效应的结果

[1786] 无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218c在无转染试剂转移72小时后在A549细胞中介导CTGF mRNA的强剂量依赖性和显著减少(表70)。

[1787] 表70:无转染试剂转移Seq.ID No.218c后72小时A549细胞中CTGF mRNA的下调。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后中的未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,D＝Seq.ID No.218c。±＝SEM,参考A**p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后“Dunnett's”事后比较来计算统计数据。

[1788]

细胞系	A549 无转染试剂转移的 mRNA 水平
靶 时间点	CTGF 72 h n=4
A	1.00±0.08
B 2.5 μM	0.97±0.07
B 10 μM	0.85±0.06
D 2.5 μM	0.49**±0.05
D 10 μM	0.31**±0.03

[1789] 结论

[1790] 无转染试剂转移ASO Seq.ID No.218c有效减少TGF-β下游介质CTGF的mRNA

[1791] 20.2.2.2 TGF-β预孵育后无转染试剂转移的效应的结果

[1792] TGF-β1预孵育后ASO Seq.ID No.218c的无转染试剂转移的结果验证了有效阻断TGF-β1诱导的对CTGF mRNA水平的强作用(表71)。针对CTGF的免疫细胞化学染色证实了蛋白水平的这些发现(图28)。

[1793] 表71:TGF-β1预孵育后Seq.ID No.218c的无转染试剂转移以及平行的TGF-β1处理的A549中的CTGF mRNA水平。数据证实了与组合处理相比,ASO Seq.ID No.218c有效阻断TGF-β1诱导的对CTGF mRNA水平的作用。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,D＝Seq.ID No.218c,E＝TGF-β1。±＝SEM,参考A**$p<0.01$,参考E+$B^{++}$$p<0.01$。使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”事后比较来计算统计数据。

[1794]

靶 时间点	A549 48 h TGF-β1 -> 72 h TGF-β1 + ASO/单一治疗
细胞系	CTGF n= 3
A	1.00±0.05
B 10 μM	0.86±0.11
D 10 μM	0.53±0.10
E 10 ng/ml	4.71±1.76
E 10 ng/ml + B 10 μM	5.89*±2.16
E 10 ng/ml + D 10 μM	0.86++±0.06

[1795] 结论

[1796] ASO Seq ID 218c在由过多的TGF-β1浓度模拟的人造病理状态下在A549细胞中有效介导抗纤维化作用。

[1797] 总之,ASO Seq ID 218c是有效的治疗剂,因为通过减少CTGF、FN和ColIV可以减缓肺纤维化的病理学。此外,通过TGF-R_{II}特异性ASO可有效减少应激纤维形成,从而使本发明的ASO成为理想的治疗剂。

[1798] 20.3对几种癌细胞的影响

[1799] 方法说明

[1800] 为了调查针对ECM(CTGF,FN,ColIV)的ASO效应,如标准方案(表10)所述使用和培养细胞。对于处理,将细胞接种在24孔培养皿(Sarstedt#83.1836.300)(30,000细胞/孔),6孔培养皿(Sarstedt#83.3920.300)(50,000个细胞/孔)中,并在37℃和5%二氧化碳下孵育过夜。为了分析mRNA表达和对CTGF、FN和ColIV mRNA和蛋白水平的影响,用Ref.1(打乱对照)或ASO Seq.ID No.218b(以2.5和10μM的浓度)处理细胞,并在37℃和5%CO_2下孵育72小时。每72小时重复处理3次(共12天),包括更换培养基。为了收获,将细胞用PBS洗涤两次,随后用于RNA分离(24孔培养皿)或蛋白分离(6孔培养皿)。如上所述进行RNA和蛋白分离的方案以及使用的抗体和稀释液。

[1801] 20.3.1 Seq.ID No.218b的结果

[1802] 通过CTGF,FN,ColIV mRNA和蛋白水平的分析检测抗纤维化作用。在HT-29,HTZ-19,MCF-7和THP-1细胞中CTGF mRNA(表72)被Seq.ID No.218b剂量依赖性地减少。对于KG-1细胞,对于2.5μM ASO Seq.ID No.218b观察到TGF-β下游介质的下调。对于A549、Panc-1和CaCo2细胞,根据THP-1、HTZ-19和L3.6pl细胞(表65)中ColIV mRNA的剂量依赖性下降(表74),证明FN的减少(表73)。Western印迹分析显示HT-29,MCF-7,TMK-1和L3.6pl细胞中CTGF蛋白的强烈减少。MCF-7的结果是显著的(表75)。此外,A549和TMK-1细胞中Erk1/2的磷酸化

被ASO Seq.ID No.218b抑制。pErk1/2通常被CTGF激活以诱导TGF-β调节的纤维化作用(表76)。对于FN(A549,MCF-7,HT-29,HTZ-19,HPAFII)和Col IV(A549,HTZ-19,HPAFII,PC3M)(表77和78)(ECM的两个主要成分),蛋白水平最小化约50%。

[1803] 表72:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天HT-29,HTZ-19,KG1,MCF-7和THP-1细胞中CTGF的mRNA表达。对于所有测试细胞系在Seq.ID No.218b的无转染试剂转移后CTGF mRNA减少。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后中的未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1804]

靶	CTGF 重复无转染试剂转移后 12 天的 mRNA 水平(4x 72 h)				
细胞系	HT-29 n = 2	HTZ-19 n = 1	KG-1 n = 1	MCF-7 n = 1	THP-1 n = 2
A	1.00±0.28	1.00	1.00	1.00	1.00±0.28
B 2.5 μM	0.68±0.11	1.30		0.93	0.99±0.68
B 10 μM	0.65±0.03	1.20	0.88	0.91	1.15±0.34
C 2.5 μM	0.40±0.20	0.64		0.24	0.98±0.11
C 10 μM	0.33±0.19	0.55	0.26	0.22	0.09±0.03

[1805] 表73:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天A549,Panc-1和CaCo2细胞中的FN mRNA表达。对于所有测试细胞系在Seq.ID No.218b的无转染试剂转移后FN mRNA减少。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后中的未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,参考A**p<0.01。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1806]

靶	FN 重复无转染试剂转移后 12 天的 mRNA 水平(4x 72 h)		
细胞系	A549 n = 2	Panc-1 n = 1	CaCo2 n = 2
A	1.00±0.39	1.00	1.00±0.30
B 2.5	0.83±0.08	1.29	0.55±0.13

[1807]

μM			
B 10 μM			1.00±0.76
C 2.5 μM	0.35±0.20	0.15	0.73±0.54
C 10 μM			0.18±0.17

[1808] 表74:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天A549,HTZ-19,THP-1,L3.6pl,Panc-1和CaCo2细胞中ColIV 12的mRNA表达。对于所有测试细胞系在Seq.ID No.218b的无转染试剂转移后ColIV mRNA减少。使用定量实时RT-PCR相对于管家基因GNB2L1测定mRNA水平,然后针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b,±=SEM,使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1809]

靶	Col IV 重复无转染试剂转移后 12 天的 mRNA 水平(4x 72 h)					
细胞系	A549 n = 2	THP-1 n = 2	HTZ-19 n = 1	L3.6pl n = 2	Panc-1 n = 1	CaCo2 n = 2
A	1.00±0.00	1.00±0.22	1.00	1.00±0.20	1.00	1.00±0.71
B 2.5 μM	1.18±0.31	0.71±0.25	0.94	0.83±0.09	0.98	1.37±0.19
B 10 μM	1.11±0.60	0.61±0.03		0.91±0.29	0.57	2.61±0.01
C 2.5 μM	0.84±0.02	0.65±0.19	0.51	1.14±0.13	0.59	1.30±0.03
C 10 μM	0.75±0.02	0.30±0.13		0.69±0.05	0.30	0.57±0.14

[1810] 表75:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天HT-29,MCF-7,L3.6pl和TMK-1细胞中Western印迹后的密度计量分析。可以观察到ASO Seq.ID No.218b对CTGF蛋白的下调。使用Image Studio™ Lite软件相对于管家基因α-微管蛋白测定蛋白水平,然后将其针对未处理的对照进行标准化。A=未处理对照,B=Ref.1,C=Seq.ID No.218b。使用普通单因子ANOVA随后"Tukey's"多重事后比较来计算统计数据。

[1811]

靶	CTGF 重复无转染试剂转移（4×72 小时）后 12 天的蛋白水平			
细胞系	HT-29 n = 1	MCF-7 n = 2	TMK-1 n =1	L3.6pl n = 1
A	1.00	1.00±0.0	1.00	1.00
B 10 μM	1.19	1.12±0.11	0.85	0.93
C 10 μM	0.50	0.22**++±0.03	0.38	0.22

[1812] 表76:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天A549和TMK-1细胞中Western印迹后的密度计量分析。可以观察到ASO Seq.ID No.218b对pErk1/2蛋白的下调。确使用Image Studio™ Lite软件相对于管家基因α-微管蛋白进行蛋白水平的定量,然后将其针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b。使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”多重事后比较来计算统计数据。

[1813]

靶	pErk1/2 重复无转染试剂转移（4×72 小时）后 12 天的蛋白水平	
细胞系	A549 n = 1	TMK-1 n =1
A	1.00	1.00
B 10 μM	1.21	1.14
C 10 μM	0.58	0.76

[1814] 表77:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天A549,MCF-7,HT-29,HTZ-19和HPAFII细胞中Western印迹后的密度计量分析。可以观察到ASO Seq.ID No.218b对FN蛋白的下调。使用Image Studio™ Lite软件相对于管家基因α-微管蛋白进行蛋白水平的定量,然后将其针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b。使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”多重事后比较来计算统计数据。

[1815]

靶	FN 重复无转染试剂转移（4×72 小时）后 12 天的蛋白水平				
细胞系	A549 n = 1	MCF-7 n = 2	HT-29 n =1	HTZ-19 n =1	HPAFII n = 1
A	1.00	1.00±0.22	1.00	1.00	1.00
B 10 μM	1.10	1.08±0.25	0.81	1.20	1.12
C 10 μM	0.56	0.69±0.18	0.40	0.83	0.56

[1816] 表78:无转染试剂转移Seq.ID No.218b后12天A549,MCF-7,HT-29,HTZ-19和HPAFII细胞中Western印迹后的密度计量分析。可以观察到ASO Seq.ID No.218b对FN蛋白的下调。使用Image Studio™ Lite软件相对于管家基因α-微管蛋白分析蛋白水平,然后将其针对未处理的对照进行标准化。A＝未处理对照,B＝Ref.1,C＝Seq.ID No.218b。使用普通单因子ANOVA随后“Tukey's”多重事后比较来计算统计数据。

[1817]

靶	Col IV 重复无转染试剂转移（4×72 小时）后 12 天的蛋白水平			
细胞系	A549 n = 1	HTZ-19 n =1	HPAFII n =1	PC3M n = 1
A	1.00	1.00	1.00	1.00

[1818]

B 10 μM	1.31	1.01	1.05	1.07
C 10 μM	0.61	0.36	0.76	0.43

[1819] 结论

[1820] TGF-β1通过其下游介导物CTGF介导的ECM的增加的沉积可以通过不同肿瘤细胞系中的本发明的TGF-R_{II}特异性ASO有效地逆转。ECM组分的减少水平可能有助于肿瘤进展较低侵袭性。总之,测试的ASO可能在不同的纤维化相关疾病中表现出新的治疗策略。

[1821] 实施例21:通过使用食蟹猴中的剂量递增范例的慢性脑室内施用的本发明ASO的毒性阈值。

[1822] 为了评估GLP-毒性研究的理想剂量范围,在食蟹猴中进行使用慢性脑室内(icv)反义寡核苷酸(ASO)施用的预实验,其中剂量不断增加。在施用期间监测范例动物的免疫学、血液学和生理学改变。

[1823] 方法说明:

[1824] 对于雄性和雌性食蟹猴的慢性中枢ASO输注，将连接到靶向右侧脑室的有机硅导管的气压泵(0.25ml/24h,Tricumed-IP 2000V)在氯胺酮/木糖酸麻醉和半无菌条件下皮下植入。每个处理条件(Seq.ID No.218b,Seq.ID No.218c,表79中给出的浓度)使用单只雄性和单只雌性猴。每个泵通过在猴颈部的10cm长的皮肤切口皮下植入腹部，并通过硅胶导管与icv插管连接。将动物置于立体定位框架中，将icv插管下降到右侧脑室。使用牙科水泥(Kallocryl,Speiko-Dr。Speier GmbH,Münster,Germany)用两个不锈钢螺钉固定插管。颈部的皮肤用缝合线封闭。在手术过程中，体温通过加热垫保持。为了避免手术后感染，用**betaisodona®** (Mundipharma GmbH,Limburg,Germany)局部治疗猴子，并接受1ml抗生素(sc,**Baytril®**2.5%Bayer Vital GmbH,Leverkusen,Germany)。套管和各自的泵用相应的处理溶液填充。ASO输注期(每个剂量1周)通过一周的使用专门施用的0.9%的NaCl的洗脱期中断。在整个施用范例期间，监测体重发育和食物消耗。此外，血液和CSF样品每周采集一次，以确定血液学和免疫学改变，但也确定系统性ASO浓度。在最后一天，处死动物，取出器官(肝，肾，脑)，分析增殖、凋亡、mRNA敲低和肿瘤形成。

[1825] 表79:7周施用范例期间给出的实验设计和ASO剂量。

[1826]

处理条件	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周
Seq. ID No.218b	0.048 mM	0.9 % NaCl	0.24 mM	0.9 % NaCl	1.2 mM	0.9 % NaCl	6 mM
Seq. ID No 218c	0.048 mM	0.9 % NaCl	0.24 mM	0.9 % NaCl	1.2 mM	0.9 % NaCl	6 mM

[1827] 结论：

[1828] 所有测试的本发明的ASO在第1-6周至少无毒，因此用于进一步的研究和毒理学检查。然而，输注反义寡核苷酸Seq.ID No.214,Seq.ID No.138b,Seq.ID No.172b以及Ref.0和Ref.5在上述方案的早期导致毒性作用。因此，这些反义寡核苷酸不合适作为治疗剂，不用于进一步的研究。

[1829] 实施例22:中枢反义寡核苷酸施用后行为和生理异常的测定

[1830] 本研究的目的是调查单次脑室内(icv)反义寡核苷酸施用对大鼠神经和所产生的行为参数的影响。

[1831] 方法说明：

[1832] 在氯胺酮/木糖酸麻醉和半无菌条件下进行立体定向程序。手术后，大鼠恢复两天。

[1833] 植入icv引导插管

[1834] 将动物置于立体定位框架中，将引导插管(12mm)植入左侧脑室上方2mm(相对于前囟的坐标：后距1.0mm，中线侧向-1.6mm，颅骨表面下方1.8mm)。

[1835] 使用牙科丙烯酸水泥(Kallocryl，**Speiko®**-Dr.Speier GmbH，Münster，Germany)将引导插管锚定至两个不锈钢螺钉，并用假插管封闭。在手术过程中，体温通过加热垫保持。为了避免手术后感染，用**betaisodona®** (Mundipharma GmbH，Limburg，Germany)局部治疗小鼠，并接受0.1ml抗生素(sc，**Baytril®**2.5％Bayer Vital GmbH，Leverkusen，Germany)。

[1836] ICV输注

[1837] 使用27号插管使稍微受约束的大鼠接受ASO(2μM/5μl，10μM/5μl，50μM/5μl，250μM/5μl)或媒介物(5μl，0.9％NaCl，pH 7.4，Braun)的icv输注，其延伸超过引导插管2mm并且保持位置30秒以允许扩散。在icv施用后15、30、60和120分钟监测大鼠的行为反应、运动活动、CNS激发、姿势、运动协调、肌张力、反射和体温。

[1838] 插管和微量透析探针放置的验证

[1839] 处死后，取出脑，快速冷冻并储存于-80℃直到分析。在40μm冠状、甲酚紫染色的脑切片处进行icv植入部位的组织学验证。

[1840] 本结果表明，对于不同剂量的单次ASO(对于序列Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c)icv施用，由于对神经学参数的影响而在大鼠中是安全和可靠的技术。

[1841] 实施例23：食蟹猴GLP-毒性研究(大鼠中的毒性前实验)的理想剂量范围的测定

[1842] 为了调查每日静脉内(iv)反义-寡核苷酸(ASO)施用的任何一般性毒理作用，并且为了取得大鼠中GLP-前毒性研究的完美剂量范围，进行大鼠的毒性前试验。

[1843] 方法说明：

[1844] 对于重复静脉内ASO注射，将20只雄性和20只雌性大鼠分为四个治疗组：媒介物组，$ASO_{低}$，$ASO_{中等}$和$ASO_{高}$组。这个范例是针对Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c执行的。大鼠连续15天每天接受静脉内推注ASO注射。监测大鼠的死亡率(每天两次)，临床症状(每日一次，体重发育(每周)，食物消耗(每周)。在实验范例的第15天，处死动物，取出器官(肝，肾，脑)并收集躯干血液。然后分析组织和血液的免疫学和血液学变化。

[1845] 本研究的结果显示了两个ASO Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c是用于各种不同疾病的安全药物，当以低和中等剂量施用时，其无毒性作用。

[1846] 实施例24：通过重复静脉内反义寡核苷酸注射测定任何一般性毒理作用

[1847] 本研究的目的是调查每日静脉内(iv)反义寡核苷酸(ASO)施用在大鼠体内引发的一般性毒理作用。

[1848] 方法说明：

[1849] 对于重复静脉内ASO注射，将80只雄性和80只雌性大鼠分为4个治疗组：媒介物组，$ASO_{低}$，$ASO_{中等}$和$ASO_{高}$组。大鼠连续29天每天接受静脉内推注ASO注射。监测大鼠的死亡率(每天两次)，临床症状(每日一次，体重发展(每周)，食物消耗(每周)。在实验范例的第29天，处死动物，取出器官(肝，肾，脑)并收集躯干血液。此外，收集骨髓涂片。然后分析组织和血液的免疫学和血液学以及组织病理学改变。

[1850] 本研究的结果显示了两个ASO Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c是用于各种不同疾病的安全药物，当以低和中等剂量施用时，其无毒性作用。

[1851] 实施例25：在食蟹猴中测定慢性中枢反义寡核苷酸施用的毒理学性质

[1852] 为了确定有效剂量，并确定毒性剂量，雄性和雌性食蟹猴通过慢性脑室内施用接受不同剂量的本发明的反义寡核苷酸(ASO)。在施用范例期间，监测动物的免疫学、血液学和生理学改变。

[1853] 方法说明：

[1854] 对于雄性和雌性食蟹猴的慢性中枢ASO输注，将连接到靶向右侧脑室的有机硅导管的气压泵(0.25ml/24h，Tricumed-IP 2000V)在氯胺酮/木糖酸麻醉和半无菌条件下皮下植入。每个处理条件(表79中给出的媒介物、$ASO_{低}$、$ASO_{高}$、浓度)使用三只雄性和三只雌性猴。此外，为了研究恢复的时间表，在ASO施用终止后四周，处死两只雄性和两只雌性猴(媒介物和$ASO_{高}$)。每个泵通过在猴颈部的10cm长的皮肤切口皮下植入腹部，并通过硅胶导管与icv插管连接。将动物置于立体定位框架中，将icv插管下降到右侧脑室。使用牙科水泥(Kallocryl，Speiko-Dr。Speier GmbH，Münster，Germany)用两个不锈钢螺钉固定插管。颈部的皮肤用缝合线封闭。在手术过程中，体温通过加热垫保持。为了避免手术后感染，用**betaisodona®** (Mundipharma GmbH，Limburg，Germany)局部治疗猴子，并接受1ml抗生素(sc，**Baytril®**2.5％Bayer Vital GmbH，Leverkusen，Germany)。套管和各自的泵用相应的处理溶液填充。ASO输注期(每个剂量1周)通过一周的使用专门施用的0.9％的NaCl的洗脱期中断。在整个施用范例期间，监测体重发育和食物消耗。此外，血液和aCSF样品每周采集一次，以确定血液学和免疫学改变，但也确定系统性ASO浓度。在最后一天，处死动物，取出器官(肝，肾，脑)，分析增殖、凋亡、mRNA敲低和肿瘤形成。第57周后，还处死用于研究恢复期的额外动物，并测定了相同的读出参数。

[1855] 表80.四周GLP-毒性研究和额外的4周恢复期的处理条件和每组的动物。

[1856]

处理条件	主要研究		4周恢复期	
	雄性 [n]	雌性 [n]	雄性 [n]	雌性 [n]
媒介物	3	3	2	2
$ASO_{低}$	3	3	/	/
$ASO_{高}$	3	3	2	2

[1857] 本研究的结果表明慢性脑室内ASO施用是用于治疗各种不同的疾病的无毒和安全的药物。

[1858] 实施例26：在不同媒介物溶液中测定反义寡核苷酸的稳定性和生物学活性

[1859] 为了研究反义寡核苷酸(Seq.ID No.218b，Seq.ID No.218c)和输注溶液是否存在任何相互作用的影响，进行了29天的预实验。因此，两种ASO在不同的不含内毒素的媒介物溶液(PBS，注射用水(WFI)，0.9％NaCl)中重构，分别在不同的条件下储存。每一周收集样品，并通过AEX-HPLC分析pH值、ASO稳定性、含量和完整性。通过分别在每个样品中证明细胞培养测定中$TGF\text{-}R_{II}$ mRNA敲低的效力来测试功效条件的任何变化。

[1860] 方法说明：

[1861] 在无菌条件(层流,BIOWIZARD Golden GL-170**Ergoscience®**,S1条件)下,用各种媒介物溶液(注射用水,0.9%NaCl,PBS)稀释冻干的ASO。标记1.5ml Eppendorf杯,并填充100µl(AEX-HPLC)或250µl(靶敲低)的各自ASO溶液(所有步骤处于层流,BIOWIZARD Golden GL-170**Ergoscience®**,S1条件,参见表81的吸移/标记方案)。在下一步骤中,将所有样品储存在各自的储存条件下,每一周收集样品(见取样方案表82),并储存在-80℃直到分析。

[1862] 表81:ASO-媒介物-稳定性研究的标记方案。标记方案是针对Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c(各自10µM和0.24mM)和所有三种媒介物WFI、0.9%NaCl和PBS(=>12种不同方案)进行的。

[1863]

	天							
标记	媒介物(WFI,0.9%NaCL 或 PBS)	条件	0	6	12	18	24	29
ASO[10 µM]	X	基线	ASO[10 µM]X_					

[1864]

			基线					
ASO [10 μM]	X	-20° C		ASO [10 μM] X_-20° C_第 6 天	ASO [10 μM] X_-20° C_ 第 12 天	ASO [10 μM] X_-20° C_ 第 18 天	ASO [10 μM] X_-20° C_ 第 24 天	ASO [10 μM] X_-20° C_ 第 29 天
ASO [10 μM]	X	+4° C		ASO [10 μM] X_+4° C_第 6 天	ASO [10 μM] X_+4° C _第 12 天	ASO [10 μM] X_+4° C _第 18 天	ASO [10 μM] X_+4° C _第 24 天	ASO [10 μM] X_+4° C _第 29 天
ASO [10 μM]	X	+20° C		ASO [10 μM] X_+20° C _第 6 天	ASO [10 μM] X_+20 °C _第 12 天	ASO [10 μM] X_+20 °C _第 18 天	ASO [10 μM] X_+20 °C _第 24 天	ASO [10 μM] X_+20 °C _第 29 天
ASO [10 μM]	X	+37° C		ASO [10 μM] X_+37° C_第 6 天	ASO [10 μM] X_+37 °C _第 12 天	ASO [10 μM] X_+37 °_第 18 天	ASO [10 μM] X_+37 °_第 24 天	ASO [10 μM] X_+37 °C _第 29 天
ASO	X	+40° C		ASO [10 μM]	ASO [10 μM]	ASO [10 μM]	ASO [10 μM]	ASO [10 μM]

[1865]

[10 μM]				X_40° C_第 6 天	X_40° C _第 12 天	X_40° C _第 18 天	X_40° C _第 24 天	X_40° C _第 29 天
ASO [10 μM]	X	pH 值	ASO [10 μM] X_pH 值 _第 0 天					ASO [10 μM] X_pH 值_ 第 29 天
ASO [0.24 mM]	X	基线	ASO [0.24 mM] X_基线					
ASO [0.24 mM]	X	-20° C		ASO [0.24 mM] X_-20° C_第 6 天	ASO [0.24 mM] X_-20° C_ 第 12 天	ASO [0.24 mM] X_-20° C_ 第 18 天	ASO [0.24 mM] X_-20° C_ 第 24 天	ASO [0.24 mM] X_-20° C_ 第 29 天
AS	X	+4°		ASO	ASO	ASO	ASO	ASO

[1866]

O [0.24 mM]		C		[0.24 mM] X_+4° C_第 6 天	[0.24 mM] X_+4° C _第 12 天	[0.24 mM] X_+4° C _第 18 天	[0.24 mM] X_+4° C _第 24 天	[0.24 mM] X_+4° C _第 29 天
ASO [0.24 mM]	X	+20° C		ASO [0.24 mM] X_+20° C _第 6 天	ASO [0.24 mM] X_+20 °C _第 12 天	ASO [0.24 mM] X_+20 °C _第 18 天	ASO [0.24 mM] X_+20 °C _第 24 天	ASO [0.24 mM] X_+20 °C _第 29 天
ASO [0.24 mM]	X	+37° C		ASO [0.24 mM] X_+37° C_第 6 天	ASO [0.24 mM] X_+37 °C _第 12 天	ASO [0.24 mM] X_+37 °_第 18 天	ASO [0.24 mM] X_+37 °_第 24 天	ASO [0.24 mM] X_+37 °C _第 29 天
ASO [0.24 mM]	X	+40° C		ASO [0.24 mM] X_40° C_第 6 天	ASO [0.24 mM] X_40° C _第 12 天	ASO [0.24 mM] X_40° C _第 18 天	ASO [0.24 mM] X_40° C _第 24 天	ASO [0.24 mM] X_40° C _第 29 天
ASO [0.24 m	X	pH 值	ASO [0.24 mM					ASO [0.24 mM] X_pH_ 值_

[1867]

M]			]X_pH值_第0天					第 29 天

[1868] 表82:ASO-媒介物-稳定性研究的收集方案。收集方案是针对Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c(各自10μM和0.24mM)和所有三种媒介物WFI、0.9%NaCl和PBS(=>12种不同方案)进行的。

[1869]

样品	天					
条件	0	6	12	18	24	29
基线	X					
-20°C		X	X	X	X	X
+4°C		X	X	X	X	X
+20°C		X	X	X	X	X
+37°C		X	X	X	X	X
+40°C		X	X	X	X	X
pH 值	X					X

[1870] 由于任何媒介物溶液对Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c的稳定性、含量和完整性没有任何影响,将0.9%NaCl用于ASO-使用稳定性实验。

[1871] 实施例27:测定本发明的反义寡核苷酸(ASO)在媒介物溶液中的使用稳定性和生物学活性

[1872] 为了研究反义寡核苷酸(ASO)(Seq.ID No.218b,Seq.ID No.218c)和气体压力泵或导管是否存在任何相互作用的影响,进行了29天的预实验。因此,两种ASO在0.9%NaCl中重构,泵和导管按照制造商说明进行填充。每一周收集样品,并通过AEX-HPLC分析pH值,微生物学和寡聚体稳定性,含量和完整性。还通过分别在每个样品的细胞培养测定中证明敲低TGF-R_{II} mRNA的效力来测试功效条件的任何变化。

[1873] 方法说明:

[1874] 冻干的ASO在无菌条件(层流,BIOWIZARD Golden GL-170**Ergoscience®**,S1条件)下用0.9%NaCl稀释。在无菌条件(层流,BIOWIZARD Golden GL-170**Ergoscience®**,S1条件)下,根据标记方案(见表83)标记5ml Eppendorf杯。根据制造商的描述,使用相应的ASO溶液填充两个气体压力泵(Tricumed Model IP-**2000V®**)和导管(脊柱导管组4000)(所有步骤处于层流,BIOWIZARD Golden GL-170 **Ergoscience®**,S1条件,参见表83的吸

移/标记方案)。在接下来的步骤中,将连接到5ml Eppendorf杯盖的导管连接的泵和剩余的杯储存在储存箱中,所有开口都用**Parafilm®**封闭,以避免任何污染。每一周收集样品,储存在-80℃直到分析,并将连接到5ml Eppendorf杯盖的导管转移到下一杯以继续取样。此外,通过推注口从泵中直接取出一个样品,并储存在-80℃。在最后一天,收集了额外的样品用于微生物分析。

[1875] 表83:ASO使用稳定性研究的标记方案。标记方案是针对Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c(各自0.24mM)进行的。PS:(PumpSample:直接从导管取样),AS:(AdditionalSample:通过推注口直接从泵内的储液器中取样,MB:(MicroBiology:来自PS和AS的500μM)

[1876]

样品	天							
Oligo	杯	条件	**0**	**6**	**12**	**18**	**24**	**29**
Seq. ID No. 218b [0.24 mM]	**5ml**	**PS**	**Seq. ID No. 218b [10 μM]**	**Seq. ID No. 218b _+37°C PS_ 第 6 天**	**Seq. ID No. 218b _+37°C PS_ 第 12 天**	**Seq. ID No. 218b _+37°C PS_ 第 18 天**	**Seq. ID No. 218b _+37°C PS_ 第 24 天**	**Seq. ID No. 218b _+37°C PS_ 第 29 天**

[1877]

			基线					
Seq. ID No. 218b [0.24 mM]	5 ml	AS		Seq. ID No. 218b _+37°C AS_ 第 6 天	Seq. ID No. 218b _+37°C AS_ 第 12 天	Seq. ID No. 218b _+37°C AS_ 第 18 天	Seq. ID No. 218b _+37°C AS_ 第 24 天	Seq. ID No. 218b _+37°C AS_ 第 29 天
Seq. ID No. 218b [0.24 mM]	5 ml	MB						Seq. ID No. 218b _+37°C MB_第 29 天
Seq. ID No. 218b [0.24 mM]	5 ml	pH 值	Seq. ID No. 218b pH 值 Day 0					Seq. ID No. 218b pH 值第 29 天
Seq. ID No. 218c [0.24 mM]	5 ml	PS	Seq. ID No. 218c 基线	Seq. ID No. 218c _+37°C PS_ 第 6 天	Seq. ID No. 218c _+37°C PS_ 第 12 天	Seq. ID No. 218c _+37°C PS_ 第 18 天	Seq. ID No. 218c _+37°C PS_ 第 24 天	Seq. ID No. 218c _+37°C PS_ 第 29 天
Seq. ID No. 218c	5 ml	AS		Seq. ID No. 218c _+37°C	Seq. ID No. 218c _+37°C	Seq. ID No. 218c _+37°C	Seq. ID No. 218c _+37°C	Seq. ID No. 218c _+37°C

[1878]

[0.24 mM]				AS_ 第 6 天	AS_ 第 12 天	AS_ 第 18 天	AS_ 第 24 天	AS_ 第 29 天
Seq. ID No. 218c [0.24 mM]	5 ml	MB						Seq. ID No. 218c _+37°C MB_第 29 天
Seq. ID No. 218c [0.24 mM]	5 ml	pH 值	Seq. ID No. 218c pH 值 Day 0					Seq. ID No. 218c pH 值第 29 天

[1879] 表84:ASO使用稳定性研究的收集方案。收集方案是针对Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c(0.24mM)进行的。PS:(PumpSample:直接从导管取样),AS:(AdditionalSample:通过推注口直接从泵内的储液器中取样,MB:(MicroBiology:来自PS和AS的500μM)

[1880]

样品		天					
杯	条件	0	6	12	18	24	29
5 ml	基线	X					
5 ml	PS		X	X	X	X	X
5 ml	AS		X	X	X	X	X
5 ml	MB						X
5 ml	pH 值	X					X

[1881] 由于泵和导管没有影响Seq.ID No.218b和Seq.ID No.218c的稳定性、含量和完整性,也没有明显的微生物问题,这种应用范例代表了食蟹猴和人中鞘内和脑室内施用的最佳技术。

[1882] 化学合成

[1883] 缩写

[1884] Pybop:(苯并三唑-1-基-氧)三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐

[1885] DCM:二氯甲烷

[1886] DMF:二甲基甲酰胺

[1887] DMAP:4-二甲基氨基吡啶

[1888] DMT:4,4'二甲氧基三苯甲基

[1889] LCAA:长链烷基氨基

[1890] TRIS:三(羟甲基)-氨基甲烷

[1891] TRIS-HCl:三(羟甲基)-氨基甲烷盐酸盐

[1892] DEPC:二碳酸二乙酯

[1893] Gapmer反义寡核苷酸合成和纯化

[1894] 在ABI 3900或ABI 394合成仪上,或在Expedite™(Applied Biosystems)上根据亚磷酰胺寡聚化学方法组装gapmer形式的反义寡核苷酸。在ABI3900上,固相支持物是负载UnySupport(购自Glen Research,Sterling,Virginia,USA)的聚苯乙烯,以得到0.2μmol的合成规模。在ABI 394上,固相支持物是负载从Chemgenes(Wilmington,MA,USA)购买的Unylinker™的500A受控孔玻璃(CPG),以得到3μmol的合成规模。

[1895] 辅助合成试剂如“Deblock”,“Oxidizer”,“CapA”和“CapB”以及DNA亚磷酰胺从SAFC Proligo(Hamburg,Germany)获得。

[1896] 具体地说,将脱氧胸苷(dT)、4-N-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷(dC^{Bz})、6-N-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷(dA^{Bz})和2-N-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷(dG^{iBu})的5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-O,3'-O-(2-氰基乙基N,N-二异丙基)亚磷酰胺单体用作DNA构建单元。5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒-鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(LNA-G^{DMF}),5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-胸苷-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]亚磷酰胺(LNA-Tb),5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(LNA-A^{Bz}),5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(LNA-C*^{Bz})用作LNA构建单元。LNA亚磷酰胺购自Exiqon(Vebaek,Denmark)。

[1897] 如表85中的LNA的实例所示,将亚磷酰胺溶解在无水乙腈中,得到0.07M寡核苷酸,除了溶解在THF/乙腈(25/75(v/v))的混合物中的LNA-C*^{Bz}之外。

[1898] 表85:

[1899]

	分子量 g/mole	CAS No.	溶剂	获得 0.07M 溶液 100 mg
LNA-A^{Bz}	885.9	[206055-79-0]	无水乙腈	1.6 ml
LNA-C*^{Bz}	875.9	[206055-82-5]	THF/乙腈 25/75 (v/v)	1.6 ml
LNA-G^{DMF}	852.9	[709641-79-2]	无水乙腈	1.7 ml
LNA-T	772.8	[206055-75-6]	无水乙腈	1.8 ml

[1900] β-D-硫代-LNA 5'-O-DMT-2'-脱氧-2'-巯基-2'-S,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-

3'-[(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺,5'-O-DMT-2'脱氧-2'-巯基-2'-S,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺,5'-O-DMT-2'-脱氧-2'-巯基-2'-S,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺,5'-O-DMT-2'-脱氧-2'-巯基-2'-S,4'-C-亚甲基-胸苷-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺,和5'-O-DMT-2'-脱氧-2'-氨基-2'-N,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺如J.Org.Chem.1998,63,6078-6079中所述合成。

[1901] β-D-氨基-LNA 5'-O-DMT-2'脱氧-2'-氨基-2'-N,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-[(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺,5'-O-DMT-2'-脱氧-2'-氨基-2'-N,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺,5'-O-DMT-2'-脱氧-2'-氨基-2'-N,4'-C-亚甲基-胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺,5'O-DMT-2'-脱氧-2'-甲氨基-2'-N,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-[(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺和5'-O-DMT-2'脱氧-2'-甲氨基-2'-N,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺,5'-O-DMT-2'-脱氧-2'-甲氨基-2'-N,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基)(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺,5'-O-DMT-2'脱氧-2'-甲氨基-2'-N,4'-C-亚甲基-胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺的合成根据文献程序(J.Org Chem.1998,63,6078-6079)进行。

[1902] α-L-氧基-LNA_α-L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺,α-L-5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰基乙基-N,N--二异丙基)亚磷酰胺,α-L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C亚甲基-N^2-二甲基脒啶鸟苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺和α-L-5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺以类似于文献(J.Am.Chem.Soc.2002,124,2164-2176;Angew.Chem.Int.Ed.200,39,1656-1659)中描述的程序进行。

[1903] 用类似于Caruthers(J.Org.Chem.1996,61,4272-4281)报道的方案制备用于合成具有硫代磷酸酯主链的寡核苷酸的(β-苯甲酰巯基)乙基)吡咯烷基硫代亚磷酰胺。

[1904] "亚磷酰胺-C3"(3-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基)丙基-1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺和"3'-间隔子C3CPG"(1-二甲氧基三苯甲基氧基-丙二醇-3-琥珀酰基)-长链烷基氨基-CPG购自Glen Research。

[1905] 一般程序

[1906] LNA固相支持物的制备:

[1907] 1)LNA琥珀酰半酯的制备(WO2007/112754)

[1908] 将5'-O-DMT-3'-羟基核苷单体、琥珀酸酐(1.2当量)和DMAP(1.2当量)溶于35ml二氯甲烷(DCM)中。将反应在室温下搅拌过夜。在用0.1M pH 5.5(2x)NaH_2PO_4和盐水(1x)萃取后,将有机层进一步用无水$NaSO_4$干燥并过滤并蒸发。得到半酯衍生物,产率为95%,无需进一步纯化即可使用。

[1909] 2)LNA-支持物的制备(WO2007/112754)

[1910] 将上述制备的半酯衍生物(90μmol)溶于最少量的DMF中,加入DIEA和pyBOP(90μmol)并混合1分钟。将该预活化的混合物在手动合成仪中与LCAA CPG(**500Å**,80-120筛目

尺寸,300mg)混合并搅拌。在室温下1.5小时后,滤出支持物并用DMF、DCM和MeOH洗涤。干燥后,测定负载量为57μmol/g(参见Tom Brown,Dorcas J.S.Brown.Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis.In:F.Eckstein,editor.Oligonucleotides和35Analogues A Practical Approach.Oxford:IRL Press,1991:13-14)。

[1911] 寡核苷酸的延伸(偶联)

[1912] 5-乙硫基-1H-四唑(ETT)作为活化剂(乙腈中0.5M)用于亚磷酰胺的偶联。代替ETT,可以使用其它试剂如WO2007/112754中所述的4,5-二氰基咪唑(DCI),5-苄基硫基-1H-四唑或糖精-1-甲基咪唑可用作活化剂。将在乙腈中的0.25M DCI用于与LNA的偶联。

[1913] 封端

[1914] 加入10%乙酸酐(Ac $_2$O)的THF(HPLC级)和10%N-甲基咪唑(NMI)的THF/吡啶(8:1)(HPLC级),使其反应。

[1915] 氧化

[1916] 磷(III)至磷(V)通常用例如碘/THF/吡啶/H_2O,使用购自Glen Research的0.02M碘的THF/吡啶/H_2O或购自购自Glen Research的0.5M 1S)-(+)-(10-樟脑磺酰基)-恶氮烷(CSO)来完成

[1917] 在制备磷酸核苷间核苷键联的情况下,使用3-((二甲基氨基亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(DDTT,获自Chemgenes(Wilmington,MA,USA))在无水乙腈/吡啶(1:1v/v)中的0.05M溶液。在使用LNA的情况下,使用0.2M 3,H-1,2-苯并噻吩-3-酮1,1-二氧化物(Beaucage试剂)在无水乙腈中进行硫醇化。

[1918] 通常,如WO2007/112754中所述,硫醇化还可以通过使用氯化亚烷(0.01M,在乙腈/吡啶10%中)进行。

[1919] 替代地,可以应用硫醇化步骤的其它试剂如氢化黄原素(5-亚氨基-(1,2,4)二噻唑烷-3-硫酮),苯乙酰基二硫化物(PADS)。

[1920] 在合成二硫代磷酸酯的情况下,通过加入在吡啶/异腈(4:1v/v)中的0.05M DDTT(3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮)将所得硫代亚磷酸三酯氧化成硫代磷酸三酯。

[1921] 从固相支持物的切割和脱保护

[1922] 在固相合成结束时,反义寡核苷酸可以被切割为“DMT-on”或“DMT-off”。“DMT off”意指使用“Deblock”试剂在合成仪上除去最终的5'-O-(4,4'二甲氧基三苯甲基)基团和DMT-on意指当寡核苷酸从固相支持物上切割时存在该基团。用三氯乙酸除去DMT交替。

[1923] “DMT-off”

[1924] 固相合成完成后,反义寡核苷酸用乙腈(Biosolve BV,Valkenswaard,The Netherlands)中的20%二乙胺溶液处理20分钟。以除去磷酸酯主链上的氰基乙基保护基。随后,将反义寡核苷酸从固相支持物上切下,并使用1至5mL浓氨水(从Sigma Aldrich获得)在55℃下脱保护16小时。通过过滤或离心从反义寡核苷酸中分离固相支持物。

[1925] 如果寡核苷酸含有二硫代磷酸三酯,则硫醇基团用1:1:2v/v/v的苯硫酚:三乙胺:二恶烷脱保护24小时,然后使用氨水将寡核苷酸从固相支持物上切掉,在室温下进行1-2小时,并在65℃进一步脱保护4小时。

[1926] “DMT-on”

[1927] 在室温下,使用氨水将寡核苷酸从固相支持物上切掉,进行1-2小时,并在65℃进一步脱保护4小时。寡核苷酸通过反相HPLC(RP-HPLC)纯化,然后用三氯乙酸除去DMT-基团。

[1928] 如果寡核苷酸含有二硫代磷酸三酯,则通过在55℃下在浓乙醇(氨/乙醇3:1v/v)中加入850μl氨进行从固相支持物的切割和硫醇基的脱保护,进行15-16h。

[1929] 末端基团

[1930] 在反义寡核苷酸的5’-末端的末端基团

[1931] 固体支持的寡核苷酸用在二氯甲烷(w/v)中的3%三氯乙酸处理,以完全去除5’-DMT保护基团。此外,化合物用适当的具有氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺部分的末端基团转化。在将磷(III)氧化成磷(V)后,如上所述进行脱保护、从固相支持物和脱保护序列脱离。

[1932] 纯化

[1933] 接下来,将粗制的反义寡核苷酸通过AKTA Explorer系统(GE Healthcare,Freiburg,Germany)上的阴离子交换高效液相色谱(HPLC)和填充有Source Q15(GE Helthcare)的柱进行纯化。缓冲液A为10mM高氯酸钠,20mM Tris,1mM EDTA,pH7.4,并且含有20%乙腈,缓冲液B与缓冲液A相同,但不包括500mM高氯酸钠。采用32柱体积(CV)内15%B至55%B的梯度。记录280nm处的UV迹线。合并适当的级分并用3M NaOAc,pH=5.2和70%乙醇沉淀。最后,用70%乙醇洗涤沉淀。(Analytics)

[1934] 通过电喷雾电离质谱(ESI MS)证实反义寡核苷酸的鉴定,纯度通过分析型OligoPro毛细管电泳(CE)进行。

[1935] 二硫酸盐的纯化在装有Mono Q 10/100GL柱的Amersham Biosciences P920FPLC仪器上进行。用DEPC处理的水制备缓冲液,其组成如下:缓冲液A:25mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH8.0;缓冲液B:25mM Tris-HCl,1mM EDTA,1M NaCl,pH8.0。

[1936] 实施例28

[1937] $Gb^{1}sTb^{1}sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}$(Seq.ID No.209y)

[1938] 用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理5’-O-DMT-2’-O,4’-C亚甲基-5-甲基-N^{4}-苯并氧基胞苷-3’-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5’-DMT保护基团。在用总量800μl乙腈的几次洗涤后,用80μl 5’-O-DMT-2’-O,4’-C-亚甲基-N^{2}-二甲基甲脒鸟苷-3’-[(2-氰基乙基))-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5’-DMT保护基团。

[1939] 偶联用80μl 5’-O-DMT-2’-O,4’-C-亚甲基-N^{6}-苯甲酰腺苷-3’-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二

氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1940] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1941] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1942] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1943] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1944] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1945] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1946] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉

过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1947] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1948] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1949] 偶联用80μl 5'O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1950] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1951] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基胸苷3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1952] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合

物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1953] 固相合成完成后,将反义寡核苷酸用乙腈(Biosolve BV,Valkenswaard,The Netherlands)中的20%二乙胺溶液处理20分钟。以除去磷酸酯主链上的氰基乙基保护基。

[1954] 随后,将反义寡核苷酸从固相支持物上切下,并在55℃下使用5mL浓氨水进一步脱保护16小时。通过过滤或离心从反义寡核苷酸中分离固相支持物。

[1955] 接下来,将粗制的反义寡核苷酸通过AKTA Explorer系统(GE Healthcare,Freiburg,Germany)上的阴离子交换高效液相色谱(HPLC)和填充有Source Q15(GE Helthcare)的柱进行纯化。缓冲液A为10mM高氯酸钠,20mM Tris,1mM EDTA,pH7.4,并且含有20%乙腈,缓冲液B与缓冲液A相同,但不包括500mM高氯酸钠。采用32柱体积(CV)内15%B至55%B的梯度。记录280nm处的UV迹线。合并适当的级分并用3M NaOAc,pH=5.2和70%乙醇沉淀。最后,用70%乙醇洗涤沉淀。接受纯度为93.7%的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5387.3Da;计算值:5387.80Da。

[1956] 实施例29

[1957] $Gb^{1}Tb^{1}dAdGdTdGdTdTdTdAdGdGdGAb^{1}Gb^{1}C*b^{1}$(Seq.ID No.209u)

[1958] LNA根据一般程序结合至CPG。偶联反应和封端步骤也如实施例28所述进行。封端步骤之后,用800μl乙腈冲洗该系统,并将400μl THF/吡啶/H_2O中的0.02M碘插入柱45秒。在氧化步骤后用24μl乙腈冲洗该系统。纯化后,接受95.3%纯度的反义寡核苷酸。ESI Ms:实验值:5146.80Da;计算值:5146.4Da。

[1959] 实施例30

[1960] $/5SpC3s/Gb^{1}sTb^{1}sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb^{1}s\ Gb^{1}sC*b^{1}$(Seq.ID No.209v)

[1961] 根据一般程序,使用如实施例28中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成该化合物。但是除了在最后一个核苷酸偶联到寡核苷酸之后,进行了后续的氧化和封端步骤,加入80μl亚磷酰胺-C3(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)。使偶联进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂。随后的步骤如实施例28所述进行。纯化后,接受纯度为97.4%的反义寡核苷酸。HRMS(ESI):实验值:5540.70Da;计算值:5541.4Da。

[1962] 实施例31

[1963] $Gb^{1}sTb^{1}sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb^{1}sGb^{1}sC*b^{1}/3SpC3s/$(Seq.ID No.209w)

[1964] 3'-间隔子C3CPG(0.2μmol)用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60s以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^{4}-苯甲酰基胞苷-3'-[(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。随后的反应如实施例28所述进行。纯化后,接受纯度为92.7%的反义寡核苷酸。ESI-sMS:实验值:5541.70Da;计算值:5541.4Da。

[1965] 实施例32

[1966] Gb[1]ssTb[1]ssAb[1]ssdGssdTssdGssdTssdTssdTssdA*ssdGssdGssdGs sAb[1]ssGb[1]ssC*b[1] (Seq.ID No.209an)

[1967] 用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C亚甲基-5-甲基-N^4-苯并氧基胞苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用38μl的乙腈中10％二氯甲烷(v/V)中的5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(β-苯甲酰巯基))乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1968] 用38μl的乙腈中10％二氯甲烷(v/v)中的5'-O-DMT-2'-O,4'-C亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1969] 以相同的方式进行寡核苷酸的进一步延伸。

[1970] 在固相合成完成后,将反义寡核苷酸在浓乙醇(氨/乙醇3:1v/v)中用850μl氨在55℃处理15-16h,以从固相支持物切割反义寡核苷酸,和使硫醇基脱保护。

[1971] 接下来,使用Mono Q 10/100GL柱,通过阴离子交换色谱法纯化粗制的反义寡核苷酸。用DEPC处理的水制备缓冲液,其组成如下:缓冲液A:25mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH8.0;缓冲液B:25mM Tris-HCl,1mM EDTA,1M NaCl,pH8.0。

[1972] 实施例33

[1973] Gb[1]sTb[1]sAb[1]sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGbsAb[1]sGb[1]sC*b[1](Seq.ID No.209az)

[1974] 根据一般程序,用如实施例28所示例的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后,接受纯度为90.5％的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5442.9Da;计算值:5443.3Da。

[1975] 实施例34

[1976] Gb[1]sTb[1]sAb[1]sGb[1]sdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsGb[1]sAb[1]sGb[1]sC*b[1](Seq.ID No.209ba)

[1977] 根据一般方法,用如实施例28所示例的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后,接受纯度为89.4％的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5469.9Da;计算值:5471.3Da。

[1978] 实施例35

[1979] Gb[1]sTb[1]sAb[1]sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsdAsGb[1]sC*b[1](Seq.ID No.209bb)

[1980] 根据一般程序,用如实施例28所示例的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后,接受纯度为88.4％的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5386.5Da;计算值:5387.3Da。

[1981] 实施例36

[1982] Gb[1]Tb[1]dAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb[1]Gb[1]C*b[1](Seq.ID No.209s)

[1983] 根据实施例28和实施例29所述的方法，用适当的DNA、DNA衍生物和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为96.8％的反义寡核苷酸。ESI-MS：实验值：5323.30Da；计算值：5323.0Da。

[1984] 实施例37

[1985] $Gb^{l}sTb^{l}sdA*sdGsdTsdGsdTsdTsdTsdA*sdGsdGsdGsAb^{l}sGb^{l}sC*b^{l}$(Seq.ID No.209t)

[1986] 根据一般程序并如实施例28所述用合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受91.4％纯度的反义寡核苷酸。ESI-MS：实验值：5416.30Da；计算值：5417.3Da。

[1987] 实施例38

[1988] /5SpC3s/$Gb^{l}sTb^{l}sdAsdGsdTsdGsdTsdTsdTsdAsdGsdGsdGsAb^{l}sGb^{l}sC*b^{l}$/3SpC3s/(Seq.ID No.209x)

[1989] 根据一般程序，用实施例28、实施例30和实施例31中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为95.1％的反义寡核苷酸。ESI-MS：实验值：5696.30Da；计算值：5695.5Da。

[1990] 实施例39-132

[1991] 根据一般程序并如实施例中所示合成表6的其它寡核苷酸。以与含有β-D-氧基-LNA单元的反义寡核苷酸相同的方式进行包含β-D-硫基-LNA、α-L-氧基-LNA、β-D-(NH)-LNA或β-D-(NCH_3)-LNA单元的反义寡核苷酸的制备。

[1992] 实施例133

[1993] $Gb^{l}sC*b^{l}sTb^{l}sAb^{l}sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb^{l}sTb^{l}sTb^{l}$(Seq.ID No.210q)

[1994] 1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基胸苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后，用80μl5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基胸苷3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1995] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1996] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1997] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1998] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[1999] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2000] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2001] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2002] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2003] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步

骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2004] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2005] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2',4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2006] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基胸苷3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2007] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2008] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2009] 固相合成完成后，将反义寡核苷酸用乙腈(Biosolve BV,Valkenswaard,The Netherlands)中的20％二乙胺溶液处理20分钟。以除去磷酸酯主链上的氰基乙基保护基。

[2010] 随后，将反义寡核苷酸从固相支持物上切下，并在55℃下使用5mL浓氨水进一步脱保护16小时。通过过滤或离心从反义寡核苷酸中分离固相支持物。

[2011] 接下来，将粗制的反义寡核苷酸通过AKTA Explorer系统(GE Healthcare,Freiburg,Germany)上的阴离子交换高效液相色谱(HPLC)和填充有Source Q15(GE

Helthcare)的柱进行纯化。缓冲液A为10mM高氯酸钠,20mM Tris,1mM EDTA,pH7.4,并且含有20％乙腈,缓冲液B与缓冲液A相同,但不包括500mM高氯酸钠。采用32柱体积(CV)内15％B至55％B的梯度。记录280nm处的UV迹线。合并适当的级分并用3M NaOAc,pH＝5.2和70％乙醇沉淀。最后,用70％乙醇洗涤沉淀。

[2012] 接受纯度为87.1％的反义寡核苷酸。

[2013] ESI-MS:实验值:5384.30Da;计算值:5384.3Da。

[2014] 实施例134

[2015] $Gb^{l}C*b^{l}Tb^{l}Ab^{l}dTdTdTdGdGdTdA*dGdTGb^{l}Tb^{l}Tb^{l}$(Seq.ID No.210r)

[2016] LNA根据一般程序结合至CPG。偶联反应和封端步骤也如实施例133所述进行。封端步骤之后,用800μl乙腈冲洗该系统,并将400μl THF/吡啶/H_2O中的0.02M碘插入柱45秒。在氧化步骤后用24μl乙腈冲洗该系统。纯化后,接受95.3％纯度的反义寡核苷酸。

[2017] 实施例135

[2018] /5SpC3s/$Gb^{l}sC*b^{l}sTb^{l}sAb^{l}sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsG\ b^{l}sTb^{l}sTb^{l}$(Seq.ID No.210v)

[2019] 根据一般程序,使用如实施例133中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成该化合物。但是除了在最后一个核苷酸偶联到寡核苷酸之后,进行了后续的氧化和封端步骤,加入80μl亚磷酰胺-C3(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)。使偶联进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂。随后的步骤如实施例133所述进行。纯化后,接受纯度为93.9％的反义寡核苷酸。

[2020] 实施例136

[2021] $Gb^{l}sC*b^{l}sTb^{l}sAb^{l}sdTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb^{l}sTb^{l}sT\ b^{l}$/3SpC3s/(Seq.ID No.210w)

[2022] 3'-间隔子C3CPG(0.2μmol)用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60s以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。随后的反应如实施例133所述进行。纯化后,接受纯度为89.7％的反义寡核苷酸。

[2023] 实施例137

[2024] $Gb^{l}C*b^{l}Tb^{l}Ab^{l}dTsdTsdTsdGsdGsdTsdAsdGsdTsGb^{l}Tb^{l}Tb^{l}$(Seq.ID No.210o)

[2025] 根据一般程序,用如实施例133和实施例134中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后,接受纯度为83.8％的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5288.10Da;计算值:5287.9Da。

[2026] 实施例138

[2027] $Gb^{l}sC*b^{l}sTb^{l}sAb^{l}sdTsdTsdTdGsdGsdTsdA*sdGsdTsGb^{l}sTb^{l}sT\ b^{l}$(Seq.ID No.210p)

[2028] 根据一般程序，用如实施例133所示的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为80.7％的反义寡核苷酸。ESI-MS：实验值：5398.40Da；计算值：5399.3Da。

[2029] 实施例139

[2030] $Gb^{1}ssC*b^{1}ssTb^{1}ssdAssdTssdTssdTssdGssdGssdTssdA*ssdGssdT\ ssGb^{1}ssTb^{1}ssTb^{1}$ (Seq.ID No.210af)

[2031] 用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-胸苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后，用38μl的乙腈中10％二氯甲烷(v/V)中的5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-胸苷--3'-[(β-苯甲酰巯基))乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2032] 用38μl的乙腈中10％二氯甲烷(v/v)中的5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{2}-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2033] 以相同的方式进行寡核苷酸的进一步延伸。

[2034] 在固相合成完成后，将反义寡核苷酸在浓乙醇(氨/乙醇3:1v/v)中用850μl氨在55℃处理15-16h，以从固相支持物切割反义寡核苷酸，和使硫醇基脱保护。

[2035] 接下来，使用Mono Q 10/100GL柱，通过阴离子交换色谱法纯化粗制的反义寡核苷酸。用DEPC处理的水制备缓冲液，其组成如下：缓冲液A：25mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH8.0；缓冲液B：25mM Tris-HCl，1mM EDTA，1M NaCl，pH8.0。

[2036] 实施例140至233

[2037] 根据一般程序并如实施例中所示合成表7的其它寡核苷酸。以与含有β-D-氧基-LNA单元的反义寡核苷酸相同的方式进行包含β-D-硫基-LNA、α-L-氧基-LNA、β-D-(NH)-LNA或β-D-(NCH_3)-LNA单元的反义寡核苷酸的制备。

[2038] 实施例234

[2039] $C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sA\ b^{1}$ (Seq.ID No.218b)

[2040] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C亚甲基-N^{6}-苯甲酰腺苷-3'-O-琥珀酸酯

[2041] 将5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{6}-苯甲酰腺苷(500mg，0.73mmol)、95mg琥珀酸酐(0.95mmol，1.2当量)和116mg DMAP(0.95mmol，1.2当量)溶解在35ml二氯甲烷中。将反应在室温下搅拌过夜。将反应溶液用10ml NaH_2PO_4(0.1M，pH 5.5)洗涤2次，并用10ml盐水洗涤1次。将有机相在无水$NaSO_4$下干燥，过滤并真空浓缩干燥。得到95％产率的半酯衍生物，将

其不经进一步纯化用于下一步骤。

[2042] 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG

[2043] 将70mg半酯衍生物(90μmol)溶于0.3ml DMF中,加入11.6μl DIEA(90μmol)和pyBOP(90μmol),并混合1分钟。将该混合物在手动合成仪中与LCAA CPG(500Å,80-120筛目尺寸,300mg)混合,并在室温下搅拌1.5小时。滤出支持物并用DMF,DCM和MeOH洗涤。干燥后,测定负载量为57μmol/g。

[2044] 延伸

[2045] 用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯并氧基腺苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-胸苷3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2046] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2047] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2048] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^4-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2049] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^4-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2050] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2051] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2052] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2053] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2054] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2055] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2056] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于

封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2057] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基胸苷3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2058] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2059] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2060] 固相合成完成后，将反义寡核苷酸用乙腈(Biosolve BV，Valkenswaard，The Netherlands)中的20％二乙胺溶液处理20分钟。以除去磷酸酯主链上的氰基乙基保护基。

[2061] 随后，将反义寡核苷酸从固相支持物上切下，并在55℃下使用5mL浓氨水进一步脱保护16小时。通过过滤或离心从反义寡核苷酸中分离固相支持物。

[2062] 接下来，将粗制的反义寡核苷酸通过AKTA Explorer系统(GE Healthcare，Freiburg，Germany)上的阴离子交换高效液相色谱(HPLC)和填充有Source Q15(GE Helthcare)的柱进行纯化。缓冲液A为10mM高氯酸钠，20mM Tris，1mM EDTA，pH7.4，并且含有20％乙腈，缓冲液B与缓冲液A相同，但不包括500mM高氯酸钠。采用32柱体积(CV)内15％B至55％B的梯度。记录280nm处的UV迹线。合并适当的级分并用3M NaOAc，pH＝5.2和70％乙醇沉淀。最后，用70％乙醇洗涤沉淀。接受纯度为94.8％的反义寡核苷酸。ESI-MS：实验值：5365.80Da；计算值：5365.30Da。

[2063] 实施例235

[2064] C*b^1Ab^1Tb^1dGdAdAdTdGdGdAdCdCAb^1Gb^1Tb^1Ab^1(Seq.ID No.218r)

[2065] LNA根据一般程序结合至CPG。偶联反应和封端步骤也如实施例234所述进行。封端步骤之后，用800μl乙腈冲洗该系统，并将400μl THF/吡啶/H_2O中的0.02M碘插入柱45秒。在氧化步骤后用24μl乙腈冲洗该系统。纯化后，接受纯度为97.8％的反义寡核苷酸。ESI-MS：实验值：5125.10Da。计算值：5124.4Da。

[2066] 实施例236

[2067] /5SpC3s/C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb^{1}sG b^{1}sTb^{1}sAb^{1}(Seq.ID No.218t)

[2068] 根据一般程序,使用如实施例234中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成该化合物。但是除了在最后一个核苷酸偶联到寡核苷酸之后,进行了后续的氧化和封端步骤,加入80μl亚磷酰胺-C3(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)。使偶联进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂。随后的步骤如实施例234所述进行。纯化后,接受纯度为94.2%的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5519.60Da;计算值:5519.4Da。

[2069] 实施例237

[2070] C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sA b^{1}s/3SpC3/(Seq.ID No.218u)

[2071] 3'-间隔子C3CPG(0.2μmol)用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60s以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{6}-苯甲酰腺苷-3'-[(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。随后的反应如实施例234所述进行。纯化后,接受纯度为94.3%的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5519.10Da;计算值:5519.4Da。

[2072] 实施例238

[2073] C*b^{1}ssAb^{1}ssTb^{1}ssdGssdAssdAssdTssdGssdGssdAssdCssdCssAb^{1}ssGb^{1}ssTb^{1}ssAb^{1}(Seq.ID No.218aa)

[2074] 用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{6}-苯甲酰腺苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用38μl的乙腈中10%二氯甲烷(v/V)中的5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-胸苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2075] 用38μl的乙腈中10%二氯甲烷(v/v)中的5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{2}-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2076] 以相同的方式进行寡核苷酸的进一步延伸。

[2077] 在固相合成完成后，将反义寡核苷酸在浓乙醇(氨/乙醇3:1v/v)中用850μl氨在55℃处理15-16h，以从固相支持物切割反义寡核苷酸，和使硫醇基脱保护。

[2078] 接下来，使用Mono Q 10/100GL柱，通过阴离子交换色谱法纯化粗制的反义寡核苷酸。用DEPC处理的水制备缓冲液，其组成如下：缓冲液A:25mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH8.0；缓冲液B:25mM Tris-HCl，1mM EDTA，1M NaCl，pH8.0。

[2079] 实施例239

[2080] C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}(Seq.ID No.218m)

[2081] 根据一般程序，用如实施例234所示例的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为93.8％的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5394.00Da;计算值:5393.3Da。

[2082] 实施例240

[2083] C*b^{1}Ab^{1}Tb^{1}dGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdC*sAb^{1}Gb^{1}Tb^{1}Ab^{1}(Seq.ID No.218n)

[2084] 根据一般程序，使用如实施例234和实施例235所示例的合适的DNA结构单元和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为94.7％的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5297.30Da;计算值:5297.0Da。

[2085] 实施例241

[2086] C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdCsdCsAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}(Seq.ID No.218o)

[2087] 根据一般程序，用如实施例234所示例的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为92.8％的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5410.40Da;计算值:5410.3Da。

[2088] 实施例242

[2089] C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdA*sdA*sdTsdGsdGsdA*sdC*sdC*sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}(Seq.ID.No.218p)

[2090] 根据一般程序，使用如实施例234所示例的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为95.3％的反义寡核苷酸。ESI-MS:实验值:5437.40Da;计算值:5438.4Da。

[2091] 实施例243

[2092] C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdC*sdCsAbsGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}(Seq.ID No.218q)

[2093] 根据一般程序，使用如实施例234所示例的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为93.9％的反义寡核苷酸。ESI MS:实验值:5378.80Da;计算值:5379.3Da。

[2094] 实施例244

[2095] C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdC*sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}(Seq.ID No.218c)

[2096] 根据一般程序，用如实施例234中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为92.9％的反义寡核苷酸。ESI MS:实验值:5379.10Da;计算值:5379.3Da。

[2097] 实施例245

[2098] C*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGdAdAdTdGdGdAdC*sdC*sAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}(Seq.ID No.218s)

[2099] 根据一般程序，用如实施例234中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为94.5％的反义寡核苷酸。ESI MS：实验值：5152.70Da；计算值：5152.4Da。

[2100] 实施例246

[2101] /5SpC3/sC*b^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdGsdAsdAsdTsdGsdGsdAsdCsdCsAb^{1}sGb^{1}sTb^{1}sAb^{1}s/3SpC3/(Seq.ID No.218v)

[2102] 根据一般程序，使用如实施例234、实施例236和实施例237所示例的合适的DNA结构单元和LNA结构单元合成化合物。纯化后，接受纯度为94.4％的反义寡核苷酸。ESI MS：实验值：5673.50Da；计算值：5673.5Da

[2103] 实施例247-335

[2104] 根据一般程序和如实施例所示合成表8的其它寡核苷酸。以与含有β-D-氧基-LNA单元的反义寡核苷酸相同的方式进行包含β-D-硫基-LNA、α-L-氧基-LNA、β-D-(NH)-LNA或β-D-(NCH_3)-LNA单元的反义寡核苷酸的制备。

[2105] 实施例336

[2106] C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdAsdCsdGsdCsdGsdTsdCsdCsAb^{1}sC*b^{1}sAb^{1}(Seq.ID No.152h)

[2107] 用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{6}-苯甲酰腺苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后，用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^{4}-苯甲酰基胞苷-3'(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2108] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{6}-苯甲酰腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2109] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^{4}-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2110] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^{4}-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于

封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2111] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2112] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2113] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^4-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2114] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2115] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^4-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2116] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2117] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基胸苷3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2118] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2119] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2120] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2121] 固相合成完成后,将反义寡核苷酸用乙腈(Biosolve BV,Valkenswaard,The Netherlands)中的20%二乙胺溶液处理20分钟。以除去磷酸酯主链上的氰基乙基保护基。

[2122] 随后,将反义寡核苷酸从固相支持物上切下,并在55℃下使用5mL浓氨水进一步脱保护16小时。通过过滤或离心从反义寡核苷酸中分离固相支持物。

[2123] 接下来,将粗制的反义寡核苷酸通过AKTA Explorer系统(GE Healthcare,Freiburg,Germany)上的阴离子交换高效液相色谱(HPLC)和填充有Source Q15(GE Helthcare)的柱进行纯化。缓冲液A为10mM高氯酸钠,20mM Tris,1mM EDTA,pH7.4,并且含有20%乙腈,缓冲液B与缓冲液A相同,但不包括500mM高氯酸钠。采用32柱体积(CV)内15%B至55%B的梯度。记录280nm处的UV迹线。合并适当的级分并用3M NaOAc,pH=5.2和70%乙醇沉淀。最后,用70%乙醇洗涤沉淀。

[2124] 实施例337

[2125] C*b^1Gb^1Ab^1Tb^1dAdCdGdC*dGdTdCdC*Ab^1C*b^1Ab^1(Seq.ID No.152q)

[2126] LNA根据一般程序结合至CPG。偶联反应和封端步骤也如实施例336所述进行。封端步骤之后,用800μl乙腈冲洗该系统,并将400μl THF/吡啶/H_2O中的0.02M碘插入柱45秒。在氧化步骤后用24μl乙腈冲洗该系统。纯化后,接受纯度为93.1%的反义寡核苷酸。

[2127] 实施例338

[2128] /5SpC3s/C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdAsdC*sdGsdC*sdGsdTsdCsdCsAb^{1}sC*b^{1}sAb^1 (Seq.ID.No.152s)

[2129] 根据一般程序，使用如实施例336中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成该化合物。但是除了在最后一个核苷酸偶联到寡核苷酸之后，进行了后续的氧化和封端步骤，加入80μl亚磷酰胺-C3(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)。使偶联进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂。随后的步骤如实施例336所述进行。纯化后，接受纯度为96.5％的反义寡核苷酸。

[2130] 实施例339

[2131] C*b^{1}sGb^{1}sAb^{1}sTb^{1}sdAsdC*sdGsdCsdGsdTsdCsdC*sAb^{1}sC*b^{1}sA b^1/3SpC3s/(Seq.ID No.152t)

[2132] 3'-间隔子C3CPG(0.2μmol)用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60s以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后，用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-[(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。随后的反应如实施例336所述进行。纯化后，接受纯度为92.1％的反义寡核苷酸。

[2133] 实施例340

[2134] C*b^{1}ssGb^{1}ssAb^{1}ssdTssdAssdC*ssdGssdCssdGssdTssdCssdC*ssA b^{1}ssC*b^{1}ssAb^1 (Seq.ID No.152aa)

[2135] 用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后，用38μl的乙腈中10％二氯甲烷(v/V)中的5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2136] 用38μl的乙腈中10％二氯甲烷(v/v)中的5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2137] 以相同的方式进行寡核苷酸的进一步延伸。

[2138] 在固相合成完成后，将反义寡核苷酸在浓乙醇(氨/乙醇3:1v/v)中用850μl氨在55℃处理15-16h，以从固相支持物切割反义寡核苷酸，和使硫醇基脱保护。

[2139] 接下来，使用Mono Q 10/100GL柱，通过阴离子交换色谱法纯化粗制的反义寡核苷酸。用DEPC处理的水制备缓冲液，其组成如下：缓冲液A:25mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH8.0；缓冲液B:25mM Tris-HCl，1mM EDTA，1M NaCl，pH8.0。

[2140] 实施例341-433

[2141] 根据一般程序并如实施例所示合成表5的其它寡核苷酸。以与含有β-D-氧基-LNA单元的反义寡核苷酸相同的方式进行包含β-D-硫基-LNA、α-L-氧基-LNA、β-D-(NH)-LNA或β-D-(NCH_3)-LNA单元的反义寡核苷酸的制备。

[2142] 实施例434

[2143] C*b^1sTb^1sdCsdGsdTsdCsdAsdTsdAsdGsdAsC*b^1sC*b^1sGb^1(Seq.ID No.143h)

[2144] 用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全去除5-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后，用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2145] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2146] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2147] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2148] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2149] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2150] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2151] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^4-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2152] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2153] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2154] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^4-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于

封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2155] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基胸苷3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2156] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2157] 固相合成完成后，将反义寡核苷酸用乙腈(Biosolve BV,Valkenswaard,The Netherlands)中的20％二乙胺溶液处理20分钟。以除去磷酸酯主链上的氰基乙基保护基。

[2158] 随后，将反义寡核苷酸从固相支持物上切下，并在55℃下使用5mL浓氨水进一步脱保护16小时。通过过滤或离心从反义寡核苷酸中分离固相支持物。

[2159] 接下来，将粗制的反义寡核苷酸通过AKTA Explorer系统(GE Healthcare,Freiburg,Germany)上的阴离子交换高效液相色谱(HPLC)和填充有Source Q15(GE Helthcare)的柱进行纯化。缓冲液A为10mM高氯酸钠，20mM Tris，1mM EDTA，pH7.4，并且含有20％乙腈，缓冲液B与缓冲液A相同，但不包括500mM高氯酸钠。采用32柱体积(CV)内15％B至55％B的梯度。记录280nm处的UV迹线。合并适当的级分并用3M NaOAc，pH＝5.2和70％乙醇沉淀。最后，用70％乙醇洗涤沉淀。

[2160] 实施例435

[2161] C*b^1Tb^1dC*dGdTdCdAdTdAdGdAC*b^1C*b^1Gb^1(Seq.ID No.143ad)

[2162] LNA根据一般程序结合至CPG。偶联反应和封端步骤也如实施例434所述进行。封端步骤之后，用800μl乙腈冲洗该系统，并将400μl THF/吡啶/H_2O中的0.02M碘插入柱45秒。在氧化步骤后用24μl乙腈冲洗该系统。纯化后，接受纯度为88.7％的反义寡核苷酸。

[2163] 实施例436

[2164] /5SpC3s/C*b^1sTb^1sdC*dGdTdC*dA*dTdAdGdA*sC*b^1sC*b^1sGb^1(Seq.ID No.143af)

[2165] 根据一般程序，用如实施例434和实施例435中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成该化合物。但是除了在最后一个核苷酸偶联到寡核苷酸之后，进行了后续的氧化和封端步骤，加入80μl亚磷酰胺-C3(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)。使偶联进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂。随后的步骤如实施例434和实施例435所述进行。纯化后，接受纯度为94.4％的反义寡核苷酸。

[2166] 实施例437

[2167] C*b^1sTb^1sdC*dGdTdC*dA*dTdAdGdA*sC*b^1sC*b^1sGb^1/3SpC3s/(Seq.ID No.143ag)

[2168] 3'-间隔子C3CPG(0.2μmol)用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60s以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基))-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。随后的反应如实施例434和实施例435所述进行。纯化后,接受纯度为91.6%的反义寡核苷酸。

[2169] 实施例438

[2170] C*b^1ssTb^1ssC*b^1ssdGssdTssdC*ssdAssdTssdAssdGssdAssC*b^1ssC*b^1ssGb^1 (Seq.ID No.143t)

[2171] 用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用38μl的乙腈中10%二氯甲烷(v/V)中的5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2172] 用38μl的乙腈中10%二氯甲烷(v/v)中的5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2173] 以相同的方式进行寡核苷酸的进一步延伸。

[2174] 在固相合成完成后,将反义寡核苷酸在浓乙醇(氨/乙醇3:1v/v)中用850μl氨在55℃处理15-16h,以从固相支持物切割反义寡核苷酸,和使硫醇基脱保护。

[2175] 接下来,使用Mono Q 10/100GL柱,通过阴离子交换色谱法纯化粗制的反义寡核苷酸。用DEPC处理的水制备缓冲液,其组成如下:缓冲液A:25mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH8.0;缓冲液B:25mM Tris-HCl,1mM EDTA,1M NaCl,pH8.0。

[2176] 实施例439-534

[2177] 根据一般程序并如实施例中所示合成表4的其它寡核苷酸。以与含有β-D-氧基-LNA单元的反义寡核苷酸相同的方式进行包含β-D-硫基-LNA、α-L-氧基-LNA、β-D-(NH)-LNA或β-D-(NCH_3)-LNA单元的反义寡核苷酸的制备。

[2178] 实施例535

[2179] C*b[1]sAb[1]sGb[1]sdGsdCsdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb[1]sTb[1]sGb[1](Seq.ID No.213k)

[2180] 用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全去除5-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基胸苷3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2181] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2182] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2183] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2184] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2185] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％

三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2186] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2187] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2188] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2189] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-脱氧胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2190] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^6-苯甲酰基-2'-脱氧腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2191] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^4-苯甲酰基-2'-脱氧胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2192] 偶联用80μl 5'-O-DMT-N^2-异丁酰基-2'-脱氧鸟苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒,用800μl乙

腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2193] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^2-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2194] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^6-苯甲酰腺苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2195] 偶联用80μl 5'-O-DMT-2'-O-,4'-C-亚甲基-5-甲基-N^4-苯甲酰基胞苷-3'-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行。使偶联反应进行250秒，用800μl乙腈冲掉过量试剂，将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤，加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1)，使其反应45秒。在该循环结束时，系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3％三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2196] 固相合成完成后，将反义寡核苷酸用乙腈(Biosolve BV,Valkenswaard,The Netherlands)中的20％二乙胺溶液处理20分钟。以除去磷酸酯主链上的氰基乙基保护基。

[2197] 随后，将反义寡核苷酸从固相支持物上切下，并在55℃下使用5mL浓氨水进一步脱保护16小时。通过过滤或离心从反义寡核苷酸中分离固相支持物。

[2198] 接下来，将粗制的反义寡核苷酸通过AKTA Explorer系统(GE Healthcare,Freiburg,Germany)上的阴离子交换高效液相色谱(HPLC)和填充有Source Q15(GE Helthcare)的柱进行纯化。缓冲液A为10mM高氯酸钠，20mM Tris，1mM EDTA，pH7.4，并且含有20％乙腈，缓冲液B与缓冲液A相同，但不包括500mM高氯酸钠。采用32柱体积(CV)内15％B至55％B的梯度。记录280nm处的UV迹线。合并适当的级分并用3M NaOAc，pH＝5.2和70％乙醇沉淀。最后，用70％乙醇洗涤沉淀。

[2199] 实施例536

[2200] C*b^1Ab^1Gb^1dGdC*dAdTdTdAdAdTdAdAdAGb^1Tb^1Gb^1(Seq.ID No.213n)

[2201] LNA根据一般程序结合至CPG。偶联反应和封端步骤也如实施例535所述进行。封端步骤之后，用800μl乙腈冲洗该系统，并将400μl THF/吡啶/H_2O中的0.02M碘插入柱45秒。在氧化步骤后用24μl乙腈冲洗该系统。纯化后，以91.4％的纯度接受反义寡核苷酸。

[2202] 实施例537

[2203] /5SpC3s/C*b^1sAb^1sGb^1sdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb^1sTb^1sGb^1

(Seq.ID No.213o)

[2204] 根据一般程序,使用如实施例535中举例说明的合适的DNA和LNA结构单元合成该化合物。但是除了在最后一个核苷酸偶联到寡核苷酸之后,进行了后续的氧化和封端步骤,加入80μl亚磷酰胺-C3(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)。使偶联进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂。随后的步骤如实施例535所述进行。纯化后,接受纯度为87.1%的反义寡核苷酸。

[2205] 实施例538

[2206] C*b^{l}sAb^{l}sGb^{l}sdGsdC*sdAsdTsdTsdAsdAsdTsdAsdAsdAsGb^{l}sTb^{l}sGb^{l}/3SpC3s/(Seq.ID No.213p)

[2207] 3'-间隔子C3CPG(0.2μmol)用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60s以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用80μl 5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{2}-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(2-氰基乙基))-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺(0.07M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将640μl Beaucage(0.2M)插入柱中180s。用320μl乙腈冲洗该系统。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。随后的反应如实施例535所述进行。纯化后,接受纯度为95.7%的反义寡核苷酸。

[2208] 实施例539

[2209] C*b^{l}ssAb^{l}ssGb^{l}ssdGssdC*ssdAssdTssdTssdAssdAssdTssdAssdAssAb^{l}ssGb^{l}ssTb^{l}ssGb^{l}(Seq.ID No.213ae)

[2210] 用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{2}-二甲基甲脒鸟苷-3'-O-琥珀酰基连接的LCAA CPG(0.2μmol)60秒以完全除去5'-DMT保护基团。用总量800μl乙腈多次洗涤后,用38μl的乙腈中10%二氯甲烷(v/V)中的5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-胸苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2211] 用38μl的乙腈中10%二氯甲烷(v/v)中的5'-O-DMT-2'-O,4'-C-亚甲基-N^{2}-二甲基甲脒鸟苷-3'-[(β-苯甲酰巯基)乙基]吡咯烷基硫代亚磷酰胺(0.15M)和236μl乙腈中的DCI(0.25M)进行偶联反应。使偶联反应进行250秒,用800μl乙腈冲掉过量试剂,将900μl DDTT(吡啶/乙腈4:1v/v中的0.05M)插入柱中240s。该系统用320μl乙腈冲洗。对于封端步骤,加入448μl THF中的乙酸酐(1:9v/v)和448μl N-甲基咪唑(NMI)/THF/吡啶(1:8:1),使其反应45秒。在该循环结束时,系统用480μl乙腈洗涤。该化合物用1400μl二氯甲烷中的3%三氯乙酸处理60秒以完全除去5'-DMT保护基团。

[2212] 以相同的方式进行寡核苷酸的进一步延伸。

[2213] 在固相合成完成后,将反义寡核苷酸在浓乙醇(氨/乙醇3:1v/v)中用850μl氨在55

℃处理15-16h,以从固相支持物切割反义寡核苷酸,和使硫醇基脱保护。

[2214] 接下来,使用Mono Q 10/100GL柱,通过阴离子交换色谱法纯化粗制的反义寡核苷酸。用DEPC处理的水制备缓冲液,其组成如下:缓冲液A:25mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH8.0;缓冲液B:25mM Tris-HCl,1mM EDTA,1M NaCl,pH8.0。

[2215] 实施例540-640

[2216] 根据一般程序并如实施例所示合成表9的其它寡核苷酸。以与含有β-D-氧基-LNA单元的反义寡核苷酸相同的方式进行包含β-D-硫基-LNA、α-L-氧基-LNA、β-D-(NH)-LNA或β-D-(NCH_3)-LNA单元的反义寡核苷酸的制备。

[2217] 序列表

[2218] Seq.ID No.1:智人转化生长因子,β受体II(TGFBR2),转录变体2(反义;DNA码)

[2219]

```
TTTAGCTACT AGGAATGGGA ACAGGAGGCA GGATGCTCAC CTGAGTATTT TGCTTTATTC      60
AATCTAATAA ACATTTTATT TATGTAAAAG ACAAACAATG CATAGAATAA AAATAAGTGC     120
TTGAGACTTT TGATATAAAA AGAGTATATA GCATTCACAT TCCTATTTTA ATACATGAGT     180
ACAGCTGAAG TGTTCCATAA AAGAATAAAA CTTTCCCTTT ATGTATAGTA GTGAAAAAAG     240
TCAGTATTTT TAGGAACTAC AGAATGTTAT TCCTTGGTCT TTTTTCTTGA ATAAGAAAAA     300
AAAACATAAA CAAAACAAGC CACAGTATCC TCTGACACTA CATTCCAGTT TATGCTGATA     360
ACCCAGAAGT GAGAATACTC TTGAATCTTG AATATCTCAT GAATGGACCA GTATTCTAGA     420
AACTCACCAC TAGAGGTCAA TGGGCAACAG CTATTGGGAT GGTATCAGCA TGCCCTACGG     480
TGCAAGTGGA ATTTCTAGGC GCCTCTATGC TACTGCAGCC ACACTGTCTT TAACTCTCAG     540
CCCACCCACA CTGAGGAGGG TGCCTAGAGG TTCTATTTCC AAACCTTTGC ATGTATCTTA     600
AAAATCTCAA TAAAATGAGA CCTTCCACCA TCCAAACAGA GCTGATATTC TCACTACCAG     660
TCCCTCTCTA ATATTCCTAT TTGGCTGAAA ATAAGTAGCT TCAAAAAGTT TTAAAAAAGA     720
GATTACTTGC AGCATTAACA CTTCTTTGTT GATTAACAAG TTTCCTATGG AGTTTTAAAG     780
CTCATACTTT GTTCTTGTCC TTGTGGACAC AAATTTTCTA ACTGCAAATG GGACCTTTGT     840
GTCCCACATT CAAATCCTCT CTAGTAATTT CTGCAAAGGT TGAGAAGGCT GGCATGATGG     900
AGAGAACGGT AACCATGAGG AAAGCTTCTT GGAGTAAAGC ACTCCTCTCT CCAATGCAGA     960
GGGTAAAACT ATTAACATAT AAGCAAAAGA AACTTGGGCT AACTGAGACC CTTAAAGGAG    1020
TTCCCCTTTA GTCCAATAAA AGGCCAACTT CAAATCTTAA CACCAGATAA GGTAGTCAAA    1080
ATCATATTAT ATACCCAGAG AATGACTGCT TGAATGGACA TTTCTTACAA GGGACCTTGG    1140
TTAGGTGCAG ATTTAATTCC TAGACTGGGG TCCAGGTAGG CAGTGGAAAG AGCTAATGTT    1200
TACAGTGAGA AGTGAGGCAG CTTTGTAAGT GTCTCCACAC CTTCACATTT TGTGAACGTG    1260
GACTGGAGAT AACTGAAAAC CATCTGCTAT CCTTACCTGG GGATCCAGAT TTTCCTGCAA    1320
AATCTCCAAA TATTTATAAA GTGGCTTCAC TTTTTGAAAC GCTGTGCTGA CCAAACAAAA    1380
CATATGTTTA GAGTGCCTGA GGTCATAGTC CTGACAATGA TAGTATTGTG TAGTTGAAAT    1440
CCTCTTCATC AGGCCAAACT GTGCTTGAGC AATCAGGAGC CCAGAAAGAT GGAACCCATT    1500
GGTGTTTGTA TAGAAAACTA GAAAATCAAG TCAAGTGTAA TGAAAAAGTA AACACGATAA    1560
AGCCTAGAGT GAGAATTTGC TCCTTTTTAG AAAAGGATGA AGGCTGGGAG CAGAGAATAG    1620
TAACATAAGT GCAGGGGAAA GATGAAAAAA AGAACAATTT TTCATTAGTA GATGGTGGGG    1680
CAATCGCATG GATGGGGACA TCTGTTCTGA TTTTTCTGCA ACCCATGAAG GTAAAAAGTG    1740
GGGTTCAAAA CATTCAAGGT ATTAAAGATG GGGTAGAGTT TCTAAACTAG GTTGAGGGAG    1800
AGTTTCTAAA CTAGCCCCCC AGATTTGGGG CTTGGAGCTT AAATGAAAAG TCCAGGAGAA    1860
ATAAGGGCAC ACAGGAACCC CGGGAACACT GGTCCTCAAA CAGTGCCACT GTACTTAGTT    1920
CCATGGCCAG AAGAGAAGTG CTAGGCAGGG AATGATTATT TTGCAAAAGC AAGTGCAATG    1980
TGGTCATAGC TGGCTGTGAG ACATGGAGCC TCTTTCCTCA TGCAAAGTTC ACTGTTTTAC    2040
AGTCAGAGAA CCACTGCATG TGTGATTGTC AAATGCTAAT GCTGTCATGG GTCCCTTCCT    2100
TCTCTGCTTG GTTCTGGAGT TCTCCAATAA AACCAATTTC CTGGGAATAT TTGATGTTTT    2160
```

[2220]

```
TCCTTGTCTC TTTTCAAGGT ATGGCTATAT ATATAGAGCT ATAGACATAT ATAGATATAT     2220
ATATATATAT ATAAAACATA GCTATTCATA TTTATATACA GGCATTAATA AAGTGCAAAT     2280
GTTATTGGCT ATTGTAAAAA TCAATCTCAT TTCCTGAGGA AGTGCTAACA CAGCTTATCC     2340
TATGACAATG TCAAAGGCAT AGAATGCTCT ATGTCACCCA CTCCCTGCTG CTGTTGTTTC     2400
TGCTTATCCC CACAGCTTAC AGGGAGGGGA GTGACCCCCT TGGTTTTCCA GGAAGCATCA     2460
GTTCAGGGGC AGCTTCCTGC TGCCTCTGTT CTTTGGTGAG AGGGGCAGCC TCTTTGGACA     2520
TGGCCCAGCC TGCCCCAGAA GAGCTATTTG GTAGTGTTTA GGGAGCCGTC TTCAGGAATC     2580
TTCTCCTCCG AGCAGCTCCT CCCCGAGAGC CTGTCCAGAT GCTCCAGCTC ACTGAAGCGT     2640
TCTGCCACAC ACTGGGCTGT GAGACGGGCC TCTGGGTCGT GGTCCCAGCA CTCAGTCAAC     2700
GTCTCACACA CCATCTGGAT GCCCTGGTGG TTGAGCCAGA AGCTGGGAAT TTCTGGTCGC     2760
CCTCGATCTC TCAACACGTT GTCCTTCATG CTTTCGACAC AGGGGTGCTC CCGCACCTTG     2820
GAACCAAATG GAGGCTCATA ATCTTTTACT TCTCCCACTG CATTACAGCG AGATGTCATT     2880
TCCCAGAGCA CCAGAGCCAT GGAGTAGACA TCGGTCTGCT TGAAGGACTC AACATTCTCC     2940
AAATTCATCC TGGATTCTAG GACTTCTGGA GCCATGTATC TTGCAGTTCC CACCTGCCCA     3000
CTGTTAGCCA GGTCATCCAC AGACAGAGTA GGGTCCAGAC GCAGGGAAAG CCCAAAGTCA     3060
CACAGGCAGC AGGTTAGGTC GTTCTTCACG AGGATATTGG AGCTCTTGAG GTCCCTGTGC     3120
ACGATGGGCA TCTTGGGCCT CCCACATGGA GTGTGATCAC TGTGGAGGTG AGCAATCCCC     3180
CGGGCGAGGG AGCTGCCCAG CTTGCGCAGG TCCTCCCAGC TGATGACATG CCGCGTCAGG     3240
TACTCCTGTA GGTTGCCCTT GGCGTGGAAG GCGGTGATCA GCCAGTATTG TTTCCCCAAC     3300
TCCGTCTTCC GCTCCTCAGC CGTCAGGAAC TGGAGTATGT TCTCATGCTT CAGATTGATG     3360
TCTGAGAAGA TGTCCTTCTC TGTCTTCCAA GAGGCATACT CCTCATAGGG AAAGATCTTG     3420
ACTGCCACTG TCTCAAACTG CTCTGAAGTG TTCTGCTTCA GCTTGGCCTT ATAGACCTCA     3480
GCAAAGCGAC CTTTCCCCAC CAGGGTGTCC AGCTCAATGG GCAGCAGCTC TGTGTTGTGG     3540
TTGATGTTGT TGGCACACGT GGAGCTGATG TCAGAGCGGT CATCTTCCAG GATGATGGCA     3600
CAGTGCTCGC TGAACTCCAT GAGCTTCCGC GTCTTGCCGG TTTCCCAGGT TGAACTCAGC     3660
TTCTGCTGCC GGTTAACGCG GTAGCAGTAG AAGATGATGA TGACAGATAT GGCAACTCCC     3720
AGTGGTGGCA GGAGGCTGAT GCCTGTCACT TGAAATATGA CTAGCAACAA GTCAGGATTG     3780
CTGGTGTTAT ATTCTTCTGA GAAGATGATG TTGTCATTGC ACTCATCAGA GCTACAGGAA     3840
CACATGAAGA AAGTCTCACC AGGCTTTTTT TTTTCCTTCA TAATGCACTT TGGAGAAGCA     3900
GCATCTTCCA GAATAAAGTC ATGGTAGGGG AGCTTGGGGT CATGGCAAAC TGTCTCTAGT     3960
GTTATGTTCT CGTCATTCTT TCTCCATACA GCCACACAGA CTTCCTGTGG CTTCTCACAG     4020
ATGGAGGTGA TGCTGCAGTT GCTCATGCAG GATTTCTGGT TGTCACAGGT GGAAAATCTC     4080
ACATCACAAA ATTTACACAG TTGTGGAAAC TTGACTGCAC CGTTGTTGTC AGTGACTATC     4140
ATGTCGTTAT TAACCGACTT CTGAACGTGC GGTGGGATCG TGCTGGCGAT ACGCGTCCAC     4200
AGGACGATGT GCAGCGGCCA CAGGCCCCTG AGCAGCCCCC GACCCATGGC AGACCCCGCT     4260
GCTCGTCATA GACCGAGCCC CCAGCGCAGC GGACGGCGCC TTCCCGGACC CCTGGCTGCG     4320
CCTCCGCGCC GCGCCCTCTC CGGACCCCGC GCCGGGCCGG CAGCGCAGAT GTGCGGGCCA     4380
GATGTGGCGC CCGCTCGCCA GCCAGGAGGG GGCCTGGAGG CCGGCGAGGC GCGGGGAGGC     4440
CCCCGGCGGC CGAGGGAAGC TGCACAGGAG TCCGGCTCCT GTCCCGAGCG GGTGCACGCG     4500
CGGGGGTGTC GTCGCTCCGT GCGCGCGAGT GACTCACTCA ACTTCAACTC AGCGCTGCGG     4560
GGGAAACAGG AAACTCCTCG CCAACAGCTG GGCAGGACCT CTCTCCGCCC GAGAGCCTTC     4620
TCCCTCTCC                                                             4629
```

[2221] Seq.ID No.2:智人转化生长因子,β受体II(TGFBR2),转录变体2,mRNA(有义;按DNA码书写)

[2222]

```
GGAGAGGGAG AAGGCTCTCG GGCGGAGAGA GGTCCTGCCC AGCTGTTGGC GAGGAGTTTC      60
CTGTTTCCCC CGCAGCGCTG AGTTGAAGTT GAGTGAGTCA CTCGCGCGCA CGGAGCGACG     120
ACACCCCCGC GCGTGCACCC GCTCGGGACA GGAGCCGGAC TCCTGTGCAG CTTCCCTCGG     180
CCGCCGGGGG CCTCCCCGCG CCTCGCCGGC CTCCAGGCCC CCTCCTGGCT GGCGAGCGGG     240
CGCCACATCT GGCCCGCACA TCTGCGCTGC CGGCCCGGCG CGGGGTCCGG AGAGGGCGCG     300
GCGCGGAGGC GCAGCCAGGG GTCCGGGAAG GCGCCGTCCG CTGCGCTGGG GGCTCGGTCT     360
ATGACGAGCA GCGGGGTCTG CCATGGGTCG GGGGCTGCTC AGGGGCCTGT GGCCGCTGCA     420
CATCGTCCTG TGGACGCGTA TCGCCAGCAC GATCCCACCG CACGTTCAGA AGTCGGTTAA     480
TAACGACATG ATAGTCACTG ACAACAACGG TGCAGTCAAG TTTCCACAAC TGTGTAAATT     540
TTGTGATGTG AGATTTTCCA CCTGTGACAA CCAGAAATCC TGCATGAGCA ACTGCAGCAT     600
CACCTCCATC TGTGAGAAGC CACAGGAAGT CTGTGTGGCT GTATGGAGAA AGAATGACGA     660
GAACATAACA CTAGAGACAG TTTGCCATGA CCCCAAGCTC CCCTACCATG ACTTTATTCT     720
GGAAGATGCT GCTTCTCCAA AGTGCATTAT GAAGGAAAAA AAAAAGCCTG GTGAGACTTT     780
CTTCATGTGT TCCTGTAGCT CTGATGAGTG CAATGACAAC ATCATCTTCT CAGAAGAATA     840
TAACACCAGC AATCCTGACT TGTTGCTAGT CATATTTCAA GTGACAGGCA TCAGCCTCCT     900
GCCACCACTG GGAGTTGCCA TATCTGTCAT CATCATCTTC TACTGCTACC GCGTTAACCG     960
GCAGCAGAAG CTGAGTTCAA CCTGGGAAAC CGGCAAGACG CGGAAGCTCA TGGAGTTCAG    1020
CGAGCACTGT GCCATCATCC TGGAAGATGA CCGCTCTGAC ATCAGCTCCA CGTGTGCCAA    1080
CAACATCAAC CACAACACAG AGCTGCTGCC CATTGAGCTG GACACCCTGG TGGGGAAAGG    1140
TCGCTTTGCT GAGGTCTATA AGGCCAAGCT GAAGCAGAAC ACTTCAGAGC AGTTTGAGAC    1200
AGTGGCAGTC AAGATCTTTC CCTATGAGGA GTATGCCTCT TGGAAGACAG AGAAGGACAT    1260
CTTCTCAGAC ATCAATCTGA AGCATGAGAA CATACTCCAG TTCCTGACGG CTGAGGAGCG    1320
GAAGACGGAG TTGGGGAAAC AATACTGGCT GATCACCGCC TTCCACGCCA AGGGCAACCT    1380
ACAGGAGTAC CTGACGCGGC ATGTCATCAG CTGGGAGGAC CTGCGCAAGC TGGGCAGCTC    1440
CCTCGCCCGG GGGATTGCTC ACCTCCACAG TGATCACACT CCATGTGGGA GGCCCAAGAT    1500
GCCCATCGTG CACAGGGACC TCAAGAGCTC CAATATCCTC GTGAAGAACG ACCTAACCTG    1560
CTGCCTGTGT GACTTTGGGC TTTCCCTGCG TCTGGACCCT ACTCTGTCTG TGGATGACCT    1620
GGCTAACAGT GGGCAGGTGG GAACTGCAAG ATACATGGCT CCAGAAGTCC TAGAATCCAG    1680
GATGAATTTG GAGAATGTTG AGTCCTTCAA GCAGACCGAT GTCTACTCCA TGGCTCTGGT    1740
GCTCTGGGAA ATGACATCTC GCTGTAATGC AGTGGGAGAA GTAAAAGATT ATGAGCCTCC    1800
ATTTGGTTCC AAGGTGCGGG AGCACCCCTG TGTCGAAAGC ATGAAGGACA ACGTGTTGAG    1860
AGATCGAGGG CGACCAGAAA TTCCCAGCTT CTGGCTCAAC CACCAGGGCA TCCAGATGGT    1920
GTGTGAGACG TTGACTGAGT GCTGGGACCA CGACCCAGAG GCCCGTCTCA CAGCCCAGTG    1980
TGTGGCAGAA CGCTTCAGTG AGCTGGAGCA TCTGGACAGG CTCTCGGGGA GGAGCTGCTC    2040
GGAGGAGAAG ATTCCTGAAG ACGGCTCCCT AAACACTACC AAATAGCTCT TCTGGGGCAG    2100
GCTGGGCCAT GTCCAAAGAG GCTGCCCCTC TCACCAAAGA ACAGAGGCAG CAGGAAGCTG    2160
```

[2223]

```
CCCCTGAACT GATGCTTCCT GGAAAACCAA GGGGGTCACT CCCCTCCCTG TAAGCTGTGG  2220
GGATAAGCAG AAACAACAGC AGCAGGGAGT GGGTGACATA GAGCATTCTA TGCCTTTGAC  2280
ATTGTCATAG GATAAGCTGT GTTAGCACTT CCTCAGGAAA TGAGATTGAT TTTTACAATA  2340
GCCAATAACA TTTGCACTTT ATTAATGCCT GTATATAAAT ATGAATAGCT ATGTTTTATA  2400
TATATATATA TATATCTATA TATGTCTATA GCTCTATATA TATAGCCATA CCTTGAAAAG  2460
AGACAAGGAA AAACATCAAA TATTCCCAGG AAATTGGTTT TATTGGAGAA CTCCAGAACC  2520
AAGCAGAGAA GGAAGGGACC CATGACAGCA TTAGCATTTG ACAATCACAC ATGCAGTGGT  2580
TCTCTGACTG TAAAACAGTG AACTTTGCAT GAGGAAAGAG GCTCCATGTC TCACAGCCAG  2640
CTATGACCAC ATTGCACTTG CTTTTGCAAA ATAATCATTC CCTGCCTAGC ACTTCTCTTC  2700
TGGCCATGGA ACTAAGTACA GTGGCACTGT TTGAGGACCA GTGTTCCCGG GGTTCCTGTG  2760
TGCCCTTATT TCTCCTGGAC TTTTCATTTA AGCTCCAAGC CCCAAATCTG GGGGGCTAGT  2820
TTAGAAACTC TCCCTCAACC TAGTTTAGAA ACTCTACCCC ATCTTTAATA CCTTGAATGT  2880
TTTGAACCCC ACTTTTTACC TTCATGGGTT GCAGAAAAAT CAGAACAGAT GTCCCCATCC  2940
ATGCGATTGC CCCACCATCT ACTAATGAAA AATTGTTCTT TTTTTCATCT TTCCCCTGCA  3000
CTTATGTTAC TATTCTCTGC TCCCAGCCTT CATCCTTTTC TAAAAAGGAG CAAATTCTCA  3060
CTCTAGGCTT TATCGTGTTT ACTTTTTCAT TACACTTGAC TTGATTTTCT AGTTTTCTAT  3120
ACAAACACCA ATGGGTTCCA TCTTTCTGGG CTCCTGATTG CTCAAGCACA GTTTGGCCTG  3180
ATGAAGAGGA TTTCAACTAC ACAATACTAT CATTGTCAGG ACTATGACCT CAGGCACTCT  3240
AAACATATGT TTTGTTTGGT CAGCACAGCG TTTCAAAAAG TGAAGCCACT TTATAAATAT  3300
TTGGAGATTT TGCAGGAAAA TCTGGATCCC CAGGTAAGGA TAGCAGATGG TTTTCAGTTA  3360
TCTCCAGTCC ACGTTCACAA AATGTGAAGG TGTGGAGACA CTTACAAAGC TGCCTCACTT  3420
CTCACTGTAA ACATTAGCTC TTTCCACTGC CTACCTGGAC CCCAGTCTAG GAATTAAATC  3480
TGCACCTAAC CAAGGTCCCT TGTAAGAAAT GTCCATTCAA GCAGTCATTC TCTGGGTATA  3540
TAATATGATT TTGACTACCT TATCTGGTGT TAAGATTTGA AGTTGGCCTT TTATTGGACT  3600
AAAGGGGAAC TCCTTTAAGG GTCTCAGTTA GCCCAAGTTT CTTTTGCTTA TATGTTAATA  3660
GTTTTACCCT CTGCATTGGA GAGAGGAGTG CTTTACTCCA AGAAGCTTTC CTCATGGTTA  3720
CCGTTCTCTC CATCATGCCA GCCTTCTCAA CCTTTGCAGA AATTACTAGA GAGGATTTGA  3780
ATGTGGGACA CAAAGGTCCC ATTTGCAGTT AGAAAATTTG TGTCCACAAG GACAAGAACA  3840
AAGTATGAGC TTTAAAACTC CATAGGAAAC TTGTTAATCA ACAAAGAAGT GTTAATGCTG  3900
CAAGTAATCT CTTTTTTAAA ACTTTTTGAA GCTACTTATT TTCAGCCAAA TAGGAATATT  3960
AGAGAGGGAC TGGTAGTGAG AATATCAGCT CTGTTTGGAT GGTGGAAGGT CTCATTTTAT  4020
TGAGATTTTT AAGATACATG CAAAGGTTTG GAAATAGAAC CTCTAGGCAC CCTCCTCAGT  4080
GTGGGTGGGC TGAGAGTTAA AGACAGTGTG GCTGCAGTAG CATAGAGGCG CCTAGAAATT  4140
CCACTTGCAC CGTAGGGCAT GCTGATACCA TCCCAATAGC TGTTGCCCAT TGACCTCTAG  4200
TGGTGAGTTT CTAGAATACT GGTCCATTCA TGAGATATTC AAGATTCAAG AGTATTCTCA  4260
CTTCTGGGTT ATCAGCATAA ACTGGAATGT AGTGTCAGAG GATACTGTGG CTTGTTTTGT  4320
TTATGTTTTT TTTTCTTATT CAAGAAAAAA GACCAAGGAA TAACATTCTG TAGTTCCTAA  4380
AAATACTGAC TTTTTTCACT ACTATACATA AAGGGAAAGT TTTATTCTTT TATGGAACAC  4440
TTCAGCTGTA CTCATGTATT AAAATAGGAA TGTGAATGCT ATATACTCTT TTTATATCAA  4500
AAGTCTCAAG CACTTATTTT TATTCTATGC ATTGTTTGTC TTTTACATAA ATAAAATGTT  4560
TATTAGATTG AATAAAGCAA AATACTCAGG TGAGCATCCT GCCTCCTGTT CCCATTCCTA  4620
GTAGCTAAA                                                          4629
```

[2224] Seq.ID No.3:智人转化生长因子,β受体II(TGFBR2),转录变体2,mRNA(有义;按RNA码书写)

[2225]

GGAGAGGGAG AAGGCUCUCG GGCGGAGAGA GGUCCUGCCC AGCUGUUGGC GAGGAGUUUC 60
CUGUUUCCCC CGCAGCGCUG AGUUGAAGUU GAGUGAGUCA CUCGCGCGCA CGGAGCGACG 120
ACACCCCCGC GCGUGCACCC GCUCGGGACA GGAGCCGGAC UCCUGUGCAG CUUCCCUCGG 180
CCGCCGGGGG CCUCCCCGCG CCUCGCCGGC CUCCAGGCCC CCUCCUGGCU GGCGAGCGGG 240
CGCCACAUCU GGCCCGCACA UCUGCGCUGC CGGCCCGGCG CGGGGUCCGG AGAGGGCGCG 300
GCGCGGAGGC GCAGCCAGGG GUCCGGGAAG GCGCCGUCCG CUGCGCUGGG GGCUCGGUCU 360
AUGACGAGCA GCGGGGUCUG CCAUGGGUCG GGGGCUGCUC AGGGGCCUGU GGCCGCUGCA 420
CAUCGUCCUG UGGACGCGUA UCGCCAGCAC GAUCCCACCG CACGUUCAGA AGUCGGUUAA 480
UAACGACAUG AUAGUCACUG ACAACAACGG UGCAGUCAAG UUUCCACAAC UGUGUAAAUU 540
UUGUGAUGUG AGAUUUUCCA CCUGUGACAA CCAGAAAUCC UGCAUGAGCA ACUGCAGCAU 600
CACCUCCAUC UGUGAGAAGC CACAGGAAGU CUGUGUGGCU GUAUGGAGAA AGAAUGACGA 660
GAACAUAACA CUAGAGACAG UUUGCCAUGA CCCCAAGCUC CCCUACCAUG ACUUUAUUCU 720
GGAAGAUGCU GCUUCUCCAA AGUGCAUUAU GAAGGAAAAA AAAAAGCCUG GUGAGACUUU 780
CUUCAUGUGU UCCUGUAGCU CUGAUGAGUG CAAUGACAAC AUCAUCUUCU CAGAAGAAUA 840
UAACACCAGC AAUCCUGACU UGUUGCUAGU CAUAUUUCAA GUGACAGGCA UCAGCCUCCU 900
GCCACCACUG GGAGUUGCCA UAUCUGUCAU CAUCAUCUUC UACUGCUACC GCGUUAACCG 960
GCAGCAGAAG CUGAGUUCAA CCUGGGAAAC CGGCAAGACG CGGAAGCUCA UGGAGUUCAG 1020
CGAGCACUGU GCCAUCAUCC UGGAAGAUGA CCGCUCUGAC AUCAGCUCCA CGUGUGCCAA 1080
CAACAUCAAC CACAACACAG AGCUGCUGCC CAUUGAGCUG GACACCCUGG UGGGGAAAGG 1140
UCGCUUUGCU GAGGUCUAUA AGGCCAAGCU GAAGCAGAAC ACUUCAGAGC AGUUUGAGAC 1200
AGUGGCAGUC AAGAUCUUUC CCUAUGAGGA GUAUGCCUCU UGGAAGACAG AGAAGGACAU 1260
CUUCUCAGAC AUCAAUCUGA AGCAUGAGAA CAUACUCCAG UUCCUGACGG CUGAGGAGCG 1320
GAAGACGGAG UUGGGGAAAC AAUACUGGCU GAUCACCGCC UUCCACGCCA AGGGCAACCU 1380
ACAGGAGUAC CUGACGCGGC AUGUCAUCAG CUGGGAGGAC CUGCGCAAGC UGGGCAGCUC 1440
CCUCGCCCGG GGGAUUGCUC ACCUCCACAG UGAUCACACU CCAUGUGGGA GGCCCAAGAU 1500
GCCCAUCGUG CACAGGGACC UCAAGAGCUC CAAUAUCCUC GUGAAGAACG ACCUAACCUG 1560
CUGCCUGUGU GACUUUGGGC UUUCCCUGCG UCUGGACCCU ACUCUGUCUG UGGAUGACCU 1620
GGCUAACAGU GGGCAGGUGG GAACUGCAAG AUACAUGGCU CCAGAAGUCC UAGAAUCCAG 1680
GAUGAAUUUG GAGAAUGUUG AGUCCUUCAA GCAGACCGAU GUCUACUCCA UGGCUCUGGU 1740
GCUCUGGGAA AUGACAUCUC GCUGUAAUGC AGUGGGAGAA GUAAAAGAUU AUGAGCCUCC 1800
AUUUGGUUCC AAGGUGCGGG AGCACCCCUG UGUCGAAAGC AUGAAGGACA ACGUGUUGAG 1860
AGAUCGAGGG CGACCAGAAA UUCCCAGCUU CUGGCUCAAC CACCAGGGCA UCCAGAUGGU 1920
GUGUGAGACG UUGACUGAGU GCUGGGACCA CGACCCAGAG GCCCGUCUCA CAGCCCAGUG 1980
UGUGGCAGAA CGCUUCAGUG AGCUGGAGCA UCUGGACAGG CUCUCGGGGA GGAGCUGCUC 2040
GGAGGAGAAG AUUCCUGAAG ACGGCUCCCU AAACACUACC AAAUAGCUCU UCUGGGGCAG 2100
GCUGGGCCAU GUCCAAAGAG GCUGCCCCUC UCACCAAAGA ACAGAGGCAG CAGGAAGCUG 2160

[2226]

CCCCUGAACU GAUGCUUCCU GGAAAACCAA GGGGGUCACU CCCCUCCCUG UAAGCUGUGG 2220
GGAUAAGCAG AAACAACAGC AGCAGGGAGU GGGUGACAUA GAGCAUUCUA UGCCUUUGAC 2280
AUUGUCAUAG GAUAAGCUGU GUUAGCACUU CCUCAGGAAA UGAGAUUGAU UUUUACAAUA 2340
GCCAAUAACA UUUGCACUUU AUUAAUGCCU GUAUAUAAAU AUGAAUAGCU AUGUUUUAUA 2400
UAUAUAUAUA UAUAUCUAUA UAUGUCUAUA GCUCUAUAUA UAUAGCCAUA CCUUGAAAAG 2460
AGACAAGGAA AAACAUCAAA UAUUCCCAGG AAAUUGGUUU UAUUGGAGAA CUCCAGAACC 2520
AAGCAGAGAA GGAAGGGACC CAUGACAGCA UUAGCAUUUG ACAAUCACAC AUGCAGUGGU 2580
UCUCUGACUG UAAAACAGUG AACUUUGCAU GAGGAAAGAG GCUCCAUGUC UCACAGCCAG 2640
CUAUGACCAC AUUGCACUUG CUUUUGCAAA AUAAUCAUUC CCUGCCUAGC ACUUCUCUUC 2700
UGGCCAUGGA ACUAAGUACA GUGGCACUGU UUGAGGACCA GUGUUCCCGG GGUUCCUGUG 2760
UGCCCUUAUU UCUCCUGGAC UUUUCAUUUA AGCUCCAAGC CCCAAAUCUG GGGGGCUAGU 2820
UUAGAAACUC UCCCUCAACC UAGUUUAGAA ACUCUACCCC AUCUUUAAUA CCUUGAAUGU 2880
UUUGAACCCC ACUUUUUACC UUCAUGGGUU GCAGAAAAAU CAGAACAGAU GUCCCCAUCC 2940
AUGCGAUUGC CCCACCAUCU ACUAAUGAAA AAUUGUUCUU UUUUUCAUCU UUCCCCUGCA 3000
CUUAUGUUAC UAUUCUCUGC UCCCAGCCUU CAUCCUUUUC UAAAAAGGAG CAAAUUCUCA 3060
CUCUAGGCUU UAUCGUGUUU ACUUUUUCAU UACACUUGAC UUGAUUUUCU AGUUUUCUAU 3120
ACAAACACCA AUGGGUUCCA UCUUUCUGGG CUCCUGAUUG CUCAAGCACA GUUUGGCCUG 3180
AUGAAGAGGA UUUCAACUAC ACAAUACUAU CAUUGUCAGG ACUAUGACCU CAGGCACUCU 3240
AAACAUAUGU UUUGUUUGGU CAGCACAGCG UUUCAAAAAG UGAAGCCACU UUAUAAAUAU 3300
UUGGAGAUUU UGCAGGAAAA UCUGGAUCCC CAGGUAAGGA UAGCAGAUGG UUUUCAGUUA 3360
UCUCCAGUCC ACGUUCACAA AAUGUGAAGG UGUGGAGACA CUUACAAAGC UGCCUCACUU 3420
CUCACUGUAA ACAUUAGCUC UUUCCACUGC CUACCUGGAC CCCAGUCUAG GAAUUAAAUC 3480
UGCACCUAAC CAAGGUCCCU UGUAAGAAAU GUCCAUUCAA GCAGUCAUUC UCUGGGUAUA 3540
UAAUAUGAUU UUGACUACCU UAUCUGGUGU UAAGAUUUGA AGUUGGCCUU UUAUUGGACU 3600
AAAGGGGAAC UCCUUUAAGG GUCUCAGUUA GCCCAAGUUU CUUUUGCUUA UAUGUUAAUA 3660
GUUUUACCCU CUGCAUUGGA GAGAGGAGUG CUUUACUCCA AGAAGCUUUC CUCAUGGUUA 3720
CCGUUCUCUC CAUCAUGCCA GCCUUCUCAA CCUUUGCAGA AAUUACUAGA GAGGAUUUGA 3780
AUGUGGGACA CAAAGGUCCC AUUUGCAGUU AGAAAAUUUG UGUCCACAAG GACAAGAACA 3840
AAGUAUGAGC UUUAAAACUC CAUAGGAAAC UUGUUAAUCA ACAAAGAAGU GUUAAUGCUG 3900
CAAGUAAUCU CUUUUUUAAA ACUUUUUGAA GCUACUUAUU UUCAGCCAAA UAGGAAUAUU 3960
AGAGAGGGAC UGGUAGUGAG AAUAUCAGCU CUGUUUGGAU GGUGGAAGGU CUCAUUUUAU 4020
UGAGAUUUUU AAGAUACAUG CAAAGGUUUG GAAAUAGAAC CUCUAGGCAC CCUCCUCAGU 4080
GUGGGUGGGC UGAGAGUUAA AGACAGUGUG GCUGCAGUAG CAUAGAGGCG CCUAGAAAUU 4140
CCACUUGCAC CGUAGGGCAU GCUGAUACCA UCCCAAUAGC UGUUGCCCAU UGACCUCUAG 4200
UGGUGAGUUU CUAGAAUACU GGUCCAUUCA UGAGAUAUUC AAGAUUCAAG AGUAUUCUCA 4260
CUUCUGGGUU AUCAGCAUAA ACUGGAAUGU AGUGUCAGAG GAUACUGUGG CUUGUUUUGU 4320
UUAUGUUUUU UUUUCUUAUU CAAGAAAAAA GACCAAGGAA UAACAUUCUG UAGUUCCUAA 4380
AAAUACUGAC UUUUUUCACU ACUAUACAUA AAGGGAAAGU UUUAUUCUUU UAUGGAACAC 4440
UUCAGCUGUA CUCAUGUAUU AAAAUAGGAA UGUGAAUGCU AUAUACUCUU UUUAUAUCAA 4500
AAGUCUCAAG CACUUAUUUU UAUUCUAUGC AUUGUUUGUC UUUUACAUAA AUAAAAUGUU 4560
UAUUAGAUUG AAUAAAGCAA AAUACUCAGG UGAGCAUCCU GCCUCCUGUU CCCAUUCCUA 4620
GUAGCUAAA 4629

[0001] 序列表

[0002] <110> Neurovision Pharma GmbH

[0003] <120> 反义寡核苷酸作为TGF-R信号传导的抑制剂

[0004] <130> NVP-P03653WO

[0005] <150> EP14193368

[0006] <151> 2014-11-16

[0007] <160> 508

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 4629

[0011] <212> DNA

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2), 转录变体2, 反义DNA

[0015] <400> 1

[0016] tttagctact aggaatggga acaggaggca ggatgctcac ctgagtattt tgctttattc 60

[0017] aatctaataa acattttatt tatgtaaaag acaaacaatg catagaataa aaataagtgc 120

[0018] ttgagacttt tgatataaaa agagtatata gcattcacat tcctatttta atacatgagt 180

[0019] acagctgaag tgttccataa aagaataaaa ctttcccttt atgtatagta gtgaaaaaag 240

[0020] tcagtatttt taggaactac agaatgttat tccttggtct tttttcttga ataagaaaaa 300

[0021] aaaacataaa caaaacaagc cacagtatcc tctgacacta cattccagtt tatgctgata 360

[0022] acccagaagt gagaatactc ttgaatcttg aatatctcat gaatggacca gtattctaga 420

[0023] aactcaccac tagaggtcaa tgggcaacag ctattgggat ggtatcagca tgccctacgg 480

[0024] tgcaagtgga atttctaggc gcctctatgc tactgcagcc acactgtctt taactctcag 540

[0025] cccacccaca ctgaggaggg tgcctagagg ttctatttcc aaacctttgc atgtatctta 600

[0026] aaaatctcaa taaaatgaga ccttccacca tccaaacaga gctgatattc tcactaccag 660

[0027] tccctctcta atattcctat ttggctgaaa ataagtagct tcaaaaagtt ttaaaaaaga 720

[0028] gattacttgc agcattaaca cttctttgtt gattaacaag tttcctatgg agttttaaag 780

[0029] ctcatacttt gttcttgtcc ttgtggacac aaattttcta actgcaaatg ggacctttgt 840

[0030] gtcccacatt caaatcctct ctagtaattt ctgcaaaggt tgagaaggct ggcatgatgg 900

[0031] agagaacggt aaccatgagg aaagcttctt ggagtaaagc actcctctct ccaatgcaga 960

[0032] gggtaaaact attaacatat aagcaaaaga aacttgggct aactgagacc cttaaaggag 1020

[0033] ttccccttta gtccaataaa aggccaactt caaatcttaa caccagataa ggtagtcaaa 1080

[0034] atcatattat atacccagag aatgactgct tgaatggaca tttcttacaa gggaccttgg 1140

[0035] ttaggtgcag atttaattcc tagactgggg tccaggtagg cagtggaaag agctaatgtt 1200

[0036] tacagtgaga agtgaggcag ctttgtaagt gtctccacac cttcacattt tgtgaacgtg 1260

[0037] gactggagat aactgaaaac catctgctat ccttacctgg ggatccagat tttcctgcaa 1320

[0038] aatctccaaa tatttataaa gtggcttcac tttttgaaac gctgtgctga ccaaacaaaa 1380

[0039] catatgttta gagtgcctga ggtcatagtc ctgacaatga tagtattgtg tagttgaaat 1440

[0040] cctcttcatc aggccaaact gtgcttgagc aatcaggagc ccagaaagat ggaacccatt 1500

[0041] ggtgtttgta tagaaaacta gaaaatcaag tcaagtgtaa tgaaaaagta aacacgataa 1560

[0042] agcctagagt gagaatttgc tccttttag aaaaggatga aggctgggag cagagaatag 1620

[0043] taacataagt gcaggggaaa gatgaaaaaa agaacaattt ttcattagta gatggtgggg 1680

[0044] caatcgcatg gatggggaca tctgttctga tttttctgca acccatgaag gtaaaaagtg 1740

[0045] gggttcaaaa cattcaaggt attaaagatg gggtagagtt tctaaactag gttgagggag 1800

[0046] agtttctaaa ctagcccccc agatttgggg cttggagctt aaatgaaaag tccaggagaa 1860

[0047] ataagggcac acaggaaccc cgggaacact ggtcctcaaa cagtgccact gtacttagtt 1920

[0048] ccatggccag aagagaagtg ctaggcaggg aatgattatt ttgcaaaagc aagtgcaatg 1980

[0049] tggtcatagc tggctgtgag acatggagcc tctttcctca tgcaaagttc actgttttac 2040

[0050] agtcagagaa ccactgcatg tgtgattgtc aaatgctaat gctgtcatgg gtcccttcct 2100

[0051] tctctgcttg gttctggagt tctccaataa aaccaatttc ctgggaatat ttgatgtttt 2160

[0052] tccttgtctc ttttcaaggt atggctatat atatagagct atagacatat atagatatat 2220

[0053] atatatatat ataaaacata gctattcata tttatataca ggcattaata aagtgcaaat 2280

[0054] gttattggct attgtaaaaa tcaatctcat ttcctgagga agtgctaaca cagcttatcc 2340

[0055] tatgacaatg tcaaaggcat agaatgctct atgtcaccca ctccctgctg ctgttgtttc 2400

[0056] tgcttatccc cacagcttac agggagggga gtgacccccc tggttttcca ggaagcatca 2460

[0057] gttcaggggc agcttcctgc tgcctctgtt ctttggtgag aggggcagcc tctttggaca 2520

[0058] tggcccagcc tgccccagaa gagctatttg gtagtgttta gggagccgtc ttcaggaatc 2580

[0059] ttctcctccg agcagctcct ccccgagagc ctgtccagat gctccagctc actgaagcgt 2640

[0060] tctgccacac actgggctgt gagacgggcc tctgggtcgt ggtcccagca ctcagtcaac 2700

[0061] gtctcacaca ccatctggat gccctggtgg ttgagccaga agctgggaat ttctggtcgc 2760

[0062] cctcgatctc tcaacacgtt gtccttcatg ctttcgacac aggggtgctc ccgcaccttg 2820

[0063] gaaccaaatg gaggctcata atcttttact tctcccactg cattacagcg agatgtcatt 2880

[0064] tcccagagca ccagagccat ggagtagaca tcggtctgct tgaaggactc aacattctcc 2940

[0065] aaattcatcc tggattctag gacttctgga gccatgtatc ttgcagttcc cacctgccca 3000

[0066] ctgttagcca ggtcatccac agacagagta gggtccagac gcagggaaag cccaaagtca 3060

[0067] cacaggcagc aggttaggtc gttcttcacg aggatattgg agctcttgag gtccctgtgc 3120

[0068] acgatgggca tcttgggcct cccacatgga gtgtgatcac tgtggaggtg agcaatcccc 3180

[0069] cgggcgaggg agctgcccag cttgcgcagg tcctcccagc tgatgacatg ccgcgtcagg 3240

[0070] tactcctgta ggttgcccct ggcgtggaag gcggtgatca gccagtattg tttccccaac 3300

[0071] tccgtcttcc gctcctcagc cgtcaggaac tggagtatgt tctcatgctt cagattgatg 3360

[0072] tctgagaaga tgtccttctc tgtcttccaa gaggcatact cctcataggg aaagatcttg 3420

[0073] actgccactg tctcaaactg ctctgaagtg ttctgcttca gcttggcctt atagacctca 3480

[0074] gcaaagcgac ctttccccac cagggtgtcc agctcaatgg gcagcagctc tgtgttgtgg 3540

[0075] ttgatgttgt tggcacacgt ggagctgatg tcagagcggt catcttccag gatgatggca 3600

[0076] cagtgctcgc tgaactccat gagcttccgc gtcttgccgg tttcccaggt tgaactcagc 3660

[0077] ttctgctgcc ggttaacgcg gtagcagtag aagatgatga tgacagatat ggcaactccc 3720

[0078] agtggtggca ggaggctgat gcctgtcact tgaaatatga ctagcaacaa gtcaggattg 3780

[0079] ctggtgttat attcttctga gaagatgatg ttgtcattgc actcatcaga gctacaggaa 3840

[0080] cacatgaaga aagtctcacc aggctttttt ttttccttca taatgcactt tggagaagca 3900

[0081] gcatcttcca gaataaagtc atggtagggg agcttggggt catggcaaac tgtctctagt 3960

[0082] gttatgttct cgtcattctt tctccataca gccacacaga cttcctgtgg cttctcacag 4020

[0083] atggaggtga tgctgcagtt gctcatgcag gatttctggt tgtcacaggt ggaaaatctc 4080

[0084] acatcacaaa atttacacag ttgtggaaac ttgactgcac cgttgttgtc agtgactatc 4140

[0085] atgtcgttat taaccgactt ctgaacgtgc ggtgggatcg tgctggcgat acgcgtccac 4200

[0086] aggacgatgt gcagcggcca caggcccctg agcagccccc gacccatggc agaccccgct 4260

[0087] gctcgtcata gaccgagccc ccagcgcagc ggacggcgcc ttcccggacc cctggctgcg 4320

[0088] cctccgcgcc gcgccctctc cggaccccgc gccgggccgg cagcgcagat gtgcgggcca 4380

[0089] gatgtggcgc ccgctcgcca gccaggaggg ggcctggagg ccggcgaggc gcggggaggc 4440

[0090] ccccggcggc cgagggaagc tgcacaggag tccggctcct gtcccgagcg ggtgcacgcg 4500

[0091] cgggggtgtc gtcgctccgt gcgcgcgagt gactcactca acttcaactc agcgctgcgg 4560

[0092] gggaaacagg aaactcctcg ccaacagctg ggcaggacct ctctccgccc gagagccttc 4620

[0093] tccctctcc 4629

[0094] <210> 2

[0095] <211> 4629

[0096] <212> DNA

[0097] <213> 智人

[0098] <400> 2

[0099] ggagagggag aaggctctcg ggcggagaga ggtcctgccc agctgttggc gaggagtttc 60

[0100] ctgtttcccc cgcagcgctg agttgaagtt gagtgagtca ctcgcgcgca cggagcgacg 120

[0101] acacccccgc gcgtgcaccc gctcgggaca ggagccggac tcctgtgcag cttccctcgg 180

[0102] ccgccggggg cctccccgcg cctcgccggc ctccaggccc cctcctggct ggcgagcggg 240

[0103] cgccacatct ggcccgcaca tctgcgctgc cggcccggcg cggggtccgg agagggcgcg 300

[0104] gcgcggaggc gcagccaggg gtccgggaag gcgccgtccg ctgcgctggg ggctcggtct 360

[0105] atgacgagca gcggggtctg ccatgggtcg ggggctgctc aggggcctgt ggccgctgca 420

[0106] catcgtcctg tggacgcgta tcgccagcac gatcccaccg cacgttcaga agtcggttaa 480

[0107] taacgacatg atagtcactg acaacaacgg tgcagtcaag tttccacaac tgtgtaaatt 540

[0108] ttgtgatgtg agattttcca cctgtgacaa ccagaaatcc tgcatgagca actgcagcat 600

[0109] cacctccatc tgtgagaagc cacaggaagt ctgtgtggct gtatggagaa agaatgacga 660

[0110] gaacataaca ctagagacag tttgccatga ccccaagctc ccctaccatg actttattct 720

[0111] ggaagatgct gcttctccaa agtgcattat gaaggaaaaa aaaaagcctg gtgagacttt 780

[0112] cttcatgtgt tcctgtagct ctgatgagtg caatgacaac atcatcttct cagaagaata 840

[0113] taacaccagc aatcctgact tgttgctagt catatttcaa gtgacaggca tcagcctcct 900

[0114] gccaccactg ggagttgcca tatctgtcat catcatcttc tactgctacc gcgttaaccg 960

[0115] gcagcagaag ctgagttcaa cctgggaaac cggcaagacg cggaagctca tggagttcag 1020

[0116] cgagcactgt gccatcatcc tggaagatga ccgctctgac atcagctcca cgtgtgccaa 1080

[0117] caacatcaac cacaacacag agctgctgcc cattgagctg gacaccctgg tggggaaagg 1140

[0118] tcgctttgct gaggtctata aggccaagct gaagcagaac acttcagagc agtttgagac 1200

[0119] agtggcagtc aagatctttc cctatgagga gtatgcctct tggaagacag agaaggacat 1260

[0120] cttctcagac atcaatctga agcatgagaa catactccag ttcctgacgg ctgaggagcg 1320

[0121] gaagacggag ttggggaaac aatactggct gatcaccgcc ttccacgcca agggcaacct 1380

[0122] acaggagtac ctgacgcggc atgtcatcag ctgggaggac ctgcgcaagc tgggcagctc 1440

[0123] cctcgcccgg gggattgctc acctccacag tgatcacact ccatgtggga ggcccaagat 1500

[0124] gcccatcgtg cacagggacc tcaagagctc caatatcctc gtgaagaacg acctaacctg 1560

[0125] ctgcctgtgt gactttgggc tttccctgcg tctggaccct actctgtctg tggatgacct 1620

[0126] ggctaacagt gggcaggtgg gaactgcaag atacatggct ccagaagtcc tagaatccag 1680
[0127] gatgaatttg gagaatgttg agtccttcaa gcagaccgat gtctactcca tggctctggt 1740
[0128] gctctgggaa atgacatctc gctgtaatgc agtgggagaa gtaaaagatt atgagcctcc 1800
[0129] atttggttcc aaggtgcggg agcacccctg tgtcgaaagc atgaaggaca acgtgttgag 1860
[0130] agatcgaggg cgaccagaaa ttcccagctt ctggctcaac caccagggca tccagatggt 1920
[0131] gtgtgagacg ttgactgagt gctgggacca cgacccagag gcccgtctca cagcccagtg 1980
[0132] tgtggcagaa cgcttcagtg agctggagca tctggacagg ctctcgggga ggagctgctc 2040
[0133] ggaggagaag attcctgaag acggctccct aaacactacc aaatagctct tctggggcag 2100
[0134] gctgggccat gtccaaagag gctgcccctc tcaccaaaga acagaggcag caggaagctg 2160
[0135] cccctgaact gatgcttcct ggaaaaccaa gggggtcact cccctccctg taagctgtgg 2220
[0136] ggataagcag aaacaacagc agcagggagt gggtgacata gagcattcta tgcctttgac 2280
[0137] attgtcatag gataagctgt gttagcactt cctcaggaaa tgagattgat ttttacaata 2340
[0138] gccaataaca tttgcacttt attaatgcct gtatataaat atgaatagct atgttttata 2400
[0139] tatatatata tatatctata tatgtctata gctctatata tatagccata ccttgaaaag 2460
[0140] agacaaggaa aaacatcaaa tattcccagg aaattggttt tattggagaa ctccagaacc 2520
[0141] aagcagagaa ggaagggacc catgacagca ttagcatttg acaatcacac atgcagtggt 2580
[0142] tctctgactg taaaacagtg aactttgcat gaggaaagag gctccatgtc tcacagccag 2640
[0143] ctatgaccac attgcacttg cttttgcaaa ataatcattc cctgcctagc acttctcttc 2700
[0144] tggccatgga actaagtaca gtggcactgt ttgaggacca gtgttcccgg ggttcctgtg 2760
[0145] tgcccttatt tctcctggac ttttcattta agctccaagc cccaaatctg gggggctagt 2820
[0146] ttagaaactc tccctcaacc tagtttagaa actctacccc atctttaata ccttgaatgt 2880
[0147] tttgaacccc acttttacc ttcatgggtt gcagaaaaat cagaacagat gtccccatcc 2940
[0148] atgcgattgc cccaccatct actaatgaaa aattgttctt tttttcatct ttcccctgca 3000
[0149] cttatgttac tattctctgc tcccagcctt catccttttc taaaaaggag caaattctca 3060
[0150] ctctaggctt tatcgtgttt acttttttcat tacacttgac ttgattttct agttttctat 3120
[0151] acaaacacca atgggttcca tctttctggg ctcctgattg ctcaagcaca gtttggcctg 3180
[0152] atgaagagga tttcaactac acaatactat cattgtcagg actatgacct caggcactct 3240
[0153] aaacatatgt tttgtttggt cagcacagcg tttcaaaaag tgaagccact ttataaatat 3300
[0154] ttggagattt tgcaggaaaa tctggatccc caggtaagga tagcagatgg ttttcagtta 3360
[0155] tctccagtcc acgttcacaa aatgtgaagg tgtggagaca cttacaaagc tgcctcactt 3420
[0156] ctcactgtaa acattagctc tttccactgc ctacctggac cccagtctag gaattaaatc 3480
[0157] tgcacctaac caaggtccct tgtaagaaat gtccattcaa gcagtcattc tctgggtata 3540
[0158] taatatgatt ttgactacct tatctggtgt taagatttga agttggcctt ttattggact 3600
[0159] aaaggggaac tcctttaagg gtctcagtta gcccaagttt cttttgctta tatgttaata 3660
[0160] gttttaccct ctgcattgga gagaggagtg ctttactcca agaagctttc ctcatggtta 3720
[0161] ccgttctctc catcatgcca gccttctcaa cctttgcaga aattactaga gaggatttga 3780
[0162] atgtgggaca caaaggtccc atttgcagtt agaaaatttg tgtccacaag gacaagaaca 3840
[0163] aagtatgagc tttaaaactc cataggaaac ttgttaatca acaaagaagt gttaatgctg 3900
[0164] caagtaatct ctttttaaa acttttgaa gctacttatt ttcagccaaa taggaatatt 3960
[0165] agagagggac tggtagtgag aatatcagct ctgtttggat ggtggaaggt ctcattttat 4020
[0166] tgagattttt aagatacatg caaaggtttg gaaatagaac ctctaggcac cctcctcagt 4080
[0167] gtgggtgggc tgagagttaa agacagtgtg gctgcagtag catagaggcg cctagaaatt 4140

[0168] ccacttgcac cgtagggcat gctgatacca tcccaatagc tgttgcccat tgacctctag 4200

[0169] tggtgagttt ctagaatact ggtccattca tgagatattc aagattcaag agtattctca 4260

[0170] cttctgggtt atcagcataa actggaatgt agtgtcagag gatactgtgg cttgttttgt 4320

[0171] ttatgttttt ttttcttatt caagaaaaaa gaccaaggaa taacattctg tagttcctaa 4380

[0172] aaatactgac ttttttcact actatacata aagggaaagt tttattcttt tatggaacac 4440

[0173] ttcagctgta ctcatgtatt aaaataggaa tgtgaatgct atatactctt tttatatcaa 4500

[0174] aagtctcaag cacttatttt tattctatgc attgtttgtc ttttacataa ataaaatgtt 4560

[0175] tattagattg aataaagcaa aatactcagg tgagcatcct gcctcctgtt cccattccta 4620

[0176] gtagctaaa 4629

[0177] <210> 3

[0178] <211> 4629

[0179] <212> RNA

[0180] <213> 智人

[0181] <400> 3

[0182] ggagagggag aaggcucucg ggcggagaga gguccugccc agcuguuggc gaggaguuuc 60

[0183] cuguuucccc cgcagcgcug aguugaaguu gagugaguca cucgcgcgca cggagcgacg 120

[0184] acacccccgc gcgugcaccc gcucgggaca ggagccggac uccugugcag cuucccucgg 180

[0185] ccgccggggg ccucccccgcg ccucgccggc cuccaggccc ccuccuggcu ggcgagcggg 240

[0186] cgccacaucu ggcccgcaca ucugcgcugc cggcccggcg cgggguccgg agagggcgcg 300

[0187] gcgcggaggc gcagccaggg guccgggaag gcgccguccg cugcgcuggg ggcucggucu 360

[0188] augacgagca gcggggucug ccaugggucg ggggcugcuc aggggccugu ggccgcugca 420

[0189] caucguccug uggacgcgua ucgccagcac gaucccaccg cacguucaga agucgguuaa 480

[0190] uaacgacaug auagucacug acaacaacgg ugcagucaag uuuccacaac uguguaaauu 540

[0191] uugugaugug agauuuucca ccugugacaa ccagaaaucc ugcaugagca acugcagcau 600

[0192] caccuccauc ugugagaagc cacaggaagu cuguguggcu guauggagaa agaaugacga 660

[0193] gaacauaaca cuagagacag uuugccauga ccccaagcuc cccuaccaug acuuuauucu 720

[0194] ggaagaugcu gcuucuccaa agugcauuau gaaggaaaaa aaaaagccug gugagacuuu 780

[0195] cuucaugugu uccuguagcu cugaugagug caaugacaac aucaucuucu cagaagaaua 840

[0196] uaacaccagc aauccugacu uguugcuagu cauauuucaa gugacaggca ucagccuccu 900

[0197] gccaccacug ggaguugcca uaucugucau caucaucuuc uacugcuacc gcguuaaccg 960

[0198] gcagcagaag cugaguucaa ccugggaaac cggcaagacg cggaagcuca uggaguucag 1020

[0199] cgagcacugu gccaucaucc uggaagauga ccgcucugac aucagcucca cgugugccaa 1080

[0200] caacaucaac cacaacacag agcugcugcc cauugagcug gacacccugg uggggaaagg 1140

[0201] ucgcuuugcu gaggucuaua aggccaagcu gaagcagaac acuucagagc aguuugagac 1200

[0202] aguggcaguc aagaucuuuc ccuaugagga guaugccucu uggaagacag agaaggacau 1260

[0203] cuucucagac aucaaucuga agcaugagaa cauacuccag uuccugacgg cugaggagcg 1320

[0204] gaagacggag uuggggaaac aauacuggcu gaucaccgcc uuccacgcca agggcaaccu 1380

[0205] acaggaguac cugacgcggc augucaucag cugggaggac cugcgcaagc ugggcagcuc 1440

[0206] ccucgcccgg gggauugcuc accuccacag ugaucacacu ccauguggga ggcccaagau 1500

[0207] gcccaucgug cacagggacc ucaagagcuc caauauccuc gugaagaacg accuaaccug 1560

[0208] cugccugugu gacuuugggc uuucccugcg ucuggacccu acucugucug uggaugaccu 1620

[0209] ggcuaacagu gggcaggugg gaacugcaag auacauggcu ccagaagucc uagaauccag 1680

[0210] gaugaauuug gagaauguug aguccuucaa gcagaccgau gucuacucca uggcucuggu 1740

[0211] gcucugggaa augacaucuc gcuguaaugc agugggagaa guaaaagauu augagccucc 1800

[0212] auuugguucc aaggugcggg agcaccccug ugucgaaagc augaaggaca acguguugag 1860

[0213] agaucgaggg cgaccagaaa uucccagcuu cuggcucaac caccagggca uccagauggu 1920

[0214] gugugagacg uugacugagu gcugggacca cgacccagag gcccgucuca cagcccagug 1980

[0215] uguggcagaa cgcuucagug agcuggagca ucuggacagg cucucgggga ggagcugcuc 2040

[0216] ggaggagaag auuccugaag acggcucccu aaacacuacc aaauagcucu ucuggggcag 2100

[0217] gcugggccau guccaaagag gcugccccuc ucaccaaaga acagaggcag caggaagcug 2160

[0218] ccccugaacu gaugcuuccu ggaaaaccaa gggggucacu ccccucccug uaagcugugg 2220

[0219] ggauaagcag aaacaacagc agcagggagu gggugacaua gagcauucua ugccuuugac 2280

[0220] auugucauag gauaagcugu guuagcacuu ccucaggaaa ugagauugau uuuuacaaua 2340

[0221] gccaauaaca uuugcacuuu auuaaugccu guauauaaau augaauagcu auguuuuaua 2400

[0222] uauauauaua uauaucuaua uaugucuaua gcucuauaua uauagccaua ccuugaaaag 2460

[0223] agacaaggaa aaacaucaaa uauucccagg aaauugguuu uauuggagaa cuccagaacc 2520

[0224] aagcagagaa ggaagggacc caugacagca uuagcauuug acaaucacac augcaguggu 2580

[0225] ucucugacug uaaaacagug aacuuugcau gaggaaagag gcuccauguc ucacagccag 2640

[0226] cuaugaccac auugcacuug cuuuugcaaa auaaucauuc ccugccuagc acuucucuuc 2700

[0227] uggccaugga acuaaguaca guggcacugu uugaggacca guguucccgg gguuccugug 2760

[0228] ugcccuuauu ucuccuggac uuuucauuua agcuccaagc cccaaaucug gggggcuagu 2820

[0229] uuagaaacuc ucccucaacc uaguuuagaa acucuacccc aucuuuaaua ccuugaaugu 2880

[0230] uuugaacccc acuuuuuacc uucauggguu gcagaaaaau cagaacagau guccccaucc 2940

[0231] augcgauugc cccaccaucu acuaaugaaa aauuguucuu uuuuucaucu uuccccugca 3000

[0232] cuuauguuac uauucucugc ucccagccuu cauccuuuuc uaaaaaggag caaauucuca 3060

[0233] cucuaggcuu uaucguguuu acuuuuucau uacacuugac uugauuuucu aguuuucuau 3120

[0234] acaaacacca auggguucca ucuuucuggg cuccugauug cucaagcaca guuuggccug 3180

[0235] augaagagga uuucaacuac acaauacuau cauugucagg acuaugaccu caggcacucu 3240

[0236] aaacauaugu uuuguuuggu cagcacagcg uuucaaaaag ugaagccacu uuauaaauau 3300

[0237] uuggagauuu ugcaggaaaa ucuggauccc cagguaagga uagcagaugg uuuucaguua 3360

[0238] ucuccagucc acguucacaa aaugugaagg uguggagaca cuuacaaagc ugccucacuu 3420

[0239] cucacuguaa acauuagcuc uuuccacugc cuaccuggac cccagucuag gaauuaaauc 3480

[0240] ugcaccuaac caaggucccu uguaagaaau guccauucaa gcagucauuc ucuggguaua 3540

[0241] uaauaugauu uugacuaccu uaucuggugu uaagauuuga aguuggccuu uuauuggacu 3600

[0242] aaaggggaac uccuuuaagg gucucaguua gcccaaguuu cuuuugcuua uauguuaaua 3660

[0243] guuuuacccu cugcauugga gagaggagug cuuuacucca agaagcuuuc cucaugguua 3720

[0244] ccguucucuc caucaugcca gccuucucaa ccuuugcaga aauuacuaga gaggauuuga 3780

[0245] augugggaca caaaggcccc auuugcaguu agaaaauuug uguccacaag gacaagaaca 3840

[0246] aaguaugagc uuuaaaacuc cauaggaaac uuguuaauca acaaagaagu guuaaugcug 3900

[0247] caaguaaucu cuuuuuuaaa acuuuuugaa gcuacuuauu uucagccaaa uaggaauauu 3960

[0248] agagagggac ugguagugag aauaucagcu cuguuuggau gguggaaggu cucauuuuau 4020

[0249] ugagauuuuu aagauacaug caaagguuug gaaauagaac cucuaggcac ccuccucagu 4080

[0250] gugggugggc ugagaguuaa agacagugug gcugcaguag cauagaggcg ccuagaaauu 4140

[0251] ccacuugcac cguagggcau gcugauacca ucccaauagc uguugcccau ugaccucuag 4200

[0252] uggugaguuu cuagaauacu gguccauuca ugagauauuc aagauucaag aguauucuca 4260

[0253] cuucuggguu aucagcauaa acuggaaugu agugucagag gauacugugg cuuguuuugu 4320

[0254] uuauguuuuu uuuucuuauu caagaaaaaa gaccaaggaa uaacauucug uaguuccuaa 4380

[0255] aaauacugac uuuuuucacu acuauacaua aagggaaagu uuuauucuuu uauggaacac 4440

[0256] uucagcugua cucauguauu aaaauaggaa ugugaaugcu auauacucuu uuuauaucaa 4500

[0257] aagucucaag cacuuauuuu uauucuaugc auuguuuguc uuuuacauaa auaaaauguu 4560

[0258] uauuagauug aauaaagcaa aauacucagg ugagcauccu gccuccuguu cccauuccua 4620

[0259] guagcuaaa 4629

[0260] <210> 4

[0261] <211> 10

[0262] <212> DNA

[0263] <213> 人工序列

[0264] <220>

[0265] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[0266] <400> 4

[0267] tggtccattc 10

[0268] <210> 5

[0269] <211> 10

[0270] <212> DNA

[0271] <213> 人工序列

[0272] <220>

[0273] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[0274] <400> 5

[0275] ccctaaacac 10

[0276] <210> 6

[0277] <211> 10

[0278] <212> DNA

[0279] <213> 人工序列

[0280] <220>

[0281] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[0282] <400> 6

[0283] actaccaaat 10

[0284] <210> 7

[0285] <211> 10

[0286] <212> DNA

[0287] <213> 人工序列

[0288] <220>

[0289] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[0290] <400> 7

[0291] ggacgcgtat 10

[0292] <210> 8

[0293] <211> 10

[0294] <212> DNA

[0295] <213> 人工序列

[0296] <220>

[0297] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[0298] <400> 8

[0299] gtctatgacg 10

[0300] <210> 9

[0301] <211> 10

[0302] <212> DNA

[0303] <213> 人工序列

[0304] <220>

[0305] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[0306] <400> 9

[0307] ttattaatgc 10

[0308] <210> 10

[0309] <211> 10

[0310] <212> DNA

[0311] <213> 人工序列

[0312] <220>

[0313] <223> 一般通式S3

[0314] <220>

[0315] <221> misc_feature

[0316] <222> (1)..(1)

[0317] <223> n可表示5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG'3或衍生自5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTAG'3的序列,其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中n为至少G

[0318] <220>

[0319] <221> misc_feature

[0320] <222> (10)..(10)

[0321] <223> n可表示5'GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3或衍生自5'GAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3的序列，其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中n为至少G

[0322] <400> 10

[0323] ntgtttaggn 10

[0324] <210> 11

[0325] <211> 10

[0326] <212> DNA

[0327] <213> 人工序列

[0328] <220>

[0329] <223> 一般通式S4

[0330] <220>

[0331] <221> misc_feature

[0332] <222> (1)..(1)

[0333] <223> n可表示5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA'3或衍生自5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTA'

3的序列，其中一个或多个核苷酸从5’末端删除并且其中n为至少A

[0334] <220>

[0335] <221> misc_feature

[0336] <222> (10)..(10)

[0337] <223> n可表示5’TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA’3或衍生自5’TGTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA’3的序列，其中一个或多个核苷酸从3’末端删除并且其中n为至少T

[0338] <400> 11

[0339] ntttggtagn 10

[0340] <210> 12

[0341] <211> 10

[0342] <212> DNA

[0343] <213> 人工序列

[0344] <220>

[0345] <223> 一般通式S1

[0346] <220>

[0347] <221> misc_feature

[0348] <222> (1)..(1)

[0349] <223> n可表示5’CATGGCAGACCCCGCTGCTC’3或衍生自5’CATGGCAGACCCCGCTGCTC’3的序列，其中一个或多个核苷酸从5’末端删除并且其中n为至少C

[0350] <220>

[0351] <221> misc_feature

[0352] <222> (10)..(10)

[0353] <223> n可表示5’CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG’3或衍生自5’CCGAGCCCCCAGCGCAGCGG’3的序列，其中一个或多个核苷酸从3’末端删除并且其中n为至少C

[0354] <400> 12

[0355] ngtcatagan 10

[0356] <210> 13

[0357] <211> 16

[0358] <212> DNA

[0359] <213> 人工序列

[0360] <220>

[0361] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0362] <400> 13

[0363] gctcgtcata gaccga 16

[0364] <210> 14

[0365] <211> 16

[0366] <212> DNA

[0367] <213> 人工序列

[0368] <220>

[0369] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸 <400> 14

[0370] cgatacgcgt ccacag 16

[0371] <210> 15

[0372] <211> 16

[0373] <212> DNA

[0374] <213> 人工序列

[0375] <220>

[0376] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

<400> 15

[0377] gtagtgttta gggagc 16

[0378] <210> 16

[0379] <211> 16

[0380] <212> DNA

[0381] <213> 人工序列

[0382] <220>

[0383] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

<400> 16

[0384] gctatttggt agtgtt 16

[0385] <210> 17

[0386] <211> 16

[0387] <212> DNA

[0388] <213> 人工序列

[0389] <220>

[0390] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

<400> 17

[0391] catgaatgga ccagta 16

[0392] <210> 18

[0393] <211> 16

[0394] <212> DNA

[0395] <213> 人工序列

[0396] <220>

[0397] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

<400> 18

[0398] aggcattaat aaagtg 16

[0399] <210> 19

[0400] <211> 18

[0401] <212> DNA

[0402] <213> 人工序列

[0403] <220>

[0404] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

<400> 19

[0405] ccgctgctcg tcatagac 18

[0406] <210> 20

[0407] <211> 18

[0408] <212> DNA

[0409] <213> 人工序列

[0410] <220>

[0411] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

<400> 20

[0412] cgctgctcgt catagacc 18

[0413] <210> 21

[0414] <211> 18

[0415] <212> DNA

[0416] <213> 人工序列

[0417] <220>

[0418] <223>针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0419] <400> 21

[0420] gctgctcgtc atagaccg 18

[0421] <210> 22

[0422] <211> 18

[0423] <212> DNA

[0424] <213> 人工序列

[0425] <220>

[0426] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

<400> 22

[0427] ctgctcgtca tagaccga 18

[0428] <210> 23

[0429] <211> 18

[0430] <212> DNA

[0431] <213> 人工序列

[0432] <220>

[0433] <223>针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0434] <400> 23

[0435] tgctcgtcat agaccgag 18

[0436] <210> 24

[0437] <211> 18

[0438] <212> DNA

[0439] <213> 人工序列

[0440] <220>

[0441] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0442] <400> 24

[0443] gctcgtcata gaccgagc 18

[0444] <210> 25

[0445] <211> 18

[0446] <212> DNA

[0447] <213> 人工序列

[0448] <220>

[0449] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0450] <400> 25

[0451] ctcgtcatag accgagcc 18

[0452] <210> 26

[0453] <211> 18

[0454] <212> DNA

[0455] <213> 人工序列

[0456] <220>

[0457] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0458] <400> 26

[0459] tcgtcataga ccgagccc 18

[0460] <210> 27

[0461] <211> 18

[0462] <212> DNA

[0463] <213> 人工序列

[0464] <220>

[0465] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0466] <400> 27

[0467] cgtcatagac cgagcccc 18

[0468] <210> 28

[0469] <211> 17

[0470] <212> DNA

[0471] <213> 人工序列

[0472] <220>

[0473] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0474] <400> 28

[0475] cgctgctcgt catagac 17

[0476] <210> 29

[0477] <211> 17

[0478] <212> DNA

[0479] <213> 人工序列

[0480] <220>

[0481] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0482] <400> 29

[0483] gctgctcgtc atagacc 17

[0484] <210> 30

[0485] <211> 17

[0486] <212> DNA

[0487] <213> 人工序列

[0488] <220>

[0489] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0490] <400> 30

[0491] ctgctcgtca tagaccg 17

[0492] <210> 31

[0493] <211> 17

[0494] <212> DNA

[0495] <213> 人工序列

[0496] <220>

[0497] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0498] <400> 31

[0499] tgctcgtcat agaccga 17

[0500] <210> 32

[0501] <211> 17

[0502] <212> DNA

[0503] <213> 人工序列

[0504] <220>

[0505] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0506] <400> 32

[0507] gctcgtcata gaccgag 17

[0508] <210> 33

[0509] <211> 17

[0510] <212> DNA

[0511] <213> 人工序列

[0512] <220>

[0513] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0514] <400> 33

[0515] ctcgtcatag accgagc 17

[0516] <210> 34

[0517] <211> 17

[0518] <212> DNA

[0519] <213> 人工序列

[0520] <220>

[0521] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0522] <400> 34

[0523] tcgtcataga ccgagcc 17

[0524] <210> 35

[0525] <211> 17

[0526] <212> DNA

[0527] <213> 人工序列

[0528] <220>

[0529] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0530] <400> 35

[0531] cgtcatagac cgagccc 17

[0532] <210> 36

[0533] <211> 16

[0534] <212> DNA

[0535] <213> 人工序列

[0536] <220>

[0537] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0538] <400> 36

[0539] gctgctcgtc atagac 16

[0540] <210> 37

[0541] <211> 16

[0542] <212> DNA

[0543] <213> 人工序列

[0544] <220>

[0545] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0546] <400> 37

[0547] ctgctcgtca tagacc 16

[0548] <210> 38

[0549] <211> 16

[0550] <212> DNA

[0551] <213> 人工序列

[0552] <220>

[0553] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0554] <400> 38

[0555] tgctcgtcat agaccg 16

[0556] <210> 39

[0557] <211> 16

[0558] <212> DNA

[0559] <213> 人工序列

[0560] <220>

[0561] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0562] <400> 39

[0563] gctcgtcata gaccga 16

[0564] <210> 40

[0565] <211> 16

[0566] <212> DNA

[0567] <213> 人工序列

[0568] <220>

[0569] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0570] <400> 40

[0571] ctcgtcatag accgag 16

[0572] <210> 41

[0573] <211> 16

[0574] <212> DNA

[0575] <213> 人工序列

[0576] <220>

[0577] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0578] <400> 41

[0579] tcgtcataga ccgagc 16

[0580] <210> 42

[0581] <211> 16

[0582] <212> DNA

[0583] <213> 人工序列

[0584] <220>

[0585] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0586] <400> 42

[0587] cgtcatagac cgagcc 16

[0588] <210> 43

[0589] <211> 15

[0590] <212> DNA

[0591] <213> 人工序列

[0592] <220>

[0593] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0594] <400> 43

[0595] ctgctcgtca tagac 15

[0596] <210> 44

[0597] <211> 15

[0598] <212> DNA

[0599] <213> 人工序列

[0600] <220>

[0601] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0602] <400> 44

[0603] tgctcgtcat agacc 15

[0604] <210> 45

[0605] <211> 15

[0606] <212> DNA

[0607] <213> 人工序列

[0608] <220>

[0609] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0610] <400> 45

[0611] gctcgtcata gaccg 15

[0612] <210> 46

[0613] <211> 15

[0614] <212> DNA

[0615] <213> 人工序列

[0616] <220>

[0617] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0618] <400> 46

[0619] ctcgtcatag accga 15

[0620] <210> 47

[0621] <211> 15

[0622] <212> DNA

[0623] <213> 人工序列

[0624] <220>

[0625] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0626] <400> 47

[0627] tcgtcataga ccgag 15

[0628] <210> 48

[0629] <211> 15

[0630] <212> DNA

[0631] <213> 人工序列

[0632] <220>

[0633] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0634] <400> 48

[0635] cgtcatagac cgagc 15

[0636] <210> 49

[0637] <211> 14

[0638] <212> DNA

[0639] <213> 人工序列

[0640] <220>

[0641] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0642] <400> 49

[0643] tgctcgtcat agac 14

[0644] <210> 50

[0645] <211> 14

[0646] <212> DNA

[0647] <213> 人工序列

[0648] <220>

[0649] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0650] <400> 50

[0651] gctcgtcata gacc 14

[0652] <210> 51

[0653] <211> 14

[0654] <212> DNA

[0655] <213> 人工序列

[0656] <220>

[0657] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0658] <400> 51

[0659] ctcgtcatag accg 14

[0660] <210> 52

[0661] <211> 14

[0662] <212> DNA

[0663] <213> 人工序列

[0664] <220>

[0665] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0666] <400> 52

[0667] tcgtcataga ccga 14

[0668] <210> 53

[0669] <211> 14

[0670] <212> DNA

[0671] <213> 人工序列

[0672] <220>

[0673] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0674] <400> 53

[0675] cgtcatagac cgag 14

[0676] <210> 54

[0677] <211> 18

[0678] <212> DNA

[0679] <213> 人工序列

[0680] <220>

[0681] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0682] <400> 54

[0683] gctggcgata cgcgtcca 18

[0684] <210> 55

[0685] <211> 18

[0686] <212> DNA

[0687] <213> 人工序列

[0688] <220>

[0689] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0690] <400> 55

[0691] ctggcgatac gcgtccac 18

[0692] <210> 56

[0693] <211> 18

[0694] <212> DNA

[0695] <213> 人工序列

[0696] <220>

[0697] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0698] <400> 56

[0699] tggcgatacg cgtccaca 18

[0700] <210> 57

[0701] <211> 18

[0702] <212> DNA

[0703] <213> 人工序列

[0704] <220>

[0705] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0706] <400> 57

[0707] ggcgatacgc gtccacag 18

[0708] <210> 58

[0709] <211> 18

[0710] <212> DNA

[0711] <213> 人工序列

[0712] <220>

[0713] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0714] <400> 58

[0715] gcgatacgcg tccacagg 18

[0716] <210> 59

[0717] <211> 18

[0718] <212> DNA

[0719] <213> 人工序列

[0720] <220>

[0721] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0722] <400> 59

[0723] cgatacgcgt ccacagga 18

[0724] <210> 60

[0725] <211> 18

[0726] <212> DNA

[0727] <213> 人工序列

[0728] <220>

[0729] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0730] <400> 60

[0731] gatacgcgtc cacaggac 18

[0732] <210> 61

[0733] <211> 18

[0734] <212> DNA

[0735] <213> 人工序列

[0736] <220>

[0737] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0738] <400> 61

[0739] atacgcgtcc acaggacg 18

[0740] <210> 62

[0741] <211> 18

[0742] <212> DNA
[0743] <213> 人工序列
[0744] <220>
[0745] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[0746] <400> 62
[0747] tacgcgtcca caggacga 18
[0748] <210> 63
[0749] <211> 17
[0750] <212> DNA
[0751] <213> 人工序列
[0752] <220>
[0753] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[0754] <400> 63
[0755] ctggcgatac gcgtcca 17
[0756] <210> 64
[0757] <211> 17
[0758] <212> DNA
[0759] <213> 人工序列
[0760] <220>
[0761] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[0762] <400> 64
[0763] tggcgatacg cgtccac 17
[0764] <210> 65
[0765] <211> 17
[0766] <212> DNA
[0767] <213> 人工序列
[0768] <220>
[0769] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[0770] <400> 65
[0771] ggcgatacgc gtccaca 17
[0772] <210> 66
[0773] <211> 17
[0774] <212> DNA
[0775] <213> 人工序列
[0776] <220>
[0777] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[0778] <400> 66
[0779] gcgatacgcg tccacag 17
[0780] <210> 67
[0781] <211> 17
[0782] <212> DNA
[0783] <213> 人工序列

[0784] <220>

[0785] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0786] <400> 67

[0787] cgatacgcgt ccacagg 17

[0788] <210> 68

[0789] <211> 17

[0790] <212> DNA

[0791] <213> 人工序列

[0792] <220>

[0793] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0794] <400> 68

[0795] gatacgcgtc cacagga 17

[0796] <210> 69

[0797] <211> 12

[0798] <212> DNA

[0799] <213> 人工序列

[0800] <220>

[0801] <223> 一般序列

[0802] <220>

[0803] <221> misc_feature

[0804] <222> (1)..(1)

[0805] <223> n可表示5'CATGGCAGACCCCGCTGCT'3或衍生自5'CATGGCAGACCCCGCTGCT'3的序列,其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中n为至少T

[0806] <220>

[0807] <221> misc_feature

[0808] <222> (10)..(10)

[0809] <223> n可表示5'CGAGCCCCCAGCGCAGCGG'3或衍生自5'CGAGCCCCCAGCGCAGCGG'3的序列,其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中n为至少C

[0810] <220>

[0811] <221> misc_feature

[0812] <222> (12)..(12)

[0813] <223> n为a, c, g, 或t

[0814] <400> 69

[0815] ncgtcataga cn 12

[0816] <210> 70

[0817] <211> 12

[0818] <212> DNA

[0819] <213> 人工序列

[0820] <220>

[0821] <223> 通式

[0822] <220>

[0823] <221> misc_feature

[0824] <222> (1)..(1)

[0825] <223> n可表示5'GGTGGGATCGTGCTGGCGA'3或衍生自5'GGTGGGATCGTGCTGGCGA'3的序列，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中n为至少A

[0826] <220>

[0827] <221> misc_feature

[0828] <222> (12)..(12)

[0829] <223> n可表示5'CAGGACGATGTGCAGCGGC'3或衍生自5'CAGGACGATGTGCAGCGGC'3的序列，其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中n为至少C

[0830] <400> 70

[0831] ntacgcgtcc an 12

[0832] <210> 71

[0833] <211> 12

[0834] <212> DNA

[0835] <213> 人工序列

[0836] <220>

[0837] <223> 一般序列

[0838] <220>

[0839] <221> misc_feature

[0840] <222> (1)..(1)

[0841] <223> n可表示5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA'3或衍生自5'TGCCCCAGAAGAGCTATTTGGTA'3的序列，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中n为至少A

[0842] <220>

[0843] <221> misc_feature

[0844] <222> (12)..(12)

[0845] <223> n可表示5'AGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3或衍生自5'AGCCGTCTTCAGGAATCTTCTCC'3的序列，其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中n为至少A

[0846] <400> 71

[0847] ngtgtttagg gn 12

[0848] <210> 72

[0849] <211> 12

[0850] <212> DNA

[0851] <213> 人工序列

[0852] <220>

[0853] <223> 一般序列

[0854] <220>

[0855] <221> misc_feature

[0856] <222> (1)..(1)

[0857] <223> n可表示5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT'3或衍生自5'GCCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCT'3的序列，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中n为至少T

[0858] <220>

[0859] <221> misc_feature

[0860] <222> (12)..(12)

[0861] <223> n可表示5'GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA'3或衍生自5'GTTTAGGGAGCCGTCTTCAGGAA'3的序列，其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中n为至少G

[0862] <400> 72

[0863] natttggtag tn 12

[0864] <210> 73

[0865] <211> 12

[0866] <212> DNA

[0867] <213> 人工序列

[0868] <220>

[0869] <223> 一般序列

[0870] <220>

[0871] <221> misc_feature

[0872] <222> (1)..(1)

[0873] <223> n可表示5'TGAATCTTGAATATCTCAT'3或衍生自5'TGAATCTTGAATATCTCAT'3，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中n为至少T

[0874] <220>

[0875] <221> misc_feature

[0876] <222> (12)..(12)

[0877] <223> n可表示5'GTATTCTAGAAACTCACCA'3或衍生自5'GTATTCTAGAAACTCACCA'3，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中n为至少G

[0878] <400> 73

[0879] ngaatggacc an 12

[0880] <210> 74

[0881] <211> 12

[0882] <212> DNA

[0883] <213> 人工序列

[0884] <220>

[0885] <223> 一般序列

[0886] <220>

[0887] <221> misc_feature

[0888] <222> (1)..(1)

[0889] <223> n可表示5'ATTCATATTTATATACAGG'3或衍生自5'ATTCATATTTATATACAGG'3，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中n为至少G

[0890] <220>

[0891] <221> misc_feature

[0892] <222> (12)..(12)

[0893] <223> n可表示5'GTGCAAATGTTATTGGCTA'3或衍生自5'GTGCAAATGTTATTGGCTA'3，其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中n为至少G

[0894] <400> 74

[0895] ncattaataa an 12

[0896] <210> 75

[0897] <211> 41

[0898] <212> DNA

[0899] <213> 人工序列

[0900] <220>

[0901] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0902] <400> 75

[0903] gaatcttgaa tatctcatga atggaccagt attctagaaa c 41

[0904] <210> 76

[0905] <211> 15

[0906] <212> DNA

[0907] <213> 人工序列

[0908] <220>

[0909] <223> 参考寡核苷酸(打乱对照)

[0910] <400> 76

[0911] aacacgtcta tacgc 15

[0912] <210> 77

[0913] <211> 41

[0914] <212> DNA

[0915] <213> 人工序列

[0916] <220>

[0917] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0918] <400> 77

[0919] ttcatattta tatacaggca ttaataaagt gcaaatgtta t 41

[0920] <210> 78

[0921] <211> 42

[0922] <212> DNA

[0923] <213> 人工序列

[0924] <220>

[0925] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0926] <400> 78

[0927] tgaggaagtg ctaacacagc ttatcctatg acaatgtcaa ag 42

[0928] <210> 79

[0929] <211> 49

[0930] <212> DNA

[0931] <213> 人工序列

[0932] <220>

[0933] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0934] <400> 79

[0935] gcctgcccca gaagagctat ttggtagtgt ttagggagcc gtcttcagg 49

[0936] <210> 80

[0937] <211> 20

[0938] <212> DNA

[0939] <213> 人工序列

[0940] <220>

[0941] <223> 参考寡核苷酸

[0942] <400> 80

[0943] ttgaatatct catgaatgga 20

[0944] <210> 81

[0945] <211> 49

[0946] <212> DNA

[0947] <213> 人工序列

[0948] <220>

[0949] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0950] <400> 81

[0951] cgcaggtcct cccagctgat gacatgccgc gtcaggtact cctgtaggt 49

[0952] <210> 82

[0953] <211> 20

[0954] <212> DNA

[0955] <213> 人工序列

[0956] <220>

[0957] <223> 参考寡核苷酸

[0958] <400> 82

[0959] cagaagagct atttggtagt 20

[0960] <210> 83

[0961] <211> 78

[0962] <212> DNA

[0963] <213> 人工序列

[0964] <220>

[0965] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0966] <400> 83

[0967] atgtcgttat taaccgactt ctgaacgtgc ggtgggatcg tgctggcgat acgcgtccac 60

[0968] aggacgatgt gcagcggc 78

[0969] <210> 84

[0970] <211> 74

[0971] <212> DNA

[0972] <213> 人工序列

[0973] <220>

[0974] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0975] <400> 84

[0976] ggccacaggc ccctgagcag cccccgaccc atggcagacc ccgctgctcg tcatagaccg 60

[0977] agcccccagc gcag 74

[0978] <210> 85

[0979] <211> 20

[0980] <212> DNA

[0981] <213> 人工序列

[0982] <220>

[0983] <223> 参考寡核苷酸

[0984] <400> 85

[0985] tggtagtgtt tagggagccg 20

[0986] <210> 86

[0987] <211> 149

[0988] <212> DNA

[0989] <213> 人工序列

[0990] <220>

[0991] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[0992] <400> 86

[0993] atgtcgttat taaccgactt ctgaacgtgc ggtgggatcg tgctggcgat acgcgtccac 60

[0994] aggacgatgt gcagcggcca caggcccctg agcagccccc gacccatggc agaccccgct 120

[0995] gctcgtcata gaccgagccc ccagcgcag 149

[0996] <210> 87

[0997] <211> 31

[0998] <212> DNA

[0999] <213> 人工序列

[1000] <220>

[1001] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1002] <400> 87

[1003] ttgaatatct catgaatgga ccagtattct a 31

[1004] <210> 88

[1005] <211> 33

[1006] <212> DNA

[1007] <213> 人工序列

[1008] <220>

[1009] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1010] <400> 88

[1011] caagtggaat ttctaggcgc ctctatgcta ctg 33

[1012] <210> 89

[1013] <211> 31

[1014] <212> DNA

[1015] <213> 人工序列

[1016] <220>

[1017] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1018] <400> 89

[1019] atttatatac aggcattaat aaagtgcaaa t 31

[1020] <210> 90

[1021] <211> 32

[1022] <212> DNA

[1023] <213> 人工序列

[1024] <220>
[1025] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1026] <400> 90
[1027] aagtgctaac acagcttatc ctatgacaat gt 32
[1028] <210> 91
[1029] <211> 39
[1030] <212> DNA
[1031] <213> 人工序列
[1032] <220>
[1033] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1034] <400> 91
[1035] ccccagaaga gctatttggt agtgtttagg gagccgtct 39
[1036] <210> 92
[1037] <211> 78
[1038] <212> DNA
[1039] <213> 人工序列
[1040] <220>
[1041] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1042] <400> 92
[1043] ctggtcgccc tcgatctctc aacacgttgt ccttcatgct ttcgacacag gggtgctccc 60
[1044] gcaccttgga accaaatg 78
[1045] <210> 93
[1046] <211> 39
[1047] <212> DNA
[1048] <213> 人工序列
[1049] <220>
[1050] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1051] <400> 93
[1052] gtcctcccag ctgatgacat gccgcgtcag gtactcctg 39
[1053] <210> 94
[1054] <211> 40
[1055] <212> DNA
[1056] <213> 人工序列
[1057] <220>
[1058] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1059] <400> 94
[1060] ctcagcttct gctgccggtt aacgcggtag cagtagaaga 40
[1061] <210> 95
[1062] <211> 68
[1063] <212> DNA
[1064] <213> 人工序列
[1065] <220>

[1066] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1067] <400> 95

[1068] gttattaacc gacttctgaa cgtgcggtgg gatcgtgctg gcgatacgcg tccacaggac 60

[1069] gatgtgca 68

[1070] <210> 96

[1071] <211> 64

[1072] <212> DNA

[1073] <213> 人工序列

[1074] <220>

[1075] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1076] <400> 96

[1077] caggcccctg agcagccccc gacccatggc agaccccgct gctcgtcata gaccgagccc 60

[1078] ccag 64

[1079] <210> 97

[1080] <211> 52

[1081] <212> DNA

[1082] <213> 人工序列

[1083] <220>

[1084] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1085] <400> 97

[1086] cacgcgcggg ggtgtcgtcg ctccgtgcgc gcgagtgact cactcaactt ca 52

[1087] <210> 98

[1088] <211> 10

[1089] <212> DNA

[1090] <213> 人工序列

[1091] <220>

[1092] <223> 一般通式S2

[1093] <220>

[1094] <221> misc_feature

[1095] <222> (1)..(1)

[1096] <223> w可表示5'GGTGGGATCGTGCTGGCGAT'3或衍生自5'GGTGGGATCGTGCTGGCGAT'3的序列,其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中w为至少T

[1097] <220>

[1098] <221> misc_feature

[1099] <222> (10)..(10)

[1100] <223> r可表示5'ACAGGACGATGTGCAGCGGC'3或衍生自5'ACAGGACGATGTGCAGCGGC'3的序列,其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中w为至少A

[1101] <400> 98

[1102] nacgcgtccn 10

[1103] <210> 99

[1104] <211> 10

[1105] <212> DNA

[1106] <213> 人工序列

[1107] <220>

[1108] <223> 一般通式S5

[1109] <220>

[1110] <221> misc_feature

[1111] <222> (1)..(1)

[1112] <223> w可表示5'CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG'3 或衍生自5'CCCAGCCTGCCCCAGAAGAGCTATTTG'3的序列，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中w为至少G

[1113] <220>

[1114] <221> misc_feature

[1115] <222> (10)..(10)

[1116] <223> r可表示5'TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC'3 或衍生自5'TAGGGAGCCGTCTTCAGGAATCTTCTC'3的序列，其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中w为至少G

[1117] <400> 99

[1118] ngtagtgttn 10

[1119] <210> 100

[1120] <211> 10

[1121] <212> DNA

[1122] <213> 人工序列

[1123] <220>

[1124] <223> 一般通式S6

[1125] <220>

[1126] <221> misc_feature

[1127] <222> (1)..(1)

[1128] <223> w可表示5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3或衍生自5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3的序列，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中w为至少G

[1129] <220>

[1130] <221> misc_feature

[1131] <222> (1)..(1)

[1132] <223> n可表示5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3或衍生自5'TGAATCTTGAATATCTCATG'3的序列，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中n为至少G

[1133] <220>

[1134] <221> misc_feature

[1135] <222> (10)..(10)

[1136] <223> r可表示5'AGTATTCTAGAAACTCACCA'3或衍生自5'AGTATTCTAGAAACTCACCA'3，其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中w为至少A

[1137] <400> 100

[1138] naatggaccn 10

[1139] <210> 101

[1140] <211> 10

[1141] <212> DNA

[1142] <213> 人工序列

[1143] <220>

[1144] <223> 一般通式S7

[1145] <220>

[1146] <221> misc_feature

[1147] <222> (1)..(1)

[1148] <223> w可表示5'ATTCATATTTATATACAGGC'3或衍生自5'ATTCATATTTATATACAGGC'3的序列，其中一个或多个核苷酸从5'末端删除并且其中w为至少C

[1149] <220>

[1150] <221> misc_feature

[1151] <222> (10)..(10)

[1152] <223> r可表示5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3或衍生自5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3的序列，其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中w为至少A

[1153] <220>

[1154] <221> misc_feature

[1155] <222> (10)..(10)

[1156] <223> n可表示5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3或衍生自5'AGTGCAAATGTTATTGGCTA'3的序列，其中一个或多个核苷酸从3'末端删除并且其中n为至少A

[1157] <400> 101

[1158] nattaataan 10

[1159] <210> 102

[1160] <211> 17

[1161] <212> DNA

[1162] <213> 人工序列

[1163] <220>

[1164] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1165] <400> 102

[1166] gcgagtgact cactcaa 17

[1167] <210> 103

[1168] <211> 15

[1169] <212> DNA

[1170] <213> 人工序列

[1171] <220>

[1172] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1173] <400> 103

[1174] cgagtgactc actca 15

[1175] <210> 104

[1176] <211> 16

[1177] <212> DNA

[1178] <213> 人工序列

[1179] <220>

[1180] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1181] <400> 104

[1182] gcgagtgact cactca 16
[1183] <210> 105
[1184] <211> 17
[1185] <212> DNA
[1186] <213> 人工序列
[1187] <220>
[1188] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1189] <400> 105
[1190] cgcgagtgac tcactca 17
[1191] <210> 106
[1192] <211> 14
[1193] <212> DNA
[1194] <213> 人工序列
[1195] <220>
[1196] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1197] <400> 106
[1198] cgagtgactc actc 14
[1199] <210> 107
[1200] <211> 16
[1201] <212> DNA
[1202] <213> 人工序列
[1203] <220>
[1204] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1205] <400> 107
[1206] cgcgagtgac tcactc 16
[1207] <210> 108
[1208] <211> 17
[1209] <212> DNA
[1210] <213> 人工序列
[1211] <220>
[1212] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1213] <400> 108
[1214] gcgcgagtga ctcactc 17
[1215] <210> 109
[1216] <211> 14
[1217] <212> DNA
[1218] <213> 人工序列
[1219] <220>
[1220] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1221] <400> 109
[1222] gcgagtgact cact 14
[1223] <210> 110

[1224] <211> 16
[1225] <212> DNA
[1226] <213> 人工序列
[1227] <220>
[1228] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1229] <400> 110
[1230] gcgcgagtga ctcact 16
[1231] <210> 111
[1232] <211> 17
[1233] <212> DNA
[1234] <213> 人工序列
[1235] <220>
[1236] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1237] <400> 111
[1238] cgcgcgagtg actcact 17
[1239] <210> 112
[1240] <211> 12
[1241] <212> DNA
[1242] <213> 人工序列
[1243] <220>
[1244] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1245] <400> 112
[1246] cgagtgactc ac 12
[1247] <210> 113
[1248] <211> 13
[1249] <212> DNA
[1250] <213> 人工序列
[1251] <220>
[1252] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1253] <400> 113
[1254] gcgagtgact cac 13
[1255] <210> 114
[1256] <211> 14
[1257] <212> DNA
[1258] <213> 人工序列
[1259] <220>
[1260] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1261] <400> 114
[1262] cgcgagtgac tcac 14
[1263] <210> 115
[1264] <211> 16
[1265] <212> DNA

[1266] <213> 人工序列
[1267] <220>
[1268] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1269] <400> 115
[1270] cgcgcgagtg actcac 16
[1271] <210> 116
[1272] <211> 17
[1273] <212> DNA
[1274] <213> 人工序列
[1275] <220>
[1276] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1277] <400> 116
[1278] gcgcgcgagt gactcac 17
[1279] <210> 117
[1280] <211> 13
[1281] <212> DNA
[1282] <213> 人工序列
[1283] <220>
[1284] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1285] <400> 117
[1286] cgcgagtgac tca 13
[1287] <210> 118
[1288] <211> 14
[1289] <212> DNA
[1290] <213> 人工序列
[1291] <220>
[1292] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1293] <400> 118
[1294] gcgcgagtga ctca 14
[1295] <210> 119
[1296] <211> 15
[1297] <212> DNA
[1298] <213> 人工序列
[1299] <220>
[1300] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1301] <400> 119
[1302] cgcgcgagtg actca 15
[1303] <210> 120
[1304] <211> 16
[1305] <212> DNA
[1306] <213> 人工序列
[1307] <220>

[1308] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1309] <400> 120
[1310] gcgcgcgagt gactca 16
[1311] <210> 121
[1312] <211> 17
[1313] <212> DNA
[1314] <213> 人工序列
[1315] <220>
[1316] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1317] <400> 121
[1318] tgcgcgcgag tgactca 17
[1319] <210> 122
[1320] <211> 14
[1321] <212> DNA
[1322] <213> 人工序列
[1323] <220>
[1324] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1325] <400> 122
[1326] cgcgcgagtg actc 14
[1327] <210> 123
[1328] <211> 16
[1329] <212> DNA
[1330] <213> 人工序列
[1331] <220>
[1332] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1333] <400> 123
[1334] tgcgcgcgag tgactc 16
[1335] <210> 124
[1336] <211> 17
[1337] <212> DNA
[1338] <213> 人工序列
[1339] <220>
[1340] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1341] <400> 124
[1342] gtgcgcgcga gtgactc 17
[1343] <210> 125
[1344] <211> 13
[1345] <212> DNA
[1346] <213> 人工序列
[1347] <220>
[1348] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1349] <400> 125

[1350] cgcgcgagtg act 13
[1351] <210> 126
[1352] <211> 14
[1353] <212> DNA
[1354] <213> 人工序列
[1355] <220>
[1356] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1357] <400> 126
[1358] tgcgcgcgag tgac 14
[1359] <210> 127
[1360] <211> 16
[1361] <212> DNA
[1362] <213> 人工序列
[1363] <220>
[1364] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1365] <400> 127
[1366] cgtgcgcgcg agtgac 16
[1367] <210> 128
[1368] <211> 13
[1369] <212> DNA
[1370] <213> 人工序列
[1371] <220>
[1372] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1373] <400> 128
[1374] tgcgcgcgag tga 13
[1375] <210> 129
[1376] <211> 16
[1377] <212> DNA
[1378] <213> 人工序列
[1379] <220>
[1380] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1381] <400> 129
[1382] gtcgtcgctc cgtgcg 16
[1383] <210> 130
[1384] <211> 15
[1385] <212> DNA
[1386] <213> 人工序列
[1387] <220>
[1388] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1389] <400> 130
[1390] gtcgtcgctc cgtgc 15
[1391] <210> 131

[1392] <211> 17
[1393] <212> DNA
[1394] <213> 人工序列
[1395] <220>
[1396] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1397] <400> 131
[1398] gtgtcgtcgc tccgtgc 17
[1399] <210> 132
[1400] <211> 13
[1401] <212> DNA
[1402] <213> 人工序列
[1403] <220>
[1404] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1405] <400> 132
[1406] tcgtcgctcc gtg 13
[1407] <210> 133
[1408] <211> 15
[1409] <212> DNA
[1410] <213> 人工序列
[1411] <220>
[1412] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1413] <400> 133
[1414] tgtcgtcgct ccgtg 15
[1415] <210> 134
[1416] <211> 12
[1417] <212> DNA
[1418] <213> 人工序列
[1419] <220>
[1420] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1421] <400> 134
[1422] tcgtcgctcc gt 12
[1423] <210> 135
[1424] <211> 13
[1425] <212> DNA
[1426] <213> 人工序列
[1427] <220>
[1428] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1429] <400> 135
[1430] gtcgtcgctc cgt 13
[1431] <210> 136
[1432] <211> 14
[1433] <212> DNA

[1434] <213> 人工序列
[1435] <220>
[1436] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1437] <400> 136
[1438] tgtcgtcgct ccgt 14
[1439] <210> 137
[1440] <211> 15
[1441] <212> DNA
[1442] <213> 人工序列
[1443] <220>
[1444] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1445] <400> 137
[1446] gtgtcgtcgc tccgt 15
[1447] <210> 138
[1448] <211> 16
[1449] <212> DNA
[1450] <213> 人工序列
[1451] <220>
[1452] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1453] <400> 138
[1454] ggtgtcgtcg ctccgt 16
[1455] <210> 139
[1456] <211> 16
[1457] <212> DNA
[1458] <213> 人工序列
[1459] <220>
[1460] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1461] <400> 139
[1462] cgtcatagac cgagcc 16
[1463] <210> 140
[1464] <211> 12
[1465] <212> DNA
[1466] <213> 人工序列
[1467] <220>
[1468] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1469] <400> 140
[1470] atagaccgag cc 12
[1471] <210> 141
[1472] <211> 16
[1473] <212> DNA
[1474] <213> 人工序列
[1475] <220>

[1476] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1477] <400> 141
[1478] gctcgtcata gaccga 16
[1479] <210> 142
[1480] <211> 13
[1481] <212> DNA
[1482] <213> 人工序列
[1483] <220>
[1484] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1485] <400> 142
[1486] cgtcatagac cga 13
[1487] <210> 143
[1488] <211> 14
[1489] <212> DNA
[1490] <213> 人工序列
[1491] <220>
[1492] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1493] <400> 143
[1494] ctcgtcatag accg 14
[1495] <210> 144
[1496] <211> 15
[1497] <212> DNA
[1498] <213> 人工序列
[1499] <220>
[1500] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1501] <400> 144
[1502] gctcgtcata gaccg 15
[1503] <210> 145
[1504] <211> 14
[1505] <212> DNA
[1506] <213> 人工序列
[1507] <220>
[1508] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1509] <400> 145
[1510] gctcgtcata gacc 14
[1511] <210> 146
[1512] <211> 17
[1513] <212> DNA
[1514] <213> 人工序列
[1515] <220>
[1516] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1517] <400> 146

[1518] cagcccccga cccatgg 17
[1519] <210> 147
[1520] <211> 16
[1521] <212> DNA
[1522] <213> 人工序列
[1523] <220>
[1524] <223> 参考寡核苷酸
[1525] <400> 147
[1526] cagcccccga cccatg 16
[1527] <210> 148
[1528] <211> 14
[1529] <212> DNA
[1530] <213> 人工序列
[1531] <220>
[1532] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1533] <400> 148
[1534] agcccccgac ccat 14
[1535] <210> 149
[1536] <211> 28
[1537] <212> DNA
[1538] <213> 人工序列
[1539] <220>
[1540] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1541] <400> 149
[1542] cagcccccga cccaagcccc cgacccat 28
[1543] <210> 150
[1544] <211> 17
[1545] <212> DNA
[1546] <213> 人工序列
[1547] <220>
[1548] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1549] <400> 150
[1550] cgcgtccaca ggacgat 17
[1551] <210> 151
[1552] <211> 14
[1553] <212> DNA
[1554] <213> 人工序列
[1555] <220>
[1556] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1557] <400> 151
[1558] cgcgtccaca ggac 14
[1559] <210> 152

[1560] <211> 15
[1561] <212> DNA
[1562] <213> 人工序列
[1563] <220>
[1564] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1565] <400> 152
[1566] cgatacgcgt ccaca 15
[1567] <210> 153
[1568] <211> 13
[1569] <212> DNA
[1570] <213> 人工序列
[1571] <220>
[1572] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1573] <400> 153
[1574] cgatacgcgt cca 13
[1575] <210> 154
[1576] <211> 16
[1577] <212> DNA
[1578] <213> 人工序列
[1579] <220>
[1580] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1581] <400> 154
[1582] tggcgatacg cgtcca 16
[1583] <210> 155
[1584] <211> 12
[1585] <212> DNA
[1586] <213> 人工序列
[1587] <220>
[1588] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1589] <400> 155
[1590] cgatacgcgt cc 12
[1591] <210> 156
[1592] <211> 13
[1593] <212> DNA
[1594] <213> 人工序列
[1595] <220>
[1596] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1597] <400> 156
[1598] gcgatacgcg tcc 13
[1599] <210> 157
[1600] <211> 17
[1601] <212> DNA

[1602] <213> 人工序列
[1603] <220>
[1604] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1605] <400> 157
[1606] gctggcgata cgcgtcc 17
[1607] <210> 158
[1608] <211> 15
[1609] <212> DNA
[1610] <213> 人工序列
[1611] <220>
[1612] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1613] <400> 158
[1614] ctggcgatac gcgtc 15
[1615] <210> 159
[1616] <211> 12
[1617] <212> DNA
[1618] <213> 人工序列
[1619] <220>
[1620] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1621] <400> 159
[1622] gcgatacgcg tc 12
[1623] <210> 160
[1624] <211> 16
[1625] <212> DNA
[1626] <213> 人工序列
[1627] <220>
[1628] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1629] <400> 160
[1630] gctggcgata cgcgtc 16
[1631] <210> 161
[1632] <211> 14
[1633] <212> DNA
[1634] <213> 人工序列
[1635] <220>
[1636] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1637] <400> 161
[1638] tggcgatacg cgtc 14
[1639] <210> 162
[1640] <211> 13
[1641] <212> DNA
[1642] <213> 人工序列
[1643] <220>

[1644] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1645] <400> 162

[1646] tggcgatacg cgt 13

[1647] <210> 163

[1648] <211> 14

[1649] <212> DNA

[1650] <213> 人工序列

[1651] <220>

[1652] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1653] <400> 163

[1654] ctggcgatac gcgt 14

[1655] <210> 164

[1656] <211> 12

[1657] <212> DNA

[1658] <213> 人工序列

[1659] <220>

[1660] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1661] <400> 164

[1662] ggcgatacgc gt 12

[1663] <210> 165

[1664] <211> 13

[1665] <212> DNA

[1666] <213> 人工序列

[1667] <220>

[1668] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1669] <400> 165

[1670] ctggcgatac gcg 13

[1671] <210> 166

[1672] <211> 12

[1673] <212> DNA

[1674] <213> 人工序列

[1675] <220>

[1676] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1677] <400> 166

[1678] tggcgatacg cg 12

[1679] <210> 167

[1680] <211> 17

[1681] <212> DNA

[1682] <213> 人工序列

[1683] <220>

[1684] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1685] <400> 167

[1686] atcgtgctgg cgatacg 17
[1687] <210> 168
[1688] <211> 16
[1689] <212> DNA
[1690] <213> 人工序列
[1691] <220>
[1692] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1693] <400> 168
[1694] cgtgcggtgg gatcgt 16
[1695] <210> 169
[1696] <211> 17
[1697] <212> DNA
[1698] <213> 人工序列
[1699] <220>
[1700] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1701] <400> 169
[1702] acgtgcggtg ggatcgt 17
[1703] <210> 170
[1704] <211> 17
[1705] <212> DNA
[1706] <213> 人工序列
[1707] <220>
[1708] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1709] <400> 170
[1710] aacgtgcggt gggatcg 17
[1711] <210> 171
[1712] <211> 15
[1713] <212> DNA
[1714] <213> 人工序列
[1715] <220>
[1716] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1717] <400> 171
[1718] aacgtgcggt gggat 15
[1719] <210> 172
[1720] <211> 17
[1721] <212> DNA
[1722] <213> 人工序列
[1723] <220>
[1724] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1725] <400> 172
[1726] tgaacgtgcg gtgggat 17
[1727] <210> 173

[1728] <211> 17
[1729] <212> DNA
[1730] <213> 人工序列
[1731] <220>
[1732] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1733] <400> 173
[1734] cgacttctga acgtgcg 17
[1735] <210> 174
[1736] <211> 17
[1737] <212> DNA
[1738] <213> 人工序列
[1739] <220>
[1740] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1741] <400> 174
[1742] ttaacgcggt agcagta 17
[1743] <210> 175
[1744] <211> 16
[1745] <212> DNA
[1746] <213> 人工序列
[1747] <220>
[1748] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1749] <400> 175
[1750] taacgcggta gcagta 16
[1751] <210> 176
[1752] <211> 17
[1753] <212> DNA
[1754] <213> 人工序列
[1755] <220>
[1756] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1757] <400> 176
[1758] gttaacgcgg tagcagt 17
[1759] <210> 177
[1760] <211> 15
[1761] <212> DNA
[1762] <213> 人工序列
[1763] <220>
[1764] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1765] <400> 177
[1766] ttaacgcggt agcag 15
[1767] <210> 178
[1768] <211> 13
[1769] <212> DNA

[1770] <213> 人工序列
[1771] <220>
[1772] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1773] <400> 178
[1774] taacgcggta gca 13
[1775] <210> 179
[1776] <211> 12
[1777] <212> DNA
[1778] <213> 人工序列
[1779] <220>
[1780] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1781] <400> 179
[1782] taacgcggta gc 12
[1783] <210> 180
[1784] <211> 13
[1785] <212> DNA
[1786] <213> 人工序列
[1787] <220>
[1788] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1789] <400> 180
[1790] ttaacgcggt agc 13
[1791] <210> 181
[1792] <211> 12
[1793] <212> DNA
[1794] <213> 人工序列
[1795] <220>
[1796] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1797] <400> 181
[1798] ttaacgcggt ag 12
[1799] <210> 182
[1800] <211> 13
[1801] <212> DNA
[1802] <213> 人工序列
[1803] <220>
[1804] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1805] <400> 182
[1806] gttaacgcgg tag 13
[1807] <210> 183
[1808] <211> 15
[1809] <212> DNA
[1810] <213> 人工序列
[1811] <220>

[1812] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1813] <400> 183
[1814] cggttaacgc ggtag 15
[1815] <210> 184
[1816] <211> 16
[1817] <212> DNA
[1818] <213> 人工序列
[1819] <220>
[1820] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1821] <400> 184
[1822] ccggttaacg cggtag 16
[1823] <210> 185
[1824] <211> 14
[1825] <212> DNA
[1826] <213> 人工序列
[1827] <220>
[1828] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1829] <400> 185
[1830] cggttaacgc ggta 14
[1831] <210> 186
[1832] <211> 13
[1833] <212> DNA
[1834] <213> 人工序列
[1835] <220>
[1836] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1837] <400> 186
[1838] ggttaacgcg gta 13
[1839] <210> 187
[1840] <211> 15
[1841] <212> DNA
[1842] <213> 人工序列
[1843] <220>
[1844] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1845] <400> 187
[1846] ccggttaacg cggta 15
[1847] <210> 188
[1848] <211> 16
[1849] <212> DNA
[1850] <213> 人工序列
[1851] <220>
[1852] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1853] <400> 188

[1854] gccggttaac gcggta 16
[1855] <210> 189
[1856] <211> 17
[1857] <212> DNA
[1858] <213> 人工序列
[1859] <220>
[1860] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1861] <400> 189
[1862] tgccggttaa cgcggta 17
[1863] <210> 190
[1864] <211> 13
[1865] <212> DNA
[1866] <213> 人工序列
[1867] <220>
[1868] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1869] <400> 190
[1870] cggttaacgc ggt 13
[1871] <210> 191
[1872] <211> 13
[1873] <212> DNA
[1874] <213> 人工序列
[1875] <220>
[1876] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1877] <400> 191
[1878] ccggttaacg cgg 13
[1879] <210> 192
[1880] <211> 14
[1881] <212> DNA
[1882] <213> 人工序列
[1883] <220>
[1884] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1885] <400> 192
[1886] gccggttaac gcgg 14
[1887] <210> 193
[1888] <211> 15
[1889] <212> DNA
[1890] <213> 人工序列
[1891] <220>
[1892] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1893] <400> 193
[1894] tgccggttaa cgcgg 15
[1895] <210> 194

[1896] <211> 13
[1897] <212> DNA
[1898] <213> 人工序列
[1899] <220>
[1900] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1901] <400> 194
[1902] gccggttaac gcg 13
[1903] <210> 195
[1904] <211> 15
[1905] <212> DNA
[1906] <213> 人工序列
[1907] <220>
[1908] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1909] <400> 195
[1910] ctgccggtta acgcg 15
[1911] <210> 196
[1912] <211> 16
[1913] <212> DNA
[1914] <213> 人工序列
[1915] <220>
[1916] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1917] <400> 196
[1918] gctgccggtt aacgcg 16
[1919] <210> 197
[1920] <211> 16
[1921] <212> DNA
[1922] <213> 人工序列
[1923] <220>
[1924] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1925] <400> 197
[1926] atgccgcgtc aggtac 16
[1927] <210> 198
[1928] <211> 13
[1929] <212> DNA
[1930] <213> 人工序列
[1931] <220>
[1932] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1933] <400> 198
[1934] acatgccgcg tca 13
[1935] <210> 199
[1936] <211> 16
[1937] <212> DNA

[1938] <213> 人工序列
[1939] <220>
[1940] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1941] <400> 199
[1942] gatgacatgc cgcgtc 16
[1943] <210> 200
[1944] <211> 12
[1945] <212> DNA
[1946] <213> 人工序列
[1947] <220>
[1948] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1949] <400> 200
[1950] gacatgccgc gt 12
[1951] <210> 201
[1952] <211> 15
[1953] <212> DNA
[1954] <213> 人工序列
[1955] <220>
[1956] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1957] <400> 201
[1958] gatgacatgc cgcgt 15
[1959] <210> 202
[1960] <211> 13
[1961] <212> DNA
[1962] <213> 人工序列
[1963] <220>
[1964] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1965] <400> 202
[1966] atgacatgcc gcg 13
[1967] <210> 203
[1968] <211> 17
[1969] <212> DNA
[1970] <213> 人工序列
[1971] <220>
[1972] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[1973] <400> 203
[1974] tcccgcacct tggaacc 17
[1975] <210> 204
[1976] <211> 16
[1977] <212> DNA
[1978] <213> 人工序列
[1979] <220>

[1980] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1981] <400> 204

[1982] cgatctctca acacgt 16

[1983] <210> 205

[1984] <211> 17

[1985] <212> DNA

[1986] <213> 人工序列

[1987] <220>

[1988] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1989] <400> 205

[1990] tcgatctctc aacacgt 17

[1991] <210> 206

[1992] <211> 15

[1993] <212> DNA

[1994] <213> 人工序列

[1995] <220>

[1996] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[1997] <400> 206

[1998] cgatctctca acacg 15

[1999] <210> 207

[2000] <211> 16

[2001] <212> DNA

[2002] <213> 人工序列

[2003] <220>

[2004] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2005] <400> 207

[2006] tcgatctctc aacacg 16

[2007] <210> 208

[2008] <211> 17

[2009] <212> DNA

[2010] <213> 人工序列

[2011] <220>

[2012] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2013] <400> 208

[2014] ctcgatctct caacacg 17

[2015] <210> 209

[2016] <211> 16

[2017] <212> DNA

[2018] <213> 人工序列

[2019] <220>

[2020] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2021] <400> 209

[2022] gtagtgttta gggagc 16
[2023] <210> 210
[2024] <211> 16
[2025] <212> DNA
[2026] <213> 人工序列
[2027] <220>
[2028] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2029] <400> 210
[2030] gctatttggt agtgtt 16
[2031] <210> 211
[2032] <211> 15
[2033] <212> DNA
[2034] <213> 人工序列
[2035] <220>
[2036] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2037] <400> 211
[2038] agcttatcct atgac 15
[2039] <210> 212
[2040] <211> 14
[2041] <212> DNA
[2042] <213> 人工序列
[2043] <220>
[2044] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2045] <400> 212
[2046] agcttatcct atga 14
[2047] <210> 213
[2048] <211> 17
[2049] <212> DNA
[2050] <213> 人工序列
[2051] <220>
[2052] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2053] <400> 213
[2054] caggcattaa taaagtg 17
[2055] <210> 214
[2056] <211> 16
[2057] <212> DNA
[2058] <213> 人工序列
[2059] <220>
[2060] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2061] <400> 214
[2062] ctaggcgcct ctatgc 16
[2063] <210> 215

[2064] <211> 14
[2065] <212> DNA
[2066] <213> 人工序列
[2067] <220>
[2068] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2069] <400> 215
[2070] taggcgcctc tatg 14
[2071] <210> 216
[2072] <211> 15
[2073] <212> DNA
[2074] <213> 人工序列
[2075] <220>
[2076] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2077] <400> 216
[2078] ctaggcgcct ctatg 15
[2079] <210> 217
[2080] <211> 13
[2081] <212> DNA
[2082] <213> 人工序列
[2083] <220>
[2084] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2085] <400> 217
[2086] taggcgcctc tat 13
[2087] <210> 218
[2088] <211> 16
[2089] <212> DNA
[2090] <213> 人工序列
[2091] <220>
[2092] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2093] <400> 218
[2094] catgaatgga ccagta 16
[2095] <210> 219
[2096] <211> 10
[2097] <212> DNA
[2098] <213> 人工序列
[2099] <220>
[2100] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2101] <400> 219
[2102] gaatggacca 10
[2103] <210> 220
[2104] <211> 12
[2105] <212> DNA

[2106] <213> 人工序列
[2107] <220>
[2108] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2109] <400> 220
[2110] tgaatggacc ag 12
[2111] <210> 221
[2112] <211> 13
[2113] <212> DNA
[2114] <213> 人工序列
[2115] <220>
[2116] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2117] <400> 221
[2118] tgaatggacc agt 13
[2119] <210> 222
[2120] <211> 14
[2121] <212> DNA
[2122] <213> 人工序列
[2123] <220>
[2124] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2125] <400> 222
[2126] atgaatggac cagt 14
[2127] <210> 223
[2128] <211> 15
[2129] <212> DNA
[2130] <213> 人工序列
[2131] <220>
[2132] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2133] <400> 223
[2134] atgaatggac cagta 15
[2135] <210> 224
[2136] <211> 17
[2137] <212> DNA
[2138] <213> 人工序列
[2139] <220>
[2140] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2141] <400> 224
[2142] catgaatgga ccagtat 17
[2143] <210> 225
[2144] <211> 18
[2145] <212> DNA
[2146] <213> 人工序列
[2147] <220>

[2148] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2149] <400> 225

[2150] tcatgaatgg accagtat 18

[2151] <210> 226

[2152] <211> 19

[2153] <212> DNA

[2154] <213> 人工序列

[2155] <220>

[2156] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2157] <400> 226

[2158] tcatgaatgg accagtatt 19

[2159] <210> 227

[2160] <211> 20

[2161] <212> DNA

[2162] <213> 人工序列

[2163] <220>

[2164] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2165] <400> 227

[2166] ctcatgaatg gaccagtatt 20

[2167] <210> 228

[2168] <211> 22

[2169] <212> DNA

[2170] <213> 人工序列

[2171] <220>

[2172] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2173] <400> 228

[2174] tctcatgaat ggaccagtat tc 22

[2175] <210> 229

[2176] <211> 24

[2177] <212> DNA

[2178] <213> 人工序列

[2179] <220>

[2180] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2181] <400> 229

[2182] atctcatgaa tggaccagta ttct 24

[2183] <210> 230

[2184] <211> 26

[2185] <212> DNA

[2186] <213> 人工序列

[2187] <220>

[2188] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2189] <400> 230

[2190] tatctcatga atggaccagt attcta 26

[2191] <210> 231

[2192] <211> 28

[2193] <212> DNA

[2194] <213> 人工序列

[2195] <220>

[2196] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2197] <400> 231

[2198] atatctcatg aatggaccag tattctag 28

[2199] <210> 232

[2200] <211> 10

[2201] <212> DNA

[2202] <213> 人工序列

[2203] <220>

[2204] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2205] <400> 232

[2206] cgtcatagac 10

[2207] <210> 233

[2208] <211> 12

[2209] <212> DNA

[2210] <213> 人工序列

[2211] <220>

[2212] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2213] <400> 233

[2214] tcgtcataga cc 12

[2215] <210> 234

[2216] <211> 13

[2217] <212> DNA

[2218] <213> 人工序列

[2219] <220>

[2220] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2221] <400> 234

[2222] tcgtcataga ccg 13

[2223] <210> 235

[2224] <211> 15

[2225] <212> DNA

[2226] <213> 人工序列

[2227] <220>

[2228] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2229] <400> 235

[2230] ctcgtcatag accga 15

[2231] <210> 236

[2232] <211> 28
[2233] <212> DNA
[2234] <213> 人工序列
[2235] <220>
[2236] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2237] <400> 236
[2238] atatacaggc attaataaag tgcaaatg 28
[2239] <210> 237
[2240] <211> 17
[2241] <212> DNA
[2242] <213> 人工序列
[2243] <220>
[2244] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2245] <400> 237
[2246] tgctcgtcat agaccga 17
[2247] <210> 238
[2248] <211> 18
[2249] <212> DNA
[2250] <213> 人工序列
[2251] <220>
[2252] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2253] <400> 238
[2254] tgctcgtcat agaccgag 18
[2255] <210> 239
[2256] <211> 19
[2257] <212> DNA
[2258] <213> 人工序列
[2259] <220>
[2260] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2261] <400> 239
[2262] tgctcgtcat agaccgagc 19
[2263] <210> 240
[2264] <211> 20
[2265] <212> DNA
[2266] <213> 人工序列
[2267] <220>
[2268] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2269] <400> 240
[2270] ctgctcgtca tagaccgagc 20
[2271] <210> 241
[2272] <211> 22
[2273] <212> DNA

[2274] <213> 人工序列
[2275] <220>
[2276] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2277] <400> 241
[2278] gctgctcgtc atagaccgag cc 22
[2279] <210> 242
[2280] <211> 24
[2281] <212> DNA
[2282] <213> 人工序列
[2283] <220>
[2284] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2285] <400> 242
[2286] cgctgctcgt catagaccga gccc 24
[2287] <210> 243
[2288] <211> 26
[2289] <212> DNA
[2290] <213> 人工序列
[2291] <220>
[2292] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2293] <400> 243
[2294] ccgctgctcg tcatagaccg agcccc 26
[2295] <210> 244
[2296] <211> 28
[2297] <212> DNA
[2298] <213> 人工序列
[2299] <220>
[2300] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2301] <400> 244
[2302] cccgctgctc gtcatagacc gagccccc 28
[2303] <210> 245
[2304] <211> 10
[2305] <212> DNA
[2306] <213> 人工序列
[2307] <220>
[2308] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2309] <400> 245
[2310] tacgcgtcca 10
[2311] <210> 246
[2312] <211> 12
[2313] <212> DNA
[2314] <213> 人工序列
[2315] <220>

[2316] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2317] <400> 246

[2318] atacgcgtcc ac 12

[2319] <210> 247

[2320] <211> 13

[2321] <212> DNA

[2322] <213> 人工序列

[2323] <220>

[2324] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2325] <400> 247

[2326] gatacgcgtc cac 13

[2327] <210> 248

[2328] <211> 14

[2329] <212> DNA

[2330] <213> 人工序列

[2331] <220>

[2332] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2333] <400> 248

[2334] gatacgcgtc caca 14

[2335] <210> 249

[2336] <211> 16

[2337] <212> DNA

[2338] <213> 人工序列

[2339] <220>

[2340] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2341] <400> 249

[2342] cgatacgcgt ccacag 16

[2343] <210> 250

[2344] <211> 17

[2345] <212> DNA

[2346] <213> 人工序列

[2347] <220>

[2348] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2349] <400> 250

[2350] gcgatacgcg tccacag 17

[2351] <210> 251

[2352] <211> 18

[2353] <212> DNA

[2354] <213> 人工序列

[2355] <220>

[2356] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2357] <400> 251

[2358] gcgatacgcg tccacagg 18
[2359] <210> 252
[2360] <211> 19
[2361] <212> DNA
[2362] <213> 人工序列
[2363] <220>
[2364] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2365] <400> 252
[2366] gcgatacgcg tccacagga 19
[2367] <210> 253
[2368] <211> 20
[2369] <212> DNA
[2370] <213> 人工序列
[2371] <220>
[2372] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2373] <400> 253
[2374] ggcgatacgc gtccacagga 20
[2375] <210> 254
[2376] <211> 22
[2377] <212> DNA
[2378] <213> 人工序列
[2379] <220>
[2380] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2381] <400> 254
[2382] tggcgatacg cgtccacagg ac 22
[2383] <210> 255
[2384] <211> 24
[2385] <212> DNA
[2386] <213> 人工序列
[2387] <220>
[2388] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2389] <400> 255
[2390] ctggcgatac gcgtccacag gacg 24
[2391] <210> 256
[2392] <211> 26
[2393] <212> DNA
[2394] <213> 人工序列
[2395] <220>
[2396] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2397] <400> 256
[2398] gctggcgata cgcgtccaca ggacga 26
[2399] <210> 257

[2400] <211> 28
[2401] <212> DNA
[2402] <213> 人工序列
[2403] <220>
[2404] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2405] <400> 257
[2406] tgctggcgat acgcgtccac aggacgat 28
[2407] <210> 258
[2408] <211> 10
[2409] <212> DNA
[2410] <213> 人工序列
[2411] <220>
[2412] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2413] <400> 258
[2414] gtgtttaggg 10
[2415] <210> 259
[2416] <211> 12
[2417] <212> DNA
[2418] <213> 人工序列
[2419] <220>
[2420] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2421] <400> 259
[2422] agtgtttagg ga 12
[2423] <210> 260
[2424] <211> 13
[2425] <212> DNA
[2426] <213> 人工序列
[2427] <220>
[2428] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2429] <400> 260
[2430] tagtgtttag gga 13
[2431] <210> 261
[2432] <211> 14
[2433] <212> DNA
[2434] <213> 人工序列
[2435] <220>
[2436] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2437] <400> 261
[2438] tagtgtttag ggag 14
[2439] <210> 262
[2440] <211> 15
[2441] <212> DNA

[2442] <213> 人工序列
[2443] <220>
[2444] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2445] <400> 262
[2446] tagtgtttag ggagc 15
[2447] <210> 263
[2448] <211> 17
[2449] <212> DNA
[2450] <213> 人工序列
[2451] <220>
[2452] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2453] <400> 263
[2454] gtagtgttta gggagcc 17
[2455] <210> 264
[2456] <211> 18
[2457] <212> DNA
[2458] <213> 人工序列
[2459] <220>
[2460] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2461] <400> 264
[2462] ggtagtgttt agggagcc 18
[2463] <210> 265
[2464] <211> 19
[2465] <212> DNA
[2466] <213> 人工序列
[2467] <220>
[2468] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2469] <400> 265
[2470] ggtagtgttt agggagccg 19
[2471] <210> 266
[2472] <211> 20
[2473] <212> DNA
[2474] <213> 人工序列
[2475] <220>
[2476] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2477] <400> 266
[2478] tggtagtgtt tagggagccg 20
[2479] <210> 267
[2480] <211> 22
[2481] <212> DNA
[2482] <213> 人工序列
[2483] <220>

[2484] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2485] <400> 267

[2486] ttggtagtgt ttagggagcc gt 22

[2487] <210> 268

[2488] <211> 24

[2489] <212> DNA

[2490] <213> 人工序列

[2491] <220>

[2492] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2493] <400> 268

[2494] tttggtagtg tttagggagc cgtc 24

[2495] <210> 269

[2496] <211> 26

[2497] <212> DNA

[2498] <213> 人工序列

[2499] <220>

[2500] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2501] <400> 269

[2502] atttggtagt gtttagggag ccgtct 26

[2503] <210> 270

[2504] <211> 28

[2505] <212> DNA

[2506] <213> 人工序列

[2507] <220>

[2508] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2509] <400> 270

[2510] tatttggtag tgtttaggga gccgtctt 28

[2511] <210> 271

[2512] <211> 10

[2513] <212> DNA

[2514] <213> 人工序列

[2515] <220>

[2516] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2517] <400> 271

[2518] atttggtagt 10

[2519] <210> 272

[2520] <211> 12

[2521] <212> DNA

[2522] <213> 人工序列

[2523] <220>

[2524] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[2525] <400> 272

[2526] tatttggtag tg 12
[2527] <210> 273
[2528] <211> 13
[2529] <212> DNA
[2530] <213> 人工序列
[2531] <220>
[2532] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2533] <400> 273
[2534] tatttggtag tgt 13
[2535] <210> 274
[2536] <211> 14
[2537] <212> DNA
[2538] <213> 人工序列
[2539] <220>
[2540] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2541] <400> 274
[2542] ctatttggta gtgt 14
[2543] <210> 275
[2544] <211> 15
[2545] <212> DNA
[2546] <213> 人工序列
[2547] <220>
[2548] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2549] <400> 275
[2550] ctatttggta gtgtt 15
[2551] <210> 276
[2552] <211> 17
[2553] <212> DNA
[2554] <213> 人工序列
[2555] <220>
[2556] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2557] <400> 276
[2558] gctatttggt agtgttt 17
[2559] <210> 277
[2560] <211> 18
[2561] <212> DNA
[2562] <213> 人工序列
[2563] <220>
[2564] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2565] <400> 277
[2566] agctatttgg tagtgttt 18
[2567] <210> 278

[2568] <211> 19
[2569] <212> DNA
[2570] <213> 人工序列
[2571] <220>
[2572] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2573] <400> 278
[2574] agctatttgg tagtgttta 19
[2575] <210> 279
[2576] <211> 20
[2577] <212> DNA
[2578] <213> 人工序列
[2579] <220>
[2580] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2581] <400> 279
[2582] gagctatttg gtagtgttta 20
[2583] <210> 280
[2584] <211> 22
[2585] <212> DNA
[2586] <213> 人工序列
[2587] <220>
[2588] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2589] <400> 280
[2590] agagctattt ggtagtgttt ag 22
[2591] <210> 281
[2592] <211> 24
[2593] <212> DNA
[2594] <213> 人工序列
[2595] <220>
[2596] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2597] <400> 281
[2598] aagagctatt tggtagtgtt tagg 24
[2599] <210> 282
[2600] <211> 26
[2601] <212> DNA
[2602] <213> 人工序列
[2603] <220>
[2604] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2605] <400> 282
[2606] gaagagctat ttggtagtgt ttaggg 26
[2607] <210> 283
[2608] <211> 28
[2609] <212> DNA

[2610] <213> 人工序列
[2611] <220>
[2612] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2613] <400> 283
[2614] agaagagcta tttggtagtg tttaggga 28
[2615] <210> 284
[2616] <211> 10
[2617] <212> DNA
[2618] <213> 人工序列
[2619] <220>
[2620] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2621] <400> 284
[2622] cattaataaa 10
[2623] <210> 285
[2624] <211> 12
[2625] <212> DNA
[2626] <213> 人工序列
[2627] <220>
[2628] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2629] <400> 285
[2630] gcattaataa ag 12
[2631] <210> 286
[2632] <211> 13
[2633] <212> DNA
[2634] <213> 人工序列
[2635] <220>
[2636] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2637] <400> 286
[2638] gcattaataa agt 13
[2639] <210> 287
[2640] <211> 14
[2641] <212> DNA
[2642] <213> 人工序列
[2643] <220>
[2644] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2645] <400> 287
[2646] ggcattaata aagt 14
[2647] <210> 288
[2648] <211> 15
[2649] <212> DNA
[2650] <213> 人工序列
[2651] <220>

[2652] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2653] <400> 288
[2654] ggcattaata aagtg 15
[2655] <210> 289
[2656] <211> 16
[2657] <212> DNA
[2658] <213> 人工序列
[2659] <220>
[2660] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2661] <400> 289
[2662] aggcattaat aaagtg 16
[2663] <210> 290
[2664] <211> 18
[2665] <212> DNA
[2666] <213> 人工序列
[2667] <220>
[2668] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2669] <400> 290
[2670] caggcattaa taaagtgc 18
[2671] <210> 291
[2672] <211> 19
[2673] <212> DNA
[2674] <213> 人工序列
[2675] <220>
[2676] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2677] <400> 291
[2678] acaggcatta ataaagtgc 19
[2679] <210> 292
[2680] <211> 20
[2681] <212> DNA
[2682] <213> 人工序列
[2683] <220>
[2684] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2685] <400> 292
[2686] acaggcatta ataaagtgca 20
[2687] <210> 293
[2688] <211> 22
[2689] <212> DNA
[2690] <213> 人工序列
[2691] <220>
[2692] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2693] <400> 293

[2694] tacaggcatt aataaagtgc aa 22
[2695] <210> 294
[2696] <211> 24
[2697] <212> DNA
[2698] <213> 人工序列
[2699] <220>
[2700] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2701] <400> 294
[2702] atacaggcat taataaagtg caaa 24
[2703] <210> 295
[2704] <211> 26
[2705] <212> DNA
[2706] <213> 人工序列
[2707] <220>
[2708] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[2709] <400> 295
[2710] tatacaggca ttaataaagt gcaaat 26
[2711] <210> 296
[2712] <211> 11
[2713] <212> DNA
[2714] <213> 人工序列
[2715] <220>
[2716] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2717] <400> 296
[2718] ctggtccatt c 11
[2719] <210> 297
[2720] <211> 11
[2721] <212> DNA
[2722] <213> 人工序列
[2723] <220>
[2724] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2725] <400> 297
[2726] tggtccattc a 11
[2727] <210> 298
[2728] <211> 12
[2729] <212> DNA
[2730] <213> 人工序列
[2731] <220>
[2732] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2733] <400> 298
[2734] ctggtccatt ca 12
[2735] <210> 299

[2736] <211> 11
[2737] <212> DNA
[2738] <213> 人工序列
[2739] <220>
[2740] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2741] <400> 299
[2742] tccctaaaca c 11
[2743] <210> 300
[2744] <211> 11
[2745] <212> DNA
[2746] <213> 人工序列
[2747] <220>
[2748] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2749] <400> 300
[2750] ccctaaacac t 11
[2751] <210> 301
[2752] <211> 12
[2753] <212> DNA
[2754] <213> 人工序列
[2755] <220>
[2756] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2757] <400> 301
[2758] tccctaaaca ct 12
[2759] <210> 302
[2760] <211> 11
[2761] <212> DNA
[2762] <213> 人工序列
[2763] <220>
[2764] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2765] <400> 302
[2766] cactaccaaa t 11
[2767] <210> 303
[2768] <211> 11
[2769] <212> DNA
[2770] <213> 人工序列
[2771] <220>
[2772] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2773] <400> 303
[2774] actaccaaat a 11
[2775] <210> 304
[2776] <211> 12
[2777] <212> DNA

[2778] <213> 人工序列
[2779] <220>
[2780] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2781] <400> 304
[2782] cactaccaaa ta 12
[2783] <210> 305
[2784] <211> 11
[2785] <212> DNA
[2786] <213> 人工序列
[2787] <220>
[2788] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2789] <400> 305
[2790] tggacgcgta t 11
[2791] <210> 306
[2792] <211> 11
[2793] <212> DNA
[2794] <213> 人工序列
[2795] <220>
[2796] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2797] <400> 306
[2798] ggacgcgtat c 11
[2799] <210> 307
[2800] <211> 12
[2801] <212> DNA
[2802] <213> 人工序列
[2803] <220>
[2804] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2805] <400> 307
[2806] tggacgcgta tc 12
[2807] <210> 308
[2808] <211> 11
[2809] <212> DNA
[2810] <213> 人工序列
[2811] <220>
[2812] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2813] <400> 308
[2814] ggtctatgac g 11
[2815] <210> 309
[2816] <211> 11
[2817] <212> DNA
[2818] <213> 人工序列
[2819] <220>

[2820] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[2821] <400> 309

[2822] gtctatgacg a 11

[2823] <210> 310

[2824] <211> 12

[2825] <212> DNA

[2826] <213> 人工序列

[2827] <220>

[2828] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[2829] <400> 310

[2830] ggtctatgac ga 12

[2831] <210> 311

[2832] <211> 11

[2833] <212> DNA

[2834] <213> 人工序列

[2835] <220>

[2836] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[2837] <400> 311

[2838] tttattaatg c 11

[2839] <210> 312

[2840] <211> 11

[2841] <212> DNA

[2842] <213> 人工序列

[2843] <220>

[2844] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[2845] <400> 312

[2846] ttattaatgc c 11

[2847] <210> 313

[2848] <211> 12

[2849] <212> DNA

[2850] <213> 人工序列

[2851] <220>

[2852] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[2853] <400> 313

[2854] tttattaatg cc 12

[2855] <210> 314

[2856] <211> 12

[2857] <212> DNA

[2858] <213> 人工序列

[2859] <220>

[2860] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[2861] <400> 314

[2862] actggtccat tc 12
[2863] <210> 315
[2864] <211> 12
[2865] <212> DNA
[2866] <213> 人工序列
[2867] <220>
[2868] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2869] <400> 315
[2870] tggtccattc at 12
[2871] <210> 316
[2872] <211> 13
[2873] <212> DNA
[2874] <213> 人工序列
[2875] <220>
[2876] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2877] <400> 316
[2878] ctggtccatt cat 13
[2879] <210> 317
[2880] <211> 13
[2881] <212> DNA
[2882] <213> 人工序列
[2883] <220>
[2884] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2885] <400> 317
[2886] actggtccat tca 13
[2887] <210> 318
[2888] <211> 14
[2889] <212> DNA
[2890] <213> 人工序列
[2891] <220>
[2892] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2893] <400> 318
[2894] actggtccat tcat 14
[2895] <210> 319
[2896] <211> 12
[2897] <212> DNA
[2898] <213> 人工序列
[2899] <220>
[2900] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2901] <400> 319
[2902] ctccctaaac ac 12
[2903] <210> 320

[2904] <211> 12
[2905] <212> DNA
[2906] <213> 人工序列
[2907] <220>
[2908] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2909] <400> 320
[2910] ccctaaacac ta 12
[2911] <210> 321
[2912] <211> 13
[2913] <212> DNA
[2914] <213> 人工序列
[2915] <220>
[2916] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2917] <400> 321
[2918] tccctaaaca cta 13
[2919] <210> 322
[2920] <211> 13
[2921] <212> DNA
[2922] <213> 人工序列
[2923] <220>
[2924] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2925] <400> 322
[2926] ctccctaaac act 13
[2927] <210> 323
[2928] <211> 14
[2929] <212> DNA
[2930] <213> 人工序列
[2931] <220>
[2932] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2933] <400> 323
[2934] ctccctaaac acta 14
[2935] <210> 324
[2936] <211> 12
[2937] <212> DNA
[2938] <213> 人工序列
[2939] <220>
[2940] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2941] <400> 324
[2942] acactaccaa at 12
[2943] <210> 325
[2944] <211> 12
[2945] <212> DNA

[2946] <213> 人工序列
[2947] <220>
[2948] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2949] <400> 325
[2950] actaccaaat ag 12
[2951] <210> 326
[2952] <211> 13
[2953] <212> DNA
[2954] <213> 人工序列
[2955] <220>
[2956] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2957] <400> 326
[2958] cactaccaaa tag 13
[2959] <210> 327
[2960] <211> 13
[2961] <212> DNA
[2962] <213> 人工序列
[2963] <220>
[2964] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2965] <400> 327
[2966] acactaccaa ata 13
[2967] <210> 328
[2968] <211> 14
[2969] <212> DNA
[2970] <213> 人工序列
[2971] <220>
[2972] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2973] <400> 328
[2974] acactaccaa atag 14
[2975] <210> 329
[2976] <211> 12
[2977] <212> DNA
[2978] <213> 人工序列
[2979] <220>
[2980] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[2981] <400> 329
[2982] gtggacgcgt at 12
[2983] <210> 330
[2984] <211> 12
[2985] <212> DNA
[2986] <213> 人工序列
[2987] <220>

[2988] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[2989] <400> 330

[2990] ggacgcgtat cg 12

[2991] <210> 331

[2992] <211> 13

[2993] <212> DNA

[2994] <213> 人工序列

[2995] <220>

[2996] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[2997] <400> 331

[2998] tggacgcgta tcg 13

[2999] <210> 332

[3000] <211> 13

[3001] <212> DNA

[3002] <213> 人工序列

[3003] <220>

[3004] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[3005] <400> 332

[3006] gtggacgcgt atc 13

[3007] <210> 333

[3008] <211> 14

[3009] <212> DNA

[3010] <213> 人工序列

[3011] <220>

[3012] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[3013] <400> 333

[3014] gtggacgcgt atcg 14

[3015] <210> 334

[3016] <211> 12

[3017] <212> DNA

[3018] <213> 人工序列

[3019] <220>

[3020] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[3021] <400> 334

[3022] cggtctatga cg 12

[3023] <210> 335

[3024] <211> 12

[3025] <212> DNA

[3026] <213> 人工序列

[3027] <220>

[3028] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义

[3029] <400> 335

[3030] gtctatgacg ag 12
[3031] <210> 336
[3032] <211> 13
[3033] <212> DNA
[3034] <213> 人工序列
[3035] <220>
[3036] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[3037] <400> 336
[3038] ggtctatgac gag 13
[3039] <210> 337
[3040] <211> 13
[3041] <212> DNA
[3042] <213> 人工序列
[3043] <220>
[3044] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[3045] <400> 337
[3046] cggtctatga cga 13
[3047] <210> 338
[3048] <211> 14
[3049] <212> DNA
[3050] <213> 人工序列
[3051] <220>
[3052] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[3053] <400> 338
[3054] cggtctatga cgag 14
[3055] <210> 339
[3056] <211> 12
[3057] <212> DNA
[3058] <213> 人工序列
[3059] <220>
[3060] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[3061] <400> 339
[3062] ctttattaat gc 12
[3063] <210> 340
[3064] <211> 12
[3065] <212> DNA
[3066] <213> 人工序列
[3067] <220>
[3068] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[3069] <400> 340
[3070] ttattaatgc ct 12
[3071] <210> 341

[3072] <211> 13
[3073] <212> DNA
[3074] <213> 人工序列
[3075] <220>
[3076] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[3077] <400> 341
[3078] tttattaatg cct 13
[3079] <210> 342
[3080] <211> 13
[3081] <212> DNA
[3082] <213> 人工序列
[3083] <220>
[3084] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[3085] <400> 342
[3086] ctttattaat gcc 13
[3087] <210> 343
[3088] <211> 14
[3089] <212> DNA
[3090] <213> 人工序列
[3091] <220>
[3092] <223> 智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2内的靶序列，有义
[3093] <400> 343
[3094] ctttattaat gcct 14
[3095] <210> 344
[3096] <211> 20
[3097] <212> DNA
[3098] <213> 人工序列
[3099] <220>
[3100] <223> 参考寡核苷酸
[3101] <400> 344
[3102] gtgcagggga aagatgaaaa 20
[3103] <210> 345
[3104] <211> 20
[3105] <212> DNA
[3106] <213> 人工序列
[3107] <220>
[3108] <223> 参考寡核苷酸
[3109] <400> 345
[3110] gagctcttga ggtccctgtg 20
[3111] <210> 346
[3112] <211> 20
[3113] <212> DNA

[3114] <213> 人工序列
[3115] <220>
[3116] <223> 参考寡核苷酸
[3117] <400> 346
[3118] agcctctttc ctcatgcaaa 20
[3119] <210> 347
[3120] <211> 20
[3121] <212> DNA
[3122] <213> 人工序列
[3123] <220>
[3124] <223> 参考寡核苷酸
[3125] <400> 347
[3126] ccttctctgc ttggttctgg 20
[3127] <210> 348
[3128] <211> 20
[3129] <212> DNA
[3130] <213> 人工序列
[3131] <220>
[3132] <223> 参考寡核苷酸
[3133] <400> 348
[3134] gccatggagt agacatcggt 20
[3135] <210> 349
[3136] <211> 17
[3137] <212> DNA
[3138] <213> 人工序列
[3139] <220>
[3140] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3141] <400> 349
[3142] atacgcgtcc acaggac 17
[3143] <210> 350
[3144] <211> 17
[3145] <212> DNA
[3146] <213> 人工序列
[3147] <220>
[3148] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3149] <400> 350
[3150] tacgcgtcca caggacg 17
[3151] <210> 351
[3152] <211> 16
[3153] <212> DNA
[3154] <213> 人工序列
[3155] <220>

[3156] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3157] <400> 351

[3158] tggcgatacg cgtcca 16

[3159] <210> 352

[3160] <211> 16

[3161] <212> DNA

[3162] <213> 人工序列

[3163] <220>

[3164] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3165] <400> 352

[3166] ggcgatacgc gtccac 16

[3167] <210> 353

[3168] <211> 16

[3169] <212> DNA

[3170] <213> 人工序列

[3171] <220>

[3172] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3173] <400> 353

[3174] gcgatacgcg tccaca 16

[3175] <210> 354

[3176] <211> 16

[3177] <212> DNA

[3178] <213> 人工序列

[3179] <220>

[3180] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3181] <400> 354

[3182] cgatacgcgt ccacag 16

[3183] <210> 355

[3184] <211> 16

[3185] <212> DNA

[3186] <213> 人工序列

[3187] <220>

[3188] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3189] <400> 355

[3190] gatacgcgtc cacagg 16

[3191] <210> 356

[3192] <211> 16

[3193] <212> DNA

[3194] <213> 人工序列

[3195] <220>

[3196] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3197] <400> 356

[3198] atacgcgtcc acagga 16
[3199] <210> 357
[3200] <211> 16
[3201] <212> DNA
[3202] <213> 人工序列
[3203] <220>
[3204] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3205] <400> 357
[3206] tacgcgtcca caggac 16
[3207] <210> 358
[3208] <211> 15
[3209] <212> DNA
[3210] <213> 人工序列
[3211] <220>
[3212] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3213] <400> 358
[3214] ggcgatacgc gtcca 15
[3215] <210> 359
[3216] <211> 15
[3217] <212> DNA
[3218] <213> 人工序列
[3219] <220>
[3220] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3221] <400> 359
[3222] gcgatacgcg tccac 15
[3223] <210> 360
[3224] <211> 15
[3225] <212> DNA
[3226] <213> 人工序列
[3227] <220>
[3228] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3229] <400> 360
[3230] cgatacgcgt ccaca 15
[3231] <210> 361
[3232] <211> 15
[3233] <212> DNA
[3234] <213> 人工序列
[3235] <220>
[3236] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3237] <400> 361
[3238] gatacgcgtc cacag 15
[3239] <210> 362

[3240] <211> 15
[3241] <212> DNA
[3242] <213> 人工序列
[3243] <220>
[3244] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3245] <400> 362
[3246] atacgcgtcc acagg 15
[3247] <210> 363
[3248] <211> 15
[3249] <212> DNA
[3250] <213> 人工序列
[3251] <220>
[3252] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3253] <400> 363
[3254] tacgcgtcca cagga 15
[3255] <210> 364
[3256] <211> 14
[3257] <212> DNA
[3258] <213> 人工序列
[3259] <220>
[3260] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3261] <400> 364
[3262] gcgatacgcg tcca 14
[3263] <210> 365
[3264] <211> 14
[3265] <212> DNA
[3266] <213> 人工序列
[3267] <220>
[3268] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3269] <400> 365
[3270] cgatacgcgt ccac 14
[3271] <210> 366
[3272] <211> 14
[3273] <212> DNA
[3274] <213> 人工序列
[3275] <220>
[3276] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3277] <400> 366
[3278] gatacgcgtc caca 14
[3279] <210> 367
[3280] <211> 14
[3281] <212> DNA

[3282] <213> 人工序列
[3283] <220>
[3284] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3285] <400> 367
[3286] atacgcgtcc acag 14
[3287] <210> 368
[3288] <211> 14
[3289] <212> DNA
[3290] <213> 人工序列
[3291] <220>
[3292] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3293] <400> 368
[3294] tacgcgtcca cagg 14
[3295] <210> 369
[3296] <400> 369
[3297] 000
[3298] <210> 370
[3299] <211> 18
[3300] <212> DNA
[3301] <213> 人工序列
[3302] <220>
[3303] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3304] <400> 370
[3305] tttggtagtg tttaggga 18
[3306] <210> 371
[3307] <211> 18
[3308] <212> DNA
[3309] <213> 人工序列
[3310] <220>
[3311] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3312] <400> 371
[3313] ttggtagtgt ttagggag 18
[3314] <210> 372
[3315] <211> 18
[3316] <212> DNA
[3317] <213> 人工序列
[3318] <220>
[3319] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3320] <400> 372
[3321] tggtagtgtt tagggagc 18
[3322] <210> 373
[3323] <211> 18

[3324] <212> DNA
[3325] <213> 人工序列
[3326] <220>
[3327] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3328] <400> 373
[3329] ggtagtgttt agggagcc 18
[3330] <210> 374
[3331] <211> 18
[3332] <212> DNA
[3333] <213> 人工序列
[3334] <220>
[3335] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3336] <400> 374
[3337] gtagtgttta gggagccg 18
[3338] <210> 375
[3339] <211> 18
[3340] <212> DNA
[3341] <213> 人工序列
[3342] <220>
[3343] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3344] <400> 375
[3345] tagtgtttag ggagccgt 18
[3346] <210> 376
[3347] <211> 18
[3348] <212> DNA
[3349] <213> 人工序列
[3350] <220>
[3351] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3352] <400> 376
[3353] agtgtttagg gagccgtc 18
[3354] <210> 377
[3355] <211> 18
[3356] <212> DNA
[3357] <213> 人工序列
[3358] <220>
[3359] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3360] <400> 377
[3361] gtgtttaggg agccgtct 18
[3362] <210> 378
[3363] <211> 17
[3364] <212> DNA
[3365] <213> 人工序列

[3366] <220>
[3367] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3368] <400> 378
[3369] tttggtagtg tttaggg 17
[3370] <210> 379
[3371] <211> 17
[3372] <212> DNA
[3373] <213> 人工序列
[3374] <220>
[3375] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3376] <400> 379
[3377] ttggtagtgt ttaggga 17
[3378] <210> 380
[3379] <211> 17
[3380] <212> DNA
[3381] <213> 人工序列
[3382] <220>
[3383] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3384] <400> 380
[3385] tggtagtgtt tagggag 17
[3386] <210> 381
[3387] <211> 17
[3388] <212> DNA
[3389] <213> 人工序列
[3390] <220>
[3391] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3392] <400> 381
[3393] ggtagtgttt agggagc 17
[3394] <210> 382
[3395] <211> 17
[3396] <212> DNA
[3397] <213> 人工序列
[3398] <220>
[3399] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3400] <400> 382
[3401] gtagtgttta gggagcc 17
[3402] <210> 383
[3403] <211> 17
[3404] <212> DNA
[3405] <213> 人工序列
[3406] <220>
[3407] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3408] <400> 383
[3409] tagtgtttag ggagccg 17
[3410] <210> 384
[3411] <211> 17
[3412] <212> DNA
[3413] <213> 人工序列
[3414] <220>
[3415] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3416] <400> 384
[3417] agtgtttagg gagccgt 17
[3418] <210> 385
[3419] <211> 17
[3420] <212> DNA
[3421] <213> 人工序列
[3422] <220>
[3423] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3424] <400> 385
[3425] gtgtttaggg agccgtc 17
[3426] <210> 386
[3427] <211> 16
[3428] <212> DNA
[3429] <213> 人工序列
[3430] <220>
[3431] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3432] <400> 386
[3433] ttggtagtgt ttaggg 16
[3434] <210> 387
[3435] <211> 16
[3436] <212> DNA
[3437] <213> 人工序列
[3438] <220>
[3439] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3440] <400> 387
[3441] tggtagtgtt taggga 16
[3442] <210> 388
[3443] <400> 388
[3444] 000
[3445] <210> 389
[3446] <211> 16
[3447] <212> DNA
[3448] <213> 人工序列
[3449] <220>

[3450] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3451] <400> 389

[3452] gtagtgttta gggagc 16

[3453] <210> 390

[3454] <211> 16

[3455] <212> DNA

[3456] <213> 人工序列

[3457] <220>

[3458] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3459] <400> 390

[3460] tagtgtttag ggagcc 16

[3461] <210> 391

[3462] <211> 16

[3463] <212> DNA

[3464] <213> 人工序列

[3465] <220>

[3466] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3467] <400> 391

[3468] agtgtttagg gagccg 16

[3469] <210> 392

[3470] <211> 16

[3471] <212> DNA

[3472] <213> 人工序列

[3473] <220>

[3474] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3475] <400> 392

[3476] gtgtttaggg agccgt 16

[3477] <210> 393

[3478] <211> 15

[3479] <212> DNA

[3480] <213> 人工序列

[3481] <220>

[3482] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3483] <400> 393

[3484] tggtagtgtt taggg 15

[3485] <210> 394

[3486] <211> 15

[3487] <212> DNA

[3488] <213> 人工序列

[3489] <220>

[3490] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3491] <400> 394

[3492] ggtagtgttt aggga 15
[3493] <210> 395
[3494] <211> 15
[3495] <212> DNA
[3496] <213> 人工序列
[3497] <220>
[3498] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3499] <400> 395
[3500] gtagtgttta gggag 15
[3501] <210> 396
[3502] <211> 15
[3503] <212> DNA
[3504] <213> 人工序列
[3505] <220>
[3506] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3507] <400> 396
[3508] tagtgtttag ggagc 15
[3509] <210> 397
[3510] <211> 15
[3511] <212> DNA
[3512] <213> 人工序列
[3513] <220>
[3514] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3515] <400> 397
[3516] agtgtttagg gagcc 15
[3517] <210> 398
[3518] <211> 15
[3519] <212> DNA
[3520] <213> 人工序列
[3521] <220>
[3522] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3523] <400> 398
[3524] gtgtttaggg agccg 15
[3525] <210> 399
[3526] <211> 14
[3527] <212> DNA
[3528] <213> 人工序列
[3529] <220>
[3530] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3531] <400> 399
[3532] ggtagtgttt aggg 14
[3533] <210> 400

[3534] <211> 14
[3535] <212> DNA
[3536] <213> 人工序列
[3537] <220>
[3538] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3539] <400> 400
[3540] gtagtgttta ggga 14
[3541] <210> 401
[3542] <211> 14
[3543] <212> DNA
[3544] <213> 人工序列
[3545] <220>
[3546] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3547] <400> 401
[3548] tagtgtttag ggag 14
[3549] <210> 402
[3550] <211> 14
[3551] <212> DNA
[3552] <213> 人工序列
[3553] <220>
[3554] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3555] <400> 402
[3556] agtgtttagg gagc 14
[3557] <210> 403
[3558] <211> 14
[3559] <212> DNA
[3560] <213> 人工序列
[3561] <220>
[3562] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3563] <400> 403
[3564] gtgtttaggg agcc 14
[3565] <210> 404
[3566] <211> 18
[3567] <212> DNA
[3568] <213> 人工序列
[3569] <220>
[3570] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3571] <400> 404
[3572] gaagagctat ttggtagt 18
[3573] <210> 405
[3574] <211> 18
[3575] <212> DNA

[3576] <213> 人工序列
[3577] <220>
[3578] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3579] <400> 405
[3580] aagagctatt tggtagtg 18
[3581] <210> 406
[3582] <211> 18
[3583] <212> DNA
[3584] <213> 人工序列
[3585] <220>
[3586] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3587] <400> 406
[3588] agagctattt ggtagtgt 18
[3589] <210> 407
[3590] <211> 18
[3591] <212> DNA
[3592] <213> 人工序列
[3593] <220>
[3594] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3595] <400> 407
[3596] gagctatttg gtagtgtt 18
[3597] <210> 408
[3598] <211> 18
[3599] <212> DNA
[3600] <213> 人工序列
[3601] <220>
[3602] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3603] <400> 408
[3604] agctatttgg tagtgttt 18
[3605] <210> 409
[3606] <211> 18
[3607] <212> DNA
[3608] <213> 人工序列
[3609] <220>
[3610] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3611] <400> 409
[3612] gctatttggt agtgttta 18
[3613] <210> 410
[3614] <211> 18
[3615] <212> DNA
[3616] <213> 人工序列
[3617] <220>

[3618] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3619] <400> 410

[3620] ctatttggta gtgtttag 18

[3621] <210> 411

[3622] <211> 18

[3623] <212> DNA

[3624] <213> 人工序列

[3625] <220>

[3626] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3627] <400> 411

[3628] tatttggtag tgtttagg 18

[3629] <210> 412

[3630] <211> 18

[3631] <212> DNA

[3632] <213> 人工序列

[3633] <220>

[3634] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3635] <400> 412

[3636] atttggtagt gtttaggg 18

[3637] <210> 413

[3638] <211> 17

[3639] <212> DNA

[3640] <213> 人工序列

[3641] <220>

[3642] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3643] <400> 413

[3644] aagagctatt tggtagt 17

[3645] <210> 414

[3646] <211> 17

[3647] <212> DNA

[3648] <213> 人工序列

[3649] <220>

[3650] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3651] <400> 414

[3652] agagctattt ggtagtg 17

[3653] <210> 415

[3654] <211> 17

[3655] <212> DNA

[3656] <213> 人工序列

[3657] <220>

[3658] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3659] <400> 415

[3660] gagctatttg gtagtgt 17
[3661] <210> 416
[3662] <211> 17
[3663] <212> DNA
[3664] <213> 人工序列
[3665] <220>
[3666] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3667] <400> 416
[3668] agctatttgg tagtgtt 17
[3669] <210> 417
[3670] <211> 17
[3671] <212> DNA
[3672] <213> 人工序列
[3673] <220>
[3674] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3675] <400> 417
[3676] gctatttggt agtgttt 17
[3677] <210> 418
[3678] <211> 17
[3679] <212> DNA
[3680] <213> 人工序列
[3681] <220>
[3682] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3683] <400> 418
[3684] ctatttggta gtgttta 17
[3685] <210> 419
[3686] <211> 17
[3687] <212> DNA
[3688] <213> 人工序列
[3689] <220>
[3690] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3691] <400> 419
[3692] atttggtagt gtttagg 17
[3693] <210> 420
[3694] <211> 17
[3695] <212> DNA
[3696] <213> 人工序列
[3697] <220>
[3698] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3699] <400> 420
[3700] atttggtagt gtttagg 17
[3701] <210> 421

[3702] <211> 16
[3703] <212> DNA
[3704] <213> 人工序列
[3705] <220>
[3706] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3707] <400> 421
[3708] agagctattt ggtagt 16
[3709] <210> 422
[3710] <211> 16
[3711] <212> DNA
[3712] <213> 人工序列
[3713] <220>
[3714] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3715] <400> 422
[3716] gagctatttg gtagtg 16
[3717] <210> 423
[3718] <211> 16
[3719] <212> DNA
[3720] <213> 人工序列
[3721] <220>
[3722] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3723] <400> 423
[3724] agctatttgg tagtgt 16
[3725] <210> 424
[3726] <211> 16
[3727] <212> DNA
[3728] <213> 人工序列
[3729] <220>
[3730] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3731] <400> 424
[3732] gctatttggt agtgtt 16
[3733] <210> 425
[3734] <211> 16
[3735] <212> DNA
[3736] <213> 人工序列
[3737] <220>
[3738] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3739] <400> 425
[3740] ctatttggta gtgttt 16
[3741] <210> 426
[3742] <211> 16
[3743] <212> DNA

[3744] <213> 人工序列
[3745] <220>
[3746] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3747] <400> 426
[3748] tatttggtag tgttta 16
[3749] <210> 427
[3750] <211> 16
[3751] <212> DNA
[3752] <213> 人工序列
[3753] <220>
[3754] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3755] <400> 427
[3756] atttggtagt gtttag 16
[3757] <210> 428
[3758] <211> 15
[3759] <212> DNA
[3760] <213> 人工序列
[3761] <220>
[3762] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3763] <400> 428
[3764] gagctatttg gtagt 15
[3765] <210> 429
[3766] <211> 15
[3767] <212> DNA
[3768] <213> 人工序列
[3769] <220>
[3770] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3771] <400> 429
[3772] agctatttgg tagtg 15
[3773] <210> 430
[3774] <211> 15
[3775] <212> DNA
[3776] <213> 人工序列
[3777] <220>
[3778] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3779] <400> 430
[3780] gctatttggt agtgt 15
[3781] <210> 431
[3782] <211> 15
[3783] <212> DNA
[3784] <213> 人工序列
[3785] <220>

[3786] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3787] <400> 431

[3788] ctatttggta gtgtt 15

[3789] <210> 432

[3790] <211> 15

[3791] <212> DNA

[3792] <213> 人工序列

[3793] <220>

[3794] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3795] <400> 432

[3796] tatttggtag tgttt 15

[3797] <210> 433

[3798] <211> 15

[3799] <212> DNA

[3800] <213> 人工序列

[3801] <220>

[3802] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3803] <400> 433

[3804] atttggtagt gttta 15

[3805] <210> 434

[3806] <211> 14

[3807] <212> DNA

[3808] <213> 人工序列

[3809] <220>

[3810] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3811] <400> 434

[3812] agctatttgg tagt 14

[3813] <210> 435

[3814] <211> 14

[3815] <212> DNA

[3816] <213> 人工序列

[3817] <220>

[3818] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3819] <400> 435

[3820] gctatttggt agtg 14

[3821] <210> 436

[3822] <211> 14

[3823] <212> DNA

[3824] <213> 人工序列

[3825] <220>

[3826] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3827] <400> 436

[3828] ctatttggta gtgt 14
[3829] <210> 437
[3830] <211> 14
[3831] <212> DNA
[3832] <213> 人工序列
[3833] <220>
[3834] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3835] <400> 437
[3836] tatttggtag tgtt 14
[3837] <210> 438
[3838] <211> 14
[3839] <212> DNA
[3840] <213> 人工序列
[3841] <220>
[3842] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3843] <400> 438
[3844] atttggtagt gttt 14
[3845] <210> 439
[3846] <211> 18
[3847] <212> DNA
[3848] <213> 人工序列
[3849] <220>
[3850] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3851] <400> 439
[3852] tatctcatga atggacca 18
[3853] <210> 440
[3854] <211> 18
[3855] <212> DNA
[3856] <213> 人工序列
[3857] <220>
[3858] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3859] <400> 440
[3860] atctcatgaa tggaccag 18
[3861] <210> 441
[3862] <211> 18
[3863] <212> DNA
[3864] <213> 人工序列
[3865] <220>
[3866] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3867] <400> 441
[3868] tctcatgaat ggaccagt 18
[3869] <210> 442

[3870] <211> 18
[3871] <212> DNA
[3872] <213> 人工序列
[3873] <220>
[3874] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3875] <400> 442
[3876] ctcatgaatg gaccagta 18
[3877] <210> 443
[3878] <211> 18
[3879] <212> DNA
[3880] <213> 人工序列
[3881] <220>
[3882] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3883] <400> 443
[3884] tcatgaatgg accagtat 18
[3885] <210> 444
[3886] <211> 18
[3887] <212> DNA
[3888] <213> 人工序列
[3889] <220>
[3890] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3891] <400> 444
[3892] catgaatgga ccagtatt 18
[3893] <210> 445
[3894] <211> 18
[3895] <212> DNA
[3896] <213> 人工序列
[3897] <220>
[3898] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3899] <400> 445
[3900] atgaatggac cagtattc 18
[3901] <210> 446
[3902] <211> 18
[3903] <212> DNA
[3904] <213> 人工序列
[3905] <220>
[3906] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3907] <400> 446
[3908] tgaatggacc agtattct 18
[3909] <210> 447
[3910] <211> 18
[3911] <212> DNA

[3912] <213> 人工序列
[3913] <220>
[3914] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3915] <400> 447
[3916] gaatggacca gtattcta 18
[3917] <210> 448
[3918] <211> 17
[3919] <212> DNA
[3920] <213> 人工序列
[3921] <220>
[3922] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3923] <400> 448
[3924] atctcatgaa tggacca 17
[3925] <210> 449
[3926] <211> 17
[3927] <212> DNA
[3928] <213> 人工序列
[3929] <220>
[3930] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3931] <400> 449
[3932] tctcatgaat ggaccag 17
[3933] <210> 450
[3934] <211> 17
[3935] <212> DNA
[3936] <213> 人工序列
[3937] <220>
[3938] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3939] <400> 450
[3940] ctcatgaatg gaccagt 17
[3941] <210> 451
[3942] <211> 17
[3943] <212> DNA
[3944] <213> 人工序列
[3945] <220>
[3946] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[3947] <400> 451
[3948] tcatgaatgg accagta 17
[3949] <210> 452
[3950] <211> 17
[3951] <212> DNA
[3952] <213> 人工序列
[3953] <220>

[3954] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3955] <400> 452

[3956] catgaatgga ccagtat 17

[3957] <210> 453

[3958] <211> 17

[3959] <212> DNA

[3960] <213> 人工序列

[3961] <220>

[3962] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3963] <400> 453

[3964] atgaatggac cagtatt 17

[3965] <210> 454

[3966] <211> 17

[3967] <212> DNA

[3968] <213> 人工序列

[3969] <220>

[3970] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3971] <400> 454

[3972] tgaatggacc agtattc 17

[3973] <210> 455

[3974] <211> 17

[3975] <212> DNA

[3976] <213> 人工序列

[3977] <220>

[3978] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3979] <400> 455

[3980] gaatggacca gtattct 17

[3981] <210> 456

[3982] <211> 16

[3983] <212> DNA

[3984] <213> 人工序列

[3985] <220>

[3986] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3987] <400> 456

[3988] tctcatgaat ggacca 16

[3989] <210> 457

[3990] <211> 16

[3991] <212> DNA

[3992] <213> 人工序列

[3993] <220>

[3994] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[3995] <400> 457

[3996] ctcatgaatg gaccag 16
[3997] <210> 458
[3998] <211> 16
[3999] <212> DNA
[4000] <213> 人工序列
[4001] <220>
[4002] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4003] <400> 458
[4004] tcatgaatgg accagt 16
[4005] <210> 459
[4006] <211> 16
[4007] <212> DNA
[4008] <213> 人工序列
[4009] <220>
[4010] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4011] <400> 459
[4012] catgaatgga ccagta 16
[4013] <210> 460
[4014] <211> 16
[4015] <212> DNA
[4016] <213> 人工序列
[4017] <220>
[4018] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4019] <400> 460
[4020] atgaatggac cagtat 16
[4021] <210> 461
[4022] <211> 16
[4023] <212> DNA
[4024] <213> 人工序列
[4025] <220>
[4026] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4027] <400> 461
[4028] tgaatggacc agtatt 16
[4029] <210> 462
[4030] <211> 16
[4031] <212> DNA
[4032] <213> 人工序列
[4033] <220>
[4034] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4035] <400> 462
[4036] gaatggacca gtattc 16
[4037] <210> 463

[4038] <211> 15
[4039] <212> DNA
[4040] <213> 人工序列
[4041] <220>
[4042] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4043] <400> 463
[4044] ctcatgaatg gacca 15
[4045] <210> 464
[4046] <211> 15
[4047] <212> DNA
[4048] <213> 人工序列
[4049] <220>
[4050] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4051] <400> 464
[4052] tcatgaatgg accag 15
[4053] <210> 465
[4054] <211> 15
[4055] <212> DNA
[4056] <213> 人工序列
[4057] <220>
[4058] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4059] <400> 465
[4060] catgaatgga ccagt 15
[4061] <210> 466
[4062] <211> 15
[4063] <212> DNA
[4064] <213> 人工序列
[4065] <220>
[4066] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4067] <400> 466
[4068] atgaatggac cagta 15
[4069] <210> 467
[4070] <211> 15
[4071] <212> DNA
[4072] <213> 人工序列
[4073] <220>
[4074] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4075] <400> 467
[4076] tgaatggacc agtat 15
[4077] <210> 468
[4078] <211> 15
[4079] <212> DNA

[4080] <213> 人工序列
[4081] <220>
[4082] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4083] <400> 468
[4084] gaatggacca gtatt 15
[4085] <210> 469
[4086] <211> 14
[4087] <212> DNA
[4088] <213> 人工序列
[4089] <220>
[4090] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4091] <400> 469
[4092] tcatgaatgg acca 14
[4093] <210> 470
[4094] <211> 14
[4095] <212> DNA
[4096] <213> 人工序列
[4097] <220>
[4098] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4099] <400> 470
[4100] catgaatgga ccag 14
[4101] <210> 471
[4102] <211> 14
[4103] <212> DNA
[4104] <213> 人工序列
[4105] <220>
[4106] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4107] <400> 471
[4108] atgaatggac cagt 14
[4109] <210> 472
[4110] <211> 14
[4111] <212> DNA
[4112] <213> 人工序列
[4113] <220>
[4114] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4115] <400> 472
[4116] tgaatggacc agta 14
[4117] <210> 473
[4118] <211> 14
[4119] <212> DNA
[4120] <213> 人工序列
[4121] <220>

[4122] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4123] <400> 473

[4124] gaatggacca gtat 14

[4125] <210> 474

[4126] <211> 18

[4127] <212> DNA

[4128] <213> 人工序列

[4129] <220>

[4130] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4131] <400> 474

[4132] tatacaggca ttaataaa 18

[4133] <210> 475

[4134] <211> 18

[4135] <212> DNA

[4136] <213> 人工序列

[4137] <220>

[4138] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4139] <400> 475

[4140] atacaggcat taataaag 18

[4141] <210> 476

[4142] <211> 18

[4143] <212> DNA

[4144] <213> 人工序列

[4145] <220>

[4146] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4147] <400> 476

[4148] tacaggcatt aataaagt 18

[4149] <210> 477

[4150] <211> 18

[4151] <212> DNA

[4152] <213> 人工序列

[4153] <220>

[4154] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4155] <400> 477

[4156] acaggcatta ataaagtg 18

[4157] <210> 478

[4158] <211> 18

[4159] <212> DNA

[4160] <213> 人工序列

[4161] <220>

[4162] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4163] <400> 478

[4164] caggcattaa taaagtgc 18
[4165] <210> 479
[4166] <211> 18
[4167] <212> DNA
[4168] <213> 人工序列
[4169] <220>
[4170] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4171] <400> 479
[4172] aggcattaat aaagtgca 18
[4173] <210> 480
[4174] <211> 18
[4175] <212> DNA
[4176] <213> 人工序列
[4177] <220>
[4178] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4179] <400> 480
[4180] ggcattaata aagtgcaa 18
[4181] <210> 481
[4182] <211> 18
[4183] <212> DNA
[4184] <213> 人工序列
[4185] <220>
[4186] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4187] <400> 481
[4188] gcattaataa agtgcaaa 18
[4189] <210> 482
[4190] <211> 18
[4191] <212> DNA
[4192] <213> 人工序列
[4193] <220>
[4194] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4195] <400> 482
[4196] cattaataaa gtgcaaat 18
[4197] <210> 483
[4198] <211> 17
[4199] <212> DNA
[4200] <213> 人工序列
[4201] <220>
[4202] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4203] <400> 483
[4204] atacaggcat taataaa 17
[4205] <210> 484

[4206] <211> 17
[4207] <212> DNA
[4208] <213> 人工序列
[4209] <220>
[4210] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4211] <400> 484
[4212] tacaggcatt aataaag 17
[4213] <210> 485
[4214] <211> 17
[4215] <212> DNA
[4216] <213> 人工序列
[4217] <220>
[4218] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4219] <400> 485
[4220] acaggcatta ataaagt 17
[4221] <210> 486
[4222] <211> 17
[4223] <212> DNA
[4224] <213> 人工序列
[4225] <220>
[4226] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4227] <400> 486
[4228] caggcattaa taaagtg 17
[4229] <210> 487
[4230] <211> 17
[4231] <212> DNA
[4232] <213> 人工序列
[4233] <220>
[4234] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4235] <400> 487
[4236] aggcattaat aaagtgc 17
[4237] <210> 488
[4238] <211> 17
[4239] <212> DNA
[4240] <213> 人工序列
[4241] <220>
[4242] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4243] <400> 488
[4244] ggcattaata aagtgca 17
[4245] <210> 489
[4246] <211> 17
[4247] <212> DNA

[4248] <213> 人工序列
[4249] <220>
[4250] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4251] <400> 489
[4252] gcattaataa agtgcaa 17
[4253] <210> 490
[4254] <211> 17
[4255] <212> DNA
[4256] <213> 人工序列
[4257] <220>
[4258] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4259] <400> 490
[4260] cattaataaa gtgcaaa 17
[4261] <210> 491
[4262] <211> 16
[4263] <212> DNA
[4264] <213> 人工序列
[4265] <220>
[4266] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4267] <400> 491
[4268] tacaggcatt aataaa 16
[4269] <210> 492
[4270] <211> 16
[4271] <212> DNA
[4272] <213> 人工序列
[4273] <220>
[4274] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4275] <400> 492
[4276] acaggcatta ataaag 16
[4277] <210> 493
[4278] <211> 16
[4279] <212> DNA
[4280] <213> 人工序列
[4281] <220>
[4282] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4283] <400> 493
[4284] caggcattaa taaagt 16
[4285] <210> 494
[4286] <211> 16
[4287] <212> DNA
[4288] <213> 人工序列
[4289] <220>

[4290] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4291] <400> 494

[4292] aggcattaat aaagtg 16

[4293] <210> 495

[4294] <211> 16

[4295] <212> DNA

[4296] <213> 人工序列

[4297] <220>

[4298] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4299] <400> 495

[4300] ggcattaata aagtgc 16

[4301] <210> 496

[4302] <211> 16

[4303] <212> DNA

[4304] <213> 人工序列

[4305] <220>

[4306] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4307] <400> 496

[4308] gcattaataa agtgca 16

[4309] <210> 497

[4310] <211> 16

[4311] <212> DNA

[4312] <213> 人工序列

[4313] <220>

[4314] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4315] <400> 497

[4316] cattaataaa gtgcaa 16

[4317] <210> 498

[4318] <211> 15

[4319] <212> DNA

[4320] <213> 人工序列

[4321] <220>

[4322] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4323] <400> 498

[4324] acaggcatta ataaa 15

[4325] <210> 499

[4326] <211> 15

[4327] <212> DNA

[4328] <213> 人工序列

[4329] <220>

[4330] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸

[4331] <400> 499

[4332] caggcattaa taaag 15
[4333] <210> 500
[4334] <211> 15
[4335] <212> DNA
[4336] <213> 人工序列
[4337] <220>
[4338] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4339] <400> 500
[4340] aggcattaat aaagt 15
[4341] <210> 501
[4342] <211> 15
[4343] <212> DNA
[4344] <213> 人工序列
[4345] <220>
[4346] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4347] <400> 501
[4348] ggcattaata aagtg 15
[4349] <210> 502
[4350] <211> 15
[4351] <212> DNA
[4352] <213> 人工序列
[4353] <220>
[4354] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4355] <400> 502
[4356] gcattaataa agtgc 15
[4357] <210> 503
[4358] <211> 15
[4359] <212> DNA
[4360] <213> 人工序列
[4361] <220>
[4362] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4363] <400> 503
[4364] cattaataaa gtgca 15
[4365] <210> 504
[4366] <211> 14
[4367] <212> DNA
[4368] <213> 人工序列
[4369] <220>
[4370] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4371] <400> 504
[4372] caggcattaa taaa 14
[4373] <210> 505

[4374] <211> 14
[4375] <212> DNA
[4376] <213> 人工序列
[4377] <220>
[4378] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4379] <400> 505
[4380] aggcattaat aaag 14
[4381] <210> 506
[4382] <211> 14
[4383] <212> DNA
[4384] <213> 人工序列
[4385] <220>
[4386] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4387] <400> 506
[4388] ggcattaata aagt 14
[4389] <210> 507
[4390] <211> 14
[4391] <212> DNA
[4392] <213> 人工序列
[4393] <220>
[4394] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4395] <400> 507
[4396] gcattaataa agtg 14
[4397] <210> 508
[4398] <211> 14
[4399] <212> DNA
[4400] <213> 人工序列
[4401] <220>
[4402] <223> 针对智人转化生长因子受体βII (70/80kDa) (TGFBR2)转录变体2的反义寡核苷酸
[4403] <400> 508
[4404] cattaataaa gtgc 14

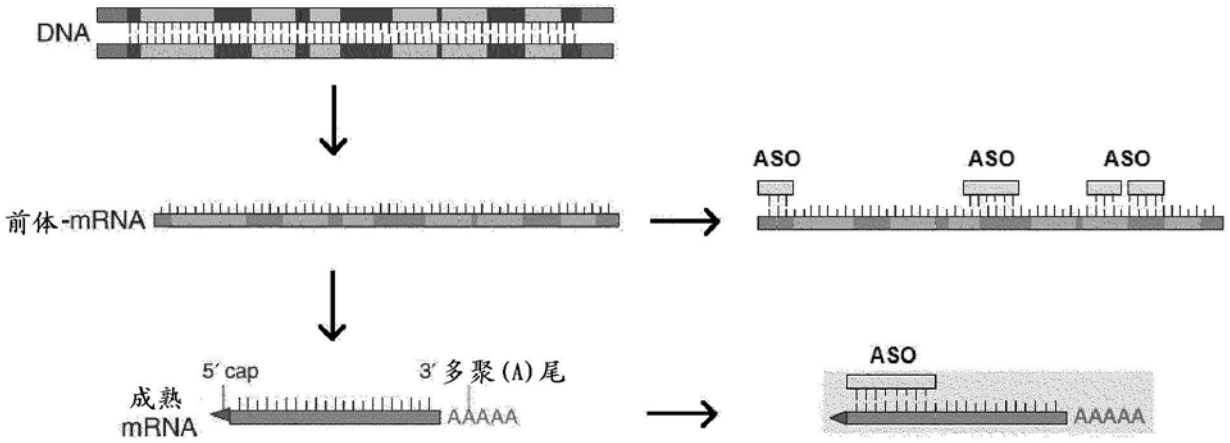

DNA
前体-mRNA
ASO
ASO
ASO
5′ cap
3′ 多聚(A)尾
成熟
mRNA
AAAAA
ASO
AAAAA

图1

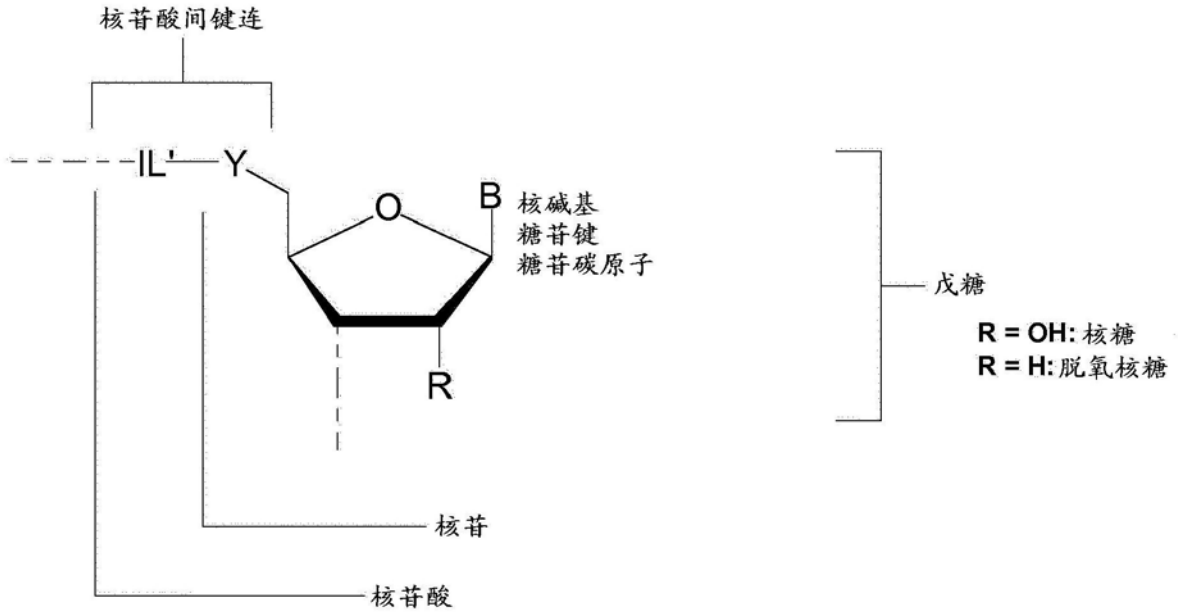

核苷酸间键连
IL'
Y
O
B
核碱基
糖苷键
糖苷碳原子
R
戊糖
R = OH: 核糖
R = H: 脱氧核糖
核苷
核苷酸

图2

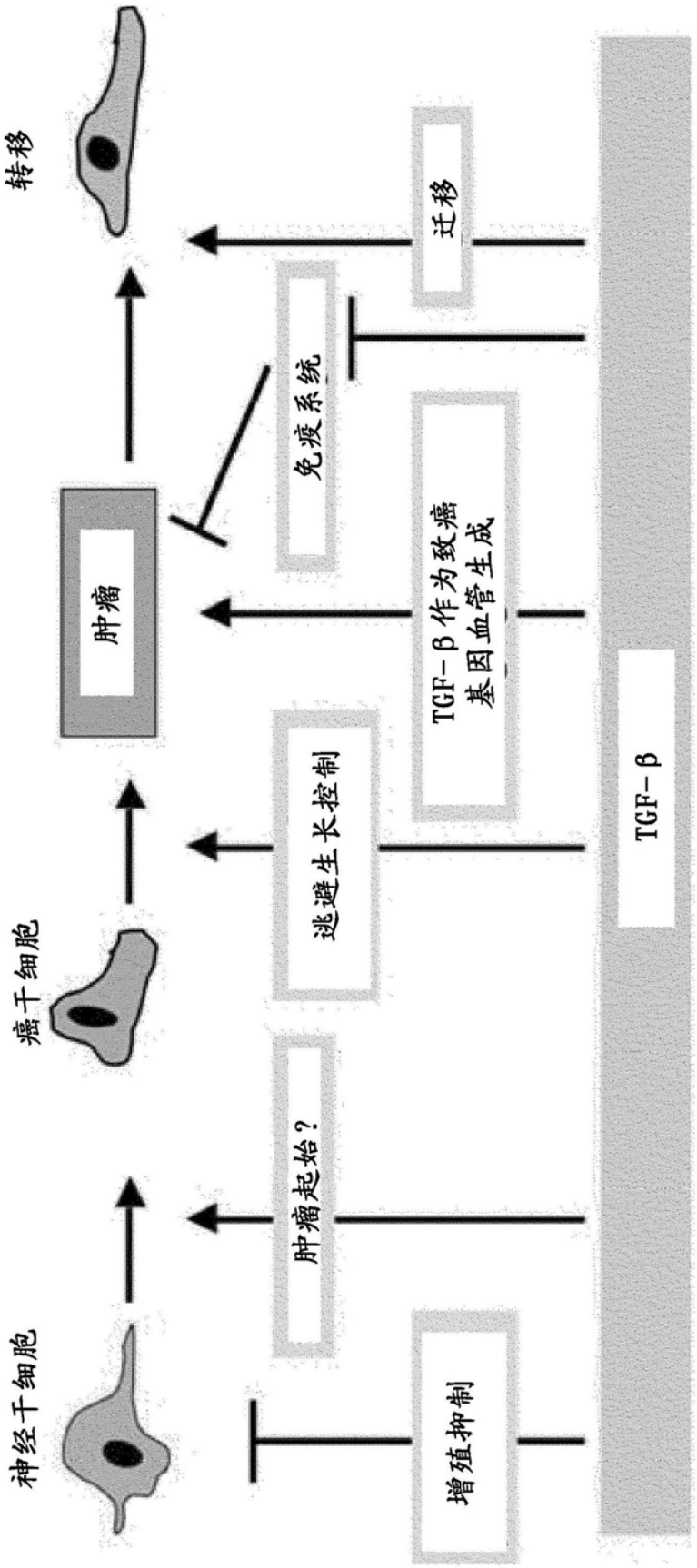

转移
肿瘤
癌干细胞
神经干细胞
迁移
免疫系统
TGF-β作为致癌基因血管生成
逃避生长控制
肿瘤起始?
增殖抑制
TGF-β

图3

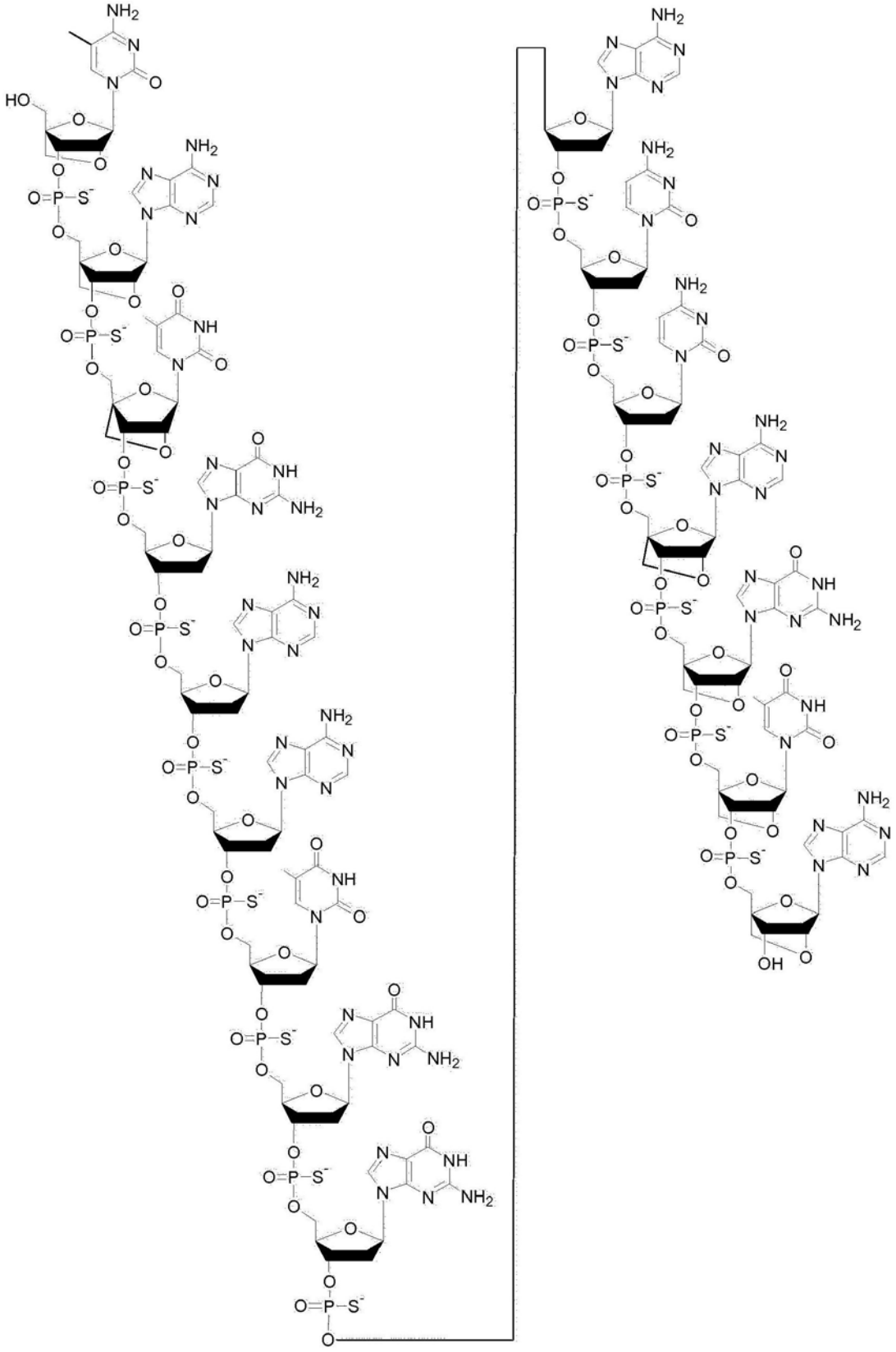


图4

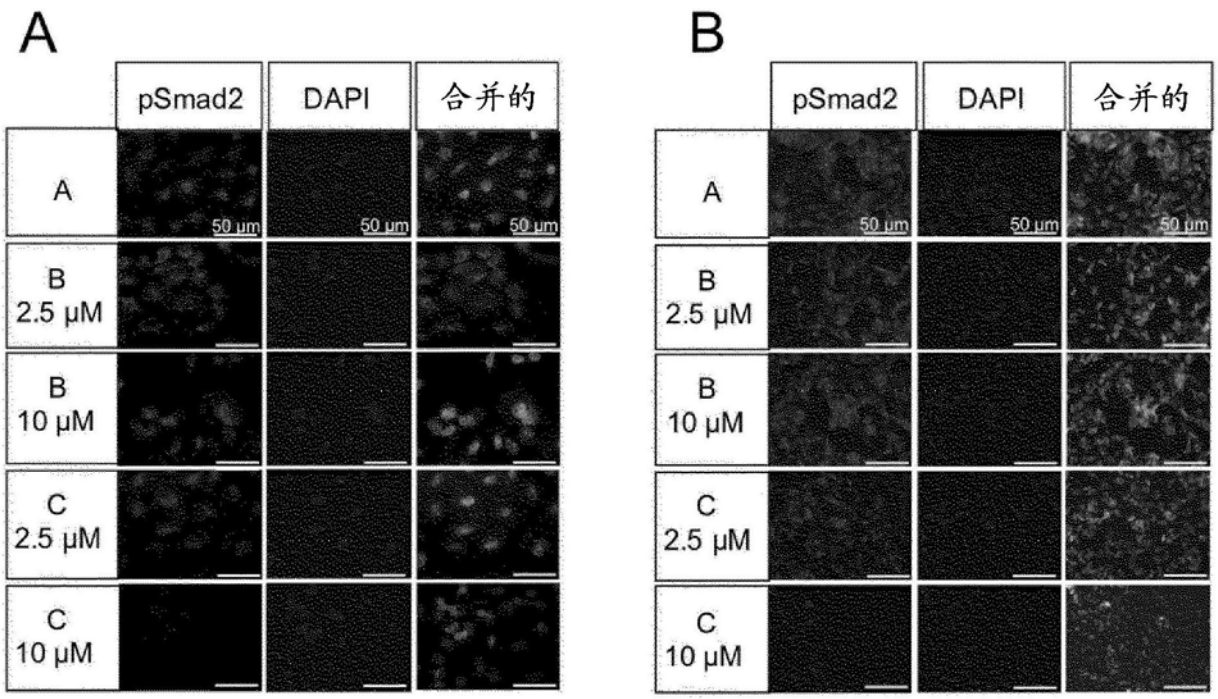

A
pSmad2
DAPI
合并的
A
B 2.5 μM
B 10 μM
C 2.5 μM
C 10 μM
50 μm
B
pSmad2
DAPI
合并的
A
B 2.5 μM
B 10 μM
C 2.5 μM
C 10 μM
50 μm

图5

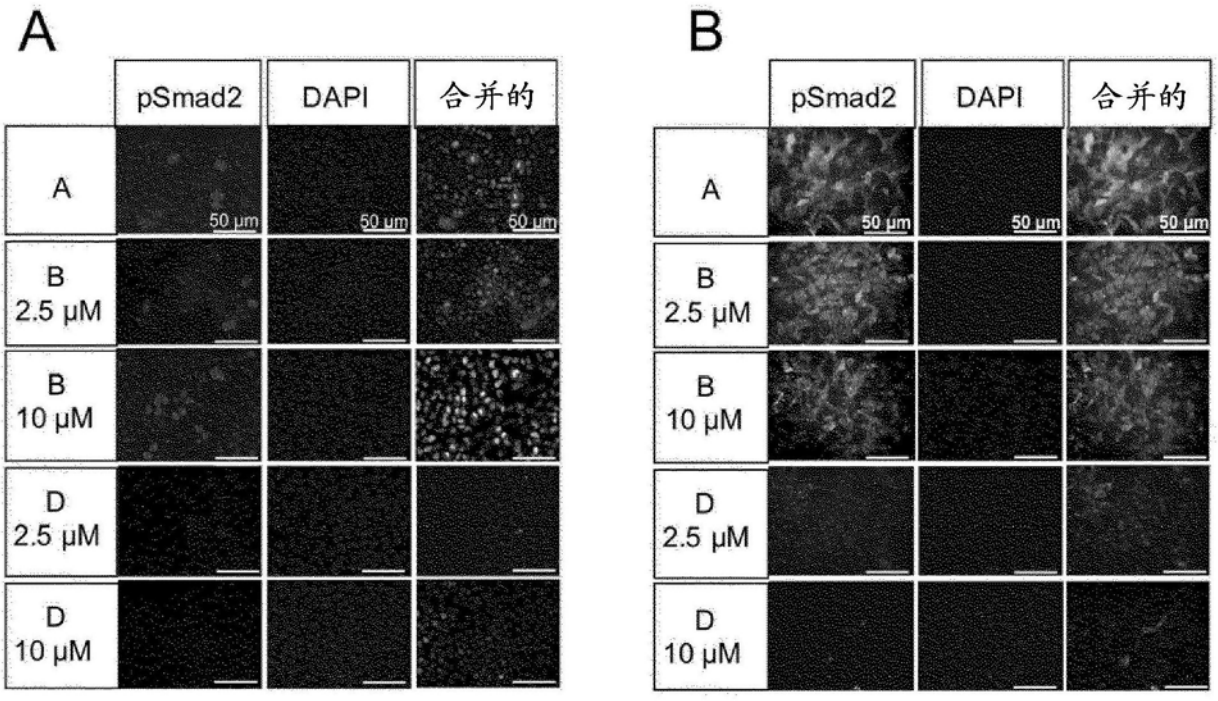

A
pSmad2
DAPI
合并的
A
B 2.5 μM
B 10 μM
D 2.5 μM
D 10 μM
50 μm
B
pSmad2
DAPI
合并的
A
B 2.5 μM
B 10 μM
D 2.5 μM
D 10 μM
50 μm

图6

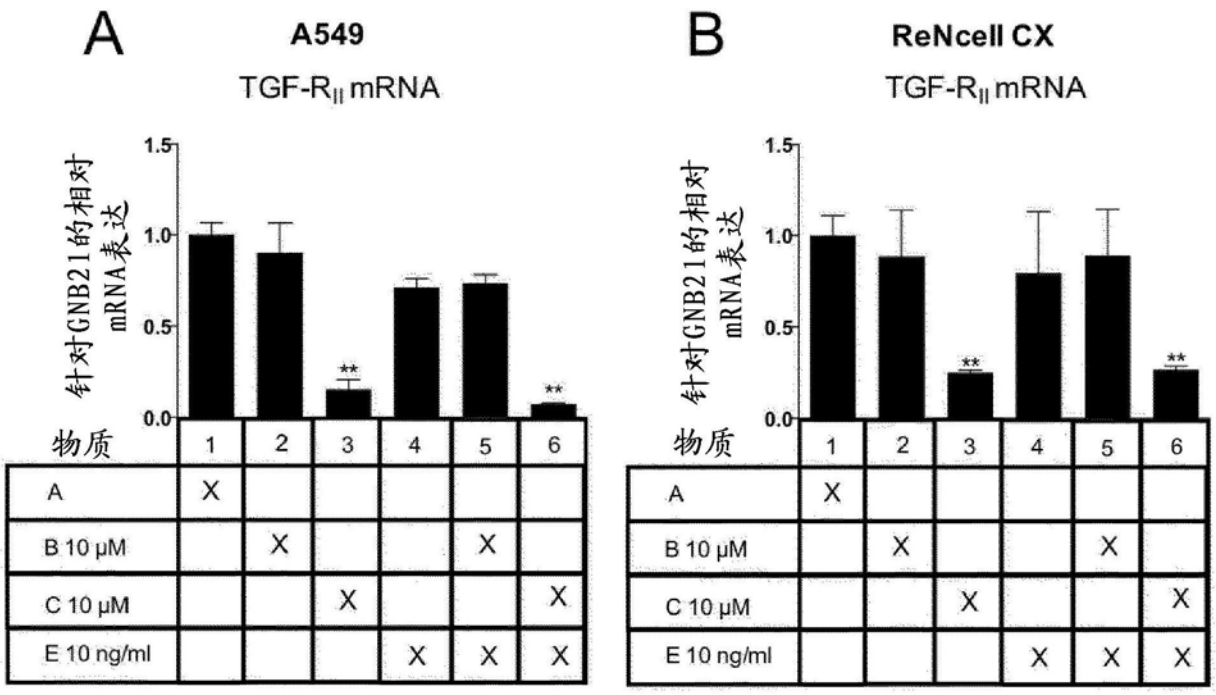

A
A549
TGF-RII mRNA
针对GNB21的相对mRNA表达
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
物质
1 2 3 4 5 6
A X
B 10 μM X X
C 10 μM X X
E 10 ng/ml X X X
B
ReNcell CX
TGF-RII mRNA
针对GNB21的相对mRNA表达
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
物质
1 2 3 4 5 6
A X
B 10 μM X X
C 10 μM X X
E 10 ng/ml X X X

图7

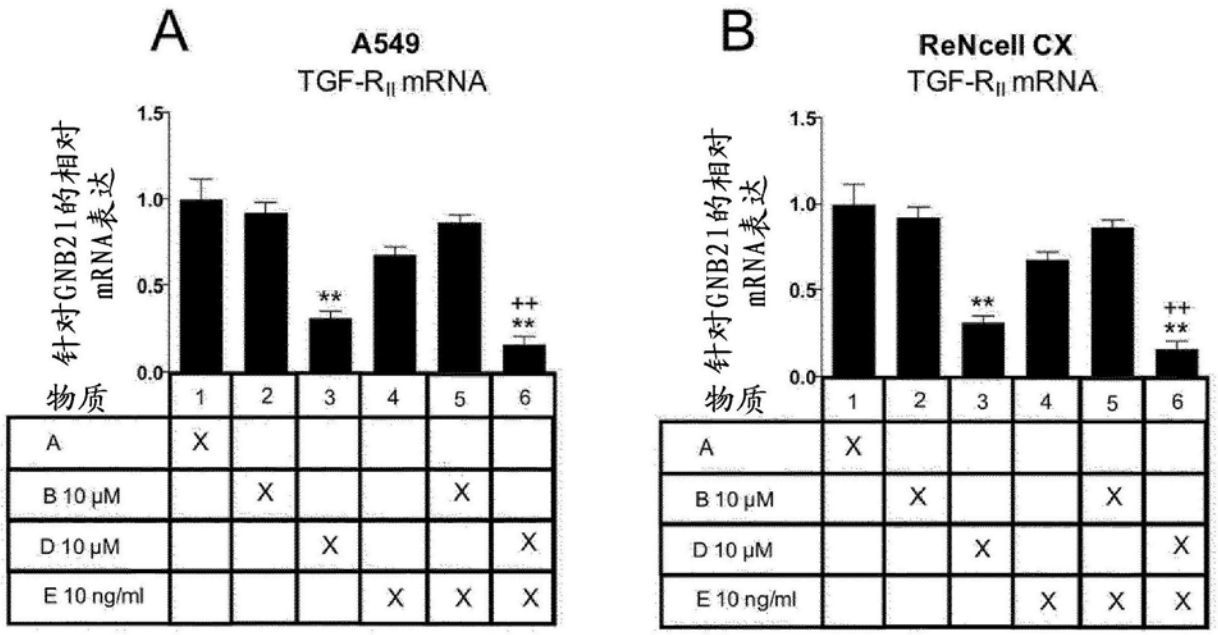

A
A549
TGF-RII mRNA
针对GNB21的相对mRNA表达
1.5
1.0
0.5
0.0
**
++
**
物质
1 2 3 4 5 6
A X
B 10 μM X X
D 10 μM X X
E 10 ng/ml X X X
B
ReNcell CX
TGF-RII mRNA
针对GNB21的相对mRNA表达
1.5
1.0
0.5
0.0
**
++
**
物质
1 2 3 4 5 6
A X
B 10 μM X X
D 10 μM X X
E 10 ng/ml X X X

图8

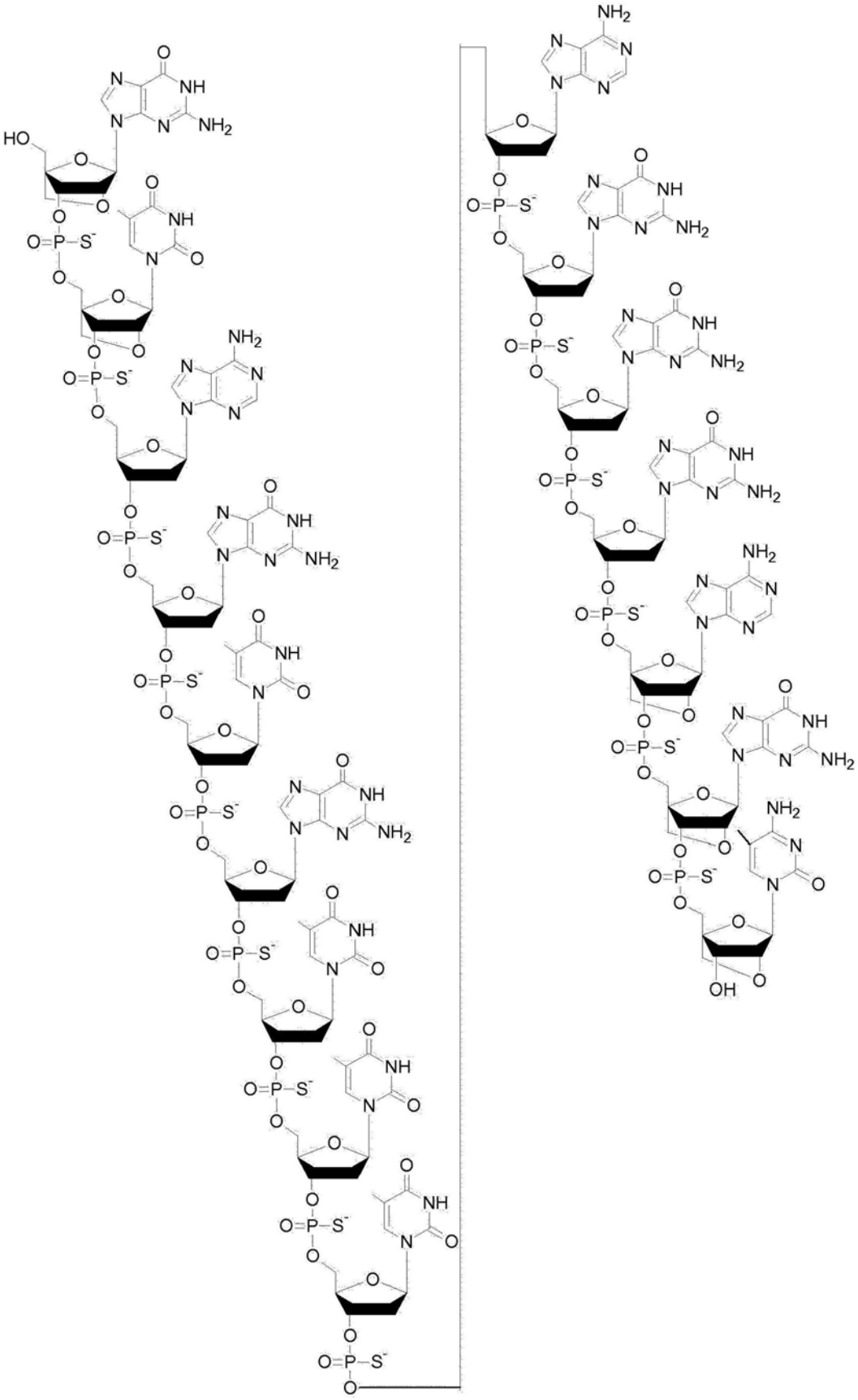


图9

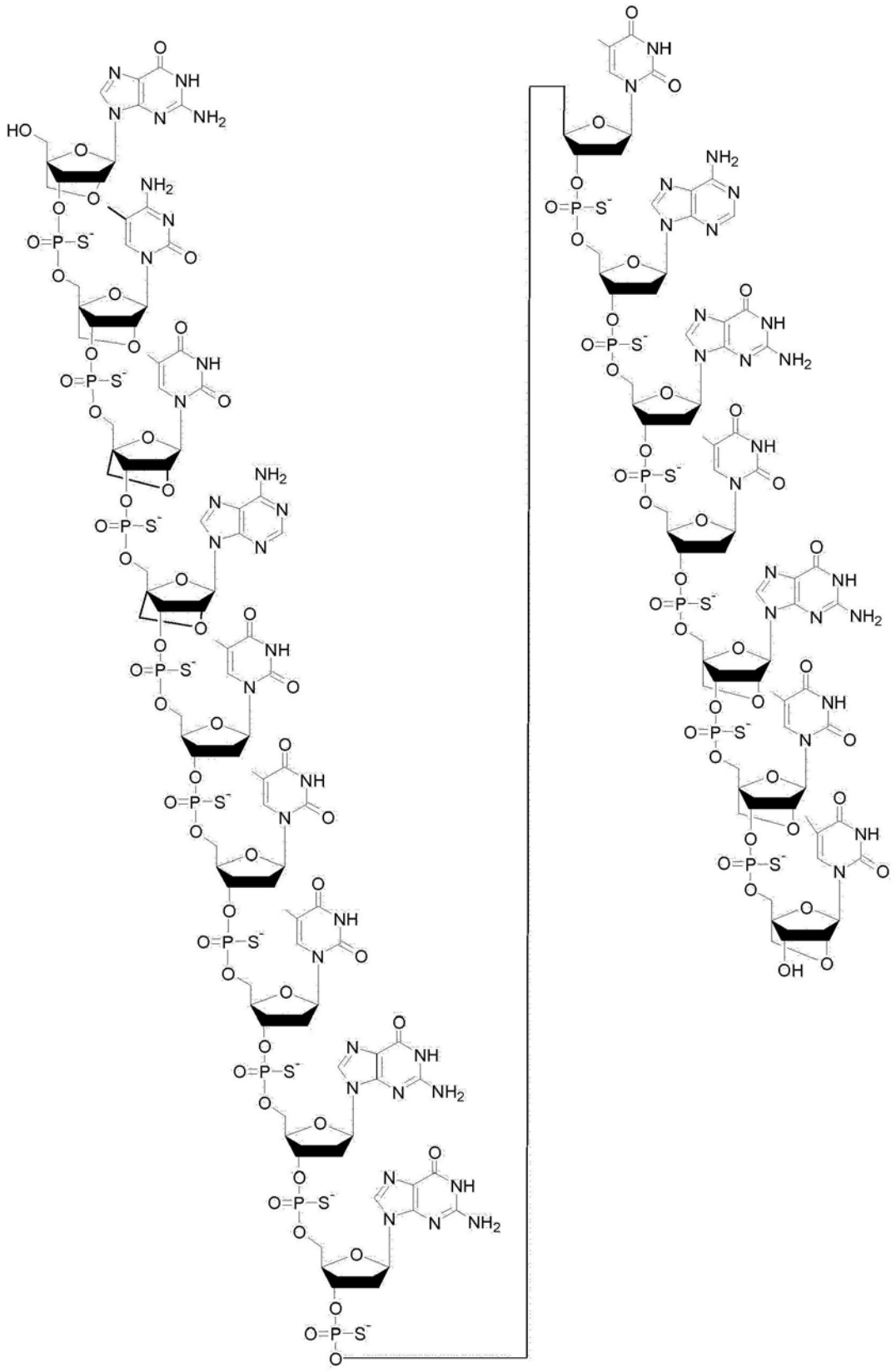


图10

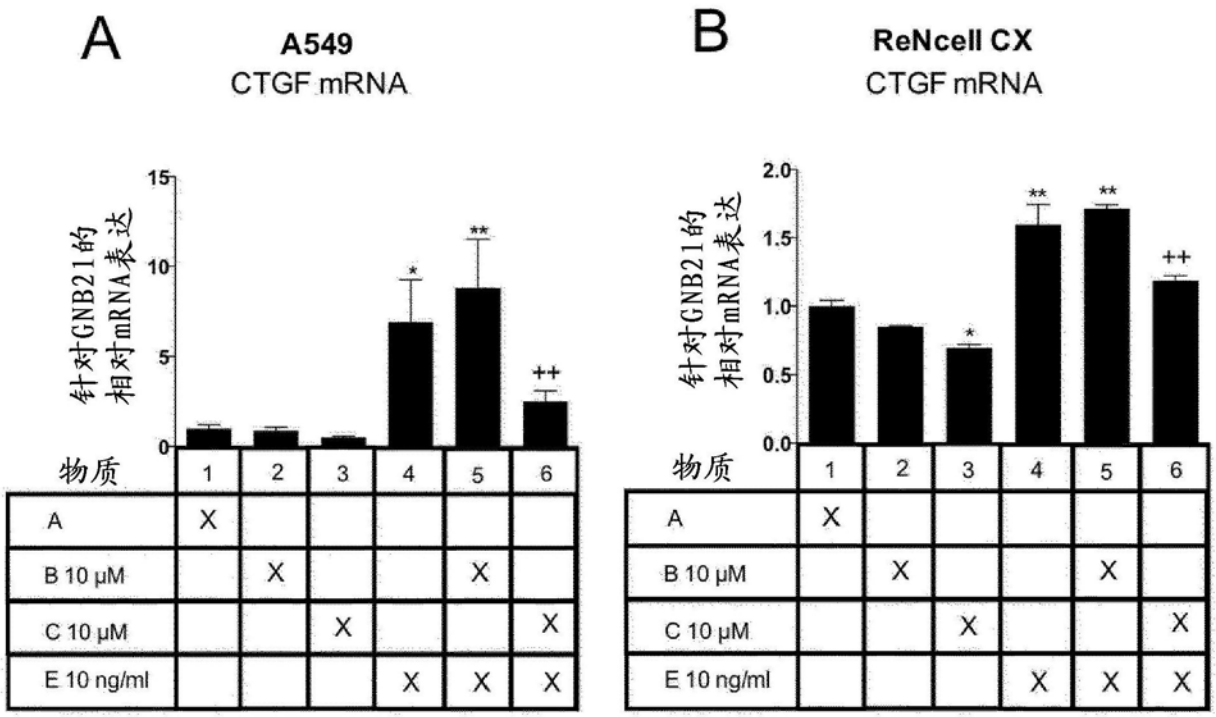

A
A549
CTGF mRNA
针对GNB21的
相对mRNA表达
15
10
5
0
*
**
++
物质
1 2 3 4 5 6
A X
B 10 μM X X
C 10 μM X X
E 10 ng/ml X X X
B
ReNcell CX
CTGF mRNA
针对GNB21的
相对mRNA表达
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
**
++
物质
1 2 3 4 5 6
A X
B 10 μM X X
C 10 μM X X
E 10 ng/ml X X X

图11

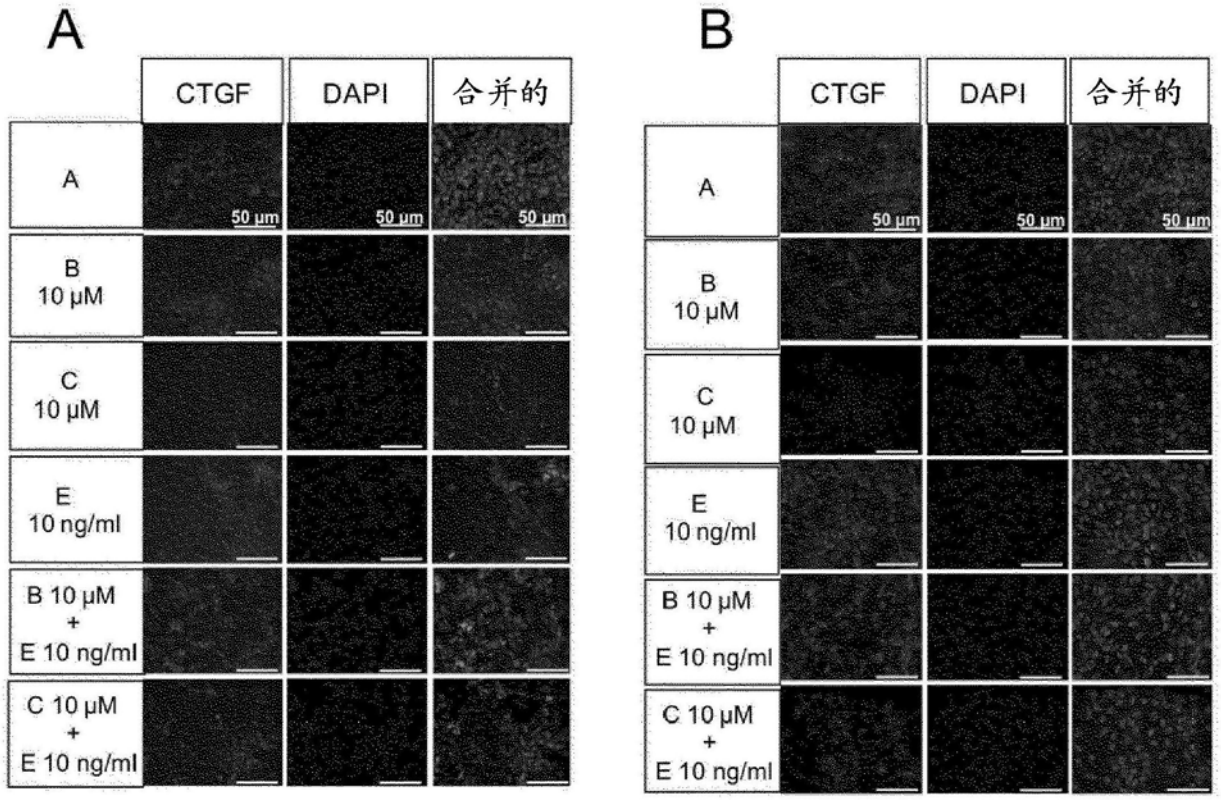

A
CTGF
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm
B
CTGF
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm

图12

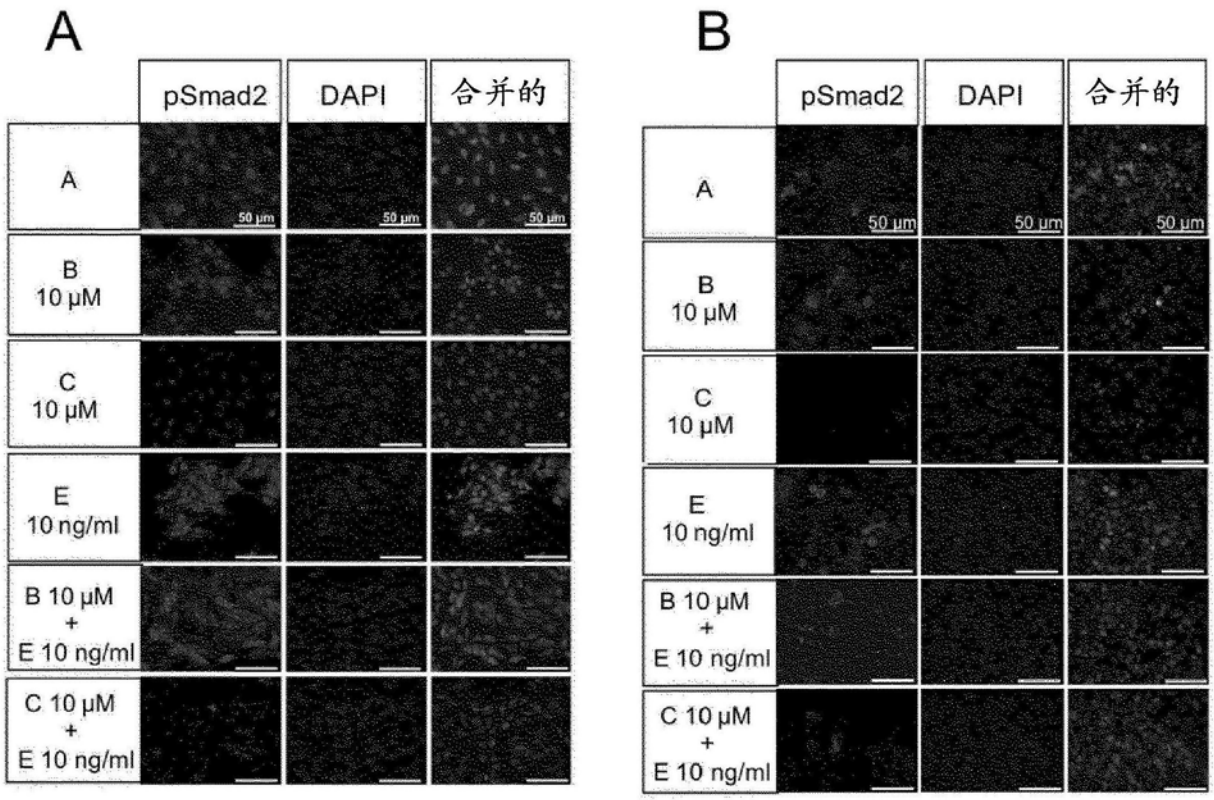

A
pSmad2
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm
B
pSmad2
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm

图13

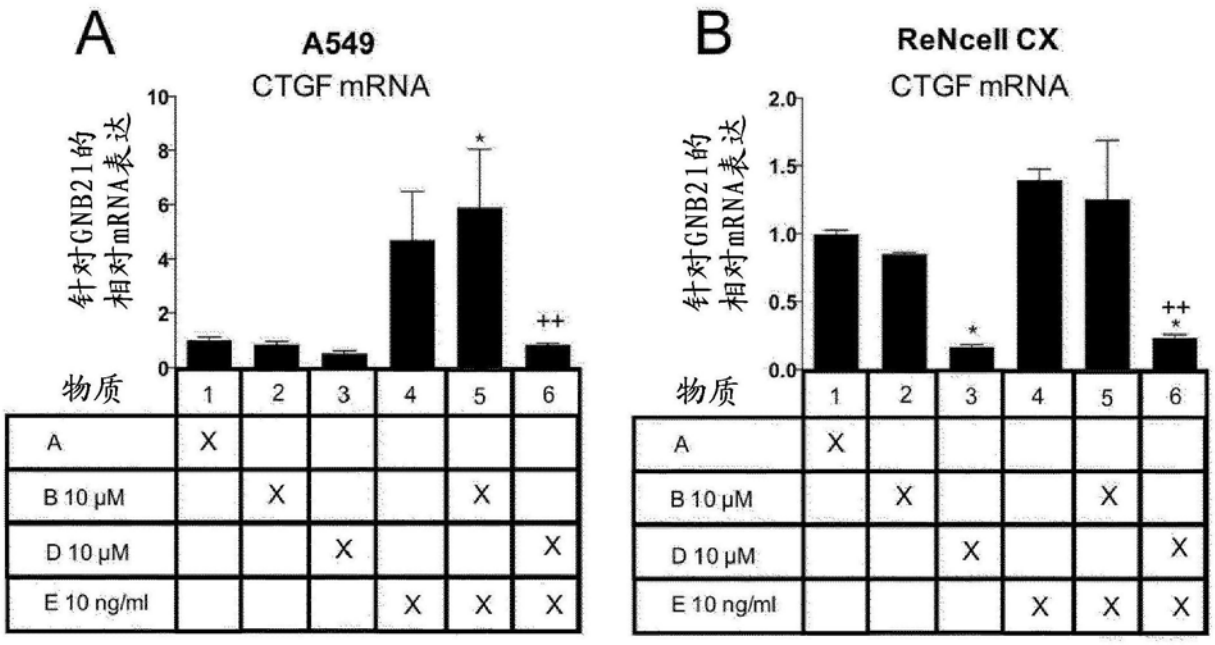

A
A549
CTGF mRNA
针对GNB21的相对mRNA表达
物质
1 2 3 4 5 6
A X
B 10 μM X X
D 10 μM X X
E 10 ng/ml X X X
B
ReNcell CX
CTGF mRNA
针对GNB21的相对mRNA表达
物质
1 2 3 4 5 6
A X
B 10 μM X X
D 10 μM X X
E 10 ng/ml X X X

图14

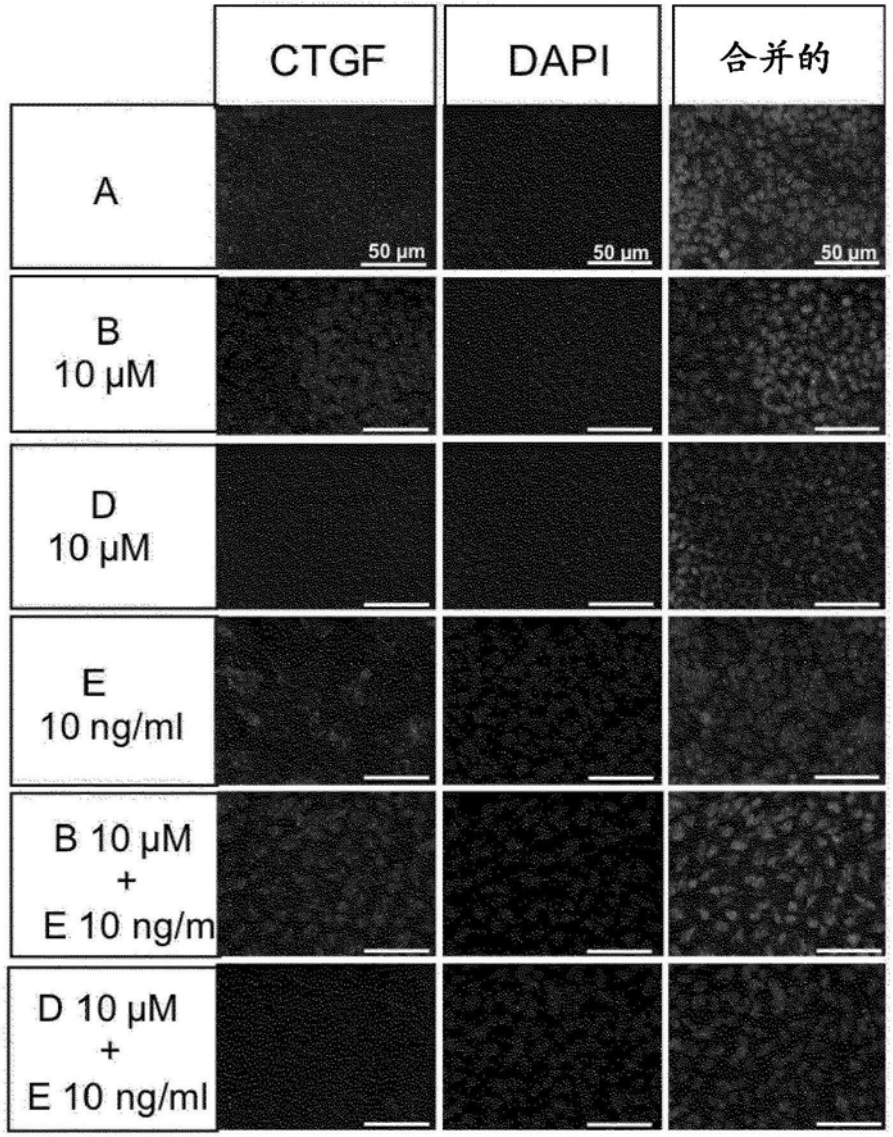

CTGF
DAPI
合并的
A
B
10 μM
D
10 μM
E
10 ng/ml
B 10 μM
+
E 10 ng/m
D 10 μM
+
E 10 ng/ml
50 μm
50 μm
50 μm

图15

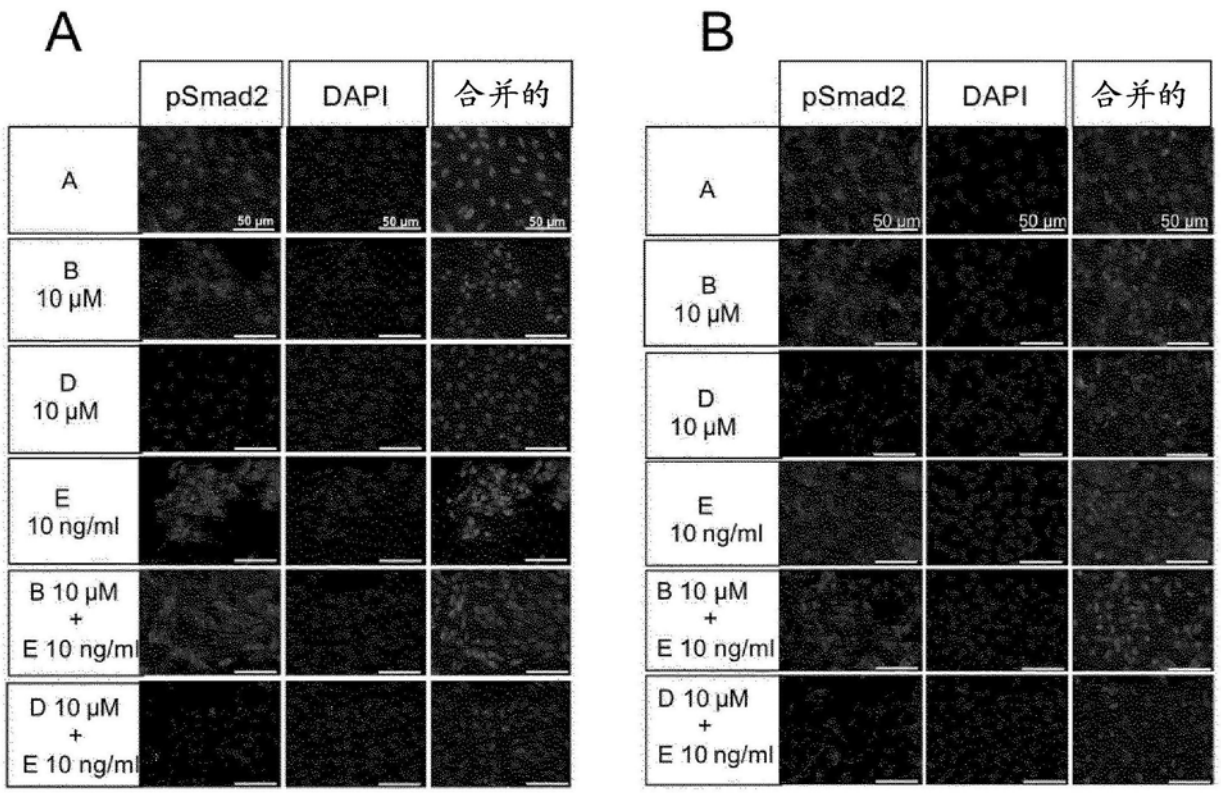

A
pSmad2
DAPI
合并的
A
B 10 μM
D 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
D 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm
B
pSmad2
DAPI
合并的
A
B 10 μM
D 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
D 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm

图16

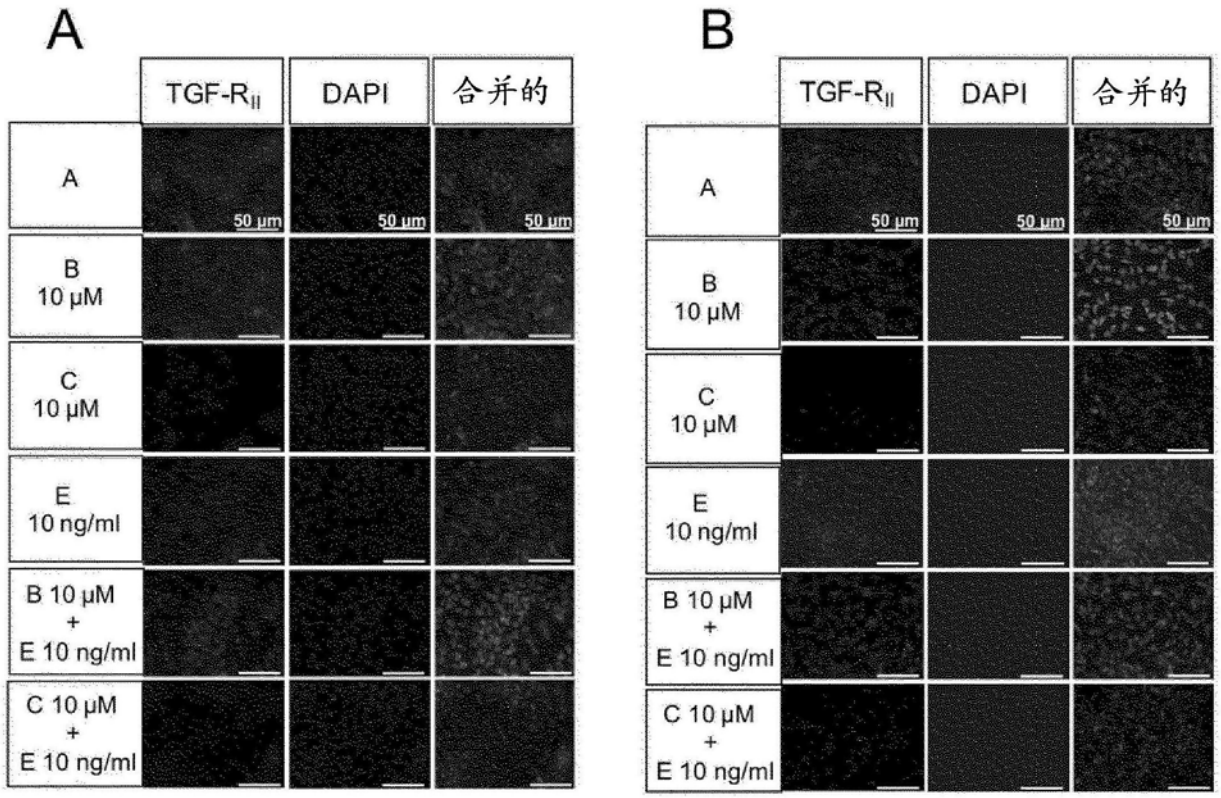

A
TGF-RII
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm
B
TGF-RII
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm

图17

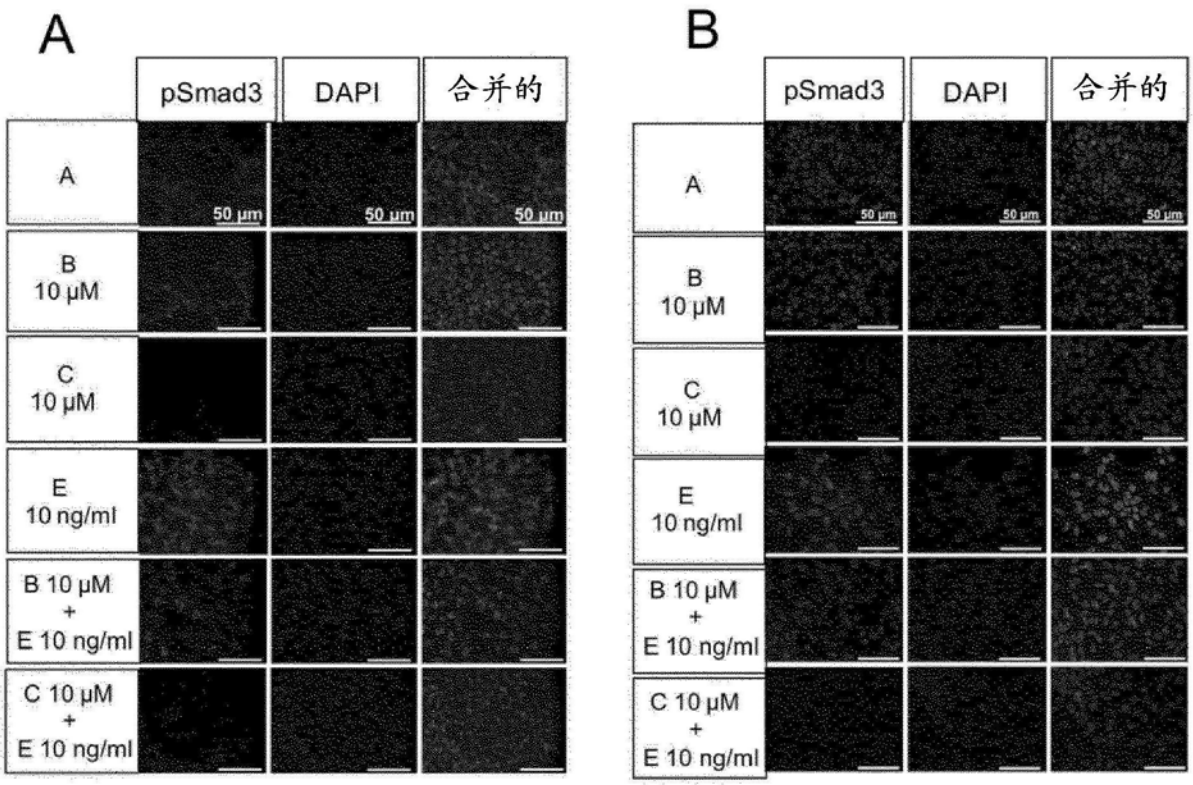

A
pSmad3
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm
B
pSmad3
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm

图18

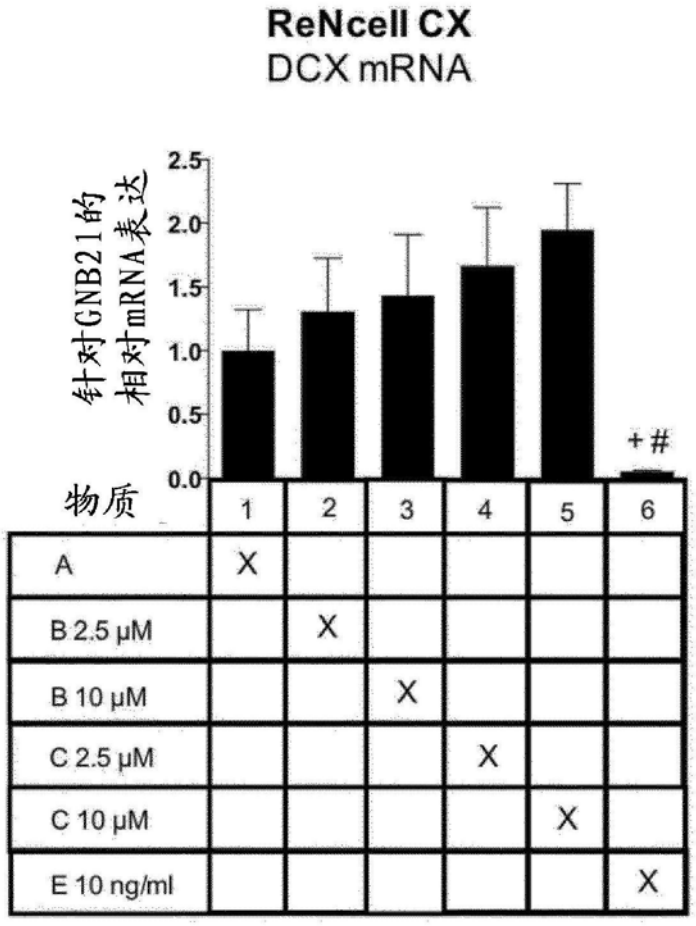

ReNcell CX
DCX mRNA
针对GNB21的
相对mRNA表达
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
+#
物质
1
2
3
4
5
6
A
X
B 2.5 μM
X
B 10 μM
X
C 2.5 μM
X
C 10 μM
X
E 10 ng/ml
X

图19

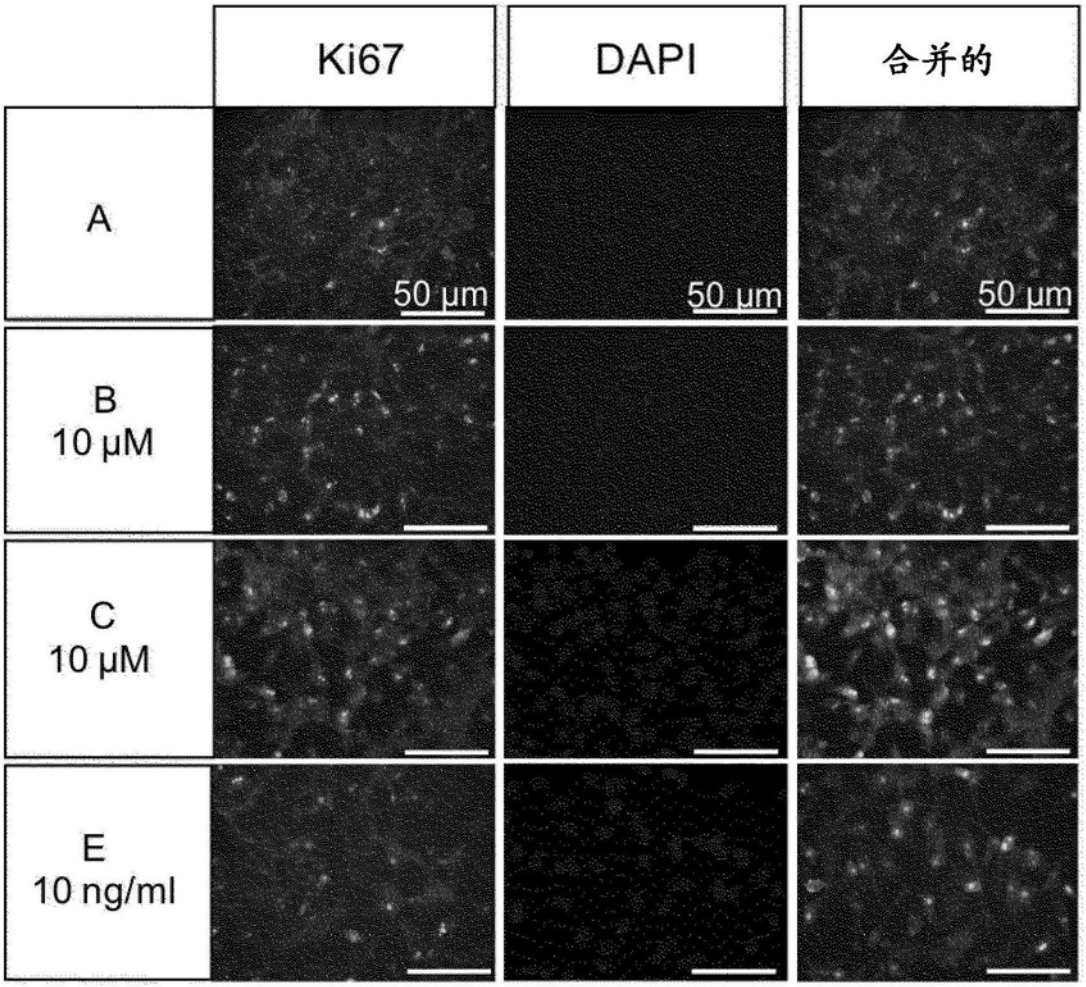
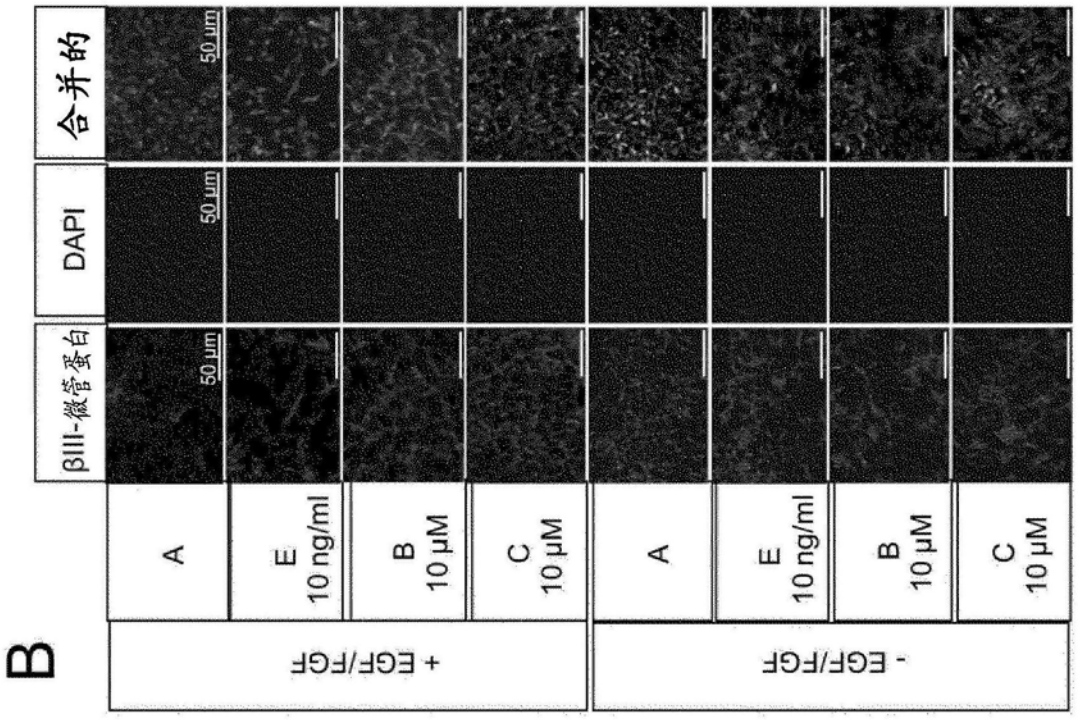


图20


B
βIII-微管蛋白
DAPI
合并的
50 μm
+ EGF/FGF
- EGF/FGF
A
E 10 ng/ml
B 10 μM
C 10 μM

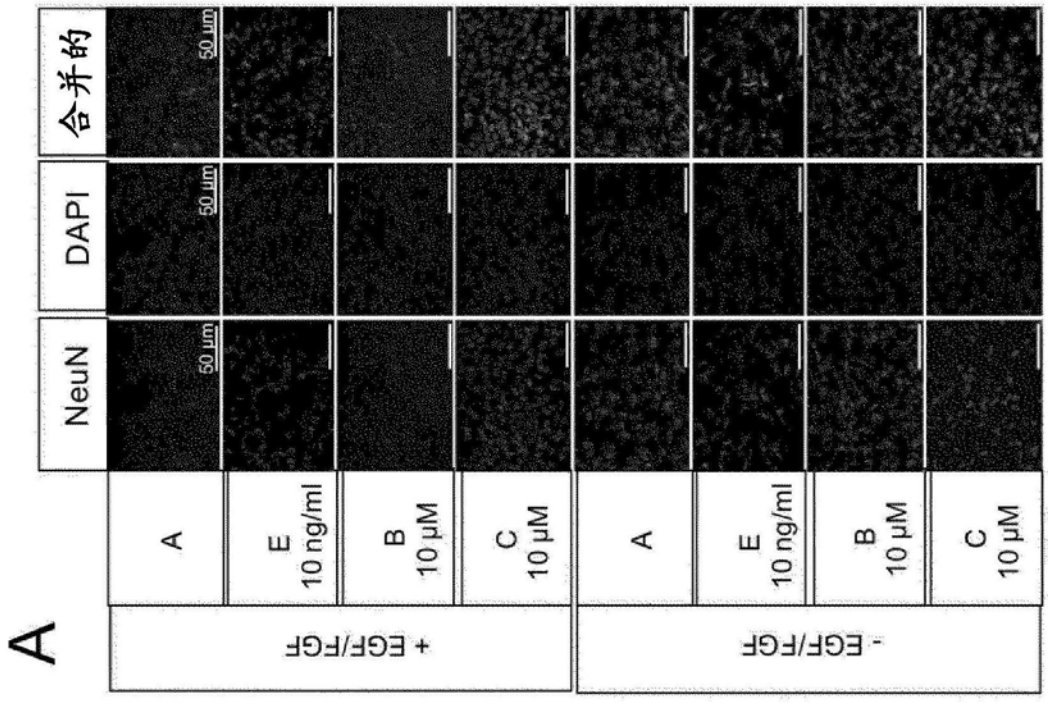

A
NeuN
DAPI
合并的
50 μm
+ EGF/FGF
- EGF/FGF
E 10 ng/ml
B 10 μM
C 10 μM

图21

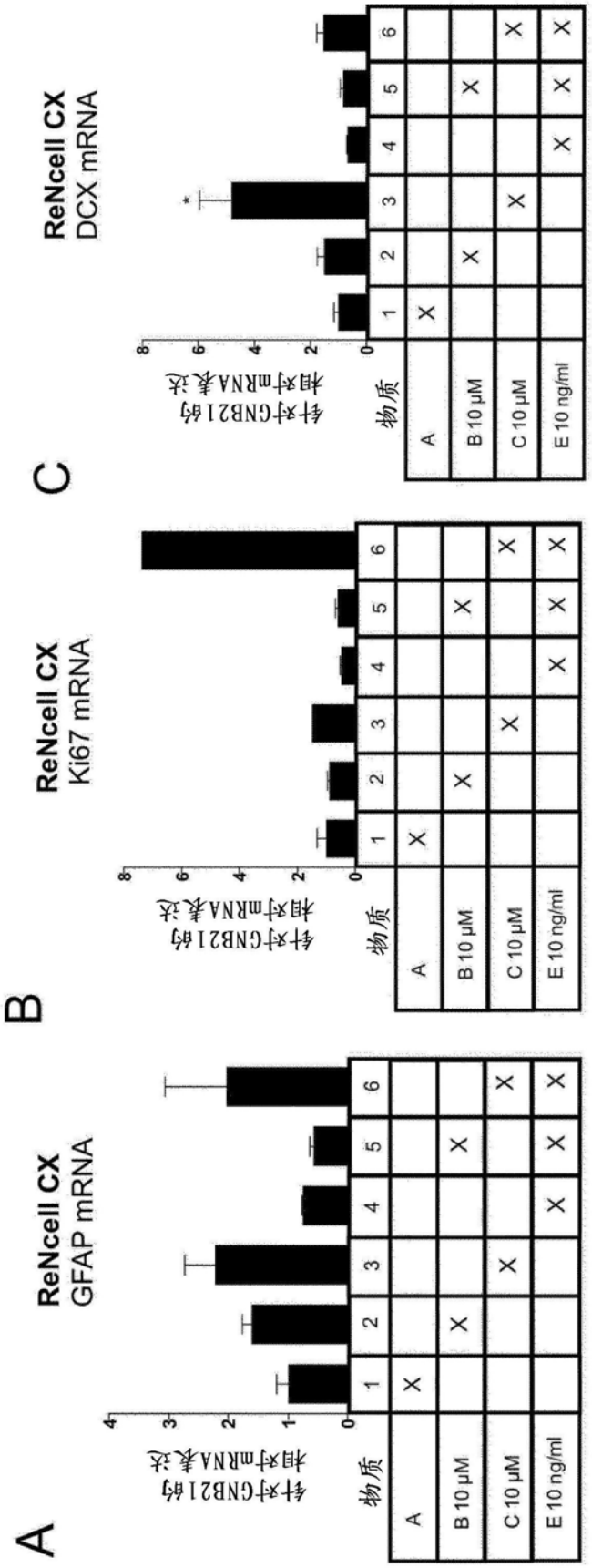

A
ReNcell CX
GFAP mRNA
针对GNB21的相对mRNA表达
物质
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B
ReNcell CX
Ki67 mRNA
针对GNB21的相对mRNA表达
C
ReNcell CX
DCX mRNA
针对GNB21的相对mRNA表达

图22

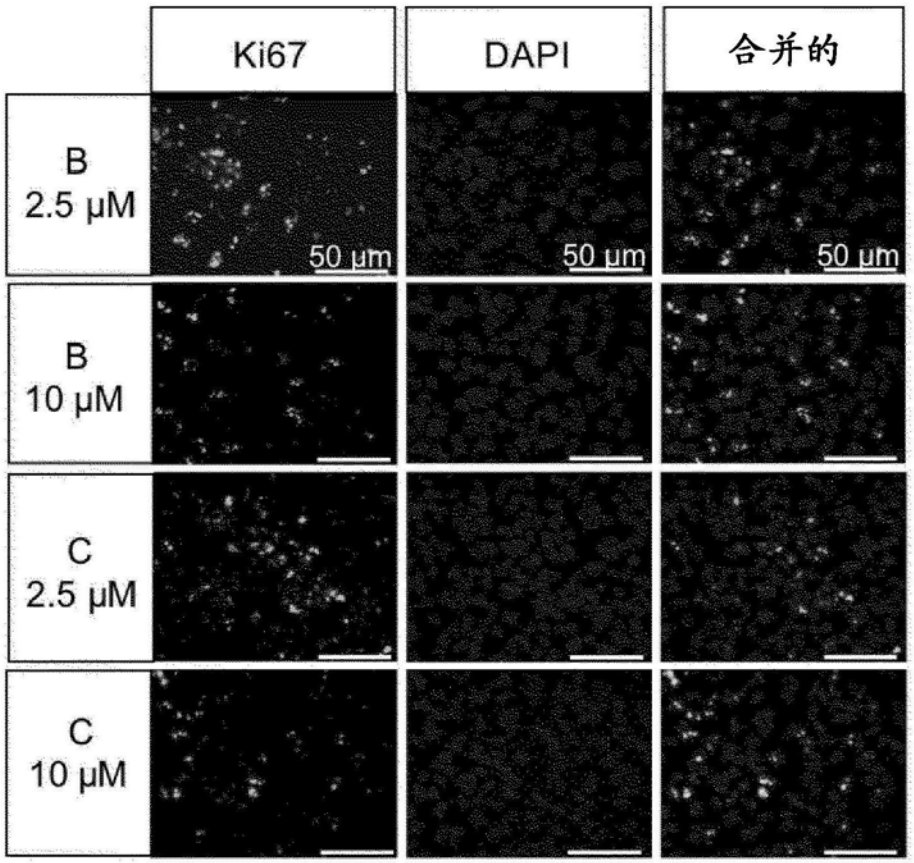

Ki67
DAPI
合并的
B
2.5 μM
B
10 μM
C
2.5 μM
C
10 μM
50 μm
50 μm
50 μm

图23

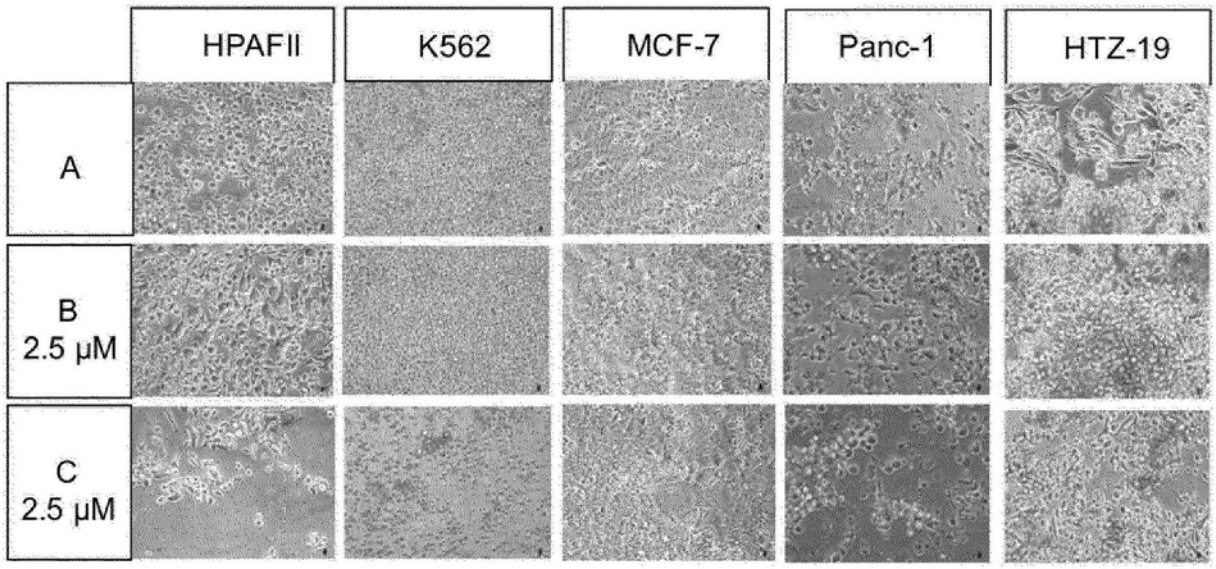

HPAFII
K562
MCF-7
Panc-1
HTZ-19
A
B
2.5 μM
C
2.5 μM

图24

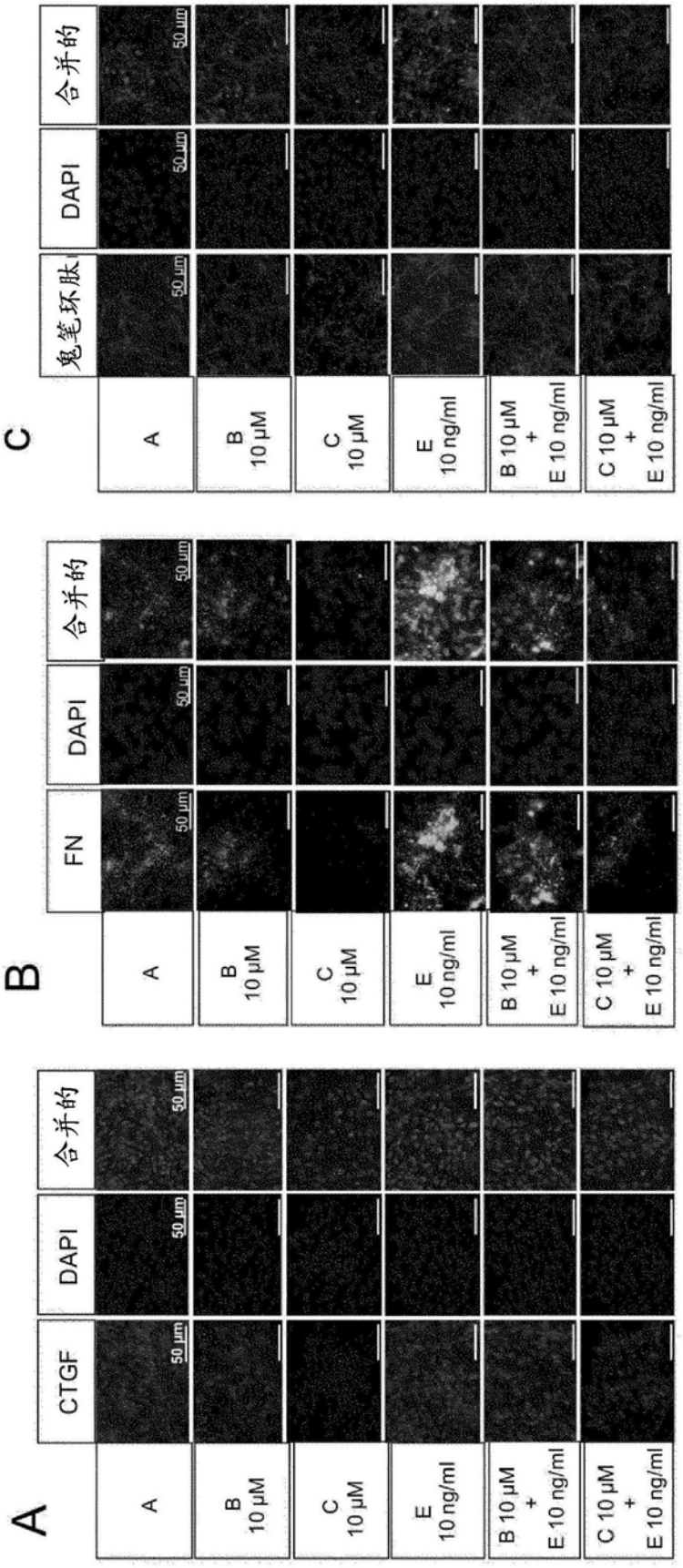

A
CTGF
DAPI
合并的
B
FN
DAPI
合并的
C
鬼笔环肽
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm

图25

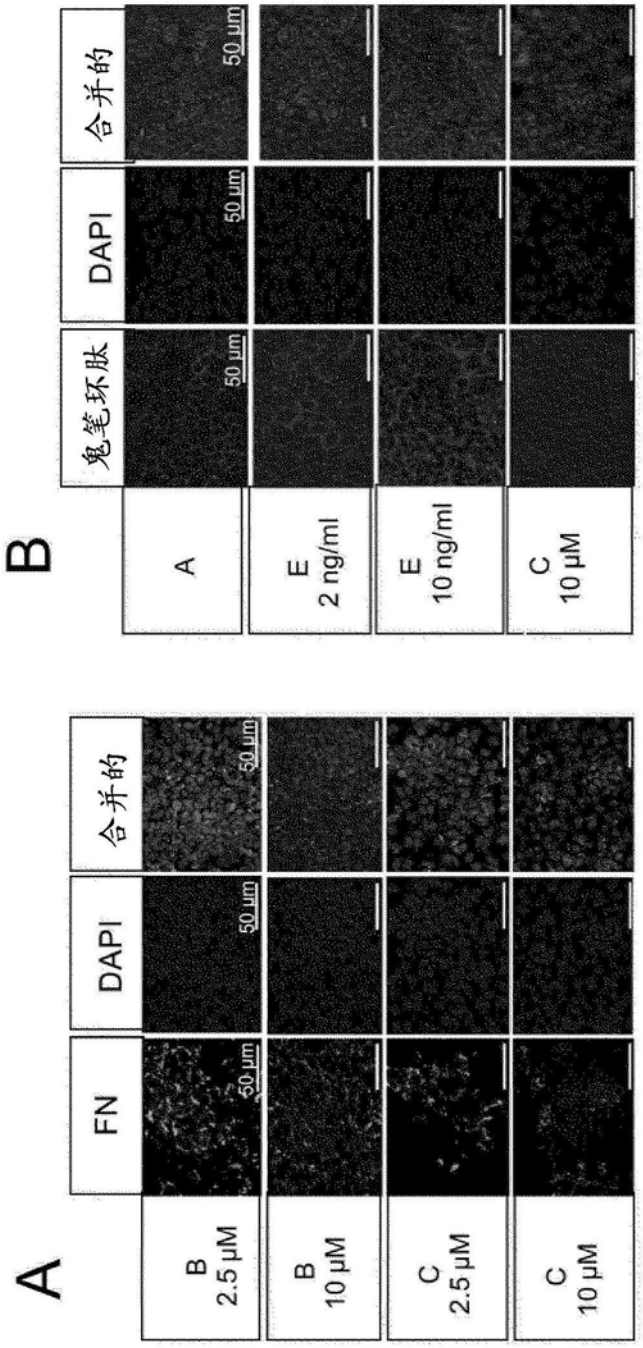

A
FN
DAPI
合并的
B
2.5 μM
B
10 μM
C
2.5 μM
C
10 μM
50 μm
B
鬼笔环肽
DAPI
合并的
A
E
2 ng/ml
E
10 ng/ml
C
10 μM
50 μm

图26

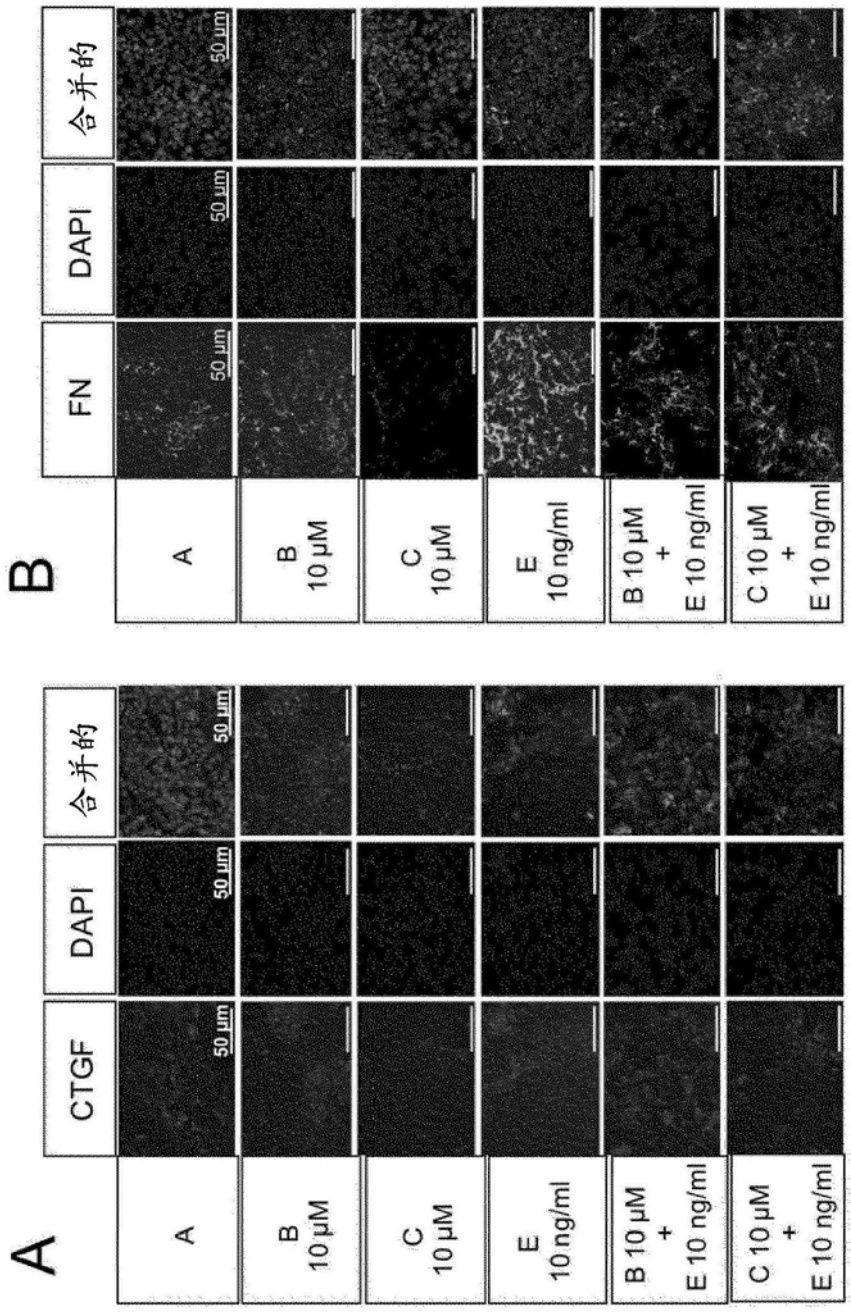

A
CTGF
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm
B
FN
DAPI
合并的
A
B 10 μM
C 10 μM
E 10 ng/ml
B 10 μM + E 10 ng/ml
C 10 μM + E 10 ng/ml
50 μm

图27

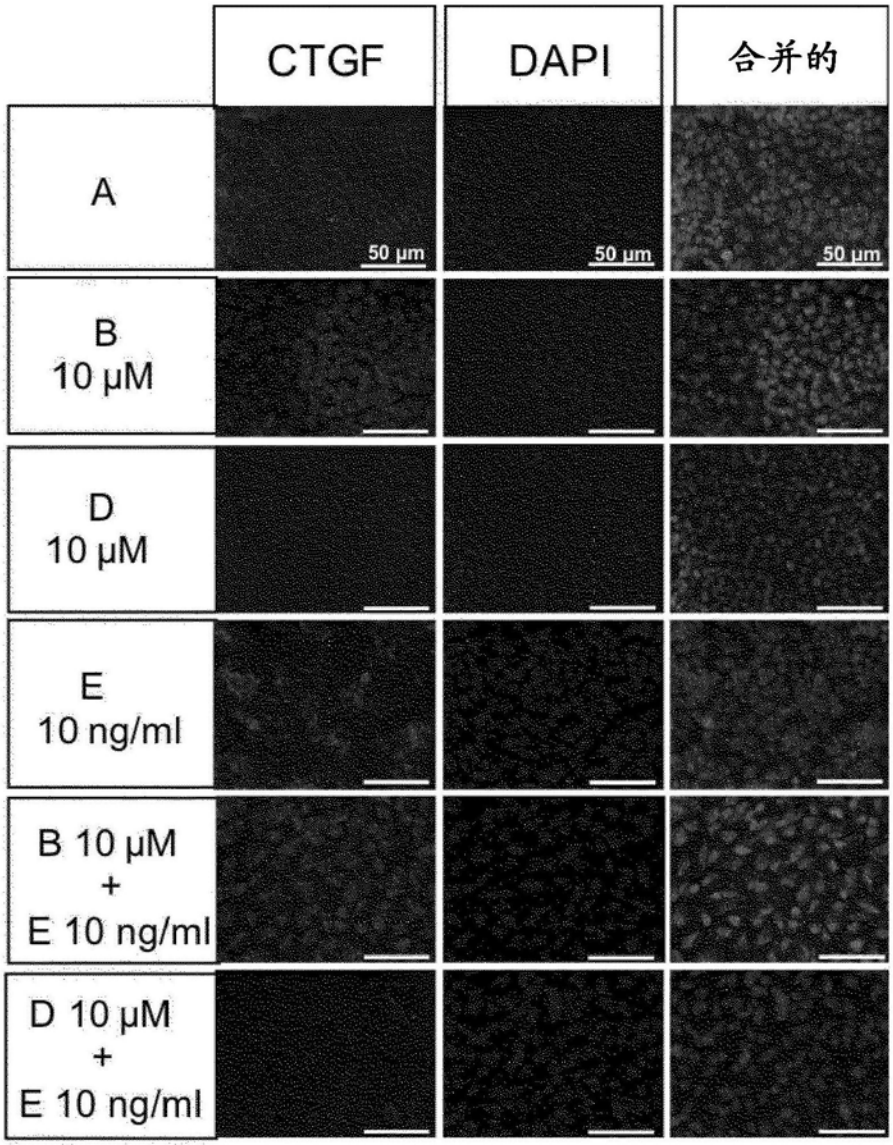

CTGF
DAPI
合并的
A
50 μm
50 μm
50 μm
B
10 μM
D
10 μM
E
10 ng/ml
B 10 μM
+
E 10 ng/ml
D 10 μM
+
E 10 ng/ml

图28

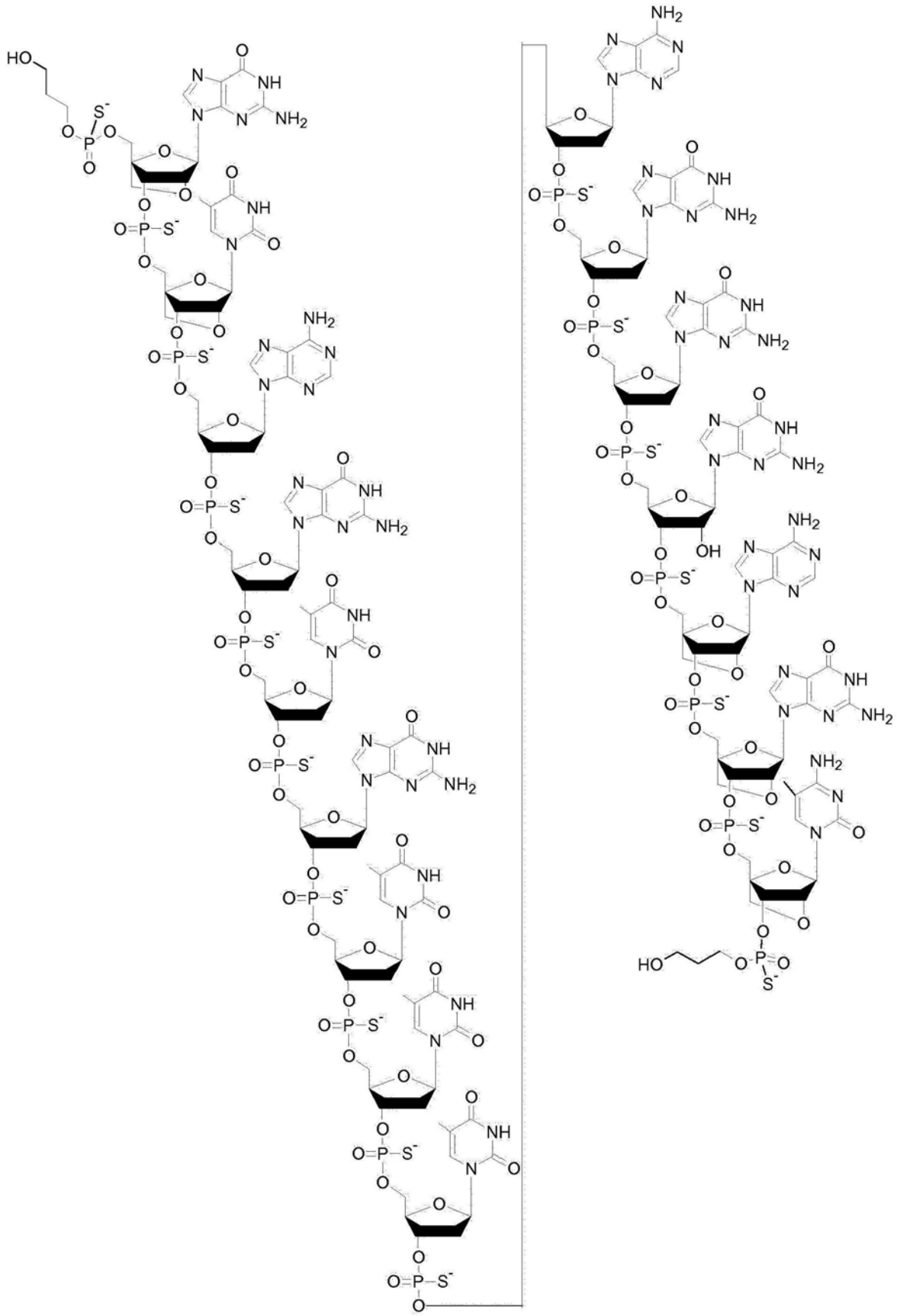


图29

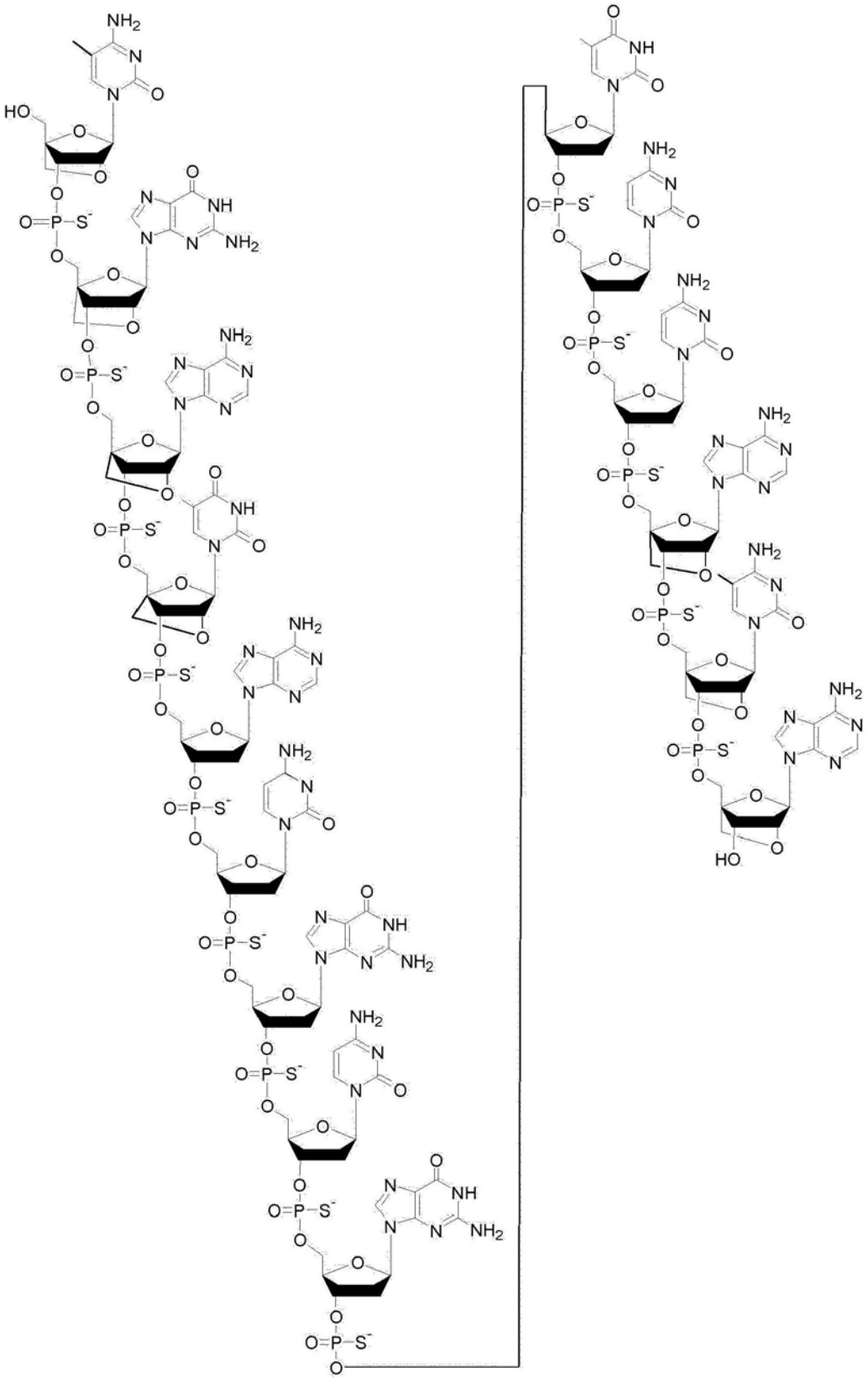


图30

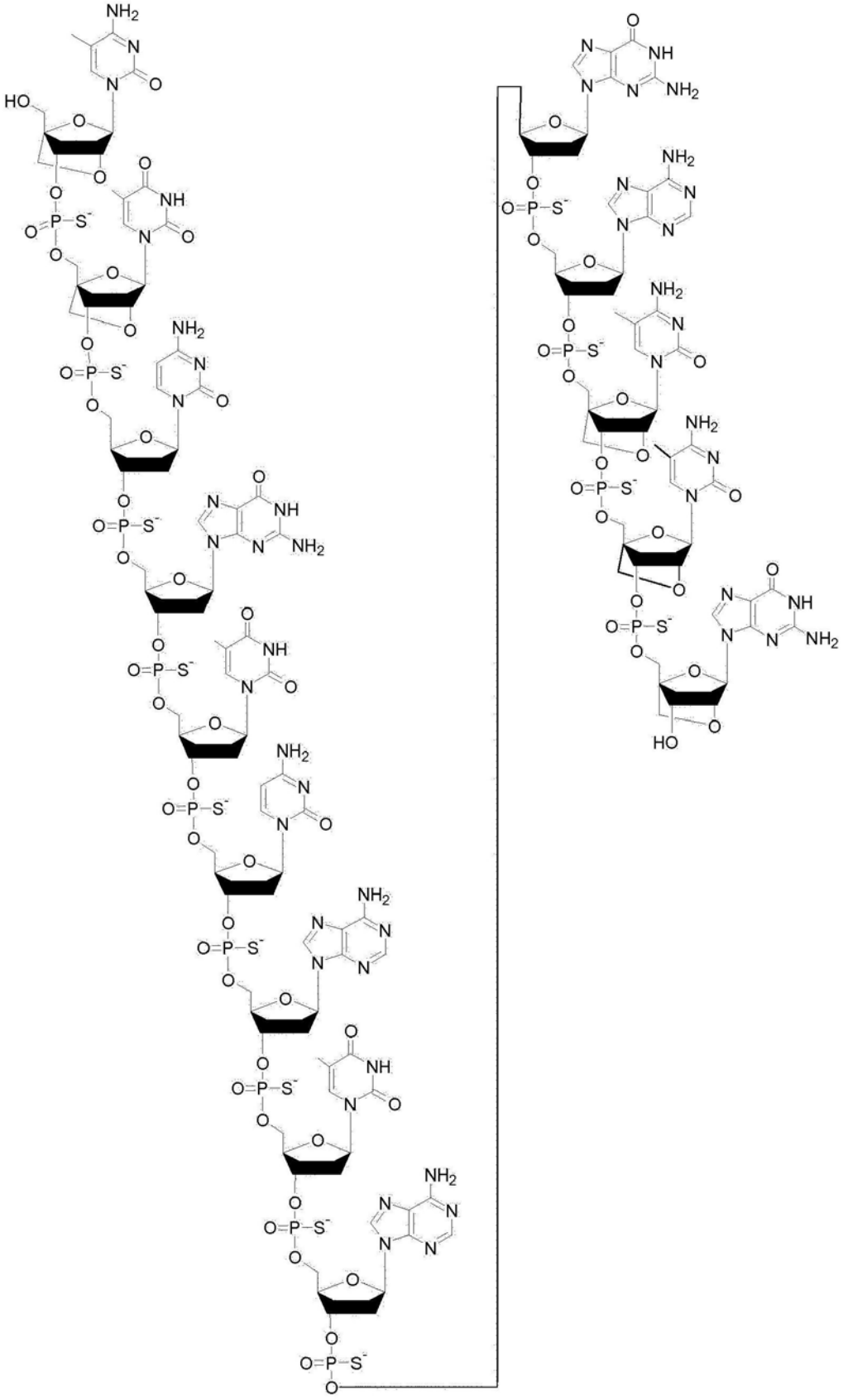


图31

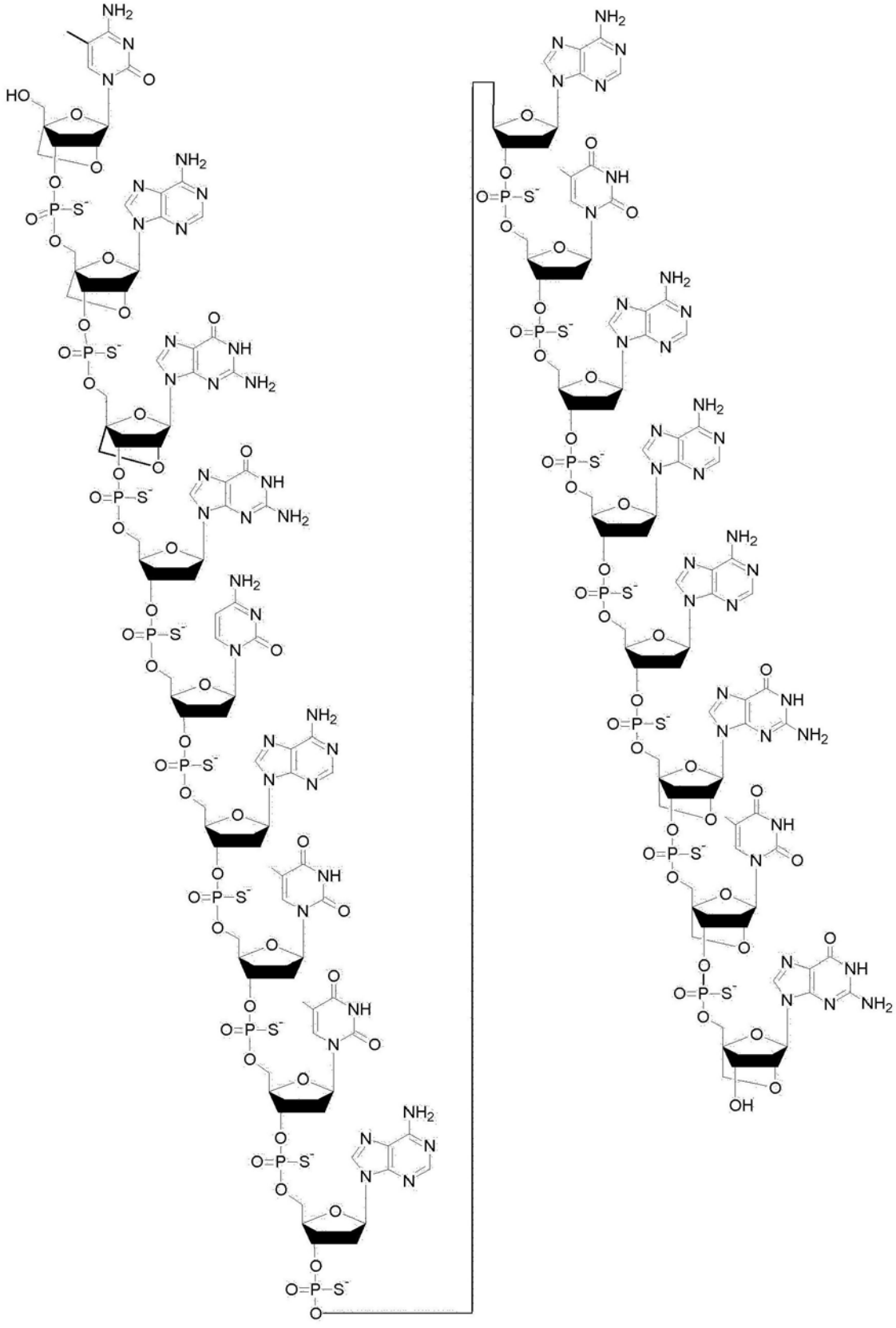


图32