

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480026916.9

[51] Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100558893C

[22] 申请日 2004.9.17

[21] 申请号 200480026916.9

[30] 优先权

[32] 2003.9.18 [33] US [31] 60/504,110

[32] 2004.6.3 [33] US [31] 60/576,534

[86] 国际申请 PCT/US2004/030436 2004.9.17

[87] 国际公布 WO2005/028628 英 2005.3.31

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.17

[73] 专利权人 ISIS 药物公司

地址 美国加利福尼亚州

共同专利权人 伊莱利利公司

[72] 发明人 S·M·弗赖尔 K·W·多比

E·G·马库松 E·E·斯韦茨

B·巴特 J·R·格雷夫

B·W·科尼切克

[56] 参考文献

WO0210409A 2002.2.7

TRANSLATIONAL REGULATION BY
P38MITOGEN - ACTIVATED PROTEIN KINASE
SIGNALINGDURING HUMAN CHOLANGIOCAR-
CINOMA GROWTH. YAMAGIWA YOKO, ET
AL. HEPATOLOGY, Vol. 38 No. 1. 2003

真核细胞翻译起始因子 eIF4E 与头颈部鳞
状细胞癌. 陶磊. 国外医学耳鼻喉科学分
册, 第 25 卷第 1 期. 2001

审查员 吴汀晨

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 2 页 说明书 237 页

[54] 发明名称

eIF4E 表达的调节

[57] 摘要

本发明提供了用于调节 eIF4E 表达的寡聚化合物、组合物和方法。本发明反义化合物可以是单链的或双链的并且靶向编码 eIF4E 的核酸。本发明提供了使用这些化合物调节 eIF4E 表达和诊断与治疗与 eIF4E 表达相关的疾病和状况的方法。

1. 修饰的反义寡核苷酸或其可药用盐,其由 SEQ ID NO: 40 的核苷酸序列组成并具有至少一个化学修饰的糖部分、核苷间键或核碱基。

2. 权利要求 1 的修饰的反义寡核苷酸或其可药用盐,其具有至少一个 2'-O-(2-甲氧基乙基)糖部分。

3. 权利要求 1 的修饰的反义寡核苷酸或其可药用盐,其具有至少一个硫代磷酸酯核苷间键。

4. 权利要求 1 的修饰的反义寡核苷酸或其可药用盐,其中至少一个胞嘧啶为 5-甲基胞嘧啶。

5. 权利要求 1 的修饰的反义寡核苷酸或其可药用盐,其中每一个核苷间键为硫代磷酸酯键,从 SEQ ID NO: 40 的 5'端向 3'端读取的核苷酸 1-5 和 16-20 每一个均包含 2'-O-(2-甲氧基乙基)糖,核苷酸 6-15 为 2'-脱氧核苷酸,并且每个胞嘧啶残基均为 5-甲基胞嘧啶。

6. 权利要求 1 的修饰的反义寡核苷酸或其可药用盐,其为钠盐形式。

7. 修饰的反义寡核苷酸,其由 SEQ ID NO:40 所示核苷酸序列组成,并具有至少一个化学修饰的核苷间键、糖部分或核碱基,其为钠盐形式。

8. 修饰的反义寡核苷酸,其由 SEQ ID NO:40 所示核苷酸序列组成,其中每一个核苷间键为硫代磷酸酯键,从 5'端向 3'端读取的核苷酸 1-5 和 16-20 每一个均包含 2'-O-(2-甲氧基乙基)糖,核苷酸 6-15 为 2'-脱氧核苷酸,并且至少一个胞嘧啶为 5-甲基胞嘧啶,所述修饰的反义寡核苷酸为钠盐形式。

9. 修饰的反义寡核苷酸,其由 SEQ ID NO:40 所示核苷酸序列组成,其中每一个核苷间键为硫代磷酸酯键,从 5'端向 3'端读取的核苷酸 1-5 和 16-20 每一个均包含 2'-O-(2-甲氧基乙基)糖,核苷酸 6-15 为 2'-脱氧核苷酸,并且每一个胞嘧啶均为 5-甲基胞嘧啶,所述修饰的反义寡核苷酸为钠盐形式。

10. 医药或兽药组合物,其包含权利要求 1-9 中任意一项所述的修饰

的反义寡核苷酸或其可药用盐以及可药用或生理可接受载体。

11. 权利要求 10 的医药或兽药组合物，其中所述可药用或生理可接受载体是可药用或生理可接受赋形剂或稀释剂。

12. 权利要求 10 或 11 的医药或兽药组合物，其为用于胃肠外施用的形式。

13. 权利要求 12 的医药或兽药组合物，其中所述胃肠外施用为通过静脉注射或输注。

14. 用作药物的权利要求 1-9 中任意一项的修饰的反义寡核苷酸或其可药用盐。

15. 权利要求 1-9 中任意一项的修饰的反义寡核苷酸或其可药用盐的用途，其用于制造用来治疗与 eIF4E 表达或过表达相关的状况的药物。

16. 权利要求 15 的用途，其中所述状况是与 eIF4E 表达或过表达相关的疾病。

17. 权利要求 16 的用途，其中所述与 eIF4E 表达或过表达相关的疾病是过度增殖疾病。

18. 权利要求 17 的用途，其中所述过度增殖疾病是癌症。

19. 权利要求 18 的用途，其中所述癌症选自：乳腺癌、头颈癌、结肠直肠癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、肾癌和成胶质细胞瘤。

20. 权利要求 17 的用途，其中所述过度增殖疾病是肿瘤。

eIF4E 表达的调节

发明领域

本发明提供了用于调节 eIF4E 表达的组合物和方法。具体而言, 本发明涉及与编码 eIF4E 的核酸分子杂交的单链或双链反义化合物, 特别是寡核苷酸化合物。本文表明此类化合物能够调节 eIF4E 的表达。

发明背景

真核基因表达必须受到调节以致力于使细胞能够快速地对广范围的不同条件作出反应。mRNA 翻译过程是基因表达受到高度调节的一个步骤。作为对激素、生长因子、细胞因子和营养物的反应, 动物细胞通常激活翻译为增殖反应作准备。在应激条件下例如氧化应激或渗透性应激、DNA 损伤或营养物撤除, 蛋白质合成速度典型降低。mRNA 翻译的活化或抑制在几分钟内发生, 并且认为对该过程的控制施加于蛋白质合成的起始阶段 (Rosenwald 等, *Oncogene*, 1999, 18, 2507-2517; Strudwick 和 Borden, *Differentiation*, 2002, 70, 10-22)。

翻译起始需要几种真核起始因子(eIF)的协同活性, 所述的真核起始因子是通过其细胞质定位和调节蛋白质合成起始阶段的能力进行分类定义的蛋白质。作为这些因子之一的真核起始因子 4E (eIF4E) (也称作真核翻译起始因子 4E、真核翻译起始因子 4E 样 1(eIF4EL1)、帽结合蛋白(CBP) 和信使 RNA 帽结合蛋白)最初是作为一个涉及翻译的 25 kDa 的 mRNA 帽结合蛋白分离得到的(Rychlik 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 945-949) 并且因此已经成为最充分表征的 eIF 之一。相对于其它起始因子而言以有限量存在的 eIF4E 是 eIF4F 起始复合物的一种成份, 该起始复合物还包括支架蛋白 eIF4G 和 RNA 解旋酶 eIF4A。在细胞质中, eIF4E 通过特异性结合至几乎全部成熟细胞 mRNA 上都存在的 7-甲基 GpppX 帽结构的 5' 末端而催化帽依赖蛋白质合成的限速步骤, 其中帽结构行使将 mRNA 递送

至 eIF4F 复合物的功能。一旦结合, eIF4F 复合物从帽的 5' 向 3' 端扫描, 这允许 eIF4A 的 RNA 解旋酶活性解开 5' 非翻译区 (UTR) 中存在的任何二级结构, 从而暴露出翻译起始密码子并促进核糖体装配于 mRNA (Graff 等, Clin. Exp. Metastasis, 2003, 20, 265-273; Strudwick 等, Differentiation, 2002, 70, 10-22)。

掺入到 eIF4E 复合物的 eIF4E 可用性受到磷酸化作用以及抑制蛋白质结合的调节。eIF4E 是磷蛋白, 其丝氨酸 209 由促分裂原活化蛋白激酶相互作用激酶 Mnk1 磷酸化 (Flynn 等, J. Biol. Chem., 1995, 270, 21684-21688; Wang 等, J. Biol. Chem., 1998, 273, 9373-9377 和 Waskiewicz 等, Embo J., 1997, 16, 1909-1920)。eIF4E 的磷酸化作用增加其对 mRNA 帽子的亲和力, 从而提高翻译速度 (Waskiewicz 等, Mol. Cell Biol., 1999, 19, 1871-1880)。通过佛波酯、细胞应激和细胞因子增加 eIF4E 的磷酸化涉及 p38 促分裂原活化 (MAP) 激酶和/或 Erk 信号转导通路, 其依次刺激 Mnk1 活性。其它应激如热休克、山梨醇和过氧化氢可刺激 p38 MAP 激酶并增加 Mnk1 活性, 然而这些刺激会增加 eIF4E 与 eIF4E 结合蛋白质 1 (4E-BP1) 的结合 (Wang 等, J. Biol. Chem., 1998, 273, 9373-9377)。4E-BP1 与 eIF4E 的结合阻断了 Mnk1 对 eIF4E 的磷酸化作用 (Wang 等, J. Biol. Chem., 1998, 273, 9373-9377)。4E 结合蛋白质 1 和 2 通过与 eIF4G 竞争结合至 eIF4E 背侧表面而担当有效的翻译抑制剂功能 (Ptushkina 等, Embo J., 1999, 18, 4068-4075)。MTOR 对结合蛋白质的磷酸化作用引起结合蛋白质从 eIF4E 上解离, 使 eIF4E 恢复活性。

越来越多的观察表明翻译因子定位于细胞核和细胞质中并在那里行使功能。传统上认为在真核生物中转录和翻译在空间上是分离的; 然而, 在哺乳动物细胞核中观察了结合进行的转录和翻译 (Iborra 等, Science, 2001, 293, 1139-1142)。一部分 eIF4E 定位于细胞核, 表明该翻译因子可以对细胞核中的翻译呈现一些控制作用 (Lejbkiewicz 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 9612-9616)。eIF4E 由核质穿梭蛋白质 eIF4E 转运蛋白 (4E-T) 经过输入蛋白 α/β 通道, 输入至细胞核 (Dostie 等, Embo J., 2000, 19,

3142-3156)。在细胞核中,早幼粒细胞白血病蛋白质(PML)是一种重要的哺乳动物细胞生长和细胞凋亡调节物,其能够直接结合 eIF4E(Cohen 等, *Embo J.*, 2001, 20, 4547-4559)。PML 通过其 RING 结构域极大降低 eIF4E 对 mRNA 5'帽子结构的亲和力而调节 eIF4E 活性(Cohen 等, *Embo J.*, 2001, 20, 4547-4559)。

过量的 eIF4E 不导致翻译速度的整体提高,而是选择性增加 eIF4E 敏感类 mRNA 所编码蛋白质的合成,包括生长刺激性蛋白质如血管内皮生长因子(VEGF)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)和细胞周期蛋白 D1(Kevil 等, *Int. J. Cancer*, 1996, 65, 785-790; Rosenwald, *Cancer Lett.*, 1995, 98, 77-82 和 Shantz 等, *Cancer Res.*, 1994, 54, 2313-2316)。通过增加翻译起始提高 ODC 和 VEGF 蛋白质水平,而由于细胞周期蛋白 D1 mRNA 向细胞质的转运更多使得细胞周期蛋白 D1 水平提高(Kevil 等, *Int. J. Cancer*, 1996, 65, 785-790; Rosenwald, *Cancer Lett.*, 1995, 98, 77-82; Rousseau 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 1065-1070)。因此, eIF4E 除了在翻译起始中起作用外还可以影响 mRNA 的核质运输。

eIF4E 功能是总体细胞蛋白质合成和生长的基本决定因素(De Benedetti 等, *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 11, 5435-5445)。在正常细胞中, eIF4E 以有限数量存在,这可限制翻译。编码细胞生长和存活必需蛋白质的 mRNA 典型地包含复杂的、高度结构化的 5'UTR,其给予这些 mRNA 较差的翻译基础。然而,当存在过量 eIF4E 时许多这种 mRNA 仍可以进行很好地翻译并且还通过肿瘤上调(Graff 和 Zimmer, *Clin. Exp. Metastasis*, 2003, 20, 265-273)。通过 eIF4E 还可以增强与细胞分化相关的 mRNA 的翻译,如在包括上皮肺肿瘤细胞系在内的一些正在分化的细胞系中发现 eIF4E 水平增加(Walsh 等, *Differentiation*, 2003, 71, 126-134)。

已经报道在许多人类癌症和癌症来源的细胞系中 eIF4E 过表达并且其过表达还导致了细胞的致癌性转化和在动物模型中出现侵袭/转移表型。与非转化的培养细胞不同,转化的细胞系不依赖于血清生长因子的存在而表达 eIF4E(Rosenwald, *Cancer Lett.*, 1995, 98, 77-82)。过量 eIF4E 导致 HeLa

细胞异常生长和瘤形态并且在 NIH 3T3 和 Rat2 成纤维细胞中引起致瘤性转化, 如通过非贴壁依赖性生长、培养转化灶形成和裸鼠中肿瘤形成所判断的那样(De Benedetti 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 8212-8216 和 Lazaris-Karatzas 等, *Nature*, 1990, 345, 544-547)。而且, 通过过表达 eIF4E 所呈现出的瘤转化还与增加的 ODC 翻译相关(Lazaris-Karatzas 等, *Nature*, 1990, 345, 544-547)。另外, 与 eIF4E 表达增加相关的细胞周期蛋白 D1 核输出的增加与转化活性直接相联系(Cohen 等, *Embo J.*, 2001, 20, 4547-4559)。这些发现证明, 当 eIF4E 过量时能够增加生长调节性 mRNA 的表达或核输出。结果, 所影响细胞能够不依赖于正常生长控制机制而增殖。在用 src 酪氨酸激酶癌蛋白转化的细胞中观察到增强的 eIF4E 磷酸化作用, 表明除了过表达外 eIF4E 活性的提高也有助于转化细胞中生长调节的丧失(Frederickson 等, *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 11, 2896-2900)。

在几种人癌症中观察到 eIF4E 提高, 其中所书癌症包括但不限于非霍奇金淋巴瘤、结肠腺瘤和癌以及喉癌、头颈癌、前列腺癌、乳腺癌和膀胱癌(Crew 等, *Br. J. Cancer*, 2000, 82, 161-166; Graff 等, *Clin. Exp. Metastasis*, 2003, 20, 265-273; Haydon 等, *Cancer*, 2000, 88, 2803-2810; Kerekatte 等, *Int. J. Cancer*, 1995, 64, 27-31; Rosenwald 等, *Oncogene*, 1999, 18, 2507-2517; Wang 等, *Am. J. Pathol.*, 1999, 155, 247-255)。eIF4E 上调是结肠癌发生中的早期事件并且通常伴随着细胞周期蛋白 D1 水平的提高(Rosenwald 等, *Oncogene*, 1999, 18, 2507-2517)。过量 eIF4E 还是头颈癌肿瘤复发的可靠预示, 它还在侵袭性膀胱癌中选择性上调并且在喉鳞状细胞癌中与较差的组织学分级和转移的更晚期状态关联(Crew 等, *Br. J. Cancer*, 2000, 82, 161-166; Liang 等, *Laryngoscope*, 2003, 113, 1238-1243 和 Nathan 等, *Oncogene*, 1997, 15, 579-584)。这些发现表明 eIF4E 水平提高参与癌症的进展和起始。

通过使用反义机制已经实现了对 eIF4E 表达和活性的抑制。安装有 3'-悬突核苷酸的反义寡核苷酸能够调节 eIF4E 与具有 5'帽子的寡核糖核苷酸的结合(Baker 等, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 11495-11499)。将工程化表达与

eIF4E 翻译起始区内 20 个核苷酸互补的寡核苷酸的附加型载体导入 HeLa 细胞会降低 eIF4E 水平并且伴随着降低细胞生长和蛋白质合成速度, 这证明 eIF4E 是细胞增殖所必需的(Bommer 等, *Cell. Mol. Biol. Res.*, 1994, 40, 633-641; De Benedetti 等, *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 11, 5435-5445)。eIF4F 复合物的支架蛋白成份 eIF4G 的水平也降低了。尽管抑制 eIF4E 后翻译水平降低, 但某些蛋白质仍继续合成, 并且许多这些蛋白质已经鉴定为应激诱导或热休克蛋白质(Joshi-Barve 等, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 21038-21043)。在大鼠胚胎成纤维细胞中相同的载体使 eIF4E 降低 50-60%, 这足以抑制 ras 介导的这些细胞的转化和肿瘤发生(Graff 等, *Int. J. Cancer*, 1995, 60, 255-263; Rinker-Schaeffer 等, *Int. J. Cancer*, 1993, 55, 841-847)。而且, ODC 翻译和多胺转运也降低了, 该观察提供了 ras 诱导的恶性肿瘤、eIF4E 活性和多胺代谢之间的联系(Graff 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 240, 15-20)。使用 eIF4E 反义载体稳定转化乳癌细胞系和头部与颈部鳞状细胞癌细胞系导致成纤维细胞生长因子 2 (FGF-2)表达降低并且导致细胞在小鼠内致瘤能力和血管发生能力的抑制, 这表明 eIF4E 在肿瘤血管化中的诱因作用(DeFatta 等, *Laryngoscope*, 2000, 110, 928-933; Nathan 等, *Oncogene*, 1997, 15, 1087-1094)。

通过将小干扰 RNA 注射入秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) 年轻成虫靶向失活人 eIF4E 同系物 IFE-3, 导致后代中 100%的胚胎致死率(Keiper 等, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 10590-10596)。靶向 eIF4E 的小干扰双链 RNA 还揭示出 eIF4E 调节的缺乏参与细胞转化。使用靶向人 eIF4E 部分编码区的基因特异性 21-核苷酸小干扰 RNA 使 eIF4E 功能性失活导致恶性胆管细胞非锚定依赖性生长显著降低, 非锚定依赖性生长是与转化细胞相关的表型。此外, 恶性胆管细胞中 eIF4E 的磷酸化依赖于 p38 MAP 激酶信号转导通路, 这证明在胆管癌生长过程中 p38 MAP 激酶信号与蛋白质合成的调节之间存在联系(Yamagiwa 等, *Hepatology*, 2003, 38, 158-166)。

在表达组成型活性形式 eIF4E 抑制剂 4EBP-1 的乳腺癌细胞中发现了 eIF4E 活性的抑制降低细胞肿瘤发生潜能的进一步证据, 这导致与细胞周

期蛋白 D1 下调和细胞周期蛋白依赖激酶 p27^{Kip1} 上调相关的细胞周期阻滞 (Jiang 等, *Cancer Cell Int.*, 2003, 3, 2)。在 eIF4E 水平显著高于正常组织的胃肠癌中, 4E-BP1 的过表达与远端转移降低相关 (Martin 等, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2000, 32, 633-642)。

美国专利 5,646,009 要求并公开了杂合载体, 其中一段 DNA 片段编码由 eIF4E、eIF4E 因子或其突变体组成的帽结合蛋白。该专利还公开了编码人 eIF4E 的核酸序列。

在美国专利 6,171,798 中公开了通过向癌细胞施用反义构建体来治疗患者中癌症的方法, 该构建体包含选自人 eIF4E 基因编码序列中的至少 12 个核苷酸, 其相对控制其表达的启动子而言为 3'-5' 方向。

美国专利 6,596,854 要求并公开了编码人 eIF4E 变体的分离核酸分子, 其中所述变体在氨基酸 112 和 114-121 区域内, 或位置 118, 或位置 119, 或位置 115 或位置 121 发生氨基酸取代。

欧洲专利申请 1 033 401 和日本专利申请 2001269182 要求纯化的核酸, 其包含选自包括编码人 eIF4E 的部分核酸分子的 EST 相关序列中序列的至少 10 个连续核苷酸。这些公布还公开了用于基因治疗的反义构建体和寡核苷酸的制备和用途。

PCT 公布 WO 01/96388 和 WO 01/96389 公开并要求了所分离多聚核苷酸, 其包含选自以下序列的序列: 序列表中提供的序列、序列的互补序列、由序列中至少 20 个相连残基组成的序列、与序列杂交的序列或者与序列具有至少 75% 或至少 95% 同一性的序列, 其包含编码人 eIF4E 的核酸分子。该公布还要求了治疗患者癌症的方法, 其包括向患者施用所要求的多聚核苷酸组合物。

PCT 公布 WO 03/039443 要求并公开了用于治疗白血病的药物组合物的制备方法, 其特征在于将与编码相应标记物蛋白质的选自人 eIF4E 核酸分子的多聚核苷酸互补的反义寡核苷酸与药物化合物相混合。

在美国专利早期公开 20030087852 中公开了编码 eIF4E 反义 mRNA 的质粒和用该质粒转染的培养小鼠细胞。

在美国专利早期公开 20030144190 中公开了用于降低或消除本发明核酸序列或蛋白质（包括 eIF4E）表达的反义分子。还公开了编码 eIF4E 反义 mRNA 的质粒和持续表达该质粒的大鼠成纤维细胞。

由于 eIF4E 参与许多疾病，所以仍然长期需要能够有效调节 eIF4E 的其它制剂。如此，考虑到 eIF4E 表达上调与许多不同类型的癌症相关，所以在癌症治疗中抑制作用特别重要。

反义技术是降低特异基因产物表达的有效方法并且已经证明在许多治疗、诊断和研究应用中具有独特的用途。本发明提供了调节 eIF4E 表达的组合物和方法。

发明概述

本发明针对靶向编码 eIF4E 的核酸分子的并抑制 eIF4E 表达的寡聚化合物，例如反义化合物及其可药用盐。寡聚化合物可以是 RNA 样或 DNA 样寡聚化合物，包括寡核苷酸。寡聚化合物可以是单链寡聚化合物或者部分或全部双链寡聚化合物，并且可以是化学修饰的或未修饰的。还提供了包含这些化合物的药物及其它组合物。

还提供了筛选 eIF4E 调节物的方法和在细胞、组织或动物中调节 eIF4E 表达的方法，其包括将所述细胞、组织或动物与一种或多种本发明化合物或组合物相接触。文中还提出了治疗动物（特别是人）的方法。此类方法包括施用治疗或预防有效量的一种或多种本发明化合物或组合物。

发明详述

A. 发明总述

本发明将寡聚化合物如反义化合物、单链或双链寡核苷酸及相似种类化合物用于调节编码 eIF4E 的核酸分子的功能或效应。这是通过提供与编码 eIF4E 的一种或多种核酸分子特异性杂交的寡聚化合物实现的。如文中所使用，术语“靶核酸”和“编码 eIF4E 的核酸分子”已经方便使用用来包括编码 eIF4E 的 DNA、从此种 DNA 转录的 RNA（包括前 mRNA 和 mRNA

或其部分)以及从此种 RNA 衍生的 cDNA。这种通过与其杂交的化合物对靶核酸功能进行的调节通常称为“反义”。

受到干扰的 DNA 功能可以包括复制和转录。复制和转录可以从例如内源性细胞模板、载体、质粒构建体或其它上面进行。受到干扰的 RNA 功能可以包括功能例如 RNA 向蛋白质翻译位点的易位、RNA 向距离 RNA 合成位点较远的细胞内位点的易位、蛋白质从 RNA 上的翻译以及由 RNA 参与或促进的涉及 RNA 的催化活性或复合物形成。此种对靶核酸功能干扰的一种结果是对 eIF4E 表达的调节。在本发明的上下文中,“调节”和“表达调节”意思是编码基因的核酸分子如 DNA 或 RNA 的数量或水平增加(刺激)或降低(抑制)。抑制是调节表达的一种形式并且 mRNA 通常是靶核酸。

在本发明的上下文中,“杂交”意思是指基本上互补的寡聚化合物链的配对。在本发明中,配对的一种机制涉及氢键,氢键可以是寡聚化合物链的互补核苷或核苷酸碱基(核碱基)之间的 Watson-Crick、Hoogsteen 或反向 Hoogsteen 氢键。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是互补的核碱基,它们通过形成氢键配对。杂交可以在多种条件下发生。

如果反义化合物与靶核酸的结合干扰了靶核酸的正常功能而引起活性丧失,并且存在足够程度的互补性以避免在期望特异性结合的条件下(即在体内测定或治疗处理情况下的生理条件和在体外测定情况下开展测定所用的条件)反义化合物与非靶核酸序列非特异性结合,则反义化合物是“可特异性杂交的”。

在本发明中,短语“严格杂交条件”或者“严格条件”是指本发明化合物除了与最低数量其它序列杂交外将与其靶序列杂交的条件。严格条件是序列依赖的并且在不同情况下是不同的,并且在本发明情况下,寡聚化合物与靶序列杂交的“严格条件”可以通过寡聚化合物的性质和组成以及研究这些寡聚化合物的测定方法来确定。通常,严格杂交条件包括低浓度(<0.15M)的无机阳离子如 Na^{++} 或 K^{++} 的盐(即低离子强度)、比低于寡聚化合物:靶序列复合物 T_m 值 20-25°C 的温度更高的温度以及变性剂如甲酰胺、二甲基

甲酰胺、二甲亚砷或去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)的存在。例如,甲酰胺每增加1%则杂交率降低1.1%。高严格杂交条件的实例为:0.1×氯化钠-柠檬酸钠缓冲液(SSC)/0.1%(w/v)SDS,于60℃杂交30分钟。

如文中所使用,“互补的”指在一条或两条寡聚链上两个核碱基之间精确配对的能力。例如,如果反义化合物某一位置的核碱基能够与靶核酸(该靶核酸可以是DNA、RNA或寡核苷酸分子)某个位置的核碱基形成氢键,则寡核苷酸和靶核酸之间形成氢键的位置被认为是互补位置。当每个分子中足够数量的互补位置被彼此能够形成氢键的核碱基占据时,则寡聚化合物和其它DNA、RNA或寡核苷酸分子是彼此互补的。因此,“可特异性杂交的”和“互补的”是用于表示在足够数量核碱基间精确配对或互补以致于在寡聚化合物和靶核酸之间发生稳定并特异结合的足够程度的术语。

在本领域中应该理解,寡聚化合物的序列不必要同能够与其可特异性杂交的靶核酸序列100%互补。而且,寡核苷酸可以在一个或多个片段上杂交从而使间隔或相邻片段不参与杂交事件(例如环结构、错配或者发夹结构)。本发明的寡聚化合物与其所靶向靶核酸序列内的靶区域具有至少大约70%、或至少大约75%、或至少大约80%、或至少大约85%、或至少大约90%、或至少大约95%、或至少大约99%的序列互补性。例如,在反义化合物的20个核碱基中有18个与靶区域互补并因此可特异性杂交的反义化合物代表90%的互补性。在该例子中,剩余非互补核碱基可以是成簇的或者散布于非互补核碱基间,并且不必彼此相邻或者与互补核碱基相邻。照这样,具有4(四)个非互补核碱基(其两侧为两个与靶核酸完全互补区域)的长度为18个核碱基的反义化合物与靶核酸具有77.8%的总体互补性并且因此也处于本发明的范围之内。使用本领域已知的BLAST程序(基本局部比对搜索工具)和PowerBLAST程序(Altschul等, *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang和Madden, *Genome Res.*, 1997, 7, 649-656)能够常规确定反义化合物与靶核酸区域的互补性百分数。例如通过Gap程序(Wisconsin序列分析软件包,用于Unix的版本8, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI)并且使用采用Smith和

Waterman 算法(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)的缺省设置能够确定同源性、序列同一性或互补性百分数。

本发明的寡聚化合物还包括在化合物的一个或多个核苷酸位置上存在不同碱基的变体。例如，如果第一个核苷酸是腺苷，则可以产生在该位置上为胸腺嘧啶核苷、鸟苷或胞苷的变体。在反义化合物的任意位置上都可以进行此种变化。然后使用文中所描述的方法对这些化合物进行测试以确定其对 eIF4E mRNA 表达的抑制能力。

在一些实施方案中，反义化合物和靶标之间的同源性、序列同一性或互补性为大约 50% 至大约 60%。在一些实施方案中，同源性、序列同一性或互补性为大约 60% 至大约 70%。在一些实施方案中，同源性、序列同一性或互补性为大约 70% 至大约 80%。在一些实施方案中，同源性、序列同一性或互补性为大约 80% 至大约 90%。在一些实施方案中，同源性、序列同一性或互补性为大约 90%、大约 92%、大约 94%、大约 95%、大约 96%、大约 97%、大约 98%、大约 99% 或大约 100%。

B. 本发明的化合物

在本发明的上下文中，术语“寡聚化合物”指能够与核酸分子区域杂交的多聚体结构。该术语包括寡核苷酸、寡核苷、寡核苷酸类似物、寡核苷酸模拟物及其它们的嵌合组合。寡聚化合物常规制备成线性的，但是也可以连接成或另外制备成环状的并且还可以包含分支。寡聚化合物可以包含双链构建体，例如能够杂交形成双链化合物的两条链或者具有足够自身互补性以允许完全或部分双链化合物杂交和形成的单链。在本发明的一个实施方案中，双链反义化合物包括短干扰 RNA(siRNA)。如文中所使用，术语“siRNA”定义为具有第一链和第二链的双链化合物，并且其包含在所述第一链和第二链之间互补的中央部分和末端部分，其任选地在所述第一链和第二链或靶 mRNA 之间互补。每条链可以为从大约 8 至大约 80 核碱基长度、从 10 至 50 个核碱基长度、从 12 或 13 至 30 个核碱基长度、从 12

或 13 至 24 个核碱基长度或者从 19 至 23 个核碱基长度。中央互补部分可以为从大约 8 至大约 80 个核碱基长度、从 10 至 50 个核碱基长度、从 12 或 13 至 30 个核碱基长度、从 12 或 13 至 24 个核碱基长度或者从 19 至 23 个核碱基长度。末端部分可以为 1-6 个核碱基长度。siRNA 还可以不含末端部分。siRNA 的两条链可以在内部连接从而保留游离 3' 或 5' 末端, 或者可以连接形成连续的发夹结构或环。发夹结构可以在 5' 或 3' 末端包含能够产生单链特征延伸的悬突。

在本发明的一个实施方案中, 双链反义化合物为规范的 siRNA。如文中所使用, 术语“规范 siRNA”定义为具有第一链和第二链的双链寡聚化合物, 其中每一链长度为 21 个核碱基, 并且链中 19 个核碱基是互补的且在每条链的 3' 末端具有在双链化合物中担当 3' 悬突的脱氧胸腺嘧啶二聚体 (dTdT)。

在另一个实施方案中, 双链反义化合物为平端 siRNA。如文中所使用, 术语“平端 siRNA”定义为不具有末端悬突的 siRNA。即双链化合物的至少一个末端是平端。不管是规范的 siRNA 还是平端 siRNA 均能引出 dsRNA 酶并引起 RNAi 反义机制的募集或活化。在另一个实施方案中, 关注了通过 RNAi 反义机制起作用的单链 RNAi (ssRNAi) 化合物。

可以对双链化合物进行进一步的修饰并且这些修饰包括将缀合基团连接到一个末端、所选核碱基位置、糖位置上或者连接到一个核苷间键上。备选地, 两条链可以通过非核酸部分或接头基团进行连接。当 dsRNA 仅从一条链形成时, 其可以采取自身向后折拢以便形成双链体的自身互补发夹型分子形式。因此, dsRNA 可以是完全或部分双链的。当从两条链形成时或者从采用自身向后折拢以形成双链体的自身互补发夹型分子的单链形成时, 两条链 (或者单链的双链体形成区) 是以 Watson-Crick 方式碱基配对的互补 RNA 链。

根据本发明, “反义化合物”包括反义寡核苷酸、核酶、外部指导序列 (EGS) 寡核苷酸、siRNA 化合物、单链或双链 RNA 干扰 (RNAi) 化合物如 siRNA 化合物, 以及与至少部分靶核酸杂交并调节其功能的其它寡聚化合

物。照这样，反义化合物可以是 DNA、RNA、DNA 样、RNA 样或其混合物，或者可以是一种或多种这些化合物的模拟物。这些化合物可以是单链、双链、环状或发夹状寡聚化合物并且可以包含结构元件例如内部或末端凸出、错配或环。常规情况下将寡聚化合物制备成线性的，但是也可以连接成或另外制备成环状和/或分支状。寡聚化合物可以包含构建体，例如杂交形成完全或部分双链化合物的两条链或者具有足够自身互补性以允许完全或部分双链化合物杂交和形成的单链。两条链可以在内部连接而保留游离的 3' 或 5' 末端或者连接形成连续的发夹结构或环。发夹结构可以在 5' 或 3' 末端包含产生单链特征延伸的悬突。双链化合物任选地在末端包括悬突。进一步的修饰包括将缀合基团连接到一个末端、所选核碱基位置、糖位置上或者连接到一个核苷间键上。备选地，两条链可以通过非核酸部分或接头基团连接。当 dsRNA 仅从一条链形成时，其可以采取自身向后折拢以形成双链体的自身互补发夹型分子形式。因此，dsRNA 是完全或部分双链的。通过在转基因细胞系中稳定表达 dsRNA 发夹可以实现基因表达的特异性抑制(Hammond 等, *Nat. Rev. Genet.*, 1991, 2, 110-119; Matzke 等, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2001, 11, 221-227; Sharp, *Genes Dev.*, 2001, 15, 485-490)。当从两条链形成时或者从采取自身向后折拢以形成双链体的自身互补发夹型分子的单链形成时，两条链（或者单链的双链体形成区）是以 Watson-Crick 方式碱基配对的互补 RNA 链。

本发明化合物一旦被导入体系中，其可以引起一种或多种酶或结构蛋白质的作用以影响靶核酸的断裂或其它修饰，或者可以通过基于占用的机制起作用。通常，核酸（包括寡核苷酸）可以描述为“DNA 样”（即一般具有一个或多个 2'-脱氧糖并且一般具有 T 而不是 U 碱基）或者“RNA 样”（一般具有一个或多个 2'-羟基或 2'-修饰糖并且一般具有 U 而不是 T 碱基）。核酸螺旋能够采用一种以上结构类型，最通常地为 A 型和 B 型。通常，据认为具有 B 型样结构的寡核苷酸为“DNA 样”而那些具有 A 型样结构的寡核苷酸为“RNA 样”。在一些（嵌合）实施方案中，反义化合物可以包含 A 和 B 型区域。

修饰靶核酸的酶的一个实例为 RNA 酶 H，它是一种断裂 RNA:DNA 双链体中 RNA 链的细胞内切核酸酶。在本领域中已知，包含长于大约 3 或 4 个连续核碱基的“DNA 样”区域（例如 2'-脱氧区域）的单链反义化合物能够招募 RNA 酶 H。因此，RNA 酶 H 的活化导致 RNA 靶的断裂，从而极大地增强寡核苷酸介导的基因表达抑制作用的效率。最近，推测 dsRNA 酶参与 RNA 干扰(RNAi)过程中所观察到的 RNA:RNA 双链体中 RNA 链的断裂。

虽然一种被广泛接受的反义化合物形式是单链反义寡核苷酸，但在其它情况下双链 RNA 或其类似物也是有用的。在许多物种中，双链结构如双链 RNA (dsRNA)分子的导入已经显出能够诱导基因或其相关基因产物功能被有效且特异性反义介导降低。这种现象在植物和动物中都有发生并且认为与病毒防御和转座子沉默具有进化上的联系(Guo 等, *Cell*, 1995, 81, 611-620; Montgomery 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 15502-15507)。在秀丽隐杆线虫中所阐明的源自双链 RNA(dsRNA)暴露的转录后反义机制后来被命名为 RNA 干扰(RNAi)。该术语已经概括成意思是指涉及能够导致所靶向内源性 mRNA 水平产生序列特异性降低的 dsRNA 导入的反义介导基因沉默(Fire 等, *Nature*, 1998, 391, 806-811)。RNAi 化合物常常称作短干扰 RNA 或者 siRNA。最近，已经表明它实际上是 RNAi 有效诱导物 dsRNA 反义极性的单链 RNA 寡聚物(Tijsterman 等, *Science*, 2002, 295, 694-697)。RNAi 化合物（即单链或双链 RNA 或者 RNA 样化合物）和单链 RNA 酶 H 依赖反义化合物都能够通过碱基配对（即杂交）与其 RNA 靶结合并且通过特异性 RNA 酶诱导靶 RNA 的位点特异性断裂；即两个都是通过反义机制起作用。Vickers 等, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 7108-7118。

在本发明的上下文中，术语“寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)和/或脱氧核糖核酸(DNA)的寡聚物或多聚物，或者其模拟物、嵌合体、类似物或同系物。该术语包括天然存在核碱基、糖和共价核苷间（主链）键组成的寡核苷酸以及功能相似的具有非天然存在部分的寡核苷酸。比天然形式相比，

此类修饰的或替代的寡核苷酸常常是所期望的，这是因为其具有令人期望的特性例如增强的细胞摄入、增强的靶核酸亲和力和在核酸酶存在情况下提高的稳定性。

根据本发明的反义化合物可以包含大约8至大约80个核碱基(即大约8至大约80个连接核苷)长度的反义部分。该长度指反义化合物的反义链或部分的长度。换言之，本发明的单链反义化合物包含从8至大约80个核碱基，并且本发明的双链反义化合物(例如 dsRNA)包含长度为从8至大约80个核碱基的反义链或部分。本领域的每个普通技术人员将意识到这包括长度为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个或者其内的任意范围的核碱基反义部分。

在一个实施方案中，本发明的反义化合物具有长度为10-50个核碱基的反义部分。本领域中的普通技术人员将意识到这体现了反义化合物具有长度为10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 个或者其内的任意范围的核碱基反义部分。

在一个实施方案中，本发明的反义化合物具有长度为12或13至30个核碱基的反义部分。本领域中的普通技术人员将意识到这体现了反义化合物具有长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个或者其内的任意范围的核碱基反义部分。

在一些实施方案中，本发明的反义化合物具有长度为12或13至24个核碱基的反义部分。本领域中的普通技术人员将意识到这体现了反义化合物具有长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个或者其内的任意范围的核碱基反义部分。

在一些实施方案中，本发明的反义化合物具有长度为 19 至 23 个核碱基的反义部分。本领域中的普通技术人员将意识到这体现了反义化合物具有长度为 19、20、21、22 或 23 个或者其内的任意范围的核碱基反义部分。

包含选自说明性反义化合物的一段至少 8 个连续核碱基的长度为 8-80 个核碱基的反义化合物被认为同样也是适宜的反义化合物。

代表性化合物可以包括包含说明性反义化合物之一的 5'末端至少 8 个连续核碱基的寡核苷酸序列（剩余核碱基是在与靶核酸特异杂交的反义化合物 5'末端上游即刻开始的同一寡核苷酸的连续一段，并持续直到寡核苷酸包含大约 8 至大约 80 个核碱基）。其它化合物还可以包括包含说明性反义化合物之一的 3'末端至少 8 个连续核碱基的寡核苷酸序列（剩余核碱基是在与靶核酸特异杂交的反义化合物 3'末端下游即刻开始的同一寡核苷酸的连续一段，并持续直到寡核苷酸包含大约 8 至大约 80 个核碱基）。还应该理解，化合物可以为这样的寡核苷酸序列，即其包含来自说明性化合物序列内部部分的至少 8 个连续核碱基并且向任一方向或两个方向延伸直到寡核苷酸包含大约 8 至大约 80 个核碱基。

应该注意到本发明的寡聚化合物或其可药用盐不包括核碱基序列 5'-AGTCGCCATCTTAGATCGAT-3' (SEQ ID NO:454) 或 5'-AGUCGCCAUCUUAGAUCGAU-3' (SEQ ID NO:455)。此外，本发明所包括的寡聚化合物或其可药用盐可以由或基本上由本文所公开的特异核苷酸序列组成、或者包含本文所公开的特异核苷酸序列。当短语“基本上由它组成”、“基本上由它们组成”、“基本上由它组成的”等应用于本发明所包括的寡聚化合物或其可药用盐时是指如文中所公开的那些核苷酸序列，除此之外本发明所包括的寡聚化合物或其可药用盐还包含另外的核苷酸（如文中所论述的核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或者其类似物或衍生物）。然而，与文中所公开的相应寡聚化合物或其可药用盐的相应参数相比，此类另外核苷酸本质上并不影响这些寡聚化合物或其可药用盐在调节、减弱或抑制 eIF4E 基因表达或 RNA 功能方面的基本特性或新特性，所述特性包括这些分子的特异性定量效应。

在本领域中掌握了文中所说明反义化合物的技术人员能够在无需进行过多实验的条件下鉴定其它反义化合物。

C. 本发明的靶标

在本发明的上下文中，将寡聚化合物“靶向”特定核酸分子可能是多步骤的过程。该过程通常起始于其功能将要受到调节的靶核酸的鉴定。该靶核酸可以是例如其表达与特定失调或疾病状态相关的细胞基因（或自该基因转录的 mRNA）或者来自传染介质的核酸分子。在本发明中，靶核酸编码 eIF4E。

靶向过程通常还包括确定靶核酸内用于发生反义相互作用以致于产生预期效应（如表达受到调节）的至少一个靶区域、片段或位点。在本发明的上下文中，术语“区域”定义为具有至少一种可以确认的结构、功能或特性的靶核酸部分。在靶核酸区域内为片段。“片段”定义为靶核酸内区域的更小部分或亚部分。如本发明中所使用的“位点”定义为靶核酸内的位置。

既然如本领域中已知翻译起始密码子典型地为 5'-AUG（在转录的 mRNA 分子中；在相应 DNA 分子中为 5'-ATG），翻译起始密码子也称为“AUG 密码子”、“起始密码子”或“AUG 起始密码子”。少数基因具有 RNA 序列为 5'-GUG、5'-UUG 或 5'-CUG 的翻译起始密码子，并且已经显示 5'-AUA、5'-ACG 和 5'-CUG 在体内具有功能。因此，术语“翻译起始密码子”和“起始密码子”可以包括许多密码子序列，尽管在每种情况下起始氨基酸典型地为蛋氨酸（在真核生物中）或甲酰蛋氨酸（在原核生物中）。在本领域中还已知真核或原核基因可以具有两个或多个可选择的起始密码子，它们中的任意一个可以在特定细胞类型或组织中或者在一组特定条件下优选地用于翻译起始。在本发明的上下文中，“起始密码子”和“翻译起始密码子”指体内使用以便从编码 eIF4E 基因所转录的 mRNA 进行起始翻译的一个密码子或多个密码子，而不管此类密码子序列如何。在本领域中还已知基因的终止翻译密码子（或“终止密码子”）具有以下三个序列之一，即 5'-UAA、5'-UAG 和 5'-UGA（相应 DNA 序列分别为 5'-TAA、5'-TAG

和 5'-TGA)。

术语“起始密码子区域”和“翻译起始密码子区域”是指 mRNA 或基因的一部分，其包含从翻译起始密码子的任一方向（即 5' 或 3'）上的大约 25 至大约 50 个相邻核苷酸。同样，术语“终止密码子区域”和“翻译终止密码子区域”是指 mRNA 或基因的一部分，其包含从翻译终止密码子的任一方向（即 5' 或 3'）上的大约 25 至大约 50 个相邻核苷酸。因此，“起始密码子区域”（或“翻译起始密码子区域”）和“终止密码子区域”（或“翻译终止密码子区域”）是可以用本发明反义化合物有效靶向的全部区域。

在本领域中已知指翻译起始密码子和翻译终止密码子之间的区域的可读框(ORF)或“编码区”也是可以有效靶向的区域。在本发明的上下文中，一个区域是包含基因可读框(ORF)的翻译起始或终止密码子的基因内区域。

其它靶区域包括 5' 非翻译区(5'UTR)和 3' 非翻译区(3'UTR)，其中在本领域已知 5' 非翻译区是指翻译起始密码子 5' 方向的 mRNA 部分并且因此包括 mRNA 5' 帽子位点和翻译起始密码子之间的核苷酸（或基因上的相应核苷酸），并且在本领域中已知 3' 非翻译区指翻译终止密码子 3' 方向上的 mRNA 部分并且因此包括 mRNA 翻译终止密码子和 3' 末端之间的核苷酸（或基因上的相应核苷酸）。mRNA 的 5' 帽子位点包括通过 5'-5' 三磷酸键连接至 mRNA 最 5' 端残基的 N7-甲基化鸟苷残基。mRNA 的 5' 帽子区域被认为包括 5' 帽子结构自身以及与帽子位点相邻的最开始的 50 个核苷酸。5' 帽子区域也是靶标。

尽管一些真核 mRNA 转录本是直接翻译的，但是多数转录本包含一个或多个被称作“内含子”的区域，在翻译之前将这些内含子从转录本上剪切掉。剩余（且因此翻译）的区域已知为被称为“外显子”并且被剪接到一起形成连续的 mRNA 序列。在异常剪接涉及疾病或者特定剪接产物生产过剩涉及疾病的情况下，靶向剪接位点即靶向内含子-外显子接点或外显子-内含子接点也是特别有用的。由于重排或缺失产生的异常融合接点也是适宜的靶位点。通过来自不同基因来源的两个（或多个）mRNA 的剪接过程产

生的 mRNA 转录本被称作“融合转录本”。还已知使用靶向如 DNA 或前 mRNA 的反义化合物能够有效地靶向内含子。单链反义化合物如通过 RNA 酶 H 机制起作用的寡核苷酸化合物可有效地用于靶向前 mRNA。

在本领域中还已知从 DNA 的同一基因组区域能够产生选择性 RNA 转录本。这些选择性转录本通常称作“变体”。更加具体而言，“前 mRNA 变体”是从同一基因组 DNA 产生的、在起始或终止位置上不同于从同一基因组 DNA 产生的其它转录本并且包含内含子和外显子序列的转录本。

在剪接过程中，一旦一个或多个外显子或内含子区域或其部分被剪切，则前 mRNA 变体产生较小的“mRNA 变体”。结果，mRNA 变体被加工成前 mRNA 变体并且作为剪接的结果每个独特前 mRNA 变体必须无例外地产生独特的 mRNA 变体。这些 mRNA 变体也称作“选择性剪接变体”。如果前 mRNA 变体不发生剪接，那么前 mRNA 变体与 mRNA 变体是相同的。

在本领域中还已知可以通过使用选择性起始或终止转录的信号产生变体并且前 mRNA 和 mRNA 可以拥有一个以上起始密码子或终止密码子。来源于使用选择性起始密码子的前 mRNA 或 mRNA 的变体被称作该前 mRNA 或 mRNA 的“选择性起始变体”。那些使用选择性终止密码子的转录本被称为该前 mRNA 或 mRNA 的“选择性终止变体”。一种特殊类型选择性终止变体是“polyA 变体”，其中多重转录本产生于转录装置对“polyA 终止信号”之一的可变选择，由此产生了终止于独特 polyA 位点的转录本。在本发明的上下文中，文中所描述的变体类型也是适宜的靶核酸。

靶核酸上的能够被适宜寡聚化合物杂交的位置在下文中称作“适宜靶片段”。如文中所使用的术语“适宜靶片段”被定义为活性寡聚化合物所靶向的靶区域中的至少 8-核碱基部分。虽然不希望受到理论的束缚，但目前应该相信这些靶片段代表了杂交可接近的靶核酸部分。

虽然文中提出的是某些适宜靶片段的特定部分，但本领域的技术人员应该认识到，它们是用来举例说明和描述本发明范围内的特定实施方案。本领域的普通技术人员可以鉴定另外的适宜靶片段。如果有的话，则“适宜靶片段”没有必要通过该术语来识别或者包括于“适宜靶片段”表中。

包含选自说明性适宜靶片段内至少 8 个连续核碱基的长度为 8-80 个核碱基的靶片段认为也适于用于靶向。

靶片段可以包括包含选自说明性适宜靶片段之一的 5'末端的至少 8 个连续核碱基的 DNA 或 RNA 序列(剩余核碱基是在靶片段 5'末端上游即刻开始的同一 DNA 或 RNA 的连续一段,并持续直到 DNA 或 RNA 包含大约 8 至大约 80 个核碱基)。相似地,适宜靶片段可以是包含选自说明性适宜靶片段之一的 3'末端的至少 8 个连续核碱基的 DNA 或 RNA 序列(剩余核碱基是在靶片段 3'末端下游即刻开始的同一 DNA 或 RNA 的连续一段,并持续直到 DNA 或 RNA 包含大约 8 至大约 80 个核碱基)。还应该理解,适宜寡聚靶片段可以为这样的 DNA 或 RNA 序列,即其包含来自说明性适宜靶片段序列内部部分的至少 8 个连续核碱基并且向任一方向或两个方向延伸直到寡核苷酸包含大约 8 至大约 80 个核碱基。了解了本文举例说明的适宜靶片段的本领域技术人员能够在无需进行过多实验的情况下鉴定另外的适宜靶片段。

一旦鉴定出一个或多个靶区域、片段或位点,则选择与靶标充分互补(即足够好地杂交且具有足够特异性)的寡聚化合物以得出预期效应。

寡聚化合物还可以靶向靶核碱基序列的区域(例如下面实施例中所公开的那些区域),其包含核碱基 1-80、81-160、161-240、241-320、321-400、401-480、481-560、561-640、641-720、721-800、801-880、881-960、961-1040、1041-1120、1121-1200、1201-1280、1281-1360、1361-1440、1441-1520、1521-1600、1601-1680、1681-1760 或 1761-1842 或其任意组合。

D. 筛选和靶标确认

在另一个实施方案中,文中所鉴定的“适宜靶片段”可以应用于筛选调节 eIF4E 表达的另外的化合物。“调节物”是那些降低或增加编码 eIF4E 的核酸分子表达的化合物并且其包含与适宜靶片段互补(即反义)的至少 8-核碱基部分。筛选方法包括将编码 eIF4E 的核酸分子的适宜靶片段与一种或多种候选调节物相接触的步骤,和选择降低或增加编码 eIF4E 的核酸分

子表达的一种或多种候选调节物的步骤。一旦显示某种候选调节物或几种调节物能够调节（例如降低或增加）编码 eIF4E 的核酸分子的表达，则采用该调节物可以用于 eIF4E 功能的进一步调查研究或者用作根据本发明的研究试剂、诊断剂或治疗剂。

一般而言，dsRNA 构建体活性与靶向同一位点的 RNA 酶 H 依赖单链反义化合物的活性相关。Vickers 等, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 7108。因此，作为任一单链反义化合物（例如 RNA 酶 H 依赖化合物）有活性的序列能够用于设计双链（例如 siRNA）反义化合物，并且反之亦然。本发明的适宜靶片段可以与其分别互补的反义化合物相结合形成稳定的双链（双链体）化合物。本领域中已经显示此类双链寡聚化合物部分可以调节靶标表达并且通过反义机制调控翻译及 RNA 加工。而且，双链部分还可以进行化学修饰（Fire 等, *Nature*, 1998, 391, 806-811; Timmons 和 Fire, *Nature* 1998, 395, 854; Timmons 等, *Gene*, 2001, 263, 103-112; Tabara 等, *Science*, 1998, 282, 430-431; Montgomery 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 15502-15507; Tuschl 等, *Genes Dev.*, 1999, 13, 3191-3197; Elbashir 等, *Nature*, 2001, 411, 494-498; Elbashir 等, *Genes Dev.* 2001, 15, 188-200)。例如，已经显示此类双链部分通过双链体反义链与靶标的典型杂交而抑制靶标，从而触发靶标的酶降解（Tijsterman 等, *Science*, 2002, 295, 694-697）。基于 RNA 酶 H 的反义（通常使用单链化合物）和 siRNA（通常使用双链化合物）都是反义机制，一般导致靶 RNA 功能丧失。最佳 siRNA 和 RNA 酶 H 依赖寡聚化合物在效能、最大效应、特异性和作用持续期间以及效率方面的行为相似。而且已经显示，dsRNA 构建体的活性通常与靶向同一位点的 RNA 酶 H 依赖单链反义化合物的活性相关。一个主要的例外是 RNA 酶 H 依赖反义化合物的活性通常针对前 mRNA 中的靶位点，而 siRNA 不是。Vickers 等, *J. Biol. Chem.*, 203, 278, 7108。

本发明的寡聚化合物还能够应用于药物发现和靶标验证领域。本发明包括将文中所鉴定的化合物和适宜靶片段用于药物发现尝试的用途以阐明 eIF4E 和疾病状态、表型或状况之间存在的关系。这些方法包括检测或调

节 eIF4E, 其包括将样品、组织、细胞或有机体与一种或多种本发明反义化合物相接触、在治疗后某个时间测量 eIF4E 核酸或蛋白质水平和/或相关表型或化学药品的终末点、和任选地将测量值与非处理样品或用本发明另外化合物处理样品相比较。这些方法还能够平行或与其它实验联合进行, 以便确定用于靶标确认过程的未知基因的功能或者确定特定基因产物作为治疗或预防特定疾病、状况或表型的靶标的有效性。

E. 试剂盒、研究试剂、诊断剂和治疗剂

本发明的寡聚化合物能够用于诊断、治疗、预防和作为研究试剂和试剂盒。而且, 那些普通技术人员通常将能够以精确特异性抑制基因表达的寡聚化合物用于阐明特定基因的功能或者用于区别生物学途径多个成员的功能。

对于用于试剂盒和诊断剂, 本发明化合物单独或者与其它化合物或治疗剂联合用作差别分析和/或组合分析中的工具, 以阐明细胞和组织内所表达基因的部分或全部互补体的表达模式。

作为一个非限定性实施例, 将用一种或多种化合物处理的细胞或组织内的表达模式与不用化合物处理的对照细胞和组织进行比较, 并将所产生的模式用于分析基因表达的差异水平, 这些差异水平与例如所检测基因的疾病相关性、信号转导途径、细胞定位、表达水平、大小、结构或功能相关。这些分析能够在刺激或非刺激细胞中以及在影响表达模式的其它化合物存在或缺乏条件下进行。

本领域已知的基因表达分析方法的例子包括 DNA 阵列或微阵列 (Brazma 等, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celis 等, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16)、SAGE (基因表达系列分析)(Madden 等, Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425)、READS (消化 cDNA 的限制性内切酶扩增) (Prashar 等, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72)、TOGA (总基因表达分析) (Sutcliffe 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 1976-81)、蛋白质阵列和蛋白质组(Celis 等, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut 等, Electrophoresis, 1999, 20,

2100-10)、表达序列标签(EST)序列测定 (Celis 等, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson 等, J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57)、消减 RNA 指纹法(SuRF) (Fuchs 等, Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson 等, Cytometry, 2000, 41, 203-208)、消减克隆、差异展示(DD) (Jurecic 等, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21)、比较基因组杂交(Carulli 等, J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96)、FISH (荧光原位杂交)技术(Going 等, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904)和质谱分析法(To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41)。

本领域的技术人员还将反义的特异性和敏感性用于治疗用途。反义化合物已经作为治疗部分应用于动物(包括人)疾病情况的治疗。包括核酶在内的反义药物已经安全并有效地施用于人类并且很多临床试验目前正在进行中。因此已确定反义化合物是有用的治疗方法,可以配置(configure)用于治疗细胞、组织和动物特别是动物的治疗方案。本发明也期望对选自伴侣动物、动物园动物和农业动物(包括但不限于猫、狗、啮齿类、马、母牛、绵羊、猪、山羊等)的治疗。

对于治疗剂,通过施用本发明的化合物治疗怀疑患有通过调节 eIF4E 表达能够治疗的疾病或失调的动物,例如人。例如,在一个非限定性实施方案中,方法包括将治疗有效量的抑制 eIF4E 的寡聚化合物施用于需要治疗的动物的步骤。本发明 eIF4E 化合物有效地抑制了编码 eIF4E RNA 核酸的活性和表达。由于 eIF4E RNA 水平的降低同样导致 eIF4E 蛋白质水平的降低,所以也可以测量蛋白质表达或水平的降低。在一些实施方案中,在治疗之前动物已经被诊断患有疾病或失调。在一个实施方案中,寡聚化合物调节 eIF4E mRNA 的活性或表达至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 25%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 75%、至少大约 80%、至少大约 85%、至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99%或 100%。

例如,在动物的血清、脂肪组织、肝脏或任何其它体液、组织或器官中可以测量到 eIF4E 表达的降低。在所分析的所述体液、组织或器官内包

含的细胞可能含有编码 eIF4E 蛋白质的核酸分子和/或 eIF4E 蛋白质本身。

通过将有效量化合物加入到适宜的可药用或生理可接受赋形剂、稀释剂或载体，可以将本发明化合物用于药物组合物。本发明的化合物和方法在预防上也是有用的。因此，本发明包括文中所公开的化合物用于药物的用途，以及目前所公开的化合物用于制备治疗如文中所公开失调的药物的用途。

本发明的化合物能够抑制 eIF4E 的表达。因为这些化合物抑制 eIF4E 活化的效应，所以这些化合物可用于治疗与 eIF4E 表达相关的失调。因此，本发明的化合物是抗肿瘤剂。

相信本发明化合物在治疗癌症方面是有用的，所述癌症例如中枢神经系统肿瘤：多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜和脉络丛肿瘤、松果体肿瘤、神经元肿瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、脑膜肉瘤；眼部肿瘤：基底细胞癌、鳞状细胞癌、黑素瘤、横纹肌肉瘤、视网膜母细胞瘤；内分泌腺肿瘤：垂体瘤、甲状腺肿瘤、肾上腺皮质肿瘤、神经内分泌系统肿瘤、胃肠胰腺内分泌系统肿瘤、生殖腺肿瘤；头部和颈部肿瘤：头和颈癌、口腔、咽、喉、牙源性肿瘤。胸部肿瘤：大细胞肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胸肿瘤、恶性间皮瘤、胸腺瘤、胸原始胚细胞肿瘤；消化道肿瘤：食道肿瘤、胃部肿瘤、肝脏肿瘤、胆囊肿瘤、胰腺外分泌部肿瘤、小肠、不同型阑尾和腹膜肿瘤、结肠和直肠腺癌、肛门肿瘤；生殖泌尿道肿瘤：肾细胞癌、肾盂和输尿管肿瘤、膀胱肿瘤、尿道肿瘤、前列腺肿瘤、阴茎肿瘤、睾丸肿瘤；女性生殖器官肿瘤：外阴和阴道肿瘤、子宫颈肿瘤、子宫体腺癌、卵巢癌、妇科肉瘤；乳房肿瘤；皮肤肿瘤：基底细胞癌、鳞状细胞癌、皮肤纤维肉瘤、梅克尔细胞瘤；恶性黑色素瘤；骨和软组织肿瘤：成骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、原始神经外胚层瘤、血管肉瘤；造血系统肿瘤：骨髓增生异常综合症、急性粒细胞白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、HTLV-1 和 T-细胞白血病和淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、肥大细胞白血病；以及儿童肿瘤：

急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、成神经细胞瘤、骨肿瘤、横纹肌肉瘤、淋巴瘤、肾脏肿瘤。

因此，在一个实施方案中，本发明提供了治疗易感肿瘤的方法，其包括将有效量的靶向 eIF4E 的分离单链 RNA 或双链 RNA 寡核苷酸施用于所需要的病人。ssRNA 或 dsRNA 寡核苷酸可以是修饰的或未修饰的。就是说，本发明提供了靶向 eIF4E 的分离双链 RNA 寡核苷酸或者其药物组合物用于治疗易感肿瘤的用途。

另一方面，本发明提供了分离双链 RNA 寡核苷酸的化合物在制造用于抑制 eIF4E 表达或过表达的药物中的用途。因此，本发明提供了靶向 eIF4E 的分离双链 RNA 寡核苷酸在制造用于通过上述方法治疗易感肿瘤的药物中的用途。

本发明化合物可用于过度增殖疾病的治疗。具体而言，本发明化合物用于治疗癌症。本发明化合物在实体瘤治疗方面特别有用。因此，本发明化合物在治疗乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、膀胱癌、卵巢癌、肾癌和成胶质细胞瘤方面是特别有用的。本发明反义化合物在治疗实体瘤方面是特别有用的。

F. 修饰

如本领域中已知，核苷是碱基-糖组合体。核苷的碱基部分通常是杂环碱基（有时称为“核碱基”或简单地称为“碱基”）。此类杂环碱基最常见的两类为嘌呤和嘧啶。核苷酸是进一步包括共价连接至核苷的糖部分的磷酸基团的核苷。对于包含呋喃戊糖基糖的那些核苷，磷酸基团能够连接至糖的 2'、3' 或 5' 羟基部分。在形成寡核苷酸时，磷酸基团将相邻的核苷彼此共价连接形成线性多聚体化合物。反过来，该线性化合物的各个末端能够进一步连接形成环状化合物，然而，线性化合物通常是所期望的。另外，线性化合物可以具有内部核碱基互补性并因此可以以一定方式折叠产生完全或部分双链化合物。在寡核苷酸内，通常认为磷酸基团形成寡核苷酸的核苷间主链。RNA 和 DNA 的正常键或主链是从 3' 至 5' 的磷酸二酯键。

修饰的糖和核苷间键

用于本发明的寡聚反义化合物的特殊例子包括包含修饰如非天然存在核苷间键的寡核苷酸。如在本说明书中所定义，具有修饰的核苷间键的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷间键和不具有磷原子的核苷间键。为了本说明书的目的并且如有时候在本领域中所提到，在其核苷间主链中不具有磷原子的修饰核苷酸也可以认为是寡核苷。

本发明的寡聚化合物可能具有一个或多个修饰的核苷间键。一种含磷的修饰的核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。其它其内包含磷原子的修饰的寡核苷酸主链包括例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯包括 3'-亚烷基磷酸酯、5'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯、磷酸酯、氨基磷酸酯包括 3'-氨基氨基磷酸酯和氨烷基氨基磷酸酯、硫代羰基氨基磷酸酯、硫代羰基烷基氨基磷酸酯、硫代羰基烷基磷酸三酯、磷酰基乙酸酯 (phosphonoacetate) 和硫代磷酰基乙酸酯 (thio phosphonoacetate) (参见 Sheehan 等, *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(14), 4109-4118 和 Dellinger 等, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 940-950)、具有正常 3'-5'键的硫代磷酸酯和硼代磷酸酯、其 2'-5'键连接类似物以及那些具有颠倒极性 (其中一个或多个核苷间键为 3'-3'、5'-5'或 2'-2'键) 的类似物。具有颠倒极性的寡核苷酸在最 3'端核苷间键包含单一 3'-3'键，即可以是无碱基单一颠倒核苷残基 (核碱基丢失或者在其位置上为羟基)。各种盐、混合盐和游离酸形式可包括在内。

已经报道了 N3'-P5'-氨基磷酸酯呈现出对互补 RNA 链的高亲和性和核酸酶抗性 (Gryaznov 等, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 3143-3144)。已经成功地研究了 N3'-P5'-氨基磷酸酯在体内能够特异性下调 c-myc 基因的表达 (Skorski 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94, 3966-3971 和 Faira 等, *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 40-44)。

教授上述含磷键制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利：3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423;

5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 和 5,625,050, 其中每一个在本文引用作为参考。

在本发明的一些实施方案中, 寡聚化合物可以具有一个或多个硫代磷酸酯和/或杂原子核苷间键, 具体而言为 $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$ (称作亚甲基(甲基亚氨)或者 MMI 主链)、 $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ 和 $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ (其中天然磷酸二酯核苷酸间键表示为 $-\text{O-P(=O)(OH)-O-CH}_2-$)。MMI 型核苷间键公开于上面引用的美国专利 5,489,677。酰胺核苷间键公开于上面引用的美国专利 5,602,240。

一些其中不包含磷原子的核苷酸主链具有通过短链烷基或环烷基核苷间键、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间键或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键形成的主链。这些包括那些具有吗啉代键(部分从核苷糖部分形成); 硅氧烷主链; 硫化物、亚砷和砷主链; formacetyl 和 thioformacetyl 主链; 亚甲基 formacetyl 和 thioformacetyl 主链; riboacetyl 主链; 含烯烃主链; 氨基磺酸酯主链; methyleneimino 和 methylenehydrazino 主链; 磺酸酯和氨磺酰主链; 酰胺主链; 以及其它具有混合的 N、O、S 和 CH_2 组成部分的主链。

教授上述寡核苷制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利: 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 和 5,677,439, 其中每一个在本文引用作为参考。

符合本发明的另一组寡聚化合物包括寡核苷酸模拟物。当用于寡核苷酸时, 术语模拟物旨在包括呋喃糖环或者呋喃糖环和核苷酸间键由新的基

团所替代的寡聚化合物,在本领域中仅呋喃糖环的替换物也称为糖替代物。保留杂环碱基部分或修饰的杂环碱基部分以便与适宜靶核酸杂交。

已经显示具有出色的杂交特性的寡核苷酸模拟物的一种此类寡聚化合物称为肽核酸(PNA)。Nielsen 等, *Science*, 1991, 254, 1497-1500。PNA 具有良好的杂交特性、高度生物学稳定性并且在静电学上是中性分子。在最近的一项研究中, PNA 化合物用于在转基因小鼠模型中校正异常剪接(Sazani 等, *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, 1228-1233)。在 PNA 寡聚化合物中, 寡核苷酸的糖主链由含酰胺的主链所替代, 具体而言是氨乙基甘氨酸主链。核碱基直接或间接($-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$ 如下所示)结合至主链酰胺部分的氮杂氮原子。教授 PNA 寡聚化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利: 5,539,082; 5,714,331 和 5,719,262, 每个专利在本文引用作为参考。PNA 化合物能够从 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)商业性获得。对碱基 PNA 主链的大量修饰在本领域中是已知的; 具有缀合至一个或两个末端的一个或多个氨基酸的 PNA 化合物是特别有用的。具体而言, 当缀合至 PNA 分子末端时, 1-8 个赖氨酸或精氨酸残基是有用的。

已经研究的另一类寡核苷酸模拟物是基于所连接的具有连接于吗啉代环的杂环碱基的吗啉代单位(吗啉代核酸)。已经报道了大量连接基团在吗啉代核酸中连接吗啉代单体单元。已经选择了一类连接基团以产生非离子寡聚化合物。非离子基于吗啉代寡聚化合物与细胞蛋白质具有非预期相互作用的可能性较小。基于吗啉代寡聚化合物是寡核苷酸的非离子模拟物, 它们与细胞蛋白质形成非预期相互作用的可能性较小(Braasch 等, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510)。已经在斑马鱼胚胎中研究了基于吗啉代寡聚化合物(见: *Genesis*, 第 30 卷, 第 3 期, 2001 和 Heasman, J., *Dev. Biol.*, 2002, 243, 209-214)。还已经报道了基于吗啉代寡聚化合物的其它研究(见: Nasevicius 等, *Nat. Genet.*, 2000, 26, 216-220 和 Lacerra 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 9591-9596)。基于吗啉代寡聚化合物公开于 1991 年 7 月 23 日发布的美国专利 5,034,506。已经制备了多种吗啉代类寡聚化合物, 它们具有多种不同连接单体亚单位的连接基团。连接基团可以从手性到非

手性变化,并且能够从带电荷到中性变化。美国专利 5,166,315 公开了包括 $-O-P(=O)(N(CH_3)_2)-O-$ 的键;美国专利 5,034,506 公开了非手性吗啉代间键;并且美国专利 5,185,444 公开了含磷手性吗啉代间键。

另一类寡核苷酸模拟物称为环己烯基核酸(CeNA)。通常存在于 DNA 或 RNA 分子的呋喃糖环被环己基环代替。按照经典亚磷酰胺化学已经制备了 CeNA DMT 保护的亚磷酰胺单体并用于寡聚化合物合成。已经制备并研究了充分修饰的 CeNA 寡聚化合物和寡核苷酸,它们具有用 CeNA 修饰的特定位置(见 Wang 等, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 8595-8602)。一般而言, CeNA 单体掺入 DNA 链可以增加其 DNA/RNA 杂合体的稳定性。CeNA 寡腺嘌呤核苷酸与 RNA 和 DNA 互补体形成的复合物具有与天然复合物相似的稳定性。将 CeNA 结构掺入天然核酸结构的研究显示通过 NMR 和圆二色性可容易地进行构象改变。此外, CeNA 掺入靶向 RNA 的序列对于血清是稳定的并且能够活化大肠杆菌 (*E. coli*) RNA 酶最终导致靶 RNA 链的断裂。

进一步的修饰包括二环糖部分如“锁核酸 (Locked Nucleic Acids)” (LNA), 其中核糖基糖环的 2'-羟基基团连接至糖环的 4'碳原子,从而形成 2'-C,4'-C-甲醛键以形成二环糖部分(综述于 Elayadi 等, *Curr. Opinion Inven. Drugs*, 2001, 2, 558-561; Braasch 等, *Chem. Biol.*, 2001, 8 1-7 和 Orum 等, *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243; 还见美国专利 6,268,490 和 6,670,461)。该键可以是亚甲基($-CH_2-$)基团,其连接 2'氧原子和 4'碳原子,对此使用术语 LNA 用于二环部分;在该位置为乙烯基的情况下,使用术语 ENATM(Singh 等, *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; ENATM: Morita 等, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 2003, 11, 2211-2226)。LNA 和其它二环糖类似物显示了与互补的 DNA 和 RNA 非常高的双链体热稳定性($T_m=+3-+10^{\circ}C$)、对 3'-核酸外切降解作用的稳定性和良好的溶解特性。LNA 可以从 ProLigo (Paris, 法国和 Boulder, CO, 美国)商业性获得。

已经研究的 LNA 异构体是 ∇ -L-LNA, 其已经显示对 3'-核酸外切酶具有较高的稳定性(Frieden 等, *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372)。 ∇ -L-LNA 被掺入了显示出有效反义活性的反义 gapmer 和嵌合体。

另一个已经制备并研究的相似二环糖部分具有通过单一亚甲基将 3'-羟基与糖环的 4' 碳原子连接的桥, 从而形成 3'-C,4'-C-甲醛键(见美国专利 6,043,060)。

通过 2D NMR 光谱法确定的 LNA 的构象显示, 在单链 LNA 和双链体中 LNA 核苷酸的锁定方向, 以产生更高数量 N 型构象的方式束缚磷酸酯主链(Petersen 等, *J. Mol. Recognit.*, 2000, 13, 44-53)。这些构象与改善的碱基堆积相关(Wengel 等, *nucleosides Nucleotides*, 1999, 18, 1365-1370)。

已经显示 LNA 能够形成极端稳定的 LNA:LNA 双链体(Koshkin 等, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 13252-13253)。LNA:LNA 杂交显示为最热稳定的核酸类型双链体系统, 并且 LNA 的模拟 RNA 特性是在双链体水平确立的。导入 3 个 LNA 单体(T 或 A)显著增加对 DNA 互补体的解链温度($T_m = +15/+11$)。通过形成极端稳定的 LNA:LNA 双链体强调了 LNA 介导杂交作用的通用性。单体 N 型构象限制和 LNA:RNA 双链体的二级结构反映出了 LNA 的 RNA 模拟性。

LNA 还与互补的 DNA、RNA 或具有高度热亲和力 LNA 形成双链体。圆二色性(CD)光谱显示包括充分修饰的 LNA 的双链体(特别是 LNA:RNA)在结构上类似于 A 型 RNA:RNA 双链体。LNA:DNA 双链体的核磁共振(NMR)检测证实了 LNA 单体的 3' 内构象。对双链 DNA 的认识还已经证明了通过 LNA 进行链侵入。对错配序列的研究表明 LNA 服从 Watson-Crick 碱基配对规则, 与相应未修饰的参照链相比通常具有改进的选择性。已经显示当 DNA:LNA 嵌合体靶向荧光素酶 mRNA 内多种区域(5' 非翻译区、起始密码子区域或编码区)时, 其能够有效抑制基因表达(Braasch 等, *Nucleic Acids Research*, 2002, 30, 5160-5167)。

已经描述了包含 LNA 的有效且无毒的反义寡核苷酸(Wahlestedt 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 5633-5638)。作者已经证明了 LNA

赋予反义试剂几种预期特性。LNA/DNA 共聚物在血清和细胞提取物中不容易降解。在与活大鼠脑中 G 蛋白偶联受体信号和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中报告基因检测不同的测定系统中, LNA/DNA 共聚物展示出有效的反义活性。还已经实现了 LNA 通过 Lipofectin 介导向活的人乳腺癌细胞的有效递送。涉及 LNA 的更加成功的体内研究已经显示了敲低大鼠 δ 阿片受体而无毒性 (Wahlestedt 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 5633-5638) 并且在另一个研究中显示了 RNA 聚合酶 II 大亚基翻译的阻断 (Fluiter 等, *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, 953-962)。

已经描述了 LNA 单体腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶的合成和制备, 以及其寡聚化作用和核酸识别特性 (Koshkin 等, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630)。LNA 及其制备还描述于 WO 98/39352 和 WO 99/14226。

已经制备了最初的 LNA 类似物, 硫代磷酸酯-LNA 和 2'-硫代-LNA (Kumar 等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222)。还已经描述了包含寡脱氧核糖核苷酸双链体的锁核苷类似物的制备, 它们用作核酸聚合酶的底物 (Wengel 等, WO 99/14226)。此外, 在本领域中已经描述了 2'-氨基-LNA (一个新的构象限制的高亲和力寡核苷酸类似物) 的合成 (Singh 等, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039)。另外, 已经制备了 2'-氨基-和 2'-甲氨基-LNA 并且先前已经报道了具有互补 RNA 和 DNA 链的双链体的热稳定性。

已经制备并研究了另一个根据本发明的寡核苷酸模拟物是苏糖核酸。该寡核苷酸模拟物是基于苏糖核苷而不是核糖核苷。对 (3',2')- γ -L-苏糖核酸 (TNA) 的最初兴趣直接针对这样一个问题, 即所存在的 DNA 聚合酶是否复制 TNA。发现某些 DNA 聚合酶能够复制有限长度的 TNA 模板 (报道于 C&EN/2003 年 1 月 13 日)。在另一个研究中, 已经确定了 TNA 能够反向平行地与互补 DNA、RNA 和 TNA 寡核苷酸进行 Watson-Crick 碱基配对 (Chaput 等, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 856-857)。

在一个研究中,制备了(3',2')- ∇ -L-苏糖核酸并将其与2'和3'酰胺类似物进行了比较(Wu等, *Organic Letters*, 2002, 4(8), 1279-1282)。已表明酰胺类似物以与RNA/DNA结合强度可比的强度结合至RNA和DNA。

已经制备了其它寡核苷酸模拟物以包括二环和三环核苷类似物(见Steffens等, *Helv. Chim. Acta*, 1997, 80, 2426-2439; Steffens等, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 3249-3255; Renneberg等, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 5993-6002 和 Renneberg等, *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30, 2751-2757)。这些修饰的核苷类似物已经使用亚磷酰胺方法进行了寡聚化并且所得到的包含三环核苷类似物的寡聚化合物已经显示出与DNA、RNA和其自身杂交时增加的热稳定性(T_m)。已经证明包含二环核苷类似物的寡聚化合物的热稳定性接近于DNA双链体的热稳定性。

另一类寡核苷酸模拟物称为磷酸单酯核酸,其主链中掺入了磷基团。已报道该类寡核苷酸模拟物(反义寡核苷酸、核酶、有意寡核苷酸和三联体形成寡核苷酸)在抑制基因表达领域具有有用的物理特性和生物特性和药理学特性,该类寡核苷酸模拟物可以作为探针用于核酸检测并且作为辅助物用于分子生物学。已经制备了依据本发明的其它寡核苷酸模拟物,其中环丁基环代替了天然存在的呋喃基环。

寡聚化合物还可以包含一个或多个替代的糖部分。适宜化合物可以在2'位置包含以下基团之一: OH; F; O-烷基、S-烷基或N-烷基; O-烯基、S-烯基或N-烯基; O-炔基、S-炔基或N-炔基或者O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或非取代的 C_1 - C_{10} 烷基或者 C_2 - C_{10} 烯基和炔基。特别适合的是 $O((CH_2)_nO)_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 和 $O(CH_2)_nON((CH_2)_nCH_3)$, 其中 n 和 m 为从1至大约10。其它寡核苷酸在2'位置包含以下基团之一: C_1 - C_{10} 低烷基、取代低烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环芳烷基、氨烷基氨基、多烷基氨基、取代甲硅烷基、RNA断裂基团、报告基团、插入剂、改善寡核苷酸药物代谢

动力学的基团或者具有相似特性的其它取代基。一种修饰包括 2'-甲氧乙氧基 ($2'\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, 也称为 2'-O-(2-甲氧乙基)或者 2'-MOE) (Martin 等, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504)即烷氧烷氧基。另一个修饰包括 2'-二甲氨基氧乙氧基和 2'-二甲氨基氧乙氧基乙氧基, 其中如在下文中的实施例中所述 2'-二甲氨基氧乙氧基即 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基 (也称为 2'-DMAOE), 并且如在下文中的实施例中所述 2'-二甲氨基氧乙氧基乙氧基(本领域中也称为 2'-O-二甲基-氨基-乙氧基-乙基或者 2'-DMAEOE)即 $2'\text{-O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ 。

其它修饰包括 2'-甲氧基 ($2'\text{-O-CH}_3$)、2'-氨基丙氧基 ($2'\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)、2'-丙烯基 ($2'\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$)、2'-O-丙烯基 ($2'\text{-O-CH}_2\text{-CH=CH}_2$)和 2'-氟代(2'-F)。2'-修饰可以在阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置。一个 2'-阿拉伯糖修饰是 2'-F。在寡核苷酸上其它位置也可以进行相似修饰, 具体而言是 3'末端核苷酸上或者 2'-5'连接的寡核苷酸中糖的 3'位置和 5'末端核苷酸的 5'位置。反义化合物还可以具有糖模拟物, 例如代替呋喃戊糖的环丁基部分。教授此类修饰糖结构制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747 和 5,700,920, 此处其中每一个都整体引用作为参考。

在本发明的一个方面, 寡聚化合物包括经合成修饰以诱导 3'-内糖构象的核苷。核苷中可以掺入杂环碱基、糖部分或两者的合成修饰以诱导预期的 3'-内糖构象。这些修饰的核苷用于模拟 RNA 样核苷从而使得能够在维持预期的 3'-内构象几何形状的同时增强寡聚化合物的特殊特性。对于作为 RNA 干扰必要条件(例如激发)的 RNA 型双链体(A 型螺旋, 主要是 3'-内)是明显优选的, 由 2'-脱氧-2'-F-核苷组成的双链体能有效地在秀丽隐杆线虫系统中激发 RNAi 反应, 这一事实部分支持了以上观点。通过使用更稳定的 3'-内核苷而增强的特性包括但不限于: 通过修饰蛋白质结合、蛋白质解离率、吸收和清除而调节药物代谢动力学特性; 调节核酸酶稳定性

以及化学稳定性；调节寡聚物的结合亲和力和特异性（对酶以及对互补序列的亲和力和特异性）；和增加 RNA 断裂效率。本发明提供了 RNAi 的寡聚触发物，其中寡聚触发物具有以此种方式修饰而赋予其 C3'-内型构象的一个或多个核苷。

核苷构象受到各种因素的影响，包括在呋喃戊糖的 2'、3'或 4'-位置的取代。负电取代通常倾向于中轴位置，而空间要求取代通常倾向于赤道位置 (Principles of Nucleic Acid Structure, Wolfgang Sanger, 1984, Springer-Verlag)。如下面图 2 中举例说明，在维持 2'-OH 作为识别元件的同时能够实现 2'位置的修饰以赋予 3'-内构象(Gallo 等, Tetrahedron, 2001, 57, 5707-5713; Harry-O'kuru 等, J. Org. Chem., 1997, 62(6), 1754-1759 和 Tang 等, J. Org. Chem., 1999, 64, 747-754)。

备选地，如以 2'脱氧-2'F-核苷举例说明，优先选择通过删除 2'-OH 实现 3'-内构象(Kawasaki 等, J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841)，其通过在中轴位置放置带负电的氟原子而实现 3'-内构象。核糖环的其它修饰例如在 4'-位置取代以产生 4'-F 修饰的核苷(Guillerm 等, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1995, 5, 1455-1460; 和 Owen 等, J. Org. Chem., 1976, 41, 3010-3017)或者例如产生 methanocarba 核苷类似物的修饰(Jacobson 等, J. Med. Chem. Lett., 2000, 43, 2196-2203;和 Lee 等, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2001, 11, 1333-1337)也诱导优先产生 3'-内构象。沿着相似的线索，RNAi 反应的寡聚触发物可以由一个或多个以此种方式修饰的核苷组成从而使该构象锁定成 C3'-内型构象，即锁核酸(LNA, Singh 等, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456)和乙烯基桥连核酸 (ethylene bridged Nucleic Acids) (ENA, Morita 等, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, 12, 73-76.)。

通过各种方法例如分子动力学计算、核磁共振波谱学和 CD 测量法能够评价修饰的核苷及其寡聚物的一种构象。因此，在寡聚情况下的 A 型双链体几何形状被选择用于本发明修饰的寡核苷酸中。符合本发明的大量修饰核苷的合成在本领域中是已知的(见例如 Chemistry of Nucleosides and

Nucleotides 1-3 卷, Leroy B. Townsend 编著, 1988, Plenum 出版社, 和下面实施例部分)。

用于描述同型双链体核酸构象几何学的术语对于 RNA 是“A 型”并且对于 DNA 为“B 型”。从核酸纤维的 X 射线衍射分析确定了 RNA 和 DNA 双链体各自的构象几何学(Arnott 和 Hukins, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1970, 47, 1504)。一般而言, RNA:RNA 双链体比 DNA:DNA 双链体更加稳定并具有更高的解链温度(T_m) (Sanger 等, *Principles of Nucleic Acid Structure*, 1984, Springer-Verlag; New York, NY.; Lesnik 等, *Biochemistry*, 1995, 34, 10807-10815; Conte 等, *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25, 2627-2634)。增加的 RNA 稳定性归功于几种结构特点, 最值得注意的是源自 A 型几何形状的改善了的碱基堆积相互作用(Searle 等, *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 2051-2056)。RNA 中 2'羟基的存在使糖偏移向 C3'内折叠, 即也命名为 Northern 折叠, 这使得双链体易于形成 A 型几何形状。另外, RNA 的 2'羟基能够形成水介导的氢键网状结构, 该结构有助于稳定 RNA 双链体(Egli 等, *Biochemistry*, 1996, 35, 8489-8494)。另一方面, 脱氧核酸更偏向于 C2'内糖折叠, 即也称作 Southern 折叠, 该结构被认为产生较小稳定性的 B 型几何形状(Sanger, W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, NY)。如文中所使用, B 型几何形状包括 C2'-内折叠和 O4'-内折叠。这与 Berger 等, *Nucleic Acids Research*, 1998, 26, 2473-2480 相一致, Berger 等指出考虑到呋喃糖构象产生 B 型双链体, 那么还应该考虑到呋喃糖构象也有助于产生 O4'内折叠。

然而, DNA:RNA 杂合体双链体通常没有纯 RNA:RNA 双链体稳定, 并且依赖于其序列, DNA:RNA 杂合体双链体可以比 DNA:DNA 双链体更稳定或者没有 DNA:DNA 双链体稳定(Searle 等, *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 2051-2056)。杂合体双链体的结构是 A 和 B 型几何形状之间的中间体, 这可以导致弱的堆积相互作用(Lane 等, *Eur. J. Biochem.*, 1993, 215, 297-306; Fedoroff 等, *J. Mol. Biol.*, 1993, 233, 509-523; Gonzalez 等, *Biochemistry*, 1995, 34, 4969-4982; Horton 等, *J. Mol. Biol.*, 1996, 264,

521-533)。靶 RNA 和合成序列之间形成的双链体的稳定性是诸如但不限于反义和 RNA 干扰治疗的关键，因为这些治疗机制需要合成寡聚体链结合至靶 RNA 链。关于反义，mRNA 的有效抑制需要反义 DNA 与 mRNA 具有非常高的结合亲和力。否则合成寡聚体链与靶 mRNA 链之间预期的相互作用将很少发生，这使得效率降低。

一种常规使用的修饰糖折叠的方法是用影响糖几何形状的取代基代替 2'-位置的糖。对环构象的影响依赖于 2'位置取代基的性质。已经研究了大量不同的取代基以确定其糖折叠作用。例如，已经对 2'卤代进行的研究显示 2'氟代衍生物呈现最大量(65%) C3'内型，并且 2'碘代呈现最少量的(7%)C3'内型。腺苷(2'-OH)对脱氧腺苷(2'-H)的总数分别为 36%和 19%。而且，腺苷二聚体(2'-脱氧-2'-氟腺苷-2'-脱氧-2'-氟腺苷)的 2'-氟代基的作用进一步与堆积构象的稳定化作用相关。

如所期望，通过用 2'-F 基替换 2'-OH 基能够增强相对双链体稳定性，从而增加 C3'-内的数量。可以假定 2'-F 键的高度极性特性和对于 C3'内折叠的极端偏性可以稳定 A 型双链体中的堆积构象。来自 UV 减色性、圆二色性和 ^1H NMR 的数据还表明堆积程度随着卤素取代基负电性的降低而降低。而且，与 B 型双链体相比，糖部分 2'位置处的立体体积更适应于 A 型双链体。因此，二核苷一磷酸盐 3'末端上的 2'取代基认为对堆积构象产生许多效应：空间排斥、呋喃糖折叠偏性、静电排斥、疏水吸引和氢键合能力。这些取代基效应被认为是由取代基的分子大小、负电性和疏水性决定的。互补链的解链温度也随着 2'取代的二磷酸腺苷而增加。构象的 3'内偏性或取代基的存在是否负责结合的增加还不清楚。然而，使用 3'内构象能够实现相邻碱基更大的重叠（堆积）。

增加靶向 RNA 靶链的修饰寡核苷酸中 C3'内糖的百分数将预先组织该链使其结合至 RNA。在已经报道并在文献中研究的几种糖修饰中，负电取代基如 2'-氟或 2'-烷氧基的掺入将糖构象转化为 3'内（northern）折叠构象。这将掺入此类修饰的寡核苷酸预先组织成具有 A 型构象几何学。该 A 型构象导致寡核苷酸对靶 RNA 链的结合亲和力增加。

符合本发明并使所得双链体具有 A 型构象特征 (3'-内) 的典型 2' 取代基包括 2'-O-烷基、2'-O-取代烷基和 2'-氟取代基。适宜的取代基为各种烷基和芳香基醚和硫醚、胺以及单烷基和二烷基取代的胺。更加期望的是, 在一个或多个单体亚基 (核苷是适宜的) 多重位点和核苷内键上对一种和多种本发明寡聚化合物进行多重修饰, 以增强特性例如 (但不限于) 在所选应用中的活性。

天然的和修饰的核碱基

寡聚化合物还可以包括核碱基 (在本领域中通常称为杂环碱基或简称为“碱基”) 修饰或取代。如文中所使用, “未修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G), 以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其它合成的和天然的核碱基例如 5-甲基胞嘧啶(5-me-C); 5-羟甲基胞嘧啶; 黄嘌呤; 次黄嘌呤; 2-氨基腺嘌呤; 腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基衍生物和其它烷基衍生物; 腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基衍生物其它烷基衍生物; 2-硫尿嘧啶; 2-硫胸腺嘧啶和 2-硫胞嘧啶; 5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶; 5-丙炔($-C\equiv C-CH_3$)尿嘧啶和 5-丙炔胞嘧啶以及嘧啶碱基的其它炔基衍生物; 6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶; 5-尿嘧啶(假尿嘧啶); 4-硫尿嘧啶; 8-卤代、8-氨基、8-硫羧、8-硫代烷基、8-羟基以及其它 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤; 5-卤代特别是 5-溴、5-三氟甲基以及其它 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶; 7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮鸟嘌呤和 8-氮腺嘌呤; 7-脱氮鸟嘌呤和 7-脱氮腺嘌呤和 3-脱氮鸟嘌呤和 3-脱氮腺嘌呤。进一步修饰的核碱基包括三环嘧啶例如吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并(5,4-b)(1,4)苯并噻嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并(5,4-b)(1,4)苯并噻嗪-2(3H)-酮)、G-夹 (G-clamp) 例如取代的吩噻嗪胞苷 (例如 9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并(5,4-b)(1,4)苯并噻嗪-2(3H)-酮)、咔唑胞苷(2H-嘧啶并(4,5-b)吲哚-2-酮)、吡啶吲哚胞苷 (H-吡啶并(3',2':4,5)吡咯并(2,3-d)嘧啶-2-酮)。修饰的核碱基还可以包括那些其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环所代替的核碱基, 例如 7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟苷、2-氨基吡啶和

2-羟基吡啶。其它核碱基包括公开于美国专利号 3,687,808 中的那些核碱基、公开于聚合物科学与技术的简明百科全书 (The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 第 858-859 页, Kroschwitz, J.I. 编著, John Wiley & Sons, 1990) 中的那些核碱基、由 Englisch 等 (Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613) 所公开的那些核碱基, 以及由 Sanghvi, Y.S. (Antisense Research and Applications, 第 15 章, 第 289-302 页, Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 编著, CRC 出版社, 1993) 所公开的那些核碱基。这些核碱基中的某些核碱基对于增加本发明化合物的结合亲和力是特别有用的。这些核碱基包括 5-取代的嘧啶、6-氮嘧啶以及 N-2、N-6 和 O-6 取代的嘌呤, 包括 2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔尿嘧啶和 5-丙炔胞嘧啶。已经显示 5-甲基胞嘧啶取代物可使核酸双链体稳定性增加 0.6-1.2°C 并且是目前适宜的碱基取代物, 甚至在与 2'-O-甲氧乙基糖修饰相组合时更加适宜。

教授某些上面所提到修饰核碱基和其它修饰核碱基制备的代表性美国专利包括但不限于上面所提到的美国专利 3,687,808, 以及美国专利: 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096 和 5,681,941, 其中每一个在文中引用作为参考, 并且美国专利 5,750,692 也在文中引用作为参考。

本发明寡聚化合物还可以包括代替一个或多个杂环碱基部分的多环杂环化合物。以前已经报道了大量三环杂环化合物。这些化合物通常用于反义应用以增加修饰链对靶链结合特性。大多数已研究的修饰靶向鸟苷, 因此它们被称为 G-夹或胞苷类似物。与第二链上鸟苷形成 3 氢键的代表性的胞嘧啶类似物包括 1,3-二氮吩噻嗪-2-酮 ($R_{10}=O$, $R_{11}-R_{14}=H$) (Kurchavov 等, nucleosides and Nucleotides, 1997, 16, 1837-1846)、1,3-二氮吩噻嗪-2-酮 ($R_{10}=S$, $R_{11}-R_{14}=H$) (Lin 等, J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 3873-3874) 和 6,7,8,9-四氟-1,3-二氮吩噻嗪-2-酮 ($R_{10}=O$, $R_{11}-R_{14}=F$) (Wang 等,

Tetrahedron Lett., 1998, 39, 8385-8388)。这些碱基修饰在掺入寡核苷酸后显示出能够与互补鸟嘌呤杂交，并且后者还显示出能够与腺嘌呤杂交并通过延伸堆积相互作用增强螺旋的热稳定性(还参见2002年5月24日提交的标题为“修饰的肽核酸”的序列号10/155,920的美国专利申请和2002年5月24日提交的标题为“抵抗核酸酶的嵌合体寡核苷酸”的序列号10/013,295的美国专利申请，两者在此处整体引用作为参考)。

当胞嘧啶类似物/取代物具有连接于刚性1,3-二氮吩噻嗪-2-酮支架($R_{10}=O$, $R_{11}=-O-(CH_2)_2-NH_2$, $R_{12-14}=H$)氨乙氧基部分时，观察到了进一步稳定螺旋的特性(Lin等, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 8531-8532)。结合研究证明单一掺入能够增强模型寡核苷酸与其互补靶DNA或RNA的结合亲和力，相对5-甲基胞嘧啶($dC5^{me}$) ΔT_m 高达18°C，然而，对于单一修饰这是已知最高的亲和力增强作用。另一方面，螺旋稳定性的增加不影响寡核苷酸的特异性。

能够用于本发明的其它三环杂环化合物及其使用方法公开于2000年5月22日发布的美国专利序号6,028,183，和1999年12月28日发布的美国专利序列号6,007,992，它们的内容在文中整体引用作为参考。

吩噻嗪衍生物的增强结合亲和力及其未受影响的序列特异性使得它们成为用于研发基于反义的更有效药物的有价值核碱基类似物。事实上，来自体外实验的有价值的证据已经证明包含吩噻嗪取代的七核苷酸能够活化RNA酶H、增强细胞摄入并呈现增加的反义活性(Lin等, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 8531-8532)。在形成G-夹情况下活性增强作用甚至更加显著，因为单一取代物显示能显著提高20mer 2'-脱氧硫代磷酸酯寡核苷酸的体外效能(Flanagan等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 3513-3518)。然而，为了优化寡核苷酸设计和更好地理解这些杂环修饰对生物学活性的影响，评价它们对寡聚物核酸酶稳定性的影响是重要的。

可用作杂环碱基的其它修饰多环杂环化合物公开于但不限于上面提出的美国专利3,687,808，以及美国专利：4,845,205；5,130,302；5,134,066；5,175,273；5,367,066；5,432,272；5,434,257；5,457,187；5,459,255；5,484,908；

5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,646,269; 5,750,692; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096 和 5,681,941,以及 2001 年 11 月 28 日提交的美国专利申请序列号 09/996,292, 每项专利在文中引用作为参考。

共轭物

本发明反义化合物的另一种修饰涉及将能够增强寡核苷酸活性、细胞分布或细胞摄入的一种或多种部分或共轭物化学连接至寡聚化合物。这些部分或共轭物可以包括共价结合至功能基团的共轭基团,如伯羟基或仲羟基。本发明的共轭基团包括插入剂、报告分子、聚胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、增强寡聚物药效学特性的基团,以及增强寡聚物药物代谢动力学特性的基团。典型的共轭基团包括胆固醇、脂类、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。在本发明的上下文中,增强药效学特性的基团包括改善摄入、增强降解抗性和/或加强与靶核酸进行序列特异性杂交的基团。在本发明的上下文中,增强药物代谢动力学特性的基团包括改善本发明化合物摄入、分布、代谢或分泌的基团。代表性共轭基团公开于 1992 年 10 月 23 日提交的国际专利申请 PCT/US92/09196 和美国专利 6,287,860,其全部公开内容在文中引用作为参考。共轭物部分包括但不限于脂类部分诸如胆固醇部分、胆酸、硫醚例如己基-S-三苯甲基硫醇、硫代胆固醇、脂肪族链例如癸二酸或十一烷基残基、磷脂例如双十六烷基-rac-丙三醇或三乙基铵 1,2-双-O-十六烷基-rac-甘油-3-H-磷酸酯、聚胺或聚乙二醇链,或金刚烷乙酸、软酯酰部分,或者十八胺或己基氨基-羧基-羟胆固醇部分。本发明反义化合物还可以与活性药物缀合,例如阿司匹林、新双豆素、苯基丁氮酮、布洛芬、塞丙芬、芬布芬、酮洛芬、(S)-(+)-吡喃洛芬、卡洛芬、丹磺酰肌氨酸、2,3,5-三碘苯甲酸、氟芬那酸、甲酰四氢叶酸、苯噻嗪、氯噻嗪、diazepine、吲哚美辛、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺药物、抗糖尿病剂、抗菌剂或抗生素。寡核苷酸药物共轭物及其制备描述于美国专利申请 09/334,130(1999 年 6 月 15

日提交), 该申请在文中整体引用作为参考。

教授此类寡核苷酸共轭物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 和 5,688,941, 每项专利在文中引用作为参考。

寡聚化合物还能够进行修饰使其具有一个或多个稳定基团, 稳定基团通常附加于寡聚链的一个或两个末端以增强诸如核酸酶稳定性的特性。稳定基团包括帽子结构。“帽子结构或末端帽子部分”意思是指已经掺入寡核苷酸的任一个末端的化学修饰物(参见例如 Wincott 等, WO 97/26270, 在本文引用作为参考)。这些末端修饰物保护具有末端核酸分子的寡聚化合物不被核酸外切酶降解, 并且可能有助于细胞内递送和/或定位。帽子可以存在于 5'末端(5'帽子)或者 3'末端(3'-帽子), 或者可以存在于单链的两个末端或双链化合物两条链的一个或多个末端。该帽子架构不能与存在于天然 mRNA 分子 5'端的倒转甲基鸟苷“5'帽子”相混淆。在非限定性实施例中, 5'帽子包括倒转无碱性残基(部分)、4',5'-亚甲基核苷酸; 1-(β -D-赤型呋喃糖基)核苷酸、4'-硫代核苷酸、碳环核苷酸; 1,5-失水己糖醇核苷酸; L-核苷酸; α -核苷酸; 修饰碱基核苷酸; 二硫代磷酸酯键; 苏型呋喃戊糖基核苷酸; 无环 3',4'-断裂核苷酸; 无环 3,4-二羟丁基核苷酸; 无环 3,5-二羟基戊基核苷酸、3'-3'-倒转核苷酸部分; 3'-3'-倒转无碱性部分; 3'-2'-倒转核苷酸部分; 3'-2'-倒转无碱性部分; 1,4-丁二醇磷酸酯; 3'-亚磷酰胺; 己基磷酸酯; 氨基己基磷酸酯; 3'-磷酸酯; 3'-硫代磷酸酯; 二硫代磷酸酯;

桥连或非桥连甲基磷酸酯部分(更多详细内容参见 Wincott 等, 国际 PCT 公开号 WO 97/26270, 在本文引用作为参考)。对于 siRNA 构建体, 5'端 (5'帽子)通常是 (但不限于) 5'-羟基或 5'-磷酸。

特别适宜的 3'帽子结构包括例如 4',5'-亚甲基核苷酸; 1-(β -D-赤型呋喃糖基)核苷酸; 4'-硫代核苷酸、碳环核苷酸; 5'-氨基-烷基磷酸酯; 1,3-二氨基-2-丙基磷酸酯、3-氨基丙基磷酸酯; 6-氨基己基磷酸酯; 1,2-氨基十二烷基磷酸酯; 羟基丙基磷酸酯; 1,5-失水己糖醇核苷酸; L-核苷酸; α -核苷酸; 修饰碱基核苷酸; 二硫代磷酸酯; 苏型呋喃戊糖基核苷酸; 无环 3',4'-断裂核苷酸; 3,4-二羟基丁基核苷酸; 3,5-二羟基戊基核苷酸、5'-5'-倒转核苷酸部分; 5'-5'-倒转无碱性部分; 5'-亚磷酰胺; 5'-硫代磷酸酯; 1,4-丁二醇磷酸酯; 5'-氨基; 桥连和/或非桥连 5'-亚磷酰胺、硫代磷酸酯和/或二硫代磷酸酯、桥连非桥连甲基磷酸酯和 5'-巯基部分(更详细内容参见 Beaucage 和 Tyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925; 在本文引用作为参考)。

其它能够用于在寡聚化合物一个或两个末端加帽以赋予核酸酶稳定性的 3'和 5'稳定基团包括那些公开于 2003 年 1 月 16 日公布的 WO 03/004602 的那些稳定基团。

嵌合化合物

不必在给定反义化合物的全部位置一律进行修饰, 并且事实上一个以上的上述修饰可以掺入单一化合物中或者甚至掺入反义化合物内的单一核苷中。

本发明还包括为嵌合化合物的反义化合物。在本发明的上下文中, “嵌合”反义化合物或“嵌合体”是单链或双链反义化合物, 例如寡核苷酸, 它们包含两个或多个化学上不同的区域, 每个区域由至少一个单体单元(即以寡核苷酸化合物为例单体单元是核苷酸)组成。嵌合反义寡核苷酸是反义化合物的一种形式。这些寡核苷酸一般包含至少一个修饰过的区域, 以便赋予寡核苷酸增加的抗核酸酶降解抗性、增加的细胞摄入、电荷变化、增加的稳定性和/或增加的对靶核酸的结合亲和力。寡核苷酸另外区域可以

作为 RNA 酶或其它酶的底物。作为例子, RNA 酶 H 是断裂 RNA:DNA 双链体的 RNA 链的细胞内切核酸酶。因此, RNA 酶 H 的活化导致 RNA 靶标的断裂,从而极大地增强寡核苷酸介导基因表达抑制的效率。RNA:RNA 杂合体的断裂可以通过核糖核酸内切酶(例如断裂细胞和病毒 RNA 的 RNA 酶 III 或 RNA 酶 L)的作用以相似的方式实现。可以通过本领域已知的电泳和相关核酸杂交技术(如果必要)常规检测 RNA 靶标的断裂产物。

本发明嵌合反义化合物可以形成如上所述的两种或多种寡核苷酸、修饰的寡核苷酸、寡核苷和/或寡核苷酸模拟物的复合结构。在本领域中此类化合物还称为杂化物或 gapmer。教授此类杂化物结构制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利: 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356 和 5,700,922, 每个专利在文中整体引用作为参考。

盐、前体药物和生物等效物

本发明这些反义化合物包括任何可药用盐、酯或此类酯的盐,或者任何其它化合物,当将其施用于包括人在内的动物时,化合物能够提供(直接或间接)生物活性代谢物或其残余物。因此,例如,公开还可以延伸至本发明化合物的前体药物和可药用盐、此类前体药物的可药用盐和其它生物等效物。

术语“前体药物”指以无活性或低活性形式制备治疗剂,其在体内或其细胞内通过内源性酶或其它化学物和/或条件下可以转化为活性形式(即药物)。具体而言,按照公开于 Gosselin 等的 WO 93/24510 (1993 年 12 月 9 日公布)和 Imbach 等的 WO 94/26764 中的方法,可以将本发明寡核苷酸前体药物形式制备成 SATE ((S-乙酰基-2-硫代乙基)磷酸盐)衍生物。

术语“可药用盐”是指本发明化合物的生理学上或药学上可以接受的盐:即保留母体化合物的期望生物学活性且不产生不期望的毒理学效应。

可药用碱加成盐由金属或胺形成,例如碱和碱土金属或有机胺。用作

阳离子的金属的例子为钠、钾、镁、钙等等。适宜的胺的例子是N,N'-二苄乙烯二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、二环己基胺、乙二胺、N-甲基葡萄糖胺和普鲁卡因(见, 例如 Berge 等, "Pharmaceutical Salts," *J. of Pharma Sci.*, 1977, 66, 1-19)。通过将游离酸形式与足量预期碱相接触以产生盐而常规方式制备了所述酸性化合物的碱加成盐。通过将盐形式与酸相接触并以常规方式分离游离酸可以再生游离酸形式。游离酸形式与其各自的盐形式在某些物理特性(如在极性溶剂中的溶解性)上稍微不同, 但是为了本发明的目的这些盐在其它方面与其各自游离酸是等效的。如文中所使用, "药物加成盐" 包括本发明组合物成份之一的酸形式的可药用盐。它们包括胺的有机或无机酸盐。酸性盐为盐酸盐、醋酸盐、水杨酸盐、硝酸盐和磷酸盐。其它适宜的可药用盐对于本领域那些技术人员是已知的并且包括多种无机和有机酸的碱性盐, 例如具有无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸或磷酸; 具有有机的羧酸、磺酸、硫代酸或膦酸或者N-取代氨基磺酸, 例如醋酸、丙酸、羟基乙酸、琥珀酸、马来酸、羟基马来酸、甲基马来酸、延胡索酸、苹果酸、酒石酸、乳酸、草酸、葡萄糖酸、葡萄糖二酸、葡萄糖醛酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、苦杏仁酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、2-苯氧基苯甲酸、2-乙酰基苯甲酸、双羟萘酸、烟酸或异烟酸; 并且具有氨基酸如自然界中参与蛋白质合成的20种 α -氨基酸(例如谷氨酸或天冬氨酸), 还有苯乙酸、甲磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、乙烷-1,2-二磺酸、苯磺酸、4-甲基苯磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、2-或3-磷酸甘油酸、葡萄糖-6-磷酸、N-环己氨基磺酸(对于环磺酸盐的形成), 或者具有其它酸有机化合物例如抗坏血酸。化合物的可药用盐还可以用可药用阳离子进行制备。适宜的可药用阳离子对于本领域的技术人员是已知的并且包括碱性、碱土金属、铵和季铵阳离子。也可使用碳酸盐或氢碳酸盐。

对于寡核苷酸, 可药用盐的例子包括但不限于(a)由阳离子如钠、钾、铵、镁、钙、多胺如精胺和亚精胺等所形成的盐; (b)由无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等等形成的酸加成盐; (c)由有机酸例如醋酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、延胡索酸、葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸、

抗坏血酸、苯甲酸、鞣酸、棕榈酸、褐藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸等等形成的盐；和(d)由元素阴离子例如氯、溴和碘形成的盐。反义寡核苷酸的钠盐是有用的并且公认可治疗性施用于人。在另一个实施方案中，还提供了 dsRNA 化合物的钠盐。

G. 制剂

本发明化合物还可以与其它分子、分子结构或化合物混合物（例如脂质体、受体靶向分子、口腔、直肠、局部或其它制剂）相混合、封装入胶囊、缀合或联合，以辅助摄入、分布和/或吸收。教授此类摄入、分布和/或吸收辅助制剂制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利：5,108,921；5,354,844；5,416,016；5,459,127；5,521,291；5,543,158；5,547,932；5,583,020；5,591,721；4,426,330；4,534,899；5,013,556；5,108,921；5,213,804；5,227,170；5,264,221；5,356,633；5,395,619；5,416,016；5,417,978；5,462,854；5,469,854；5,512,295；5,527,528；5,534,259；5,543,152；5,556,948；5,580,575 和 5,595,756，每一专利在文中引用作为参考。

本发明还包括包含本发明反义化合物的药物组合物和制剂。取决于期望局部治疗还是全身治疗以及所治疗的区域，本发明药物组合物可以以多种方式施用。施用可以是局部的（包括眼部以及包括阴道和直肠递送的粘膜）、肺部，例如通过粉剂或烟雾剂的吸入或吹入，包括通过喷雾器；气管内、鼻内、表皮和经皮）、口腔或胃肠外施用。胃肠外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注；或者颅内例如鞘膜内或心室内施用。具有至少一个 2'-O-甲氧乙基修饰的寡核苷酸被认为对于口服施用特别有用。已经发现穿透促进剂可增强口服施用寡核苷酸的生物利用率。穿透促进剂包括表面活性剂、胆盐、脂肪酸、螯合剂或非螯合表面活性剂。癸酸(C10)和/或月桂酸(C12)及其盐是其中有效增强寡核苷酸生物利用率的脂肪酸；熊脱氧胆酸(UDCA)和鹅脱氧胆酸(CDCA)是其中有效增强寡核苷酸生物利用率的胆盐。缓释（例如脉冲或脉动式释放）制剂和持续释放制剂对于增强生物利用率也是有用的。可以加入生物粘合材料以将药物载体

颗粒粘附于粘膜以增强摄入。

用于局部施用的药物组合物和制剂可以包括透皮贴剂、软膏剂、洗剂、乳剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规药物载体、水溶液、粉末或油性基质、增稠剂等等可以是必需的或期望的。涂敷的避孕套、手套等等也是有用的。

按照制药工业中熟知的常规技术可以制备本发明的药物制剂，其可以方便地为单位剂量形式。此类技术包括使活性成分与药物载体或赋形剂相联系的步骤。一般而言，通过均匀且紧密地使活性成分与液体载体或精细固体载体或两者组合并且然后（如果需要）使产物成形来制备制剂。

本发明组合物可以按配方制成多种可能剂型的任意一种，例如但不限于片剂、胶囊剂、凝胶胶囊剂、液体糖浆剂、软凝胶剂、栓剂和灌肠剂。本发明组合物还可以按配方制成水溶液、非水溶液或混合介质中的悬浮液。水溶液悬浮液还进一步包括增加悬浮液粘度的物质，包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液还可以包含稳定剂。

本发明药物组合物包括但不限于溶液、乳剂、泡沫和含脂质体制剂。本发明药物组合物和制剂可以包含一种或多种穿透促进剂、载体、赋形剂或者其它活性或非活性成分。

乳剂一般是一种液体以微滴形式（直径通常超过 $0.1\ \mu\text{m}$ ）分散于另一种液体的异质系统。除了分散相之外，乳剂可以包含另外的成分和活性药物，它们可作为存在于水相、油相或者其自身作为单独相的溶液。作为本发明的实施方案还包括微乳剂。乳剂及其使用在本领域中是众所周知的并且进一步描述于美国专利 6,287,860，该专利在文中整体引用作为参考。

本发明制剂包括脂质体制剂。如本发明中所使用，术语“脂质体”意思是指由以一层球状双分子层或多层双分子层排列的两亲性脂类组成的小囊泡。脂质体可以是单层的或多层的囊泡，其具有由亲脂性物质形成的膜和包含所递送组合物的水性内部。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体，其可与带负电荷的 DNA 分子相互作用形成稳定的复合物。pH 敏感或带负电的脂质体可以诱陷 DNA 而不是与其形成复合物。阳离子和非阳离子脂质

体都已经用于将 DNA 递送至细胞。

脂质体还包括“空间稳定”脂质体，如文中所使用，该术语是指包含一种或多种特化脂类的脂质体，当特化脂类掺入脂质体时导致循环寿命相对于缺乏此类特化脂类的脂质体有所增强。空间稳定脂质体的例子是那些在脂质体中的一部分的形成囊泡脂类部分包含一个或多个糖脂或者由一个或多个亲水多聚物（如聚乙二醇(PEG)部分）衍生的脂质体。脂质体及其用途进一步描述于美国专利号 6,287,860，该专利在本文整体引用参考。

本发明的药物制剂和组合物还包括表面活性剂。表面活性剂在药物产品、制剂和乳剂中的用途在本领域是众所周知的。表面活性剂及其用途进一步描述于美国专利号 6,287,860，该专利在本文整体引用参考。

在一个实施方案中，本发明采用各种穿透促进剂以影响核酸（特别是寡核苷酸）的有效递送。穿透促进剂除了辅助非亲脂性药物扩散穿过细胞膜以外还增强亲脂性药物的渗透。穿透促进剂可以归类属于五大类之一，该五大类即表面活性剂、脂肪酸、胆盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂。穿透促进剂及其用途进一步描述于美国专利号 6,287,860，该专利在本文整体引用参考。作为穿透促进剂的多种脂肪酸及其衍生物包括例如油酸、月桂酸(C12)、癸酸(C10)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸盐、三癸酸盐、recinleate、油酸单甘油酯（另一个名称为 1-单油酰-rac-甘油）、二月桂酸甘油酯、辛酸、花生四烯酸（arachidonic acid）、甘油 1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、单酰甘油和二酰甘油及其生理可接受盐（即油酸盐、月桂酸盐、癸酸盐、肉豆蔻酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、亚油酸盐等）(Lee 等， *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 8:2, 91-192; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7:1, 1-33; El-Hariri 等， *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654)。一些脂肪酸的实例为以 0.5-5% 的浓度单独使用或组合使用的癸酸钠 (C10) 和月桂酸钠 (C12)。

代表性的胆盐包括例如胆酸（或其可药用钠盐胆酸钠）、脱氢胆酸（脱氢胆酸钠）、脱氧胆酸（脱氧胆酸钠）、葡萄糖胆酸（glucolic acid）（葡萄糖

胆酸钠)、甘胆酸(甘胆酸钠)、甘脱氧胆酸(甘脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺酸-24,25-二氢羧链孢酸钠(STDHF)、甘氨酸二氢羧链孢酸钠和聚氧化乙烯-9-月桂醚(POE) (Lee 等, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 第 92 页; Swinyard, 第 39 章, 在: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版, Gennaro 编, Mack 出版公司, Easton, PA, 1990, 782-783 页; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto 等, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita 等, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583)。UDCA 和 CDCA 已经有效地用作寡核苷酸的穿透促进剂, 并且组合使用时甚至更加有效。

包含一种或多种胆盐和一种或多种脂肪酸的复合物制剂与月桂酸盐和葵酸盐组合时甚至更加有效, 特别是 CDCA (有或没有 UDCA) (美国申请序列号 09/108,673, Teng 和 Hardee, 1998 年 7 月 1 日提交)。

本领域技术人员会认识到制剂通常是根据其旨在用途即施用途径设计。

用于局部施用的制剂包括那些其中本发明寡核苷酸是与局部递送剂如脂类、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、甾类化合物、螯合剂和表面活性剂相混合的制剂。脂类和脂质体包括中性的(例如二油酰磷脂酰 DOPE 乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 DMPC, 二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性的(例如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 DMPG)和阳离子性的(例如二油酰四甲铵丙基 DOTAP 和二油酰磷脂酰乙醇胺 DOTMA)。

对于局部或其它施用, 本发明寡核苷酸可以装入脂质体胶囊或者可以与其形成复合物, 具体而言是与阳离子脂质体形成复合物。备选地, 寡核苷酸还可以与脂类特别是阳离子脂类形成复合物。脂肪酸和酯、其可药用盐及其用途进一步描述于美国专利号 6,287,860, 该专利在文中整体引用作为参考。局部制剂详细描述于 1999 年 5 月 20 日提交的美国专利申请 09/315,298, 该专利在文中整体引用作为参考。

口服施用的组合物和制剂包括粉剂或颗粒剂、微颗粒、纳米颗粒、水或非水溶性介质的悬浮剂或溶液、胶囊、凝胶胶囊、冲剂、片剂或微片剂。也可使用增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。口服制剂是那些其中本发明寡核苷酸与一种或多种穿透促进剂表面活性剂和螯合剂联合施用的口服制剂。表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐、胆酸和/或其盐。胆酸/盐和脂肪酸及其用途进一步描述于美国专利号 6,287,860, 该专利在文中整体引用作为参考。穿透促进剂组合也是适宜的, 例如脂肪酸/盐与胆酸/盐的组合。一种组合是月桂酸钠盐、癸酸和 UDCA。另外的穿透促进剂包括聚氧化乙烯-9-月桂醚、聚氧化乙烯-20-十六烷醚。本发明的寡核苷酸可以以颗粒形式口服递送, 颗粒形式包括喷雾干颗粒或者复合形成微小颗粒或纳米颗粒。寡核苷酸复合剂及其用途进一步描述于美国专利号 6,287,860, 该专利在文中整体引用作为参考。寡核苷酸的口服制剂及其制备详细描述于美国专利申请 09/108,673 (1998 年 7 月 1 日提交)、09/315,298 (1999 年 5 月 20 日提交)和 10/071,822 (2002 年 2 月 8 日提交), 它们每一个在本文全部整合作为参考。

用于胃肠外、鞘膜内、心室内施用的组合物和制剂可以包括无菌水溶液, 其还可以包含缓冲液、稀释剂和其它适宜添加剂例如(但不限于)穿透促进剂、载体化合物和其它可药用载体或赋形剂。

本发明的某些实施方案提供了包含一种或多种寡聚化合物和一种或多种通过非反义机制起作用的其它化疗剂的药物组合物。此类化疗剂的实例包括但不限于癌症化学治疗药物例如柔红菌素、道诺酶素、更生霉素、阿霉素、表阿霉素、去甲氧柔红霉素、去羟阿霉素、博来霉素、麦磺磷芥、异环磷酰胺、阿糖胞苷、双氯乙亚硝脲、白消安、丝裂霉素 C、放线菌素 D、光辉霉素、强的松、羟孕酮、睾酮、三苯氧胺、氮烯咪胺、甲基苄肼、六甲密胺、五甲密胺(pentamethylmelamine)、米托蒽醌、胺苯吡啶、苯丁酸氮芥、甲基环己基亚硝基脲(methylcyclohexylnitrosurea)、氮芥、苯丙氨酸氮芥、环磷酰胺、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、胞嘧啶阿拉伯糖苷、5-氮杂胞苷、羟基脲、喷司他丁、4-羟基过氧化环磷酰胺、5-氟尿嘧啶(5-FU)、

5-氟脱氧尿苷(5-FUdR)、氮甲喋呤(MTX)、秋水仙素、紫杉醇、长春花新碱、长春花碱、鬼臼亚乙苷(VP-16)、曲美沙特、伊立替康、抑拓替康、吉西他滨(gemcitabine)、表鬼臼毒噻吩糖甙、顺铂、培美曲塞(pemetrexed)和己烯雌酚(DES)。当与本发明化合物一起使用时,此类化疗剂可以单独(例如 5-FU 和寡核苷酸)、相继(例如 5-FU 和寡核苷酸使用一段时间,随后使用 MTX 和寡核苷酸)或者与一种或多种其它此类化疗剂组合使用(例如 5-FU、MTX 和寡核苷酸,或者 5-FU、放射治疗和寡核苷酸)。抗炎药(包括但不限于非类固醇类抗炎药和糖皮质激素)和抗病毒药(包括但不限于三氮唑核苷(ribivirin)、阿糖腺苷、阿昔洛韦和更昔洛韦)也可以与本发明的组合物进行组合。反义化合物和其它非反义药物的组合也处于本发明的范围内。两种或多种组合的化合物可以一起使用或相继使用。

在另一个相关的实施方案中,本发明的组合物可以包含一种或多种靶向第一个核酸的反义化合物(特别是寡核苷酸)和一种或多种靶向第二个核酸靶的另外的反义化合物。备选地,本发明组合物可以包含两种或多种靶向同一核酸靶的不同区域的反义化合物。反义化合物的大量实例在本领域中是已知的。两种或多种组合化合物可以一起使用或相继使用。

H. 剂量确定

如文中所使用,术语“患者”是指患有的一种或多种与 eIF4E 表达或过表达相关的疾病的哺乳动物。应当理解,最期望的患者为人。还应当理解本发明特别涉及对哺乳动物 eIF4E 表达或过表达的抑制作用。

应该认识到,本领域的技术人员可以通过用有效量的本发明化合物治疗目前患有该类疾病的患者来影响与 eIF4E 表达或过表达相关的疾病。因此,术语“治疗”旨在指全部过程,其中有本文所述疾病进展的减慢、打断、阻止、控制、延缓和停止,但是不必指所有症状的全部消除。

如文中所使用,本发明化合物的“有效量”或“治疗有效量”是指有效治疗或预防文中所述疾病的量。

相信治疗组合物的制剂及其随后的施用(剂量确定)为本领域技术人

员所掌握。剂量确定依赖于所治疗疾病状态的严重性和反应性，治疗过程从几天持续到几个月，或者直到痊愈或者实现疾病状态减轻。从患者体内药物积累的测量能够计算最佳剂量方案。普通技术人员能够容易地确定最适剂量、剂量确定方法和重复率。最佳剂量依赖于各个寡核苷酸的相对潜能而改变，并且通常能够基于在体外或体内动物模型中发现有效的 EC_{50} 进行估计。通常，剂量为每公斤体重 $0.0001\ \mu\text{g}$ 至 $100\ \text{g}$ ，并且可以每天、每周、每月或每年一次或多次给药，或者甚至每 2-20 年给药一次。在一些实施方案中，剂量为每公斤体重 $0.0001\ \mu\text{g}$ 至 $100\ \text{g}$ 、每公斤体重 $0.001\ \mu\text{g}$ 至 $10\ \text{g}$ 、每公斤体重 $0.01\ \mu\text{g}$ 至 $1\ \text{g}$ 、每公斤体重 $0.1\ \mu\text{g}$ 至 $100\ \text{mg}$ 、每公斤体重 $1\ \mu\text{g}$ 至 $10\ \text{mg}$ 、每公斤体重 $10\ \mu\text{g}$ 至 $1\ \text{mg}$ 或者每公斤体重 $100\ \mu\text{g}$ 至 $500\ \mu\text{g}$ ，并且可以每天、每周、每月或每年一次或多次给药，或者甚至每 2-20 年给药一次。对于双链化合物，必须计算剂量以解决第二条链（对于包含两条链的化合物）核酸载量或者其它核酸长度（对于自身互补的化合物）的增加。本领域普通技术人员能够容易地基于所测量的体液或组织中药物滞留时间和浓度来计算剂量重复率。

对于寡核苷酸的吸收、分布、代谢和排泄（统称为 ADME）已经进行了大量工作。因为给定化学性质（例如具有 $\text{P}=\text{S}$ 主链的所有 2' MOE gapmer）的全部顺序具有相似的物理/化学特性如水溶解度、分子量（大约 7000）和 pK_a ，所以 ADME 是顺序不依赖的。通过分布至组织，主要为（但不限于）肝、肾、脾和骨髓，寡核苷酸相对快速地从血浆中去除（分布半寿期大约 1 小时、24 小时分布完全）。已经在组织包括肾、肝、骨髓、脂肪组织、脾、淋巴结、肺（通过气溶胶）和中枢神经系统（脑室内给药）中证明了药物代谢动力学和药效学之间的强相关。对于第一代反义药物（具有硫代磷酸酯主链的 2'-脱氧）组织半寿期为 1-5 天，而对于具有硫代磷酸酯主链的 2'-MOE 缺口(gap)寡核苷酸组织半寿期为 10-28 天。Henry 等，*Curr. Opin. Invest. Drugs*, 2001, 2, 1444-1449。

在成功治疗之后，可以期望对患者进行持续治疗以防止疾病状态复发，其中寡核苷酸以持续剂量施用，剂量范围为每公斤体重 $0.0001\ \mu\text{g}$ 至 $100\ \text{g}$ ，

每天一次或多次施用至每 20 年一次施用。

虽然确信已经按照其实施方案对本发明进行了特异性描述，但是以下实施例仅用于举例说明本发明并且无意于限制本发明。在本申请中所引用的每一参考文献、GenBank 登录号等等在文中整体引用作为参考。

实施例

实施例 1: 核苷亚磷酰胺的合成

如美国专利 6,426,220 和公布的 PCT WO 02/36743 中所描述制备以下化合物，包括 amidites 及其中间体；用于 5-甲基 dC amidite 的 5'-O-二甲氧三苯甲基-胸腺嘧啶中间体、用于 5-甲基 dC amidite 的 5'-O-二甲氧三苯甲基-2'-脱氧-5-甲基胞苷中间体、用于 5-甲基 dC amidite 的 5'-O-二甲氧三苯甲基-2'-脱氧-N⁴-苯甲酰基-5-甲基胞苷前末端基中间体、(5'-O-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-2'-脱氧-N⁴-苯甲酰基-5-甲基胞苷-3'-O-基)-2-氰乙基-N,N-二异丙基亚磷酰胺 (5-甲基 dC amidite)、2'-氟脱氧腺苷、2'-氟脱氧尿苷、2'-氟尿苷、2'-氟脱氧胞苷、2'-O-(2-甲氧乙基)修饰的 amidites、2'-O-(2-甲氧乙基)-5-甲基尿苷中间体、5'-O-DMT-2'-O-(2-甲氧乙基)-5-甲基尿苷前末端基中间体、(5'-O-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-2'-O-(2-甲氧乙基)-5-甲基尿苷-3'-O-基)-2-氰乙基-N,N-二异丙基亚磷酰胺 (MOE T amidite)、5'-O-二甲氧三苯甲基-2'-O-(2-甲氧乙基)-5-甲基胞苷中间体、5'-O-二甲氧三苯甲基-2'-O-(2-甲氧乙基)-N⁴-苯甲酰基-5-甲基胞苷前末端基中间体、(5'-O-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-2'-O-(2-甲氧乙基)-N⁴-苯甲酰基-5-甲基胞苷-3'-O-基)-2-氰乙基-N,N-二异丙基亚磷酰胺 (MOE 5-Me-C amidite)、(5'-O-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-2'-O-(2-甲氧乙基)-N⁶-苯甲酰基腺苷-3'-O-基)-2-氰乙基-N,N-二异丙基亚磷酰胺 (MOE A amidite)、(5'-O-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-2'-O-(2-甲氧乙基)-N⁴-异丁酰鸟苷-3'-O-基)-2-氰乙基-N,N-二异丙基亚磷酰胺 (MOE G amidite)、2'-O-(氨基乙氧基)核苷 amidites 和 2'-O-(二甲基氨基乙氧基)核苷 amidites、2'-(二甲基氨基氧基乙氧基)核苷 amidites、5'-O-叔丁基二苯基甲硅烷基-O²-2'-失水-5-甲基尿苷、5'-O-叔丁基二苯基甲硅烷基

基-2'-O-(2-羟乙基)-5-甲基尿苷、2'-O-((2-苯二酰亚氨基氧)乙基)-5'-叔丁基二苯基甲硅烷基-5-甲基尿苷、5'-O-叔丁基二苯基甲硅烷基-2'-O-((2-formadoximinooxy)乙基)-5-甲基尿苷、5'-O-叔丁基二苯基甲硅烷基-2'-O-(N,N-二甲基氨基乙氧基)-5-甲基尿苷、2'-O-(二甲基氨基乙氧基)-5-甲基尿苷、5'-O-DMT-2'-O-(二甲基氨基乙氧基)-5-甲基尿苷、5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-二甲基氨基乙氧基)-5-甲基尿苷-3'-((2-氰乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺)、2'-(氨基氧基乙氧基)核苷 amidites、N2-异丁酰-6-O-二苯基氨基甲酰基-2'-O-(2-乙基乙酰基)-5'-O-(4,4'-二甲氧)鸟苷-3'-((2-氰乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺)、2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(2'-DMAEOE)核苷 amidites、2'-O-(2(2-N,N-二甲基氨基乙氧基)乙基)-5-甲基尿苷、5'-O-二甲氧三苯甲基-2'-O-(2(2-N,N-二甲基氨基乙氧基)-乙基))-5-甲基尿苷和 5'-O-二甲氧三苯甲基-2'-O-(2(2-N,N-二甲基氨基乙氧基)-乙基))-5-甲基尿苷-3'-O-(氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺。

2'-脱氧和 2'-甲氧基 amidites

2'-脱氧和 2'-甲氧基 β -氰乙基二异丙基亚磷酰胺从商业来源购得(例如 Chemgenes、Needham、MA 或 Glen Research, Inc. Sterling, VA)。其它 2'-O-烷氧基取代的核苷 amidites 如美国专利 5,506,351 中所描述制备,该专利在文中引用作为参考。对于利用 2'-烷氧基 amidites 合成的寡核苷酸,使用了用于未修饰寡核苷酸的标准循环,除了脉冲递送四唑之后的等待步骤,并且碱基(base)增加至 360 秒。

按照已公布的方法(Sanghvi 等, Nucleic Acids Research, 1993, 21, 3197-3203),使用商业获得的亚磷酰胺(Glen Research, Sterling VA 或 ChemGenes, Needham, MA)合成了包含 5-甲基-2'-脱氧胞苷(5-Me-C)核苷酸的寡核苷酸。

2'-氟代 amidites

如先前文献(Kawasaki 等, J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841)和美国专

利 5,670,633 所描述合成了 2'-氟代寡核苷酸,该专利在文中引用作为参考。简而言之,利用商业获得的 9- β -D-阿糖呋喃腺嘌呤作为原料并且使用文献中的修饰方法从而通过 2'- β -三苯甲基基团的 S_N2 置换导入了 2'- α -氟原子,合成了受保护的核苷 N6-苯甲酰基-2'-脱氧-2'-氟腺苷。因此 N6-苯甲酰基-9- β -D-阿糖呋喃腺嘌呤作为 3',5'-二四氢吡喃基(THP) 中间体以适中量选择性受到保护。使用标准方法实现了 THP 和 N6-苯甲酰基基团的脱保护,并且标准方法还用于获得 5'-二甲氧三苯甲基-(DMT)和 5'-DMT-3'-亚磷酰胺中间体。

使用四异丙基二硅氧烷基 (TPDS)保护的 9- β -D-阿糖呋喃鸟嘌呤作为原料并转化为中间体二异丁酰阿糖呋喃鸟苷合成 2'-脱氧-2'-氟鸟苷。TPDS 基团脱保护后用 THP 保护羟基基团以产生二异丁酰二-THP 保护的阿糖呋喃鸟嘌呤。选择性 O-脱酰基作用和三次稳定 (triflation) 后,用氟化物处理粗产物,然后 THP 基团脱保护。标准方法学用于获得 5'-DMT- 和 5'-DMT-3'-亚磷酰胺。

通过文献中的过程进行修改合成 2'-脱氧-2'-氟尿苷,其中用 70%氟化氢-嘧啶处理 2,2'-失水-1- β -D-阿拉伯呋喃尿嘧啶。标准过程用于获得 5'-DMT 和 5'-DMT-3'亚磷酰胺。

通过 2'-脱氧-2'-氟尿苷的氨基化作用合成 2'-脱氧-2'-氟胞苷,随后选择性保护以产生 N4-苯甲酰基-2'-脱氧-2'-氟胞苷。标准过程用于获得 5'-DMT 和 5'-DMT-3'亚磷酰胺。

2'-O-(2-甲氧乙基)修饰的 amidites

通过 Martin, Helvetica Chimica Acta, 1995, 78, 486-504 的方法制备 2'-O-甲氧乙基取代的核苷 amidites。

2'-(氨基乙氧基) 核苷 amidites 和 2'-(二甲基氨基乙氧基) 核苷 amidites

通过美国专利申请号 6,127,533 中的方法制备氨基乙氧基和二甲基氨基乙氧基 amidites,该专利在文中引用作为参考。

实施例 2: 寡核苷酸和寡核苷合成

通过众所周知的固相合成技术可以方便地且常规地制备用于本发明的寡聚化合物。几个供应商包括例如 Applied Biosystems (Foster City, CA) 出售用于此种合成的装置。另外或备选地, 可以应用本领域已知的任意其它用于此种合成的方式。众所周知, 可以使用相似技术制备寡核苷酸例如二硫代磷酸酯及其烷基化衍生物。

寡核苷酸: 利用具碘氧化作用的标准亚磷酰胺化学作用在自动化 DNA 合成(Applied Biosystems model 394)仪上合成未取代的和取代的磷酸二酯(P=O) 寡核苷酸。

硫代磷酸酯(P=S)合成与磷酸二酯寡核苷酸相似, 以下步骤除外: 对于亚磷酸酯键的氧化, 利用含溶于乙腈的 10% w/v 3,4-二氢-2H-1,2-苯并二硫杂环戊二烯-3-酮 1,1-二氧化物引起硫杂化。硫杂化反应步骤时间增加至 180 秒并且之前先进行正常加帽步骤。在从 CPG 柱断裂出来并在浓氨水中 55°C 去封闭(12-16 小时)后, 用 >3 倍体积的乙醇沉淀从 1 M NH_4OAc 溶液中回收寡核苷酸。如美国专利 5,508,270 中所描述制备次磷酸酯寡核苷酸, 该专利在文中引用作为参考。

如美国专利 4,469,863 中所描述制备了烷基磷酸酯寡核苷酸, 该专利文中引用作为参考。

如美国专利 5,610,289 或 5,625,050 中所描述制备了 3'-脱氧-3'-亚甲基磷酸酯寡核苷酸, 该专利在文中引用作为参考。

如美国专利 5,256,775 或美国专利 5,366,878 中所描述制备了亚磷酰胺寡核苷酸, 该专利在文中引用作为参考。

如公布的 PCT 申请 PCT/US94/00902 和 PCT/US93/06976 (分别作为 WO 94/17093 和 WO 94/02499 公布) 中所描述制备了烷基硫代磷酸酯寡核苷酸, PCT 申请在文中引用作为参考。

如美国专利 5,476,925 中所描述制备了 3'-脱氧-3'-氨基氨基磷酸酯寡核苷酸, 该专利在文中引用作为参考。

如美国专利 5,023,243 中所描述制备了磷酸三酯寡核苷酸,该专利在文中引用作为参考。

如美国专利 5,130,302 和 5,177,198 中所描述制备了硼磷酸酯寡核苷酸,两项专利在文中引用作为参考。

如美国专利 5,639,873 中所描述合成了含 4'-硫代的寡核苷酸,该专利的内容在文中引用作为参考。

寡核苷: 如美国专利 5,378,825、5,386,023、5,489,677、5,602,240 和 5,610,289 中所描述制备了亚甲基甲基亚氨基连接的寡核苷(也鉴定为 MMI 连接的寡核苷)、亚甲基二甲基联亚氨基连接的寡核苷(也鉴定为 MDH 连接的寡核苷)和亚甲基羰基氨基连接的寡核苷(也鉴定为酰胺-3 连接的寡核苷)和亚甲基氨基羰基连接的寡核苷(也鉴定为酰胺-4 连接的寡核苷)以及具有例如交替 MMI 和 P=O 或 P=S 键的混合主链化合物,全部专利在文中引用作为参考。

如美国专利 5,264,562 和 5,264,564 中所描述制备了甲缩醛 (Formacetal) 和硫代甲缩醛连接的寡核苷,两项专利在文中引用作为参考。

如美国专利 5,223,618 中所描述制备了环氧乙烷连接的寡核苷,该专利在文中引用作为参考。

PNA 合成

按照 Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23 中所提及的各种方法中的任意方法制备了肽核酸(PNA)。根据美国专利 5,539,082、5,700,922 和 5,719,262 也可以制备肽核酸,专利在文中引用作为参考。

实施例 3: RNA 合成

一般而言, RNA 合成化学基于在关键中间反应中各种保护性基团的选择性掺入。本领域普通技术人员能够理解保护基团在有机合成中的用途,

一类有用的保护基团包括甲硅烷基醚。具体而言,大量甲硅烷基醚用于保护与 2'-羟基上的对酸敏感原酸酯保护基团相联合来保护 5'-羟基。因而该套保护基团可用于标准固相合成技术。在全部其它合成步骤之后最后去除对酸敏感原酸酯保护基团是重要的。而且,在合成过程中早期使用甲硅烷基保护基团可确保在期望去除保护基团时可以容易去除,而不对 2'羟基进行脱保护。

通过保护基团(被差异去除或具有不同化学不稳定性)使 5'-羟基和 2'羟基被相继保护之后,合成了 RNA 寡核苷酸。

RNA 寡核苷酸以分步方式合成。每个核苷酸相继(3'至 5'方向)加到固相支持物结合的寡核苷酸上。链 3'末端的第一个核苷共价连接于固相支持物上。加入核苷酸前体、核糖核苷亚磷酰胺和催化剂,将第二个碱基偶联至第一个核苷的 5'末端上。洗涤支持物并使用乙酸酐对任何未反应的 5'-羟基基团进行加帽,以产生 5'-乙酰基部分。然后将键氧化成更加稳定并最终期望的 P(V)键。核苷酸加成循环结束时,使用氟化物断裂 5'-甲硅烷基团。对于每一个随后的核苷酸重复该循环。

合成之后,利用溶于 DMF 的 1M 二钠-2-氨基乙酰基-2-丙烯腈-1,1-二硫醇三水合物(S_2Na_2)断裂磷酸酯上的甲基保护基团。用水从固相支持物结合寡核苷酸上洗去脱保护溶液。然后用 40%甲胺水溶液 55℃处理支持物 10 分钟。这将 RNA 寡核苷酸释放入溶液中,将环外胺脱保护并修饰 2'-基团。在该阶段通过阳离子交换 HPLC 能够合成寡核苷酸。

2'-原酸酯基团是将要去除的最后的保护基团。由 Dharmacon Research 公司(Lafayette, CO)研发的乙二醇单醋酸酯原酸酯保护基团是有用的原酸酯保护基团的一个实例,其具有以下重要特性。它在核苷亚磷酰胺合成和寡核苷酸合成的条件下是稳定的。然而,寡核苷酸合成后,需使用甲胺处理寡核苷酸,这不仅将寡核苷酸从固相支持物上断裂下来还从原酸酯上去除乙酰基基团。所得到的原酸酯上的 2-乙基-羟基取代基比乙酰化前体吸电子差。结果,修饰的原酸酯变得对酸催化的水解作用更加不稳定。具体而言是,当乙酰基团去除后断裂的速率快了大约 10 倍。因此,该原酸酯拥有

足够的稳定性以便与寡核苷酸合成相容并且当随后修饰时允许在与最终 RNA 寡核苷酸产物相容的相对温和水溶液条件下进行脱保护。

另外, RNA 合成的方法在本领域中是众所周知的(Scaringe, S. A. 博士论文, 科罗拉多大学, 1996; Scaringe 等, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 11820-11821; Matteucci 等, J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 3185-3191; Beaucage 等, Tetrahedron Lett., 1981, 22, 1859-1862; Dahl 等, Acta Chem. Scand., 1990, 44, 639-641; Reddy 等, Tetrahedron Lett., 1994, 25, 4311-4314; Wincott 等, Nucleic Acids Res., 1995, 23, 2677-2684; Griffin 等, Tetrahedron, 1967, 23, 2301-2313; Griffin 等, Tetrahedron, 1967, 23, 2315-2331)。

本发明 RNA 反义化合物(RNA 寡核苷酸)能够通过文中的方法合成或者从 Dharmacon Research 公司(Lafayette, CO)购买。一旦合成, 然后通过本领域已知的方法能够对互补 RNA 反义化合物进行退火以形成双链(双链体)反义化合物。例如, 通过将 30 μ l 的 RNA 寡核苷酸(50 μ M RNA 寡核苷酸溶液)每一互补的链与 15 μ l 5 $\times$ 退火缓冲液(100 mM 醋酸钾、30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 2 mM 醋酸镁)相混合, 随后 90 $^{\circ}$ C 加热 1 分钟, 然后 37 $^{\circ}$ C 1 小时, 能够形成双链体。所得到的双链体反义化合物能够用于试剂盒、测定、筛选或其它方法以研究靶核酸的作用, 或者用于诊断或治疗。

实施例 4: 嵌合体寡核苷酸的合成

本发明的嵌合体寡核苷酸、寡核苷或混合的寡核苷酸/寡核苷可以是几种不同的类型。这些类型包括第一种类型和第二种的“开放末端”类型, 其中在第一种类型中所连接的核苷的“缺刻”段位于所连接的核苷的 5'和 3'“翼”之间, 在第二种类型中“缺刻”段位于寡聚化合物 3'或 5'末端。第一种类型的寡核苷酸在本领域中已知为“gapmer”或有缺刻的寡核苷酸。第二种类型的寡核苷酸在本领域中已知为“hemimer”或“wingmer”。

(2'-O-Me)--(2'-脱氧)--(2'-O-Me)嵌合体硫代磷酸酯寡核苷酸

如上, 利用 Applied Biosystems 自动化 DNA 合成仪型号 394 合成了具

有 2'-O-烷基硫代磷酸酯和 2'-脱氧硫代磷酸酯寡核苷酸片段的嵌合体寡核苷酸。利用自动化合成仪和对于 DNA 部分的 2'-脱氧-5'-二甲氧三苯甲基-3'-O-亚磷酰胺和对于 2'-O-烷基部分的 5'-二甲氧三苯甲基-2'-O-甲基-3'-O-亚磷酰胺合成了寡核苷酸。对标准合成循环进行了修饰,即包含了对于 5'-二甲氧三苯甲基-2'-O-甲基-3'-O-亚磷酰胺反应时间增加的偶联步骤。充分保护的寡核苷酸从支持物上断裂下来并在浓氨水(NH₄OH)中 55℃ 脱保护 12-16 小时。然后通过适宜的方法(沉淀、柱层析、真空减少体积)回收脱保护的寡聚物并通过分光光度方法分析产量且通过毛细管电泳和质谱法分析纯度。

(2'-O-(2-甲氧乙基))--(2'-脱氧)--(2'-O-(甲氧乙基))嵌合体硫代磷酸酯寡核苷酸

按照如上用于 2'-O-甲基嵌合体寡核苷酸的方法制备了(2'-O-(2-甲氧乙基))--(2'-脱氧)--(2'-O-(甲氧乙基))嵌合体硫代磷酸酯寡核苷酸,其中 2'-O-(甲氧乙基)amidites 替代了 2'-O-甲基 amidites。

(2'-O-(2-甲氧乙基)磷酸二酯)--(2'-脱氧硫代磷酸酯)--(2'-O-(2-甲氧乙基)磷酸二酯)嵌合体寡核苷酸

按照如上用于 2'-O-甲基嵌合体寡核苷酸的方法制备了(2'-O-(2-甲氧乙基)磷酸二酯)--(2'-脱氧硫代磷酸酯)--(2'-O-(甲氧乙基)磷酸二酯)嵌合体寡核苷酸,其中 2'-O-(甲氧乙基)amidites 替代了 2'-O-甲基 amidites,用碘进行氧化作用以产生嵌合体结构翼部分内的核苷酸间磷酸二酯键,并且利用 3,4-二氢-2H-1,2-苯并二硫杂-3-酮 1,1-二氧化物(Beaucage Reagent)进行硫化作用以产生中央缺刻的核苷酸间硫代磷酸酯键。

按照美国专利 5,623,065 合成了其它嵌合体寡核苷酸、嵌合体寡核苷和混合的嵌合体寡核苷酸/寡核苷,该专利在文中引用作为参考。

实施例 5: 靶向 eIF4E 的双链体反义化合物的设计与筛选

根据本发明,设计靶向 eIF4E 的一系列的包含本发明反义化合物及其互补体核酸双链体。双链体反义链的核碱基序列包含表 1 寡核苷酸中的至

少 8 个核碱基部分。通过加入一个或多个天然或修饰核碱基以形成悬突将链末端进行修饰。然后将 dsRNA 的有意链作为反义链的互补体进行设计并合成并且有意链也可以在每一个末端包含修饰或添加。例如，在一个实施方案中，dsRNA 双链体的两条链的中间核碱基是互补的，每一条链在一个或两个末端含有悬突。双链体的一个末端可以是平端并且另一个末端具有悬突核碱基。在一个实施方案中，在双链体每一条链的 3' 端上的悬突核碱基数目为 1-6。在另一个实施方案中，仅在双链体的一条链的 3' 端悬突核碱基数目为 1-6。在另外实施方案中，在双链体链的一个或两个 5' 端上悬突核碱基的数目为 1-6。在另一个实施方案中，悬突核碱基数目为 0。

作为实例，包含具有序列 CGAGAGGCGGACGGGACCG (SEQ ID NO:456) 和具有脱氧胸腺嘧啶(dT)的 2 核碱基悬突的反义链的双链体可能具有下列结构：

cgagagggcggacgggaccgTT 反义链(SEQ ID NO:457)

|||||

TTgctctccgcctgccctggc 有意链互补体 (SEQ ID NO:458)

在另一个实施方案中，包含具有相同序列 CGAGAGGCGGACGGGACCG 的反义链的双链体可以制备成平端(无单链悬突)，如下所示：

cgagagggcggacgggaccg 反义链 (SEQ ID NO:456)

|||||

gctctccgcctgccctggc 有意链 (互补体) (SEQ ID NO:459)

双链体可以是单分子或双分子，即有意链和反义链可以是同一分子的一部分（其形成发夹结构或其它自身结构）或两个（或者甚至更多）分开的分子。

双链体的 RNA 链可以通过本文公开的方法合成或者购自 Dharmacon Research Inc., (Lafayette, CO)。一旦合成，将互补链退火。将单一链分成

等份并稀释至浓度为 50 μM 。一旦稀释, 将 30 μL 的每条链与 15 μL 5 $\times$ 退火缓冲溶液混合。该缓冲液终浓度为 100 mM 醋酸钾、30 mM HEPES-KOH pH 7.4 和 2mM 醋酸镁。终体积为 75 μL 。将溶液于 90 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 分钟, 然后离心 15 秒。将管于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 小时, 在这段时间 dsRNA 双链体用于实验。dsRNA 双链体终浓度为 20 μM 。该溶液可以冰冻储存(-20 $^{\circ}\text{C}$)并且可以冻融多达 5 次。

一旦制备完毕, 双链体反义化合物用于评价其调节 eIF4E 表达的能力。

当细胞达到 80% 汇合时, 用本发明的双链体反义化合物处理。对于生长于 96 孔板中的细胞, 用 200 μL OPTI-MEM-1 降低血清培养基(Gibco BRL)洗涤孔一次, 然后用包含 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LIPOFECTIN (Gibco BRL)和终浓度 200 nM 的目的双链体反义化合物的 130 μL OPTI-MEM-1 处理。处理 5 小时后, 培养基用新鲜培养基替换。处理 16 小时后收获细胞, 在此时分离 RNA 并通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

实施例 6: 寡核苷酸分离

从可控多孔玻璃固体支持物上断裂并在浓氨水中于 55 $^{\circ}\text{C}$ 去封闭 12-16 小时之后, 通过用 >3 倍体积的乙醇沉淀从 1 M NH_4OAc 中回收寡核苷酸或寡核苷。合成的寡核苷酸用电喷雾质谱(分子量确定)和毛细管凝胶电泳分析并且经判断至少 70% 为全长的。通过正确分子量和 -16 amu 产物(+/-32 +/-48)的比率确定合成中所获得的硫代磷酸酯键和磷酸二酯键的相对量。对于一些研究, 如 Chiang 等, J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171 所描述, 通过 HPLC 纯化寡核苷酸。使用 HPLC 纯化材料所获得的结果与使用非 HPLC 纯化材料所获得的结果相似。

实施例 7: 寡核苷酸合成-96 孔板格式

通过固相 P(III) 亚磷酰胺化学在自动合成仪上合成寡核苷酸, 其中合成仪能够在 96 孔格式中同时合成 96 条序列。通过水溶性碘的氧化作用提供核苷酸间磷酸二酯键。通过利用无水乙腈中的 3,4-二氢-2H-1,2-苯并二硫杂环戊

二烯-3-酮 1,1 二氧化物(Beaucage Reagent)的硫化作用产生核苷酸间硫代磷酸酯键。标准碱基保护的 β -氰乙基-二异丙基亚磷酰胺购自商品供应商(例如 PE-Applied Biosystems, Foster City, CA 或者 Pharmacia, Piscataway, NJ)。按照标准方法或具有专利权的方法合成非标准核苷。它们用作碱基保护 β -氰乙基二异丙基亚磷酰胺。

寡核苷酸从支持物上断裂下来并用浓 NH_4OH 于升高的温度($55\text{-}60^\circ\text{C}$)下脱保护 12-16 小时,然后将释放的产物真空干燥。然后将干燥的产物重悬于无菌水得到主板(master plate),然后利用自动移液管操纵器从主板稀释分析和测试平板样品。

实施例 8: 寡核苷酸分析-96 孔板格式

通过样品稀释和 UV 吸收光谱估计每孔中寡核苷酸的浓度。通过毛细管电泳(CE)在 96 孔板格式(Beckman P/ACE™ MDQ)或者对于单个制备的样品在商品化 CE 装置(例如 Beckman P/ACE™ 5000, ABI 270)上评价单个产品的全长完整性。通过利用电喷雾质谱对化合物进行质量分析证实碱基和主链组成。使用单一通道或多重通道自动移液管操纵器从主板稀释所有分析测试板。如果板上至少 85%的化合物为至少 85%全长,则判断该板为可接受的。

实施例 9: 细胞培养和寡核苷酸处理-单一标准反义化合物

反义化合物对靶核酸表达的影响可以在多种细胞类型的任意一种中进行测试,只要靶核酸以可测定水平存在即可。这可以使用例如 PCR 或者 Northern 印迹分析进行常规确定。下面提供的细胞类型用于举例说明,但是其他细胞类型也可以常规使用,只要靶标在所选择的细胞类型中表达即可。这可以通过本技术领域常规方法例如 Northern 印迹分析、核糖核酸酶保护分析或 RT-PCR 容易地确定。

T-24 细胞:

人过渡期细胞膀胱癌细胞系 T-24 从美国典型培养物保藏中心(ATCC)

(Manassas, VA)获得。T-24 细胞在添加有 10%胎牛血清(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)、100 单位/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)的完全 McCoy's 5A 基本培养基中常规培养。当细胞达到 90%汇合时,通过胰酶消化和稀释将细胞常规传代培养。细胞以 7000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板(Falcon-Primaria #353872)用于 RT-PCR 分析。

对于 Northern 印迹或其它分析,将细胞接种于 100 mm 或其它标准组织培养板并且相似地使用适宜体积的培养基和寡核苷酸处理。

A549 细胞:

人肺癌细胞系 A549 从美国典型培养物保藏中心(ATCC) (Manassas, VA)获得。A549 细胞在添加有 10%胎牛血清(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)、100 单位/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)的 DMEM 基本培养基(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)中常规培养。当细胞达到 90%汇合时,通过胰酶消化和稀释将细胞常规传代培养。

NHDF 细胞:

人新生儿皮肤成纤维细胞(NHDF)从 Clonetics Corporation (Walkersville, MD)获得。将 NHDF 在如供应商所建议添加的成纤维细胞生长培养基(Clonetics Corporation, Walkersville, MD)中常规维持。如供应商所推荐将细胞常规维持高达 10 代。

HEK 细胞:

人胚胎角质化细胞(HEK)从 Clonetics Corporation (Walkersville, MD)获得。将 HEK 常规维持于如供应商所推荐进行配制的角质化细胞生长培养基(Clonetics Corporation, Walkersville, MD)。如供应商所推荐将细胞常规维持高达 10 代。

b.END 细胞:

小鼠脑内皮细胞系 b.END 从 Max Plank Institute (Bad Nauheim, Germany)的 Werner Risau 博士获得。b.END 细胞在添加有 10%胎牛血清

(Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) 的高葡萄糖 DMEM(Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD)中常规培养。当细胞达到 90%汇合时,通过胰酶消化和稀释将细胞常规传代培养。细胞以 3000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板(Falcon-Primaria #3872)用于 RT-PCR 分析。对于 Northern 印迹或其它分析,将细胞接种于 100 mm 或其它标准组织培养板并且相似地使用适宜体积的培养基和寡核苷酸处理。

HeLa 细胞:

人上皮样癌细胞系 HeLa 从美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA)获得。HeLa 细胞在添加有 10%胎牛血清(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)的高葡萄糖 DMEM(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)中常规培养。当细胞达到大约 90%汇合时,通过胰酶消化和稀释将细胞常规传代培养。将细胞以大约 50,000 个细胞/孔的密度接种于 24 孔板 (Falcon-Primaria #3846)或者以大约 5000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板用于 RT-PCR 分析。对于 Northern 印迹或其它分析,将细胞达到大约 90%汇合时收获细胞。

U-87 MG 细胞:

人成胶质细胞瘤 U-87 MG 细胞系从美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA)获得。U-87 MG 细胞在添加有 10%胎牛血清(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)和抗生素的 DMEM(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)中培养。当细胞达到适当汇合时,通过胰酶消化和稀释将细胞常规传代培养。将细胞以大约 10,000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板(Falcon-Primaria #3872)用于 RT-PCR 分析。

对于 Northern 印迹或其它分析,将细胞接种于 100 mm 或其它标准组织培养板并且相似地使用适宜体积的培养基和寡核苷酸处理。

MH-S 细胞:

小鼠 MH-S 细胞购自美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA)。细胞维持于包含 10%热灭活胎牛血清(FCS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) 的 RPMI 1640 培养基中。将细胞以大约 5000 个细胞/孔的密度铺于 96 孔

板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1%青霉素/链霉素的 DMEM 中。使用反义化合物处理：

当细胞达到 65-75%汇合时，用寡核苷酸处理。对于生长于 96 孔板中的细胞，用 100 μ L OPTI-MEM™-1 降低血清培养基 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 洗涤孔一次，然后用包含 3.75 μ g/mL LIPOFECTIN™ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 和预期浓度寡核苷酸的 130 μ L OPTI-MEM™-1 处理。三次重复处理细胞并收集数据。在 37°C 处理 4-7 小时后，将培养基用新鲜培养基替换。寡核苷酸处理 16-24 小时后收获细胞。

所使用寡核苷酸的浓度随细胞系而变化。为了确定对于特定细胞系的最佳寡核苷酸浓度，用浓度范围的阳性对照寡核苷酸处理细胞。对于人类细胞，阳性对照寡核苷酸选自靶向人 H-ras 的 ISIS 13920 (TCCGTCATCGCTCCTCAGGG, SEQ ID NO:1) 或靶向人 Jun-N 末端激酶 2 (JNK2) 的 ISIS 18078, (GTGCGCGCGAGCCCGAAATC, SEQ ID NO:2)。两个对照都是具有硫代磷酸酯主链的 2'-O-甲氧乙基 gapmer (2'-O-甲氧乙基显示为粗体)。对于小鼠或大鼠细胞，阳性对照寡核苷酸是靶向小鼠和大鼠 c-raf 的 ISIS 15770, ATGCATTCTGCCCCCAAGGA, SEQ ID NO:3, 其为具有硫代磷酸酯主链 2'-O-甲氧乙基 gapmer (2'-O-甲氧乙基显示为粗体)。然后将导致 c-H-ras (对于 ISIS 13920)、JNK2 (对于 ISIS 18078) 或 c-raf (对于 ISIS 15770) mRNA 80% 抑制的阳性对照寡核苷酸浓度用作在对于那个细胞系随后实验中新寡核苷酸的筛选浓度。如果没有达到 80% 抑制，导致 c-H-ras、JNK2 或 c-raf mRNA 60% 抑制的阳性对照寡核苷酸的最低浓度用作在对于那个细胞系随后实验中寡核苷酸的筛选浓度。如果没有达到 60% 抑制，认为特定细胞系不适于寡核苷酸转染实验。文中所使用的反义寡核苷酸的浓度为 50 nM-300 nM。

实施例 10：寡核苷酸对 eIF4E 表达抑制的分析

可以使用本领域已知的多种方法分析 eIF4E 表达的反义调节。例如，

可以通过如 Northern 印迹分析、竞争性聚合酶链式反应(PCR)或实时 PCR (RT-PCR)定量 eIF4E mRNA 水平。实时定量 PCR 为目前适用的。RNA 分析可以针对总细胞 RNA 或 poly(A)+ mRNA 进行。如在本文其他实施例中所述,本发明 RNA 分析的一种方法是使用总细胞 RNA。RNA 分离的方法在本领域中是众所周知的。Northern 印迹分析也是本领域的常规方法。实时定量 PCR 可以使用商业可得的 ABI PRISM™ 7600、7700 或 7900 序列检测系统(可从 PE-Applied Biosystems, Foster City, CA 获得)方便地实现,并且根据制造商的说明书使用。

eIF4E 蛋白质水平可以用本领域众所周知的多种方法进行定量,所述方法例如免疫沉淀、Western 印迹分析(免疫印迹)、酶联免疫吸附测定(ELISA)或荧光激活细胞分选术(FACS)。可以鉴定出抗 eIF4E 的抗体并从多种来源获得,例如 MSRS 目录中的抗体(Aerie Corporation, Birmingham, MI),或者通过本领域众所周知的传统单克隆或多克隆抗体产生方法制备。

实施例 11: 用于 eIF4E 抑制剂的表型测定法设计

一旦已经通过文中公开的方法鉴定出 eIF4E 抑制剂,则在一个或多个表型测定中进一步研究化合物,每个测定都具有可测量的终末点以预测在特定疾病情况或状态的治疗中的效率。

表型测定法、试剂盒和它们所使用的试剂是本领域的那些技术人员众所周知的并且文中用于研究 eIF4E 在健康和疾病中的作用和/或联系。典型的表型测定法可以从几个商品供应商的任意一个购得,表型测定法包括用于确定细胞生存力、细胞毒性、细胞增殖或细胞存活的那些测定法(Molecular Probes, Eugene, OR; PerkinElmer, Boston, MA),基于蛋白质的测定包括酶学测定(Panvera, LLC, Madison, WI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; Oncogene Research Products, San Diego, CA)、细胞调控、信号转导、炎症反应、氧化过程和细胞凋亡(Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI)、三酰甘油积累(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、血管发生测定、管形成测定、细胞因子和激素测定以及代谢测定(Chemicon International

Inc., Temecula, CA; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。

在一个非限定性实施例中, 用从体外研究中所鉴定出来的 eIF4E 抑制剂和对照化合物以通过上述方法确定的最佳浓度处理所确定的适于特定表型测定的细胞(即对于乳腺癌研究选择 MCF-7 细胞, 对于肥胖症研究选择脂肪细胞)。在处理期结束时, 通过一种或多种特异用于测定的方法分析处理和未处理细胞以确定表型结果和终末点。

表型终末点包括细胞形态随着时间或处理剂量的变化以及细胞成分如蛋白质、脂类、核酸、激素、糖类或金属的水平变化。对细胞状态包括 pH、细胞周期阶段、细胞对生物指示剂的摄入或分泌的测量也是目的终末点。

处理后细胞表型的分析(测量一种或多种细胞基因的表达)也用作 eIF4E 抑制剂效率或潜能的指示剂。在处理和未处理细胞中测定了标志基因或者怀疑与特定疾病状态相关的那些基因。

实施例 12: RNA 分离

Poly(A)+ mRNA 分离

按照 Miura 等, (*Clin. Chem.*, 1996, 42, 1758-1764)分离 Poly(A)+ mRNA。用于 poly(A)+ mRNA 分离的其它方法在本领域中也是常规的。简而言之, 对于生长于 96 孔板的细胞, 从细胞撤除生长培养基并且用 200 μ L 冷 PBS 洗涤各孔。在各孔中加入 60 μ L 裂解缓冲液(10 mM Tris-HCl, pH 7.6、1 mM EDTA、0.5 M NaCl、0.5% NP-40、20 mM 氧钒-核糖核苷复合物), 轻轻摇动培养板, 然后在室温赋予 5 分钟。将 55 μ L 裂解物转移至 Oligo d(T)包被的 96 孔板(AGCT Inc., Irvine CA)中。在室温孵育培养板 60 分钟并用 200 μ L 洗涤缓冲液(10 mM Tris-HCl pH 7.6、1 mM EDTA、0.3 M NaCl)洗涤 3 次。最后一次洗涤之后, 将板在纸巾上拍干以去除多余的洗涤缓冲液, 然后空气干燥 5 分钟。在各孔中加入预热至 70 $^{\circ}$ C 的 60 μ L 洗脱缓冲液(5 mM Tris-HCl pH 7.6), 将板在 90 $^{\circ}$ C 加热板上孵育 5 分钟, 然后将洗脱液转移至新的 96 孔板。

可以使用适宜体积的全部溶液对生长于 100 mm 或其它标准培养板的

细胞进行相似处理。

总 RNA 分离

使用购自 Qiagen Inc. (Valencia, CA) 的 RNEASY 96™ 试剂盒和缓冲液按照制造商推荐的步骤分离总 RNA。简而言之, 对于生长于 96 孔板的细胞, 从细胞撤除生长培养基并且用 200 μ L 冷 PBS 洗涤各孔。在各孔中加入 150 μ L 缓冲液 RLT 并剧烈振荡板 20 秒。然后向各孔中加入 150 μ L 70% 乙醇并用吸量管上下吹吸三次混合内容物。然后将样品转移至连接有 QIAVAC™ 多支管 (固定有废液收集盘) 且和真空源的 RNEASY 96™ 孔板上。施加真空 1 分钟。在 RNEASY 96™ 板的各孔中加入 500 μ L 缓冲液 RW1 并孵育 15 分钟, 再次施加真空 1 分钟。再次向 RNEASY 96™ 板的各孔中加入 500 μ L 缓冲液 RW1 并施加真空 2 分钟。然后向 RNEASY 96™ 板的各孔中加入 1 mL 缓冲液 RPE 并且施加真空 90 秒。然后重复缓冲液 RPE 洗涤并额外施加真空 3 分钟。然后将板从 QIAVAC™ 多支管上取出并在纸巾上拍干。然后将板再次连接至配备有收集管架 (包含 1.2 mL 收集管) 的 QIAVAC™ 多支管。然后通过向各孔中吸入 140 μ L 无 RNA 酶水, 孵育 1 分钟, 然后施加真空 3 分钟洗脱 RNA。

使用 QIAGEN Bio-Robot 9604 (Qiagen, Inc., Valencia CA) 可以自动化重复移液和洗脱步骤。基本上, 在培养板上的细胞裂解之后将板转移至自动化操作台, 在那里进行移液、DNA 酶处理和洗脱步骤。

实施例 13: eIF4E mRNA 水平的实时定量 PCR 分析

利用 ABI PRISM™ 7600、7700 或 7900 序列检测系统 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) 按照制造商说明书进行 eIF4E mRNA 水平的定量。这是不基于凝胶的闭合管荧光检测系统, 其允许实时对聚合酶链式反应 (PCR) 产物进行高通量定量。与在 PCR 完成后对扩增产物进行定量的标准 PCR 相反, 实时定量 PCR 中的产物随着它们的积累便可以进行定量。这是通过在 PCR 反应中包含寡核苷酸探针实现的, 该探针在正向和反向

PCR 引物之间特异性退火并包含两种荧光染料。报告染料(例如 FAM 或 JOE, 从 PE-Applied Biosystems, Foster City, CA、Operon Technologies Inc., Alameda, CA 或 Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA 获得)连接到探针的 5'端而猝灭染料(例如 TAMRA, 从 PE-Applied Biosystems, Foster City, CA、Operon Technologies Inc., Alameda, CA 或 Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA 获得)连接至探针的 3'端。当探针和染料完整时, 报告染料发射光被附近的 3'猝灭染料猝灭。在扩增过程中, 探针退火至靶序列以产生能够被 Taq 聚合酶 5'核酸外切酶活性断裂的底物。在 PCR 扩增循环的延伸期过程中, 通过 Taq 聚合酶断裂探针将报告染料从探针剩余物上释放下来(并因此从猝灭部分释放下来)并产生序列特异的荧光信号。对于每个循环, 连接的报告染料分子从其各自的探针上断裂下来, 并且通过内置于 ABI PRISM™序列检测系统的激光光学器以规则时间间隔监测荧光强度。在每个测定中, 包含来自未处理对照样品的 mRNA 系列稀释液的一系列平行反应产生标准曲线, 其用于在用反义寡核苷酸处理测试样品后定量抑制的百分数。

在定量 PCR 分析之前, 评价对所测量的靶基因特异的引物-探针组与 GAPDH 扩增反应“多重扩增”的能力。在多重扩增中, 靶基因和内标准基因 GAPDH 同时在单一样品中扩增。在该分析中, 从未处理细胞分离的 mRNA 是连续稀释的。在存在仅对 GAPDH 特异、仅对靶基因特异(“一重扩增”)或对两者特异(多重扩增)的引物-探针组时对每种稀释液进行扩增。PCR 扩增后, 从一重扩增和多重扩增样品中产生 GAPDH 标准曲线和作为稀释的函数的靶 mRNA 信号。如果从多重扩增样品产生的 GAPDH 和靶信号的斜率和相关系数都在从一重扩增样品产生的其相应值的 10%范围内, 则认为对该靶特异的引物-探针组是可以多重扩增的。其它 PCR 方法在本领域中也是已知的。

PCR 试剂从 Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA)获得。通过将 20 μ L PCR 混合液(2.5 $\times$ 不含 $MgCl_2$ 的 PCR 缓冲液、6.6 mM $MgCl_2$ 、375 μ M 每种 dATP、dCTP、dGTP 和 dGTP、375 nM 每种正向引物和反向引物、

125 nM 探针、4 单位 RNA 酶抑制剂、1.25 单位 PLATINUM[®] Taq、5 单位 MuLV 逆转录酶和 2.5×ROX 染料)加入包含 30 μL 总 RNA 溶液(20-200 ng)的 96 孔板进行 RT-PCR 反应。通过在 48℃ 孵育 30 分钟进行 RT 反应。在 95℃ 孵育 10 分钟活化 PLATINUM[®] Taq 后, 进行 40 轮两步法 PCR 程序: 95℃ 15 秒(变性), 随后 60℃ 1.5 分钟(退火/延伸)。

利用 GAPDH (其表达恒定的基因) 的表达水平或者通过使用 RiboGreen[™] (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)定量总 RNA 对通过实时 RT-PCR 获得的基因靶数量进行标准化。通过实时 RT-PCR、通过与靶标同时、多重扩增或独立运行, 定量 GAPDH 表达。使用 RiboGreen[™] RNA 定量试剂(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)定量总 RNA。在 Jones, L.J. 等, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374) 中教授了通过 RiboGreen[™] 进行 RNA 定量的方法。

在该测定中, 将 170 μL RiboGreen[™] 工作试剂(用 10mM Tris-HCl、1 mM EDTA, pH 7.5 以 1:350 稀释 RiboGreen[™] 试剂)用移液器加入包含 30 μL 纯化细胞 RNA 的 96 孔板中。在 CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) 中以 485nm 激发光和 530nm 发射光读取板。

利用已公布的序列信息(GenBank 登录号 M15353.1, 文中引用为 SEQ ID NO: 4), 将针对人 eIF4E 的探针和引物设计成能够人 eIF4E 序列杂交。对于人 eIF4E, PCR 引物为:

正向引物: TGGCGACTGTCTGAACCG (SEQ ID NO:5)

反向引物: AGATTCCGTTTTCTCCTCTTCTGTAG (SEQ ID NO:6)

并且 PCR 探针为:

FAM-AAACCACCCCTACTCCTAATCCCCCG-TAMRA(SEQ ID NO:7), 其中 FAM 是荧光染料而 TAMRA 是猝灭染料。对于人 GAPDH, PCR 引物为:

正向引物: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC(SEQ ID NO:8)

反向引物: GAAGATGGTGATGGGATTTC (SEQ ID NO:9)

并且 PCR 探针为: 5' JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC- TAMRA 3' (SEQ ID NO:10), 其中 JOE 是荧光报告染料而 TAMRA 是猝灭染料。

利用已公布的序列信息(GenBank 登录号 NM_007917.1, 文中引用为 SEQ ID NO: 11), 将针对小鼠 eIF4E 的探针和引物设计成能够与小鼠 eIF4E 序列杂交。对于小鼠 eIF4E, PCR 引物为:

正向引物: AGGACGGTGGCTGATCACA (SEQ ID NO:12)

反向引物: TCTCTAGCCAGAAGCGATCGA (SEQ ID NO:13)

并且 PCR 探针为:

FAM-TGAACAAGCAGCAGAGACGGAGTGA-TAMRA (SEQ ID NO:14), 其中 FAM 是荧光报告染料而 TAMRA 是猝灭染料。对于小鼠 GAPDH, PCR 引物为:

正向引物: GGCAAATTCAACGGCACAGT (SEQ ID NO:15)

反向引物: GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT (SEQ ID NO:16)

并且 PCR 探针为: 5' JOE-AAGGCCGAGAATGGGAAGCTTGTCATC-TAMRA 3' (SEQ ID NO:17), 其中 JOE 是荧光报告染料而 TAMRA 是猝灭染料。

实施例 14: eIF4E mRNA 水平的 Northern 印迹分析

反义处理 18 小时后,用冷的 PBS 洗涤单层细胞两次并将细胞裂解于 1 mL RNazol™ (TEL-TEST “B” Inc., Friendswood, TX)。按照制造商推荐的步骤制备总 RNA。使用 MOPS 缓冲系统(AMRESCO, Inc. Solon, OH)通过电泳在包含 1.1% 甲醛的 1.2% 琼脂糖凝胶中分离 20μg 总 RNA。使用 Northern/Southern 转移缓冲系统(TEL-TEST “B” Inc., Friendswood, TX)通过毛细管转移过夜将 RNA 从凝胶转移至 HYBOND™-N+ 尼龙膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)。通过 UV 显影证实 RNA 的转移。使用 STRATALINKER™ UV 交联仪 2400 (Stratagene, Inc, La Jolla, CA)通过 UV 交联固定膜, 然后利用 QUICKHYB™ 杂交溶液 (Stratagene, La Jolla, CA)使用制造商推荐的严格条件进行探测。

为了检测人 eIF4E, 使用正向引物 TGGCGACTGTCTGAACCG (SEQ ID NO:5)和反向引物 AGATTCCGTTTTCTCCTCTTCTGTAG (SEQ ID NO:6)通过 PCR 制备了人 eIF4E 特异的探针。为了将上样量和转移效率中的变化标准化, 将膜洗掉探针并探测人甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶(GAPDH) RNA (Clontech, Palo Alto, CA)。

为了检测小鼠 eIF4E, 使用正向引物 AGGACGGTGGCTGATCACA (SEQ ID NO:12)和反向引物 TCTCTAGCCAGAAGCGATCGA (SEQ ID NO:13)通过 PCR 制备了小鼠 eIF4E 特异的探针。为了将上样量和转移效率中的变化标准化, 将膜洗掉探针并探测小鼠甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶 (GAPDH) RNA(Clontech, Palo Alto, CA)。

使用 PHOSPHORIMAGER™ 和 IMAGEQUANT™ 软件 V3.3 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)观察并定量杂交膜。将数据对未处理对照中 GAPDH 水平进行标准化。

实施例 15: 通过具有 2'-MOE 翼和脱氧缺刻的嵌合体硫代磷酸酯寡核苷酸反义抑制人 eIF4E 表达

根据本发明, 利用已公布的序列(GenBank 登录号 M15353.1, 文中引用为 SEQ ID NO:4)将一系列反义化合物设计成靶向人 eIF4E RNA 的不同区域。化合物显示于表 1。“靶位点”表示化合物与其结合的特定人 eIF4E 靶序列的第一个(最 5')核苷酸编号。表 1 中的全部化合物为 20 个核苷酸长度的嵌合体寡核苷酸 (“gapmer”), 由包含 10 个 2'-脱氧核苷酸的中央“缺刻”区域组成, 其通过 5 个核苷酸的“翼”搭在两侧(5'和 3'方向)。翼由 2'-甲氧乙基 (2'-MOE) 核苷酸组成。在整个寡核苷酸中核苷间(主链)键为硫代磷酸酯键 (P=S)。全部胞苷残基为 5-甲基胞苷。

利用已公布的序列(GenBank 登录号 NM_007917.1, 文中引用为 SEQ ID NO:11)将第二系列反义化合物设计成靶向小鼠 eIF4E RNA 的不同区域。化合物显示于表 1。“靶位点”表示化合物与其结合的特定人 eIF4E 靶核酸的第一个(最 5')核苷酸编号。表 1 中的全部化合物为 20 个核苷酸

长度的嵌合体寡核苷酸 (“gapmer”), 由包含 10 个 2'-脱氧核苷酸的中央“缺刻”区域组成, 其通过 5 个核苷酸的“翼”搭在两侧 (5'和 3'方向)。翼由 2'-甲氧乙基 (2'-MOE) 核苷酸组成。在整个寡核苷酸中核苷间 (主链) 键为硫代磷酸酯键 (P=S)。全部胞苷残基为 5-甲基胞苷。

由于表 1 中的化合物与人和小鼠的 eIF4E 序列都互补, 通过文中其它实施例中所描述的定量实时 PCR 分析了这些化合物对人 eIF4E mRNA 水平的影响。数据为来自三次实验的平均值, 其中 A549 细胞用本发明反义寡核苷酸进行处理。每个数据点的阳性对照通过序列 ID 号标在表中。如果存在, “N.D.” 表示“无数据”。

表 1

具有 2'-MOE 翼和脱氧缺刻的嵌合体硫代磷酸酯
对人 eIF4E mRNA 水平的抑制作用

ISIS #	区域	靶 SEQ ID NO	靶位点	序列	%抑制	SEQ ID NO	对照 SEQ ID NO
183728	3'UTR	4	950	aatggtaattctactgaact	42	18	1
183729	3'UTR	4	1191	atattatcaagtagggaaac	0	19	1
183730	编码	4	513	tttcacattcagtagtccat	73	20	1
183731	编码	4	600	cggtgggactgataaccaac	84	21	1
183732	3'UTR	4	1001	atgccaagtgttttctgac	68	22	1
183733	编码区	4	480	caccttttagctctaacatta	81	23	1
183734	编码区	4	643	aacctatttttagtggtgga	76	24	1
183735	3'UTR	4	1156	tagcagccatcagcaagagt	76	25	1
183736	3'UTR	4	1165	attaaaatctagcagccatc	56	26	1
183737	编码区	4	584	aatcactatctttggaggaa	18	27	1
183738	3'UTR	4	1583	tcttaatatgaatgggactg	75	28	1
183739	终止密码子	4	665	gaagggtgtcttcttaaaaa	78	29	1
183740	编码区	4	604	tctgcgtgggactgataacc	81	30	1
183741	3'UTR	4	703	tctcgattgcttgacgcagt	83	31	1
183742	编码区	4	527	aacagcttctctgttttcac	51	32	1
183743	3'UTR	4	1162	aaaatctagcagccatcagc	75	33	1
183744	编码区	4	112	ggatgtttaatatagtgttc	61	34	1
183745	3'UTR	4	1587	actgtcttaatatgaatggg	45	35	1
183746	3'UTR	4	1800	tcaattttattaaaaattgta	7	36	1
183747	3'UTR	4	1370	ataaattttagcaaaagctt	53	37	1
183748	3'UTR	4	1092	aaaactgtatgcatacataat	54	38	1

183749	编码区	4	387	aaaagcgatcgaggtaactt	62	39	1
183750	3'UTR	4	1285	tgatcatattcttgatcctt	84	40	1
183751	3'UTR	4	1432	tataatccacaattatgttt	41	41	1
183752	3'UTR	4	1055	tatgcttctgcataaaatgg	55	42	1
183753	编码区	4	631	gtgggtggagccgctcttagt	68	43	1
183754	3'UTR	4	1094	agaaaaactgtatgcata	67	44	1
183755	3'UTR	4	1627	aagacaattcactgtacaca	41	45	1
183756	起始密码子	4	12	cgacagtcgccatcttagat	82	46	1
183757	3'UTR	4	1021	ttttctgttaaagtatagaa	55	47	1
183758	3'UTR	4	1639	ctagttgtctaaaagacaat	17	48	1
183759	编码区	4	435	tgtagtcatcaaaagattct	42	49	1
183760	3'UTR	4	980	attgtggataggtaaaatct	0	50	1
183761	3'UTR	4	1745	tgctgttcacatggaagaca	65	51	1
183762	3'UTR	4	1768	atcaaaactagtgtctcaaac	61	52	1
183763	3'UTR	4	758	aaatttaaatgcagtcact	42	53	1
183764	编码区	4	621	cgtcttagtagctgtgtct	66	54	1
298772	5'帽子/ UTR	4	1	atcttagatcgatctgatcg	15	55	1
298773	起始密码子	4	10	acagtcgccatcttagatcg	73	56	1
298774	编码区	4	88	ttagcaacctcctgattaga	82	57	1
298775	编码区	4	94	tctgggttagcaacctcctg	76	58	1
298776	编码区	4	168	gccaaagtttgcctttatca	88	59	1
298777	编码区	4	176	gtttgcttgccaagtttgc	72	60	1
298778	编码区	4	211	tcttcaacagtatcaaaactt	40	61	1
298779	编码区	4	216	aaaagttctcaacagtatca	31	62	1
298780	编码区	4	223	agagcccaaaaagttctaac	55	63	1
298781	编码区	4	244	gacaactggataggttgta	83	64	1
298782	编码区	4	249	tactagacaactggataggg	88	65	1
298783	编码区	4	254	taaatctactagacaactgga	84	66	1
298784	编码区	4	259	ggcattaaaattactagacaa	71	67	1
298785	编码区	4	264	agccaggcattaaattacta	33	68	1
298786	编码区	4	269	gtcacagccaggcattaaat	68	69	1
298787	编码区	4	274	gagtagtcacagccaggcat	74	70	1
298788	编码区	4	279	aaagtgagtagtcacagcca	64	71	1
298789	编码区	4	286	tcttataaaaagtgagtagtc	58	72	1
298790	编码区	4	310	tcttccacataggetcaat	70	73	1
298791	编码区	4	315	tctcatcttccacataggc	73	74	1
298792	编码区	4	320	gtttttctcatcttccacaca	79	75	1
298793	编码区	4	424	aaagattctccaataaggca	70	76	1
298794	编码区	4	445	acatcatcactgtatgcate	87	77	1
298795	编码区	4	472	gctctaacattaacaacage	84	78	1
298796	编码区	4	486	tcttatcacctttagctcta	84	79	1
298797	编码区	4	491	tgctatcttatcacctttag	91	80	1
298798	编码区	4	499	gtccatattgctatcttate	82	81	1

298799	编码区	4	505	tcagtagtccatattgctat	78	82	1
298801	编码区	4	553	tccttgataacctccctat	57	83	1
298802	编码区	4	558	accttcccttgataacctc	59	84	1
298803	编码区	4	563	tcctaaccttccctgtata	71	85	1
298804	编码区	4	571	ggagggaagtcctaaccttc	86	86	1
298805	编码区	4	592	tgataaccaatcactatctt	66	87	1
298806	编码区	4	613	gtagctgtgtctgcgtggga	56	88	1
298807	编码区	4	634	ttagtggtggagccgctctt	74	89	1
298808	编码区	4	649	acaacaaacctatttttagt	43	90	1
298809	终止密码子	4	659	gtcttcttaacaacaaacc	52	91	1
298810	终止密码子	4	672	atactcagaagggtgtctct	73	92	1
298811	3'UTR	4	677	tgagaatactcagaagggtgt	70	93	1
298812	3'UTR	4	713	agctcccaaattctcgattgc	84	94	1
298813	3'UTR	4	724	ggctttgggtcagctcccaa	79	95	1
298814	3'UTR	4	800	atgagacttctcttatctct	78	96	1
298815	3'UTR	4	805	ggcgaatgagacttctctta	88	97	1
298816	3'UTR	4	812	agacaaaggcgaatgagact	78	98	1
298817	3'UTR	4	817	gtacaagacaaaggcgaatg	78	99	1
298818	3'UTR	4	876	tctttgattgggtagtgga	55	100	1
298819	3'UTR	4	883	ctgtaattctttgattggga	67	101	1
298820	3'UTR	4	1157	ctagcagccatcagaagag	84	102	1
298821	3'UTR	4	1209	ctgaaatcagaatcactaat	67	103	1
298822	3'UTR	4	1272	gatccttcaccaatgttaca	77	104	1
298823	3'UTR	4	1277	tcctggatecttcaccaatg	88	105	1
298824	3'UTR	4	1356	aagctttgtagttacaaaaa	35	106	1
298825	3'UTR	4	1361	tagcaaagctttgtagttac	72	107	1
298826	3'UTR	4	1376	aaatgcataaattttagca	37	108	1
298827	3'UTR	4	1381	gaatgaaatgcataaatttg	36	109	1
298828	3'UTR	4	1386	gatttgaaatgaaatgcataa	52	110	1
298829	3'UTR	4	1391	tcactgattgaaatgaaatg	64	111	1
298830	3'UTR	4	1397	catagatcactgattgaaat	61	112	1
298831	3'UTR	4	1466	ctagttaggaatgtaattat	49	113	1
298832	3'UTR	4	1471	taattctagttaggaaatgta	55	114	1
298833	3'UTR	4	1480	cagacatactaatctagtt	74	115	1
298834	3'UTR	4	1564	gctttctacttgagccatt	85	116	1
298835	3'UTR	4	1593	ttgtacactgtcttaatatg	60	117	1
298836	3'UTR	4	1598	cagttttgtacactgtctta	85	118	1
298837	3'UTR	4	1603	atttacagttttgtacactg	74	119	1
298838	3'UTR	4	1614	gtacacattttatttacagt	76	120	1
298839	3'UTR	4	1649	aaggacaaatctagttgtct	46	121	1
298800	编码区	11	514	tttcacactcagtagtccat	34	122	1

如表 1 中所示, SEQ ID NO 20、21、22、23、24、25、26、28、29、

30、31、32、33、34、37、38、39、40、42、43、44、46、47、51、52、54、56、57、58、59、60、63、64、65、66、67、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、107、110、111、112、114、115、116、117、118、119、120 和 122 在该测定中证明对人 eIF4E 表达具有至少 50%的抑制作用并因此是适宜的。SEQ ID NO 80、65、40、97 和 105 也是适宜的。

与这些适宜序列所互补的靶区域文中称为“适宜靶区段”并因此适用于通过本发明化合物进行靶向。这些适宜靶区段显示于表 3。这些序列显示包含胸腺嘧啶(T)，但是本领域的技术人员会意识到在 RNA 序列中通常由尿嘧啶(U)代替胸腺嘧啶(T)。序列代表了表 1 中所示的适宜反义化合物的反向互补体。“靶位点”表示寡核苷酸与其结合的特定靶核酸上的第一个(最 5')核苷酸的编号。在表 3 中也显示了在其中发现了每一适宜靶片段的物种。

实施例 16：具有 2'-MOE 翼和脱氧缺刻的嵌合体硫代磷酸酯寡核苷酸对小鼠 eIF4E 表达的反义抑制作用。

根据本发明，如文中其它实施例所描述通过定量实时 PCR 进一步分析了与人和小鼠 eIF4E(例如小鼠 eIF4E GenBank 登录号 NM_007917.1，文中引用为 SEQ ID NO:11)都互补的表 1 中的化合物对小鼠 eIF4E mRNA 水平的影响。在表 2 中，“靶位点”表示化合物与其结合的特定小鼠 eIF4E 靶核酸上第一个(最 5')核苷酸的编号。显示于表 2 的数据是来自三次实验的平均值，其中用本发明反义寡核苷酸对 b.END 细胞进行处理。通过序列 ID 号在表中标出每个数据点的阳性对照。如果存在，“N.D.”表示“无

数据”。

表 2

具有 2'-MOE 翼和脱氧缺刻的嵌合体硫代磷酸酯寡核苷酸对小鼠 eIF4E 表达的抑制作用

ISIS #	区域	靶 SEQ ID NO	靶位点	序列	% 抑 制	SEQ ID NO	对照 SEQ ID NO
183731	编码区	11	601	cgtgggactgataaccaatc	83	21	1
183733	编码区	11	481	cacetttagctctaacatta	90	23	1
183734	编码区	11	644	aaectatttttagtggtgga	87	24	1
183739	终止密码子	11	666	gaagggtgtcttcttaacaa	81	29	1
183740	编码区	11	605	tctgcgtgggactgataacc	87	30	1
183746	3'UTR	11	1764	tcaatttattaaaaattgta	0	36	1
183747	3'UTR	11	1351	ataaattttagcaaaagctt	62	37	1
183750	3'UTR	11	1267	tgctatattcttgatcctt	90	40	1
183755	3'UTR	11	1604	aagacaattcactgtacaca	73	45	1
183758	3'UTR	11	1616	ctagttgtctaaaagacaat	43	48	1
298772	起始密码子	11	2	atcttagatcgatctgatcg	47	55	1
298773	起始密码子	11	11	acagtcgccatcttagatcg	67	56	1
298774	编码区	11	89	ttageaacctcctgattaga	83	57	1
298775	编码区	11	95	tctgggttagcaacctcctg	83	58	1
298776	编码区	11	169	gccaaagtttgcctttatca	76	59	1
298777	编码区	11	177	gtttgcttgccaaagtttgc	77	60	1
298778	编码区	11	212	tcttcaacagtatcaaaett	59	61	1
298779	编码区	11	217	aaaagtttcaacagtatca	69	62	1
298780	编码区	11	224	agagcccaaaagtcttcaac	55	63	1
298781	编码区	11	245	gacaactggatatggttgta	82	64	1
298782	编码区	11	250	tactagacaactggatatgg	85	65	1
298783	编码区	11	255	taaattactagacaactgga	78	66	1
298784	编码区	11	260	ggcattaaattactagacaa	81	67	1
298785	编码区	11	265	agccaggcattaaattacta	87	68	1
298786	编码区	11	270	gtcacagccaggcattaaat	87	69	1
298787	编码区	11	275	gagtagtcacagccaggcat	91	70	1
298788	编码区	11	280	aaagtgagtagtcacagcca	91	71	1
298789	编码区	11	287	tccttaaaaagtgagtagtc	83	72	1
298790	编码区	11	311	tcttccacataggetcaat	71	73	1
298791	编码区	11	316	tctcatcttccacatagge	90	74	1
298792	编码区	11	321	gtttttctcatcttccacaa	83	75	1
298793	编码区	11	425	aaagattctcaataaggca	87	76	1
298794	编码区	11	446	acatcatcactgtagtcate	86	77	1
298795	编码区	11	473	gctetaacattaaacacage	80	78	1

298796	编码区	11	487	tcttateacctttagctcta	90	79	1
298797	编码区	11	492	tgctatcttataacctttag	87	80	1
298798	编码区	11	500	gtccatattgetatcttate	89	81	1
298799	编码区	11	506	tcagtagtccatattgetat	87	82	1
298801	编码区	11	554	tcttgtataacctccctat	80	83	1
298802	编码区	11	559	accttctctgtataacctc	86	84	1
298803	编码区	11	564	tcttaaccttctctgtata	83	85	1
298804	编码区	11	572	ggagggaagtccataaccttc	88	86	1
298805	编码区	11	593	tgataaccaatactatctt	77	87	1
298806	编码区	11	614	gtagctgtgtctgcgtggga	87	88	1
298807	编码区	11	635	ttagtgggtggagcgcctt	77	89	1
298808	编码区	11	650	acaacaaacctatctttagt	47	90	1
298809	终止密码子	11	660	gtcttcttaaacaacaaacc	64	91	1
298810	3'UTR	11	673	atactcagaaggtgtcttct	70	92	1
298811	3'UTR	11	678	tgagaatactcagaaggtgt	78	93	1
298812	3'UTR	11	713	agtcaccaaatctcgattgc	74	94	1
298813	3'UTR	11	724	ggcttgggttcagctcccaa	92	95	1
298814	3'UTR	11	796	atgagaactctcttatact	81	96	1
298815	3'UTR	11	801	ggcgaaatgagactctctta	93	97	1
298816	3'UTR	11	808	agacaaaggcgaaatgagact	86	98	1
298817	3'UTR	11	813	gtacaagacaaaggcgaaatg	85	99	1
298818	3'UTR	11	878	tctttgattgggatagtgga	86	100	1
298819	3'UTR	11	885	ctgtaattctttgattggga	88	101	1
298820	3'UTR	11	1149	ctagcagccatcagcaagag	87	102	1
298821	3'UTR	11	1200	ctgaaatcagaatcactaat	66	103	1
298822	3'UTR	11	1254	gaccttcaccaatgttaca	90	104	1
298823	3'UTR	11	1259	tctggaccttcaccaatg	95	105	1
298824	3'UTR	11	1337	aagctttgtagttacaaaaa	72	106	1
298825	3'UTR	11	1342	tagcaaaagctttgtagttac	81	107	1
298826	3'UTR	11	1357	aaatgcataaattttagca	80	108	1
298827	3'UTR	11	1362	gaatgaaatgcataaatttg	43	109	1
298828	3'UTR	11	1367	gatttgaatgaaatgcataa	49	110	1
298829	3'UTR	11	1372	tcactgattgaaatgaaatg	70	111	1
298830	3'UTR	11	1378	catagatcactgatttgaat	76	112	1
298831	3'UTR	11	1445	ctagttaggaatgtaattat	65	113	1
298832	3'UTR	11	1450	taattctagttaggaatgta	59	114	1
298833	3'UTR	11	1459	cagacatactaattctagtt	82	115	1
298834	3'UTR	11	1541	gcttttctacttgagccatt	87	116	1
298835	3'UTR	11	1570	ttgtacactgtcttaatatg	72	117	1
298836	3'UTR	11	1575	cagttttgtacactgtctta	83	118	1
298837	3'UTR	11	1580	atttacagttttgtacactg	67	119	1
298838	3'UTR	11	1591	gtacacattttatttacagt	79	120	1
298839	3'UTR	11	1626	aaggacaaatctagttgtct	56	121	1
298800	编码区	11	514	ttcacactcagtagtccat	84	122	1

如表 2 中所示, SEQ ID NO 21、23、24、29、30、40、45、57、58、59、60、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、104、105、106、107、108、111、112、115、116、117、118、120 和 122 在该实验中证明对小鼠 eIF4E 表达具有至少 70% 的抑制作用并因此是适宜的。SEQ ID NO 105、40、97 和 80 也是适宜的。

与这些适宜序列所互补的靶区域在文中称为“适宜靶区段”并因此适用于通过本发明化合物进行靶向。这些适宜靶区段显示于表 3。这些序列显示包含胸腺嘧啶(T), 但是本领域的技术人员会意识到在 RNA 序列中通常由尿嘧啶(U)代替胸腺嘧啶(T)。序列代表了显示于表 1 和 2 中所示适宜反义化合物的反向互补体。“靶位点”表示寡核苷酸与其结合的特定靶核酸上第一个(最 5')核苷酸的编号。在表 3 中也显示了在其中发现了每一适宜靶片段的物种。在表 3 中也显示了在其中发现了每一适宜靶片段的物种。

表 3

在 eIF4E 中所鉴定的适宜靶区段的序列和位置

位点 ID	靶 SEQ ID NO	靶位点	序列	SEQ ID 的反向互补体	在该物种中具有活性	SEQ ID NO
99068	4	513	atggactactgaatgtgaaa	20	人类	123
99069	4	600	gattgggttatcagtcaccacg	21	人类	124
99070	4	1001	gtcagaaaacaacttggeat	22	人类	125
99071	4	480	taatgttagagctaaagggtg	23	人类	126
99072	4	643	tccaccactaaaaatagggtt	24	人类	127
99073	4	1156	actettgetgatggctgcta	25	人类	128
99074	4	1165	gatggctgctagattttaat	26	人类	129
99076	4	1583	cagtcaccattcatattaaga	28	人类	130
99077	4	665	ttgtttaagaagacaccttc	29	人类	131
99078	4	604	ggttatcagtcaccacgcaga	30	人类	132
99079	4	703	actgcgtcaagcaatcgaga	31	人类	133
99080	4	527	gtgaaaacagagaagctgtt	32	人类	134

99081	4	1162	getgatggetgtagatttt	33	人类	135
99082	4	112	gaacactatattaaacatcc	34	人类	136
99085	4	1370	aagctttgetacaaatttat	37	人类	137
99086	4	1092	attatgatgcatacagtttt	38	人类	138
99087	4	387	aagtgaacctcgatcgctttt	39	人类	139
99088	4	1285	aaggatccagggaatatgaca	40	人类	140
99090	4	1055	ccattttatgcagaagcata	42	人类	141
99091	4	631	actaagageggctccaccac	43	人类	142
99092	4	1094	tatgatgcatacagttttct	44	人类	143
99094	4	12	atctaagatggcgactgtcg	46	人类	144
99095	4	1021	ttctatactttacaggaaaa	47	人类	145
99099	4	1745	tgtcttccatgtgaacagca	51	人类	146
99100	4	1768	gtttggagcactagtttgat	52	人类	147
99102	4	621	agacacagctactaagagcg	54	人类	148
214540	4	10	cgatctaagatggcgactgt	56	人类	149
214541	4	88	tctaatacaggagggttgctaa	57	人类	150
214542	4	94	caggagggttgctaaccaga	58	人类	151
214543	4	168	tgataaaagcaaaacttggc	59	人类	152
214544	4	176	gcaaaaacttggcaagcaaac	60	人类	153
214547	4	223	gttgaagacttttgggctct	63	人类	154
214548	4	244	tacaaccataatccagttgtc	64	人类	155
214549	4	249	ccataatccagttgtctagta	65	人类	156
214550	4	254	tccagttgtctagtaattta	66	人类	157
214551	4	259	ttgtctagtaatttaatgcc	67	人类	158
214553	4	269	atttaatgcctggctgtgac	69	人类	159
214554	4	274	atgcctggctgtgactactc	70	人类	160
214555	4	279	tggtgtgactactcacttt	71	人类	161
214556	4	286	gactactcaacttttaagga	72	人类	162
214557	4	310	attgagcctatgtgggaaga	73	人类	163
214558	4	315	gcctatgtgggaagatgaga	74	人类	164
214559	4	320	tggtgggaagatgagaaaaac	75	人类	165
214560	4	424	tgccctattggagaatcttt	76	人类	166
214561	4	445	gatgactacagtgtatgtgt	77	人类	167
214562	4	472	gctgttgttaatgttagage	78	人类	168
214563	4	486	tagagctaaagggtgataaga	79	人类	169
214564	4	491	ctaaagggtgataagatagca	80	人类	170
214565	4	499	gataagatagcaatatggac	81	人类	171
214566	4	505	atagcaatatggactactga	82	人类	172
214567	4	553	atagggagggtatacaagga	83	人类	173
214568	4	558	gagggtatacaaggaaaggt	84	人类	174
214569	4	563	tatacaaggaaaggtagga	85	人类	175
214570	4	571	gaaagggttaggacttctcc	86	人类	176
214571	4	592	aagatagtgttggttatca	87	人类	177
214572	4	613	tcccacgcagacacagctac	88	人类	178

214573	4	634	aagagcggtccaccactaa	89	人类	179
214575	4	659	ggttgtgtttaagaagac	91	人类	180
214576	4	672	agaagacacctctgagtat	92	人类	181
214577	4	677	acacctctgagtattctca	93	人类	182
214578	4	713	gcaatcgagatttgggagct	94	人类	183
214579	4	724	ttgggagctgaaccaaagcc	95	人类	184
214580	4	800	agatataagagaagtctcat	96	人类	185
214581	4	805	taagagaagtctcatcgcc	97	人类	186
214582	4	812	agtctcatcgctttgtct	98	人类	187
214583	4	817	catcgctttgtctgtac	99	人类	188
214584	4	876	tccactatcccaatcaaaga	100	人类	189
214585	4	883	tcccaatcaaagaattacag	101	人类	190
214586	4	1157	ctcttgctgatggctgtag	102	人类	191
214587	4	1209	attagtgtattctgatttcag	103	人类	192
214588	4	1272	tgtaacattggtgaaggatc	104	人类	193
214589	4	1277	cattggtgaaggatccagga	105	人类	194
214591	4	1361	gtaactacaaagctttgcta	107	人类	195
214594	4	1386	ttatgcatttcattcaaatc	110	人类	196
214595	4	1391	catttcattcaaatcagtga	111	人类	197
214596	4	1397	attcaaatcagtgtatctatg	112	人类	198
214598	4	1471	tacattcctaactagaatta	114	人类	199
214599	4	1480	aactagaattagtgtcttg	115	人类	200
214600	4	1564	aatggtcaagtagaaaagc	116	人类	201
214601	4	1593	catattaagacagtgtacaa	117	人类	202
214602	4	1598	taagacagtgtacaaaactg	118	人类	203
214603	4	1603	cagtgtacaaaactgtaaat	119	人类	204
214604	4	1614	actgtaaataaaatgtgtac	120	人类	205
214433	11	514	atggactactgagtgtgaaa	122	小家鼠	206

由于通过实验发现这些“适宜靶片段”对于本发明反义化合物的杂交是开放的并且是可接近的，本领域技术人员使用常规实验就会识别或者能够确定包含其它化合物的本发明其它实施方案，其中所述其它化合物特异结合这些适宜靶片段并且因此抑制 eIF4E 的表达。

根据本发明，反义化合物包括反义寡核苷酸、核酶、外部引导序列(EGS)寡核苷酸、siRNA 化合物、单链或双链 RNA 干扰(RNAi) 化合物以及其它与至少部分靶核酸杂交并调节其功能的寡聚化合物。

实施例 17: eIF4E 蛋白质水平的 Western 印迹分析

使用标准方法可以进行 Western 印迹分析（免疫印迹分析）。寡核苷酸处理后 16-20 小时收获细胞，用 PBS 洗涤一次，重悬于 Laemmli 缓冲液 (100 μ l/孔)，煮沸 5 分钟并上样于 16% SDS-PAGE 凝胶上。将凝胶以 150 V 运行 1.5 小时，并将凝胶转移至膜用于 Western 印迹。使用适宜的抗 eIF4E 的一抗和具有放射性标记或荧光标记的抗一抗的二抗。使用 PHOSPHORIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) 观察条带。

实施例 18: eIF4E 表达的反义抑制对细胞增殖的影响

使用 3.25、7.5、15 和 30 μ M 寡核苷酸将 1×10^6 细胞/100 μ l HeLa 细胞 (美国典型培养物保藏中心, Manassas VA) 进行电穿孔。所使用的 eIF4E 反义抑制剂 ISIS 为 ISIS 183750 (SEQ ID NO: 40) 和 ISIS 298815 (SEQ ID NO: 97)。所使用的对照寡核苷酸是 ISIS 29848 (NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN; SEQ ID NO: 207, 其中 N 是 A、C、G 和 T 的混合物) 和无关对照寡核苷酸 ISIS 129688 (TTCGCGGCTGGACGATTCAG; SEQ ID NO: 208)。也使用了 mock 转染的对照。使用 CyQUANT 细胞增殖测定试剂盒 (Molecular Probes, Inc., Eugene OR) 测定用 15 μ M 寡核苷酸处理细胞的细胞增殖。与 mock 处理对照相比，人 eIF4E 反义寡核苷酸抑制剂 ISIS 183750 和 ISIS 298815 对 72 小时后的细胞增殖分别抑制 31% 和 36%。用对照寡核苷酸处理的细胞以与 mock 处理对照细胞至少同样快的速度增殖。

在该实验中，还测定了 eIF4A 靶 mRNA 降低。ISIS 183750 和 ISIS 298815 的 IC₅₀ 均小于 3 μ M (eIF4E mRNA 水平被 50% 抑制所需要的浓度) 并且在 7.5 μ M 或更高的寡核苷酸浓度时表现为 70-80% 的抑制。对照寡核苷酸 29848 和 129688 的最大抑制为 20% (7.5 μ M 129688)，但在其它浓度通常为大约 10% 的抑制。

还在 U87-MG 人类成胶质细胞瘤细胞中测定了 eIF4E 反义抑制对细胞增殖的影响。用 7.5 μ M 的 ISIS 183750 (SEQ ID NO: 40) 和 ISIS 298815 (SEQ ID NO: 97) 和无关 (对照) 寡核苷酸 ISIS 129699

(GGATAGAACGCGAAAGCTTG; SEQ ID NO:209)对 1×10^6 细胞/100 μ l 的 U87-MG 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)进行电穿孔。在 96 小时后,与对照(ISIS 129699)相比 eIF4E 的两个反义抑制剂 ISIS 183750 和 ISIS 298815 分别使 U87-MG 细胞增殖降低大约 12%和 10%。在处理开始 48 小时后测定 EIF4E 靶 mRNA 并且与无关对照相比 ISIS 183750 和 ISIS 298815 降低 EIF4E 靶 mRNA 分别为大约 31%和 36%。对照寡核苷酸 ISIS 129699 不能降低 eIF4E mRNA 水平并且实际上 eIF4E mRNA 水平稍微升高。

实施例 19: eIF4E 表达的反义抑制对细胞周期的影响

检查了 eIF4E 反义化合物对细胞周期的影响。用 30 μ M 反义寡核苷酸 (ISIS 183750 或 299815)或对照寡核苷酸 (ISIS 29848 或 ISIS 129688)对 HeLa 细胞进行电穿孔,或者 HeLa 细胞用 mock 转染。通过流式细胞术使用荧光 DNA 嵌入剂碘化丙锭(PI)测量 48 小时时的 DNA 含量。结果(重复两次)显示于表 4。

表 4

反义处理后的细胞周期谱

	每一期细胞的大约百分数:				
处理	SubG1	G1	S	G2M	非整倍体
mock	3.0	50.3	30.7	19.0	7.4
29848	2.4	45.8	33.0	21.2	8.2
129688	2.5	44.6	34.3	21.1	10.2
183750	8.3	46.1	32.9	21.0	12.7
298815	5.0	36.8	35.6	27.6	15.2

从表 4 所示的结果可以看出使用两种 eIF4E 反义化合物(ISIS 183750 或 ISIS 298815)处理增加 SubG1 期的细胞部分,SubG1 期通常预示着凋亡。在 ISIS 298815 处理之后 G2M 期细胞部分也增加了。

实施例 20: eIF4E 表达的反义抑制对血管发生/管形成的影响

通过多种能够促进内皮细胞彼此相互作用和内皮细胞与细胞外基质分子相互作用的因子刺激血管发生,从而导致毛细管的形成。通过由内皮细胞形成管样结构能够在组织培养中重现该过程。体外管形成的丧失与体内血管发生的抑制相关联(Carmeliet 等, *Nature*, 2000, 407, 249-257 和 Zhang 等, *Cancer Research*, 2002, 62, 2034-42), 这支持体外管形成可以用作血管发生的终末点。

使用体外血管发生分析试剂盒(Chemicon International, Temecula, CA)或者生长因子降低的 Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA)进行管形成测定。将 HUVEC 以 4000 细胞/孔铺于 96 孔板。一天后,按照标准公布程序(Monia 等, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268(19), 14514-22)使用溶于 lipofectin (Gibco, Grand Island, NY)中的 75nM 寡核苷酸将反义和对照寡核苷酸转染入细胞。转染后大约 50 小时,将细胞转移至用 ECMatrix™ (Chemicon International)或生长因子缺乏的 Matrigel 包被的 96 孔板中。在这些条件下,未处理 HUVEC 形成管样结构。于 37℃ 孵育过夜后,通过光学显微镜检查处理和未处理细胞。根据管形成程度将单个细胞指定为离散值 1-5。值 1 指孔中没有管形成,而值 5 指孔中所有细胞正在形成广泛的管状网络。

当从指定离散值计算时发现用反义抑制剂 ISIS 183750 和 ISIS 298815 处理的细胞分别具有大约 1.5 和 2.25 的平均管形成值。用随机对照寡核苷酸 ISIS 29848 (NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN; SEQ ID NO:207,其中 N 为 A、C、G 和 T 的混合物)处理的细胞具有大约 4.25 的平均管形成值,并且用 ISIS 334163 (TGTTACAGTCTTGTACCCTT; SEQ ID NO:210)处理的细胞具有大约 4.5 的平均管形成值,其中 ISIS 334163 与 ISIS 183750 具有 6 个碱基错配。因此,eIF4E 反义寡核苷酸特异性抑制 47-67%的管形成。因此,eIF4E 的反义抑制剂能够抑制血管发生。

实施例 21: 在小鼠中抑制 eIF4E 的表达

使用溶于盐水的寡核苷酸以 40 mg/kg 的寡核苷酸浓度腹腔内注射 8 周龄 C57BL6 小鼠，每周注射两次并持续注射三周(总共 6 剂量)。所使用化合物为 eIF4E 反义化合物 ISIS 183750 (SEQ ID NO:40)、ISIS 299815 (SEQ ID NO:97)、ISIS 298797 (SEQ ID NO:80)和 ISIS 298823 (SEQ ID NO:105)。所有反义寡核苷酸都是针对人和小鼠 eIF4E 的物种交叉反义寡核苷酸。ISIS 141923 是无关(对照)寡核苷酸(CCTTCCCTGAAGGTTCTCC; SEQ ID NO:211)。还使用了盐水(介质)对照。与盐水对照相比，ISIS 183750 降低小鼠肝脏 eIF4E mRNA 水平至小于对照的 20% (超过 80%抑制)。ISIS 298815 还降低 eIF4E mRNA 水平至对照的大约 20%。ISIS 298797 处理降低 eIF4E mRNA 水平至对照的大约 30% (70%抑制)并且 ISIS 298823 处理降低 eIF4E mRNA 水平至对照的大约 37%(63%抑制)。相反，使用 ISIS 141923 处理没有降低 eIF4E mRNA 水平并且实际上其增加至盐水对照的大约 140%。

还测量了小鼠肝脏 EIF4E 蛋白质水平。与盐水对照相比，使用 ISIS 183750、ISIS 299815、ISIS 298797 和 ISIS 298823 处理分别使 eIF4E 蛋白质水平降低 77%、47%、50%和 47%；使用对照寡核苷酸 ISIS 141923 处理使 eIF4E 蛋白质水平降低 12%。

使用任何一个 eIF4E 反义化合物处理的小鼠基本上不显现肝脏、脾脏或总体重的变化。肝脏酶水平(AST/ALT)没有显著变化并且肝脏组织学表现为与盐水处理对照小鼠相同。

实施例 22: eIF4E 表达的反义抑制对小鼠中人类肿瘤异种移植物的影响

使用 5×10^6 PC-3 前列腺癌细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)在侧腹部皮下注射雄性裸鼠。当肿瘤达到平均大小 100mm^3 时(植入后大约 3-3.5 周)开始反义处理。在首次剂量通过静脉注射给予小鼠 50 mg/kg 针对 eIF4E 的反义寡核苷酸 ISIS 183750 (SEQ ID NO:40)或对照寡核苷酸 ISIS 141923 (SEQ ID NO:211)，然后在此后的每个星期一、星期三或星期五给予 25 mg/kg。肿瘤植入后第 54 天，使用 ISIS 183750 处理的小

鼠中的肿瘤大小为大约 450 mm^3 ，与使用对照 ISIS 141923 处理的小鼠内肿瘤（大约 930 mm^3 ）相比降低 50%。该降低的水平一直持续到第 57 天研究结束时。

在雌性小鼠中使用 MDA-231 人乳腺癌细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA) 也同样进行异种移植。在该实验中，测试了 ISIS 183750 和 ISIS 298815 并且与盐水对照相比它们使肿瘤细胞生长降低几乎相等，分别降低 55%和 50%。通过 Western 印迹分析（使用来自 Pharmingen, San Diego CA 的抗 eIF4E 抗体)测定了这些 MDA-231 异种移植物中 eIF4E 蛋白质表达，并且发现与用无关对照寡核苷酸 (ISIS 141923, SEQ ID NO:211)处理的小鼠中异种移植物相比，用 ISIS 183750 (SEQ ID NO:40) 处理的小鼠异种移植物中 eIF4E 蛋白质表达降低 45%且用 ISIS 298815 (SEQ ID NO:97) 处理的小鼠异种移植物中降低 39%。

eIF4E 可以在人类序列的丝氨酸残基 209 位进行体内磷酸化。磷酸化形式常常被认为是蛋白质的活性状态，其中磷酸化增加常常与蛋白质合成速率上调关联。使用特异性抗磷酸化(pS^{209}) eIF4E 的抗体(BioSource, Camarillo CA)的 Western 印迹证实用反义化合物 ISIS 183750 和 298815 处理后 eIF4E 磷酸化形式降低，而使用反义对照(ISIS 129699)处理的不降低。

细胞周期蛋白 D1 是 eIF4E 靶蛋白质并且发现在用针对 eIF4E 的反义寡核苷酸处理的 MDA-231 小鼠异种移植物中细胞周期蛋白 D1 蛋白质也降低了。当与使用无关对照寡核苷酸 ISIS 141923 处理的小鼠异种移植物中细胞周期蛋白 D1 相比，使用 ISIS 183750 处理后细胞周期蛋白 D1 降低 40%并且使用 ISIS 298815 处理后细胞周期蛋白 D1 降低几乎 50%。

在第三个相似实施的异种移植物研究中，将 5×10^6 H460 人非小细胞肺癌(NSCLC)细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)在侧腹部皮下注射入雌性裸鼠。一旦肿瘤达到 100 mm^3 的平均大小，开始寡核苷酸静脉给药。反义处理方案为：开始为 50 mg/kg 单一剂量的 ISIS 141923 或 ISIS 183750，接着在之后的每个星期一、星期三和星期五以 25 mg/kg 给药，总

处理时间为 17 天。在研究结束时, ISIS 141923 对照处理组的平均肿瘤体积为大约 2000 mm³ 而 ISIS 183750 处理组为 550 mm³($p < 0.001$)。

实施例 23: 通过短双链 RNA 寡核苷酸对 eIF-4E 的抑制作用 dsRNA 寡核苷酸的设计和合成

人类 eIF-4E 序列 Genbank #M15353 用于查询序列。所选择序列的 G+C 含量范围为 30%-70%。对 eIF-4E 特异的和下面所描述的 dsRNA 序列中的每一个序列在 RNA 寡核苷酸双链体每一条链的 3'末端包含两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸(未显示)。基因特异 siRNA 的合成、双链体形成和纯化由 Dharmacon Research 公司完成。选择和测试了 3 个 eIF-4E siRNA 序列, 其序列显示如下:

eIF4E_1:

在基因序列中的位置:141-159

GC 含量: 53%

5' -CAGAUGGGGCACUCUGGUUU-3' SEQ ID NO:212

3' -GUCUACCCGUGAGACCAAA-5' SEQ ID NO:213

eIF4E_2:

在基因序列中的位置:195-213

GC 含量: 63%

5' -CCUGCGGCUGAUCUCCAAG-3' SEQ ID NO:214

3' -GGACGCCGACUAGAGGUUC-5' SEQ ID NO:215

eIF4E_3:

在基因序列中的位置:1010-1028

GC 含量: 37%

5' -CAACUUGGCAUUUCUAUAC-3' SEQ ID NO:216

3' -GUUGAACCGUAAAGAUUAUG-5' SEQ ID NO:217

在每一条链的 3'末端也包含两个脱氧胸腺嘧啶核苷酸并且与 pGL3 荧光素酶互补的对照 dsRNA 化合物购自 Dharmacon Research 公司并且用于下面的分析。

对照:

5' -CUUACGCUGAGUACUUCGA-3' SEQ ID NO:218

3' -GAAUGCGACUCAUGAAGCU-5' SEQ ID NO:219

细胞培养

LNCaP、PC3、HCT116、MDA-231、MCF-7、T24 和 CWR22RV1 细胞系通过 ATCC 得到并且生长于含有 L-谷氨酰胺和 10% FBS (Hyclone)而不含有酚红(Gibco)的 RPMI 1640 培养基中。

siRNA 向哺乳动物细胞内的转染

在转染前 24 小时, 将哺乳动物细胞以 1×10^5 铺于 24 孔板。使用 Oligofectamine (Invitrogen) 进行瞬时转染。简言之, 用 OptiMEM (Invitrogen) 稀释 5-500 nM 浓度 (终体积) 的各个 dsRNA, 而将独立的 OptiMEM 和 Oligofectamine 的溶液室温孵育 5 分钟。将两个溶液混合, 然后室温孵育 30 分钟。将包含血清的培养基加入到转染复合物中, 终体积为 0.5 ml/孔。吸掉存在的细胞培养基并且替换为转染复合物, 在 37 °C、5% CO₂ 下孵育 48-72 小时。

免疫印迹

72 小时后, 轻轻吸掉转染混合物, 将细胞在 150 μ l 包含完全片剂蛋白酶抑制剂 (Roche Molecular Biochemicals) 和 1 mM 活化 Na₃VO₅ 的冰冷 RIPA 缓冲液(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% 脱氧胆酸钠, 1 mM EDTA)中裂解, 室温孵育 30 分钟并且储藏于 -20 °C 下 1-24 小时。将 30 μ l 冻融裂解物加至包含 0.2 M DTT 的 10 μ l 4×NuPage 样品缓

冲液(Invitrogen)中。将样品在 85℃加热 5 分钟并上样于 4-20% tris-甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen)。将胶在含有 20% 甲醇的 1×转移缓冲液中以 1100 mA·H 转移至 Hybond-P PVDF 膜(Amersham Pharmacia Biotech)。膜在包含 5%脱脂奶的 PBS 中封闭 1 小时。在封闭缓冲液中分别以 1:500 和 1:10,000 稀释抗 eIF4E(BD Biosciences)和抗肌动蛋白 (Sigma)的初级抗体,并于 4℃孵育 16 小时。用 PBS 将膜洗涤三次,接着用抗小鼠次级抗体(Santa Cruz)室温孵育 2 小时。用 PBS 洗涤印迹膜三次并用 SuperSignal West Pico 化学发光底物(Pierce)处理 1 分钟。将捕捉到的信号记录在 Lumi-Imager F1 (Roche Molecular Biochemicals)上。使用 LumiAnalyst 软件将对应于 eIF4E 和肌动蛋白的条带定量,并且对肌动蛋白标准化(为了控制凝胶加样和转移)后确定 eIF4E 表达水平。

在 LNCaP 细胞系中, eIF4E-1、eIF4E-2 和 eIF4E-3 中每一个在小于 50 nM 的浓度时抑制 eIF-4E 蛋白质水平大于 50%。在 CWR22RV1 细胞系中, 小于 5 nM 浓度的 eIF4E-2 抑制 eIF-4E 蛋白质水平大于 50%。在 LNCaP、PC3、HCT116、MDA-231 和 MCF-7 细胞系的每一个中, 小于 50 nM 浓度的 eIF4E-1 和 eIF4E-2 降低 eIF-4E 蛋白质水平大于 50%。

细胞增殖测定

在转染前 24 小时将细胞以 $1.5-3.0 \times 10^3$ 细胞/孔的密度铺于多聚-D-赖氨酸包被的 96 孔板(Becton Dickinson)。eIF-4E 和对照 siRNA 的转染重复三次, siRNA 浓度范围为 5 nM-500 nM。在 3、6 和 8 天通过加入终浓度为 50 μ g/ml 的碘化丙锭(Sigma)接着避光室温孵育 30 分钟收获细胞。在冷冻前和冷冻后使用 Victor² 1420 多重标记计数器(Wallac)对板进行测量。通过从冷冻后测量值中减去冷冻前测量值得到矫正后的总值。

在 LNCaP、PC3 和 MDA-231 细胞系的每一个中, 小于 50 nM 浓度的 eIF4E-1 和 eIF4E-2 降低细胞增殖大于 50%。

实施例 24: 靶向 eIF4E 的 siRNA 构建体在 HeLa 细胞中的活性

如先前实施例中所描述制备表 5 所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。为了比较还测试了几个单链嵌合体反义寡核苷酸。

将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1%青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次并且用包含 25 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条寡聚化合物链 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL) 的 130 μ L OPTI-MEM-1™处理。处理重复进行两次。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低, 对 Ribogreen 进行标准化。用于先前实施例的人引物/探针组为 SEQ ID NO:5、6 和 7。

结果示于表 5。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下面的表 5 中首先显示反义链(AS)接着在下一行显示有意链(S)。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA (即核糖具有磷酸(P=O)主链和 5' 末端羟基) 并且除非另外指出为平端(无 dTdT 或其它悬突)。除非另外指出, 单链反义分子为嵌合体缺刻寡核苷酸, 在核苷酸 1-5 和 16-20 为 2'-MOE 并且在位置 6-15 为 2'-脱氧核苷酸, 在每一个 C 上为硫代磷酸酯 (P=S) 主链和 5-甲基胞嘧啶。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。

表 5

靶向 eIF4E 的 siRNA 构建体在 HeLa 细胞中的活性

链	ISIS #	序列 (5'→3')	SEQ ID NO	靶位点	靶区域	物种 / 备注	% 抑制
AS	338910	UGUCAUAUCCUGGAUCCUU	220	1285	3'UTR	h/m	80.1
S	338935	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221				± 2.8
AS	338911	GGAGGAAGUCCUAACCUUUC	222	571	编码区	h/m/r	27.5

S	338936	GAAAGGUUAGGACUCCUCC	223				+1.4
AS	338912	GGCUUUGGUUCAGCUCCCAA	224	724	3'UTR	h/m/r	55.8
S	338937	UUGGGAGCUGAACCAAAGCC	225				+3.5
AS	338913	GGCGAAUGAGACUUCUCUUA	226	805	3'UTR	h/m/r	74.2
S	338938	UAAGAGAAGUCUCAUUCGCC	227				+0.2
AS	338914	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	1277	3'UTR	h/m/r	76.1
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229				+1.2
AS	338915	GCUUUUCUACUUGAGCCAUAU	230	1564	3' UTR	h/m/r	51.3
S	338940	AAUGGCUCAAGUAGAAAAGC	231				+1.6
AS	338916	ACAUCAUCACUGUAGUCAUC	232	445	编码区	h/m	56.7
S	338941	GAUGACUACAGUGAUGAUGU	233				+0.9
AS	338917	CACCUUUAGCUCUAAAUUA	234	480	编码区	h/m	42.3
S	338942	UAAUGUUAGAGCUAAAGGUG	235				+2.8
AS	338918	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	486	编码区	h/m/r	77 +
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAGA	237				2.7
AS	338919	UGCUAUCUUAUCACCUUUAG	238	491	编码区	h/m/r	52.4
S	338944	CUAAAGGUGAUAAAGAUAGCA	239				+9
AS	338920	GUCCAUAUUGCUAUCUUAUC	240	499	编码区	h/m/r	62.5
S	338945	GAUAAGAUAGCAAUAUGGAC	241				+4.4
AS	338921	GCCAAGUUUUGCUUUUAUCA	242	168	编码区	h/m/r	32.3
S	338946	UGAUAAAAGCAAAACUUGGC	243				+ 12.1
AS	338922	UCUUCAACAGUAUCAAACUU	244	211	编码区	h/m/r	16.6
S	338947	AAGUUUGAUACUGUUGAAGA	245				+0.6
AS	338923	GUCACAGCCAGGCAUUAUU	246	269	编码区	h/m/r	65.6
S	338948	AUUUAAUGCCUGGCUGUGAC	247				+0.3
AS	338924	UCUCAUCUCCCAUAGGC	248	315	编码区	h/m/r	45 +
S	338949	GCCUAUGUGGGAAGAUGAGA	249				1.3
AS	338925	ACCUUCCUUGUAUACCCUC	250	558	编码区	h/m/r	60.2
S	338950	GAGGGUAUACAAGGAAAGGU	251				+4.8
AS	338926	GUAGCUGUGUCUGCGUGGGA	252	613	编码区	h/m/r	45.4
S	338951	UCCACGCAGACACAGCUAC	253				+0.5
AS	338927	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	672	3'UTR	h/m/r	83 +
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255				1.2
AS	338928	CUGUAAUUCUUGAUUGGGA	256	883	3'UTR	h/m/r	74 +
S	338953	UCCCAAUCAAAGAAUUACAG	257				0.2
AS	338929	GAAUGAAAUGCAUAAUUUG	258	1381	3'UTR	h/m/r	5.6 +
S	338954	CAAAUUUAUGCAUUUCAUUC	259				1.4
AS	338930	UCACUGAUUUGAAUGAAAUG	260	1391	3'UTR	h/m/r	62.8
S	338955	CAUUUCAUUCAAAUCAGUGA	261				+0.7
AS	338931	AUUUACAGUUUUGUACACUG	262	1603	3'UTR	h/m/r	63.8
S	338956	CAGUGUACAAAACUGUAAAU	263				+0.4
AS	338932	AAAACCAGAGUGCCCAUCUG	264	141	编码区	h	88.2

S	338957	CAGAUGGGCACUCUGGUUUU	265				+ 0.2
AS	338933	ACUUGGAGAUCAGCCGCAGG	266	195	编码区	h	42.1
S	338958	CCUGCGGCUGAUCUCCAAGU	267				+ 5.7
AS	338934	AGUAUAGAAAUGCCAAGUUG	268	1010	3'UTR	h	69.3
S	338959	CAACUUGGCAUUUCUAUACU	269				+ 6.6
AS	341887 eIF4E_ 1	AAACCAGAGUGCCCAUCUGTT	270	141	编码区	H 除 了 3'dTd T 外 为核糖	69.5 + 4.6
S	341886	CAGAUGGGCACUCUGGUUUTT	271			除 了 3'dTd T 外 为核糖	
AS	341889 eIF4E_ 2	CUUGGAGAUCAGCCGCAGGTT	272	195	编码区	h 除 了 3'dTd T 外 为核糖	45.5 + 16
S	341888	CCUGCGGCUGAUCUCCAAGTT	273			除 了 3'dTd T 外 为核糖	
AS	341891 eIF4E_ 3	GUAUAGAAAUGCCAAGUUGTT	274	1010	3'UTR	h 除 了 3'dTd T 外 为核糖	65 ± 14.8
S	341890	CAACUUGGCAUUUCUAUACTT	275			除 了 3'dTd T 外 为核糖	
AS	335449	UUUGUCUCUGGUCCUUACUU 靶向 PTEN 的对照	276	--		额外 5' UU; 5' 磷酸	31 ± 4
S	308746	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	277				
AS	263188	CUUCUGGCAUCCGGUUUAGUU 对照; 与 PTEN 有 6 个错配	278	--		除 了 3'dTd T 外 为 核 糖; 交 互 的 P=O/P =S	-5.7 ± 8.1

S	263189	CUAAACCGGAUGCCAGAAGUU	279			除了 3'dTd T 外 为核 糖; 交互的 P=O/P =S	
AS	183750	TGTCATATTCCTGGATCCTT	40	1285	3'UTR	h/m MOE gapme r	94 ± 0.5
	无						
AS	298815	GGCGAATGAGACTTCTCTTA	97	805	3'UTR	h/m/r MOE gapme r	94.1 ±1.6
S	无						
AS	116847	CTGCTAGCCTCTGGATTGA 靶向 PTEN 的对照	280	--		h/m/r/ rab MOE gapme r	-7.2 ± 3.3
S	无						
AS	129686	CGTTATTAACCTCCGTTGAA 阴性(混杂)对照	281	--		MOE gapme r	8.7 ± 17.6
S	无						
AS	129691	ATGCATACTACGAAAGGCCG 阴性(混杂)对照	282	--		MOE gapme r	4.9 ± 9.5
S	无						

“%抑制”表示与未处理对照细胞相比在用 siRNA 双链体(或所显示的其它化合物)处理的细胞中 eIF4E RNA 降低的百分数。通过 RT-PCR 对 RNA 定量。当“%抑制”为负值时,则表示靶 RNA 增加。

“靶位点”是指化合物特异性杂交的 Genbank 登录号 M15353.1 上靶位点的最 5' 核苷酸的位置。

“物种”是指反义序列是否与人(h)、大鼠(h)、小鼠(m)和/或兔(rab) eIF4E 完全互补。

在该筛选中,发现 MOE gapmer 比最佳 siRNA (88% 抑制)对 eIF4E 的活性稍稍增加(94%抑制)。在先前鉴定的 5 个 MOE gapmer siRNA 构建体当中有 3 个导致位点活化。8 个 eIF4E siRNA 构建体表现为靶标降低

70%或更多并且有 7 个显示降低 75%或更多。这与 Vickers 等(J. Biol. Chem., 2003, 278, 7108-7118)的结论一致, 即通常 siRNA 寡核苷酸双链体的活性与靶向同一位点的 RNA 酶 H 依赖的寡核苷酸(例如 MOE gapmer)活性相关联, 并且最佳 siRNA 和 RNA 酶 H 依赖的寡核苷酸在潜能、最大作用、特异性以及作用持续阶段和效率方面行为相似。

还测试了上表中化合物在 HeLa 细胞中降低 PTEN RNA 水平的能力。没有一个靶向 eIF4E 的化合物(siRNA 或单链 MOE gapmer)使 PTEN 靶 RNA 水平降低超过大约 20%。siRNA 阳性对照 335449 构建体使 PTEN RNA 抑制大约 85%并且单链 MOE gapmer 阳性对照使 PTEN RNA 抑制大约 80%。

实施例 25: 靶向 eIF4E 的 siRNA 构建体在 MH-S 细胞中的活性

几乎全部的上表中 siRNA 化合物对小鼠和人 eIF4E mRNA 都完全互补。这里在小鼠 MH-S 鼠细胞系中对它们进行测试。小鼠 MH-S 细胞购自美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA)。细胞维持于包含 10%热灭活胎牛血清(FCS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT)的 RPMI 1640 培养基中。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次并且用包含 20 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条寡聚化合物链 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™处理。处理重复进行两次。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 6。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下面的表 6 中首先显示反义链(AS)接着在下一行显示有意链(S)。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。除非另外指出, 单链反义分子为嵌合体缺刻寡核苷酸, 在核苷酸 1-5 和 16-20 为 2'-MOE 并且在位置 6-15 为 2'-脱氧核苷酸, 在每一个

C 上为硫代磷酸酯 (P=S)主链和 5-甲基胞嘧啶。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。

靶位点、物种、化学和序列如前表。

表 6

eIF4E siRNA 构建体在 MH-S 小鼠细胞中的活性

链	ISIS #	%抑制
AS	338910	77.3 $\pm$ 4.6
S	338935	
AS	338911	37.9 $\pm$ 0.6
S	338936	
AS	338912	67.1 $\pm$ 0.3
S	338937	
AS	338913	77.3 $\pm$ 5.5
S	338938	
AS	338914	78.3 $\pm$ 1.8
S	338939	
AS	338915	52.5 $\pm$ 1.3
S	338940	
AS	338916	66.6 $\pm$ 3.2
S	338941	
AS	338917	54.8 $\pm$ 11.2
S	338942	
AS	338918	78.0 $\pm$ 2.4
S	338943	
AS	338919	59.8 $\pm$ 7.4
S	338944	
AS	338920	52.4 $\pm$ 2.7
S	338945	
AS	338921	61.6 $\pm$ 0.9
S	338946	
AS	338922	44.1 $\pm$ 2.1
S	338947	
AS	338923	66.8 $\pm$ 1.3
S	338948	
AS	338924	63.8 $\pm$ 2.7
S	338949	
AS	338925	65.0 $\pm$ 4.4

S	338950	
AS	338926	66.7 ± 2.3
S	338951	
AS	338927	81.6 ± 0.5
S	338952	
AS	338928	69.5 ± 2.4
S	338953	
AS	338929	3.0 ± 8.4
S	338954	
AS	338930	53.7 ± 0.0
S	338955	
AS	338931	58.2 ± 0.6
S	338956	
AS	338932	57.5 ± 4.5
S	338957	
AS	338933	38.7 ± 26.2
S	338958	
AS	338934	21.6 ± 5.3
S	338959	
AS	335449	7.4 ± 8.1
S	308746	
AS	263188	18.3 ± 3.8
S	263189	
AS	183750	84.1 ± 3.5
	无	
AS	298815	82.6 ± 3.6
S	无	
AS	116847	1.1 ± 4.9
S	无	
AS	129686	14.4 ± 7.4
S	无	
AS	341887	18.7 ± 14.2
S	341886	
AS	341889	21.7 ± 6.4
S	341888	
AS	341891	11.6 ± 7.2
S	341890	
AS	129691	6.3 ± 2.7
S	无	

实施例 26: 靶向 eIF4E 的另外 siRNA 构建体在 HeLa 细胞中的活性

开展了另外的基因步移 (gene walk) 以鉴定能抑制 eIF4E 的其它 siRNA。在 HeLa 细胞中以 50 nM 的浓度筛选构建体。

双链体寡 RNA (dsRNA) 化合物示于下面的表 7, 并且如先前实施例所描述进行制备并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA) 进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。为了比较还测试了几种单链嵌合体反义寡核苷酸。

将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™ 降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次并且用包含 50 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条寡聚化合物链 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL) 的 130 μ L OPTI-MEM-1™ 处理。处理重复进行两次。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 7。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下面的表 7 中首先显示反义链(AS)接着在下一行显示有意链(S)。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 末端羟基。除非另外指出, 单链反义分子为嵌合体缺刻寡核苷酸, 在核苷酸 1-5 和 16-20 为 2'-MOE 并且在位置 6-15 为 2'-脱氧核苷酸, 在每一个 C 上为硫代磷酸酯 (P=S) 主链和 5-甲基胞嘧啶。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶) 通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。

表 7

eIF4E siRNA 在 HeLa 细胞中的活性

链	ISIS #	序列	SEQ ID NO	靶位点	靶序列	物种	% 抑制
AS	342735	UUAAAAAACCAGAGUGCCCA	283	145	编码区	h/m/r	75.7 $\pm$ 5.7
S	342755	UGGGCACUCUGGUUUUUUAA	284				

AS	342736	UUUAAAAAACCAGAGUGCCC	285	146	编 码 区	h/m/r	56.6 $\pm$ 8.8
S	342756	GGGCACUCUGGUUUUUUAAA	286				
AS	342737	UUUUAAAAAACCAGAGUGCC	287	147	编 码 区	h/m/r	75.4 $\pm$ 1.6
S	342757	GGCACUCUGGUUUUUUAAAA	288				
AS	342738	AUUUUUAAAAAACCAGAGUG	289	149	编 码 区	h/m/r	50.7 $\pm$ 3.3
S	342758	CACUCUGGUUUUUUAAAAAU	290				
AS	342739	AGAGCCCAAAGUCUUCAAC	291	223	编 码 区	h/m/r	58.0 $\pm$ 7.5
S	342759	GUUGAAGACUUUUGGGCUCU	292				
AS	342740	UACUAGACAACUGGAUAUGG	293	249	编 码 区	h/m/r	86.1 $\pm$ 5.3
S	342760	CCAUAUCCAGUUGUCUAGUA	294				
AS	342741	GGCAUUAUUACUAGACAA	295	259	编 码 区	h/m/r	6.2 $\pm$ 1.8
S	342761	UUGUCUAGUAAUUUAAUGCC	296				
AS	342742	AAAGUGAGUAGUCACAGCCA	297	279	编 码 区	h/m/r	89.9 $\pm$ 0.5
S	342762	UGGCUGUGACUACUCACUUU	298				
AS	342743	GUUUUUCUCAUCUCCCACA	299	320	编 码 区	h/m/r	86.1 $\pm$ 5.6
S	342763	UGUGGGAAGAUGAGAAAAAC	300				
AS	342744	UCUUAUCACCUUAGCUCU	301	487	编 码 区	h/m/r	84.3 $\pm$ 2.6
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAGA	302				
AS	342745	UCCUUGUAUACCCUCCCUAU	303	553	编 码 区	h/m/r	71.6 $\pm$ 9.1
S	342765	AUAGGGAGGGUAUACAAGGA	304				
AS	342746	UGAUAAACCAUCACUAUCUU	305	592	编 码 区	h/m/r	88.7 $\pm$ 0.8
S	342766	AAGAUAGUGAUUGGUUAUCA	306				
AS	342747	ACAACAAACCUAUUUUUAGU	307	649	编 码 区	h/m/r	10.8 $\pm$ 1.7
S	342767	ACUAAAAAUAGGUUGUUGU	308				
AS	342748	AUGAGACUUCUCUUAUAUCU	309	800	3'UT R	h/m/r	86.3 $\pm$ 0.1
S	342768	AGAUUAAGAGAAGUCUCAU	310				
AS	342749	GUACAAGACAAAGGCCGAUG	311	817	3'UT R	h/m/r	81.3 $\pm$ 2.6
S	342769	CAUUCGCCUUUGUCUUGUAC	312				
AS	342750	CUAGCAGCCAUCAGCAAGAG	313	1157	3'UT R	h/m/r	78.5 $\pm$ 0.6

S	342770	CUCUUGCUGAUGGCUGCUAG	314				
AS	342751	UAGCAAAGCUUUGUAGUUAC	315	1361	3'UT R	h/m/r	70.5± 3.8
S	342771	GUAACUACAAAGCUUUGCUA	316				
AS	342752	CUAGUUAGGAAUGUAAUUAU	317	1466	3'UT R	h/m/r	62.1± 0.8
S	342772	AUAAUUACAUUCCUAAACUAG	318				
AS	342753	UUGUACACUGUCUUAUAUG	319	1593	3'UT R	h/m/r	58.0± 2.8
S	342773	CAUAUUAAAGACAGUGUACAA	320				
AS	342754	GUACACAUUUUAUUUACAGU	321	1614	3'UT R	h/m/r	10.7± 4.3
S	342774	ACUGUAAAUAUAAUGUGUAC	322				
AS	338910	UGUCAUAUUCCUGGAUCCUU	220	1285	3'UT R	h/m 来自筛 选 1	80.2± 2.3
S	338935	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221				
AS	338914	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	1277	3'UT R	h/m/r 来自筛 选 1	79.6± 2.2
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229				
AS	338918	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	486	编 码 区	h/m/r 来自筛 选 1	84.7± 0.0
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAGA	237				
AS	338927	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	672	3'UT R	h/m/r 来自筛 选 1	88.6± 8.8
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255				
AS	338932	AAAACCAGAGUGCCCAUCUG	264	141	编 码 区	h	88.1± 3.6
S	338957	CAGAUGGGCACUCUGGUUUU	265				
AS	341887 eIF4E_1	AAACCAGAGUGCCCAUCUGUU	270	141	编 码 区	h 除 了 3'dTdT 外为核 糖	56.5
S	341886	CAGAUGGGCACUCUGGUUUU U	271				

AS	263188	CUUCUGGCAUCCGGUUUAGU U 对照; 与 PTEN 具有 6 个错配	278	--		除了 3'dTdT 外为核 糖; 交互 的 P=O/P= S	-5.6± 26.0
S	263189	CUAAACCGGAUGCCAGAAGU U	279				
AS	335449	UUUGUCUCUGGUCCUUACUU 靶向 PTEN 的对照	276	--		额外 3' UU; 5' 磷酸	-16.3± 6.1
S	308746	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	277				
AS	183750	TGTCATATTCCTGGATCCTT	40	1285	3'UT R	MOE gapmer h/m	96.2± 0.6
S	无						
AS	129691	ATGCATACTACGAAAGGCCG 阴性(混杂)对照	282	--		MOE gapmer	1.7± 7.0
S	无						
AS	116847	CTGCTAGCCTCTGGATTTGA 靶向 PTEN 的对照	280	--		h/m/r/ra b MOE gapmer	-10.9± 9.7
S	无						

“%抑制”表示与对未处理细胞相比在用 siRNA 双链体(或所显示的其它化合物)处理的细胞中 eIF4E RNA 降低的百分数。当“%抑制”为负值时,则表示靶 RNA 增加。通过 RT-PCR 对 RNA 定量。

“靶位点”是指与化合物特异性杂交的 Genbank 登录号 M15353.1 上靶位点的最 5' 核苷酸的位置。

“物种”是指反义序列是否与人(h)、大鼠(h)、小鼠(m)和/或兔(rab) eIF4E 完全互补。

实施例 27: 靶向 eIF4E 的 siRNA 构建体在 MH-S 细胞中的活性

几乎全部的前表中 siRNA 化合物对小鼠和人 eIF4E mRNA 完全互补。这里在小鼠 MH-S 鼠尘细胞系中对它们进行测试。小鼠 MH-S 细胞购自美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA)。细胞维持于包含 10%热灭活胎牛血清(FCS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT)的 RPMI 1640 培养基中。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10%

FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次并且用包含 50 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条寡聚化合物链 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL) 的 130 μ L OPTI-MEM-1™处理。处理重复进行两次。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。结果示于表 8。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。显示了反义链; 有意链、靶位点、物种、化学和序列如前表。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。

除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯 (P=O)主链和 5'末端羟基。除非另外指出, 单链反义分子为嵌合体缺刻寡核苷酸, 在核苷酸 1-5 和 16-20 为 2'-MOE 并且在位置 6-15 为 2'-脱氧核苷酸, 在每一个 C 上为硫代磷酸酯 (P=S)主链和 5-甲基胞嘧啶。显示了反义链标识。

表 8

eIF4E siRNA 构建体在小鼠 MH-S 细胞中的活性

链	ISIS #	%抑制
AS	342735	63.1 + 8.9
AS	342736	57.2 + 8.0
AS	342737	42.2 + 5.1
AS	342738	28.6 + 4.3
AS	342739	23.9 + 3.5
AS	342740	70.3 + 9.3
AS	342741	7.2 + 5.9
AS	342742	68.3 + 7.3
AS	342743	59.2 + 8.5
AS	342744	62.7 + 10.5
AS	342745	58.1 + 0.8
AS	342746	69.2 + 5.7
AS	342747	8.8 + 11.7
AS	342748	70.6 + 3.1
AS	342749	58.7 + 0.3

AS	342750	48.3 + 7.9
AS	342751	32.0 + 10.0
AS	342752	50.4 + 3.2
AS	342753	38.5 + 1.7
AS	342754	-5.2 + 8.2
AS	338910	60.9 + 3.2
AS	338914	70.0 + 14.1
AS	338918	69.0 + 2.3
AS	338927	71.3 + 5.3
AS	338932	46.4 + 12.7
AS	341887 eIF4E_1	15.6 + 1.0
AS	263188	6.5 + 3.6
AS	335449	-5.9 + 4.3
AS	183750	47.8 + 6.9
AS	129691	-0.1 + 2.5
AS	116847	1.6 + 1.2

“%抑制”表示与未处理对照细胞相比在用 siRNA 双链体（或所显示的其它化合物）处理的细胞中 eIF4E RNA 降低的百分数。如果“%抑制”为负值时，则表示靶 RNA 增加。通过 RT-PCR 对 RNA 定量。

“靶位点”是指化合物特异性杂交的 Genbank 登录号 M15353.1 上靶位点的最 5' 核苷酸的位置。

“物种”是指反义序列是否与人(h)、大鼠(h)、小鼠(m)和/或兔(rab) eIF4E 完全互补。

实施例 28：剂量反应实验- eIF4E siRNA 构建体在 HeLa 细胞中的 IC₅₀

使用上面的处理方法和 0.1 nM、1.0 nM、10 nM 和 100 nM 浓度的 siRNA 在 HeLa 细胞中开展了剂量反应实验，并且计算了某些上述化合物的 IC₅₀ (IC₅₀ 为与未处理对照相比导致 eIF4E 50%抑制的化合物浓度)。结果示于表 9。显示了反义链标识。有意链、靶位点、物种、化学和序列如前表。

表 9

siRNA 化合物在 HeLa 细胞中的 IC₅₀

ISIS #反义	IC ₅₀ (nM)
183750	3.0
338910	3.0
338914	1.9

338918	2.9
338927	6.0
338932	0.45
342740	1.3
342742	2.2
342743	6.6
342744	3.0
342746	5.2
342748	3.2
342749	3.6

选择上面 siRNA 构建体中的 4 个用于进一步评价和 SAR (结构-活性-关系)分析。此处显示了用于 siRNA SAR 分析的这些母体构建体。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。

“338918 构建体”

有意链: 5'-UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA-3'

ISIS 338943 (SEQ ID NO:237)

反义链: 3'-AUCUCGAUUUCCACUAUUCU-5'

ISIS 338918 (SEQ ID NO:236)

“338910 构建体”

有意链: 5'-AAGGAUCCAGGAAUAUGACA-3'

ISIS 338935 (SEQ ID NO:221)

反义链: 3'-UUCCUAGGUCCUUAUACUGU-5'

ISIS 338910 (SEQ ID NO:220)

“338927 构建体”

有意链: 5'-AGAAGACACCUUCUGAGUAU-3'

ISIS 338952 (SEQ ID NO:255)

反义链: 3'-UCUUCUGUGGAAGACUCAUA-5'

ISIS 338927 (SEQ ID NO:254)

“338914 构建体”

有意链: 5'-CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA-3'

ISIS 338939 (SEQ ID NO:229)

反义链: 3'-GUAACCACUUCCUAGGUCCU-5'

ISIS 338914 (SEQ ID NO:228)

实施例 29: 具有交互 2'修饰的 eIF4E siRNA 构建体

选自先前实施例的 4 个 siRNA 构建体 (“母体”构建体) 与具有交互 2'-O-甲基 (2'-O-Me 或 2'OMe) 和 2'-氟 (2'-F) 修饰的 siRNA 构建体相比较。

如先前实施例中所描述制备了显示于下面表 10 的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并在 HeLa 细胞 (美国典型培养物保藏中心, Manassas VA) 进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。为了比较还测试了几种单链嵌合体反义寡核苷酸。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™ 降低血清培养基 (Gibco BRL) 将细胞洗涤一次并且用包含 0.2、2 和 20 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条寡聚化合物链 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL) 的 130 μ L OPTI-MEM-1™ 处理。处理重复进行两次。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 10。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。对于交互 2'-OMe/2'-F 修饰化合物, 有意链和反义链均被修饰, 在有意链的最 5'核苷具有 2'-F 并且在反义链的最 5'核苷具有 2'-O-Me, 以致于两种类型修饰没有记录在双链体分子中。应当指出母体化合物为 20mer 且

2'修饰化合物为 19mer，其缺乏对应于有意链（即所示双链体的有意链）最 5'端配对的碱基对。它们显示于表 10。2'-O-甲基核苷用粗体显示；2'-氟用下划线表示。未修饰核糖显示为纯大写文本。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。

表 10

具有交互 2'-O-Me 和 2'-F 修饰的 eIF4E siRNA 构建体

链	Isis No.	序列 5'→3'	SEQ ID NO	IC50 (nM)	% 抑制	稳定性 t ½ (h)
AS	338918	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	1.8	81	0.5
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237			
AS	351831	UCUUAUCACCUUUAGCUCU	301	1.1	88	> 4
S	351832	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	302			
AS	338910	UGUCAUAUCCUGGAUCCUU	220	1.9	84	
S	338935	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221			
AS	351827	UGUCAUAUCCUGGAUCCU	323	7.3	65	
S	351828	AGGAUCCAGGAAUAUGACA	324			
AS	338914	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	1.6	81	
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229			
AS	351829	UCCUGGAUCCUUCACCAAU	325	5.8	63	
S	351830	AUUGGUGAAGGAUCCAGGA	326			
AS	338927	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	5.1	82	
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255			
AS	351833	AUACUCAGAAGGUGUCUUC	327	6.5	61	
S	351834	GAAGACACCUUCUGAGUAU	328			

“%抑制”表示与未处理对照细胞相比在用 siRNA 双链体（或所显示的其它化合物）处理的细胞中 eIF4E RNA 降低的百分数。

正常大写字母=具有磷酸酯主链的未修饰 RNA。

2'-O-甲基核苷用粗体显示；2'-氟用下划线表示。

对于几种构建体，交互 2'-O-甲基/2'-氟 (2'-OMe/2'F) 构建体在降低 eIF4E mRNA 效率方面与母体(未修饰 RNA) 构建体相当或者更好。而且，所测试修饰构建体的稳定性是未修饰化合物的 8 倍以上（详见下面实施例）。

实施例 30: 交互 2'-O-甲基/2'-氟 siRNA 构建体在小鼠血浆中的稳定性

使用与先前所述相似的提取和毛细管电泳方法(Leeds 等, *Anal. Biochem.*, 1996, 235, 36-43; Geary 等, *Anal. Biochem.*, 1999, 274, 241-248)自稀释的小鼠血浆分析完整双链体 RNA。来自 3-6 月龄雌性 Balb/c 小鼠(Charles River Labs)的经肝素处理小鼠血浆从-80℃解冻并用磷酸缓冲盐溶液(140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM 磷酸钾, 10 mM 磷酸钠)稀释至 25% (v/v)。将大约 10 nmol 预退火 siRNA 以 100 μM 的浓度加到 25%血浆中并于 37℃孵育 0、15、30、45、60、120、180、240、360 和 420 分钟。在所指定时间,取出等份试样,用 EDTA 处理至终浓度为 2 mM,并放置于 0℃冰上直到使用毛细管凝胶电泳(具有 eCap DNA 毛细管的 Beckman P/ACE MDQ-UV)进行分析。测量 siRNA 双链体峰面积并用于计算完整的剩余 siRNA 的存在。将腺嘌呤三磷酸(ATP)以 2.5 mM 浓度加入到每一注射作为内部校准标准。用磷酸缓冲盐溶液稀释 siRNA 为零时间点,接着进行毛细管电泳。将完整 siRNA 的百分数对时间做图,以便计算准一级反应半寿期。结果示于表 11。

表 11

交互 2'-O-甲基/2'-氟 siRNA 构建体在小鼠血浆中的稳定性

	时间(分钟)								
构建体	0	15	30	45	60	120	180	240	360
338918_338943	76.98	71.33	49.77	40.85	27.86	22.53	14.86	4.18	0
351831_351832	82.42	81.05	79.56	77.64	75.54	75.55	75.56	75.55	75

母体(未修饰)构建体在 30 分钟后降解大约 50%并且在 4 小时后几乎消失(在 6 小时完全消失)。相反,交互 2'-O-甲基/2'-氟构建体相对没有变化并且甚至在 6 小时后仍存在 75%。

实施例 31: eIF4E siRNA 的另外修饰

如先前实施例所描述制备并测试了具有各种修饰的另外 siRNA 构建

体。

如先前实施例所描述制备在表 12 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞培养方法可以从 ATCC 获得并且在例如 www.atcc.org 中找到。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次并且用包含一定浓度范围的目的 dsRNA 和对于每条寡聚化合物链 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™处理。处理重复两次进行。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。对于稳定性分析, 将 siRNA 双链体在 25%肝素化小鼠血浆中于 37°C 孵育并通过具有内部参照标准的毛细管凝胶电泳进行分析。

结果示于表 12。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有义链组成。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。除非另外指出, 单链反义分子为嵌合体缺刻寡核苷酸, 在核苷酸 1-5 和 16-20 为 2'-MOE 并且在位置 6-15 为 2'-脱氧核苷酸, 在每一个 C 上为硫代磷酸酯 (P=S)主链和 5-甲基胞嘧啶。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示; 2'-氟代用下划线表示, 4'-硫代核苷用小写字母表示并且未修饰核糖以纯大写文本表示。

化合物 338918_338943 为未修饰 (核糖, P=O 主链)母体构建体。349892_338943 在反义链位置 1-5、8、9、12-17 为 2'F 并且在位置 6、7、10、11、18-20 为 2'OMe; 有义链不修饰 (核糖, P=O 主链)。

345847_345849 为在双链上具有交互核糖和 2'OMe 核苷(没有记录在内)的 19mer。有义链的最 5' 核苷为核糖且反义链的最 5' 核苷为 2'OMe。

351831_351832 为在双链上具有交互 2'-F 和 2'OMe 核苷(没有记录

在内)的 19mer。有意链的最 5' 核苷为 2'-F 且反义链的最 5' 核苷为 2'OMe。

352824_342764 为在反义链每一末端具有三个 4'-硫代核苷的 19mer(有意链未修饰)。

352827_342764 为在反义链 5' 末端具有三个 4'-硫代核苷并且在反义链 3' 末端具有三个 2'-OMe 核苷的 19mer(有意链未修饰)。

349890_338935 为在反义链上具有混合 2'-F/2'-OMe 修饰的 20mer(有意链未修饰)。在反义链的位置 1-5、8、9 和 12-17 具有 2'-F 且在位置 6、7、10、11、18-20 具有 2'-OMe(在 5'端开始)。

349891_338939 为在反义链上具有混合 2'-F/2'-OMe 修饰的 20mer(有意链未修饰)。在反义链的位置 1-5、8、9 和 12-17 具有 2'-F 且在位置 6、7、10、11、18-20 具有 2'-OMe(在 5'端开始)。

351097_338952 为在反义链上具有混合 2'-F/2'-OMe 修饰的 20mer(有意链未修饰)。在反义链的位置 1-5、8、9 和 12-17 具有 2'-F 且在位置 6、7、10、11、18-20 具有 2'-OMe(在 5'端开始)。

应当指出母体化合物为 20mer 而一些 2'修饰化合物显示为 19mer，其缺乏对应有义链(即所显示双链体的有意链)最 5'对的碱基对。它们显示于表 12。2'-O-甲基核苷用粗体显示；2'-氟代用下划线表示，4'-硫代核苷用小写字母表示并且未修饰核糖以纯大写文本表示。

表 12
eIF4E siRNA 的另外修饰和活性-总结

链	Isis 号	序列 5'→3'	SEQ ID NO	IC50 (nM)	% 抑制	稳定性 t ½ (h)
AS	338918	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	1.5	81	0.5
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237			
AS	349892	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	0.4	85	0.3
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237			
AS	345847	UCUUAUCACCUUUAGCUCU	301	2, 23	80, 70	> 4
S	345849	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	302			

AS	351831	UCUUAUCACCUUUAGCUCU	301	1.1	88	> 4
S	351832	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	302			
AS	352824	ucuUAUCACCUUUAGCucu	301	~10	50	> 4
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	302			
AS	352827	ucuUAUCACCUUUAGCUCU	301	2	82	n.d.
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	302			
AS	349890	UGUCAUAUCCUGGAUCCUU	220			
S	338935	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221			
AS	349891	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228			
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229			
AS	351097	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254			
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255			

正常类型大写字母 = 具有磷酸酯主链的未修饰 RNA；

粗体= 具有磷酸酯主链的 2'-O-甲基 RNA；

下划线=具有磷酸酯主链的 2'-氟 RNA；

小写字母=具有磷酸酯主链的 4'-硫代 RNA；

“%抑制”表示与未处理对照细胞相比在用 siRNA 双链体（或所显示的其它化合物）处理的细胞中 eIF4E RNA 降低的百分数。

2'-O-甲基核苷用粗体显示；2'-氟代用下划线表示。

混合（封闭）2'-O-甲基/2'-氟代（2'-OMe/2'F）构建体 349892_338943 在 eIF4E mRNA 降低效率方面与母体（未修饰 RNA）构建体相当或更好。

交互 2'-O-甲基/未修饰构建体 345847_345849 构建体被检测两次，并且显示在 eIF4E mRNA 降低效率方面与母体（未修饰 RNA）构建体相当或更好，且具有增强的稳定性。

4'-硫代封闭修饰构建体 352824_342764 具有比母体低的活性但具有稳定性高。

4'-硫代/2'-O-甲基构建体 352827_342764 在效率方面与母体相当。稳定性资料还没有得到。

实施例 32：缺刻修饰的 siRNA 构建体- 在 HeLa 细胞中的活性

在 HeLa 细胞中测试了另外的 siRNA 构建体。如先前实施例所描述制备在表 13 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物，并且在 HeLa 细

胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 获得并且在例如 www.atcc.org 中找到。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次并且用包含 0.1、1、10 和 100 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™处理。处理重复进行两次。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

对于稳定性分析, 将 siRNA 双链体在 25%肝素化小鼠血浆中于 37°C 孵育并通过具有内部参照标准的毛细管凝胶电泳进行分析。结果示于表 13。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。除非另外指出, 单链反义分子为嵌合体缺刻寡核苷酸, 在核苷酸 1-5 和 16-20 为 2'-MOE 并且在位置 6-15 为 2'-脱氧核苷酸, 在每一个 C 上为硫代磷酸酯 (P=S)主链和 5-甲基胞嘧啶。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。

化合物 338918_338943 为未修饰 (核糖, P=O 主链)母体构建体。349892_338943 在反义链位置 1-5、8、9、12-17 为 2'F 并且在位置 6、7、10、11、18-20 为 2'Ome; 有意链不修饰 (核糖, P=O 主链)。

349896_338943 在反义链位置 1-5 为 2'F、位置 6-15 为核糖并且位置 16-20 为 2'Ome, 从 AS 链 5'端开始计数; 有意链不修饰 (核糖, P=O 主链)。

349894_338935 在反义链位置 1-5 为 2'F、位置 6-15 为核糖并且位置 16-20 为 2'Ome, 从 AS 链 5'端开始计数; 有意链不修饰 (核糖, P=O 主链)。

349895_338939 在反义链位置 1-5 为 2'F、位置 6-15 为核糖并且位置 16-20 为 2'Ome, 从 AS 链 5'端开始计数; 有意链不修饰 (核糖, P=O 主链)。

349897_338952 在反义链位置 1-5 为 2'F、位置 6-15 为核糖并且位置 16-20 为 2'Ome, 从 AS 链 5'端开始计数; 有意链不修饰 (核糖, P=O 主链)。

它们显示于表 13。2'-O-甲基核苷用粗体显示；2'-氟代用下划线表示，4'-硫代核苷用小写字母表示并且未修饰核糖以纯文本表示。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。

表 13

缺刻修饰 eIF4E siRNA 的活性

链	Isis 号	序列 5'→3'	SEQ ID NO	IC50 (nM)	% 抑制
AS	338918	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	0.81	86.3
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	349892	<u>UCUUAUCACCUUUAGCUCUA</u>	236	0.36	85.0
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	349896	<u>UCUUAUCACCUUUAGCUCUA</u>	236	1.05	84.4
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	349894	<u>UGUCAUAUCCUGGAUCCUU</u>	220		
S	338935	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221		
AS	349895	<u>UCCUGGAUCCUUCACCAAUG</u>	228		
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		
AS	349897	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254		
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		

正常类型大写字母 = 具有磷酸酯主链的未修饰 RNA；

粗体= 具有磷酸酯主链的 2'-O-甲基 RNA；

下划线=具有磷酸酯主链的 2'-氟代 RNA；

小写字母=具有磷酸酯主链的 4'-硫代 RNA；

“%抑制”表示与未处理对照细胞相比在用 siRNA 双链体（或所显示的其它化合物）处理的细胞中 eIF4E RNA 降低的百分数。

2'-O-甲基核苷用粗体显示；2'-氟代用下划线表示。

实施例 33: 交互 2'-Ome 修饰平端(无 dT 悬突)19mer siRNA 在 HeLa 细胞中的活性 -在 eIF4E_1 (341887)周围微步移 (microwalk)

如先前实施例所描述制备在表 14 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物，并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™

降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次并且用包含 0.2、2 和 20 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 $\mu\text{l/ml}$ LIPOFECTINTM (Gibco BRL)的 130 μL OPTI-MEM-1TM处理。处理重复进行两次。处理 4 或 5 小时后,用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞,在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 14。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下表 14 中首先显示反义链 (AS),接着在下一行显示有意链 (S)。除非另外指出,所有双链构建体为非修饰 RNA,即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示。

338932 为靶向 eIF4E_1 (341887) 19mer 位点的具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 磷酸的未修饰核糖 20mer。

338957 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 磷酸的未修饰核糖 20mer。

346658 为靶向 eIF4E_1 (341887)位点的具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 磷酸的未修饰核糖 19mer(无 dT)。

346660 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 磷酸的未修饰核糖 19mer。

346661 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 19mer。从 5'端开始在核苷 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 上为 2'OMe。

346659 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 19mer。从 5'端开始在核苷 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 上为 2'OMe。

346662 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 磷酸的未修饰核糖 19mer。

346664 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 磷酸的未修饰核糖 19mer。

346665 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 19mer。从 5'端开始在核苷 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 上为 2'OMe。

346663 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 19mer。从 5'端开始在核苷 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 上为 2'OMe。

346666 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 磷酸的未修饰核糖 19mer。

346668 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 磷酸的未修饰核糖 19mer。

346669 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 19mer。从 5'端开始在核苷 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 上为 2'-OMe。

346667 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 19mer。从 5'端开始在核苷 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 上为 2'-OMe。

表 14

在 eIF4E_1 (341887)周围微步移的交互 2'-O-Me/核糖平端 19mer

链	ISIS #	序列 (5'→3')	SEQ ID NO	%抑制	IC50 (nM)
AS	338932	AAAACCAGAGUGCCCAUCUG	264	88.6	0.52
S	338957	CAGAUGGGCACUCUGGUUUU	265		
AS	346658	AAACCAGAGUGCCCAUCUG	329	39.5	~112
S	346660	CAGAUGGGCACUCUGGUUUU	330		
AS	346658	AAACCAGAGUGCCCAUCUG	329	48.9	21.1
S	346661	CAGAUGGGCACUCUGGUUUU	330		
AS	346659	AAACCAGAGUGCCCAUCUG	329	42.8	~72
S	346661	CAGAUGGGCACUCUGGUUUU	330		
AS	346659	AAACCAGAGUGCCCAUCUG	329	9.0	N/A
S	346660	CAGAUGGGCACUCUGGUUUU	330		
AS	346662	AAAACCAGAGUGCCCAUCU	331	66.2	4.98
S	346664	AGAUGGGCACUCUGGUUUU	332		
AS	346662	AAAACCAGAGUGCCCAUCU	331	58.3	6.35
S	346665	AGAUGGGCACUCUGGUUUU	332		
AS	346663	AAAACCAGAGUGCCCAUCU	331	76.4	1.25
S	346665	AGAUGGGCACUCUGGUUUU	332		
AS	346663	AAAACCAGAGUGCCCAUCU	331	26.6	n/a
S	346664	AGAUGGGCACUCUGGUUUU	332		
AS	346666	AAAAACCAGAGUGCCCAUC	333	54.2	22.16
S	346668	GAUGGGCACUCUGGUUUUU	334		
AS	346666	AAAAACCAGAGUGCCCAUC	333	60.9	5.83
S	346669	GAUGGGCACUCUGGUUUUU	334		
AS	346667	AAAAACCAGAGUGCCCAUC	333	16.4	n/a
S	346668	GAUGGGCACUCUGGUUUUU	334		
AS	346667	AAAAACCAGAGUGCCCAUC	333	62.0	4.65
S	346669	GAUGGGCACUCUGGUUUUU	334		

实施例 34: 交互 2'-Ome 修饰平端 21mer siRNA 在 HeLa 细胞中的活性 – 在 eIF4E_1 (341887) 周围微步移

如先前实施例所描述制备在表 15 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™ 降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次然后用包含 0.2、2 和 20 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 μ L/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™ 处理。处理重复两次进行。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 15。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下表 15 中首先显示反义链 (AS), 接着在下一行显示有意链 (S)。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示。

338932 为靶向 eIF4E_1 位点的具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

338957 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

346674 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 末端磷酸的未修饰核糖 21mer。

346676 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 末端 磷酸的未修饰核糖 21mer。

346675 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 21mer。从 5'端开始在核苷 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 和 21 上为 2'-OMe。

346677 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 21mer。从 5'端开始在核苷 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 上为 2'OMe。

346678 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 末端磷酸的未修饰核糖 21mer。

346680 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5' 末端磷酸的未修饰核糖 21mer。

346679 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 21mer。从 5'端开始在核苷 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 和 21 上为 2'OMe。

346681 为具有磷酸酯主链和 5' 末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 21mer。从 5'端开始在核苷 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 上为 2'OMe。

表 15

HeLa 细胞中交互 2'-Ome 修饰平端 21mer siRNA-
在 eIF4E_1 (341887)周围微步移

链	ISIS #	序列 (5'→3')	SEQ ID NO	% 抑制	IC50 (nM)
AS	338932	AAAACCAGAGUGCCCAUCUG	264	88.6	0.52
S	338957	CAGAUGGGGCACUCUGGUUUU	265		
AS	346674	AAAACCAGAGUGCCCAUCUGU	335	81.7	0.74
S	346676	ACAGAUGGGGCACUCUGGUUUU	336		
AS	346674	AAAACCAGAGUGCCCAUCUGU	335	82.5	0.43
S	346677	ACAGAUGGGGCACUCUGGUUUU	336		
AS	346675	AAAACCAGAGUGCCCAUCUGU	335	69.0	3.44
S	346676	ACAGAUGGGGCACUCUGGUUUU	336		
AS	346675	AAAACCAGAGUGCCCAUCUGU	335	84.5	0.19
S	346677	ACAGAUGGGGCACUCUGGUUUU	336		
AS	346678	AAAAACCAGAGUGCCCAUCUG	337	82.5	0.13
S	346680	CAGAUGGGGCACUCUGGUUUU	338		
AS	346678	AAAAACCAGAGUGCCCAUCUG	337	83.9	0.66
S	346681	CAGAUGGGGCACUCUGGUUUU	338		
AS	346679	AAAAACCAGAGUGCCCAUCUG	337	66.8	2.39
S	346680	CAGAUGGGGCACUCUGGUUUU	338		
AS	346679	AAAAACCAGAGUGCCCAUCUG	337	83.0	1.09
S	346681	CAGAUGGGGCACUCUGGUUUU	338		

实施例 35: 4'-硫代核糖修饰 19mer siRNA 在 HeLa 细胞中的活性

如先前实施例所描述制备在表 16 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次然后用包含 0.02、0.2、2 和 20 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™处理。处理重复两次进行。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 16。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下表 16 中首先显示反义链 (AS), 接着在下一行显示有意链 (S)。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示。未修饰核糖核苷用纯大写字母表示并且 4'-硫代用小写字母表示。表 16 中的所有序列为 SEQ ID NO: 301 (反义链)/SEQ ID NO: 302 (有意链)的 19mer。

342744 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 19mer。

342764 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 19mer。

352824 在位置 1、2、3、17、18 和 19 具有 4'-硫代核苷(即在每一末端具有三个)且在位置 4-16 具有核糖。主链为 P=O, 5'末端为磷酸。

352819 在位置 1、2、3、4、16、17、18 和 19 具有 4'-硫代核苷(即在每一末端具有四个)且在位置 5-14 具有核糖。主链为 P=O, 5'末端为磷酸。

352827 在位置 1、2、3 具有 4'-硫代核苷且在位置 17、18 和 19 具有

2'-OMe 并且在位置 4-16 具有核糖。主链为 P=O, 5'末端为磷酸。

352826 在位置 1、2、3、10、13 和 17-19 具有 4'-硫代核苷并且在位置 4-9、11、12 和 14-16 具有核糖。主链为 P=O, 5'末端为磷酸。

352825 在位置 1、2、3、7、10、13 和 17-19 具有 4'-硫代核苷并且在位置 4、5、6、8、9、11、12 和 14-16 具有核糖。主链为 P=O, 5'末端为磷酸。

表 16

4'-硫代核糖修饰 19mer siRNA 的活性

链	ISIS #	序列(5'→3')	%抑制	IC ₅₀ (nM)
AS	342744	UCUUAUCACCUUUAGCUCU	89.8	0.08
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA		
AS	352824	ucuUAUCACCUUUAGCucu	49.3	n/a
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA		
AS	352819	ucuuAUCACCUUUAGcucu	49.8	n/a
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA		
AS	352827	ucuUAUCACCUUUAGCUCU	74.4	0.03
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA		
AS	352826	ucuUAUCACcUUuAGCucu	31.3	n/a
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA		
AS	352825	ucuUAcCcUUuAGCucu	37.5	n/a
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA		

几个 4'-硫代构建体显示具有皮摩尔范围内的 IC₅₀。

实施例 36: 基于 338914 构建体的具有 2'-O-甲基修饰的另外 eIF4E siRNA 的活性

如先前实施例所描述制备在表 17 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次然后用包含

0.5、5 和 50 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ LIPOFECTINTM (Gibco BRL)的 130 μL OPTI-MEM-1TM处理。处理重复进行两次。处理 4 或 5 小时后,用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞,在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 17。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下表 17 中首先显示反义链 (AS),接着在下一行显示有意链 (S)。除非另外指出,所有双链构建体为非修饰 RNA,即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示。未修饰核糖核苷用纯大写字母表示。

338914 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

338939 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

345840 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 19mer。从 5'端开始在核苷 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 上为 2'OMe。

345842 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 19mer。从 5'端开始在核苷 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 上为 2'OMe。

345735 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的 20mer,在从 5'端开始的位置 16-20 为 2'O-Me 核苷且位置 1-15 为核糖。

345843 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的 20mer,在从 5'端开始的位置 2-19 为 2'O-Me 核苷且位置 1 和 20 为核糖。

345838 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的 20mer,在从 5'端开始的位置 6、12、15 和 18-20 为 2'O-Me 核苷且位置 1-5、7-11、13、14、16、17 和 20 为核糖。

345839 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的 20mer,在从 5'端开始的位置 6、7、10、11 和 18-20 为 2'O-Me 核苷且位置 1-5、8、9 和 12-17 为核糖。

表 17

具有 2'-O-甲基修饰的另外 eIF4E siRNA 的活性-
基于 338914 构建体的

链	ISIS #	序列(5'→3')	SEQ ID NO	%抑制	IC50 (nM)
AS	338914	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	78.3	0.03
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		
AS	345840	UCCUGGAUCCUUCACCAAU	325	23.9	n/a
S	345842	AUUGGUGAAGGAUCCAGGA	326		
AS	345735	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	77.9	1.4
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		
AS	345735	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	75.5	8.2
S	345843	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		
AS	345838	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	76.9	0.78
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		
AS	345838	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	64.1	12.31
S	345843	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		
AS	345839	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	80.3	1.64
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		
AS	345839	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	71.3	12
S	345843	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		

实施例 37: 具有 2'-O-甲基修饰的另外 eIF4E siRNA 的活性-基于 338910 构建体

如先前实施例所描述制备在表 18 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次然后用包含 0.5、5 和 50 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™处理。处理重复两次进行。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后

16 或 18 小时收获细胞，在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 18。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下表 18 中首先显示反义链 (AS)，接着在下一行显示有意链 (S)。除非另外指出，所有双链构建体为非修饰 RNA，即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示。

338910 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

338935 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

345731 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 的 19mer。从 5'端开始在核苷 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 上为 2'OMe。

345733 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 的 19mer。从 5'端开始在核苷 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 上为 2'OMe。

345713 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的位置 1-15 为核糖且位置 16-20 为 2'OMe 核苷。

345734 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的位置 1 和 20 为核糖且位置 2-19 为 2'OMe 核苷。

345729 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的位置 1-5、7、8、10、11、13、14、16 和 17 为核糖且位置 6、9、12、15 和 18-20 为 2'OMe 核苷。

345730 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的位置 1-5、8、9、12、13、14、15、16 和 17 为核糖且位置 6、7、10、11 和 18-20 为 2'OMe 核苷。

表 18

具有 2'-O-甲基修饰的另外 eIF4E siRNA-基于 338910 构建体

链	ISIS #	序列 (5'→3')	SEQ ID NO	% 抑制	IC50 (nM)
AS	338910	UGUCAU AU UCCUGGAUCCU U	220	81.5	3.21

S	338935	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221		
AS	345731	UGUCAUAUCCUGGAUCCU	323	37.4	96.96
S	345733	AGGAUCCAGGAAUAUGACA	324		
AS	345713	UGUCAUAUCCUGGAUCCU	220	69.4	3.04
S	338935	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221		
AS	345713	UGUCAUAUCCUGGAUCCU	220	59.8	44.7
S	345734	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221		
AS	345729	UGUCAUAUCCUGGAUCCU	220	68.8	19.42
S	338935	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221		
AS	345729	UGUCAUAUCCUGGAUCCU	220	56.0	331
S	345734	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221		
AS	345730	UGUCAUAUCCUGGAUCCU	220	78.5	6.24
S	338935	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221		
AS	345730	UGUCAUAUCCUGGAUCCU	220	81.8	23.5
S	345734	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA	221		

实施例 38: 具有 2'-O-甲基修饰的另外 eIF4E siRNA 的活性-基于 338927 构建体的

如先前实施例所描述制备在表 19 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次然后用包含 0.5、5 和 50 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™处理。处理重复两次进行。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 19。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下表 19 中首先显示反义链 (AS), 接着在下一行显示有意链 (S)。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)

主链和 5'末端羟基。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U(尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T(胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示。

338927 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

338952 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

345854 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 的 19mer。从 5'端开始在核苷 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 上为 2'OMe。

345856 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 的 19mer。从 5'端开始在核苷 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 上为 2'OMe。

345851 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的核苷 1-15 为核糖且位置 16-20 为 2'OMe 核苷。

345857 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的核苷 1 和 20 为核糖且位置 2-19 为 2'OMe 核苷。

345852 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的核苷 1-5、7、8、10、11、13、14、16 和 17 为核糖且位置 6、9、12、15 和 18-20 为 2'OMe 核苷。

345853 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的核苷 1-5、8、9、12、13、14、15、16 和 17 为核糖且位置 6、7、10、11 和 18-20 为 2'OMe 核苷。

表 19

具有 2'-O-甲基修饰的另外 eIF4E siRNA-基于 338927 构建体

链	ISIS #	序列 (5'→3')	SEQ ID NO	%抑制	IC50 (nM)
AS	338927	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	69.7	6.5
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		
AS	345854	AUACUCAGAAGGUGUCUUC	327	59.8	20.77
S	345856	GAAGACACCUUCUGAGUAU	328		
AS	345851	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	70.8	5.43
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		
AS	345851	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	65.5	24.48
S	345857	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		

AS	345852	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	70.0	4.98
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		
AS	345852	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	69.2	17.04
S	345857	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		
AS	345853	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	85.6	2.2
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		
AS	345853	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	94.9	4.28
S	345857	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		

实施例 39: 具有 2'-O-甲基修饰的另外 eIF4E siRNA-基于 338918 构建体

如先前实施例所描述制备在表 20 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次然后用包含 0.5、5 和 50 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™处理。处理重复两次进行。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 20。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下表 20 中首先显示反义链 (AS), 接着在下一行显示有意链 (S)。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示。

338918 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

338943 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

345847 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 的 19mer。从 5'端开始在核苷 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 上为 2'OMe。

345849 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的交互核糖和 2'-OMe 的 19mer。从 5'端开始在核苷 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 上为 2'OMe。

345844 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的核苷 1-15 为核糖且位置 16-20 为 2'OMe 核苷。

345850 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的核苷 1 和 20 为核糖且位置 2-19 为 2'OMe 核苷。

345845 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的核苷 1-5、7、8、10、11、13、14、16 和 17 为核糖且位置 6、9、12、15 和 18-20 为 2'OMe 核苷。

345846 为具有磷酸酯主链和 5'末端磷酸的 20mer，在从 5'端开始的核苷 1-5、8、9、12、13、14、15、16 和 17 为核糖且位置 6、7、10、11 和 18-20 为 2'OMe 核苷。

表 20

具有 2'-O-甲基修饰的另外 eIF4E siRNA-基于 338918 构建体

链	ISIS #	序列 (5'→3')	SEQ ID NO	% 抑制	IC50 (nM)
AS	338918	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	77.9	4.92
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	345847	UCUUAUCACCUUUAGCUCU	301	69.3	23.39
S	345849	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	302		
AS	345844	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	67.2	17.7
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	345844	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	83.0	8.85
S	345850	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	345845	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	30.9	n/a
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	345845	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	61.5	48.22
S	345850	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	345846	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	79.6	9.6
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	345846	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	89.6	4.77
S	345850	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		

实施例 40: 4'-硫代核糖修饰的和混合的 19mer siRNA 在 HeLa 细胞中的

活性

如先前实施例所描述制备在表 21 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。用于 HeLa 细胞的培养方法可以从 ATCC 得到并且可以在例如 www.atcc.org 中找到。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™ 降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次然后用包含 0.02、0.2、2 和 20 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™ 处理。处理重复两次进行。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 21。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下表 21 中首先显示反义链(AS), 接着在下一行显示有意链(S)。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示。全部都是 SEQ ID NO: 301 (反义链)/SEQ ID NO: 302 (有意链)的 19mer。

342744 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 19mer。

342764 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 19mer。

352824 在核苷位置 1、2、3、17、18 和 19 具有 4'-硫代(即在每一末端具有三个)且在位置 4-16 具有核糖。主链为 P=O, 5'末端为磷酸。

352819 在位置 1、2、3、4、16、17、18 和 19 具有 4'-硫代核苷(即在每一末端具有四个)且在位置 5-14 具有核糖。主链为 P=O, 5'末端为磷酸。

352827 在位置 1、2、3 具有 4'-硫代核苷且在位置 17、18 和 19 具有 2'-OMe 并且在位置 4-16 具有核糖。主链为 P=O, 5'末端为磷酸。

352826 在位置 1、2、3、10、13 和 17-19 具有 4'-硫代核苷并且在位置 4-9、11、12 和 14-16 具有核糖。主链为 P=O，5'末端为磷酸。

352825 在位置 1、2、3、7、10、13 和 17-19 具有 4'-硫代核苷并且在位置 4、5、6、8、9、11、12 和 14-16 具有核糖。主链为 P=O，5'末端为磷酸。

354604 在位置 1、2、3 具有 4'-硫代核苷且在位置 17、18 和 19 具有 2'-OMe 并且在位置 4-16 具有核糖。主链为 P=O，5'末端为磷酸。

表 21

4'-硫代核糖修饰和混合的 19mer siRNA 在 HeLa 细胞中的活性

链	ISIS #	序列 (5'→3')	IC ₅₀ (nM)
AS	342744	UCUUAUCACCUUUAGCUCU	1.4
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	
AS	352824	ucuUAUCACCUUUAGCucu	n/a
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	
AS	352819	ucuuAUCACCUUUAGcucu	n/a
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	
AS	352827	ucuUAUCACCUUUAGCUCU	3.7
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	
AS	352826	ucuUAUCACcUUuAGCucu	n/a
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	
AS	352825	ucuUAUcACcUUuAGCucu	n/a
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	
AS	354604	ucuUAUCACCUUUAGCUCU	2.7
S	342764	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	

几个 4'-硫代构建体显示具有皮摩尔范围内的 IC₅₀。

实施例 41: 靶向 eIF4E 的 siRNA 构建体在 U-87 MG 成胶质细胞瘤细胞中的活性

使用上面描述的方法测试了先前表中所示的修饰和未修饰 siRNA 构建体在 U-87 MG 细胞中降低人 eIF4E mRNA 水平的能力。U-87 人成胶质细

胞瘤细胞系从 ATCC (Rockville Md.) 获得并维持于添加有热灭活 10% 胎牛血清的 Iscove's DMEM 培养基中。如先前实施例所描述开展剂量反应实验以获得 IC50 值。

实施例 42: 靶向人 eIF4E 的另外 siRNA

设计了靶向人 eIF4E mRNA (Genbank 登录号 M15353.1, SEQ ID NO: 4) 的另外 siRNA。所有 siRNA 在反义链上具有交互 2'-O-甲基/2'-OH 且在有意链上具有交互 2'-OH/2'-O-甲基。主链为磷酸酯 (P=O) 且 5' 末端为 5'-OH, 虽然应该理解文中所示的这些和其它 siRNA 构建体也可以合成具有 5'-磷酸基团。

反义链示于表 22; 有意链为完全互补的因此未显示。

“靶位点”指寡核苷酸所靶向的 M15353.1 人 eIF4E 序列 (SEQ ID NO: 4) 中靶区域的最 5' 位置。

表 22
靶向人 eIF4E 的另外 siRNA

Isis#	SEQ ID NO	反义链 5'→3'	靶位点
357532	339	GCUUUGGUUCAGCUCCCAA	724
357533	340	GGCGA AUGAGACUUCUCUU	806
357534	341	CUUUUCUACUUGAGCCA AU	1564
357535	342	CAUCAUCACUGUAGUCAUC	445
357536	343	UGCUAUCUUAUCACCUUUA	492
357537	344	UCCAUAUUGCUAUCUUAUC	499
357538	345	UCACAGCCAGGCAUUA AAU	269
357539	346	ACCUUCCUUGUAUACCCU	559
357540	347	UGUAAUUCUUUGAUUGGGA	883
357541	348	UCACUGAUUUUGAAUGAAAU	1392
357542	349	UUUACAGUUUUGUACACUG	1603
357543	350	UUAAAAAACCAGAGUGCCC	146
357544	351	UUUAAAAAACCAGAGUGCC	147
357545	352	UUUUAAAAAACCAGAGUGC	148
357546	353	AUUUUUAAAAAACCAGAGU	150
357547	354	AGAGCCCAAAGUCUUCAA	224

357548	355	UACUAGACAACUGGAUAUG	250
357549	356	AAAGUGAGUAGUCACAGCC	280
357550	357	UUUUUCUCAUCUUCCCACA	320
357551	358	UCCUUGUAUACCCUCCCUA	554
357552	359	UGAUAACCAAUCACUAUCU	593
357553	360	AUGAGACUUCUCUUAUAUC	801
357554	361	UACAAGACAAAGGCGAAUG	817
357555	362	UAGCAGCCAUCAGCAAGAG	1157
357556	363	UAGCAAAGCUUUGUAGUUA	1362
357557	364	UAGUUAGGAAUGUAAUUAU	1466
357558	365	UUGUACACUGUCUUAUAU	1594
346659	329	AAACCAGAGUGCCCAUCUG	141
357559	366	UUAUCACCUUUAGCUCUAA	485
357560	367	UUUAGCUCUAACAUAACA	477
357561	368	CUUUAGCUCUAACAUAAC	478
357562	369	CUCUAACAUAACAACAGC	472
357563	370	UUACUAGACAACUGGAUAU	251
357564	371	CUAGACAACUGGAUAUGGU	248
357565	372	UUAAAUUACUAGACAACUG	256
357566	373	AUUAAAUUACUAGACAACU	257
357567	374	AAAAAGUGAGUAGUCACAG	282
357568	375	UUAAAAAGUGAGUAGUCAC	284
357569	376	UGAGUAGUCACAGCCAGGC	276
357570	377	AAGUGAGUAGUCACAGCCA	279
357571	378	UUUUGCUUUUAUCAUUUUU	163
357572	379	GUUUUGCUUUUAUCAUUUU	164
357573	380	UUUUUUUUACAGUUUUGUA	1608
357574	381	CAUUUUUUUUACAGUUUUG	1610
357575	382	UUAAAAAUUGUAAUAAACA	1793
357576	383	UUUAUUAAAAAUUGUAAUA	1797
357577	384	UUUGUUUUUCUCAUCUCC	324
357578	385	AAAAAUUACCAAAGAAUG	1333
357579	386	AAUGAAAUGCAUAAAUUUG	1381
357580	387	AAACUGAAAUCAGAAUCAC	1213
357630	388	UUAAUGUUUAUCCACCUU	1307
357631	389	UAAAUUUGUAGCAAAGCUU	1370
357632	390	UAAUUCUAGUUAGGAAUGU	1472
357633	391	UAACCAAAGCAAAAUACC	1543
357634	392	UGUACACAUUUUAUUUACA	1616
357635	393	UAGUUGUCUAAAAGACAAU	1639
357636	394	UCAAUUUAUUAAAAAUUGU	1801

实施例 43: 靶向 eIF4E 的另外反义化合物

合成了一组均匀的 2'-O-甲氧乙基(2'-MOE)硫代磷酸酯寡核苷酸, 全部均靶向于 eIF4E mRNA 的 5'帽子区域, 即与 5'帽子邻接的极其靠近 5'端的 mRNA。它们示于表 23。所有胞嘧啶为 5-甲基胞嘧啶。不希望被理论所束缚, 认为完全进行 2'-MOE 修饰的寡核苷酸不是 RNA 酶 H 的底物, 并因此认为通过占位(occupancy-only)或立体位阻机制而不是通过 mRNA 靶标降解来干扰蛋白质翻译。“靶位点”指 eIF4E mRNA (如所指出的 SEQ ID NO: 4 或 11)上的位置。

表 23

靶向 eIF4E mRNA 5'帽子区域的 2'-O-甲氧乙基反义寡核苷酸

ISIS #	序列	区域	靶SEQ ID NO	靶位点	SEQ ID NO
335022	GATCGATCTGATCGC	5' UTR	11	1	395
335023	AGATCGATCTGATCG	5' UTR	4	1	396
335024	TAGATCGATCTGATC	5' UTR	4	2	397
335025	TTAGATCGATCTGAT	5' UTR	4	3	398

还合成了一系列 PNA 寡聚物, 所述寡聚物与表 23 中的寡核苷酸靶向同一位点。它们示于表 24。每一个寡聚物在其 3'端具有赖氨酸。由于具有完全修饰的 2' MOE 化合物, 认为 PNA 寡聚物不是 RNA 酶 H 的底物。

表 24

靶向 eIF4E mRNA 5'帽子区域的 PNA 反义寡聚物

ISIS #	序列	区域	靶SEQ ID NO	靶位点	SEQ ID NO
333879	GATCGATCTGATCGC	5' UTR	11	1	395
333880	AGATCGATCTGATCG	5' UTR	4	1	396
333881	TAGATCGATCTGATC	5' UTR	4	2	397
333882	TTAGATCGATCTGAT	5' UTR	4	3	398

实施例 44: LNA 和 2'-OMe 修饰的 siRNA

如先前实施例所描述制备在表 14 中所示的双链体寡聚 RNA (dsRNA) 化合物, 并且在 HeLa 细胞(美国典型培养物保藏中心, Manassas VA)中进行评价。将细胞以 5000 细胞/孔的密度铺于 96 孔板并且生长于含有高葡萄糖、10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中。用 200 μ L OPTI-MEM-1™ 降低血清培养基(Gibco BRL)将细胞洗涤一次然后用包含 0.2、2 和 20 nM 浓度的目的 dsRNA 和对于每条链寡聚化合物 2.5 μ l/ml LIPOFECTIN™ (Gibco BRL)的 130 μ L OPTI-MEM-1™ 处理。处理重复两次进行。处理 4 或 5 小时后, 用新鲜培养基替换培养基。dsRNA 处理后 16 或 18 小时收获细胞, 在此时分离 RNA 并且如先前实施例所描述通过 RT-PCR 测量靶标的降低。

结果示于表 25。所显示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有意链组成。在下表 25 中首先显示反义链 (AS), 接着在下一行显示有意链 (S)。除非另外指出, 所有双链构建体为非修饰 RNA, 即核糖具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端羟基。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。2'-O-甲基核苷用粗体显示。LNA 核苷用斜体表示。

338910 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

338935 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

352493 为在位置 6、9、12 和 15 具有 LNA (斜体)、在位置 18-20 具有 2'-O-甲基 (粗体) 并且在剩余位置为核糖的 20mer。

338914 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

338939 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

352494 为在位置 6、9、12 和 15 具有 LNA (斜体)、在位置 18-20 具有 2'-O-甲基 (粗体) 并且在剩余位置为核糖的 20mer。

338918 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

338943 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

352495 为在位置 6、9、12 和 15 具有 LNA (斜体)、在位置 18-20

具有 2'-O-甲基 (粗体) 并且在剩余位置为核糖的 20mer。

338927 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

338952 为具有磷酸酯(P=O)主链和 5'末端磷酸的未修饰核糖 20mer。

352496 为在位置 6、9、12 和 15 具有 LNA (斜体)、在位置 18-20 具有 2'-O-甲基 (粗体) 并且在剩余位置为核糖的 20mer。

表 25

LNA 和 2'-OMe 修饰的 siRNA

链	ISIS#	构建体 5'→3'	SEQ ID NO	IC50 (nM)	% 抑制
AS	338910	UGUCAU <u>AU</u> UCCUGGAUCCUU	220	1.42	72
S	338935	AAGGAUCCAGGAUAUGACA	221		
AS	352493	UGUCAU <u>AU</u> UCCUGGAUCCUU	220	--	18
S	338935	AAGGAUCCAGGAUAUGACA	228		
AS	338914	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	2.29	72
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		
AS	352494	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	--	9
S	338939	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	229		
AS	338918	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	1.96	66
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	352495	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	--	13
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237		
AS	338927	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	5.78	62
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		
AS	352496	AUACUCAGAAGGUGU <u>CUUCU</u>	254	--	25
S	338952	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	255		

实施例 45: 靶向人 eIF4E 的另外 siRNA 的活性

测试了来自表 22 的 siRNA 在 HeLa 细胞内降低 eIF4E RNA 水平的能力。将这些化合物设计成针对人 eIF4E mRNA (Genbank 登录号 M15353.1, SEQ ID NO:4)。除非指出, 反义链从位置 1 的 2'-O-甲基开始为交互 2'-O-甲基/核糖(即奇数位置为 2'-O-甲基且偶数位置为核糖)并且有义链从位置 1 的核糖开始为交互核糖/2'-O-甲基(即奇数位置为核糖且偶数位置为 2'-O-甲基)。主链为磷酸酯(P=O)且 5'末端为 5'-OH, 虽然应该理解此处所示的

这些及其它 siRNA 构建体也可以合成为具有 5'-磷酸基。应当注意 ISIS 351831_351832 构建体与 345847_345849 构建体具有相同的序列但是前者为交互的 2'-O-甲基/2'-氟 (反义链上的奇数位置为 2'-O-甲基且偶数位置为 2'-氟; 有义链奇数位置为 2'F 且偶数位置为 2'-O-甲基)。

如上面实施例在 HeLa 细胞中测试了 5 nM 低剂量的表 26 所示化合物。结果示于表 26。所示 siRNA 构建体由一条反义链和一条有义链组成。在下表中首先显示反义链(AS)接着在下一行显示有义链。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。结果表示为表 26 中的 eIF4E RNA 的降低百分数(“%抑制”)。“靶位点”指寡核苷酸所靶向的 M15353.1 人 eIF4E 序列(SEQ ID NO: 4)中靶区域的最 5' 位置。

表 26

靶向人 eIF4E 的另外 siRNA 的活性

链	Isis#	序列 5'→3'	SEQ ID NO	靶位点	靶区域	备注	% 抑制
AS	183750	TGTCATATTCCTGGATCCTT	40	1285	3'UTR	MOE gapmer	40 ±11
S	无						
AS	338918	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	486	编码区	全部核糖	42 ±
S	338943	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA	237			全部核糖	8
AS	345847	UCUUAUCACCUUUAGCUCU	301	487	编码区		0
S	345849	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	302				
AS	351831	UCUUAUCACCUUUAGCUCU	301	487	编码区	交互 2'-OMe/2'F	42 ±
S	351832	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA	302			交互 2'F/2'-OMe	28
AS	357532	GCUUUGGUUCAGCUCCCAA	339	724	3'UTR		0
S	357581	UUGGGAGCUGAACCAAAGC	399				
AS	357533	GGCGAAUGAGACUUCUCUU	340	806	3'UTR		4 ±
S	357582	AAGAGAAGUCUCAUUCGCC	400				17
AS	357534	CUUUUCUACUUGAGCCAUU	341	1564	3'UTR		0
S	357583	AAUGGCUCAAGUAGAAAAG	401				

AS	357535	CAUCAUCACUGUAGUCAUC	342	445	编码区		0
S	357584	GAUGACUACAGUGAUGAUG	402				
AS	357536	UGCUAUCUUAUCACCUUUA	343	492	编码区		27 ±
S	357585	UAAAGGUGAUAAAGAUAGCA	403				41
AS	357537	UCCAUAUUGCUAUCUUAUC	344	499	编码区		0
S	357586	GAUAAGAUAGCAAUAUGGA	404				
AS	357538	UCACAGCCAGGCAUUAUUAAU	345	269	编码区		0
S	357587	AUUUAAUGCCUGGCUGUGA	405				
AS	357539	ACCUUUCUUGUAUACCCU	346	559	编码区		0
S	357588	AGGGUAUACAAGGAAAGGU	406				
AS	357540	UGUAAUUCUUGAUUGGGA	347	883	3'UTR		24 ±
S	357589	UCCCAAUCAAAGAAUUACA	407				5
AS	357541	UCACUGAUUUGAAUGAAAU	348	1392	3'UTR		1 ± 5
S	357590	AUUUCAUUCAAAUCAGUGA	408				
AS	357542	UUUACAGUUUUGUACACUG	349	1603	3'UTR		0
S	357591	CAGUGUACAAAACUGUAAA	409				
AS	357543	UUAAAAAACAGAGUGCCC	350	146	编码区		4 ± 9
S	357592	GGGCACUCUGGUUUUUUAA	410				
AS	357544	UUUAAAAAACAGAGUGCC	351	147	编码区		7 ±
S	357593	GGCACUCUGGUUUUUUAAA	411				29
AS	357545	UUUUAAAAAACAGAGUGC	352	148	编码区		7 ±
S	357594	GCACUCUGGUUUUUUAAAA	412				11
AS	357546	AUUUUUAAAAAACAGAGU	353	150	编码区		0
S	357595	ACUCUGGUUUUUUAAAAAU	413				
AS	357547	AGAGCCCAAAGUCUUCAA	354	224	编码区		0
S	357596	UUGAAGACUUUUGGGCUCU	414				
AS	357548	UACUAGACAACUGGAUAUG	355	250	编码区		30 ±
S	357597	CAUAUCCAGUUGUCUAGUA	415				4
AS	357549	AAAGUGAGUAGUCACAGCC	356	280	编码区		0
S	357598	GGCUGUGACUACUCACUUU	416				
AS	357550	UUUUUCUCAUCUCCCA	357	320	编码区		0
S	357599	UGUGGGAAGAUGAGAAAAA	417				
AS	357551	UCCUUGUAUACCCUCCCUA	358	554	编码区		0
S	357600	UAGGGAGGGUAUACAAGGA	418				
AS	357552	UGAUAACCAAUCACUAUCU	359	593	编码区		38 ±
S	357601	AGAUAGUGAUUGGUUAUCA	419				6
AS	357553	AUGAGACUUCUCUUAUAUC	360	801	3'UTR		10 ±
S	357602	GAUAUAAGAGAAGUCUCAU	420				12
AS	357554	UACAAGACAAAGGCGAAUG	361	817	3'UTR		26 ±
S	357603	CAUUCGCCUUGUCUUGUA	421				8
AS	357555	UAGCAGCCAUCAGCAAGAG	362	1157	3'UTR		0
S	357604	CUCUUGCUGAUGGCUGCUA	422				
AS	357556	UAGCAAAGCUUUGUAGUUA	363	1362	3'UTR		13 ±

S	357605	UAACUACAAAGCUUUGCUA	423				5
AS	357557	UAGUUAGGAAUGUAAUUAU	364	1466	3'UTR		16 ±
S	357606	AUAAUUACAUUCCUAACUA	424				3
AS	357558	UUGUACACUGUCUUAUAU	365	1594	3'UTR		21 ±
S	357607	AUAUUAAGACAGUGUACAA	425				15
AS	357559	UUAUCACCUUUAGCUCUAA	366	485	编码区		0
S	357608	UUAGAGCUAAAGGUGAUAA	426				
AS	357560	UUUAGCUCUACAUAUACA	367	477	编码区		48 ±
S	357609	UGUUA AUGUUAGAGCUAAA	427				12
AS	357561	CUUUAGCUCUACAUAUAAAC	368	478	编码区		0
S	357610	GUUAAUGUUAGAGCUAAAG	428				
AS	357562	CUCUAACAUAUACAACAGC	369	472	编码区		4 ±
S	357611	GCUGUUGUUA AUGUUAGAG	429				31
AS	357563	UUACUAGACAACUGGAUAU	370	251	编码区		55 ±
S	357612	AUAUCCAGUUGUCUAGUAA	430				18
AS	357564	CUAGACAACUGGAUAUGGU	371	248	编码区		0
S	357613	ACCAUAUCCAGUUGUCUAG	431				
AS	357565	UUAAAUAUACUAGACAACUG	372	256	编码区		20 ±
S	357614	CAGUUGUCUAGUAAUUUAA	432				13
AS	357566	AUUAUUUACUAGACAACU	373	257	编码区		20 ±
S	357615	AGUUGUCUAGUAAUUUAAU	433				12
AS	357567	AAAAAGUGAGUAGUCACAG	374	282	编码区		35 ±
S	357616	CUGUGACUACUCACUUUUU	434				20
AS	357568	UUAAAAAGUGAGUAGUCAC	375	284	编码区		51 ±
S	357617	GUGACUACUCACUUUUUAA	435				4
AS	357569	UGAGUAGUCACAGCCAGGC	376	276	编码区		21 ±
S	357618	GCCUGGCUGUGACUACUCA	436				6
AS	357570	AAGUGAGUAGUCACAGCCA	377	279	编码区		0
S	357619	UGGCUGUGACUACUCACUU	437				
AS	357571	UUUUGCUUUUAUCAUUUUU	378	163	编码区		0
S	357620	AAAAAUGAUAAAAGCAAAA	438				
AS	357572	GUUUUGCUUUUAUCAUUUU	379	164	编码区		0
S	357621	AAAAUGAUAAAAGCAAAAC	439				
AS	357573	UUUUAUUUACAGUUUUGUA	380	1608	3'UTR		2 ± 3
S	357622	UACAAAACUGUAAAUA AAA	440				
AS	357574	CAUUUUAUUUACAGUUUUG	381	1610	3'UTR		0
S	357623	CAAAACUGUAAAUA AAAUG	441				
AS	357575	UUAAAAAUUGUAAUAAACA	382	1793	3'UTR		7 ± 5
S	357624	UGUUUAUUACAAUUUUUAA	442				
AS	357576	UUUAUUAAAAUUGUAAUA	383	1797	3'UTR		0
S	357625	UAUUACAAUUUUUAUAAA	443				
AS	357577	UUUGUUUUUCUCAUCUCC	384	324	编码区		34 ±
S	357626	GGAAGAUGAGAAAAACAAA	444				3

AS	357578	AAAAAAUUAACCAAAGAAUG	385	1333	3'UTR		0
S	357627	CAUUCUUUGGUAUUUUUU	445				
AS	357579	AAUGAAAUGCAUAAAUUUG	386	1381	3'UTR		0
S	357628	CAAAUUUAUGCAUUUCAUU	446				
AS	357580	AAACUGAAAUCAGAAUCAC	387	1213	3'UTR		56 ±
S	357629	GUGAUUCUGAUUUCAGUUU	447				14
AS	357631	UAAAUUUGUAGCAAAGCUU	389	1370	3'UTR		0
S	358638	UUGUCCUCAACCAUGGUCAG	448				
AS	357632	UAAUUCUAGUUAGGAAUGU	390	1472	3'UTR		4 ± 9
S	357639	CUGCCCUAGGCUGGCAGGGC	449				
AS	357633	UAACCAAAGCAAAAUAACC	391	1543	3'UTR		13
S	357640	UUGGCAUGGAGGUGGGAGA G	450				
AS	357634	UGUACACAUUUUUAUUUACA	392	1616	3' UTR		0
S	357641	GGCAUUCCAAACAUCUUU	451				
AS	357635	UAGUUGUCUAAAAGACAAU	393	1639	3'UTR		0
S	357642	UGCGCCUCAGGAGUCCGG	452				
AS	357636	UCAAUUUAUAAAAAUUGU	394	1801	3'UTR		0
S	357643	AUUGUCACAGGGUCUCACAG	453				

其反义链具有 SEQ ID NO: 236、301、343、347、355、359、360、361、363、364、365、367、370、372、373、374、375、376、384、387 或 391 的 siRNA 双链体在该测定中抑制 eIF4E 至少 10%。

实施例 46: 靶向 eIF4E 的单链反义 RNA (asRNA)

合成了一系列靶向人 eIF4E (SEQ ID NO: 4) 的单链 RNA 反义寡核苷酸。全部都是整个主链为硫代磷酸酯键且具有 5' 磷酸帽子的 RNA (核糖)。人脐静脉内皮细胞系 HuVEC 从美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA) 获得。HuVEC 细胞常规培养于添加了 SingleQuots 补充物 (Clonetics Corporation, Walkersville, MD) 的 EBM 中 (Clonetics Corporation Walkersville, MD)。当细胞达到 90% 汇合时通过胰酶消化和稀释常规传代, 并且维持高达 15 代。将细胞以 10000 细胞/孔的密度接种于 96 孔板 (Falcon-Primaria #3872) 用于使用 RNA 寡核苷酸 (30 nM 浓度的寡核苷酸) 处理。序列和处理结果 (eIF4E RNA 水平的降低) 示于表 27。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶) 通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在

的 T (胸腺嘧啶)。如在上面的实施例一样,“靶位点”指寡核苷酸所靶向的 M15353.1 人 eIF4E 序列(SEQ ID NO: 4)中靶区域的最 5'位置。“%抑制”指 eIF4E RNA 降低百分数(显示为 $\pm$ 标准差)。

表 27

靶向 eIF4E 的单链反义 RNA 在 HuVEC 细胞中的活性

Isis #	序列 5'→3'	SEQ ID NO:	靶 位 点	靶区域	%抑制
347398	UGUCAUAUCCUGGAUCCUU	220	1285	3' UTR	16 $\pm$ 14
347399	GGAGGAAGUCCUAACCUUUC	222	571	编码区	29 $\pm$ 16
347400	GGCUUUGGUUCAGCUCCCAA	224	724	3' UTR	18 $\pm$ 22
347401	GGCGAAGAGACUUCUCUUA	226	805	3' UTR	18 $\pm$ 4
347402	UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	1277	3' UTR	59 $\pm$ 1
347403	GCUUUUCUACUUGAGCCAUAU	230	1564	3' UTR	21 $\pm$ 1
347404	ACAUCAUCACUGUAGUCAUC	232	445	编码区	24 $\pm$ 1
347405	CACCUUUAGCUCUAACAUAUA	234	480	编码区	22 $\pm$ 3
347406	UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	486	编码区	27 $\pm$ 4
347407	UGCUAUCUUAUCACCUUUAG	238	491	编码区	24 $\pm$ 3
347408	GUCCAUAUUGCUAUCUUAUC	240	499	编码区	26 $\pm$ 7
347409	GCCAAGUUUUGCUUUUAUCA	242	168	编码区	24 $\pm$ 6
347410	UCUUCAACAGUAUCAAACUU	244	211	编码区	11 $\pm$ 9
347411	GUCACAGCCAGGCAUUAUAU	246	269	编码区	48 $\pm$ 11
347412	UCUCAUCUCCCACAUAGGC	148	315	编码区	17 $\pm$ 10
347413	ACCUUCCUUGUAUACCCUC	250	558	编码区	17 $\pm$ 2
347414	GUAGCUGUGUCUGCGUGGGA	252	613	编码区	43 $\pm$ 5
347415	AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	672	终止	12 $\pm$ 10
347416	CUGUAAUUCUUGAUUGGGA	256	883	3' UTR	27 $\pm$ 2
347417	GAAUGAAAUGCAUAAAUUUG	258	1381	3' UTR	22 $\pm$ 8
347418	UCACUGAUUUGAAUGAAAUG	260	1391	3' UTR	22 $\pm$ 7
347419	AUUUACAGUUUUGUACACUG	262	1603	3' UTR	11 $\pm$ 20
347420	AAAACCAGAGUGCCCAUCUG	264	141	编码区	33 $\pm$ 7
347421	ACUUGGAGAUCAGCCGCAGG	266	195	编码区	31 $\pm$ 2

如上面表中所示,全部单链反义 RNA 化合物能够降低人 eIF4E RNA 水平至少 10%。降低 eIF4E RNA 水平至少 20%、至少 30%、至少 40%或至少 50%的化合物特别适宜用作 eIF4E 表达的抑制剂。

在本实验中 ISIS 347402 (SEQ ID NO: 228)使得 eIF4E 表达降低最大。使用 1 nM、10 nM 和 100 nM 浓度的反义 RNA 在 HeLa 细胞中进行了该单链反义 RNA 化合物的剂量反应分析。ISIS 347402 对 eIF4E 表达具有剂量依赖抑制,在 10 nM 浓度时 eIF4E 表达降低 41%并且在 100 nM 时降低 67% (在该实验中 1 nM 剂量没有作用)。

实施例 47: 具有对应于单链反义 RNA 化合物的反义链序列的双链 siRNA 化合物的活性

如先前实施例制备了双链 RNA 化合物。双链体的反义链在序列上与先前实施例中所使用的单链反义 RNA 化合物相同,但是具有磷酸二酯 (P=O)主链。有意链与反义链完全互补 (因此形成平端 20mer 双链体)并且也具有 P=O 主链。两条链都是未修饰 RNA。如先前 siRNA 实施例中所描述,使用 25 nM 浓度的 siRNA 双链体处理 HeLa 细胞。处理对 HeLa 细胞中 eIF4E RNA 水平的影响如表 28 所示。“%抑制”是指 eIF4E RNA 的降低百分数(显示为 $\pm$ 标准差)。在表 28 中仅显示了反义链的序列。在本领域应当理解对于 RNA 序列 U (尿嘧啶)通常取代 DNA 或 DNA 样序列中正常存在的 T (胸腺嘧啶)。

表 28

对应于单链反义 RNA 化合物的双链 siRNA 化合物的活性

序列(反义链)	SEQ ID NO	% 抑制
UGUCAUAUCCUGGAUCCUU	220	80 $\pm$ 3
GGAGGAAGUCCUAACCUUUC	222	28 $\pm$ 1
GGCUUUGGUUCAGCUCCCAA	224	56 $\pm$ 4
GGCGAAUGAGACUUCUCUUA	226	74 $\pm$ 0
UCCUGGAUCCUUCACCAAUG	228	76 $\pm$ 1
GCUUUUCUACUUGAGCCAUU	230	51 $\pm$ 2
ACAUCAUCACUGUAGUCAUC	232	57 $\pm$ 1
CACCUUUAGCUCUAACAUA	234	42 $\pm$ 3
UCUUAUCACCUUUAGCUCUA	236	77 $\pm$ 3
UGCUAUCUUAUCACCUUUAG	238	52 $\pm$ 9
GUCCAUAUUGCUAUCUUAUC	240	62 $\pm$ 4

GCCAAGUUUUGCUUUUAUCA	242	32 ± 12
UCUUCAACAGUAUCAAACUU	244	17 ± 1
GUCACAGCCAGGCAUUAUU	246	66 ± 0
UCUCAUCUUCCCACAUAGGC	248	45 ± 1
ACCUUUCUUGUAUACCCUC	250	60 ± 5
GUAGCUGUGUCUGCGUGGGA	252	45 ± 1
AUACUCAGAAGGUGUCUUCU	254	83 ± 1
CUGUAAUUCUUGAUUGGGA	256	74 ± 0
GAAUGAAAUGCAUAAUUUG	258	6 ± 1
UCACUGAUUUGAAUGAAAUG	260	63 ± 1
AUUUACAGUUUUGUACACUG	262	64 ± 0
AAAACCAGAGUGCCCAUCUG	264	88 ± 0
ACUUGGAGAUCAAGCCGAGG	266	42 ± 6
AGUAUAGAAAUGCCAAGUUG	268	69 ± 7

其反义链具有 SEQ ID NO: 220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、260、262、264、266 或 268 的双链 RNA 反义化合物对 eIF4E RNA 水平至少抑制 10%。其反义链具有 SEQ ID NO: 220、224、226、228、230、232、236、238、240、246、250、254、256、260、262、264 或 268 的双链 RNA 反义化合物对 eIF4E RNA 水平至少抑制 50%，并且因此是 eIF4E 表达的特别适宜抑制剂。

因此单链和双链反义 RNA 化合物都能够引起 eIF4E RNA 水平的抑制。其单链和双链形式都有活性的化合物(即具有或不具有互补有意链的活性反义链) 认为是特别有用的。

除了文中所描述的那些之外，来自上述说明书的本发明多种修饰对本领域技术人员是显而易见的。此类修饰也旨在处于后附权利要求范围内。本申请引用的每一参考(包括但不限于期刊文章、美国和非美国专利、专利申请公开、国际专利申请公开、基因银行登录号等等)在本文整合引用作为参考。2004 年 9 月 18 日提交的美国临时申请序列号 60/504,110 和 2004 年 6 月 3 日提出的美国临时申请序列号 60/576,534 在本文整合引用作为参考。

序列表

<110> ISIS 药物公司
伊莱利利公司

<120> eIF4E 表达的调节

<130> ISIS0135-500WO (RTS-0552WO)

<150> 60/504,110

<151> 2003-09-18

<150> 60/576,534

<151> 2004-06-03

<160> 459

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 1

tccgtcatcg ctcttcaggg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 2

gtgcgcgcga gcccgaaatc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 3

atgcattctg cccccaagga

20

<210> 4

<211> 1842

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<220>

<221> CDS

<222> (19)...(672)

<400> 4

```

cgatcagatc gatctaag atg gcg act gtc gaa ccg gaa acc acc cct act      51
                Met Ala Thr Val Glu Pro Glu Thr Thr Pro Thr
                  1              5              10

cct aat ccc ccg act aca gaa gag gag aaa acg gaa tct aat cag gag      99
Pro Asn Pro Pro Thr Thr Glu Glu Glu Lys Thr Glu Ser Asn Gln Glu
              15              20              25

gtt gct aac cca gaa cac tat att aaa cat ccc cta cag aac aga tgg      147
Val Ala Asn Pro Glu His Tyr Ile Lys His Pro Leu Gln Asn Arg Trp
              30              35              40

gca ctc tgg ttt ttt aaa aat gat aaa agc aaa act tgg caa gca aac      195
Ala Leu Trp Phe Phe Lys Asn Asp Lys Ser Lys Thr Trp Gln Ala Asn
              45              50              55

ctg cgg ctg atc tcc aag ttt gat act gtt gaa gac ttt tgg gct ctg      243
Leu Arg Leu Ile Ser Lys Phe Asp Thr Val Glu Asp Phe Trp Ala Leu
              60              65              70              75

tac aac cat atc cag ttg tct agt aat tta atg cct ggc tgt gac tac      291
Tyr Asn His Ile Gln Leu Ser Ser Asn Leu Met Pro Gly Cys Asp Tyr
              80              85              90

tca ctt ttt aag gat ggt att gag cct atg tgg gaa gat gag aaa aac      339
Ser Leu Phe Lys Asp Gly Ile Glu Pro Met Trp Glu Asp Glu Lys Asn
              95              100              105

aaa cgg gga gga cga tgg cta att aca ttg aac aaa cag cag aga cga      387
Lys Arg Gly Gly Arg Trp Leu Ile Thr Leu Asn Lys Gln Gln Arg Arg
              110              115              120

agt gac ctc gat cgc ttt tgg cta gag aca ctt ctg tgc ctt att gga      435
Ser Asp Leu Asp Arg Phe Trp Leu Glu Thr Leu Leu Cys Leu Ile Gly
              125              130              135

gaa tct ttt gat gac tac agt gat gat gta tgt ggc gct gtt gtt aat      483
Glu Ser Phe Asp Asp Tyr Ser Asp Asp Val Cys Gly Ala Val Val Asn
              140              145              150              155

gtt aga gct aaa ggt gat aag ata gca ata tgg act act gaa tgt gaa      531
Val Arg Ala Lys Gly Asp Lys Ile Ala Ile Trp Thr Thr Glu Cys Glu

```

160	165	170	
aac aga gaa gct gtt aca cat ata ggg agg gta tac aag gaa agg tta			579
Asn Arg Glu Ala Val Thr His Ile Gly Arg Val Tyr Lys Glu Arg Leu			
175	180	185	
gga ctt cct cca aag ata gtg att ggt tat cag tcc cac gca gac aca			627
Gly Leu Pro Pro Lys Ile Val Ile Gly Tyr Gln Ser His Ala Asp Thr			
190	195	200	
gct act aag agc ggc tcc acc act aaa aat agg ttt gtt gtt taa			672
Ala Thr Lys Ser Gly Ser Thr Thr Lys Asn Arg Phe Val Val *			
205	210	215	
gaagacacct tctgagtatt ctcataggag actgcgtcaa gcaatcgaga tttgggagct			732
gaaccaaagc ctcttcaaaa agcagagtgg actgcattta aatttgattt ccatcttaat			792
gttactcaga tataagagaa gtctcattcg cctttgtctt gtacttctgt gttcattttt			852
tttttttttt tttggctaga gtttccacta tcccaatcaa agaattacag tacacatccc			912
cagaatccat aaatgtgttc ctggccact ctgtaatagt tcagtagaat taccattaat			972
tacatacaga ttttacctat ccacaatagt cagaaaacaa cttggcattt ctatacttta			1032
caggaaaaaa aattctgttg ttccatttta tgcagaagca tattttgctg gtttgaaaga			1092
ttatgatgca tacagttttc tagcaatttt ctttgtttct ttttacagca ttgtctttgc			1152
tgtactcttg ctgatggctg ctagatttta atttatttgt ttccctactt gataatatta			1212
gtgattctga tttcagtttt tcatttgttt tgcttaaat tttttttttt ttttcctcat			1272
gtaacattgg tgaaggatcc aggaatatga cacaagggtg gaataaacat taattttgtg			1332
cattcttttg taattttttt tgttttttgt aactacaaag ctttgctaca aatttatgca			1392
tttcattcaa atcagtgatc tatgtttgtg tgatttccta aacataattg tggattataa			1452
aaaatgtaac atcataatta cattcctaac tagaattagt atgtctgttt ttgtatcttt			1512
atgctgtatt ttaacacttt gtattactta gggtattttt ctttggttaa aaatggctca			1572
agtagaaaag cagtcgccatt catattaaga cagtgtacaa aactgtaaat aaaatgtgta			1632
cagtgaattg tcttttagac aactagattt gtccttttat ttctccatct ttatagaagg			1692
aatttgact tcttattgca ggcaagtctc tatattatgt cctcttttgt ggtgtcttcc			1752
atgtgaacag cataagtttg gagcactagt ttgattatta tgtttattac aatttttaat			1812
aaattgaata ggtagtatca tatatatgga			1842

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 5

tggcgactgt cgaaccg

17

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 6

agattccggtt ttctcctctt ctgtag

26

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 探针

<400> 7

aaaccacccc tactcctaata cccccg

26

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 8

gaaggatgaag gtcggagtc

19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 9

gaagatggtg atgggatttc

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 探针

<400> 10
caagcttccc gttctcagcc

20

<210> 11
<211> 2763
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>

<220>

<221> CDS

<222> (15)...(668)

<400> 11
gagatcgatc taag atg gcg act gtg gaa ccg gaa acc acc cct acc act 50
Met Ala Thr Val Glu Pro Glu Thr Thr Pro Thr Thr
1 5 10

aat ccc cca cct gca gaa gag gaa aaa aca gag tct aat caa gag gtt 98
Asn Pro Pro Pro Ala Glu Glu Glu Lys Thr Glu Ser Asn Gln Glu Val
15 20 25

gct aac cca gag cac tat att aaa cac cct cta cag aac agg tgg gca 146
Ala Asn Pro Glu His Tyr Ile Lys His Pro Leu Gln Asn Arg Trp Ala
30 35 40

ctc tgg ttt ttt aaa aat gat aaa agc aaa act tgg caa gca aac ctt 194
Leu Trp Phe Phe Lys Asn Asp Lys Ser Lys Thr Trp Gln Ala Asn Leu
45 50 55 60

cga ttg atc tct aag ttt gat act gtt gaa gac ttt tgg gct cta tac 242
Arg Leu Ile Ser Lys Phe Asp Thr Val Glu Asp Phe Trp Ala Leu Tyr
65 70 75

aac cat atc cag ttg tct agt aat tta atg cct ggc tgt gac tac tca 290
Asn His Ile Gln Leu Ser Ser Asn Leu Met Pro Gly Cys Asp Tyr Ser
80 85 90

ctt ttt aag gac ggg att gag cct atg tgg gaa gat gag aaa aac aaa 338
Leu Phe Lys Asp Gly Ile Glu Pro Met Trp Glu Asp Glu Lys Asn Lys
95 100 105

cga gga gga cgg tgg ctg atc aca ctg aac aag cag cag aga cgg agt 386
Arg Gly Gly Arg Trp Leu Ile Thr Leu Asn Lys Gln Gln Arg Arg Ser
110 115 120

gac ctc gat cgc ttc tgg cta gag aca ctg ctg tgc ctt att gga gaa 434
Asp Leu Asp Arg Phe Trp Leu Glu Thr Leu Leu Cys Leu Ile Gly Glu
125 130 135 140

tct ttc gat gac tac agt gat gat gtg tgt gga gct gtt gtt aat gtt 482
Ser Phe Asp Asp Tyr Ser Asp Asp Val Cys Gly Ala Val Val Asn Val
145 150 155

aga gct aaa ggc gat aag ata gca ata tgg act act gag agt gaa aac	530
Arg Ala Lys Gly Asp Lys Ile Ala Ile Trp Thr Thr Glu Ser Glu Asn	
160 165 170	

aga gat gca gtc aca cac ata ggg agg gta tac aag gaa agg tta gga	578
Arg Asp Ala Val Thr His Ile Gly Arg Val Tyr Lys Glu Arg Leu Gly	
175 180 185	

ctt cct ccg aag ata gtg att ggt tat cag tcc cac gca gac aca gct	626
Leu Pro Pro Lys Ile Val Ile Gly Tyr Gln Ser His Ala Asp Thr Ala	
190 195 200	

aca aag agc ggc tcc acc act aaa aat agg ttt gtt gtt taa	668
Thr Lys Ser Gly Ser Thr Thr Lys Asn Arg Phe Val Val *	
205 210 215	

aaagacacct	tctgagtatt	ctcacaggag	actgcgtcac	gcaatcgaga	ttgggagctg	728
aaccaaagcc	tcataaaagc	agagtggact	gcactgaagt	tgattccatc	caagtgttgc	788
taagatataa	gagaagtctc	attcgccctt	gtcttgact	tctgtgttca	ttctcctccc	848
ccacccccaa	tttttgctag	tgtgtccact	atcccaatca	aagaattaca	gtatacgtca	908
ccccagaacc	cgcagatgtg	ttcctggccc	gctctgtaac	agccggttag	aattaccatg	968
acacacacat	ttgcctttcc	acagtattcg	aaaaagaact	tgcattttcta	ttaccttagc	1028
aggaaagatc	tggttttgct	ccactccatg	caggagcgga	ctttgctggg	gtgagagtct	1088
gagtacagct	ttctagcaac	cttctgtttc	ctttcacagc	attgtccttg	ctgtcctctt	1148
gctgatggct	gctagattta	atatttttgc	ttccctcctt	gataacatta	gtgattctga	1208
tttcagtttt	tcattttgtt	tgtttttgtt	tttttcctcg	tgtaacattg	gtgaaggatc	1268
caggaatatg	acagaaaggt	ggaataaaca	ttaaatttgt	gcattctttg	gtaatttttt	1328
tgttttctgt	aactacaaag	ctttgctaca	aatttatgca	tttcattcaa	atcagtgatc	1388
tatgtctgtg	tgatccctaa	acataattgt	ggactataaa	aatgtaacac	cataattaca	1448
ttcctaacta	gaattagtat	gtctgccttt	gtatctctat	gctgtacttt	aacactttgt	1508
attcttaggt	tattttgctt	tgggttacaat	ggctcaagta	gaaaagcggt	cccatccata	1568
ttaagacagt	gtacaaaact	gtaaataaaa	tgtgtacagt	gaattgtctt	ttagacaact	1628
agatttgtcc	tttatttctc	catctctaga	aggaatctgt	acttcgtatt	gcaaggcagt	1688
ctcttggtgc	ttcttagagt	gtcttcccca	tgcacagcct	cagtttggag	cactagttta	1748
ttatgtttat	tacaattttt	aataaattga	ctaggtagta	tcacatgtaa	ttacactgat	1808
gtggctatct	ttttaataaa	gttaaggcac	agttgtcag	tcctagggtg	agtgatggac	1868
tttgactatg	ttacagttga	tgaggattgg	ggttttggtg	catcaccatt	cggtaggaac	1928
agcggctaga	aactgattgt	tgggtttaag	atgtttttac	ttaatggcca	gaaaatttagc	1988
gtaaggaaag	tatatagaga	aacatgcgtt	agggacatta	gtgttactat	ctgaataaaa	2048
cacaataaac	aagtattaag	aactacttat	attggccaat	tgttgcagta	tggttttctg	2108
taaacttgaa	accttgatct	attctttgta	tcatttaaaag	caaacatgaa	gacattttgt	2168
ctgcagtacg	taattgtata	gttcagatcc	tgtgagatga	ggtgtggctg	ttaacgccga	2228
agggttaagct	gaactgtggg	tagcagagtg	gaaaccattg	gctgagagaa	aaatgctctt	2288
taagtgggtg	ttgttatgaa	ttcacactga	taacttgata	aagatcctta	taaaatacat	2348
acggaattaa	tagcattgct	cttattatgt	acgtcaagaa	tgtataaccg	cctgctcttg	2408
ttgtcacaga	taactccctg	ttcagtgcct	tggaaatagc	gatgctcacg	atctcagcat	2468
tctgtaccct	acatctactg	tgtggatcat	tgagagatct	tttgacattg	caacatgata	2528
tggctctatgt	tgggctgcat	tcctggctgt	cttgtatgag	accccggttg	gctccctgaa	2588
gctgattgat	acagtgtaca	ggcatgaagg	tggctgatga	ggctttctta	ccaacatgtg	2648
ggattctagt	agttgtatct	attagagatt	aattctcata	ttccttttca	ttcatttgta	2708
agaagtatca	actttagaag	tgaaaaaaga	atcataaaat	acagttttta	aagtt	2763

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 12

aggacggtgg ctgatacaca

19

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 13

tctctagcca gaagcgatcg a

21

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 探针

<400> 14

tgaacaagca gcagagacgg agtga

25

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 15

ggcaaattca acggcacagt

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 16

gggtctcgct cctggaagat

20

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 探针

<400> 17

aaggccgaga atgggaagct tgatcatc

27

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 18

aatggtaatt ctactgaact

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 19

atattatcaa gtagggaaac

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 20 tttcacattc agtagtccat	20
<210> 21 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 21 cgtgggactg ataaccaatc	20
<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 22 atgccaaagtt gtttttctgac	20
<210> 23 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 23 caccttttagc tctaacatta	20
<210> 24 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 24 aacctatttt tagtggtgga	20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 25
tagcagccat cagcaagagt

20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 26
attaataatct agcagccatc

20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 27
aatcactatc tttggaggaa

20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 28
tcttaatatg aatgggactg

20

<210> 29
<211> 20

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 29	20
gaaggtgtct tcttaaaca	
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 30	20
tctgcgtggg actgataacc	
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 31	20
tctcgattgc ttgacgcagt	
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 32	20
aacagcttct ctgttttcac	
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 反义化合物

<400> 33

aaaatctagc agccatcagc

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 34

ggatgttttaa tatagtgttc

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 35

actgtcttaa tatgaatggg

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 36

tcaatttatt aaaaattgta

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 37
ataaaatttgt agcaaagctt 20

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 38
aaaactgtat gcatcataat 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 39
aaaagcgatc gaggtcactt 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 40
tgtcatattc ctggatcctt 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 41

tataatccac aattatgttt	20
<210> 42	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 42	
tatgcttctg cataaaatgg	20
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 43	
gtggtggagc cgctcttagt	20
<210> 44	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 44	
agaaaactgt atgcatcata	20
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 45	
aagacaattc actgtacaca	20

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 46
cgacagtcgc catcttagat

20

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 47
ttttcctgta aagtatagaa

20

<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 48
ctagttgtct aaaagacaat

20

<210> 49
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 49
tgtagtcatc aaaagattct

20

<210> 50
<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 50

attgtggata ggtaaaatct

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 51

tgctgttcac atggaagaca

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 52

atcaaactag tgctccaaac

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 53

aaattttaa at gcagtcact

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 54

cgctcttagt agctgtgtct

20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 55

atcttagatc gatctgatcg

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 56

acagtcgcca tcttagatcg

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 57

ttagcaacct cctgattaga

20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 58 tctgggtag caacctcctg	20
<210> 59 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 59 gccaaagtttt gcttttatca	20
<210> 60 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 60 gtttgcttgc caagttttgc	20
<210> 61 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 61 tcttcaacag tatcaaactt	20
<210> 62 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 62 aaaagtcttc aacagtatca	20

<210> 63
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 63
agagcccaaa agtcttcaac

20

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 64
gacaactgga tatggttgta

20

<210> 65
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 65
tactagacaa ctggatatgg

20

<210> 66
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 66
taaattacta gacaactgga

20

<210> 67

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 67
ggcattaaat tactagacaa

20

<210> 68
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 68
agccaggcat taaattacta

20

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 69
gtcacagcca ggcattaaat

20

<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 70
gagtagtcac agccaggcat

20

<210> 71
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 71

aaagtgagta gtcacagcca

20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 72

tccttaaaaa gtgagtagtc

20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 73

tcttcccaca taggctcaat

20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 74

tctcatcttc ccacataggc

20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 75

gttttttctca tcttccacaca

20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 76

aaagattctc caataaggca

20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 77

acatcatcac tgtagtcac

20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 78

gctctaacad taacaacagc

20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 79 tcttatcacc tttagctcta	20
<210> 80 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 80 tgctatctta tcacctttag	20
<210> 81 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 81 gtccatattg ctatcttatc	20
<210> 82 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 82 tcagtagtcc atattgctat	20
<210> 83 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 83 tccttgtata ccctccctat	20

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 84
accttttcctt gtataccctc

20

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 85
tcctaaccctt tccttgtata

20

<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 86
ggaggaagtc ctaacctttc

20

<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 87
tgataaccaa tcactatctt

20

<210> 88

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 88
gtagctgtgt ctgcgtggga

20

<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 89
ttagtggtgg agccgctctt

20

<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 90
acaacaaacc tatttttagt

20

<210> 91
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 91
gtcttcttaa acaacaaacc

20

<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 92

atactcagaa ggtgtcttct

20

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 93

tgagaatact cagaaggtgt

20

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 94

agctcccaaa tctcgattgc

20

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 95

ggcttttggtt cagctcccaa

20

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 96

atgagacttc tcttatatct

20

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 97

ggcgaatgag acttctctta

20

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 98

agacaaaggc gaatgagact

20

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 99

gtacaagaca aaggcgaatg

20

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 100

tcttttgattg ggatagtgga 20

<210> 101
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 101
ctgtaattct ttgattggga 20

<210> 102
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 102
ctagcagcca tcagcaagag 20

<210> 103
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 103
ctgaaatcag aatcactaat 20

<210> 104
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 104
gatccttcac caatgttaca 20

<210> 105	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 105	
tcctggatcc ttcaccaatg	20
<210> 106	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 106	
aagcttttgta gttacaaaaa	20
<210> 107	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 107	
tagcaaagct ttgtagttac	20
<210> 108	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 108	
aaatgcataa atttgtagca	20
<210> 109	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 109	
gaatgaaatg cataaatttg	20
<210> 110	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 110	
gattttgaatg aaatgcataa	20
<210> 111	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 111	
tcactgattt gaatgaaatg	20
<210> 112	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 112	
catagatcac tgatttgaat	20
<210> 113	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 反义化合物

<400> 113

ctagttagga atgtaattat

20

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 114

taattctagt taggaatgta

20

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 115

cagacatact aattctagtt

20

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 116

gcttttctac ttgagccatt

20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 117
ttgtacactg tcttaatatg 20

<210> 118
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 118
cagttttgta cactgtctta 20

<210> 119
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 119
atttacagtt ttgtacactg 20

<210> 120
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 120
gtacacatatt tatttacagt 20

<210> 121
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 121
aaggacaaat ctagttgtct 20

<210> 122
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 122
tttcacactc agtagtccat

20

<210> 123
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 123
atggactact gaatgtgaaa

20

<210> 124
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 124
gattggttat cagtcccacg

20

<210> 125
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 125
gtcagaaaac aacttgcat

20

<210> 126
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 126
taatgtaga gctaaagggtg 20

<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 127
tccaccacta aaaatagggtt 20

<210> 128
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 128
actcttgctg atggctgcta 20

<210> 129
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 129
gatggctgct agattttaat 20

<210> 130
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 130
cagtcccatt catattaaga 20

<210> 131
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 131

ttgtttaaga agacaccttc	20
<210> 132	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 132	
ggttatcagt cccacgcaga	20
<210> 133	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 133	
actgcgtcaa gcaatcgaga	20
<210> 134	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 134	
gtgaaaacag agaagctgtt	20
<210> 135	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 135	
gctgatggct gctagatttt	20
<210> 136	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 136	
gaacactata ttaaacaatcc	20

<210> 137
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 137
aagcttttgct acaaatttat 20

<210> 138
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 138
attatgatgc atacagtttt 20

<210> 139
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 139
aagtgcctc gatcgctttt 20

<210> 140
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 140
aaggatccag gaatatgaca 20

<210> 141
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 141
ccatttttatg cagaagcata 20

<210> 142
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 142
actaagagcg gctccaccac 20

<210> 143
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 143
tatgatgcat acagttttct 20

<210> 144
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 144
atctaagatg gcgactgtcg 20

<210> 145
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 145
ttctatactt tacaggaaaa 20

<210> 146
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 146
tgtcttccat gtgaacagca 20

<210> 147
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 147
gttttgagca ctagtttgat 20

<210> 148
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 148
agacacagct actaagagcg 20

<210> 149
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 149
cgatctaaga tggcgactgt 20

<210> 150
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 150
tctaatacagg aggttgctaa 20

<210> 151
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 151
caggaggttg ctaaccacaga 20

<210> 152

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 152	
tgataaaagc aaaacttggc	20
<210> 153	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 153	
gcaaaacttg gcaagcaaac	20
<210> 154	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 154	
gttgaagact tttgggctct	20
<210> 155	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 155	
tacaaccata tccagttgtc	20
<210> 156	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<400> 156	
ccatatccag ttgtctagta	20
<210> 157	

<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 157
tccagttgtc tagtaattta 20

<210> 158
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 158
ttgtctagta atttaatgcc 20

<210> 159
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 159
atttaatgcc tggctgtgac 20

<210> 160
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 160
atgcctggct gtgactactc 20

<210> 161
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 161
tggctgtgac tactcacttt 20

<210> 162
<211> 20

<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 162
gactactcac tttttaagga 20

<210> 163
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 163
attgagccta tgtggaaga 20

<210> 164
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 164
gcctatgtgg gaagatgaga 20

<210> 165
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 165
tgtggaaga tgagaaaaac 20

<210> 166
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<220>

<400> 166
tgccttattg gagaatcttt 20

<210> 167
<211> 20
<212> DNA

<213> 人类	
<220>	
<400> 167 gatgactaca gtgatgatgt	20
<210> 168 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 168 gctgttggtta atgttagagc	20
<210> 169 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 169 tagagctaaa ggtgataaga	20
<210> 170 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 170 ctaaaggtga taagatagca	20
<210> 171 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 171 gataagatag caatatggac	20
<210> 172 <211> 20 <212> DNA	

<213> 人类

<220>

<400> 172

atagcaatat ggactactga

20

<210> 173

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 173

atagggaggg tatacaagga

20

<210> 174

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 174

gaggggtatac aaggaaaggt

20

<210> 175

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 175

tatacaagga aaggtagga

20

<210> 176

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 176

gaaaggtag gacttcctcc

20

<210> 177

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 177

aagatagtga ttggttatca

20

<210> 178

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 178

tcccacgcag acacagctac

20

<210> 179

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 179

aagagcggct ccaccactaa

20

<210> 180

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 180

ggtttgttgt ttaagaagac

20

<210> 181

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 181

agaagacacc ttctgagtat

20

<210> 182

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 182

acaccttctg agtatttctca

20

<210> 183

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 183

gcaatcgaga tttgggagct

20

<210> 184

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 184

ttgggagctg aaccaaagcc

20

<210> 185

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 185

agatataaga gaagtctcat

20

<210> 186

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 186

taagagaagt ctcattcgcc

20

<210> 187

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类	
<220>	
<400> 187 agtctcatte gcctttgtct	20
<210> 188 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 188 cattcgcctt tgtcttgtac	20
<210> 189 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 189 tccactatcc caatcaaaga	20
<210> 190 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 190 tcccaatcaa agaattacag	20
<210> 191 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 191 ctcttgctga tggctgctag	20
<210> 192 <211> 20 <212> DNA	

<213> 人类	
<220>	
<400> 192 attagtgatt ctgatttcag	20
<210> 193 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 193 tgtaacattg gtgaaggatc	20
<210> 194 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 194 cattggtgaa ggatccagga	20
<210> 195 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 195 gtaactacaa agcttttgcta	20
<210> 196 <211> 20 <212> DNA <213> 人类	
<220>	
<400> 196 ttatgcattt cattcaaatc	20
<210> 197 <211> 20 <212> DNA	

<213> 人类

<220>

<400> 197

catttcattc aaatcagtga

20

<210> 198

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 198

attcaaatca gtgatctatg

20

<210> 199

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 199

tacattccta actagaatta

20

<210> 200

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 200

aactagaatt agtatgtctg

20

<210> 201

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 201

aatggctcaa gtagaaaagc

20

<210> 202

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 202

catattaaga cagtgtacaa

20

<210> 203

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 203

taagacagtg tacaaaactg

20

<210> 204

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 204

cagtgtacaa aactgtaa

20

<210> 205

<211> 20

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 205

actgtaaata aaatgtgtac

20

<210> 206

<211> 20

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<400> 206

atggactact gagtgtgaaa

20

<210> 207

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列	
<220>	
<221> n 为任何碱基	
<222> 位置 1-20	
<223> 反义化合物	
<400> 207	
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	20
<210> 208	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 208	
ttcgcggctg gacgattcag	20
<210> 209	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 209	
ggatagaacg cgaaagcttg	20
<210> 210	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 210	
tgttacagtc ttgtaccctt	20
<210> 211	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 反义化合物

<400> 211

ccttccctga aggttcctcc

20

<210> 212

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 212

cagaugggca cucugguuu

19

<210> 213

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 213

gucuacccgu gagaccaa

19

<210> 214

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 214

ccugcggcug aucuccaag

19

<210> 215

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 215

ggacgccgac uagagguuc

19

<210> 216

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 216

caacuuggca uuucuaauac

19

<210> 217

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 217

guugaaccgu aaagauaug

19

<210> 218

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 218

cuuacgcuga guacuucga

19

<210> 219

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 219

gaaugcgacu caugaagcu

19

<210> 220

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 220

ugucauauuc cuggauccuu

20

<210> 221

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 221

aaggauccag gaauaugaca

20

<210> 222

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 222

ggaggaaguc cuaaccuuuc

20

<210> 223

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 223

gaaagguuag gacuuccucc

20

<210> 224

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 224

ggcuuugguu cagcucccaa

20

<210> 225

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 225

uugggagcug aaccaaagcc

20

<210> 226

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 226

ggcgaaugag acuucucuua

20

<210> 227

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 227

uaagagaagu cucauucgcc

20

<210> 228

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 228

uccuggaucc uucaccaaug

20

<210> 229

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 229

cauuggugaa ggauccagga

20

<210> 230

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 230

gcuuuucuac uugagccauu

20

<210> 231

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 231

aauggcucaa guagaaaagc 20

<210> 232

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 232

acaucaucac uguagucauc 20

<210> 233

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 233

gaugacuaca gugaugaugu 20

<210> 234

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 234

caccuuuagc ucuaacauua 20

<210> 235

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 235

uaauguuaga gcuaaaggug 20

<210> 236

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 236
ucuuaucacc uuuagcucua 20

<210> 237
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 237
uagagcuaaa ggugauaaga 20

<210> 238
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 238
ugcuauuuu ucacuuuag 20

<210> 239
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 239
cuaaagguga uaagauagca 20

<210> 240
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 240
guccauauug cuauuuuauuc 20

<210> 241
<211> 20
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 241

gauaagauag caauauggac

20

<210> 242

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 242

gccaauguuuu gcuuuuauca

20

<210> 243

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 243

ugauaaaagc aaaacuuggc

20

<210> 244

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 244

ucuucaacag uaucaaacu

20

<210> 245

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 245

aaguugaua cuguugaaga

20

<210> 246

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 246

gucacagcca ggcauuaau

20

<210> 247

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 247

auuuuaugcc uggcugugac

20

<210> 248

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 248

ucucaucuuc ccacauaggc

20

<210> 249

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 249

gccuaugugg gaagaugaga

20

<210> 250

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 250

accuuuccuu guauaccuc

20

<210> 251

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 251

gaggguaauac aaggaaaggu

20

<210> 252

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 252

guagcugugu cugcguggga

20

<210> 253

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 253

ucccacgcag acacagcuac

20

<210> 254

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 254

auacucagaa ggugucuucu

20

<210> 255

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 255

agaagacacc uucugaguau

20

<210> 256

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 256

cuguaauucu uugauuggga 20

<210> 257

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 257

ucccaaucaa agaauuacag 20

<210> 258

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 258

gaaugaaaug cauaaaauug 20

<210> 259

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 259

caaaauuaug cauuucauuc 20

<210> 260

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 260

ucacugauuu gaaugaaaug 20

<210> 261

<211> 20

<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 261	
cauuucauuc aaaucaguga	20
<210> 262	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 262	
auuuacaguu uuguacacug	20
<210> 263	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 263	
caguguacaa aacuguaaaau	20
<210> 264	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 264	
aaaaccagag ugcccacug	20
<210> 265	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 265	
cagaugggca cucugguuuu	20
<210> 266	

<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 266	
acuuggagau cagccgcagg	20
<210> 267	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 267	
ccugcggcug aucuccaagu	20
<210> 268	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 268	
aguauagaaa ugccaaguug	20
<210> 269	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 269	
caacuuggca uuucuauacu	20
<210> 270	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 270	
aaaccagagu gcccaucugt t	21

<210> 271
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 271
cagaugggca cucugguut t 21

<210> 272
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 272
cuuggagauc agccgcaggt t 21

<210> 273
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 273
ccugcggcug aucuccaagt t 21

<210> 274
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 274
guauagaaau gccaguugt t 21

<210> 275
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 275
caacuuggca uuucuaauact t 21

<210> 276	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 276	
uuugucucug guccuuacuu	20
<210> 277	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 277	
aaguaaggac cagagacaaa	20
<210> 278	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 278	
cuucuggcau ccgguuuagu u	21
<210> 279	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 279	
cuaaaccgga ugccagaagu u	21
<210> 280	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 280	
ctgctagcct ctggatttga	20

<210> 281
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 281
cgttattaac ctccgttgaa 20

<210> 282
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 282
atgcatacta cgaaaggccg 20

<210> 283
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 283
uuaaaaaacc agagugccca 20

<210> 284
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 284
ugggcacucu gguuuuuuuaa 20

<210> 285
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 285
uuuaaaaaac cagagugccc 20

<210> 286
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 286
gggcacucug guuuuuuaaa 20

<210> 287
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 287
uuuuuaaaaa ccagagugcc 20

<210> 288
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 288
ggcacucugg uuuuuuaaaa 20

<210> 289
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 289
auuuuuuaaaa aaccagagug 20

<210> 290
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 290
cacucugguu uuuuuuaau 20

<210> 291	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 291	
agagcccaaa agucuucaac	20
<210> 292	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 292	
guugaagacu uuugggcucu	20
<210> 293	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 293	
uacuagacaa cuggauaugg	20
<210> 294	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 294	
ccaauaccag uugucuagua	20
<210> 295	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 295	
ggcauuaaaau uacuagacaa	20

<210> 296
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 296
uugucuagua auuuaaugcc 20

<210> 297
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 297
aaagugagua gucacagcca 20

<210> 298
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 298
uggcugugac uacucacuuu 20

<210> 299
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 299
guuuuucuca ucuucccaca 20

<210> 300
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 300
ugugggaaga ugagaaaaac 20

<210> 301	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 301	
ucuuaucaacc uuuagcucu	19
<210> 302	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 302	
agagcuaaaag gugauaaga	19
<210> 303	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 303	
uccuuguaua cccucccuau	20
<210> 304	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 304	
auagggaggg uauacaagga	20
<210> 305	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 305	
ugauaacc aa ucacuaucuu	20

<210> 306
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 306
aagauaguga uugguauca 20

<210> 307
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 307
acaacaaacc uauuuuuagu 20

<210> 308
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 308
acuaaaaaua gguuuguugu 20

<210> 309
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 309
augagacuuc ucuuauaucu 20

<210> 310
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 310
agauauaaga gaagucucau 20

<210> 311
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 311
guacaagaca aaggcgaaug 20

<210> 312
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 312
cauucgccuu ugucuuguac 20

<210> 313
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 313
cuagcagcca ucagcaagag 20

<210> 314
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 314
cucuugcuga uggcugcuag 20

<210> 315
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 315
uagcaaagcu uuguaguuac 20

<210> 316	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 316	
guaacuacaa agcuuugcua	20
<210> 317	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 317	
cuaguuagga auguaauuau	20
<210> 318	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 318	
auaaauacau uccuaacuag	20
<210> 319	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 319	
uuguacacug ucuuaauaug	20
<210> 320	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 320	
cauauuaaga caguguacaa	20

<210> 321	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 321	
guacacauuu uauuuacagu	20
<210> 322	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 322	
acuguaaaaua aaauguguac	20
<210> 323	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 323	
ugucauauuc cuggauccu	19
<210> 324	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 324	
aggauccagg aaauaugaca	19
<210> 325	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 325	
uccuggaucc uucaccaau	19

<210> 326
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 326
auuggugaag gauccagga 19

<210> 327
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 327
auacucagaa ggugucuuc 19

<210> 328
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 328
gaagacaccu ucugaguau 19

<210> 329

<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 329
aaaccagagu gcccaucug 19

<210> 330
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 330

cagaugggca cucugguuu	19
<210> 331	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 331	
aaaaccagag ugcccaucu	19
<210> 332	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 332	
agaugggcac ucugguuuu	19
<210> 333	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 333	
aaaaaccaga gugcccauc	19
<210> 334	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 334	
gaugggcacu cugguuuuu	19
<210> 335	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	

<400> 335 aaaaccagag ugcccacug u	21
<210> 336 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 336 acagaugggc acucugguuu u	21
<210> 337 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 337 aaaaaccaga gugcccaucu g	21
<210> 338 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 338 cagaugggca cucugguuuu u	21
<210> 339 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 339 gcuuugguuc agcucccaa	19
<210> 340 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 340 ggcgaaugag acuucucuu	19
<210> 341 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 341 cuuuucuacu ugagccauu	19
<210> 342 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 342 caucaucacu guagucauc	19
<210> 343 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 343 ugcuaucuuu ucaccuuua	19
<210> 344 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 344 uccauauugc uaucuuauuc	19
<210> 345 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 345 ucacagccag gcauuaaaau	19
<210> 346 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 346 accuuuccuu guauacccu	19
<210> 347 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 347 uguaauucuu ugauuggga	19
<210> 348 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 348 ucacugauuu gaaugaaau	19
<210> 349 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 349 uuuacaguuu uguacacug	19
<210> 350 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 350 uuaaaaaacc agagugccc	19
<210> 351 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 351 uuuuuuuuuac cagagugcc	19
<210> 352 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 352 uuuuuuuuuuu ccagagugc	19
<210> 353 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 353 auuuuuuuuuu aaccagagu	19
<210> 354 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 354 agagcccaaa agucuucuaa	19
<210> 355 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 355 uacuagacaa cuggauaug	19
<210> 356 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 356 aaagugagua gucacagcc	19
<210> 357 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 357 uuuuucucau cuucccaca	19
<210> 358 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 358 uccuuguaua cccucccua	19
<210> 359 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 359 ugauaaccac ucacuaucu	19
<210> 360 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 360 augagacuuc ucuuauauc	19
<210> 361 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 361 uacaagacaa aggcgaaug	19
<210> 362 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 362 uagcagccau cagcaagag	19
<210> 363 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 363 uagcaaagcu uuguaguua	19
<210> 364 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 364 uaguuaggaa uguauuuau	19
<210> 365 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 365 uuguacacug ucuuaauau	19
<210> 366 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 366 uuaucacuu uagcucuaa	19
<210> 367 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 367 uuuagcucua acauuuaca	19
<210> 368 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 368 cuuuagcucu aacauuaac	19
<210> 369 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 369 cucuaacauu aacaacagc	19
<210> 370 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 370 uuacuagaca acuggauau	19
<210> 371 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 371 cuagacaacu ggauauggu	19
<210> 372 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 372 uuaaaauuacu agacaacug	19
<210> 373 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 373 auuaaaauuac uagacaacu	19
<210> 374 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 374 aaaaagugag uagucacag	19
<210> 375 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 375 uuaaaaagug aguagucac	19
<210> 376 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 376 ugaguaguca cagccaggc	19
<210> 377 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 377 aagugaguag ucacagcca	19
<210> 378 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 378 uuuugcuuuu aucauuuuu	19
<210> 379 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 379 guuuugcuuu uaucauuuu	19
<210> 380 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 380 uuuuauuuac aguuuugua	19
<210> 381 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 381 cauuuuauuu acaguuuug	19
<210> 382 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 382 uuaaaaauug uaauaaaca	19
<210> 383 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 383 uuuauuaaaa auuguaaua	19
<210> 384 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 384 uuuguuuuuc ucaucuucc	19
<210> 385 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 385 aaaaaaauuac caaagaaug	19
<210> 386 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 386 aaugaaaugc auaaaauug	19
<210> 387 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 387 aaacugaaaau cagaauacac	19
<210> 388 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 388 uuaauguuua uuccaccuu	19
<210> 389 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 389 uaaaauugua gcaaagcuu	19
<210> 390 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	

<400> 390 uaauucuagu uaggaaugu	19
<210> 391 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 391 uaaccaaagc aaaauaacc	19
<210> 392 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 392 uguacacauu uuauuuaca	19
<210> 393 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 393 uaguugucua aaagacaau	19
<210> 394 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反义化合物	
<400> 394 ucaauuuauu aaaaauugu	19
<210> 395 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

<223> 反义化合物

<400> 395

gatcgatctg atcgc

15

<210> 396

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 396

agatcgatct gatcg

15

<210> 397

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 397

tagatcgatc tgatc

15

<210> 398

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 398

ttagatcgat ctgat

15

<210> 399

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 399

uugggagcug aaccaaagc

19

<210> 400

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 400
aagagaaguc ucauucgcc 19

<210> 401
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 401
aauggcucaa guagaaaag 19

<210> 402
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 402
gaugacuaca gugaugaug 19

<210> 403
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 403
uaaaggugau aagauagca 19

<210> 404
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 404
gauaagauag caauaugga 19

<210> 405
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 405	
auuuuauugcc uggcuguga	19
<210> 406	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 406	
aggguaauaca aggaaaggu	19
<210> 407	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 407	
ucccaaucaa agaauuaca	19
<210> 408	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 408	
auuucuuca aaucaguga	19
<210> 409	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 409	
caguguacaa aacuguaaa	19
<210> 410	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 410	
gggcacucug guuuuuuaa	19
<210> 411	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 411	
ggcacucugg uuuuuuaaa	19
<210> 412	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 412	
gcacucuggu uuuuuaaaa	19
<210> 413	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 413	
acucugguuu uuuaaaaau	19
<210> 414	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 414	
uugaagacuu uugggcucu	19
<210> 415	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 415	
cauauccagu ugucuagua	19
<210> 416	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 416	
ggcugugacu acucacuuu	19
<210> 417	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 417	
ugugggaaga ugagaaaaa	19
<210> 418	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 418	
uagggaggggu auacaagga	19
<210> 419	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 419	
agauagugau ugguuauca	19
<210> 420	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 反义化合物

<400> 420

gauauaagag aagucucau

19

<210> 421

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 421

cauucgccuu ugucugua

19

<210> 422

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 422

cucuugcuga uggcugcua

19

<210> 423

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 423

uaacuacaaa gcuuugcua

19

<210> 424

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义化合物

<400> 424

auaauuacau uccuaacua

19

<210> 425

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 425	
auauuaagac aguguacaa	19
<210> 426	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 426	
uuagagcuua aggugauaa	19
<210> 427	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 427	
uguuaauguu agagcuaaa	19
<210> 428	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 428	
guuaauguua gagcuaaag	19
<210> 429	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 429	
gcuguuguua auguuagag	19
<210> 430	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>
<223> 反义化合物

<400> 430
auauccaguu gucuaguua 19

<210> 431
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 431
accauaucca guugucuag 19

<210> 432
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 432
caguugucua guaauuuaa 19

<210> 433
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 433
aguugucuag uaauuuuau 19

<210> 434
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义化合物

<400> 434
cugugacuac ucacuuuuu 19

<210> 435
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 435	
gugacuacuc acuuuuuuaa	19
<210> 436	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 436	
gccugggcugu gacuacuca	19
<210> 437	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 437	
uggcugugac uacucacuu	19
<210> 438	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 438	
aaaaaugaua aaagcaaaa	19
<210> 439	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 439	
aaaaugauaa aagcaaaac	19
<210> 440	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 440	
uacaaaacug uaaauaaaa	19
<210> 441	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 441	
caaaacugua aaauaaaug	19
<210> 442	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 442	
uguuuauuac aauuuuuua	19
<210> 443	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 443	
uauuacaauu uuuaauaaa	19
<210> 444	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 444	
ggaagaugag aaaaacaaa	19
<210> 445	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 445	
cauucuuugg uaauuuuuu	19
<210> 446	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 446	
caaauuuauug cauuucauu	19
<210> 447	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 447	
gugauucuga uuucaguuu	19
<210> 448	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 448	
uuguccucaa ccauggucag	20
<210> 449	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 449	
cugcccuagg cuggcagggc	20
<210> 450	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 450	
uuggcaugga ggugggagag	20
<210> 451	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 451	
ggcauuccaa aacauucuuu	20
<210> 452	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 452	
ugcgcccuca ggaguuccgg	20
<210> 453	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 453	
auugucacag ggucucacag	20
<210> 454	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 454	
agtcgccatc ttagatcgat	20
<210> 455	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 455	
agucgccauc uuagaucgau	20
<210> 456	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 456	
cgagaggcgg acgggaccg	19
<210> 457	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义化合物	
<400> 457	
cgagaggcgg acgggaccgt t	21
<210> 458	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Sense Compound	
<400> 458	
cggtcccgtc cgcctctcgt t	21
<210> 459	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Sense Compound	
<400> 459	
cggtcccgtc cgcctctcg	19