



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114340678 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 12

(21) 申请号 202080061734.4

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

(22) 申请日 2020.09.03

代理人 钟海胜 宋琴芝

(30) 优先权数据

10-2019-0109090 2019.09.03 KR

10-2019-0109091 2019.09.03 KR

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/155 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2020/011877 2020.09.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/045538 KO 2021.03.11

(71) 申请人 索瓦尔基因股份有限公司

地址 韩国大田广域市

(72) 发明人 李柱昊 金将根 金秉泰 金善均

权利要求书3页 说明书48页

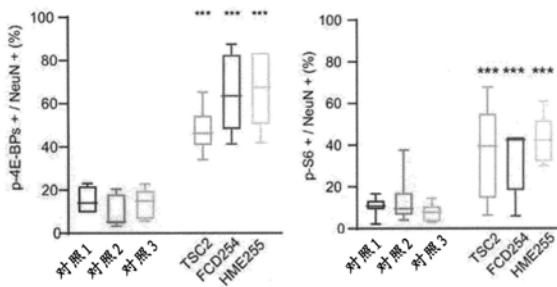
序列表70页 附图40页

(54) 发明名称

用于诊断或治疗与ELF4E活性增加相关的病症的包含ELF4E抑制剂的组合物

(57) 摘要

本发明涉及诊断或治疗与eIF4E活性增加有关的病症的组合物、试剂盒或方法,所述组合物包含eIF4E抑制剂。



1. 一种用于预防、缓解或治疗与脑神经元细胞中真核翻译起始因子4E (eIF4E) 的活性增加相关的疾病或其症状的药物组合物,所述药物组合物包含eIF4E抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中,所述疾病是皮质发育畸形 (FMCD)。

3. 根据权利要求2所述的药物组合物,其中,所述FMCD是局灶性皮质发育不良 (FCD)、半侧巨脑症 (HME) 或结节性硬化症 (TSC)。

4. 根据权利要求2至3中任一项所述的药物组合物,其中,所述FMCD为脑体细胞突变引起的FMCD。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的药物组合物,其中,所述FMCD为局灶性皮质发育不良II型 (FCD II型)。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的药物组合物,其中,所述症状为选自由以下组成的组中的至少一种:癫痫、焦虑、认知障碍、短期记忆障碍、运动障碍、社交行为障碍、重复行为障碍和抑郁症。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的药物组合物,其中,所述症状为自发性癫痫发作、行为性癫痫发作或脑电图癫痫发作。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的药物组合物,其中,所述eIF4E抑制剂抑制或降低eIF4E的活性。

9. 根据权利要求1至7中任一项所述的药物组合物,其中,所述eIF4E抑制剂抑制eIF4E的表达,或降低eIF4E的表达水平。

10. 根据权利要求1至7中任一项所述的药物组合物,其中,所述eIF4E抑制剂抑制eIF4E激活敏感基因的表达增加,或降低eIF4E激活敏感基因的表达,其中,所述eIF4E激活敏感基因包括选自由位于5'-非翻译区的富含U基序、鸟嘌呤四联体基序、富含A基序和CERT基序组成的组中的至少一个基序。

11. 根据权利要求10所述的药物组合物,其中,所述eIF4E激活敏感基因为ADK基因、CREB1基因或IRSp53基因。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的药物组合物,其中,所述eIF4E抑制剂为化合物、多核苷酸、肽或抗体。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的药物组合物,其中,所述eIF4E抑制剂为帽结合拮抗剂、eIF4E-eIF4G相互作用抑制剂、通过与eIF4E结合降低游离eIF4E水平的物质、阻断eIF4E磷酸化的MNK抑制剂或能够与eIF4E结合的核酸。

14. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中,所述eIF4E抑制剂是二甲双胍、利巴韦林、7-BnGMP、4Ei-1、4EGI-1、4E1RCat、喹巴因、紫苏醇、4EBP模拟肽、GnRH激动剂-4EBP融合肽、CGP052088、CGP57380,或能够与eIF4E结合的siRNA、shRNA或反义寡核苷酸。

15. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中,所述反义寡核苷酸是抑制eIF4E表达的反义寡核苷酸,并且所述反义寡核苷酸的长度为14至30、15至30、16至30、17至30、18至30或19至30个核苷酸。

16. 根据权利要求14至15中任一项所述的药物组合物,其中,所述反义寡核苷酸包含可与选自由eIF4E的5'-非翻译区、翻译起始区、外显子区、内含子区和3'-非翻译区组成的组中的至少一个区杂交的反义核苷酸分子。

17. 根据权利要求14至16中任一项所述的药物组合物,其中,与具有SEQ ID NO:201的

核苷酸序列的对照相比,所述反义寡核苷酸降低90%或更低的eIF4E mRNA的相对表达水平。

18.根据权利要求14至16中任一项所述的药物组合物,其中,所述反义寡核苷酸包含选由化学修饰的核苷间键、化学修饰的糖部分和化学修饰的核碱基组成的组中的至少一种化学修饰。

19.根据权利要求18所述的药物组合物,其中,所述寡核苷酸中包含的至少一种核苷酸是选自由2'-O-甲氧基乙基核糖、cET核糖和锁核酸组成的组中的至少一种。

20.根据权利要求19所述的药物组合物,其中,在所述寡核苷酸的每一端包含1至6个修饰的核苷酸。

21.根据权利要求14至20中任一项所述的药物组合物,其中,所述寡核苷酸包含至少一个化学修饰的核苷间键。

22.根据权利要求21所述的药物组合物,其中,所述化学修饰的核苷间键为硫代磷酸酯键,化学修饰的糖部分为2'-O-甲氧基乙基核糖,或化学修饰的核碱基为5-甲基胞嘧啶。

23.根据权利要求14至22中任一项所述的药物组合物,其中,所述寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:1至95和SEQ ID NO:101至200组成的组中的至少一种寡核苷酸。

24.根据权利要求23所述的药物组合物,其中,所述寡核苷酸包括具有SEQ ID NO:96的核苷酸序列的寡核苷酸。

25.根据权利要求23所述的药物组合物,其中,所述寡核苷酸包含选自由具有SEQ ID NO:16、20、21、27、28、35、75、77、132、143、147、149、161、162、171、178、179、180、182、183和184的核苷酸序列的寡核苷酸组成的组中的至少一种寡核苷酸。

26.根据权利要求25所述的药物组合物,其中,所述寡核苷酸包含硫代磷酸酯键、2'-O-甲氧基乙基核糖和5-甲基胞嘧啶。

27.根据权利要求1所述的药物组合物,其中,所述eIF4E抑制剂通过皮下注射、静脉注射、肌肉注射、动脉内注射、腹膜内注射、脑内注射、鞘内注射或脑室内注射提供。

28.一种反义寡核苷酸,其中,所述反义寡核苷酸抑制eIF4E的表达或活性,并且所述反义寡核苷酸的长度为14至30、15至30、16至30、17至30、18至30或19至30个核苷酸,并且其中所述反义寡核苷酸包含选自由化学修饰的核苷间键、化学修饰的糖部分和化学修饰的核碱基组成的组中的至少一种化学修饰。

29.根据权利要求28所述的反义寡核苷酸,其中,所述反义寡核苷酸包含可与选自由eIF4E的5'-非翻译区、翻译起始区、外显子区、内含子区和3'-非翻译区组成的组中的至少一个区特异性杂交的反义核苷酸分子。

30.根据权利要求28所述的反义寡核苷酸,其中,与具有SEQ ID NO:201的核苷酸序列的对照相比,所述反义寡核苷酸降低90%或更低的eIF4EmRNA的相对表达水平。

31.根据权利要求28至30中任一项所述的反义寡核苷酸,其中,所述反义寡核苷酸包含选自由化学修饰的核苷间键、化学修饰的糖部分和化学修饰的核碱基组成的组中的至少一种化学修饰。

32.根据权利要求31所述的反义寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸中包含的至少一种核苷酸是选自由2'-O-甲氧基乙基核糖、cET核糖和锁核酸组成的组中的至少一种。

33.根据权利要求32所述的反义寡核苷酸,其中,在所述寡核苷酸的每一端包括1至6个

修饰的核苷酸。

34. 根据权利要求28至33中任一项所述的反义寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸包含至少一种化学修饰的核苷间键。

35. 根据权利要求28所述的反义寡核苷酸,其中,所述化学修饰的核苷间键是硫代磷酸酯键,化学修饰的糖部分是2'-O-甲氧基乙基核糖,或化学修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。

36. 根据权利要求28至35中任一项所述的反义寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸包含选自SEQ ID NO:1至95和SEQ ID NO:101至200组成的组中的至少一种寡核苷酸。

37. 根据权利要求36所述的反义寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸包含具有SEQ ID NO:96的核苷酸序列的寡核苷酸。

38. 根据权利要求36所述的反义寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸包含选自具有SEQ ID NO:16、20、21、27、28、35、75、77、132、143、147、149、161、162、171、178、179、180、182、183和184的核苷酸序列的寡核苷酸组成的组中的至少一种寡核苷酸。

39. 根据权利要求28所述的反义寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸包含硫代磷酸酯键、2'-O-甲氧基乙基核糖和5-甲基胞嘧啶。

40. 一种用于预防、缓解或治疗与脑神经元细胞或神经组织中真核翻译起始因子4E (eIF4E)的活性增加相关的疾病或其症状的方法,包括向有需要的受试者给药eIF4E抑制剂。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中,所述受试者具有激活的eIF4E激活敏感基因的特征,所述激活的eIF4E激活敏感基因包括受eIF4E调节的5'-非翻译区。

42. 一种与真核翻译起始因子4E (eIF4E)的活性增加相关的脑部疾病的诊断试剂盒,其包含检测选自eIF4E、其表达或活性受eIF4E调节的eIF4E激活敏感基因,以及编码它们的核苷酸分子组成的组中的至少一种生物标志物的试剂。

43. 一种通过使用选自eIF4E、其表达或活性受eIF4E调节的eIF4E激活敏感基因,以及编码它们的核苷酸分子组成的组中的至少一种生物标志物来选择要给药eIF4E抑制剂的受试者、预测eIF4E抑制剂在受试者中的易感性或监测eIF4E抑制剂在受试者中的功效的方法。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中,所述eIF4E激活敏感基因在其5'-非翻译区包括的选自富含U基序、鸟嘌呤四联体基序、富含A基序和CERT基序组成的组中的至少一个基序。

45. 根据权利要求43所述的方法,其中,所述方法还包括测量所述受试者的测试样品中的生物标志物的活性、表达水平或浓度水平,并与参考样品中的生物标志物的活性、表达水平或浓度水平进行比较。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中,所述样品是脑组织、脑细胞、脑组织裂解物或脑脊液。

用于诊断或治疗与ELF4E活性增加相关的病症的包含ELF4E抑制剂的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于诊断或治疗与eIF4E活性增加相关的病症的包含eIF4E抑制剂的组合物,更具体地,涉及用于预防、缓解、减轻或治疗与eIF4E活性增加相关的病症(例如,与eIF4E活性增加相关的疾病或病症)、其症状及其相关疾病的组合物。

背景技术

[0002] eIF4E是一种24kDa的蛋白质,作为真核翻译起始因子,在mRNA翻译的起始中起重要作用。在mRNA翻译起始后,eIF4E与mRNA的5'端的7-甲基鸟苷帽结构结合,这导致支架蛋白eIF4G和解旋酶eIF5A的募集以形成复合物(称为eIF4F)。复合物的组装对于帽依赖性翻译的起始是必要的。因此,eIF4E与eIF4G的结合是翻译中的关键过程。eIF4F复合物的组装是翻译起始的限速步骤,并取决于eIF4E的可用性。

[0003] eIF4E组装成eIF4F复合物的可用性受阻遏蛋白调节,称为eIF4E结合蛋白(4E-BPs:4E-BP1/2/3),4E-BP1/2/3与eIF4E的结合是由4E-BPs的磷酸化状态控制的。在正常情况下,eIF4E与4E-BP结合,并被抑制与mRNA的5'端的7-甲基鸟苷帽结合。然而,当磷酸化时,4E-BP1/2/3功能减弱。结果,4E-BP1/2/3(4E-BPs)作为抑制剂的eIF4E变得活跃。

[0004] W02001/096388和W02001/096389介绍了编码人eIF4E的核酸分子,公开了通过向癌症患者给药多核苷酸组合物实现的癌症治疗。

[0005] 此前有报道称,eIF4E在小鼠体内的过表达和激活选择性地增强了ODC、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、c-myc等促生长基因的翻译,从而诱导细胞转化、肿瘤发生、肿瘤侵袭和肿瘤转移。特别是,癌症中eIF4E表达和激活的增加增强了参与生长促进的基因的翻译,从而增加细胞生长并引发肿瘤发生和转移。已知eIF4E的表达升高与肿瘤发生相关,并在白血病、淋巴瘤、乳腺癌、结肠直肠癌、膀胱癌、肺癌、前列腺癌和头颈癌的进展中发挥作用(Oncogene.2004年4月19日;23(18):3189-99,eIF-4E表达及其在恶性肿瘤和转移中的作用(eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases))。

[0006] 此外,在癌症中发现eIF4E的表达上调,增强血管生成和肿瘤生长。eIF4E抑制剂下调eIF4E的表达并降低癌基因c-myc和细胞周期蛋白D1以及存活的抗凋亡蛋白和Bcl-2的表达。因此,已知eIF4E抑制剂可诱导肿瘤细胞凋亡并降低肿瘤细胞中的细胞活力(J.Clin.Invest.117:2638-2648,2007)。因此,传统上,eIF4E的表达是过度增殖性疾病(如血管生成或实体癌)研究的目标。

发明内容

[0007] 本发明涉及用于诊断或治疗与eIF4E活性增加相关的病症的包含eIF4E抑制剂的组合物,或用于其的试剂盒或方法。

[0008] 本发明的一种实施方式提供了用于预防、缓解或治疗与eIF4E活性增加相关的脑部疾病(例如FMCD(皮质发育的局灶性畸形)、FMCD的症状,或其相关疾病)的包含eIF4E抑制

剂作为活性成分的组合物,或其相关疾病或用于其的试剂盒或方法。

[0009] 本发明的另一种实施方式提供了用于预防、缓解或治疗与脑神经元细胞或神经组织中真核翻译起始因子4E (eIF4E) 的活性增加相关的疾病或其症状的方法,该方法包括以下步骤:向有需要的受试者给药eIF4E抑制剂。

[0010] 本发明的另一种实施方式提供了用于诊断与eIF4E活性增加相关的脑部疾病(例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病)的生物标志物,其中所述生物标志物是选自由以下组成的组中的至少一种:eIF4E、其表达或活性受eIF4E调节的eIF4E活化敏感蛋白和编码其的核酸分子。

[0011] 本发明的另一种实施方式提供了用于诊断与eIF4E活性增加相关的脑部疾病(例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病)的组合物或试剂盒,该组合物或试剂盒包含能够检测选自由以下组成的组中的至少一种生物标志物的分子或试剂,所述生物标志物选自eIF4E、其表达或活性受eIF4E调节的eIF4E活化敏感蛋白和编码其的核酸分子;或用于诊断与eIF4E活性的增加相关的脑部疾病(例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病)的方法;或用于提供关于与eIF4E的活性增加相关的脑部疾病(例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病)的诊断信息的方法,该方法使用能够检测选自由以下组成的组中的至少一种生物标志物的分子或试剂,所述生物标志物选自eIF4E、其表达或活性受eIF4E调节的eIF4E活化敏感蛋白和编码其的核酸分子。能够检测生物标志物的分子或试剂可以是全部可与生物标志物杂交的引物、探针或适体,或者各自与生物标志物蛋白特异性结合的抗体或适体。

[0012] 本发明的另一种实施方式提供了用于选择要给药eIF4E抑制剂的受试者、用于预测受试者对eIF4E抑制剂的易感性、或用于监测eIF4E抑制剂在受试者中的给药功效的方法,该方法使用选自以下组成的组中的至少一种生物标志物:eIF4E、其表达或活性受eIF4E调节的eIF4E活化敏感蛋白和编码其的核酸分子。

[0013] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指根据本发明的化合物的生理学和药学上可接受的盐,即保留母体化合物的所需生物活性并且不赋予不希望的毒理学作用的盐。

[0014] 如本文所用,术语“诊断”旨在涵盖鉴定病理状况的存在或特征、确定病理状况的发作、检测或探测发病机制的风险或可能性以及监测病理状况。

[0015] 如本文所用,术语“治疗”旨在包括减轻或缓解病症、疾病、紊乱或其症状,降低疾病程度,延迟或阻止疾病进展,改善、减轻或稳定疾病状态、部分或完全康复、延长生存期或其他有益结果。在本文中,“治疗”包括通过将eIF4E抑制剂给药于患此病的患者来缓解、减轻、减少或治疗与eIF4E的活性增加相关的病症(例如疾病、紊乱、其症状或其相关疾病)。

[0016] 本文中的术语“受试者”是指被选择用于诊断、缓解、预防或治疗的人或非人动物。受试者可以是患有eIF4E活性诱导的脑部疾病(例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病)、具有疾病发作的风险或可能性、或已接受针对疾病的病变进行的手术的人或动物。

[0017] 受试者可以是需要预防、减轻或治疗与脑神经元细胞或神经组织中的eIF4E活性增加相关的疾病或其症状的受试者,例如,可能患有由eIF4E的表达、细胞内水平或活性增加引起的脑部疾病、其症状或其相关疾病,或可能经历脑神经元细胞或神经组织中PI3K-AKT-mTOR信号传导途径中上游基因的表达或活性的变化,上游基因诱导eIF4E激活敏感基因的激活,该激活的表达受eIF4E或eIF4E激活的调节。eIF4E激活敏感基因通过eIF4E活性增加而被激活,并且在其5'-非翻译区包括由eIF4E调节的基序,例如,选自5'-非翻译区中

的富含U基序、鸟嘌呤四重基序、富A的基序和CERT基序中的至少一种基序。该基因的具体实例列于下表1中。

[0018] eIF4E抑制剂可以抑制或降低IF4E的活性、表达或水平。具体而言，eIF4E抑制剂可以起到抑制eIF4E的产生和/或表达或抑制eIF4E的活性的作用，例如，eIF4E抑制剂可以是药物、抗体、shRNA、siRNA、微RNA、反义寡核苷酸等，这些都是eIF4E的抑制剂。eIF4E mRNA的mRNA表达抑制剂，例如与IF4E互补结合的物质，例如药物、抗体、siRNA、shRNA、微RNA、反义寡核苷酸，均能抑制eIF4E，均落入本发明范围内。

[0019] 本发明的一种实施方式涉及抑制真核翻译起始因子4E的活性或表达并且具有14至30、15至30、16至30、17至30、18至30或19至30个核苷酸长度的反义寡核苷酸。更具体地，反义寡核苷酸可以是与eIF4E中的5'-非翻译区、起始区、外显子、内含子和3'-非翻译区中的至少一种特异性杂交的反义核酸分子。

[0020] 本发明的一种实施方式提供了包含作为eIF4E抑制剂的反义寡核苷酸的组合物或试剂盒，用于诊断、预防、缓解或治疗与eIF4E的活性增加相关的脑部疾病，例如FMCD（皮质发育的局灶性畸形）、FMCD的症状或其相关疾病，或使用反义寡核苷酸作为eIF4E抑制剂用于诊断、预防、缓解或治疗与eIF4E的活性增加相关的脑部疾病（例如FMCD（皮质发育的局灶性畸形）、FMCD的症状或其相关疾病）的方法。

[0021] 下面，将给出本发明的详细描述。

[0022] 在本发明中，由eIF4E的活性增加引起的脑部疾病、其症状或其相关疾病可能是由脑神经元细胞或神经组织中eIF4E活性的增加引起的。与eIF4E活性的增加相关的脑部疾病可能是由eIF4E的表达、细胞内水平或活性增加引起的。例如，由eIF4E活性增加引起的脑部疾病可能是FMCD，例如，可能包括局灶性皮质发育不良（FCD）、半侧巨脑症（HME）、偏侧肥大、多发性硬化症（TSC）或韦伯综合征（Sturge-Weber syndrome, SWS）。

[0023] eIF4E的表达、细胞内水平或活性增加可以通过负责调节eIF4E活性或表达的上游基因来实现，例如，活性的基因促进和/或活性的基因抑制，或通过eIF4E的磷酸化来实现。

[0024] 通过磷酸化激活eIF4E主要以两种模式进行，包括eIF4E结合蛋白（4E-BP）的磷酸化和eIF4E的磷酸化。例如，mTOR负责调节eIF4E的活性或表达，疾病可能是由mTOR基因的活性或表达上调驱动的eIF4E的活性或表达增加引起的。mTOR激活突变对eIF4E的激活可能是由于脑神经组织和神经元细胞中参与PI3K-AKT-mTOR信号传导途径的上游基因中的脑体细胞突变所致。具体而言，PI3K-AKT-mTOR信号传导途径中的上游基因如mTOR、PI3K、AKT、TSC等脑体细胞突变可以是氨基酸缺失、取代或插入，优选为氨基酸取代。由脑体细胞突变引起的疾病的实例包括局灶性皮质发育不良（FCD）（例如FCD II型）、半侧巨脑症（HME）或韦伯综合征（SWS）。

[0025] 根据本发明的与eIF4E活性增加相关的脑部疾病是指与脑神经元细胞或神经组织中eIF4E活性增加相关的脑部疾病，但不包括大脑以外的身体部分中或神经元细胞或神经组织以外的细胞或组织中与eIF4E活性增加相关的过度增殖性疾病，例如恶性肿瘤。

[0026] 根据本发明的与eIF4E的活性增加相关的疾病的症状或相关疾病可以包括选自由以下组成的组中的至少一种：癫痫（尤其是顽固性癫痫）、大脑中异常神经细胞的产生和神经精神障碍。癫痫的具体症状包括自发性癫痫发作、行为性癫痫发作和/或脑电图癫痫发作。神经精神障碍包括焦虑、认知障碍、短期记忆障碍、运动障碍、社交行为障碍、重复行为

障碍和抑郁症。

[0027] 如本文所用,术语“癫痫”是指一种慢性疾病,其特征在于由于某些神经元在短时间内过度电变化而导致反复发作。术语“顽固性癫痫”是指对迄今为止开发的任何抗癫痫药物均无反应的癫痫。顽固性癫痫的病因包括皮质发育畸形,例如FCD,尤其是FCD II型、HME和TSC。

[0028] 癫痫可能是由参与mTOR信号传导途径的基因中的脑体细胞突变引起的,更具体地,由参与mTOR信号传导途径的基因mTOR、PI3K、AKT或eIF4E中的脑体细胞突变引起,例如,氨基酸缺失、取代或插入,优选氨基酸取代。

[0029] 局灶性皮质发育不良是散发性大脑皮质发育异常之一,伴有大脑皮质的结构异常和神经元细胞的细胞学异常。局灶性皮质发育不良根据病理标准分为几种类型。其中,FCD II型表现出以皮质发育不良、畸形神经元或球囊细胞为特征的一致病理表现(Epilepsia 52,158-174(2011))。

[0030] 在从局灶性皮质发育不良患者手术获得的脑组织中,可以使用各种深度测序技术,如全外显子组测序、杂交捕获测序、扩增子测序等,检测出局灶性皮质发育不良的脑损伤特异性体细胞突变。

[0031] 如根据本发明的一种实施方式的FMCD模型动物所表明的,mTOR激活突变通过上述机制增加了eIF4E的活性,进而增加了在其5'-UTR中具有富含A、鸟嘌呤四联体(GGC)₄、CERT和/或富含U基序的eIF4E激活敏感基因的活性和/或表达,导致顽固性癫痫发作。

[0032] 在本发明中,eIF4E激活敏感基因的表达或活性通常受eIF4E调控,并且eIF4E激活敏感基因在其5'-UTR中具有受eIF4E调控的特定共同基序。当从5'-UTR中去除共同基序时,基因的表达不再因eIF4E活性的增加而上调。因此,发现根据本发明的eIF4E激活敏感基因的5'-UTR中的特定基序受eIF4E特异性调控。

[0033] 具体地,根据本发明的eIF4E激活敏感基因可以包括选自以下组成的组中的至少一个基序:富含U基序、鸟嘌呤四联体基序、富含A基序和CERT基序。例如,5'-UTR可以包含两个或更多个不同的基序、一个基序的重复或它们的组合。富含U基序表示为TTDWTTTTNT (SEQ ID NO:97),鸟嘌呤四联体基序表示为GGCGGCGGCGGC (SEQ ID NO:98),富含A基序表示为AANATAAAA (SEQ ID NO:99),以及CERT基序表示为GCCGCCGCCGCC (SEQ ID NO:100)。在ADK基因的5'-UTR中检测到一个鸟嘌呤四联体,在CREB1基因的5'-UTR中检测到鸟嘌呤四联体基序、富含A基序和CERT基序,在IRSp53基因的5'-UTR中检测到富含U基序。

[0034] eIF4E过度激活敏感基因列于下表1中,优选可以是选自以下组成的组中的至少一种:腺苷激酶(ADK)、cAMP反应元件结合蛋白1(CREB1)和IRSp53。eIF4E激活敏感基因或蛋白质可用作探测、检测或诊断由eIF4E活性增加引起的病症的生物标志物,例如疾病、病症、其症状或其相关疾病。

[0035] 具体而言,从每个时间点单个基因相对于对照的翻译效率(TE)的倍数变化分布来看,相对于MTOR-WT模型,在MTOR-C1483Y或MTOR-L2427P模型中选择了256个z评分为1.2或更高的基因用于eIF4E激活敏感蛋白或基因。选择的基因在下表1中给出。TE倍数变化分布中z-评分 ≥ 1.2 满足 $\log_2(\text{TE}_{[p.C1483Y]}/[\text{WT}]) \geq 2.142605598$ 和 $\log_2(\text{TE}_{[p.L2427P]}/[\text{WT}]) \geq 2.232171262$ 的条件。

[0036] [表1]

[0037]

基因符号	$\log_2(\text{TE}[\text{p.C1483Y}]/[\text{WT}])$	$\log_2(\text{TE}[\text{p.L2427P}]/[\text{WT}])$	Z-评分 ($\text{TE}[\text{p.C1483Y}]/[\text{WT}]$)	Z-评分 ($\text{TE}[\text{p.L2427P}]/[\text{WT}]$)
5830418K08Rik	3.2856631	4.5591033	1.7868901	2.5603092
9130011E15Rik	3.51417249	2.6823654	1.9028764	1.4671319
Abcd3	2.50073286	2.8555022	1.3884768	1.567982
Abhd11	3.90207066	3.6263167	2.0997649	2.0169722
Acp2	2.64286893	4.9551647	1.460622	2.7910102
Acss2	4.40712622	4.6151318	2.3561199	2.5929451
Adk	4.75289218	3.1865551	2.5316231	1.7608164
Akap12	2.79269016	2.8719541	1.5366679	1.5775651
Akap6	3.64116218	4.1969928	1.9673335	2.3493842
Aldh6a1	3.84339227	2.3184609	2.0699811	1.2551619
Aldh7a1	3.71542216	4.0948263	2.0050263	2.2898734
Alg10b	3.80165894	3.7793599	2.0487981	2.106118
Alkbh8	2.45996221	3.2205098	1.3677826	1.7805946
Anapc11	3.24367565	4.3904542	1.7655782	2.4620731
Ankrd13a	3.19254087	3.128509	1.7396233	1.7270052
Arfgap2	3.06321482	2.3417788	1.6739802	1.2687444
Arfp2	2.17275667	2.7423389	1.2220034	1.5020658
Atg2a	2.25567335	3.0777147	1.26409	1.6974181
Atp9b	3.86588752	3.085986	2.0813991	1.7022361
B4galt3	3.66297481	2.363857	1.9784051	1.2816046
Bag1	3.11791212	2.6654072	1.7017434	1.457254
Bai3	3.6397109	3.5282795	1.9665969	1.9598667
BC037034	4.42211929	4.0664985	2.3637301	2.2733728
Bcap31	5.89061681	3.0055392	3.1091069	1.6553768
Bicd2	4.31449403	3.9481991	2.3091019	2.2044648
C2cd2l	2.74187106	2.2321713	1.5108732	1.2048993
Cacng7	4.54392732	4.1402893	2.4255571	2.3163551
Casp8ap2	2.15343867	3.3493978	1.212198	1.8556703
Cbfb	2.93248177	4.305199	1.607623	2.412413

[0038]

Ccdc85c	2.80008216	2.9677035	1.5404199	1.6333379
Ccna2	6.55094526	2.5901207	3.4442751	1.4134005
Ccng2	2.93037152	2.3633945	1.6065519	1.2813352
Cd99l2	2.23567856	2.3494794	1.2539411	1.2732298
Cdc26	2.27667706	4.1367687	1.2747511	2.3143043
Cdc37	2.33722519	2.7254588	1.305484	1.4922333
Cdc37l1	2.18987873	2.796954	1.2306942	1.5338784
Cdk1	4.11012324	3.7569592	2.2053678	2.0930699
Cep170b	2.97138905	2.9107013	1.6273715	1.6001348
Cep70	2.73848736	2.6855048	1.5091558	1.4689606
Chchd1	2.94115082	3.5703768	1.6120232	1.9843879
Chka	3.77709567	3.3294571	2.0363304	1.8440551
Clcn7	2.63037157	3.0387087	1.4542786	1.6746976
Cluap1	2.38917506	3.0370247	1.3318526	1.6737167
Cops3	3.02119963	3.8907357	1.6526543	2.1709931
Cplx1	2.56291271	2.6107044	1.4200379	1.4253902
Cr1l	4.10628594	2.6910166	2.2034201	1.4721712
Creb1	3.78627579	4.6574872	2.04099	2.6176166
Ctsa	4.70786584	4.0924853	2.5087687	2.2885098
Ctsz	4.28655898	3.7028614	2.2949227	2.0615585
Cttnbp2nl	3.22636487	3.4067755	1.7567916	1.8890921
Dcun1d1	4.35230961	2.3695016	2.3282962	1.2848926
Ddx28	2.79381592	2.312294	1.5372393	1.2515698
Ddx54	2.5603724	3.0298635	1.4187485	1.6695454
Dicer1	2.36124952	3.3004263	1.3176782	1.827145
Dimt1	2.36710718	2.9739816	1.3206514	1.6369949
Dlg3	2.46615436	2.4639877	1.3709255	1.3399296
Dmxl1	5.30365144	2.8198142	2.8111763	1.5471942
Dusp11	3.25281329	3.4605326	1.7702162	1.920405
Dync2h1	3.08234773	3.4810935	1.6836917	1.9323814
Dyrk2	2.90241867	5.1938115	1.5923637	2.9300191
E430025E21Ri k	3.14365957	2.8084614	1.7148122	1.5405814
Eef1d	2.32632222	2.7207772	1.2999498	1.4895064
Efh2	2.70490435	3.8944797	1.4921098	2.1731739
Efna4	4.53388702	3.2598453	2.4204609	1.803507
Eif4ebp2	2.19032536	3.222706	1.2309208	1.7818738
Epn2	2.3432873	3.418907	1.3085609	1.8961586
Ept1	2.58907202	2.5398365	1.4333158	1.3841106
Exd2	3.03585336	5.5851586	1.6600922	3.157974
Fam214a	3.33349073	3.1353713	1.8111663	1.7310024
Fbxl15	3.15650571	2.7981507	1.7213326	1.5345755

[0039]

Fbx15	2.94836835	3.07889	1.6156867	1.6981027
Fbxo44	3.64710956	3.5892837	1.9703523	1.995401
Fkbp1a	3.00733504	3.9047968	1.6456169	2.1791835
Fkbp5	5.68378185	3.3894767	3.0041221	1.8790157
Fundc1	2.93613865	3.0659569	1.6094792	1.6905694
Galnt2	2.20931657	3.0053342	1.2405604	1.6552574
Gas8	3.39376258	4.4158914	1.841759	2.4768899
Gbas	3.32439775	2.4686182	1.8065509	1.3426268
Gfm2	4.47640785	2.3433825	2.3912858	1.2696785
Gmppa	7.44392554	3.1146183	3.8975321	1.7189141
Gphn	3.37808116	2.6308913	1.8337994	1.4371489
Grsf1	2.85377027	2.601336	1.5676708	1.4199333
Gtf2ird1	2.91476453	2.7898979	1.5986301	1.5297683
Hap1	2.23006946	2.8261261	1.2510941	1.5508708
Hdac4	2.66190057	3.0625822	1.470282	1.6886037
Hint1	3.08842934	2.3646244	1.6867786	1.2820516
Hist1h2bm	3.2919312	2.2535338	1.7900716	1.2173427
Hist2h4	2.94503466	3.0574136	1.6139946	1.685593
Hn1l	3.52766105	2.5378846	1.9097229	1.3829736
Hsd1l	3.57453224	2.3092549	1.9335136	1.2497996
Hspbp1	4.68052072	3.0532918	2.4948889	1.6831921
Ifnar1	2.4036695	3.1484884	1.3392096	1.738643
Ints9	2.48240568	2.7552702	1.3791744	1.5095981
Ipo7	3.39895604	4.0937511	1.844395	2.2892471
Kctd13	2.64340416	2.4354735	1.4608936	1.3233204
Kctd17	8.09699097	4.7229141	4.2290137	2.655727
Kdm1b	6.04558712	2.8712246	3.1877665	1.5771402
Klhl2	3.28764197	2.338704	1.7878945	1.2669533
Klhl42	2.89493913	2.5216341	1.5885672	1.3735079
Lcmt1	3.56908844	3.5116271	1.9307505	1.9501669
Leprotl1	4.17016905	4.5564652	2.2358457	2.5587725
Lhfpl4	2.66962768	2.8123077	1.4742041	1.5428218
Lman2	3.69744247	4.1797903	1.9959002	2.3393639
Lrrc16b	3.65134149	5.5159584	1.9725003	3.1176658
Lsm4	5.92260312	4.6432292	3.1253425	2.6093115
Lta4h	2.29319667	2.8477669	1.2831361	1.5634763
Lyz2	4.40107743	2.2536795	2.3530497	1.2174276
Mak16	2.76339212	2.8096904	1.5217969	1.5412972
Man1b1	4.41782659	3.1114358	2.3615512	1.7170603
Mapk9	5.30550998	4.7466957	2.8121197	2.6695795
Mesdc2	2.8210658	2.4839872	1.5510707	1.351579
Mfsd8	2.77168992	2.9983641	1.5260086	1.6511974

[0040]

Mgst3	2.8464849	2.8503997	1.5639729	1.5650099
Mon2	2.22500165	2.3417553	1.2485218	1.2687306
Mrpl23	2.44827635	3.5112	1.3618511	1.9499181
Mrpl30	2.44828353	2.4608321	1.3618547	1.3380915
Mrpl43	3.72077909	2.765537	2.0077453	1.5155784
Mrpl45	2.20302539	2.2891612	1.2373671	1.2380952
Mrto4	2.20687131	3.5162877	1.2393192	1.9528817
Msantd3	2.29587326	2.4701118	1.2844946	1.3434967
Nampt	4.13781088	3.3783726	2.2194214	1.8725478
Narfl	2.44807601	4.0853359	1.3617494	2.2843454
Ndufa3	2.24135388	2.2427935	1.2568218	1.2110866
Nelfa	5.73959286	2.619677	3.0324505	1.4306167
Nme7	2.75229653	2.767858	1.516165	1.5169303
Nploc4	3.89962171	2.4852057	2.0985219	1.3522888
Nrp2	3.67752176	3.2936718	1.9857888	1.8232106
Osbpl2	4.78535716	3.3304507	2.5481016	1.8446338
Pagr1a	3.57789227	3.1983288	1.9352191	1.7676744
Pan2	5.46529766	5.5151547	2.8932244	3.1171976
Papd5	2.4110601	3.1823173	1.3429609	1.7583479
Pard6a	3.3105048	4.1092909	1.7994992	2.2982989
Pcyl1a	5.64522189	2.7058002	2.9845499	1.4807824
Pdcd2	2.67770779	3.9559438	1.4783054	2.2089761
Pdxp	5.31809271	2.6260715	2.8185064	1.4343414
Pex13	3.49963446	3.167124	1.8954972	1.749498
Pfkfb2	2.96806352	3.6649636	1.6256835	2.0394835
Polr2c	4.05837061	3.173369	2.1790993	1.7531356
Pop4	3.33928325	2.6235951	1.8141065	1.4328989
Ppp1r10	2.32116548	3.0526632	1.2973324	1.6828259
Prkar2a	2.16590205	3.7084944	1.2185241	2.0648397
Prpf38a	3.25065058	3.1483157	1.7691185	1.7385424
Psd3	3.98929206	2.7247325	2.1440366	1.4918103
Ptcd3	3.82278389	3.7194961	2.0595207	2.0712481
Ptprn2	2.86899971	2.6882481	1.5754009	1.4705585
Ptpru	2.50900243	4.0679509	1.3926743	2.2742188
R3hcc1	2.24104709	2.2730127	1.2566661	1.2286889
Rab2a	6.5186579	4.844434	3.4278867	2.7265109
Rap1gap	5.19527675	4.4354615	2.7561677	2.4882893
Rap2b	2.34847275	2.4767369	1.311193	1.3473558
Rbm45	3.55196324	3.050396	1.9220581	1.6815054
Rcbtb2	3.51733022	2.3475437	1.9044792	1.2721023
Rgs3	2.9111232	2.772411	1.5967819	1.5195824
Rian	2.87076983	3.1755758	1.5762994	1.754421

[0041]

Ric8	8.72513303	2.3826736	4.5478447	1.2925651
Rlf	4.3374585	3.9990296	2.3207581	2.234073
Rnaseh2c	2.48371622	3.1367336	1.3798396	1.731796
Rnd3	2.46299386	4.1229297	1.3693214	2.3062433
Rnf24	6.70574007	4.6457462	3.5228455	2.6107776
Rpa2	2.51965707	2.8051124	1.3980823	1.5386306
Rpgr	5.74588167	2.5880439	3.0356426	1.4121908
Samd4b	5.29992671	3.0706801	2.8092857	1.6933206
Sap130	2.99737365	2.6659827	1.6405607	1.4575892
Sart1	2.61309671	2.9733795	1.4455102	1.6366441
Sbds	4.76991977	2.6350228	2.5402659	1.4395554
Scaf8	3.78782237	3.685814	2.041775	2.0516287
Sec23a	2.69727519	3.149027	1.4882374	1.7389567
Sept9	2.16801345	4.1109862	1.2195958	2.2992863
Sh3glb1	2.1426056	2.6075124	1.2066994	1.423531
Shkbp1	2.27249537	2.7246948	1.2726285	1.4917883
Sike1	2.78217733	2.4686615	1.5313318	1.342652
Sipa1l1	3.14755761	2.2693811	1.7167908	1.2265736
Slc25a17	2.40962792	2.798179	1.342234	1.534592
Slc29a4	3.50483688	2.3975639	1.8981378	1.3012385
Slc30a5	3.3525133	3.1579409	1.8208217	1.7441489
Slc35b4	3.14790045	2.2767761	1.7169648	1.2308811
Smc6	3.57120524	3.0694862	1.9318249	1.6926252
Snape3	3.04143459	2.4534287	1.6629251	1.3337791
Snx13	4.78391441	2.6276813	2.5473693	1.4352791
Socs6	3.67887016	4.3720688	1.9864733	2.4513639
Spns1	2.90741242	2.4968309	1.5948984	1.3590603
Spryd3	4.69336996	2.4758247	2.5014109	1.3468244
Srsf4	5.5080472	2.5154349	2.9149231	1.3698969
Stk35	2.95341596	2.5856721	1.6182488	1.4108092
Stk36	2.54379578	5.682034	1.4103346	3.2144028
Sult4a1	2.194657	2.4852584	1.2331195	1.3523195
Tars2	2.46042694	3.0555761	1.3680184	1.6845227
Tbc1d14	3.51508436	3.464142	1.9033392	1.9225074
Tbp	5.41048128	3.9875535	2.8654008	2.2273883
Tbrg1	2.29159917	2.2850008	1.2823252	1.2356719
Tmem11	3.51118312	3.1221879	1.901359	1.7233232
Tmem132b	3.28355027	4.3736388	1.7858176	2.4522784
Tmem44	3.104972	3.7682099	1.6951753	2.0996233
Tmub2	2.34540761	2.567316	1.3096372	1.400117
Traf4	2.2585901	3.8347851	1.2655705	2.1384025
Trim8	2.88701245	4.1994575	1.5845438	2.3508198

[0042]

Ttc13	4.07886504	3.2371211	2.1895018	1.7902704
Ttc33	5.95232536	2.2989447	3.1404288	1.243794
Ttyh1	4.54541338	3.9692053	2.4263114	2.2167007
Tub	3.12756533	2.9711791	1.7066431	1.6353625
Txn2	6.00419076	4.2368528	3.1667546	2.3726021
Txndc16	2.43947484	2.9849377	1.3573836	1.6433766
Ube2m	3.90088402	2.4202251	2.0991626	1.3144384
Unc79	3.74317238	2.6195756	2.0191117	1.4305576
Upf3a	7.68946208	3.6402834	4.022161	2.0251077
Uso1	4.92411717	4.3719504	2.6185331	2.4512949
Usp11	4.89078293	4.7420138	2.6016134	2.6668524
Vti1b	4.02417391	4.0869526	2.1617418	2.2852871
Wdr5	3.06576486	2.5963471	1.6752746	1.4170273
Ypel1	5.82431342	3.7186054	3.0754528	2.0707292
Zcchc17	4.23987298	4.1958037	2.2712259	2.3486915
Zfp128	3.27218513	2.7063625	1.7800489	1.4811099
Zfp553	2.37628249	3.5674136	1.3253086	1.9826619
Zfp623	4.16147602	3.125352	2.2314333	1.7251663
2310045N01Rik	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Abat	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Abhd13	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Acy1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Adamts18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Adarb1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Adpgk	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Atg13	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B230118H07Rik	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Baiap2(IRSp53)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Cers4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Cln8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Cmtr2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Commd8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Dhodh	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Esyt2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fcfl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Galk1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Gmppb	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Hmces	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Kctd18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

[0043]	Leng1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mettl22	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mrpl1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mrpl57	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Nfxl1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Nsmaf	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Pofut2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Psrl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Rev1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Rpap1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Slc15a4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Smg5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Suv420h2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Tmem178b	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Tor1aip1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Trub1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Vamp3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Zfp426	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Zfp566	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Zfyve9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Zscan12	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

[0044] 作为eIF4E过度激活敏感基因的一个具体实例,腺苷激酶(ADK,EC 2.7.1.20)是一种进化上保守的磷酸转移酶,可将腺苷转化为5'-单磷酸腺苷。ADK在复杂的内稳态和代谢网络中起着上游调节器的作用。ADK功能障碍与包括糖尿病、癌症等在内的各种病理有关。人腺苷激酶的氨基酸和核酸序列是已知的,例如NCBI登录号NP_001114.2、NP_001189378.1、NP_001189379.1、NP_001356052.1或NP_006712.2的氨基酸序列和NCBI登录号NC_000010.11的核酸序列。由于ADK在星形胶质细胞中过表达而患癫痫的模型是已知的,但与本发明无关,本发明致力于因ADK在神经元中过表达而发生癫痫。

[0045] cAMP反应元件结合蛋白1(CREB1)是一种细胞转录因子,它与称为cAMP反应元件(CRE)的某些DNA序列结合,从而调节下游基因的转录。人CREB1的氨基酸和核酸序列是已知的,例如NCBI登录号NP_001307722.1、NP_004370.1和NP_604391.1的氨基酸序列以及NCBI登录号NG_023299.1的核酸序列。

[0046] 胰岛素受体底物p53(IRS_p53),也称为脑特异性血管生成抑制剂1相关蛋白2(BAIAP2),与脑特异性血管生成抑制剂1相互作用并作为胰岛素受体酪氨酸激酶底物发挥作用。人IRS_p53的氨基酸和核酸序列是已知的,例如NCBI登录号NP_001138360.1、NP_006331.1、NP_059344.1和NP_059345.1的氨基酸序列以及NCBI登录号NG_029486.2的核酸序列。

[0047] 根据本发明的eIF4E抑制剂是能够抑制脑中eIF4E的表达、活性或水平的物质,可以包括化合物(例如二甲双胍)、多核苷酸(例如siRNA、shRNA、miRNA、反义寡核苷酸等)、多肽和抗体(例如,完整抗体、抗体片段等),但不限于此。优选地,多核苷酸可以是反义多核苷酸。详细地,多核苷酸可以是能够与靶基因互补结合的任何多核苷酸或核酸分子,并且包括可以是单链或双链的DNA和RNA。术语“对eIF4E的表达、活性或水平的抑制活性”是指将

eIF4E的表达、活性或水平降低至未患有与eIF4E的表达增加相关的脑部疾病的受试者中的95%或更低、90%或更低、85%或更低、80%或更低、75%或更低、70%或更低、65%或更低、60%或更低、55%或更低或50%或更低。

[0048] 因此,只要本领域已知,任何eIF4E抑制剂均可用于本发明。例如,eIF4E抑制剂包括(i)利巴韦林、合成的核苷酸衍生物7-苄基鸟苷一磷酸(7-BnGMP)和4Ei-1(无毒小分子),它们各自是与eIF4E结合并竞争性抑制EIF4E与7-MeG-加帽的mRNA结合的帽结合拮抗剂,(ii)4EGI-1,4E1RCat、喹巴因(Quabain)(一种强心苷)和紫苏醇(一种植物甲羟戊酸代谢的次级产物),它们各自是eIF4E-eIF4G相互作用抑制剂,(iii)4EBP模拟肽和GnRH激动剂-4EBP融合肽,它们各自与eIF4E结合以降低游离eIF4E的水平,(iv)CGP052088(星形孢菌素的衍生物,一种广谱激酶抑制剂)、CGP57380(一种有效的Mnk1和Mnk2抑制剂)和视黄酰胺(一种新型Mnk抑制剂/一种视黄酸代谢阻断剂/阻断eIF4E磷酸化),它们各自是阻断eIF4E磷酸化的Mnk抑制剂,和(v)反义寡核苷酸。

[0049] eIF4E抑制剂可以是帽结合拮抗剂、eIF4E-eIF4G相互作用抑制剂、与eIF4E结合以降低游离eIF4E水平的物质、阻断eIF4E磷酸化的Mnk抑制剂或与eIF4E结合的核酸。更具体地,eIF4E抑制剂可以是二甲双胍、利巴韦林、7-BnGMP、4Ei-1、4EGI-1、4E1RCat、喹巴因、紫苏醇、4EBP模拟肽、GnRH激动剂-4EBP融合肽、CGP052088、CGP57380,或能够与eIF4E结合的siRNA、shRNA或反义寡核苷酸。

[0050] 只要它具有针对eIF4E表达、活性或水平的抑制活性,任何反义寡核苷酸(ASO)都可以用作本发明中的eIF4E抑制剂,即使在本领域中已知为抗癌剂。反义寡核苷酸的实例包括在US 9,096,851、US 8,410,074、US 8,252,762和US 7,601,700中公开的那些,但不限于此。示例性的eIF4E特异性ASO包括LY2275796和ISIS 183750,但不限于此。

[0051] 在其一种实施方式中,本发明提供了一种eIF4E mRNA表达抑制剂,例如,包括能够与真核翻译起始因子4E(eIF4E)互补结合的多核苷酸的eIF4E抑制剂。在此,“mRNA表达抑制剂”与mRNA互补结合以抑制该mRNA编码的蛋白质的表达,可以优选为选自反义寡核苷酸、siRNA、shRNA和微RNA组成的组中的至少一种,更优选为shRNA,但不限于此。shRNA可以更有效地实现目标,因为它在转染时具有高周转率和低降解率。

[0052] 在本发明中,作为eIF4E抑制剂起作用的多核苷酸可以是各自与eIF4E mRNA互补结合的反义寡核苷酸、siRNA或shRNA。多核苷酸与eIF4E mRNA互补结合,而eIF4E mRNA又经历由RNase H介导的降解,从而预防、减轻或治疗与eIF4E表达增加相关的疾病、其症状或其相关疾病。

[0053] 在根据本发明的一种实施方式中,eIF4E抑制剂可以是eIF4E抑制药物,例如二甲双胍。或者,eIF4E抑制剂可以是shRNA并且可以包括例如SEQ ID NO:203或SEQ ID NO:204。在另一种实施方式中,eIF4E抑制剂可以是反义寡核苷酸(ASO),其实例列于下表2中。任何抑制eIF4E基因表达和/或活性的寡核苷酸都是可用的。

[0054] 寡核苷酸可以是抑制eIF4E的活性或表达的反义寡核苷酸,并且长度为14至30个核苷酸、15至30个核苷酸、16至30个核苷酸、17至30个核苷酸、18至30个核苷酸、19至30个核苷酸、14至25个核苷酸、15到25个核苷酸、16到25个核苷酸、17到25个核苷酸、18到25个核苷酸、19到25个核苷酸、14到23个核苷酸、15到23个核苷酸、16到23个核苷酸、17到23个核苷酸、18到23个核苷酸,或19到23个核苷酸。更具体地,反义寡核苷酸可以是与选自eIF4E中的

5'-非翻译区、翻译起始区、外显子、内含子和3'-非翻译区的至少一种特异性杂交的反义核酸分子。

[0055] 通常,反义寡核苷酸是指具有允许与靶核酸分子的相应区段杂交的碱基序列的单链寡核苷酸。

[0056] 根据本发明的一种实施方式的反义寡核苷酸是与选自eIF4E中的5'-非翻译区、翻译起始区、外显子、内含子和3'-非翻译区组成的组中的至少一种特异性杂交的反义核酸分子,以降低eIF4E的产生表达水平和/或活性,从而预防、缓解或治疗由脑神经元细胞中eIF4E的过度激活或活性增加引起的病症,特别是疾病、或病症、或疾病或病症的症状。此外,根据本发明的反义寡核苷酸可以抑制或降低eIF4E的活性,从而可以调节eIF4E激活敏感基因的表达或活性,该基因的表达受eIF4E调节。eIF4E激活敏感基因如上所述。

[0057] 更详细地,反义寡核苷酸可以将eIF4E mRNA的表达水平降低至具有SEQ ID NO: 201序列的对照的95%或更低、90%或更低、85%或更低、80%或更低、75%或更低、70%或更低、65%或更低60%或更低、55%或更低、或50%或更低。

[0058] 可以对寡核苷酸进行各种化学修饰,以提高体内稳定性、赋予对核酸酶的抗性和减少非特异性免疫反应。

[0059] 可以修饰反义寡聚化合物以在寡聚物链的至少一个末端具有至少一个稳定基团,以增加例如对核酸酶的稳定性。术语“帽结构”或“末端帽部分”是指已掺入反义寡聚化合物的任一末端的化学修饰。

[0060] 此外,反义寡核苷酸可具有化学修饰的核苷间键、糖部分或碱基。“修饰的寡核苷酸”是指具有至少一个修饰的核苷间键、修饰的糖和/或修饰的核碱基的寡核苷酸。

[0061] 用于化学修饰的核苷酸可以是选自以下组成的组中的至少一种:核苷酸的糖部分的2'位置的OH基被-CH₃(甲基)、-OCH₃(甲氧基)、-NH₂、-F、-O-2-甲氧基乙基、-O-丙基、-O-2-甲硫基乙基、-O-3-氨基丙基、-O-3-二甲基氨基丙基、-O-N-甲基乙酰胺基或-O-二甲基氨基氧基乙基取代的修饰;核苷酸的糖部分上的氧被硫取代的修饰;将核苷酸中的胞嘧啶修饰为在5位具有甲基的修饰;以及核苷间键被修饰为硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯或膦酸甲酯键的修饰。寡核苷酸可以包括修饰成PNA(肽核酸)、LNA(锁核酸)或UNA(未锁核酸)的修饰。LNA是一种修饰的核苷酸,其核糖部分被连接2'氧和4'碳的额外的亚甲基桥修饰。“cEt”或“受约束的乙基”或“cEt修饰的糖”是指具有包含连接4'-碳和2'-碳的桥的糖部分的双环核苷,其中该桥具有式:4'-CH(CH₃)-O-2'。

[0062] 在本发明的一种实施方式中,反义寡核苷酸可以包括选自化学修饰的核苷间键、化学修饰的糖部分和化学修饰的核碱基组成的组中的至少一种化学修饰。

[0063] 寡核苷酸中的单个核苷酸可以被化学修饰并且可以包含选自受约束的乙基(cEt)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)和锁核酸(LNA)的修饰的糖部分。在寡核苷酸中,修饰的核苷酸的数量可以是1至6个,例如在其每个末端有1、2、3、4、5或6个。

[0064] 寡核苷酸中的单个核苷酸可以包括化学修饰的碱基。术语“修饰的碱基”是指除腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶之外的任何核碱基。“修饰的核碱基”是指除腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶之外的任何核碱基。“未修饰的核碱基”是指嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。例如,修饰的碱基可以是在5位具有甲基的胞嘧啶。

[0065] 在反义寡核苷酸中,核苷间键可以被化学修饰,例如硫代磷酸酯键、硼磷酸酯键或磷酸甲酯键,优选硫代磷酸酯键。

[0066] 在本发明中,反义寡核苷酸的给药、腺相关病毒(AAV)介导的siRNA递送、eIF4E活性抑制剂(例如eFT-508)的给药或肽介导的RNA递送可以被实施。

[0067] 根据本发明的组合物可以通过各种途径给药于受试者。可以考虑所有的给药方式。例如,可以非胃肠道给药。非胃肠道给药是指通过注射(例如推注)或输注给药。非胃肠道给药包括皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射、动脉内注射、腹膜内注射、脑内注射、鞘内注射或脑室内注射。

[0068] 反义多核苷酸的具体实例列于表2中。在表2中,SEQ ID NO:1至89和SEQ ID NO:101至200的寡核苷酸在5'到3'方向的第1-5和16-20位的核苷酸上包含2'-MOE修饰。SEQ ID NO:81至95的寡核苷酸在第1-3和14-16位的核苷酸上包含2'-MOE。表2中的所有寡核苷酸都经过修饰以在每两个相邻的核苷酸之间含有硫代磷酸酯键。

[0069] [表2]

SEQ ID NO	Id	核苷酸序列(5'→3')	目标位置
1	EIF4E_98879841	AAACAAAGATAGCCACATCA	3'UTR
2	EIF4E_98879924	TCAAAGTAGTGCTCCAAACT	3'UTR
3	EIF4E_98880043	AGGACAAATCTAGTTGTCTA	3'UTR
4	EIF4E_98880044	GGACAAATCTAGTTGTCTAA	3'UTR
5	EIF4E_98880054	AGTTGTCTAAAAGACAATTC	3'UTR
6	EIF4E_98881125	CTTTCCTTGATACCCTCCT	外显子7
7	EIF4E_98881126	TTTCCTTGATACCCTCCTA	外显子7
8	EIF4E_98882525	AGGATAGGTTTTTTTTTATAC	内含子6
9	EIF4E_98882527	GATAGGTTTTTTTTTATACCT	内含子6
10	EIF4E_98883689	CACTGCGCCTGGTGTCAAAT	内含子6
11	EIF4E_98883695	GCCTGGTGTCAAATATTACT	内含子6
12	EIF4E_98885582	GGCATAACATACAGGGACATG	内含子5
13	EIF4E_98885583	GCATAACATACAGGGACATGT	内含子5
14	EIF4E_98886839	GCTTACTGTGGTGAGAGTCA	内含子5
15	EIF4E_98886840	CTTACTGTGGTGAGAGTCAA	内含子5
16	EIF4E_98887070	AAACCTTACTGTCTCTAGCC	外显子5
17	EIF4E_98887071	AACCTTACTGTCTCTAGCCA	外显子5
18	EIF4E_98887260	AACAGTTAAGCAACAACACT	内含子4
19	EIF4E_98887261	ACAGTTAAGCAACAACACTG	内含子4
20	EIF4E_98887650	CTGGATAATCAAAGCTCTCA	内含子4
21	EIF4E_98887651	TGGATAATCAAAGCTCTCAT	内含子4
22	EIF4E_98887880	TAAGCATACCTTAAAAAGTG	外显子4
23	EIF4E_98887881	AAGCATACCTTAAAAAGTGA	外显子4
24	EIF4E_98887882	AGCATACCTTAAAAAGTGAG	外显子4
25	EIF4E_98887883	GCATACCTTAAAAAGTGAGT	外显子4
26	EIF4E_98887884	CATACCTTAAAAAGTGAGTA	外显子4
27	EIF4E_98888747	TCTCCAATATTAGATGGCAG	内含子3
28	EIF4E_98888750	CCAATATTAGATGGCAGAAA	内含子3
29	EIF4E_98889967	AAATTATTAGGCCTTAAATG	内含子3
30	EIF4E_98889970	TTATTAGGCCTTAAATGTAG	内含子3
31	EIF4E_98891226	TGGTTACTTACGCCCAAAG	外显子3
32	EIF4E_98891227	GGTTACTTACGCCCAAAGT	外显子3
33	EIF4E_98891228	GTTACTTACGCCCAAAGTC	外显子3
34	EIF4E_98891229	TTACTTACGCCCAAAGTCT	外显子3
35	EIF4E_98891231	ACTTACGCCCAAAGTCTTC	外显子3
36	EIF4E_98901055	CCAAGTCAGCACGGACTTTT	内含子2
37	EIF4E_98901056	CAAGTCAGCACGGACTTTT	内含子2
38	EIF4E_98901057	AAGTCAGCACGGACTTTT	内含子2
39	EIF4E_98901649	TCCATTATGACCAATACTTT	内含子2
40	EIF4E_98901650	CCATTATGACCAATACTTT	内含子2
41	EIF4E_98901651	CATTATGACCAATACTTTC	内含子2

[0070]

[0071]

42	EIF4E_98901863	TTAGAAAGCTTACCTGTTCT	外显子2
43	EIF4E_98901864	TAGAAAGCTTACCTGTTCTG	外显子2
44	EIF4E_98901865	AGAAAGCTTACCTGTTCTGT	外显子2
45	EIF4E_98916244	TATAACAATTACAGGAAGCT	内含子1
46	EIF4E_98916247	AACAATTACAGGAAGCTATA	内含子1
47	EIF4E_98923992	CATGCTCATTTCCACTTCTC	内含子1
48	EIF4E_98928252	TACAGCGATCTGTAGGCCTC	内含子1
49	EIF4E_98928259	ATCTGTAGGCCTCGCTCCTC	内含子1
50	EIF4E_98928283	TTCCCTCCTCCATGACAGCC	内含子1
51	EIF4E_98929081	AAGGCAATACTCACCGGTTT	外显子1
52	EIF4E_98929101	GACAGTCGCCATCTTAGATC	外显子1
53	EIF4E_98929115	TAGATCGATCTGATCGCACA	5'UTR
54	EIF4E_98929123	TCTGATCGCACAACCGCTCC	5'UTR
55	EIF4E_98929166	AATGAGATTCAAACCGGATT	5'UTR
56	EIF4E_98929170	AGATTCAAACCGGATTGGCC	5'UTR
57	EIF4E_98929269	GGCTTCTGGGAAGTGGAGTC	5'UTR
58	EIF4E_98929547	ATAAGGCTTCATTTGCTTAG	5'UTR
59	EIF4E_98930006	GGGTCAACTATGACTCTTGA	5'UTR
60	EIF4E_98930012	ACTATGACTCTTGACGTTGA	5'UTR
61	EIF4E_98930017	GACTCTTGACGTTGACTCAT	5'UTR
62	EIF4E_98930038	CTCCTTAGGCGAGTGACTTA	5'UTR
63	EIF4E_98930102	GATACACTTACCTCACAAGG	5'UTR
64	EIF4E_98930109	TTACCTCACAAGGGTGTGCT	5'UTR
65	EIF4E_98880048	AAATCTAGTTGTCTAAAAGA	3'UTR
66	EIF4E_98880053	TAGTTGTCTAAAAGACAATT	3'UTR
67	EIF4E_98928260	TCTGTAGGCCTCGCTCCTCC	内含子1
68	EIF4E_98928261	CTGTAGGCCTCGCTCCTCCC	内含子1
69	EIF4E_98928284	TCCCTCCTCCATGACAGCCC	内含子1
70	EIF4E_98929933	AGATGCCAGCCAGGGAAGCC	5'UTR
71	EIF4E_98929937	GCCAGCCAGGGAAGCCACTC	5'UTR
72	EIF4E_98884969	TGCTATCTTATCACCTTTAG	外显子6
73	EIF4E_98880876	GGCGAATGAGACTTCTCTTA	3'UTR
74	EIF4E_98880414	TCCTGGATCCTTCACCAATG	3'UTR
75	EIF4E_98880406(ASO-1)	TGTCATATTCCTGGATCCTT	3'UTR
76	EIF4E_98880417(ASO-2)	TGGATCCTTCACCAATGTTA	3'UTR
77	EIF4E_98880419(ASO-3)	GATCCTTCACCAATGTTACA	3'UTR
78	EIF4E_98884977(ASO-4)	TATCACCTTTAGCTCTAACA	外显子6
79	EIF4E_98887921(ASO-5)	AATTACTAGACAACCTGGATA	外显子4
80	EIF4E_98929104	CATCTTAGATCGATCTGATC	外显子1
81	EIF4E_98880414_简写	CTGGATCCTTCACCAA	3'UTR
82	EIF4E_98884969_简写	CTATCTTATCACCTTT	外显子6
83	EIF4E_98887921_简写	TTACTAGACAACCTGGA	外显子4

[0072]

84	EIF4E_98929104_简写	ATCTTAGATCGATCTG	外显子1
85	EIF4E_98891227_简写	TACTTACGCCAAAA	外显子3
86	EIF4E_98881125_简写	TTCCTTGTATACCCTC	外显子7
87	EIF4E_98887070_简写	ACCTTACTGTCTCTAG	外显子5
88	EIF4E_98901864_简写	GAAAGCTTACCTGTTC	外显子2
89	EIF4E_98930017_简写	CTCTTGACGTTGACTC	5'UTR
90	EIF4E_98928261_简写	GTAGGCCTCGCTCCTC	内含子1
91	EIF4E_98901649_简写	CATTATGACCAATACT	内含子2
92	EIF4E_98888750_简写	AATATTAGATGGCAGA	内含子3
93	EIF4E_98887650_简写	GGATAATCAAAGCTCT	内含子4
94	EIF4E_98886839_简写	TACTGTGGTGAGAGT	内含子5
95	EIF4E_98883695_简写	CTGGTGTCAAATATTA	内含子6
101	EIF4E_98929109	CCATCTTAGATCGATCTGAT	外显子1
102	EIF4E_98929111	ATCTTAGATCGATCTGATCG	外显子1
103	EIF4E_98929201	ACGTGACGGATATGTCCGTT	外显子1
104	EIF4E_98929463	TGCCAGGCAAGCCTACTGTG	外显子1
105	EIF4E_98929873	GAAGTTCTGTGCAACCGTTC	外显子1
106	EIF4E_98929875	AGTTCTGTGCAACCGTTCCA	外显子1
107	EIF4E_98929917	GAAATAGCCTAAGTCCAGAT	外显子1
108	EIF4E_98929921	TAGCCTAAGTCCAGATGCCA	外显子1
109	EIF4E_98930010	CAACTATGACTCTTGACGTT	外显子1
110	EIF4E_98930095	AGGTGATGATACACTTACCT	外显子1
111	EIF4E_98930164	GACTCTAGAAATGATTGATA	外显子1
112	EIF4E_98902048	ACTAAACCTGAACTGATATG	内含子1
113	EIF4E_98902052	AACCTGAACTGATATGCTGA	内含子1
114	EIF4E_98902946	CTATCGTAACTAAAAGTTC	内含子1
115	EIF4E_98902976	TATTTTCAATGGAACCTAAC	内含子1
116	EIF4E_98904158	GTATTTGTGAAACGTAAGCA	内含子1
117	EIF4E_98906453	ATTCAGGCTTACATATTGTA	内含子1
118	EIF4E_98908332	ACGTGTTTCGGTCAATGCTAC	内含子1
119	EIF4E_98908338	TCGGTCAATGCTACAGCACC	内含子1
120	EIF4E_98910345	TCATATATCAATCATGATTC	内含子1
121	EIF4E_98910440	ACTGGATTACTAAAGAGTTG	内含子1
122	EIF4E_98910444	GATTACTAAAGAGTTGTGAT	内含子1
123	EIF4E_98911027	CCAGGCCTAAAACCTTGATG	内含子1
124	EIF4E_98911030	GGCCTAAAACCTTGATGAAT	内含子1
125	EIF4E_98912603	TACATACGTTGAACATTATG	内含子1
126	EIF4E_98913964	CGTTTATGATGTAAGCACTA	内含子1
127	EIF4E_98917268	AGTTCAGCTTTAATCCAATC	内含子1
128	EIF4E_98920149	GGAGATAGGTTTTCCACATT	内含子1
129	EIF4E_98920153	ATAGGTTTTCCACATTAGAC	内含子1
130	EIF4E_98925375	AGAAACACGACCTACTGGAG	内含子1

[0073]

131	EIF4E_98901927	TTAGATTCGGTTTTCTCCTC	外显子2
132	EIF4E_98901929	AGATTCGGTTTTCTCCTCTT	外显子2
133	EIF4E_98901937	TTTTCTCCTCTTCTGTAGTC	外显子2
134	EIF4E_98901940	TCTCCTCTTCTGTAGTCGGG	外显子2
135	EIF4E_98901943	CCTCTTCTGTAGTCGGGGGA	外显子2
136	EIF4E_98901946	CTTCTGTAGTCGGGGGATTA	外显子2
137	EIF4E_98901950	TGTAGTCGGGGGATTAGGAG	外显子2
138	EIF4E_98901953	AGTCGGGGGATTAGGAGTAG	外显子2
139	EIF4E_98891637	GGTGATTGCCACTAGCCAAA	内含子2
140	EIF4E_98891970	CGGAATTCACAGAAATGACG	内含子2
141	EIF4E_98893710	GCTTCAAAGTCATCAATACG	内含子2
142	EIF4E_98894256	AGTCATTGGCTGCAAGATCC	内含子2
143	EIF4E_98897774	TTCATCTGCCACTGTAAGCC	内含子2
144	EIF4E_98897930	TAAGCAGTGTATGATGTTAA	内含子2
145	EIF4E_98900200	GTAAACTATATAAGACTGC	内含子2
146	EIF4E_98900208	ATATAAGACTGCCTCTAACG	内含子2
147	EIF4E_98901760	CCTCAACCTTAGCATATCTA	内含子2
148	EIF4E_98901769	TAGCATATCTAAAAGTAGTC	内含子2
149	EIF4E_98901104	GACATCTTGCTTCATTGAC	内含子2
150	EIF4E_98887991	GTAATATAGAGTTTAGGTGC	内含子3
151	EIF4E_98887997	TAGAGTTTAGGTGCTTACAT	内含子3
152	EIF4E_98888000	AGTTTAGGTGCTTACATATA	内含子3
153	EIF4E_98888635	CGATGACTTAGTTGCTTGCC	内含子3
154	EIF4E_98888641	CTTAGTTGCTTGCCGAAGG	内含子3
155	EIF4E_98889221	CACAAATATAGTTTAGGTGA	内含子3
156	EIF4E_98889228	ATAGTTTAGGTGAGACAACC	内含子3
157	EIF4E_98890236	ATGAGCAGAATATCTTGAGG	内含子3
158	EIF4E_98890336	TTAGATAACTGCTAGGTAAT	内含子3
159	EIF4E_98890730	GAGGTTGATCAAAGTATAAT	内含子3
160	EIF4E_98887924	TACTAGACAACCTGGATATGG	外显子4
161	EIF4E_98887927	TAGACAACCTGGATATGGTTG	外显子4
162	EIF4E_98887930	ACAACCTGGATATGGTTGTAC	外显子4
163	EIF4E_98887933	ACTGGATATGGTTGTACAGA	外显子4
164	EIF4E_98887357	GCATGACATTGCAGAATTAG	内含子4
165	EIF4E_98887647	AGACTGGATAATCAAAGCTC	内含子4
166	EIF4E_98887648	GACTGGATAATCAAAGCTCT	内含子4
167	EIF4E_98887092	AAGCGATCGAGGTCACCTCG	外显子5
168	EIF4E_98887095	CGATCGAGGTCACCTCGTCT	外显子5
169	EIF4E_98887098	TCGAGGTCACCTCGTCTCTG	外显子5
170	EIF4E_98887101	AGGTCACCTCGTCTCTGCTG	外显子5
171	EIF4E_98887103	GTCACCTCGTCTCTGCTGTT	外显子5
172	EIF4E_98885135	TTGCATAGAACTAAAGGC	内含子5

[0074]	173	EIF4E_98885140	ATAGAAACTAAAGGCAGTTT	内含子5
	174	EIF4E_98885275	TTGGCAGTTAATGTCATGGC	内含子5
	175	EIF4E_98885278	GCAGTTAATGTCATGGCAGA	内含子5
	176	EIF4E_98885327	TGCTCTGCTGCTGCTTATAT	内含子5
	177	EIF4E_98886329	TGTCTTGTAAGCCAGAAGT	内含子5
	178	EIF4E_98884989	CTCTAACATTAACAACAGCG	外显子6
	179	EIF4E_98884993	AACATTAACAACAGCGCCAC	外显子6
	180	EIF4E_98884997	TTAACAACAGCGCCACATAC	外显子6
	181	EIF4E_98885000	ACAACAGCGCCACATACATC	外显子6
	182	EIF4E_98885005	AGCGCCACATACATCATCAC	外显子6
	183	EIF4E_98881534	GACCTGTATCACATGCATAC	内含子6
	184	EIF4E_98881537	CTGTATCACATGCATACTTA	内含子6
	185	EIF4E_98881795	TTTCAAGTAAGACATGACTC	内含子6
	186	EIF4E_98881800	AGTAAGACATGACTCTATTG	内含子6
	187	EIF4E_98882037	TGAGATAAAGCTGACAAGGT	内含子6
	188	EIF4E_98882042	TAAAGCTGACAAGGTTTCAG	内含子6
	189	EIF4E_98884156	TTAATGAAAATTATACGTAG	内含子6
	190	EIF4E_98884163	AAATTATACGTAGTAAACAC	内含子6
	191	EIF4E_98873115	CAACCTTCATAAAAGTACTA	外显子7
	192	EIF4E_98874238	TGCCACTTGATACTGCTGAA	外显子7
	193	EIF4E_98875120	AGTTTCTAGACACGTACAAG	外显子7
	194	EIF4E_98875416	ACTTTACTTGGACAATCATA	外显子7
	195	EIF4E_98877382	CTTTTGAATGCAACTTTAGC	外显子7
	196	EIF4E_98879129	TATGTACAGTATGCTGAGAT	外显子7
	197	EIF4E_98879807	CTAAGACTGAATGACTGTGC	外显子7
	198	EIF4E_98879820	ACTGTGCCTTACTTTATAAA	外显子7
	199	EIF4E_98880301	CACTGATTTGAATGAAATGC	外显子7
	200	EIF4E_98880973	CCAAATCTCGATTGCTTGAC	外显子7

[0075] 可以通过皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射、动脉内注射、腹膜内注射、脑内注射、鞘内注射或脑室内注射来将治疗有效剂量的根据本发明的寡核苷酸递送到细胞中。由于eIF4E抑制剂除了作用于神经系统外，还被称为抗癌剂，因此静脉注射可以发挥抗癌活性，但eIF4E抑制剂不能穿过脑血屏障进入大脑。因此，优选脑内注射、鞘内注射或脑室内注射，更优选鞘内注射。

[0076] 取决于给药途径，根据本发明的包含eIF4E抑制剂的药物组合物可以通过本领域已知的方法与药学上可接受的载体一起不同地配制。载体包括所有类型的溶剂、分散介质、水包油或油包水乳液、水性组合物、脂质体、微珠和微粒体。

[0077] 根据本发明的药物组合物可以药学有效量给药，即以足以预防、减轻或治疗癫痫或其症状的量给药。例如，组合物可以以0.01至1000mg/kg的日剂量给药，优选以1至100mg/kg的日剂量给药。本发明的药物组合物在所需剂量范围内可以一次给药或分成多次给药。但是，本领域技术人员可以根据给药途径、待给药的受试者、年龄、性别、体重、个体差异和疾病状态适当地选择根据本发明的组合物的剂量。

[0078] 此外，本发明的药物组合物可以口服或非胃肠道给药。此外，根据本发明的药物组

合物的给药可以借助能够将活性成分递送至靶细胞的任何装置来进行。根据不同的给药途径,本发明的药物组合物可以配制成合适的剂型。

[0079] 根据其实实施方式,本发明提供至少一种选自自由eIF4E、eIF4E激活敏感蛋白和编码其的核酸分子组成的组中的生物标志物。生物标志物可用于探测、检测或诊断由eIF4E活性的增加引起的脑部疾病,例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病。

[0080] 因此,根据本发明的一种实施方式,考虑了用于诊断与eIF4E的活性增加相关的脑部疾病(例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病)的组合物或试剂盒,该组合物或试剂盒包含能够检测生物标志物的分子或试剂;或用于诊断或提供关于与eIF4E的活性增加相关的脑部疾病(例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病)的诊断信息的方法;或用于提供关于与eIF4E的活性增加相关的脑部疾病(例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病)的诊断信息的方法,该方法使用能够检测生物标志物的分子或试剂。本发明的另一种实施方式涉及包含作为生物标志物能够探测、检测或诊断与eIF4E的活性增加相关的脑部疾病(例如FMCD、FMCD的症状,或相关疾病)的分子或试剂的组合物或试剂盒。

[0081] 本发明的另一种实施方式涉及用于选择要给药eIF4E抑制剂的受试者、用于预测受试者对eIF4E抑制剂的易感性或用于监测受试者中eIF4E抑制剂的给药功效的方法,该方法使用至少一种选自自由eIF4E、其表达或活性受eIF4E调节的eIF4E激活敏感蛋白和编码其的核酸分子组成的组中的生物标志物。

[0082] 在本发明的一种实施方式中,该方法包括以下步骤:测量来自受试者的生物测试样品中的生物标志物的活性、表达或浓度水平,并比较测试样品和参考样品中生物标志物的活性、表达或浓度水平的测量值。

[0083] 此外,该方法还可以包括以下步骤:选择需要eIF4E抑制剂的受试者;在比较步骤中,当来自受试者的生物样品中的生物标志物的活性、表达或浓度水平高于参考样品时,将eIF4E抑制剂给药于选择的受试者。参考样品可获自未患有与eIF4E活性增加相关的脑部疾病、其症状或其相关疾病的受试者。测试样品可获自具有发生与eIF4E活性增加相关的疾病、其症状或其相关疾病的风险,或因与eIF4E活性增加相关的疾病而接受手术的受试者。

[0084] 如本文所用,术语“来自患者的样品”或“来自受试者的样品”是指可以从中检测到生物标志物蛋白质或基因的组织或细胞等样品,并且旨在涵盖脑组织、脑细胞、脑组织匀浆物或脑脊液,但不限于此。

[0085] 与eIF4E活性增加相关的脑部疾病,例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病,如上描述了eIF4E、eIF4E过度激活敏感蛋白和编码其的核酸分子。

[0086] 根据本发明的能够检测生物标志物的分子或试剂可以是能够与生物标志物杂交的引物、探针或适体,或者与生物标志物特异性结合的抗体或适体。

[0087] 详细而言,本发明中的“能够检测基因的试剂”是指可用于检测感兴趣样品中的靶基因的物质。在具体实施方式中,所述试剂可以是能够与靶基因的核酸序列互补结合的引物、探针、反义寡核苷酸或适体。引物、探针或反义寡核苷酸特异性结合靶基因,但优选不结合其他核酸序列。探针可以构建成寡核苷酸探针、单链DNA探针、双链DNA探针或RNA探针的形式。在本发明中,可以通过确定靶基因和与其互补的探针、引物或反义寡核苷酸之间的杂交来进行诊断。可以基于本领域知识修改合适序列和杂交条件的选择。

[0088] 在诊断组合物、诊断试剂盒、诊断方法和提供与eIF4E活性增加相关的脑部疾病

(例如FMCD、FMCD的症状或其相关疾病)的诊断信息的方法中,检测来自受试者的样品中的生物标志物基因可以通过扩增来自患者样品的核酸序列和/或确定扩增的核酸序列来进行。

[0089] 详细地,核酸扩增可以通过靶序列的聚合酶链式反应(PCR)、多重PCR、降落PCR(touchdown PCR)、热启动PCR、巢式PCR、加强PCR(booster PCR)、实时PCR、差异显示PCR(DD-PCR)、cDNA末端快速扩增(RACE)、反向PCR、小载体PCR、热不对称交错PCR(TAIL-PCR)、连接酶链反应、修复链反应、转录介导的扩增、自保留序列复制或选择性扩增反应来进行。

[0090] 另外,扩增子的测序步骤可以通过Sanger测序、Maxam-Gilbert测序、Shotgun测序、焦磷酸测序、微阵列杂交、等位基因特异性PCR、动态等位基因特异性杂交(DASH)、PCR延伸分析、TaqMan方法、自动序列分析或下一代测序进行。可以使用本领域广泛使用的序列分析系统进行下一代测序,例如可以使用Roche公司的454GS FLX、Illumina公司的Genome Analyzer、Applied Biosystems公司的SOLid Platform等。

[0091] 这里,“能够检测基因的试剂”是指可以用于检测目标样品中的靶蛋白的物质。优选地,所述试剂可以是靶向靶蛋白的特定化合物、肽、抗体、适体或合成物质。抗体可以是多克隆或单克隆的。

[0092] 此外,可以以试剂盒的形式提供包含能够检测用于诊断癫痫的靶基因或蛋白质的试剂的组合物。用于检测mTOR激活敏感基因或蛋白质的试剂盒可包含组合物、溶液或装置,该组合物、溶液或装置含有一种或多种适用于分析的不同成分,以及能够检测基因或蛋白质的试剂,该试剂包括引物、探针、反义核酸、适体、抗体、肽和化合物。

[0093] 通过检测eIF4E信号传导途径下游基因即可检测eIF4E激活敏感蛋白或编码其的核酸分子,从而实现无需切除脑组织进行的微创诊断,并在时间和成本方面具有优于传统基因检测方法的优点。

[0094] 发明效果

[0095] 在本发明中,如药理学或遗传抑制所表明的,eIF4E被鉴定为顽固性癫痫的新治疗靶标,并且可以使用eIF4E阻遏物或eIF4E抑制剂来抑制癫痫。

附图说明

[0096] 图1示出了通过免疫荧光分析测量的来自TSC、FCD和HME患者的脑组织中磷酸化4E-BP1/2/3(4E-BP)和S6的表达水平增加,其中对照1指UMB5309的死后脑组织,对照2指UMB5408的死后脑组织,对照3指FCD247的未受影响的脑组织。

[0097] 图2示出了通过蛋白质印迹分析测量的从TSC、FCD和HME患者的脑组织获得的蛋白质溶液中ADK、IRSp53、CREB1和p-S6的表达水平增加,其中 α -微管蛋白用作上样对照,对照1指UMB5309的死后脑组织,对照2指UMB5408的死后脑组织,对照3指FCD247的未受影响的脑组织,对照4指UMB1712的死后脑组织,对照5指UMB4917的死后脑组织。

[0098] 图3示出了通过免疫荧光分析测量的TSC、FCD和HME患者的病变组织中ADK、IRSp53和CREB1的表达水平增加,其中对照1指UMB5309的死后脑组织,对照2指UMB5408的死后脑组织,对照3指FCD247的未受影响的脑组织。

[0099] 图4示出了FMCD动物模型(胚胎第18天)中4E-BP的磷酸化和S6K的激活,其中4E-BP的磷酸化和S6K的激活导致包括eIF4E在内的eIF4F的活性增加。

[0100] 图5示出了FMCD动物模型(成体-出生后第56天和第120天)中4E-BPs的磷酸化和S6K的活化,其中4E-BPs的磷酸化和S6K的活化导致包括eIF4E的eIF4F的活性增加。

[0101] 图6至图8示出了根据实施例1-6的FMCD动物模型中大脑皮质发育不良、癫痫和细胞肥大的产生。

[0102] 图9a和9b示出了根据实施例2的pCIG-MTOR突变体-IRES-GFP;mU6-shScramble或pCIG-MTOR突变体-IRES-GFP;和mU6-sheIF4E载体构建,以及通过蛋白质印迹测量的sheIF4E对eIF4E的抑制活性。

[0103] 图9c和9d示出了来自实施例1-6和2-1中使用实施例2-1的pCIG-MTOR突变体-IRES-GFP;mU6-sheIF4E载体建立的动物模型的出生后第21天脑组织中eIF4E的表达降低。

[0104] 图9e示出了来自实施例1-6和2-1中使用实施例2-1的pCIG-MTOR突变体-IRES-GFP;mU6-sheIF4E载体建立的动物模型的出生后第21天脑组织中ADK、IRSp53和CREB1的表达降低,其中eIF4E表达降低。

[0105] 图9f示出了使用实施例2中具有sheIF4E介导的eIF4E表达下调的CIG-MTOR突变体-IRES-GFP;mU6-sheIF4E载体和动物模型建立的动物模型中癫痫的显著减少。

[0106] 图10示出了根据实施例2的在其中具有eIF4E表达下调的动物模型中癫痫发作开始时的癫痫发作频率和持续时间。

[0107] 图11示出了FMCD癫痫动物模型中皮质发育不良的显著减少,其中根据实施例2通过靶向eIF4E的shRNA降低了eIF4E表达(** $P < 0.001$ (在每种情况下 $n = 5$,使用Bonferroni事后检验的单因素方差分析)。比例尺=100 μm 。平均值 \pm sem)。

[0108] 图12示出了在实施例2的FMCD癫痫动物模型的mTOR突变体表达细胞中,当eIF4E表达被靶向eIF4E的shRNA下调时,mTOR突变导致肥大体细胞大小显著减小,其中比较了来自出生后第21天,FMCD癫痫动物模型大脑皮层的2/3层的细胞大小方面的治疗效果。

[0109] 图13示出了根据实施例2在动物模型中根据突触棘密度对癫痫的治疗。在出生后第21天的FMCD癫痫动物模型中,当eIF4E表达被靶向eIF4E的shRNA下调时,mTOR突变体表达细胞中mTOR突变介导的突触棘密度的降低被恢复。*** $P < 0.001$ ($n = 10$ 个分支,每种条件下5只小鼠,使用Bonferroni事后检验的单因素方差分析)。比例尺=2 μm 。平均值 \pm sem)。

[0110] 图14和15示出了在根据实施例3的患有癫痫的癫痫动物模型中,二甲双胍介导的癫痫发作频率和持续时间减少,其中eIF4E活性被二甲双胍降低(** $P < 0.01$ 和*** $P < 0.001$ (p.C1483Y-shScramble: $n = 20$,p.L2427P-shScramble: $n = 25$,p.C1483Y-sheIF4E: $n = 15$,p.L2427P-sheIF4E: $n = 20$,图14中的条件为10只小鼠,图15中的条件为5只小鼠,使用Bonferroni事后检验的单因素方差分析)。平均值 \pm sem)。

[0111] 图16a示出了通过蛋白质印迹分析的,根据本发明实施方式的在用ASO候选物处理的细胞中ASO介导的eIF4E表达下调。

[0112] 图16b和16c是根据实施方式的在用ASO候选物处理的细胞中定量表达相对eIF4E mRNA表达水平的图。

[0113] 图16d示出了根据本发明实施方式选择的ASO序列中的共同基序。

[0114] 图16e示出了根据本发明实施方式选择的ASO序列的mRNA表达水平和 IC_{50} 值。

[0115] 图16f和16g示出了根据本发明实施方式的ASO序列的脱靶表达水平。

[0116] 图16h示出了根据本发明实施方式的ASO的化学变体对eIF4E表达的抑制效率。

[0117] 图17至图19示出了将根据本发明实施方式的ASO候选物的脑室内注射到正常小鼠,降低了大脑皮质、小脑和脊髓中的eIF4E表达并因此降低了癫痫发作频率,其中在脑室内注射ASO候选物后,实施例1-6的FMCD动物模型的癫痫发作频率降低。

[0118] 图20a和20b示出了脑室内注射后脑细胞中对照ASO的分布;图20a示出了在正常小鼠中通过将Cy3荧光标记到ASO的ASO分布;和图20b示出了用Cy3(红色)标记的ASO渗透到实施例1中p.C1483Y和p.L2427P小鼠的突变体表达细胞(GFP标记)中。

[0119] 图21a示出了通过免疫荧光分析分析的ASO注射导致的脑细胞中eIF4E表达的降低。

[0120] 图21b示出了根据实施例5在注射ASO后ADK、IRSp53和CREB1的表达恢复到正常水平。

[0121] 图22示出了根据实施例5的ASO在突变细胞大小方面的治疗效果。

[0122] 图23a至23c示出了根据实施例6的ASO的一些副作用(体温、体重和神经精神效应)。

[0123] 图24至25示出了ASO对根据实施例6的对照动物模型伴随的神经精神障碍的影响。

[0124] 图26至27示出了根据实施例7的FMCD模型的神经精神障碍。

[0125] 图28至29示出了sheIF4E对根据实施例7的FMCD模型中的神经精神障碍的治疗效果。

[0126] 图30至31示出了ASO 3对根据实施例7的顽固性癫痫模型中的神经精神障碍的治疗效果。

[0127] 图32示出了eIF4E激活敏感基因中的5'-UTR共有序列(基序),其中在eIF4E激活敏感基因中富集了富含U基序、鸟嘌呤四联体(GGC)₄基序、富含A基序和富含胞嘧啶的翻译调节子(CERT)基序,通过多重Em对基序诱导(MEME)进行分析,具有统计学意义。在所有eIF4E激活敏感基因中,给出了包含富含U基序、鸟嘌呤四联体(GGC)₄基序、富含A基序和CERT基序的基因百分比。

[0128] 图33是说明根据本发明实施方式的FMCD小鼠中含有5'-UTR基序的mTOR激活敏感基因的频率图。

[0129] 图34a和34b示出了通过mTOR激活突变增加的具有5'-UTR区的eIF4E激活敏感基因的表达。当eIF4E激活敏感基因Adk-S、Adk-L、Creb1和IRSp53的5'-UTR位于荧光素酶基因的上游时,荧光素酶的表达响应于mTOR中的体细胞激活突变而增加。mTOR激活突变是mTOR p.C1483Y和mTOR p.L2427P,而mTOR WT用作对照。mTOR WT、mTOR p.C1483Y和mTOR p.L2427P在HEK293T细胞中表达。在图中,Pro代表启动子,Actb代表β-肌动蛋白基因,pGL3代表缺乏5'-UTR的空载体。结果标准化为mTOR WT转染的细胞中的荧光素酶活性。

[0130] 图35示出了取决于5'-UTR基序的存在或不存在的eIF4E激活敏感基因的表达水平的差异,其中指示了5'-UTR基序在Adk-S、IRSp53和Creb1中的位置。从每个eIF4E过度激活敏感基因中删除5'-基序逆转了响应于mTOR突变的基因表达增加,这意味着响应于mTOR激活突变的eIF4E激活敏感基因的翻译增加依赖于相应基因的5-UTR基序。

具体实施方式

[0131] 根据以下实施例可以获得对本发明的更好理解,这些实施例旨在说明但不应解释

为限制本发明。

[0132] <实施例1>mTOR突变的FMCD患者脑组织中蛋白质表达的图像分析

[0133] 1-1:受试者的选择

[0134] 确定了自2004年以来在Severance儿童医院接受癫痫手术的被诊断患有HME、FCD或TSC的个体。入选的个体符合FCD II的研究准入标准,并接受了广泛的术前评估,包括视频脑电图监测、高分辨率MRI、氟脱氧葡萄糖质子发射断层扫描和减法发作期单光子发射计算机断层扫描,与MRI共同注册,以定位解剖病变。完全切除被定义为切除颅内脑电图上癫痫发作和刺激区的所有区域。

[0135] 根据国际抗癫痫联盟诊断方法委员会最近的共识分类,对本发明重新确认了具有HME、FCD或TSC的研究个体的病理诊断。根据Severance儿童医院和韩国科学技术高级研究所(KAIST)机构审查委员会和人类研究委员会批准的方案获得了进行的研究以及所有人体组织。从患有HME、FCD和TSC的个体的父母那里获得了知情同意。从马里兰大学大脑和组织库获得健康成人对照脑样本:获得没有神经系统疾病的个体的脑组织。

[0136] 具体而言,该测试中使用的样品的患者的临床信息在下表3中给出。在此表中,UMB组代表从马里兰大学大脑和组织库获得的健康成人对照大脑样本。

[0137] [表3]

患者ID	年龄	性别	首次发 作年龄	手术年龄	癫痫发作 频率	组织区域	Etc
UMB1712	20Y	男性	-	-	-	额叶	死后组织
UMB4917	22Y	男性	-	-	-	额叶	死后组织
UMB5309	14Y	女性	-	-	-	颞叶	死后组织
UMB5408	6Y	男性	-	-	-	颞叶	死后组织
FCD56	10Y	女性	2Y	6Y	3/天	额叶	-
FCD247	11Y	女性	1Y	9Y	N.A.	颞叶	-
FCD254	12Y	男性	4Y	9Y	10/天	额叶	-
FCD348	6Y	男性	4Y	5Y	N.A.	额叶	-
HME20	5Y	女性	2M	9M	10/天	额叶	-
HME255	20Y	女性	8Y	17Y	3/天	颞叶	-
HME338	17Y	女性	5Y	15Y	N.A.	颞叶	-
TSC2	8Y	女性	2Y	4Y	N.A.	颞叶	-
TSC264	2Y	女性	1Y	1Y	6/天	额叶	-
TSC357	20Y	男性	1Y	18Y	N.A.	额叶	-

[0138] [0139] 1-2:突变测试

[0140] 对于实施例1-1的表4中的患者TSC2、FCD254、HME255、TSC264和TSC357,通过WES(全外显子组测序)、panel测序和扩增子测序确认突变信息。具体分析结果总结在下表4中。从患者中,选择被诊断为患有结节性硬化症(TSC)、局灶性皮质发育不良(FCD)和半侧巨脑症(HME)的患者。选择的TSC、FCD和HME患者分别由TSC2、FCD254和HME255表示。

[0141] [表4]

患者ID	测序	突变类型	突变的基因	核苷酸变化	蛋白质变化	频率(%)
TSC2	全外显子测序	种系	TSC2	c.3355C>T	p.Gln1119*	36.75
FCD254	靶向杂交捕获 测序	体细胞	MTOR	c.4376C>A	p.Ala1459Asp	3.29
[0142] HME255	靶向杂交捕获 测序	体细胞	MTOR	c.4448G>A	p.Cys1483Tyr	9.43
TSC264	靶向杂交捕获 测序	种系	TSC2	c.3007delG	p.Ala1003fs	10.86
TSC357	靶向杂交捕获 测序	种系	TSC2	c.5153A>C	p.His1718Pro	31.99

[0143] 1-3: 患者样本中磷酸化4E-BP1/2/3 (4E-BPs) 和S6的表达水平

[0144] 使用免疫荧光染色, 鉴定出实施例1-1中的FCD254和HME255患者(TSC2、FCD254和HME255), 4E-BP的磷酸化增加和S6的磷酸化增加(图1)。在以磷酸化蛋白诱导的eIF4E活性增加为特征的动物模型中观察到相同的模式。

[0145] 简而言之, 通过从实施例1-1中选择的TSC2、FCD254和HME255患者切除病变组织并进行免疫荧光染色获得样品。通过切除患有疾病的患者的病变组织并进行免疫荧光染色获得样品。在平均2-5个皮质区域的NeuN阳性神经元细胞中, 对免疫荧光染色的组织中的p-4E-BP-阳性或p-S6-阳性细胞进行定量, 并且测量值在图1中以百分比表示。

[0146] 对于小鼠脑块, 在研究时收获脑组织并在新鲜制备的磷酸盐缓冲的4%多聚甲醛中固定2小时, 在30%缓冲蔗糖中冷冻保护过夜, 在干冰上的OCT中冷冻, 并储存在-80°C。收集冷冻切片(20-μm厚)并放置在载玻片上。

[0147] 将组织切片在磷酸盐缓冲盐水(PBS)-GT(0.2%明胶和0.2%TritonX-100的PBS溶液)中于室温下封闭1小时, 然后在封闭缓冲液中的稀释的一抗中于4°C培养过夜, 然后在PBS中洗涤(3×5分钟), 然后在室温下与封闭缓冲液中的稀释的二抗反应1小时。再进行一轮洗涤后, 将盖玻片安放在含有DAPI(P36931, Life Technologies)的封固液上。

[0148] 在使用的抗体中, 有针对磷酸化S6(Ser240/244)(Cell Signaling, 5364, 1:800)、磷酸化4E-BP(Thr37/46)(Cell Signaling, 2855, 1:200)和NeuN(Millipore, MAB377, 1:100)的抗体。用PBS洗涤样品并用以下二抗染色: Alexa Fluor 594缀合的山羊抗兔抗体(1:200稀释, A11012, Thermo Scientific)和Alexa Fluor 488缀合的山羊抗兔抗体(1:200稀释; A11001, Thermo Scientific)。含有DAPI(P36931, Life Technology)的封固液用于核染色。使用Zeiss LSM780或LSM800(Carl Zeiss)共聚焦显微镜获得共聚焦图像, 顺序采集设置为2048×2048像素的分辨率。

[0149] 使用×10或×20物镜计数NeuN、磷酸化S6(Ser240/244)和磷酸化4E-BP(Thr37/46)阳性的细胞。每个受试者获得四个或五个视野。

[0150] 图1示出了通过免疫荧光分析测量的来自选择的TSC2、FCD254和HME255患者的脑组织中磷酸化4E-BP1/2/3(4E-BP)和S6的表达水平增加。在图1的箱线图中, 对照1指UMB5309的死后脑组织, 对照2指UMB5408的死后脑组织, 对照3指FCD247的未受影响的脑组织。观察选择的TSC2、FCD254和HME255患者均具有升高的磷酸化4E-BP和S6水平, 表明mTOR激活发生在所有相应患者的脑损伤中。4E-BP和S6的磷酸化增加导致包括eIF4E在内的eIF4F复合物的活性增加。

[0151] mTOR是一种靶向4E-BP1/2/3 (4E-BP) 和S6K的激酶,当被激活时,可诱导4E-BP1/2/3和S6的磷酸化。当磷酸化时,4E-BP1/2/3失活,导致eIF4E激活,4E-BP1/2/3 (4E-BP) 在其上充当阻遏物。同时,激活eIF4B以帮助eIF4E的功能。S6K磷酸化S6和eIF4B,这反过来又增加了eIF4E的活性。eIF4B增加了eIF4F复合物的活性,其中eIF4F复合物包括eIF4E作为关键成分。

[0152] 1-4: 患者样本中ADK、CREB1和IRSp53表达的蛋白质印迹分析

[0153] 如通过翻译组分析所测量的,eIF4E过度激活导致实施例1-1的FMCD癫痫患者中eIF4E激活敏感基因ADK、CREB1和IRSp53的表达增加(图2)。

[0154] 翻译组由在单个细胞中瞬间或条件中翻译的所有mRNA片段组成。通常,使用翻译组分析或核糖体分析技术来获取翻译组分析信息。翻译组分析是一种在基因组水平上分析将mRNA翻译成蛋白质的技术。

[0155] 图2示出了通过对从FMCD患者的脑组织中提取的蛋白质进行蛋白质印迹分析来鉴定mTOR活性,并对ADK、IRSp53、CREB1和p-S6的表达水平进行定量,并以相对于对照样品平均值的百分比变化表示的条形图(* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 和*** $P < 0.001$ (使用Bonferroni事后检验的单因素方差分析。平均值 \pm sem)。在图2中, α -微管蛋白用作上样对照。

[0156] 本分析中使用的抗体包括针对ADK(人类图谱,HPA038409,1:500)、IRSp53(Novus,NBP1-88711,1:1000)、CREB1(Cell signaling,9197,1:1000)和磷酸化S6(Ser240/244)(Cell signaling,5364,1:1000)的抗体。

[0157] 在FMCD癫痫患者中,如通过翻译组分析的,观察到eIF4E过度激活会增加eIF4E过度激活敏感基因ADK、CREB1和IRSp53的表达水平(图2)。在这方面,对野生型ADK-S、CREB1和IRSp53及其具有基序删除5'-UTR的变体进行了实施例12的实验,表明当从mTOR过度激活敏感基因中删除特定基序(其翻译受eIF4E调节)时,由mTOR突变和eIF4E过度激活引起的基因表达上调消失。数据表明ADK、CREB1和IRSp53具有共同的基序,该基序在通过eIF4E激活上调基因表达中发挥作用。患者样本中ADK、CREB1和IRSp53的表达上调是由eIF4E激活引起的。

[0158] 1-5: 患者样本中ADK、CREB1和IRSp53表达的免疫荧光分析

[0159] 使用免疫荧光染色,鉴定实施例1-1中的FMCD癫痫患者(TSC2、FCD254和HME255)的ADK、IRSp53和CREB1的表达增加(图3)。在以磷酸化蛋白质诱导的eIF4E活性增加为特征的动物模型中观察到相同的蛋白质表达模式。

[0160] 通过切除实施例1-1中选择的TSC2、FCD254和HME255患者的病变组织获得样品,并与实施例1-3相同的方式进行免疫荧光染色。通过切除患有疾病的患者的病变组织并进行免疫荧光染色获得样品。在平均2-5个皮质区域的NeuN阳性神经元细胞中,对免疫荧光染色的组织中的ADK-、IRSp53-或CREB1-阳性细胞进行定量,测量值在图3中以百分比表示。

[0161] 在使用的抗体中,有针对NeuN(Millipore,MAB377,1:100)、ADK(Human atlas,HPA038409,1:200)、CREB1(Cell signaling,9197,1:800)和IRSp53(Novus,NBP1-88711,1:100)的抗体。使用 $\times 10$ 或 $\times 20$ 物镜对NeuN、ADK、CREB1和IRSp53阳性细胞进行计数。每个受试者获得四个或五个视野。

[0162] 如图3中,对照1指UMB5309的死后脑组织,对照2指UMB5408的死后脑组织,对照3指FCD247的未受影响的脑组织。如图3所示,与对照组1至3相比,观察到TSC、FCD和HME患者的

神经元细胞的ADK、IRSp53和CREB1的表达增加。

[0163] 1-6: 患者与动物模型比较

[0164] 美国专利号9,629,346公开了在mTOR (C1483Y或L2427P) 中具有脑体细胞突变的FCD II型动物模型通过S6蛋白的磷酸化表现出mTOR过度激活。

[0165] 实施例1-3中获得的FMCD患者组织中4E-BP磷酸化和S6K激活的结果(图1)与图4和5的FMCD动物模型中(在FCD II型动物模型中)4E-BP磷酸化和S6K激活一致,在FCD II型动物模型中,mTOR通过引入mTOR突变体(C1483Y或L2427P)而被过度激活。图4示出了FMCD动物模型(胚胎第18天)中4E-BP的磷酸化和S6K的激活,图5示出了FMCD动物模型(成体-出生后第56天和第120天)中4E-BP的磷酸化和S6K的激活。4E-BP的磷酸化和S6K的激活增加了含有eIF4E的eIF4F复合物的活性。

[0166] 在胚胎第18天(E18)和出生后第56天至第120天(P56-P120)的小鼠中,在胚胎第14天(E14)进行了子宫内电穿孔,由于mTOR突变导致的mTOR过度激活大大增加了磷酸化的S6蛋白的水平和磷酸化的4E-BP蛋白的水平(图4和图5)。通过该实验,观察到mTOR的体内突变导致mTOR过度激活,中断正常的皮质发育。

[0167] 对动物模型进行视频脑电图监测。使用小脑作为参考记录来自位于额叶(AP 2.8mm, ML ± 1.5mm)和颞叶(前至后-2.4mm, 内侧至外侧±2.4mm)上的硬膜外电极的EEG信号。从手术恢复超过10天后,记录脑电图信号超过2天(每天12小时)(图7)。结果,在小鼠的大脑皮质中观察到明显有缺陷的神经元迁移,并且动物模型表现出与患者相同模式的典型癫痫发作。相反,其中插入了野生型mTOR基因的小鼠没有表现出癫痫发作。大脑皮质中明显有缺陷的神经元迁移表明皮质径向神经元迁移的中断。动物模型中的实验结果总结在下表5中。

[0168] [表5]

[0169]

组	GFP+pups的数量	癫痫发作的老鼠数量	%
野生型	8	0	0
p.Cys1483Tyr	15	14	93.3
p.Leu2427Pro	23	21	91.3

[0170] 如图8所示,用根据本发明的携带mTOR突变基因的质粒电穿孔的小鼠的神经元大小比正常神经元的大小显著增加,而其中导入了野生型mTOR基因的小鼠的神经元大小没有显著改变。这些结果与皮质发育畸形患者的畸形神经元模式一致,表明可以使用mTOR突变体产生癫痫动物模型。与正常神经元相比,用携带mTOR突变基因的质粒电穿孔的小鼠的树突分支数量显著减少,而观察到具有野生型mTOR基因的小鼠的突触棘数量保持不变。

[0171] <实施例2>通过用shIF4E下调eIF4E来预防癫痫发作(eIF4E的遗传抑制)

[0172] 2-1: 使用shIF4E制备eIF4E下调的动物模型

[0173] 进行了一项检查,以了解由eIF4F激活突变介导的翻译失调是否会诱导FMCD的主要表型,包括癫痫、巨细胞畸形神经元和皮质分层异常。

[0174] 为此,通过在子宫内电穿孔共表达加扰的(scrambled) shRNA (shScramble) 或针对eIF4E的shRNA的mTOR突变体或野生型构建体来在体内敲低eIF4E(其是eIF4F复合物的关键组分),以降低FMCD小鼠中的eIF4F活性(图9a和9b)。

[0175] 简而言之,以与美国专利号9,629,346中关于脑体细胞突变的FCD II型动物模型

公开的相同方式使用携带mTOR突变(C1483Y或L2427P)的载体制备用于评估治疗效果的FMCD癫痫动物模型,其中将负责eIF4E翻译下调的shRNA序列插入pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP载体,以构建重组载体(pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP;mU6-sheIF4E)。

[0176] 具体而言,为了用于制备FCD II型动物模型,通过将sheIF4E序列添加到pCIG-mTOR-IRES-EGFP质粒的背面序列来构建重组载体。用pSicoR载体获得shScramble或sheIF4E序列。用限制酶HpaI和XhoI消化pSicoR载体。使用的shRNA序列如下。为了与shRNA进行比较,表达了shScramble。为了使shRNA发挥作用,需要来自有义链的RNA转录物。因此,在构建载体时引入反义链以产生表达有义链的双链序列。序列列于下表6中。

[0177] sheIF4E由包含与靶区域互补结合的CGATTGATCTCTAAGTTTGAT (SEQ ID NO:202)的有义序列 (SEQ ID NO:203) 和反义序列 (SEQ ID NO:204) 组成。shScramble序列由包含与靶区域互补结合的GGAATCTCATTTCGATGCAT (SEQ ID NO:205)的有义序列 (SEQ ID NO:206) 和反义序列 (SEQ ID NO:207) 组成。

[0178] [表6]

SEQ ID NO	名称	核苷酸序列(5'→3')
202	SheIF4E	CGATTGATCTCTAAGTTTGAT
203	sheIF4E有义链	T-CGATTGATCTCTAAGTTTGAT -TTCAAGAGA- ATCAAACCTAGAGATCAATCG -TTTTTTCTCGA
[0179] 204	sheIF4E反义链	TCGAGAAAAAA-CGATTGATCTCTAAGTTTGAT- TCTCTTGAA-ATCAAACCTAGAGATCAATCG-A
205	shScramble	GGAATCTCATTTCGATGCAT
206	shScramble有义链	T-GGAATCTCATTTCGATGCAT-TTCAAGAGA-ATG CATCGAATGAGATTCC-TTTTTTCTCGA
207	shScramble反义链	TCGAGAAAAAA-GGAATCTCATTTCGATGCAT-TC
[0180]		TCTTGAA-ATGCATCGAATGAGATTCC-A

[0181] 用HpaI和XhoI限制酶消化的pSicoR载体在连接酶存在下与shScramble或sheIF4E序列连接,分别构建pSicoR-shScramble和pSicoR-sheIF4E载体。以与实施例1.2相同的方式培养Neuro2A细胞并用pSicoR转染,以评估eIF4E的翻译下调。

[0182] 从pSicoR-shScramble载体和pSicoR-sheIF4E载体中,shScramble和sheIF4E分别与mU6启动子一起通过PCR使用以下引物进行扩增:

[0183] 正向引物 (SEQ ID NO:208) :ggccgaggcctcctgggcccgcctctagagatccgac

[0184] 反向引物 (SEQ ID NO:209) :cgagtactaggatccattaggcgg

[0185] 用SfiI限制酶消化PCR产物(shScramble和sheIF4E序列),其每一个都包括mU6启动子。pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP载体用PsiI和SfiI限制酶切割。使用连接酶将消化的pCIG-mTOR突变体-IRES-与消化的shScramble或sheIF4E(每一个都包括mU6启动子)连接。使用上述方法构建sheIF4E序列添加载体pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP;mU6-sheIF4E质粒。

[0186] 正如下面将要解释的,图9a至9f提供的数据表明,使用根据实施例2的sheIF4E建立的eIF4E下调的动物模型可以被防止受到癫痫的影响。

[0187] 2-2:eIF4E的有效敲低和eIF4E的体内敲低对ADK、IRSp53和CREB1表达的影响

[0188] 对于实施例2-1中制备的动物模型,以与美国专利号9,629,346中相同的方式,在胚胎第14天(E14)用携带mTOR突变基因的质粒对胚胎进行电穿孔后使用sheIF4E敲低eIF4E,出生后,通过手电筒(ElectronMicroscopyScience,USA)筛选表达荧光的小鼠。

[0189] 在这方面,对小鼠进行了eIF4E的免疫荧光染色,示出了降低的eIF4E的表达水平并表明了模型的功能(图9a至9d)。

[0190] 具体而言,以与实施例1中基本相同的方式通过蛋白质印迹分析验证了sheIF4E对eIF4E的有效敲低(图9a和9b)。构建pCIG-MTOR突变体-IRES-GFP;mU6-shScramble或pCIG-MTOR突变体-IRES-GFP;mU6-sheIF4E载体,并使用细胞裂解物通过蛋白质印迹分析鉴定sheIF4E对eIF4E的抑制活性。

[0191] 以与实施例1中基本相同的方式对小鼠进行针对eIF4E的免疫染色,表明在表达sheIF4E的神经元中eIF4E表达显著降低(图9c和9d)。在与实施例1-6和2-1相同的方式使用pCIG-MTOR突变体-IRES-GFP;mU6-sheIF4E载体建立的动物模型中,在出生后第21天的脑组织表现出降低的eIF4E表达水平。

[0192] 因此,本发明人进行了额外的免疫染色以研究体内敲低对FMCD小鼠中ADK、IRSp53和CREB1表达的影响,并证实基因的表达显著降低(图9e)。在与实施例1-3和3-1相同的方式使用pCIG-MTOR突变体-IRES-GFP;mU6-sheIF4E载体建立的动物模型的出生后第21天的脑组织中,ADK、IRSp53和CREB1的表达随着eIF4E表达的降低而降低。如通过免疫组织化学分析的,与shScramble小鼠相比,sheIF4E敲低的eIF4E显著降低了mTOR p.Cys1483Tyr和p.Leu2427Pro小鼠中eIF4E敏感基因ADK、IRSp53和CREB1的表达。

[0193] 2-3:在表达shScramble的动物模型中癫痫发作的发生率

[0194] 在FMCD动物模型中,癫痫发作平均从出生后第21天开始,并在出生后第50天完成。视频EGG监测从出生后3周开始进行。从出生后第21天到出生后第120天,每周记录3次EGG信号,每天12小时。从12小时的视频记录中,测量癫痫发作的次数和长度。

[0195] 对于该实验,使用了在实施例2-1中建立的表达shScramble的动物模型。在具有mTOR p.C1483Y突变的20个模型中的19个和具有mTOR p.L2427P突变的25个模型中的23个中检测到癫痫发作。从出生后第21天到出生后第120天拍摄的12小时视频记录中观察癫痫发作(图9f)。

[0196] 2-4:(癫痫发作测量)中sheIF4E介导的针对eIF4E的敲低的动物模型中癫痫发病率的预防

[0197] 使用lifecam对实施例2-1中建立的eIF4E下调的动物模型从出生后第21天到出生后第120天每周3次,每天12小时进行视频记录。从12小时的视频记录中,测量癫痫发作的次数和时长(图10)。

[0198] 如图10所示,对于具有sheIF4E介导的eIF4E敲低的动物模型,从直到出生后第120天拍摄的视频记录,在mTOR p.C1483Y突变的15只动物中没有观察到癫痫发作,并且仅在mTOR p.L2427P突变的20只动物中的5只中观察到癫痫发作。因此,具有sheIF4E介导的eIF4E下调的动物模型被阻止受到癫痫的影响。考虑到FMCD小鼠模型中的癫痫通常在出生后第21天至出生后第56天开始,直到出生后第120天没有癫痫发作证实了癫痫发病的预防。

[0199] 虽然产生了癫痫,但癫痫发作的频率和时间明显减少。在FMCD动物模型中,当eIF4E靶向shRNA表达以降低mTOR突变体表达细胞中eIF4E的表达时,难治性癫痫的发作频

率和时间显著降低。在FMCD癫痫动物模型中,当表达eIF4E靶向shRNA以降低mTOR突变体表达细胞中eIF4E的表达时,难治性癫痫的发作频率和时间显著降低。

[0200] 2-5:在sheIF4E介导的eIF4E下调的动物模型中分析皮质发育不良、神经元大小和突触棘密度

[0201] 实施例2-1中用pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP、mU6sheIF4E载体制作的动物模型具有mTOR突变表达神经元,其中eIF4E蛋白的表达被下调。

[0202] 然后,分析实施例1-6的电穿孔后出生的小鼠的神经元细胞大小和突触棘密度。在ImageJ软件(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)中测量神经元细胞大小。使用63X物镜对突触棘进行计数。每个受试者获得十个基底树突,并使用手动计数在表达GFP报告基因的电穿孔细胞中测量。对于神经元细胞大小(图12),获得出生后第21天的小鼠脑组织并测量GFP(绿色)阳性突变细胞(表达的shScramble或sheIF4E)的大小。对于突触棘密度(图13),获得出生后第21天的小鼠脑组织,并在GFP(绿色)阳性突变细胞(表达的shScramble或sheIF4E)中计数基底树突的突触棘。

[0203] 此外,对于皮质发育不良(图11),获得实施例2-1的出生后第7天的小鼠脑组织,并检测皮质中GFP(绿色)阳性突变细胞(表达的shScramble或sheIF4E)的分布(在每种情况下n=5。比例尺=100 μ m。平均值 \pm SEM)。如图9a和9b所示,当表达靶向eIF4E的shRNA以降低mTOR突变体表达细胞中eIF4E的表达时,FMCD癫痫动物模型中的皮质发育不良显著减少。

[0204] 因此,观察到eIF4E的表达下调可以减少顽固性癫痫患者中发现的由mTOR传导途径激活突变引起的皮质发育不良,eIF4E的表达调节可以为皮质发育不良的治疗靶点。

[0205] 2-6:eIF4E的体内敲低效果

[0206] 进行该实验以检查实施例2-1中sheIF4E介导的eIF4E的体内敲低是否可以减轻FMCD的主要表型。与shScramble小鼠相比,发现sheIF4E介导的eIF4E敲低成功地挽救了mTOR p.Cys1483Tyr和p.Leu2427Pro小鼠中的所有病理表型(图10、11、12和13)。

[0207] 具体而言,发现eIF4E敲低几乎完全挽救了在FMCD癫痫小鼠中观察到的自发性癫痫发作(图10)。此外,eIF4E敲低挽救了肥大的体细胞和降低了突触棘密度,这是FMCD中发现的畸形神经元的代表性形态(图12和13)。此外,eIF4E敲低显著减轻了mTOR突变小鼠的神经元迁移缺陷(图11)。

[0208] 2-7:sheIF4E介导的eIF4E的体内敲低的挽救作用

[0209] 在用实施例2-1的pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP;mU6sheIF4E载体建立的FMCD动物模型中,神经元细胞表现出下调的eIF4E蛋白表达水平。为了检查sheIF4E介导的eIF4E的体内敲低是否导致eIF4E敏感基因的表达下调,通过免疫荧光分析eIF4E敏感基因的表达。免疫荧光结果在图9e中描述。具有sheIF4E介导的eIF4E敲低特性的动物模型和shScramble小鼠与实施例2-1中的基本相同。

[0210] 如图9e所示,如通过免疫组织化学染色分析的,与shScramble小鼠相比,sheIF4E介导的eIF4E敲低显著降低了mTOR p.Cys1483Tyr和p.Leu2427Pro小鼠中eIF4E敏感基因ADK、IRSp53和CREB1的表达。

[0211] <实施例3>在动物模型中用药物治疗癫痫(eIF4E的药理抑制)

[0212] 在本实验中,将200m/kg剂量的二甲双胍腹腔注射到实施例1的FMCD动物模型中,从P14到P56进行早期治疗,从P84到P114进行晚期治疗。此后,12小时的记录和视频脑电图

分析表明,在FMCD小鼠中,用二甲双胍的早期治疗预防了癫痫发作,而晚期治疗抑制了癫痫发作频率(图14和15)。

[0213] 因此,这些结果表明,eIF4F活性的增加通过mTOR激活敏感基因(例如ADK、IRSp53和CREB1)的翻译增加导致FMCD的表型,并且可以通过二甲双胍抑制eIF4E来预防癫痫发作。

[0214] <实施例4>eIF4E抑制剂功效的体外测定

[0215] 4-1:ASO设计与构建

[0216] 通过体外筛选获得对由上调eIF4E表达、活性或水平引起的癫痫产生预防或治疗作用的ASO序列。选择高度抑制eIF4E表达的ASO治疗序列。

[0217] 在这方面,使用BLAST程序,16聚体到20聚体的ASO序列能够与前mRNA互补结合,该前mRNA包括人类eIF4E基因的UTR、内含子和外显子。

[0218] 简而言之,每个候选物ASO序列对于每个核苷间键都有一个硫代磷酸酯键。对于20聚体的ASO,在5'至3'翻译方向的第1至5位和第16至20位核苷酸中的每一个都具有2'-O-(2-甲氧基乙基)糖,而第6至15位的核苷酸则每个都被修饰为2'-脱氧核苷酸,以及使用5-甲基胞嘧啶代替所有胞嘧啶残基。16聚体的ASO与20聚体的ASO基本相同,不同之处在于5'至3'方向上第1至3位和第14至16位的核苷酸具有2'-O-(2-甲氧基乙基)糖。此外,磷酸二酯键被化学修饰成磷酸硫酯键。

[0219] 4-2:通过蛋白质印迹分析进行ASO筛选

[0220] 设计的抑制ASO的eIF4E由整合的DNA技术(Integrated DNA Technologies, IDT)构建,并通过HPLC和Na⁺交换纯化进行纯化。

[0221] 对于ASO筛选,首先,在脂质体(Lipofectamine) 2000的帮助下,将ASO候选物转染到人细胞系HEK293T(人)或小鼠细胞系Neuro2A(小鼠)中。在ASO转染后72小时收获细胞,然后裂解以提取蛋白质,通过蛋白质印迹分析蛋白质的eIF4E表达。通过体外筛选鉴定了调节eIF4E的有效ASO序列。将每个细胞系中的eIF4E蛋白表达水平标准化为 α -微管蛋白,并相对于对照进行量化(加扰的ASO-1:CTCAGTAACAGTGACACCAG (SEQ ID NO:201)。描绘了相对于对照的eIF4E的表达水平(图16a)。在图16a、16b和16c中,加扰的ASO被用作对照。

[0222] 对于图16a的蛋白质印迹,在单因素方差分析检验中p值小于0.05的ASO候选物被确定为具有癫痫治疗活性的eIF4E抑制剂。与对照相比,分别对应于SEQ ID NO:75至79的核苷酸序列的ASO#75至#79均被证实降低了HEK293T和Neuro2A细胞中eIF4E的表达水平,具有统计学意义。

[0223] 4-3:通过实时PCR筛选的ASO

[0224] 在实施例4-2中,通过蛋白质印迹分析从细胞中提取的蛋白质的eIF4E表达,以筛选调节eIF4E表达的ASO。在该实施例中,从细胞中提取RNA并通过实时PCR分析eIF4E mRNA的转录,从而筛选出调节eIF4E表达的ASO。

[0225] 在筛选设计的ASO候选物的另一种方法中,将人类细胞系HEK293T细胞(人)在96孔培养板上培养24小时,然后在iNfect转染试剂(iNtRON, 15081)的帮助下用ASO候选物转染。转染后24小时,收获细胞并使用SuperPrep™ II细胞裂解&RT试剂盒试剂(Toyobo, SCQ-401)进行裂解和RNA提取。基于由此获得的RNA,通过逆转录PCR合成cDNA。实时PCR在CFX384实时系统(Bio-Rad)中使用SYBR green实时PCR预混物(Toyobo, QPK-201)进行。eIF4E和GAPDH的正向和反向PCR引物序列如下:

[0226] EIF4E正向引物 (SEQ ID NO:210) :TGGCGACTGTCTGAACCG

[0227] EIF4E反向引物 (SEQ ID NO:211) :

[0228] AGATTCCGTTTTCTCCTCTTCTGTAG

[0229] GAPDH正向引物 (SEQ ID NO:212) :

[0230] GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACG

[0231] GAPDH正向引物 (SEQ ID NO:213) :GAAGATGGTGATGGGATTTCC

[0232] CFX384实时系统中的实时PCR条件如下:95°C1分钟,然后95°C15秒、59.5°C20秒、72°C30秒,共39个循环。一式三份分析每个样品。使用GAPDH作为内部对照将相对mRNA表达标准化为表达水平,并使用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 方法进行评估。在图16b和16c中,eIF4E表达水平表示为与对照加扰的ASO-1 (CTCAGTAACAGTGACACCAG:(SEQ ID NO:201)) 相比的相对比率。图16b和16c是相对eIF4E表达水平定量表示为与用ASO候选物处理的HEK293T细胞中的GAPDH表达水平相比的比率图。

[0233] 通过筛选方法,选择了与对照加扰的ASO-1 (CTCAGTAACAGTGA CACCAG;SEQ ID NO:201) 相对对eIF4E表达表现出高抑制活性的ASO序列。选则的ASO序列在表2中给出。

[0234] 4-4:ASO的二次选择

[0235] 从表2中主要选择的作为eIF4E抑制剂的ASO中,选择了将eIF4E表达降低到与SEQ ID NO:75 (ASO-1) 相同或更大程度的ASO,例如允许eIF4E mRNA表达相对于ASO#75 (ASO-1) 的eIF4E表达水平在定量预定范围内的ASO (例如,相对于ASO#75,eIF4E mRNA表达水平为125%或更低、120%或更低、115%或更低、110%或更低,或100%或更低)。此外,基于如脱靶和/或错配碱基配对等附加标准选择了更优选的ASO,结果在下表7中给出。

[0236] 在表7中,脱靶基因的数量是除eIF4E之外的靶基因的数量,当对每个选择的ASO序列进行硅片(in-silico)方法时,除了在相应的ASO序列上相差1、2或3个核苷酸之外,它们是一致的;eIF4E表达表示通过实时PCR以与实施例4-3相同方式测量的mRNA表达水平,作为相对于ASO#75的每种ASO的抑制百分比。

[0237] [表7]

SEQ ID NO	脱靶基因数			与 ASO#75相比的 eIF4E 的表达水平(%)
	1bp	2bp	3bp	
#16	0	2	59	93%
#20	0	5	70	71%
#21	0	6	78	68%
#27	0	1	64	97%
#28	2	9	132	94%
#35	0	1	18	72%
#75	0	3	67	100%
#77	0	2	48	121%
#89	4	N/D	N/D	65%
#132	2	14	5	45%
#143	0	3	27	45%
#147	0	5	18	91%
#149	0	3	29	73%
#161	2	5	24	122%
#162	2	4	25	63%
#171	0	8	25	59%
#178	0	7	40	38%
#179	0	5	34	92%
#180	1	4	31	70%
#182	0	0	37	99%
#183	0	4	9	89%
#184	0	3	27	82%

[0239] 4-5:ASO序列的共同基序

[0240] 对于表2中列出的序列,使用MEME浏览器应用程序(版本5.1.1)执行多重Em基序诱导(multiple Em for motif elicitation, MEME, <http://meme-suite.org/tools/meme>)以分析ASO序列对共同基序的eIF4E表达的高度抑制性(Bailey TL, Elkan C.通过期望最大化拟合混合模型以发现生物聚合物中的基序(Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers)。Proc.Second Int.Conf.Intell.Syst.Mol.Biol.1994;28-36)。

[0241] 通过对实施例4-4中选择的一些ASO序列的多重Em基序诱导(multiple Em for motif elicitation, MEME)分析,发现特定的共同基序富集具有统计学意义。

[0242] 图16d示出了位于ASO序列上的作为共同基序的ACAWYAGC (SEQ ID NO:96),该ASO序列包括表2中的ASO#27、ASO#28、ASO#35、ASO#147、ASO#178、ASO#179、ASO#180和ASO#182。在图16d中,描绘了基序中四个核苷酸A、G、T和C的占有率,其中单个核苷酸贡献了0位到2位的信息内容。共同ACAWYAGC基序的位置在20聚体ASO序列上表示为红线。在共同基序中,Y指吡啶T或C,W指A或T。

[0243] 4-6:针对eIF4E mRNA(实时PCR)的抑制浓度(IC_{50})

[0244] 通过体外筛选方法获得了有效抑制eIF4E表达的AS0序列,即分析了AS0#21、AS0#27、AS0#35、AS0#75 (AS0-1)、AS0#77 (AS0-3) 和AS0#182对eIF4E mRNA表达的抑制浓度(IC_{50})。

[0245] 为了计算AS0序列的 IC_{50} 值,在iN-fect™体外转染试剂(15081,iNtRON,Republic of Korea)的帮助下,将AS0候选物以不同浓度(20nM,80nM,320nM)转染到人细胞系HEK293T(人)中。AS0转染后24小时,收获细胞并通过实时PCR分析eIF4E mRNA表达的降低。使用GAPDH作为内部对照,将相对eIF4E mRNA表达标准化为表达水平,并使用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 方法进行评估。

[0246] 作为HEK293T细胞的分析结果,与错配AS0:GATCCTTTGTTAAT GTTACA (SEQ ID NO:214) (与AS0#77相同,不同之处在于将位置8-9-10-11的CAC C碱基更改为TGTT) 相比,eIF4E mRNA表达在所有剂量下均被AS0#75、AS0#77、AS0#21、AS0#27和AS0#35抑制。为了比较AS0候选物之间的抑制浓度(IC_{50}),使用Prism8程序(GraphPad Software,USA)通过归一化非线性回归导出剂量反应曲线(图16e)。

[0247] IC_{50} 数据表明,对HEK293T细胞中eIF4E mRNA表达的抑制效力降低,依次为AS0#35 ($IC_{50}=22.77nM$)、AS0#77 ($IC_{50}=53.82nM$)、AS0#21 ($IC_{50}=86.69nM$)、AS0#182 ($IC_{50}=91.07nM$)、AS0#27 ($IC_{50}=92.45nM$) 和AS0#75 ($IC_{50}=93.93nM$)。

[0248] 4-7:脱靶基因的表达水平

[0249] 进行该实验以检查表2中的AS0#35和AS0#75是否对脱靶基因的表达具有抑制活性。

[0250] 计算机分析确定了以下脱靶基因:一个脱靶基因(ERBB4)与AS0#35的两个核苷酸错配;和四个脱靶基因(TNFAIP8L3、STK32A、TTPA、TTC28)与AS0#75的两个核苷酸错配。对ERBB4到AS0#35和TTC28(四肽重复结构域28)到AS0#75进行脱靶基因分析。

[0251] 简而言之,借助iN-fect™体外转染试剂(15081,iNtRON,Republic of Korea)的帮助,将AS0#35或AS0#1以不同剂量(5nM、20nM、80nM、320nM和1280nM)转染到HEK293T细胞(人)中。AS0转染24小时后,收获细胞并使用SuperPrep™ II细胞裂解&RT试剂盒试剂(Toyobo,SCQ-401)进行裂解和RNA提取。然后,使用SYBR® Green实时PCR预混物(QPK-201,TOYOB0,Japan)在CXF384Touch实时PCR检测系统(Bio-Rad,USA)中进行ERBB4和TTC28 mRNA表达的实时PCR。使用CXF384Touch实时PCR检测系统进行实时PCR的条件如下:95°C 1分钟,然后是95°C 15秒、59.5°C 20秒和72°C 30秒,40个循环。一式三份分析每个样品。使用GAPDH作为内部对照,将ERBB4和TTC28的相对mRNA表达标准化为表达水平,并使用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 方法进行评估。用于实时PCR的eIF4E和GAPDH引物与实施例4-3中的相同。ERBB4和TTC28基因的正向和反向引物如下:

[0252] ERBB4正向引物(SEQ ID NO:215):CAGTCAGTGTGTGCAGGAAC

[0253] ERBB4反向引物(SEQ ID NO:216):AGCCTGTGACTTCTCGAACA

[0254] TTC28正向引物(SEQ ID NO:217):CTCATGGGAATCTGGGCTCT

[0255] TTC28反向引物(SEQ ID NO:218):TGATGAAGCTGCCTCTCGAT

[0256] 在图16f和16g中,描述了与加扰AS0-2(TAAGGCTATGAAGAGATACG,SEQ ID NO:219)相比的相对表达比率。从实时PCR产物的双因素方差分析中,观察到AS0#35对脱靶基因ERBB4的mRNA表达没有影响,而当以1280nM的浓度应用时,AS0#1抑制了脱靶基因TTC28的表

达。通过归一化非线性回归得出的剂量反应曲线显示,ASO#1对脱靶基因TTC28的 IC_{50} 为400.6nM,是eIF4E的 IC_{50} 值83.72nM的约五倍。

[0257] 4-8:化学修饰(cEt/LNA)

[0258] 具有受约束乙基(cEt)核苷酸修饰的ASO通常称为2.5ASO。cEt修饰的糖是指包含4'-碳和2'-碳(4'-CH(CH₃)-O-2')之间的桥的双环糖部分。此外,对于化学修饰的结构,被称为ASO的第三代类似物的锁核酸(LNA)包含具有修饰结构的核糖,该修饰结构被核苷酸中的4'碳和2'氧之间的额外桥锁定。LNA被称为增强Watson-Crick碱基配对强度的RNA类似物。

[0259] 通过生物合成(Bio-Synthesis)合成eIF4E抑制性ASO,该ASO被修饰为在位置1-5和16-20处具有cEt核苷酸,并且对于实施例4-1的ASO序列#21、#35和#78的每个核苷间键都有硫代磷酸酯键。通过IDT合成了eIF4E抑制性ASO,该ASO被修饰为在位置1-5和16-20处具有LNA核苷酸,并且对于ASO序列#77、#27和#35的每个核苷间键都有硫代磷酸酯键。所有合成的ASO均通过HPLC和Na⁺交换纯化进行纯化。错配对照(MM)说明了2'MOE间隔体(gapmer)结构中GATCCTTTGTTAATGTTACA(SEQ ID NO:214)的对照ASO,其在ASO#77序列的第8-9-10位具有TGT而不是碱基CAC。

[0260] 作为eIF4E抑制剂,分析了用cEt或LNA化学修饰的ASO对eIF4E表达的抑制活性。在这方面,使用iNfect转染试剂(iNtRON,15081)将ASO候选物转染到人细胞系HEK293T(人)中。转染后24小时,收获细胞并通过实时PCR分析对eIF4E表达的抑制活性。与具有与eIF4E的3个核苷酸错配的对照ASO相比,相对表达水平定量地表示为比率(图16h)。对于实时PCR产物,与对照eIF4E错配ASO相比,ASO示出了HEK293T细胞中eIF4E mRNA的表达水平下调,如通过单因素方差检验分析的,具有统计学意义(p 值 ≤ 0.05)。错配对照(MM)与ASO#77相同,不同之处在于TGT取代了在5'到3'方向的8-9-10位置的CAC。

[0261] <实施例5>用ASO治疗FMCD癫痫动物模型

[0262] 5-1:在动物模型中通过eIF4E表达降低来治疗癫痫(癫痫发作监测)

[0263] 观察到在实施例4-1中构建的表2的ASO#75和ASO#77降低了动物模型中的eIF4E表达。

[0264] 对于该实验,使用了使用实施例1的pCIG-mTOR p.C1483Y-IRES-EGFP和pCIG-mTOR p.L2427P-IRES-EGFP建立的动物模型,同时使用pCIG-mTOR(WT)-IRES-EGFP(mTOR p.C1483Y或mTOR p.L2427P)建立的动物模型作为对照。将ASO以100-500 μ g的剂量分别脑室内注射(ICV注射)到已确定患有癫痫发作的小鼠的脑中。从ASO注射后第3天到第70天,每只小鼠每周2-3次记录12小时视频用于癫痫监测。

[0265] 根据实验结果,发现注射ASO#75(ASO-1)或ASO#77(ASO-3)可显著降低癫痫模型(mTOR p.C1483Y或mTOR p.L2427P)的癫痫发作频率。

[0266] 在动物模型脑室内注射ASO候选物后,eIF4E表达在大脑皮质、小脑和脊髓中降低,因此癫痫发作频率降低。图17至19示出了向动物模型脑室内注射ASO候选物降低了大脑皮质、小脑和脊髓中的eIF4E表达,从而降低了癫痫发作频率。ASO-1的结果描述在图17(A)的图(A)、和图18的图(E)、(F)和(G)中,ASO-3的结果描述在图17的图(B)、(C)和(D)中和图18(H)的图(H)中,ASO#75(ASO-1)和ASO#77(ASO-3)的结果描述在图19中。

[0267] 5-2:脑细胞中ASO的分布

[0268] 为了检查脑细胞在实践中是否摄取ASO,将cy3(荧光染料)标记的ASO(cy3-ASO)脑室内注射并分析细胞分布。

[0269] 将小鼠(C57BL/6J)(Damul Science)或实施例1中用pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP建立的动物模型用异氟醚(手术操作期间0.4L/min的氧气和异氟醚蒸发器仪表2)麻醉。从背颈到眉间做手术切口。用棉签擦拭暴露的头盖骨。

[0270] 蒸汽消毒的26G注射器用70%乙醇消毒3次,另外用蒸馏水洗涤1次。注射器针头位于距前凶门AP-0.3mm和ML+1.0mm的部位。注射器针头插入距前凶门DL-3.0mm的位置并置于侧脑室。针定位后三分钟,ASO以0.5 μ l/秒的速度注射。注射器在注射后放置3分钟,然后取出。将棉签压在注射部位1分钟并缝合皮肤。

[0271] 对于正常小鼠和实施例1-5的FMCD癫痫动物模型,图20a和20b中分别描述了向小鼠脑室内注射ASO的结果。

[0272] 图20a和20b示出了脑室内注射后脑细胞中对照ASO的分布。图20a示出了在正常小鼠中通过标记到ASO的Cy3荧光的ASO分布。图20b示出了用Cy3(红色)标记的ASO渗透到作为实施例1-5中描述的FMCD癫痫动物模型的p.C1483Y和p.L2427P小鼠的突变体表达细胞(GFP标记)中。

[0273] 5-3 ASO注射动物模型中ADK、IRSp53和CREB1的表达恢复及细胞内eIF4E表达的降低

[0274] 在将ASO脑室内注射到使用实施例1的pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP载体建立的动物模型中后第4-5周,将脑取出、固定、切片和免疫染色。

[0275] 以与实施例2中相同的方式进行用针对ADK、CREB1、IRSp53和eIF4E的抗体的免疫染色和用荧光成像。

[0276] 图21a示出了通过免疫荧光分析的ASO#75(ASO-1)和ASO#77(ASO-3)注射对脑细胞中eIF4E表达的降低。可以看出,ASO 1和ASO 3(红色标记)被有效地递送到癫痫小鼠模型的脑组织中的突变表达细胞(GFP标记)中。

[0277] 图21b示出了在注射ASO#75(ASO-1)和ASO#77(ASO-3)后突变细胞中ADK、IRSp53和CREB1的表达恢复到正常水平。ADK、IRSp53和CREB1是mTOR激活敏感基因,其翻译水平通过mTOR激活突变介导的eIF4E活性上调而增加。ASO在突变细胞中抑制eIF4E表达可将ADK、IRSp53和CREB1的表达恢复到正常水平。

[0278] 5-4:ICV注射ASO降低eIF4E表达的动物模型中皮质发育不良和神经元细胞大小的分析

[0279] 在将ASO脑室内注射到使用实施例1的pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP载体建立的FMCD动物模型中后第4-5周,取出脑,固定,切片,并进行免疫染色。对于神经元细胞大小(图22),测量所得小鼠脑组织中GFP(绿色)标记的突变细胞(ASO对照或ASO eIF4E)的大小。

[0280] 图22示出了ASO#75(ASO-1)和ASO#77(ASO-3)在难治性癫痫模型中在突变细胞大小方面的治疗效果。ASO抑制eIF4E表达可以恢复顽固性癫痫患者中由mTOR传导途径激活突变介导的神经元细胞大小增加。

[0281] <实施例6>根据ASO注射对正常动物的行为测定

[0282] 6-1:实验小鼠和ASO

[0283] 检查了在ASO注射后在对照正常模型(C57BL/6J小鼠)中发生的行为异常的治疗效

果。在这方面,ASO通过ICV注射给药。本实验中使用的ASO是ASO#77。

[0284] 以实施例6-2和6-10中的方式评价注射ASO的对照动物模型的行为异常。在图23至24中描述了根据向小鼠注射ASO的行为异常测定结果。

[0285] 6-2: 体重和温度测量

[0286] 小鼠在ASO注射后每周称重。

[0287] 小鼠麻醉后测量体温。简而言之,将小鼠置于麻醉诱导室内。用0.4L/min的氧气和异氟醚诱导麻醉并维持2分钟。在麻醉维持期间,使用啮齿动物加热器×1 (STOELTING) 测量直肠温度。将直肠温度探头插入直肠2cm,10秒后测量温度。

[0288] 图23a示出了在将ASO注射到8周龄的C57BL/6J小鼠后8周内的体重测量结果,没有由于ASO注射而发生体重变化。图23b示出了在将ASO注射到8周龄的mTOR突变C57BL/6J小鼠后8周内的体重测量结果,通过ASO注射将体重恢复到正常状态。图23c (A) 示出了在将ASO注射到C57BL/6J小鼠后第21天的体温,没有由ASO注射引起的体温变化。在图23c的图(A)中,在给予ASO注射后第21天测量难治性癫痫小鼠模型(mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P) 和对照(mTOR-WT)的体温,表明体温没有被ASO注射改变。

[0289] 6-3: 小鼠处理

[0290] 在行为测试前5天,每天在同一时间对小鼠进行10分钟的处理,以使小鼠对处理者感到安全。为了让小鼠接受最小的压力,在不同的行为测试之间设置了一天的间隔。在双盲试验中分析了所有行为测试。

[0291] 6-4: 旷场测试

[0292] 在行为测试之前,小鼠在测试空间进行了10分钟的习惯化过程。将小鼠置于尺寸为40×40 (cm) 的盒子中,允许在其中自由移动,并测量旷场活动10分钟。使用EthoVision XT (Noldus) 记录和分析行为。将小鼠放回它们的笼子,并用70%EtOH清洗实验装置。

[0293] 图24 (A) 示出了从ASO注射到C57BL/6J小鼠后第21天开始进行的行为测试的结果,表明没有由ASO注射引起的运动障碍。图24 (B) 示出了旷场测试的结果,表明了ASO在神经系统中的安全性,因为作为焦虑的指标,中心花费的时间在注射ASO的正常小鼠中没有改变。

[0294] 6-5: 明暗箱测试

[0295] 在每次实验之前,小鼠在测试空间中接受10分钟的习惯化程序。将每只小鼠置于尺寸为20×20 (cm) 的明暗盒中,并允许在其中自由移动10分钟。使用EthoVision XT (Noldus) 记录和分析行为。将小鼠放回它们的笼子,并用70%EtOH清洗实验装置。

[0296] 图24 (C) 示出了明暗箱测试的结果,表明了ASO在神经系统中的安全性,因为作为焦虑的指标,在中心花费的时间(在明箱内的停留时间)在注射ASO的正常小鼠中没有改变。

[0297] 6-6: 社交回避测试

[0298] 使用视频跟踪系统对不熟悉的社交目标的接近-回避行为进行评分。该场所是一个黑箱子(400×400mm)。将每只实验小鼠引入黑箱子,并连续两次跟踪其轨迹,每次2.5分钟。在第一次会话期间(“无目标”),箱子里有一个空的穿孔笼子(10×6.5cm)。在第二次会话期间(“目标”),除了将社交目标(不熟悉的CD1小鼠)引入笼子外,条件相同。在两次会话之间,将实验小鼠从场所中移出,并放回其笼子中一分钟。来自“无目标”和“目标”条件的视频跟踪数据用于确定实验小鼠在“交互区”中所花费的时间,“交互区”是笼子周围的走廊。

[0299] 图24 (D) 示出了社交回避测试的结果,表明了ASO在神经系统中的安全性,因为作

为社交和抑郁的指标,在中心花费的时间(与陌生老鼠互动所花费的时间)在注射ASO的正常小鼠中没有改变。

[0300] 6-7:3-腔室测试(社交互动测试)

[0301] 3-腔室测试衡量社交互动和对社交新奇事物的偏好。该装置由三个腔室组成,中心腔室尺寸为 $12 \times 20 \times 26$ cm,相对侧的腔室尺寸为 $14 \times 20 \times 26$ cm。每个相对的侧室都包括一个塑料笼子(直径11cm,高2.15cm),用于放置角落中的物体或陌生小鼠。该实验由三个时期组成:习惯化(10分钟)、探索对象/小鼠(10分钟)和探索熟悉/新小鼠(10分钟)。在第二个时期中,将一只WT陌生小鼠随机放置在塑料笼中,而相对侧的塑料笼是空的。允许小鼠自由探索整个装置。测量在每个房间中花费的时间,然后用于随后的社交互动测试。在最后一个时期中,将一只新的WT陌生小鼠放置在空的塑料笼子里。

[0302] 图25(E)示出了3腔室测试(社交互动)的结果,表明了ASO在神经系统中的安全性,因为作为社交的指标,在嗅区花费的时间(与陌生小鼠交互所花费的时间)在注射ASO的雄性或雌性小鼠中没有改变。

[0303] 6-8:埋藏弹珠测试

[0304] 使用了覆盖有过滤器盖的普通小鼠笼。在每个笼子中均匀放置没有小鼠气味的的新鲜床上用品,高度为5厘米。玻璃弹珠每个重5克,直径15毫米,以四个六排排列在床上。用清洁剂清洁弹珠并用去离子水洗涤。将小鼠置于笼子中。在笼子盖上盖子二十分钟后,对埋藏的弹珠进行计数。当弹珠的一半高度隐藏在床上用品中时,就认为弹珠被埋藏了。

[0305] 图25(F)示出了埋藏弹珠测试的结果,表明了ASO在神经系统中的安全性,因为作为重复行为的指标,埋藏弹珠的数量在注射ASO的雄性或雌性小鼠中没有改变。

[0306] 6-9:蔗糖偏好测试

[0307] 每只小鼠在笼子里适应3-5天,笼子里有两个可选择的水瓶。此后,在实验当天将小鼠分别置于与习惯笼相同的笼中。给小鼠提供了两个双瓶,一个装有自来水,另一个装有1%蔗糖溶液。24小时后测量水和蔗糖溶液的摄入量,并根据蔗糖摄入体积/液体摄入总体积 $\times 100\%$ 计算蔗糖偏好。

[0308] 图25(G)示出了蔗糖偏好测试的结果,表明了ASO在神经系统中的安全性,因为作为愉悦或补偿功能障碍的指标,蔗糖偏好百分比在注射了ASO的雄性或雌性小鼠中没有改变。

[0309] <实施例7>eIF4E抑制剂对神经精神障碍的治疗潜力的测定

[0310] 7-1:FMCD动物模型的适用性评价

[0311] 评价了实施例1的FMCD动物模型(mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P)在测定伴随FMCD和癫痫模型的神经精神疾病中的适用性。

[0312] 患有癫痫的FMCD动物模型根据FMCD进行与实施例6中基本相同的行为异常测定。未用治疗剂治疗的癫痫动物模型的结果描绘在图26和27中。

[0313] 图26(A)示出了行为测试的结果,表明在男性和女性顽固性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P)中均未发生运动障碍。

[0314] 图26(B)示出了旷场测试的结果,表明在男性和女性顽固性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P)中,随着作为焦虑指标的在中心花费的时间减少,焦虑程度增加。

[0315] 图26 (C) 示出了明暗箱测试的结果,表明在男性和女性顽固性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P) 中,随着作为焦虑指标的在中心花费的时间(在灯箱内的停留时间)减少,焦虑程度增加。

[0316] 图26 (D) 示出了社交回避测试的结果,表明在男性和女性顽固性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P) 中,随着作为社交性和抑郁的指标的在中心花费的时间(与陌生老鼠互动的的时间)减少,社交性降低和抑郁程度增加。

[0317] 图27 (E) 示出了3腔室测试(社交互动)的结果,表明在男性和女性顽固性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P) 中,随着作为社交性指标的在嗅区花费的时间(与陌生小鼠交互所花费的时间)减少,社交性降低。

[0318] 图27 (F) 示出了埋藏弹珠测试的结果,表明在男性和女性顽固性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P) 中,随着作为重复行为的指标的埋藏弹珠的数量减少,重复行为降低。也就是说,根据作为重复行为的指标的埋藏弹珠测试的结果,观察到男性和女性顽固性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P) 所具有的异常重复行为减少。

[0319] 图27 (G) 示出了蔗糖偏好测试的结果,表明在男性和女性顽固性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P) 中,随着作为快乐或补偿功能障碍的指标的蔗糖偏好百分比降低,快乐或补偿功能降低。

[0320] 7-2: sheIF4E对神经精神疾病的治疗潜力的测定

[0321] 针对实施例7-1的FMCD和癫痫动物模型 (mTOR-p.C1483Y、mTOR-p.L2427P) 及对照正常动物模型 (mTOR-WT) 进行实验。使用与实施例2中描述的相同的sheIF4E。sheIF4E注射后第2周,在动物中进行处理。sheIF4E注射后第3周,对动物进行行为测试。

[0322] 对癫痫动物模型进行与实施例6中基本相同的行为异常测定。结果描绘在图28和29中。

[0323] 在28和29中,解释了sheIF4E对伴随难治性癫痫模型的神经精神疾病的治疗潜力。

[0324] 图28 (A) 示出了行为测试的结果,表明在具有sheIF4E的顽固性癫痫模型中没有运动障碍。

[0325] 图28 (B) 示出了旷场测试的结果,表明与难治性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y;mU6-shscramble,mTOR-p.L2427P;mU6-shscramble) 相比,在具有shRNA介导的eIF4E表达下调的难治性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y;mU6-sheIF4E,mTOR-p.L2427P;mU6-sheIF4E) 中,随着作为焦虑程度的指标的在中心花费的时间的增加,shRNA对焦虑的治疗效果。

[0326] 图28 (C) 示出了明暗箱测试的结果,表明了与难治性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y;mU6-shscramble,mTOR-p.L2427P;mU6-shscramble) 相比,在具有shRNA介导的eIF4E表达下调的难治性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y;mU6-sheIF4E,mTOR-p.L2427P;mU6-sheIF4E) 中,随着作为焦虑程度的指标的在中心花费的时间(明箱内的停留时间)的增加,shRNA对焦虑的治疗效果。

[0327] 图28 (D) 示出了社交回避测试的结果,表明了与难治性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y;mU6-shscramble,mTOR-p.L2427P;mU6-shscramble) 相比,在具有shRNA介导的eIF4E表达下调的难治性癫痫模型 (mTOR-p.C1483Y;mU6-sheIF4E、mTOR-p.L2427P;mU6-sheIF4E) 中,随着作为社交能力和抑郁的指标的在中心花费的时间(与陌生小鼠互动所花费的时间)的增加,shRNA对社交能力和抑郁的治疗效果。

[0328] 图29(E)示出了3腔室测试(社交互动)的结果,表明了与难治性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;mU6-shscramble,mTOR-p.L2427P;mU6-shscramble)相比,在具有shRNA介导的eIF4E表达下调的难治性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;mU6-sheIF4E,mTOR-p.L2427P;mU6-sheIF4E)中,随着作为社交能力指标的在嗅区花费的时间(与陌生小鼠互动所花费的时间)的增加,shRNA对社交能力的治疗效果。

[0329] 图29(F)示出了埋藏弹珠测试的结果,表明了与难治性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;mU6-shscramble,mTOR-p.L2427P;mU6-shscramble)相比,在具有shRNA介导的eIF4E表达下调的难治性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;mU6-sheIF4E,mTOR-p.L2427P;mU6-sheIF4E)中,随着作为重复行为的指标的埋藏弹珠数量的增加,shRNA对重复行为的治疗效果。

[0330] 图29(G)示出了蔗糖偏好测试的结果,表明了与难治性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;mU6-shscramble,mTOR-p.L2427P;mU6-shscramble)相比,在具有shRNA介导的eIF4E表达下调的难治性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;mU6-sheIF4E,mTOR-p.L2427P;mU6-sheIF4E)中,随着作为快乐或补偿功能障碍的指标的蔗糖偏好百分比的增加,shRNA对快乐或补偿功能的治疗效果。

[0331] 7-3:ASO对神经精神疾病的治疗潜力的测定

[0332] 针对实施例7-1的FMCD和癫痫动物模型(mTOR-p.C1483Y,mTOR-p.L2427P)和对照正常动物模型(mTOR-WT)进行实验。在该实验中,使用了下调eIF4E表达的ASO#77。

[0333] 简而言之,通过ICV注射将ASO#77给药于FMCD,以及用实施例1的pCIG-mTOR突变体-IRES-EGFP产生癫痫动物模型。以与实施例6中基本相同的方式评估ASO#77对伴随FMCD癫痫动物模型的神经精神障碍的治疗潜力。

[0334] 根据癫痫模型小鼠中ASO介导的eIF4E敲低,ASO对FMCD动物模型的神经精神疾病的治疗潜力的测定结果在图30至31中描述。图30和31示出了ASO#77(ASO-3)对伴随难治性癫痫模型的神经精神疾病的治疗效果。

[0335] 图30(A)示出了在ASO#77(ASO-3)注射后第21天进行的行为测试的结果,表明根据ASO注射没有运动障碍。

[0336] 图30(B)示出了旷场试验的结果,表明了与顽固性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO对照,mTOR-p.L2427P;ASO对照)相比,在具有ASO#77(ASO-3)介导的eIF4E表达下调的FMCD和癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO-eIF4E,mTOR-p.L2427P;ASO-eIF4E)中,随着焦虑程度的指标的在中心花费的时间的增加,ASO#77(ASO-3)对焦虑的治疗效果。

[0337] 图30(C)示出了明暗箱测试的结果,表明了与顽固性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO对照,mTOR-p.L2427P;ASO对照)相比,在具有ASO#77(ASO-3)介导的eIF4E表达下调的FMCD和癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO-eIF4E,mTOR-p.L2427P;ASO-eIF4E)中,随着作为焦虑程度的指标的在中心花费的时间(明箱内的停留时间)的增加,ASO#77(ASO-3)对焦虑的治疗效果。

[0338] 图30(D)示出了社交回避测试的结果,表明了与顽固性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO对照,mTOR-p.L2427P;ASO对照)相比,在具有ASO#77(ASO-3)介导的eIF4E表达下调的FMCD和癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO-eIF4E,mTOR-p.L2427P;ASO-eIF4E)中,随着作为社交能力和抑郁的指标的在中心花费的时间(与陌生小鼠互动所花费的时间)的增加,ASO对社交能力和抑郁的治疗效果。

[0339] 图31 (E) 示出了3腔室测试(社交互动)的结果,表明了与顽固性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO对照,mTOR-p.L2427P;ASO对照)相比,在具有ASO#77(ASO-3)介导的eIF4E表达下调的FMCD和癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO-eIF4E,mTOR-p.L2427P;ASO-eIF4E)中,随着作为社交能力的指标的在嗅区花费的时间(与陌生小鼠互动所花费的时间)的增加,ASO对社交能力的治疗效果。

[0340] 图31 (F) 示出了埋藏弹珠测试的结果,表明了与顽固性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO对照,mTOR-p.L2427P;ASO对照)相比,在具有ASO#77(ASO-3)介导的eIF4E表达下调的FMCD和癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO-eIF4E,mTOR-p.L2427P;ASO-eIF4E)中,随着埋藏弹珠数量(重复行为的指标)的增加,ASO对重复行为的治疗效果。

[0341] 图31 (G) 示出了蔗糖偏好测试的结果,表明了与顽固性癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO对照,mTOR-p.L2427P;ASO对照)相比,在具有ASO介导的eIF4E表达下调的FMCD和癫痫模型(mTOR-p.C1483Y;ASO-eIF4E,mTOR-p.L2427P;ASO-eIF4E)中,随着蔗糖偏好百分比(快乐或补偿功能障碍的指标)的增加,ASO对快乐或补偿功能的治疗效果。

[0342] <实施例8>eIF4E过度激活敏感基因的鉴定

[0343] 8-1:具有mTOR突变的神经元细胞的构建

[0344] 实施例1的FMCD动物模型中的突变细胞用GFP标记,GFP阳性细胞通过荧光激活细胞分选(FACS)进行分选以获得mTOR突变细胞。

[0345] 简而言之,在子宫内电穿孔小鼠中,表达MTOR-WT、MTOR-p.Cys1483Tyr或MTOR-p.Leu2427Pro以及GFP报告基因的皮质神经元在补充有10mM HEPES(Gibco,15630-080)和Pen/Strep(Life Technologies,15140-122)的Hank平衡盐溶液(Life Technologies)中的E18.5处被解剖。为了分析蛋白质表达调控,培养基中加入了100 μ g/mL放线菌酮(Millipore,239763),放线菌酮是一种核糖体延伸抑制剂。

[0346] 为了区分表达突变的细胞,从电穿孔区域鉴定GFP阳性皮质部分,并在补充有GlutaMAX-I(Gibco,35050-061)和B27(Gibco,17504-044)的Hibernate-E培养基(Gibco,A12476-01)中切除。GFP阳性皮质在4 $^{\circ}$ C下在含有0.05%胰蛋白酶(Life Technologies,15090-046)的解剖培养基中消化30分钟。消化后,将颗粒离心并重悬于补充有GlutaMAX-I和B27的Hibernate-E培养基中3次。

[0347] 为了分离细胞,使用了火抛光的巴斯德移液器(Corning,CO-7095B-9)。随后,使用100- μ m和40- μ m过滤器去除大块碎片。使用带有FITC门控的BD FACSAria II流式细胞仪(BD Biosciences)进行细胞分选。分选的皮质神经元在-80 $^{\circ}$ C下储存长达6个月。

[0348] 8-2:使用mTOR突变表达细胞进行翻译组分析

[0349] 翻译组分析确定了mTOR突变上调mRNA翻译的基因。mTOR突变增加了基因的mRNA翻译。如图2所示,在具有脑体细胞突变的顽固性癫痫小鼠模型中进行核糖体分析可以揭示导致FMCD的mTOR靶基因。表达水平通过mTOR突变而增加的基因可以通过mTOR突变介导的mRNA翻译增加来解释。

[0350] 8-3:Ribo-seq和RNA-seq文库的制备

[0351] (1)核糖体分析(Ribo-seq)和RNA测序(RNA-seq)

[0352] 细胞以50%的汇合度接种在10厘米的培养皿中。到第二天,细胞还没有达到最大汇合度。NIH 3T3细胞用200nM Torin1或载体处理,CRISPR编辑的mTOR(G4448A)-pC1483Y

NIH 3T3细胞用载体处理3小时。用补充有100 μ g/mL放线菌酮的冰冷PBS洗涤细胞一次,并在哺乳动物多核糖体缓冲液(补充有1 μ L蛋白酶抑制剂混合物、2 μ L RNasin和2 μ L SUPERase的10mM Tris-HCl,pH7.4、5mM MgCl₂、100mM KCl、2mM DTT、1% Triton X-100、100 μ g/mL放线菌酮)中溶解,以维持核糖体和mRNA之间的结合。将样品在旋转器上孵育20分钟以诱导细胞裂解。对于FACS分类的皮质神经元,应用相同的处理。将细胞裂解物分成2个试管,75%的样品用于Ribo-Seq,其余用于RNA-Seq,分别用于制备Ribo-Seq和RNA-Seq文库。

[0353] (2) Ribo-seq和RNA-seq的制备

[0354] 对于Ribo-seq,用RNaseI (Ambion,AM2294)处理制备的细胞裂解物,以从核糖体-mRNA复合物中去除mRNA的核糖体未结合区域。随后,使用Sephacryl S-400柱(GE Healthcare,27-5140-01)纯化核糖体-mRNA复合物。使用TRIzol LS (Ambion,10296-010)从样品中提取RNA足迹(即mRNA的核糖体结合区域)。使用Ribo-zero RNA去除试剂盒(Epicentre,RZH110424)从样品中去除rRNA。

[0355] 对于RNA-seq,使用TRIzol LS从细胞裂解物中纯化总RNA。随后,使用RNA清洁和浓缩器(Clean&Concentrator)-5或-25(Zymo Research,R1015或R1017)对RNA样品进行富集。使用Ribo-zero RNA去除试剂盒(Epicentre,RZH110424)去除rRNA。去除rRNA后,使用NEBNext镁RNA片段化组件(New England BioLabs,E6150S)通过碱水解将样品RNA片段化。

[0356] 核糖体足迹(30nt大小)和RNA片段(40-60nt大小)通过尿素-PAGE进行大小分级,并从凝胶洗脱液中纯化。

[0357] (3) 南极磷酸酶和PNK治疗

[0358] RNaseI消化和碱性水解分别在每个核糖体足迹和RNA片段的3'末端留下单磷酸基团。在南极磷酸酶(NEB,M0289S)去除单磷酸基团后,裸露的3'端连接到腺苷酸化3'接头的5'端。为此,将样品在含有1 μ L南极磷酸酶的20 μ L 1 \times 反应混合物中于37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,然后在65 $^{\circ}$ C下孵育5分钟以使酶失活。反应后,将RNA在含有2 μ L PNK(Takara,2021A)和1 μ L [γ -³²P]-ATP(PerkinElmer,NEG502Z)的45 μ L的1 \times 反应混合物中于37 $^{\circ}$ C下孵育5分钟,以用³²P标记RNA。标记后,加入5 μ L的1mM ATP(NEB,P0756L),将样品在37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟,以磷酸化RNA的5'末端,用于随后的5'接头连接。核糖体足迹和RNA片段通过酸性苯酚介导的RNA提取进行纯化,随后使用尿素-PAGE进行大小分级和纯化以去除游离ATP。

[0359] (4) 接头连接、RT-PCR和测序

[0360] TruSeq小RNA试剂盒(Illumina,RS-200-0012)用于3'接头、5'接头、RT引物、5'引物和3'引物连接。

[0361] 为了连接3'接头,将1.5 μ L T4 RNA连接酶2(Epicentre,LR2D1132K)、1 μ L 10 \times 缓冲液、0.5 μ L 3'接头(RA3,TruSeq Small RNA试剂盒)和1 μ L SUPERase-In加入每个RNA样品,并在22 $^{\circ}$ C下培养4小时。接头连接的RNA通过尿素-PAGE进行大小分级,然后从凝胶洗脱液中纯化以去除残留的3'接头。

[0362] 随后,为了连接5'接头,将1 μ L T4 RNA连接酶、1 μ L 10 \times 缓冲液、1 μ L 10mM ATP、0.5 μ L 5'接头(RA5,TruSeq Small RNA试剂盒)和1 μ L SUPERase-In加入每个样品中,并在22 $^{\circ}$ C下孵育16小时。

[0363] 为了构建cDNA文库,将接头连接的RNA在含有4 μ L 2.5mM dNTP、1 μ L Superscript II RT酶、4 μ L 5 \times 缓冲液和2 μ L 0.1M DTT的20 μ L的1 \times 反应混合物中进行逆转录。为了扩增

用于Illumina DNA测序的cDNA,将总共20 μ L RT样品中的1 μ L与1 μ L Phusion HF聚合酶(Thermo Fisher Scientific,F-530L)、5 μ L 5 \times 缓冲液、2.5mM dNTP、0.2 μ L 5'引物(TruSeq Small RNA试剂盒)、0.2 μ L 3'引物(TruSeq Small RNA试剂盒)和33.6 μ L蒸馏水混合。该PCR混合物在T1热循环仪上运行22-25个循环,即98 $^{\circ}$ C 10秒、60 $^{\circ}$ C 30秒和72 $^{\circ}$ C 20秒。扩增的cDNA文库通过Native-PAGE和凝胶洗脱纯化。

[0364] 使用Illumina HiSeq 2000或HiSeq 2500测序系统对纯化的cDNA文库进行测序。翻译组分析导致检测具有mTOR突变介导的表达上调的基因。

[0365] 8-4:Ribo-seq和RNA-seq文库的测序处理和比对

[0366] 使用Assaf Gordon的FASTX-Toolkit(http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)进行序列分析中的一些第一步。如此获得的读数从3'端修剪,使剩余的读数为26nt长。用Bowtie(<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>)版本1.1.2将读数与UCSC mm10组装对齐,以去除rRNA和tRNA。然后,使用带有默认选项的TopHat(<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>)版将2.1.1读数与UCSC mm10基因组序列对齐,除了没有新的连接。

[0367] 8-5:Ribo-seq和RNA-seq文库的mRNA转录物量化和标准化

[0368] 为了量化单个基因的核糖体足迹和mRNA丰度,在与HTSeq(https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.9.1/)对齐后,按单个转录物计算Ribo-Seq和RNA-Seq标签。将Ribo-Seq和RNA-Seq文库中读数计数低的转录物(即所有文库中的FMCD小鼠模型<100个原始读数)排除在外以减少噪音。每个单独的mRNA转录物的每个读数计数被标准化为每个文库中读取计数的中值。

[0369] 8-6:单个mRNA转录物翻译效率的量化

[0370] 将多达5,000个基因的mRNA转录物的翻译效率(TE)计算为核糖体保护的mRNA片段(RPF)中单个转录物的标准化读数计数除以映射到编码序列(CDS)的标准化RNA-Seq标签计数。CDS映射的RNA-Seq标签计数也被标准化为它们在RNA-Seq文库中的中位数。以log₂尺度计算各个基因在每个时间点相对于对照的翻译效率(TE)的倍数变化。

[0371] 8-7:eIF4E过度激活敏感基因的鉴定

[0372] 从各个基因在每个时间点相对于对照的翻译效率(TE)的倍数变化分布来看,选择MTOR-C1483Y和MTOR-L2427P模型中相对于MTOR-WT模型的256个z评分 ≥ 1.2 的基因用于eIF4E激活敏感基因。TE倍数变化分布中z评分 ≥ 1.2 满足 $\log_2(\text{TE}[\text{p.C1483Y}]/[\text{WT}]) \geq 2.142605598$ 和 $\log_2(\text{TE}[\text{p.L2427P}]/[\text{WT}]) \geq 2.232171262$ 的条件。表1中给出了256个选择的基因。<实施例9>eIF4E过度激活敏感基因的分析

[0373] 9-1:一般5'-UTR特征分析

[0374] 从UCSC基因组浏览器(GRCm38/mm10;<https://genome.ucsc.edu/>)获得核糖体分析中存在的所有基因的5'-UTR。选择在RefSeq中注释的单个mRNA的最长5'-UTR序列进行分析。

[0375] 将表1中FMCD小鼠中256个mTOR过度激活敏感基因的mRNA与所有检测到的基因在5'-UTR中的GC含量、长度和吉布斯自由能进行比较。

[0376] 使用QuikFold2 3.0版(<http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Quickfold>)预测每个序列的最小折叠 ΔG° ,并设置了RNA折叠能量规则的默认参数(Lee JH

等,PI3K-AKT3-mTOR传导途径成分中的新生(De novo)体细胞突变导致半侧巨脑症(De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly)Nat.Genet.2012;44(8):941-945)。

[0377] 图9-2:eIF4E过度激活敏感基因中的共同基序

[0378] 使用MEME浏览器应用程序(版本4.12.0)操作多重Em基序诱导(MEME,http://meme-suite.org/tools/meme)(Bailey TL,Elkan C.通过期望最大化拟合混合模型以发现生物聚合物中的基序(Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers)Proc.Second Int.Conf.Intell.Syst.Mol.Biol.1994;28-36)。从UCSC基因组浏览器(GRCm38/mm10)中调用5'-UTR,并选择具有已知5'-UTR的RefSeq注释的mRNA进行进一步分析。每个基因最长的5'-UTR被编译为输入MEME作为训练集。

[0379] 对于表1的FMCD模型中的eIF4E激活敏感基因,采用仅使用给定链的具有任意数量重复的12-nt序列的基序搜索参数来识别鸟嘌呤四联体(GGC)₄基序、CERT基序、富含A基序和富含U基序。

[0380] 对于FMCD小鼠,使用发现个体基序发生(Find Individual Motif Occurrences, FIMO;http://meme-suite.org/tools/fimo)评估FMCD中的eIF4E激活敏感基因与包含已知5'-UTR的RefSeq注释mRNA所存在的鸟嘌呤四联体(GGC)₄基序、CERT基序、富含A基序和富含U基序。

[0381] MEME分析结果表明,eIF4E过度激活敏感基因具有共同的5'-UTR特异性基序(图32和33)。

[0382] 如图32所示,eIF4E激活敏感基因提供了新的mTOR响应5'-UTR基序,其共有序列存在于5'-UTR中。通过MEME分析鉴定了表1的FMCD小鼠的256个eIF4E激活敏感基因中识别的富含U基序、鸟嘌呤四联体(GGC)₄基序、富含A基序和CERT基序的共有序列和富集值(E值)。

[0383] 图33是说明了FMCD小鼠中含有富含U基序、鸟嘌呤四联体基序、富含A基序和CERT基序的mTOR激活敏感基因的频率图,其中给予相同基因,独立地计数两个或更多个基序。结果,具有5'-UTR基序的基因占mTOR过度激活敏感基因的80%。

[0384] 9-3:5'-UTR荧光素酶报告基因测定

[0385] 5'-UTR来自UCSC基因组浏览器(GRCm38/mm10)。为ADK-S、CREB1和IRSp53中的每一个合成了具有WT、颠换和缺失序列的5'-UTR。

[0386] 在表8中,ADK-S野生型(WT)序列上的粗体下划线字母代表鸟嘌呤四联体(GGC)₄; CREB1野生型序列上的粗体下划线字母中的第一个和第三个标记分别代表富含A和富含U的基序;IRSp53野生型序列上的粗体下划线字母代表富含U的基序。在类型中,删除表示从WT中删除每个基序所产生的序列。

[0387] [表8]

[0388]

基因/类型	链型 (SEQ ID NO)	序列
ADK-S-WT	有义(SEQ ID NO: 220)	GGGCCGCCCCGCGCGCGGGGTGTGTAAGGACG AGCTCTCCGACGCTGAGTGCCAGAGCTAGGGA GCAGTTGCTGTGGTACCTACTGCTACCTGGGCA GACGCTGAGCATCGGACATCAGGCGCGGGGCG CTGCGGTGCGGGACGGGTAGGTGCAGTC
	反义(SEQ ID NO: 221)	GACTGCACCTACCCGTCCCGCACCGCAGCGCC CCGCGCCTGATGTCCGATGCTCAGCGTCTGCCC AGGTAGCAGTAGGTACCACAGCAACTGCTCCC TAGCTCTGGCACTCAGCGTCGGAGAGCTCGTC CTTACACACCCCGCGCGCGGGCGGCC
ADK-S-删除	有义(SEQ ID NO: 222)	GGGCCGCCCCGCGCGCGGGGTGTGTAAGGACG AGCTCTCCGACGCTGAGTGCCAGAGCTAGGGA GCAGTTGCTGTGGTACCTACTGCTACCTGGGCA GACGCTGAGCATCCGCTGCTGCAGTC
	反义(SEQ ID NO: 223)	GACTGCAGCAGCGGATGCTCAGCGTCTGCCCA GGTAGCAGTAGGTACCACAGCAACTGCTCCCT AGCTCTGGCACTCAGCGTCGGAGAGCTCGTCC TTACACACCCCGCGCGCGGGCGGCC
CREB1-WT	有义(SEQ ID NO: 224)	<u>TCGGCACTGGGCGGCGCTGGCTGGCTCCCT</u> <u>GGCTGCGGCTCCT</u> CAGTCGGCGGCGGCTGCT GCTGCCTGTGGCCCGGGCGGCTGGGAGAAGC GGAGTGTTGGTGAGTGACGCGGCGGAGGTGTA GTTTGACGCGGTGTGTTACGTGGGGGAGAGAA <u>TAAACTCCAGCGAGATCCGGGCCGCGAACGA</u> AAGCAGTGACGGAGGAGCTTGTACCACCGGTA TCC
	反义(SEQ ID NO: 225)	GGATACCGGTGGTACAAGCTCCTCCGTCAGT CTTTCGTTCCGCGGCCCGGATCTCGCTGGAGTTT TATTCTCTCCCCACGTAACACACCGCGTCAAA CTACACCTCCGCCGCGTCACTACCAACA CGCTTCTCCAGCCGCCCAGGACAGGCAGC AGCAGCCGCCGCGACTGAGGAGCCGCGAGCC AGGGAGCCAGCCAGCGCCGCCAGTGCCGA
CREB1-删除1	有义(SEQ ID NO: 226)	TCCTGGCTCCCTGGCTGCGGCTCCTCAGTCGG CGGCGGCTGCTGCTGCCTGTGGCCCGTGAGTG ACGCGGCGGAGGTGTAGTTTGACGCGGTGTGT TACGTGGGGGAGAGAATAAACTCCAGCGAGA TCCGGGCCGCGAACGAAAGCAGTGACGGAGG AGCTTGTACCACCGGTATCC

[0389]

	反义(SEQ ID NO: 227)	GGATACCGGTGGTACAAGCTCCTCCGTCCTG CTTTCGTTTCGCGGCCCGGATCTCGCTGGAGTTT TATTCTCTCCCCACGTAACACACCGCGTCAAA CTACACCTCCGCCGCGTCACTCACGGGCCACA GGCAGCAGCAGCCGCCGCCGACTGAGGAGCC GCAGCCAGGGAGCCAGGA
CREB1-删除2	有义(SEQ ID NO: 228)	TCGGCACTGGGCGGCGCTGGCTGGCTCCCTGG CTGCGGCTCCTCAGTCGGCGGCGGCTGCTGCT GCCTGTGGCCCCGGGCGGCTGGGAGAAGCGGA GTGTTGGTGAGTGACGCGGCGGAGGTGTAGTT TGACGCGGTGTGTTACGTGGGGGCTCCAGCGA GATCCGGGCCGCGAACGAAAGCAGTGACGGA GGAGCTTGTACCACCGGTATCC
	反义(SEQ ID NO: 229)	GGATACCGGTGGTACAAGCTCCTCCGTCCTG CTTTCGTTTCGCGGCCCGGATCTCGCTGGAGCCC CCACGTAACACACCGCGTCAAACACTACACCTCC GCCGCGTCACTACCAAACTCCGCTTCTCCC AGCCGCCCGGGCCACAGGCAGCAGCAGCCGC CGCCGACTGAGGAGCCGCAGCCAGGGAGCCA GCCAGCGCCGCCAGTGCCGA
CREB1-删除3	有义(SEQ ID NO: 230)	TCGGCACTGGGCGGCGCTGGCTGGCTCTCATG CTGCCTGTGGCCCCGGGCGGCTGGGAGAAGCG GAGTGTGGTGAGTGACGCGGCGGAGGTGTAG TTTGACGCGGTGTGTTACGTGGGGGAGAGAAT AAAACCTCCAGCGAGATCCGGGCCGCGAACGA AAGCAGTGACGGAGGAGCTTGTACCACCGGTA TCC
	反义(SEQ ID NO: 231)	GGATACCGGTGGTACAAGCTCCTCCGTCCTG CTTTCGTTTCGCGGCCCGGATCTCGCTGGAGTTT TATTCTCTCCCCACGTAACACACCGCGTCAAA CTACACCTCCGCCGCGTCACTACCAAACTC CGTTCTCCCAGCCGCCCGGGCCACAGGCAGC ATGAGAGCCAGCCAGCGCCGCCAGTGCCGA
IRSp53-WT	有义(SEQ ID NO: 232)	GTGGTCCTGGTCTGCGCGCC TTTTCTGTTGC TGC AGTTGTCGCTTTCCTCACCGCCACCCGTG CCCCTGCTCTGGTCTGTGGTGTAGCCGGGACC CAGGACC
	反义(SEQ ID NO: 233)	GGTCCTGGGTCCCGGCTACACCACAGACCAGA GCAGGGGCACGGGTGGCGGTGAGGAAAGCGA CAACTGCAGCAACAGGAAAAGGCGCGCAGAC CAGGACCAC
IRSp53-删除	有义(SEQ ID NO: 234)	GTGGTCCTGGTCTGCGCGCCAGTTGTCGCTTTC CTCACCGCCACCCGTGCCCTGCTCTGGTCTGT

		GGTGTAGCCGGGACCCAGGACC
[0390]	反义(SEQ ID NO: 235)	GGTCCTGGGTCCCGGCTACACCACAGACCAGA GCAGGGGCACGGGTGGCGGTGAGGAAAGCGA CAACTGGCGCGCAGACCAGGACCAC

[0391] 使用HindIII (NEB, R3104) 和NcoI (NEB, R3193) 将合成的5'-UTR克隆到pGL3启动子载体 (Promega, E1761) 中SV40启动子和萤火虫荧光素酶开放阅读框之间的位点。Renilla pGL4.74用作对照报告基因。使用iNfect转染试剂将HEK293T细胞与30:30:1的pGL3-SV40 5'-UTR报告基因;FLAG标记的mTOR WT、FLAG标记的mTOR p.Cys1483Tyr或FLAG标记的mTOR p.Leu2427Pro;和pGL4.74控制报告基因的混合物共转染。转染后24小时收获细胞并裂解。使用双荧光素酶测定试剂盒 (Promega, E1960) 测量细胞裂解物的荧光素酶活性。萤火虫荧光素酶活性被归一化为海肾活性,并表示为相对于FLAG标记的mTOR WT转染的HEK293T细胞的值。

[0392] 图34a和34b示出了eIF4E激活敏感基因中5'-UTR基序介导的翻译上调。详细地,当eIF4E激活敏感基因Adk-S、Adk-L、Creb1和IRSp53的5'-UTR位于荧光素酶基因的上游时,荧光素酶的表达响应于mTOR中的体细胞激活突变而增加。mTOR激活突变是mTOR p.C1483Y和mTOR p.L2427P,而mTOR WT用作对照。mTOR WT、mTOR p.C1483Y和mTOR p.L2427P在HEK293T细胞中表达。在图中,Pro代表启动子,Actb代表β-肌动蛋白基因,pGL3代表缺乏5'-UTR的空载体。结果标准化为转染的mTOR WT细胞中的荧光素酶活性。

[0393] 图34b示出了5'-UTR基序介导的表达上调。对靶mRNA (ADK-S、ADK-L、CREB1和IRSp53) 和对照mRNA (ACTB和GAPDH) 进行5'-UTR介导的翻译,并通过mTOR WT (WT) -和mTOR p.C1483Y (p.C1483Y) -转染的HEK293T细胞,或mTOR WT (WT) -和p.L2427P (p.L2427P) -转染的HEK293T细胞中的5'-UTR荧光素酶报告基因测定分析结果。

[0394] 在图34a中,Pro表示启动子,Actb表示β-肌动蛋白基因,pGL3表示缺乏5'-UTR的测试载体。分析结果归一化为转染的mTOR-WT细胞中的5'-UTR报告基因活性。图34b示出了图34a中获得的结果的量化。

[0395] 从图35的数据可以理解,从eIF4E过度激活敏感基因中删除特定基序逆转了响应mTOR突变和eIF4E过度激活的基因的表达增加。从图35中,观察到eIF4E激活敏感基因提供新的eIF4E响应性5'-UTR基序,并且根据5'-UTR基序的存在或不存在测量不同的表达水平。在图35的上图中,示出了Adk-S、IRSp53和Creb1中5'-UTR基序的位置。在图35的下图的图表中,示出了Adk-S、IRSp53和Creb1中5'-UTR基序结构域的缺失突变对mTOR激活的(mTOR p.C1483Y [p.C1483Y] 或p.L2427P [p.L2427P]) 细胞相对于mTOR WT (WT) 转染的HEK293T细胞中的5'-UTR荧光素酶报告基因活性的影响。在图中,Pro表示启动子。

[0396] <实施例10>重复剂量毒性试验

[0397] 通过皮下注射分别测定实施例4中选择的AS0#16、#21、#27、#35、#75、#77和#89的重复剂量毒性。

[0398] AS0序列的重复剂量毒性测定由Biototech Co.,Ltd.进行。在重复剂量毒性测定中,每个AS0序列在一个月以内以100mg/kg的剂量对4只雄性小鼠组分7次(第1、3、5、7、14、21和28天)进行皮下注射。最后一次注射后两天,进行组织病理学观察。

[0399] 在ASO#16、#21、#27、#35、#75和#77测试组中未观察到死亡或垂死的动物,而ASO#89测试组中的所有动物均死亡或处于垂死状态。除ASO#89测试组外,所有测试组均无行为异常。

[0400] ASO#89的毒性可能归因于其序列,而不是通常已知的2'-MOE间隔体化学修饰结构,或者可能是由于对靶基因以外的脱靶基因表达的影响。实施例4-4中的计算机脱靶基因分析表明,每个靶向eIF4E的ASO#16、#21、#27、#35、#75和#77除1个核苷酸序列外,没有与其余19个核苷酸序列一致的脱靶基因,而ASO#89有4个脱靶基因。

- <110> 索瓦尔基因股份有限公司(SoVaGen Co., Ltd.)
- <120> 用于诊断或治疗与ELF4E活性增加相关的病症的包含ELF4E抑制剂的组合物
- <130> DPP20203125KR
- <150> 10-2019-0109090
<151> 2019-09-03
- <150> 10-2019-0109091
<151> 2019-09-03
- <160> 235
- <170> koPatentIn 3.0
- <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0001] <220>
<223> 反义寡核苷酸
- <400> 1
aaacaaagat agccacatca 20
- <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
<223> 反义寡核苷酸
- <400> 2
tcaaactagt gctccaaact 20
- <210> 3
<211> 20
<212> DNA

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 3	
	aggacaaatc tagttgtcta	20
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 4	
[0002]	ggacaaatct agttgtctaa	20
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 5	
	agttgtctaa aagacaattc	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 6 cttccttgt ataccctct	20
	<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 7 ttccttgta taccctcta	20
	<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0003]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 8 aggatagggt tttttatac	20
	<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 9 gataggttt tttatacct	20
	<210> 10 <211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 10	
	cactgcgctt ggtgtcaaat	20
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 11	
[0004]	gcctggtgtc aaatattact	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 12	
	ggcatacata cagggacatg	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 13	
	gcatacatagcaggacatgt	20
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 14	
	gcttactgtggtgagagtc	20
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0005]	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 15	
	cttactgtggtagagtc	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 16	
	aaaccttactgtctctagcc	20
	<210> 17	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 17	
	aaccttactg tctctagcca	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0006]	<400> 18	
	aacagttaag caacaacact	20
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 19	
	acagttaagc aacaacactg	20
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 20		
	ctggataatc aaagctctca		20
	<210> 21		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 21		
	tggataatca aagctctcat		20
	<210> 22		
	<211> 20		
	<212> DNA		
[0007]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 22		
	taagcatacc ttaaaaagtg		20
	<210> 23		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 23		
	aagcatacct taaaaagtgga		20

	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 24	
	agcatacctt aaaaagtgag	20
	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0008]	<400> 25	
	gcataacctta aaaagtgagt	20
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 26	
	cataaccttaa aaagtgagta	20
	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	

	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 27	
	tctccaatat tagatggcag	20
	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 28	
	ccaatattag atggcagaaa	20
	<210> 29	
	<211> 20	
[0009]	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 29	
	aaattattag gccttaaatg	20
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 30	
	ttattaggcc ttaatgtag	20

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 31
 tggttactta cgcccaaaag 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

[0010]

<400> 32
 ggttacttac gcccaaaagt 20

<210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 33
 gttacttacg cccaaaagtc 20

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	34	
		ttacttacgc ccaaaagtct	20
	<210>	35	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	35	
		acttacgccc aaaagtcttc	20
[0011]	<210>	36	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	36	
		ccaagtcagc acggactttt	20
	<210>	37	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	37	
		caagtcagca cggactttt	20

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 38
 aagtcagcac ggacttttt 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

[0012]

<400> 39
 tccattatga ccaatacttt 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 40
 ccattatgac caatacttt 20

<210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	41	
		cattatgacc aatacttttc	20
	<210>	42	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	42	
		ttagaaagct tacctgttct	20
[0013]	<210>	43	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	43	
		tagaaagctt acctgttctg	20
	<210>	44	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	44	

	agaaagctta cctgttctgt	20
	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 45	
	tataacaatt acaggaagct	20
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
[0014]	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 46	
	aacaattaca ggaagctata	20
	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 47	
	catgctcatt tccacttctc	20
	<210> 48	
	<211> 20	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 48	
	tacagcgatc tgtaggcctc	20
	<210> 49	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 49	
[0015]	atctgtaggc ctcgctcctc	20
	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 50	
	ttcctcctc catgacagcc	20
	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 51 aaggcaatac tcaccggtc	20
	<210> 52 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 52 gacagtcgcc atcttagatc	20
	<210> 53 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0016]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 53 tagatcgatc tgatcgaca	20
	<210> 54 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 54 tctgatcgca caaccgctcc	20
	<210> 55 <211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 55	
	aatgagattc aaaccggatt	20
	<210> 56	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 56	
[0017]	agattcaaac cggattggcc	20
	<210> 57	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 57	
	ggcttctggg aagtggagtc	20
	<210> 58	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 58 ataagcttc attgcttag	20
	<210> 59 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 59 gggtcaacta tgactcttga	20
	<210> 60 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0018]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 60 actatgactc ttgacgttga	20
	<210> 61 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 61 gactcttgac gttgactcat	20
	<210> 62	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 62	
	ctccttaggc gagtgactta	20
	<210> 63	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0019]	<400> 63	
	gatacactta cctcacaagg	20
	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 64	
	ttacctcaca aggggtgtgct	20
	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 65 aaatctagtt gtctaaaaga	20
	<210> 66 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 66 tagttgtcta aaagacaatt	20
	<210> 67 <211> 20 <212> DNA [0020] <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 67 tctgtaggcc tcgctcctcc	20
	<210> 68 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 68 ctgtaggcct cgctcctccc	20

	<210> 69	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 69	
	tccctcctcc atgacagccc	20
	<210> 70	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0021]	<400> 70	
	agatgccagc cagggagcc	20
	<210> 71	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 71	
	gccagccagg gaagccactc	20
	<210> 72	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	

	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 72	
	tgctatctta tcaccttag	20
	<210> 73	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 73	
	ggcgaatgag acttctcta	20
	<210> 74	
	<211> 20	
[0022]	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 74	
	tcctggatcc tccaccaatg	20
	<210> 75	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 75	
	tgtcatattc ctggatcctt	20

<210> 76
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 76
 tggatccttc accaatgtta 20

<210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

[0023]

<400> 77
 gatccttcac caatgttaca 20

<210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 78
 tatcaccttt agctctaaca 20

<210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	79	
		aattactaga caactggata	20
	<210>	80	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	80	
		catcttagat cgatctgatc	20
[0024]	<210>	81	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	81	
		ctggatcctt caccaa	16
	<210>	82	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	82	
		ctatcttatc accttt	16

<210> 83
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 83
 ttactagaca actgga 16

<210> 84
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

[0025]

<400> 84
 atcttagatc gatctg 16

<210> 85
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 85
 ttacttacgc ccaaaa 16

<210> 86
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	86	
		ttccttgat accctc	16
	<210>	87	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	87	
		accttactgt ctctag	16
[0026]	<210>	88	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	88	
		gaaagcttac ctgttc	16
	<210>	89	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	89	

	ctcttgacgt tgactc	16
	<210> 90	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 90	
	gtaggcctcg ctctc	16
	<210> 91	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
[0027]	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 91	
	cattatgacc aatact	16
	<210> 92	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 92	
	aatattagat ggcaga	16
	<210> 93	
	<211> 16	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 93	
	ggataatcaa agctct	16
	<210> 94	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 94	
[0028]	ttactgtggt gagagt	16
	<210> 95	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 95	
	ctggtgtcaa atatta	16
	<210> 96	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> ASO Common motif	

	<400> 96 acawyagc	8
	<210> 97 <211> 11 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> U-rich motif	
	<400> 97 ttdwttttn t	11
	<210> 98 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0029]	<220> <223> guanine quartet	
	<400> 98 ggcggcggcg gc	12
	<210> 99 <211> 11 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> A-rich motif	
	<400> 99 aaaanataaa a	11
	<210> 100 <211> 12	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> CERT motif	
	<400> 100	
	gccgccgccg cc	12
	<210> 101	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 101	
[0030]	ccatcttaga tcgatctgat	20
	<210> 102	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 102	
	atcttagatc gatctgatcg	20
	<210> 103	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 103 acgtgacgga tatgtccggt	20
	<210> 104 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 104 tgccaggcaa gcctactgtg	20
	<210> 105 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0031]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 105 gaagtctgt gcaaccgttc	20
	<210> 106 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 106 agttctgtgc aaccgtcca	20
	<210> 107	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 107	
	gaaatagcct aagtccagat	20
	<210> 108	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0032]	<400> 108	
	tagcctaagt ccagatgccca	20
	<210> 109	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 109	
	caactatgac tcttgacgtt	20
	<210> 110	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 110 aggtgatgat acacttacct	20
	<210> 111 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 111 gactctagaa atgattcata	20
	<210> 112 <211> 20 <212> DNA [0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 112 actaaacctg aactgatatg	20
	<210> 113 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 113 aacctgaact gatatgctga	20

	<210> 114	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 114	
	ctatcgtaac ctaaaagttc	20
	<210> 115	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0034]	<400> 115	
	tattttcaat ggaacctaac	20
	<210> 116	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 116	
	gtatttgatga aacgtaagca	20
	<210> 117	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	

	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 117 attcaggctt acatattgta	20
	<210> 118 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 118 acgtgttcgg tcaatgctac	20
[0035]	<210> 119 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 119 tcggtcaatg ctacagcacc	20
	<210> 120 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 120 tcatatatca atcatgattc	20

<210>	121	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	反义寡核苷酸	
<400>	121	
	actggattac taaagagttg	20
<210>	122	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	反义寡核苷酸	
[0036]		
<400>	122	
	gattactaaa gagttgat	20
<210>	123	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	反义寡核苷酸	
<400>	123	
	ccaggcctaa aacttgatg	20
<210>	124	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	124	
		ggcctaaaac ttgatgaat	20
	<210>	125	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	125	
		tacatacggt gaacattatg	20
[0037]	<210>	126	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	126	
		cgtttatgat gtaagcacta	20
	<210>	127	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	127	
		agttcagctt taatccaatc	20

<210> 128
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 128
 ggagataggt tttccacatt 20

<210> 129
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

[0038]

<400> 129
 ataggttttc cacattagac 20

<210> 130
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 130
 agaaacacga cctactggag 20

<210> 131
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	131	
		ttagattccg ttttctctc	20
	<210>	132	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	132	
		agattccggt ttctctctt	20
[0039]	<210>	133	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	133	
		ttttctctc ttctgtagtc	20
	<210>	134	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	134	

	tctcctcttc tgtagtcggg	20
	<210> 135	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 135	
	cctcttctgt agtcggggga	20
	<210> 136	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
[0040]	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 136	
	cttctgtagt cgggggatta	20
	<210> 137	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 137	
	tgtagtcggg ggattaggag	20
	<210> 138	
	<211> 20	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 138	
	agtcggggga ttaggagtag	20
	<210> 139	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 139	
[0041]	ggtgattgcc actagccaaa	20
	<210> 140	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 140	
	cggaattcac agaaatgacg	20
	<210> 141	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 141 gcttcaaagt catcaatcgc	20
	<210> 142 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 142 agtcattggc tgcaagatcc	20
	<210> 143 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0042]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 143 ttcatctgcc actgtaagcc	20
	<210> 144 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 144 taagcagtgt atgatgtaa	20
	<210> 145 <211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 145	
	gttaaactat ataagactgc	20
	<210> 146	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0043]	<400> 146	
	atataagact gcctctaacg	20
	<210> 147	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 147	
	cctcaacctt agcatatcta	20
	<210> 148	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 148	
	tagcatatct aaaactagtc	20
	<210> 149	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 149	
	gacatcttgc tcattgac	20
	<210> 150	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0044]	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 150	
	gtaatataga gtttagtg	20
	<210> 151	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 151	
	tagagtttag gtgcttacat	20
	<210> 152	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 152	
	agtttagtg cttacatata	20
	<210> 153	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0045]	<400> 153	
	cgatgactta gttgcttgcc	20
	<210> 154	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 154	
	cttagtgct tgctgaagg	20
	<210> 155	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 155	
	cacaaatata gtttaggtga	20
	<210> 156	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 156	
	atagtttagg tgagacaacc	20
	<210> 157	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0046]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 157	
	atgagcagaa tatcttgagg	20
	<210> 158	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 158	
	ttagataact gctaggtaat	20

	<210> 159	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 159	
	gaggttgatc aaagtataat	20
	<210> 160	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0047]	<400> 160	
	tactagacaa ctggatatgg	20
	<210> 161	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 161	
	tagacaactg gatatggttg	20
	<210> 162	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	

	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 162	
	acaactggat atggtgtac	20
	<210> 163	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 163	
	actggatatg gttgtacaga	20
	<210> 164	
	<211> 20	
[0048]	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 164	
	gcatgacatt gcagaattag	20
	<210> 165	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 165	
	agactggata atcaaagctc	20

<210>	166	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	反义寡核苷酸	
<400>	166	
	gactggataa tcaaagctct	20
<210>	167	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	反义寡核苷酸	
[0049]		
<400>	167	
	aagcgatcga ggtcacttcg	20
<210>	168	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	反义寡核苷酸	
<400>	168	
	cgatcgaggt cacttcgtct	20
<210>	169	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	169	
		tcgaggtcac ttcgtctctg	20
	<210>	170	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	170	
		aggtcacttc gtctctgctg	20
[0050]	<210>	171	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	171	
		gtcacttcgt ctctgctgtt	20
	<210>	172	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	172	
		tttgcataga aactaaaggc	20

<210> 173
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 173
 atagaaacta aaggcagttt 20

<210> 174
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

[0051]

<400> 174
 ttggcagtta atgtcatggc 20

<210> 175
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<400> 175
 gcagttaatg tcatggcaga 20

<210> 176
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	176	
		tgctctgctg ctgcttatat	20
	<210>	177	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	177	
		tgtcttgtaa agccagaagt	20
[0052]	<210>	178	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	178	
		cttaacatt aacaacagcg	20
	<210>	179	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	179	

	aacattaaca acagcgccac	20
	<210> 180	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 180	
	ttaacaacag cgccacatac	20
	<210> 181	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
[0053]	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 181	
	acaacagcgc cacatacatc	20
	<210> 182	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 182	
	agcgccacat acatcatcac	20
	<210> 183	
	<211> 20	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 183	
	gacctgtatc acatgcatac	20
	<210> 184	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 184	
[0054]	ctgtatcaca tgcatactta	20
	<210> 185	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 185	
	tttcaagtaa gacatgactc	20
	<210> 186	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 186 agtaagacat gactctattg	20
	<210> 187 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 187 tgagataaag ctgacaaggt	20
	<210> 188 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0055]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 188 taaagctgac aaggtttcag	20
	<210> 189 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 189 ttaatgaaaa ttatacgtag	20
	<210> 190 <211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 190	
	aaattatcg tagtaaacac	20
	<210> 191	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0056]	<400> 191	
	caacctcat aaaagtacta	20
	<210> 192	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 192	
	tgccactga tactgctgaa	20
	<210> 193	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 193 agtttctaga cacgtacaag	20
	<210> 194 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 194 actttacttg gacaatcata	20
	<210> 195 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0057]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 195 cttttgaatg caacttagc	20
	<210> 196 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 196 tatgtacagt atgctgagat	20
	<210> 197	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 197	
	ctaagactga atgactgtgc	20
	<210> 198	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
[0058]	<400> 198	
	actgtgcctt actttataaa	20
	<210> 199	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 199	
	cactgattg aatgaaatgc	20
	<210> 200	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 200 ccaaatctcg attgcttgac	20	
	<210> 201 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220> <223> 加扰的ASO-1		
	<400> 201 ctcagtaaca gtcacaccag	20	
	<210> 202 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0059]	<220> <223> shScramble		
	<400> 202 cgattgatct ctaagttga t	21	
	<210> 203 <211> 63 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220> <223> shE4E有义链		
	<400> 203 tcgattgatc tctaagtttg atttcaagag aatcaaactt agagatcaat cgtttttct	60	
	cga	63	

	<210>	204		
	<211>	63		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>			
	<223>	shelF4E 反义链		
	<400>	204		
		tcgagaaaa acgattgatc tctaagtttg attctcttga aatcaaactt agagatcaat		60
		cga	63	
	<210>	205		
	<211>	19		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>			
[0060]	<223>	shScramble		
	<400>	205		
		ggaatctcat tcgatgcat	19	
	<210>	206		
	<211>	59		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>			
	<223>	shScramble有义链		
	<400>	206		
		tggaatctca ttcgatgcat ttcaagagaa tgcacgaat gagattcctt ttttctcga		59
	<210>	207		
	<211>	59		

	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> shScramble 反义链	
	<400> 207	
	tcgagaaaa aggaatctca ttcgatgcat tctctgaaa tgcacgaat gagattcca	59
	<210> 208	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> shEIF4E的正向引物	
	<400> 208	
[0061]	ggccgaggcc tctgggccc gctctagaga tccgac	36
	<210> 209	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> shEIF4E的反向引物	
	<400> 209	
	cgagtactag gatccattag gcgg	24
	<210> 210	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> EIF4E正向引物	

	<400> 210 tggcgactgt cgaaccg	17
	<210> 211 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> EIF4E反向引物	
	<400> 211 agattccggt ttctcctt ctgtag	26
	<210> 212 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0062]	<220> <223> GAPDH正向引物	
	<400> 212 gaaggtgaag gtcggagtca acg	23
	<210> 213 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <223> GAPDH正向引物	
	<400> 213 gaagatggtg atgggatttc c	21
	<210> 214	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 错配ASO	
	<400> 214	
	gatcctttgt taatgttaca	20
	<210> 215	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> ERBB4正向引物	
[0063]	<400> 215	
	cagtcagtgt gtgcaggaac	20
	<210> 216	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> ERBB4反向引物	
	<400> 216	
	agcctgtgac ttctcgaaca	20
	<210> 217	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> TTC28正向引物	

	<400> 217		
	ctcatgggaa tctgggctct	20	
	<210> 218		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> TTC28反向引物		
	<400> 218		
	tgatgaagct gcctctcgat	20	
	<210> 219		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0064]	<220>		
	<223> 加扰的ASO-2		
	<400> 219		
	taaggctatg aagagatacg	20	
	<210> 220		
	<211> 156		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> ADK-WT-UTR有义		
	<400> 220		
	gggccgcccg cgcgcggggt gtgtaaggac gagctctccg acgctgagtg ccagagctag	60	
	ggagcagttg ctgtggtacc tactgctacc tgggcagacg ctgagcatcg gacatcaggc	120	

	gcggggcgct gcggtgcggg acgggtaggt gcagtc	156
	<210> 221	
	<211> 156	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> ADK-WT-UTR反义	
	<400> 221	
	gactgcacct acccgctccg caccgcagcg cccgcgcct gatgtccgat gctcagcgtc	60
	tgcccaggta gcagtaggta ccacagcaac tgctccctag ctctggcact cagcgtcgga	120
	gagctcgtcc ttacacaccc cgcgcgcggg cggcc	156
[0065]	<210> 222	
	<211> 122	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> ADK-缺失-UTR有义	
	<400> 222	
	gggccgcccg cgcgcggggt gtgtaaggac gagctctccg acgctgagtg ccagagctag	60
	ggagcagttg ctgtgtacc tactgctacc tgggcagacg ctgagcatcc gctgctgcag	120
	tc	122
	<210> 223	
	<211> 122	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> ADK-缺失-UTR反义	

	<400> 223		
	gactgcagca gcggatgctc agcgtctgcc caggtagcag taggtaccac agcaactgct	60	
	ccctagctct ggcaactcagc gtcggagagc tcgtccttac acaccccgcg cgcggggcggc	120	
	cc	122	
	<210> 224		
	<211> 223		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> CREB1-WT-UTR有义		
	<400> 224		
	tcggcactgg gcggcgctgg ctggctccct ggctgcggct cctcagtcgg cggcggctgc	60	
[0066]	tgctgcctgt ggcccgggcg gctgggagaa gcggagtgtt ggtgagtgac gcggcggagg	120	
	tgtagtttga cgcggtgtgt tacgtggggg agagaataaa actccagcga gatccgggcc	180	
	gcgaacgaaa gcagtgacgg aggagcttgt accaccggtg tcc	223	
	<210> 225		
	<211> 223		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> CREB1-WT-UTR反义		
	<400> 225		
	ggataccggt ggtacaagct cctccgtcac tgcttctgtt cgcggcccgg atctcgtgg	60	
	agttttattc tctccccac gtaacacacc gcgtcaaact acacctccgc cgcgtcactc	120	
	accaacactc cgcttctccc agccgcccgg gccacaggca gcagcagccg ccgcccgactg	180	

	aggagccgca gccagggagc cagccagcgc cgcccagtgc cga	223
	<210> 226	
	<211> 179	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> CREB1-缺失1-UTR有义	
	<400> 226	
	tcctggctcc ctggctgcgg ctctcagtc ggcggcggct gctgctgct gtggcccgtg	60
	agtgacgcgg cggaggtgta gttgacgcg gtgtgttacg tgggggagag aataaaactc	120
	cagcgagatc cgggccgcga acgaaagcag tgacggagga gcttgtacca ccggtatcc	179
	<210> 227	
	<211> 179	
[0067]	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> CREB1-缺失1-UTR反义	
	<400> 227	
	ggataccggt ggtacaagct cctccgtcac tgctttcgtt cgcgccccgg atctcgctgg	60
	agttttattc tctccccac gtaacacacc gcgtaaact acacctccgc cgcgtcactc	120
	acgggccaca ggcagcagca gccgcccgg actgaggagc cgcagccagg gagccagga	179
	<210> 228	
	<211> 212	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> CREB1-缺失2-UTR有义	

	<400> 228		
	tcggcactgg gcggcgctgg ctggctccct ggctgcggct cctcagtcgg cggcggctgc	60	
	tgctgcctgt ggcccgggcg gctgggagaa gcggagtgtt ggtgagtgac gcggcggagg	120	
	tgtagttga cgcggtgtgt tacgtggggg ctccagcgag atccgggccg cgaacgaaag	180	
	cagtgacgga ggagcttga ccaccggtat cc	212	
	<210> 229		
	<211> 212		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> CREB1-缺失2-UTR反义		
	<400> 229		
[0068]	ggataccggt ggtacaagct cctccgtcac tgcttctgtt cgcggcccg atctcgctgg	60	
	agccccacg taacacaccg cgtaaacta cacctccgcc gcgtcactca ccaactcc	120	
	gcttctcca gccgcccggg ccacaggcag cagcagccgc cgccgactga ggagccgag	180	
	ccagggagcc agccagcgcc gccagtgcc ga	212	
	<210> 230		
	<211> 193		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> CREB1-缺失3-UTR有义		
	<400> 230		
	tcggcactgg gcggcgctgg ctggctctca tgctgcctgt ggcccgggcg gctgggagaa	60	
	gcggagtgtt ggtgagtgac gcggcggagg tgtagttga cgcggtgtgt tacgtggggg	120	

	agagaataaa actccagcga gatccgggcc gcgaacgaaa gcagtgacgg aggagcttgt	180
	accaccggt tcc	193
	<210> 231	
	<211> 193	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> CREB1-缺失3-UTR反义	
	<400> 231	
	ggataccggt ggtacaagct cctccgtcac tgcttcggt cgcgcccg atctcgctgg	60
	agttttattc tctccccac gtaacacacc gcgtcaaact acacctccgc cgcgtcactc	120
	accaacactc cgcttctccc agccgcccg gccacaggca gcatgagagc cagccagcgc	180
[0069]	cgcccagtgc cga	193
	<210> 232	
	<211> 103	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> IRSp53-WT-UTR有义	
	<400> 232	
	gtggctctgg tctgcgcgcc ttttctggt gctgcagttg tcgctttcct caccgccacc	60
	cgtgcccctg ctctggtctg tgggtagacc gggaccagg acc	103
	<210> 233	
	<211> 103	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	

<223> IRSp53-WT-UTR反义

<400> 233

ggctctgggt cccggctaca ccacagacca gagcaggggc acgggtggcg gtgaggaaag 60

cgacaactgc agcaacagga aaaggcgcgc agaccaggac cac 103

<210> 234

<211> 88

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IRSp53-缺失-UTR有义

[0070]

<400> 234

gtggctctgg tctgcgcc agttgtcgt ttctcaccg ccaccgtgc cctgctctg 60

gtctgtggtg tagccgggac ccaggacc 88

<210> 235

<211> 88

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IRSp53-缺失-UTR反义

<400> 235

ggctctgggt cccggctaca ccacagacca gagcaggggc acgggtggcg gtgaggaaag 60

cgacaactgg cgcgagacc aggaccac 88

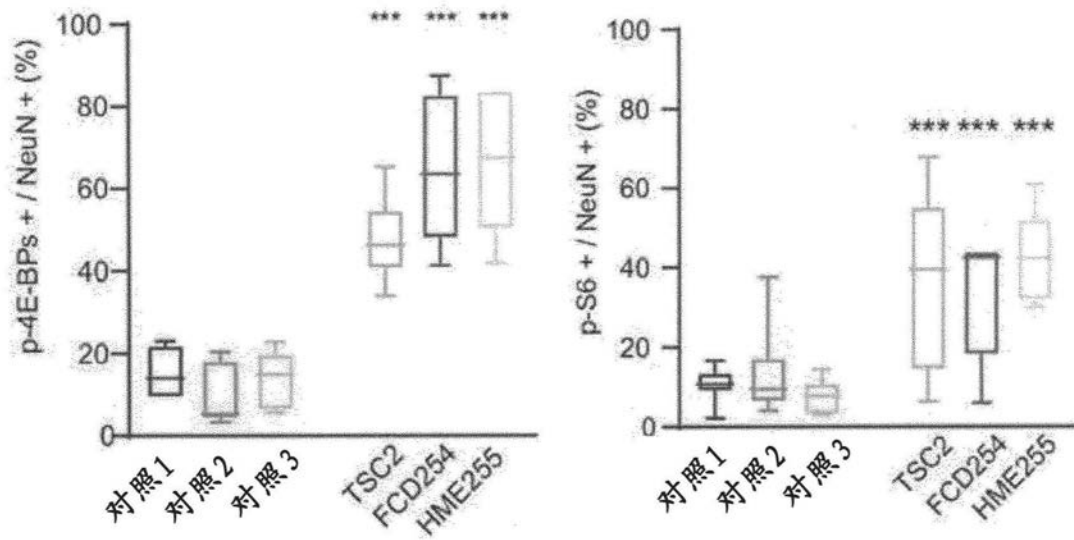


图1

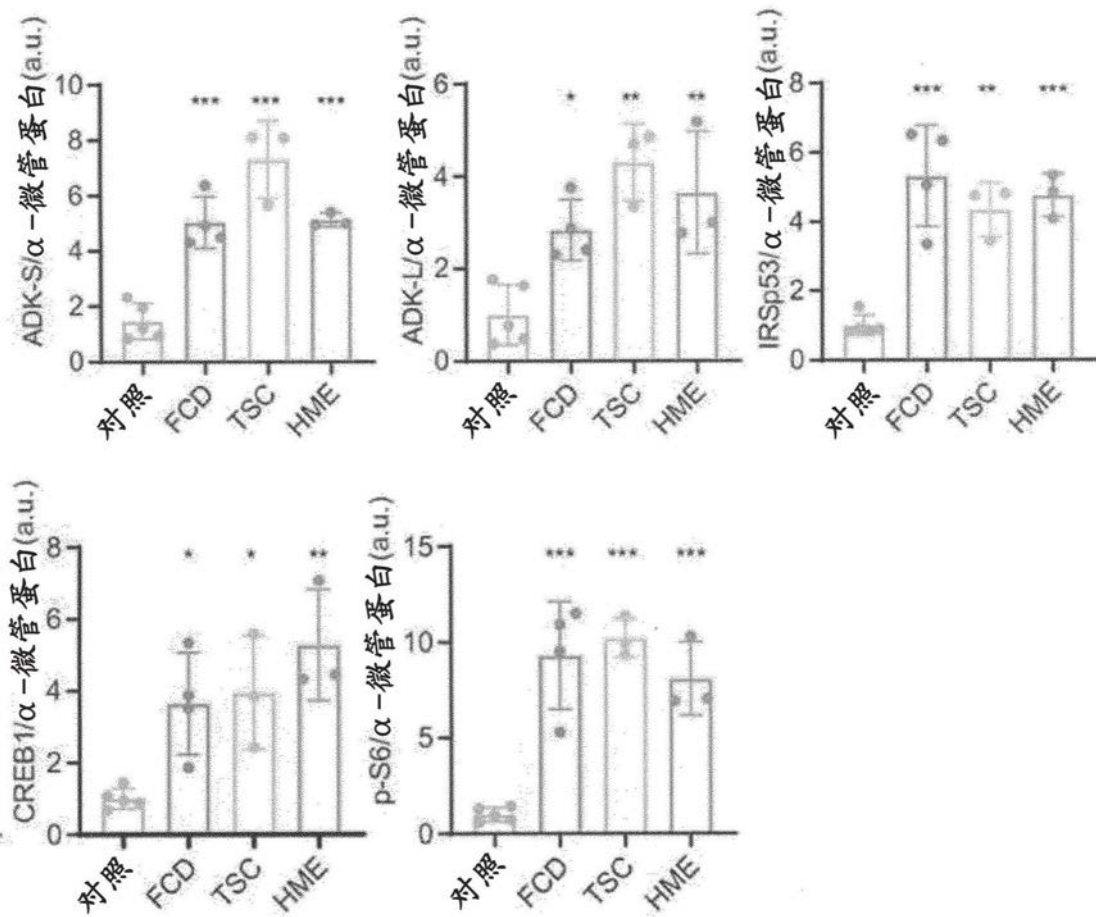


图2

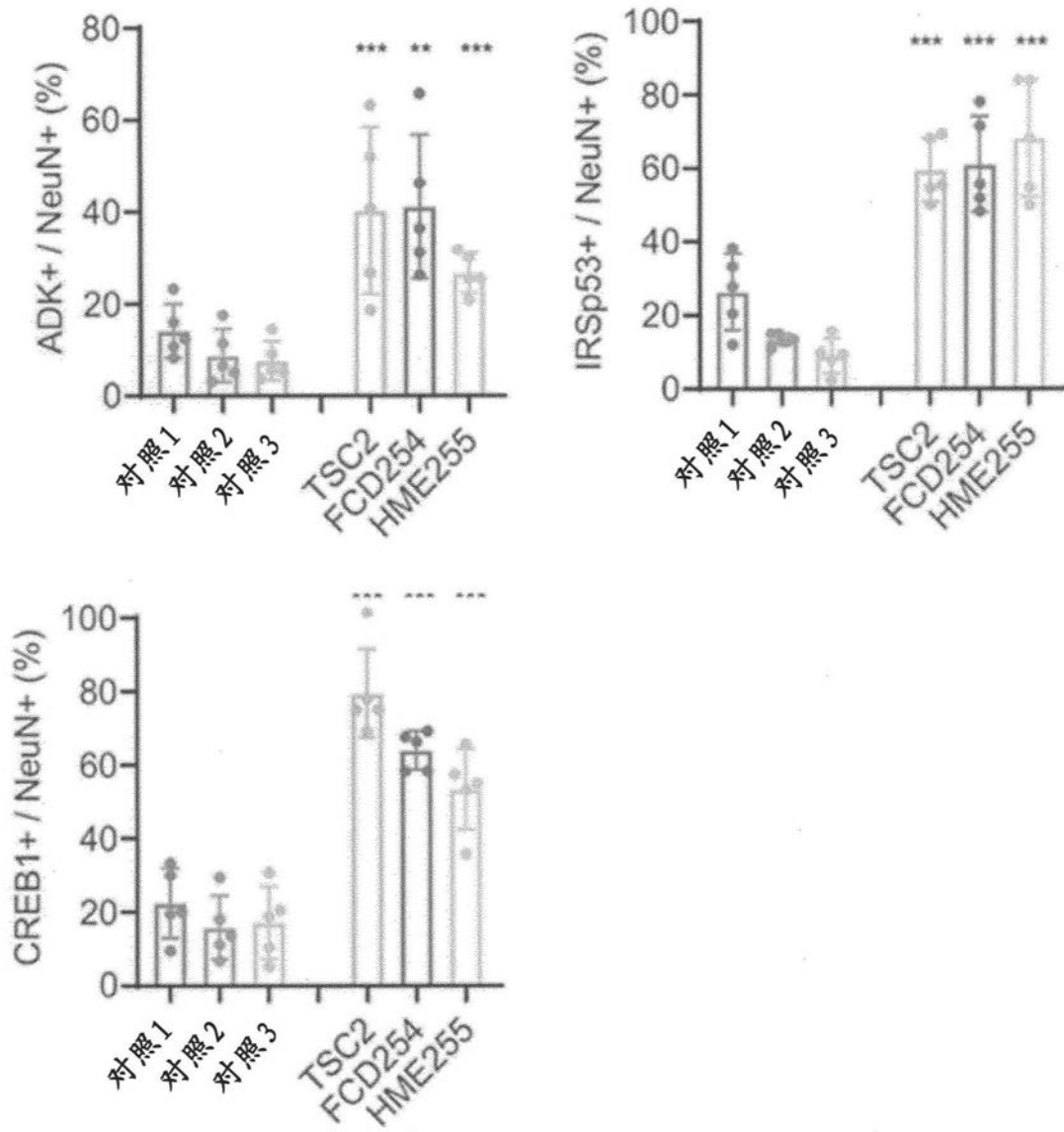


图3

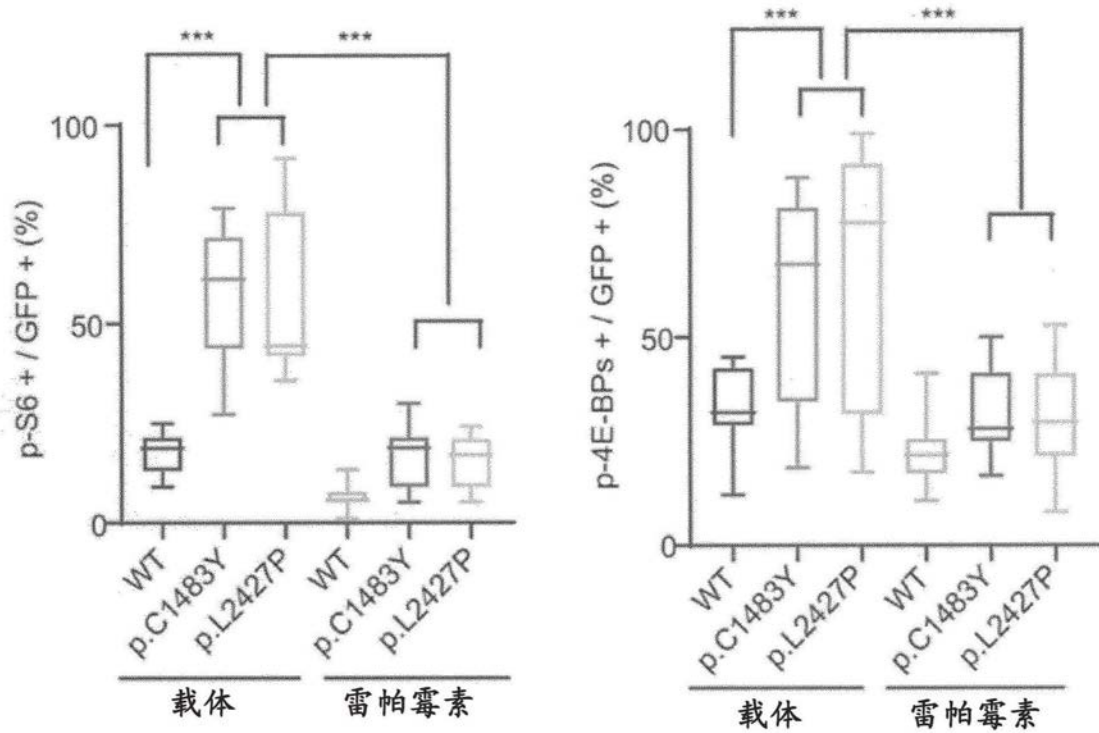


图4

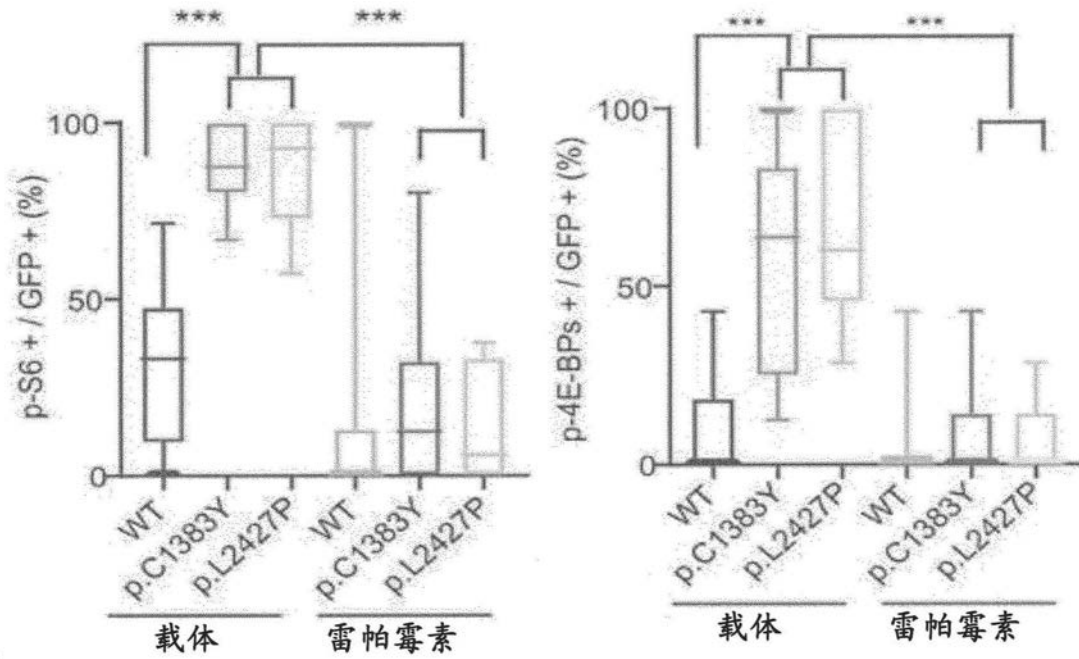


图5

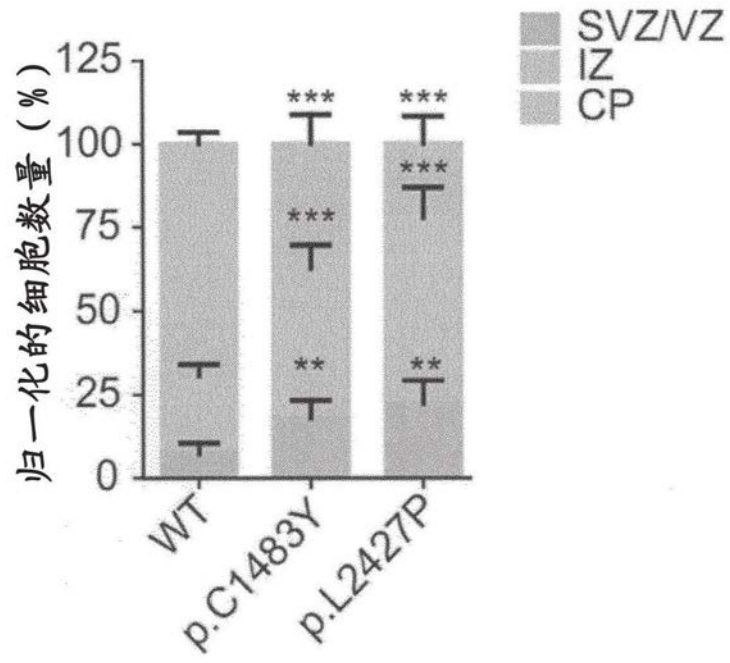


图6

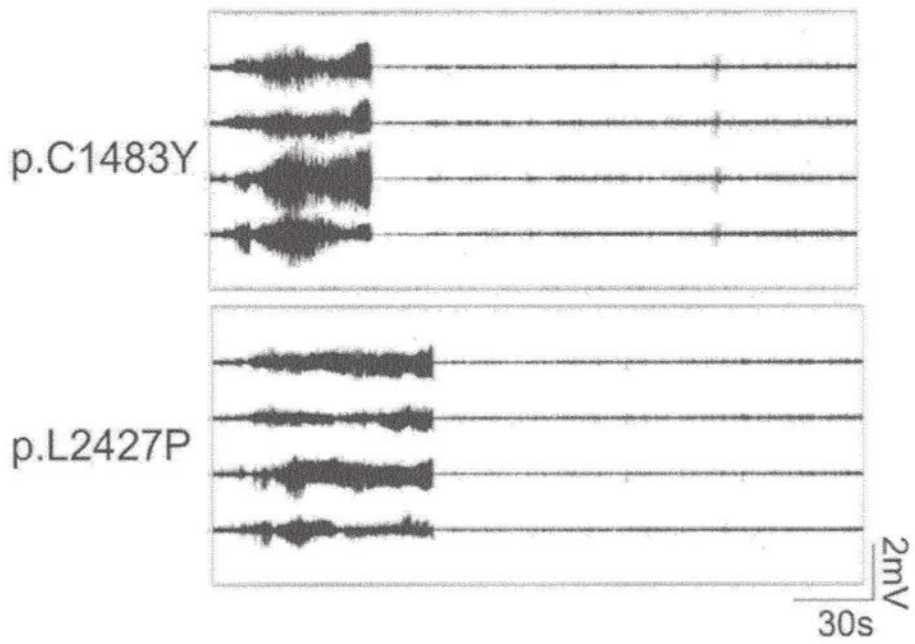


图7

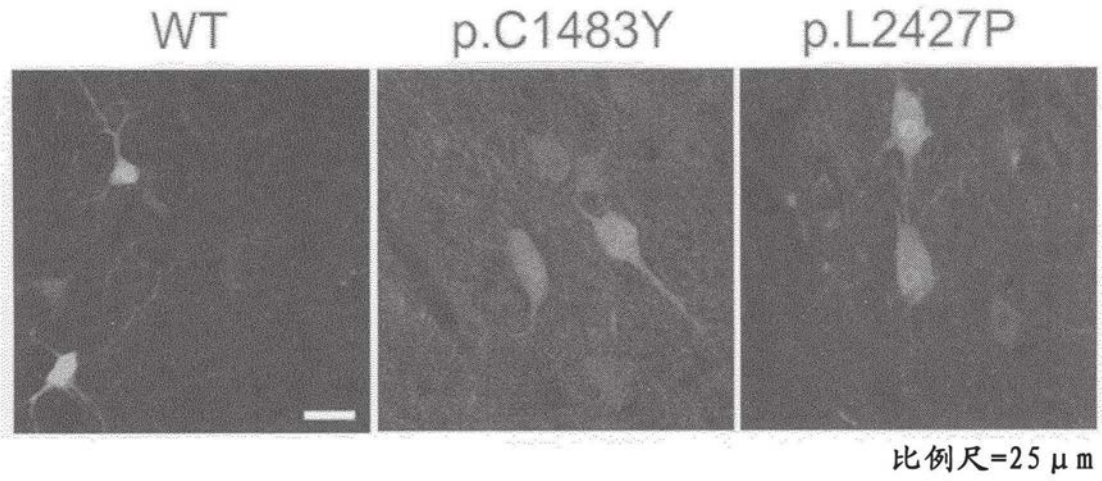


图8



图9a

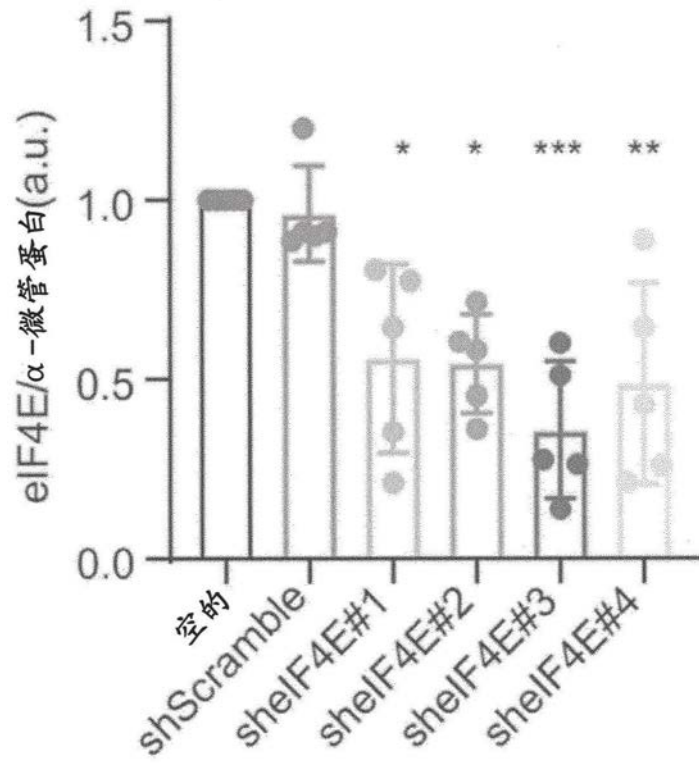


图9b

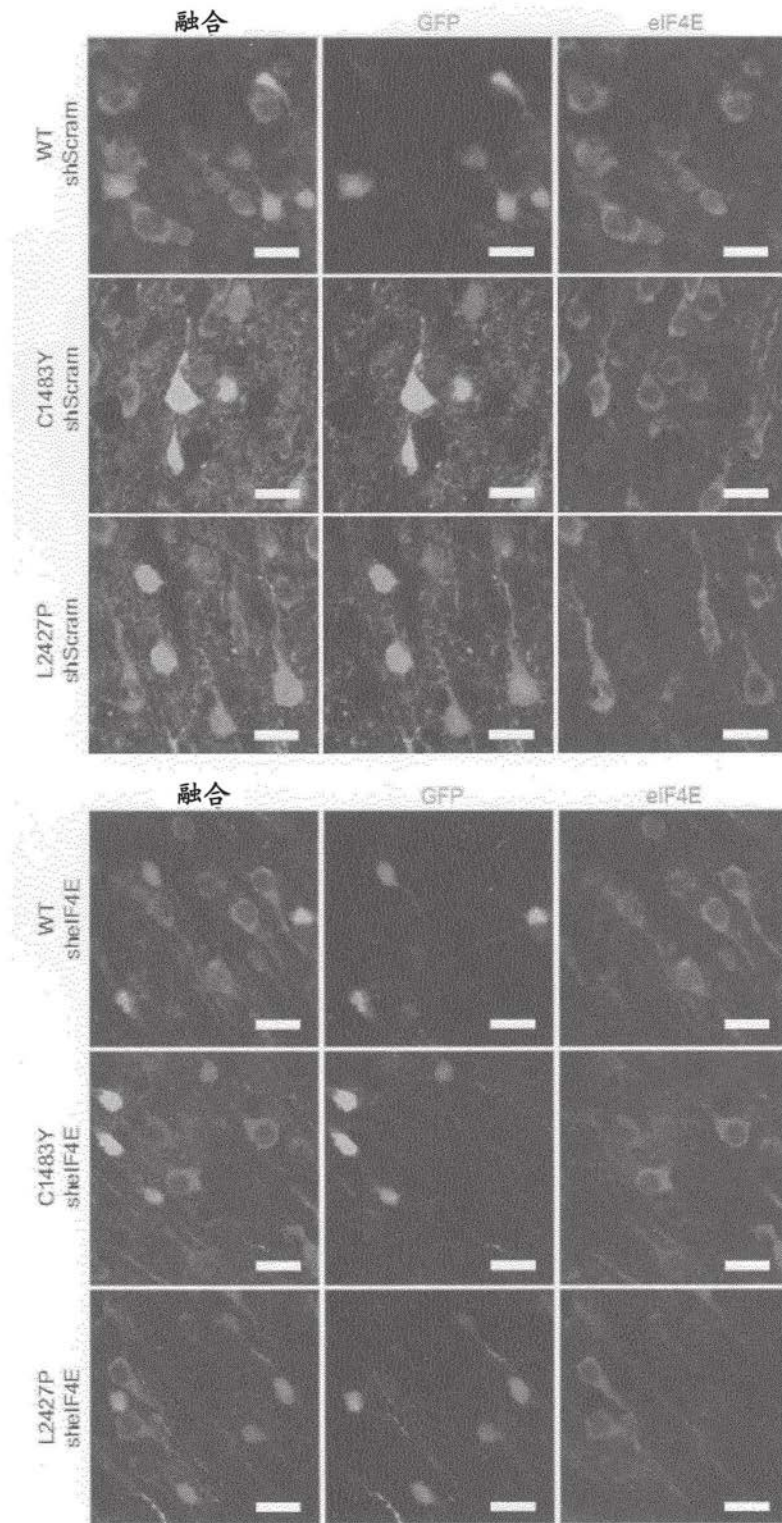


图9c

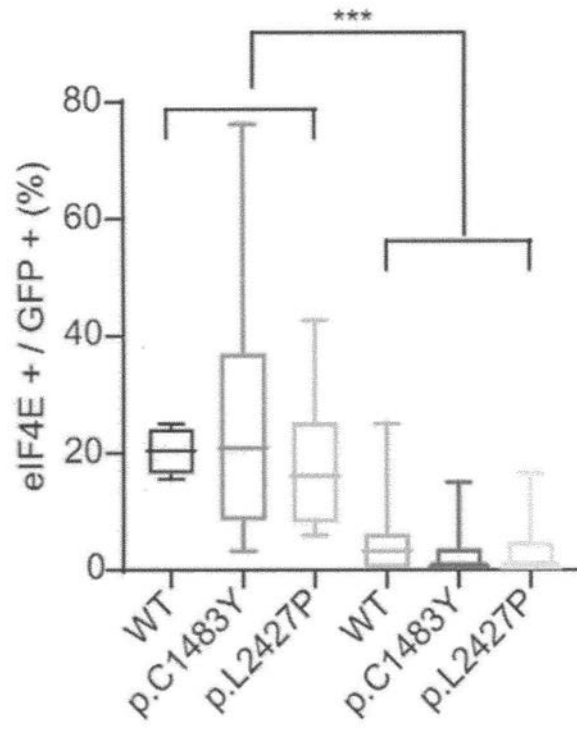


图9d

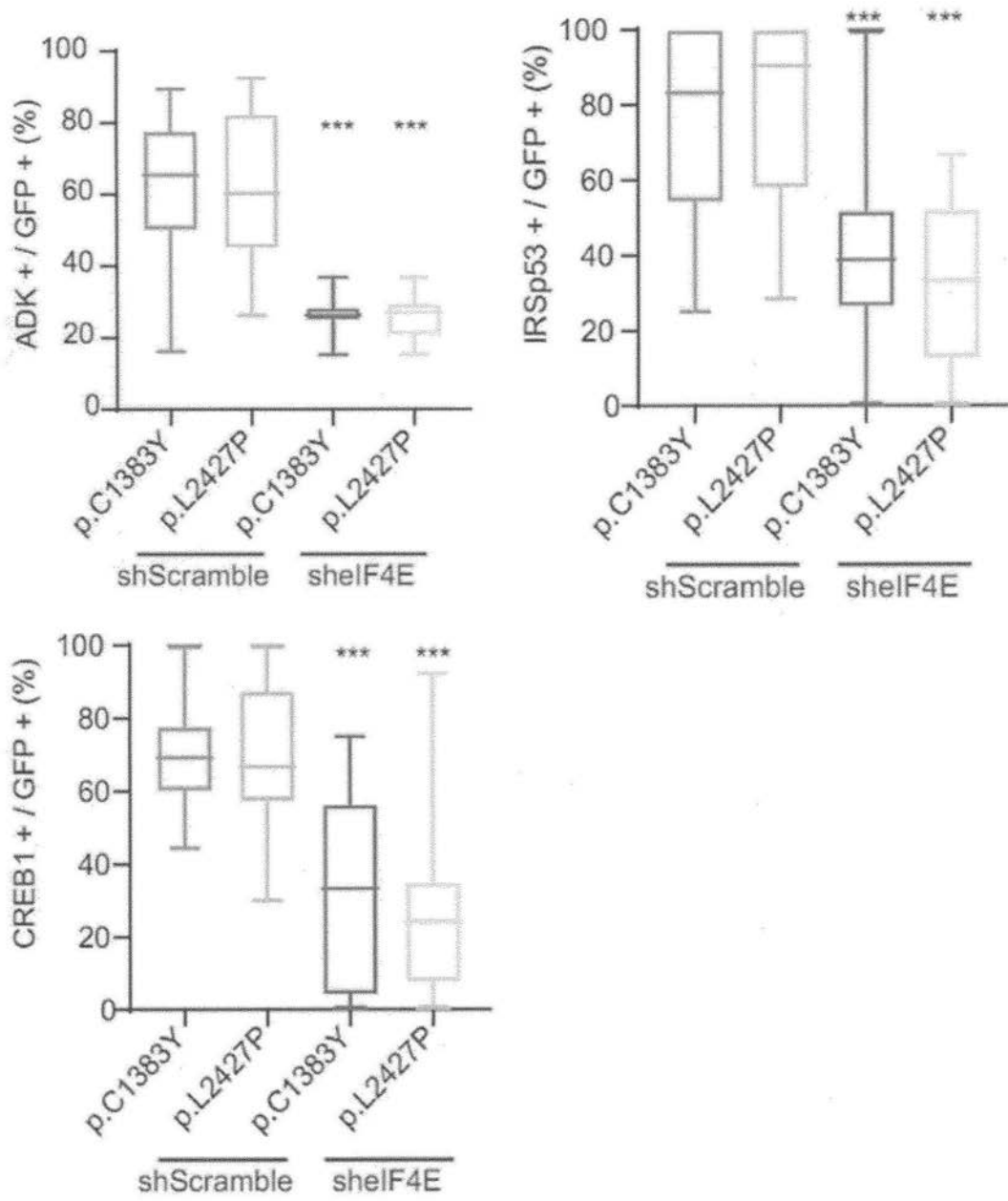


图9e

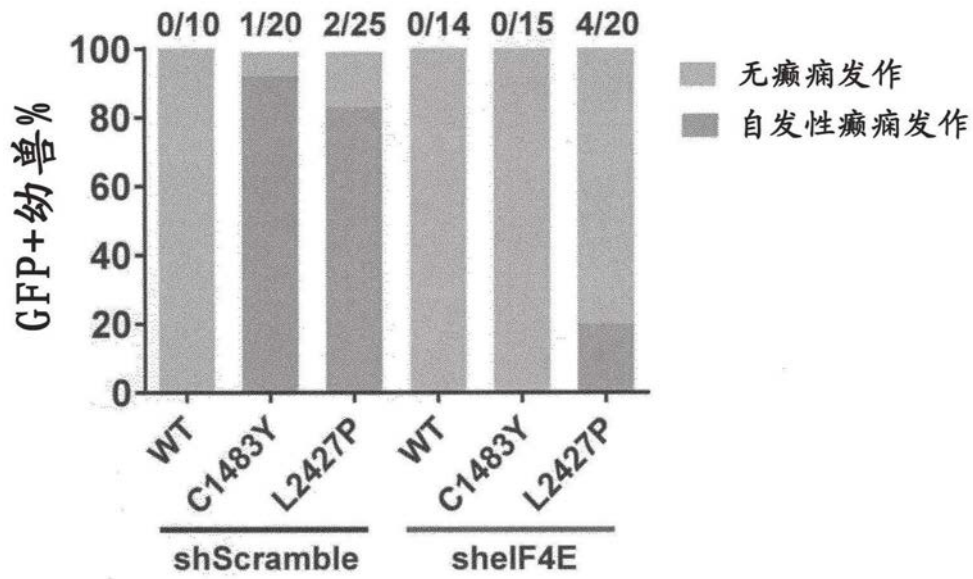


图9f

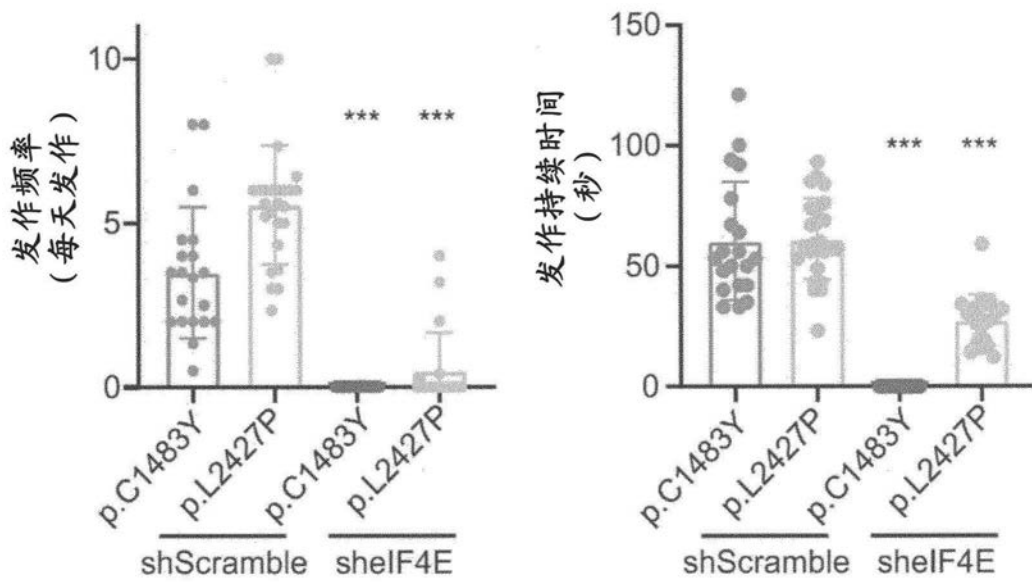


图10

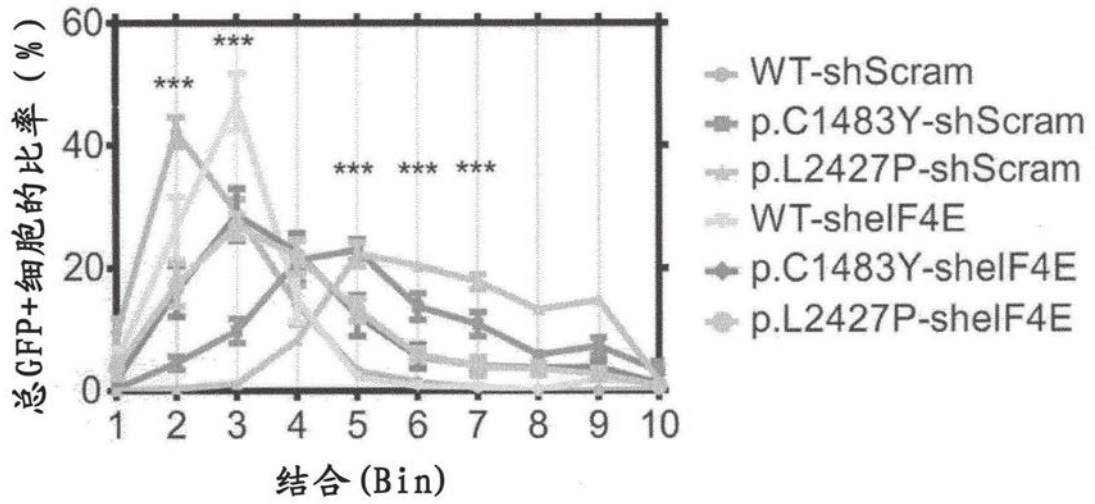


图11

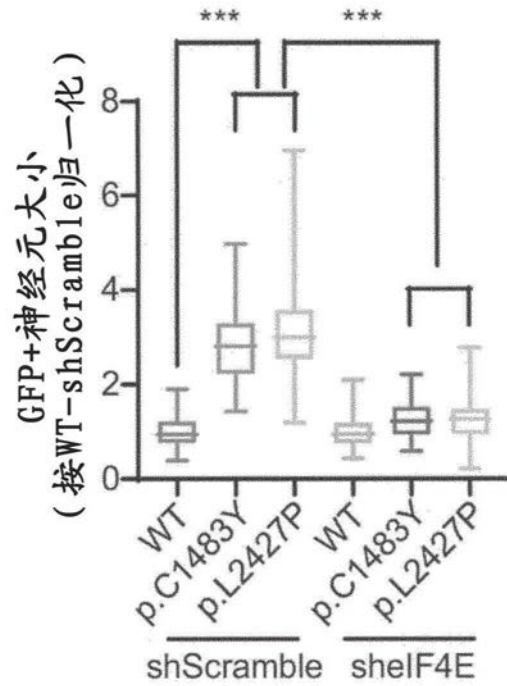


图12

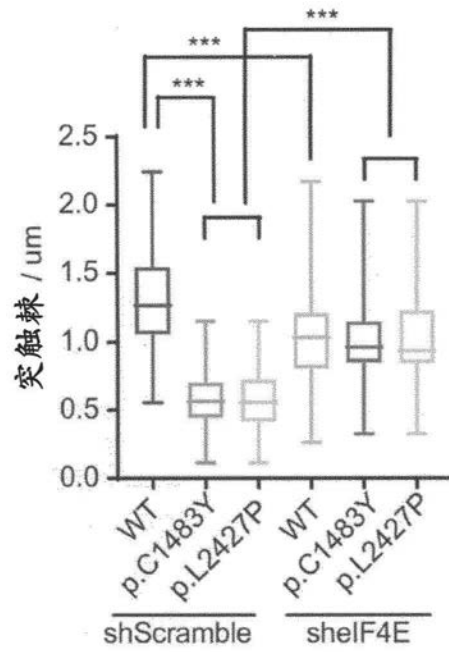


图13

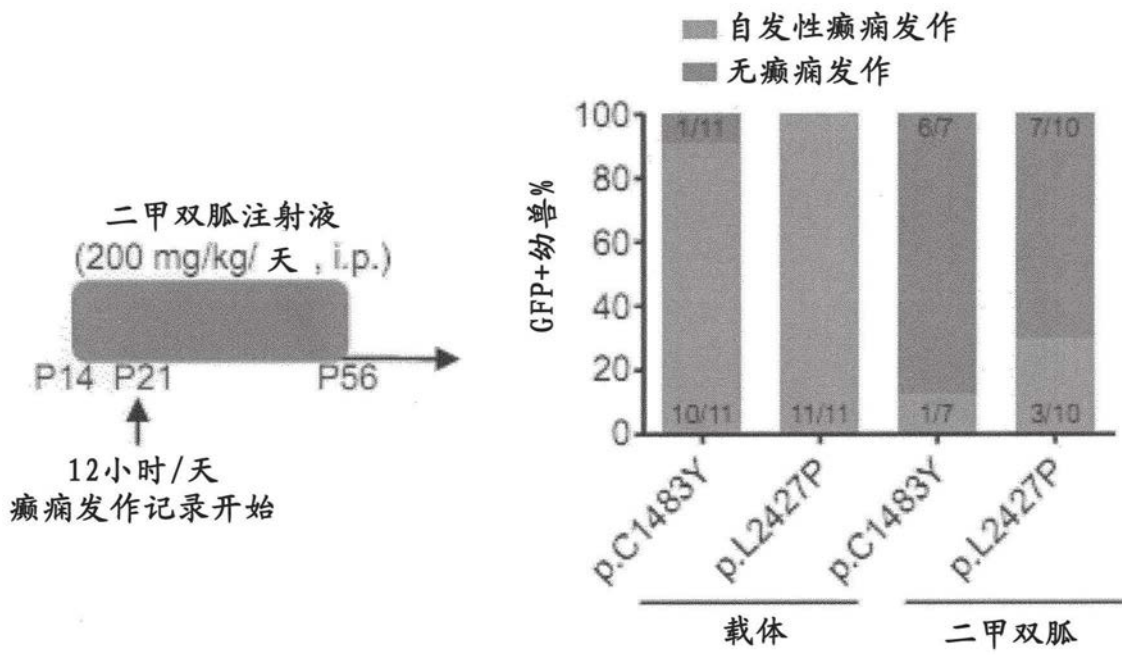


图14

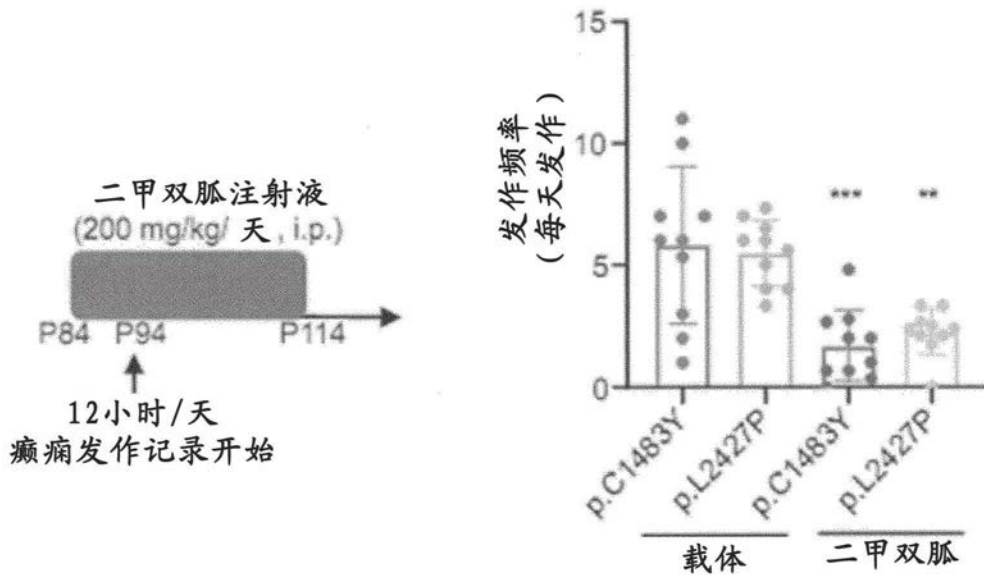


图15

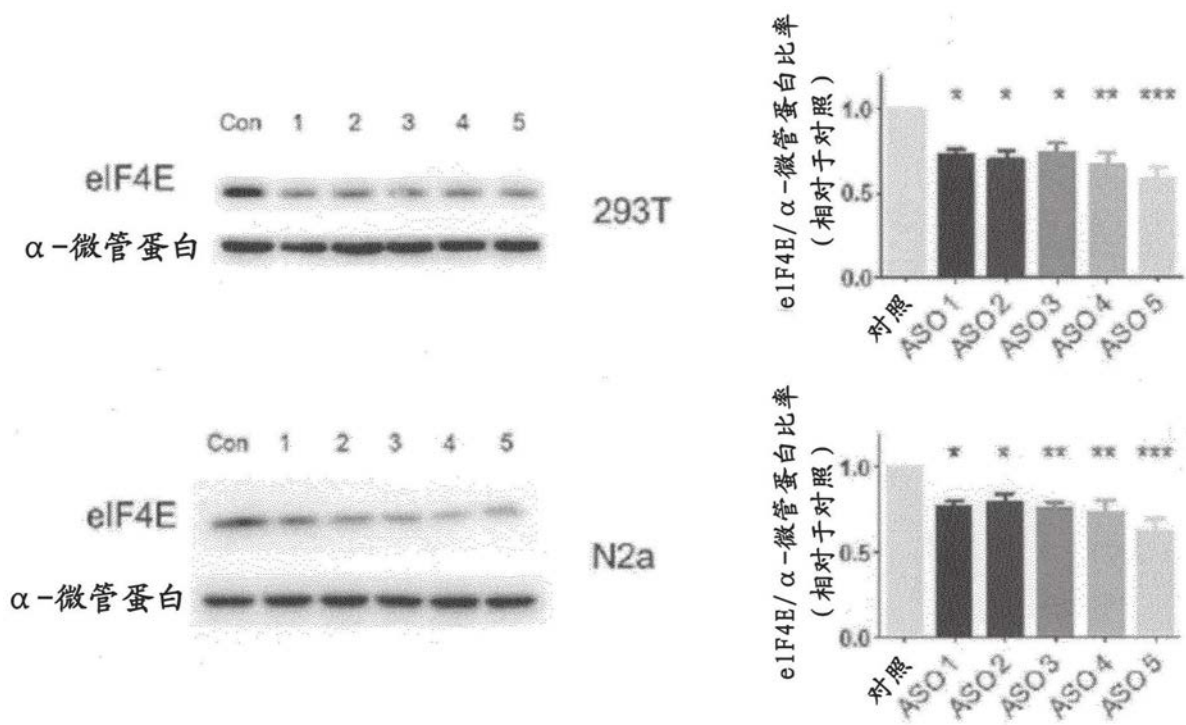


图16a

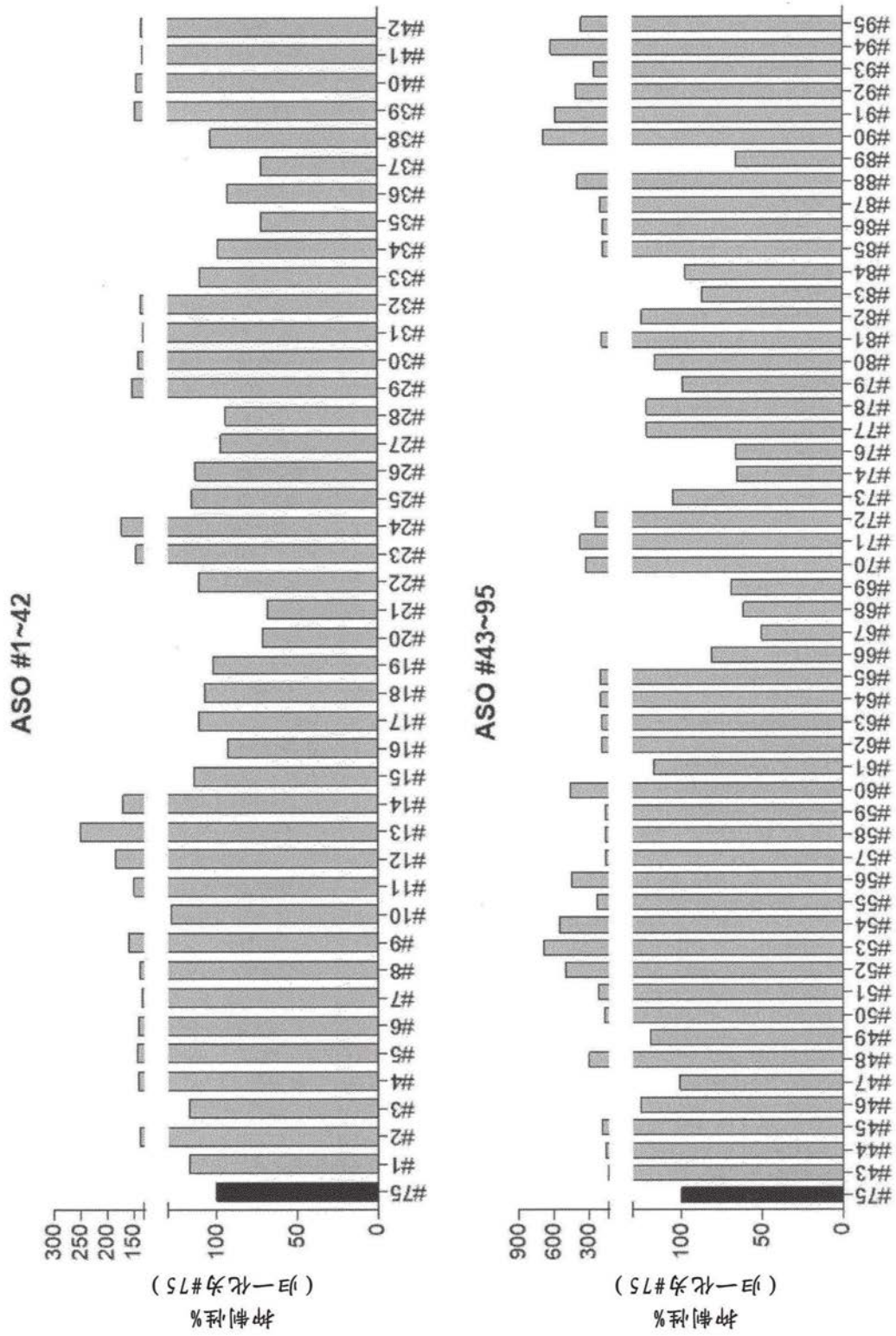


图16b

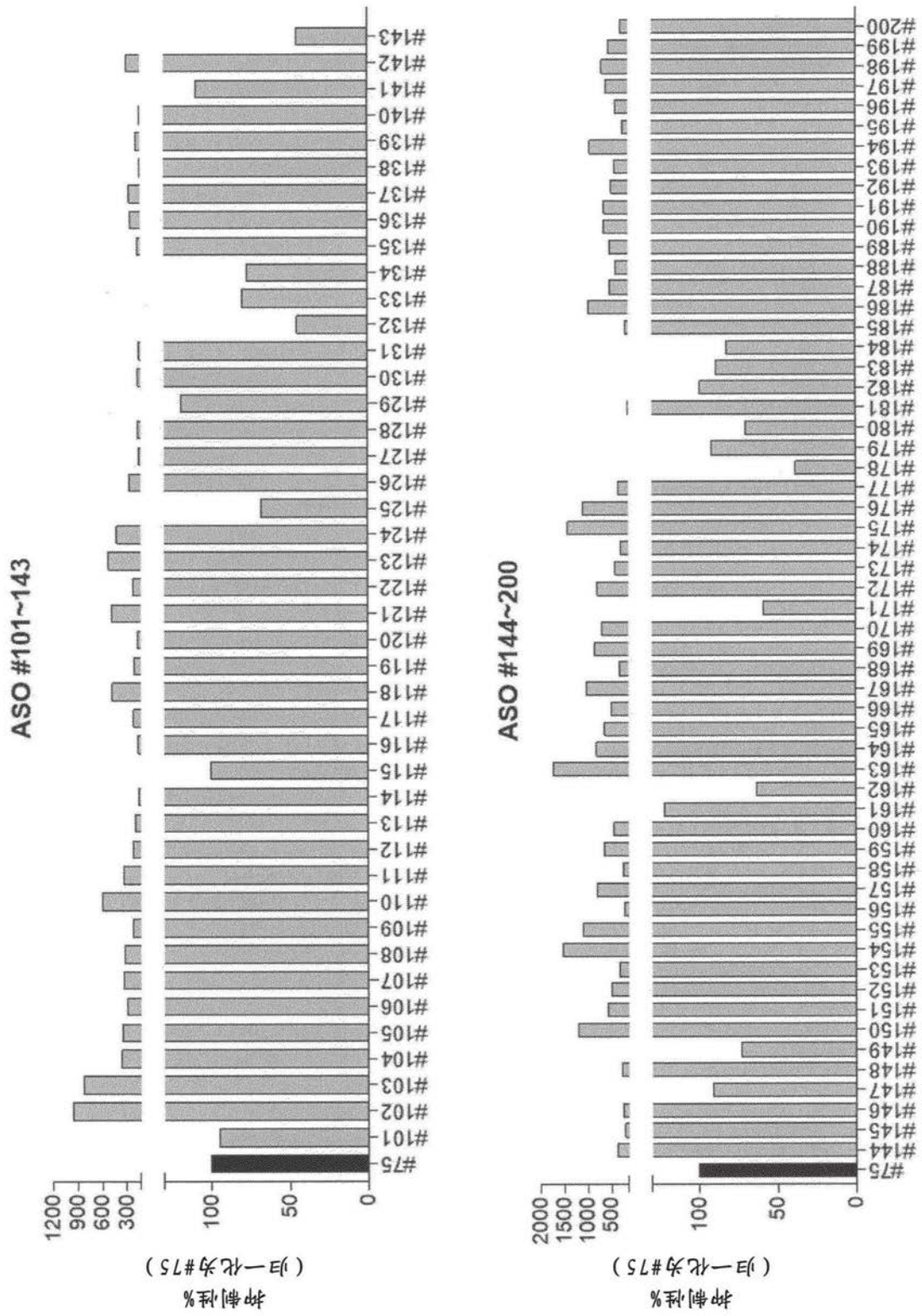


图16c

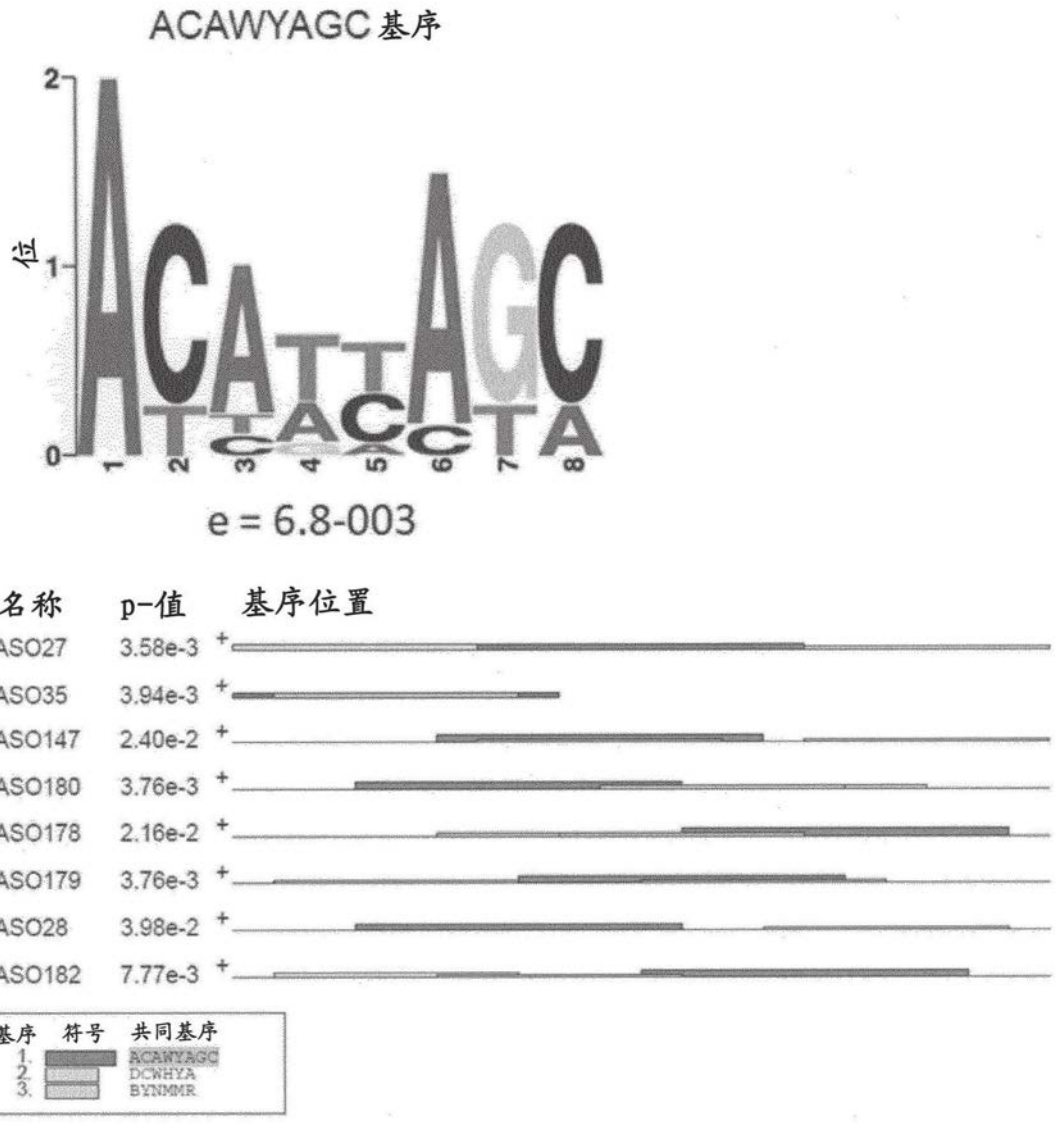
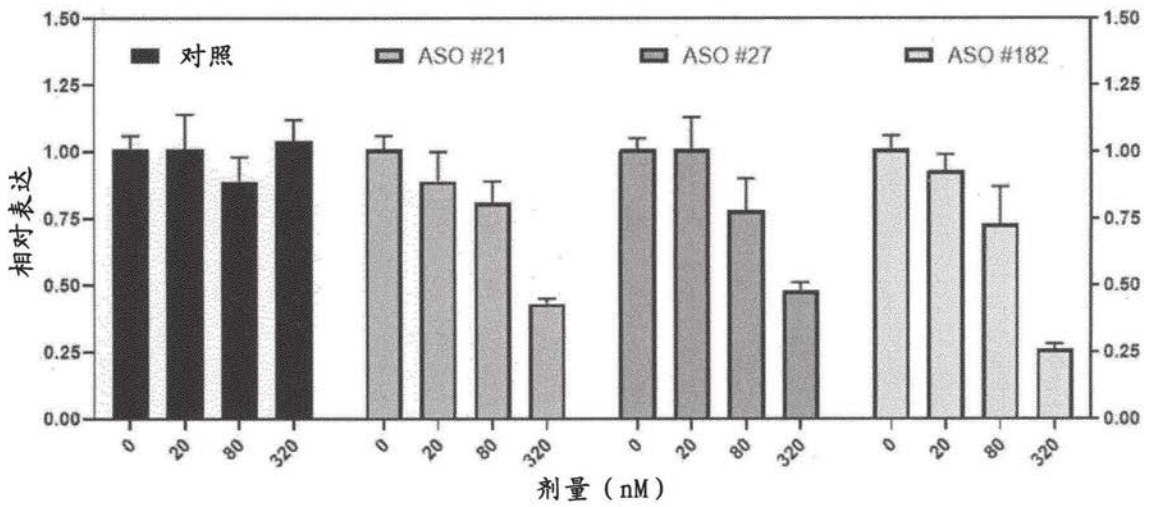
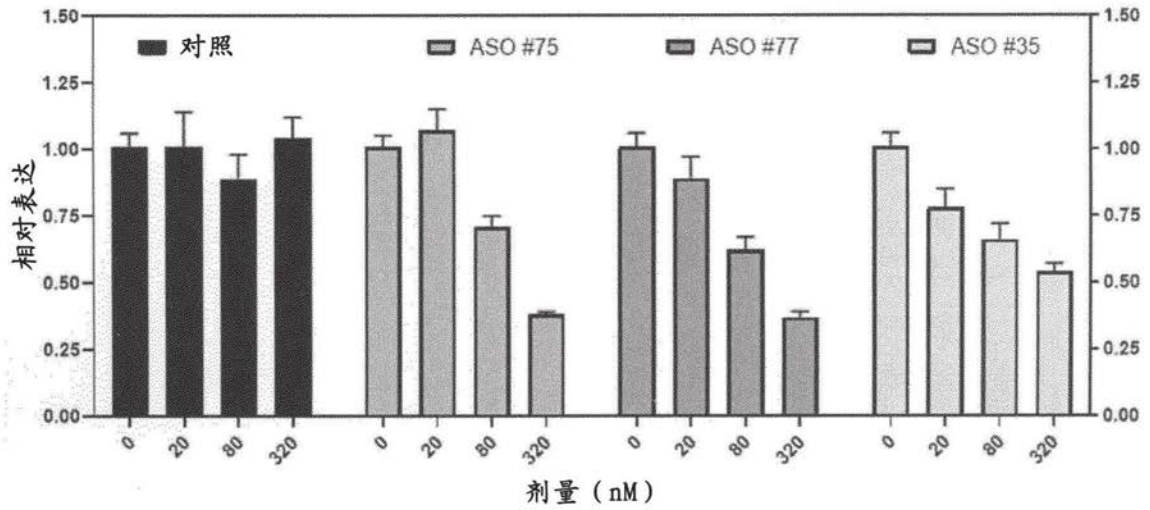


图16d



[抑制剂] 相对于归一化响应	ASO #75	ASO #77	ASO #35	ASO #21	ASO #27	ASO #182
IC50 (nM)	93.93	53.82	22.77	86.69	92.45	91.07

图16e

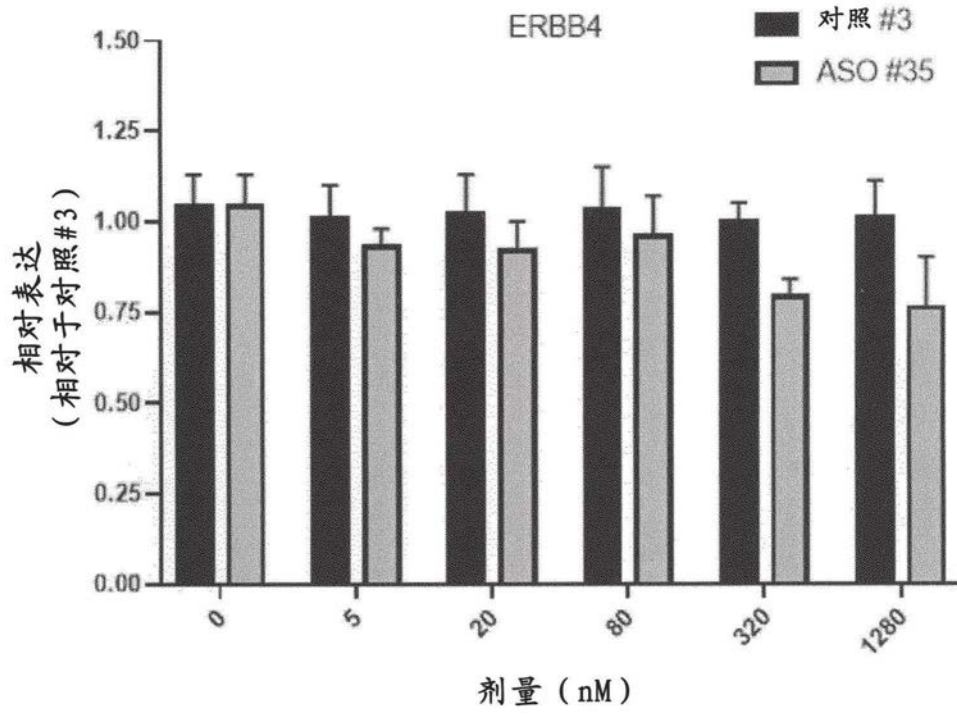


图16f

TTC28 (四肽重复结构域28)

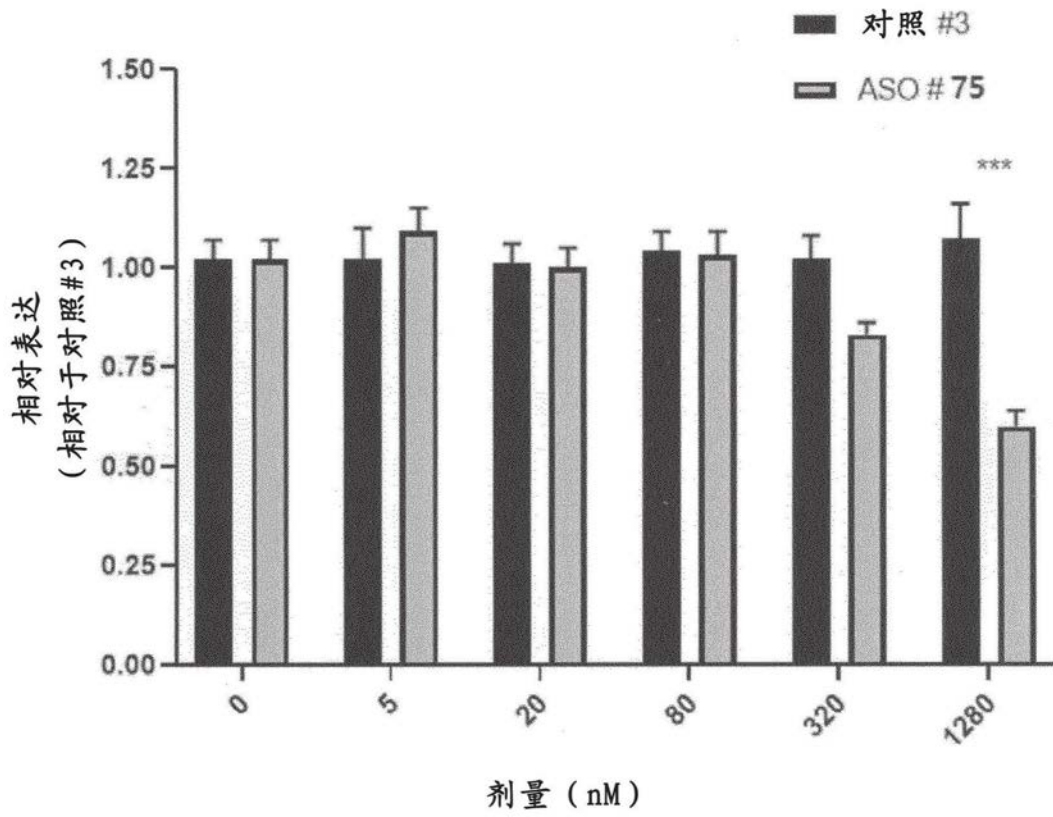
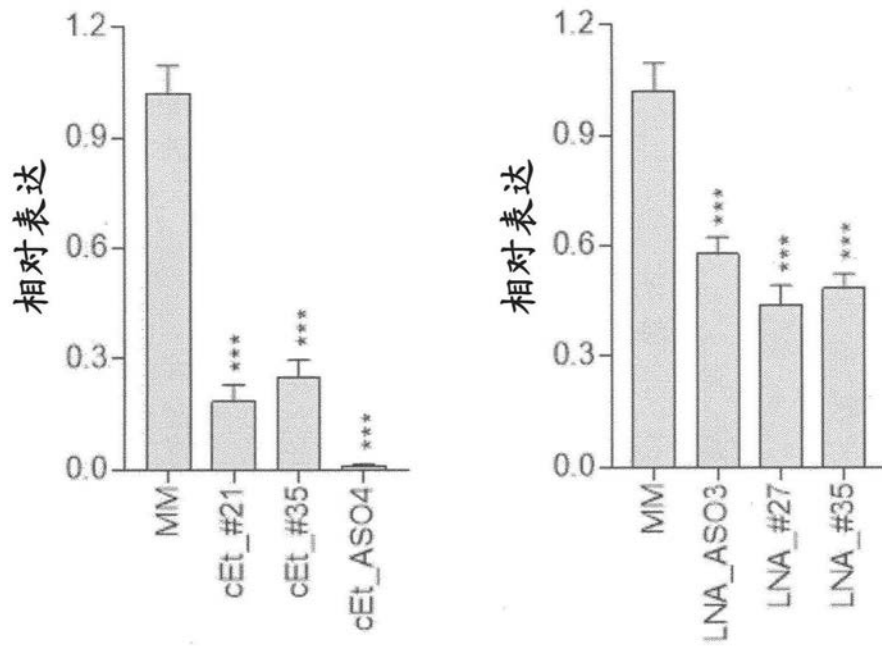


图16g

qPCR



HEK293T 细胞

n=4

MM: 错配对照

单因素方差分析 (Bonferroni事后检验)

图16h

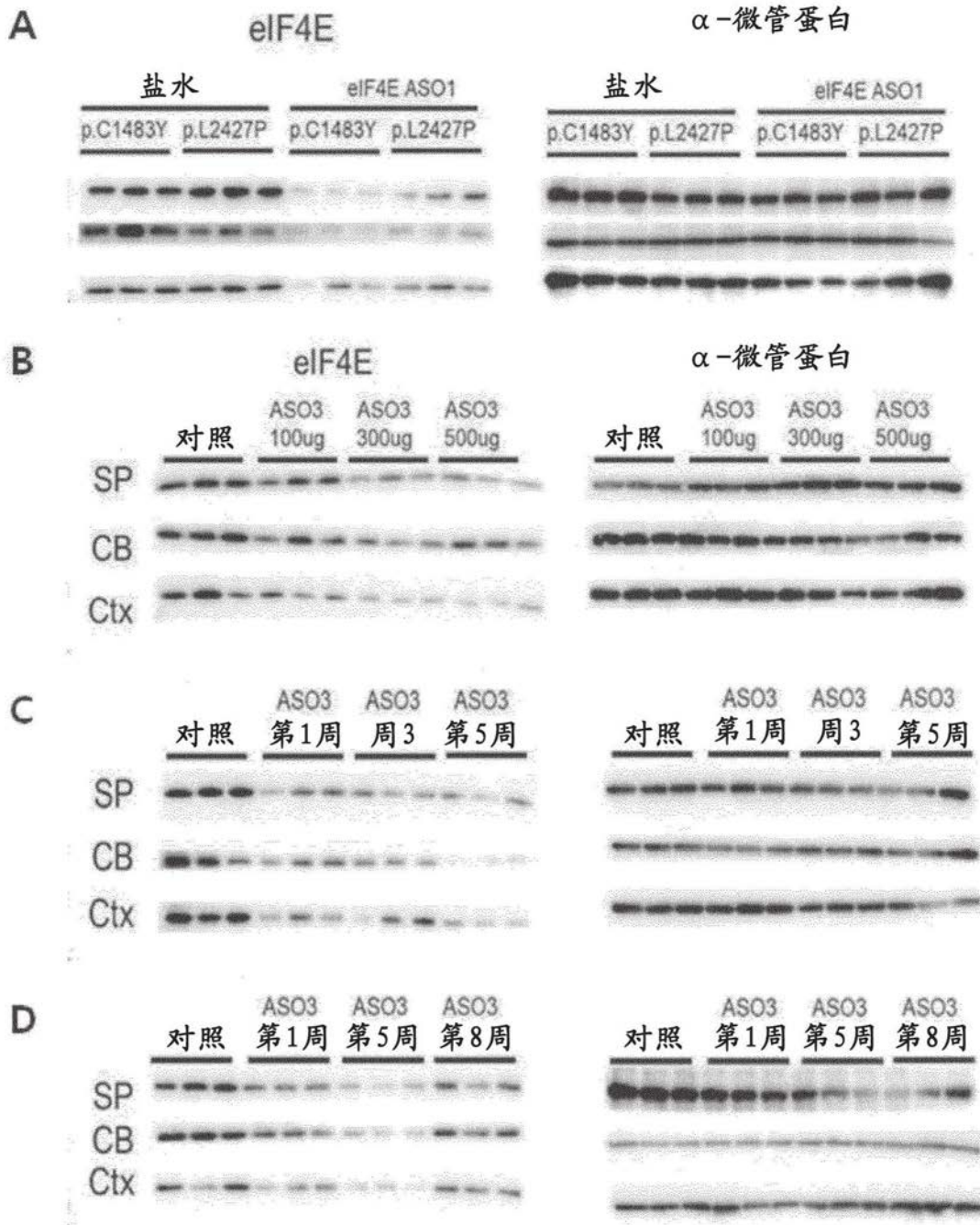


图17

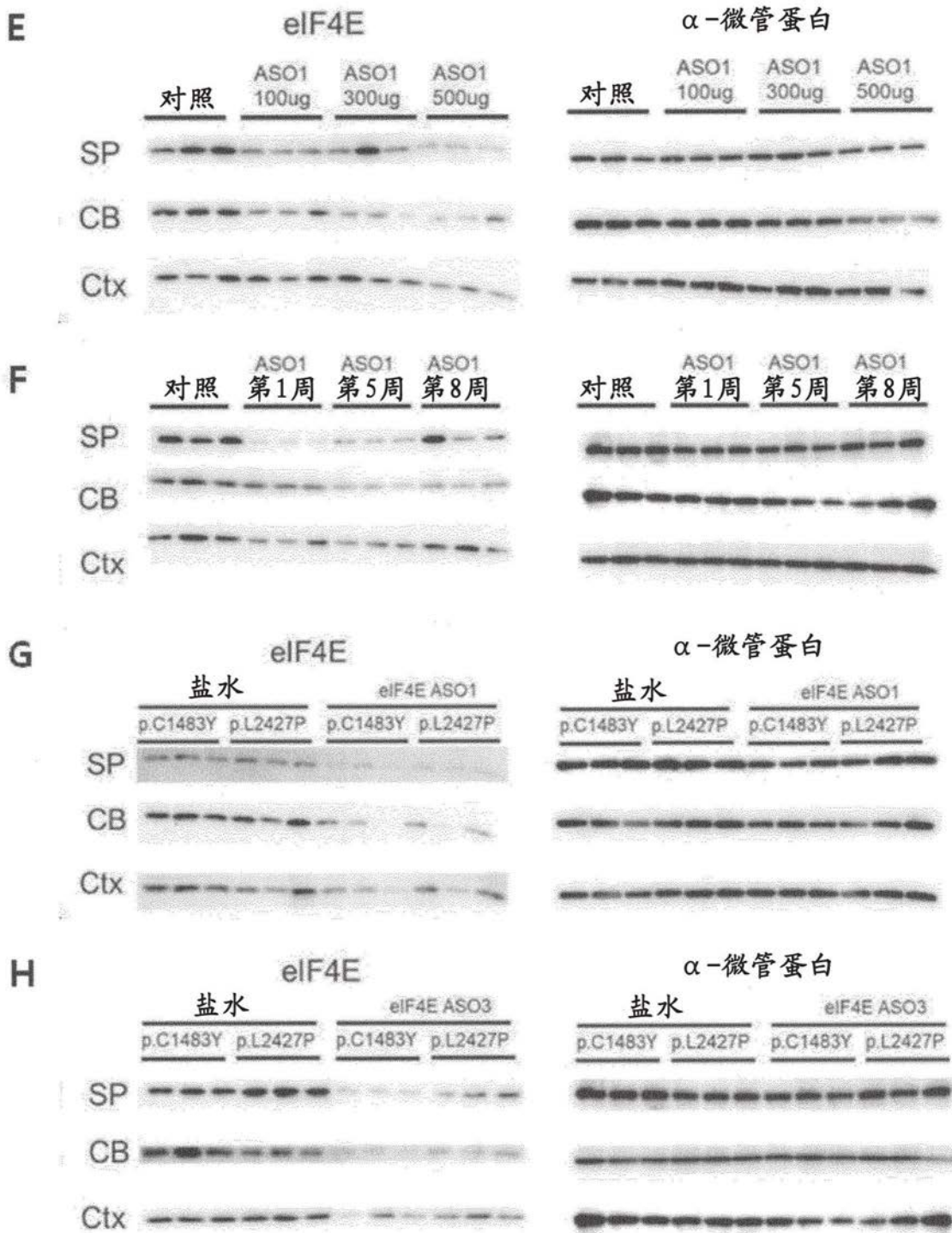


图18

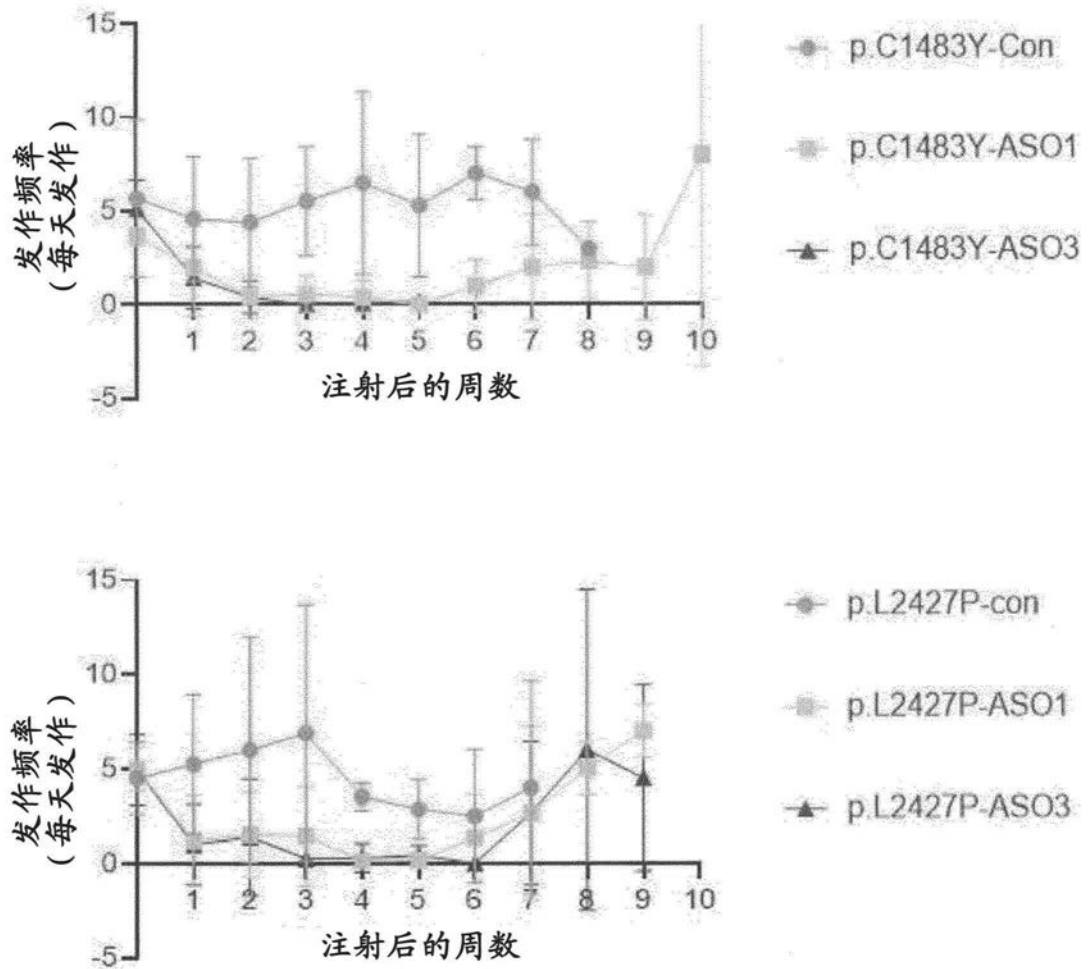


图19

Cy3标记的ASO

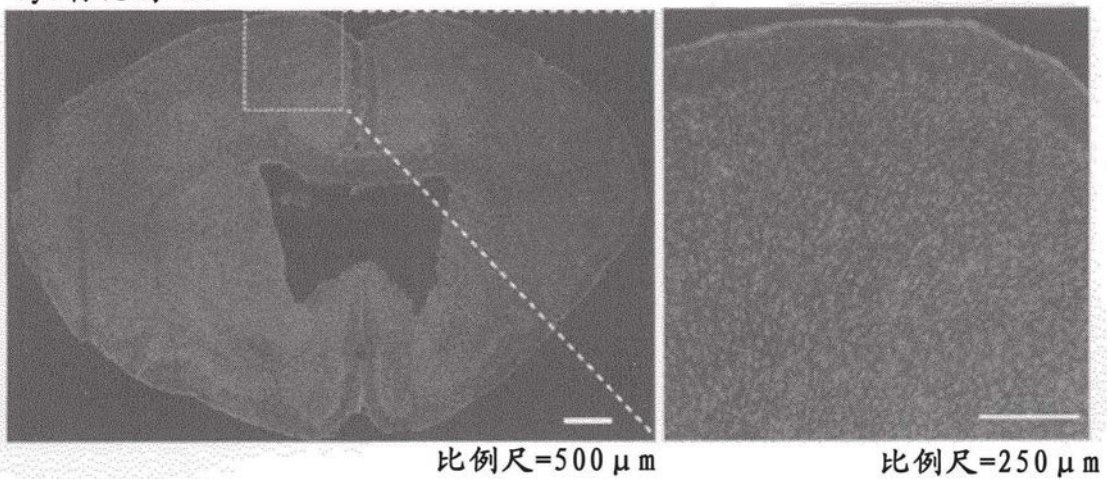


图20a

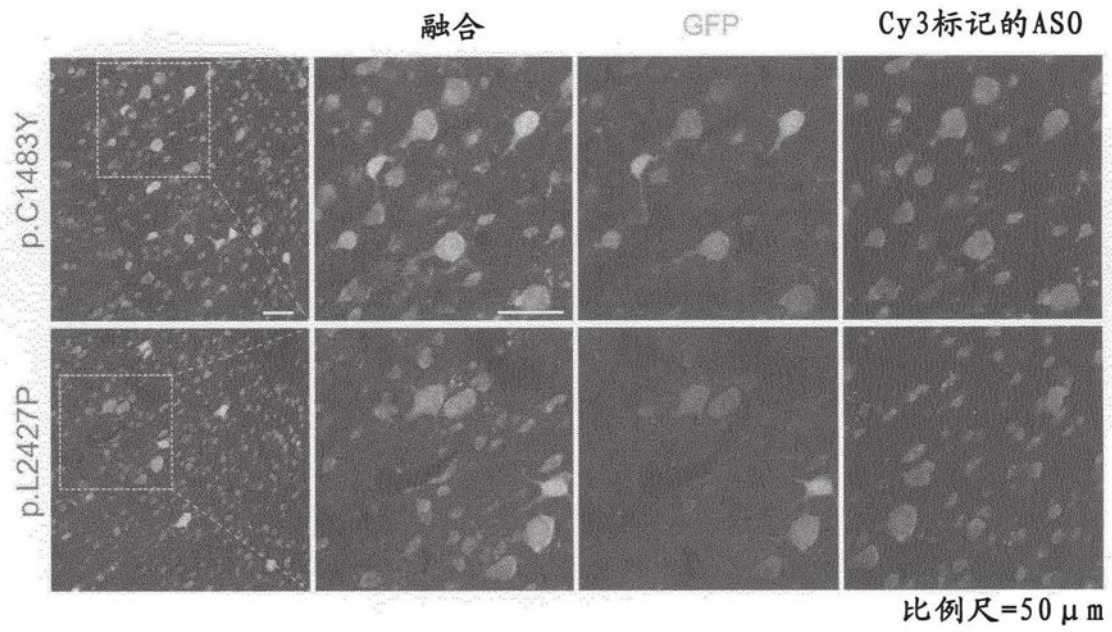


图20b

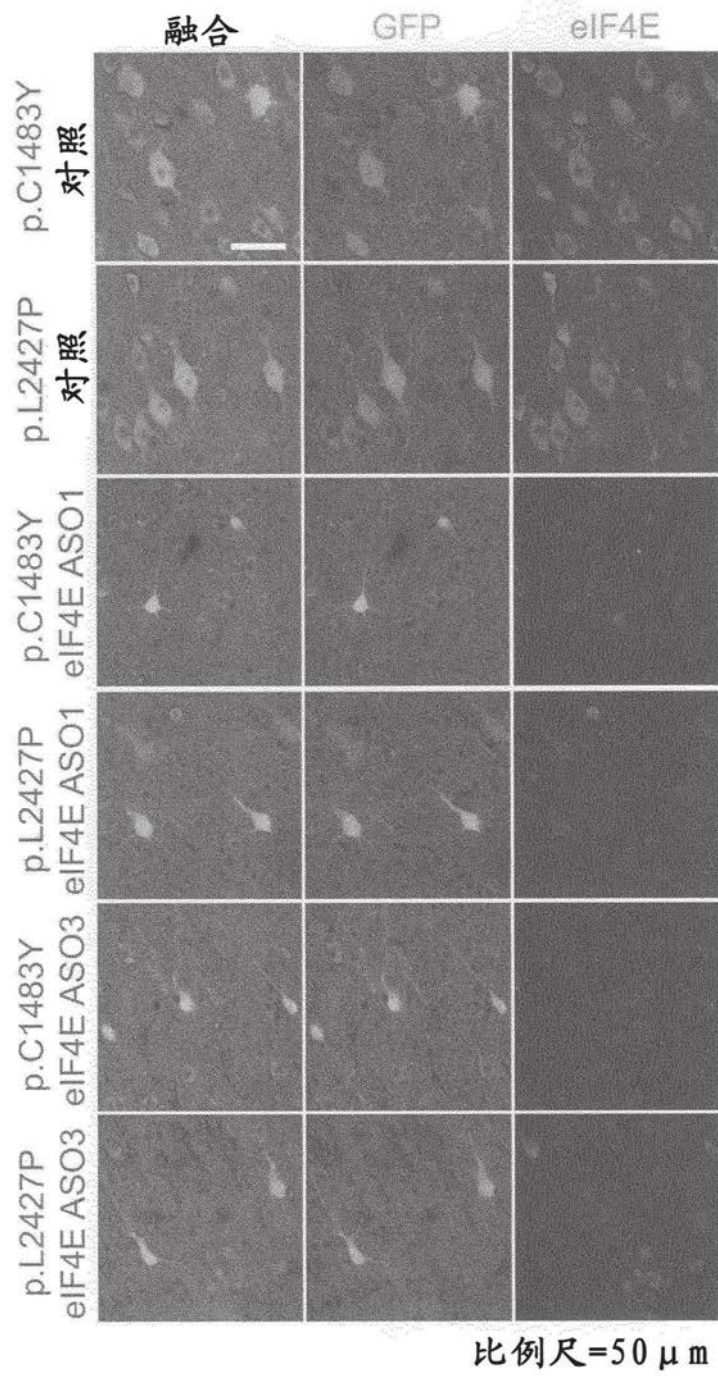


图21a

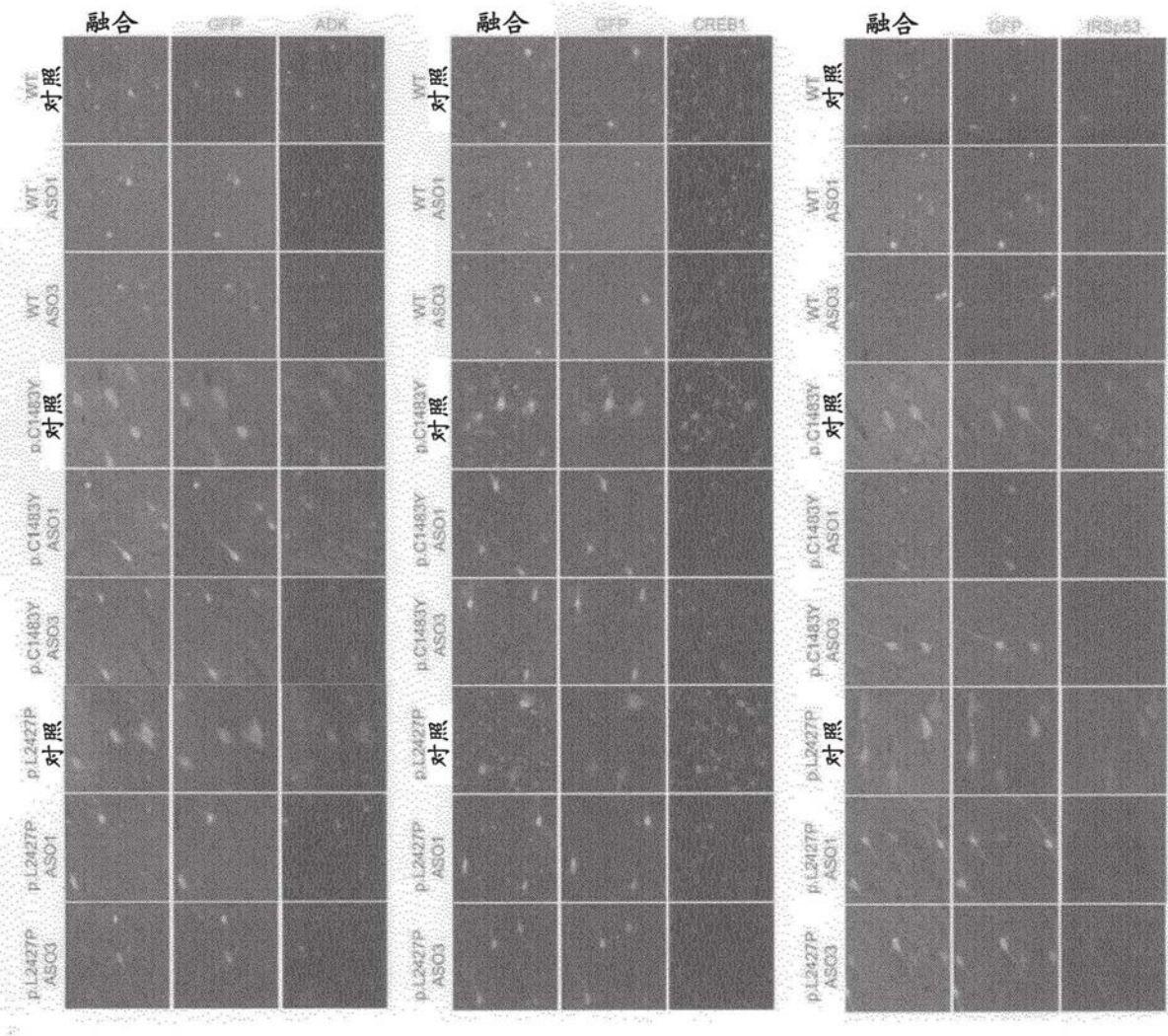


图21b

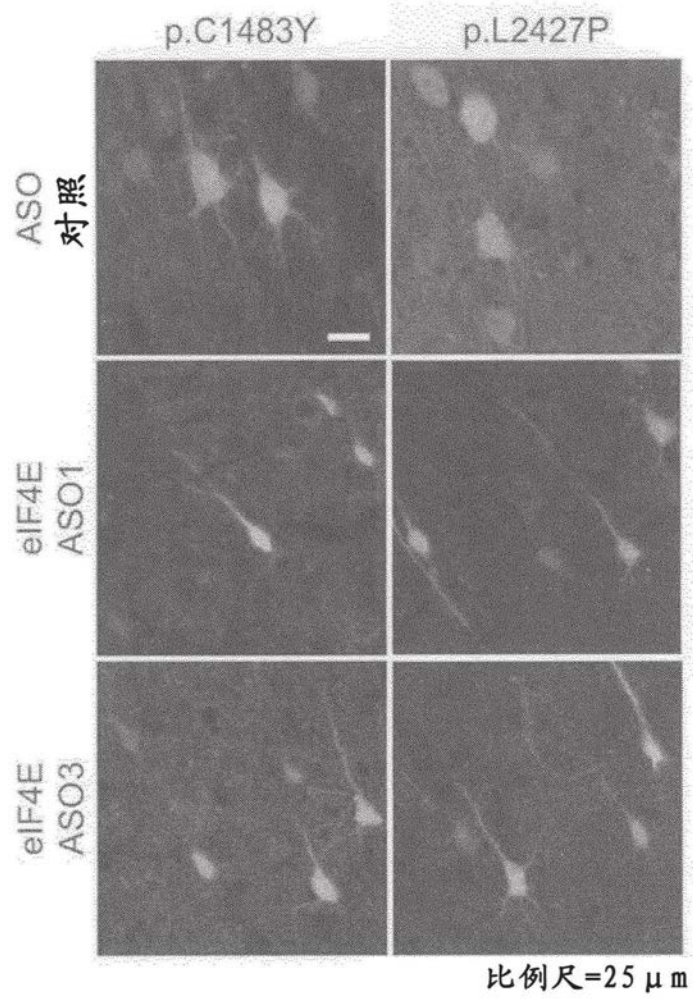


图22

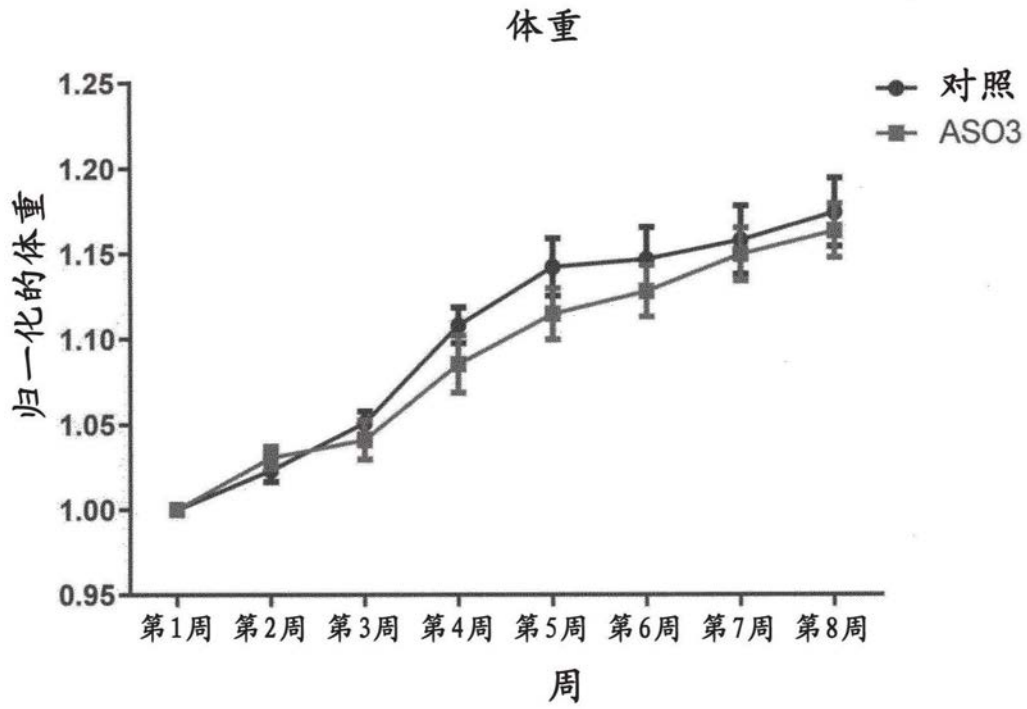


图23a

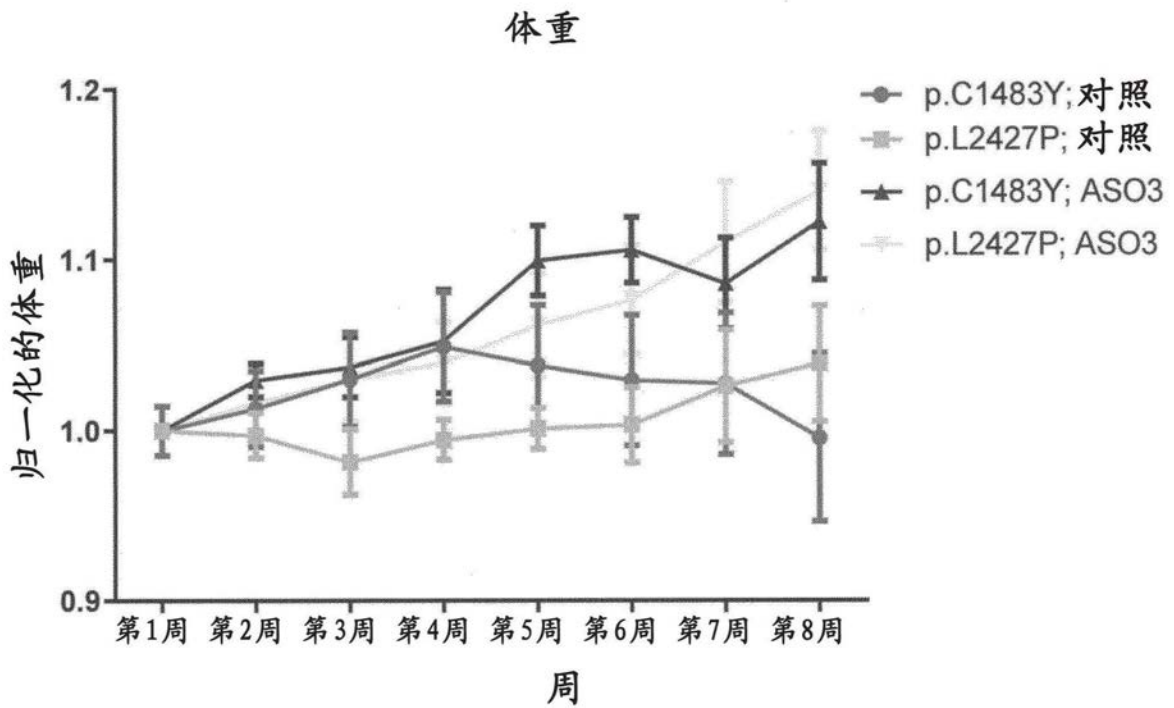


图23b

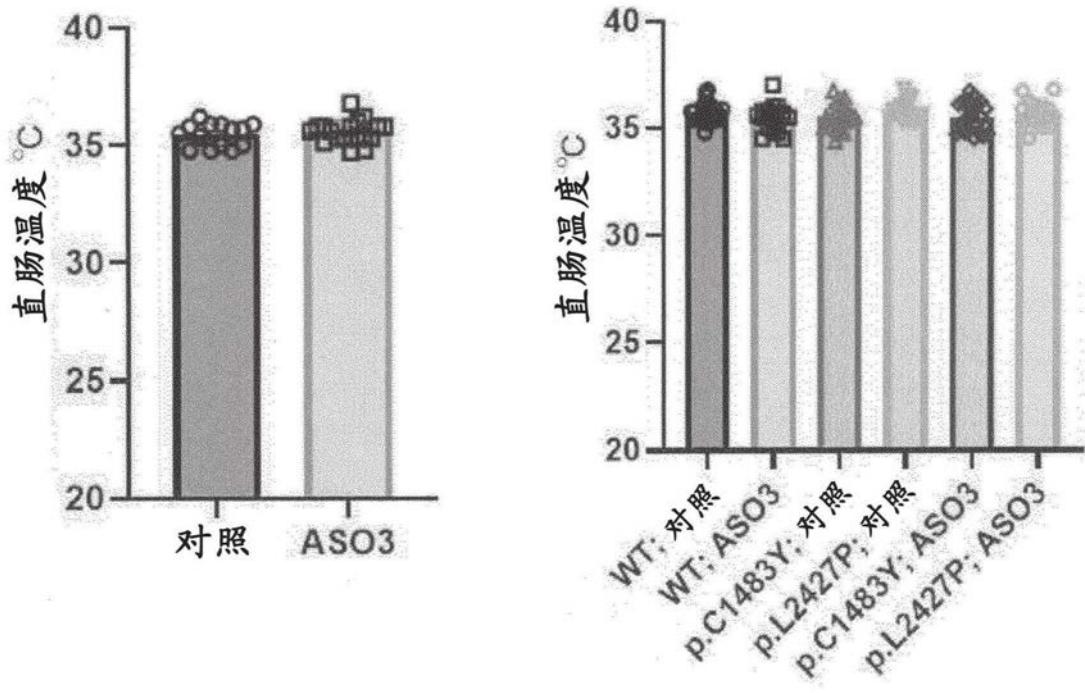
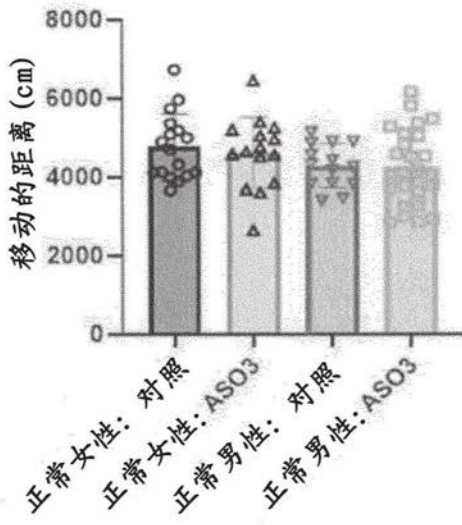
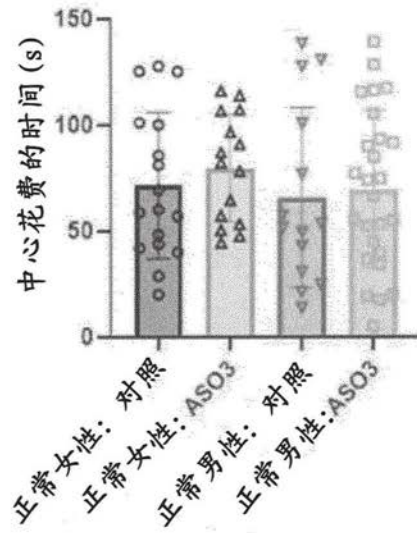


图23c

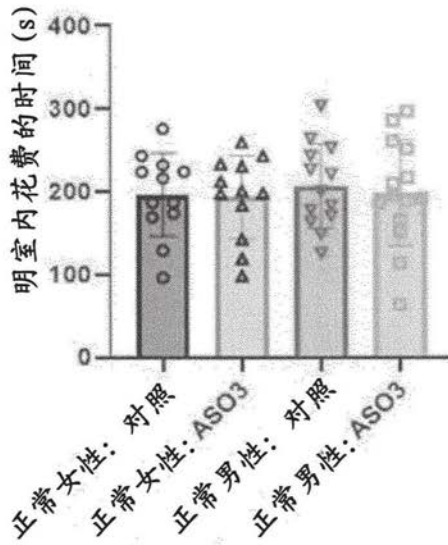
A-运动障碍



B-旷场测试



C-明暗测试



D-社交回避测试

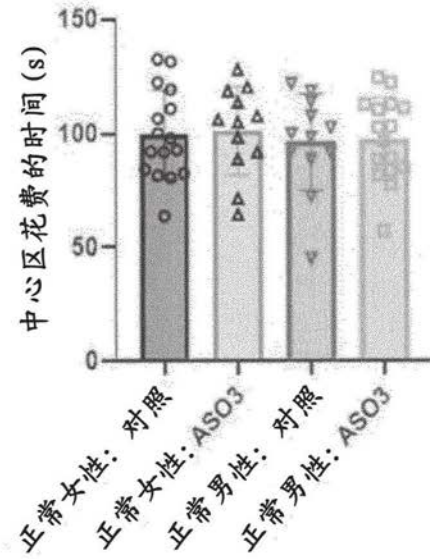
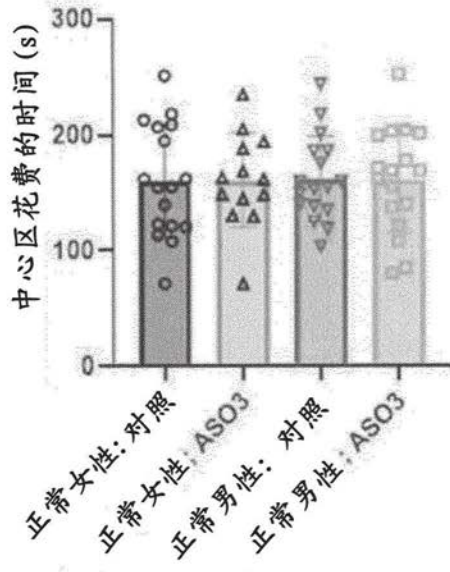
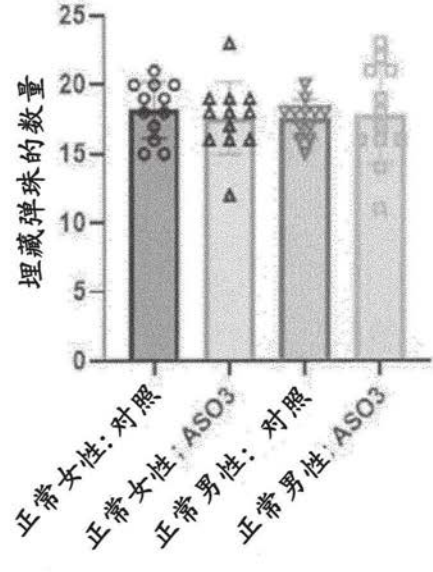


图24

E-3-室测试 (社交互动测试)



F-埋藏弹珠测试



G-蔗糖偏好测试

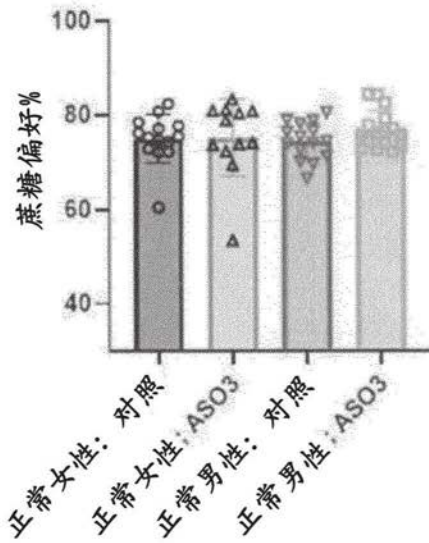
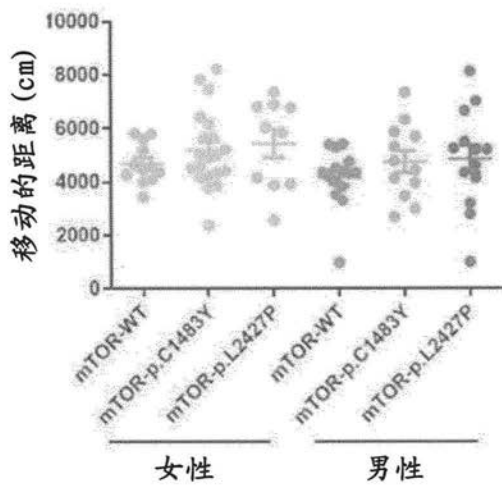
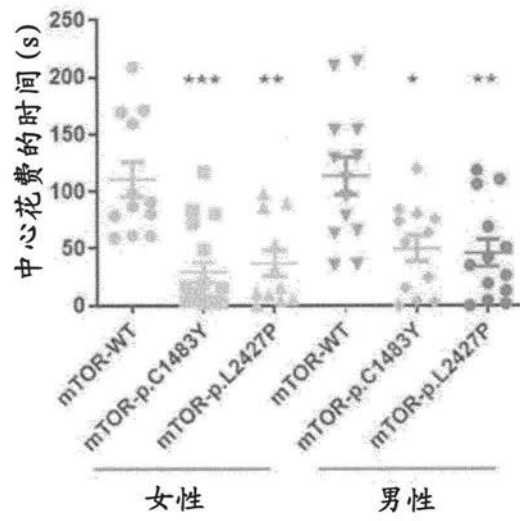


图25

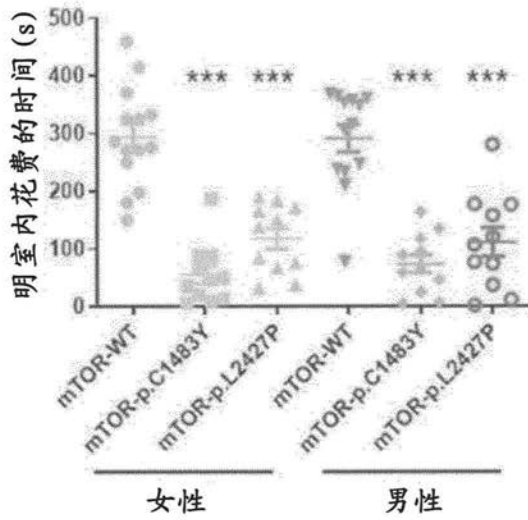
A-运动障碍



B-旷场测试



C-明暗测试



D-社交回避测试

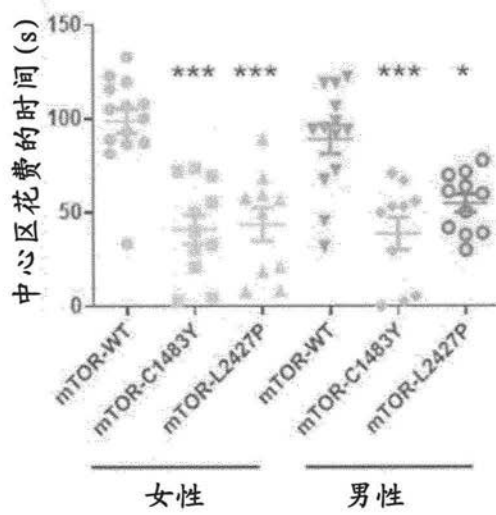
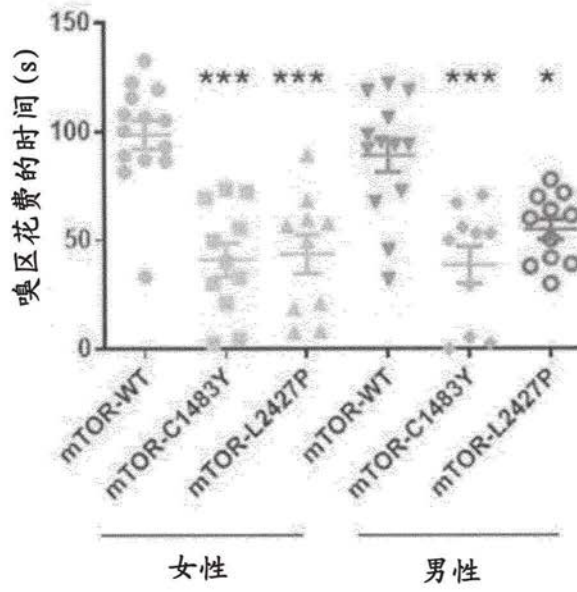
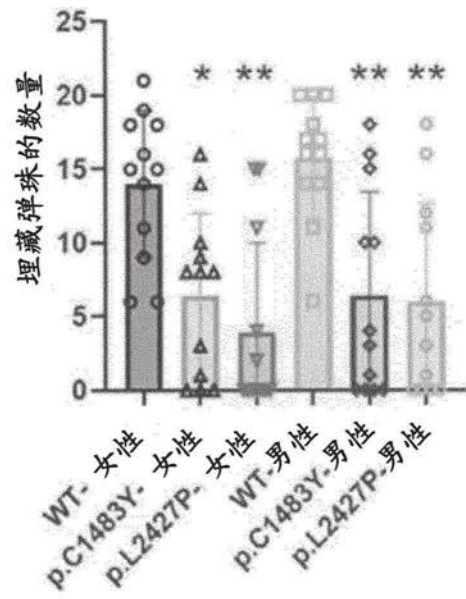


图26

E-3-室测试 (社交互动测试)



F-埋藏弹珠测试



G-蔗糖偏好测试

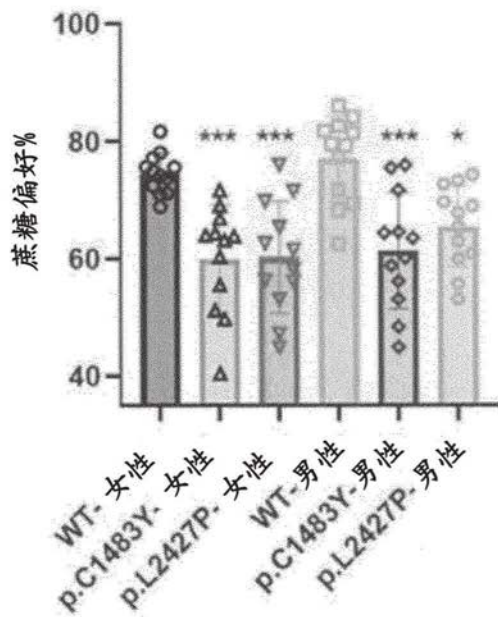


图27

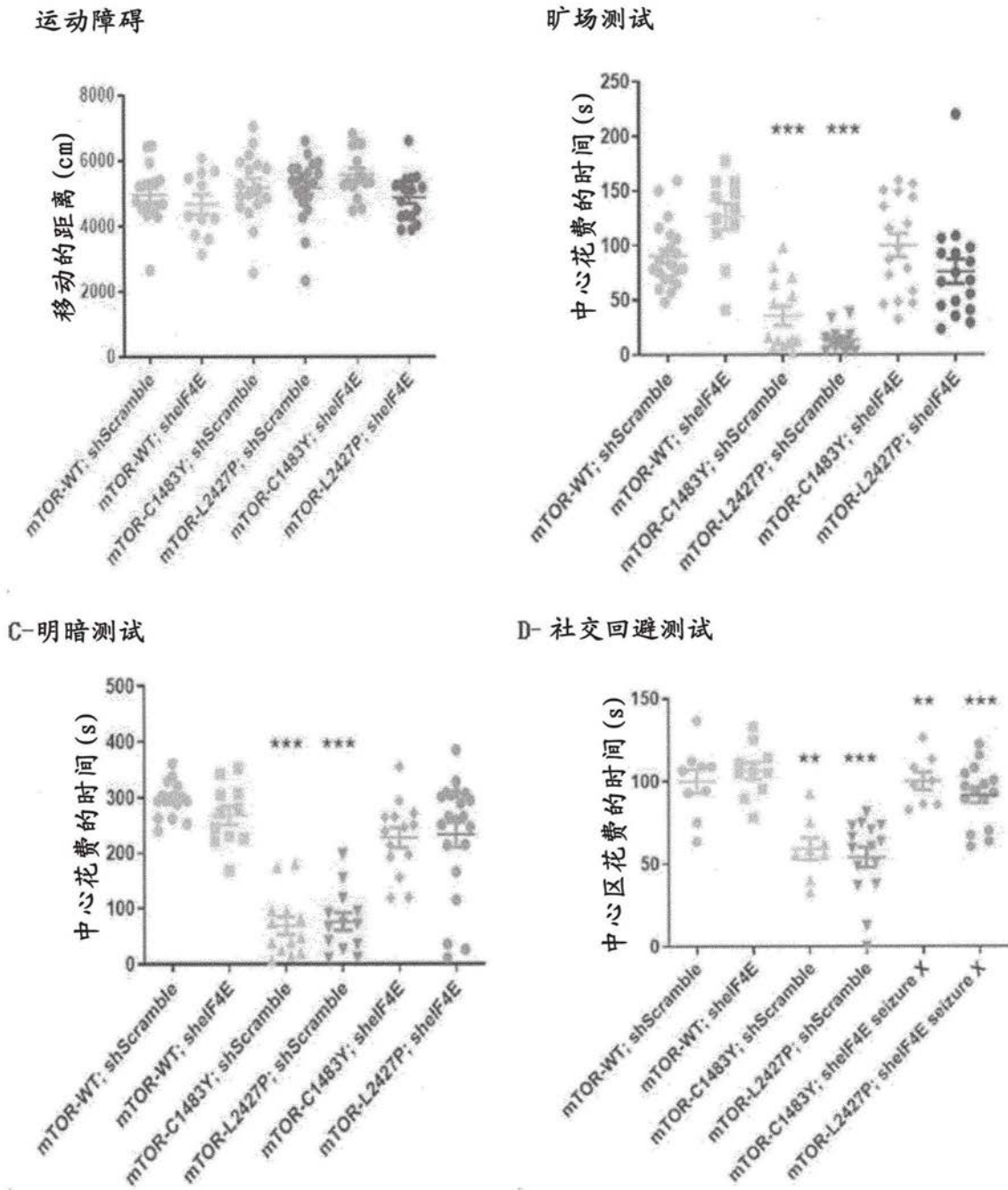
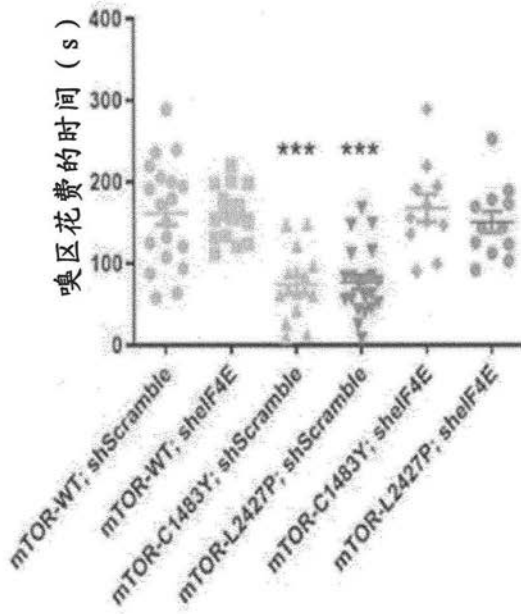
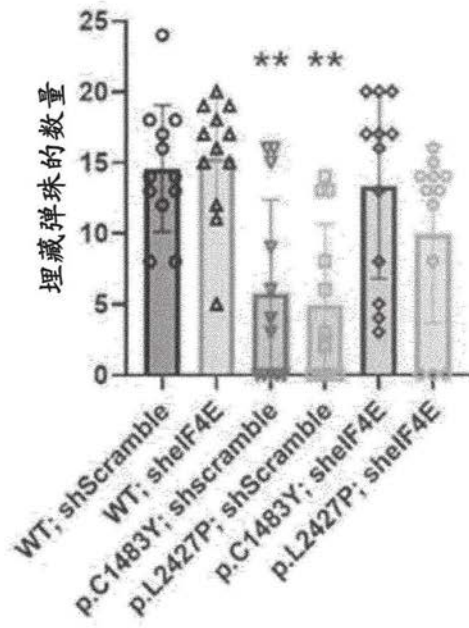


图28

E-3-腔室测试 (社交互动测试)



F-埋藏弹珠测试



G-蔗糖偏好测试

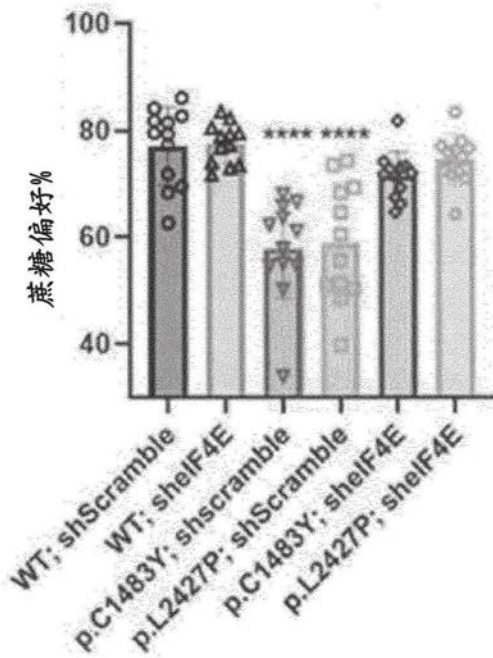
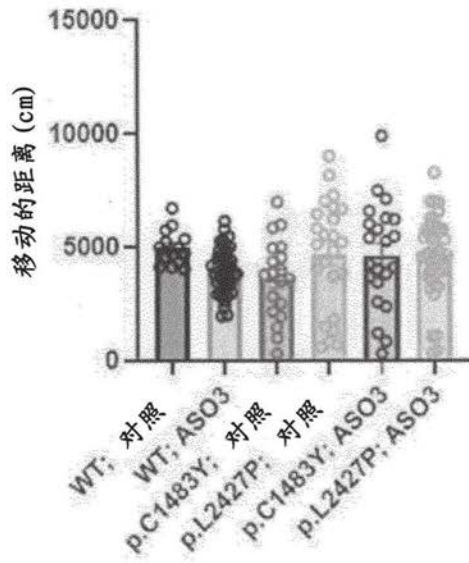
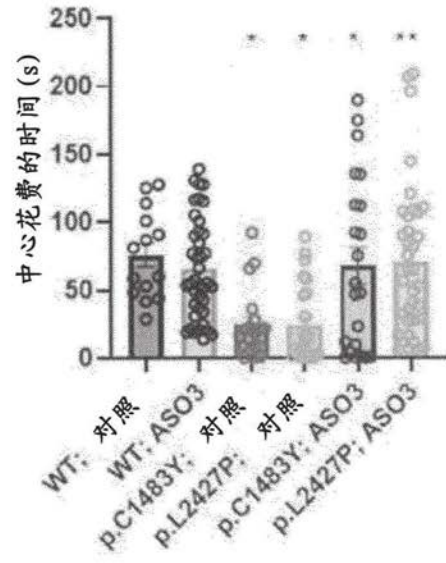


图29

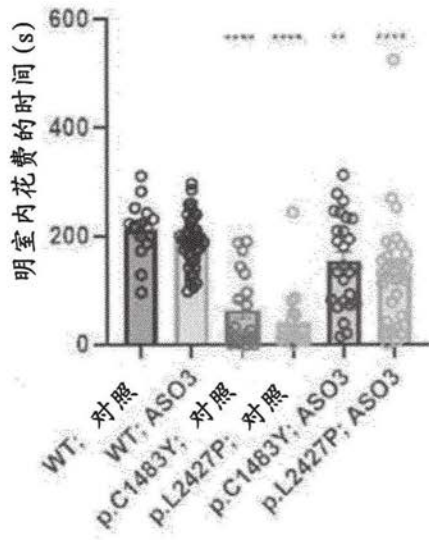
A-运动障碍



B-旷场测试



C-明暗测试



D-社交回避测试

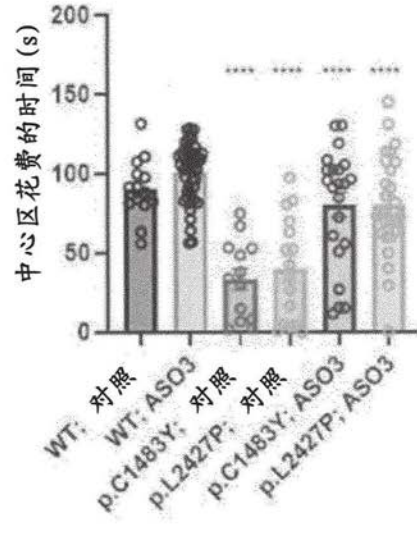
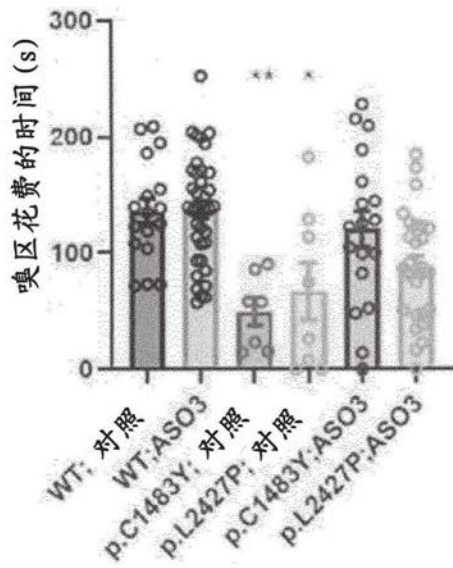
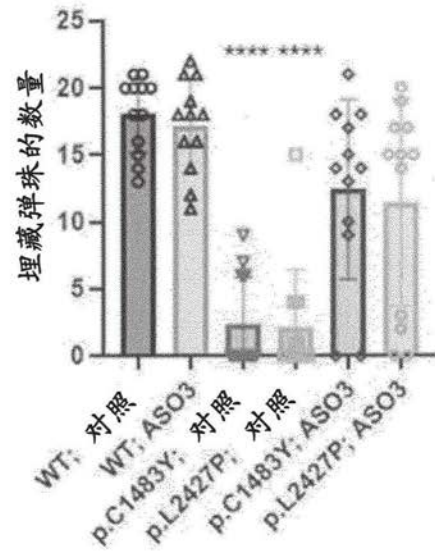


图30

E-3-腔室测试 (社交互动测试)



F- 埋藏弹珠测试



G-蔗糖偏好测试

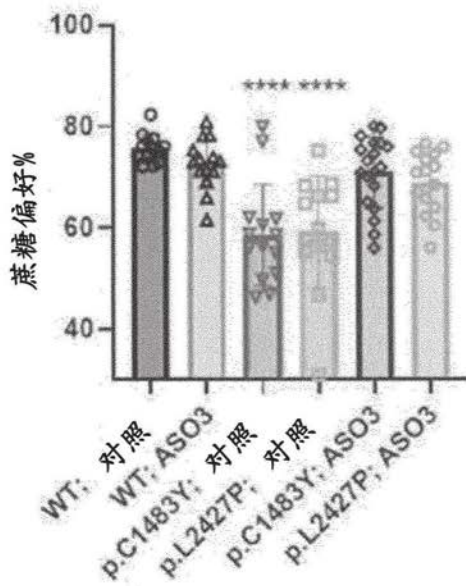


图31

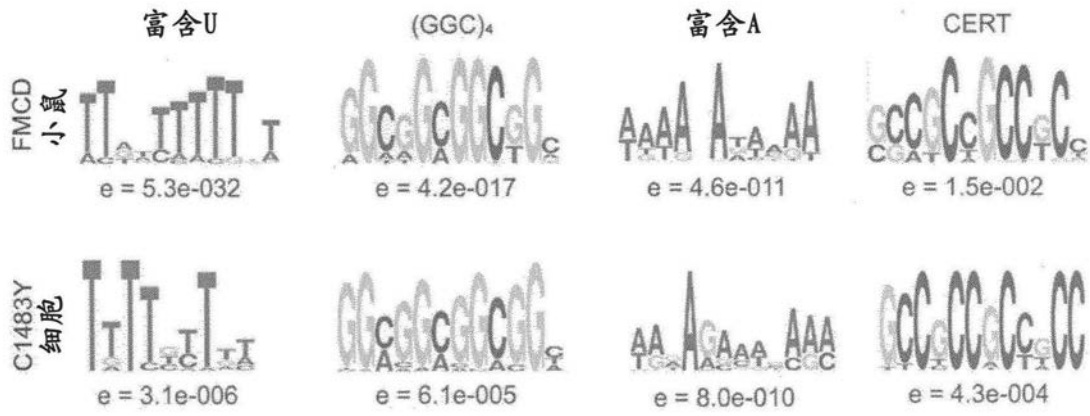


图32

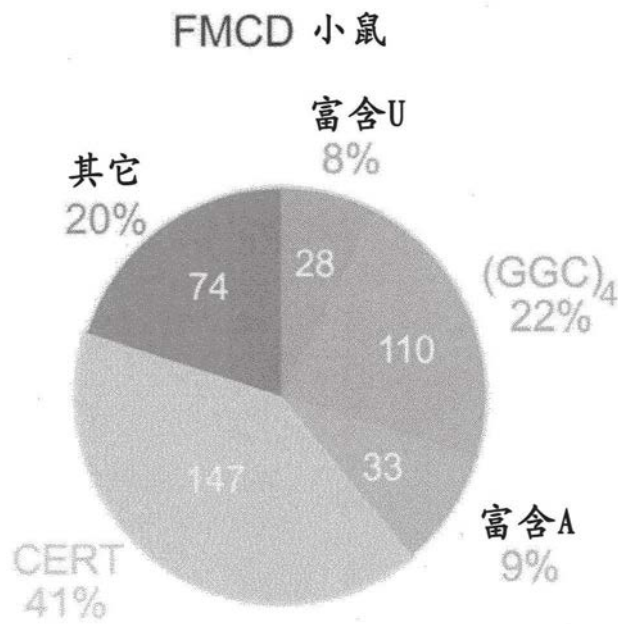


图33

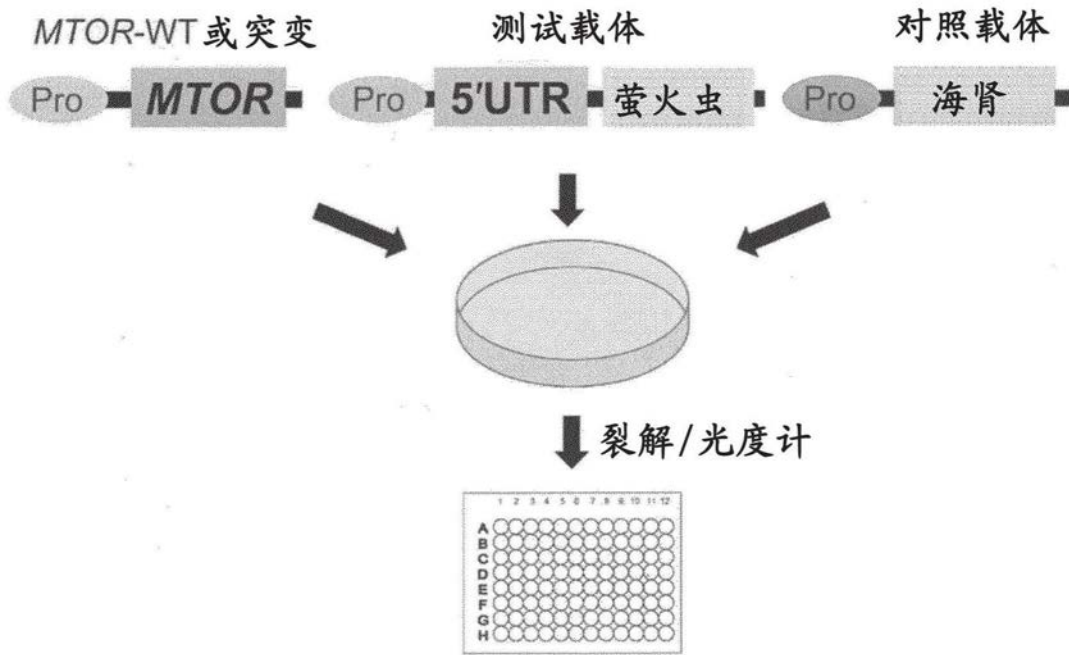


图34a

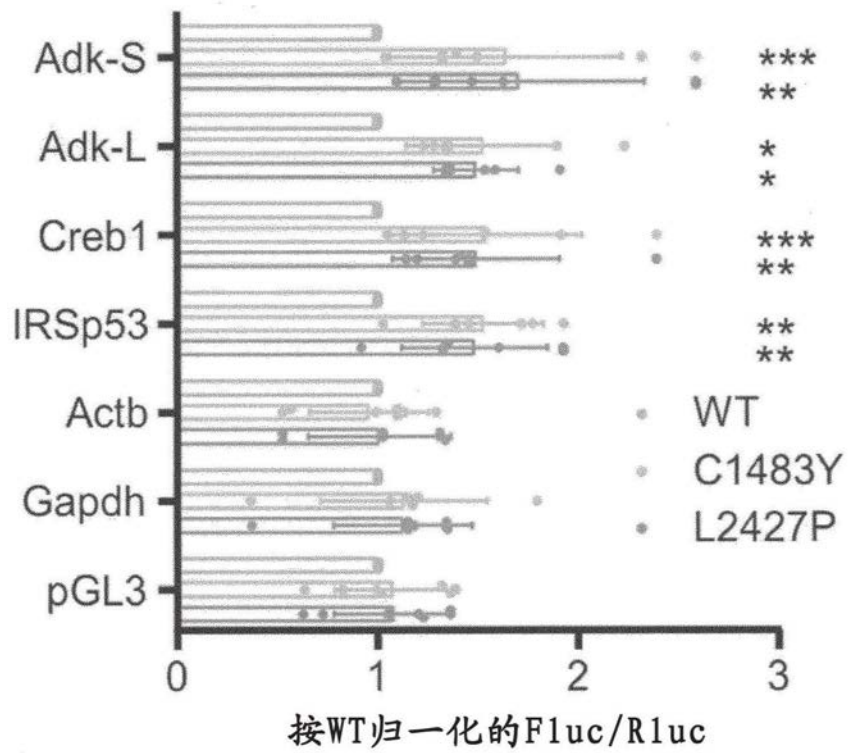


图34b

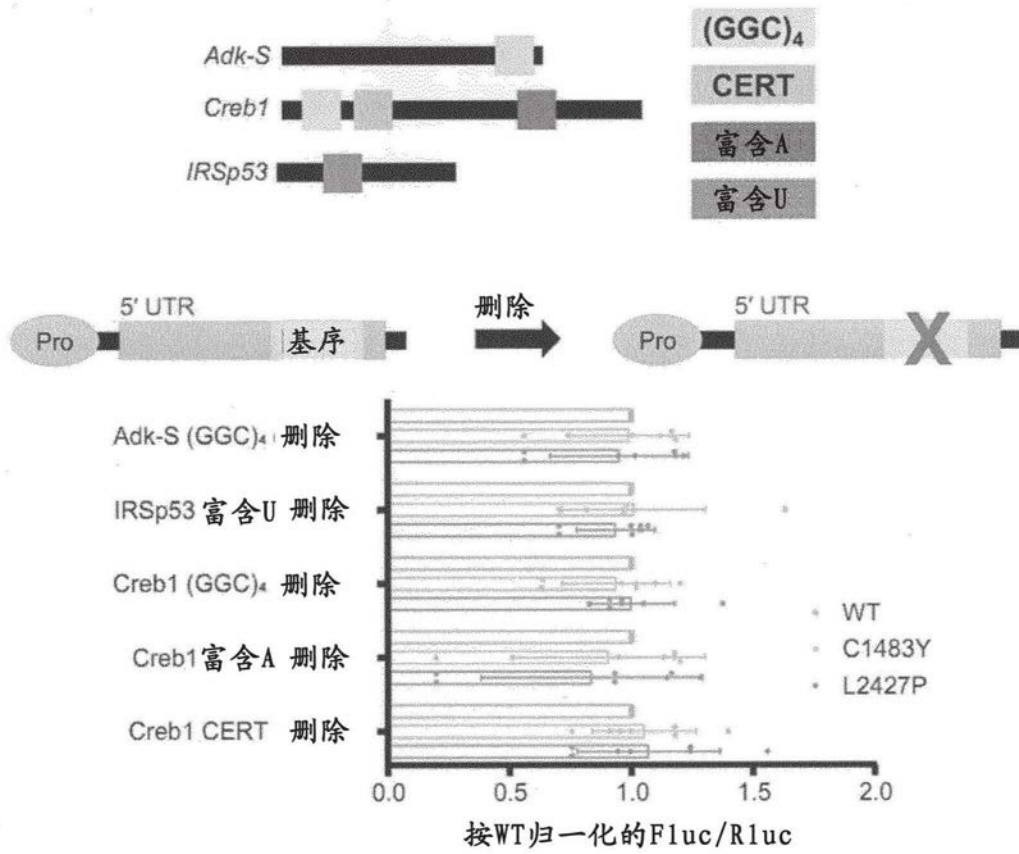


图35