

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00818858.0

[45] 授权公告日 2008 年 12 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100445380C

[22] 申请日 2000.12.12 [21] 申请号 00818858.0

[30] 优先权

[32] 1999.12.13 [33] US [31] 60/170,325

[32] 2000. 8.29 [33] US [31] 60/228,925

[86] 国际申请 PCT/CA2000/001467 2000.12.12

[87] 国际公布 WO2001/044465 英 2001.6.21

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.7

[73] 专利权人 拜昂尼科生命科学有限公司

地址 加拿大安大略省

[72] 发明人 奈杰尔·C·菲利普斯

马里翁·C·菲利翁

[56] 参考文献

WO9623508A1 1996.1.1

WO9720924A1 1997.1.1

WO9408053A 1994.1.1

CN1202900A 1998.1.1

CN1193280A 1998.1.1

审查员 索 翌

[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

代理人 李 宓

权利要求书 1 页 说明书 60 页 附图 3 页

[54] 发明名称

治疗用合成寡核苷酸

[57] 摘要

本发明提供一种包含 2 - 20 个碱基的 3' - OH, 5' - OH 合成寡核苷酸(序列)的组合物和方法, 所述寡核苷酸选自 $(G_x T_y)_n$ 、 $(T_y G_x)_n$ 、 $a(G_x T_y)_n$ 、 $a(T_y G_x)_n$ 、 $(G_x T_y)_n b$ 、 $(T_y G_x)_n b$ 、 $a(G_x T_y)_n b$ 、 $a(T_y G_x)_n b$, 其中 x 和 y 是 1 - 7 的整数, n 是 1 - 12 的整数, a 和 b 是一个或多个 As、Cs、Gs 或 Ts, 其中所述序列诱导选自下列的反应: 诱导细胞周期停滞、抑制增殖、活化癌细胞中的半胱氨酸门冬氨酸特异性蛋白酶和诱导癌细胞的细胞凋亡以及刺激免疫系统细胞产生细胞因子。

1. 一种组合物，包含具有选自 SEQ ID NOs : 7-18、22-48、50-66、70-75、79 和 80-83 的序列的 3'-OH, 5'-OH 合成寡核苷酸。
2. 权利要求 1 的组合物，其中所述序列选自 SEQ ID NOs : 7、8、9、10、22-48、50-65、70-75、79 和 80。
3. 权利要求 1 的组合物，还包含可药用载体。
4. 权利要求 1 的组合物，还包含化疗剂。
5. 权利要求 4 的组合物，其中所述化疗剂选自抗代谢剂、烷化剂和激素拮抗剂。

治疗用合成寡核苷酸

发明领域

本发明涉及用于治疗癌症的寡核苷酸组合物。

发明背景

癌症是一种非正常细胞的异常净积聚，它主要由过度增殖、不适当的细胞死亡或二者结合所致。

增殖是通过细胞周期致使一个细胞分裂为两个细胞的细胞连续积聚。细胞周期的5个主要阶段是 G_0 、 G_1 、S、 G_2 和M。在 G_0 阶段，细胞是静止的。在任何时候，体内的大多数细胞处于该阶段。 G_1 阶段期间，对应于分裂信号的细胞产生DNA合成所需的RNA和蛋白质。S-阶段期间(SE：早期S-阶段；SM：中期S-阶段；和SL：后期S-阶段)，细胞复制其DNA。 G_2 阶段期间，构建蛋白质，为细胞分裂作制备。有丝分裂(M)阶段期间，细胞分裂为两个子细胞。细胞周期过程中的变化发生于所有癌症中，这种变化可由基因的过度表达、调节基因的突变或DNA损伤关卡的消失引起(Hochhauser D., Anti-Cancer Chemotherapeutic Agents 8 : 903, 1997)。

与癌细胞不同，大多数正常细胞不会因为变化期的细胞衰亡而无限度地增殖。细胞衰亡是一种导致细胞生长停止的程序化细胞死亡反应(Dimri 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 20, 1995)。据报道，DNA损伤，结肠、乳腺和卵巢癌细胞与拓扑异构体抑制剂的接触以及鼻咽癌细胞与顺铂的接触可通过诱导衰亡来防止这些细胞的增殖(Wang 等, Cancer Res. 58 : 5019, 1998 ; Poole 等, Br. J. Cancer 80 : 9, 1999)。

合成寡核苷酸是在细胞中内在化的多阴离子序列(Vlassov 等, Biochim. Biophys. Acta 1197 : 95, 1994)。据报道，合成寡核苷酸选择性地与核酸(Wagner, R. Nature : 372 : 333, 1994)、特异性细胞蛋白质(Bates 等, J. Biol. Chem. 274 : 26369, 1999)和特异性核蛋白质结合(Scaggiante 等, Eur. J. Biochem. 252 : 207, 1998)来抑制癌细

胞的增殖。

据报道,合成的含鸟嘌呤(G)和可变数量的胸腺嘧啶(T)的27个碱基的序列(寡核苷酸 GT_n),其中 n = 1 或 7 并且其中碱基的数量 ≥ 20 (Scaggiante 等, Eur. J. Biochem. 252 : 207, 1998)通过序列与 45 kDa 核蛋白质的特异性结合抑制癌细胞系的生长;但另据报道,其中碱基数量 ≥ 20 的 GT_n 对癌细胞系没有活性(Morassutti 等, Nucleosides and Nucleotides 18 : 1711, 1999)。据报道,两种合成的用 3'-氨基烷基修饰的 15 个碱基和 29 个碱基的富含 GT 的寡核苷酸形成 G-四集体,该四集体与核仁蛋白结合并抑制癌细胞系的增殖(Bates 等, J. Biol. Chem. 274 : 26369, 1999)。据报道,合成的 6 碱基 TTAGGG-硫代磷酸酯在体内和体外抑制非洲淋巴瘤细胞的增殖,所述硫代磷酸酯具有与哺乳动物端粒重复序列相同的序列(Mata 等, Toxicol. Applied Pharmacol. 144 : 189, 1997)。但另据报道,合成的 6 碱基 TTAGGG-磷酸二酯不具有抗端粒酶的活性(US 5,643,890)。

细胞死亡可由促进细胞凋亡的免疫调节剂,或者由直接引发导致细胞死亡途径的凋亡诱导剂引起(Muzio 等, Cell 85 : 817, 1996 ; Levine, A., Cell 88 : 323, 1997)。细胞凋亡是一种主动的细胞死亡过程,其特征在于显著的形态学变化,这些变化包括核染质的缩聚、细胞皱缩、核破碎、原生质膜形成气泡并形成膜结合的细胞凋亡体(Wyllie 等, Int. Rev. Cytol. 68 : 251, 1980)。细胞凋亡的分子标志是细胞核 DNA 分解为寡核小体长度的碎片,这是内源性内切核酸酶活化的结果(Wyllie A., Nature 284 : 555, 1980)。

半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶(Caspases)作为一种关键酶参与细胞凋亡的后期过程。半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶家族包括至少 14 种有关的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶。所有的半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶都包含保守的 QACXG (其中 X 是 R、Q 或 G)五肽活性位点基元(Cohen G., Biochim. Biophys. Acta 1366 : 139, 1997)。许多半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶是作为无活性酶原被合成的,所述酶原在半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶的特异性分解位点分解后被活化(Cohen G., Biochim.

Biophys. Acta 1366 : 139, 1997); 或者它们作为无活性的酶被合成, 这些酶需与用于活化的调节分子结合 (Stennicke 等, J. Biol. Chem. 274 : 8359, 1999)。

除了它们在细胞凋亡中的作用以外, 半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶还与 B 和 T 淋巴细胞的活化和增殖、炎症期间细胞因子的成熟、红细胞生成期间祖代细胞的分化和晶状体纤维的发育有关 (Fadeel 等, Leukemia 14 : 1514, 2000)。关于 B 和 T 淋巴细胞, 半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶 3 在 B 淋巴细胞以及 CD4 (+)、CD8 (+)、CD45RA (+) 和 CD45RO (+) 亚型的 T 淋巴细胞的活化中起作用 (Alam 等, J. Exp. Med. 190 : 1879, 1999)。此外, 促细胞分裂剂和白介素-2 对 T 淋巴细胞的刺激与半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶途径的活化和 PARP 的分解有关 (Wilheim 等, Eur. J. Immunol. 28 : 891, 1998)。关于细胞因子, 半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶 3 活性是通过活化的 T 淋巴细胞释放 IL-2 (Posmantur 等, Exp. Cell Res. 244 : 302, 1998) 和促炎细胞因子白介素-16 的加工和成熟所必需的 (Zhang 等, J. Biol. Chem. 273 : 1144, 1998)。关于红细胞生成, 半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶的活化与红细胞生成的调节有关, 据示该酶调节 GATA-1, 一种对于红细胞前体的成熟至关重要的核调节蛋白质 (De Maria 等, Nature 401 : 489, 1999)。

细胞溶解是细胞的完全或部分破坏, 它由免疫系统介导。活化的巨噬细胞和单核细胞产生包括, 但不限于细胞因子的生物活性分子。细胞因子包括, 但不限于白介素 (IL)-1、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF- α 。

IL-1 β 降低骨髓细胞对细胞减少性药物、放射和自体骨髓移植中使用药物的体外肿瘤细胞清除的敏感性 (Dalmau 等, Bone Marrow Transplant. 12 : 551, 1993)。

IL-6 诱导 B 细胞分化, 刺激 IgG 分泌 (Taga 等, J. Exp. Med. 166 : 967, 1987), 诱导细胞毒性 T 细胞分化 (Lee 等, Vaccine 17 : 490, 1999) 并促进巨核细胞成熟 (Ishibashi 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 8953, 1989), 并且对癌细胞还具有抗增殖因子 (Mori 等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 257 : 609, 1999 ; Alexandroff 等, Biochem. Soc. Trans.

25 : 270, 1997 ; Takizawa 等, Cancer Res. 53 : 18, 1993 ; Novick 等, Cytokine 4 : 6, 1992) 和增殖前因子(proproliferative factor) 的功能(Okamoto 等, Cancer Res. 57 : 141, 1997 ; Okamoto 等, Int. J. Cancer 72 : 149, 1997 ; Chiu 等, Clin. Cancer Res. 2 : 215, 1996 ; Lu 等, Clin. Cancer Res. 2 : 1417, 1996)。

在鼠的肿瘤模型中, IL-10 提高疫苗的效力(Kauffman 等, J. Immunother. 22 : 489, 1999) 并上调抗癌自体反应性 T 细胞的反应(Alleva 等, Immunobiol. 192 : 155, 1995)。

IL-12 单独和与其它细胞因子联合使用时, 促进白细胞的成熟并诱导 γ -干扰素的分泌。据报道, IL-12 具有抗癌活性(Stine 等, Annals NY Academy of Science 795 : 420, 1996 ; Chen 等, Journal of Immunol. 159 : 351, 1997), 所述活性包括, 但不限于活化特异性溶细胞性 T 淋巴细胞, 活化天然杀伤细胞(NK) 并诱导抗血管生成蛋白质 IP-10 和 MiG。

TNF- α 引起实体肿瘤的坏死(Porter 等, Trends in Biotech. 9 : 158, 1991), 敏化癌细胞对 γ 放射引发的细胞凋亡(Kimura 等, Cancer Res. 59 : 1606, 1999) 并保护骨髓前体细胞, 使其免受抗肿瘤剂的影响(Dalmau 等, Bone Marrow Transplant. 12 : 551, 1993)。

然而, 大多数现有技术的抗癌疗法, 无论是涉及诱导细胞周期停滞、抑制增殖、诱导细胞凋亡, 还是激发免疫系统的, 都被证明不能满足临床的应用。这些疗法中的许多方法不够有效或具有毒性, 具有明显的副作用, 导致形成耐药性或免疫致敏, 以及致患者虚弱。

因此, 一直需要新的组合物和方法, 所述组合物和方法能诱导癌细胞的细胞周期停滞、抑制癌细胞增殖、活化癌细胞中的半胱氨酸门冬氨酸特异性蛋白酶、诱导癌细胞的细胞凋亡并刺激免疫系统细胞产生细胞因子。

发明内容

本发明通过提供包含 2—20 个碱基的 3'-OH, 5'-OH 合成寡核苷酸(下文称“序列”)的组合物和方法满足了这种需要, 所述寡核苷酸选自 $(G_xT_y)_n$ 、 $(T_yG_x)_n$ 、 $a(G_xT_y)_n$ 、 $a(T_yG_x)_n$ 、 $(G_xT_y)_nb$ 、 $(T_yG_x)_nb$ 、 $a(G_xT_y)_nb$ 、 $a(T_yG_x)_nb$, 其

中 x 和 y 是 1—7 的整数, n 是 1—12 的整数, a 和 b 是一个或多个 As、Cs、Gs 或 Ts, 并且其中所述序列诱导一种选自下列的反应: 诱导细胞周期停滞、抑制增殖、活化癌细胞中的半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶、诱导癌细胞的细胞凋亡以及刺激免疫系统细胞产生细胞因子。

将治疗动物癌症的有效量的包含序列和可药用载体的组合物施用于患癌症的动物, 包括人。本发明的序列在下列方面具有出人意料的和令人惊奇的能力满足了医疗领域长足的未实现的需求并对动物, 包括人具有重要的益处, 所述方面是诱导细胞周期停滞、抑制增殖、活化癌症细胞中的半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶并诱导癌细胞中细胞凋亡以及刺激免疫系统细胞产生细胞因子。

因此, 本发明的一个目的是提供一种有效治疗动物, 包括人的疾病的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种有效治疗癌症的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导细胞衰亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导细胞的细胞周期停滞的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导癌细胞的细胞周期停滞的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种抑制细胞增殖的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种抑制癌细胞增殖的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导不依赖于 Fas 的癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导不依赖于 TNFR1 的癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导不依赖于 p53/p21 的癌细胞的

细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导不依赖于 p21/waf-1/CIP 的癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导不依赖于 p15^{ink4B} 的癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导不依赖于 p16^{ink4} 的癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导不依赖于半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶 3 的癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导不依赖于 TGF- β 1 受体的癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导非激素依赖性癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种诱导非耐药性癌细胞的细胞凋亡的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种活化细胞中半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种活化癌细胞中半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种治疗自身免疫疾病的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种治疗淋巴细胞增殖性疾病的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种治疗感染的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种治疗炎症的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种调节 T-或 B-细胞活化的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种调节祖代细胞成熟的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种调节红细胞生成的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种调节细胞中转录因子的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种增强针对细胞的其它治疗剂的效果的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种增强针对癌细胞的化疗剂的效果的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种增强放射的抗肿瘤效果的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种刺激免疫系统细胞产生细胞因子的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种刺激免疫系统细胞产生 IL-1 β 的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种刺激免疫系统细胞产生 IL-6 的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种刺激免疫系统细胞产生 IL-10 的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种刺激免疫系统细胞产生 IL-12 的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种刺激免疫系统细胞产生 TNF- α 的组合物和方法。

本发明的另一个目的是提供一种易于制备的组合物。

本发明的另一个目的是提供对接受者毒性最低的组合物。

在阅读了下列公开的技术方案和附录权利要求书的详细描述后，本发明的这些和其它目的、特征和优点将变得十分清晰。

附图说明

图 1：用 0 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 6 碱基 GT SEQ ID NO : 25 培养的 Jurkat 人 T 细胞白血病细胞的荧光[Fluo-3-AM]。

图 2：不使用 0 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 GT SEQ ID NOs : 66、67、

81、82 的 83 培养的 Jurkat 人 T 细胞白血病细胞中的半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶 3 的活化(用细胞计数方法(A)和比色法(B)测定)。

图 3: Jurkat 人 T 细胞白血病细胞中的半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶的活化。(A) 用 0 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 6 碱基 GT SEQ ID NO : 25 培养的细胞中半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶 3 的活化; (B) 用 0 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 6 碱基 GT SEQ ID NO : 25 培养的细胞中半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶 7 的活化(a)和 PARP 含量(b)。

具体实施方式

本发明提供一种包含 2—20 个碱基的 3'-OH, 5'-OH 合成寡核苷酸(序列)的组合物, 所述寡核苷酸选自 $(G_xT_y)_n$ 、 $(T_yG_x)_n$ 、 $a(G_xT_y)_n$ 、 $a(T_yG_x)_n$ 、 $(G_xT_y)_nb$ 、 $(T_yG_x)_nb$ 、 $a(G_xT_y)_nb$ 、 $a(T_yG_x)_nb$, 其中 x 和 y 是 1—7 的整数, n 是 1—12 的整数, a 和 b 是一个或多个 As、Cs、Gs 或 Ts, 其中所述序列诱导选自下列的反应: 诱导细胞周期停滞、抑制增殖、活化癌细胞中的半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶和诱导癌细胞的细胞凋亡以及刺激免疫系统细胞产生细胞因子。

将治疗动物癌症的有效量的包含序列和可药用载体的组合物施用于患癌症的动物, 包括人。本发明的序列在下列方面具有出人意料的和令人惊奇的能力满足了医疗领域长足的未实现的需求并对动物, 包括人具有重要的益处, 所述方面是诱导细胞周期停滞、抑制增殖、诱导细胞凋亡和活化癌症细胞中的半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶以及刺激免疫系统细胞产生细胞因子。

本发明采用的术语“序列”是指 2—20 个碱基的 3'-OH, 5'-OH 合成寡核苷酸, 其中包含 A、C、G 和 T 碱基。

本发明采用的缩写“GT”、“AG”、“CG”、“GG”、“AGT”和“CGT”是指以任何顺序合成的包含指定碱基的序列。

本发明采用的术语“反应”是指诱导细胞周期停滞、抑制增殖、活化癌症细胞中的半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶和诱导癌细胞的细胞凋亡以及刺激免疫系统细胞产生细胞因子。

本发明采用的术语“治疗性治疗”和“有效量”是指有效诱导选自

下列反应的量：诱导细胞周期停滞、抑制增殖、活化癌症细胞中的半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶和诱导癌细胞的细胞凋亡以及刺激免疫系统细胞产生细胞因子。

本发明采用的术语“悬浮肿瘤模型”和“实体肿瘤模型”是指原发性或继发性癌或肉瘤。

本发明采用的术语“化疗剂”是指一个国家或州政府的管理部门批准的，或者美国药典或其它通常知道的药典列出的用于治疗动物，包括人的癌症的任何药物。

本发明采用的术语“抗肿瘤”是指防止癌细胞的发育、成熟、增殖或扩散。

本发明采用的术语“增强”是指大于各种药物相加的活性的协同程度。

本发明采用的术语“协同”是指两种或多种药物协调作用。

给动物，包括人施用有效量的本发明序列是一种预防、治疗或消除疾病的治疗性治疗，所述疾病包括，但不限于癌症、类风湿关节炎、淋巴细胞增殖性疾病和哮喘。癌症包括，但不限于鳞状细胞癌、纤维肉瘤、类肉瘤、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌、肾癌、骨肉瘤、皮肤黑素瘤、基底细胞癌、胰腺癌、膀胱癌、脑癌、卵巢癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤和由其生成的转移瘤。

序列的治疗有效性可通过不限于下列的方法得到增强：化学修饰碱基、糖或磷酸酯骨架，化学添加序列或者用包含适当序列的细菌质粒用生物技术扩增序列，将序列与生物或化学载体配合，或者将序列与组织型或细胞型定向的配体或抗体偶联。

通过使本发明的序列与可药用载体均匀、紧密地结合来制备包含一种或多种序列和可药用载体的组合物。可药用载体包括液体载体、固体载体或包括这两者。液体载体是水性载体、非水性载体或是这两者，并且包括，但不限于水性悬浮液、油性乳液、油包水乳液、水包油包水乳液、位置特异性乳液、长滞留乳液、粘性乳液、微乳和毫微乳。固体载体是生物载体、化学载体或是这两者，并且包括，但不限于病毒载体系

统、颗粒、微粒、毫微颗粒、微球、毫微球、微泵、细菌细胞壁提取物和使序列缓释的生物降解或非生物降解的天然的或合成的聚合物。用于配合序列与固体载体的方法包括，但不限于直接吸附于固体载体的表面；直接地或者通过连接部分与固体载体的表面共价偶联；和与用于制备固体载体的聚合物共价偶联。任选地，序列可通过添加非离子或离子性聚合物，例如聚氧化乙烯脱水山梨醇一油酸酯(吐温)或透明质酸来稳定。

优选的水性载体包括，但不限于水、盐水和可药用缓冲剂。优选的非水性载体包括，但不限于矿物油和中性油或其混合物。与用于使所述序列呈示于响应细胞的可药用载体无关，可任选地包括赋形剂。这些赋形剂包括，但不限于抗氧剂、缓冲剂和制菌剂，还可以包括悬浮剂和增稠剂。

可单独施用一种或多种序列，或者可将其与其它治疗形式联合施用，所述其它治疗形式包括，但不限于化疗剂、免疫治疗剂、抗菌剂、抗病毒剂或与放疗联合施用。化疗剂包括，但不限于抗代谢剂、DNA 损害剂、微管破坏剂、微管稳定剂、肌动蛋白解聚剂、生长抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、HMG-CoA 抑制剂、嘌呤抑制剂、嘧啶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、CDK 抑制剂、血管生成抑制剂和分化促进剂。

给药途径包括，但不限于口服、局部、皮下、透皮、真皮下、肌肉、腹膜内、膀胱内、关节内、动脉内、静脉内、真皮内、颅内、损害部位内、肿瘤内、眼内、肺内、脊髓内、前列腺内、置入体腔、经鼻吸入、肺吸入、经皮、电介入途径。

根据给药途径，单位剂量体积优选为约 0.001—100 ml/剂，更优选为约 0.01—50 ml/剂，最优选为约 0.1—30 ml/剂。每剂给予的序列的量优选为约 0.001—100 mg/kg，更优选为约 0.01—10 mg/kg 和最优选为约 0.1—5 mg/kg。本发明的序列或序列加治疗剂可以以单剂疗法、多剂疗法或在一个治疗方案中连续输注的形式给药一段时间，所述时间对于被治疗的疾病、接受治疗者的状况和给药途径而言是适宜的。此外，所述序列可以在所述治疗剂给药之前、同时或之后给予。

将有效增强化疗剂的抗肿瘤作用量的序列与化疗剂联合施用于患癌

症的动物。每剂施用的治疗剂的量优选为约 0.001—1000 mg/m² 或者约 0.01—1000 mg/kg, 更优选约 0.01—500 mg/m² 或者约 0.01—500 mg/kg 并且更优选约 0.1—100 mg/m² 或者约 0.1—100 mg/kg。施用的特定的序列和特定的治疗剂、每剂的量、给药方案和给药途径应由医师用本领域专业技术人员已知的方法决定, 并且还应取决于癌症的类型、癌症的严重程度、癌症的位置和其它临床因素, 如接受者的大小、体重和身体状况。此外, 可任选地使用体外分析以帮助确定序列给药或序列加治疗剂给药的最佳范围。

虽不期望受到下列假说的限制, 据认为本发明的序列形成一类新结构, 并且它们不是作为反义 RNAs、反义 DNAs、三倍螺旋体形成的 DNAs、端粒酶抑制剂、转录活化剂或转录抑制剂而起作用。

下列实施例将用于进一步举例说明本发明, 而同时不对本发明构成任何限制。相反, 在阅读本发明的说明书之后, 对于本领域专业技术人员来说, 应该清楚必需借助各种其它的实施方案、其改变的和等同的方案, 在不背离本发明实质精神下来自我启发。

实施例 1

序列的制备

磷酸二酯和硫代磷酸酯序列由 HUKABEL Scientific Ltd (Montreal, Quebec, Canada) 用 EXPEDITE™ 8900 自动 DNA 合成系统 (PersSeptive Biosystems, Inc., Farmingham, MA) 和由 Sigma-Genosys (Woodlands, TX) 用算盘分割的合成技术 (Abacus Segmented Synthesis Technology) 制备。除非另有说明, 使用的序列是磷酸二酯序列。除非另有说明, 在临用前, 将序列分散到高压灭菌的去离子水或高压灭菌的药用缓冲剂中, 例如, 但不限于盐水。

实施例 2

细胞和试剂

所有的细胞系均得自 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) 并且在 ATCC 建议的培养基中进行培养。表 1 显示了细胞系、它们的产地和它们的特性。

表 1 细胞系

细胞系	产地	特性
THP-1	人急性单核细胞性白血病	悬浮肿瘤模型 p53 无
MCF-7	人乳腺癌	实体瘤模型；非转移的；半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶 3-阴性的；雌激素-依赖的
JURKAT	人 T 细胞白血病	悬浮肿瘤模型；耐受非典型的多种药物的 与 p190-MRP 蛋白有关
PC-3	人前列腺癌	实体肿瘤模型；转移性的 p53 突变的；雄激素-非依赖性的(激素不应的)
LNCaP	人前列腺癌	实体肿瘤模型；转移性的 TGF- β 1 受体-阴性的；雄激素-依赖性的
OVCAR-3	人卵巢癌	实体肿瘤模型；转移性的 p53 突变的；p21/waf-1/Cip-1 缺失的
SK-OV-3	人卵巢癌	实体肿瘤模型；转移性的 p53 缺失的；p21/waf-1/Cip 缺失的；p15 ^{ink4B} ， p16 ^{ink4} 缺失的
HL-60	人早幼粒细胞白血病	悬浮肿瘤模型 p53 突变的
EL-4	鼠 T 淋巴瘤	悬浮肿瘤模型
A20	鼠 B 细胞白血病	悬浮肿瘤模型
L-1210	鼠白血病	悬浮肿瘤模型
D-17	犬骨肉瘤	实体肿瘤模型
CF-51	犬乳腺癌	实体肿瘤模型

将细胞接种到 6 (1 ml/孔)、24 (0.5 ml/孔)或 96 (0.1 ml/孔)孔平底微滴板并保持在 37°C 下和 5%CO₂ 气氛中。除非另有说明，将 2.5×10^5

个细胞/ml 与 0 $\mu\text{g/ml}$ (对照)和 100 $\mu\text{g/ml}$ (治疗的)的包含 A、C、G 和 T 的 2—45 个碱基的序列一起培养 48 小时。

实施例 3

细胞增殖的测定

用二甲基噻唑-二苯基四唑翁(MTT)还原测定细胞增殖(Mosman 等, J. Immunol. Methods 65 : 55, 1983)。在 570 nm 波长下用重叠的分光光度计阅读器(ELX800, Bio-TEK Instruments Inc., Winooski, VT)测定 MTT。

实施例 4

Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的抑制

Jurkat 人白血病 T 细胞是耐受非典型的多种药物的人悬浮肿瘤细胞模型。将 Jurkat 细胞与 27 碱基的 GT 和 CT 序列一起培养(表 2)。

表 2 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG-(GT) ₁₃ G SEQ ID NO:1-(27 bases)	51
GGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGG-(G ₃ T) ₆ G ₃ SEQ ID NO:2-(27 bases)	23
GGGGGTGGGGGTGGGGGTGGGGGTGGG-(G ₃ T) ₄ G ₃ SEQ ID NO:3-(27 bases)	24
GGGGGGGTGGGGGGGTGGGGGGGTGG-(G ₇ T) ₃ G ₃ SEQ ID NO:4-(27 bases)	11
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG-(TG) ₁₃ T SEQ ID NO:5-(27 bases)	45
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT-(TC) ₁₃ T SEQ ID NO:6-(27 bases)	0

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 2 所示，Jurkat T 细胞的增殖被测试的 GT 序列抑制，但不被测试的 CT 序列抑制。

将 Jurkat T 细胞与 3、6、9、12、14、15、18、21 和 24 碱基的 GT 序列一起培养(表 3)。

表 3 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
TGT-(TG) ₁ T SEQ ID NO:7-(3 bases)	22
GTG-(GT) ₁ G SEQ ID NO:8-(3 bases)	46
TGTGTG-(TG) ₃ SEQ ID NO:9-(6 bases)	36
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	48
TGTGTGTGT-(TG) ₄ T SEQ ID NO:11-(9 bases)	45
GTGTGTGTG-(GT) ₄ G SEQ ID NO:12-(9 bases)	47
TGTGTGTGTGTG-(TG) ₆ SEQ ID NO:13-(12 bases)	49
GTGTGTGTGTGT-(GT) ₆ SEQ ID NO:14-(12 bases)	51
TGTGTGTGTGTGTG-(TG) ₇ SEQ ID NO:15-(14 bases)	47
GTGTGTGTGTGTGTG-(GT) ₇ G SEQ ID NO:16-(15 bases)	58
TGTGTGTGTGTGTGTGTG-(TG) ₉ SEQ ID NO:17-(18 bases)	56
GTGTGTGTGTGTGTGTGT-(GT) ₉ SEQ ID NO:18-(18 bases)	60
TGTGTGTGTGTGTGTGTGT-(TG) ₁₀ T SEQ ID NO:19-(21 bases)	60
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG-(GT) ₁₀ G SEQ ID NO:20-(21 bases)	46
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG-(TG) ₁₂ SEQ ID NO:21-(24 bases)	54
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG-(GT) ₁₂ SEQ ID NO:22-(24 bases)	56

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 3 所示，3、6、9、12、14、15 和 18 碱基的 GT 序列如同 21 和 24 碱基 GT 序列一样有效地抑制 Jurkat T 细胞增殖。

将 Jurkat T 细胞与 6 碱基的 GT、AG、CG、GG、AGT 和 CGT 序列一起培养(表 4)。

表 4 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
TGTGTG-(TG) ₃ SEQ ID NO:9-(6 bases)	36
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	48
TTTGTT-TT(TG) ₁ TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	31
GGTGGG-GG(TG) ₁ GG SEQ ID NO:24-(6 bases)	48

GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	60
TTGTTT-TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	34
AAGTAA-AA(GT) ₁ AA SEQ ID NO:27-(6 bases)	13
CCGTCC-CC(GT) ₁ CC SEQ ID NO:28-(6 bases)	11
TGGTTG-TG(GT) ₁ TG SEQ ID NO:29-(6 bases)	42
ATGTAT-AT(GT) ₁ AT SEQ ID NO:30-(6 bases)	16
AGGTGA-AG(GT) ₁ GA SEQ ID NO:31-(6 bases)	10
GAGTGA-GA(GT) ₁ GA SEQ ID NO:32-(6 bases)	24
GGGTCT-GG(GT) ₁ CT SEQ ID NO:33-(6 bases)	15
CCGTGG-CC(GT) ₁ GG SEQ ID NO:34-(6 bases)	37
GGGTCC-GG(GT) ₁ CC SEQ ID NO:35-(6 bases)	20
CTGTCT-CT(GT) ₁ CT SEQ ID NO:36-(6 bases)	19
TCGTTC-TC(GT) ₁ TC SEQ ID NO:37-(6 bases)	20
CGGTGC-CG(GT) ₁ GC SEQ ID NO:38-(6 bases)	16
TTGTGG-TT(GT) ₁ GG SEQ ID NO:39-(6 bases)	35
GGGTTT-GG(GT) ₁ TT SEQ ID NO:40-(6 bases)	31
GGTTGG-GG(TT) ₁ GG SEQ ID NO:41-(6 bases)	43
GGAAGG-GG(AA) ₁ GG SEQ ID NO:42-(6 bases)	22
GGCCGG-GG(CC) ₁ GG SEQ ID NO:43-(6 bases)	29
GGGGGG-GG(GG) ₁ GG SEQ ID NO:44-(6 bases)	26
GGGAGG-GG(GA) ₁ GG SEQ ID NO:45-(6 bases)	28
GGGCGG-GG(GC) ₁ GG SEQ ID NO:46-(6 bases)	23
GGAGGG-GG(AG) ₁ GG SEQ ID NO:47-(6 bases)	14
GTGGGG-(GT) ₁ G ₄ SEQ ID NO:48-(6 bases)	26
TTAGGG-TT(AG) ₁ GG SEQ ID NO:49-(6 bases)	45

注：表中“bases”为“碱基”。

如表4所示,6碱基GT序列抑制 Jurkat T细胞的增殖。GT SEQ ID NO : 25 抑制 60%增殖, AGT SEQ ID NO : 49 抑制 45%增殖。用 PHARM/PCS-4 软件(Microcomputer Specialists, Philadelphia, PA)比较GT SEQ ID NO : 25 和 AGT SEQ ID NO : 49 的相对效力,表明 GT SEQ ID NO : 25 是 AGT

SEQ ID NO : 49 的效力的 3.4 倍。据报道, AGT SEQ ID NO : 49-硫代磷酸酯抑制端粒酶的活性并诱导非洲淋巴瘤细胞的细胞凋亡(Mata 等, Toxicol. Appl. Pharmacol. 144 : 189, 1997)。

为测定端粒酶活性, 用 PCR-端粒重复扩增方法(TRAP) (Roche, Laval, Quebec, Canada)分析 2×10^5 个 Jurkat T 细胞的提取物。在 1—100 g/ml 浓度下, GT SEQ ID NO : 25-磷酸二酯表现出 0—10%的抗端粒酶活性, 而 AGT SEQ ID NO : 49-硫代磷酸酯表现出 30—75%抗端粒酶活性。GT SEQ ID NO : 25-硫代磷酸酯和 GT SEQ ID NO : 49-磷酸二酯都没有表现出任何抗端粒酶活性。

将 Jurkat T 细胞与 2、3、4、5、6 和 7 碱基的 GT 序列一起培养(表 5)。

表 5 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
GT-(GT) ₁ SEQ ID NO:50-(2 bases)	38
TG-(TG) ₁ SEQ ID NO:51-(2 bases)	50
TGT-(TG) ₁ T SEQ ID NO:7 (3 bases)	22
GTG-(GT) ₁ G SEQ ID NO:8-(3 bases)	46
GTGG-G(TG) ₁ G SEQ ID NO:52-(4 bases)	52
TTGT-T(GT) ₁ T SEQ ID NO:53-(4 bases)	25
GTGT-G(TG) ₁ T SEQ ID NO:54-(4 bases)	42
TTGG-T(TG) ₁ G SEQ ID NO:55-(4 bases)	44
GGTG-G(GT) ₁ G SEQ ID NO:56-(4 bases)	54
TGTT-T(GT) ₁ T SEQ ID NO:57-(4 bases)	32
GGTT-G(GT) ₁ T SEQ ID NO:58-(4 bases)	37
TGTG-T(GT) ₁ G SEQ ID NO:59-(4 bases)	52
GGTGG-G(GT) ₁ G ₂ SEQ ID NO:60-(5 bases)	50
GGGTG-G ₂ (GT)G SEQ ID NO:61-(5 bases)	50
TGTGTG-(TG) ₃ SEQ ID NO:9-(6 bases)	36
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	48

TTTGTT-TT(TG) ₁ TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	31
GGTGGG-GG(TG) ₁ GG SEQ ID NO:24-(6 bases)	48
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	60
TTGTTT-TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	34
TGGTTG-TG(GT) ₁ TG SEQ ID NO:29-(6 bases)	42
GGGGTGG-G ₃ (GT) ₁ G ₂ SEQ ID NO:62-(7 bases)	41
GGGTGGG-G ₂ (GT) ₁ G ₃ SEQ ID NO:63-(7 bases)	28
TGGGTGG-TG ₂ (GT) ₁ G ₂ SEQ ID NO:64-(7 bases)	55
GGGTGGT-G ₂ (GT) ₁ G ₂ T SEQ ID NO:65-(7 bases)	48

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 5 所示，2、3、4、5、6 和 7 碱基的 GT 序列抑制 Jurkat T 细胞的增殖。

实施例 5

HL-60 人早幼粒细胞白血病细胞增殖的抑制

HL-60 早幼粒细胞白血病细胞是 p53 突变的人悬浮肿瘤模型。将 HL-60 细胞与 6 碱基的 GT 序列一起培养(表 6)。

表 6 HL-60 人早幼粒细胞白血病细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
TGTGTG-(TG) ₃ SEQ ID NO:9-(6 bases)	7
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	13
TTTGTT-TT(TG) ₁ TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	13
GGTGGG-GG(TG) ₁ GG SEQ ID NO:24-(6 bases)	18
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	35
TTGTTT-TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	16

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 6 所示，6 碱基的 GT 序列抑制 HL-60 细胞的增殖。

实施例 6

MCF-7 人乳腺癌细胞增殖的抑制

MCF-7 人乳腺癌细胞是半胱氨酸门冬氨酰特异性蛋白酶 3 阴性的、雌激素依赖性的人实体肿瘤模型。将 MCF-7 细胞(5×10^5 个细胞/ml)与 3

和 6 碱基的 GT 序列一起培养(表 7)。

表 7 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
TGT-(TG)T SEQ ID NO:7-(3 bases)	-6
GTG-(GT)G SEQ ID NO:8-(3 bases)	18
TGTGTG-(TG) ₃ SEQ ID NO:9-(6 bases)	6
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	31
TTTGTT-TT(TG) ₁ TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	7
GGTGGG-GG(TG) ₁ GG SEQ ID NO:24-(6 bases)	41
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	41
TTGTTT-TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	20

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 7 所示，6 和 7 碱基的 GT 序列抑制 MCF-7 细胞的增殖。

实施例 7

PC-3 人前列腺癌细胞增殖的抑制

PC-3 前列腺癌细胞是 p53 突变的、雄激素非依赖性的人实体肿瘤模型。将 PC-3 细胞 (5×10^5 个细胞/ml) 与 3 和 6 碱基的 GT 序列一起培养(表 8)。

表 8 PC-3 人前列腺癌细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
TGT-(TG)T SEQ ID NO:7-(3 bases)	8
GTG -(GT)G SEQ ID NO:8-(3 bases)	13
TGTGTG (TG) ₃ SEQ ID NO:9-(6 bases)	16
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	37
TTTGTT-TT(TG) ₁ TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	14
GGTGGG-GG(TG) ₁ GG SEQ ID NO:24-(6 bases)	26
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	38
TTGTTT-TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	18

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 8 所示，3 和 6 碱基的 GT 序列抑制 PC-3 细胞的增殖。

实施例 8

LNCaP 人前列腺癌细胞增殖的抑制

LNCaP 前列腺癌细胞是 TGF- β 1 受体阴性的、雄激素-非依赖性的、转移性人实体肿瘤模型。将 LNCaP 细胞 (5×10^5 个细胞/ml) 与 6 碱基的 GT 序列一起培养(表 9)。

表 9 LNCaP 人前列腺癌细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
TGTGTG-(TG) ₃ SEQ ID NO:9-(6 bases)	-9
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	-4
TTTGTT-TT(TG)TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	14
GGTGGG-GG(TG)GG SEQ ID NO:24-(6 bases)	17
GGGTGG-GG(GT)GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	18
TTGTTT-TT(GT)TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	22

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 9 所示，6 碱基的 GT 序列抑制 LNCaP 细胞的增殖。

实施例 9

THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞增殖的抑制

THP-1 急性单核细胞性白血病细胞是无 p53 的人悬浮肿瘤模型。将 THP-1 细胞 (1.6×10^6 个细胞/ml) 与 6 碱基的 GT 序列一起培养(表 10)。

表 10 THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
TGTGTG-(TG) ₃ SEQ ID NO:9-(6 bases)	0
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	11
TTTGTT-TT(TG) ₁ TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	8
GGTGGG-GG(TG) ₁ GG SEQ ID NO:24-(6 bases)	6
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	15
TTGTTT-TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	1

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 10 所示，6 碱基的 GT 序列抑制 THP-1 细胞的增殖。

实施例 10

OVCAR-3 人卵巢癌细胞增殖的抑制

OVCAR-3 卵巢癌细胞是 p53 突变的、p21/waf-1/Cip 缺失的、转移性人实体肿瘤模型。将 OVCAR-3 细胞 (5×10^5 个细胞/ml) 与 2、6 和 18 碱基的 GT 细胞一起培养并与 6 碱基的 AGT 序列一起培养(表 11)。

表 11 OVCAR-3 人卵巢癌细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
TG-(TG) ₁ SEQ ID NO:51-(2 bases)	23
TTAGGG-TT(AG) ₁ GG SEQ ID NO:49-(6 bases)	15
GTGTGTGTGTGTGTGTGT-(GT) ₉ SEQ ID NO:18-(18 bases)	10
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	15

中“bases”为“碱基”。

如表 11 所示, 2、6 和 18 碱基的 GT 序列以及 6 碱基的 AGT 序列抑制 OVCAR-3 细胞的增殖。

实施例 11

SK-OV-3 人卵巢癌细胞增殖的抑制

SK-OV-3 卵巢癌细胞是 p53 突变的、p21/waf-1/Cip 缺失的、p15^{ink48} 缺失的、p16^{ink4} 缺失的、转移性人实体肿瘤模型。将 SK-OV-3 细胞 (5×10^5 个细胞/ml) 与 2、6 和 18 碱基的 GT 序列一起培养(表 12)。

表 12 SK-OV-3 人卵巢癌细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
TG-(TG) ₁ SEQ ID NO:51-(2 bases)	18
TTAGGG-TT(AG) ₁ GG SEQ ID NO:49-(6 bases)	11
GTGTGTGTGTGTGTGTGT-(GT) ₉ SEQ ID NO:18-(18 bases)	6
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	12

注: 表中“bases”为“碱基”。

如表 12 所示, 2、6 和 18 碱基的 GT 序列抑制 SK-OV-3 细胞的增殖。

实施例 12

磷酸二酯和硫代磷酸酯序列对细胞增殖的抑制

据报道, 通过用硫原子取代一个或多个磷酸酯基上的非桥氧原子修饰的天然磷酸二酯序列提高寡核苷酸序列在生物体液和细胞中对内切核酸酶的稳定性(Crooke 等, Anticancer Drugs 6 : 609, 1991)。

将 Jurkat 人白血病 T 细胞(表 13)、LNCaP 人前列腺癌细胞(5×10^5 个细胞/ml) (表 14)和 MCF-7 人乳腺癌细胞 (5×10^5 个细胞/ml) (表 15) 与具有氧原子(磷酸二酯)或硫原子(硫代磷酸酯)作为磷酸酯基的非桥接原子的 6 碱基的 GT 序列一起培养。

表 13 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列	%抑制	
	磷酸二酯	硫代磷酸酯
TGTGTG- (TG) ₃ (6 碱基) SEQ ID NO: 9 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	37	-17
GTGTGT- (GT) ₃ (6 碱基) SEQ ID NO: 10 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	44	0
TTTGTT-TT (TG) ₃ TT(6 碱基) SEQ ID NO: 23 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	31	4
GGTGGG-GG (TG) ₃ GG (6 碱基) SEQ ID NO: 24 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	48	6
GGGTGG-GG (GT) ₃ GG (6 碱基) SEQ ID NO: 25 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	60	0
TTGTTT-TT (GT) ₃ TT (6 碱基) SEQ ID NO: 26 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	34	0

表 14 LNCaP 人前列腺癌细胞增殖的%抑制

序列	%抑制	
	磷酸二酯	硫代磷酸酯
TGTGTG- (TG) ₃ (6 碱基) SEQ ID NO: 9 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	-9	-16
GTGTGT- (GT) ₃ (6 碱基) SEQ ID NO: 10 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	-4	-20
TTTGTT-TT (TG) ₃ TT (6 碱基) SEQ ID NO: 23 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	14	-11
GGTGGG-GG (TG) ₃ GG (6 碱基) SEQ ID NO: 24 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	17	-17
GGGTGG-GG (GT) ₃ GG (6 碱基) SEQ ID NO: 25 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	18	-8
TTGTTT-TT (GT) ₃ TT (6 碱基) SEQ ID NO: 26 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	22	-1

表 15 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖的%抑制

序列	%抑制	
	磷酸二酯	硫代磷酸酯
TGTGTG- (TG) ₃ (6 碱基) SEQ ID NO: 9 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	6	6
GTGTGT- (GT) ₃ (6 碱基) SEQ ID NO: 10 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	31	12
TTTGTT-TT (TG) ₂ TT (6 碱基) SEQ ID NO: 23 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	7	8
GGTGGG-GG (TG) ₂ GG (6 碱基) SEQ ID NO: 24 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	41	12
GGGTGG-GG (GT) ₂ GG (6 碱基) SEQ ID NO: 25 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	41	12
TTGTTT-TT (GT) ₂ TT (6 碱基) SEQ ID NO: 26 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	20	6

如表 13、14 和 15 所示, 6 碱基的 GT-磷酸二酯序列比 6 碱基的 GT-硫代磷酸酯序列更有效地抑制 Jurkat T、LNCaP 和 MCF-7 细胞的增殖。

实施例 13

混合的磷酸二酯和硫代磷酸酯序列对细胞增殖的抑制

将 Jurkat 人白血病 T 细胞(表 16)和 MCF-7 人乳腺癌细胞 (5×10^5 个细胞/ml) (表 17)与 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 一起培养, 其中氧原子(磷酸二酯)或硫原子(硫代磷酸酯)是磷酸酯基的非桥接原子。

表 16 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列*	%抑制
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ (oxygen atom 1 to 6) SEQ ID NO:25-(6 bases)	60
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ (oxygen atom 1,2,4,5,6; sulfur atom 3) SEQ ID NO:25-(6 bases)	17
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ (oxygen atom 1,2,3,5,6; sulfur atom 4) SEQ ID NO:25-(6 bases)	12
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ (oxygen atom 1,2,5,6; sulfur atom 3,4) SEQ ID NO:25-(6 bases)	13
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ (oxygen atom 2,3,4,5; sulfur atom 1,6) SEQ ID NO:25-(6 bases)	16
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ (oxygen atom 1,3,4,6; sulfur atom 2,5) SEQ ID NO:25-(6 bases)	11
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ (oxygen atom 3,4; sulfur atom 1,2,5,6) SEQ ID NO:25-(6 bases)	- 13
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ (sulfur atom 1 to 6) SEQ ID NO:25-(6 bases; phosphorothioate)	0

注: 表中“oxygen atom”为“氧原子”; “sulfur atom”为“硫原子”;

注: 表中“bases”为“碱基”。

*注: “o”代表磷酸酯基中的氧原子, “s”代表硫原子

表 17 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖的%抑制

序列*	%抑制
G _o G _o G _o T _o G _o G _o -G _o G _o (G _o T _o) ₁ G _o G _o (oxygen atom 1 to 6) SEQ ID NO:25-(6 bases; phosphodiester)	41
G _o G _o G _o T _o G _o G _o -G _o G _o (G _s T _o) ₁ G _o G _o (oxygen atom 1,2,4,5,6; sulfur atom 3) SEQ ID NO:25-(6 bases)	12
G _o G _o G _o T _o G _o G _o -G _o G _o (G _o T _s) ₁ G _o G _o (oxygen atom 1,2,3,5,6; sulfur atom 4) SEQ ID NO:25-(6 bases)	0
G _o G _o G _s T _s G _o G _o -G _o G _o (G _s T _s) ₁ G _o G _o (oxygen atom 1,2,5,6; sulfur atom 3,4) SEQ ID NO:25-(6 bases)	43
G _s G _o G _o T _o G _o G _s -G _s G _o (G _o T _o) ₁ G _o G _s (oxygen atom 2,3,4,5; sulfur atom 1,6) SEQ ID NO:25-(6 bases)	12
G _o G _s G _o T _o G _s G _o -G _s G _s (G _o T _o) ₁ G _s G _o (oxygen atom 1,3,4,6; sulfur atom 2,5) SEQ ID NO:25-(6 bases)	13
G _s G _s G _o T _o G _s G _s -G _s G _s (G _o T _o) ₁ G _s G _s (oxygen atom 3,4; sulfur atom 1,2,5,6) SEQ ID NO 25-(6 bases)	-3
G _s G _s G _s T _s G _s G _s -G _s G _s (G _s T _s) ₁ G _s G _s ; (sulfur atom 1 to 6) SEQ ID NO:25 (6 bases: phosphorothioate)	12

注:表中“oxygen atom”为“氧原子”;“sulfur atom”为“硫原子”;“phosphodiester”为“磷酸二酯”;“phosphorthioate”为“硫代磷酸酯”;“bases”为“碱基”。

*注：“o”代表磷酸酯基中的氧原子，“s”代表硫原子

如表 16 和 17 所示，用硫原子取代 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 的一个或多个磷酸酯基上的非桥接氧原子明显降低对 Jurkat T 和 MCF-7 细胞增殖的抑制作用。

实施例 14

鼠癌细胞增殖的抑制

EL-4 鼠淋巴瘤 T 细胞是一种悬浮肿瘤模型。将 EL-4 鼠淋巴瘤 T 细胞与 6、18、27 和 33 碱基的 GT 序列以及与 15 碱基的 ACG 序列一起培养(表 18)。

表 18 EL-4 鼠 T 淋巴瘤细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	4
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases phosphorothioate)	-8
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG-(G ₁ T) ₁₃ G SEQ ID NO:1-(27 bases)	1
GTGTGTTTGGTGGTTTGTGTTGTTGTTTTTG SEQ ID NO:66-(33 bases)	-1
AACCACAAGCCCAAC SEQ ID NO:67-(15 bases)	-6
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	-2
GTGTGTGTGTGTGTGTGT-(GT) ₉ SEQ ID NO:18-(18 bases)	-2

注：表中“phosphorothioate”为“硫代磷酸酯”；“bases”为“碱基”。

表 21 CF-51 犬乳腺癌细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ. ID NO:25-(6 bases)	14
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG-(GT) ₁₃ G SEQ ID NO:1-(27 bases)	23
GTGTGTTTGGTGGTTTTGTTTGTGTTTTTTG SEQ ID NO:66-(33 bases)	23
AACCACAAGCCCAAC SEQ ID NO:67-(15 bases)	20
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(9 bases)	15
TGTGTGTGTGTGTGT-(TG) ₄ T SEQ ID NO:17-(17 bases)	8

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 20 和 21 所示，6、9、17、27 和 33 碱基的 GT 序列以及 15 碱基的 ACG 序列抑制 D-17 和 CF-51 犬细胞的增殖。

实施例 16
癌细胞增殖的抑制

表 22 概括了 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 对。

表 22 人、鼠和犬癌细胞增殖的%抑制

细胞	GG(GT) ₁ GG(SEQ ID NO : 25)
人 Jurkat	60
人 PC-3	38
人 MCF-7	41
人 HL-60	35
人 OVCAR-3	14
人 LNCaP	18
人 SK-OV-3	12
人 THP-1	15
鼠 EL-4	1
鼠 A20	11
鼠 L-1210	8
犬 D17	18
犬 CF-51	14

如表 22 所示，人癌细胞比犬癌细胞和鼠癌细胞对 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 产生的增殖抑制作用更敏感。

实施例 17
两种 6 碱基的 GT 序列对增殖抑制的协同作用

将 Jurkat 人白血病 T 细胞与次最佳浓度(5. 0 g/ml)的 6 碱基的 GT 序列一起培养(表 23)。

表 23 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	5
TTGTTT-TT(GT) ₁ GG SEQ ID NO:26-(6 bases)	-2
GG(GT) ₁ GG + TT(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25 + SEQ ID NO:26	14
TGGTIG-TG(GT) ₁ TG SEQ ID NO:29-(6 bases)	-1
TGGTIG-TG(GT) ₁ TG SEQ ID NO:10-(6 bases)	2
TG(GT) ₁ TG + TG(GT) ₁ TG SEQ ID NO:29 + SEQ ID NO:10	9
GGTTGG-GG(TT) ₁ GG SEQ ID NO:41-(6 bases)	4
TTGTGG-TT(GT) ₁ GG SEQ ID NO:39-(6 bases)	4
GG(TT) ₁ GG + TT(GT) ₁ GG SEQ ID NO:41 + SEQ ID NO:39	18

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 23 所示，同时使用两种 6 碱基的 GT 序列具有协同抑制 Jurkat T 细胞增殖的作用。

实施例 18

对化疗剂抗肿瘤作用的增强

在 0、0.1、1.0 或 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 5-氟尿嘧啶或顺铂的存在下，将 Jurkat 人白血病 T 细胞与 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 和 27 碱基的 GT SEQ ID NO : 1 一起培养（表 24）。5-氟尿嘧啶是一种干扰 DNA 和 RNA 合成的抗代谢剂。顺铂是一种交联 DNA 并抑制 DNA 前体的烷基化试剂。

表 24 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列	%抑制			
	5-氟尿嘧啶 ($\mu\text{g/ml}$)			
	0.0	0.1	1.0	10.0
5-氟尿嘧啶	0	3	14	38
GG(GT) ₁ GG-(6 碱基) SEQ ID NO:25(1.0 $\mu\text{g/ml}$)	0	10	21	40
(GT) ₁₀ G-(27 碱基) SEQ ID NO:1(1.0 $\mu\text{g/ml}$)	3	15	25	41
	顺铂 ($\mu\text{g/ml}$)			
	0.0	0.1	1.0	10.0
	0.0	0.1	1.0	10.0
顺铂	0	7	29	73
GG(GT) ₁ GG-(6 碱基) SEQ ID NO:25(1.0 $\mu\text{g/ml}$)	0	14	38	76
(GT) ₁₀ G-(27 碱基) SEQ ID NO:1(1.0 $\mu\text{g/ml}$)	3	18	35	76

如表 24 所示，6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 和 27 碱基的 GT SEQ ID NO : 1 增强，并且 GT SEQ ID NO : 25 增强 0.1 和 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的顺铂对 Jurkat T 细胞增殖的抗肿瘤作用。

在 0、0.1、1.0 或 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 5-氟尿嘧啶或他莫昔芬的存在下，将 MCF-7 人乳腺癌细胞 (5×10^5 个细胞/ml) 与 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 和 27 碱基的 GT SEQ ID NO : 1 一起培养。他莫昔芬是一种雌激素拮抗剂。

表 25 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖的%抑制

序列	%抑制			
	5-氟尿嘧啶 ($\mu\text{g/ml}$)			
	0.0	0.1	1.0	10.0
5-氟尿嘧啶	0	13	28	28
GG(GT) ₆ GG-(6 碱基) SEQ ID NO:25 (1.0 $\mu\text{g/ml}$)	6	24	36	33
(GT) ₁₃ G-(27 碱基) SEQ ID NO:1 (1.0 $\mu\text{g/ml}$)	8	24	35	33
	他莫昔芬 ($\mu\text{g/ml}$)			
	0.0	0.1	1.0	10.0
他莫昔芬	0	10	18	15
GG(GT) ₆ GG-(6 碱基) SEQ ID NO:25 (1.0 $\mu\text{g/ml}$)	6	21	24	31
(GT) ₁₃ G-(27 碱基) SEQ ID NO:1 (1.0 $\mu\text{g/ml}$)	8	19	24	20

如表 25 所示，6 碱基的 SEQ ID NO : 25 增强 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 5-氟尿嘧啶和 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 他莫昔芬对 MCF-7 细胞增殖的抗肿瘤作用。27 碱基的 SEQ ID NO : 1 不增强 5-氟尿嘧啶或他莫昔芬对 MCF-7 细胞增殖的抗肿瘤作用。

实施例 19

重复的 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 对增殖的抑制

将 Jurkat 人白血病 T 细胞与 1、2、3 和 4 重复的 6 碱基的 GG (GT)₆GG (SEQ ID NO : 25) 一起培养(表 26)。

表 26 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
GGGTGG-GG(GT) ₆ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	60
GGGTGGGGGTGG-[GG(GT) ₆ GG] ₂ SEQ ID NO:68-(12 bases)	18
GGGTGGGGGTGGGGGTGG-[GG(GT) ₆ GG] ₃ SEQ ID NO:69-(18 bases)	5
GGGTGGGGGTGGGGGTGGGGGTGG-[GG(GT) ₆ GG] ₄ SEQ ID NO:70-(24 bases)	13

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 26 所示, 6 碱基的 GT SEQ. ID NO : 25 对 Jurkat T 细胞增殖的抑制率为 60%, 而 12 碱基的 GT SEQ ID NO : 68、18 碱基的 GT SEQ ID NO : 69 和 24 碱基的 GT SEQ ID NO : 70 对 Jurkat T 细胞增殖的抑制作用减弱。6 碱基的 GT SEQ. ID NO : 25 的熔化温度(T_m)为 2.5℃, 但 GT SEQ ID NO : 68 的熔融温度升至 56.8℃, GT SEQ ID NO : 69 的熔融温度为 76.3℃, GT SEQ ID NO : 70 的熔融温度为 86.3℃。

实施例 20

由 Bacillus Calmette-guerin (BCG) 衍生的序列对增殖的抑制

据报道, BCG 衍生的序列抑制体内肿瘤的生长(Kataoka 等, Jpn. J. Cancer Res. 83 : 244, 1992)。另外据报道, 当与 IMC 细胞预先混合并注射到 CDF-1 小鼠中时, A-2 (SEQ ID NO : 72) 和 BCG A-4 (SEQ ID NO : 74) 对 IMC 肿瘤生长的抑制分别达 88% 和 37%。

将 Jurkat 人白血病 T 细胞与由 BCG 衍生的 45 碱基的序列一起培养(表 27)。

表 27 Jurkat 人白血病 T 细胞增殖的%抑制

序列	%抑制
BCG A-1 AAAGAGGGGCATGACCCGGTGC GGGGCTTCTTGCACTCGGCATAG SEQ ID NO:71 (45 bases)	6
BCG A-2 AAAAGAAGTGGGGTGCCCCAC GATACCAACGATGGTGTGTCCA SEQ ID NO:72 (45 bases)	19
BCG A-3 TCCATCGCCAAGGAGATCGAGC TGGAGGATCCGTACGAGAAGATC SEQ ID NO:73 (45 bases)	24
BCG A-4 ACCGATGACGTCGCCGGTGACG GCAACACGACGGCCACCGTGCTG SEQ ID NO:74 (45 bases)	9
BCG A-6 ACGAGACCACCATCGTCGAGGG CGCCGGTGACACCGACGCCATCG SEQ ID NO:75 (45 bases)	21
BCG A-7 GCCGAGAAGGTGCGCAACCTGC CGGCTGGCCACGGAAGTGAACGCT SEQ ID NO:76 (45 bases)	4
BCG M-3 ACGCCGACGTCGTCTGTGGTGG GGTGTCTACGCCAACGCGACGG SEQ ID NO:77 (45 bases)	22
BCG ALPHA-1 CGACTACAACGGCTGGGATATC AACACCCGCGGTCGAGTGGTA SEQ ID NO:78 (45 bases)	10

注: 表中“bases”为“碱基”。

如表 27 所示, BCG 衍生的序列对 Jurkat T 细胞增殖的抑制率 $\leq 24\%$ 。

实施例 21

细胞周期停滞的诱导

使用 CYCLETEST™ PLUS DNA 市售检测盒(Becton Dickinson)测定细胞周期阶段。概括地说, 如下得到细胞的核: 将细胞膜溶于非离子洗涤剂中, 用胰蛋白酶除去细胞的细胞支架和核蛋白, 用 RNA 酶消化细胞 RNA 并用精胺稳定核染质。将碘化丙锭加到细胞核中并在安装有电子双重识别能力的流式细胞术(FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA)中分析它们的荧光。用 MODFIT LT 软件(Verity Software House Inc., Topsham, MA)分析在细胞周期的 G_0/G_1 、早期 S(SE)、中期 S(SM)、晚期 S(SL) 或 G_2/M 阶段积聚的细胞。

将以指数生长的 Jurkat 人白血病 T 细胞(表 28)和 MCF-7 人乳腺癌细胞(5×10^5 个细胞/ml) (表 29)与 2、6、15、18、27 和 45 碱基的包含 A、C、G 和 T 的序列一起培养。将细胞收集并离心, 再测定细胞周期的阶段。

表 28 Jurkat T 人白血病细胞的细胞周期停滞的诱导

	处于各阶段的细胞%					停滞*
	G_0/G_1	SE	SM	SL	G_2/M	
未处理细胞	31.4	19.1	14.3	11.6	23.6	无
GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 碱基)	28.5	46.3	14.6	10.7	0.0	末期 SE
TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 碱基)	32.6	11.5	12.8	10.7	32.4	末期 G_2/M (弱)
GT(GT) ₁ GT SEQ ID NO:10-(6 碱基)	30.8	41.9	16.8	10.2	0.3	末期 SE
AG(GT) ₁ GA SEQ ID NO:31-(6 碱基)	35.2	29.1	10.4	8.2	17.1	中期 SE
GG(AA) ₁ GG SEQ ID NO:42-(6 碱基)	48.0	19.8	8.5	5.8	34.1	末期 G_0/G_1
GG(CC) ₁ GG SEQ ID NO:43-(6 碱基)	26.5	21.3	22.8	10.7	18.7	末期 SM(弱)
GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 碱基硫代磷酸酯)	34.9	14.8	15.0	10.6	24.7	无
(G ₁ T) ₁₃ G SEQ ID NO:1-(27 碱基)	40.6	35.6	14.2	9.3	0.3	末期 SE
(G ₁ T) ₁₃ G SEQ ID NO:1-(27 碱基硫代磷酸酯)	33.7	17.6	13.2	11.0	24.5	无
(G ₃ T) ₆ G ₃ SEQ ID NO:2-(27 碱基)	34.3	15.5	13.6	10.3	26.4	无
(G ₅ T) ₄ G ₃ SEQ ID NO:3-(27 碱基)	40.5	13.3	12.9	9.7	23.6	无
(G ₇ T) ₃ G ₃ SEQ ID NO:4-(27 碱基)	36.5	16.3	13.8	11.1	22.3	无

AACCACAAGCCCAAC SEQ ID NO:67-(15 碱基)	39.6	13.5	12.8	9.5	24.6	无
TT(AG) ₆ GG SEQ ID NO:49-(6 碱基)	24.6	37.2	19.5	5.9	12.8	中期 SM
(GT) ₉ SEQ ID NO:18-(18 碱基)	24.2	26.7	24.0	8.7	16.4	中期 SM
BCG A-1 SEQ ID NO:71-(45 碱基)	19.8	31.7	22.5	14.0	12.0	中期 SM
BGC A-3 SEQ ID NO:73-(45 碱基)	32.3	20.2	14.1	12.0	21.4	无
TG SEQ ID NO:51-(2 碱基)	23.1	52.3	14.8	9.8	0.0	末期 SE

如表 28 所示，在 Jurkat T 细胞中，2、6 和 27 碱基的 GT 序列诱导细胞周期的 SE 阶段停止，6 碱基的 CG 和 AGT，18 碱基的 GT 和 45 碱基的 BCG A-1 序列诱导细胞周期的 SM 阶段停止，6 碱基的 AG 序列诱导细胞周期的 G₀/G₁阶段停止。

表 29 MCF-7 人乳腺癌细胞的细胞周期停滞的诱导

	处于各阶段的细胞%					停滞*
	G ₀ /G ₁	SE	SM	SL	G ₂ /M	
未处理细胞	23.6	14.4	10.8	11.1	40.1	无
GG(GT) ₆ GG SEQ ID NO:25-(6 碱基)	21.9	27.6	22.2	10.9	17.4	末期 SM
TT(AG) ₆ GG SEQ ID NO:49-(6 碱基)	20.0	18.6	25.7	20.7	15.0	中期 SM
(GT) ₉ SEQ ID NO:18-(18 碱基)	25.3	31.6	16.9	10.5	15.7	中期 SM
TG SEQ ID NO:51-(2 碱基)	17.2	36.4	13.4	14.1	17.9	末期 SM

如表 29 所示，在 MCF-7 细胞中，2 和 6 碱基的 GT 序列诱导细胞周期的 SE 阶段停止，6 碱基的 AGT 序列和 18 碱基的 GT 序列诱导细胞周期的 SM 阶段停止。

实施例 22

GT SEQ ID NO : 25、AC SEQ ID NO : 79 和 GT SEQ ID NO : 25 + AC SEQ ID NO : 79 诱导细胞周期停滞

将 Jurkat 人细胞白血病 T 细胞(1 X 10⁶个细胞/ml)与 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 一起培养 24 小时，其中补充有 6 碱基的 AC SEQ ID NO : 79 和 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 + 6 碱基的 AC SEQ ID NO : 79。GT SEQ ID NO : 25 和 AC SEQ ID NO : 79 通过混合所述寡核苷酸(1 : 1)并在 65℃加热 10 分钟进行杂交。作为对照，将 GT SEQ ID NO : 25 和 AC SEQ

ID NO : 79 在 65℃加热 10 分钟(表 30)。

表 30 Jurkat 人白血病 T 细胞的细胞周期停滞的诱导

	处于各阶段的细胞%					停滞*
	G ₀ /G ₁	SE	SM	SL	G ₂ /M	
未处理细胞	31.7	15.2	13.7	14.0	25.4	无
GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 碱基)	28.0	45.8	14.0	11.3	0.9	末期 SE
CC(AC) ₁ CC SEQ ID NO:79-(6 碱基)	36.0	10.4	13.4	9.7	30.5	无
GT(GT) ₁ GT+CC(AC) ₁ CC SEQ ID NO:25+ SEQ ID NO:79-(12 碱基)	35.0	13.0	10.1	8.7	33.2	无

如表 30 所示, 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 诱导细胞周期的 SE 阶段后期停止, 而补充的 6 碱基的 AC SEQ ID NO : 79 对细胞周期没有影响。GT SEQ ID NO : 25 和 AC SEQ ID NO : 79 的杂交抵销 GT SEQ ID NO : 25 对细胞周期停滞的诱导作用。这些数据证明, 为具有有效性, 本发明的序列必须是单链的。

实施例 23

细胞凋亡的诱导

原生质膜磷脂酰丝氨酸的再分配和核基质蛋白(NuMA)的释放是正经历细胞凋亡的细胞的特征(Martin 等, J. Exp. Med., 182 : 1545, 1995 ; Miller 等, Biotechniques, 15 : 1042, 1993)。

使用 FITC-结合的膜联蛋白 V (BD Pharmingen, San Diego, CA)通过流式细胞术测定细胞凋亡期间原生质膜中磷脂酰丝氨酸的再分配。用市售的 ELISA 检测盒(Oncogen/Calbiochem, Cambridge, MA)测定释放到上清液中的 NuMA。

将 Jurkat 人白血病 T 细胞与 50 μM 的 3、4、5、6 和 7 GT 碱基序列、5 碱基的 ACGT 序列、6 碱基的 AG、GG、AGT 和 CGT 序列以及 7 碱基的 GG 序列一起培养。表 31 显示出凋亡的细胞的百分数(对磷脂酰-丝氨酸/膜联蛋白 V 染色(PS/A-V)阳性的)和由细胞释放的 %NuMA。

表 31 Jurkat T 细胞白血病细胞的细胞凋亡的诱导

序列	凋亡的细胞% (PS/A-V 染色阳性的)	释放的%NuMA (处理组对未处理组)
未处理细胞	4	0
GG(GT) _i GG SEQ ID NO:2-(6 bases)	27	69
GG(GA) _i GG SEQ ID NO:45-(6 bases)	27	74
GG(GC) _i GG SEQ ID NO:46-(6 bases)	16	11
GG(GG) _i GG SEQ ID NO:44-(6 bases)	5	0
AA(GT) _i AA SEQ ID NO:27-(6 bases)	20	56
CC(GT) _i CC SEQ ID NO:28-(6 bases)	6	0
TT(GT) _i TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	14	23
GT(GT) _i GT SEQ ID NO:10-(6 bases)	33	90
GG(GT) _i SEQ ID NO:78-(4 bases)	21	64
(GT) _i GG SEQ ID NO:52-(4 bases)	24	60
G(GT) _i G SEQ ID NO:56-(4 bases)	24	112
(GT) _i G SEQ ID NO:8-(3 bases)	21	97
T(GT) _i SEQ ID NO:7-(3 bases)	10	35
GG(GT) _i G SEQ ID NO:6-(5 bases)	25	92
G(GT) _i GG SEQ ID NO:60-(5 bases)	25	120
GG(GG) _i GGG SEQ ID NO:63-(7 bases)	12	26
GGG(GT) _i GG SEQ ID NO:62-(7 bases)	30	123
CG(GT) _i A SEQ ID NO:80-(5 bases)	6	9

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 31 所示，3、4、5 和 6 碱基的 GT、AG、CG 和 AGT 序列诱导 Jurkat T 细胞的细胞凋亡。5 碱基的 ACGT 和 6 碱基的 CGT 以及 GG 序列不诱导 Jurkat T 细胞的细胞凋亡。

实施例 24

细胞内钙的增高 (Ca^{2+})_i

据报道，细胞内钙 (Ca^{2+}) 的增高与细胞凋亡的诱导有关 (Lam 等, Mol. Endocrinol. 7 : 686, 1993)。用荧光探针 Fluo-3-AM (Cell Permaant, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 跟踪 (Ca^{2+})_i。Fluo-3-AM 荧光增

强则表示 $(Ca^{2+})_i$ 增高。

将 Jurkat 人白血病 T 细胞与 6 碱基的 GT SEQ. NO : 25 一起培养 24 小时。离心收集细胞, 将其悬浮于含 1% FBS 的 PBS 中, 并在 37°C 用 10 μ M Fluo-3-AM 负载 1 小时。在 488 nm 激发波长和 530 nm 发射波长测定细胞荧光 (FL1 检测器)。在 FACSCALIBUR 上用程序 CellQUEST (Becton Dickinson) 分析数据。

如附图 1 所示, Jurkat T 细胞与 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 一起培养导致细胞荧光增强 88%, 表明 $(Ca^{2+})_i$ 增高了。

实施例 25

细胞凋亡的诱导

通过与细胞表面受体结合的配体引发细胞凋亡, 所述配体包括, 但不限于 Fas (CD95) 和肿瘤坏死因子 (TNF)。与 Fas Ligand 结合的 Fas 和与 TNF Receptor 1 结合的 TNF 引发细胞内产生导致半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 (caspases) 活化的信号。半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶引发致命的与核 DNA-碎裂有关的细胞凋亡完成的蛋白水解级联反应、核基质蛋白 (NuMA) 的释放并细胞底物接触的丧失。

将 Jurkat 人白血病 T 细胞 (1×10^6 /ml) 与 6 和 27 GT 碱基序列一起培养 (表 32)。如实施例 23 测定 NuMA。

表 32 Jurkat 人白血病 T 细胞释放的 %NuMA

序列	释放的 %NuMA
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-(G,T) ₁₃ G SEQ ID NO:1-(27 bases)	22
GGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGG-(G,T) ₆ G ₃ SEQ ID NO:2-(27 bases)	49
GGGGGTGGGGGTGGGGGTGGGGGTGGG-(G,T) ₄ G ₃ SEQ ID NO:3-(27 bases)	139
GGGGGGGTGGGGGGGTGGGGGGGTGGG-(G,T) ₃ G ₃ SEQ ID NO:4-(27 bases)	90
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	269

注: 表中“bases”为“碱基”。

如表 32 所示, 使用 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 的 % NuMA 释放大于使用 27 碱基的 GT SEQ ID NOs : 1、2、3 和 4 的 % NuMA 释放。

实施例 26

6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 和 6 碱基的 AC SEQ ID NO : 79 对细胞凋亡的诱导

将 Jurkat 人细胞白血病 T 细胞与 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 一起培养 24 小时, 其中补充有 6 碱基的 AC SEQ ID NO : 79 和 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 + 6 碱基的 AC SEQ ID NO : 79。GT SEQ ID NO : 25 和 AC SEQ ID NO : 79 通过混合所述序列(1 : 1)并在 65℃加热 10 分钟进行杂交。作为对照, 将 GT SEQ ID NO : 25 和 AC SEQ ID NO : 79 在 65℃加热 10 分钟(表 33)。如实施例 23 评价细胞凋亡。

表 33 Jurkat 人白血病 T 细胞的细胞凋亡的诱导

	凋亡的细胞% (PS/A-V 染色阳性的)	释放的 NuMA% (未处理细胞对处理细胞)
未处理细胞	4	0
GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	27	69
CC(AC) ₁ CC SEQ ID NO:79-(6 bases)	6	9
GT(GT) ₁ GT + CC(AC) ₁ CC SEQ ID NO:25-(6 bases) + SEQ ID NO:79-(6 bases)	5	9

注: 表中“bases”为“碱基”。

如表 33 所示, 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 诱导 JurkatT 细胞的细胞凋亡, 但补充的 6 碱基的 AC SEQ ID NO : 79 对细胞凋亡没有影响。GT SEQ ID NO : 25 和 AC SEQ ID NO : 79 的杂交抵销 GT SEQ ID NO : 25 的细胞凋亡的诱导作用。这些数据证明, 为具有有效性, 本发明的序列必须是单链的。

实施例 27

草分支杆菌衍生的富含 GT 和富含 AC 的序列对增殖的抑制、细胞周期的停止和细胞凋亡的诱导作用

将 Jurkat 人白血病 T 细胞与草分支杆菌的 murA 基因(GenBank : Accession Number X99776)衍生的富含 GT 和富含 AC 的序列一起培养。如实施例 3 通过还原 MTT 测定增殖的抑制作用, 如实施例 21 通过流式细胞术用碘化丙锭测定细胞周期的停止, 以及如实施例 23, 通过流式细胞

术用膜联蛋白-V-FITC 评价细胞凋亡。

表 34 Jurkat 细胞增殖的抑制、细胞周期的停止和细胞凋亡的诱导

序列	%抑制 (增殖)	凋亡的细胞%	细胞周期停滞
AACCACAAGCCCAAC SEQ ID NO:67-(15 碱基)	0	4	无
GTGTGTTTGGT SEQ ID NO:81-(11 碱基)	22	23	G0/G1
GGTTTGTGTTG SEQ ID NO:82-(11 碱基)	20	25	末期 SE
TTGTTTTTTTG SEQ ID NO:83-(11 碱基)	21	16	SM

如表 34 所示，富含 GT 的 SEQ ID NOs : 81、82 和 83 抑制 Jurkat T 细胞的增殖、诱导所述细胞的细胞周期停滞并诱导其细胞凋亡；但富含 AC 的 SEQ ID NO : 15 对 Jurkat T 细胞的增殖、细胞周期停滞和细胞凋亡均没有抑制作用。

实施例 28

GT 序列对半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶活化的调节

半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶识别 3 种主要的肽底物序列：1) Tyr-Val-Ala-Asp (YVAD, 半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶-1、-4 和-5) (SEQ ID NO : 84); 2) Asp-Glu-Val-Asp (DEVD, 半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶-2、-3 和-7) (SEQ ID NO : 85); 和 3) Ile- (Leu)-Glu-X-Asp (I(L)EXD; 半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶-8 和-10) (SEQ ID NO : 86) (Thornberry 等, J. Biol. Chem. 272 : 17907, 1997)。蛋白质靶中序列的识别导致靶的有限的和特异性的蛋白水解，正如在第一个实施例中，半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 调节半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7 的活化；正如在第二个实施例中，分解的结构蛋白质靶包括，但不限于核纤层蛋白；或者正如在第三个实施例中，活化的酶包括，但不限于 PARP。

使用 5'-C₂酰胺间隔区臂与标准酰胺-羧基水溶性 carbohexiimide 缀合技术(Guy 等, J. Chromatography. B. Biomed. Sci. Appl. 706 : 149, 1998)合成的寡核苷酸，通过化学保护的 GT 序列或化学保护的 AC 序列与

化学保护的选自 $\text{NH}_2\text{-YVAD-COOH}$ (SEQ ID NO : 84)、 $\text{NH}_2\text{-DEVD-COOH}$ (SEQ ID NO : 85) 和 $\text{NH}_2\text{-IEGD-COOH}$ (SEQ ID NO : 87) 的序列化学共轭生成 $\text{NH}_2\text{-XXXD-COO-GT}$ 序列构成物。在共轭后, 脱去反应性羧酸酯和反应性氨基的保护基。

包括, 但不限于 $\text{NH}_2\text{-YVAD-COO-GT}$; $\text{NH}_2\text{-DEVD-COO-GT}$; 和 $\text{NH}_2\text{-I(L)EXD-COO-GT}$ 的肽-GT(本文称 PGT) 序列构成物被酶在 D 和 GT 之间的羧酸酯官能团处裂解, 所述酶包括, 但不限于半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶、与癌症转移有关的酶、胶原酶和金属蛋白酶。这类裂解导致半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶获得的 GT 序列从 PGT 中释放。由此产生的胞内半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶活性的增高可, 例如提高化疗剂对多种药物耐药的癌细胞的疗效或者增强对弱抗原刺激的免疫反应。

为测定半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶的活化, 使用制造商建议的条件, 将对照组和处理组细胞洗涤、固定、渗透化并与识别活化形式的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶的 FITC-缀合抗体(Pharmingen, San Diego, CA)一起培养。在 FACSCALIBUR 上, 使用程序 CellQUEST (Becton Dickinson), 通过流式细胞术分析与活化的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 有关的荧光。或者, 采用基于与颜色指示分子硝基苯胺缀合的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶特异性的肽的分解分析, 通过比色法测定半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶的活化, 该分析是在 405 nm 以分光光度分析法定量进行。

实施例 29

GT SEQ ID NOs : 66、81、82 和 83 以及 AGC 序列 SEQ ID NO : 67 对半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶的活化

将 Jurkat T 细胞白血病细胞与下列序列一起培养 72 小时: 33 碱基的 GT SEQ ID NO : 66; 11 碱基的 GT SEQ ID NO : 81 (GT SEQ ID NO : 66 的碱基 1-11)、11 碱基的 GT SEQ ID NO : 82 (GT SEQ ID NO : 66 的碱基 12-22)、11 碱基的 GT SEQ ID NO : 83 (GT SEQ ID NO : 66 的碱基 23-33) 和 15 碱基的 ACG SEQ ID NO : 67。如实施例 28, 用 FITC 缀合抗体(Clone : C92-605)测定活性半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 (17-22 kDa)。

如附图 2A 所示, 33 碱基的 GT SEQ ID NO : 66 和 11 碱基的 GT SEQ ID NOs : 81、82 和 83 各自诱导非活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶原 3 转变为活性半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3, 但 15 碱基的 ACG SEQ ID NO : 67 不诱导半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶原 3 转变为活性半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3。

也可如实施例 28, 经比色法测定半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 的活化。如附图 2B 所示, 在用 33 碱基的 GT SEQ ID NO : 66 和 11 碱基的 GT SEQ ID NOs : 81、82 和 83 处理的细胞中, 半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 的活性比对照细胞中高 105%、77%、100%和 60%, 但在用 15 碱基的 ACG SEQ ID NO : 67 处理的细胞中, 半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 的活化与对照细胞大致相同。

实施例 30

6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 对半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 活性的活化

将 Jurkat T 细胞白血病细胞与 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 一起培养 72 小时。如实施例 28, 用比色法测定半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 的活化。如附图 3A 所示, 用 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 处理的细胞中半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 的活化比对照细胞中高 323%。

实施例 31

GT SEQ ID NO : 25 对半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶-7 的活化和 PARP 的分解

将 Jurkat T 细胞白血病细胞与 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 一起培养 72 小时。细胞用 PBS 洗涤三次, 用 10 mM HEPES (pH 7.5, 含 5 mM MgCl₂、1 mM 二硫苏糖醇、1.5 nM 抑肽酶、10 mM 亮抑蛋白酶肽和 2.5 μM 原钒酸钠)溶解并测定溶解物的蛋白质含量(Bradford J. Anal. Biochem. 72 : 248, 1976)。

通过蛋白质印迹分析测定活化的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7 和 PARP 的分解。将溶解物与 Laemmli 缓冲液(Laemmli U. Nature 15 : 680, 1970)混合, 振摇并与 100℃加热 4 分钟。将 Fifty jig 蛋白质加到各泳道上, 并在 100 V 的恒定电压下(1.5 h), 用 10% (半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶)或 17% (PARP)月桂基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白

质。将分得的蛋白质在 PVDF 膜上进行电印迹。用丽春红染色该膜监测相同的蛋白质负载量。

在 4℃ 下用缓冲液将膜阻断过夜, 所述缓冲液含有 1% Tris-缓冲的盐水(2 mM Tris-HCl, 13.7 mM NaCl, pH 7.6 和 0.1% 聚乙烯脱水山梨醇一月桂酸酯(土温 20) (TBST) + 5%脱脂奶粉。洗涤该膜并在室温下与鼠单克隆 IgG 抗-半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7 抗体(Pharmingen) (用 TBST+1% BSA 以 1:1000 稀释的)或者与鼠单克隆 IgG 抗-PARP 抗体(用 TBST+1% BSA 以 1:1000 稀释的) (Pharmingen)一起培养 1 小时。用与辣根过氧化物酶(用 TBST+5%脱脂奶粉以 1:1000 稀释的) (Pharmingen)缀合的羊抗鼠 IgG 测定与半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7 或 PARP 结合的 IgG。用加强的化学发光检测系统(ECL, Amersham, Corp., Amersham, UK)展开印迹。

如附图 3B 所示, 6 碱基的 GT SEQ ID NO : 25 诱导非活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶原 7 (30 kDa)转变为活性半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7 (19-20 kDa)以及活性 PARP 转变为失活的其 85 kDa 降解产物。

实施例 32

半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶活化的正反馈放大

将 Jurkat 人白血病 T 细胞与下列序列一起培养 72 小时: NH₂-YVAD-CO-GG (GT) GG、NH₂-DEVD-CO-GG (GT) GG、NH₂-IEGD-COO-GG (GT) GG、NH₂-YVAD-CO-AACCACAAGCCCAAC 、 NH₂-DVED-CO-AACCACAAGCCCAAC 和 NH₂-IEGD-CO-AACCACAAGCCCAAC。测定半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 和半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7 的活化。

NH₂-YVAD-CO-GT、NH₂-DEVD-CO-GT 和 NH₂-IEGD-COO-GT 各自诱导非活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 转化为活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 以及非活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7 转化为活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7, 但 NH₂-YVAD-CO-ACG、NH₂-DVED-CO-ACG 和 NH₂-IEGD-CO-ACG 不诱导非活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶原 3 转化为活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 或者非活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7 转化为活性的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7。

虽不期望受到下列假设的限制，但据认为在含半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶的细胞内，基础半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶活性调节半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶的释放，所述酶通过蛋白水解/水解 $\text{NH}_2\text{-XXXD-COO-GT}$ 构成物活化 GT 序列。这通过释放的半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶活化的 GT 序列导致在细胞内半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶活性(半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 3 和半胱氨酸门冬氨酰蛋白酶 7 的水平增高)的正放大。

实施例 33

诱导细胞因子的产生

除非另有说明，在 37°C 和 5% CO_2 中，将 1×10^6 个细胞与 $100 \mu\text{g/ml}$ 的各种测试序列一起培养 48 小时。在 $100 \mu\text{l}$ 培养上清液中，用合适的市售 ELISA (BioSource, Camarillo CA) 测定细胞因子 IL-6、IL-10、IL-12、IL- 1β 和 TNF- α 的产生 (pg/ml)。IL-12 ELISA 测定 IL-12 p70 络合物和游离 p40 亚基。结果以与对照细胞相比，处理的细胞产生的细胞因子的增加“倍数”(x)表示。

将 THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞与 2、3、6、9、12、14、15 和 18 碱基的 GT 序列一起培养并测定细胞因子 IL-6 的产生。(表 35)。

表 35 THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞产生的细胞因子

序列	↑. IL-6
TG-(TG) ₁ T SEQ ID NO:7-(3 bases)	2.7 x
TG-(TG) ₁ SEQ ID NO:51-(2 bases)	2.9 x
TGTGTG-(TG) ₃ SEQ ID NO:9-(6 bases)	4.0 x
GTGTGT-(GT) ₃ SEQ ID NO:10-(6 bases)	5.0 x
TGTGTGTG-(TG) ₄ T SEQ ID NO:11-(9 bases)	5.4 x
GTGTGTGTG-(GT) ₄ G SEQ ID NO:12-(9 bases)	5.4 x
TGTGTGTGTG-(TG) ₆ SEQ ID NO:13-(12 bases)	5.7 x
GTGTGTGTGTG-(GT) ₆ SEQ ID NO:14-(12 bases)	1.3 x
TGTGTGTGTGTG-(TG) ₇ SEQ ID NO:15-(14 bases)	1.0 x
GTGTGTGTGTGTG-(GT) ₇ G SEQ ID NO:16-(15 bases)	2.6 x
TGTGTGTGTGTGTGTG-(TG) ₉ SEQ ID NO:17-(18 bases)	2.2 x
GTGTGTGTGTGTGTGTG-(GT) ₉ SEQ ID NO:18-(18 bases)	2.8 x

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 35 所示，2、3、6、9、12、14、15 和 18 碱基的 GT 序列提高 THP-1 细胞产生的细胞因子 IL-6 的量。

将 THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞与 6 碱基的 GT、AG、CG、GG、AGT 和 CGT 序列一起培养并测定细胞因子 IL-12 和 IL-16 的产生(表 36)。

表 36 THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞产生的细胞因子

序列	↑. IL-12	↑. IL-6
TGTGTG-(TG) ₂ SEQ ID NO:9	1.8x	4.0x
GTGTGT-(GT) ₂ SEQ ID NO:10	2.2x	5.0x
TTTGTT-TT(TG) ₂ TT SEQ ID NO:23	3.5x	4.9x
GGTGGG-GG(TG) ₂ GG SEQ ID NO:24	3.7x	6.9x
GGGTGG-GG(GT) ₂ GG SEQ ID NO:25	2.3x	3.1x
TTGTTT-TT(GT) ₂ TT SEQ ID NO:26	3.5x	5.3
AAGTAA-AA(GT) ₂ AA SEQ ID NO:27	6.0x	12.8x
CCGTCC-CC(GT) ₂ CC SEQ ID NO:28	3.8x	12.6x
TGGTTG -TG(GT) ₂ TG SEQ ID NO:29	4.1x	10.5x
ATGTAT-AT(GT) ₂ AT SEQ ID NO:30	4.8x	9.8x
AGGTGA-AG(GT) ₂ GA SEQ ID NO:31	1.9x	4.9x
GAGTGA-GA(GT) ₂ GA SEQ ID NO:32	1.8x	5.8x
GGGTCT-GG(GT) ₂ CT SEQ ID NO:33	1.2x	3.1x
CCGTGG-CC(GT) ₂ GG SEQ ID NO:34	0.0x	10.8x
GGGTCC-GG(GT) ₂ CC SEQ ID NO:35	1.9x	21.3x
CTGTCT-CT(GT) ₂ CT SEQ ID NO:36	2.0x	15.9x
TCGTTT-TC(GT) ₂ TC SEQ ID NO:37	2.2x	12.9x
CGGTGC-CG(GT) ₂ GC SEQ ID NO:38	0.2x	6.9x
TTGTG-TT(GT) ₂ GG SEQ ID NO:39	0.0x	6.6x
GGGTT-GG(GT) ₂ TT SEQ ID NO:40	-1.2x	14.0x
GGTTGG-GG(TT) ₂ GG SEQ ID NO:41	3.3x	16.0x
GGAAG-GG(AA) ₂ G SEQ ID NO:42	4.1x	29.2x
GGCCGG-GG(CC) ₂ GG SEQ ID NO:43	3.1x	17.1x
GGGGGG-GG(GG) ₂ GG SEQ ID NO:44	0.0x	15.1x
GGGAGG-GG(GA) ₂ GG SEQ ID NO:45	-1.6x	23.2x
GGGCGG-GG(GC) ₂ GG SEQ ID NO:46	2.3x	9.8x
TTAGGG-TT(AG) ₂ GG SEQ ID NO:49	2.0x	6.7x

如表 36 所示, 6 碱基的 GT、AG、CG、GG、AGT 和 CGT 序列提高 THP-1 细胞产生的细胞因子 IL-12 和 IL-6 的量。

表 37 概括了 6 碱基的序列对 IL-12 和 IL-6 合成的诱导。

表 37 6 碱基序列诱导的 IL-6 和 IL-12 合成

增加倍数	IL-12 合成 SEQ ID NOs:	IL-6 合成 SEQ ID NOs:
≤2.0	9, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 44, 45, 49	
> 2.0 和 ≤10.0	10, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 45	9, 10, 23, 24, 25, 26, 30, 31, 32, 33, 38, 39, 46, 49
> 10.0		25, 27, 29, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 45

据报道, BCG 衍生的序列 A-3 (SEQ ID NO : 73)、A-4 (SEQ ID NO : 74)、A-6 (SEQ ID NO : 75)、A-7 (SEQ ID NO : 76)、M3 (SEQ ID NO : 77)和α1 (SEQ ID NO : 78)在体内活化 NK 细胞(Kataoka 等, Jpn. J. Cancer Res. 83 : 244, 1992)。将 THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞

与 45 碱基的 BCG-衍生序列一起培养并测定细胞因子 IL-12 和 IL-6 的产生(表 38)。

表 38 TOP-1 人急性单核细胞性白血病细胞产生的细胞因子

序列	↑. IL-12	↑. IL-6
BCG A-1 AAAGAGGGGCATGACCCGGTGC GGGGCTTCTTGCACTCGGCATAG SEQ ID NO:69-(45 bases)	1.9 x	2.6 x
BCG A-2 AAAAGAAGTGGGGTGCCCCAC GATCACCAACGATGGTGTGTCCA SEQ ID NO:70-(45 bases)	1.6 x	3.9 x
BCG A-3 TCCATCGCCAAGGAGATCGAGC TGGAGGATCCGTACGAGAAGATC SEQ ID NO:71-(45 bases)	1.7 x	2.5 x
BCG A-4 ACCGATGACGTGCGCCGGTGACG GCAACACGACGGCCACCGTGCTG SEQ ID NO:72-(45 bases)	0.9 x	1.8 x
BCG A-6 ACGAGACCACCATCGTCGAGGG CGCCGGTGACACCGACGCCATCG SEQ ID NO:73-(45 bases)	2.1 x	3.9 x
BCG A-7 GCCGAGAAGGTGCGCAACCTGC CGGCTGGCCACGGACTGAACGCT SEQ ID NO:74-(45 bases)	0.5 x	N.D.
BCG M-3 ACGCCGACGTGCTGTGTGGTGG GGTGTCTACCGCCAACGCGACGG SEQ ID NO:75-(45 bases)	1.6 x	2.8 x
BCG ALPHA-1 CGACTACAACGGCTGGGATATC AACACCCCGGCGTTTCGAGTGGTA SEQ ID NO:76-(45 bases)	1.1 x	2.1 x

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 38 所示，45 碱基的 BCG 衍生的序列极轻微地提高 THP-1 细胞产生的 IL-12 和 IL-6 的量。

实施例 34

磷酸二酯和硫代磷酸酯序列诱导 IL-12 的产生

将 THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞与 6 碱基的 GT 序列一起培养，所述序列具有作为磷酸酯基非桥接原子的氧原子(磷酸二酯)或硫原子(硫代磷酸酯)，并测定细胞因子 IL-12 的产生(表 39)。

表 39 THP-1 急性单核细胞性白血病细胞产生的 IL-12

序列	增加	
	磷酸二酯	硫代磷酸酯
TGTGTG-(TG) ₃ (6 碱基) SEQ ID NO:9 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	1.8x	-0.1x
GTGTGT-(GT) ₃ (6 碱基) SEQ ID NO:10 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	2.2x	-0.2x
TTTGT-TT(TG) ₃ TT (6 碱基) SEQ ID NO:23 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	3.5x	0.1x

GGTGGG-GG(TG) ₁ GG (6 碱基) SEQ ID NO: 24 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	3.7x	-0.1x
GGGTGG-GG(GT) ₁ GG (6 碱基) SEQ ID NO: 25 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	2.0x	0.0x
TTGTTT-TT(GT) ₁ TT (6 碱基) SEQ ID NO: 26 磷酸二酯, 硫代磷酸酯	3.8x	0.1x

如表 39 所示, 用硫原子(硫代磷酸酯)替代磷酸酯基上的非桥接氧原子(磷酸二酯)明显减少 THP-1 细胞产生的 IL-12 的量。

将 THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞与 6 碱基的 GT SEQ ID NO: 25 一起培养, 所述序列具有作为磷酸酯基非桥接原子的氧原子(磷酸二酯)或硫原子(硫代磷酸酯), 并测定细胞因子 IL-12 的产生(表 40)。

表 40 THP-1 人急性单核细胞性白血病细胞产生的 IL-12

序列*	增加
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ ; (oxygen atom: base 1 to 6) SEQ ID NO:25-(6 bases)	2.0
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ ; (oxygen atom: base 1,2,4,5,6; sulfur atom: base 3) SEQ ID NO:25-(6 bases)	0.1
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ ; (oxygen atom: base 1,2,3,5,6; sulfur atom: base 4) SEQ ID NO:25-(6 bases)	0.2x
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ ; (oxygen atom: base 1,2,5,6; sulfur atom: base 3,4) SEQ ID NO:25-(6 bases)	0.5x
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ ; (oxygen atom: base 2,3,4,5; sulfur atom: base 1,6) SEQ ID NO:25-(6 bases)	-0.1x
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ ; (oxygen atom: position 1,3,4,6; sulfur atom: position 2,5) SEQ ID NO:25-(6 bases)	-0.1x
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ ; (oxygen atom: position 3,4; sulfur atom: position 1,2,5,6) SEQ ID NO:25-(6 bases)	0
G ₀ G ₀ G ₀ T ₀ G ₀ G ₀ -G ₀ G ₀ (G ₀ T ₀) ₁ G ₀ G ₀ ; (sulfur atom: position 1 to 6) SEQ ID NO:25(6 bases)	0

注: 表中“oxygen atom”为“氧原子”; “bases”为“碱基”;

“sulfur atom”为“硫原子”; “position”为“位置”。

*注: “o”代表磷酸酯基中的氧原子, “s”代表硫原子

如表 40 所述, 用硫原子(硫代磷酸酯)替代 6 碱基的 GT SEQ ID NO: 25 中的非桥接氧原子(磷酸二酯)明显减少 THP-1 细胞产生的 IL-12 的量。

实施例 35

刺激人周围血单核细胞中细胞因子的合成

用 Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfee, Quebec, Canada), 通过密度梯度离心全血, 从 7 名健康的人分离周围血单核细胞(下文称“PBMCs”)。将 PBMCs 与 6 碱基的 GT、AGT、CGT、AG、

CG 和 GG 序列一起培养并测定细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 IL-12 的产生。

表 41 人 PBMC 产生的细胞因子

序列	IL-1 β 增加倍数 均值 $\pm$ SD(范围)	IL-6 增加倍数 均值 $\pm$ SD(范围)	IL-10 增加倍数 均值 $\pm$ SD(范围)	IL-12 增加倍数 均值 $\pm$ SD(范围)
TG(TG) ₁ TG SEQ ID NO:9-(6 bases)	1.2 $\pm$ 0.4 (0.8-1.5)	8.3 $\pm$ 12.8 (1.2-37.0)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.1)	2.7 $\pm$ 2.6 (1.0-6.6)
GT(GT) ₁ GT SEQ ID NO:10-(6 bases)	2.0 $\pm$ 1.6 (0.9-3.8)	9.8 $\pm$ 14.2 (0.8-39.1)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.1)	4.0 $\pm$ 6.3 (0.9-18.1)
TG(TG) ₁ TG SEQ ID NO:13-(12 bases)	2.4 $\pm$ 1.9 (0.9-4.5)	12.1 $\pm$ 6.5 (2.9-20.8)	1.2 $\pm$ 0.4 (0.9-1.9)	4.4 $\pm$ 5.3 (1.2-15.0)
GT(GT) ₁ GT SEQ ID NO:14-(12 bases)	1.1 $\pm$ 0.2 (0.9-1.3)	2.0 $\pm$ 1.5 (0.9-4.9)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.2)	2.0 $\pm$ 1.1 (0.9-2.6)
TT(TG) ₁ TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.0)	11.8 $\pm$ 9.0 (1.3-25.6)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.1)	1.1 $\pm$ 0.3 (0.9-1.6)
GG(TG) ₁ GG SEQ ID NO. 24 (6 bases)	0.9 $\pm$ 0.1 (0.9-1.0)	15.9 $\pm$ 14.9 (0.7-37.1)	2.4 $\pm$ 2.9 (1.0-7.5)	2.3 $\pm$ 1.6 (0.9-5.5)
GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	1.0 $\pm$ 0.1 (1.0-1.2)	20.9 $\pm$ 18.0 (1.6-50.0)	11.6 $\pm$ 1.2 (9.9-13.2)	13.2 $\pm$ 11.5 (1.0-26.8)
TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	1.5 $\pm$ 0.9 (0.9-2.5)	5.8 $\pm$ 8.0 (0.5-21.7)	1.0 $\pm$ 0.1 (1.0-1.2)	1.6 $\pm$ 1.3 (0.8-4.5)
AA(GT) ₁ AA SEQ ID NO:27-(6 bases)	1.3 $\pm$ 0.5 (0.9-1.8)	9.6 $\pm$ 7.3 (1.8-16.0)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.1)	2.4 $\pm$ 2.2 (0.8-6.7)
CC(GT) ₁ CC SEQ ID NO:28-(6 bases)	2.1 $\pm$ 1.8 (0.8-4.1)	10.4 $\pm$ 13.0 (1.4-35.8)	1.0 $\pm$ 0.1 (1.0-1.1)	5.9 $\pm$ 10.7 (0.9-30.0)
TG(GT) ₁ TG SEQ ID NO:29-(6 bases)	1.7 $\pm$ 1.0 (1.1-2.8)	9.3 $\pm$ 12.1 (0.8-33.8)	1.0 $\pm$ 0.1 (1.0-1.1)	3.3 $\pm$ 4.2 (0.8-12.7)
AT(GT) ₁ AT SEQ ID NO:30-(6 bases)	1.1 $\pm$ 0.2 (1.0-1.4)	4.6 $\pm$ 4.4 (1.6-14.4)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.1)	1.3 $\pm$ 0.2 (1.0-1.6)
CT(GT) ₁ CT SEQ ID NO:36-(6 bases)	1.2 $\pm$ 0.3 (1.0-1.5)	5.3 $\pm$ 3.6 (0.9-10.6)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.2)	1.2 $\pm$ 0.3 (0.9-1.8)
TC(GT) ₁ TC SEQ ID NO:37-(6 bases)	1.2 $\pm$ 0.4 (0.9-1.6)	7.5 $\pm$ 9.8 (0.7-27.0)	1.0 $\pm$ 0.1 (1.0-1.1)	1.4 $\pm$ 1.1 (0.9-3.8)
GG(TT) ₁ GG SEQ ID NO:41-(6 bases)	3.2 $\pm$ 3.0 (0.8-6.5)	7.8 $\pm$ 12.8 (0.9-36.4)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.1)	4.9 $\pm$ 8.6 (0.8-24.3)
GG(AA) ₁ GG SEQ ID NO:42-(6 bases)	3.5 $\pm$ 3.9 (0.8-8.0)	11.8 $\pm$ 5.8 (1.2-15.6)	1.1 $\pm$ 0.2 (0.9-1.5)	3.0 $\pm$ 2.7 (1.1-8.6)
GG(CC) ₁ GG SEQ ID NO:43-(6 bases)	1.5 $\pm$ 0.9 (0.8-2.5)	14.9 $\pm$ 10.2 (1.2-29.8)	1.2 $\pm$ 0.3 (1.0-1.8)	2.5 $\pm$ 2.0 (1.0-7.0)
GG(GG) ₁ GG SEQ ID NO:44-(6 bases)	7.1 $\pm$ 9.4 (0.8-17.9)	21.0 $\pm$ 14.7 (4.6-42.0)	1.7 $\pm$ 1.6 (0.9-4.6)	7.0 $\pm$ 12.5 (1.3-35.3)
GG(GA) ₁ GG SEQ ID NO:45-(6 bases)	13.6 $\pm$ 14.9 (1.2-30.2)	24.7 $\pm$ 16.5 (5.9-50.0)	6.0 $\pm$ 5.5 (2.1-15.5)	20.7 $\pm$ 10.3 (5.7-35.3)
GG(GC) ₁ GG SEQ ID NO:46-(6 bases)	1.2 $\pm$ 0.3 (1.0-1.5)	15.8 $\pm$ 16.2 (1.3-37.8)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.1)	3.0 $\pm$ 3.8 (1.1-10.7)

注：表中“bases”为“碱基”。

实施例 36

通过黑猩猩外周血液单核细胞合成细胞因子

如实施例 35 所述从 4 只健康的黑猩猩中分离 PBMCs。将 PBMCs 与 6 碱基 GT、AGT、CGT、AG、CG 和 GG 序列一起培养，并测定细胞因子 IL-10、IL-12 和 TNF- α 的生成(表 41)。

表 41 通过黑猩猩 PBMC 生成细胞因子

序列	IL-10 增加倍数 平均 $\pm$ SD(范围)	IL-12 增加倍数 平均 $\pm$ SD(范围)	TNF- α 增加倍数 平均 $\pm$ SD(范围)
TG(TG) ₁ TG SEQ ID NO:9-(6 bases)	2.3 $\pm$ 1.3 (1.3-4.1)	13.5 $\pm$ 8.9 (2.8-21.1)	11.3 $\pm$ 6.9 (5.3-19.5)
GT(GT) ₁ GT SEQ ID NO:1-(6 bases)	4.0 $\pm$ 2.1 (1.8-6.7)	14.0 $\pm$ 8.5 (3.0-21.3)	12.9 $\pm$ 6.4 (6.5-19.6)
TT(TG) ₁ TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	1.5 $\pm$ 0.6 (1.0-2.4)	12.9 $\pm$ 8.2 (2.7-20.1)	9.0 $\pm$ 5.5 (4.1-14.4)
GG(TG) ₁ GG SEQ ID NO:24-(6 bases)	2.9 $\pm$ 1.5 (1.3-4.8)	14.3 $\pm$ 9.1 (3.0-22.5)	11.9 $\pm$ 7.0 (5.8-19.8)
GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	2.5 $\pm$ 1.5 (1.4-4.6)	13.5 $\pm$ 8.4 (2.8-20.8)	11.7 $\pm$ 6.7 (5.9-19.6)
TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	1.4 $\pm$ 0.9 (1.1-2.1)	12.3 $\pm$ 8.5 (2.5-20.1)	7.5 $\pm$ 4.6 (3.4-13.1)
AA(GT) ₁ AA SEQ ID NO:27(6 bases)	2.1 $\pm$ 1.1 (1.1-3.7)	13.2 $\pm$ 8.2 (2.8-19.8)	7.9 $\pm$ 3.9 (4.6-12.0)
CC(GT) ₁ CC SEQ ID NO:28-(6 bases)	3.8 $\pm$ 2.8 (1.5-7.7)	13.3 $\pm$ 8.4 (2.8-20.4)	10.3 $\pm$ 5.7 (5.0-15.8)
TG(GT) ₁ TG SEQ ID NO:29-(6 bases)	3.1 $\pm$ 2.0 (1.6-5.9)	13.6 $\pm$ 8.8 (2.9-21.9)	12.4 $\pm$ 7.3 (6.1-20.8)
AT(GT) ₁ AT SEQ ID NO:30-(6 bases)	1.4 $\pm$ 0.4 (1.2-1.9)	10.7 $\pm$ 7.0 (2.5-18.6)	5.9 $\pm$ 3.3 (3.4-10.5)
CT(GT) ₁ CT SEQ ID NO:36-(6 bases)	3.0 $\pm$ 2.1 (1.2-5.9)	13.4 $\pm$ 8.9 (2.8-20.4)	12.4 $\pm$ 6.3 (7.0-19.6)
TC(GT) ₁ TC SEQ ID NO:37-(6 bases)	3.4 $\pm$ 2.6 (1.4-7.1)	14.1 $\pm$ 10.0 (2.4-24.9)	11.4 $\pm$ 6.4 (6.1-19.3)
GG(TT) ₁ GG SEQ ID NO:41(6 bases)	9.1 $\pm$ 7.7 (3.0-20.3)	15.3 $\pm$ 10.0 (2.9-25.9)	14.1 $\pm$ 7.3 (7.7 $\pm$ 23.2)
GG(AA) ₁ GG SEQ ID NO:42-(6 bases)	9.9 $\pm$ 8.9 (2.6-22.7)	15.6 $\pm$ 10.6 (2.6-26.6)	14.4 $\pm$ 7.1 (8.0-22.9)
GG(CC) ₁ GG SEQ ID NO:43-(6 bases)	13.6 $\pm$ 9.0 (4.3-26.7)	15.1 $\pm$ 10.2 (2.8-26.1)	14.0 $\pm$ 6.6 (7.9-22.3)
GG(GG) ₁ GG SEQ ID NO:44-(6 bases)	11.2 $\pm$ 9.1 (3.9-24.3)	15.1 $\pm$ 10.0 (2.9-25.9)	13.8 $\pm$ 6.5 (7.6-21.8)
GG(GA) ₁ GG SEQ ID NO:45-(6 bases)	9.9 $\pm$ 9.2 (2.6-23.1)	15.9 $\pm$ 10.7 (2.9-26.9)	14.5 $\pm$ 6.9 (7.9-23.0)
GG(GC) ₁ GG SEQ ID NO:46-(6 bases)	4.7 $\pm$ 3.4 (1.7-9.3)	15.8 $\pm$ 10.4 (3.0-26.2)	14.1 $\pm$ 6.6 (8.3-21.7)

注：表中“bases”为“碱基”。

如表 41 所示, 6 碱基 GT、AGT、CGT、AG、CG 和 GG 序列提高了黑猩猩 PBMC 细胞生成细胞因子 IL10 和 IL-12 以及 TNF- α 。

实施例 37

通过恒河猴外周血液单核细胞合成细胞因子

如实施例 35 所述从 4 只健康的恒河猴中分离 PBMCs。将 PBMCs 与 6 碱基 GT、AGT、CGT、AG、CG 和 GG 序列一起培养, 并测定细胞因子 IL-10、IL-12 和 TNF- α 的生成(表 42)。

表 42 通过恒河猴 PBMC 生成细胞因子

序列	IL-10 增加倍数 平均 $\pm$ SD (范围)	IL-12 增加倍数 平均 $\pm$ SD (范围)	TNF- α 增加倍数 平均 $\pm$ SD (范围)
TG(TG) ₁ TG SEQ ID NO:9-(6 bases)	1.1 $\pm$ 0.2 (0.9-1.3)	10.6 $\pm$ 4.2 (5.6-14.3)	14.3 $\pm$ 6.3 (6.2-21.2)
GT(GT) ₁ GT SEQ ID NO:10-(6 bases)	1.3 $\pm$ 0.1 (1.1-1.4)	10.7 $\pm$ 4.1 (6.1-15.8)	16.1 $\pm$ 4.2 (11.0-21.6)
TT(TG) ₁ TT SEQ ID NO:23-(6 bases)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.8-1.0)	6.7 $\pm$ 3.6 (3.6-11.7)	4.4 $\pm$ 3.8 (1.3-9.5)
GG(TG) ₁ GG SEQ ID NO:24-(6 bases)	1.0 $\pm$ 0.1 (1.0-1.1)	11.2 $\pm$ 4.8 (5.6-16.8)	14.5 $\pm$ 5.4 (7.7-20.0)
GG(GT) ₁ GG SEQ ID NO:25-(6 bases)	1.0 $\pm$ 0.1 (1.0-1.1)	10.6 $\pm$ 4.7 (5.5-16.5)	12.5 $\pm$ 5.2 (6.2-18.6)
TT(GT) ₁ TT SEQ ID NO:26-(6 bases)	1.0 $\pm$ 0.1 (1.0-1.2)	4.9 $\pm$ 2.9 (2.6-8.8)	2.1 $\pm$ 1.0 (1.3-3.4)
AA(GT) ₁ AA SEQ ID NO:27-(6 bases)	0.9 $\pm$ 0.1 (0.9-1.0)	7.6 $\pm$ 2.6 (5.9-11.5)	6.0 $\pm$ 5.0 (2.4-13.4)
CC(GT) ₁ CC SEQ ID NO:28-(6 bases)	1.1 $\pm$ 0.2 (0.9-1.2)	10.1 $\pm$ 3.7 (6.2-14.2)	14.2 $\pm$ 3.7 (9.6-18.6)
TG(GT) ₁ TG SEQ ID NO:29-(6 bases)	1.1 $\pm$ 0.2 (0.9-1.2)	11.1 $\pm$ 4.2 (6.5-15.7)	16.5 $\pm$ 2.7 (14.0-19.1)
AT(GT) ₁ AT SEQ ID NO:30-(6 bases)	1.9 $\pm$ 1.4 (1.0-4.0)	6.0 $\pm$ 1.9 (5.6-8.5)	6.9 $\pm$ 4.7 (2.2-13.4)
CT(GT) ₁ CT SEQ ID NO:36-(6 bases)	1.0 $\pm$ 0.1 (0.9-1.1)	10.7 $\pm$ 4.6 (6.2-16.4)	15.3 $\pm$ 3.6 (11.2-19.8)
TC(GT) ₁ TC SEQ ID NO:37-(6 bases)	1.1 $\pm$ 0.2 (0.9-1.3)	10.0 $\pm$ 3.8 (6.3-14.1)	14.7 $\pm$ 3.1 (13.7-19.1)
GG(TT) ₁ GG SEQ ID NO:41-(6 bases)	1.9 $\pm$ 1.5 (1.0-4.1)	11.5 $\pm$ 5.9 (4.3-17.2)	14.1 $\pm$ 8.2 (2.5-20.7)
GG(AA) ₁ GG SEQ ID NO:42-(6 bases)	1.2 $\pm$ 0.2 (1.0-1.4)	11.9 $\pm$ 5.4 (5.9-17.1)	16.5 $\pm$ 4.5 (11.4-21.2)
GG(CC) ₁ GG SEQ ID NO:43-(6 bases)	1.0 $\pm$ 0.2 (0.8-1.2)	11.7 $\pm$ 4.8 (6.2-16.4)	16.9 $\pm$ 3.5 (13.9-21.1)
GG(GG) ₁ GG SEQ ID NO:44-(6 bases)	2.1 $\pm$ 1.0 (1.1-3.5)	10.7 $\pm$ 5.6 (3.7-15.9)	13.9 $\pm$ 8.5 (2.0-20.9)
GG(GA) ₁ GG SEQ ID NO:45-(6 bases)	1.1 $\pm$ 0.1 (1.0-1.3)	11.9 $\pm$ 4.5 (6.8-16.0)	16.7 $\pm$ 4.6 (11.6-21.5)
GG(GC) ₁ GG SEQ ID NO:46-(6 bases)	1.2 $\pm$ 0.2 (1.0-1.4)	11.0 $\pm$ 4.4 (6.3-16.1)	16.8 $\pm$ 4.1 (11.9-21.8)

如表 42 所示, 6 碱基 GT、AGT、CGT、AG、CG 和 GG 序列提高了恒河猴 PBMC 细胞生成细胞因子 IL10、IL-12 以及 TNF- α 。

实施例 38

6 碱基 GT SEQ ID NO:25 + 5-氟尿嘧啶和 6 碱基 GT SEQ ID NO:25 + 他莫昔芬中的 6 碱基 GT SEQ ID NO:25 对 MCF-7 人乳腺癌肿瘤的影响

将 MCF-7 人乳腺癌细胞作为异种皮移植物皮下植入到雌性裸 BALB/c 小鼠中。将小鼠分成 6 组, 每组 10 只。在第 0 天, 第 1 组小鼠接受盐水, 第 2 组小鼠接受 6 碱基 GT SEQ ID NO:25, 第 3 组小鼠接受 5-氟尿嘧啶, 第 4 组小鼠接受他莫昔芬, 第 5 组小鼠接受 6 碱基 GT SEQ ID NO:25 + 5-氟尿嘧啶, 第 6 组小鼠接受 6 碱基 GT SEQ ID NO:25 + 他莫昔芬。治疗 4 周后, 将小鼠处死, 并测定肿瘤质量。第 1 组小鼠具有最大的肿瘤质量, 第 2、3 和 4 组小鼠的肿瘤质量比第 1 组小鼠小, 第 5 和 6 组小鼠的肿瘤质量比第 1、2、3 和 4 组小鼠小。

实施例 39

3 和 6 碱基 GT 序列和 45 碱基 BCGA-3 序列对 LNCaP 人前列腺癌肿瘤的影响

将 LNCaP 人前列腺癌细胞作为异种皮移植物皮下植入到雄性裸 nu/nu 小鼠中。将小鼠分成 5 组, 每组 10 只小鼠。在第 0 天, 第 1 组小鼠接受盐水, 第 2 组小鼠接受 3 碱基 SEQ ID NO:8, 第 3 组小鼠接受 6 碱基 GT SEQ ID NO:25, 第 4 组小鼠接受 6 碱基 AG SEQ ID NO:45, 第 5 组小鼠接受 45 碱基 BCG A-3 SEQ ID NO:69。治疗 4 周后, 将小鼠处死, 并测定肿瘤质量。第 1 组小鼠具有最大的肿瘤质量, 第 5 组小鼠的肿瘤质量比第 1 组小鼠小, 第 2、3 和 4 组小鼠的肿瘤质量比第 1 和 5 组小鼠小。

实施例 41

3、6、8 和 27 碱基序列对 EL-4 鼠 T 淋巴瘤的影响

将 EL-4 鼠 T 淋巴细胞植入到 C57/BL6 小鼠体内。将小鼠分成 6 组, 每组 10 只小鼠。在第 0 天, 第 1 组小鼠接受盐水, 第 2 组小鼠接受 3 碱基 GT SEQ ID NO:8, 第 3 组小鼠接受 6 碱基 SEQ ID NO:25, 第 4 组小鼠接受 6 碱基 AG SEQ ID NO:45, 第 5 组小鼠接受 18 碱基 GT SEQ ID NO:18,

第6组小鼠接受27碱基GT SEQ ID NO:1。治疗4周后，将小鼠处死，并测定肿瘤质量。第1组小鼠具有最大的肿瘤质量，第2、3、4、5和6组小鼠的肿瘤质量比第1组小鼠小。

实施例 42

将人结肠癌细胞系作为粘着细胞培养物维持。将处于指数生长期的细胞用2—20碱基GT、GA、GC或GG序列以0 μ g/ml—100 μ l/ml的剂量处理24—72小时。通过MTT还原测定对细胞增殖的抑制，通过流动血细胞计数测定细胞周期停滞，通过膜联蛋白-V结合或NuMA释放测定细胞凋亡。在结肠癌细胞系中，GT、GA、GC或GG序列抑制增殖，诱导细胞周期停滞，并诱导细胞凋亡。

用盐水或者用在体外具有抗人结肠直肠癌细胞系的抗癌活性的2—20碱基GT、GA、GC或GG序列治疗皮下携带人结肠直肠癌细胞系的SCID小鼠。用在体外具有抗人结肠直肠癌细胞系的抗癌活性的2—20碱基GT、GA、GC或GG序列治疗的小鼠的肿瘤质量比用盐水治疗的小鼠显著减小。

虽然已经详细描述了本发明，并提供了其具体实施方案，但是显然本领域技术人员可在不背离其实质和范围的情况下对其作各种改变和改进。

<213> 合成寡核苷酸	
<400> 6 tctctctctc tctctctctc tctctct	27
<210> 7	
<211> 3	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 7 tgt	3
<210> 8	
<211> 3	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 8 gtg	3
<210> 9	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 9 tgtgtg	6
<210> 10	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 10 gtgtgt	6
<210> 11	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 11 tgtgtgtgt	9
<210> 12	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 12 gtgtgtgtgt	9
<210> 13	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 13 tgtgtgtgtgtg tg	12

<210> 14	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 14	
gtgtgtgtgt gt	12
<210> 15	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 15	
tgtgtgtgtg tgtg	14
<210> 16	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 16	
gtgtgtgtgt gtgtg	15
<210> 17	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 17	
tgtgtgtgtg tgtgtgtg	18
<210> 18	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 18	
gtgtgtgtgt gtgtgtgt	18
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 19	
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg t	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 20	
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt g	21
<210> 21	
<211> 24	

<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	21	
	tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtg	24
<210>	22	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	22	
	gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgt	24
<210>	23	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	23	
	tttgtt	6
<210>	24	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	24	
	ggtggg	6
<210>	25	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	25	
	gggtgg	6
<210>	26	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	26	
	ttgttt	6
<210>	27	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	27	
	aagtaa	6
<210>	28	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	28	

ccgtcc	6
<210> 29	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 29	
tggttg	6
<210> 30	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 30	
atgtat	6
<210> 31	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 31	
aggtga	6
<210> 32	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 32	
gagtga	6
<210> 33	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 33	
gggtct	6
<210> 34	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 34	
ccgtgg	6
<210> 35	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 35	
gggtcc	6
<210> 36	

<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 36	
ctgtct	6
<210> 37	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 37	
tcgttc	6
<210> 38	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 38	
cggtgc	6
<210> 39	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 39	
ttgtgg	6
<210> 40	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 40	
gggttt	6
<210> 41	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 41	
ggttgg	6
<210> 42	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 42	
ggaagg	6
<210> 43	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	

<400> 43 ggccgg	6
<210> 44 <211> 6 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 44 gggggg	6
<210> 45 <211> 6 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 45 gggagg	6
<210> 46 <211> 6 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 46 gggcgg	6
<210> 47 <211> 6 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 47 ggaggg	6
<210> 48 <211> 6 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 48 gtgggg	6
<210> 49 <211> 6 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 49 ttaggg	6
<210> 50 <211> 2 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 50 gt	2

<210>	51	
<211>	2	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	51	2
tg		
<210>	52	
<211>	4	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	52	4
gtgg		
<210>	53	
<211>	4	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	53	4
ttgt		
<210>	54	
<211>	4	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	54	4
gtgt		
<210>	55	
<211>	4	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	55	4
ttgg		
<210>	56	
<211>	4	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	56	4
ggtg		
<210>	57	
<211>	4	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	57	4
tggtt		
<210>	58	
<211>	4	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	

<400> 58 ggtt	4
<210> 59 <211> 4 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 59 tgtg	4
<210> 60 <211> 5 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 60 ggtgg	5
<210> 61 <211> 5 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 61 gggtg	5
<210> 62 <211> 7 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 62 ggggtgg	7
<210> 63 <211> 7 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 63 gggtggg	7
<210> 64 <211> 7 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 64 tgggtgg	7
<210> 65 <211> 7 <212> DNA <213> 合成寡核苷酸	
<400> 65 gggtggt	7

<210> 66	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 66	
gtgtgtgtgtgt gtgtgtgtgtgt gtgtgtgtg	27
<210> 67	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 67	
gggtgggtgg gtgggtgggt gggtggg	27
<210> 68	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 68	
gggggtgggg gtgggggtgg gggtggg	27
<210> 69	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 69	
gggggggtgg ggggggtgggg gggtggg	27
<210> 70	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 70	
tgtgtg	6
<210> 71	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 71	
gtgtgt	6
<210> 72	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 72	
tttgtt	6
<210> 73	
<211> 6	
<212> DNA	

<213>	合成寡核苷酸	
<400>	73	
	ggtggg	6
<210>	74	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	74	
	gggtgg	6
<210>	75	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	75	
	ttgttt	6
<210>	76	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	76	
	gccgagaagg tgcgcaacct gccggctggc cacggactga acgct	45
<210>	77	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	77	
	acgccgacgt cgtctgtggt ggggtgtcta ccgccaacgc gacgg	45
<210>	78	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	78	
	cgactacaac ggctgggata tcaacacccc ggcgttcgag tggt	45
<210>	79	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	79	
	ccaccc	6
<210>	80	
<211>	5	
<212>	DNA	
<213>	合成寡核苷酸	
<400>	80	
	cggta	5

<210> 81
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> 合成寡核苷酸

<400> 81
 gtgtgttttgg t 11

<210> 82
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> 合成寡核苷酸

<400> 82
 ggttttgttt g 11

<210> 83
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 合成寡核苷酸

<400> 83
 ttgttttttt tg 12

<210> 84
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 合成肽

<400> 84
 Tyr Val Ala Asp
 1

<210> 85
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 合成肽

<400> 85
 Asp Glu Val Asp
 1

<210> 86
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 合成肽

<220>
 <221> SITE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = Any Amino Acid

<400> 86
 Ile Leu Glu Xaa Cys
 1 5

<210> 87
 <211> 4

<212> PRT
<213> 合成肽
<400> 87

Ile Glu Gly Asp
1

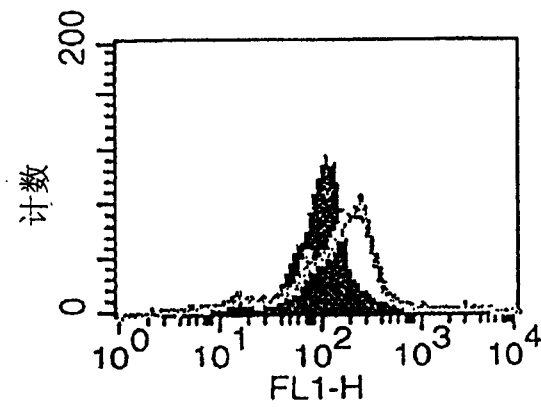


图 1

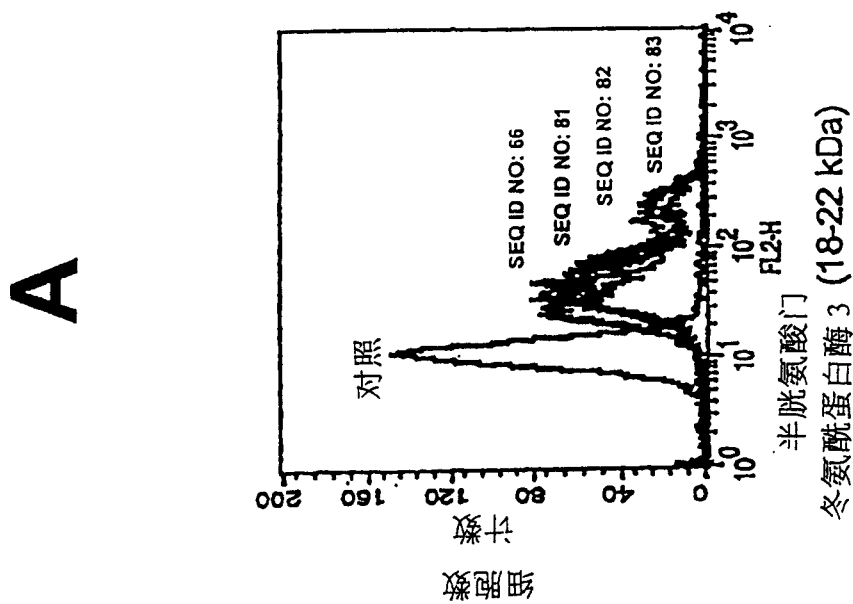
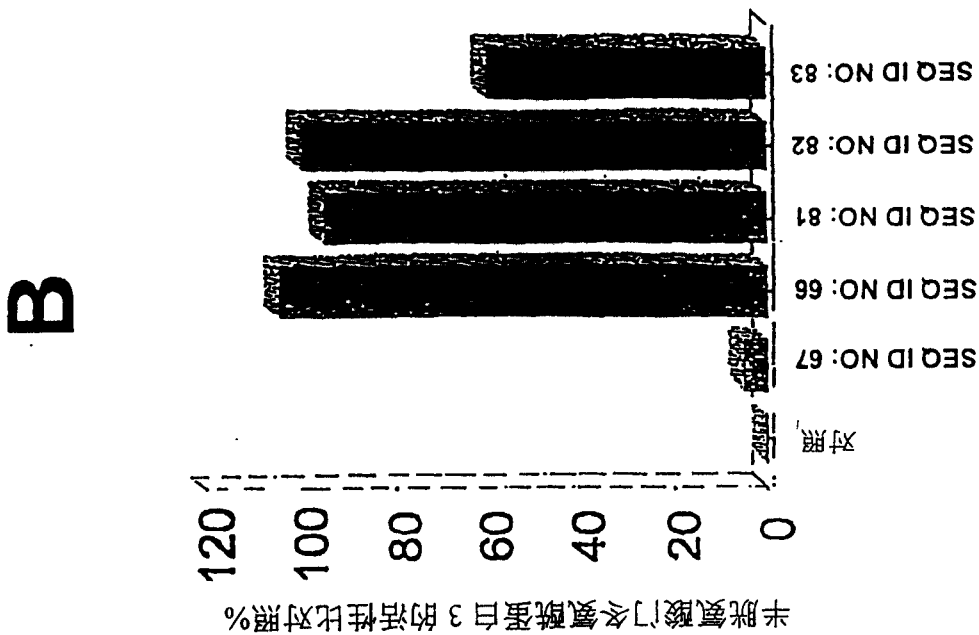


图 2

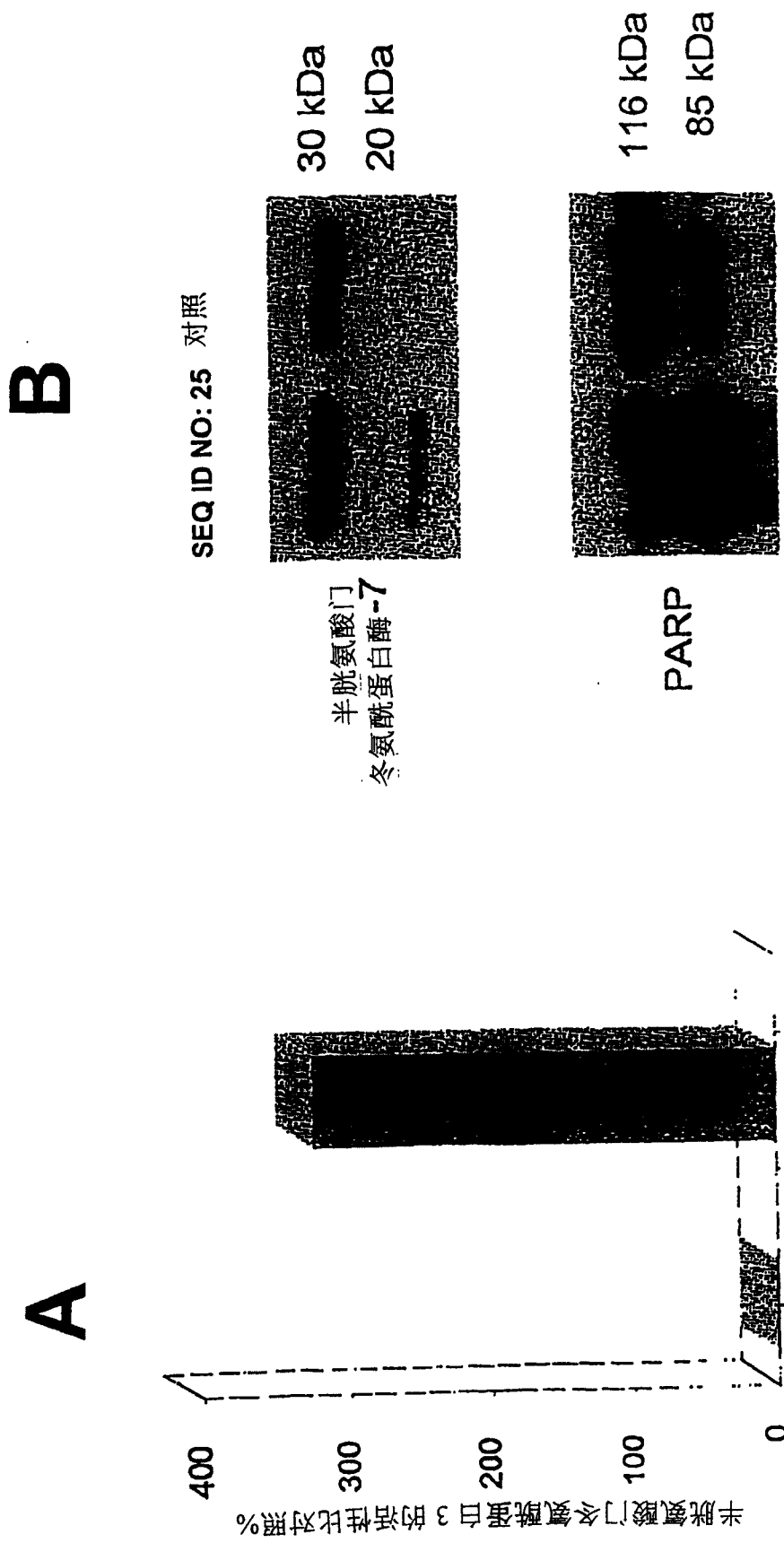


图 3