

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99811966.0

[43]公开日 2001年11月21日

[11]公开号 CN 1323344A

[22]申请日 1999.8.12 [21]申请号 99811966.0

[30]优先权

[32]1998.8.13 [33]US [31]60/096374

[86]国际申请 PCT/IB99/01484 1999.8.12

[87]国际公布 W000/09672 英 2000.2.24

[85]进入国家阶段日期 2001.4.10

[71]申请人 庄臣及庄臣研究股份有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士省

[72]发明人 L·-Q·孙

M·J·凯恩斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

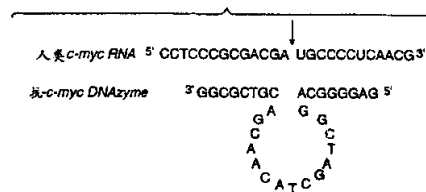
代理人 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图页数 12 页

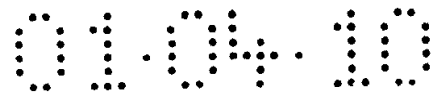
[54]发明名称 治疗再狭窄的 DNAzyme 和方法

[57]摘要

本申请提供了特异性切割 c - myc mRNA 的 DNAzyme,它包含一个 15 个核苷酸的催化域和两个结合域,其中一个结合域邻接催化域的 5' 末端,另一个结合域邻接催化域的 3' 末端。本发明也提供用于抑制再狭窄起病的药用组合物,它包含所述的 DNAzyme 和适用于局部给药的药用可接受载体。本发明还提供了用于抑制再狭窄起病的血管成形术斯滕特固定模,它包括可操作涂上有效预防量的所述药用组合物的血管成形术斯滕特固定模。最后,本发明提供了用于抑制经受血管成形术的受治疗者再狭窄起病的方法,它包括局部给予受治疗者所述的药用组合物或血管成形术斯滕特固定模。



ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 特异性切割 *c-myc* mRNA 的 DNAzyme, 其包含
 - (a) 一个催化域, 它具有核苷酸序列 GGCTAGCTACAACGA,
5 并在朝着它的任何嘌呤:嘧啶切割位点切割,
 - (b) 邻接所述催化域 5'末端的一个结合域, 和
 - (c) 邻接所述催化域 3'末端的另一个结合域;其中所述结合域分别地互补于侧翼紧接 *c-myc* mRNA 中需要 DNAzyme 催化切割的切割位点的嘌呤残基的两个区域, 并因此与之杂交, 且其中
10 每个结合域长度至少为 6 个核苷酸, 两个结合域结合的总长至少为 14 个核苷酸。
 2. 权利要求 1 的所述 DNAzyme, 其中每个结合域的长度为 9 个核苷酸。
 3. 权利要求 1 的所述 DNAzyme, 其中邻接所述催化域 3'末端的
15 所述结合域中的 3'-末端核苷酸残基是倒置的。
 4. 权利要求 1 的所述 DNAzyme, 其具有 TGAGGGGCAGGCTAGCTACAACGACGTCGTGAC 序列。
 5. 权利要求 1 的所述 DNAzyme, 其中在 *c-myc* mRNA 中的切割位点是嘌呤:尿嘧啶。
 - 20 6. 权利要求 1 的所述 DNAzyme, 其中 *c-myc* mRNA 中的切割位点位于选择以下的区域: 翻译起始位点、剪接识别位点、5'非翻译区和 3'非翻译区。
 7. 用于抑制再狭窄起病的药用组合物, 它包含权利要求 1 的所述 DNAzyme 和适用于局部给药的药学上可接受的载体。
 - 25 8. 权利要求 7 的所述的药用组合物, 其中所述药学上可接受的载体选自: 脂质体和生物可降解的聚合物。
 9. 用于抑制再狭窄起病的血管成形术斯滕特固定模, 它包括可操作地涂上有效预防量的权利要求 7 的药用组合物的血管成形术斯滕

特固定模。

10. 用于抑制经受血管成形术的受治疗者中再狭窄起病的方法，所述方法包括在所述血管成形术的前后局部给予所述受治疗者有效预防量的权利要求 7 的药用组合物。

5 11. 用于抑制经受血管成形术的受治疗者中再狭窄起病的方法，所述方法包括在所述血管成形术的前后局部给予所述受治疗者权利要求 9 的血管成形术斯滕特固定模。

10

说明书

治疗再狭窄的 DNAzyme 和方法

5

发明领域

本发明涉及采用 DNAzyme 抑制再狭窄的起病。所述 DNAzyme 通过切割编码 *c-myc* 的 mRNA 达到这一目的，而在血管平滑肌细胞中 *c-myc* 的表达是再狭窄的发生所需要的。

10

发明背景

再狭窄

再狭窄是一种严重的内科疾病，它经常在血管成形术之后发生。这种疾病折磨了所有血管成形术患者的 30%-60%。

15

人们认为再狭窄是由(至少部分是由)在血管形成术过程中发生的血管损伤之后平滑肌细胞("SMC's")过分增殖而引起的。认为几种生物调节剂有助于这种 SMC 的增殖。这些调节剂包括血小板衍生生长因子("PDGF")、成纤维细胞生长因子("FGF")和胰岛素样生长因子("IGF")(Ross; Banscota; Libby; Gay)。这些调节剂对 SMC 增殖的诱导作用经由许多重要基因的胞内反式激活作用而发生(Kindy; Gadeau)。这些基因包括 *c-myc*、*c-myb*、*c-fos* 和 PCNA (增殖细胞核抗原)，且一般是细胞周期特异性的。

20

具体地说，在血管损伤 30 分钟至 2 小时内，*c-myc* 在 SMC's 中过量表达，且表达在此后 12 小时内降低至正常水平。也就是说，血管成形术引起血管 SMC 损伤，后者引起 *c-myc* 在损伤后 30 分钟至 2 小时开始过量表达，而在损伤后 12 小时结束。

25

目前采用放射疗法和药理学疗法治疗再狭窄。放射疗法包括放射性植入物或将放射性组合物传递到正在治疗的位点上。尽管放射治疗已经显示出一些有希望的成果，却产生了内冠状放射的长期副

作用。关于药理学疗法，到此为止使用的抗-thrombotin 和抗增殖的方法一般都没有效果(Bennet)。

DNAzyme

5 在人类基因治疗中，反义核酸技术已经是选择用于使那些表达引起疾病并因此不希望有的基因失活的主要方法之一。所述反义的方法使用一种核酸分子，它互补于编码不希望有的基因的 mRNA 分子，并因此与之杂交。这种杂交导致了基因表达的抑制。

10 反义技术有某些缺点。反义杂交的结果是 DNA/目标 mRNA 异源双链体的形成。该异源双链体作为 RNA 酶 H 介导的降解目标 mRNA 成分的底物。在此，所述 DNA 反义分子以被动方式作用，因为它仅仅有助于内源 RNA 酶 H 的所需切割。这种对 RNase H 的依赖在反义分子的化学性质和与其目标 mRNA 形成稳定异源双链体的能力方面，限制了反义分子的设计。反义 DNA 分子也有与非特异性活性的
15 相关问题，在较高浓度下甚至有与毒性相关问题。

 作为反义分子的替代物，催化核酸分子已表明有希望作为用于抑制基因表达的治疗剂，且在文献中广泛讨论(Haseloff; Breaker (1994); Koizumi; Otsuka; Kashani-Sabet; Raillard; 和 Carmi)。这样，不同于常规的反义分子，催化核酸分子通过真正切割它的目标 mRNA 分子而不是仅仅与之结合而起作用。如果目标序列满足某些最低需要，则
20 催化核酸可以只切割目标核酸序列。所述目标序列必须互补于催化核酸的杂交区域，并且该目标必须在切割位点包含特异序列。

 有许多资料记载了催化 RNA 分子(“核酶”)(Haseloff; Symonds; 和 Sun)，并且已经表明它们既能够切割 RNA 分子(Haseloff)又能够切割 DNA 分子(Raillard)。事实上，在体外选择和进化技术的发展已经
25 使采用已知核酶的随机变体或随机序列 RNA 作为起始点而获得针对已知底物的新核酶成为可能(Pan; Tsang; 和 Breaker (1994))。

 然而，核酶在它们进行作用的细胞中对酶水解作用是高度敏感

的。这本身又限制了它们的药学应用。

近来，创造了一类新的名为“DNAzyme”的催化分子(Breaker (1995); Santoro)。DNAzyme 是单链的，切割 RNA (Breaker (1994); Santoro)，也切割 DNA (Carmi)。已经提出了 DNAzyme 的一般模型，称为“10-23”模型。按照“10-23”模型的 DNAzyme，也简称为“10-23 DNAzyme”，它包含一个 15 个脱氧核糖核苷酸的催化域，侧翼为两个分别含 7-9 个脱氧核糖核苷酸的底物识别域。体外分析表明，这种类型的 DNAzyme 能在生理条件下在嘌呤:嘧啶连接处有效地切割它的底物 RNA (Santoro)。

DNAzyme 表明有希望成为治疗药物。然而，DNAzyme 成功对抗由于已知 mRNA 的存在而导致的疾病是不可预料的。这种不可预料性部分归因于两个因素。首先，某些 mRNA 二级结构可能阻碍 DNAzyme 结合并切割其目标 mRNA 的能力。其次，表达目标 mRNA 的细胞对 DNAzyme 的吸入可能不够有效地提供有治疗意义的结果。由于这些原因，仅仅知道疾病和它的成因目标 mRNA 序列不能单独允许人们合理地预料针对目标 mRNA 的 DNAzyme 的治疗成功，因为缺少一个发明性步骤。

发明概述

本申请提供特异性切割 *c-myc* mRNA 的 DNAzyme，其包含(a)一个催化域，它具有核苷酸序列 GGCTAGCTACAACGA，并在朝着它的任何嘌呤:嘧啶切割位点切割，(b)邻接催化域 5'末端的一个结合域，和(c)邻接催化域 3'末端的另一个结合域；其中所述结合域分别地互补于侧翼紧接 *c-myc* mRNA 中需要 DNAzyme 催化切割的切割位点的嘌呤残基的两个区域，并因此与之杂交，且其中每个结合域长度至少为 6 个核苷酸，两个结合域结合的总长至少为 14 个核苷酸。

本发明也提供了用于抑制再狭窄起病的药用组合物，它包含所述 DNAzyme 和适用于局部给药的药用可接受的载体。

本发明还提供用于抑制再狭窄起病的血管成形术斯滕特固定模，它包括可操作地涂上预防有效剂量的所述药用组合物的血管成形术斯滕特固定模。

5 本发明还提供了用于抑制经受血管成形术的受治疗者中再狭窄起病的方法，它包括在血管成形术时前后一般给予所述受治疗者预防有效剂量的所述药用组合物。

最后，本发明提供用于抑制经受血管成形术的受治疗者中再狭窄起病的方法，它包括在血管成形术时前后局部给予所述受治疗者所述的血管成形术斯滕特固定模。

10

附图简述

图 1 显示 Santoro 中描述的“10-23” DNAzyme 的结构。由 X 和 Y 之间的星号表示切割位点。由 N's 表示底物-结合域。

15 图 2 显示 *c-myc* RNA-切割 DNAzyme 的设计。*c-myc* DNAzyme 的切割位点选在人类 *c-myc* mRNA (第二个外显子)的 AUG 起始子密码子。如图所示，切割发生在 A 和 U 之间。

图 3 显示最佳化的 DNAzyme 臂长和化学修饰。基于“10-23”型设计了具有不同臂长的 *c-myc*-切割 DNAzyme。由阴影 C 或 G (3' INV)表示在 3'端的 3'-3'末端碱基倒置。

20 图 4 显示多转换(multiple turnover)动力学。图 A 显示 16%聚丙烯酰胺凝胶的光密度测量图象，它是采用磷光成像器(PhosphorImager) (Molecular Dynamics)而获得的，显示在多转换条件下对合成的 *c-myc* mRNA 的切割。所有的反应均用 200 pM DNAzyme 和 2nM、4nM、8nM、16nM 和 32nM 的底物 mRNA (如所示)进行。每个反应的温育时间

25 时间在 0-60 分钟之间，在每道的顶端注明。图 B 显示每个底物浓度的 DNAzyme 切割进程(nM)曲线。这些数据是从图 A 所示的切割条带的光密度测定中得到的。

图 5 显示体外 *c-myc* mRNA 的切割。在有 ^{32}P -UTP 的情况下从

PGEM 载体中转录 1.5 kb *c-myc* mRNA 底物。切割反应于 10mM MgCl₂、50mM Tris.HCl pH 7.5、37°C 下进行 60 分钟。

5 图 6 显示人类血清中 3'-倒置 DNAzyme 的稳定性分析。DNAzyme 与 AB 型人类血清(Sigma)一起温育。在所示的不同时间点收集样品, 并用 ³²P 标记。该标记的 DNAzyme 在 16%聚丙烯酰胺凝胶中分析。这里显示了未修饰的 DNAzyme 的典型凝胶带型(上右角)和 3'-倒置的 DNAzyme 的典型凝胶带型(下右角)。

10 图 7 显示在 SV-LT-SMC's 中对 *c-myc* mRNA 切割 DNAzyme 的测试。生长停滞的 SMC's 用 10% FBS-DME (包含 0.5%牛胎血清的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基)在有以下物质的情况下刺激: 10mM 称为 Rs-6 的抗-*c-myc* mRNA DNAzyme (下述)、10mM 对照寡核苷酸 (与 Rs-6 相同的臂序列, 含倒置催化核心序列)或单独的脂质体 (DOTAP; 即 N-[1-(2,3-二油酰氧基)]-N,N,N-三甲铵-甲基硫酸盐)。数据以均值 ± SD 表示。

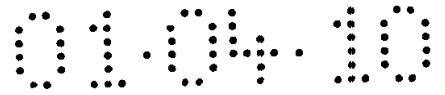
15 图 8 显示 SMC's 中 Rs-6 DNAzyme 的剂量-反应实验。该实验详述按照图 7。数据以对照的百分数表示。

图 9 显示在 DNAzyme 处理的 SMC's 中 *c-myc* 的表达。如实施例 7 所述用 ³⁵S-甲硫氨酸标记细胞, 并进行免疫沉淀法以确定 DNAzyme 处理的 SMC's 中 *c-myc* 蛋白的表达水平。

20 图 10 显示人类 *c-myc* 基因的基因组 DNA 序列(外显子 1 和 2)。

发明详述

25 本发明目的在于采用 DNAzyme 技术抑制再狭窄起病。所述疾病的起病, 是在血管成形术过程中由动脉平滑肌的物理性损伤而触发的, 其特征是在此后不久 *c-myc* 过量表达几个小时。这种 *c-myc* 过量表达导致 SMC 过度增殖, 而抑制这种过量表达本身又抑制再狭窄起病。本发明通过在血管成形术时的前后应用 *c-myc* mRNA 特异性 DNAzyme 于损伤区而利用这个 *c-myc* 过量表达的“时机窗口”, 因



此而切割 mRNA 并抑制再狭窄起病。

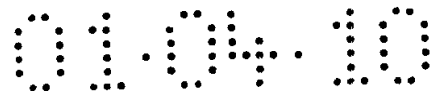
更具体的说，本申请提供了特异性切割 *c-myc* mRNA 的 DNAzyme，其包含 (a) 一个催化域，它具有核苷酸序列 GGCTAGCTACAACGA，并在朝着它的任何嘌呤:嘧啶切割位点切割，(b) 邻接催化域 5' 末端的一个结合域，和 (c) 邻接催化域 3' 末端的另一个结合域；其中所述结合域分别地互补于侧翼紧接 *c-myc* mRNA 中需要 DNAzyme 催化切割的切割位点的嘌呤残基的两个区域，并因此与之杂交，且其中每个结合域长度至少为 6 个核苷酸，两个结合域结合的总长至少为 14 个核苷酸。

这里所用的“DNAzyme”是指特异性识别并切割特殊的目标核酸序列的 DNA 分子，它可以是 DNA 或 RNA。所述 DNAzyme 切割 RNA 分子，如图 1 所示它是“10-23”型的，如此命名是由于历史原因。在 Santoro 中描述了这种类型的 DNAzyme。10-23 DNAzyme 需要的 RNA 目标序列是由 NNNNNNNR*YNNNNNNN、NNNNNNNNR*YNNNNNN 或 NNNNNNR*YNNNNNNNN 构成的任何 RNA 序列，其中 R*Y 是切割位点，R 是 A 或 G，Y 是 U 或 C，N 是任意的 G、U、C 或 A。

在本发明的参量中，结合域的长度(这里也称为“臂长”)可以任意变更，可以相同或不同。预想了各种变更如 7+7、8+8 和 9+9，且在后面的实施例中更全面地列举。已经很好地证实了结合域的长度更长，那么它与互补的 mRNA 序列就结合得更紧。因此，在优选的实施方案中，每个结合域的长度为 9 个核苷酸。在一个实施方案中，所述 DNAzyme 具有

TGAGGGGCAGGCTAGCTACAACGACGTCGTGAC 序列(在此也称为“Rs-6”)。

在应用基于 DNAzyme 的治疗中，DNAzyme 在胞内环境下抗降解而尽可能地稳定是重要的。达到这一目的的一个方法是通过在所示 DNAzyme 的一个或多个末端加入一个 3'-3'-倒置。更具体地说，



3'-3'-倒置(在此也简称为“倒置”)是指末端核苷酸及与其相邻的核苷酸的 3'碳原子间的共价磷酸键合。这种类型的键合与相邻核苷酸的 3'和 5'碳原子间的一般磷酸键合反向, 从而有“倒置”一词。因此, 在优选的实施方案中, 3'末端核苷酸残基在邻接催化域 3'末端的结合域中倒置。除倒置外, 所述 DNAzyme 还可以包含修饰的核苷酸。修饰的核苷酸包括如 N3'-P5'磷酰胺(phosphoramidate)键和肽-核酸键。这些在本领域是众所周知的(Wagner)。

在本发明中, 在 *c-myc* mRNA 中的任何邻接的嘌呤:嘧啶核苷酸对都可以作为切割位点。在优选的实施方案中, 嘌呤:尿嘧啶是希望的嘌呤:嘧啶切割位点。

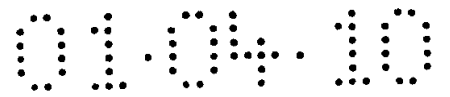
包含所述切割位点的 *c-myc* mRNA 区域可以是任何区域。例如, *c-myc* mRNA 中需要 DNAzyme-催化切割的位置可以是翻译起始位点、剪接识别位点、5'非翻译区和 3'非翻译区。在一个实施方案中, 切割位点位于翻译起始位点。

人类 *c-myc* mRNA 序列和/或编码所述序列的 DNA 是众所周知的(Bernard)。如这里所用的“*c-myc* mRNA”是指由图 10 所示的人类 *c-myc* DNA 序列或由其任何自然存在的多态形式编码的任何 mRNA 序列。*c-myc* mRNA 包括成熟 mRNA 和不成熟 mRNA。在本发明的参量中, 确定 *c-myc* mRNA 切割位点、每个结合域的所需序列和因此确定完整 DNAzyme 序列可以按照众所周知的方法进行。

本发明也提供了用于抑制再狭窄起病的药用组合物, 它包含所述 DNAzyme 和适用于局部给药的药用可接受载体。

在本发明中, 局部给予所述药用组合物可以采用本领域技术人员已知的任何不同方法和传递系统实现或完成。例如, 局部给予可以经由导管和局部注射和经由如下讨论的涂层斯滕特固定模完成。

用于局部给予的药用载体在本领域中广为人知, 将所述载体与待传递的活性剂混合的方法也是广为人知。以下使用许多常规使用的载体的传递系统, 只是许多预想用于给予所述组合物的实施方案



的代表。

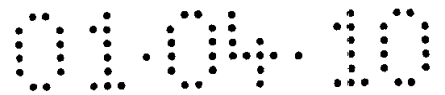
局部传递系统包括如凝胶和溶液，并可以包含赋形剂如增溶剂、渗透增强剂(如脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪族醇和氨基酸)，和亲水聚合物(如 polycarbophil 和聚乙烯吡咯烷酮)。在优选实施方案中，所述药
5 学上可接受的载体是脂质体或生物可降解的聚合物。可以用于本发明的脂质体的例子包括如下：(1) Cellfectin，阳离子类脂 N,N^I,N^{II},N^{III}-四甲基-N,N^I,N^{II},N^{III}-四棕榈基(palmityl)精胺和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE) (GIBCO BRL)的 1:1.5 (M/M)脂质体制剂；(2) Cytofectin GSV，一种阳离子类脂和 DOPE 的 2:1 (M/M)脂质体制剂(Glen
10 Research)；(3) DOTAP (N-[1-(2,3-二油酰氧基)-N,N,N-三甲基铵-甲基硫酸盐] (Boehringer Mannheim)；(4) Lipofectamine，聚阳离子类脂 DOSPA 和中性类脂 DOPE 的 3:1 (M/M)脂质体制剂(GIBCO BRL)。

本发明还提供用于抑制再狭窄起病的血管成形术斯滕特固定模，它包括可操作涂上预防有效剂量的所述药用组合物的血管成形
15 术斯滕特固定模。

血管成形术斯滕特固定模，也叫其它名称如“血管内斯滕特固定模”或简单的“斯滕特固定模”，它们是本领域中众所周知的。它们经常用于阻止由物理性异常引起的血管闭合，如外科损伤引起的不希望有的血管组织向内生长的。它们经常含有一个与它们的功能相称的管状的、膨胀的格栅型结构，并且可选择地被生物降解。
20

在本发明中，所述斯滕特固定模可以采用任何适合的本领域所知的方法可操作地涂上所述药用组合物。在此，“可操作地涂上”斯滕特固定模是指以这样的方式涂布：一旦给予所述涂布的斯滕特固定模，则允许适时释放所述药用组合物于待治疗的周围组织。这种涂布方法，例如，可以采用聚合物聚吡咯(polypyrrole)。斯滕特固定模、用于涂上上述物质的方法和组合物在美国序列号 60/091,217
25 中详细讨论。

确定所述药用组合物的预防有效剂量可以采用常规计算方法基



于动物数据完成。在一个实施方案中，所述预防有效剂量包含在约 0.1mg 和约 1g 之间的所述 DNAzyme。在另一个实施方案中，预防有效剂量包含在约 1mg 和 100mg 之间的所述 DNAzyme。在再一实施方案中，所述预防有效剂量包含在约 10mg 和 50mg 之间的所述 DNAzyme。在又一实施方案中，所述预防有效剂量包含约 25mg 的所述 DNAzyme。

本发明还提供了抑制经受血管成形术的受治疗者中再狭窄起病的方法，所述方法包括在血管成形术时的前后局部给予受治疗者有效剂量的所述药用组合物。如这里所用的，在血管成形术时的“前后”给予所述药用组合物，可以在该手术期间或紧随之前或之后进行。给予可以按照已知的方法进行，如导管传递。“抑制”再狭窄起病是指减弱发生于血管成形术之后的再狭窄的严重性，或完全阻止再狭窄起病。在优选的实施方案中，抑制再狭窄起病是指完全阻止再狭窄起病。

最后，本发明提供了抑制经受血管成形术的受治疗者中再狭窄起病的方法，所述方法包括在血管成形术时局部给予受治疗者所述血管成形术斯滕特固定模。

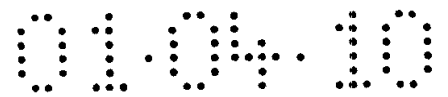
通过参考以下的实施例将更好地理解本发明，但是本领域技术人员将易于理解，它们只是说明如后面的权利要求书中更全面描述的本发明。另外，本申请中列举了不同的文献。这些文献的内容通过引用结合到本申请中，以更全面地描述本发明所属领域的技术状况。

实施例

实施例 1

抗-c-myc DNAzyme 的体外特性鉴定

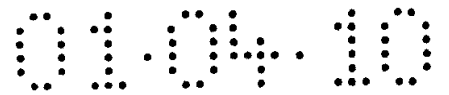
DNAzyme 的体外效力是通过在测量多转换条件下 RNA 切割的速率而确定的。关于这些实验，采用底物的浓度范围以使 $[S] \geq 10$



5 倍[E], [E]固定在 200pM。所述 DNAzyme 和 ^{32}P -标记的合成 RNA 底物分别于 37°C 在 50mM Tris·HCl pH7.5、10mM MgCl_2 和 0.01% SDS 中预平衡 10 分钟。在时间零时, 将 DNAzyme 和底物混合在一起开始反应。然后在反应过程后分析在不同时间点按顺序所取并在 90% 甲酰胺、20 mM EDTA 和加样染料中猝灭的等分试样。在这些样品中的产物碎片和没有反应的底物通过在 16%的变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离。每个时间点的反应程度通过由磷光成像器(Molecular Dynamics)产生的凝胶图象的光密度测定确定。采用 k_{obs} 的值(由这些时程实验的斜率而来的)以产生在改进的 Eadie-Hofstee 曲线中最佳拟合的线(k_{obs} 对 $k_{\text{obs}}/[\text{S}]$)。以这种方法, K_m 和 k_{cat} 的值分别的以回归线的负斜率和 y 截距给出。

15 采用多转换动力学检测合成的短 *c-myc* RNA 序列的体外 DNAzyme 催化切割的效力(图 4)。含对称的 7、8 和 9 个碱基对底物结合臂的三种修饰的 DNAzyme 和它们未修饰对照与过量的 ^{32}P -标记的合成 *c-myc* RNA 一起温育。根据 k_{obs} 值确定动力学参量 K_m 和 k_{cat} (表 1)。

20 通过 k_{cat}/K_m 的比率测定的每个 DNAzyme 的总催化效率在修饰的种类和未修饰的种类之间明显不同。在短臂 DNAzyme (7+7 bp)中, 包含一个倒置碱基的修饰产生 k_{cat}/K_m 的 3 倍减小。与这种切割活性的负相应相反, 长臂种类(9+9 bp)由于有倒置碱基修饰, 相对效率增强了 10 倍。中间长度(8+8 bp)的结合臂 DNAzyme 受修饰作用的影响最小, 显示 k_{cat}/K_m 值增加 2 倍。因此, 3'-倒置末端碱基的影响根据底物结合臂的长度而不同。在短臂(7+7 bp) DNAzyme 中, 发现修饰作用对催化效率有害。然而, 在长臂(9+9 bp)分子中, 它的确改善催化活性。未修饰的 DNAzyme 的活性以 8 bp 底物结合臂最佳。在短臂(7 bp) DNAzyme 中, 其总效率主要由于较高的 K_m (3.4-23 nM)而较低。在臂长超过 8 bp (如 9 bp)的 DNAzyme 中, 由于 K_m 的相对升高(3.4-7nM)和 k_{cat} 的减小(0.11-0.06 min^{-1}), 总活性减小。



这样，对于 *c-myc* mRNA 切割 DNAzyme 而言，发现未修饰型式
的最佳切割效率是含 8 bp 臂的型式。根据各自的 k_{cat}/K_m 值，未修饰
的 *c-myc* DNAzyme 的 7 bp 和 9 bp 的型式总效率较低。

5 这三种不同大小的 *c-myc* 切割分子的动力学型式由于包含 3'-末
端核苷酸倒置而明显地改变。这种 DNA 修饰作用对 *c-myc* RNA 切割
动力学的影响在短的 7 bp 臂 DNAzyme 中特别明显。与未修饰型对
比，这种分子按照它的 k_{cat}/K_m 值基本上没有效率。然而这种催化效
率的减弱通过在 8 bp 修饰型中添加另外两个核苷酸而恢复甚至增
10 强。这表明短 DNAzyme 活性的减弱是由于 DNA/RNA 相互作用的一
些干扰(由核苷酸倒置而引起的)引起的，它可以通过增加臂长度至 8
bp 而得到恢复。通过进一步增加修饰型 DNAzyme 的长度至 9 bp，
发现催化效率的另一个轻微改进。这与未修饰型 DNAzyme 的情况形
成对照，未修饰型 DNAzyme 的情况证明当从 8 bp 增加臂的长度至 9 bp
时发现活性急剧下降。

15 这些结果证明 8 bp 是未修饰型 DNAzyme 对 *c-myc* RNA 切割的
最佳长度。在 3'-倒置型 DNAzyme 中 9 bp 的臂长度好象提供了最佳
催化切割活性。含 9 bp 臂的未修饰型 DNAzyme 中所见的催化效率
的下降部分反映酶转换率的减弱，表现为较低的 k_{cat} 值。这种较低的
转换率可能是由于所述 DNAzyme 对反应物亲和力增强的结果，亲和
20 力本身又减慢产物的解离。在通过末端碱基倒置修饰的 DNA 中避免
了这种活性的减弱，这可能是对酶-产物相互作用的去稳定作用的结
果。

表 1
c-myc-切割 DNAzyme 的动力学

DNAzyme	臂长	修饰	k_{cat} (min^{-1})	K_m (nM)	k_{cat}/K_m ($\text{pM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
Rs-1	7+7	无	0.25	23	10.8
Rs-2	7+7	3'-倒置	0.16	50	3.2
Rs-3	8+8	无	0.11	3.4	32
Rs-4	8+8	3'-倒置	0.24	4	60
Rs-5	9+9	无	0.06	7	8.6
Rs-6	9+9	3'-倒置	0.26	4	65

5 分析三种不同长度、都针对起始子的 DNAzyme (修饰的和未修饰的)的 *c-myc* RNA 切割的动力学。反应在有 10 mM MgCl_2 和 50 mM $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ pH 7.5 的情况下, 在含至少 10 倍过量的底物的多转换条件下进行。

10 实施例 2

全长 c-myc mRNA 的体外切割

 全长 *c-myc* mRNA 用于进一步测试 DNAzyme 在刺激的生理条件下(10 mM MgCl_2 , pH 7.5, 37°C)切割不同型式的 *c-myc* mRNA 的能力。切割反应在单转换条件下进行, 采用 10 nM 长底物(*c-myc* mRNA)和 50 nM DNAzyme。

15 图 5 显示了所有的 DNAzyme 以 20-50%的切割速率有效地切割 *c-myc* mRNA。如所预料的, 较长臂的 DNAzyme 更有效地切割底物。3'-倒置碱基的修饰作用减小了 7+7 臂 DNAzyme 的切割效率, 但增强了 9+9 臂 DNAzyme 的切割效率。有趣的是, 预热和不预热的 DNAzyme 之间的 DNAzyme 切割效率没有不同。这种结果表明 *c-myc* mRNA 中的切割位点的可及性不受 mRNA 二级结构的影响。

20

实施例 3

DNAzyme 的化学修饰和稳定性

以下方法分析在 100%人类 AB 血清中 DNAzyme 的稳定性。简
5 要的说, 将 150 μ M 未标记的 DNAzyme 在 37 $^{\circ}$ C 培养于 100 μ l 100%的
人类血清中温育, 在时间点 0、2、4、8、24、48 和 72 小时取出重
复样品 5 μ l。取样时, 立即将 295 μ l TE (10mM Tris·HCl, pH 7.5, 1ml
EDTA)加入到 5 μ l 的等分样品中, 且进行酚/氯仿提取。每个时间点
10 的所有样品用 γ -³²P-ATP 末端标记, 并且没有进一步纯化或沉淀就直
接在 16% PAGE 凝胶中跑电泳, 这样显示了所有完整的 DNAzyme
和降解产物。结果表明在 3'-末端的 3'-3'倒置大大地改善了 DNAzyme
在人类血清中的稳定性($t_{1/2}$ =20 小时), 而未修饰的 DNAzyme 显示半
衰期 < 2 小时(图 6)。

实施例 4

15 DNAzyme 介导的抑制 SMC 的增殖

在血管 SV40LT (猿猴病毒 40 大 T 抗原)平滑肌细胞(Simons)中测
试抗-c-myc DNAzyme 的活性。在 0.5% FBS-DMEM 中生长停滞后,
通过加入 10%的 FBS-DMEM 将 SMC's 从 G₀ 中释放。同时将细胞暴
露于由 DOTAO 传递的 DNAzyme 或对照寡核苷酸(即含倒置催化核
20 心序列的 9/9 臂 DNAzyme)中。在传递之后 72 小时检测 DNAzyme
的生长-抑制能力。图 7 所示的不同 DNAzyme 的数据显示 SMC 数量
减少的范围在 30%-80%之间, 而采用对照的没有发现减少。基于这
些分析结果, 最有效的分子 Rs-6 (含 3'-倒置碱基的 9/9 臂)的活性在
剂量-反应分析(图 8)中进一步检测。与对照相比, Rs-6 在低至 50nM
25 的浓度下明显抑制 SMC 的生长。

实施例 5抗-c-myc DNAzyme 对 SMC 细胞周期的影响

DNAzyme 对 SMC 增生的影响也采用两个独立的技术评定, 即 DNA 细胞周期分析和有丝分裂指数的确定。DNA 直方图在血清刺激后 72 小时产生。在这 72 小时的间隔后, 与只有 65% 的刺激细胞保持在 G_0/G_1 相比, 74% 的未刺激细胞保持在 G_0/G_1 。然而, 由于加入 DNAzyme Rs-6, 保持在 G_0/G_1 期的刺激细胞的比例增加至 71%。对比之下, 未激活的 DNAzyme 对照(Rs-8)对 SMC 周期没有影响。通过确定刺激后 72 小时 SMC 群体的有丝分裂指数(即每 1000 个细胞中有丝分裂的数值, 用显微镜确定)证明这些结果。

表 2

抗-c-myc DNAzyme 对血清-刺激的平滑肌细胞增殖的影响

	<u>G0/G1 (%)</u>	<u>S (%)</u>	<u>G2/M (%)</u>	<u>有丝分裂指数 (%)</u>
未刺激	73.66	8.56	13.39	0.5
DOTAP	65.24	12.59	16.62	1.9
Rs-6	70.81	9.93	14.12	0.3
Rs-8 (对照)	67.81	12.33	15.19	2.2

实施例 6DNAzyme 转染的 SMC's 中 c-myc 蛋白的表达

为了在分子水平上说明抗-c-myc DNAzyme 的效力, 采用免疫沉淀法分析 DNAzyme 处理的 SMC's 中 c-myc 蛋白的表达。简单地说, SMC's 在没有血清的培养基中停滞 72 小时, 然后在无 met-free 培养基(包含 5% 的透析胎牛血清)中于 37°C 培养 1 小时。除去培养基后, 为细胞更换含 5% 的透析胎牛血清、100 mCi/ml $^{35}\text{S-Met}$ 和 5mM DNAzyme 的 met-free 培养基, 并另外培养 2 小时。采用如所描述的方法制备细胞溶胞产物, 并采用琼脂糖结合的抗-c-myc 抗体检测 c-myc

蛋白。如图 9 所示，如通过代谢标记材料的免疫沉淀法确定，用抗-*c-myc* DNAzyme 处理 SMC's 明显地抑制 *c-myc* 蛋白的合成。SMC 与对照寡核苷酸(Rs-8)一起温育对 *c-myc* 的表达没有影响。

参考文献

- Ausubel, F.M.等人., Analysis of proteins. Current Protocols in Molecular Biology (1995) 第2卷, 10.18.3, John Wiley & Sons, Inc.
- Banscota, N.等人., (1989) Mol. Endocrinol. (3): 1183-1190.
- 5 Bennet, M.R. 和 Schwartz, S.M. (1995) Circulation 92: 1981-1993.
- Bernard, O., 等人., (1983) EMBO J 2: 2375-2383.
- Breaker, R.R. 和 Joyce, G. (1994) Chemistry and Biology 1: 223-229.
- Breaker, R.R., Joyce, G.F. (1995) Chem. & Biol. (2): 655-600.
- Carmi, N.等人., (1996) Chemistry and Biology 3: 1039-1046.
- 10 Gadeau, A.等人., (1991) J. Cell Physiol. (146): 356-361.
- Gay, G., Winkles, J. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (88): 296-300.
- Haseloff, J., Gerlach, W.L. (1988) Nature (334): 585-591.
- Kashani-Sabet, M.等人., (1992) Antisense Research and Development 2: 3-15.
- 15 Kindy, M., Sonenshein, G. (1986) J. Biol. Chem. 261: 12865-12868.
- Koizumi, M.等人., (1989) Nucleic Acids Research 17: 7059-7069.
- Libby, P. (1992) J. Vasc. Surg. (15): 916-917.
- Otsuka, E. 和 Koizumi, M., 日本专利第 4,235,919 号。
- Pan, T. 和 Uhlenbeck, O.C. (1992) Biochemistry 31: 3887-3895.
- 20 Raillard, S.A. 和 Joyce, G. F. (1996) Biochemistry 35: 11693-11701.
- Ross, R.等人., (1986) Cell 46: 155-169.
- Santoro, S.W., Joyce, G.F. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4262-4266.
- Simons, M.等人. (1994) J. Clin. Invest. 93: 2351-2356.
- 25 Sun, L.Q.等人. (1997) Mol. Biotechnology 7: 241-251.
- Symonds, R.H. (1992) Annu. Rev. Biochem. 61: 641-671.
- Tsang, J. 和 Joyce, G. F. (1994) Biochemistry 33: 5966-5973.
- 美国序号 60/091, 217, 1998 年 6 月 30 日申请。
- Wagner, R. W. (1995) Nature Medicine 1: 1116-1118.

说明书附图

图.1

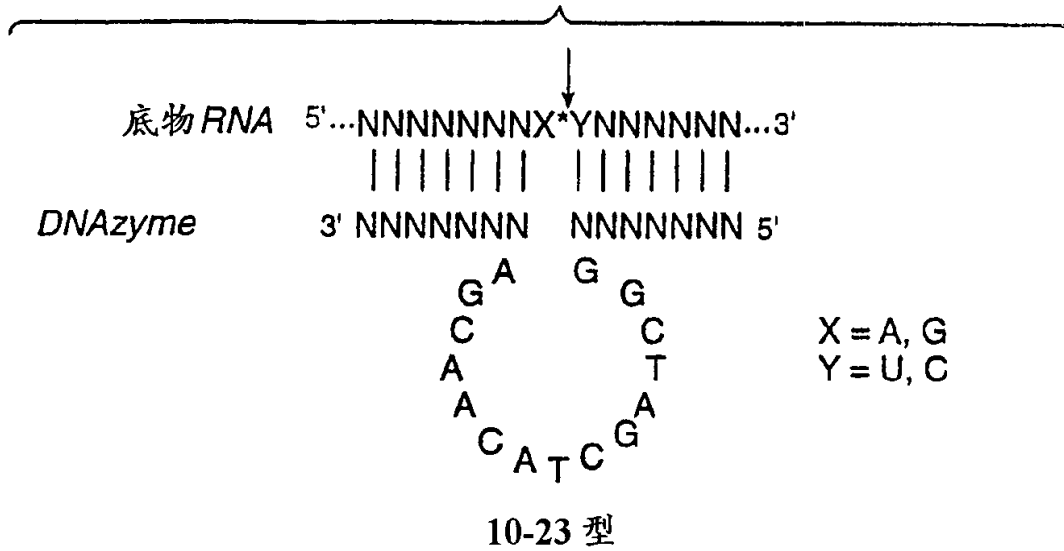


图.2

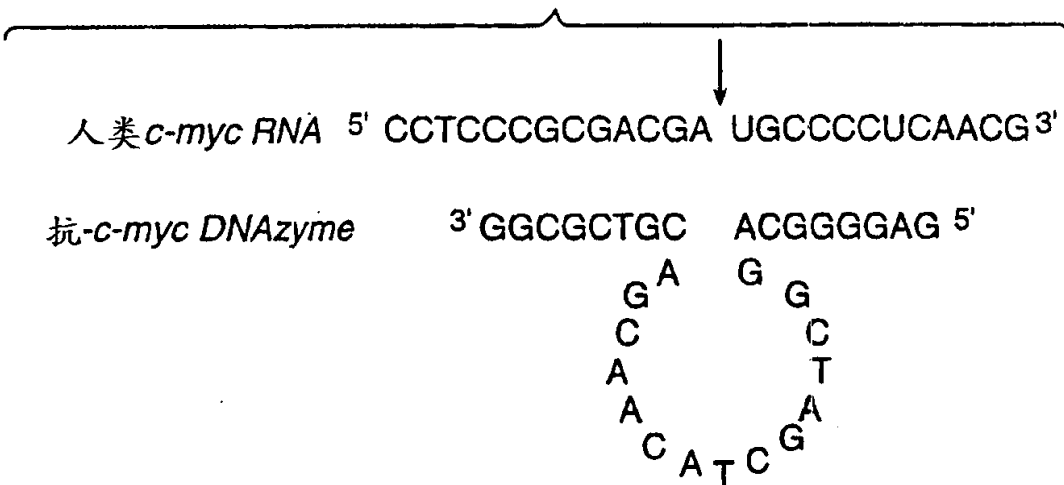


图.3

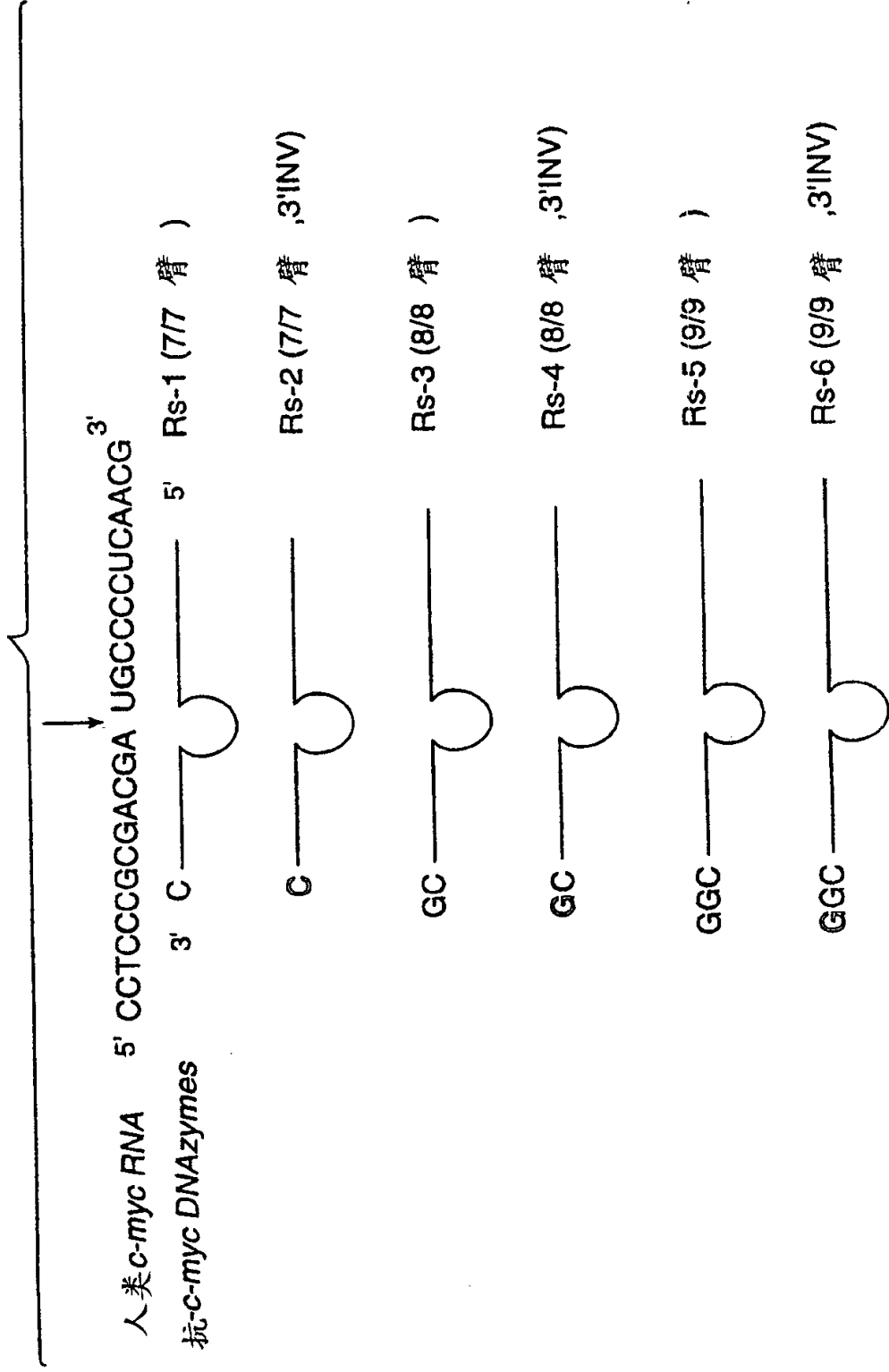


图.4A

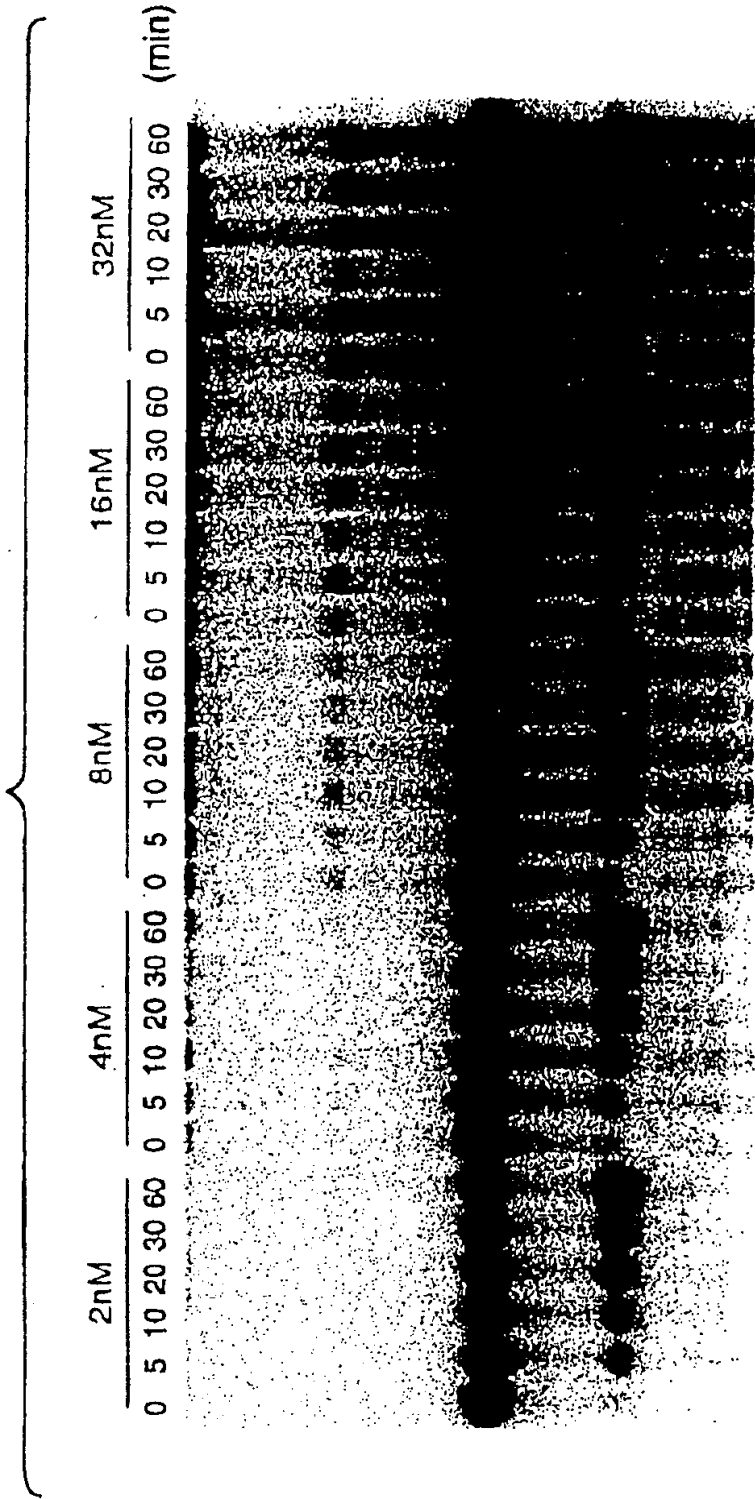


图.6

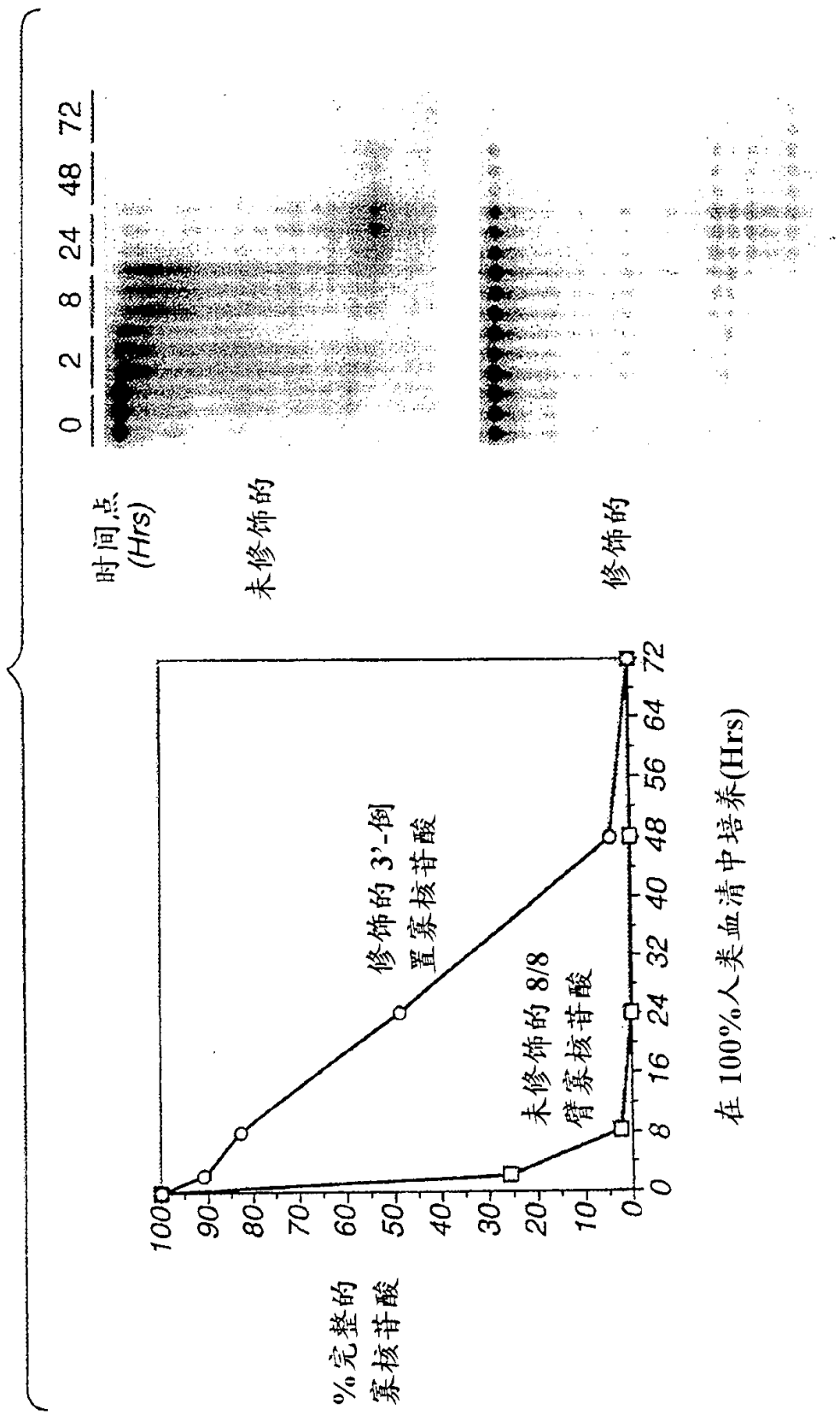


图.7

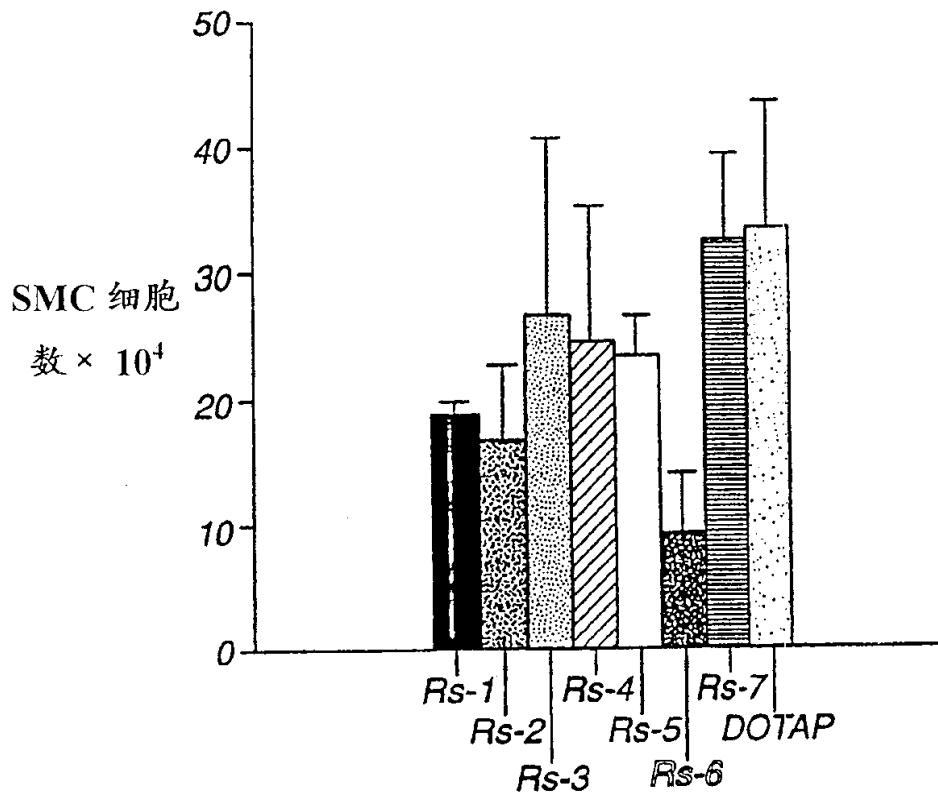


图.8

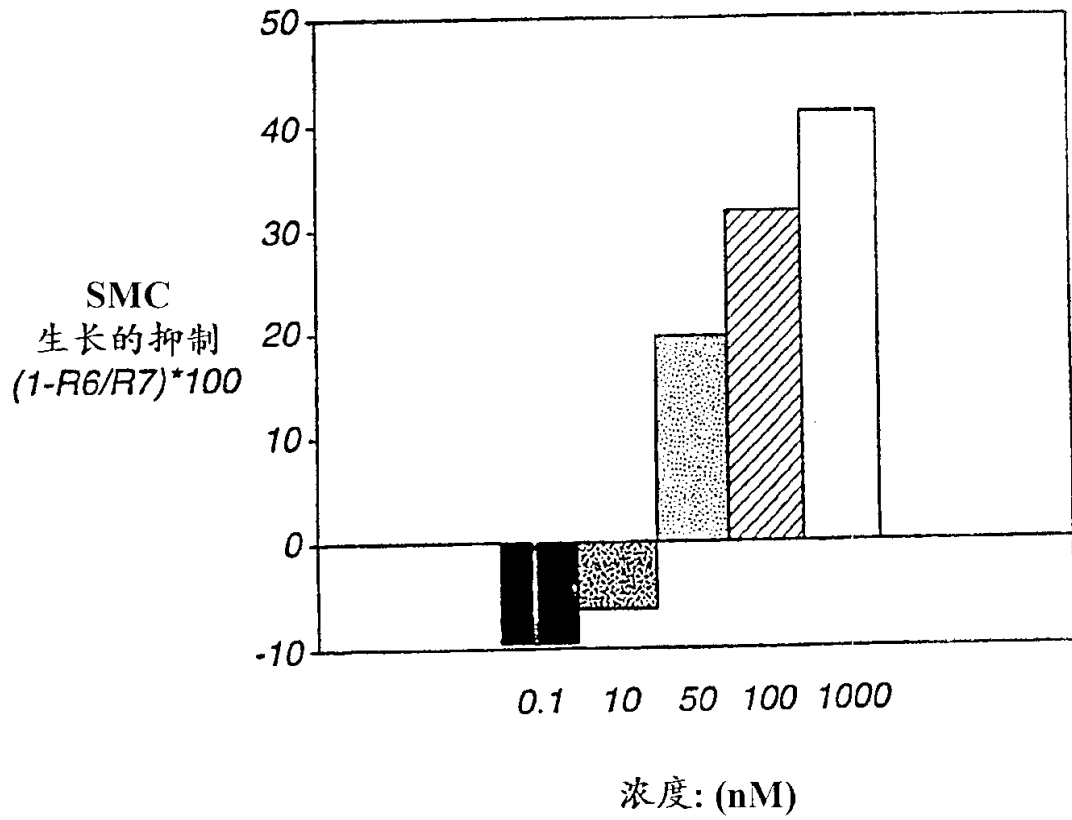


图.9

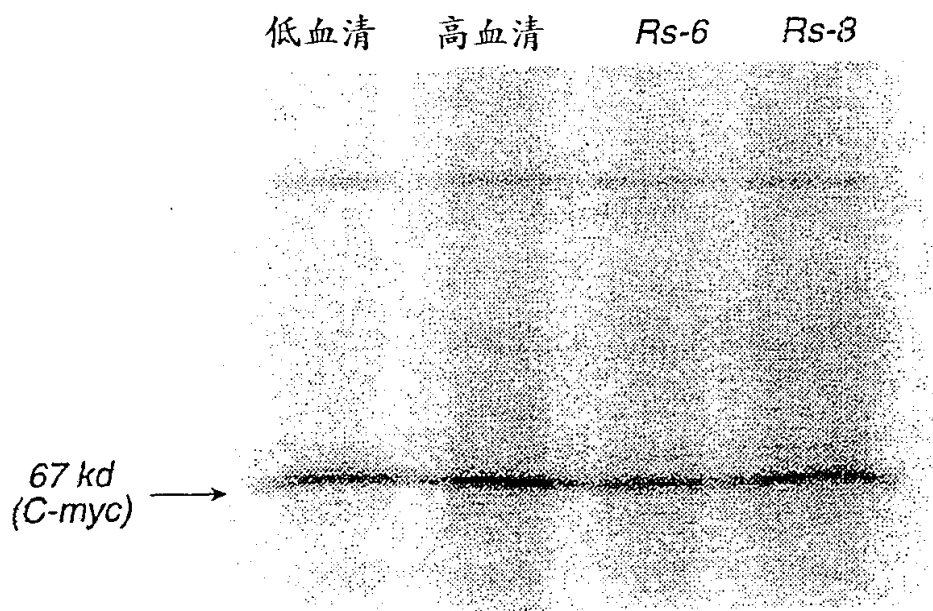


图.10A

c-myc 基因组 DNA 序列

```

1   ttctcgtgtg gaggcagct gtccgcctg gcgtagattt atactcacatg gataaaggtaa
61  cggtttgtca aacagtactg ctacggagga gcagcagaga aagggagagg gtllgagagg
121 gagcgaagaag aaaatggtag gcgcgcgtag ttaatccaat gcggctctct tactctgttt
181 acatccetaga gctagagtgc tggctgccc ggctgagttt cctcccacc ttccccacc
241 tccccacctt cccataaag cccctcccgg gtccccaaag cagagggcgt gggggaaaaag
301 aaaaaagatc ctctctcgt aactctccgc ccaccggccc ttataatgc gaggtctgg
361 acggctgagg acccccgagc tgtgctgctc gcggccgcca ccgccggcc ccggccgtcc
421 ctggctcccc tctgacctg agaaggcag ggcttctcag aggcttggcg ggaaaaaagaa
481 cggaggagg gatcgcctg agtataaaag ccggtttcgc taactcgtg
541 tagtaattcc agcagaggc agagggagcg agcggcggc cggctaggtt ggaagagccg
601 ggcgagcaga gctgcgctgc gggcgtcctg ggaaggaga tccggagcga atagggggct
661 tcgctcttgg ccagccctc ccgctgatcc ccagccagc ggtccgcaac cctggccgca
721 tccacgaaac ttgcccata gcagcgggcg ggcactttac gactggaact tacaacaccc
781 gagcaaggac gcgactctcc gacgcgggga ggctattctg cccatttggg gacacttccc
841 cgcgcctgcc aggacaccgc ttctctgaaa ggctctcctt gcagctgctt agacgttga
901 ttttttctgg gtagtgaaa accaggtaag caccgaagtc cacttgcctt ttaatttatt
961 tttttatcac tttatgctg agatgagtcg aatgcctaat ctttctccc attccttgcg
1021 tatlgaact tttctcagag tagttctagg taactggggc tggggtgggg gtaatccaga
1081 actggaatcgg ggtaaagtgc attgcaagat gggagaggag aagggcagagg gaaacgggaa
1141 tggtttttaa gactaccctt tcgagattc tgccttatga atatatcac gctgactccc
1201 gcccgggtcg gacatcctg ctttatgtg ttaatgtctc tctgggtttt gggggctggg
1261 ggttgtttgg cggtggaag aaagccctg catcctgagc tccctggagt acggaccgca
1321 ttatcgcctg tgtgagccag atcgtccgc agccgctgac ttgtccccgt ctccgggagg
1381 gcaattaaat ttcggtcac cgcaattctg acagccggag acggacactg cggcgcgtcc

```

图.10B

1441 cgcccgccctg tccccgcggc gattccaacc cgccctgatac cttttaataa atlccgattt
 1501 ggctttttaa aaagcaataa tacaatttaa aacctgggtc tctagaggtg ttaggacgtg
 1561 gtgtlgggta ggccagggca ggggaaaagg aggggaaatc ggggaaagc tctgtccgat tctcccttggg
 1621 atcgltgact tggaaaacc tgggaaatc agggcagat cgcccgagat ggcgaggagc gcccagactc cctgcccgcg
 1681 gccgcccctcg ggtgtcctcg ggtgtcctcg cgcccgagat ggcgaggagc tgcgaggagc ggggctctgg
 1741 gcggttccag aacagctgct aacctgggtg accctgggtg ggtggcaggta tgcgagcggg
 1801 gtctctggcg cagltgcatc tccgtattga gtcgaaagg gtcgaaagg ggtccccct attattatt
 1861 gacaccccc ttgtatttat ggagggtgt taaagcccgc gctgagctc gccactccag
 1921 ccggcgagag aaagaagaaa agctggcaaa aggagtgttg gacgggggagc gtactggggg
 1981 tggggacggg ggcggtggag aggaaaggtt gggaggggct ggggtgcccgg cgggggtagg
 2041 agagcggcta gggcgcgagt ggaacagcc gacgaggag ggcgccggcg cggagcggg
 2101 ttcacgcagc cgtagcgcc caggcgcctc tgccttctc cttcagggtg cgcataaact
 2161 tgtgccttgg attttggcaa attgtttcc tcaccgccac ctcccgggc tcttaaggg
 2221 cgccagggcc gatttcgatt cctctgccgc tgcggggcg actcccggg ctttgcgctc
 2281 cgggctcccg gggagcggg ggctcggcgg gaccaagcc gctgggtcac taagtgcgctc
 2341 tccgagatag caggggactg tccaaagggg gtaaaagggt gctcccctta tccccacc
 2401 aagaccacc agccgcttta ggggatagt ctgcaagggg agaggttcgg gactgtggcg
 2461 cgcactgccc gctgcccag gttccgcac caagaccctt ttaactcaag actgacctcc
 2521 gcttfgtgtg cccgctcca gcagcctccc gcagcagatgc cctcaacgt tagcttcacc
 2581 aacaggaaact atgacctcga ctacgactcg gtgcagccgt atttctactg cgacgaggag
 2641 gagaacttct accagcagca gcagcagagc gactgcagc ccccgccgccc cagcagggat
 2701 atctggaaga aatcagact gctgcccacc ccgcccctgt cccctagccc ccgctccggg
 2761 ctctgctcgc cctcctacgt tgcggtcaca ccttctccc ttcggggaga caacgacggc
 2821 ggtggcggga gcttctccac ggccgaccag ctggagatgg tgaccgagct gctgggagga

