



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102245186 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 27

(21) 申请号 200980150276. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 10. 15

A61K 31/70 (2006. 01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

61/174, 461 2009. 04. 30 US

WO 02072882 A2, 2002. 09. 19, 全文.

61/105, 772 2008. 10. 15 US

审查员 孟晋东

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 06. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/060922 2009. 10. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/045509 EN 2010. 04. 22

(73) 专利权人 ISIS 制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S · M · · 弗赖尔 B · P · · 莫尼亚

张宏 赵臣广 J · R · · 克罗斯比

A · M · · 斯夫科夫斯基

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有

限公司 11111

代理人 郭玥 张一军

权利要求书3页 说明书150页

序列表48页

(54) 发明名称

因子 11 表达的调节

(57) 摘要

此处披露了用于在需要的个体中降低因子 11 以及治疗或预防血栓栓塞性并发症的反义化合物和方法。可以通过将靶向因子 11 的反义化合物给药而改善的疾病状况的例子包括血栓形成、栓塞以及血栓栓塞, 比如如深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞和中风。靶向因子 11 的反义化合物也可以用作防止个体血栓形成及栓塞风险的预防性治疗。

1. 一种化合物, 包含由 12 至 30 个连接的核苷组成的修饰寡核苷酸, 并且该修饰寡核苷酸包含一核苷碱基序列, 该核苷碱基序列包括与 SEQ ID NO:1 的核苷碱基 1275 至 1318 的等长部分互补的至少 8 个连续核苷碱基的部分; 其中, 所述修饰寡核苷酸的核苷碱基序列与 SEQ ID NO:1 至少 90% 互补。

2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中, 所述修饰寡核苷酸的核苷碱基序列与 SEQ ID NO:1 至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 互补。

3. 如权利要求 1 所述的化合物, 具有:

(i) 包括 SEQ ID NO:223、217、51、52、53、114、115、213、214、215、216、218、219、220、221、222、224、225、226、227、228、229、230、231、232、242、243、245、246、247、248、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268 或 269 的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至 16 个、至 18 个或 20 个连续核苷碱基的核苷碱基序列; 或者

(ii) 包括 SEQ ID NO:223、217、51、52、53、114、115、213、214、215、216、218、219、220、221、222、224、225、226、227、228、229、230、231 或 232 的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基的核苷碱基序列。

4. 如权利要求 2 所述的化合物, 具有:

(i) 包括 SEQ ID NO:223、217、51、52、53、114、115、213、214、215、216、218、219、220、221、222、224、225、226、227、228、229、230、231、232、242、243、245、246、247、248、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268 或 269 的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基的核苷碱基序列; 或者

(ii) 包括 SEQ ID NO:223、217、51、52、53、114、115、213、214、215、216、218、219、220、221、222、224、225、226、227、228、229、230、231 或 232 的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基的核苷碱基序列。

5. 如权利要求 1 所述的化合物, 具有 SEQ ID NO:223 或 217 的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基的核苷碱基序列。

6. 如权利要求 2 所述的化合物, 具有 SEQ ID NO:223 或 217 的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基的核苷碱基序列。

7. 如权利要求 3 所述的化合物, 具有 SEQ ID NO:223 或 217 的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基的核苷碱基序列。

8. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中, 所述修饰寡核苷酸由 15-30、18-24、19-22 或 20 个连接的核苷所组成。

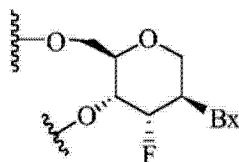
9. 如权利要求 2 所述的化合物, 其中, 所述修饰寡核苷酸由 15-30、18-24、19-22 或 20 个连接的核苷所组成。

10. 如权利要求 3 所述的化合物, 其中, 所述修饰寡核苷酸由 15-30、18-24、19-22 或 20 个连接的核苷所组成。

11. 如权利要求 5 所述的化合物, 其中, 所述修饰寡核苷酸由 15-30、18-24、19-22 或 20 个连接的核苷所组成。

12. 如权利要求 1 所述的化合物, 由单链修饰寡核苷酸组成。

13. 如权利要求 1 所述的化合物,其中,至少一个核苷内连接是修饰核苷内连接。
14. 如权利要求 13 所述的化合物,其中,每一核苷内连接是磷硫酰核苷内连接。
15. 如权利要求 1 所述的化合物,其中,至少一个核苷包含修饰糖。
16. 如权利要求 15 所述的化合物,其中,至少一个修饰糖是双环糖。
17. 如权利要求 16 所述的化合物,其中,所述至少一个双环糖的每一个包含一个 4'-(CH₂)_n-O-2' 桥联,其中 n 为 1 或 2。
18. 如权利要求 16 所述的化合物,其中,所述至少一个双环糖的每一个包含一个 4'-CH(CH₃)-O-2' 桥联。
19. 如权利要求 15 所述的化合物,其中,至少一个修饰糖包含一个 2'-O- 甲氧乙基基团。
20. 如权利要求 1 所述的化合物,其包含至少一个四氢吡喃修饰的核苷,其中,四氢吡喃环取代了呋喃环。
21. 如权利要求 20 所述的化合物,其中,所述至少一个四氢吡喃修饰的核苷的每一个具有如下结构:



其中, Bx 是可选择地被保护的杂环碱基。

22. 如权利要求 1 所述的化合物,其中,至少一个核苷包含修饰的核苷碱基。
23. 如权利要求 22 所述的化合物,其中,所述修饰核苷碱基是 5- 甲基胞嘧啶。
24. 如权利要求 1 所述的化合物,其中,所述修饰寡核苷酸包含:
 - 由连接的脱氧核苷组成的间隙区段;
 - 由连接的核苷组成的 5' 侧翼区段;
 - 由连接的核苷组成的 3' 侧翼区段;
 其中,所述间隙区段直接相邻于且位于 5' 侧翼区段和 3' 侧翼区段之间,其中,每一侧翼区段的每个核苷包含一个修饰糖。
25. 如权利要求 24 所述的化合物,其中,所述修饰寡核苷酸包含:
 - 由 10 个连接的脱氧核糖核苷组成的间隙区段;
 - 由 5 个连接的核苷组成的 5' 侧翼区段;
 - 由 5 个连接的核苷组成的 3' 侧翼区段;
 其中,所述间隙区段直接相邻于且位于 5' 侧翼区段和 3' 侧翼区段之间,其中,每一侧翼区段的每个核苷包含一个 2'-O- 甲氧乙基糖;其中,每一个核苷内连接是磷硫酰连接。
26. 如权利要求 25 所述的化合物,其中,所述修饰寡核苷酸由 20 个连接的核苷组成并且具有包括 SEQ ID NO:223 的 20 个连续核苷碱基的核苷碱基序列,其中,所述修饰寡核苷酸包括:
 - 由 10 个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;
 - 由 5 个连接的核苷组成的 5' 侧翼区段;
 - 由 5 个连接的核苷组成的 3' 侧翼区段;

其中,所述间隙区段直接相邻于且位于 5' 侧翼区段和 3' 侧翼区段之间,其中,每一侧翼区段的每个核苷包含一个 2'-O- 甲氧乙基糖;其中,每一核苷内连接是磷硫酰连接,每一胞嘧啶是 5- 甲基胞嘧啶。

27. 如权利要求 25 所述的化合物,其中,所述修饰寡核苷酸由 20 个连接的核苷组成,并且具有包括 SEQ ID NO:217 的 20 个连续核苷碱基的核苷碱基序列,其中,所述修饰寡核苷酸包括:

由 10 个连接的脱氧核苷组成的间隙区段;

由 5 个连接的核苷组成的 5' 侧翼区段;

由 5 个连接的核苷组成的 3' 侧翼区段;

其中,所述间隙区段直接相邻于且位于 5' 侧翼区段和 3' 侧翼区段之间,其中,每一侧翼区段的每个核苷包含一个 2'-O- 甲氧乙基糖;其中,每一核苷内连接是磷硫酰连接,每一胞嘧啶是 5- 甲基胞嘧啶。

28. 如权利要求 24 所述的化合物,其中,每一胞嘧啶是 5- 甲基胞嘧啶。

29. 一种组合物,包括如权利要求 1-28 任一项所述的化合物或其盐以及药用可接受的载体或稀释剂。

30. 一种如权利要求 1-28 任一项所述的化合物,用于治疗。

31. 一种如权利要求 30 所述的化合物,用于治疗或预防动物的血栓栓塞性并发症,其中,所述血栓栓塞性并发症选自深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞和中风。

32. 一种如权利要求 30 所述的化合物,用于治疗动物体内的凝血紊乱。

33. 如权利要求 1-28 任一项所述的化合物或如权利要求 29 所述的组合物用于制备预防或治疗动物的血栓栓塞性并发症的药物的用途,其中,该药物用于向该动物给药以预防或治疗该动物的血栓栓塞性并发症,其中,所述血栓栓塞性并发症选自深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞和中风。

34. 如权利要求 1-28 任一项所述的化合物或如权利要求 29 所述的组合物用于制备预防或治疗动物的凝血紊乱的药物的用途,其中,该药物用于向该动物给药以预防或治疗该动物的凝血紊乱。

35. 如权利要求 1-28 任一项所述的化合物或如权利要求 29 所述的组合物用于制备抑制动物体内因子 11 的表达的药物的用途,其中,该药物用于向该动物给药以抑制该动物体内因子 11 的表达。

因子 11 表达的调节

[0001] 交叉引用相关申请

[0002] 本申请根据 35 U. S. C § 119(e) 主张 2008 年 10 月 15 日递交的美国临时专利申请第 61/105,772 号以及 2009 年 4 月 30 日递交的美国临时专利申请第 61/174,461 号的优先权。每一项上述申请在此被作为参考并且其全部内容被并入本申请。

[0003] 序列表

[0004] 本申请与电子格式的序列表一起被递交。提供的序列表是 2009 年 10 月 15 日生成的名称为 20091015_BIOL0107W0SEQ.txt, 大小为 92Kb 的文件。电子格式的序列表中的信息在此被作为参考, 并且其全部内容被并入本申请。

发明领域

[0005] 本发明的实施例提供了降低动物中因子 11 的 mRNA 和蛋白的表达的方法、化合物以及组合物。这些方法、化合物以及组合物可用于治疗、防止或改善血栓栓塞性并发症。

背景技术

[0006] 循环系统需要防止失血的机制, 以及对抗不当血管内栓塞的机制。通常, 凝血包括以可溶性纤维蛋白原转化为不溶性纤维蛋白凝胶为终点的级联反应。级联反应的步骤涉及非活性酶原向活性酶的转化。然后活性酶再催化级联反应的下一步骤。

[0007] 凝血级联反应

[0008] 凝血级联反应可能通过两条支路启动, 作为初始通路的组织因子通路 (也称为“外源性通路”), 以及接触激活通路 (也称为“内源性通路”)。

[0009] 组织因子通路由细胞表面受体组织因子 (TF, 也被称为因子 III) 启动, 后者由血管外细胞 (周边细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和角质细胞) 组成型表达, 并且由血管单核细胞和内皮细胞在炎症细胞因子或内毒素的诱导下表达 (Drake et al., Am J Pathol 1989, 134:1087-1097)。TF 是凝血因子 VIIa (一种丝氨酸蛋白酶) 的高亲和力细胞受体。缺少 TF 时, VIIa 具有非常低的催化活性, 与 TF 的结合对于通过变构机制赋予 VIIa 功能是必要的 (Drake et al., Am J Pathol 1989, 134:1087-1097)。TF-VIIa 复合物将因子 X 激活为 Xa。Xa 再与辅因子因子 Va 结合为凝血酶原酶复合物, 后者再将凝血酶原 (也被称为因子 II 或因子 2) 激活为凝血酶 (也被称为因子 IIa 或因子 2a)。凝血酶激活血小板, 将纤维蛋白原转化为纤维蛋白, 通过激活因子 XIII 促进纤维蛋白交联, 然后在 TF 暴露于血管外细胞的位点形成稳定的栓塞。此外, 凝血酶通过激活因子 V 和 VIII 来增强凝血级联反应。

[0010] 接触激活通路由因子 XII 向 XIIa 的活化所引起。因子 XIIa 将 XI 转化为 XIa, 而 XIa 将 IX 转化为 IXa。IXa 与辅因子 VIIIa 结合, 将 X 转化为 Xa。当因子 Xa 与因子 Va 结合而将凝血酶原 (因子 II) 转化为凝血酶 (因子 IIa) 时, 两条通路在这一点汇合。

[0011] 凝血抑制。

[0012] 至少有三种机制控制凝血级联反应, 即活化蛋白 C、抗凝血酶和组织因子通路抑制剂的作用。活化蛋白 C 是一种能降解辅因子 Va 和 VIIIa 的丝氨酸蛋白酶。蛋白 C 由凝血

酶和血栓调节蛋白一起激活,行使功能需要辅酶蛋白 S。抗凝血酶是一种能抑制凝血酶、Xa、XIIa、XIa 和 IXa 等丝氨酸蛋白酶的丝氨酸蛋白酶抑制剂(丝氨酸蛋白酶抑制剂)。组织因子通路抑制剂抑制 Xa 和 TF-VIIa 复合物的作用(Schwartz AL et al., Trends Cardiovasc Med. 1997 ;7 :234-239.)。

[0013] 疾病

[0014] 血栓形成是血栓的病理学发展,当血凝块迁移至个体的另一部分并且干扰器官功能时,栓塞出现。血栓栓塞可能导致如深静脉血栓、肺栓塞、心肌梗塞和中风等状况。很明显,血栓栓塞是发病的一个主要原因,其每年影响超过两百万个美国人(Adcock et al. American Journal of Clinical Pathology. 1997 ;108 :434-49)。尽管大部分血栓形成的病例是因为例如手术、癌症以及不动等后天的外在问题,一些病例则是因为遗传易感性,比如抗磷脂综合症和常染色体显性遗传,因子 V Leiden(Bertina RM et al. Nature 1994 ;369 :64-67.)。

[0015] 治疗。

[0016] 最常用抗凝剂华法林、肝素以及低分子量肝素(LMWH)都有显著的缺点。

[0017] 华法林通常用于治疗患有心房颤动的病人。药物与包括因子 II、VII、IX 和 X 等维生素 K 依赖的凝固因子相互作用。抗凝剂蛋白 C 和 S 也被华法林所抑制。华法林与包括如胺碘酮等心房颤动治疗药物的其他药物相互作用的事实使华法林的药物治疗进一步变得复杂。因为华法林的治疗难以预测,为了检测任何异常出血迹象,必须对病人小心监测。

[0018] 肝素通过激活对凝血酶和因子 X 都抑制的抗凝血酶来作用(Bjork I, Lindahl U. Mol Cell Biochem. 1982 48 :161-182.)。肝素治疗可能引起免疫反应,这使血管中血小板聚集而导致血栓形成。这种副作用被称为肝素诱导的血小板减少症(HIT),需要对病人监测。肝素的延长治疗也可能导致骨质疏松症。LMWH 也可以抑制因子 2,但程度弱于未分级肝素(UFH)。LMWH 与 HIT 发展有关。

[0019] 因此,现有的抗凝血药缺少可预测性和特异性,所以需要小心监测病人以防止如出血并发症等不良副作用。目前没有仅针对内源性或外源性通路的抗凝剂。

发明内容

[0020] 此处提供了调节因子 11 的 mRNA 和蛋白的表达的方法、化合物以及组合物。在一些实施例中,因子 11 特异性抑制剂调节因子 11 的 mRNA 和蛋白的表达。在一些实施例中,因子 11 特异性抑制剂是核酸、蛋白或小分子。

[0021] 在一些实施例中,调节作用在细胞或组织中发生。在一些实施例中,细胞或组织在动物中。在一些实施例中,所述动物是人。在一些实施例中,因子 11 的 mRNA 水平被降低。在一些实施例中,因子 11 的蛋白水平被降低。这种降低可以时间依赖的方式或剂量依赖的方式发生。

[0022] 本申请也提供了用于防止、治疗和改善疾病、紊乱和状况的方法、化合物以及组合物。在一些实施例中,这些疾病、紊乱和状况是血栓栓塞性并发症。这种血栓栓塞性并发症包括各类血栓形成、栓塞和血栓栓塞。在一些实施例中,这些血栓栓塞性并发症包括深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞和中风。

[0023] 这些疾病、紊乱和状况通常具有一个或多个危险因素、原因或结果。血栓栓塞性

并发症发展的某些危险因素和原因包括不动、手术（尤其是矫形手术）、恶性肿瘤、怀孕、高龄、使用口服避孕药、心房颤动、先前的血栓栓塞性并发症、慢性炎症疾病和遗传或后天的凝血紊乱。血栓栓塞性并发症发展相关的某些结果包括通过受影响血管的血流降低、组织坏死以及死亡。

[0024] 在一些实施例中，治疗方法包括将因子 11 特异性抑制剂给药于需要的个体。

[0025] 发明的详细说明

[0026] 在此声明，前面的一般说明和后面的详细说明都仅仅是示例性和说明性的，不限制本发明，这是可以理解的。此处，单数的使用包括复数，除非另有特别指明。如此处所用，使用“或”意味着“和 / 或”，除非另有特别指明。而且，使用术语“包括”以及如“包括”和“被包括”等其他形式，不是限制性的。如“元素”或“组分”等术语涵盖包括一个单元的元素和组分，也涵盖包括一个以上单元的元素和组分，除非另有特别指明。

[0027] 此处所用的分段标题仅用于组织的目的，不应被解释为限制所描述的主题。本申请中引用的所有文件或文件部分，包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文，其在此被套论的部分被作为参考，并且其全部内容被并入本申请。

[0028] 定义

[0029] 除非提供特别定义，此处描述的分析化学、合成有机化学和医药化学的相关术语以及其流程和技术是那些本领域所熟知和通用的。在化学合成和化学分析中可使用标准技术。本公开中准许引用的所有专利、申请、已发表的申请和其他出版物、从如国家生物技术信息中心 (NCBI) 等数据库中获得的 GENBANK 登录号和相关序列信息以及其他数据，其在此被套论的部分被作为参考，并且这些部分的全部内容被并入本申请。

[0030] 除非另行指出，下列术语具有下列含义：

[0031] “2'-O- 甲氧乙基”（也表示为 2'-MOE 和 2'-O(CH₂)₂-OCH₃）指的是呋喃环的 2' 位置的 O- 甲氧 - 乙基修饰。2'-O- 甲氧乙基修饰的糖是修饰糖。

[0032] “2'-O- 甲氧乙基核苷酸”是指包含 2'-O- 甲氧乙基修饰糖基的核苷酸。

[0033] “5- 甲基胞嘧啶”是指 5' 位置连有甲基修饰的胞嘧啶。5- 甲基胞嘧啶是修饰的核苷碱基。

[0034] “活性药剂”是指当给个体给药时能够提供治疗益处的药物组合物中的物质。例如，在一些实施例中，针对因子 11 的反义寡核苷酸是一种活性药剂。

[0035] “活性靶区”或“靶区”是指一个或多个活性反义化合物针对的区域。“活性反义化合物”是指能降低目标核酸水平或蛋白质水平的反义化合物。

[0036] “随附给药”是指两种试剂以它们的药理学效果在病人体内同时都显现的任何方式共同给药。随附给药不需要在单一药物组合物中、相同剂型中或以相同给药途径将两种试剂给药。两种试剂的效果不需要同时显现。效果只需要在一段时间重叠，不需要共同延伸。

[0037] “给药”是指将一种药剂提供给个体，包括但不限于医学专业人员的给药以及自我给药。

[0038] “改善”是指与疾病、紊乱或状况关联的至少一种指标、迹象或症状的减轻。指标的严重程度可以通过本领域普通技术人员已知的主观或客观的测定来确定。

[0039] “动物”是指人或非人动物，包括但不限于小鼠、大鼠、兔、狗、猫、猪和非人灵长类，

包括但不限于猴和黑猩猩。

[0040] “解毒化合物”指的是能降低任何反义介导活性的强度或持续时间的化合物。

[0041] “解毒寡核苷酸”是指包括与反义化合物互补且能与之杂交的寡核苷酸的解毒化合物。

[0042] “解毒蛋白”是指包括肽的解毒化合物。

[0043] “抗体”指的是以通过某种方式与抗原特异性反应为特征的分子，其中抗体和抗原各自根据对方来定义。抗体可能是指完整的抗体分子或其中任何片段或区域，如重链、轻链、Fab 区段以及 Fc 区段。

[0044] “反义活性”是指反义化合物与目标核酸相杂交所引起的任何可检测或可测量的活性。在一些实施例中，反义活性是目标核酸或该目标核酸编码的蛋白质的量或表达的减少。

[0045] “反义化合物”是指能够通过氢键与目标核酸相杂交的寡聚化合物。

[0046] “反义抑制”是指在与目标核酸互补的反义化合物存在时，与没有反义化合物时的目标核酸水平或目标蛋白水平相比，目标核酸水平或目标蛋白水平降低。

[0047] “反义寡核苷酸”是指具有能与目标核酸的相应区域或片段杂交的核苷碱基序列的单链寡核苷酸。

[0048] “双环糖”是指通过两个非偕式环原子桥接而修饰的呋喃环。双环糖是一种修饰的糖。

[0049] “双环核酸”或“BNA”指的是一种核苷或核苷酸，其中核苷或核苷酸的呋喃糖部分包括一个连接呋喃糖环上两个碳原子的桥键，从而形成一个双环系统。

[0050] “帽结构”或“末端帽部分”是指包含在反义化合物任一末端的化学修饰。

[0051] “化学独特区域”指的是反义化合物中在某些方面在化学上不同于相同反义化合物的另一区域的区域。例如，具有 2'-O- 甲氧乙基核苷酸的区域在化学上不同于含有无 2'-O- 甲氧乙基修饰的核苷酸的区域。

[0052] “嵌合型反义化合物”是指具有至少两个化学独特区域的反义化合物。

[0053] “共同给药”是指将两种或多种药剂给药于一个个体。两种或多种药剂可以在单一药物组合物中，也可能在分开的药物组合物中。两种或多种药剂中的每一种可以通过相同或不同的给药途径给药。共同给药涵盖平行或顺序给药。

[0054] “凝结因子”是指凝血级联反应中的因子 I、II、III、IV、V、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII 或 TAFI 中的任一个。“凝结因子核酸”是指编码凝结因子的任意核酸。例如，在一些实施例中，凝结因子核酸非限制地包括编码凝结因子的 DNA 序列（包括内含子和外显子的基因组 DNA）、由编码凝结因子的 DNA 转录的 RNA 序列以及编码凝结因子的 mRNA 序列。“凝结因子 mRNA”是指编码凝结因子蛋白的 mRNA。

[0055] “互补性”是指第一核酸与第二核酸的核苷碱基间的配对能力。

[0056] “相邻核苷碱基”是指彼此直接相邻的核苷碱基。

[0057] “稀释剂”是指组合物中无药理学活性，但药学必需或需要的成分。例如，在注射的组合物中的稀释剂可能是液体，比如盐溶液。

[0058] “剂量”是指在单一给药中或规定时间期间内提供的药剂的规定量。在一些实施例中，一个剂量可能通过一份、两份或多份丸药、片剂或注射剂来给药。例如，在一些需要皮下

给药的实施例中,所需剂量需要通过一次注射不容易容纳的体积,因此,可以使用两次或多次注射以达到所需剂量。在一些实施例中,药剂是通过在延长的时间期间或连续输液来给药的。剂量可以按小时、日、周或月来规定。

[0059] “有效量”是指在需要药剂的个体中足以实现所需生理学结果的活性药剂量。根据待处理个体的健康与生理状况、处理个体的分类群、组合物的剂型、个体医疗状况的评估以及其他有关因素,个体间的有效量可能有变化。

[0060] “因子 11 核酸”、“因子 XI 核酸”、“F 11 核酸”或“F XI 核酸”是指编码因子 11 的任意核酸。例如,在一些实施例中,因子 11 核酸包括编码因子 11 的 DNA 序列、由编码因子 11 的 DNA 转录的 RNA 序列(包括内含子和外显子的基因组 DNA)以及编码因子 11 的 mRNA 序列。“因子 11mRNA”是指编码因子 11 蛋白的 mRNA。

[0061] “因子 11 特异性抑制剂”指的是能在分子水平上特异性抑制因子 11 的 mRNA 和/或因子 11 蛋白的表达的任何试剂。例如,因子 11 特异性抑制剂包括能够抑制因子 11 的 mRNA 和/或因子 11 蛋白的表达的核酸(包括反义化合物)、肽、抗体、小分子以及其他试剂。在一些实施例中,通过特异性调节因子 11 的 mRNA 表达和/或因子 11 蛋白的表达,因子 11 特异性抑制剂可能影响凝血级联反应中的其他组分,包括下游组分。类似地,在一些实施例中,因子 11 特异性抑制剂可能影响动物中其他分子过程。

[0062] “因子 11 特异性抑制剂解毒剂”是指能降低因子 11 特异性抑制剂效果的化合物。在一些实施例中,因子 11 特异性抑制剂解毒剂挑选自:因子 11 肽;因子 11 解毒剂寡核苷酸,包括与因子 11 反义化合物互补的因子 11 解毒化合物;以及影响内源性或外源性凝通路的任何化合物或蛋白。

[0063] “完全互补”或“100%互补”是指第一核酸的每个核苷碱基在第二核酸中具有一个互补的核苷碱基。在一些实施例中,第一核酸是反义化合物,目标核酸是第二核酸。

[0064] “Gapmer”是指一种嵌合型反义化合物,其中,具有多个支持 RNase H 裂解的核苷的内部区段位于具有一个或多个核苷的外部区段之间,其中,组成内部区段的核苷化学上不同于组成外部区段的核苷。内部区段可被称为“间隙区段”,外部区段可被称为“侧翼区段”。

[0065] “间隙扩大的”是指在具有一到六个核苷的 5' 和 3' 侧翼区段之间并且与其直接相邻处具有 12 或更多个连续的 2' - 脱氧核糖核苷的嵌合型反义化合物。

[0066] “杂交”是指互补的核酸分子的退火。在一些实施例中,互补的核酸分子包括反义化合物和目标核酸。

[0067] “找出具有血栓栓塞性并发症风险的动物”是指找出已经诊断具有血栓栓塞性并发症的动物,或找出具有发展血栓栓塞性并发症倾向性的动物。具有发展血栓栓塞性并发症倾向性的个体包括那些具有一种或多种血栓栓塞性并发症危险因素的个体,这些因素包括不动、手术(尤其是矫形手术)、恶性肿瘤、怀孕、高龄、使用口服避孕药和遗传或后天的凝血紊乱。这种识别可能通过包括评价个体病史和标准的临床测试或评估的任何方法来完成。

[0068] “直接相邻”是指在直接相邻的元素之间没有任何干扰元素。

[0069] “个体”是指被挑选用于处理或治疗的人或非人动物。

[0070] “核苷内连接”指的是核苷间的化学连接。

[0071] “连接的核苷”是指连接在一起的相邻核苷。

[0072] “错配”或“非互补核苷碱基”指的是当第一核酸的核苷碱基不能与第二或目标核酸的相应核苷碱基配对时的情形。

[0073] “修饰的核苷内连接”指的是天然存在的核苷内连接（也就是磷酸二酯键核苷内键）的替换或任意改变。

[0074] “修饰核苷碱基”指的是除了腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶之外的任何核苷碱基。“未修饰的核苷碱基”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）。

[0075] “修饰核苷酸”是指独立具有修饰糖基、修饰核苷内连接或修饰核苷碱基的核苷酸。

[0076] “修饰核苷”是指独立具有修饰糖基或修饰核苷碱基的核苷。

[0077] “修饰寡核苷酸”是指包含修饰核苷内连接、修饰糖或修饰核苷碱基的寡核苷酸。

[0078] “修饰糖”指的是从天然糖的替换或改变。

[0079] “结构域”是指反义化合物中化学独特区域的模式。

[0080] “天然存在的核苷内连接”是指 3' 至 5' 磷酸二酯键连接。

[0081] “天然糖基”是指在 DNA (2' -H) 或 RNA (2' -OH) 中发现的糖。

[0082] “核酸”指的是由单体核苷酸组成的分子。核酸包括核糖核酸（RNA）、脱氧核糖核酸（DNA）、单链核酸、双链核酸、小干扰核糖核酸（siRNA）以及微 RNA（miRNA）。

[0083] “核苷碱基”是指能与另一核酸的碱基配对的杂环基团。

[0084] “核苷碱基序列”是指不依赖于任何糖、连接或核苷碱基修饰的连续核苷碱基的顺序。

[0085] “核苷”是指连接于糖的核苷碱基。

[0086] “模拟核苷”包括用于替代寡聚化合物的一个或多个位点上的糖或糖和碱基且未必是连接的那些结构，例如具有吗啉基、环己烯基、环己基、四氢吡喃基、如非呋喃糖单元的双环或三环模拟糖的模拟核苷。模拟核苷包括用于替代寡聚化合物的一个或多个位点上的核苷和连接的那些结构，例如肽核酸或吗啉（通过 -N(H)-C(=O)-O- 或其他非磷酸二酯键连接而连接的吗啉）。糖替代物与稍广义术语模拟核苷有重叠，但仅仅倾向于用于表示糖单元（呋喃糖环）的替代。此处提供的四氢吡喃环是糖替代物例子的展示，其中，呋喃糖基团被四氢吡喃环系统所替代。

[0087] “核苷酸”是指具有与核苷的糖部分共价连接的磷酸基团的核苷。

[0088] “寡聚化合物”或“寡聚物”是指能与核酸分子的至少一个区段杂交的连接的单体亚单位的聚合物。

[0089] “寡核苷酸”是连接核苷的聚合物，其中，这些核苷的每一可以是修饰或未修饰，并且彼此独立的。

[0090] “肠胃外给药”是指通过注射或输液给药。肠胃外给药包括皮下给药、静脉给药、肌肉给药、动脉给药、腹腔内给药或颅内给药，比如鞘内给药或脑室内给药。

[0091] “肽”是指以酰胺键连接至少两个氨基酸形成的分子。肽指多肽和蛋白质。

[0092] “药物组合物”是指适于个体给药的物质的混合物。例如，药物组合物可以包含一种或多种活性药剂和无菌水溶液。

[0093] “药用可接受盐”是指生理学和药学可接受的反义化合物的盐,也就是保留本体寡核苷酸的需要生物活性,但不另外赋予不需要的毒性效果的盐。

[0094] “磷硫酰连接”是指核苷间的连接,其中,一个非桥接氧原子被硫原子替代而修饰磷酸二酯键。磷硫酰连接(P = S)是修饰的核苷内连接。

[0095] “部分”是指核酸中确定数量的连续(也就是连接的)核苷碱基。在一些实施例中,部分是指目标核酸中确定数量的连续核苷碱基。在一些实施例中,部分是反义化合物中确定数量的连续核苷碱基。

[0096] “防止”指的是延迟或预防疾病、紊乱或状况的发生或发展几分钟到无限的时间期间。防止也指降低疾病、紊乱或状况发展的风险。

[0097] “前体药物”是指以在身体或细胞内由其中的内源酶或其他化学品或条件的作用而转化为活性形式的非活化形式制备的治疗剂。

[0098] “副作用”是指由治疗所引起的除了预期效果之外的生理反应。在一些实施例中,副作用包括注射部位反应、肝功能测试异常、肾功能异常、肝脏毒性、肾脏毒性、中枢神经系统异常、肌肉疾病以及不适。例如,血清中提高的转氨酶水平可能表明肝脏毒性或肝功能异常。例如,增高的胆红素可能表明肝脏毒性或肝功能异常。

[0099] “单链寡核苷酸”是指没有与互补链杂交的寡核苷酸。

[0100] “可特异性杂交的”指的是反义化合物在反义寡核苷酸和目标核酸间具有足以诱导期望效果的互补度,而在期望特异性结合的条件下,也就是在体内化验和治疗处理时的生理条件下,表现出对非目标核酸最低影响或无影响。

[0101] “靶向”或“被靶向”是指设计和选择与目标核酸特异性杂交并诱导预期效果的反义化合物的过程。

[0102] “目标核酸”、“目标 RNA”和“目标 RNA 转录本”都指的是能被反义化合物靶向的核酸。

[0103] “目标区段”是指反义化合物靶向的目标核酸的核苷酸的序列。“5' 靶向位点”指的是目标区段的最 5' 端核苷酸。“3' 靶向位点”指的是目标区段的最 3' 端的核苷酸。

[0104] “治疗有效量”是指为个体提供治疗益处的药剂的量。

[0105] “血栓栓塞性并发症”是指涉及血栓引起的栓塞的任何疾病、紊乱或状况。这些疾病、紊乱或状况的示例包括各类血栓形成、栓塞和血栓栓塞。在一些实施例中,这些疾病、紊乱或状况包括深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞和中风。

[0106] “处理”指的是将药物组合物进行给药以影响疾病、紊乱或状况的改变或改善。

[0107] “未修饰核苷酸”是指由天然存在的核苷碱基、糖基和核苷内连接所组成的核苷酸。在一些实施例中,未修饰核苷酸是 RNA 核苷酸(也就是 β -D-核糖核苷)或 DNA 核苷酸(也就是 β -D-脱氧核糖核苷)。

[0108] 一些实施例

[0109] 本发明的实施例提供了降低因子 11 的 mRNA 和蛋白的表达的方法、化合物以及组合物。

[0110] 本发明的实施例提供了用于治疗、防止或改善需要治疗的个体中与因子 11 相关的疾病、紊乱和状况的方法、化合物以及组合物。也构思了用于治疗、防止或改善与因子 11 相关的疾病、紊乱和状况的药剂制备的方法和化合物。与因子 11 相关的疾病、紊乱和状况

包括血栓栓塞性并发症,如血栓形成、栓塞、血栓栓塞、深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞和中风。

[0111] 本发明的实施例提供了用于治疗、防止或改善因子 11 相关疾病的因子 11 特异性抑制剂。在一些实施例中,因子 11 特异性抑制剂是能够抑制因子 11 的 mRNA 和 / 或因子 11 蛋白的表达的核酸(包括反义化合物)、肽、抗体、小分子以及其他试剂。

[0112] 在本发明的一些实施例中,因子 11 特异性抑制剂是肽或蛋白,比如但不限于 J Clin Invest 1982,69:844-852 中所述的 alpha 1 蛋白酶抑制剂、抗凝血酶 III、C1 抑制剂和 alpha 2 纤溶酶抑制剂;Thromb Res 1987,48:145-151 中所述的 alpha 1 抗胰蛋白酶(alpha 1AT);USPPN 2008/021998 和 Blood 1998,92:4198-206 中所述的因子 11 肽抑制剂;Thromb Res 2001,104:451-465 中所述的 MAP4-RGKWC;Proc Natl Acad Sci 2004,101:3939-44 中所述的 beta 2 GPI;Eur J Biochem 1999,262:915-923 中所述的香菇蛋白酶抑制剂;J Biol Chem 2004,279:29485-29492 中所述的连接蛋白酶 2/beta 淀粉样蛋白前体 Kunitz 结构域抑制剂(APPI) 和抗凝血酶(AT);以及 J Biol Chem 2005,280:23523-30 中所述的抑肽酶。

[0113] 在本发明的一些实施例中,因子 11 特异性抑制剂是抗体,比如,但不限于 Blood 1988,72:1748-54 中所述的 Winston-Salem(IgG3 kappa) 和 Baltimore(IgG1 kappa);J Biol Chem 1985,260:10714-719 中所述的 5F4、3C1 和 1F1;Throm Haemost 1990,63:417-23 中所述的单克隆抗体;J Thromb Haem 2006,4:1496-1501 中所述的 XI-5108;Thromb Res 1986,42:225-34 中所述的单克隆抗体 4-1;以及 USPN 6,566,140 中例子 19 中所述的 abcixmab 抗体。

[0114] 在本发明的一些实施例中,因子 11 特异性抑制剂是小分子,比如,但不限于二丙基氟磷酸盐(DFP);USPPN 2004/0180855 中例子 1-7 中所述的小分子抑制剂;以及 J Biol Chem 2005,280:23523-30 中所述的对氨基苄脒(pAB)。

[0115] 本发明的实施例提供了因子 11 特异性抑制剂,如此处所述,可用于治疗、防止或改善血栓栓塞性并发症,如血栓形成、栓塞、血栓栓塞、深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞和中风。

[0116] 本发明的实施例提供了如此处所述的因子 11 特异性抑制剂在用于治疗、防止或改善血栓栓塞性并发症,如血栓形成、栓塞、血栓栓塞、深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞和中风的药剂生产中的使用。

[0117] 本发明的实施例提供了此处所述的因子 11 特异性抑制剂与此处所述的其他试剂或治疗方法相结合的疗法中的应用,这些疗法用于治疗、防止或改善此处所述的血栓栓塞性并发症。试剂或治疗方法可以共同给药或随附给药。

[0118] 本发明的实施例提供了此处所述的因子 11 特异性抑制剂在药剂生产中的应用,该药剂与此处所述的其他试剂或治疗方法相结合的疗法用于治疗、防止或改善此处所述的血栓栓塞性并发症的药剂生产。试剂或治疗方法可以共同给药或随附给药。

[0119] 本发明的实施例提供了此处所述的因子 11 特异性抑制剂在用于治疗、防止或改善此处所述的病人体内血栓栓塞性并发症的药剂生产中的应用,该病人后续被给药其他试剂或疗法。

[0120] 本发明的实施例提供了用于治疗、防止或改善此处所述的血栓栓塞性并发症的试

剂盒,其中试剂盒包括:

[0121] (i) 此处所述的因子 11 特异性抑制剂;以及作为选择

[0122] (ii) 此处所述的其他试剂或治疗方法。

[0123] 本发明的试剂盒可以进一步包括用试剂盒以此处所述的组合治疗方法来治疗、防止或改善此处所述的血栓栓塞性并发症的说明书。

[0124] 本发明的实施例提供了靶向因子 11 核酸的反义化合物。在一些实施例中,因子 11 核酸是下列发布序列中的任一个:GENBANK 登录号 NM_000128:3(以 SEQ ID NO:1 并入本申请),GENBANK 登录号 NT_022792.17,19598000 至 19624000 缺失(以 SEQ ID NO:2 并入本申请),GENBANK 登录号 NM_028066.1(以 SEQ ID NO:6 并入本申请),外显子 1-15,GENBANK 登录号 NW_001118167.1(以 SEQ ID NO:274 并入本申请)。

[0125] 在一些实施例中,本发明提供了包含修饰寡核苷酸的化合物。在一些实施例中,本发明的化合物包括由 12 至 30 个连接核苷组成的修饰寡核苷酸。

[0126] 在一些实施例中,本发明的化合物可以包括含有与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%互补的核苷碱基序列的修饰寡核苷酸。在一些实施例中,本发明的化合物可以包括含有与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 100%互补的核苷碱基序列的修饰寡核苷酸。

[0127] 在一些实施例中,本发明提供了包括含有与 SEQ ID NO:1 的第 656 位至第 676 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列的修饰寡核苷酸的化合物。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 656 位至第 676 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的相同长度部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的相同长度部分 100%互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80%的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0128] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸含有与 SEQ ID NO:1 的第 665 位至第 687 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 665 位至第 687 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100%互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 50%的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0129] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 675 位至第 704 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 675 位至第 704 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100%互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法

测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 50% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0130] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 677 位至第 704 位核苷碱基至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 677 位至第 704 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 60% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0131] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 678 位至第 697 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 678 位至第 697 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 70% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0132] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 680 位至第 703 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 680 位至第 703 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80% 的抑制(例如,如例 3 和例 30 所述)。

[0133] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 683 位至第 702 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 683 位至第 702 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 90% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0134] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 738 位至第 759 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 738 位至第 759 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少

96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100%互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80%的抑制(例如,如例 3 和例 30 所述)。

[0135] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 738 位至第 760 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 738 位至第 760 位核苷碱基的等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100%互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 60%的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0136] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 738 位至第 762 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 738 位至第 762 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100%互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 45%的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0137] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 1018 位至第 1042 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 1018 位至第 1042 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100%互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80%的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0138] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 1062 位至第 1089 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 1062 位至第 1089 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100%互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 70%的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0139] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 1062 位至第 1090 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 1062 位至第 1090 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 60% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0140] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 1062 位至第 1091 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 1062 位至第 1091 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 20% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0141] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 1275 位至第 1301 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 1062 位至第 1091 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0142] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 1276 位至第 1301 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可能包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 1062 位至第 1091 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80% 的抑制(例如,如例 30 所述)。

[0143] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 1284 位至第 1308 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ

ID NO:1 的第 1062 位至第 1091 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0144] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 1291 位至第 1317 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 个与 SEQ ID NO:1 的第 1062 位至第 1091 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0145] 在一些实施例中,本发明提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 的第 1275 位至第 1318 位核苷碱基的至少部分互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含至少 8、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18 或 20 与 SEQ ID NO:1 的第 1275 位至第 1318 位核苷碱基等长部分互补的连续核苷碱基。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 互补的核苷碱基序列。所述修饰寡核苷酸可以包含与 SEQ ID NO:1 的等长部分 100% 互补的核苷碱基序列。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 70% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0146] 本发明的实施例提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包括选自 SEQ ID NO:15 至 241 中列举的核苷碱基序列的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基。

[0147] 本发明的实施例提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包括选自 SEQ ID NO:15 至 269 中列举的核苷碱基序列的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基。

[0148] 本发明的实施例提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包括选自 SEQ ID NO:242 至 269 中列举的核苷碱基序列的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基。

[0149] 在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个或至少 18 个选自以下的核苷碱基序列的核苷碱基:ISIS Nos 22、31、32、34、36 至 38、40、41、43、51 至 53、55、56、59、60、64、66、71、73、75、96、98 至 103、105 至 109、113 至

117、119、124、127、129、171、172、174、176、178、179、181 至 197、199 至 211 和 213 至 232。在一些实施例中,修饰寡核苷酸包含选自以下的核苷碱基序列:ISIS Nos 22、31、32、34、36 至 38、40、41、43、51 至 53、55、56、59、60、64、66、71、73、75、96、98 至 103、105 至 109、113 至 117、119、124、127、129、171、172、174、176、178、179、181 至 197、199 至 211 和 213 至 232。在一些实施例中,修饰寡核苷酸由选自以下的核苷碱基序列所组成:SEQ ID NOs 22、31、32、34、36 至 38、40、41、43、51 至 53、55、56、59、60、64、66、71、73、75、96、98 至 103、105 至 109、113 至 117、119、124、127、129、171、172、174、176、178、179、181 至 197、199 至 211 和 213 至 232。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 70% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0150] 在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个或至少 18 个选自以下的核苷碱基序列的核苷碱基:ISIS Nos 22、31、34、37、40、43、51 至 53、60、98、100 至 102、105 至 109、114、115、119、171、174、176、179、181、186、188 至 193、195、196、199 至 210 和 213 至 232。在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括选自以下的核苷碱基序列:SEQ ID NOs 22、31、34、37、40、43、51 至 53、60、98、100 至 102、105 至 109、114、115、119、171、174、176、179、181、186、188 至 193、195、196、199 至 210 和 213 至 232。在一些实施例中,修饰寡核苷酸由选自以下的核苷碱基序列所组成:SEQ ID NOs 22、31、34、37、40、43、51 至 53、60、98、100 至 102、105 至 109、114、115、119、171、174、176、179、181、186、188 至 193、195、196、199 至 210 和 213 至 232。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0151] 在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个或至少 18 个选自以下的核苷碱基序列的核苷碱基:ISIS Nos 31、37、100、105、179、190 至 193、196、202 至 207、209、210、214 至 219、221 至 224、226、227、229 和 231。在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括选自以下的核苷碱基序列:SEQ ID NOs 31、37、100、105、179、190 至 193、196、202 至 207、209、210、214 至 219、221 至 224、226、227、229 和 231。在一些实施例中,修饰寡核苷酸由选自以下的核苷碱基序列所组成:SEQ ID NOs 31、37、100、105、179、190 至 193、196、202 至 207、209、210、214 至 219、221 至 224、226、227、229 和 231。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 90% 的抑制(例如,如例 3 所述)。

[0152] 在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个或至少 18 个选自以下的核苷碱基序列的核苷碱基:SEQ ID NOs 34、52、53、114、115、190 至 213、232、242 至 260 以及 262 至 266。在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括选自以下的核苷碱基序列:SEQ ID NOs 34、52、53、114、115、190、213 至 232、242 至 260 以及 262 至 266。在一些实施例中,修饰寡核苷酸由选自以下的核苷碱基序列所组成:SEQ ID NOs 34、52、53、114、115、190、213 至 232、242 至 260 和 262 至 266。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 70% 的抑制(例如,如例 30 所述)。

[0153] 在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个或至少 18 个选自以下的核苷碱基序列的核苷碱基:SEQ ID NOs 34、52、53、114、115、190、213 至 216、218 至 226、243 至 246、248、249、252 至 259、264 和 265。在一些实施

例中,修饰寡核苷酸包括选自以下的核苷碱基序列:SEQ ID NOs 34、52、53、114、115、190、213 至 216、218 至 226、243 至 246、248、249、252 至 259、264 和 265。在一些实施例中,修饰寡核苷酸由选自以下的核苷碱基序列所组成:SEQ ID NOs 34、52、53、114、115、190、213 至 216、218 至 226、243 至 246、248、249、252 至 259、264 和 265。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 80% 的抑制(例如,如例 30 所述)。

[0154] 在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个或至少 18 个选自以下的核苷碱基序列的核苷碱基:SEQ ID NOs 34、190、215、222、223、226、246 和 254。在一些实施例中,修饰寡核苷酸包括选自以下的核苷碱基序列:SEQ ID NOs 34、190、215、222、223、226、246 和 254。在一些实施例中,修饰寡核苷酸由选自以下的核苷碱基序列所组成:SEQ ID NOs 34、190、215、222、223、226、246 和 254。当在 HepG2 细胞中,用 RT-PCR 分析方法测定,所述修饰寡核苷酸可以实现人 mRNA 水平至少 90% 的抑制(例如,如示例 30 所述)。

[0155] 在一些实施例中,化合物由单链修饰寡核苷酸所组成。

[0156] 在一些实施例中,修饰寡核苷酸由 20 个连接核苷所组成。

[0157] 在一些实施例中,修饰寡核苷酸的核苷碱基序列与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:274 的核苷碱基序列 100% 互补。

[0158] 在一些实施例中,化合物具有至少一个修饰的核苷内连接。在一些实施例中,核苷内连接是硫代磷酸核苷内连接。

[0159] 在一些实施例中,化合物具有至少一个包含修饰糖的核苷。在一些实施例中,至少一个修饰糖是双环糖。在一些实施例中,至少一个修饰糖包含 2'-O- 甲氧乙基。

[0160] 本发明的实施例提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包括选自 SEQ ID NO:15-241、SEQ ID NO:15-269 或 SEQ ID NO:242-269 中所列举的核苷碱基序列的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基,其中,至少一个核苷包含修饰糖。

[0161] 在一些实施例中,所述至少一个修饰糖是双环糖。

[0162] 在一些实施例中,所述至少一个双环糖包含 4'-(CH₂)_n-O-2' 桥联,其中 n 为 1 或 2。

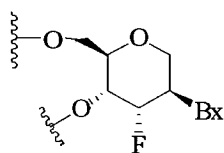
[0163] 在一些实施例中,所述至少一个双环糖包含 4'-CH(CH₃)-O-2' 桥联。

[0164] 在一些实施例中,所述至少一个修饰糖包含 2'-O- 甲氧乙基基团。

[0165] 本发明的实施例提供了包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包括选自 SEQ ID NO:15-241、SEQ ID NO:15-269 或 SEQ ID NO:242-269 中所列举的核苷碱基序列的至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个或 20 个连续核苷碱基,包含至少一个四氢吡喃修饰核苷,其中,四氢吡喃环取代了呋喃糖环。

[0166] 在一些实施例中,所述至少一个四氢吡喃修饰核苷具有如下结构:

[0167]



[0168] 在一些实施例中,化合物具有至少一个包含修饰的核苷碱基的核苷。在一些实施例中,修饰核苷碱基是 5-甲基胞嘧啶。

[0169] 在一些实施例中,化合物的修饰寡核苷酸包括:

[0170] (i) 由连接的脱氧核苷组成的间隙区段;

[0171] (i) 由连接的核苷组成的 5' 侧翼区段;

[0172] (iii) 由连接的核苷组成的 3' 侧翼区段,其中,间隙区段直接相邻于且位于 5' 侧翼区段和 3' 侧翼区段之间,其中,每一侧翼区段的每个核苷包含一个修饰糖。在一些这样的实施例中,修饰寡核苷酸中的每个胞嘧啶是 5-甲基胞嘧啶。

[0173] 在一些实施例中,化合物的修饰寡核苷酸包括:

[0174] (i) 由 10 个连接脱氧核苷组成的间隙区段;

[0175] (i) 由 5 个连接的核苷组成的 5' 侧翼区段;

[0176] (iii) 由 5 个连接的核苷组成的 3' 侧翼区段,其中,间隙区段直接相邻于且位于 5' 侧翼区段和 3' 侧翼区段之间,其中,每一侧翼区段的每个核苷包含 2' -O- 甲氧乙基糖;其中,每个核苷内连接是磷硫酰连接。在一些这样的实施例中,修饰寡核苷酸中的每个胞嘧啶是 5-甲基胞嘧啶。

[0177] 在一些实施例中,化合物的修饰寡核苷酸包括:

[0178] (i) 由 14 个连接脱氧核苷组成的间隙区段;

[0179] (ii) 由 3 个连接的核苷组成的 5' 侧翼区段;

[0180] (iii) 由 3 个连接的核苷组成 3' 侧翼区段,其中,间隙区段直接相邻于且位于 5' 侧翼区段和 3' 侧翼区段之间,其中,每一侧翼区段的每个核苷包含 2' -O- 甲氧乙基糖;其中,每个核苷内连接是磷硫酰连接。在一些这样的实施例中,修饰寡核苷酸中的每个胞嘧啶是 5-甲基胞嘧啶。

[0181] 在一些实施例中,化合物的修饰寡核苷酸包括:

[0182] (i) 由 13 个连接脱氧核苷组成的间隙区段;

[0183] (i) 由 2 个连接的核苷组成的 5' 侧翼区段;

[0184] (iii) 由 5 个连接的核苷组成的 3' 侧翼区段,其中,间隙区段直接相邻于且位于 5' 侧翼区段和 3' 侧翼区段之间,其中,每一侧翼区段的每个核苷包含 2' -O- 甲氧乙基糖;其中,每个核苷内连接是磷硫酰连接。在一些这样的实施例中,修饰寡核苷酸中的每个胞嘧啶是 5-甲基胞嘧啶。

[0185] 本发明的实施例提供了包括修饰寡核苷酸的组合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包括选自 SEQ ID NO:15-241 所列举的核苷碱基序列的至少 12 个连续核苷碱基,或其盐以及药用可接受的载体或稀释剂。

[0186] 本发明的实施例提供了包括修饰寡核苷酸的组合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包括选自 SEQ ID NO:15-269 所列举的核苷碱基序列的至少 12 个连续核苷碱基,或其盐以及药用可接受的载体或稀释剂。

[0187] 本发明的实施例提供了包括修饰寡核苷酸的组合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30

个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包括选自 SEQ ID NO :241-269 所列举的核苷碱基序列的至少 12 个连续核苷碱基,或其盐以及药用可接受的载体或稀释剂。

[0188] 本发明的实施例提供了方法,这些方法包括向动物给药包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包含选自 SEQ ID NO :15-241 所列举的核苷碱基序列的至少 8 个连续核苷碱基。

[0189] 本发明的实施例提供了方法,这些方法包括向动物给药包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包含选自 SEQ ID NO :15-269 所列举的核苷碱基序列的至少 8 个连续核苷碱基。

[0190] 本发明的实施例提供了方法,这些方法包括向动物给药包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接核苷组成并且具有核苷碱基序列,该核苷碱基序列包含选自 SEQ ID NO :241-269 所列举的核苷碱基序列的至少 8 个连续核苷碱基。

[0191] 在一些实施例中,动物是人。

[0192] 在一些实施例中,给药防止了深静脉血栓形成或肺栓塞。

[0193] 在一些实施例中,所述化合物与从阿司匹林、氯吡格雷、双嘧达莫、肝素、来匹卢定、噻氯匹啶、华法林、阿哌沙班、利伐沙班和依诺肝素钠中挑选的任一个共同给药。

[0194] 在一些实施例中,所述化合物与任何因子 Xa 抑制剂共同给药。

[0195] 在一些实施例中,因子 Xa 抑制剂是利伐沙班、LY517717、YM150、阿哌沙班、PRT054021 和 DU-176b 中的任一种。

[0196] 在一些实施例中,化合物与从阿司匹林、氯吡格雷、双嘧达莫、肝素、来匹卢定、噻氯匹啶、华法林、阿哌沙班、利伐沙班和依诺肝素钠中挑选的任一个随附给药。

[0197] 在一些实施例中,给药是肠胃外给药。在一些实施例中,肠胃外给药是皮下注射或静脉注射给药中的任一种。

[0198] 本发明的实施例提供了方法,包括鉴定有发展血栓栓塞性并发症的风险的动物,以及向该有风险的动物给药治疗有效量的包括修饰寡核苷酸的化合物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接的核苷组成,其中,该修饰的寡核苷酸与因子 11 核酸互补。

[0199] 在一些实施例中,血栓栓塞性并发症是深静脉血栓形成、肺栓塞或其组合。

[0200] 本发明的实施例提供了方法,包括通过向动物给药治疗有效量的包括修饰寡核苷酸的化合物识别出有凝血紊乱风险的动物,该修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接的核苷组成,其中,修饰的寡核苷酸与因子 11 核酸互补。

[0201] 在一些实施例中,化合物与从阿司匹林、氯吡格雷、双嘧达莫、肝素、来匹卢定、噻氯匹啶、华法林、阿哌沙班、利伐沙班和依诺肝素钠中挑选的任一个共同给药。

[0202] 在一些实施例中,化合物与从阿司匹林、氯吡格雷、双嘧达莫、肝素、来匹卢定、噻氯匹啶、华法林、阿哌沙班、利伐沙班和依诺肝素钠中挑选的任一个随附给药。

[0203] 本发明的实施例提供了方法,该方法包括通过向动物给药治疗有效量的包括修饰寡核苷酸的化合物,降低动物血栓栓塞性并发症的风险,其中,修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接的核苷组成,其中,修饰的寡核苷酸与因子 11 核酸互补。

[0204] 本发明的实施例提供了方法,包括通过向动物给药治疗有效量的包括修饰寡核苷酸的化合物,治疗动物体内的凝血紊乱,其中,修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接的核苷组成,其中,修饰的寡核苷酸与因子 11 核酸互补。

[0205] 本发明的实施例提供了方法,包括通过向动物给药治疗有效量的包括修饰寡核苷酸的化合物,抑制动物体内因子 11 的表达,其中,修饰寡核苷酸由 12 至 30 个连接的核苷组成,其中,修饰的寡核苷酸与因子 11 核酸互补。

[0206] 在一些实施例中,通过给药修饰寡核苷酸的解毒剂逆转动物体内因子 11 的抑制。

[0207] 在一些实施例中,解毒剂是与修饰寡核苷酸互补的寡核苷酸。

[0208] 反义化合物

[0209] 寡聚化合物包括,但不限于,寡核苷酸、寡核苷、寡核苷酸类似物、寡核苷酸模拟物、反义化合物、反义寡核苷酸以及 siRNA。寡聚化合物可以与目标核酸“反义”,是指它能够通过氢键作用与目标核酸相杂交。

[0210] 在一些实施例中,反义化合物具有核苷碱基序列,当以 5' 至 3' 方向表示时,其包含其靶向的目标核酸的目标区段的反式互补序列。在一些这样的实施例中,反义寡核苷酸具有核苷碱基序列,当 5' 至 3' 方向表示时,其具有其靶向的目标核酸的目标区段的反式互补序列。

[0211] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的反义化合物的长度为 12-30 个亚单位。换言之,这样的反义化合物是 12 到 30 个连接的亚单位。在其他实施例中,反义化合物是 8 至 80、12 至 50、15 至 30、18 至 24、19 至 22 或 20 个连接的亚单位。在一些这种实施例中,反义化合物的长度是 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个连接的亚单位,或是由任意两个上述数值定义的范围。在一些实施例中,反义化合物是反义寡核苷酸,连接的亚单位是核苷酸。

[0212] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的反义寡核苷酸可能被缩短或截短。例如,可以从 5' 末端 (5' 截短) 或者从 3' 末端 (3' 截短) 删除单个亚单位。靶向因子 11 核酸的缩短或截短的反义化合物可能有两个从反义化合物的 5' 末端删除的亚单位,或者两个从反义化合物的 3' 末端删除的亚单位。另外,被删除的核苷可能分散在反义化合物的各处,例如,分散在有一个从 5' 末端删除的亚单位以及一个从 3' 末端删除的亚单位的反义化合物中。

[0213] 当加长的反义化合物中存在单个额外的亚单位时,该额外的亚单位可以位于反义化合物的 5' 或 3' 末端。当存在两个或多个额外的亚单位时,这些增加的亚单位可能彼此相邻,例如,在有两个亚单位被加到反义化合物的 5' 末端 (5' 增加) 或者 3' 末端 (3' 增加) 的反义化合物中。或者,增加的亚单位可以分散在反义化合物的各处,例如,在有一个亚单位被增加到 5' 末端以及一个亚单位被增加到 3' 末端的反义化合物中。

[0214] 增加或降低反义化合物,如反义寡核苷酸,的长度,和 / 或引入错配碱基而不消除活性是可能的。例如,在 Woolf 等人的工作中 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :7305-7309, 1992), 对一系列长度为 13-25 个核苷碱基的反义寡核苷酸在卵母细胞注射模型中诱导目标 RNA 裂解的能力进行了测试。靠近反义寡核苷酸末端有 8 或 11 个错配碱基且长度为 25 个核苷碱基的反义寡核苷酸能够引导目标 mRNA 的特异性裂解,虽然其程度小于不含错配的反义寡核苷酸。类似地,用包括那些有 1 个或 3 个错配的 13 个核苷碱基的反义寡核苷酸实现了目标特异性裂解。

[0215] Gautschi 等人 (J. Natl. Cancer Inst. 93 :463-471, March 2001) 说明了与 bcl-2mRNA 100% 互补并且与 bcl-xL mRNA 有 3 个错配的寡核苷酸在体外和体内对 bcl-2 和 bcl-xL 兼有降低表达的能力。而且, 这种寡核苷酸在体内表现出有效地抗肿瘤活性。

[0216] Maher 和 Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16 :3341-3358, 1988) 分别对一系列 14 个核苷碱基串联的反义寡核苷酸以及由两个或三个串联反义寡核苷酸构成的 28 个和 42 个核苷碱基的反义寡核苷酸测试了它们在兔网织红细胞测试中阻止人 DHFR 翻译的能力。3 条 14 个核苷碱基的反义寡核苷酸的每一个单独能抑制翻译, 虽然水平比 28 个或 42 个核苷碱基的反义寡核苷酸的水平要更弱些。

[0217] 反义化合物结构域

[0218] 在一些实施例中, 靶向因子 11 核酸的反义化合物具有模式化排列的化学修饰亚单位或结构域, 以赋予反义化合物如增强抑制活性、增强对目标核酸的结合力或对体内核酸酶引起的降解的抵抗力等特性。

[0219] 嵌合型反义化合物通常包含至少一个修饰区域, 以便赋予对核酸酶降解的增强的抵抗力、增强的细胞摄入、对目标核酸的增强的结合力和 / 或增强的抑制活性。嵌合型反义化合物的第二个区域可作为裂解 RNA:DNA 双螺旋的 RNA 链的细胞核酸内切酶 RNase H 的底物。

[0220] 具有 gapmer 结构域的反义化合物被视为嵌合型反义化合物。在 gapmer 中, 具有多个支持 RNase H 裂解的核苷酸的内部区段位于具有多个化学上不同于内部区域核苷的核苷酸的外部区段之间。就具有 gapmer 结构域的反义寡核苷酸而言, 间隙区段通常作为核酸内切酶裂解的底物, 而侧翼区段包含修饰的核苷。在一些实施例中, gapmer 的区域的差别在于包括每个独特区域的糖基的类型。在一些实施例中, 用来区别 gapmer 区域的糖基类型包括 β -D-核糖核苷、 β -D-脱氧核糖核苷、2'-修饰的核苷 (这些 2'-修饰的核苷可以包括 2'-MOE 和 2'-O-CH₃ 等等) 和双环糖修饰的核苷 (这些双环糖修饰的核苷可以包括那些具有 4'-(CH₂)_n-O-2' 桥联的核苷, 其中 $n = 1$ 或 $n = 2$)。优选地, 每一独特区域包括统一的糖基。侧翼-间隙-侧翼结构域经常表示为 "X-Y-Z", 其中, "X" 代表 5' 侧翼区域的长度, "Y" 代表间隙区域的长度, "Z" 代表 3' 侧翼区域的长度。如此处所用, 被描述为 "X-Y-Z" 的 gapmer 具有间隙区段与 5' 侧翼区段和 3' 侧翼区段每个直接相邻的结构。因此, 在 5' 侧翼区段和间隙区段之间或间隙区段与 3' 侧翼区段之间没有干扰核苷。此处描述的任何反义化合物可以有 gapmer 结构域。在一些实施例中, X 和 Z 相同, 在其他实施例中, 它们不同。在优先实施例中, Y 介于 8 个至 15 个核苷酸之间。X、Y 或 Z 可以是 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、25 个、30 个或更多个核苷酸。因此, 本发明的 gapmer 包括, 但不限于, 例如 5-10-5、4-8-4、4-12-3、4-12-4、3-14-3、2-13-5、2-16-2、1-18-1、3-10-3、2-10-2、1-10-1、2-8-2、5-8-5 或 6-8-6。

[0221] 在一些实施例中, 反义化合物具有侧翼-间隙或间隙-侧翼结构的 "wingmer" 结构域, 也就是上面描述的 gapmer 结构的 X-Y 或 Y-Z 结构。因此, 本发明的 wingmer 结构包括, 但不限于, 例如 5-10、8-4、4-12、12-4、3-14、16-2、18-1、10-3、2-10、1-10、8-2、2-13、5-13、5-8 或 6-8。

[0222] 在一些实施例中, 靶向因子 11 核酸的反义化合物具有 5-10-5gapmer 结构域。

[0223] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的反义化合物具有 3-14-3gapmer 结构域。

[0224] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的反义化合物具有 2-13-5gapmer 结构域。

[0225] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的反义化合物具有 5-8-5gapmer 结构域。

[0226] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的反义化合物具有 6-8-6gapmer 结构域。

[0227] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的反义化合物具有间隙扩宽的结构域。

[0228] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的间隙扩宽的反义寡核苷酸具有由 14 个 2'-脱氧核糖核苷构成的间隙区段,其直接相邻并介于由三个化学修饰的核苷构成的侧翼区段之间。在一些实施例中,化学修饰包括 2'-糖基修饰。在另一实施例中,化学修饰包括含 2'-MOE 糖基修饰。

[0229] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的间隙扩宽的反义寡核苷酸具有由 13 个 2'-脱氧核糖核苷构成的间隙区段,其直接相邻并介于由两个化学修饰的核苷构成的 5'侧翼区段和由五个化学修饰的核苷构成的 3'侧翼区段之间。在一些实施例中,化学修饰包括 2'-糖基修饰。在另一实施例中,化学修饰包括 2'-MOE 糖基修饰。

[0230] 目标核酸、目标区域和核苷酸序列

[0231] 编码因子 11 的核苷酸序列包括,但不限于以下:GENBANK 登录号 NM_000128.3, 1999 年 3 月 24 日 GENBANK 首次收录,指定为 SEQ ID NO:1;NT_022792.17,从 19598000 至 19624000 截断,2000 年 11 月 29 日 GENBANK 首次收录,指定为 SEQ ID NO:2;GENBANK 登录号 NM_028066.1,2002 年 6 月 2 日 GENBANK 首次收录,指定为 SEQ ID NO:6;以及外显子 1-15, GENBANK 登录号 NW_001118167.1,2006 年 3 月 28 日 GENBANK 首次收录,指定为 SEQ ID NO:274。

[0232] 可以理解,此处包含的例子中每个 SEQ ID NO 所对应的序列独立于任何糖基、核苷内连接或核苷碱基的修饰。同样,SEQ ID NO 定义的反义化合物可以独立地包含一个或多个糖基、核苷内连接或核苷碱基的修饰。Isis 号 (Isis No) 描述的反义化合物表示核苷碱基序列和结构域的结合。

[0233] 在一些实施例中,目标区段是目标核酸的结构性定义的区域。例如,目标区段可包含 3'UTR、5'UTR、外显子、内含子、外显子/内含子结合点、编码区域、翻译起始区域、翻译终止区域或其他定义的核酸区域。针对因子 11 的结构性定义区域可以通过登录号从如 NCBI 等序列数据库中获得,这些信息在此被作为参考并并入本申请。在一些实施例中,目标区域可包含从目标区域中目标区段的 5'目标位点到同样目标区域中另一目标区段的 3'目标位点间的序列。

[0234] 靶向包括确定反义化合物与之杂交以便发生预期效果的至少一个目标区段。在一些实施例中,预期效果是目标核酸 mRNA 水平的下降。在一些实施例中,预期效果是目标核酸编码的蛋白水平的下降或目标核酸相关的表型变化。

[0235] 目标区域可包含一个或多个目标区段。目标区域中的多个目标区段可以重叠。或者,它们可以不重叠。在一些实施例中,目标区域中的目标区段被至多约 300 个核苷酸分开。在一些实施例中,目标区域中的目标区段被目标核酸的大约、至多、至多约 250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20 或 10 个核苷酸,或者任意两个前面数值定义的范围的数量的核苷酸分开。在一些实施例中,目标区域中的目标区段被目标核酸的至多或至多约 5 个核苷酸分开。在一些实施例中,目标区段是连续的。由具有以此处所列的 5'目标位点

或 3' 目标位点中任一个为起始核酸的范围所定义的目标区域同样被构思。

[0236] 合适的目标区段可能在 5' UTR、编码区域、3' UTR、内含子、外显子或外显子 / 内含子结合点中被发现。包含起始密码子或终止密码子的目标区段也是合适的目标区段。合适的目标区段可能特异性地排除如起始密码子或终止密码子等特定结构性定义的区域。

[0237] 合适的目标区段的确定可包括目标核酸序列与基因组中其他序列的比较。例如，BLAST 算法可用于鉴定不同核酸中有相似性的区域。这种比较可以防止挑选出可能与选中的目标核酸之外的序列（也就是非靶向的或脱靶序列）非特异性杂交的反义化合物序列。

[0238] 反义化合物在活性目标区域中的活性（例如，以目标核酸水平的降低百分比来定义）可能会变化。在一些实施例中，因子 11 mRNA 水平的降低表明了因子 11 表达的抑制。因子 11 蛋白水平的降低也表明了对目标 mRNA 表达的抑制。而且，表型变化表明了因子 11 表达的抑制。例如，延长的 aPTT 时间可表明因子 11 表达的抑制。在另一例子中，延长的 aPTT 时间连同正常的 PT 时间可表明因子 11 表达的抑制。在另一例子中，血小板因子 4 (PF-4) 的减少量可表明因子 11 表达的抑制。在另一例子中，减少的血栓形成或血栓形成时间增加可表明因子 11 表达的抑制。

[0239] 杂交

[0240] 在一些实施例中，杂交发生在此处披露的反义化合物与因子 11 核酸之间。杂交最常见的机制涉及核酸分子的互补核苷碱基间的氢键作用（例如 Watson-Crick, Hoogsteen 或反向 Hoogsteen 氢键作用）。

[0241] 杂交可以在不同条件下发生。严谨条件是序列依赖的，取决于待杂交的核酸分子的特性和组成。

[0242] 确定序列是否与目标核酸特异性杂交的方法为本领域所熟知。在一些实施例中，此处提供的反义化合物可与因子 11 的核酸特异性杂交。

[0243] 互补

[0244] 当反义化合物的足够数量的核苷碱基与目标核酸的相应核苷碱基发生氢键作用而产生期望效果时（例如，目标核酸，如因子 11 核酸，的反义抑制），那么反义化合物与目标核酸彼此互补。

[0245] 反义化合物和因子 11 核酸间的非互补核苷碱基是可被容忍说明反义化合物依然能够与目标核酸特异性杂交。而且，反义化合物可与因子 11 核酸的一个或多个区段杂交，以至于干扰或相邻区段不涉及到杂交事件中（例如，回环结构、错配或发卡结构）。

[0246] 在一些实施例中，此处提供的反义化合物或其中指定部分与因子 11 核酸、目标区域、目标区段或其中指定部分有或至少有 70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的互补。反义化合物和目标核酸的互补百分比可以用常规方法测定。例如，反义化合物的 20 个核苷碱基中的 18 个与目标区域互补并因此特异性杂交的反义化合物展示 90% 的互补性。在该例中，剩下的非互补核苷碱基可以是聚集的或点缀着互补核苷碱基，不必彼此之间或与互补核苷碱基相连续。同样，长度为 18 个核苷碱基且具有 4（四）个两侧有与目标核酸完全互补的两个区域的非互补核苷碱基的反义化合物即具有与目标核酸 77.8% 的总的互补性，也落在本发明的范围之内。可以用本领域已知的 BLAST 程序（基本的局部比对搜索工具）和 PowerBLAST 程序 (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res.,

1997,7,649-656) 以常规的方法确定反义化合物与目标核酸区域的互补性百分比。同源百分比、序列身份或互补性可以用例如采用默认设置的 Gap 程序 (Wisconsin 序列分析软件包, Unix 的版本 8, 遗传学计算机组, Research Park 大学, Madison Wis.) 来确定, 其利用 Smith 和 Waterman 算法 (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)。

[0247] 在一些实施例中, 此处提供的反义化合物或其中指定部分与目标核酸或其中指定部分完全互补 (也就是 100% 互补)。例如, 反义化合物可与因子 11 核酸或目标区域或其中的目标区段或目标序列完全互补。如此处所用, “完全互补” 是指反义化合物的每个核苷碱基能够与目标核酸的相应核苷碱基准确碱基配对。例如, 只要 400 个核苷碱基长的目标核酸中有 20 个核苷碱基部分与反义化合物完全互补, 20 个核苷碱基反义化合物就与该目标序列完全互补。完全互补也可以用于第一条和 / 或第二条核酸的指定部分。例如, 30 个核苷碱基的反义化合物中的 20 个核苷碱基部分可以与 400 个核苷碱基长度的目标序列“完全互补”。如果目标序列有相应的 20 个核苷碱基, 其中每个碱基与反义化合物的 20 个核苷碱基部分互补, 那么 30 个核苷碱基寡核苷酸的 20 个核苷碱基部分与目标序列完全互补。同时, 根据反义化合物剩下 10 个核苷碱基是否也与目标序列互补, 整个 30 个核苷碱基反义化合物与目标序列可能完全互补或可能不完全互补。

[0248] 非互补核苷碱基的位置可在反义化合物的 5' 末端或 3' 末端。或者, 非互补核苷碱基或核苷碱基可在反义化合物的内部位置。当存在两个或多个非互补核苷碱基时, 它们可以是连续的 (也就是连接的) 或非连续的。在一个实施例中, 非互补核苷碱基位于 gapmer 反义寡核苷酸的侧翼区段。

[0249] 在一些实施例中, 相对于如因子 11 核酸的目标核酸或其中指定部分, 长度为或高至 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个核苷碱基的反义化合物包含不多于 4、不多于 3、不多于 2、不多于 1 个非互补核苷碱基。

[0250] 在一些实施例中, 相对于如因子 11 核酸的目标核酸或其中指定部分, 长度为或高至 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷碱基的反义化合物包含不多于 6、不多于 5、不多于 4、不多于 3、不多于 2、不多于 1 个非互补核苷碱基。

[0251] 此处提供的反义化合物还包括那些与目标核酸的部分互补的化合物。如此处所用, “部分” 指的是在目标核酸的区域或区段中确定数量的连续的 (也就是连接的) 核苷碱基。“部分” 也可以指反义化合物中确定数量的连续核苷碱基。在一些实施例中, 反义化合物与目标区段的至少 8 个核苷碱基的部分互补。在一些实施例中, 反义化合物与目标区段的至少 12 个核苷碱基的部分互补。在一些实施例中, 反义化合物与目标区段的至少 15 个核苷碱基的部分互补。与目标区段中至少 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多个核苷碱基或由这些数值中任意两个所定义的范围内的核苷碱基数相互补的反义化合物也被考虑到了。

[0252] 标识

[0253] 此处提供的反义化合物也可有与特定核苷酸序列、SEQ ID NO 或由特定 Isis 号代表的化合物或其中部分的相似度百分比。如此处所用, 如果具有相同的核苷碱基配对能力, 反义化合物就与此处披露的序列相同。例如, 由于尿嘧啶和胸腺嘧啶与腺嘌呤都能配对, 在披露的 DNA 序列中包含尿嘧啶替代胸腺嘧啶的 RNA 被认为与该 DNA 序列的相同。此处描述的反义化合物的缩短和延长版本以及具有相对于此处提供的反义化合物的非相同碱基

的化合物也被考虑了。非相同碱基可彼此相邻或分散在反义化合物中各处。根据相对于被比较序列具有相同碱基配对的碱基数量计算反义化合物的相似度百分比。

[0254] 在一些实施例中,反义化合物或其中部分与此处公开的一个或多个反义化合物或 SEQ ID NOs 或其中部分有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的相同。

[0255] 在一些实施例中,反义化合物的部分与目标核酸的等长部分相比较。在一些实施例中,8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个核苷碱基部分与目标核酸的等长部分相比较。

[0256] 在一些实施例中,反义寡核苷酸的部分与目标核酸的等长部分相比较。在一些实施例中,8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个核苷碱基部分与目标核酸的等长部分相比较。

[0257] 修饰

[0258] 核苷是碱基-糖组合。核苷的核苷碱基(也被称为碱基)部分通常是一个杂环碱基部分。核苷酸是进一步包括共价偶联在核苷的糖部分的磷酸基的核苷。对于那些包括五呋喃糖的核苷,磷酸基团可被连接在糖的 2'、3' 或 5' 羟基上。寡核苷酸是通过彼此相邻的核苷间的共价连接形成,以形成线性多聚寡核苷酸。在寡核苷酸结构中,磷酸基团通常被认为形成寡核苷酸的核苷内连接。

[0259] 反义化合物的修饰包括核苷内连接、糖基或核苷碱基的取代或改变。因为像例如增强细胞摄入、对核酸目标的增强亲和力、核酸酶存在时的增强稳定性或增强抑制活性等期望特性,相对于天然形式,优选修饰的反义化合物。

[0260] 化学修饰核苷也可能用来增加缩短或截短的反义寡核苷酸对其目标核酸的结合力。所以,以具有这样化学修饰核苷的更短的反义化合物,经常可以获得类似的结果。

[0261] 修饰的核苷内连接

[0262] RNA 和 DNA 的天然存在的核苷内连接是 3' 至 5' 磷酸二酯键连接。因为像例如增强细胞摄入、对目标核酸的增强亲和力和核酸酶存在时的增强稳定性等期望的特性,相对于天然存在的核苷内连接,优选具有一个或多个修饰的,也就是非天然存在的核苷内连接的反义化合物。

[0263] 具有修饰的核苷内连接的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷内连接以及没有磷原子的核苷内连接。典型的含有磷原子的核苷内连接包括,但不限于,磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯以及磷硫酰。制备含磷和不含磷连接的方法是业界习知的。

[0264] 在一些实施例中,靶向因子 11 核酸的反义化合物包含一个或多个修饰的核苷内连接。在一些实施例中,修饰的核苷内连接是磷硫酰连接。在一些实施例中,反义化合物的每个核苷内连接是磷硫酰核苷内连接。

[0265] 修饰的糖基

[0266] 可选地,本发明的反义化合物可包含一个或多个其中糖基被修饰的核苷。这样的糖修饰的核苷可赋予反义化合物增强的核酸酶稳定性、增强的结合力或一些其他有益的生物学特性。在一些实施例中,核苷包含化学修饰的呋喃核糖环部分。化学修饰的呋喃核糖环的例子非限制地包括加入取代基(包括 5' 和 2' 取代基)、形成双环核酸(BNA)的非偕环原子的桥联、以 S 或 N(R) 或 C(R1)(R)2(R = H, C1-C12 烷基或保护基团)替代核糖环

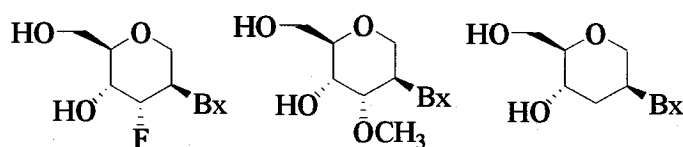
氧原子, 以及其组合。化学修饰糖的例子包括 2' -F-5' - 甲基取代核苷 (见 08 年 8 月 21 日公开的 PCT 国际申请 WO 2008/101157, 其是有关其他被披露的 5', 2' - 双取代核苷), 或者以 S 取代核糖环氧原子并在 2' - 位 (见 2005 年 6 月 16 日公开的美国专利申请 US2005-0130923 号) 或者在 5' - 取代 BNA (见 07 年 11 月 22 日公开的 PCT 国际申请 WO 2007/134181 号, 其中 LNA 被例如 5' - 甲基或 5' - 乙烯基所取代)。

[0267] 具有修饰糖基的核苷的例子非限制地包括含有 5' - 乙烯基、5' - 甲基 (R 或 S)、4' -S、2' -F、2' -OCH₃ 以及 2' -O(CH₂)₂OCH₃ 取代基团的核苷。2' 位的取代也可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代的、O- 烯丙基、O-C1-C10 烷基、OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) 和 O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), 其中, R_m 和 R_n 各自独立地是 H 或取代的或非取代的 C1-C10 烷基。

[0268] 双环核酸 (BNAs) 的例子非限制地包括包含 4' 和 2' 核糖环原子间桥联的核苷。在一些实施例中, 此处提供的反义化合物包括一个或多个 BNA 核苷, 其中, 桥联包括下列分子式之一: 4' -(CH₂)-O-2' (LNA); 4' -(CH₂)-S-2' ; 4' -(CH₂)-O-2' (LNA); 4' -(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4' -C(CH₃)₂-O-2' (见 PCT/US2008/068922); **4'-CH(CH₃)-O-2'** 和 **4'-C-H(CH₂OCH₃)-O-2'** (见美国专利 7, 399, 845 号, 2008 年 7 月 15 日授权); 4' -CH₂-N(OCH₃)-2' (见 PCT/US2008/064591); 4' -CH₂-O-N(CH₃)-2' (见已公开的美国专利申请 US2004-0171570 号, 2004 年 9 月 2 日公开); 4' -CH₂-N(R)-O-2' (见美国专利 7, 427, 672 号, 2008 年 9 月 23 日公开); 4' -CH₂-C(CH₃)-2' 和 **4'-CH₂-C(=CH₂)-2'** (见 PCT/US2008/066154); 其中, R 独立地是 H、C1-C12 烷基或保护基团。每一个前面的 BNA 包含包括例如 α-L- 呋喃核糖和 β-D- 呋喃核糖 (见 PCT 国际申请 PCT/DK98/00393 号, 于 1999 年 3 月 25 日公开为 WO 99/14226) 的各种立体化学的糖构型。

[0269] 在一些实施例中, 核苷被以糖替代物对核糖环的替代所修饰。这样的修饰非限制地包括以替代环系统 (有时指的是 DNA 类似物) 对核糖环的替代, 替代环系统如吗啉环、环己烯

[0270]



[0271] 基环、环己基环或如具有下列结构式之一的四氢吡喃环:

[0272] 可用于修饰以包含在反义化合物中的核苷的许多其他双环和三环糖替代环系统也为本领域已知 (见例如综述文章: Leumann, J. C, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854)。这种环系统可以承受各种附加替代以增强活性。

[0273] 制备修饰糖的方法为本领域普通技术人员所熟知。

[0274] 具有修饰糖基的核苷中, 核苷碱基部分 (天然的、修饰的或其组合) 被保留, 用于与合适的核酸目标杂交。

[0275] 在一些实施例中, 靶向因子 11 核酸的反义化合物包含一个或多个具有修饰的糖部分的核苷酸。在一些实施例中, 修饰的糖基是 2'-MOE。在一些实施例中, 2'-MOE 修饰的核苷酸以 gapmer 结构域排列。

[0276] 修饰的核苷碱基

[0277] 核苷碱基（或碱基）修饰或取代与天然存在或合成的未修饰的核苷碱基在结构上可区别，然而在功能上可互换。天然和修饰的核苷碱基都能够参与氢键作用。这样的核苷碱基修饰可能赋予反义化合物核酸酶稳定性、结合力或一些其他有益的生物学特性。修饰的核苷碱基包括像例如 5- 甲基胞嘧啶 (5-me-C) 等合成和天然的核苷碱基。包括 5- 甲基胞嘧啶取代的一些核苷碱基取代对于增强反义化合物与目标核酸的亲合力特别有用。例如，5- 甲基胞嘧啶取代已经被证明使核酸双螺旋稳定性增加了 0.6-1.2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)。

[0278] 另外的修饰核苷碱基包括 5- 羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2- 氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的 6- 甲基和其他烷基衍生物、2- 硫脲嘧啶、2- 硫代胸腺嘧啶和 2- 巯基胞嘧啶、5- 卤素尿嘧啶和胞嘧啶、5- 丙炔基 ($-C \equiv C-CH_3$) 尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6- 含氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5- 尿嘧啶（假尿嘧啶）、4- 硫脲嘧啶、8- 卤素、8- 氨基、8- 硫醇、8- 硫代烷基、8- 羟基和其他 8- 取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5- 卤素特别是 5- 溴代、5- 三氟甲基和其他 5- 取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7- 甲基鸟嘌呤和 7- 甲基腺嘌呤、2-F- 腺嘌呤、2- 氨基 - 腺嘌呤、8- 氮鸟嘌呤和 8- 氮杂腺嘌呤、7- 去氮杂鸟嘌呤和 7- 去氮杂腺嘌呤和 3- 去氮杂鸟嘌呤以及 3- 去氮杂腺嘌呤。

[0279] 杂环碱基部分也可包括那些其中的嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环所取代的，例如 7- 去氮杂 - 腺嘌呤、7- 去氮杂鸟嘌呤、2- 氨基吡啶和 2- 吡啶酮等。对于增强反义化合物的结合力特别有用的核苷碱基包括 5- 取代嘧啶、6- 氮杂嘧啶和 N-2、N-6 和 O-6 取代嘌呤，包括 2- 氨基丙基腺嘌呤、5- 丙基尿嘧啶和 5- 丙炔基胞嘧啶。

[0280] 在一些实施例中，靶向因子 11 核酸的反义化合物包含一个或多个修饰的核苷碱基。在一些实施例中，靶向因子 11 核酸的间隙扩宽的反义寡核苷酸包含一个或多个修饰的核苷碱基。在一些实施例中，修饰核苷碱基是 5- 甲基胞嘧啶。在一些实施例中，每一个胞嘧啶是 5- 甲基胞嘧啶。

[0281] 配制药物组合物的组分和方法

[0282] 为制备药物组合物或剂型，反义寡核苷酸可与药用可接受的活性或惰性物质相混合。配制药物组合物的组分和方法取决于一些标准，包括但不限于，给药方式、疾病程度或给药剂量。

[0283] 通过组合反义化合物和合适的药用可接受的稀释剂或载体，靶向因子 11 核酸的反义化合物可被用于药物组合物。药用可接受的稀释剂包括磷酸盐缓冲液 (PBS)。PBS 是一种适合用在非肠道给药的组合物中的稀释剂。因此，在一个实施例中，被此处描述的方法采用的是 一种包含靶向因子 11 核酸的反义化合物以及药用可接受的稀释剂的药物组合物。在一些实施例中，药用可接受的稀释剂是 PBS。在一些实施例中，反义化合物是反义寡核苷酸。

[0284] 含反义化合物的药物组合物涵盖在给包括人的动物给药时能提供（直接或间接）生物活性的代谢物或其残基的任何药用可接受的盐、酯类、或这些酯的盐、或者任何其他寡核苷酸。因此，例如，本披露也指向反义化合物的药用可接受的盐、前体药物、这种前体药物的药用可接受的盐以及其他生物等同物。合适的药用可接受的盐包括但不限于，钠和钾盐。

[0285] 前体药物可以包括在反义化合物的一个或两个末端添加额外的核苷，其被体内的

内源性核酸酶裂解以形成活性反义化合物。

[0286] 偶联的反义化合物

[0287] 反义化合物可共价连接至能增强得到的反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄入的一个或多个部分或偶联物。典型的偶联基团包括胆固醇基或脂基。另外的偶联基团包括碳水化合物、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、葱醌、吡啶、荧光素、若丹明、香豆素以及染料。

[0288] 反义化合物也可以被修饰为具有一个或多个通常连接在反义化合物的一个或两个末端的稳定基团,以增强例如核酸酶稳定性等特性。稳定基团包括帽结构。这些末端修饰能防止具有末端核酸的反义化合物被核酸外切酶降解,并有助于细胞内的传送和/或定位。帽可以存在于 5' - 末端 (5' - 帽),或在 3' - 末端 (3' - 帽),或者在两个末端都存在。帽结构为本领域普通技术人员所熟知,包括,例如,反转的脱氧脱碱基帽。可用于在反义化合物的一个或两个末端形成帽结构以赋予核酸酶稳定性的 3' 和 5' 稳定基团还包括 2003 年 1 月 16 日公开的 WO 03/004602 中所披露的那些基团。

[0289] 细胞培养和反义化合物处理

[0290] 可以在各种细胞类型中体外测试反义化合物对因子 11 核酸水平、活性或表达的影响。用于这种分析的细胞类型可购自商业供应商(例如美国菌种保藏中心, Manassus, VA ;Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC ;Clonetics Corporation, Walkersville, MD), 根据供应商说明书用商售试剂(例如 Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 进行培养。示例性的细胞类型包括但不限于, HepG2 细胞、Hep3B 细胞以及原代肝细胞。

[0291] 反义寡核苷酸的体外测试

[0292] 此处描述的是用反义寡核苷酸处理细胞的方法,这些方法可以被适当修改从而用其他反义化合物来处理。

[0293] 通常,当细胞达到约 60-80% 培养克隆率时,用反义寡核苷酸处理细胞。

[0294] 通常用于将反义寡核苷酸转入培养细胞的试剂包括阳离子脂类转染试剂 LIPOFECTIN (Invitrogen, Carlsbad, CA)。将反义寡核苷酸与 LIPOFECTIN 在 OPTI-MEM 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中混合以达到期望的反义寡核苷酸的终浓度以及通常每 100nM 反义寡核苷酸对应 2 至 12ug/mL 范围的 LIPOFECTIN 浓度。

[0295] 用于将反义寡核苷酸转入培养细胞的另一种试剂包括 LIPOFECTAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA)。将反义寡核苷酸与 LIPOFECTAMINE 在 OPTI-MEM 1 减血清培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中混合以达到期望的反义寡核苷酸的浓度以及通常每 100nM 反义寡核苷酸对应 2 至 12ug/mL 范围的 LIPOFECTAMINE 的浓度。

[0296] 用于将反义寡核苷酸转入培养细胞的另一种技术包括电穿孔。

[0297] 细胞用反义寡核苷酸以常规方法处理。细胞通常在反义寡核苷酸处理后 16-24 小时收获,此时用此处描述的本领域已知的方法测定目标核酸的 RNA 或蛋白水平。通常,以多份重复进行处理时,以重复处理的平均值作为结果。

[0298] 采用的反义寡核苷酸的浓度因细胞株而变化。针对特定细胞株确定最佳反义寡核苷酸浓度的方法为本领域所熟知。当用 LIPOFECTAMINE 转染时,通常在 1nM 至 300nM 的浓度范围内使用反义寡核苷酸。当用电穿孔转染时,通常在 625 至 20,000nM 的浓度范围内使用反义寡核苷酸。

[0299] 分离 RNA

[0300] 可对总的细胞 RNA 或 poly(A)+mRNA 进行 RNA 分析。分离 RNA 的方法为本领域所熟知。用本领域熟知的方法制备 RNA,例如,根据制造商推荐的操作规程用 TRIZOL 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行。

[0301] 目标水平或表达的抑制的分析

[0302] 因子 11 核酸的水平或表达的抑制可以用本领域已知的各种方法测试。例如,目标核酸水平可以用例如印记杂交分析 (Northern blot analysis)、竞争性聚合酶链式反应或定量实时 PCR 来定量。可对总的细胞 RNA 或 poly(A)+mRNA 进行 RNA 分析。分离 RNA 的方法为本领域所熟知。印记杂交分析也是本领域的常规方法。定量实时 PCR 可以根据制造商的说明用加利福尼亚州福斯特市的 PE- 应用生物系统公司提供的商售 ABI PRISM 7600、7700 或 7900 序列检测系统方便地完成。

[0303] 目标 RNA 水平的定量实时 PCR 分析

[0304] 目标 RNA 水平的定量可以根据制造商的说明用 ABI PRISM 7600、7700 或 7900 序列检测系统 (PE- 应用生物系统公司,福斯特市,加利福尼亚州) 的定量实时 PCR 来完成。定量实时 PCR 的方法为本领域所熟知。

[0305] 在实时 PCR 之前,分离的 RNA 要进行逆转录酶 (RT) 反应,以产生随后可用作实时 PCR 扩增的底物的互补 DNA(cDNA)。RT 和实时 PCR 反应在同样的样本孔中顺序进行。RT 和实时 PCR 的试剂从 Invitrogen (Carlsbad, CA) 获得。RT 和实时 PCR 反应用本领域普通技术人员熟知的方法实现。

[0306] 用实时 PCR 获得的基因 (或 RNA) 目标量用如亲环素 A 等表达恒定的基因的表达水平或用 RIBOGREEN (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA) 对总 RNA 的定量来归一化。亲环素 A 用实时 PCR 来定量,与目标同时或多通路或分别地运行。总 RNA 用 RIBOGREEN RNA 定量试剂 (Invitrogen, Inc. Eugene, OR) 来定量。RIBOGREEN 定量 RNA 的方法在 Jones, L. J 等人的工作 (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374) 中讲授。CYTOFLUOR 4000 设备 (PE 应用生物系统公司) 用来测定 RIBOGREEN 荧光。

[0307] 设计与因子 11 核酸杂交的探针和引物。设计实时 PCR 探针和引物的方法为本领域所熟知,可包括使用如 PRIMER EXPRESS 软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 等软件的使用。

[0308] 蛋白水平分析

[0309] 因子 11 核酸的反义抑制可以通过测定因子 11 蛋白水平来评估。因子 11 的蛋白水平可以用本领域熟知的各种方法来评价或定量,比如免疫沉淀反应、Western 印记分析 (免疫印记)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、定量蛋白质分析、蛋白活性分析 (例如,凋亡蛋白酶活性分析)、免疫组织化学、免疫细胞化学或荧光活化细胞分选 (FACS)。指向目标的抗体可被识别并从如 MSRS 抗体目录 (Aerie Corporation, Birmingham, MI) 等各种来源获得,或可以通过本领域熟知的常规单克隆或多克隆抗体生产技术来制备。对探测小鼠、大鼠、猴和人的因子 11 有用的抗体可以通过商业途径购买。

[0310] 反义化合物的体外测试

[0311] 在动物体内测试了例如反义寡核苷酸的反义化合物,以评价它们抑制因子 11 表达和产生表型变化的能力,例如,延长的 aPTT、与正常 PT 交汇的延长的 aPTT 时间、血小板因

子 4(PF-4) 的减少量以及血栓形成减少或血栓形成时间增加。测试可以在正常动物体内或在实验疾病模型中进行。向动物给药的反义寡核苷酸在如磷酸盐缓冲液等药用可接受的稀释剂中配制。给药包括如腹腔注射、静脉注射以及皮下注射等非肠道给药途径。对反义寡核苷酸剂量和给药频率的计算在本领域普通技术人员的能力范围之内,取决于如给药方式和动物体重等因素。以反义寡核苷酸的处理一段期间之后,从肝脏组织中分离 RNA,测定因子 11 核酸表达的改变。还用凝血酶生成试验测定了因子 11 蛋白水平的改变。另外,用已处理动物的血浆测定对例如 PT 和 aPTT 等凝结时间的影响。

[0312] 耐受性

[0313] 在一些实施例中,此处提供的化合物表现最低的副作用。副作用包括通常与因子 11 靶向无关的对反义化合物的给药的反应,比如在动物中的炎症反应。在一些实施例中,化合物被动物很好地耐受。增强的耐受性取决于一些因素,包括但不限于反义化合物的核苷酸序列、核苷酸的化学修饰、反义化合物中未修饰或修饰核苷的特定结构域,或其组合。耐受性取决于许多因素。这些因素包括体重、器官重量、肝功能、肾功能、血小板数、白细胞数。

[0314] 在一些实施例中,此处提供的化合物表现出对器官重量的最低影响。在一些实施例中,化合物表现出脾脏和 / 或肝脏重量的低于 7 倍、6 倍、5 倍、4 倍、3 倍、2 倍或没有明显的增加。

[0315] 在一些实施例中,此处提供的化合物表现出对肝功能的最小影响。评价肝功能的因素包括 ALT 水平、AST 水平、血浆胆红素水平以及血浆白蛋白水平。在一些实施例中,此处提供的化合物表现出 ALT 或 AST 的低于 7 倍、低于 6 倍、低于 5 倍、低于 4 倍、低于 3 倍、低于 2 倍或没有明显的增加。在一些实施例中,此处提供的化合物表现出血浆胆红素水平的低于 3 倍、低于 2 倍或没有明显的增加。

[0316] 在一些实施例中,此处提供的化合物表现出对肾功能的最低影响。在一些实施例中,此处提供的化合物表现出血浆血液尿素氮 (BUN) 浓度的低于 3 倍、至少 2 倍或没有明显的增加。在一些实施例中,此处提供的化合物表现出尿蛋白与肌酐比值的低于 6 倍、5 倍、4 倍、3 倍、2 倍或没有明显的增加。

[0317] 在一些实施例中,此处提供的化合物表现出对血液指标的最低影响。在一些实施例中,此处提供的化合物表现出血小板数的低于 60%、50%、40%、30%、20%、10% 或 5% 的减少。在一些实施例中,此处提供的化合物表现出单核细胞数的低于 4 倍、低于 3 倍、低于 2 倍或没有明显的增加。

[0318] 在一些实施例中,化合物进一步表现出有利的药物动力学。在一些实施例中,反义化合物在相关生物体液或组织中显示出相对高的半衰期。

[0319] 在一些实施例中,化合物或组合物进一步表现出有利的粘度。在一些实施例中,化合物或组合物在 165-185mg/mL 浓度时的粘度仅为 40cP。

[0320] 在其他实施例中,化合物表现出上述特征的组合,在动物模型中高效地降低因子 11mRNA 的表达。

[0321] 一些适应症

[0322] 在一些实施例中,本发明提供了治疗个体的方法,包括给药本发明的一种或多种药物组合物。在一些实施例中,个体具有血栓栓塞性并发症。在一些实施例中,个体具有血液凝结紊乱的风险,包括但不限于,梗塞、血栓形成、栓塞以及血栓栓塞,比如如深静脉血栓

形成、肺栓塞、心肌梗塞和中风。这包括个体具有引起血栓形成风险的后天问题、疾病或紊乱，例如手术、癌症、不动、败血症、动脉粥样硬化、心房颤动等，以及例如抗磷脂综合征和常染色体显性遗传的因子 V Leiden 突变等遗传倾向性。在一些实施例中，个体被鉴定为需要抗凝治疗。这样的个体的例子包括但不限于，那些经受大型矫形手术（例如，髌骨 / 膝关节置换术或髌骨骨折手术）的人以及如那些经历心房颤动需防止中风等需要长期治疗的病人。在一些实施例中，本发明提供了预防性地降低个体内因子 11 表达的方法。一些实施例包括通过向需要治疗的个体给药治疗有效量的靶向因子 11 核酸的反义化合物。

[0323] 在一个实施例中，给药治疗有效量的靶向因子 11 核酸的反义化合物的同时，伴随着监测个体血清中的因子 11 的水平，以确定个体对于反义化合物给药的反应。个体对于反义化合物给药的反应被内科医师用来确定治疗干预的用量及持续时间。

[0324] 在一些实施例中，靶向因子 11 核酸的反义化合物的给药导致因子 11 的表达至少 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 99%，或者这些数值中任意两个所定义的范围的降低。在一些实施例中，靶向因子 11 核酸的反义化合物的给药导致用标准测试测量的血液凝结的测量值的改变，例如但不限于，活化部分凝血活酶时间（aPTT）测试、凝血酶原时间（PT）测试、凝血酶时间（TCT）、出血时间或 D-二聚体。在一些实施例中，因子 11 的反义化合物的给药至少增加了测量值 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 99% 或者这些数值中任意两个所定义的范围。在一些实施例中，因子 11 的反义化合物的给药至少降低了测量值 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 99% 或者这些数值中任意两个所定义的范围。

[0325] 在一些实施例中，包含靶向因子 11 的反义化合物的药物组合物被用于用来治疗遭受或易患血栓栓塞性并发症的病人的药剂生产。

[0326] 一些联合治疗

[0327] 在一些实施例中，本发明的一种或多种药物组合物与一种或多种其他药剂共同给药。在一些实施例中，这样的一种或多种其他药剂被设计成用于治疗本发明的一种或多种药物组合物所治疗的相同的疾病、紊乱或状况。在一些实施例中，这样的一种或多种其他药剂被设计成用于治疗不同于本发明的一种或多种药物组合物所治疗的疾病、紊乱或状况。在一些实施例中，这样的一种或多种其他药剂被设计成用于治疗本发明的一种或多种药物组合物的不希望副作用。在一些实施例中，本发明的一种或多种药物组分与另一种药剂共同给药以治疗其他药剂的副作用。在一些实施例中，本发明的一种或多种药物组合物与另一种药剂共同给药以产生联合效果。在一些实施例中，本发明的一种或多种药物组合物与另一种药剂共同给药以产生协同效应。

[0328] 在一些实施例中，本发明的一种或多种药物组合物与一种或多种其他药剂同时给药。在一些实施例中，本发明的一种或多种药物组合物与一种或多种其他药剂在不同时间给药。在一些实施例中，本发明的一种或多种药物组合物与一种或多种其他药剂一起制备成单一制剂。在一些实施例中，本发明的一种或多种药物组合物与一种或多种其他药剂分别制备。

[0329] 在一些实施例中，可与本发明的药物组分共同给药的药剂包括抗凝剂或抗血小板剂。在一些实施例中，可与本发明的药物组分共同给药的药剂包括 NSAID/ 环氧酶抑制剂，比如阿司匹林。在一些实施例中，可与本发明的药物组分共同给药的药剂包括二磷酸腺苷

(ADP) 受体抑制剂, 比如氯吡格雷 (波立维) 和噻氯匹啶 (TICLID)。在一些实施例中, 可与本发明的药物组分共同给药的药剂包括磷酸二酯酶抑制剂, 比如西洛他唑 (PLETAL)。在一些实施例中, 可与本发明的药物组合物共同给药的药剂包括糖蛋白 IIB/IIIA 抑制剂, 比如阿昔单抗 (REOPRO)、埃替非巴肽 (INTEGRILIN)、替罗非班 (AGGRASTAT) 以及去纤苷。在一些实施例中, 可与本发明的药物组合物共同给药的药剂包括腺苷再摄取抑制剂, 比如双嘧达莫 (PERSANTINE)。在一些实施例中, 可与本发明的药物组合物共同给药的药剂包括但不限于, 华法林 (和相关香豆素)、肝素、直接凝血酶抑制剂 (比如来匹卢定、比伐卢定)、阿哌沙班、依诺肝素钠以及直接干扰特定凝固因子的小分子化合物 (例如, 干扰因子 Xa 的利伐沙班)。在一些实施例中, 可与本发明的因子 11 特异性抑制剂共同给药的药剂包括但不限于, 其他因子 11 抑制剂。在一些实施例中, 抗凝剂或抗血小板剂在本发明的药物组合物给药之前给药。在一些实施例中, 抗凝剂或抗血小板剂在本发明的药物组合物给药之后给药。在一些实施例中, 抗凝剂或抗血小板剂在本发明的药物组合物给药同时给药。在一些实施例中, 共同给药的抗凝剂或抗血小板剂的剂量与该抗凝剂或抗血小板剂单独给药时的给药剂量相同。在一些实施例中, 共同给药的抗凝剂或抗血小板剂的剂量低于该抗凝剂或抗血小板剂单独给药时的给药剂量。在一些实施例中, 共同给药的抗凝剂或抗血小板剂的剂量高于该抗凝剂或抗血小板剂单独给药时的给药剂量。

[0330] 在一些实施例中, 第二个化合物的共同给药增强了第一个化合物的抗凝效果, 以至于化合物的共同给药会导致高于第一个化合物单独给药时的抗凝效果。在其他实施例中, 相对于单独给药化合物, 共同给药导致了增加的抗凝效果。在一些实施例中, 相对于单独给药化合物, 共同给药导致了超量增加的抗凝效果。在一些实施例中, 第二个化合物的共同给药会增加抗血栓形成的活性, 同时不增加出血风险。在一些实施例中, 第一个化合物是反义化合物。在一些实施例中, 第二个化合物是反义化合物。

[0331] 在一些实施例中, 解毒剂在因子 11 特异性抑制剂给药后的任意时间给药。在一些实施例中, 解毒剂在靶向因子 11 的反义寡核苷酸给药后的任意时间给药。在一些实施例中, 解毒剂在靶向因子 11 的反义化合物给药的几分钟、几小时、几天、几周或几月后给药。在一些实施例中, 解毒剂与靶向因子 11 的反义化合物互补 (例如, 同义链)。在一些实施例中, 解毒剂是因子 7、因子 7a、因子 11 或因子 11a 蛋白。在一些实施例中, 因子 7、因子 7a、因子 11 或因子 11a 蛋白是人因子 7、人因子 7a、人因子 11 或人因子 11a 蛋白。在一些实施例中, 因子 7 蛋白是 NOVOSEVEN。

[0332] 一些共同给药的抗血小板治疗

[0333] 在一些实施例中, 因子 11 抑制剂与抗血小板治疗联用。在一些实施例中, 相比于单独抗血小板治疗, 与抗血小板治疗联用的因子 11 抑制剂的给药导致出血风险的少量至没有可觉察或可检测的增加。在一些实施例中, 风险概况或风险指标与单独抗血小板治疗相比没有改变。

[0334] 抗血小板和抗凝血疗法联用在临床实践中最频繁使用于被诊断具有例如血栓栓塞、心房颤动、心瓣膜紊乱、瓣膜性心脏病、中风、CAD 的病人以及有机机械阀的病人。双重疗法的益处有关对血小板和凝固因子活性兼有抑制的可能的累加效应。双重疗法的风险是增加出血的可能性 (Dowd, M. Plenary Sessions/Thrombosis Research 123(2008))。

[0335] 相比于抗凝血或抗血小板单独治疗, 以前的抗血小板和抗凝血疗法联用已经表现

出血风险的增加。这样的联用包括 Fxa 抑制剂（例如阿匹西班和利伐沙班）与 ADP 受体 /P2Y₁₂ 抑制剂（噻吩并吡啶类，比如氯吡格雷 - 也被称为 PLAVIX）以及 NSAIDs（例如阿司匹林和萘普生）(Kubitza, D. et al., Br. J. Clin. Pharmacol. 63 :4(2006) ;Wong, P. C. et al. Journal of Thrombosis and Haemostasis 6(2008) ;新药申请的 FDA 咨询委员会简报文件 22-406(2009))。例如，Wong 报道增加特定剂量的阿哌沙班至阿司匹林和至阿司匹林与氯吡格雷中，相比于单用阿司匹林和阿司匹林与氯吡格雷会显著增加出血时间。Kubitza 报道利伐沙班和萘普生联合给药相比于单用萘普生会显著增加出血时间。

[0336] 例子

[0337] 非限制性披露及通过参考并入文献

[0338] 尽管此处所述的一些化合物、组合物和方法已经依照某些实施例进行了具体描述，下面的例子仅仅用于说明此处所述的化合物，而非限制。本申请列举的每个参考文献都在此被参考并且其全文被并入本申请中。

[0339] 例 1 :对 HepG2 细胞中人因子 11 的反义抑制

[0340] 在体外测试靶向因子 11 核酸的反义寡核苷酸对因子 11 的 mRNA 的影响。用含 75nM 反义寡核苷酸的脂质体试剂转染密度为每孔 10,000 个细胞的培养的 HepG2 细胞。在处理约 24 小时后，从细胞中分离 RNA，以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。结果以相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比来表示。

[0341] 表 1 和 2 中的嵌合型反义寡核苷酸被设计为 5-10-5 MOE gapmer。gapmer 长度为 20 个核苷酸，其中，中央的间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成，两边（在 5' 和 3' 方向）为各包含 5 个核苷酸的侧翼。5' 侧翼区段中的每个核苷酸和 3' 侧翼区段中的每个核苷酸有 2'-MOE 修饰。每条 gapmer 中的核苷内连接是磷硫酰 (P = S) 连接。每条 gapmer 中的所有胞嘧啶核苷都是 5-甲基胞嘧啶核苷。“目标起始位点”是指 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“目标终止位点”是指 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。表 1 中所列的每条 gapmer 靶向 SEQ ID NO :1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3)，表 2 中所列的每条 gapmer 靶向 SEQ ID NO :2 (GENBANK 登录号 NT_022792.17, 19598000 至 19624000 缺失)。

[0342] 表 1

[0343] 具有靶向 SEQ ID NO :1 的 5-10-5MOE 侧翼和脱氧间隙的嵌合型反义寡核苷酸对人因子 11mRNA 水平的抑制

[0344]

寡核苷酸 ID	目标起始位点	目标终止位点	序列	% 抑制	SEQ ID NO
412187	38	57	TTCAAACAAGTGACATACAC	21	15
412188	96	115	TGAGAGAATTGCTTGCTTTC	21	16
412189	106	125	AAATATACCTTGAGAGAATT	8	17
412190	116	135	AGTATGTCAGAAATATACCT	24	18
412191	126	145	TTAAAATCTTAGTATGTCAG	14	19
412192	146	165	CAGCATATTTGTGAAAGTCG	44	20
412193	222	241	TGTGTAGGAAATGGTCACTT	38	21
412194	286	305	TGCAATTCTTAATAAGGGTG	80	22
412195	321	340	AAATCATCCTGAAAAGACCT	22	23
412196	331	350	TGATATAAGAAAATCATCCT	25	24
412197	376	395	ACACATTACCCAGAAACTGA	45	25
412198	550	569	TTCAGGACACAAGTAAACCA	21	26
412199	583	602	TTCACTCTTGGCAGTGTTTC	66	27
412200	612	631	AAGAATACCCAGAAATCGCT	59	28
412201	622	641	CATTGCTTGAAAGAATACCC	66	29
412202	632	651	TTGGTGTGAGCATTGCTTGA	65	30
412203	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	91	31
412204	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	74	32
412205	686	705	GTTTATGCCCTTCATGTCTA	69	33
412206	738	757	CCGTGCATCTTCTTGGCAT	87	34

[0345]

412207	764	783	CGTGAAAAAGTGGCAGTGGA	64	35
412208	811	830	AGACAAATGTTACGATGCTC	73	36
412209	821	840	GTGCTTCAGTAGACAAATGT	91	37
412210	896	915	TGCACAGGATTTTCAGTGAAA	73	38
412211	906	925	GATTAGAAAGTGCACAGGAT	64	39
412212	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAGAT	88	40
412213	1028	1047	AAACAAGCAACCGGGATGAT	71	41
412214	1048	1067	TCCTGGGAAAAGAAGGTAAA	58	42
412215	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCCTGG	81	43
412216	1077	1096	AAAGATTTCTTTGAGATTCT	43	44
412217	1105	1124	AATCCACTCTCAGATGTTTT	47	45
412218	1146	1165	AACCAGAAAGAGCTTTGCTC	27	46
412219	1188	1207	GGCAGAACACTGGGATGCTG	56	47
412220	1204	1223	TGGTAAAATGAAGAATGGCA	58	48
412221	1214	1233	ATCAGTGT CATGGTAAAATG	48	49
412222	1241	1263	AACAATATCCAGTTCTTCTC	5	50
412223	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	84	51
412224	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	87	52
412225	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	86	53
412226	1371	1390	TTGAAGAAAGCTTTAAGTAA	17	54
412227	1391	1410	AGTATTTTAGTTGGAGATCC	75	55
412228	1425	1444	ATGTGTATCCAGAGATGCCT	71	56
412229	1456	1475	GTACACTCATTATCCATTTT	64	57
412230	1466	1485	GATTTTGGTGGTACACTCAT	52	58
412231	1476	1495	TCCTGGGCTTGATTTTGGTG	74	59
412232	1513	1532	GGCCACTCACCACGAACAGA	80	60
412233	1555	1574	TGTCTCTGAGTGGGTGAGGT	64	61
412234	1583	1602	GTTTCCAATGATGGAGCCTC	60	62
412235	1593	1612	ATATCCACTGGTTTCCAATG	57	63
412236	1618	1637	CCATAGAAACAGTGAGCGGC	72	64
412237	1628	1647	TGACTCTACCCCATAGAAAC	48	65
412238	1642	1661	CGCAAAATCTTAGGTGACTC	71	66
412239	1673	1692	TTCAGATTGATTTAAAATGC	43	67
412240	1705	1724	TGAACCCCAAAGAAAGATGT	32	68
412241	1715	1734	TATTATTTCTTGAACCCCAA	41	69
412242	1765	1784	AACAAGGCAATATCATACCC	49	70
412243	1775	1794	TTCCAGTTTCAACAAGGCAA	70	71
412244	1822	1841	GAAGGCAGGCATATGGGTCG	53	72
412245	1936	1955	GTCACTAAGGGTATCTTGGC	75	73
412246	1992	2011	AGATCATCTTATGGGTATT	68	74
412247	2002	2021	TAGCCGGCACAGATCATCTT	75	75

[0346]

412248	2082	2101	CCAGATGCCAGACCTCATTG	53	76
412249	2195	2214	CATTCACACTGCTTGAGTTT	55	77
412250	2268	2287	TGGCACAGTGAACCTCAACAC	63	78
412251	2326	2345	CTAGCATTTTCTTACAAACA	58	79
412252	2450	2469	TTATGGTAATTCTTGGACTC	39	80
412253	2460	2479	AAATATTGCCTTATGGTAAT	20	81
412254	2485	2504	TATCTGCCTATATAGTAATC	16	82
412255	2510	2529	GCCACTACTTGGTTATTTTC	38	83
412256	2564	2583	AACAAATCTATTTATGGTGG	39	84
412257	2622	2641	CTGCAAAATGGTGAAGACTG	57	85
412258	2632	2651	GTGTAGATTCTGCAAAATG	44	86
412259	2882	2901	TTTTCAGGAAAGTGTATCTT	37	87
412260	2892	2911	CACAAATCATTTTTTCAGGAA	27	88
412261	2925	2944	TCCCAAGATATTTTAAATAA	3	89
412262	3168	3187	AATGAGATAAATATTTGCAC	34	90
412263	3224	3243	TGAAAGCTATGTGGTGACAA	33	91
412264	3259	3278	CACACTTGATGAATTGTATA	27	92
413460	101	120	TACCTTGAGAGAATTGCTTG	40	93
413461	111	130	GTCAGAAATATACCTTGAGA	39	94
413462	121	140	ATCTTAGTATGTCAGAAATA	12	95
413463	381	400	GAGTCACACATTCACCAGAA	74	96
413464	627	646	GTGAGCATTGCTTGAAAGAA	42	97
413465	637	656	CTTATTTGGTGTGAGCATTG	80	98
413466	661	680	ACATAAATGTCTTTGTTGCA	79	99
413467	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	91	100
413468	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	84	101
413469	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	84	102
413470	692	711	GTTATAGTTTATGCCCTTCA	72	103
413471	816	835	TCAGTAGACAAATGTTACGA	67	104
413472	826	845	TGGGTGTGCTTCAGTAGACA	99	105
413473	911	930	AGCCAGATTAGAAAGTGCAC	80	106
413474	1023	1042	AGCAACCGGGATGATGAGTG	84	107
413475	1053	1072	GCCATTCTGCGGAAAAGAAG	80	108
413476	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	88	109
413477	1151	1170	ACTGAAACCAGAAAGAGCTT	54	110
413478	1193	1212	AGAATGGCAGAACACTGGGA	53	111
413479	1209	1228	TGTCATGGTAAAATGAAGAA	40	112
413480	1219	1238	AAGAAATCAGTGTATGGTA	71	113
413481	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	86	114
413482	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	85	115
413483	1300	1319	AACTGGCAGCGGACGGCATT	78	116

[0347]

413484	1430	1449	CCTTAATGTGTATCCAGAGA	74	117
413485	1461	1480	TGGTGGTACACTCATTATCC	68	118
413486	1471	1490	GGCTTGATTTTGGTGGTACA	83	119
413487	1481	1500	AACGATCCTGGGCTTGATTT	57	120
413488	1560	1579	ACAGGTGTCTCTGAGTGGGT	49	121
413489	1588	1607	CACTGGTTTCCAATGATGGA	68	122
413490	1623	1642	CTACCCCATAGAAACAGTGA	57	123
413491	1633	1652	TTAGGTGACTCTACCCCAT	73	124
413492	1647	1666	AGACACGCAAAATCTTAGGT	68	125
413493	1710	1729	TTTCTTGAACCCCAAAGAAA	65	126
413494	1780	1799	GTGGTTTCCAGTTTCAACAA	70	127
413495	1921	1940	TTGGCTTTCTGGAGAGTATT	58	128
413496	1997	2016	GGCACAGATCATCTTATGGG	72	129
413497	2627	2646	GATTCCTGCAAAATGGTGAA	39	130
413498	2637	2656	GCAGAGTGTAGATTCCTGCA	60	131
413499	2887	2906	ATCATTTTTTCAGGAAAGTGT	52	132

[0348] 表 2

[0349] 具有靶向 SEQ ID NO :2 的 5-10-5MOE 侧翼和脱氧间隙的嵌合型反义寡核苷酸对人因子 11mRNA 水平的抑制

[0350]

寡核苷酸 ID	目标起始位点	目标终止位点	序列	% 抑制	SEQ ID NO
413500	1658	1677	GTGAGACAAATCAAGACTTC	15	133
413501	2159	2178	TTAGTTTACTGACACTAAGA	23	134
413502	2593	2612	CTGCTTTATGAAAAACCAAC	22	135
413503	3325	3344	ATACCTAGTACAATGTAAAT	29	136
413504	3548	3567	GGCTTGTGTGTGGTCAATAT	54	137
413505	5054	5073	TGGGAAAGCTTTCAATATTC	57	138
413506	6474	6493	ATGGAATTGTGCTTATGAGT	57	139
413507	7590	7609	TTTCAAGCTCAGGATGGGAA	55	140
413508	7905	7924	GTTGGTAAATGCAACCAAA	64	141
413509	8163	8182	TCAGGACACAAGTAAACCTG	66	142
413510	9197	9216	TGCAAGCTGGAAATAAAAGC	17	143
413511	9621	9640	TGCCAATTTAAAGTGTAGC	43	144
413512	9800	9819	ATATTTCAAAATCCAGTATG	39	145
413513	9919	9938	TTCTGAATATACAAATTAAT	27	146
413514	9951	9970	TTTACTATGAAAATCTAAAT	5	147
413515	11049	11068	GGTATCCTGAGTGAGATCTA	36	148
413516	11269	11288	CCAGCTATCAGGAAAATTCC	50	149

[0351]

413517	12165	12184	AAAGCTATTGGAGACTCAGA	51	150
413518	12584	12603	ATGGAATCTCTTCATTTTCAT	49	151
413519	12728	12747	ATGGAGACATTCATTTCCAC	59	152
413520	13284	13303	GCTCTGAGAGTTCCAATTCA	52	153
413521	14504	14523	CTGGGAAGGTGAATTTTTAG	62	154
413522	14771	14790	TCAAGAGTCTTCATGCTACC	42	155
413523	15206	15225	TCAGTTTACCTGGGATGCTG	61	156
413524	15670	15689	GACATTATACTCACCATTAT	7	157
413525	15905	15924	GTATAAATGTGTCAAATTAA	43	158
413526	16482	16501	GTAAAGTTTTACCTTAACCT	47	159
413527	17298	17317	CCATAATGAAGAAGGAAGGG	52	160
413528	17757	17776	TTAAGTTACATTGTAGACCA	48	161
413529	18204	18223	TGTGTGGGTCCTGAAATTCT	52	162
413530	18981	19000	ATCTTGTAATTACACACCCC	27	163
413531	19174	19193	GTACACTCTGCAACAGAAGC	47	164
413532	19604	19623	AGGGAATAACATGAAGGCC	32	165
413533	20936	20955	ATCCAGTTCACCATTGGAGA	48	166
413534	21441	21460	TTTTCCAGAAGAGACTCTTC	31	167
413535	21785	21804	GTCACATTTAAAATTTCCAA	41	168
413536	23422	23441	TTAATATACTGCAGAGAACC	37	169
413537	25893	25912	AGAAATATCCCCAGACAGAG	16	170

[0352] 例 2 :对 HepG2 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0353] 在 HepG2 细胞中,在不同剂量下测试 12 条对人因子 11 表现出 84%或更高的体外抑制的 gapmer。细胞以每孔 10,000 个细胞铺板,按照表 3,用含有 9.375nM、18.75nM、37.5nM、75nM 和 150nM 浓度的反义寡核苷酸的脂质体试剂转染。处理约 16 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 引物探针组 RTS 2966 (前向序列: CAGCCTGGAGCATCGTAACA, 以 SEQ ID NO:3 并入本申请;反向序列: CAGCCTGGAGCATCGTAACA, 以 SEQ ID NO:4 并入本申请;探针序列: CAGCCTGGAGCATCGTAACA, 以 SEQ ID NO:5 并入本申请) 被用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。结果以相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比来表示。如表 3 所示,在经反义寡核苷酸处理的细胞中,因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低了。

[0354] 表 3

[0355] 对 HepG2 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0356]

	9.375 nM	18.75 nM	37.5 nM	75 nM	150 nM	IC ₅₀ (nM)	SEQ ID No.
412203	29	15	61	77	82	33	31
412206	28	44	68	80	89	22	34
412212	28	45	59	73	88	25	40
412223	33	48	62	76	81	21	51
412224	24	45	57	70	81	28	52
412225	32	42	65	78	73	23	53
413467	2	35	49	61	47	43	100
413468	14	34	56	78	75	35	101
413469	24	33	53	70	84	33	102
413476	26	44	64	73	82	25	109
413481	22	38	56	67	83	32	114
413482	26	39	59	74	82	28	115

[0357] 例3:微步 (microwalk) 设计的寡核苷酸对 HepG2 细胞中人因子 11 的反义抑制

[0358] 根据表 3 所列的 gapmer 设计了其他 gapmer。通过向表 3 的原始 gapmer 的上游和下游略微移动 (即“微步”) 产生 gapmer 而设计这些 gapmer。Gapmer 也用如 5-10-5MOE、3-14-3 MOE 和 2-13-5 MOE 等不同的结构域来产生。在体外测试了这些 gapmer。用含有 75nM 反义寡核苷酸的脂质体试剂转染密度为每孔 10,000 个细胞的培养的 HepG2 细胞。处理约 24 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。以相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比来表示结果。

[0359] 然后将微步设计的 gapmer 的体外抑制数据与表 3 的 gapmer 的体外抑制数据进行比较,如表 4、5、6、7 和 8 所示。根据寡核苷酸映射的人 mRNA (GENBANK 登录号 NM_000128.3) 上的区域来显示寡核苷酸。

[0360] 表 4 中的嵌合型反义寡核苷酸被设计为 5-10-5 MOE、3-14-3 MOE 和 2-13-5 MOE gapmer。在表 4 中首先列出的 gapmer 是用来通过微步设计剩下的 gapmer 的原始 gapmer (见表 3),用星号指定。5-10-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸,其中,中央的间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 5 个核苷酸的侧翼。3-14-3gapmer 的长度为 20 个核苷酸,其中,中央的间隙区段由 14 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 3 个核苷酸的侧翼。2-13-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸,其中,中央的间隙区段由 13 个 2'-脱氧核苷酸组成。中央间隙的 5' 末端有包含 2 个核苷酸的侧翼,3' 末端有包含 5 个核苷酸的侧翼。对于每一个结构域 (5-10-5、3-14-3 和 2-13-5),5' 侧翼区段中的每个核苷酸和 3' 侧翼区段中的每个核苷酸有 2' -MOE 修饰。每个 gapmer 中的核苷内连接是磷硫酰 (P = S) 连接。每条 gapmer 中的所有胞嘧啶核苷残基都是 5-甲基胞嘧啶核苷。“目标起始位点”是指 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“目标终止位点”是指 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。表 4 中所列的每条 gapmer 靶向 SEQ ID NO :1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3)。

[0361] 如表 4 所示,所有靶向 SEQ ID NO :1 的从目标起始位点 656 开始,在目标终止位点 704 终止 (也就是核苷碱基 656-704) 的目标区域的 5-10-5 MOE gapmer、3-14-3 MOE gapmer 和 2-13-5 MOE gapmer 对因子 11 的 mRNA 都表现出至少 20% 的抑制。许多 gapmer

表现出至少 60% 的抑制。一些 gapmer 表现出至少 80% 的抑制, 包括 ISIS 编号 :416806、416809、416811、416814、416821、416825、416826、416827、416828、416868、416869、416878、416879、416881、416883、416890、416891、416892、416893、416894、416895、416896、416945、416946、416969、416970、416971、416972、416973、412203、413467、413468 和 413469。下列 ISIS 编号表现出至少 90% 的抑制 :412203、413467、416825、416826、416827、416868、416878、416879、416892、416893、416895、416896、416945、416972 和 416973。下列 ISIS 编号表现出至少 95% 的抑制 :416878、416892、416895 和 416896。

[0362] 表 4

[0363] 靶向 SEQ ID NO :1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3) 的第 656 位 - 第 704 位核苷碱基的嵌合型反义寡核苷酸对人因子 11mRNA 水平的抑制

[0364]

ISIS No.	目标起始位点	目标终止位点	序列 (5'至 3')	% 抑制	结构域	SEQ ID No.
*412203	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	97	5-10-5	31
*413467	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	92	5-10-5	100
*413468	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	83	5-10-5	101
*413469	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	86	5-10-5	102
416868	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	93	3-14-3	31
416945	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	94	2-13-5	31
416806	657	676	AAATGTCTTTGTTGCAAGCG	86	5-10-5	171

[0365]

416869	657	676	AAATGTCTTTGTTGCAAGCG	81	3-14-3	171
416946	657	676	AAATGTCTTTGTTGCAAGCG	86	2-13-5	171
416807	658	677	TAAATGTCTTTGTTGCAAGC	51	5-10-5	172
416870	658	677	TAAATGTCTTTGTTGCAAGC	76	3-14-3	172
416947	658	677	TAAATGTCTTTGTTGCAAGC	62	2-13-5	172
416808	659	678	ATAAATGTCTTTGTTGCAAG	55	5-10-5	173
416871	659	678	ATAAATGTCTTTGTTGCAAG	28	3-14-3	173
416948	659	678	ATAAATGTCTTTGTTGCAAG	62	2-13-5	173
416809	660	679	CATAAATGTCTTTGTTGCAA	86	5-10-5	174
416872	660	679	CATAAATGTCTTTGTTGCAA	20	3-14-3	174
416949	660	679	CATAAATGTCTTTGTTGCAA	64	2-13-5	174
416873	661	680	ACATAAATGTCTTTGTTGCA	51	3-14-3	99
416950	661	680	ACATAAATGTCTTTGTTGCA	71	2-13-5	99
416810	662	681	CACATAAATGTCTTTGTTGC	68	5-10-5	175
416874	662	681	CACATAAATGTCTTTGTTGC	49	3-14-3	175
416951	662	681	CACATAAATGTCTTTGTTGC	48	2-13-5	175
416811	663	682	CCACATAAATGTCTTTGTTG	84	5-10-5	176
416875	663	682	CCACATAAATGTCTTTGTTG	75	3-14-3	176
416952	663	682	CCACATAAATGTCTTTGTTG	51	2-13-5	176
416812	664	68	TCCACATAAATGTCTTTGTT	59	5-10-5	177
416876	664	683	TCCACATAAATGTCTTTGTT	37	3-14-3	177
416953	664	683	TCCACATAAATGTCTTTGTT	45	2-13-5	177
416813	665	684	GTCCACATAAATGTCTTTGT	70	5-10-5	178
416877	665	684	GTCCACATAAATGTCTTTGT	51	3-14-3	178
416954	665	684	GTCCACATAAATGTCTTTGT	61	2-13-5	178
416878	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	95	3-14-3	100
416955	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	75	2-13-5	100
416814	667	686	AGGTCCACATAAATGTCTTT	83	5-10-5	179
416879	667	686	AGGTCCACATAAATGTCTTT	92	3-14-3	179
416956	667	686	AGGTCCACATAAATGTCTTT	61	2-13-5	179
416815	668	687	TAGGTCCACATAAATGTCTT	63	5-10-5	180
416880	668	687	TAGGTCCACATAAATGTCTT	66	3-14-3	180
416957	668	687	TAGGTCCACATAAATGTCTT	59	2-13-5	180
416816	669	688	CTAGGTCCACATAAATGTCT	79	5-10-5	181
416881	669	688	CTAGGTCCACATAAATGTCT	81	3-14-3	181
416958	669	688	CTAGGTCCACATAAATGTCT	43	2-13-5	181
416817	670	689	TCTAGGTCCACATAAATGTC	74	5-10-5	182
416882	670	689	TCTAGGTCCACATAAATGTC	60	3-14-3	182
416959	670	689	TCTAGGTCCACATAAATGTC	25	2-13-5	182
416883	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	82	3-14-3	101
416960	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	60	2-13-5	101

[0366]

416818	672	691	TGTCTAGGTCCACATAAATG	76	5-10-5	183
416884	672	691	TGTCTAGGTCCACATAAATG	69	3-14-3	183
416961	672	691	TGTCTAGGTCCACATAAATG	40	2-13-5	183
416819	673	692	ATGTCTAGGTCCACATAAAT	56	5-10-5	184
416885	673	692	ATGTCTAGGTCCACATAAAT	67	3-14-3	184
416962	673	692	ATGTCTAGGTCCACATAAAT	77	2-13-5	184
416820	674	693	CATGTCTAGGTCCACATAAA	77	5-10-5	185
416886	674	693	CATGTCTAGGTCCACATAAA	74	3-14-3	185
416963	674	693	CATGTCTAGGTCCACATAAA	48	2-13-5	185
416821	675	694	TCATGTCTAGGTCCACATAA	84	5-10-5	186
416964	675	694	TCATGTCTAGGTCCACATAA	69	2-13-5	186
412204	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	76	5-10-5	32
416888	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	76	3-14-3	32
416965	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	53	2-13-5	32
416822	677	696	CTTCATGTCTAGGTCCACAT	76	5-10-5	187
416889	677	696	CTTCATGTCTAGGTCCACAT	60	3-14-3	187
416966	677	696	CTTCATGTCTAGGTCCACAT	64	2-13-5	187
416823	678	697	CCTTCATGTCTAGGTCCACA	77	5-10-5	188
416890	678	697	CCTTCATGTCTAGGTCCACA	87	3-14-3	188
416967	678	697	CCTTCATGTCTAGGTCCACA	75	2-13-5	188
416824	679	698	CCCTTCATGTCTAGGTCCAC	64	5-10-5	189
416891	679	698	CCCTTCATGTCTAGGTCCAC	81	3-14-3	189
416968	679	698	CCCTTCATGTCTAGGTCCAC	73	2-13-5	189
416825	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	92	5-10-5	190
416892	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	100	3-14-3	190
416969	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	80	2-13-5	190
416893	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	90	3-14-3	102
416970	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	88	2-13-5	102
416826	682	701	ATGCCCTTCATGTCTAGGTC	94	5-10-5	191
416894	682	701	ATGCCCTTCATGTCTAGGTC	85	3-14-3	191
416971	682	701	ATGCCCTTCATGTCTAGGTC	83	2-13-5	191
416827	683	702	TATGCCCTTCATGTCTAGGT	93	5-10-5	192
416895	683	702	TATGCCCTTCATGTCTAGGT	95	3-14-3	192
416972	683	702	TATGCCCTTCATGTCTAGGT	90	2-13-5	192
416828	684	703	TTATGCCCTTCATGTCTAGG	87	5-10-5	193
416896	684	703	TTATGCCCTTCATGTCTAGG	95	3-14-3	193
416973	684	703	TTATGCCCTTCATGTCTAGG	92	2-13-5	193
416829	685	704	TTTATGCCCTTCATGTCTAG	72	5-10-5	194
416897	685	704	TTTATGCCCTTCATGTCTAG	66	3-14-3	194
416974	685	704	TTTATGCCCTTCATGTCTAG	73	2-13-5	194

[0367] 表 5 中的嵌合型反义寡核苷酸被设计为 5-10-5MOE、3-14-3MOE 和 2-13-5MOEgapmer。在表 5 中首先列出的 gapmer 是用来通过微步设计剩下的 gapmer 的原始 gapmer (见表 3), 用星号指定。5-10-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成, 两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 5 个核苷酸的侧翼。3-14-3gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 14 个 2'-脱氧核苷酸组成, 两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 3 个核苷酸的侧翼。2-13-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 13 个 2'-脱氧核苷酸组成。中央间隙的 5' 末端有包含 2 个

核苷酸的侧翼,3'末端有包含5个核苷酸的侧翼。对于每一个结构域(5-10-5、3-14-3和2-13-5),5'侧翼区段中的每个核苷酸和3'侧翼区段中的每个核苷酸有2'-MOE修饰。每个gapmer中的核苷内连接是磷硫酰(P=S)连接。每条gapmer中的所有胞嘧啶核苷残基都是5-甲基胞嘧啶核苷。“目标起始位点”是指gapmer靶向的最5'端的核苷酸。“目标终止位点”是指gapmer靶向的最3'端的核苷酸。表5中所列的每条gapmer靶向SEQ ID NO:1(GENBANK 登录号 NM_000128.3)。

[0368] 如表5所示,所有靶向SEQ ID NO:1的从目标起始位点738开始,在目标终止位点762终止(也就是核苷碱基738-762)的目标区域的5-10-5MOE gapmer、3-14-3MOE gapmer和2-13-5MOE gapmer对因子11的mRNA都表现出至少45%的抑制。大部分gapmer表现出至少60%的抑制。一些gapmer表现出至少80%的抑制,包括ISIS编号:412206、416830、416831、416898、416899、416900、416903、416975、416976、416977和416980。下列ISIS编号表现出至少90%的抑制:412206、416831和416900。

[0369] 表5

[0370] 靶向SEQ ID NO:1(GENBANK 登录号 NM_000128.3)的第738位-第762位核苷碱基的嵌合型反义寡核苷酸对人因子11mRNA水平的抑制

[0371]

ISIS No.	目标起始位点	目标终止位点	序列(5'至3')	% 抑制	结构域	SEQ ID No.
*412206	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCA T	93	5-10-5	34
416898	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCA T	88	3-14-3	34
416975	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCA T	87	2-13-5	34

[0372]

416830	739	758	TCCGTGCATCTTTCTTGGC A	81	5-10-5	195
416899	739	758	TCCGTGCATCTTTCTTGGC A	86	3-14-3	195
416976	739	758	TCCGTGCATCTTTCTTGGC A	83	2-13-5	195
416831	740	759	ATCCGTGCATCTTTCTTGG C	91	5-10-5	196
416900	740	759	ATCCGTGCATCTTTCTTGG C	90	3-14-3	196
416977	740	759	ATCCGTGCATCTTTCTTGG C	82	2-13-5	196
416832	741	760	CATCCGTGCATCTTTCTTG G	79	5-10-5	197
416901	741	760	CATCCGTGCATCTTTCTTG G	65	3-14-3	197
416978	741	760	CATCCGTGCATCTTTCTTG G	76	2-13-5	197
416833	742	761	TCATCCGTGCATCTTTCTT G	65	5-10-5	198
416902	742	761	TCATCCGTGCATCTTTCTT G	46	3-14-3	198
416979	742	761	TCATCCGTGCATCTTTCTT G	63	2-13-5	198
416834	743	762	GTCATCCGTGCATCTTTCT T	58	5-10-5	199
416903	743	762	GTCATCCGTGCATCTTTCT T	88	3-14-3	199
416980	743	762	GTCATCCGTGCATCTTTCT T	87	2-13-5	199

[0373] 表 6 中的嵌合型反义寡核苷酸被设计为 5-10-5MOE、3-14-3MOE 和 2-13-5MOE gapmer。在表 6 中首先列出的 gapmer 是用来通过微步设计其余 gapmer 的原始 gapmer (见表 3), 用星号指定。5-10-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成, 两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 5 个核苷酸的侧翼。3-14-3gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 14 个 2'-脱氧核苷酸组成, 两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 3 个核苷酸的侧翼。2-13-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 13 个 2'-脱氧核苷酸组成。中央间隙的 5' 末端有包含 2 个核苷酸的侧翼, 3' 末端有包含 5 个核苷酸的侧翼。对于每一个结构域 (5-10-5、3-14-3 和 2-13-5), 5' 侧翼区段中的每个核苷酸和 3' 侧翼区段中的每个核苷酸有 2'-MOE 修饰。每个 gapmer 中的核苷内连接是磷硫酰 (P = S) 连接。每条 gapmer 中的所有胞嘧啶核苷残基都是 5-甲基胞嘧啶核苷。“目标起始位点”是指 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“目标终止位点”是指 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。表 6 中所列的每条 gapmer 靶向 SEQ ID NO:1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3)。

[0374] 如表 6 所示, 所有靶向 SEQ ID NO:1 的从目标起始位点 1018 开始、在目标终止位点 1042 终止 (也就是核苷碱基 1018-1042) 的目标区域的 5-10-5MOE gapmer、3-14-3MOE gapmer 和 2-13-5MOE gapmer 对因子 11 的 mRNA 都表现出至少 20% 的抑制。下列 ISIS 编号表现出至少 90% 的抑制: 413474、416837、416838、416904、416907 和 416908。

[0375] 表 6

[0376] 靶向 SEQ ID NO :1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3) 的第 1018 位 - 第 1042 位核苷碱基的嵌合型反义寡核苷酸对人因子 11mRNA 水平的抑制

[0377]

ISIS No.	目标起始位点	目标终止位点	序列 (5'至 3')	% 抑制	结构域	SEQ ID No.
*41221 2	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAG AT	89	5-10- 5	40
416904	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAG AT	90	3-14- 3	40
416981	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAG AT	87	2-13- 5	40
416835	1019	1038	ACCGGGATGATGAGTGCA GA	83	5-10- 5	200
416905	1019	1038	ACCGGGATGATGAGTGCA GA	85	3-14- 3	200
416982	1019	1038	ACCGGGATGATGAGTGCA GA	84	2-13- 5	200
416836	1020	1039	AACCGGGATGATGAGTGC AG	89	5-10- 5	201
416906	1020	1039	AACCGGGATGATGAGTGC AG	88	3-14- 3	201
416983	1020	1039	AACCGGGATGATGAGTGC AG	86	2-13- 5	201
416837	1021	1040	CAACCGGGATGATGAGTG CA	90	5-10- 5	202
416907	1021	1040	CAACCGGGATGATGAGTG CA	90	3-14- 3	202
416984	1021	1040	CAACCGGGATGATGAGTG	89	2-13-	202

[0378]

			CA		5	
416838	1022	1041	GCAACCGGGATGATGAGT GC	94	5-10- 5	203
416908	1022	1041	GCAACCGGGATGATGAGT GC	98	3-14- 3	203
416985	1022	1041	GCAACCGGGATGATGAGT GC	88	2-13- 5	203
413474	1023	1042	AGCAACCGGGATGATGAG TG	93	5-10- 5	107

[0379] 表 7 中的嵌合型反义寡核苷酸被设计为 5-10-5MOE、3-14-3MOE 和 2-13-5MOE gapmer。在表 7 中首先列出的 gapmer 是用来通过微步设计其余 gapmer 的原始 gapmer (见表 3), 用星号指定。5-10-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成, 两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 5 个核苷酸的侧翼。3-14-3gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 14 个 2'-脱氧核苷酸组成, 两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 3 个核苷酸的侧翼。2-13-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 13 个 2'-脱氧核苷酸组成。中央间隙的 5' 末端有包含 2 个核苷酸的侧翼, 3' 末端有包含 5 个核苷酸的侧翼。对于每一个结构域 (5-10-5、3-14-3 和 2-13-5), 5' 侧翼区

段中的每个核苷酸和 3' 侧翼区段中的每个核苷酸有 2' -MOE 修饰。每个 gapmer 中的核苷内连接是磷硫酰 (P = S) 连接。每条 gapmer 中的所有胞嘧啶核苷残基都是 5- 甲基胞嘧啶核苷。“目标起始位点”是指 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“目标终止位点”是指 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。表 7 中所列的每条 gapmer 靶向 SEQ ID NO :1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3)。

[0380] 如表 7 所示, 靶向 SEQ ID NO :1 的从目标起始位点 1062 开始, 在目标终止位点 1091 终止 (也就是核苷碱基 1062-1091) 的目标区域的所有 5-10-5MOE gapmer、3-14-3MOE gapmer 和 2-13-5MOE gapmer 对因子 11 的 mRNA 都表现出至少 20% 的抑制。许多 gapmer 表现出至少 50% 的抑制, 包括 :412215、413476、413476、416839、416840、416841、416842、416843、416844、416845、416846、416847、416909、416910、416911、416912、416913、416914、416915、416916、416917、416918、416986、416987、416988、416989、416990、416991、416992、416993、416994、416995。下列 ISIS 编号表现出至少 80% 的抑制 :412215、413476、413476、416839、416840、416841、416842、416843、416844、416845、416910、416911、416912、416913、416914、416916、416917、416986、416987、416989、416991、416992、416993 和 416994。 下列 ISIS 编号表现出至少 90% 的抑制 :413476、413476、416842、416844、416910、416911、416912、416913、416916、416917 和 416993。

[0381] 表 7

[0382] 靶向 SEQ ID NO :1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3) 的第 1062 位 - 第 1091 位核苷碱基的嵌合型反义寡核苷酸对人因子 11mRNA 水平的抑制

[0383]

ISIS No.	目标起始位点	目标终止位点	序列 (5'至 3')	% 抑制	结构域	SEQ ID No.
*413476	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	93	5-10-5	109
412215	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCCTGG	82	5-10-5	43
416909	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCCTGG	78	3-14-3	43
416986	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCCTGG	88	2-13-5	43
416839	1063	1082	GATTCTTTGGGCCATTCCTG	89	5-10-5	204
416910	1063	1082	GATTCTTTGGGCCATTCCTG	90	3-14-3	204
416987	1063	1082	GATTCTTTGGGCCATTCCTG	80	2-13-5	204
416840	1064	1083	AGATTCTTTGGGCCATTCCT	85	5-10-5	205
416911	1064	1083	AGATTCTTTGGGCCATTCCT	90	3-14-3	205
416988	1064	1083	AGATTCTTTGGGCCATTCCT	76	2-13-5	205
416841	1065	1084	GAGATTCTTTGGGCCATTCC	87	5-10-5	206
416912	1065	1084	GAGATTCTTTGGGCCATTCC	92	3-14-3	206
416989	1065	1084	GAGATTCTTTGGGCCATTCC	88	2-13-5	206
416842	1066	1085	TGAGATTCTTTGGGCCATTC	94	5-10-5	207
416913	1066	1085	TGAGATTCTTTGGGCCATTC	93	3-14-	207

[0384]

					3	
416990	1066	1085	TGAGATTCTTTGGGCCATTC	76	2-13-5	207
413476	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	93	5-10-5	109
416914	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	87	3-14-3	109
416991	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	87	2-13-5	109
416843	1068	1087	TTTGAGATTCTTTGGGCCAT	89	5-10-5	208
416915	1068	1087	TTTGAGATTCTTTGGGCCAT	79	3-14-3	208
416992	1068	1087	TTTGAGATTCTTTGGGCCAT	84	2-13-5	208
416844	1069	1088	CTTTGAGATTCTTTGGGCCA	90	5-10-5	209
416916	1069	1088	CTTTGAGATTCTTTGGGCCA	91	3-14-3	209
416993	1069	1088	CTTTGAGATTCTTTGGGCCA	91	2-13-5	209
416845	1070	1089	TCCTTTGAGATTCTTTGGGCC	86	5-10-5	210
416917	1070	1089	TCCTTTGAGATTCTTTGGGCC	92	3-14-3	210
416994	1070	1089	TCCTTTGAGATTCTTTGGGCC	83	2-13-5	210
416846	1071	1090	TTCTTTGAGATTCTTTGGGC	72	5-10-5	211
416918	1071	1090	TTCTTTGAGATTCTTTGGGC	63	3-14-3	211
416995	1071	1090	TTCTTTGAGATTCTTTGGGC	64	2-13-5	211
416847	1072	1091	TTTCTTTGAGATTCTTTGGG	50	5-10-5	212
416919	1072	1091	TTTCTTTGAGATTCTTTGGG	27	3-14-3	212
416996	1072	1091	TTTCTTTGAGATTCTTTGGG	22	2-13-5	212

[0385] 表 8 中的嵌合型反义寡核苷酸被设计为 5-10-5MOE、3-14-3MOE 和 2-13-5MOE gapmer。在表 8 中首先列出的 gapmer 是用来通过微步设计其余 gapmer 的原始 gapmer (见表 3), 用星号指定。5-10-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成, 两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 5 个核苷酸的侧翼。3-14-3gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 14 个 2'-脱氧核苷酸组成, 两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 3 个核苷酸的侧翼。2-13-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 13 个 2'-脱氧核苷酸组成。中央间隙的 5' 末端有包含 2 个核苷酸的侧翼, 3' 末端有包含 5 个核苷酸的侧翼。对于每一个结构域 (5-10-5、3-14-3 和 2-13-5), 5' 侧翼区段中的每个核苷酸和 3' 侧翼区段中的每个核苷酸有 2'-MOE 修饰。每个 gapmer 中的核苷内连接是磷硫酰 (P = S) 连接。每条 gapmer 中的所有胞嘧啶核苷残基都是 5-甲基胞嘧啶核苷。“目标起始位点”是指 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“目标终止位点”是指 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。表 8 中所列的每条 gapmer 靶向 SEQ ID NO:1 (GENBANK 登录号

NM_000128.3)。

[0386] 如表 8 所示,靶向 SEQ ID NO:1 的从目标起始位点 1275 开始,在目标终止位点 1318 终止(也就是核苷碱基 1275-1318)的目标区域的所有 5-10-5MOE gapmer、3-14-3MOE gapmer 和 2-13-5MOE gapmer 对因子 11 的 mRNA 都表现出至少 70% 的抑制。许多 gapmer 表现出至少 80% 的抑制,包括:412223、412224、412225、413482、416848、416849、416850、416851、416852、416853、416854、416855、416856、416857、416858、416859、416860、416861、416862、416863、416864、416865、416866、416867、416920、416921、416922、416923、416924、416925、416926、416927、416928、416929、416930、416931、416932、416933、416934、416935、416936、416937、416938、416939、416940、416941、416942、416943、416944、416997、416998、416999、417000、417001、417002、417003、417004、417006、417007、417008、417009、417010、417011、417013、417014、417015、417016、417017、417018、417019 和 417020。下列 ISIS 编号表现出至少 90% 的抑制:412224、416850、416853、416856、416857、416858、416861、416862、416864、416922、416923、416924、416925、416926、416928、416931、416932、416933、416934、416935、416937、416938、416940、416941、416943、416999、417002、416854 和 416859。

[0387] 表 8

[0388] 靶向 SEQ ID NO:1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3) 的第 1275 位 - 第 1318 位核苷碱基的嵌合型反义寡核苷酸对人因子 11mRNA 水平的抑制

[0389]

ISIS No.	目标起始位点	目标终止位点	序列 (5'至 3')	% 抑制	结构域	SEQ ID No.
*412223	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	85	5-10-5	51
*412224	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	93	5-10-5	52
*413482	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	89	5-10-5	115
*412225	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	86	5-10-5	53
416920	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	88	3-14-3	51
416997	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	84	2-13-5	51
416848	1276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	86	5-10-5	213
416921	1276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	88	3-14-3	213
416998	1276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	88	2-13-5	213
416849	1277	1296	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	88	5-10-5	214
416922	1277	1294	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	94	3-14-3	214
416999	1277	1296	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	92	2-13-5	214
416850	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	93	5-10-5	215
416923	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	96	3-14-3	215
417000	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	89	2-13-5	215
416851	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	88	5-10-5	216
416924	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	96	3-14-3	216
417001	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	83	2-13-5	216
416925	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	98	3-14-3	114
417002	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	92	2-13-5	114
416852	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	84	5-10-5	217
416926	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	93	3-14-3	217
417003	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	89	2-13-5	217
416853	1282	1301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	91	5-10-5	218
416927	1282	1301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	87	3-14-3	218
417004	1282	1301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	86	2-13-5	218
416854	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	90	5-10-5	219
416928	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	91	3-14-3	219
417005	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	79	2-13-5	219
416855	1284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	87	5-10-5	220
416929	1284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	83	3-14-3	220
417006	1284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	81	2-13-5	220
416930	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	87	3-14-3	52
417007	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	82	2-13-5	52
416856	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	95	5-10-5	221
416931	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	96	3-14-3	221
417008	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	82	2-13-5	221
416857	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	92	5-10-5	222

[0390]

416932	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	92	3-14-3	222
417009	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	85	2-13-5	222
416858	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	93	5-10-5	223
416933	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	92	3-14-3	223
417010	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	81	2-13-5	223
416859	1289	1308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	90	5-10-5	224
416934	1289	1308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	90	3-14-3	224
417011	1289	1308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	86	2-13-5	224
416935	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	92	3-14-3	115
417012	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	72	2-13-5	115
416860	1291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	88	5-10-5	225
416936	1291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	89	3-14-3	225
417013	1291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	86	2-13-5	225
416861	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	92	5-10-5	226
416937	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	93	3-14-3	226
417014	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	87	2-13-5	226
416862	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	90	5-10-5	227
416938	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	90	3-14-3	227
417015	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	87	2-13-5	227
416863	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	83	5-10-5	228
416939	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	88	3-14-3	228
417016	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	85	2-13-5	228
416940	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	92	3-14-3	53
417017	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	82	2-13-5	53
416864	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	93	5-10-5	229
416941	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	95	3-14-3	229
417018	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	82	2-13-5	229
416865	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	88	5-10-5	230
416942	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	85	3-14-3	230
417019	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	84	2-13-5	230
416866	1298	1317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	88	5-10-5	231
416943	1298	1317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	92	3-14-3	231
417020	1298	1317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	84	2-13-5	231
416867	1299	1318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	83	5-10-5	232
416944	1299	1318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	83	3-14-3	232
417021	1299	1318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	74	2-13-5	232

[0391] 例 4 :对 HepG2 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0392] 在 HepG2 细胞中,在不同剂量下测试了例 3 中(见表 4、5、6、7 和 8)对人因子 11 表现出体外抑制的 gapmer。细胞以每孔 10,000 个细胞铺板,如表 9 所列,用含 9.375nM、18.75nM、37.5nM 和 75nM 浓度的反义寡核苷酸的脂质体试剂转染。处理约 16 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 的引物探针组 RTS 2966 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。以相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比来表示结果。如表 9 所示,在经反义寡核苷酸处理的细胞中,因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低了。

[0393] 表 9

[0394] 通过用脂质体转染寡核苷酸对 HepG2 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0395]

	9.375 nM	18.75 nM	37.5 nM	75 nM	结构域	IC ₅₀ (nM)	SEQ ID No.
412203	33	40	62	74	5-10-5	24	31
412206	24	47	69	86	5-10-5	21	34
413467	35	51	62	69	5-10-5	20	100
413474	29	44	57	67	5-10-5	28	107
413476	24	58	62	77	5-10-5	21	109
416825	23	52	73	92	5-10-5	20	190
416826	8	36	58	84	5-10-5	29	191
416827	31	42	62	77	5-10-5	23	192
416838	31	51	64	86	5-10-5	19	203
416842	18	33	62	71	5-10-5	31	207
416850	4	30	67	84	5-10-5	29	215
416856	21	45	58	74	5-10-5	27	221
416858	0	28	54	82	5-10-5	33	223
416864	18	43	62	78	5-10-5	26	229
416878	22	34	60	82	5-10-5	27	100
416892	16	50	70	85	3-14-3	23	190
416895	39	57	66	71	3-14-3	15	192
416896	22	39	57	81	3-14-3	27	193
416908	36	57	67	76	3-14-3	16	203
416922	14	25	49	75	3-14-3	36	214
416923	36	47	60	67	3-14-3	23	215
416924	25	38	56	59	3-14-3	36	216
416925	13	38	59	75	3-14-3	30	114
416926	31	43	63	82	3-14-3	22	217
416931	44	39	57	71	3-14-3	22	221

[0396]

416941	33	54	63	78	3-14-3	19	229
416945	34	45	62	65	2-13-5	24	31
416969	17	39	61	76	2-13-5	28	190
416972	32	40	60	69	2-13-5	26	192
416973	60	75	85	87	2-13-5	3	193
416984	26	50	62	81	2-13-5	22	202
416985	17	30	47	57	2-13-5	49	203
416989	18	41	62	83	2-13-5	26	206
416993	15	37	50	68	2-13-5	36	209
416999	24	37	55	73	2-13-5	30	214
417000	35	47	58	70	2-13-5	23	215
417002	35	52	67	70	2-13-5	19	114
417003	26	44	60	56	2-13-5	33	217

[0397] 也通过电穿孔转染 gapmer, 并测定了它们对人因子 11mRNA 的剂量依赖的抑制。细

胞以每孔 20,000 个细胞铺板,并如表 10 所列,用浓度为 0.7nM、2.2nM、6.7nM 和 20nM 的反义寡核苷酸以电穿孔转染。处理约 16 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 的引物探针组 RTS 2966 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。以相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比来表示结果。如表 10 所示,在经反义寡核苷酸处理的细胞中,因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低了。

[0398] 表 10

[0399] 通过用电穿孔转染寡核苷酸对 HepG2 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0400]

	0.7 M	2.2 M	6.7 M	20 M	IC ₅₀ (M)	SEQ ID No.
412203	11	60	70	91	2.7	31
412206	22	39	81	94	2.7	34
413467	5	31	65	89	4.2	100
413474	0	5	52	81	6.9	107
413476	40	69	88	93	0.9	109
416825	27	74	92	98	1.3	190
416826	2	47	86	82	3.2	191
416827	37	68	87	92	1.1	192
416838	5	30	55	83	5.1	203
416842	0	10	66	92	5.0	207
416850	14	25	81	91	3.4	215
416856	0	29	47	93	5.1	221

[0401]

416858	5	20	56	86	5.3	223
416864	32	65	78	90	1.4	229
416878	1	26	75	85	4.3	100
416892	14	52	82	92	2.5	190
416895	0	62	70	91	3.0	192
416896	12	35	81	89	3.2	193
416908	7	58	74	89	2.8	203
416922	35	51	77	91	1.7	214
416923	15	30	60	90	4.0	215
416924	22	40	63	70	4.1	216
416925	0	40	76	80	3.9	114
416926	47	71	91	94	0.6	217
416931	7	24	60	82	5.1	221
416941	16	38	79	89	3.0	229
416945	48	70	81	88	0.6	31
416969	25	34	86	92	2.5	190
416972	25	30	48	88	4.3	192
416973	20	48	86	93	2.3	193
416984	43	54	88	90	1.1	202
416985	12	48	45	69	5.8	203
416989	32	65	88	94	1.3	206
416993	22	48	87	92	2.2	209
416999	20	42	77	88	2.8	214
417000	46	73	76	89	0.6	215
417002	32	38	82	91	2.2	114
417003	0	34	75	89	3.9	217

[0402] 例 5 :对 HepG2 细胞中人因子 11 的有效的剂量依赖的反义抑制的选择和确认

[0403] 挑选了例 4 中表现出对人因子 11 的明显的剂量依赖抑制的 gapmer, 在 HepG2 细胞中在不同剂量下对其进行测试。细胞以每孔 10,000 个细胞铺板, 如表 11 所列, 用含有浓度为 2.34nM、4.69nM、9.375nM、18.75nM、37.5nM 和 75nM 的反义寡核苷酸的脂质体试剂转染。处理约 16 小时后, 从细胞中分离 RNA, 以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 的引物探针组 RTS 2966 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量, 对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。以相对于未处理的对照细胞的人因子 11 的抑制百分比来表示结果。如表 11 所示, 与对照相比, 在经反义寡核苷酸处理的细胞中因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低了。

[0404] 表 11

[0405] 通过用脂质体转染寡核苷酸对 HepG2 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0406]

	2.34nM	4.69nM	9.375nM	18.75nM	37.5nM	75nM	结构域	IC50 (nM)	SEQ ID No.
416825	4	22	39	57	79	89	5-10-5	13	190
416826	15	22	32	54	76	90	5-10-5	15	191
416838	21	37	50	63	74	83	5-10-5	10	203
416850	24	31	49	55	70	77	5-10-5	13	215
416858	11	35	46	61	75	77	5-10-5	11	223
416864	13	34	42	65	68	80	5-10-5	15	229
416892	14	34	49	70	84	93	3-14-3	9	190
416925	24	34	45	56	67	72	3-14-3	13	114
416999	10	26	42	62	72	80	2-13-5	14	214
417002	17	26	49	61	81	84	2-13-5	12	114
417003	6	29	48	64	73	82	2-13-5	11	217

[0407] 还通过电穿孔转染 gapmer, 测定它们对人因子 11 的 mRNA 的剂量依赖的抑制。以每孔 20,000 个细胞的浓度铺板细胞, 按照表 12, 以 625nM、1250nM、2500nM、5,000nM、10,000nM 和 20,000nM 浓度的反义寡核苷酸通过电穿孔转染细胞。处理约 16 小时后, 从细胞中分离 RNA, 以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 的引物探针组 RTS2966 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREE 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。结果以相对于未处理的对照细胞的人因子 11 的抑制百分比来表示。如表 12 所示, 与对照相比, 经反义寡核苷酸处理的细胞中, 因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低了。

[0408] 表 12

[0409] 通过用电穿孔转染寡核苷酸的 HepG2 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0410]

	625nM	1250nM	2500nM	5000nM	10000nM	20000nM	IC50 (μM)	SEQ ID No.
416825	69	84	91	94	96	97	19	190
416826	67	82	89	92	95	97	33	191
416838	66	79	87	90	93	96	43	203

[0411]

416850	69	80	87	90	93	96	25	215
416858	65	77	87	89	93	93	44	223
416864	45	74	84	87	92	94	338	229
416892	66	86	96	97	100	100	31	190
416925	64	80	88	91	95	96	51	114
416999	61	82	89	94	94	97	67	214
417002	59	72	86	90	94	96	156	114
417003	60	74	86	90	95	95	123	217

[0412] 例 6: 对冻存 (cyano) 的原代肝细胞中人因子 11 的有效的剂量依赖的反义抑制的选择和确认

[0413] 在冻存原代肝细胞中, 也在不同剂量下测试了例 4 中表现出对人因子 11 有明显

的剂量依赖抑制的 gapmer。细胞以每孔 35,000 个细胞铺板,按照表 13,以 0.74nM、2.2nM、6.7nM、20nM、60nM 和 180nM 浓度的反义寡核苷酸通过电穿孔转染细胞。处理约 16 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 的引物探针组 RTS 2966 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。以相对于未处理的对照细胞的人因子 11 的抑制百分比来表示结果。如表 13 所示,与对照相比,经反义寡核苷酸处理的细胞中,因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低了。

[0414] 表 13

[0415] 对冻存原代肝细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0416]

	0.74nM	2.2nM	6.7 nM	20nM	60nM	180nM	IC ₅₀ (μ M)	SEQ ID No.
416825	5	22	51	61	77	84	1.0	190
416826	13	24	34	67	69	71	1.3	191
416838	0	0	21	34	48	62	6.9	203
416850	2	20	24	65	69	67	1.6	215
416858	2	13	22	44	63	68	3.7	223
416864	0	1	15	23	47	64	7.7	229
416892	20	20	43	62	88	92	1.0	190
416925	0	9	1	48	55	76	4.4	114
416999	3	40	36	62	67	82	1.3	214
417002	32	16	28	38	55	71	4.0	114
417003	12	18	19	39	58	74	4.1	217

[0417] 例 7 :gapmer 对 HepB3 细胞中人因子 11 的有效的剂量依赖的反义抑制的选择和确认

[0418] 在人 HepB3 细胞中,在不同剂量下测试例 4 中表现出对人因子 11 有体外抑制的 gapmer。细胞以每孔 4,000 个细胞铺板,按照表 14,用具有以下浓度的反义寡核苷酸的脂质体试剂转染细胞 :2.3nM、4.7nM、9.4nM、18.75nM、37.5nM 和 75nM。处理约 16 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 的引物探针组 RTS 2966 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。以相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比来表示结果。如表 14 所示,与对照相比,在反义寡核苷酸处理的细胞中因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低了。

[0419] 表 14

[0420] HepB3 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0421]

ISIS No.	2.3 nM	4.7nM	9.4 nM	18.75 nM	37.5 nM	75 nM	IC ₅₀ (nM)	SEQ ID No.
416825	0	15	34	36	53	59	35	190
416826	16	28	38	55	64	66	16	191
416838	23	34	43	59	71	56	11	203
416850	22	32	43	56	75	60	13	215
416858	17	34	43	57	74	62	12	223
416864	24	37	42	66	76	63	9	229
416892	28	34	50	68	82	72	9	190
416925	26	33	45	59	72	60	12	114
416999	19	33	42	60	71	59	12	214
417002	24	30	46	57	71	65	13	114
417003	11	28	40	40	63	58	17	217

[0422] 也通过电穿孔转染 gapmer,测定它们对人因子 11 的 mRNA 的剂量依赖的抑制。细胞以每孔 20,000 个细胞铺板,按照表 15,以 41.15nM、123.457nM、370.37nM、1111.11nM、3333.33nM 和 10,000nM 浓度的反义寡核苷酸通过电穿孔转染细胞。处理约 16 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 的引物探针组 RTS 2966 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。以相对于未处理的对照细胞的人因子 11 的抑制百分比来表示结果。如表 15 所示,与对照相比,在经反义寡核苷酸处理的细胞中,因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低了。

[0423] 表 15

[0424] HepB3 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0425]

	41.15nM	123.457nM	370.37nM	1111.11nM	3333.33nM	10000nM	IC ₅₀ (μM)	SEQ ID No.
416825	32	40	48	75	90	92	0.16	190
416826	0	0	34	61	87	92	0.78	191
416838	12	9	28	40	77	88	1.20	203
416850	26	38	51	73	90	95	0.30	215
416858	23	45	52	64	87	92	0.30	223
416864	4	3	6	35	75	87	2.20	229
416892	9	12	28	65	89	98	0.61	190
416925	27	39	50	73	88	96	0.20	114
416999	31	45	62	78	94	97	0.16	214
417002	19	0	31	47	86	93	1.20	114
417003	31	0	15	43	84	92	1.50	217

[0426] 例 8:原代小鼠肝细胞中小鼠因子 11 的反义抑制

[0427] 靶向小鼠因子 11 的嵌合型反义寡核苷酸被设计为靶向小鼠因子 11 的 5'-10-5MOE gapmer (GENBANK 登录号 NM_028066.1,以 SEQ ID NO:6 并入本申请)。gapmer 的长度为 20 个核苷酸,其中,中央的间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边(在 5'和 3'方向)为各包含 5 个核苷酸的侧翼。每个侧翼区段中的每一核苷酸都有 2'-MOE 修饰。每条 gapmer

中的核苷内连接是磷硫酰 (P = S) 连接。每条 gapmer 中的所有胞嘧啶残基都是 5- 甲基胞嘧啶。在原代小鼠肝细胞中, 针对降低小鼠因子 11mRNA 的能力, 对这些反义寡核苷酸进行了评估。

[0428] 以 6.25nM、12.5nM、25nM、50nM、100nM 和 200nM 的反义寡核苷酸处理原代小鼠肝细胞约 24 小时。从细胞中分离 RNA, 以定量实时 PCR 测定小鼠因子 11 的 mRNA 水平。小鼠因子 11 的引物探针组 RTS 2898 (正向序列 ACATGACAGGCGCGATCTCT, 以 SEQ ID NO:7 并入本申请; 反向序列 TCTAGGTTACGTACACATCTTTGC, 以 SEQ ID NO:8 并入本申请; 探针序列 TTCCTTCAAGCAATGCCCTCAGCAATX, 以 SEQ ID NO:9 并入本申请) 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。一些小鼠反义寡核苷酸以剂量依赖的方式降低了因子 11 的 mRNA 水平。例 9: 原代小鼠肝细胞中小鼠因子 11 的交叉反应性反义抑制

[0429] 体外测试了靶向小鼠因子 11 核酸的反义寡核苷酸对因子 11 的 mRNA 的影响。以 100nM 反义寡核苷酸处理密度为每孔 10,000 个细胞的培养的原代小鼠肝细胞。处理约 24 小时后, 从细胞中分离 RNA, 以定量实时 PCR 测定小鼠因子 11 的 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。以相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比来表示结果。

[0430] 表 16 中的嵌合型反义寡核苷酸被设计为 5-10-5MOE gapmer。gapmer 的长度为 20 个核苷酸, 其中, 中央的间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成, 两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 5 个核苷酸的侧翼。5' 侧翼区段中的每个核苷酸和 3' 侧翼区段中的每个核苷酸有 2'-MOE 修饰。每个 gapmer 中的核苷内连接是磷硫酰 (P = S) 连接。每条 gapmer 中的所有胞嘧啶残基都是 5- 甲基胞嘧啶。“小鼠目标起始位点”是指 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“小鼠目标终止位点”是指 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。所有列出的小鼠寡核苷酸都显示在小鼠因子 11mRNA (GENBANK 登录号 NM_028066.1), 以 SEQ ID NO:6 并入本申请, 和人因子 11mRNA (GENBANK 登录号 NM_000128.3), 以 SEQ ID NO:1 并入本申请, 之间有交叉反应性。“人目标起始位点”是指反义寡核苷酸靶向的人 mRNA (GENBANK 登录号 NM_000128.3) 的最 5' 端的核苷酸。“人目标终止位点”是指反义寡核苷酸靶向的人 mRNA (GENBANK 登录号 NM_000128.3) 的最 3' 端的核苷酸。“错配数”是指在小鼠寡核苷酸和人 mRNA 序列间的错配。

[0431] 表 16

[0432] 具有 5-10-5MOE 侧翼和脱氧间隙的靶向 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:6 的嵌合型反义寡核苷酸对小鼠因子 11mRNA 水平的抑制

[0433]

ISIS No.	小鼠目标起始位点	小鼠目标终止位点	序列 (5'至 3')	% 抑制	SEQ ID No.	人目标起始位点	人目标终止位点	错配数
404050	379	398	TGCTTGAAGGAATATCCAGA	82	233	619	638	2
404054	448	467	TAGTTCATGCCCTTCATGTC	45	234	688	707	1
404055	453	472	TGTTATAGTTCATGCCCTTC	27	235	693	712	1
404066	686	705	AATGTCCCTGATACAAGCCA	37	236	926	945	1
404067	691	710	GGGAAAATGTCCCTGATACA	39	237	931	950	1
404083	1299	1318	TGTGCAGAGTCACCTGCCAT	47	238	1533	1552	2
404087	1466	1485	TTCTTGAACCCTGAAGAAAG	29	239	1709	1728	2
404089	1477	1496	TGAATTATCATTTCTTGAAC	6	240	1720	1739	2
404090	1483	1502	TGATCATGAATTATCATTTTC	42	241	1726	1745	2

[0434] 例 10 :小鼠因子 11 的体内反义抑制

[0435] 对显示明显的剂量依赖抑制的一些靶向小鼠因子 11mRNA 的反义寡核苷酸 (GENBANK 登录号 NM_028066.1, 以 SEQ ID NO :6 并入本申请) 进行了体内评估。以 ISIS 404057 (TCCTGGCATTCTCGAGCATT, 目标起始位点 487, 以 SEQ ID NO :10 并入本申请) 和 ISIS 404071 (TGGTAATCCACTTTCAGAGG, 目标起始位点 869, 以 SEQ ID NO :11 并入本申请) 处理 BALB/c 小鼠。

[0436] 治疗

[0437] 向 BALB/c 小鼠注射 5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg 或 50mg/kg 的 ISIS 404057 或 ISIS 404071, 一周两次, 共 3 周。向对照组小鼠注射磷酸盐缓冲液, 一周两次, 共 3 周。在接受最后一次剂量后 5 天处死小鼠。收获完整肝脏进行 RNA 分析, 收集血浆进行凝血分析 (PT 和 aPTT) 和蛋白分析。

[0438] RNA 分析

[0439] 从肝脏组织中抽提 RNA 用于因子 11 的实时 PCR 分析。如表 17 所示, 与 PBS 对照相比, 反义寡核苷酸对小鼠因子 11 实现了剂量依赖的降低。以相对于对照的因子 11 的抑制百分比来表示结果。

[0440] 表 17

[0441] BALB/c 小鼠中小鼠因子 11mRNA 的剂量依赖的反义抑制

[0442]

	mg/kg	%抑制
404057	5	40
	10	64
	25	85
	50	95
404071	5	72
	10	82
	25	93
	50	96

[0443] PT 和 aPTT 试验

[0444] 用 ISIS 404057 和 ISIS 404071 处理过的小鼠的贫血小板血浆 (PPP) 测定凝血酶原时间 (PT) 和活化部分凝血活酶时间 (aPTT)。表 18 提供的 PT 和 aPTT 值以国际标准化比值 (INR) 来显示。将每一实验组的 PT 或 aPTT 值 (也就是 5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg 和

50mg/kg ISIS 404057 或 ISIS 404071 处理的) 除以 PBS 处理组的 PT 或 aPTT, 来确定 PT 或 aPTT 的 INR 值。将该比值以采用的组织因子的国际敏感度指数 (ISI) 进行加幂。如表 18 所示, 在经 ISIS 404057 或 ISIS 404071 处理的小鼠中, PT 没有明显延长。然而, 在经 ISIS 404057 和 ISIS 404071 处理的小鼠中, aPTT 以剂量依赖方式延长。这些数据表明因子 11 的反义减少影响了接触激活通路, 但没有影响血液凝结的外源性通路。

[0445] 表 18

[0446] ISIS 404071 和 404057 对 BALB/c 小鼠中 PT 和 aPTT 的影响

[0447]

	剂量 mg/kg	PT INR	aPTT INR
ISIS 404057	5	1.00	1.07
	10	0.94	1.19
	25	1.02	1.27

[0448]

	50	1.00	1.37
ISIS 404071	5	1.06	1.09
	10	1.08	1.13
	25	1.06	1.35
	50	1.02	2.08

[0449] 蛋白分析

[0450] 用基于凝血时间的 F11 分析测定经 ISIS 404071 处理的小鼠的血浆中的因子 11 酶原。用 ST4 半自动凝结装置 (Diagnostic Stago, NJ), 以两轮相同的实验测定凝血时间。将 30 μ l 柠檬酸钠作为防凝结剂的样本血浆用含 BSA 的 HEPES-NaCl 缓冲液以 1/20 稀释, 稀释液与 30 μ l aPTT 试剂 (血小板因子 3 试剂和微粒活化剂) 以及 30 μ l 缺乏因子 11 的有柠檬酸钠作为防凝结剂的血浆 (人先天性的, George King 生物医学公司) 在 37°C 下孵育以启动凝血。结果插入梯度稀释的以柠檬酸钠作为防凝结剂的对照小鼠血浆的标准曲线上。

[0451] 如表 19 所示, 以 ISIS 404071 处理导致因子 11 蛋白质的明显地剂量依赖地减少。结果以相对于 PBS 对照的因子 11 的抑制百分比来表示。

[0452] 表 19

[0453] BALB/c 小鼠中小鼠因子 11 蛋白的剂量依赖的抑制

[0454]

剂量 mg/kg	% 抑制
5	39
10	67
25	89
50	96

[0455] 例 11 : 与华法林相比, 在 FeCl₃ 诱导的静脉血栓形成 (VT) 模型中小鼠因子 11 的反义抑制的体内影响

[0456] 处理

[0457] 在 FeCl₃ 诱导的 VT 小鼠模型中评估了 ISIS 404071 和华法林 (COUMADIN)。以

1. 25mg/kg、2. 5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg 或 40mg/kg 的 ISIS 404071 处理六组 BALB/c 小鼠, 皮下给药, 一周两次, 共 3 周。在接受最后一次剂量的 ISIS 404071 后 2 天, 将 150mg/kg 氯胺酮和 10mg/kg 甲苯噻嗪混合后通过腹腔内注射使小鼠麻醉。以 0. 5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg 和 5mg/kg 华法林处理另外 6 组 BALB/c 小鼠, 腹腔内给药, 每天一次, 共 6 天。华法林的最后一次剂量后 4 小时, 将 150mg/kg 氯胺酮和 10mg/kg 甲苯噻嗪混合后通过腹腔内注射使小鼠麻醉。以 PBS 处理两个对照组 BALB/c 小鼠, 皮下给药, 一周两次, 共 3 周。PBS 的最后一次剂量 2 天后, 将 150mg/kg 氯胺酮和 10mg/kg 甲苯噻嗪混合后通过腹腔内注射使小鼠麻醉。除第一对照组外的所有组的小鼠中, 以 FeCl_3 诱导血栓形成。

[0458] 在经受 FeCl_3 处理的小鼠中, 把以 10% FeCl_3 溶液预先饱和的滤纸 (2x4mm) 直接置于腔静脉上从而诱导血栓形成。暴露 3 分钟后, 将滤纸拿走。应用滤纸后 30 分钟, 切出固定长度的含有血栓的静脉用以血小板分析。收集肝脏用以 RNA 分析。

[0459] RNA 分析

[0460] 从肝脏组织中抽提 RNA 用以因子 11 的实时 PCR 分析。结果以相对于 PBS 对照的因子 11 的抑制百分比来表示。如表 20 所示, 相比于 PBS 对照, ISIS 404071 处理导致因子 11 的 mRNA 的明显的剂量依赖的减少。相反, 相比于 PBS 对照, 华法林处理没有导致因子 11 的明显减少。

[0461] 表 20

[0462] 在 FeCl_3 诱导的静脉血栓形成模型中因子 11 的 mRNA 剂量依赖的降低

[0463]

处理	剂量 mg/kg	% 抑制
华法林	0.5	0
	1	0
	2	1
	3	5
	4	8
	5	11
ISIS 404071	1.25	0
	2.5	8
	5	62
	10	78
	20	92
	40	96

[0464]

[0465] 血小板组分的定量

[0466] 用血小板因子-4 (PF-4) 的实时 PCR 定量方法来定量腔静脉中的血小板, 从而测定血栓形成。用与两个以 PBS 处理的对照组的 PF-4 相比的, 经 ISIS 404071 或华法林处理的小鼠体内的 PF-4 的百分比来表示结果。如表 21 所示, 相比于 PBS 对照, 5mg/kg 和更高剂量的 ISIS 404071 处理导致 PF-4 的剂量依赖的降低。相比于 PBS 对照, 2mg/kg 和更高剂量的华法林处理导致 PF-4 的降低。因此, 由此处提供的化合物引起的因子 11 的降低可用于抑

制血栓和凝结形成。

[0467] 表 21

[0468] 在 FeCl_3 诱导的静脉血栓形成模型中以 PF-4 的实时 PCR 定量分析血栓形成

[0469]

	剂量 mg/kg	PF-4
PBS- FeCl_3		0
PBS+ FeCl_3		100
华法林	0.5	128
	1	124
	2	80
	3	21
	4	12
	5	33
ISIS 404071	1.25	143
	2.5	120
	5	95
	10	21
	20	37
	40	20

[0470] 例 12 :与华法林相比,在尾巴失血试验中小鼠因子 11 的反义抑制的体内影响

[0471] 处理

[0472] 测定尾巴失血以观察 ISIS 404071 或华法林处理是否导致小鼠内出血。在尾巴失血试验中评估了 ISIS 404071 和华法林 (COUMADIN)。以 1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg 或 40mg/kg 的 ISIS 404071 处理六组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。以 0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg 和 5mg/kg 华法林处理另外 6 组 BALB/c 小鼠,腹腔内给药,每天一次,共 6 天。以 PBS 处理一个单独对照组的 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。

[0473] 尾巴失血试验

[0474] ISIS 404071、华法林或 PBS 最后处理后两天,将小鼠置于尾巴失血室中。小鼠在异氟烷室中麻醉,用无菌剪刀割下小段尾巴(离尖端约 4mm)。割下的尾巴立刻置于装有约 10mL 加热至 37℃的 0.9% NaCl 缓冲溶液的 15mL 的 Falcon 管中。40 分钟后收集血液。在放血前后将装有盐溶液的管进行称重。结果在表 22 中提供。

[0475] 与 PBS 处理的小鼠相比,ISIS 404071 处理没有影响出血。然而,与 PBS 对照相比,华法林确实增加了出血。华法林剂量的增加与失血增加正相关。这些数据表明此处提供的化合物导致出血的可能性低,尤其与华法林相比。由例 11 所提供的结果获得的这些数据表明用此处所述化合物抑制因子 11 对提供抗血栓形成活性有用,并且无失血风险。

[0476] 表 22

[0477] 在 FeCl_3 诱导的静脉血栓形成模型中的尾巴失血试验

[0478]

处理	剂量 mg/kg	血液 (g)
PBS	0	0.01
华法林	0.5	0.07
	1	0.35
	2	0.39
	3	0.51
	4	0.52
	5	0.76
ISIS 404071	1.25	0.00
	2.5	0.00
	5	0.03
	10	0.00
	20	0.06

[0479]

	40	0.03
--	----	------

[0480] 例 13 :与华法林相比,小鼠因子 11 的反义抑制对 PT 和 aPTT 的体内影响

[0481] 处理

[0482] 用来自经 ISIS 404071 或华法林处理的小鼠的 PPP 测定 PT 和 aPTT。以 1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg 或 40mg/kg 的 ISIS 404071 处理六组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。以 0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg 和 5mg/kg 华法林处理另外 6 组 BALB/c 小鼠,腹腔内给药,每天一次,共 6 天。在对照组中,以 PBS 处理 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。在最后剂量给药两天后,收集 PPP,进行 PT 和 aPTT 试验。

[0483] PT 和 aPTT 试验

[0484] 表 16 提供的 PT 和 aPTT 值以国际标准化比值 (INR) 来表示。把每一实验组的 PT 或 aPTT 值 (也就是以 5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg 和 50mg/kg ISIS 404071 处理) 除以 PBS 处理的组的 PT 或 aPTT,即测定了 PT 或 aPTT 的 INR 值。将该比值以采用的组织因子的国际敏感度指数 (ISI) 进行加幂。如表 23 所示,经华法林处理小鼠的 PT 在每个剂量都被明显延长。华法林处理小鼠的 aPTT 延长了,尤其在 1mg/kg 和更高剂量时。ISIS 404071 没有明显影响 PT,但延长了 aPTT;但没有经华法林处理小鼠那么明显。这些结果表明 ISIS 404071 影响了接触激活通路,但没有影响血液凝结的外源性途径,然而,华法林对血液凝结的接触激活通路和外源性通路都有影响。

[0485] 表 23

[0486] BALB/c 小鼠中 ISIS 404071 和华法林对 PT 和 aPTT 的影响

[0487]

处理	剂量 mg/kg	PT INR	aPTT INR
华法林	0.5	1.41	1.10
	1	2.03	1.31
	2	2.77	1.54
	3	22.76	2.90
	4	6.74	2.18

[0488]

	5	9.20	2.29
ISIS 404071	1.25	0.99	0.98
	2.5	1.01	1.03
	5	1.07	1.09
	10	1.08	1.29
	20	1.09	1.32
	40	0.98	1.64

[0489] 例 14 :与阿哌沙班相比,在 FeCl_3 诱导的静脉血栓形成 (VT) 模型中小鼠因子 11 的反义抑制的体内影响

[0490] 处理

[0491] 在 FeCl_3 诱导的 VT 小鼠模型中评估了 ISIS 404071 和阿哌沙班。以 1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg 或 40mg/kg 的 ISIS 404071 处理六组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。在接受 ISIS 404071 的最后一次剂量后 2 天,将 150mg/kg 氯胺酮和 10mg/kg 甲苯噻嗪混合后通过腹腔内注射使小鼠麻醉。以 0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg 和 5mg/kg 阿哌沙班处理另外 6 组 BALB/c 小鼠,一次皮下给药。接受阿哌沙班后 20 分钟,将 150mg/kg 氯胺酮和 10mg/kg 甲苯噻嗪混合后通过腹腔内注射使小鼠麻醉。以 PBS 处理两个对照组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。PBS 的最后一次剂量后 2 天,将 150mg/kg 氯胺酮和 10mg/kg 甲苯噻嗪混合后通过腹腔内注射使小鼠麻醉。除第一对照组外的所有小鼠以 FeCl_3 诱导血栓形成。

[0492] 在进行 FeCl_3 处理的小鼠中,把以 10% FeCl_3 溶液预先饱和的滤纸 (2x4mm) 直接置于腔静脉上,从而诱导血栓形成。暴露 3 分钟后,将滤纸拿走。应用滤纸后 30 分钟,切出固定长度的含有血栓的静脉用以血小板分析。收集肝脏用以 RNA 分析。

[0493] RNA 分析

[0494] 从肝脏组织中抽提 RNA 用以因子 11 的实时 PCR 分析。结果以相对于 PBS 对照的因子 11 的抑制百分比来表示。如表 24 所示,相比于 PBS 对照,ISIS 404071 处理导致因子 11 的 mRNA 的明显剂量依赖的降低。相反,相比于 PBS 对照,阿哌沙班处理没有导致因子 11 的明显降低。

[0495] 表 24

[0496] 在 FeCl_3 诱导的静脉血栓形成模型中因子 11 的 mRNA 剂量依赖的降低

[0497]

	剂量 mg/kg	% % 抑制
阿哌沙班	0.5	5
	2	8
	5	12
	10	2
	20	0
ISIS 404071	1.25	15
	2.5	44
	5	63
	10	76
	25	91
	50	95

[0498] 血小板成分的定量

[0499] 用血小板因子-4 (PF-4) 的实时 PCR 定量方法来定量腔静脉中的血小板, 从而测定血栓形成。如表 25 所示, 相比于 PBS 对照, ISIS 404071 处理导致了 PF-4 的减少。相比于 PBS 对照, 阿哌沙班处理也导致了 PF-4 的减少。用与两个以 PBS 处理的对照组相比的, 经 ISIS404071 或阿哌沙班处理的小鼠的 PF-4 百分比来表示结果。

[0500] 表 25

[0501] 在 FeCl_3 诱导的静脉血栓形成模型中以 PF-4 的实时 PCR 定量方法分析血栓形成

[0502]

处理	剂量 mg/kg	PF-4
PBS- FeCl_3		0
PBS+ FeCl_3		100
阿哌沙班	0.5	67
	2	46
	5	15
	10	5
	20	26
ISIS 404071	1.25	42
	2.5	87
	5	60

[0503]

	10	28
	25	14
	50	4

[0504] 例 15 : 在尾巴失血试验中, 小鼠因子 11 的反义抑制的体内效果与阿哌沙班的比较

[0505] 处理

[0506] 测定尾巴失血以观察 ISIS 404071 或华法林处理是否导致小鼠内出血。在尾巴失血模型中评估了 ISIS 404071 和阿哌沙班。以 1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg 或 40mg/kg 的 ISIS 404071 处理六组 BALB/c 小鼠, 皮下给药, 一周两次, 共 3 周。以 0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg 和 5mg/kg 阿哌沙班处理另外 6 组 BALB/c 小

鼠,一次单一皮下剂量给药。以 PBS 处理一个单独对照组的 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。

[0507] 尾巴失血试验

[0508] ISIS 404071、阿哌沙班或 PBS 最后处理后两天,将小鼠置于尾巴失血室中。小鼠在室中麻醉,用无菌剪刀割下小段尾巴(离尖端约 4mm)。割下的尾巴立刻置于装有约 10mL 加热至 37℃的 0.9% NaCl 缓冲溶液的 15mL Falcon 管中。40 分钟后收集血液。在放血前后将装有盐溶液的管进行称重。

[0509] 如表 26 所示,与 PBS 处理的小鼠相比,ISIS 404071 处理没有影响出血。然而,与 PBS 对照相比,阿哌沙班确实增加了出血。阿哌沙班剂量的增加与失血增加正相关。这些数据表明此处提供的化合物导致出血的可能性低,尤其是与阿哌沙班相比。由例 14 中提供的结果获得的这些数据表明用此处所述化合物抑制因子 11 对抗血栓形成有用,并且无失血风险。

[0510] 表 26

[0511] BALB/c 小鼠的尾巴失血试验

[0512]

	mg/kg	血液 (g)
PBS	0	0.06
阿哌沙班	0.5	0.03
	2	0.34
	5	0.37
	10	0.40

[0513]

	20	0.52
ISIS 404071	1.25	0.00
	2.5	0.03
	5	0.00
	10	0.04
	25	0.01
	50	0.01

[0514] 例 16 :与依诺肝素钠结合的小鼠因子 11 的反义抑制的间接体内效果

[0515] 处理

[0516] 以 10mg/kg、20mg/kg 或 40mg/kg ISIS 404071 处理三组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。以 PBS 处理对照组小鼠,一周两次给药,共 3 周。最后剂量后五天,处死小鼠并收集血浆。以 0g/ml、2.5g/ml、5.0g/ml 和 7.5g/ml 不同剂量的低分子量 (LMW) 肝素,依诺肝素钠间接体内给药至血浆。依诺肝素钠给药后 20 分钟测定 PT 和 aPTT。

[0517] PT 和 aPTT 试验

[0518] 如表 27 所示,依诺肝素钠处理以剂量依赖的方式提高了 PT。ISIS 404071 处理没有明显提高 PT。PT 没有被 ISIS 404071 处理明显影响。在 ISIS 404071 和依诺肝素钠处理血浆中,没有显示出对 PT 的组合影响。

[0519] 表 27

[0520] ISIS 404071 和依诺肝素钠组合对小鼠血浆中 PT INR 的影响

[0521]

ISIS 404071 (mg/kg)	依诺肝素钠 (mg/ml)			
	0	2.5	5.0	7.5
0	1.00	1.02	1.10	1.12
10	0.97	1.07	1.10	1.12
20	1.00	1.10	1.07	1.10
40	0.97	1.02	1.07	1.10

[0522] 如表 28 所示,依诺肝素钠处理以剂量依赖的方式提高了 aPTT。ISIS 404071 处理也以剂量依赖的方式提高了 aPTT。而且,ISIS 404071 和依诺肝素钠组合处理似乎对 aPTT 有协同效应。

[0523] 表 28

[0524] ISIS 404071 和依诺肝素钠组合对小鼠血浆中 PT INR 的影响

[0525]

ISIS 404071 mg/kg	依诺肝素钠(mg/ml)			
	0	2.5	5.0	7.5
0	1.00	1.53	2.10	2.70
10	1.14	1.76	2.39	3.20
20	1.28	1.95	2.83	3.65
40	1.52	2.66	n.d.	4.78

[0526] n. d. = 没有数据

[0527] 例 17 :在 FeCl_3 诱导的静脉血栓形成 (VT) 模型中,小鼠因子 11 的反义抑制与依诺肝素钠联用的体内影响

[0528] 处理

[0529] 在 FeCl_3 诱导的 VT 小鼠模型中评估了 ISIS 404071 和依诺肝素钠组合。以 15mg/kg、30mg/kg、45mg/kg 或 60mg/kg 依诺肝素钠处理四组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一天一次,共 3 天。以 20mg/kg ISIS 404071 处理另外四组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。ISIS 404071 的最后剂量后,以 15mg/kg、30mg/kg、45mg/kg 或 60mg/kg 依诺肝素钠处理小鼠,皮下给药,一天一次,共 3 天。以 PBS 处理两个对照组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。除第一对照组外的所有小鼠以 FeCl_3 诱导血栓形成。将 150mg/kg 氯胺酮和 10mg/kg 甲苯噻嗪混合后通过腹腔内注射使所有小鼠麻醉。

[0530] 在经受 FeCl_3 处理的小鼠中,把以 10% FeCl_3 溶液预先饱和的滤纸 (2x4mm) 直接置于腔静脉上,从而诱导血栓形成。暴露 3 分钟后,将滤纸拿走。应用滤纸后 30 分钟,切出固定长度的含有血栓的静脉用以血小板分析。

[0531] 血小板成分的定量

[0532] 用 PF-4 的实时 PCR 定量来定量腔静脉中的血小板,作为衡量血栓形成的指标。如

表 29 所示,相比于 PBS 对照,依诺肝素钠处理导致了 PF-4 的降低。相比于单独依诺肝素钠,依诺肝素钠与 ISIS 404071 组合处理导致 PF-4 更高的降低。

[0533] 表 29

[0534] 在 FeCl_3 诱导的静脉血栓形成模型中以 PF-4 的实时 PCR 定量分析血栓形成

[0535]

处理	mg/kg	PF-4
PBS- FeCl_3		0
PBS+ FeCl_3		100
依诺肝素钠	15	57
	30	33
	45	10
	60	5
依诺肝素钠(+ ISIS 404071)	15	0
	30	0
	45	11
	60	5

[0536] 例 18:小鼠因子 11 的反义抑制与依诺肝素钠的组合对体内失血的影响

[0537] 处理

[0538] 测定尾巴失血以观察 ISIS 404071 和依诺肝素钠处理是否导致小鼠内出血。以 20mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于四组 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周,在 ISIS 404071 处理的最后三天将 15mg/kg、30mg/kg、45mg/kg 和 60mg/kg 不同剂量的依诺肝素钠以每天一次皮下给药。在第五组中,将 20mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周。在第六组中,将 PBS 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共三周,作为对照。

[0539] 尾巴失血试验

[0540] 最后处理后两天,将小鼠置于尾巴失血室中。小鼠在异氟烷室中麻醉,用无菌剪刀割下小段尾巴(离尖端约 4mm)。割下的尾巴立刻置于装有约 10mL 加热至 37℃的 0.9% NaCl 缓冲溶液的 15mL Falcon 管中。40 分钟后收集血液。在出血前后对充有盐溶液的管进行称重。

[0541] 如表 30 所示,与 PBS 处理的小鼠相比,依诺肝素钠处理增加了小鼠出血。依诺肝素钠剂量的增加与失血增加正相关。ISIS 404071 和依诺肝素钠组合处理所导致的失血增加没有明显地超过仅以依诺肝素钠处理的失血增加。

[0542] 表 30

[0543] 比较诺肝素钠与依诺肝素钠和 ISIS 404071 联用的尾巴失血试验

[0544]

	剂量 mg/kg	血液 (g)
PBS		0.05
依诺肝素钠	15	0.11
	30	0.20
	45	0.27
	60	0.47
依诺肝素钠(+ ISIS 404071)	15	0.14
	30	0.19
	45	0.36
	60	0.61

[0545] 例 19 :小鼠因子 11 的反义抑制与依诺肝素钠组合对 PT 和 aPTT 的体内影响

[0546] 处理

[0547] 用来自经 ISIS 404071 和依诺肝素钠组合处理的小鼠的 PPP 测定 PT 和 aPTT。在第一群中,将 25mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周。在接受最后剂量的 ISIS 404071 后 5 天收集这些小鼠的血浆。在第二群中,将 20mg/kg 剂量的依诺肝素钠皮下给药于 BALB/c 小鼠,一天一次,共 3 天。在接受最后剂量的依诺肝素钠后 4 小时收集这些小鼠的血浆。第三群中,将 20mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周,在接受最后剂量的 ISIS 404071 后 2 天,将 20mg/kg 剂量的依诺肝素钠一天一次皮下给药。在最后剂量的依诺肝素钠后 4 小时收集这些小鼠的血浆。在第四组中,将 PBS 皮下给药,一周两次,共三周,作为对照。在最后剂量后 5 天收集这些小鼠的血浆。

[0548] PT 和 aPTT 试验

[0549] 表 31 提供的 PT 和 aPTT 值以国际标准化比值 (INR) 来显示。如表 31 所示, ISIS 404071 或依诺肝素钠处理或 ISIS 404071 联合依诺肝素钠处理,没有明显地影响 PT。这些数据表明 ISIS 404071 联合依诺肝素钠对 PT 没有联合影响。也如表 31 所示,依诺肝素钠处理以及 ISIS 404071 联合依诺肝素钠处理提高了 aPTT。这些数据表明 ISIS 404071 和依诺肝素钠联合处理对 aPTT 有累加作用。

[0550] 表 31

[0551] ISIS 404071 和依诺肝素钠组合对小鼠血浆中 PT 和 aPTT 的影响

[0552]

	PT INR	aPTT INR
ISIS 404071	0.95	1.31
依诺肝素钠	1.04	2.04
404071+依诺 肝素钠	1.04	2.58

[0553] 例 20 :小鼠因子 11 的反义抑制与阿哌沙班的组合对 PT 和 aPTT 的体内影响

[0554] 处理

[0555] 用来自经 ISIS 404071 和阿哌沙班联合处理的小鼠的 PPP 测定 PT 和 aPTT。在第一群中,将 25mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周。在接受最后剂量的 ISIS 404071 后 5 天收集这些小鼠的血浆。在第二群中,将 6mg/kg 剂量的阿哌沙班皮下给药于 BALB/c 小鼠,一天一次,共 3 天。在接受最后剂量的阿哌沙班后 20 分钟收集这些小鼠的血浆。第三群中,将 20mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周,在 ISIS 404071 处理的最后三天,将 6mg/kg 剂量的阿哌沙班一天两次皮下给药。在接受最后剂量的阿哌沙班后 20 分钟收集这些小鼠的血浆。在第四组中,将 PBS 皮下给药,一周两次,共三周,作为对照。在最后剂量的 PBS 后 5 天收集血浆。

[0556] PT 和 aPTT 试验

[0557] 表 32 提供的 PT 和 aPTT 值以国际标准化比值 (INR) 来显示。如表 32 所示,ISIS 404071 处理没有明显影响 PT。然而阿哌沙班以及阿哌沙班和 ISIS 404071 联用提高了 PT。也如表 32 所示,阿哌沙班、ISIS 404071 以及 ISIS 404071 和阿哌沙班的组合提高了 aPTT。

[0558] 表 32

[0559] ISIS 404071 和阿哌沙班联用对小鼠血浆中 PT 和 aPTT 的影响

[0560]

	PT INR	aPTT INR
ISIS 404071	0.95	1.31
阿哌沙班	3.25	1.44
404071+阿哌沙班	3.50	2.26

[0561] 例 21 :小鼠因子 11 的反义抑制与华法林的组合对 PT 和 aPTT 的体内影响

[0562] 处理

[0563] 用来自经 ISIS 404071 和华法林联合处理的小鼠的 PPP 测定 PT 和 aPTT。以 25mg/kg 或者 50mg/kg ISIS 404071 处理两组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。在最后剂量后 5 天收集每组的血浆。在第三组中,将 20mg/kg 剂量的华法林处理 BALB/c 小鼠,一天一次,共 5 天。在最后剂量的华法林给药后 6 小时收集血浆。将 25mg/kg 或 50mg/kg 的 ISIS 404071 皮下给药于另外两组 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周,在 ISIS 404071 处理的最后 5 天,将 2mg/kg 剂量的华法林一天一次皮下给药。在最后华法林处理后 6 小时收集每组的血浆。在最后一组 BALB/c 小鼠中,将 PBS 皮下给药,一周两次,共三周,作为对照。在最后 PBS 处理后 5 天收集血浆。

[0564] PT 和 aPTT 试验

[0565] 表 33 提供的 PT 和 aPTT 值以国际标准化比值 (INR) 来显示。如表 33 所示,在任一剂量下 PBS 或 ISIS 404071 处理都没有影响 PT。然而,2mg/kg 华法林、25mg/kg ISIS 404071 与 2mg/kg 华法林联用以及 50mg/kg ISIS 404071 和 2mg/kg 华法林联用提高了 PT。这些数据表明 ISIS 404071 和华法林联合处理对 PT 有累加作用。也如表 33 所示,ISIS 404071 和华法林处理影响了 aPTT。ISIS 404071 和华法林联用比两种药物单独使用表现出更大的 aPTT 提高。这些数据表明 ISIS 404071 和华法林联合处理对 aPTT 有累加作用。

[0566] 表 33

[0567] ISIS 404071 和华法林联用对小鼠血浆中 PT 和 aPTT 的影响

[0568]

	剂量 mg/kg	PT INR	aPTT INR
ISIS 404071	25	0.98	1.37
	50	0.93	1.49
华法林	2	21.33	2.52
ISIS 404071(+华法林)	25	25.77	4.45
	50	36.33	4.75

[0569] 例 22 :小鼠因子 11 的反义抑制对小鼠肠系膜静脉血栓形成的体内抗血栓形成作用处理

[0570] 第一群中,将 50mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 C57BL/6 小鼠,一周两次,共 3 周。第二组中,将 50mg/kg 剂量的对照寡核苷酸 ISIS 405277 (AAGGACCTACACTATGGAAT ; 因子 2 的反义寡核苷酸,以 SEQ ID NO :12 并入本申请)皮下给药于 C57BL/6 小鼠,一周两次,共 3 周。

[0571] 血小板制备

[0572] 用穿刺法从天然 C57BL/6 小鼠的后眼窝静脉丛收集血液,收集在含有 300 μ l 肝素 (30U/ml) 的聚丙烯管中。以 1000rpm 离心 5 分钟获取富血小板血浆 (PRP)。将 PRP 转移至含有 2 μ l 前列腺素 I₂ (PGI₂) (2 μ g/ml) 的新试管中,在 37℃ 下孵育 5 分钟。以 2600rpm 离心后,沉淀块重悬于含 2 μ l PGI₂ 的 1ml 经改良的 Tyrode' s-HEPES 缓冲液 (137mM NaCl, 0.3mM Na₂HPO₄, 2mM KCl, 12mM NaHCO₃, 5mM HEPES, 5mM glucose, 0.35% BSA, pH 7.2) 中,并在 37℃ 下孵育 5 分钟。将悬浮的团粒以 2600rpm 离心 5 分钟。为了去除 PGI₂,洗涤步骤重复两次,血小板以 2.5 μ g/mL 钙黄绿素 AM (Molecular Probes, Eugene, OR) 在室温下荧光标记 10 分钟。

[0573] 血栓形成的活体显微观察

[0574] 将荧光标记的血小板静脉注射至经 ISIS 404071 处理和经对照寡核苷酸处理的 C57BL/6 小鼠中。以 2.5% 阿佛丁麻醉小鼠,以约 150s⁻¹ 的剪切速率切开腹腔壁以暴露 250-300 μ m 直径的肠系膜静脉。在实验过程中通过用温 (37℃) PBS 周期性灌流使暴露的肠系膜保持湿润。肠系膜以 12V、100WDC 稳定电源穿腔。静脉以连接至 SVHS 录像机 (AG-6730 ; 松下, 东京, 日本) 的 Zeiss (德国) Axiovert 135 倒置显微镜 (物镜 32X) 及 CCD 摄像机 (滨松光学系统公司, 滨松市, 日本) 进行成像。用光学多普勒测速仪 (微循环研究所, 德克萨斯 A&M 医学院, 大学城, 德克萨斯) 测量中心线红细胞流速 (V_{rbc})。根据牛顿流体的泊肃叶定律, $\tau = 8(V_{mean}/D_v)$, 计算小静脉剪切速率 (τ), 其中 D_v 是小静脉的直径, 用经验公式 $V_{mean} = V_{rbc}/1.6$ 由测量获得的 V_{rbc} 估计出 V_{mean} 。

[0575] 结果分析

[0576] 在最后一次反义寡核苷酸注射两天后进行肠系膜静脉血栓形成。把在 10% FeCl₃ 溶液中吸收 5 分钟的 Whatman 纸置于肠系膜静脉上而诱导血栓形成。监测静脉 40 分钟或直至闭塞。观察了首次形成直径为 30-50 μ m 的血栓前所经过的时间以及血液停流 30 秒前所经过的时间。

[0577] 在经 ISIS 404071 处理的小鼠中血栓形成 (直径为 30 μ m) 发生在 14.8 $\pm$ 1.7 分钟。在对照小鼠中血栓形成 (直径为 30 μ m) 发生在 8.9 $\pm$ 0.6 分钟。在对照小鼠中,在

19.3±0.8 分钟形成了闭塞的血栓并且所有损伤的静脉都闭塞了。相反,在经 ISIS 404071 处理的小鼠中,当损伤后 40 分钟停止观察时以及那些静脉显示闭塞时,大部分静脉没有闭塞。在经 ISIS 404071 处理的小鼠中,显示闭塞的唯一静脉在 29.5 分钟时闭塞,5 分钟后重新开放,发生在研究结束之前。

[0578] 例 23:用于 BALB/c 小鼠体内反义抑制小鼠因子 11 的同义寡核苷酸解毒剂

[0579] 处理

[0580] 在 BALB/c 小鼠中测试了 ISIS 404071 的特异性同义寡核苷酸作为解毒剂的作用。第一群中,将 40mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周。第二组中,将 40mg/kg 剂量的 ISIS 404057 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周。在 ISIS404071 或 404057 最后处理后 48 小时,将 ISIS 404071 特异性解毒剂 ISIS 418026(CCTCTGAAAGTGGATTACCA;与 ISIS 404071 互补,以 SEQ ID NO:13 并入本申请)以 90mg/kg 的单一注射量皮下给药于两群小鼠。第三群中,将 40mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共 3 周。在 ISIS 404071 最后处理后,对小鼠皮下注射 PBS。在第四群中,将 40mg/kg 剂量的 ISIS 404057 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共三周。在 ISIS 404057 最后处理后,对小鼠皮下注射 PBS。在解毒剂给药后 12 小时、1 天、2 天、3 天、7 天和 14 天时,将每群中一组 4 只小鼠处死。收集完整肝脏进行 RNA 分析,收集 PPP 用于 aPTT 分析。

[0581] RNA 分析

[0582] 从肝脏组织中抽提 RNA 用以因子 11 的实时 PCR 分析。结果以相对于 PBS 对照的因子 11 的抑制百分比来表示。如表 34 所示,在 14 天的观察周期,经 ISIS 404071 处理但未经解毒剂处理的小鼠表现出抑制的逐渐降低。然而,与未经解毒剂处理的小鼠相比,在 14 天的观察周期,经 ISIS 404071 和解毒剂处理的小鼠表现出抑制的加速降低。也如表 34 所示,在经 ISIS 404057 处理的小鼠中,ISIS 418026 处理对于因子 11 的 mRNA 表达的抑制没有影响。

[0583] 表 34

[0584] 与 PBS 对照相比,小鼠因子 11mRNA 的抑制百分比

[0585]

	12 小时:	1 天:	2 天:	3 天:	7 天:	14 天:
ISIS 404071	93	90	89	88	81	67
ISIS 404071 + ISIS 418026	90	87	72	66	57	31
ISIS 404057	n.d.	n.d.	n.d.	95	n.d.	n.d.
ISIS 404057 + ISIS 418026	n.d.	n.d.	n.d.	97	n.d.	n.d.

[0586] n. d. =没有数据

[0587] aPTT 分析

[0588] 如表 35 所示,在 14 天的观察周期中,相比于经 ISIS 404071 处理但未经解毒剂处理的小鼠,经 ISIS 404071 和解毒剂 (ISIS 418026) 处理的小鼠表现出 aPTT 的逐渐降低。

[0589] 表 35

[0590] 解毒剂处理对 aPTT INR 的影响

[0591]

	12 小时:	1 天:	2 天:	3 天:	7 天:	14 天:
ISIS 404071	1.51	1.30	1.35	1.27	1.18	1.05
ISIS 404071 + ISIS 418026	1.45	1.23	1.16	1.15	1.10	0.95

[0592] 例 24 :用于体内反义抑制 BALB/c 小鼠中小鼠因子 11 的因子 7a 蛋白解毒剂

[0593] 处理

[0594] 在 BALB/c 小鼠中测试了人因子 7a(因子 VIIa) 蛋白作为 ISIS 404071 的解毒剂的作用。以 20mg/kg ISIS 404071 处理两个实验组的 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。以 PBS 处理两个对照组 BALB/c 小鼠,皮下给药,一周两次,共 3 周。除第一对照组外的所有小鼠以 FeCl₃ 诱导血栓形成。在 FeCl₃ 处理前 15 分钟,以 5 μg/kg 人因子 7a 蛋白解毒剂(产品号 407act,American Diagnostica Inc.) 处理第一实验组。在最后一次剂量后 2 天,将 150mg/kg 氯胺酮和 10mg/kg 甲苯噻嗪混合后通过腹腔内注射麻醉所有小鼠。

[0595] 在经受 FeCl₃ 处理的小鼠中,把以 10% FeCl₃ 溶液预先饱和的滤纸(2x4mm) 直接置于腔静脉上,从而诱导血栓形成。暴露 3 分钟后,将滤纸拿走。应用滤纸后 30 分钟,切出固定长度的含有血栓的静脉用以血小板分析。

[0596] 血小板组成的定量

[0597] 用血小板因子-4(PF-4) 的实时 PCR 定量来定量腔静脉中的血小板,作为血栓形成的指标。结果表示为经解毒剂处理和未处理小鼠相比于两组 PBS 处理的对照组的 PF-4 的百分比。如表 36 所示,相比于以 ISIS 404071 单独处理的动物,经人因子 7a 蛋白解毒剂处理的动物表达了更多的 PF-4。这些数据显示人因子 7a 成功地回救了反义寡核苷酸的抑制作用。

[0598] 表 36

[0599] 在 FeCl₃ 诱导的静脉血栓形成模型中,通过 PF-4 的实时 PCR 定量分析血栓形成

[0600]

处理	PF-4
PBS-FeCl ₃	0
PBS+FeCl ₃	100
ISIS 404071	18
ISIS 404071+hFV7a	68

[0601] 例 25 :在胶原酶诱导脑出血模型中小鼠因子 11 的体内反义抑制

[0602] 处理

[0603] 在胶原酶诱导脑出血模型中检测了 ISIS 404071 和华法林(COUMADIN)。第一群中,将 40mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共两周。第二组中,将 2mg/kg 剂量的华法林腹腔给药于小鼠,一周两次,共两周。在第三群中,将 40mg/kg 剂量的 ISIS 421208(TCGGAAGCGACTCTTATATG,与小鼠因子 118 个错配,以 SEQ ID NO:14 并入本申请) 皮下给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共两周。在第四群中,将 PBS 给药于 BALB/c 小鼠,一周两次,共两周。

[0604] 最后剂量处理后两天,将所有群的所有小鼠用 5 μg/g 阿佛丁麻醉。然后,用含 0.075U 胶原酶(150U/mL) 的 10 μL 的 Hamilton 注射器从前顶平颅骨的 -1mm AP、1mm R ML

和 -4mm DV 处注射小鼠。胶原酶在 5 分钟内注完, 针头在该处多保持 5 分钟以防止逆流。然后分析小鼠的出血规模、神经功能评分以及死亡率。

[0605] 表 37 提供了经胶原酶处理后在小鼠中检测到的出血体积。表 38 提供了小鼠的神经功能评分, 表 39 提供了小鼠的死亡率。以标准评分体系测算神经缺陷, 其中, 无缺陷为 0, 严重缺陷为 5。总体而言, 数据表明对 ISIS 404071 对小鼠的出血规模、神经功能评分或死亡率没有明显影响。因此, 与华法林处理的小鼠相比, ISIS 404071 处理的小鼠脑内出血的风险 (华法林处理个体的危险系数) 显著降低。

[0606] 表 37

[0607] 胶原酶处理后的出血体积

[0608]

	体积 (mm ³)
PBS	51
ISIS 421208	41
ISIS 404071	38

[0609] 表 38

[0610] 胶原酶处理后的神经功能评分

[0611]

	分值
PBS	2.4
ISIS 421208	2.0
ISIS 404071	3.8

[0612] 表 39

[0613] 胶原酶处理后的死亡率

[0614]

	% 死亡率
PBS	0
ISIS 421208	0
ISIS 404071	20
华法林	80

[0615] 例 26 : 在 FeCl₃ 诱导的静脉血栓形成 (VT) 模型中小鼠因子 11 的反义抑制与波立维 (PLAVIX) 组合的体内作用

[0616] 处理

[0617] 在 FeCl₃ 诱导的 VT 小鼠模型中评估了 ISIS 404071 和波立维的联用。以 6.25mg/kg、12.50mg/kg、25.00mg/kg 或 50.00mg/kg 波立维处理四组 8 只每只重约 25g 的 BALB/c 小鼠。手术前两小时, 小鼠在第一天给药两个剂量的波立维, 第二天给药一个剂量的波立维。

[0618] 以 20mg/kg ISIS 404071 处理另外四组 8 只每只重约 25g 的 BALB/c 小鼠, 皮下给药, 一周两次, 共三周。在 ISIS 404071 的最后剂量后, 以 6.25mg/kg、12.50mg/kg、25.00mg/kg 或 50.00mg/kg 波立维处理小鼠。手术前两小时, 小鼠在第一天给药两个剂量的波立维, 第二天给药一个剂量的波立维。

[0619] 两个对照组共 8 只, 每只重约 25g 的 BALB/c 小鼠不用 ISIS 404071 或波立维处理。不用波立维处理而用 20mg/kg ISIS 404071 处理另外两个对照组共 8 只, 每只重约 25g 的 BALB/c 小鼠, 皮下给药, 一周两次, 共三周。除第一和第三对照组外的所有小鼠以 FeCl_3 诱导血栓形成。将 150mg/kg 氯胺酮和 10mg/kg 甲苯噻嗪混合后通过腹腔内注射使所有小鼠麻醉。

[0620] 在经受 FeCl_3 处理的小鼠中, 把以 10% FeCl_3 溶液预先饱和的滤纸 (2x4mm) 直接置于下腔静脉上, 从而诱导血栓形成。暴露 3 分钟后, 将滤纸拿走。应用滤纸后 30 分钟, 切出固定长度的含有血栓的静脉用以血小板分析。

[0621] 血小板组成的定量

[0622] 用 PF-4 的实时 PCR 定量来定量腔静脉中的血小板, 作为血栓形成的指标。如表 40 所示, 相比于 PBS 对照, 波立维处理导致了 PF-4 的减少。相比于单独以波立维处理, 波立维与 ISIS 404071 组合处理导致 PF-4 更高地降低。因此, 抗血小板治疗和因子 11 ASO 联用增强了抗血栓形成活性。结果表示为相对于 PBS+ FeCl_3 对照的 PF-4mRNA 百分比。

[0623] 表 40

[0624] 在 FeCl_3 诱导的静脉血栓形成模型中通过 PF-4 的实时 PCR 定量分析血栓形成

[0625]

处理	ISIS 404071 mg/kg	PLAVIX mg/kg	PF-4
PBS- FeCl_3	0	0	29
PBS+ FeCl_3	0	0	100
仅波立维	0	6.25	59
	0	12.50	37
	0	25.00	30
	0	50.00	30
ISIS 404071- FeCl_3	20	0	27
ISIS 404071+ FeCl_3	20	0	40
波立维 (+ ISIS 404071)	20	6.25	35
	20	12.50	38

[0626]

	20	25.00	25
	20	50.00	35

[0627] 例 27 : 小鼠因子 11 的反义抑制与波立维的组合在体内对失血的影响

[0628] 处理

[0629] 测定尾巴失血以观察 ISIS 404071 和波立维联用是否导致出血倾向的增加。将 20mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于五组 8 只 BALB/c 小鼠, 一周两次, 共 3 周。ISIS 404071 的最后剂量后, 以 0mg/kg、6.25mg/kg、12.50mg/kg、25.00mg/kg 或 50.00mg/kg 波立维处理小鼠。放血前两小时, 小鼠在第一天给药两个剂量的波立维, 第二天给药一个剂量的波立维。

[0630] 除了不注射 ISIS 404071 外, 另外 5 组 8 只 BALB/c 小鼠同样处理。

[0631] 尾巴失血试验

[0632] 最后处理后两小时,将小鼠置于尾巴失血室中。小鼠在异氟烷室中麻醉,用无菌剪刀割下小段尾巴(离尖端约4mm)。割下的尾巴立刻置于装有约10mL加热至37℃的0.9% NaCl 缓冲溶液的15mL Falcon 管中。收集血液40分钟。在放血前后将装有盐溶液的管进行称重。

[0633] 结合例26提供的结果,这些数据表明抗血小板治疗与因子11ASO联用增强了抗血栓形成活性,同时没有增加失血风险。

[0634] 表41

[0635] 比较波立维以及波立维和 ISIS 404071 联用的尾巴失血试验

[0636]

处理	ISIS 404071 mg/kg	PLAVIX mg/kg	血液 (g)
未处理	0	0	0.040
仅波立维	0	6.25 mg/kg	0.075
	0	12.50 mg/kg	0.205
	0	25.00 mg/kg	0.524
	0	50.00 mg/kg	0.628
仅 ISIS 404071	20 mg/kg	0	0
波立维 (+ ISIS 404071)	20 mg/kg	6.25 mg/kg	0.065
	20 mg/kg	12.50 mg/kg	0.300

[0637]

	20 mg/kg	25.00 mg/kg	0.401
	20 mg/kg	50.00 mg/kg	0.577

[0638] 例28:因子Xa小分子抑制剂与波立维联用对失血的体内影响

[0639] 处理

[0640] 测定尾巴失血以观察因子10a和波立维联合处理是否导致出血倾向的增加。以0mg/kg、6.25mg/kg、12.50mg/kg、25.00mg/kg或50.00mg/kg波立维处理五组每组8只BALB/c小鼠。放血前两小时,小鼠在第一天给药两个剂量的波立维,第二天给药一个剂量的波立维。

[0641] 以0mg/kg、6.25mg/kg、12.50mg/kg、25.00mg/kg或50.00mg/kg波立维处理另外五组每组8只BALB/c小鼠。放血前两小时,小鼠在第一天给予两个剂量的波立维,第二天给予一个剂量的波立维。放血前20分钟,还用0.5mg/kg阿哌沙班,一种小分子因子10a抑制剂,一次腹腔给药于这些小鼠。

[0642] 尾巴失血试验

[0643] 最后处理后两小时,将小鼠置于尾巴失血室中。小鼠在异氟烷室中麻醉,用无菌剪刀割下小段尾巴(离尖端约4mm)。割下的尾巴立刻置于装有约10mL加热至37℃的0.9% NaCl 缓冲溶液的15mL Falcon 管中。收集血液40分钟。在放血前后将装有盐溶液的管进行称重。

[0644] 如下面表42中所示,这些数据表明抗血小板治疗与如阿哌沙班等小分子因子10a

抑制剂联用增加了出血风险。因此,相比于抗血小板治疗与小分子因子 10a 抑制剂联用的安全性,抗血小板治疗与因子 11ASO 联用提供了更好的安全性。

[0645] 表 42

[0646] 比较波立维、阿哌沙班以及波立维和阿哌沙班联用的尾巴失血试验

[0647]

处理	阿哌沙班 mg/kg	PLAVIX mg/kg	血液 (g)
未处理	0	0	0.002
仅波立维	0	6.25 mg/kg	0.061
	0	12.50 mg/kg	0.149
	0	25.00 mg/kg	0.246
	0	50.00 mg/kg	0.258
仅阿哌沙班	0.5 mg/kg	0	0.004

[0648]

波立维 (+阿哌沙班)	0.5 mg/kg	6.25 mg/kg	0.258
	0.5 mg/kg	12.50 mg/kg	0.252
	0.5 mg/kg	25.00 mg/kg	0.361
	0.5 mg/kg	50.00 mg/kg	0.363

[0649] 例 29 :血液中体内小鼠因子 11 的反义介导的降低和相应抗凝作用的时间进程

[0650] 处理

[0651] 观察了 BALB/c 小鼠中小鼠因子 11mRNA 的反义介导的降低的时间进程。将一个 50mg/kg 剂量的 ISIS 404071 皮下给药于 BALB/c 小鼠。在 ISIS 404071 给药后 12 小时、1 天、2 天、3 天、4 天、7 天、14 天、28 天和 56 天时,将小鼠处死。收集完整肝脏用于 RNA 分析,收集 PPP 用于 aPTT 分析。对照组小鼠用一个皮下给药剂量的 PBS 处理。

[0652] RNA 分析

[0653] 从肝脏组织中抽提 RNA 用于因子 11 的实时 PCR 分析。结果以相对于 PBS 对照来表示。以 ISIS 404071 处理的小鼠在第一天表现出明显的因子 11mRNA 的下调。小鼠在第 14 天重新获得因子 11mRNA 的表达。小鼠在第 28 天重新获得了因子 11mRNA 的完全表达,第 56 天的结果表明因子的 mRNA 维持在处理前的水平。因此,ISIS 404071 处理的小鼠没有反弹效应。

[0654] 反弹效应以前在抗体介导的因子 11 的降低中观察到过(血液,第一版论文,2008 年 10 月 22 日在线提前出版;通过抑制因子 XI 预防血管移植物闭塞以及血栓相关的凝血发生)。因为因子 11 的过表达可以通过导致凝结增强而发生损害,这些数据表明反义介导的因子 11 抑制比抗体介导的因子 11 的抑制更安全,因为反义介导的因子 11 的抑制不会反弹。

[0655] aPTT 分析

[0656] 表 43 提供的 aPTT 值是以国际标准化比值 (INR) 来表示。把以 ISIS 404071 处理的小鼠的 aPTT 值除以用 PBS 处理组的小鼠的 aPTT 而确定 aPTT 的 INR 值。将该比值以采用的组织因子的国际敏感度指数 (ISI) 进行加幂。如表 43 所示,以 ISIS 404071 处理的小

鼠到第 4 天为止表现出 aPTT 的逐渐减少,然后从第 7 天到第 28 天逐渐地增加至处理前的水平。

[0657] 表 43

[0658] ISIS 404071 处理对 aPTT INR 的影响 *

[0659]

	12 小时:	第 1 天:	第 2 天:	第 3 天:	第 4 天:	第 7 天:	第 14 天:	第 28 天:	第 56 天:
ISIS 404071	0	1.02	1.12	1.29	1.30	1.25	1.11	1.02	0

[0660] * 表 43 中的数值是近似的

[0661] 例 30 :微步设计的寡核苷酸对 HepG2 细胞中人因子 11 的反义抑制

[0662] 根据 ISIS 416850 和 ISIS 416858(见上面表 8) 设计了额外的 gapmer。这些 gapmer 向 ISIS 416850 和 ISIS 416858 上游和下游略微移动(也就是“微步”)。微步 gapmer 是用 5-8-5MOE 或者 6-8-6MOE 结构域来设计的。

[0663] 体外测试了这些微步 gapmer。以将 8,000nM 反义寡核苷酸,用电穿孔转染密度为每孔 20,000 个细胞的培养的 HepG2 细胞。处理约 24 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。结果表示为相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比。

[0664] ISIS 416850 和 ISIS 416858,以及从表 1 和 8 挑选的 gapmer(也就是 ISIS 412206、ISIS 412223、ISIS 412224、ISIS 412225、ISIS 413481、ISIS 413482、ISIS 416825、ISIS 416848、ISIS 416849、ISIS 416850、ISIS 416851、ISIS 416852、ISIS 416853、ISIS 416854、ISIS 416855、ISIS 416856、ISIS 416857、ISIS 416858、ISIS 416859、ISIS 416860、ISIS 416861、ISIS 416862、ISIS 416863、ISIS 416864、ISIS 416865、ISIS 416866 和 ISIS 416867) 和微步 gapmer 一起在上述同样的条件下重新测试。

[0665] 表 44 中的嵌合型反义寡核苷酸被设计为 5-10-5MOE、5-8-5 和 6-8-6MOE gapmer。在表 44 中列出的前两条 gapmer 是用来通过微步设计 ISIS 445493-445543 的原始 gapmer(ISIS 416850 和 ISIS 416858),用星号指定。5-10-5gapmer 的长度为 20 个核苷酸,其中,中央间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边(在 5' 和 3' 方向)为各包含 5 个核苷酸的侧翼。5-8-5gapmer 的长度为 18 个核苷酸,其中,中央间隙区段由 8 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边(在 5' 和 3' 方向)为各包含 5 个核苷酸的侧翼。6-8-6gapmer 的长度为 20 个核苷酸,其中,中央间隙区段由 8 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边(在 5' 和 3' 方向)为各包含 6 个核苷酸的侧翼。对于这些结构域(5-10-5、5-8-5 和 6-8-6)的每一个,5' 侧翼区段中的每个核苷酸和 3' 侧翼区段中的每个核苷酸有 2'-MOE 修饰。每个 gapmer 中的核苷内连接是磷硫酰(P=S)连接。每条 gapmer 中的所有胞嘧啶残基都是 5-甲基胞嘧啶核苷。“人目标起始位点”是指人序列中 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“人目标终止位点”是指人序列中 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。表 44 中所列的每条 gapmer 靶向 SEQ ID NO:1(GENBANK 登录号 NM_000128.3)。表 44 中的每条 gapmer 也与此处标为 SEQ ID NO:274 的猕猴因子 11 基因序列可完全交叉反应(外显子 1-15GENBANK 登录号 NW_001118167.1)。

“猕猴起始位点”是指猕猴序列中 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“猕猴终止位点”是指猕猴序列中 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。

[0666] 如表 44 所示,所有微步设计的靶向 SEQ ID NO :1 的从目标起始位点 1275 开始,在目标终止位点 1317 终止(也就是核苷碱基 1275-1317)的目标区域的 gapmer 对因子 11 的 mRNA 都表现出至少 60% 的抑制。同样,来自表 1 和 8 的所有重新测试的 gapmer 也表现出至少 60% 的抑制。

[0667] 一些 gapmer 表现出至少 70 % 的抑制,包括 ISIS 编号:ISIS 412206、412224、412225、413481、413482、416825、416848、416849、416850、416851、416852、416853、416854、416855、416856、416857、416858、416859、416860、416861、416862、416863、416864、416865、416866、416867、445494、445495、445496、445497、445498、445499、445500、445501、445502、445503、445504、445505、445506、445507、445508、445509、445510、445511、445512、445513、445514、445515、445516、445517、445518、445519、445520、445521、445522、445523、445524、445525、445526、445527、445528、445529、445530、445531、445532、445533、445534、445535、445536、445537、445538、445539、445540、445541、445542 和 445543。

[0668] 一些 gapmer 表现出至少 80 % 的抑制,包括 ISIS 编号:ISIS 412206、412224、412225、413481、413482、416825、416848、416849、416850、416851、416852、416853、416854、416855、416856、416857、416858、416859、416860、416861、416862、416863、416864、416865、416866、416867、445494、445495、445496、445497、445498、445500、445501、445502、445503、445504、445505、445506、445507、445508、445509、445510、445513、445514、445519、445520、445521、445522、445525、445526、445529、445530、445531、445532、445533、445534、445535、445536、445538、445541 和 445542。

[0669] 一些 gapmer 表现出至少 90 % 的抑制,包括 ISIS 编号:ISIS 412206、416825、416850、416857、416858、416861、445522 和 445531。

[0670] 表 44

[0671] 靶向 SEQ ID NO :1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3) 的嵌合型反义寡核苷酸对人因子 11mRNA 水平的抑制

[0672]

ISIS No.	人起始 位点	人终止 位点	序列 (5'至 3')	抑制百 分比	结构域	SEQ ID No.	猕猴起 始位点	猕猴终 止位点
*416850	1278	1297	TGCACAGTTT CTGGCAGGCC	91	5-10-5	215	1277	1296
*416858	1288	1307	ACGGCATTGG TGCACAGTTT	90	5-10-5	223	1287	1306
416825	680	699	GCCCTTCATGT CTAGGTCCA	90	5-10-5	190	679	698
412206	738	757	CCGTGCATCTT TCTTGGCAT	91	5-10-5	34	737	756
412223	1275	1294	ACAGTTTCTG GCAGGCCTCG	62	5-10-5	51	1274	1293
445493	1275	1294	ACAGTTTCTG GCAGGCCTCG	69	6-8-6	51	1274	1293
445518	1275	1292	AGTTTCTGGC AGGCCTCG	75	5-8-5	242	1274	1291
416848	1276	1295	CACAGTTTCT GGCAGGCCTC	87	5-10-5	213	1275	1294
445494	1276	1295	CACAGTTTCT GGCAGGCCTC	85	6-8-6	213	1275	1294
445519	1276	1293	CAGTTTCTGG CAGGCCTC	81	5-8-5	243	1275	1292
416849	1277	1296	GCACAGTTTC TGGCAGGCCT	88	5-10-5	214	1276	1295
445495	1277	1296	GCACAGTTTC TGGCAGGCCT	89	6-8-6	214	1276	1295
445520	1277	1294	ACAGTTTCTG GCAGGCCT	82	5-8-5	244	1276	1293

[0673]

445496	1278	1297	TGCACAGTTT CTGGCAGGCC	87	6-8-6	215	1277	1296
445521	1278	1295	CACAGTTTCT GGCAGGCC	87	5-8-5	245	1277	1294
416851	1279	1298	GTGCACAGTT TCTGGCAGGC	89	5-10-5	216	1278	1297
445497	1279	1298	GTGCACAGTT TCTGGCAGGC	81	6-8-6	216	1278	1297
445522	1279	1296	GCACAGTTTC TGGCAGGC	91	5-8-5	246	1278	1295
413481	1280	1299	GGTGCACAGT TTCTGGCAGG	82	5-10-5	114	1279	1298
445498	1280	1299	GGTGCACAGT TTCTGGCAGG	83	6-8-6	114	1279	1298
445523	1280	1297	TGCACAGTTT CTGGCAGG	73	5-8-5	267	1279	1296
416852	1281	1300	TGGTGCACAG TTTCTGGCAG	87	5-10-5	217	1280	1299
445499	1281	1300	TGGTGCACAG TTTCTGGCAG	75	6-8-6	217	1280	1299
445524	1281	1298	GTGCACAGTT TCTGGCAG	75	5-8-5	247	1280	1297
416853	1282	1301	TTGGTGCACA GTTTCTGGCA	84	5-10-5	218	1281	1300
445500	1282	1301	TTGGTGCACA GTTTCTGGCA	81	6-8-6	218	1281	1300
445525	1282	1299	GGTGCACAGT TTCTGGCA	85	5-8-5	248	1281	1298
416854	1283	1302	ATTGGTGCAC AGTTTCTGGC	86	5-10-5	219	1282	1301
445501	1283	1302	ATTGGTGCAC AGTTTCTGGC	83	6-8-6	219	1282	1301
445526	1283	1300	TGGTGCACAG TTTCTGGC	81	5-8-5	249	1282	1299
416855	1284	1303	CATTGGTGCA CAGTTTCTGG	85	5-10-5	220	1283	1302
445502	1284	1303	CATTGGTGCA CAGTTTCTGG	83	6-8-6	220	1283	1302
445527	1284	1301	TTGGTGCACA GTTTCTGG	70	5-8-5	250	1283	1300

[0674]

412224	1285	1304	GCATTGGTGC ACAGTTTCTG	84	5-10-5	52	1284	1303
445503	1285	1304	GCATTGGTGC ACAGTTTCTG	89	6-8-6	52	1284	1303
445528	1285	1302	ATTGGTGCAC AGTTTCTG	73	5-8-5	251	1284	1301
416856	1286	1305	GGCATTGGTG CACAGTTTCT	84	5-10-5	221	1285	1304
445504	1286	1305	GGCATTGGTG CACAGTTTCT	87	6-8-6	221	1285	1304
445529	1286	1303	CATTGGTGC CAGTTTCT	85	5-8-5	252	1285	1302
416857	1287	1306	CGGCATTGGT GCACAGTTTC	91	5-10-5	222	1286	1305
445505	1287	1306	CGGCATTGGT GCACAGTTTC	89	6-8-6	222	1286	1305
445530	1287	1304	GCATTGGTGC ACAGTTTC	83	5-8-5	253	1286	1303
445506	1288	1307	ACGGCATTGG TGCACAGTTT	86	6-8-6	223	1287	1306
445531	1288	1305	GGCATTGGTG CACAGTTT	90	5-8-5	254	1287	1304
416859	1289	1308	GACGGCATTG GTGCACAGTT	85	5-10-5	224	1288	1307
445507	1289	1308	GACGGCATTG GTGCACAGTT	85	6-8-6	224	1288	1307
445532	1289	1306	CGGCATTGGT GCACAGTT	89	5-8-5	255	1288	1305
413482	1290	1309	GGACGGCATT GGTGCACAGT	88	5-10-5	115	1289	1308
445508	1290	1309	GGACGGCATT GGTGCACAGT	81	6-8-6	115	1289	1308
445533	1290	1307	ACGGCATTGG TGCACAGT	87	5-8-5	256	1289	1306
416860	1291	1310	CGGACGGCAT TGGTGCACAG	89	5-10-5	225	1290	1309
445509	1291	1310	CGGACGGCAT TGGTGCACAG	84	6-8-6	225	1290	1309
445534	1291	1308	GACGGCATTG GTGCACAG	82	5-8-5	257	1290	1307

[0675]

416861	1292	1311	GCGGACGGCA TTGGTGCACA	90	5-10-5	226	1291	1310
445510	1292	1311	GCGGACGGCA TTGGTGCACA	88	6-8-6	226	1291	1310
445535	1292	1309	GGACGGCATT GGTGCACA	83	5-8-5	258	1291	1308
416862	1293	1312	AGCGGACGGC ATTGGTGCAC	89	5-10-5	227	1292	1311
445511	1293	1312	AGCGGACGGC ATTGGTGCAC	77	6-8-6	227	1292	1311
445536	1293	1310	CGGACGGCAT TGGTGCAC	82	5-8-5	259	1292	1309
416863	1294	1313	CAGCGGACGG CATTGGTGCA	86	5-10-5	228	1293	1312
445512	1294	1313	CAGCGGACGG CATTGGTGCA	79	6-8-6	228	1293	1312
445537	1294	1311	GCGGACGGCA TTGGTGCACA	78	5-8-5	260	1293	1310
412225	1295	1314	GCAGCGGACG GCATTGGTGC	86	5-10-5	53	1294	1313
445513	1295	1314	GCAGCGGACG GCATTGGTGC	85	6-8-6	53	1294	1313
445538	1295	1312	AGCGGACGGC ATTGGTGC	80	5-8-5	261	1294	1311
416864	1296	1315	GGCAGCGGAC GGCATTGGTG	88	5-10-5	229	1295	1314
445514	1296	1315	GGCAGCGGAC GGCATTGGTG	81	6-8-6	229	1295	1314
445539	1296	1313	CAGCGGACGG CATTGGTG	79	5-8-5	262	1295	1312
416865	1297	1316	TGGCAGCGGA CGGCATTGGT	86	5-10-5	230	1296	1315
445515	1297	1316	TGGCAGCGGA CGGCATTGGT	75	6-8-6	230	1296	1315
445540	1297	1314	GCAGCGGACG GCATTGGT	74	5-8-5	263	1296	1313
416866	1298	1317	CTGGCAGCGG ACGGCATTGG	84	5-10-5	231	1297	1316
445516	1298	1317	CTGGCAGCGG ACGGCATTGG	79	6-8-6	231	1297	1316

[0676]

445541	1298	1315	GGCAGCGGAC GGCATTGG	80	5-8-5	264	1297	1314
416867	1299	1318	ACTGGCAGCG GACGGCATTG	85	5-10-5	232	1298	1317
445517	1299	1318	ACTGGCAGCG GACGGCATTG	74	6-8-6	232	1298	1317
445542	1299	1316	TGGCAGCGGA CGGCATTG	83	5-8-5	265	1298	1315
445543	1300	1317	CTGGCAGCGG ACGGCATT	74	5-8-5	266	1299	1316

[0677] 例 31 :HepG2 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0678] 在 HepG2 细胞中,在不同剂量下测试了例 30 中表现出对人因子 11 有体外抑制的 gapmer。细胞以每孔 20,000 个细胞铺板,以 123.46nM、370.37nM、1,111.11nM 和 3,333.33nM 浓度的反义寡核苷酸,用电穿孔转染,如表 45 所示。处理约 16 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 的引物探针组 RTS 2966 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。结果表示为相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比。如表 45 所示,在经反义寡核苷酸处理的细胞中,因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低。

[0679] 通过绘制所采用的反义寡核苷酸浓度和每个浓度所获得的因子 11mRNA 表达的抑制百分比的图,并且记录相对于 PBS 对照因子 11mRNA 表达的抑制为 50% 时的反义寡核苷酸的浓度,计算出每条寡核苷酸的半数最大抑制浓度 (IC_{50})。 IC_{50} 值如表 45 中所示。

[0680] 表 45

[0681] HepG2 细胞中以寡核苷酸通过用电穿孔转染对人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0682]

ISIS No.	123.47 nM	370.37 nM	1,111.11 nM	3,333.33 nM	10,000.0 nM	IC_{50} (μ M)
416849	5	5	26	57	68	2.7
416850	0	12	36	74	73	2.8
416851	13	35	36	64	72	1.5
416856	12	23	35	59	83	1.6
416857	2	20	35	62	72	2.3
416858	0	27	36	64	70	2.2
416860	0	28	39	41	40	n.d.

[0683]

416861	0	15	27	66	80	2.0
445498	3	1	27	50	58	4.8
445503	0	0	22	36	60	5.9
445504	8	20	38	53	68	2.7
445505	12	30	39	59	77	1.8
445522	0	0	44	63	74	2.9
445531	8	16	52	61	77	1.8
445532	5	12	39	60	70	2.0

[0684] n. d. = 没有数据

[0685] 例 32 :微步设计的寡核苷酸对 HepG2 细胞中人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0686] 根据 ISIS 416850 和 ISIS 416858 (见上面表 8) 设计了其他 gapmer。这些 gapmer 向 ISIS416850 和 ISIS 416858 上游和下游略微移动 (也就是“微步”)。微步设计的 gapmer 具有 3-8-3MOE、4-8-4MOE、2-10-2MOE、3-10-3MOE 或 4-10-4MOE 结构域。

[0687] 在 HepG2 细胞中,在不同剂量下测试了这些 gapmer。细胞以每孔 20,000 个细胞铺板,以 375nM、750nM、1,500nM、3,000nM、6,000nM 和 12,000nM 浓度的反义寡核苷酸用电穿孔转染。处理约 16 小时后,从细胞中分离 RNA,以定量实时 PCR 测定因子 11 的 mRNA 水平。人因子 11 的引物探针组 RTS 2966 用于测定 mRNA 水平。根据 RIBOGREEN 测定的总的 RNA 量对因子 11 的 mRNA 水平进行校正。结果表示为相对于未处理的对照细胞的因子 11 的抑制百分比。

[0688] ISIS 416850、ISIS 416858、ISIS 445522 以及 ISIS 445531 (见上面表 45) 和微步 gapmer 一起在上述同样的条件下在体外重新测试。

[0689] 表 46 中的嵌合型反义寡核苷酸被设计为 3-8-3MOE、4-8-4MOE、2-10-2MOE、3-10-3MOE 或 4-10-4MOE gapmer。3-8-3gapmer 的长度为 14 个核苷酸,其中,中央间隙区段由 8 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 3 个核苷酸的侧翼。4-8-4gapmer 的长度为 16 个核苷酸,其中,中央间隙区段由 8 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 4 个核苷酸的侧翼。2-10-2gapmer 的长度为 14 个核苷酸,其中,中央间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 2 个核苷酸的侧翼。3-10-3gapmer 的长度为 16 个核苷酸,其中,中央间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 3 个核苷酸的侧翼。4-10-4gapmer 的长度为 18 个核苷酸,其中,中央间隙区段由 10 个 2'-脱氧核苷酸组成,两边 (在 5' 和 3' 方向) 为各包含 4 个核苷酸的侧翼。对于每一个结构域 (3-8-3、4-8-4、2-10-2、3-10-3 和 4-10-4),5' 侧翼区段中的每个核苷酸和 3' 侧翼区段中的每个核苷酸有 2'-MOE 修饰。每个 gapmer 中的核苷内连接是磷硫酰 (P = S) 连接。每条 gapmer 中的所有胞嘧啶残基都是 5-甲基胞嘧啶核苷。“人目标起始位点”是指人序列中 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“人目标终止位点”是指人序列中 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。表 46 中所列的每条 gapmer 靶向 SEQ ID NO:1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3)。表 46 中的每条 gapmer 还可与此处标为 SEQ ID NO:274 的猕猴因子 11 基因序列完全交叉反应 (外显子 1-15 GENBANK 登录号 NW_001118167.1)。“猕猴起始位点”是指猕猴序列中 gapmer 靶向的最 5' 端的核苷酸。“猕猴终止位点”是指猕猴序列中 gapmer 靶向的最 3' 端的核苷酸。

[0690] 表 46

[0691] 靶向 SEQ ID NO :1 (GENBANK 登录号 NM_000128.3) 且通过 ISIS 416850 和 ISIS 416858 的微步设计的嵌合型反义寡核苷酸

[0692]

ISIS No.	人目标 起始位 点	人目标 终止位 点	序列 (5'至 3')	结 构 域	SEQ ID No.	猕猴 起始 位点	猕猴终 止位点
449707	1280	1295	CACAGTTT CTGGCAGG	4-8-4	268	1279	1294
449708	1281	1294	ACAGTTT CTGGCAG	3-8-3	269	1280	1293
449709	1279	1296	GCACAGTT TCTGGCAGGC	4-10- 4	246	1278	1295
449710	1280	1295	CACAGTTT CTGGCAGG	3-10- 3	268	1279	1294
449711	1281	1294	ACAGTTT CTGGCAG	2-10- 2	269	1280	1293

[0693] 剂量反应抑制数据在表 47 中给出。如表 47 所示,在以反义寡核苷酸处理的细胞中,因子 11 的 mRNA 水平以剂量依赖的方式降低了。每条反义寡核苷酸的 IC₅₀ 也被计算出并在表 47 中列出。在表 47 中列出的前两条 gapmer 是用来通过微步设计剩下的 gapmer 的原始 gapmer (ISIS 416850 和 ISIS 416858),用星号指定。

[0694] 表 47

[0695] HepG2 细胞中通过用电穿孔转染寡核苷酸对人因子 11 的剂量依赖的反义抑制

[0696]

ISIS No.	375 nM	750 nM	1,500 nM	3,000 nM	6,000 nM	12,000 nM	IC ₅₀ (μM)
*416850	40	59	69	87	90	95	0.56
*416858	31	35	78	85	90	93	0.83
445522	59	71	83	82	81	92	n.d.
445531	44	64	78	86	91	93	0.44
449707	7	35	63	73	85	91	1.26
449708	0	0	22	33	61	85	4.46
449709	52	71	80	87	92	95	0.38
449710	2	21	52	70	82	87	1.59
449711	6	14	1	7	32	52	11.04

[0697] n. d. = 没有数据

[0698] 例 33 :靶向人因子 11 的反义寡核苷酸在 CD1 小鼠中的耐受性

[0699] 以靶向人因子 11 的 ISIS 反义寡核苷酸处理 CD1 小鼠,并评估多种代谢指标水平的变化。

[0700] 处理

[0701] 按组向每组 5 只的 CD1 小鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 416825、ISIS 416826、ISIS 416838、ISIS 416850、ISIS 416858、ISIS 416864、ISIS 416892、ISIS 416925、ISIS 416999、ISIS 417002 或 ISIS 417003,一周两次,2、4 或 6 周。5 只小鼠的一组对照组以 PBS 皮下注射 2 周。将所有实验组 (也就是在 ASO 处理 2、4、6 周的小鼠) 与对照组 (也就是

PBS, 2 周) 相比较。

[0702] 所有组最后剂量给药后三天处死小鼠。测量器官重量, 收集血液用于进一步分析。

[0703] 器官重量

[0704] 在研究结束时测量肝脏、脾脏和肾脏的重量, 以体重归一化, 以 PBS 对照的百分比表示在表 48、49 和 50 中。挑选那些使肝脏和脾脏重量比 PBS 对照影响不超过六倍增加的反义寡核苷酸用于下一步分析。

[0705] 表 48

[0706] 反义寡核苷酸处理后的 CD1 小鼠的肝脏重量的百分比变化

[0707]

ISIS No.	2 周 :	4 周 :	6 周 :
416825	+5	+22	+13
416826	+10	+32	+33
416838	+8	-6	0
416850	+5	+3	+6
416858	+7	+1	+10
416864	-2	+2	-5
416925	+14	+14	+33
416999	+13	+30	+47
417002	+14	+8	+35
416892	+35	+88	+95
417003	+8	+42	+32

[0708] 表 49

[0709] 反义寡核苷酸处理后的 CD1 小鼠的脾脏重量的百分比变化

[0710]

ISIS No.	2 周:	4 周:	6 周:
416825	-12	+19	+21
416826	-12	-5	+22
416838	+21	-8	+9
416850	-4	+6	+48
416858	-2	+8	+28
416864	-10	-2	-6
416925	-7	+33	+78
416999	+7	+22	+38
417002	+29	+26	+108
416892	+24	+30	+65
417003	+12	+101	+98

[0711] 表 50

[0712] 反义寡核苷酸处理后的 CD1 小鼠的肾脏重量的百分比变化

[0713]

ISIS No.	2 周:	4 周:	6 周:
416825	-12	-12	-11
416826	-13	-7	-22
416838	-2	-12	-8
416850	-10	-12	-11
416858	+1	-18	-10
416864	-4	-9	-15
416925	-4	-14	-2

[0714]

416999	-9	-6	-7
417002	+3	-5	-2
416892	+2	-3	+19
417003	-9	-2	-1

[0715] 肝功能

[0716] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e,Melville,NY) 测量血浆转氨酶浓度。丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 的测量用 IU/L 表示,结果在表 51 和 52 中提供。血浆胆红素和白蛋白水平也用同样的临床化学分析仪测试,用 mg/dL 表示。结果在表 53 和 54 中提供。挑选那些不影响 ALT/AST 水平相对于对照水平的七倍以上的提高的反义寡核苷酸用以下一步分析。挑选那些使胆红素水平增加不超过对照水平的两倍的反义寡核苷酸用于下一步分析。

[0717] 表 51

[0718] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对 ALT(IU/L) 的影响

[0719]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	36	n. d.	n. d.
ISIS 416825	64	314	507
ISIS 416826	182	126	1954
ISIS 416838	61	41	141

ISIS 416850	67	58	102
ISIS 416858	190	57	216
ISIS 416864	44	33	92
ISIS 416925	160	284	1284
ISIS 416999	61	160	1302
ISIS 417002	71	138	2579
ISIS 416892	66	1526	1939
ISIS 417003	192	362	2214

[0720] n. d. = 没有数据

[0721] 表 52

[0722] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对 AST(IU/L) 的影响

[0723]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	68	n. d.	n. d.
ISIS 416825	82	239	301
ISIS 416826	274	156	1411
ISIS 416838	106	73	107
ISIS 416850	72	88	97
ISIS 416858	236	108	178
ISIS 416864	58	46	101
ISIS 416925	144	206	712
ISIS 416999	113	130	671
ISIS 417002	96	87	1166
ISIS 416892	121	1347	1443
ISIS 417003	152	249	839

[0724] n. d. = 没有数据

[0725] 表 53

[0726] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对胆红素 (mg/dL) 的影响

[0727]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	0.28	n. d.	n. d.
ISIS 416825	0.41	0.69	0.29
ISIS 416826	0.39	0.20	0.37
ISIS 416838	0.57	0.24	0.20
ISIS 416850	0.46	0.23	0.22
ISIS 416858	0.57	0.24	0.16
ISIS 416864	0.40	0.26	0.22
ISIS 416925	0.45	0.25	0.25
ISIS 416999	0.48	0.18	0.28
ISIS 417002	0.50	0.25	0.29
ISIS 416892	0.38	2.99	0.50
ISIS 417003	0.33	0.15	0.24

[0728] n. d. = 没有数据

[0729] 表 54

[0730] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对白蛋白 (mg/dL) 的影响

[0731]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	3.7	n. d.	n. d.

ISIS 416825	3.6	3.4	3.5
ISIS 416826	3.3	3.4	3.4
ISIS 416838	3.5	3.8	3.6
ISIS 416850	3.6	3.5	3.1
ISIS 416858	3.4	3.5	2.8
ISIS 416864	3.5	3.6	3.5
ISIS 416925	3.5	3.5	3.2
ISIS 416999	3.4	3.3	3.2
ISIS 417002	3.2	3.4	3.4
ISIS 416892	3.2	4.0	4.4
ISIS 417003	3.4	3.4	3.2

[0732] n. d. =没有数据

[0733] 肾功能

[0734] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肾功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆血液尿素氮 (BUN) 和肌酐浓度。结果以 mg/dL 表示,在表 55 和 56 中提供。挑选那些对 BUN 水平提高比 PBS 对照不超过两倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。

[0735] 表 55

[0736] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对 BUN(mg/dL) 的影响

[0737]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	30	n. d.	n. d.
ISIS 416825	29	35	31
ISIS 416826	24	34	27
ISIS 416838	25	38	30
ISIS 416850	25	30	23
ISIS 416858	21	29	19
ISIS 416864	22	31	28
ISIS 416925	21	30	17
ISIS 416999	22	27	22
ISIS 417002	19	23	19
ISIS 416892	19	28	23
ISIS 417003	23	26	24

[0738] n. d. =没有数据

[0739] 表 56

[0740] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对肌酐 (mg/dL) 的影响

[0741]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	0.14	n. d.	n. d.
ISIS 416825	0.14	0.21	0.17
ISIS 416826	0.15	0.20	0.15
ISIS 416838	0.09	0.27	0.14
ISIS 416850	0.13	0.22	0.19
ISIS 416858	0.13	0.23	0.10
ISIS 416864	0.11	0.22	0.16
ISIS 416925	0.12	0.25	0.13
ISIS 416999	0.07	0.18	0.13
ISIS 417002	0.06	0.16	0.10

ISIS 416892	0.11	0.20	0.17
ISIS 417003	0.17	0.24	0.18

[0742] n. d. = 没有数据

[0743] 血液学分析

[0744] 从所有小鼠分组获得的血液被送去 Antech Diagnostics 进行血细胞比容 (HCT)、平均红细胞体积 (MCV)、平均红细胞血红蛋白 (MCH) 和平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC) 的测定和分析, 以及如 WBC (中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞以及总血红蛋白含量的测定。结果在表 57-67 中提供。表中给出的百分数表示占血细胞总数的百分比。挑选那些对血小板数降低不超过 50% 和 / 或单核细胞数提高不超过三倍的反义寡核苷酸用以进一步分析。

[0745] 表 57

[0746] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对 HCT (%) 的影响

[0747]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	50	n. d.	n. d.
ISIS 416825	49	46	40
ISIS 416826	47	41	37
ISIS 416838	42	44	39
ISIS 416850	44	44	38
ISIS 416858	50	45	46
ISIS 416864	50	45	42
ISIS 416925	51	47	47
ISIS 416999	51	42	40
ISIS 417002	44	44	51
ISIS 416892	48	42	45
ISIS 417003	48	41	43

[0748] n. d. = 没有数据

[0749] 表 58

[0750] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对 MCV (fL) 的影响

[0751]

	2 周:	4 周:	6 周:
PBS	61	n.d.	n.d.
ISIS 416825	58	53	51
ISIS 416826	56	52	53
ISIS 416838	56	54	48

[0752]

ISIS 416850	57	51	50
ISIS 416858	59	51	50
ISIS 416864	57	52	51
ISIS 416925	61	52	47
ISIS 416999	60	49	48
ISIS 417002	61	50	52
ISIS 416892	59	49	53
ISIS 417003	60	48	45

[0753] n. d. = 没有数据

[0754] 表 59

[0755] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对 MCH(pg) 的影响

[0756]

ISIS No.	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	18	n. d.	n. d.
ISIS 416825	17	16	15
ISIS 416826	17	16	16
ISIS 416838	17	17	15
ISIS 416850	17	16	15
ISIS 416858	17	16	15
ISIS 416864	18	16	16
ISIS 416925	17	16	15
ISIS 416999	17	16	15
ISIS 417002	17	16	16
ISIS 416892	18	16	16
ISIS 417003	17	16	16

[0757] n. d. = 没有数据

[0758] 表 60

[0759] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对 MCHC(%) 的影响

[0760]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	30	n. d.	n. d.
ISIS 416825	29	31	31
ISIS 416826	29	31	30
ISIS 416838	30	31	32
ISIS 416850	30	31	31
ISIS 416858	30	32	31
ISIS 416864	31	31	31
ISIS 416925	30	32	32
ISIS 416999	27	32	31
ISIS 417002	29	32	31
ISIS 416892	30	32	30
ISIS 417003	29	32	33

[0761] n. d. = 没有数据

[0762] 表 61

[0763] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对 WBC 数 (细胞数 /nL) 的影响

[0764]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	6	n. d.	n. d.
ISIS 416825	8	8	6
ISIS 416826	5	6	8
ISIS 416838	4	6	5
ISIS 416850	4	5	5
ISIS 416858	6	7	4
ISIS 416864	7	6	5
ISIS 416925	6	6	11
ISIS 416999	4	9	7
ISIS 417002	8	8	16
ISIS 416892	5	8	9
ISIS 417003	7	9	10

[0765] n. d. = 没有数据

[0766] 表 62

[0767] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对 RBC 数 (细胞数 / μ L) 的影响

[0768]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	8	n. d.	n. d.
ISIS 416825	9	9	8
ISIS 416826	8	8	7
ISIS 416838	8	8	8
ISIS 416850	8	9	8
ISIS 416858	9	9	9
ISIS 416864	9	9	8
ISIS 416925	9	9	10
ISIS 416999	9	9	8
ISIS 417002	9	9	10
ISIS 416892	7	9	9
ISIS 417003	8	9	10

[0769] n. d. = 没有数据

[0770] 表 63

[0771] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对中性粒细胞数 (%) 的影响

[0772]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	16	n. d.	n. d.
ISIS 416825	15	43	23
ISIS 416826	26	33	23
ISIS 416838	19	33	31
ISIS 416850	15	21	16
ISIS 416858	14	24	27
ISIS 416864	13	27	20
ISIS 416925	12	39	33
ISIS 416999	12	25	22
ISIS 417002	14	31	36
ISIS 416892	19	43	28
ISIS 417003	10	39	24

[0773] n. d. = 没有数据

[0774] 表 64

[0775] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对淋巴细胞数(%)的影响

[0776]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	81	n. d.	n. d.
ISIS 416825	82	53	71
ISIS 416826	70	61	67
ISIS 416838	76	64	60
ISIS 416850	82	73	76
ISIS 416858	83	73	65
ISIS 416864	84	71	74
ISIS 416925	86	58	57
ISIS 416999	86	72	69
ISIS 417002	83	64	51
ISIS 416892	79	52	64
ISIS 417003	86	54	66

[0777] n. d. = 没有数据

[0778] 表 65

[0779] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对单核细胞数(%)的影响

[0780]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	3	n. d.	n. d.
ISIS 416825	2	5	4
ISIS 416826	3	5	8
ISIS 416838	2	2	6
ISIS 416850	3	6	6
ISIS 416858	2	3	7
ISIS 416864	2	2	5
ISIS 416925	2	4	8
ISIS 416999	2	4	8
ISIS 417002	3	4	12
ISIS 416892	3	6	7
ISIS 417003	2	6	8

[0781] n. d. = 没有数据

[0782] 表 66

[0783] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对血小板数(细胞数/nL)的影响

[0784]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	2126	n. d.	n. d.
ISIS 416825	1689	1229	942
ISIS 416826	1498	970	645
ISIS 416838	1376	1547	1229
ISIS 416850	1264	1302	1211
ISIS 416858	2480	1364	1371
ISIS 416864	1924	1556	933
ISIS 416925	1509	1359	1211
ISIS 416999	1621	1219	1057
ISIS 417002	1864	1245	1211
ISIS 416892	1687	636	1004
ISIS 417003	1309	773	922

[0785] n. d. = 没有数据

[0786] 表 67

[0787] CD1 小鼠中反义寡核苷酸处理对血红蛋白含量 (g/dL) 的影响

[0788]

	2 周 :	4 周 :	6 周 :
PBS	15.1	n. d.	n. d.
ISIS 416825	14.5	14.1	12.1
ISIS 416826	13.4	12.8	11.0
ISIS 416838	12.4	13.6	12.6
ISIS 416850	13.1	13.5	11.6
ISIS 416858	14.8	14.2	14.1
ISIS 416864	15.2	13.9	13.0
ISIS 416925	14.9	14.8	15.3
ISIS 416999	14.2	13.3	12.8
ISIS 417002	14.7	14.0	15.7
ISIS 416892	13.0	13.5	13.1
ISIS 417003	13.7	13.4	14.0

[0789] n. d. = 没有数据

[0790] 例 34 :CD1 小鼠肝脏中反义寡核苷酸的半衰期的测定

[0791] 以靶向人因子 11 的 ISIS 反义寡核苷酸处理 CD1 小鼠,并评估了寡核苷酸的半衰期以及寡核苷酸降解和从肝脏消除所花的时间。

[0792] 处理

[0793] 按组向每组 15 只 CD1 小鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 416825、ISIS 416826、ISIS 416838、ISIS 416850、ISIS 416858、ISIS 416864、ISIS 416892、ISIS 416925、ISIS 416999、ISIS 417002 或 ISIS 417003,一周两次,共 2 周。在最后剂量后 3 天、28 天和 56 天分别将每组中的 5 只小鼠处死。收取肝脏进行分析。

[0794] 寡核苷酸浓度的测定

[0795] 测定全长寡核苷酸浓度以及总的寡核苷酸浓度 (包括降解形式)。采用的方法是以前发表方法 (Leeds et al., 1996 ;Geary et al., 1999) 的改良方法,其包括苯酚 - 氯仿 (液体 - 液体) 提取以及之后的固相提取。在提取前加入内标物 (ISIS 355868, 27 单体的 2' -O- 甲氧乙基修饰的硫代磷酸寡核苷酸, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, 此处标为 SEQ ID NO :270)。以定量下限 (LLOQ) 约为 1.14 μ g/g 的校正曲线计算组织样本浓度。然后用 WinNonlin 软件 (PHARSIGHT) 计算半衰期。

[0796] 结果以 μ g/g 肝脏组织在表 68 和 69 中提供。每条寡核苷酸的半衰期在表 70 中提供。

[0797] 表 68

[0798] CD1 小鼠肝脏中的全长寡核苷酸浓度 (μ g/g)

[0799]

ISIS No.	结构域	第 3 天 :	第 28 天 :	第 56 天 :
416825	5-10-5	151	52	7
416826	5-10-5	186	48	8
416838	5-10-5	170	46	10
416850	5-10-5	238	93	51
416858	5-10-5	199	102	18

416864	5-10-5	146	38	25
416999	2-13-5	175	26	0
417002	2-13-5	119	24	1
417003	2-13-5	245	42	4
416925	3-14-3	167	39	5
416892	3-14-3	135	31	6

[0800] 表 69

[0801] CD1 小鼠肝脏中的总的寡核苷酸浓度 (μ g/g)

[0802]

ISIS No.	结构域	第 3 天 :	第 28 天 :	第 56 天 :
416825	5-10-5	187	90	39
416826	5-10-5	212	61	12
416838	5-10-5	216	98	56
416850	5-10-5	295	157	143
416858	5-10-5	273	185	56
416864	5-10-5	216	86	112
416999	2-13-5	232	51	0
417002	2-13-5	206	36	1
417003	2-13-5	353	74	4
416925	3-14-3	280	72	8
416892	3-14-3	195	54	6

[0803] 表 70

[0804] CD1 小鼠肝脏中反义寡核苷酸的半衰期

[0805]

ISIS No.	结构域	半衰期 (天):
416825	5-10-5	16
416826	5-10-5	13
416838	5-10-5	13
416850	5-10-5	18
416858	5-10-5	26
416864	5-10-5	13
416999	2-13-5	9
417002	2-13-5	11
417003	2-13-5	10
416925	3-14-3	12
416892	3-14-3	12

[0806] 例 35 :Sprague-Dawley 大鼠中靶向人因子 11 的反义寡核苷酸的耐受性

[0807] 以靶向人因子 11 的 ISIS 反义寡核苷酸处理 Sprague-Dawley 大鼠,并评估多种代谢指标水平的变化。

[0808] 处理

[0809] 按组向每组 4 只 Sprague Dawley 大鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 416825、ISIS 416826、ISIS 416838、ISIS 416850、ISIS 416858、ISIS 416848、ISIS 416864、ISIS 416892、ISIS 416925、ISIS 416999、ISIS 417002 或 ISIS 417003,每周两次,共 6 周。向一个由 4 只 Sprague Dawley 大鼠组成的对照组皮下注射 PBS,每周两次,共 6 周。在处理周期之前和期间测定体重。在处理开始之前采集尿液样本。最后剂量后三天,采集尿液样本

并处死大鼠。测量器官重量,收集血液用以进一步分析。

[0810] 体重和器官重量

[0811] 在研究开始时以及随后每周两次测定大鼠体重。体重在表 71 中提供,表示为占研究开始时重量的百分比变化。在研究结束时测定肝脏、脾脏和肾脏的重量,以盐溶液对照的百分比在表 71 中提供,以体重归一化。挑选那些对肝脏和脾脏重量比 PBS 对照影响不超过六倍增加的反义寡核苷酸用于进一步研究。

[0812] 表 71

[0813] 反义寡核苷酸处理后的 Sprague Dawley 大鼠的器官重量的百分比变化

[0814]

ISIS No.	肝脏	脾脏	肾脏	体重
416825	+20	+245	+25	-18
416826	+81	+537	+44	-40
416838	+8	+212	-0.5	-23
416850	+23	+354	+47	-33
416858	+8	+187	+5	-21
416864	+16	+204	+16	-24
416925	+44	+371	+48	-32
416999	+51	+405	+71	-37
417002	+27	+446	+63	-29
416892	+38	+151	+32	-39
417003	+51	+522	+25	-40

[0815]

[0816] 肝功能

[0817] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆转氨酶浓度。丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 的测量用 IU/L 表示,结果在表 72 中提供。挑选那些没有使 ALT/AST 水平提高超过对照水平七倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。血浆胆红素和白蛋白水平也用同样的临床化学分析仪测定,结果用 mg/dL 在表 72 中提供。挑选那些没有使胆红素水平提高超过两倍对照水平的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[0818] 表 72

[0819] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠肝脏中代谢指标的影响

[0820]

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	胆红素 (mg/ml)	白蛋白 (mg/dl)
PBS	9	5	20	2
ISIS 416825	89	17	4	2
ISIS 416826	611	104	115	6
ISIS 416838	5	2	4	2
ISIS 416850	80	5	1	4
ISIS 416858	13	4	4	2
ISIS 416864	471	68	3	4
ISIS 416925	102	20	13	5
ISIS 416999	92	28	54	5
ISIS 417002	44	11	12	3
ISIS 416892	113	183	1	8
ISIS 417003	138	23	50	6

[0821] 肾功能

[0822] 为了评价肾功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville,NY) 测量血浆血液尿素氮 (BUN) 和肌酐浓度。结果以 mg/dL 在表 73 中提供。挑选那些相比于 PBS 对照,没有使 BUN 水平提高超过两倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。在反义寡核苷酸处理之前和之后还计算总的尿液样本中尿蛋白与肌酐的比值,结果在表 74 中提供。挑选那些没有使尿蛋白 / 肌酐的比值相比于 PBS 对照提高超过五倍的反义寡核苷酸用于下一步研究。

[0823] 表 73

[0824] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠肾脏中代谢指标的影响

[0825]

	BUN	肌酐
PBS	4	8
ISIS 416825	7	17
ISIS 416826	25	6
ISIS 416838	4	5
ISIS 416850	5	7
ISIS 416858	8	4
ISIS 416864	5	6
ISIS 416925	7	5
ISIS 416999	2	4
ISIS 417002	11	1
ISIS 416892	188	1
ISIS 417003	9	9

[0826] 表 74

[0827] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠肝脏中尿蛋白 / 肌酐比值的影响

[0828]

	之前	之后
PBS	1.2	1.3
416825	1.1	5.4
416826	1.0	11.4
416838	1.2	3.7
416850	1.0	4.0
416858	0.9	4.4
416864	1.2	4.0
416925	1.0	4.3
416999	1.3	9.1

417002	1.0	2.4
416892	0.8	21.3
417003	0.9	4.8

[0837] 血液学分析

[0838] 从所有大鼠分组获得的血液被送去 Antech Diagnostics 进行血细胞比容 (HCT)、平均红细胞体积 (MCV)、平均红细胞血红蛋白 (MCH) 和平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC) 的测定和分析, 以及如 WBC (中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞以及血红蛋白含量的测定。结果在表 75 和 76 中提供。挑选那些没有使血小板数降低超过 50% 和没有使单核细胞数提高超过三倍的反义寡核苷酸用于进一步研究。

[0839] 表 75

[0840] Sprague-Dawley 大鼠中反义寡核苷酸处理对血细胞数的影响

[0841]

	WBC (/nL)	RBC (/pL)	中性粒细 胞(%)	淋巴细胞 (%)	单核细胞 (%)	血小板 (10 ³ /μL)
PBS	21	6	37	7	26	18
ISIS 416825	22	2	25	3	15	6
ISIS 416826	7	5	30	5	7	11
ISIS 416838	13	4	17	3	6	27
ISIS 416850	16	7	48	8	11	26
ISIS 416858	28	2	20	3	10	19
ISIS 416864	15	4	26	2	29	12
ISIS 416925	24	6	20	4	23	8
ISIS 416999	12	5	23	3	20	12
ISIS 417002	23	5	22	4	25	7
ISIS 416892	68	12	92	18	58	66
ISIS 417003	83	11	17	3	6	19

[0829] 表 76

[0830] Sprague-Dawley 大鼠中反义寡核苷酸处理对血液学因子(%对照)的影响

[0831]

	血红蛋白 (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)
PBS	6	4	6	2	4
ISIS 416825	2	2	4	2	4
ISIS 416826	7	7	6	3	4
ISIS 416838	2	5	4	2	5
ISIS 416850	4	5	3	4	2
ISIS 416858	2	3	2	2	1
ISIS 416864	4	2	4	2	4
ISIS 416925	6	8	5	2	4
ISIS 416999	6	5	2	3	1
ISIS 417002	5	7	7	3	5
ISIS 416892	14	13	1	2	0
ISIS 417003	11	8	6	4	4

[0832] 例 36 :Sprague-Dawley 大鼠的肝脏和肾脏中反义寡核苷酸的半衰期的测定

[0833] 以靶向人因子 11 的 ISIS 反义寡核苷酸处理 Sprague Dawley 大鼠,并评估了寡核苷酸的半衰期以及寡核苷酸降解和从肝脏和肾脏消除所花的时间。

[0834] 处理

[0835] 按组分别向每组 4 只 Sprague Dawley 大鼠皮下注射 20mg/kg 的 ISIS416825、ISIS 416826、ISIS 416838、ISIS 416850、ISIS 416858、ISIS 416864、ISIS 416892、ISIS 416925、ISIS 416999、ISIS 417002 或 ISIS 417003,一周两次,共 2 周。在最后剂量后 3 天,处死大鼠,收集肝脏和肾脏用于分析。

[0836] 寡核苷酸浓度的测定

[0837] 测定全长寡核苷酸浓度以及总的寡核苷酸浓度(包括降解形式)。方法采用以前发表方法(Leeds et al.,1996;Geary et al.,1999)的改良方法,其包括苯酚-氯仿(液体-液体)提取以及之后的固相提取。在提取前加入内标物(ISIS 355868,27 单体的 2'-O- 甲氧乙基修饰的磷硫酰寡核苷酸,GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTT,此处标为 SEQ ID

NO:270)。以约为 $1.14 \mu\text{g/g}$ 的定量下限 (LLOQ), 用校正曲线计算组织样本浓度。结果以 $\mu\text{g/g}$ 肝脏或肾脏组织在表 77 和 78 中提供。然后用 WinNonlin 软件 (PHARSIGHT) 计算半衰期。

[0838] 表 77

[0839] Sprague Dawley 大鼠的肝脏和肾脏中的全长寡核苷酸浓度 ($\mu\text{g/g}$)

[0840]

ISIS No.	结构域	肾脏	肝脏
416825	5-10-5	632	236
416826	5-10-5	641	178
416838	5-10-5	439	171
416850	5-10-5	259	292
416858	5-10-5	575	255
416864	5-10-5	317	130
416999	2-13-5	358	267
417002	2-13-5	291	118
417003	2-13-5	355	199
416925	3-14-3	318	165
416892	3-14-3	351	215

[0841] 表 78

[0842] Sprague Dawley 大鼠的肝脏和肾脏中的总的寡核苷酸浓度 ($\mu\text{g/g}$)

[0843]

ISIS No.	结构域	肾脏	肝脏
416825	5-10-5	845	278
416826	5-10-5	775	214
416838	5-10-5	623	207
416850	5-10-5	352	346
416858	5-10-5	818	308
416864	5-10-5	516	209
416999	2-13-5	524	329
417002	2-13-5	490	183
417003	2-13-5	504	248
416925	3-14-3	642	267
416892	3-14-3	608	316

[0845] 表 79

[0846] Sprague Dawley 大鼠的肝脏和肾脏中的 ISIS 寡核苷酸的半衰期 (天)

[0847]

ISIS No.	结构域	半衰期
416825	5-10-5	16
416826	5-10-5	13
416838	5-10-5	13
416850	5-10-5	18
416858	5-10-5	26

416864	5-10-5	13
416999	2-13-5	9
417002	2-13-5	11
417003	2-13-5	10
416925	3-14-3	12
416892	3-14-3	12

[0848] 例 37 :靶向人因子 11 的反义寡核苷酸在 CD1 小鼠中的耐受性

[0849] 以靶向人因子 11 的 ISIS 反义寡核苷酸处理 CD1 小鼠,评估各种代谢指标水平的变化。

[0850] 处理

[0851] 按组分别向每组 5 只 CD1 小鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 412223、ISIS 412224、ISIS 412225、ISIS 413481、ISIS 413482、ISIS 416848、ISIS 416849、ISIS 416850、ISIS 416851、ISIS 416852、ISIS 416853、ISIS 416854、ISIS 416855、ISIS 416856、ISIS 416857、ISIS 416858、ISIS 416859、ISIS 416860、ISIS 416861、ISIS 416862、ISIS 416863、ISIS 416864、ISIS 416865、ISIS 416866 或 ISIS 416867,一周两次,共 6 周。向 10 只 CD1 小鼠的对照组皮下注射 PBS,每周两次,共六周。在处理周期之前和期间测定体重。最后剂量后三天,处死小鼠,测定器官重量,并收集血液用于进一步分析。

[0852] 体重和器官重量

[0853] 在研究开始时以及随后每周两次测定体重。小鼠体重在表 80 中提供,表示为与研究开始前 PBS 对照重量的克数增加。在研究结束时测定肝脏、脾脏和肾脏的重量,以占体重的百分比在表 80 中提供。挑选那些没有使肝脏和脾脏重量提高超过 PBS 对照的六倍的反义寡核苷酸用于下一步分析。

[0854] 表 80

[0855] 反义寡核苷酸处理后的 CD1 小鼠的身体和器官重量的变化

[0856]

	肝脏 (%)	肾脏 (%)	脾脏 (%)	体重 (g)
PBS	5	1.5	0.3	7
ISIS 416850	6	1.6	0.4	12
ISIS 416858	7	1.6	0.6	12
ISIS 416864	5	1.6	0.3	12
ISIS 412223	6	1.5	0.4	12
ISIS 412224	6	1.6	0.5	10
ISIS 412225	6	1.5	0.4	10
ISIS 413481	6	1.5	0.5	9
ISIS 413482	6	1.6	0.5	11
ISIS 416848	6	1.5	0.4	11
ISIS 416849	8	1.5	0.4	8
ISIS 416851	7	1.5	0.5	11
ISIS 416852	6	1.5	0.4	10
ISIS 416853	8	1.5	0.7	13
ISIS 416854	7	1.2	0.4	13
ISIS 416855	8	1.4	0.6	12
ISIS 416856	6	1.4	0.4	10
ISIS 416857	7	1.6	0.5	10
ISIS 416859	6	1.5	0.4	10
ISIS 416860	6	1.4	0.4	10
ISIS 416861	5	1.3	0.4	9
ISIS 416862	6	1.5	0.4	10
ISIS 416863	5	1.5	0.4	9
ISIS 416865	6	1.5	0.4	8

[0857]

ISIS 416866	5	1.6	0.4	10
ISIS 416867	5	1.4	0.4	9

[0858] 肝功能

[0859] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆转氨酶浓度。丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 的测量用 IU/L 表示,结果在表 81 中提供。挑选那些没有使 ALT/AST 水平提高超过对照水平的七倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。血浆胆红素、胆固醇和白蛋白水平也用同样的临床化学分析仪测定,用 mg/dL 表示在表 81 中提供。挑选那些没有使胆红素水平提高超过对照水平的两倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[0860] 表 81

[0861] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠肝脏中代谢指标的影响

[0862]

[0863]

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	胆红素 (mg/dL)	白蛋白 (mg/dL)	胆固醇 (mg/dL)
PBS	32	68	0.25	3.7	135
ISIS 416850	75	99	0.21	3.5	142
ISIS 416858	640	547	0.28	4.4	181
ISIS 416864	36	67	0.19	2.6	152
ISIS 412223	60	125	0.20	3.0	117
ISIS 412224	214	183	0.19	3.4	114
ISIS 412225	40	69	0.23	3.3	128
ISIS 413481	85	143	0.18	3.2	153
ISIS 413482	54	77	0.24	3.0	138
ISIS 416848	153	153	0.19	3.1	151
ISIS 416849	1056	582	0.22	2.5	109
ISIS 416851	47	76	0.19	3.1	106
ISIS 416852	49	91	0.16	4.9	125
ISIS 416853	1023	1087	0.25	3.1	164
ISIS 416854	1613	1140	0.21	5.5	199
ISIS 416855	786	580	0.25	4.2	162
ISIS 416856	130	129	0.23	5.2	109
ISIS 416857	370	269	0.22	3.7	94
ISIS 416859	214	293	0.20	4.2	160
ISIS 416860	189	160	0.23	3.5	152
ISIS 416861	38	85	0.27	4.3	133
ISIS 416862	225	172	0.36	3.9	103

ISIS 416863	41	101	0.24	3.6	118
ISIS 416865	383	262	0.27	4.1	95
ISIS 416866	36	120	0.29	4.3	113
ISIS 416867	45	82	0.21	3.3	144

[0864] 肾功能

[0865] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肾功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测定血浆血液尿素氮 (BUN) 浓度,结果以 mg/dL 表示在表 82 中提供。挑选那些没有使 BUN 水平相比于 PBS 对照提高超过两倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。

[0866] 表 82

[0867] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠肾脏中 BUN 水平 (mg/dL) 的影响

[0868]

	BUN
PBS	22
ISIS 416850	24
ISIS 416858	23
ISIS 416864	24
ISIS 412223	28
ISIS 412224	29
ISIS 412225	23

ISIS 413481	23
ISIS 413482	27
ISIS 416848	23
ISIS 416849	23
ISIS 416851	21
ISIS 416852	21
ISIS 416853	22
ISIS 416854	27
ISIS 416855	23
ISIS 416856	21
ISIS 416857	17
ISIS 416859	18
ISIS 416860	25
ISIS 416861	23
ISIS 416862	21
ISIS 416863	22
ISIS 416865	20
ISIS 416866	22
ISIS 416867	20

[0869] 血液学分析

[0870] 从所有小鼠分组获得的血液被送去 Antech Diagnostics 进行血细胞比容 (HCT) 以及如 WBC (中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞的测定以及总血红蛋白含量的分析。结果在表 83 和 84 中提供。挑选那些没有使血小板数降低超过 50% 和没有使单核细胞数提高超过三倍的反义寡核苷酸用于进一步研究。

[0871] 表 83

[0872] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠中血液因子的影响

[0873]

	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	血红蛋白 (g/dL)	HCT (%)	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)
PBS	10	15	51	7
ISIS 416850	10	15	49	5
ISIS 416858	9	14	50	8
ISIS 416864	10	15	52	5
ISIS 412223	9	15	48	7
ISIS 412224	10	15	50	9
ISIS 412225	9	15	50	7
ISIS 413481	9	13	45	7
ISIS 413482	10	15	50	8
ISIS 416848	9	14	47	7
ISIS 416849	9	14	48	9
ISIS 416851	9	14	47	6
ISIS 416852	9	14	49	5
ISIS 416853	11	17	56	8
ISIS 416854	9	13	43	12
ISIS 416855	9	14	50	6
ISIS 416856	9	14	47	5
ISIS 416857	10	15	53	6
ISIS 416859	10	15	49	6
ISIS 416860	10	15	51	7
ISIS 416861	9	14	48	7
ISIS 416862	9	14	49	6
ISIS 416863	9	14	48	7
ISIS 416865	9	14	50	7
ISIS 416866	9	15	51	6
ISIS 416867	10	14	47	8

[0874]

[0875] 表 84

[0876] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠中血细胞数的影响

[0877]

	中性粒细胞 (细胞/ μ L)	淋巴细胞 (细胞/ μ L)	单核细胞(细 胞/ μ L)	血小板 ($10^3/\mu$ L)
PBS	1023	6082	205	940
ISIS 416850	1144	4004	156	916
ISIS 416858	2229	5480	248	782
ISIS 416864	973	3921	141	750
ISIS 412223	1756	4599	200	862
ISIS 412224	2107	6284	195	647
ISIS 412225	1547	4969	293	574
ISIS 413481	1904	4329	204	841
ISIS 413482	1958	5584	275	818
ISIS 416848	1264	5268	180	953
ISIS 416849	1522	6967	253	744
ISIS 416851	1619	4162	194	984
ISIS 416852	1241	3646	189	903
ISIS 416853	2040	5184	225	801
ISIS 416854	2082	9375	455	1060
ISIS 416855	1443	4236	263	784
ISIS 416856	1292	3622	151	753
ISIS 416857	1334	3697	215	603
ISIS 416859	1561	4363	229	826
ISIS 416860	1291	4889	161	937
ISIS 416861	1122	5119	219	836
ISIS 416862	1118	4445	174	1007
ISIS 416863	1330	5617	226	1131
ISIS 416865	1227	5148	315	872
ISIS 416866	1201	4621	211	1045
ISIS 416867	1404	6078	188	1006

[0878] 例 38 :CD1 小鼠肝脏中反义寡核苷酸的半衰期的测定

[0879] 进一步评估了已经在 CD1 小鼠 (例 37) 中被评估过的 15 条反义寡核苷酸。以 ISIS 反义寡核苷酸处理 CD1 小鼠,评估寡核苷酸的半衰期以及寡核苷酸降解和从肝脏中消除所花的时间。

[0880] 处理

[0881] 按组分别向每组 15 只 CD1 小鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 412223、ISIS 412225、ISIS 413481、ISIS 413482、ISIS 416851、ISIS 416852、ISIS 416856、ISIS 416860、ISIS 416861、ISIS 416863、ISIS 416866、ISIS 416867、ISIS 412224、ISIS 416848 或 ISIS 416859,每周两次,共 2 周。分别在最后剂量后 3 天、28 天和 56 天从每组选出 5 只小鼠处死,收集肝脏用于分析。

[0882] 寡核苷酸浓度的测定

[0883] 测定全长寡核苷酸的浓度。方法采用以前发表的方法 (Leeds et al., 1996 ;Geary et al., 1999) 的改良方法,其包括苯酚-氯仿 (液体-液体) 提取和之后的固相提取。

在提取前加入内标物 (ISIS 355868, 27 单体的 2' -O- 甲氧乙基修饰的磷硫酰寡核苷酸, GCGTTTGCTCTTCTTCTTTCGTTTTT, 此处标为 SEQ ID NO :270)。以约为 $1.14 \mu\text{g/g}$ 的定量下限 (LLOQ), 用校正曲线计算组织样本浓度。结果以 $\mu\text{g/g}$ 肝脏组织表示, 在表 85 中提供。每条寡核苷酸的半衰期也在表 85 中提供。

[0884] 表 85

[0885] 全长寡核苷酸 CD1 在小鼠肝脏中的浓度和半衰期

[0886]

ISIS No.	结构域	第 3 天:	第 28 天:	第 56 天:	半衰期 (天):
412223	5-10-5	276	127	52	21.9
412224	5-10-5	287	111	31	16.6
412225	5-10-5	279	91	47	20.7
413481	5-10-5	185	94	31	20.6
413482	5-10-5	262	95	40	19.5
416848	5-10-5	326	147	68	23.5
416851	5-10-5	319	147	68	23.8
416852	5-10-5	306	145	83	28.4
416856	5-10-5	313	115	46	19.2
416859	5-10-5	380	156	55	19.0
416860	5-10-5	216	96	36	20.6
416861	5-10-5	175	59	39	24.5
416863	5-10-5	311	101	48	19.8
416866	5-10-5	246	87	25	16.0
416867	5-10-5	246	87	35	18.9

[0888] 例 39 : 靶向人因子 11 的反义寡核苷酸在 Sprague-Dawley 大鼠中的耐受性

[0889] 针对各种代谢指标水平的变化, 进一步在 Sprague-Dawley 大鼠中评估了已经在 CD1 小鼠 (例 37) 中评估过的 15 条反义寡核苷酸。

[0890] 处理

[0891] 按组向每组 4 只 Sprague Dawley 大鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 412223、ISIS 412224、ISIS 412225、ISIS 413481、ISIS 413482、ISIS 416848、ISIS 416851、ISIS 416852、ISIS 416856、ISIS 416859、ISIS 416860、ISIS 416861、ISIS 416863、ISIS 416866 或 ISIS 416867, 每周两次, 共 6 周。向 4 只 Sprague Dawley 大鼠的对照组皮下注射 PBS, 每周两次, 共 6 周。在处理周期之前和期间测定体重。最后剂量后三天, 收集尿液样本, 然后处死大鼠, 测定器官重量, 并收集血液用于进一步分析。

[0892] 体重和器官重量

[0893] 在研究开始时以及随后每周两次测定大鼠体重。体重在表 86 中提供, 用与研究开始前 PBS 对照的体重相比增加的克数来表示。在研究结束时测定肝脏、脾脏和肾脏的重量, 以占体重的百分比表示, 并在表 86 中提供。挑选那些没有使肝脏和脾脏重量增加超过 PBS 对照的六倍的反义寡核苷酸用于下一步分析。

[0894] 表 86

[0895] 反义寡核苷酸处理后的 Sprague Dawley 大鼠的体重和器官重量的变化

[0896]

	体重 (g)	肝脏 (%)	肾脏 (%)	脾脏 (%)
PBS	179	4	0.9	0.2
ISIS 412223	126	5	1.0	0.5
ISIS 412224	165	5	1.0	0.5

[0897]

ISIS 412225	184	4	1.0	0.5
ISIS 413481	147	5	0.9	0.3
ISIS 413482	158	5	1.0	0.6
ISIS 416848	117	5	1.1	0.8
ISIS 416851	169	5	0.9	0.3
ISIS 416852	152	5	1.0	0.4
ISIS 416856	156	5	1.0	0.4
ISIS 416859	128	4	1.0	0.4
ISIS 416860	123	5	1.0	0.5
ISIS 416861	182	5	0.9	0.3
ISIS 416863	197	5	1.0	0.4
ISIS 416866	171	5	1.0	0.5
ISIS 416867	129	5	1.0	0.5

[0898] 肝功能

[0899] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆转氨酶浓度。丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 的测量用 IU/L 表示,结果在表 87 中提供。挑选那些没有使 ALT/AST 水平提高超过对照水平七倍以的反义寡核苷酸用以下一步分析。血浆胆红素和白蛋白的水平也用同样的临床化学分析仪测定,结果用 mg/dL 表示,在表 87 中提供。挑选那些没有使胆红素水平提高超过对照水平两倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[0900] 表 87

[0901] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠肝脏中代谢指标的影响

[0902]

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	胆红素 (mg/dL)	白蛋白 (mg/dL)
PBS	42	71	0.13	4
ISIS 412223	85	180	0.14	5
ISIS 412224	84	132	0.12	4
ISIS 412225	48	108	0.15	5
ISIS 413481	54	80	0.22	4
ISIS 413482	59	157	0.14	4
ISIS 416848	89	236	0.14	3
ISIS 416851	64	91	0.14	4
ISIS 416852	49	87	0.15	4
ISIS 416856	123	222	0.13	4

[0903]

ISIS 416859	114	206	0.21	5
ISIS 416860	70	157	0.15	4
ISIS 416861	89	154	0.15	5
ISIS 416863	47	78	0.13	4
ISIS 416866	41	78	0.16	4
ISIS 416867	47	126	0.17	4

[0904] 肾功能

[0905] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肾功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆血液尿素氮 (BUN) 和肌酐的浓度。结果以 mg/dL 表示,在表 88 中提供。挑选那些没有使 BUN 水平相比 PBS 对照提升超过两倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。计算出在反义寡核苷酸处理之后总的尿液样本中总的尿蛋白和尿蛋白与肌酐的比值,在表 88 中提供。挑选那些没有使尿蛋白 / 肌酐的比值相比于 PBS 对照提升超过五倍的反义寡核苷酸用于进一步研究。

[0906] 表 88

[0907] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠肾脏中代谢指标的影响

[0908]

	BUN (mg/dL)	肌酐 (mg/dL)	总的尿 蛋白 (mg/dL)	尿蛋白/肌酐比 值
PBS	19	38	60	1.7
ISIS 412223	24	46	224	4.6
ISIS 412224	24	44	171	3.8
ISIS 412225	23	58	209	4.0
ISIS 413481	26	45	148	3.6
ISIS 413482	23	34	157	4.8
ISIS 416848	26	64	231	3.9
ISIS 416851	24	70	286	4.0
ISIS 416852	25	60	189	3.0
ISIS 416856	23	48	128	2.7
ISIS 416859	24	44	144	3.3
ISIS 416860	23	58	242	4.6
ISIS 416861	22	39	205	5.1
ISIS 416863	29	73	269	3.8
ISIS 416866	22	85	486	6.2
ISIS 416867	22	70	217	3.1

[0909] 血液学分析

[0910] 从所有大鼠组获得的血液被送去 Antech Diagnostics 进行血细胞比容 (HCT) 测定以及如 WBC (中性粒细胞和淋巴细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞以及总血红蛋白含量的测定。结果在表 89 和 90 中提供。挑选那些没有使血小板数降低超过 50% 并且没有使单核细胞数提升超过三倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[0911] 表 89

[0912] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠中血液因子的影响

[0913]

	RBC ($10^6/\text{mL}$)	血红蛋白 (g/dL)	HCT (%)	WBC ($10^3/\text{mL}$)
PBS	6.9	13.2	42	9
ISIS 412223	7.2	13.1	41	20
ISIS 412224	7.4	13.4	42	20
ISIS 412225	7.4	13.4	42	15
ISIS 413481	7.5	14.2	43	14
ISIS 413482	7.1	13.2	40	13
ISIS 416848	6.0	11.1	35	17
ISIS 416851	7.4	13.7	42	11
ISIS 416852	7.2	13.4	42	13
ISIS 416856	7.7	14.1	43	19
ISIS 416859	7.8	14.0	45	16
ISIS 416860	7.8	14.1	45	17
ISIS 416861	7.7	14.6	45	15
ISIS 416863	7.6	14.1	45	17
ISIS 416866	7.8	14.0	44	20
ISIS 416867	7.8	14.0	45	14

[0914] 表 90

[0915] Sprague-Dawley 大鼠中反义寡核苷酸处理对血细胞数的影响

[0916]

	中性粒 细胞 (/mL)	淋巴细胞 (/mL)	血小板 ($10^3/\square \text{L}$)
PBS	988	7307	485
ISIS 412223	1826	16990	567
ISIS 412224	1865	16807	685
ISIS 412225	1499	13204	673

[0917]

ISIS 413481	1046	12707	552
ISIS 413482	1125	11430	641
ISIS 416848	1874	14316	384
ISIS 416851	1001	9911	734
ISIS 416852	836	11956	632
ISIS 416856	3280	14328	740
ISIS 416859	1414	14323	853
ISIS 416860	1841	13986	669
ISIS 416861	1813	12865	1008
ISIS 416863	1720	14669	674
ISIS 416866	1916	16834	900
ISIS 416867	3044	10405	705

[0918] 例 40 :反义寡核苷酸在 Sprague-Dawley 大鼠的肝脏和肾脏中的半衰期的测定

[0919] 以靶向人因子 11 的 ISIS 反义寡核苷酸处理 Sprague Dawley 大鼠,评估了寡核苷

酸的半衰期以及寡核苷酸降解和从肝脏和肾脏消除所花的时间。

[0920] 处理

[0921] 按组向每组 4 只 Sprague Dawley 大鼠皮下注射 20mg/kg 的 ISIS 412223、ISIS 412224、ISIS 412225、ISIS 413481、ISIS 413482、ISIS 416848、ISIS 416851、ISIS 416852、ISIS 416856、ISIS 416859、ISIS 416860、ISIS 416861、ISIS 416863、ISIS 416866 或 ISIS 416867，每周两次，共 2 周。最后剂量后三天，处死大鼠并收集肝脏和肾脏。

[0922] 寡核苷酸浓度的测定

[0923] 测定全长寡核苷酸浓度以及总的寡核苷酸浓度（包括降解形式）。方法采用以前发表方法 (Leeds et al., 1996 ; Geary et al., 1999) 的改良方法，其包括苯酚-氯仿（液体-液体）提取和后续的固相提取。在提取前加入内标物 (ISIS 355868, 27 单体的 2'-O-甲氧乙基修饰的磷硫酰寡核苷酸, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, 此处被指定为 SEQ ID NO : 270)。以约为 1.14 $\mu\text{g/g}$ 的定量下限 (LLOQ)，用校正曲线计算组织样本浓度。结果以 $\mu\text{g/g}$ 肝脏或肾脏组织表示，在表 91 和 92 中提供。然后用 WinNonlin 软件 (PHARSIGHT) 计算半衰期。

[0924] 表 91

[0925] Sprague Dawley 大鼠的肝脏和肾脏中的全长寡核苷酸浓度 ($\mu\text{g/g}$)

[0926]

ISIS No.	结构域	肾脏	肝脏
412223	5-10-5	551	97
412224	5-10-5	487	107
412225	5-10-5	202	119
413481	5-10-5	594	135
413482	5-10-5	241	95
416848	5-10-5	488	130
416851	5-10-5	264	193
416852	5-10-5	399	108
416856	5-10-5	378	84
416859	5-10-5	253	117
416860	5-10-5	247	94
416861	5-10-5	187	159
416863	5-10-5	239	82
416866	5-10-5	210	98
416867	5-10-5	201	112

[0927] 表 92

[0928] Sprague Dawley 大鼠的肝脏和肾脏中的总的寡核苷酸浓度 ($\mu\text{g/g}$)

[0929]

ISIS No.	结构域	肾脏	肝脏
412223	5-10-5	395	86
412224	5-10-5	292	78
412225	5-10-5	189	117
413481	5-10-5	366	96
413482	5-10-5	217	91
416848	5-10-5	414	115
416851	5-10-5	204	178
416852	5-10-5	304	87
416856	5-10-5	313	80
416859	5-10-5	209	112
416860	5-10-5	151	76
416861	5-10-5	165	144
416863	5-10-5	203	79
416866	5-10-5	145	85
416867	5-10-5	157	98

[0930] 表 93

[0931] Sprague Dawley 大鼠的肝脏和肾脏中的 ISIS 寡核苷酸的半衰期 (天)

[0932]

ISIS No.	结构域	半衰期
412223	5-10-5	22
412224	5-10-5	17
412225	5-10-5	21
413481	5-10-5	21
413482	5-10-5	20
416848	5-10-5	24
416851	5-10-5	24
416852	5-10-5	28
416856	5-10-5	19
416859	5-10-5	19
416860	5-10-5	21
416861	5-10-5	25
416863	5-10-5	20
416866	5-10-5	16
416867	5-10-5	19

[0933] 例 41 :靶向人因子 11 的反义寡核苷酸在 CD1 小鼠中的耐受性

[0934] 向 CD1 小鼠给药靶向人因子 11 且具有 6-8-6MOE 和 5-8-5MOE 结构域的 ISIS 反义寡核苷酸,评估多种代谢指标水平的变化。

[0935] 处理

[0936] 按组向每组 5 只 CD1 小鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 416850、ISIS 445498、ISIS 445503、ISIS 445504、ISIS 445505、ISIS 445509、ISIS 445513、ISIS 445522、ISIS 445530、ISIS 445531 或 ISIS 445532,每周两次,共 6 周。向 5 只 CD1 小鼠的对照组皮下注射 PBS,每周两次,共 6 周。在处理周期之前和结束时测定体重。最后剂量后三天,处死小鼠,测定器官重量,并收集血液用于进一步分析。

[0937] 体重和器官重量

[0938] 小鼠体重的变化在表 94 中提供,表示为相对于处理开始前 PBS 对照重量的克数增加。在研究结束时测定肝脏、脾脏和肾脏的重量,以占体重的百分比表示,在表 94 中提供。挑选那些没有使肝脏和脾脏重量提高超过 PBS 对照六倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。

[0939] 表 94

[0940] 反义寡核苷酸处理后的 CD1 小鼠的体重和器官重量的变化

[0941]

	体重 (g)	肝脏 (%)	肾脏 (%)	脾脏 (%)
PBS	10	5	1.6	0.3
ISIS 416850	11	6	1.5	0.4
ISIS 445498	10	6	1.6	0.5
ISIS 445503	9	8	1.4	0.6
ISIS 445504	11	6	1.6	0.4
ISIS 445505	12	6	1.5	0.5
ISIS 445509	10	6	1.6	0.5
ISIS 445513	9	5	1.6	0.4
ISIS 445522	11	6	1.7	0.4
ISIS 445530	11	6	1.5	0.5
ISIS 445531	10	6	1.5	0.5
ISIS 445532	10	6	1.6	0.4

[0942] 肝功能

[0943] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆转氨酶浓度。丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 的测量用 IU/L 表示,结果在表 95 中提供。挑选那些没有使 ALT/AST 水平提升超过对照水平七倍以上的反义寡核苷酸用以下一步分析。还测定了血浆胆红素和白蛋白水平,结果用 mg/dL 表示,在表 95 中提供。挑选那些没有使胆红素水平提高超过对照水平两倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[0944] 表 95

[0945] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠肝脏中代谢指标的影响

[0946]

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	胆红素 (mg/dL)	白蛋白 (mg/dL)
PBS	34	49	0.23	3.6
ISIS 416850	90	115	0.20	3.2

[0947]

ISIS 445498	66	102	0.24	3.4
ISIS 445503	1314	852	0.28	3.4
ISIS 445504	71	107	0.17	3.4
ISIS 445505	116	153	0.18	3.2
ISIS 445509	80	117	0.17	3.1
ISIS 445513	37	84	0.22	3.1
ISIS 445522	51	110	0.19	3.4
ISIS 445530	104	136	0.18	3.2
ISIS 445531	60	127	0.16	3.2
ISIS 445532	395	360	0.20	2.9

[0948] 肾功能

[0949] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肾功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测定血浆血液尿素氮 (BUN) 浓度。结果以 mg/dL 表示,在表 96 中提供。挑选那些没有使 BUN 水平相比 PBS 对照提升超过两倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。

[0950] 表 96

[0951] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠肾脏中 BUN 水平 (mg/dL) 的影响

[0952]

	BUN
PBS	29
ISIS 416850	28
ISIS 445498	28
ISIS 445503	29
ISIS 445504	29
ISIS 445505	29
ISIS 445509	29
ISIS 445513	27
ISIS 445522	28
ISIS 445530	26
ISIS 445531	27
ISIS 445532	23

[0953]

[0954] 血液学分析

[0955] 从所有小鼠分组获得的血液被送去 Antech Diagnostics 进行血细胞比容 (HCT) 测定以及如 WBC (中性粒细胞和淋巴细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞以及总血红蛋白含

量的测定。结果在表 97 和 98 中提供。挑选那些没有使血小板降低超过 50% 并且没有使单核细胞数提高超过三倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[0956] 表 97

[0957] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠中血液因子的影响

[0958]

	RBC ($10^6/\text{mL}$)	血红蛋白 (g/dL)	HCT (%)	WBC ($10^3/\text{mL}$)
PBS	9.6	15.0	51	6
ISIS 416850	9.8	14.8	50	6
ISIS 445498	9.4	13.9	47	5
ISIS 445503	9.2	13.6	46	8
ISIS 445504	9.6	14.7	49	5
ISIS 445505	9.6	14.6	49	5
ISIS 445509	10.2	15.3	51	5
ISIS 445513,	9.8	15.0	50	7
ISIS 445522	9.7	14.6	49	5
ISIS 445530	10.0	15.1	50	7
ISIS 445531	9.4	14.5	48	9
ISIS 445532	9.7	14.8	48	7

[0959] 表 98

[0960] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠中血细胞数的影响

[0961]

	中性粒 细胞 (/mL)	淋巴细胞 (/mL)	血小板 ($10^3/\text{mL}$)
PBS	1356	4166	749
ISIS 416850	1314	4710	614
ISIS 445498	1197	3241	802
ISIS 445503	1475	6436	309

[0962]

ISIS 445504	959	3578	826
ISIS 445505	818	3447	725
ISIS 445509	1104	3758	1085
ISIS 445513	959	5523	942
ISIS 445522	698	3997	1005
ISIS 445530	930	5488	849
ISIS 445531	2341	6125	996
ISIS 445532	1116	5490	689

[0963] 例 42 : 靶向人因子 11 的反义寡核苷酸在 Sprague-Dawley 大鼠中的耐受性

[0964] 就各种代谢指标水平的变化进一步在 Sprague-Dawley 大鼠中评估了已经在 CD1 小鼠 (例 41) 中评估过的 8 条反义寡核苷酸。

[0965] 处理

[0966] 按组向每组 4 只 Sprague Dawley 大鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 445498、ISIS

445504、ISIS 445505、ISIS 445509、ISIS 445513、ISIS 445522、ISIS 445530 或 ISIS 445531,每周两次,共 6 周。向 Sprague Dawley 大鼠的对照组皮下注射 PBS,每周两次,共 6 周。在处理之前和期间测定体重。最后剂量后三天,收集尿液样本,然后处死大鼠,测定器官重量,并收集血液用于进一步分析。

[0967] 体重和器官重量

[0968] 在研究开始时以及随后每周两次测定大鼠体重。体重在表 99 中提供,表示为相对研究开始前 PBS 对照体重的增加百分比。在研究结束时测定肝脏、脾脏和肾脏的重量,以占体重的百分比表示,也在表 99 中提供。挑选那些没有使肝脏和脾脏重量提升超过 PBS 对照六倍以上的反义寡核苷酸用于下一步分析。

[0969] 表 99

[0970] 反义寡核苷酸处理后的 Sprague Dawley 大鼠的体重和器官重量的变化(%)

[0971]

	体重	肝脏	脾脏	肾脏
ISIS 445498	-17	+26	+107	-10
ISIS 445504	-15	+22	+116	+6
ISIS 445505	-21	+12	+146	+2
ISIS 445509	-17	+16	+252	+3
ISIS 445513	-13	+25	+194	+15
ISIS 445522	-13	+26	+184	+19
ISIS 445530	-7	+24	+99	+4
ISIS 445531	-10	+17	+89	+4

[0972] 肝功能

[0973] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆转氨酶浓度。测定血浆 ALT(丙氨酸转氨酶)和 AST(天冬氨酸转氨酶)浓度,结果用 IU/L 表示,在表 100 中提供。挑选那些没有使 ALT/AST 水平提升超过对照水平七倍的反义寡核苷酸用以下一步研究。血浆胆红素和白蛋白水平也用同样的临床化学分析仪测定;结果用 mg/dL 表示,在表 100 中提供。挑选那些没有使胆红素水平提升超过对照水平两倍以上反义寡核苷酸用于进一步研究。

[0974] 表 100

[0975] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠肝脏中代谢指标的影响

[0976]

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	胆红素 (mg/dL)	白蛋白 (mg/dL)
PBS	102	36	0.13	3.7
ISIS 445498	417	124	0.14	3.7
ISIS 445504	206	86	0.11	3.5
ISIS 445505	356	243	0.15	3.6
ISIS 445509	676	291	0.14	3.5
ISIS 445513	214	91	0.15	3.5
ISIS 445522	240	138	0.47	3.6
ISIS 445530	116	56	0.11	3.7
ISIS 445531	272	137	0.12	3.7

[0977] 肾功能

[0978] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肾功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆血液尿素氮 (BUN) 和肌酐浓度。结果以 mg/dL 表示,在表 101 中提供。挑选那些没有使 BUN 水平相比 PBS 对照提升超过两倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。在反义寡核苷酸处理之后,计算出总的尿液样本中总的尿蛋白和尿蛋白与肌酐的比值,也在表 101 中提供。挑选那些没有使尿蛋白 / 肌酐的比值相比 PBS 对照提升超过五倍的反义寡核苷酸用于进一步研究。

[0979] 表 101

[0980] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠肾脏中代谢指标的影响

[0981]

	BUN (mg/dL)	肌酐 (mg/dL)	尿蛋白/肌酐 比值
PBS	18	0.4	1.4
ISIS 445498	25	0.5	3.1
ISIS 445504	26	0.4	4.3
ISIS 445505	24	0.4	3.8
ISIS 445509	27	0.5	4.0
ISIS 445513	24	0.4	4.6
ISIS 445522	25	0.4	6.4
ISIS 445530	22	0.4	4.2
ISIS 445531	23	0.4	3.4

[0982] 血液学分析

[0983] 从所有大鼠组获得的血液被送去 Antech Diagnostics 进行血细胞比容 (HCT) 测定以及如 WBC (中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞以及总血红蛋白含量的测定。结果在表 102 和 103 中提供。挑选那些没有使血小板数降低超过 50% 并且没有使单核细胞数提升超过三倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[0984] 表 102

[0985] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠中血液因子的影响

[0986]

	RBC (/pL)	血红蛋白 (g/dL)	HCT (%)	WBC (/nL)
PBS	8.8	16.0	55	13
ISIS 445498	8.5	14.7	49	13
ISIS 445504	8.9	14.7	50	16
ISIS 445505	9.1	15.0	50	21
ISIS 445509	8.4	14.1	47	17

[0987]

ISIS 445513	7.8	13.0	44	17
ISIS 445522	7.7	13.6	47	18
ISIS 445530	8.9	14.7	50	12
ISIS 445531	8.8	14.8	50	13

[0988] 表 103

[0989] Sprague-Dawley 大鼠中反义寡核苷酸处理对血细胞数的影响

[0990]

	中性粒 细胞 (%)	淋巴细胞 (%)	单核细胞 (%)	血小板 (/nL)
PBS	14	82	2.0	1007
ISIS 445498	9	89	2.0	1061
ISIS 445504	10	87	2.0	776
ISIS 445505	10	87	2.5	1089
ISIS 445509	11	84	3.8	1115
ISIS 445513	14	82	3.5	1051
ISIS 445522	13	84	2.8	1334
ISIS 445530	11	87	2.0	1249
ISIS 445531	10	86	2.8	1023

[0991] 例 43 :靶向人因子 11 的反义寡核苷酸在 CD1 小鼠中的耐受性

[0992] 以靶向人因子 11 且具有 4-8-4MOE、3-8-3MOE、2-10-2MOE、3-10-3MOE 和 4-10-4MOE 结构域的 ISIS 反义寡核苷酸给药于 CD1 小鼠,评估多种代谢指标水平的变化。

[0993] 处理

[0994] 按组向每组 5 只 CD1 小鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 449707、ISIS 449708、ISIS 449409、ISIS 449710 或 ISIS 449711,每周两次,共 6 周。向 5 只 CD1 小鼠的对照组皮下注射 PBS,每周两次,共 6 周。在处理之前和结束时测定体重。最后剂量后三天,处死小鼠,测定器官重量,并收集血液用于进一步分析。

[0995] 体重和器官重量

[0996] 研究结束时测得的小鼠体重以克表示,在表 104 中提供。在研究结束时也测定肝脏、脾脏和肾脏的重量,以占体重的百分比表示,在表 104 中提供。挑选那些没有使肝脏和脾脏重量相比 PBS 对照提升超过六倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。

[0997] 表 104

[0998] 反义寡核苷酸处理后的 CD1 小鼠的体重和器官重量的变化

[0999]

	体重 (g)	肝脏 (%)	脾脏 (%)	肾脏 (%)
PBS	39	-	-	-
ISIS 449707	42	+11	+63	-5
ISIS 449708	40	+17	+66	0
ISIS 449709	40	+15	+62	-14
ISIS 449710	42	+6	+43	-7
ISIS 449711	42	+18	+63	-12

[1000] 肝功能

[1001] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆转氨酶浓度。血浆测定 ALT(丙氨酸转氨酶)和 AST(天冬氨酸转氨酶)浓度,结果用 IU/L 表示,在表 105 中提供。挑选那些没有使 ALT/AST 水平提升超过对照水平七倍的反义寡核苷酸用以下一步研究。血浆胆红素和白蛋白水平也用同样的临床化学分析仪测定,结果用 mg/dL 表示,在表 105 中提供。挑选那些没有使胆红素水平提升超过对照水平两倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[1002] 表 105

[1003] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠肝脏中代谢指标的影响

[1004]

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	胆红素 (mg/dL)	白蛋白 (mg/dL)
PBS	39	52	0.22	3.2
ISIS 449707	41	62	0.19	2.3
ISIS 449708	66	103	0.17	2.8
ISIS 449709	62	83	0.18	2.8
ISIS 449710	43	95	0.18	2.8
ISIS 449711	52	83	0.22	2.8

[1005] 肾功能

[1006] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肾功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆血液尿素氮 (BUN) 和肌酐浓度。结果以 mg/dL 表示,在表 106 中提供。挑选那些没有使 BUN 水平相比 PBS 对照提升超过两倍的反义寡核苷酸用于下一步分析。

[1007] 表 106

[1008] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠肾脏中代谢指标 (mg/dL) 的影响

[1009]

	BUN	肌酐
PBS	28	0.3
ISIS 449707	27	0.2
ISIS 449708	28	0.2
ISIS 449709	34	0.3
ISIS 449710	29	0.2
ISIS 449711	26	0.2

[1010] 血液学分析

[1011] 从所有小鼠组中获得的血液被送去 Antech Diagnostics 进行血细胞比容 (HCT)

测定以及如 WBC (中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞以及总血红蛋白含量的测定。结果在表 107 和 108 中提供。挑选那些没有使血小板数下降超过 50% 并且没有使单核细胞数提升超过三倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[1012] 表 107

[1013] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠中血液因子的影响

[1014]

	RBC (/pL)	血红蛋白 (g/dL)	血细胞比 容 (%)	WBC (/nL)
PBS	9.8	14.6	54	6
ISIS 449707	8.4	12.4	45	6
ISIS 449708	9.2	13.2	48	7
ISIS 449709	9.2	13.2	49	5
ISIS 449710	9.1	13.5	48	7
ISIS 449711	9.0	13.3	48	6

[1015] 表 108

[1016] 反义寡核苷酸处理对 CD1 小鼠中血细胞数的影响

[1017]

	中性粒细 胞(%)	淋巴细胞 (%)	单核细胞 (%)	血小板 (/nL)
PBS	15	80	3	1383
ISIS 449707	11	85	3	1386
ISIS 449708	17	77	5	1395

[1018]

ISIS 449709	19	76	4	1447
ISIS 449710	15	81	3	1245
ISIS 449711	15	79	6	1225

[1019] 例 44 :靶向人因子 11 的反义寡核苷酸在 Sprague-Dawley 大鼠中的耐受性

[1020] 就各种代谢指标水平的变化进一步在 Sprague-Dawley 大鼠中评估已经在 CD1 小鼠 (例 43) 中评估过的 5 条反义寡核苷酸。

[1021] 处理

[1022] 按组向每组 4 只 Sprague-Dawley 大鼠皮下注射 50mg/kg 的 ISIS 449707、ISIS 449708、ISIS 449409、ISIS 449710 或 ISIS 449709, 每周两次, 共 6 周。向 4 只 Sprague-Dawley 大鼠的对照组皮下注射 PBS, 每周两次, 共 6 周。在处理之前和期间测定体重。最后剂量后三天, 收集尿液样本, 然后处死大鼠, 测定器官重量, 并收集血液用于进一步分析。

[1023] 体重和器官重量

[1024] 在研究开始时以及研究结束时测定大鼠体重。体重变化在表 109 中提供, 表示为相比研究开始前 PBS 对照重量的克数增加。在研究结束时测定肝脏、脾脏和肾脏的重量, 以占体重的百分比表示, 在表 109 中提供。挑选那些没有使肝脏和脾脏重量提升超过 PBS 对照六倍的反义寡核苷酸用以进一步分析。

[1025] 表 109

[1026] 反义寡核苷酸处理后的 Sprague Dawley 大鼠的体重和器官重量的变化

[1027]

	体重 (g)	肝脏 (%)	脾脏 (%)	肾脏 (%)
PBS	478	-	-	-
ISIS 449707	352	+41	+400	+80
ISIS 449708	382	+31	+259	+40
ISIS 449709	376	+8	+231	+19
ISIS 449710	344	+82	+302	+50
ISIS 449711	362	+52	+327	+72

[1028]

[1029] 肝功能

[1030] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测定血浆 ALT 和 AST 浓度。测定血浆丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 浓度,结果用 IU/L 表示,在表 110 中提供。挑选那些没有使 ALT/AST 提升超过对照水平七倍的反义寡核苷酸用于下一步研究。还测定血浆胆红素和白蛋白水平,结果用 mg/dL 表示,在表 110 中提供。挑选那些没有使胆红素水平提升超过对照水平两倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[1031] 表 110

[1032] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠肝脏中代谢指标的影响

[1033]

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	胆红素 (mg/dL)	白蛋白 (mg/dL)
PBS	41	107	0.1	3.4
ISIS 449707	61	199	0.2	3.1
ISIS 449708	25	90	0.1	3.2
ISIS 449709	63	126	0.2	3.1
ISIS 449710	36	211	0.1	2.9
ISIS 449711	32	163	0.1	2.9

[1034] 肾功能

[1035] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肾功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测定血浆 BUN 和肌酐浓度。结果以 mg/dL 表示,在表 111 中提供。挑选那些没有使 BUN 水平相比 PBS 对照提升超过两倍的反义寡核苷酸用以下一步分析。在反义寡核苷酸处理之后,计算出总的尿液样本中总的尿蛋白和尿蛋白与肌酐的比值,也在表 111 中提供。挑选那些没有使尿蛋白 / 肌酐的比值相比 PBS 对照提升超过五倍的反义寡核苷酸用于进一步研究。

[1036] 表 111

[1037] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠肾脏中代谢指标的影响

[1038]

	BUN (mg/dL)	肌酐 (mg/dL)	尿蛋白/肌酐比 值
PBS	22	0.4	1.5

[1039]

ISIS 449707	24	0.4	3.2
ISIS 449708	24	0.4	5.7
ISIS 449709	24	0.4	3.4
ISIS 449710	29	0.3	5.9
ISIS 449711	28	0.4	7.3

[1040] 血液学分析

[1041] 从所有大鼠组获得的血液被送去 Antech Diagnostics 进行血细胞比容 (HCT) 测定以及如 WBC (中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞以及总血红蛋白含量的测定。结果在表 112 和 113 中提供。挑选那些没有使血小板数降低超过 50% 并且没有使单核细胞数提升超过三倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。

[1042] 表 112

[1043] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠中血液因子的影响

[1044]

	RBC (/pL)	血红蛋白 (g/dL)	血细胞比 容 (%)	WBC (/nL)
PBS	8.2	15.1	50	16
ISIS 449707	6.0	12.0	40	20
ISIS 449708	6.6	12.2	40	22
ISIS 449709	6.9	12.6	41	14
ISIS 449710	6.3	12.5	41	13
ISIS 449711	6.4	12.6	43	13

[1045] 表 113

[1046] 反义寡核苷酸处理对 Sprague-Dawley 大鼠中血细胞数的影响

[1047]

	中性粒细 胞 (%)	淋巴细胞 (%)	单核细胞 (%)	血小板 (/nL)
PBS	12	84	2	1004
ISIS 449707	6	91	2	722
ISIS 449708	6	92	2	925
ISIS 449709	5	91	3	631
ISIS 449710	6	91	2	509
ISIS 449711	7	90	2	919

[1048] 例 45 : 靶向人因子 11 的反义寡核苷酸在猕猴中剂量依赖的药理学效应

[1049] 在猕猴中测试了一些反义寡核苷酸以确定寡核苷酸对于因子 11 活性、抗凝和失血时间、肝脏和肾脏分布以及耐受性的药理学效应。本研究使用的所有寡核苷酸都靶向人因子 11 的 mRNA, 也与猕猴的基因序列可完全交叉反应 (见表 44)。期望猕猴的 ISIS 寡核苷酸同样与猕猴的基因序列可完全交叉反应。在研究开始时, 在国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中没有猕猴的基因组序列; 因此, 无法确定与猕猴基因序列的交叉反应性。

[1050] 处理

[1051] 以逐步上升的剂量,按组向每组两只雄性猴和三只雌性猴皮下注射 ISIS 416838、ISIS 416850、ISIS 416858、ISIS 416864 或 ISIS 417002。在第 1 周,以 5mg/kg 的剂量向猴子给药三次反义寡核苷酸;在第 2 和第 3 周,以 5mg/kg 的剂量每周给药两次;在第 4 周,以 10mg/kg 的剂量每周给药三次;在第 5 和第 6 周,以 10mg/kg 的剂量每周给药两次;在第 7 周,以 25mg/kg 的剂量每周给药三次;在第 8、9、10、11 和 12 周,以 25mg/kg 的剂量每周给药两次。根据相同的给药方案,向包括两只雄性猴和三只雌性猴的对照组皮下注射 PBS。以长期的低剂量的给药方案,向包括两只雄性猴和三只雌性猴的额外实验组皮下注射 ISIS 416850。在第 1 周,以 5mg/kg 的剂量向猴子给药反义寡核苷酸,每周三次;在第 2 和第 3 周,以 5mg/kg 的剂量给药,每周两次;在第 4 周,以 10mg/kg 的剂量给药,每周三次;在第 5 至第 12 周,以 10mg/kg 的剂量给药,每周两次。每周测量体重。在处理开始前 14 天和 5 天以及随后每周一次采集血液样本,用于血浆中因子 11 蛋白活性分析、纤维蛋白原测定、PT 和 aPTT 测定、失血时间以及各种血液指标的测定。在第 85 天,当猕猴处于深度麻醉时用放血法实施安乐死,收集器官用于进一步分析。

[1052] RNA 分析

[1053] 在第 85 天,从肝脏组织中提取 RNA,用于使用引物探针组 LTS00301(正向引物序列 ACACGCATTAAAAAGAGCAAAGC,此处指定为 SEQ ID NO 271;反向引物序列 CAGTGTTCATGGTAAATGAAGAATGG,此处指定为 SEQ ID NO:272;以及探针序列 TGCAGGCACAGCATCCCAGTGTCTX,此处指定为 SEQ ID NO. 273)的因子 11 的实时 PCR 分析。结果表示为相对于 PBS 对照的因子 11 的抑制百分比。如表 114 所示,相比于 PBS 对照,ISIS 寡核苷酸处理导致因子 11 的 mRNA 的明显减少。

[1054] 表 114

[1055] 猕猴肝脏中因子 11mRNA 相对于 PBS 对照的抑制

[1056]

ISIS No	% 抑制
416838	37
416850	84
416858	90
416864	44
417002	57

[1057] 蛋白分析

[1058] 以亲和纯化的抗因子 11 的多克隆抗体为俘获抗体,以过氧化物酶结合的抗因子 11 的多克隆抗体为检测抗体,用三明治式 ELISA 测试法 (Affinity Biologicals Inc.) 分析所有猕猴组在不同天采集的血浆样本。猴血浆以 1 : 50 稀释用于试验。过氧化物酶活性通过与底物邻苯二胺孵育来表达。产生的颜色用 490nm 酶标仪定量,被认为与样本中因子 11 的浓度成正比。

[1059] 结果在表 115 中提供,表示为相对于 PBS 对照的抑制百分比。ISIS 416850 和 ISIS 416858 处理导致蛋白水平时间依赖地降低。

[1060] 表 115

[1061] 猕猴肝脏中因子 11 蛋白质相对于 PBS 对照的抑制

[1062]

天	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	0	0	0	0	0	0
-5	0	0	0	5	0	1
8	3	8	6	7	0	6
15	4	4	16	9	4	13
22	5	11	23	7	2	12
29	8	15	28	10	8	20
36	11	17	35	9	8	22
43	5	23	39	9	9	24
50	8	42	49	10	13	30
57	10	49	60	7	24	34
64	11	55	68	5	26	37
71	12	57	71	10	30	41
78	10	63	73	9	22	42
85	10	64	78	8	23	34

[1063]

[1064] PT 和 aPTT 试验

[1065] 血液样本收集在含柠檬酸钠的试管中。用 ACL 9000 凝结装置 (Instrumentation Laboratory, Italy) 重复两次测定 PT 和 aPTT。结果插入以柠檬酸钠为抗凝剂的被测对照猕猴血浆的梯度稀释的标准曲线上,以产生正常百分比形式的结果。

[1066] 用来自经 ISIS 寡核苷酸处理的猴的贫血小板血浆 (PPP) 测定凝血酶原时间 (PT) 和活化部分凝血活酶时间 (aPTT)。PT 和 aPTT 值在表 116 和 117 中给出,以国际标准化比 (INR) 值来表示。将每一实验组的 PT 或 aPTT 值除以 PBS 处理的组的 PT 或 aPTT,即测定了 PT 或 aPTT 的 INR 值。将该比值以采用的组织因子的国际敏感度指数 (ISI) 进行加幂。使用长期给药方案的 ISIS 寡核苷酸, ISIS 416850,用星号与其他寡核苷酸相区别。

[1067] 如表 116 所示, PT 在用 ISIS 寡核苷酸用逐步上升的给药方案或长期给药方案处理的猴中都没有明显延长。然而,如表 117 所示, aPTT 剂量依赖地延长。这些数据表明因子 11 的反义减少影响了接触激活通路,但没有影响血液凝结的外源性途径。因此,因子 11 的反义减少对于由异常血管壁而非组织损伤造成的血栓或凝结形成的抑制有用。

[1068] 表 116

[1069] ISIS 反义寡核苷酸在猕猴中对 PT 比值的影响

[1070]

天	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
-5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	1.03	1.00	1.05	1.02	1.02	1.03
15	1.03	1.02	1.07	1.07	1.04	1.06
22	1.07	1.02	1.06	1.03	1.04	1.06
29	1.03	1.03	1.08	1.06	1.01	1.00
36	1.05	1.02	1.07	1.06	1.05	1.06
43	1.03	1.01	1.08	1.04	1.03	1.02
50	1.02	1.02	1.03	1.01	0.99	0.98
[1071] 57	1.04	1.04	1.09	1.08	1.03	n.d.

64	1.04	1.03	1.09	1.10	1.03	n.d.
71	1.02	1.03	1.07	1.07	0.99	n.d.
78	1.04	1.05	1.10	1.08	1.02	n.d.
85	1.05	1.04	1.07	1.13	1.02	n.d.

[1072] n. d. = 没有数据

[1073] 表 117

[1074] ISIS 反义寡核苷酸在猕猴中对 aPTT 比值的影响

[1075]

天	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
-5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
8	1.07	1.05	1.03	1.05	1.05	1.12
15	1.05	1.05	1.07	1.03	1.03	1.07
22	1.20	1.13	1.18	1.11	1.16	1.21
29	1.19	1.13	1.20	1.13	1.11	1.26
36	1.20	1.26	1.36	1.19	1.18	1.34
43	1.18	1.17	1.28	1.07	1.06	1.22
50	1.25	1.68	1.55	1.26	1.18	1.35
57	1.21	1.59	1.59	1.19	1.22	n.d.
64	1.18	1.64	1.60	1.12	1.11	n.d.
71	1.15	1.76	1.70	1.18	1.16	n.d.
78	1.19	1.88	1.79	1.18	1.18	n.d.
85	1.22	1.99	1.76	1.25	1.20	n.d.

[1076] n. d. = 没有数据

[1077] 蛋白活性分析

[1078] 在各个时间点采集血液样本,用基于凝结时间的F11测试测定因子11酶原。用ST4半自动凝结装置(Diagnostica Stago, NJ)重复两次测定凝血时间。将30 μl以含BSA的HEPES-NaCl缓冲液以1/20稀释的以柠檬酸钠作为抗凝剂的样本血浆与30 μl aPTT试剂(自动化aPTT, Organon Technika, NC)以及30 μl缺乏因子11的以柠檬酸钠为抗凝剂的血浆(George King 生物医学公司)在37℃下孵育5分钟,随后加入30 μl 25mM CaCl₂以启动凝血。结果插入梯度稀释的以柠檬酸钠为抗凝剂的对照血浆的标准曲线上。

[1079] 结果以相对于 PBS 对照的因子 11 的抑制百分比表示,在表 118 中提供。使用长期给药方案的 ISIS 寡核苷酸, ISIS 416850,用星号与其他寡核苷酸相区别。

[1080] 表 118

[1081] 以逐步增加剂量 / 长期给药方案给药于猕猴的 ISIS 反义寡核苷酸对因子 11 蛋白的抑制

[1082]

处理之前/ 之后天数	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	0	0	0	0	0	0
-5	0	0	0	5	0	1
8	3	8	6	7	0	6
15	4	4	16	9	4	13
22	5	11	23	7	2	12
29	8	15	28	10	8	20
36	11	17	35	9	8	24
43	5	23	39	9	9	24
50	8	42	49	10	13	30
57	10	49	60	7	24	n.d.
64	11	55	68	5	26	n.d.
71	12	57	71	10	30	n.d.
78	10	63	73	9	22	n.d.
85	10	64	78	8	23	n.d.

[1083] n. d. = 没有数据

[1084] 纤维蛋白原测定

[1085] 收集 9 份新鲜猕猴血浆至 1 份柠檬酸三钠中。用 ACL 9000 凝结装置 (Instrumentation Laboratory, Italy) 测定样本的纤维蛋白原含量。结果以 mg/dL 表示, 在表 119 中提供。使用长期给药方案的 ISIS 寡核苷酸, ISIS 416850, 用星号与其他寡核苷酸相区别。

[1086] 表 119

[1087] ISIS 反义寡核苷酸在猕猴中对纤维蛋白原水平的影响

[1088]

[1089]

处理之前/之后天数	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	296	251	310	277	300	291	274
-5	246	205	261	246	243	222	227
8	245	209	281	246	227	221	232
15	207	198	270	219	210	195	174
22	219	183	243	222	184	199	192
29	231	184	234	220	205	199	192
36	235	182	232	225	202	191	185
43	231	186	219	229	198	187	194
50	251	216	215	259	233	236	204
57	235	190	186	225	200	201	n.d.
64	240	190	190	236	218	236	n.d.
71	233	199	178	239	245	228	n.d.
78	234	189	177	234	250	221	n.d.
85	246	196	187	243	240	224	n.d.

[1090] n. d. = 没有数据

[1091] 失血试验

[1092] 在处理周期的不同日, 用 Surgicutt Jr. 装置 (ITC, New Jersey) 进行失血试验。将猴置于猴椅, 猴臂置于稳定支架中。将猴臂轻柔剃毛, 血压计置于其上臂上。将血压计臂带膨胀至 40mm Hg, 整个过程始终保持该压力。上臂上待切开的区域用消毒棉签清洁, 用 Surgicutt Jr 装置在前臂的侧面掌底表面、平行于肘前皱并位于其下方 5cm 处产生一个切口。在产生切口的时候, 开始秒表计时。每隔 30 秒, 用吸水纸不直接接触切口地将切口的血液吸除, 以便不干扰血小板栓的形成。每隔 30 秒吸除血液, 直到血液不再染红纸张。然后停止秒表计时, 测定失血时间。将血压计从动物臂拿走, 切口位点以消毒棉签消毒, 使用

伤口密封条。结果以秒表示,在表 X 中提供。结果在表 120 中提供。使用长期给药方案的 ISIS 寡核苷酸, ISIS 416850,用星号与其他寡核苷酸相区别。

[1093] 这些数据表明此处提供的化合物导致出血的可能性低。

[1094] 表 120

[1095] 猕猴失血试验

[1096]

处理之前/ 之后天数	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	147	200	172	154	166	185	177
-5	153	150	127	149	111	175	93
15	111	167	165	146	153	174	149
22	113	165	151	100	133	194	143
36	174	166	137	206	205	186	221
43	157	120	216	111	146	120	156
57	147	238	195	138	216	206	n.d.
64	113	131	201	113	218	146	n.d.
78	114	145	203	186	170	163	n.d.
85	147	201	201	191	203	182	n.d.

[1097] 血小板聚集试验

[1098] 将 1mmol/L ADP 和 / 或 3 μg 胶原 (根据采集时间,如表 121 所述) 加入血浆样本,以启动血小板凝聚,进行 10 分钟。通过记录血小板形态改变后的电阻或阻抗改变以及凝聚的起始斜率的改变,来表征积聚。在每个采集日,对每份样本进行两次凝聚测试,取平均值。使用长期给药方案的 ISIS 寡核苷酸, ISIS 416850,用星号标记以区别于其他寡核苷酸。

[1099] 表 121

[1100] ISIS 反义寡核苷酸在猕猴中对血小板聚集的影响 (欧姆)

[1101]

	第-5天 (用胶原):	第15天 (用ADP):	第36天 (用ADP):	第43天 (用胶原):	第57天 (用ADP):	第64天 (用胶原):	第78天 (用ADP):	第85天 (用ADP):	第85天 (用胶原):
PBS	17	15	7	14	16	13	12	16	17
ISIS 416838	15	15	8	16	7	13	11	15	24
ISIS 416850	23	12	16	16	18	17	9	22	26
ISIS 416858	22	19	17	16	11	14	8	18	23
ISIS 416864	27	20	17.8	20	18	17	13	22	28
ISIS 417002	21	16	13.9	19	18	18	18	22	24
ISIS 416850*	21	14	11.6	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[1102] n. d. =没有数据

[1103] 体重和器官重量

[1104] 在给药方案始终测定体重。每组的测量值以克表示,在表 122 中提供。结果表明反义寡核苷酸处理不会导致动物健康的任何不良变化,健康的不良变化会导致体重相比于 PBS 对照的显著改变。动物安乐死后测定器官重量,收取肝脏、肾脏和脾脏并称重。结果在表 123 中提供,除脾脏重量增加的 ISIS 416858 外,没有显示出重量上相比于 PBS 对照的任何显著改变。使用长期给药方案的 ISIS 寡核苷酸,ISIS 416850,用星号与其他寡核苷酸相区别。

[1105] 表 122

[1106] 猕猴体重 (g) 的每周测量值

[1107]

天	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
1	2780	2720	2572	2912	2890	2640	2665
8	2615	2592	2430	2740	2784	2523	2579
15	2678	2642	2474	2760	2817	2571	2607
22	2715	2702	2514	2800	2857	2617	2661
29	2717	2689	2515	2763	2863	2622	2667
36	2738	2708	2545	2584	3327	2631	2656
43	2742	2700	2544	2607	3355	2630	2670
50	2764	2731	2613	2646	3408	2652	2679
57	2763	2737	2629	2617	3387	2654	n.d.
64	2781	2746	2642	2618	3384	2598	n.d.
71	2945	2869	2769	2865	2942	2727	n.d.
78	2815	2766	2660	2713	2822	2570	n.d.

[1108] n. d. =没有数据

[1109] 表 123

[1110] 反义寡核苷酸处理后猕猴的器官重量 (g)

[1111]

	肝脏	脾脏	肾脏
PBS	46	4	11
ISIS 416838	63	5	12
ISIS 416580	64	4	16
ISIS 416858	60	12	13
ISIS 416864	53	5	14
ISIS 417002	51	5	15

[1112] 肝功能

[1113] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量血浆转氨酶浓度。测定血浆 ALT (丙氨酸转氨酶) 和 AST (天冬氨酸转氨酶) 浓度,结果用 IU/L 表示,在表 124 和 125 中提供。挑选那些没有使 ALT/AST 水平提升超过对照水平七倍的反义寡核苷酸用以下一步研究。还测定了血浆胆红素水平,结果用 mg/dL 表示,在表 126 中提供。挑选那些没有使胆红素水平提升超过对照水平两倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。使用长期给药方案的 ISIS 寡核苷酸, ISIS

416850,用星号与其他寡核苷酸相区别。

[1114] 表 124

[1115] 反义寡核苷酸处理对猕猴肝脏中 ALT (IU/L) 的影响

[1116]

处理之前/ 之后天数	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	57	76	54	47	54	61	80
22	39	36	41	28	37	36	42
43	36	35	43	36	36	35	41
64	38	40	60	47	43	42	n.d.
85	34	41	75	50	43	116	n.d.

[1117] n. d. = 没有数据

[1118] 表 125

[1119] 反义寡核苷酸处理对猕猴肝脏中 AST (IU/L) 的影响

[1120]

处理之前/ 之后天 数	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	71	139	81	58	76	114	100
22	43	39	45	38	41	44	39
43	38	32	50	39	40	42	40
64	35	33	56	50	46	37	n.d.
85	41	30	82.	49	56	50	n.d.

[1121] n. d. = 没有数据

[1122] 表 126

[1123] 反义寡核苷酸处理对猕猴肝脏中胆红素 (IU/L) 的影响

[1124]

处理之前/ 之后天 数	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	0.24	0.26	0.21	0.27	0.31	0.26	0.28
22	0.16	0.17	0.13	0.18	0.22	0.20	0.19
43	0.17	0.17	0.13	0.14	0.17	0.21	0.18
64	0.19	0.15	0.14	0.12	0.16	0.14	n.d.
85	0.20	0.13	0.14	0.14	0.17	0.12	n.d.

[1125] n. d. = 没有数据

[1126] 肾功能

[1127] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肾功能的影响,采集尿液样本。计算出在反义寡核苷酸处理之后液样本中尿蛋白与肌酐的比值,结果在表 127 中提供。挑选那些没有使尿蛋白 / 肌酐的比值相比 PBS 对照提升超过五倍的反义寡核苷酸用于进一步研究。

[1128] 表 127

[1129] 反义寡核苷酸处理对猕猴的尿蛋白 / 肌酐比值的影响

[1130]

	第 80 天 :	第 84 天 :
PBS	0.09	0.10
ISIS 416838	0.13	0.13
ISIS 416850	0.09	0.12
ISIS 416858	0.10	0.07
ISIS 416864	0.36	0.34
ISIS 417002	0.18	0.24

[1131] 寡核苷酸浓度的测定

[1132] 评估全长寡核苷酸浓度以及寡核苷酸降解和从肝脏和肾脏消除所花的时间。方法采用以前发表方法 (Leeds et al., 1996 ; Geary et al., 1999) 的改良方法, 其包括苯酚-氯仿 (液体-液体) 提取及随后的固相提取。在提取前加入内标物 (ISIS 355868, 27 单体的 2' -O- 甲氧乙基修饰的磷硫酰寡核苷酸, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, 此处指定为 SEQ ID NO : 270)。以约为 1.14 $\mu\text{g/g}$ 的定量下限 (LLOQ) 用校正曲线计算组织样本浓度。然后用 WinNonlin 软件 (PHARSIGHT) 计算半衰期。结果以 $\mu\text{g/g}$ 肝脏或肾脏组织表示, 在表 128 和 129 中提供。

[1133] 表 128

[1134] 猕猴的肝脏和肾脏中的全长寡核苷酸浓度 ($\mu\text{g/g}$)

[1135]

ISIS No.	肾脏	肝脏
416838	1339	1087
416850	2845	1225
416858	1772	1061
416864	2093	1275
417002	2162	1248

[1136] [1151] 表 129

[1137] 猕猴的肝脏和肾脏中的总的寡核苷酸浓度 ($\mu\text{g/g}$)

[1138]

ISIS No.	肾脏	肝脏
416838	1980	1544
416850	3988	1558
416858	2483	1504
416864	3522	1967
417002	3462	1757

[1139] 血液学分析

[1140] 从所有猴分组获得的血液被送去韩国毒理学研究所 (KIT) 进行 HCT、MCV、MCH 和 MCHC 分析以及如 WBC (中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和网织红细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞以及总血红蛋白含量的测定。结果在表 130-143 中提供。挑选那些没有使血小板数提升超过 50% 并且没有使单核细胞数提升超过三倍的反义寡核苷酸用以进一步研究。使用长期给药方案的 ISIS 寡核苷酸, ISIS 416850, 用星号标记以区别于其他寡核苷酸。

[1141] 表 130

[1142] 反义寡核苷酸处理对猕猴中 WBC 数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$) 的影响

[1143]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	14	12	13	14	13	13	15
第-5天:	13	12	13	14	13	14	15
第8天:	10	10	10	12	11	10	13
第15天:	10	10	9	11	10	10	16
第22天:	12	11	10	11	10	10	15
第29天:	11	11	11	12	10	10	14
第36天:	10	10	10	12	10	11	16
第43天:	10	10	9	11	10	10	15
第50天:	12	11	11	13	12	13	15
第57天:	11	12	11	13	12	12	n.d.
第64天:	11	13	11	12	11	11	n.d.
第71天:	15	15	15	13	14	12	n.d.
第78天:	10	11	12	11	11	9	n.d.
第85天:	10	12	15	11	12	10	n.d.

[1144] n. d. = 没有数据

[1145] 表 131

[1146] 反义寡核苷酸处理对猕猴中 RBC 数 ($\times 10^6/\mu\text{L}$) 的影响

[1147]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	5.7	5.6	5.3	5.6	5.5	5.6	5.5
第-5天:	5.7	5.6	5.5	5.6	5.6	5.6	5.5
第8天:	5.7	5.7	5.4	5.6	5.7	5.6	5.5
第15天:	5.6	5.6	5.3	5.4	5.7	5.4	5.3
第22天:	5.5	5.4	5	5.3	5.3	5.2	5.1
第29天:	5.6	5.3	4.9	5.3	5.3	5.2	5.2
第36天:	5.7	5.5	5.3	5.5	5.6	5.4	5.3
第43天:	5.7	5.6	5.2	5.5	5.5	5.4	5.2
第50天:	5.8	5.5	5.2	5.5	5.6	5.4	5.3
第57天:	5.7	5.5	5.2	5.6	5.5	4.9	n.d.
第64天:	5.8	5.6	5.4	5.7	5.6	5.4	n.d.
第71天:	5.6	5.5	5.4	5.6	5.6	5.5	n.d.
第78天:	5.6	5.4	5.3	5.4	5.3	5.4	n.d.
第85天:	5.6	5.5	5.5	5.5	5.4	5.4	n.d.

[1148] n. d. = 没有数据

[1149] 表 132

[1150] 反义寡核苷酸处理对猕猴中血红蛋白 (g/dL) 的影响

[1151]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	13.2	12.9	12.4	13.2	12.7	13.0	12.8
第-5天:	13.1	13.1	12.7	13.2	13.0	13.2	12.8
第8天:	13.1	12.9	12.4	12.8	12.7	12.8	12.5
第15天:	12.9	12.9	12.1	12.6	12.8	12.3	12.2
第22天:	12.7	12.5	11.6	12.4	12.1	12.1	11.7
第29天:	12.8	12.4	11.5	12.3	12.1	12.0	12.0
第36天:	13.0	12.8	12.2	12.6	12.5	12.5	12.3
第43天:	12.9	12.7	11.8	12.4	12.2	12.3	11.8
第50天:	12.6	12.3	11.8	12.2	12.1	12.3	11.9
第57天:	13.1	12.6	12.1	12.7	12.3	11.3	n.d.
第64天:	13.1	12.6	12.3	12.8	12.1	12.2	n.d.
第71天:	12.9	12.7	12.3	12.7	12.2	12.5	n.d.
第78天:	13.0	12.5	12.2	12.4	11.9	12.4	n.d.
第85天:	13.2	12.4	12.7	11.9	12.3	12.2	n.d.

[1152] n. d. = 没有数据

[1153] 表 133

[1154] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内血细胞比容 (g/dL) 的影响

[1155]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	46	42	41	43	43	44	44
第-5天:	44	42	43	42	44	45	43
第8天:	44	43	43	43	44	44	43
第15天:	44	42	40	40	42	40	40
第22天:	45	43	41	41	42	41	40
第29天:	46	43	41	41	43	42	42
第36天:	46	43	42	40	42	42	41
第43天:	46	43	40	40	42	41	40
第50天:	48	44	42	41	44	43	42
第57天:	46	43	42	41	42	38	n.d.
第64天:	47	44	43	42	42	41	n.d.
第71天:	46	44	43	42	44	43	n.d.
第78天:	43	41	41	39	39	40	n.d.
第85天:	43	42	42	39	40	41	n.d.

[1156] n. d. = 没有数据

[1157] 表 134

[1158] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 MCV (fL) 的影响

[1159]

[1160]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	81	77	78	77	79	79	81
第-5天:	78	76	77	75	79	80	78
第8天:	77	77	80	77	78	79	79
第15天:	78	75	76	74	74	76	75
第22天:	84	80	83	77	79	79	79
第29天:	83	81	83	78	80	81	82
第36天:	81	78	80	75	76	78	76
第43天:	80	78	79	74	77	77	77
第50天:	84	80	83	76	79	80	80
第57天:	82	79	80	74	77	80	n.d.
第64天:	81	79	79	73	75	76	n.d.
第71天:	84	80	80	75	79	78	n.d.
第78天:	78	76	79	72	74	75	n.d.
第85天:	77	77	77	72	74	76	n.d.

[1161] n. d. = 没有数据

[1162] 表 135

[1163] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 MCH (pg) 的影响

[1164]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	23	23	23	24	23	24	24
第-5天:	23	23	23	23	23	24	23
第8天:	23	23	23	23	23	23	23
第15天:	23	23	23	23	23	23	23
第22天:	23	23	24	24	23	23	23
第29天:	23	23	23	23	23	23	23
第36天:	23	23	23	23	23	23	23
第43天:	23	23	23	23	22	23	23
第50天:	22	23	23	23	22	23	23
第57天:	23	23	23	22	23	23	n.d.
第64天:	23	23	22	22	23	22	n.d.
第71天:	23	23	23	22	23	23	n.d.
第78天:	23	23	23	23	23	23	n.d.
第85天:	23	23	22	22	23	23	n.d.

[1165] n. d. = 没有数据

[1166] 表 136

[1167] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 MCHC(g/dL) 的影响

[1168]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14 天:	29	30	30	31	29	30	29
第-5 天:	30	31	30	31	29	30	30
第 8 天:	30	30	29	30	29	29	29
第 15 天:	30	31	30	31	30	31	30
第 22 天:	28	29	28	30	29	29	29
第 29 天:	28	29	28	30	29	29	28
第 36 天:	28	30	29	31	30	30	30
第 43 天:	28	30	29	31	29	30	30
第 50 天:	26	28	28	30	28	29	29
第 57 天:	29	29	29	31	29	29	n.d.
第 64 天:	28	29	29	30	29	30	n.d.
第 71 天:	28	29	28	30	28	29	n.d.

[1169]

第 78 天:	30	30	29	32	30	31	n.d.
第 85 天:	31	30	30	31	30	30	n.d.

[1170] n. d. = 没有数据

[1171] 表 137

[1172] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内血小板数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$) 的影响

[1173]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14 天:	349	377	528	419	434	442	387
第-5 天:	405	425	573	463	456	466	434
第 8 天:	365	387	548	391	438	435	401
第 15 天:	375	387	559	400	439	410	396
第 22 天:	294	319	466	316	364	377	347
第 29 天:	311	337	475	336	397	410	370
第 36 天:	326	370	505	371	428	415	379
第 43 天:	336	365	490	342	351	393	391
第 50 天:	379	372	487	331	419	389	351
第 57 天:	345	371	528	333	409	403	n.d.
第 64 天:	329	358	496	295	383	436	n.d.
第 71 天:	322	365	465	286	394	490	n.d.
第 78 天:	309	348	449	262	366	432	n.d.
第 85 天:	356	344	458	267	387	418	n.d.

[1174] n. d. = 没有数据

[1175] 表 138

[1176] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内网织红细胞 (%) 的影响

[1177]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	1.4	1.0	1.7	1.0	0.9	0.9	1.1
第-5天:	1.0	0.9	1.2	0.9	0.9	0.8	0.8
第8天:	1.0	1.2	1.2	1.2	0.8	1.1	1.1
第15天:	1.5	1.2	1.9	1.6	0.8	1.1	1.0
第22天:	1.2	1.2	1.9	1.3	0.9	1.2	1.0
第29天:	1.6	1.6	2.5	1.5	1.3	1.6	1.4
第36天:	1.7	1.6	2.2	1.6	1.3	1.3	1.3
第43天:	1.3	1.2	1.6	1.3	1.1	1.1	1.0
第50天:	1.6	1.6	2.7	1.5	1.3	1.6	1.2
第57天:	1.8	1.5	2.0	1.4	1.0	4.6	n.d.
第64天:	1.3	1.3	1.7	1.0	0.8	1.3	n.d.

[1178]

第71天:	1.6	1.3	1.8	1.3	1.0	1.3	n.d.
第78天:	1.5	1.4	1.8	1.2	1.2	1.3	n.d.
第85天:	1.5	1.5	2.3	1.3	1.5	1.4	n.d.

[1179] n. d. =没有数据

[1180] 表 139

[1181] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内中性粒细胞(%)的影响

[1182]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	40	36	49	37	53	43	48
第-5天:	37	35	52	46	51	43	53
第8天:	54	42	57	51	52	46	53
第15天:	49	43	58	54	59	57	73
第22天:	41	37	57	47	59	55	64
第29天:	44	36	53	43	44	45	42
第36天:	37	39	57	47	58	61	72
第43天:	40	30	50	45	57	57	61
第50天:	36	31	45	46	49	61	62
第57天:	41	32	49	44	57	54	n.d.
第64天:	40	30	41	37	49	55	n.d.
第71天:	38	28	27	26	42	34	n.d.
第78天:	42	35	42	39	48	51	n.d.
第85天:	30	22	60	40	39	36	n.d.

[1183] n. d. =没有数据

[1184] 表 140

[1185] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内淋巴细胞(%)的影响

[1186]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	54	59	47	58	42	53	47
第-5天:	56	59	43	49	44	53	43
第8天:	43	54	39	45	45	50	44
第15天:	47	53	38	43	38	40	24
第22天:	54	59	39	49	37	41	33
第29天:	51	59	43	51	51	50	53
第36天:	58	57	39	49	38	35	26
第43天:	55	65	45	51	39	39	36
第50天:	59	64	49	48	46	34	35
第57天:	55	63	45	51	39	40	n.d.

[1187]

64天:	56	64	53	56	46	39	n.d.
71天:	56	65	61	66	52	59	n.d.
78天:	53	60	51	54	46	41	n.d.
85天:	63	72	34	52	54	56	n.d.

[1188] n. d. =没有数据

[1189] 表 141

[1190] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内嗜酸性细胞(%)的影响

[1191]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	1.3	0.6	1.0	0.7	1.0	0.3	0.5
第-5天:	1.5	0.6	1.6	1.3	0.9	0.3	0.7
第8天:	0.9	0.4	1.1	0.3	0.7	0.2	0.5
第15天:	0.7	0.3	1.0	0.3	0.5	0.1	0.2
第22天:	0.9	0.5	0.7	0.6	0.9	0.3	0.5
第29天:	0.9	0.3	1.2	0.6	0.9	0.3	0.8
第36天:	0.9	0.5	1.7	0.4	0.6	0.2	0.4
第43天:	0.9	0.6	1.2	0.3	0.6	0.2	0.4
第50天:	1.2	0.8	1.2	0.4	0.7	0.1	0.3
第57天:	0.7	0.6	1.0	0.3	0.4	0.2	n.d.
第64天:	1.0	0.7	1.3	0.4	0.7	0.2	n.d.
第71天:	1.6	0.8	1.8	0.9	1.1	0.3	n.d.
第78天:	1.0	0.9	1.0	0.5	1.2	0.1	n.d.
第85天:	1.3	1.5	1.2	0.6	1.6	0.2	n.d.

[1192] n. d. =没有数据

[1193] 表 142

[1194] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内单核细胞(%)的影响

[1195]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	3.3	3.1	2.3	2.8	2.8	3.0	2.9
第-5天:	3.8	3.6	2.8	2.8	3.3	3.2	2.4
第8天:	2.3	2.5	1.8	2.7	2.1	3.3	1.8
第15天:	2.7	2.4	2.0	2.2	2.4	2.3	1.5
第22天:	3.4	2.9	2.4	2.8	2.8	3.1	1.9
第29天:	3.3	3.2	2.7	3.8	3.4	3.5	2.7
第36天:	3.1	2.5	2.1	2.9	2.3	2.6	1.5
第43天:	3.5	3.3	2.6	3.1	2.1	2.8	1.8
第50天:	2.6	3.2	3.7	4.6	2.9	3.1	1.8

[1196]

第57天:	2.6	3.2	n.d.3.2	3.8	2.4	3.6	n.d.
第64天:	2.6	3.5	n.d.3.5	4.4	2.8	4.0	n.d.
第71天:	3.4	4.3	n.d.4.7	4.9	3.7	4.7	n.d.
第78天:	3.3	3.6	n.d.4.5	4.9	3.7	4.7	n.d.
第85天:	4.4	3.7	n.d.3.5	6.1	3.7	5.3	n.d.

[1197] n. d. = 没有数据

[1198] 表 143

[1199] 反义寡核苷酸处理对猕猴中嗜碱性细胞(%)的影响

[1200]

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
第-14天:	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2
第-5天:	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3
第8天:	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3
第15天:	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
第22天:	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
第29天:	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3
第36天:	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1
第43天:	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2
第50天:	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.2
第57天:	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.3	n.d.
第64天:	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	n.d.
第71天:	0.2	0.5	0.3	0.4	0.4	0.3	n.d.
第78天:	0.2	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	n.d.
第85天:	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	n.d.

[1201] n. d. = 没有数据

[1202] 细胞因子和趋化因子分析

[1203] 以逐步增加剂量的给药方案,用PBS、ISIS 416850和ISIS 416858处理猴分组,把从这些猴获得的血液样本送至Pierce Biotechnology(Woburn,MA)测定细胞因子和趋化因子水平。用各自的灵长类抗体测定IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 和TNF- α 的水平,用各自的交叉反应的人抗体测定IL-8、MIP-1 α 、MCP-1、MIP-1 β 和RANTES的水平。在处理开始前14天以及第85天,当猴被执行安乐死时,进行测定。结果在表144和145中提供。

[1204] 表 144

[1205] 反义寡核苷酸处理在第 -14 天对猕猴中细胞因子 / 趋化因子水平 (pg/mL) 的影响

[1206]

	IL-	IL-	IFN- γ	TNF-	IL-8	MIP-	MCP-	MIP-	RANTES
--	-----	-----	---------------	------	------	------	------	------	--------

[1207]

	1 β	6		α		1 α	1	1 β	
PBS	16	10	114	7	816	54	1015	118	72423
ISIS 416850	3	30	126	14	1659	28	1384	137	75335
ISIS 416858	5	9	60	9	1552	36	1252	122	112253

[1208] 表 145

[1209] 反义寡核苷酸处理在第 85 天对猕猴中细胞因子 / 趋化因子水平 (pg/mL) 的影响

[1210]

	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 β	RANTES
PBS	7	4	102	34	87	23	442	74	84430
ISIS 416850	13	17	18	27	172	41	2330	216	83981
ISIS 416858	5	25	18	45	303	41	1752	221	125511

[1211] 例 46 : 靶向人因子 11 的反义寡核苷酸在猕猴体内的药理作用

[1212] 在猕猴体内测试一些从啮齿类耐受性研究 (例 41-44) 中挑选的反义寡核苷酸以测定在猕猴模型中它们对于因子 11 活性和耐受性的药理作用和相对效力。还把这些反义寡核苷酸与在前面所述猕猴研究 (例 45) 中选出的 ISIS 416850 和 ISIS 416858 进行了比较。本研究所采用的所有寡核苷酸都靶向人因子 11 的 mRNA, 并且与猕猴的基因序列可完全交叉反应 (见表 44 和 46)。期望猕猴的 ISIS 寡核苷酸同样与猕猴的基因序列可完全交叉反应。在研究开始时, 在国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中没有猕猴的基因组序列; 因此, 没有确认与猕猴基因序列的交叉反应性。

[1213] 处理

[1214] 按组向每组两只雄性猴和两只雌性猴皮下注射 25mg/kg 的 ISIS 416850、ISIS 449709、ISIS 445522、ISIS 449710、ISIS 449707、ISIS 449711、ISIS 449708、416858 和 ISIS 445531。反义寡核苷酸以 5mg/kg 的剂量在第 1 周每周三次给药于猕猴; 以 25mg/kg 的剂量在第 2 至第 8 周每周两次给药。向两只雄性猴和两只雌性猴的对照组以相同给药方案皮下注射 PBS。在处理开始前 14 天和 7 天以及在整个处理周期内每周一次测定体重。在处理开始前 14 天和 5 天以及随后给药方案期间数次采集血液样本, 用于 PT 和 aPTT 测定以及各种血液因子的测定。在第 55 天, 当猕猴处于深度麻醉时用放血法实施安乐死, 收集器官用于进一步分析。

[1215] RNA 分析

[1216] 在第 55 天,从肝脏组织中抽提 RNA 用于用引物探针组 LTS00301 对因子 11 的实时 PCR 分析。结果表示为相对于 PBS 对照的因子 11 的抑制百分比。如表 146 所示,相比于 PBS 对照,ISIS 416850、ISIS 449709、ISIS 445522、ISIS 449710、ISIS 449707、ISIS 449708、ISIS 416858 和 ISIS 445531 处理导致因子 11 的 mRNA 明显减少。

[1217] 表 146

[1218] 猕猴肝脏中因子 11mRNA 相对于 PBS 对照的抑制

[1219]

寡核苷酸标识	% 抑制
416850	68
449709	69
445522	89
449710	52
449707	47
449711	0
449708	46
416858	89
445531	66

[1220] 蛋白分析

[1221] 以亲和纯化的抗因子 11 的多克隆抗体为俘获抗体,以过氧化物酶结合的抗因子 11 的多克隆抗体为检测抗体,用三明治式 ELISA 测试法 (Affinity Biologicals Inc.) 分析在不同日所有猕猴组采集的血浆样本。猴血浆以 1 : 50 稀释用于试验。过氧化物酶活性通过与底物邻苯二胺孵育来表达。产生的颜色用 490nm 酶标仪定量,其被认为与样本中因子 11 的浓度成正比。

[1222] 结果在表 147 中提供,表示为相对于 PBS 对照的抑制百分比。ISIS 416850、ISIS 449709、ISIS 445522 和 ISIS 416858 处理导致蛋白水平时间依赖的降低。

[1223] 表 147

[1224] 相对于 PBS 对照,猕猴肝脏中因子 11 蛋白质的抑制

[1225]

ISIS No.	第-14 天:	第-5 天:	第 10 天:	第 17 天:	第 24 天:	第 31 天:	第 38 天:	第 45 天:	第 52 天:	第 55 天:
416850	0	0	20	31	38	52	51	53	53	58
449709	1	0	27	35	44	45	46	48	47	50
445522	2	0	36	50	61	70	73	77	80	82
449710	1	0	10	14	17	25	20	23	4	24
449707	0	0	16	19	21	29	28	35	29	32
449711	0	1	5	3	6	9	2	4	3	5
449708	1	0	7	15	3	14	9	2	6	6
416858	4	0	36	49	62	68	74	79	81	81
445531	0	1	9	22	23	27	29	32	32	37

[1226] PT 和 aPTT 试验

[1227] 用来自经 ISIS 寡核苷酸处理的小鼠的贫血小板血浆 (PPP) 测定 PT 和 aPTT。PT 和 aPTT 值在表 148 和 149 中给出,以国际标准化比值 (INR) 来表示。将每一实验组的 PT 或 aPTT 值除以 PBS 处理的组的 PT 或 aPTT 值,获得 PT 或 aPTT 的 INR 值。将该比值以采用的组织因子的国际敏感度指数 (ISI) 进行加幂。如表 148 所示,PT 在经 ISIS 寡核苷酸处理的小鼠中没有明显延长。然而,如表 149 所示,在经 ISIS 416850、ISIS 445522 和 ISIS 416858 处理的组中,aPTT 明显延长了。这些数据表明因子 11 的反义减少影响了接触激活通路,但没有影响血液凝结的外源性途径。因此,以这些 ISIS 寡核苷酸反义减少因子 11 对由异常血管壁而非组织损伤造成的血栓和凝结形成的抑制有用。

[1228] 表 148

[1229] ISIS 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 PT 比值的影响

[1230]

	第-14 天:	第-5 天:	第 10 天:	第 17 天:	第 24 天:	第 31 天:	第 38 天:	第 45 天:	第 52 天:	第 55 天:
ISIS 416850	1.02	1.00	0.99	1.00	0.97	1.00	1.01	1.00	1.02	1.07
ISIS 449709	1.00	0.96	0.95	0.95	0.95	0.95	0.97	0.97	0.99	1.03
ISIS 445522	1.00	0.94	0.95	0.96	0.94	0.96	0.97	0.96	0.98	1.01
ISIS 449710	1.03	0.96	0.98	1.00	0.97	0.98	0.99	0.97	0.98	1.06
ISIS 449707	1.01	0.94	0.95	0.97	0.95	0.96	1.00	0.96	0.96	1.00
ISIS 449711	1.00	0.95	0.94	0.95	0.94	0.98	1.02	1.01	1.00	1.07
ISIS 449708	1.03	0.95	0.98	1.00	0.95	1.06	0.99	0.99	0.99	1.04
ISIS 416858	1.01	0.96	0.96	0.98	0.95	1.00	0.97	1.00	0.99	1.01
ISIS 445531	1.06	1.00	1.00	1.06	1.02	1.04	1.03	1.01	1.04	1.06

[1231] 表 149

[1232] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 aPTT 比值的影响

[1233]

	第-14 天:	第-5 天:	第 10 天:	第 17 天:	第 24 天:	第 31 天:	第 38 天:	第 45 天:	第 52 天:	第 55 天:
ISIS 416850	0.99	0.90	0.98	1.01	1.05	1.22	1.25	1.34	1.32	1.45
ISIS 449709	0.99	0.91	0.99	1.03	1.05	1.08	1.08	1.15	1.09	1.17
ISIS 445522	0.96	0.91	1.06	1.10	1.14	1.25	1.32	1.39	1.39	1.42
ISIS 449710	1.07	0.98	1.00	0.97	1.00	1.04	1.02	1.06	1.03	1.07
ISIS 449707	0.90	0.87	0.92	0.94	0.93	0.95	0.99	1.00	0.99	1.04
ISIS 449711	0.94	0.96	0.92	0.90	0.92	0.89	0.93	0.94	0.92	0.96
ISIS 449708	1.07	1.01	1.06	1.05	1.01	1.09	1.06	1.06	1.08	1.11
ISIS 416858	1.03	0.96	1.07	1.13	1.21	1.32	1.41	1.49	1.53	1.61
ISIS 445531	1.00	0.89	0.95	1.05	1.00	1.07	1.06	1.13	1.15	1.19

[1234] 体重和器官重量

[1235] 每组的体重以克表示,在表 150 中提供。结果表明反义寡核苷酸处理不会导致动物健康的任何不良变化,健康的不良变化会导致体重相比于 PBS 对照显著改变。在第 55 天动物安乐死后测定器官重量,收取肝脏、肾脏和脾脏。结果以占体重的百分比表示,在表 150 中提供,除导致脾脏重量增加的 ISIS 449711 外,也没有显示出重量上相比于 PBS 对照的任何显著改变。

[1236] 表 150

[1237] 猕猴体重 (g) 的每周测量值

[1238]

天	PBS	ISIS 416850	ISIS 449709	ISIS 445522	ISIS 449710	ISIS 449707	ISIS 449711	ISIS 449708	ISIS 416858	ISIS 445531
-14	2069	2061	2044	2050	2097	2072	2049	2096	2073	2079
-7	2107	2074	2093	2042	2114	2083	2105	2163	2092	2092
1	2131	2083	2112	2047	2131	2107	2123	2130	2115	2125
8	2186	2072	2075	2094	2120	2088	2123	2148	2149	2119
15	2201	2147	2085	2092	2145	2120	2103	2125	2162	2109
22	2206	2139	2117	2114	2177	2142	2171	2110	2188	2143
29	2204	2159	2068	2125	2149	2155	2203	2095	2196	2148
36	2246	2136	2064	2121	2180	2158	2227	2100	2210	2191

[1239]

43	2304	2186	2106	2142	2227	2197	2251	2125	2238	2233
50	2274	2143	2147	2127	2201	2185	2227	2076	2225	2197

[1240] 表 151

[1241] 反义寡核苷酸处理后猕猴的器官重量 (g)

[1242]

	肝脏	脾脏	肾脏
PBS	2.3	0.16	0.48
ISIS 416850	2.5	0.17	0.51
ISIS 449709	2.6	0.21	0.57
ISIS 445522	2.6	0.23	0.55
ISIS 449710	2.6	0.24	0.58
ISIS 449707	2.5	0.24	0.53
ISIS 449711	2.6	0.32	0.54
ISIS 449708	2.6	0.19	0.60
ISIS 416858	2.6	0.24	0.47
ISIS 445531	2.8	0.24	0.49

[1243] 肝功能

[1244] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肝功能的影响,用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测定血浆 ALT 和 AST 浓度。测定血浆丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 浓度,结果用 IU/L 表示,在表 152 和 153 中提供。还测定了血浆胆红素水平,用 mg/dL 表示,在表 154 中提供。如表 152-154,还观察到在反义寡核苷酸处理后任何肝脏代谢指标都没有明显增加。

[1245] 表 152

[1246] 反义寡核苷酸处理对猕猴肝脏中 ALT (IU/L) 的影响

[1247]

	第-14 天:	第-5 天:	第 31 天:	第 55 天:
PBS	57	55	53	57
ISIS 416850	48	42	45	55
ISIS 449709	73	77	65	102
ISIS 445522	43	45	40	60
ISIS 449710	37	42	37	45
ISIS 449707	54	56	52	63
ISIS 449711	49	137	48	54

[1248]

ISIS 449708	48	54	44	46
ISIS 416858	43	66	46	58
ISIS 445531	84	73	57	73

[1249] 表 153

[1250] 反义寡核苷酸处理对猕猴肝脏中 AST (IU/L) 的影响

[1251]

	第-14 天:	第-5 天:	第 31 天:	第 55 天:
PBS	65	45	44	47
ISIS 416850	62	45	46	57
ISIS 449709	62	51	45	71
ISIS 445522	62	47	46	79
ISIS 449710	52	38	37	64
ISIS 449707	64	53	50	52
ISIS 449711	58	78	47	47
ISIS 449708	74	53	56	50
ISIS 416858	64	100	60	69
ISIS 445531	78	46	47	49

[1252] 表 154

[1253] 反义寡核苷酸处理对猕猴肝脏中胆红素 (mg/dL) 的影响

[1254]

	第-14 天:	第-5 天:	第 31 天:	第 55 天:
PBS	0.25	0.20	0.20	0.17
ISIS 416850	0.26	0.22	0.26	0.17
ISIS 449709	0.24	0.19	0.15	0.18
ISIS 445522	0.24	0.20	0.14	0.18
ISIS 449710	0.24	0.19	0.15	0.22
ISIS 449707	0.27	0.19	0.13	0.16
ISIS 449711	0.23	0.16	0.13	0.13
ISIS 449708	0.27	0.21	0.14	0.14
ISIS 416858	0.25	0.23	0.16	0.16
ISIS 445531	0.22	0.18	0.13	0.11

[1255] 肾功能

[1256] 为了评价 ISIS 寡核苷酸对肾功能的影响,在不同日采集尿液样本。用自动化临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测定不同时间点的 BUN 水平,结果在表 155 中提供。还计算出反义寡核苷酸处理后第 49 天的尿液样本中尿蛋白与肌酐的比值,结果在表 156 中提供。如表 155 和 156 中所观察到的,在反义寡核苷酸处理后任何肾脏代谢指标都没有明显增加。

[1257] 表 155

[1258] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 BUN 水平 (mg/dL) 的影响

[1259]

	第-14 天:	第-5 天:	第 31 天:	第 55 天:
PBS	22	21	22	22
ISIS 416850	24	23	21	26
ISIS 449709	22	21	20	28
ISIS 445522	23	22	22	22
ISIS 449710	19	19	19	23
ISIS 449707	25	21	21	20
ISIS 449711	26	22	20	23
ISIS 449708	25	23	23	23
ISIS 416858	25	24	23	24
ISIS 445531	22	18	20	22

[1260] 表 156

[1261] 反义寡核苷酸处理对猕猴的尿蛋白 / 肌酐比值的影响

[1262]

	尿蛋白/肌酐比 值
PBS	0.02
ISIS 416850	0.08
ISIS 449709	0.05
ISIS 445522	0.01
ISIS 449710	0.00
ISIS 449707	0.03
ISIS 449711	0.01
ISIS 449708	0.00
ISIS 416858	0.05
ISIS 445531	0.08

[1263] 血液学分析

[1264] 在不同日从所有组猴获得的血液被送去韩国毒理学研究所 (KIT) 进行 HCT、MCV、MCH 和 MCHC 的测定以及如 WBC (中性粒细胞和单核细胞)、RBC 和血小板等各种血细胞以及总血红蛋白含量的测定。结果在表 157-166 中提供。

[1265] 表 157

[1266] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 HCT (%) 的影响

[1267]

	第-14 天:	第-5 天:	第 17 天:	第 31 天:	第 45 天:	第 55 天:
PBS	40	42	43	43	41	40
ISIS 416850	41	44	42	42	42	40
ISIS 449709	41	42	43	42	41	40
ISIS 445522	42	42	41	43	41	39
ISIS 449710	41	44	43	44	43	41
ISIS 449707	40	43	42	43	43	42
ISIS 449711	41	41	42	39	39	38
ISIS 449708	41	44	44	43	44	42
ISIS 416858	41	44	43	43	41	39
ISIS 445531	41	42	43	41	41	41

[1268] 表 158

[1269] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内血小板数 (x100/μL) 的影响

[1270]

	第-14 天:	第-5 天:	第 17 天:	第 31 天:	第 45 天:	第 55 天:
PBS	361	441	352	329	356	408
ISIS 416850	462	517	467	507	453	396
ISIS 449709	456	481	449	471	418	441
ISIS 445522	433	512	521	425	403	333
ISIS 449710	411	463	382	422	313	360
ISIS 449707	383	464	408	408	424	399
ISIS 449711	410	431	325	309	257	259
ISIS 449708	387	517	444	378	381	348
ISIS 416858	369	433	358	289	287	257
ISIS 445531	379	416	380	376	345	319

[1271] 表 159

[1272] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内中性粒细胞 (%) 的影响

[1273]

	第 -14	第 -5	第 17	第 31	第 45	第 55
--	-------	------	------	------	------	------

[1274]

	天:	天:	天:	天:	天:	天:
PBS	81	84	75	75	91	118
ISIS 416850	88	109	95	100	85	108
ISIS 449709	73	101	89	81	77	115
ISIS 445522	61	84	81	66	69	125
ISIS 449710	93	86	80	94	97	132
ISIS 449707	85	106	80	89	89	98
ISIS 449711	64	71	52	58	45	70
ISIS 449708	73	84	61	57	61	75
ISIS 416858	65	84	54	54	61	73
ISIS 445531	60	80	85	116	93	91

[1275] 表 160

[1276] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内单核细胞 (%) 的影响

[1277]

	第-14 天:	第-5 天:	第 17 天:	第 31 天:	第 45 天:	第 55 天:
PBS	1.9	2.8	3.1	2.8	3.9	2.2
ISIS 416850	1.9	2.9	3.2	3.7	3.8	3.4
ISIS 449709	4.0	2.0	3.0	2.8	3.6	3.4
ISIS 445522	2.1	2.3	3.6	3.9	4.4	3.0
ISIS 449710	1.3	2.0	2.5	2.4	3.4	1.6
ISIS 449707	1.3	2.3	3.2	4.2	4.0	4.8
ISIS 449711	1.2	2.3	5.9	6.9	7.6	7.8
ISIS 449708	1.7	2.6	5.4	5.8	7.0	6.2
ISIS 416858	2.0	2.7	4.0	4.7	4.6	4.6
ISIS 445531	1.3	2.2	3.4	4.1	4.4	4.1

[1278] 表 161

[1279] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内血红蛋白含量 (g/dL) 的影响

[1280]

	第-14 天:	第-5 天:	第 17 天:	第 31 天:	第 45 天:	第 55 天:
PBS	12.3	12.5	12.9	12.7	12.4	12.1
ISIS 416850	13.0	13.5	13.3	13.1	13.1	12.7
ISIS 449709	12.8	12.8	13.2	13.1	12.6	12.5
ISIS 445522	13.3	12.7	12.7	12.9	12.6	12.0
ISIS 449710	13.0	13.2	13.4	13.1	13.0	12.7
ISIS 449707	12.7	12.8	12.7	12.7	12.9	12.6
ISIS 449711	12.7	12.7	12.5	11.8	11.5	11.3
ISIS 449708	13.0	13.2	13.5	13.0	13.3	13.0
ISIS 416858	12.8	13.0	13.0	12.8	12.3	12.0
ISIS 445531	12.6	12.6	12.7	12.3	12.0	12.1

[1281]

[1282] 表 162

[1283] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 WBC 数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$) 的影响

[1284]

	第-14 天:	第-5 天:	第 17 天:	第 31 天:	第 45 天:	第 55 天:
PBS	10	10	11	12	11	12
ISIS 416850	12	13	11	12	12	10
ISIS 449709	11	10	11	11	11	10
ISIS 445522	10	9	11	13	10	11
ISIS 449710	11	11	12	12	11	15
ISIS 449707	13	11	12	11	12	8
ISIS 449711	13	12	10	9	9	7
ISIS 449708	14	10	11	11	10	10
ISIS 416858	10	11	10	9	8	9
ISIS 445531	20	15	17	17	20	15

[1285] 表 163

[1286] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 RBC 数 ($\times 10^6/\mu\text{L}$) 的影响

[1287]

	第-14 天:	第-5 天:	第 17 天:	第 31 天:	第 45 天:	第 55 天:
PBS	5.6	5.6	5.8	5.8	5.6	5.5
ISIS 416850	5.5	5.7	5.6	5.6	5.7	5.6
ISIS 449709	5.8	5.8	5.9	5.9	5.7	5.7
ISIS 445522	5.9	5.6	5.6	5.8	5.7	5.4
ISIS 449710	5.6	5.8	5.8	5.8	5.7	5.6
ISIS 449707	5.7	5.8	5.7	5.7	5.9	5.8
ISIS 449711	5.6	5.7	5.6	5.4	5.4	5.3
ISIS 449708	5.7	5.9	5.9	5.8	6.0	5.8
ISIS 416858	5.5	5.5	5.6	5.6	5.5	5.3
ISIS 445531	5.7	5.7	5.8	5.6	5.5	5.6

[1288] 表 164

[1289] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 MCV (fL) 的影响

[1290]

	第-14 天:	第-5 天:	第 17 天:	第 31 天:	第 45 天:	第 55 天:
PBS	72	74	75	73	73	73
ISIS 416850	74	77	76	75	75	73
ISIS 449709	72	74	73	73	71	71

[1291]

ISIS 445522	72	74	74	75	73	72
ISIS 449710	75	77	75	75	75	73
ISIS 449707	71	75	74	74	73	73
ISIS 449711	73	74	75	73	73	73
ISIS 449708	73	75	75	75	74	74
ISIS 416858	75	79	78	76	75	75
ISIS 445531	72	74	75	75	75	74

[1292] 表 165

[1293] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 MCH(pg) 的影响

[1294]

	第-14 天:	第-5 天:	第 17 天:	第 31 天:	第 45 天:	第 55 天:
PBS	22.1	22.4	22.3	22.1	22.0	22.0
ISIS 416850	23.7	23.7	23.7	23.3	22.7	22.9
ISIS 449709	22.4	22.3	22.5	22.2	21.0	22.0
ISIS 445522	22.6	22.5	22.8	22.4	22.4	22.2
ISIS 449710	23.0	22.8	23.1	22.6	21.8	22.7
ISIS 449707	22.2	22.2	22.1	22.1	22.6	21.9
ISIS 449711	22.6	22.7	22.2	22.1	21.7	21.3
ISIS 449708	22.9	22.7	22.9	22.7	22.2	22.5
ISIS 416858	23.2	23.5	23.1	23.0	22.2	22.8
ISIS 445531	22.2	22.2	22.1	22.0	21.6	21.7

[1295] 表 166

[1296] 反义寡核苷酸处理对猕猴体内 MCHC(g/dL) 的影响

[1297]

	第-14 天:	第-5 天:	第 17 天:	第 31 天:	第 45 天:	第 55 天:
PBS	30.8	30.0	30.1	29.9	30.3	30.2
ISIS 416850	32.0	30.7	31.3	31.0	31.0	30.9
ISIS 449709	31.4	30.3	30.7	30.7	31.1	31.2
ISIS 445522	31.4	30.4	30.9	30.0	30.7	31.0
ISIS 449710	31.2	29.7	30.7	30.1	30.4	31.1
ISIS 449707	31.4	29.8	30.0	29.8	29.8	30.0
ISIS 449711	31.0	30.7	29.9	29.8	29.6	29.5
ISIS 449708	31.4	30.2	30.7	29.9	30.6	31.8
ISIS 416858	31.1	29.8	29.9	31.0	30.3	30.4
ISIS 445531	30.9	30.0	29.5	29.7	29.0	29.6

[1298] 细胞因子和趋化因子分析

[1299] 把从所有组猴获得的血液样本送至Pierce Biotechnology (Woburn, MA) 测定细胞因子和趋化因子水平。用各自的灵长类抗体测定 IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 的水平, 用各自的交叉反应的人抗体测定 IL-8、MIP-1 α 、MCP-1、MIP-1 β 和 RANTES 的水平。在处理开始前 14 天以及第 55 天, 猴被执行安乐死时, 进行测定。结果在表 167 和 168 中提供。

[1300] 表 167

[1301] 反义寡核苷酸处理在第-14 天对猕猴体内细胞因子 / 趋化因子水平 (pg/mL) 的影响

[1302]

	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 β	RANTES
PBS	350	3	314	32	82	27	277	8	297
ISIS 416850	215	1	115	4	45	14	434	31	4560
ISIS 449409	137	1	37	9	34	13	290	14	2471
ISIS 445522	188	5	172	16	32	22	297	27	3477
ISIS 449710	271	7	1115	72	29	20	409	18	1215
ISIS 449707	115	1	34	6	106	16	294	13	3014
ISIS 449711	79	2	29	6	156	20	264	24	3687
ISIS 449708	35	1	27	12	184	11	361	19	11666
ISIS 416858	103	0	32	4	224	11	328	37	6521
ISIS 445531	101	2	68	9	83	25	317	22	7825

[1303] 表 168

[1304] 反义寡核苷酸处理在第 55 天对猕猴体内细胞因子 / 趋化因子水平 (pg/mL) 的影响

[1305]

	IL-1 β	IL-6	IFN- γ	TNF- α	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 β	RANTES
PBS	453	3	232	191	68	21	237	34	775
ISIS 416850	106	1	19	16	620	17	887	50	27503
ISIS 449409	181	0	25	8	254	17	507	47	8958
ISIS 445522	341	2	83	18	100	22	592	63	16154
ISIS 449710	286	2	176	26	348	27	474	53	22656
ISIS 449707	97	1	24	16	48	12	264	49	1193
ISIS 449711	146	7	22	31	110	17	469	91	3029
ISIS 449708	131	0	18	17	85	23	409	128	4561
ISIS 416858	28	1	9	15	167	11	512	47	5925
ISIS 445531	155	1	15	16	293	12	339	84	5935

[1306] 例 47 : 靶向人因子 11 的 ISIS 反义寡核苷酸的粘度的测定

[1307] 测定靶向人因子 11 的 ISIS 反义寡核苷酸的粘度, 目的在于筛选出在 165-185mg/mL 浓度时具有超过 40cP 粘度的反义寡核苷酸。

[1308] 将 ISIS 寡核苷酸 (32-35mg) 称重至玻璃瓶中, 加入 120 μ L 水, 50 $^{\circ}$ C 加热玻璃瓶使反义寡核苷酸溶入溶液。将部分 (75 μ L) 预热样本移至微粘度计 (剑桥) 中。微粘度计的温度设至 25 $^{\circ}$ C, 测定样本的粘度。将另一部分 (20 μ L) 预热样本移至 10mL 水中, 在 260nm 和 85 $^{\circ}$ C 下进行紫外读数 (Cary 紫外装置)。结果在表 169 中提供。

[1309] 表 169

[1310] 靶向人因子 11 的 ISIS 反义寡核苷酸的粘度和浓度

[1311]

ISIS No.	粘度 (cP)	浓度 (mg/ml)
412223	8	163
412224	98	186
412225	> 100	162
413481	23	144
413482	16.	172
416848	6	158
416850	67	152
416851	26	187
416852	29	169
416856	18	175
416858	10	166
416859	10	161
416860	> 100	154
416861	14	110
416863	9	165
416866	> 100	166
416867	8	168
445498	21	157
445504	20	139
445505	9	155
445509	> 100	167
445513	34	167
445522	63	173
445522	58	174
445530	25	177
445531	15	155
445531	20	179

[1312]

449707	7	166
449708	9	188
449709	65	171
449710	7	186
449711	6	209
451541	10	168

[0001]

序列表

<110> Isis制药公司。
Freier, Susan M.
Monia, Brett P.
Zhang, Hong
Zhao, Chenguang
Crosby, Jeffrey R.
Siwkowski, Andrew M.

<120> 因子11表达的调节

<130> BIOL0107W0

<150> 61/105, 772

<151> 2008-10-15

<150> 61/174, 461

<151> 2009-04-30

<160> 274

<170> 针对Windows4.0版本的FastSEQ

<210> 1

<211> 3278

<212> DNA

<213> 智人属

<400> 1

```
aggcacacag gcaaaatcaa gttctacatc tgtccctgtg tatgtcactt gtttgaatac 60
gaaataaaat taaaaaata aattcagtgt attgagaaag caagcaattc tctcaaggta 120
tatttctgac atactaagat tttaacgact ttcacaaata tgctgtactg agagagaatg 180
ttacataaca ttgagaacta gtacaagtaa atattaaagt gaagtgaaca ttctctacac 240
aagctcattc agaggaggat gaagaccatt ttggagggaag aaaagcacc cttattaagaa 300
ttgcagcaag taagccaaca aggtcttttc aggatgattt tcttatatca agtggatcac 360
ttcattttat ttacttcagt ttctggtgaa tgtgtgactc agttgttgaa ggacacctgc 420
tttgaggag gggacattac tacggtcttc acaccagcg ccaagtactg ccaggtagtc 480
tgactttacc acccaagatg ttactcttc actttcacgg cggaaacacc atctgagatg 540
cccaccgat ggtttacttg tgtctgaaa gacagtgtta cagaacact gccaaagatg 600
aataggacag cagcgatttc tgggtattct ttcagaact gctcacacca aataagcgt 660
tgcaacaag acatttatgt ggacctagac atgaaggga taaactataa cagctcagtt 720
gccaaagtg ctcaagaatg ccaagaaga tgcacggatg acgtccactg ccacttttc 780
acgtacgcca caagcgatt tccagcctg gacatcgta acatttgtt actgaagcac 840
acccaacag ggacaccaac cagaataacg aagctcgata aagtgggtgc tggattttca 900
ctgaattctt gtgcacttct taatctggtt tgtattaggg acattttccc taatacgggtg 960
tttgacagca gcaacatgca cagtgtcatg gctcccgatg cttttgtctg tgcccgaaac 1020
tgcaactcat atcccggttg ctgtttttt acctctttt cccaggaaat gcccaagaa 1080
tctcaagaa atctttgtct ccttaaaaca tctgagagt gattgcccag tacacgcatt 1140
aaaaagagca aagctcttct tggtttcagt ctacaaagt gcaggcacag catcccgatg 1200
ttctgcaatt ctteatttta ccatgacact gattttttgg gagaagaact ggatattgtt 1260
gtgcacaaa gtcacgagc ctgccagaaa ctgtgcacca atgcccctcg ctgccagttt 1320
tttacctata ccccgccca agcactctgc aacgaaggga agggcaagt ttaactaaag 1380
ctttcttcaa acgatctcc aactaaaata ctacacgga gaggagcat ctctggatag 1440
acattaaggt tgtgtaaat ggataatgag tgtaccacca aatcaagcc caggatcggt 1500
ggaggaactg cgtctgttcg tggtagtggt cgtggcagg tgacctgca cacaacctca 1560
cccactcaga gacacctgtg tggaggtctc atcattggaa accagtggat attaacagcc 1620
gctcactgtt tctatgggtt agagtcaact aagattttgc gtgtctacag tggcatttta 1680
aatcaatctg aatatgaaga ggacacatct ttctttgggg ttcaagaaat aataatccat 1740
gatcagtata aatggcaga aagcgggtat gatattgcct tgttgaaact ggaaaccaca 1800
gtgaattaca cagatttcca acgacctata tgcctgcctt ccaaggaga tagaatgta 1860
atatacactg attgctgggt gactggatgg gggtacagaa aactaagaga caaaatacaa 1920
aatactctcc agaaagccaa gataccctta gtgaccaacg aagagtgcga gaagagatac 1980
agaggacata aaataaccac taagatgac tgtgccggtt acagggaagg aggggaaggac 2040
gcttgcaagg gagattcggg aggcctcttg tctgcaaac acaatgaggt ctggcactctg 2100
gtaggcatca cgagctgggg cgaaggtgtg gctcaagggt agcgccagg tgtttacac 2160
aacgtgggtc agtacgtgga ctggattctg gaaaaacte aagcagtgtg aatgggttc 2220
caggggccct tggagtcctt gaaggacca ggatttctg ggagagggtg ttgagttcac 2280
tgtgccagca tgettctcc acagtaacac gctgaagggt cttgtgtgtt gtaagaaat 2340
gctagaagaa acaaaactgt cacaagttgt tatgtccaaa actccggtt tatgatcggt 2400
gtagtgtgtt tgagcattca gtctctttgt ttttgatcac gcttctatgg agtccaagaa 2460
ttaccataag gcaatatttc tgaagattac tatataggca gatatagcag aaaataacca 2520
agtatggca gtggggatca ggcagaagaa ctggtaaaag aagccaccat aaatagattt 2580
gttcgatgaa agatgaaac tggaaagaa gagaacaaag acagtcttca ccattttgca 2640
```

[0002]

```

ggaatctaca ctctgectat gtgaacacat ttcttttgta aagaaagaaa ttgattgcat 2700
ttaatggcag attttcagaa tagtcaggaa ttctgtcat ttccatttta aaatatatat 2760
taaaaaaaat cagttcgagt agacacgagc taagagttaa tggaaagata acagaatttc 2820
tgtgtgggaag aggattacaa gcagcaatttt acctgggaagt gataccttag gggcaatctt 2880
gaagatacac ttctctgaaa aatgattttgt gatggattgt atattttatt aaaatatctt 2940
gggaggggag gctgatggag ataggagagca tgcacaaacc tccctaagac aagctgctgc 3000
tgtgactatg ggctcccaaa gagctagatc gtatatttat ttgacaaaaa tcaccataga 3060
ctgcatccat actacagaga aaaaacaatt agggcgcaaa tggatagtta cagtaaaagtc 3120
ttcagcaagc agctgectgt attctaagca ctgggatttt ctgtttctgt caaatattta 3180
tctcattatt gtgtgatct agttcaataa cctagaattt gaattgtcac cacatagctt 3240
tcaatctgtg ccaacaacta tacaattcat caagtgtg 3278

```

<210> 2
 <211> 26001
 <212> DNA
 <213> 智人属

```

<400> 2
atgccctcca taggetttca gaccttcttc aaggccaaag ggaaggcctt catggaaata 60
taattatgtg aaacacccca gaattttttc acaaaacttc ctgctataa acgccaggtc 120
ctaccactgt ccagtgctcc acttcccact gtccagtggg aagactccct ccaggacaaa 180
accacccttt ccttcaggga tgtgacgtgc tgtcttttcg ttgacagtea tgcagctgct 240
agacatgtca ctctctagct ctccattcgg gtctgtgtcc caggacctaa agaaagctaa 300
aagaagccgg gctgtgtggt tcatgctgtt cateccagca ttttgggagg ctgaggctgg 360
cggatcaact gagatcagga gtttgagacc agtctgacca gcattggtga accctgtctc 420
tactaaaaat acaaaaaaag aaaaagaaaa agaaaaaaa ataagctggg cgtgtgtggc 480
gagacatgta gtccagctca ctccggaggg ggaggcagga caatcacttg aacctggaag 540
gctgtctaaa agaaagaaag aaagagagaa agaaagaaag aaagaaagaa 600
gagaaagaaa agaaagaaag gaaagtaaga agcaagcaag ctgaaatagc ttatttttct 660
gttttaaaaa atagactttt agtgttcaca agtaagaata aaaaaaaaaa aagcttggcc 720
ttaggaggaa tctatctgct ttaggcctct gagaggcagc gtccactgaa gggaaactga 780
ctgggcaaga gccaggtctt taggagctgt ctgtactttg ctcccatcc gtccgtcttc 840
ccccagcagc caaagtctcc tccctccatt atattgcaaa tcaatgaatc cattagactt 900
tccatgtttt ctttttagac tttagatttc aaggtcagct agaattaatg gttaacagct 960
gacaggtgaa agtgtgtgta aatgcagctt tggttagcag gcacacaggg aaaaatcaagt 1020
tctacatctg tccctgtgta tgcacttgt ttgaatacga aataaaatta aaaaaataaa 1080
ttcagtgatg tgagaagcaa agcaattctc tcaaggtata ttctgacat actaagattt 1140
taacgacttt cacaatatg ctgtactgag agagaatgtt acataacatt gagaactagt 1200
acaagttaat attaaagtga agtgaccatt tccctacaaa gctcattcag aggagatga 1260
agaccatttt ggaggaagaa aagcaccctt attaagaatt gcagcaagta agccaacaag 1320
gtcttttcag gtacagtttc agaacttact atttaacatt cctctcaagc aaatacgctt 1380
tgaaatgctt tttttaaatc ataggaattt aaaaacactt tacaatagag aatgattgat 1440
ttttaaatg tgtctgattt agctttgtag agatgttccg ctaatatcca taactaatc 1500
ggagggaaat gtggaacaac agaagagtaa cagtgtctac tcagtaacaa gcgttttacg 1560
agttaaaaag acatccaaat gcagtactga aaaaacagaa gtcttgattt gtctcactga 1620
tgactccgtt ttctctagag cagctctgtt aatgcttact ggagataaat agatttatag 1680
gtgaccaaga caatcgatta atgtatcagc cacagacttt tttaaataga aaattttcta 1740
agtaggaat cattcatagc tctttgaaag atatagggag aggcctcaag gaaagaaaga 1800
aagggaaaaa attgggaag gaacacaaag tgaaaaattg ggggtgggag agcggtcaga 1860
tggtggccat gagaaggatc tgaacacaga gagcgcgagg gccggcgagg aaggaggagg 1920
gaggggagag cgtctcttcc ctgtgggttc cggcttctgc agagctgtaa gaggttgaatg 1980
ccacacacag tcacactaag gaatgtctca ggattgggaa agaaaattca acattataat 2040
gagaaacact tgaatgctat tgaattaaat actccctctc ctccctattt ctgttaagtc 2100
ttagtgtcag taaactaatt ataaatttac attttatgtt ctaaaagcat gcaccttttt 2160
ctcattgtag gatgattttc ttatatcaag tggtagattt cattttattt acttcagttt 2220
ctgtgtgtaa gtagagtgtt atcttaacta tgggtctggg gagggaaate acactgcaat 2280
ctccacacat gtgggagaat cccacacatt ttatgccggg aaggaaataa aatgttttta 2340
ttaacttctt gccctgaggc ccagagggtt tcaagcagg gtaggaattg aggtgaaaaa 2400
attgtttgta ctggtaggaa tctgtgtcta tatgtgtacc atatctacat ccatgcttac 2460
atacatcatt catttaaatg atatttaaaa gcaatattaa aaagaagaaa tcttgatttg 2520
ctcactaat tagttggttt ttcataaagc agtcagttca atggaacata cacacacaca 2580
taaaatagga attttgtact gaaaaatgtt atgtaactat tcatacacag tttatgcatt 2640
tcaataattt aactaccctg ttaattctcc accctatgtc acatctgcta aatttgttta 2700
taaattactt agccaatatt aagtaggata tatcagtaca ggtattgttt agttccatga 2760
ccattcttta tttaaatga aagetgaagc attcctttag aaaaatagct tatgtctaca 2820
tgtttatatt aatttctgat actattgcta gcattttaag catagtaaat tctttttgct 2880
ggcctatgtg aaaaaaggca aacctagggt agatatttaa aagtaaatte cacttaatat 2940
attaaattac acagctcata atttcaattt tctctgtgac aagactactg ctcaggttat 3000
aatatctctt tgtttataat atctggaaat tgtattgtta ttteattgat aaatatgtca 3060
ggcctaaata atttgatata ttttgaacac tggacccaat aactacataa acaattgacc 3120
ctgaatcagg ggttccacat ccatggattt aaacaacatt gaagtgaat tttttaaaaa 3180
aaattatate tgaactcaac atgtgcagag tttttctgtt tcattattcc cgaacaacaa 3240
cagtataaca acaatttga tagtatttac attgtactag gtattataag taatctagag 3300
atgatttaaa gtacacagga ggcgtgtgag aggttatatg taaatactat gccattttct 3360
atcagggaat tgagcgttca tggattttgg tatctgcagg aggtctggca gccaatccct 3420

```

[0003]

```

catagatate aaggaatgat agtgtacata tttaggtcct ttatcacatgc acatggaaca 3540
tttacaataa ttgaccacac acaagecctet gaaacaagge tcaacaaatt ttaaggggtt 3600
aaaattatac tgatcatgtt attcaatcac cgtgaatggg agctagaata ataataaaaa 3660
gggaattgaa aatctgcaaa cgtttgaaaa ttgagtattt ataatacccg tgaatgggag 3720
ctagaataat aataaaaagg gaattgaaaa tctgcaaatg ttgaaaattt gagtatttat 3780
accttttttag attaatgatga atcagagatg aaatcacaaat ggtaattaga aaaggaattg 3840
tacaataaatg aaagtacagt atatacaaac tttgagatgt aacegaatca gtgttgagat 3900
caaatgtata gattttacatg tatacattag aatacagaaa agggaaaaat taatgatata 3960
agatgacaaag aagatagaga atagcaactt aagtgtctag aaattagaag gcagaaagaa 4020
gaaatcgcaag aaatttaatta aatggaaagac acacatattt gagaggtaaa cataaccctt 4080
ttctagccca ttttataagg tcagggtaat cttgacacca aaatctgata ggaaatttct 4140
gaggaaaaaa agtcacaggt cttttatctt atgaacatat gtacaaatgt cctaaacaaa 4200
atatattcca acttaacca gtagattgtt aaaaaaatta aaggatgatt acattgtgat 4260
attgtgacaa agttgggttt attccaggaa tgaaaagtgt atttaacatt caaaaatcaa 4320
tagatgtgtg acttcggggt acataccgaa aaaaagaag ggaaagcagg aactcacaca 4380
gatatacttg tacaccatc tcatagcagc attattcaca ctaaccacaa ggtggaagca 4440
gccatgtgtt ttatacaacg gtgactggat aaagtgtggt acatacatac aaaggaatat 4500
tactcaaccc taaaaagaaa ggaaattctg acacatgcta tgacatggat gaaccttgag 4560
gacattacgc taagtgaat aagccagta caaaagaaca aatactgttg gatctcactg 4620
ataggaggta cttagggtag tcaatttcat caagacggaa attagaacag aggttgccag 4680
gggcccaggg gccaggggaa gggctgaggg ttggtgttta atgggcacag agcatcaget 4740
ggcgaagtgt aaaagtcttg aggggtgagt gtgctgtagg ttgcacagca atgtaaatac 4800
ccttagtgcc acagaactgt acactcaaga tggctacatg gcacatggta tgcctatctt 4860
cataataaaa aataaaaaata attttaaatg ttaatatgtg ccgaaaaatg cttgctaaaa 4920
ttctattaat gatcaaaact ttaataaaac tggaaatgga agagaacttt catcagctat 4980
taaacgatat tttaaacaaa agcaaaacaa aatccaaacc aaaaacttte aagaaacata 5040
atacgtataa gcggaatatt gaaagcttcc ccaagggtat gagaatagga caagaatact 5100
tccattattt tccatttact cttgactgga ggtactcgtt ggtgcggtaa ggaagggaaa 5160
taaaagggaaa acgattagga ggaacataag ctctcgtttt tcacagatga tgtgattgag 5220
tacctagaaa aatccaaat taaccatcac ataattattt tgagccaaat aattaaatga 5280
gtaagaagtc tggatacaac gtcaatatac aacagcaagc acttgctcgt tcgcaaaagc 5340
agatgaacta gtttttactg acactagaag cagcatgtgt tccatgtgtt ccacatccat 5400
gcactcaaac aaccttgacg tgaaatattt tttaaaaaat tgtatctgta ctcaacgtgt 5460
gcagagtttt ttcccaaat tgttttccaa aaatttttaa atgtttatat gtttaggggg 5520
tgtaagtcca gatttcttac atacatatat tatgcggcgg tgaagtcccg gcttttggtg 5580
tacctatcac ccaagttagt aacacagcct ccaacaggta atttttcaac gctcacccca 5640
ctccatctct cccatctagt ggcataattg aaatcaattt gtctgttaaa attaaataat 5700
ccaattagga gggggatata ttctaaggaa attagtcat gatgcacaca cacacacaca 5760
cacagaacac gtgtgtgcgc atgtgcacat gagagagagt gagagagaaa ctgggtcttg 5820
ctctgtgcgc caggctggat tgcagtgtga aaatcacagc tcaactgcag ctcaaacctc 5880
caggctcagg agatctctct acctcagcct cccgagttagc tgggattaca ggtggaacaa 5940
accatgcccc gctagtattt tttttttttt ttgtattttt tatagagaca gggctcttgc 6000
atgttgcccc ggctggtctt gaactctca gctcaagcaa tctacctacc ttgacctccc 6060
aaagtgtgg gattacacgc atgagccact gcgccactc cgcattatta aatatagaac 6120
atttatttga ttcatcagtt aatattcttc ttaaaagtac tattttaatg tagcaagatt 6180
gctttccacc aaaaggtggg gtttccacgg tggggtttcc aaattattct caatgggggt 6240
aggatgtgtg ttatcacacc cccgagccat cagatgtgtg cagaagtgta tcaactctga 6300
gtctttgttt caaataagca cagggtttgg ataaagagac gcaattagga aaggaaaaag 6360
cagaagcttc gttccagacc tggatgagat cctaaaaagc agcagctttt gccagtaaa 6420
atccttgaaa tgattcaatt acctcaaaag cactccttgt ctccaagaca atcactcata 6480
agcacaaatc cattgaagcc aacgtaccat tttgtgattt tegtttccac ctgaggtgtg 6540
tcattcaata aactcacata aaagtgttta ttgccttgat ttccaaatc aggcgtattt 6600
ctgtgtaagt agagctactt gccttgccct tatgagatta ccacctaaat agatgtatgc 6660
ccagtataat ccaacataac gcatgccatg tactacatca cagaatgtgt gactcagttg 6720
tgaaggaca cctgctttga agggggggac attactacgg tcttcacacc aagcgccaag 6780
tactgccagg tagtctgcac ttaccacca agatgtttac tcttcactt cagggcgaaa 6840
tcacctctg aggatccac ccgatggtaa atgcttatgt ttctacatcg agggagaca 6900
tttttaagg gagattgcta ttcttaacac atttccatct aacattttat aaaatttaac 6960
attaacaact ggaagataaa ttgtctttca gttgaaatat tgttacagaa agaagtgtg 7020
gtgtttacgc aatttagaaa agaataaata tgcctccaa gtagactttt ccagcctctc 7080
ctatagcttc atattaatgg tatgtttctt ctgtttgtct caatttttac acttcttaa 7140
catttcacac tttgcttttc tatcgattat taatttttgt cgtgcttctc aacaaactgg 7200
aacctctccc aactatttta ttgaaaaaaa ataaaaatatt taaaaagaaa atttgaaaaa 7260
aagtacagta cagtgatecc cctgccacca ccaaaaccgc aatgtttgct atatttgtac 7320
agcaatatac aatatacaat acctatattt gtatacatgt ttaaccgttt gaaataattt 7380
taaacatga cactttacc ctaaaacttt cagcatgcac tatectacac aaaagacata 7440
cgaaattttaa caagaattcc tttatattat ttcagttttc cctcaaatat aatttatagt 7500
aattaaccag aatcttacca agagtcaact actgcattgg gtggtttgtc aggtttaaaa 7560
cattttaaac agtccacca ccaattgtat tcccatctcg agcttgaaaa ttttaataa 7620
agectttctc tagaatttag ttctcaacat ctttattatt gctacattca caggcattta 7680
tgtagcacc agaacttata aaatttacta ttccagaacc tagagcaggg attggcaatt 7740
gtcttcttaa taacgcagag taatatgttt aggcctttgt ggcaaaaccc acagttaagc 7800
caaggatatt atttaagtat ttatgtcacc acttaaaatg taacaatttg aaaatataaa 7860
aatcattttg tatagctaac aggcataaca gaaacacaca gatttttggt tgcattttac 7920
caacaggtec tagttgacac attcctgttt gtctctatta gaaaggagta ttacatgcag 7980
tctcttaagt gtagggatat tgaagtaaaa aacaacatca gaactcttgc aagaaaatat 8040

```

[0004]

```

ttgttttggc atgagataaa gtagtttgtt tecttttttt tggtttctg tgtgtgact 8100
tttaagatcc attattttta aaacataaat tectattcat taatatgtat tttttaaaa 8160
aacaggttta ctgtgttctt gaaagacagt gttacagaaa cactgccaa agtgaatagg 8220
acagcagcga ttcttggtta ttctttcaag caatgtctac accaaataag cggtaagata 8280
tgtttctcaga atcaacaaat accagctgtg atgtacacat atcgccacat cggatgtggt 8340
tttaaggcta tgaatgaaa cactgtctat tggaataaaa ccccttaat gaagtcttt 8400
cagtgtagag tataaactag tatacataca tgcctgccct ccaacacact gtaaaaacct 8460
ctttacctca tagaaagaca tatcttacta cctcacttcc cactcattat ttatattctt 8520
tctatttccc agcctaaaa cttaaatgaa agtctttttt tttttgagac agggctctac 8580
tctgttgtcc aggttgaggt gcagtgggtc aatcacagct cactccagcc tcaacctctc 8640
gggttcaagt gatcttcttg ccttagcctc tggagtactt gggaccagag gcatgcacca 8700
acattcccag ctaatttgtt catttttctt agagacaggg tctcactgta ttgccaggc 8760
tggtctcaaa ctcttggect caagtgtctt gcccgctctg gcttccaga gtgccgggat 8820
tccatgggtc ccagtcgaaa ttctttatta aacgtattaa tccaaattga aaggagcaca 8880
tataaagggt gaagtgcac ttgtcttaat agtgaataga taattgaate agttaattag 8940
cgaaaataat agtgcagtta gggagaagag aggttaggtc agaaaatcaa aatgtgaatt 9000
tacaagtcta aaattgttac agtgttaaga ggacattggc attcttttac tgcctccatt 9060
caagaataag aattttgcag attaatataa cgaaagacct ctgaggaaag gtgggtgaaa 9120
aagttgaaag gatgagtcag gaggacaggt tgetttaggtc attgccctta gaattctgaa 9180
ggtactcatg tcttctgctt ttatttccag ctgtcaacaa agacatttat gtggacctag 9240
acatgaaggc cataaactat aacagctcag ttgccaaagag tgcacaagaa tgcacagaaa 9300
gatgcacgga tgacgtccac tgcacatttt tcacgtacgc cacaaggcag ttccccagcc 9360
tgagcagatg gtgagtgagt cccaggacat tgcagtggtc gatgaaaaac agaactgtga 9420
tttactaaaa agcttttggc atcaacttta tgcagaatt tattttgaac cctataaaga 9480
catttctata atagtactcc tagttttctt catgaaaaat acacttaag cctaatttgg 9540
atgcatttca ttattggtaa ggagctctatc ttttaataac actgtcagaa aaatatatat 9600
acttgcctaa ttcaaaaagc gctacacttt taaattggca cttttgaaac agctgcaatt 9660
ggtatgattg tcagtgcctt tcccagctta aaaaatgta cagtctaaaa gaataaaaat 9720
aaaaacctac tctctctctc tetaataaac agttccttac ctaagacaaa atactcatgt 9780
aaaaagtctt atcctgtctc atactggatt ttgaaatatt tcaaggataa atctatcaca 9840
taaggattta aaaaattatct gatctctaat aaccaaactc gtgttctcat ctttaaaaat 9900
ttactaggga aatagattat faatttgtat attcagaaat atttgagatg atttagattt 9960
tcatagttaa ctgcatttat ctggaatcaa cagaaaagtg aaaaacattc aaattactaa 10020
tacttgcgtt ttaacattgg attttaacat tctgtctctc acattcacaa agaggagtga 10080
acagaaagca aacaaagcat caacaggtta tttaaaaaac aacagtgggtg aaaaacacac 10140
acaccaaaccc cctaaattca tgatttgact tgaaggctt atctttagct cagctcagac 10200
gacagctttt atgtctaaag cttaacagaa tgtgaactgc aagacaagaa attggagggt 10260
tctaagcaag ataaagttaa gtcatttaaa gtaagaagga cttagccagg cgcgggtggc 10320
cacacctgta atcccagcac ttggggaggc cgaggcgggc agatcacctg aggtcaggag 10380
ttcgacacca gcctgaccaa tatggtgaaa ccccgctctc actaaaaaag aatacaaaaa 10440
ttagccagcc gcggtggtgg gcgcltgtaa tcccagctac ttgggagget gagacaagag 10500
aatcgcttga acccaggagg cggaggttgc agtgagccaa gatcgtgcca ttgcaactca 10560
acctgggcaa cagagtgaga ctccgtctca aataaaaaaa aacaaaaaat gagaagggtc 10620
tgagaagtca ttcatctatg cactctctct cttcatgttg tcaactcttc aagctgtcat 10680
tatactgaag aagaataaaa ctacacaaat tcacaggtgc ttagcaaacac tgetgggacc 10740
atgccagacc attcagctc ccagatggat gcttcgggtt ctgcaggctc ctctctccaa 10800
aggggacttt cttaatatct catgtttttt cctccttgca gttggaagaa taagacattt 10860
ttcttttttc tttttattca gtaacatttg tctactgaag cacaccaaaa cagggacacc 10920
aaccagaata acgaagctcg ataaagtgg gtctggattt tcaactgaat cctgtgcact 10980
ttctaacttg ggaattatc gacttcttga tgatgtaatt caaccattaa atatgtctat 11040
gattacagta gatctcactc aggtaccagc cttatgtctc cgalgaacag gacccaagaa 11100
tctttacett ctctatgtga tagatttcat catgtctat acagttagat cctctattta 11160
aatttccagt ttaaaaataat catgccattt tcttctaaat aaaaaaaaat taaaagatct 11220
tgggatacac ttaatttttt taatatggaa ttacacata ctgtgaccgg aattttctct 11280
atagctgggt aattgagtc ctgacatagt tcttcgctcg cgcagcttgt attagggaac 11340
ttttccctaa tacggtgttt gcagacagca acatcgacag tgcattggtt cccgatgctt 11400
ttgtctgttg ccgaatctgc actcactcact ccggttgctt gttttttacc ttcttttccc 11460
aggaatggcc caaagaatct caaaggtaag gatttaacaa gtaaggataa tttgttatct 11520
tetaaaaata gctgatcaaa atccatcatt aaaaattcca agtaactaaa aatttactct 11580
aaatgtcagt ataggataaa agttgcaag aatttctage cctctctccc ttctattccc 11640
cactcttta ccacaaaccc aacattacgc agactcttt tttttttttt tttttttttg 11700
agatggagtc tgcgtgtgtt gccaggtgc gagtgcggtg gcatgatttc agctcactgc 11760
aaccttgcgc tcccaggtcc aagcgattct cctgcctcag cctcctgagt agctgggact 11820
acaggcatgg gacaccacgc ccagtaattt tttttgtatt ttttagtag agtgggttcc 11880
accatgttgg ccagctgggt ctcaaaactc tgacttcagg tgatccacct gcctcgccct 11940
cccaagtgcc tgagattaca ggtttgggccc accgtgcccg gccagtaaat tttaaaataa 12000
atataaatat tacttccact aaataaattt taggtacagg tacagttgtg ttacatggat 12060
atactgtgta gtgggtgaagt ctgggcttcc agtgtagcca aatagtatac attattccca 12120
ttagataaatt tctctgctt caccctctct tatctctcca actctctgag tctccaatag 12180
ctttcatctc actgtctctg tgcctgtgta cactttattt agctccacct taaaagttag 12240
aatctacaaat atttgacttt ctgtttctga gttgtttcac ttgagataat agcctccagt 12300
tctatccatg ttgtgcaaa agatatgatt ttatgatttt tttatggcta agtaacattc 12360
tatagtatat tctatacacc acattttctt tatccattca tttgtgata gactcttagg 12420
ttgatccata tctttgttat tgtgaatagt gctgcagtaa acatgtgagt gtaggtatct 12480
ttgtgacatg attttttttt cttttgttat gtaccagta gtgggattgc 12540
tgagggtctc caccittgca aaggggcagt tgtctagtct taaatgaat gaagagattc 12600

```

[0005]

```

catttccatt tcatgacaac taaaagacaa ttcagtccaa tgctttgttt aaaataattg 12660
aaccaggaaac agaaaagagct gaaaatgtca gtgaaatgtc aaacccaaag tggagagaga 12720
gagagagggtg gaaatgaatg tctccatcaa gtgggttagg gtgggtgttg agggagggtt 12780
gagaatttag tccctgtttc cttaccaatg gaaattaaca taggacatca gaaacagcat 12840
ggaaaaatttc ttigtattac aaaagtacac tagctaaggt tgctgtccct cttttattta 12900
tttatttatt tgagacaggg tcttgcctcg tcactcagat ttgggttcac tgggtgtgat 12960
ctcagcccccac tgcagccctcc acttccctagg ctcagcaaat ccaccctgtc catccctccc 13020
agttgtctggg accacaggtg tgcaccacca cccccagcta atgtttgttt tttgttagag 13080
acagagtttc gccatgttgg ccaggctggg ctagaactcc tggcctcaag caatccacct 13140
gccttgggtct cccacagtcg agggattaca agcctgagcc actatgcccc gcttcttatt 13200
cctcattgac aacattcact taaacacgca acaaatatc cgtaaaaatta agtcagcttt 13260
aaaacctggc ttgtatatat ctttgaattg gaactctcag agcctcagc acttgcctga 13320
ttggcctcct gtgtatgaaa agttgtccct cagacaactc agccaaggga ggccctgtgt 13380
gccttgccta tcacatgagc ctcactttcc actgagttag gtgtcattt cagaagcacc 13440
gggtctgtca catgaaaaa tatctgttac catcacttac taaacaaatt tagtagaatt 13500
tgttttgggtc ttattatgta tcaggcattg ttctgaaggc tggggatacc atttagtgaa 13560
ctaaatcgac aaaaactttg cctattggac cagagtggag atgagagaga agtgaccaga 13620
tcgatctgtg ttatcagcag acagccaata agatttctg ataggttgga ccacggattg 13680
tgaaggagtc agtgatagca ccaagacttt tggcccaagg aactggaaag atggaatgt 13740
caatgacaga atgtggagga ttctgcgaag agcagagtgt aggagaagca atgcccttgg 13800
ctcatctagg gcaaaagggt gaattggcaa ctggaaatag aagtc aaatt cagaagagag 13860
gtttatgttg acatctgtgt ttagggtgca ccaatataca gctgatactt tttaaaaate 13920
tagtgaattt atcaaagggt taaatgcaga gagggaaaga agtaggtcca aagatcaagc 13980
cttgggacat tggaaagtta gaaataagaa agatgtcatt gtcacttgta attttgtgt 14040
agtcactgtc ctttttcttt gtcttattac cttactgacc aattccctaga ataggaaata 14100
cacatttgat ctttaataca gtatgtgata ggaacatggc ttctataagc ccaaaacttgg 14160
caatttaaat ttaattttat taaaattaaa taaaactggc tgggtgcagt ggtcaccgcc 14220
tgtaatccca gcacttttgg aggcgcaggg ggtgaatcac gaggtcagga gtacgagacc 14280
atcctggcca acatgggtgaa accecgctct tactaaaaat aaaaagtta gccaggtgtg 14340
gtggcatgtg cctgtaatcc cagctactca agaggtgtag gcaggagaat caattgaacc 14400
cgggagggcg aggttgcagt gagccaagat cgcgacactg cactccagcc tgggtgacaa 14460
gagaagagct atgtctcaaa aaaaaaaaaa attttaataa aaactaaaaa ttcaccttcc 14520
cagctgtgtt agccacattt caagtgcacca atagccacat gtagtggcca gttactgtat 14580
tggatggcac aggcatagaa tatttccate actgcagaaa gatctatgga cagtcttgc 14640
ctagactgtg attttgtcta cttaggaaaa gtcaactttt tccaggaaag tgcctccagg 14700
gtgtggagta aacgacggac ttcaccate tecttataaa cctattgcaa ccttgatag 14760
gaggtttcta ggtagcatga agactcttga atctttaaga taggtcggga gtgttgaaag 14820
gaaggaaatg aaaaagggaag atactaggaa gactgacaat agagcaagct cagaaaaatt 14880
ttatggaggt gatttagtta gaaaatttgt ctgcaaccta agggccatgg agtgtgactc 14940
catgttttat ggggttaact ccgtgtgtta tgaagagtac ttcaaaaata ggaanaattc 15000
cacaactaag tctagcatg agctgacttt actttctcta ggtgtgttaa aaatgttttt 15060
atgtgtttga tatgatata ttctacttcc cttttgtttt tgttagaaat ctttgtctcc 15120
ttaaaacate tgagagtgga ttgcccagta cagcattaa aaagagcaaa gctctttct 15180
gtttcagctc acaaaagctc aggcacagca tcccaggtaa actgagagtt ctgcattctg 15240
gctgagagtg accagccccc agggaggtga tacatgctga gggaggtctc cactctgaca 15300
tgtgtcttgc tgtctagtgt tctgccatc ttcattttac catgacactg atttcttggg 15360
agaagaactg gatattgttg ctgcanaaag tcacgagggc tgcaganaac tgtgcacaa 15420
tgccgtccgc tgccagtttt ttacctatac cccagcccaa gcactctgca acgaaggga 15480
gtaagccata tgaagggtta tgcagacacc cttgtccctg ctgctgtgta ggtgcattat 15540
gtttataccg ttttgtttcc aactgcaggg gcaagtgtta cttaaagctt tcttcaaacg 15600
gatctccaac taaaataact caggggagag gagcatctc tggatacaca ttaaggttgt 15660
gtaaaatgga taatggtgag tataatgtca cttgaaaaaa tatagctgaa ggaattatte 15720
catgctteat acatcacaat caagactgtc agttatagcc acagaaggga gaacattcag 15780
gaaataacaa attttgcaat ttctctattt ttctactcct gtcactcaag ctgaccatgt 15840
tttaaggta aatattgagg cttgactaaa ctgtacattg cctagtatta actaaatata 15900
tgctttaatt tgacacattt atacacctgg catttctgtt ttcttttttt ctttttttt 15960
tttttttttt tgagacacag tctcactctg ttgcccaggg tggagtgcag tgatgtgtgt 16020
agtgttcaat gcagcctctg gcttgaactc ctggactcga acaatctctc cactttagct 16080
ccctgagtag ctggggctac aggcgtgcac cacaacactc ggctaatttg ttgttagagat 16140
gggatcttgc catgttgcgc aggetgtgtc tgaactcctg ggtcagaaga atctctccgc 16200
tttggcctcc caaagttctg ggattacagg cttcagccac tgcacccagc cacaactggc 16260
atttctaat gagaccaga ctctgccaac actcctgtta tcaaggccag taatctttcc 16320
tattatcett tgtaaggga ttatcgatca gcactttgtt tagtcaaat actaattttc 16380
ttccaaaaat tgtgtatcta ttcaagaaat actggagcac ctccttttta ggtctttat 16440
tcagattcca tgcagggttc tggagactta gggattggca aaggtttaag taaaacttta 16500
ctagtaacaa tgagtgtgtt aggatggaaa taagtgttta gattacagca gacctgta 16560
aacataaaaag ttacaataaa aatccaacca gcagtgttcc catcccagtg gccattttc 16620
gagcatagtc acgagagatg cttttaggag aaacagaatt gttetaaggg acaaaatccc 16680
caacaggaaa gaacacacca caaacactcc tgetttaaatt accatagtaa cttaggatgg 16740
ctttactata tattgattta cataaagctg catgttctta tactgtttat tgccaaatgt 16800
ccaatattac aatacactat aaggtgcac tgagatttaa tgaataaaat ggaagtaaca 16860
atcctgcctc gtgatagttt tagaagcaca aaaacattct gtgtcagatt atctgtctga 16920
ccgagaaggc gaatcaatcc ttaatttctg agaacttgtt ttgtagaaca taaagacgtt 16980
atattgcctc caaacactgg atcctaacta acagactatg cttctctaga gcttagagge 17040
gctccagtga aaatctctgg atggctcaag acttctttaa aagcaagtea attacgtcgt 17100
atctcataca ttctgttttc ctcacaataa atttccctaa gacaagaagg agcattggcc 17160

```

[0006]

```

accattctgt tgtctttctt ctaettctaa gegttagaag ggacacttag caaatgttgc 17220
tgttaagtaa tgttgacatg gtttaataaa atgggaatga gcacgtatac ctcaatcatat 17280
tgcagactgc ttttccccc ttcttcttct attatggttt tctctgttgg atttatagac 17340
tctggcctgt agaagttaca gaataigcca ggtatagatt gatagctaca ggagaaaatg 17400
taagataaag gaaanaaang tcttacgtct tttcagtgca actttggagg gagtgaatta 17460
gataactagg tttttactgc gctgtatttg atgaataaac cccctaattg gaaagggaa 17520
agctgcgtga gatatttatg gtgccttgct tgtcactggg ctacaatgta acttaacttt 17580
ctgaagatag atagcagcac cattaaaata aacatttctt accacaaaat atgattctaa 17640
acacatattt tcagcatttc gtttaaacgt agaacacga taggatgaac ctcaaggcct 17700
ctcacctgga ccttgagtta tttctaaaaa atcttagtta ctatttacct attaattttc 17760
ctaaaattta cttttatgac gcttccccc ttgcagaaat tccagaatag atggccctcc 17820
aaaatgaatg ttcacccttc cggctctaaa atgagagcct ctgttcaggc ttccgaagtc 17880
acatcgtgct cgttctcacc tcagttgctg tttagctgctg tttccttcgg aactcctct 17940
ctcatcctct cctcttattt gaaatctgcc ccagaattat acactcattt tcttaccacg 18000
gaaaaaaaag cctagaaaag ttgtttttaca cccacaaaac tagtgaatgg accctctagg 18060
acccggtctc tcacagtgta tttcttctgt aacttagact cctcccttag ctccaggacc 18120
ggagccttct gacacactga gcttggttat tctaaatgtg atctgggcac agcacattga 18180
cateacctgg gactttgta gaaagaattt caggaccacac acagatgta ctgagtcaga 18240
atctgcattt tgaagactac acaggcaacc cacaggcaca taaattttga gtgcgatagg 18300
tgtgtgcgtg tgtgtgcgca tgtatgtgtg cgtgtgtttg tgtgcacgtg tgtgtgtgtg 18360
tgtctagaat actgctgtct acgaacaccc tatccctcct catctgtgtt ccatggctcc 18420
aaccggtagg gtgggttctt gtgtcgggca tccagtaagt agaaatagag ggcactgtcc 18480
tgtctaggca gccccaaag aaaagaaaac gagggatgag cctgagtcac agtccctgaa 18540
aagtaccacg gaccccagag aatcccaaac tgtcaacaag gccaaaggtc agaggaagtt 18600
catagcagat cagtcttact ttggactggg gtggagcagg agtgactggg atcatgtgca 18660
gcagagctac tgggacaggg caggaaactg acaatggctg cagcctgcgg gcaaggtgct 18720
tgctctttct ttctaaagac gctgtctaaa cgcacaggag gctgttctaa acacagatgg 18780
ctgagcttcc aggttggagt tttctattca ctggatctga ggttggctg aagaatgtgc 18840
atttctaaac cgttccacag tgacgtgttt ggtctggaga ctgcacttga caaccactgg 18900
tttaaaaaac ccattcacgt tatcatttga aggagggtaa gacagccttg tagtaccaca 18960
caaggagggc tacattctta ggggtgtgta attacaagat gacttagtca attccatttt 19020
tcattgtcat gttttgcttt ggcagcttga ttataaagtc tctgtaacct agggctcatga 19080
taactattg acttgaggaa aggttttctt ctgttctctg aaggagcata attactgatg 19140
gaaaggaaag ttaggaagc tgcctatcac aatgcttctg ttgcagagtg taccacaaa 19200
atcaagccca ggatcgttgg aggaactgcg tctgttctgt gtgagtggcc gtggcagggt 19260
accctgcaca caacctcacc cactcagaga cactctgtgt gaggtctcat cattggaaac 19320
cagtggtatg taacagccgc tcactgttct tatgggtcag taccacggct gttttatta 19380
gttcatcttc ttacacattt tataaaaaat attactagca tgttaggaaa taaatacttt 19440
aaccaattag attgtcttat ttgcaaaatt aattaattgc ttcagtggta aaaaacgcaa 19500
aaaggaagag ctcatggctt cccagcatca gaacagggtg aggtacaagg ctgcttgact 19560
gcctgtctatt ccgttccca ttttaaccga ttacatctcc caagggcctt catgttattc 19620
cctgcaagag catacctccc tctgtgccct gctctgtgca ctgtgccgg aactaaacte 19680
acagaggatt taccattgtc tgaatcaaat ttctaatatg ttgtgtgtgt ttgtgtgcgtg 19740
tgtgtttaaa taccagaaag tggcagggtg ggtgttctac gctgtctate tcagcacttt 19800
gggtgtgtga ggtgggagga ttgtctaatg ccaggagtct gaggtcagcc tgggcaacat 19860
agtgagacct cgtctctaaa aatattttaa aaactagcct ggcatgggtt tttgtgtgcc 19920
tgtagcacca gctgctcaga agtctgaggt agggagattg cttgagccca agagtccaag 19980
ggtgcagtga gttactacag tgccactgtg ctccagcctg agcaacagag caagacccta 20040
tctctaaagta aataaataaa atacagaacg agttcgggtat gcactctcac attggattcc 20100
ttacttaggt cactttcagc gttggccaaa caaaaaggct ccagctgggg gtatatatat 20160
tccagggaaag ttaagttggc ttttaaccga ttacatctcc caagggcctt catgttattc 20220
tccagacaca gttttgtgtg ctttttagtt ttggtttct tttttaatca atctgcagca 20280
cactcatgtt aaactcaaga acacatgtga ggcacagagt tcccgttacc tgtcacatat 20340
gggaatggag tagcagaag cctagtttct gtacacgcta gttactggcg agattgagac 20400
tgagtccagc ggtcttctgt ttgtgtgtgt cgtgtgtgtc ttgtcagtg gctgtgtgt 20460
gcgtgtctgt gtgtgcgtgt gcgggtgtgt gcgtgtgtgt gtgttggagc acggaggagg 20520
tgctcattea tttttgtgt ataattgatt ttctttatag ggtgaatatg tttttatcc 20580
cgaaaaaatg taggataaaa tcacttttt ctacetaaat gtccatcatt ggcagaaaa 20640
attagtaata attaaacagc cacacacttc acaatgtctg ggaattattt ttagtaagg 20700
aaatttctt cctctgttg ttgtctctt agggtagagt cactaagat tttgcgtgc 20760
tacagtggca ttttaaatca atctgaaata aaaggagaca catctttctt tgggttcaa 20820
gaaataataa tccatgatea gtataaaatg gcagaaagcg ggtatgatat tgcctgttg 20880
aaactggaaa ccacagtgaa ttacacaggt accgagaatt ttatccggaa agttgtctc 20940
aatggtgaac tggataaaat gtttaacact actagactta cggcctgacc ctgccaatct 21000
ctccatgcgt tateatcatg aaaggagag ggcctggaa gctagtcatt cactctgcta 21060
aggctgacac actttctctg ctattgaaac ttattttggg aatgtgggtg aagagatag 21120
tttctctgag tcttctcag gtgcataag ttacataatt tcataatact ttggaatag 21180
aaagataatt tagtctaaag ataatttatt aaagataatt tagggatgaa ggattgaag 21240
ttagaacaat taagcaactt gtgcaggatc aaagtgagtt ggatgaggag ttacgggtga 21300
gggtgaggct tgcctctctc tgcctctctc atcctggcac atgtgcgata tctgtctgaa 21360
cctgaggagg gaaaaaacac gacacaaagg caaaaaatga atatagtaaa caaagaaaac 21420
acagataatg tacagtggaa gaagagctct ttctggaaaa gaggatatat tttgcgtctc 21480
atatttaaac cagatttttt taaatttaga ttctcaacga cccatatgcc tgccttccaa 21540
aggagataga aatgtaatat acactgattg ctgggtgact ggatgggggt acagaaaaac 21600
aagggtaaa aatgatgttg ttatatgtgc tccatcttag aaatgaagag cggaaacttt 21660
tctgcctgt caagtcatgt agctgaagca caactcagat cacactactc agttgcagga 21720

```

[0007]

```

agcggattaa taaagatgga gaggcacaaa tcaccaagt gaggcctggtg cctcatatgt 21780
ttgattggaa attttaaatg tgactaaate tctttaaaga ctaattatat ttaatgaagt 21840
ttaatgtgaa gcctagcaat tticagtaaa tgttctagcc tgctatccaa ttactttctt 21900
gggaagtcac tccagttaga gtacataatta atttttgaac ttaatttaaca ttaacaaaat 21960
ggtagacgca atagtgaggaa taatgtcttc ttcatacttg taattataaa aggtctgtga 22020
agtaaatcta acattttttc cttctagatt ttatataga catgagtttt gtgtgtgtgt 22080
tgttttgaga tggactctcg ctcctgtgcc caggctggag tgcagtggca cgtatctggc 22140
tcaactgtac ctecaectcc egggttcaag tgattctcct gcctcagcct cccgagtagc 22200
tgggattata ggtacccaac caccaccca agctaatttt ttgtattttt agtagagacg 22260
gggtttcacc atgttagcca ggatggcttc aatctctcga cctcgtgac cactgcctc 22320
ggccttccaa agtgcgtgaa ttacaggcgt gagccccac acccgcccat gatttttatt 22380
ttaaatatat gtggcccagc accactgggt gctcacgcct gtaatcccag cactttggga 22440
ggccaagatg ggtggatcac ttgaggtcag gaggttcaaga ctggcctggc caacatgggt 22500
aaacctgttc tctactaaaa atacaaaaat tagctgggca tgggtggtgtg tgcctgtaat 22560
cccagctact cgggaggtcg aggcaagata atcgcttgaa ctgggaggt ggaggtagca 22620
gtgagctgag attgcaccac tgcactccag cctgggcgac agaaagagac tccgttcaa 22680
ttaaaaaat atatatatat atatttatat gtatgcatat atgtttatgt gtatttgtta 22740
tggtttattc acaaacgaac caaaaaaatt ttttccagac aaaaatacaa atactctca 22800
ggaagccaa atacccttag tgaccaacga agagtgcag aagagataca gaggacata 22860
aataacccat aagatgatct gtcccgcta cagggaagga gggaaggacg cttgcaaggt 22920
aacagagtg tcttagccaa tggaaatat gcaaatggga atgcttaatg cgttggggtt 22980
ttttgtttg tttgttttt tttgtttgt tttttttgag acagagtcct gctctgttgc 23040
ccaggctgga gtgcagtgcc tgcactcag ctcactgcaa gctctgcct ccaggttcac 23100
gccattctcc tgcctcagcc tcccaaatag ctgggactac aggcgcagc taccagccc 23160
agctagcgtc ttttttttt ttatgtttag tagagacggg gtttcacat gttggccagg 23220
atgtctctga tctctgacc tcatgatctg cctgcctggg cctcccaag tcttgggtat 23280
acaggcgtga gccacgcgc cgggcgcctt aatgcatttt aaaaagcagt cttctgcaa 23340
tgagcaggga acacagtgta tttgtttgac tttagactgaa atcaaaagca aggagattga 23400
ctgtagtaac gcaagcacc aggttctctg cagtatatta aggggcacag acaacatttt 23460
aggcaaaatc agcctgagca agatgtctg aagatgggaa gctctgagt tgatctgtc 23520
accttttctt gtctccctc gttctagga gattcggag gcctctgtc ctgcaaacac 23580
aatgaggtct ggcatctggt aggcacacg agctgggag aaggctgtg tcaaaaggag 23640
cgccaggtg tttacacca cgtggctgag tacgtggaat ggattctgga gaaaactcaa 23700
gcagtgtgaa tgggttccca ggggcattg gactccctga aggaccagg atttgcctgg 23760
agagggtgtt gagtctcag tgcagcatg ctctccctac agtaacacg tgaaggggt 23820
tggtgtttgt aagaaaatgc tagaagaaaa caaactgtca caagttgtta gtccaaaa 23880
tcccgttcta tgcctgtgt agttgtttg agcattcagt cctctgttt ttgatcacg 23940
ttctatggag tccaagaatt accataaggc aatattctg aagattacta tataggcaga 24000
tatagcagaa aataaccaag tagtggcagt ggggacagg cagaagaact ggtanaagaa 24060
gccaccataa atagatttgt tcatgaaaag atgaaaactg gaagaagga gaacaaagac 24120
agtctcacc attttgcagg aatctacact ctgctatgt gaacacattt cttttgtaaa 24180
gaaagaaatt gattgcattt aatggcagat ttccagaata gtcaggaaat cttgtcattt 24240
ccattttaaa atatatatta aaaaaaatca gtctgagtag acacagcta agagtgaatg 24300
tgaagataac agaatttctg tgtggaagag gattacaagc agcaatttac ctggaagtga 24360
taccttaggg gcaatcttga agatacactt tctgaaaaa tgatttgtga tggattgtat 24420
atattattaa aatatcttgg gaggggagc tgatggagat agggagcatg ctcaaacctc 24480
cctaagacaa gctgctctg tgactatggg ctcccaaga gctagatcgt atatttattt 24540
gacaaaaatc accatagact gcatccatac tacagagaaa aaacaattag ggcgcaaatg 24600
gatagttaca gtaagtcct cagcaagcag ctgctgttat tctaagcact gggattttct 24660
gtttgtgca aatatttate tcatatttgt tgtgactag ttcaataacc tagaatttga 24720
attgtacca catagcttcc aatctgtgac acaactata caattcatca agtgtgattt 24780
tttttttttt tttttgagat gaagtctcac cctgttgcac aagctggagt gcagtgggt 24840
gatctcgct cactgtaaac tctacctcct ggattcaagc gattgtctg cctcagctc 24900
ccaagtact gagattacag gcacatgcca ccatgcccg ctaatttttg tatttttagt 24960
agagacgggg ttctactatg ttggccagc tggctttgaa ctctgacct cgtgatctgc 25020
ccacctcgcc ctctcaaatg gctgggatta cagggtgtgag tcactgcgtc tggccatgga 25080
aaatatttat tgaacacaa tatgtgagag catcatgctg agctttgaag atacagtgtg 25140
gagcaaacat atacctgccc ttcatgaaga ttatactcta gttaacatga gcaacaaaat 25200
aaaaataaca cacaataat ataggttcaa gctgaaatga gtggtgcac cagattctat 25260
gagataagaa aggaagaagg acatttttca ccaagttcaa agactgggt acaaaaggaat 25320
ttgtctgac aaaggcaaaa caaaaacac acaaaaacaa aaacccaaaa gagcaaaatg 25380
acagtgaac ataacggggc cagatcaaaa atgctgacag gtcccaaaa gaataaaatg 25440
acggtaggac atgacggggc cagatccaaa atgctgacag gtccaacaa aattggaatt 25500
gaaaatcga gtgcgttcaa gattatcaaa caatactate ttgttacttg cttattacct 25560
tagtagactg gaagcaaac ttcacacaaa aaaagggttt ggatgtaatt tcggataaga 25620
agagatgttt ctgtaaagtc ttctctgaga agcatattat ttgagaaaaa cacatatttc 25680
tgtttttagt atttcactt gtataatgtc ttaattttg aagagctggt atattcctat 25740
gattcattaa tgaagttct ataatatata aaatatacaa tgaggagatc tctctctctg 25800
taccagaaga gtgcacattc tacacactgc gtagcactt tctcacttac gttctgtctg 25860
ggcacacttc tgattgacac gcagagggct ctcctgtctc ggggatattt ctgatgggta 25920
ccgagagagc ttcctctatc ttgggttatt tctgatgcgt agagaagggc tgcctctgtc 25980
cattatggaa ggctggtgtt c 26001

```

<210> 3

<211> 20

[0008]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 3	
cagcctggag catcgtaaca	20
<210> 4	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 4	
tttatcgagc ttcgttatcc tgggt	25
<210> 5	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探针	
<400> 5	
ttgtctactg aagcacaccc aaacaggga	29
<210> 6	
<211> 2246	
<212> DNA	
<213> 小鼠属	
<400> 6	
ggataccggc tcacgtagaa aaaggacaag actataggaa agaaagcaaa cactccgccg 60	
aggactacag caaagacaga aagtatctgc aggatgacct cattacatca ggtgttatat 120	
ttttattttt ttgcctcagt ttctagttaa tgcgttacta aggtcttcaa agacatcagc 180	
tttcaaggag gtgacctgag tactgttttc acaccgagcg ccacatactg ccgcttggtc 240	
tgcactcacc acccaggtg cttgctcttc acgttcatgg ctgagtcate ttccgatgat 300	
cctaccaaat ggtttgcctg catcctgaag gacagcgta cagaaatatt gccaatggta 360	
aacatgacag gcgcgacttc tggatatcc ttcaagcaat gccctcagca attaagtact 420	
tgcagcaaaag atgtgtactg gaacctagac atgaaggcca tgaactataa cagctctgtc 480	
gtgaagaatg ctcgagaatg ccaggagaga tgcacagacg atgcccactg ccagtttttc 540	
acatacgcga cagggtatit tcccagtgtg gaccatcgta aatgtgtct tttgaagtac 600	
acccgaaacgg ggacgccaac cacaataacg aagctcaatg gcgtgggtatc tggattttca 660	
ctgaagtctc gtggacttcc aaacttggct tgtatcaggg acattttccc taacacggtg 720	
ctggcagacc ttaacattga cagcgtgggt gccccagatg cttttgtctg tctctgcate 780	
tgcacgcate accccacttg ttgttcttc acattctttt cccaagcatg gccgaaagaa 840	
tctcagagac atctttgtct ccttaaaacc tctgaaagtg gattaccaag cacacgcatt 900	
acaagagacc acgcccttcc gggttccagt ctccagcact gcaggcacag tgtcccagta 960	
ttctgccate cgtctcttta caacgacact gatttcttgg gagaagagct ggacatcgtc 1020	
gatgtgaaag gccagaanaac ctgtcagaaa acgtgtacca ataacgcccg ctgccagttc 1080	
tttacctact atccatcgca cagactgtgc aatgagagga accgcagggg cagatgttac 1140	
ctaaagcttt cctccaatgg atctccaacg agaatacttc atgggagggg aggcattctc 1200	
ggatactcac ttaggtgtgt caaaatggat aatgtgtgca caactaaaat caaccacaga 1260	
gtggtaggag gagctgcgtc tgttcacggg gagtggccat ggcagggtac tctgcacate 1320	
agccaggggac acctgtgtgg aggtcccatc attggaacc aatggatact gacagcagct 1380	
cattgtttct ctgggataga gacacctaaa aagctgcgtg tctacggtgg cattgtaaat 1440	
caatcagaaa taaatgaagg gactgcttcc ttacgggttc aagaaatgat aattcatgat 1500	
cagtatacga cagcagaagg tgggtatgat attgccctgt taaaactgga atcagccatg 1560	
aattcacagc attttcagcg gccaatatgc ctgccctcca aaggagatag aaacgcagtg 1620	
cacacagaat gctgggtgac tggatggggg tacacagcac taagaggtga agtacaaagt 1680	
actcttcaga aagccaaggt tccattgggt tcaaatgaag aatgtcagac aagatacaga 1740	
agacacaaaa taaccaataa gatgatctgt gcaggctaca aagaaggagg gaaggatacg 1800	
tgcgaaggag attctggagg gccctgtccc tgcgaatata atggggctctg gcacttgggt 1860	
ggcatcacaa gctgggggtga aggcctgtgt cagaaggaga gaccgggggt ctacacgaac 1920	
gtggcccaag acgtggactg gattctggag aaaactcaaa cagctctgaaa gagttcaact 1980	
ggatcacctt tgtggccctg gaagattatt ccatagaat gagcttgacg tctctgatga 2040	
agacactggg atactgactc ttccactgta accaattgaa tggccttgat gtacgtaaga 2100	
acaccagaaa agaaaactat tattttcaga attctgatac tgggagaacc actgggtgtt 2160	
ttctgcatcc agctactact caaggaaaca aatacagcaa ggagatttta aaaataaaaa 2220	
cacatcagat atataaggaa aatatac	2246

[0009]

<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 7	
acatgacagg cgcatctct	20
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 8	
tctaggttca cgtacacatc ttgc	25
<210> 9	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探针	
<400> 9	
ttccttcaag caatgccctc agcaat	26
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 10	
tcctggcatt ctgcagcatt	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 11	
tggtaatcca ctttcagagg	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 12	
aaggacctac actatggaat	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 13	
cctctgaaag tggattacca	20

[0010]

<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 14	
tcggaagcga ctcttatatg	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 15	
ttcaacaag tgacatacac	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 16	
tgagagaatt gcttgetttc	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 17	
aaatatacct tgagagaatt	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 18	
agtatgtcag aaatatacct	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 19	
ttaaaatctt agtatgtcag	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 20	

[0011]

cagcatattt gtgaaagtcg	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 21	
tgtgtaggaa atggtcactt	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 22	
tgaattcttt aataagggtg	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 23	
aaatcctcct gaaaagacct	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 24	
tgatataaga aaatcctcct	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 25	
acacattcac cagaaactga	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 26	
ttcaggacac aagtaaacca	20
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	

[0012]

<400> 27 ttcactcttg gcagtgtttc	20
<210> 28 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 28 aagaataccc agaaatcgct	20
<210> 29 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 29 cattgcttga aagaataccc	20
<210> 30 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 30 ttggtgtgag cattgcttga	20
<210> 31 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 31 aatgtctttg ttgcaagcgc	20
<210> 32 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 32 ttcatgteta ggtccacata	20
<210> 33 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 33 gtttatgccc ttcatgteta	20
<210> 34 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	

[0013]

<400> 34 ccgtgcattct ttcttgcat	20
<210> 35 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 35 cgtgaaaaag tggcagtga	20
<210> 36 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 36 agacaaatgt tacgatgctc	20
<210> 37 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 37 gtgcttcagt agacaaatgt	20
<210> 38 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 38 tgcacaggat ttcagtga	20
<210> 39 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 39 gattagaag tgcacaggat	20
<210> 40 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 40 ccgggatgat gaggcagat	20
<210> 41 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0014]

<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 41 aaacaagcaa ccgggatgat	20
<210> 42 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 42 tcctgggaaa agaaggtaaa	20
<210> 43 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 43 attctttggg ccattctctg	20
<210> 44 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 44 aaagatttct ttgagattct	20
<210> 45 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 45 aatccactct cagatgtttt	20
<210> 46 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 46 aaccagaaag agctttgtct	20
<210> 47 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 47 ggcagaacac tgggatgctg	20
<210> 48 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	

[0015]

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	48	
tggtaaaatg aagaatggca		20
<210>	49	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	49	
atcagtgta tggtaaaatg		20
<210>	50	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	50	
aacaatatcc agttcttctc		20
<210>	51	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	51	
acagtttctg gcaggcctcg		20
<210>	52	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	52	
gcattgggtgc acagtttctg		20
<210>	53	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	53	
gcagcggacg gcattgggtgc		20
<210>	54	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	54	
ttgaagaaag ctttaagtaa		20
<210>	55	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0016]

<220>		
<223> 合成的寡核苷酸		
<400> 55		
agtatttttag ttggagatcc	20	
<210> 56		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的寡核苷酸		
<400> 56		
atgtgtatcc agagatgcct	20	
<210> 57		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的寡核苷酸		
<400> 57		
gtacactcat tatccatttt	20	
<210> 58		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的寡核苷酸		
<400> 58		
gatttttgtg gtacactcat	20	
<210> 59		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的寡核苷酸		
<400> 59		
tcctgggctt gatttttgtg	20	
<210> 60		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的寡核苷酸		
<400> 60		
ggccactcac cacgaacaga	20	
<210> 61		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的寡核苷酸		
<400> 61		
tgtctctgag tgggtgaggt	20	
<210> 62		
<211> 20		
<212> DNA		

[0017]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 62	
gtttccaatg atggagcctc	20
<210> 63	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 63	
atatccactg gtttccaatg	20
<210> 64	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 64	
ccatagaaac agtgagcggc	20
<210> 65	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 65	
tgactctacc ccatagaaac	20
<210> 66	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 66	
cgcaaaatct taggtgactc	20
<210> 67	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 67	
ttcagattga tttaaaatgc	20
<210> 68	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 68	
tgaaccccaa agaaagatgt	20
<210> 69	
<211> 20	

[0018]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 69	
tattattttct tgaaccccaa	20
<210> 70	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 70	
aacaaggcaa tatcataccc	20
<210> 71	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 71	
ttccagtttc aacaaggcaa	20
<210> 72	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 72	
gaaggcaggc atatgggtcg	20
<210> 73	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 73	
gtcactaagg gtatcttggc	20
<210> 74	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 74	
agatcatett atgggttatt	20
<210> 75	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 75	
tagccggcac agatcatett	20
<210> 76	

[0019]

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 76	
ccagatgccg gacctcattg	20
<210> 77	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 77	
cattcacact gcttgagttt	20
<210> 78	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 78	
tggcacagtg aactcaacac	20
<210> 79	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 79	
ctagcatittt cttacaacaa	20
<210> 80	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 80	
ttatggtaat tcttggaact	20
<210> 81	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 81	
aaatattgcc ttatggtaat	20
<210> 82	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 82	
tatctgcta tatagtaatc	20

[0020]

<210> 83	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 83	
gccactactt ggttatcttc	20
<210> 84	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 84	
aacaaatcta tttatggtgg	20
<210> 85	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 85	
ctgcaaatg gtgaagactg	20
<210> 86	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 86	
gtgtagattc ctgcaaatg	20
<210> 87	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 87	
ttttcaggaa agtgtatctt	20
<210> 88	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 88	
cacaaatcat ttttcaggaa	20
<210> 89	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 89	
tccaagata ttttaataa	20

[0021]

<210> 90	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 90	
aatgagataa atattgtcac	20
<210> 91	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 91	
tgaaagctat gtggtgacaa	20
<210> 92	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 92	
cacacttgat gaattgtata	20
<210> 93	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 93	
taccttgaga gaattgcttg	20
<210> 94	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 94	
gtcagaaata taccttgaga	20
<210> 95	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 95	
atcttagtat gtcagaaata	20
<210> 96	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 96	

[0022]

gagtcacaca ttcaccagaa	20
<210> 97	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 97	
gtgagcattg ctgaaagaa	20
<210> 98	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 98	
cttatttggt gtgagcattg	20
<210> 99	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 99	
acataaatgt cttgtttgca	20
<210> 100	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 100	
ggtccacata aatgtctttg	20
<210> 101	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 101	
gtctaggtcc acataaatgt	20
<210> 102	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 102	
tgcccttcat gtctaggtcc	20
<210> 103	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	

[0023]

<400> 103 gttatagttt atgccttca	20
<210> 104 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 104 tcagtagaca aatgttacga	20
<210> 105 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 105 tgggtgtgct tcagtagaca	20
<210> 106 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 106 agccagatta gaaagtgcac	20
<210> 107 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 107 agcaaccggg atgatgagtg	20
<210> 108 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 108 gccattcctg ggaaaagaag	20
<210> 109 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 109 ttgagattct ttggccatt	20
<210> 110 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	

[0024]

<400> 110 actgaaacca gaaagagctt	20
<210> 111 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 111 agaatggcag aacactggga	20
<210> 112 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 112 tgtcatggta aatgaagaa	20
<210> 113 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 113 aagaaatcag tgtcatggta	20
<210> 114 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 114 ggtgcacagt ttctggcagg	20
<210> 115 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 115 ggacggcatt ggtgcacagt	20
<210> 116 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 116 aactggcagc ggacggcatt	20
<210> 117 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0025]

<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 117 ccttaatgtg tatccagaga	20
<210> 118 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 118 tgggtgtaca ctcattatcc	20
<210> 119 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 119 ggcttgattt tgggtgtaca	20
<210> 120 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 120 aacgatcctg ggcttgattt	20
<210> 121 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 121 acagtggtct ctgagtggt	20
<210> 122 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 122 cactggtttc caatgatgga	20
<210> 123 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 123 ctaccccata gaaacagtga	20
<210> 124 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	

[0026]

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	124	
	ttaggtgact ctacccata	20
<210>	125	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	125	
	agacacgcaa aattcttaggt	20
<210>	126	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	126	
	tttcttgaac cccaaagaaa	20
<210>	127	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	127	
	gtggtttcca gttcaacaa	20
<210>	128	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	128	
	ttggctttct ggagagtatt	20
<210>	129	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	129	
	ggcacagatc atcttatggg	20
<210>	130	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	130	
	gattcctgca aaatggtgaa	20
<210>	131	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0027]

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	131	
	gcagagtgtgta gattcctgca	20
<210>	132	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	132	
	atcatttttc aggaaagtgt	20
<210>	133	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	133	
	gtgagacaaa tcaagacttc	20
<210>	134	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	134	
	ttagtttact gacactaaga	20
<210>	135	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	135	
	ctgctttatg aaaaaccaac	20
<210>	136	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	136	
	atacctagta caatgtaaat	20
<210>	137	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	137	
	ggcttgtgtg tggtaaatat	20
<210>	138	
<211>	20	
<212>	DNA	

[0028]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 138	
tggaagct ttcaatattc	20
<210> 139	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 139	
atgaattgt gcttatgagt	20
<210> 140	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 140	
tttcaagctc aggatgggaa	20
<210> 141	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 141	
gttggtaaaa tgcaaccaa	20
<210> 142	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 142	
tcaggacaca agtaaacctg	20
<210> 143	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 143	
tgcaagctgg aaataaaagc	20
<210> 144	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 144	
tgccaattta aaagtgtagc	20
<210> 145	
<211> 20	

[0029]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 145	
atatttcaaa atccagtatg	20
<210> 146	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 146	
ttctgaatat acaaattaat	20
<210> 147	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 147	
tttactatga aaatctaat	20
<210> 148	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 148	
ggtatcctga gtgagatcta	20
<210> 149	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 149	
ccagctatca ggaaaattcc	20
<210> 150	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 150	
aaagctattg gagactcaga	20
<210> 151	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 151	
atggaatctc ttcatttcat	20
<210> 152	

[0030]

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 152	
atggagacat tcatttcac	20
<210> 153	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 153	
gtctctgagag ttccaattca	20
<210> 154	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 154	
ctgggaaggt gaatttttag	20
<210> 155	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 155	
tcaagagtct tcattgtacc	20
<210> 156	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 156	
tcagtttacc tgggatgctg	20
<210> 157	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 157	
gacattatac tcaccattat	20
<210> 158	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 158	
gtataaatgt gtcaaattaa	20

[0031]

<210> 159	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 159	
gtaaagtttt accttaacct	20
<210> 160	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 160	
ccataatgaa gaaggaagg	20
<210> 161	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 161	
ttaagttaca ttgtagacca	20
<210> 162	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 162	
tgtgtgggtc ctgaaattct	20
<210> 163	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 163	
atcttgtaat tacacacccc	20
<210> 164	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 164	
gtacactctg caacagaagc	20
<210> 165	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 165	
aggaataac atgaaggccc	20

[0032]

<210> 166	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 166	
atccagtta ccattggaga	20
<210> 167	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 167	
ttttccagaa gagactcttc	20
<210> 168	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 168	
gtcacattta aaatttccaa	20
<210> 169	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 169	
ttaatatact gcagagaacc	20
<210> 170	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 170	
agaaatatcc ccagacagag	20
<210> 171	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 171	
aaatgtcttt gttgcaagcg	20
<210> 172	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 172	

[0033]

taaattgtctt tgttgcaagc	20
<210> 173	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 173	
ataaatgtctt tgttgcaag	20
<210> 174	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 174	
cataaatgtc ttgttgcaa	20
<210> 175	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 175	
cacataaatg tctttgttc	20
<210> 176	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 176	
ccacataaat gtctttgttg	20
<210> 177	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 177	
tccacataaa tgtctttgtt	20
<210> 178	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 178	
gtccacataa atgtctttgt	20
<210> 179	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	

[0034]

<400> 179 aggtccacat aaatgtcttt	20
<210> 180 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 180 taggtccaca taaatgtctt	20
<210> 181 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 181 ctaggtccac ataaatgtct	20
<210> 182 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 182 tctaggtcca cataaatgtc	20
<210> 183 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 183 tgtctaggtc cacataaatg	20
<210> 184 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 184 atgtctaggt ccacataaat	20
<210> 185 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 185 catgtctagg tccacataaa	20
<210> 186 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	

[0035]

<400> 186 tcatgtctag gtccacataa	20
<210> 187 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 187 cttcatgtct aggtccacat	20
<210> 188 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 188 ccttcatgtc taggtccaca	20
<210> 189 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 189 cccttcatgt ctaggtccac	20
<210> 190 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 190 gcccttcatg tctaggtcca	20
<210> 191 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 191 atgcccttca tgtctaggtc	20
<210> 192 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 192 tatgcccttc atgtctaggt	20
<210> 193 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0036]

<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 193 ttatgccctt catgtctagg	20
<210> 194 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 194 tttatgccct tcatgtctag	20
<210> 195 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 195 tccgtgcac tttcttggca	20
<210> 196 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 196 atccgtgcat cttcttggc	20
<210> 197 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 197 catccgtgca tcttcttgg	20
<210> 198 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 198 tcacccgtgc atcttcttg	20
<210> 199 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 199 gtcatccgtg catcttctt	20
<210> 200 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	

[0037]

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	200	
accgggatga	tgagtgcaga	20
<210>	201	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	201	
aaccgggatg	atgagtgcag	20
<210>	202	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	202	
caaccgggat	gatgagtgca	20
<210>	203	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	203	
gcaaccggga	tgatgagtgc	20
<210>	204	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	204	
gattcttttg	gccattcctg	20
<210>	205	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	205	
agattctttg	ggccattcct	20
<210>	206	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	206	
gagattcttt	ggccattcc	20
<210>	207	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0038]

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	207	
	tgagattctt tgggccattc	20
<210>	208	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	208	
	tttgagattc ttgggccat	20
<210>	209	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	209	
	ctttgagatt ctttggcca	20
<210>	210	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	210	
	tctttgagat tctttggcc	20
<210>	211	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	211	
	ttctttgaga ttctttggc	20
<210>	212	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	212	
	tttctttgag attctttggg	20
<210>	213	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	213	
	cacagtttct ggcaggctc	20
<210>	214	
<211>	20	
<212>	DNA	

[0039]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 214	
gcacagtttc tggcaggcct	20
<210> 215	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 215	
tgcacagttt ctggcaggcc	20
<210> 216	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 216	
gtgcacagtt tctggcagge	20
<210> 217	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 217	
tggtgcacag tttctggcag	20
<210> 218	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 218	
ttggtgcaca gtttctggca	20
<210> 219	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 219	
attggtgcac agtttctggc	20
<210> 220	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 220	
cattggtgca cagtttctgg	20
<210> 221	
<211> 20	

[0040]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 221	
ggcattggtg cacagtttct	20
<210> 222	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 222	
cggcattggt gcacagtttc	20
<210> 223	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 223	
acggcattgg tgcacagttt	20
<210> 224	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 224	
gacggcattg gtgcacagtt	20
<210> 225	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 225	
cggacggcat tgggtgcacag	20
<210> 226	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 226	
gcggacggca ttggtgcaca	20
<210> 227	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 227	
agcggacggc attggtgcac	20
<210> 228	

[0041]

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 228	
cagcggacgg cattggtgca	20
<210> 229	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 229	
ggcagcggac ggcattggtg	20
<210> 230	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 230	
tggcagcggc cgccattggt	20
<210> 231	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 231	
ctggcagcgg accgcattgg	20
<210> 232	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 232	
actggcagcg gacggcattg	20
<210> 233	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 233	
tgcttgaagg aatatccaga	20
<210> 234	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 234	
tagttcatgc cttcatgtc	20

[0042]

<210> 235	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 235	
tggtatagtt catgcccttc	20
<210> 236	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 236	
aatgtccctg atacaagcca	20
<210> 237	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 237	
gggaaaatgt ccctgataca	20
<210> 238	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 238	
tgtgcagagt cacctgcat	20
<210> 239	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 239	
ttcttgaacc ctgaagaag	20
<210> 240	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 240	
tgaattatca ttcttgaac	20
<210> 241	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 241	
tgatcatgaa ttatcatttc	20

[0043]

<210> 242	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 242	
agtttctggc aggcctcg	18
<210> 243	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 243	
cagtttctgg caggcctc	18
<210> 244	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 244	
acagtttctg gcaggcct	18
<210> 245	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 245	
cacagtttct ggcaggcc	18
<210> 246	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 246	
gcacagtttc tggcaggc	18
<210> 247	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 247	
gtgcacagtt tctggcag	18
<210> 248	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 248	

[0044]

ggtgcacagt ttctggca	18
<210> 249	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 249	
tggtgcacag ttctggc	18
<210> 250	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 250	
ttggtgcaca gtttctgg	18
<210> 251	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 251	
attggtgcac agtttctg	18
<210> 252	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 252	
cattggtgca cagtttct	18
<210> 253	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 253	
gcattggtgc acagtttc	18
<210> 254	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 254	
ggcattggtg cacagttt	18
<210> 255	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	

[0045]

<400> 255 cggcattggt gcacagtt	18
<210> 256 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 256 acggcattgg tgcacagt	18
<210> 257 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 257 gacggcattg gtgcacag	18
<210> 258 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 258 ggacggcatt ggtgcaca	18
<210> 259 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 259 cggacggcat tggtgac	18
<210> 260 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 260 gaggacggca ttggtgca	18
<210> 261 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 261 agcggacggc attggtgc	18
<210> 262 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	

[0046]

<400> 262 cagcggacgg cattggtg	18
<210> 263 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 263 gcagcggacg gcattggt	18
<210> 264 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 264 ggcagcggac ggcatgtg	18
<210> 265 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 265 tggcagcggg acggcattg	18
<210> 266 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 266 ctggcagcgg acggcatt	18
<210> 267 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 267 tgcacagttt ctggcagg	18
<210> 268 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 268 cacagtttct ggcagg	16
<210> 269 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0047]

<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 269 acagtttctg gcag	14
<210> 270 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 270 gcgtttgctc ttctttctgc gtttttt	27
<210> 271 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 271 acacgcatta aaaagagcaa agc	23
<210> 272 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 272 cagtgctatg gtaaaatgaa gaatgg	26
<210> 273 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 探针	
<400> 273 tgcaggcaca gcattcccagt gttct	25
<210> 274 <211> 3275 <212> DNA <213> 猕猴属	
<220> <221> 混杂特征 <222> (1)... (3275) <223> n = A, T, C or G	
<400> 274 aggcacacag acaaaatcaa gctctacagc tgtctgtgtg tatgtcactt gtttgaatat 60 gaattaaaat taaaatataa attcaatgta ttgagaaagc aagcaattct ctcaagggtat 120 atttttgaca tactaagatt ttaacgactt tcacaaatat gctgcaccga gagacaatgt 180 tacacaacac tgagaaccag tacaagtaaa tattaagtt aagtgacctt ttctacaca 240 cgctcattca gaggaggatg aggatcaatt tggaagaaga aaaacacct tattaagaat 300 tgcagcaaat aagcaaacga ggtcttttca ggatgatttt cttatatcaa atggtacatt 360 tcattctatt tacgtcagtt tctgggtgaat gtgtgactcg gttgttcaag gacatccact 420 ttgaaggagg ggacattgct acggttttca caccaagcgc caagcactgc cagggtggtct 480 gcactcacca cccacgatgt ctgctcttca ctttcacggg ggaatctgca tctgaggatc 540 ctaccacagt gtttacttgt gtcttgaagg acagtgttac agaaacactg ccaagagtga 600 ataggacagg agcgatttct ggttattctt tcaagcaatg ctacaccaa ataagcgctt 660 gcaacaaaga ctttatgtg gacctagaca tgaaggcat aaactataac agctcacttg 720 ccaagagtgc tcaagaatgc caagaagat gcacggatga catccactgc cactttttca 780 cgatggcac aaggcagttt ccagctctgg agcatcgtaa catttgtcta ctgaagcaca 840 cccaaacggg gacaccaacc ggaataatga agctcgataa agtgggtgact ggattttcac 900 tgaaatctcg tgcactttct aatctggcgt gtatcaggga cgttttcccc aacacgggtg 960	

[0048]

```

ttgceggacag caacategat agtgtcatgg ctccagatgc ctttgtctgt cgecggatct 1020
gcactcatca tcccgggtgc ttgtttttta cettcttttc ccagggaatgg cccaaagaat 1080
ctcaaaagaaa tctttgtctc cttaaaacat ctgagagtgg attaccagct acacgcatta 1140
aaaagagcaa agctctttct ggtttcagtc tccaaagctg caggcacagc atcccagtgt 1200
tctgccattc ttcatittac catgacactg atttcttggg agaagaactg gatattgttg 1260
ctgtgaaggc tcacagggcc tgcagaaac tgtgcaccaa tgcgctccgc tgcagtttt 1320
ttacctatgc cccagctcaa gcactcttgc acgaaggga gggcaaatgt tacttaaac 1380
ttttctcaaa tggatctcca actaaaatac ttccggggac aggaggeatc tetggataca 1440
cattaaggct gtgtaaaatg gataatgagt gtaccaccaa aatcaagccc aggatcgttg 1500
gaggaactgc atctgttctg ggtgagtggc catggcaggt gactctgcac accacctcac 1560
ccactcagag acacctgtgt ggaggtctca tcattggaaa ccagtggata ttaacggccg 1620
ctcactgttt ctatggggta gagtccacta agattttgcg tgtctacatt ggcattttaa 1680
atcaatctga aataaaagag gatacatctt tctttggggt tcaagaata ataatecatg 1740
atcaatataa aatggcagaa agtgggtatg atattgcctt gttgaaactg gaaaccacag 1800
tgaattacac agattctcaa cgaacctat gcctgccttc aaaaggagat agaaatgtga 1860
tatacactga ctctgggtg actggatggg ggtacagaaa attaagagac aaaatacaga 1920
atactctcca gaaagecaag atacccttag tgaccaatga cgagtgcag aagagataca 1980
gaggacataa aataacccat aagatgatct gtccggcta cagggaagga ggggaagatg 2040
cttgcagann nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2100
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2160
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2220
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2280
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngc ttggtgctgg taggaaaatg 2340
ccagaagaaa acaaaactgtc acaagctgtt atgtccaaag ctcccgttct atgatcattg 2400
tagtttgttt cagcatccag tgtctttgtt tctgatcacg cttctaagga gtccaagaat 2460
taccataagg caatatttct gatgattact atatagccag atatatcaga aaataaccaa 2520
gtagtggcag cagggatcag gtagaagaac tgataaaaga aaccaccata aatagatttg 2580
ttcaatgaaa aatgaaaact ggaagaaagg ataacaaaga cagtcttcac cattttgcag 2640
gaatctacac tctgcctgtg tgaacacatt tctttgtaaa gaagaattt gattgcattt 2700
actggcagat ttccagaata gtcaggaatt catgttattt ccattttaaa acatgtttaa 2760
aaaaatcagt ttgagtagac acaagctaa agtgaatgtg aaggtaccag aatttctgta 2820
tggaagaggg tgacaagcag caatgtacct ggaagtggta ccttaggacc aatcttaag 2880
atacacttct ctgaaaaatg atttgtgat gatcgtatat ttattttaa tatcttggga 2940
gggagaggct gatggcgata gggaggcaag ctgaagcctc cataagacaa getgctactg 3000
cgactgtggc ccccaagag ctacaccgca tatttatttg acaaaagtca ccattgacta 3060
catccgtact acagagaaaa acaatttgg gcacaaatgg atggttacag taaagtctc 3120
agcaagcagc tcctgttatt ctaagtactg ggctttctg tttggtgcaa atatttatct 3180
cattattgct gtgatctagt ccagtaacct agaatttgat ttgtaccac atagctttca 3240
acctgtgcca acaattatc aattcatcaa gtgtg 3275

```