



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108300718 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 22

(21) 申请号 201810067329.8

(22) 申请日 2013.10.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108300718 A

(43) 申请公布日 2018.07.20

(30) 优先权数据

61/712756 2012.10.11 US
61/712780 2012.10.11 US
61/723701 2012.11.07 US
61/777813 2013.03.12 US
61/777851 2013.03.12 US
61/777895 2013.03.12 US

(62) 分案原申请数据

201380052830.2 2013.10.11

(73) 专利权人 苏州瑞博生物技术股份有限公司
地址 215300 江苏省苏州市昆山市玉山镇
元丰路168号

(72) 发明人 R.A.麦克劳德 金永秀 周天媛

S.M.弗赖尔 P.P.塞思 E.斯韦兹
B.P.莫尼亚

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 孙占华 张广育

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

(56) 对比文件

CN 101932709 A, 2010.12.29

US 2005246794 A1, 2005.11.03

US 2010292140 A1, 2010.11.18

张淼 等..靶向于雄激素受体的siRNA筛选
及效能评价.《第三军医大学学报》.2011,
Jepsen JS et al.LNA-Antisense rivals
siRNA for gene silencing.《Current Opinion
in Drug Discovery and Development》.2004,

审查员 王小玉

权利要求书2页 说明书133页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

雄激素受体表达的调节

(57) 摘要

某些实施例是针对靶向人雄激素受体(AR)用于抑制细胞中雄激素受体水平的化合物和组合物,其对于治疗癌症和抑制癌细胞生长或增殖的方法可以是有用的。在此提供的一些实施例涉及用于抑制细胞中雄激素受体水平的化合物和组合物的发现,其对于治疗癌症和抑制癌细胞的增殖或生长的方法可以是有用的,诸如前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌或膀胱癌或者癌细胞。

1. 一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物, 该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成, 其具有核碱基序列, 该核碱基序列由SEQ ID NO: 35、39或43中任一项的核碱基序列组成, 其中经修饰的寡核苷酸包括:

由连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

由连接的核苷组成的5' 翼区段;

由连接的核苷组成的3' 翼区段;

其中该缺口区段位于该5' 翼区段和该3' 翼区段之间, 并且其中每个翼区段的每个核苷包括经修饰的糖, 其中每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接; 并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

2. 如权利要求1所述的化合物, 其中该经修饰的糖包括2' -O-甲氧基乙基糖。

3. 如权利要求1所述的化合物, 其中该经修饰的糖包括二环糖。

4. 如权利要求3所述的化合物, 其中该二环糖包括选自以下项的基团: 4' -CH(CH₃)-O-2'、4' -CH₂-O-2' 和4' -(CH₂)₂-O-2'。

5. 如权利要求1所述的化合物, 其中该经修饰的寡核苷酸包含由SEQ ID NO: 43的核碱基序列组成的核碱基序列, 其中该经修饰的寡核苷酸包括:

由10个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

由3个连接的核苷组成的5' 翼区段; 和

由3个连接的核苷组成的3' 翼区段;

其中该缺口区段位于该5' 翼区段和该3' 翼区段之间, 其中每个翼区段的每个核苷包括受约束乙基(cEt)核苷, 其中经修饰的寡核苷酸的每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接; 并且经修饰的寡核苷酸的每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

6. 如权利要求1所述的化合物, 其中经修饰的寡核苷酸包含由SEQ ID NO: 39的核碱基序列组成的核碱基序列, 且其中该经修饰的寡核苷酸包括:

由7个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

由4个连接的核苷组成的5' 翼区段; 和

由5个连接的核苷组成的3' 翼区段;

其中该缺口区段位于该5' 翼区段和该3' 翼区段之间; 该5' 翼区段的4个连接的核苷从5' 到3' 方向是2' -O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和受约束乙基(cEt)糖; 该3' 翼区段的5个连接的核苷从5' 到3' 方向是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、2' -O-甲氧基乙基糖和2' -O-甲氧基乙基糖; 每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接; 并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

7. 如权利要求1所述的化合物, 其中经修饰的寡核苷酸包含由SEQ ID NO: 39的核碱基序列组成的核碱基序列, 且其中该经修饰的寡核苷酸包括:

由9个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

由3个连接的核苷组成的5' 翼区段; 和

由4个连接的核苷组成的3' 翼区段;

其中该缺口区段位于该5' 翼区段和该3' 翼区段之间; 该5' 翼区段的3个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖; 该3' 翼区段的4个连接的核苷从5' 到3' 方向是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和2' -O-甲氧基乙基糖; 每个核苷间连接是硫

代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

8.如权利要求1所述的化合物,其中经修饰的寡核苷酸包含由SEQ ID NO: 39的核碱基序列组成的核碱基序列,且其中该经修饰的寡核苷酸包括:

由8个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

由4个连接的核苷组成的5'翼区段;和

由4个连接的核苷组成的3'翼区段;

其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的4个连接的核苷从5'到3'方向是2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的4个连接的核苷从5'到3'方向是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

9.如权利要求1所述的化合物,其中经修饰的寡核苷酸包含由SEQ ID NO: 39的核碱基序列组成的核碱基序列,且其中该经修饰的寡核苷酸包括:

由8个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

由5个连接的核苷组成的5'翼区段;和

由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的5个连接的核苷从5'到3'方向是2'-O-甲氧基乙基糖、2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的3个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

10.一种组合物,包括如权利要求1-9中任一项所述的化合物、或其药学上可接受的盐。

11.一种组合物,包括如权利要求1-9中任一项所述的化合物或权利要求10的组合物,及选自以下项的抗雄激素剂:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464。

12.如权利要求1-9中任一项所述的化合物或如权利要求10的组合物或权利要求11的组合物用于制备用于治疗癌症的药剂的用途,包括向具有癌症的受试者给予所述药剂,由此治疗该受试者的癌症。

13.如权利要求12所述的用途,其中该癌症是前列腺癌或去势抗性前列腺癌。

雄激素受体表达的调节

[0001] 本申请是与母案发明名称相同的分案申请，母案的中国申请号是201380052830.2，国际申请号是PCT/US2013/064479，申请日是2013年10月11日。

[0002] 序列表

[0003] 本申请与电子格式的序列表一起提交。该序列表被提供为标题为200157W0SEQ.txt，创建于2013年10月1日，大小为大约556KB的文件。将该电子格式的序列表中的信息通过引用以其全部内容结合在此。

技术领域

[0004] 某些实施例是针对靶向人雄激素受体 (AR) 用于抑制细胞中的雄激素受体水平的化合物和组合物，这些化合物和组合物对于治疗癌症和抑制癌细胞生长或增殖的方法而言可以是有用的。

背景技术

[0005] 雄激素受体 (AR) 属于核受体超家族并且通过结合至其激素配体而激活，这些配体是雄激素、睾酮或DHT。在细胞质中结合激素配体后，雄激素受体移位至细胞核，在细胞核中它结合DNA并作为转录因子而发挥作用，以调节多种靶基因的表达，例如前列腺特异性抗原 (PSA) 和TMPRSS2。Knudsen等人 (Trends Endocrinol Metab (《内分泌学与新陈代谢趋势》) 21:315-24, 2010) Bennett等人 (Int J Biochem Cell Biol. (《生物化学与细胞生物学国际杂志》) 42:813-827, 201)。

[0006] 雄激素受体 (AR) 信号转导是前列腺癌细胞的关键存活途径，并且雄激素剥夺疗法 (ADT) (又称“化学去势”) 是一种对抗激素敏感、雄激素依赖性前列腺癌的一线治疗策略，该策略减少循环的雄激素水平并且由此抑制AR活性。尽管大部分患者最初对ADT响应，但是大多数将最终发展为去势抗性，在此情况下，不管睾酮的去势水平如何，该疾病仍进展。此种类型的癌症称为去势抗性前列腺癌 (CRPC)。存在多种引起去势 (castrate, castration) 抗性的发展的机制，包括AR蛋白的表达增加 (该AR蛋白可以使得细胞对低水平的雄激素敏感)，AR突变 (这些突变可以改变转录激活或使得AR对替代性配体敏感) AR的可变剪接形式的出现，这些可变剪接形式缺乏配体结合结构域，尽管如此但是可以起作用以促进肿瘤在不存在配体刺激的情况下生长。另外，前列腺肿瘤还可以合成其自身雄激素，由此增加可供激活AR使用的局部瘤内睾酮水平。

[0007] 雄激素受体 (AR) 信号转导是前列腺癌细胞的关键存活途径，并且雄激素剥夺疗法 (ADT) 对于患有局部晚期和转移性疾病的患者而言仍是主要治疗。尽管大部分患者最初对ADT响应，但是大多数将最终发展为去势抗性，在此情况下，不管睾酮的去势水平如何，该疾病仍进展。此种类型的癌症称为去势抗性前列腺癌 (CRPC) (Karantos等人, Oncogene advance online (《原癌基因进展在线》):1-13, 2013)。存在多种引起去势抗性的发展的机制，包括AR蛋白的表达增加，该AR蛋白可以使得细胞对低水平的雄激素敏感 (Gregory等人, Cancer Res (《癌症研究》) 61:2892-2898, 2001; Linja等人, 《癌症研究》61:3550-3555,

2001), AR突变, 这些突变可以改变转录激活或使得AR对替代性配体敏感 (Scher等人, J Clin Oncol (《临床肿瘤学杂志》) 23:8253-8261, 2005) 以及AR的可变剪接形式的出现, 这些可变剪接形式缺乏配体结合结构域, 尽管如此但是可以起作用以促进肿瘤在不存在配体刺激的情况下生长 (Yingming等人, 《癌症研究》73:483-489, 2013)。另外, 前列腺肿瘤还可以合成其自身雄激素, 由此增加可供激活AR使用的局部瘤内睾酮水平 (Attard等人, Cancer Cell (《癌细胞》) 16:458-462, 2009)。

[0008] 雄激素受体在去势抗性前列腺癌中仍具有活性的事实已经引起新的药剂的研发, 这些药剂抑制雄激素配体的产生或阻断这些配体对AR的作用。这些新的药剂包括乙酸阿比特龙, 其抑制17- α -羟化酶/17, 20-裂解酶 (CYP17) 活性, 从而引起由肾上腺和在前列腺肿瘤自身中合成的残余雄激素的减少 deBono等人 (N Engl J Med (《新英格兰医学杂志》) 364:1995-2006, 2011), 以及恩杂鲁胺 (enzalutamide), 其阻止雄激素配体结合至AR、移位至细胞核并结合至DNA (Scher等人, 《新英格兰医学杂志》367:1187-1197, 2012)。多种其他雄激素合成抑制剂或雄激素受体阻断剂处于临床前或临床研发之下并且包括例如 ARN509、ODM201、TOK001、VT464。

[0009] 尽管药剂 (例如恩杂鲁胺和阿比特龙) 在CRPC中的活性是非常令人鼓舞的, 但是两者并不在所有患者体内起作用并且两者都与通过上述机制经由AR的重新激活发展另外的抗性相关 (Yingming等人, Cancer Res (《癌症研究》) 73:483-489, 2013)。因此, 对于鉴定出治疗CRPC的替代性疗法, 并且特别是可以除去和/或抑制所有形式的AR (包括例如, 野生型、突变和剪接变体AR) 的活性的那些存在持续需求。

[0010] 本发明提供了反义寡核苷酸, 凭借其设计和作用方式 (与AR RNA靶标进行碱基配对并且通过RNase H介导其破坏, 该RNase H是一种破坏DNA/RNA双链体中的RNA的酶) 这些反义寡核苷酸旨在抑制主要形式的AR。通过靶向AR mRNA的适当区域, 该反义寡核苷酸将引起主要形式 (全长、剪接变体和突变形式) 的雄激素受体蛋白的抑制并且因此将适于治疗患有CRPC的患者。

[0011] 除前列腺癌之外, AR在其他肿瘤 (例如乳腺癌) 的进展中也被牵连为一个因素。在乳腺癌中, AR被表达于70%-80%的肿瘤中, 这些肿瘤也是ER阳性的, 并且在12%情况下, 被称为三阴性的 (不表达ER、PR和HER2) (Hickey等人, Molecular Endocrinology (《分子内分泌学》) 26:1252-1267, 2012)。在临床前研究中, 雄激素受体拮抗剂比卡鲁胺在乳腺癌细胞中诱导体外抗增殖应答并且这通过加入Pi3K/mTOR抑制剂得以增强 (Ni等人, Cancer Cell (《癌细胞》) 20:119-131, 2011)。第2代抗雄激素恩杂鲁胺在ER+/AR+乳腺癌细胞中抑制二氢睾酮 (DHT) 介导的增殖并且在体内临床前模型中在抑制雌激素刺激的乳腺癌肿瘤生长方面与三苯氧胺同样有效 (Cochrane等人, Cancer Res (《癌症研究》) 72 (24增刊): P2-14-02, 2012)。恩杂鲁胺还在HER2+和三阴性乳腺癌细胞中抑制增殖。看来在雌激素作用被减少 (例如, 长期雌激素剥夺或不存在ER) 的情况下, AR水平增加并且可以变得致癌。这将表明, AR拮抗剂可以被最佳定位在三阴性或激素抗性乳腺癌环境中 (Hickey等人, Molecular Endocrinology (《分子内分泌学》) 26:1252-1267, 2012)。AR靶向疗法目前在乳腺癌临床试验中的研究之下 (NCT00468715、NCT01597193、NCT01381874、NCT00755886)。

[0012] AR还被表达于多种其他肿瘤中, 包括但不限于膀胱、卵巢、胃、肺以及肝。临床前数据支持如在乳腺癌中促进肿瘤细胞增殖存活的类似角色, 因而阻断这些肿瘤中的AR可以具

有治疗临床益处 (Chang等人, Oncogene advance online (《原癌基因进展在线》):1-10, 2013)。

发明内容

[0013] 在此提供的若干实施例涉及用于抑制细胞中的雄激素受体水平的化合物和组合物的发现, 这些化合物和组合物对于治疗癌症和抑制癌细胞增殖或生长的方法而言可以是有用的, 例如前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌或膀胱癌或癌细胞。

[0014] 详细说明

[0015] 应理解, 前述的一般说明以及以下的详细说明都是示例性的并且仅是解释性的并且不限制所要求的本发明。在此, 单数的使用包括复数, 除非另外明确说明。如在此所使用, 除非另外说明, “或”的使用意指“和/或”。此外, 术语“包括(including)”以及其他形式(例如, “包括(includes)”和“被包括(included)”)的使用是非限制性的。同样, 除非另外明确说明, 术语例如“要素”或“组分”涵盖包括一个单位的要素和组分以及包括超过一个亚单位的要素和组分。

[0016] 在此使用的小节标题仅是为了组织的目的并且不应被解释为限制所描述的主题。在本申请中引用的所有文献或文献的部分(包括但不限于专利、专利申请、文章、书及论文)通过引用以在此讨论的文献的部分以及以其全部内容而特此清楚地结合。

[0017] 定义

[0018] 除非提供了具体定义, 否则与在此描述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学结合使用的术语以及其程序和技术是本领域中熟知并且通常使用的那些。可以将标准技术用于化学合成和化学分析。在允许的情况下, 所有专利、申请、公开的申请以及其他公开物、通过数据库(例如国家生物技术信息中心(NCBI))可获得的GENBANK登录号和相关的序列信息以及其他贯穿在此的披露而提及的其他数据通过引用以在此讨论的文献的部分以及以其全部内容而结合。

[0019] 除非另外指明, 以下术语具有以下含义:

[0020] “2'-O-甲氧基乙基”(亦称2'-MOE和2'-O(CH₂)₂-OCH₃)是指糖环(例如, 呋喃糖环)的2'位处的O-甲氧基-乙基修饰。2'-O-甲氧基乙基修饰的糖是一种经修饰的糖。

[0021] “2'-MOE核苷”(亦称2'-O-甲氧基乙基核苷)意指包括一个2'-MOE修饰的糖部分的核苷。

[0022] “2'-取代的核苷”意指在呋喃糖基环的2'-位处包括一个除H或OH外的取代基的核苷。在某些实施例中, 2'取代的核苷包括具有二环糖修饰的核苷。

[0023] “3'靶位点”是指与特定反义化合物的最3'端核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0024] “5'靶位点”是指与特定反义化合物的最5'端核苷酸互补的靶核酸的核苷酸。

[0025] “5-甲基胞嘧啶”意指被附接至5'位的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是一种经修饰核碱基。

[0026] “约”意指在某值的±7%内。例如, 如果指明“这些化合物影响雄激素受体的至少约70%抑制”, 则暗指雄激素受体水平在63%与77%的范围内被抑制。

[0027] “给予”或“给药”是指向受试者引入在此提供的反义化合物以完成其预期功能的途径。可以使用的给予途径的一个实例包括但不限于胃肠外给予, 例如皮下、静脉内、或肌

肉注射或输注。

[0028] 相对于乳腺癌或乳腺癌细胞,“雄激素受体阳性”是指表达雄激素受体的乳腺癌或乳腺癌细胞。

[0029] “动物”是指人或非人动物,包括但不限于,小鼠、大鼠、兔、狗、猫、猪以及非人灵长类(包括但不限于猴和黑猩猩)。

[0030] “抗雄激素剂”是指作为雄激素合成抑制剂或雄激素受体阻断剂的治疗化合物或药物。

[0031] “反义活性”意指可归因于反义化合物与其靶核酸杂交的任何可检测或可测量活性。在某些实施例中,反义活性是靶核酸或由这样的靶核酸编码的蛋白的量或表达的下降。

[0032] “反义化合物”意指能够通过氢键合而经历与靶核酸杂交的寡聚化合物。反义化合物的实例包括单链和双链化合物,例如反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、ssRNA以及基于占据的(occupancy-based)化合物。

[0033] “反义抑制”意指与在不存在反义化合物的情况下的靶核酸水平相比,在存在与该靶核酸互补的该反义化合物的情况下的该靶核酸水平的减少。

[0034] “反义机制”是涉及化合物与靶核酸杂交的所有那些机制,其中杂交结果或作用是靶标降解或靶标占据,伴随涉及例如转录或剪接的细胞机器的停止。

[0035] “反义寡核苷酸”意指具有一个允许与靶核酸的对应区域或区段杂交的核碱基序列的单链寡核苷酸。

[0036] “碱基互补性”是指反义寡核苷酸的核碱基与靶核酸中的对应核碱基精确碱基配对(即,杂交)的能力,并且由对应的核碱基之间的沃森-克里克(Watson-Crick)、胡斯坦(Hoogsteen)或反向胡斯坦氢键合介导。

[0037] “二环糖部分”意指包括一个4至7元环的经修饰的糖部分(包括但不限于呋喃糖基),该4至7元环包括连接该4至7元环的两个原子的一个桥从而形成第二环,从而产生双环结构。在某些实施例中,该4至7元环是糖环。在某些实施例中,该4至7元环是呋喃糖基。在某些此类实施例中,该桥连接呋喃糖基的2'-碳和4'-碳。

[0038] 还被包括在根据本发明的LNA的定义内的是以下LNA,其中核糖基糖的2'-羟基被连接至该糖环的4'碳原子,由此形成一个亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2')桥,以形成该二环糖部分。该桥还可以是一个连接2'氧原子和4'碳原子的亚甲基(-CH₂-)基团,针对其使用术语亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2')LNA。此外,在该二环糖部分在此位置中具有一个亚乙基桥联基团的情况下,使用术语亚乙基氧基(4'-CH₂CH₂-O-2')LNA。 α -L-亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2')(一种亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2')LNA异构体)也被涵盖在LNA的定义内,如在此所使用。

[0039] “帽子结构”或“末端帽子部分”意指已经被掺入在反义化合物的任一末端处的化学修饰。

[0040] “去势抗性前列腺癌(castrate-resistant prostate cancer)”或“去势抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer)”和前列腺癌细胞是指前列腺癌和前列腺癌细胞对雄激素剥夺疗法或抗雄激素剂的敏感性降低。

[0041] “cEt”或“受约束乙基”意指包括一个连接4'-碳和2'-碳的桥的二环糖部分,其中该桥具有以下式:4'-CH(CH₃)-O-2'。

[0042] “受约束乙基核苷”(亦称cEt核苷)意指包括一个包含4'-CH(CH₃)-O-2'桥的二环

糖部分的核苷。

[0043] “化学上不同的区域(chemically distinct region)”是指反义化合物的一个区域,其以一些方式在化学上不同于同一反义化合物的另一区域。例如,一个具有2'-O-甲氧基乙基核苷酸的区域在化学上不同于一个不具有2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸的区域。

[0044] “嵌合反义化合物”意指具有至少2个化学上不同的区域的反义化合物,每个位置都具有多个亚单位。

[0045] “互补性”意指第一核酸与第二核酸的核碱基之间进行配对的能力。

[0046] “包括(comprise)”、“包括(comprises)”和“包括(comprising)”应当理解为暗示包括一个所述的步骤或要素或多个步骤或要素的组,但不排除任何其他一个步骤或要素或多个步骤或要素的组。

[0047] “连续核碱基”意指彼此紧邻的核碱基。

[0048] “脱氧核糖核苷酸”意指在核苷酸的糖部分的2'位处具有一个氢的核苷酸。可以用多种取代基中的任何取代基修饰脱氧核糖核苷酸。

[0049] “设计”或“被设计为”是指设计与所选核酸分子特异性杂交的寡聚化合物的过程。

[0050] “下游”意指朝向核酸的3'端或C-末端的相对方向。

[0051] “疗效”意指产生希望的效果的能力。

[0052] 关于乳腺癌或乳腺癌细胞,“雌激素受体(ER)阳性”是指表达雌激素受体(ER)的乳腺癌或乳腺癌细胞。

[0053] 关于乳腺癌或乳腺癌细胞,“雌激素受体(ER)阴性”是指不表达雌激素受体(ER)的乳腺癌或乳腺癌细胞。

[0054] “表达”意指所有功能,借助所述功能,基因的编码信息转化成在细胞中存在和运行的结构。此类结构包括但不限于转录和翻译产物。

[0055] “完全互补”或“100%互补”意指第一核酸的每个核碱基在第二核酸中都具有互补核碱基。在某些实施例中,第一核酸是反义化合物并且靶核酸是第二核酸。

[0056] “缺口体(gapmer)”意指嵌合的反义化合物,在该化合物中具有多个支持RNase H切割的核苷的内部区域被定位在具有一个或多个核苷的外部区域之间,其中这些包括该内部区域的核苷在化学上不同于包括这些外部区域的该核苷或这些核苷。该内部区域可以被称作“缺口(gap)”并且这些外部区域可以被称作“翼(wing)”。

[0057] 关于乳腺癌或乳腺癌细胞,“Her2/neu阴性”是指不表Her2/neu的乳腺癌或乳腺癌细胞。

[0058] “杂交”意指互补核酸分子的退火。在某些实施例中,互补核酸分子包括但不限于,反义化合物和核酸靶标。在某些实施例中,互补核酸分子包括但不限于,反义寡核苷酸和核酸靶标。

[0059] “紧邻”意指在紧邻要素之间不存在介入要素。

[0060] “个体”意指选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0061] “诱导”、“抑制”、“增强”、“升高”、“增加”、“减少”、“上调”、“下调”等通常表示两种状态之间的量化差异。

[0062] “抑制表达或活性”是指表达或活性的降低、阻断并且未必指示表达或活性的完全消除。

[0063] “核苷间连接”是指核苷之间的化学键。

[0064] “延伸的”反义寡核苷酸是相对于在此披露的反义寡核苷酸,具有一个或多个另外的核苷的那些。

[0065] “连接的脱氧核苷”意指被由磷酸酯连接的脱氧核糖取代以形成核苷酸的核酸碱基(A、G、C、T、U)。

[0066] “连接的核苷”意指通过核苷间连接连接在一起的相邻核苷。

[0067] “错配”或“非互补核碱基”是指当第一核酸的核碱基不能与第二或靶核酸的对应核碱基配对的情况。

[0068] “经修饰的核苷间连接”是指来自天然发生的核苷间键(即,磷酸二酯核苷间键)的取代或任何变化。

[0069] “经修饰核碱基”意指除腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶外的任何核碱基。“未经修饰核碱基”意指嘌呤碱基腺嘌呤(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)。

[0070] “经修饰的核苷”意指独立地具有经修饰的糖部分和/或经修饰核碱基的核苷。

[0071] “修饰的核苷酸”意指独立地具有经修饰的糖部分、经修饰的核苷间连接或经修饰核碱基的核苷酸。

[0072] “经修饰的寡核苷酸”意指包括至少一个经修饰的核苷间连接、经修饰的糖和/或经修饰核碱基的寡核苷酸。

[0073] “经修饰的糖”意指来自天然糖部分的取代和/或任何变化。

[0074] “单体”是指单个单位的寡聚体。单体包括但不限于无论是天然发生的还是修饰的核苷和核苷酸。

[0075] “基序”意指反义化合物中的未经修饰的和经修饰的核苷的模式。

[0076] “天然糖部分”意指DNA(2'-H)或RNA(2'-OH)中发现的糖部分。

[0077] “天然发生的核苷间连接”意指3'至5'磷酸二酯连接。

[0078] “非互补核碱基”是指不彼此形成氢键或不以其他方式支持杂交的一对核碱基。

[0079] “核酸”是指由单体核苷酸组成的分子。核酸包括但不限于,核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、单链核酸以及双链核酸。

[0080] “核碱基”意指能够与另一核酸的碱基配对的杂环部分。

[0081] “核碱基互补性”是指核碱基能够与另一核碱基碱基配对。例如,在DNA中,腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)互补。例如,在RNA中,腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)互补。在某些实施例中,互补核碱基是指能够与其靶核酸的核碱基进行碱基配对的反义化合物的核碱基。例如,如果反义化合物的某个位置处的核碱基能够与靶核酸的某个位置处的核碱基进行氢键合,则该寡核苷酸与该靶核酸之间的氢键合的位置被认为在该核碱基对处是互补的。

[0082] “核碱基序列”意指独立于任何糖、连接和/或核碱基修饰的连续核碱基的顺序。

[0083] “核苷”意指连接至糖的核碱基。

[0084] “核苷模拟物”包括用于在寡聚化化合物的一个或多个位置处替换糖或糖和碱基以及不是必然地替换连接的那些结构,例如像具有吗啉基、环己烯基、环己基、四氢吡喃基、二环或三环糖模拟物的核苷模拟物,例如非呋喃糖糖单位。核苷酸模拟物包括用于在寡聚化化合物的一个或多个位置处替换核苷和连接的那些结构,例如像肽核酸或吗啉基(由-N(H)-C

(=O)-O-或其他非磷酸二酯连接而连接的吗啉基)。糖代用品与略为宽泛的术语核苷模拟物重叠,但是旨在指示仅替换糖单位(呋喃糖环)。在此提供的四氢吡喃基环示意了糖代用品的一个实例,其中该呋喃糖糖基团已经被四氢吡喃基环系统替换。“模拟物”是指替换糖、核碱基和/或核苷间连接的基团。通常,使用模拟物代替糖或糖-核苷间连接组合,并且维持该核碱基用于与所选靶标杂交。

[0085] “核苷酸”意指一种核苷,该核苷具有共价连接至该核苷的糖部分的磷酸酯基团。

[0086] “寡聚化合物”意指连接的单体亚单位的聚合物,该聚合物能够与核酸分子的至少一个区域杂交。

[0087] “寡核苷”意指其中的核苷间连接不包含磷原子的寡核苷酸。

[0088] “寡核苷酸”意指连接的核苷的聚合物,这些核苷中的每个核苷都可以彼此独立地被修饰或不被修饰。

[0089] “硫代磷酸酯连接”意指核苷之间的连接,其中磷酸二酯键通过用硫原子替换非桥氧原子之一而被修饰。硫代磷酸酯连接是一种经修饰的核苷间连接。

[0090] “部分”意指核酸的限定数目的连续(即,连接的)核碱基。在某些实施例中,一个部分是靶核酸的限定数目的连续核碱基。在某些实施例中,一个部分是反义化合物的限定数目的连续核碱基。

[0091] 关于乳腺癌或乳腺癌细胞,“孕酮受体(PR)阴性”是指不表达孕酮受体(PR)的乳腺癌或乳腺癌细胞。

[0092] 将“区域”定义为具有至少一个可鉴定的结构、功能或特征的靶核酸的部分。

[0093] “核糖核苷酸”意指在核苷酸的糖部分的2'位处具有一个羟基的核苷酸。可以用多种取代基中的任何取代基修饰核糖核苷酸。

[0094] 将“区段”定义为靶核酸内的区域的较小或亚部分。

[0095] 如在此所使用,将“位点”定义为靶核酸内的独特核碱基位置。

[0096] “可特异性杂交”是指在特异性结合是所希望的条件下,即在体内测定和治疗性治疗的情况下,在生理条件下,反义化合物在反义寡核苷酸与靶核酸之间具有足够的互补性程度以诱导希望的效应,同时对非靶核酸展现出最小效应或没有效应。“严谨杂交条件”或“严谨条件”是指在其下寡聚化合物将与其靶序列杂交而与最小数目的其他序列杂交的条件。

[0097] “受试者”意指选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0098] “协同作用(synergy)”或“协同(synergize)”是指组合效应大于每种组分单独的效应的加和。

[0099] “靶标”意指其调节是所希望的蛋白质。

[0100] “靶基因”是指编码靶标的基因。

[0101] “靶向”意指设计和选择将与靶核酸特异性杂交并诱导希望的效应的反义化合物的过程。

[0102] “靶核酸”、“靶标RNA”、“靶标RNA转录物”以及“核酸靶标”都意指能够被反义化合物靶向的核酸。

[0103] “靶标区域”意指一种或多种反义化合物所靶向的靶核酸的一部分。

[0104] “靶标区段”意指反义化合物所靶向的靶核酸的核苷酸序列。“5'靶位点”是指靶标

区段的最5'端核苷酸。“3'靶位点”是指靶标区段的最3'端核苷酸。

[0105] “治疗癌症”是指进行引起癌症或与之相伴的症状的缓解的行为。所述行为的组合被术语“治疗”所涵盖。癌症的缓解包括但不限于,减少受试者体内的癌细胞数目或减少该受试者体内的癌细胞数目。如在此所使用,所述治疗还包括相对于癌症的健康的整体恢复。应当理解的是,如根据在此提供的实施例所使用的治疗不是在所有有待治疗的受试者中都有效。然而,在此提及的患有癌症的受试者群体可以被成功治疗。在某些实施例中,“治疗癌症”可以由多个不同参数加以描述,包括但不限于,患有癌症的受试者的肿瘤大小减小、患有癌症的受试者的肿瘤生长或增殖减少、阻止转移或减小转移范围和/或与对照相比延长患有癌症的受试者的存活。在此定义中提及的癌症可以是任何癌症,包括选自前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌以及膀胱癌的一种癌症。

[0106] “未修饰的”核碱基意指嘌呤碱基腺嘌呤(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)。

[0107] “未修饰的核苷酸”意指由天然发生的核碱基、糖部分和核苷间连接组成的核苷酸。在某些实施例中,未修饰的核苷酸是RNA核苷酸(即, β -D-核糖核苷)或DNA核苷酸(即, β -D-脱氧核糖核苷)。

[0108] “上游”意指朝向核酸的5'末端或N-端的相对方向。

[0109] 某些实施例

[0110] 某些实施例提供了用于抑制雄激素受体(AR)mRNA表达的方法、化合物和组合物。

[0111] 某些实施例提供了靶向雄激素受体核酸的反义化合物或组合物。在某些实施例中,该雄激素受体核酸是陈述在以下各项中的序列:GENBANK登录号NT_011669.17_TRUNC_5079000_5270000(作为SEQ ID NO:1结合在此)、GENBANK登录号NM_000044.3(作为SEQ ID NO:2结合在此)、GENBANK登录号NM_001011645.2(作为SEQ ID NO:3结合在此)、GENBANK登录号FJ235916.1(作为SEQ ID NO:4结合在此)、GENBANK登录号FJ235917.1(作为SEQ ID NO:5结合在此)、GENBANK登录号FJ235918.1(作为SEQ ID NO:6结合在此)、GENBANK登录号FJ235919.1(作为SEQ ID NO:7结合在此)或GENBANK登录号FJ235920.1(作为SEQ ID NO:8结合在此)。

[0112] 在某些实施例中,这些化合物或组合物包括靶向AR的长度为10至30个连接的核苷的经修饰的寡核苷酸。该AR靶标可以具有在SEQ ID NO:1-8的任一项中列举的序列或其部分或其变体。在某些实施例中,该AR靶标可以具有已知的AR剪接变体的序列,这些剪接变体包括但不限于AR-V1、AR-V2、AR-V3、AR-V4、AR-V5、AR-V6以及AR-V7(也称为AR3),这些剪接变体包含外显子1-3但缺乏外显子4-8。可被在此提供的化合物靶向的AR-V1、AR-V2、AR-V3、AR-V4、AR-V5、AR-V6、AR-V7以及另外的剪接变体描述于Hu等人,Cancer Res(《癌症研究》)2009;69:16-22和美国专利申请公开号US 2010/0068802中,将每者都通过引用以其全部内容结合在此。

[0113] 在某些实施例中,这些化合物或组合物包括一个经修饰的寡核苷酸,该寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179的任一项的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基。在某些实施例中,翼区段中的一个或多个经修饰的核苷具有经修饰的糖。在某些实施例中,该经修饰的糖是二环糖。在某些实施例中,该经修饰的核苷是LNA核苷。在某些实施例中,该经修饰的核

昔是2'-取代的核苷。在某些实施例中,2'-取代的核苷包括具有二环糖修饰的核苷。在某些实施例中,该经修饰的核苷是2'-MOE核苷。在某些实施例中,该经修饰的核苷是受约束乙基(cEt)核苷。

[0114] 在某些实施例中,这些化合物或组合物包括一个经修饰的寡核苷酸,该寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:12-179的任一项的核碱基序列组成。在某些实施例中,翼区段中的一个或多个经修饰的核苷具有经修饰的糖。在某些实施例中,该经修饰的糖是二环糖。在某些实施例中,该经修饰的核苷是LNA核苷。在某些实施例中,该经修饰的核苷是2'-取代的核苷。在某些实施例中,2'-取代的核苷包括具有二环糖修饰的核苷。在某些实施例中,该经修饰的核苷是2'-MOE核苷。在某些实施例中,该经修饰的核苷是受约束乙基(cEt)核苷。

[0115] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的这些化合物或组合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175的序列组成。在某些实施例中,靶向人AR的该反义化合物是ISIS 560131、ISIS 569213、ISIS 569216、ISIS 569221、ISIS 569236、ISIS 579671、ISIS 586124、ISIS 583918、ISIS 584149、ISIS 584163、ISIS 584269或ISIS 584468。

[0116] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸包括:a) 一个缺口区段,由连接的脱氧核苷组成;b) 一个5'翼区段,由连接的核苷组成;以及c) 一个3'翼区段,由连接的核苷组成。该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间并且每个翼区段的每个核苷都包括经修饰的糖。

[0117] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由20个连接的核苷、缺口区段、5'翼区段、3'翼区段组成,该缺口区段由10个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由五个连接的核苷组成,该3'翼区段由五个连接的核苷组成,每个翼区段的每个核苷都包括2'-O-甲氧基乙基糖,每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0118] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷、一个缺口区段、一个5'翼区段、一个3'翼区段组成,该缺口区段由10个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由三个连接的核苷组成,该3'翼区段由三个连接的核苷组成,每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖,每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0119] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷、一个缺口区段、一个5'翼区段、一个3'翼区段组成,该缺口区段由9个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由三个连接的核苷组成,该3'翼区段由四个连接的核苷组成;该5'翼区段的这三个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这四个连接的核苷在5'至3'方向上是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖以及2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0120] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷、一个缺口区段、一个5'翼区段、一个3'翼区段组成,该缺口区段由8个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由五个连接的核苷组成,该3'翼区段由三个连接的核苷组成;该5'翼区段的这五个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这三个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0121] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷、一个缺口区段、一个5'翼区段、一个3'翼区段组成,该缺口区段由8个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由四个连接的核苷组成,该3'翼区段由四个连接的核苷组成;该5'翼区段的这四个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-0-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖以及受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这四个连接的核苷在5'至3'方向上是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖以及2'-0-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0122] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷、一个缺口区段、一个5'翼区段、一个3'翼区段组成,该缺口区段由8个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由五个连接的核苷组成,该3'翼区段由三个连接的核苷组成;该5'翼区段的这五个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-0-甲氧基乙基糖、2'-0-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖以及受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这三个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0123] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷、一个缺口区段、一个5'翼区段、一个3'翼区段组成,该缺口区段由7个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由七个连接的核苷组成,该3'翼区段由两个连接的核苷组成;该5'翼区段的这七个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-0-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、2'-0-甲氧基乙基糖、2'-0-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖以及受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这两个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0124] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷、一个缺口区段、一个5'翼区段、一个3'翼区段组成,该缺口区段由7个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由六个连接的核苷组成,该3'翼区段由三个连接的核苷组成;该5'翼区段的这六个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-0-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、2'-0-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖以及受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这三个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0125] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷、一个缺口区段、一个5'翼区段、一个3'翼区段组成,该缺口区段由7个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由五个连接的核苷组成,该3'翼区段由四个连接的核苷组成;该5'翼区段的这五个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-0-甲氧基乙基糖、2'-0-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖以及受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这四个连接的核苷在5'至3'方向上是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖以及2'-0-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0126] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷、一个缺口区段、一个5'翼区段、一个3'翼区段组成,该缺口区段由7个连接的脱氧核苷组成,该5'翼区段由四个连接的核苷组成,该3'翼区段由五个连接的核苷组成;该5'翼区段的这四个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-0-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖以及受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这五个连接的核苷在5'至3'方向上是受约束乙基(cEt)糖、受约

束乙基 (cEt) 糖、受约束乙基 (cEt) 糖、2'-O-甲氧基乙基糖以及2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0127] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的这些化合物或组合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括一个由脱氧核苷组成的缺口区段;一个5'翼区段;和一个3'翼区段,其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间并且每个翼区段的每个核苷都包括经修饰的糖。在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸的每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接。在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸的每个胞嘧啶都是5'-甲基胞嘧啶。

[0128] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0129] 一个缺口区段,由9个连接的脱氧核苷组成;

[0130] 一个5'翼区段,由三个连接的核苷组成;以及

[0131] 一个3'翼区段,由四个连接的核苷组成;

[0132] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的3个连接的核苷各自是受约束乙基 (cEt) 糖;该3'翼区段的4个连接的核苷从5'到3'方向是受约束乙基 (cEt) 糖、受约束乙基 (cEt) 糖、受约束乙基 (cEt) 糖和2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0133] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:39的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0134] 一个缺口区段,由9个连接的脱氧核苷组成;

[0135] 一个5'翼区段,由三个连接的核苷组成;以及

[0136] 一个3'翼区段,由四个连接的核苷组成;

[0137] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的3个连接的核苷各自是受约束乙基 (cEt) 糖;该3'翼区段的4个连接的核苷从5'到3'方向是受约束乙基 (cEt) 糖、受约束乙基 (cEt) 糖、受约束乙基 (cEt) 糖和2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0138] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:39的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0139] 一个缺口区段,由8个连接的脱氧核苷组成;

[0140] 一个5'翼区段,由四个连接的核苷组成;以及

[0141] 一个3'翼区段,由四个连接的核苷组成;

[0142] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;该5'翼区段的这四个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基 (cEt) 糖、受约束乙基 (cEt) 糖以及受约束乙基 (cEt) 糖;该3'翼区段的这四个连接的核苷在5'至3'方向上是受约束乙基 (cEt) 糖、受约束乙基 (cEt) 糖、受约束乙基 (cEt) 糖以及2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连

接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0143] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:39的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0144] 一个缺口区段,由8个连接的脱氧核苷组成;

[0145] 一个5'翼区段,由五个连接的核苷组成;以及

[0146] 一个3'翼区段,由三个连接的核苷组成;

[0147] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;该5'翼区段的这五个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-O-甲氧基乙基糖、2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖以及受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这三个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0148] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:39的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0149] 一个缺口区段,由7个连接的脱氧核苷组成;

[0150] 一个5'翼区段,由四个连接的核苷组成;以及

[0151] 一个3'翼区段,由五连接的核苷组成;

[0152] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;该5'翼区段的这四个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖以及受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这五个连接的核苷在5'至3'方向上是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、2'-O-甲氧基乙基糖以及2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0153] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0154] 一个缺口区段,由7个连接的脱氧核苷组成;

[0155] 一个5'翼区段,由六个连接的核苷组成;以及

[0156] 一个3'翼区段,由三个连接的核苷组成;

[0157] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;该5'翼区段的这六个连接的核苷在5'至3'方向上是2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖以及受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的这三个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0158] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:43的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0159] 一个缺口区段,由10个连接的脱氧核苷组成;

[0160] 一个5'翼区段,由三个连接的核苷组成;以及

[0161] 一个3'翼区段,由三个连接的核苷组成;

[0162] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0163] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:124的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0164] 一个缺口区段,由10个连接的脱氧核苷组成;

[0165] 一个5'翼区段,由三个连接的核苷组成;以及

[0166] 一个3'翼区段,由三个连接的核苷组成;

[0167] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0168] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:150的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0169] 一个缺口区段,由10个连接的脱氧核苷组成;

[0170] 一个5'翼区段,由三个连接的核苷组成;以及

[0171] 一个3'翼区段,由三个连接的核苷组成;

[0172] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0173] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:155的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0174] 一个缺口区段,由10个连接的脱氧核苷组成;

[0175] 一个5'翼区段,由三个连接的核苷组成;以及

[0176] 一个3'翼区段,由三个连接的核苷组成;

[0177] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0178] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:169的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0179] 一个缺口区段,由10个连接的脱氧核苷组成;

[0180] 一个5'翼区段,由三个连接的核苷组成;以及

[0181] 一个3'翼区段,由三个连接的核苷组成;

[0182] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-

甲基胞嘧啶。

[0183] 在某些实施例中,靶向雄激素受体的化合物包括一个单链的经修饰的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,该寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:175的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0184] 一个缺口区段,由10个连接的脱氧核苷组成;

[0185] 一个5'翼区段,由三个连接的核苷组成;以及

[0186] 一个3'翼区段,由三个连接的核苷组成;

[0187] 其中该缺口区段被定位在该5'翼区段与该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接都是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶都是5-甲基胞嘧啶。

[0188] 在某些实施例中,靶向雄激素受体核酸的反义化合物或反义寡核苷酸在SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域内是互补的:2957-2972、3079-3094、3099-3114、3109-3124、3113-3128、3120-3135、3133-3148、3224-3239、3226-3241、3351-3366、3353-3368、3361-3376、3388-3403、3513-3528、3517-3532、3519-3534、3641-3656、3735-3750、3764-3779、3768-3783、3798-3813、3799-3814、3851-3866、3870-3885、3874-3889、3876-3891、3878-3893、3884-3899、3886-3901、3888-3903、3901-3916、3956-3971、3962-3977、3964-3979、3967-3982、4019-4034、4038-4053、4049-4064、4056-4071、4059-4074、4062-4077、4066-4081、4070-4085、4101-4116、4103-4118、4105-4120、4109-4124、4305-4320、4405-4420、4532-4547、4534-4549、4537-4552、4539-4554、4555-4570、4571-4586、4573-4588、4578-4593、4597-4612、4632-4647、4655-4670、4656-4671、4662-4677、4699-4714、4747-4762、4750-4765、4752-4767、4754-4769、4755-4770、4769-4784、4798-4813、4804-4819、4807-4822、4833-4848、4837-4852、4839-4854、4865-4880、4868-4883、4872-4887、4874-4889、4876-4891、4887-4902、4889-4904、4916-4931、4918-4933、4938-4953、4942-4957、4944-4959、4951-4966、5050-5065、5052-5067、5054-5069、5056-5071、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5133-5148、5141-5156、5155-5170、5265-5280、5293-5308、5308-5323、5392-5407、5448-5463、5469-5484、5481-5496、5483-5498、5486-5501、5488-5503、5494-5509、5521-5536、5666-5681、6222-6237、6701-6716、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58739、58720-58735、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58724-58739、58725-58740、58725-58740、58725-58740、58750-58769、58750-58765、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、60902-60917、67454-67469、102156-102171、114874-114889、115272-115287、115365-115380、134971-134986、139682-139697、139762-139777、139782-139797、144856-144871、144938-144953、148406-148421、148443-148458、148520-148535、181695-181710、182958-182973或183049-183064。

[0189] 在某些实施例中,靶向雄激素受体核酸的反义化合物或反义寡核苷酸靶向SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域:2957-2972、3079-3094、3099-3114、3109-3124、3113-3128、3120-

3135、3133-3148、3224-3239、3226-3241、3351-3366、3353-3368、3361-3376、3388-3403、3513-3528、3517-3532、3519-3534、3641-3656、3735-3750、3764-3779、3768-3783、3798-3813、3799-3814、3851-3866、3870-3885、3874-3889、3876-3891、3878-3893、3884-3899、3886-3901、3888-3903、3901-3916、3956-3971、3962-3977、3964-3979、3967-3982、4019-4034、4038-4053、4049-4064、4056-4071、4059-4074、4062-4077、4066-4081、4070-4085、4101-4116、4103-4118、4105-4120、4109-4124、4305-4320、4405-4420、4532-4547、4534-4549、4537-4552、4539-4554、4555-4570、4571-4586、4573-4588、4578-4593、4597-4612、4632-4647、4655-4670、4656-4671、4662-4677、4699-4714、4747-4762、4750-4765、4752-4767、4754-4769、4755-4770、4769-4784、4798-4813、4804-4819、4807-4822、4833-4848、4837-4852、4839-4854、4865-4880、4868-4883、4872-4887、4874-4889、4876-4891、4887-4902、4889-4904、4916-4931、4918-4933、4938-4953、4942-4957、4944-4959、4951-4966、5050-5065、5052-5067、5054-5069、5056-5071、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5133-5148、5141-5156、5155-5170、5265-5280、5293-5308、5308-5323、5392-5407、5448-5463、5469-5484、5481-5496、5483-5498、5486-5501、5488-5503、5494-5509、5521-5536、5666-5681、6222-6237、6701-6716、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58739、58720-58735、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58724-58739、58725-58740、58725-58740、58725-58740、58750-58769、58750-58765、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、60902-60917、67454-67469、102156-102171、114874-114889、115272-115287、115365-115380、134971-134986、139682-139697、139762-139777、139782-139797、144856-144871、144938-144953、148406-148421、148443-148458、148520-148535、181695-181710、182958-182973或183049-183064。

[0190] 在某些实施例中，反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域。在某些实施例中，靶向雄激素受体核酸的此类化合物或寡核苷酸具有一个连续的核碱基部分，该部分与该区域的等长核碱基部分互补。例如，该部分可以是与在此列举的区域的等长部分互补的至少8、9、10、11、12、13、14、15或16个连续核碱基部分。在某些实施例中，此类化合物或寡核苷酸靶向SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域：2957-2972、3079-3094、3099-3114、3109-3124、3113-3128、3120-3135、3133-3148、3224-3239、3226-3241、3351-3366、3353-3368、3361-3376、3388-3403、3513-3528、3517-3532、3519-3534、3641-3656、3735-3750、3764-3779、3768-3783、3798-3813、3799-3814、3851-3866、3870-3885、3874-3889、3876-3891、3878-3893、3884-3899、3886-3901、3888-3903、3901-3916、3956-3971、3962-3977、3964-3979、3967-3982、4019-4034、4038-4053、4049-4064、4056-4071、4059-4074、4062-4077、4066-4081、4070-4085、4101-4116、4103-4118、4105-4120、4109-4124、4305-4320、4405-4420、4532-4547、4534-4549、4537-4552、4539-4554、4555-4570、4571-4586、4573-4588、4578-4593、4597-4612、4632-4647、4655-4670、4656-4671、4662-4677、4699-4714、4747-4762、4750-4765、4752-4767、4754-4769、4755-4770、4769-4784、4798-4813、4804-

4819-4807-4822、4833-4848、4837-4852、4839-4854、4865-4880、4868-4883、4872-4887、4874-4889、4876-4891、4887-4902、4889-4904、4916-4931、4918-4933、4938-4953、4942-4957、4944-4959、4951-4966、5050-5065、5052-5067、5054-5069、5056-5071、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5133-5148、5141-5156、5155-5170、5265-5280、5293-5308、5308-5323、5392-5407、5448-5463、5469-5484、5481-5496、5483-5498、5486-5501、5488-5503、5494-5509、5521-5536、5666-5681、6222-6237、6701-6716、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58739、58720-58735、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58724-58739、58725-58740、58725-58740、58725-58740、58750-58769、58750-58765、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、60902-60917、67454-67469、102156-102171、114874-114889、115272-115287、115365-115380、134971-134986、139682-139697、139762-139777、139782-139797、144856-144871、144938-144953、148406-148421、148443-148458、148520-148535、181695-181710、182958-182973或183049-183064。

[0191] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物或反义寡核苷酸靶向AR的外显子1内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域2863-5593(外显子1)或27672-27853(外显子1B)内。在某些实施例中,靶向AR的外显子1的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:2957-2972、3079-3094、3099-3114、3109-3124、3113-3128、3120-3135、3133-3148、3224-3239、3226-3241、3351-3366、3353-3368、3361-3376、3388-3403、3513-3528、3517-3532、3519-3534、3641-3656、3735-3750、3764-3779、3768-3783、3798-3813、3799-3814、3851-3866、3870-3885、3874-3889、3876-3891、3878-3893、3884-3899、3886-3901、3888-3903、3901-3916、3956-3971、3962-3977、3964-3979、3967-3982、4019-4034、4038-4053、4047-4062、4049-4064、4056-4071、4059-4074、4062-4077、4066-4081、4070-4085、4101-4116、4103-4118、4105-4120、4109-4124、4305-4320、4405-4420、4532-4547、4534-4549、4537-4552、4539-4554、4555-4570、4571-4586、4573-4588、4578-4593、4597-4612、4632-4647、4655-4670、4656-4671、4662-4677、4699-4714、4747-4762、4750-4765、4752-4767、4754-4769、4755-4770、4769-4784、4798-4813、4804-4819、4807-4822、4833-4848、4837-4852、4839-4854、4865-4880、4868-4883、4872-4887、4874-4889、4876-4891、4887-4902、4889-4904、4916-4931、4918-4933、4938-4953、4942-4957、4944-4959、4951-4966、5050-5065、5052-5067、5054-5069、5056-5071、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5133-5148、5141-5156、5155-5170、5265-5280、5293-5308、5308-5323、5392-5407、5448-5463、5469-5484、5481-5496、5483-5498、5486-5501、5488-5503、5494-5509或5521-5536。

[0192] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物或反义寡核苷酸靶向AR的外显子2内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域102087-102238(外显子2)或139551-139834(外显子2c)内。在某些实施例中,靶向AR的外显子2的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域内是互补的:102155-102170、102156-102171、139682-139697、139762-139777或139782-139797。

[0193] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物或反义寡核苷酸靶向AR的外显子3内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域144841-144957(外显子3)、148380-148594(外显子3b)或153504-154908(外显子3d)内。在某些实施例中,靶向AR的外显子3的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:144856-144871、144938-144953、148406-148421、148443-148458或148520-148535。

[0194] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物或反义寡核苷酸靶向AR的外显子7内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域181658-181815内。在某些实施例中,靶向AR的外显子7的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的核苷酸区域181695-181710中是互补的。

[0195] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物或反义寡核苷酸靶向AR的外显子8内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域182517-189455内。在某些实施例中,靶向AR的外显子8的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的核苷酸区域182958-182973或183049-183064中是互补的。

[0196] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物或反义寡核苷酸靶向AR的内含子1内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域5594-27671或27854-102086内。在某些实施例中,靶向AR的内含子1的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域的任一项内是互补的:5666-5681、6222-6237、6701-6716、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58739、58720-58735、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58724-58739、58725-58740、58725-58740、58725-58740、58750-58769、58750-58765、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、60902-60917或67454-67469。

[0197] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物或反义寡核苷酸靶向AR的内含子2内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域102239-139550或139835-144840内。在某些实施例中,靶向AR的内含子2的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:114874-114889、115272-115287、115365-115380或134971-134986。

[0198] 在某些实施例中,当被反义化合物或反义寡核苷酸靶向时,SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域展示出至少50%抑制:3099-3114、3120-3135、3351-3366、3353-3368、3361-3376、3513-3528、3519-3534、3768-3783、3799-3814、3851-3866、3888-3903、4059-4074、4534-4549、4555-4570、4571-4586、4578-4593、4655-4670、4699-4714、4750-4765、4755-4770、4865-4880、5054-5069、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5155-5170、5265-5280、5392-5407、5448-5463、5483-5498、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58735、58720-58739、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58725-58740、58750-58765、58750-58769、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、60902-60917、67454-67469、

102156-102171、114874-114889、114874-114889、115272-115287、115365-115380、134971-134986、144856-144871、181695-181710、182958-182973以及183049-183064。

[0199] 在某些实施例中,当被反义化合物或反义寡核苷酸靶向时,SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域展示出至少60%抑制:3799-3814、3851-3866、3888-3903、4059-4074、4534-4549、4555-4570、4571-4586、4578-4593、4655-4670、4699-4714、4755-4770、4865-4880、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5155-5170、5265-5280、5392-5407、5448-5463、5483-5498、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58735、58720-58739、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58725-58740、58750-58765、58750-58769、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、67454-67469、102156-102171、115272-115287、115365-115380、144856-144871、181695-181710、182958-182973以及183049-183064。

[0200] 在某些实施例中,当被反义化合物或反义寡核苷酸靶向时,SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域展示出至少70%抑制:3799-3814、3851-3866、3888-3903、4059-4074、4534-4549、4655-4670、4699-4714、4755-4770、4865-4880、5060-5075、5062-5077、5155-5170、5265-5280、5392-5407、5448-5463、5483-5498、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、33315-33330、42017-42032、58719-58734、58720-58739、58720-58735、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58725-58740、58750-58769、58750-58765、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、102156-102171、115365-115380、144856-144871、181695-181710、182958-182973以及183049-183064。

[0201] 在某些实施例中,当被反义化合物或反义寡核苷酸靶向时,SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域展示出至少80%抑制:3799-3814、3851-3866、3888-3903、4059-4074、4534-4549、4655-4670、4699-4714、4755-4770、4865-4880、5060-5075、5062-5077、5155-5170、5265-5280、5392-5407、5448-5463、5483-5498、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10865-10880、11197-11212、13189-13204、16793-16808、58719-58734、58720-58735、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58725-58740、58750-58765、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、102156-102171、144856-144871、181695-181710、182958-182973以及183049-183064。

[0202] 在某些实施例中,当被反义化合物或反义寡核苷酸靶向时,SEQ ID NO:1的以下核苷酸区域展示出至少90%抑制:4534-4549、5060-5075、5062-5077、5155-5170、5265-5280、5448-5463、58720-58735、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58725-58740、58750-58765、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、182958-182973以及183049-183064。

[0203] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少50%抑制,ISIS ID:549332、549334、549338、549347、

549358、549360、549361、549362、549366、549371、549372、549374、549377、549379、549380、549381、549387、549390、549414、549432、549434、549457、549458、549459、560071、560098、560099、560100、560131、560132、560133、560137、569213、569215、569216、569220、569222、569223、569227、569228、569229、569236、569238、583559、583567、583608、583609、583613、583635、583638、583662、583795、583796、583799、583834、583919、584145、584148、584149、584152、584157、584158、584162、584163、584165、584166、584167、584168、584179、584180、584183、584184、584192、584233、584242、584245、584263、584269、584274、584312、584329、584361、584465、584465、584468、584469、584469、584495、584495、585233、585259、585262、585263、585264、585265、585268、585269、585271、585274、586124、586224、586224、586225、586225、586227以及586227。

[0204] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少50%抑制,SEQ ID NO:12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、29、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、46、49、53、54、55、57、59、63、92、93、95、101、125、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176以及177。

[0205] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少60%抑制,ISIS ID:549332、549334、549338、549347、549358、549360、549361、549362、549366、549371、549372、549374、549377、549379、549380、549381、549387、549390、549414、549432、549434、549457、549458、549459、560071、560098、560099、560100、560131、560137、569213、569216、569222、569228、569236、583795、583796、583799、584145、584148、584149、584152、584157、584158、584162、584163、584165、584166、584167、584168、584179、584180、584183、584184、584192、584233、584242、584245、584274、584312、584361、584468、584469、585233、585259、585262、585263、585264、585265、585268、585269、585274、586124、586224、586225以及586227。

[0206] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少60%抑制,SEQ ID NO:12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、29、31、32、33、34、35、36、37、38、38、39、40、41、42、43、92、93、95、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、170、171、173、175以及176。

[0207] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少70%抑制,ISIS ID:549332、549334、549338、549347、549358、549360、549361、549362、549366、549371、549372、549374、549377、549379、549380、549381、549387、549390、549414、549432、549434、549457、549458、549459、560071、560098、560099、560100、560131、560137、569222、584145、584148、584149、584152、584162、584163、584165、584166、584167、584168、584179、584180、584183、584184、584192、584245、584274、584469、585259、585262、585268、585269、586124、586224、586225以及586227。

[0208] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少70%抑制,SEQ ID NO:12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、29、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、43、148、149、150、151、

154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、167、170以及176。

[0209] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少80%抑制,ISIS ID:549332、549334、549338、549347、549358、549360、549361、549362、549366、549371、549372、549374、549377、549379、549380、549381、549387、549390、549414、549432、549434、549457、549458、549459、560098、560099、560100、560137、584148、584149、584152、584162、584163、584166、584180、586124、586224、586225以及586227。

[0210] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少80%抑制,SEQ ID NO:12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、29、31、32、33、34、35、36、37、39、40、41、43、149、150、151、154、155、157以及161。

[0211] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少90%抑制,ISIS ID:549358、549371、549372、549374、549377、549380、549432、549434、549457、549458、549459、560098、560099、560100、560137以及586224。

[0212] 在某些实施例中,以下反义化合物或反义寡核苷酸靶向雄激素受体核酸的一个区域并且实现雄激素受体mRNA的至少90%抑制,SEQ ID NO:16、21、22、23、24、26、33、34、35、36、37、39、40以及41。

[0213] 可以使用本领域的技术人员已知的标准方法(例如描述于实例1中)确定雄激素受体mRNA的百分比抑制。

[0214] 应理解的是,在此包含的实例中的每个SEQ ID NO中陈述的序列都独立于对糖部分、核苷间连接或核碱基的任何修饰。这样,由SEQ ID NO限定的反义化合物可以独立地包括一个或多个对糖部分、核苷间连接或核碱基的修饰。由ISIS编号(ISIS#)描述的反义化合物指示核碱基序列、化学修饰和基序的组合。

[0215] 在某些实施例中,当递送至HuVEC细胞时,如在此描述的这些化合物或组合物凭借具有以下体外 IC_{50} 中的至少一项而是有效的:小于250nM、小于200nM、小于150nM、小于100nM、小于90nM、小于80nM、小于70nM、小于65nM、小于60nM、小于55nM、小于50nM、小于45nM、小于40nM、小于35nM、小于30nM、小于25nM或小于20nM。在某些实施例中,用如在此描述的引物探针组RTS3559测量抑制。

[0216] 在某些实施例中,如在此描述的这些化合物或组合物是可高度耐受的,如通过具有与盐水处理的动物相比,不多于4倍、3倍或2倍的ALT或AST值的增加或肝脏、脾脏或肾脏重量不多于30%、20%、15%、12%、10%、5%或2%的增加中的至少一项所证实的。在某些实施例中,如在此描述的这些化合物或组合物是可高度耐受的,如通过与盐水处理的动物相比,没有ALT或AST的增加所证实的。在某些实施例中,如在此描述的这些化合物或组合物是可高度耐受的,如通过与盐水处理的动物相比,没有肝脏、脾脏或肾脏重量的增加所证实的。

[0217] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向一种AR剪接变体,该变体包括编码N-端结构域的外显子1和编码DNA结合结构域的外显子2和3,但是不包括编码短铰链区的外显子4的至少一部分或编码配体结合结构域的外显子4-8的至少一部分。这样的一种AR剪接

变体的一个实例包括但不限于AR-V7,其包含外显子1-3但缺乏外显子4-8。此类AR剪接变体的另外的实例包括例如AR3、AR4、AR4b、AR5以及AR6(分别为SEQ ID NO:4-8)。在某些实施例中,靶向AR的外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游的反义化合物能够比靶向配体结合结构域的反义化合物在更大程度上抑制雄激素受体水平,该靶向配体结合结构域的反义化合物是例如EZN-4176,其靶向外显子4并且对应于US 7,737,125中所描述的SEQ ID NO:58。

[0218] 在某些实施例中,反义化合物靶向一种AR剪接变体,该变体具有一个功能性DNA结合结构域,但是没有功能性配体结合结构域。应该理解的是,在某些实施例中,反义化合物可以靶向一种AR剪接变体,该变体包括整个的编码N-端结构域的外显子1或其至少一个功能部分和整个的编码DNA结合结构域的外显子2和3或其至少一个功能部分,但是不包括编码短铰链区的外显子4的至少一个功能部分或编码配体结合结构域的外显子4-8的至少一个功能部分。应考虑到的是,由在此提供的这些反义化合物靶向的、基本由外显子1-3组成的某些AR剪接变体还可以包括来自基因组区域或外显子4-8的核酸序列的一个非功能部分。应考虑到的是,剪接过程可以产生保留DNA结合功能,但未保留配体结合功能的此类AR剪接变体。在某些实施例中,靶向一种AR剪接变体的反义化合物能够抑制去势抗性的前列腺癌细胞的生长或增殖,该变体具有一个功能性DNA结合结构域,但是没有功能性配体结合结构域。在某些实施例中,靶向一种AR剪接变体的反义化合物能够比靶向配体结合结构域的反义化合物在更大程度上抑制抗具有式XI的二芳基乙内酰脲AR抑制剂的前列腺癌细胞的生长或增殖,该变体具有一个功能性DNA结合结构域,但是没有功能性配体结合结构域,该靶向配体结合结构域的反义化合物是例如EZN-4176,其靶向外显子4并且对应于US 7,737,125中所描述的SEQ ID NO:58。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的外显子1内,该外显子1在外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的外显子2内,该外显子2在外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的内含子1内,该内含子1在外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游。

[0219] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物能够减少全长AR和AR剪接变体两者的表达,该变体包括编码N-端结构域的外显子1和编码DNA结合结构域的外显子2和3,但是不包括编码短铰链区的外显子4的至少一部分或编码配体结合结构域的外显子4-8的任一项的至少一部分。在某些实施例中,这样的一种反义化合物靶向人雄激素受体的配体结合结构域的上游。在某些实施例中,此类反义化合物靶向人雄激素受体的在外显子3的3'端的上游。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的外显子1内,该外显子1在外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的外显子2内,该外显子2在外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的内含子1内,该内含子1在外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游。

[0220] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向一种AR剪接变体,该变体包括编码N-端结构域的外显子1和编码DNA结合结构域的外显子2和3,但是不包括编码短铰链区的外显子4的至少一部分或编码配体结合结构域的外显子4-8的至少一部分。这样的一种AR剪接变体的一个实例包括但不限于AR-V7,其包含外显子1-3但缺乏外显子4-8。

[0221] 某些实施例起草涉及以下反义化合物,该反义化合物靶向雄激素受体(AR)的配体结合结构域的上游,能够比靶向配体结合结构域的反义化合物在更大程度上抑制抗性前列腺癌细胞的生长或增殖,该靶向配体结合结构域的反义化合物是例如EZN-4176,其靶向外显子4并且对应于US7,737,125中所描述的SEQ ID NO:58。在某些实施例中,靶向人雄激素受体(AR)的配体结合结构域的上游的反义化合物靶向外显子3的3'端的上游的AR区域。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的外显子1内,该外显子1在外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的外显子2内,该外显子2在外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的内含子1内,该内含子1在外显子3的3'端的上游和/或配体结合结构域的上游。

[0222] 在某些实施例中,在此提供的经修饰的寡核苷酸的核碱基序列是与SEQ ID NO:1-8的任一项是至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%互补的,如在该经修饰的寡核苷酸的整体上所测量的。

[0223] 在某些实施例中,反义化合物是一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列与SEQ ID NO:1-8的任一项至少90%互补,如在所述经修饰的寡核苷酸的整体上所测量的。

[0224] 在某些实施例中,反义化合物是一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列与SEQ ID NO:1-8的任一项100%互补,如在所述经修饰的寡核苷酸的整体上所测量的。在某些实施例中,在此提供的化合物或经修饰的寡核苷酸是单链的。

[0225] 在某些实施例中,在此提供的经修饰的寡核苷酸由8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连接的核苷组成。在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由20个连接的核苷组成。在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成。

[0226] 在某些实施例中,在此提供的经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷间连接是经修饰的核苷间连接。在某些实施例中,每个核苷间连接都是硫代磷酸酯核苷间连接。

[0227] 在某些实施例中,该经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷包括经修饰的糖。在某些实施例中,至少一个经修饰的糖包括2'-O-甲氧基乙基基团(2'-O(CH₂)₂-OCH₃)。在某些实施例中,该经修饰的糖包括2'-O-CH₃基团。

[0228] 在某些实施例中,至少一个经修饰的糖是二环糖。在某些实施例中,该二环糖包括4'-(CH₂)_n-O-2'桥,其中n是1或2。在某些实施例中,该二环糖包括4'-CH₂-O-2'桥。在某些实施例中,该二环糖包括4'-CH(CH₃)-O-2'桥。

[0229] 在某些实施例中,在此提供的经修饰的寡核苷酸的至少一个核苷包括经修饰核碱基。在某些实施例中,该经修饰核碱基是5-甲基胞嘧啶。

[0230] 在某些实施例中,在此提供的经修饰的寡核苷酸由单链的经修饰的寡核苷酸组成。

[0231] 在某些实施例中,在此提供的化合物或组合物包括该经修饰的寡核苷酸的盐。

[0232] 组合物和用于配制药物组合物的方法

[0233] 可将反义寡核苷酸与药学上可接受的活性或惰性物质掺合,用以制备药物组合物

或配制品。组合物和用于配制药物组合物的方法取决于多个标准,包括但不限于给药途径、疾病程度、或待给予的剂量。

[0234] 可在药物组合物中利用靶向雄激素受体核酸的一种反义化合物,这是通过将该反义化合物和一种适合的药学上可接受的稀释剂或载体组合。在某些实施例中,一种药学上可接受的稀释剂是水,例如适合于注射的灭菌水。因此,在一个实施例中,在此所述的方法中采用的是一种药物组合物,该药物组合物包括靶向雄激素受体核酸一种反义化合物和一种药学上可接受的稀释剂。在某些实施例中,该药学上可接受的稀释剂是水。在某些实施例中,该反义化合物是在此提供的一种反义寡核苷酸。

[0235] 包括反义化合物的药物组合物囊括任何药学上可接受的盐、酯、或此类酯的盐、或任何其他寡核苷酸,这些寡核苷酸在被给予至一种动物(包括人类)后能够提供(直接或间接)生物上具有活性的代谢物或其残余物。因此,例如,本披露也起草涉及反义化合物的药学上可接受的盐、前药、此类前药的药学上可接受的盐、以及其他生物等效物。适合的药学上可接受的盐包括但不限于钠和钾盐。

[0236] 一种前药可包括在一种反义化合物的一端或两端处的另外的核苷的掺入,该反义化合物被体内的内源性核酸酶切割,以形成活性反义化合物。

[0237] 在某些实施例中,这些化合物或组合物进一步包括一种药学上可接受的载体或稀释剂。

[0238] 某些适应症

[0239] 本发明的某些方面针对治疗癌症的方法,包括给予在此提供的靶向雄激素受体的一种反义化合物。在某些实施例中,该癌症是AR阳性。在某些实施例中,该癌症是前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌或胃癌。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个连续的核碱基。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:12-179中任一个的核碱基序列组成。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175组成。在某些实施例中,该反义化合物是单链的。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物是ISIS 560131、ISIS 569213、ISIS 569216、ISIS 569221、ISIS 569236、ISIS 579671、ISIS 586124、ISIS 583918、ISIS 584149、ISIS 584163、ISIS 584269、或ISIS 584468。

[0240] 某些方面针对在此提供的用于治疗癌症的一种靶向雄激素受体的反义化合物。在某些实施例中,该癌症是AR阳性。在某些实施例中,该癌症是前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌或胃癌。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个连续的核碱基。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该

经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:12-179中任一个的核碱基序列组成。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175组成。在某些实施例中,该反义化合物是单链的。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物是ISIS 560131、ISIS 569213、ISIS 569216、ISIS 569221、ISIS 569236、ISIS 579671、ISIS 586124、ISIS 583918、ISIS 584149、ISIS 584163、ISIS 584269、或ISIS 584468。

[0241] 某些方面针对在此提供的一种靶向雄激素受体的反义化合物用于制造一种药物的用途,该药物用于治疗癌症。在某些实施例中,该癌症是AR阳性。在某些实施例中,该癌症是前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌或胃癌。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个连续的核碱基。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:12-179中任一个的核碱基序列组成。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175组成。在某些实施例中,该反义化合物是单链的。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物是ISIS 560131、ISIS 569213、ISIS 569216、ISIS 569221、ISIS 569236、ISIS 579671、ISIS 586124、ISIS 583918、ISIS 584149、ISIS 584163、ISIS 584269、或ISIS 584468。

[0242] 本发明的某些方面针对如在此所述的一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物用于治疗一个癌症患者的用途,该患者的癌症已对用一种抗雄激素剂(例如化合物或药物)进行的治疗变得具有抗性。在某些实施例中,所述癌症是前列腺癌。在某些实施例中,所述患者是这样一个患者,该患者或该患者的癌症已发展了对用选自以下各项的一种药剂进行治疗具有抗性:MDV3100、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个连续的核碱基。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:12-179中任一个的核碱基序列组成。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175组成。在某些实施例中,该反义化合物靶向AR的外显子1内的,例如

SEQ ID NO:1的核苷酸区域2863-5593 (外显子1) 或27672-27853 (外显子1B) 内。在某些实施例中,靶向AR的外显子1的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:2957-2972、3079-3094、3099-3114、3109-3124、3113-3128、3120-3135、3133-3148、3224-3239、3226-3241、3351-3366、3353-3368、3361-3376、3388-3403、3513-3528、3517-3532、3519-3534、3641-3656、3735-3750、3764-3779、3768-3783、3798-3813、3799-3814、3851-3866、3870-3885、3874-3889、3876-3891、3878-3893、3884-3899、3886-3901、3888-3903、3901-3916、3956-3971、3962-3977、3964-3979、3967-3982、4019-4034、4038-4053、4049-4064、4056-4071、4059-4074、4062-4077、4066-4081、4070-4085、4101-4116、4103-4118、4105-4120、4109-4124、4305-4320、4405-4420、4532-4547、4534-4549、4537-4552、4539-4554、4555-4570、4571-4586、4573-4588、4578-4593、4597-4612、4632-4647、4655-4670、4656-4671、4662-4677、4699-4714、4747-4762、4750-4765、4752-4767、4754-4769、4755-4770、4769-4784、4798-4813、4804-4819、4807-4822、4833-4848、4837-4852、4839-4854、4865-4880、4868-4883、4872-4887、4874-4889、4876-4891、4887-4902、4889-4904、4916-4931、4918-4933、4938-4953、4942-4957、4944-4959、4951-4966、5050-5065、5052-5067、5054-5069、5056-5071、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5133-5148、5141-5156、5155-5170、5265-5280、5293-5308、5308-5323、5392-5407、5448-5463、5469-5484、5481-5496、5483-5498、5486-5501、5488-5503、5494-5509、或5521-5536。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的外显子2内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域102087-102238 (外显子2) 或139551-139834 (外显子2c) 内。在某些实施例中,靶向AR的外显子2的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:102155-102170、102156-102171、139682-139697、139762-139777、或139782-139797。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的外显子3内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域144841-144957 (外显子3)、148380-148594 (外显子3b)、或153504-154908 (外显子3d) 内。在某些实施例中,靶向AR的外显子3的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:144856-144871、144938-144953、148406-148421、148443-148458、或148520-148535。在某些实施例中,在此提供的反义化合物靶向AR的内含子1内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域5594-27671或27854-102086内。在某些实施例中,靶向AR的内含子1的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:5666-5681、6222-6237、6701-6716、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58739、58720-58735、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58724-58739、58725-58740、58725-58740、58725-58740、58750-58769、58750-58765、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、60902-60917、或67454-67469。在某些实施例中,在此提供的一种反义化合物靶向AR的内含子2内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域102239-139550或139835-144840内。在某些实施例中,靶向AR的内含子2的在此提供的反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:114874-114889、115272-115287、115365-115380、或134971-134986。在某些实施例中,该反

义化合物是单链的。在某些实施例中，靶向雄激素受体的反义化合物是ISIS 560131、ISIS 569213、ISIS 569216、ISIS 569221、ISIS 569236、ISIS 579671、ISIS 586124、ISIS 583918、ISIS 584149、ISIS 584163、ISIS 584269、或ISIS 584468。

[0243] 对用一种具体的药剂(例如化合物或药物)进行治疗具有抗性意指该药剂在停止该癌症的生长或扩散方面不再那么有效或不再有效,并且因此该患者或该患者的癌症随着时间的推移已变得对该药剂具有更少响应性或敏感性。典型地,此类患者会被归类为抗所述药剂并且不再用此类药剂进行治疗。患有对选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的一种药剂具有抗性的前列腺癌的一个受试者可包括,例如,如下的一个患者,该患者先前接受所述药剂,但该患者的前列腺癌已变得对一种药剂具有更少敏感性或响应性。例如,对一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂具有抗性的前列腺癌可包括如下的前列腺癌,尽管用该药剂进行治疗,但该前列腺癌已在肿瘤体积、转移、或进展方面增加。在某些实施例中,对一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂具有抗性的前列腺癌可包括如下的前列腺癌,尽管进行治疗,该前列腺癌对该药剂而言是难治性的,并且在肿瘤体积、转移、或进展方面不减少。若干实施例涉及一种治疗受试者中前列腺癌的方法,该前列腺癌对一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂具有抗性,该方法包括将该受试者鉴别为患有抗该药剂的前列腺癌,并且向该受试者给予如在此所述的靶向人雄激素受体(AR)的外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游的一种反义化合物。若干实施例涉及一种治疗受试者中前列腺癌的方法,该前列腺癌对一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂具有抗性,该方法包括向被鉴别或诊断为患有抗所述抗雄激素剂的前列腺癌的受试者给予如在此所述的靶向人雄激素受体(AR)的外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游的一种反义化合物。在某些实施例中,对一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂具有抗性的前列腺癌细胞表达一种AR剪接变体超过全长AR。

[0244] 本发明的某些方面针对治疗遭受前列腺癌的患者的一种方法,其中该患者、或该患者的癌症已发展为或变得对用一种抗雄激素剂(化合物或药物)进行治疗具有抗性,该方法包括向所述患者给予如在此所述的靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物。在某些实施例中,所述患者是这样一个患者,该患者已发展了对用选自以下各项的一种药剂进行治疗的抗性:MDV3100、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个连续的核碱基。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:12-179中任一个的核碱基序列组成。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169

或175组成。在某些实施例中,该反义化合物是单链的。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物是ISIS 560131、ISIS 569213、ISIS 569216、ISIS 569221、ISIS 569236、ISIS 579671、ISIS 586124、ISIS 583918、ISIS 584149、ISIS 584163、ISIS 584269、或ISIS 584468。

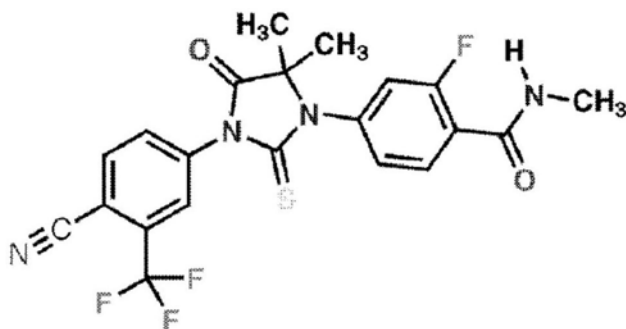
[0245] 已发展为或变得对用一种抗雄激素剂进行的治疗具有抗性的前列腺癌被称为去势抗性前列腺癌(CRPC)。因此,在一些实施例中,对一种抗雄激素剂(例如MDV3100)具有抗性的前列腺癌细胞先前被暴露于该抑制剂,并且随着时间的推移已变得对该抑制剂具有更少响应性或敏感性。例如,MDV3100可能最初抑制该患者中的前列腺癌细胞生长或增殖,但随着时间的推移,当这些细胞变得抗该抑制剂时,此类抑制效果可能被削弱。

[0246] 本发明的某些方面针对在此提供的一种靶向雄激素受体的反义化合物用于制造一种药物的用途,该药物用于治疗如下的一个患者的癌症,该患者的癌症已变得对用一种抗雄激素剂(化合物或药物)进行的治疗具有抗性。在某些实施例中,该癌症是前列腺癌。在某些实施例中,所述患者是这样一患者,该患者或该患者的癌症已发展了对用选自以下各项的一种药剂进行的治疗具有抗性:MDV3100、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个连续的核碱基。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:12-179中任一个的核碱基序列组成。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175组成。在某些实施例中,该反义化合物是单链的。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物是ISIS 560131、ISIS 569213、ISIS 569216、ISIS 569221、ISIS 569236、ISIS 579671、ISIS 586124、ISIS 583918、ISIS 584149、ISIS 584163、ISIS 584269、或ISIS 584468。

[0247] 恩杂鲁胺:

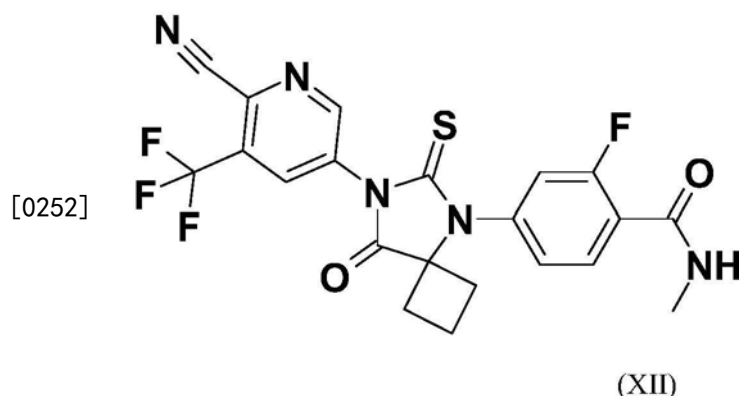
[0248] MDV3100也称为恩杂鲁胺(Xtandi™),并且IUPAC名称是4-(3-(4-氰基-3-(三氟甲基)苯基)-5,5-二甲基-4-氧代-2-硫代咪唑烷-1-基)-2-氟-N-甲基苯甲酰胺,是一种雄激素受体配体结合抑制剂,属于由式XI表示的二芳基乙内酰脲类的雄激素受体抑制剂。MDV3100具有以下式:

[0249]



[0250] MDV3100和在此提供的适合用于某些实施例的另外的二芳基乙内酰脲雄激素受体抑制剂描述于美国专利号7,709,517、美国专利申请公开号US 20100172975和美国专利申请公开号US 20100210665中,将其通过引用以其全部内容结合在此。

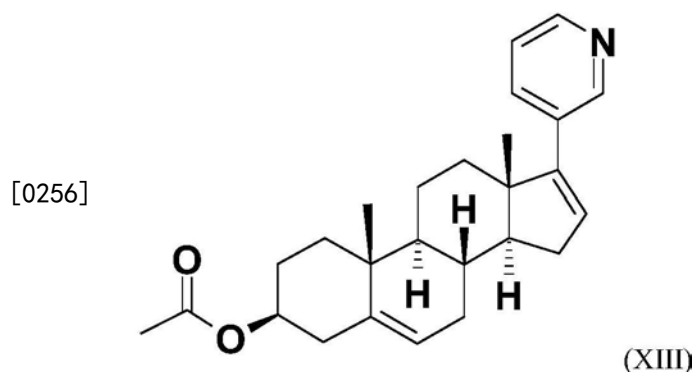
[0251] ARN-509:



[0253] 具有式XII的化合物也称为ARN-509并且IUPAC名称是4-(7-(6-氰基-5-(三氟甲基)吡啶-3-基)-6,8-二氧化-5,7-二氮杂螺[3.4]辛-5-基)-2-氟-N-甲基苯甲酰胺,是一种雄激素受体配体结合抑制剂。ARN-509和在此提供的适合用在某些实施例中的另外的雄激素受体抑制剂描述于W0 2007126765、W0 2008119015和美国专利申请公开号2013/0116258,将其通过引用以其全部内容结合在此。

[0254] 乙酸阿比特龙

[0255] 具有式XIII的化合物也被称为乙酸阿比特龙和 ZYTIGA®,并且IUPAC名称是[(3S,8R,9S,10R,13S,14S)-10,13-二甲基-17-(3-吡啶基)-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15-十二氢-1H-环戊[a]菲-3-基]乙酸盐,是一种雄激素生物合成抑制剂并且具有以下式:

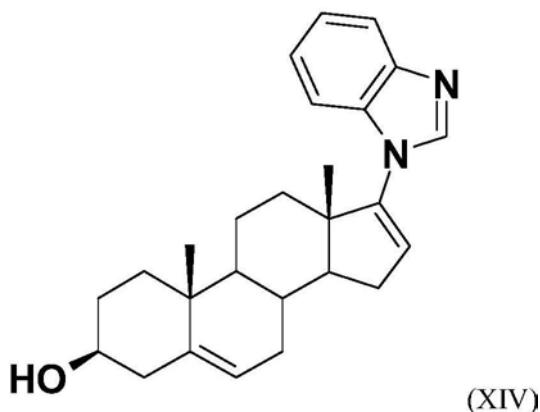


[0257] 乙酸阿比特龙的结构和合成描述于Potter等人,Journal of Medicinal Chemistry(《药物化学杂志》)(38(13),2463-71,1995)中,将其通过引用以其全部内容结合在此。

[0258] Galeterone:

[0259] 具有式XIV的化合物也称为TOK-001和Galeterone,并且IUPAC名称是(3S,10R,13S)-17-(1H-苯并[d]咪唑-1-基)-10,13-二甲基-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-十二氢-1H-环戊[a]菲-3-醇,具有以下式:

[0260]

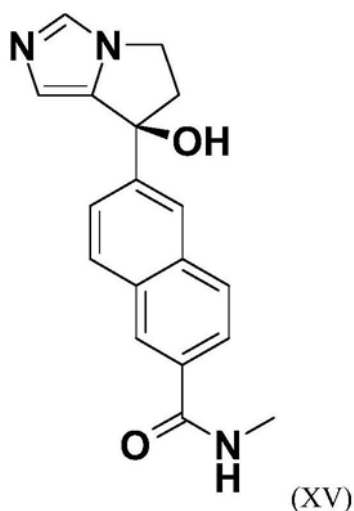


[0261] TOK-001的结构和合成描述于Handratta等人(Journal of Medicinal Chemistry (《药物化学杂志》)(2005), 48 (8), 2972-84, 2005)中, 将其通过引用以其全部内容结合在此:

[0262] Orteronel:

[0263] 具有式XV的化合物也被称为TAK-700和Orteronel, 并且IUPAC名称是6-[7(S)-羟基-6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-7-基]-N-甲基萘-2-甲酰胺被知道, 是一种雄激素生物合成抑制剂并且具有以下式:

[0264]



[0265] TAK-700的结构和合成描述于Kaku等人,Bioorganic and Medicinal Chemistry (《生物有机和药物化学》)(19 (21), 6383-99, 2011)中。

[0266] Yin等人, (Int. J. Mol. Sci. (《国际分子科学杂志》), 14 (7): 13958-13978, 2013) 讨论了用于去势抗性前列腺癌的各种药物治疗法包括ODM-21、VT464、ARN509、TAK700和TOK-001的最近进展。

[0267] 某些组合和组合疗法

[0268] 在某些实施例中, 将包括在此所述的化合物的一种第一药剂与一种或多种第二药剂进行共给予。在某些实施例中, 设计此类第二药剂来治疗与在此所述的第一药剂相同的疾病、障碍、或病症。在某些实施例中, 设计此类第二药剂来治疗与在此所述的第一药剂不同的疾病、障碍、或病症。在某些实施例中, 设计一种第一药剂来治疗一种第二药剂的不希望的副作用。在某些实施例中, 将第二药剂与该第一药剂进行共给予来治疗该第一药剂的不希望的副作用。在某些实施例中, 设计此类第二药剂来治疗在此所述的一种或多种药物

组合物的不希望副作用。在某些实施例中,将第二药剂与该第一药剂进行共给予以产生一个组合效果。在某些实施例中,将第二药剂与该第一药剂进行共给予以产生一个协同作用。在某些实施例中,该第一和第二药剂的共给予允许使用比如果将这些药剂作为单独的疗法给予而达到治疗或预防效果所需的更低的剂量。

[0269] 在某些实施例中,将在此提供的一种或多种化合物或组合物与一种或多种抗雄激素剂进行共同给予。在某些实施例中,将在此提供的一种或多种化合物或组合物和一种或多种抗雄激素剂在不同的时间进行给药。在某些实施例中,将在此提供的一种或多种化合物或组合物和一种或多种抗雄激素剂在单一配制品中一起制备。在某些实施例中,将在此提供的一种或多种化合物或组合物和一种或多种抗雄激素剂分开地进行制备。在某些实施例中,一种抗雄激素剂选自MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464。

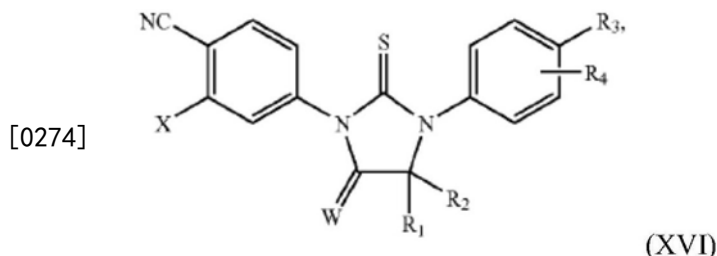
[0270] 本发明的某些方面针对与一种抗雄激素剂组合的如在此所述的一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物的用途。在具体的实施例中,此类用途是在治疗患有癌症的患者的一种方法中或在用于治疗癌症的一种药物的制造中。在某些实施例中,该癌症是选自:前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌或胃癌。具体类型的抗雄激素剂是第二代的抗激素剂,例如:恩杂鲁胺(MDV3100)、ARN-059、ODM-201、乙酸阿比特龙、Galeterone(TOK001)、orteronel(TAK700)和VT464(参见Yin等人同上)。

[0271] 某些方面起草涉及如在此所述的一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物和一种抗雄激素剂(例如一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的第二代抗激素剂)的组合。

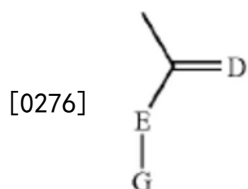
[0272] 在某些实施例中,如在此所述的一种靶向雄激素受体(AR)的反义化合物和一种抗雄激素剂(例如一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的第二代抗激素剂)的这样一种组合有助于抑制癌细胞生长或增殖和/或治疗癌症。在某些实施例中,该癌症是选自:前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌或胃癌。在某些实施例中,该癌症是前列腺癌。在某些实施例中,该癌症是乳腺癌。在某些实施例中,如在此所述的一种靶向AR的反义化合物和一种抗雄激素剂(例如一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的第二代抗激素剂)组合协同以抑制癌细胞的生长或增殖。在一些实施例中,该癌细胞是前列腺癌细胞,其是去势抗性的或已经变得去势抗性。在不同的实施例中,该癌细胞是前列腺癌细胞,其对一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的第二代抗激素剂具有抗性或已变得对其具有抗性。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个连续的核碱基。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:12-179中任一个的核碱基序列组成。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175组成。在某些实施例中,靶向雄激素受体的反义化合物是ISIS 560131、ISIS 569213、

ISIS 569216、ISIS 569221、ISIS 569236、ISIS 579671、ISIS 586124、ISIS 583918、ISIS 584149、ISIS 584163、ISIS 584269、或ISIS 584468。

[0273] 若干实施例起草涉及一种靶向人雄激素受体 (AR) 的反义化合物和一种具有式XI的二芳基乙内酰脲AR抑制剂 (例如MDV3100) 的组合。在一些实施例中, 一种二芳基乙内酰脲雄激素受体 (AR) 抑制剂是一种具有式XVI的化合物:



[0275] 其中X选自下组, 该组由三氟甲基和碘组成, 其中W选自下组, 该组由O和NR5组成, 其中R5选自下组, 该组由H、甲基组成, 并且



[0277] 其中D是S或O且E是N或O且G是烷基、芳基、经取代的烷基或经取代的芳基; 或D是S或O且E-G一起是C1-C4低级烷基,

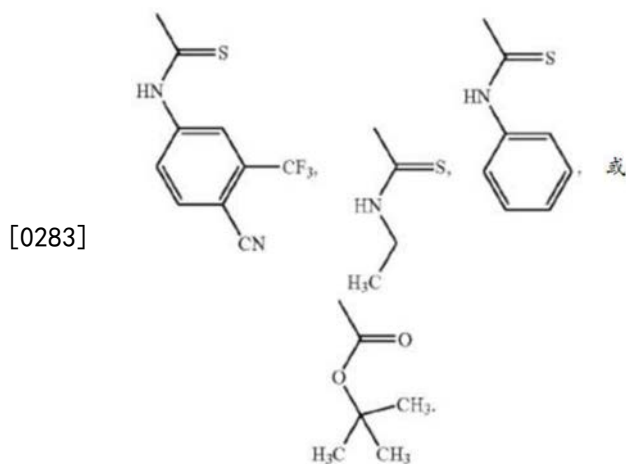
[0278] 其中R1和R2一起包括8个或更少的碳原子并且选自下组, 该组由烷基、经取代的烷基 (包括卤代烷基) 以及 (和它们相连接的碳一起) 环烷基或经取代的环烷基基团组成,

[0279] 其中R3选自下组, 该组由以下各项组成: 氢、卤素、甲基、C1-C4烷氧基、甲酰基、卤代乙酰氧基、三氟甲基、氰基、硝基、羟基、苯基、氨基、甲基氨基甲酰基、甲氧基羰基、乙酰胺基、甲磺酰氨基、甲磺酰基、4-甲磺酰基-1-哌嗪基、哌嗪基、以及任选地被羟基、甲氧基羰基、氰基、氨基、胺基、硝基、氨基甲酰基取代的C1-C6烷基或烯基、或经取代的氨基甲酰基 (包括甲基氨基甲酰基、二甲基氨基甲酰基和羟基乙基氨基甲酰基),

[0280] 其中R4选自下组, 该组由以下各项组成: 氢、卤素、烷基和卤代烷基, 并且

[0281] 其中R3不是甲基氨基甲基或二甲基氨基甲基。

[0282] R5可以是



[0284] 在某些实施例中,一种靶向雄激素受体(AR)的反义化合物和一种具有式XVI的二芳基乙内酰脲AR抑制剂(例如MDV3100)的这样一种组合有助于抑制前列腺癌细胞生长或增殖和/或治疗前列腺癌。在某些实施例中,一种靶向AR的反义化合物和一种具有式XVI的二芳基乙内酰脲AR抑制剂(例如MDV3100)组合协同以抑制前列腺癌细胞的生长或增殖。在一些实施例中,该前列腺癌细胞是去势抗性的。在不同的实施例中,该前列腺癌细胞对一种具有式XVI的二芳基乙内酰脲AR抑制剂,例如MDV3100具有抗性。在某些实施例中,该前列腺癌细胞或去势抗性前列腺癌细胞优先表达AR剪接变体超过全长AR。在某些实施例中,如在此所述的靶向AR的反义化合物和另一种抗雄激素剂用于通过同时、分开或顺序地给予这两种药剂进行的组合治疗。在某些实施例中,这两种药剂被配制为一种固定剂量的组合产物。在其他实施例中,将这两种药剂作为分开的单位提供给该患者,然后可将其同时或连续地(顺序地)服用。

[0285] 在某些实施例中,与另一种抗雄激素剂(例如一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的第二代抗激素剂)组合,有助于抑制前列腺癌细胞和/或去势抗性前列腺癌细胞生长或增殖的反义化合物靶向人雄激素受体的外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的一种反义化合物靶向如在此所述的AR的外显子1、外显子2、外显子3、内含子1、或内含子2内。

[0286] 在某些实施例中,在此提供的一种反义化合物靶向一个AR剪接变体,该AR剪接变体包括编码N端结构域的外显子1以及编码DNA结合结构域的外显子2和3,但不包括编码短铰链区的外显子4的至少一部分或编码配体结合结构域的外显子4-8的至少一部分。此AR剪接变体的一个实例包括但不限于AR-V7,该AR-V7包含外显子1-3但缺少外显子4-8。此类AR剪接变体的另外实例包括,例如,AR3、AR4、AR4b、AR5、以及AR6(分别是SEQ ID NO:4-8)。在某些实施例中,该前列腺癌细胞(其可以是去势抗性的)优先表达AR剪接变体超过全长AR。在具体的实施例中,该前列腺癌细胞对一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂是去势抗性的。在某些实施例中,与一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂组合,靶向AR的外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游的一种反义化合物能够抑制前列腺癌细胞(包括去势抗性前列腺癌细胞)的生长或增殖,其抑制程度比与相同的选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂组合的一种反义化合物(该反义化合物靶向配体结合结构域,例如EZN-4176,其靶向外显子4并对应于US 7,737,125中所述的SEQ ID NO:58)的抑制程度更大。在某些实施例中,如在此所述的一种反义化合物和选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂的组合在抑制前列腺癌细胞(例如去势抗性前列腺癌细胞)的生长或增殖方面,与该反义化合物单独或该选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂单独相比,提供了一个协同(例如大于加和)作用。因此,在某些实施例中,当组合使用时,该反义化合物和/或选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂中任一者或两者的量可少于该反义化合物单独或该选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂单独任一者为达到前列腺癌细胞生长或增殖抑制的等效水平所需的相应量。

[0287] 在某些实施例中,与一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、

TAK700和VT464的抗雄激素剂组合,在此提供的用于抑制前列腺癌细胞和/或去势抗性前列腺癌细胞生长或增殖的一种反义化合物靶向一个AR剪接变体,该AR剪接变体具有功能性DNA结合结构域,但不具有功能性配体结合结构域。应理解,在某些实施例中,一种反义化合物可靶向一个AR剪接变体,该AR剪接变体包括编码N端结构域的外显子1的整个或至少一个功能部分以及编码DNA结合结构域的外显子2和3的整个或至少一个功能部分,但不包括编码短铰链区的外显子4的至少一个功能部分或编码配体结合结构域的外显子4-8的至少一个功能部分。在此考虑了被在此提供的基本上由外显子1-3组成的反义化合物靶向的某些AR剪接变体还可包括来自一个基因组区域或外显子4-8的核酸序列的一个非功能部分。在此考虑了该剪接过程可导致此类保留了DNA结合功能而未保留配体结合功能的AR剪接变体。在某些实施例中,该前列腺癌细胞(其可以是去势抗性的)优先表达AR剪接变体超过全长AR。在某些实施例中,该前列腺癌细胞对选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂是去势抗性的。在某些实施例中,在此提供的一种反义化合物靶向AR的外显子1内,该外显子1是外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的一种反义化合物靶向如在此所述的AR的外显子1、外显子2、外显子3、内含子1、或内含子2内。

[0288] 在某些实施例中,与一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂组合,靶向具有功能性DNA结合结构域,但不具有功能性配体结合结构域的一个AR剪接变体的一种反义化合物能够抑制前列腺癌细胞(包括去势抗性前列腺癌细胞)的生长或增殖,其程度比与相同的选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂组合的一种反义化合物(该反义化合物靶向配体结合结构域,例如EZN-4176,其靶向外显子4并对应于US 7,737,125中所述的SEQ ID NO: 58)的抑制程度更大。在某些实施例中,一种反义化合物和选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂的组合在抑制前列腺癌细胞(例如去势抗性前列腺癌细胞)的生长或增殖方面,与该反义化合物单独或该抗雄激素剂单独相比,提供了一个协同(例如大于加和)作用。因此,在某些实施例中,当组合使用时,该反义化合物和/或选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂中任一者或两者的量可少于该反义化合物单独或抗雄激素剂单独任一者为达到前列腺癌细胞生长或增殖抑制的等效水平所需的相应量。

[0289] 在某些实施例中,与一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂组合,在此提供的用于抑制前列腺癌细胞和/或去势抗性前列腺癌细胞生长或增殖的一种反义化合物能够降低全长AR和如下的一个AR剪接变体两者的表达,该AR剪接变体包括编码N端结构域的外显子1以及编码DNA结合结构域的外显子2和3,但不包括编码短铰链区的外显子4的至少一部分或编码配体结合结构域的外显子4-8中任一个的至少一部分。在某些实施例中,这样一种反义化合物靶向人雄激素受体的配体结合结构域上游。在某些实施例中,此类反义化合物靶向人雄激素受体的外显子3的3'端上游。在某些实施例中,在此提供的一种反义化合物靶向AR的外显子1内,该外显子1是在外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游。

[0290] 在某些实施例中,提供了如在此所述的一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物和一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂

的组合,其中该反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个连续的核碱基。在某些实施例中,提供了一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物和一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂的组合,其中该反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一个。在某些实施例中,提供了一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物和一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂的组合,其中该反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:12-179中任一个的核碱基序列组成。在某些实施例中,提供了一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物和一种具有式XI的二芳基乙内酰脲AR抑制剂(例如MDV3100)的组合,其中该反义化合物包括一种经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175组成。在某些实施例中,提供了一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物和一种具有式XI的二芳基乙内酰脲AR抑制剂(例如MDV3100)的组合,其中该靶向雄激素受体的反义化合物是ISIS 560131、ISIS 569213、ISIS 569216、ISIS 569221、ISIS 569236、ISIS 579671、ISIS 586124、ISIS 583918、ISIS 584149、ISIS 584163、ISIS 584269、或ISIS 584468。

[0291] 若干实施例起草涉及一种抑制前列腺癌细胞生长或增殖的方法,该方法包括使该前列腺癌细胞接触一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物和一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂。在某些实施例中,该反义化合物和一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂组合协同以抑制该前列腺癌细胞的生长或增殖。在一些实施例中,该前列腺癌细胞是去势抗性的。在不同实施例中,该前列腺癌细胞通过对一种选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂具有抗性而是去势抗性的。在某些实施例中,该前列腺癌细胞或去势抗性前列腺癌细胞优先表达AR剪接变体超过全长AR。

[0292] 在前述实施例中任一个的某些方面中,与一种具有式XVI的二芳基乙内酰脲AR抑制剂(例如MDV3100)组合,用于抑制前列腺癌细胞生长或增殖的反义化合物可靶向(i)人雄激素受体的外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游或(ii)具有功能性DNA结合结构域,但不具有功能性配体结合结构域的一个AR剪接变体;和/或能够(i)降低全长AR和如下的一个AR剪接变体两者的表达,该AR剪接变体包括编码N端结构域的外显子1以及编码DNA结合结构域的外显子2和3,但不包括编码短铰链区的外显子4的至少一部分或编码配体结合结构域的外显子4-8中任一个的至少一部分;条件是,这些反义化合物不具有如下的核碱基序列,该核碱基序列由以下表A中鉴别的SEQ ID NO:194-215中任一个组成。

[0293] 表A

[0294]

SEQ ID NO:	序列
194	GAGAACCATCCTCACC
195	GGACCAGGTAGCCTGT
196	CCCCTGGACTCAGATG

197	GCACAAGGAGTGGGAC
198	GCTGTGAAGAGAGTGT
199	TTTGACACAAGTGGGA
200	GTGACACCCAGAAGCT
201	CATCCCTGCTTCATAA
202	TGGGGAGAACCATCCTCACCTGC
203	TCCAGGACCAGGTAGCCTGTGGGG
204	TGTTCCCTGGACTCAGATGCTCC
205	TGGGGCACAAGGAGTGGGACGCAC
206	TTCGGCTGTGAAGAGAGTGTGCCA
207	CGCTTTTGACACAAGTGGGACTGG
208	CATAGTGACACCCAGAAGCTTCAT
209	GAGTCATCCCTGCTTCATAACATT
210	CTGTGAAGAGAGTG
211	TGTGAAGAGAGT
212	TTGACACAAGTGGG
213	TGACACAAGTGG
214	TGACACCCAGAAGC
215	GACACCCAGAAG

[0295] 在前述实施例中任一个的某些方面中,用于抑制对选自:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464的抗雄激素剂具有抗性的前列腺癌细胞的生长或增殖的反义化合物可靶向(i)人雄激素受体的外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游或(ii)具有功能性DNA结合结构域,但不具有功能性配体结合结构域的一个AR剪接变体;和/或能够(i)降低全长AR和如下的一个AR剪接变体两者的表达,该AR剪接变体包括编码N端结构域的外显子1以及编码DNA结合结构域的外显子2和3,但不包括编码短铰链区的外显子4的至少一部分或编码配体结合结构域的外显子4-8中任一个的至少一部分;或(ii)抑制该具有抗性的前列腺癌细胞的生长或增殖的程度比一种靶向配体结合结构域的反义化合物(例如EZN-4176)更大;条件是,这些反义化合物不具有如下的核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:194-215(US 7,737,125中描述为SEQ ID NO:2-9、49-50、52-53、55-56、以及86-93(此处通过引用结合),并且在表A中鉴别)中任一个组成。

[0296] 某些方面针对用如在此所述的一种靶向人雄激素受体(AR)的反义寡核苷酸治疗乳腺癌的方法和抑制乳腺癌细胞生长或增殖的方法。在某些实施例中,该乳腺癌具有以下特点中的一个或多个:雄激素受体阳性、生长依赖于雄激素、雌激素受体(ER)阴性、生长不依赖于雌激素、孕酮受体(PR)阴性、生长不依赖于孕酮、或Her2/neu阴性。在某些实施例中,该乳腺癌或乳腺癌细胞是顶浆分泌的。

[0297] 某些实施例起草涉及一种治疗受试者的乳腺癌的方法,该方法包括向该受试者给予一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物。某些实施例起草涉及一种治疗受试者的乳腺癌的方法,该方法包括鉴别患有乳腺癌的受试者和向该受试者给予一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物,从而治疗该受试者的乳腺癌。某些实施例针对一种抑制乳腺癌细胞的

生长或增殖的方法,该方法包括使该乳腺癌细胞接触一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物。某些实施例涉及抑制患有乳腺癌或具有患乳腺癌风险的受试者中AR表达的一种方法,该方法包括鉴别受试者乳腺癌,并向该受试者给予一种靶向人AR的反义化合物,其中该反义化合物抑制该受试者中的AR表达。

[0298] 在某些实施例中,该乳腺癌或乳腺癌细胞具有以下特点中的一个或多个:雄激素受体阳性、生长依赖于雄激素、雌激素受体(ER)阴性、生长不依赖于雌激素、孕酮受体(PR)阴性、生长不依赖于孕酮、或Her2/neu阴性。在某些实施例中,该乳腺癌或乳腺癌细胞是ER、PR、以及HER2三阴性的和AR阳性的(ER⁻、PR⁻、HER2⁻、AR⁺)。在某些实施例中,该乳腺癌或乳腺癌细胞是ER阴性的和AR阳性的(ER⁻、AR⁺)。在某些实施例中,该乳腺癌或乳腺癌细胞是ER阳性的和AR阳性的(ER⁺、AR⁺)。

[0299] 在某些实施例中,该乳腺癌或乳腺癌细胞是顶浆分泌的。顶浆分泌的乳腺癌常是“三阴性的”,意指这些细胞不表达ER、PR、或HER2受体,并且通常(而不是必要地)是AR阳性的。在某些实施例中,一种顶浆分泌的乳腺癌或乳腺癌细胞是ER、PR、以及HER2三阴性的和AR阳性的(ER⁻、PR⁻、HER2⁻、AR⁺)。在某些实施例中,一种顶浆分泌的乳腺癌或乳腺癌细胞是ER阴性的和AR阳性的(ER⁻、AR⁺)。在某些实施例中,一种顶浆分泌的乳腺癌或乳腺癌细胞源自于胸部的汗腺。在某些实施例中,一种顶浆分泌的乳腺癌或乳腺癌细胞是乳腺的一种导管癌症或癌细胞。在某些实施例中,一种顶浆分泌的乳腺癌可具有以下特点中的任一个或多个:大量的嗜酸性颗粒小体细胞质、明确定义的边缘、大的泡状核、约1:2的核质比、和/或分泌颗粒积聚在顶端细胞质(称为顶端吻部)中。

[0300] 在某些实施例中,该乳腺癌或乳腺癌细胞是一种ER阴性的和AR阳性的(ER⁻、AR⁺)分子顶浆分泌的乳腺癌或乳腺癌细胞。在某些方面,一种ER阴性的和AR阳性的(ER⁻、AR⁺)分子顶浆分泌的乳腺癌或乳腺癌细胞可进一步是PR阳性、PR阴性、HER2阴性、或HER2阳性的。

[0301] 乳腺癌可通过标准组织学技术被识别为相对于激素受体(例如ER、PR、或HER2)是阳性或阴性的。例如,当少于1%的细胞表明对雌激素和孕激素受体的核染色,并且根据相关的ASCO和CAP指南,HER2的免疫组织化学染色显示0、1倍、或2倍的阳性得分以及少于1.8的FISH比(HER2基因信号与染色体17信号)时,组织学的乳腺癌样品可被归类为“三阴性”(ER⁻、PR⁻、HER2⁻)。(Meyer, P. 等人, PLoS ONE (《公共科学图书馆综合》) 7 (5): e38361 (2012))。

[0302] 在某些实施例中,在此提供的一种用于治疗乳腺癌或抑制乳腺癌细胞靶的生长或增殖的反义化合物靶向AR的外显子1内,该外显子1是在外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的一种反义化合物靶向AR的外显子1内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域2863-5593(外显子1)或27672-27853(外显子1B)内。在某些实施例中,在此提供的靶向AR的外显子1的一种反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:3353-3368、3361-3376、3519-3534、3735-3750、3768-3783、3798-3813、3799-3814、3851-3866、3870-3885、3874-3889、3888-3903、4047-4062、4062-4077、4109-4124、4534-4549、4537-4552、4555-4570、4571-4586、4573-4588、4578-4593、4655-4670、4750-4765、4752-4767、4833-4848、4837-4852、4839-4854、4865-4880、4872-4887、4874-4889、4876-4891、4916-4931、4918-4933、5052-5067、5054-5069、5060-5075、5061-5076、5061-5076、5062-5077、5155-5170、5265-5280、5293-5308、5392-5407、5448-5463、5483-5498、

5486-5501、或5494-5509。

[0303] 在某些实施例中,在此提供一种反义化合物靶向AR的外显子2内,该外显子2是在外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供一种用于治疗乳腺癌或抑制乳腺癌细胞靶的生长或增殖的反义化合物靶向AR的外显子2内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域102087-102238(外显子2)或139551-139834(外显子2c)内。在某些实施例中,在此提供的靶向AR的外显子2的一种反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:102155-102170或102156-107171。

[0304] 在某些方面,在此提供一种用于治疗乳腺癌或抑制乳腺癌细胞的生长或增殖的反义化合物靶向AR的内含子1内,该内含子1是在外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供一种反义化合物靶向AR的内含子1内,例如SEQ ID NO:1的核苷酸区域5594-27671或27854-102086内。在某些方面,在此提供的靶向AR的内含子1的一种反义化合物在SEQ ID NO:1的任何以下核苷酸区域内是互补的:5666-5681、6701-6716、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58735、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58725-58740、58750-58765、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、或58755-58770。

[0305] 在前述实施例中任一个的某些方面中,用于治疗乳腺癌或抑制乳腺癌细胞的生长或增殖的反义化合物靶向人雄激素受体的外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游。在某些实施例中,在此提供的反义化合物(包括但不限于靶向人雄激素受体的外显子3的3'端上游和/或配体结合结构域的上游的那些)可治疗乳腺癌或抑制乳腺癌细胞的生长或增殖,其抑制程度比一种靶向配体结合结构域的反义化合物(例如EZN-4176)的制程度更大;条件是,这些反义化合物不具有如下的核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:194-215(US 7,737,125中描述为SEQ ID NO:2-9、49-50、52-53、55-56、以及86-93(此处通过引用结合),并且在表A中鉴别)中任一个组成。

[0306] 反义化合物

[0307] 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。一种寡聚化合物可以对一个靶标核酸是“反义”的,意指能够通过氢键合经受与靶标核酸的杂交。

[0308] 在某些实施例中,一种反义化合物具有如下的一个核碱基序列,当以5'至3'方向编写时,该核碱基序列包括所靶向的一个靶标核酸的靶标区段的反向互补序列。在某些此类实施例中,一个反义寡核苷酸具有如下的一个核碱基序列,当以5'至3'方向编写时,该核碱基序列包括所靶向的一个靶标核酸的靶标区段的反向互补序列。

[0309] 在某些实施例中,一种反义化合物在长度上是10-30个亚单位。在某些实施例中,一种反义化合物在长度上是12至30个亚单位。在某些实施例中,一种反义化合物在长度上是12至22个亚单位。在某些实施例中,一种反义化合物在长度上是14至30个亚单位。在某些实施例中,一种反义化合物在长度上是14至20个亚单位。在某些实施例中,一种反义化合物在长度上是15至30个亚单位。在某些实施例中,一种反义化合物在长度上是15至20个亚单

位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是16至30个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是16至20个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是17至30个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是17至20个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是18至30个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是18至21个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是18至20个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是20至30个亚单位。换句话说，此类反义化合物分别是12至30个连接的亚单位、14至30个连接的亚单位、14至20个亚单位、15至30个亚单位、15至20个亚单位、16至30个亚单位、16至20个亚单位、17至30个亚单位、17至20个亚单位、18至30个亚单位、18至20个亚单位、18至21个亚单位、20至30个亚单位、或12至22个连接的亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是14个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是16个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是17个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是18个亚单位。在某些实施例中，一种反义化合物在长度上是20个亚单位。在其他实施例中，该反义化合物是8至80、12至50、13至30、13至50、14至30、14至50、15至30、15至50、16至30、16至50、17至30、17至50、18至22、18至24、18至30、18至50、19至22、19至30、19至50、或20至30个连接的亚单位。在某些此类实施例中，这些反义化合物在长度上是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，或由以上值中任两个所定义的范围。在一些实施例中，该反义化合物是一种反义寡核苷酸，并且这些连接的亚单位是核苷酸。

[0310] 在某些实施例中，反义寡核苷酸可以是缩短的或截短的。例如，可以从5'末端(5'截短)、或可替代地从3'末端(3'截短)删除单个亚单位。靶向一种雄激素受体核酸的一种缩短的或截短的反义化合物可从该反义化合物的5'末端删除两个亚单位，或可替代地，可从该反义化合物的3'末端删除两个亚单位。可替代地，所删除的核苷可贯穿该反义化合物散布，例如，在从5'末端删除了一个核苷以及从3'末端删除了一个核苷的一种反义化合物中。

[0311] 当一个单另外的亚单位存在于一种加长的反义化合物中时，该另外的亚单位可位于该反义化合物的5'或3'端。当两个或更多个另外的亚单位存在时，所添加的亚单位可以彼此相邻，例如，在向5'末端(5'添加)或可替代地3'末端(3'添加)添加了两个亚单位的反义化合物中。可替代地，所添加的亚单位可贯穿该反义化合物散布，例如，在向5'末端添加了一个亚单位以及向3'末端添加了一个亚单位的一种反义化合物中。

[0312] 有可能增加或减少一种反义化合物(例如一种反义寡核苷酸)的长度，和/或引入错配碱基而不消除活性。例如，于Woolf等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国国家科学院院刊》)89:7305-7309,1992)，在一个卵母细胞注射模型中，将在长度上13-25个核碱基的一系列反义寡核苷酸针对其诱导一个靶标RNA切割的能力进行测试。靠近这些反义寡核苷酸的末端处具有8或11个错配碱基的在长度上25个核碱基的反义寡核苷酸能够引导该靶标mRNA的特异性切割(尽管是与不包含错配的反义寡核苷酸相比更小的程度)。类似地，靶标特异性切割是使用13个核碱基反义寡核苷酸(包括具有1或3个错配的那些)达到。

[0313] Gautschi等人(J.Natl.Cancer Inst.(《欧洲癌症杂志》)93:463-471,2001年3月)证明了与bcl-2mRNA具有100%互补性和与bcl-xL mRNA具有3个错配的一个寡核苷酸减少

bcl-2和bcl-xL两者的体外和体内表达的能力。此外,这个寡核苷酸证明了强有力的体内抗肿瘤活性。

[0314] Maher和Dolnick (Nuc.Acid.Res. (《核酸研究》) 16:3341-3358,1988) 在一个兔网织红细胞测定中,分别将一系列串联的14个核碱基反义寡核苷酸以及一个由这些串联的反义寡核苷酸的两个或三个的序列构成的28和42个核碱基反义寡核苷酸针对其停滞人DHFR的翻译的能力进行了测试。这三个14个核碱基反义寡核苷酸中每个单独能够抑制翻译(尽管与这些28或42个核碱基反义寡核苷酸相比是更温和的水平)。

[0315] 某些反义化合物基序和机制

[0316] 在某些实施例中,反义化合物具有以模式或基序安排的经化学修饰的亚单位以向这些反义化合物赋予特性,例如增强的抑制活性、增加的对靶标核酸的结合亲和力、或对被体内核酸酶降解的抗性。

[0317] 嵌合的反义化合物典型地包含至少一个经修饰的区域,以赋予增加的对核酸酶降解的抗性、增加的细胞摄取、增加的对靶标核酸的结合亲和力、和/或增加的抑制活性。一种嵌合的反义化合物的一个第二区域可赋予另一个希望的特性,例如充当细胞核酸内切酶RNase H的底物,该RNase H切割一个RNA:DNA双链体的RNA链。

[0318] 反义活性可能起因于涉及该反义化合物(例如,寡核苷酸)与一种靶标核酸的杂交的任何机制,其中该杂交最后导致生物效应。在某些实施例中,该靶标核酸的量和/或活性被调节。在某些实施例中,该靶标核酸的量和/或活性被减少。在某些实施例中,该反义化合物杂交至该靶标核酸最后导致靶标核酸降解。在某些实施例中,该反义化合物杂交至该靶标核酸不会导致靶标核酸降解。在某些此类实施例中,与该靶标核酸杂交的反义化合物的存在(占据)导致反义活性的调节。在某些实施例中,具有具体化学基序或模式的化学修饰的反义化合物特别适于利用一个或多个机制。在某些实施例中,反义化合物通过多于一个机制和/或通过还未阐明的机制发挥功能。因此,在此所述的反义化合物不受具体机制的限制。

[0319] 反义机制包括(不受限制)RNase H介导的反义;RNAi机制(利用RISC通路并包括(不受限制)siRNA、ssRNA和microRNA机制);以及基于占据的机制。某些反义化合物可通过超过一种此类机制和/或通过另外的机制起作用。

[0320] RNaseH介导的反义

[0321] 在某些实施例中,反义活性至少部分起因于RNase H对靶标RNA的降解。RNase H是一种切割RNA:DNA双链体的RNA链的细胞内切核酸酶。本领域已知“DNA样”的单链反义化合物引发哺乳动物细胞中的RNase H活性。因此,包括DNA或DNA样核苷的至少一部分的反义化合物可激活RNase H,导致该靶标核酸的切割。在某些实施例中,利用RNase H的反义化合物包括一个或多个经修饰的核苷。在某些实施例中,此类反义化合物包括至少一个区块的1-8个经修饰的核苷。在某些此类实施例中,该经修饰的核苷不支持RNase H活性。在某些实施例中,如在此所述的,此类反义化合物是缺口体。在某些此类实施例中,该缺口体的缺口包括DNA核苷。在某些此类实施例中,该缺口体的缺口包括DNA样核苷。在某些此类实施例中,该缺口体的缺口包括DNA核苷和DNA样核苷。

[0322] 具有缺口体基序的某些反义化合物被视为嵌合的反义化合物。在缺口体中,内部区域位于外部区域之间,该内部区域具有支持RNase H切割的多个核苷酸,该外部区域具有

在化学上不同于内部区域的核苷的多个核苷酸。在具有缺口体基序的反义寡核苷酸的情况下,该缺口区段通常充当内切核酸酶切割的底物,而翼区段包括经修饰的核苷。在某些实施例中,缺口体的各区域由构成每个不同的区域的糖部分的类型来区分。用于区分缺口体的各区域的糖部分的类型在有些实施例中可包括 β -D-核糖核苷、 β -D-脱氧核糖核苷、2'-修饰的核苷(这样的2'-修饰的核苷可包括2'-MOE和2'-O-CH₃等等)、以及双环糖修饰的核苷(这样的双环糖修饰的核苷可包括具有受约束的乙基的那些)。在某些实施例中,这些翼中的核苷可包括若干经修饰的糖部分,包括例如2'-MOE以及双环糖部分(例如受约束的乙基或LNA)。在某些实施例中,翼可包括若干经修饰的和未经修饰的糖部分。在某些实施例中,翼可包括2'-MOE核苷、双环糖部分(例如受约束的乙基核苷或LNA核苷)、以及2'-脱氧核苷的不同组合。

[0323] 每个不同的区域可包括统一的糖部分、变体的、或交替的糖部分。翼-缺口-翼基序常被描述为“X-Y-Z”,其中“X”代表5'翼的长度,“Y”代表缺口的长度,而“Z”代表3'翼的长度。“X”和“Z”可包括统一的、变体的、或交替的糖部分。在某些实施例中,“X”和“Y”可包括一个或多个2'-脱氧核苷。“Y”可包括2'-脱氧核苷。如此处使用的,描述为“X-Y-Z”的一个缺口体具有如下的构型,以使得该缺口的位置紧邻该5'-翼和该3'翼中每个。因此,在该5'-翼和缺口、或该缺口和该3'-翼之间不存在介入的核苷酸。在此所述的反义化合物中的任一种可具有一个缺口体基序。在某些实施例中,“X”和“Z”是相同的;在其他实施例中,它们是不同的。在某些实施例中,“Y”是8与15个之间的核苷。X、Y、或Z可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30或更多个核苷中任一个。

[0324] 在某些实施例中,靶向一种雄激素受体核酸的反义化合物具有一个缺口体基序,其中该缺口由6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、或16个连接的核苷组成。

[0325] 在某些实施例中,该反义寡核苷酸具有如以下的式A所述的一个糖基序: (J)_m - (B)_n - (J)_p - (B)_r - (A)_t - (D)_g - (A)_v - (B)_w - (J)_x - (B)_y - (J)_z

[0326] 其中:

[0327] 每个A独立地是一个2'-取代的核苷;

[0328] 每个B独立地是一个双环核苷;

[0329] 每个J独立地是一个2'-取代的核苷或一个2'-脱氧核苷;

[0330] 每个D是一个2'-脱氧核苷;

[0331] m是0-4;n是0-2;p是0-2;r是0-2;t是0-2;v是0-2;w是0-4;x是0-2;y是0-2;z是0-4;g是6-14;

[0332] 其条件是:

[0333] m、n、以及r中至少一个不是0;

[0334] w和y中至少一个不是0;

[0335] m、n、p、r、以及t的总和是从2至5;并且

[0336] v、w、x、y、和z的总和是从2至5。

[0337] RNAi化合物

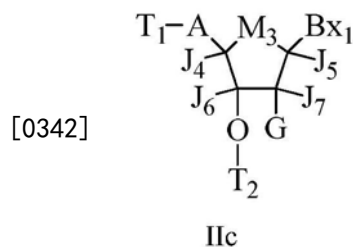
[0338] 在某些实施例中,反义化合物是干扰RNA化合物(RNAi),其包括双链RNA化合物(也称为短的干扰RNA或siRNA)以及单链RNAi化合物(或ssRNA)。此类化合物至少部分通过RISC通路起作用,以降解和/或整合一个靶标核酸(因此,包括微小RNA/微小RNA-模拟化合物)。

在某些实施例中,反义化合物包括如下修饰,这些修饰使它们特别适于此类机制。

[0339] i. ssRNA化合物

[0340] 在某些实施例中,包括那些特别适合作为单链RNAi化合物(ssRNA)的反义化合物包括一个经修饰的5'-末端。在某些此类实施例中,该5'-末端包括一个经修饰的磷酸酯部分。在某些实施例中,此类经修饰的磷酸酯是稳定的(例如对降解/切割具有抗性,相比于未经修饰的5'-磷酸酯而言)。在某些实施例中,此类5'-末端核苷使该5'-含磷部分稳定。某些经修饰的5'-末端核苷在本领域中找到,例如在W0/2011/139702中。

[0341] 在某些实施例中,一种ssRNA化合物的5'-核苷具有式IIc:

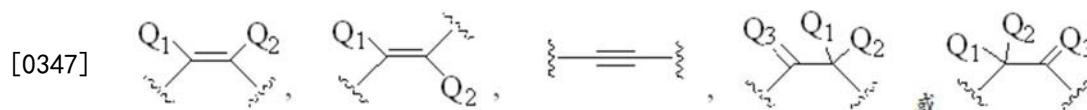


[0343] 其中:

[0344] T₁是一个可任选被保护的含磷部分;

[0345] T₂是一个将具有式IIc的化合物连接到该寡聚化合物的核苷间连接基团;

[0346] A具有以下式之一:



[0348] Q₁和Q₂各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、取代的C₂-C₆炔基或N(R₃)(R₄);

[0349] Q₃是O、S、N(R₅)或C(R₆)(R₇);

[0350] 每个R₃、R₄、R₅、R₆和R₇独立地是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基或C₁-C₆烷氧基;

[0351] M₃是O、S、NR₁₄、C(R₁₅)(R₁₆)、C(R₁₅)(R₁₆)C(R₁₇)(R₁₈)、C(R₁₅)=C(R₁₇)、OC(R₁₅)(R₁₆)或OC(R₁₅)(Bx₂);

[0352] R₁₄是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基;

[0353] R₁₅、R₁₆、R₁₇和R₁₈各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基;

[0354] Bx₁是一个杂环碱基部分;

[0355] 或者如果Bx₂存在,那么Bx₂是一个杂环碱基部分,并且Bx₁是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基;

[0356] J₄、J₅、J₆和J₇各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基;

[0357] 或者J₄与J₅或J₇中一者形成一个桥,其中所述桥包括从1至3个连接的二基基团,该二基基团选自O、S、NR₁₉、C(R₂₀)(R₂₁)、C(R₂₀)=C(R₂₁)、C[=C(R₂₀)(R₂₁)]和C(=O),并且J₅、J₆和J₇中另外两者各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-

C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；

[0358] 每个R₁₉、R₂₀和R₂₁独立地是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；

[0359] G是H、OH、卤素或O-[C(R₈)(R₉)]_n-(C=O)_m-X₁]-Z；

[0360] 每个R⁸和R⁹独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基或取代的C₁-C₆烷基；

[0361] X₁是O、S或N(E₁)；

[0362] Z是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、取代的C₂-C₆炔基或N(E₂)(E₃)；

[0363] E₁、E₂和E₃各自独立地是H、C₁-C₆烷基或取代的C₁-C₆烷基；

[0364] n是从1至约6；

[0365] m是0或1；

[0366] j是0或1；

[0367] 每个取代的基团包括一个或多个任选地被保护的取代基，这些取代基独立地选自卤素、OJ₁、N(J₁)(J₂)、=NJ₁、SJ₁、N₃、CN、OC(=X₂)J₁、OC(=X₂)N(J₁)(J₂)和C(=X₂)N(J₁)(J₂)；

[0368] X₂是O、S或NJ₃；

[0369] 每个J₁、J₂和J₃独立地是H或C₁-C₆烷基；

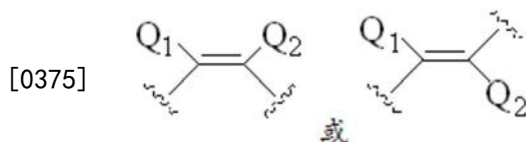
[0370] 当j是1时，则Z不是卤素或N(E₂)(E₃)；并且

[0371] 其中所述寡聚化合物包括从8至40个单体亚单位，并且可杂交到一个靶标核酸的至少一个部分上。

[0372] 在某些实施例中，M₃是O、CH=CH、OCH₂或OC(H)(Bx₂)。在某些实施例中，M₃是O。

[0373] 在某些实施例中，J₄、J₅、J₆和J₇各自是H。在某些实施例中，J₄与J₅或J₇中一者形成桥。

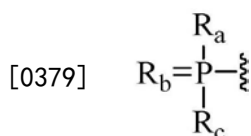
[0374] 在某些实施例中，A具有以下式之一：



[0376] 其中：

[0377] Q₁和Q₂各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基或取代的C₁-C₆烷氧基。在某些实施例中，Q₁和Q₂各自是H。在某些实施例中，Q₁和Q₂各自独立地是H或卤素。在某些实施例中，Q₁和Q₂是H，并且Q₁和Q₂中另一个是F、CH₃或OCH₃。

[0378] 在某些实施例中，T₁具有以下式：



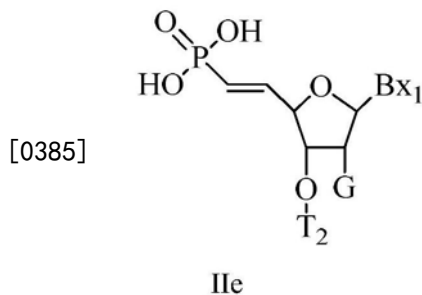
[0380] 其中：

[0381] R_a和R_c各自独立地是被保护的羟基、被保护的硫醇、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、被保护的氨基或取代的氨基；并且

[0382] R_b是O或S。在某些实施例中，R_b是O，并且R_a和R_c各自独立地是OCH₃、OCH₂CH₃或CH(CH₃)₂。

[0383] 在某些实施例中,G是卤素、 OCH_3 、 OCH_2F 、 OCHF_2 、 OCF_3 、 OCH_2CH_3 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{F}$ 、 OCH_2CHF_2 、 OCH_2CF_3 、 $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-SCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-OCF}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-ON}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-O}(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$ 、 $\text{OCH}_2\text{C(=O)-N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$ 、 $\text{OCH}_2\text{C(=O)-N}(\text{R}_{12})\text{-(CH}_2)_2\text{-N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})$ 或 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{R}_{12})\text{-C(=NR}_{13})[\text{N}(\text{R}_{10})(\text{R}_{11})]$,其中 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地是H或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基。在某些实施例中,G是卤素、 OCH_3 、 OCF_3 、 OCH_2CH_3 、 OCH_2CF_3 、 $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-O}(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{OCH}_2\text{C(=O)-N(H)CH}_3$ 、 $\text{OCH}_2\text{C(=O)-N(H)-(CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ 或 $\text{OCH}_2\text{-N(H)-C(=NH)NH}_2$ 。在某些实施例中,G是F、 OCH_3 或 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-OCH}_3$ 。在某些实施例中,G是 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-OCH}_3$ 。

[0384] 在某些实施例中,该5'-端核苷具有式IIe:



[0386] 在某些实施例中,反义化合物(包括特别适于ssRNA的那些)包括以一个定义的模式或糖修饰基序沿一个寡核苷酸或其区域安排一个或多个类型的经修饰的糖部分和/或天然发生的糖部分。此类基序可包括此处所讨论的糖修饰中任一个和/或其他已知的糖修饰。

[0387] 在某些实施例中,该寡核苷酸包括具有统一糖修饰的一个区域或由其组成。在某些此类实施例中,该区域的每个核苷包括相同的RNA样糖修饰。在某些实施例中,该区域的每个核苷是一个2'-F核苷。在某些实施例中,该区域的每个核苷是一个2'-OMe核苷。在某些实施例中,该区域的每个核苷是一个2'-MOE核苷。在某些实施例中,该区域的每个核苷是一个cEt核苷。在某些实施例中,该区域的每个核苷是一个LNA核苷。在某些实施例中,该统一的区域构成该寡核苷酸的全部或基本上全部。在某些实施例中,该区域构成除了1-4端核苷之外的整个寡核苷酸。

[0388] 在某些实施例中,寡核苷酸包括交替的糖修饰的一个或多个区域,其中该核苷在具有第一类型的糖修饰的核苷酸和具有第二类型的糖修饰的核苷酸之间交替。在某些实施例中,两个类型的核苷都是RNA样核苷。在某些实施例中,这些交替的核苷选自:2'-OMe、2'-F、2'-MOE、LNA、以及cEt。在某些实施例中,这些交替的修饰是2'-F和2'-OMe。这样的区域是连续的或可以被不同地修饰的核苷或共轭的核苷打断。

[0389] 在某些实施例中,交替的修饰的交替的区域每个由单个核苷组成(即,该模式是 $(\text{AB})_x\text{A}_y$,其中A是具有第一类型的糖修饰的核苷,并且B是具有第二类型的糖修饰的核苷;x是1-20,并且y是0或1)。在某些实施例中,交替基序中的一个或多个交替区域包括超过一个某类型的单个核苷。例如,寡核苷酸可包括任何以下核苷基序中任的一个或多个区域:

[0390] AABBA;

[0391] ABBABB;

[0392] AABAAB;

[0393] ABBABAABB;

[0394] ABABAA;

[0395] AABABAB;

[0396] ABABAA;

[0397] ABBAABBABABAA;

[0398] BABBAABBABABAA;或

[0399] ABABBAABBABABAA;

[0400] 其中A是第一类型的核苷,并且B是第二类型的核苷。在某些实施例中,A和B各自选自2'-F、2'-OMe、BNA、和MOE。

[0401] 在某些实施例中,具有这样一个交替基序的寡核苷酸还包括经修饰的5'端核苷,例如具有式IIc或IIe的那些。

[0402] 在某些实施例中,寡核苷酸包括具有2-2-3基序的区域。这样的区域包括以下基序:

[0403] $-(A)_2-(B)_x-(A)_2-(C)_y-(A)_3-$

[0404] 其中:A是第一类型的经修饰的核苷;

[0405] B和C是其修饰不同于A的核苷,然而B和C可具有与彼此相同或不同的修饰;

[0406] x和y是从1至15。

[0407] 在某些实施例中,A是一个2'-OMe修饰的核苷。在某些实施例中,B和C都是2'-F修饰的核苷。在某些实施例中,A是一个2'-OMe修饰的核苷,并且B和C都是2'-F修饰的核苷。

[0408] 在某些实施例中,寡核苷酸具有以下糖基序:

[0409] $5'-(Q)-(AB)_{x-y}-(D)_z$

[0410] 其中:

[0411] Q是一个包括稳定的磷酸酯部分的核苷。在某些实施例中,Q是一个具有式IIc或IIe的核苷;

[0412] A是第一类型的经修饰的核苷;

[0413] B是第二类型的经修饰的核苷;

[0414] D是经修饰的核苷,其包括与其邻近核苷不同的修饰。因此,如果y是0,那么对D的修饰必须与B不同,并且如果y是1,那么对D的修饰必须与A不同。在某些实施例中,D不同于A和B两者。

[0415] X是5-15;

[0416] Y是0或1;

[0417] Z是0-4。

[0418] 在某些实施例中,寡核苷酸具有以下糖基序:

[0419] $5'-(Q)-(A)_x-(D)_z$

[0420] 其中:

[0421] Q是一个包括稳定的磷酸酯部分的核苷。在某些实施例中,Q是一个具有式IIc或IIe的核苷;

[0422] A是第一类型的经修饰的核苷;

[0423] D是经修饰的核苷,其包括与A不同的修饰。

[0424] X是11-30;

[0425] Z是0-4。

[0426] 在某些实施例中,以上基序中的A、B、C、以及D选自:2'-OMe、2'-F、2'-MOE、LNA、以及cEt。在某些实施例中,D表示末端核苷。在某些实施例中,未将此类末端核苷设计为与该靶标核酸杂交(尽管一个或多个可能偶然杂交)。在某些实施例中,每个D核苷的核碱基是腺嘌呤,不论在该靶标核酸的相应位置处的核碱基的同一性。在某些实施例中,每个D核苷的核碱基是胸腺嘧啶。

[0427] 在某些实施例中,反义化合物(包括特别适合用作ssRNA的那些)包括以一个定义的模式或经修饰的核苷间连接基序沿该寡核苷酸或其区域安排的经修饰的核苷间连接。在某些实施例中,寡核苷酸包括一个具有交替的核苷间连接基序的区域。在某些实施例中,寡核苷酸包括经统一修饰的核苷间连接的一个区域。在某些此类实施例中,该寡核苷酸包括如下的一个区域,该区域被硫代磷酸酯核苷间连接统一地连接。在某些实施例中,该寡核苷酸被硫代磷酸酯核苷间连接统一地连接。在某些实施例中,该寡核苷酸的每个核苷间连接选自磷酸二酯和硫代磷酸酯。在某些实施例中,该寡核苷酸的每个核苷间连接选自磷酸二酯和硫代磷酸酯,并且至少一个核苷间连接是硫代磷酸酯。

[0428] 在某些实施例中,该寡核苷酸包括至少6个硫代磷酸酯核苷间连接。在某些实施例中,该寡核苷酸包括至少8个硫代磷酸酯核苷间连接。在某些实施例中,该寡核苷酸包括至少10个硫代磷酸酯核苷间连接。在某些实施例中,该寡核苷酸包括至少一个区块的至少6个连续的硫代磷酸酯核苷间连接。在某些实施例中,该寡核苷酸包括至少一个区块的至少8个连续的硫代磷酸酯核苷间连接。在某些实施例中,该寡核苷酸包括至少一个区块的至少10个连续的硫代磷酸酯核苷间连接。在某些实施例中,该寡核苷酸包括至少一个区块的至少12个连续的硫代磷酸酯核苷间连接。在某些此类实施例中,至少一个这样的区块位于该寡核苷酸的3'端。在某些此类实施例中,至少一个这样的区块位于该寡核苷酸的3'端的3个核苷内。

[0429] 在此所述的具有任何这些不同糖基序的寡核苷酸可具有任何连接基序。例如,这些寡核苷酸(包括但不限于上述的那些)可具有非限制性地选自下表的一个连接基序:

[0430]	最5'的连接	中心区域	3'-区域
	PS	交替的P0/PS	6PS
	PS	交替的P0/PS	7PS
	PS	交替的P0/PS	8PS

[0431] ii.siRNA化合物

[0432] 在某些实施例中,反义化合物是双链RNAi化合物(siRNA)。在此类实施例中,一条或两条链可以包括如上针对ssRNA描述的任何修饰基序。在某些实施例中,ssRNA化合物可以是未经修饰的RNA。在某些实施例中,siRNA化合物可以包括未经修饰的RNA核苷,但不包括经修饰的核苷间连接。

[0433] 若干实施例涉及双链组合物,其中每一条链包括由一个或多个经修饰的或未经修饰的核苷的位置限定的一个基序。在某些实施例中,提供的组合物包括全部或至少部分地杂交以形成一个双链体区的一个第一和一个第二寡聚化合物并且进一步包括与靶核酸互补或杂交的一个区域。适合地是,这样一种组合物包括一个第一寡聚化合物(反义链,与靶核酸具有完全或部分互补)和一个第二寡聚化合物(有义链,具有与该第一寡聚化合物互补或与该第一寡聚化合物的形成至少一个双链体区的一个或多个区域)。

[0434] 若干实施例的组合物通过与靶核酸杂交导致其正常功能丧失来调节基因表达。在一些实施例中,该靶核酸是雄激素受体。在某些实施例中,通过与本发明组合物形成的活化RISC复合体促进靶雄激素受体的降解。

[0435] 若干实施例针对双链组合物,其中这些链中的一条有用于,例如,影响相反链优先加载到RISC(或切割)复合体中。这些组合物用于靶向所选择的核酸分子并调节一个或多个基因的表达。在一些实施例中,本发明的组合物与靶RNA的一部分杂交以使该靶RNA丧失正常的功能。

[0436] 某些实施例起草涉及双链组合物,其中两条链都包括半体(hemimer)基序、全修饰基序、定点修饰基序以及交替基序。本发明组合物的每条链可以是经修饰的以满足特定作用,例如在siRNA通路中。在每一条链中使用不同的基序或在每一条链中使用具有不同化学修饰的相同基序允许靶向RISC复合体的反义链,同时抑制有义链的掺入。在这一模型内,每条链可以是独立地经修饰的以使得其特定作用得以增强。该反义链可以是在5'-端经修饰的以增强其在RISC的一个区域中的作用,而3'-端可以是经不同修饰的以增强其在RISC的不同区域中的作用。

[0437] 该双链寡核苷酸分子可以是包括自我互补的有义区和反义区的双链多核苷酸分子,其中反义区包括与靶核酸分子中的核苷酸序列或其部分互补的核苷酸序列并且有义区具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列。该双链寡核苷酸分子可以组装自两个分开的寡核苷酸,其中一条链是有义链并且另一条链是反义链,其中该反义链和有义链是自我互补的(即,每一条链包括与另一条链的核苷酸序列互补的核苷酸序列;例如其中反义链和有义链形成一个双链体或双链结构,例如其中该双链区是约15至约30,例如,约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个碱基对;该反义链包括与靶核酸分子或其一部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列并且该有义链包括对应于该靶核酸序列或其一部分的核苷酸序列(例如,该双链寡核苷酸分子的约15至约25或更多个核苷酸与该靶核酸或其一部分互补)。可替代地,该双链寡核苷酸组装自单寡核苷酸,其中该siRNA的自我互补的有义和反义区借助一个或多个基于核酸的或基于非核酸的连接物进行连接。

[0438] 该双链寡核苷酸可以是具有双链体、非对称双链体、发夹或非对称发夹二级结构、具有自我互补的有义区和反义区的多核苷酸,其中反义区包括与分离的靶核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列并且有义区具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列。该双链寡核苷酸可以是环状单链多核苷酸,该环状单链多核苷酸具有两个或更多个环结构以及一个包括自我互补的有义区和反义区的茎,其中反义区包括与靶核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列并且有义区具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列,并且其中该环状多核苷酸可以在体内或在体外进行加工以产生能够介导RNAi的活性siNA分子。

[0439] 在某些实施例中,该双链寡核苷酸包括分开的有义和反义序列或区域,其中该有义区和反义区如本领域所知的由核苷酸或非核苷酸连接物分子共价地连接,或可替代地由离子相互作用、氢键合、范德瓦耳斯(van der waals)相互作用、疏水性相互作用、和/或堆积作用非共价地连接。在某些实施例中,该双链寡核苷酸包括与靶基因的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在另一个实施例中,该双链寡核苷酸以一种导致靶基因的表达的抑制的方式与该靶基因的核苷酸序列相互作用。

[0440] 如在此使用的,双链寡核苷酸无须局限于那些仅包含RNA的分子,而是进一步涵盖经用化学方法修饰的核苷酸以及非核苷酸。在某些实施例中,短干扰核酸分子缺乏包含2'-羟基(2'-OH)的核苷酸。在某些实施例中,短干扰核酸分子任选地不包括任何核糖核苷酸(例如,具有2'-羟基基团的核苷酸)。然而在该分子内不需要用来支持RNAi的核糖核苷酸的存在,此类双链寡核苷酸可以具有包含一个或多个具有2'-OH基团的核苷酸的一个或多个附接连接物、或其他附接或相关基团、部分、或链。任选地,该双链寡核苷酸可以在该核苷酸位置的约5%、10%、20%、30%、40%、或50%处包括核糖核苷酸。如在此使用的,术语siRNA意在相当于用来描述核酸分子的其他术语,这些核酸分子能够介导序列特异性RNAi,例如短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微小-RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、短干扰寡核苷酸、短干扰核酸、短干扰经修饰的寡核苷酸、用化学方法修饰的siRNA(chemically-modified siRNA)、转录后基因沉默RNA(ptgsRNA)、以及其他。此外,如在此使用,术语RNAi意在相当于用来描述序列特异性RNA干扰(例如转录后基因沉默)、翻译抑制、或表观遗传学的其他术语。例如,双链寡核苷酸可以用来表观遗传地在转录后水平以及转录前水平两者处使基因沉默。在一个非限制性实例中,本发明siRNA分子对基因表达的表观遗传调节可源自染色质结构的siRNA介导的修饰或甲基化模式以改变基因表达(参见,例如,Verdel等人,2004,Science(《科学》),303,672-676;Pal-Bhadra等人,2004,Science(《科学》),303,669-672;Allshire,2002,Science(《科学》),297,1818-1819;Volpe等人,2002,Science(《科学》),297,1833-1837;Jenuwein,2002,Science(《科学》),297,2215-2218;以及Hall等人,2002,Science(《科学》),297,2232-2237)。

[0441] 构思了在此提供的若干实施例的化合物和组合物可以靶向雄激素受体,这是通过dsRNA-介导的基因沉默或RNAi机制,包括,例如“发夹”或茎-环双链RNA效应分子(其中具有自我互补的序列的单链RNA能够假定双链构象),或双链dsRNA效应分子(包括RNA的两条分开的链)。在不同实施例中,dsRNA完全由核糖核苷酸组成或由核糖核苷酸和脱氧核苷酸的混合物组成,例如像如下各项所披露的RNA/DNA杂交体,WO 00/63364,2000年4月19日提交,或U.S.序列号60/130,377,1999年4月21日提交。dsRNA或dsRNA效应分子可以是具有自我互补区的单个分子,以使得该分子一个区段中的核苷酸与该分子另一个区段中的核苷酸碱基配对。在多个实施例中,由单个分子组成的dsRNA完全由核糖核苷酸组成或包括与一个脱氧核糖核苷酸区互补的一个核糖核苷酸区。可替代地,该dsRNA可以包括具有一个彼此互补的区的两条不同的链。

[0442] 在不同实施例中,两条链完全由核糖核苷酸组成,一条链完全由核糖核苷酸组成并且一条链完全由脱氧核糖核苷酸组成,或者一条或两条链包含核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸的混合物。在某些实施例中,这些互补区彼此地并且与靶核酸序列具有至少70%、80%、90%、95%、98%、或100%互补性。在某些实施例中,以双链构象存在的dsRNA区包括以dsRNA表示的cDNA或其他靶核酸序列中的至少19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、50、75、100、200、500、1000、2000或5000个核苷酸或包括全部核苷酸。在一些实施例中,dsRNA不包含任何单链区,例如单链末端,或dsRNA是一个发夹。在其他实施例中,dsRNA具有一个或多个单链区或悬突。在某些实施例中,RNA/DNA杂交体包括作为一个反义链或区的DNA链或区(例如,与靶核酸具有至少70%、80%、90%、95%、98%、或100%互补性)以及作为一个有义链或区的RNA链或区(例如,与靶核酸具有至少70%、80%、90%、95%、98%、或

100%同一性),并且反之亦然。

[0443] 在不同实施例中,该RNA/DNA杂交体是在体外使用酶或化学合成方法制成,这些化学合成方法是例如在此描述的那些或在以下各项中描述的那些,W0 00/63364,2000年4月19日提交,或U.S.序列号60/130,377,1999年4月21日提交。在其他实施例中,体外合成的DNA链与体内或体外制成的RNA在该DNA链转化进入细胞之前、之后、或同时进行复合。在又其他实施例中,dsRNA是包含有义和反义区的单一环状核酸,或dsRNA包括环状核酸以及一个第二环状核酸或线状核酸(参见,例如,W0 00/63364,2000年4月19日提交,或U.S.序列号60/130,377,1999年4月21日提交。示例性环状核酸包括套索结构,其中核苷酸的游离的5'磷酸基变为与另一个核苷酸的2'羟基以回环的方式连接。

[0444] 在其他实施例中,dsRNA包括一个或多个经修饰的核苷酸,其中在糖中的2'位置包含一个卤素(例如,氟基团)或包含烷氧基(例如,甲氧基),这与其中对应的2'位置包含氢或羟基的对应的dsRNA相比,增加了dsRNA体外或体内半衰期。在又其他实施例中,除天然发生的磷酸二酯连接之外,dsRNA在相邻核苷酸之间包括一个或多个连接。此类连接的实例包括磷酸胺、硫代磷酸酯、以及二硫代磷酸酯连接。dsRNA还可以是经化学修饰的核酸分子,如在美国专利号No.6,673,661中传授的。在其他实施例中,dsRNA包含一个或两个加帽的链,这是例如通过以下各项披露的:W000/63364,2000年4月19日提交,或U.S.序列号60/130,377,1999年4月21日提交。

[0445] 在其他实施例中,dsRNA可以是W0 00/63364中披露的任何至少部分的dsRNA分子,以及美国临时申请60/399,998;以及美国临时申请60/419,532,和PCT/US 2003/033466中描述的任何dsRNA分子,将其传授内容通过引用结合在此。使用在此描述的方法或标准方法(如W0 00/63364中描述的那些),这些dsRNA中的任一个可以体外或体内表达。

[0446] 占用

[0447] 在某些实施例中,不预期反义化合物将导致经RNase H的靶核酸的切割或将导致通过RISC通路的切割或整合。在某些此类实施例中,反义活性可以产生自占用,其中杂交的反义化合物的存在破坏了靶核酸的活性。在某些此类实施例中,该反义化合物可以是经统一修饰的或可以包括修饰和/或经修饰的以及未经修饰的核苷的混合物。

[0448] 靶核酸、靶区域以及靶序列

[0449] 编码人雄激素受体的核苷酸序列包括但不限于以下各项:GENBANK登录号NT_011669.17_TRUNC_5079000_5270000(在此结合为SEQ ID NO:1)、GENBANK登录号NM_000044.3(在此结合为SEQ ID NO:2)、GENBANK登录号NM_001011645.2(在此结合为SEQ ID NO:3)、GENBANK登录号FJ235916.1(在此结合为SEQ ID NO:4)、GENBANK登录号FJ235917.1(在此结合为SEQ ID NO:5)、GENBANK登录号FJ235918.1(在此结合为SEQ ID NO:6)、GENBANK登录号FJ235919.1(在此结合为SEQ ID NO:7)、以及GENBANK登录号FJ235920.1(在此结合为SEQ ID NO:8)。

[0450] 雄激素受体mRNA编码若干个功能结构域。在某些实施例中,全长雄激素受体mRNA包括外显子1(编码N-端结构域)、外显子2和3(编码DNA结合结构域)、外显子4(编码短铰链区)、以及外显子4-8(编码配体结合结构域)。

[0451] 在某些实施例中,通过在此提供的反义化合物可靶向的雄激素受体剪接变体包括外显子1(编码N-端结构域)以及外显子2和3(编码DNA结合结构域),或其功能部分,但不包

括外显子4(编码短铰链区)的至少一部分或外显子4-8(编码配体结合结构域)的至少一部分。此类AR剪接变体的实例包括但不限于AR-V1、AR-V2、AR-V3、AR-V4、AR-V5、AR-V6、以及AR-V7(还称作AR3),其包括外显子1-3但缺乏外显子4-8。AR-V1、AR-V2、AR-V3、AR-V4、AR-V5、AR-V6、AR-V7、以及另外的通过在此提供的反义化合物可靶向的剪接变体描述于Hu等人,Cancer Res.《癌症研究》2009;69:16-22以及美国专利申请公开号US 2010/0068802,将各自通过引用以其全文结合在此。通过在此提供的反义化合物可靶向的此类AR剪接变体的另外的实例包括但不限于AR3、AR4、AR4b、AR5、以及AR6(分别是SEQ ID NO:4-8)),如描述于Guo等人,Cancer Res.《癌症研究》2009;69:2305-13,将其通过引用以其全文结合在此。

[0452] 杂交

[0453] 在一些实施例中,杂交可以发生在本文披露的反义化合物和雄激素受体之间。最常见的杂交机制涉及核酸分子的互补核碱基之间的氢键键合(例如,沃森-克里克、胡斯坦或反向胡斯坦氢键键合)。

[0454] 杂交能在不同的条件下发生。严谨条件依赖于序列,并且由待杂交的核酸分子的性质和组成决定。

[0455] 测定序列是否能够与靶核酸特异性杂交的方法是本领域公知的。在某些实施例中,在此提供的反义化合物能够与雄激素受体特异性地杂交。

[0456] 互补性

[0457] 当足够数目的反义化合物的核碱基能与靶核酸中对应的核碱基氢键键合时,所述反义化合物和所述靶核酸彼此互补,由此将产生期望的作用(例如,对靶核酸例如雄激素受体核酸的反义抑制)。

[0458] 反义化合物和雄激素受体核酸之间的非互补核碱基可以被容忍,只要该反义化合物仍然能够与靶核酸特异性地杂交。另外,反义化合物可以杂交到雄激素受体核酸的一个或多个区段上,使得间插或相邻区段不涉及在杂交事件中(例如,环结构、错配或发夹结构)。

[0459] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物或其具体部分是,或至少是与雄激素受体核酸、靶区域、靶区段、或其具体部分具有70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%互补性。反义化合物与靶核酸的百分比互补性可以使用常规方法测定。

[0460] 例如,在反义化合物的20个核碱基中有18个与靶区域互补并因此可特异性杂交的反义化合物代表百分之九十的互补性。在该实例中,剩余的非互补核碱基可以与互补核碱基成簇或散布,不需要彼此连续或与互补核碱基连续。因此,长度为18个核碱基,具有由与靶核酸完全互补的两个区域侧接的四个非互补核碱基的反义化合物将与靶核酸具有77.8%的总互补性,并且因此将包含在本发明的范围内。使用本领域已知的BLAST程序(基本局部比对搜索工具)和PowerBLAST程序(Altschul等人,J.Mol.Biol.《分子生物学杂志》,1990,215,403410;Zhang和Madden,Genome Res.《基因组研究》,1997,7,649656)能够常规确定反义化合物与靶核酸区域的互补性百分数。例如通过Gap程序(Wisconsin序列分析软件包,用于Unix的版本8,Genetics Computer Group,University Research Park, Madison Wis.(美国威斯康星州麦迪逊,大学研究园,遗传学计算组)),使用采用Smith和Waterman算法(Adv.Appl.《高等数学应用》)1981,2,482489)的缺省设置能够确定同源性、

序列同一性或互补性百分数。

[0461] 在某些实施例中,在此提供的反义化合物或其具体部分与靶核酸或其具体部分完全互补(即,100%互补)。例如,反义化合物可以是与雄激素受体核酸、或其靶区域、或靶区段或靶序列完全互补的。如在此使用的,“完全互补”是指反义化合物的每个核碱基都能够与靶核酸的对应核碱基进行精确碱基配对。例如,20个核碱基反义化合物与400个核碱基长的靶序列完全互补,只要存在与该反义化合物完全互补的靶核酸的相应的20个核碱基部分。当提及该第一和/或第二核酸的具体部分时,也可以使用完全互补。例如,30个核碱基的反义化合物的20个核碱基部分与400个核碱基长的靶序列可以是“完全互补”。该30个核碱基的寡核苷酸的20个核碱基部分与该靶序列(如果该靶序列具有相应的20个核碱基部分,其中每个核碱基与该反义化合物的20个核碱基部分互补)是完全互补的。同时,整个30个核碱基的反义化合物可以完全或可以不完全与靶序列互补,取决于该反义化合物的剩余10个核碱基是否也与该靶序列互补。

[0462] 非互补核碱基的位置可以是在反义化合物的5'末端或3'末端。可替代地,一个或多个非互补核碱基可以在反义化合物的内部位置。当存在两个或更多个非互补核碱基时,它们可以是连续的(即连接的)或不连续的。在一个实施例中,非互补核碱基位于缺口体反义寡核苷酸的翼区段。

[0463] 在某些实施例中,长度是,或长度高达11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个核碱基的反义化合物相对于靶核酸例如雄激素受体核酸或其具体部分包括不多于4、不多于3、不多于2、或不多于1个非互补核碱基。

[0464] 在某些实施例中,长度是,或长度高达11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或30个核碱基的反义化合物相对于靶核酸例如雄激素受体核酸或其具体部分包括不多于6、不多于5、不多于4、不多于3、不多于2、或不多于1个非互补核碱基。

[0465] 所提供的反义化合物还包括那些与靶核酸的一部分互补的。如在此使用的,“部分”是指靶核酸的一个区域或区段内确定数目的连续的(即连接的)核碱基。一“部分”也可以指反义化合物的确定数目的连续核碱基。在某些实施例中,反义化合物与靶区段的至少8个核碱基的部分是互补的。在某些实施例中,反义化合物与靶区段的至少9个核碱基的部分是互补的。在某些实施例中,反义化合物与靶区段的至少10个核碱基的部分是互补的。在某些实施例中,反义化合物与靶区段的至少11个核碱基的部分是互补的。在某些实施例中,反义化合物与靶区段的至少12个核碱基的部分是互补的。在某些实施例中,反义化合物与靶区段的至少13个核碱基的部分是互补的。在某些实施例中,反义化合物与靶区段的至少14个核碱基的部分是互补的。在某些实施例中,反义化合物与靶区段的至少15个核碱基的部分是互补的。还构思了与靶区段的至少9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、或更多个核碱基的部分或由这些值中任意两个限定的范围互补的反义化合物。

[0466] 同一性

[0467] 本文提供的反义化合物也可以与特定核苷酸序列、SEQ ID NO或由特定Isis编号代表的化合物或其部分具有确定的百分比同一性。如本文使用的,如果反义化合物具有与本文公开的序列相同的核碱基配对能力,那么该反义化合物与本文公开的该序列是同一的。例如,代替披露的DNA序列中的胸腺嘧啶而含有尿嘧啶的RNA可以被认为与该DNA序列是

同一的,因为尿嘧啶和胸腺嘧啶均与腺嘌呤配对。还涵盖本文描述的反义化合物的缩短和延长形式以及相对于本文提供的反义化合物具有非同一性碱基的化合物。非同一性碱基可以彼此相邻或分散在整个反义化合物中。反义化合物的百分比同一性根据相对于与它进行比较的序列具有同一性碱基配对的碱基数来计算。

[0468] 在某些实施例中,反义化合物或其部分与在此披露的这些反义化合物或SEQ ID NO的一个或多个,或其部分具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0469] 在某些实施例中,反义化合物部分与靶核酸的相同长度部分相比。在某些实施例中,8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或25个核碱基部分与靶核酸的相同长度部分相比。

[0470] 在某些实施例中,反义寡核苷酸的部分与靶核酸的相同长度的部分相比。在某些实施例中,8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或25个核碱基部分与靶核酸的相同长度部分相比。

[0471] 修饰

[0472] 核苷是碱基-糖组合。核苷的核碱基(也称作碱基)部分通常是杂环碱基部分。核苷酸是进一步包括与核苷的糖部分共价连接的磷酸基团的核苷。对于那些包含呋喃戊糖基糖(pentofuranosyl sugar)的核苷,磷酸基团可以与糖的2'、3'或5'羟基部分连接。寡核苷酸通过相邻核苷彼此共价连接形成,从而形成线性聚合寡核苷酸。在寡核苷酸结构中,磷酸基团通常是指形成寡核苷酸的核苷间连接。

[0473] 对反义化合物的修饰包括替代或改变核苷间连接、糖部分或核碱基。修饰的反义化合物相对于天然形式通常是优选的,原因是期望的性质,例如,例如,增强的细胞摄取、增强的对靶核酸的亲合力、在核酸酶存在时增加的稳定性、或增加的抑制活性。

[0474] 化学修饰的核苷也可以用于增加缩短或截短的反义寡核苷酸对其靶核酸的结合亲合力。因此,使用具有这类化学修饰核苷的较短的反义化合物通常能获得可比的结果。

[0475] 经修饰的核苷间连接

[0476] RNA和DNA中天然存在的核苷间连接是3'到5'的磷酸二酯连接。具有一个或多个修饰的,即非天然存在的核苷间连接的反义化合物通常被选择为优于具有天然存在的核苷间连接的反义化合物,原因是期望的性质,例如像,增强的细胞摄取、增强的对靶核酸的亲合力、和在核酸酶存在时增加的稳定性。

[0477] 具有经修饰的核苷间连接的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷间连接以及不含磷原子的核苷间连接。代表性的含磷核苷间连接包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、磷酸甲酯、氨基磷酸酯和硫代磷酸酯。制备含磷和非含磷连接的方法是熟知的。

[0478] 在某些实施例中,靶向雄激素受体核酸的反义化合物包括一个或多个经修饰的核苷间连接。在某些实施例中,该经修饰的核苷间连接是硫代磷酸酯连接。在某些实施例中,反义化合物的每个核苷间连接均为硫代磷酸酯核苷间连接。

[0479] 经修饰的糖部分

[0480] 反义化合物可以任选地包含一个或多个核苷,其中糖基是经修饰的。此类糖经修饰的核苷可以赋予反义化合物以核酸酶稳定性、增加的结合亲合力或一些其他的有益的生物学特性。在某些实施例中,核苷包括经化学修饰的呋喃核糖环部分。经化学修饰的呋喃核

糖环的实例包括但不限于,取代基的添加(包括5'和2'取代基,非偕环原子的桥接以形成二环核酸(BNA),核糖基环氧原子被S、N(R)、或C(R₁)(R₂)(R、R₁和R₂各自独立地是H、C₁-C₁₂烷基或保护基)替换及其组合。经化学修饰的糖的实例包括2'-F-5'-甲基取代的核苷(参见PCT国际申请W0 2008/101157,公开日为8/21/08,另外披露了5',2'-双取代的核苷)或具有S的核糖基环氧原子进一步在2'-位置发生取代(参见公开的美国专利申请US 2005-0130923,公开日为2005年6月16日)或可替代地BNA的5'-取代(参见PCT国际申请W0 2007/134181公开日为11/22/07其中4'-(CH₂)-O-2'(LNA)被例如5'-甲基或5'-乙烯基取代)。

[0481] 具有经修饰的糖部分的核苷的实例包括但不限于包括5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃、2'-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F以及2'-O(CH₂)₂OCH₃取代基的核苷。在2'位置处的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O-烯丙基、O-C₁-C₁₀烷基、OCF₃、OCH₂F、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)、以及O-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n),其中R₁、R_m和R_n各自独立地是H或经取代的或未经取代的C₁-C₁₀烷基。

[0482] 如在此使用的,“二环核苷”是指经修饰的、包括二环糖部分的核苷。二环核苷的实例包括但不限于在4'和2'核糖基环原子之间包括桥的核苷。在某些实施例中,在此提供的反义化合物包括一个或多个二环核苷(包括4'至2'桥)。此类4'至2'桥接的二环核苷的实例包括但不限于以下式中的一种:4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2'(也称为限制性乙基(constrained ethyl)或cEt)和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(及其类似物,参见美国专利7,399,845,2008年7月15日发布);4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'(及其类似物,参见公开的国际申请W0/2009/006478,2009年1月8日公开);4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(及其类似物,参见公开的国际申请W0/2008/150729,2008年12月11日公开);4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(参见公开的美国专利申请US2004-0171570,2004年9月2日公开);4'-CH₂-N(R)-O-2',其中R是H、C₁-C₁₂烷基、或保护基(参见美国专利7,427,672,2008年9月23日发布);4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(参见Chattopadhyaya等人,J.Org.Chem.(《有机化学杂志》),2009,74,118-134);以及4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(及其类似物,参见公开的国际申请W0 2008/154401,公开日为2008年12月8日)。

[0483] 此外,涉及二环核苷的报道还可以发现于公开的文献中(参见例如:Singh等人,Chem.Commun.(《化学通讯》),1998,4,455-456;Koshkin等人,Tetrahedron(《四面体》),1998,54,3607-3630;Wahlestedt等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(《美国国家科学院院刊》),2000,97,5633-5638;Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.(《生物有机化学与医药化学通讯》),1998,8,2219-2222;Singh等人,J.Org.Chem.(《有机化学杂志》),1998,63,10035-10039;Srivastava等人,J.Am.Chem.Soc.(《美国化学会会刊》),2007,129(26)8362-8379;Elayadi等人,Curr.Opinion Invest.Drugs(《药物研究新见》),2001,2,558-561;Braasch等人,Chem.Biol.(《化学与生物学》),2001,8,1-7;乙基Orum等人,Curr.Opinion Mol.Ther.(《分子疗法新见》),2001,3,239-243;美国专利号6,268,490;6,525,191;6,670,461;6,770,748;6,794,499;7,034,133;7,053,207;7,399,845;7,547,684;和7,696,345;美国专利公开号US 2008-0039618;US 2009-0012281;美国专利序列号60/989,574;61/026,995;61/026,998;61/056,564;61/086,231;61/097,787;和61/099,844;公开的PCT国际申请W0 1994/014226;W0 2004/106356;W0 2005/021570;W0 2007/134181;W0 2008/150729;W0 2008/154401;和W0 2009/006478。前述二环核苷中的每一者都可以被制备为具

有一个或多个立体化学糖构型,包括例如 α -L-呋喃核糖和 β -D-呋喃核糖(参见PCT国际申请PCT/DK 98/00393,在1999年3月25日公开为WO 99/14226)。

[0484] 在某些实施例中,BNA核苷的二环糖部分包括但不限于在呋喃戊糖基糖部分的4'和2'位置之间具有至少一个桥的化合物,其中此类桥独立地包括1个或从2至4个连接的基团,这个或这些连接的基团独立地选自 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-C(R_a)=C(R_b)-$ 、 $-C(R_a)=N-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=NR_a)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R_a)_2-$ 、 $-S(=O)_x-$ 和 $-N(R_a)-$;

[0485] 其中:

[0486] x是0、1、或2;

[0487] n是1、2、3、或4;

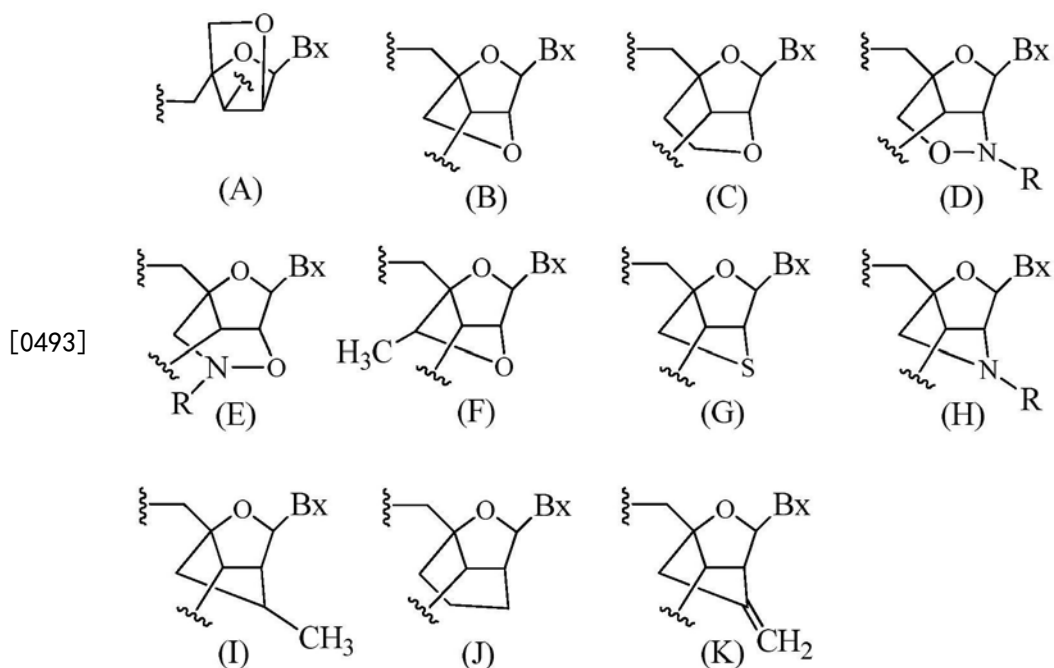
[0488] R_a 和 R_b 各自独立地是H、保护基、羟基、 C_1 - C_{12} 烷基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、经取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、经取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_5 - C_{20} 芳基、经取代的 C_5 - C_{20} 芳基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、 C_5 - C_7 脂环基、经取代的 C_5 - C_7 脂环基、卤素、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $COOJ_1$ 、酰基($C(=O)-H$)、经取代的酰基、CN、磺酰基($S(=O)_2-J_1$)、或次硫酸基(sulfoxy)($S(=O)-J_1$);并且

[0489] J_1 和 J_2 各自独立地是H、 C_1 - C_{12} 烷基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、经取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、经取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_5 - C_{20} 芳基、经取代的 C_5 - C_{20} 芳基、酰基($C(=O)-H$)、经取代的酰基、杂环基、经取代的杂环基、 C_1 - C_{12} 氨烷基、经取代的 C_1 - C_{12} 氨烷基或保护基。

[0490] 在某些实施例中,二环糖部分的桥是 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ 、 $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ 或 $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ 。在某些实施例中,桥是4'- CH_2 -2'、4'-(CH_2)₂-2'、4'-(CH_2)₃-2'、4'- CH_2 -O-2'、4'-(CH_2)₂-O-2'、4'- CH_2 -O-N(R)-2'和4'- CH_2 -N(R)-O-2'-其中R各自独立地是H、保护基或 C_1 - C_{12} 烷基。

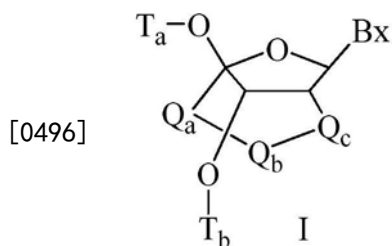
[0491] 在某些实施例中,二环核苷进一步由异构构型限定。例如,包括4'-2'亚甲基-氧基桥的核苷可以处于 α -L构型或处于 β -D构型。先前, α -L-亚甲基氧基(4'- CH_2 -O-2')BNA's已经被掺入到显示反义活性的反义寡核苷酸中(Frieden等人,Nucleic Acids Research(《核酸研究》),2003,21,6365-6372)。

[0492] 在某些实施例中,如下所描绘的,二环核苷包括但不限于(A) α -L-亚甲基氧基(4'- CH_2 -O-2')BNA,(B) β -D-亚甲基氧基(4'- CH_2 -O-2')BNA,(C)乙烯氧基(4'-(CH_2)₂-O-2')BNA,(D)氨基氧基(4'- CH_2 -O-N(R)-2')BNA,(E)氧基氨基(4'- CH_2 -N(R)-O-2')BNA,以及(F)甲基(亚甲基氧基)(4'-CH(CH_3)-O-2')BNA,(G)亚甲基-硫代(4'- CH_2 -S-2')BNA,(H)亚甲基-氨基(4'- CH_2 -N(R)-2')BNA,(I)甲基碳环(4'- CH_2 -CH(CH_3)-2')BNA,(J)丙烯碳环(4'-(CH_2)₃-2')BNA以及(K)乙烯基BNA:



[0494] 其中Bx是碱基部分并且R独立地是H、保护基、 C_1 - C_{12} 烷基或 C_1 - C_{12} 烷氧基。

[0495] 在某些实施例中,提供的二环核苷具有式I:



[0497] 其中:

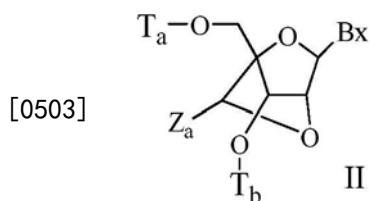
[0498] Bx为杂环碱基部分;

[0499] $-Q_a-Q_b-Q_c-$ 是 $-CH_2-N(R_c)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-N(R_c)-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-N(R_c)-$ 、 $-CH_2-N(R_c)-O-$ 或 $-N(R_c)-O-CH_2-$;

[0500] R_c 是 C_1 - C_{12} 烷基或氨基保护基;并且

[0501] T_a 和 T_b 彼此独立地是H、羟基保护基、共轭基、反应性磷基、磷部分或至支撑介质的共价附接物。

[0502] 在某些实施例中,提供的二环核苷具有式II:



[0504] 其中:

[0505] Bx为杂环碱基部分;

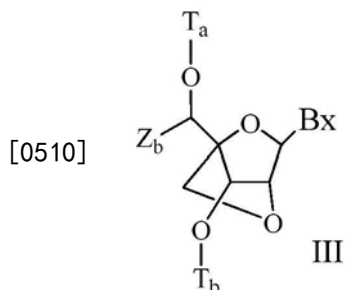
[0506] T_a 和 T_b 彼此独立地是H、羟基保护基、共轭基、反应性磷基、磷部分或至支撑介质的共价附接物;

[0507] Z_a 是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、经

取代的 C_2 - C_6 炔基、酰基、经取代的酰基、经取代的酰胺、巯基或经取代的硫代。

[0508] 在一个实施例中,这些经取代的基团各自独立地经取代基单或多取代,这些取代基独立地选自卤素、氧基、羟基、 OJ_c 、 NJ_cJ_d 、 SJ_c 、 N_3 、 $OC(=X)J_c$ 、以及 $NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$,其中 J_c 、 J_d 和 J_e 各自独立地是H、 C_1 - C_6 烷基、或经取代的 C_1 - C_6 烷基并且X是O或 NJ_c 。

[0509] 在某些实施例中,提供的二环核苷具有式III:



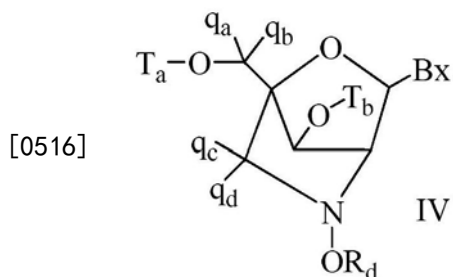
[0511] 其中:

[0512] Bx 为杂环碱基部分;

[0513] T_a 和 T_b 彼此独立地是H、羟基保护基、共轭基、反应性磷基、磷部分或至支撑介质的共价附接物;

[0514] Z_b 是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 炔基或经取代的酰基($C(=O)-$)。

[0515] 在某些实施例中,提供的二环核苷具有式IV:



[0517] 其中:

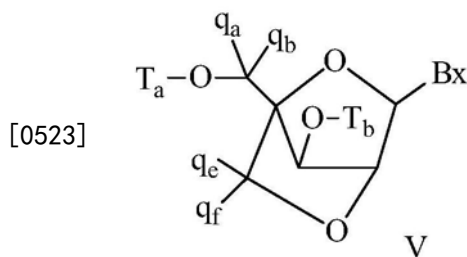
[0518] Bx 为杂环碱基部分;

[0519] T_a 和 T_b 彼此独立地是H、羟基保护基、共轭基、反应性磷基、磷部分或至支撑介质的共价附接物;

[0520] R_d 是 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基;

[0521] q_a 、 q_b 、 q_c 和 q_d 各自独立地是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基、 C_1 - C_6 烷氧基、经取代的 C_1 - C_6 烷氧基、酰基、经取代的酰基、 C_1 - C_6 氨烷基或经取代的 C_1 - C_6 氨烷基;

[0522] 在某些实施例中,提供的二环核苷具有式V:



[0524] 其中:

[0525] Bx为杂环碱基部分;

[0526] T_a 和 T_b 彼此独立地是H、羟基保护基、共轭基、反应性磷基、磷部分或至支撑介质的共价附接物;

[0527] q_a 、 q_b 、 q_e 和 q_f 各自独立地是氢、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、经取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、经取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷氧基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SO_2J_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 或 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$;

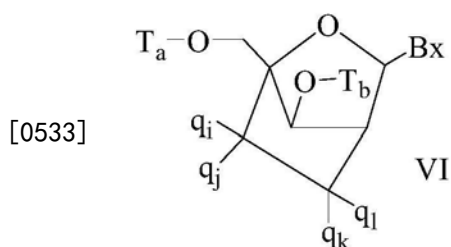
[0528] 或 q_e 与 q_f 一起是 $=C(q_g)(q_h)$;

[0529] q_g 和 q_h 各自独立地是H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基或经取代的 C_1 - C_{12} 烷基。

[0530] 亚甲基氧基(4'- CH_2 -O-2')BNA单体腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶的合成及制备,连同其寡聚反应,以及核酸识别特性已经得以描述(Koshkin等人,Tetrahedron(《四面体》),1998,54,3607-3630)。二环核酸(BNA)及其制备还描述于W098/39352以及W099/14226中。

[0531] 还制备了亚甲基氧基(4'- CH_2 -O-2')BNA以及2'-硫代-BNA的类似物(Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.(《生物有机化学与医药化学通讯》),1998,8,2219-2222)。还描述了锁定核苷类似物的制备,该类似物包括寡脱氧核糖核苷酸双链体作为核酸聚合酶的底物(Wengel等人,W099/14226)。2'-氨基-BNA(一种新颖的构象受限制的高亲和力寡核苷酸类似物)也已经描述于现有技术中(Singh等人,J.Org.Chem.(《有机化学杂志》),1998,63,10035-10039)。此外,已经制备了2'-氨基-和2'-甲基氨基-BNA's并且先前已经报道了它们与互补RNA和DNA链的双链体的热稳定性。

[0532] 在某些实施例中,提供的二环核苷具有式VI:



[0534] 其中:

[0535] Bx为杂环碱基部分;

[0536] T_a 和 T_b 彼此独立地是H、羟基保护基、共轭基、反应性磷基、磷部分或至支撑介质的共价附接物;

[0537] q_i 、 q_j 、 q_k 和 q_l 各自独立地是H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、经取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、经取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、经取代的 C_1 - C_{12} 烷氧基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SO_2J_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 或 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$;

基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OJ}_j$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_j\text{J}_k$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{J}_j$ 、 $\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_j\text{J}_k$ 、 $\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{NH})\text{NJ}_j\text{J}_k$ 、 $\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_j\text{J}_k$ 或 $\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{S})\text{NJ}_j\text{J}_k$ ；并且

[0538] q_i 和 q_j 或 q_l 和 q_k 一起是 $=\text{C}(q_g)(q_h)$ ，其中 q_g 和 q_h 各自独立地是H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基或经取代的 C_1 - C_{12} 烷基。

[0539] 具有4'-(CH_2)₃-2'桥以及烯基类似物桥4'- $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$ -2'的一个碳环型二环核苷已经得以描述(Freier等人, *Nucleic Acids Research* (《核酸研究》), 1997, 25 (22), 4429-4443以及Albaek等人, *J. Org. Chem.* (《有机化学杂志》), 2006, 71, 7731-7740)。碳环型二环核苷的合成及制备, 连同其寡聚反应, 以及生化研究已经得以描述(Srivastava等人, *J. Am. Chem. Soc.* (《美国化学会会刊》), 2007, 129 (26), 8362-8379)。

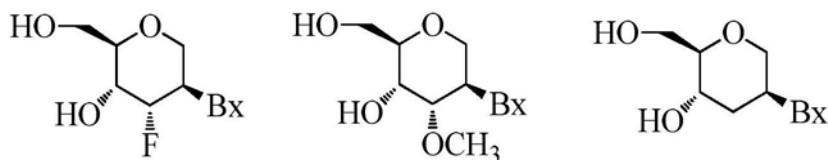
[0540] 如在此使用的, “4'-2' 二环核苷”或“4'至2' 二环核苷”是指包括呋喃糖环的二环核苷, 该呋喃糖环包括一个连接该呋喃糖环的两个碳原子的桥, 该桥连接该糖环的2' 碳原子和4' 碳原子。

[0541] 如在此使用的, “单环核苷”是指包括经修饰的糖部分的核苷, 该经修饰的糖部分不是二环糖部分。在某些实施例中, 核苷的糖部分、或糖部分类似物可以是在任何位置经修饰的或经取代的。

[0542] 如在此使用的, “2'-修饰的糖”是指在2' 位置处经修饰的呋喃糖基糖。在某些实施例中, 此类修饰包括选自以下的取代基: 卤化物, 包括但不限于经取代的和未经取代的烷氧基、经取代的和未经取代的硫代烷基、经取代的和未经取代的氨基烷基、经取代的和未经取代的烷基、经取代的和未经取代的烯丙基、以及经取代的和未经取代的炔基。在某些实施例中, 2' 修饰选自以下取代基, 包括但不限于 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{F}$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 、 $\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$ 、和 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, 其中n和m是从1到约10。其他2'-取代基还可以选自: C_1 - C_{12} 烷基、经取代的烷基、烯基, 炔基、烷芳基、芳烷基、0-烷芳基或0-芳烷基、SH、 SCH_3 、 OCN 、Cl、Br、CN、F、 CF_3 、 OCF_3 、 SOCH_3 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基、聚烷基氨基、经取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告子基团、嵌入子、用于改进药代动力学特性的基团、或用于改进反义化合物的药效动力学特性的基团、以及具有类似特性的其他取代基。在某些实施例中, 经修饰的核苷包括2'-MOE侧链(Baker等人, *J. Biol. Chem.* (《有机化学杂志》), 1997, 272, 11944-12000)。与未经修饰的核苷以及与其他经修饰的核苷(例如2'-0-甲基、0-丙基、和0-氨基丙基)相比, 此类2'-MOE取代已经被描述为具有改进的结合亲和力。具有2'-MOE取代基的寡核苷酸还已经显示了具有在体内使用的希望的特性的基因表达反义抑制剂, (Martin, *Helv. Chim. Acta* (《瑞士化学学报》), 1995, 78, 486-504; Altmann等人, *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann等人, *Biochem. Soc. Trans.* (《英国生物化学学会会报》), 1996, 24, 630-637; 以及Altmann等人, *Nucleosides Nucleotides* (《核苷核苷酸》), 1997, 16, 917-926)。

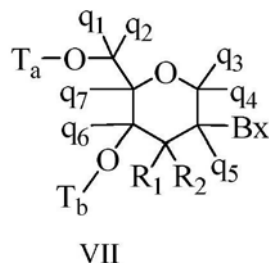
[0543] 如在此使用的, “经修饰的四氢吡喃核苷”或“经修饰的THP核苷”是指用六元四氢吡喃“糖”取代正常核苷中的呋喃戊糖基残基的核苷(糖代用品)。经修饰的THP核苷包括但不限于在本领域中称作己糖醇核酸(HNA)、安尼妥核酸(anitol nucleic acid)(ANA)、甘露醇核酸(MNA)(参见Leumann, *Bioorg. Med. Chem.* (《生物有机化学与医药化学》), 2002, 10, 841-854)或具有如下示例的四氢吡喃环系统的氟代HNA(F-HNA):

[0544]



[0545] 在某些实施例中,糖代用品被选择为具有式VII:

[0546]



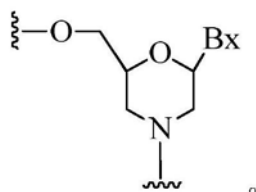
[0547] 其中独立地对于所述至少一个具有式VII的四氢吡喃核苷类似物中的每一个:

[0548] Bx为杂环碱基部分;

[0549] T_a 和 T_b 各自独立地是核苷间连接基团(连接四氢吡喃核苷类似物到该反义化合物上)或 T_a 和 T_b 中的一个为核苷间连接基团(连接四氢吡喃核苷类似物到该反义化合物上)并且 T_a 和 T_b 中的另一个是H、羟基保护基、连接的共轭基团或5'或3'-末端基;[0550] q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 和 q_7 各自独立地是、H、 C_1 - C_6 烷基、经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、经取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或经取代的 C_2 - C_6 炔基;并且 R_1 和 R_2 各自独立地选自氢、羟基、卤素、经取代的或未经取代的烷氧基、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $OC(=X)J_1$ 、 $OC(=X)NJ_1J_2$ 、 $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$ 和CN,其中X是O、S或 NJ_1 并且 J_1 、 J_2 和 J_3 各自独立地是H或 C_1 - C_6 烷基。[0551] 在某些实施例中,在此提供的是具有式VII的经修饰的THP核苷,其中 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 以及 q_7 各自是H。在某些实施例中, q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 以及 q_7 中至少一个不是氢。在某些实施例中, q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 以及 q_7 中至少一个是甲基。在某些实施例中,在此提供的是具有式VII的THP核苷,其中 R_1 和 R_2 中的一个为氟。在某些实施例中, R_1 是氟并且 R_2 是H; R_1 是甲氧基并且 R_2 是H,并且 R_1 是甲氧基乙氧基并且 R_2 是H。

[0552] 在某些实施例中,糖代用品包括具有超过5个原子并且超过一个杂原子的环。例如包括吗啉基糖部分的核苷及其在寡聚化合物中的用途已经被报道(参见例如: Braasch等人, Biochemistry (《生物化学》), 2002, 41, 4503-4510; 以及美国专利5,698,685; 5,166,315; 5,185,444; 和5,034,506)。如在此使用的,术语“吗啉基”是指具有以下式的糖代用品:

[0553]

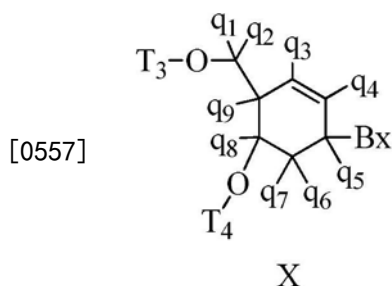


[0554] 在某些实施例中,吗啉基可以被修饰,例如,通过添加或改变来自上述吗啉基结构的不同取代基。此类糖代用品在此称作“经修饰的吗啉基”。

[0555] 还提供了修饰的组合(非限制性的),例如2'-F-5'-甲基取代的核苷(参见PCT国际申请W0 2008/101157公开日为8/21/08,另外披露了5',2'-双经取代的核苷)以及S替换核糖基环氧原子并且进一步在2'-位置发生取代(参见公开的美国专利申请US 2005-0130923,公开日为2005年6月16日)或可替代地二环核苷的5'-取代(参见PCT国际申请W0

2007/134181,公开日为11/22/07其中4'-CH₂-O-2'二环核苷进一步被5'-甲基或5'-乙烯基在5'位置处取代)。碳环型二环核苷的合成及制备,连同其寡聚反应,以及生化研究已经得以描述(参见,例如,Srivastava等人,J.Am.Chem.Soc.《美国化学会会刊》)2007,129(26),8362-8379)。

[0556] 在某些实施例中,反义化合物包括一个或多个经修饰的环己烯基核苷,这是用六元环己烯基取代天然发生的核苷中的呋喃戊糖基残基的核苷。经修饰的环己烯基核苷包括但不限于本领域中描述的那些(参见例如共同拥有的、公开的PCT申请W0 2010/036696,公开日为2010年4月10日,Robeyns等人,J.Am.Chem.Soc.《美国化学会会刊》),2008,130(6),1979-1984;Horváth等人,Tetrahedron Letters《四面体通讯》),2007,48,3621-3623;Nauwelaerts等人,J.Am.Chem.Soc.《美国化学会会刊》),2007,129(30),9340-9348;Gu等人,Nucleosides,Nucleotides&Nucleic Acids《核苷、核苷酸&核苷酸》),2005,24(5-7),993-998;Nauwelaerts等人,NucleicAcids Research《核酸研究》),2005,33(8),2452-2463;Robeyns等人,Acta Crystallographica,Section F:StructuralBiology and Crystallization Communications《晶体学报》第F章:结构生物学与晶体通讯),2005,F61(6),585-586;Gu等人,Tetrahedron《四面体》),2004,60(9),2111-2123;Gu等人,Oligonucleotides《寡核苷酸》),2003,13(6),479-489;Wang等人,J.Org.Chem.《有机化学杂志》),2003,68,4499-4505;Verbeure等人,Nucleic Acids Research《核酸研究》),2001,29(24),4941-4947;Wang等人,J.Org.Chem.《有机化学杂志》),2001,66,8478-82;Wang等人,Nucleosides,Nucleotides&Nucleic Acids《核苷、核苷酸&核苷酸》),2001,20(4-7),785-788;Wang等人,J.Am.Chem.《有机化学杂志》),2000,122,8595-8602;公开的PCT申请,W0 06/047842;以及公开的PCT申请W0 01/049687;将各自的内容通过引用以其整体结合在此)。某些经修饰的环己烯基核苷具有式X。



[0558] 其中独立地对于所述至少一个具有式X的环己烯基核苷类似物中的每一个:

[0559] B_x为杂环碱基部分;

[0560] T₃和T₄各自独立地是核苷间连接基团(连接环己烯基核苷类似物到反义化合物上)或T₃和T₄中的一个核苷间连接基团(连接四氢吡喃核苷类似物到反义化合物上)并且T₃和T₄中的另一个是H、羟基保护基、连接的共轭基团或5'或3'-末端基;

[0561] q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、q₇、q₈和q₉各自独立地是H、C₁-C₆烷基、经取代的C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、经取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、经取代的C₂-C₆炔基或其他糖取代基。

[0562] 如在此使用的,“2'-修饰的”或“2'-取代的”是指包括一种糖的核苷,该糖在2'位置处包括不是H或OH的取代基。2'-修饰的核苷包括但不限于二环核苷,其中连接该糖环的两个碳原子的桥连接该糖环的2'碳和另一个碳;以及具有非桥接2'取代基的核苷,例如烯丙基、氨基、叠氨基、硫代、0-烯丙基、0-C₁-C₁₀烷基、-OCF₃、0-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、

$O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, 或 $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, 其中 R_m 和 R_n 各自独立地是 H 或经取代的或未经取代的 C_1-C_{10} 烷基。2'-修饰的核苷可以进一步包括其他修饰, 例如在该糖的其他位置处和/或在核碱基处。

[0563] 如在此使用的, “2'-F” 是指包括一种糖的核苷, 该糖在糖环的 2' 位置处包括氟代基团。

[0564] 如在此使用的, “2'-OMe” 或 “2'-OCH₃” 或 “2'-O-甲基” 各自是指包括一种糖的核苷, 该糖在糖环的 2' 位置处包括 -OCH₃ 基团。

[0565] 如在此使用的, “寡核苷酸” 是指包括多个连接的核苷的化合物。在某些实施例中, 该多个核苷中的一个或多个是经修饰的。在某些实施例中, 寡核苷酸包括一个或多个核糖核苷 (RNA) 和/或脱氧核糖核苷 (DNA)。

[0566] 本领域中熟知许多其他二环和三环糖代用品环系统可以用来修饰用以掺入到反义化合物中的核苷 (参见例如综述文章: Leumann, Bioorg. Med. Chem. (《有机化学杂志》), 2002, 10, 841-854)。此类环系统可以经历不同的另外的取代以增强活性。

[0567] 用于制备经修饰的糖的方法是本领域技术人员熟知的。传授此类经修饰的糖的制备的一些代表性美国专利包括但不限于 U.S.: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,670,633; 5,700,920; 5,792,847 和 6,600,032 以及国际申请 PCT/US 2005/019219, 2005 年 6 月 2 日提交以及在 2005 年 12 月 22 日作为 WO 2005/121371 的公开, 并将它们各自通过引用以其全文结合在此。

[0568] 在具有经修饰的糖部分的核苷酸中, 为了与适合靶核酸的杂交, 保持核碱基部分 (天然的、经修饰的或其组合)。

[0569] 在某些实施例中, 反义化合物包括一个或多个具有经修饰的糖部分的核苷。在某些实施例中, 经修饰的糖部分是 2'-MOE。在某些实施例中, 将 2'-MOE 修饰的核苷安排在缺口体基序中。在某些实施例中, 经修饰的糖部分是具有 (4'-CH(CH₃)-O-2') 桥接基团的二环核苷。在某些实施例中, 将 (4'-CH(CH₃)-O-2') 修饰的核苷安排遍及缺口体基序的整个翼。

[0570] 经修饰核碱基

[0571] 核碱基 (或碱基) 修饰或取代在结构上是可以与天然存在的或合成的未经修饰核碱基区别开的, 而在功能上是可以互换的。天然的和经修饰核碱基均能够参与氢键键合。这样的核碱基修饰可以为反义化合物赋予核酸酶稳定性、结合亲和力或一些其他的有益的生物学特性。经修饰核碱基包括合成的和天然的核碱基例如, 例如, 5-甲基胞嘧啶 (5-me-C)。某些核碱基取代, 包括 5-甲基胞嘧啶取代, 对于增加反义化合物对靶核酸的结合亲和力是特别有用的。例如, 已经表明 5-甲基胞嘧啶取代基提高核酸双链体的稳定性 0.6°C-1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 和 Lebleu, B., 编著., Antisense Research and Applications (《反义研究与应用》), CRC 出版社 (CRC Press), Boca Raton (波卡拉顿), 1993, pp.276-278)。

[0572] 此外, 经修饰核碱基包括 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, 腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其他烷基衍生物, 2-硫代腺嘌呤, 2-硫代胸腺嘌呤和 2-硫代胞嘧啶, 5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶, 5-丙炔基 (-C≡CH₃) 尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物, 6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶,

5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫代尿嘧啶,8-卤代、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-卤代,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-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤,以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0573] 杂环碱基部分还可以包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环取代的那些,例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶2-吡啶酮。特别有助于增加反义化合物的结合亲和力的核碱基包括5-取代嘧啶,6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。

[0574] 在某些实施例中,靶向雄激素受体核酸的反义化合物包括一个或多个经修饰核碱基。在某些实施例中,靶向雄激素受体核酸的缩短的或缺口加宽的反义寡核苷酸包括一个或多个经修饰核碱基。在某些实施例中,经修饰核碱基是5-甲基胞嘧啶。在某些实施例中,每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。共轭的反义化合物

[0575] 反义化合物可以与一个或多个部分或共轭物共价连接,所述部分或共轭物增强所得反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。典型的共轭基团包括胆固醇部分和脂质部分。另外的共轭基团包括碳水化合物、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、蒽醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。

[0576] 也可以修饰反义化合物以使其具有一个或多个稳定基团,所述稳定基团通常附接于反义化合物的一端或两端以增强例如像核酸酶稳定性等性质。稳定基团中包括帽结构。这些末端修饰保护具有末端核酸的反义化合物免于被外切核酸酶降解,并且能有助于在细胞内的递送和/或定位。帽可以存在于5'-末端(5'-帽),或在3'-末端(3'-帽),或者可以同时存在于两个末端。帽结构在本领域中是熟知的并且包括,例如,反向脱氧碱基帽。另外,能够用于在反义化合物的一个或两个末端加帽以赋予核酸酶稳定性的3'和5'稳定基团包括那些于2003年1月16日公布的WO 03/004602中披露那些。

[0577] 在某些实施例中,反义化合物(包括但不限于特别适合用作ssRNA的那些)通过附接一个或多个共轭基来修饰。通常,共轭基修饰所附接的寡聚化合物的一种或多种性质,包括但不限于药效动力学、药代动力学、稳定性、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、储存和清除。共轭基通常用于化学领域并且直接或通过任选的共轭连接部分或共轭连接基团连接至母体化合物如寡核苷酸。共轭基包括但不限于:嵌入剂、报告子分子、聚胺、聚酰胺、聚乙烯乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫胆固醇、胆酸部分、叶酸、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、菲啶、蒽醌、金刚烷、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。先前已经描述了某些共轭基,例如,胆固醇部分(Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院院刊),1989,86,6553-6556);胆酸(Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Let.《生物有机化学与医药化学通讯》),1994,4,1053-1060);硫醚例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.《纽约科学院年报》),1992,660,306-309;Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Let.《生物有机化学与医药化学通讯》),1993,3,2765-2770);巯基胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.《核酸研究》),1992,20,533-538);脂肪链,例如十二烷二醇或十一烷残基(Saison-Behmoaras等人,EMBO J.《EMBO杂志》),1991,10,1111-1118;Kabanov等人,FEBS Lett.《FEBS通讯》),1990,259,327-330;Svinarchuk等人,Biochimie《生物化学》),1993,75,49-54);磷脂,例如,二-十六烷基-外消旋-丙三醇或三乙基铵1,2-而-O-十六烷

基-外消旋-丙三醇-3-H-磷酸酯 (Manoharan等人, Tetrahedron Lett. (《四面体通讯》), 1995, 36, 3651-3654; Shea等人, Nucl. Acids Res. (《核酸研究》), 1990, 18, 3777-3783); 聚胺或聚乙二醇链 (Manoharan等人, Nucleosides & Nucleotides (《核苷&核苷酸》), 1995, 14, 969-973); 或金刚烷乙酸 (Manoharan等人, Tetrahedron Lett. (《四面体通讯》), 1995, 36, 3651-3654); 棕榈基模块 (Mishra等人, Biochim. Biophys. Acta (生物化学与生物物理学报), 1995, 1264, 229-237); 或十八烷基胺或己基氨基-羧基-羟胆固醇模块 (Crooke等人, J. Pharmacol. Exp. Ther. (《药理学与实验治疗学杂志》), 1996, 277, 923-937)。

[0578] 对于包含有助于ssRNA的那些的另外的共轭及其在反义化合物内的置换, 参见例如, PCT公开号W0 2013/033230。

[0579] 组合物和用于配制药物流合物的方法

[0580] 可以将反义寡核苷酸与药学上可接受的活性或惰性物质混合以制备药物组合物或配制品。组合物和用于配制药物流合物的方法依赖于多种标准, 包括, 但不限于, 施用途径、疾病程度、或要施用的剂量。

[0581] 通过将靶向雄激素受体核酸的反义化合物与合适的药学上可接受的稀释剂或载体组合, 可以在药物组合物中使用该反义化合物。在某些实施例中, 药学上可接受的稀释剂是水, 例如灭菌注射用水。因而, 在一个实施例中, 在本文描述的方法中使用的是包含靶向雄激素受体核酸的反义化合物和药学上可接受的稀释剂的药物组合物。在某些实施例中, 药学上可接受的稀释剂是水。在某些实施例中, 反义化合物是在此提供的反义寡核苷酸。

[0582] 包含反义化合物的药物组合物包括任何药学上可接受的盐、酯, 或这些酯的盐, 或任何其他寡核苷酸, 其在向动物包括人施用后, 能够(直接或间接) 提供其生物学活性代谢物或残余物。因而, 例如, 本文还起草涉及反义化合物的药学上可接受的盐、前药、这些前药的药学上可接受的盐、和其他生物等效物。合适的药学上可接受的盐包括, 但不限于, 钠盐和钾盐。

[0583] 前药可以包括在反义化合物的一端或两端掺入另外的核苷, 所述核苷在体内通过内源核酸酶切割, 以形成活性反义化合物。

[0584] 反义寡核苷酸的体外测试

[0585] 本文描述的是用反义寡核苷酸处理细胞的方法, 对于用其他反义化合物进行的处理可以适当地修改该方法。

[0586] 当细胞在培养中达到大约60%-80%的汇合度时, 用反义寡核苷酸处理细胞。

[0587] 通常用于将反义寡核苷酸引入到所培养的细胞中的一种试剂包括阳离子脂质转染试剂LIPOFECTIN (Invitrogen (英杰公司), Carlsbad (卡尔斯巴德), CA (加利福尼亚州))。反义寡核苷酸可以与LIPOFECTIN在OPTI-MEM 1 (英杰公司, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州) 中混合以达到反义寡核苷酸的所希望的终浓度以及范围可以从每100nM反义寡核苷酸2至12ug/mL的LIPOFECTIN浓度。

[0588] 用于将反义寡核苷酸引入到所培养的细胞中的另一种试剂包括LIPOFECTAMINE (英杰公司, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州)。反义寡核苷酸可以与LIPOFECTAMINE在OPTI-MEM 1减少的血清培养基 (英杰公司, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州) 中混合以达到反义寡核苷酸的所希望的浓度以及范围可以从每100nM反义寡核苷酸2至12ug/mL的LIPOFECTAMINE浓度。

[0589] 用于将反义寡核苷酸引入到所培养的细胞中的另一种技术包括电穿孔。

[0590] 用于将反义寡核苷酸引入到所培养的细胞中的又另一种技术包括寡核苷酸由这些细胞自由摄取。

[0591] 通过常规方法用反义寡核苷酸处理细胞。反义寡核苷酸处理16-24小时后可以收获这些细胞,此时通过本领域中已知的和在此描述的方法测量靶核酸的RNA或蛋白水平。一般来说,当以多个重复进行处理时,所呈现的数据是这些重复性处理的平均值。

[0592] 所使用的反义寡核苷酸的浓度在不同细胞系之间不同。对于特定细胞系,确定最适反义寡核苷酸浓度的方法在本领域中是熟知的。当用LIPOFECTAMINE转染时,典型地以范围从1nM至300nM的浓度使用反义寡核苷酸。当用电穿孔转染时,以范围从625nM至20,000nM的较高浓度使用反义寡核苷酸。

[0593] RNA分离

[0594] 基于总细胞RNA或聚(A)⁺mRNA进行RNA分析。分离RNA的方法在本领域中是熟知的。根据制造商推荐的实验方案,例如,使用TRIZOL试剂(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州),使用本领域中熟知的方法制备RNA。

[0595] 实施例:

[0596] E1.一种包括经修饰的寡核苷酸的化合物,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179的核碱基序列中任一项的至少8个连续核碱基。

[0597] E2.一种包括经修饰的寡核苷酸的化合物,该经修饰的寡核苷酸由16至30个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:12-179中任一项的核碱基序列。

[0598] E3.一种包括经修饰的寡核苷酸的化合物,该经修饰的寡核苷酸由SEQ ID NO:12-179中任一项的核碱基序列组成。

[0599] E4.一种包括经修饰的寡核苷酸的化合物,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175的核碱基序列中任一项的至少8个连续核碱基。

[0600] E5.一种包括经修饰的寡核苷酸的化合物,该经修饰的寡核苷酸由16至30个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175的核碱基序列。

[0601] E6.一种包括经修饰的寡核苷酸的化合物,该经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35、39、43、124、150、155、169或175的核碱基序列组成。

[0602] E7.一种包括经修饰的寡核苷酸的化合物,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成,这些核苷在SEQ ID NO:1的以下核苷酸之内互补:2957-2972、3079-3094、3099-3114、3109-3124、3113-3128、3120-3135、3133-3148、3224-3239、3226-3241、3351-3366、3353-3368、3361-3376、3388-3403、3513-3528、3517-3532、3519-3534、3641-3656、3735-3750、3764-3779、3768-3783、3798-3813、3799-3814、3851-3866、3870-3885、3874-3889、3876-3891、3878-3893、3884-3899、3886-3901、3888-3903、3901-3916、3956-3971、3962-3977、3964-3979、3967-3982、4019-4034、4038-4053、4049-4064、4056-4071、4059-4074、4062-4077、4066-4081、4070-4085、4101-4116、4103-4118、4105-4120、4109-4124、

4305-4320、4405-4420、4532-4547、4534-4549、4537-4552、4539-4554、4555-4570、4571-4586、4573-4588、4578-4593、4597-4612、4632-4647、4655-4670、4656-4671、4662-4677、4699-4714、4747-4762、4750-4765、4752-4767、4754-4769、4755-4770、4769-4784、4798-4813、4804-4819、4807-4822、4833-4848、4837-4852、4839-4854、4865-4880、4868-4883、4872-4887、4874-4889、4876-4891、4887-4902、4889-4904、4916-4931、4918-4933、4938-4953、4942-4957、4944-4959、4951-4966、5050-5065、5052-5067、5054-5069、5056-5071、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5133-5148、5141-5156、5155-5170、5265-5280、5293-5308、5308-5323、5392-5407、5448-5463、5469-5484、5481-5496、5483-5498、5486-5501、5488-5503、5494-5509、5521-5536、5666-5681、6222-6237、6701-6716、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58739、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58725-58740、58750-58769、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、60902-60917、67454-67469、114874-114889、115272-115287、115365-115380、134971-134986、102156-102171、139682-139697、139762-139777、139782-139797、144856-144871、144938-144953、148406-148421、148443-148458、148520-148535、181695-181710、182958-182973或183049-183064,其中所述经修饰的寡核苷酸与SEQ ID NO:1至少90%互补。

[0603] E8.一种包括经修饰的寡核苷酸的化合物,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列包括一个具有至少8个连续核碱基的部分,这些连续核碱基与SEQ ID NO:1的以下的核碱基的同等长度部分100%互补:2957-2972、3079-3094、3099-3114、3109-3124、3113-3128、3120-3135、3133-3148、3224-3239、3226-3241、3351-3366、3353-3368、3361-3376、3388-3403、3513-3528、3517-3532、3519-3534、3641-3656、3735-3750、3764-3779、3768-3783、3798-3813、3799-3814、3851-3866、3870-3885、3874-3889、3876-3891、3878-3893、3884-3899、3886-3901、3888-3903、3901-3916、3956-3971、3962-3977、3964-3979、3967-3982、4019-4034、4038-4053、4049-4064、4056-4071、4059-4074、4062-4077、4066-4081、4070-4085、4101-4116、4103-4118、4105-4120、4109-4124、4305-4320、4405-4420、4532-4547、4534-4549、4537-4552、4539-4554、4555-4570、4571-4586、4573-4588、4578-4593、4597-4612、4632-4647、4655-4670、4656-4671、4662-4677、4699-4714、4747-4762、4750-4765、4752-4767、4754-4769、4755-4770、4769-4784、4798-4813、4804-4819、4807-4822、4833-4848、4837-4852、4839-4854、4865-4880、4868-4883、4872-4887、4874-4889、4876-4891、4887-4902、4889-4904、4916-4931、4918-4933、4938-4953、4942-4957、4944-4959、4951-4966、5050-5065、5052-5067、5054-5069、5056-5071、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5133-5148、5141-5156、5155-5170、5265-5280、5293-5308、5308-5323、5392-5407、5448-5463、5469-5484、5481-5496、5483-5498、5486-5501、5488-5503、5494-5509、5521-5536、5666-5681、6222-6237、6701-6716、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、

16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58739、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58725-58740、58750-58769、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、60902-60917、67454-67469、114874-114889、115272-115287、115365-115380、134971-134986、102156-102171、139682-139697、139762-139777、139782-139797、144856-144871、144938-144953、148406-148421、148443-148458、148520-148535、181695-181710、182958-182973或183049-183064,其中该经修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1互补。

[0604] E9.如E1、E7或E8中任一项所述的化合物,其中该化合物包括经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成,这些核苷在SEQ ID NO:1的以下的外显子1核苷酸之内互补:2957-2972、3079-3094、3099-3114、3109-3124、3113-3128、3120-3135、3133-3148、3224-3239、3226-3241、3351-3366、3353-3368、3361-3376、3388-3403、3513-3528、3517-3532、3519-3534、3641-3656、3735-3750、3764-3779、3768-3783、3798-3813、3799-3814、3851-3866、3870-3885、3874-3889、3876-3891、3878-3893、3884-3899、3886-3901、3888-3903、3901-3916、3956-3971、3962-3977、3964-3979、3967-3982、4019-4034、4038-4053、4049-4064、4056-4071、4059-4074、4062-4077、4066-4081、4070-4085、4101-4116、4103-4118、4105-4120、4109-4124、4305-4320、4405-4420、4532-4547、4534-4549、4537-4552、4539-4554、4555-4570、4571-4586、4573-4588、4578-4593、4597-4612、4632-4647、4655-4670、4656-4671、4662-4677、4699-4714、4747-4762、4750-4765、4752-4767、4754-4769、4755-4770、4769-4784、4798-4813、4804-4819、4807-4822、4833-4848、4837-4852、4839-4854、4865-4880、4868-4883、4872-4887、4874-4889、4876-4891、4887-4902、4889-4904、4916-4931、4918-4933、4938-4953、4942-4957、4944-4959、4951-4966、5050-5065、5052-5067、5054-5069、5056-5071、5060-5075、5061-5076、5062-5077、5133-5148、5141-5156、5155-5170、5265-5280、5293-5308、5308-5323、5392-5407、5448-5463、5469-5484、5481-5496、5483-5498、5486-5501、5488-5503、5494-5509或5521-5536。

[0605] E10.如E9所述的化合物,其中该化合物包括经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成,这些核苷在SEQ ID NO:1的5052-5067外显子1核苷酸之内互补。

[0606] E11.如E1、E7或E8中任一项所述的化合物,其中该化合物包括经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核苷酸由10至30个连接的核苷组成,这些核苷在SEQ ID NO:1的以下内含子1核苷酸之内互补:5666-5681、6222-6237、6701-6716、7543-7558、8471-8486、8638-8653、9464-9479、10217-10232、10250-10265、10865-10880、11197-11212、11855-11870、13189-13204、13321-13336、13346-13361、16555-16570、16793-16808、16968-16983、17206-17221、18865-18880、29329-29344、32290-32305、33315-33330、39055-39070、40615-40630、42017-42032、56050-56065、58719-58734、58720-58739、58721-58736、58722-58737、58723-58738、58724-58739、58725-58740、58750-58769、58751-58766、58752-58767、58753-58768、58754-58769、58755-58770、60902-60917、67454-67469、114874-114889、115272-115287、115365-115380或134971-134986。

[0607] E12.如E11所述的化合物,其中该化合物包括经修饰的寡核苷酸,该经修饰的寡核

苷酸由10至30个连接的核苷组成,这些核苷在SEQ ID NO:1的以下项内含子1核苷酸之内互补:8638-8653、11197-11212、40615-40630、58719-58734、58720-58735或58721-58736。

[0608] E13.如E1-12中任一项所述的化合物,其中该经修饰的寡核苷酸包括至少一个经修饰的糖。

[0609] E14.如E13所述的化合物,其中至少一个经修饰的糖包括2'-O-甲氧基乙基基团。

[0610] E15.如E13所述的化合物,其中该至少一个经修饰的糖是二环糖。

[0611] E16.如E15所述的化合物,其中该二环糖包括4'-CH(CH₃)-O-2'基团。

[0612] E17.如E15所述的化合物,其中该二环糖包括4'-CH₂-O-2'或4'-(CH₂)₂-O-2'基团。

[0613] E18.如E1-17中任一项所述的化合物,其中该经修饰的寡核苷酸包括至少一个经修饰的核苷间连接。

[0614] E19.如E18所述的方法,其中该反义寡核苷酸的每个核苷间连接都是硫代磷酸酯核苷间连接。

[0615] E20.如E1-19中任一项所述的化合物,其中该经修饰的寡核苷酸包括至少一个经修饰核碱基。

[0616] E21.如E20所述的化合物,其中该经修饰核碱基是5-甲基胞嘧啶。

[0617] E22.如E1-21中任一项所述的化合物,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0618] 由连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0619] 由连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0620] 由连接的核苷组成的3'翼区段;

[0621] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间,并且其中每个翼区段的每个核苷都包括经修饰的糖。

[0622] E23.如E22所述的化合物,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0623] 由十个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0624] 由3个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0625] 由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0626] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷都包括2'-O-甲氧基乙基糖或受约束的乙基糖;并且其中每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0627] E24.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0628] 由9个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0629] 由3个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0630] 由4个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0631] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的3个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的4个连接的核苷从5'到3'方向是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0632] E25.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链

的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:39的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0633] 由9个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0634] 由3个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0635] 由4个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0636] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的3个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的4个连接的核苷从5'到3'方向是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0637] E26.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:39的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0638] 由8个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0639] 由4个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0640] 由4个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0641] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的4个连接的核苷从5'到3'方向是2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的4个连接的核苷从5'到3'方向是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0642] E27.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:39的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0643] 由8个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0644] 由5个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0645] 由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0646] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的5个连接的核苷从5'到3'方向是2'-O-甲氧基乙基糖、2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的3个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0647] E28.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:39的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0648] 由7个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0649] 由4个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0650] 由5个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0651] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的4个连接的核苷从5'到3'方向是2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖和受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的5个连接的核苷从5'到3'方向是受约束乙基(cEt)糖、受约束乙

基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、2'-O-甲氧基乙基糖和2'-O-甲氧基乙基糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0652] E29.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:35的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0653] 由7个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0654] 由6个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0655] 由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0656] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;该5'翼区段的6个连接的核苷从5'到3'方向是2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖、受约束乙基(cEt)糖、2'-O-甲氧基乙基糖、受约束乙基(cEt)糖和受约束乙基(cEt)糖;该3'翼区段的3个连接的核苷各自是受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0657] E30.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:43的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0658] 由10个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0659] 由3个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0660] 由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0661] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0662] E31.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:124的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0663] 由10个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0664] 由3个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0665] 由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0666] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0667] E32.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:150的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0668] 由10个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0669] 由3个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0670] 由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0671] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

啶。

[0672] E33.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:155的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0673] 由10个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0674] 由3个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0675] 由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0676] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0677] E34.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:169的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0678] 由10个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0679] 由3个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0680] 由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0681] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0682] E35.一种包括单链的经修饰的寡核苷酸的化合物或其药学上可接受的盐,该单链的经修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成,具有一个核碱基序列,该核碱基序列由SEQ ID NO:175的序列组成,其中该经修饰的寡核苷酸包括:

[0683] 由10个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;

[0684] 由3个连接的核苷组成的5'翼区段;和

[0685] 由3个连接的核苷组成的3'翼区段;

[0686] 其中该缺口区段位于该5'翼区段和该3'翼区段之间;每个翼区段的每个核苷都包括受约束乙基(cEt)糖;每个核苷间连接是硫代磷酸酯连接;并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0687] E36.如E1-35中任一项所述的化合物,其中该经修饰的寡核苷酸与编码雄激素受体的核酸至少90%互补。

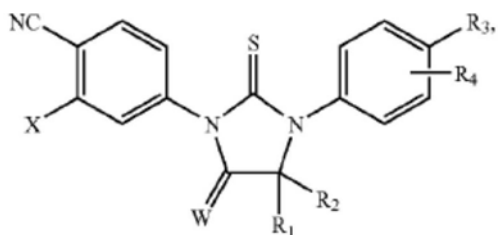
[0688] E37.如E1-36中任一项所述的化合物,其中该反义寡核苷酸与编码雄激素受体的核酸100%互补。

[0689] E38.如E37所述的化合物,其中该编码雄激素受体的核酸包括SEQ ID NO:1-8中任一项的核苷酸序列。

[0690] E39.一种组合物,包括E1-38中任一项所述的化合物、或其药学上可接受的盐,以及一种药学上可接受的稀释剂或载体。

[0691] E40.一种组合物,包括E1-38中任一项所述的化合物和具有式XVI的二芳基乙内酰胺雄激素受体(AR)抑制剂:

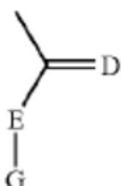
[0692]



(XVI)

[0693] 其中X选自下组,该组由三氟甲基和碘组成,其中W选自下组,该组由O和NR₅组成,其中R₅选自下组,该组由H、甲基组成,并且

[0694]



[0695] 其中D是S或O且E是N或O且G是烷基、芳基、经取代的烷基或经取代的芳基;或D是S或O且E-G一起是C₁-C₄低级烷基,

[0696] 其中R₁和R₂一起包括8个或更少的碳原子并且选自下组,该组由以下各项组成:烷基、经取代的烷基(包括卤代烷基)以及(和它们连接的碳一起)环烷基或经取代的环烷基基团,

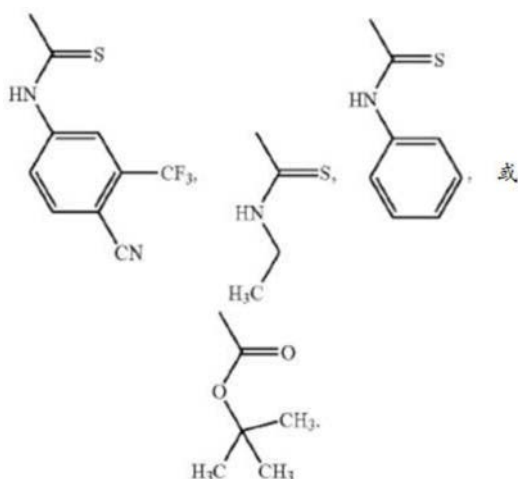
[0697] 其中R₃选自下组,该组由以下各项组成:氢、卤素、甲基、C₁-C₄烷氧基、甲酰基、卤代乙酰氧基、三氟甲基、氰基、硝基、羟基、苯基、氨基、甲基氨基甲酰基、甲氧基羰基、乙酰胺基、甲磺酰氨基、甲磺酰基、4-甲磺酰基-1-哌嗪基、哌嗪基、以及任选地被羟基、甲氧基羰基、氰基、氨基、胺基、硝基、氨基甲酰基取代的C₁-C₆烷基或烯基、或经取代的氨基甲酰基(包括甲基氨基甲酰基、二甲基氨基甲酰基和羟基乙基氨基甲酰基),

[0698] 其中R₄选自下组,该组由以下各项组成:氢、卤素、烷基和卤代烷基,并且

[0699] 其中R₃不是甲基氨基甲基或二甲基氨基甲基。

[0700] R₅可以是

[0701]



[0702] E₄₁.如E₄₀所述的组合物,其中该二芳基乙内酰脲雄激素受体(AR)抑制剂是MDV3100。

[0703] E₄₂.一种组合物,包括如E₁-38中任一项所述的化合物及选自以下项的抗雄激素

剂:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464。

[0704] E43. 一种治疗癌症的方法,该方法包括向具有癌症的受试者给予如E1-38中任一项所述的化合物或如E39-42中任一项所述的组合物,由此治疗该受试者中的癌症。

[0705] E44. 如E1-38中任一项所述的反义化合物或如权利要求39-42中任一项所述的组合物,用于在治疗癌症中使用

[0706] E45. 如E44所述的化合物或组合物,其中该癌症是前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌或膀胱癌。

[0707] E46. 如E45所述的化合物或组合物,其中该癌症是去势抗性前列腺癌。

[0708] E47. 如E46所述的化合物或组合物,其中该去势抗性前列腺癌对选自以下项的抗雄激素剂有抗性:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464。

[0709] E48. 如E43所述的方法,其中该癌症是前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌或膀胱癌。

[0710] E49. 如E48所述的方法,其中该癌症是去势抗性前列腺癌。

[0711] E50. 如E49所述的方法,其中该去势抗性前列腺癌对选自以下项的抗雄激素剂有抗性:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464。

[0712] E51. 如E44-47所述的化合物或如E49或E50所述的方法,其中该反义化合物靶向AR剪接变体。

[0713] E52. 如E51所述的化合物或方法,其中该AR剪接变体缺乏功能性配体结合结构域。

[0714] E53. 如E44-47所述的化合物或如E49-52中任一项所述的方法,其中该反义化合物能够降低全长AR和缺乏外显子4-8中任一项的AR剪接变体的表达。

[0715] E54. 如E51所述的化合物或方法,其中该AR剪接变体由外显子1-3组成。

[0716] E55. 如E44-47所述的化合物或如E49-52中任一项所述的方法,其中该反义化合物靶向AR的外显子3的3'端的上游并且与靶向AR的外显子3的3'端的下游区域的反义化合物相比能够更大程度地抑制前列腺癌细胞的生长或增殖。

[0717] E56. 如E55所述的化合物或方法,其中该靶向AR的外显子3的3'端的下游区域的反义化合物能够降低全长AR的水平,但不能降低由外显子1-3组成的AR剪接变体的水平。

[0718] E57. 如E56所述的化合物,其中在该外显子3的3'端的下游的区域包括外显子4。

[0719] E58. 如E44-47所述的化合物或如E49-52中任一项所述的方法,其中该前列腺癌细胞优先地表达AR剪接变体超过全长AR。

[0720] E59. 如E58所述的化合物或方法,其中该AR剪接变体缺乏功能性配体结合结构域。

[0721] E60. 一种治疗受试者中的前列腺癌的方法,该前列腺癌对选自以下项的抗雄激素剂具有抗性:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464,该方法包括向该受试者给予靶向人雄激素受体(AR)的外显子3的3'端上游的反义化合物,由此治疗前列腺癌。

[0722] E61. 如E60所述的方法,其中该受试者被诊断为具有前列腺癌,该前列腺癌对选自以下项的抗雄激素剂有抗性:MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464。

[0723] E62. 如E60或E61所述的方法,其中该反义化合物靶向AR剪接变体。

[0724] E63. 如E62所述的方法,其中该AR剪接变体缺乏功能性配体结合结构域。

[0725] E64. 如E60-63中任一项所述的方法,其中该反义化合物能够降低全长AR和缺乏外

显子4-8中任一项的AR剪接变体的表达。

[0726] E65. 如E64所述的方法, 其中该AR剪接变体由外显子1-3组成。

[0727] E66. 如E60-65中任一项所述的方法, 其中将该反义化合物靶向AR的外显子3的3'端的上游并且与靶向AR的外显子3的3'端的下游区域的反义化合物相比能够更大程度地抑制前列腺癌细胞的生长或增殖, 该前列腺癌细胞对二芳基乙内酰脲雄激素受体 (AR) 抑制剂有抗性。

[0728] E67. 如E66所述的方法, 其中该靶向AR的外显子3的3'端的下游区域的反义化合物能够降低全长AR的水平, 但不能降低缺乏外显子4-8中任一项的AR剪接变体的水平。

[0729] E68. 如E67所述的方法, 其中该AR剪接变体由外显子1-3组成。

[0730] E69. 如E68所述的方法, 其中在该外显子3的3'端的下游的区域包括外显子4。

[0731] E70. 如E60-69中任一项所述的方法, 其中该前列腺癌是去势抗性的。

[0732] E71. 如E60-70中任一项所述的方法, 其中该前列腺癌包括优先地表达AR剪接变体超过全长AR的细胞。

[0733] E72. 如E71所述的方法, 其中该AR剪接变体缺乏外显子4-8中任一项。

[0734] E73. 如E72所述的方法, 其中该AR剪接变体由外显子1-3组成。

[0735] E74. 如E72所述的方法, 其中该AR剪接变体缺乏功能性配体结合结构域。

[0736] E75. 一种抑制前列腺癌细胞生长或增殖的方法, 该方法包括使前列腺癌细胞与靶向人雄激素受体 (AR) 的反义化合物和抗雄激素剂接触, 该抗雄激素剂选自: MDV3100、ARN-059、ODM-201、阿比特龙、TOK001、TAK700和VT464, 其中该反义化合物和该抗雄激素剂组合协同以抑制前列腺癌细胞的生长或增殖。

[0737] E76. 如E75所述的方法, 其中将该反义化合物靶向AR的外显子3的3'端的上游。

[0738] E77. 如E75或E76所述的方法, 其中将该前列腺癌细胞与一定量的该反义化合物和一定量的抗雄激素剂接触, 所述的量在组合中各自低于或两者都低于该反义化合物亦或抗雄激素剂在抑制所述前列腺癌细胞的生长或增殖中单独有效的量。

[0739] E78. 如E75-77中任一项所述的方法, 其中与该单独的反义化合物或该单独的抗雄激素剂相比, 该反义化合物和该抗雄激素剂在抑制所述前列腺癌细胞的生长或增殖中提供比加和更大的效应。

[0740] E79. 如E75-78中任一项所述的方法, 其中该反义化合物靶向AR剪接变体。

[0741] E80. 如E79所述的方法, 其中该AR剪接变体缺乏功能性配体结合结构域。

[0742] E81. 如E75-80中任一项所述的方法, 其中该反义化合物能够减少全长AR和由外显子1-3组成的AR剪接变体的表达。

[0743] E82. 一种抑制雄激素受体 (AR) - 阳性乳腺癌细胞的生长或增殖的方法, 该方法包括使该乳腺癌细胞与靶向人雄激素受体 (AR) 的反义化合物接触, 其中该乳腺癌细胞的生长或增殖被抑制。

[0744] E83. 一种抑制具有或有风险具有雄激素受体 (AR) - 阳性乳腺癌的受试者中AR表达的方法, 该方法包括:

[0745] 鉴定具有或有风险具有AR-阳性乳腺癌的受试者, 并且

[0746] 向该受试者给予一种靶向人AR的反义化合物,

[0747] 其中该反义化合物抑制该受试者中的AR表达。

[0748] E84. 一种治疗受试者中的AR-阳性乳腺癌的方法,该方法包括向该受试者给予一种靶向人雄激素受体(AR)的反义化合物,由此治疗该受试者中的乳腺癌。

[0749] E85. 如E82-84中任一项所述的方法,其中该AR-阳性乳腺癌或乳腺癌细胞依赖于雄激素表达而生长。

[0750] E86. 如E82-85中任一项所述的方法,其中该乳腺癌或乳腺癌细胞是雌激素受体(ER)-阴性、孕酮受体(PR)-阴性、或Her2/neu-阴性。

[0751] E87. 如E82-85中任一项所述的方法,其中该乳腺癌或乳腺癌细胞是ER-阳性和AR-阳性。

[0752] E88. 如E82-85中任一项所述的方法,其中该乳腺癌或乳腺癌细胞是ER-阴性和AR-阳性。

[0753] E89. 如E82-88中任一项所述的方法,其中该乳腺癌或乳腺癌细胞是顶浆分泌的乳腺癌或乳腺癌细胞。

[0754] E90. 如E60-88中任一项所述的方法,其中该反义化合物是如E1-38中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

[0755] E91. 如E60-88中任一项所述的方法,其中该反义化合物是如E24-35中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

具体实施方式

[0756] 非限制性披露和通过引用结合

[0757] 尽管在此描述的某些化合物、组合物以及方法已经根据某些实施例特定地进行了描述,但以下实例仅用以说明在此所述的化合物并且不是旨在限制这些化合物的。在本申请中引用的各个参考文献通过引用以其全文结合在此。

[0758] 实例1:在HuVEC细胞中的人AR的反义抑制

[0759] 反义寡核苷酸被设计为靶向AR核酸,并且将它们针对其在体外对AR mRNA的作用进行测试。将这些反义寡核苷酸在一系列具有相似培养条件的实验中进行测试。对于每个实验的结果呈现于下文所示的单独的表中。使用电穿孔用500nM反义寡核苷酸来对具有每孔20,000个细胞的密度的经培养的HuVEC细胞进行转染。在大约24小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人类引物探针组RTS3559(正向序列TCCTTCACCAATGTCAACTCC,在此指定为SEQ ID NO:9;反向序列GAGCCATCCAACTCTTGAGA,在此指定为SEQ ID NO:10;探针序列AGTACCGCATGCACAAGTCCCG,在此指定为SEQ ID NO:11)测量mRNA水平。根据如通过RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。对总计155种寡核苷酸进行测试。只有那些被选择用于进一步研究的寡核苷酸示于表1和表2中。

[0760] 表1和表2中新设计的嵌合反义寡核苷酸被设计为3-10-3(S)-cET缺口体。缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括十个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向和3'方向上均包括三个核苷的翼区段。在5'翼区段中的各个核苷和在3'翼区段中的各个核苷具有(S)-cEt修饰。遍及各缺口体,核苷间连接是硫代磷酸酯连接。遍及各缺口体,所有的胞嘧啶残基均是5-甲基胞嘧啶。“起始位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最5'-的核苷。“终止位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最3'-的核苷。列出于表1和表2中的

每个缺口体靶向人AR基因组序列(在此指定为SEQ ID NO:1 (GENBANK登录号NT_011669.17, 从其核苷酸5079000至5270000截取))或人AR mRNA序列(在此指定为SEQ ID NO:2 (GENBANK登录号NM_000044.3)或两者。‘n/a’指示寡核苷酸不靶向该特定基因序列。

[0761] 表1

[0762]	对于 SEQ ID NO: 1 的靶标起 始位点	对于 SEQ ID NO: 2 的 靶标起始 位点	ISIS 号	序列	%抑制	SEQ ID NO
[0763]	3799	937	549332	GCGCTCTGACAGCCTC	84	12
	3851	989	549334	CACCTGCGGGAAGCTC	83	13
	3888	1026	549338	GGCTGTGATGATGCGG	83	14
	4047	1185	549345	TCTGGAACAGATTCTG	82	191
	4059	1197	549347	CTTCGCGCACGCTCTG	84	15
	4534	1672	549358	ATGGTGCTGGCCTCGC	91	16
	4655	1793	549360	GGTCGAAGTGCCCCCT	89	17
	4699	1837	549361	GACACCGACACTGCCT	84	18
	4755	1893	549362	CCCGAAGCTGTTCCCC	85	19
	4865	2003	549366	CTTGCTGCGCTGTCG	84	20
	5060	2198	549371	GTTGTAGTAGTCGCGA	93	21
	5062	2200	549372	AAGTTGTAGTAGTCGC	92	22
	5155	2293	549374	GCGCTGCCGTAGTCCA	93	23
	5265	2403	549377	AGGATGAGGAAGCGGC	90	24
	5392	2530	549379	GCTCCCGCCTCGCCGC	86	25
	5448	2586	549380	CGCTTTCCTGGCCCGC	94	26
	5483	2621	549381	GCCGCCAGGGTACCAC	89	27
	n/a	2721	549383	CCAAACGCATGTCCCC	88	28
	102155	2800	549386	GCTTCATCTCCACAGA	77	192
	102156	2801	549387	AGCTTCATCTCCACAG	84	29
	n/a	2871	549388	TCCCTTCAGCGGCTCT	88	30
	144856	2801	549390	TTTCTGCTGGCGCACA	89	31

[0764] 表2

[0765]

对于 SEQ ID NO: 1 的靶标起始位点	对于 SEQ ID NO: 2 的靶标起始位点	ISIS 号	序列	%抑制	SEQ ID NO
181695	3602	549414	GTTCATTCGAAGTTCA	81	32
182958	4164	549432	GAGGATCATCACAGAT	90	33
183049	4255	549434	CTAAACTTCCCGTGGC	96	34
58721	n/a	549457	TTGATTTAATGGTTGC	98	35
58751					
58722	n/a	549458	GTTGATTTAATGGTTG	95	36
58752					
58725	n/a	549459	ATGGTTGATTTAATGG	96	37
58755					

[0766] 实例2:在HuVEC细胞中的人AR的剂量依赖性反义抑制

[0767] 来自上述研究并展现显著的对AR mRNA的体外抑制的缺口体被选择并在HuVEC细胞中以不同的剂量来测试。将细胞以20,000个细胞/孔的密度进行铺板并且使用电穿孔用18.5nM、55.6nM、166.7nM、500.0nM和1500.0nM浓度的反义寡核苷酸进行转染,如表3和表4中所指定的。在大约16小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人AR引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过 RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。将这些反义寡核苷酸在一系列具有相似培养条件的实验中进行测试。对于每个实验的结果呈现于下文所示的单独的表中。

[0768] 各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC₅₀)也呈现于表3和表4中。如所展示的,在反义寡核苷酸处理的细胞中ARmRNA水平是以剂量依赖性方式降低的。

[0769] 表3

[0770]

ISIS 号	18.5 nM	55.6 nM	166.7 nM	500.0 nM	1500.0 nM	IC ₅₀ (nM)
549358	0	29	63	85	95	141
549360	2	44	58	79	83	116
549361	0	12	30	52	66	525
549362	0	10	23	57	74	447
549371	0	30	52	83	88	148
549372	0	22	51	85	89	150
549374	15	40	59	83	92	108
549377	0	13	52	72	93	216
549379	9	11	51	68	88	237
549380	14	50	87	94	98	62
549381	4	14	33	71	91	261
549383	2	10	34	75	88	270
549388	0	15	42	36	86	428
549390	12	0	35	55	91	369

[0771] 表4

[0772]

ISIS 号	18.5 nM	55.6 nM	166.7 nM	500.0 nM	1500.0 nM	IC ₅₀ (nM)
549332	24	35	57	79	79	104
549334	9	29	46	63	72	253
549338	30	32	47	67	78	154
549347	5	15	37	62	71	357
549366	8	44	58	72	91	129
549387	2	9	41	68	92	261
549414	0	21	35	53	76	366
549432	10	15	46	80	92	179
549434	27	38	60	86	96	85
549457	50	70	95	99	99	18
549458	22	48	84	97	98	57
549459	51	61	90	94	97	18

[0773] 实例3:在HuVEC细胞中的人AR的反义抑制

[0774] 另外的反义寡核苷酸被设计为靶向AR核酸,并且将它们针对其在体外对AR mRNA的作用进行测试。使用电穿孔用500nM反义寡核苷酸来对具有每孔20,000个细胞的密度的经培养的HuVEC细胞进行转染。在大约24小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人类引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。对总计82种寡核苷酸进行测试。只有那些被选择用于进一步研究的寡核苷酸示于表5中。

[0775] 表5中新设计的嵌合反义寡核苷酸被设计为3-10-3(S)-cET缺口体或5-10-5MOE缺口体。3-10-3(S)-cEt缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括十个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向和3'方向上均包括三个核苷的翼区段。在5'翼区段中的各个核苷和在3'翼区段中的各个核苷具有(S)-cEt修饰。5-10-5MOE缺口体是20个核苷长,其中中央缺口区段包括十个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向和3'方向上各自包括五个核苷的翼区段。在5'翼区段中的各个核苷和在3'翼区段中的各个核苷具有2'-MOE修饰。遍及各缺口体,核苷间连接是硫代磷酸酯连接。遍及各缺口体,所有的胞嘧啶残基均是5-甲基胞嘧啶。“起始位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最5'-的核苷。“终止位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最3'-的核苷。列出于表5中的各个缺口体靶向人AR基因组序列,在此指定为SEQ ID NO:1 (GENBANK登录号NT_011669.17,从其核苷酸5079000至5270000截取)

[0776] 表5

[0777]	靶标起始位点	靶标终止位点	ISIS 号	ISIS 号	基序	%抑制	SEQ ID NO
	58721	58736	549457	TTGATTTAATGGTTGC	3-10-3	98	35
	58751	58766					
	58722	58737	549458	GTTGATTTAATGGTTG	3-10-3	94	36
	58752	58767					
	58725	58740	549459	ATGGTTGATTTAATGG	3-10-3	92	37
	58755	58770					
	58720	58739	560071	TGGTTGATTTAATGGTTGCA	5-10-5	73	38
	58750	58769					
	58720	58735	560098	TGATTTAATGGTTGCA	3-10-3	99	39
	58750	58765					
	58723	58738	560099	GGTTGATTTAATGGTT	3-10-3	95	40
	58753	58768					
	58724	58739	560100	TGGTTGATTTAATGGT	3-10-3	91	41
	58754	58769					
	58721	58736	560137	TTGATTTAATGGTTGC	3-10-3	95	35
	58751	58766					

[0778] 实例4:在HuVEC细胞中的人AR的剂量依赖性反义抑制

[0779] 来自上述研究并展现显著的对AR mRNA的体外抑制的缺口体被选择并在HuVEC细胞中以不同的剂量来测试。将细胞以20,000个细胞/孔的密度进行铺板并且使用电穿孔用31.3nM、62.5nM、125.0nM、250.0nM、500.0nM、和1000.0nM浓度的反义寡核苷酸进行转染,如表6中所指定的。在大约16小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人AR引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。将这些反义寡核苷酸在一系列具有相似培养条件的实验中进行测试。对于每个实验的结果呈现于下文所示的单独的表中。

[0780] 各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC₅₀)也呈现于表6中。如所展示的,在反义寡核苷酸处理的细胞中ARmRNA水平是以剂量依赖性方式降低的。

[0781] 表6

[0782]	ISIS 号	31.25 nM	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
	549457	40	57	78	89	96	96	0.03
	549458	15	25	47	70	88	93	0.1
	549459	16	23	50	71	85	92	0.1
	560071	7	0	19	40	57	76	0.4
	560098	20	41	64	83	94	94	0.1
	560099	13	29	58	72	89	94	0.1
	560100	16	24	53	69	81	93	0.1
	560137	27	49	61	82	91	96	0.1

[0783] 实例5:在HuVEC细胞中的人AR的反义抑制

[0784] 另外的反义寡核苷酸被设计为靶向AR核酸,并且将它们针对其在体外对AR mRNA的作用进行测试。使用电穿孔用250nM反义寡核苷酸来对具有每孔20,000个细胞的密度的经培养的HuVEC细胞进行转染。在大约24小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且

通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人类引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过 RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。对总计40种寡核苷酸进行测试。只有那些被选择用于进一步研究的寡核苷酸示于表7中。

[0785] 表7中新设计的嵌合反义寡核苷酸被设计为3-10-3 (S) -cEt缺口体或脱氧的、MOE及 (S) -cEt寡核苷酸。3-10-3 (S) -cEt缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括十个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向和3'方向上均包括三个核苷的翼区段。在5'翼区段中的各个核苷和在3'翼区段中的各个核苷具有 (S) -cEt修饰。脱氧的、MOE及 (S) -cEt寡核苷酸是16个核苷长,其中该核苷具有MOE糖修饰、(S) -cEt糖修饰、或脱氧修饰。‘化学性’一栏描述了每个寡核苷酸的糖修饰。‘k’指示 (S) -cEt糖修饰;数目指示脱氧核苷的数目;并且‘e’指示MOE修饰。遍及各缺口体,核苷间连接是硫代磷酸酯连接。遍及各缺口体,所有的胞嘧啶残基均是5-甲基胞嘧啶。在表中列出的SEQ ID NO是指寡核苷酸序列。“起始位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最5'-的核苷。“终止位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最3'-的核苷。列出于表7中的各个缺口体靶向人AR基因组序列,在此指定为SEQ ID NO:1 (GENBANK登录号NT_011669.17,从其核苷酸5079000至5270000截取)。

[0786] 表7

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	化学性	%抑制	SEQ ID NO
58721	58736	TTGATTTAATGGTTGC	549457	kkk-10-kkk	67	35
58751	58766					
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	kkk-10-kkk	71	36
58752	58767					
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	560098	kkk-10-kkk	69	39
58750	58765					
58721	58736	TTGATTTAATGGTTGC	560131	kkk-9-kkke	74	35
58751	58766					
58721	58736	TTGATTTAATGGTTGC	560137	ekkk-8-kkke	66	35
58751	58766					
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	569213	kkk-9-kkke	69	39
58750	58765					
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	569216	ekkk-8-kkke	68	39
58750	58765					
58721	58736	TTGATTTAATGGTTGC	569222	ekkk-8-kkk	74	35
58751	58766					
58721	58736	TTGATTTAATGGTTGC	569228	ekkk-7-kkke	67	35
58751	58766					
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	569236	ekkk-7-kkkee	66	39
58750	58765					

[0788] 实例6:在HuVEC细胞中的人AR的剂量依赖性反义抑制

[0789] 来自上述研究并展现显著的对AR mRNA的体外抑制的缺口体被选择并在HuVEC细胞中以不同的剂量来测试。将细胞以20,000个细胞/孔的密度进行铺板并且使用电穿孔用31.3nM、62.5nM、125.0nM、250.0nM、500.0nM、和1000.0nM浓度的反义寡核苷酸进行转染,如表8中所指定的。在大约16小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量

PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人AR引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。将这些反义寡核苷酸在一系列具有相似培养条件的实验中进行测试。对于每个实验的结果呈现于下文所示的单独的表中。

[0790] 各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC₅₀)也呈现于表8中。如所展示的,在反义寡核苷酸处理的细胞中ARmRNA水平是以剂量依赖性方式降低的。

[0791] 表8

ISIS 号	31.25 nM	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549457	34	44	75	82	93	96	0.06
549458	30	36	54	70	85	90	0.10
560098	30	54	65	78	89	97	0.07
560131	16	48	65	82	89	97	0.09
560137	35	39	64	73	89	94	0.08
569213	35	53	65	83	94	96	0.06
569216	38	51	68	83	91	96	0.05
569222	36	48	67	83	91	98	0.06
569228	26	43	62	78	88	92	0.09
569236	17	39	54	79	84	92	0.11

[0793] 实例7:在HuVEC细胞中的人AR的剂量依赖性反义抑制

[0794] 将另外的反义寡核苷酸设计为靶向AR基因序列的脱氧的、MOE及(S)-cEt寡核苷酸,并且对其在HuVEC细胞中以不同的剂量进行测试。这些寡核苷酸是16个核苷长,其中该核苷具有MOE糖修饰、(S)-cEt糖修饰、或脱氧修饰。‘化学性’一栏描述了每个寡核苷酸的糖修饰。‘k’指示(S)-cEt糖修饰;数目指示脱氧核苷的数目;另外‘d’指示脱氧核糖;并且‘e’指示MOE修饰。遍及各缺口体,核苷间连接是硫代磷酸酯连接。遍及各缺口体,所有的胞嘧啶残基均是5-甲基胞嘧啶。在表中列出的SEQ ID NO是指寡核苷酸序列。“起始位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最5’-的核苷。“终止位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最3’-的核苷。列出于表9中的各个缺口体靶向人AR基因组序列,在此指定为SEQ ID NO:1 (GENBANK登录号NT_011669.17,从其核苷酸5079000至5270000截取)

[0795] 表9

靶标起 始位点	靶标终 止位点	序列	ISIS 号	化学性	SEQ ID NO
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	569221	eekkk-8-kkk	39
58750	58765				
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	569227	eekkk-7-kkke	39

[0797]

58750	58765				
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	569236	ekkk-7-kkkee	39
58750	58765				
58720	58735				
58750	58765	TGATTTAATGGTTGCA	579666	ekkekk-7-kk	39
58721	58736				
58751	58766				
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	579670	ekkekk-7-kkk	39
58750	58765				
58721	58736				
58751	58766	TTGATTTAATGGTTGC	579671	ekkekk-7-kkk	35
58721	58736				
58751	58766				
58723	58738	GGTTGATTTAATGGTT	579669	ekkekk-7-kk	40
58753	58768				
58722	58737				
58752	58767	GTTGATTTAATGGTTG	579672	ekkekk-7-kkk	36
58722	58737				
58752	58767				
58723	58738	GGTTGATTTAATGGTT	569217	ekkk-8-kkke	36
58753	58768				
58723	58738				
58753	58768	GGTTGATTTAATGGTT	569214	kkk-9-kkke	40
58723	58738				
58753	58768				
58723	58738	GGTTGATTTAATGGTT	560099	kkk-10-kkk	40
58753	58768				
58723	58738				

[0798] 将细胞以20,000个细胞/孔的密度进行铺板并且使用电穿孔用62.5nM、125.0nM、250.0nM、500.0nM、以及1000.0nM浓度的反义寡核苷酸进行转染,如表10-12中所指定的。在大约16小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人AR引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。将这些反义寡核苷酸在一系列具有相似培养条件的实验中进行测试。对于每个实验的结果呈现于下文所示的单独的表中。

[0799] 各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC₅₀)也呈现于表10-12中。如所展示的,在一些经反义寡核苷酸处理的细胞中ARmRNA水平是以剂量依赖性方式降低的。

[0800] 表10

[0801]

ISIS 号	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	IC ₅₀ (nM)
549458	25	46	55	64	78	203
569227	8	40	33	51	73	388
569228	29	44	63	77	87	158
569236	4	35	54	68	88	252
579666	33	34	47	64	80	229
579667	30	29	44	36	76	411

[0802] 表11

ISIS 号	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	IC ₅₀ (nM)
549458	16	22	44	64	74	324
579669	24	39	45	74	91	207
579670	27	28	55	75	70	236
579671	6	40	54	57	77	288
579672	9	30	50	72	86	258

[0804] 表12

ISIS 号	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	IC ₅₀ (nM)
549458	19	22	45	38	71	470
569214	20	26	61	62	76	265
569217	34	39	49	64	64	247
569221	12	32	59	57	73	294

[0806] 实例8:在HuVEC细胞中的人AR的反义抑制

[0807] 另外的反义寡核苷酸被设计为靶向AR核酸,并且将它们针对其在体外对AR mRNA的作用进行测试。使用电穿孔用1,000nM反义寡核苷酸来对具有每孔20,000个细胞的密度的经培养的HuVEC细胞进行转染。在大约24小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人类引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过 RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。对总计75种寡核苷酸进行测试。只有那些被选择用于进一步研究的寡核苷酸示于表13中。

[0808] 在表13中的新设计的嵌合反义寡核苷酸被设计为3-10-3(S)-cEt缺口体、3-9-4(S)-cEt缺口体、4-8-4(S)-cEt缺口体、4-9-3(S)-cEt缺口体、5-7-4(S)-cEt缺口体、5-8-3(S)-cEt缺口体、6-7-3(S)-cEt缺口体、或脱氧的、MOE及(S)-cEt寡核苷酸。3-10-3(S)-cEt缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括十个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向和3'方向上均包括三个核苷的翼区段。3-9-4(S)-cEt缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括九个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向上包括三个核苷酸并在3'方向上包括四个核苷的翼区段。4-8-4(S)-cEt缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括八个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向和3'方向上均包括四个核苷的翼区段。4-9-3(S)-cEt缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括九个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向上包括四个核苷酸并在3'方向上包括三个核苷的翼区段。5-7-4(S)-cEt缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括七个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向上包括五个核苷酸并在3'方向上包括四个核苷酸的翼区段。5-8-3(S)-cEt缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括八个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向上包括五个核苷酸并在3'方向上包括三个核苷的翼区段。6-7-3(S)-cEt缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括七个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向上包括六个核苷酸并在3'方向上包括三个核苷的翼区段。在5'翼区段中的各个核苷和在3'翼区段中的各个核苷具有(S)-cEt修饰。脱氧的、MOE及(S)-cEt寡核苷酸是16个核苷长,其中该核苷具有MOE糖修饰、(S)-cEt糖修饰、或脱氧修饰。‘化学性’一栏描述了每个寡核苷酸的糖修饰。‘k’指示(S)-cEt糖修饰;数目指示脱氧核苷的数目;另外‘d’指示脱氧

核糖;并且‘e’指示MOE修饰。遍及各缺口体,核苷间连接是硫代磷酸酯连接。遍及各缺口体,所有的胞嘧啶残基均是5-甲基胞嘧啶。

[0809] 在表中列出的SEQ ID NO是指寡核苷酸序列。“起始位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最5’-的核苷。“终止位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最3’-的核苷。列出于表13中的各个缺口体靶向人AR基因组序列,在此指定为SEQ ID NO:1 (GENBANK登录号NT_011669.17,从其核苷酸5079000至5270000截取)。

[0810] 表13

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	化学性	%抑制	SEQ ID NO
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	kkk-10-kkk	64	22
5061	5076	AGTTGTAGTAGTCGCG	585233	kkk-8-keeee	69	42
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	585259	ekkk-9-kkk	71	22
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	585262	kkk-9-kkke	77	22
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	585263	kkk-8-kkkee	69	22
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	585264	kkk-7-kkkeee	62	22
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	585265	eekk-8-kkee	69	22
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	585268	keke-8-ekék	72	22
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	585269	ekék-8-ekék	73	22
[0811] 5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	585271	ekk-10-kke	57	22
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	585274	kkk-10-kke	65	22
58719	58734	GATTTAATGGTTGCAA	586124	kkk-10-kkk	82	43
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	569227	eekkk-7-kkke	51	39
58750	58765					
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	560132	kkk-9-kkke	58	36
58752	58767					
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	569229	eekkk-7-kkke	57	36
58752	58767					
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	569238	ekkk-7-kkkee	51	36
58752	58767					
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	kkk-10-kkk	87	36
58752	58767					
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	569223	eekkk-8-kkk	59	36
58752	58767					
58724	58739	TGGTTGATTTAATGGT	569215	kkk-9-kkke	59	41
58754	58769					
58725	58740	ATGGTTGATTTAATGG	560133	kkk-9-kkke	53	37
58755	58770					
58725	58740	ATGGTTGATTTAATGG	569220	ekkk-8-kkke	58	37
58755	58770					
58721	58736	TTGATTTAATGGTTGC	586224	kkkkk-8-kkk	90	35
58751	58766					
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	586225	kkkkk-8-kkk	88	36
58752	58767					
58720	58735	TGATTTAATGGTTGCA	586227	kkkkk-8-kkk	87	39
58750	58765					

[0813] 实例9:在HuVEC细胞中的人AR的剂量依赖性反义抑制

[0814] 来自上述研究并展现显著的对AR mRNA的体外抑制的反义寡核苷酸被选择并在

HuVEC细胞中以不同的剂量来测试。将细胞以20,000个细胞/孔的密度进行铺板并且使用电穿孔用31.25nM、62.5nM、125.0nM、250.0nM、500.0nM、和1000.0nM浓度的反义寡核苷酸进行转染,如表14中所指定的。在大约16小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人AR引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。将这些反义寡核苷酸在一系列具有相似培养条件的实验中进行测试。对于每个实验的结果呈现于下文所示的单独的表中。

[0815] 各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC_{50})也呈现于表14中。如所展示的,在反义寡核苷酸处理的细胞中ARmRNA水平是以剂量依赖性方式降低的。

[0816] 表14

[0817]	ISIS 号	31.25 nM	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	IC_{50} nM
	549372	2	17	31	51	61	80	271
	549458	0	19	40	63	74	90	196
	560132	8	19	21	53	65	85	252
	560133	17	15	24	35	58	79	336
	569215	12	2	26	55	71	90	234
	569220	11	29	34	43	59	78	275
	569223	21	20	30	59	73	87	191
	569227	13	22	45	46	61	74	255
	569229	16	14	36	47	74	84	220
	569238	4	32	33	54	71	88	202

[0818] 实例10:在HuVEC细胞中的人AR的剂量依赖性反义抑制

[0819] 来自实例8并展现显著的对AR mRNA的体外抑制的缺口体被选择并在HuVEC细胞中以不同的剂量来测试。将细胞以20,000个细胞/孔的密度进行铺板并且使用电穿孔用46.9nM、187.5nM、750.0nM、以及3000.0nM浓度的反义寡核苷酸进行转染,如表15中所指定的。在大约16小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人AR引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准ARmRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。

[0820] 各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC_{50})也呈现于表15中。如所展示的,在反义寡核苷酸处理的细胞中ARmRNA水平是以剂量依赖性方式降低的。

[0821] 表15

[0822]

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	9	41	66	87	0.29
549458	15	50	85	96	0.19
586124	28	47	84	94	0.13
586224	39	75	93	98	0.05
586225	17	61	89	97	0.13
586227	20	60	88	96	0.13

[0823] 实例11:在HuVEC细胞中的人AR的反义抑制

[0824] 另外的反义寡核苷酸被设计为靶向AR核酸,并且将它们针对其在体外对AR mRNA的作用进行测试。使用电穿孔用500nM反义寡核苷酸来对具有每孔20,000个细胞的密度的经培养的HuVEC细胞进行转染。在大约24小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人类引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。对总计616种寡核苷酸进行测试。只有那些被选择用于进一步研究的寡核苷酸示于表16-23中。

[0825] 表16-23中新设计的嵌合反义寡核苷酸被设计为3-10-3(S)-cET缺口体。缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括十个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向和3'方向上均包括三个核苷的翼区段。在5'翼区段中的各个核苷和在3'翼区段中的各个核苷具有(S)-cEt修饰。遍及各缺口体,核苷间连接是硫代磷酸酯连接。遍及各缺口体,所有的胞嘧啶残基均是5-甲基胞嘧啶。

[0826] 在表中列出的SEQ ID NO是指寡核苷酸序列。“起始位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最5'-的核苷。“终止位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最3'-的核苷。列出于表16-23中的每个缺口体靶向人AR基因组序列(在此指定为SEQ ID NO:1(GENBANK登录号NT_011669.17,从其核苷酸5079000至5270000截取))或人AR mRNA序列(在此指定为SEQ ID NO:2(GENBANK登录号NM_000044.3)或两者。‘n/a’指示寡核苷酸不靶向该特定基因序列。

[0827] 表16

[0828]

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	47	22
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	60	36
58752	58767				
2957	2972	ACAGCACTGGAGCGGC	583542	45	44
3079	3094	AACTTCACCGAAGAGG	583556	43	45
3099	3114	AGTCTTTAGCAGCTTT	583559	52	46
3109	3124	GCTTCCTCCGAGTCTT	583564	45	47
3113	3128	CCTTGCTTCCTCCGAG	583566	47	48
3120	3135	GCACTTTCCTTGCTTC	583567	52	49
3133	3148	TCAGTCCTACCAGGCA	583571	43	50
3224	3239	GACTGAGGCAGCTGCG	583583	45	51
3226	3241	CCGACTGAGGCAGCTG	583584	44	52

[0829] 表17

[0830]

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	40	22
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	46	36
58752	58767				
3351	3366	GCTAGCTCGCCCGCTC	583608	51	53
3353	3368	CAGTAGCTCGCCCGC	583609	51	54
3361	3376	GCAATGTGCAGCTAGC	583613	51	55
3388	3403	GTCGCCTGGCTCCTAA	583620	41	56
3513	3528	CTGGCTCCGCACTCGG	583635	50	57
3517	3532	ATCTCTGGCTCCGCAC	583637	43	58
3519	3534	TGATCTCTGGCTCCGC	583638	51	59
3641	3656	AGTGTCCACTGAAGTA	583642	42	60
3735	3750	AGGCTCACAGTCTGTC	583649	46	61
3764	3779	GACACACGGTGGACAA	583660	44	62
3768	3783	AGAAGACACACGGTGG	583662	51	63
3798	3813	CGCTCTGACAGCCTCA	583667	42	64

[0831] 表18

[0832]

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
--------	--------	----	--------	-----	-----------

[0833]

5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	26	22
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	48	36
58752	58767				
3870	3885	GTCGCTGCAGCTAGCT	583685	47	65
3874	3889	GGTAGTCGCTGCAGCT	583687	41	66
3876	3891	GCGGTAGTCGCTGCAG	583688	38	67
3878	3893	ATGCGGTAGTCGCTGC	583689	39	68
3884	3899	GTGATGATGCGGTAGT	583692	41	69
3886	3901	CTGTGATGATGCGGTA	583693	36	70
3901	3916	GAAGAGTTCAACAGGC	583700	36	71
3956	3971	GCTTGCTGAATCTTC	583709	39	72
3962	3977	CCTTGAGCTTGGCTGA	583712	37	73
3964	3979	ATCCTTGAGCTTGGCT	583713	36	74
3967	3982	TCCATCCTTGAGCTTG	583714	36	75
4019	4034	GTAGGTCTTGGACGGC	583719	36	76
4038	4053	GATTCTGGAAAGCTCC	583727	40	77
4049	4064	GCTCTGGAACAGATTC	583728	45	78
4056	4071	CGCGCACGCTCTGGAA	583731	34	79
4062	4077	TCACTTCGCGCACGCT	583734	46	80
4066	4081	TGGATCACTTCGCGCA	583736	47	81
4070	4085	GTTCTGGATCACTTCG	583738	36	82
4101	4116	CGCTCGCGGCCTCTGG	583745	40	83
4103	4118	TGCGCTCGCGGCCTCT	583746	32	84
4105	4120	GCTGCGCTCGCGGCCT	583747	35	85

[0834] 表19

[0835]

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	39	22
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	50	36
58752	58767				
4109	4124	AGGTGCTGCGCTCGCG	583749	36	86
4305	4320	GCTGTTCTCATCCAG	583759	38	87
4405	4420	TGCTGCGGCAGCCCCT	583771	40	88
4532	4547	GGTGCTGGCCTCGCTC	583787	37	89
4537	4552	TGCATGGTGCTGGCCT	583789	39	90
4539	4554	GTTGCATGGTGCTGGC	583790	39	91
4555	4570	TGCTGTTGCTGAAGGA	583795	63	92
4571	4586	GGATACTGCTTCCTGC	583796	65	93
4573	4588	TCGGATACTGCTTCCT	583797	35	94
4578	4593	TGCCTTCGGATACTGC	583799	65	95
4597	4612	CTCGCTCTCCCGCTGC	583802	37	96
4632	4647	TGTCCTTGAGGAAGT	583809	45	97
4656	4671	TGGTCGAAGTGCCCCC	583818	42	98
4662	4677	CAGAAATGGTCGAAGT	583821	42	99

[0836] 表20

[0837]

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	23	22
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	54	36
58752	58767				
4747	4762	TGTTCCCCTGGACTCA	583833	37	100
4750	4765	AGCTGTTCCCCTGGAC	583834	52	101
4752	4767	GAAGCTGTTCCCCTGG	583835	44	102
4754	4769	CCGAAGCTGTTCCCCT	583836	37	103
4769	4784	GTACATGCAATCCCCC	583843	35	104
4798	4813	ACAGCGGGTGGAACTC	583847	34	105
4804	4819	GGACGCACAGCGGGTG	583850	38	106
4807	4822	GTGGGACGCACAGCGG	583851	33	107
4833	4848	TGCATTCGGCCAATGG	583853	33	108
4837	4852	CCTTTGCATTCGGCCA	583855	44	109
4839	4854	AACCTTTGCATTCGGC	583856	45	110
4868	4883	GCTCTTGCTGCGCTG	583862	32	111
4872	4887	CAGTGCTCTTGCTGC	583864	46	112
4874	4889	TTCAGTGCTCTTGCT	583865	45	113
4876	4891	TCTTCAGTGCTCTTGC	583866	32	114
4887	4902	ACTCAGCAGTATCTTC	583868	34	115
4889	4904	ATACTCAGCAGTATCT	583871	47	116
4916	4931	TTTGGTGTAACCTCCC	583880	39	117
4918	4933	CCTTTGGTGTAACCTC	583881	47	118
4938	4953	CTAGGCTCTCGCCTTC	583890	32	119
4942	4957	CAGCCTAGGCTCTCGC	583892	35	120
4944	4959	AGCAGCCTAGGCTCTC	583893	34	121
4951	4966	CTGCCAGAGCAGCCTA	583896	37	122

[0838] 表21

[0839]

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	37	22
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	47	36
58752	58767				
5050	5065	TCGCGACTCTGGTACG	583917	37	123
5052	5067	AGTCGCGACTCTGGTA	583918	47	124
5054	5069	GTAGTCGCGACTCTGG	583919	55	125
5056	5071	TAGTAGTCGCGACTCT	583920	42	126
5061	5076	AGTTGTAGTAGTCGCG	583922	37	42
5133	5148	TCTCCAGCTTGATGCG	583932	39	127
5141	5156	CAGCGGGTTCTCCAGC	583933	38	128
5293	5308	CCTTCTTCGGCTGTGA	583969	44	129
5308	5323	GGTCCATACAACCTGGC	583975	42	130

[0840] 表22

SEQ ID NO: 1 上的靶 标起始 位点	SEQ ID NO: 2 上的靶 标起始 位点	序列	ISIS 号	%抑 制	SEQ ID NO
5062	2200	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	46	22
58722	n/a	GTTGATTTAATGGTTG	549458	39	36
58752	n/a				
5469	2607	ACACATCAGGTGCGGT	583990	30	131
5481	2619	CGCCAGGGTACCACAC	583996	33	132
5486	2624	CATGCCGCCAGGGTAC	583998	45	133
5488	2626	ACCATGCCGCCAGGGT	583999	29	134
5494	2632	CTGCTCACCATGCCGC	584002	30	135
5521	2659	ACACAAGTGGGACTGG	584006	33	136
n/a	2870	CCCTTCAGCGGCTCTT	584044	29	137

[0842] 表23

靶标起 始位点	靶标终 止位点	序列	ISIS 号	%抑 制	SEQ ID NO
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	25	22
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	51	36
58752	58767				
144938	144953	CAGAGTCATCCCTGCT	584069	36	138
148406	148421	CACCCTCAAGATTCTT	584100	36	139
148443	148458	AAGGTAGTCTTTAAGG	584106	30	140
148520	148535	GTTTTCAAATGCAGCC	584111	33	141
139682	139697	GCCATGAGACAGCTTT	584125	35	142
139762	139777	ATTCTTGACTGTCTGA	584128	38	143
139782	139797	GCATGCCAGCTGGCTC	584130	29	144
5666	5681	CGCGCAGGTAGGAGCC	584138	35	145
6222	6237	TCTAAACATGACGGTT	584139	37	146
6701	6716	ATGCAATTGCCTGCCA	584141	39	147

[0844] 实例12:在HuVEC细胞中的人AR的反义抑制

[0845] 另外的反义寡核苷酸被设计为靶向AR核酸,并且将它们针对其在体外对AR mRNA的作用进行测试。使用电穿孔用1,000nM反义寡核苷酸来对具有每孔20,000个细胞的密度的经培养的HuVEC细胞进行转染。在大约24小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人类引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过 RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准AR mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。对总计385种寡核苷酸进行测试。只有那些被选择用于进一步研究的寡核苷酸示于表24-28中。

[0846] 表24-28中新设计的嵌合反义寡核苷酸被设计为3-10-3(S)-cET缺口体。缺口体是16个核苷长,其中中央缺口区段包括十个2'-脱氧核苷,并且侧翼为在5'方向和3'方向上均包括三个核苷的翼区段。在5'翼区段中的各个核苷和在3'翼区段中的各个核苷具有(S)-

cEt修饰。遍及各缺口体,核苷间连接是硫代磷酸酯连接。遍及各缺口体,所有的胞嘧啶残基均是5-甲基胞嘧啶。

[0847] 在表中列出的SEQ ID NO是指寡核苷酸序列。“起始位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最5'-的核苷。“终止位点”指示该缺口体在人类基因序列中所靶向的最3'-的核苷。列出于表24-28中的各个缺口体靶向人AR基因组序列,在此指定为SEQ ID NO:1 (GENBANK登录号NT_011669.17,从其核苷酸5079000至5270000截取)

[0848] 表24

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	63	22
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	88	36
58752	58767				
7543	7558	ATGGGAGTAACTTTTG	584145	76	148
8471	8486	CATATTATTGTGCTGC	584148	85	149
8638	8653	GTCAATATCAAAGCAC	584149	85	150
9464	9479	GAGTTGTGATTTCAGG	584152	88	151
10217	10232	TTGATGGAATGCTGAT	584157	69	152
10250	10265	GGTAACTTTCTCTGA	584158	69	153
10865	10880	TGGATTGTAAATTACG	584162	82	154
11197	11212	GAACATTATTAGGCTA	584163	81	155
11855	11870	TCAATCTAGATACCAT	584165	70	156
13189	13204	CACATCAGAAGGAGTA	584166	89	157
13321	13336	GAGTGTTAATGAAGAC	584167	78	158
13346	13361	CTGATTAGCTATGACC	584168	70	159
16555	16570	ATGAGTCCTCAGAATC	584179	74	160
16793	16808	GTAGATTCTAGCTTTG	584180	81	161
16968	16983	ACAGGCTCTGACTAGG	584183	76	162
17206	17221	TGTGTGACCCTTGGAC	584184	78	163
18865	18880	AAGTATGAGCATGGTT	584192	73	164

[0850] 表25

靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	59	22
58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	76	36

[0852]

58752	58767				
29329	29344	GGATTCTCTACACACA	584233	62	165
32290	32305	CCATTGTGCCAAACC	584242	62	166
33315	33330	AGGTTAGGGAGTAGGC	584245	70	167
39055	39070	TAGGGTTTGGTCAGAA	584263	56	168
40615	40630	CCTTATGGATGCTGCT	584269	57	169
42017	42032	GTTATCTTACTCTCCC	584274	70	170

[0853] 表26

[0854]	靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
	5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	58	22
	58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	79	36
	58752	58767				
	56050	56065	GATTGTGTATAGCTGC	584312	65	171
	60902	60917	GGTTATGGTTCTGTCT	584329	58	172
	67454	67469	CTTCATTGCAGGTCTG	584361	61	173

[0855] 表27

[0856]	靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
	5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	70	22
	58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	76	36
	58752	58767				
	114874	114889	TAGCCAACCTTTCTTTA	584465	58	174
	115272	115287	CATTGTACTATGCCAG	584468	64	175
	115365	115380	TTTGGTAACATTAGGC	584469	74	176
	134971	134986	ATGGTTGTCCTGTACA	584495	58	177

[0857] 表28

[0858]	靶标起始位点	靶标终止位点	序列	ISIS 号	%抑制	SEQ ID NO
	5062	5077	AAGTTGTAGTAGTCGC	549372	54	22
	58722	58737	GTTGATTTAATGGTTG	549458	65	36
	58752	58767				
	114874	114889	TAGCCAACCTTTCTTTA	584465	54	174
	115365	115380	TTTGGTAACATTAGGC	584469	63	176
	134971	134986	ATGGTTGTCCTGTACA	584495	53	177

[0859] 实例13:在HuVEC细胞中的人AR的剂量依赖性反义抑制

[0860] 来自上述研究并展现显著的对AR mRNA的体外抑制的缺口体被选择并在HuVEC细胞中以不同的剂量来测试。将细胞以20,000个细胞/孔的密度进行铺板并且使用电穿孔用46.9nM、187.5nM、750.0nM、以及3000.0nM浓度的反义寡核苷酸进行转染,如表29-37中所指定的。在大约16小时的处理期之后,将RNA从这些细胞中分离,并且通过实时定量PCR对AR mRNA水平进行测量。使用人AR引物探针组RTS3559测量mRNA水平。根据如通过RIBOGREEN®测量的总RNA含量,校准ARmRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞而言AR的抑制百分比。

[0861] 各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC₅₀)也呈现于表29-37中。如所展示的,在一些经反义寡核苷酸处理的细胞中ARmRNA水平是以剂量依赖性方式降低的。

[0862] 表29

[0863]

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	7	41	70	91	0.32
549458	21	72	91	97	0.11
583542	9	28	47	66	0.90
583556	19	47	68	66	0.34
583559	30	49	63	80	0.22
583564	16	33	55	74	0.52
583566	0	28	50	74	0.73
583567	17	34	60	79	0.43
583571	18	36	53	59	0.80
583583	21	31	49	64	0.79
583584	24	44	52	73	0.41
583608	12	46	67	76	0.35
583609	16	48	63	73	0.36
583613	24	60	70	75	0.19
583635	35	56	69	78	0.13
583638	33	64	79	85	0.11
583649	28	50	68	84	0.20
583660	21	39	61	72	0.42
583662	27	59	75	75	0.15

[0864] 表30

[0865]

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	13	29	69	90	0.37
549458	22	62	92	97	0.13
583620	0	17	44	54	1.85
583637	22	32	59	75	0.45
583642	18	35	67	74	0.46
583667	35	55	73	82	0.14
583685	32	53	73	81	0.16
583687	34	67	83	81	0.08
583688	3	26	50	60	1.05
583689	20	34	62	74	0.44
583692	8	47	61	71	0.44

[0866]

583709	8	50	70	84	0.29
583712	15	47	72	78	0.29
583727	18	49	70	76	0.29
583728	9	48	67	70	0.40
583734	29	60	74	75	0.12
583736	21	38	60	63	0.51
583738	16	40	56	71	0.51
583745	19	51	68	77	0.27

[0867] 表31

[0868]

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	5	36	69	88	0.36
549458	24	59	92	98	0.13
583693	12	39	64	80	0.38
583700	14	34	57	71	0.55
583713	29	51	67	74	0.22
583714	22	34	59	79	0.40
583719	22	46	65	72	0.32
583731	18	24	47	58	1.31
583746	24	44	65	67	0.35
583747	13	38	50	69	0.64
583771	17	27	47	69	0.77
583789	30	49	71	85	0.19
583790	17	42	65	81	0.32
583795	37	61	83	90	0.09
583796	38	69	83	90	0.07
583799	29	60	76	85	0.14
583809	13	37	68	81	0.36
583818	9	46	71	84	0.31
583821	11	35	61	77	0.46

[0869] 表32

[0870]

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	15	39	70	86	0.30
549458	19	58	89	96	0.15
583749	34	40	75	87	0.17
583759	5	28	61	67	0.63
583787	15	31	66	74	0.43
583797	21	50	74	82	0.22
583802	17	25	47	60	1.07
583834	34	54	73	84	0.13
583835	20	55	74	88	0.19
583836	11	27	67	86	0.39
583850	9	21	54	78	0.60
583855	22	50	81	91	0.18

[0871]

583856	31	55	74	89	0.14
583864	30	49	72	85	0.17
583864	0	47	62	85	0.37
583865	33	42	68	85	0.19
583871	28	30	68	87	0.28
583880	13	52	78	92	0.22
583881	28	50	85	91	0.15

[0872] 表33

[0873]

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	14	33	64	90	0.34
549458	21	61	90	96	0.13
583833	26	43	70	74	0.26
583843	22	40	67	85	0.30
583847	8	30	60	84	0.46
583851	8	24	54	76	0.61
583853	24	51	70	80	0.21
583862	15	37	64	79	0.41
583866	17	48	71	91	0.24
583868	19	31	59	81	0.41
583890	0	0	17	33	> 30
583892	22	38	68	83	0.27
583893	15	35	62	79	0.42
583896	13	17	49	69	0.86
583918	16	47	68	86	0.30
583919	27	60	85	91	0.14
583920	11	16	50	72	0.76
583969	12	26	66	86	0.44
583975	19	49	55	88	0.36

[0874] 表34

[0875]

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	14	36	64	88	0.32
549458	14	53	84	95	0.18
583917	6	30	50	70	0.64
583922	16	43	76	92	0.23
583932	9	35	64	81	0.38
583933	22	25	56	81	0.41
583990	0	9	33	56	1.92
583996	26	12	50	70	0.71
583998	4	25	38	70	0.89
583999	13	12	30	64	1.53
584002	12	46	70	92	0.25
584006	21	26	59	88	0.35
584044	23	30	51	78	0.44

[0876]

584069	18	40	63	82	0.30
584100	6	5	20	44	7.79
584125	12	12	47	76	0.72
584128	20	22	41	72	0.74
584139	13	33	56	85	0.4
584141	22	37	61	85	0.29

[0877] 表35

[0878]

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	0	28	64	88	0.42
549458	13	49	84	91	0.19
584106	3	13	12	32	> 30
584111	22	30	59	84	0.33
584130	0	10	11	37	> 30
584138	2	40	62	89	0.37
584145	6	32	63	88	0.36
584148	16	48	79	95	0.20
584149	11	37	68	89	0.31
584152	28	59	87	95	0.11
584162	24	45	80	92	0.18
584163	19	37	74	90	0.25
584166	34	52	84	92	0.10
584167	13	45	76	93	0.21
584179	1	25	62	87	0.44
584180	26	56	84	96	0.12
584183	3	41	64	87	0.31
584184	9	42	76	93	0.23
584192	1	34	73	95	0.30

[0879] 表36

[0880]

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	2	26	61	85	0.42
549458	1	51	83	96	0.23
584157	6	6	52	82	0.59
584158	14	37	70	89	0.26
584165	12	34	66	89	0.30
584168	5	32	70	91	0.32
584233	0	30	66	86	0.39
584242	12	38	66	93	0.27
584245	4	33	69	90	0.32
584263	9	24	67	90	0.34
584269	6	26	69	92	0.34
584274	17	36	74	93	0.23
584312	17	37	65	93	0.26
584329	0	17	67	86	0.46

[0881]

584361	0	18	71	87	0.41
584465	0	0	32	51	2.5
584468	9	26	60	90	0.37
584469	13	46	73	89	0.22
584495	0	14	55	74	0.65

[0882] 表37

ISIS 号	46.9 nM	187.5 nM	750.0 nM	3000.0 nM	IC ₅₀ (μM)
549372	9	41	66	87	0.29
549458	15	50	85	96	0.19
586124	28	47	84	94	0.13
586195	41	62	90	95	0.07
586197	27	47	77	94	0.14
586198	39	62	89	96	0.07
586199	25	56	89	97	0.13
586200	23	44	85	95	0.15
586205	34	67	89	95	0.07
586207	0	39	79	93	0.3
586208	32	70	88	93	0.08
586212	20	60	86	94	0.13
586221	39	72	94	98	0.04
586224	39	75	93	98	0.05
586225	17	61	89	97	0.13
586227	20	60	88	96	0.13
586232	24	45	82	91	0.17
586240	14	49	83	93	0.18
586570	16	44	81	91	0.21

[0884] 实例14:选择靶向人雄激素受体 (AR) mRNA的反义寡核苷酸用于采用了前列腺癌细胞系的测定

[0885] 来自以上研究中呈现的那些的靶向人AR基因组序列的不同区的反义寡核苷酸被选择用于在前列腺癌细胞系中的进一步研究。AR-V7和AR-V567es是在癌症患者中检测到的主要的AR剪接变体,如在Hornberg,E.等人,PLoS One (《公共科学图书馆·综合》) 2011.Vol.6.中描述的。

[0886] 以下ISIS寡核苷酸被选择用于进一步的研究:ISIS 549372,它靶向人AR基因组序列外显子1;ISIS 549434,它靶向人AR基因组序列外显子8的3'-末端,越过AR终止密码子;ISIS 560131,它靶向人AR基因组序列内含子1;以及ISIS 569236,它靶向人AR基因组序列内含子1。另一个反义寡核苷酸ISIS 554221 (ACCAAGTTTCTTCAGC,在此被指定为SEQ ID NO: 178) 被设计为靶向AR的外显子4 (即配体结合结构域) 的具有硫代磷酸酯骨架的3-10-3LNA缺口体,与被指定为US7,737,125中的SEQ ID NO:58的反义寡核苷酸相同,用作基准标记。

[0887] 实例15:在抗MDV3100的C4-2B细胞中人雄激素受体 (AR) mRNA的反义抑制对雄激素受体蛋白水平的作用

[0888] C4-2B细胞是在肿瘤学领域中常用的雄激素依赖性人类前列腺癌细胞,并且已经被建立为临床上相关的培养细胞 (Thalmann,G.N.等人,Cancer Res. (《癌症研究》) 1994.54:2577)。MDV3100或恩杂鲁胺是一种由Medivation公司开发的实验雄激素受体拮抗剂药物,用于治疗去势抗性的前列腺癌。将ISIS 549372、ISIS 554221、和ISIS 549434在抗

MDV3100的(MR)的C4-2B细胞中进行了测试。

[0889] 将细胞在5 μ M浓度的MDV3100的存在下进行培养,经历2个月以诱导MDV3100抗性。以1 μ M反义寡核苷酸浓度,将ISIS 549372、ISIS 549434、和ISIS 554221各自以1 μ M浓度添加至培养基中以便由细胞自由摄取。在2天的处理期之后,将细胞收获于包含蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中。使用AR抗体(N-20,圣克鲁兹公司(Santa Cruz)),通过蛋白质印迹法检测针对全长AR以及变体形式AR-V7的条带的存在。与采用ISIS 554221或ISIS 549434进行的处理相比,采用ISIS 549372处理细胞更大程度地减少了全长AR和AR-V7。

[0890] 实例16:在抗MDV3100的C4-2B细胞中人雄激素受体(AR)mRNA的反义抑制对AR-靶标基因的作用

[0891] 将AR的反义抑制对AR靶标基因的作用进行分析。将ISIS 549372、ISIS 549458、ISIS 554221、以及ISIS 549434在C4-2B MR细胞中进行了测试。

[0892] 将细胞以40,000个细胞/孔的密度铺板于96孔板中并且在具有10%胎牛血清的RPMI1640培养基中进行培养。将细胞在5 μ M浓度的MDV3100的存在下进行培养,经历2个月以诱导MDV3100抗性。以0.04 μ M、0.20 μ M、1.00 μ M、和5.00 μ M反义寡核苷酸浓度,将ISIS 549372、ISIS 549458、ISIS 549434、以及ISIS 554221各自添加至培养基中以便由细胞自由摄取。将在人类基因序列中不具有已知的靶标区的对照寡核苷酸ISIS 347526(序列TCTTATGTTTCCGAACCGTT(SEQ ID NO:179)5'-10'-5MOE缺口体)包括在内作为阴性对照。在24小时的处理期之后,使用引物探针组RTS3559通过实时定量PCR来测量总AR mRNA水平。使用人AR引物探针组hAR_LTS00943(正向序列GCCCCTGGATGGATAGCTACT,在此指定为SEQ ID NO:180;反向序列CCACAGATCAGGCAGGTCTTC,在此指定为SEQ ID NO:181;探针序列ACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCC,在此指定为SEQ ID NO:182)来测量AR-V7mRNA水平。将AR mRNA水平调整为人类肌动蛋白水平。结果呈现在表38中,呈现为相对于未处理的对照细胞而言总AR的抑制百分比。与采用ISIS 554221的处理相比,采用ISIS 549372、ISIS 549458、和ISIS 549434处理细胞以一种剂量依赖性方式更广泛地降低了总AR转录物水平。

[0893] 同样以一种类似于上述测定的方式进行了全长AR以及AR-V7变体的蛋白质印迹分析。该测定证实了采用ISIS 549372和ISSI 549458进行的处理降低了全长AR和AR-V7的水平。采用ISIS549434进行的处理降低了全长AR而非AR-V7的水平。与ISIS 549372相比,采用ISIS 554221进行的处理更低程度地降低了全长AR的水平,并且未降低AR-V7的水平。如所预期的,对照寡核苷酸ISIS 347526未降低蛋白质水平。

[0894] 使用引物探针组hKLK2_LTS00963(正向序列CTTGCGCCCCAGGAGTCT,在此指定为SEQ ID NO:183;反向序列CTCAGAGTAAGCTCTAGCACACATGTC,在此指定为SEQ ID NO:184;探针序列AGTGTGTGAGCCTCCATCTCCTGTCCAA,在此指定为SEQ ID NO:185)来测量AR靶标基因KLK2的mRNA水平。使用引物探针组RTS1072(正向序列GCCAAGGAGGGAGGGTCTT,在此指定为SEQ ID NO:186;反向序列CCCCCATAGTGAATCAGCTT,在此指定为SEQ ID NO:187;探针序列ATGAAGTAAGGAGAGGGACTGGACCCCC,在此指定为SEQ ID NO:188)来测量AR靶标基因KLK3的mRNA水平。如表39和表40中所呈现的,与采用ISIS 554221的处理相比,采用I ISIS 549372、ISIS 549458、和ISIS 549434进行的处理以一种剂量依赖性方式更大程度地降低了靶标基因水平。

[0895] 表38

[0896] 在C4-2B MR细胞中全长ARmRNA的抑制百分比

ISIS号	0.04μM	0.20μM	1.00μM	5.00μM
549372	35	47	88	91
549434	9	36	66	88
549458	41	78	94	97
554221	0	0	0	23
347526	28	35	31	17

[0898] 表39

[0899] 在C4-2B MR细胞中KLK3mRNA的抑制百分比

ISIS号	0.04μM	0.20μM	1.00μM	5.00μM
549372	17	35	68	80
549434	10	47	42	64
549458	0	42	81	92
554221	0	0	47	56
347526	5	38	42	16

[0901] 表40

[0902] 在C4-2B MR细胞中KLK2mRNA的抑制百分比

ISIS号	0.04μM	0.20μM	1.00μM	5.00μM
549372	14	16	57	87
549434	5	27	49	68
549458	35	47	87	93
554221	24	25	56	66
347526	28	29	23	22

[0904] 实例17:人雄激素受体 (AR) mRNA的反义抑制对抗MDV3100的C4-2B细胞的增殖能力的影响

[0905] 将AR的反义抑制对癌细胞的增殖能力的影响进行分析。将ISIS 549372、ISIS 549458、ISIS 554221、以及ISIS 549434在C4-2B MR细胞中进行了测试。

[0906] 以0.04μM、0.20μM、1.00μM、和5.00μM反义寡核苷酸浓度,将ISIS 549372、ISIS 549434、ISIS 549458、和ISIS 554221各自添加至培养基中。将ISIS 347526包括在内作为阴性对照。在6天的处理期之后,使用CellTiter 96® AQueous单溶液细胞增殖试剂盒 (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation kit) (普洛麦格公司 (Promega)),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表41中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。与采用ISIS 554221的处理相比,采用ISIS 549372、ISIS 549434、和ISIS 549458处理细胞以一种剂量依赖性方式更大程度地降低了细胞增殖。

[0907] 表41

[0908] C4-2B MR细胞增殖的抑制百分比

ISIS号	0.04μM	0.20μM	1.00μM	5.00μM
-------	--------	--------	--------	--------

549372	0	4	25	43
549434	0	0	21	22
549458	8	16	41	56
554221	11	12	0	24
347526	11	22	7	16

[0910] 实例18:人雄激素受体 (AR) mRNA的反义抑制对抗MDV3100的LMR20细胞的影响

[0911] 建立抗MDV3100的细胞系,指定为LMR20。将AR的反义抑制对LMR20细胞的增殖能力和AR mRNA水平的影响进行分析。对ISIS 560131、ISIS 549458、和ISIS 569236连同LNA缺口体ISIS 554221进行测试。

[0912] 将LnCaP细胞进行孵育,伴随着渐增浓度的MDV3100,持续大约6个月。在20 μ M MDV3100的存在下充分培养之后选择单克隆。克隆LMR20维持了允许在没有脂质介导的转染的情况下自由摄取反义寡核苷酸的能力,同时证实了当用MDV3100处理时与亲本LnCaP细胞相比IC₅₀大约增加十倍。

[0913] 研究1

[0914] 以1,500个细胞/孔将LMR20细胞铺板在不含酚红的具有经活性炭处理的胎牛血清(CSS) (以去除来自培养基(生命技术公司(Life Technologies))的任何雄激素)的培养基中。将ISIS 560131、ISIS 549458、ISIS 569236、和ISIS 554221以0.04 μ M、0.2 μ M、1.0 μ M、或5.0 μ M浓度单独地添加至培养基中。将不具有已知的人类靶标序列的ISIS 549148包括在内作为对照。将合成的雄激素激动剂R1881 (Takeda, A.N. 等人, Mol. Pharmacol. (《分子药理学》) 2007.71:473-82) 以1nM剂量在第1天添加至一组也经各反义寡核苷酸处理的细胞中。将DHT以10nM的剂量在第1天添加至另一组也经各反义寡核苷酸处理的细胞中。将MDV3100以10nM剂量在第1天添加至另一组未经反义寡核苷酸处理的细胞中,充当对照。在5天的处理期之后,通过标准MTT测定对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表42中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。

[0915] 如在表42中呈现的,在雄激素激动剂R1881或DHT的存在下,ISIS 560131、ISIS 549458、和ISIS 569236与ISIS 554221相比而言以一种剂量依赖性方式更大程度地显著抑制抗MDV3100的前列腺癌细胞增殖。与采用MDV3100进行的处理相比,由这些反义寡核苷酸造成的对增殖的抑制也是可比的或更有力的。

[0916] 表42

[0917] LMR20细胞增殖的抑制百分比

[0918]

处理	ASO (μM)	ISIS 560131	ISIS 569236	ISIS 549458	ISIS 554221	MDV3100
CSS	0.04	0	0	0	0	0
	0.20	0	10	0	1	5
	1.0	9	0	0	2	0
	5.0	16	12	5	16	11
CSS+ R1881	0.04	0	0	0	1	0
	0.20	13	2	22	10	5
	1.0	55	34	59	19	31
	5.0	70	61	74	54	67
CSS+ DHT	0.04	0	0	0	0	0
	0.20	13	10	25	0	1
	1.0	57	32	60	10	13
	5.0	71	57	70	36	41

[0919] 研究2

[0920] 将LMR20细胞以1,500个细胞/孔铺板于具有CSS的不含酚红的培养基中。将ISIS 560131、ISIS 549458、ISIS 569236、和LNA缺口体ISIS 554221以0.04 μM 、0.2 μM 、1.0 μM 、或5.0 μM 浓度单独地添加至培养基中。将不具有已知的人类靶标序列的ISIS 549148包括在内作为对照。将MDV3100以10nM剂量在第1天添加至一组细胞中,并且充当对照。将DHT以10nM的剂量在第1天添加至一组也经各反义寡核苷酸或MDV3100处理的细胞中,持续72小时。将R1881以10nM的剂量在第1天添加至另一组也经各反义寡核苷酸或MDV3100处理的细胞中,持续72小时。对AR、前列腺特异性抗原 (PSA)、以及TMPRSS2 (一种雄激素调节基因) 的mRNA水平 (Lin, B., 等人, Cancer Res. (《癌症研究》) 1999. 59:4180) 进行测量。结果呈现于表43-45中, 呈现为表示为基线值的百分比的mRNA水平。在处理之后mRNA水平可以降低或升高。

[0921] 如在表43-45中所呈现的, ISIS 560131、ISIS 549458、和ISIS 569236以一种剂量依赖性方式相对于基线降低了经AR激动剂处理或未经其处理的LMR20细胞中的AR mRNA水平。采用LNA缺口体ISIS 554221的处理未改变AR mRNA水平。与LNA缺口体ISIS 554221或MDV3100相比, ISIS 560131、ISIS 549458、和ISIS 569236更大程度地降低了PSA水平和TMPRSS2。采用MDV3100的处理增加了经AR激动剂处理的细胞中AR mRNA的水平, 并且不降低PSA或TMPRSS2 mRNA水平。

[0922] 表43

[0923] 未经AR激动剂处理的细胞中的mRNA水平 (%基线值)

[0924]

基因	ASO (μM)	560131	569236	549458	554221	MDV3100
AR	0.04	107	104	101	124	106
	0.20	74	87	75	140	101
	1.0	29	42	30	132	99
	5.0	17	27	25	98	92
PSA	0.04	113	122	135	106	98
	0.20	83	90	85	118	93
	1.0	75	78	50	58	90
	5.0	71	73	72	87	113
TMPRSS2	0.04	92	96	110	95	101
	0.20	67	81	85	117	119
	1.0	52	59	54	77	119
	5.0	45	48	62	73	141

[0925] 表44

[0926] 在用DHT处理之后的mRNA水平(%基线值)

[0927]

基因	ASO (μM)	560131	569236	549458	554221	MDV3100
----	--------------------------	--------	--------	--------	--------	---------

[0928]

AR	0.04	89	94	91	137	105
	0.20	55	77	66	135	124
	1.0	25	44	34	136	110
	5.0	20	34	31	100	143
PSA	0.04	74	108	93	97	124
	0.20	61	79	71	86	108
	1.0	35	46	47	64	95
	5.0	35	46	47	64	95
TMPRSS2	0.04	112	113	127	121	134
	0.20	108	123	119	118	144
	1.0	93	111	106	122	132
	5.0	71	110	91	114	124

[0929] 表45

[0930] 在用R1881处理之后的mRNA水平(%基线值)

[0931]

基因	ASO (μM)	560131	569236	549458	554221	MDV3100
AR	0.04	87	89	88	131	94
	0.20	65	80	56	133	107
	1.0	30	44	25	124	115
	5.0	26	37	32	99	136
PSA	0.04	92	90	93	100	84
	0.20	77	90	67	93	101
	1.0	44	57	50	80	92
	5.0	35	41	44	57	87
TMPRSS2	0.04	132	126	137	136	114
	0.20	117	131	119	134	125
	1.0	88	98	96	125	133
	5.0	76	95	96	122	139

[0932] 实例19:人类雄激素受体 (AR) mRNA的反义抑制结合MDV3100对C4-2B细胞的增殖能力的影响

[0933] 将AR的反义抑制结合不同剂量的MDV3100对癌细胞的增殖能力的影响进行分析。将ISIS 549372、ISIS 549434、ISIS 549458、以及ISIS 554221在C4-2B细胞中进行了测试。

[0934] 将C4-2B细胞以1,500个细胞/孔进行铺板。将ISIS 549372、ISIS 549434、ISIS 549458、或ISIS 554221以0.1 μM 浓度单独地添加至培养基中。将ISIS 347526包括在内作为阴性对照。以0.25 μM 或1.00 μM 的剂量在第1天添加MDV3100。在6天的处理期之后,使用CellTiter 96® AQueous单溶液细胞增殖试剂盒(普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表46中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。与采用ISIS 554221的处理相比,采用ISIS 549372或ISIS 549458处理细胞更大程度地降低了细胞增殖。例如,如表46中所呈现的,与单独ISIS 554221将细胞增殖降低23%相比,单独采用ISIS 549372进行处理将细胞增殖降低59%,而采用ISIS 549458进行处理将细胞增殖降低74%。

[0935] 如表46和47中所呈现的,与等摩尔浓度的ISIS 554221结合MDV3100相比,ISIS 549372或ISIS 549458结合MDV3100更大程度地抑制了前列腺癌细胞增殖。

[0936] 为了查明采用ISIS 549372或ISIS 549458处理细胞是否与MDV3100具有协同作用,以0.1 μM ASO重复了测定。如表46中所呈现的,采用ISIS 549372或ISIS 549458进行的处理与MDV3100具有协同作用。例如,MDV3100单独在0.25 μM 将增殖抑制4%; ISIS 549372单独在0.1 μM 将细胞增殖抑制23%;相组合的话,细胞增殖被抑制66%。类似地,ISIS 549458单独在0.1 μM 将细胞增殖抑制39%;相组合的话,细胞增殖被抑制75%。所以,在前列腺癌细胞增殖的抑制方面,ISIS 549372或ISIS 549458与MDV3100的组合是协同的(即,大于加和)。

[0937] 表46

[0938] 采用0.1 μM ASO时C4-2B细胞增殖的抑制百分比

[0939]

	MDV3100		
	0 μM	0.25 μM	1 μM
PBS	0	9	38
ISIS 549372	23	44	66
ISIS 549458	39	59	75
ISIS 554221	9	29	59
ISIS 141923	0	4	38

[0940] 表47

[0941] 采用0.2 μM AS0时C4-2B细胞增殖的抑制百分比

[0942]

	MDV3100		
	0 μM	0.25 μM	1 μM
PBS	0	20	46
ISIS 549372	59	69	77
ISIS 549458	74	75	79
ISIS 554221	23	45	67
ISIS 141923	0	5	50

[0943] 实例20:人雄激素受体 (AR) mRNA的反义抑制结合MDV3100对LNCaP细胞的增殖能力的影响

[0944] 将AR的反义抑制结合不同剂量的MDV3100对癌细胞的增殖能力的影响进行分析。将ISIS 560131和ISIS 569236在LNCaP细胞中进行测试。

[0945] 将LNCaP细胞以1,000个细胞/孔进行铺板。将ISIS 560131或ISIS 569236以0.08 μM 、0.04 μM 、0.2 μM 、或1.0 μM 浓度单独地添加至培养基中。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。在第2天将MDV3100以0.016 μM 、0.08 μM 、0.4 μM 、或2.0 μM 的剂量添加至经ISIS寡核苷酸处理的细胞中。在5天的处理期之后,使用CellTiter 96® AQueous单 (CellTiter 96® AQueous One) 或CellTiter-Glo®溶液细胞增殖试剂盒 (CellTiter-Glo® Solution Cell Proliferation kit) (普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表48-52中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。

[0946] 如表中所呈现的,采用ISIS 560131或ISIS 569236进行的处理与MDV3100具有协同作用。例如,MDV3100连同对照寡核苷酸0.08 μM 的ISIS 549148将增殖平均抑制7%;ISIS 560131单独在0.04 μM 将细胞增殖抑制24%;相组合的话,细胞增殖被抑制41%。类似地,ISIS 569236单独在0.04 μM 将细胞增殖抑制9%;相组合的话,细胞增殖被抑制26%。所以,在前列腺癌细胞增殖的抑制方面,ISIS 560131或ISIS 569236与MDV3100的组合是协同的(即,大于加和)。

[0947] 表48

[0948] 在LNCaP中在没有MDV-3100的情况下的增殖(%未处理的对照)

	ASO 剂量			
	0.08 μM	0.04 μM	0.2 μM	1.0 μM
[0949] ISIS 560131	106	76	50	26
ISIS 569236	106	91	60	35
ISIS 549148	104	101	91	82

[0950] 表49

[0951] 在LNCaP中在采用0.016 μM MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

	ASO 剂量			
	0.08 μM	0.04 μM	0.2 μM	1.0 μM
[0952] ISIS 560131	103	71	49	25
ISIS 569236	104	92	58	29
ISIS 549148	106	86	83	59

[0953] 表50

[0954] 在LNCaP中在采用0.08 μM MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

	ASO 剂量			
	0.08 μM	0.04 μM	0.2 μM	1.0 μM
[0955] ISIS 560131	99	59	48	27
ISIS 569236	98	74	51	31
ISIS 549148	93	101	89	90

[0956] 表51

[0957] 在LNCaP中在采用0.4 μM MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

	ASO 剂量			
	0.08 μM	0.04 μM	0.2 μM	1.0 μM
[0958] ISIS 560131	68	50	40	26
ISIS 569236	61	48	41	27
ISIS 549148	65	57	50	48

[0959] 表52

[0960] 在LNCaP中在采用2.0 μM MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

	ASO 剂量			
	0.08 μM	0.04 μM	0.2 μM	1.0 μM
[0961] ISIS 560131	45	42	38	23
ISIS 569236	44	41	35	23
ISIS 549148	39	42	41	32

[0962] 实例21:人雄激素受体 (AR) mRNA的反义抑制结合MDV3100对C4-2B细胞的增殖能力的影响

[0963] 将AR的反义抑制结合不同剂量的MDV3100对癌细胞的增殖能力的影响进行分析。

将ISIS 560131和ISIS 569236在C4-2B细胞中进行测试。

[0964] 将C4-2B细胞以1,000个细胞/孔进行铺板。将ISIS 560131或ISIS 569236以0.08 μ M、0.04 μ M、0.2 μ M、或1.0 μ M浓度单独地添加至培养基中。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。在第2天将MDV3100以0.016 μ M、0.08 μ M、0.4 μ M、或2.0 μ M的剂量添加至经ISIS寡核苷酸处理的细胞中。在5天的处理期之后,使用CellTiter 96® AQueous单溶液细胞增殖试剂盒(普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表53-57中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。

[0965] 如表中所呈现的,采用ISIS 560131或ISIS 569236进行的处理与MDV3100具有协同作用。例如,MDV3100连同对照寡核苷酸0.4 μ M的ISIS 549148将增殖平均抑制6%;ISIS 560131单独在0.08 μ M将细胞增殖抑制16%;相组合的话,细胞增殖被抑制31%。类似地,MDV3100连同对照寡核苷酸0.08 μ M的ISIS 549148不抑制增殖(0%);ISIS 569236单独在0.2 μ M将细胞增殖抑制37%;相组合的话,细胞增殖被抑制52%。所以,在前列腺癌细胞增殖的抑制方面,ISIS 560131或ISIS 569236与MDV3100的组合是协同的(即,大于加和)。

[0966] 表53

[0967] 在C4-2B中在没有MDV-3100的情况下的增殖(%未处理的对照)

	ASO 剂量			
	0.08 μ M	0.04 μ M	0.2 μ M	1.0 μ M
[0968] ISIS 560131	84	59	47	41
ISIS 569236	100	72	63	51
ISIS 549148	111	117	118	126

[0969] 表54

[0970] 在C4-2B中在采用0.016 μ M MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

	ASO 剂量			
	0.08 μ M	0.04 μ M	0.2 μ M	1.0 μ M
[0971] ISIS 560131	104	71	53	39
ISIS 569236	107	74	65	55
ISIS 549148	110	107	124	103

[0972] 表55

[0973] 在C4-2B中在采用0.08 μ M MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

	ASO 剂量			
	0.08 μ M	0.04 μ M	0.2 μ M	1.0 μ M
[0974] ISIS 560131	66	73	56	42
ISIS 569236	89	79	51	43
ISIS 549148	84	125	123	114

[0975] 表56

[0976] 在C4-2B中在采用0.4 μ M MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

		ASO 剂量			
		0.08 μM	0.04 μM	0.2 μM	1.0 μM
[0977]	ISIS 560131	69	69	48	48
	ISIS 569236	90	63	48	39
	ISIS 549148	89	110	88	88

[0978] 表57

[0979] 在C4-2B中在采用2.0 μM MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

		ASO 剂量			
		0.08 μM	0.04 μM	0.2 μM	1.0 μM
[0980]	ISIS 560131	37	42	49	43
	ISIS 569236	44	45	48	46
	ISIS 549148	47	40	52	59

[0981] 实例22:人雄激素受体(AR)mRNA的反义抑制结合MDV3100对22RV1细胞的增殖能力的影响

[0982] 将AR的反义抑制结合不同剂量的MDV3100对癌细胞的增殖能力的影响进行分析。将ISIS 560131和ISIS 569236在22RV1细胞中进行测试。

[0983] 将22RV1细胞以2,000个细胞/孔铺板于5%CSS培养基中持续48小时。使用RNAiMAX试剂,采用浓度为0.4nM、1.34nM、4nM、或13.4nM的ISIS 560131或ISIS 569236对细胞进行转染。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。在4小时之后,添加1nM DHT和/或剂量为0.04 μM 、0.2 μM 、1.0 μM 、或5.0 μM 的MDV3100。在3天的处理期之后,使用CellTiter 96® AQueous单溶液细胞增殖试剂盒(普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表58-62中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。

[0984] 如表中所呈现的,采用ISIS 560131或ISIS 569236进行的处理与MDV3100具有协同作用。例如,MDV3100连同对照寡核苷酸1.0 μM 的ISIS 549148将增殖平均抑制5%;ISIS 560131单独在1.34nM将细胞增殖抑制3%;相组合的话,细胞增殖被抑制23%。类似地,MDV3100连同对照寡核苷酸1.0 μM 的ISIS 549148将增殖抑制5%;ISIS 569236单独在1.0 μM 将细胞增殖抑制17%;相组合的话,细胞增殖被抑制30%。所以,在前列腺癌细胞增殖的抑制方面,ISIS 560131或ISIS 569236与MDV3100的组合是协同的(即,大于加和)。

[0985] 表58

[0986] 在22RV1中在没有MDV-3100的情况下的增殖(%未处理的对照)

		ASO 剂量			
		0.4 nM	1.34 nM	4.0 nM	13.4 nM
[0987]	ISIS 560131	103	97	77	57
	ISIS 569236	97	83	69	37
	ISIS 549148	109	109	109	99

[0988] 表59

[0989] 在22RV1细胞中在采用0.04 μM MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

[0990]		ASO 剂量			
		0.4 nM	1.34 nM	4.0 nM	13.4 nM
[0991]	ISIS 560131	96	80	65	39
	ISIS 569236	83	70	61	24
	ISIS 549148	106	106	100	85

[0992] 表60

[0993] 在22RV1细胞中在采用0.2 μ M MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

		ASO 剂量			
		0.4 nM	1.34 nM	4.0 nM	13.4 nM
[0994]	ISIS 560131	95	90	76	51
	ISIS 569236	93	77	60	20
	ISIS 549148	101	115	110	96

[0995] 表61

[0996] 在22RV1细胞中在采用1.0 μ M MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

		ASO 剂量			
		0.4 nM	1.34 nM	4.0 nM	13.4 nM
[0997]	ISIS 560131	96	77	63	40
	ISIS 569236	79	70	52	18
	ISIS 549148	106	95	98	82

[0998] 表62

[0999] 在22RV1细胞中在采用5.0 μ M MDV-3100时的增殖(%未处理的对照)

		ASO 剂量			
		0.4 nM	1.34 nM	4.0 nM	13.4 nM
[1000]	ISIS 560131	91	76	63	41
	ISIS 569236	82	72	52	24
	ISIS 549148	96	102	98	85

[1001] 实例23:人雄激素受体(AR)mRNA的反义抑制对CWR22-RV1细胞的影响

[1002] 将AR的反义抑制对癌细胞的增殖能力的影响进行分析。将ISIS 549372、ISIS 549434、ISIS 549458、和ISIS 554221在CWR22-RV1细胞中进行测试。

[1003] 将CWR22-RV1细胞进行铺板,并且使用RNAiMax试剂(生命技术公司)连同浓度为1.7nM、5.0nM、16.7nM、或50nM的ISIS寡核苷酸进行转染。将ISIS 347526包括在内作为阴性对照。在6天的处理期之后,对癌细胞的靶标降低和增殖能力进行测量。

[1004] 采用RTS3559引物探针组对AR全长mRNA的反义抑制进行测量。结果呈现在表63中,呈现为相对于未处理的细胞而言的抑制百分比。还通过RT-PCR使用SYBR绿(SYBR Green)染色对AR mRNA的V7剪接变体的降低进行测量(Hu, R. 等人, Cancer Res. (《癌症研究》) 2009.69:16-22)。结果呈现在表64中,呈现为相对于未处理的细胞而言的降低百分比。采用

CellTiter 96® AQueous单溶液细胞增殖试剂盒(普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对细胞增殖进行测量。结果呈现在表65中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。

[1005] 表63

[1006] AR全长mRNA的抑制百分比

	剂量 (nM)	ISIS 549372	ISIS 549434	ISIS 549458	ISIS 554221	ISIS 347526
[1007]	1.7	24	27	28	24	0
	5.0	53	46	41	41	3
	16.7	64	69	61	67	4
	50.0	78	86	78	72	0

[1008] 表64

[1009] AR剪接变体V7的抑制百分比

	剂量 (nM)	ISIS 549372	ISIS 549434	ISIS 549458	ISIS 554221	ISIS 347526
[1010]	1.7	23	0	18	25	17
	5.0	35	20	34	1	0
	16.7	56	4	58	7	0
	50.0	82	23	82	35	10

[1011] 表65

[1012] 细胞增殖的抑制百分比

	剂量 (nM)	ISIS 549372	ISIS 549434	ISIS 549458	ISIS 554221	ISIS 347526
[1013]	1.7	0	8	0	17	0
	5.0	0	15	0	11	0
	16.7	25	13	17	27	0
	50.0	53	38	40	47	0

[1014] 实例24:通过由C4-2B细胞自由摄取反义寡核苷酸引起的人雄激素受体(AR)mRNA的反义抑制的作用

[1015] 针对反义寡核苷酸的自由摄取对AR mRNA水平的作用进行了研究。对ISIS 549372、ISIS 549434、ISIS 549458、和ISIS 554221进行测试。

[1016] 将细胞以1,000个细胞/孔的浓度铺板于96-孔板中以测量细胞增殖,并且以4,000个细胞/孔来测量靶标降低。将ISIS 549458、ISIS 549372、ISIS 549434、和ISIS 554221以0.04μM、0.20μM、1.00μM、或5.00μM单独地进行添加。在24小时的孵育期之后,使用hAR_LTS00943测量mRNA水平。数据呈现于表66中。结果指示与ISIS 554221相比,ISIS 549458、ISIS 549372、和ISIS 549434更有力地抑制ARmRNA表达。

[1017] 在第6天,采用MTT试剂将铺板用于测量增殖的细胞进行孵育直到显色。使用分光光度计在490nm测量颜色强度。数据呈现于表67中。

[1018] 表66

[1019] AR全长mRNA的抑制百分比

[1020]	剂量 (μM)	ISIS 549372	ISIS 549434	ISIS 549458	ISIS 554221
	0.04	10	10	16	0
	0.20	36	35	48	0
	1.00	73	52	80	0
	5.00	80	55	86	0

[1021] 表67

[1022] 细胞增殖的抑制百分比

[1023]	剂量 (μM)	ISIS 549372	ISIS 549434	ISIS 549458	ISIS 554221
	0.04	8	0	7	0
	0.20	34	14	31	10
	1.00	44	35	45	21
	5.00	45	37	41	30

[1024] 实例25:通过由LnCaP细胞自由摄取反义寡核苷酸引起的人雄激素受体 (AR) mRNA 的反义抑制的作用

[1025] 针对反义寡核苷酸的自由摄取对ARmRNA水平的作用进行了研究。

[1026] 将细胞以4,000个细胞/孔的浓度铺板于96-孔板中。将表68中指定的ISIS寡核苷酸以0.02 μM 、0.10 μM 、0.50 μM 、2.50 μM 、或10.00 μM 单独地进行添加。在24小时的孵育期之后,使用引物探针组hAR_LTS00943测量mRNA水平。数据呈现于表68中。结果指示,与ISIS 554221相比,在各浓度下,大多数ISIS寡核苷酸更有力地抑制ARmRNA表达。

[1027] 表68

[1028] AR mRNA的抑制百分比

[1029]	ISIS 号	0.02	0.1 μM	0.5 μM	2.5 μM	10 μM
--------	--------	------	-------------------	-------------------	-------------------	------------------

[1030]

	μM				
554221	0	0	0	0	17
549372	0	0	21	63	78
549458	4	14	67	86	89
560131	0	0	13	31	57
569213	3	0	31	59	78
569216	15	17	49	66	82
569221	18	31	49	78	91
569227	0	0	4	33	55
569236	3	2	21	43	70
579666	0	8	30	49	68
579667	0	0	8	12	40
579671	15	0	19	54	71
583918	8	0	0	0	13
584149	0	0	0	14	39
584163	0	0	19	41	70
584269	0	0	0	12	23
584468	0	0	10	44	73
586124	0	0	19	64	82
586227	0	0	14	44	59

[1031] 实例26:在DHT的存在下人雄激素受体 (AR) mRNA的反义抑制对22RV1细胞的增殖能力的影响

[1032] 二氢睾酮 (DHT) 是雄激素激素和AR激活剂。将AR的反义抑制对经DHT处理的癌细胞的增殖能力的影响进行分析。将ISIS 560131和ISIS 569236在人类前列腺癌细胞系22RV1中进行测试。

[1033] 将22RV1细胞以1,500个细胞/孔进行铺板。使用RNAiMAX™试剂 (生命技术公司), 将ISIS 560131和ISIS 569236以1.34nM、4.00nM、13.4nM、或40.0nM浓度单独地转染进细胞中。将不具有已知的人类靶标序列的ISIS 549148包括在内作为对照。将也用各反义寡核苷酸处理的细胞的单独组采用在第1天添加的终浓度为1nM的DHT进行处理。在5天的处理期之后, 使用标准MTT测定对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表69中, 呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。

[1034] 如表69中呈现的, 与对照相比, 甚至在AR激活剂DHT的存在下, ISIS 560131和ISIS 569236两者均显著地抑制前列腺癌细胞增殖。如所预期的, 对照寡核苷酸未显示任何对于增殖的影响。

[1035] 表69

[1036] 22RV1细胞增殖的抑制百分比

[1037]

	ASO (nM)	ISIS 560131	ISIS 569236	ISIS 549148
- DHT	1.34	0	0	0
	4.0	2	18	0
	13.4	29	47	4
	40.0	54	64	0
+ DHT	1.34	0	0	0
	4.0	1	6	0
	13.4	13	32	3
	40.0	34	56	0

[1038] 实例27:采用靶向AR的ISIS寡核苷酸处理C4-2B细胞的时间历程研究

[1039] 将反义抑制对C4-2B癌细胞基因表达的影响进行分析。对ISIS 560131和ISIS 569236进行测试。

[1040] AR mRNA分析

[1041] 将C4-2B细胞以1,000个细胞/孔铺板于完全培养基中。在不使用转染试剂的情况下,将ISIS 560131或ISIS 569236单独地添加至培养基中以达到0.04 μ M、0.2 μ M、1.0 μ M、或5.0 μ M浓度的最终浓度。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。将MDV3100以0.04 μ M、0.2 μ M、1.0 μ M、或5.0 μ M的剂量添加至细胞的单独组中。在8小时、24小时、和48小时的处理期之后,采用引物探针组hAR-LTS00943对AR表达进行测量。结果呈现于表70-72中,呈现为相对于未处理的细胞而言AR的表达百分比。相对于对照组而言,采用ISIS 560131或ISIS 569236处理细胞降低了细胞中的AR表达。采用MDV-3100的处理在48小时时间点处增加了AR表达。

[1042] 表70

[1043] 相比于对照组,在8小时内AR的表达百分比

[1044]

	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
ISIS 560131	110	85	68	45
ISIS 569236	100	87	84	58
ISIS 549148	116	105	111	110
MDV-3100	99	100	92	103

[1045] 表71

[1046] 相比于对照组,在24小时内AR的表达百分比

[1047]

	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
ISIS 560131	47	18	5	4

[1048]

ISIS 569236	103	35	15	5
ISIS 549148	87	85	87	107
MDV-3100	88	99	96	84

[1049] 表72

[1050] 相比于对照组,在48小时内AR的表达百分比

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	33	5	6	4
ISIS 569236	80	19	7	2
ISIS 549148	98	90	87	99
MDV-3100	94	94	113	126

[1052] AR蛋白质分析

[1053] 还对细胞中的蛋白质水平进行了分析。将细胞收获于包含蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中。使用AR抗体(N-20, SC-816, 圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology)),通过蛋白质印迹法检测针对全长AR的条带的存在。在经ISIS 560131或ISIS 569236处理持续24小时和48小时的细胞中,全长AR得以显著地降低,并将其针对管家基因GAPDH的水平进行归一化。

[1054] 下游基因的mRNA表达分析

[1055] 还分析了前列腺特异性抗原(PSA)和TMPRSS2的表达分析。结果呈现于表73-75中,呈现为相对于未处理的细胞而言,PSA表达的抑制百分比,以及表76-78中呈现为TMPRSS2表达的抑制百分比。相对于对照组而言,采用ISIS 560131或ISIS 569236对细胞进行的处理在24小时和48小时时间点处降低了细胞中的PSA和TMPRSS2表达。采用MDV-3100进行的处理还降低了下游基因表达,但不如采用ISIS寡核苷酸时那样有力。

[1056] 表73

[1057] 相比于对照组,在8小时内PSA表达的抑制百分比

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	12	0	3	1
ISIS 569236	18	3	0	0
ISIS 549148	1	8	8	0
MDV-3100	0	3	23	33

[1059] 表74

[1060] 相比于对照组,在24小时内PSA表达的抑制百分比

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	27	46	56	60
ISIS 569236	10	34	44	54
ISIS 549148	22	13	16	6
MDV-3100	24	24	53	65

[1062] 表75

[1063] 相比于对照组,在48小时内PSA表达的抑制百分比

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	20	61	71	80
ISIS 569236	4	45	68	76
ISIS 549148	2	0	18	10

MDV-3100	5	5	32	63
----------	---	---	----	----

[1065] 表76

[1066] 相比于对照组,在8小时内TMPRSS2表达的抑制百分比

[1067]

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	0	0	6	0
ISIS 569236	0	0	0	0
ISIS 549148	5	0	0	0
MDV-3100	0	6	45	52

[1068] 表77

[1069] 相比于对照组,在24小时内TMPRSS2表达的抑制百分比

[1070]

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	35	57	66	67
ISIS 569236	10	32	57	66
ISIS 549148	29	10	29	10
MDV-3100	23	31	63	72

[1071] 表78

[1072] 相比于对照组,在48小时内TMPRSS2表达的抑制百分比

[1073]

	0.04 μM	0.2 μM	1 μM	5.0 μM
ISIS 560131	46	71	77	76
ISIS 569236	22	57	70	75
ISIS 549148	0	4	0	0

[1074]

MDV-3100	5	16	46	59
----------	---	----	----	----

[1075] 实例28:在完全培养基和CSS培养基中培养的LNCaP细胞中AR mRNA的反义抑制

[1076] 对在完全培养基以及具有DHT的CSS培养基中培养的LNCaP细胞中的AR的反义抑制作用进行了研究。

[1077] 在完全培养基中的基因表达

[1078] 将细胞以1,000个细胞/孔进行铺板。将ISIS 560131或ISIS 569236以0.04μM、0.2 μM、1.0μM、或5.0μM单独地进行添加。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。将MDV3100以0.04μM、0.2μM、1.0μM、或5.0μM的剂量添加至细胞的单独组中。在48小时的孵育期之后,对AR、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表79-81中。

[1079] 全长AR的蛋白质分析还证实了针对管家基因GAPDH的水平进行归一化的表达的剂量依赖性减少。

[1080] 表79

[1081] 在完全培养基中培养的LNCaP细胞中AR的表达百分比

[1082]

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	101	53	17	7
ISIS 569236	98	90	47	20

ISIS 549148	102	111	109	109
MDV-3100	111	133	121	139

[1083] 表80

[1084] 在完全培养基中培养的LNCaP细胞中PSA表达的抑制百分比

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	0	60	87	90
ISIS 569236	0	19	63	81
ISIS 549148	0	0	0	0
MDV-3100	0	35	84	87

[1086] 表81

[1087] 在完全培养基中培养的LNCaP细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

	0.04 μM	0.2 μM	1 μM	5.0 μM
ISIS 560131	0	25	50	51
ISIS 569236	0	5	40	48
ISIS 549148	0	0	0	0

[1088]

MDV-3100	0	0	34	39
----------	---	---	----	----

[1089]

[1090] 在CSS培养基和CSS+DHT培养基中的基因表达

[1091] 将细胞以2,000个细胞/孔进行铺板,并且培养于不含酚红的RPMI中,其中增补有5%经活性炭处理的血清(Gibco)培养基,持续16小时。将ISIS 560131或ISIS 569236以0.04μM、0.2μM、1.0μM、或5.0μM单独地添加至每个细胞组。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。将MDV3100以0.04μM、0.2μM、1.0μM、或5.0μM添加至细胞的单独组中。在4小时的孵育期之后,将DHT添加至培养基中到1nM的终浓度,如所指示的。在48小时后收集RNA,并且对AR、PSA和TMPRSS2的水平进行测量。数据呈现于表82-85中。在不存在DHT时,与未处理的对照相比,在LNCaP细胞中的AR表达是95%,PSA表达是7%,并且TMPRSS2表达是24%。

[1092] 表82

[1093] 在CSS培养基中培养的LNCaP细胞中AR的表达百分比

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	81	46	16	5
ISIS 569236	94	66	35	13
ISIS 549148	106	97	96	104
MDV-3100	91	67	64	77

[1095] 表83

[1096] 在CSS+DHT培养基中培养的LNCaP细胞中AR的表达百分比

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	101	71	27	10
ISIS 569236	104	86	55	21
ISIS 549148	98	102	96	111

[1097]

MDV-3100	107	121	110	113
----------	-----	-----	-----	-----

[1098] 表84

[1099] 在CSS+DHT培养基中培养的LNCaP细胞中PSA表达的抑制百分比

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	10	21	21	72
ISIS 569236	4	11	45	59
ISIS 549148	0	8	0	9
MDV-3100	15	38	81	82

[1101] 表85

[1102] 在CSS+DHT培养基中培养的LNCaP细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	6	11	26	64
ISIS 569236	6	8	40	50
ISIS 549148	0	0	1	10
MDV-3100	8	24	60	69

[1104] 对在CSS培养基和CSS+DHT培养基中的增殖的影响

[1105] 在完全培养基或CSS+1nM DHT培养基中5天的处理期之后,使用CellTiter 96® AQueous单溶液或CellTiter-Glo® 溶液细胞增殖试剂盒(普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表86和表87中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。与对照相比,采用ISIS 560131、ISIS 569236、和MDV-3100处理细胞以一种剂量依赖性方式降低了细胞增殖。与采用MVD-3100进行的处理相比,在CSS+DHT培养基中采用ISIS寡核苷酸进行的处理将增殖能力以一个更大的程度降低。在不含DHT的CSS培养基中培养的细胞的增殖能力是未处理对照水平的17%。

[1106] 表86

[1107] 在完全培养基中培养的LNCaP细胞的增殖(%未处理的对照)

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	96	70	48	45
ISIS 569236	100	85	68	54
ISIS 549148	101	95	94	110
MDV-3100	107	88	65	45

[1109] 表87

[1110] 在CSS+DHT培养基中培养的LNCaP细胞的增殖(%未处理的对照)

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	97	81	46	8
ISIS 569236	95	99	54	17
ISIS 549148	112	96	95	89
MDV-3100	112	95	74	33

[1112] 实例29:在完全培养基和CSS培养基中培养的C4-2细胞中AR mRNA的反义抑制

[1113] 对在完全培养基以及具有DHT的CSS培养基中培养的C4-2细胞中的AR mRNA水平的反义抑制作用进行了研究。

[1114] 在完全培养基中的基因表达

[1115] 将细胞以1,000个细胞/孔进行铺板。将ISIS 560131或ISIS 569236以0.04 μ M、0.2 μ M、1.0 μ M、或5.0 μ M单独地进行添加。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。将MDV3100以0.04 μ M、0.2 μ M、1.0 μ M、或5.0 μ M添加至细胞的单独组中。在48小时的孵育期之后,对AR、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表88-90中。采用ISIS寡核苷酸进行的处理抑制了AR表达,而采用MDV-3100进行的处理增加了细胞中的AR表达。

[1116] 全长AR和PSA的蛋白质分析还证实了针对管家基因GAPDH的水平进行归一化的表达的剂量依赖性减少。

[1117] 表88

[1118] 在完全培养基中培养的C4-2细胞中AR的表达百分比

[1119]

	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
ISIS 560131	48	13	8	8
ISIS 569236	72	27	11	9
ISIS 549148	89	90	84	86
MDV-3100	95	99	132	137

[1120] 表89

[1121] 在完全培养基中培养的C4-2细胞中PSA表达的抑制百分比

[1122]

	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
ISIS 560131	48	78	88	89
ISIS 569236	35	62	83	88
ISIS 549148	15	24	24	23
MDV-3100	28	40	72	89

[1123] 表90

[1124] 在完全培养基中培养的C4-2细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

[1125]

	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
ISIS 560131	29	62	76	71
ISIS 569236	17	54	67	67
ISIS 549148	2	7	10	0
MDV-3100	10	20	44	67

[1126] CSS+DHT培养基中的基因表达

[1127] 将细胞以2,000个细胞/孔进行铺板,并且培养于具有1nM DHT的CSS培养基中。将ISIS 560131或ISIS 569236以0.04 μ M、0.2 μ M、1.0 μ M、或5.0 μ M单独地添加至每个细胞组。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。将MDV3100以0.04 μ M、0.2 μ M、1.0 μ M、或5.0 μ M添加至细胞的单独组中。在48小时的孵育期之后,对AR、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表91-93中。在不存在DHT时,与未处理的对照相比,在C4-2细胞中的AR表达是153%,PSA表达是42%,并且TMPRSS2表达是23%。采用ISIS寡核苷酸进行的处理抑制了AR表达,而采

用MDV-3100进行的处理增加了细胞中的AR表达。

[1128] 表91

[1129] 在CSS+DHT培养基中培养的C4-2细胞中AR的表达百分比

[1130]

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	88	57	20	15
ISIS 569236	89	82	52	23
ISIS 549148	101	101	118	111
MDV-3100	101	109	156	148

[1131] 表92

[1132] 在CSS+DHT培养基中培养的C4-2细胞中PSA表达的抑制百分比

[1133]

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	10	24	49	74
ISIS 569236	0	4	57	64
ISIS 549148	0	8	21	22
MDV-3100	9	8	51	73

[1134] 表93

[1135] 在CSS+DHT培养基中培养的C4-2细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

[1136]

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	10	17	51	78
ISIS 569236	0	11	61	67
ISIS 549148	3	0	22	28
MDV-3100	9	0	44	78

[1137] 对在CSS培养基和CSS+DHT培养基中的增殖的影响

[1138] 在完全培养基或CSS+1nM DHT培养基中5天的处理期之后,使用CellTiter96® Aqueous单溶液 (CellTiter96® Aqueous One Solution) 或CellTiter-Glo®细胞增殖试剂盒 (CellTiter-Glo® Cell Proliferation kit) (普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表94和表95中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。与对照相比,采用ISIS 560131、ISIS 569236、和MDV-3100处理细胞以一种剂量依赖性方式降低了细胞增殖。在不含DHT的CSS培养基中培养的细胞的增殖能力是未处理对照水平的17%。

[1139] 表94

[1140] 在完全培养基中培养的C4-2细胞的增殖 (%未处理的对照)

[1141]

	0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
ISIS 560131	104	82	70	51
ISIS 569236	103	81	57	58
ISIS 549148	106	112	91	94
MDV-3100	105	108	71	67

[1142] 表95

[1143] 在CSS+DHT培养基中培养的C4-2细胞的增殖 (%未处理的对照)

[1144]		0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
	ISIS 560131	106	94	47	31
	ISIS 569236	99	99	88	51
	ISIS 549148	102	82	82	91
	MDV-3100	122	124	87	22

[1145] 实例30:在完全培养基和CSS培养基中培养的C4-2B细胞中AR mRNA的反义抑制

[1146] 对在完全培养基以及具有DHT的CSS培养基中培养的C4-2B细胞中的AR mRNA水平的反义抑制作用进行了研究。

[1147] 在完全培养基中的基因表达

[1148] 将细胞以1,000个细胞/孔进行铺板。将ISIS 560131或ISIS 569236以0.04μM、0.2μM、1.0μM、或5.0μM单独地进行添加。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。将MDV3100以0.04μM、0.2μM、1.0μM、或5.0μM添加至细胞的单独组中。在48小时的孵育期之后,对AR、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表96-98中。采用ISIS寡核苷酸进行的处理抑制了AR表达,而采用MDV-3100进行的处理增加了细胞中的AR表达。

[1149] 全长AR的蛋白质分析还证实了针对管家基因GAPDH的水平进行归一化的表达的剂量依赖性减少。

[1150] 表96

[1151] 在完全培养基中培养的C4-2B细胞中AR的表达百分比

[1152]		0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
	ISIS 560131	34	15	14	14
	ISIS 569236	61	23	20	16
	ISIS 549148	101	91	88	87
	MDV-3100	108	121	157	182

[1153] 表97

[1154] 在完全培养基中培养的C4-2B细胞中PSA表达的抑制百分比

[1155]		0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
	ISIS 560131	56	84	89	92
	ISIS 569236	30	72	81	89
	ISIS 549148	3	11	18	14
	MDV-3100	8	27	73	88

[1156] 表98

[1157] 在完全培养基中培养的C4-2B细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

[1158]		0.04μM	0.2μM	1μM	5.0μM
	ISIS 560131	46	71	72	75
	ISIS 569236	33	59	69	73
	ISIS 549148	0	2	4	0
	MDV-3100	3	24	55	71

[1159] CSS+DHT培养基中的基因表达

[1160] 将细胞以2,000个细胞/孔进行铺板,并且培养于具有1nM DHT的CSS培养基中。将ISIS 560131或ISIS 569236以0.04 μ M、0.2 μ M、1.0 μ M、或5.0 μ M单独地添加至每个细胞组。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。将MDV3100以0.04 μ M、0.2 μ M、1.0 μ M、或5.0 μ M添加至细胞的单独组中。在48小时的孵育期之后,对AR、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表99-101中。在不存在DHT时,与未处理的对照相比,在C4-2细胞中的AR表达是188%,PSA表达是43%,并且TMPRSS2表达是27%。采用ISIS寡核苷酸进行的处理抑制了AR表达,而采用MDV-3100进行的处理增加了细胞中的AR表达。

[1161] 表99

[1162] 在CSS+DHT培养基中培养的C4-2B细胞中AR的表达百分比

	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
ISIS 560131	55	31	15	13
ISIS 569236	67	49	24	19
ISIS 549148	91	104	101	95
MDV-3100	112	144	165	173

[1165] 表100

[1166] 在CSS+DHT培养基中培养的C4-2B细胞中PSA表达的抑制百分比

	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
ISIS 560131	0	17	50	61
ISIS 569236	0	5	33	46
ISIS 549148	0	0	0	0
MDV-3100	0	0	37	45

[1168] 表101

[1169] 在CSS+DHT培养基中培养的C4-2B细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
ISIS 560131	0	34	60	76
ISIS 569236	0	6	43	59
ISIS 549148	0	0	0	3
MDV-3100	0	11	48	66

[1171] 对在CSS培养基和CSS+DHT培养基中的增殖的影响

[1172] 在完全培养基或CSS+1nM DHT培养基中5天的处理期之后,使用CellTiter 96® AQueous单或CellTiter-Glo® 溶液细胞增殖试剂盒(普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表102和表103中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。与对照相比,采用ISIS 560131、ISIS 569236、和MDV-3100处理细胞以一种剂量依赖性方式降低了细胞增殖。与采用MVD-3100进行的处理相比,在CSS+DHT培养基中采用ISIS寡核苷酸进行的处理将增殖能力以一个更大的程度降低。在不含DHT的CSS培养基中培养的细胞的增殖能力是未处理对照水平的12%。

[1173] 表102

[1174] 在完全培养基中培养的C4-2B细胞的增殖(%未处理的对照)

	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
[1175] ISIS 560131	93	50	50	41
ISIS 569236	98	64	55	48

[1176] ISIS 549148	119	97	103	98
MDV-3100	131	105	72	60

[1177] 表103

[1178] 在CSS+DHT培养基中培养的C4-2B细胞的增殖(%未处理的对照)

[1179]	0.04 μ M	0.2 μ M	1 μ M	5.0 μ M
ISIS 560131	111	75	49	40
ISIS 569236	109	109	67	39
ISIS 549148	109	131	119	114
MDV-3100	125	100	83	17

[1180] 实例31:在完全培养基和CSS培养基中培养的VCaP细胞中AR mRNA的反义抑制

[1181] 对在完全培养基以及具有DHT的CSS培养基中培养的VCaP前列腺癌细胞中AR的反义抑制作用(Korenychuk,S.等人,In Vivo.《体内》2001.15:163-168)进行了研究。VCaP细胞表达全长AR和V7变体两者。

[1182] 在完全培养基中的基因表达

[1183] 将细胞以10,000个细胞/孔进行铺板。使用RNAiMax转染试剂将ISIS 560131或ISIS 569236以1.34nM、4nM、13.4nM、或40nM单独地进行添加。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。在48小时的孵育期之后,对全长AR、V7变体、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表104-107中。

[1184] 全长AR和V7变体的蛋白质分析还证实了与管家基因GAPDH的水平进行比较而得出的两者表达的剂量依赖性减少。

[1185] 表104

[1186] 在完全培养基中培养的VCaP细胞中全长AR的抑制百分比

[1187]	1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
ISIS 560131	0	59	77	84
ISIS 569236	0	41	49	74
ISIS 549148	0	8	5	17

[1188] 表105

[1189] 在完全培养基中培养的VCaP细胞中ARV7变体的抑制百分比

[1190]	1.34 nM	4.0 nM	13.4 nM	40 nM
ISIS 560131	0	57	78	84

[1191]	ISIS 569236	0	40	53	80
	ISIS 549148	0	8	0	14

[1192] 表106

[1193] 在完全培养基中培养的VCaP细胞中PSA表达的抑制百分比

	1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
ISIS 560131	2	24	35	46
ISIS 569236	7	19	40	52
ISIS 549148	2	0	0	20

[1195] 表107

[1196] 在完全培养基中培养的VCaP细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

	1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
ISIS 560131	0	0	0	4
ISIS 569236	0	0	0	36
ISIS 549148	0	0	0	0

[1198] 对细胞的单独组用0.04μM、0.2μM、1.0μM、或5.0μM的MDV-3100进行处理。在48小时的孵育期之后,对全长AR、V7变体、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表108中,表示为与未处理的对照相比而言基因水平的表达百分比。

[1199] 表108

[1200] 在经MDV-3100处理并在完全培养基中培养的VCaP细胞中的基因表达的百分比

	0.04μM	0.2μM	1.0μM	5.0μM
全长AR	136	135	160	178
ARV7变体	172	179	244	237
PSA	105	76	75	61
TMPRSS2	131	121	135	141

[1202] CSS+DHT培养基中的基因表达

[1203] 将细胞以15,000个细胞/孔进行铺板,并且培养于CSS培养基中持续16小时。使用RNAiMax试剂,针对每个细胞组,采用1.34nM、4nM、13.4nM、或40nM的ISIS 560131或ISIS 569236对细胞进行转染。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。在4小时之后,添加1nM DHT。将MDV3100以0.04μM、0.2μM、1.0μM、或5.0μM的剂量添加至细胞的单独组中。在48小时的孵育期之后,对AR、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表109-113中。在不存在DHT时,与未处理的对照相比,在VCaP细胞中的AR表达是555%,V7变体表达是656%,PSA表达是11%,并且TMPRSS2表达是22%。

[1204] 表109

[1205] 在CSS+DHT培养基中培养的VCaP细胞中全长AR的抑制百分比

	1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
ISIS 560131	12	16	37	38
ISIS 569236	23	21	38	35
ISIS 549148	0	0	0	0

[1207] 表110

[1208] 在CSS+DHT培养基中培养的VCaP细胞中ARV7变体的抑制百分比

[1209]		1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
	ISIS 560131	27	31	39	41
	ISIS 569236	37	33	48	39
	ISIS 549148	12	0	0	5

[1210] 表111

[1211] 在CSS+DHT培养基中培养的VCaP细胞中PSA表达的抑制百分比

[1212]		1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
	ISIS 560131	0	35	69	73
	ISIS 569236	8	25	62	74
	ISIS 549148	0	3	9	0

[1213] 表112

[1214] 在CSS+DHT培养基中培养的VCaP细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

[1215]		1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
	ISIS 560131	0	21	49	57
	ISIS 569236	6	19	40	54
	ISIS 549148	0	0	0	0

[1216] 表113

[1217] 在经MDV-3100处理并在CSS+DHT培养基中培养的VCaP细胞中的基因表达的百分比

		0.04 μ M	0.2 μ M	1.0 μ M	5.0 μ M
[1218]	全长 AR	114	94	142	233
	AR V7 变体	82	65	101	181

[1219]	PSA	90	72	57	30
	TMPRSS2	115	96	70	42

[1220] 对增殖的影响

[1221] 在完全培养基或CSS+1nM DHT培养基中5天的处理期之后,使用CellTiter96® AQueous单或CellTiter-Glo®溶液细胞增殖试剂盒(普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表114-116中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。与对照相比,采用ISIS 560131、ISIS 569236、和MDV-3100处理细胞以一种剂量依赖性方式降低了细胞增殖。与采用MVD-3100进行的处理相比,在CSS+DHT培养基中采用ISIS寡核苷酸进行的处理将增殖能力以一个更大的程度降低。在不含DHT的CSS培养基中培养的细胞的增殖能力是未处理对照水平的12%。

[1222] 表114

[1223] 在完全培养基中培养的VCaP细胞的增殖(%未处理的对照)

[1224]		1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
	ISIS 560131	98	66	53	48
	ISIS 569236	98	76	68	59
	ISIS 549148	98	98	113	106

[1225] 表115

[1226] 在CSS+DHT培养基中培养的VCaP细胞的增殖(%未处理的对照)

[1227]		1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
	ISIS 560131	95	65	42	37
	ISIS 569236	83	68	61	45
	ISIS 549148	114	123	104	92

[1228] 表116

[1229] 经MDV-3100处理的VCaP细胞的增殖(%未处理的对照)

		完全培养基	CSS+DHT培养基
[1230]	0.04 μ M	49	117
	0.2 μ M	44	119
	1.0 μ M	27	71
	5.0 μ M	17	65

[1231] 对细胞凋亡的影响

[1232] 在完全培养基中在72小时的处理期之后,采用Caspase-Glo 3/7测定(普洛麦格公司)对癌细胞的细胞凋亡进行测量。结果呈现在表117和表118中,呈现为相对于未处理的细胞而言细胞的凋亡百分比。与对照相比,采用ISIS 560131、ISIS 569236、和MDV-3100处理细胞以一种剂量依赖性方式增加了细胞凋亡。

[1233] 还通过切割的PARP的水平的蛋白印迹分析来测量细胞凋亡,在采用ISIS 560131、ISIS 569236、和MDV-3100处理的细胞中,其显示以一种剂量依赖性方式增加。

[1234] 表117

[1235] 在完全培养基中培养的VCaP细胞的细胞凋亡(%未处理的对照)

[1236]		1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
	ISIS 560131	189	253	356	262
	ISIS 569236	176	293	402	581
	ISIS 549148	131	108	103	146

[1237] 表118

[1238] 经MDV-3100处理的VCaP细胞的细胞凋亡(%未处理的对照)

[1239]		%
	0.04 μ M	186
	0.2 μ M	210
	1.0 μ M	612
	5.0 μ M	528

[1240] 实例32:在完全培养基和CSS培养基中培养的22RV1细胞中AR mRNA的反义抑制

[1241] 对在完全培养基以及具有DHT的CSS培养基中培养的22RV1细胞中的AR的反义抑制作用进行了研究。

[1242] 在完全培养基中的基因表达

[1243] 将细胞以1,000个细胞/孔进行铺板。使用RNAiMax转染试剂将ISIS 560131或ISIS 569236以1.34nM、4nM、13.4nM、或40nM单独地进行添加。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。在48小时的孵育期之后,对全长AR、V7变体、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表119-122中。

[1244] 全长AR和V7变体的蛋白质分析还证实了与管家基因GAPDH的水平进行比较而得出的表达的剂量依赖性减少。

[1245] 表119

[1246] 在完全培养基中培养的22RV1细胞中全长AR的抑制百分比

[1247]

	1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
ISIS 560131	7	19	49	76
ISIS 569236	17	15	37	71
ISIS 549148	6	0	11	17

[1248] 表120

[1249] 在完全培养基中培养的22RV1细胞中ARV7变体的抑制百分比

[1250]

	1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
ISIS 560131	12	29	57	81
ISIS 569236	30	2	46	81
ISIS 549148	0	0	22	26

[1251] 表121

[1252] 在完全培养基中培养的22RV1细胞中PSA表达的抑制百分比

[1253]

	1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
ISIS 560131	10	20	27	36
ISIS 569236	0	17	25	7
ISIS 549148	9	11	17	27

[1254] 表122

[1255] 在完全培养基中培养的22RV1细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

[1256]

	1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
ISIS 560131	7	3	19	32
ISIS 569236	0	13	21	36
ISIS 549148	15	9	14	4

[1257] 对细胞的单独组用0.04μM、0.2μM、1.0μM、或5.0μM的MDV-3100进行处理。在48小时的孵育期之后,对全长AR、V7变体、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表123中,表示为与未处理的对照相比而言基因水平的表达百分比。

[1258] 表123

[1259] 在经MDV-3100处理并在完全培养基中培养的22RV1细胞中的基因表达的百分比

[1260]

	0.04 μM	0.2 μM	1.0 μM	5.0 μM
全长 AR	103	93	81	83

[1261]	AR V7 变体	106	98	87	77
	PSA	83	70	71	86
	TMPRSS2	101	80	82	93

[1262] CSS+DHT培养基中的基因表达

[1263] 将细胞以2,000个细胞/孔进行铺板,并且培养于CSS培养基中持续16小时。使用RNAiMax试剂,针对每个细胞组,采用1.34nM、4nM、或13.4nM的ISIS 560131或ISIS 569236对细胞进行转染。将ISIS 549148包括在内作为阴性对照。在4小时之后,添加1nM DHT。将MDV3100以0.04μM、0.2μM、1.0μM、或5.0μM的剂量添加至细胞的单独组中。在48小时的孵育期之后,对AR、AR V7变体、PSA和TMPRSS2的RNA水平进行测量。数据呈现于表124-128中。在不存在DHT时,与未处理的对照相比,在VCaP细胞中的AR表达是555%,V7变体表达是656%,PSA表达是11%,并且TMPRSS2表达是22%。

[1264] 采用ISIS寡核苷酸进行的处理导致全长AR和V7变体以及下游基因表达的显著抑制。与采用MVD-3100进行的处理相比,采用ISIS寡核苷酸进行的处理导致以一个更大的程度抑制基因表达。

[1265] 表124

[1266] 在CSS+DHT培养基中培养的22RV1细胞中全长AR的抑制百分比

[1267]		1.34nM	4.0nM	13.4nM
	ISIS 560131	65	85	93
	ISIS 569236	59	89	97
	ISIS 549148	2	13	22

[1268] 表125

[1269] 在CSS+DHT培养基中培养的22RV1细胞中ARV7变体的抑制百分比

[1270]		1.34nM	4.0nM	13.4nM
	ISIS 560131	63	83	93
	ISIS 569236	54	88	97
	ISIS 549148	19	19	32

[1271] 表126

[1272] 在CSS+DHT培养基中培养的22RV1细胞中PSA表达的抑制百分比

[1273]		1.34nM	4.0nM	13.4nM
	ISIS 560131	3	50	66
	ISIS 569236	28	49	70
	ISIS 549148	8	23	29

[1274] 表127

[1275] 在CSS+DHT培养基中培养的22RV1细胞中TMPRSS2表达的抑制百分比

[1276]		1.34nM	4.0nM	13.4nM
	ISIS 560131	39	50	59
	ISIS 569236	27	50	75

ISIS 549148	0	3	1
-------------	---	---	---

[1277] 表128

[1278] 在经MDV-3100处理并在CSS+DHT培养基中培养的22RV1细胞中的基因表达的百分比

	0.04μM	0.2μM	1.0μM	5.0μM
全长AR	5	11	6	18
ARV7变体	16	17	19	12
PSA	15	19	18	16
TMPRSS2	17	9	26	18

[1280] 对增殖的影响

[1281] 在完全培养基中5天的处理期之后,使用CellTiter 96® AQueous单或CellTiter-Glo®溶液细胞增殖试剂盒(普洛麦格公司),遵循生产商说明书,对癌细胞的增殖能力进行测量。结果呈现在表129和表130中,呈现为相对于未处理的细胞而言增殖的抑制百分比。与对照相比,采用ISIS 560131、ISIS 569236、和MDV-3100处理细胞以一种剂量依赖性方式降低了细胞增殖。与采用MVD-3100进行的处理相比,在CSS+DHT培养基中采用ISIS寡核苷酸进行的处理将增殖能力以一个更大的程度降低。在不含DHT的CSS培养基中培养的细胞的增殖能力是未处理对照水平的12%。

[1282] 表129

[1283] 在完全培养基中培养的22RV1细胞的增殖(%未处理的对照)

	1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
ISIS 560131	94	72	50	17
ISIS 569236	92	53	20	7
ISIS 549148	97	97	101	83

[1285] 表130

[1286] 经MDV-3100处理的22RV1细胞的增殖(%未处理的对照)

	%
--	---

	0.04 μM	87
	0.2 μM	83
	1.0 μM	81
	5.0 μM	74

[1289] 对细胞凋亡的影响

[1290] 在完全培养基或CSS+DHT培养基中,在72小时的处理期之后,采用Caspase-glo 3/7测定试剂盒(普洛麦格公司)对癌细胞的细胞凋亡进行测量。结果呈现在表131和表132中,呈现为相对于未处理的细胞而言细胞的凋亡百分比。与对照相比,采用ISIS 560131和ISIS 569236处理细胞以一种剂量依赖性方式增加了细胞凋亡。

[1291] 表131

[1292] 在完全培养基中培养的22RV1细胞的细胞凋亡(%未处理的对照)

[1293]		1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
	ISIS 560131	99	127	131	566
	ISIS 569236	91	141	333	1452
	ISIS 549148	81	76	72	123

[1294] 表132

[1295] 在CSS+DHT培养基中培养的22RV1细胞的细胞凋亡(%未处理的对照)

[1296]		1.34nM	4.0nM	13.4nM	40nM
	ISIS 560131	121	113	172	518
	ISIS 569236	127	106	257	1136
	ISIS 549148	113	94	102	108

[1297] 实例33:在食蟹猴中靶向人雄激素受体的ISIS反义寡核苷酸的影响

[1298] 将食蟹猴用选自上述研究中的ISIS反义寡核苷酸进行处理。对反义寡核苷酸效力和耐受性进行评估。测试的人类反义寡核苷酸与恒河猴基因组序列(GENBANK登录号NW_001218131.1,从其核苷酸134001至308000截取,并且在此被指定为SEQ ID NO:189)具有交叉反应。针对SEQ ID NO:189的各寡核苷酸的靶标起始位点和靶标区域连同它们的化学性和序列的细节呈现于表133中。

[1299] 表133

[1300] 与SEQ ID NO:189互补的反义寡核苷酸

[1301]	ISIS 号	靶标起始位点	靶标区域	序列	化学性	SEQ ID NO
	560131	59450	内含子	TTGATTTAATGGTTGC	脱氧的、MOE、及	35
[1302]					(S)-cEt	
	569213	59449	内含子	TGATTTAATGGTTGCA	脱氧的、MOE、及	39
		59479		TGATTTAATGGTTGCA	(S)-cEt	39
	569216	59449	内含子	TGATTTAATGGTTGCA	脱氧的、MOE、及	39
		59479		TGATTTAATGGTTGCA	(S)-cEt	39
	569221	59449	内含子	TGATTTAATGGTTGCA	脱氧的、MOE、及	39
		59479		TGATTTAATGGTTGCA	(S)-cEt	39
	569236	59449	内含子	TGATTTAATGGTTGCA	脱氧的、MOE、及	39
		59479		TGATTTAATGGTTGCA	(S)-cEt	39
	579671	59450	内含子	TTGATTTAATGGTTGC	脱氧的、MOE、及 (S)-cEt	35
	586124	59448	内含子	GATTTAATGGTTGCAA	3-10-3 (S)-cEt	43
	583918	3754	外显子	AGTCGCGACTCTGGTA	3-10-3 (S)-cEt	124
	584149	7260	内含子	GTCAATATCAAAGCAC	3-10-3 (S)-cEt	150
	584163	9811	内含子	GAACATTATTAGGCTA	3-10-3 (S)-cEt	155
	584269	41322	内含子	CCTTATGGATGCTGCT	3-10-3 (S)-cEt	169
	584468	109552	内含子	CATTGTACTATGCCAG	3-10-3 (S)-cEt	175

[1303] 处理

[1304] 在研究之前,将猴子保持隔离持续30天时期,在此期间对这些动物针对一般健康情况进行日常观察。猴子是2-4岁并且重量在2和4kg之间。将以随机分配的四只雄性食蟹猴为一组的十三个组皮下注射ISIS寡核苷酸或PBS。将PBS溶液或ISIS寡核苷酸以40mg/kg的

剂量按照以下方案进行给予：加载方案，由在研究的第一周的四个剂量（第1、3、5、和7天）组成，随后为维持方案，由在14天开始（第2至6周）的每周一次的给予组成。皮下注射是在背上以顺时针旋转的4个部位进行的；每个剂量一个部位。使用克他命使其镇静时，将这些注射部位通过刺青描绘出，并且以最低3cm分开。

[1305] 在研究期间，最少每日一次针对疾病或病痛体征对猴子进行观察。在实例中描述的方案得到研究机构动物护理和使用委员会 (IACUC) 的批准。

[1306] 靶标降低

[1307] RNA分析

[1308] 将RNA从肝脏、心脏、骨骼肌、肾脏、以及前列腺组织进行提取，以用于使用引物探针组RTS3559进行AR的实时PCR分析。将结果针对 RIBOGREEN®进行归一化。结果呈现为相对于PBS对照而言AR mRNA的抑制百分比。如表134中所示，相对于PBS对照，采用ISIS反义寡核苷酸的处理导致ARmRNA的显著降低。‘n/a’ 指示在该器官中未测量mRNA水平。

[1309] 表134

[1310] 在食蟹猴中相对于PBS对照而言ARmRNA的抑制百分比

[1311]

ISIS号	心脏	骨骼肌	肾脏	肝脏	前列腺
560131	32	30	19	65	27
569221	52	35	31	60	n/a
569236	42	47	42	33	32
579671	24	31	53	33	n/a
583918	76	74	73	88	58
584149	33	63	77	93	45
584163	53	73	90	98	58
584269	72	76	92	96	41
584468	33	53	88	97	50

[1312] 蛋白质分析

[1313] 用ELISA试剂盒 (Enzo生命科学公司 (Enzo Life Sciences)), 遵循生产商说明书，对血浆中的血清睾酮蛋白水平进行测量。结果呈现于表135中，表示为ng/mL。结果指示ISIS寡核苷酸中的一些降低了睾酮蛋白水平。

[1314] 表135

[1315] 在食蟹猴中的睾酮蛋白水平

[1316]

	ng/mL
PBS	12.6
ISIS 560131	14.7
ISIS 569221	8.8
ISIS 569236	12.7
ISIS 579671	7.3
ISIS 584269	14.1
ISIS 584468	13.6

[1317] 耐受性研究

[1318] 体重和器官重量测量

[1319] 为了评估ISIS寡核苷酸对动物全面健康的影响,对体重和器官重量进行了测量。在第42天对体重进行测量,并且呈现于表136中。在安乐死的时间处对器官重量进行测量,并且数据也呈现于表136中。确切地,在猴子的体重和器官重量方面,采用ISIS 560131进行的处理耐受良好。

[1320] 表136

[1321] 食蟹猴的最终体重和器官重量

[1322]	处理	体重 (kg)	脾脏 (g)	心脏 (g)	肾脏 (g)	肠系膜淋 巴结 (g)	肝脏 (g)
	PBS	2.5	2.6	8.5	13	1.4	58
[1323]	ISIS 560131	2.4	2.5	9.8	12	2.0	58
	ISIS 569213	2.4	5.3	8.3	16	2.4	69
	ISIS 569216	2.6	4.9	9.3	15	2.7	71
	ISIS 569221	2.5	3.3	8.5	14	3.5	68
	ISIS 569236	2.4	3.2	8.4	12	2.4	56
	ISIS 579671	2.4	3.2	8.8	14	2.5	62
	ISIS 586124	2.5	3.3	9.4	14	2.8	58
	ISIS 583918	2.5	4.6	8.9	12	3.5	60
	ISIS 584149	2.5	2.2	9.3	13	2.1	60
	ISIS 584163	2.5	3.2	8.4	15	3.3	54
	ISIS 584269	2.5	4.7	8.7	13	3.6	60
	ISIS 584468	2.5	4.1	8.3	13	3.8	60

[1324] 肝功能

[1325] 为了评估ISIS寡核苷酸对肝功能的影响,对猴子禁食过夜。在第44天从所有研究组中收集大约1.5mL的血样。将血液收集在不具有抗凝血剂的试管中,以用于血清分离。将试管保持在室温下持续最低90min,并且然后在3,000rpm离心10min。使用东芝120FR NEO化学分析仪(东芝公司(Toshiba Co.),日本)对各项肝功能标志物的水平进行测量。结果呈现于表137中。确切地,在肝功能标志物方面,采用ISIS 560131进行的处理耐受良好。

[1326] 表137

[1327] 在食蟹猴血浆中的肝功能标志物

[1328]

处理	白蛋白 (g/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
PBS	4.2	37	39
ISIS 560131	4.0	87	68
ISIS 569213	3.7	80	47
ISIS 569216	3.7	93	75
ISIS 569221	4.0	73	48
ISIS 569236	4.1	45	35
ISIS 579671	4.0	53	56
ISIS 586124	3.9	94	56
ISIS 583918	4.1	73	75
ISIS 584149	4.5	58	57
ISIS 584163	4.2	68	50
ISIS 584269	4.0	81	75
ISIS 584468	4.0	52	46

[1329] 血液学

[1330] 为了评估食蟹猴中ISIS寡核苷酸对血液学参数的影响,在第44天从各个可用研究动物中将大约0.5mL血液的血样收集在包含K₂-EDTA的试管中。使用ADVIA2120i血液分析仪(西门子,美国),针对红细胞(RBC)计数、白细胞(WBC)计数、血小板计数、血红蛋白含量以及红细胞压积对样品进行分析。数据呈现于表138中。

[1331] 数据指示,采用大多数寡核苷酸进行的处理并未导致血液学参数针对在此剂量下的反义寡核苷酸的任何在预期范围外的变化。确切地,在猴子的血液学方面,采用ISIS 560131进行的处理耐受良好。

[1332] 表138

[1333] 在食蟹猴中的血液学参数

[1334]

处理	RBC (x 10 ⁶ /μL)	血小板 (x 10 ³ /μL)	WBC (x 10 ³ /μL)	血红蛋白 (g/dL)	HCT (%)
PBS	5.3	426	13.6	13.2	43
ISIS 560131	5.8	392	11.3	13.1	44
ISIS 569213	5.6	426	12.9	12.5	42
ISIS 569216	5.6	504	12.2	12.8	43
ISIS 569221	5.6	406	11.1	12.9	45
ISIS 569236	5.7	358	14.4	13.1	44
ISIS 579671	5.4	438	10.0	12.5	42
ISIS 586124	5.8	391	10.4	13.6	45
ISIS 583918	5.8	435	12.7	13.3	46
ISIS 584149	5.7	478	11.3	13.7	45
ISIS 584163	5.5	461	9.1	12.8	44
ISIS 584269	5.2	522	9.8	12.4	41
ISIS 584468	5.9	408	11.1	13.5	45

[1335] 肾功能

[1336] 为了评估ISIS寡核苷酸对肾功能的影响,对猴子禁食过夜。在第44天,从所有研究组中收集大约1.5mL血样。将血液收集在不具有抗凝血剂的试管中,以用于血清分离。将试管保持在室温下持续最低90min,并且然后在3,000rpm离心10min。使用东芝120FR NEO化学分析仪(东芝公司,日本)对BUN和肌酸酐的水平进行测量。结果呈现于表139中,表示为mg/dL。血浆化学数据指示大多数ISIS寡核苷酸不具有对肾功能的在针对反义寡核苷酸的预期范围之外的任何影响。确切地,在猴子的肾功能方面,采用ISIS 560131进行的处理耐受良好。

[1337] 还通过尿液分析来评价肾功能。在第44天,使用在湿冰上的干净的保持盘(cage pan)从所有动物收集新鲜尿液。在进行新鲜尿液收集前一天,去除食物过夜但供应水。使用东芝120FR NEO自动化学分析仪(东芝公司,日本)对总蛋白和肌酸酐水平进行测量,并且对蛋白质与肌酸酐的比率进行计算。结果呈现于表140中。

[1338] 表139

[1339] 食蟹猴的血浆BUN和肌酸酐水平(mg/dL)

[1340]

处理	BUN	肌酸酐
PBS	30.5	0.78
ISIS 560131	23.7	0.84
ISIS 569213	29.4	0.91
ISIS 569216	28.4	0.81
ISIS 569221	20.2	0.86
ISIS 569236	24.9	0.87
ISIS 579671	22.7	0.74
ISIS 586124	23.8	0.87
ISIS 583918	24.5	0.87
ISIS 584149	26.4	0.85
ISIS 584163	22.4	0.82
ISIS 584269	21.8	0.89
ISIS 584468	22.2	0.78

[1341] 表140

[1342] 食蟹猴的尿蛋白/肌酸酐比率

[1343]

处理	比率
PBS	0.00
ISIS 560131	0.02
ISIS 569213	0.02
ISIS 569216	0.08
ISIS 569221	0.00
ISIS 569236	0.02
ISIS 579671	0.00
ISIS 586124	0.01
ISIS 583918	0.01

ISIS 584149	0.01
ISIS 584163	0.01
ISIS 584269	0.00
ISIS 584468	0.00

[1344] C-反应蛋白水平分析

[1345] 为了评估在食蟹猴中ISIS寡核苷酸的任何炎性作用,对猴子禁食过夜。在第44天,从所有研究组中收集大约1.5mL血样。将血液收集在不具有抗凝血剂的试管中,以用于血清分离。将试管保持在室温下持续最低90min,并且然后在3,000rpm离心10min。在第43天,使用东芝120FR NEO化学分析仪(东芝公司,日本)对C-反应蛋白(CRP)(它合成于肝脏中,并且充当炎症标志物)进行测量。还类似地对补体C3进行测量,并且数据呈现为基线值的百分比。结果呈现于表141中,并且指示采用大多数ISIS寡核苷酸进行的处理未引起猴子中的任何炎症。

[1346] 表141

[1347] 食蟹猴血浆中的C-反应蛋白和C3水平

处理	CRP (mg/dL)	C3 (基线 的%)
PBS	2.5	118
ISIS 560131	1.7	100
ISIS 569213	2.8	60
ISIS 569216	3.6	94
ISIS 569221	4.9	91
ISIS 569236	2.6	103
ISIS 579671	4.5	101
ISIS 586124	4.0	93
ISIS 583918	3.5	89
ISIS 584149	1.7	110
ISIS 584163	1.0	102
ISIS 584269	4.9	102
ISIS 584468	1.3	111

[1348] 药物代谢动力学研究

[1350] 对选择处理组中的肾脏和肝脏中的全长寡核苷酸的浓度进行测量。使用的方法是先前公开的方法(Leeds等人,1996;Geary等人,1999)的改进,由以下项组成:苯酚-氯仿(液-液)萃取,随后为固相萃取。在萃取之前,添加内标(ISIS 355868,27-mer的2'-O-甲氧基乙基修饰的硫代磷酸酯寡核苷酸,GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT,在此被指定为SEQ ID NO:190)。使用定量下限(LL0Q)为大约1.14μg/g的校正曲线来计算组织样品浓度。

[1351] 结果呈现于表142中,表示为μg/g组织。还对肾脏与肝脏比率进行计算并且呈现于表142中。

[1352] 表142

[1353] 在食蟹猴中的寡核苷酸浓度

[1354]	处理	肝脏	肾脏	K/L 比率
	ISIS 560131	793	2029	2.6
	ISIS 569221	966	1372	1.4
	ISIS 569236	898	1282	1.4
	ISIS 579671	871	2576	3.0
	ISIS 584269	698	2823	4.0

[1355]	ISIS 584468	474	2441	5.2
--------	-------------	-----	------	-----

[1356] 实例34:雄激素受体(AR)的反义抑制对雄激素受体依赖性乳癌原位模型的作用

[1357] 在雌激素受体和孕酮受体不存在时,MDA-MB-453细胞表达AR(Hall, R.E.等人, Eur. J. Cancer 《欧洲癌症杂志》) 1994.30:484-490)。在MDA-MB-453荷瘤小鼠中对AR mRNA表达被反义寡核苷酸抑制的作用进行了检验。

[1358] 研究1

[1359] 将ISIS 569216(TGATTTAATGGTTGCA;SEQ ID NO:39) (是在测定中测试的反义寡核苷酸)设计为脱氧的、MOE及(S) cEt寡核苷酸,并且长度为16个核苷。该寡核苷酸的化学性是5'-Te Gk Ak Tk Td Td Ad Ad Td Gd Gd Td Tk Gk Ck A,其中'e'指代2'-O-甲氧基乙基核糖;'k'指代(S)-cEt;'d'指代2'-脱氧核糖。遍及该寡核苷酸,核苷间连接是硫代磷酸酯(P=S)连接。遍及该寡核苷酸,所有的胞嘧啶残基均是5-甲基胞嘧啶。ISIS 569216在人AR基因组序列(GENBANK登录号NT_011669.17,从核苷酸5079000至5270000截取,SEQ ID NO:1)上具有两个靶标起始位点,58720和58750。

[1360] 处理

[1361] 将与50%基质胶进行混合的MDA-MB-453乳腺癌细胞(5×10^6)注射入10个雌性NSG小鼠的乳房脂肪垫中。同时皮下植入二氢睾酮(DHT)球粒(循环雄激素睾酮的主要活性形式)。一旦肿瘤达到100mm³的大小,随机将小鼠分为两个处理组。在第一处理组注射ISIS 569216,通过皮下注射以50mg/kg、一周五次持续4周的剂量来给予。第二处理组仅注射媒介物,通过皮下注射,一周五次持续4周来给予,并且充当对照组。一周一次监测肿瘤生长,并且将小鼠在处理第32天处死。将肿瘤组织和TB界面样品进行收集,并且进行处理以用于进一步分析。

[1362] RNA分析

[1363] 将肿瘤切离,并且对组织进行处理以用于RNA提取和qPCR分析。对TB-界面处的AR mRNA表达进行评估,并且将其针对肌动蛋白mRNA表达进行归一化。与对照组相比,在采用ISIS 569216处理的小鼠中ARmRNA表达被抑制了48%。

[1364] 肿瘤体积的测量

[1365] 在整个研究时期中,使用游标卡尺定期地对肿瘤体积进行测量。如表143所示,与对照组相比,在用ISIS 569216处理的小鼠中肿瘤体积显著地减小。

[1366] 表143

[1367] 在MDA-MB-453癌症原位模型中在不同天数时的肿瘤体积

[1368]		第16天	第23天	第30天	第37天	第44天	第51天
	ISIS 569216	134	142	173	125	92	73

对照	111	141	155	195	287	347
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[1369] 研究2.

[1370] 处理

[1371] 将从ATCC获得的MDA-MB-453细胞保持在具有10%FBS的来博维茨 (Leibovitz) L-15培养基中。将在低生长因子基质胶中的 5×10^6 个肿瘤细胞 (1:1) 植入雌性NSG小鼠 (杰克逊实验室 (Jackson Laboratories)) 的乳房脂肪垫中。同时还将DHT球粒植入小鼠肩胛骨之间。

[1372] 20天之后,进而将小鼠随机分为处理组。对小鼠各组注射50mg/kg的ISIS 569236或ISIS 560131,每周5天皮下给予,持续2周。类似地将一组小鼠用对照寡核苷酸ISIS 549148 (3-10-3 (S) -cEt缺口体,具有序列GGCTACTACGCCGTCA,在此被指定为SEQ ID NO: 193,不具有已知的人类序列) 进行处理。类似地将另一个对照组的小鼠用PBS进行处理。

[1373] 肿瘤生长的测量

[1374] 在整个研究时期中,使用游标卡尺定期地对肿瘤体积进行测量。如表144所示,与对照组相比,在用靶向AR的反义寡核苷酸处理的小鼠中肿瘤体积得以减小。

[1375] 表144

[1376] 在MDA-MB-453模型中的肿瘤体积

	第 0 天	第 8 天	第 13 天	第 20 天	第 23 天	第 27 天	第 29 天
[1377] PBS	136	336	331	358	338	417	481
ISIS 549148	148	303	312	365	413	490	550
ISIS 560131	144	261	243	204	232	233	258
ISIS 569236	134	283	260	230	264	329	323

[1378] RNA分析

[1379] 使用来自凯杰公司 (Qiagen) 的RNA提取试剂盒进行RNA提取。使用引物探针组LTS00943对AR RNA表达进行测量,并且将其针对人类肌动蛋白mRNA表达进行归一化。

[1380] 对肿瘤组织中的人AR RNA表达进行评估。与对照组相比,在采用ISIS 560131处理的小鼠中AR RNA表达被抑制35%,并且在采用ISIS 569236处理的小鼠中AR表达被抑制19%。