



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113748207 A

(43) 申请公布日 2021.12.03

(21) 申请号 202080031598.4

(22) 申请日 2020.02.26

(30) 优先权数据

62/810,697 2019.02.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.10.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/055071 2020.02.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/174023 EN 2020.09.03

(71) 申请人 诺格拉制药有限公司

地址 爱尔兰都柏林

(72) 发明人 F·维蒂 S·贝林维亚

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

权利要求书5页 说明书26页

序列表14页 附图35页

(54) 发明名称

脆性X智力低下蛋白干扰寡核苷酸及其使用方法

(57) 摘要

本文公开了针对脆性X智力低下蛋白(FMRP)的反义寡核苷酸序列及使用其来治疗与FMRP的活性升高或表达升高相关的肠病诸如结肠直肠癌和炎性肠病(例如克罗恩病和溃疡性结肠炎)的方法。还公开了可用于治疗肠病的包含FMRP反义寡核苷酸的药物组合物,以及用于治疗肠病的包含所公开的FMRP反义寡核苷酸的药物的制备。

1. 一种治疗有相应需要的患者的肠病的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的抑制脆性X智力低下蛋白(FMRP)表达的反义寡核苷酸。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述肠病是结肠直肠癌。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述肠病是炎性肠病。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述炎性肠病是克罗恩病或溃疡性结肠炎。

5. 一种治疗有相应需要的患者的实体瘤、肿瘤侵袭或肿瘤转移的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的抑制脆性X智力低下蛋白(FMRP)表达的反义寡核苷酸。

6. 一种预防或减轻有相应需要的患者的肿瘤侵袭或肿瘤转移的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的抑制脆性X智力低下蛋白(FMRP)表达的反义寡核苷酸。

7. 一种预防或减轻有相应需要的患者的结肠直肠癌肿瘤侵袭或结肠直肠肿瘤转移的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的抑制脆性X智力低下蛋白(FMRP)表达的反义寡核苷酸。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述反义寡核苷酸诱导坏死性凋亡。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包括选自由以下组成的组的序列或其互补序列:5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3'(SEQ ID NO:1)、5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3'(SEQ ID NO:2)、5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3'(SEQ ID NO:3)、5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3'(SEQ ID NO:4)、和5'-TCACCCTTTATCATCCTC-3'(SEQ ID NO:5)。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包括选自由以下组成的组的序列或其互补序列:5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3'(SEQ ID NO:6)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3'(SEQ ID NO:7)、5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3'(SEQ ID NO:8)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3'(SEQ ID NO:9)、和5'-CTCACCCTTTATCATCCTCA-3'(SEQ ID NO:10)。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个核糖核苷酸。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个脱氧核糖核苷酸。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包含核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的混合物。

14. 根据权利要求1至13所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自由以下组成的组的经修饰的核苷:5-甲基胞苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷、脱氧胞苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷5'单磷酸和5-甲基-2'-脱氧胞苷-5'-单硫代磷酸。

15. 根据权利要求1至14所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自由以下组成的组的经修饰的核苷:2'-O-甲基胞苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基胸苷、2'-O-甲基尿苷和2'-O-甲基腺苷。

16. 根据权利要求1至15所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自由以下组成的组的经修饰的核苷酸:5-甲基胞嘧啶和5-甲基鸟嘌呤。

17. 根据权利要求1至16所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自以下的经修饰的核苷:2'-O-(2-甲氧乙基)核苷、2'-脱氧-2'-氟核苷和2'-氟-β-D-阿糖核苷。

18. 根据权利要求1至17所述的方法,其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自以

下的基团：桥接核酸、锁核酸 (LNA)、约束乙基 (cET) 核酸、三环-DNA (tcDNA)、2'-O,4'-C-亚乙基连接核酸 (ENA) 和肽核酸 (PNA)。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸包含至少一个选自自由以下组成的组的核苷间连接：硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、磷酸三酯连接、烷基磷酸酯连接、氨基烷基磷酸三酯连接、亚烷基磷酸酯连接、次磷酸酯连接、磷酰胺连接、磷酰吗啉连接、磷酰哌嗪连接、氨基烷基磷酰胺连接、硫代磷酰胺连接、硫羰烷基磷酸酯连接、硫羰烷基磷酸三酯连接、硫代磷酸酯连接、硒代磷酸酯连接和硼烷磷酸酯连接。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯连接。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸的所有核苷间连接均为硫代磷酸酯连接。

22. 根据权利要求19所述的方法，其中所述反义寡核苷酸包含至少一个甲基磷酸酯连接。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸的长度为20个至40个核苷酸。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸的长度为20个至24个核苷酸。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸由选自自由以下组成的组的序列或其互补序列组成：5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO:6)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO:7)、5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO:8)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO:9)、和5'-CTCACCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO:10)。

26. 根据权利要求25所述的方法，其中所述反义寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯连接。

27. 根据权利要求25或26所述的方法，其中所述反义寡核苷酸的所有核苷间连接均为硫代磷酸酯连接。

28. 根据权利要求25所述的方法，其中所述反义寡核苷酸包含至少一个甲基磷酸酯连接。

29. 根据权利要求8所述的方法，其中所述反义寡核苷酸导致选自自由以下组成的组的一种或多种激酶的激活增加：受体相互作用蛋白激酶1 (RIPK1)、受体相互作用蛋白激酶3 (RIPK3) 和混合谱系激酶结构域样蛋白 (MLKL)。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法，其中所述寡核苷酸经肠内或肠胃外施用至所述患者。

31. 根据权利要求30所述的方法，其中肠内施用是口服施用、舌下施用、胃施用或直肠施用。

32. 根据权利要求30所述的方法，其中肠胃外施用是静脉内施用、肿瘤内施用、空肠内施用、回肠内施用、结肠内施用或直肠内施用。

33. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法，其中所述患者是人类。

34. 一种反义寡核苷酸，所述反义寡核苷酸包含选自自由以下组成的组的序列或其互补

序列:

5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO:1)、5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO:2)、5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3' (SEQ ID NO:3)、5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3' (SEQ ID NO:4)、和5'-TCACCCTTTATCATCCTC-3' (SEQ ID NO:5)。

35. 根据权利要求34所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸序列包括选自以下组成的组的序列或其互补序列: 5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO:6)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO:7)、5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO:8)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO:9)、和5'-CTCACCCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO:10)。

36. 根据权利要求34或35所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个核糖核苷酸。

37. 根据权利要求34至36中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个脱氧核糖核苷酸。

38. 根据权利要求34至37中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的混合物。

39. 根据权利要求34至38中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自以下组成的组的经修饰的核苷: 5-甲基胞苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷、脱氧胞苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷5'单磷酸和5-甲基-2'-脱氧胞苷-5'-单硫代磷酸。

40. 根据权利要求34至39中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自以下组成的组的经修饰的核苷: 2'-O-甲基胞苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基胸苷、2'-O-甲基尿苷和2'-O-甲基腺苷。

41. 根据权利要求34至40中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自以下组成的组的经修饰的核苷酸: 5-甲基胞嘧啶和5-甲基鸟嘌呤。

42. 根据权利要求34至41中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自以下的经修饰的核苷: 2'-O-(2-甲氧乙基)核苷、2'-脱氧-2'-氟核苷和2'-氟-β-D-阿糖核苷。

43. 根据权利要求34至42中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含一个或更多个选自以下的基团: 桥接核酸、锁核酸 (LNA)、约束乙基 (cET) 核酸、三环-DNA (tcDNA)、2'-O,4'-C-亚乙基连接核酸 (ENA) 和肽核酸 (PNA)。

44. 根据权利要求34至43中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含至少一个选自以下组成的组的核苷间连接: 硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、磷酸三酯连接、烷基膦酸酯连接、氨基烷基磷酸三酯连接、亚烷基膦酸酯连接、次膦酸酯连接、磷酰胺连接、磷酰吗啉连接、磷酰哌嗪连接、氨基烷基磷酰胺连接、硫代磷酰胺连接、硫羰烷基膦酸酯连接、硫羰烷基磷酸三酯连接、硫代磷酸酯连接、硒代磷酸酯连接和硼烷磷酸酯连接。

45. 根据权利要求34至44中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯连接。

46. 根据权利要求34至45中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸的所有核苷间连接均为硫代磷酸酯连接。

47. 根据权利要求34至44中任一项所述的反义寡核苷酸序列, 其中所述反义寡核苷酸

包含至少一个甲基磷酸酯连接。

48. 根据权利要求34至47中任一项所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸的长度为20个至40个核苷酸。

49. 根据权利要求34至48中任一项所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸的长度为20个至24个核苷酸。

50. 根据权利要求34至49中任一项所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸序列由选自以下组成的组的序列或其互补序列组成:5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO:6)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO:7)、5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO:8)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO:9)、和5'-CTCACCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO:10)。

51. 根据权利要求50所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯连接。

52. 根据权利要求50或51所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸的所有核苷间连接均为硫代磷酸酯连接。

53. 根据权利要求50所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸包含至少一个甲基磷酸酯连接。

54. 根据权利要求34或35所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸是FMRP siRNA或其药学上可接受的盐。

55. 根据权利要求54所述的FMRP siRNA,其中所述FMRP siRNA包含至少一个选自以下组成的组的核苷间连接:硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、磷酸三酯连接、烷基磷酸酯连接、氨基烷基磷酸三酯连接、亚烷基磷酸酯连接、次磷酸酯连接、磷酰胺连接、磷酰吗啉连接、磷酰哌嗪连接、氨基烷基磷酰胺连接、硫代磷酰胺连接、硫羰烷基磷酸酯连接、硫羰烷基磷酸三酯连接、硫代磷酸酯连接、硒代磷酸酯连接和硼烷磷酸酯连接。

56. 根据权利要求54或55所述的FMRP siRNA,其中所述FMRP siRNA包含至少一个硫代磷酸酯连接。

57. 根据权利要求54至56中任一项所述的FMRP siRNA,其中所述FMRP siRNA的所有核苷连接均为硫代磷酸酯连接。

58. 根据权利要求54至57中任一项所述的FMRP siRNA,其中所述FMRP siRNA的至少一个胞苷被5-甲基胞苷取代。

59. 根据权利要求54至58中任一项所述的FMRP siRNA,其中所述FMRP siRNA的长度为20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、20个至40个或20个至24个核苷酸。

60. 根据权利要求54至59中任一项所述的FMRP siRNA,其中所述FMRP siRNA的长度为20个至40个核苷酸。

61. 根据权利要求54至60中任一项所述的FMRP siRNA,其中所述FMRP siRNA的长度为20个至24个核苷酸。

62. 一种药学上可接受的组合物,所述药学上可接受的组合物包含根据权利要求32至54中任一项所述的反义寡核苷酸或权利要求55至61中任一项所述的FMRP siRNA;和药学上可接受的载体。

63. 根据权利要求32至54中任一项所述的反义寡核苷酸或权利要求55至61中任一项所述的FMRP siRNA在制备用于治疗肠病的药物中的用途。

64. 根据权利要求63所述的用途,其中所述肠病是结肠直肠癌。

65. 根据权利要求63所述的用途,其中所述肠病是炎性肠病。

66. 根据权利要求65所述的用途,其中所述炎性肠病是克罗恩病或溃疡性结肠炎。

67. 根据权利要求63至66中任一项所述的用途,其中所述药物经肠内或肠胃外施用至所述患者。

68. 根据权利要求67所述的用途,其中肠内施用是口服施用、舌下施用、胃施用或直肠施用。

69. 根据权利要求67所述的用途,其中肠胃外施用是静脉内施用、肿瘤内施用、空肠内施用、回肠内施用、结肠内施用或直肠内施用。

70. 根据权利要求63至69中任一项所述的用途,其中所述药物用于治疗人类的肠病。

71. 根据权利要求32至54中任一项所述的反义寡核苷酸或权利要求55至61中任一项所述的FMRP siRNA在制备用于治疗实体瘤、肿瘤侵袭或肿瘤转移的药物中的用途。

脆性X智力低下蛋白干扰寡核苷酸及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年2月26日提交的美国临时专利申请第62/810,697号的权益和优先权,为了所有目的,特此将该申请的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 背景

[0004] RNA结合蛋白(RBP)几乎参与转录后调控过程的所有步骤,决定细胞中每个转录物的命运和功能,并确保细胞稳态。RBP与蛋白以及编码RNA和非编码RNA建立高度动态的相互作用,产生被称为核糖核蛋白复合物的功能单位,核糖核蛋白复合物调控RNA剪接、聚腺苷酸化、稳定性、定位、翻译和降解。

[0005] 现在已经清楚的是,RBP在不同类型的癌症中失调,影响促肿瘤发生蛋白和肿瘤抑制蛋白以及炎症介质的表达和功能。若干研究已提供证据表明相对于邻近的正常组织,RBP在癌症中异常表达,并且它们的表达与患者的预后相关。近年来,脆性X智力低下蛋白(FMRP)因在控制许多不同类型的人类癌症的发展和生长中的关键重要性而得到识别。FMRP的突变或缺乏失引起脆性X综合征(FXS),这是人类遗传性智力残疾中最常见的形式。FMRP是一种参与RNA代谢的多个步骤的RBP。在大脑中,FMRP的功能缺乏引起突触可塑性受损,这是由于突触处的细胞骨架组织和受体移动性的缺陷。取决于靶mRNA的身份、非编码RNA的存在和/或细胞环境,FMRP可以作为翻译的负调控因子,调控mRNA的稳定性、调控mRNA转运或影响RNA编辑。值得注意的是,FMRP调控的mRNA参与若干种控制癌症进展和转移的机制。

[0006] 合并证据表明FMRP参与不同类型的癌症:编码FMRP的FMR1基因在不同的组织和癌细胞类型中表达;FMR1常染色体旁系同源物和相互作用因子FXR1最近被鉴定为三阴性乳腺癌远端转移的预测因子;并且若干FMRP mRNA靶参与癌症进展。此外,与普通人群的发病率相比,FXS患者的癌症标准化发病率明显较低,并且FXS患者可能免受某些癌症形式的侵害。

[0007] 结肠直肠癌(CRC)是世界范围最常见的癌症之一,每年引起超过50万人死亡。CRC肿瘤发生的模型包括癌症起始和进展所需的若干遗传改变。这些改变在很大程度上取决于负责从正常粘膜进展为腺瘤性息肉并且然后进展为癌(carcinoma)的致癌性和/或肿瘤性抑制信号传导途径的改变。已经清楚的是,结肠肿瘤细胞劫持使得能够响应于内在的和细胞外信号快速和稳健地调节蛋白表达水平的转录后机制,从而导致细胞适应局部微环境。

[0008] 流行病学/遗传学研究也记录了携带包含扩展的三核苷酸(CGG)重复元件的FMR1前突变等位基因的妇女中免疫相关紊乱(例如,甲状腺炎、类风湿性关节炎、干燥综合征、全身性红斑狼疮和多发性硬化症)的频繁发展。尽管尚不清楚这样的FMRP基因改变引起免疫疾病倾向的基础机制,但最近的两项研究记录了患有FXS的儿童中细胞因子谱的改变。

[0009] 炎性肠病(IBD)是一种胃肠道慢性炎性紊乱,在美国约有140万患者罹患该病。它是美国五大最普遍的胃肠疾病负担之一,总医疗保健费用超过17亿美元。在美国,IBD每年导致超过700,000次门诊、100,000次住院和119,000名患者失能。目前无法医学治愈,因此疾病管理需要终生护理。

[0010] 最常见的两种IBD形式是克罗恩病和溃疡性结肠炎。虽然克罗恩病可以影响整个胃肠道,但它主要影响回肠(小肠的远端或下部)和大肠。溃疡性结肠炎主要影响结肠和直

肠。炎性肠病的病因尚不完全清楚,尽管环境和遗传因素都被认为在该疾病中发挥作用。环境组成可能包括通过暴露于摄入的食物和药物而受到影响的肠道菌群改变。

[0011] IBD伴随腹痛、呕吐、腹泻、直肠出血、严重痛性痉挛(severe cramp)、肌肉痉挛、体重减轻、营养不良、发热和贫血。IBD患者也可能罹患皮肤病变、关节痛、眼部炎症和肝紊乱,并且罹患溃疡性结肠炎的儿童可能罹患发育缺陷。虽然很少致命,但这些症状会降低患者的生活质量。

[0012] 因此,迫切需要开发治疗肠病(诸如CRC和IBD)的可靠方法。还需要鉴定为遍及广泛患者的症状提供有效和长期的缓解并且不伴随负面副作用或缓解和/或炎症循环的治疗方法。

[0013] 概述

[0014] 本文描述了抑制脆性X智力低下蛋白(FMRP)表达的反义寡核苷酸及其使用方法。在一些实施方案中,本公开内容提供了一种治疗有相应需要的患者的肠病的方法,该方法包括向患者施用有效量的抑制FMRP表达的反义寡核苷酸。在一些实施方案中,肠病可以是结肠直肠癌或炎性肠病,诸如克罗恩病或溃疡性结肠炎。在一些实施方案中,反义寡核苷酸诱导坏死性凋亡。

[0015] 在一些实施方案中,本公开内容提供了治疗有相应需要的患者的实体瘤、肿瘤侵袭或肿瘤转移的方法,该方法包括向患者施用有效量的抑制FMRP表达的反义寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开内容提供了一种预防或减轻肿瘤侵袭或肿瘤转移的方法。在某些实施方案中,本公开内容提供了预防或减轻结肠直肠癌肿瘤侵袭或结肠直肠癌肿瘤转移的方法。

[0016] 在一些实施方案中,抑制FMRP表达的反义寡核苷酸包括选自由以下组成的组的序列或其互补序列:5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3'(SEQ ID NO:1)、5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3'(SEQ ID NO:2)、5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3'(SEQ ID NO:3)、5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3'(SEQ ID NO:4)、和5'-TCACCCTTTATCATCCTC-3'(SEQ ID NO:5)。

[0017] 在其他实施方案中,抑制FMRP表达的反义寡核苷酸包括选自由以下组成的组的序列或其互补序列:5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3'(SEQ ID NO:6)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3'(SEQ ID NO:7)、5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3'(SEQ ID NO:8)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3'(SEQ ID NO:9)、和5'-CTCACCCTTTATCATCCTCA-3'(SEQ ID NO:10)。

[0018] 在一些实施方案中,抑制FMRP表达的反义寡核苷酸由选自由以下组成的组的序列或其互补序列组成:5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3'(SEQ ID NO:6)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3'(SEQ ID NO:7)、5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3'(SEQ ID NO:8)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3'(SEQ ID NO:9)、和5'-CTCACCCTTTATCATCCTCA-3'(SEQ ID NO:10)。

[0019] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸可以是其中序列的至少一个核苷间连接是以下的反义寡核苷酸:硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、磷酸三酯连接、烷基膦酸酯连接、氨基烷基膦酸三酯连接、亚烷基膦酸酯连接、次膦酸酯连接、磷酰胺连接、磷酰吗啉连接、磷酰哌嗪连接、氨基烷基磷酰胺连接、硫代磷酰胺连接、硫羰烷基膦酸酯连接、硫羰烷基磷酸三酯连接、硫代磷酸酯连接、硒代磷酸酯连接或硼烷磷酸酯连接。在特定实施方案中,反义寡

核苷酸序列的至少一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,反义寡核苷酸序列的所有核苷间连接均为硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,该序列的至少一个核苷连接是甲基磷酸酯连接。

[0020] 本文描述的FMRP反义寡核苷酸中包含的核苷酸的数目可以变化。例如,在一些实施方案中,反义寡核苷酸的长度为20个至40个核苷酸。在一些实施方案中,反义寡核苷酸的长度为20个至24个核苷酸。

[0021] 在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸通过激活受体相互作用蛋白激酶1 (RIP1或RIPK1) -受体相互作用蛋白激酶3 (RIP3或RIPK3) -混合谱系激酶结构域样蛋白 (MLKL) 复合物诱导坏死性凋亡。例如,FMRP反义寡核苷酸可以增加RIPK1的表达。

[0022] 在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸包含一个或更多个核糖核苷酸、一个或更多个脱氧核糖核苷酸、或核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的混合物。

[0023] 在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸包含一个或更多个经修饰的核苷,例如,5-甲基胞苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷、脱氧胞苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷5'-单磷酸或5-甲基-2'-脱氧胞苷-5'-单硫代磷酸。在某些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸包含一个或更多个经修饰的核苷,例如,2'-O-甲基胞苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基胸苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基腺苷。在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸包含一个或更多个经修饰的核苷酸,例如,5-甲基胞嘧啶或5-甲基鸟嘌呤。在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸包含一个或更多个经修饰的核苷酸,例如,2'-O-(2-甲氧乙基)核苷、2'-脱氧-2'-氟核苷或2'-氟-β-D-阿糖核苷。

[0024] 在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸包含桥接核酸、锁核酸(LNA)、约束乙基(cET)核酸、三环-DNA(tcDNA)、2'-O,4'-C-亚乙基连接核酸(ENA)或肽核酸(PNA)。

[0025] 在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是FMRP siRNA或其药学上可接受的盐。

[0026] 在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸经肠内(enteral)或肠胃外(parenteral)施用至患者。例如,在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸经口服、舌下、胃或直肠施用至患者。在其他实施方案中,FMRP反义寡核苷酸经静脉内、肿瘤内、空肠内、回肠内、结肠内或直肠内施用至患者。

[0027] 在特定实施方案中,本公开内容的FMRP反义寡核苷酸用于治疗人类患者的肠病。

[0028] 本文还描述了包含本文所述的FMRP反义寡核苷酸和药学上可接受的载体的药学上可接受的组合物。在一些实施方案中,药物组合物适于口服施用、舌下施用、胃施用或直肠施用。在其它实施方案中,药物组合物适于静脉内施用、肿瘤内施用、空肠内施用、回肠内施用、结肠内施用或直肠内施用。

[0029] 本文还描述了FMRP反义寡核苷酸在制备用于治疗肠病的药物中的用途。在一些实施方案中,肠病是CRC或IBD,诸如克罗恩病或溃疡性结肠炎。在其他实施方案中,该药物经肠内或肠胃外施用至患者。例如,在一些实施方案中,该药物适于口服施用、舌下施用、胃施用或直肠施用。在其它实施方案中,该药物适于静脉内施用、肿瘤内施用、空肠内施用、回肠内施用、结肠内施用或直肠内施用。在一些实施方案中,该药物用于治疗人类肠病。

[0030] 在一些实施方案中,本公开内容提供了FMRP反义寡核苷酸在制备用于治疗实体瘤、肿瘤侵袭或肿瘤转移的药物中的用途。

[0031] 附图简述

[0032] 图1A是示出人类CRC样品中FMRP染色的免疫组织学图像(IgG=同种型对照;NC=正常对照的结肠样品;P=瘤周样品;T=肿瘤样品)。图1B是示出通过RT-PCR分析确定的瘤周(P)和CRC肿瘤样品(T)中FMRP mRNA表达水平的线形图(** $p < 0.01$)。图1C是示出来自CRC患者的配对瘤周(P)和CRC肿瘤样品(T)中FMRP蛋白表达的蛋白印迹。图1D是示出通过蛋白印迹分析的定量密度测定测量的配对的瘤周(P)和CRC肿瘤样品(T)中相对于 β -肌动蛋白表达的FMRP蛋白表达的图(相对表达显示为任意单位(a.u.))。

[0033] 图2A是未处理的野生型(WT)和FMR1敲除(KO)小鼠、或腹膜内注射氧化偶氮甲烷(AOM)后21周的小鼠的结肠内窥镜图像。图2B是示出腹膜内注射AOM后21周的WT和FMR1 KO小鼠结肠中的肿瘤负荷(左图)和肿瘤尺寸(右图)的条形图(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。图2C是示出腹膜内注射AOM的WT和FMR1 KO小鼠的存活率百分比的图。图2D是示出从WT和FMR1 KO小鼠中AOM诱导的肿瘤制备的样品的苏木精和伊红(H&E)染色的组织学图像。图2E是示出由未处理的WT小鼠和AOM处理的小鼠制备的结肠样品中FMRP和 β -肌动蛋白(上样量对照)蛋白表达的蛋白印迹(P=瘤周样品;T=CRC肿瘤样品)。图2F是示出从WT和FMR1 KO小鼠中AOM诱导的肿瘤制备的样品的TUNEL染色的组织学图像。图2G是示出来自WT和FMR1 KO小鼠的AOM诱导的肿瘤样品中Ki67染色的免疫组织学图像。

[0034] 图3A是示出DLD-1和HCT-116人类结肠癌细胞系以及HCEC-1ct非癌人类结肠上皮细胞系中FMRP和 β -肌动蛋白(上样量对照)蛋白表达的代表性蛋白印迹。图3B是示出通过图3A中描述的蛋白印迹的密度测定分析确定的DLD-1、HCT-116和HCEC-1ct细胞系中相对于 β -肌动蛋白表达的FMRP蛋白表达的图(相对表达显示为任意单位(a.u.))(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。图3C是示出DLD-1、HCT-116和HCEC-1ct细胞的FMRP表达染色的免疫荧光图像。图3D、图3G和图3I分别是示出用有义或反义FMRP寡核苷酸(U=未处理;S=有义;AS=反义)处理48小时的DLD-1细胞、HCT-116细胞和HCEC-1ct细胞中的FMRP和 β -肌动蛋白(上样量对照)蛋白表达的蛋白印迹。图3E、图3H和图3J分别示出了用有义或反义FMRP寡核苷酸(Neg=阴性染色对照;U=未处理;S=有义;AS=反义)处理并用碘化丙锭(PI)和膜联蛋白V(AnnV)染色的DLD-1细胞、HCT-116细胞和HCEC-1ct细胞的流式细胞术点图。图3F和图3K分别示出了图3E和图3J的相应流式细胞术点图数据的条形图(** $p < 0.01$)。

[0035] 图4A是示出未处理的CRC细胞(U)、用有义FMRP寡核苷酸(S)处理的CRC细胞、用反义FMRP寡核苷酸(AS)处理的CRC细胞或用星形孢菌素(Stauro)处理的CRC细胞中胱天蛋白酶8和胱天蛋白酶3染色的流式细胞术直方图。图4B是图4A的相应流式细胞术数据的条形图(** $p < 0.001$)。图4C是示出通过流式细胞术分析PI和AnnV染色的CRC细胞确定的相对细胞死亡的条形图。CRC细胞未接受预处理或用泛胱天蛋白酶抑制剂(Cas in)进行预处理,然后用有义FMRP寡核苷酸(S)、反义FMRP寡核苷酸(AS)或星形孢菌素(Stauro)处理。图4D是示出未处理的DLD-1细胞(U)或用有义FMRP寡核苷酸(S)或反义FMRP寡核苷酸(AS)处理的DLD-1细胞的BrdU和PI染色的流式细胞术点图。图4E是示出图4D的相应流式细胞术点图数据的条形图。图4F是示出通过36小时BrdU掺入测定(U=未处理;S=有义;AS=反义)评估的HCT-116细胞增殖的条形图。图4G是示出用有义或反义FMRP寡核苷酸(U=未处理;S=有义;AS=反义)处理36小时的HCT-116细胞的细胞周期分布的条形图。

[0036] 图5示出了人类CRC细胞裂解物的RNA免疫沉淀。图5A是证实用于人类CRC细胞裂解物的RNA免疫沉淀的FMRP抗体特异性的蛋白印迹。图5B是示出通过使用肌动蛋白、E-钙粘蛋

白、RIPK3和RIPK1特异性的引物进行的RT-PCR分析确定的FMRP共沉淀的mRNA富集的条形图。图5C是示出通过使用肌动蛋白、波形蛋白、RIPK3和RIPK1特异性的引物进行的RT-PCR分析确定的来自CRC细胞系裂解物的FMRP共沉淀的mRNA富集的条形图。

[0037] 图6A是示出未处理的人类结肠细胞系(U)、或用FMRP有义寡核苷酸(S)处理的人类结肠细胞系、或用FMRP反义寡核苷酸(AS)处理的人类结肠细胞系中FMRP、磷酸-RIPK1(pRIPK1)、RIPK1、磷酸-RIPK3(pRIPK3)、RIPK3、磷酸-MLKL(pMLKL)、MLKL和 β -肌动蛋白(上样量对照)的蛋白/磷酸蛋白表达的代表性蛋白印迹。图6B、图6C和图6D分别是示出通过图6A中描述的蛋白印迹的密度测定分析确定的pRIPK1、pRIPK3和pMLKL表达水平的条形图(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。图6E和图6F是示出通过流式细胞术分析PI和AnnV染色的人类CRC细胞系(分别用RIPK1特异性抑制剂(NEC1)或MLKL特异性抑制剂(NSA)和有义FMRP寡核苷酸(S)或反义FMRP寡核苷酸(AS)处理)确定的相对细胞死亡的条形图。图6G是示出未处理的HCEC-1ct细胞、用FMRP有义寡核苷酸(S)处理的HCEC-1ct细胞或用FMRP反义寡核苷酸(AS)处理的HCEC-1ct细胞中FMRP、pRIPK1、RIPK1、pRIPK3、RIPK3、pMLKL、MLKL和 β -肌动蛋白(上样量对照)的蛋白/磷酸蛋白表达的代表性蛋白印迹。

[0038] 图7A是示出瘤周(P)和CRC肿瘤样品(T)中CREB mRNA表达水平的RT-PCR分析的线形图(** $p < 0.001$)。图7B是示出来自CRC患者的匹配的配对的瘤周(P)和CRC肿瘤样品(T)中的CREB、FMRP和 β -肌动蛋白(上样量对照)蛋白表达的代表性蛋白印迹。图7C是示出通过图7B中描述的蛋白印迹的密度测定分析确定的相对于 β -肌动蛋白表达的CREB蛋白表达的条形图(** $p < 0.01$)。图7D是示出未处理的CRC细胞系(U)、用FMRP有义寡核苷酸(S)处理的CRC细胞系、或用FMRP反义寡核苷酸(AS)处理的CRC细胞系的CREB、FMRP、和 β -肌动蛋白(上样量对照)蛋白表达的代表性蛋白印迹。图7E和图7F分别是示出通过图7D中描述的蛋白印迹的密度测定分析确定的相对于 β -肌动蛋白表达的CREB蛋白表达和FMRP蛋白表达的条形图(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

[0039] 图8A是示出用有义或反义FMRP寡核苷酸(U=未处理;S=有义;AS=反义)处理并接种到ibidi®培养基插入物每一侧的HCT-116细胞在插入物去除时(T0)、以及培养24小时和48小时后(分别为T24和T48)的细胞迁移的显微图像。图8B是示出对应于图8A的显微图像的细胞覆盖面积百分比的条形图(T24:U对比AS, ** $p < 0.01$; S对比AS, * $p < 0.05$; T48:U对比AS和S对比AS, *** $p < 0.001$)。图8C和图8D分别是用有义或反义FMRP寡核苷酸(U=未处理;S=有义;AS=反义)处理的HCT-116细胞在48小时培养后跨Matrigel®包被的Transwell®插入物迁移的显微图像和相应的细胞计数条形图(** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。图8E是示出用有义或反义FMRP寡核苷酸(U=未处理;S=有义;AS=反义)处理48小时的HCT-116细胞中FMRP、E-钙粘蛋白、 β -连环蛋白和 β -肌动蛋白(上样量对照)蛋白表达的代表性蛋白印迹。图8F和图8G分别是示出通过图8E中描述的蛋白印迹的密度测定分析确定的HCT-116细胞中相对于 β -肌动蛋白表达的E-钙粘蛋白和 β -连环蛋白蛋白表达的条形图(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

[0040] 图9A是示出未处理的HCT-116细胞(U)或用有义寡核苷酸(S)或反义FMRP寡核苷酸(AS)处理48小时的HCT-116细胞中FMRP、MCC和 β -肌动蛋白(上样量对照)蛋白表达的代表性蛋白印迹。图9B是示出通过图9A中描述的蛋白印迹的密度测定分析确定的HCT-116细胞中

相对于 β -肌动蛋白表达的MCC蛋白表达的条形图。图9C是示出未处理(U)的HCT-116细胞或用有义寡核苷酸(S)、反义FMRP寡核苷酸(AS)和/或对照siRNA(siRNA Ctrl)或对MCC特异的siRNA(siRNA MCC)处理48小时的HCT-116细胞中MCC、FMRP、E-钙粘蛋白、 β -连环蛋白和 β -肌动蛋白(上样量对照)蛋白表达的代表性蛋白印迹。图9D和图9E分别是示出通过图9C中描述的蛋白印迹的密度测定分析确定的HCT-116细胞中相对于 β -肌动蛋白表达的E-钙粘蛋白和 β -连环蛋白蛋白表达的条形图(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。图9F是示出用有义或反义FMRP寡核苷酸(U=未处理;S=有义;AS=反义)和/或siRNA Ctrl或siRNA MCC处理并接种到ibidi®培养基插入物每一侧的HCT-116细胞在插入物去除时(T0)、以及培养24小时和48小时后(分别为T24和T48)的细胞迁移的显微图像。图9G是示出对应于图9F的显微图像的细胞覆盖面积百分比的条形图(T24:用反义FMRP寡核苷酸和siRNA MCC转染的HCT-116细胞对比单独用反义FMRP寡核苷酸转染的HCT-116细胞,*** $p < 0.001$;T48:用反义FMRP寡核苷酸和siRNA MCC转染的HCT-116细胞对比单独用反义FMRP寡核苷酸转染的HCT-116细胞,**** $p < 0.0001$)。

[0041] 详述

[0042] FMRP反义寡核苷酸

[0043] 如本文使用的“反义寡核苷酸”是指与编码靶蛋白(例如FMRP)的信使RNA(mRNA)互补的短的合成寡核苷酸序列。反义寡核苷酸序列与mRNA杂交产生双链分子,该双链分子可以导致识别并降解双链分子的核酸酶激活,从而阻止该mRNA的翻译。反义寡核苷酸可以包括单链DNA寡核苷酸、小发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)和经修饰的反义寡核苷酸,包括但不限于2'-O-烷基、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)和吗啉代寡聚物化学物质。

[0044] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸可以是包含与靶mRNA(例如,FMRP)互补的核苷酸序列的单链核酸分子。例如,反义寡核苷酸可以是具有与FMRP mRNA互补的序列的单链DNA寡核苷酸。FMRP反义寡核苷酸与靶mRNA的杂交产生双链DNA/RNA杂交体,该双链DNA/RNA杂交体可以导致普遍存在的识别并降解DNA/RNA杂交体链的核酸酶(诸如RNA酶H)激活,从而阻止靶蛋白(例如,FMRP)的翻译。

[0045] 可选地,反义寡核苷酸可以是双链的。双链反义寡核苷酸可以包含具有自我互补性的有义区域和反义区域的单个寡核苷酸。在其他实施方案中,双链反义寡核苷酸可以包含两条单独的寡核苷酸,其中一条寡核苷酸是有义链,并且另一条寡核苷酸是反义链,并且其中反义链具有与靶mRNA(例如,FMRP)互补的核苷酸序列。

[0046] 反义寡核苷酸可以被设计成使得每种反义寡核苷酸的掺入核苷酸序列的靶向部分与FMRP mRNA序列完全或几乎完全互补。这种互补或几乎互补的核苷酸序列的掺入允许人们设计针对特定的靶具有高度特异性的反义寡核苷酸。特异性可以通过测量参数(诸如解离常数)或其他标准(诸如蛋白或RNA表达水平的变化)或其他测量FMRP活性或表达的测定来评估。

[0047] 本公开内容提供了包括向患者施用能够靶向FMRP mRNA进行降解、干扰mRNA剪接或阻止FMRP基因表达或蛋白翻译的FMRP反义寡核苷酸的方法。本公开内容的FMRP反义寡核苷酸可以靶向人类FMRP mRNA的不同区域进行结合。人类FMRP mRNA具有以下NCBI参考序列的序列:NM_001185075(SEQ ID NO:18)、NM_001185076(SEQ ID NO:19)、NM_001185081(SEQ ID NO:20)、NM_001185082(SEQ ID NO:21)或NM_002024(SEQ ID NO:22)。

[0048] 诸如本文公开的FMRP反义寡核苷酸可以是长度为5个至100个核苷酸的寡核苷酸序列,例如长度为10个至40个核苷酸,例如长度为14个至40个核苷酸,例如长度为10个至30个核苷酸,例如长度为14个至30个核苷酸,例如长度为14个至25个核苷酸,例如长度为15个至22个寡核苷酸,例如长度为18个至40个核苷酸,例如长度为18个至24个核苷酸,例如长度为20个至40个核苷酸,或者例如长度为20个至24个核苷酸。在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸的长度可以是例如20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个或40个核苷酸。FMRP反义寡核苷酸可以包含与FMRP mRNA序列的一个或多个部分互补的寡核苷酸序列。

[0049] 在一些实施方案中,本公开内容的FMRP反义寡核苷酸可以是但不限于小发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、吗啉代寡聚物、微RNA(microRNA),以及包含这些化合物的组合物,例如包含药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0050] 在本公开内容的一些实施方案中,靶向FMRP的反义寡核苷酸包含选自以下中的任一种或其互补序列的序列或序列的一部分(例如,包含在全长上具有90%、95%或99%同一性的序列):5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3'(SEQ ID NO:1)、5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3'(SEQ ID NO:2)、5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3'(SEQ ID NO:3)、5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3'(SEQ ID NO:4)、和5'-TCACCCTTTATCATCCTC-3'(SEQ ID NO:5)。

[0051] 在其他实施方案中,靶向FMRP的反义寡核苷酸包含选自以下中的任一种或其互补序列的序列或序列的一部分(例如,包含在全长上具有90%、95%或99%同一性的序列):5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3'(SEQ ID NO:6)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3'(SEQ ID NO:7)、5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3'(SEQ ID NO:8)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3'(SEQ ID NO:9)、和5'-CTCACCTTTATCATCCTCA-3'(SEQ ID NO:10)。

[0052] 在一些实施方案中,本公开内容的FMRP反义寡核苷酸包含一个或更多个核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、或核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的混合物。

[0053] 在一些实施方案中,本公开内容的FMRP反义寡核苷酸包含一个或更多个选自由以下组成的组的经修饰的核苷:5-甲基胞苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷、脱氧胞苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷5'单磷酸和5-甲基-2'-脱氧胞苷-5'-单硫代磷酸。

[0054] 在某些实施方案中,本公开内容的FMRP反义寡核苷酸包含一个或更多个选自由以下组成的组的经修饰的核苷:2'-O-甲基胞苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基胸苷、2'-O-甲基尿苷和2'-O-甲基腺苷。

[0055] 在一些实施方案中,本公开内容的FMRP反义寡核苷酸包含一个或更多个选自由以下组成的组的经修饰的核苷酸:5-甲基胞嘧啶和5-甲基鸟嘌呤。

[0056] 在一些实施方案中,本公开内容的FMRP反义寡核苷酸包含选自以下的一个或更多个经修饰的核苷:2'-O-(2-甲氧乙基)核苷、2'-脱氧-2'-氟核苷和2'-氟-β-D-阿糖核苷。

[0057] 在某些实施方案中,本公开内容的FMRP反义寡核苷酸包含选自以下的一个或更多个基团:桥接核酸、锁核酸(LNA)、约束乙基(cET)核酸、三环-DNA(tcDNA)、2'-O,4'-C-亚乙基连接核酸(ENA)和肽核酸(PNA)。

[0058] 在一些实施方案中,所公开的FMRP反义寡核苷酸的至少一个核苷间连接可以具有以下修饰连接:诸如硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、磷酸三酯连接、烷基膦酸酯连接、氨基烷基磷酸三酯连接、亚烷基膦酸酯连接、次膦酸酯连接、磷酰胺连接、磷酰吗啉连接、磷

酰脲嗪连接、和氨基烷基磷酰胺连接、硫代磷酰胺连接、硫羰烷基膦酸酯连接、硫羰烷基磷酸三酯连接、硫代磷酸酯连接、硒代磷酸酯连接和/或硼烷磷酸酯连接。例如,在一些实施方案中,所公开的FMRP反义寡核苷酸的一个、两个或更多个(例如所有)核苷间连接可以是硫代磷酸酯连接。在其他实施方案中,所公开的FMRP反义寡核苷酸的一个、两个或更多个(例如所有)核苷间连接可以是甲基膦酸酯连接。

[0059] 例如,在一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3'(SEQ ID NO:1)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3'(SEQ ID NO:1)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的一个或多于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0060] 在另一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3'(SEQ ID NO:2)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3'(SEQ ID NO:2)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的一个或多于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0061] 在另一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3'(SEQ ID NO:3)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3'(SEQ ID NO:3)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的一个或多于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0062] 在另一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3'(SEQ ID NO:4)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3'(SEQ ID NO:4)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的一个或多于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0063] 在另一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-TCACCCTTTATCATCCTC-3'(SEQ ID NO:5)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-TCACCCTTTATCATCCTC-3'(SEQ ID NO:5)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的一个或多于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0064] 在另一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3'(SEQ ID NO:6)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3'(SEQ ID NO:6)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的一个或多于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0065] 在另一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3'(SEQ ID NO:7)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3'(SEQ ID NO:7)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸

的一个或多个于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0066] 在另一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO:8)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO:8)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的一个或多个于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0067] 在另一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO:9)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO:9)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的一个或多个于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0068] 在另一种实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含序列5'-CTCACCCCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO:10)的针对FMRP的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的每个核苷酸间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,针对FMRP的反义寡核苷酸是包含序列5'-CTCACCCCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO:10)的硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸的一个或多个于一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0069] 在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸是包含核苷酸序列SEQ ID NO:1-10中任一种的siRNA或其药学上可接受的盐。例如,FMRP siRNA可以包括以下任一种的序列:5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO:1)、5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO:2)、5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3' (SEQ ID NO:3)、5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3' (SEQ ID NO:4)、5'-TCACCCTTTATCATCCTC-3' (SEQ ID NO:5)、5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO:6)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO:7)、5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO:8)、5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO:9)、和5'-CTCACCCCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO:10),或包含SEQ ID NO:1-10中任一种的序列的FMRP siRNA的药学上可接受的盐。

[0070] 在一些实施方案中,FMRP siRNA包含至少一个选自由以下组成的组的核苷间连接:硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、磷酸三酯连接、烷基膦酸酯连接、氨基烷基磷酸三酯连接、亚烷基膦酸酯连接、次膦酸酯连接、磷酰胺连接、磷酰吗啉连接、磷酰哌嗪连接、氨基烷基磷酰胺连接、硫代磷酰胺连接、硫羰烷基膦酸酯连接、硫羰烷基磷酸三酯连接、硫代磷酸酯连接、硒代磷酸酯连接和硼烷磷酸酯连接。在某些实施方案中,FMRP siRNA的至少一个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。例如,在一些实施方案中,FMRP siRNA的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、1个-5个、1个-10个、1个-14个、1个-15个、1个-16个、1个-19个、5个-10个、5个-14个、5个-15个、5个-19个、10个-14个、10个-15个或10个-19个核苷间连接是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,FMRP siRNA的所有核苷间连接均为硫代磷酸酯连接。

[0071] 在各种实施方案中,所公开的FMRP反义寡核苷酸(例如FMRP siRNA)可以任选地在序列中具有至少一个经修饰的核酸碱基(例如5-甲基胞嘧啶)和/或至少一个甲基膦酸酯核苷酸,其被放置在例如5'末端或3'末端中的仅一个处,或5'末端和3'末端两处,或沿着寡核苷酸序列放置。

[0072] FMRP反义寡核苷酸(例如FMRP siRNA)可以任选地包含至少一个经修饰的糖。例

如,构成寡核苷酸的至少一个核苷酸的糖部分可以是核糖,其中2'-OH基团可以被选自以下组成的组的任一种取代:OR、R、ROR、SH、SR、NH₂、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br和I(其中R是烷基或芳基并且R'是亚烷基)。

[0073] 在一些实施方案中,某些公开的核苷酸可以是修饰的或具有变化形式,例如,所公开的FMRP反义寡核苷酸(例如FMRP siRNA)中的某些胞苷可以是例如5-甲基-2'-脱氧胞苷,包括但不限于5-甲基-2'-脱氧胞苷5'-单磷酸和5-甲基-2'-脱氧胞苷-5'-单硫代磷酸。

[0074] 在某些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸(例如FMRP siRNA)可以包含化学修饰的核苷,例如2'-O-甲基(2'-OMe)核糖核苷,例如2'-O-甲基胞苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基胸苷、2'-O-甲基尿苷和/或2'-O-甲基腺苷。本文描述的FMRP反义寡核苷酸(例如FMRP siRNA)也可以包含一个或更多个化学修饰的碱基,包括5-甲基嘧啶,例如5-甲基胞嘧啶,和/或5-甲基嘌呤,例如5-甲基鸟嘌呤。在一些实施方案中,FMRP反义寡核苷酸(例如FMRP siRNA)可以包含一个或更多个2'-O-(2-甲氧乙基)(2'-MOE)核苷、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿糖核苷、桥接核酸、锁核酸(LNA)、约束乙基(cET)核酸、三环-DNA(tcDNA)、2'-O,4'-C-亚乙基连接核酸(ENA)和/或肽核酸(PNA)。

[0075] 在一些实施方案中,设想的反义寡核苷酸(例如FMRP siRNA)的至少一个核苷酸间连接是O,O-连接的硫代磷酸酯。例如,SEQ ID NO:1-10的每个核苷酸间连接可以是O,O-连接的硫代磷酸酯。在一些实施方案中,本文公开的组合物可以包括药学上可接受的盐,例如所公开序列的反义寡核苷酸的钠盐,其任选地可以包含1个至24个或更多个O,O-连接的硫代磷酸酯核苷酸间连接。设想的寡核苷酸的盐包括完全中和的那些,例如每个硫代磷酸酯连接与离子诸如Na⁺缔合。寡核苷酸可以包含天然存在的核酸碱基、糖和共价核苷间(主链)连接以及非天然存在的部分。

[0076] 本文还提供了所公开的反义寡核苷酸的同位素体(isotopologue)、包含它们的药物组合物以及使用它们的方法。例如,在一些实施方案中,本文提供了包含多于一个氢(H)的SEQ ID NO:1-10的氘代反义寡核苷酸,其中多于一个氢中的一个或更多个氢被氘(D)取代。

[0077] 肠病

[0078] 本公开内容提供了用于治疗 and/或预防肠病的寡核苷酸。如本文使用的,“肠病”是指影响胃之后的消化管部分(即,小肠、大肠、结肠和直肠)的任何疾病、紊乱和/或综合征。例如,肠病可以包括但不限于结肠癌、炎性肠病、家族性腺瘤性息肉病、加德纳综合征、Turcot综合征、林奇综合征、乳糜泻、胃肠类癌肿瘤、小肠癌(small intestine cancer)、十二指肠癌、小肠癌(small bowel cancer)和胃肠间质肿瘤。例如,本文提供了治疗罹患肠病的患者的方法,该方法包括向患者施用有效量的所公开的反义寡核苷酸。

[0079] 结肠直肠癌

[0080] 如本文使用的“结肠直肠癌”是指影响结肠和/或直肠的任何癌症。结肠直肠癌可由任何一种或多于一种环境和遗传因素引起,所述环境和遗传因素引起遗传和/或表观遗传改变逐渐积累,遗传和/或表观遗传改变减弱结肠或直肠上皮细胞中肿瘤抑制基因并激活癌基因。结肠直肠赘生物通常与基因组和/或表观基因组稳定性的丧失相关,这种丧失加速恶性转化。

[0081] 结肠直肠癌中存在的特定基因突变存在显著的异质性,并且包括但不限于APC、

CTNNB1、KRAS、BRAF、SMAD4、TGFB2、TP53、PIK3CA、ARID1A、SOX9、FAM123B和ERBB2的改变。结肠直肠癌通常是由导致Wnt信号传导失调的突变起始,并且肿瘤在其他信号途径(包括RAS-RAF-MAPK、TGFB和PI3K-AKT途径)进一步失调时进展。所公开的序列可以转录后调控所有Wnt、RAS-RAF-MAPK、TGFB和PI3K-AKT途径中的癌基因、肿瘤抑制因子和关键信号传导蛋白的表达。本文提供了治疗罹患结肠直肠癌的患者的方法,该方法包括向患者施用所公开的反义寡核苷酸。

[0082] 炎性肠病

[0083] 如本文使用的“炎性肠病”是指许多慢性炎性疾病,包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、胃十二指肠克罗恩病、克罗恩(肉芽肿性)结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎、白塞病、微观结肠炎、溃疡性直肠炎、直肠乙状结肠炎、空肠回肠炎、左侧结肠炎、全结肠炎、回肠结肠炎、回肠炎和未定型性结肠炎。克罗恩病和溃疡性结肠炎是两种最常见的炎性肠病形式。炎性肠病是消化系统的自身免疫性疾病。克罗恩病可以定位于胃肠道的任何部分,包括末端回肠,并且可以影响胃肠道的所有细胞类型。溃疡性结肠炎定位于结肠和直肠,并且仅影响粘膜细胞。本文提供了治疗罹患炎性肠病的患者的方法,该方法包括向患者施用所公开的反义寡核苷酸。

[0084] 炎性肠病伴随包括以下的症状:腹痛、呕吐、腹泻、直肠出血、严重痛性痉挛、肌肉痉挛、体重减轻、营养不良、发热、贫血、皮肤病变、关节痛、眼部炎症、肝紊乱、关节炎、坏疽性脓皮病、原发性硬化性胆管炎和非甲状腺疾病综合征,并且在一种实施方案中也设想使用所公开的反义化合物治疗这些症状,例如治疗罹患溃疡性结肠炎的儿童,该儿童也可能罹患生长缺陷。在一些实施方案中,本文设想例如通过向患者施用有效量的所公开的反义寡核苷酸来减轻或治疗这些症状的方法。

[0085] 如本文使用的“坏死性凋亡(necroptosis)”是指受调控的、不依赖于胱天蛋白酶的细胞死亡,其可以是一种消除抗凋亡癌细胞的替代方法。核心坏死性凋亡途径由受体相互作用蛋白激酶1(RIP1或RIPK1)受体相互作用蛋白激酶3(RIP3或RIPK3)混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)复合物组成,该复合物也称为“坏死小体(necrosome)”。坏死小体启动下游效应物功能,诸如产生活性氧(ROS)爆发、质膜通透化和胞质ATP减少,进一步驱动不可逆的坏死性凋亡执行机制。本文提供了通过调节坏死性凋亡来治疗患者的方法,该方法包括向患者施用所公开的反义寡核苷酸。

[0086] 如本文使用的“有需要的患者”是指罹患任何肠病症状或表现的患者、可能罹患任何肠病症状或表现的患者、或可能从本公开内容的用于治疗肠病的方法受益的任何患者。有需要的患者可以包括被诊断具有发展成肠病风险的患者、过去曾罹患肠病的患者、或先前已经接受过肠病治疗的患者。特别重要的是罹患与FMRP表达或活性水平增加相关的肠病的个体。

[0087] 本文使用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等通常指获得期望的药理学和/或生理学效果。该效果可以是预防性的(就完全或部分预防疾病或其症状而言)和/或可以是治疗性的(就部分或完全治愈疾病和/或归因于该疾病的副作用而言)。如本文使用的术语“治疗(treatment)”包括对哺乳动物(特别是人类)疾病的任何治疗,并且包括:(a)预防可能易患疾病但尚未被诊断为具有疾病的受试者中发生疾病;(b)抑制疾病,即预防疾病的严重程度或范围增加;(c)缓解疾病,即引起疾病的部分或完全减轻;

或(d)预防疾病复发,即在以前成功治疗疾病的症状或治疗疾病之后,预防疾病恢复到活跃状态。

[0088] 如本文使用的“有效量”是指当施用至患者时足以至少部分地治疗或减轻状况的症状的剂的量。有效量将取决于状况的严重程度、组分的施用途径以及治疗的患者的年龄、体重等而变化。因此,所公开的FMRP反义寡核苷酸的有效量是治疗患者肠病所必需的FMRP反义寡核苷酸的量,使得向患者施用该剂可预防受试者发生肠病,预防肠病进展(例如,预防肠病症状(诸如直肠出血、贫血或胃肠道炎症)的发作或加重,或者缓解或完全减轻肠病的所有相关症状,即引起疾病消退。

[0089] 在一些实施方案中,所公开的方法包括向患者施用至少1 μ g、至少5 μ g、至少10 μ g、至少20 μ g、至少30 μ g、至少40 μ g、至少50 μ g、至少60 μ g、至少70 μ g、至少80 μ g、至少90 μ g或至少100 μ g反义寡核苷酸。在一些实施方案中,所公开的方法包括向患者施用35mg至500mg、1mg至10mg、10mg至20mg、20mg至30mg、30mg至40mg、40mg至50mg、50mg至60mg、60mg至70mg、70mg至80mg、80mg至90mg、90mg至100mg、100mg至150mg、150mg至200mg、200mg至250mg、250mg至300mg、300mg至350mg、350mg至400mg、400mg至450mg、450mg至500mg、500mg至600mg、600mg至700mg、700mg至800mg、800mg至900mg、900mg至1g、1mg至50mg、20mg至40mg或1mg至500mg的反义寡核苷酸。

[0090] 治疗效果可以通过与肠病相关的总体症状的评价、组织的组织学分析、生物化学测定、成像方法(诸如,例如磁共振成像)或其他已知方法来评估。例如,治疗效果可以通过在向罹患肠病的患者施用所公开的FMRP反义寡核苷酸后,分析疾病的总体症状(诸如腹痛、呕吐、腹泻、直肠出血、痛性痉挛、肌肉痉挛、体重减轻、营养不良、发热、贫血或与肠病相关的总体疾病的其他方面)的变化来评价。

[0091] 治疗效果也可以在组织或细胞水平进行评价,例如,通过获得组织活检样品(例如肿瘤或胃肠组织活检样品)并评价总体组织或细胞形态或染色特性的方法。检查蛋白或RNA表达的生物化学测定也可用于评价治疗效果。例如,人们可以通过免疫细胞化学、免疫组织化学、蛋白印迹或RNA印迹方法、或可用于评价RNA水平的方法(诸如定量或半定量聚合酶链式反应)来评价FMRP、胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶3或胱天蛋白酶8)、RIPK1、磷酸-RIPK1、RIPK3、磷酸-RIPK3、MLKL、磷酸-MLKL、CREB、IL-6、IL-8、TNF- α 或指示结肠直肠癌、坏死性凋亡、炎症性肠病或炎症细胞因子产生的其他蛋白或基因产物的水平。人们也可以评价存在于粪便物、血浆或血清中的有用生物标志物的存在或表达水平来评价疾病状态和治疗效果。

[0092] 在评价治疗效果时,可以选择合适的对照以确保有效的评估。例如,人们可以将在向患有肠病的患者施用所公开的FMRP反义寡核苷酸后评价的患者症状与同一患者在治疗前或在治疗过程的较早时间点的那些症状与其他未被诊断患肠病的患者进行比较。可选地,人们可以将在向患者施用所公开的FMRP反义寡核苷酸后肠组织的生物化学或组织学分析结果与来自同一患者或来自未被诊断患肠病的个体或在向患者施用FMRP反义寡核苷酸之前来自同一患者的肠组织的结果进行比较。此外,人们可以将在向患者施用FMRP反义寡核苷酸后的血液、血清、细胞或粪便样品与来自未被诊断患肠病的个体的可比样品或来自向患者施用FMRP反义寡核苷酸前的同一患者的可比样品进行比较。

[0093] FMRP抑制的验证可以通过直接或间接评估FMRP表达水平或活性来确定。例如,测量FMRP蛋白或RNA表达的生物化学测定可用于评价总体FMRP抑制。例如,人们可以通过蛋白

印迹测量肠组织中的FMRP蛋白水平,以评价总体FMRP水平。人们也可以通过RNA印迹或定量聚合酶链式反应测量FMRP mRNA水平,以确定总体FMRP抑制。人们也可以通过免疫细胞化学或免疫组织化学方法评价FMRP蛋白水平或指示解离细胞、非解离组织或粪便物中的FMRP活性/表达的其他蛋白的水平。

[0094] FMRP抑制也可以通过测量参数(诸如RIPK1的增强表达和/或RIPK1-RIPK3-MLKL复合物的激活,其与坏死性凋亡相关)来间接评价。例如,人们可以通过蛋白印迹测量肠组织中的磷酸-RIPK1、磷酸-RIPK3或磷酸-MLKL水平。

[0095] FMRP下调也可以通过测量诸如CREB表达等参数来间接评价。例如,测量CREB蛋白或RNA表达的生物化学测定可用于评价总体FMRP抑制。例如,人们可以通过蛋白印迹测量肠组织中的CREB蛋白水平。人们也可以通过RNA印迹或定量聚合酶链式反应测量CREB mRNA水平,以确定总体FMRP抑制。人们也可以通过免疫细胞化学或免疫组织化学方法评价CREB蛋白水平或指示解离细胞、非解离组织或粪便物中的CREB活性/表达的其他蛋白的水平。

[0096] 本公开内容提供了用于治疗结肠癌的方法。设想结肠癌的治疗导致以下一种或多种结果:例如,疾病的完全减轻;肿瘤数目和/或等级减少;转移减少;复发减少;以及症状(例如腹泻、便秘、血便、直肠出血、腹痛、虚弱、疲劳和体重减轻)的发生或严重程度减少。

[0097] 本公开内容还提供了用于治疗IBD(例如克罗恩病和溃疡性结肠炎)的方法。设想IBD的治疗导致以下一种或多种结果:例如,疾病的完全减轻;炎症减少,包括炎性细胞因子产生和免疫细胞的肠浸润减少;肠/粘膜结构恢复;复发减少;以及症状(例如腹泻、便秘、血便、出血、腹痛、虚弱、疲劳和体重减轻)的发生或严重程度减少。“炎性细胞因子产生”是指启动和/或促进炎性细胞因子应答的细胞因子的表达。“炎性细胞因子应答”是指可以表征为粒细胞募集、淋巴细胞募集、全身性炎症(尤其是胃肠道或其一部分或多于一部分)、发热、组织破坏、休克和/或死亡的免疫应答。炎性细胞因子应答可以表征为个体细胞因子与其同源细胞表面受体的结合以及随后改变细胞功能和基因表达的细胞内信号传导级联。炎性细胞因子包括但不限于IL-1、IL-6、IL-8和TNF α 。炎性细胞因子的表达可发生在例如巨噬细胞、单核细胞、固有层单个核细胞、或胃肠道的其他细胞或免疫系统的细胞中。抑制炎性细胞因子产生的方法包括降低罹患炎性肠病的患者的一些或所有炎性细胞因子表达水平的方法。抑制炎性细胞因子产生的方法还包括降低罹患炎性疾病的患者细胞中一些或所有炎性细胞因子表达水平的方法。

[0098] 本公开内容还提供了抑制罹患肠病的患者细胞中的FMRP的方法。FMRP可以在出现FMRP表达或活性的任何细胞(包括胃肠道、免疫系统和血液的细胞)中进行抑制。胃肠道的细胞(包括胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠和肛管的细胞)包括柱状上皮细胞、粘膜上皮细胞、产酶细胞、颈粘液细胞、壁细胞、胃泌素细胞、杯状细胞、潘氏细胞、寡黏液细胞和绒毛吸收细胞。免疫系统的细胞包括白细胞、吞噬细胞(例如巨噬细胞、中性粒细胞和树突细胞)、单核细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞、固有细胞(innate cell)、淋巴细胞、B细胞和T细胞。血细胞包括红细胞(red blood cell)(红细胞(erythrocyte))和白细胞(white blood cell)(白细胞(leukocyte)、单核细胞和血小板)。

[0099] 肿瘤侵袭和肿瘤转移

[0100] 肿瘤侵袭是指癌细胞的增殖和肿瘤尺寸的增加,导致癌细胞延伸、突破、穿透和扩散到周围组织中。当癌细胞从原发肿瘤部位脱离,通过血液或淋巴移动,并在体内其他器官

和组织中形成新的肿瘤灶时,发生肿瘤转移。

[0101] 在一些实施方案中,可将有效量的本公开内容的FMRP反义寡核苷酸施用至有相应需要的患者,以治疗实体瘤、肿瘤侵袭或肿瘤转移。在一些实施方案中,有效量的本公开内容的FMRP反义寡核苷酸可用于预防或减轻肿瘤侵袭或肿瘤转移。在某些实施方案中,有效量的本公开内容的FMRP反义寡核苷酸可用于预防或减轻结肠直肠癌肿瘤侵袭或结肠直肠癌肿瘤转移。

[0102] 药物组合物和施用途径

[0103] 本公开内容还提供了通过向患者施用包含所公开的FMRP反义寡核苷酸的药物组合物来治疗肠病的方法。另一方面,本公开内容提供了用于治疗肠病的药物组合物。药物组合物可以包含所公开的靶向FMRP的反义寡核苷酸和药学上可接受的载体。如本文使用的,术语“药物组合物”意指,例如,待施用至哺乳动物(例如人类)以治疗肠病的包含药学上可接受的载体中的特定量的治疗性化合物(例如有效量的治疗性化合物)的混合物。在一些实施方案中,本文设想了包含所公开的FMRP反义寡核苷酸和药学上可接受的载体的药物组合物。另一方面,本公开内容提供了所公开的FMRP反义寡核苷酸在制备用于治疗炎症性疾病的药物中的用途。如本文使用的,“药物”与术语“药物组合物”具有实质相同的含义。

[0104] 如本文使用的,“药学上可接受的载体”意指适于与人类和动物的组织接触使用,而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称的缓冲剂、载体和赋形剂。载体应当是“可接受的”,其含义是与制剂的其他成分相容并且对接受者无害。药学上可接受的载体包括与药物施用相容的缓冲剂、溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂等。这样的介质和剂用于药学上活性物质的用途在本领域是已知的。在一种实施方案中,药物组合物被口服施用至患者,并且包含适于调控在消化系统或肠道内吸收包封物质的部位的肠溶包衣。例如,肠溶包衣可以包括丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸共聚物。

[0105] 在一些实施方案中,所公开的FMRP反义寡核苷酸及其任何药物组合物可以通过一种或若干种途径(包括肠内或肠胃外递送,或肿瘤内注射)施用至患者。如本文使用的,肠内(enteral)或肠内(enteric)施用或递送是指通过胃肠道向患者施用所公开的FMRP反义寡核苷酸,并且可以包括口服、舌下、胃和直肠递送。如本文使用的,肠胃外施用是指将所公开的FMRP反义寡核苷酸通过胃肠道以外的途径向患者施用,并且包括但不限于静脉内、肿瘤内、鼻内、经皮、皮下、肌内、腹膜内、肠道内(intraintestinal)(例如空肠内、回肠内)、结肠内或直肠内注射或输注。

[0106] 例如,所公开的FMRP反义寡核苷酸可以皮下施用至受试者。在某些实例中,所公开的FMRP反义寡核苷酸可以口服施用至受试者。在各种实例中,所公开的FMRP反义寡核苷酸可以通过肠胃外施用直接施用至患者的胃肠系统或胃肠系统的特定区域(例如空肠、回肠、结肠或直肠)。

[0107] 包含所公开的FMRP反义寡核苷酸的药物组合物,诸如本文所公开的那些,可以以剂量单位形式存在,并且可以通过任何合适的方法制备。药物组合物应当被配制为与其预期的施用途径相容。可用制剂可以通过制药领域熟知的方法制备。例如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990)。

[0108] 药物制剂是例如无菌的。无菌可以通过例如通过无菌滤膜过滤来实现。在组合物是冻干的情况下,可以在冻干和重构之前或之后进行过滤灭菌。

[0109] 肠胃外施用

[0110] 本公开内容的药物组合物可以配制为用于肠胃外施用,例如配制为用于通过静脉内、肿瘤内、肌内、皮下、病灶内、肠道内(例如空肠内、回肠内)、结肠内、或直肠内或腹膜内途径注射。根据本公开内容,本领域技术人员将了解水性组合物(诸如包含所公开的FMRP反义寡核苷酸的水性药物组合物)的制备。通常,这样的组合物可以制备为可注射的液体溶液或悬浮液;也可以制备为适合用于在注射前添加液体时制备溶液或悬浮液的固体形式;并且制剂也可以被乳化。

[0111] 适于注射使用的药物形式包括无菌水性溶液或分散体;包括芝麻油、花生油或含水丙二醇的制剂;和用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,该形式必须是无菌的、并且必须是达到存在易于注射能力的程度的流体。它必须在制备和储存条件下是稳定的,并且必须防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用。

[0112] 作为游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液可以在水中合适地与表面活性剂诸如羟丙基纤维素混合制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中以及在油中制备。另外,无菌的不挥发性油可用作溶剂或悬浮介质。为了该目的,可以使用包括合成的甘油单酯或甘油二酯在内的任何温和的不挥发性油。另外,脂肪酸诸如油酸可用于制备可注射剂(injectables)。无菌可注射制剂也可以是在无毒性的、肠胃外可接受的稀释剂或溶剂(例如,如在1,3-丁二醇中的溶液)中的无菌可注射溶液、悬浮液或乳剂。可以使用水、Ringer溶液(U.S.P.)和等渗氯化钠溶液,以及可接受的媒介物和溶剂。在一种实施方案中,所公开的FMRP反义寡核苷酸可以悬浮于包含1% (w/v) 羧甲基纤维素钠和0.1% (v/v) TWEENTM80的载液中。在通常的储存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂,以防止微生物的生长。

[0113] 可注射制剂,例如无菌可注射的水性或油性悬浮液,可以根据已知技术使用合适的分散剂或湿润剂和助悬剂来配制。通常,分散体通过将各种灭菌的活性成分掺入到无菌媒介物中来制备,所述无菌媒介物包含基础分散介质和来自上文枚举的那些所需其他成分。本公开内容的无菌可注射溶液可以通过将所公开的FMRP反义寡核苷酸掺入所需量的合适溶剂(根据需要,含有各种量的上文枚举的其它成分)中,然后过滤灭菌来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,所述技术从之前的活性成分加任何另外所需成分的无菌过滤的溶液产生其粉末。可注射制剂可以被灭菌,例如,通过细菌截留滤器过滤。

[0114] 还设想了制备用于肌肉注射的较浓缩或高度浓缩的溶液。在这方面,优选使用DMSO作为溶剂,因为这将导致极快的渗透,将高浓度的所公开的FMRP反义寡核苷酸递送至小区域。

[0115] 适用于这样的溶液的防腐剂包括苯扎氯铵、苄索氯铵、氯丁醇、硫柳汞等。合适的缓冲剂包括硼酸、碳酸氢钠和碳酸氢钾、硼酸钠和硼酸钾、碳酸钠和碳酸钾、乙酸钠、磷酸二氢钠等,其量足以将pH保持在约pH 6和pH 8之间,并且例如约pH 7和pH 7.5之间。合适的张度剂是葡聚糖40、葡聚糖70、右旋糖、甘油、氯化钾、丙二醇、氯化钠等,使得溶液的氯化钠当量在0.9%±0.2%的范围内。合适的抗氧化剂和稳定剂包括亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、硫脲等。合适的湿润剂和澄清剂包括聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、泊洛沙姆282和泰洛沙泊。合适的增黏剂包括葡聚糖40、葡聚糖70、明胶、甘油、羟乙基纤维素、羟甲基丙基

纤维素、羊毛脂、甲基纤维素、矿脂、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素等。

[0116] 肠内施用 (Enteral Administration)

[0117] 在一些实施方案中,本文设想了适于口服、舌下、胃或直肠递送所公开的FMRP反义寡核苷酸的组合物。

[0118] 例如,包含所公开的FMRP反义寡核苷酸的组合物可以适于口服递送,例如,包含肠溶包衣(例如抗胃包衣)的片剂,使得该组合物可以将FMRP反义寡核苷酸递送至例如患者的胃肠道。例如,这样施用至患者可以产生局部效果,基本上将FMRP反义寡核苷酸直接局部施加至患者胃肠道的受影响部分。在一些实施方案中,这样施用至患者基本上避免FMRP反义寡核苷酸的不期望的全身性吸收。

[0119] 例如,提供了用于口服施用的片剂,该片剂包括包含所公开的FMRP反义寡核苷酸(例如,由SEQ ID NO:1-10中任一种表示的反义寡核苷酸)的颗粒(例如,至少部分地由颗粒形成)和药学上可接受的赋形剂。这样的片剂可以用肠溶包衣包覆。设想的片剂可以包括药学上可接受的赋形剂,诸如填充剂、粘合剂、崩解剂和/或润滑剂,以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂诸如冬青油(wintergreen)、橙味剂(orange)、木糖醇、山梨醇、果糖和麦芽糊精,以及芳香剂、防腐剂和/或抗氧化剂。

[0120] 在一些实施方案中,设想的药物制剂包含颗粒内相(intra-granular phase),所述颗粒内相包含所公开的FMRP反义寡核苷酸(例如,由SEQ ID NO:1-10中任一种表示的反义寡核苷酸)、药学上可接受的盐和/或药学上可接受的填充剂。例如,所公开的FMRP反义寡核苷酸和填充剂可以混合在一起,任选地与其他赋形剂混合,并形成颗粒。在一些实施方案中,可以使用湿法制粒形成颗粒内相,例如将液体(例如水)添加到混合的FMRP反义寡核苷酸化合物和填充剂中,并且然后将该组合干燥、研磨和/或筛分以产生颗粒。本领域技术人员将理解,可以使用其他加工来实现颗粒内相。

[0121] 在一些实施方案中,设想的制剂包含颗粒外相(extra-granular phase),颗粒外相可以包括一种或更多种药学上可接受的赋形剂,并且颗粒外相可以与颗粒内相混合以形成所公开的制剂。

[0122] 所公开的制剂可以包括包含填充剂的颗粒内相。示例性填充剂包括但不限于纤维素、明胶、磷酸钙、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、微晶纤维素、果胶、聚丙烯酸酯、右旋糖、醋酸纤维素、羟丙基甲基纤维素、部分预胶化淀粉、碳酸钙和其他物质,包括其组合。

[0123] 在一些实施方案中,所公开的制剂可以包括包含粘合剂的颗粒内相和/或颗粒外相,粘合剂的通常作用是将药物制剂的成分保持在一起。本公开内容的示例性粘合剂可包括但不限于以下:淀粉、糖、纤维素或改性纤维素(诸如羟丙基纤维素)、乳糖、预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、低取代羟丙基纤维素、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、糖醇和其他物质,包括其组合。

[0124] 包含颗粒内相和/或颗粒外相的制剂,例如,可以包括崩解剂,诸如但不限于淀粉、纤维素、交联的聚乙烯吡咯烷酮、羟基乙酸淀粉钠、羧甲基纤维素钠、藻酸盐、玉米淀粉、交联羧甲基纤维素钠、交联的羧甲基纤维素、低取代的羟丙基纤维素、阿拉伯胶和其他物质,包括其组合。例如,颗粒内相和/或颗粒外相可以包含崩解剂。

[0125] 在一些实施方案中,设想的制剂包含颗粒内相(包含所公开的FMRP反义寡核苷酸

和选自以下的赋形剂：甘露醇、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素和羟基乙酸淀粉钠或其组合)和颗粒外相(包含以下一种或更多种：微晶纤维素、羟基乙酸淀粉钠和硬脂酸镁或其混合物)。

[0126] 在一些实施方案中，制剂可以包含润滑剂，例如，颗粒外相可以包含润滑剂。润滑剂包括但不限于滑石、二氧化硅(silica)、脂肪、硬脂、硬脂酸镁、磷酸钙、二氧化硅(silicone dioxide)、硅酸钙、磷酸钙、胶体二氧化硅、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、苯甲酸钠、聚乙二醇、乙酸钠、硬脂酸钙、十二烷基硫酸钠、氯化钠、十二烷基硫酸镁、滑石和硬脂酸。

[0127] 在一些实施方案中，药物制剂包含肠溶包衣。通常，肠溶包衣为口服药物形成屏障，控制药物沿消化道吸收所在的位置。肠溶包衣可以包含根据pH以不同速率崩解的聚合物。肠溶包衣可以包括，例如，邻苯二甲酸乙酸纤维素、丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物、乙酸琥珀酸纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物、丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸共聚物、C型甲基丙烯酸共聚物、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯和邻苯二甲酸乙酸纤维素。

[0128] 示例性的肠溶包衣包括Opadry[®] AMB、Acryl-EZE[®]、Eudragit[®]级。在一些实施方案中，肠溶包衣按重量计可以占设想片剂的约5%至约10%、约5%至约20%、8%至约15%、约8%至约20%、约10%至约20%、或约12%至约20%或约18%。例如，肠溶包衣可以包括丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸共聚物。

[0129] 例如，在设想的实施方案中，提供包含以下或主要上由以下组成的片剂：按重量计约0.5%至约70%，例如约0.5%至约10%，或约1%至约20%的所公开的FMRP反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐。这样的片剂可以包含例如按重量计约0.5%至约60%的甘露醇，例如按重量计约30%至约50%的甘露醇，例如按重量计约40%的甘露醇；和/或按重量计约20%至约40%的微晶纤维素或按重量计约10%至约30%的微晶纤维素。例如，所公开的片剂可以包括包含以下的颗粒内相：按重量计约30%至约60%、例如约45%至约65%、或可选地、按重量计约5%至约10%的所公开的FMRP反义寡核苷酸，按重量计约30%至约50%、或可选地、约5%至约15%的甘露醇，约5%至约15%的微晶纤维素，约0%至约4%、或约1%至7%的羟丙基甲基纤维素，以及按重量计约0%至约4%、例如约2%至约4%的羟基乙酸淀粉钠。

[0130] 在各种实施方案中，用于口服施用所公开的FMRP反义寡核苷酸的药物片剂制剂包含颗粒内相，其中颗粒内相包含所公开的FMRP反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐(诸如钠盐)和药学上可接受的填充剂，并且也可以包含颗粒外相，颗粒外相可以包含药学上可接受的赋形剂诸如崩解剂。颗粒外相可以包含选自微晶纤维素、硬脂酸镁及其混合物的组分。药物组合物也可以包含按片剂重量计约12%至20%的肠溶包衣。例如，用于口服使用的药学上可接受的片剂可以包含按重量计约0.5%至10%的所公开的FMRP反义寡核苷酸，例如所公开的FMRP反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐，按重量计约30%至50%的甘露醇，按重量计约10%至30%的微晶纤维素，以及包含丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸共聚物的肠溶包衣。

[0131] 在一些实例中，用于口服使用的药学上可接受的片剂可以包括包含以下的颗粒内相：按重量计约5%至约10%的所公开的FMRP反义寡核苷酸，例如所公开的FMRP反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐，按重量计约40%的甘露醇，按重量计约8%的微晶纤维素，按重

量计约5%的羟丙基甲基纤维素,和按重量计约2%的羟基乙酸淀粉钠;包含以下的颗粒外相:按重量计约17%的微晶纤维素、按重量计约2%羟基乙酸淀粉钠、按重量计约0.4%的硬脂酸镁;以及片剂上的包含丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸共聚物的肠溶包衣。

[0132] 在一些实施方案中,药物组合物可以包括包含按重量计约13%或约15%、16%、17%或18%的例如Acryl-EZE[®]的肠溶包衣(参见例如PCT公布第W02010/054826号,其通过引用整体并入本文)。

[0133] 包衣溶解并且释放活性成分的速率是包衣的溶解速率。在一些实施方案中,片剂可具有以下溶解曲线:例如,当在37°C在pH为7.2的磷酸盐缓冲液中以100rpm的USP/EP 2型装置(桨)测试时,约120分钟至约240分钟后,例如约180分钟后,约50%至约100%的FMRP反义寡核苷酸释放。在某些实施方案中,片剂可具有以下溶解曲线:例如,当在37°C在pH为1.0的稀释HCl中以100rpm的USP/EP 2型装置(桨)测试时,其中120分钟后基本上没有FMRP反义寡核苷酸释放。在一些实施方案中,片剂可具有以下溶解曲线:例如,当在37°C在pH为6.6的磷酸盐缓冲液中以100rpm的USP/EP 2型装置(桨)测试时,30分钟后,约10%至约30%或不超过约50%的FMRP反义寡核苷酸释放。

[0134] 在一些实施方案中,当口服施用至患者时,制剂例如片剂可以在患者体内产生极小血浆浓度的FMRP反义寡核苷酸。在另一种实施方案中,当口服施用至患者时,所公开的制剂被局部递送至患者的结肠或直肠,例如递送至患者的受影响或病变的部位。

[0135] 向患者施用所公开的FMRP反义寡核苷酸可以通过直肠模式进行。用于直肠施用的药物组合物包括泡沫、溶液(灌肠剂)和栓剂(Block, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990中第87章)。

[0136] 在一些实施方案中,本文提供的方法还可以包括向患者施用至少一种涉及治疗本文公开的疾病和紊乱的其他的剂。在一些实施方案中,设想的其他的剂可以被共施用(例如顺序或同时地)至患者。

[0137] 例如,这样的剂包括但不限于化学治疗剂,诸如道诺霉素、柔红霉素、更生霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、依索比星、博来霉素、马磷酰胺、异环磷酰胺、胞嘧啶阿拉伯糖苷、双氯乙基亚硝基脲、白消安、丝裂霉素C、放线菌素D、光神霉素、泼尼松、羟孕酮、睾酮、他莫昔芬、达卡巴嗪、丙卡巴肼、六甲蜜胺、五甲蜜胺、米托蒽醌、安吖啶、苯丁酸氮芥、甲基环己基亚硝基脲、氮芥、美法仑、环磷酰胺、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷(CA)、5-氮杂胞苷、羟基脲、脱氧助间型霉素、4-羟基过氧环磷酰胺(4-hydroxyperoxycyclophosphoramide)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、5-氟脱氧尿苷(5-FUdR)、氨甲蝶呤(MTX)、秋水仙碱、长春新碱、长春花碱、依托泊苷、三甲曲沙、替尼泊苷、顺铂和乙蔗酚(DES)。

[0138] 剂也包括免疫抑制剂,包括糖皮质激素、细胞抑制剂、抗体、作用于免疫亲和蛋白(immunophilin)的剂、干扰素、阿片类药物、TNF结合蛋白、霉酚酸酯和小的生物学剂。例如,设想的免疫抑制剂包括但不限于:他克莫司、环孢菌素、吡美莫司、西罗莫司、依维莫司、霉酚酸、芬戈莫德、地塞米松、氟达拉滨、环磷酰胺、氨甲蝶呤、硫唑嘌呤、来氟米特、特立氟胺、阿那白滞素、抗胸腺细胞球蛋白、抗淋巴细胞球蛋白、莫罗单抗-CD3、afutuzumab、利妥昔单抗、teplizumab、依法利珠单抗(efalizumab)、达利珠单抗(daclizumab)、巴利昔单抗、阿达木单抗、英夫利昔单抗、certolizumab pegol、那他珠单抗(natalizumab)和依那西普。其他

的剂包括抗生素、止泻剂、轻泻药、镇痛药、铁补充剂和钙或维生素D或B-12补充剂。

[0139] 施用剂量和频率

[0140] 示例性制剂包括包含约35mg至约500mg所公开的FMRP反义寡核苷酸或主要由约35mg至约500mg所公开的FMRP反义寡核苷酸组成的剂型。例如,本文设想了包含约35mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、110mg、120mg、130mg、140mg、150mg、160mg、170mg、180mg、190mg、200mg或250mg所公开的FMRP反义寡核苷酸的制剂。在一种实施方案中,制剂可以包含约40mg、80mg或160mg所公开的FMRP反义寡核苷酸。在一些实施方案中,制剂可以包含至少100 μ g所公开的FMRP反义寡核苷酸。例如,制剂可包含约0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、1mg、5mg、10mg、15mg、20mg或25mg所公开的FMRP反义寡核苷酸。向患者施用的量将取决于诸如以下的变量:待治疗疾病或适应症的类型和程度、患者的总体健康状况和体重、FMRP反义寡核苷酸的体内效力、药物制剂和施用途径。初始剂量可以增加超过上限水平,以便快速达到期望的血液水平或组织水平。初始剂量可以小于最佳剂量,并且在治疗过程期间可以逐渐增加剂量。可以优化人类剂量,例如在常规I期剂量递增研究中,设计为从40mg至160mg进行。给药频率可以取决于诸如施用途径、剂量和所治疗的疾病等因素而变化。示例性的给药频率是每天一次、每周一次和每两周一次。在一些实施方案中,给药为每天一次,持续7天。

[0141] 诊断方法

[0142] 本公开内容还提供了一种诊断患有肠病的患者的方法,该方法依赖于检测患者的一种或更多种生物学样品中FMRP表达信号的水平。如本文使用的,术语“FMRP表达信号”可以指FMR1基因表达、FMR1基因产物或FMRP活性的任何指标。FMR1基因产物包括RNA(例如mRNA)、肽和蛋白(例如FMRP、变体、类似物和/或其部分)。可评估的FMR1基因表达指数包括但不限于,FMR1基因或染色质状态、FMR1基因与调控基因表达的细胞组分的相互作用、FMR1基因产物表达水平(例如FMRP RNA表达水平、FMRP蛋白表达水平)或者FMRP RNA或蛋白与转录机制、翻译机制或翻译后加工机制的相互作用。FMRP活性指数包括但不限于,对RIPK/MLKL途径激活的评估(例如对RIPK1、RIPK3和/或MLKL磷酸化的评估)和CREB表达(例如mRNA和蛋白表达)。

[0143] FMRP表达信号的检测可以通过体内、体外或离体方法来完成。在优选的实施方案中,本公开内容的方法可以在体外进行。检测方法可以包括检测患者的血液、血清、粪便物、组织或细胞。检测可以通过测量整个组织、组织外植体、细胞培养物、解离的细胞、细胞提取物或体液(包括血液或血清)中的FMRP表达信号来实现。设想的检测方法包括测量FMR1基因产物表达水平的测定,诸如蛋白印迹、流式细胞术、ELISA、其他定量结合测定、细胞或组织生长测定、RNA印迹、定量或半定量聚合酶链式反应、医学成像方法(例如MRI)或免疫染色方法(例如免疫组织化学或免疫细胞化学)。

实施例

[0144] 本公开内容通过以下实施例进一步说明。实施例仅为说明目的而提供,并且不应被解释为以任何方式限制本公开内容的范围或内容。

[0145] 实施例1:FMRP在人类结肠直肠癌中上调

[0146] 为了研究FMRP在CRC肿瘤发生中的作用,分析了人类CRC样品中FMRP mRNA和蛋白

水平。本实施例展示了在人类CRC样品中存在FMRP表达增加。

[0147] 患者和样品

[0148] 人类CRC肿瘤和邻近的肉眼观察未受影响区域的匹配配对样品取自在Tor Vergata University Hospital (Rome, Italy) 因散发性CRC而接受结肠切除术的48名患者。所有患者在手术前均未接受过放射治疗或化学治疗。

[0149] 免疫组织化学

[0150] 对CRC患者的经福尔马林固定、石蜡包埋的正常组织切片和配对的肿瘤及瘤周样品进行免疫组织化学。结肠切片使用二甲苯和乙醇进行脱蜡和脱水,并且在98°C的恒温浴(Dako Agilent Technologies, Glostrup, Denmark)中,在Tris-EDTA柠檬酸盐缓冲液(pH 7.8)中进行抗原修复30min。免疫组织化学染色如下进行:使用针对人类FMRP的单克隆抗体(最终稀释1:500, LifeSpan BioSciences, Inc.)在室温孵育1小时,随后使用以3,3'-二氨基联苯胺(DAB)作为发色团的不含生物素的HRP-聚合物检测技术(MACH 4™ Universal HRP-Polymer Kit, Biocare Medical, Pacheco, CA)。切片用苏木精进行复染,脱水并封固。同种型对照IgG染色的切片在如上所述的相同免疫组织化学条件下制备,用纯化的小鼠正常IgG对照抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN)代替一抗。

[0151] 在取自人类CRC肿瘤和邻近区域的匹配配对样品的切片(n=40)和取自正常对照的结肠的样品(NC)中分析FMRP表达。如图1A所示,与瘤周区域(P)和NC相比,CRC肿瘤样品(T)中FMRP蛋白的表达显著增加。与表达相对较低水平FMRP的邻近的非肿瘤区域和NC相比,约61%的CRC样品(24/40)中强烈表达FMRP。

[0152] FMRP mRNA表达

[0153] 使用PureLink® mRNA微型试剂盒(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.)根据制造商的说明从人类CRC和邻近的肉眼观察未受影响区域的匹配配对样品中提取RNA。将恒定量的RNA(每个样品1μg)反转录为互补DNA(cDNA),并使用以下条件对其进行扩增:在95°C变性1min;对于人类FMRP,在59°C退火30s,对于人类/小鼠β-肌动蛋白,在60°C退火30s;在72°C延伸30s。β-肌动蛋白用作管家基因。使用ΔΔCt算法计算基因表达。引物序列如下:人类FMRP(正向5'-GTTGAGCGCCGAGTTTGTCAG-3'(SEQ ID NO:11);反向5'-CCCACTGGGAGAGGATTATTTGGG-3'(SEQ ID NO:12)),人类和小鼠β-肌动蛋白(正向5'-AAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACC-3'(SEQ ID NO:13);反向5'-AGCCAGTCCAGACGCAGGAT-3'(SEQ ID NO:14))。

[0154] 如在图1B中观察到的,RT-PCR证实了免疫组织化学分析,并且显示,与取自同一患者的肉眼观察未受影响的区域的瘤周样品(P)相比,人类CRC肿瘤样品(T)中的FMRP mRNA显著上调。

[0155] FMRP蛋白表达

[0156] 从人类结肠组织提取总蛋白,并将其在包含10mM HEPES[pH 7.9]、10mM KCl、0.1mM乙二胺四乙酸(EDTA)、0.2mM乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)和0.5%Nonidet P40的缓冲液(补充有1mM二硫苏糖醇(DTT)、10mg/ml抑肽酶、10mg/ml亮抑肽酶、1mM苯甲磺酰氟(PMSF)、1mM Na₃VO₄和1mM NaF)中于冰上进行裂解。裂解物通过离心澄清,并通过十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。将印迹与抗FMRP抗体(Cell Signaling, Danvers, MA)一起孵育,然后与缀合至辣根过氧化物酶的二抗(Dako, Milan,

Italy)一起孵育。分析后,对每个印迹进行剥离(strip),并与小鼠抗人类 β -肌动蛋白单克隆抗体(Sigma-Aldrich)一起孵育,以确定各泳道的上样量相等。

[0157] 如在图1C和图1D中观察到的,蛋白印迹分析证实了免疫组织化学和RT-PCR分析,并且显示,与取自同一患者的肉眼观察未受影响的区域的瘤周样品(P)相比,人类CRC肿瘤样品(T)中的FMRP蛋白显著上调。

[0158] 实施例2:FMR1敲除小鼠对氧化偶氮甲烷诱导的肿瘤发生具有抗性

[0159] 为了剖析FMRP在CRC中的作用,使用由氧化偶氮甲烷(AOM)诱导的散发性CRC小鼠模型。本实施例描述了在AOM诱导CRC模型中FMR1敲除小鼠的抗肿瘤表型。

[0160] CRC的AOM诱导

[0161] 野生型(WT)和FMR1敲除(KO)小鼠被注射烷化剂AOM(10mg/kg;Sigma Aldrich, Milan, Italy),每周一次腹腔内注射,持续5周,以诱导肿瘤形成。监测小鼠的肿瘤形成,并在处死前7天使用高分辨率内窥镜系统进行内窥镜筛查。在第22周,通过颈椎脱位法处死小鼠,并收集结肠组织用于分析。

[0162] 结肠镜检查以不知情方式进行,使用高分辨率小鼠内窥镜系统监测肿瘤形成。在第21周进行的内镜检查期间检测到肿瘤。处理终止后,对肿瘤进行计数以确定结肠病灶的总数。所有肿瘤均根据其尺寸进行评价,并使用Becker C.et al., Gut.2005;54(7):950-4.(通过引用以其整体并入本文中描述的方案进行评分)。简而言之,肿瘤分级如下:1级(非常小但可检测到的肿瘤)、2级(覆盖最多八分之一结肠周长的肿瘤)、3级(覆盖最多四分之一结肠周长的肿瘤)、4级(覆盖最多一半结肠周长的肿瘤)和5级(覆盖超过一半结肠周长的肿瘤)。

[0163] 如在图2A和图2B中观察到的,用AOM处理的WT小鼠发展多个大肿瘤,而在AOM处理的FMR1 KO小鼠中肿瘤数目和尺寸显著减少。这些结果通过直接评估第22周处死的小鼠的肿瘤得到证实(数据未示出)。如图2C所示,与AOM处理的FMR1 KO动物相比,AOM处理的WT小鼠表现出20%的存活力降低。

[0164] 免疫组织化学

[0165] 对取自WT和FMR1 KO小鼠的肿瘤和瘤周区域的结肠冷冻切片进行苏木精和伊红(H&E)染色后,进行组织学分析。结肠切片使用二甲苯和乙醇进行脱蜡和脱水,并且在98℃的恒温浴(Dako Agilent Technologies, Glostrup, Denmark)中,在Tris-EDTA柠檬酸盐缓冲液(pH 7.8)中进行抗原修复30min。免疫组织化学染色如下进行:使用针对人类FMRP的单克隆抗体(最终稀释1:500, LifeSpan BioSciences, Inc.)在室温孵育1小时,然后使用以3,3'-二氨基联苯胺(DAB)作为发色团的不含生物素的HRP-聚合物检测技术(MACH 4™通用HRP-聚合物试剂盒, Biocare Medical, Pacheco, CA)。切片用苏木精进行复染,脱水并封固。同种型对照IgG染色的切片在如上所述的相同免疫组织化学条件下制备,用纯化的小鼠正常IgG对照抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN)代替一抗。

[0166] 在没有AOM处理的情况下,与WT小鼠相比,FMRP-KO小鼠的肠道正常,并且不存在肉眼观察异常(数据未示出)。然而,如图2D所示,在AOM处理后第22周切下的肿瘤显示,WT小鼠发展了伴有广泛异常增生的肿瘤(tumors with pervasive dysplasia),而FMR1 KO动物的邻近异常增生区域的粘膜组织结构保持正常。

[0167] FMRP蛋白表达

[0168] 从小鼠结肠组织提取总蛋白,并将其在包含10mM HEPES[pH 7.9]、10mM KCl、0.1mM乙二胺四乙酸(EDTA)、0.2mM乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)和0.5%Nonidet P40的缓冲液(补充有1mM二硫苏糖醇(DTT)、10mg/ml抑肽酶、10mg/ml亮抑肽酶、1mM苯甲磺酰氟(PMSF)、1mM Na₃VO₄和1mM NaF)中于冰上进行裂解。裂解物通过离心澄清,并在十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离。将印迹与抗FMRP抗体(Cell Signaling, Danvers, MA)一起孵育,然后与缀合至辣根过氧化物酶的二抗(Dako, Milan, Italy)一起孵育。分析后,对每个印迹进行剥离(strip),并与小鼠抗人类β-肌动蛋白单克隆抗体(Sigma-Aldrich)一起孵育,以确定各泳道的上样量相等。

[0169] 如图2E所示,与人类CRC样品一致,与同一动物的邻近瘤周区域(P)相比,AOM处理的WT小鼠的粘膜肿瘤(T)中FMRP蛋白表达增加。

[0170] TUNEL和Ki67染色

[0171] 为了确定在FMR1 KO动物中观察到的肿瘤发生降低是由于细胞死亡增加还是由于肿瘤细胞增殖降低,进行了TUNEL染色和Ki67免疫组织化学染色。在取自WT和FMR1 KO小鼠的结肠冷冻切片中,使用TUNEL原位细胞死亡检测试剂盒(Roche Applied Science)根据制造商的说明检测凋亡细胞。3-氨基-9-乙基咔唑用作发色团,并且切片用苏木精进行复染。凋亡细胞核显示为蓝紫色背景下的红色染色结构。

[0172] 还将免疫组织化学切片与针对小鼠Ki67的小鼠单克隆抗体(克隆MIB-5,最终稀释1:100, DaKO, Agilent, Santa Clara, CA, USA)在室温一起孵育30分钟,然后进行以3,3'-二氨基联苯胺作为发色团(DaKO, Agilent)的不含生物素的HRP聚合物检测(Ultravision Detection System, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)。切片用苏木精进行复染,脱水并封固。

[0173] 如图2F所示,TUNEL染色揭示,与AOM处理的WT动物相比,AOM处理的FMR1 KO小鼠表现出增加的DNA片段化水平。然而,如图2G中可见,观察到Ki67阳性细胞的数目不存在差异。总之,这些结果表明FMRP与肿瘤对细胞死亡的抗性增加相关。

[0174] 实施例3:FMRP反义寡核苷酸在CRC细胞系中诱导细胞死亡

[0175] 为了确定FMRP如何影响CRC存活,分析用特定FMRP反义寡核苷酸处理的人类CRC上皮细胞系的细胞死亡。本实施例展示,FMRP反义寡核苷酸可以通过不依赖于细胞凋亡的机制在CRC细胞系中诱导细胞死亡。

[0176] 结肠直肠癌细胞培养物中的FMRP表达

[0177] 人类CRC细胞系,DLD-1和HCT-116,从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA)获得,并分别在RPMI 1640(DLD-1)和McCoy's 5A(HCT-116)培养基中培养。所有培养基均补充有10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素(两者均来自Lonza, Verviers, Belgium)。正常人类结肠上皮细胞系(HCEC-1ct)从EVERCYTE GmbH(Vienna, Austria)获得,并在ColoUp[®]培养基(EVERCYTE GmbH)中培养。细胞保持在37℃、5%CO₂、充分加湿的培养箱中。使用如前面实施例2中描述的方法,制备细胞系裂解物并通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳/免疫印迹进行分析。对于免疫荧光染色,细胞系在4℃用3.7%甲醛固定10分钟,在室温用0.1%Triton透化10分钟,并在室温封闭(1%牛血清白蛋白, 0.1%Tween, 2%甘氨酸)1小时。固定并封闭的细胞与抗FMRP单克隆抗体(1:500, Cell Signaling, Danvers, MA)在4℃一起孵育过夜。用PBS洗涤后,施加二抗山羊抗兔Alexa 488

(1:2000, A11008; Invitrogen), 在室温持续1小时。载玻片用PBS洗涤, 使用含有4', 6-二脒基-2-苯基吲哚的Prolonggold[®]抗淬灭试剂(P36931; Invitrogen)封固, 并通过装有Leica应用配套软件(V4.6.2)的Leica DMI4000 B显微镜进行分析。

[0178] 如图3A-图3C所示, 与HCEC-1ct上皮细胞(即正常结肠细胞)相比, 人类CRC细胞系(DLD-1和HCT-116)中的FMRP表达更高。

[0179] 结肠直肠癌细胞培养物中的FMRP敲低

[0180] 合成了与人类FMRP互补的硫代磷酸酯单链反义寡核苷酸[5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO:6)]和单链有义寡核苷酸[5'-ATGGAGGAGCTGGTGGTGA-3' (SEQ ID NO:15)]。使用Opti-MEM培养基和lipofectamine 3000试剂(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)根据制造商的说明, 用FMRP反义(AS)(最终浓度0.5nM-100nM)或FMRP有义寡核苷酸(S)(最终浓度100nM)转染CRC细胞系和HCEC-1ct细胞24小时和48小时。

[0181] 如在图3D、图3G和图3I中观察到的, 用FMRP反义寡核苷酸(AS)处理DLD-1细胞(图3C)、HCT-116细胞(图3G)和HCEC-1ct细胞(图3I)显著抑制了FMRP表达, 并且在用有义寡核苷酸处理的细胞中未观察到显著抑制。

[0182] FMRP反义寡核苷酸处理的细胞的细胞死亡

[0183] 用FMRP反义寡核苷酸(AS)(最终浓度0.5nM和100nM)或FMRP有义寡核苷酸(S)(最终浓度100nM)转染细胞。24小时(图3E、图3F、图3J和图3K)或48小时(图3H)后, 收集细胞, 在膜联蛋白V(AV)缓冲液中洗涤两次, 用FITC-膜联蛋白V(最终稀释1:100; Immunotools, Friesoythe, Germany)根据制造商的说明染色, 并与5mg/ml碘化丙锭(PI)一起在4℃孵育30min。还用FMRP有义寡核苷酸或FMRP AS寡核苷酸(最终浓度100nM)转染细胞36小时, 并分析激活的胱天蛋白酶3和胱天蛋白酶8。作为阳性和阴性对照, 细胞分别用星形孢菌素(最终浓度1μM, Sigma-Aldrich Milan, Italy)或Q-VD-OPh(一种泛胱天蛋白酶抑制剂; 最终浓度1μM)(R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN)进行处理。此外, 转染后36小时(图4F和图4G)或48小时(图4D和图4E), 用10M溴脱氧尿苷脉冲标记(pulse)细胞60分钟, 在70%冷乙醇中固定, 并在-20℃储存至少3小时。然后细胞在2M HCl中变性, 并用抗溴脱氧尿苷单克隆抗体(Immunotech, Marseille, France)染色, 然后用异硫氰酸荧光素缀合的二级抗小鼠免疫球蛋白G(Molecular Probes, Milan, Italy)和100g/mL PI染色。使用Gallios流式细胞仪(Beckman Coulter, Life Sciences, Pasadena, CA, USA)测量荧光, 并使用Kaluza软件(Beckman Coulter)进行分析。认为AV⁻/PI⁻细胞是存活细胞。

[0184] 如图3E和图3F所示, 用FMRP反义寡核苷酸处理DLD-1细胞导致膜联蛋白V⁺或膜联蛋白V⁺PI⁺细胞数目增加, 表明这些CRC细胞正在经历自发凋亡或坏死性凋亡。然而, 如图3H、图3J和图3K所示, 用FMRP反义寡核苷酸处理的HCT-116细胞和HCRC-1ct细胞均未显示出膜联蛋白V⁺或膜联蛋白V⁺PI⁺细胞数目增加。使用转染到细胞系中的特定FMRP siRNA观察到类似的结果(数据未示出)。

[0185] 为了剖析FMRP反义寡核苷酸诱导细胞死亡的机制, 分析了FMRP敲低对促凋亡胱天蛋白酶8和胱天蛋白酶3的激活的影响。如图4A和4B所示, 用FMRP反义寡核苷酸处理CRC细胞并未改变激活的胱天蛋白酶3阳性细胞或激活的胱天蛋白酶8阳性细胞的百分比。如预期的, 星形孢菌素(Stauro)显著增加了激活的胱天蛋白酶3阳性细胞的百分比。

[0186] 如图4C所示,用泛胱天蛋白酶抑制剂(Q-VD-OPh;Cas in)预处理细胞未改变FMRP反义寡核苷酸诱导的细胞死亡。此外,为了验证FMRP反义寡核苷酸诱导的细胞死亡是否继发于细胞生长停滞,分析了DLD-1细胞系的细胞周期进程。如图4D-图4G所示,在诱导细胞死亡之前,FMRP反义寡核苷酸没有影响G2/M、S或G0/G1细胞周期阶段的细胞的相对百分比。总之,这些发现表明FMRP通过不影响细胞周期的不依赖于凋亡的途径影响CRC细胞死亡。

[0187] 实施例4:FMRP反义寡核苷酸诱导坏死性凋亡

[0188] 癌细胞已发展了各种机制以逃避程序性细胞死亡。坏死性凋亡是一种受调控的、不依赖于胱天蛋白酶的细胞死亡途径,是消除抗凋亡细胞的替代机制。本实施例展示,FMRP反义寡核苷酸通过激活坏死性凋亡途径在CRC细胞中诱导细胞死亡。

[0189] FMRP与坏死性凋亡途径相关的mRNA缔合

[0190] 使用FMRP特异性抗体将来自人类CRC样品和CRC细胞系的FMRP与其缔合的RNA一起免疫沉淀(图5A),以通过实时PCR鉴定结合的转录物。 β -肌动蛋白用作阴性对照,并且E-钙粘蛋白和波形蛋白用作阳性对照。如图5B和图5C所示,在人类CRC样品或CRC细胞系中,RIPK3 mRNA不与FMRP免疫共沉淀。相比之下,与IgG同种型对照相比,FMRP与显著水平的RIPK1 mRNA免疫共沉淀。

[0191] 为了证实FMRP与坏死性凋亡途径的组分缔合,将细胞保持未处理或用FMRP反义寡核苷酸(最终浓度0.5nM和100nM)或FMRP有义寡核苷酸(最终浓度100nM)转染;与pMLKL抑制剂(坏死磺酰胺(necrosulfonamide),NSA;最终浓度1 μ M)(Calbiochem)或pRIPK1抑制剂(坏死抑制素1(necrostatin1),NEC1;最终浓度10 μ M)(Cayman Chemical,Ann Arbor,MI USA)一起孵育。24小时后,如前面实施例1-3所述收集细胞并通过蛋白印迹分析,或用FITC-膜联蛋白V和PI染色用于流式细胞术分析。

[0192] 如图6A-图6D所示,用FMRP反义寡核苷酸处理在人类CRC细胞系中增加了RIPK1的总蛋白表达水平。FMRP反义寡核苷酸处理还导致RIPK1、RIPK3和MLKL的磷酸化增加。然而,如在图6G中观察到的,在用FMRP反义寡核苷酸处理的HCEC-1ct细胞中没有观察到类似的磷酸化增加。

[0193] 如图6E和图6F所示,与RIPK1特异性抑制剂坏死抑制素1(NEC1)和MLKL特异性抑制剂坏死磺酰胺(NSA)一起孵育的人类CRC细胞系免于FMRP反义寡核苷酸诱导的细胞死亡。总之,这些结果表明,FMRP通过抑制RIPK1信号级联来消除CRC细胞的坏死性凋亡,从而抑制坏死性凋亡。

[0194] 实施例5:FMRP表达受CREB调控

[0195] 若干种细胞内蛋白激酶(例如mTOR和MAPK)和转录因子(例如CREB)已被报道正向调控FMRP表达。本实施例展示了FMRP表达受CREB转录因子正向调控。

[0196] CREB mRNA表达和蛋白表达

[0197] 为了评估CREB是否调控FMRP表达,用CREB反义寡核苷酸(ASc)(5'-GCATCTCCACTCTGCTGGTT-3')(SEQ ID NO:16)或CREB有义寡核苷酸(Ss)(5'-AACCAGCAGAGTGGAGATGC-3')(SEQ ID NO:17)(最终浓度200nM)转染细胞系24小时或48小时。如前面实施例1至3所述制备mRNA和总蛋白裂解物并分别通过RT-PCR和蛋白印迹进行分析。

[0198] 如图7A所示,与瘤周样品(P)中的水平相比,人类CRC肿瘤(T)具有的CREB mRNA转

录物水平显著更高。类似地,如图7B和图7C所示,与瘤周组织样品(P)相比,人类CRC肿瘤(T)中CREB蛋白表达显著更高。

[0199] 为了研究CREB是否调控FMRP在CRC细胞系中的表达,使用特异性AS寡核苷酸抑制CREB表达。如图7D-图7F所示,与未处理的细胞或用有义寡核苷酸对照处理的细胞相比,用CREB反义寡核苷酸处理的人类CRC细胞系具有减少的CREB蛋白表达。此外,用CREB反义寡核苷酸处理导致FMRP蛋白表达同时减少。这些发现表明,在人类CRC中,CREB正向调控FMRP表达。

[0200] 实施例6:FMRP水平影响CRC迁移和侵袭

[0201] 为了研究FMRP在CRC迁移和侵袭中的作用,使用了伤口闭合和细胞侵袭的体外模型。本实施例描述了FMRP调控参与细胞迁移和侵袭的蛋白,所述蛋白包括:E-钙粘蛋白、 β -连环蛋白和结肠直肠癌突变蛋白(mutated in colorectal cancer, MCC), MCC是一种肿瘤抑制因子,其基因在结肠直肠癌中并且特别是在淋巴结转移增加的患者中通过启动子甲基化而沉默。

[0202] FMRP水平通过E-钙粘蛋白和 β -连环蛋白调控来影响CRC细胞迁移和侵袭

[0203] 为了研究FMRP在肿瘤细胞迁移和侵袭中的作用,将HCT-116细胞接种到ibidi®培养基插入物的每一侧,并生长至汇合,然后保持未处理(U)或用有义FMRP寡核苷酸(S)(最终浓度0.5nM)或反义FMRP寡核苷酸(AS)(最终浓度0.5nM)转染。此外,将HCT-116细胞接种到用Matrigel®预包被的Transwell®插入物中,并保持未处理(U)或用有义寡核苷酸(S)(最终浓度100nM)或反义FMRP寡核苷酸(AS)(最终浓度0.5nM)转染48小时。

[0204] 如图8A和图8B所示,与未处理的细胞或用有义寡核苷酸转染的细胞相比,用反义FMRP寡核苷酸转染HCT-116细胞显著降低了覆盖假“伤口”的细胞百分比。该图表示3个独立实验的平均细胞覆盖面积百分比 $\pm$ S.D.。

[0205] 类似地,如图8C和图8D所示,与未处理的细胞或用有义寡核苷酸转染的细胞相比,用反义FMRP寡核苷酸转染的HCT-116细胞表现出显著减少的跨Matrigel®包被的Transwell®插入物的迁移。该图表示3个独立实验的平均迁移细胞数 $\pm$ S.D.。

[0206] 为了确定FMRP是否调控E-钙粘蛋白和/或 β -连环蛋白(与细胞粘附、细胞骨架重塑以及抑制肿瘤迁移和侵袭相关的关键蛋白)的水平,将细胞保持未处理(U)或者用FMRP有义(S)寡核苷酸(最终浓度0.5nM)或FMRP反义(AS)寡核苷酸(最终浓度0.5nM)转染48小时。

[0207] 如图8E-图8G所示,与未处理的细胞或用有义寡核苷酸转染的细胞相比,用反义FMRP寡核苷酸转染HCT-116细胞显著增加了E-钙粘蛋白和 β -连环蛋白的表达。图8F和图8G以任意单位(a.u)表示值,并表示3个独立实验的平均值 $\pm$ S.D.。

[0208] FMRP下调调控E-钙粘蛋白和 β -连环蛋白表达的蛋白MCC

[0209] 为了研究FMRP是否调控已知与E-钙粘蛋白/ β -连环蛋白复合物相互作用的蛋白MCC,将HCT-116细胞保持未处理(U)或用有义FMRP寡核苷酸(S)(最终浓度0.5nM)或反义FMRP寡核苷酸(AS)(最终浓度0.5nM)转染48小时。

[0210] 如图9A和图9B所示,与未处理的细胞或用有义FMRP寡核苷酸转染的细胞相比,用反义FMRP寡核苷酸转染的HCT-116细胞表现出显著增加的MCC表达。

[0211] 最近的研究已经描述了MCC在调控结肠直肠细胞中E-钙粘蛋白/ β -连环蛋白复合

物介导的细胞间粘附 (cell-cell adhesion) 中的新型肿瘤抑制因子功能。为了研究MCC是否介导在用反义FMRP寡核苷酸转染的HCT-116细胞中观察到的E-钙粘蛋白和 β -连环蛋白表达的增加(例如图8E-图8G), 将细胞保持未处理(U) 或用有义FMRP寡核苷酸(最终浓度0.5nM)、或反义FMRP寡核苷酸(最终浓度0.5nM)、和/或对照siRNA (siRNA Ctrl) 或对MCC特异的siRNA (siRNA MCC) 转染48小时。

[0212] 如代表性的蛋白印迹(图9C) 和相应的定量分析(图9D和图9E) 所示, siRNA MCC的存在消除了单独用反义FMRP寡核苷酸转染的细胞中E-钙粘蛋白和 β -连环蛋白的上调表达。

[0213] 为了确定E-钙粘蛋白/ β -连环蛋白复合物的MCC调控对于观察到的结肠直肠细胞系迁移和侵袭的抑制(例如图8A和图8B) 是否也是必需的, 将HCT-116细胞接种到ibidi®培养基插入物的每一侧, 并生长至汇合, 然后保持未处理(U) 或用有义寡核苷酸(S) (最终浓度0.5nM) 或反义寡核苷酸(AS) (最终浓度0.5nM) 和/或siRNA Ctrl或siRNA MCC转染。

[0214] 如图9F和图9G所示, 对MCC特异的siRNA的存在显著降低了反义FMRP寡核苷酸介导的结肠直肠癌细胞系迁移和侵袭的抑制。总之, 这些数据表明FMRP通过调控MCC/E-钙粘蛋白/ β -连环蛋白复合物来控制结肠癌细胞的细胞间粘附。

[0215] 通过引用并入

[0216] 为了所有目的, 将本文引用的每个专利文件和科学论文的全部公开内容通过引用并入。

[0217] 等同物

[0218] 本公开内容可以在不脱离其主要特征的情况下以其他特定形式体现。因此, 前述实施方案应被认为是说明性的, 而不是对本文描述的公开内容的限制。本公开内容的范围由所附权利要求书指示, 而不是前述描述, 并且在权利要求书的等同物的含义和范围内的所有变化都被意图包含在其中。

序列表

<110> 诺格拉制药有限公司

<120> 脆性X智力低下蛋白干扰寡核苷酸及其使用方法

<130> GIU-059W0

<150> 62/810,697

<151> 2019-02-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸

<400> 1

ccaccaccag ctcctcca 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸

<400> 2

cttccaccac cagctcct 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸

<400> 3

tccaccacca gctcctcc 18

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸

<400> 4
cttccaccac cagctcc 17
<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸
<400> 5
tcacccttta tcacctc 18
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸
<400> 6
tccaccacca gctcctccat 20
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸
<400> 7
acttccacca ccagctcctc 20
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸
<400> 8
ttccaccacc agctcctcca 20
<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸
<400> 9
acttccacca ccagctcct 19
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸
<400> 10
ctcacccttt atcatcctca 20
<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 注解=人工序列的描述:合成引物 (人类FMRP)
<400> 11
gttgagcggc cgagttgtc ag 22
<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 注解=人工序列的描述:合成引物 (人类FMRP)
<400> 12
cccactggga gaggattatt tggg 24
<210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 注解=人工序列的描述:合成引物 (人类和小鼠 β -肌动蛋白)
<400> 13
aagatgaccc agatcatgtt tgagacc 27
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 注解=人工序列的描述:合成引物 (人类和小鼠 β -肌动蛋白)

<400> 14

agccagtcca gacgcaggat 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸

<400> 15

atggaggagc tgggtggtgga 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 注解=人工序列的描述:反义寡核苷酸

<400> 16

gcattctccac tctgctggtt 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 注解=人工序列的描述:有义寡核苷酸

<400> 17

aaccagcaga gtggagatgc 20

<210> 18

<211> 4140

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

acttccggtg gagggccgcc tctgagcggg cggcggggccg acggcgagcg cgggcggcgg 60
 cggtgacgga ggccgccgtg ccagggggcg tgcggcagcg cggcggcggc ggccggcgcg 120
 gcggcgggcg aggcggcggc ggccggcgcg gcggcgggcg ctgggcctcg agcggccgca 180
 gcccacctct cggggggcgg ctcccggcg tagcagggt gaagagaaga tggaggagct 240
 ggtggtggaa gtgcggggct ccaatggcg tttctacaag gcatttgtaa aggatgttca 300
 tgaagattca ataacagttg catttgaaaa caactggcag cctgataggc agattccatt 360

```

tcatgatgtc agattccac ctcctgtagg ttataataaa gatataaatg aaagtgatga 420
agttgaggtg tattccagag caaatgaaaa agagccttgc tgttggtggt tagctaaagt 480
gaggatgata aagggtgagt tttatgtgat agaatatgca gcatgtgatg caacttaca 540
tgaaattgtc acaattgaac gtctaagatc tgtaaatccc aacaaacctg ccacaaaaga 600
tactttccat aagatcaagc tggatgtgcc agaagactta cggcaaagtgt gtgccaaaaga 660
ggcgccacat aaggatttta aaaaggcagt tggcgccctt tctgtaactt atgatccaga 720
aaattatcag cttgtcattt tgtccatcaa tgaagtcacc tcaaagcgag cacatatgct 780
gattgacatg cactttcgga gtctgcgcac taagttgtct ctgataatga gaaatgaaga 840
agctagtaag cagctggaga gttcaaggca gcttgccctg agatttcatg aacagtttat 900
cgtaagagaa gatctgatgg gtctagctat tggtagctat ggtgctaata ttcagcaagc 960
tagaaaagta cctgggggtca ctgctattga tctagatgaa gataacctgca catttcatat 1020
ttatggagag gatcaggatg cagtgaaaaa agctagaagc tttctcgaat ttgctgaaga 1080
tgtaatacaa gttccaagga acttagtagg caaagtaata ggaaaaaatg gaaagctgat 1140
tcaggagatt gtggacaagt caggagttgt gagggtgagg attgaggctg aaaatgagaa 1200
aaatgttcca caagaagagg aaattatgcc accaaattcc cttccttcca ataattcaag 1260
ggttggaacct aatgccccag aagaaaaaaaa acatttagat ataaaggaaa acagcaccca 1320
tttttctcaa cctaacagta caaaagtcca gaggggtgta gtggcttcat cagttgtagc 1380
aggggaatcc cagaaacctg aactcaaggc ttggcagggt atggtaccat ttgtttttgt 1440
gggaacaaag gacagcatcg ctaatgccac tgttcttttg gattatcacc tgaactattt 1500
aaagctccaa cagaggaaga gagggagagc ttctgcgca gaggagacgg acggcggcgt 1560
ggagggggag gaagaggaca aggaggaaga ggacgtggag gaggcttcaa aggaaacgac 1620
gatcactccc gaacagataa tcgtccacgt aatccaagag aggctaaagg aagaacaaca 1680
gatggatccc ttcagatcag agttgactgc aataatgaaa ggagtgtcca cactaaaaca 1740
ttacagaata cctccagtga aggtagtcgg ctgcgcacgg gtaaagatcg taaccagaag 1800
aaagagaagc cagacagcgt ggatggtcag caaccactcg tgaatggagt accctaaact 1860
gcataattct gaagttatat ttcctatacc atttccgtaa ttcttattcc atattagaaa 1920
actttgttag gccaaagaca aatagtaggc aagatggcac agggcatgaa atgaacacaa 1980
attatgctaa gaatttttta ttttttggtt ttggccataa gcaacaattt tcagatttgc 2040
acaaaaagat accttaaaat ttgaaacatt gcttttaaaa ctacttagca cttcagggca 2100
gatttttagtt ttatttttcta aagtactgag cagtgatatt ctttgttaat ttggaccatt 2160
ttcctgcatt gggatgatcat tcaccagtac attctcagtt tttcttaata tatagcattt 2220
atggtaatca tattagactt ctgttttcaa tctcgtagat aagtcttcat gaaatgctat 2280
gtcatttcat gtcctgtgtc agtttatgtt ttgggtccact tttccagtat tttagtggac 2340
cctgaaatgt gtgtgatgtg acatttgtca ttttcattag caaaaaaagt tgtatgatct 2400
gtgccttttt tatatcttgg caggtaggaa tattatattt ggatgcagag ttcagggaag 2460
ataagttgga aacactaaat gttaaagatg tagcaaacc tgtcaaacat tagtacttta 2520
tagaagaatg catgctttcc atattttttt cttacataa acatcagggt aggcagtata 2580
aagaatagga cttgtttttg tttttgtttt gttgcactga agtttgataa atagtgttat 2640
tgagagagat gtgtaatttt tctgtataga caggagaaga aagaactatc ttcactctgag 2700

```

agaggctaaa atgttttcag ctaggaacaa atcttcctgg tcgaaagtta gtaggatatg 2760
 cctgctcttt ggccgatga ccaattttta cttagagctt ttttttttta attttgtctg 2820
 ccccaagttt tgtgaaatth ttcatattht aatttcaagc ttattttgga gagataggaa 2880
 ggtcatthtc atgtatgcat aataatcctg caaagtacag gtactttgtc taagaaacat 2940
 tggaagcagg ttaaatgtth tgtaaactht gaaatatatg gtctaagtth taagcagaat 3000
 tggaaaagac taagatcggg taacaaataa caactththt ttctththth cththgttht 3060
 ttgaagtgtt ggggtthgtt ththththth gagtctthth tththtaagt aaattthatt 3120
 aggaataata tgtgaaggac cttcactcta agatgttata tththcttaa aaagtaactc 3180
 ctagtagggg taccactgaa tctgtacaga gccgtaaaaa ctgaagttct gcctctgatg 3240
 tatththtga gththththt ttgaattthc atththacagt tactththct tgcatacaaa 3300
 caagcatata aaatggcaac aaactgcaca tgatttcaca aatattaaaa agtctththt 3360
 aaagtattgc caaacattaa tgttgatttc tagthththt thctgggaat gtatagtatt 3420
 tgaaaacaga aattggtacc ttgcacacat catctgtaag ctgththgtt ttaaaatact 3480
 gtagataatt aaccaaggta gaatgacctt gtaatgtaac tgctcttggg caatattctc 3540
 tgtacatatt agcgacaaca gattggattt tatgttgaca ththththgt tatagtgcaa 3600
 tataththgt atgcaagcag ththcaataaa gththgatct cctctgctaa attgatgttg 3660
 atgcaatcct tacaatgat tgctththaa atththtaagc aggaataaaa atctatagaa 3720
 agtgttctgt tacaatatgt aactgttacc attggaaatt tcacgtcata ggaagtttagc 3780
 cththcttac caactthcaa gaactgttht aataaagcga aaaactcaac caaatggtac 3840
 aaaaccacag tgtaccatta aaatatgcac taagtctctt ththtacaag gctgtattca 3900
 gcaaggcgct aacttgctta aatgtgaatt actaacttct aaaactgtac ththgattcac 3960
 atgtththcaa atggagttgg agttcattca tattacaata ththgtgtgt aaacgtgtat 4020
 gthththcagt tcaaagtcag gatgtththt aaatcttatt aaagththcaa aaatctgaag 4080
 attgtthtat tagatgtaaa thththththt aaagththcac ththtgaaaa gcaaaaaatt 4140

<210> 19

<211> 4348

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

acttccggtg gagggccgcc tctgagcggg cggcggggcg acggcgagcg cgggcggcgg 60
 cggtgacgga ggcgccgctg ccagggggcg tgcggcagcg cggcggcggc ggcggcggcg 120
 gcggcggcgg aggcggcggc ggccggcggc gcggcggcgg ctgggcctcg agcggccgca 180
 gcccacctct cgggggcggg ctcccggcgc tagcagggtc gaagagaaga tggaggagct 240
 ggtggtggaa gtgcggggct ccaatggcgc ththtacaag gcattthtaa aggatgttca 300
 tgaagattca ataacagttg catttgaaaa caactggcag cctgataggc agattccatt 360
 tcatgatgtc agattccac ctctgttagg ttataataaa gatataaatg aaagtatga 420
 agttgaggtg tattccagag caaatgaaaa agagccttgc tgttggtggt tagctaaagt 480
 gaggatgata aagggtgagt ththtattgat agaatatgca gcatgtgat caacttaca 540
 tgaaattgtc acaattgaac gtctaagatc tgthtaatcc acaaacctg ccacaaaaga 600

tactttccat aagatcaagc tggatgtgcc agaagactta cggcaaagtgt gtgccaaaga 660
 ggcggcacat aaggatttta aaaaggcagt tgggtgccttt tctgtaactt atgatccaga 720
 aaattatcag cttgtcattt tgtccatcaa tgaagtcacc tcaaagcgag cacatatgct 780
 gattgacatg cactttcgga gtctgcgcac taagttgtct ctgataatga gaaatgaaga 840
 agctagtaag cagctggaga gttcaaggca gcttgcctcg agatttcatg aacagtttat 900
 cgtaagagaa gatctgatgg gtctagctat tggtagctat ggtgctaata ttcagcaagc 960
 tagaaaagta cctgggggtca ctgctattga tctagatgaa gatacctgca catttcatat 1020
 ttatggagag gatcaggatg cagtgaaaaa agctagaagc tttctcgaat ttgctgaaga 1080
 tgtaatacaa gttccaagga acttagtagg caaagtaata ggaaaaaatg gaaagctgat 1140
 tcaggagatt gtggacaagt caggagttgt gagggtgagg attgaggctg aaaatgagaa 1200
 aaatgttcca caagaagagg aaattatgcc accaaattcc ctctcttcca ataattcaag 1260
 ggttggacct aatgccccag aagaaaaaaa acatttagat ataaaggaaa acagcaccca 1320
 tttttctcaa cctaacagta caaaagtcca gaggggtatg gtaccatttg tttttgtggg 1380
 aacaaaggac agcatcgcta atgccactgt tcttttggat tatcacctga actattttaa 1440
 ggaagtagac cagttgcgtt tggagagatt acaaattgat gagcagttgc gacagattgg 1500
 agctagttct agaccaccac caaatcgtac agataaggaa aaaagctatg tgactgatga 1560
 tggtaagga atgggtcgag gtagtagacc ttacagaaat agggggcacg gcagacgcgg 1620
 tcctggatat acttcaggaa ctaattctga agcatcaaat gcttctgaaa cagaatctga 1680
 ccacagagac gaactcagt attggtcatt agctccaaca gaggaagaga gggagagctt 1740
 cctgctcaga ggagacggac ggcggcgtgg agggggagga agaggacaag gaggaagagg 1800
 acgtggagga ggcttcaaag gaaacgacga tcactccga acagataatc gtccacgtaa 1860
 tccaagagag gctaaaggaa gaacaacaga tggatccctt cagatcagag ttgactgcaa 1920
 taatgaaagg agtgtccaca ctaaaacatt acagaatacc tccagtgaag gtagtcggct 1980
 gcgcacgggt aaagatcgta accagaagaa agagaagcca gacagcgtgg atggtcagca 2040
 accactcgtg aatggagtac cctaaactgc ataattctga agttatattt cctataccat 2100
 ttccgtaatt ctattccat attagaaaac tttgttaggc caaagacaaa tagtaggcaa 2160
 gatggcacag ggcatgaaat gaacacaaat tatgctaaga attttttatt ttttggattt 2220
 ggccataagc aacaattttc agatttgcac aaaaagatac cttaaaattt gaaacattgc 2280
 ttttaaaact acttagcact tcagggcaga ttttagtttt attttctaaa gtactgagca 2340
 gtgatattct ttgttaattt ggaccatttt cctgcattgg gtgatcattc accagtacat 2400
 tctcagtttt tcttaatata tagcatttat ggtaatcata ttagacttct gttttcaatc 2460
 tcgtatagaa gtcttcatga aatgctatgt catttcatgt cctgtgtcag tttatgtttt 2520
 ggtccacttt tccagtattt tagtggacce tgaaatgtgt gtgatgtgac atttgtcatt 2580
 ttcatagca aaaaaagttg tatgatctgt gcctttttta tatcttggca ggtaggaata 2640
 ttatatattg atgcagagtt cagggaagat aagttggaaa cactaaatgt taaagatgta 2700
 gcaaacctg tcaaacatta gtactttata gaagaatgca tgctttccat atttttttcc 2760
 ttacataaac atcaggttag gcagtataaa gaataggact tgtttttgtt tttgttttgt 2820
 tgcactgaag tttgataaat agtgttattg agagagatgt gtaatttttc tgtatagaca 2880
 ggagaagaaa gaactatctt catctgagag aggctaaaat gttttcagct aggaacaaat 2940

cttcctgggtc gaaagttagt aggatatgcc tgctcttttg cctgatgacc aattttaact 3000
 tagagctttt tttttttaat tttgtctgcc ccaagttttg tgaaattttt catattttaa 3060
 tttcaagcctt attttggaga gataggaagg tcatttccat gtatgcataa taatcctgca 3120
 aagtacaggt actttgtcta agaaacattg gaagcagggtt aaatgttttg taaactttga 3180
 aatatatggt ctaatgttta agcagaattg gaaaagacta agatcgggta acaaataaca 3240
 actttttttt ctttttttct tttgtttttt gaagtgttgg gggttggttt tgttttttga 3300
 gtcttttttt ttttaagtga atttattgag gaaaaatatg tgaaggacct tcaacttaag 3360
 atgttatatt tttcttaaaa agtaactcct agtaggggta ccactgaatc tgtacagagc 3420
 cgtaaaaaact gaagttctgc ctctgatgta ttttgtgagt ttgtttcttt gaattttcat 3480
 tttacagtta cttttccttg catacaaaa agcatataaa atggcaacaa actgcacatg 3540
 atttcacaaa tattaataaag tcttttaaaa agtattgcc aacattaatg ttgatttcta 3600
 gttatttatt ctgggaatgt atagtatttg aaaacagaaa ttggtacctt gcacacatca 3660
 tctgtaagct gtttggtttt aaaatactgt agataattaa ccaaggtaga atgacctgt 3720
 aatgtaactg ctcttgggca atattctctg tacatattag cgacaacaga ttggatttta 3780
 tgttgacatt tgtttggtta tagtgcaata tattttgtat gcaagcagtt tcaataaagt 3840
 ttgatcttcc tctgctaaat tgatgttgat gcaatcctta caaatgattg cttttaaaat 3900
 ttttaagctag gaaaagaaat ctatagaaa tgttctgtta caaatgtaa ctgttaccat 3960
 tggaaatttc acgtcatagg aagttagcct ttatctacca actttcaaga acttgtttaa 4020
 taaagcgaaa aactcaacca aatggtacaa aaccacagtg taccattaaa atatgcacta 4080
 agtctctttt ttacaaaggc tgtattcagc aaggcgctaa cttgcttaaa tgtgaattac 4140
 taacttctaa aactgtactt tgattcacat gttttcaaat ggagttggag ttcatcata 4200
 ttacaatatt tgtgtgctaa acgtgtatgt ttttcagttc aaagtcatga tgtttttaaa 4260
 atcttattaa agtttcaaaa atctgaagat tgtttatcta gatgtaaatt tttattaaaa 4320
 agttgcactt atgaaaaagc aaaaaatt 4348

<210> 20

<211> 4107

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

ctcagtcagg cgctcagctc cgtttcgggtt tcaattccgg tggagggccg cctctgagcg 60
 ggcggcgggc cgacggcgag cgcgggcggc ggcggtgacg gaggcgccgc tgccaggggg 120
 cgtgcggcag cgcggcgggc gcggcgggcg cggcgggcggc ggaggcgggc gcggcgggcg 180
 cggcgggcggc ggctgggcct cgagcgcccc cagcccacct ctcggggggc ggctcccggc 240
 gctagcaggg ctgaagagaa gatggaggag ctggtggtgg aagtgcgggg ctccaatggc 300
 gctttctaca aggcatthgt aaaggatggt catgaagatt caataacagt tgcatttgaa 360
 aacaactggc agcctgatag gcagattcca tttcatgatg tcagattccc acctcctgta 420
 gggtataata aagatataaa tgaaagtgat gaagttgagg tgtattccag agcaaatgaa 480
 aaagagcctt gctgttggtg gtttagctaaa gtgaggatga taaagggtga gttttatgtg 540
 atagaatatg cagcatgtga tgcaacttac aatgaaattg tcacaattga acgtctaaga 600

```

tctgttaatc ccaacaaacc tgccacaaaa gatactttcc ataagatcaa gctggatgtg 660
ccagaagact tacggcaa at gtgtgccaaa gaggcggcac ataaggattt taaaaaggca 720
gttgggtgcct tttctgtaac ttatgatcca gaaaattatc agcttgtcat tttgtccatc 780
aatgaagtca cctcaaagcg agcacatatg ctgattgaca tgcactttcg gagtctgcgc 840
actaagttgt ctctgataat gagaaatgaa gaagctagta agcagctgga gagttcaagg 900
cagcttgccct cgagatttca tgaacagttt atcgtaagag aagatctgat gggcttagct 960
attgggtactc atgggtgctaa tattcagcaa gctagaaaag tacctggggg cactgctatt 1020
gatctagatg aagataacctg cacatttcat atttatggag aggatcagga tgcagtga aa 1080
aaagctagaa gcttttctcg atttgctgaa gatgtaatac aagttccaag gaacttagta 1140
ggcaaagtaa taggaaaaaa tggaaagctg attcaggaga ttgtggacaa gtcaggagtt 1200
gtgagggtga ggattgagcg tga aaatgag aaaaatgttc cacaagaaga ggaaattatg 1260
ccaccaaaatt cccttccttc caataattca agggttggac ctaatgcccc agaagaaaaa 1320
aaacatttag atataaagga aaacagcacc catttttctc aacctaacag taaaaagtc 1380
cagaggggta tgggtaccatt tgtttttgtg ggaacaaagg acagcatcgc taatgccact 1440
gttcttttgg attatcacct gaactattta aagctccaac agaggaagag agggagagct 1500
tcctgcgcag aggagacgga cggcggcgtg gagggggagg aagaggacaa ggaggaagag 1560
gacgtggagg aggcctcaaa ggaaacgacg atcactcccc aacagataat cgtccacgta 1620
atccaagaga ggctaaagga agaacaacag atggatccct tcagatcaga gttgactgca 1680
ataatgaaag gagtgtccac actaaaacat tacagaatac ctccagtga ggtagtcggc 1740
tgcgcacggg taaagatcgt aaccagaaga aagagaagcc agacagcgtg gatggtcagc 1800
aaccactcgt gaatggagta ccctaaactg cataattctg aagttatatt tcctatacca 1860
tttccgtaat tcttattcca tattagaaaa ctttgtagg ccaaagacaa atagtaggca 1920
agatggcaca gggcatgaaa tgaacacaaa ttatgctaag aattttttat tttttggtat 1980
tgGCCataag caacaatttt cagatttgca caaaaagata ccttaaaatt tgaacattg 2040
cttttaaaac tacttagcac ttcagggcag attttagttt ttttttctaa agtactgagc 2100
agtgatattc tttgttaatt tggaccattt tcctgcattg ggtgatcatt caccagtaca 2160
ttctcagttt ttcttaatat atagcattta tggtaatcat attagacttc tgttttcaat 2220
ctcgtataga agtcttcatg aaatgctatg tcatttcatg tcctgtgtca gtttatgttt 2280
tggtccactt ttccagtatt ttagtggacc ctgaaatgtg tgtgatgtga catttgtcat 2340
tttcattagc aaaaaaagtt gtatgatctg tgctttttt atatcttggc aggtaggaat 2400
attatatattg gatgcagagt tcagggaaga taagttggaa aactaaatg ttaaagatgt 2460
agcaaaccct gtcaaacatt agtactttat agaagaatgc atgctttcca ttttttttc 2520
cttacataaa catcaggtta ggcagtataa agaataggac ttgtttttgt ttttgttttg 2580
ttgcactgaa gtttgataaa tagtgttatt gagagagatg tgtaattttt ctgtatagac 2640
aggagaagaa agaactatct tcatctgaga gaggctaaaa tgttttcagc taggaacaaa 2700
tcttcctggc cgaaagttag taggatatgc ctgctctttg gcctgatgac caattttaac 2760
ttagagcttt ttttttttaa ttttgtctgc cccaagtttt gtgaaatttt tcatatttta 2820
atttcaagct ttttttgag agataggaag gtcatttcca tgtatgcata ataactctgc 2880
aaagtacagg tactttgtct aagaaacatt ggaagcaggt taaatgtttt gtaaactttg 2940

```

aaatatatgg tctaattgttt aagcagaatt ggaaaagact aagatcgggtt aacaaataac 3000
 aactttttttt tctttttttc ttttgttttt tgaagtgttg gggtttggtt ttgttttttg 3060
 agtcctttttt ttttaagtga aattttattga ggaaaaatat gtgaaggacc ttcactctaa 3120
 gatgttatat ttttcttaaa aagtaactcc tagtaggggt accactgaat ctgtacagag 3180
 ccgtaaaaac tgaagtcttg cctctgatgt attttgtgag tttgtttctt tgaattttca 3240
 ttttacagtt acttttcctt gcatacaaac aagcatataa aatggcaaca aactgcacat 3300
 gatttcacaa atattaaaaa gtcttttaaa aagtattgcc aaacattaat gttgattttct 3360
 agttattttat tctgggaatg tatagtatatt gaaaacagaa attggtacct tgcacacatc 3420
 atctgtaagc tgtttggttt taaaatactg tagataatta accaaggtag aatgaccttg 3480
 taatgtaact gctcttgggc aatattctct gtacatatta gcgacaacag attggatttt 3540
 atgttgacat ttgtttggtt atagtgcatt atattttgta tgcaagcagt ttcaataaag 3600
 tttgatcttc ctctgctaaa ttgatgttga tgcaatcctt acaaatgatt gcttttaaaa 3660
 ttttaagcta ggaaaagaaa tctatagaaa gtgttctgtt acaaaatgta actgttacca 3720
 ttggaaattt cacgtcatag gaagttagcc tttatctacc aactttcaag aacttgttta 3780
 ataaagcgaa aaactcaacc aaatggtaca aaaccacagt gtaccattaa aatatgcact 3840
 aagtcctttt ttacaaaagg ctgtattcag caaggcgcta acttgcttaa atgtgaatta 3900
 ctaacttcta aaactgtact ttgattcaca tgttttcaaa tggagttgga gttcattcat 3960
 attacaatat ttgtgtgcta aacgtgtatg tttttcagtt caaagtcatt atgtttttta 4020
 aatcttatta aagtttcaaa aatctgaaga ttgtttatct agatgtaaatt ttttattaaa 4080
 aagttgcact tatgaaaaag caaaaaa 4107

<210> 21

<211> 4303

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21

ctcagtcagg cgctcagctc cgtttcgggtt tcacttccgg tggagggccg cctctgagcg 60
 ggcggcgggc cgacggcgag cgcgggcggc ggcggtgacg gaggcgccgc tgccaggggg 120
 cgtgcggcag cgcggcggcg gcggcgggcg cgcgggcggc ggagggcgcg gcggcgggcg 180
 cggcgggcgc ggctgggcct cgagcgcccc cagcccacct ctcgggggcg ggctcccggc 240
 gctagcaggg ctgaagagaa gatggaggag ctggtggttg aagtgcgggg ctccaatggc 300
 gctttctaca aggcatttgt aaaggatgtt catgaagatt caataacagt tgcatttgaa 360
 aacaactggc agcctgatag gcagattcca tttcatgatg tcagattccc acctcctgta 420
 gggtataata aagatataaa tgaaagtgat gaagttgagg tgtattccag agcaaataaa 480
 aaagagcctt gctgttggtg gtttagctaaa gtgaggatga taaagggtga gttttatgtg 540
 atagaatatg cagcatgtga tgcaacttac aatgaaattg tcacaattga acgtctaaga 600
 tctgttaatc ccaacaaacc tgccacaaaa gatactttcc ataagatcaa gctggatgtg 660
 ccagaagact tacggcaaat gtgtgcaaaa gaggcggcac ataaggattt taaaaaggca 720
 gttggtgcct tttctgtaac ttatgatcca gaaaattatc agcttgatcat tttgtccatc 780
 aatgaagtca cctcaaagcg agcacatatg ctgattgaca tgcactttcg gagtctgcgc 840

actaagttgt ctctgataat gagaaatgaa gaagctagta agcagctgga gagttcaagg 900
 cagcttgccct cgagatttca tgaacagttt atcgtaagag aagatctgat gggcttagct 960
 attggtactc atgggtgctaa tattcagcaa gctagaaaag tacctggggt cactgctatt 1020
 gatctagatg aagatacctg cacatttcat atttatggag aggatcagga tgcagtgaaa 1080
 aaagctagaa gcttttctcga atttgctgaa gatgtaatac aagttccaag gaacttagta 1140
 ggcaaagtaa taggaaaaaa tggaaagctg attcaggaga ttgtggacaa gtcaggagtt 1200
 gtgagggtga ggattgaggc tgaaaatgag aaaaatgttc cacaagaaga ggaaattatg 1260
 ccaccaaatt cccttccttc caataattca agggttggac ctaatgcccc agaagaaaaa 1320
 aaacatttag atataaagga aaacagcacc cttttttctc aacctaacag taaaaagtc 1380
 cagaggggta tggtagcatt tgtttttgtg ggaacaaagg acagcatcgc taatgccact 1440
 gttcttttgg attatcacct gaactattta aaggaagtag accagttgcg tttggagaga 1500
 ttacaaattg atgagcagtt gcgacagatt ggagctagtt ctagaccacc accaaatcgt 1560
 acagataagg aaaaaagcta tgtgactgat gatggtcaag gaatgggtcg aggtagtaga 1620
 ccttacagaa atagggggca cggcagacgc ggtcctggat atacttcagc tccaacagag 1680
 gaagagaggg agagcttcct gcgacagagga gacggacggc ggcgtggagg gggaggaaga 1740
 ggacaaggag gaagaggacg tggaggaggc ttcaaaggaa acgacgatca ctcccgaaca 1800
 gataatcgtc cacgtaatcc aagagaggct aaaggaagaa caacagatgg atcccttcag 1860
 atcagagttg actgcaataa tgaaaggagt gtccacacta aaacattaca gaatacctcc 1920
 agtgaaggta gtcggctgcg cacgggtaaa gatcgtaacc agaagaaaga gaagccagac 1980
 agcgtggatg gtcagcaacc actcgtgaat ggagtaccct aaactgcata attctgaagt 2040
 tataatttcct ataccatttc cgtaattctt attccatatt agaaaacttt gttaggccaa 2100
 agacaaatag taggcaagat ggcacagggc atgaaatgaa cacaattat gctaagaatt 2160
 ttttatTTTT tggtagtggc cataagcaac aattttcaga tttgcacaaa aagatacctt 2220
 aaaatttgaa acattgcttt taaaactact tagcattca gggcagattt tagttttatt 2280
 ttctaaagta ctgagcagtg atattctttg ttaatttggc ccattttcct gcattgggtg 2340
 atcattcacc agtacattct cagtttttct taatatatag ctttatgggt aatcatatta 2400
 gacttctgtt ttcaatctcg tatagaagtc ttcatgaaat gctatgtcat ttcatgtcct 2460
 gtgtcagttt atgttttggc ccacttttcc agtattttag tggaccctga aatgtgtgtg 2520
 atgtgacatt tgtcattttc attagcaaaa aaagttgtat gatctgtgcc ttttttatat 2580
 cttggcaggt aggaatatta ttttggatg cagagttcag ggaagataag ttggaaacac 2640
 taaatgttaa agatgtagca aacctgtca aacattagta ctttatagaa gaatgcatgc 2700
 tttccatatt tttttcctta cataaacatc aggttaggca gtataaagaa taggacttgt 2760
 ttttgTTTT gttttgttgc actgaagttt gataaatagt gttattgaga gagatgtgta 2820
 atttttctgt atagacagga gaagaaagaa ctatcttcat ctgagagagg ctaaaatgtt 2880
 ttcagctagg aacaaatctt cctggtcgaa agttagtagg atatgcctgc tctttggcct 2940
 gatgaccaat tttaacttag agcttttttt ttttaatttt gtctgcccc agttttgtga 3000
 aatttttcat attttaattt caagcttatt ttggagagat aggaaggtca tttccatgta 3060
 tgcataataa tcctgcaaag tacaggtact ttgtctaaga aacattggaa gcaggttaaa 3120
 tgTTTTgtaa actttgaaat atatggtcta atgtttaagc agaattggaa aagactaaga 3180

tcggttaaca aataacaact tttttttctt tttttctttt gttttttgaa gtgttgggg 3240
 ttggttttgt tttttgagtc tttttttttt aagtgaattt tattgaggaa aaatatgtga 3300
 aggaccttca ctctaagatg ttatatTTTT cttaaaaagt aactcctagt aggggtacca 3360
 ctgaatctgt acagagccgt aaaaactgaa gttctgcctc tgatgtatTT tgtgagtttg 3420
 tttctttgaa ttttcatTTT acagttactt ttccttgcat acaaacaagc atataaaatg 3480
 gcaacaaact gcacatgatt tcacaaatat taaaaagtct tttaaaaagt attgccaaac 3540
 attaagtgtg atttctagtt atttattctg ggaatgtata gtatttgaaa acagaaattg 3600
 gtaccttgca cacatcatct gtaagctgtt tgggttttaa atactgtaga taattaacca 3660
 aggtagaatg accttgtaat gtaactgctc ttgggcaata ttctctgtac atattagcga 3720
 caacagattg gattttatgt tgacatttgt ttggttatag tgcaatatat tttgtatgca 3780
 agcagtttca ataaagtttg atcttctctc gctaaattga tgttgatgca atccttaca 3840
 atgattgctt ttaaaatttt aagctaggaa aagaaatcta tagaaagtgt tctgttaca 3900
 aatgtaactg ttaccattgg aaatttcacg tcataggaag ttagccttta tctaccaact 3960
 ttcaagaact tgtttaataa agcgaaaaac tcaaccaaat ggtacaaaac cacagtgtac 4020
 cattaaaata tgcactaagt ctctttttta caaaggctgt attcagcaag gcgctaactt 4080
 gcttaaagt gaattactaa cttctaaaac tgtactttga ttcacatgtt ttcaaatgga 4140
 gttggagttc attcatatta caatatttgt gtgctaaacg tgtatgtttt tcagttcaaa 4200
 gtcatgatgt ttttaaaatc ttattaaagt ttcaaaaatc tgaagattgt ttatctagat 4260
 gtaatttttt attaaaaagt tgcacttatg aaaaagcaaa aaa 4303

<210> 22

<211> 4441

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 22

ctcagtcagg cgctcagctc cgtttcgggt tcacttccgg tggaggggccg cctctgagcg 60
 ggcggcgggc cgacggcgag cgcgggcggc ggcggtgacg gaggcgccgc tgccaggggg 120
 cgtgcggcag cgcggcggcg gcggcgggcg cggcgggcggc ggaggcggcg gcggcgggcg 180
 cggcgggcg gcgtgggcct cgagcgcccg cagcccacct ctcgggggcg ggctcccggc 240
 gctagcaggg ctgaagagaa gatggaggag ctggtggtgg aagtgcgggg ctccaatggc 300
 gctttctaca aggcatttgt aaaggatgtt catgaagatt caataacagt tgcatttgaa 360
 aacaactggc agcctgatag gcagattcca tttcatgatg tcagattccc acctcctgta 420
 gggtataata aagatataaa tgaaagtgat gaagttgagg tgtattccag agcaaatgaa 480
 aaagagcctt gctgttggtg gttagctaaa gtgaggatga taaagggtga gttttatgtg 540
 atagaatatg cagcatgtga tgcaacttac aatgaaattg tcacaattga acgtctaaga 600
 tctgttaatc ccaacaaacc tgccacaaaa gatactttcc ataagatcaa gctggatgtg 660
 ccagaagact tacggcaaat gtgtgccaaa gaggcggcac ataaggattt taaaaaggca 720
 gttgggtgct tttctgtaac ttatgatcca gaaaattatc agcttgatcat tttgtccatc 780
 aatgaagtca cctcaaagcg agcacatatg ctgattgaca tgcactttcg gagtctgcgc 840
 actaagttgt ctctgataat gagaaatgaa gaagctagta agcagctgga gagttcaagg 900

cagcttgcct cgagatttca tgaacagttt atcgtaagag aagatctgat gggcttagct 960
 attggtactc atggtgctaa tattcagcaa gctagaaaag tacctggggt cactgctatt 1020
 gatctagatg aagataacctg cacatttcat atttatggag aggatcagga tgcagtgaaa 1080
 aaagctagaa gctttctcga atttgctgaa gatgtaatac aagttccaag gaacttagta 1140
 ggcaaagtaa taggaaaaaa tggaaagctg attcaggaga ttgtggacaa gtcaggagtt 1200
 gtgagggtga ggattgaggc tgaaaatgag aaaaatgttc cacaagaaga ggaattatg 1260
 ccaccaaaatt cccttccttc caataattca agggttggac ctaatgcccc agaagaaaaa 1320
 aaacatttag atataaaagga aaacagcacc catttttctc aacctaacag taaaaagtc 1380
 cagagggtgt tagtggcttc atcagttgta gcaggggaat cccagaaacc tgaactcaag 1440
 gcttggcagg gtatggtacc atttgttttt gtgggaacaa aggacagcat cgctaattgcc 1500
 actgttcttt tggattatca cctgaactat ttaaaggaag tagaccagtt gcgtttggag 1560
 agattacaaa ttgatgagca gttgcgacag attggagcta gttctagacc accaccaaat 1620
 cgtacagata aggaaaaaag ctatgtgact gatgatggtc aaggaatggg tcgaggtagt 1680
 agaccttaca gaaatagggg gcacggcaga cgcggtcctg gatatacttc aggaactaat 1740
 tctgaagcat caaatgcttc tgaaacagaa tctgaccaca gagacgaact cagtgattgg 1800
 tcattagctc caacagagga agagaggag agcttcctgc gcagaggaga cggacggcgg 1860
 cgtggagggg gaggaagagg acaaggagga agaggacgtg gaggaggctt caaaggaaac 1920
 gacgatcact cccgaacaga taatcgtcca cgtaatccaa gagaggctaa aggaagaaca 1980
 acagatggat cccttcagat cagagttgac tgcaataatg aaaggagtgt ccacactaaa 2040
 acattacaga atacctccag tgaaggtagt cggctgcgca cgggtaaaga tcgtaaccag 2100
 aagaaagaga agccagacag cgtggatggc cagcaaccac tcgtgaatgg agtaccctaa 2160
 actgcataat tctgaagtta tatttcctat accatttccg taattcttat tccatattag 2220
 aaaactttgt taggccaaag acaaatagta ggcaagatgg cacaggcat gaaatgaaca 2280
 caaattatgc taagaatttt ttattttttg gtattggcca taagcaacaa ttttcagatt 2340
 tgcacaaaaa gataccttaa aatttgaaac attgctttta aaactactta gcatttcagg 2400
 gcagatttta gttttatttt cttaaagtact gagcagtgat attctttgtt aatttggacc 2460
 attttcctgc attgggtgat cattcaccag tacattctca gtttttctta atatatagca 2520
 tttatggtaa tcatattaga cttctgtttt caatctcgta tagaagtctt catgaaatgc 2580
 tatgtcattt catgtcctgt gtcagtttat gttttggccc acttttccag tatttttagtg 2640
 gacctgaaa tgtgtgtgat gtgacatttg tcattttcat tagcaaaaaa agttgtatga 2700
 tctgtgcctt ttttatatct tggcaggtag gaatattata tttggatgca gaggttcagg 2760
 aagataagtt ggaaacacta aatgttaaag atgtagcaaa ccctgtcaaa cattagtact 2820
 ttatagaaga atgcatgctt tccatatttt tttccttaca taaacatcag gttaggcagt 2880
 ataaagaata ggacttgctt ttgtttttgt tttgttgac tgaagtttga taaatagtgt 2940
 tattgagaga gatgtgtaat ttttctgtat agacaggaga agaaagaact atcttcatct 3000
 gagagaggct aaaaatgttt cagctaggaa caaatcttc tggtcgaaag ttagtaggat 3060
 atgcctgctc tttggcctga tgaccaattt taacttagag cttttttttt ttaattttgt 3120
 ctgccccaaag ttttgtgaaa ttttcatat tttaatttca agcttatttt ggagagatag 3180
 gaaggtcatt tccatgtatg cataataatc ctgcaaagta caggtacttt gtctaagaaa 3240

cattggaagc aggttaaagc ttttgtaaac tttgaaatat atggtctaata gtttaagcag 3300
aattggaaaa gactaagatc ggtaacaaa taacaacttt tttttctttt tttcttttgt 3360
tttttgaagt gttgggggtt ggttttgtt tttgagtctt ttttttttaa gtgaaattta 3420
ttgaggaaaa atatgtgaag gaccttcact ctaagatgtt atatttttct taaaaagtaa 3480
ctcctagtag ggggtaccact gaatctgtac agagccgtaa aaactgaagt tctgcctctg 3540
atgtattttg tgagtttggt tctttgaatt ttcattttac agttactttt ccttgcatat 3600
aaacaagcat ataaaaatggc aacaaactgc acatgatttc acaaataata aaaagtcttt 3660
taaaaaagtat tgccaaacat taatgttgat ttctagttat ttattctggg aatgtatagt 3720
atttgaaaac agaaattggg acctgcaca catcatctgt aagctgtttg gttttaaaat 3780
actgtagata attaaccaag gtagaatgac cttgtaatgt aactgctctt gggcaatatt 3840
ctctgtacat attagcgaca acagattgga ttttatgttg acatttggtt ggttatagtg 3900
caatatatgt tgtatgcaag cagtttcaat aaagtttgat cttcctctgc taaattgatg 3960
ttgatgcaat ccttacaagt gattgctttt aaaattttta gctaggaaaa gaaatctata 4020
gaaagtgttc tgttacaaaa tgtaactgtt accattggaa atttcacgtc ataggaagtt 4080
agcctttatc taccaacttt caagaacttg ttttaataag cgaaaaactc aaccaaatgg 4140
tacaaaacca cagtgtacca ttaaaatatg cactaagtct cttttttaca aaggctgtat 4200
tcagcaaggc gctaacttgc ttaaatgtga attactaact tctaaaactg tactttgatt 4260
cacatgtttt caaatggagt tggagttcat tcatattaca atatttggtg gctaaacgtg 4320
tatgtttttc agttcaaagt catgatgtt ttaaaatctt attaaagttt caaaaatctg 4380
aagattgttt atctagatgt aaatttttat taaaaagttg cacttatgaa aaagcaaaaa 4440
a 4441

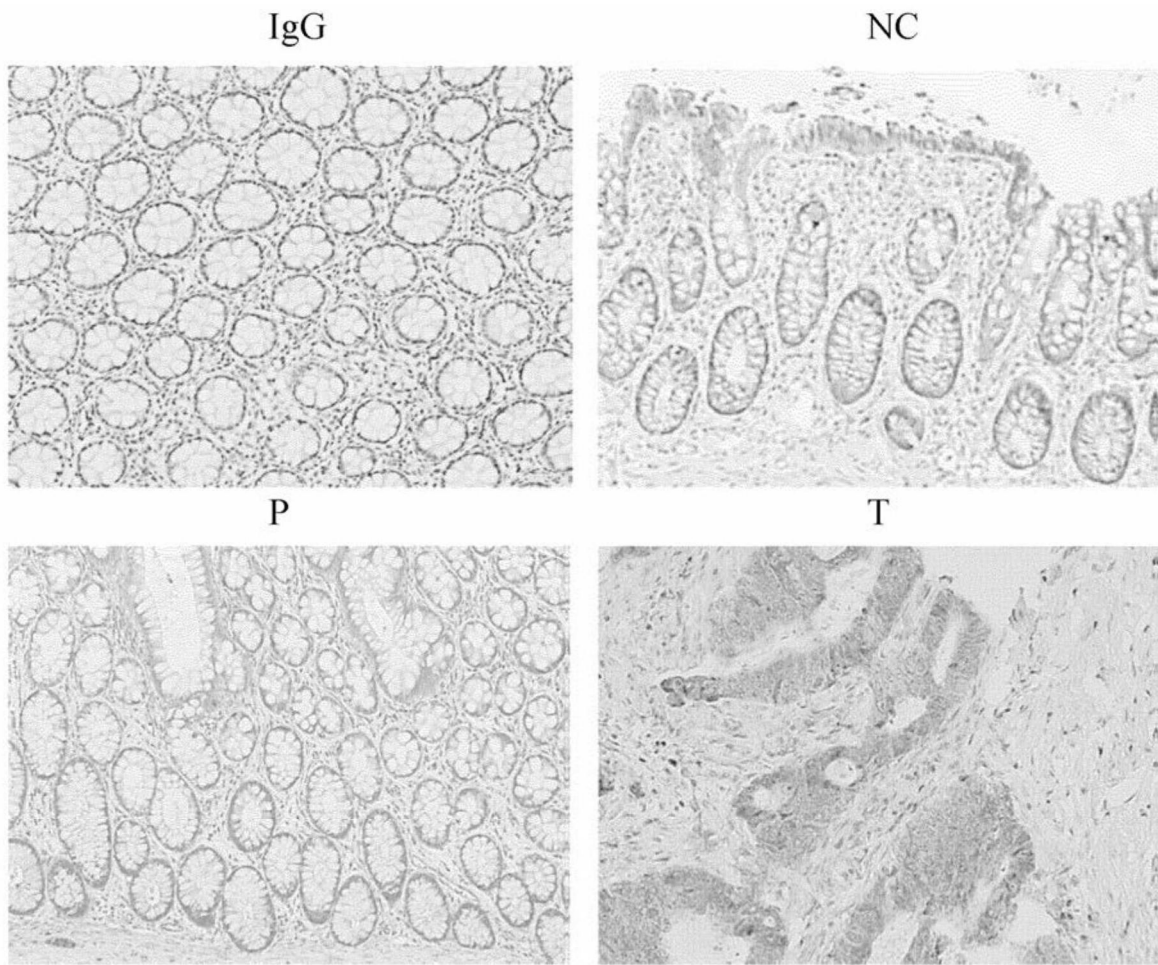


图1A

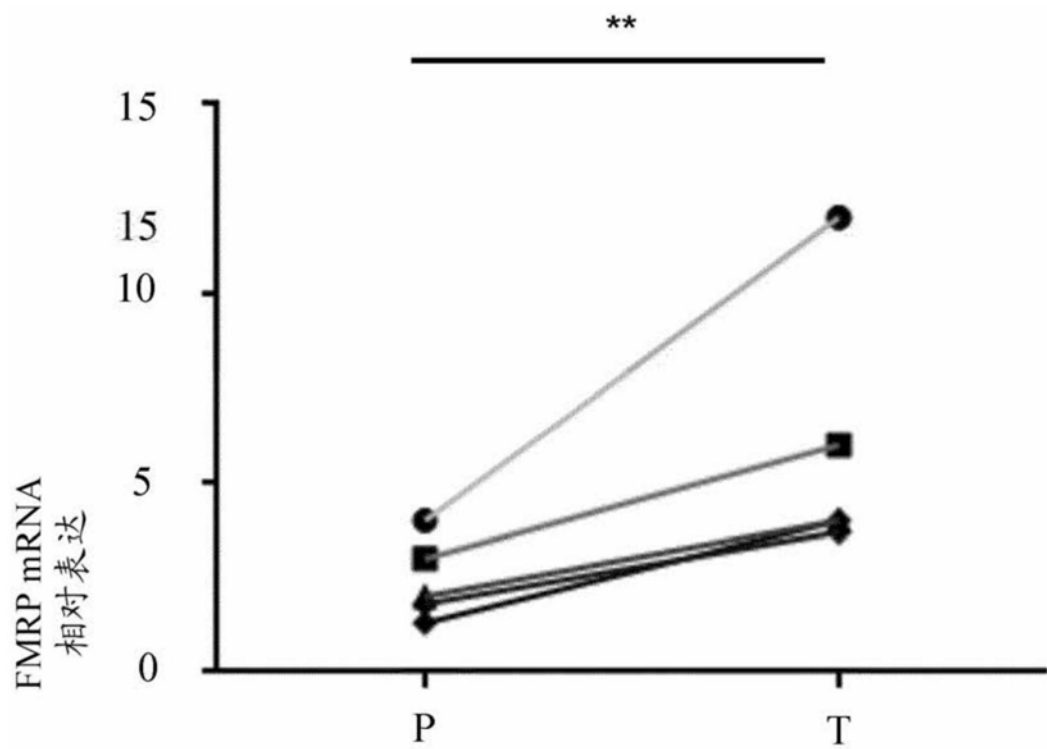


图1B

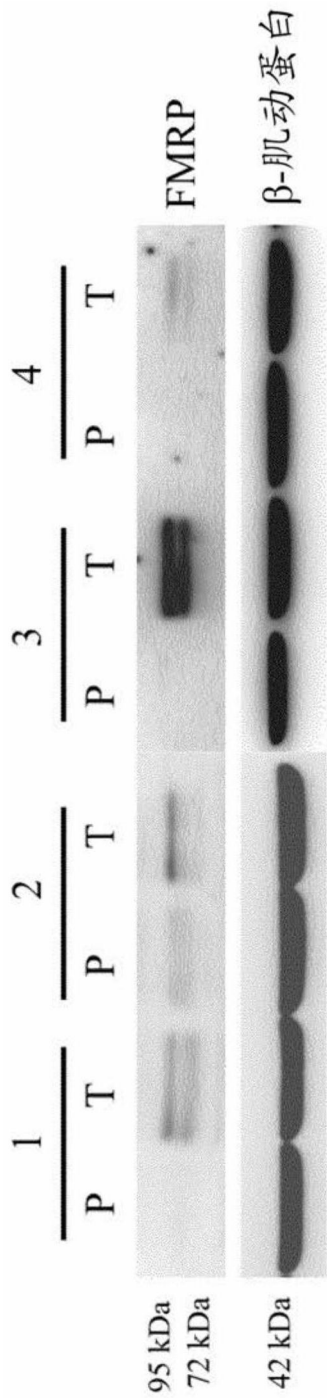


图1C

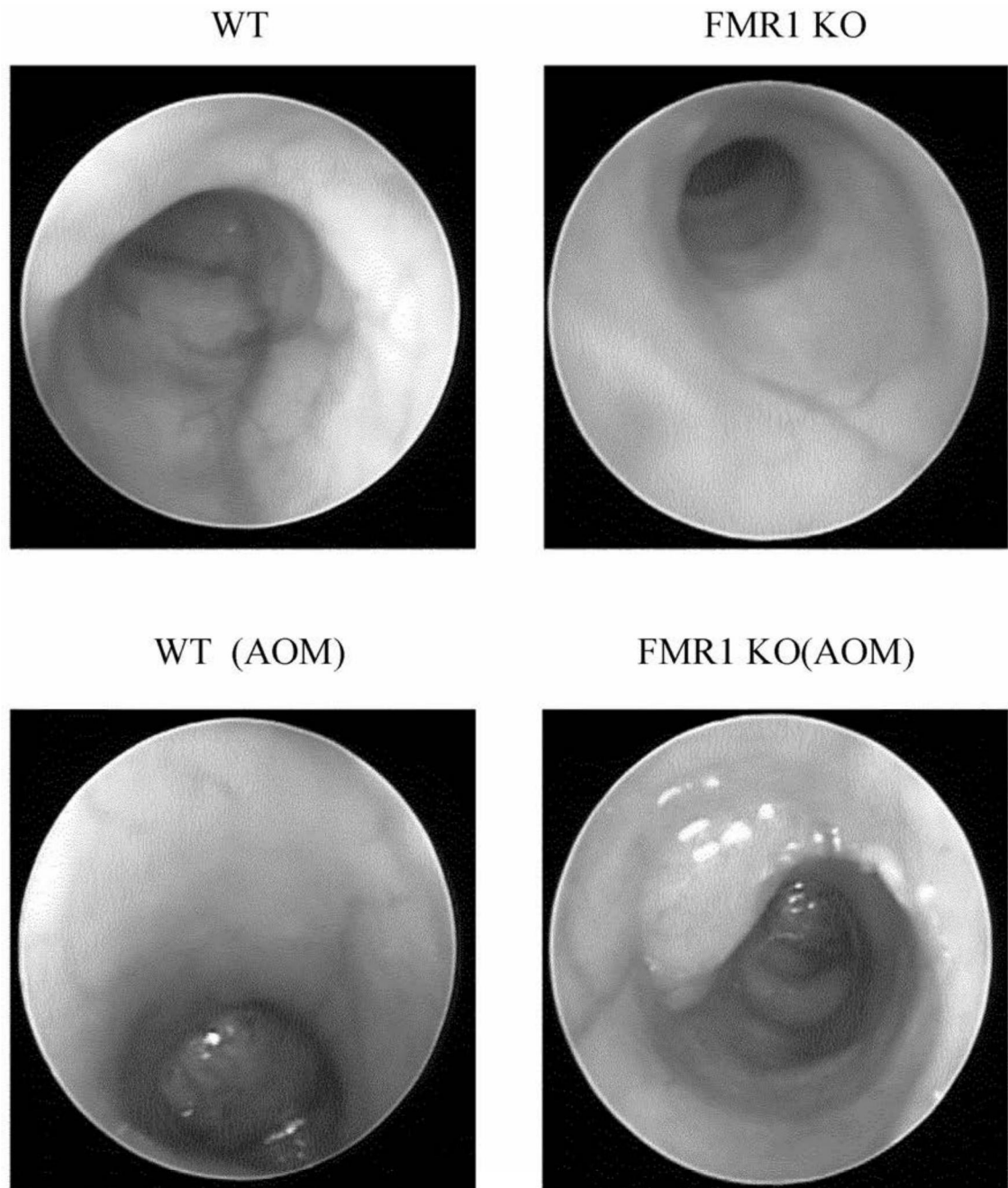


图2A

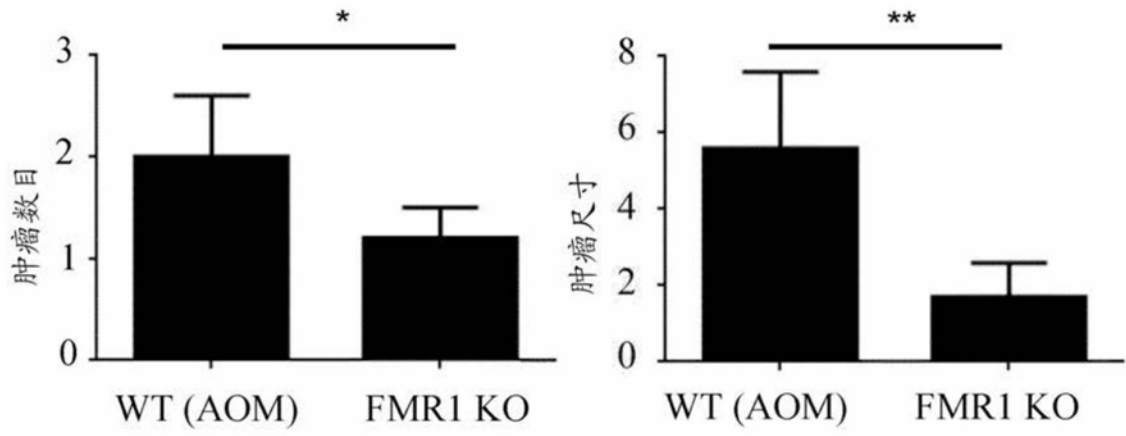


图2B

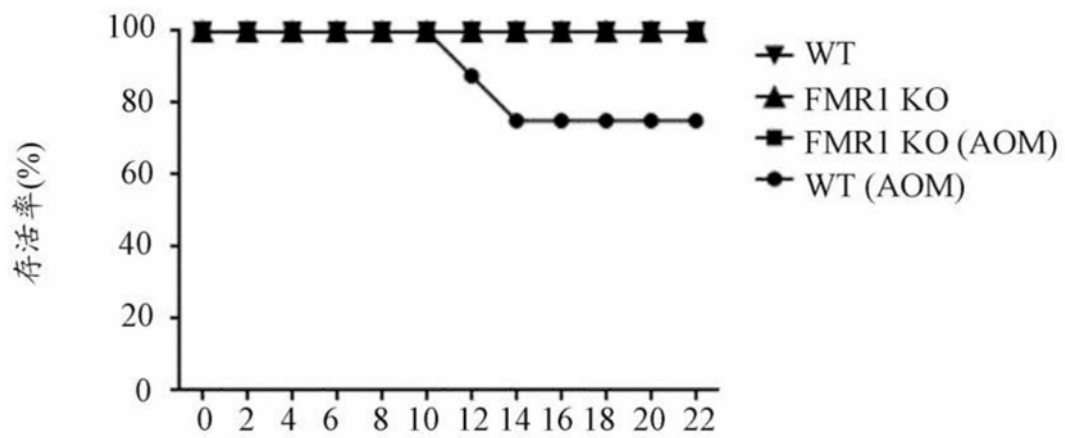


图2C

WT (AOM) 肿瘤

FMR1 KO (AOM) 肿瘤

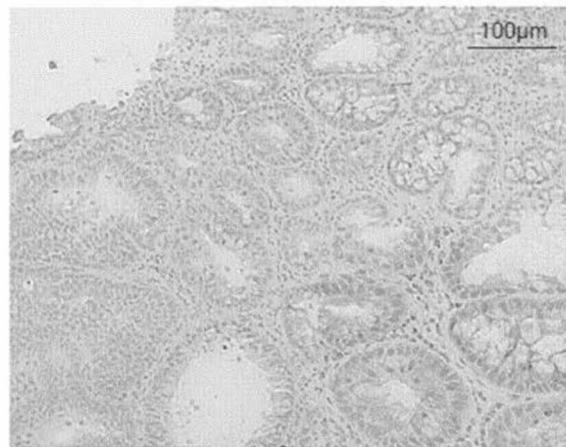
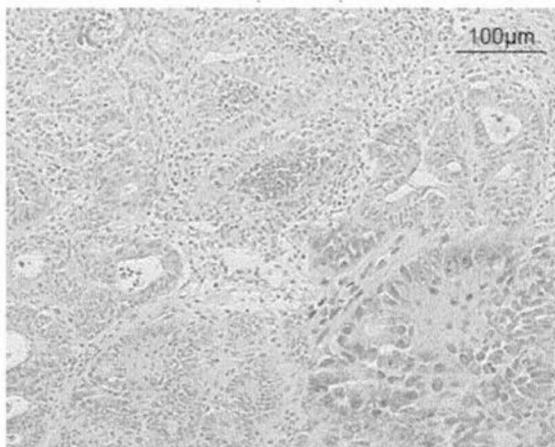


图2D

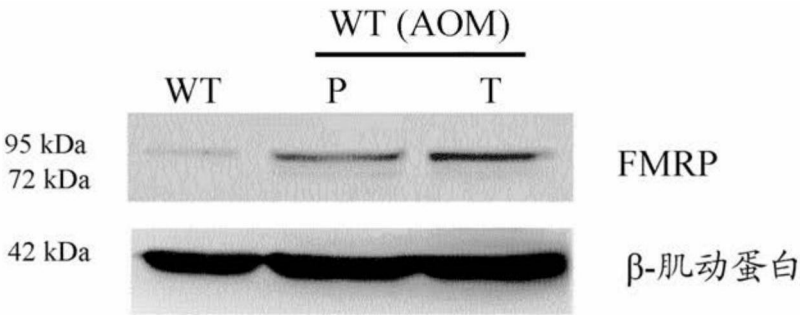


图2E

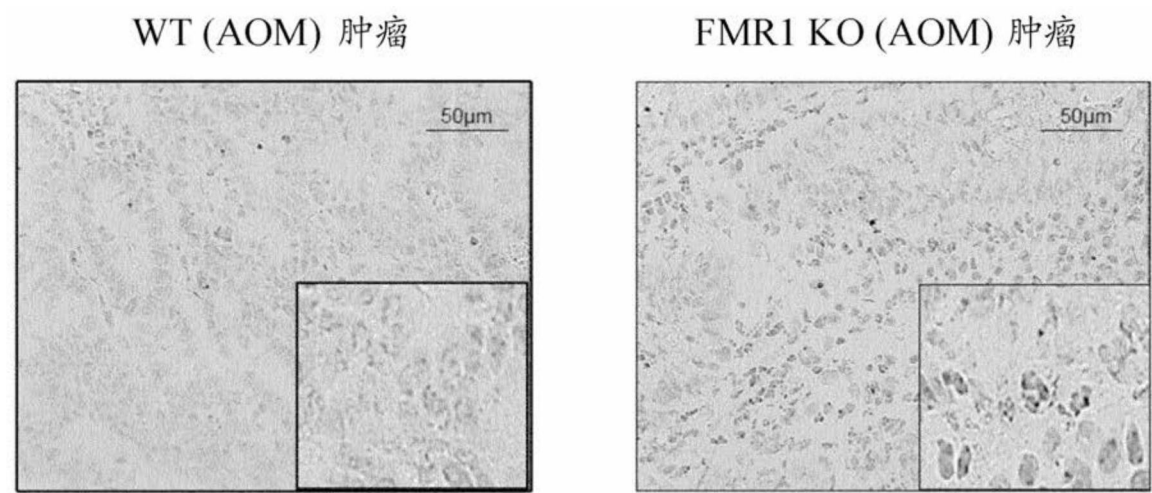


图2F

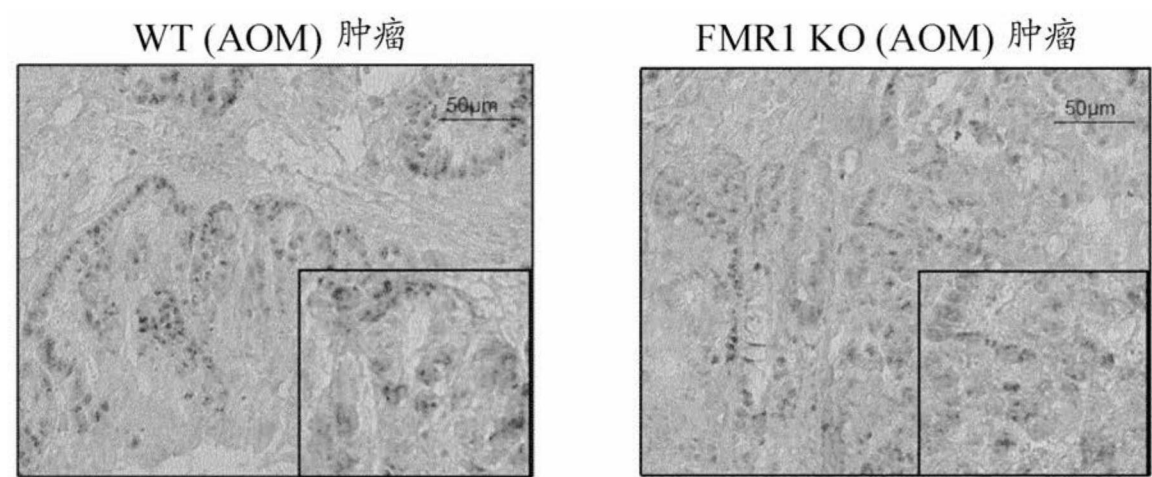


图2G

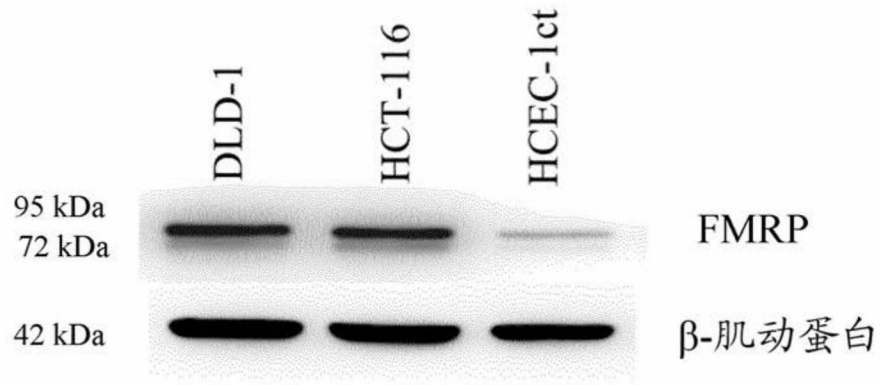


图3A

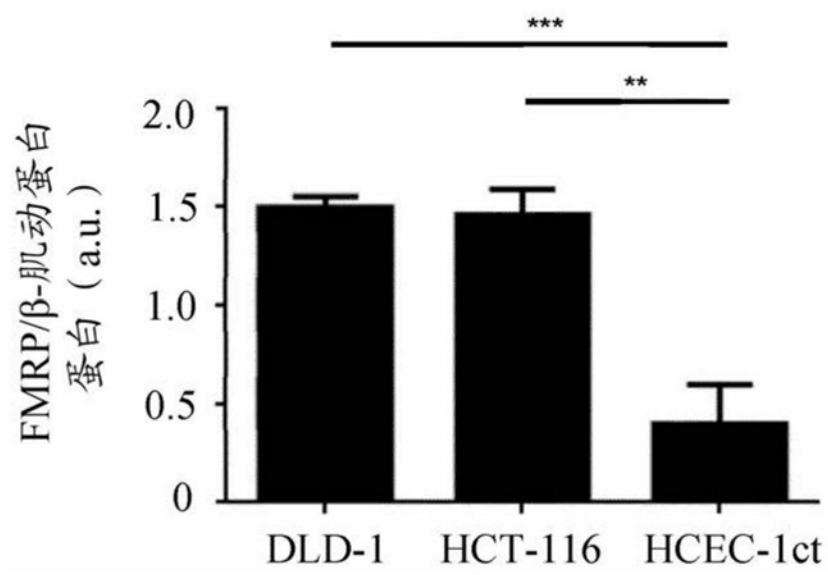


图3B

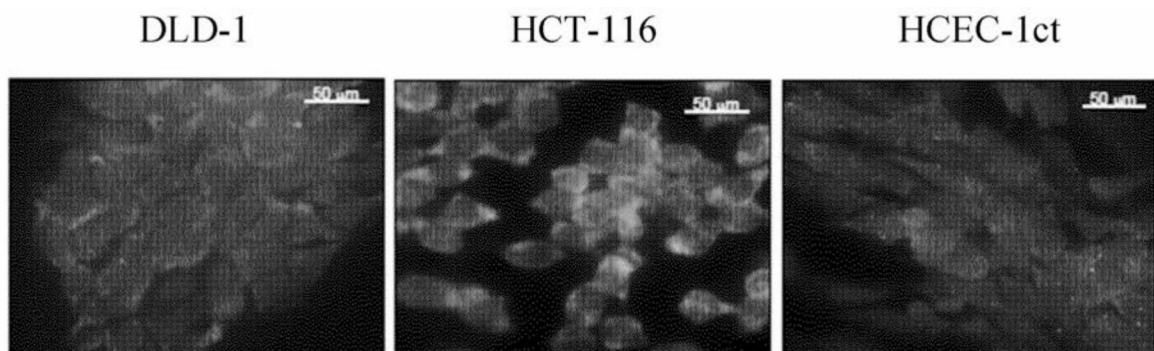


图3C

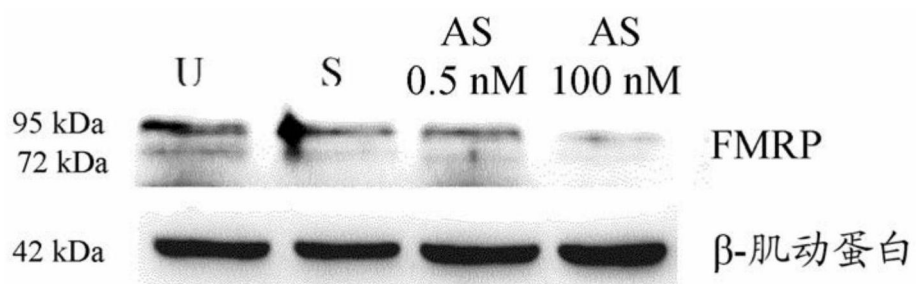


图3D

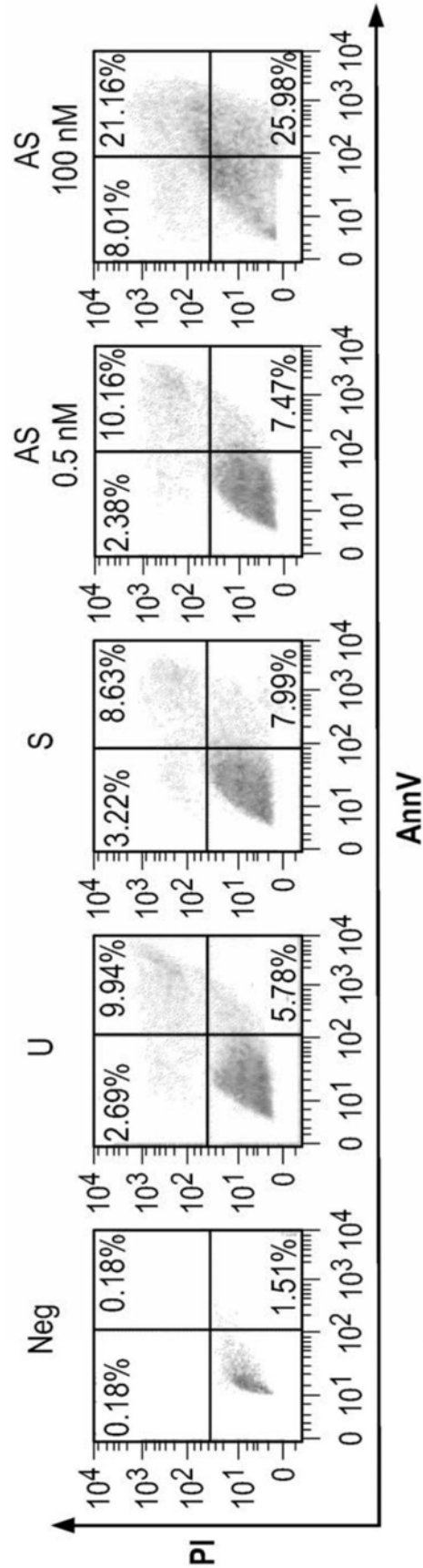


图3E

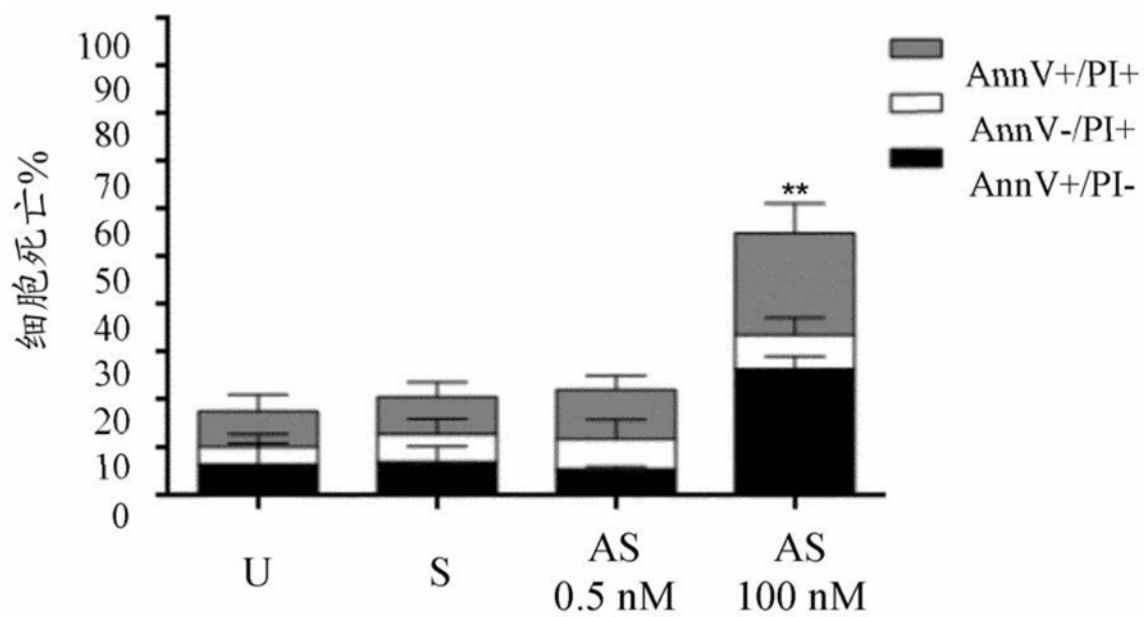


图3F

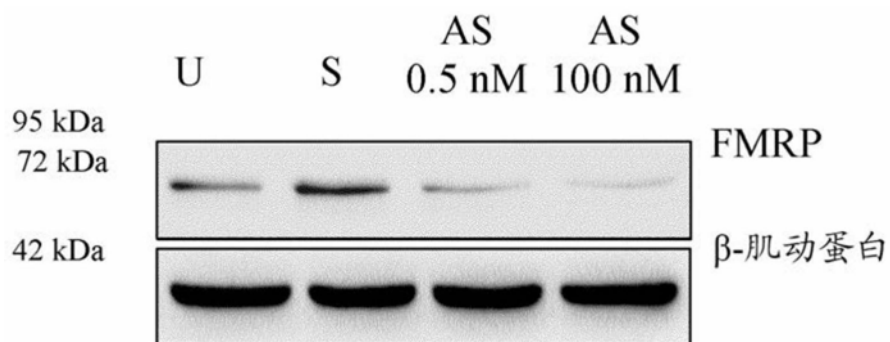


图3G

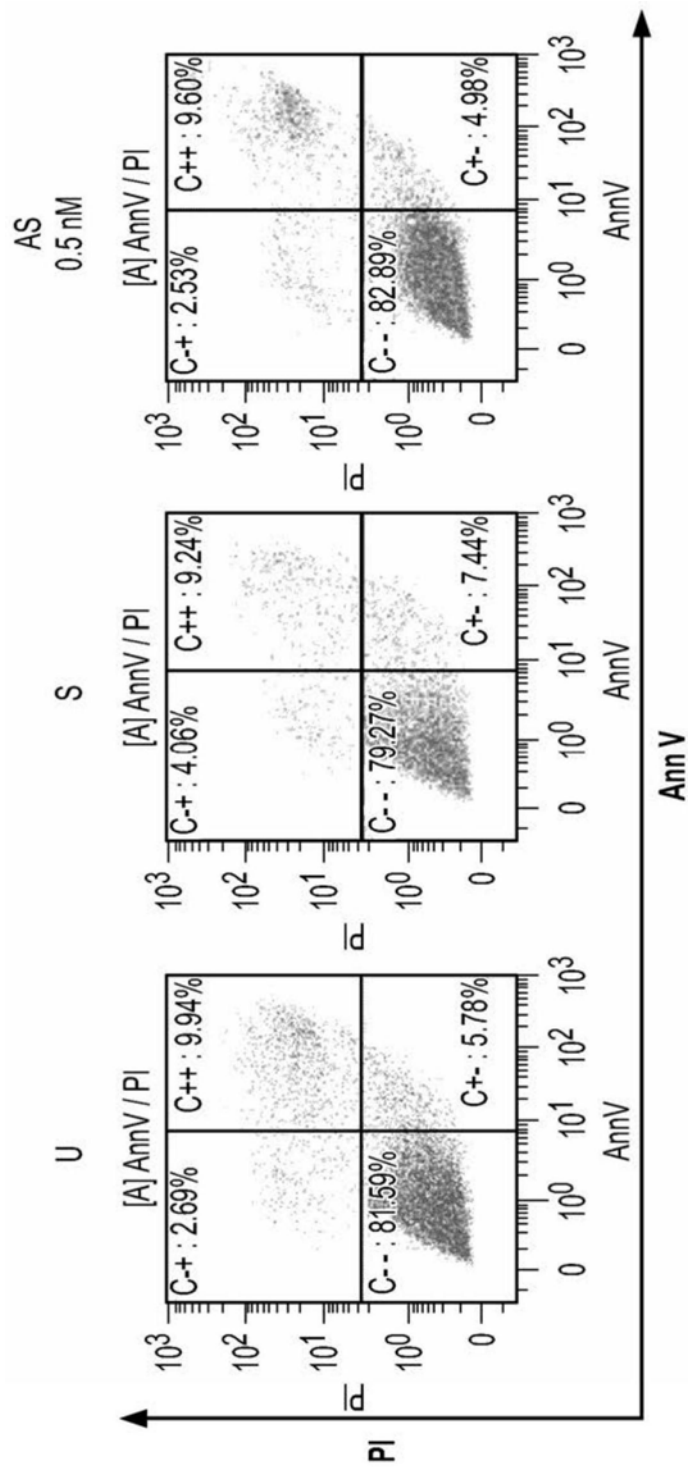


图3H

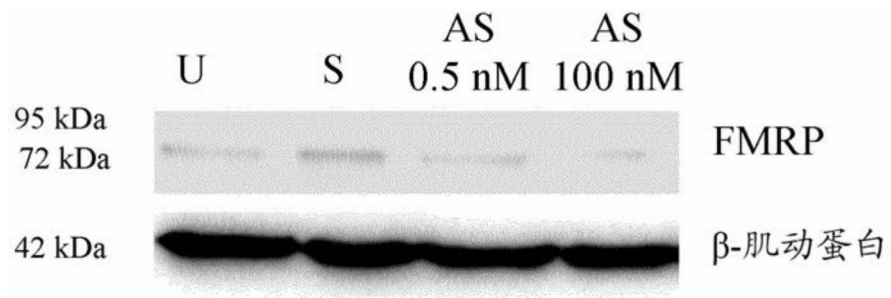


图3I

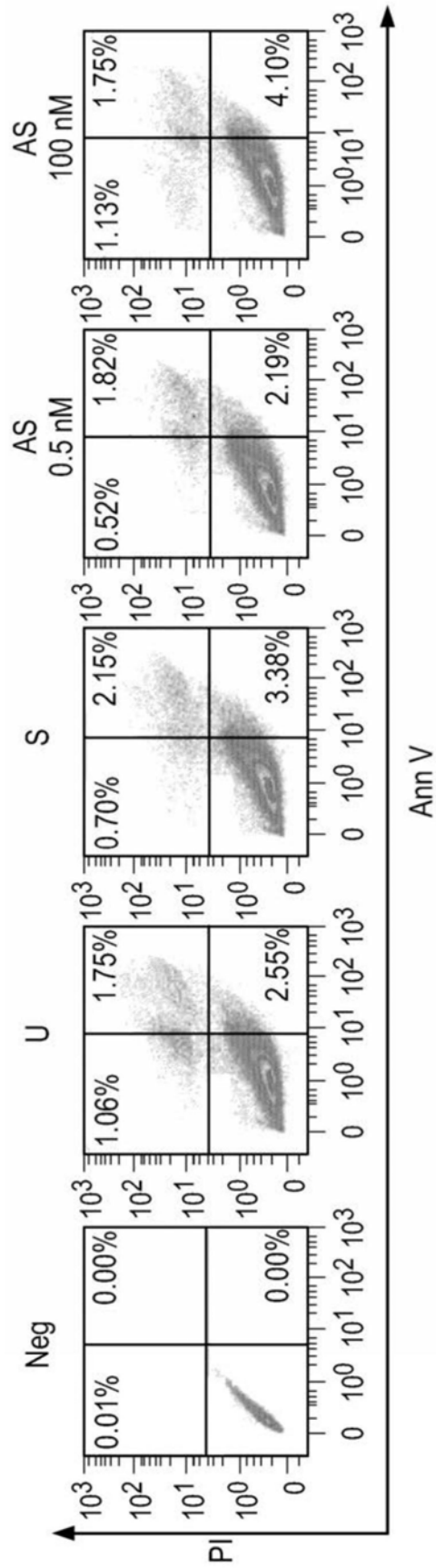


图3J

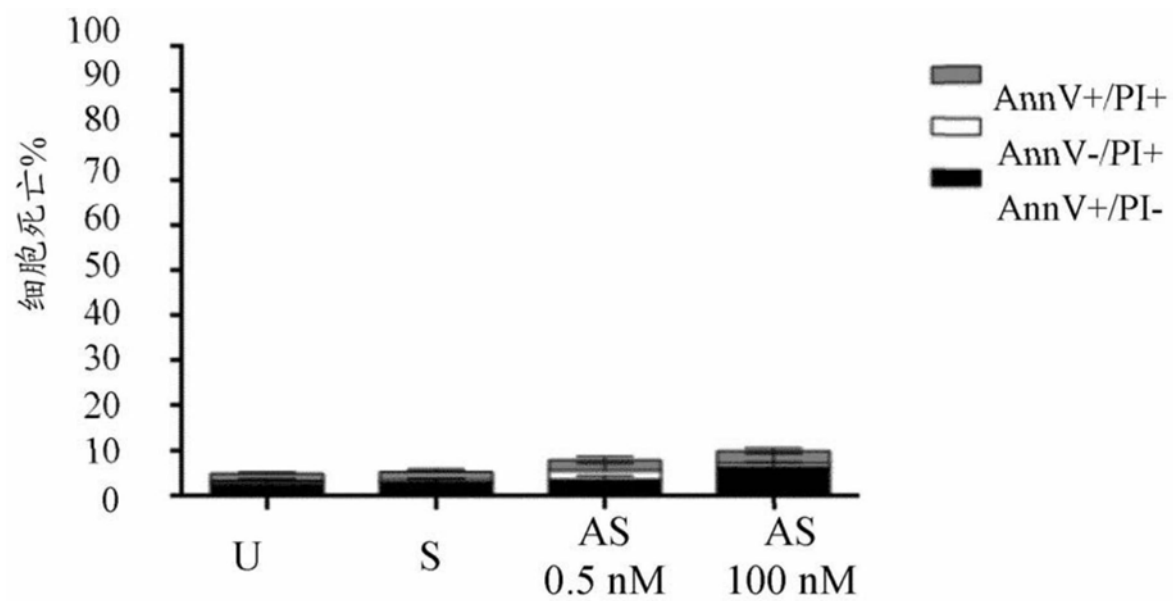


图3K

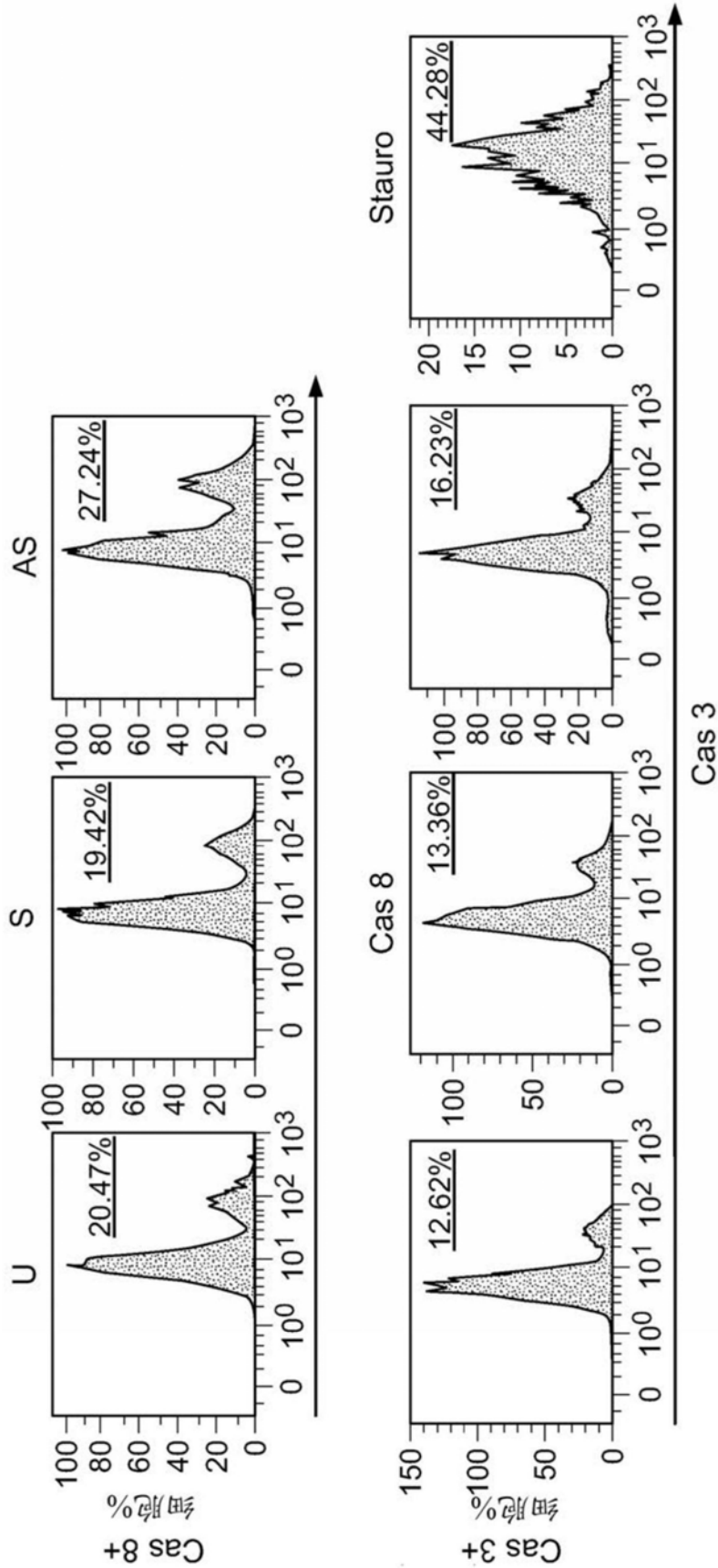


图4A

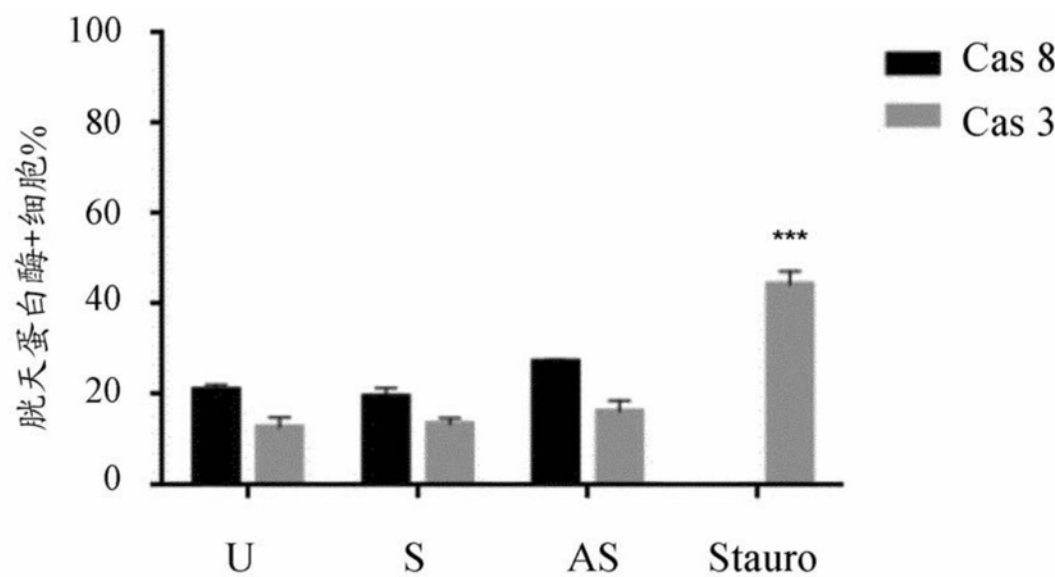


图4B

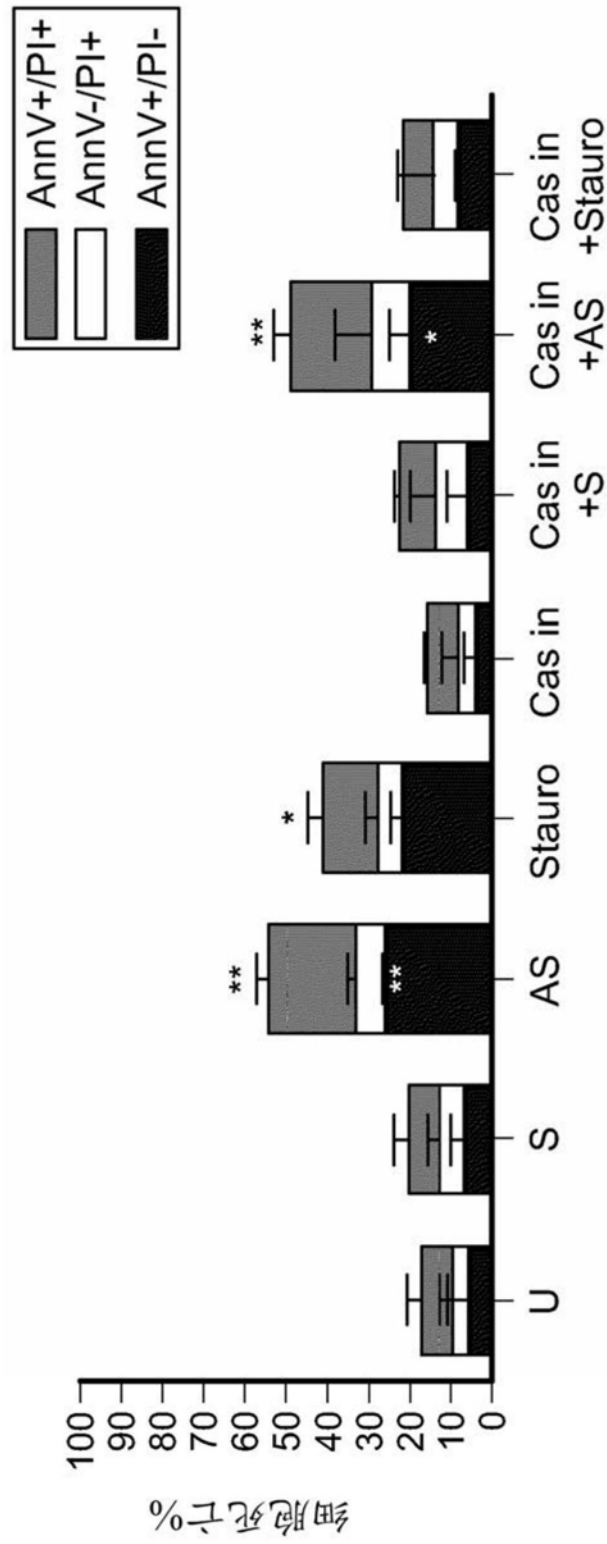


图4C

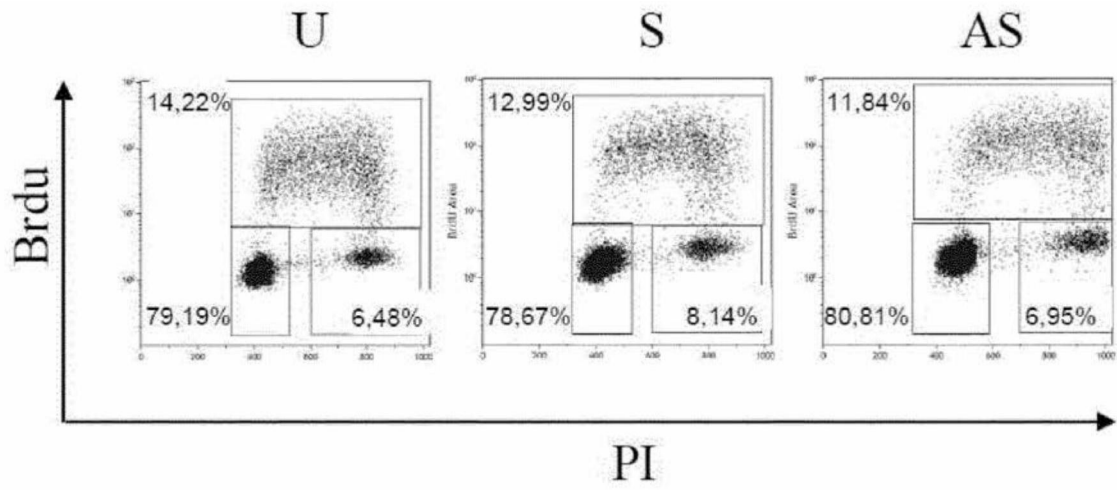


图4D

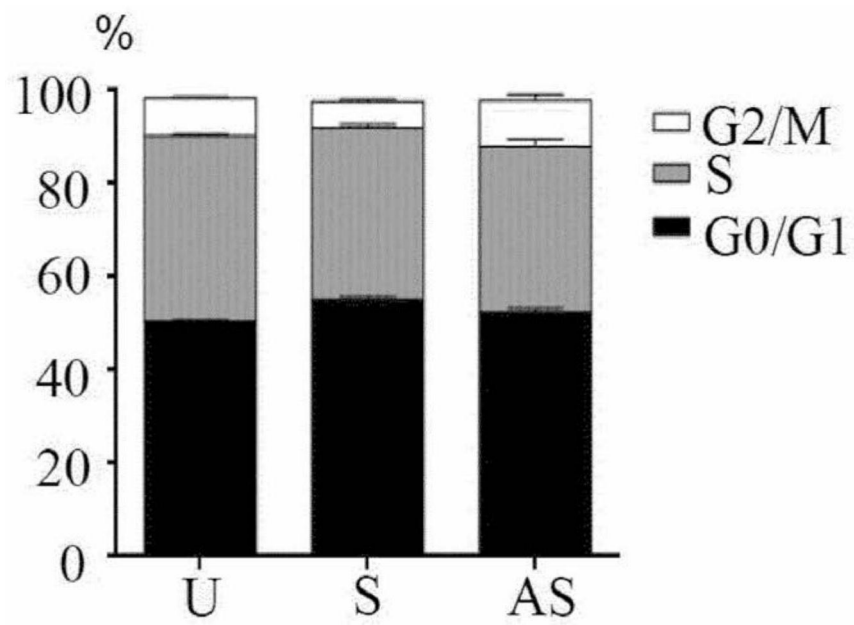


图4E

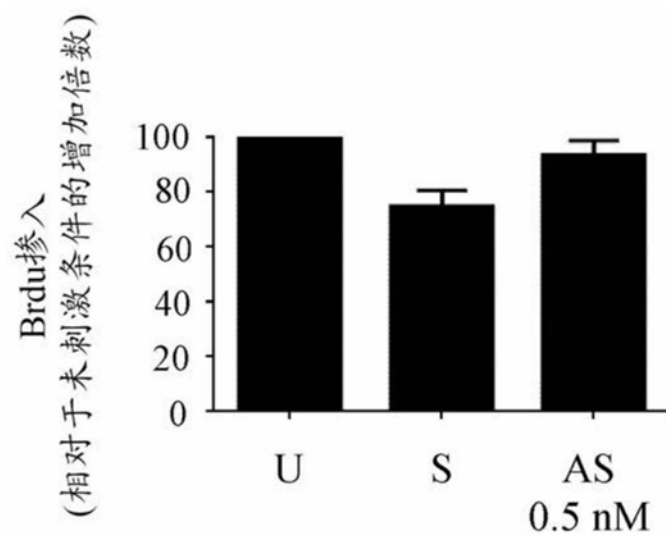


图4F

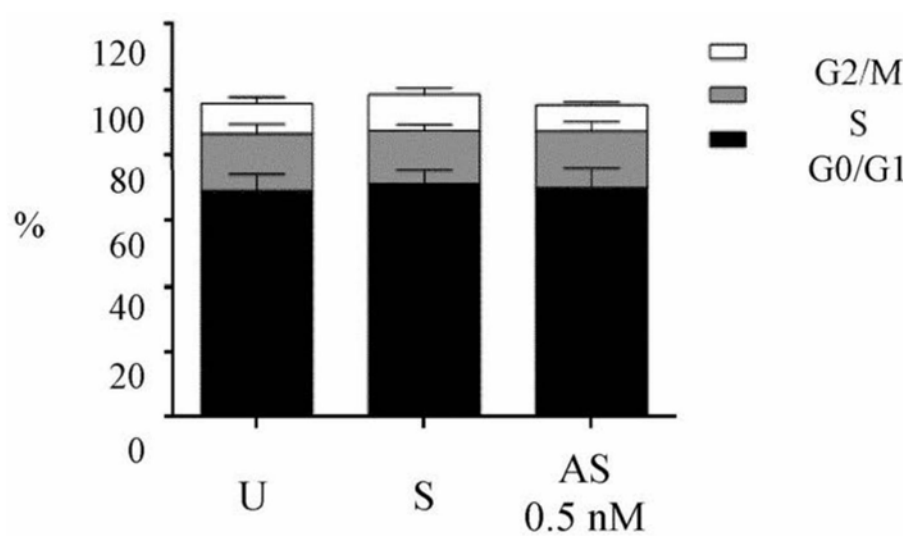


图4G

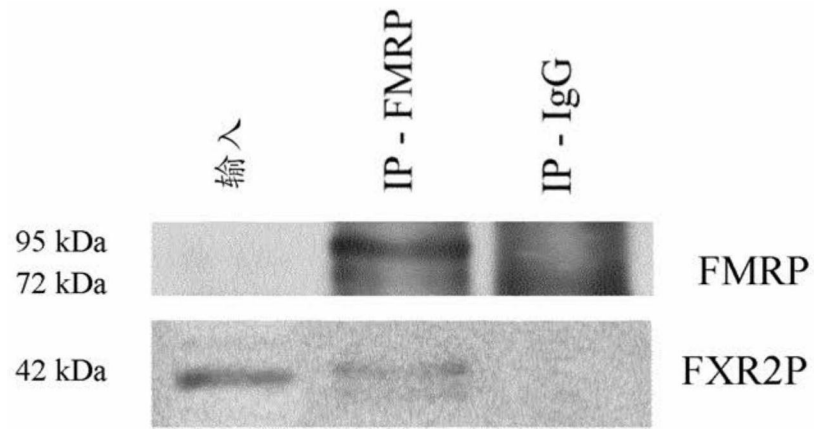


图5A

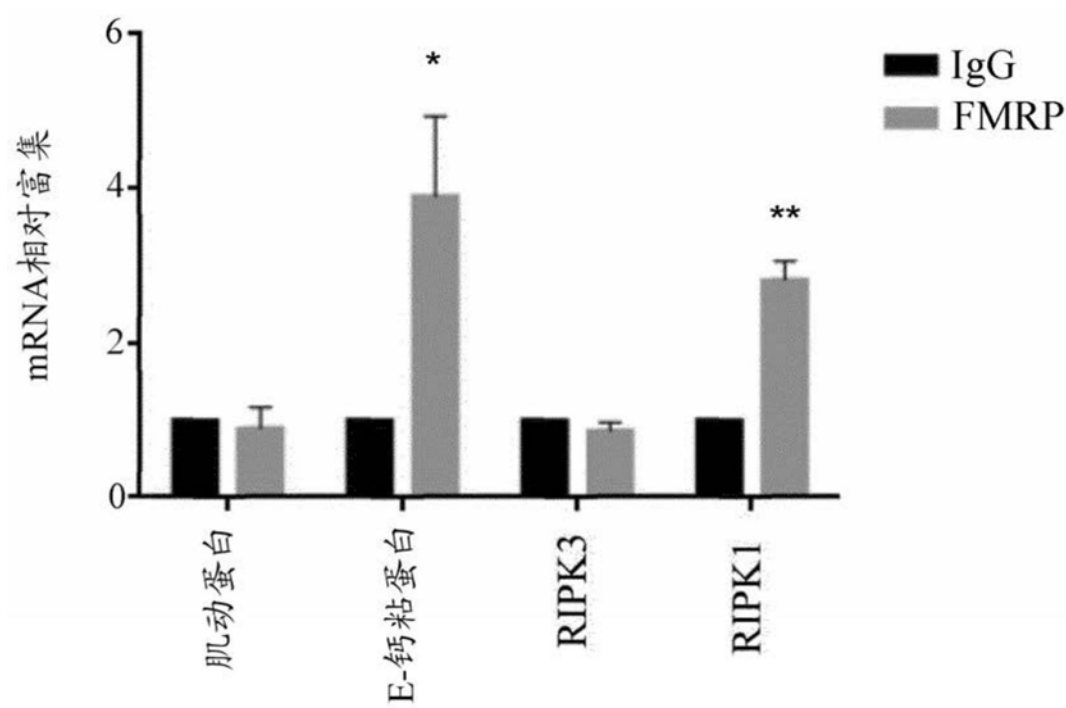


图5B

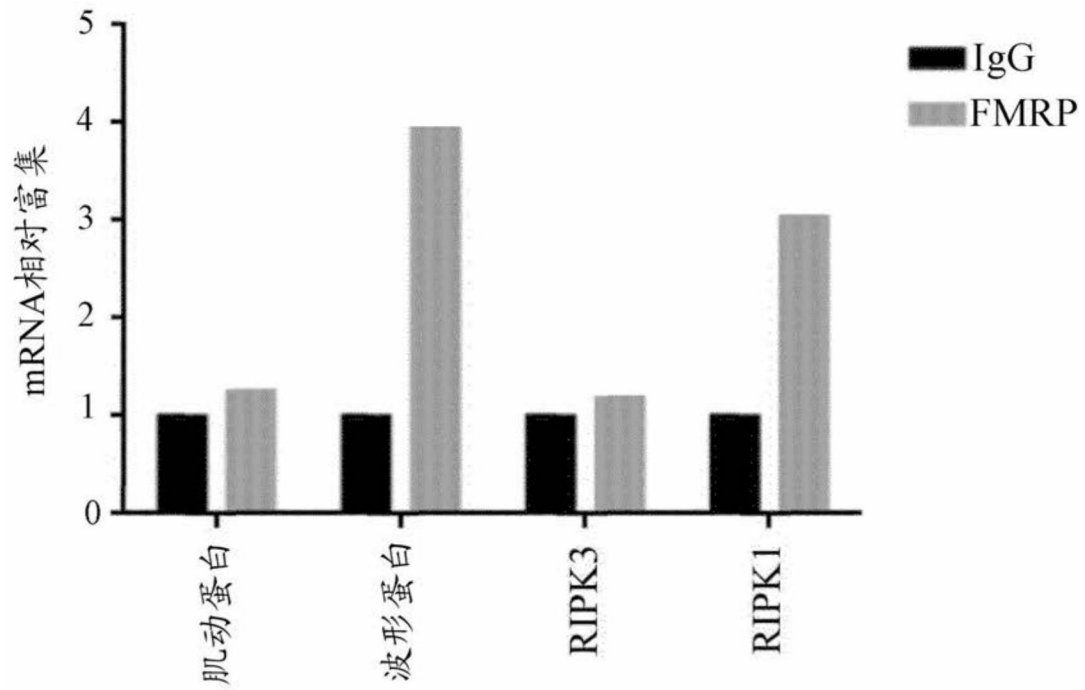


图5C

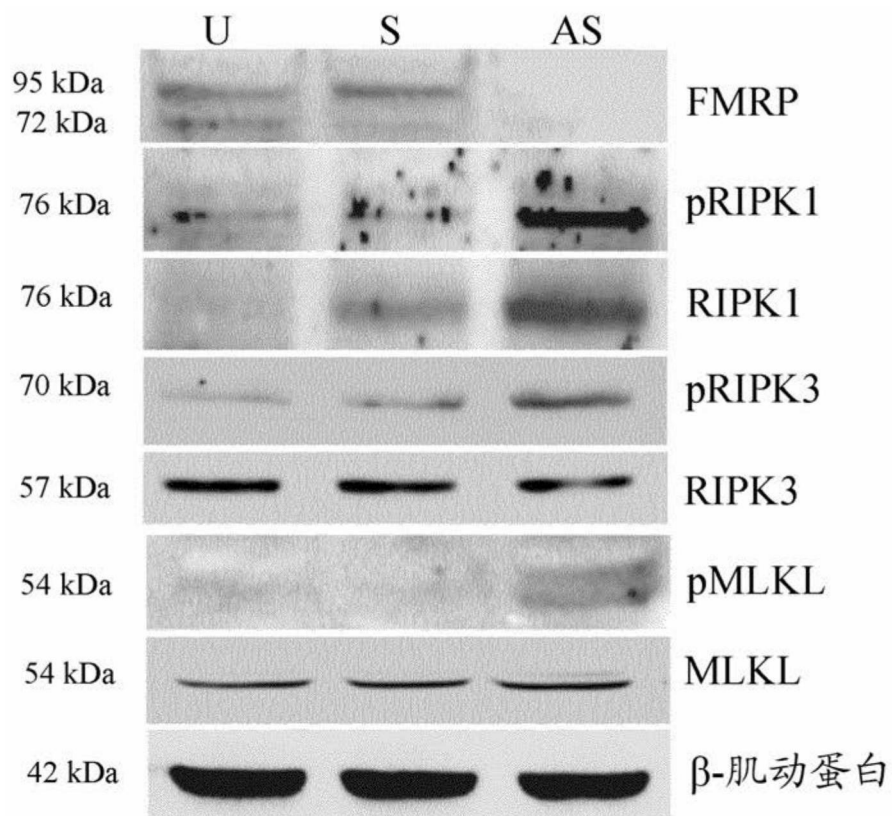


图6A

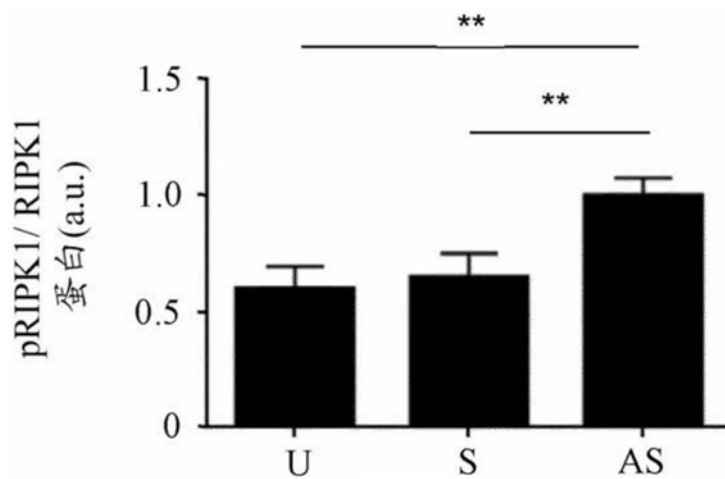


图6B

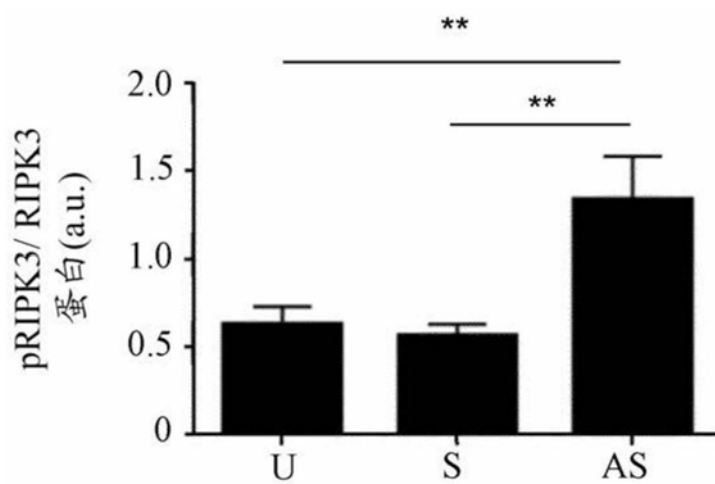


图6C

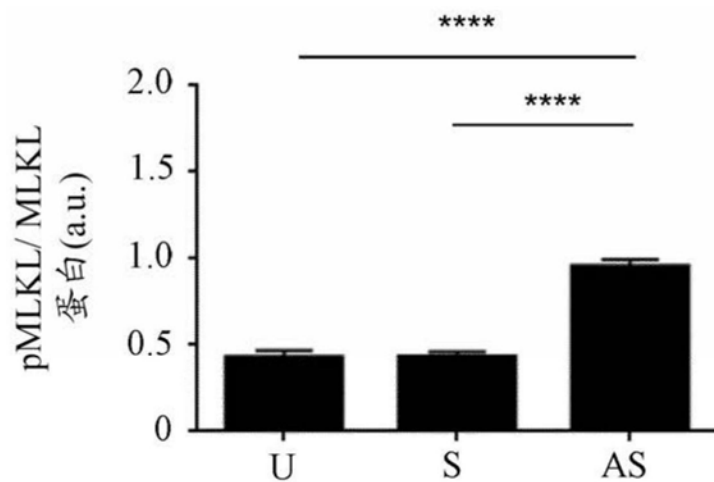


图6D

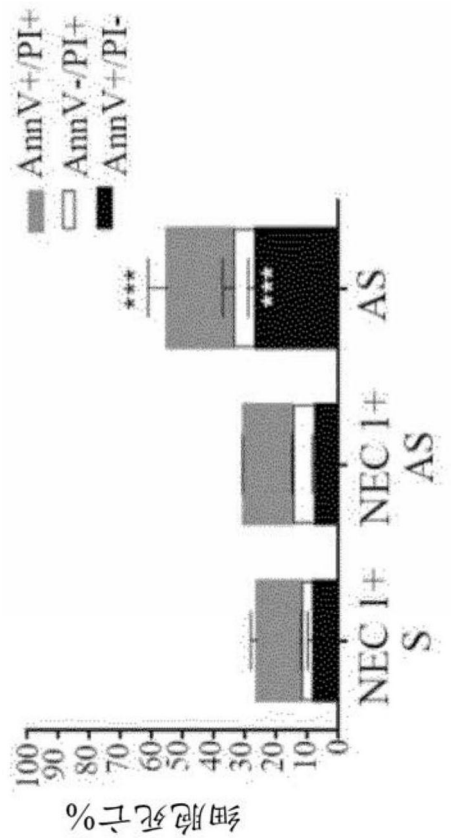


图6E

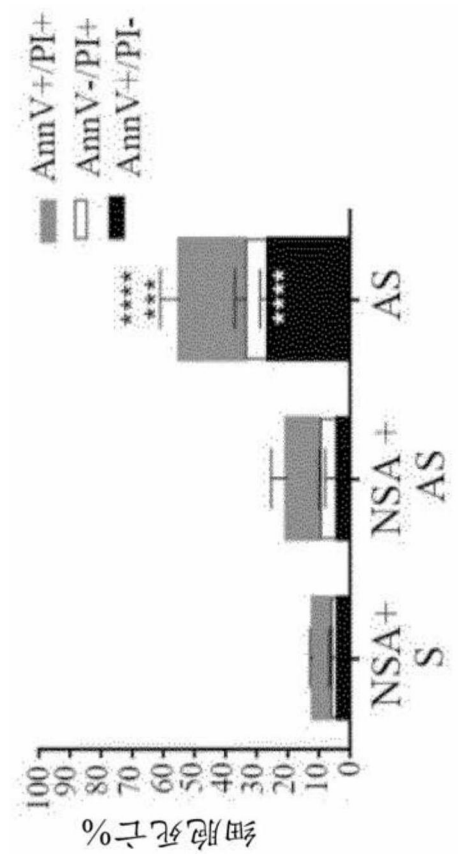


图6F

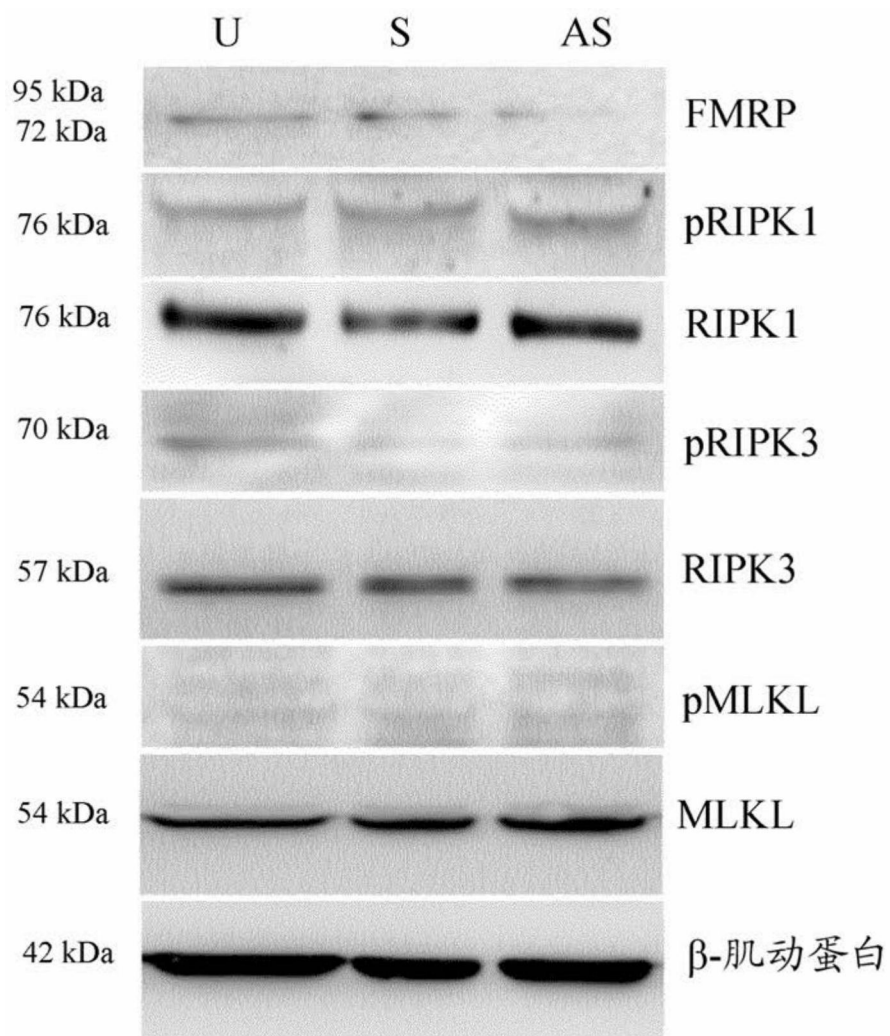


图6G

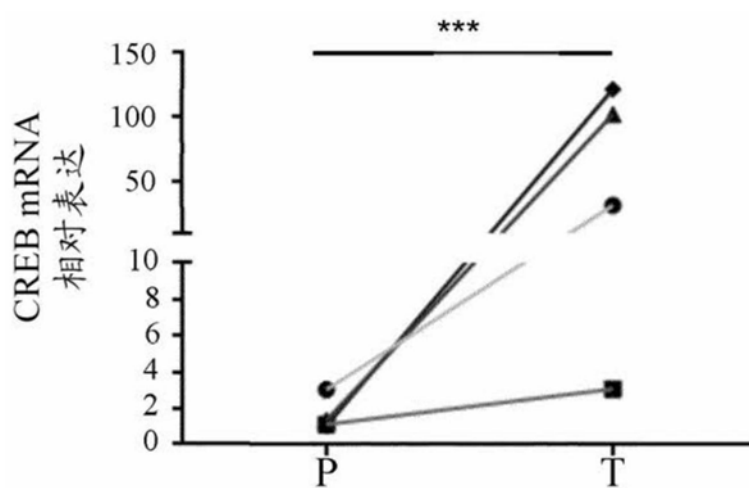


图7A

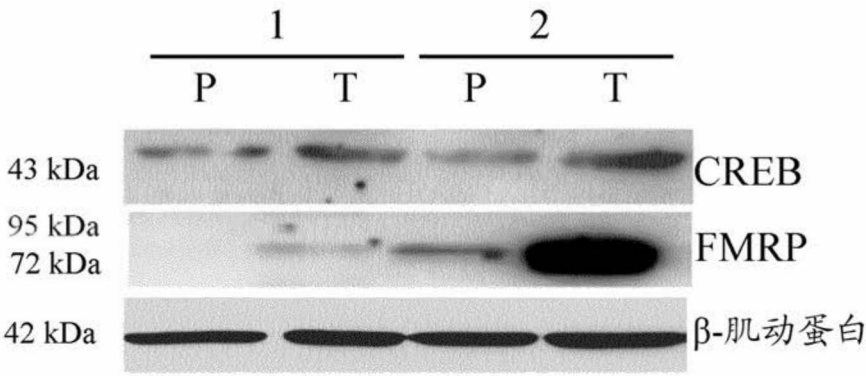


图7B

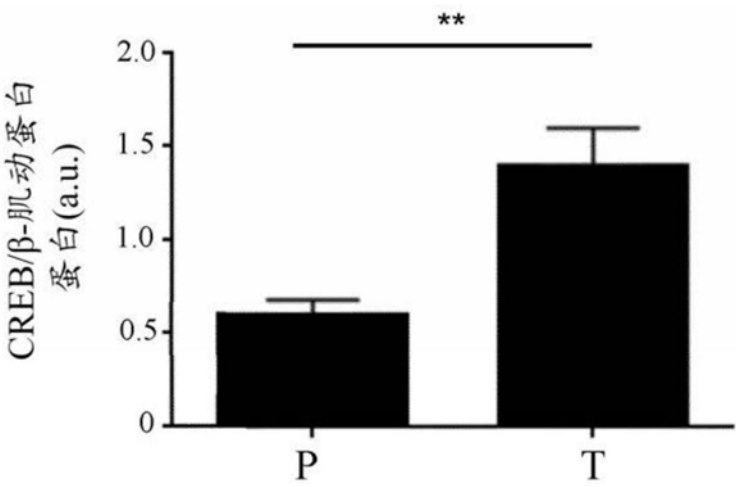


图7C

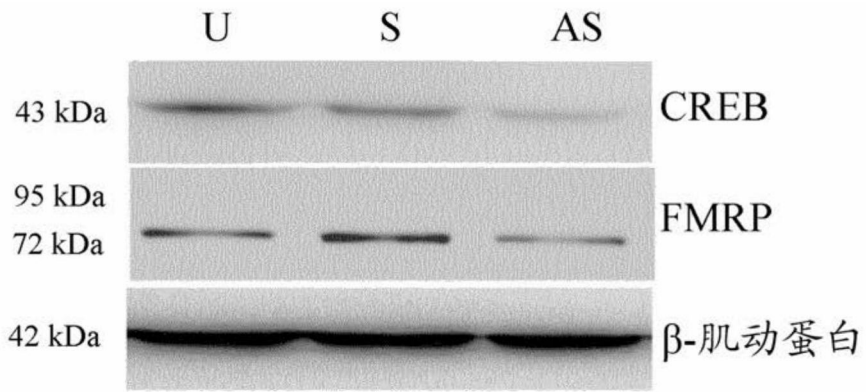


图7D

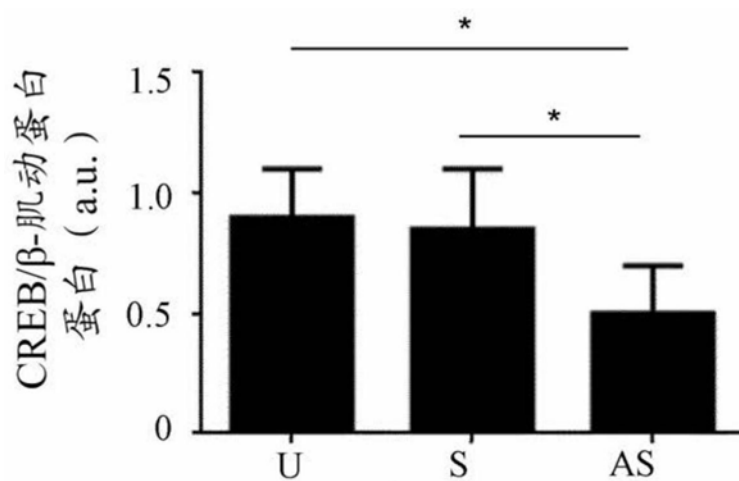


图7E

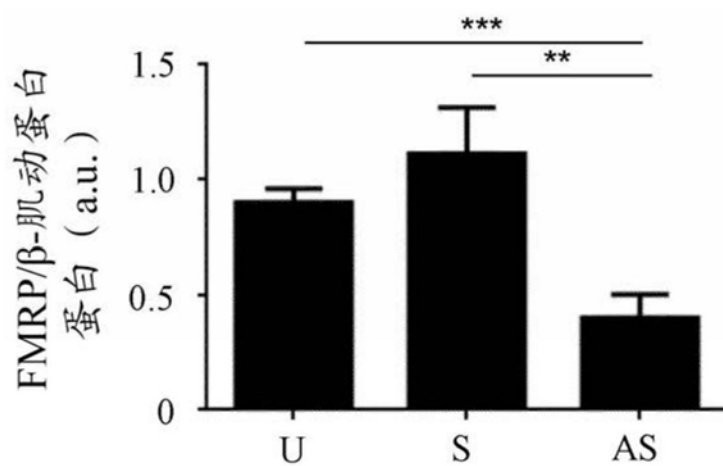


图7F

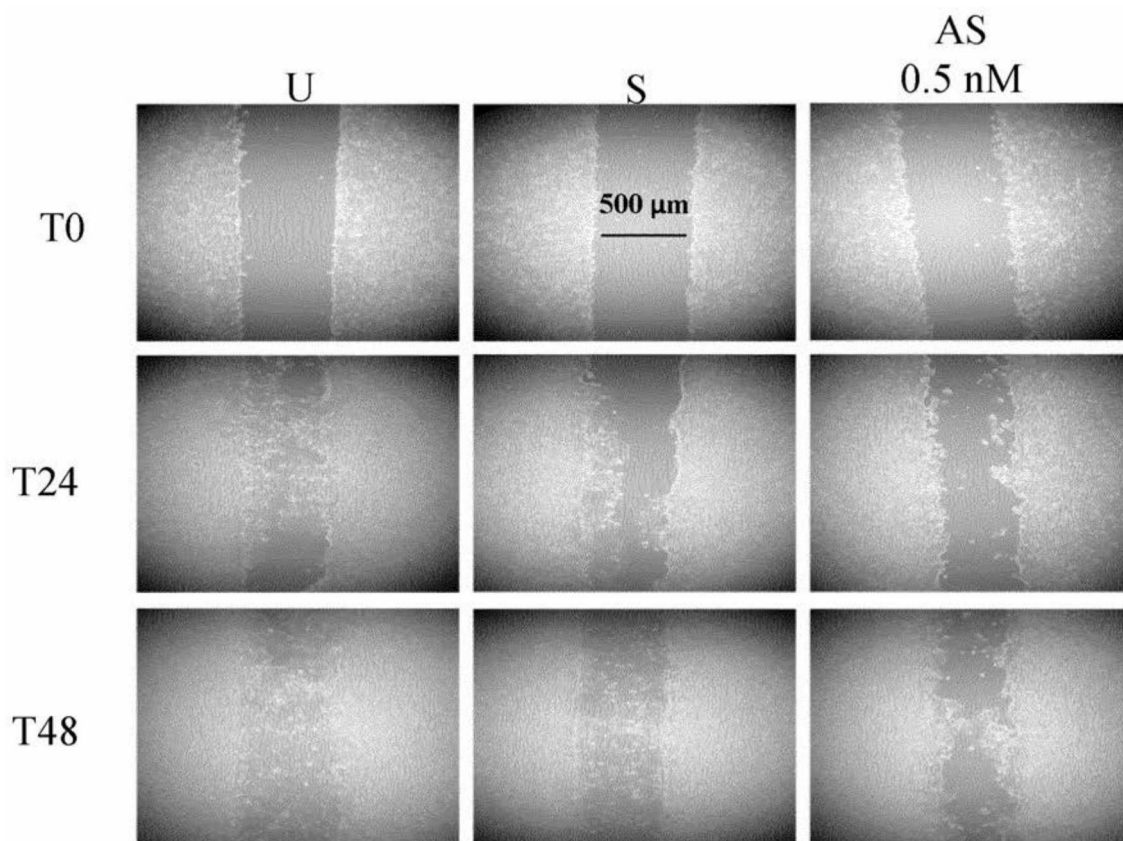


图8A

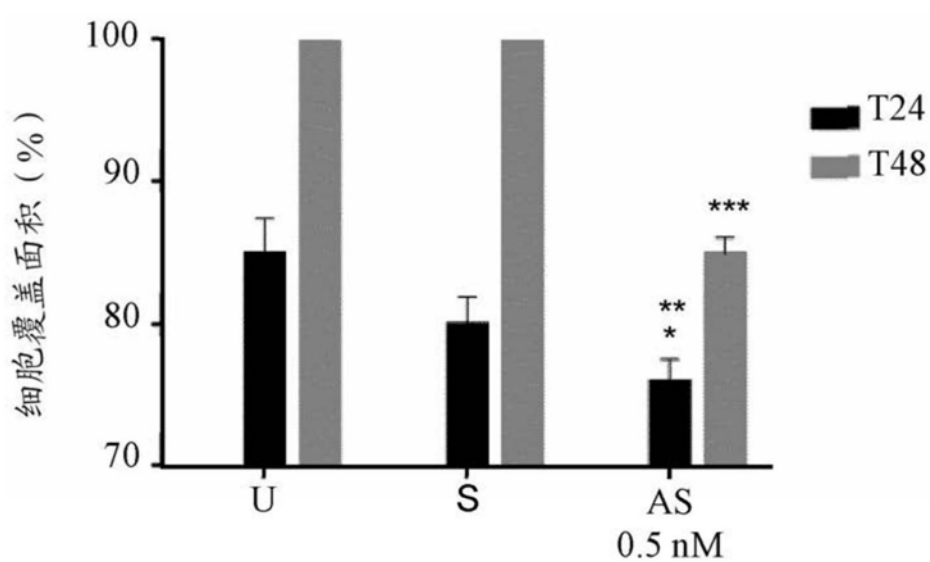


图8B

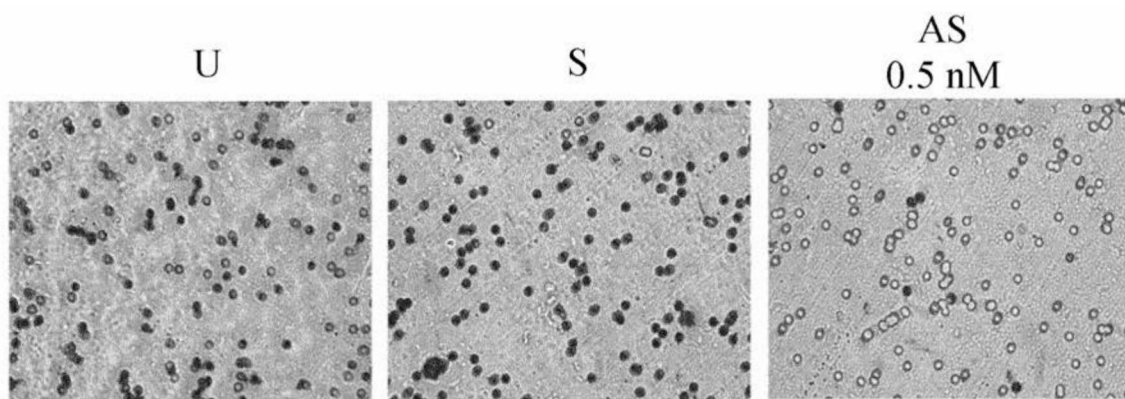


图8C

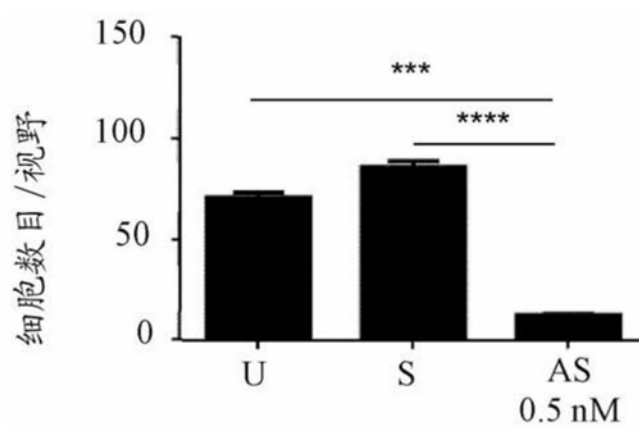


图8D

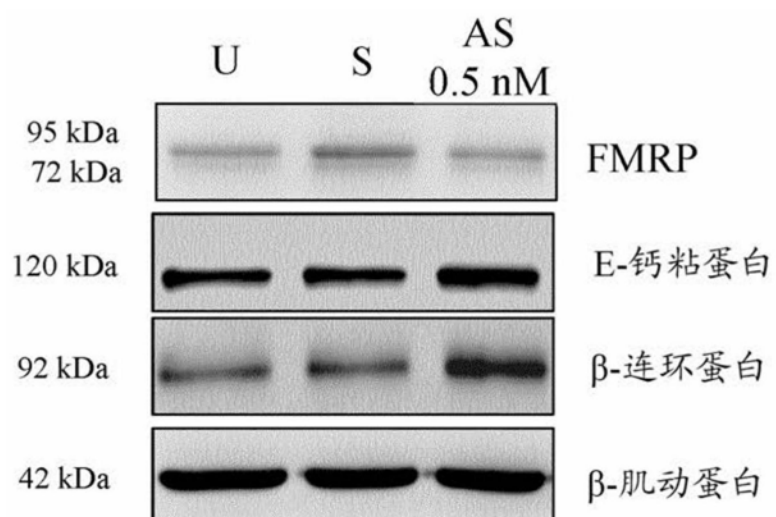


图8E

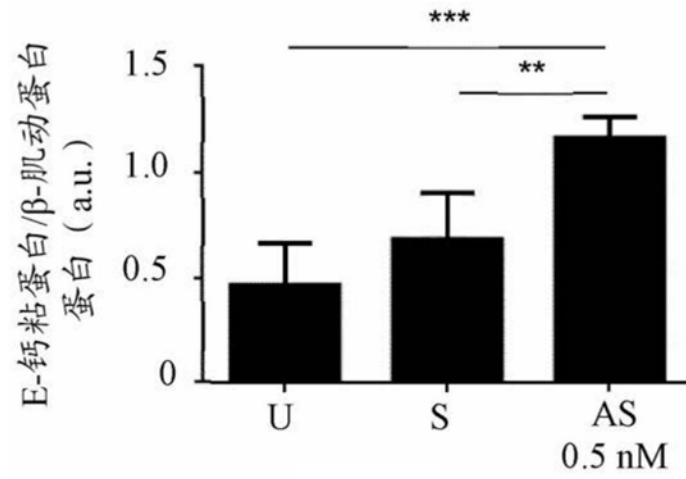


图8F

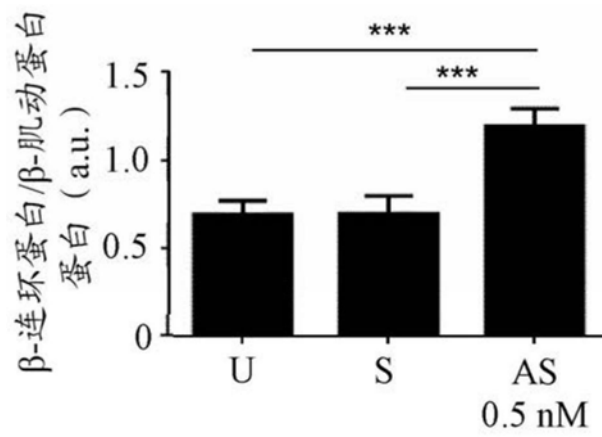


图8G

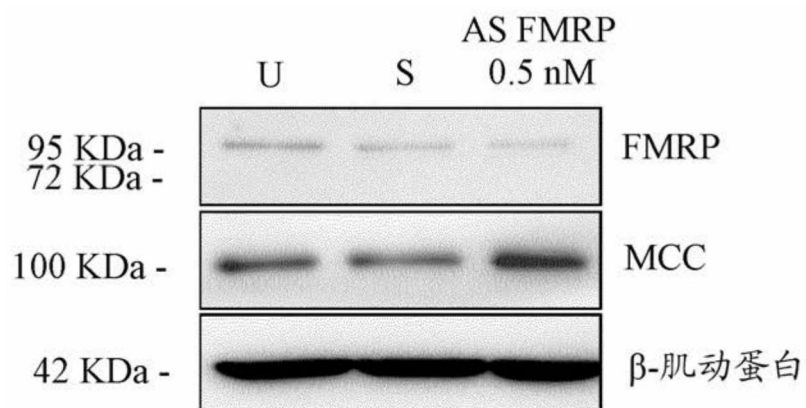


图9A

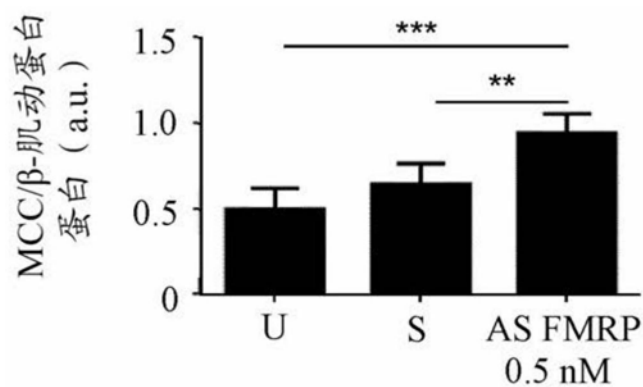


图9B

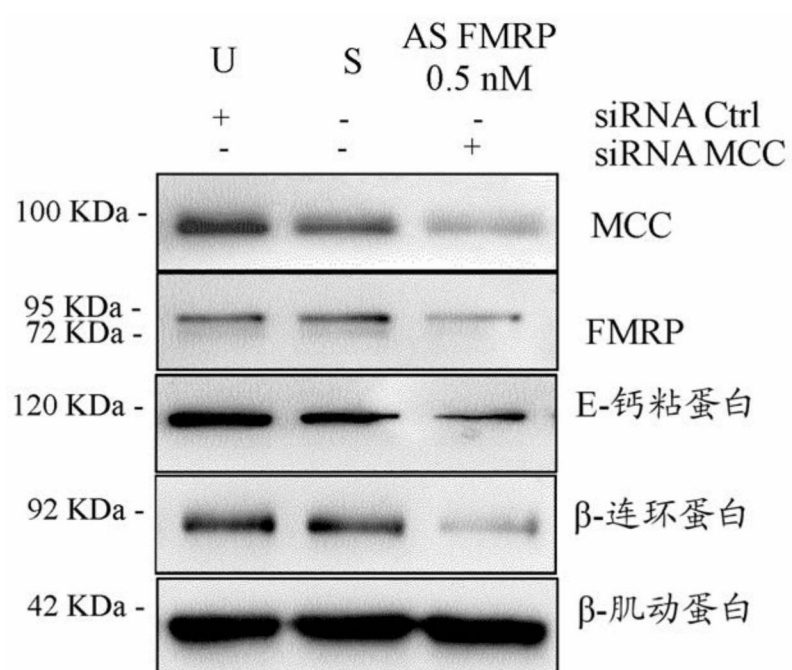


图9C

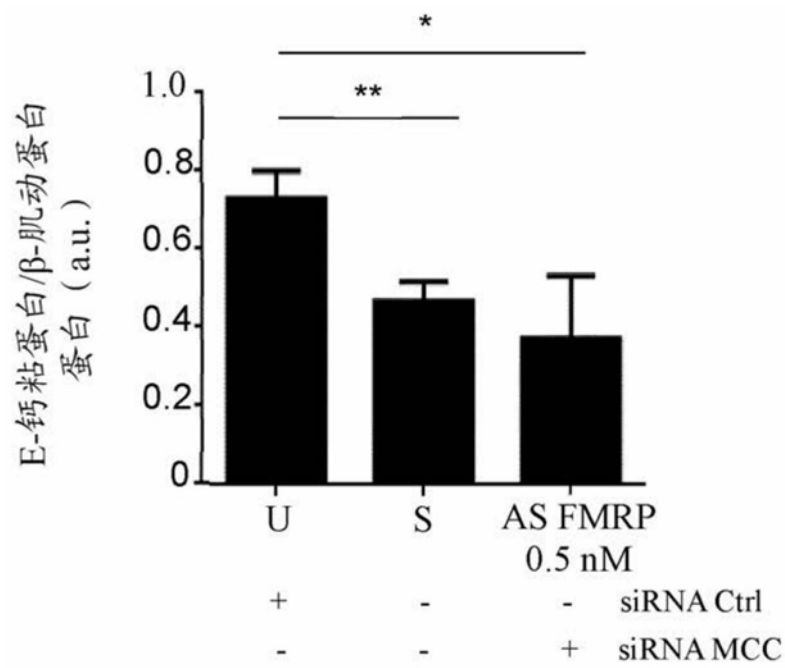


图9D

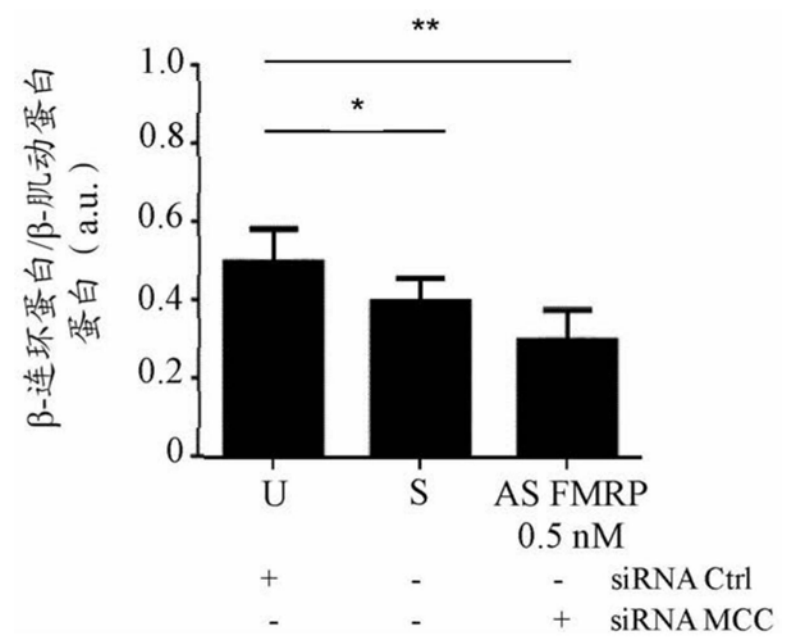


图9E

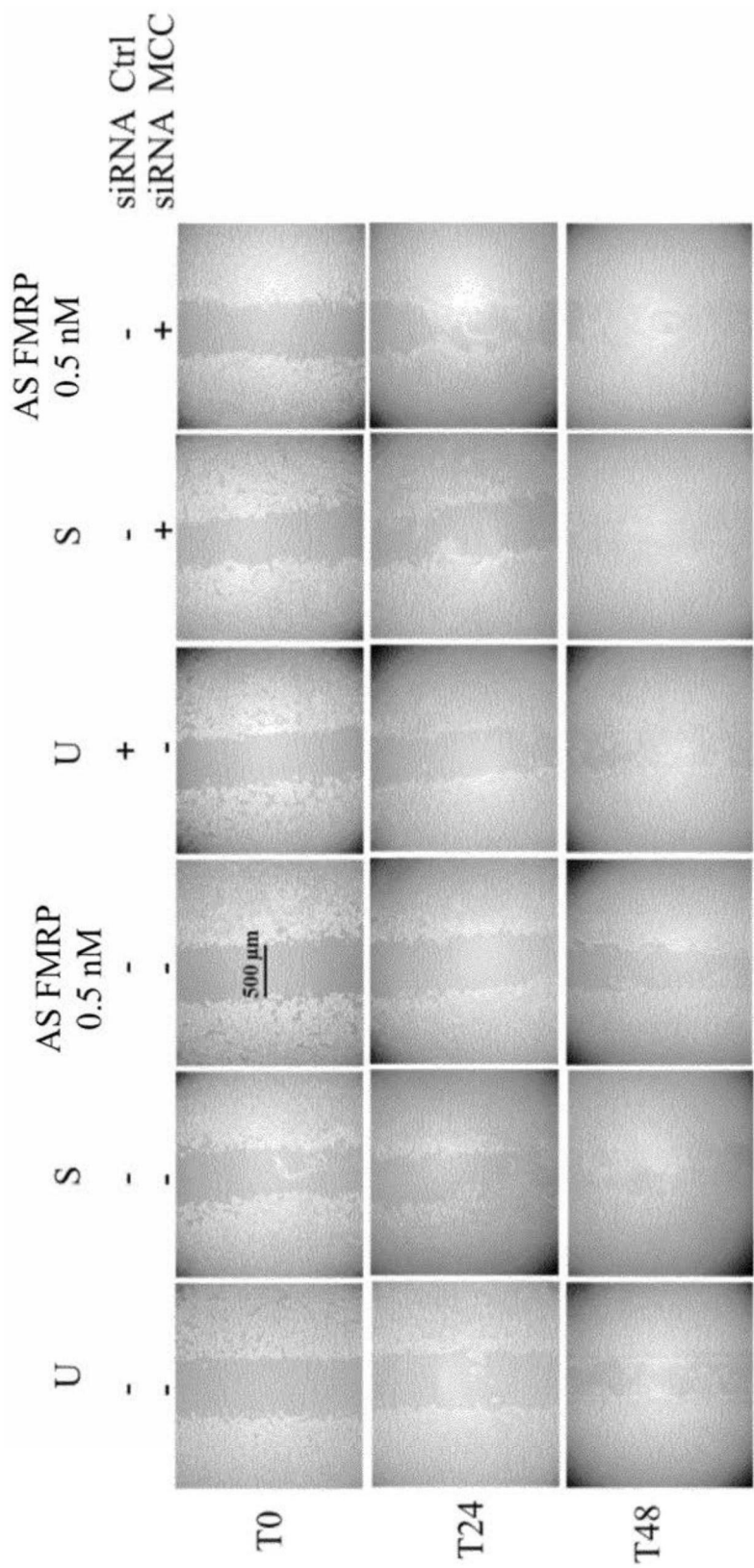


图9F

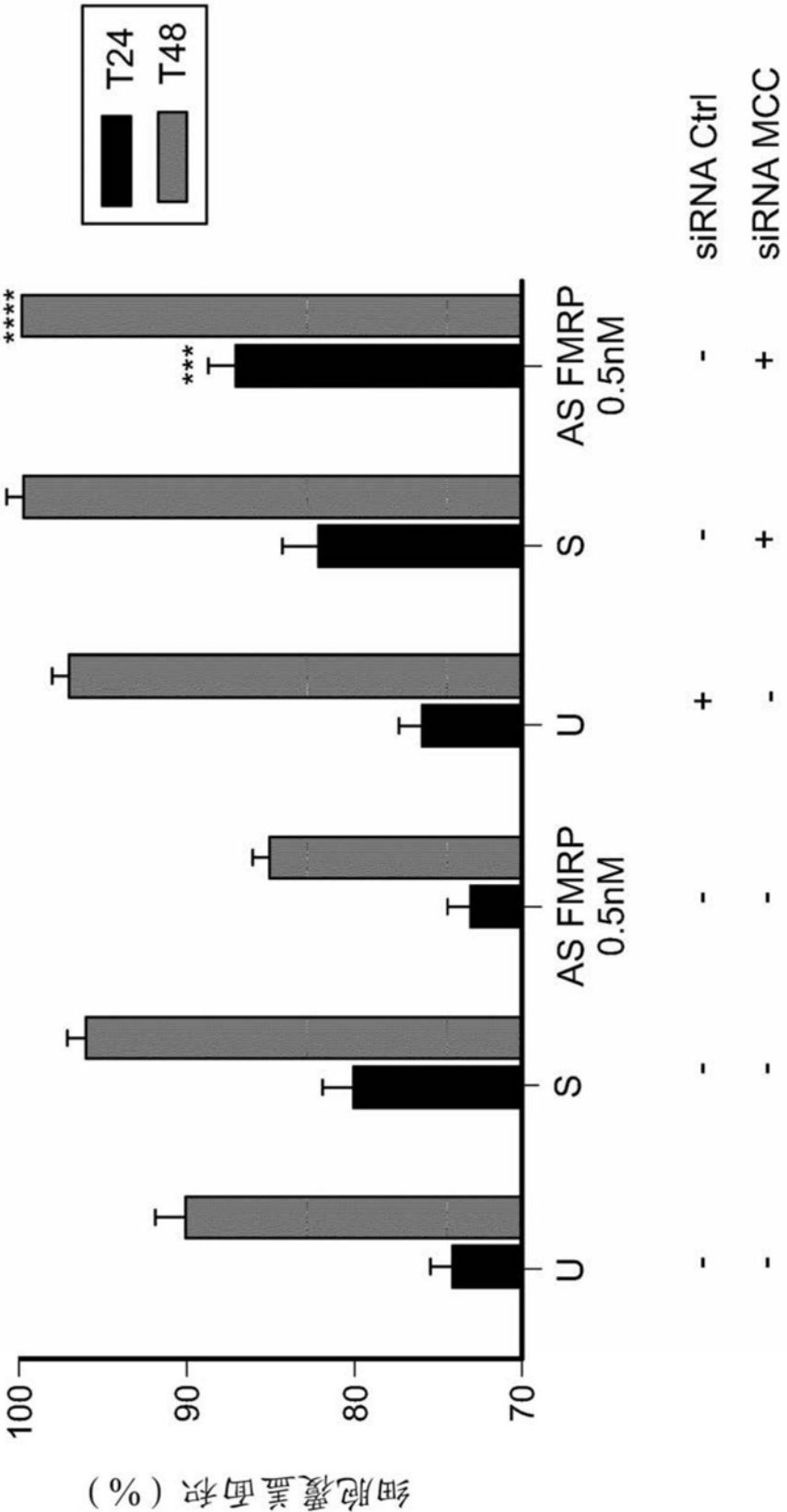


图9G