



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101849007 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 29

(21) 申请号 200880024089. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 05. 09

C12N 15/11 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7088 (2006. 01)

60/917, 392 2007. 05. 11 US

A61P 35/00 (2006. 01)

61/023, 250 2008. 01. 24 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 01. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/055779 2008. 05. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02008/138904 EN 2008. 11. 20

(71) 申请人 桑塔里斯制药公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

申请人 安佐制药股份有限公司

(72) 发明人 马杰·赫德贾恩

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张平元

权利要求书 2 页 说明书 46 页 序列表 95 页
附图 13 页

(54) 发明名称

用于调节 HER3 的 RNA 拮抗剂化合物

(57) 摘要

本发明涉及寡聚化合物(寡聚物),其靶向细胞中的 HER3mRNA,导致 HER3 和 / 或 HER2 和 / 或 EGFR 的表达降低。HER3 和 / 或 HER2 和 / 或 EGFR 表达的降低对于许多医学病症是有益的,例如过度增生性疾病,包括癌症。本发明提供了包含寡聚物的治疗组合物以及使用所述寡聚物调节 HER3 和 / 或 HER2 和 / 或 EGFR 的表达的方法,包括治疗的方法。

1. 长度为 10-25 个核碱基的寡聚物,其包含总共 10-24 个核碱基的连续核碱基序列,其中,i) 所述连续核碱基序列与选自 SEQ ID NO :211 和 SEQID NO :200 的序列的对应区 100% 同源;或(ii) 所述连续核碱基序列相对于选自 SEQ ID NO :211 和 SEQ ID NO :200 的序列的对应区包含不超过一个错配。

2. 长度为 10-50 个核碱基的寡聚物,其包含总共 10-50 个核碱基的连续核碱基序列,其中所述连续的核碱基序列与哺乳动物 HER3 基因或 mRNA,例如 SEQ ID NO :197 或其天然存在的变体的对应区至少 80% 同源。

3. 根据权利要求 1 或 2 的寡聚物,其中所述连续核碱基序列与选自 SEQID NO :200-227、SEQ ID NO :1-140 和 SEQ ID NO :228-233 的序列,例如选自 SEQ ID NO :1、54、200 和 211 的序列的对应区至少 80% 同源。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项的寡聚物,其中,相对于 SEQ ID NO :197 的对应区,所述连续核碱基序列不包含错配,或包含不超过一个或两个错配。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项的寡聚物,其中所述寡聚物的核碱基序列由连续核碱基序列组成。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项的寡聚物,其中所述连续核碱基序列长度为 10-18 个核苷酸。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项的寡聚物,其中所述连续核碱基序列包含核苷酸类似物。

8. 根据权利要求 7 的寡聚物,其中所述核苷酸类似物是糖修饰的核苷酸,例如选自锁核酸(LNA)单元;2'-O-烷基-RNA 单元、2'-OMe-RNA 单元、2'-氨基-DNA 单元和 2'-氟-DNA 单元的糖修饰的核苷酸。

9. 根据权利要求 7 的寡聚物,其中所述核苷酸类似物是 LNA。

10. 根据权利要求 7-9 中任一项的寡聚物,其是缺口聚物。

11. 根据权利要求 1-10 中任一项的寡聚物,其抑制表达 HER3 基因或 mRNA 的细胞中 Her-3 基因或 mRNA 的表达。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项的寡聚物,其中所述寡聚物选自 SEQ IDNO :169-196 和 234,例如 SEQ ID NO :169 和 180。

13. 缀合物,其包含权利要求 1-12 中任一项的寡聚物、以及共价连接于所述寡聚物的至少一个非核苷酸或非多核苷酸部分。

14. 药物组合物,其包含权利要求 1-12 中任一项的寡聚物、或权利要求 13 的缀合物,以及药学上可接受的稀释剂、载体、盐或佐剂。

15. 根据权利要求 1-12 中任一项的寡聚物,或根据权利要求 13 的缀合物,其用作药物,例如用于治疗过度增生性疾病,例如癌症。

16. 根据权利要求 1-12 中任一项的寡聚物、或权利要求 13 中定义的缀合物在制备用于治疗过度增生性疾病例如癌症的药物中的用途。

17. 治疗过度增生性疾病例如癌症的方法,所述方法包括向患有或可能患有过度增生性疾病例如癌症的患者给药权利要求 1-12 中任一项的寡聚物、或权利要求 13 的缀合物、或权利要求 14 的药物组合物。

18. 在表达 HER3 的细胞中抑制 HER3 的方法,所述方法包括向所述细胞给药权利要求

1-12 中任一项的寡聚物、或权利要求 13 的缀合物,以抑制所述细胞中的 HER3。

19. 降低或抑制细胞或组织(其表达 HER3 和 / 或 HER2 和 / 或 EGFR) 中 HER3 和 / 或 HER2 和 / 或 EGFR 的表达的方法,所述方法包括用权利要求 1-12 中任一项定义的寡聚物、或权利要求 13 中定义的缀合物、或权利要求 14 中定义的药物组合物与所述细胞或组织接触的步骤,使得 HER3 和 / 或 HER2 和 / 或 EGFR 的表达被降低或抑制。

20. 触发细胞例如癌细胞凋亡的方法,所述方法包括用权利要求 1-12 中任一项定义的寡聚物、或权利要求 13 中定义的缀合物、或权利要求 14 中定义的药物组合物与所述细胞或组织接触的步骤,使得 HER3 和 / 或 HER2 和 / 或 EGFR 的表达被抑制或降低,和 / 或细胞凋亡被触发。

用于调节 HER3 的 RNA 拮抗剂化合物

[0001] 本发明涉及寡聚化合物（寡聚物），其靶向细胞中的 HER3mRNA，导致 HER3 的表达降低。HER3 表达的降低对于许多医学病症是有益的，例如过度增生性疾病（hyperproliferative diseases），包括癌症。本发明提供了包含寡聚物的治疗组合物以及使用所述寡聚物调节 HER3 的表达的方法，包括治疗方法。

[0002] 相关的案件

[0003] 以下相关的申请在此引用作为参考，US 60/917,392 和 US 61/023,250。

[0004] 背景

[0005] HER3 属于受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族，其包括四种不同的受体：ErbB-1 (EGFR、HER1)、ErbB-2 (neu、HER2)、ErbB-3 (HER3) 和 ErbB-4 (HER4) (Yarden 等人, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol, 2001, 2(2):127-137)。这个家族的受体蛋白由细胞外配体结合区域、疏水的跨膜区域和细胞质的含酪氨酸激酶的区域组成。EGF 家族的生长因子结合大多数 ErbB 受体并活化它们。Her-3 (ErbB3) 特征在于缺乏酪氨酸激酶活性。EGFR、HER2 和近来的 HER3 已经与肿瘤形成相关联。例如，近来的研究已经表明，当与它们的正常组织对应物相比较时，EGFR 在许多恶性的人组织中过表达。编码 EGFR 的基因的过表达、扩增、删除和结构重排的高发生率已经在脑肿瘤的活检中发现。在多形性胶质母细胞瘤肿瘤中 EGFR 基因的扩增是已知的最一致的遗传学改变之一。ErbB-3mRNA 水平的提高已经在人乳腺癌中检测到。近来，已经表明，使用酪氨酸激酶抑制剂对 Her2 和 EGFR 酪氨酸激酶活性的抑制作用显示对 HER2 驱动的乳腺癌作用有限，因为 HER3 表达的代偿性提高和随后通过 PI3K/Akt 途径的信号转导 (Sergina 等人, Nature, 2007, 445:437-441)。

[0006] 对于能够有效地抑制 HER3 功能的药物存在着需求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供长度为 10-50 个核碱基（例如 10-30 个核碱基）的寡聚物，其包含总共 10-50 个核碱基，或 10-30 个核碱基的连续 (contiguous) 核碱基序列，其中所述连续核碱基序列与哺乳动物 HER3 基因或 mRNA，例如 SEQ ID NO:197，或其天然存在的变体的对应区至少 80% 同源。

[0009] 本发明提供长度为 10-50 个核碱基的寡聚物，其包含总共 10-50 个核碱基的连续核碱基序列，其中所述连续核碱基序列与选自 SEQ ID No 200-227 的核酸序列的对应区至少 80% 同源。

[0010] 本发明提供了长度 10-50 个核碱基的寡聚物，其包含总共 10-50 个核碱基的连续核碱基序列，其中所述连续核碱基序列与选自 SEQ ID NO:1-140 和 228-233 的核酸序列的对应区至少 80% 同源。

[0011] 本发明进一步提供包含根据本发明的寡聚物的缀合物，如以下缀合物，其除了包含寡聚物的核碱基序列外还包含至少一个共价连接至本发明的寡聚物的非核苷酸（即非核碱基）或非多核苷酸部分。该非核苷酸 / 非核碱基或非多核苷酸部分可由以下组成或包含以下：固醇基团如胆固醇，或促进进入细胞的其它部分 (moiety)。

[0012] 本发明提供包含根据本发明的寡聚物的缀合物，如以下缀合物，其除了包含寡聚

物的核碱基序列外还包含含带正电部分的聚合缀合物,如聚乙二醇 (PEG)-即根据本发明的寡聚物可任选被聚乙二醇化。

[0013] 本发明提供了药物组合物,其包含根据本发明的寡聚物或缀合物,和药学上可接受的稀释剂、载体、盐或佐剂。

[0014] 本发明提供了根据本发明的寡聚物或缀合物,其用作药物,例如用于治疗本文涉及的一种或多种疾病,例如用于治疗过度增生性疾病如本文涉及的那些,例如癌症。

[0015] 本发明进一步提供了根据本发明的寡聚物,其用于医药。

[0016] 本发明提供了根据本发明的寡聚物或缀合物在制备或制造用于治疗过度增生性疾病,例如本文涉及的那些,例如癌症的治疗的药物中的用途。

[0017] 本发明提供了治疗过度增生性疾病,例如本文涉及的那些,例如癌症的方法,所述方法包括向需要治疗的患者,例如患有或可能患有过度增生性疾病,例如本文涉及的那些,例如癌症的患者给药根据本发明的寡聚物、缀合物或药物组合物。

[0018] 本发明提供了在表达 HER3 的细胞中抑制 HER3 的方法,所述方法包括向所述细胞给药根据本发明的寡聚物或缀合物以在所述细胞中实现 HER3 的抑制。

[0019] 进一步提供的是下调 (down-regulate) 细胞或组织中 HER3、任选的还有 EGFR 和 / 或 HER2 的表达的方法,包括在体内或体外用本发明的一种或多种寡聚物、缀合物或组合物接触所述细胞或组织。

[0020] 还公开的是治疗认为患有或易于疾病或病症的动物、哺乳动物或人的方法,所述疾病或病症与 HER3 (和 / 或 EGFR 和 / 或 HER2) 的表达或过表达相关,通过向所述动物或人给药治疗或预防有效量的本发明的一种或多种寡聚物、缀合物或组合物。

[0021] 进一步的,提供了使用寡聚物抑制 HER3 和任选的还有 EGFR 和 / 或 HER2 的表达、以及治疗与 HER3 (和 / 或 EGFR 和 / 或 HER2) 活性相关的疾病的方法。

[0022] 本发明提供了治疗疾病或病症,例如本文涉及的那些,例如过度增生性疾病,例如癌症的方法,所述方法包括向有需要的患者给药根据本发明的寡聚物、缀合物或药物组合物。

[0023] 本发明提供了抑制或降低细胞或组织中 HER3 以及任选的还有 EGFR 和 / 或 HER2 的表达的方法,所述方法包括用根据本发明的寡聚物、缀合物或药物组合物接触所述细胞或组织的步骤,使得 HER3 以及任选的还有 EGFR 和 / 或 HER2 的表达被抑制或降低。

[0024] 本发明提供了触发细胞例如癌细胞中的细胞凋亡的方法,所述方法包括用根据本发明的寡聚物、缀合物或药物组合物接触所述细胞的步骤,使得 HER3、以及任选的还有 EGFR 和 / 或 HER2 的表达被抑制或降低,和 / 或细胞凋亡被触发。

[0025] 本发明进一步提供了寡聚物,其包含或由连续核碱基序列组成,所述连续核碱基序列与选自 SEQ ID NO :1-140 和 228-233 和 SEQ ID NO :200-227 的序列,例如选自 SEQ ID NO :200、211、54 和 1 的序列的对应区至少 80% 同源。

[0026] 本发明进一步提供了寡聚物,其包含或由连续核碱基序列组成,所述连续核碱基序列相应于在选自 SEQ ID NO :169-196 和 SEQ ID NO :234,例如 SEQ ID NO :169 或 SEQ ID NO :180 的序列中存在的等价序列。

[0027] 本发明进一步提供了寡聚物,其包含以下序列或由以下序列组成:选自 SEQ ID NO :169-196 和 234 的序列,例如 SEQ ID NO 169 或 180,或其包含以下序列或由以下序列组

成：与所述序列相应的连续核碱基序列。

[0028] 附图的简要说明

[0029] 附图 1：分别与 SEQ ID NO：1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139 和 140 的寡核苷酸序列相应的 HER3 靶序列以粗体和下划线显示，表明它们在 HER3 转录产物中的位置 (Genbank 登记号 NM 001982-SEQ IDNO：197)。

[0030] 附图 2：在转染后 24 小时，在 15PC3 中的 HER3mRNA 的表达，SEQ IDNO：169-179

[0031] 附图 3：在转染后 24 小时，在 15PC3 中的 EGFR mRNA 的表达，SEQ IDNO：169-179

[0032] 附图 4：在转染后 24 小时，在 15PC3 中的 HER2mRNA 的表达，SEQ IDNO：169-179

[0033] 附图 5：在转染后 24 小时，在 15PC3 中的 HER3mRNA 的表达，SEQ IDNO：180-194

[0034] 附图 6：数据显示了细胞凋亡，其通过在用 5 和 25nM 浓度的寡核苷酸转染的 HUH7 细胞中，在不同的时间点的活化的 Caspase 3/7 (半胱氨酸蛋白酶 3/7) 而测定。结果相对于模拟品 (mock) 处理的细胞来绘图，SEQ ID NO：235 是乱序对照 (scrambled control) 的寡核苷酸。

[0035] 附图 7：数据显示了活细胞，其通过在用 5 和 25nM 浓度的寡核苷酸转染的 HUH-7 细胞中，在不同的时间点使用 MTS 实验测定 OD490 值而测定。SEQ ID NO：235 是乱序对照的寡核苷酸。

[0036] 附图 8A：数据显示了以 25 和 50mg/kg q3dx10 用 SEQ ID NO：180 静脉注射治疗的雌性裸小鼠上移植的 15PC3 异种移植肿瘤中肿瘤体积的改变百分比。盐水处理的小鼠用作对照。

[0037] 附图 8B：数据显示了以 25 和 50mg/kg q3dx10 用 SEQ ID NO：180 静脉注射治疗的雌性裸小鼠上移植的 15PC3 异种移植肿瘤中的 HER3mRNA 表达。结果相对于 GAPDH 标准化，以盐水治疗对照的 % 表示。

[0038] 附图 9：数据显示了在 SEQ ID NO：180 或 SEQ ID NO：234 连续三天用 1 或 5mg/kg 寡核苷酸静脉注射治疗之后小鼠肝脏中的 HER3mRNA 的表达。结果相对于 GAPDH 标准化，以盐水治疗对照的 % 表示。

[0039] 发明的详细说明

[0040] 寡聚物

[0041] 本发明提供了用于调节 HER3 (和 / 或 EGFR 和 / 或 HER2) 的表达的序列、组合物和方法。特别是，本发明涉及 HER3 基因中的靶序列，其序列信息适合于用来产生能够下调 HER3 的表达的相应的反义寡核苷酸。本发明进一步提供了特异性地与编码 HER3 的核酸杂交的寡核苷酸 (寡聚物)，和其药物制剂，以及它们用于治疗与 HER3 表达相关的疾病，特别是癌症疾病的用途。本发明的寡核苷酸已经显示了下调 HER3 的表达。本发明的寡核苷酸已经显示了还下调 HER3 的表达、以及在某些情况下还下调 HER2 和 / 或 EGFR 的表达。

[0042] 术语 HER3 在此与术语 ErbB-3 可互换使用。

[0043] 本发明采用了寡聚化合物 (在此称为寡聚物)，用于调节编码哺乳动物 HER3 的核酸分子，例如 SEQ ID NO：197 中所示的 HER3 核酸、以及编码哺乳动物 HER3 的这种核酸分子的天然存在的变体 (variants) 的功能。

[0044] 在本发明的上下文中术语“寡聚物”是指通过两个或更多个核碱基 (即，寡核苷

酸)的共价连接形成的分子。在此,每个单独的核碱基还可以被称为单体或单元。寡聚物包含或由长度 10 到 50 个,例如 10 到 30 个核碱基的连续核碱基序列组成。

[0045] 寡聚物可以包含天然的核苷酸单元,例如核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA),或核酸类似物,或其混合物,如本文涉及的那些,优选包括锁核酸(LNA)。因而其包括由天然存在的核碱基、糖和核碱基间连接构成的寡聚物,以及具有非天然存在的核碱基的寡聚物,所述非天然存在的核碱基类似地起作用或具有特别改善的功能。完全或部分修饰的或取代的寡聚物相对于天然形式常常是优选,因为这样的寡聚物具有一些期望的性质,例如,穿透细胞膜的能力、对细胞外和/或细胞内核酸酶的良好抗性,以及对核酸靶的高亲和力和特异性。考虑到上述的性质,例如,LNA类似物是特别优选。因此,在特别优选实施方式中,根据本发明的寡聚物由核苷酸和核苷酸类似物单元(例如LNA单元)构成或由来自不同类的核苷酸类似物单元构成,形成10-50个、优选10-25个核碱基、更优选10-16个核碱基、再更优选12-16个核碱基的寡核苷酸。

[0046] 在多种实施方式中,本发明的寡聚物不包含RNA(单元)。优选是,根据本发明的化合物是链状分子,或合成为链状分子。所述寡聚物是单链的分子,优选不包含与相同寡聚物内的等价区域(即,双链体(duplexes))互补的例如至少3、4或5个连续核碱基的短区,就此来说,所述寡聚物(基本上(essentially))不是双链的。在多种实施方式中,所述寡聚物基本上不是双链的,例如,不是siRNA。所述寡聚物包含连续核碱基序列或由连续核碱基序列组成。在多种实施方式中,本发明的寡聚物可以完全由连续核碱基区组成。所述寡聚物包含连续核碱基序列或由连续核碱基序列组成。在多种实施方式中,所述寡聚物的核碱基序列由连续核碱基序列组成。

[0047] 然而,还设想的是,所述寡聚物可以包含一般在5'或3'末端之一侧翼于所述连续核碱基序列的其它核碱基序列,或在5'和3'末端两处的进一步的核碱基序列。适当地,这些5'和/或3'“侧翼”区域可以是长度1、2、3、4、5或6个核碱基。处在本发明的寡聚物的末端的DNA或RNA核碱基预期当在体内使用时被内源的核酸外切酶从寡聚物上裂解,因而包含侧翼的DNA或RNA单元可不影响所述寡聚物的体内性能。这些进一步的核碱基或碱基可以相当于在本文缺口聚物(gapmer)寡聚物的上下文中描述的D区。在多种实施方式中,所述一个或多个进一步的核碱基是核苷酸类似物,其在体内稳定所述寡聚物,例如,保护寡聚物免于核酸酶(例如,在此描述的核苷酸类似物)降解。

[0048] 在多种实施方式中,所述连续核碱基序列的3'末端侧翼是1、2或3个DNA或RNA单元。3'DNA单元常常在寡聚物的固态合成期间使用。在多种实施方式中,其可以是相同的或不同的,所述连续核碱基序列的5'末端侧翼是1、2或3个DNA或RNA单元。

[0049] 靶

[0050] 哺乳动物HER3优选是人HER3,例如由SEQ ID NO:197所示核酸编码的HER3,或天然存在的变体,例如其等位变体(allelic variant)或同工型。

[0051] 在此使用的术语“靶核酸”是指编码哺乳动物HER3多肽(和/或Her2和/或EGFR多肽)的DNA,即HER3(和/或Her2和/或EGFR)多肽编码核酸,例如,人HER3如SEQ ID NO:197,或其天然存在的变体,及由其衍生的RNA核酸,优选mRNA,例如pre-mRNA,而优选成熟的mRNA。在多种实施方式中,例如,当在研究或诊断中使用时,所述“靶核酸”可以是源自上述DNA或RNA核酸靶的合成的寡核苷酸或cDNA。根据本发明的寡聚化合物优选能够与靶

核酸杂交。

[0052] 术语“靶核酸”在多种实施方式中可以是例如哺乳动物 HER3mRNA, 例如 SEQ ID NO:197。其他哺乳动物 HER3mRNA 的实例包括, 但不限于, 具有登记号 NM 010153 (小鼠 HER3mRNA); NM 017218 (大鼠 HER3mRNA); 或 XM 509131 (预测的黑猩猩 HER3mRNA) 的那些。

[0053] 当然, 应当认识到, 上述登记号涉及 cDNA 序列而非 mRNA 序列本身, 成熟的 mRNA 序列当然地可以从 cDNA 序列直接得出——胸腺嘧啶 (T) 残基被尿嘧啶 (U) 残基替代。

[0054] 如在此使用的, “杂交”是指在互补的核苷酸/核碱基碱基之间的氢键合, 其可以是 Watson-Crick、Hoogsteen、反向的 Hoogsteen 氢键合, 等等。Watson 和 Crick 在大约五十年前显示了, 脱氧核糖核酸 (DNA) 由两条链组成, 这两条链通过在两链中相对的互补核碱基之间形成的氢键以螺旋构型保持在一起。通常在 DNA 中存在的四种核碱基是鸟嘌呤 (G)、腺嘌呤 (A)、胸腺嘧啶 (T) 和胞嘧啶 (C), 其中 G 核碱基与 C 配对, A 核碱基与 T 配对。在 RNA 中, 核碱基胸腺嘧啶被核碱基尿嘧啶 (U) 替代, 其与 T 碱基类似地与 A 配对。参与标准双螺旋形成的核碱基中的化学基团构成了 Watson-Crick 面。几年后 Hoogsteen 显示了嘌呤核碱基 (G 和 A) 除了它们的 Watson-Crick 面之外具有 Hoogsteen 面, 其可以从双螺旋的外部识别, 用于通过氢键结合嘧啶寡核苷酸, 从而形成三螺旋结构。

[0055] 高度优选是, 本发明的化合物能够与靶核酸例如 mRNA 杂交。

[0056] 本发明的适合的寡聚物能够抑制, 例如, 下调 HER3 基因的表达。所述寡聚物当被导入表达 HER3 基因的哺乳动物细胞例如人细胞时, 优选引起 HER3mRNA 水平的降低, 引起细胞中 HER3 表达水平的降低。所述寡聚物当被导入表达 HER3 基因的细胞中时, 优选引起 HER3mRNA 水平的降低, 引起细胞中 HER3 的表达水平的降低。在人细胞中, HER3 以两种选择性剪接同工型 (spliced isoforms) (NP 001973.2 和 NP 001005915.1, 其氨基酸和相应的核酸在此引用作为参考) 存在。同工型 1 是更长的同工型, 由 mRNA NM 001982 编码, 在此引用作为参考。靶 mRNA 可以是两种“同工型”之一或两者, 而在多种实施方式中, 编码同工型 1 的 mRNA 是靶 mRNA。例如, SEQ ID NO:180 靶向两种同工型。

[0057] 在多种实施方式中, 当所述寡聚物被导入表达 HER2 基因的哺乳动物细胞, 例如人细胞中时, 优选引起 HER2mRNA 水平的降低, 引起细胞中 HER2 表达水平的降低。

[0058] 在多种实施方式中, 当所述寡聚物被导入表达 EGFR 基因的哺乳动物细胞, 例如人细胞中时, 优选引起 EGFR mRNA 水平的降低, 引起细胞中 EGFR 表达水平的降低。

[0059] 人 HER2mRNA 显示为 SEQ ID NO:199。人 EGFR mRNA 显示为 SEQ ID NO:198。

[0060] 在多种实施方式中, 本发明的寡聚物结合至靶核酸, 且与正常的表达水平相比产生至少 10% 或 20% 的表达抑制作用, 更优选与正常的表达水平相比至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的抑制。在某些实施方式中, 当使用 1 到 25nM 的本发明的化合物时观察到这种调节。在相同的或不同的实施方式中, 表达的抑制低于 100%, 例如低于 98% 的抑制、低于 95% 抑制、低于 90% 抑制、低于 80% 抑制, 例如低于 70% 抑制。表达水平的调节可以通过测量蛋白水平来确定, 例如, 通过例如 SDS-PAGE 随后使用针对靶蛋白产生的适合的抗体的蛋白质印迹的方法。或者, 表达水平的调节, 例如抑制, 可以通过测量 mRNA 的水平, 例如, 通过 RNA 印迹或定量 RT-PCR 来确定。当通过 mRNA 水平测量时, 在使用合适的剂量, 例如 1 到 25nM 浓度时, 在多种实施方式中, 抑制或下调的水平一般达到不存在本发明的化合物的情况下正常水平的 10-20% 的水平。

[0061] 本发明因而提供了在表达 HER3 蛋白和 / 或 mRNA 的细胞中下调或抑制 HER3 蛋白和 / 或 mRNA 的表达的方法,所述方法包括向所述细胞给药根据本发明的寡聚物或缀合物来下调或抑制所述细胞中 HER3 蛋白和 / 或 mRNA 的表达。适合地,所述细胞是哺乳动物细胞,例如人细胞。在多种实施方式中,给药可以发生于体外。在多种实施方式中,给药可以发生于体内。

[0062] 在此使用的术语“靶核酸”是指编码哺乳动物 HER3 多肽例如人 HER3 的 DNA,例如 SEQ ID NO:197。HER3 编码核酸或其天然存在的变体,和由此衍生的 RNA 核酸,优选 mRNA,例如 pre-mRNA,而优选成熟的 mRNA。在多种实施方式中,例如,当在研究或诊断中使用,所述“靶核酸”可以是源自上述 DNA 或 RNA 核酸靶的合成的寡核苷酸或 cDNA。根据本发明的寡聚物优选能够与靶核酸杂交。

[0063] 术语“其天然存在的变体”是指 HER3 多肽或核酸序列的变体,其在规定的分类群,例如哺乳动物,例如小鼠、猴和优选人中天然地存在。一般地,当涉及多核苷酸的“天然存在的变体”时,该术语还可涵盖 HER3 编码基因组 DNA(在染色体 Chr 12:54.76-54.78Mb 处通过染色体转位或复制存在的),以及 RNA(例如,由此衍生的 mRNA)的任何等位变体。“天然存在的变体”还包括来自 HER3mRNA 的选择性剪接的变体。当涉及特定的多肽序列时,例如,该术语还包括天然存在形式的蛋白质,因此其可被加工,例如,通过其翻译时或翻译后修饰,例如信号肽裂解、蛋白酶裂解 (proteolytic cleavage)、糖基化,等等。

[0064] 变体序列,例如,但不限于等位变体(例如 HER3)基因存在于人基因座染色体 Chr 12:54.76-54.78Mb 上,这样的靶序列也在本发明的范围内。变体序列可以与 HER3 中的靶序列具有至少 60%、更优选至少 70%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、更优选至少 95%或至少 98%的序列同源性。一般地,与所述变体序列相应的本发明的寡聚物仍然能够下调 HER3。应当理解的是,来自 HER2 和 / 或 EGFR 基因的靶序列可以具有与 HER3 靶序列的该同源性,且与所述变体序列相应的本发明的寡核苷酸可以仍然能下调 HER3。

[0065] 术语“至少一个(种)”包含大于或等于 1 的整数,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 等等。在多种实施方式中,例如当涉及本发明的化合物的核酸或蛋白质靶时,术语“至少一个(种)”包括术语“至少两个(种)”和“至少三个(种)”和“至少四个(种)”等等的术语,“至少两个(种)”可以包含术语“至少三个(种)”和“至少四个(种)”。

[0066] 序列

[0067] 本发明提供了寡聚物、组合物和方法,其用于下调 HER3(和任选 HER2 和 / 或 EGFR)的表达。特别是,本发明涉及靶向 HER3 的寡聚物和寡核苷酸序列。同时对于靶 HER3mRNA/cDNA 序列寡核苷酸在哪里设计没有限制,在多种实施方式中,所述寡核苷酸序列包含下列序列、或来源于(例如包含所述 SEQ ID 内存在的相应的连续核碱基序列)下列序列:选自 SEQ ID NO:200-227 的序列。

[0068] 所述寡聚物包含连续核碱基序列或由连续核碱基序列组成,所述连续核碱基序列相应于存在于所述靶核酸例如 SEQ ID NO:197 或选自 SEQ ID NO:200-227、1-140 和 228-233(参见表 1)的序列的核苷酸序列,其中所述寡聚物(或其连续核碱基部分)可以任选地包含相对于所述被选序列的一个、两个或三个错配。包含 16 个核碱基的寡聚物序列的

实例示于 SEQ ID NO :1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139 和 140。更短的序列可以来自其中。更长的序列可以包括来自 SEQ ID NO 中例示的那些的全部或至少 10 个核碱基。

[0069] 本发明进一步提供了 HER3 基因中的靶序列,特别是与 SEQ ID NO :1-140 相应(即,其反向补体)的那些,其中与所述靶序列相应的反义寡核苷酸(寡聚物)能够下调 HER3。例如,分别与反义寡核苷酸序列 SEQ ID NO :1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139 和 140 相应的靶序列在附图 1 中示出(粗体和下划线的,具有上文所述的相应的寡聚 SEQ ID NO)。还公开了寡核苷酸的设计,例如在 SEQ ID NO :141-168 中所示的那些。还公开了 LNA 寡核苷酸的具体的设计,例如在 SEQ ID NO :169-196 和 234 中所示的那些,尤其是在 SEQ ID NO :169、170、173、174、180、181、183、185、187、188、189、190、191、192、194 和 / 或 SEQ ID NOS :169、170、172、174、175、176 和 179 中所示的那些。在一个实施方式中,本发明的寡聚物包含或由 SEQ ID NO :169、180 或 234 组成,或者包含或由与 SEQ ID NO :169、180 或 234 相应的连续核碱基序列组成,或是其缀合物的形式。在优选实施方式中,本发明的寡核苷酸被认为是 HER3mRNA 和蛋白质表达的有效的抑制剂。

[0070] 在一个方面,本发明提供了能够结合 HER3 基因的靶序列并下调 HER3 的表达的反义寡核苷酸(寡聚物),所述寡核苷酸包含下列序列或由下列序列组成:与靶序列相应的 10-50 个、优选 10-25 个核碱基、更优选 10-16 个核碱基的(连续)序列,并且其中优选至少两个所述的核碱基是核苷酸类似物。这样的寡聚序列的实例的列表在表 1 中给出(实施例 3)。

[0071] 优选,寡核苷酸序列包含 10-16 个核碱基的序列。包含 16 个核碱基的寡核苷酸序列的实例示于选自 SEQ ID NO :1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139 和 140 的 SEQ ID。具有更少的核碱基,例如 10、11、12、13、14 或 15 个核碱基的寡核苷酸序列,因而可以具有与子序列相应的连续核碱基序列,例如在 SEQ ID NO :1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139 和 140 中存在的至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14 或 15 个连续核碱基。因而,更短的序列可以来自其中。更长的序列可以包括来自 SEQ ID NO 中例示的那些的全部或至少 10 个核碱基。一般地,如果寡核苷酸的仅一部分序列是选自 SEQ ID NO :1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139 和 140 的 SEQ ID,则寡核苷酸的序列的其余部分与所述 SEQ ID 侧翼的相应核苷酸同源。

[0072] 两个感兴趣的序列基序为 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :54。

[0073] 本发明的寡聚物包含缺口聚物或由缺口聚物核碱基序列组成,所述缺口聚物核碱基序列选自 SEQ ID NO :141 到 168,例如 SEQ ID NO :141 和 152。

[0074] 在某些实施方式中,所述寡聚物可以包含连续核碱基序列或由连续核碱基序列组成,所述连续核碱基序列与编码哺乳动物 HER3 的核酸的等价区域完全互补(或完美互补),即,包含反义核苷酸序列。

[0075] 然而,在某些实施方式中,当与靶序列杂交时,所述寡聚物可以包含 1、2、3 或 4 个(或更多个)错配,并仍然足以结合靶以显示期望的效果,即,靶的下调。例如,错配可以通

过提高寡聚物核碱基序列的长度和 / 或提高核碱基序列中存在的核苷酸类似物 (如 LNA) 的数量来补偿。

[0076] 在多种实施方式中,所述连续核碱基序列包含相对于靶序列,例如相对于编码哺乳动物 HER3 的核酸的对应区的不超过 3 个,例如不超过 2 个的错配。

[0077] 在多种实施方式中,连续核碱基序列包含相对于靶序列,例如编码哺乳动物 HER3 的核酸的对应区的不超过 1 个的错配。

[0078] 本发明的寡聚物的核碱基序列或连续核碱基序列优选与选自 SEQ ID NO :200-227、1-140 和 228-233 的相应序列至少 80% 同源,例如至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 同源,例如 100% 同源 (相同)。

[0079] 本发明的寡聚物的核苷酸序列或连续核苷酸序列优选与 SEQ ID NO :197 中存在的相应序列至少 80% 同源,例如至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 同源,例如 100% 同源 (相同)。

[0080] 本发明的寡聚物的核苷酸序列或连续核苷酸序列优选至少 80% 与 SEQ ID NO :197 中存在的子序列互补,例如至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 互补,例如 100% 互补 (完美互补)。

[0081] 在多种实施方式中,所述寡聚物 (或其连续核碱基部分) 选自,或包含,选自 SEQ ID NO :220-227、1-140 和 228-233 的序列之一或其至少 10 个连续核碱基的子序列,其中所述寡聚物 (或其连续核碱基部分) 可以任选地包含相对于所述选择的序列的一个、两个或三个错配。

[0082] 在多种实施方式中,所述子序列可以由 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 或 29 个连续核碱基,例如 12-22 个,例如 12-18 个核碱基组成。适合地,在多种实施方式中,所述子序列具有与本发明的寡聚物的连续核碱基序列相同的长度。

[0083] 然而,认识到的是,在多种实施方式中,所述寡聚物的核碱基序列可以包含附加的 5' 或 3' 核碱基,例如,独立地,1、2、3、4 或 5 个附加的核碱基 5' 或 3', 其与靶序列不互补。在这点上,在多种实施方式中,本发明的寡聚物可以包含在 5' 和 / 或 3' 侧翼具有附加核碱基的连续核碱基序列。在多种实施方式中,附加的 5' 或 3' 核碱基是天然存在的核苷酸,例如 DNA 或 RNA。在多种实施方式中,附加的 5' 或 3' 核碱基可以代表如本文缺口寡聚物寡聚物的上下文中所涉及的 D 区。

[0084] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :200 的核碱基序列、或其子序列。

[0085] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :201 的核碱基序列、或其子序列。

[0086] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :202 的核碱基序列、或其子序列。

[0087] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :203 的核碱基序列、或其子序列。

[0088] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据

SEQ ID NO :204 的核碱基序列、或其子序列。

[0089] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :205 的核碱基序列、或其子序列。

[0090] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :206 的核碱基序列、或其子序列。

[0091] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :207 的核碱基序列、或其子序列。

[0092] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :208 的核碱基序列、或其子序列。

[0093] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :209 的核碱基序列、或其子序列。

[0094] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :210 的核碱基序列、或其子序列。

[0095] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :211 的核碱基序列、或其子序列。

[0096] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :212 的核碱基序列、或其子序列。

[0097] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :213 的核碱基序列、或其子序列。

[0098] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :214 的核碱基序列、或其子序列。

[0099] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :215 的核碱基序列、或其子序列。

[0100] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :216 的核碱基序列、或其子序列。

[0101] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :217 的核碱基序列、或其子序列。

[0102] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :218 的核碱基序列、或其子序列。

[0103] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :219 的核碱基序列、或其子序列。

[0104] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :220 的核碱基序列、或其子序列。

[0105] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :221 的核碱基序列、或其子序列。

[0106] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :222 的核碱基序列、或其子序列。

[0107] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO :223 的核碱基序列、或其子序列。

[0108] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO:224 的核碱基序列、或其子序列。

[0109] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO:225 的核碱基序列、或其子序列。

[0110] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO:226 的核碱基序列、或其子序列。

[0111] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含以下序列或由以下序列组成:根据 SEQ ID NO:227 的核碱基序列、或其子序列。

[0112] 当确定本发明的寡聚物(或连续核碱基序列)和编码哺乳动物 HER3(或 Her2 或 EGFR)的核酸(例如在此公开的那些)之间的“同源性”或“互补性”时,同源性的确定可以通过与本发明化合物的相应核苷酸序列和编码哺乳动物 HER3 的核酸(或靶核酸)的对应区或其补体的简单比对来进行,通过计算对齐(align)的碱基的数目并除以本发明的化合物中连续核碱基的总数,并乘以 100 来确定同源性。在这样的比较中,如果存在缺口(gaps),优选是这些缺口仅仅是错配而不是一些下述区域,其中缺口内核苷酸数量在本发明的核苷酸序列和靶序列之间不同。

[0113] 氨基酸和多核苷酸同源性可以使用标准设置的 ClustalW 算法确定:参见 <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>, 方法:EMBOSS::水(局部):缺口产生(Gap Open) = 10.0, 缺口延伸(Gap extend) = 0.5, 使用 Blosum 62(蛋白质),或用于核苷酸/核碱基序列的 DNafull。这样的比对也可以用于鉴定编码来自人和不同的哺乳动物物种如猴、小鼠和/或大鼠的 HER3 的核酸的区域,其中该区有足够长度的核酸互补性,以允许设计同时靶向人 HER3 靶核酸和不同哺乳动物物种中存在的相应核酸的寡核苷酸,例如,包含以下区域或由以下区域组成的寡聚物:至少 10 个、例如至少 12 个、例如至少 14 个、例如至少 16 个、例如至少 18 个,例如 11、12、13、14、15、16、17 或 18 个连续核碱基,所述连续核碱基与编码来自人的 HER3 的核酸、以及编码来自不同哺乳动物物种的 HER3 的核酸的等价的区域 100%互补。

[0114] 在多种实施方式中,本发明的寡聚物包含连续核碱基序列或由连续核碱基序列组成,所述连续核碱基序列与编码来自人的 HER3 的核酸、以及编码来自不同哺乳动物物种的 HER3 的核酸(例如编码 HER3 的小鼠核酸)的对应区至少 80%、例如至少 85%、例如至少 90%、例如至少 95%、例如至少 98%、例如至少 99%、或 100%同源(即,与人和小鼠序列两者的等价区域(equivalent region)80%或 100%互补)。优选是,所述寡聚物的连续核碱基序列与人 HER3mRNA 的等价区域 100%互补。

[0115] 术语“对应”和“相应”是指寡聚物的核碱基序列或连续核碱基序列与下述的等价核苷酸序列之间的比较:i) 核酸靶的反向补体,核酸靶例如编码靶蛋白质的 mRNA,例如 HER3 蛋白,例如 SEQ ID NO:197;和/或(ii) 本文提供的核苷酸的序列,例如选自 SEQ ID NO:200-227、1-140 和 228-233。核苷酸类似物直接地与它们等价的或相应的核苷酸比较。

[0116] 术语“相应的核苷酸类似物”和“相应的核苷酸”是指核苷酸类似物和天然存在的核苷酸中的核碱基是相同的。例如,当核苷酸的 2-脱氧核糖单元与腺嘌呤连接时,“相应的核苷酸类似物”含有与腺嘌呤连接的戊糖单元(不同于 2-脱氧核糖)。

[0117] 本发明进一步提供了包含与 HER3 基因中的靶序列相应的寡聚序列的反义寡核苷

酸,所述反义寡核苷酸不仅能够下调 HER3 表达,还能够下调受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族的其他成员中一个或多个,特别是 HER2 和 / 或 EGFR 的表达。能够有效地下调两种靶的寡核苷酸被称为“双特异性的 (bispecific)” ;能够有效地下调三种靶的寡核苷酸被称为“三特异性的 (trispecific)” 。更一般地,本发明的反义寡核苷酸是多特异性的,即,能够下调受体酪氨酸激酶的 Erb 家族的多个成员的表达。术语“双特异性的” 和“三特异性的” 因而仅仅为了便于描述,而不能理解为是限制性的。举例来说,双特异性寡核苷酸可能对第三靶具有某些效果,而三特异性寡核苷酸可能对它的靶之一具有非常弱的因而不明显的效果。

[0118] 因而,在另一个方面,本发明提供了双特异性反义寡核苷酸,即,能够下调 HER3 的表达和受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族的另一种成员的表达的寡核苷酸。优选,这样的双特异性寡核苷酸能够有效地下调 HER3 和 HER2 的表达。或者以及也优选,这样的双特异性寡核苷酸能够有效地下调 HER3 和 EGFR 的表达。

[0119] 在另一个方面,本发明提供了三特异性反义寡核苷酸,即,能够下调 HER3 和受体酪氨酸激酶的 erbB 家族的另两种其他成员的表达的寡核苷酸。优选,这样的三特异性寡核苷酸能够有效地下调 HER3、HER2 和 EGFR 的表达。

[0120] 有效地下调 HER3 的寡核苷酸的实例是 SEQ ID NO :169-196 和 234。有效地下调 HER3 和 HER2 的寡核苷酸的实例是 SEQ ID NO :177 和 178。有效地下调 HER3 和 EGFR 的寡核苷酸的实例是 SEQ ID NO :171 和 173。有效地下调 HER3、HER2 和 EGFR 的寡核苷酸的实例是 SEQ ID NO :169、170、172、174-176 和 179。

[0121] 根据本发明的双特异性或三特异性寡核苷酸可以容许 1、2、3、4、5 或更多个错配以充分地分别结合两种、或全部三种靶。

[0122] 根据本发明的双特异性或三特异性寡核苷酸的靶可以选自受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族,特别是选自 HER3、HER2 和 EGFR。两种或更多种所述靶的下调可以通过提供充分地编码相应靶的核酸例如信使 RNA 杂交的反义寡核苷酸来实现。

[0123] 还公开了 LNA 寡核苷酸的具体设计,例如在 SEQ ID NO :169-196 和 SEQ ID NO :234 到 236 中所显示的那些。本发明的寡聚物被认为是 HER3mRNA 和蛋白表达的有效抑制剂。

[0124] 在多种实施方式中,所述寡聚物包含连续核碱基序列或由连续核碱基序列组成,所述连续核碱基序列与编码哺乳动物 HER3、和 / 或独立地 HER2 和 / 或独立地 EGFR 的核酸的对应区至少 80%、例如至少 90%、例如至少 95% 同源。

[0125] 长度

[0126] 所述寡聚物包含以下序列或由以下序列组成 :总共 10-50 个核碱基的连续核碱基序列,例如长度 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个连续核碱基。

[0127] 在多种实施方式中,所述寡聚物包含以下序列或由以下序列组成 :总共 10-25 个、10-24 个、12-25 个、12-24 个或 10-22 个的连续核碱基序列,例如,长度 12-18 个,例如 13-17 个或 12-16 个,例如 13、14、15、16 个连续核碱基。

[0128] 在多种实施方式中,所述寡聚物包含以下序列或由以下序列组成 :总共 10-22 个或 10-18 个的连续核碱基序列,例如,长度 12-18 个,例如 13-17 个或 12-16 个,例如 13、14、15、16 个连续核碱基。在多种实施方式中,所述寡聚物包含以下序列或由以下序列组成 :总共 10-16、12-16 或 12-14 个核碱基的连续核碱基序列。在多种实施方式中,所述寡聚物包

含以下序列或由以下序列组成：总共 14-18 或 14-16 个核碱基的连续核碱基序列。

[0129] 在多种实施方式中，所述寡聚物包含以下序列或由以下序列组成：长度总共 10、11、12、13 或 14 个连续核碱基的连续核碱基序列。

[0130] 在多种实施方式中，根据本发明的寡聚物由不超过 22 个核碱基，例如不超过 20 个核碱基，例如不超过 18 个核碱基，例如 15、16 或 17 个核碱基组成。在多种实施方式中，本发明的寡聚物包含低于 20 个核碱基。

[0131] 核苷酸类似物

[0132] 如在此使用的，术语“核苷酸”是指包含糖部分、碱基部分和共价连接的磷酸基团的糖苷，包括天然存在的核苷酸，例如 DNA 或 RNA，优选 DNA。包含修饰的糖类和 / 或碱基部分的非天然存在的核苷酸在此被称为“核苷酸类似物”。

[0133] 术语“核碱基”用于涵盖天然的（DNA 或 RNA 型）核苷酸以及核苷酸类似物。

[0134] 非天然存在的核苷酸包括具有修饰的糖部分的核苷酸，例如二环的核苷酸或 2' 修饰的核苷酸，例如 2' 取代的核苷酸。

[0135] “核苷酸类似物”是通过在糖和 / 或碱基部分的修饰而得到的天然核苷酸如 DNA 或 RNA 核苷酸的变体。在寡核苷酸的情况下，类似物原则上可以仅仅是“沉默”或“等价”于天然核苷酸，即，对于寡核苷酸抑制靶基因表达的作用方式没有功能上的影响。这样的“等价”类似物可以仍然是有用的，如果例如，它们更容易或更便宜地制造，或对于保存或制备条件更为稳定，或表示标签或标记。然而，优选，所述类似物将对寡聚物抑制表达的作用方式具有功能性影响；例如，通过产生对靶的提高了的亲合力，和 / 或对细胞内核酶的提高了的抗性，和 / 或更方便地转运到细胞中。

[0136] 术语“核碱基”被用作集合性的术语，其包括了核苷酸和核苷酸类似物。核碱基序列是包含至少两个核苷酸或核苷酸类似物的序列。在多种实施方式中，核碱基序列可以仅包含核苷酸，例如 DNA 单元，在可选择的实施方式中，所述核碱基序列可以仅包含核苷酸类似物，例如 LAN 单元，或在多种实施方式中，所述核碱基序列可以包含核苷酸和核苷酸类似物单元两者。

[0137] 术语“核酸”被定义为由两个或更多个核苷酸的共价连接形成的分子。

[0138] 术语“核酸”和“多核苷酸”在此可互换使用。

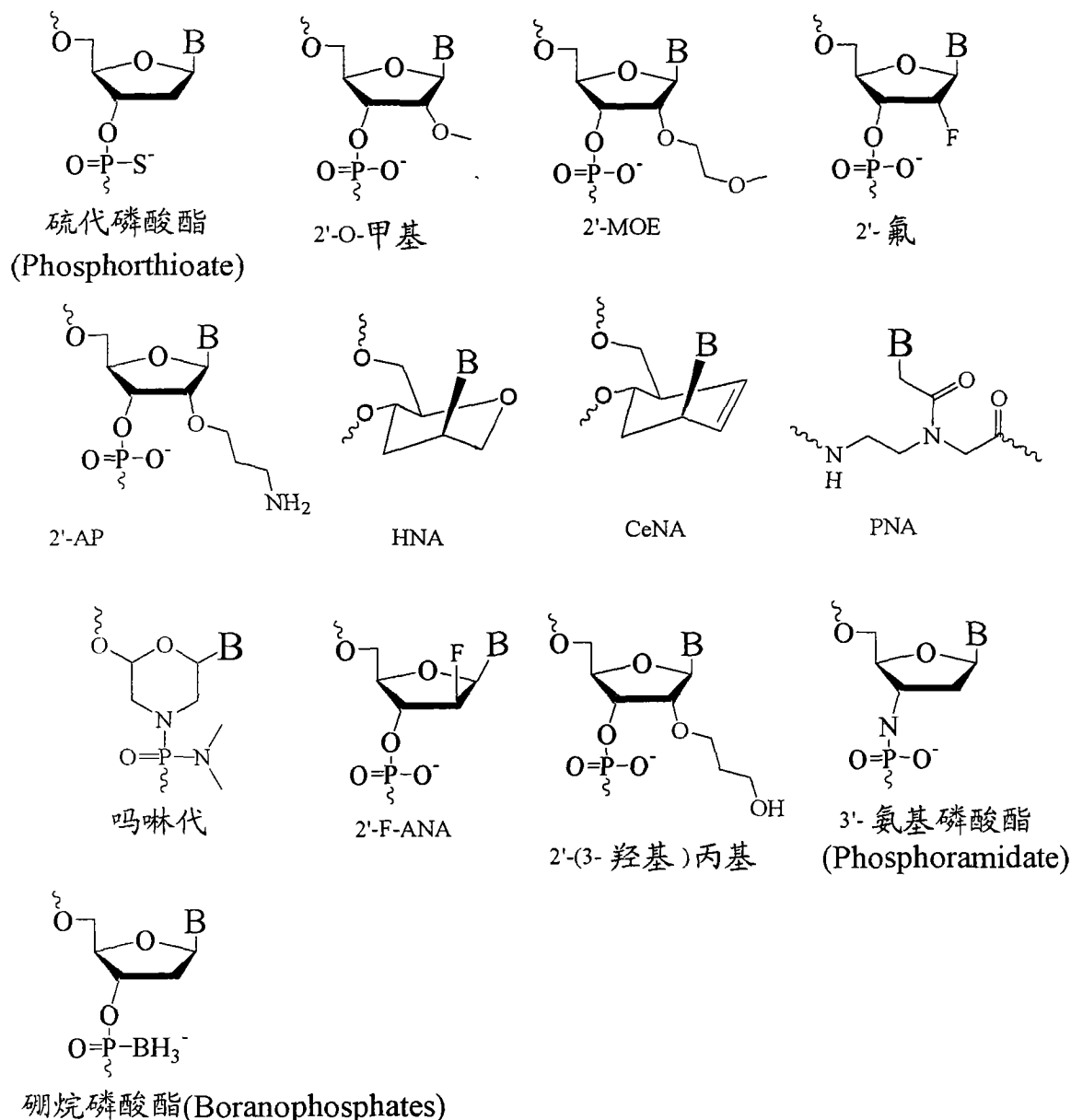
[0139] 核碱基的“碱基部分”包括了天然存在的以及非天然存在的核碱基的碱基。因而，碱基部分不仅包括了已知的嘌呤和嘧啶杂环，还包括了其杂环类似物和互变异构体。

[0140] 这样的碱基部分的实例包括但不限于，腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶 (isocytosine)、假异胞嘧啶 (pseudoisocytosine)、5-溴尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和 2-氯-6-氨基嘌呤。

[0141] 在多种实施方式中，所述寡聚物中存在的至少一个核碱基包含修饰的碱基，例如，选自 5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和 2-氯-6-氨基嘌呤。

[0142] 核苷类似物的具体实例由例如 Freier&Altmann;Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 和 Uhlmann;Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213 描述，以及在示例 1 中描述：

[0143]



[0144] 示例 1

[0145] 寡聚物因而可以包含以下序列或由以下序列组成：天然存在的核苷酸——优选 2' - 脱氧核苷酸（在此一般称为“DNA”）的简单序列，但还可能的是核糖核苷酸（在此一般称为“RNA”），或这些天然存在的核苷酸和一种或多种非天然存在的核苷酸，即，核苷酸类似物的组合。这样的核苷酸类似物可以适当地增强寡聚物对靶序列的亲合力。

[0146] 适合的和优选核苷酸类似物的实例在 W02007/031091 中描述，因而在此引用作为参考，或参考其中的内容。

[0147] 核苷酸的一种优选修饰包括其中糖部分被修饰来提供 2' - 取代基团或来产生桥接的（锁核酸-LNA）结构的核苷酸，其增强了结合亲和力，以及还能提供某些提高的核酸酶抗性；将核苷酸间连接从其正常的磷酸二酯修饰为对核酸酶攻击有 10 倍抗性的一种，例如硫代磷酸酯或硼烷磷酸酯，这两种可以被 RNase H 裂解，还容许在调节 HER3 表达中的反义抑制的途径。在寡聚物中掺入亲和力增强的核苷酸类似物，例如 LNA 或 2' 取代的糖，能使特异性结合寡聚物的大小降低，还可以在发生非特异性或异常的结合之前降低寡聚物大小

的上限。

[0148] 在多种实施方式中,所述寡聚物包含至少 2 个核苷酸类似物。在某些实施方式中,所述寡聚物包含 3-8 个核苷酸类似物,例如 6 个或 7 个核苷酸类似物。在最优选实施方式中,至少一个所述核苷酸类似物是锁核酸 (LNA);例如,至少 3 或至少 4、或至少 5、或至少 6、或至少 7、或 8 个核苷酸类似物可以是 LNA。在某些实施方式中,所有核苷酸类似物可以是 LNA。

[0149] 将认识到的是,当涉及仅由核苷酸组成的优选核苷酸序列基序或核苷酸序列时,由该序列限定的本发明的寡聚物可以包含相应的核苷酸类似物来代替所述序列中存在的一个或多个核苷酸,例如 LNA 单元或其他核苷酸类似物,其提高寡聚物/靶双链体的双螺旋稳定性/ T_m (即,亲和力增强的核苷酸类似物)。

[0150] 在多种实施方式中,寡聚物和靶序列的核碱基序列之间任何错配优选在所述亲和力增强核苷酸类似物(例如,A 区和 C 区)之外的区域中存在,例如本文涉及的 B 区、和/或本文涉及的 D 区之内,和/或在非修饰的位点处,例如寡核苷酸中的 DNA 核苷酸,和/或在所述连续核碱基序列的 5' 或 3' 的区域中。

[0151] 核苷酸的这种修饰的实例包括修饰糖部分来提供 2' 取代基团或产生桥接的(锁核酸)结构,其增强结合亲和力并可能还提供提高的核酸酶抗性。

[0152] 优选核苷酸类似物是 LNA,例如氧-LNA(例如 β -D-氧基-LNA,和 α -L-氧基-LNA),和/或氨基-LNA(例如 β -D-氨基-LNA 和 α -L-氨基-LNA)和/或硫基-LNA(例如 β -D-硫基-LNA 和 α -L-硫基-LNA)和/或 ENA(例如 β -D-ENA 和 α -L-ENA)。在多种实施方式中,所述 LNA 单元是 β -D-氧基-LNA。

[0153] 在某些实施方式中,本发明的寡聚物内存在的核苷酸类似物(例如,在本文提及的 A 区和 C 区中)独立地选自,例如:2'-O-烷基-RNA 单元、2'-氨基-DNA 单元、2'-氟-DNA 单元、LNA 单元、阿拉伯糖核酸(ANA)单元、2'-氟-ANA 单元、HNA 单元、INA(intercalating nucleic acid-Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 200230:4918-4925,在此引用作为参考)单元和 2' MOE 单元。在多种实施方式中,仅有一种上述类型的核苷酸类似物存在于本发明的寡聚物或其连续核碱基序列中。

[0154] 在多种实施方式中,核苷酸类似物是 2'-O-甲氧基乙基-RNA (2'MOE)、2'-氟-DNA 单体或 LNA 核苷酸类似物,因而本发明的寡核苷酸可以包含核苷酸类似物,其独立地选自这三种类似物,或可以包含选自三种类型的仅一种类型的类似物。在多种实施方式中,至少一个所述核苷酸类似物是 2'-MOE-RNA,例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个 2'-MOE-RNA 核苷酸单元。在多种实施方式中,至少一个所述核苷酸类似物是 2'-氟 DNA,例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个 2'-氟-DNA 核苷酸单元。

[0155] 在多种实施方式中,根据本发明的寡聚物包含至少一个锁核酸 (LNA) 单元,例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个 LNA 单元,例如 3-7 个或 4 到 8 个 LNA 单元,或 3、4、5、6 或 7 个 LNA 单元。在多种实施方式中,所有的核苷酸类似物是 LNA。在某些实施方式中,所述寡聚物可以包含 β -D-氧基-LNA 以及一种或多种以下的 LNA 单元: β -D 或 α -L 构型的硫基-LNA、氨基-LNA、氧基-LNA 和/或 ENA 或其组合。在多种实施方式中,全部 LNA 胞嘧啶单元是 5' 甲基-胞嘧啶。在本发明的各种实施方式中,寡聚物可以包含 LNA 和 DNA 单元。优选, LNA 和 DNA 单元的组合的总数是 10-25 个,优选 10-20 个,再更优选 12-16 个。在本发明的各种

实施方式中,寡聚物的核苷酸序列,例如连续核碱基序列由至少一个 LNA 组成,其余的核苷酸单元是 DNA 单元。在多种实施方式中,所述寡聚物仅包含 LNA 核苷酸类似物和天然存在的核苷酸(例如 RNA 或 DNA,最优选 DNA 核苷酸),任选的具有修饰的核苷酸间连接,例如硫代磷酸酯(phosphorothioate)。

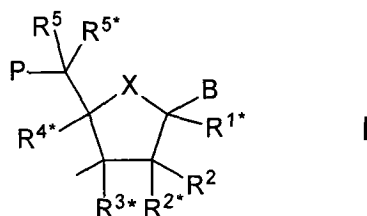
[0156] 在多种实施方式中,所述寡聚物中存在的至少一个核碱基具有修饰的碱基,其选自 5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和 2-氯-6-氨基嘌呤。

[0157] LNA

[0158] 术语“LNA”是指二环的核苷酸类似物,称为“锁核酸(Locked Nucleic Acid)”。它可以指 LNA 单体,或当在“LNA 寡核苷酸”或“LNA 寡聚物”的上下文中使用时,是指含有一个或多个这样的二环的核苷酸类似物的寡聚物。

[0159] 本发明的寡聚物中使用的 LNA 优选具有通式 I 的结构,及其碱盐(basic salts)和酸加成盐

[0160]



[0161] 其中 X 选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^{N*})-$ 、 $-C(R^6R^{6*})-$;

[0162] B 选自氢、任选取代的 C_{1-4} -烷氧基、任选取代的 C_{1-4} -烷基、任选取代的 C_{1-4} -酰基、核碱基、DNA 嵌入剂、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、报道基(report groups)和配体;

[0163] P 表示与在后的单体之间的核苷酸间连接(internucleotide linkage)的基团位置,或 5'-末端基团,该核苷酸间连接或 5'-末端基团任选包括取代基 R^5 或等同适用取代基 R^{5*} ;

[0164] P^* 表示与在前的单体的核苷酸间连接,或 3'-末端基团;

[0165] R^{4*} 和 R^{2*} 一起表示由 1-4 个选自下列的基团/原子组成的二价基团(biradical): $-C(R^aR^b)-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R^a)-$ 和 $>C=Z$,

[0166] 其中 Z 选自 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-N(R^a)-$,且 R^a 和 R^b 各自独立地选自氢、任选取代的 C_{1-12} -烷基、任选取代的 C_{2-12} -烯基、任选取代的 C_{2-12} -炔基、羟基、 C_{1-12} -烷氧基、 C_{2-12} -烷氧基烷基、 C_{2-12} -烯基氧基、羧基、 C_{1-12} -烷氧基羰基、 C_{1-12} -烷基羰基、甲酰基、芳基、芳基氧基-羰基、芳基氧基、芳基羰基、杂芳基、杂芳基氧基-羰基、杂芳基氧基、杂芳基羰基、氨基、单和二(C_{1-6} -烷基)氨基、氨基甲酰基、单和二(C_{1-6} -烷基)-氨基-羰基、氨基- C_{1-6} -烷基-氨基羰基、单和二(C_{1-6} -烷基)氨基- C_{1-6} -烷基-氨基羰基、 C_{1-6} -烷基-羰基氨基、脲基、 C_{1-6} -烷酰基氧基、磺基(sulphono)、 C_{1-6} -烷基磺酰基氧基、硝基、叠氮基、硫基(sulphanyl)、 C_{1-6} -烷基硫基、卤素、DNA 嵌入剂、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、报道基和配体,其中芳基和杂芳基可任选被取代,且其中两个成对的(geminal)取代基 R^a 和

[0167] R^b 一起可表示任选取代的亚甲基 ($=CH_2$), 和

[0168] 存在的取代基 R^{1*} 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、 R^{5*} 、 R^6 和 R^{6*} 各自独立地选自氢、任选取代的 C_{1-12} -烷基、任选取代的 C_{2-12} -烯基、任选取代的 C_{2-12} -炔基、羟基、 C_{1-12} -烷氧基、 C_{2-12} -烷氧基烷基、 C_{2-12} -烯基氧基、羧基、 C_{1-12} -烷氧基羰基、 C_{1-12} -烷基羰基、甲酰基、芳基、芳基氧基-羰基、芳基氧基、芳基羰基、杂芳基、杂芳基氧基-羰基、杂芳基氧基、杂芳基羰基、氨基、单和二 (C_{1-6} -烷基) 氨基、氨基甲酰基、单和二 (C_{1-6} -烷基)-氨基-羰基、氨基- C_{1-6} -烷基-氨基羰基、单和二 (C_{1-6} -烷基) 氨基- C_{1-6} -烷基-氨基羰基、 C_{1-6} -烷基-羰基氨基、脲基、 C_{1-6} -烷酰基氧基、磺基、 C_{1-6} -烷基磺酰基氧基、硝基、叠氮基、硫基 (sulphanyl)、 C_{1-6} -烷基硫基、卤素、DNA 嵌入剂、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、报道基和配体、其中芳基和杂芳基可任选被取代, 且其中两个成对的取代基一起可表示氧代、硫代、亚氨基或任选取代的亚甲基, 或一起可形成由 1-5 个碳原子亚烷基链组成的螺环二价基团, 所述亚烷基链任选插入一个或多个杂原子 / 基团和 / 或被一个或多个杂原子 / 基团终止, 所述杂原子 / 基团选自 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-(NR^N)-$, 其中 R^N 选自氢和 C_{1-4} -烷基, 且其中两个相邻的 (非成对的) 取代基可表示另一键, 导致形成双键; 且 R^{N*} , 当存在且不涉及二价基团时, 选自氢和 C_{1-4} -烷基;

[0169] 在多种实施方案中, R^{5*} 选自 H 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-O-CH_3$ 和 $-CH=CH_2$ 。

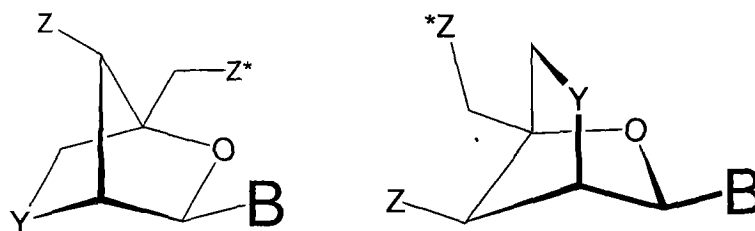
[0170] 在多种实施方案中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起表示二价基团, 其选自 $-C(R^aR^b)-O-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-O-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-O-$ 、 $-C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-$ 、 $-C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-O-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-C(R^cR^d)-$ 、 $-C(R^aR^b)-N(R^c)-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-N(R^e)-$ 、 $-C(R^aR^b)-N(R^c)-O-$ 和 $-C(R^aR^b)-S-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-S-$, 其中 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 和 R^f 各自独立地选自氢、任选取代的 C_{1-12} -烷基、任选取代的 C_{2-12} -烯基、任选取代的 C_{2-12} -炔基、羟基、 C_{1-12} -烷氧基、 C_{2-12} -烷氧基烷基、 C_{2-12} -烯基氧基、羧基、 C_{1-12} -烷氧基羰基、 C_{1-12} -烷基羰基、甲酰基、芳基、芳基氧基-羰基、芳基氧基、芳基羰基、杂芳基、杂芳基氧基-羰基、杂芳基氧基、杂芳基羰基、氨基、单和二 (C_{1-6} -烷基) 氨基、氨基甲酰基、单和二 (C_{1-6} -烷基)-氨基-羰基、氨基- C_{1-6} -烷基-氨基羰基、单和二 (C_{1-6} -烷基) 氨基- C_{1-6} -烷基-氨基羰基、 C_{1-6} -烷基-羰基氨基、脲基、 C_{1-6} -烷酰基氧基、磺基、 C_{1-6} -烷基磺酰基氧基、硝基、叠氮基、硫基 (sulphanyl)、 C_{1-6} -烷基硫基、卤素、DNA 嵌入剂、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、报道基和配体, 其中芳基和杂芳基可任选被取代, 且其中两个成对的取代基 R^a 和 R^b 一起可表示任选取代的亚甲基 ($=CH_2$),

[0171] 在另一实施方案中 R^{4*} 和 R^{2*} 一起表示二价基团, 其选自 $-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-NH-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-$ 、 $-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$ 、 $-CH=CH-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-NH-O-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-O-$ 、 $-CH(CH_2-O-CH_3)-O-$ 。

[0172] 对于所有手性中心, 不对称的基团可为 R 或 S 取向。

[0173] 优选地, 本发明的寡聚物中使用的 LNA 包括至少一个根据任一下式的 LNA 单元

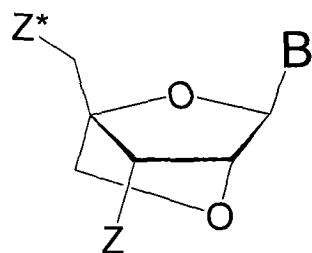
[0174]



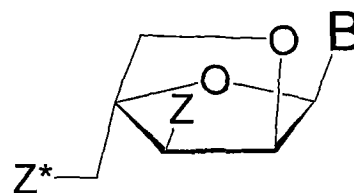
[0175] 其中 Y 为 $-O-$ 、 $-O-CH_2-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 或 $N(R^H)$; Z 和 Z^* 独立地选自核苷酸间连接、末端基团或保护基 ; B 构成天然或非天然核苷酸碱基部分, 且 R^H 选自氢和 C_{1-4} -烷基。

[0176] 特别优选的 LNA 单元示于示例 2 :

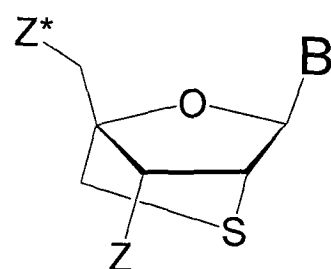
[0177]



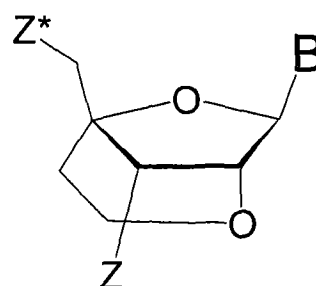
β -D-氧基-LNA



A-L-氧基-LNA

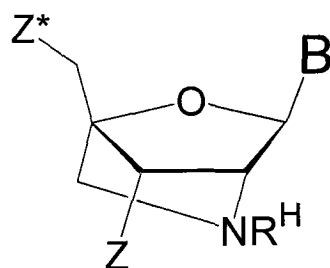


β -D-硫基-LNA



B-D-ENA

[0178]



β -D-氨基-LNA

[0179] 示例 2

[0180] 术语“硫基-LNA”包括其中上述通式中的 Y 选自 S 或 $-CH_2-S-$ 的锁核碱基 (locked nucleobase) (LNA)。硫基-LNA 可为 β -D 和 α -L- 构型。

[0181] 术语“氨基-LNA”包括其中上述通式中的 Y 选自 $-N(H)-$ 、 $N(R)-$ 、 $CH_2-N(H)-$ 和 $-CH_2-N(R)-$, 其中 R 选自氢和 C_{1-4} -烷基的锁核碱基 (LNA)。氨基-LNA 可为 β -D 和 α -L- 构型。

[0182] 术语“氧基-LNA”包括其中上述通式中的 Y 表示 $-O-$ 或 $-CH_2-O-$ 的锁核碱基 (LNA)。氧基-LNA 可为 β -D 和 α -L- 构型。

[0183] 术语“ENA”包括其中上述通式中的Y为 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ (其中 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 的氧原子连接至相对碱基B的2'-位)的锁核碱基(LNA)。

[0184] 在优选实施方案中LNA选自 β -D-氧基-LNA、 α -L-氧基-LNA、 β -D-氨基-LNA和 β -D-硫基-LNA,特别是 β -D-氧基-LNA。

[0185] 在本文中,术语“ C_{1-4} -烷基”是指直链或支链的饱和烃链,其中该链具有1至4个碳原子,如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

[0186] RNase H 募集

[0187] 应认识到寡聚化合物可通过非RNase介导的靶mRNA的降解起作用,如通过翻译的位阻,或其它方法,然而,本发明优选的寡聚物能募集核糖核酸内切酶(RNase),如RNase H。

[0188] 在多种实施方案中,该寡聚物或连续核碱基序列,包含至少6个,如至少7个连续核苷酸或核碱基单元,如至少8或至少9个相连核碱基单元(残基),包括7,8,9,10,11,12,13,14,15或16个连续核苷酸或核碱基的区域,当其与互补靶RNA形成双链体时能募集RNase。能募集RNase的连续序列可为本文所述的缺口聚物(gapmer)涉及的B区。在多种实施方案中,能募集RNase的连续序列(如B区)的尺寸可更大,如10,11,12,13,14,15,16,17,18,19或20个核碱基单元。

[0189] EP 1222309 提供了体外测定RNaseH活性的方法,其可用于测定募集RNaseH的能力。使用EP 1222309的实施例91-95提供的方法,如果当提供互补RNA靶时,具有的初始速率(以 $\text{pmol}/1/\text{min}$ 测量),为等效DNA(equivalent DNA)的至少1%,如至少5%,如至少10%或少于20%,该等效DNA仅为寡核苷酸,没有2'取代,且在寡核苷酸中的所有核苷酸间具有硫代磷酸酯连接基,则认为该寡聚物能募集RNase H。

[0190] 在多种实施方案中,使用EP 1222309的实施例91-95提供的方法,如果当提供互补RNA靶和RNaseH时,该RNaseH初始速率(以 $\text{pmol}/1/\text{min}$ 测量),少于使用等效DNA测定的初始速率的1%,如少于5%,如少于10%或少于20%,该等效DNA仅为寡核苷酸,没有2'取代,且在寡核苷酸中的所有核苷酸间具有硫代磷酸酯连接基,则认为该寡聚物基本不能募集RNase H。

[0191] 在其它实施方案中,使用EP 1222309的实施例91-95提供的方法,如果当提供互补RNA靶和RNaseH时,该RNaseH初始速率(以 $\text{pmol}/1/\text{min}$ 测量),为使用等效DNA测定的初始速率的至少20%,如至少40%,如至少60%,如至少80%,该等效DNA仅为寡核苷酸(即具有相同的碱基序列,但仅含有DNA单元),没有2'取代,且在寡核苷酸中的所有核苷酸间具有硫代磷酸酯连接基,则认为该寡聚物能募集RNase H。

[0192] 通常,形成连续核碱基序列的寡聚物的区域,当与互补靶RNA形成双链体时,能募集由核苷酸单元(其与RNA靶形成DNA/RNA状的双链体)组成的RNase-且可包括 α -L构型的DNA单元和LNA单元,特别优选为 α -L-氧基LNA。

[0193] 本发明的寡聚物可包含核碱基序列,其包括核苷酸和核苷酸类似物,且可为缺口聚物(gapmer)、头聚物(headmer)或混合聚物(mixmer)的形式。

[0194] 头聚物如下定义:在5'-端的连续的一段非-募集RNase的核苷酸类似物,接着直到3'-端的连续的一段可由RNase识别和裂解的DNA或修饰的核苷酸(类似物)单元(如至少7个该核苷酸),而尾聚物(tailmer)如下定义:在5'-端的连续的一段可由RNase识别和裂解的DNA或修饰的核苷酸(类似物)(如至少7个该核苷酸),接着直到3'-端的

连续的一段非-募集 RNase 的核苷酸类似物。其它根据本发明的“嵌合”寡聚物,称为“混合聚物”,其由下述交替组分构成:i)可由 RNase 识别和裂解的 DNA 或修饰的核苷酸,和 ii)非-募集 RNase 的核苷酸类似物。一些核苷酸类似物也能介导 RNaseH,结合和裂解。因为 α -L-LNA 募集 RNaseH 活性到一定程度,可能需要可由 RNaseH 识别和裂解的 DNA 或修饰的核苷酸的较小区域(例如缺口-或 B 区)用于缺口聚物构建体,且混合聚物构建中会引入更多的柔性。

[0195] 缺口聚物设计

[0196] 优选地,本发明的寡聚物是缺口聚物。缺口聚物寡聚物是包含一段连续的核苷酸或核碱基的寡聚物(该核苷酸或核碱基能募集 RNase,如 RNaseH),如至少 6 或 7 个 DNA 核苷酸的区域,在本文涉及的为 B 区,其中 B 区的 5' 和 3' 的侧翼均为核苷酸类似物的区域,如增强亲和力的核苷酸类似物,如 1-6 个核苷酸类似物,5' 和 3' 连接至一段连续的能募集 RNase 的核苷酸-涉及的这些区分别称为 A 区和 C 区。

[0197] 优选该缺口聚物包含下式的(聚)核苷酸序列(5'至 3'):A-B-C,或任选 A-B-C-D 或 D-A-B-C,其中:A 区(5'区)由以下组成或包含以下:至少一个核苷酸类似物,如至少一个 LNA 单元,如 1-6 个核苷酸类似物,如 LNA 单元,和;B 区由以下组成或包含以下:至少 5 个能募集 RNase(当与互补 RNA 分子,如 mRNA 靶形成双链体时)的连续核苷酸或核碱基,如 DNA 核苷酸,和;C 区(3'区)由以下组成或包含以下:至少一个核苷酸类似物,如至少一个 LNA 单元,如 1-6 个核苷酸类似物,如 LNA 单元,和;D 区,当存在时由以下组成或包含以下:1,2 或 3 个核苷酸单元,如 DNA 核苷酸。

[0198] 在多种实施方案中,A 区由 1,2,3,4,5 或 6 个核苷酸类似物(如 LNA 单元)组成,如 2-5 个核苷酸类似物,如 2-5 个 LNA 单元,如 3 或 4 个核苷酸类似物,如 3 或 4 个 LNA 单元;和/或 C 区由 1,2,3,4,5 或 6 个核苷酸类似物(如 LNA 单元)组成,如 2-5 个核苷酸类似物,如 2-5 个 LNA 单元,如 3 或 4 个核苷酸类似物,如 3 或 4 个 LNA 单元。

[0199] 在多种实施方案中,B 由以下组成或包含以下:5,6,7,8,9,10,11 或 12 个能募集 RNase 的连续核苷酸或核碱基,或 6-10,或 7-9,如 8 个能募集 RNase 的连续核苷酸或核碱基。在多种实施方案中,B 区由以下组成或包含以下:至少一个 DNA 核苷酸单元,如 1-12 个 DNA 单元,优选 4-12 个 DNA 单元,更优选 6-10 个 DNA 单元,如 7-10 个 DNA 单元,最优选 8,9 或 10 个 DNA 单元。

[0200] 在多种实施方案中,A 区由 3 或 4 个核苷酸类似物(如 LNA)组成,B 区由 7,8,9 或 10 个 DNA 单元组成,且 C 区由 3 或 4 个核苷酸类似物(如 LNA)组成。这些设计包括(A-B-C)3-10-3,3-10-4,4-10-3,3-9-3,3-9-4,4-9-3,3-8-3,3-8-4,4-8-3,3-7-3,3-7-4,4-7-3,且可进一步包括 D 区,其可具有 1 个或 2 个核苷酸单元,如 DNA 单元。

[0201] 其它缺口聚物设计公开于 W02004/046160 且在此引入作为参考。

[0202] 美国临时申请,60/977409 和 PCT/EP2008/053314,在此引入作为参考,涉及‘短聚物(shortmer)’缺口聚物寡聚物,在多种实施方案中,其可为本发明的缺口聚物寡聚物。

[0203] 在多种实施方案中,该寡聚物由总共 10,11,12,13 或 14 个核碱基单元的连续核碱基序列组成,其中该连续核碱基序列为式(5'-3'),A-B-C,或任选 A-B-C-D 或 D-A-B-C,其中:A 由 1,2 或 3 个核苷酸类似物单元(如 LNA 单元)组成;B 由 7,8 或 9 个连续核苷酸或核碱基单元组成,当与互补 RNA 分子(如 mRNA 靶)形成双链体时,所述核苷酸或核碱基单

元能募集 RNase ;且 C 由 1,2 或 3 个核苷酸类似物单元 (如 LNA 单元) 组成。当存在时, D 由单一 DNA 单元组成。

[0204] 在多种实施方案中, A 由 1 个 LNA 单元组成。在多种实施方案中, A 由 2 个 LNA 单元组成。在多种实施方案中, A 由 3 个 LNA 单元组成。在多种实施方案中, C 由 1 个 LNA 单元组成。在多种实施方案中, C 由 2 个 LNA 单元组成。在多种实施方案中, C 由 3 个 LNA 单元组成。在多种实施方案中, B 由 7 个核苷酸单元组成。在多种实施方案中, B 由 8 个核苷酸单元组成。在多种实施方案中, B 由 9 个核苷酸单元组成。在多种实施方案中, B 包含 1-9 个 DNA 单元, 如 2, 3, 4, 5, 6, 7 或 8 个 DNA 单元。在多种实施方案中, B 由 DNA 单元组成。在多种实施方案中, B 包含至少一个 α -L 构型的 LNA 单元, 如 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 或 9 个 α -L- 构型的 LNA 单元。在多种实施方案中, B 包含至少一个 α -L- 氧基 LNA 单元或其中所有 α -L- 构型的 LNA 单元为 α -L- 氧基 LNA 单元。在多种实施方案中, A-B-C 中存在的核苷酸数选自 (核苷酸类似物单元 -B 区 - 核苷酸类似物单元) : 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, 或 ; 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, 或 ; 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1。在多种实施方案中, A-B-C 中的核苷酸数选自 : 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4 和 4-7-3。在多种实施方案中, A 和 C 各自都由两个 LNA 单元组成, 且 B 由 8 或 9 个核苷酸单元, 优选 DNA 单元组成。

[0205] 其它缺口聚物设计包括以下那些 : 其中 A 区和或 C 区由 3, 4, 5 或 6 个核苷酸类似物组成, 如选自 2'-O- 甲氧基乙基 -RNA (2' MOE) 和 2'- 氟 -DNA 单体的核苷酸类似物, 且 B 区由 8, 9, 10, 11 或 12 个核苷酸, 如 DNA 单元 (或核碱基) 组成, 如 5-10-5 和 4-12-4 缺口聚物设计。其它缺口聚物设计公开于 WO 2007/146511A2, 在此引入作为参考。

[0206] 连接基

[0207] 术语 " 连接基 " 或 " 核苷酸间连接 (internucleotide linkage) " 是指能将两个核苷酸或核碱基、两个核苷酸类似物、以及核苷酸和核苷酸类似物等共价结合在一起的基团。具体且优选的实例包括磷酸基 (phosphate group) 和硫代磷酸酯基 (phosphorothioate)。

[0208] 本发明的寡聚物或其连续核碱基序列的核碱基通过连接基结合在一起。合适地, 各核碱基通过连接基连接至 3' 邻近 (adjacent) 的核碱基。

[0209] 合适的连接基包括列于 WO2007/031091 的那些, 例如列于 WO2007/031091 的第 34 页第一段的连接基 (在此引入作为参考)。

[0210] 也就是说, 在多种实施方案中, 优选将连接基从其正常磷酸二酯修饰为对核酸酶攻击更有抗性的基团, 如硫代磷酸酯或硼烷磷酸酯 (boranophosphate) - 这两个可被 RNase H 裂解, 也产生在减少靶基因的表达中反义抑制的途径。

[0211] 本文提供的合适的含硫 (S) 连接基可为优选的。硫代磷酸酯连接基也是优选的, 尤其对于缺口聚物的缺口 (gap) 区 (B)。硫代磷酸酯连接也可用于侧翼区 (A 和 C, 且用于将 A 或 C 连接至 D, 且在 D 区内, 视情况而定)。

[0212] 然而 A、B 和 C 区可包含除硫代磷酸酯外的其它连接基, 如磷酸二酯连接, 特别地, 例如当使用核苷酸类似物防止 A 和 C 区内的连接基进行内切核酸酶降解 - 如当 A 和 C 区包含 LNA 核苷酸时。

[0213] 寡聚物中的连接基可为磷酸二酯、硫代磷酸酯或硼烷磷酸酯以使得 RNase H 裂解

靶向的 RNA。优选硫代磷酸酯,这是由于改善的核酸酶抗性和其它原因,如易于制造。

[0214] 在本发明的寡聚物的一方面,该核苷酸和 / 或核苷酸类似物通过硫代磷酸酯基彼此连接。

[0215] 应认识到将磷酸二酯连接,如一个或两个连接,加入到其它硫代磷酸酯寡聚物,特别是介于核苷酸类似物单元之间或相邻于核苷酸类似物单元(典型地在 A 区和或 C 区)可修饰寡聚物的生物利用度和 / 或生物分布 - 参见 W02008/053314,在此引入作为参考。

[0216] 在一些实施方案中,如上述实施方案,其中适当且非特异表明,所有剩余的连接基为磷酸二酯或硫代磷酸酯,或其混合物。

[0217] 在一些实施方案中所有核苷酸间连接基为硫代磷酸酯。

[0218] 当涉及具体的缺口聚物寡核苷酸序列,如那些在此提供的,应理解在多种实施方案中,当该连接为硫代磷酸酯连接时,可使用如那些在此公开的其它连接,例如可使用磷酸酯(磷酸二酯)连接,特别是用于核苷酸类似物,如 LNA 单元之间的连接。同样,当涉及具体缺口聚物寡核苷酸序列时,如在此提供的那些,当 C 残基注释为 5' 甲基修饰的胞嘧啶时,在多种实施方案中,寡聚物中存在的一个或多个 C 可为未修饰的 C 残基。

[0219] 寡聚化合物

[0220] 本发明的寡聚物可以选自 SEQ ID NO:169-196 和 234,如在实施例 8 中的表 4 中所示。

[0221] 缀合物

[0222] 在本文中术语“缀合物(conjugate)”是表示通过将本文所述的寡聚物共价连接(“缀合”)至一个或多个非核苷酸 / 非核苷酸 - 类似物(即非核碱基),或非多核苷酸部分形成的异源(heterogenous)分子。非核苷酸或非多核苷酸部分的实例包括大分子试剂如蛋白质、脂肪酸链、糖残基、糖蛋白、聚合物或其组合。典型的蛋白质可为靶蛋白的抗体。典型聚合物可为聚乙二醇。

[0223] 因此,在多种实施方案中,本发明的寡聚物可包含多核苷酸区和非核苷酸区,该多核苷酸区即为核苷酸 / 核碱基区,其通常由核碱基的连续序列组成。当涉及本发明的由连续核碱基序列组成的寡聚物,该化合物可包含非核苷酸 / 非核碱基组分,如缀合物组分。

[0224] 在本发明多种实施方案中,该寡聚化合物连接至配体 / 缀合物,其可用于例如增加寡聚化合物的细胞吸收。W02007/031091 提供了合适的配体和缀合物,其在此引入作为参考。

[0225] 本发明还提供缀合物,其包含本文所述的根据本发明的化合物和至少一种共价连接至所述化合物的非核苷酸或非多核苷酸部分。因此,在多种实施方案中,其中本发明的化合物由特定的核酸或核碱基序列组成,如本文所公开,该化合物也可包含至少一种非核苷酸或非多核苷酸部分(例如不包含一种或多种核苷酸或核苷酸类似物)共价连接至所述化合物。

[0226] 缀合物可增强本发明的寡聚物的活性、细胞分布或细胞吸收。这些部分包括,但不限于,抗体、多肽、脂质部分如胆固醇部分、胆酸、硫醚,例如己基 -s- 三苯甲基硫醇、硫胆固醇(thiocholesterol)、脂肪酸链,例如,十二烷二醇或十一烷基残基、磷脂,例如,二 - 十六烷基 -rac- 甘油或 1,2- 二 -o- 十六烷基 -rac- 甘油 -3-h- 磷酸三乙基铵、聚胺或聚乙二醇链、金刚烷乙酸、棕榈基部分、十八烷基胺或己基氨基 - 羰基 - 氧基胆固醇部分。

[0227] 本发明的寡聚物也可缀合至活性药物,例如,阿司匹林,布洛芬,磺胺药物,抗糖尿病药,抗菌药或抗生素。

[0228] 在多种实施方案中该缀合的部分为固醇,如胆固醇。

[0229] 在多种实施方案中,该缀合的部分包含或由以下组成:带正电荷的聚合物,如带正电荷的肽,例如长度为 1-50,如 2-20 如 3-10 个氨基酸残基,和 / 或聚环氧烷如聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇 - 参见 WO 2008/034123,在此引入作为参考。合适地该带正电荷的聚合物,如聚环氧烷可通过连接基连接至本发明的寡聚物,如描述于 WO 2008/034123 的可释放的连接基。

[0230] 活化的寡聚物

[0231] 本文所用的术语“活化的寡聚物”,是指共价连接(即,官能化)至至少一个官能部分(functional moiety)的本发明的寡聚物,该官能部分允许寡聚物共价连接至一个或多个缀合的部分(即本身不为核酸或单体的部分),以形成本文描述的缀合物。典型地,官能部分将包含能通过以下连接共价连接至寡聚物的化学基团:例如,3'-羟基或腺嘌呤碱基的环外 NH₂ 基,优选亲水性间隔基(spacer)和能结合至缀合的部分的末端基团(例如,氨基、巯基或羟基)。在一些实施方案中,末端基团未被保护,例如,为 NH₂ 基团。在其它实施方案中,末端基团被保护,例如,被任何合适的保护基,如描述于 Theodora WGreene 和 Peter G M Wuts,第三版(John Wiley&Sons,1999)的“Protective Groups in Organic Synthesis”的那些保护。合适的羟基保护基的实例包括酯如乙酸酯,芳烷基如苄基,二苯基甲基,或三苯基甲基和四氢吡喃基。合适的氨基保护基的实例包括苄基,α-甲基苄基,二苯基甲基,三苯基甲基,苄基氧基羰基,叔丁氧基羰基和酰基如三氯乙酰基或三氟乙酰基。在一些实施方案中,该官能部分是自裂解的(self-cleaving)。在其它实施方案中,该官能部分为生物可降解的。参见例如,美国专利号 7,087,229,其以其整体在此引入作为参考。

[0232] 在一些实施方案中,本发明的寡聚物在 5' 端官能化以使缀合的部分共价连接至寡聚物的 5' 端。在其它实施方案中,本发明的寡聚物可在 3' 端官能化。在其它实施方案中,本发明的寡聚物可沿着主链或在杂环碱基部分上官能化。在其它实施方案中,本发明的寡聚物可在多于一个位置官能化,所述位置独立地选自 5' 端、3' 端、主链和碱基。

[0233] 在一些实施方案中,本发明的活化的寡聚物通过在合成过程中掺入一个或多个共价连接至官能部分的单体而合成。在其它实施方案中,本发明的活化的寡聚物使用未被官能化的单体合成,且该寡聚物在合成完成后立即官能化。在一些实施方案中,该寡聚物使用含氨基烷基连接基的位阻酯官能化,其中该烷基部分具有式 (CH₂)_w,其中 w 为 1 至 10 的整数,优选约 6,其中烷基氨基的烷基部分可为直链或支链的,且其中该官能团通过酯基(-O-C(O)-(CH₂)_wNH) 连接至寡聚物。

[0234] 在其它实施方案中,该寡聚物使用含 (CH₂)_w- 巯基(SH) 连接基的位阻酯官能化,其中 w 为 1 至 10 的整数,优选约 6,其中烷基氨基的烷基部分可为直链或支链的,且其中该官能团通过酯基(-O-C(O)-(CH₂)_wSH) 连接至寡聚物。

[0235] 在一些实施方案中,巯基-活化的寡核苷酸与聚合物部分如聚乙二醇或肽缀合(通过二硫键的形成)。

[0236] 上述包含位阻酯的活化的寡聚物可通过任何本领域已知的方法合成,且特别是通过公开于 PCT 公开号 WO 2008/034122 和其实施例中的方法,其以其整体在此引入作为参

考。

[0237] 在其它实施方案中,本发明的寡聚物通过使用官能化试剂(functionalizing reagent)向寡聚物引入巯基、氨基或羟基而官能化,该官能化试剂基本上描述于美国专利号 4,962,029 和 4,914,210,即,为基本上链状的试剂,其在一端具有亚磷酰胺(phosphoramidite)通过亲水性间隔基链连接至相对的端,该相对的端包含保护的或未保护的巯基、氨基或羟基。这些试剂主要与寡聚物的羟基反应。在一些实施方案中,该活化的寡聚物具有官能化试剂结合至寡聚物的 5'-羟基。在其它实施方案中,该活化的寡聚物具有官能化试剂结合至 3'-羟基。在其它实施方案中,本发明的活化的寡聚物具有官能化试剂结合至寡聚物的主链上的羟基。在其它实施方案中,本发明的寡聚物使用多于一种官能化试剂官能化,该官能化试剂描述于美国专利号 4,962,029 和 4,914,210 中,以其整体在此引入作为参考。合成该官能化试剂和将它们加入单体或寡聚物的方法公开于美国专利号 4,962,029 和 4,914,210。

[0238] 在一些实施方案中,固相结合寡聚物的 5'-端使用二烯基亚磷酰胺衍生物官能化,然后将脱保护的寡聚物与例如氨基酸或肽通过 Diels-Alder 环加成反应而缀合。

[0239] 在多种实施方案中,将含 2'-糖修饰的单体,如 2'-氨基甲酸酯取代的糖或 2'-(O-戊基-N-邻苯二甲酰亚氨基)-脱氧核糖的糖掺入寡聚物促进缀合的部分与寡聚物的糖的共价连接。在其它实施方案中,一个或多个单体的 2'-位具有含氨基的连接基的寡聚物使用以下试剂制备:例如,5'-二甲氧基三苯甲基-2'-O-(e-邻苯二甲酰亚氨基氨基戊基)-2'-脱氧腺苷-3'--N,N-二异丙基-氰基乙氧基亚磷酰胺。参见,例如,Manoharan,等人,Tetrahedron Letters,1991,34,7171。

[0240] 在其它实施方案中,本发明的寡聚物可在核碱基上具有含胺的官能部分,包括在 N6 嘌呤氨基上,在鸟嘌呤的环外 N2 上,或在胞嘧啶的 N4 或 5 位上。在多种实施方案中,该官能化可通过使用已在寡聚物合成中官能化的商业试剂实现。

[0241] 一些官能部分是可商购的,例如,异双官能(heterobifunctional)和同双官能(homobifunctional)连接部分可购自 Pierce Co.(Rockford, Ill.)。其它可商购的连接基为 5'-氨基-修饰体(Modifier)C6 和 3'-氨基-修饰体试剂,均可购自 Glen Research Corporation(Sterling, Va.)。5'-氨基-修饰体 C6 也可作为 Aminolink-2 购自 ABI(Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.),且 3'-氨基-修饰体也可购自 Clontech Laboratories Inc.(Palo Alto, Calif.)。

[0242] 组合物

[0243] 本发明的寡聚物可用于药物制剂和组合物。合适地,该组合物包含药学可接受的稀释剂、载体、盐或佐剂。W02007/031091 提供了合适和优选的药学可接受的稀释剂、载体和佐剂-其在此引入作为参考。合适的剂量、制剂、给药途径、组合物、剂型、与其它治疗剂的组合,前药制剂也提供于 W02007/031091-其也在此引入作为参考。

[0244] 如本文所述,术语“药学可接受的盐”是指保持本文鉴别的化合物的所需生物活性且显示最小的不希望有的毒理学作用的盐。这些盐的非限制性实例可通过与有机氨基酸形成,以及与金属阳离子形成的碱加成盐,该金属阳离子如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉、钠、钾等,或与由氨形成的阳离子,N,N'-二苄基乙二胺,D-葡萄糖胺,四乙基铵,或乙二胺形成的碱加成盐;或(a)和(b)的(c)组合;例如,鞣酸锌盐等。

[0245] 应用

[0246] 本发明的寡聚物可用作研究试剂,用于例如,诊断、治疗和预防。

[0247] 在研究中,该寡聚物可用于特异抑制细胞和实验动物中 HER3 的表达或合成(通常通过降解或抑制 mRNA 从而防止蛋白质形成),从而促进该靶的功能分析或评估其作为治疗干预的靶的有用性。

[0248] 在诊断中该寡聚物可用于通过 RNA 印迹法、原位杂交或类似技术检测和定量细胞和组织中的 HER3 表达。

[0249] 对于治疗,疑患疾病或病症的动物或人(其可通过调节 HER3(和任选 HER2 和/或 EGFR)的表达治疗)通过给药本发明的寡聚化合物,如有效量的寡聚物(或其缀合物)而治疗。本文进一步提供了治疗哺乳动物的方法,如治疗人,其疑患疾病或症状或易患疾病或症状,该疾病或症状与 HER3 的表达相关,该方法通过给药治疗或预防有效量的本发明的一种或多种寡聚物或组合物。

[0250] 本发明还提供本发明所述的化合物或缀合物在制备用于治疗本文涉及的疾病的药物中的用途,或提供治疗本文所述的疾病的方法。

[0251] 本发明还涉及本文所述的寡聚物、组合物或缀合物用作药物。合适地,当涉及本发明的方法时,本发明的寡聚物或缀合物的给药通过给药有效量的寡聚物或缀合物进行,例如能有效提供治疗的量或有效抑制或下调细胞中 HER3 表达的量。

[0252] 本发明还提供治疗本文涉及的疾病的方法,所述方法包括向需要的患者给药本发明的化合物,和/或本发明的缀合物,和/或本发明的药物组合物。

[0253] 在多种实施方案中,该寡聚物或其缀合物,通过例如氢键合至靶核酸而结合,在人体内引起所需的治疗效果。该寡聚物或其缀合物,通过氢键合(杂交)至靶的 mRNA 导致基因表达减少,引起靶的表达减少(抑制)。还可看出本文公开的寡聚化合物和缀合物可具有非治疗应用,如诊断应用。

[0254] 在多种实施方式中,本发明的寡聚物能够诱导其中导入了它的细胞的细胞凋亡,例如癌细胞,例如本文涉及的细胞株(例如,在此处公开的半胱氨酸蛋白酶实验中)。然而,在多种实施方式中,本发明的寡聚物可以不诱导细胞凋亡,例如,如通过半胱氨酸蛋白酶实验所确定的。就此来说,虽然细胞凋亡对于有效的杀死细胞例如癌细胞是期望的,在多种实施方式中,它可以与对非靶细胞和组织的更为毒性的效果负相关。因而,取决于要治疗的医学适应症,可能有益的是选择触发细胞凋亡非常有效的寡核苷酸,而其他的,在医学适应症可能不立即危急生命的时候,在触发细胞凋亡方面不那么有效的寡聚物可能是适合的。

[0255] 医学适应症

[0256] 如本文涉及的,过度增生性疾病在多种实施方式中是癌症。在更具体的实施方式中,所述癌症选自淋巴瘤和白血病(例如,非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、急性白血病例如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞样白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤)、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、子宫颈癌、睾丸癌、肺癌、膀胱癌、黑素瘤、头颈癌、脑癌、未知原发位点的癌症(cancers of unknown primary sites)、赘瘤(neoplasm)、外周神经系统的癌症、中枢神经系统的癌症、不同种类的肿瘤(例如,纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤(osteogenic sarcoma)、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴

管内皮细胞肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯氏肿瘤、小细胞肺癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤和视网膜母细胞瘤)、重链病、转移 (metastases), 或以不受控制的或异常的细胞生长为特征的任何疾病或病症。

[0257] 在某些特别的实施方式中, 所述癌细胞选自乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌和脑癌。

[0258] 根据本发明的这样的疾病或病症的治疗可以与一种或多种其他抗癌治疗, 例如放射治疗、化学治疗或免疫治疗组合。

[0259] 在多种实施方式中, 在此使用的术语“治疗”是指现有疾病 (例如, 本文涉及的疾病或病症) 的治疗, 或防止疾病, 即, 预防。因而要认识到的是, 本文涉及的治疗, 在多种实施方式中, 可以是预防性的。

[0260] 一般地, 本发明的一个方面涉及治疗患有或易感于与异常的 HER3 水平相关的病症的哺乳动物的方法, 包括向所述哺乳动物给药治疗有效量的靶向 HER3 的寡聚物, 例如包含一个或多个 LNA 单元的寡聚物。

[0261] 在多种实施方式中, 本文涉及的疾病或病症可以与 HER3 基因、或其蛋白质产物与 HER3 相关或相互作用的基因的突变相关。因而, 在多种实施方式中, 靶 mRNA 是 HER3 序列的突变形式。

[0262] 本发明的令人感兴趣的方面涉及在此定义的寡聚物 (化合物) 或在此定义的缀合物在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗本文涉及的疾病、病症或症状。

[0263] 可以采用本发明的方法用于治疗或预防由异常水平的 HER3 所引起的疾病。

[0264] 做为选择, 在多种实施方式中, 本发明还涉及治疗异常水平的 HER3 的方法, 所述方法包括向有需要的患者给药本发明的寡聚物、或本发明的缀合物或本发明的药物组合物。

[0265] W02007/031091 中还提供了适合的剂量、制剂、给药途径、组合物、剂型、与其他治疗试剂的组合、前药制剂——其在此引入作为参考。本发明还提供了药物组合物, 其包含在此描述的化合物或缀合物, 以及药学上可接受的稀释剂、载体或佐剂。W02007/031091 提供了适合的和优选药学上可接受的稀释剂、载体和佐剂——其在此引入作为参考。

[0266] 本发明进一步涉及在此定义的寡聚物 (化合物)、组合物或缀合物在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗异常 HER3 水平或 HER3 的突变形式 (例如, 等位变体, 例如与本文涉及的疾病之一相关的那些) 的表达。

[0267] 本发明还涉及在此定义的寡聚物、组合物或缀合物, 其用作药物。

[0268] 此外, 本发明涉及治疗患有例如本文涉及那些的疾病或病症的受试者的方法。

[0269] 需要治疗的患者是患有或可能患有所述疾病或病症的患者。

[0270] 在多种实施方式中, 本文涉及的疾病或病症可以与 HER3 基因、或其蛋白质产物与 HER3 相关或相互作用的基因的突变相关。因此, 在多种实施方式中, 靶 mRNA 是 HER3 序列的突变的形式, 例如, 它可以包含一个或多个单点突变, 例如与癌症相关的 SNPs。

[0271] 根据本发明的寡聚物和其他组合物可以用于治疗与 HER3 的突变形式的过表达或

表达相关的疾病。已经由本领域的先驱科学家表明的是, HER3 的药物介入将产生针对过度增生性疾病 (hyperproliferative disorder), 例如癌症, 例如本文涉及的那些的治疗选择。

[0272] 本发明的一个方面涉及治疗患有或易感于与 HER3、突变的 HER3 或 HER3 的异常水平相关的疾病的哺乳动物的方法, 包括向所述哺乳动物给药治疗有效量的靶向 HER3 的、包含一个或多个 LNA 单元的寡聚物。

[0273] 然而认识到的是, 在多种实施方式中, 所述疾病, 例如过度增生性疾病, 例如本文涉及的癌症, 可不必与 HER3 的过表达、或 HER3 相关的基因产物相关联。

[0274] 本发明的一个方面涉及治疗患有或易感于与 HER2、突变的 HER2 或 HER2 的异常水平相关的疾病的哺乳动物的方法, 包括向所述哺乳动物给药治疗有效量的靶向 HER3 (和任选地 HER2 和 / 或 EGFR) 的、包含一个或多个 LNA 单元的寡聚物。

[0275] 本发明的一个方面涉及治疗患有或易感于与 EGFR、突变的 EGFR 或 EGFR 的异常水平相关的疾病的哺乳动物的方法, 包括向所述哺乳动物给药治疗有效量的靶向 HER3 (和任选地 HER2 和 / 或 EGFR) 的、包含一个或多个 LNA 单元的寡聚物。

[0276] 其中, HER3 的突变导致 HER3 活性的异常水平的这些疾病的实例有乳腺癌。因而, 在一个特定的实施方式中, 所述根据本发明的治疗的癌症是乳腺癌。

[0277] 根据本发明所指的癌症, 可以选自上文提及的癌症的形式之一。

[0278] 此外, 在此描述的发明包括了预防或治疗疾病的方法, 包括向需要这样的治疗的人给药治疗有效量的 HER3 调节寡聚物。本发明进一步包括短期给药 HER3 调节寡核苷酸化合物的用途。

[0279] 做为选择, 在多种实施方式中, 本发明还涉及治疗异常水平的 HER3 的方法, 所述方法包括向有需要的患者给药本发明的寡聚物、或本发明的缀合物或本发明的药物组合物, 并进一步包括给药其他药物或其他活性成分。所述进一步的给药可以是这样, 使得所述其他药物或其他活性成分与本发明的化合物缀合、存在于所述药物组合物中、或在独立的制剂中给药。

[0280] 本发明进一步涉及在此定义的化合物、组合物或缀合物在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗异常水平的 HER3 或 HER3 的突变形式 (例如等位变体, 例如与本文涉及的疾病之一相关的那些) 的表达。

[0281] 需要治疗的患者是患有或可能患有所述疾病或病症的患者。

[0282] 与其他反义寡聚物组合

[0283] 在此认识到的是, 本发明的寡聚物可以靶向 HER3、HER2 和 / 或 EGFR 靶。因而认识到的是, 在多种实施方式中, 本发明涉及超过一个寡聚物的用途, 所述寡聚物容许或优化两个或三个靶的靶向, 例如, 靶向 HER3 的寡聚物和靶向 EGFR 或 Her2 的第二寡聚物, 或甚至任选独立地靶向 HER3、Her2 和 EGFR 靶的三种寡聚物。

[0284] 在多种实施方式中, 根据本发明的药物组合物可以包含靶向 Her2 的其他治疗剂, 例如靶向 Her2mRNA 的反义寡聚物。

[0285] 在多种实施方式中, 其可以是相同的或不同的, 根据本发明的药物组合物可以包含靶向 EGFR 的其他治疗剂, 例如靶向 EGFR mRNA 的反义寡聚物。

[0286] 对于靶向 Her2 或 EGFR mRNA 的寡聚物 (例如缺口聚物和短聚物)、和其缀合物的

结构,除了该寡聚物将与 Her2 或 EGFR mRNA 的对应区互补(或至少 80%互补),或在一种情况中,相对于相应的靶区域包含 1、2、3 或 4 个错配,在多种实施方式中,可以具有与根据本发明寡聚物相同的结构(即,除了核碱基的特异性序列之外)。

[0287] 成套试剂盒(kits of parts)

[0288] 本发明还提供了成套试剂盒,其中第一部分包含根据本发明的寡聚物、缀合物和/或药物组合物,和其他部分,包含其他活性成分(即,本文涉及的其他治疗试剂或寡聚物),例如本文涉及的那些。因而设想的是,所述部件试剂盒可以用于治疗方法,如本文涉及的,其中所述方法包括同时地或相继地给药所述第一部分和其他部分。

[0289] 本发明还提供了成套试剂盒,其中第一部分包含根据本发明的寡聚物、缀合物和/或药物组合物,和其他部分,所述其他部分包含能够降低 Her2 和/或 EGFR 的表达的反义寡核苷酸。因而设想的是,所述部件试剂盒可以用于治疗方法,如本文涉及的,其中所述方法包括同时地或相继地给药所述第一部分和其他部分。

[0290] 进一步的实施方式

[0291] 以下实施方式还涉及本发明的说明书和摘要,并且可以与本文涉及的本发明的实施方式组合,包括权利要求中涉及的实施方式:

[0292] 1. 反义寡核苷酸,其能够结合 SEQ ID NO:197 的 HER3 基因或其等位基因的靶序列、并下调 HER3 的表达,所述寡核苷酸包含与所述靶序列相应的 10-50 个核碱基的序列。

[0293] 2. 实施方式 1 的反义寡核苷酸,其中所述靶序列选自 SEQ ID NO:1-140 所示的 HER3 基因或其等位变体的区域。

[0294] 3. 实施方式 1 或实施方式 2 的寡核苷酸,包含 SEQ ID NO:1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139 和 140 中所示的 10-16 个核碱基的序列或其等位变体。

[0295] 4. 根据实施方式 1-3 中任一项的寡核苷酸,包含 SEQ ID NO:1-140 所示的序列中的任一个。

[0296] 5. 前述实施方式中任一项的寡核苷酸,其由 SEQ ID NO:141-196 所示。

[0297] 6. 实施方式 1 的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸进一步能够下调 SEQ ID NO:199 的 HER2 基因或其等位变体、和/或 SEQ ID NO:198 的 EGFR 基因或其等位变体的表达。

[0298] 7. 实施方式 6 的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸能够下调 SEQ ID NO:199 的 HER2 基因或其等位变体的表达,以及其中所述寡核苷酸由 SEQ ID NO:177 或 178 所示。

[0299] 8. 实施方式 6 的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸能够下调 SEQ ID NO:198 的 EGFR 基因或其等位变体的表达,以及其中所述寡核苷酸由 SEQ ID NO:171 或 173 所示。

[0300] 9. 实施方式 6 的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸能够下调 SEQ ID NO:199 的 HER2 基因或其等位变体、以及 SEQ ID NO:198 的 EGFR 基因或其等位变体的表达。

[0301] 10. 实施方式 9 的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸由 SEQ ID NO:169、170、172、174、175、176 和 179 的任一个所示。

[0302] 11. 根据前述实施方式中任一项的寡核苷酸,其中所述核碱基序列包含独立地选自磷酸二酯、硫代磷酸酯和硼烷磷酸脂的核碱基间连接。

[0303] 12. 前述实施方式中任一项的寡核苷酸,其中所述核碱基的至少两个是核苷酸类似物。

[0304] 13. 根据实施方式 5 的寡核苷酸,其中所述核碱基的序列包含,在 5' 到 3' 方向上,(i)A 区:一段 2-4 个核苷酸类似物,随后是(ii)B 区:一段不同于 A 区的 6-11 个核苷酸或核苷酸类似物,随后是(iii)C 区:一段 2-4 个核苷酸类似物,以及任选随后是(iv)D 区:一个或两个核苷酸。

[0305] 14. 根据实施方式 13 的寡核苷酸,其中所述 A 区包含在两个核苷酸类似物单元和/或核苷酸类似物单元与 B 区的核碱基单元之间的至少一个磷酸二酯连接。

[0306] 15. 根据实施方式 13 或实施方式 14 的寡核苷酸,其中 C 区在两个核苷酸类似物单元和/或核苷酸类似物单元与 B 区的核碱基单元之间的包含至少一个磷酸二酯连接。

[0307] 16. 根据实施方式 1 到 11 中任一项的寡核苷酸,其中所有的核碱基间连接是硫代磷酸酯。

[0308] 17. 根据实施方式 12 到 16 中任一项的寡核苷酸,其中所述核苷酸类似物单元独立地选自 2' -O- 烷基 -RNA、2' - 氨基 -DNA、2' - 氟 -DNA、锁核酸 (LNA)、阿拉伯糖核酸 (ANA)、2' - 氟 -ANA、HNA、嵌入核酸 (intercalating nucleic acid) (INA) 和 2' MOE。

[0309] 18. 根据实施方式 17 的寡核苷酸,其中所述核苷酸类似物独立地选自 2' -MOE-RNA、2' - 氟 -DNA 和 LNA。

[0310] 19. 根据实施方式 18 的寡核苷酸,其中所述核苷酸类似物的至少一个是锁核酸 (LNA)。

[0311] 20. 根据实施方式 19 的寡核苷酸,其中所有核苷酸类似物是 LNA。

[0312] 21. 根据实施方式 17 到 20 中任一项的寡核苷酸,其中 LNA 选自 β -D- 氧基 -LNA、 α -L- 氧基 -LNA、 β -D- 氨基 -LNA 和 β -D- 巯基 -LNA。

[0313] 22. 缀合物,其包含前述实施方式的任一项中寡核苷酸和与所述寡核苷酸共价连接的至少一个非核苷酸或非多核苷酸部分。

[0314] 23. 根据实施方式 22 的缀合物,其中所述非核苷酸或非多核苷酸部分包含固醇基团例如胆固醇或由固醇基团例如胆固醇组成。

[0315] 24. 药物组合物,包含根据实施方式 1 到 21 中任一项的寡核苷酸或根据实施方式 22 或实施方式 23 的缀合物,以及药学上可接受的稀释剂、载体或佐剂。

[0316] 25. 根据实施方式 1 到 23 中任一项的寡核苷酸或缀合物,其用作药物。

[0317] 26. 根据实施方式 1 到 23 中任一项的寡核苷酸或缀合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗异常水平的 HER3 和/或 HER2 和/或 EGFR、或需要 (indicate) 下调 HER3 和/或 HER2 和/或 EGFR 表达的疾病或病症。

[0318] 27. 根据实施方式 26 的用途,其中所述疾病或状况是癌症。

[0319] 28. 治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向有需要的受试者给药根据实施方式 1 到 24 中任一项的药物组合物、寡核苷酸或缀合物的步骤。

[0320] 29. 实施方式 27 或 28 的用途或方法,其中所述癌症选自乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌和脑癌。

[0321] 30. HER3 基因中的靶序列,其中与所述靶序列相应的反义寡核苷酸能够下调 HER3 的表达。

[0322] 31. 实施方式 30 的靶序列,其中所述靶序列选自与 SEQ ID NO:1-140 互补的 HER3 基因或其等位变体的区域。

[0323] 32. 下调细胞中 HER3 的表达的方法, 包括用根据实施方式 1-21 中任一项的寡核苷酸接触所述细胞。

实施例

[0324] 实施例 1: 单体合成

[0325] LNA 单体构建块 (building blocks) 和衍生物根据公开的方法和其中引述的参考文献来制备——参见 W007/031081 和其中引证的参考文献。

[0326] 实施例 2: 寡核苷酸合成

[0327] 寡核苷酸根据 W007/031081 中描述的方法来合成。表 1 显示了本发明的反义寡核苷酸基序的实例。

[0328] 实施例 3: 寡核苷酸的设计

[0329] 根据本发明, 设计一系列不同的寡核苷酸除了人 HER3 (GenBank 登记号 NM_001982, 在此作为 SEQ ID NO:197 示出) 之外还靶向人 EGFR (GenBank 登记号 NM 005228, 在此作为 SEQ ID NO:198 示出) 和人 HER2 (GenBank 登记号 NM 004448, 在此作为 SEQ ID NO:199 示出) 的不同区域。

[0330] 表 1: 本发明的反义寡核苷酸序列。SEQ ID NO:1-50、53、139 和 140 是寡聚序列 (oligo sequences), 其被设计为除了人 HER3 之外还靶向人 EGFR 和人 HER2。显示了与 HER3、EGFR 和 HER2 的序列同源性的百分比。所述寡聚物具有相对于 EGFR 的 0 到 2 个错配, 相对于 HER2 的 1 到 2 个错配。

[0331]

表 1-反义寡核苷酸序列 (基序)					
SEQ ID NO	序列 (5'-3')	长度 (碱基)	靶位点 HER3	互补性 EGFR	互补性 HER2
SEQ ID NO: 1	GCTCCAGACATCACTC	16	2866-2881	100%	87.5%
SEQ ID NO: 2	GCTCCAGACATCACT	15			
SEQ ID NO: 3	CTCCAGACATCACTC	15			
SEQ ID NO: 4	GCTCCAGACATCAC	14			
SEQ ID NO: 5	CTCCAGACATCACT	14			
SEQ ID NO: 6	TCCAGACATCACTC	14			
SEQ ID NO: 7	GCTCCAGACATCA	13			
SEQ ID NO: 8	CTCCAGACATCAC	13			

[0332]

表 1-反义寡核苷酸序列 (基序)

SEQ ID NO	序列 (5'-3')	长度 (碱基)	靶 位 点	互补性	互补性
			HER3	EGFR	HER2
SEQ ID NO: 9	TCCAGACATCACT	13			
SEQ ID NO: 10	CCAGACATCACTC	13			
SEQ ID NO: 11	GCTCCAGACATC	12			
SEQ ID NO: 12	CTCCAGACATCA	12			
SEQ ID NO: 13	TCCAGACATCAC	12			
SEQ ID NO: 14	CCAGACATCACT	12			
SEQ ID NO: 15	CAGACATCACTC	12			
SEQ ID NO: 16	CTCCAGACATCACTCT	16	2865-2880	100%	93.8%
SEQ ID NO: 17	CAGACATCACTCTGGT	16	2862-2877	100%	93.8%
SEQ ID NO: 18	AGACATCACTCTGGTG	16	2861-2876	100%	93.8%
SEQ ID NO: 19	ATAGCTCCAGACATCA	16	2869-2884	93.8%	87.5%
SEQ ID NO: 20	ATAGCTCCAGACATC	15			
SEQ ID NO: 21	TAGCTCCAGACATCA	15			
SEQ ID NO: 22	ATAGCTCCAGACAT	14			
SEQ ID NO: 23	TAGCTCCAGACATC	14			
SEQ ID NO: 24	AGCTCCAGACATCA	14			
SEQ ID NO: 25	ATAGCTCCAGACA	13			
SEQ ID NO: 26	TAGCTCCAGACAT	13			
SEQ ID NO: 27	AGCTCCAGACATC	13			
SEQ ID NO: 28	GCTCCAGACATCA	13			
SEQ ID NO: 29	ATAGCTCCAGAC	12			
SEQ ID NO: 30	TAGCTCCAGACA	12			
SEQ ID NO: 31	AGCTCCAGACAT	12			
SEQ ID NO: 32	GCTCCAGACATC	12			
SEQ ID NO: 33	CTCCAGACATCA	12			
SEQ ID NO: 34	TCACACCATAGCTCCA	16	2876-2891	87.5%	93.8%

[0333]

表 1-反义寡核苷酸序列 (基序)

SEQ ID NO	序列 (5'-3')	长度 (碱基)	靶 位 点 HER3	互补性 EGFR	互补性 HER2
SEQ ID NO: 35	TCACACCATAGCTCC	15			
SEQ ID NO: 36	CACACCATAGCTCCA	15			
SEQ ID NO: 37	TCACACCATAGCTC	14			
SEQ ID NO: 38	CACACCATAGCTCC	14			
SEQ ID NO: 39	ACACCATAGCTCCA	14			
SEQ ID NO: 40	TCACACCATAGCT	13			
SEQ ID NO: 41	CACACCATAGCTC	13			
SEQ ID NO: 42	ACACCATAGCTCC	13			
SEQ ID NO: 43	CACCATAGCTCCA	13			
SEQ ID NO: 44	TCACACCATAGC	12			
SEQ ID NO: 45	CACACCATAGCT	12			
SEQ ID NO: 46	ACACCATAGCTC	12			
SEQ ID NO: 47	CACCATAGCTCC	12			
SEQ ID NO: 48	ACCATAGCTCCA	12			
SEQ ID NO: 49	CATCCAACACTTGACC	16	3025-3040	93.8%	93.8%
SEQ ID NO: 50	ATCCAACACTTGACCA	16	3024-3039	93.8%	93.8%
SEQ ID NO: 51	CAATCATCCAACACTT	16	3029-3044	87.5%	93.8%
SEQ ID NO: 52	TCAATCATCCAACACT	16	3030-3045	87.5%	93.8%
SEQ ID NO: 53	CATGTAGACATCAATT	16	3004-3019	87.5%	93.8%
SEQ ID NO: 54	TAGCCTGTCACTTCTC	16	435 - 450	68.8%	75%
SEQ ID NO: 228	TAGCCTGTCACTTCT	15			
SEQ ID NO: 229	AGCCTGTCACTTCTC	15			
SEQ ID NO: 230	TAGCCTGTCACTTC	14			
SEQ ID NO: 231	AGCCTGTCACTTCT	14			
SEQ ID NO: 232	TAGCCTGTCACTT	13			
SEQ ID NO: 233	TAGCCTGTCACT	12			

[0334]

表 1-反义寡核苷酸序列 (基序)

SEQ ID NO	序列 (5'-3')	长度 (碱基)	靶 位 点	互补性	互补性
			HER3	EGFR	HER2
SEQ ID NO: 55	AGATGGCAAACCTTCCC	16	530-545	68.8%	68.8%
SEQ ID NO: 56	CAAGGCTCACACATCT	16	1146 - 1161	75%	68.8%
SEQ ID NO: 57	AAGTCCAGGTTGCCCA	16	1266 - 1281	75%	75%
SEQ ID NO: 58	CATTCAAGTTCTTCAT	16	1490 - 1505	75%	68.8%
SEQ ID NO: 59	CACTAATTCCTTCAG	16	1529 - 1544	81.3%	68.8%
SEQ ID NO: 60	CACTAATTCCTTCA	15			
SEQ ID NO: 61	ACTAATTCCTTCAG	15			
SEQ ID NO: 62	CACTAATTCCTTC	14			
SEQ ID NO: 63	ACTAATTCCTTCA	14			
SEQ ID NO: 64	CTAATTCCTTCAG	14			
SEQ ID NO: 65	CACTAATTCCTT	13			
SEQ ID NO: 66	ACTAATTCCTTC	13			
SEQ ID NO: 67	CTAATTCCTTCA	13			
SEQ ID NO: 68	TAATTCCTTCAG	13			
SEQ ID NO: 69	CACTAATTCCT	12			
SEQ ID NO: 70	ACTAATTCCTT	12			
SEQ ID NO: 71	CTAATTCCTTC	12			
SEQ ID NO: 72	TAATTCCTTCA	12			
SEQ ID NO: 73	AATTCCTTCAG	12			
SEQ ID NO: 74	GCCCAGCACTAATTTC	16	1535-1550	75%	68.8%
SEQ ID NO: 75	CTTTGCCCTCTGCCAC	16	1673 - 1688	75%	75%
SEQ ID NO: 76	CACACACTTTGCCCTC	16	1679 - 1694	68.8%	75%
SEQ ID NO: 77	CACACACTTTGCCCT	15			
SEQ ID NO: 78	ACACACTTTGCCCTC	15			
SEQ ID NO: 79	CACACACTTTGCCC	14			
SEQ ID NO: 80	ACACACTTTGCCCT	14			

[0335]

表 1-反义寡核苷酸序列 (基序)

SEQ ID NO	序列 (5'-3')	长度 (碱基)	靶 位 点		互 补 性	
			HER3	EGFR	HER2	HER2
SEQ ID NO: 81	CACACTTTGCCCTC	14				
SEQ ID NO: 82	CACACACTTTGCC	13				
SEQ ID NO: 83	ACACACTTTGCCC	13				
SEQ ID NO: 84	CACACTTTGCCCT	13				
SEQ ID NO: 85	ACACTTTGCCCTC	13				
SEQ ID NO: 86	CACACACTTTGC	12				
SEQ ID NO: 87	ACACACTTTGCC	12				
SEQ ID NO: 88	CACACTTTGCCC	12				
SEQ ID NO: 89	ACACTTTGCCCT	12				
SEQ ID NO: 90	CACTTTGCCCTC	12				
SEQ ID NO: 91	CAGTTCCAAAGACACC	16	2345 - 2360	75%	68.8%	
SEQ ID NO: 92	TGGCAATTTGTACTCC	16	2636 - 2651	75%	68.8%	
SEQ ID NO: 93	TGGCAATTTGTACTC	15				
SEQ ID NO: 94	GGCAATTTGTACTCC	15				
SEQ ID NO: 95	TGGCAATTTGTACT	14				
SEQ ID NO: 96	GGCAATTTGTACTC	14				
SEQ ID NO: 97	GCAATTTGTACTCC	14				
SEQ ID NO: 98	TGGCAATTTGTAC	13				
SEQ ID NO: 99	GGCAATTTGTACT	13				
SEQ ID NO: 100	GCAATTTGTACTC	13				
SEQ ID NO: 101	CAATTTGTACTCC	13				
SEQ ID NO: 102	TGGCAATTTGTA	12				
SEQ ID NO: 103	GGCAATTTGTAC	12				
SEQ ID NO: 104	GCAATTTGTACT	12				
SEQ ID NO: 105	CAATTTGTACTC	12				
SEQ ID NO: 106	AATTTGTACTCC	12				

[0336]

表 1-反义寡核苷酸序列 (基序)

SEQ ID NO	序列 (5'-3')	长度 (碱基)	靶 位 点 HER3	互补性 EGFR	互补性 HER2
SEQ ID NO: 107	GTGTGTGTATTTCCTCA	16	2848 – 2863	75%	68.8%
SEQ ID NO: 108	GTGTGTGTATTTCCTC	15			
SEQ ID NO: 109	TGTGTGTATTTCCTCA	15			
SEQ ID NO: 110	GTGTGTGTATTTCCT	14			
SEQ ID NO: 111	TGTGTGTATTTCCTC	14			
SEQ ID NO: 112	GTGTGTATTTCCTCA	14			
SEQ ID NO: 113	GTGTGTGTATTTCCT	13			
SEQ ID NO: 114	TGTGTGTATTTCCT	13			
SEQ ID NO: 115	GTGTGTATTTCCTC	13			
SEQ ID NO: 116	TGTGTATTTCCTCA	13			
SEQ ID NO: 117	GTGTGTGTATTTT	12			
SEQ ID NO: 118	TGTGTGTATTTCCT	12			
SEQ ID NO: 119	GTGTGTATTTCCT	12			
SEQ ID NO: 120	TGTGTATTTCCTC	12			
SEQ ID NO: 121	GTGTATTTCCTCA	12			
SEQ ID NO: 122	CCCTCTGATGACTCTG	16	3474 – 3489	68.8%	68.8%
SEQ ID NO: 123	CCCTCTGATGACTCT	15			
SEQ ID NO: 124	CCTCTGATGACTCTG	15			
SEQ ID NO: 125	CCCTCTGATGACTC	14			
SEQ ID NO: 126	CCTCTGATGACTCT	14			
SEQ ID NO: 127	CTCTGATGACTCTG	14			
SEQ ID NO: 128	CCCTCTGATGACT	13			
SEQ ID NO: 129	CCTCTGATGACTC	13			
SEQ ID NO: 130	CTCTGATGACTCT	13			
SEQ ID NO: 131	TCTGATGACTCTG	13			
SEQ ID NO: 132	CCCTCTGATGAC	12			

[0337]

表 1-反义寡核苷酸序列 (基序)

SEQ ID NO	序列 (5'-3')	长度 (碱基)	靶 位 点	互补性	互补性
			HER3	EGFR	HER2
SEQ ID NO: 133	CCTCTGATGACT	12			
SEQ ID NO: 134	CTCTGATGACTC	12			
SEQ ID NO: 135	TCTGATGACTCT	12			
SEQ ID NO: 136	CTGATGACTCTG	12			
SEQ ID NO: 137	CATACTCCTCATCTTC	16	3770-3785	81.3%	81.3%
SEQ ID NO: 138	CCACCACAAAGTTATG	16	1067-1082	81.3%	68.8%
SEQ ID NO: 139	CATCACTCTGGTGTGT	16	2858-2873	93.8%	93.8%
SEQ ID NO: 140	GACATCACTCTGGTGT	16	2860-2875	93.8%	87.5%

[0338] 表 2 显示了 24 聚体 (24mer) 序列基序, 从其中可以设计本发明的寡聚物——黑体字代表表 1 中显示的 16 聚体 (16mer) 序列基序。

[0339]

表 2- HER3 24 聚体序列基序

16 聚体 SEQ IDs	包含 16 聚体的相应的 24 聚体序列	24 聚体 SEQ ID
SEQ ID NO: 1	catag ctccagacatcactct ggt	SEQ ID NO: 200
SEQ ID NO: 16	atag ctccagacatcactct ggtg	SEQ ID NO: 201
SEQ ID NO: 17	g ctccagacatcactct ggtgtgt	SEQ ID NO: 202
SEQ ID NO: 18	ctcc agacatcactct ggtgtgtg	SEQ ID NO: 203
SEQ ID NO: 19	cacc atagctccagacatcactct	SEQ ID NO: 204
SEQ ID NO: 34	actgt tcacaccatagctccagaca	SEQ ID NO: 205
SEQ ID NO: 49	caat catccaacacttgaccatca	SEQ ID NO: 206
SEQ ID NO: 50	aat catccaacacttgaccatcac	SEQ ID NO: 207
SEQ ID NO: 51	tc atcaatcatccaacacttgacc	SEQ ID NO: 208
SEQ ID NO: 52	ctcat caatcatccaacacttgac	SEQ ID NO: 209
SEQ ID NO: 53	tcacc atgtagacatcaattgtgc	SEQ ID NO: 210
SEQ ID NO: 54	gacat agcctgtcacttctcgaat	SEQ ID NO: 211

[0340]

SEQ ID NO: 55	acgaagatggcaaacttcccatcg	SEQ ID NO: 212
SEQ ID NO: 56	cccacaaggctcacacatcttgag	SEQ ID NO: 213
SEQ ID NO: 57	cagaaagtccagggtgccaggat	SEQ ID NO: 214
SEQ ID NO: 58	gtgacattcaagttcttcatgatc	SEQ ID NO: 215
SEQ ID NO: 59	ccagcactaatttcttcagggat	SEQ ID NO: 216
SEQ ID NO: 74	atacgcccagcactaatttcttc	SEQ ID NO: 217
SEQ ID NO: 75	cacaatttgccctctgccacgcag	SEQ ID NO: 218
SEQ ID NO: 76	gggtcacacactttgccctctgcc	SEQ ID NO: 219
SEQ ID NO: 91	tgcacagttccaaagacaccgag	SEQ ID NO: 220
SEQ ID NO: 92	cccttggaatttgactcccag	SEQ ID NO: 221
SEQ ID NO: 107	tctggtgtgtgtatttcccaagt	SEQ ID NO: 222
SEQ ID NO: 122	atgcccctctgatgactctgatgc	SEQ ID NO: 223
SEQ ID NO: 137	tattcatactctcatcttcatct	SEQ ID NO: 224
SEQ ID NO: 138	tgatccaccacaaagttatgggga	SEQ ID NO: 225
SEQ ID NO: 139	cagacatcactctggtgtgtgtat	SEQ ID NO: 226
SEQ ID NO: 140	tccagacatcactctggtgtgtgt	SEQ ID NO: 227

[0341] 表 3: 本发明的寡核苷酸设计

[0342] 在 SEQ ID NO: 141-168 中, 大写字母表示核苷酸类似物单元, 下标“s”代表硫代磷酸酯连接。小写字母代表核苷酸 (DNA) 单元。没有“s” (如果存在的话) 表示磷酸二酯连接。

[0343]

表 3-寡聚物设计	
SEQ ID NO	序列 (5'-3')
SEQ ID NO: 141	G _s C _s T _s C _s C _s A _s G _s A _s C _s A _s T _s C _s A _s C _s T _s C
SEQ ID NO: 142	C _s T _s C _s C _s A _s G _s A _s C _s A _s T _s C _s A _s C _s T _s C _s T
SEQ ID NO: 143	C _s A _s G _s A _s C _s A _s T _s C _s A _s C _s T _s C _s T _s G _s G _s T
SEQ ID NO: 144	A _s G _s A _s C _s A _s T _s C _s A _s C _s T _s C _s T _s G _s T _s G
SEQ ID NO: 145	A _s T _s A _s G _s C _s T _s C _s A _s G _s A _s C _s A _s T _s C _s A
SEQ ID NO: 146	T _s C _s A _s C _s A _s C _s A _s T _s A _s G _s C _s T _s C _s C _s A
SEQ ID NO: 147	C _s A _s T _s C _s C _s A _s A _s C _s A _s C _s T _s T _s G _s A _s C _s C

表 3-寡聚物设计

SEQ ID NO	序列 (5'-3')
SEQ ID NO: 148	A _s T _s C _s C _s a _s a _s C _s a _s C _s t _s t _s g _s a _s C _s C _s A
SEQ ID NO: 149	C _s A _s A _s t _s C _s a _s t _s C _s C _s a _s a _s C _s a _s C _s T _s T
SEQ ID NO: 150	T _s C _s A _s a _s t _s C _s a _s t _s C _s C _s a _s a _s C _s A _s C _s T
SEQ ID NO: 151	C _s A _s T _s g _s t _s a _s g _s a _s C _s a _s t _s C _s a _s A _s T _s T
SEQ ID NO: 152	T _s A _s G _s C _s C _s t _s g _s t _s C _s a _s C _s t _s T _s C _s T _s C
SEQ ID NO: 153	A _s G _s A _s t _s g _s g _s C _s a _s a _s a _s C _s t _s T _s C _s C _s C
SEQ ID NO: 154	C _s A _s A _s g _s g _s C _s t _s C _s a _s C _s a _s C _s a _s T _s C _s T
SEQ ID NO: 155	A _s A _s G _s t _s C _s C _s a _s g _s g _s t _s t _s g _s C _s C _s A
SEQ ID NO: 156	C _s A _s T _s t _s C _s a _s a _s g _s t _s C _s t _s T _s C _s A _s T
SEQ ID NO: 157	C _s A _s C _s t _s a _s a _s t _s t _s C _s C _s t _s T _s C _s A _s G
SEQ ID NO: 158	G _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s a _s C _s t _s a _s a _s T _s T _s C
SEQ ID NO: 159	C _s T _s T _s t _s g _s C _s C _s C _s t _s C _s t _s g _s C _s C _s A _s C
SEQ ID NO: 160	C _s A _s C _s a _s C _s a _s C _s t _s t _s t _s g _s C _s C _s C _s T _s C
SEQ ID NO: 161	C _s A _s G _s t _s C _s C _s a _s a _s a _s g _s a _s C _s A _s C _s C
SEQ ID NO: 162	T _s G _s G _s C _s a _s a _s t _s t _s t _s g _s t _s a _s C _s T _s C _s C
SEQ ID NO: 163	G _s T _s G _s t _s g _s t _s g _s t _s a _s t _s t _s C _s C _s A
SEQ ID NO: 164	C _s C _s C _s t _s C _s t _s g _s a _s t _s g _s a _s C _s t _s C _s T _s G
SEQ ID NO: 165	C _s A _s T _s a _s C _s t _s C _s C _s t _s C _s a _s t _s C _s T _s T _s C
SEQ ID NO: 166	C _s C _s A _s C _s C _s a _s C _s a _s a _s g _s t _s A _s T _s G
SEQ ID NO: 167	C _s A _s T _s C _s a _s C _s t _s C _s t _s g _s g _s t _s g _s T _s G _s T
SEQ ID NO: 168	G _s A _s C _s a _s t _s C _s a _s C _s t _s C _s t _s g _s g _s T _s G _s T

[0344]

[0345] 实施例 4 :体外模型 :细胞培养

[0346] 反义寡核苷酸对靶核酸表达的作用可以在多种细胞类型的任一种中测试,条件是该靶核酸以可检测的水平存在。靶可内源性表达或通过对编码所述靶的核酸进行瞬时转染或稳定的转染而表达。靶核酸的表达水平可常规地使用,例如, RNA 印迹分析、实时 PCR、核糖核酸酶保护测试而确定。为了例示,提供以下细胞类型,但可常规使用其它细胞类型,条件是该靶在所选的细胞类型中表达。

[0347] 细胞如下所述在合适的培养基中培养,并保持在 37℃ 和 95-98% 湿度和 5% CO₂

下。细胞每周常规传代 2-3 次。

[0348] 15PC3: 人前列腺癌细胞株 15PC3 在 DMEM(Sigma)+10 % 胎牛血清 (FBS)+2mM Glutamax I+ 庆大霉素 (25 μ g/ml) 中培养。

[0349] HUH7: 人肝癌细胞株在 DMEM(Sigma)+10 % 胎牛血清 (FBS)+2mM Glutamax I+ 庆大霉素 (25 μ g/ml)+1x 非必需氨基酸中培养。

[0350] 实施例 5: 体外模型: 用反义寡核苷酸处理

[0351] 将细胞用寡核苷酸处理, 使用阳离子脂质体制剂 LipofectAMINE 2000 (Gibco) 作为转染载体。将细胞接种于 6-孔细胞培养板 (NUNC) 并当铺满 80-90 % 时进行处理。使用的寡核苷酸浓度范围为 1nM 至 25nM 终浓度。寡核苷酸-脂质复合物的配制基本上按照制造商的说明进行, 其使用无血清 OptiMEM (Gibco) 且最终脂质浓度为 5 μ g/mL 的 LipofectAMINE 2000。将细胞在 37°C 培养 4 小时且通过去除含寡核苷酸的培养基终止处理。清洗细胞且添加含血清的培养基。寡核苷酸处理后, 使细胞恢复 20 小时, 然后将其收集用于 RNA 分析。

[0352] 实施例 6: 体外模型: RNA 的提取和 cDNA 合成

[0353] 使用 Qiagen RNeasy 试剂盒 (Qiagen cat.no. 74104) 根据厂家的说明书从如上所述转染的细胞提取总 RNA。根据厂家的说明书使用来自 Ambion 的逆转录酶试剂 (Reverse Transcriptase reagents) 进行第一链合成。

[0354] 对于每个样品, 使用无 RNase H₂O 将 0.5 μ g 总 RNA 调节到 10.8 μ l, 并与 2 μ l 十碱基的随机引物 (random decamers) (50 μ M) 和 4 μ l dNTP 混合物 (每种 dNTP 2.5mM) 混合, 加热到 70°C 保持 3 分钟, 在这之后样品在冰上快速冷却。在冰上冷却样品之后, 将 2 μ l 10x 缓冲液 RT、1 μ l 的 MMLV 逆转录酶 (100U/ μ l) 和 0.25 μ l RNase 抑制剂 (10U/ μ l) 添加到各样品中, 随后在 42°C 孵育 60 分钟, 酶在 95°C 加热灭活 10 分钟, 然后将样品冷却到 4°C。

[0355] 实施例 7: 体外模型: 通过实时 PCR 分析 HER3、EGFR 和 HER2 表达的寡核苷酸抑制作用

[0356] HER3、EGFR 和 HER2 表达的反义调节可以以本领域已知的多种方式分析。举例来说, HER3、EGFR 和 HER2 mRNA 水平可以通过例如 RNA 印迹分析、竞争性聚合酶链式反应 (PCR) 或实时 PCR 来定量。实时定量 PCR 当前是优选。可以对总细胞 RNA 或 mRNA 进行 RNA 分析。

[0357] RNA 分离和 RNA 分析的方法例如 RNA 印迹分析是本领域常规的, 在例如 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons 中教导了。

[0358] 实时定量的 (PCR) 可以使用可从 Applied Biosystems 商业上获得的 Multi-Color Real Time PCR 检测系统方便地实现。

[0359] HER3、EGFR 和 HER2 mRNA 水平的实时定量 PCR 分析

[0360] 人 HER3、EGFR 和 HER2 mRNA 的样品含量使用人 HER3、EGFR 和 HER2 AB I Prism Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (Applied Biosystems cat.no. Hs00951444_m1 (HER3)、Hs00193306_m1 (EGFR) 和 Hs00170433_m1 (HER2) 根据厂家的说明书来定量。

[0361] 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) mRNA 的量用作内源对照用于标准化样品制备中的任何变化。人 GAPDH mRNA 的样品含量使用人 GAPDH ABI Prism Pre-Developed TaqMan Assay Reagent (Applied Biosystems cat.no. 4310884E) 根据厂家的说明书来定量。

[0362] 实时定量 PCR 是本领域公知的技术, 在例如 Heid 等人, Real time quantitative PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994 中教导了。

[0363] 实时 PCR

[0364] 将来自第一链合成的 cDNA (如实施例 5 中描述进行的) 稀释 2-20 倍, 通过使用来自 Applied Biosystems 的 Taqman 7500FAST 或 7900FAST 的实时定量 PCR 来分析。将引物和探针与 2×Taqman Fast Universal PCR 主混合物 (master mix) (2×) (Applied Biosystems Cat. #4364103) 混合, 添加到 4 μl cDNA 中至 10 μl 的终体积。一式两份分析每种样品。测试 2 倍稀释的 cDNA 得到该测试的标准曲线, 该 cDNA 从表达感兴趣的 RNA 的细胞株纯化的物质制备。使用无菌的 H₂O 代替 cDNA 用于无模板对照。PCR 程序: 95°C 30 秒, 然后进行 40 个循环, 95°C 3 秒, 60°C 20-30 秒。使用 Applied Biosystems Fast System SDS 软件版本 1.3.1.21. 或 SDS 软件版本 2.3 根据计算的阈值循环测定靶 mRNA 的相对数量。

[0365] 实施例 8: 体外分析: 寡核苷酸化合物对人 HER3、EGFR 和 HER2 表达的反义抑制

[0366] 评估表 3 中呈现的寡核苷酸在 1、5 和 25nM 浓度下在 15PC3 细胞 (或如 * 所指示的 Huh-7) 中敲减 HER3、EGFR 和 HER2 mRNA 的潜力 (参见附图 2、3、4 和 5)。SEQ ID NO: 235 和 236 是乱序 (scrambled) 对照。

[0367] 表 4: 寡核苷酸对人 HER3、EGFR 和 HER2 表达的反义抑制

[0368] 表 4 中的数据被表示为在 25nM 下相对于模拟品转染的细胞的 mRNA 下调百分比。小写字母代表 DNA 单元, 粗体大写字母代表 β-D-氧基-LNA 单元。所有的 LNA C 是 5' 甲基 C。下标 "s" 表示硫代磷酸酯连接。

[0369]

表 4

测试物质	序列 (5'-3')	HER3 %抑制	EGFR %抑制	HER2 %抑制
SEQ ID NO: 169	G _s C _s T _s c _s c _s a _s g _s a _s c _s a _s t _s c _s a _s C _s T _s C	93.4%	95.2%	75.8%
SEQ ID NO: 170	C _s T _s C _s c _s a _s g _s a _s c _s a _s t _s c _s a _s c _s T _s C _s T	85.8%	91.5%	65.8%
SEQ ID NO: 171	C _s A _s G _s a _s c _s a _s t _s c _s a _s c _s t _s c _s t _s G _s G _s T	70.6%	84.2%	2.8%
SEQ ID NO: 172	A _s G _s A _s c _s a _s t _s c _s a _s c _s t _s c _s t _s g _s G _s T _s G	84.2%	86.2%	61%
SEQ ID NO: 173	A _s T _s A _s g _s c _s t _s c _s c _s a _s g _s a _s c _s a _s T _s C _s A	94.5%	96.4%	39.2%
SEQ ID NO: 174	T _s C _s A _s c _s a _s c _s c _s a _s t _s a _s g _s c _s t _s C _s C _s A	88.8%	86.4%	94.8%
SEQ ID NO: 175	C _s A _s T _s c _s c _s a _s a _s c _s a _s c _s t _s t _s g _s A _s C _s C	65.5%	86.1%	76.9%
SEQ ID NO: 176	A _s T _s C _s c _s a _s a _s c _s a _s c _s t _s t _s g _s a _s C _s C _s A	61.6%	79.4%	74.8%
SEQ ID NO: 177	C _s A _s A _s t _s c _s a _s t _s c _s c _s a _s a _s c _s a _s C _s T _s T	51.1%	0%	63.4%
SEQ ID NO: 178	T _s C _s A _s a _s t _s c _s a _s t _s c _s c _s a _s a _s c _s A _s C _s T	76.7%	0%	88.6%
SEQ ID NO: 179	C _s A _s T _s g _s t _s a _s g _s a _s c _s a _s t _s c _s a _s A _s T _s T	70.5%	52.6%	75.6%
SEQ ID NO: 180	T _s A _s G _s c _s c _s t _s g _s t _s c _s a _s c _s t _s C _s T _s C	92.8%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 181	A _s G _s A _s t _s g _s g _s c _s a _s a _s c _s t _s C _s C _s C	90.6%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 182	C _s A _s A _s g _s g _s c _s t _s c _s a _s c _s a _s c _s a _s T _s C _s T	74.6%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 183	A _s A _s G _s t _s c _s c _s a _s g _s g _s t _s t _s g _s c _s C _s C _s A	85.9%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 184	C _s A _s T _s t _s c _s a _s a _s g _s t _s t _s c _s t _s C _s A _s T	81.1%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 185	C _s A _s C _s t _s a _s a _s t _s t _s c _s c _s t _s C _s A _s G	89.1%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 186	G _s C _s C _s c _s a _s g _s c _s a _s c _s t _s a _s a _s T _s T _s C	79.9%	N.D.	N.D.

[0370]

表 4

测试物质	序列 (5'-3')	HER3 %抑制	EGFR %抑制	HER2 %抑制
SEQ ID NO: 187	C _s T _s T _s t _s g _s c _s c _s c _s t _s c _s t _s g _s c _s C _s A _s C	90.4%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 188	C _s A _s C _s a _s c _s a _s c _s t _s t _s t _s g _s c _s c _s C _s T _s C	96.1%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 189	C _s A _s G _s t _s c _s c _s a _s a _s a _s g _s a _s c _s A _s C _s C	88.9%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 190	T _s G _s G _s c _s a _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s c _s T _s C _s C	95.7%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 191	G _s T _s G _s t _s g _s t _s g _s t _s a _s t _s t _s c _s C _s C _s A	97.7%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 192	C _s C _s C _s t _s c _s t _s g _s a _s t _s g _s a _s c _s t _s C _s T _s G	92.3%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 193	C _s A _s T _s a _s c _s t _s c _s c _s t _s c _s a _s t _s c _s T _s T _s C	64%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 194	C _s C _s A _s c _s c _s a _s c _s a _s a _s g _s t _s t _s A _s T _s G	87.5%	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 195	C _s A _s T _s c _s a _s c _s c _s c _s t _s g _s g _s t _s g _s T _s G _s T	64.4%*	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 196	G _s A _s C _s a _s t _s c _s a _s c _s t _s c _s t _s g _s g _s T _s G _s T	77.0%*	N.D.	N.D.
SEQ ID NO: 234	T _s A _s g _s c _s c _s t _s g _s t _s c _s a _s C _s T _s T			
SEQ ID NO: 235	C _s G _s T _s c _s a _s g _s t _s a _s t _s g _s c _s g _s A _s A _s T _s c			
SEQ ID NO: 236	C _s G _s C _s A _s g _s a _s t _s t _s a _s g _s a _s A _s C _s C _s t			
SEQ ID NO: 249	T _s A _s G _s c _s c _s t _s t _s t _s g _s a _s c _s c _s t _s C _s T _s C			

[0371] 如在表 4 中所示,在这些实验中在 15PC3 细胞中,SEQ ID NO:169、170、173、174、180、181、183、185、187、188、189、190、191、192 和 194 的寡核苷酸在 25nM 展现了的 85%或更大的对 HER3mRNA 表达抑制。

[0372] 同样优选的是,基于列举的反义寡聚序列的寡核苷酸,例如,改变长度(更短或更长)和/或核碱基含量(例如,类似物单元的类型和/或比例),其也提供了对 HER3 表达的良好抑制。

[0373] 实施例 9:LNA 寡核苷酸的细胞凋亡诱导

[0374] 在转染的前一天,将 HUH7 细胞以 2.5×10^5 个细胞/孔的密度接种在 6 孔培养平板(NUNC)中。当 75-90%汇合时利用阳离子脂质体制剂 LipofectAMINE 2000(Gibco)作为转染载体用寡核苷酸处理细胞。使用的寡聚物浓度是 5nM 和 25nM(反应孔中的终浓度)。寡聚物-脂质复合物的配制基本上如厂家所描述的进行,使用无血清 OptiMEM(Gibco)和 5 μ g/mL 的最终脂质浓度的 LipofectAMINE 2000。细胞在 37℃ 孵育 4 小时,通过除去含有寡聚物的培养基来停止处理。在用 OptiMEM 洗涤之后,将 300 μ l 的胰蛋白酶添加到每个孔中直到细胞从孔脱离。通过向孔中添加 3ml HUH7 培养基来灭活胰蛋白酶,通过上下轻轻地吸移细胞悬浮液来产生单细胞悬浮液。乱序的寡聚物 SEQ ID NO:235 用作对照。

[0375] 在这之后,将 100 μ l 的细胞悬浮液添加到来自 Nunc 的白色 96 孔平板(cat#136101)的每个孔中(制备四个平板,用于在不同时间点测量)。将平板然后在 37℃、

95%湿度和 5% CO₂ 中孵育直到进行分析。

[0376] 半胱氨酸蛋白酶分析:细胞凋亡特异性半胱氨酸蛋白酶 3 和 7 的活性使用荧光 Caspase-Glo 3/7-底物分析(来自 Promega 的 Cat#G8091)来测量。要分析的平板平衡到室温保持 15 分钟。Caspase- **Glo**® 3/7 缓冲液与 Caspase- **Glo**® 3/7 底物混合,得到 Caspase- **Glo**® 工作溶液,将其平衡到室温。然后,将 100 μl 的 Caspase- **Glo**® 工作溶液小心地添加到 96 孔平板的每个孔的培养基中(重要的是避免气泡和孔之间的污染)。平板小心地振摇 1 分钟,在这之后,将它在室温避光孵育 1 小时。半胱氨酸蛋白酶活性以 LuminoscanAscent 仪器(Thermo Labsystems)中的每秒的相对光单元(RLU/s)来测量。相对于被设置为 1 的模拟品(mock)的平均值将数据进行相关和绘图。参见附图 6。

[0377] 实施例 10:使用 LNA 寡核苷酸对增殖的体外抑制

[0378] 如实施例 9 中所述,转染 HUH7 细胞并收集成单细胞悬浮液。SEQ ID NO:235 充当乱序的对照。

[0379] 在这之后,将 100 μl 的细胞悬浮液添加到 96 孔平板("OrangeScientific")的每个孔中用于 MTS 实验(制备四个平板,用于在不同的时间点测量)。然后将平板在 37℃、95%湿度和 5% CO₂ 中孵育直到进行实验。

[0380] 增殖的活细胞的测定(MTS 分析)

[0381] 对于增殖分析,将 10 μl CellTiter **96**® Aqueous One Solution CellProliferation Assay(Promega, G3582)添加到 96 孔平板的每个孔的培养基中,小心地振摇平板,并在测量前在 37℃、95%湿度和 5% CO₂ 孵育 1 小时。在分光光度计中测量 490nm 处的吸光度,减去从仅含有培养基的孔中得到的实验背景。490nm 处的吸光度与活细胞的数量成比例,对模拟品转染的细胞和对用寡聚物转染的细胞相对于时间进行绘图。参见附图 7。

[0382] 实施例 11:靶 mRNA 敲减的体内评估

[0383] 为了评估 HER3 寡聚化化合物的体内敲减(knockdown)效力,带有 15PC3 异种移植物的雌性裸小鼠(通过向右侧腋下肋部皮下注射 5×10^6 个细胞/小鼠得到),在多种剂量和注射方案(即,单剂量、每天(qd)、每 3 天(q3d)、每 4 天(q4d))下用寡聚物静脉内注射。乱序的寡聚物 SEQ ID NO:236 充当阴性对照。最后注射后 24 小时,小鼠被麻醉,将肝脏和肿瘤组织采集在 RNAlater 溶液(Ambion)中。从组织纯化总 RNA,通过使用 QuantiTect Probe RT-PCR 试剂盒(Cat#:204443;Qiagen)的定量逆转录实时 PCR(qRT-PCR)测定 HER3mRNA 的水平。GAPDH mRNA 充当内部对照。

[0384] 小鼠 ErbB3:探针:cca cac ctg gtc ata gcg gtg a(SEQ ID NO 237),引物-1:ctg ttt agg cca agc aga gg(SEQ ID NO 238),引物-2:att ctg aat cct gcg tcc ac(SEQ ID NO 239)。

[0385] 人 ErbB3:探针:cat tgc cca acc tcc gcg tg(SEQ ID NO 240),引物-1:tgcagt gga ttc gag aag tg(SEQ ID NO 241),引物-2:ggc aaa ctt ccc atc gta ga(SEQ ID NO 242)。

[0386] 人 GAPDH:探针:act ggc gct gcc aag gct gt(SEQ ID NO 243),引物-1:cca ccc aga aga ctg tgg at(SEQ ID NO 244),引物-2:ttc agc tca ggg atg acc tt(SEQ ID NO 245)。

[0387] 小鼠 GAPDH :探针 :agc tgt ggc gtg atg gcc gt (SEQ ID NO 246), 引物 -1 :aac ttt ggc att gtg gaa gg (SEQ ID NO 247), 引物 -2 :gga tgc agg gat gat gtt ct (SEQ ID NO 248)。

[0388] 在 PCR 反应中使用 200ng 的总 RNA。通过使用包括软件的 ABI-7500PCR Fast System 进行数据分析。参见表 5。

[0389] 表 5 :小鼠肝脏和肿瘤中 HER3mRNA 的抑制作用

[0390] 表 5 中的数据表示为,在按照指定的剂量用寡核苷酸连续 5 天对动物静脉给药后,在肝脏和肿瘤样品中,相对于盐水治疗的对照 HER3mRNA 水平的%。

[0391]

表 5			
LNA ID	剂量 (mg/kg, i.v. , qdx5)	HER3 mRNA	
		肝脏 (%盐 水对照)	肿瘤 (%)
SEQ ID NO: 236	76.3	78 ± 17	100 ± 10.5
	60	86.5 ± 9.9	95.5 ± 12.7
	30	87.6 ± 19	101.2 ± 21.1
	22.9	81.4 ± 6.5	119.3 ± 24.9
SEQ ID NO: 180	85.3	1 ± 0.3	25.8 ± 4.1
	66	6 ± 5.3	32.3 ± 9.7
	31.3	1.6 ± 0.3	37 ± 5.8
	25.6	3 ± 0.3	65 ± 20.2
	19.8	1.7 ± 0.6	83.1 ± 19.5
SEQ ID NO: 169	37.7	20.7 ± 9.8	77 ± 10
	11.3	10.2 ± 5.5	ND
SEQ ID NO: 172	32.4	7.4 ± 5.2	78.1 ± 15.3
	9.7	12.2 ± 5.9	ND

[0392] 实施例 12 :肿瘤生长抑制的评估

[0393] ErbB3 特异性 LNA 抑制体内肿瘤生长的能力在带有 15PC3 异种移植物的裸雌性小鼠中评估。15PC3 人前列腺肿瘤模型通过向右侧腋下肋部皮下注射 5×10^6 个细胞 / 小鼠来构建。肿瘤体积将通过卡尺测量 2 个方向来测定,并使用下式来计算 :肿瘤体积 = (长度 × 宽度²) / 2)。当肿瘤达到 70-100mm³ 的平均体积时,将带有肿瘤的小鼠被分成治疗组和对照组。以 q3d x10 的方案,小鼠分别静脉注射 25 和 50mg/kg 的 SEQ ID NO :180。盐水或乱序

对照 SEQ ID NO :236 充当对照。每周两次地测量小鼠的体重和肿瘤大小。通过临床观察、临床化学和组织病理学检验来估计毒性。通过如实施例 11 描述的 QPCR 测量肿瘤 HER3mRNA。参见附图 8A 和 8B。

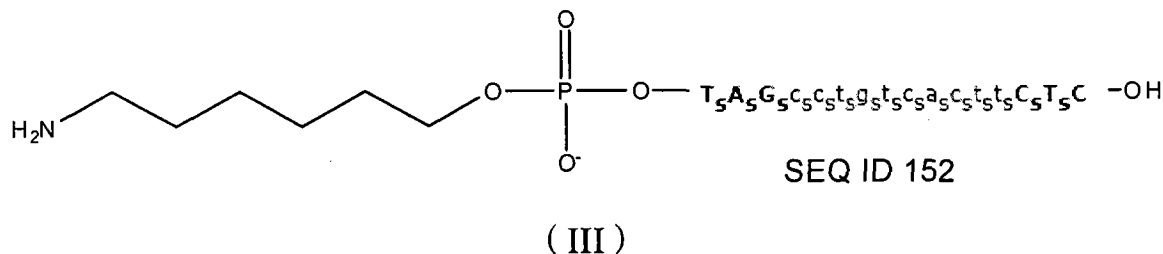
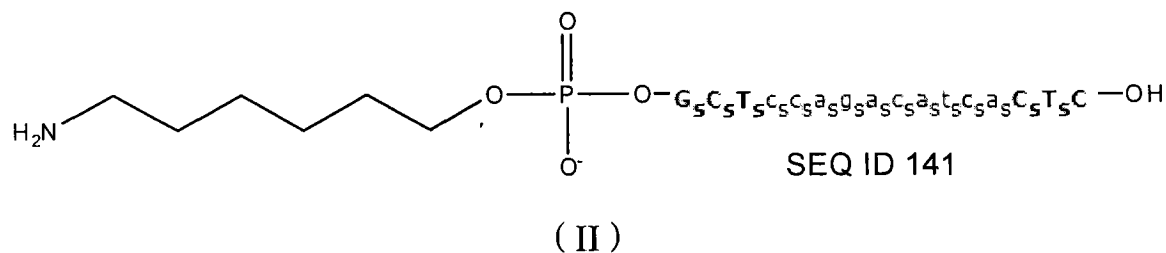
[0394] 实施例 13 :小鼠肝脏中 HER3mRNA 的抑制

[0395] 连续三天以 1 或 5mg/kg 寡核苷酸对 NMRI 小鼠静脉给药 (每组 5 只小鼠)。反义寡核苷酸 (SEQ ID NO :180 和 SEQ ID NO :234) 溶于 0.9% 盐水 (NaCl) 中。在最后的给药后 24 小时处死动物, 采样肝脏组织, 并保存在 RNA later (Ambion) 中直到 RNA 提取和 QPCR 分析。提取总 RNA, 肝脏样品中的 HER3mRNA 表达使用小鼠 HER3QPCR 实验 (cat. no. Mm01159999_m1, Applied Biosystems), 如实施例 7 中描述的通过 QPCR 来测量。结果对小鼠 GAPDH (cat. no. 4352339E, Applied Biosystems) 进行标准化, 相对于盐水处理的对照绘图 (参见附图 9)。

[0396] 实施例 14 :SEQ ID NO :141 或 SEQ ID NO :152 和聚乙二醇的缀合物的制备

[0397] 具有 SEQ ID NO :141 或 SEQ ID NO :152 的寡聚物, 通过利用常规的亚磷酰胺化学作用将用阻断基团例如 Fmoc 阻断的氨基烷基基团例如己烷-1-胺连接到寡聚物的 5' 磷酸基团, 来在 5' 末端功能化, 氧化产生的化合物, 将它脱保护, 纯化来得到具有式 (II) 或 (III) 的功能化的寡聚物:

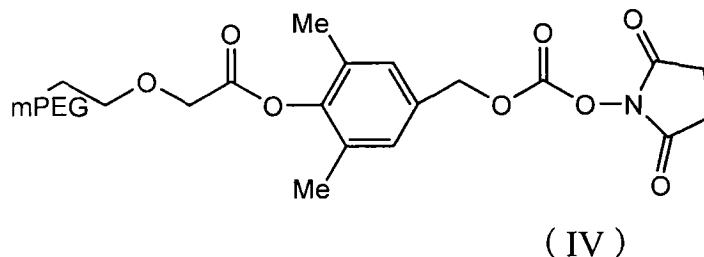
[0398]



[0399] 其中 SEQ ID NO :141 或 SEQ ID NO :152 中的粗体大写字母和下标“s”具有如上所述的相同的含义。

[0400] 活化的 PEG 的方案, 例如在式 (IV) 中所示的一种:

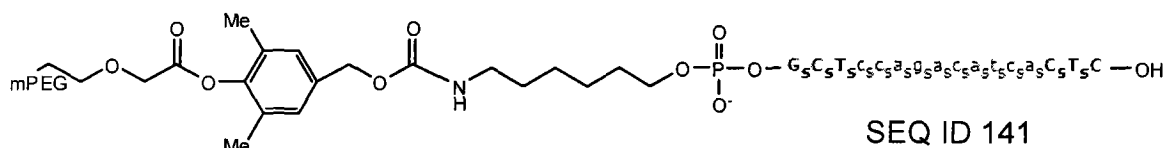
[0401]



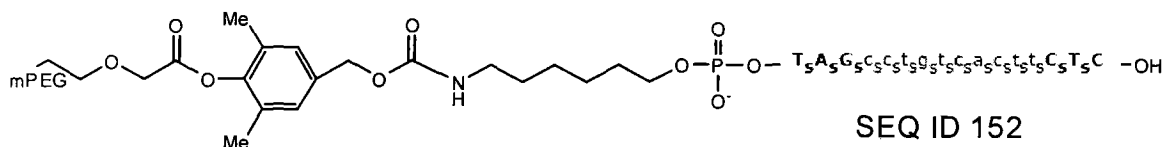
[0402] 其中 PEG 部分具有 12,000Da 的平均分子量, 且的式 (II) 或 (III) 化合物在 PBS 缓冲液中在室温下搅动 12 小时。反应溶液用二氯甲烷提取三次, 合并的有机层用硫酸镁干

干燥,并过滤,溶剂减压蒸发。残余物溶于双蒸水,并加载到阴离子交换柱上。未反应的 PEG 连接基 (linker) 用水洗脱,产物用 NH_4HCO_3 溶液洗脱。收集含有纯产物的级分,冻干得到式 (V) 或 (VI) 的缀合物:

[0403]



(V)

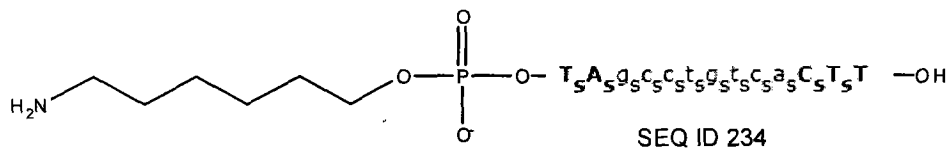


(VI)

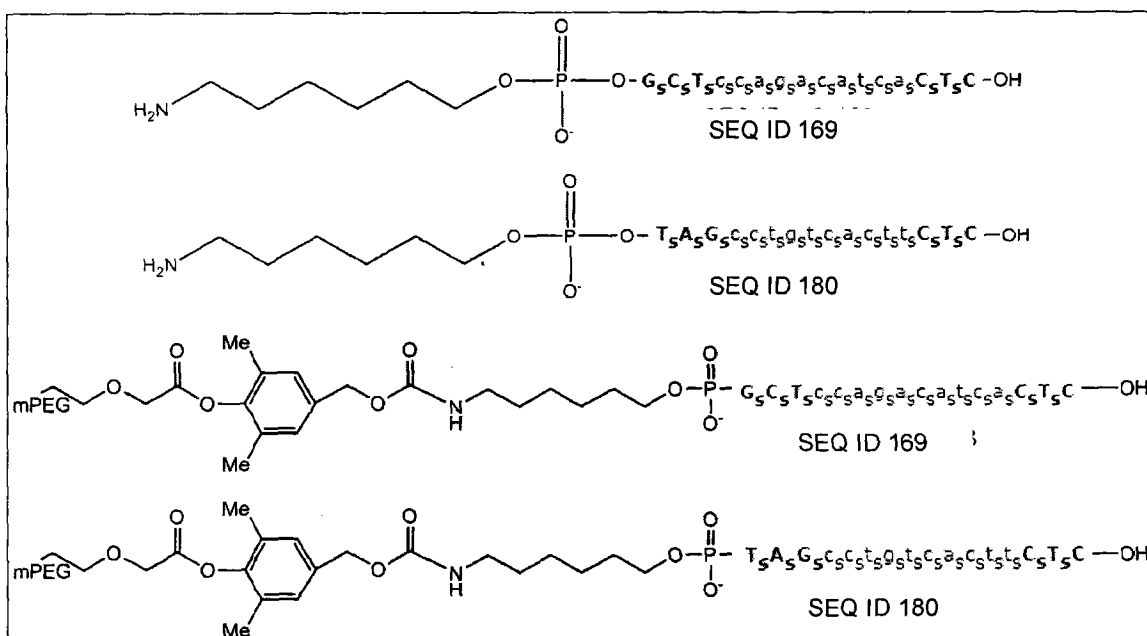
[0404] 其中 SEQ ID NO:141 或 SEQ ID NO:152 的寡聚物经由可释放的连接基连接到具有 12,000 平均分子量的 PEG 聚合物上。

[0405] 以下是 SEQ ID NO:180、SEQ ID NO:234 和 SEQ ID NO:169 的缀合物的实例:

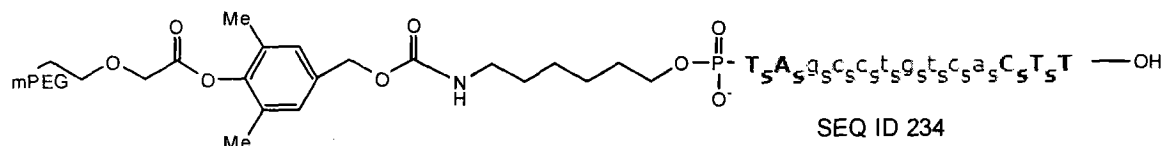
[0406]



[0407]



[0408]



[0409] 实施例 15 :使用不同的给药周期评估靶 mRNA 体内敲减

[0410] 使用如上在实施例 11 中描述的方案,在带有来自 15PC3 细胞或 A549 细胞 (NSCLC) 或 N87 细胞 (胃癌) 的异种移植肿瘤的裸小鼠中,体内评估寡聚物的敲减效力。寡聚物通过每三天 2-4 剂注射给药。在最后的注射后 3 或 4 天收集组织。

[0411] 表 6 和 7 中的数据表示为相对于盐水治疗的对照,在用指定的寡聚物对动物静脉给药后,在肝脏和肿瘤样品中 HER3mRNA 或 HIF-1 α mRNA 水平的%。

[0412]

表 6-在小鼠肝脏和来自 15PC3 细胞的异种移植肿瘤中,对 ErbB3 mRNA 的抑制作用 (3-5 只小鼠/组)

治疗	剂量 (mg/kg)	肿瘤		肝脏
		HER3 (%)	Hif1A (%)	HER3 (%)
盐水	0 x 4	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 8	100 $\pm$ 18
SEQ ID No: 236	76.3 x 4	106 $\pm$ 6.6	101 $\pm$ 13.8	115.9 $\pm$ 26.3
SEQ ID No: 169	37.7 x 4	81.6 $\pm$ 12.7	94.6 $\pm$ 19.6	39 $\pm$ 4.6
SEQ ID No: 172	32.4 x 4	107.3 $\pm$ 17	100.3 $\pm$ 7.5	44.3 $\pm$ 10.6
SEQ ID No: 180	60.2 x 2 或 3	47.1 $\pm$ 2.2	101 $\pm$ 7.3	6.9 $\pm$ 3.6
	60.2 x 4	54.2 $\pm$ 9.1	ND	31.8 $\pm$ 5

[0413]

[0414] 观察到的具有 SEQ ID NO:169 和 SEQ ID NO:180 的序列的寡聚物的敲减效果不是对 15PC3 肿瘤细胞独特的,因为在来自 A549 (NSCLC) 和 N87 (胃癌) 细胞的肿瘤中观察到了相似的效果。参见以下的表 7。

[0415]

表 7-在小鼠肝脏和来自 N87 细胞的异种移植肿瘤中,对 ErbB3 mRNA 的抑制作用 (3 只小鼠/组)

异种移植 模型	治疗	剂量 mg/kg	HER3 (%) 盐水对照)	
			肿瘤	肝脏
A549	盐水	0 x 3	100 $\pm$ 20.9	100 $\pm$ 4.8
	SEQ ID No: 236	35, q4d x 3	87.6 $\pm$ 11.9	97.5 $\pm$ 21.2
	SEQ ID No: 180	35, q4d x 3	54.6 $\pm$ 15.2	31.8 $\pm$ 5.7
N87	盐水	0 x 5	100 $\pm$ 8.2	100 $\pm$ 9.4
	SEQ ID No: 249	25, q3d x 5	99.0 $\pm$ 8.9	123 $\pm$ 4.5
	SEQ ID No: 180	25, q3d x 5	46.6 $\pm$ 13.4	24.7 $\pm$ 3.1

序列表

<110>Santaris A/S

<120> 用于调节 HER3 的 RNA 拮抗剂化合物

<130>17207PCT00

<160>248

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>1

gctccagaca tcactc 16

<210>2

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>2

gctccagaca tcact 15

<210>3

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>3

ctccagacat cactc 15

<210>4

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>4

gctccagaca tcac 14

<210>5

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>5

ctccagacat cact 14

<210>6

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>6

tccagaca tc actc 14

<210>7

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>7

gctccagaca tca 13

<210>8

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>8

ctccagacat cac 13

<210>9

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>9

tccagacatc act 13

<210>10

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>10

ccagacatca ctc

13

<210>11

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>11

gctccagaca tc

12

<210>12

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>12

ctccagacat ca

12

<210>13

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>13

tccagacatc ac

12

<210>14

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>14

ccagacatca ct

12

<210>15

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>15

cagacatcac tc

12

<210>16

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>16

ctccagacatcac tct

16

<210>17

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>17

cagacatcac tctggt 16

<210>18

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>18

agacatcact ctggtg 16

<210>19

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>19

atagctccag acatca 16

<210>20

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>20

atagctccag acatc 15

<210>21

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>21

tagctccaga catca 15

<210>22

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>22

atagctccag acat 14

<210>23

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>23

tagctccaga catc 14

<210>24

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>24

agctccagaca tca 14

<210>25

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>25

atagctccag aca 13

<210>26

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>26

tagctccaga cat 13

<210>27

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>27

agctccagaca tc 13

<210>28

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>28

gctccagaca tca 13

<210>29

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>29

atagctccag ac 12

<210>30

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>30

tagctccaga ca 12

<210>31

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>31

agctccagac at 12

<210>32

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>32

gctccagaca tc 12

<210>33

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>33

ctccagacat ca 12

<210>34

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>34

tcacaccata gctcca 16

<210>35

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>35

tcacaccata gctcc 15

<210>36

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>36

cacaccatag ctcca 15

<210>37

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>37

tcacaccata gctc 14

<210>38

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>38

cacaccatag ctcc 14

<210>39

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>39

acaccatagc tcca 14

<210>40

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>40

tcacaccata gct 13

<210>41

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>41

cacaccatag ctc 13

<210>42

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>42

acaccatagc tcc 13

<210>43

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>43

caccatagct cca 13

<210>44

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>44

tcacaccata gc 12

<210>45

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>45

cacaccatag ct 12

<210>46

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>46

acaccatagc tc

12

<210>47

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>47

caccatagct cc

12

<210>48

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>48

accatagctc ca

12

<210>49

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>49

catccaacac ttgacc

16

<210>50

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>50

atccaacact tgacca

16

<210>51

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>51

caatcatcca acactt

16

<210>52

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>52

tcaatcatcc aacact

16

<210>53

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>53

catgtagaca tcaatt 16

<210>54

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>54

tagcctgtca cttctc 16

<210>55

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>55

agatggcaaa cttccc 16

<210>56

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>56

caaggtcac acatct 16

<210>57

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>57

aagtcaggt tgcca 16

<210>58

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>58

cattcaagtt cttcat 16

<210>59

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>59

cactaatttc cttcag 16

<210>60

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>60

cactaatttc cttca 15

<210>61

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>61

actaatttcc ttcag 15

<210>62

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>62

cactaatttc cttc 14

<210>63

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>63

actaatttcc ttca 14

<210>64

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>64

ctaatttcct tcag 14

<210>65

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>65

cactaatttc ctt 13

<210>66

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>66

actaatttcc ttc 13

<210>67

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>67

ctaatttcct tea 13

<210>68

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>68

taatttcctt cag 13

<210>69

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>69

cactaatttc ct 12

<210>70

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>70

actaatttcc tt 12

<210>71

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>71

ctaatttcct tc 12

<210>72

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>72

taatttcctt ca 12

<210>73

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>73

aatttccttc ag 12

<210>74

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>74

gcccagcact aatttc 16

<210>75

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>75

cttttgccctc tgccac 16

<210>76

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>76

cacacacttt gccctc 16

<210>77

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>77

cacacacttt gccct 15

<210>78

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>78

acacactttg ccctc 15

<210>79

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>79

cacacacttt gcc 14

<210>80

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>80

acacactttg ccct 14

<210>81

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>81

cacactttgc cctc 14

<210>82

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>82

cacacacttt gcc 13

<210>83

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>83

acacacttttg ccc 13

<210>84

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>84

cacacttttgc cct 13

<210>85

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>85

acacttttgcc ctc 13

<210>86

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>86

cacacacttt gc 12

<210>87

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>87

acacactttg cc 12

<210>88

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>88

cacactttgc cc 12

<210>89

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>89

acacttttgcc ct 12

<210>90

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>90

cacttttgccc tc 12

<210>91

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>91

cagttccaaa gacacc 16

<210>92

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>92

tggcaatttg tactcc 16

<210>93

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>93

tggcaatttg tactc 15

<210>94

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>94

ggcaatttgt actcc 15

<210>95

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>95

tggcaatttg tact 14

<210>96

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>96

ggcaatttgt actc 14

<210>97

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>97

gcaatttgta ctcc 14

<210>98

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>98

tggcaatttg tac 13

<210>99

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>99

ggcaatttgt act 13

<210>100

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>100

gcaatttgta ctc 13

<210>101

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>101

caatttgta ccc 13

<210>102

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>102

tggcaatttg ta 12

<210>103

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>103

ggcaatttgt ac 12

<210>104

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>104

gcaatttgta ct 12

<210>105

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>105

caatttgtac tc 12

<210>106

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>106

aatttgtact cc 12

<210>107

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>107

gtgtgtgtat ttccca 16

<210>108

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>108

gtgtgtgtat ttccc 15

<210>109

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>109

tgtgtgtatt tccca 15

<210>110

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>110

gtgtgtgtat ttcc 14

<210>111

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>111

tgtgtgtatt tccc 14

<210>112

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>112

gtgtgtattt ccca 14

<210>113

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>113

gtgtgtgtat ttc 13

<210>114

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>114

tgtgtgtatt tcc 13

<210>115

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>115

gtgtgtattt ccc 13

<210>116

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>116

tgtgtatttc cca 13

<210>117

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>117

gtgtgtgtat tt 12

<210>118

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>118

tgtgtgtatt tc 12

<210>119

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>119

gtgtgtattt cc 12

<210>120

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>120

tgtgtatttc cc 12

<210>121

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>121

gtgtatttcc ca

12

<210>122

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>122

ccctctgatg actctg

16

<210>123

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>123

ccctctgatg actct

15

<210>124

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>124

cctctgatga ctctg 15

<210>125

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>125

ccctctgat gactc 14

<210>126

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>126

cctctgatga ctct 14

<210>127

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>127

ctctgatgac tctg 14

<210>128

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>128

ccctctgatg act 13

<210>129

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>129

cctctgatga ctc 13

<210>130

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>130

ctctgatgac tct 13

<210>131

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>131

tctgatgact ctg 13

<210>132

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>132

ccctctgatg ac 12

<210>133

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>133

cctctgatga ct 12

<210>134

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>134

ctctgatgac tc 12

<210>135

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>135

tctgatgact ct 12

<210>136

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>136

ctgatgactc tg 12

<210>137

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>137

catactcctc atcttc 16

<210>138

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>138

ccaccacaaa gttatg 16

<210>139

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>139

catcactctg gtgtgt 16

<210>140

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>140

gacatcactc tgggtgt 16

<210>141

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基 (phosphorothiate linkage)

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>141

gctccagaca tcactc 16

<210>142

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>142

ctccagacat cactct 16

<210>143

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>143

cagacatcac tctggt 16

<210>144

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>144

agacatcact ctggtg 16

<210>145

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>145

atagctccag acatca 16

<210>146

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>146

tcacaccata gctcca 16

<210>147

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>147

catccaacac ttgacc 16

<210>148

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>148

atccaacact tgacca 16

<210>149

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>149

caatcatcca acactt 16

<210>150

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>150

tcaatcatcc aacact 16

<210>151

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>151

catgtagaca tcaatt 16

<210>152

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>152

tagcctgtca cttctc 16

<210>153

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>153

agatggcaaa cttccc 16

<210>154

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>154

caaggctcac acatct 16

<210>155

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>155

aagtccaggt tgccca 16

<210>156

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>156

cattcaagtt cttcat 16

<210>157

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>157

cactaatttc cttcag 16

<210>158

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>158

gcccagcact aatttc 16

<210>159

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>159

cttttgccctc tgccac 16

<210>160

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>160

cacacacttt gccctc 16

<210>161

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>161

cagttccaaa gacacc 16

<210>162

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>162

tggcaatttg tactcc 16

<210>163

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>163

gtgtgtgtat ttccca 16

<210>164

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>164

ccctctgatg actctg 16

<210>165

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>165

catactectc atcttc 16

<210>166

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(14).. (16)

<400>166

ccaccacaaa gttatg 16

<210>167

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222>(1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>167

catcactctg gtgtgt 16

<210>168

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸设计

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (1).. (3)

<220>

<221> 核苷酸类似物

<222> (14).. (16)

<400>168

gacatcactc tggtgt 16

<210>169

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>169

gctccagaca tcactc 16

<210>170

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>170

ctccagacat cactct 16

<210>171

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>171

cagacatcac tctggt 16

<210>172

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>172

agacatcact ctggtg 16

<210>173

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1)..(15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1)..(3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14)..(16)

<400>173

atagctccag acatca 16

<210>174

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1)..(15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>174

tcacaccata gctcca 16

<210>175

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>175

catccaacac ttgacc 16

<210>176

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>176

atccaacact tgacca 16

<210>177

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>177

caatcatcca acactt 16

<210>178

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>178

tcaatcatcc aacact 16

<210>179

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>179

catgtagaca tcaatt 16

<210>180

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>180

tagcctgtca cttctc 16

<210>181

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>181

agatggcaaa cttccc 16

<210>182

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>182

caaggtcac acatct 16

<210>183

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>183

aagtccaggt tgccca 16

<210>184

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>184

cattcaagtt cttcat 16

<210>185

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1)..(15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1)..(3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14)..(16)

<400>185

cactaatttc cttcag 16

<210>186

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1)..(15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>186

gcccagcact aatttc 16

<210>187

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>187

ctttgccctc tgccac 16

<210>188

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> LNA 核碱基

<222> (1).. (3)

<220>

<221> LNA 核碱基

<222> (14).. (16)

<400> 188

cacacacttt gccctc 16

<210> 189

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221> LNA 核碱基

<222> (1).. (3)

<220>

<221> LNA 核碱基

<222> (14).. (16)

<400> 189

cagttccaaa gacacc 16

<210>190

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>190

tggcaatttg tactcc 16

<210>191

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>191

gtgtgtgtat ttccca 16

<210>192

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>192

ccctctgatg actctg 16

<210>193

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>193

catactcctc atcttc 16

<210>194

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>194

ccaccacaaa gttatg 16

<210>195

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1)..(15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1)..(3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14)..(16)

<400>195

catcactctg gtgtgt 16

<210>196

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1)..(15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1)..(3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14)..(16)

<400>196

gacatcactc tggtgt 16

<210>197

<211>5511

<212>DNA

<213> 人

<400>197

acacacacac	acccctcccc	tgccatccct	ccccggactc	cggtctccggc	tccgattgca	60
atttgcaacc	tccgctgccg	tcgccgcagc	agccaccaat	tcgccagcgg	ttcaggtggc	120
tcttgccctg	atgtcctagc	ctagggggccc	ccggggccgga	cttggctggg	ctcccttcac	180
cctctgcgga	gtcatgaggg	cgaacgacgc	tctgcaggtg	ctgggcttgc	ttttcagcct	240
ggccccggggc	tccgaggtgg	gcaactctca	ggcagtggtg	cctgggactc	tgaatggcct	300
gagtgtgacc	ggcgatgctg	agaaccaata	ccagacactg	tacaagctct	acgagaggtg	360
tgaggtgggtg	atggggaacc	ttgagattgt	gctcacggga	cacaatgccg	acctctcctt	420
cctgcagtggtg	attcgagaag	tgacaggcta	tgtcctcgtg	gccatgaatg	aattctctac	480
tctaccattg	cccaacctcc	gcgtgggtgcg	agggacccag	gtctacgatg	ggaagtttgc	540
catcttcgtc	atgttgaact	ataacaccaa	ctccagccac	gctctgcgcc	agctccgctt	600
gactcagctc	accgagattc	tgtcagggggg	tgtttatatt	gagaagaacg	ataagctttg	660
tcacatggac	acaattgact	ggaggggacat	cgtgagggac	cgagatgctg	agatagtggt	720
gaaggacaat	ggcagaagct	gtcccccttg	tcattgaggtt	tgcaaggggc	gatgctgggg	780
tccttgatca	gaagactgcc	agacattgac	caagaccatc	tgtgctcctc	agtgtaatgg	840
tcactgcttt	gggcccaccc	ccaaccagtg	ctgccatgat	gagtgtgccg	ggggctgctc	900
aggccctcag	gacacagact	gctttgcctg	ccggcacttc	aatgacagtg	gagcctgtgt	960
acctgctgtg	ccacagcctc	ttgtctacaa	caagctaact	ttccagctgg	aacccaatcc	1020
ccacaccaag	tatcagtatg	gaggagtttg	tgtagccagc	tgtccccata	actttgtggt	1080
ggatcaaaca	tcctgtgtca	gggcctgtcc	tcctgacaag	atggaagtag	ataaaaaatgg	1140
gctcaagatg	tgtgagcctt	gtgggggact	atgtcccaaa	gcctgtgagg	gaacaggctc	1200
tgggagccgc	ttccagactg	tggactcgag	caacattgat	ggattttgtga	actgcaccaa	1260
gatcctgggc	aacctggact	ttctgatcac	cggcctcaat	ggagacccct	ggcacaagat	1320
ccctgccctg	gaccagaga	agctcaatgt	cttccggaca	gtacgggaga	tcacaggtta	1380
cctgaacatc	cagtcttggc	cgccccacat	gcacaacttc	agtgtttttt	ccaatttgac	1440
aaccattgga	ggcagaagcc	tctacaaccg	gggctttctca	ttgtttgatca	tgaagaactt	1500
gaatgtcaca	tctctgggct	tccgatccct	gaaggaaatt	agtgtctgggc	gtatctatat	1560
aagtgccaat	aggcagctct	gctaccacca	ctctttgaac	tggaccaagg	tgcttcgggg	1620
gcctacggaa	gagcgactag	acatcaagca	taatcgcccg	cgcagagact	gcgtggcaga	1680
gggcaaagtg	tgtgaccac	tgtgctcctc	tgggggatgc	tggggcccag	gccctgggtca	1740
gtgcttgtcc	tgtcgaaatt	atagccgagg	aggtgtctgt	gtgacccact	gcaactttct	1800

gaatggggag	cctcgagaat	ttgcccata	ggccgaatgc	ttctcctgcc	acccggaatg	1860
ccaacccatg	gagggcactg	ccacatgcaa	tggctcgggc	tctgatactt	gtgtcfaatg	1920
tgcccatttt	cgagatgggc	cccactgtgt	gagcagctgc	ccccatggag	tcctaggtgc	1980
caagggccca	atctacaagt	accagatgt	tcagaatgaa	tgtcggccct	gcatgagaa	2040
ctgcaccag	gggtgtaaag	gaccagagct	tcaagactgt	ttaggacaaa	cactggtgct	2100
gatcggaaca	acccatctga	caatggcttt	gacagtata	gcaggattgg	tagtgatttt	2160
catgatgctg	ggcggcactt	ttctctactg	gcgtgggcgc	cggattcaga	ataaaagggc	2220
tatgaggcga	tacttggaac	ggggtgagag	catagagcct	ctggacccca	gtgagaaggc	2280
taacaaagtc	ttggccagaa	tcttcaaaga	gacagagcta	aggaagctta	aagtgccttg	2340
ctcgggtgtc	tttggaaactg	tgcacaaagg	agtgtggatc	cctgagggtg	aatcaatcaa	2400
gattccagtc	tgcattaaag	tcattgagga	caagagtggc	cggcagagtt	ttcaagctgt	2460
gacagatcat	atgctggcca	ttggcagcct	ggaccatgcc	cacattgtaa	ggctgctggg	2520
actatgccca	gggtcatctc	tgcagcttgt	cactcaatat	ttgcctctgg	gttctctgct	2580
ggatcatgtg	agacaacacc	ggggggcact	ggggccacag	ctgctgctca	actggggagt	2640
acaaattgcc	aagggaatgt	actaccttga	ggaacatggt	atgggtgcata	gaaacctggc	2700
tgcccgaaac	gtgctactca	agtcaccag	tcaggttcag	gtggcagatt	ttggtgtggc	2760
tgacctgctg	cctcctgatg	ataagcagct	gctatacagt	gaggccaaga	ctccaattaa	2820
gtggatggcc	cttgagagta	tccactttgg	gaaatacaca	caccagagtg	atgtctggag	2880
ctatggtgtg	acagtttggg	agttgatgac	cttcggggca	gagccctatg	cagggctacg	2940
attggctgaa	gtaccagacc	tgctagagaa	gggggagcgg	ttggcacagc	cccagatctg	3000
cacaattgat	gtctacatgg	tgatgggtcaa	gtgttggatg	attgatgaga	acattcgccc	3060
aacctttaaa	gaactagcca	atgagttcac	caggatggcc	cgagaccac	cacggtatct	3120
ggtcataaag	agagagagtg	ggcctggaat	agccctggg	ccagagcccc	atggtctgac	3180
aaacaagaag	ctagaggaag	tagagctgga	gccagaacta	gacctagacc	tagacttggc	3240
agcagaggag	gacaacctgg	caaccaccac	actgggctcc	gccctcagcc	taccagttgg	3300
aacacttaat	cggccacgtg	ggagccagag	ccttttaagt	ccatcatctg	gatacatgcc	3360
catgaaccag	ggtaatcttg	gggagctttg	ccaggagtct	gcagtttctg	ggagcagtga	3420
acggtgcccc	cgtccagtct	ctctacaccc	aatgccacgg	ggatgcctgg	catcagagtc	3480
atcagagggg	catgtaacag	gctctgaggc	tgagctccag	gagaaagtgt	caatgtgtag	3540
gagccggagc	aggagccgga	gccacggcc	acgcggagat	agcgccctacc	attcccagcg	3600
ccacagtctg	ctgactcctg	ttaccccact	ctccccaccc	gggttagagg	aagaggatgt	3660
caacggttat	gtcatgccag	atacacacct	caaaggtact	ccctcctccc	gggaaggcac	3720
cctttcttca	gtgggtctca	gttctgtcct	gggtactgaa	gaagaagatg	aagatgagga	3780
gtatgaatac	atgaaccgga	ggagaaggca	cagtccacct	catcccccta	ggccaagtcc	3840
ccttgaggag	ctgggttatg	agtacatgga	tgtgggggtca	gacctcagtg	cctctctggg	3900
cagcacacag	agttgcccac	tccacctgt	acccatcatg	cccactgcag	gcacaaactcc	3960
agatgaagac	tatgaatata	tgaatcggca	acgagatgga	ggtgggtcctg	ggggtgatta	4020
tgcagccatg	ggggcctgcc	cagcatctga	gcaagggtat	gaagagatga	gagcttttca	4080
ggggcctgga	catcaggccc	cccatgtcca	ttatgcccgc	ctaaaaactc	tacgtagctt	4140

agaggctaca gactctgcct ttgataacce tgattactgg catagcaggc ttttccccaa	4200
ggctaattgcc cagagaacgt aactcctgct ccctgtggca ctcagggagc atttaattggc	4260
agctagtgcc tttagagggt accgtcttct ccctattccc tctctctccc aggtcccagc	4320
cccttttccc cagteccaga caattccatt caatctttgg aggcttttaa acattttgac	4380
acaaaattct tatggtatgt agccagctgt gcactttctt ctctttccca accccaggaa	4440
aggttttctt tatttttgtgt gctttccag tccattcct cagcttcttc acaggcactc	4500
ctggagatat gaaggattac tctccatata ccttctctc aggctcttga ctacttggaa	4560
ctaggctctt atgtgtgcct ttgtttccca tcagactgtc aagaagagga aaggaggaa	4620
acctagcaga ggaaagtgt attttggttt atgactctta accccctaga aagacagaag	4680
cttaaaatct gtgaagaaag aggttaggag tagatattga ttactatcat aattcagcac	4740
ttaactatga gccaggcacc atactaaact tcacctacat tatctcactt agtcctttat	4800
catccttaaa acaattctgt gacatacata ttatctcatt ttacacaaag ggaagtcggg	4860
catggtggct catgcctgta atctcagcac tttgggaggc tgaggcagaa ggattacctg	4920
aggcaaggag tttgagacca gcttagccaa catagtaaga ccccatctc tttaaaaaaa	4980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa actttagaac tgggtgcagt ggctcatgcc tgtaatccca	5040
gccagcactt tgggaggctg agatgggaag atcacttgag ccagaatta gagataagcc	5100
tatggaaaca tagcaagaca ctgtctctac aggggaaaaa aaaaaaagaa actgagcctt	5160
aaagagatga aataaattaa gcagtagatc caggatgcaa aatcctccca attcctgtgc	5220
atgtgctctt attgtaaggt gccaagaaaa actgatttaa gttacagccc ttgtttaagg	5280
ggcactgttt ctgttttttg cactgaatca agtctaaccc caacagccac atcctcctat	5340
acctagacat ctcatctcag gaagtgggtg tgggggtagt cagaaggaaa aataactgga	5400
catctttgtg taaaccataa tccacatgtg ccgtaaataa tcttcactcc ttatccgagg	5460
gcaaattcac aaggatcccc aagatccact tttagaagcc attctcatcc a	5511

<210>198

<211>5616

<212>DNA

<213> 人

<400>198

ccccggcgca gcgcggccgc agcagcctcc gcccccgca cggtgtgagc gcccgacgcg	60
gccgagcgcg ccgaggtccc gagctagccc cggcggccgc cgccgcccag accggacgac	120
aggccacctc gtcggcgctc gcccgagtcc ccgcctcgcc gccaacgcca caaccaccgc	180
gcacggcccc ctgactccgt ccagtattga tggggagagc cggagcgagc tcttcgggga	240
gcagcgatgc gaccctccgg gacggccggg gcagcgctcc tggcgctgct ggtgcgctc	300
tgccccggca gtcgggctct ggaggaaaag aaagtttgcc aaggcacgag taacaagctc	360
acgcagttgg gcacttttga agatcatttt ctcagcctcc agaggatgtt caataactgt	420
gaggtgggtc ttgggaattt ggaaattacc tatgtgcaga ggaattatga tctttccttc	480
ttaaagacca tccaggaggt ggctggttat gtcctcattg ccttcaacac agtggagcga	540

attccttttg	aaaacctgca	gatcatcaga	ggaaatatgt	actacgaaaa	ttcctatgcc	600
ttagcagtct	tatctaacta	tgatgcaaat	aaaaccggac	tgaaggagct	gccccatgaga	660
aatttacagg	aaatcctgca	tggcgccgtg	cggttcagca	acaaccttgc	cctgtgcaac	720
gtggagagca	tccagtggcg	ggacatagtc	agcagtgact	ttctcagcaa	catgtcgtatg	780
gacttccaga	accacctggg	cagctgccaa	aagtgtgata	caagctgtcc	caatgggagc	840
tgctggggtg	caggagagga	gaactgccag	aaactgacca	aaatcatctg	tgcccagcag	900
tgctccgggc	gctgccgtgg	caagtcctcc	agtgtactgt	gccacaacca	gtgtgtctgca	960
ggctgcacag	gcccccgga	gagcgactgc	ctggtctgcc	gcaaattccg	agacgaagcc	1020
acgtgcaagg	acacctgccc	cccactcatg	ctctacaacc	ccaccacgta	ccagatggat	1080
gtgaaccccg	agggcaataa	cagcttttgt	gccacctgcg	tgaagaagtg	tccccgtaat	1140
tatgtggtga	cagatcacgg	ctcgtgcgtc	cgagcctgtg	gggccgacag	ctatgagatg	1200
gaggaagacg	gcgtccgcaa	gtgtaagaag	tgcgaagggc	cttgccgcaa	agtgtgtaac	1260
ggaataggta	ttggtgaatt	taaagactca	ctctccataa	atgctacgaa	tattaaacac	1320
ttcaaaaact	gcacctccat	cagtggcgat	ctccacatcc	tgccgggtggc	atttaggggt	1380
gactccttca	cacatactcc	tcctctggat	ccacaggaac	tggatattct	gaaaaccgta	1440
aaggaaatca	cagggttttt	gctgattcag	gcttggcctg	aaaacaggac	ggacctccat	1500
gcctttgaga	acctagaaat	catacgcggc	aggaccaagc	aacatgggtca	gttttctctt	1560
gcagtcgtca	gcctgaacat	aacatccttg	ggattacgct	ccctcaagga	gataagtgtat	1620
ggagatgtga	taatttcagg	aaacaaaaat	ttgtgtctatg	caaatacaat	aaactggaaa	1680
aaactgtttg	ggacctccgg	tcagaaaacc	aaaattataa	gcaacagagg	tgaaaacagc	1740
tgcaaggcca	caggccaggt	ctgccatgcc	ttgtgtctcc	ccgagggctg	ctggggcccgc	1800
gagcccaggg	actgcgtctc	ttgccggaat	gtcagccgag	gcagggaatg	cgtggacaag	1860
tgcaaccttc	tggagggtga	gccaaggag	tttgtggaga	actctgagtg	catacagtg	1920
caccagaggt	gcctgcctca	ggccatgaac	atcacctgca	caggacgggg	accagacaac	1980
tgtatccagt	gtgcccacta	cattgacggc	ccccactgcg	tcaagacctg	cccggcagga	2040
gtcatgggag	aaaacaacac	cctggtcttg	aagtacgcag	acgccggcca	tgtgtgccac	2100
ctgtgccatc	caaactgcac	ctacggatgc	actgggccag	gtcttgaagg	ctgtccaacg	2160
aatgggccta	agatcccgtc	cacgcccact	gggatgggtg	gggccctcct	cttgcgtgtg	2220
gtggtggccc	tggggatcgg	cctcttcatg	cgaaggcgcc	acatcggttcg	gaagcgcacg	2280
ctgcggaggc	tgctgcagga	gagggagctt	gtggagcctc	ttacaccag	tggagaagct	2340
cccaaccaag	ctctcttgag	gatcttgaag	gaaactgaat	tcaaaaagat	caaagtgtctg	2400
ggctccgggtg	cgttcggcac	ggtgtataag	ggactctgga	tcccagaagg	tgagaaaagtt	2460
aaaattcccc	tcgtatatca	ggaattaaga	gaagcaacat	ctccgaaagc	caacaaggaa	2520
atcctcgatg	aagcctacgt	gatggccagc	gtggacaacc	cccacgtgtg	ccgcctgtctg	2580
ggcatctgcc	tcacctccac	cgtgcagctc	atcacgcagc	tcatgccctt	cggtgcctc	2640
ctggactatg	tccgggaaca	caaagacaat	attggctccc	agtacctgct	caactgggtgt	2700
gtgcagatcg	caaaggcat	gaactacttg	gaggaccgtc	gcttgggtgca	ccgcgacctg	2760
gcagccagga	acgtactggg	gaaaacaccg	cagcatgtca	agatcacaga	ttttgggctg	2820
gccaaactgc	tgggtgcgga	agagaaagaa	taccatgcag	aaggaggcaa	agtgcctatc	2880

aagtggatgg cattggaatc aattttacac agaatctata cccaccagag tgatgtctgg	2940
agctacgggg tgaccgtttg ggagttgatg acctttggat ccaagccata tgacggaatc	3000
cctgccagcg agatctctc catcctggag aaaggagaac gcctccctca gccaccata	3060
tgtaccatcg atgtctacat gatcatggtc aagtgtctga tgatagacgc agatagtcgc	3120
ccaaagttcc gtgagttgat categaattc tccaaaatgg cccgagaccc ccagcgtac	3180
cttgtcattc aggggggatga aagaatgcat ttgccaaagtc ctacagactc caacttctac	3240
cgtgccctga tggatgaaga agacatggac gacgtgggtg atgccgacga gtacctcatc	3300
ccacagcagg gcttcttcag cageccctcc acgtcacgga ctccctctct gagctctctg	3360
agtgaacca gcaacaattc caccgtggct tgcattgata gaaatgggct gcaaagctgt	3420
cccatcaagg aagacagctt ctgcagcga tacagctcag accccacagg cgcttgact	3480
gaggacagca tagacgacac ctctctcca gtgcctgaat acataaacca gtccgttccc	3540
aaaaggcccg ctggctctgt gcagaatcct gtctatcaca atcagcctct gaaccccgcg	3600
cccagcagag acccacacta ccaggacccc cacagcactg cagtgggcaa ccccgagtat	3660
ctcaacactg tccagcccac ctgtgtcaac agcacattcg acagccctgc ccactgggccc	3720
cagaaaggca gccaccaa atagcctggac aaccctgact accagcagga ctcttttccc	3780
aaggaagcca agccaaatgg catctttaag ggctccacag ctgaaaatgc agaataccta	3840
agggtcgcgc cacaagcag tgaatttatt ggagcatgac cacggaggat agtatgagcc	3900
ctaaaaatcc agactcttcc gataccagg accaagccac agcaggctct ccatcccaac	3960
agccatgccc gcattagctc ttagaccac agactggttt tgcaacgttt acaccgacta	4020
gccaggaagt acttccacct cgggcacatt ttgggaagtt gcattccttt gtcttcaaac	4080
tgtgaagcat ttacagaaac gcattccagca agaataattgt ccctttgagc agaaatttat	4140
ctttcaaaga ggtatatttg aaaaaaaaa aaagtatatg tgaggatttt tattgattgg	4200
ggatcttggg gtttttcatt gtcgtattg atttttactt caatgggctc ttccaacaag	4260
gaagaagctt gctggttagc ctgtctaccc tgagttcatc caggcccaac tgtgagcaag	4320
gagcacaagc cacaagtctt ccagaggatg ctgtattcca gtggttctgc ttcaaggctt	4380
ccactgcaa acactaaaga tccaagaagg ccttcatggc cccagcaggc cggatcggtta	4440
ctgtatcaag tcatggcagg tacagtagga taagccactc tgtcccttcc tgggcaaaga	4500
agaaacggag gggatggaat tcttcccttag acttactttt gtaaaaatgt cccacggtta	4560
cttactcccc actgatggac cagtggtttc cagtcatgag cgtttagactg acttgtttgt	4620
cttccattcc attgttttga aactcagtat gctgcccctg tcttgctgtc atgaaatcag	4680
caagagagga tgacacatca aataataact cggattccag cccacattgg attcatcagc	4740
atttggacca atagcccaca gctgagaatg tggaaatacct aaggatagca ccgcttttgt	4800
tctcgcaaaa acgtatctcc taatttgagg ctcatagaa atgcatcagg tcccttgggg	4860
catagatcag aagactacaa aaatgaagct gctctgaaat ctccctttagc catcaccca	4920
acccccaaa attagtttgt gttacttatg gaagatagtt ttctcctttt acttcacttc	4980
aaaagctttt tactcaaaga gtatatgttc cctccaggtc agctgcccc aaacccctc	5040
cttacgcttt gtacacaaa aagtgtctct gccttgagtc atctattcaa gcaattacag	5100
ctctggccac aacagggcatt ttacagggtg cgaatgacag tagcattatg agtagtgtgg	5160
aattcaggta gtaaatatga aactagggtt tgaaattgat aatgctttca caacatttgc	5220

agatgtttta	gaaggaaaaa	agttccttcc	taaaataatt	tctctacaat	tggaagattg	5280
gaagattcag	ctagttagga	gcccaccttt	tttcctaate	tgtgtgtgcc	ctgtaacctg	5340
actggttaac	agcagtcctt	tgtaaacagt	gttttaaact	ctcctagtca	atatccaccc	5400
catccaat	atcaaggaag	aaatggttca	gaaaatattt	tcagcctaca	gttatgttca	5460
gtcacacaca	catacaaaat	gttccttttg	cttttaaagt	aatttttgac	tcccagatca	5520
gtcagagccc	ctacagcatt	gttaagaaag	tatttgattt	ttgtctcaat	gaaaataaaa	5580
ctatatcat	ttccactcta	aaaaaaaaaa	aaaaaa			5616

<210>199

<211>4624

<212>DNA

<213> 人

<400>199

ggaggaggtg	gaggaggagg	gctgcttgag	gaagtataag	aatgaagttg	tgaagctgag	60
attcccctcc	attgggaccg	gagaaaccag	gggagccccc	cgggcagccg	cgcgcccctt	120
cccacggggc	cctttactgc	gccgcgcgcc	cggccccccac	ccctcgcagc	accccgcgcc	180
ccgcgcctc	ccagccgggt	ccagccggag	ccatggggcc	ggagccgcag	tgagcaccat	240
ggagctggcg	gccttgtgcc	gctgggggct	cctcctcgcc	ctcttgcccc	ccggagccgc	300
gagcacccaa	gtgtgcaccg	gcacagacat	gaagctgcgg	ctccctgcca	gtcccagac	360
ccacctggac	atgctccgcc	acctctacca	gggctgccag	gtgggtgcagg	gaaacctgga	420
actcacctac	ctgcccacca	atgccagcct	gtccttccctg	caggatatcc	aggaggtgca	480
gggctacgtg	ctcatcgctc	acaaccaagt	gaggcaggtc	ccactgcaga	ggctgcggat	540
tgtgcgaggc	accagctctt	ttgaggacaa	ctatgccctg	gccgtgctag	acaatggaga	600
cccgtgaac	aataccaccc	ctgtcacagg	ggcctcccca	ggaggcctgc	gggagctgca	660
gcttcgaagc	ctcacagaga	tcttgaaagg	aggggtcttg	atccagcgga	acccccagct	720
ctgctaccag	gacacgattt	tgtggaagga	catcttccac	aagaacaacc	agctggctct	780
cacactgata	gacaccaacc	gctctcgggc	ctgccacccc	tgttctccga	tgtgtaaggg	840
ctcccgtgc	tggggagaga	gttctgagga	ttgtcagagc	ctgacgcgca	ctgtctgtgc	900
cgggtggctgt	gcccgtgca	agggggccact	gcccactgac	tgctgccatg	agcagtgtgc	960
tgccggctgc	acgggccccca	agcactctga	ctgcctggcc	tgccctccact	tcaaccacag	1020
tggcatctgt	gagctgcact	gcccagccct	ggtcacctac	aacacagaca	cgtttgagtc	1080
catgcccatt	cccaggggcc	ggtatacatt	cggcgccagc	tgtgtgactg	cctgtcccta	1140
caactacett	tctacggacg	tgggatccctg	caccctcgtc	tgccccctgc	acaaccaaga	1200
ggtgacagca	gaggatggaa	cacagcgggtg	tgagaagtgc	agcaagccct	gtgcccagat	1260
gtgctatgg	ctgggcatgg	agcacttgcg	agaggtgagg	gcagttacca	gtgccaatat	1320
ccaggagt	gctggctgca	agaagatctt	tgggagcctg	gcatttctgc	cggagagctt	1380
tgatggggac	ccagcctcca	acactgcccc	gctccagcca	gagcagctcc	aagtgtttga	1440
gactctggaa	gagatcacag	gttacctata	catctcagca	tggccggaca	gcctgcctga	1500

cctcagcgtc	ttccagaacc	tgcaagtaat	ccggggacga	attctgcaca	atggcgccta	1560
ctcgctgacc	ctgcaagggc	tgggcatcag	ctggctgggg	ctgcgctcac	tgagggaact	1620
gggcagtgga	ctggccctca	tccaccataa	caccacctc	tgtttcgtgc	acacggtgcc	1680
ctgggaccag	ctctttcgga	acccgcacca	agctctgctc	cacactgcca	accggccaga	1740
ggacgagtgt	gtgggcgagg	gcctggcctg	ccaccagctg	tgcgcccag	ggcactgctg	1800
gggtccagg	cccacccagt	gtgtcaactg	cagccagttc	cttcggggcc	aggagtgcgt	1860
ggaggaatgc	cgagtactgc	aggggctccc	caggagtat	gtgaatgcca	ggcactgttt	1920
gccgtgccac	cctgagtgtc	agccccagaa	tggctcagtg	acctgttttg	gaccggaggc	1980
tgaccagtgt	gtggcctgtg	cccactataa	ggacctccc	ttctgcgtgg	cccgtgccc	2040
cagcgggtgtg	aaacctgacc	tctctacat	gcccactctg	aagtttccag	atgaggagg	2100
cgcatgccag	ccttgcccca	tcaactgcac	ccactcctgt	gtggacctgg	atgacaagg	2160
ctgccccgcc	gagcagagag	ccagccctct	gacgtccatc	atctctgcgg	tggttggcat	2220
tctgctggtc	gtggtcttgg	gggtggtctt	tgggatcctc	atcaagcgac	ggcagcagaa	2280
gatccggaag	tacacgatgc	ggagactgct	gcaggaaacg	gagctggtgg	agccgctgac	2340
acctagcgga	gcgatgcca	accaggcgca	gatgcggatc	ctgaaagaga	cggagctgag	2400
gaaggtgaag	gtgcttggat	ctggcgcttt	tggcacagtc	tacaagggca	tctggatccc	2460
tgatggggag	aatgtgaaaa	ttccagtggc	catcaaagtg	ttgagggaaa	acacatcccc	2520
caaagccaac	aaagaaatct	tagacgaagc	atacgtgatg	gctggtgtgg	gctccccata	2580
tgtctccgc	cttctgggca	tctgcctgac	atccacggtg	cagctggtga	cacagcttat	2640
gccctatggc	tgcctcttag	accatgtccg	ggaaaaccgc	ggacgcctgg	gctcccagga	2700
cctgctgaac	tgggtgtatgc	agattgcca	ggggatgagc	tacctggagg	atgtgcggct	2760
cgtacacagg	gacttggccg	ctcggaacgt	gctggtcaag	agtcccaacc	atgtcaaaat	2820
tacagacttc	gggctggctc	ggctgctgga	cattgacgag	acagagtacc	atgcagatgg	2880
gggcaagggtg	cccatcaagt	ggatggcgct	ggagtccatt	ctccgccggc	ggttcaccca	2940
ccagagtgat	gtgtggagt	atggtgtgac	tgtgtgggag	ctgatgactt	ttggggccaa	3000
accttacgat	gggatcccag	cccgggagat	ccctgacctg	ctggaaaagg	gggagcggct	3060
gccccagccc	cccatctgca	ccattgatgt	ctacatgac	atggtcaaat	gttggatgat	3120
tgactctgaa	tgtcggccaa	gattccggga	gttgggtgtct	gaattctccc	gcatggccag	3180
ggacccccag	cgctttgtgg	tcatccagaa	tgaggacttg	ggcccagcca	gtcccttgga	3240
cagcaccttc	taccgctcac	tgttgaggga	cgatgacatg	ggggacctgg	tggatgctga	3300
ggagtatctg	gtacccagc	agggtctctt	ctgtccagac	cctgccccgg	gcgtggggg	3360
catggtccac	cacaggcacc	gcagctcatc	taccaggagt	ggcgggtggg	acctgacact	3420
agggtctggag	ccctctgaag	aggaggcccc	caggtctcca	ctggcacccct	ccgaaggggc	3480
tggctccgat	gtatttgatg	gtgacctggg	aatgggggca	gccaaggggc	tgcaaaacct	3540
ccccacacat	gacccagcc	ctctacagcg	gtacagttag	gacccacag	tacccctgcc	3600
ctctgagact	gatggctacg	ttgccccct	gacctgcagc	ccccagcctg	aatatgtgaa	3660
ccagccagat	gttcggcccc	agcccccttc	gccccgagag	ggccctctgc	ctgctgcccc	3720
acctgctgg	gccactctgg	aaaggcccaa	gactctctcc	ccagggaaga	atggggctcgt	3780
caaagacgtt	tttgcctttg	ggggtgccgt	ggagaacccc	gagtacttga	caccccagg	3840

aggagctgcc cctcageccc accctcctcc tgccttcagc ccagccttcg acaacctcta	3900
ttactgggac caggaccac cagagcgggg ggctccaccc agcaccttca aaggacacc	3960
tacggcagag aaccagagt acctgggtct ggacgtgcca gtgtgaacca gaaggccaag	4020
tccgcagaag ccctgatgtg tcctcaggga gcagggaagg cctgacttct gctggcatca	4080
agaggtggga gggccctccg accacttcca ggggaacctg ccatgccagg aacctgtcct	4140
aaggaacctt ccttctgtct tgagtccca gatggctgga aggggtccag cctcgttgga	4200
agaggaacag cactggggag tctttgtgga ttctgaggcc ctgccaatg agactctagg	4260
gtccagtgga tgccacagcc cagcttgccc ctttccttcc agatcctggg tactgaaagc	4320
cttagggaag ctggcctgag aggggaagcg gccctaagg agtgtctaag aacaaaagcg	4380
accattcag agactgtccc tgaaacctag tactgcccc catgaggaag gaacagcaat	4440
ggtgtcagta tccaggcttt gtacagagt cttttctgtt tagtttttac ttttttgtt	4500
ttgttttttt aaagatgaaa taaagacca gggggagaat ggggtgttgta tggggaggca	4560
agtgtggggg gtccttctcc acaccactt tgtccatttg caaatatatt ttggaaaaca	4620
gcta	4624

<210>200

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>200

catagctcca gacatcactc tggt

24

<210>201

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>201

atagctccag acatcactct ggtg

24

<210>202

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>202

gctccagaca tcactctggt gtgt 24

<210>203

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>203

ctccagacat cactctggtg tgtg 24

<210>204

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>204

caccatagct ccagacatca ctct 24

<210>205

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>205

actgtcacac catagctcca gaca 24

<210>206

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>206

caatcatcca acacttgacc atca 24

<210>207

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>207

aatcatccaa cacttgacca tcac 24

<210>208

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>208

tcatcaatca tccaacactt gacc 24

<210>209

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>209

ctcatcaatc atccaacact tgac 24

<210>210

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>210

tcacatgta gacatcaatt gtgc 24

<210>211

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>211

gacatagcct gtcacttctc gaat 24

<210>212

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>212

acgaagatgg caaacttccc atcg 24

<210>213

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>213

cccacaaggc tcacacatct tgag 24

<210>214

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>214

cagaaagtcc aggttgccca ggat 24

<210>215

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>215

gtgacattca agttcttcat gatc 24

<210>216

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>216

ccagcactaa tttccttcag ggat 24

<210>217

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>217

atacgcccag cactaatttc ctte 24

<210>218

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>218

cacactttgc cctctgccac gcag 24

<210>219

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>219

gggtcacaca ctttgccctc tgcc 24

<210>220

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>220

tgcacagttc caaagacacc cgag 24

<210>221

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>221

cccttggcaa tttgtactcc ccag 24

<210>222

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>222

tctggtgtgt gtatttccca aagt 24

<210>223

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>223

atgccctct gatgactctg atgc 24

<210>224

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>224

tattcatact cctcatcttc atct 24

<210>225

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>225

tgatccacca caaagttatg ggga 24

<210>226

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>226

cagacatcac tctggtgtgt gtat 24

<210>227

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>24 聚体序列基序

<400>227

tccagacatc actctggtgt gtgt 24

<210>228

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>228

tagcctgtca cttct 15

<210>229

<211>15

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>229

agcctgtcac ttctc 15

<210>230

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>230

tagcctgtca ctte 14

<210>231

<211>14

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>231

agcctgtcac ttct 14

<210>232

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>232

tagcctgtca ctt 13

<210>233

<211>12

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400>233

tagcctgtca ct 12

<210>234

<211>13

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (12)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222> (1).. (2)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222> (11).. (13)

<400>234

tagcctgtca ctt 13

<210>235

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222> (1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222> (1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222> (13).. (15)

<400>235

cgtcagtatg cgaatc

16

<210>236

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (4)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(13).. (15)

<400>236

cgcagattag aaacct

16

<210>237

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>237

ccacacctgg tcatagcggg ga

22

<210>238

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>238

ctgttttaggc caagcagagg

20

<210>239

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>239

attctgaatc ctgcgtccac

20

<210>240

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>240

cattgccc aa cctccgcgtg

20

<210>241

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>241

tgcaagtggat tcgagaagtg 20

<210>242

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>242

ggcaaacttc ccatcgtaga 20

<210>243

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>243

actggcgctg ccaaggctgt 20

<210>244

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>244

ccacccagaa gactgtggat 20

<210>245

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>245

ttcagctcag ggatgacctt 20

<210>246

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>246

agctgtggcgt gatggccgt 20

<210>247

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>247

aactttggca ttgtggaagg 20

<210>248

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 探针序列

<400>248

ggatgcaggg atgatgttct 20

<210>249

<211>16

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>LNA 寡聚物

<220>

<221> 硫代磷酸酯连接基

<222>(1).. (15)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(1).. (3)

<220>

<221>LNA 核碱基

<222>(14).. (16)

<400>249

tagcctttga cctctc

```

1  acacacacac acccctcccc tgccatccct ccccggaactc cggctccggc tccgattgca
61 atttgcaacc tccgtgcgc tgccgcgcgc agccaccaat tccgcagcgg ttcagggtggc
121 tcttgccctg atgtcttagc ctaggggccc ccgggcccga cttggctggg ctcctctcac
181 cctctgcgga gtcatgaggg cgaacgacgc tctgcagggtg ctgggcttgc ttttcagcct
241 ggcccggggc tccgaggttg gcaactctca ggcagtgtgt cctgggaactc tgaatggcct
301 gagtgtgacc ggcatgctg agaaccaata ccagacactg tacaagctct acgagaggtg
361 tgagggtggt atggggaacc ttgagattgt gtcacggga cacaatgccg acctctcctt
      SEQ ID NO:54
421 cctgcagtgg attcgagaag tgacaggcta tgtcctcgtg gccatgaatg aattctctac
      SEQ ID NO:55
481 tctaccattg cccaacctcc gcggtgtgcg agggacccag gtctacgatg ggaagtttgc
541 catcttcgtc atgttgaact ataaccacaa ctccagccac gctctgcgc agctccgctt
601 gactcagctc accgagattc tgtcaggggg tgtttatatt gagaagaacg ataagctttg
661 tcacatggac acaattgact ggagggacat cgtgaggggc cgagatgctg agatagtggt
721 gaaggacaat ggcaagaagt gtccccctcg tcatgaggtt tgcaaggggc gatgcgggg
781 tcttggtatc gaagactgcc agacattgac caagaccatc tgtgtctctc agtgtaatgg
841 tcaactgcttt ggcccacacc ccaaccagtg ctgcatgat gatgtgtccg ggggctgctc
901 aggcctcag gacacagact gcttgcctg ccggcacttc aatgacagtg gagcctgtgt
961 acctcgtgt ccacagcctc tgtctacaa caagctaact ttcagctgg aacccaatcc
      SEQ ID NO:138
1021 ccacaccaag tatcagtatg gaggagtgtg tgtagccagc tgtcccata actttgttgt
1081 ggatcaaaca tctgtgtca gggcctgtcc tctgacaag atggaagtag ataaaaatgg
      SEQ ID NO:56
1141 gctcaagatg tgtgagcctt gtgggggact atgtccaaa gcctgtgagg gaacaggctc
1201 tgggagccgc ttccagactg tggactcgag caacattgat ggatttgtga actgcaccaa
      SEQ ID NO:57
1261 gatcctgggc aacctggact ttctgatcac cggcctcaat ggagaccctt ggcacaagat
1321 cctgcctctg qaccagaqa agctcaatgt ctccggaca gtacqgga taacaggtta
1381 cctgaacatc cagtctggc cggcccacat gcacaacttc agtgttttt ccaatttgac
      SEQ ID NO:58
1441 aaccallgga ggcagaagcc tclacaaccg gggtttclca ttgttgatca tgaagaactt
      SEQ ID NO:59
      SEQ ID NO:74
1501 gaatgtaca tctctgggt tccgatcct gaaggaaatt agtgtgggc gtatctatat
1561 aagtgcacat aggcagctct gctaccacca ctctttgaac tggaccaagg tgcctcggg
      SEQ ID NO:75
      SEQ ID NO:76
1621 gcctacggaa gagcgactag acatcaagca taatcggccg cgcagagact ggtggcaga
1681 gggcaaatg tgtgacccac tgtgtctctc tgggggatgc tggggcccag gccctgttca
1741 gtgcttgtcc tgtcgaaatt atagccgagg aggtgtctgt gtgaccact gcaactttct
1801 gaatggggag cctcgagaat ttgcccata ggcgaatgc ttctctgccc acccggaatg
1861 ccaaccctat gagggcactg ccacatgcaa tggctcgggc tctgatactt gtgctcaatg
1921 tgcccatlct cgagatgggc cccactgtgt gagcagctgc ccccatggag tccataggtc
1981 caagggccca atclacaagt acccagatgt tcagaatgaa tgtcggccct gccatgagaa
2041 clgcacccag ggggtgaaag gaccagagct tcaagactgt ttaggacaaa cactgggtct
2101 gatcggaaca acccatclga caatggcctt gacagtata gcaggattgg tagtgalltl
2161 calgalgclg ggcggcactt ttctclactg gcglggggc cggallcaga alaaaagggc
2221 lal.gagggca tacttggaac gggglgagag catagagccl ctggaccca glgagaaggc
2281 laacaaaglc llgccagaa tcllcaaaqa gacagagcta aggaagctla aaglgcllgg
      SEQ ID NO:91
2341 ctcqggtg tttggaaactg tgcacaaaqg aqtgtqatc cctqaqqqt aaacaaatcaa
2401 gattccagtc tgcattaaaag tcaatgagga caagagtga cggcagagt ttcaagctgt
2461 gacagatcat atgctggcca ttggcagcct ggaccatgcc cacattgtaa ggctgctggg
2521 actatgccca gggtcacttc tgcagcttgt cactcaatat ttgcctctg gtctctgct
      SEQ ID NO:92
2581 ggatcatgtg agacaacacc ggggggcact gggggcacag ctgctgctca actgggagt

```

图 1

```

2641 acaaattgcc aagggaattgt actaccttga ggaacatggt atggtgcata gaaacctggc
2701 tgcccgaaac gtgctactca agtcaccag tcagggttcag gtggcagatt ttggtgtggc
2761 tgacctgctg cctcctgatg ataagcagct gctatacagt gaggccaaga ctccaattaa
                               SEQ ID NO:140
                               SEQ ID NO:18
                               SEQ ID NO:17
                               SEQ ID NO:16
                               SEQ ID NO:1
2821 gtggatggcc cttgagagta tccactttgg gaaatagaca caccagagtg atgtctggag
                               SEQ ID NO:107
                               SEQ ID NO:139
                               SEQ ID NO:19
NO:34
2881 ctatggtgtg acagtttggg agttgatgac cttcggggca gagccctatg cagggtctacg
2941 attggctgaa gtaccagacc tgctagagaa gggggagcgg ttggcacagc cccagatctg
                               SEQ ID NO:50
                               SEQ ID NO:53
                               SEQ ID NO:49
3001 cacaattgat gtctacatg tgatggtgaa gtgttggatg attgatgaga acattcgccc
                               SEQ ID NO:52
                               SEQ ID NO:51
3061 aacctttaaa gaactagcca atgagttcac caggatggcc cgagacccac caccgtatct
3121 ggtcataaag agagagagtg ggcttggaa agccctggg ccagagcccc atggtctgac
3181 aaacaagaag clagagggaag lagagctgga gccagaacta gacctagacc lagactlugga
3241 agcagaggag gacaacctg caaccaccac actgggctcc gccctcagcc taccagttgg
3301 aacacttaat cggccacgtg ggagccagag ccttttaagt ccatcatctg gatacatgcc
3361 catgaaccag ggtaatcttg gggagtcttg ccaggagtct gcagtttctg ggagcagtga
                               SEQ ID NO:122
3421 acggtgcccc cgtccagtct ctctacacc aatgccacgg ggatgccttg catcagagtc
3481 atcagagggg catgtaacag gctctgaggg tgagctccag gagaaagtgt caatgtgtag
3541 gagccggagc aggagccgga gccacggccc acgcggagat agccctacc attcccagc
3601 ccacagctct ctgactcctg ttaccccact cccccacc ccgttagagg aagaggatgt
3661 caacggttat gtcatgccag atacacacct caaaggta ctctcctccc gggaaggcac
                               SEQ ID NO:137
3721 cctllcllca glggglclca gltclglccl ggglaclgaa gaagaagalg aagatgagga
3781 gtatgaatag atgaaccgga ggagaaggca cagtcacact catcccccta ggccaagttc
3841 ccttgaggag ctgggttatg agtacatgga tgtgggtgca gacctcagtg cctctctggg
3901 caqcacacag agttqccac tccacctgt acccatcatg cccactgcag gcacaactcc
3961 agatgaagac tatgaatata tgaatcggca acgagatgga ggtggtctg ggggtgatta
4021 tgacggccatg ggggcctgcc cagcatctga gcaagggtat gaagagatga gagcttttca
4081 ggggcctgga catcaggccc cccatgtcca ttatgccgcg ctaaaaactc tacgtagctt
4141 agaggctaca gactctgcct ttgataaccc tgattactgg catagcaggg ttttcccaa
4201 ggctaagtc cagagaacgt aactcctgct cctgtggca ctcaggagc atttaagtc
4261 agctagtggc tttagagggt accgtcttct cctatttccc tctctctccc aggtcccagc
4321 ccttttccc cagtcocaga caattccatt caatctttgg aggtctttaa acattttgac
4381 acaaaattct tatggtatgt agccagctgt gcactttctt ccttttccca accccaggaa
4441 aggtttlcll tatlgtgtgl gctttccag tccatttcll cagcttcttc acaggcaclc
4501 ctggagatat gaaggattac tctccatata ccttctctc aggtctctga ctacttgaa
4561 ctagctctct atgtgtgcct ttgtttccca tcagactgtc aagaagagga aagggaaggaa
4621 acctagcaga ggaagtgta attttggtt atgactctta accccctaga aagacagaag
4681 cttaaaatct gtgaagaaag aggttaggag tagatattga ttactatcat aattcagcac
4741 ttaactatga gccaggcatc atactaaact tcacctacat tatctcactt agtctttat
4801 catccttaaa acaatctctg qacatacata ttatctcatt ttacacaaa qqaagtcqgg
4861 catggtggct catgcctgta atctcagcac tttgggaggg tagggcagaa ggattacctg
4921 aqqaaggaqg tttgagacca gcttagccaa catagtaaga ccccatctc tttaaaaaaa
4981 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa actttagaac tgggtgcagt ggctcatgct tgtaatccca
5041 gccagcactt tgggaggctg agatgggaag atcacttgag ccagaaatta gagataagcc
5101 tatggaaaca tagcaagaca ctgtctctac aggggaaaaa aaaaaaagaa actgagcctt
5161 aaagagatga aataaattaa gcagtagatc caggatgcaa aatcctccca attcctgtgc
5221 atgtgctctt atgtgaaggt gccaaagaaa actgatttaa gttacagccc ttgtttaagg
5281 ggcactgttt cttgtttttg cactgaatca agtctaacc caacagccac atcctctat
5341 acctagacat ctcatctcag gaagtgggtg tgggggtagt cagaagga aataactgga
5401 catctttgtg taaaccataa tccacatgtg ccgtaaatga tcttactcc ttatccgagg
5461 gcaaaatlac aaggalcccc aagalccact ltlagaagcc attctcaacc a

```

图 1(续)

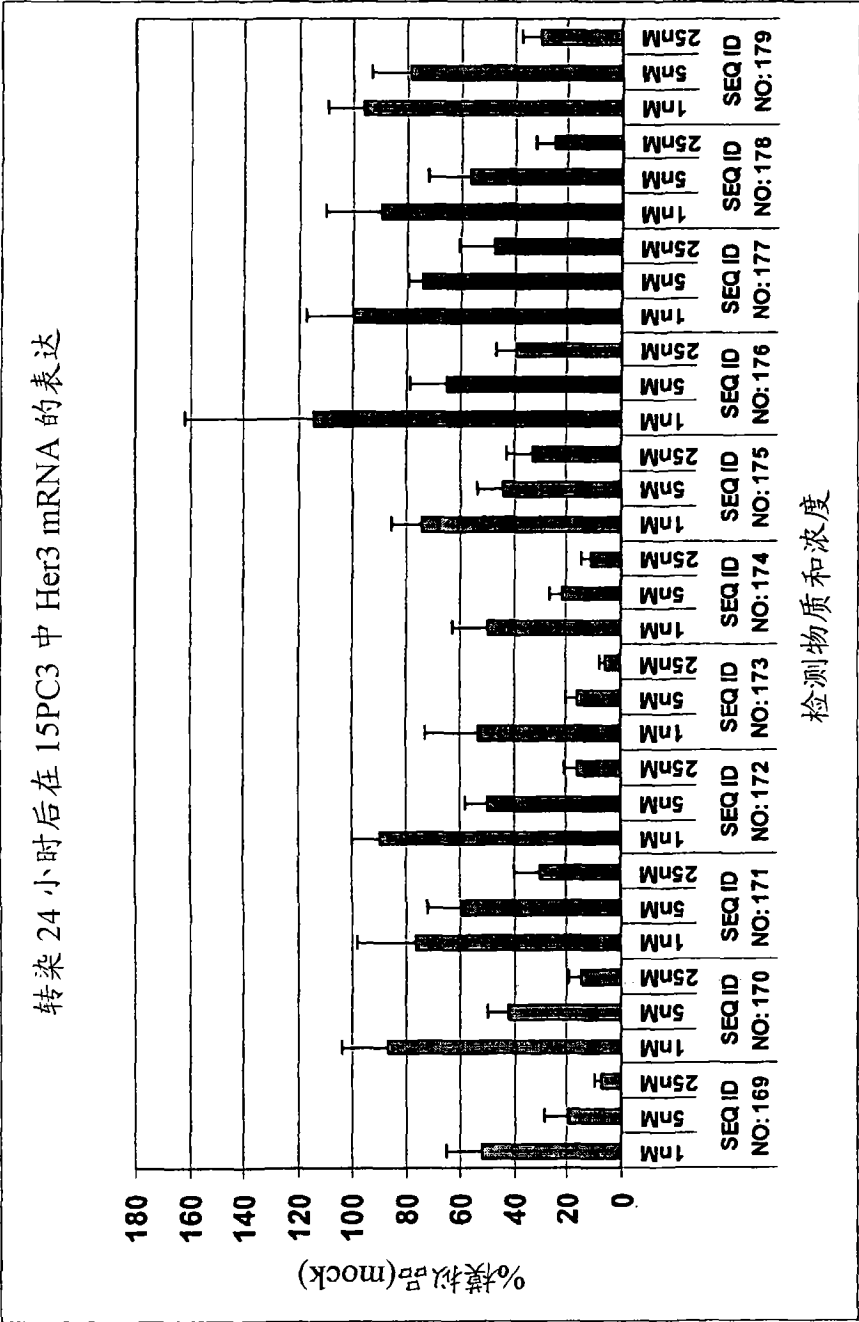


图 2

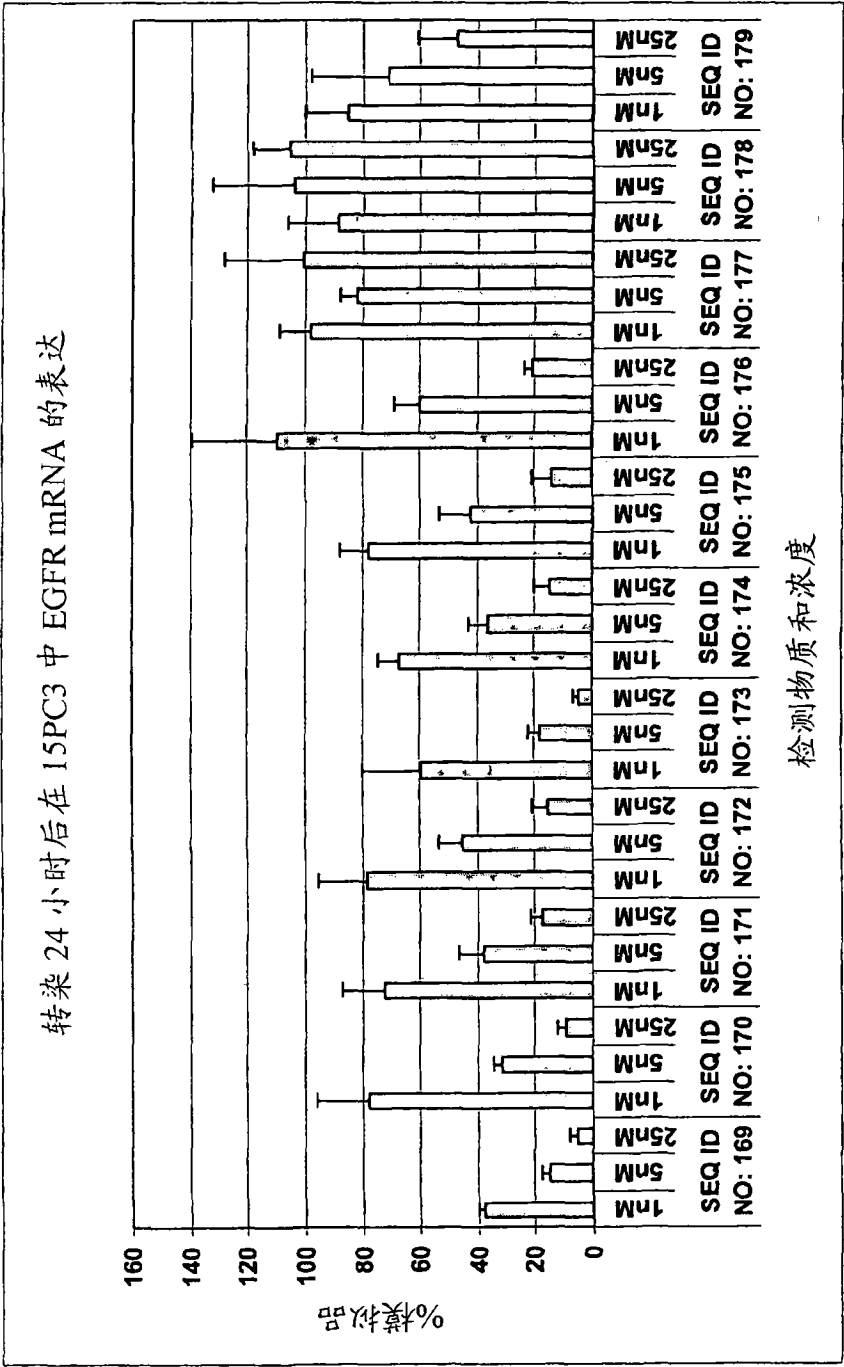


图 3

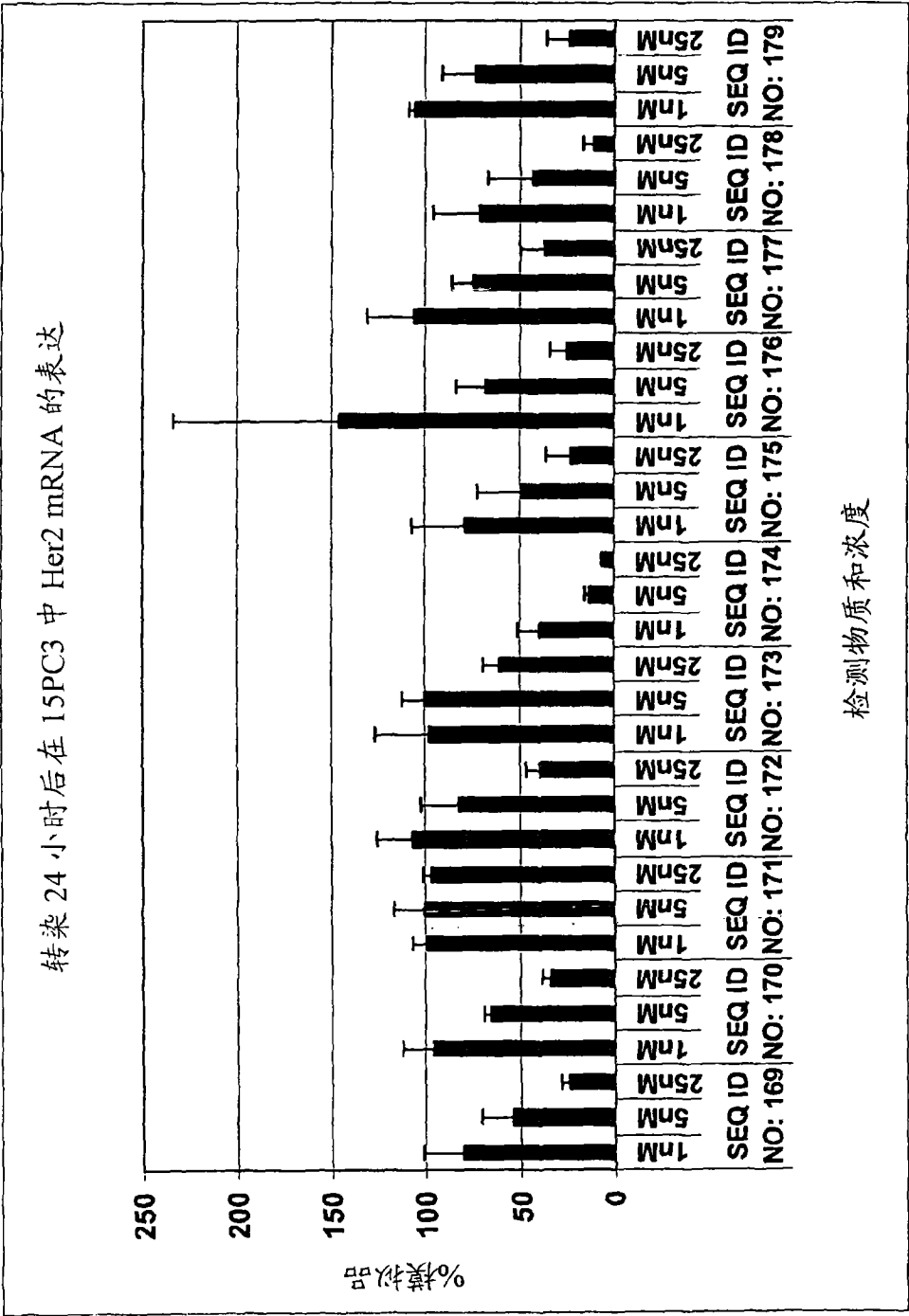


图 4

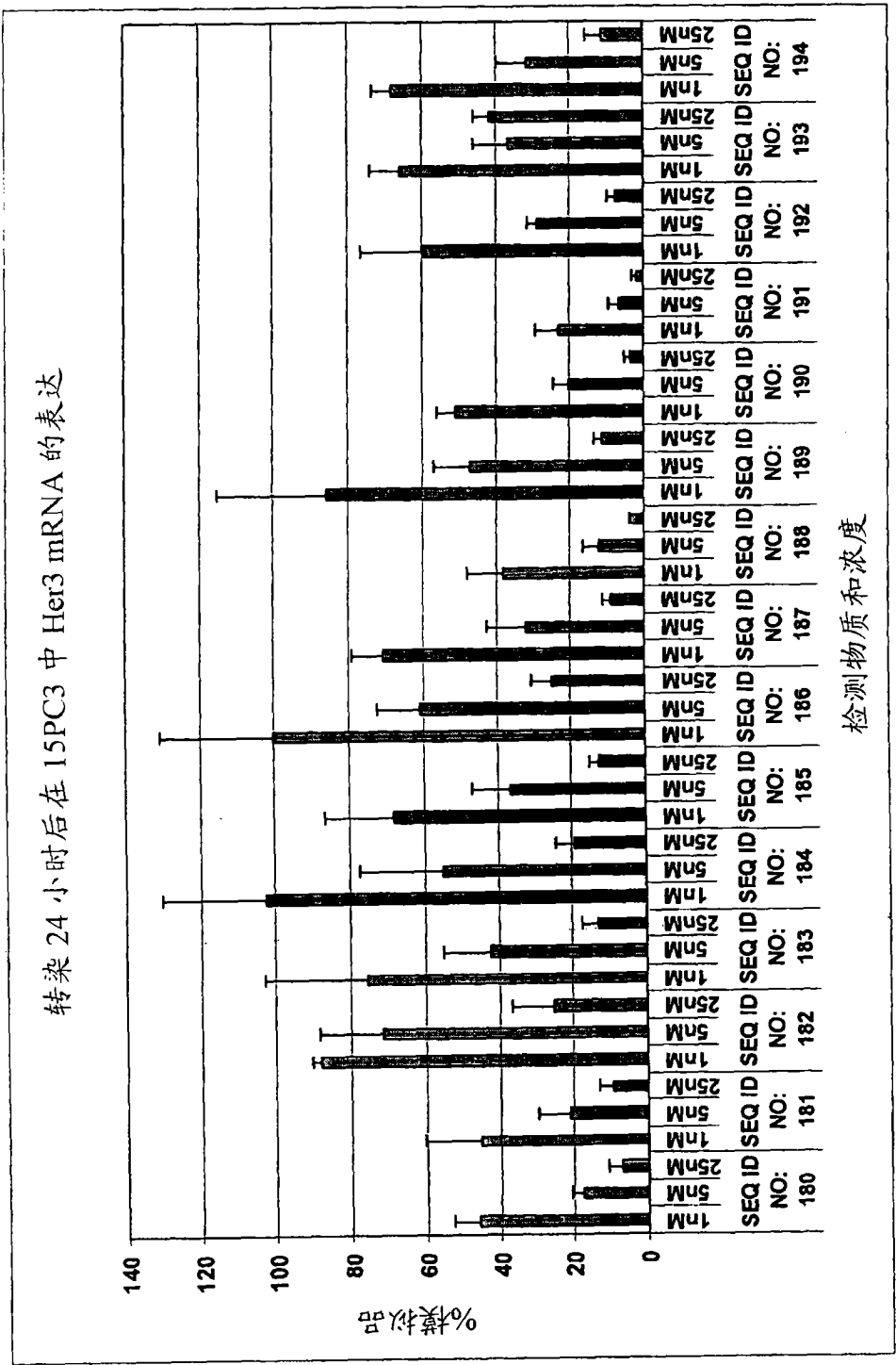


图 5

转染后不同时间点 HUH7 中 Caspase 3/7(半胱氨酸蛋白酶 3/7)活性

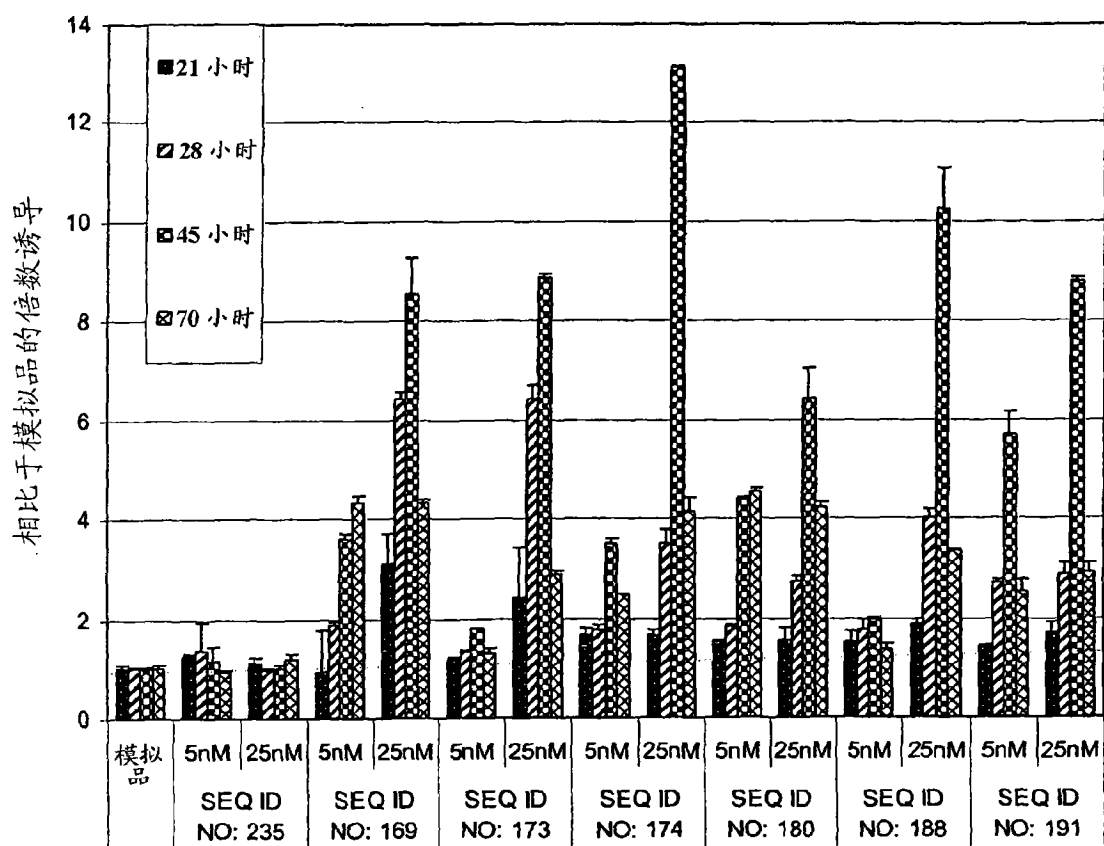


图 6

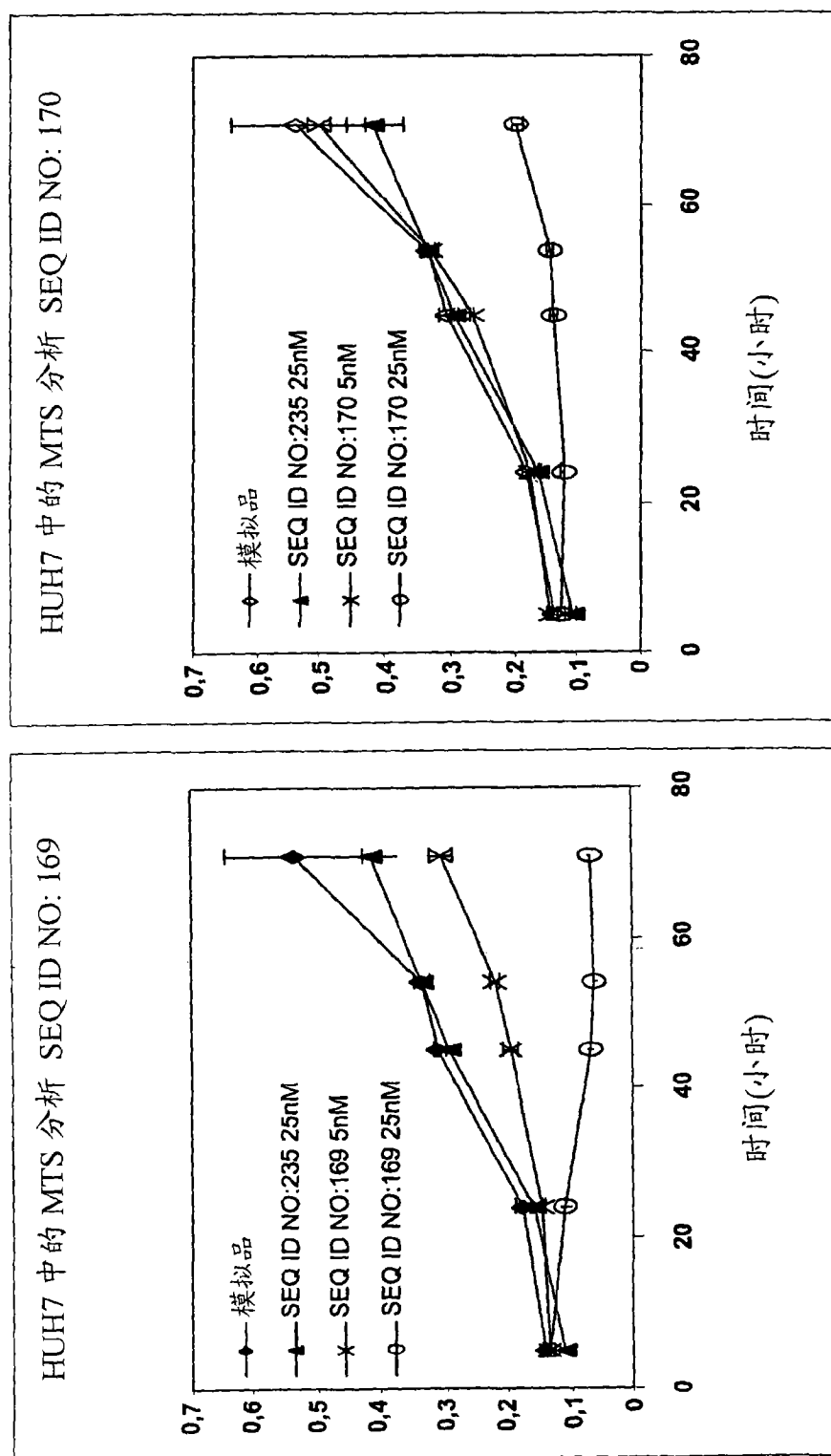


图 7

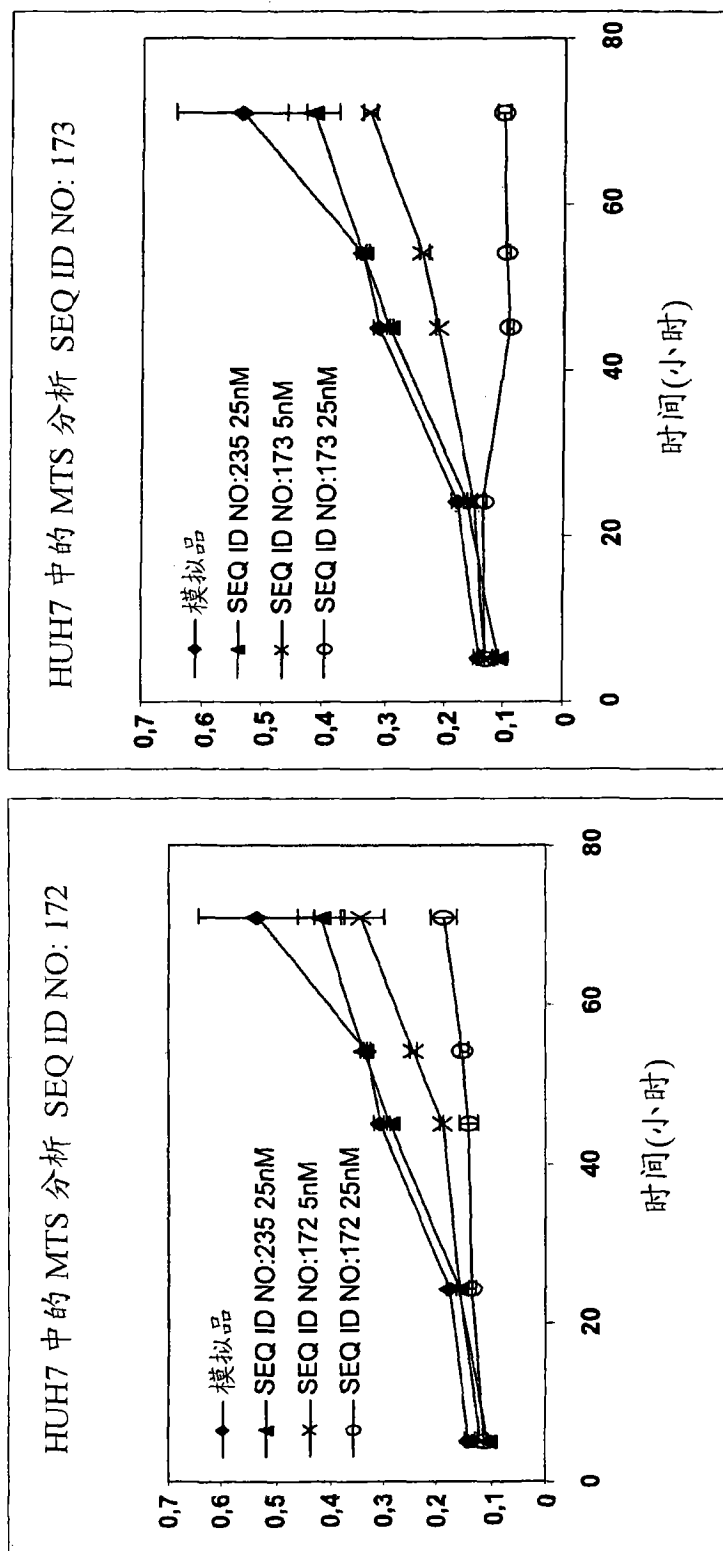


图7(续)

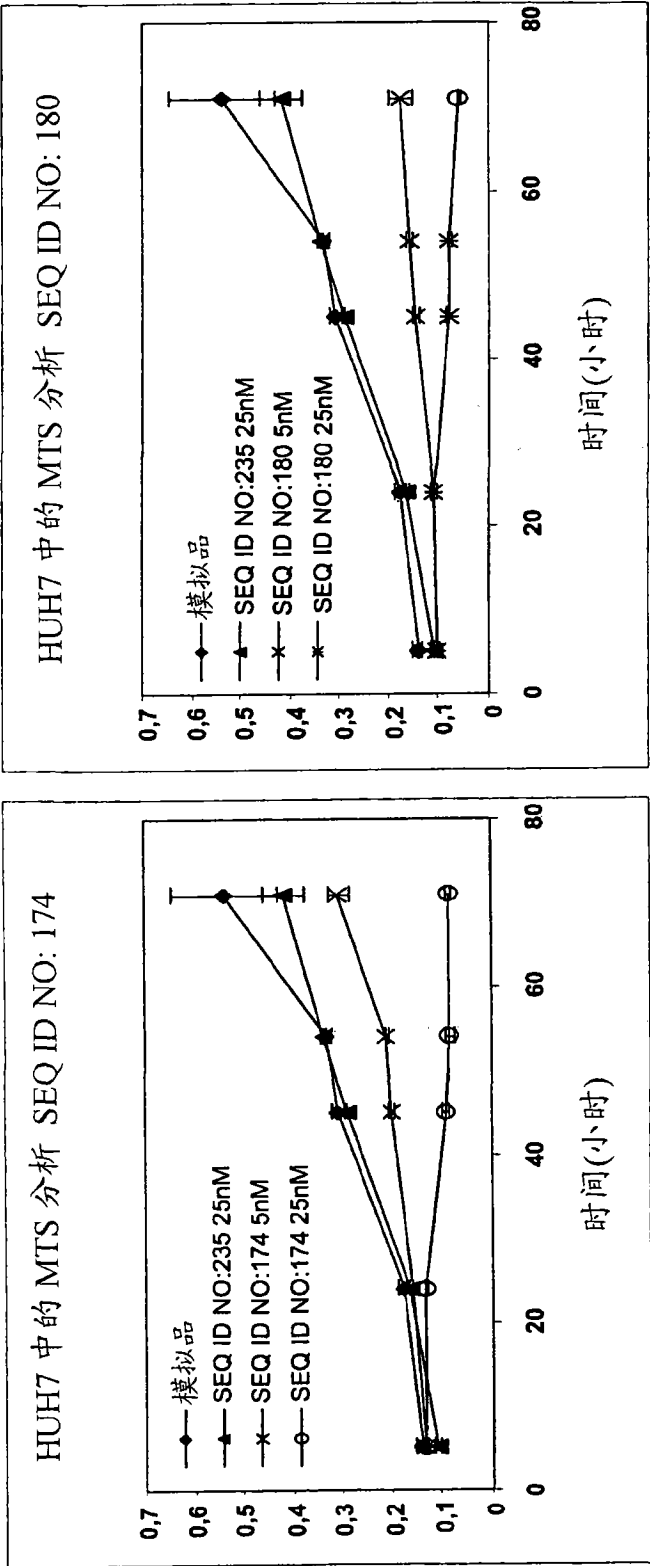


图 7(续)

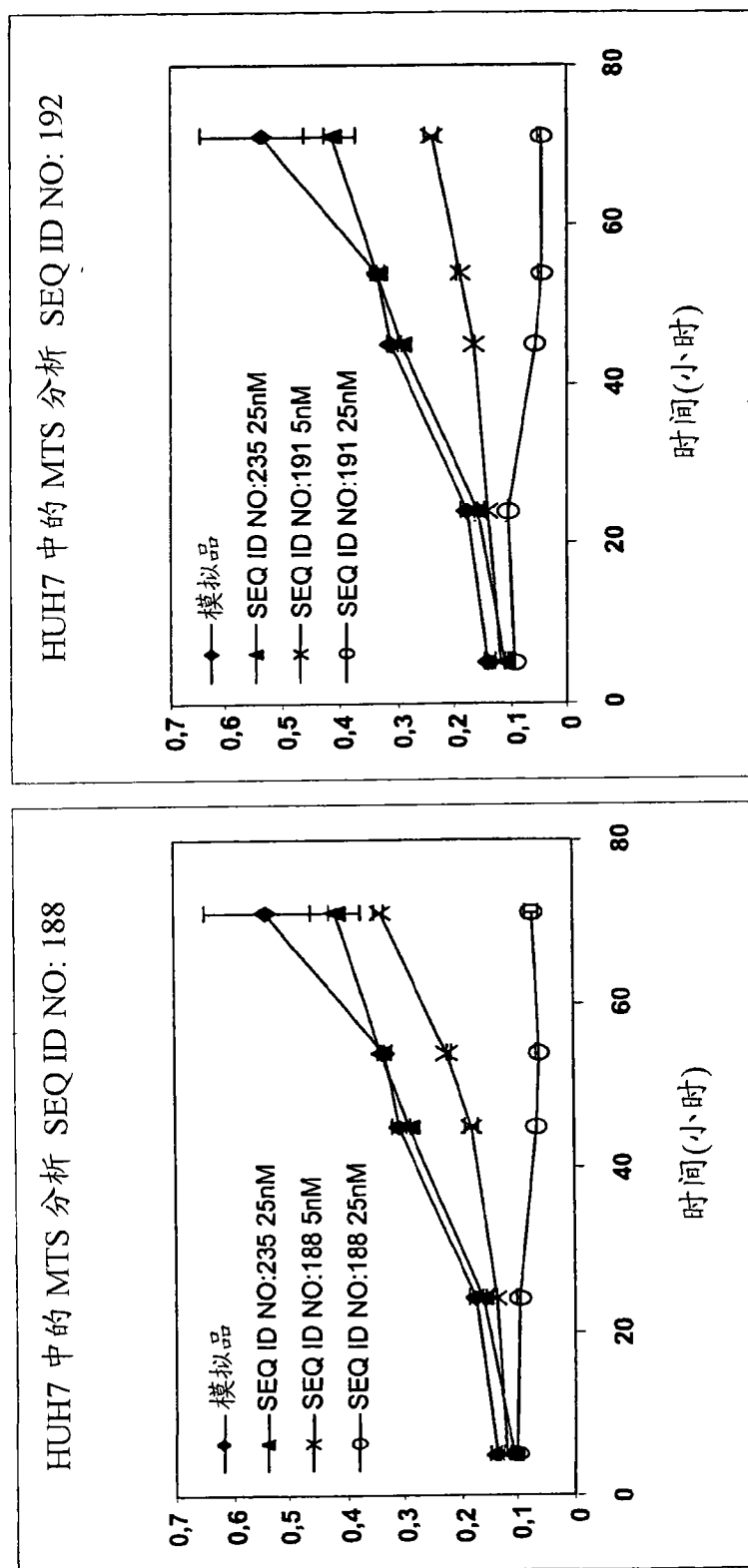


图7(续)

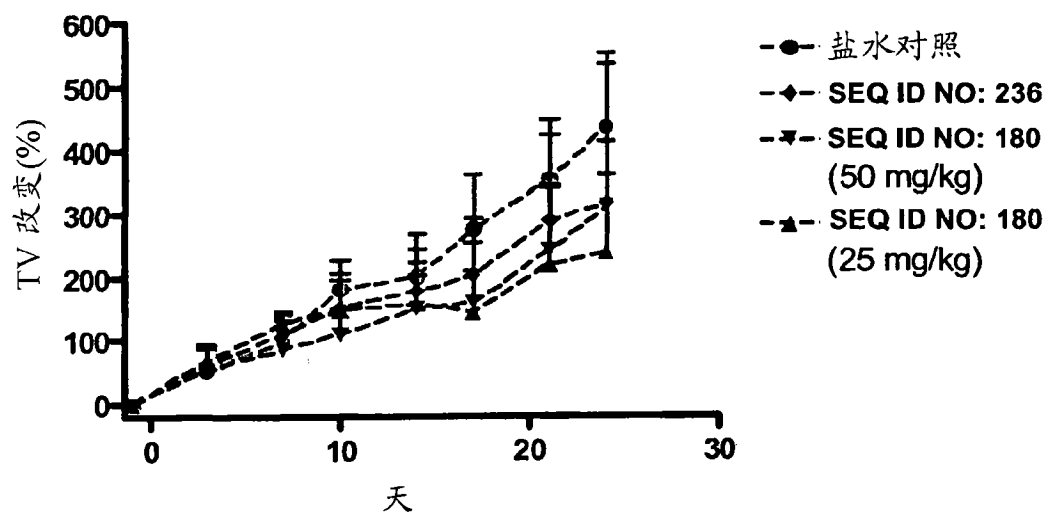


图 8A

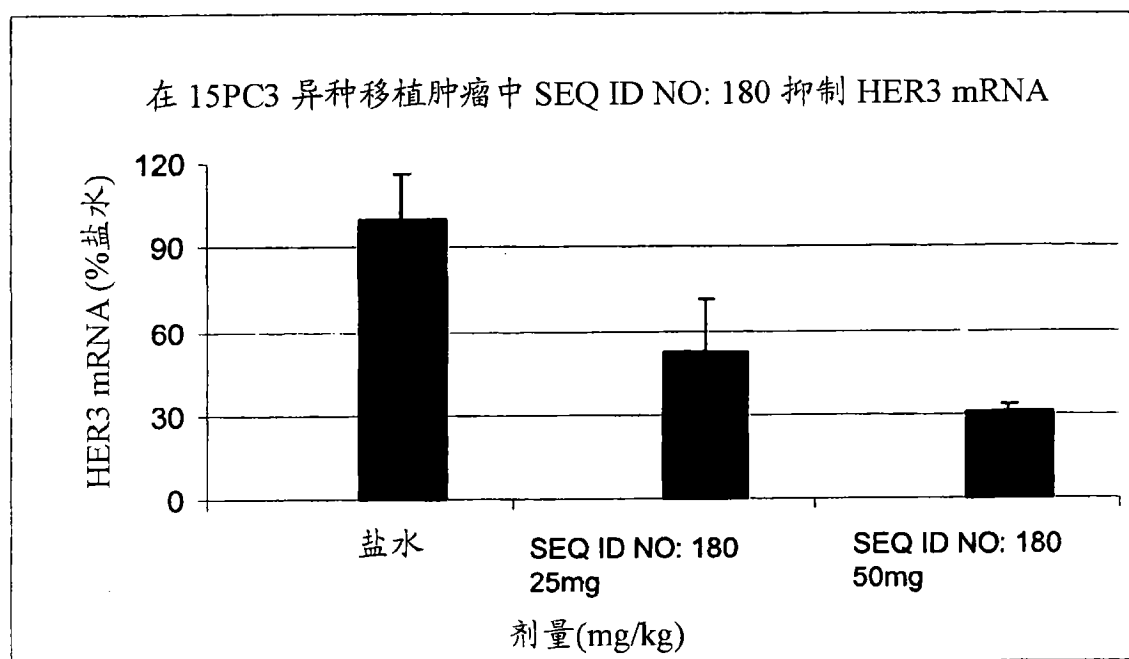


图 8B

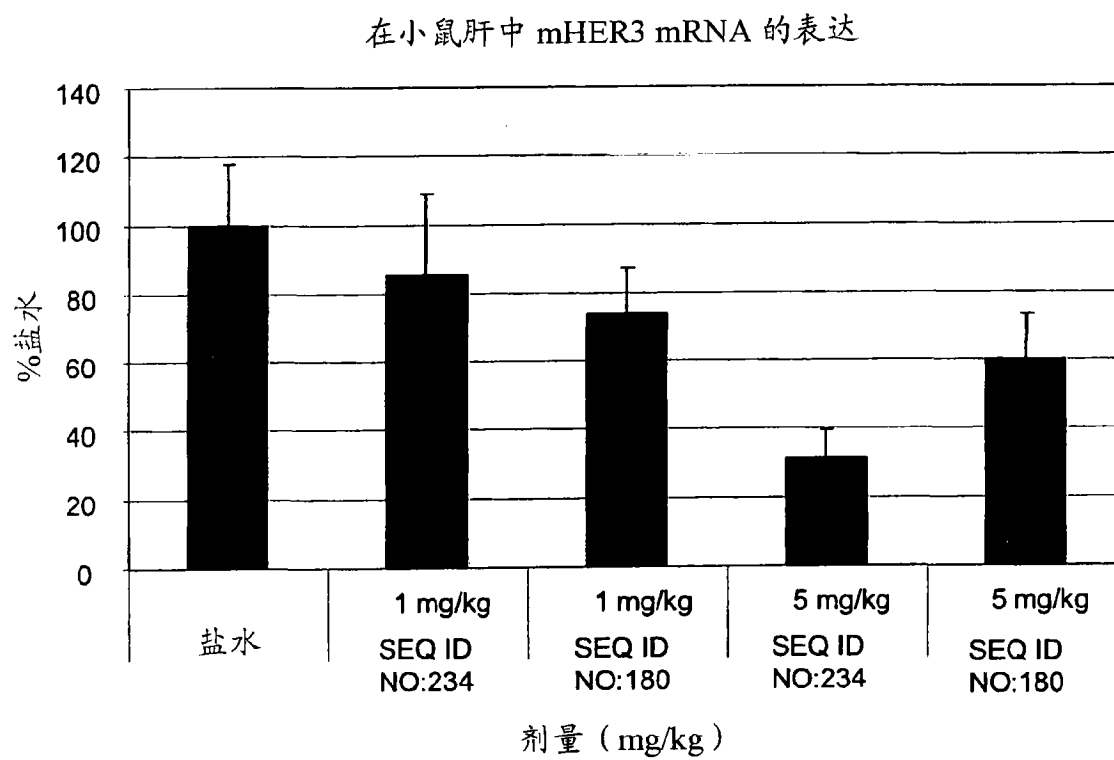


图 9