(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115518073 A
(43)申请公布日 2022.12.27

(21)申请号 202210729571.3

(22)申请日 2014.03.14

(30)优先权数据
61/785,269 2013.03.14 US
61/790,072 2013.03.15 US
61/937,438 2014.02.07 US

(62)分案原申请数据
201480026262.3 2014.03.14

(71)申请人 安第斯生物技术环球股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 L·O·布尔齐奥埃里兹
V·A·布尔齐奥梅嫩德斯
J·E·维勒加斯奥拉瓦里亚

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 史悦

(51)Int.Cl.
A61K 31/7088(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书84页 附图15页

(54)发明名称

用于治疗癌症干细胞的反义寡核苷酸

(57)摘要

本发明涉及用于治疗癌症干细胞的反义寡核苷酸,提供了与非编码嵌合线粒体RNA互补的寡核苷酸及包含该寡核苷酸的组合物和试剂盒、及其在治疗和预防先前用疗法治疗癌症的个体中的癌症转移或复发中的用途。本发明还提供了与非编码嵌合线粒体RNA互补的寡核苷酸及包含该寡核苷酸的组合物和试剂盒、及其在治疗难治性癌症(例如难治性HPV关联癌症)中的用途。

CN 115518073 A

1.一种抑制个体中的癌症转移的方法,其包括对所述个体施用有效量的一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体,且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。

2.一种用于治疗或预防个体中的癌症复发的方法,其包括对所述个体施用有效量的一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体,且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。

3.一种用于治疗个体中的转移性癌症的方法,其包括所述个体施用有效量的一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体,且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子充分互补,所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含:

a.在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的反义16S线粒体核糖体RNA或

b.在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补或至少85%互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6,优选地所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:7-198。

6.根据权利要求1-5中任一项的方法,其中与至少一种抗癌剂组合施用所述寡核苷酸,优选地所述至少一种抗癌剂选自下组:类克、多西他赛、塞来昔布、美法仑、地塞米松、类固醇、吉西他滨、顺铂、替莫唑胺、依托泊苷、环磷酰胺、temodar、卡铂、丙卡巴肼、gliadel、他莫昔芬、托泊替康、甲氨蝶呤、吉非替尼、泰素、泰索帝、氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、希罗达、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α、卡培他滨、顺铂、塞替派、氟达拉滨、卡铂、脂质体柔红霉素、阿糖胞苷、doxetaxol、帕西他赛、长春碱、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪、长春瑞滨、唑来膦酸、palmitronate、biaxin、白消安、泼尼松、硼替佐米、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱、多柔比星、帕西多赛、更昔洛韦、阿霉素、雌莫司汀磷酸钠、舒林酸、和依托泊苷,更优选地其中所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂序贯施用或同时施用。

7.根据权利要求1-6中任一项的方法,其中所述寡核苷酸与放射疗法、手术、同种干细胞移植疗法或自体干细胞移植疗法组合施用。

8.根据权利要求1-7中任一项的方法,其中所述个体先前已经用包括化学疗法、放射疗法、手术、或其组合的疗法治疗癌症,优选地所述个体中的癌症在用下列一种或多种治疗后复发:硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺(lenalidomide)、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺(thalidomide)、和长春新碱。

9.根据权利要求1-8中任一项的方法,其中所述癌症是实体瘤或非实体瘤,优选地所述实体瘤是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝和胆管癌、肺癌、黑素瘤、口癌、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾癌、睾丸癌、或甲状腺癌,优选地所述

非实体瘤是多发性骨髓瘤、白血病、或淋巴瘤。

10.一种试剂盒,其包含一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸和用于实施权利要求1-9中任一项的方法的说明。

用于治疗癌症干细胞的反义寡核苷酸

[0001] 本发明申请是基于申请日为2014年03月14日，申请号为201480026262.3(国际申请号为PCT/US2014/029606)、名称为“用于治疗癌症干细胞的反义寡核苷酸”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2013年3月14日提交的美国临时专利申请流水号61/785,269、2013年3月15日提交的美国临时专利申请流水号61/790,072和2014年2月7日提交的美国临时专利申请流水号61/937,438的优先权权益，通过提及将每篇的全部内容收入本文。

发明领域

[0004] 本发明涉及与非编码嵌合线粒体RNA互补的寡核苷酸及其在治疗和预防先前治疗癌症的个体中的癌症转移或复发的方法中的用途。本发明还涉及与非编码嵌合线粒体RNA互补的寡核苷酸及其在治疗个体中的难治性癌症(例如难治性HPV关联癌症)中的用途。

[0005] 发明背景

[0006] 癌症是一种细胞恶性，其独特的性状(即细胞周期的正常控制的丧失)导致不受调节的生长、分化的缺乏、以及侵入其它组织和转移的能力。致癌作用是正常细胞转化为恶性细胞的多步骤过程(McKinnell等,“The Biology Basis of Cancer”,Ch.3,1998)。癌症的病因学是复杂的，并且包括细胞周期调节的改变、染色体异常和染色体断裂。认为传染原(例如致癌性病毒)、化学品、放射(例如紫外线或电离辐射)和免疫学病症是致癌作用的主要原因(McKinnell等,“The Biological Basis of Cancer,Ch.3,1998)。

[0007] 最近的证据支持肿瘤以具有不同生物学特性的异质细胞群体的层次组织的观点。已经提出了两种模型造成肿瘤内的此异质性及肿瘤生长。一种此类模型基于癌症干细胞(CSC)，认为其负责癌症的各方面，如启动、进展、转移、和复发。见Chen等,Acta Pharmacol Sin.,34(6):732-740,2013;Ponti等,Cancer Res,65(13):5506-11,2005;Singh等,Cancer Res,63:5821-5828,2003;及Feng等,Oncology Reports,22:1129-1134,2009。虽然CSC一般代表总体肿瘤群体的一种非常小的群体，但是它们一般视为肿瘤细胞的自身更新的启动亚群或能够引起新肿瘤的癌细胞的小群体。已经在许多癌症中鉴定出CSC，包括但不限于乳腺、脑、血液、肝、肾、宫颈、卵巢、结肠、和肺癌，等等。见Ponti等,Cancer Res,65(13):5506-11,2005;Feng等,Oncology Reports,22:1129-1134,2009;Zhang等,Cancer Res,68(11):4311:4320,2008;Singh等,Cancer Res,63:5821-5828,2003;Clarke等,Cancer Res,66:9339,2006;Sendurai等,Cell,133:704,2008;Ohata等,Cancer Res,72:5101,2012;及Mukhopapadhyay等,Plos One,8(11):e78725,2013)。

[0008] 手术切除源自原发性肿瘤的肿瘤或转移，接着系统性施用抗癌疗法是用于治疗几种癌症的建立的临床方案。虽然用于治疗一些癌症类型获得成功，但是癌症治疗的一种公知的并发症是不能有效除去的残留肿瘤细胞或CSC的存活，这可以导致消退后的复发，其中癌症由于转移而返回肿瘤形成的原发性部位或远端部位。最近，发现了CSC由于对化学疗法的抗性也可以促成消退后的复发。见Domingo-Domenech等,Cancer Cell,22(3):373,2012。

因此,需要开发可以靶向促成复发和转移的细胞(例如CSC)的治疗剂。此类治疗剂的发现可以容许开发可用于预防消退后的癌症复发(即复发)或预防原发性肿瘤对继发性部位的扩散(即转移)的治疗。见Clarke等,Cancer Res,66:9339,2006。

[0009] 通过提及将本文中引用的所有出版物(包括专利申请、专利公开文本和科学文献)收入本文,就像每篇单独的参考文献明确且单独指出通过提及收录一样。

[0010] 发明概述

[0011] 本文中提供的发明特别公开了用于抑制个体中的癌症转移的方法,其包括对所述个体施用有效量的一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体,且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。在一些实施方案中,所述寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子充分互补,所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含:在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的反义16S线粒体核糖体RNA或在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。在本文中的任何实施方案中,所述寡核苷酸可以与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6。在本文中的任何实施方案中,所述寡核苷酸可以与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子至少85%互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6。在本文中的任何实施方案中,所述一种或多种寡核苷酸可以包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:7-198。在一些实施方案中,所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:36、197和198。在本文中的任何实施方案中,可以与至少一种抗癌剂组合施用所述寡核苷酸。在别的实施方案中,至少一种抗癌剂选自下组:类克(remicade)、多西他赛(docetaxel)、塞来昔布(celecoxib)、美法仑(melphalan)、地塞米松(dexamethasone)、类固醇、吉西他滨(gemcitabine)、顺铂(cisplatinum)、替莫唑胺(temozolomide)、依托泊苷(etoposide)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、temodar、卡铂(carboplatin)、丙卡巴肼(procarbazine)、gliadel、他莫昔芬(tamoxifen)、托泊替康(topotecan)、甲氨蝶呤、吉非替尼(gefitinib)、泰素(taxol)、泰索帝(taxotere)、氟尿嘧啶、亚叶酸(leucovorin)、伊立替康(irinotecan)、希罗达(xeloda)、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α、卡培他滨(capecitabine)、顺铂、塞替派(thiotepa)、氟达拉滨(fludarabine)、卡铂、脂质体柔红霉素(liposomal daunorubicin)、阿糖胞苷(cytarabine)、doxetaxol、帕西他赛(pacilitaxel)、长春碱(vinblastine)、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪(dacarbazine)、长春瑞滨(vinorelbine)、唑来膦酸(zoledronic acid)、palmitronate、biaxin、白消安(busulphan)、泼尼松(prednisone)、硼替佐米(bortezomib)、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱(vincristine)、多柔比星(doxorubicin)、帕西多赛(paclitaxel)、更昔洛韦(ganciclovir)、阿霉素(adriamycin)、雌莫司汀磷酸钠(estrainustine sodium phosphate)、舒林酸(sulindac)、和依托泊苷。在一些实施方案中,序贯施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。在一些实施方案中,同时施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。在本文中的任何实施方案中,可以与放射疗法组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中,可以与手术组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中,可以与同种干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中,可以与自体干细胞

移植疗法组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，所述个体先前可以已经用包括化学疗法、放射疗法、手术、或其组合的疗法治疗癌症。在本文中的任何实施方案中，所述个体中的癌症可以已经在用下列一种或多种治疗后复发：硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺(lenalidomide)、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺(thalidomide)、和长春新碱。在本文中的任何实施方案中，其中所述癌症是实体瘤。在别的实施方案中，所述实体瘤是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝和胆管癌、肺癌、黑素瘤、口癌、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾癌、睾丸癌、或甲状腺癌。在本文中的任何实施方案中，其中所述癌症可以是非实体瘤。在别的实施方案中，所述非实体瘤是多发性骨髓瘤、白血病、或淋巴瘤。在本文中的任何实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸可以减少所述个体中的癌症干细胞数目。在本文中的任何实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸可以抑制所述个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0012] 在一个方面，本文中提供的发明公开了一种用于预防个体中的癌症复发的方法，其包括对所述个体施用有效量的一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体，且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。在别的实施方案中，所述寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子是充分互补的，所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含：在其5’端与具有反向重复序列的多核苷酸的3’端共价连接的反义16S线粒体核糖体RNA或在其5’端与具有反向重复序列的多核苷酸的3’端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。在本文中的任何实施方案中，所述寡核苷酸可以与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6。在本文中的任何实施方案中，所述寡核苷酸可以与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子至少85％互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6。在本文中的任何实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸可以包含选自下组的核苷酸序列：SEQ ID NO:7-198。在一些实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列：SEQ ID NO:36、197和198。在本文中的任何实施方案中，可以与至少一种抗癌剂组合施用所述寡核苷酸。在别的实施方案中，所述至少一种抗癌剂选自下组：类克、多西他赛、塞来昔布、美法仑、地塞米松、类固醇、吉西他滨、顺铂、替莫唑胺、依托泊苷、环磷酰胺、temodar、卡铂、丙卡巴肼、gliadel、他莫昔芬、托泊替康、甲氨蝶呤、吉非替尼、泰素、泰索帝、氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、希罗达、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α、卡培他滨、顺铂、塞替派、氟达拉滨、卡铂、脂质体柔红霉素、阿糖胞苷、doxetaxol、帕西他赛、长春碱、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪、长春瑞滨、唑来膦酸、palmitronate、biaxin、白消安、泼尼松、硼替佐米、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱、多柔比星、帕西多赛、更昔洛韦、阿霉素、雌莫司汀磷酸钠、舒林酸、和依托泊苷。在一些实施方案中，可以序贯施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。在一些实施方案中，可以同时施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。在本文中的任何实施方案中，可以与放射疗法组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，可以与手术组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，可以与同种干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，可以与自体干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，所述个体先前可以已经用包括化学疗法、放射疗法、手术、或

其组合的疗法治疗癌症。在本文中的任何实施方案中，所述个体中的癌症可以已经在用下列一种或多种治疗后复发：硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺、和长春新碱。在本文中的任何实施方案中，其中所述癌症是实体瘤。在别的实施方案中，所述实体瘤是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝和胆管癌、肺癌、黑素瘤、口癌、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾癌、睾丸癌、或甲状腺癌。在本文中的任何实施方案中，其中所述癌症可以是非实体瘤。在别的实施方案中，所述非实体瘤是多发性骨髓瘤、白血病、或淋巴瘤。在本文中的任何实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸可以减少所述个体中的癌症干细胞数目。在本文中的任何实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸可以抑制所述个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0013] 在另一个方面，本文中提供的发明公开了用于治疗个体中的转移性癌症的方法，其包括所述个体施用有效量的一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体，且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。在别的实施方案中，所述寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子是充分互补的，所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含：在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的反义16S线粒体核糖体RNA或在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。在本文中的任何实施方案中，所述寡核苷酸可以与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6。在本文中的任何实施方案中，所述寡核苷酸可以与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子至少85％互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6。在本文中的任何实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸可以包含选自下组的核苷酸序列：SEQ ID NO:7-198。在一些实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列：SEQ ID NO:36、197和198。在本文中的任何实施方案中，可以与至少一种抗癌剂组合施用所述寡核苷酸。在别的实施方案中，所述至少一种抗癌剂选自下组：类克、多西他赛、塞来昔布、美法仑、地塞米松、类固醇、吉西他滨、顺铂、替莫唑胺、依托泊苷、环磷酰胺、temodar、卡铂、丙卡巴肼、gliadel、他莫昔芬、托泊替康、甲氨蝶呤、吉非替尼、泰素、泰索帝、氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、希罗达、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α、卡培他滨、顺铂、塞替派、氟达拉滨、卡铂、脂质体柔红霉素、阿糖胞苷、doxetaxol、帕西他赛、长春碱、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪、长春瑞滨、唑来膦酸、palmitronate、biaxin、白消安、泼尼松、硼替佐米、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱、多柔比星、帕西多赛、更昔洛韦、阿霉素、雌莫司汀磷酸钠、舒林酸、和依托泊苷。在一些实施方案中，可以序贯施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。在一些实施方案中，可以同时施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。在本文中的任何实施方案中，可以与放射疗法组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，可以与手术组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，可以与同种干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，可以与自体干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，所述个体先前可以已经用包括化学疗法、放射疗法、手术、或其组合的疗法治疗癌症。在本文中的任何实施方案中，所述个体中的转移性癌症可以已经在用下列一种或多种治疗后复发：硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那

度胺、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺、和长春新碱。在本文中的任何实施方案中，其中所述癌症是实体瘤。在别的实施方案中，所述实体瘤是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝和胆管癌、肺癌、黑素瘤、口癌、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾癌、睾丸癌、或甲状腺癌。在本文中的任何实施方案中，其中所述癌症可以是非实体瘤。在别的实施方案中，所述非实体瘤是多发性骨髓瘤、白血病、或淋巴瘤。在本文中的任何实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸可以减少所述个体中的癌症干细胞数目。在本文中的任何实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸可以抑制所述个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0014] 在又一个方面，本文中提供的发明公开了用于治疗个体中的难治性癌症(例如难治性HPV相关癌症)的方法，其包括所述个体施用有效量的一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体。在另外的实施方案中，所述寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子是充分互补的，所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含：在其5’端与具有反向重复序列的多核苷酸的3’端共价连接的反义16S线粒体核糖体RNA或在其5’端与具有反向重复序列的多核苷酸的3’端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。在本文中的任何实施方案中，所述寡核苷酸可以与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6。在本文中的任何实施方案中，所述寡核苷酸可以与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子至少85％互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6。在本文中的任何实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸可以包含选自下组的核苷酸序列：SEQ ID NO:7-198。在一些实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列：SEQ ID NO:36、197和198。在本文中的任何实施方案中，可以与至少一种抗癌剂组合施用所述寡核苷酸。在一些实施方案中，序贯施用寡核苷酸和至少一种抗癌剂。在一些实施方案中，同时施用寡核苷酸和至少一种抗癌剂。在本文中的任何实施方案中，可以与放射疗法组合施用寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，可以与手术组合施用寡核苷酸。在本文中的任何实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，寡核苷酸可以减少个体中的癌症干细胞数目。在本文中的任何实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，寡核苷酸可以抑制个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0015] 在另一个方面，本文中的发明提供了试剂盒，其包含一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸和用于实施本文中公开的任何方法的说明。

[0016] 具体地，本申请涉及如下各项：

[0017] 1.一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸在制备抑制个体中的癌症转移的药物中的用途，其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体，且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。

[0018] 2.项1的用途，其中所述寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子充分互补，所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含：

[0019] a.在其5’端与具有反向重复序列的多核苷酸的3’端共价连接的反义16S线粒体核

糖体RNA或

[0020] b.在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。

[0021] 3.项1或2的用途,其中所述寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0022] 4.项1或2的用途,其中所述寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子至少85%互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0023] 5.项1-4中任一项的用途,其中所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:7-198。

[0024] 6.项1-5中任一项的用途,其中与至少一种抗癌剂组合施用所述寡核苷酸。

[0025] 7.项6的用途,其中所述至少一种抗癌剂选自下组:类克(remicade)、多西他赛(docetaxel)、塞来昔布(celecoxib)、美法仑(melphalan)、地塞米松(dexamethasone)、类固醇、吉西他滨(gemcitabine)、顺铂(cisplatinum)、替莫唑胺(temozolomide)、依托泊苷(etoposide)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、temodar、卡铂(carboplatin)、丙卡巴肼(procarbazine)、gliadel、他莫昔芬(tamoxifen)、托泊替康(topotecan)、甲氨蝶呤、吉非替尼(gefitinib)、泰素(taxol)、泰索帝(taxotere)、氟尿嘧啶、亚叶酸(leucovorin)、伊立替康(irinotecan)、希罗达(xeloda)、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α、卡培他滨(capecitabine)、顺铂、塞替派(thiotepa)、氟达拉滨(fludarabine)、卡铂、脂质体柔红霉素(liposomal daunorubicin)、阿糖胞苷(cytarabine)、doxetaxol、帕西他赛(pacilitaxel)、长春碱(vinblastine)、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪(dacarbazine)、长春瑞滨(vinorelbine)、唑来膦酸(zoledronic acid)、palmitronate、biaxin、白消安(busulphan)、泼尼松(prednisone)、硼替佐米(bortezomib)、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱(vincristine)、多柔比星(doxorubicin)、帕西多赛(paclitaxel)、更昔洛韦(ganciclovir)、阿霉素(adriamycin)、雌莫司汀磷酸钠(estrainustine sodium phosphate)、舒林酸(sulindac)、和依托泊苷。

[0026] 8.项6的用途,其中序贯施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。

[0027] 9.项6的用途,其中同时施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。

[0028] 10.项1-9中任一项的用途,其中与放射疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0029] 11.项1-10中任一项的用途,其中与手术组合施用所述寡核苷酸。

[0030] 12.项1-11中任一项的用途,其中与同种干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0031] 13.项1-12中任一项的用途,其中与自体干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0032] 14.项1-13中任一项的用途,其中所述个体先前已经用包括化学疗法、放射疗法、手术、或其组合的疗法治疗癌症。

[0033] 15.项1-14中任一项的用途,其中所述个体中的癌症在用下列一种或多种治疗后复发:硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺(lenalidomide)、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺(thalidomide)、和长春新碱。

[0034] 16.项1-15中任一项的用途,其中所述癌症是实体瘤。

[0035] 17.项16的用途,其中所述实体瘤是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝和胆管癌、肺癌、黑素瘤、口癌、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾

癌、睾丸癌、或甲状腺癌。

[0036] 18.项1-15中任一项的用途，其中所述癌症是非实体瘤。

[0037] 19.项18的用途，其中所述非实体瘤是多发性骨髓瘤、白血病、或淋巴瘤。

[0038] 20.项1-19中任一项的用途，其中与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸减少所述个体中的癌症干细胞数目。

[0039] 21.项1-20中任一项的用途，其中与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸抑制所述个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0040] 22.一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸在制备用于治疗或预防个体中的癌症复发的药物中的用途，其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体，且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。

[0041] 23.项22的用途，其中所述寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子是充分互补的，所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含：

[0042] a.在其5’端与具有反向重复序列的多核苷酸的3’端共价连接的反义16S线粒体核糖体RNA或

[0043] b.在其5’端与具有反向重复序列的多核苷酸的3’端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。

[0044] 24.项22或23的用途，其中所述寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0045] 25.项22或23的用途，其中所述寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子至少85％互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0046] 26.项22-25中任一项的用途，其中所述寡核苷酸包含选自下组的核苷酸序列：SEQ ID NO:7-198。

[0047] 27.项22-26中任一项的用途，其中与至少一种抗癌剂组合施用所述寡核苷酸。

[0048] 28.项27的用途，其中所述至少一种抗癌剂选自下组：类克、多西他赛、塞来昔布、美法仑、地塞米松、类固醇、吉西他滨、顺铂、替莫唑胺、依托泊苷、环磷酰胺、temodar、卡铂、丙卡巴肼、gliadel、他莫昔芬、托泊替康、甲氨蝶呤、吉非替尼、泰素、泰索帝、氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、希罗达、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α、卡培他滨、顺铂、塞替派、氟达拉滨、卡铂、脂质体柔红霉素、阿糖胞苷、doxetaxol、帕西他赛、长春碱、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪、长春瑞滨、唑来膦酸、palmitronate、biaxin、白消安、泼尼松、硼替佐米、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱、多柔比星、帕西多赛、更昔洛韦、阿霉素、雌莫司汀磷酸钠、舒林酸、和依托泊苷。

[0049] 29.项27的用途，其中序贯施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。

[0050] 30.项27的用途，其中同时施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。

[0051] 31.项22-30中任一项的用途，其中与放射疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0052] 32.项22-31中任一项的用途，其中与手术组合施用所述寡核苷酸。

[0053] 33.项22-32中任一项的用途，其中与同种干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0054] 34.项22-32中任一项的用途，其中与自体干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷

酸。

[0055] 35.项22-34中任一项的用途,其中所述个体先前已经用包括化学疗法、放射疗法、手术、或其组合的疗法治疗癌症。

[0056] 36.项22-35中任一项的用途,其中所述个体中的癌症在用下列一种或多种治疗后复发:硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺(lenalidomide)、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺(thalidomide)、和长春新碱。

[0057] 37.项22-36中任一项的用途,其中所述癌症是实体瘤。

[0058] 38.项37的用途,其中所述实体瘤是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝和胆管癌、肺癌、黑素瘤、口癌、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾癌、睾丸癌、或甲状腺癌。

[0059] 39.项22-36中任一项的用途,其中所述癌症是非实体瘤。

[0060] 40.项39的用途,其中所述非实体瘤是多发性骨髓瘤、白血病、或淋巴瘤。

[0061] 41.项22-40中任一项的用途,其中与没有施用所述寡核苷酸的个体相比,所述寡核苷酸减少所述个体中的癌症干细胞数目。

[0062] 42.项22-41中任一项的用途,其中与没有施用所述寡核苷酸的个体相比,所述寡核苷酸抑制所述个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0063] 43.一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸在制备用于治疗个体中的转移性癌症的药物中的用途,其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体,且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。

[0064] 44.项43的用途,其中所述寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子充分互补,所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含:

[0065] a.在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的反义16S线粒体核糖体RNA或

[0066] b.在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。

[0067] 45.项43或44的用途,其中所述寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0068] 46.项43或44的用途,其中所述寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子至少85%互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0069] 47.项43-46中任一项的用途,其中所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:7-198。

[0070] 48.项43-47中任一项的用途,其中与至少一种抗癌剂组合施用所述寡核苷酸。

[0071] 49.项48的用途,其中所述至少一种抗癌剂选自下组:类克、多西他赛、塞来昔布、美法仑、地塞米松、类固醇、吉西他滨、顺铂、替莫唑胺、依托泊苷、环磷酰胺、temodar、卡铂、丙卡巴肼、gliadel、他莫昔芬、托泊替康、甲氨蝶呤、吉非替尼、泰素、泰索帝、氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、希罗达、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α、卡培他滨、顺铂、塞替派、氟达拉滨、卡铂、脂质体柔红霉素、阿糖胞苷、doxetaxol、帕西他赛、长春碱、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪、长春瑞滨、唑来膦酸、palmitronate、biaxin、白消安、泼尼松、硼替佐米、二膦酸盐、三

氧化二砷、长春新碱、多柔比星、帕西多赛、更昔洛韦、阿霉素、雌莫司汀磷酸钠、舒林酸、和依托泊苷。

[0072] 50.项48的用途，其中序贯施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。

[0073] 51.项48的用途，其中同时施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。

[0074] 52.项43-51中任一项的用途，其中与放射疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0075] 53.项43-52中任一项的用途，其中与手术组合施用所述寡核苷酸。

[0076] 54.项43-53中任一项的用途，其中与同种干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0077] 55.项43-53中任一项的用途，其中与自体干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0078] 56.项43-55中任一项的用途，其中所述个体先前已经用包括化学疗法、放射疗法、手术、或其组合的疗法治疗癌症。

[0079] 57.项43-56中任一项的用途，其中所述个体中的癌症在用下列一种或多种治疗后复发：硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺(lenalidomide)、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺(thalidomide)、和长春新碱。

[0080] 58.项43-57中任一项的用途，其中所述癌症是实体瘤。

[0081] 59.项58的用途，其中所述实体瘤是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝和胆管癌、肺癌、黑素瘤、口癌、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾癌、睾丸癌、或甲状腺癌。

[0082] 60.项43-57中任一项的用途，其中所述癌症是非实体瘤。

[0083] 61.项60的用途，其中所述非实体瘤是多发性骨髓瘤、白血病、或淋巴瘤。

[0084] 62.项43-61中任一项的用途，其中与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸减少所述个体中的癌症干细胞数目。

[0085] 63.项43-62中任一项的用途，其中与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，所述寡核苷酸抑制所述个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0086] 64.一种试剂盒，其包含一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸和用于实施项1-63中任一项的用途的说明。

[0087] 65.项64的试剂盒，其中所述说明指示对个体施用所述寡核苷酸以抑制所述个体中的癌症转移、治疗或预防个体中的癌症复发、和/或治疗个体中的转移性癌症，其中所述寡核苷酸能够与所述嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体，且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。

[0088] 66.项64或65的试剂盒，其中所述寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子充分互补，所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含：

[0089] a.在其5’端与具有反向重复序列的多核苷酸的3’端共价连接的反义16S线粒体核糖体RNA或

[0090] b.在其5’端与具有反向重复序列的多核苷酸的3’端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。

[0091] 67.项64-66的试剂盒，其中所述寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的

ASncmtRNA分子互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0092] 68.项64-66任一项的试剂盒,其中所述寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子至少85%互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0093] 69.项64-68中任一项的试剂盒,其中所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:7-198。

[0094] 70.项64-69中任一项的试剂盒,其中与至少一种抗癌剂组合施用所述寡核苷酸。

[0095] 71.项70的试剂盒,其中所述至少一种抗癌剂选自下组:类克(remicade)、多西他赛(docetaxel)、塞来昔布(celecoxib)、美法仑(melphalan)、地塞米松(dexamethasone)、类固醇、吉西他滨(gemcitabine)、顺铂(cisplatinum)、替莫唑胺(temozolomide)、依托泊苷(etoposide)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、temodar、卡铂(carboplatin)、丙卡巴肼(procarbazine)、gliadel、他莫昔芬(tamoxifen)、托泊替康(topotecan)、甲氨蝶呤、吉非替尼(gefitinib)、泰素(taxol)、泰索帝(taxotere)、氟尿嘧啶、亚叶酸(leucovorin)、伊立替康(irinotecan)、希罗达(xeloda)、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α、卡培他滨(capecitabine)、顺铂、塞替派(thiotepa)、氟达拉滨(fludarabine)、卡铂、脂质体柔红霉素(liposomal daunorubicin)、阿糖胞苷(cytarabine)、doxetaxol、帕西他赛(pacilitaxel)、长春碱(vinblastine)、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪(dacarbazine)、长春瑞滨(vinorelbine)、唑来膦酸(zoledronic acid)、palmitronate、biaxin、白消安(busulphan)、泼尼松(prednisone)、硼替佐米(bortezomib)、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱(vincristine)、多柔比星(doxorubicin)、帕西多赛(paclitaxel)、更昔洛韦(ganciclovir)、阿霉素(adriamycin)、雌莫司汀磷酸钠(estrainustine sodium phosphate)、舒林酸(sulindac)、和依托泊苷。

[0096] 72.项70的试剂盒,其中序贯施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。

[0097] 73.项70的试剂盒,其中同时施用所述寡核苷酸和所述至少一种抗癌剂。

[0098] 74.项64-73的试剂盒,其中与放射疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0099] 75.项64-74中任一项的试剂盒,其中与手术组合施用所述寡核苷酸。

[0100] 76.项64-75中任一项的试剂盒,其中与同种干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0101] 77.项64-76中任一项的试剂盒,其中与自体干细胞移植疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0102] 78.项64-77中任一项的试剂盒,其中所述个体先前已经用包括化学疗法、放射疗法、手术、或其组合的疗法治疗癌症。

[0103] 79.项64-78中任一项的试剂盒,其中所述个体中的癌症在用下列一种或多种治疗后复发:硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺(lenalidomide)、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺(thalidomide)、和长春新碱。

[0104] 80.项64-79中任一项的试剂盒,其中所述癌症是实体瘤。

[0105] 81.项80的试剂盒,其中所述实体瘤是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝和胆管癌、肺癌、黑素瘤、口癌、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾癌、睾丸癌、或甲状腺癌。

[0106] 82.项64-79中任一项的试剂盒,其中所述癌症是非实体瘤。

[0107] 83.项82的试剂盒,其中所述非实体瘤是多发性骨髓瘤、白血病、或淋巴瘤。

[0108] 84.项64-83中任一项的试剂盒,其中与没有施用所述寡核苷酸的个体相比,所述寡核苷酸减少所述个体中的癌症干细胞数目。

[0109] 85.项64-84中任一项的试剂盒,其中与没有施用所述寡核苷酸的个体相比,所述寡核苷酸抑制所述个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0110] 附图简述

[0111] 图1描绘了本文中利用的实验规程和测定法的通用方案,其基于癌症干细胞形成这些球状体的特异性能力,测量靶向ASncmtRNA的反义寡核苷酸对结肠癌细胞中形成的球体数目的影响。

[0112] 图2描绘了在无处理、仅用Lipofectamine处理、用对照寡核苷酸(对照寡聚物154)处理、或用靶向ASncmtRNA的反义寡核苷酸(ASO)(ASO 1537S)处理后原代结肠肿瘤癌细胞中形成的球体的代表性例子。用ASO 1537S处理消除球体的形成。

[0113] 图3描绘了原代结肠肿瘤细胞形成球体的能力的量化。接种细胞的总数的约0.6%能够形成球体。用ASO 1537S转染的细胞不能形成球体。

[0114] 图4描绘了在无处理、仅用Lipofectamine处理、用对照寡核苷酸(对照寡聚物154)处理、或用靶向ASncmtRNA的反义寡核苷酸(ASO 1107S)处理后来自HCT-116结肠癌细胞系的细胞中形成的球体的代表性例子。用ASO 1107S的处理消除球体的形成。

[0115] 图5描绘了HCT-116结肠癌细胞形成球体的能力的量化。接种细胞的总数的约0.3%能够形成球体。用ASO 1107S转染的细胞不能形成球体。

[0116] 图6描绘了本文中利用的实验规程和测定法的通用方案,其测量靶向ASncmtRNA的反义寡核苷酸对由SiHa细胞系和宫颈肿瘤的原代培养细胞形成的球体数目的影响。测定法基于癌症干细胞形成球体(在本文中又称为球状体)的能力。

[0117] 图7描绘了在无处理(NT)、用对照寡核苷酸(对照寡聚物154:ASO-C)处理、或用靶向ASncmtRNA的反义寡核苷酸(ASO 1537S)处理或用45μM顺铂(CISP)处理后由宫颈癌SiHa细胞系和宫颈肿瘤的原代培养细胞形成的球体的代表性例子。用ASO 1537S的处理消除球体的形成。与用HPV 16感染的自原代培养物获得的两种其它细胞相比,自用HPV 45感染的原代培养物获得的CerCa 3细胞对用顺铂的处理有抗性。

[0118] 图8描绘了在具有或没有处理的情况中量化SiHa细胞细胞系和原代宫颈肿瘤细胞(CerCa 1、CerCa 2和CerCa 3)的球体形成。用ASO 1537S转染的细胞不能形成球体。用HPV 45感染的CerCa 3原代培养物对用顺铂的处理有抗性,但对用ASO 1537S的处理没有抗性。

[0119] 图9描绘了在手术除去皮内黑素瘤肿瘤后用ASO 1560S(正方形)而非对照寡聚物154(圆圈)处理的小鼠的肺和肝中的肿瘤复发的缺乏和转移性小结的缺乏。

[0120] 图10描绘了在用对照寡聚物154处理的小鼠的肺和肝中而非用ASO1560S处理的小鼠的肺和肝中的肿瘤复发转移性黑色小结的存在。

[0121] 图11描绘了在手术除去皮内肾癌肿瘤后用ASO 1560S(三角形)而非对照ASO 154(正方形)处理的小鼠的肿瘤复发的缺乏和完全存活。

[0122] 图12描绘了在手术除去皮内肾癌肿瘤后用ASO 1560S(正方形)而非对照ASO 154(圆圈)处理的小鼠的复发缺乏和存活。

[0123] 图13描绘了在手术除去皮内黑素瘤癌肿瘤后用ASO 1560S而非对照ASO 154处理

的小鼠的肿瘤复发的缺乏和完全存活。

[0124] 图14描绘了在手术除去皮下膀胱癌肿瘤后用ASO 1560S而非对照ASO154处理的小鼠的肿瘤缺乏和完全存活。ip标示腹膜内施用,并且iv标示静脉内施用。

[0125] 图15描绘了在除去人A375黑素瘤肿瘤后用ASO 1537S而非对照ASO 154处理的Rag-/-小鼠的肿瘤缩小和存活增加。

[0126] 发明详述

[0127] 本文中提供的发明公开了包含一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸的组合物及其用于抑制个体中的癌症转移的用途,等等。在某些实施方案中,本发明提供了包含一种或多种与ASncmtRNA分子或SncmtRNA分子互补的寡核苷酸的组合物及其用于治疗或预防个体中的癌症复发的用途。在某些实施方案中,本发明提供了包含一种或多种与ASncmtRNA分子或SncmtRNA分子互补的寡核苷酸的组合物及其用于治疗个体中的转移性癌症的用途。在某些实施方案中,本发明提供了包含一种或多种与ASncmtRNA分子或SncmtRNA分子互补的寡核苷酸的组合物及其用于治疗个体中的难治性癌症(例如难治性HPV关联癌症)的用途。在本文中的一些实施方案中,所述个体先前已经用疗法(例如化学疗法、放射疗法、手术或其组合)治疗癌症。

[0128] I.通用技术

[0129] 除非另有指示,本发明的实施会采用分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学、和免疫学的常规技术,其是本领域技术人员公知的。在文献中完整解释此类技术,如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等,1989)和Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第三版(Sambrook和Russel,2001),(在本文中共同称为“Sambrook”);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编,1987,包括到2001的增刊);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等编,1994);Harlow和Lane(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York;Harlow和Lane(1999)Using Antibodies:A Laboratory Manua,l Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(在本文中共同称为“Harlow and Lane”),Beaucage等编,Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley&Sons,Inc.,New York,2000),Handbook of Experimental Immunology,第4版(D.M.Weir&C.C.Blackwell编,Blackwell Science Inc.,1987);及Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller&M.P.Calos,eds.,1987)。其它有用的参考文献包括Harrison的Principles of Internal Medicine(McGrawHill;J.Isseleacher等编),Dubois的Lupus Erythematosus(第5版;D.J.Wallace和B.H.Hahn编)。

[0130] II.定义

[0131] 在详细描述本发明前,应当理解本发明不限于具体的组合物或生物学系统,它们当然可以变化。还应当理解,本文中使用的术语是仅为了描述具体的实施方案,并且并不意图为限制性的。

[0132] 如本文中使用的,除非另有指示,单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数提及物。如此,例如提及“寡核苷酸”任选地包括两种或更多种此类寡核苷酸的组合,等等。

[0133] 应当理解,本文中描述的发明的各方面和实施方案包括“包括”、“组成为

(consisting)”和“组成基本上为(consisting essentially of)”各方面和实施方案。

[0134] “分离的”核酸分子(例如“分离的寡核苷酸”)是一种得到鉴定并且与在核酸的天然来源中通常与其关联的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。分离的核酸分子在自然界中发现它的形式或背景上不同。因此,区分分离的核酸分子与在其存在于天然细胞中时的核酸分子。

[0135] 如本文中使用的,术语“与反义非编码嵌合线粒体RNA互补的寡核苷酸”或“与有义非编码嵌合线粒体RNA互补的寡核苷酸”指分别与靶反义非编码嵌合线粒体RNA或靶有义非编码嵌合线粒体RNA具有足够的序列互补性的核酸。与靶反义非编码嵌合线粒体RNA或靶有义非编码嵌合线粒体RNA“充分互补的”寡核苷酸意味着寡核苷酸具有足以与嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体的序列。

[0136] 术语“寡核苷酸”指核苷酸和/或核苷酸类似物的短聚合物。本发明的“寡核苷酸组合物”包括含有一种或多种寡核苷酸的任何药剂、化合物或组合物,并且包括例如包含单链和/或双链(ds)寡核苷酸两者的组合物,包括例如单链RNA、单链DNA、DNA/DNA和RNA/DNA杂合寡核苷酸、以及经衍生的/修饰的其寡核苷酸。此类“寡核苷酸组合物”还可以包括扩增的寡核苷酸产物,例如聚合酶链式反应(PCR)产物。本发明的“寡核苷酸组合物”还可以包括设计为模拟寡核苷酸活性的公认的组合物,如肽核酸(PNA)分子。

[0137] 短语“对应于”或“与…对应的序列”在其涉及本文中描述的RNA(例如ASncmtRNA)时指示RNA具有与本文中描述的RNA或由类似DNA编码的RNA相同或基本上相同的序列。例如,与SEQ ID NO:4对应的ASncmtRNA指示ASncmtRNA具有与SEQ ID NO:203的RNA或由SEQ ID NO:4的类似DNA编码的RNA相同或基本上相同的序列。

[0138] “百分比(%)核酸序列同一性”或“百分比(%)互补”就参照核苷酸序列(例如SncmtRNA序列或ASncmtRNA序列)而言定义为在比对序列并且在必要时为了实现最大百分比序列同一性而引入缺口后,并且不考虑任何保守替代作为序列同一性的一部分,候选序列(例如寡核苷酸序列)中与参照核苷酸序列中的核酸残基相同的核酸残基的百分比。可以以本领域技术内的各种方式实现为了测定百分比核酸序列同一性的比对,例如使用公众可用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件进行。本领域技术人员可以确定适合于比对序列的参数,包括在所比较的序列的全长里实现最大比对需要的任何算法。例如,如下计算给定核酸序列A针对、与、或相对于给定核酸序列B的%核酸序列同一性(或者,它可以以针对、与或相对于给定核酸序列B具有或包含某种%核酸序列同一性的给定核酸序列A叙述):

[0139] 分数X/Y的100倍

[0140] 其中X是在所述程序的A和B比对中评分为序列的相同匹配的核酸残基的数目,并且其中Y是B中的核酸残基的总数。应当领会,在核酸序列A的长度不等于核酸序列B的长度的情况中,A与B的%核酸序列同一性不会等于B与A的%核酸序列同一性。

[0141] “病症”或“疾病”指会受益于用本发明的物质/分子或方法的治疗的任何状况。这包括慢性和急性病症或疾病,包括使哺乳动物对所讨论的病症有素因的那些病理学状况。在一个实施方案中,病症或疾病是癌症。在另一个实施方案中,病症或疾病是转移性癌症。

[0142] 术语“癌症”指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长/增殖为特征的病理学状况。癌症的例子包括但不限于淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。

[0143] 术语“转移性癌症”或“癌症转移”指能够转移的原发性癌症或者已经自原发性癌症、原发性癌性组织或原发性癌性细胞(例如癌症干细胞)从身体的一部分扩散(即转移)至身体的一个或多个其它部分以形成一种或多种继发性癌症的癌症。转移性癌症或癌症转移也指已经自原发性癌症扩散至附近的组织或淋巴结的局部晚期癌症。转移性癌症包括定义为高级和/或高阶段的肿瘤,例如在前列腺癌中具有6或更高的格里森(Gleason)得分的肿瘤更可能转移。转移性癌症也指以与转移关联的一种或多种分子标志物限定的肿瘤。

[0144] 术语“复发性癌症”、“癌症的复发”、“癌症复发”或“肿瘤复发”指在改善期后癌症的复发或再现。通常,改善期是在施用疗法后,所述疗法导致癌症体征和症状的减少或消失。改善期可以是癌症的所有体征和症状的减少或消失。改善期也可以是癌症的一些,但不是全部体征和症状的减少或消失。在一些实施方案中,复发性癌症是已经对药物或疗法变得不响应或部分不响应的癌症。例如但不作限制,复发性癌症包括其第一次进展在用药物或疗法成功治疗后在缺乏任何治疗的情况中发生的患者中的癌症;在治疗后或者在治疗的60天内进展的患者中的癌症;以及在接受治疗的情况中进展的患者中的癌症。

[0145] 如本文中使用的,术语“癌症干细胞”、“癌症干细胞”或“CSC”指肿瘤细胞或癌细胞的亚群。癌症干细胞拥有与正常干细胞有关的特征,如产生特定癌症或肿瘤中找到的不同细胞类型的能力。癌症干细胞具有经由自身更新和/或分化来驱动一种或多种肿瘤的生成或形成的能力。已经在许多癌症中鉴定出癌症干细胞,所述癌症包括但不限于乳腺、脑、血液、肝、肾、宫颈、卵巢、结肠和肺癌,等等。

[0146] 如本文中使用的,“治疗/处理”指试图改变治疗的个体或细胞的天然过程的临床干预,并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。期望的治疗效果包括预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理学后果、预防或抑制转移、降低疾病进展速率、改善或减轻疾病状态、和消减或改善的预后。在一些实施方案中,使用本文中描述的寡核苷酸来预防或抑制转移。若个体显示下列一项或多项的观察到和/或测量到的降低或缺乏,则例如使用本发明的寡核苷酸成功“治疗”个体:癌细胞数目的减少或癌细胞的缺乏;肿瘤大小的缩小;抑制(即在一定程度上减缓,且优选停止)癌细胞对周围器官的浸润,包括癌症对软组织和骨的扩散;抑制(即在一定程度上减缓,且优选停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长或肿瘤复发;和/或在一定程度上缓解一种或多种与特定癌症有关的症状;降低的发病率和死亡率,以及生命质量改善等问题。

[0147] 如本文中使用的,术语“预防”包括就个体中的疾病的发生或复发而言提供防范。个体可以有病症的素因、对病症易感、或者有风险形成病症,但是尚未诊断为具有病症。在一些实施方案中,使用本文中描述的寡核苷酸来预防或抑制转移。

[0148] 如本文中使用的,“有风险”形成病症的个体可以具有或没有可检测的疾病或疾病的症状,并且可以在本文中描述的治疗方法前已经或尚未展现可检测的疾病或疾病的症状。“有风险”意指个体具有一种或多种风险因素,其是与癌症(例如转移性癌症)的形成关联的可测量参数,如本文中已知的。具有这些风险因素中的一种或多种的个体比没有这些风险因素中的一种或多种的个体具有更高的形成病症的可能性。

[0149] “个体”或“受试者”可以是脊椎动物、哺乳动物、或人。哺乳动物包括但不限于家畜(如母牛)、运动动物、宠物(如马)、灵长类、小鼠和大鼠。个体还包括伴侣动物,包括但不限于犬和猫。在一个方面,个体是人。

[0150] 如本文中使用的,“健康护理专业人员”可以包括但不限于医生、护士、内科医生助理、实验室技术人员、研究科学家、他们雇佣的文员、或者任何参与测定、诊断、帮助诊断或影响个体的治疗过程的人员。

[0151] “有效量”指有效产生期望的治疗或预防结果的以单剂或一系列剂量的部分对个体施用的治疗性化合物(如寡核苷酸或其它抗癌疗法)的量。

[0152] “治疗有效量”是至少实现特定病症的可测量改善需要的最小浓度。本文中的治疗有效量可以随如疾病状态、年龄、性别、和患者的重量、以及寡核苷酸引发个体中的期望响应的能力等因素变化。治疗有效量也可以是寡核苷酸的任何毒性或有害效应被治疗有益效应超过的量。在癌症的情况中,治疗有效量的寡核苷酸可以减少癌细胞的数目;降低肿瘤大小;抑制(即在一定程度上减缓,且优选停止)癌细胞对周围器官的浸润;抑制(即在一定程度上减缓,且优选停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减缓一种或多种与癌症有关的症状。在寡核苷酸可以阻止生长和/或杀死现有癌细胞的程度上,它可以是细胞抑制的和/或细胞毒性的。

[0153] “预防有效量”指在必需的剂量和时间段有效实现期望的预防结果的量。例如,预防有效量的本发明的寡核苷酸是至少阻止或减弱转移性癌症的至少一种症状的形成的最小浓度。

[0154] 与一种或多种别的治疗剂“组合”施用包括同时(并行)施用和以任何次序连续施用。

[0155] 术语“药物配制剂”指处于如下的形式,从而容许活性成分的生物活性变得有效,并且不含对于会接受配制剂施用的受试者而言有不可接受的毒性的别的组分的制剂。此类配制剂是无菌的。

[0156] “无菌”配制剂是无菌的或者不含所有活的微生物及其孢子。

[0157] 术语“包装插页”用于指通常包含在治疗产品的商业包装中的用法说明,其含有关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌证的信息和/或关于使用此类治疗产品的警告。

[0158] 如本文中使用的,术语“约”指对于此技术领域中的技术人员容易知道的相应数值的常见误差范围。

[0159] 意图贯穿本说明书给出的每个最大数字限制包括每个数字下限,就像此类数字下限在本文中明确书写一样。贯穿本说明书给出的每个最小数字限制会包括每个数字上限,就像此类数字上限在本文中明确书写一样。贯穿本说明书给出的每个数字范围会包括落入此类较宽数字范围内的每个较窄的数字范围,就像此类较窄的数字范围全部在本文中明确书写一样。

[0160] III.寡核苷酸和其它抗癌疗法

[0161] 人细胞表达许多独特的嵌合线粒体RNA分子。这些分子是非编码的(即已知它们不充当蛋白质翻译的模板),并且包含在5’端与反向重复序列共价连接的16S线粒体核糖体RNA。嵌合线粒体RNA分子以两种形式找到:有义和反义。

[0162] 有义嵌合非编码线粒体RNA(SncmtRNA)分子对应于自环状线粒体基因组的“H链”转录的16S线粒体核糖体RNA。与此RNA分子的5’端共价连接的是与自线粒体16S基因的“L链”转录的RNA对应的核苷酸序列或反向重复序列。SncmtRNA中的反向重复序列大小可以从约25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、

500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、或800个核苷酸或更多变化至约100-200、150-250、200-300、250-350、400-500、450-550、500-600、550-650、600-700、650-750、或700-800个核苷酸或更多，包括这些数值间的任何数目。在一个实施方案中，SncmtRNA中的反向重复序列对应于自线粒体基因组的16S基因的L链转录的RNA的815个核苷酸的片段。在另一个实施方案中，SncmtRNA中的反向重复序列对应于自线粒体基因组的16S基因的L链转录的RNA的754个核苷酸的片段。在又一个实施方案中，SncmtRNA中的反向重复序列对应于自线粒体基因组的16S基因的L链转录的RNA的694个核苷酸的片段。在另一个实施方案中，SncmtRNA对应于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、或SEQ ID NO:3。在另一个实施方案中，SncmtRNA包含选自下组的序列：SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:201和SEQ ID NO:202。

[0163] 反义嵌合非编码线粒体RNA(ASncmtRNA)分子对应于自环状线粒体基因组的“L链”转录的16S线粒体核糖体RNA。与此RNA分子的5’端共价连接的是与自线粒体16S基因的“H链”转录的RNA对应的核苷酸序列或反向重复序列。ASncmtRNA中的反向重复序列大小可以从约25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、或800个核苷酸或更多变化至约100-200、150-250、200-300、250-350、400-500、450-550、500-600、550-650、600-700、650-750、或700-800个或更多，包括这些数值间的任何数目。在另一个实施方案中，ASncmtRNA对应于SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、或SEQ ID NO:6。在另一个实施方案中，ASncmtRNA包含选自下组的序列：SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:204、和SEQ ID NO:205。

[0164] 与嵌合线粒体RNA分子相关的更多信息可参见美国专利号8,318,686，通过提及将其公开内容完整收入本文。

[0165] 在一个方面，本发明提供了一种或多种与ASncmtRNA分子或SncmtRNA分子互补的寡核苷酸，其中寡核苷酸能够与嵌合线粒体RNA分子杂交以形成在本文中公开的方法中使用的稳定双链体。在一些方面，本文中提供了使用一种或多种本文中描述的寡核苷酸来抑制个体中的癌症转移的方法。在一些方面，本文中提供了用于治疗或预防个体中的癌症复发的方法。在一些方面，本文中提供了用于治疗个体中的转移性癌症的方法。在本文中的一些实施方案中，所述个体先前已经用疗法(例如化学疗法、放射疗法、手术或其组合)治疗癌症。在一些实施方案中，本文中描述的一种或多种与ASncmtRNA分子或SncmtRNA分子互补的寡核苷酸在用于本文中公开的方法时具有下列一种或多种特征：(1)与嵌合线粒体RNA分子(即ASncmtRNA分子或SncmtRNA分子)杂交以形成稳定双链体；(2)与由肿瘤细胞表达的嵌合线粒体RNA分子杂交，并且抑制、阻滞、杀死或消除肿瘤细胞；(3)与由癌症干细胞(CSC)表达的嵌合线粒体RNA分子杂交，并且抑制、阻滞、杀死或消除CSC；(4)抑制个体(例如先前用疗法治疗癌症的个体)中的癌症转移；(5)治疗或预防个体(例如先前用疗法治疗癌症的个体)中的癌症复发；(6)治疗个体(例如先前用疗法治疗癌症的个体)中的转移性癌症；并且(7)延长先前用疗法(例如化学疗法、放射疗法、手术或其组合)治疗癌症的个体中的总体存活。

[0166] 在一个方面，本文中描述的任何方法中使用的寡核苷酸可以与本文中公开的SncmtRNA分子和/或ASncmtRNA分子互补。不限于理论，认为互补性寡核苷酸结合ncmtRNA，并且干扰细胞功能。如本文中使用的，如果寡核苷酸拥有具有足够的互补性以能够与ncmtRNA杂交以形成稳定双链体的序列，那么寡核苷酸序列序列与ncmtRNA的部分“互补”，如本文中提及的。杂交的能力会取决于互补性程度和寡核苷酸长度两者。一般地，杂交寡核

苷酸越长，它可以含有并且仍形成稳定双链体的与ncmtRNA的碱基错配越多。在一些方面，依照本文中公开的方法使用的一种或多种寡核苷酸的长度是至少8(如至少9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50或更多个)碱基对。本领域技术人员可以通过使用标准规程测定杂交复合物的熔点来确定错配的可容许程度。在一些实施方案中，一种或多种寡核苷酸与本文中公开的SncmtRNA分子和/或ASncmtRNA分子至少85％(如至少86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、或100％)互补。在一些实施方案中，互补性寡核苷酸是反义寡核苷酸。在一个实施方案中，一种或多种寡核苷酸与由选自下组的核酸序列编码的一种或多种ncmtRNA互补:SEQ ID NO:1-6。在一些实施方案中，一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:7-198。在一些实施方案中，一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:36、197和198。在一些实施方案中，一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:36、197和198。

[0167] a.寡核苷酸修饰

[0168] RNA和DNA的天然存在的核苷间连接是3’至5磷酸二酯连接。用于依照本文中公开的任何方法抑制癌症转移、治疗或预防癌症复发、或治疗转移性癌症的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)可以具有一个或多个经修饰的(即非天然存在的)核苷间连接。就治疗剂而言，由于期望的特性，如例如增强的细胞摄取、增强的对靶核酸的亲和力、和在存在体液中存在的核酸酶的情况中增加的稳定性，相对于具有天然存在的核苷间连接的寡核苷酸，经常选择经修饰的核苷间连接。

[0169] 具有经修饰的核苷间连接的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)包括保留磷原子的核苷间连接及没有磷原子的核苷间连接。代表性的含有磷的核苷间连接包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯和硫代磷酸酯。制备含有磷的和非含磷的连接的方法是本领域中公知的。

[0170] 在一个实施方案中，靶向本文中公开的SncmtRNA分子和/或ASncmtRNA分子的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)包含一个或多个经修饰的核苷间连接。在一些实施方案中，经修饰的核苷间连接是硫代磷酸酯连接。

[0171] 如本领域中已知的，核苷是碱基-糖组合。核苷的碱基部分通常是杂环碱基。两种最常见种类的此类杂环碱基是嘌呤和嘧啶。核苷酸是进一步包含与核苷的糖部分共价连接的硫酸根基团的核苷。对于那些包含戊呋喃糖基糖的核苷，硫酸根基团可以与糖的2’、3’或5’羟基模块连接。在形成寡核苷酸中，硫酸根基团将相邻的核苷彼此连接以形成线性聚合化合物。继而，可以进一步连接此线性聚合结构的相应末端以形成环状结构，然而，开放的线性结构一般是优选的。在寡核苷酸结构内，硫酸根基团通常称为形成寡核苷酸的核苷间主链。RNA和DNA的正常连接或主链是3’至5’磷酸二酯连接。

[0172] 可用于本发明的方法的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)的具体的但非限制性的例子包括含有经修饰的主链或非天然核苷间连接的寡核苷酸。如本说明书中定义的，具有经修饰的主链的寡核苷酸包含那些在主链中保留磷原子的和那些在主链中没有磷原子的。出于本说明书的目的，并且如本领域中有时提及的，可认为在其核苷间主链中没有磷原子的经修饰的寡核苷酸也是寡核苷。

[0173] 在一些实施方案中，经修饰的寡核苷酸主链包括例如具有正常3'-5'连接的硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、膦酸甲酯和其它膦酸烃基酯(包括3'-烯基膦酸酯、5'-烯基膦酸酯和手性膦酸酯)、亚膦酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯、硫羰-氨基磷酸酯)、硫羰烷基膦酸酯、硫羰烷基磷酸三酯、硒代磷酸酯和硼代磷酸酯，这些的2'-5'连接的类似物，以及那些具有反向极性的，其中一个或多个核苷酸间连接是3'至3'、5'至5'或2'至2'连接。具有反向极性的寡核苷酸包含在最3'的核苷酸间连接处包含单一3'至3'连接，即也可以采用单一反向核苷残基，其可以是无碱基的(核碱基是缺少的或具有替代它的羟基基团)。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。其中不包含磷原子的寡核苷酸主链具有由短链烷基或环烷基核苷间连接、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连接、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连接形成的主链。这些包括那些具有吗啉代连接(部分由核苷的糖部分形成)；硅氧烷主链；硫化物、亚砜和砜主链；甲乙酰基(formacetyl)和硫代甲乙酰基(thioformacetyl)主链；亚甲基甲乙酰基和硫代甲乙酰基主链；核乙酰基(riboacetyl)主链；含有烯的主链；氨基磺酸酯主链；亚甲基亚胺和亚甲基肼基主链；磺酸酯和磺酰胺主链；酰胺主链以及其它具有混合的N、O、S和CH_2组成部分的骨架的。

[0174] 在其它实施方案中，用新颖的基团替换核苷酸单元的糖和核苷间连接(即主链)两者。维持碱基单元以与合适的核酸靶化合物杂交。一种此类寡聚化合物寡核苷酸模拟物称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中，用含有酰胺的主链，特别是氨基乙基甘氨酸主链替换寡核苷酸的糖主链。核碱基得到保留，并且与主链的酰胺部分的氮杂氮原子直接或间接结合。教导制备PNA化合物的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262，通过提及将每篇收入本文。PNA化合物的进一步教导可以参见Nielsen等，Science,254:1497-1500,1991。

[0175] 教导制备上述含有磷的和非含磷的连接的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,194,599;5,565,555;5,527,899;5,721,218;5,672,697和5,625,050,5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;5,792,608;5,646,269和5,677,439，通过提及将每篇收入本文。

[0176] 与本文中公开的任何方法(例如抑制癌症转移的方法)组合的用作抗癌疗法的与SncmtRNA和/或ASncmtRNA互补的经修饰的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)还可以包含一个或多个取代的糖模块。例如，可以以多种方式修饰呋喃糖基糖环，包括用取代基基团取代、桥接以形成二环核酸"BNA"和用杂原子(如S或N(R))取代4'-O，如记载于美国专利号7,399,845，在此通过提及将其完整收入本文。BNA的其它例子记载于公布的国际专利申请号WO2007/146511，在此通过提及将其完整收入本文。

[0177] 任选地，在本文中公开的方法(例如抑制癌症转移的方法)中使用的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)可以含有一个或多个具有经修饰的糖模块的核苷酸。糖修饰可以对反义化合物赋予核酸酶稳定性、结合亲和力或一些其它有益的生物学特性。可以以多种方式修饰核苷的呋喃糖基糖环，包括但不限于：添加取代基基团，特别是在2'位处；桥接两个非成对环原子以形成二环核酸(BNA)；以及用原子或基团如—S—、—N(R)—或—C(R1)(R2)取代4'位的环氧。经修饰的糖包括但不限于：取代的糖，特别是具有2'-F、2'-OCH_2(2'-OMe)或

2'-O(CH$_2$)$_2$-OCH$_3$(2'-O-甲氧基乙基或2'-MOE)取代基基团的2'-取代的糖;和经修饰的二环糖(BNA),其具有4'-(CH$_2$)n-O-2'桥,其中n=1或n=2。用于制备经修饰的糖的方法是本领域技术人员公知的。

[0178] 在某些实施方案中,2'-修饰的核苷具有二环糖模块。在某些此类实施方案中,二环糖模块是α构型的D糖。在某些此类实施方案中,二环糖模块是β构型的D糖。在某些此类实施方案中,二环糖模块是α构型的L糖。在某些此类实施方案中,二环糖模块是β构型的L糖。

[0179] 在其它实施方案中,二环糖模块包含介于2'和4'-碳原子之间的桥基团。在某些此类实施方案中,桥基团包含1至连接的双基基团。在某些实施方案中,二环糖模块包含1至4个连接的双基基团。在某些实施方案中,二环糖模块包含2或3个连接的双基基团。在某些实施方案中,二环糖模块包含2个连接的双基基团。在某些实施方案中,连接的双基基团选自:—O—、—S—、—N(R1)-、—C(R1)(R2)-、—C(R1)=C(R1)-、—C(R1)=N—、—C(=NR1)-、—Si(R1)(R2)-、—S(=O)2—、—S(=O)—、—C(=O)—和—C(=S)—;其中R1和R2各自独立是H、羟基、C1-C12烷基、取代的C1-C12烷基、C2-C12烯基、取代的C2-C12烯基、C2-C12炔基、取代的C2-C12炔基、C5-C20芳基、取代的C5-C20芳基、杂环根、取代的杂环根、杂芳基、取代的杂芳基、C5-C7脂环根、取代的C5-C7脂环根、卤素、取代的氧基(—O—)、氨基、取代的氨基、叠氮基、羧基、取代的羧基、酰基、取代的酰基、CN、硫醇、取代的硫醇、磺酰基(S(=O)2-H)、取代的磺酰基、亚磺酰基(sulfoxyl)(S(=O)—H)或取代的亚磺酰基;并且每个取代基基团独立是卤素、C1-C12烷基、取代的C1-C12烷基、C2-C12烯基、取代的C2-C12烯基、C2-C12炔基、取代的C2-C12炔基、氨基、取代的氨基、芳基、取代的芳基、C1-C12氨基烷基、C1-C12氨基烷氧基、取代的C1-C12氨基烷基、取代的C1-C12氨基烷氧基或保护基。

[0180] 本文中公开的任何方法(例如抑制癌症转移的方法)中使用的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)也可以包含核碱基(在本领域中经常简称为"碱基")修饰或取代。核碱基修饰或取代与天然存在的或合成的未修饰的核碱基是结构上可区别,但功能上可互换的。天然的和经修饰的核碱基两者都能够参与氢键键合。此类核碱基修饰可以对寡核苷酸化合物赋予核酸酶稳定性、结合亲和力或一些其它有益的生物学特性。经修饰的核碱基包含合成的和天然的核碱基,如例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)。某些核碱基取代(包括5-甲基胞嘧啶取代)特别可用于提高寡核苷酸化合物(如反义寡核苷酸化合物)对靶核酸(如ncmtRNA)的结合亲和力。

[0181] 别的未修饰的核碱基包括5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(—C≡C—CH$_3$)尿嘧啶和胞嘧啶和嘧啶碱基的其它烷炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代,特别是5-溴代、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0182] 杂环碱基模块也可以包含如下那些,其中嘌呤或嘧啶碱基用其它杂环替换,例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。特别可用于提高反义化合物的结合亲和力的核碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2氨基

丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。

[0183] 如本文中使用的，“未修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)、和嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。

[0184] 经修饰的核碱基包括其它合成的和天然的核碱基，如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(—C≡C—CH_3)尿嘧啶和胞嘧啶嘧啶碱基的其它烷炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代，特别是5-溴代、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。其它经修饰的核碱基包括三环嘧啶，如吩噁嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、O-夹，如取代的吩噁嗪胞苷(例如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、咔唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-2-酮)、吡啶吲哚胞苷(H-吡啶并[3’,2’:4,5]吡咯[2,3-d]嘧啶-2-酮)。经修饰的核碱基也可以包含如下那些，其中嘌呤或嘧啶碱基用其它杂环替换，例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。别的核碱基包括那些披露于美国专利号3,687,808的、那些披露于The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,第858-859页,Kroschwitz,J.I.编John Wiley&Sons,1990的、那些由Englisch等,Angewandte Chemie,International Edition,1991,30,613披露的、及那些由Sanghvi,Y.S.,第15章,Antisense Research and Applications,第289-302页,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编,CRC Press,1993披露的。

[0185] 教导制备某些上文记录的经修饰的核碱基及其它经修饰的核碱基的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121,5,596,091;5,614,617;5,645,985;5,830,653;5,763,588;6,005,096;和5,681,941,通过提及将每篇收入本文。

[0186] b.核酶

[0187] 在本发明的另一个实施方案中，可以使用核酶来干扰本文中描述的ncmtRNA分子以诱导与转移有关的增殖性细胞(例如CSC)的细胞死亡。可以依照ASncmtRNA的序列(例如与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、或SEQ ID NO:6对应的序列，或包含SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:204、或SEQ ID NO:205的序列)或SncmtRNA(例如与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、或SEQ ID NO:3对应的序列，或包含SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:202、或SEQ ID NO:203的序列)设计核酶的序列以切割转录物的特定区域。核酶是能够催化RNA的特异性切割的酶促RNA分子(Rossi,Curr.Biology 4:469-471,1994)。核酶作用的机制牵涉核酶分子与互补靶RNA的序列特异性杂交，接着是内切核水解切割。核酶分子的组成必须包含一种或多种与RNA互补的序列，并且必须包含负责RNA切割并且记载于美国专利号5,093,246(通过提及将其公开内容完整收入本文)的公知的催化序列。因此，在本发明的范围内，可以工程化改造锤头核酶分子，其特异性且有效催化对本文中公开的ASncmtRNA或SncmtRNA分子的内切核水解切割。锤头核酶的构建和生成是本领域中公知的，并且它得到描述(Haseloff等,Gene,82:43-52,

1989)。本发明的核酶也可以包含RNA内切核糖核酸酶(Zaug等,Science,224:574-578,1984)。在一些实施方案中,可以在本文中描述的任何方法中使用本文中描述的核酶。在一些实施方案中,抑制个体中的癌症转移的方法包括对个体施用有效量的本文中描述的一种或多种核酶。在一些实施方案中,用于治疗或预防个体中的癌症复发的方法包括对个体施用有效量的本文中描述的一种或多种核酶。在一些实施方案中,用于治疗个体中的转移性癌症的方法包括对个体施用有效量的本文中描述的一种或多种核酶。在一些实施方案中,用于治疗个体中的难治性癌症(例如难治性HPV关联癌症)的方法包括对个体施用有效量的本文中描述的一种或多种核酶。在一些实施方案中,所述个体先前已经用疗法(例如化学疗法、放射疗法、手术或其组合)治疗癌症。

[0188] c.RNA干扰

[0189] 在另一个方面,可以通过RNA干扰或RNA沉默来实现本文中公开的任何方法(例如抑制癌症转移的方法)中使用的干扰本文中公开的ASncmtRNA和/或SncmtRNA分子的功能。RNA干扰(RNAi)已经作为一种用于哺乳动物细胞中的基因沉默的新颖且有希望的方法出现(Elbashir等,Nature 411:494-498,2001;McManus等,Nature Rev.Genet.3:737-747,2002)。长度约8至40(如约10至36、14至32、18-28、或22-24)碱基对(bp)或至少约8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40bp的合成方式合成的双链RNA分子与其互补的靶RNA特异性杂交,从而导致RNA的降解。已经通过小干扰RNA或siRNA成功沉默几种不同基因(Lu等,Curr.Opin.Mol.Ther.5:225-234,2003;Wacheck等,Oligonucleotides 13:393-400,2003)。因此,可以使用靶向本文中公开的ASncmtRNA和/或SncmtRNA分子的合成的双链RNA来降解这些转录物,并诱导癌细胞死亡(例如CSC死亡)。本领域技术人员会理解siRNA的序列必须与ASncmtRNA和/或SncmtRNA分子的任何区域互补(如同与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和/或SEQ ID NO:6对应的任一种序列互补,或者与包含SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:202、SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:204、和/或SEQ ID NO:205的任一种序列互补)。在一些实施方案中,可以在本文中描述的任何方法中使用本文中描述的RNA。在一些实施方案中,抑制个体中的癌症转移的方法包括对个体施用有效量的一种或多种本文中描述的RNA。在一些实施方案中,用于治疗或预防个体中的癌症复发的方法包括对个体施用有效量的一种或多种本文中描述的RNA。在一些实施方案中,用于治疗个体中的转移性癌症的方法包括对个体施用有效量的一种或多种本文中描述的RNA。在一些实施方案中,用于治疗个体中的难治性癌症(例如难治性HPV关联癌症)的方法包括对个体施用有效量的一种或多种本文中描述的RNA。在一些实施方案中,所述个体先前已经用疗法(例如化学疗法、放射疗法、手术或其组合)治疗癌症。

[0190] d.寡核苷酸投递

[0191] 在一个实施方案中,可以使用重组载体来对个体投递一种或多种与有义和/或反义嵌合非编码线粒体RNA分子互补的寡核苷酸(如本文中公开的任何寡核苷酸)。这可以包括系统性投递和局限于身体的特定区域(如骨髓)的投递两者。本文中涵盖任何下述载体,该载体能够实现一种或多种与有义或反义嵌合ncmtRNA分子互补的寡核苷酸的重组生成和/或可以将一种或多种与有义或反义嵌合ncmtRNA分子互补的寡核苷酸投递入宿主细胞中。载体可以是RNA或DNA(原核的或真核的),并且通常是病毒或质粒。载体可以是DNA疫苗

的部分或者用作用于投递宿主细胞中表达的异源基因的任何其它方法的部分，所述方法对于本领域技术人员是已知的。重组载体能够在转化入合适的宿主细胞中时复制。病毒载体感染一大批非分裂人细胞，并且已经广泛用于活疫苗而没有不利的副作用。病毒载体(如但不限于腺病毒载体或腺伴随病毒(AAV)载体(例如AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6等或包含它们的杂合AAV载体)是用于将一种或多种与有义或反义嵌合ncmtRNA分子互补的寡核苷酸投递至癌细胞(如浆细胞；见例如美国专利申请公开号2004/0224389，通过提及将其公开内容收入本文，或CSC)的本方法中使用的载体的例子。在一些实施方案中，可以在本文中描述的任何方法中使用本文中描述的重组载体(例如病毒载体)。在一些实施方案中，抑制个体中的癌症转移的方法包括对个体施用有效量的包含一种或多种本文中描述的寡核苷酸的重组载体(例如病毒载体)。在一些实施方案中，用于治疗或预防个体中的癌症复发的方法包括对个体施用有效量的包含一种或多种本文中描述的寡核苷酸的重组载体(例如病毒载体)。在一些实施方案中，用于治疗个体中的转移性癌症的方法包括对个体施用有效量的包含一种或多种本文中描述的寡核苷酸的重组载体(例如病毒载体)。在一些实施方案中，用于治疗个体中的难治性癌症(例如难治性HPV关联癌症)的方法包括对个体施用有效量的包含一种或多种本文中描述的寡核苷酸的重组载体(例如病毒载体)。在一些实施方案中，所述个体先前已经用疗法(例如化学疗法、放射疗法、手术或其组合)治疗癌症。

[0192] 在另一个方面，在微载体内包囊一种或多种与有义和/或反义嵌合非编码线粒体RNA分子互补的寡核苷酸(如本文中公开的任何寡核苷酸)以对个体投递。在某些实施方案中，可以在微载体内包囊与有义和/或反义嵌合非编码线粒体RNA分子互补的不同寡核苷酸(如本文中公开的任何寡核苷酸)的混合物，使得微载体包囊超过一个寡核苷酸种类。在一些实施方案中，微载体内包囊的一种或多种与有义和/或反义嵌合非编码线粒体RNA分子互补的寡核苷酸(如本文中公开的任何寡核苷酸)包含选自下组的核酸序列：SEQ ID NO:7-198。在一些实施方案中，微载体内包囊的一种或多种与有义和/或反义嵌合非编码线粒体RNA分子互补的寡核苷酸(如本文中公开的任何寡核苷酸)包含选自下组的核酸序列：SEQ ID NO:36、197和198。

[0193] 在微载体中包囊寡核苷酸的方法是本领域中公知的，并且记载于例如国际申请WO98/55495。胶体分散系统(如微球、珠、大分子复合物、纳米颗粒)和基于脂质的系统(如水包油乳剂、胶束、混合的胶束和脂质体)可以提供寡核苷酸在微载体组合物内的有效包囊。包囊组合物可以进一步包含极其多种组分之任一种。这些包括但不限于明矾、脂质、磷脂、脂质膜结构(LMS)、聚乙二醇(PEG)和其它聚合物，如多肽、糖肽、和多糖。

[0194] 其它抗癌疗法

[0195] 在一些方面，本文中描述的任何治疗方法可以包括对个体施用一种或多种别的抗癌疗法。在一些实施方案中，一种或多种抗癌疗法选自下组：化学疗法、放射疗法、和手术。化学疗法和抗癌剂在本文中可互换使用。可以使用各种类别的抗癌剂。非限制性例子包括：烷化剂、抗代谢物、蒽环类、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂、鬼臼毒素、抗体(例如单克隆或多克隆)、酪氨酸激酶抑制剂(例如甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)(Gleevec®或Glivec®))、激素治疗、可溶性受体和其它抗肿瘤药。

[0196] 拓扑异构酶抑制剂也是可以在本文中使用的另一类抗癌剂。拓扑异构酶是维持DNA的拓扑学的必需酶。对I型或II型拓扑异构酶的抑制通过扰乱正确的DNA超螺旋化来干

扰DNA的转录和复制两者。一些I型拓扑异构酶抑制剂包括喜树碱:伊立替康和托泊替康。II型抑制剂的例子包括安吖啶(amsacrine)、依托泊苷、磷酸依托泊苷、和替尼泊苷(teniposide)。这些是表鬼臼毒素(美洲鬼臼(American Mayapple)(盾叶鬼臼(Podophyllum peltatum))的根中天然存在的生物碱)的半合成衍生物。

[0197] 抗肿瘤药包括免疫抑制剂更生霉素(dactinomycin)、多柔比星、表柔比星(epirubicin)、博来霉素(bleomycin)、氮芥(mechlorethamine)、环磷酰胺、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、异环磷酰胺(ifosfamide)。抗肿瘤药化合物一般通过化学修饰细胞的DNA来起作用。

[0198] 烷化剂可以在细胞中存在的条件下使许多亲核性官能团烷化。顺铂和卡铂及奥沙利铂(oxaliplatin)是烷化剂。它们通过与生物学重要的分子中的氨基、羧基、硫氢基和磷酸根基团形成共价键损害细胞功能。

[0199] 长春花生物碱结合微管蛋白上的特定位点,从而抑制微管蛋白装配成微管(细胞周期的M阶段)。长春花生物碱包括:长春新碱、长春碱、长春瑞滨、和长春地辛。

[0200] 抗代谢物类似于嘌呤(硫唑嘌呤、巯嘌呤)或嘧啶,并且阻止这些物质在细胞周期的“S”阶段期间被掺入DNA中,从而停止正常的发育和分裂。抗代谢物也影响RNA合成。

[0201] 植物生物碱和萜类化合物自植物衍生,并且通过阻止微管功能来阻断细胞分裂。由于微管对于细胞分裂是至关重要的,在没有它们的情况中不能发生细胞分裂。主要的例子是长春花生物碱类和紫杉烷类。

[0202] 鬼臼毒素是一种植物衍生的化合物,已经报告了它帮助消化并且已经用于生成两种其它细胞抑制性药物依托泊苷和替尼泊苷(teniposide)。它们阻止细胞进入G1阶段(开始DNA复制)和DNA的复制(S阶段)。

[0203] 作为组的紫杉烷类包括帕西多赛和多西他赛。帕西多赛是一种天然的产物,最初称为泰素(Taxol)并且首先自短叶紫杉(Pacific Yew)树的树皮衍生。多西他赛是帕西多赛的半合成类似物。紫杉烷类增强微管的稳定性,从而阻止后期期间的染色体分离。

[0204] 在一些方面,抗癌剂可以选自类克、多西他赛、塞来昔布、美法仑、地塞米松(Decadron®)、steroids、吉西他滨、顺铂、替莫唑胺、依托泊苷、环磷酰胺、temodar、卡铂、丙卡巴肼、gliadel、他莫昔芬、托泊替康、甲氨蝶呤、吉非替尼(Iressa®)、泰素、泰索帝、氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、希罗达、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α(例如PEG INTRON-A)、卡培他滨、顺铂、塞替派、氟达拉滨、卡铂、脂质体柔红霉素、阿糖胞苷、doxetaxol、帕西他赛、长春碱、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪、长春瑞滨、唑来膦酸、palmitronate、biaxin、白消安、泼尼松、硼替佐米(Velcade®)、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱、多柔比星(Doxil®)、帕西多赛、更昔洛韦、阿霉素、雌莫司汀磷酸钠(Emcyt®)、舒林酸、或依托泊苷。

[0205] 在其它实施方案中,抗癌剂可以选自:硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺或长春新碱。

[0206] 在一些方面,一种或多种抗癌疗法是放射疗法。如本文中使用的,术语“放射疗法”指施用放射以杀死癌性细胞。放射与细胞中的分子(如DNA)相互作用以诱导细胞死亡。放射还可以损伤细胞膜和核膜和其它细胞器。根据放射类型,DNA损伤的机制可以变化,相对生物效率亦然。例如,重粒子(即质子、中子)直接损伤DNA,并且具有较大的相对生物效率。电

磁辐射经由主要通过细胞水的离子化生成的短寿命的羟基自由基导致间接的离子化作用。放射的临床应用由外部束放射(来自外部来源)和近程治疗(使用植入或插入患者中的放射源)组成。外部束放射由X-射线和/或γ射线组成,而近程治疗采用放射性核,其衰变并发射α粒子,或β粒子以及γ射线。本文中也涵盖的放射包括例如放射性同位素对癌细胞的定向投递。本文中还涵盖DNA损伤性因素的其它形式,如微波和UV照射。

[0207] 放射可以以单剂或者在剂量分级日程表中以一系列小剂量给予。本文中涵盖的放射量的范围为约1至约100Gy,包括例如约5至约80、约10至约50Gy、或约10Gy。可以在分级方案中应用总剂量。例如,方案可以包括2Gy的分级个别剂量。放射性同位素的剂量范围广泛变化,并且取决于同位素的半衰期和发射的放射的强度和类型。在放射包括使用放射性同位素时,可以将同位素与靶向剂(如治疗性抗体)缀合,所述靶向剂将放射性核苷酸携带至靶组织(例如肿瘤组织)。合适的放射性同位素包括但不限于砹^{211}、^{14}碳、^{51}铬、^{36}氯、^{57}铁、^{58}钴、铜^{67}、^{152}铕(Eu)、镓^{67}、ˆ氢、碘^{123}、碘^{131}、铟^{111}、^{59}离子、^{32}磷、铼^{186}、^{75}硒、^{35}硫、锝(technicium)^{99m}、和/或钇°。

[0208] 本文中描述的手术包括切除,其中以物理方式除去、切除和/或破坏全部或部分癌性组织。肿瘤切除指物理除去肿瘤的至少一部分。在肿瘤切除外,通过手术的治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术、和显微镜下控制的手术(Mohs手术)。本文中还涵盖除去癌前期(precancer)或正常的组织。

[0209] 干细胞移植和自体造血干细胞的离体处理

[0210] 在其它方面,本文中描述的任何治疗方法可以包括自体或同种干细胞移植疗法。在最近几年中,伴有自体造血干细胞移植的高剂量化学疗法已经变为某些癌症(如多发性骨髓瘤、非何杰金淋巴瘤、何杰金淋巴瘤、和白血病)的优选治疗。虽然不是治愈的,但是此规程的确延长总体存活和完全消减。在干细胞移植前,患者接受诱导化学疗法的初始过程。目前使用的最常见的诱导方案是沙利度胺-地塞米松、基于硼替佐米的方案、和来那度胺-地塞米松(Kyle&Rajkumar,Blood,111(6):2962-72,2008)。例如,自体外周干细胞移植可用于多达50%的多发性骨髓瘤患者。尽管死亡率较低,但是关于此类移植物疗法的问题包括不能根治肿瘤和难以从用于移植的干细胞集合除去骨髓瘤细胞及其前体。

[0211] 同种移植物(将健康个体的干细胞移植入受累个体中)是用于治疗某些癌症(如多发性骨髓瘤、非何杰金淋巴瘤、何杰金淋巴瘤、和白血病)的另一种疗法选项,但是由于它不能提供治愈而不太常用。例如,评估其在多发性骨髓瘤患者中的使用的大多数研究表明10-20%的长期无疾病存活,相当大部分的患者形成复发。

[0212] 在作为用于依照本文中公开的任何方法抑制或阻止转移的治疗包括在内时,自体干细胞移植也可以包括在移植入受累个体中前用本文中公开的任何抗癌剂处理要移植入受累个体中的造血干细胞和/或骨髓的步骤。在一个实施方案中,可以在移植入受累个体中前用有效量的一种或多种寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)处理自体干细胞移植中使用的造血干细胞和/或骨髓,所述寡核苷酸与ASncmtRNA或SncmtRNA分子(例如本文中公开的ASncmtRNA和/或SncmtRNA分子中的任一种)充分互补以形成稳定双链体。在另一个实施方案中,一种或多种寡核苷酸与一种或多种由选自下组的核酸序列编码的ncmtRNA充分互补以形成稳定双链体:SEQ ID NO:1-6。在其它实施方案中,所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:7-198。在一些实施方案中,所述一种或多种寡核苷酸包含

选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:36、197和198。

[0213] 已经显示了也可以使用骨髓或造血干细胞的自体移植来治疗几种形式的血液学癌症(如但不限于多发性骨髓瘤、白血病和淋巴瘤)。因而,在一些方面,在作为血液学癌症的治疗包括在内时,本文中提供了实施自体干细胞移植的方法,其包括在移植入受累个体中前用本文中公开的任何抗癌剂处理要移植入受累个体中的造血干细胞和/或骨髓的步骤。在一个实施方案中,可以在移植入受累个体中前用有效量的一种或多种寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)处理自体干细胞移植中使用的造血干细胞和/或骨髓,所述寡核苷酸与ASncmtRNA或SncmtRNA分子(例如本文中公开的ASncmtRNA和/或SncmtRNA分子中的任一种)充分互补以形成稳定双链体。在另一个实施方案中,一种或多种寡核苷酸与一种或多种由选自下组的核酸序列编码的ncmtRNA充分互补以形成稳定双链体:SEQ ID NO:1-6。在其它实施方案中,所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:7-198。在一些实施方案中,所述一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:36、197和198。

[0214] IV.组合物

[0215] 可以以组合物(例如药物组合物)的形式施用本文中公开的任何抗癌剂(如基于寡核苷酸的药剂)。可以通过经由各种路径的系统性施用或局部施用施用这些化合物。可用于特定应用的施用路径对于本领域技术人员是明显的。施用路径包括但不限于口服、直肠、脑脊髓、经皮、皮下、表面、经粘膜、鼻咽、肺、静脉内、肌肉内、和鼻内。在一些实施方案中,施用是局部施用。在一些实施方案中,局部施用选自下组:器官、腔、组织的施用、和皮下施用。在一些实施方案中,施用是系统(全身)性施用。在一些实施方案中,系统性施用是静脉内或腹膜内施用。这些化合物作为可注射和口服组合物两者是有效的。此类组合物以药学领域中公知的方式制备,并且包含至少一种活性化合物。本文中的组合物在必要时还可以含有用于治疗的特定适应症的超过一种活性化合物,优选那些具有彼此没有不利影响的互补活性的。在作为口服组合物采用时,通过药学可接受保护剂保护寡核苷酸和本文中公开的其它抗癌剂免于胃中的酸消化。

[0216] 本发明还包括药物组合物,其含有与一种或多种药学可接受赋形剂或载体结合的一种或多种本文中公开的抗癌剂作为活性成分。在生成本发明的组合物中,通常将活性成分与赋形剂或载体混合,通过赋形剂或载体稀释或者在此类赋形剂或载体内密封,这可以为胶囊、囊剂、纸或其它容器形式。在赋形剂或载体充当稀释剂时,它可以是固体、半固体、或液体材料,其起活性成分的媒介物、载体或介质作用。如此,组合物可以为含有例如多达10%(按重量计)活性化合物的片剂、丸剂、粉末、锭剂、囊剂、扁囊剂、酏剂、悬浮液、乳剂、溶液、糖浆剂、气溶胶(为固体或在液体介质中)、软膏剂、软和硬明胶胶囊、栓剂、无菌可注射溶液、和无菌包装粉末的形式。

[0217] 在一些实施方案中,在制备配制剂中,可能有必要在与其它成分组合前碾磨活性冻干化合物以提供合适的粒度。若活性化合物基本上不可溶,则通常将其碾磨至小于200目(mesh)的粒度。若活性化合物是基本上水溶性的,则通常通过碾磨来调节粒度以提供配制剂中的基本上一致的分布,例如约40目。

[0218] 合适的赋形剂或载体的一些例子包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、黄蓍胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维

素、无菌水、糖浆和甲基纤维素。另外，配制剂可以包含：润滑剂，如滑石、硬脂酸镁和矿物油；湿润剂；乳化和悬浮剂；防腐剂，如苯甲酸甲酯和羟基苯甲酸丙酯；甜味剂；和芳香剂。可以配制本发明的组合物，从而在通过采用本领域中已知的规程对患者施用后提供活性成分的快速、持续或延迟的释放。

[0219] 可以以单位剂量形式配制组合物，每剂含有约5mg至约100mg或更多，如下列任一项：约1mg至约5mg、1mg至约10mg、约1mg至约20mg、约1mg至约30mg、约1mg至约40mg、约1mg至约50mg、约1mg至约60mg、约1mg至约70mg、约1mg至约80mg、或约1mg至约90mg(包括端点)，包括这些数值间的任何范围的活性成分。术语“单位剂量形式”指适合作为个体的单位剂量的物理离散单位，每个单位含有计算为与合适的药用赋形剂或载体结合产生期望的治疗效果的活性材料的预先确定量。

[0220] 本文中公开的抗癌剂(如基于寡核苷酸的药剂)在宽的剂量范围里是有效的，并且一般以治疗有效量施用。然而，应当理解，内科医生会根据相关情况(包括要治疗的状况、选择的施用路径、施用的实际化合物、个体患者的年龄、重量和响应、患者症状的严重性等)确定实际施用的抗癌剂的量。

[0221] 为了制备固体组合物(如片剂)，将主要的活性成分抗癌疗法与药用赋形剂或载体混合以形成含有本发明化合物的同质混合物的固体配制前组合物。在将这些配制前组合物称为同质时，意指活性成分贯穿组合物均匀分散，从而可以容易地将组合物细分成同等有效的单元剂量形式，如片剂、丸剂和胶囊。

[0222] 可以包被或以其它方式混合本发明的片剂或丸剂以提供给予延长作用的优点的剂量形式以及保护抗癌疗法(如寡核苷酸)免于胃中的酸水解。例如，片剂或丸剂可以包含内部剂量和外部剂量组分，后者为前者的包被形式。两种组分可以通过肠层分开，所述肠层用来抵抗在胃中的分解，并且容许内部组分完整通入十二指肠中或者在释放上延迟。多种材料可以用于此类肠层或者涂层材料，此类材料包括多种聚合酸(polymeric acid)和聚合酸与如紫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素等材料的混合物。

[0223] 可掺入本发明的组合物以口服或通过注射施用的液体形式包含水性溶液、适当调味的糖浆剂、水性或油悬浮液、和具有食用油(如玉米油、棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油)的调味乳剂、及酏剂和类似的药用媒介物。

[0224] 胃肠外施用路径包括但不限于直接注射入中枢静脉管道中、静脉内、肌肉内、腹膜内、皮内、或皮下注射。适合于胃肠外施用的寡核苷酸(例如寡核苷酸和微载体配制剂)配制剂一般在USP水或注射用水中配制，并且可以进一步包含pH缓冲剂、盐膨胀剂、防腐剂、和其它药学可接受的赋形剂。可以在药学可接受的无菌等张溶液(如注射用盐水和磷酸盐缓冲盐水)中配制供胃肠外注射的寡核苷酸(例如为寡核苷酸微载体复合物或囊粒)。

[0225] 用于吸入或吹入的组合物包括药学可接受的水性或有机溶剂或其混合物中的溶液和悬浮液和粉末。液体或固体组合物可以含有合适的药学可接受的赋形剂，如本文中描述的。可以通过口服或鼻呼吸路径施用组合物以实现局部或系统效应。可以通过使用惰性气体喷雾药学可接受溶剂中的组合物。可以从喷雾装置直接吸入喷雾的溶液或者喷雾装置可以与面罩帷罩，或间歇正压呼吸机附接。也可以从以合适的方式投递配制剂的装置口服或鼻施用溶液、悬浮液或粉末组合物。

[0226] V.治疗方法

[0227] A.用于抑制或阻止癌症转移的方法

[0228] 在一个方面，本文中提供了在抑制或阻止个体中的癌症转移中使用的一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。在另一个方面，本文中提供了与至少一种用于抑制或阻止个体中的癌症转移的疗法组合使用的一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。在本文中的任何方面，所述个体先前可以已经用疗法治疗癌症。

[0229] 在一些方面，本发明提供了用于抑制个体中的癌症转移的方法，其包括对个体施用有效量的本文中描述的一种或多种寡核苷酸，其中寡核苷酸能够与嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体，并且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。在别的实施方案中，用于抑制个体中的癌症转移的方法包括与本文中公开的至少一种疗法组合施用一种或多种寡核苷酸。在一些实施方案中，至少一种疗法选自下组：抗癌剂、放射疗法、手术、同种干细胞移植疗法、和自体干细胞移植疗法。在本文中的一些实施方案中，所述个体先前已经用包含化学疗法、放射疗法、手术或其组合的疗法治疗癌症。在一些实施方案中，先前已经用下列一种或多种治疗个体：硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺和长春新碱。在本文中的任何实施方案中，序贯施用寡核苷酸和至少一种疗法。例如，可以在已经从个体手术切除肿瘤之前或之后对个体施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸。在一些实施方案中，同时施用寡核苷酸和至少一种疗法。例如，可以在从个体手术切除肿瘤期间对个体施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸。

[0230] 在一些方面，本发明提供了用于预防个体中的癌症转移的方法，其包括对个体施用有效量的本文中描述的一种或多种寡核苷酸，其中寡核苷酸能够与嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体，并且其中所述个体先前已经用疗法治疗癌症。在别的实施方案中，用于抑制或阻止个体中的癌症转移的方法包括与本文中公开的至少一种疗法组合施用一种或多种寡核苷酸。在一些实施方案中，至少一种疗法选自下组：抗癌剂、放射疗法、手术、同种干细胞移植疗法、和自体干细胞移植疗法。在本文中的一些实施方案中，所述个体先前已经用包含化学疗法、放射疗法、手术或其组合的疗法治疗癌症。在一些实施方案中，先前已经用下列一种或多种治疗个体：硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺和长春新碱。在本文中的任何实施方案中，序贯施用寡核苷酸和至少一种疗法。例如，可以在已经从个体手术切除肿瘤之前或之后对个体施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸。在一些实施方案中，同时施用寡核苷酸和至少一种疗法。例如，可以在从个体手术切除肿瘤期间对个体施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸。

[0231] 作为非限制性例子，依照本发明的用于抑制或阻止癌症转移的方法可以通过施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸(或其组合物)进行，所述寡核苷酸以每天以约0.1至约100mg/kg，如约0.5、约0.9、约1.0、约1.1、约1.5、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约40、约45、约50、约60、约70、约80、约90或约100mg/kg的量的每日剂量，在启动治疗后第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40天中至少一天、或者第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周中至少一周，或其任

何组合，每24、12、8、6、4、或2小时使用单一或分开的剂量，或其任何组合提供。

[0232] 在一些实施方案中，可以与至少一种疗法(例如抗癌剂、放射疗法、手术、同种干细胞移植疗法、或自体干细胞移植疗法)组合施用一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。在一些实施方案中，序贯施用组合。例如本文中描述的一种或多种寡核苷酸可以在组合治疗期间与至少一种疗法的施用相隔约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40天、或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周施用。在一些实施方案中，同时施用组合。例如，本文中描述的一种或多种寡核苷酸可以在组合治疗期间与至少一种疗法的施用相隔约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、或59分钟或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、或24小时施用。

[0233] B.用于治疗或预防癌症复发的方法

[0234] 在其它方面，本文中提供了在治疗或预防个体中的癌症复发中使用的一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。在一些实施方案中，个体已经响应初始治疗并且在消退中。

[0235] 在一些方面，本发明提供了用于治疗或预防个体中的癌症复发的方法，其包括对个体施用有效量的本文中描述的一种或多种寡核苷酸，其中寡核苷酸能够与嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体，并且其中先前已经用疗法对个体治疗癌症。在别的实施方案中，用于治疗或预防个体中的癌症复发的方法包括与本文中公开的至少一种疗法组合施用一种或多种寡核苷酸。在一些实施方案中，至少一种疗法选自下组：抗癌剂、放射疗法、手术、同种干细胞移植疗法、和自体干细胞移植疗法。在本文中的一些实施方案中，先前已经用包含化学疗法、放射疗法、手术或其组合的疗法对个体治疗癌症。在一些实施方案中，先前已经用下列一种或多种治疗个体：硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺和长春新碱。在本文中的任何实施方案中，序贯施用寡核苷酸和至少一种疗法。例如，可以在已经从个体手术切除肿瘤之前或之后对个体施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸。在一些实施方案中，同时施用寡核苷酸和至少一种疗法。例如，可以在从个体手术切除肿瘤期间对个体施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸。

[0236] 作为非限制性例子，依照本发明的用于治疗或预防癌症复发的方法可以通过施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸(或其组合物)进行，所述寡核苷酸以每天以约0.1至约100mg/kg，如约0.5、约0.9、约1.0、约1.1、约1.5、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约40、约45、约50、约60、约70、约80、约90或约100mg/kg的量的每日剂量，在启动治疗后第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40天中至少一天、或者第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周中至少一周，或其任何组合，每24、12、8、6、4、或2小时使用单一或分开的剂量，或其任何组合提供。

[0237] 在一些实施方案中，可以与至少一种疗法(例如抗癌剂、放射疗法、手术、同种干细胞移植疗法、或自体干细胞移植疗法)组合施用一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。在一些

实施方案中，序贯施用组合。例如本文中描述的一种或多种寡核苷酸可以在组合治疗期间与至少一种疗法的施用相隔约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40天、或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周施用。在一些实施方案中，同时施用组合。例如，本文中描述的一种或多种寡核苷酸可以在组合治疗期间与至少一种疗法的施用相隔约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、或59分钟或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、或24小时施用。

[0238] 在其它实施方案中，可以使用“维持日程表”，其中以比在消退前施用的初始治疗中小的频率施用一种或多种基于寡核苷酸的(如基于反义的)维持疗法，如每周一次或每两周一次。可以将维持日程表继续固定的时间段，一般为约1或约2年，或者无限期，只要患者在继续不显示进行性疾病的体征，并且在没有重大毒性的情况中耐受治疗。

[0239] C.用于抑制转移性癌症的方法

[0240] 在又一些方面，本文中提供了在治疗个体中的转移性癌症(如复发性转移性癌症)中使用的一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。

[0241] 在一些方面，本发明提供了用于治疗个体中的转移性癌症(如复发性转移性癌症)的方法，其包括对个体施用有效量的本文中描述的一种或多种寡核苷酸，其中寡核苷酸能够与嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体，并且其中先前已经用疗法对个体治疗癌症。在别的实施方案中，用于治疗个体中的转移性癌症(如复发性转移性癌症)的方法包括与本文中公开的至少一种疗法组合施用一种或多种寡核苷酸。在一些实施方案中，至少一种疗法选自下组：抗癌剂、放射疗法、手术、同种干细胞移植疗法、和自体干细胞移植疗法。在本文中的一些实施方案中，先前已经用包含化学疗法、放射疗法、手术或其组合的疗法对个体治疗癌症。在本文中的任何实施方案中，序贯施用寡核苷酸和至少一种疗法。例如，可以在已经从个体手术切除肿瘤之前或之后对个体施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸。在一些实施方案中，同时施用寡核苷酸和至少一种疗法。例如，可以在从个体手术切除肿瘤期间对个体施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸。

[0242] 作为非限制性例子，依照本发明的用于治疗个体中的转移性癌症(如复发性转移性癌症)的方法可以通过施用本文中描述的一种或多种寡核苷酸(或其组合物)进行，所述寡核苷酸以每天以约0.1至约100mg/kg，如约0.5、约0.9、约1.0、约1.1、约1.5、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约40、约45、约50、约60、约70、约80、约90或约100mg/kg的量的每日剂量，在启动治疗后第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40天中至少一天、或者第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周中至少一周，或其任何组合，每24、12、8、6、4、或2小时使用单一或分开的剂量，或其任何组合提供。

[0243] 在一些实施方案中，可以与至少一种疗法(例如抗癌剂、放射疗法、手术、同种干细胞移植疗法、或自体干细胞移植疗法)组合施用一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。在一些

实施方案中，序贯施用组合。例如本文中描述的一种或多种寡核苷酸可以在组合治疗期间与至少一种疗法的施用相隔约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40天、或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周施用。在一些实施方案中，同时施用组合。例如，本文中描述的一种或多种寡核苷酸可以在组合治疗期间与至少一种疗法的施用相隔约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、或59分钟或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、或24小时施用。

[0244] 在另一个实施方案中，以治疗癌症已经对其它癌症治疗变得难治的个体中的挽救疗法的一部分施用治疗有效量的所述一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。在一些实施方案中，个体在用下列一种或多种治疗后复发：硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素α、来那度胺、美法仑、PEG化的干扰素α、泼尼松、沙利度胺、和长春新碱。

[0245] 不限于理论，认为CSC在原发性肿瘤的治疗后引起癌症的复发和/或转移。在一些方面，如本文中描述的治疗方法(例如用于抑制或阻止癌症转移的方法，等等)消除或抑制癌症干细胞。在一些实施方案中，本文中公开的寡核苷酸可以杀死或抑制癌症干细胞(CSC)以抑制转移，阻止个体中的癌症的转移或阻止复发。在一些实施方案中，先前已经用疗法对个体治疗癌症。在一个实施方案中，本文中公开的寡核苷酸可以杀死或抑制对治疗(例如化学疗法)有抗性的癌症干细胞(CSC)。在一个实施方案中，用本文中公开的任何一种或多种寡核苷酸(例如与ASncmtRNA分子互补的寡核苷酸)治疗个体非选择性抑制、阻滞、杀死、或消除个体中的CSC。在一个实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，用本文中公开的任何一种或多种寡核苷酸(例如与ASncmtRNA分子互补的寡核苷酸)减少个体中的CSC数目。在别的实施方案中，先前已经用疗法对个体治疗癌症。

[0246] 在本文中的方法的任何实施方案中，与没有施用所述寡核苷酸的个体相比，用本文中公开的任何一种或多种寡核苷酸(例如与ASncmtRNA分子互补的寡核苷酸)抑制个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0247] 在本文中的方法(例如用于抑制或阻止癌症转移的方法，用于治疗或预防癌症复发的方法，用于治疗转移性癌症的方法，等等)的任何实施方案中，癌症可以是实体瘤或非实体瘤。在本文中的任何实施方案中，癌症是实体瘤。本文中涵盖的实体瘤的例子包括但不限于鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、脑癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、肉瘤、膀胱癌、肝瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、口咽癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、黑素瘤、和各种类型的头和颈癌。

[0248] 在一些实施方案中，癌症与人乳头瘤病毒(HPV)感染有关，在本文中又称为“HPV关联癌症”，如在宫颈癌、口咽癌、和头和颈癌中。例如，形成宫颈癌的最重要的风险因素之一是HPV感染。已经鉴定出超过100种HPV毒株，然而仅将一个子集分类为形成癌症的高风险(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、和82)或可能的高风险(26、53、和66)类型(Munoz等，NEJM，348:518-527，2003)。在这些HPV类型中，报告了HPV16和HPV18引起所有宫颈癌病例的几乎70％，而HPV 31和35引起宫颈癌病例的另外10％。见Walboomers等，J

Pathol.,189(1):12-9,1999。HPV关联癌症可以牵涉一个或多个下述步骤:(1)初始HPV感染,(2)持续性HPV感染,(3)转化性HPV感染,在存在或缺乏HPV DNA对宿主细胞基因组的整合的情况中,(4)形成癌前损伤,(5)形成至少一种原发性肿瘤,和(6)形成侵入性癌症(例如转移性癌症)。

[0249] 在一些情况中,HPV关联癌症对经常用于治疗癌症的化疗剂有抗性。例如,HPV 16-永生化宫颈细胞可以形成对顺铂、帕西多赛、放射菌素D、多柔比星、依托泊苷、和5-氟尿嘧啶的抗性,这呈现癌症治疗中的一个主要障碍。见Ding等,Int J Cancer,15:87(6)818-23,2000。在本文中的一些实施方案中,本文中提供了在抑制个体中的癌症转移中使用的一种或多种寡核苷酸(或其组合物),其中癌症对化疗剂有抗性,并且其中癌症是HPV关联癌症。在本文中的一些实施方案中,本文中提供了治疗或预防个体中的癌症复发中使用的一种或多种寡核苷酸(或其组合物),其中癌症对化疗剂有抗性,并且其中癌症是HPV关联癌症。在本文中的一些实施方案中,本文中提供了在治疗个体中的转移性癌症(如复发性转移性癌症)中使用的一种或多种寡核苷酸(或其组合物),其中转移性癌症对化疗剂有抗性,并且其中转移性癌症是HPV关联癌症。在本文中的一些实施方案中,本文中提供了在治疗个体中的难治性癌症中使用的一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。在一些实施方案中,难治性癌症是难治性HPV关联癌症。在一些实施方案中,难治性HPV关联癌症对化疗剂有抗性。如本文中使用的,术语"难治性癌症"指不响应治疗的癌症(例如HPV关联癌症),例如在治疗开始(例如用化疗剂治疗)时有抗性的癌症或者可以在治疗期间变得有抗性的癌症。在一些实施方案中,化疗剂选自下组:顺铂、帕西多赛、放射菌素D、多柔比星、依托泊苷、和5-氟尿嘧啶。在一些实施方案中,化疗剂是顺铂。在本文中的一些实施方案中,HPV关联癌症(例如难治性HPV关联癌症)来自一种或多种选自下组的HPV毒株的感染:HPV 16、HPV 18、HPV 31和HPV 45。在本文中的一些实施方案中,HPV关联癌症(例如难治性HPV关联癌症)来自HPV毒株HPV 45的感染。在一些实施方案中,一种或多种寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的SncmtRNA分子互补:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、和SEQ ID NO:3。在一些实施方案中,一种或多种寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、和SEQ ID NO:6。在一些实施方案中,一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:7-198。在一些实施方案中,一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:36、197和198。

[0250] 在一些实施方案中,本文中提供了在治疗个体中的难治性癌症中使用的一种或多种寡核苷酸(或其组合物)。在一些实施方案中,难治性癌症对化疗剂有抗性。在一些实施方案中,化疗剂是顺铂。在一些实施方案中,难治性癌症是本文中公开的实体瘤。例如,难治性实体瘤可以是下列一种或多种:膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌(例如难治性HPV关联性宫颈癌)、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、肝和胆管癌、肺癌、黑素瘤、口癌、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾癌、睾丸癌、或甲状腺癌。在一些实施方案中,难治性癌症是本文中公开的非实体瘤。例如,难治性癌症可以是下列一种或多种:多发性骨髓瘤、白血病、或淋巴瘤。

[0251] 在本文中的任何实施方案中,癌症是非实体瘤。"非实体瘤"指牵涉血液细胞的异常生长和/或转移的血液学恶性。本文中涵盖的非实体瘤的例子包括但不限于多发性骨髓瘤、急性髓样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性非淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性前髓细胞性白

血病、成年T-细胞白血病、非白血病性白血病、白细胞不增多性白血病、嗜碱性白血病、母细胞白血病、牛白血病、慢性髓细胞性白血病、皮肤白血病、胚胎白血病、嗜曙红白血病、格罗斯(Gross)氏白血病、毛细胞白血病、成血性白血病、成血细胞性白血病、组织细胞性白血病、干细胞白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞减少性白血病、淋巴性白血病、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴原白血病、淋巴样白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞白血病、微成髓细胞性(micromyeloblastic)白血病、单核细胞性白血病、成髓细胞性白血病、髓细胞性白血病、髓样粒细胞性白血病、髓单核细胞性白血病、内格利(Naegeli)白血病、浆细胞白血病、浆细胞白血病、前髓细胞性白血病、里德尔(Rieder)细胞白血病、希林(Schilling)氏白血病、干细胞白血病、亚白血病性白血病、未分化细胞性白血病、特发性骨髓纤维化(idiopathic myelofibrosis)、淋巴瘤(如非何杰金氏淋巴瘤和何杰金氏淋巴瘤)、和骨髓增生异常综合征。

[0252] 可以在辅助背景中实施本文中公开的方法。“辅助背景”可以指个体已经具有癌症历史,并且一般(但不一定)响应疗法的临床背景,所述疗法包括但不限于手术(如手术切除)、放射疗法和化学疗法。然而,由于他们的癌症(如黑素瘤或结肠癌)历史,认为这些个体有风险形成癌症。“辅助背景”中的治疗或施用指后续的治疗模式。风险程度(即在认为辅助背景中的个体是“高风险”或“低风险”时)取决于几种因素,最通常是在第一次治疗时疾病(癌症)的程度。

[0253] 因而,本发明涉及用于抑制与癌症(例如转移性癌症或复发性癌症)有关的症状或状况(失能、损伤)的方法,如下文详细描述的。因此,不需要完全阻止或反转状况的所有效应,尽管目前公开的方法的效果可能延伸至个体的显著治疗益处。因此,治疗益处不一定是状况的完全阻止或治愈,而是可以涵盖如下的结果,其包括减少或阻止源自癌症(例如转移性癌症或复发性癌症)的症状,减少或阻止此类症状的发生(定量或定性),降低此类症状或其生理学效应的严重性,和/或增强经历癌症(例如转移性癌症或复发性癌症)症状后的个体恢复。

[0254] 具体地,本发明的疗法(例如一种或多种寡核苷酸)在对个体施用时可以治疗或预防一种或多种与癌症(例如转移性癌症或复发性癌症)有关的症状或状况和/或减少或减轻与此病症有关的症状或状况。因此,保护个体免于源自癌症(例如转移性癌症或复发性癌症)的效应或症状包括预防或降低病症效应的发生和/或严重性和治疗已经发生或开始发生病症效应的患者两者。本领域普通技术人员和/或在治疗患者的培训过的内科医生可以容易地评估有益效果。优选地,与尚未用本发明的方法治疗的那些个体相比在已经用本发明的方法治疗的那些个体中用于评估此类个体的至少一种临床或生物学得分、数值、或测量的严重性或发生上有积极或有益的差异。例如,用于评估此类个体的至少一种临床或生物学得分、数值或测量是从个体的原发性肿瘤、继发性肿瘤、活组织检查、或腹水采集的细胞(例如癌症干细胞)在球体形成测定法中形成球体的能力。用于从肿瘤或其它生物学样品纯化细胞(如癌症干细胞)的方法是本领域中公知的,如在美国专利号8,614,095中,通过提及将其公开内容完整收入本文。在一个例示性的球体形成测定法中,从受试者手术取出肿瘤,并用解剖刀切成约2至3mm3的碎片。用缓冲液(例如PBS)清洗碎片,随后将其与含有次氯酸钠的缓冲液一起温育。用缓冲液清洗肿瘤组织碎片,将其用PBS消化及用含有下列一种或多种的介质消化:胶原酶I、胶原酶IV、分散酶、透明质酸酶和DNA酶。离心细胞悬浮液,并且

在含有βFGF和EGF的缓冲液中悬浮团粒。清洗细胞以除去血清，并且培养基中悬浮，所述培养基补充有人EGF、人βFGF、没有维生素A的B27补充物、皮质醇、胰岛素、和N2补充物。随后，在非粘附板中培养细胞。在培养物中10天后，获得直径100至200μm的球体，并计数。可以将球体进一步克隆扩充，或者注射入受试者中以观察肿瘤形成的能力。在一些实施方案中，与没有用本发明的寡核苷酸处理的个体相比，已经接受单独或与至少一种本文中公开的疗法组合的有效量的一种或多种本文中公开的寡核苷酸(或其组合物)的个体具有降低的球体形成。

[0255] VI.制品或试剂盒

[0256] 在另一个方面，提供了制品或试剂盒，其包含本文中描述的一种或多种寡核苷酸。制品或试剂盒可以进一步包含关于一种或多种寡核苷酸在本发明的方法中使用的用法说明。因而，在某些实施方案中，制品或试剂盒包含关于一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸在用于抑制癌症转移、预防或治疗癌症复发、和/或治疗个体中的转移性癌症的方法中的使用的用法说明，所述方法包括对个体施用有效量的一种或多种寡核苷酸。在某些实施方案中，先前已经用疗法(例如化学疗法、放射疗法、手术、或其组合)对个体治疗癌症。在一些实施方案中，制品或试剂盒包含关于一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸在用于治疗个体中的难治性癌症(例如难治性HPV关联癌症)的方法中的使用的用法说明，所述方法包括对个体施用有效量的一种或多种寡核苷酸。

[0257] 制品或试剂盒可以进一步包含容器。合适的容器包含例如瓶、管形瓶(例如双室管形瓶)、注射器(例如单或双室注射器)、IV袋、和试管。容器可以由多种材料(如玻璃或塑料)形成。容器容纳组合物(例如药物配制剂)。

[0258] 制品或试剂盒可以进一步包含标签或包装插页，其在容器上或与容器结合，并且可以指示用于重建和/或使用组合物(例如药物配制剂)的指导。标签可以进一步指示配制剂可用于或意图用于静脉内、皮下、或其它施用模式以在个体中抑制癌症转移，预防或治疗癌症复发，和/或治疗转移性癌症。在其它实施方案中，标签可以进一步指示配制剂可用于或意图用于静脉内、皮下或其它施用模式以治疗个体中的难治性癌症(例如难治性HPV关联癌症)。容纳配制剂的容器可以是一次性管形瓶或多用性管形瓶，其容许重复施用(例如2-6次施用)重建的组合物(例如药物配制剂)。制品或试剂盒可以进一步包含含有合适的稀释剂的第二容器。制品或试剂盒可以进一步包含从商业、治疗、和用户观点看合意的其它材料，包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针、注射器、和具有使用用法说明的包装插页。

[0259] 任选地，本文中描述的制品或试剂盒进一步包含含有第二治疗性组合物(例如抗癌剂)的容器。例如，制品或试剂盒可以包含一种或多种寡核苷酸作为第一组合物(例如第一药物组合物)和抗癌剂作为第二组合物(例如第二药物组合物)。在一些实施方案中，试剂盒进一步包含关于与抗癌剂组合的一种或多种寡核苷酸在本发明的方法中的使用的用法说明。一种例示性的抗癌剂可以是类克、多西他赛、塞来昔布、美法仑、地塞米松、类固醇、吉西他滨、顺铂、替莫唑胺、依托泊苷、环磷酰胺、temodar、卡铂、丙卡巴肼、gliadel、他莫昔芬、托泊替康、甲氨蝶呤、吉非替尼、泰素、泰索帝、氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、希罗达、CPT-11、干扰素α、PEG化的干扰素α、卡培他滨、顺铂、塞替派、氟达拉滨、卡铂、脂质体柔红霉

素、阿糖胞苷、doxetaxol、帕西他赛、长春碱、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪、长春瑞滨、唑来膦酸、palmitronate、biaxin、白消安、泼尼松、硼替佐米、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱、多柔比星、帕西多赛、更昔洛韦、阿霉素、雌莫司汀磷酸钠、舒林酸、和/或依托泊苷。

[0260] VII.别的例示性实施方案

[0261] 在一些实施方案中，本申请提供了治疗个体中的难治性癌症的方法，其包括对个体施用有效量的一种或多种与反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子互补的寡核苷酸，其中寡核苷酸能够与嵌合线粒体RNA分子杂交以形成稳定双链体。

[0262] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，寡核苷酸与人非编码嵌合线粒体RNA分子充分互补，所述人非编码嵌合线粒体RNA分子包含：a)在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的反义16S线粒体核糖体RNA或b)在其5'端与具有反向重复序列的多核苷酸的3'端共价连接的有义16S线粒体核糖体RNA。

[0263] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0264] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，寡核苷酸与由选自下组的核苷酸序列编码的ASncmtRNA分子至少85％互补：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0265] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核苷酸序列：SEQ ID NO:7-198。

[0266] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，一种或多种寡核苷酸包含选自下组的核酸序列：SEQ ID NO:36、197和198。

[0267] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，与至少一种抗癌剂组合施用寡核苷酸。

[0268] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，序贯施用寡核苷酸和至少一种抗癌剂。

[0269] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，同时施用寡核苷酸和至少一种抗癌剂。

[0270] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，与放射疗法组合施用所述寡核苷酸。

[0271] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，与手术组合施用所述寡核苷酸。

[0272] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，先前已经用包含化学疗法、放射疗法、手术、或其组合的疗法对个体治疗癌症。

[0273] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，难治性癌症是难治性HPV关联癌症。

[0274] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，难治性HPV关联癌症是一种或多种选自下组的：宫颈癌、口咽癌、和头和颈癌。

[0275] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中，难治性HPV关联癌症对化疗剂有抗性。

[0276] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中,化疗剂是选自下组的一种或多种:顺铂、帕西多赛、放射菌素D、多柔比星、依托泊苷和5-氟尿嘧啶。

[0277] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中,难治性HPV关联癌症来自一种或多种选自下组的HPV毒株的感染:HPV 16、HPV 18、HPV 31和HPV 45。

[0278] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中,与没有施用所述寡核苷酸的个体相比,寡核苷酸减少个体中的癌症干细胞数目。

[0279] 在依照(或如应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中,与没有施用所述寡核苷酸的个体相比,寡核苷酸抑制个体中的肿瘤生长和/或转移。

[0280] 通过提及以下实施例会更完整理解本发明。实施例(其意图仅为本发明的例示性的)不应解释为以任何方式限制本发明的范围。应当理解,本文中描述的实施例和实施方案仅为了例示目的,并且鉴于其的各种修饰或改变对于本领域技术人员会有提示,并且应当包含在本申请的精神和范围及所附权利要求书的范围内。

实施例

[0281] 实施例1:用与反义非编码嵌合线粒体RNA互补的反义寡核苷酸处理HCT-116结肠癌细胞和人结肠癌细胞的原代培养物消除球体形成。

[0282] 在此研究中,测定来自HCT-116结肠癌细胞系和源自患者的人结肠癌细胞的原代培养物两者的细胞在用针对反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)的反义寡核苷酸处理后形成球状体的能力。基于癌症干细胞形成这些球状体的特异性能力,利用的测定法测量球状体(在本文中又称为球体)的数目。

[0283] 材料和方法

[0284] 实验方案:

[0285] 图1表明本文中利用的实验规程和测定法的通用方案,其基于癌症干细胞形成这些球状体的特异性能力,测量靶向ASncmtRNA的反义寡核苷酸对结肠癌细胞中形成的球体数目的影响。在HCT-116结肠癌细胞和源自患者的人结肠癌细胞的原代培养物中测量球体形成。

[0286] 人癌细胞的原代培养物:

[0287] 在手术后并且在得到每名患者的相应知情同意的情况中接受结肠癌的活组织检查。将约500mm3的肿瘤块转移至含有DMEM培养基、High-Glucose(高葡萄糖)、GlataMax™(GIBCO)、10%FCS(Biological Industries)、Fungizone® 1x,2x抗生素-抗真菌剂混合物和庆大霉素25μg/ml(Invitrogen)的50ml无菌管。在手术后2至3小时内加工活组织检查。

[0288] 为了分离肿瘤,用解剖刀将结肠肿瘤的块切成约2至3mm3的碎片。用PBS清洗碎片两次,然后与含有0.5%次氯酸钠的PBS一起温育20分钟。用PBS清洗碎片三次,并用含有1mg/ml胶原酶I、2mg/ml胶原酶IV、1mg/ml分散酶、20μg/ml透明质酸酶和2000U/ml DNA酶的RPMI培养基(Invitrogen)消化。于37℃在不断搅动的情况中将混合物温育60分钟。接着,以200x g离心细胞悬浮液5分钟,并在PBS中悬浮团粒,并以200x g再离心5分钟。在含有1x N2补充物、10ng/mlβFGF和20ng/ml EGF的DMEM/F12中重悬团粒以形成球体。

[0289] HCT-116细胞的培养物:

[0290] 依照标准方案培养HCT-116细胞。在含有青霉素、庆大霉素和Fungizone且具有

10％FCS的DMEM培养基于37℃且在5％CO2的情况中培养自ATCC获得的HCT-116细胞。

[0291] 通过球体形成和对包被板的粘附选择肿瘤细胞：

[0292] 收集自结肠癌肿瘤或HCT-116培养物衍生的细胞，清洗以除去血清，并在无血清DMEM/F12中悬浮，所述无血清DMEM/F12补充有100IU/ml青霉素、100μg/ml链霉素、20ng/ml人EGF、20ng/ml人βFGF、没有维生素A的2％B27补充物、皮质醇、胰岛素(Lonza)和N2补充物(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)。随后，在非粘附板(Corning Inc.,Corning,NY,USA)中以约5,000个细胞/孔或在T25烧瓶(Corning Inc.T25 3815)中1x105个细胞的密度培养细胞。在培养10天后，获得直径为100至200μm的球体。使用70μm尼龙滤器过滤含有球体的培养基以消除单细胞。收集球体，用胰蛋白酶-EDTA分离，并用移液管机械破坏。然后，离心细胞以除去酶，用含有105CFS的DMEM培养基清洗一次，并在用胶原I(Gibco)包被的粘附板中铺板，并于37℃和5％CO2培养，如上文描述的。

[0293] 细胞转染和反义寡核苷酸：

[0294] 本研究中使用的反义寡核苷酸(ASO)由IDT(Integrated DNA Technologies,USA),Invitrogen或Biosearch Inc.以100％硫代磷酸酯(PS)核苷间连接合成。对于转染，以50,000个细胞/孔将细胞接种入12孔板(Nunc)中。次日，使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)依照制造商的指导，以100至200nM的终浓度(取决于细胞类型)用反义寡核苷酸(ASO 1107S:5'-GTCCTAAACTACCAAACC-3'(SEQ ID NO:197)或ASO 1537S:5'-CACCCACCCAAGAACAGG-3'(SEQ ID NO:36)，取决于细胞类型)或对照寡核苷酸(对照寡聚物154:5`-AGGTGGAGTGGATTGGGG-3'(SEQ ID NO:199))转染自结肠癌肿瘤或HCT-116培养物选择的细胞(参见通过球体形成和对包被板的粘附选择肿瘤细胞)。另外，细胞亚组保持未处理或在仅存在Lipofectamine 2000的情况中。转染在正常的培养条件下持续48小时。

[0295] 球体形成测定法：

[0296] 在转染后48小时时，收获细胞，计数，并在非粘附6孔板(Corning Inc.,Corning,NY,USA)中培养5,000至6,000个细胞，如上文描述的(如上描述)。在培养10天后，获得直径100至200μm的球体，并计数。

[0297] 结果

[0298] 球体形成在无处理、仅用Lipofectamine处理、或用对照寡聚物154处理后在结肠肿瘤细胞的原代培养物中不变化。但是，在用ASO 1537S处理后，球体形成在这些原代细胞中消除(图2)。

[0299] 使用结肠肿瘤的原代培养物(患者TPT;50,000个细胞)来量化球体形成，并评估用ASO 1537S转染对这些细胞形成球体的能力的影响。三组对照细胞(未处理，仅用Lipofectamine处理，或用对照寡聚物154处理)形成与接种细胞的总数的约0.6％等同的球体(30至37个球体)。用ASO 1537S转染的细胞不能形成球体(图3)。

[0300] 球体形成在无处理、仅用Lipofectamine处理、或用对照寡聚物154处理后在来自HCT-116结肠肿瘤细胞系的细胞中不变化。然而，在用ASO 1107S处理后，球体形成在这些细胞中消除(图4)。

[0301] 使用结肠肿瘤细胞系HCT-116来量化球体形成，并评估用ASO 1107S转染对球体形成的影响。三组对照细胞(未处理，仅用Lipofectamine处理，或用对照寡聚物154处理)形成与接种细胞的总数(在此代表性实施例中为T25烧瓶中的50,000个细胞)的0.3％等同的球

体(100至160个球体)。然而,用ASO 1107S转染的细胞不能形成球体(图5)。

[0302] 总之,这些结果显示了保持未处理,仅用Lipofectamine处理,或用对照寡核苷酸转染的组保留形成球体的能力。比较而言,用反义寡核苷酸转染的原发性结肠肿瘤细胞或HCT-116结肠癌细胞丧失其形成球体的能力。这些结果指示反义寡核苷酸能够杀死癌症干细胞,如根据处理后球体形成的缺乏指示的。此外,这些结果还指示接种的所有细胞中仅一部分能够形成球体。

[0303] 实施例2:用与反义非编码嵌合线粒体RNA互补的反义寡核苷酸处理宫颈癌细胞系和人子宫宫颈癌细胞的原代培养物消除球体形成

[0304] 测定来自SiHa宫颈癌细胞系(用人乳头瘤病毒16或HPV 16转化)和来自自患者衍生的人子宫宫颈癌细胞的原代培养物的宫颈细胞在用针对反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)的反义寡核苷酸处理后形成球状体的能力。利用的测定法测量由癌症干细胞形成的球状体(本文中又称为球体)的数目。

[0305] 材料和方法

[0306] 实验方案:

[0307] 本文中利用的实验规程和测定法测量靶向ASncmtRNA的反义寡核苷酸对由宫颈癌细胞形成的球体数目的影响(图6)。在SiHa宫颈癌细胞系和自患者衍生的人宫颈癌细胞的原代培养物(CerCa)中测量球体形成。自患者活组织检查获得CerCa 1、CerCa 2和CerCa 3(用人乳头瘤病毒45转化)。

[0308] SiHa细胞的培养物:

[0309] 在DMEM、“高葡萄糖”、GlutaMAX™(含有青霉素、庆大霉素和Fungizone)在具有10%FCS的情况中于37℃且以5%CO2培养SiHa细胞。

[0310] 人癌细胞的原代培养物:

[0311] 在手术后并且在得到每名患者的相应知情同意的情况中接受子宫宫颈癌的活组织检查。将约500mm3的肿瘤块转移至含有DMEM培养基、高葡萄糖、GlataMax™(GIBCO)、10%FCS(Biological Industries)、Fungizone®1x,2x抗生素-抗真菌剂混合物和庆大霉素25μg/ml(Invitrogen)的50ml无菌管。在手术后2至3小时内加工活组织检查。

[0312] 为了分离肿瘤,将组织样品置于具有10ml无菌PBS(Gibco)的10cm培养皿上,并用解剖刀切成小块(1-3mm3)。将块与含有0.5%胶原酶I、0.5%胶原酶II、0.5%胶原酶IV(GIBCO)、0.5%透明质酸酶(AppliChem)、0.1%分散酶(GIBCO)、0.05%DNA酶(AppliChem)、0.1%BSA(Rockland)、抗生素-抗真菌剂2x混合物(GIBCO)和Fungizone®2x(GIBCO)的2ml培养基一起转移至6cm皿。将碎片于37℃温育30分钟,并且以300x g离心细胞悬浮液5分钟。在含有20ng/ml hEGF 20、皮质醇、胰岛素、GA-1000(Lonza)、没有维生素A的0.5x B-27(Invitrogen)、20ng/ml FGFb(Invitrogen)和5%CFB的5ml MEGM™培养基中悬浮团粒。在用胶原(BD Bioscience)包被的T25烧瓶于37℃且以5%CO2培养细胞。每48小时更换培养基。

[0313] 通过球体形成和对包被板的粘附选择肿瘤细胞:

[0314] 在超低粘附板(Corning)上接种约$1x10^5$在MEGM™培养基中重悬的细胞,所述MEGM™培养基补充有20ng/ml hEGF、皮质醇、胰岛素、GA-1000(Lonza)、没有维生素A的0.5x B-27(Invitrogen)、20ng/ml没有CFS的FGFb(Invitrogen)。10天后,在相差显微术下计算球体,

收集,并使用70μm的尼龙网孔过滤以弃去单细胞。从滤器回收球体,并在先前用胶原I型(Gibco)包被的6孔板(Corning)上接种,并培养,如上文描述的。分离宫颈肿瘤的三种人原代培养物CerCa 1、CerCa 2和CerCa 3。

[0315] 人乳头瘤病毒(HPV)基因型分型:

[0316] 用PGMY09/11线性阵列(Roche)分析不同原代培养物。在CerCa 1和CerCa2原代细胞培养物中检出HPV 16的存在,而在CerCa 3原代细胞培养物中检出HPV 45。

[0317] 细胞转染和反义寡核苷酸:

[0318] 本研究中使用的反义寡核苷酸(ASO)由IDT(Integrated DNA Technologies,USA),Invitrogen或Biosearch Inc.以100%硫代磷酸酯(PS)核苷间连接合成。对于转染,以5000个细胞/孔将细胞接种入12孔板(Nunc)中。次日,使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)依照制造商的指导以终浓度100nM(SiHa细胞)或200nM(CerCa细胞)用反义寡核苷酸(ASO 1537S:5'-CACCCACCCAAGAACAGG-3'(SEQ ID NO:36),取决于细胞类型)或对照寡核苷酸154(ASO-C:5'-AGGTGGAGTGGATTGGGG-3'(SEQ ID NO:199))转染自宫颈癌肿瘤或SiHa细胞选择的细胞(参见通过球体形成和对包被板的粘附选择肿瘤细胞)。另外,细胞亚组保持未处理(NT),在仅存在Lipofectamine 2000(LIPO)的情况中转染,或与45uM顺铂(CISP)一起温育。在正常的培养条件下进行转染72小时。

[0319] 球体形成测定法:

[0320] 在转染后72小时时,收获细胞,计数,并在非粘附6孔板(Corning Inc.,Corning,NY,USA)中培养5,000至6,000个细胞,如上文描述的。在培养10天后,获得直径100至200μm的球体,并计数。

[0321] 结果

[0322] 球体形成在无处理(NT)、仅用Lipofectamine(LIPO)处理、或用对照寡核苷酸154(ASO-C)处理后在宫颈肿瘤细胞的原代培养物中不改变。比较而言,在用ASO 1537S处理后,球体形成在SiHa、CerCa 1、CerCa 2和CerCa 3原代培养物中消除(图7和图8)。在用药物顺铂(CISP)(45μM)处理细胞时也消除SiHa、CerCa 1和CerCa 2细胞(都用HPV 16感染)的球体形成(图7和图8),而在用顺铂处理的CerCa 3细胞(用HPV 45感染)中没有观察到效果。

[0323] 总之,这些结果显示了保持未处理,仅用Lipofectamine处理,或用对照寡核苷酸转染的宫颈癌原代培养物(CerCa 1、CerCa 2和CerCa 3细胞)和细胞系SiHa保留形成球体的能力。比较而言,用靶向反义非编码嵌合线粒体RNA(ASncmtRNA)分子或有义非编码嵌合线粒体RNA(SncmtRNA)分子的反义寡核苷酸转染的原代宫颈肿瘤细胞或SiHa细胞丧失其形成球体的能力,无论是呈HPV 16还是呈HPV 45阳性。这些结果指示反义寡核苷酸能够杀死宫颈癌干细胞,如根据处理后的球体形成的缺乏指示的。此外,用抗癌药物顺铂处理消除SiHa、CerCa 1和CerCa 2细胞(均呈HPV 16阳性),而不能消除用HPV 45感染的CerCa 3的球体形成(图7和图8)。因此,这些结果指示反义寡核苷酸能够杀死对顺铂处理有抗性的宫颈癌干细胞(CerCa 3细胞)。见Tjalme等,Am.J.Clin.Pathol.,137:161,2012;de Sanjosé等,Eur J Cancer.,49(16):3450,2013;Tjalma等,Int J Cancer.,132(4):854,2013。

[0324] 实施例3:在手术除去皮内黑素瘤肿瘤后用与反义非编码嵌合线粒体RNA互补的反义寡核苷酸处理小鼠防止肺和肝中的肿瘤生长的复发和转移

[0325] 一种常见的用于黑素瘤的临床方案包括手术切除,接着系统性施用药物。在其它

肿瘤的实施中使用类似的方案。在此代表性实施例中呈现的黑素瘤模型中，在C57BL/6小鼠的背部上皮下注射B16F10黑素瘤细胞(200μl盐水中的100,000个细胞)。细胞注射后约11至12天，形成700至1,000mm3的肿瘤(认为小鼠中的1,000mm3肿瘤等同于人中的3,000cc3肿瘤)。在此时，将小鼠随机分成具有相似肿瘤体积的两个组(对照寡核苷酸ASO 154和ASO 1560S(SEQ ID NO:198))。在麻醉下手术切除肿瘤，并用含有100μg ASO 1560S或ASO 154的250μl清洗伤口一次。在手术缝合后，将含有100μg ASO 154或ASO 1560S的200μl盐水推注应用于肿瘤留下的空腔。在手术后3天，小鼠按交替的天数接受含有100μg ASO 1560S或ASO 154的250μl盐水的3次静脉内(图9;在时间线上的第1个、第3个、第5个箭头)或3次腹膜内(图9;在时间线上的第2个、第4个、第6个箭头)注射。用测径器一周两次测量肿瘤生长。

[0326] 在手术后约3天观察到用ASO 154处理的小鼠中的肿瘤生长的复发，并且在细胞注射后约第25天达到约1,500mm3的肿瘤体积(图9)。在麻醉条件下对这些小鼠实施安乐死，并且固定肿瘤和其它器官，并保存以进行进一步研究。在用靶向小鼠ASncmtRNA的ASO 1560S处理的小鼠中没有观察到复发。在细胞注射后130天时，小鼠表现为健康的，没有可检出的肿瘤的存在，并且实施安乐死以收集器官。对肝和肺分析转移性小结的存在。

[0327] 对照小鼠(用对照寡聚物ASO 154处理)显示肺和肝中的癌症复发和转移性黑色小结的存在。比较而言，用ASO 1560S处理的小鼠的肺和肝缺乏转移性小结的存在，证明了ASO 1560S阻止或抑制癌症复发(图10)。

[0328] 实施例4:在手术除去皮内肾肿瘤后用与反义非编码嵌合线粒体RNA互补的反义寡核苷酸静脉内处理小鼠导致肿瘤复发的缺乏和完全存活。

[0329] 在第0天皮下注射100,000个RENCA细胞(ATCC ®CRL-2947™小家鼠肾肾腺癌)。在第12天时，取出800mm3的平均大小的肿瘤，并用200μl中的100μg对照寡聚物ASO 154(4只动物)或ASO1560S(5只动物)(两者都在脂质体中配制)清洗肿瘤部位。将动物缝合，并在除去肿瘤的部位处用250μl中的100μgASO 154(图11，正方形)或ASO 1560S(图11，三角形)(两者都在脂质体中配制)静脉内注射。没有给出进一步的处理。在第40天(手术后30天)，所有对照动物已经死亡，具有平均大小1,200mm3的肿瘤和广泛的转移，而所有用ASO1560S处理的动物没有肿瘤，并且在第61天时仍然活着(图11)。

[0330] 实施例5:在手术除去皮内肾肿瘤后用与反义非编码嵌合线粒体RNA互补的反义寡核苷酸腹膜内处理小鼠导致肿瘤复发的缺乏和完全存活。

[0331] 在8只小鼠中在第0天皮下注射100,000个RENCA细胞(ATCC ®CRL-2947™小家鼠肾肾腺癌)。在第11天，肿瘤具有800mm3的平均大小。通过手术除去所有动物的肿瘤，并分为2组。在缝合前用对照寡聚物ASO 154清洗对照组的伤口一次，并在缝合前用ASO 1560S清洗处理组的伤口。在缝合后，于肿瘤已经生长的地方腹膜内注射250μl的推注:用ASO 154注射对照组，并用ASO 1560S注射处理组。在第13天、第15天、第17天和第19天，在250μl体积中注射脂质体中配制的25μg ASO 154(图12，圆圈)或25μg ASO 1560S(图12，正方形)的腹膜内注射。在第14天、第16天和第18天，用相同的方案静脉内注射小鼠。在第22天，所有对照动物具有大于1,200mm3的肿瘤，并且被处死。在第60天，用ASO 1560S处理的所有动物没有肿瘤，并且仍然活着(图12)。

[0332] 实施例6:在手术除去皮内黑素瘤肿瘤后用与反义非编码嵌合线粒体RNA互补的反义寡核苷酸处理小鼠导致肿瘤复发的缺乏和完全存活。

[0333] 在第0天对小鼠皮下注射B16F10黑素瘤细胞(200μl RPMI培养基中的100,000个细胞)。在第11天,实施手术以除去肿瘤。肿瘤体积从约800变化至1200mm3。清洗伤口一次。在缝合后,在肿瘤部位中注射脂质体中的250μl寡聚物的一次推注。在第13天、第15天、第17天、第19天和第21天,在小鼠中腹膜内注射各在250μl体积中的25μg对照裸ASO 154(图13,正方形),25μg在脂质体中的对照ASO 154(图13,圆圈),或50μg在脂质体中的ASO 154(图13,三角形)剂量。用50μg裸ASO 1560,25μg在脂质体中的ASO 1560S或50μg在脂质体中的ASO 1560S以与上文描述相同的方式注射其它组的小鼠(每组6只小鼠)(图13,菱形)。

[0334] 与用对照寡核苷酸处理的小鼠相比,用25和50μg腹膜内注射ASO 1560S的手术后处理导致皮内黑素瘤肿瘤复发的缺乏和完全存活(图13)。

[0335] 实施例7:在手术除去皮下膀胱癌肿瘤后用与反义非编码嵌合线粒体RNA互补的反义寡核苷酸处理小鼠导致肿瘤的缺乏和完全存活。

[0336] 给12只小鼠皮下注射100,000个MB49细胞(小鼠膀胱癌细胞)。在15天后,小鼠具有800mm3的平均直径的肿瘤。手术除去肿瘤(第0天),并在手术的部位处注射含有100μg ASO 154(对照)或ASO 1560S(活性药物)的200μl推注。手术后3天,将小鼠分成2组,并用含有ASO 154(对照组)或ASO 1560S(处理组)的100μl注射液腹膜内或静脉内处理,如图14中指示的。仅一只用ASO1560S腹膜内处理的小鼠形成肿瘤。所有用ASO 1560S静脉内处理的小鼠保持没有肿瘤,并且经历完全存活。在第41天处死用对照寡聚物ASO 154处理的对照动物(图14)。

[0337] 实施例8:在人黑素瘤的肿瘤除去后用与反义非编码嵌合线粒体RNA互补的反义寡核苷酸处理Rag-/-小鼠导致肿瘤复发的显著消除和存活的较大增加

[0338] 给Rag-/-小鼠注射500万个人A375黑素瘤细胞。细胞注射后约34天时,所有小鼠形成约700mm3的肿瘤。将小鼠进行肿瘤除去手术,并随机分为两组。

[0339] 组1(对照):用200μl体积中的50μg对照寡聚物154(组中的6只小鼠)清洗伤口。组2(疗法):用200μl中的50μg ASO 1537S(组中的8只小鼠)(实施例1中提供的寡核苷酸的序列)清洗伤口。缝合后,应用含有50μg对照寡聚物154的250μl(6只对照小鼠)或含有50μg ASO寡聚物1537S的250μl(8只疗法小鼠)的推注。2天后,小鼠每隔一天(every other day)接受6次用对照寡聚物154或ASO寡聚物1537S的注射。第一次注射是腹膜内,并且第二次注射在尾静脉中。

[0340] 在手术后第30天,6只用对照寡聚物154处理的小鼠具有2000mm3级别的肿瘤,并且被处死(图15,圆圈)。在手术后57天,接受ASO寡聚物1537S的8只小鼠中的4只没有肿瘤(图15,三角形)。在手术后的第17天,接受ASO寡聚物1537S的8只小鼠中的4只开始显示缓慢生长的小肿瘤,其在第36天达到约500mm3的大小(图15,正方形)。将这些小鼠再进行手术以除去肿瘤,随后2只小鼠死亡。用250μl中的50μg ASO寡聚物1537S对其它2只小鼠进行相同的治疗方案(交替3次腹膜内注射和3次静脉内注射)(图15)。

[0341] 序列

<210> SEQ ID NO 1
<211> 长度：2374
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：1

[0342]

tctaatactg gtgatgctag aggtgatgtt tttggtaaac aggcggggta agatttgccg 60
agttccttttt actttttttta acctttcctt atgagcatgc ctgtgttggg ttgacagtga 120
gggtaataat gacttgttgg ttgattgtag atattgggct gttaattgtc agttcagtgt 180
tttaatctga cgcaggctta tgcggaggag aatgttttca tgttacttat actaacatta 240
gttcttctat agggtgatag attggtccaa ttgggtgtga ggagttcagt tatatgtttg 300
ggatttttta ggtagtgggt gttgagcttg aacgctttct taattggtgg ctgcttttag 360
gcctactatg ggtgttaaat tttttactct ctctacaagg ttttttccta gtgtccaaag 420
agctgttcct ctttggacta acagttaaat ttacaagggg atttagaggg ttctgtgggc 480
aaatttaaag ttgaactaag attctatctt ggacaaccag ctatcaccag gctcggtagg 540
tttgtcgcct ctacctataa atcttcccac tattttgcta catagacggg tgtgctcttt 600
tagctgttct taggtagctc gtctggtttc gggggtctta gctttggctc tccttgcaaa 660
gttatttcta gttaattcat tatgcagaag gtataggggt tagtccttgc tatattatgc 720
ttggttataa tttttcatct ttcccttgcg gtactatatc tattgcgcca ggtttcaatt 780
tctatcgcct atactttatt tgggtaaatg gtttggctaa acctagcccc aaacccactc 840
caccttacta ccagacaacc ttagccaaac catttaccca aataaagtat aggcgataga 900
aattgaaacc tggcgcaata gatatagtac cgcaagggaa agatgaaaaa ttataaccaa 960
gcataatata gcaaggacta acccctatac cttctgcata atgaattaac tagaaataac 1020
tttgcaagga gagccaaagc taagaccccc gaaaccagac gagctaccta agaacagcta 1080
aaagagcaca cccgtctatg tagcaaaata gtgggaagat ttataggtag aggcgacaaa 1140
cctaccgagc ctggtgatag ctggttgtcc aagatagaat cttagttcaa ctttaaattt 1200
gcccacagaa ccctctaaat ccccttgtaa atttaactgt tagtccaaag aggaacagct 1260
ctttggacac taggaaaaaa ccttgtagag agagtaaaaa atttaacacc catagtaggc 1320
ctaaaagcag ccaccaatta agaaagcgtt caagctcaac acccactacc taaaaaatcc 1380
caaacatata actgaactcc tcacacccaa ttggaccaat ctatcaccct atagaagaac 1440
taatgttagt ataagtaaca tgaaaacatt ctcctccgca taagcctgcg tcagattaaa 1500
acactgaact gacaattaac agcccaatat ctacaatcaa ccaacaagtc attattaccc 1560
tcactgtcaa cccaacacag gcatgctcat aaggaaaggt taaaaaaagt aaaaggaact 1620
cggcaaatct taccccgcct gtttaccaaa aacatcacct ctagcatcac cagtattaga 1680
ggcaccgcct gcccagtgac acatgtttaa cggccgcggt accctaaccg tgcaaaggta 1740
gcataatcac ttgttcctta aatagggacc tgtatgaatg gctccacgag ggttcagctg 1800
tctcttactt ttaaccagtg aaattgacct gcccgtgaag aggcgggcat aacacagcaa 1860
gacgagaaga ccctatggag ctttaattta ttaatgcaaa cagtacctaa caaacccaca 1920
ggtcctaaac taccaaacct gcattaaaaa tttcggttgg ggcgacctcg gagcagaacc 1980
caacctccga gcagtacatg ctaagacttc accagtcaaa gcgaactact atactcaatt 2040
gatccaataa cttgaccaac ggaacaagtt accctaggga taacagcgca atcctattct 2100
agagtccata tcaacaatag ggtttacgac ctcgatgttg gatcaggaca tcccgatggt 2160
gcagccgcta ttaaaggttc gtttgttcaa cgattaaagt cctacgtgat ctgagttcag 2220
accggagtaa tccaggtcgg tttctatcta ccttcaaatt cctccctgta cgaaaggaca 2280

agagaaataa ggcctacttc acaaagcgcc ttcccccgta aatgatatca tctcaactta 2340
gtattatacc cacacccacc caagaacagg gttt 2374

<210> SEQ ID NO 2
<211> 长度：1679
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：2

ggggtcttag ctttggctct ccttgcaaag ttatttctag ttaattcatt atgcagaagg 60
tatagggttt agtccttgct atattatgct tggttataat ttttcatctt tcccttgcgg 120
tgctaaacct agccccaaac ccactccacc ttactaccag acaaccttag ccaaaccatt 180
tacccaaata aagtataggc gatagaaatt gaaacctggc gcaatagata tagtaccgca 240
agggaaagat gaaaaattat aaccaagcat aatatagcaa ggactaaccc ctataccttc 300
tgcataatga attaactaga aataactttg caaggagagc caaagctaag acccccgaaa 360
ccagacgagc tacctaagaa cagctaaaag agcacacccg tctatgtagc aaaatagtgg 420
gaagatttat aggtagaggc gacaaaccta ccgagcctgg tgatagctgg ttgtccaaga 480
tagaatctta gttcaacttt aaatttgccc acagaaccct ctaaatcccc ttgtaaattt 540
aactgttagt ccaaagagga acagctcttt ggacactagg aaaaaacctt gtagagagag 600
taaaaaattt aacacccata gtaggcctaa aagcagccac caattaagaa agcgttcaag 660
ctcaacaccc actacctaaa aaatcccaaa catataactg aactcctcac acccaattgg 720
accaatctat caccctatag aagaactaat gttagtataa gtaacatgaa aacattctcc 780
tccgcataag cctgcgtcag attaaaacac tgaactgaca attaacagcc caatatctac 840
aatcaaccaa caagtcatta ttaccctcac tgtcaaccca acacaggcat gctcataagg 900
aaaggttaaa aaaagtaaaa ggaactcggc aaatcttacc ccgcctgttt accaaaaaca 960
tcacctctag catcaccagt attagaggca ccgcctgccc agtgacacat gtttaacggc 1020
cgcggtaccc taaccgtgca aaggtagcat aatcacttgt tccttaaata gggacctgta 1080
[0343] tgaatggctc cacgagggtt cagctgtctc ttacttttaa ccagtgaaat tgacctgccc 1140
gtgaagaggc gggcataaca cagcaagacg agaagaccct atggagcttt aatttattaa 1200
tgcaaacagt acctaacaaa cccacaggtc ctaaactacc aaacctgcat taaaaatttc 1260
ggttggggcg acctcggagc agaacccaac ctccgagcag tacatgctaa gacttcacca 1320
gtcaaagcga actactatac tcaattgatc caataacttg accaacggaa caagttaccc 1380
tagggataac agcgcaatcc tattctagag tccatatcaa caatagggtt tacgacctcg 1440
atgttggatc aggacatccc aatggtgcag ccgctattaa aggttcgttt gttcaacgat 1500
taaagtccta cgtgatctga gttcagaccg gagtaatcca ggtcggtttc tatctacttc 1560
aaattcctcc ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa gcgccttccc 1620
ccgtaaatga tatcatctca acttagtatt atacccacac ccacccaaga acagggttt 1679

<210> SEQ ID NO 3
<211> 长度：1635
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：3

ggggtcttag ctttggctct ccttgcaaag ttatttctag ttaattcatt atgcagaagg 60
tatagggttt agtccttgct aaacctagcc ccaaacccac tccaccttac taccagacaa 120
ccttagccaa accatttacc caaataaagt ataggcgata gaaattgaaa cctggcgcaa 180
tagatatagt accgcaaggg aaagatgaaa aattataacc aagcataata tagcaaggac 240
taacccctat accttctgca taatgaatta actagaaata actttgcaag gagagccaaa 300
gctaagaccc ccgaaaccag acgagctacc taagaacagc taaaagagca cacccgtcta 360
tgtagcaaaa tagtgggaag atttataggt agaggcgaca aacctaccga gcctggtgat 420
agctggttgt ccaagataga atcttagttc aactttaaat ttgcccacag aaccctctaa 480
atccccttgt aaatttaact gttagtccaa agaggaacag ctctttggac actaggaaaa 540
aaccttgtag agagagtaaa aaatttaaca cccatagtag gcctaaaagc agccaccaat 600
taagaaagcg ttcaagctca acacccacta cctaaaaaat cccaaacata taactgaact 660

cctcacaccc aattggacca atctatcacc ctatagaaga actaatgtta gtataagtaa 720
catgaaaaca ttctcctccg cataagcctg cgtcagatta aaacactgaa ctgacaatta 780
acagcccaat atctacaatc aaccaacaag tcattattac cctcactgtc aacccaacac 840
aggcatgctc ataaggaaag gttaaaaaaa gtaaaaggaa ctcggcaaat cttaccccgc 900
ctgtttacca aaaacatcac ctctagcatc accagtatta gaggcaccgc ctgcccagtg 960
acacatgttt aacggccgcg gtaccctaac cgtgcaaagg tagcataatc acttgttcct 1020
taaataggga cctgtatgaa tggctccacg agggttcagc tgtctcttac ttttaaccag 1080
tgaaattgac ctgcccgtga agaggcgggc ataacacagc aagacgagaa gaccctatgg 1140
agctttaatt tattaatgca aacagtacct aacaaaccca caggtcctaa actaccaaac 1200
ctgcattaaa aatttcggtt ggggcgacct cggagcagaa cccaacctcc gagcagtaca 1260
tgctaagact tcaccagtca aagcgaacta ctatactcaa ttgatccaat aacttgacca 1320
acggaacaag ttaccctagg gataacagcg caatcctatt ctagagtcca tatcaacaat 1380
agggtttacg acctcgatgt tggatcagga catcccaatg gtgcagccgc tattaaaggt 1440
tcgtttgttc aacgattaaa gtcctacgtg atctgagttc agaccggagt aatccaggtc 1500
ggtttctatc tacttcaaat tcctccctgt acgaaaggac aagagaaata aggcctactt 1560
cacaaagcgc cttcccccgt aaatgatatc atctcaactt agtattatac ccacacccac 1620
ccaagaacag ggttt 1635

<210> SEQ ID NO 4
<211> 长度：1921
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：4

[0344]

aacctccgag cagtacatgc taagacttca ccagtcaaag cgaactacta tactcaattg 60
atccaataac ttgaccaacg gaacaagtta ccctagggat aacagcgcaa tcctattcta 120
gagtccatat caacaatagg gtttacgacc tcgatgttgg atcaggacat cccaatggtg 180
cagccgctat taaaggttcg tttgttcaac gattaaagtc ctacgtgatc tgagttcaga 240
ccggagtaat ccaggtcggt ttctatctac ttcaaattcc tccctgtacg aaaggacaag 300
agaaataagg cctacttcac aaagcgcctt cccccgtaaa tgatatcatc tcaacttagt 360
attataccct gttcttgggt gggtgtgggt ataatactaa gttgagatga tatcatttac 420
gggggaaggc gctttgtgaa gtaggcctta tttctcttgt cctttcgtac agggaggaat 480
ttgaagtaga tagaaaccga cctggattac tccggtctga actcagatca cgtaggactt 540
taatcgttga acaaacgaac ctttaatagc ggctgcacca tcgggatgtc ctgatccaac 600
atcgaggtcg taaaccctat tgttgatatg gactctagaa taggattgcg ctgttatccc 660
tagggtaact tgttccgttg gtcaagttat tggatcaatt gagtatagta gttcgctttg 720
actggtgaag tcttagcatg tactgctcgg aggttgggtt ctgctccgag gtcgccccaa 780
ccgaaatttt taatgcaggt ttggtagttt aggacctgtg ggtttgttag gtactgtttg 840
cattaataaa ttaaagctcc atagggtctt ctcgtcttgc tgtgttatgc ccgcctcttc 900
acgggcaggt caatttcact ggttaaaagt aagagacagc tgaaccctcg tggagccatt 960
catacaggtc cctatttaag gaacaagtga ttatgctacc tttgcacggt tagggtaccg 1020
cggccgttaa acatgtgtca ctgggcaggc ggtgcctcta atactggtga tgctagaggt 1080
gatgtttttg gtaaacaggc ggggtaagat ttgccgagtt ccttttactt tttttaacct 1140
ttccttatga gcatgcctgt gttgggttga cagtgagggt aataatgact tgttggttga 1200
ttgtagatat tgggctgtta attgtcagtt cagtgtttta atctgacgca ggcttatgcg 1260
gaggagaatg ttttcatgtt acttatacta acattagttc ttctataggg tgatagattg 1320
gtccaattgg gtgtgaggag ttcagttata tgtttgggat tttttaggta gtgggtgttg 1380
agcttgaacg ctttcttaat tggtggctgc ttttaggcct actatgggtg ttaaattttt 1440
tactctctct acaaggtttt ttcctagtgt ccaaagagct gttcctcttt ggactaacag 1500
ttaaatttac aaggggattt agagggttct gtgggcaaat ttaaagttga actaagattc 1560
tatcttggac aaccagctat caccaggctc ggtaggtttg tcgcctctac ctataaatct 1620
tcccactatt ttgctacata gacgggtgtg ctcttttagc tgttcttagg tagctcgtct 1680
ggtttcgggg gtcttagctt tggctctcct tgcaaagtta tttctagtta attcattatg 1740
cagaaggtat aggggttagt ccttgctata ttatgcttgg ttataatttt tcatctttcc 1800
cttgcggtac tatatctatt gcgccaggtt tcaatttcta tcgcctatac tttatttggg 1860

taaatggttt ggctaaggtt gtctggtagt aaggtggagt gggtttgggg ctaggtttag 1920
c 1921

<210> SEQ ID NO 5
<211> 长度：1744
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：5

tagggataac agcgcaatcc tattctagag tccatatcaa caatagggtt tacgacctcg 60
atgttggatc aggacatccc gatggtgcag ccgctattaa aggttcgttt gttcaacgat 120
taaagtccta cgtgatctga gttcagaccg gagtaatcca ggtcggtttc tatctacctt 180
caaattcctc cctgttcttg ggtgggtgtg ggtataatac taagttgaga tgatatcatt 240
tacgggggaa ggcgctttgt gaagtaggcc ttatttctct tgtcctttcg tacagggagg 300
aatttgaagt agatagaaac cgacctggat tactccggtc tgaactcaga tcacgtagga 360
ctttaatcgt tgaacaaacg aacctttaat agcggctgca ccatcgggat gtcctgatcc 420
aacatcgagg tcgtaaaccc tattgttgat atggactcta gaataggatt gcgctgttat 480
ccctagggta acttgttccg ttggtcaagt tattggatca attgagtata gtagttcgct 540
ttgactggtg aagtcttagc atgtactgct cggaggttgg gttctgctcc gaggtcgccc 600
caaccgaaat ttttaatgca ggtttggtag tttaggacct gtgggtttgt taggtactgt 660
ttgcattaat aaattaaagc tccatagggt cttctcgtct tgctgtgtta tgcccgcctc 720
ttcacgggca ggtcaatttc actggttaaa agtaagagac agctgaaccc tcgtggagcc 780
attcatacag gtccctattt aaggaacaag tgattatgct acctttgcac ggttagggta 840
ccgcggccgt taaacatgtg tcactgggca ggcggtgcct ctaatactgg tgatgctaga 900
ggtgatgttt ttggtaaaca ggcggggtaa gatttgccga gttcctttta ctttttttaa 960
cctttcctta tgagcatgcc tgtgttgggt tgacagtgag ggtaataatg acttgttggt 1020
tgattgtaga tattgggctg ttaattgtca gttcagtgtt ttaatctgac gcaggcttat 1080
[0345] gcggaggaga atgttttcat gttacttata ctaacattag ttcttctata gggtgataga 1140
ttggtccaat tgggtgtgag gagttcagtt atatgtttgg gatttttag gtagtgggtg 1200
ttgagcttga acgctttctt aattggtggc tgcttttagg cctactatgg gtgttaaatt 1260
ttttactctc tctacaaggt tttttcctag tgtccaaaga gctgttcctc tttggactaa 1320
cagttaaatt tacaagggga tttagagggt tctgtgggca aatttaaagt tgaactaaga 1380
ttctatcttg gacaaccagc tatcaccagg ctcggtaggt ttgtcgcctc tacctataaa 1440
tcttcccact attttgctac atagacgggt gtgctctttt agctgttctt aggtagctcg 1500
tctggtttcg ggggtcttag ctttggctct ccttgcaaag ttatttctag ttaattcatt 1560
atgcagaagg tataggggtt agtccttgct atattatgct tggttataat ttttcatctt 1620
tcccttgcgg tactatatct attgcgccag gtttcaattt ctatcgccta tactttattt 1680
gggtaaatgg tttggctaag gttgtctggt agtaaggtgg agtgggtttg gggctaggtt 1740
tagc 1744

<210> SEQ ID NO 6
<211> 长度：1854
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：6

gaactcggca aatcttaccc cgcctgttta ccaaaaacat cacctctagc atcaccagta 60
ttagaggcac cgcctgccca gtgacacatg tttaacggcc gcggtaccct aaccgtgcaa 120
aggtagcata atcacttgtt ccttaaatag ggacctgtat gaatggctcc acgagggttc 180
agctgtctct tacttttaac cagtgaaatt gacctgcccg tgaagaggcg ggcatgacac 240
agcaagacga gaagacccta tggagcttta atttattaat gcaaacagta cctaacaaac 300
cctgttcttg ggtgggtgtg ggtataatac taagttgaga tgatatcatt tacgggggaa 360
ggcgctttgt gaagtaggcc ttatttctct tgtcctttcg tacagggagg aatttgaagt 420
agatagaaac cgacctggat tactccggtc tgaactcaga tcacgtagga ctttaatcgt 480
tgaacaaacg aacctttaat agcggctgca ccatcgggat gtcctgatcc aacatcgagg 540

tcgtaaaccc tattgttgat atggactcta gaataggatt gcgctgttat ccctagggta 600
acttgttccg ttggtcaagt tattggatca attgagtata gtagttcgct ttgactggtg 660
aagtcttagc atgtactgct cggaggttgg gttctgctcc gaggtcgccc caaccgaaat 720
ttttaatgca ggtttggtag tttaggacct gtgggtttgt taggtactgt ttgcattaat 780
aaattaaagc tccatagggt cttctcgtct tgctgtgtta tgcccgcctc ttcacgggca 840
ggtcaatttc actggttaaa agtaagagac agctgaaccc tcgtggagcc attcatacag 900
gtccctattt aaggaacaag tgattatgct acctttgcac ggttagggta ccgcggccgt 960
taaacatgtg tcactgggca ggcggtgcct ctaatactgg tgatgctaga ggtgatgttt 1020
ttggtaaaca ggcggggtaa gatttgccga gttccttta ctttttttaa cctttcctta 1080
tgagcatgcc tgtgttgggt tgacagtgag ggtaataatg acttgttggt tgattgtaga 1140
tattgggctg ttaattgtca gttcagtgtt ttaatctgac gcaggcttat gcggaggaga 1200
atgttttcat gttacttata ctaacattag ttcttctata gggtgataga ttggtccaat 1260
tgggtgtgag gagttcagtt atatgtttgg gatttttag gtagtgggtg ttgagcttga 1320
acgctttctt aattggtggc tgcttttagg cctactatgg gtgttaaatt ttttactctc 1380
tctacaaggt tttttcctag tgtccaaaga gctgttcctc tttggactaa cagttaaatt 1440
tacaagggga tttagagggt tctgtgggca aatttaaagt tgaactaaga ttctatcttg 1500
gacaaccagc tatcaccagg ctcggtaggt ttgtcgcctc tacctataaa tcttcccact 1560
attttgctac atagacgggt gtgctctttt agctgttctt aggtagctcg tctggtttcg 1620
ggggtcttag ctttggctct ccttgcaaag ttatttctag ttaattcatt atgcagaagg 1680
tataggggtt agtccttgct atattatgct tggttataat ttttcatctt tcccttgcgg 1740
tactatatct attgcgccag gtttcaattt ctatcgccta tactttattt gggtaaatgg 1800
tttggctaag gttgtctggt agtaaggtgg agtgggtttg gggctaggtt tagc 1854

<210> SEQ ID NO 7
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
[0346] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：7
taggtttagc accgcaaggg 20

<210> SEQ ID NO 8
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：8
taggtttagc aaggactaac 20

<210> SEQ ID NO 9
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：9
ggggtaagat ttgccgag 18

<210> SEQ ID NO 10

<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：10
atgctagagg tgatgttttt gg 22

<210> SEQ ID NO 11
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：11
cggtgcctct aatactgg 18

<210> SEQ ID NO 12
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：12
gttaaacatg tgtcactggg 20

[0347]

<210> SEQ ID NO 13
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：13
ttgcacggtt agggtacc 18

<210> SEQ ID NO 14
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：14
ggaacaagtg attatgctac c 21

<210> SEQ ID NO 15
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：15
ggagccattc atacaggtcc c 21

<210> SEQ ID NO 16
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：16
agtaagagac agctgaaccc 20

<210> SEQ ID NO 17
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：17
ggcaggtcaa tttcactgg 19

<210> SEQ ID NO 18
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
[0348] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：18
gctgtgttat gcccgcctc 19

<210> SEQ ID NO 19
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：19
agctccatag ggtcttctc 19

<210> SEQ ID NO 20
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：20
gttaggtact gtttgcatta 20

<210> SEQ ID NO 21

<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：21
aagtcttagc atgtactg 18

<210> SEQ ID NO 22
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：22
tagtagttcg ctttgactg 19

<210> SEQ ID NO 23
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：23
caagttattg gatcaattg 19

[0349]

<210> SEQ ID NO 24
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：24
gggtaacttg ttccgttg 18

<210> SEQ ID NO 25
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：25
aataggattg cgctgtta 18

<210> SEQ ID NO 26
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：26
cctattgttg atatggac 18

<210> SEQ ID NO 27
<211> 长度：17
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：27
ctgatccaac atcgagg 17

<210> SEQ ID NO 28
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：28
tagcggctgc accattgg 18

<210> SEQ ID NO 29
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
[0350] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：29
gttgaacaaa cgaaccttt 19

<210> SEQ ID NO 30
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：30
aactcagatc acgtaggac 19

<210> SEQ ID NO 31
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：31
cgacctggat tactccgg 18

<210> SEQ ID NO 32

<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：32
ggaatttgaa gtagatag 18

<210> SEQ ID NO 33
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：33
ctcttgtcct ttcgtacag 19

<210> SEQ ID NO 34
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：34
ggcgctttgt gaagtagg 18

[0351]

<210> SEQ ID NO 35
<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：35
gttgagatga tatcatttac gg 22

<210> SEQ ID NO 36
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：36
cacccaccca agaacagg 18

<210> SEQ ID NO 37
<211> 长度：25
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：37
caacttagta ttatacccac accca 25

<210> SEQ ID NO 38
<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：38
tcccccgtaa atgattacat ct 22

<210> SEQ ID NO 39
<211> 长度：25
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：39
gagaaataag gcctacttca caaag 25

<210> SEQ ID NO 40
<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
[0352] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：40
caaattcctc cctgtacgaa ag 22

<210> SEQ ID NO 41
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：41
agtaatccag gtcggtttct atct 24

<210> SEQ ID NO 42
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：42
aagtcctagc tgatctgagt tcag 24

<210> SEQ ID NO 43

<211> 长度：25
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：43
gctattaaag gttcgtttgt tcaac 25

<210> SEQ ID NO 44
<211> 长度：16
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：44
tcccgatggt gcagcc 16

<210> SEQ ID NO 45
<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：45
ttacgacctc gatgttggat ca 22

[0353]

<210> SEQ ID NO 46
<211> 长度：25
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：46
atcctattct agagtccata tcaac 25

<210> SEQ ID NO 47
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：47
aataggattg cgctgttatc ccta 24

<210> SEQ ID NO 48
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：48
tagggataac agcgcatacc tatt 24

<210> SEQ ID NO 49
<211> 长度：23
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：49
ggaacaagtt accctaggga taa 23

<210> SEQ ID NO 50
<211> 长度：23
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：50
ttgatccaat aacttgacca acg 23

<210> SEQ ID NO 51
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
[0354] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：51
acttcaccag tcaaagcgaa c 21

<210> SEQ ID NO 52
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：52
aacccaacct ccgagcag 18

<210> SEQ ID NO 53
<211> 长度：16
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：53
gttggggcga cctcgg 16

<210> SEQ ID NO 54

<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：54
aaactaccaa acctgcttaa aa 22

<210> SEQ ID NO 55
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：55
aaacagtacc taacaaaccc acag 24

<210> SEQ ID NO 56
<211> 长度：25
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：56
gaccctatgg agctttaatt tatta 25

[0355]

<210> SEQ ID NO 57
<211> 长度：23
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：57
cataacacag caagacgaga aga 23

<210> SEQ ID NO 58
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：58
tgacctgccc gtgaagag 18

<210> SEQ ID NO 59
<211> 长度：26
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：59
cagctgtctc ttacttttaa ccagtg 26

<210> SEQ ID NO 60
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：60
ctgtatgaat ggctccacga 20

<210> SEQ ID NO 61
<211> 长度：26
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：61
agcataatca cttgttcctt aaatag 26

<210> SEQ ID NO 62
<211> 长度：23
<212> 类型：DNA
[0356] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：62
accgtgcaaa ggtagcataa tca 23

<210> SEQ ID NO 63
<211> 长度：23
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：63
tgattatgct acctttgcac ggt 23

<210> SEQ ID NO 64
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：64
gtaccctaac cgtgcaaag 19

<210> SEQ ID NO 65

<210> SEQ ID NO 65
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：65
cctgcccagtgacacatgtt t 21

<210> SEQ ID NO 66
<211> 长度：25
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：66
cacctctagc atcaccagta ttaga 25

<210> SEQ ID NO 67
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：67
cttaccccgc ctgtttacca 20

[0357]

<210> SEQ ID NO 68
<211> 长度：26
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：68
aggttaaaaa aagtaaaagg aactcg 26

<210> SEQ ID NO 69
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：69
cccaacacag gcatgctca 19

<210> SEQ ID NO 70
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：70
accaacaagt cattattacc ctca 24

<210> SEQ ID NO 71
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：71
tgacaattaa cagcccaata tcta 24

<210> SEQ ID NO 72
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：72
gcctgcgtca gattaaaaca c 21

<210> SEQ ID NO 73
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
[0358] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：73
gtaacatgaa aacattctcc tccg 24

<210> SEQ ID NO 74
<211> 长度：28
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：74
tatcacccta tagaagaact aatgttag 28

<210> SEQ ID NO 75
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：75
ctgaactcct cacacccaat t 21

<210> SEQ ID NO 76

<211> 长度：23
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：76
cactacctaa aaaatcccaa aca 23

<210> SEQ ID NO 77
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：77
ttaagaaagc gttcaagctc a 21

<210> SEQ ID NO 78
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：78
catagtaggc ctaaaagcag c 21

[0359]

<210> SEQ ID NO 79
<211> 长度：26
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：79
aaaccttgta gagagagtaa aaaatt 26

<210> SEQ ID NO 80
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：80
aaagaggaac agctctttgg acac 24

<210> SEQ ID NO 81
<211> 长度：24
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：81
aatcccttg taaatttaac tgtt 24

<210> SEQ ID NO 82
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：82
ctttaaattt gcccacagaa c 21

<210> SEQ ID NO 83
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：83
ggttgtccaa gatagaatct 20

<210> SEQ ID NO 84
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
[0360] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：84
acaaacctac cgagcctgg 19

<210> SEQ ID NO 85
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：85
aagatttata ggtagaggcg 20

<210> SEQ ID NO 86
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：86
cccgtctatg tagcaaaata 20

<210> SEQ ID NO 87

<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：87
acctaagaac agctaaaaga 20

<210> SEQ ID NO 88
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：88
taagaccccc gaaaccagac 20

<210> SEQ ID NO 89
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：89
ataactttgc aaggagagcc 20

[0361]

<210> SEQ ID NO 90
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：90
cttctgcata atgaattaac 20

<210> SEQ ID NO 91
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：91
atatagcaag gactaacccc 20

<210> SEQ ID NO 92
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：92
agatgaaaaa ttataaccaa 20

<210> SEQ ID NO 93
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：93
caatagatat agtaccgcaa 20

<210> SEQ ID NO 94
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：94
aggcgataga aattgaaacc 20

<210> SEQ ID NO 95
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
[0362] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：95
tagccaaacc atttacccaa 20

<210> SEQ ID NO 96
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：96
caccttacta ccagacaacc 20

<210> SEQ ID NO 97
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：97
ctaaacctag ccccaaacc 19

<210> SEQ ID NO 98

<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：98
ctagcatcac cagtattaga 20

<210> SEQ ID NO 99
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：99
ttaccaaaaa catcacctct 20

<210> SEQ ID NO 100
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：100
gaactcggca aatcttaccc 20

[0363]

<210> SEQ ID NO 101
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：有义寡核苷酸
<400> 序列：101
gggtaagatt tgccgagttc 20

<210> SEQ ID NO 102
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：102
gctcataagg aaaggttaaa a 21

<210> SEQ ID NO 103
<211> 长度：17
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：103
gtcaacccaa cacaggc 17

<210> SEQ ID NO 104
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：104
accaacaagt cattattacc c 21

<210> SEQ ID NO 105
<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：有义寡核苷酸
<400> 序列：105
ggttgattgt agatattggg ct 22

<210> SEQ ID NO 106
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
[0364] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：106
attaacagcc caatatctac 20

<210> SEQ ID NO 107
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：107
tgcgtcagat taaaacactg 20

<210> SEQ ID NO 108
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：108
aaaacattct cctccgcata 20

<210> SEQ ID NO 109

<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：109
gttagtataa gtaacatg 18

<210> SEQ ID NO 110
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：110
tggaccaatc tatcaccct 19

<210> SEQ ID NO 111
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：111
acatataact gaactcctca 20

[0365]

<210> SEQ ID NO 112
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：112
cacccactac ctaaaaaatc 20

<210> SEQ ID NO 113
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：113
caccaattaa gaaagcgttg 20

<210> SEQ ID NO 114
<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：114
taggcctaaa agcagccacc aa 22

<210> SEQ ID NO 115
<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：有义寡核苷酸
<400> 序列：115
ttggtggctg cttttaggcc ta 22

<210> SEQ ID NO 116
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：116
taacacccat agtaggcct 19

<210> SEQ ID NO 117
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
[0366] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：117
aaccttgtag agagagtaaa 20

<210> SEQ ID NO 118
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：118
aacagctctt tggacactag 20

<210> SEQ ID NO 119
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：119
aactgttagt ccaaagag 18

<210> SEQ ID NO 120

<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：120
ctctaaatcc ccttgtaaa 19

<210> SEQ ID NO 121
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：121
actttaaatt tgcccacag 19

<210> SEQ ID NO 122
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：122
ggttgtccaa gatagaatc 19

[0367]

<210> SEQ ID NO 123
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：123
acaaacctac cgagcctcc 19

<210> SEQ ID NO 124
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：124
atttataggt tagaggcg 18

<210> SEQ ID NO 125
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：125
atgtagcaaa atagtgggaa 20

<210> SEQ ID NO 126
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：126
taagaacagc taaaagagca c 21

<210> SEQ ID NO 127
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：127
cgaaaccaga cgagctac 18

<210> SEQ ID NO 128
<211> 长度：22
<212> 类型：DNA
[0368] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：有义寡核苷酸
<400> 序列：128
ggggtcttag ctttggctct cc 22

<210> SEQ ID NO 129
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：129
taactttgca aggagagcca 20

<210> SEQ ID NO 130
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：130
accttctgca taatgaat 18

<210> SEQ ID NO 131

<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：131
atatagcaag gactaaccc 19

<210> SEQ ID NO 132
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：132
gatgaaaaat tataaccaag 20

<210> SEQ ID NO 133
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：133
aatagatata gtaccgcaag 20

[0369]

<210> SEQ ID NO 134
<211> 长度：17
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：134
cgatagaaat tgaaacc 17

<210> SEQ ID NO 135
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：有义寡核苷酸
<400> 序列：135
tactttattt gggtaaatgg 20

<210> SEQ ID NO 136
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：136
ccatttaccc aaataaagta 20

<210> SEQ ID NO 137
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：137
ttagccaaac catttaccca 20

210> SEQ ID NO 138
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：138
aaggtggagt gggtttgggg c 21

<210> SEQ ID NO 139
<211> 长度：17
<212> 类型：DNA
[0370] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：139
gctaaggttg tctggta 17

<210> SEQ ID NO 140
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：140
atcgcctata ctttatttgg 20

<210> SEQ ID NO 141
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：141
atctattgcg ccaggtttca 20

<210> SEQ ID NO 142

<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：142
ttttcatctt tcccttgcg 19

<210> SEQ ID NO 143
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：143
tccttgctat attatgcttg 20

<210> SEQ ID NO 144
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：144
cattatgcag aaggtatagg 20

[0371]

<210> SEQ ID NO 145
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：145
tctccttgca aagttatt 18

<210> SEQ ID NO 146
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：146
tttcgggggt cttagctttg 20

<210> SEQ ID NO 147
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：147
ctgttcttag gtagctcg 18

<210> SEQ ID NO 148
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：148
tgctacatag acgggtgtg 19

<210> SEQ ID NO 149
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：149
cctctaccta taaatcttcc 20

<210> SEQ ID NO 150
<211> 长度：17
<212> 类型：DNA
[0372] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：150
gctatcacca ggctcgg 17

<210> SEQ ID NO 151
<211> 长度：17
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：151
aagttgaact aagattc 17

<210> SEQ ID NO 152
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：152
gagggttctg tgggcaaatt 20

<210> SEQ ID NO 153

<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：153
acagttaaat ttacaaggg 19

<210> SEQ ID NO 154
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：154
gtgtccaaag agctgttcc 19

<210> SEQ ID NO 155
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：155
tactctctct acaaggtttt 20

[0373]

<210> SEQ ID NO 156
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：156
taggcctact atgggtgtta 20

<210> SEQ ID NO 157
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：157
aacgctttct taattggtgg c 21

<210> SEQ ID NO 158
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸

<400> 序列：158
ttttaggtag tgggtgttga 20

<210> SEQ ID NO 159
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：159
ggagttcagt tatatgtttg 20

<210> SEQ ID NO 160
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：160
tgatagattg gtccaattgg 20

<210> SEQ ID NO 161
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
[0374] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：161
ctaacattag ttcttctata g 21

<210> SEQ ID NO 162
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：162
atgcggagga gaatgttt 18

<210> SEQ ID NO 163
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：163
tcagtgtttt aatctgacg 19

<210> SEQ ID NO 164

<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：反义寡核苷酸
<400> 序列：164
gtagatattg ggctgttaatt 21

<210> SEQ ID NO 165
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：165
gtgagggtaa taatgacttg 20

<210> SEQ ID NO 166
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：166
atgagcatgc ctgtgttggt 20

[0375]

<210> SEQ ID NO 167
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：167
ggtaagattt gccgagttc 19

<210> SEQ ID NO 168
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：168
tggtgatgct agaggtgatg 20

<210> SEQ ID NO 169
<211> 长度：15
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸

<400> 序列：169
gcggtgcctc taata 15

<210> SEQ ID NO 170
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：170
ggccgttaaa catgtgtcac 20

<210> SEQ ID NO 171
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：171
tgattatgct acctttgcac 20

<210> SEQ ID NO 172
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
[0376] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：172
ttaaggaaca agtgattatg 20

<210> SEQ ID NO 173
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：173
tggagccatt catacaggtc 20

<210> SEQ ID NO 174
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：174
aaaagtaaga gacagctgaa 20

<210> SEQ ID NO 175

<210> SEQ ID NO 175
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：175
cacgggcagg tcaatttcac 20

<210> SEQ ID NO 176
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：176
gtcttgctgt gttatgcccg 20

<210> SEQ ID NO 177
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：177
aattaaagct ccatagggt 19

[0377]

<210> SEQ ID NO 178
<211> 长度：21
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：178
gtttgttagg tactgtttgc a 21

<210> SEQ ID NO 179
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：179
aggtttggta gtttaggac 19

<210> SEQ ID NO 180
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸

<400> 序列：180
gccccaaccg aaatttttaa 20

<210> SEQ ID NO 181
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：181
ctcggaggtt gggttctgct 20

<210> SEQ ID NO 182
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：182
ctggtgaagt cttagcatgt 20

[0378]
<210> SEQ ID NO 183
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：183
caattgagta tagtagttcg 20

<210> SEQ ID NO 184
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：184
tgttccgttg gtcaagtta 19

<210> SEQ ID NO 185
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：185
aataggattg cgctgttatc 20

<210> SEQ ID NO 186

<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：186
attgttgata tggactctag 20

<210> SEQ ID NO 187
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：187
atccaacatc gaggtcgtaa 20

<210> SEQ ID NO 188
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：188
gcggctgcac catcgggat 19

[0379]

<210> SEQ ID NO 189
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：189
ttgaacaaac gaaccttta 19

<210> SEQ ID NO 190
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：190
aactcagatc acgtaggact 20

<210> SEQ ID NO 191
<211> 长度：19
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸

<400> 序列：191
aaaccgacct ggattactc 19

<210> SEQ ID NO 192
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：192
agggaggaat ttgaaggtag 20

<210> SEQ ID NO 193
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：193
ggccttattt ctcttgtcct 20

<210> SEQ ID NO 194
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
[0380] <213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：194
ggaaggcgct ttgtgaagta 20

<210> SEQ ID NO 195
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：195
aagttgagat gatatcattt 20

<210> SEQ ID NO 196
<211> 长度：17
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：196
cctgttcttg ggtgggt 17

<210> SEQ ID NO 197

<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：197
gtcctaaact accaaacc 18

<210> SEQ ID NO 198
<211> 长度：20
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：198
caccctctaa cctagagaag 20

<210> SEQ ID NO 199
<211> 长度：18
<212> 类型：DNA
<213> 生物体：人工序列
<220> 特征：
<223> 其它信息：寡核苷酸
<400> 序列：199
aggtggagtg gattgggg 18

[0381]

<210> SEQ ID NO 200
<211> 长度：2374
<212> 类型：RNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：200

ucuaauacug gugaugcuag aggugauguu uuugguaaac aggcggggua agauuugccg 60
aguuccuuuu acuuuuuuua accuuuccuu augagcaugc cuguguuggg uugacaguga 120
ggguaauaau gacuuguugg uugauuguag auauugggcu guuaauuguc aguucagugu 180
uuuaaucuga cgcaggcuua ugcggaggag aauguuuuca uguuacuuau acuaacauua 240
guucuucuau agggugauag auugguccaa uuggguguga ggaguucagu uauauguuug 300
ggauuuuuua gguagugggu guugagcuug aacgcuuucu uaauuggugg cugcuuuuag 360
gccuacuaug gguguuaaau uuuuuacucu cucuacaagg uuuuuuccua guguccaaag 420
agcuguuccu cuuuggacua acaguuaaau uuacaagggg auuuagaggg uucugugggc 480
aaauuuaaag uugaacuaag auucuaucuu ggacaaccag cuaucaccag gcucgguagg 540
uuugucgccu cuaccuauaa aucuucccac uauuuugcua cauagacggg ugugcucuuu 600
uagcuguucu uagguagcuc gucugguuuc gggggucuua gcuuuggcuc uccuugcaaa 660
guuauuucua guuaauucau uaugcagaag guauaggggu uaguccuugc uauauuaugc 720
uugguuauaa uuuuucaucu uucccuugcg guacuauauc uauugcgcca gguuucaauu 780
ucuaucgccu auacuuuauu ugggguaaaug guuuggcuaa accuagcccc aaacccacuc 840
caccuuacua ccagacaacc uuagccaaac cauuuaccca aauaaaguau aggcgauaga 900
aauugaaacc uggcgcaaua gauauaguac cgcaagggaa agaugaaaaa uuauaaccaa 960
gcauaauaua gcaaggacua accccuauac cuucugcaua augaauuaac uagaaauaac 1020
uuugcaagga gagccaaagc uaagacccce gaaaccagac gagcuaccua agaacagcua 1080
aaagagcaca cccgucuaug uagcaaaaua gugggaagau uuauagguag aggcgacaaa 1140
ccuaccgagc cuggugauag cugguugucc aagauagaau cuuaguucaa cuuuaaauuu 1200
gcccacagaa cccucuaaau ccccuuguaa auuuaacugu uaguccaaag aggaacagcu 1260

cuuuggacac uaggaaaaaa ccuuguagag agaguaaaaa auuuaacacc cauaguaggc 1320
cuaaaagcag ccaccaauua agaaagcguu caagcucaac acccacuacc uaaaaaaucc 1380
caaacauaua acugaacucc ucacacccaa uuggaccaau cuaucacccu auagaagaac 1440
uaauguuagu auaaguaaca ugaaaacauu cuccuccgca uaagccugcg ucagauuaaa 1500
acacugaacu gacaauuaac agcccaauau cuacaaucaa ccaacaaguc auuauuaccc 1560
ucacugucaa cccaacacag gcaugcucau aaggaaaggu uaaaaaaagu aaaaggaacu 1620
cggcaaaucu uaccccgccu guuuaccaaa aacaucaccu cuagcaucac caguauuaga 1680
ggcaccgccu gcccagugac acauguuuaa cggccgcggu acccuaaccg ugcaaaggua 1740
gcauaaucac uuguuccuua aauagggacc uguaugaaug gcuccacgag gguucagcug 1800
ucucuuacuu uuaaccagug aaauugaccu gcccgugaag aggcgggcau aacacagcaa 1860
gacgagaaga cccuauggag cuuuaauuua uuaaugcaaa caguaccuaa caaacccaca 1920
gguccuaaac uaccaaaccu gcauuaaaaa uuucgguugg ggcgaccucg gagcagaacc 1980
caaccuccga gcaguacaug cuaagacuuc accagucaaa gcgaacuacu auacucaauu 2040
gauccaauaa cuugaccaac ggaacaaguu acccuaggga uaacagcgca auccuauucu 2100
agaguccaua ucaacaauag gguuuacgac cucgauguug gaucaggaca ucccgauggu 2160
gcagccgcua uuaaagguuc guuuguucaa cgauuaaagu ccuacgugau cugaguucag 2220
accggaguaa uccaggucgg uuucuaucua ccuucaaauu ccucccugua cgaaaggaca 2280
agagaaauaa ggccuacuuc acaaagcgcc uuccccccgua aaugauauca ucucaacuua 2340
guauuauacc cacacccacc caagaacagg guuu 2374

<210> SEQ ID NO 201
<211> 长度：1679
<212> 类型：RNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：201

[0382]

ggggucuuag cuuuggcucu ccuugcaaag uuauuucuag uuaauucauu augcagaagg 60
uauagggguu aguccuugcu auauuaugcu ugguuauaau uuuucaucuu ucccuugcgg 120
ugcuaaaccu agccccaaac ccacuccacc uuacuaccag acaaccuuag ccaaaccauu 180
uacccaaaua aaguauaggc gauagaaauu gaaaccuggc gcaauagaua uaguaccgca 240
agggaaagau gaaaaauuau aaccaagcau aauauagcaa ggacuaaccc cuauaccuuc 300
ugcauaauga auuaacuaga aauaacuuug caaggagagc caaagcuaag acccccgaaa 360
ccagacgagc uaccuaagaa cagcuaaaag agcacacccg ucuauguagc aaaauagugg 420
gaagauuuau agguagaggc gacaaaccua ccgagccugg ugauagcugg uuguccaaga 480
uagaaucuua guucaacuuu aaauuugccc acagaacccu cuaaaucccc uuguaaauuu 540
aacuguuagu ccaaagagga acagcucuuu ggacacuagg aaaaaaccuu guagagagag 600
uaaaaaauuu aacacccaua guaggccuaa aagcagccac caauuaagaa agcguucaag 660
cucaacaccc acuaccuaaa aaaucccaaa cauauaacug aacuccucac acccaauugg 720
accaaucuau cacccuauag aagaacuaau guuaguauaa guaacaugaa aacauucucc 780
uccgcauaag ccugcgucag auuaaaacac ugaacugaca auuaacagcc caauaucuac 840
aaucaaccaa caagucauua uuacccucac ugucaaccca acacaggcau gcucauaagg 900
aaagguuaaa aaaaguaaaa ggaacucggc aaaucuuacc ccgccuguuu accaaaaaca 960
ucaccucuag caucaccagu auuagaggca ccgccugccc agugacacau guuuaacggc 1020
cgcgguaccc uaaccgugca aagguagcau aaucacuugu uccuuaaaua gggaccugua 1080
ugaauggcuc cacgaggguu cagcugucuc uuacuuuuaa ccagugaaau ugaccugccc 1140
gugaagaggc gggcauaaca cagcaagacg agaagacccu auggagcuuu aauuuauuaa 1200
ugcaaacagu accuaacaaa cccacagguc cuaaacuacc aaaccugcau uaaaaauuuc 1260
gguuggggcg accucggagc agaacccaac cuccgagcag uacaugcuaa gacuucacca 1320
gucaaagcga acuacuauac ucaauugauc caauaacuug accaacggaa caaguuaccc 1380
uagggauaac agcgcaaucc uauucuagag uccauaucaa caauaggguu uacgaccucg 1440
auguuggauc aggacauccc aauggugcag ccgcuauuaa agguucguuu guucaacgau 1500
uaaaguccua cgugaucuga guucagaccg gaguaaucca ggucgguuuc uaucuacuuc 1560
aaauuccucc cuguacgaaa ggacaagaga aauaaggccu acuucacaaa gcgccuuccc 1620
ccguaaauga uaucaucuca acuuaguauu auacccacac ccacccaaga acaggguuu 1679

<210> SEQ ID NO 202
<211> 长度：1635
<212> 类型：RNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：202

ggggucuuag cuuuggcucu ccuugcaaag uuauuucuag uuaauucauu augcagaagg 60
uauagggguu aguccuugcu aaaccuagcc ccaaacccac uccaccuuac uaccagacaa 120
ccuuagccaa accauuuacc caaauaaagu auaggcgaua gaaauugaaa ccuggcgcaa 180
uagauauagu accgcaaggg aaagaugaaa aauuauaacc aagcauaaua uagcaaggac 240
uaaccccuau accuucugca uaaugaauua acuagaaaua acuuugcaag gagagccaaa 300
gcuaagaccc ccgaaaccag acgagcuacc uaagaacagc uaaaagagca cacccgucua 360
uguagcaaaa uagugggaag auuuauaggu agaggcgaca aaccuaccga gccuggugau 420
agcugguugu ccaagauaga aucuuaguuc aacuuuaaau uugcccacag aacccucuaa 480
aucccccuugu aaauuuaacu guuaguccaa agaggaacag cucuuuggac acuaggaaaa 540
aaccuuguag agagaguaaa aaauuuaaca cccauaguag gccuaaaagc agccaccaau 600
uaagaaagcg uucaagcuca acacccacua ccuaaaaaau cccaaacaua uaacugaacu 660
ccucacaccc aauuggacca aucuaucacc cuauagaaga acuaauguua guauaaguaa 720
caugaaaaca uucuccuccg cauaagccug cgucagauua aaacacugaa cugacaauua 780
acagcccaau aucuacaauc aaccaacaag ucauuauuac ccucacuguc aacccaacac 840
aggcaugcuc auaaggaaag guuaaaaaaa guaaaaggaa cucggcaaau cuuaccccgc 900
cuguuuacca aaaacaucac cucuagcauc accaguauua gaggcaccgc cugcccagug 960
acacauguuu aacggccgcg guacccuaac cgugcaaagg uagcauaauc acuuguuccu 1020
uaaauaggga ccuguaugaa uggcuccacg aggguucagc ugucucuuac uuuuaaccag 1080
ugaaauugac cugcccguga agaggcgggc auaacacagc aagacgagaa gacccuaugg 1140
agcuuuaauu uauuaaugca aacaguaccu aacaaaccca cagguccuaa acuaccaaac 1200
cugcauuaaa aauuucgguu ggggcgaccu cggagcagaa cccaaccucc gagcaguaca 1260
ugcuaagacu ucaccaguca aagcgaacua cuauacucaa uugauccaau aacuugacca 1320
[0383] acggaacaag uuacccuagg gauaacagcg caauccuauu cuagagucca uaucaacaau 1380
aggguuuacg accucgaugu uggaucagga caucccaaug gugcagccgc uauuaaaggu 1440
ucguuuguuc aacgauuaaa guccuacgug aucugaguuc agaccggagu aauccaggUc 1500
gguuucuauc uacuucaaau uccucccugu acgaaaggac aagagaaaua aggccuacuu 1560
cacaaagcgc cuucccccgu aaaugauauc aucucaacuu aguauuauac ccacacccac 1620
ccaagaacag gguuu 1635

<210> SEQ ID NO 203
<211> 长度：1921
<212> 类型：RNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：203

aaccuccgag caguacaugc uaagacuuca ccagucaaag cgaacuacua uacucaauug 60
auccaauaac uugaccaacg gaacaaguua cccuagggau aacagcgcaa uccuauucua 120
gaguccauau caacaauagg guuuacgacc ucgauguugg aucaggacau cccaauggug 180
cagccgcuau uaaagguucg uuuguucaac gauuaaaguc cuacgugauc ugaguucaga 240
ccggaguaau ccaggucggu uucuaucuac uucaaauucc ucccuguacg aaaggacaag 300
agaaauaagg ccuacuucac aaagcgccuu cccccguaaa ugauaucauc ucaacuuagu 360
auuauacccu guucuugggu gggugugggu auaauacuaa guugagauga uaucauuuac 420
gggggaaggc gcuuugugaa guaggccuua uuucucuugu ccuuucguac agggaggaau 480
uugaaguaga uagaaaccga ccuggauuac uccggucuga acucagauca cguaggacuu 540
uaaucguuga acaaacgaac cuuuaauagc ggcugcacca ucgggauguc cugauccaac 600
aucgaggucg uaaacccuau uguugauaug gacucuagaa uaggauugcg cuguuauccc 660
uaggguaacu uguuccguug gucaaguuau uggaucaauu gaguauagua guucgcuuug 720
acuggugaag ucuuagcaug uacugcucgg agguuggguu cugcuccgag gucgccccaa 780
ccgaaauuuu uaaugcaggu uugguaguuu aggaccugug gguuuguuag guacuguuug 840
cauuaauaaa uuaaagcucc auagggucuu cucgucuugc uguguuaugc ccgccucuuc 900

acgggcaggu caauuucacu gguuaaaagu aagagacagc ugaacccucg uggagccauu 960
cauacagguc ccuauuuaag gaacaaguga uuaugcuacc uuugcacggu uaggguaccg 1020
cggccguuaa acauguguca cugggcaggc ggugccucua auacugguga ugcuagaggu 1080
gauguuuuug guaaacaggc gggguaagau uugccgaguu ccuuuuacuu uuuuuaaccu 1140
uuccuuauga gcaugccugu guuggguuga cagugagggu aauaaugacu uguugguuga 1200
uuguagauau ugggcuguua auugucaguu caguguuuua aucugacgca ggcuuaugcg 1260
gaggagaaug uuuucauguu acuuauacua acauuaguuc uucuauaggg ugauagauug 1320
guccaauugg gugugaggag uucaguuaua uguuugggau uuuuuaggua guggguguug 1380
agcuugaacg cuuucuuaau ugguggcugc uuuuaggccu acuaugggug uuaaauuuuu 1440
uacucucucu acaagguuuu uuccuagugu ccaaagagcu guuccucuuu ggacuaacag 1500
uuaaauuuac aaggggauuu agaggguucu gugggcaaau uuaaaguuga acuaagauuc 1560
uaucuuggac aaccagcuau caccaggcuc gguagguuug ucgccucuac cuauaaaucu 1620
ucccacuauu uugcuacaua gacgggugug cucuuuuagc uguucuuagg uagcucgucu 1680
gguuucgggg gucuuagcuu uggcucuccu ugcaaaguua uuucuaguua auucauuaug 1740
cagaagguau agggguuagu ccuugcuaua uuaugcuugg uuauaauuuu ucaucuuucc 1800
cuugcgguac uauaucuauu gcgccagguu ucaauuucua ucgccuauac uuuauuuggg 1860
uaaaugguuu ggcuaagguu gucugguagu aagguggagu ggguuugggg cuagguuuag 1920
c 1921

<210> SEQ ID NO 204
<211> 长度：1744
<212> 类型：RNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：204

[0384]

uagggauaac agcgcaaucc uauucuagag uccauaucaa caauaggguu uacgaccucg 60
auguuggauc aggacauccc gauggugcag ccgcuauuaa agguucguuu guucaacgau 120
uaaaguccua cgugaucuga guucagaccg gaguaaucca ggucgguuuc uaucuaccuu 180
caaauuccuc ccuguucuug ggugggugug gguauaauac uaaguugaga ugauaucauu 240
uacgggggaa ggcgcuuugu gaaguaggcc uuauuucucu uguccuuucg uacagggagg 300
aauuugaagu agauagaaac cgaccuggau uacuccgguc ugaacucaga ucacguagga 360
cuuuaaucgu ugaacaaacg aaccuuuaau agcggcugca ccaucgggau guccugaucc 420
aacaucgagg ucguaaaccc uauuguugau auggacucua gaauaggauu gcgcuguuau 480
cccuagggua acuuguuccg uuggucaagu uauuggauca auugaguaua guaguucgcu 540
uugacuggug aagucuuagc auguacugcu cggagguugg guucugcucc gaggucgccc 600
caaccgaaau uuuuaaugca gguuugguag uuuaggaccu gugguuuugu uagguacugu 660
uugcauuaau aaauuaaagc uccauagggu cuucucgucu ugcuguguua ugcccgccuc 720
uucacgggca ggucaauuuc acugguuaaa aguaagagac agcugaaccc ucguggagcc 780
auucauacag gucccuauuu aaggaacaag ugauuaugcu accuuugcac gguuagggua 840
ccgcggccgu uaaacaugug ucacugggca ggcggugccu cuaauacugg ugaugcuaga 900
ggugauguuu uugguaaaca ggcgggguaa gauuugccga guuccuuuua cuuuuuuuaa 960
ccuuuccuua ugagcaugcc uguguugggu ugacagugag gguaauaaug acuuguuggu 1020
ugauuguaga uauugggcug uuaauuguca guucaguguu uuaaucugac gcaggcuuau 1080
gcggaggaga auguuuucau guuacuuaua cuaacauuag uucuucuaua gggugauaga 1140
uugguccaau ugggugugag gaguucaguu auauguuugg gauuuuuuag guagugggug 1200
uugagcuuga acgcuuucuu aauugguggc ugcuuuuagg ccuacuaugg guguuaaauu 1260
uuuuacucuc ucuacaaggu uuuuuccuag uguccaaaga gcuguuccuc uuuggacuaa 1320
caguuaaauu uacaagggga uuuagagggu ucugugggca aauuuaaagu ugaacuaaga 1380
uucuaucuug gacaaccagc uaucaccagg cucgguaggu uugucgccuc uaccuauaaa 1440
ucuucccacu auuuugcuac auagacgggu gugcucuuuu agcuguucuu agguagcucg 1500
ucugguuucg ggggucuuag cuuuggcucu ccuugcaaag uuauuucuag uuaauucauu 1560
augcagaagg uauagggguu aguccuugcu auauuaugcu ugguuauaau uuuucaucuu 1620
ucccuugcgg uacuauaucu auugcgccag guuucaauuu cuaucgccua uacuuuauuu 1680
ggguaaaugg uuuggcuaag guugucuggu aguaaggugg aguggguuug gggcuagguu 1740
uagc 1744

<210> SEQ ID NO 205
<211> 长度：1854
<212> 类型：RNA
<213> 生物体：人
<400> 序列：205

[0385]

gaacucggca aaucuuaccc cgccuguuua ccaaaaacau caccucuagc aucaccagua 60
uuagaggcac cgccugccca gugacacaug uuuaacggcc gcgguacccu aaccgugcaa 120
agguagcaua aucacuuguu ccuuaaauag ggaccuguau gaauggcucc acgaggguuc 180
agcugucucu uacuuuuaac cagugaaauu gaccugcccg ugaagaggcg ggcaugacac 240
agcaagacga gaagacccua uggagcuuua auuuauuaau gcaaacagua ccuaacaaac 300
ccuguucuug ggugggugug gguauaauac uaaguugaga ugauaucauu uacgggggaa 360
ggcgcuuugu gaaguaggcc uuauuucucu uguccuuucg uacagggagg aauuugaagu 420
agauagaaac cgaccuggau uacuccgguc ugaacucaga ucacguagga cuuuaaucgu 480
ugaacaaacg aaccuuuaau agcggcugca ccaucgggau guccugaucc aacaucgagg 540
ucguaaaccc uauuguugau auggacucua gaauaggauu gcgcuguuau cccuagggua 600
acuuguuccg uuggucaagu uauuggauca auugaguaua guaguucgcu uugacuggug 660
aagucuuagc auguacugcu cggagguugg guucugcucc gaggucgccc caaccgaaau 720
uuuuaaugca gguuugguag uuuaggaccu gugggguugu uagguacugu uugcauuaau 780
aaauuaaagc uccauagggu cuucucgucu ugcuguguua ugcccgccuc uucacgggca 840
ggucaauuuc acugguuaaa aguaagagac agcugaaccc ucguggagcc auucauacag 900
gucccuauuu aaggaacaag ugauuaugcu accuuugcac gguuagggua ccgcggccgu 960
uaaacaugug ucacugggca ggcggugccu cuaauacugg ugaugcuaga ggugauguuu 1020
uugguaaaca ggcgggguaa gauuugccga guuccuuuua cuuuuuuuaa ccuuuccuua 1080
ugagcaugcc uguguugggu ugacagugag gguaauaaug acuuguuggu ugauuguaga 1140
uauugggcug uuaauuguca guucaguguu uuaaucugac gcaggcuuau gcggaggaga 1200
auguuuucau guuacuuaua cuaacauuag uucuucuaua gggugauaga uugguccaau 1260
ugggugugag gaguucaguu auauguuugg gauuuuuuag guagugggug uugagcuuga 1320
acgcuuucuu aauugguggc ugcuuuuagg ccuacuaugg guguuaaauu uuuuacucuc 1380
ucuacaaggu uuuuuccuag uguccaaaga gcuguuccuc uuuggacuaa caguuaaauu 1440
uacaagggga uuuagagggu ucugugggca aauuuaaagu ugaacuaaga uucuaucuug 1500
gacaaccagc uaucaccagg cucgguaggu uugucgccuc uaccuauaaa ucuucccacu 1560
auuuugcuac auagacgggu gugcucuuuu agcuguucuu agguagcucg ucugguuucg 1620
ggggucuuag cuuuggcucu ccuugcaaag uuauuucuag uuaauucauu augcagaagg 1680
uauagggguu aguccuugcu auauuaugcu ugguuauaau uuuucaucuu ucccuugcgg 1740
uacuauaucu auugcgccag guuucaauuu cuaucgccua uacuuuauuu ggguaaaugg 1800
uuuggcuaag guugucuggu aguaaggugg agugggguug gggcuagguu uagc 1854

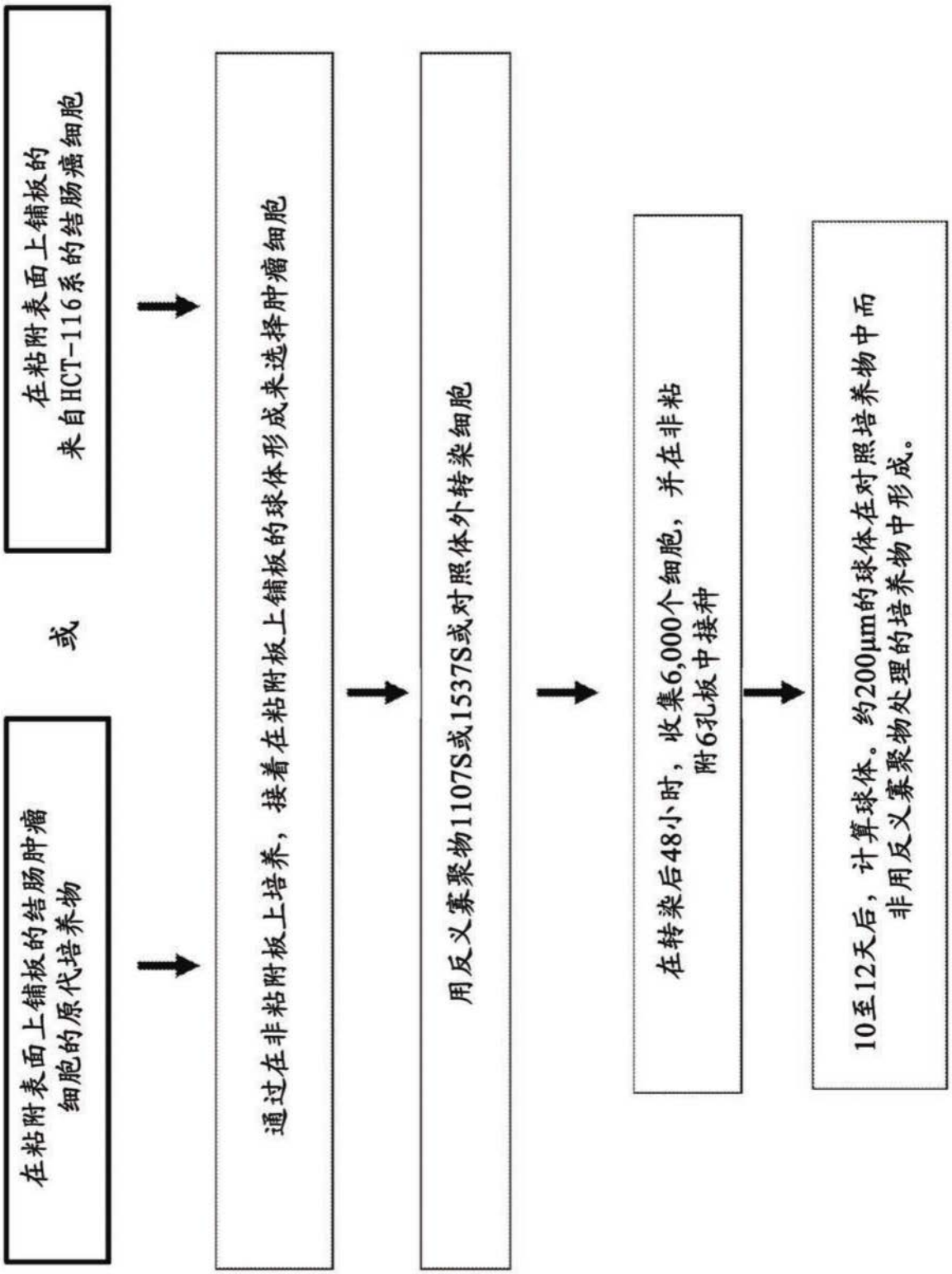

在粘附表面上铺板的结肠肿瘤细胞的原代培养物
或
在粘附表面上铺板的来自HCT-116系的结肠癌细胞
通过在非粘附板上培养，接着在粘附板上铺板的球体形成来选择肿瘤细胞
用反义寡聚物1107S或1537S或对照体外转染细胞
在转染后48小时，收集6,000个细胞，并在非粘附6孔板中接种
10至12天后，计算球体。约200μm的球体在对照培养物中而非用反义寡聚物处理的培养物中形成。

图1

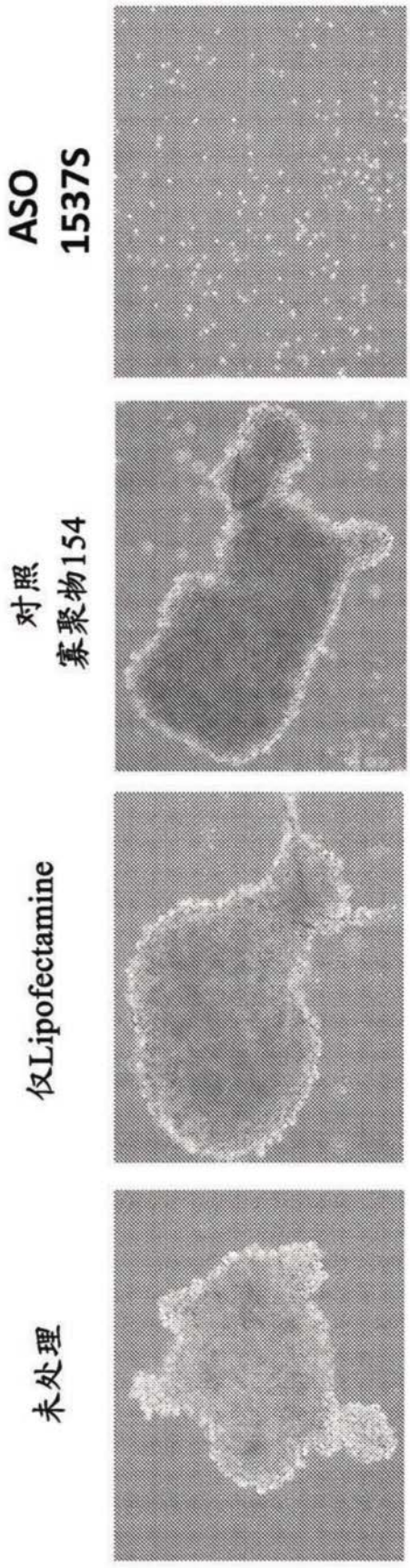


图2

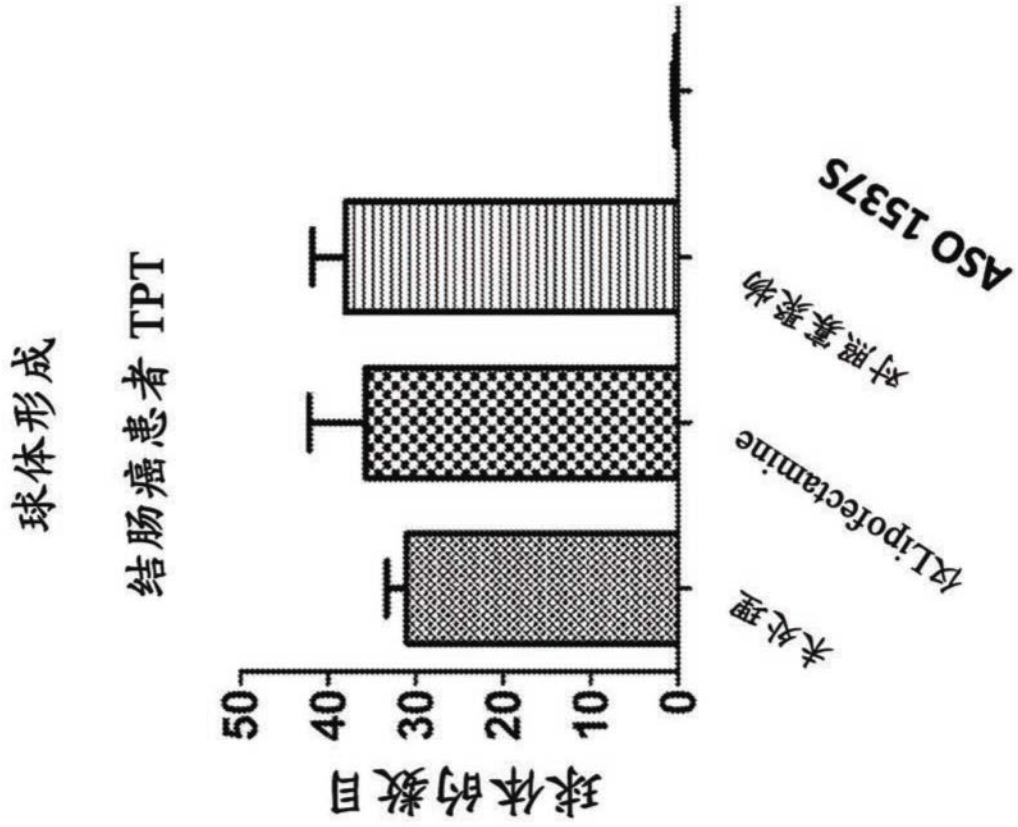

球体形成
结肠癌患者 TPT
球体的数目
50
40
30
20
10
0
未处理
rLipofectamine
对照寡聚物
ASO 15375

图3

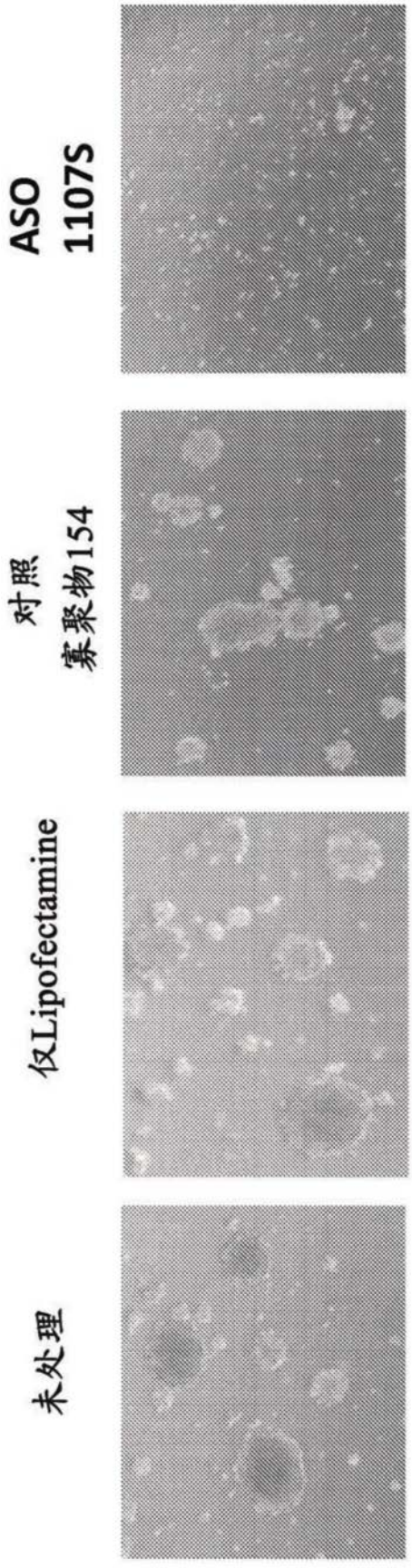


图4

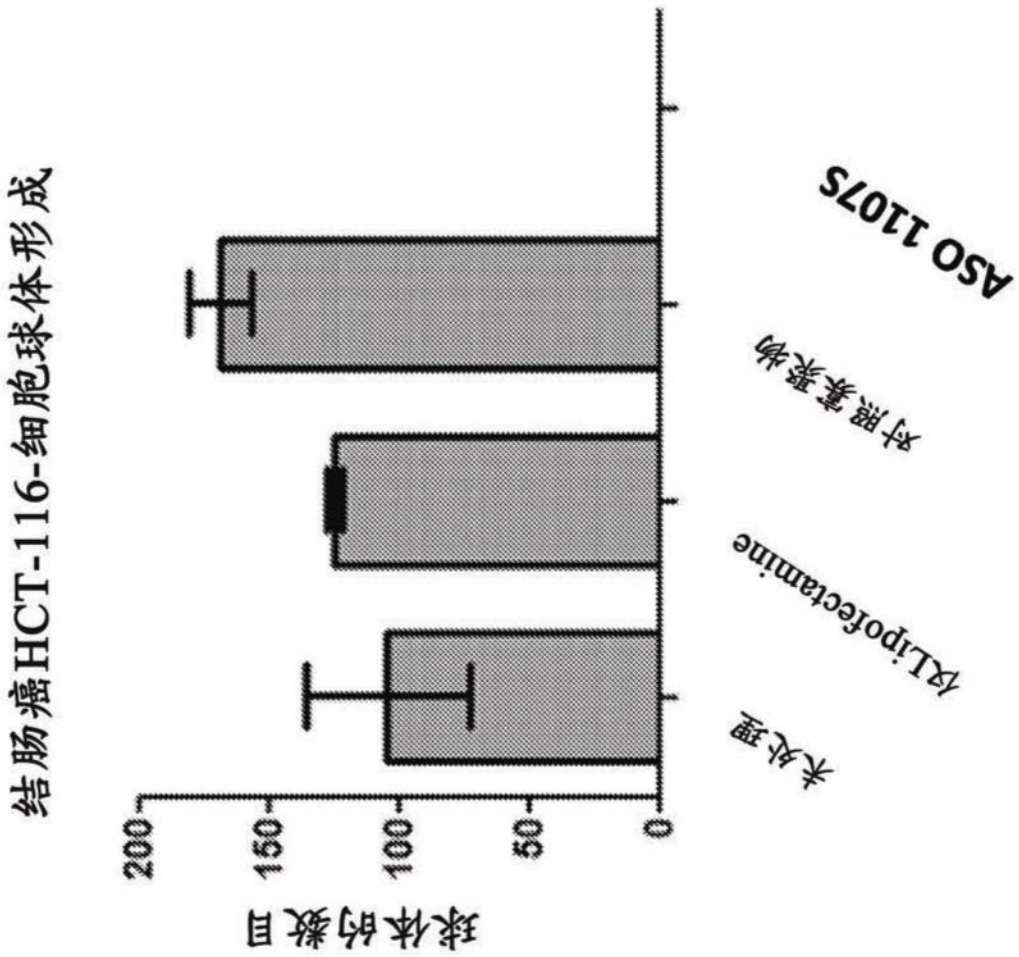

结肠癌HCT-116-细胞球体形成
球体的数目
200
150
100
50
0
未处理
仅Lipofectamine
对照寡聚物
ASO 110TS

图5

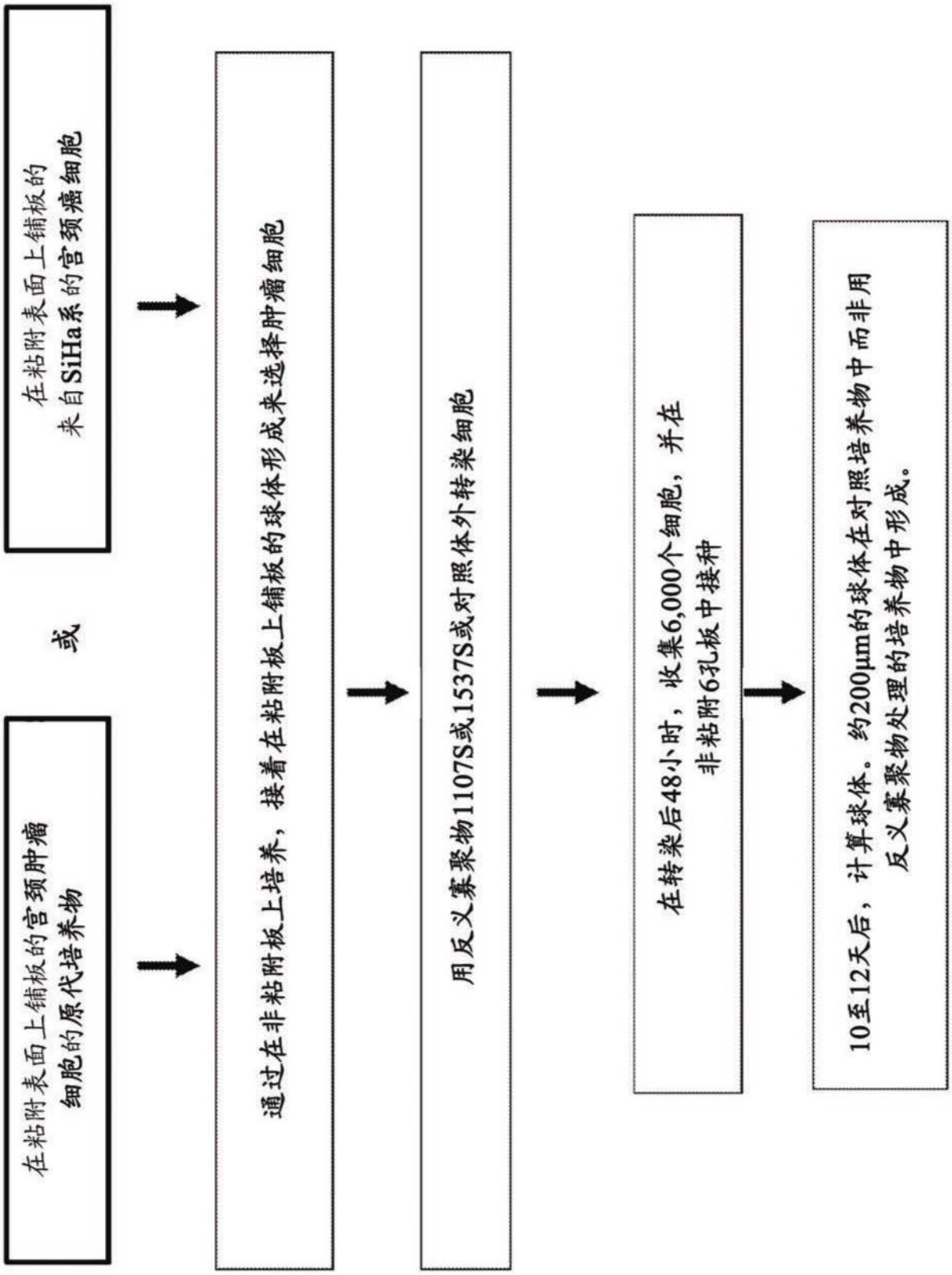

在粘附表面上铺板的宫颈肿瘤细胞的原代培养物
或
在粘附表面上铺板的来自SiHa系的宫颈癌细胞
通过在非粘附板上培养，接着在粘附板上铺板的球体形成来选择肿瘤细胞
用反义寡聚物1107S或1537S或对照体外转染细胞
在转染后48小时，收集6,000个细胞，并在非粘附6孔板中接种
10至12天后，计算球体。约200μm的球体在对照培养物中而非用反义寡聚物处理的培养物中形成。

图6

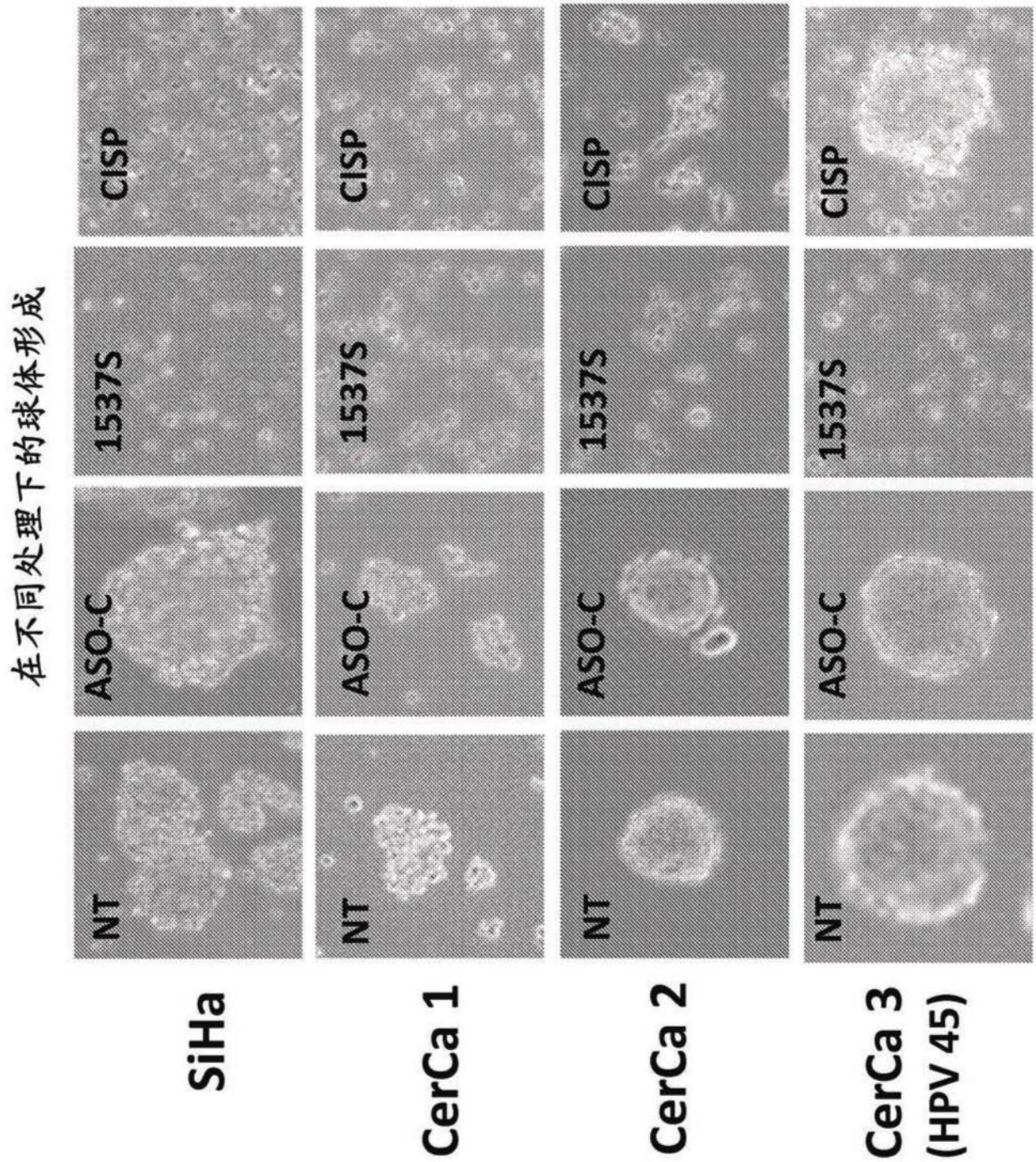

在不同处理下的球体形成
SiHa
CerCa 1
CerCa 2
CerCa 3 (HPV 45)
NT
ASO-C
1537S
CISP

图7

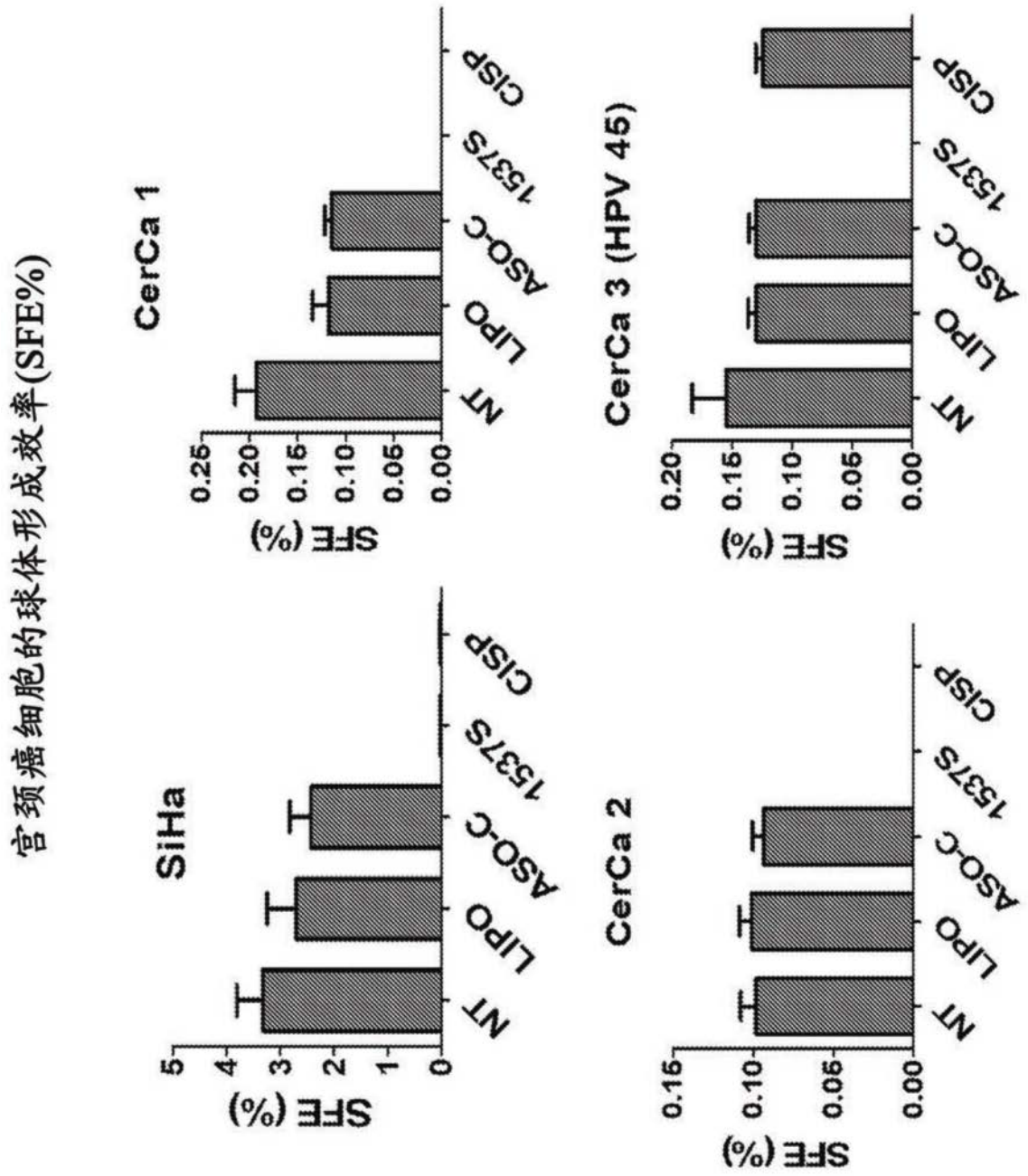

宫颈癌细胞的球体形成效率(SFE%)
CerCa 1
SiHa
CerCa 3 (HPV 45)
CerCa 2
SFE (%)
NT
LIPO
ASO-C
1537S
CISP

图8

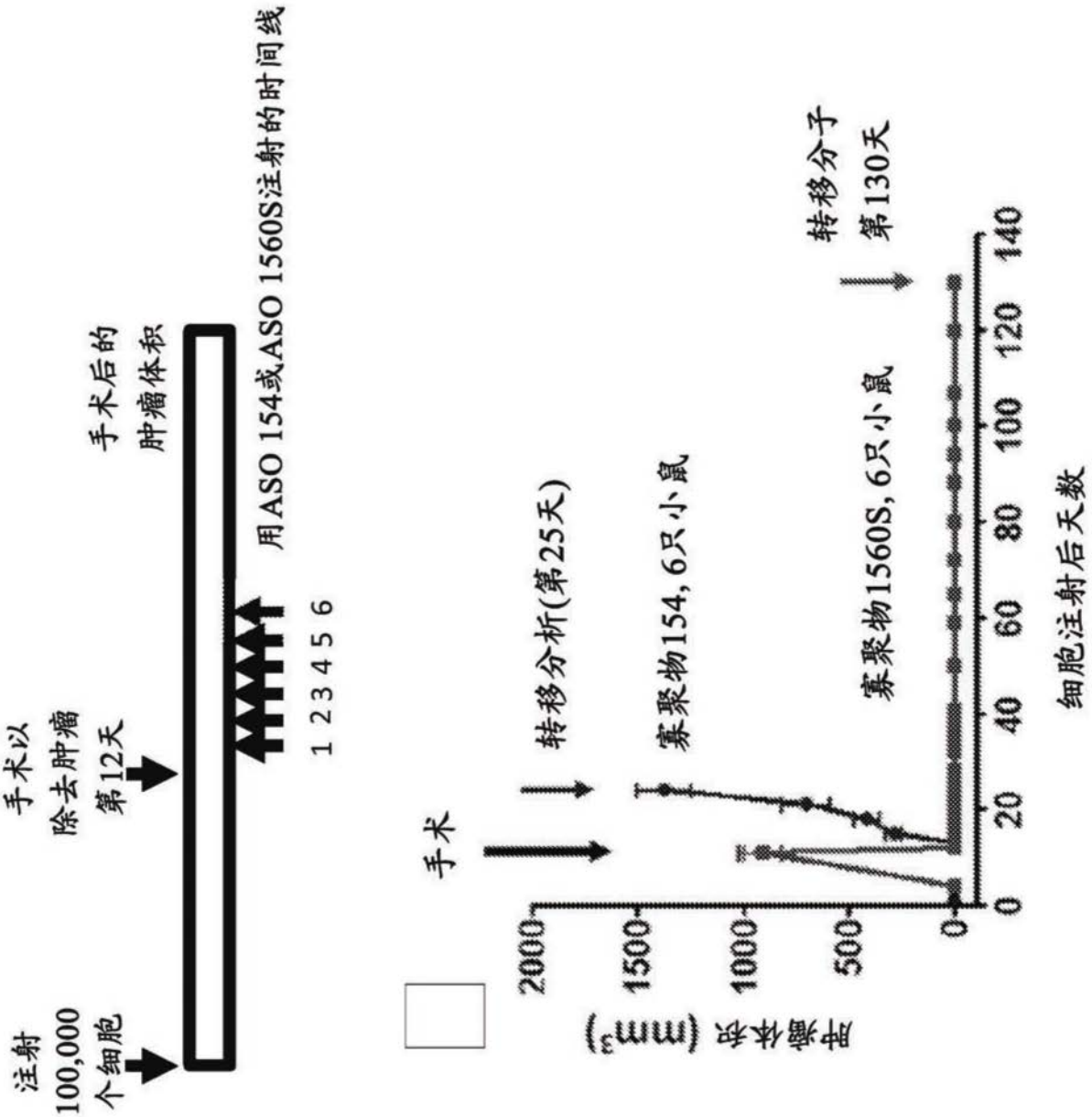

注射
100,000
个细胞
手术以
除去肿瘤
第12天
手术后的
肿瘤体积
用ASO 154或ASO 1560S注射的时间线
1 2 3 4 5 6
手术
转移分析(第25天)
寡聚物154, 6只小鼠
寡聚物1560S, 6只小鼠
转移分子
第130天
肿瘤体积 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
100
120
140
细胞注射后天数

图9

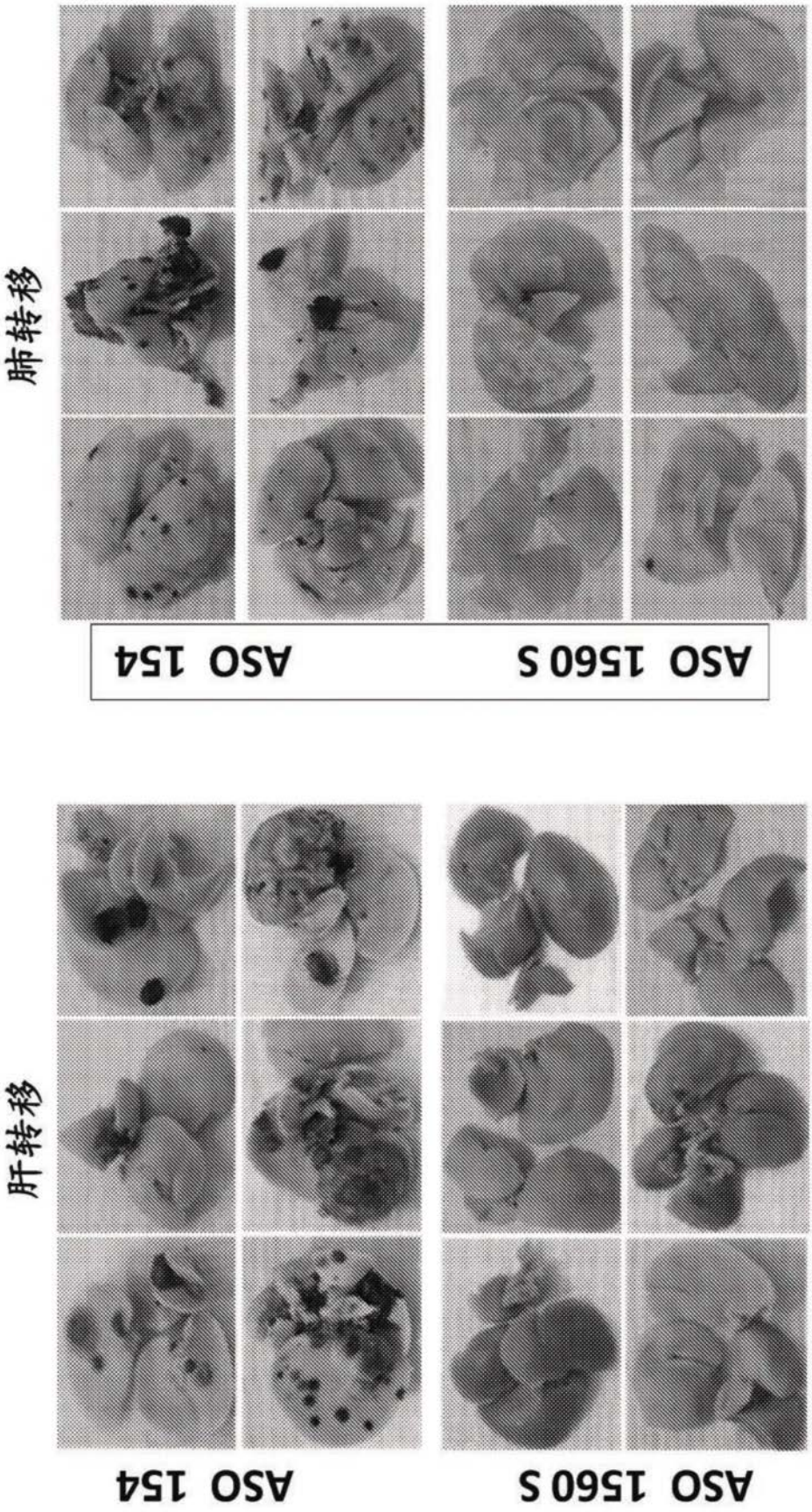


图10

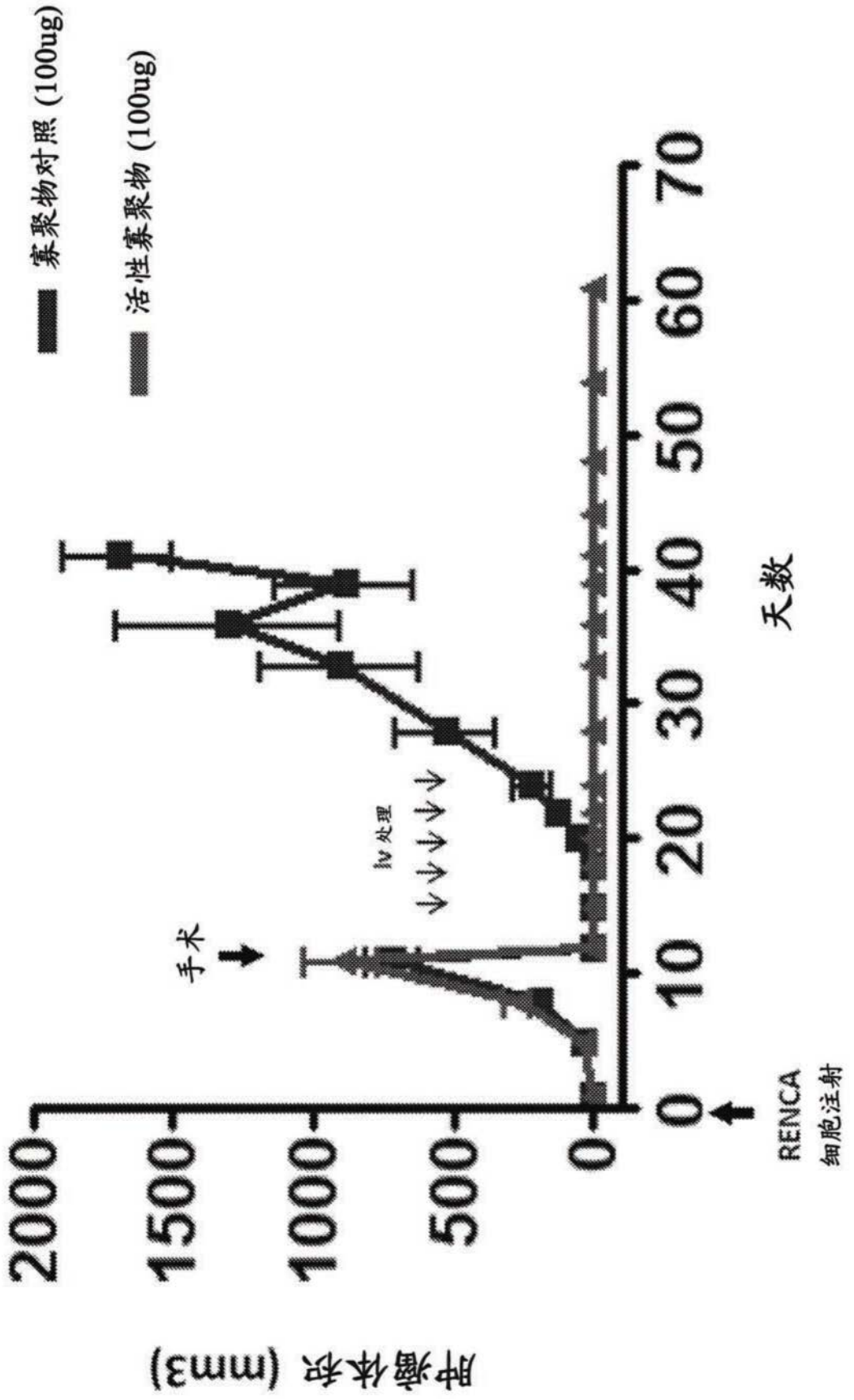

寡聚物对照 (100ug)
活性寡聚物 (100ug)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
手术
iv 处理
0
10
20
30
40
50
60
70
天数
RENCA
细胞注射

图11

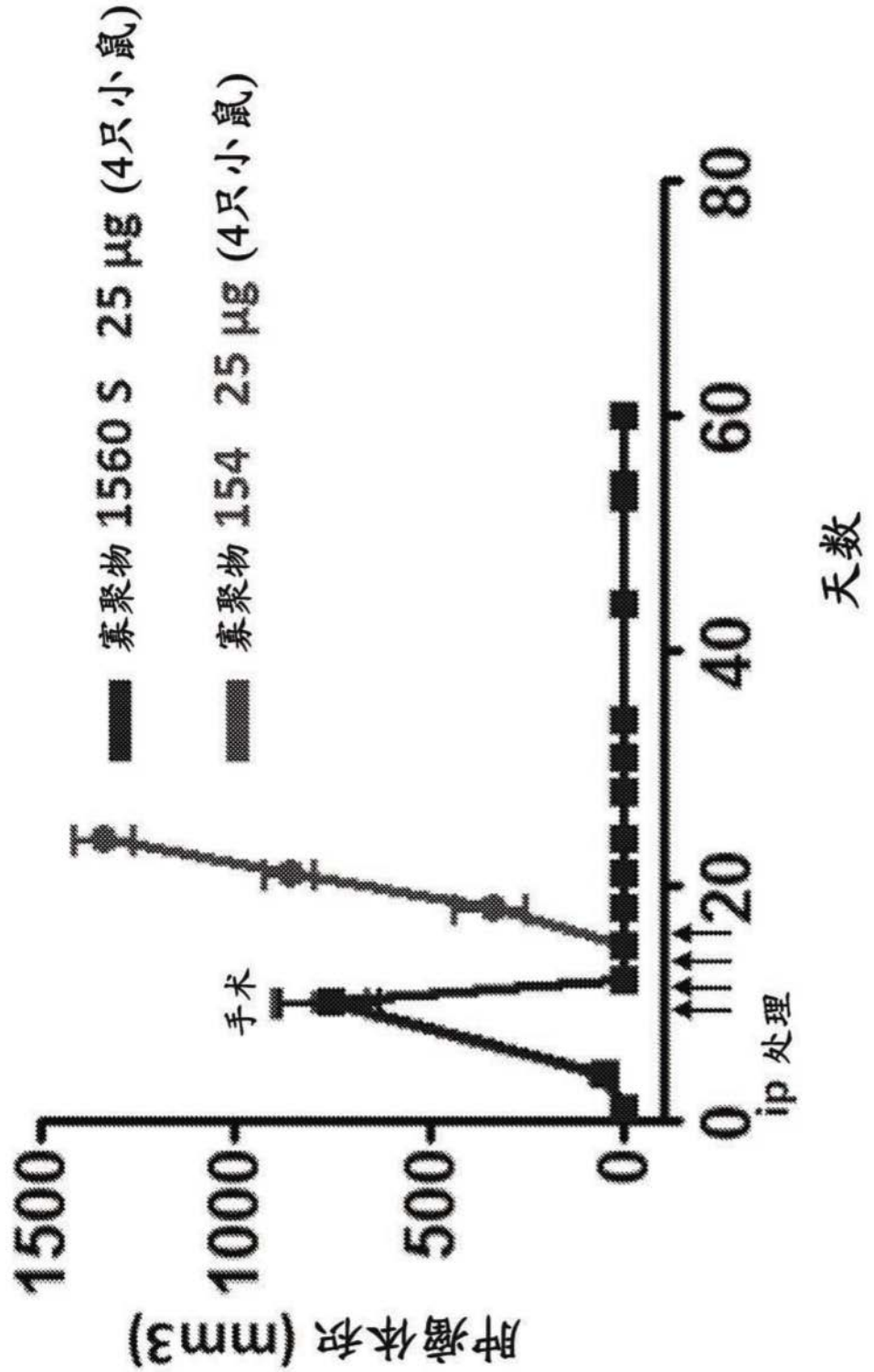

寡聚物 1560 S 25 µg (4只小鼠)
寡聚物 154 25 µg (4只小鼠)
肿瘤体积 (mm3)
1500
1000
500
0
手术
0
20
40
60
80
ip 处理
天数

图12

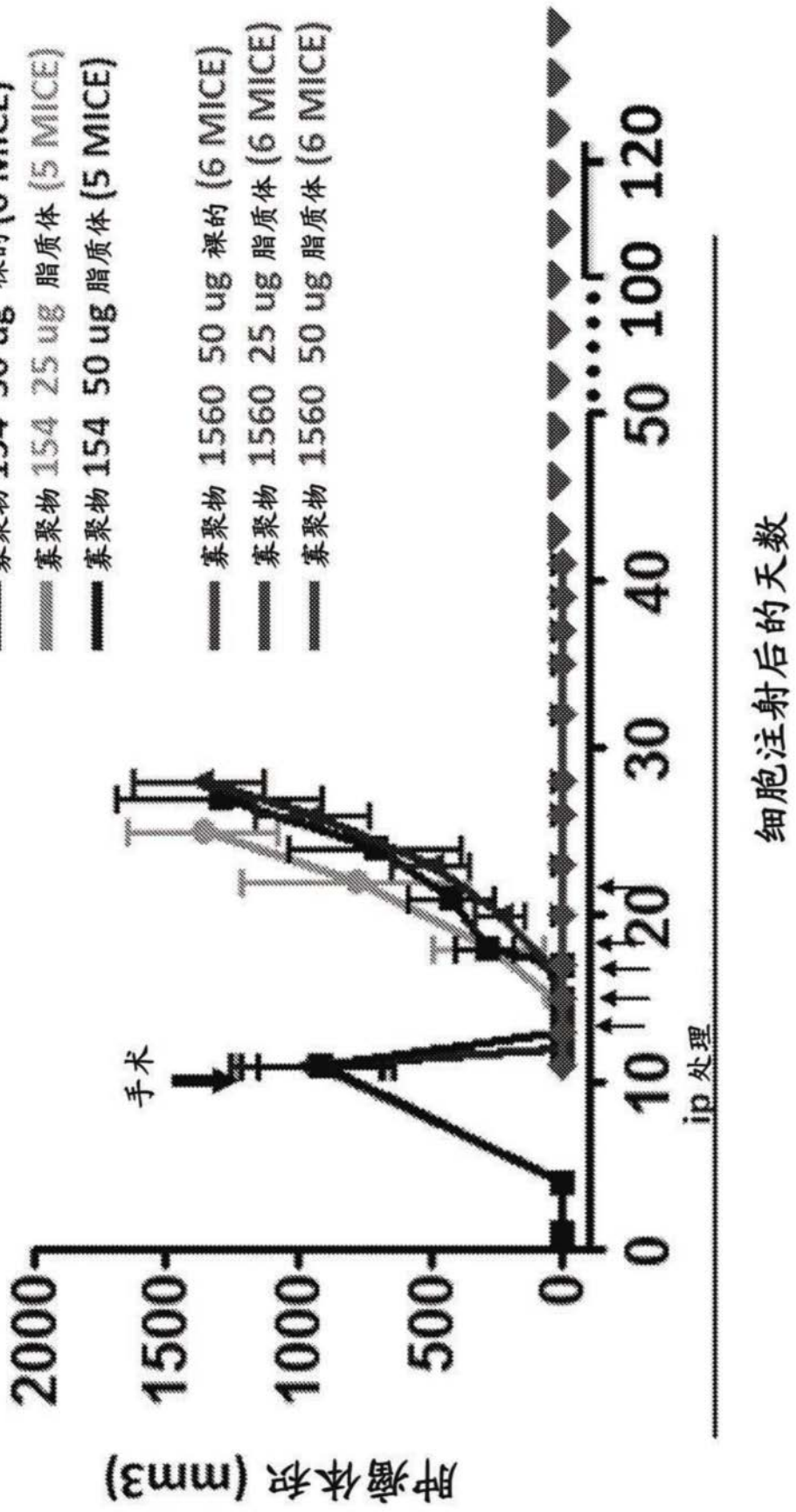

寡聚物 154 50 ug 裸的 (6 MICE)
寡聚物 154 25 ug 脂质体 (5 MICE)
寡聚物 154 50 ug 脂质体 (5 MICE)
寡聚物 1560 50 ug 裸的 (6 MICE)
寡聚物 1560 25 ug 脂质体 (6 MICE)
寡聚物 1560 50 ug 脂质体 (6 MICE)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
手术
ip 处理
0
10
20
30
40
50
100
120
细胞注射后的天数

图13

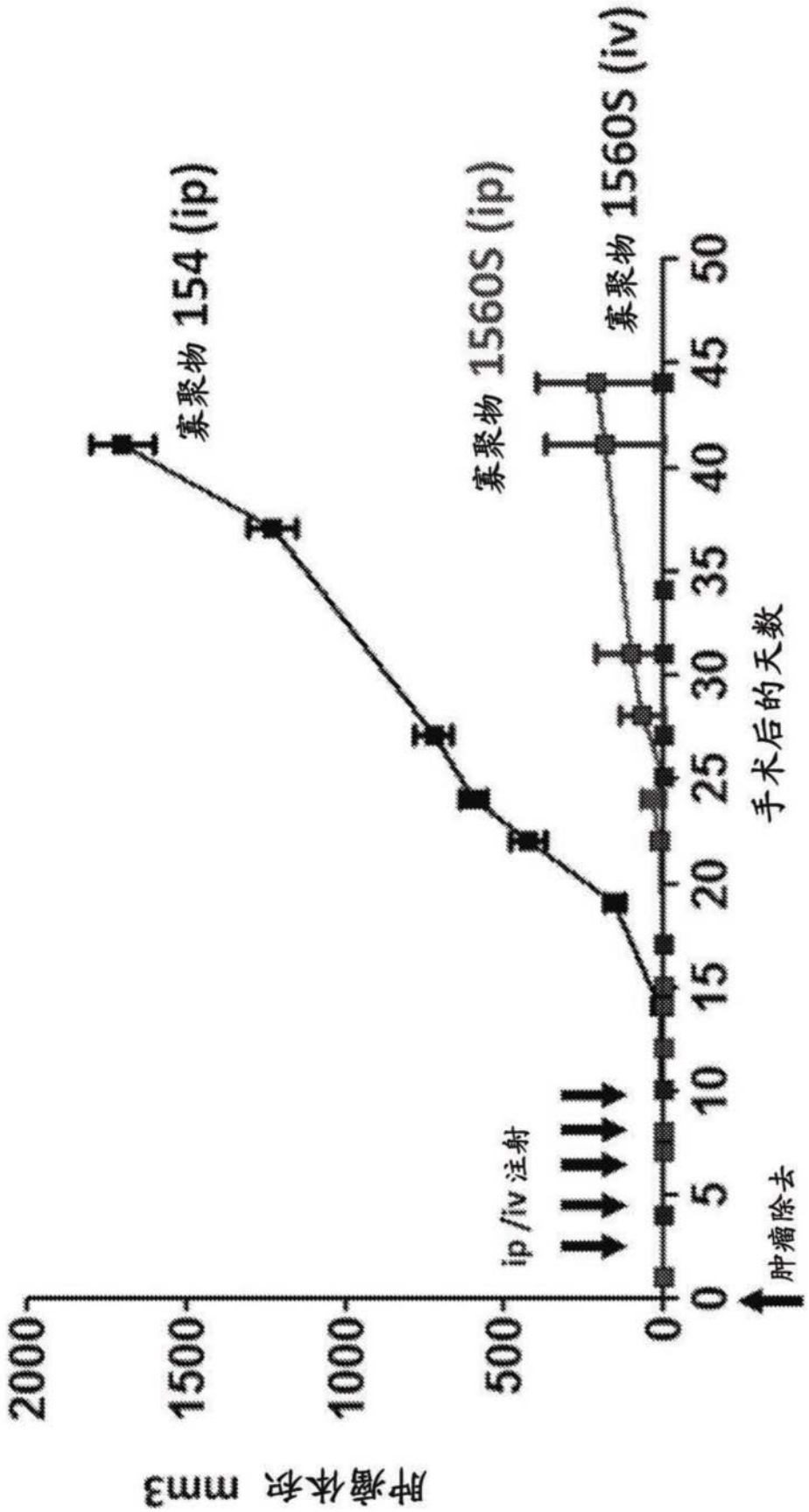

寡聚物 154 (ip)
寡聚物 1560S (ip)
寡聚物 1560S (iv)
ip /iv 注射
肿瘤除去
手术后的天数
肿瘤体积 mm3
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
500
1000
1500
2000

图14

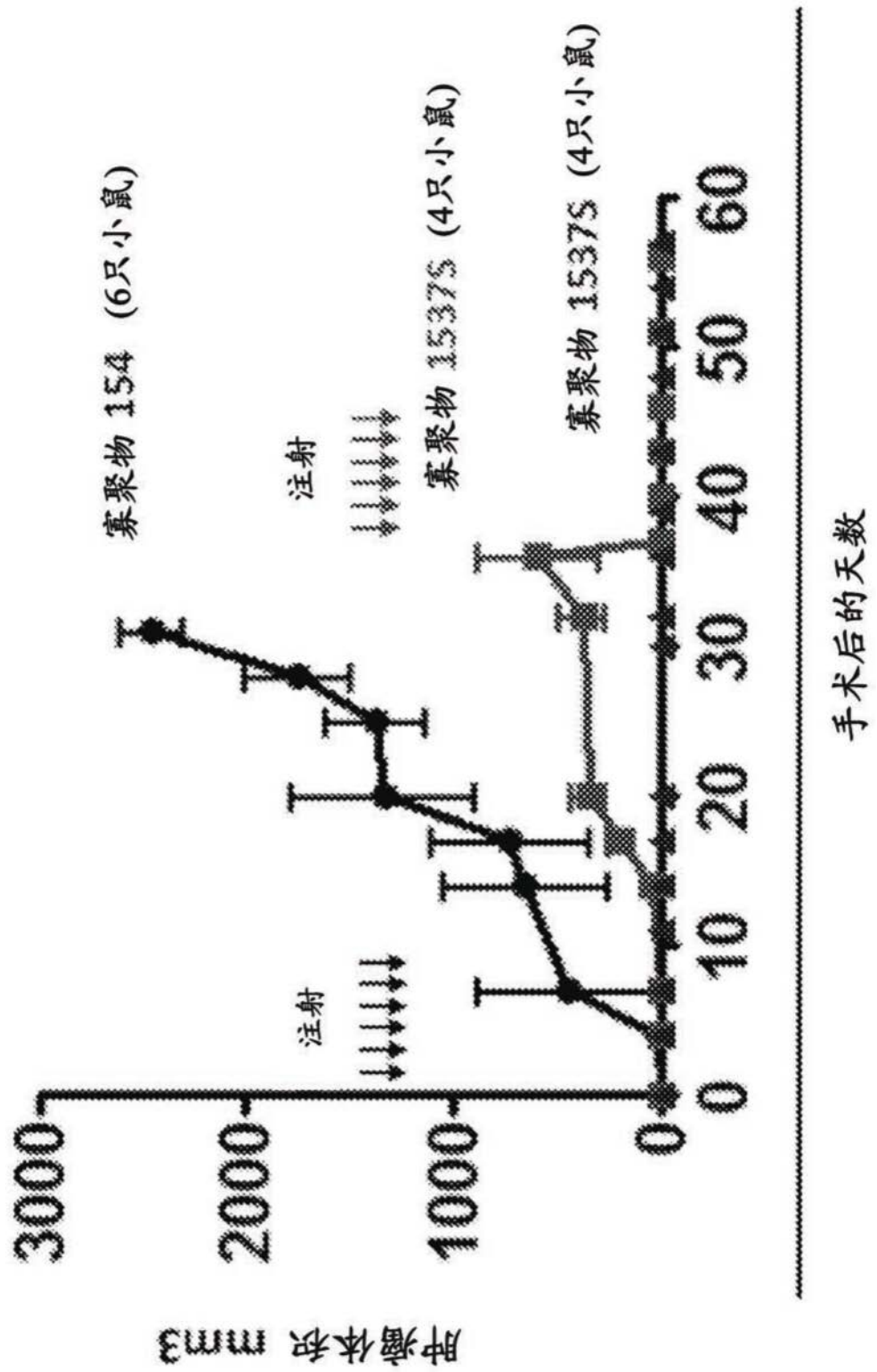

肿瘤体积 mm3
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
50
60
手术后的天数
注射
寡聚物 154 (6只小鼠)
注射
寡聚物 15375 (4只小鼠)
寡聚物 15375 (4只小鼠)

图15