



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101437933 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 06

(21) 申请号 200680053539. 7
 (22) 申请日 2006. 12. 28
 (30) 优先权数据
 60/754, 463 2005. 12. 28 US
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2008. 08. 28
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/US2006/062672 2006. 12. 28
 (87) PCT申请的公布数据
 W02007/087113 EN 2007. 08. 02
 (73) 专利权人 斯克里普斯研究所
 地址 美国加利福尼亚
 (72) 发明人 C·瓦勒斯泰特
 (74) 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283
 代理人 周建秋 王凤桐
 (51) Int. Cl.
 C12M 1/00 (2006. 01)
 C12Q 1/68 (2006. 01)
 C07H 21/04 (2006. 01)

(56) 对比文件
 WO 2004/104161 A2, 2004. 12. 02, 全文.
 US 2003/0190635 A1, 2003. 10. 09, 全文.
 S. Katayama, et al.. Antisense
 Transcription in the Mammalian
 Transcriptome. 《Science》. 2005, 第 309 卷
 1564-1566.

审查员 安玉苹

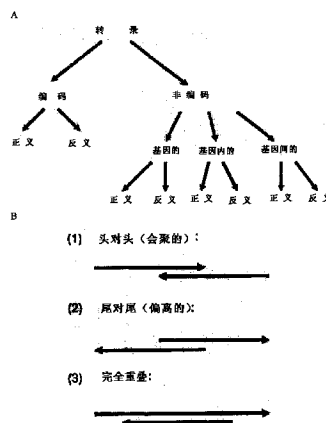
权利要求书1页 说明书62页 附图15页

(54) 发明名称

作为药物靶标的天然反义和非编码的 RNA 转录物

(57) 摘要

小干扰 RNA (siRNA) 敲低反转录, 并调节它们反义链的表达。这种调节或为不一致的 (反义敲低导致正义转录物的增多) 或为一致的 (反义敲低导致一致的正义转录物的减少)。



1. 一种以不一致或一致的方式调节基因表达的方法,其中,该方法不是用于治疗人或动物体的方法,所述方法包括:

在不一致调节的情况下,

将核酸分子靶向正义链的反义转录物,其中,靶向所述反义转录物的核酸分子与反义链互补;并且将所述核酸分子与所述反义转录物结合;其中,所述反义转录物为非编码 RNA 转录物,并且,基于所述核酸分子与所述反义转录物的结合,所述正义链的表达提高,并且基因的表达被上调;

或者,在一致调节的情况下,

将至少一种核酸分子靶向正义转录物和反义转录物,其中,靶向正义转录物的核酸分子与正义链互补,并且其中,靶向反义转录物的核酸分子与反义链互补,其中,所述反义转录物为非编码 RNA 转录物,并且其中,基于所述至少一种核酸分子与所述反义转录物和所述正义转录物的结合,所述正义链的表达被抑制,并且基因的表达被下调,并且

其中,靶向的非编码核酸包括核酸 PINK1、HIF1 α 、Gnbp3g、肾上腺髓质素 AM1 受体、6330439J10(3- 含氧酸 CoA 转移酶)、CtpW85(组织蛋白酶 W) 或 Kif20a。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述核酸分子为 SEQ ID NOs:1-3、4-32、40-61 和 64-67 中的至少一种。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,如 SEQ ID NOs:1-3、4-32、40-61、64-67 所示的核酸分子各自含有至少一个修饰的核碱基。

作为药物靶标的天然反义和非编码的 RNA 转录物

技术领域

[0001] 本发明提供了对异源核苷酸序列具有高度选择性靶向的组合物和方法。寡核苷酸是以序列依赖的方式结合在它们的靶基因上并能够调节靶细胞中非必需核苷酸序列的表达的 siRNA's。而且,如果在细菌或人类细胞的基因组中存在靶标,则 siRNA's 可以特异性地且选择性地杀死细菌或人类细胞。

背景技术

[0002] 在过去几年中,我们对于哺乳动物转录复杂性的认识有了显著的提高,并且已经检测到多种新型的核糖核酸 (RNA) 转录物。这在相当程度上是一个惊喜,因为人类基因组中常规 (编码蛋白) 基因的总数 (约 20,000-25,000) 远低于前些年所预计的,并且与更简单生物体如果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 或线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的基因数具有相同数量级 (Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 (7011):931-945 (2004))。

[0003] 两个主要的转录组学成就以互补的方式,引导建立了哺乳动物转录的新兴修正的观点。第一,世界范围的 FANTOM (哺乳动物转录组的功能注释) 已经产生多年,并分析了主要来自于小鼠以及人类细胞和组织的大量互补 DNA (cDNA) 序列数据 (Carninci, P. 等. (2005) *Science* 309 (5740), 1559-1563; Katayama, S. 等. (2005) *Science* 309 (5740), 1564-1566)。第二,高密度 ("叠瓦") 微阵列实验独立地提供了在人类基因组中广泛发生的转录以及存在许多未知功能的未注释转录的补充证据 (Cheng, J. 等. (2005). *Science* 308 (5725), 1149-1154; Kapranov, P. 等. (2005) *Genome Res* 15 (7), 987-997)。

[0004] RNAs 可被分为:(1) 信使 RNAs (mRNAs), 其被翻译成蛋白;和 (2) 非蛋白编码 RNAs (ncRNAs)。直到最近,仅认识了少量的 ncRNAs (如:tRNAs, rRNAs 和拼接 RNAs), 它们都与蛋白的合成或功能相关。并且,直到几年前,仍未有系统的努力来鉴别新型的 ncRNA 转录物并阐述它们的功能。

发明内容

[0005] 序列特异性 siRNA 结合到靶核酸分子上,并调节基因表达产物的表达。提供了一种方法,其中,靶核酸的上调或抑制对于异常细胞生长、神经系统疾病、异常细胞调节、疾病等的治疗是有效的。本发明还包括药物开发策略。

[0006] 在一个优选实施方式中,上调基因表达的方法包括:以核酸分子靶向正义链的反义转录物,其中,靶向反义转录物的核酸分子与反义链是互补的,并且核酸与反义转录物结合,从而提高正义链的表达,并上调基因的表达。优选地,核酸分子与反义链的结合在高度、中度或低度严格条件下是有效的。任何疾病、异常 (先天的或其它) 肿瘤、由病原体 (如朊病毒、病毒如肿瘤形成病毒) 引起的疾病等;分子靶,如细胞内和细胞外分子 (如受体、酶、细胞因子转录物), 都可通过被设计成靶向所需的正义和 / 或反义位点的分子来处理。还可设计序列特异性 RNA 分子,以使它们靶向重叠序列并靶向互补链。

[0007] 在另一个优选实施方式中,核酸分子是一种 RNA 分子并且包括 SEQ ID NOs :1-67 中的至少一种。

[0008] 在另一优选实施方式中,一种抑制基因表达的方法包括:以核酸分子靶向反义转录物和正义链转录物,其中,靶向反义转录物的核酸分子与反义链是互补的,靶向正义转录物的核酸分子与正义链是互补的;且核酸分子与反义和正义转录物结合,从而抑制基因的表达。优选地,核酸分子是一种 RNA 分子,并且靶向所述反义转录物和正义转录物的核酸分子与所述转录物结合,所述反义转录物与正义转录物彼此会聚、偏离,或者它们是重叠的。在另一个优选实施方式中,核酸分子为 SEQ ID NOs :4-8 中的至少一种,靶向的核酸为编码的或非编码的转录物。

[0009] 在优选的实施方式中,靶向的基因包括 CD97、TS- α 、C/EBP δ 、CDC23、PINK1、HIF1 α 、Gnbp3g、肾上腺髓质素 AM1 受体、6330439J10(3- 含氧酸 CoA 转移酶)、CtpW85(组织蛋白酶 W)、Ddx-39、rTS- α 、I530027A02、Kif20a、PINK-AS、aHIF1 α 、Gnbp3g-AS、AdmR-AS、A230019L24、或 CtpW-AS。优选地,靶向的核酸包括:核酸序列 PINK-AS、aHIF1 α 、Gnbp3g-AS、AdmR-AS、A230019L24、或 CtpW-AS。编码或非编码序列、转录物都可以为靶向的、和/或在 5' -3' 和互补的 3' -5' 序列上重叠的序列。

[0010] 在优选实施方式中,靶向的非编码核酸包括:核酸序列 CD97、TS- α 、C/EBP δ 、CDC23、PINK1、HIF1 α 、Gnbp3g、肾上腺髓质素 AM1 受体、6330439J10(3- 含氧酸 CoA 转移酶)、CtpW85(组织蛋白酶 W)、Ddx-39、rTS- α 、I530027A02、或 Kif20a。

[0011] 在另一个优选实施方式中,药物组合物含有 SEQ ID NOs :1-67 及其变体中的至少一种。

[0012] 在另一个优选实施方式中,分离的核酸含有 SED ID NOs :1-67 及其变体中的任意一种。

[0013] 在另一个优选实施方式中,组合物含有核酸序列,该核酸序列靶向包括 CD97、TS- α 、C/EBP δ 、CDC23、PINK1、HIF1 α 、Gnbp3g、肾上腺髓质素 AM1 受体、6330439J10(3- 含氧酸 CoA 转移酶)、CtpW85(组织蛋白酶 W)、Ddx-39、rTS- α 、I530027A02、Kif20a、PINK-AS、aHIF1 α 、Gnbp3g-AS、AdmR-AS、A230019L24、或 CtpW-AS 的至少一个基因和/或转录物。所述靶向的位点可以为重复序列和/或靶向正义链和反义链。在其他方面,编码和非编码序列均被靶向。

[0014] 在一个优选实施方式中,一种用于治疗帕金森症的方法包括:使用 SEQ ID NO :1-3 中的至少一种对需要的患者进行给药。

[0015] 在另一个优选实施方式中,药物组合物含有位于药学可接受载体中的 SEQ ID NOs :1-67 中的至少一种核酸分子及其变体。

[0016] 在另一个优选实施方式中,核酸分子含有靶向了正义/反义位点的重叠区的 siRNA 分子。例如,一种用于治疗阿尔茨海默病的药物组合物靶向了 BACE 转录物。核酸分子可被设计成靶向 BACE 转录物的重叠序列或位点。在阿尔茨海默病的治疗中,这些重叠靶向特异的分子包括 SEQ ID NOS :41-43 和 SEQ ID NOS :44-45 和它们的变体。

[0017] 在另一个优选实施方式中,表达载体包括 SEQ ID NOS :1-67 及其变体中的任意一种或多种。

[0018] 在另一个优选实施方式中,分离的多肽由 SEQ ID NOS :1-67 和它们的变体中的任

意一种或多种编码。

[0019] 在另一个优选实施方式中,分离的抗体对 BACE-1mRNA、BACE-1-ASRNA、SEQ ID NOS :1-67 和它们的多肽具有特异性。

[0020] 在另一个优选实施方式中,一种用于治疗神经系统疾病的方法包括:使用 SEQ ID NOS :4-8、40-61 和 64-67 及它们的变体中的至少一种对有需要的患者进行给药。该方法还包括:将 SEQ ID NOS :4-8、40-61 和 64-67 组合给药,以靶向正义/反义基因座的重叠区域。

[0021] 在另一个优选实施方式中,在一个疗程内使用 SEQ ID NOS :4-8、40-61 和 64-67 和它们的变体中的至少两种的可变组合对患者进行给药。所述神经系统疾病的实例包括但不限于:阿尔茨海默病 (Alzheimer' s Disease)、失语症 (Aphasia)、贝尔氏麻痹 (Bell' s Palsy)、克雅氏病 (Creutzfeldt-Jakob Disease)、癫痫 (Epilepsy)、脑炎 (Encephalitis)、亨廷顿舞蹈症 (Huntington' s Disease)、神经肌肉障碍神经肿瘤学疾病 (Neuromuscular Disorders Neuro-oncology)、神经免疫学疾病 (Neuro-immunology)、神经耳科学疾病 (Neuro-otology)、疼痛症、恐惧症、睡眠障碍、图雷特综合症 (Tourette' s Syndrome)、帕金森症、和其它运动障碍。

[0022] 在另一个优选实施方式中,一种上调基因表达的方法包括:以核酸分子靶向正义链的反义转录物,其中,靶向反义转录物的核酸分子与反义链是互补的,并且核酸与反义转录物相结合;其中,反义链的表达被提高,并且上调了基因的表达。优选地,所述核酸分子为干扰 RNA 分子。

[0023] 在一个优选实施方式中,所述核酸分子为 SEQ ID NOS :1-3、4-32、40-61、64-67 和它们的变体中的至少一种。在一个方面,SEQ ID NOS :1-3、4-32、40-61、64-67 的核酸分子和它们的变体含有至少一个修饰的核碱基。

[0024] 在另一个优选实施方式中,一种抑制基因表达的方法包括:以核酸分子靶向反义转录物和正义链转录物,其中,靶向反义转录物的核酸分子与反义链是互补的,靶向正义转录物的核酸分子与正义链是互补的;以及,将核酸与反义和正义转录物结合,从而抑制基因的表达。

[0025] 在一个优选实施方式中,靶向反义和正义转录物的核酸分子与所述转录物结合,所述反义转录物与正义转录物彼此会聚、偏离,或者它们是重叠的。优选地,靶向的核酸是编码和/或非编码的转录物。靶向的基因的实例包括:CD97、TS- α 、C/EBP δ 、CDC23、PINK1、HIF1 α 、Gnbp3g、肾上腺髓质素 AM1 受体、6330439J10 (3- 含氧酸 CoA 转移酶)、CtpW85 (组织蛋白酶 W)、Ddx-39、rTS- α 、I530027A02、Kif20a、PINK-AS、aHIF1 α 、Gnbp3g-AS、AdmR-AS、A230019L24、BACE 或 CtpW-AS。靶向的编码核酸的实例包括:核酸序列 PINK-AS、aHIF1 α 、Gnbp3g-AS、AdmR-AS、A230019L24、或 CtpW-AS。靶向的非编码的核酸的实例包括:核酸序列 CD97、TS- α 、C/EBP δ 、CDC23、PINK1、HIF1 α 、Gnbp3g、肾上腺髓质素 AM1 受体、6330439J10 (3- 含氧酸 CoA 转移酶)、CtpW85 (组织蛋白酶 W)、Ddx-39、rTS- α 、I530027A02、或 Kif20a。

[0026] 在另一个优选实施方式中,一种用于治疗与年龄相关的黄斑变性的方法包括:对患者给药 SEQ ID NOS :1-67 及其变体中的至少一种。

[0027] 在另一个优选实施方式中,组合物含有核酸序列,该核酸序列靶向 CD97、TS- α 、C/EBP δ 、CDC23、PINK1、HIF1 α 、Gnbp3g、肾上腺髓质素 AM1 受体、6330439J10 (3- 含氧酸 CoA

转移酶)、CtpW85(组织蛋白酶 W)、Ddx-39、rTS- α 、I530027A02、Kif20a、PINK-AS、aHIF1 α 、Gnbp3g-AS、AdmR-AS、A230019L24、BACE、或 CtpW-AS 中的编码和非编码的任意一种,并靶向重叠序列。

[0028] 下文将描述本发明的其它方面。

附图说明

[0029] 在所附的权利要求中指出了发明的特性。本发明的上述和更多优点可通过结合附图并参照以下说明更好地被理解,其中:

[0030] 图 1A 和 1B 为表现反义转录原理的示意图,图 1A 显示了在哺乳动物转录组内如何生成反义转录物,图 1B 显示了对于反义转录物和正义转录物的重叠存在的三种可能;

[0031] 图 2A-2B 是表现通过调用反义敲低(如:通过利用 siRNA)来改变正义转录水平的两种可能的示意图,图 2A 显示了调节为不一致的情况,图 2B 显示了正义和相应的反义转录物的共同敲低;

[0032] 图 3A 是胸苷酸合成酶(TS-正义)和 rTS α 反义 mRNA 的示意性说明,外显子边界由横断线标注,还标识了用于 TaqMan 的探针和原位杂交的探针以及 S-AS mRNA 的 3' 重叠区的位置;图 3B 显示了用于转染的载体的构建和 S-AS RNA 的产生;正义载体构成具有 3' 正义序列的 RNA,反义载体构成具有 3' 反义序列的 RNA, S-AS 载体构成具有连续的正义-反义序列 RNA,所述连续的正义-反义序列的正义和反义 RNA 序列之间为发夹序列;

[0033] 图 4 是显示 TS 转录物的单细胞 RNA 表达的荧光图像,(a) 反义探针;(b) 正义探针;(c) 结合于海拉细胞(HeLa cell)中固定的逆转录的 TS RNA 的正义和反义探针,探针被设计成以链特异的方式,且包括外显子边界和部分重叠区;(d) 来自肌动蛋白(actin)探针的信号显示了方法正最佳地运行;所有的探针均跨越内含子,以避免来自污染 DNA 的背景信号;

[0034] 图 5 为显示了 TS 正义和反义分子的内源单细胞 mRNA 表达的图;实时 PCR 引物被设计为跨越重叠区和非重叠区;低丰度结合蛋白 TATA 盒的表达也可定量测定试验的灵敏度;所有样品被标准化成 β 2-微球蛋白,且绘制的为 115 个独立细胞的平均结果;

[0035] 图 6 为显示了在三个细胞株(HeLa、SK-N-MC、和 HEPG2)中 TS-正义(TS)及其反义分子(rTS α)、HIF 正义(HIF)及其反义分子(aHIF)的细胞定位图;细胞质 RNA 和核 RNA 被定义为总 RNA;

[0036] 图 7 为显示了细胞质 RNA 的酶保护试验(RPA)印迹图;第 1 道为 HeLa 细胞的细胞质溶解物,第 2 道为过度表达 S-AS 的 HeLa 细胞的细胞质溶解物,第 3 道是以转录的 S-AS RNA 双螺旋体外转染的 HeLa 细胞溶解物,第 4 道是过度表达 S-AS 的 HeLa 细胞的总 RNA,所有的 RNA 均以 RNA 酶 A+T 进行处理,并且经变性 PAGE 进行分离,且可以作为胸苷酸合成酶 mRNA 重叠区的探针;

[0037] 图 8 显示了 Dicer 酶解产物的 RNA 印迹图;道(a) HeLa 细胞中的总 RNA,道(b) 过度表达 S-AS mRNA 的 HeLa 细胞中的总 RNA,道(c) 以 IVT 重叠的 dsRNA 转染的 HeLa 细胞中的总 RNA,道(d) 过度表达连续的 S-AS RNA(m) 标记的 HeLa 细胞中的总 RNA;

[0038] 图 9 为显示了 IFN β 和 OAS2mRNA 表达的图;通过 qRT-PCR 定量测定在以 IVT-dsRNATS 转染的 HeLa 细胞中或过度表达 S-AS 的 HeLa 细胞中,以及参照 HeLa 细胞中的

干扰素反应 ; mRNA 水平被标准化为 GAPDH(甘油 醛 -3- 磷酸脱氢酶) ;

[0039] 图 10A-10B 为显示了小鼠脑和肝的多个区域中 BACE-1 和 BACE-1-AS 的表达谱图 ; 在脑的多个区域中两种转录物丰度比肝中的丰度多 2-5 倍 ; 在采样的脑区域中, 脑皮层和扁桃体表现出这两种转录物的最高表达 (图 10A) ; RNA 印迹分析证实了在小鼠脑组织中 BACE-1 和 BACE-1-AS 的表达 (图 10B) ; BACE-1 和 BACE-1-AS 转录物也在未分化和分化的人成神经细胞瘤 SH-S Y5 Y 细胞中表达 ; 人成神经细胞瘤 SH-S Y5 Y 细胞的诱导分化与 BACE-1-AS 转录物的表达减少约 50% 和 BACE-1 转录物的表达减少约 20% 是相关的 (图 -10B), 表明了正义和 NAT 转录物的表达是一致的 ;

[0040] 图 11A 和 11B 是以 siRNA 处理 SH-SY5Y 细胞后 BACE-1 蛋白的蛋白印迹扫描图 ; 将对照细胞中 BACE-1 蛋白 (道 1) 与以 20nM 的 siRNA 转染的细胞中 BACE-1 (道 2)、BACE-1-AS (道 3)、或两种转录物 (道 4) 进行对比 ;

[0041] 图 12A-12D 为显示了在人 11 号染色体 q23.3 位点中人 BACE-1 位点的基因组结构示意图, (图 12A) 显示了 BACE-1 mRNA 和 BACE-1-AS 的基因组位置和包括小鼠在内的几种其它物种中两种转录物的强的保护模式 ; 由 11 号染色体的负链转录得到 BACE-1, 并由 11 号染色体的正链转录得到 BACE-1-AS 且其包括了 BACE-1 的外显子 6 ; 图 12B 以更大的视图显示了转录方向和位于 BACE-1 和 BACE-1-AS 之间的重叠区 ; 标号为 1、2 和 4 的位点是 BACE-1 siRNA 的靶位点, 并且位点 3 是 RNA 印迹探针位点, 该探针位点为重叠区且能够检测两种转录物 ; 位点 2 和 5 还可以分别代表正义和反义分子的 FISH 探针位点 ; 位点 6、7 和 8 是 BACE-1-AS siRNA 的靶位点, 该靶位点都位于 AS 转录物的非重叠区 ; 位点 5 和 9 分别表示 3' 和 5' RACE (cDNA 末端快速扩增) 的引物位点 ; 图 12C 和 12D 描述了分别来自人和小鼠脑部的 BACE-1-AS 的 RACE 测序数据 (每个 16 个克隆) ; 测序数据揭示了在人和小鼠中的反义转录物含有帽子结构和 poly-A 尾巴, 并经过不同的 剪切 ; 黄色高亮部分是与 BACE-1 正义转录物的重叠区, 绿色高亮部分是来自于我们的测序数据的新区域, 它们在之前的基因组数据库中并不存在 ; 通过以星号 (*) 表示 A 向 G 的转换, 以十字 (+) 表示 C 向 T 的转换, 来标明与基因组序列的点错配 ;

[0042] 图 13A 和 13B 为显示了以合成的 siRNA 使 BACE-1 和 BACE-1-AS 转录物沉默的图 ; 图 13A 显示了通过 BACE-1 (S-a) siRNA 的转染减少了 BACE-1 mRNA, 并使 BACE-1-AS 水平无明显变化 ; 以三种不同 siRNA, (AS-a、AS-b 和 AS-c) 靶向 BACE-1-AS 转录物, 引起 BACE-1 和 BACE-1-AS 转录物的明显下调 ($P < 0.0001$) ; 以 20nM 的靶向转录物非重叠区的 siRNAs, 来转染成神经细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) ; 所有样品被标准化为 18s rRNA, 并以每个 mRNA 占对照阴性 siRNA 样品的百分比作图 ; 图 13B 显示了淀粉质 A β 1-42 蛋白的 ELISA (酶联免疫吸附试验) 检测结果 ; 在以 20nM 的针对 BACE-1 (S-a)、BACE-1-AS (AS-a)、或两者的 siRNA 转染后, 对 HEK-SW 细胞悬浮物中的淀粉质 A β 1-42 蛋白进行分析 ; 结果与以对照 siRNA 转染的细胞作图 ; 以靶向了 BACE-1 或 BACE-1-AS 的 siRNA 转染的 A β 1-42 蛋白明显下调 ($P < 0.0001$) ; 两种 siRNA (每种 10nM) 的组合引起更为明显的下调 ($P < 0.001$)。

[0043] 图 14A-14E 为显示了在体内将合成的未修饰 siRNA 注入小鼠脑部的图 ; 合成的未修饰 siRNA 被设计成靶向 BACE-1 (正义)、BACE-1-AS 的非重叠区以降解 ; 对照 siRNA 具有相似的特性并在之前表现出对人和小鼠基因是无效的 ; 三组小鼠在 2 周的时间内被连续注入 siRNA ; 通过实时 PCR 对来自于每组小鼠的五个组织的 RNA 进行定量测定 ; 图 14A : 背内侧

前额叶皮层 (PFC), 图 14B :腹侧海马, 图 14C :背侧海马, 图 14D :背侧纹状体和图 14E :小脑 ;直接针对 BACE-1 或 BACE-1-AS 转录物的 siRNAs, 使 BACE-1 和 BACE-1-AS 水平相对于对照处理组一致下降 (***) = $P < 0.0001$); 在小脑 (e) 中的两种转录物未发生变化 ($P = 0.1518$), 被认为是不直接与第三脑室接触的组织 ;

[0044] 图 15A-15F 显示了应激诱导的反义转录物的转移 ;图 15A 为显示了 BACE-1 和 BACE-1-AS RNA 在细胞核中与细胞质中分布比较的扫描图 ;在 SH-SY5Y 的 RNA-FISH 图像中, 上板 (upper panels) 的成神经细胞瘤细胞从左至右显示了 DAPI 核染色、覆盖整个细胞的 BACE-1mRNA 信号 (Alexa Flour594)、和两者的重叠 ;下板 (lower panels) 从左至右显示了 DAPI 核染色、BACE-1-AS 信号 (Alexa Flour488), 该信号在核内和两者的重叠内基本是可检测的 ;RT-PCR 数据揭示了在 SH-SY5Y 细胞的核内, BACE-1-AS 转录物丰度是其在细胞质中的约 30 倍, 而在这两个区室中 β 肌动蛋白和 BACE-1mRNA (正义) 基本相等 ;图 15B 显示了 SH-SY5Y 细胞暴露于高渗震动的 30mM 的 KCl 中 5 分钟后, 观察到的 BACE-1-AS 的核保留模式完全消失的扫描图 ;当以 PBS (磷酸盐缓冲溶液) 洗涤细胞, 并将细胞返回常规培养液中孵育 1 小时, 则核保留恢复 ;图像显示了 SH-SY5Y 细胞暴露于 KCl 中 5 分钟后, 来自于核的 BACE-1-AS 信号向细胞质的转移, 从左至右是 DAPI 核染色、整个细胞可检测的 BACE-1-AS 信号 (Alexa Flour594)、和两者的重叠 ;图 15C 为显示了以合成的 $A\beta$ 1-42 多肽作为不同的应激源以监测 BACE-1-AS 核保留的变化的扫描图 ;将 SH-SY5Y 细胞在 $1\mu M$ 的 $A\beta$ 1-42 中暴露 2 小时, 则表现出 BACE-1-AS 远离核 ;经过洗涤多肽, 并将细胞在常规培养液保持 1 小时, 则转移恢复 ;在组板 (set panel) 中描述了经过相同的暴露后 BACE-1-AS 信号的转移, 从左至右为 DAPI 核染色、BACE-1-AS、和两者的重叠 ;在图 15D 中, 7PA2-CHO 细胞先前表现出 $A\beta$ 1-42 的二聚体和低聚体的过渡生成 ;收集这些细胞和对照的亲代 CHO 细胞的条件培养液, 并以 SH-SY5Y 细胞的常规培养液取代培养 2 小时 ;重要地, 只有 7PA2-CHO 细胞的条件培养液可以使 BACE-1-AS 转录物从核向细胞质转移 ;在组板中显示了经过 7PA2 的条件培养液孵育后, 相同的 BACE-1-AS 转移 ;从左至右是 DAPI 核染色、BACE-1-AS、和两种信号的重叠 ;图 15E 为显示了在 HTRF 试验中 APP-tg 小鼠脑部的人 $A\beta$ 1-42 多肽相较于野生型具有明显提高的图 ;图 15F 为显示了 $A\beta$ 1-42 的提高水平类似于体外实验中促使 BACE-1-AS 提高 50% ($P < 0.0001$) 后 BACE-1 也相应地提高的图 ;BACE-1-AS 提高的水平大于 BACE-1 ($P < 0.001$)。

[0045] 图 16A-16E 为显示了亲环素 -60 参与的 BACE-1-AS 的定位 / 调节和 BACE-1 与 BACE-1-AS 转录物的稳定性的图 ;在 HEK-293T 细胞中有效地敲低 Cyp-60, 导致 (图 16A) BACE-1 和 BACE-1-AS 明显的下调 ($P < 0.001$) ;图 16B :以 Cyp-60 siRNA 处理 HEK293T 细胞之后, 发生在较早时间点, 始于转染后 6 小时的 BACE-1-AS 下调 ;图 16C :Cyp-60 siRNA 的处理也明显地降低了 BACE-1-AS 的核保留 ($P < 0.0001$) ;图 16D :通过实时 PCR 测定以 α - 蝇蕈素使 RNA 的合成停止后, 在 HEK-293T 细胞中 BACE-1 与 BACE-1-AS 转录物的稳定性 ;BACE-1-AS 具有比 BACE-1 和 β - 肌动蛋白更短的半衰期 ;RNA 聚合酶 III 的产物 18s rRNA 是不变的且可被作为内源对照 ;图 16E :以 7PA2 细胞的条件培养液孵育 SH-SY5Y 细胞, 可引起 BACE-1-AS 向细胞质的转移, 可使 BACE-1 的稳定性有明显的增强 ($P < 0.001$) ;

[0046] 图 17 为显示了 BACE-1-AS 介导调节 BACE-1 及其参与阿尔茨海默病病理生理学机理的示意图 ;通过与亲环素 60 (Cyp-60) 和 / 或某些其它未知蛋白的相互作用,

BACE-1-AS RNA 在无应激条件下主要位于核内；不同类型的细胞应激源可有效地启动可导致 BACE-1-AS 转移的一系列事件，然后引起 BACE-1mRNA 稳定性的增强；BACE-1 水平的提高增强了 A β 1-42 的生成，导致 A β 聚集和 A β 斑块的形成；这些后续事件表现为有效的细胞应激源，并由于前馈机制导致从核内释放出更多的 BACE-1-AS。

具体实施方式

[0047] 小干扰 RNA (siRNA) 敲低反义转录物，并调节它们的正义链的表达。这种调节或者是不一致的（反义敲低导致正义转录物的增多）或者一致的（反义敲低导致一致的正义转录物的减少）。提供了基于以 siRNA（或其它 RNA 靶向原理）敲低反义 RNA 转录物的新药理学策略。在不一致调节的情况下，反义转录物的敲低提高了常规（正义）基因的表达，因此令人信服地模拟激动剂 / 活化剂的作用。在一致调节的情况下，反义和正义转录物的一致敲低导致了常规（正义）基因表达的协同作用降低。

[0048] 定义

[0049] 除非另有解释，本文所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解相同的含义。类似于或等效于本文所述的任何方法和材料均可被用于实践或实施本发明，本文描述了优选的方法和材料。

[0050] 除非文中另有明确指示，本文所用的单数形式“一种”“一个”和“该”包括复数指示物。

[0051] 本文所用的术语“特异性的寡核苷酸”是指具有 (i) 可以与靶基因的一部分形成稳定复合物的序列的寡核苷酸，或具有 (ii) 可以与靶基因 mRNA 转录物的一部分形成稳定双螺旋体的序列的寡核苷酸。

[0052] 本文所用的，术语“寡核苷酸”“siRNA”“siRNA 寡核苷酸”和“siRNA 的”在整个说明书中可交替使用，并包括天然和 / 或修饰的单体或连接的线性或环状低聚物，包括：脱氧核糖核苷、核糖核苷、及其取代和 α 异头形式、肽核酸 (PNA)、锁核酸 (LNA)、硫代磷酸、甲基磷酸，等等。寡核苷酸能够以单体与单体相互作用的常规模式方式，特异地结合到靶多核苷酸上，例如，碱基配对的沃森 - 克里克 (Watson-Crick) 模式，碱基配对的虎格斯梯恩 (Hoögsteen) 或反 Hoögsteen 模式，或等等。

[0053] 寡核苷酸可以是“嵌合的”，即包括不同的区域。在本发明中“嵌合”化合物是寡核苷酸，含有两个或多个化学区域，例如 DNA 区、RNA 区、PNA 区等。每个化学区域由至少一个单体单位组成，即在寡核苷酸化合物的情况下为一个核苷酸。这类寡核苷酸通常含有至少一个区域，其中，对所述寡核苷酸进行修饰以使其表现出一种或多种所需的特性。例如，寡核苷酸所需的特性包括但不限于：增加对核酸酶降解的抗性、增加细胞吸收、和 / 或增加与靶核酸的结合亲和力。因此，寡核苷酸的不同区域可具有不同的特性。本发明的嵌合寡核苷酸可以形成两个或多个上述的寡核苷酸、修饰的寡核苷酸、寡核苷和 / 或寡核苷酸类似物的混合结构。

[0054] 寡核苷酸可以含有能够连接至“重合体”中的区域，即单体是连续连接的，如天然 DNA、或经“间隔臂”连接的。间隔臂能够构成区域之间的共价“桥”，并在优选情况下具有不超过约 100 个碳原子的长度。间隔臂可以执行不同的功能，例如，具有阳性或阴性电荷，执行特定的核酸结合特性（嵌入剂、小沟粘合分子、毒素、荧光体等），具有亲脂性，诱导形成

特定的二级结构类似物（例如诱导形成 α 螺旋的含有丙氨酸的肽）。

[0055] 本文所用的，术语“单体”通常指示由磷酸二酯键连接的单体或其类似物以形成大小从几个单体单元如从大约 3-4 至大约几百个单体单元的寡核苷酸。磷酸二酯连接的类似物包括：硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、磷酸硒酯 (phosphoroselenoate)、氨基磷酸酯等等，更多如下文所述。

[0056] 在本文中，术语“核碱基 (nucleobase)”包括天然存在的核碱基以及非天然存在的核碱基。本领域技术人员应该明确的是，先前被认为是“非天然存在”的多个核碱基，随后也在自然中被发现。因而，“核碱基”不仅包括已知的嘌呤和嘧啶杂环，还包括杂环类似物及其异构体。核碱基的示例性实例为：腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、嘌呤、黄嘌呤、氨基嘌呤、8-氧代-N⁶-甲基腺嘌呤、7-去氮黄嘌呤、7-去氮鸟嘌呤、N⁴, N⁴-乙醇胞嘧啶、N⁶, N⁶-乙醇-2,6-二氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-(C³-C)-炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、拟异构胞嘧啶、2-羟基-5-甲基-4-三唑吡啶、异构胞嘧啶 (isocytosine)、异构鸟嘌呤 (isoguanin)、次黄嘌呤、和 Benner 等在美国专利 No. 5, 432, 272 中所述的“非天然存在”核碱基。术语“核碱基”包括每个和所有这些实例以及它们的类似物和异构体。特别感兴趣的核碱基是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、和尿嘧啶，它们被认为是与人类治疗和诊断应用相关的天然存在的核碱基。

[0057] 本文所用，“核苷”包括天然核苷，包括 2' - 脱氧和 2' - 羟基形式，如 Kornberg 和 Baker 在第二版的 DNA 的复制 (Freeman, San Francisco, 1992) 中所描述的。

[0058] 关于核苷“类似物”包括具有修饰碱基基团和 / 或修饰糖基的合成核苷，例如，由 Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, Nucl. Acid. Res., 1997, 25 (22), 4429-4443, Toulme, JJ., Nature Biotechnology 19 :17-18 (2001); Manoharan M., Biochemica et Biophysica Acta 1489 :117-139 (1999); Freier S., M., Nucleic Acid Research, 25 :4429-4443 (1997), Uhlman, E., Drug Discovery & Development, 3 :203-213 (2000), Herdewin P., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10 :297-310 (2000),) 通常所述的; 2' -O, 3' -C- 连接 [3. 2. 0] 双环阿拉伯糖核苷 (参见例如 N. K. Christensen., 等 J. Am. Chem. Soc, 120 :5458-5463 (1998))。这些类似物包括：被设计成能够增强结合特性（如双螺旋或三螺旋的稳定性、特异性、或类似）的合成核苷。

[0059] 涉及双螺旋或三螺旋结构的术语“稳定性”，通常是指反义寡核苷酸与它的指定靶序列结合的紧密程度，更具体而言，“稳定性”是指在生理条件下双螺旋或三螺旋结构的自由能。如下文所述的在标准条件组下的熔解温度是双螺旋和 / 或三螺旋稳定性的简便度量。优选地，本发明所选的寡核苷酸其在 pH7.0 的 100mM NaCl, 0.1mM EDTA 和 10mM 磷酸缓冲水溶液中，在寡核苷酸和靶核酸都是 1.5 μ M 的标准浓度下，所具有的熔解温度至少为 45 $^{\circ}$ C。因而，当在生理条件下使用时，双螺旋或三螺旋结构将基本保持与抗原和它的靶序列解离的状态。应理解的是，在某些实施方式中稳定的双螺旋或三螺旋包括碱基对和 / 或三螺旋中碱基三重体的错配。优选地，本发明的修饰寡核苷酸，例如含有 LNA 单位，能够与它们的靶核酸形成完美配对的双螺旋和 / 或三螺旋。

[0060] 本文所用的，涉及核苷酸序列方向的术语“下游”表示从 5' -3' 末端的方向。类似地，术语“上游”表示从 3' -5' 末端的方向。

[0061] 本文所用的，术语“基因”表示基因和它们的目前已知的变体和可以解释的任何更

多变体。

[0062] 本文所用的,多肽的“变体”是指一个或多个氨基酸残基发生变化的氨基酸序列。变异可以是“保守的”改变,即取代氨基酸具有类似的结构或化学特性(如异亮氨酸代替亮氨酸)。更罕见地,变异可以是“非保守”改变(如色氨酸代替甘氨酸)。类似的次要变异还包括:氨基酸缺失或插入,或两者都有。可利用本领域公知的计算机程序,例如 LASERGENE 软件(DNASTAR)来探查确定哪个氨基酸残基被取代、插入、或缺失后不会丧失生物活性。

[0063] 用于多核苷酸序列的术语“变体”可包括与野生型基因相关的多核苷酸序列。该定义还包括,例如“等位基因”“剪切”“物种”或“多态性”变体。剪切变体可具有参照分子的重要特性,但由于在 mRNA 过程中交替的外显子的接合,剪切变体通常具有更大或更小的多核苷酸数目。相应的多肽可拥有附加的功能结构域或缺失结构域。物种变体是在不同物种间变化的多核苷酸序列。在本发明中特别有效的是野生型靶基因产物的变体。变体可由在核酸序列上的至少一个突变造成,并可形成被该改变的 mRNAs 或结构或功能可能会改变或不会改变的多肽。任何给定的天然或重组基因可能不具有、或具有一个或多个等位基因形式。常见的可产生变体的突变通常归因于核苷的天然缺失、增加、或取代。在一个给定序列中,每种类型的变化可能单独地或与其它类型组合地发生一次或多次。

[0064] 最终的多肽通常具有相互之间相关的重要氨基酸特性。多态性变体是给定物种的不同个体之间特定基因的多核苷酸序列的变异。多态性变体还可包括“单核苷酸多态性”(SNPs,)或由一个碱基改变多核苷酸序列的单碱基突变。SNPs 的存在可指示例如具有疾病状态倾向性的特定群体,具有易感性对抗性。

[0065] 本文所用的,术语“mRNA”是指目前已知的靶基因的 mRNA 转录物,和可解释的任何更多转录物。

[0066] 由“所需的 RNA”分子表示对于治疗、诊断或其它观点有益的任何外源 RNA 分子。这类分子包括:反义 RNA 分子、诱骗 RNA 分子、酶 RNA、治疗编辑 RNA、和激动剂或拮抗剂 RNA。

[0067] 由“反义 RNA”表示以 RNA-DNA 相互作用的方式与其它 RNA(靶 RNA)结合并改变靶 RNA 活性的非酶 RNA 分子(Eguchi 等,1991Annu. Rev. Biochem. 60,631-652)。

[0068] RNA 干扰“RNAi”是由具有它们的靶核酸序列的序列特异性同源体的双链 RNA(dsRNA)分子所介导的(Caplen, N. J., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9742-9747(2001))。对果蝇无细胞溶解物的生物化学研究表明,在本发明特定实施方式中, RNA 依赖的基因沉默的中介物是 21-25 个核苷酸的“小干扰”RNA 双螺旋(siRNAs)。因此, siRNA 分子适宜用于本发明的方法中。siRNA 源自于以被称为 Dicer 的 RNA 酶处理的 dsRNA(Bernstein, E., 等, Nature 409:363-366(2001))。siRNA 双螺旋产物形成被称为 RISC(RNA 诱导沉默复合物)的多蛋白 siRNA 复合物。不受任何特定理论的限制,认为 RISC 之后会被引领至靶核酸(适宜的 mRNA),其中 siRNA 双螺旋以序列特异的方式相互作用,以便通过催化方式来介导裂解(Bernstein, E., 等, Nature 409:363-366(2001);Boutla, A., 等, Curr. Biol. 11:1776-1780(2001))。本发明还可使用的小干扰 RNAs,可通过本领域所公知的并为普通技术人员所熟知的程序来合成和使用。适宜用于本发明方法的小干扰 RNAs 含有约 0-50 个核苷酸。在非限制性的实施方式中, siRNAs 可含有约 5-40 个核苷酸、约 5-30 个核苷酸、约 10-30 个核苷酸、约 15-25 个核苷酸、约 20-25 个核苷酸。

[0069] 通过可自动排列核酸序列并指明相同或同源区域的计算机程序,可便捷地选择适

宜的 RNAi。这类程序可用于比对获得的核酸序列,例如通过搜索数据库如 GenBank,或通过对 PCR 产物进行测序。在一定范围的物种内,进行核酸序列比对可以选择出在物种间显示出具有适宜程度的同一性的核酸序列。对于还未测序的基因,通过 DNA 印迹法可测定靶物种与其它物种的基因之间的同一性程度。如本领域所公知的,通过在不同严格程度下进行 DNA 印迹法可以获得同一性的近似测量。这些程序可选择表现出与将被控制个体中的靶核酸序列具有高度互补性以及与其它物种中相应的核酸序列具有较低程度的互补性的 RNAi。本领域技术人员会认识到,可以在相当范围来选择用于本发明的适宜的基因区域。

[0070] 由“酶 RNA”表示具有酶活性的 RNA 分子 (Cech, 1988/. American. Med. Assoc. 260, 3030-3035)。酶核酸(核酸酶)通过先与靶 RNA 结合来起作用。通过靶向结合酶核酸的靶向结合位点来进行所述结合,所述酶核酸紧临能够裂解靶 RNA 的分子的酶部分。因而,酶核酸首先进行识别,然后通过碱基配对与靶 RNA 结合,并且一旦结合到正确位点上,就以酶的作用方式对靶 RNA 进行酶切。

[0071] 由“诱骗 RNA”表示模拟配基的天然结合结构域的 RNA 分子。因此诱骗 RNA 与天然结合靶竞争性地与特定配基相结合。例如,已显示出过度表达的 HIV 反式激活反应 (TAR) RNA,可作为“诱骗”有效地与 HIV tat 蛋白结合,从而防止它与 HIV RNA 编码的 TAR 序列的结合 (Sullenger et al, 1990, Cell, 63, 601-608)。这是一个特例。本领域技术人员会认识到,除了一个实例外,利用本领域公知技术可较容易地产生其它实施方式。

[0072] 术语“互补”是指若一个序列能以反向平行的方式与另一序列结合,则这两个序列是互补的,其中每个序列的 3' 末端与另一序列的 5' 末端结合且一个序列中的每个 A、T(U)、G、和 C 分别与另一序列的 T(U)、A、C、和 G 配对。正常地,寡核苷酸的互补序列与指定序列具有至少 80% 或 90%, 优选 95%, 最优选 100% 的互补性。优选地,可识别它的等位基因或变体。BLAST 程序还可用于评价这种序列的同一性。

[0073] 涉及多核苷酸序列的术语“互补序列”是指符合碱基配对规则的另一核酸分子的碱基序列。更具体而言,术语或类似术语是指在核苷酸或核酸之间的杂交或碱基配对,例如,在双链 DNA 分子的两条链之间或在寡核苷酸引物和待测序的或扩增的单链核酸的引物结合位点之间。互补核苷酸通常是 A 和 T(或 A 和 U),或 C 和 G。当最佳地排列和比对与具有适宜的核苷酸插入或缺失的一条链的核苷酸与另一条链的核苷酸具有至少约 95% 的配对,通常为至少约 98% 的配对,更优选为约 99% -100% 配对,则两条单链 RNA 或 DNA 分子被称为是完全互补的。通过各种方法包括使用公知的计算机算法和软件,例如 BLAST 程序,可识别互补的多核苷酸序列。

[0074] 涉及双螺旋或三螺旋结构的术语“稳定性”通常是指反义寡核苷酸与它的指定靶序列结合的紧密程度,更具体而言,“稳定性”是指在生理条件下双螺旋或三螺旋结构的自由能。如下文所述的在标准条件组下的熔解温度是双螺旋和 / 或三螺旋稳定性的简便度量。优选地,本发明所选的寡核苷酸其在 pH7.0 的 100mM NaCl, 0.1mM EDTA 和 10mM 磷酸缓冲水溶液中,在寡核苷酸和靶核酸都是 1.5 μ M 的标准浓度下,具有的熔解温度至少为 45°C。因而,当在生理条件下使用时,双螺旋或三螺旋结构将基本保持抗原和它的靶序列解离的状态。应理解的是,在某些实施方式中稳定的双螺旋或三螺旋 包括:碱基对和 / 或三螺旋中碱基三重体的错配。优选地,本发明的修饰的寡核苷酸(例如含有 LNA 单位),能与它们的靶核酸形成完美配对的双螺旋和 / 或三螺旋。

[0075] 本文所用的,术语“热力学熔点 (T_m)”代表在指定的离子强度、pH、和核酸浓度下,可使与靶序列互补的 50%的寡核苷酸与靶序列处于杂交平衡的温度。由于靶序列通常是过量的,因而在 T_m 下,50%的寡核苷酸处于平衡。通常的,对于短的寡核苷酸(例如 10-50 个核苷酸),严格条件是指盐浓度至少为 0.01-1.0M 的 Na 离子浓度(或其它盐)pH7.0-8.3 且温度为至少 30°C。还可通过添加去稳剂如甲酰胺以达到严格条件。

[0076] 术语“严格条件”是指可使寡核苷酸与它的靶子序列进行杂交,但仅与其它序列不牢固地杂交或不与其它序列杂交,以能够识别出差异的条件。严格条件是序列依赖的,并在不同的环境下是有差异的。在较高温度下,更长的序列可特异性杂交。通常地,所述严格条件选择比在指定离子强度和 pH 下的特定序列的热力学熔点低约 5°C。

[0077] 术语“靶核酸”是指可与被设计的寡核苷酸进行特异性杂交的核酸(通常来自于生物样品)。需要检测靶核酸的存在或缺乏,或定量靶核酸的量。靶核酸具有与相应的靶向寡核苷酸的核酸序列互补的序列。术语靶核酸可以是寡核苷酸直接针对的更大核酸的特定子序列,或需要检测其表达水平的整个序列(如基因或 mRNA)。将在本文中阐明其使用上的区别。

[0078] 本文所用的,“药学可接受的”成分/载体等是适宜用于人和/或动物且无不适当的不良副作用的(如毒性,刺激性和过敏反应)并具有相称的合理效益/风险比的成分。

[0079] 本文所用的,术语“安全和有效量”是指当以本发明的方式使用时,足以产生所需治疗反应且无不适当的不良副作用(如毒性、刺激性和过敏反应)且具有相称的合理效益/风险比的成分的量。由“有效治疗量”表示可有效产生所需治疗效果的本发明化合物的量。例如,可有效地延缓肿瘤、或肉瘤或淋巴瘤的生长或形成,或缩小肿瘤或预防其转移的量。特定的安全和有效量或有效治疗量会随这些因素而变化,如被治疗的具体病状、患者的身体状况、被治疗的哺乳动物或动物类型、治疗的持续时间、同步治疗的特性(如果有)、和所采用的特定制剂及化合物或其衍生物的结构。

[0080] 本文所用的,“制药用盐”包括但不限于:碱性残基如胺的矿物或有机酸盐;酸性残基如羧酸的碱性或有机盐。优选的盐是利用有机或无机酸制备而得。这些优选的酸性盐是氯化物、溴化物、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐、磺酸盐、甲酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、柠檬酸盐、安息香酸盐、水杨酸盐、抗坏血酸盐等等。最优选的盐是盐酸盐。

[0081] 本文所用的,“癌”是指在哺乳动物中发现的所有类型的癌或肿瘤或恶性肿瘤,包括但不限于:白血病、淋巴瘤、黑素瘤、癌、和肉瘤。癌的实例为脑癌、乳腺癌、胰腺癌、子宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、间皮瘤、卵巢癌、肉瘤、胃癌、子宫癌、和成神经管细胞瘤。

[0082] 可通过本发明的 siRNA's 治疗的其它癌包括:例如霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺癌、原发性脑癌、胃癌、结肠癌、恶性胰腺胰岛素瘤、恶性类癌、膀胱癌、癌前皮肤病变、睾丸癌、淋巴癌、甲状腺癌、成神经细胞瘤、食道癌、泌尿系癌、肿瘤高钙血症、子宫颈癌、子宫内膜癌、肾上腺皮层癌、和前列腺癌。癌也可由病原体如子宫颈癌和人乳突淋瘤病毒所引发。因此,在一个实施方式中,疾病的治疗包括对由病原体诱导的异常进行治疗。

[0083] “异源”成分是指被导入的、或在不同于天然存在的实体内产生的成分。例如,源自

于生物体的并通过基因工程技术被导入不同的生物体内的多核苷酸就是一种异源多核苷酸,如果被表达其可编码一种异源多肽。类似地,从其天然编码序列中移除并可操作地将其与不同的编码序列连接的启动子或增强子是一种异源启动子或增强子。

[0084] 本文所用的“启动子”是指能控制可操作连接的基因或编码序列的转录的多核苷酸序列。来自多种不同来源的大量启动子包括:组成型、诱导型、和可抑制型启动子,这些启动子是本领域所公知的且可用的,或位于克隆的多核苷酸序列内(来自于保藏中心如 ATCC 以及其它商业或私人来源)。

[0085] 本文所用的“增强子”是指能增强可操作连接的基因或编码序列的转录的多核苷酸序列。来自多种不同来源的大量增强子是本领域所公知的且是可行的,或位于克隆的多核苷酸序列内(来自于保藏中心如 ATCC 以及其它商业或私人来源)。许多含有启动子序列的多核苷酸(如常用的 CMV 启动子)也含有增强子序列。

[0086] “可操作连接”是指一种毗邻(juxtaposition),其中,所述的成分相互关联以它们预期的方式来维持它们的功能。若启动子可以控制编码序列的转录,则可以将启动子与编码序列可操作地连接。虽然可操作连接启动子通常位于编码序列的上游,但没有必要与其接近。若增强子可以增强编码序列的转录,则可以将增强子与编码序列可操作地连接。可操作增强子可以位于编码序列的上游、内部或下游。如果它位于编码序列末端的下游,则可以将聚腺嘌呤化的序列与编码序列可操作地连接,以使转录经过编码序列向聚腺嘌呤化序列进行。

[0087] “复制子”是指含有一个复制起点的多核苷酸,所述复制起点能够使其可在适宜的宿主细胞中进行多核苷酸复制。实例包括:可整合异源核酸的靶细胞复制子(如核和线粒体染色体)、以及染色体外复制子(如正在复制的质粒和游离基因)。

[0088] 本文所用的“基因运送”“基因转移”等是表示外源多核苷酸(有时被称为“转基因产物”)向宿主细胞的导入,但不涉及导入所用的方法的术语。这类方法包括多种公知的技术,如载体介导基因转移(通过例如病毒感染/转染、或多种其它基于蛋白或基于脂质的基因运送复合物)以及有利于“裸”多核苷酸运送的技术(如电转化、“基因枪”运送、和多种其它用于导入多核苷酸的技术)。被导入的多核苷酸可稳定地或暂时地维持在宿主细胞中。稳定维持通常要求被导入的多核苷酸含有与宿主细胞相兼容的复制起点,或整合到宿主细胞复制子如染色体外复制子(如质粒)或核和线粒体染色体的复制起点。已知许多载体可以介导基因产物向哺乳动物细胞的转移,正如本领域所公知的和本文所描述的一样。

[0089] 本文所用的“体内”基因运送、基因转移、基因治疗等是表示含有外源多核苷酸的载体直接导入生物体体内如人或非人哺乳动物,而在体内将外源多核苷酸导入这类生物体的细胞的术语。

[0090] 当核酸从细胞外环境被转移到细胞内时,细胞被核酸“转导”。可使用任何能将核酸转入细胞的方法;除非另外指出,术语不表示将核酸运送至细胞的任何特定的方法。当核酸被转导入细胞并稳定复制时,细胞被核酸“转化”。载体包括可通过细胞表达的核酸(普通的 RNA 或 DNA)。载体任选地包括可以有助于实现核酸进入细胞的物质,如病毒颗粒、脂质体、蛋白包衣等等。“细胞转导载体”是用于编码一旦被转导入细胞即可在细胞内稳定复制和表达的核酸的载体。

[0091] 本文所用的“靶细胞”或“受体细胞”是指想要成为或已经成为外源核酸分子、多

核苷酸、和 / 或蛋白的受体的单个细胞或细胞。术语还包括单细胞的子代。

[0092] “载体”（有时称为基因运送或基因转移的“媒介”）是指在体外或体内含有待运送至宿主细胞的多核苷酸的大分子或分子复合物。待运送的多核苷酸可含有基因治疗感兴趣的编码序列。例如，所述载体包括：病毒载体，例如腺病毒（“Ad”）、腺相关病毒（AAV）、和逆转录病毒；脂质体和其它含脂质的复合物；和可以介导多核苷酸向宿主细胞运送的其它大分子复合物。所述载体还可以包括能够进一步调控基因的运送和 / 或基因的表达，或相反地为靶细胞提供有益特性的其它成分或功能性。以下将进行更详细的描述和解释，这类其它成分包括例如影响结合或靶向细胞的成分（包括介导细胞型或组织特异性结合的成分）；影响细胞对载体核酸的吸收的成分；影响吸收后多核苷酸在细胞内定位的成分（如介导核定位的试剂）；和影响多核苷酸表达的成分。这类成分还可包括标记，如可用于检测或选择已经吸收并正在表达由载体运送核酸的细胞的可检测和 / 或可选择的标记。这类成分可提供载体的天然特征（如利用具有介导结合和吸收的成分或功能的特定载体），或可修饰载体以提供这类功能。其它载体包括 Chen et al; BioTechniques, 34:167-171 (2003) 所述的那些。大量这类载体是本领域公知的并通常是可用的。

[0093] “重组病毒载体”是指含有一个或多个异源基因产物或序列的病毒载体。因为许多病毒载体表现出与包装相关的大小限制，所以一般通过替代病毒基因组的一部分或多个部分来导入异源基因产物或序列。这类病毒可以为复制缺陷型，在病毒复制和包装中需要待提供的反式缺失的功能（通过利用例如携带复制和 / 或包装所需基因产物的辅助病毒或包装细胞株）。已经公开了将待运送的多核苷酸运输至病毒颗粒外面的被修饰的病毒载体（参见例如 Curiel, D T, 等. PNAS 88:8850-8854, 1991）。

[0094] 本文所用的病毒“包装”是指导致病毒载体合成和组装的一系列细胞内事件。包装通常包括“前病毒基因组”，或重组前载体通常被称为“载体质粒”（它是以类似于病毒基因组的方式包装的重组多核苷酸，一般是两侧被适宜的病毒“包装序列”包围的结果）的复制，之后是核酸的包装或其它包被。因而，当在适合的条件将适宜的载体质粒导入包装细胞株内时，其可被复制并组装成病毒颗粒。在许多病毒基因组中发现的病毒“rep”和“cap”基因产物分别是编码复制和组装蛋白的基因产物。“复制缺陷型”或“复制无能型”病毒载体是指缺失或改变了一个或多个复制和 / 或包装所需的功能的病毒载体，致使病毒载体被宿主吸收后不能开始病毒复制。为制备这类复制缺陷型病毒载体的原种，可以将病毒或前病毒核酸导入已修饰成含有能编码缺失功能基因产物的“包装细胞株”内（可被反式提供）。例如，这类包装基因产物可被稳定地整合到包装细胞系的复制子中，或通过携带编码缺失功能基因产物的“包装质粒”或辅助病毒的转染来将其导入。

[0095] “可检测的标记基因”是使携带基因的细胞可被特异地检测到的基因（例如：区别于不携带标记基因的细胞）。许多种这类标记基因的产物是本领域已知的。而优选的实例包括：编码体现在细胞表面的蛋白的检测标记基因产物，因此有利于简化和快速的检测和 / 或细胞的分选。通过例举的方法，编码 β -半乳糖苷酶的 lacZ 基因可用作检测标记，以使携带 lacZ 基因的载体转导的细胞可通过染色而被检测到。

[0096] “可选择的标记基因”是当存在相应的选择试剂时，可特异地选择不选择携带基因的细胞。通过例举方式，抗生素抗性基因可用作阳性可选择的标记基因，即当存在相应的抗生素时可阳性地对宿主细胞进行选择。可选择的标记可以是阳性的、阴性的、或双功能

的。阳性可选择的标记可以选择携带标记的细胞,而阴性可选择的标记可以选择性地排除携带标记的细胞。已经公开了多种这类标记基因产物,包括双功能的(即阳性/阴性)标记(参见例如 1992 年 5 月 29 日公开的 W092/0879 和 1994 年 12 月 8 日公开的 W094/28143)。这类标记基因的产物可提供一种另外的调控措施,这在基因治疗中是有优势的。

[0097] “诊断的”或“诊断”表示对病理状况的存在或特性进行检测。诊断方法在敏感度和特异性上是有区别的。诊断方法的“灵敏度”是指被检测为阳性的患病个体的百分比(“真阳性”的百分比)。方法未检测到的患病个体是“假阴性”。在所述方法中,未患病的且被检测为阴性的受试者被称为“真阴性”。诊断方法中的“特异性”为 1 减去假阳性率的差值,其中“假阳性”率被定义为:无病却并检测为阳性的个体比例。虽然某一特定诊断方法不能够为一种病状提供权威性的诊断,但它足以提供作为辅助诊断的阳性指示方法。

[0098] 本文中交替使用的术语“患者”或“个体”是指待治疗的哺乳动物受试者,优选为人类患者。在某些情况下,本发明方法可以用于在兽医申请中提供的实验动物,用于开发疾病的动物模型包括但不限于包括小鼠、大鼠、和仓鼠在内的啮齿动物,和灵长类动物。

[0099] “治疗”是以预防疾病的发展或改变病状或症状为目的而实施的干扰。因此,“治疗”是包括治疗性处理和预防性或防御性的措施。“治疗”还可特定为姑息治疗。需要治疗的个体包括已经患病的个体,以及需要预防疾病的个体。在肿瘤(如癌)的治疗中,治疗方法可直接减少肿瘤细胞的病状,或使肿瘤细胞变得对其它治疗剂的治疗更具敏感性,如放射和/或化疗。

[0100] “肿瘤性疾病、肿瘤细胞、癌的治疗”是指在之后的整个说明书和实施例中所述的寡核苷酸、载体和/或肽的量,能够发挥一种或多种下列作用:(1)在一定程度上抑制肿瘤生长,包括(i)减缓、和(ii)完全的生长阻滞;(2)肿瘤细胞数量的减少;(3)维持肿瘤的大小;(4)肿瘤大小的减小;(5)抑制,包括(i)减少、(ii)减缓(iii)完全防止肿瘤细胞向周边器官的扩散;(6)抑制,包括(i)减少、(ii)减缓、或(iii)完全防止癌的转移;(7)增强抗肿瘤免疫反应,其可导致(i)维持肿瘤大小、(ii)减小肿瘤的大小、(iii)减缓肿瘤的生长、(iv)减少、减缓或防止感染、或(v)减少、减缓或防止癌转移;和/或(8)在一定程度上缓解一种或多种与所述疾病相关的症状。

[0101] 对感染致病生物的个体的治疗是指减少和清除个体中的致病生物。例如,通过空斑形成单位(plaque forming unit)或其它自动化诊断方法如 ELISA 等来测定病毒颗粒的减少。

[0102] 本文所用的“神经(神经细胞,神经学)缺陷、障碍、或疾病”是指神经学障碍或疾病,包括但不限于:中枢神经系统的神经退行性疾病(如帕金森症、阿尔茨海默病)或自免疫性疾病(如多发性硬化症);失忆;长期和短期记忆障碍;学习障碍;孤独症,抑郁,良性健忘,儿童学习障碍,闭合性头部损伤,和注意缺陷障碍;脑部的自免疫疾病,对病毒感染的神经细胞反应;脑部损伤;抑郁;精神障碍如喜怒无常症,精神分裂症等等;嗜睡/睡眠障碍(包括昼夜节奏紊乱,失眠症和嗜睡);神经离断或神经损坏;脑脊髓神经索(CNS)的离断和脑或神经细胞的任何损坏;与 AIDS 相关的神经学缺陷;抽搐(如贾尔斯德拉图雷特综合征(Gilles de la Tourette syndrome));亨廷顿舞蹈症,神经分裂症,创伤性脑损伤,耳鸣,神经痛,尤其是三叉神经痛,神经性疼痛,不适当神经元活动导致的神经烦躁症如糖尿病,MS(多发性硬化症)和运动神经元疾病,运动失调,肌强直(强直状态)和颞上颌关节

功能障碍；个体表现的奖励缺乏综合症；由酒精或药物滥用（如摇头丸、甲基苯丙胺）引起的神经毒性。其它疾病包括但不限于：失语症、贝尔氏麻痹、克雅氏病、癫痫、脑炎、亨廷顿舞蹈症、神经肌肉病、神经肿瘤病、神经免疫病、神经耳科病、疼痛、恐怖症、睡眠障碍、和其它运动障碍。其它退行性障碍包括但不限于，例如老年性黄斑变性。

[0103] 靶核酸

[0104] 非编码 RNA (ncRNA) 的概念：分子生物学的中心法则已提出半个多世纪，该法则规定由 DNA 编码的遗传信息转录形成中间体分子 RNA，然后再翻译成组成蛋白的氨基酸。主流的假设是基因与蛋白是直接相关的（“一个基因 - 一个蛋白”）。在过去几年间，我们逐渐认识到 RNA 水平的复杂性比先前所认为的要复杂的多。由于，所述复杂性在很大程度上取决于非编码转录（以及可替换的剪切现象），并且在真核细胞中体现得尤为明显 (Mattick, J. S. (2004) RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* 5(4), 316-323)。

[0105] ncRNAs 包括微 RNAs、反义转录物、和其它包括高密度的终止密码子的并缺少任何广度的“开放式读码框”的转录蛋白单位 (TU)。许多 ncRNAs 从蛋白编码位点的 3' 端非翻译区的起始位点开始出现。ncRNAs 通常很少见，并且至少一半的经过 FANTOM 测序的 ncRNAs 似乎未被多聚腺苷酰化。由于显而易见的原因，大部分研究者专注于经过加工的并输出至细胞质的且被多聚腺苷酰化的 mRNAs。最近表明，非多聚腺苷酰化的核 RNAs 集可能非常巨大，并且许多这类转录物均源自于所谓的基因间区域 (Cheng, J. 等. (2005) Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308(5725), 1149-1154; Kapranov, P. 等. (2005). Examples of the complex architecture of the human transcriptome revealed by RACE and high-density tiling arrays. *Genome Res* 15(7), 987-997)；还可参见图 1A。

[0106] ncRNA 的概念仍稍存在争议，主要是因为它们具备了常规编码 RNA 的一部分而不是全部的特征。甚至在不同的物种中，某些 ncRNA 仍是高度保守的。由 Carninci 等分析的绝大多数 ncRNA (Carninci, P. 等. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309(5740), 1559-1563) 均体现了物种之间的位置保守性。鉴于功能，可以想象特定区域转录的作用或者是重要的，或是基因组结构或序列的结果。非编码转录物可通过与其所来源的 DNA 序列或其它靶点的几种类型的序列特异性相互作用来发挥作用。令人感兴趣的是，ncRNA 转录物似乎正在快速地进化，并且它们通常不很保守的事实并不必然表示它们缺乏功能。至少有 4 个关于 ncRNA 的可登录网络数据库（参见表 1）。

[0107] 表 1 包含非编码 RNA 序列的数据库

[0108]

名称	网址
RNAdb	http://research.imb.uq.edu.au/RNAdb
Rfam	http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/ 和 http://rfam.wustl.edu/
NONCODE	http://noncode.bioinfo.org.cn
ncRNADB	http://biobases.ibch.poznan.pl/ncRNA/

[0109] ncRNAs 调控基因表达的最常见的机制是通过与靶转录物的碱基配对。通过碱基配对来发挥功能的 RNAs 可被分为：(1) 顺式编码 RNA，其在相同的基因位置编码，但作用于在其所作用的 RNAs 的相反链上因此表现出与它们靶点的完美互补；和 (2) 反式编码 RNAs，其在远离其所作用的 RNAs 的染色体位置上被编码，并且通常不能与它们的靶点形成完美的碱基配对。

[0110] 反义转录物：反义转录物可来源于编码和非编码 RNA (图 1A)。引人侧目的是，哺乳动物的反义转录物远比几年前所预期的更普遍。最近，Katayama 等展示了在小鼠中，大于 72% 的所有基因组映射的转录单位 (43, 553) 与某些 cDNA、5' 或 3' 端的表达序列标签 (EST) 序列、或标签或映射到相反链上的标签配对区域相重叠 (Katayama, S. 等. (2005) Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309 (5740), 1564-1566)。目前没有理由证明在人类中该情况有所不同。

[0111] 但是，对于转录活动是“无意识的”且代表了 RNA 转录机制的“泄漏”的观点是有争议的。直到最近结束，已经表明了与非反义对相比，反义转录物对在相当程度上更可能通过进化而保留它们的基因组结构。而且，利用链特异的表达分析和常规微阵列的表达分析已经显示出，在各种小鼠组织间正义 - 反义对表达水平的明显波动。表明了各种大小的转录物中的大多数是由正义 - 反义位点表达的，并且它们倾向于不具有多聚腺苷酸尾并且表现为核定位。

[0112] 存在三种基本类型的正义 - 反义对：(1) 头接头的或偏离的；(2) 尾接尾的或会聚的；和 (3) 完全重叠的。偏离的（头接头）类型是最为普遍的（图 1B）。

[0113] 一个关键的功能性问题是天然反义对能否形成内源 RNA 干扰 (RNAi) 的基础。基于 RNAi 机制在不同生物体系中非常广泛的存在，最近的表明至少在一些物种中，一部分 RNAi 途径可以发生在核区的证据，表明了这种途径在反义介导基因抑制中可能的作用。基于这个观点，通过切割酶或其它 RNase III 族成员，可将双链 RNAs (dsRNAs) 裂解成 siRNAs。但是，最近表明了利用天然反义转录物的 RNA 调控，可以通过不依赖 RNAi 相关的 Dicer 的途径，而在人类细胞中发生 (Faghihi, M. and Wahlestedt, C. (2005) RNA interference is not involved in natural antisense mediated regulation of gene expression in mammals. *Genome Biol*)。反义 - 正义相互作用现象影响了不同类型的基因，并且不均衡地分布在基

基因组中。

[0114] RNA 靶向 :药物开发的研究历来集中于搜寻能够用于调节基因的蛋白产物的化合物。通常情况下,这些化合物是受体的激动剂或拮抗剂,或者是抑制或刺激酶或蛋白间相互作用的化合物。但是,由于靶向确认和 / 或治疗目的对靶 RNA 的兴趣越来越高,因而,并不亚于几年前对 RNAi 的介绍。此外,正在进行的多项关于以小分子的、反义寡核苷酸的、核酸酶的或适体的靶向 mRNA 的研究。

[0115] 目前药物治疗仅涉及了几百种内源靶点,主要是受体和酶。基因组学和转录组学的研究已经鉴别了许多需要验证的新型候选药物靶点。通过靶评估研究,例如,通过 RNA 水平的操作,以帮助在药物开发过程中建立优先级别,它们不直接产生候选药物。因而,有充分理由继续关注完备靶点的建立。如果它们最终受到天然反义调控,就可以尝试将这些“老”靶点用于新方法中,尤其在对于这些靶点没有药物可用时。

[0116] 对于编码蛋白的基因,就能量而言,转录前调控是一种耗能的控制基因表达的机制。在从基因到活性蛋白的过程中,mRNA 只是一种中间分子。如果细胞只在开始时在转录水平来调控这个过程,将节省供给、降解、和再生不用于合成蛋白 mRNA 分子所需的能量。为了调节 ncRNA 的活动, RNA 水平明显是最好的靶向选择。

[0117] 在一个优选实施方式中,以寡核苷酸来靶向靶核酸的反义和正义转录物。寡核苷酸可以是:(1) 头接头的或偏离的、(2) 尾接尾的或会聚的、和 (3) 完全重叠的。图 1B 提供了不同方向类型的示意图。

[0118] 在另一个优选实施方式中,以寡核苷酸来靶向一个反义转录物 (“非一致调控”),据此仅敲低反义转录物从而提高常规 (正义) 基因的表达。因而,根据发明的一个方面,可以上调所需基因的表达。例如,靶向用于编码已知或公认药物靶点的基因或核酸,然后敲低它的反义配对物,可以模拟受体激动剂或酶刺激物的作用。表 2 给出了能够证明反义 (编码以及非编码) 转录物的敲低非一致地调控正义表达的实例。例如,在帕金森症中需要增强活性的线粒体定位了激酶、PINK1 (例如, PINK1 的增强) :

[0119] PINK-AS siRNA-a :GGAAGCTGTAGCTAGAACATCTGTT (SEQ ID NO :1)

[0120] PINK-AS siRNA-b :CAGGTAAGT AGTCTCCTCTATCATT (SEQ ID NO :2)

[0121] PINK-AS siRNA-c :TCTCAACCCAAAGCCTGCTTTGTTA (SEQ ID NO :3)

[0122] 在一个优选实施方式中, siRNA 分子靶向预期的正义 / 反义位点的重叠区,进而调节正义和反义转录物。

[0123] 在一个优选实施方式中,一种组合物含有一个或者多个 siRNA 分子, 和 / 或 siRNAs 的组合 ;所述 siRNAs 与预期的靶位点重叠,和 / 或靶向正义和反义 (重叠的或其它的)。这些分子可定向地用于能够对任何疾病或异常进行潜在治疗所需的任何靶点。例如,靶向癌基因、靶向受体、靶向编码启动子的基因、靶向增强子的基因、靶向细胞因子的基因等。理论上对于待靶向的分子没有限制。本发明引导了对于无论是先天或其它的每一种疾病、异常而设计治疗方案的新纪元。而且,本文教导的技术可以为每个个体定制治疗方案。

[0124] 利用本发明的组合物和方法来上调基因表达的另一实施例是,例如在伤口愈合中上调血管的生成。为刺激血管的生成,可以通过靶向它的 (编码) 反义配对物 Ddx-39,来实现通过 G 蛋白偶联受体 (GPCR)、CD97 的增强信号。

[0125] 在另一个优选实施方式中,寡核苷酸靶向反义和正义转录物 (“一致调控”),据

此敲低反义和正义转录物,并因此实现常规(正义)基因表达的协同减少。在图 1A-1B 和 2A-2B 中图示了这些概念。如果 siRNA 被用于实现敲低,然后通过运用一个 siRNA 靶向正义转录物,而另一个 siRNA 靶向相应的反义转录物,或者单个能量对称的 siRNA 同时靶向重叠的正义和反义转录物来进一步检验该策略。如表 2 所得出的,例如,这种双重伴随靶向与对缺氧诱导因子 1 α 的追求是相关的,并且靶点的抑制在多种医疗状况中是有益的。表 2 的另一实例是肾上腺髓质素 AM1 受体,被降低信号的 GPCR 也可被证明是治疗有益的。

[0126] 可用于阿尔茨海默病中的反义和正义转录物的一致敲低的有效组合物的实例包括但不限于:

[0127] BACE1-AS:

[0128] siRNA-a:CCCTCTGACACTGTACCATCTCTTT (SEQ ID NO :4)

[0129] siRNA-b:AGAAGGGTCTAAGTGCAGACATCTG (SEQ ID NO :5)

[0130] siRNA-c:CCAGAAGAGAAAGGGCACT (SEQ ID NO :6)

[0131] BACE1:

[0132] siRNA-a:GAGCCTTTCTTTGACTCTCTGGTAA (SEQ ID NO :7)

[0133] siRNA-b:CCACGGAGAAGTCCCTGATGGTTT (SEQ ID NO :8)

[0134] 以例举的实例的方式提供了这些组合物,但并不限于此。在优选实施方式中,可以为个体的治疗而定制寡核苷酸,例如,这类寡核苷酸可以是个体中等位基因变体的特异序列,可对靶点进行不同程度的上调或抑制,例如,与对照相比,为 10%、20%、40%、100% 的表达。对于一些患者来说,靶基因的表达提高或降低 10% 就是有效的,而对于其它患者则为 80%。

[0135] 通过对内源靶 RNA 或者由靶 RNA 翻译的蛋白进行测定,可以对基因表达的上调或抑制进行定量。RNA 和蛋白的定量技术是本领域普通技术人员所熟知的。在某一个优选实施方式中,基因表达被抑制至少 10%,优选至少 33%,更优选至少 50%,还更优选至少 80%。在特定的优选实施方式中,本发明的基因表达在生物体的细胞内被抑制至少 90%,更优选至少 95%,或至少 99% -100%。在某一优选实施方式中,基因表达被上调至少 10%,优选至少 33%,更优选至少 50%,还更优选至少 80%。在特定的优选实施方式中,本发明的基因表达在生物体的细胞内被上调至少 90%,更优选至少 95%,或至少 99% -100%。

[0136] 通过可自动排列核酸序列的并可以指明相同或同源区域的计算机程序,可以便捷地选择适宜的 RNAi。这类程序可用于对获得的核酸序列进行比对,例如,通过搜索数据库如 GenBank 或通过对 PCR 产物进行测序。在一定范围的物种内进行核酸序列比对,可以选择出在物种间显示出具有适宜程度的同一性的核酸序列。对于还未测序的基因,通过 DNA 印迹法可以测定靶向物种与其它物种的基因之间的同一性程度。如本领域所公知的通过在不同严格程度下,进行 DNA 印迹法可以获得同一性的近似测量。这些程序可以对表现出与将被控制个体中的靶核酸序列有高度互补性以及与其它物种中相应的核酸序列有较低程度的互补性的 RNAi 进行选择。本领域技术人员应该认识到,可以在相当范围内来选择用于本发明的适宜的基因区域。

[0137] 在一个优选实施方式中,小干扰 RNA (siRNA) (RNA 本身或者 DNA) 通过表达质粒或病毒被运送至细胞,并编码将被加工成 siRNAs 的小发夹 RNAs 的序列。

[0138] 在另一个优选实施方式中,使用 RNA 聚合酶 I、II、或 III,用于小发夹序列的克隆

的 DNA 试剂盒实现了小发夹序列的表达和加工。这个体系可将前体 siRNAs 高效地运输至细胞质,在此它们是有活性的;并且允许用于调控基因表达的组织特异性启动子的使用。

[0139] 根据本发明,靶细胞(原核细胞和真核细胞)通过以它们的基因结构为基础的 siRNA,被选择性地靶定。感染性疾病几乎总是导致可以通过该技术而被靶定的外源核酸的采集。特异性的靶点可以是病毒,例如 HIV(病毒或前病毒)或细菌,例如,多重抗药性细菌例如 TB,真菌或原生生物。在治疗没有有效的抗微生物或抗病毒剂(例如埃博拉病毒等)或已知的或新型的生物恐怖原的传染上,该技术尤其有效。

[0140] 本发明优选的 siRNA' s 可以与靶序列,尤其是疾病如帕金森症、阿尔茨海默病等,癌,神经性疾病,传染原如病毒、细菌、真菌或原生生物原的靶寡核苷酸,在体外所确定的严格条件下进行杂交(结合)。

[0141] 本发明还可以用于编码蛋白的基因产物以及非编码蛋白的基因产物上。编码非蛋白的基因产物的实例包括:编码核糖体 RNA、转移 RNAs、小核 RNAs、小细胞质 RNAs、端粒酶 RNA、参与 DNA 复制、线粒体重排的 RNA 分子等的基因产物。

[0142] 在另一优选实施方式中,利用 siRNAs 靶向异常的或癌细胞。例如许多恶性肿瘤与外源 DNA 的存在是相关的,例如 Bcr-Ab1、Bc1-2、HPV,而这为选择性地靶向恶性肿瘤细胞提供了独特的分子靶点。该方法可用来靶向单个碱基的置换(例如 K-ras, p53)或甲基化改变。但是,之前未表达的基因产物还会引起癌细胞的增殖。可以通过靶向这些基因序列,从而抑制进一步的表达,并导致癌细胞的死亡。在其它情况下,若转位子是这种异常情况的起因,则可以靶向转位子序列,如 Tn5。

[0143] 在本发明中, siRNA 寡核苷酸被设计成对引起、参与、或恶化患者的疾病状态的分子具有特异性。例如,在病毒感染中, siRNA 可以靶向负责病毒复制;病毒感染周期,如吸附到细胞配体;编码宿主免疫调节功能因子的病毒基因产物的分子。本发明中尤其优选的能够引起人类疾病的病毒性生物体包括(但不限于):丝状病毒、疱疹病毒、肝炎病毒、逆转录病毒、正粘病毒、副粘病毒、披膜病毒、小 RNA 病毒、乳头多瘤病毒、和肠胃炎病毒。

[0144] 在另一优选实施方式中, siRNA' s 靶向由疾病源如炭疽热所产生的毒素。例如炭疽热是可用于生物恐怖袭击的病原体中的一种。炭疽热感染可由炭疽杆菌的芽孢来介导,其可以通过皮肤的破损,通过吸入,或通过摄入而进入体内。致命的炭疽热表现为发展成伴随着强烈血毒症的全身性菌血症。炭疽热似乎是一种菌血症和/或血毒症的双重病症,其可导致休克、血流灌注不足、和多器官系统衰竭的致命症状。发展成全身性疾病的可能性,随着生物进入的入口而改变,而对于吸入途径则是最显著的(参见 Dixon 等,1999, NewEngland J. Med. 341 :815-826)。 siRNA 寡核苷酸可以靶向能够抑制被感染患者细菌增殖的 mRNAs,以及可以靶向能够产生毒素的基因产物,从而消除感染炭疽热的毒性作用。可替换地, siRNA' s 可以靶向生物体中具有而宿主中不具有的任何序列靶点。

[0145] 通常本发明提供了一种治疗疾病如癌症和由传染性病原体如病毒、细胞内和细胞外寄生生物、插入元件、真菌感染等所引起的疾病的方法,疾病还可能导致正常情况下不表达基因的基因产物发生表达,正常表达基因的异常表达或异常基因的表达,所述方法包括:对需要这种治疗的患者给药有效量的 siRNA 寡核苷酸;或不同修饰 siRNA' s 的混合物(cocktail);或致病实体特异的不同修饰的和未修饰的 siRNA 寡核苷酸的混合物。

[0146] 在本发明中, siRNA 寡核苷酸的治疗包括:给药可与基因的靶 mRNA 接触(相互作用

用)的 siRNA 寡核苷酸,据此来调节基因的表达并抑制表达。适宜的这种表达调节可相对于对照有至少约 10%或 20%的差异,更优选相对于对照有至少约 30%、40%、50%、60%、70%、80%、或 90%的差异。尤其优选的是与 siRNA 寡核苷酸的接触和相互作用可导致相对于对照表达被完全或基本完全地调节,例如,相对于对照表达被抑制或增加至少约 95%、97%、98%、99%、或 100%。用于对这种调节进行检测的对照样品可以是不与 siRNA 寡核苷酸接触类似细胞(体外或体内)。

[0147] 本发明的方法优选用于治疗或预防由异常细胞生长和由传染性病原体引起的疾病,尤其是用于治疗发生在受试者的组织中,例如肺、心脏、肝、前列腺、脑、睾丸、胃、肠道、肠、脊髓、窦、泌尿道、或卵巢的感染。本发明方法还可用于治疗全身症状,例如,病毒血症或败血症。优选地,本发明方法还可用于治疗与病毒感染或细菌感染相关的疾病和病状,以及任何由传染性病原体引起的其它病状。

[0148] 优选地,从患者身上分离病原体并通过诊断工具,如 ELISA、s RIAs(酶联免疫吸附放射免疫分析法)、细胞分选、PCR 等等,进行鉴定。但是,致病体可能是一种新型的可被 siRNA 寡核苷酸靶向的病原体。来自于病原体的测序数据可用于构建 siRNA。可通过本领域已知的任何手段来完成病原体的部分测序。以下提供了一种例举性的实例,但其决不是限制或直译本发明。siRNA 被设计成与所选序列互补。

[0149] 根据本发明的一个优选实施方式,可修饰 siRNA 的核碱基以提供针对靶 mRNA 的更高特异性和亲和力。例如,可在相邻延长位或不同位置上,以 LNA 单体取代核碱基。优选地,经修饰的 siRNA 相对于互补序列具有与靶序列更高的缔合常数(K_3)。可利用杂交方法在各种严格条件下,在体外对修饰或未修饰 siRNA 与靶序列的结合进行检测,如以下实施例所述。

[0150] 作为寡核苷酸许多有效治疗应用基础的基本特性为:它们通过 Watson-Crick 氢键结合(A-T 和 G-C)或其它氢键结合方案如 Hoogsteen/反 Hoogsteen 模式来特异性地识别互补单链核酸并与其杂交的能力。亲和力和特异性是常用于表现特定寡核苷酸的杂交特征的特性。亲和力是寡核苷酸与它的互补靶点的结合强度的度量(以双螺旋的热稳定性(T_m)表示)。双螺旋的每个核碱基对增加了热稳定性,因而随着寡核苷酸大小(核碱基数量)的增加其亲和力也增加。特异性是寡核苷酸辨别完全互补和错配靶序列的能力的度量。换言之,特异性是与靶中错配核碱基对相关的亲和力损失的度量。

[0151] 通过样品试验,可以容易地测定 siRNA 寡核苷酸在调节(包括抑制)mRNA 上的效用。因而,将包括靶 mRNA、其突变体或片段的体外或体内表达系统与特定的 siRNA 寡核苷酸(修饰或未修饰)接触,并对其与利用相同表达系统而不与 siRNA 寡核苷酸接触的对照的表达水平进行比较。

[0152] 可组合使用 siRNA 寡核苷酸。例如,可以同时或分开地给药定向于同一基因不同区域的几种不同的 siRNA 修饰的和/或未修饰的寡核苷酸的联合。

[0153] 在本发明的实践中,靶基因产物可以是单链或双链 DNA 或 RNA。如果它们有与特定基因转录的起始位点为相同的序列,则短的 dsRNA 可用于阻断转录。参见例如 Janowski 等, *Nature Chemical Biology*, 2005, 10:1038。应该理解的是,本发明的 siRNA 寡核苷酸定向的靶点包括:靶基因的等位基因形式和包括剪切变体在内的相应的 mRNAs。关于为已给定了靶多核苷酸序列信息的 siRNA 寡核苷酸选择特定的序列,文献中已给出了实质性的教

导。优选的 mRNA 靶点包括 :5' 帽子位点、tRNA 引物结合位点、起始密码子位点、mRNA 供体剪切位点、和 mRNA 受体剪切位点。

[0154] 若靶多核苷酸含有 mRNA 转录物,则序列互补的寡核苷酸可与转录物的任何预期部分进行杂交。原理上,这类寡核苷酸可有效地抑制翻译,并可以诱发本文所述的效果。假设通过 mRNA 在或邻近起始密码子的位点上,可以最有效地抑制翻译。因而,优选与 mRNA 转录物的 5' 区互补的寡核苷酸。优选与包括起始密码子(转录物被翻译部分的 5' 端的第一个密码子)、或邻近起始密码子的密码子的 mRNA 互补的寡核苷酸。

[0155] 嵌合 / 修饰 siRNA

[0156] 在本发明中,本领域普通技术人员可以理解 mRNA 不仅包括含有翻译起始和终止密码子的携带信息以利用三个字母遗传因子来编码蛋白的编码区,还包括形成被称为 5' 非翻译区、3' 非翻译区、5' 帽子区、内含子区的区域的相关核苷酸,以及内含子 / 外显子或剪切结合核苷酸。因而,根据本发明,可以整体或部分地靶向与核苷酸以及编码核苷酸相关的部分来配备寡核苷酸。在优选实施方式中,寡核苷酸靶向翻译起始位点(AUG 密码子)或编码区的序列,mRNA 的 5' 非翻译区或 3' 非翻译区。被干扰的信使 RNA 的功能包括 :所用必要功能例如 RNA 转位至蛋白翻译位点、从 RNA 到蛋白的准确翻译、RNA 的剪切或成熟和还可能 RNA 参与的独立催化活性。对 RNA 功能的这种干扰的总体效果是为了干扰蛋白的表达。

[0157] 本发明中确定优选的寡核苷酸为嵌合寡核苷酸。本发明中“嵌合寡核苷酸”或“嵌合体”是含有两个或多个化学上不同区域,且每种由至少一个核苷酸构成的寡核苷酸。这些寡核苷酸通常含有至少一个修饰的核苷酸区,其可带来一种或多种有益特性(例如增强的核酸酶抗性、增强细胞的吸收、增强的与 RNA 靶点的结合亲和力)和作为能够解离 RNA :DNA 或 RNA :RNA 杂合物的酶的底物的区域。举例说明,RNA 酶 H 是一种细胞核酸内切酶,其可从 RNA :DNA 双螺旋上解离 RNA 链。因此,RNA 酶 H 的活化可导致 RNA 靶点的解离,从而极大地增强了反义抑制基因表达的效率。因此,使用嵌合寡核苷酸以较短的寡核苷酸可获得相对于与相同靶区域杂交的硫代磷酸脱氧寡核苷酸相当的效果。通过凝胶电泳,如果必要结合本领域已知的相关核酸杂交技术,可常规地检测 RNA 靶的解离。在一个优选实施方式中,嵌合寡核苷酸含有至少一个增强靶结合亲和力的修饰区域,以及通常一个作为 RNA 酶 H 底物的区域。通过测量寡核苷酸 / 靶配对的 T_m ,可常规地测定寡核苷酸与它的靶点的亲和力(这种情况下,编码 ras 的核酸), T_m 是寡核苷酸与靶点解离的温度;可以通过分光光度来测定解离。 T_m 越高寡核苷酸与靶点的亲和力越大。在一个更优选的实施方式中,被修饰的寡核苷酸区域含有至少一个糖环 2' 位上被修饰的核苷酸,更优选以 2' -O-烷基、2' -O-烷基 -O-烷基、或 2' -氟 - 修饰的核苷酸。在另一优选实施方式中,RNA 修饰包括对 RNA 3' 末端上的嘧啶核糖,基本残基或反转碱基的 2' -氟、2' -氨基、和 2' -O-甲基修饰。可常规地将这类修饰合并入寡核苷酸,而这类寡核苷酸表现出具有比 2' 脱氧寡核苷酸与给定靶点更高的 T_m (即更高的靶结合亲和力)。这种增强亲和力的作用是为了极大地增强 RNAi 寡核苷酸对基因表达的抑制。RNA 酶 H 是一种细胞核酸内切酶,其可从 RNA :DNA 双螺旋上解离 RNA 链;因此酶的活化可导致 RNA 靶点的解离,从而极大地增强了 RNAi 抑制的效率。

[0158] 通过凝胶电泳可常规地检测 RNA 靶的解离。在另一优选实施方式中,嵌合寡核苷酸还可被修饰,以增强核酸酶抗性。细胞含有多种可降解核酸的核酸外切和内切酶。许多

核苷酸和核苷酸修饰体已表现出使被合并入的寡核苷酸具有比天然寡脱氧核苷酸更强的核酸酶消化抗性。通过将寡核苷酸与细胞提取物或分离的核酸酶进行溶液孵育,可常规地测定核酸酶的抗性,并且通常利用凝胶电泳测定随时间推移完整寡核苷酸保留程度。被修饰成增强核酸酶抗性的寡核苷酸,可以比未修饰寡核苷酸完整存活更长的时间。多种寡核苷酸修饰体已被证明能够增强或具有核酸酶抗性。目前更优选的是含有至少一个硫代磷酸酯修饰体的寡核苷酸。在某些情况下,增强靶结合亲和力的寡核苷酸修饰体还可以独立地增强核酸酶的抗性。在 De Mesmaeker 等. *Ace. Chem. Res.* 1995, 28 :366-374 中发现了一些所需的修饰体。

[0159] 本发明所设想的一些优选的寡核苷酸的具体实例包括:含有修饰的骨架的例子,例如,硫代磷酸酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、短链烷基或环烷基中间糖连接、或短链杂原子或杂环中间糖连接。最优选的是具有硫代磷酸酯骨架的寡核苷酸和具有杂原子骨架的寡核苷酸,尤其是 $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ [被称为亚甲基(甲亚胺基)或 MMI 骨架]、 $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ 、和 $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$ 骨架,其中,天然磷酸二酯骨架表示为 O-P-O-CH 。优选 Mesmaeker 等. 在 *Ace. Chem. Res.* 1995, 28 :366-374 中公开的氨基骨架。还优选具有吗啉骨架结构的寡核苷酸 (Summerton and Weller, U. S. Pat. No. 5, 034, 506)。在其它优选实施方式中,例如,肽核酸 (PNA) 骨架、寡核苷酸的磷酸二酯骨架被聚酰胺骨架所取代,核酸酶直接或间接地结合在聚酰胺骨架的氮杂原子上 (Nielsen 等. *Science* 1991, 254, 1497)。寡核苷酸还可以含有一个或多个取代糖基团。优选的寡核苷酸在 2' 位上为下列基团之一:OH, SH, SCH_3 , F, OCN , OCH_2OCH_3 , $\text{OCH}_2\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$, $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ 或 $\text{O(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$ 其中, n 为约 1-10; $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 的低级烷基,烷氧基烷氧基,取代的低级烷基,烷芳基或芳烷基;Cl; Br; CN; CF_3 ; OCF_3 ; O- , S- , 或 N- 烷基; O- , S- , 或 N- 烯基; SOCH_3 ; SO_2CH_3 ; ONO_2 ; NO_2 ; N_3 ; NH_2 ; 杂环烷基; 杂环烷芳基; 氨基烷胺; 聚烷胺; 取代甲硅烷基; 和 RNA 解离基团; 受体基团; 嵌入基团; 改善寡核苷酸药代动力学特性的基团; 或改善寡核苷酸药效学特性的基团和具有类似特性的其它取代基。一个优选的修饰体含有 2' - 甲氧基乙氧基 [$2' \text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, 也被称为' -O-(2-甲氧基乙基)] (Martin 等, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486)。其它 优选修饰体含有 2' - 甲氧基 ($2' \text{-O-CH}_3$)、2' - 丙氧基 ($2' \text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、和 2' - 氟 ($2' \text{-F}$)。类似修饰还可发生在寡核苷酸的其它位置上,尤其是 3' 末端核苷酸的糖环的 3' 位上和 5' 末端核苷酸的 5' 位。寡核苷酸还可具有糖基例如以环丁基替代呋喃戊糖基。

[0160] 寡核苷酸还可含有另外的或可替换的核碱基(通常简称为碱基)修饰体或取代体。如本文所用,“未修饰”或“天然”核酸酶包括:腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、和尿嘧啶(U)。修饰核碱基包括在天然核酸中很少见的或暂时出现的核碱基,例如,次黄嘌呤、6-甲基腺嘌呤、5-甲基嘧啶,尤其是 5-甲基胞嘧啶(也称为 5-甲基-2' 脱氧胞嘧啶,在本领域中常称为 5-Me-C)、5-羟甲基胞嘧啶(HMC)、糖基 HMC 和龙胆二糖基 HMC,以及合成核碱基,例如 2-氨基腺嘌呤、2-(甲氨)腺嘌呤、2-(咪唑烷基)腺嘌呤、2-(氨基烷胺)腺嘌呤或其它杂取代烷基腺嘌呤、2-硫脲嘧啶、5-硫代胸腺嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、 N_6 (6-氨基)腺嘌呤、和 2,6-二氨基嘌呤。Komberg, A., *DNA Replication*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pp75-77; Gebeyehu, G., 等 *Nucl. Acids Res.* 1987, 15 :4513)。还可包括本领域已知的“普通”碱基,

例如次黄嘌呤核苷。5-Me-C 取代体表现出核酸双螺旋的稳定性增强 0.6-1.2°C (Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), 是目前优选的碱基取代体。

[0161] 本发明寡核苷酸的另一种修饰包括将寡核苷酸化学连接一个或多个可增强寡核苷酸活性的或细胞吸收的基团或偶联物。这类基团包括但不限于脂质基团如胆固醇基团, 胆甾醇基团 (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 6553), 胆酸 (Manoharan et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1994, 4, 1053), 硫醚如己基-S-三苯甲基硫醇 (Manoharan et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992, 660, 306; Manoharan et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993, 3, 2765), 硫代胆固醇 (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.* 1992, 20, 533), 脂肪族链如癸二酸或十一烷基残基 (Saison-Behmoaras et al. *EMBO J.* 1991, 10, 111; Kabanov et al. *FEBS Lett.* 1990, 259, 327; Svinarchuk et al. *Biochimie* 1993, 75, 49), 磷脂如外消旋甘油双十六烷酸酯或 1,2-二-氧代-甘油双十六烷酸酯基-S-氢-磷酸酯三乙胺盐 (Manoharan et al. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3651; Shea et al. *Nucl. Acids Res.* 1990, 18, 3777), 聚胺或聚乙烯乙二醇链 (Manoharan et al. *Nucleosides & Nucleotides* 1995, 14, 969), 或金刚烷乙酸 (Manoharan et al. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3651)。含有亲脂基团的寡核苷酸和这种寡核苷酸的制备方法是本领域已知的, 例如美国专利 Nos. 5138045、5218105、和 5459255。

[0162] 没有必要在给定寡核苷酸的所有位点进行同一修饰, 而事实上多于一种的前述修饰可被合并入单个寡核苷酸中或甚至一个寡核苷酸的单个核苷酸中。本发明还包括上文所定义的嵌合寡核苷酸。

[0163] 在另一实施方式中, 本发明的核酸分子可与其它基团偶联, 包括但不限于: 基本核苷酸、聚醚、聚胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、脂质、或聚烃化合物。本领域技术人员可认识到这些分子可与一个或多个含有任意核苷酸的核酸分子在糖、碱基、或磷酸基团的几个位置上连接。

[0164] 通过本领域熟知的固相合成技术, 可以方便地常规地制备用于本发明的寡核苷酸。包括 Applied Biosystems 在内的几家供应商销售用于这种合成的设备。还可采用任何其它合成手段; 寡核苷酸的准确合成对于本领域普通技术人员是轻车熟路的。利用类似技术制备其它寡核苷酸如硫代磷酸酯和烷基化衍生物也是众所周知的。利用类似技术和商业可供的修饰试剂和孔径可控玻璃珠 (CPG) 产品如生物素、荧光素、吡啶、或补骨脂素-修饰试剂和 / 或 CPG (Glen Research, Sterling VA 可提供的) 来合成荧光素标记的、生物素化的、或其它修饰的寡核苷酸, 例如, 胆固醇修饰的寡核苷酸。

[0165] 在本发明中, 修饰的应用, 例如利用 LNA 单体以增强作用的强度、特异性、和持续时间, 以及拓宽寡核苷酸的给药途径包括目前的化学法, 如 MOE, ANA, FANA, PS 等 (参考 Recent advances in the medical chemistry of antisense oligonucleotide by Uhlman, *Current Opinions in Drug Discovery & Development* 2000 Vol 3 No 1)。这可通过以 LNA 单体取代当前寡核苷酸上的一些单体来实现。LNA 修饰的寡核苷酸可具有与亲代化合物相似的大小, 或更大或优选更小。优选地, 这种 LNA 修饰的寡核苷酸含有小于约 70%, 更优选小于约 60%, 最优选小于约 50% 的 LNA 单体, 并且它们的大小在约 10-25 个核苷酸之间, 优选在约 12-20 个核苷酸之间。

[0166] 癌症治疗

[0167] 在另一优选实施方式中, siRNA 寡核苷酸被用于治疗易感或患有癌症的患者。可识别在癌细胞中过度表达的基因产物, 以使 siRNA 寡核苷酸选择性地靶向癌细胞, 而不靶向正常细胞。例如, 表达序列标签 (ESTs) 可用于识别在癌细胞中过度表达的核酸分子 [expressed sequence tag (EST) sequencing (Celis, et al, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., /.Biotechnology., 2000, 80, 143-57)]。可识别来自于多个数据库的 ESTs。例如, 优选的数据库包括: 例如, 人类孟德尔遗传在线 (OMIM)、癌肿基因组解剖计划 (CGAP)、GenBank、EMBL、PIR、SWISS-PROT 等等。OMIM 是由国家生物技术信息中心 (NCBI) 开发的与疾病相关的基因突变数据库。OMIM 可通过因特网的万维网登录, 例如 ncbi.nlm.nih.gov/Omim/。CGAP 是为了建立破译癌细胞的分子解剖学所需的信息和技术工具的学科交叉计划。CGAP 可通过因特网的万维网登录, 例如 ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap/。某些这类数据库可能包含完整或部分核苷酸序列。此外, 还可从私人遗传数据库选择可替换的转录物形式。可替换地, 可从可用的公开信息中选择核酸分子或联合本发明确定特异可用的核酸分子。

[0168] 可替换的转录物形式可通过能够产生邻近序列的计算机软件, 由每个数据库中的单个 ESTs 生成。在本发明的另一实施方式中, 通过装配大量重叠 ESTs, 来确定靶核酸分子的核苷酸序列。本领域技术人员公知可用的 EST 数据库 (dbEST) 包含大约一百万个不同的含有约 500-1000 个核苷酸的人类 mRNA 序列, 以及来自于多种不同生物体的大量 ESTs。dbEST 可通过因特网的万维网登录, 例如 ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html。这些序列来源于用于基因组测序的 cDNA 表达克隆的克隆策略。ESTs 可应用于发现新的基因产物、映射基因组、和识别基因组序列中的编码区域。正迅速变得有用的 EST 序列信息的另一重要特征是组织特异性基因表达数据。这对于从为治疗干涉所选的基因中靶定 mRNA 是极其有效。因为 EST 序列是相对较短的, 必须将它们装配以便提供一个完整序列。因为对每个可用的克隆进行了测序, 这导致数据库中报导了大量的重叠区域。最终的结果是从例如正常细胞和癌细胞中找出可替换的转录物形式。

[0169] 沿 5' 和 3' 方向延伸的重叠 ESTs 的装配, 可形成全长的“病毒转录物”。合成的病毒转录物是一个已经表现出特性的核酸或是一个新型的具有未知生物学功能的核酸。基因组研究所 (TIGR) 人类基因组索引 (HGI) 数据库是本领域技术人员公知可用的, 该数据库包含一系列的人类转录物。TIGR 可通过因特网的万维网登录, 例如 tigr.org。可利用 TIGR- 装配器以这种方式生成转录物, TIGR- 装配器是一种建立病毒转录物的装置, 是本领域技术人员公知可用的。TIGR- 装配器是一种装配大组重叠序列数据的工具, 例如 ESTs、BACs、或小基因组, 可用于装配真核或原核序列。在例如 Sutton, 等, 在 *Genome Science & Tech.*, 1995, 1, 9-19 中描述了 TIGR- 装配器, 在此将其引入本文作为参考, 可通过因特网的文件传输程序登录, 例如在 tigr.org/pub/software/TIGR.assembler。此外, 本领域技术人员公知可用的 GLAXO-MRC 是另一个构建病毒转录物的方案。在美国系列申请 No. 09/076, 440 中详细描述了 ESTs 的识别和生成邻近 ESTs 以形成全长 RNA 分子, 其被引入本文作为参考。

[0170] 可识别相对于正常细胞在癌细胞中被过度表达的基因产物, 例如, 相对于正常组织在胰腺癌中被表达至少 5 倍的基因产物。通过基因表达系列分析 (SAGE) 可分析基因表达, 其是基于识别和描述部分, 被定义的与基因片段相应的转录物序列 [SAGE (基因表达系

列分析) (Madden, et al., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425)]. 这类被定义的转录物序列“标签”是例如在细胞、组织、或提取物中表达的基因产物的标记。

[0171] 靶核酸序列的识别

[0172] 在一个优选实施方式中,本发明的组合物靶向期望的核酸序列。通过多种方法如 SAGE 可识别靶核酸序列。SAGE 以几种原理为基础。首先,短序列标签 (9-10bp) 包含充足的信息含量,可独特地识别由转录物的特定位置分离而得的转录物。例如,短至 9bp 的序列可辨别在标签位点上随机分布核苷酸的 262,144 个转录物,而据估计人类基因组编码约 80,000-200,000 转录物 (Fields, et al., Nature Genetics, 7:3451994)。标签的大小可短于例如基因组编码的转录物数目更小的较小真核细胞或原核细胞。例如,短至 6-7bp 的标签足以辨别酵母的转录物。

[0173] 第二,随机的标签二聚化作用是一个减少偏差(由扩增和/或克隆造成的)的过程。第三,这些短序列标签的串联可实现通过对单个载体或克隆内的多个标签进行测序,而以系列方式有效地分析转录物。如计算机的连续通讯,其中信息以连续的数据串传输,序列标签的系列分析需要一种建立每个标签的寄存和边界的手段。本发明的由序列得到定义标签的概念,在样品标签与序列数据库的匹配中是有益的。在优选实施方式中,采用计算机方法将样品序列与已知序列进行匹配。

[0174] 本文所用的标签独特地识别基因产物。这是由于它们的长度和它们在其所依照的基因上的特异性定位(3')。通过标签与基因数据库成员的匹配,或利用标签序列作为探针以从 cDNA 文库中物理分离出先前未经确认的基因产品,可识别全长的基因产物。利用 DNA 探针从文库分离基因产物的方法是本领域技术所公知的。参见例如 Veculescu 等, Science 270:484(1995), 和 Sambrook et al. (1989), MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.)。一旦通过与数据库条目的配对或通过 cDNA 分子的物理杂交鉴别出一个基因或转录物,则可确定转录物的杂交或匹配区位置。如果标签序列不在 3' 末端,非常邻近用限制性内切酶产生 SAGE 标签,则可能造成错配。通过对比特定细胞型中标签的转录水平与经确认的基因的水平,即可实施对 SAGE 标签同一性的确认。

[0175] 基因表达的分析不限于以上方法还可包括本领域公知的任何方法。可独立地、组合地、或与其它已知的序列识别方法组合地,应用所有这类原理。

[0176] 本领域已知的基因表达分析方法的实例包括:DNA 阵列或微阵列 (Brazma and Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16)、READS(经消化的 cDNAs 限制性内切酶扩增) (Prashar and Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72)、TOGA(总体基因表达分析) (Sutcliffe, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 1976-81)、蛋白阵列、和蛋白组学 (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10)、消滅 RNA 指纹 (SuRF) (Fuchs, et al., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson, et al., Cytometry, 2000, 41, 203-208)、消滅克隆、差异显示 (DD) (Jurecic and Belmont, Curt. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21)、比较基因组杂交 (Carulli, et al., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96)、FISH(荧光原位杂交)技术 (Going and Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904)、和质谱方法(参见 (Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41))。

[0177] 在另一方面,可选择性地结合到各种靶基因表达产物上的 siRNA 寡核苷酸,对于癌症治疗是有用的。例如,在各种肿瘤中,p53 突变体是大家所熟知的。“变体”是基因的一种可替换形式。变体是由在核酸序列上的至少一个突变引起的,并且可能形成被改变的 mRNAs 以及结构或功能发生或不发生变化的多肽。任何给定的天然或重组基因可能不具有或具有一个或多个等位基因形式。常见的可产生变体的突变通常归因于核苷酸的天然缺失、增加、或取代。在一个给定序列中,每种类型的变化可能单独发生或与其它组合发生一次或多次。

[0178] 可手动实施或通过本领域技术人员公知的几种可用计算机程序实施序列相似性的检索。优选地,可使用本领域技术人员公知可用的 Blast 和 Smith-Waterman 算法等等。Blast 是被设计成支持核苷酸和蛋白序列数据库分析的 NCBI 序列相似性检索工具。Blast 可通过因特网的万维网登录,例如 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/。GCG 包提供了一种可用于公共结构域数据库或用于任何本地可用检索数据库的 Blast 的本地版本。GCG 包 V9.0 是一个含有超过 100 个能通过编辑、映射、比对和排列,进行序列分析的相关软件程序的商业可供软件包。GCG 包中含有的其它程序包括例如易于 RNA 二级结构预测、核酸片段装配、和进化分析的程序。此外,大多数著名的基因数据库 (GenBank、EMBL、PIR、和 SWISS-PROT),随 GCG 包而分布并且全部可通过数据库检索和操作程序登录。GCG 可通过因特网登录,例如 <http://www.gcg.com/>。Fetch 是一种可通过登录号获取注释的 GenBank 记录的 GCG 可用工具,其类似于 Entrez。通过 Pangea 的 GeneWorld 和 GeneThesaurus,可实施另一种序列相似性检索。Gene World2.5 是一种用于分析多核苷酸和蛋白序列的自动化的、灵活的、高通量的应用软件。GeneWorld 可实现序列的自动化分析和注释。像 GCG、Gene World 合并了用于同族检索、基因查询、多序列排列、二级结构预测、和基序识别的几种工具。GeneThesaurus1.0™ 是一种序列和注释数据订阅服务软件,其可提供来自多种来源的信息,提供公共和当地数据的相关数据模式。

[0179] 另一种可替换的序列相似性检索可通过例如 BlastParse 来实施。BlastParse 是一种在 UNIX 平台上运行的 PERL 脚本,其可自动操作上述策略。BlastParse 接收感兴趣的靶登录号列表,并将所有 GenBank 域解析成“以制表符分隔”的文本然后以“数据库相关”格式保存,以便于检索和分析,其提供了灵活性。最终的结果是一系列完整的解析 GenBank 记录,其易于被分选、筛选、和查询也是一个注释相关数据库。

[0180] 根据本发明,设计适宜 siRNA 寡核苷酸,可识别种内同源基因。种内同源基因是在一个物种内的由于基因复制而产生的,但已进化出新功能的基因,其还被称为同种型。

[0181] 可利用在实验部分描述的所述技术分离或利用 PCR 技术,对本发明的多核苷酸进行复制。PCR 技术是美国专利 Nos. 4683195、4800159、4754065、和 4683202 的技术主题,并在 PCR:聚合酶联式反应 (The Polymerase Chain Reaction) (Mullis et al. eds, Birkhauser Press, Boston (1994)) 和本文引用的参考文献中有所描述。可选择地,本领域技术人员可采用经确认的序列和商业合成的 DNA,来复制 DNA。因此,本发明还提供一种获取本发明多核苷酸的方法,该方法通过提供多核苷酸的线性序列,核苷酸,适宜的引物分子,用于它们的复制以及在适当的方向上进行化学复制或对核苷酸进行连接的化学制品(如酶)和说明,以获取多核苷酸。在一个独立的实施方式中,这些多核苷酸被进一步分离。更进一步,本领域技术人员可将多核苷酸插入适宜的复制载体,并将载体插入到适宜的宿主细胞(原

核或真核)中以进行复制和扩增。通过本领域技术人员公知的方法,可从细胞中分离扩增的DNA。本文还进一步提供了通过这种方法获得多核苷酸的过程,以及获得的多核苷酸。

[0182] 疾病治疗

[0183] 在另一优选实施方式中, siRNA 可用于治疗免疫细胞参与的疾病,例如,自免疫疾病、对过敏原的超敏性、器官的排斥反应、炎症、等等。炎症相关症状的实例,例如,由败血症或创伤次生的成人呼吸窘迫综合症(ARDS)或多器官损伤综合症;心肌或其它组织的再灌注损伤;急性血管球性肾炎;反应性关节炎;带急性炎症成分的皮肤病;急性化脓性脑膜炎或其它中枢神经系统炎症病变;热损伤;血液透析;白细胞去除术;溃疡性结肠炎;克罗恩病;坏死性小肠结肠炎;粒细胞输血相关综合症;和细胞因子诱导毒性。自免疫疾病实例包括但不限于:银屑病、I型糖尿病、雷诺综合症、自免疫甲状腺炎、EAE(实验性变应性脑炎)、多发性硬化症、风湿性关节炎、和红斑狼疮。

[0184] 本发明方法可用于筛选能够抑制用于调节一个或多个调节免疫相关分子表达的基因的功能表达的 siRNA 多核苷酸。例如, CD-18 族分子对于细胞的粘附很重要。通过粘附过程,淋巴细胞可以持续地监测动物体中外来抗原的存在。尽管这些过程是正常所需的,但它们还是器官移植排斥反应、组织移植排斥反应、和许多自免疫疾病的起因。因此,能够削弱或抑制细胞粘附的 siRNA' s,对器官移植(例如肾脏移植)、组织移植的接受者、或自免疫疾病患者是非常理想的。

[0185] 在另一优选实施方式中, siRNA 寡核苷酸抑制参与器官移植或组织移植的 MHC 分子的表达。例如,捐赠者的 I 类和 II 类分子。siRNA 抑制这些分子的表达因子,改善了同种异体移植反应。在器官或组织移植前,处理免疫细胞;在移植时和/或之后的任何时间给药,时间由主治医生来确定。siRNA 的给药可以与免疫抑制药物治疗同时进行或不同时进行。

[0186] 在另一优选实施方式中, siRNA 被用于治疗对抗原超常反应的个体,例如,过敏个体。siRNA' s 被设计成能够靶向已知能够产生抗原特异性的 IgE 分子的 V 区基因。通过常规免疫诊断技术,例如 ELISA' s(酶联免疫吸附试验)、RIA' s(放射免疫测定法)、PCR(聚合酶链式反应)、蛋白印迹等,可检测 IgE 抗体的特异性。利用以下所述的任意的数据库技术,可从 IgE 分子的氨基酸序列中,推算出它的核酸序列。siRNA' s 被设计成结合到 V 区基因或编码所需抗体的基因的任何其它部分,包括重排和非重排的免疫球蛋白核酸序列。

[0187] 在另一优选实施方式中, siRNA' s 被设计成靶向可抑制在正常个体中不被抑制的基因表达的抑制剂分子。例如,抑制细胞周期依赖基因的抑制剂分子、p53mRNA 的抑制、编码细胞表面分子的基因转录的 mRNA 的抑制、参与凋亡的半胱氨酸蛋白酶(caspases)的抑制等等。

[0188] 由于各种原因,凋亡在临床上是很重要的。在肿瘤学领域中,许多临床有效药物通过诱导凋亡而杀死肿瘤细胞。例如,癌症化疗剂,例如顺铂、依托泊苷、和紫杉醇,都可在靶细胞中诱导凋亡。此外,多种疾病的病理状态是由细胞未经历适当调节的凋亡所造成。例如,未经历凋亡可导致自反应淋巴细胞的病态积累,就如许多自免疫疾病所发生的一样,还可导致病毒感染细胞的积累和高度增殖细胞的积累,例如,肿瘤性细胞或肿瘤细胞。靶向翻译蛋白并能够特异性地诱导凋亡的 mRNA' s 的 siRNA' s,将因此在这类疾病病理状态的治疗

中具有治疗价值。

[0189] 相反地,凋亡的抑制在临床上也是重要的。例如,在中风或心肌梗塞后分别通过脑和心脏的凋亡来认定细胞死亡。而且,凋亡的不当活化也可引起多种其它疾病病理状态包括:例如,获得性免疫缺陷综合症(AIDS)、神经退行性疾病和缺血性损伤。正如之前所述的凋亡诱导剂有益于疾病状态一样,特异性的凋亡抑制剂也类似地在后续疾病病理状态的治疗中具有治疗价值。

[0190] 在一种优选实施方式中, siRNA' s 靶向以上所述的治疗关注基因,以防止基因的正常表达,或如果需要则过度表达。如本文所用的,术语“过度表达”在用于表示基因表达水平时,意味着相对于在相应正常细胞中的表达水平在过度表达细胞中,基因产物的积累增加。通过自然生物学现象以及对于遗传工程细胞通过特定修饰,来实现过度表达。过度表达还包括实现通过内在的或外在的机制的细胞存活多肽的增加。自然现象的过度表达可以由例如增强表达、加工、运输、翻译、或 RNA 稳定性的突变以及导致多肽稳定性增强或降解减弱的突变所造成的。增强表达水平的这类实例也是过度表达内在机制的实例。由外在机制引起的过度表达的自然生物学现象的特定实例是逆转录病毒或转座子的邻近整合。特定修饰的过度表达可通过例如利用本文所述的 siRNA 寡核苷酸实现。

[0191] 可通过多种不同方式来构建 siRNA 多核苷酸,使其可以干扰靶蛋白的表达。siRNA 多核苷酸通常与靶分子序列是基本相同的(尽管是在互补方向上)。最低的同源性通常大于约 80%、大于约 90%、大于约 95%、或约 100% 相同。

[0192] 受体调节和候选治疗剂

[0193] 在一个优选实施方式中,细胞表面受体被调节(调控)。细胞受体的调控可用于例如筛选用于疾病治疗的候选药物。利用 siRNA,我们提供了 siRNA 对反义 RNA 的干扰可改变相应的正义信使 RNAs 的表达的实验性证据。然而,这种调节或者是不一致的(反义敲低导致正义转录物的增多)或者一致的(反义敲低导致一致的正义转录物的减少)。不希望受理论的限制,调控基因的概念如图 1A-1B 和图 2A-2B 所示。在表 2 中显示了一系列已经用 siRNA 靶向的人类和小鼠的反义转录物。在这些例子中,以两个或多个 siRNA 靶向反义链的非重叠部分,并通过 RT-PCR 证实了敲低。表 2 举例说明了编码以及非编码反义分子可通过相同的方式被靶定且任一种都能够以一致或不一致的方式调控相应的正义转录物的观察结果。在此我们构想了两种以 siRNA 来敲低反义 RNA 转录物为基础(或其它 RNA 靶定原理)的新 的有效药理学策略:

[0194] 策略 1:在不一致调节的情况下,可以通过仅敲低反义转录物来提高常规(正义)基因的表达。如果后面的基因编码已知的或公认的药物靶,则其反义副本的敲低可以令人信服地模拟受体拮抗剂或酶刺激剂的作用。表 2 给出了其中反义(编码和非编码)转录物的敲低被证实不一致地调节了正义表达的例子。例如,在帕金森病中,线粒体局部性激酶(PINK1)的活性需要提高是有争议的,其非编码的反义拍档(antisense partner)的敲低可能是实现该目的的一种方式。此外,在某些情况下,为了刺激血管的形成,可以通过靶向其(编码)反义拍档 Ddx-339,来增强穿过 G-蛋白偶联受体(GPCR)CD97 的信号发送。

[0195] 策略 1 的例子(PINK1 的提高,例如帕金森病):

[0196] PINK-AS siRNA-a :GGAAGCTGTAGCTAGAACATCTGTT(SEQ ID NO :1)

[0197] PINK-AS_siRNA-b :CAGGTAAGT AGTCTCCTCTATCATT(SEQ ID NO :2)

[0198] PINK-AS_siRNA-c:TCTCAACCCAAAGCCTGCTTTGTTA (SEQ ID NO :3)

[0199] 策略 2:在一致调节的情况下,可以相伴地敲低反义转录物和正义转录物,从而实现常规(正义)基因表达的协同降低。这些理念如图 2A 和 2B 所示。如果使用 siRNA 来实现敲低,则还可以通过将靶向于正义转录物和另外的 siRNA 的一种 siRNA,施用于相应的反义转录物来对该策略进行检验,或者通过同时靶向重叠的正义和反义转录物的单独的高能对称 siRNA,来对该策略进行检验。从表 2 可以看出,例如,在可诱导缺氧的因子 1 α 的情况下,这样的双重相伴的靶向与追赶者有关,所述因子 1 α 为一种在各种病症中均可能需要受到抑制的靶。表 2 中的另一个例子为肾上腺髓质素 AM1 受体,该 AM1 受体是一种已经被证实其信号发送的降低有益于治疗的 GPCR。

[0200] 随着新兴的功能 RNA 世界,有新的潜在的药物靶点将会被考虑。在这些药物靶点中,有大量天然存在的能够调节正义转录物的表达的反义转录物,所述正义转录物包括编码常规药物靶的正义转录物。由于这些反义转录物中的许多都表示非编码的 RNA,因此不能对它们进行蛋白水平上的调控。通过使用 siRNA,我们已经发现反义转录物的敲低能够使正义转录物的表达升高(不一致的调节)或降低(一致的调节)。这些发现和理念可以形成新的药理学策略的基础。

[0201] 在优选的实施方式中,鉴定用于治疗包括帕金森病、阿尔茨海默病(Alzheimer)、神经性失调/疾病、肿瘤等在内的疾病的候选治疗剂的方法包括:对其中已经使用本发明的方法例如调节(即上调或抑制受体的表达)对细胞受体进行调节的分离的细胞进行培养;和,将候选治疗剂给药至培养的细胞;与正常细胞和在候选治疗剂的存在下培养的受体受到调节的细胞相比,建立表达水平与受体磷酸化的相互关系,其中基于想要的治疗结果鉴定出药物。例如,药物提高受体的表达、降低受体的表达、或者使受体磷酸化或去磷酸化等,从而鉴定出调节受体的候选治疗剂。

[0202] 适用于诊断和发现候选药物的另一方法包括:将检测样品与表达受体、或其基因、等位基因、或它们的片段进行接触;和对检测样品与所述基因、等位基因、或它们的片段的相互作用进行检测,或者对所述基因、等位基因、或它们的片段的表达产物进行检测。可以对所需的基因、等位基因、或它们的片段,或者所述基因、等位基因、或它们的片段的表达产物进行适当的可检测的标记,如用荧光成分或放射性成分。

[0203] 在另一优选实施方式中,将来自患者的细胞进行分离,并与候选的治疗分子进行接触。对基因或其表达产物进行监控,以鉴定出哪些基因或表达产物受到药物的调节。然后,可以合成出干扰 RNA,以调节那些鉴定出的受到药物的调节的基因或表达产物,从而提供治疗的寡核苷酸。可以对个体患者定制这些寡核苷酸,当不同的患者对相同药物的反应不是同样有效时,这样是有利的。因此。相对于常规的药物疗法,寡核苷酸能够提供更便宜的个性化的治疗。

[0204] 一方面,可以与能够检测包括基因组序列在内的多核苷酸序列、编码所需的基因和密切相关的分子的寡核苷酸探针进行杂交,以鉴定出靶核酸序列。探针的特异性(不管该探针由高度特异性的区域如 5' 调控区域制得,或者由特异性较低的区域如保守基序制得)以及杂交或扩增的严格性(最大的、高度的、中度的、或低度的)将决定探针是否仅能够鉴定出天然存在的编码基因的序列、等位基因变体、或相关的序列。

[0205] 探针还可以应用于检测相关的序列,并且优选与任何鉴定的基因编码序列具有至

少 50% 的序列同一性或同源性,更优选与任何鉴定的基因编码序列具有至少约 60、70、75、80、85、90 或 95% 的序列同一性(序列同一性测定如上所述,包括使用 BLAST 程序)。本发明的杂交探针可以为 DNA 或 RNA,并且可以源自本发明的序列,或者源自包括基因的启动子、增强子和内含子在内的基因组序列。

[0206] 在此所用的“同源的”是指两个聚合分子之间(例如,两个核酸分子如两个 DNA 分子之间,或者两个多肽分子之间)的亚单元序列相似性。当两个分子中的亚单元位置都被相同的单体亚单元所占据(例如,如果两个 DNA 分子的一个位置都被腺嘌呤所占据),则它们在那个位置上是同源的。两个序列之间的同源性是相配的或同源的位置的数量的直接函数。例如,两个化合物序列的 10 个位置中的 5 个是相配的或同源的,则两个序列是 50% 同源的,如果 10 个位置中的 9 个是相配的或同源的,则两个序列是 90% 同源的。例如,DNA 序列 3' ATTGCC5' 和 3' TTTCCG5' 的同源性是 50%。

[0207] 对编码靶基因的 DNA 具有特异性的杂交探针的制备方法包括:将编码靶基因或其衍生物的寡核苷酸序列克隆到用于制备 mRNA 探针的载体中。这样的载体为本领域技术人员所公知,可以商购得到,可以通过添加合适的 RNA 聚合酶和合适的标记核苷酸,而用于在体外合成 RNA 探针。杂交探针可以被各种报告基团(例如,放射性核素如 ^{32}P 或 ^{32}S) 或酶标记(如通过抗生物素蛋白-生物素偶联系统与探针偶联的碱性磷酸酶、荧光标记等)所标记。编码靶基因的多核苷酸序列可以用于:Southern 分析(DNA 印记)或 Northern 分析(RNA 印记)、斑点印迹、或其它基于膜的技术;PCR 技术;量尺、别针、和多样 ELISA 类似的分析;利用来自患者的液体和组织的微阵列,以检测改变的靶基因表达。可以使用凝胶基能动性转变分析(Gel-based mobility-shift analyses)。其它合适的定性或定量方法是本领域公知的。

[0208] 可以使用本领域公知的技术来验证基因或其变体的同一性。例子包括但不限于:扩增的基因的核酸测序;杂交技术,如单独核酸多态性分析(SNP);微阵列,其中感兴趣的分子被固定在生物芯片上。重叠的 cDNA 克隆可以通过利用荧光染料终止者进行的二脱氧链式反应和 ABI 测序仪(Applied Biosystems, Foster City, Calif.) 而进行测序。可以使用本发明的底物平台进行其中一种成分被固定的任何类型的分析。利用固定的成分的生物分析是本领域公知的。例如,利用固定的成分的分析的例子包括:免疫分析、对蛋白-蛋白相互作用的分析、对蛋白-核酸相互作用的分析、对核酸-核酸相互作用的分析、受体结合分析、酶分析、磷酸化分析、用于确定疾病状态的诊断分析、用于药物相容性分析的基因图谱、SNP(单核苷酸多态性)分析等。

[0209] 能够与感兴趣的生物分子相结合的核酸序列的鉴定,可以通过以下过程来实现:将核酸库固定在基底表面,从而使各个不同的核酸位于确定的位置上,以形成阵列。然后在有利于使所述生物分子与核酸相结合条件下,将所述阵列暴露于生物分子。根据所需的结合的特异性水平,可以使用从轻度到严格的缓冲条件将非特异性结合的生物分子洗脱掉。然后对核酸阵列进行分析,以确定哪些核酸序列与生物分子结合。优选地,所述生物分子具有荧光标签,用于检测结合的核酸的位置。

[0210] 利用核酸序列的固定阵列的分析可以用于:确定未知核酸的序列;单核苷酸多态性(SNP)分析;对来自特定物种、组织、细胞类型等的基因表达模式进行分析;基因鉴定等。

[0211] 对寡核苷酸的其它诊断用途可以包括使用 PCR,所述寡核苷酸设计源自编码所需

的基因表达产物的序列。这些低聚物可以被化学合成、酶法生成、或体外生成。低聚物将优选包括编码表达产物的多核苷酸的片段或者与该多核苷酸互补的多核苷酸的片段，并且将在用于鉴定特定基因的优化条件下被使用。低聚物还可以在用于检测或定量分析密切相关的 DNA 或 RNA 序列的不太严格的条件下被使用。

[0212] 在其它的实施方式中，源自任何多核苷酸序列的寡核苷酸或较长的片段，可以用作微阵列中的靶点。所述微阵列可以用于同时监测许多基因和基因转录物的同一性和 / 或表达水平，以鉴定与靶基因或其产物相互作用的基因、和 / 或评估候选治疗剂对介导神经失调的基因的表达产物的调节效力。这种信息可以用于确定基因功能，以及开发和监控治疗剂的活性。

[0213] 可以使用本领域公知的方法制备、使用并分析所述微阵列（请见，例如，Brennan et al., 1995, U. S. 5, 474, 796 ;Schena et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 : 10614-10619 ;Baldeschweiler et al., 1995, PCT 申请 W095/251116 ;Shalon, et al., 1995, PCT 申请 W095/35505 ;Heller et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 :2150-2155 ;以及，Heller et al., 1997, U. S. 5, 605, 662）。

[0214] 尽管候选试剂一般为包括小的有机化合物、核酸（包括寡核苷酸）和肽在内的有机化合物，但是它们包括许多种类的化学品。适宜地，小的有机化合物的分子量可以为例如大于约 40 或 50 且小于约 2500。候选试剂可以含有与蛋白和 / 或 DNA 相互作用的化学官能团。

[0215] 候选试剂可以得自包括合成化合物库或天然化合物库在内的广泛的来源。例如，可以利用许多方法来随机地合成和定向地合成广泛的有机化合物和生物分子，包括随机化的寡核苷酸的表达。替代性地，可以利用或容易地制得天然化合物库，该天然化合物的形式例如为细菌提取物、真菌提取物和动物提取物。

[0216] 适宜地，本发明的治疗剂分析包括动物模型、基于细胞的系统和不基于细胞的系统。

[0217] 优选地，鉴定出的基因、变体、片段、和它们的寡肽用于鉴定治疗感兴趣的试剂，例如，通过筛选化合物库，或者通过多种药物筛选或分析技术中的任何技术以另外的方式鉴定感兴趣的化合物。所述基因、等位基因、片段、或它们的寡肽可以是溶液中的自由形式、粘附于固体支持物、装载在细胞表面上、或位于细胞内。

[0218] 用于药物筛选的另一技术提供了较高的化合物筛选量，所述化合物对感兴趣的蛋白具有合适的结合亲和力（请见，例如，Geysen et al., 1984, PCT 申请 W084/03564）。在该方法中，在固体基底上合成大量的不同的小的测试化合物。所述测试化合物与鉴定出的基因或其片段反应，并被洗涤。然后通过本领域公知的方法测定结合的分子。替代性地，可以使用不使肽无效的抗体捕获所述肽，并将其固定在固体支持物上。

[0219] 本发明的筛选方法包括使用筛选分析，以从多种分子的库中鉴定出具有所需的活性的一种或多种化合物。“筛选分析”是一种选择性的分析，该选择性的分析被设计为在具有预选活性的集合范围内鉴定、分离和 / 或确定化合物的结构。“鉴定”的意思是分离具有所需活性的化合物，确定其化学结构（包括但不限于分别确定核酸和多肽的核苷酸序列和氨基酸序列，另外或者替代性地对具有筛选的活性的化合物进行纯化）。生化分析和生物分析被设计为在从蛋白-蛋白相互作用、酶催化作用、小分子-蛋白结合到细胞功能的较广范围

的系统中检测活性。所述分析包括自动分析、半自动分析和高通量筛选 (high throughput screening, HTS) 分析。

[0220] 在 HTS 方法中, 优选用遥控、自动或半自动方法平行地检测许多不同的化合物, 从而针对所需的活性, 同时或几乎同时筛选大量的检测化合物。使用本发明的集成系统, 一天分析和筛选的不同化合物高达约 6000-20000, 甚至高达 100000-1000000。

[0221] 一般地, 在 HTS 中, 给予靶分子, 或者将靶分子与具有受调控的受体的分离的细胞一起培养, 包括合适的对照。

[0222] 在一种实施方式中, 筛选包括: 在使靶和配体之间可以形成络合物的条件下, 将各细胞培养物与成员化合物的不同库接触, 所述成员化合物中的一些为靶的配体; 以及, 鉴定库中的哪些成员出现在所述络合物中。在另外的非限定性的形式中, 筛选包括: 在由酶催化的反应的产物或反应物产生可检测的信号的情况下, 将靶酶与成员化合物的不同库接触, 所述成员化合物中的一些为靶的抑制剂 (或促进剂)。在后一种形式中, 靶酶的抑制剂降低来自可检测的产物的信号, 或提高来自可检测的反应物的信号 (对于促进剂则情况相反)。

[0223] 化学库: 随着组合化学的发展, 可以快速经济地合成数百至数千种不同的化合物。这些化合物一般排列在小分子的库中, 该库的设计规模适于高效地筛选。可以利用组合方法来得到适于鉴定新型化合物的无偏见的库。此外, 可以从具有初始确定的生物活性的单独母体化合物得到较小的不太多样的库。在任何一种情况下, 缺少特异性地靶向由组合化学制得的治疗相关的生物分子 (如重要酶的抑制剂) 的有效筛选系统会妨碍这些资源的最佳使用。

[0224] 组合化学库是通过将许多化学“构建模块 (building block)”如试剂进行组合而形成的不同的化合物的组合, 所述不同的化合物由化学合成或生物合成而形成。例如, 对于给定的化合物长度 (即, 多肽化合物中的氨基酸数量), 线性组合化学库如多肽库是通过以大量的组合和各种可能的方式将一组化学构建模块 (氨基酸) 进行组合而形成的。通过将化学构建模块进行组合, 可以合成数百万的化合物。

[0225] “库”可以包括 2-50000000 种不同的成员化合物。优选地, 库包括至少 48 种不同的化合物, 优选 96 或多于 96 种不同的化合物, 更优选 384 或多于 384 种不同的化合物, 更优选 10000 或多于 10000 种不同的化合物, 更优选 100000 或多于 100000 种不同的化合物, 最优选 1000000 或多于 1000000 种不同的化合物。“不同的 (diverse)”的意思是指库中 50% 以上的化合物的化学结构与库中的其它成员的化学结构不同。优选地, 库中 75% 以上的化合物的化学结构与集合的其它成员的化学结构不同, 更优选为 90%, 最优选为 99%。

[0226] 组合化学库的制备已为本领域技术人员所公知。作为参考, 请见 Thompson et al., Synthesis and application of small molecule libraries, ChemRev96: 555-600, 1996; Kenan et al, Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries, Trends Biochem Sci19: 57-64, 1994; Janda, Tagged versus untagged libraries: methods for the generation and screening of combinatorial chemical libraries, Proc Natl Acad Sci USA. 91: 10779-85, 1994; Lebl et al, One-bead-one-structure combinatorial libraries, Biopolymers37: 177-98, 1995; Eichler et al., Peptide, peptidomimetic, and organic synthetic combinatorial libraries, Med Res Rev. 15: 481-96, 1995; Chabala, Solid-phase combinatorial

chemistry and novel tagging methods for identifying leads, *Curr Opin Biotechnol.* 6 :632-9, 1995 ;Dolle, Discovery of enzyme inhibitors through combinatorial chemistry, *Mol Divers.* 2 :223-36, 1997 ;Fauchere et al, Peptide and nonpeptide lead discovery using robotically synthesized soluble libraries, *Can J. Physiol Pharmacol.* 75 :683-9, 1997 ;Eichler et al, Generation and utilization of synthetic combinatorial libraries, *Mol Med Today* 1 :174-80, 1995 ;and Kay et al, Identification of enzyme inhibitors from phage-displayed combinatorial peptide libraries, *Comb Chem High Throughput Screen* 4 :535-43, 2001.

[0227] 还可以使用用于生成化学多样库的其它化学物质。这些化学物质包括但不限于：肽 (PCT 公布 W091/19735) ;编码的肽 (PCT 公布 W093/20242) ;无规则的生物低聚物 (PCT 公布 W092/00091) ;苯并二氮杂草 (U. S. 5, 288, 514) ;潜入物 (diversomers), 如乙内酰脲、苯并二氮杂草和二肽 (Hobbs, et al, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90 :6909-6913 (1993)) ;联乙烯物 (vinylogous) 多肽 (Hagihara, et al, *J. Amer. Chem. Soc* 114 :6568 (1992)) ;具有 β -D- 葡萄糖骨架的非肽类缩氨酸模拟物 (nonpeptidal peptidomimetics) (Hirschmann, et al, *J. Amer. Chem. Soc*, 114 :9217-9218 (1992)) ;小化合物库的相似有机综合体 (Chen, et al, *J. Amer. Chem. Soc*, 116 :2661 (1994)) ;寡氨基甲酸酯 (Cho, et al., *Science*, 261 :1303 (1993)) ;和 / 或, 磷酸肽酯 (Campbell, et al, *J. Org. Chem.* 59 :658 (1994)) ;核酸库 (见, Ausubel, Berger and Sambrook, all supra) ;肽核酸库 (见, 例如 U. S. 5, 539, 083) ;抗体库 (见, 例如 Vaughn, et al, *Nature Biotechnology*, 14 (3) :309-314 (1996) 和 PCT/US96/10287) ;碳水化合物库 (见, 例如 Liang, et al, *Science*, 274 :1520-1522 (1996) 和 U. S. 5, 593, 853) ;小的有机分子库 (见, 例如, 苯并二氮杂草, Baum *C&E News*, January 18, page 33 (1993) ;类异戊二烯 (U. S. 5, 569, 588) ;噻唑烷酮衍生物 (thiazolidinones) 和间噻嗪酮衍生物 (metathiazanones) (U. S. 5, 549, 974) ;吡咯烷 (U. S. 5, 525, 735 和 5, 519, 134) ;吗啉代化合物 (U. S. 5, 506, 337) ;苯并二氮杂草 (U. S. 5, 288, 514) 等。

[0228] 用于制备组合库的设备可以商购得到 (请见, 例如 357MPS, 390MPS, Advanced Chem. Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.)。此外, 许多组合库自身是可以商购得到的 (请见, 例如, ComGenex, Princeton, NJ., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Mo., ChemStar, Ltd., Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Bio sciences, Columbia, Md., etc.)。

[0229] 高通量筛选可以用于测定药物对复杂细胞活动如信号转导途径以及细胞功能, 所述细胞功能包括但不限于细胞功能、凋亡、细胞分裂、细胞黏附、运动、胞外分泌和细胞间通信。多色荧光使得能够在单独的筛选中分析多个靶和细胞过程。细胞反应的交叉相关将收获靶确认和引导最优化所需的大量信息。

[0230] 另一方面, 本发明提供了一种用于对细胞进行分析的方法, 该方法包括: 提供含有多个细胞的位置阵列, 其中, 所述细胞含有一种或多种荧光报告分子; 在含有细胞的各个位置对所述多个细胞进行扫描, 以由细胞中的荧光报告分子获得荧光信号; 将所述荧光信号转化为数字数据; 和利用所述数字数据来测定细胞中的荧光报告分子的分布、环境或活性。

[0231] 新药发现范例的主要成分是不增长的荧光和发光试剂的家族, 所述荧光和发光

试剂用于测定细胞内离子、代谢物、大分子和细胞器官的时间和空间分布、含量和活性。这些试剂的种类包括：用于测定活体细胞和固定细胞中的分子的分布和含量的标记试剂；用于报告时间和空间上的信号转导活动的环境指示剂；用于测定活体细胞中的靶分子活性的荧光蛋白生物传感器。将几种试剂合并到单独的细胞中的多因素方法是用于药物发现的有效的新工具。

[0232] 该方法依赖于荧光或发光分子对特定细胞成分的高亲和力。对特定成分的亲和力取决于物理力如离子相互作用、共价结合（包括与蛋白基发色团、荧光团和发光团的嵌合体融合），以及疏水相互作用、电势能，并且在某些情况下取决于细胞成分内的简单包埋。发光探针可以为小分子、标记的大分子或通过基因工程得到的蛋白，包括但不限于绿色荧光蛋白嵌合体。

[0233] 本领域技术人员可以理解，可以用于本发明的多种荧光报告分子包括但不限于荧光标记的生物分子，如蛋白、磷脂、RNA 和 DNA 杂交探针。类似地，特别合成的具有结合或缔合的特定化学性质的荧光试剂已经被用作荧光报告分子 (Barak et al, (1997), /. Biol. Chem. 272 :27 ' 497 ' -21 ' 500 ;Southwick et al, (1990), Cytometry11 :418-430 ; Tsien(1989) in Methods in Cell Biology, Vol. 29 Taylor and Wang(eds.), pp. 127-156)。由于荧光标记的抗体跟与细胞或组织一样复杂的分子混合物中的单独分子靶进行结合的特异性程度很高，因此它们是非常有用的报告分子。

[0234] 发光探针可以在活体细胞中进行合成，或者可以通过几种非机械模式传输到细胞中，所述非机械模式包括扩散、易化运输或主动运输、信号 - 序列介导的运输、以及内吞摄取或胞饮摄取。本领域公知的机械块状装载方法 (mechanical bulk loading method) 也可以用于将发光探针装载到活体细胞中 (Barber et al. (1996), Neuroscience Letters207 : 17-20 ;Bright et al. (1996), Cytometry24 :226-233 ;McNeil(1989) in Methods in Cell Biology, Vol. 29, Taylor and Wang(eds.), pp. 153-173)。这些方法包括电穿孔以及其它的机械方法如摩擦装载、珠装载、冲击装载、注射器装载、高渗和低渗装载。另外，细胞还可以进行基因改造以表达与如上所述的感兴趣的蛋白相结合的报告分子如 GFP (Chalfie 和 Prasher U. S. 5, 491, 084 ;Cubitt et al. (1995), Trends in Biochemical Science20 : 448-455)。

[0235] 由于发光探针与靶域的高亲和力的相互作用或者分子靶向的其它模式（如信号 - 序列介导的输送），一旦在细胞中，发光探针则积聚在其靶域。荧光标记的报告分子可以用于测定报告分子的位置、含量和化学环境。例如，可以测定报告分子是在亲脂膜环境中还是在水性环境中 (Giuliano et al. (1995), Ann. Rev. of Biophysics and Biomolecular Structure24 :405-434 ;Giuliano 和 Taylor(1995), Methods in Neuroscience27. 1-16)。可以测定报告分子的 pH 环境 (Bright et al. (1989), J. Cell Biology104 :1019-1033 ;Giuliano et al. (1987), Anal. Biochem. 167 :362-371 ;Thomas et al. (1979), Biochemistry18 :2210-2218)。可以测定具有螯合基团的报告分子是否与离子（如 Ca^{++} ）结合 (Bright et al. (1989), In Methods in Cell Biology, Vol. 30, Taylor and Wang(eds.), pp. 157-192 ;Shimoura et al. (1988), J. of Biochemistry(Tokyo) 251 : 405-410 ;Tsien(1989) In Methods in Cell Biology, Vol. 30, Taylor and Wang(eds.), pp. 127-156)。

[0236] 此外,生物体内的某些细胞类型可能含有能够被特异性标记的成分,所述特异性标记可能没有出现在其它细胞类型中。例如,神经细胞通常含有极化的膜成分。即,这些细胞的大分子沿着细胞的等离子体膜不对称地分布。结缔组织或支持组织细胞通常含有捕获有细胞类型特异性的颗粒(例如肝磷脂、组胺、5-羟色胺等)。大多数的肌肉组织细胞含有肌质网状组织,所述肌质网状组织是一种具有调节细胞质中的钙离子浓度的作用的专门的细胞器官。许多神经组织细胞含有捕获有神经激素或神经传递素的分泌颗粒和载体。因此,荧光分子可以被设计为不仅标记特定细胞中的特定组分,而且标记混合细胞类型群体中的特定细胞。

[0237] 本领域技术人员将可以确定许多方法以测定荧光。例如,一些荧光报告分子表现出刺激谱或发射谱的变化;一些荧光报告分子表现出共振能力转移,其中,一种荧光报告分子损失荧光性,而第二种荧光报告分子获得荧光性;一些荧光报告分子表现出荧光性的损失(猝灭)或出现,而一些荧光报告分子表现出转动(Giuliano et al. (1995), Ann. Rev. of Biophysics and Biomol. Structure 24:405-434; Giuliano et al. (1995), Methods in Neuroscience 27:1-16)。

[0238] 整个过程可以完全自动进行。例如,样品物质的取样可以分多个步骤进行,所述多个步骤包括从样品容器中抽出样品,将抽出的样品的至少一部分传递到测试细胞培养物中(例如,其中基因表达受到调节的细胞培养物)。取样还可以包括附加步骤,特别优选样品制备步骤。在一种实施方式中,每次只将一种样品抽到自动样品探针中,并且同个一时间仅有一种样品存在于所述探针中。在其它实施方式中,可以分别用溶剂将多种样品抽到自动样品探针中。在进一步的其它实施方式中,多个探针可以用于平行地自动取样。

[0239] 在一般情况下,取样可以人工进行、以半自动的方式进行或者以自动的方式进行。可以人工将样品从样品容器中抽出(例如,使用吸液管或注射器式的人工探针),然后人工将抽出的样品传递到鉴定系统的加料口或注入口。在半自动方案中,方案的一些方面可以自动进行(例如传递),而其它的一些方法需要人工介入(例如,将样品从过程控制线抽出)。然而,优选的是,以全自动的方式(例如用自动取样器),将样品从样品容器中抽出并传递到鉴定系统。

[0240] 在一种实施方式中,可以使用微处理器控制的自动系统(例如,机器人臂)完成自动取样。优选地,所述微处理器是用户可编程的,以提供具有多样化样品设置的样品库(例如,具有“n组”×“n列”的正方形阵列,具有“n组”×“m列”的矩形阵列,具有“r-”×“r-”×“r-”的等边三角形阵列,具有“r-底”×“s-”×“s-”的等腰三角形阵列等,其中n、m、r和s为整数)。

[0241] 选择性地,可以用具有热注射探针(末端)的自动取样器进行样品材料的自动取样。这种自动取样器的例子公开于U. S. 6, 175, 409B1中(并入作为参考)。

[0242] 根据本发明,使用一种或多种系统和/或方法来鉴定多种样品材料。尽管可以使用人工或半自动系统和/或方法,但是优选使用自动系统或方法。多种遥控或自动系统可以用于自动或可编程地提供预定的动作,以根据预定的方案处理、接触、分散或操作固态、液态或气态材料。可以对这样的系统进行适配和扩增,以包括多种硬件和/或软件,以协助该系统测定材料的机械性能。用于扩增所述遥控系统的硬件和软件可以包括但不限于传感器、转换器、数据获取和处理硬件、数据获取和处理硬件等。示例性的遥控系统可以商购自

CAVRO Scientific Instruments(例如,型号:RSP9652)或BioDot(MicrodropModel3000)。

[0243] 一般地,自动系统包括可以利用信息进行编辑的适当的方案设计和执行软件,所述信息包括合成、组成、位置信息或与相对于基底定位的材料库相关的其它信息。方案设计和执行软件一般与用于控制机器人或其它自动设备或系统的机器人控制软件相连通。方案设计和执行软件还与用于从反应测定硬件收集数据的数据获取硬件/软件相连通。一旦将数据收集到数据库中,可以用分析软件对数据进行分析,更确切的是确定候选药物的性质,或者可以对数据进行人工分析。

[0244] 在另一优选实施方式中,用细胞培养物分析候选药物或样品与一种或多种方法相结合。在一种实施方式中,可以利用尺寸排除色谱法,根据样品中的蛋白的大小,对样品进行预分离。对于样品可利用量较小的生物样品,优选使用尺寸选择旋转柱。一般地,从柱上洗脱的第一馏分(“馏分1”)的高分子量蛋白的百分率最高;馏分2的高分子量蛋白的百分率较低;馏分3的高分子量蛋白的百分率更低;馏分4的大蛋白的量最低等。每种馏分可以通过免疫测定、气相离子光谱法等进行分析,以检测化合物。

[0245] 在另一实施方式中,可以通过阴离子交换色谱法对样品进行预分离。阴离子交换色谱法可以根据样品中的蛋白的电荷性质对它们进行粗略的预分离。例如,可以使用Q阴离子交换树脂(例如,Q HyperD F, Biosepra),可以顺次用pH值不同的洗脱剂对样品进行洗脱。阴离子交换色谱法能够将样品中的负电荷较多的化合物与其它种类的化合物分开。用pH较高的洗脱剂洗脱的蛋白的负电荷很可能较弱,用pH较低的洗脱剂洗脱的蛋白的负电荷很可能较强。因此,除了降低样品的复杂程度以外,阴离子交换色谱法还根据蛋白的结合特性对它们进行分离。

[0246] 在又一实施方式中,可以通过肝磷脂色谱法对样品进行预分离。肝磷脂色谱法也基于样品中的化合物与肝磷脂相互作用的亲和力以及电荷性质对它们进行预分离。肝磷脂(一种硫酸化的粘多糖)将与具有带正电荷的部分的化合物结合,可以顺次用pH或盐浓度不同的洗脱剂对样品进行洗脱。用pH较低的洗脱剂洗脱的样品的正电荷很可能较弱。用pH较高的洗脱剂洗脱的样品的正电荷很可能较强。因此,肝磷脂色谱法还降低了样品的复杂程度并且根据它们的结合特性对样品进行分离。

[0247] 在又一实施方式中,可以通过分离具有特定性质的蛋白(如糖基化)而对样品进行预分离。例如,可以将CSF样品通过凝集素色谱柱(对糖具有高亲和力),从而将样品分馏。糖基化的蛋白将结合到凝集素色谱柱上,而没有糖基化的蛋白将流过。然后用含糖源洗脱剂如N-乙酰基-葡糖胺将糖基化的蛋白从凝集素色谱柱上洗脱掉,糖基化的蛋白可用于进一步的分析。

[0248] 因此,基于样品中的蛋白的结合性质,存在多种方法来降低样品的复杂程度或者样品中的蛋白的性质。

[0249] siRNA的传递

[0250] 本发明的优选实践包括利用合适的核酸传递系统给予前述siRNA中的至少一种。在一种实施方式中,所述系统包括能够与多核苷酸可操作地连接的非病毒载体。所述非病毒载体的例子包括单独的多核苷酸、或者多核苷酸与合适的蛋白、多糖或脂质制剂的结合。

[0251] 其它的合适的核酸传递系统包括病毒载体,该病毒载体一般选自腺病毒、腺病毒相关的病毒(AAV)、依赖于辅助病毒的腺病毒、逆转录酶病毒、或日本脂质体(HVJ)联合体

的红血细胞凝集病毒。优选地,所述病毒载体包括能够与多核苷酸可操作地连接的强效真核启动子,例如细胞巨化病毒(CMV)启动子。

[0252] 其它优选的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学共轭物。逆转录酶病毒载体包括单独的鼠科白血病毒和 HIV 基病毒。一种优选的 HIV 基病毒载体包括至少两种载体,其中 gag 和 pol 基因来自 HIV 基因组,env 基因来自另外的病毒。优选 DNA 病毒载体。这些载体包括:梅毒载体,如正痘病毒(orthopox)或鸟痘病毒(avipox)载体;疱疹病毒载体,如单纯 I 型疱疹病毒(HSV)载体[Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64: 487(1995); Lim, F., et al., in DNACloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.: 907603(1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA: 87: 1149(1990)]; 腺病毒载体[LeGal LaSalle et al., Science, 259: 988(1993); Davidson, et al., Nat. Genet. 3: 219(1993); Yang, et al., J. Virol. 69: 2004(1995)]; 以及,腺病毒相关的病毒载体[Kaplitt, M. G., et al., Nat. Genet. 8: 148(1994)]。

[0253] 梅毒病毒载体将基因导入到细胞质中。Avipox 病毒载体仅引起核酸的短期表达。腺病毒载体、腺病毒相关的病毒载体以及单纯疱疹病毒(HSV)载体可以为本发明的一些实施方式的指示。与腺病毒相关的病毒相比,腺病毒载体引起的表达时期较短(例如,少于约 1 个月),在一些实施方式中可以更长期地表达。所选择的特定载体将取决于靶细胞和处理的条件。可以容易地选择合适的启动子。优选地,可以使用高效表达的启动子。合适的启动子的例子为 763-碱基对细胞巨化病毒(CMV)启动子。还可以使用鲁斯氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)(Davis, et al., Hm Gene Ther 4: 151(1993))和 MMT 启动子。可以使用特定蛋白的天然启动子来表达所述特定蛋白。还可以包括其它能够增强表达的因素,例如能够得到高水平表达的增强子或系统如 tat(反式激活因子)基因和 tar(反式激活应答)元件。然后将该盒插入到载体中,例如质粒载体如 pUC19、pUC18、pBR322、或者其它公知的质粒载体,例如包括复制的大肠杆菌(E. coli)源。请见 Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory press, (1989)。质粒载体还可以包括可选择的标记如氨苄青霉素耐性的 β -内酰胺酶基因,前提条件是标记多肽不会对正在处理的生物体的代谢造成不利影响。在综合传递系统中(如 W095/22618 中公开的系统),所述盒还可以与核酸的结合部分相结合。

[0254] 如果需要,本发明的多核苷酸还可以与微传递载体如脂质体和腺病毒载体一起使用。为了回顾脂质体制备、内容物的靶向和传递的程序,请见 Mannino and Gould-Fogerite, BioTechniques, 6: 682(1988)。还请见 Feigner and Holm, Bethesda Res. Lab. Focus, 11(2): 21(1989) and Maurer, R. A., Bethesda Res. Lab. Focus, 11(2): 25(1989)。

[0255] 复制缺陷的重组腺病毒载体可以根据公知的技术制备。请见 Quantin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2581-2584(1992); Stratford-Perricadet, et al., J. Clin. Invest., 90: 626-630(1992); 以及 Rosenfeld, et al., Cell, 68: 143-155(1992)。

[0256] 另一种优选的 siRNA 传递方法是使用产生载体的单链 DNA,所述载体在细胞内产生 siRNA。请见 Chen et al, BioTechniques, 34: 167-171(2003),该文献在此以其全文并入作为参考。

[0257] 核酸的有效剂量将是特定表达的蛋白,待靶向的特定心律失常,患者及其临床症

状、体重、年龄、性别等的函数。

[0258] 一种优选的传递系统是其中并入有一种或多种多核苷酸（优选约一种多核苷酸）的重组病毒载体。优选地，用于本发明的方法的病毒载体的菌落形成单位 (plaque forming units, pfu) 为约 10^8 pfu 至约 5×10^{10} pfu。在其中将使用非病毒载体给予多核苷酸的实施方式中，约 0.1 纳克至 4000 微克通常是有效的，例如 1 纳克至 100 微克。

[0259] 基因表达的上调或抑制的评价

[0260] 通过直接检测核酸在细胞或生物体中的存在来评价载体将外源核酸转移到宿主细胞或生物体中。这样的检测可以通过本领域公知的几种方法来实现。例如，可以使用 DNA 印记或聚合酶链式反应 (PCR) 技术来检测外源核酸的存在，所述 PCR 技术使用能够特别地扩增与核酸相关的核苷酸序列的引物。还可以使用常规方法来测定外源核酸的表达。例如，可以利用 RNA 印记和逆转录 PCR (RT-PCR) 来检测并定量测定由外源核酸产生的 mRNA。

[0261] 还可以通过测定酶活性或报告蛋白活性来检测外源核酸的 RNA 表达。例如，由于靶核酸表达降低或升高作为外源核酸生成效应物 RNA 的指示，因此可以间接地测定 siRNA 活性。基于序列保守性，可以设计引物并将其用于扩增靶基因的编码区域。最初，尽管可以使用任何编码区域或非编码区域，但是可以使用各基因的高效表达的编码区域，以建立模型对照基因。各对照基因是通过将各编码区域插入到报告编码区域与其聚 (A) 信号之间而组装的。这些质粒将在基因的上游区域生成具有报告基因的 mRNA 并在 3' 非编码区域生成潜在的 RNAi 靶。单个的 RNAi 的效力将通过报告基因的调制进行分析。可用于本发明的方法的报告基因包括：乙酰羟氨酸合酶 (AHAS)、碱性磷酸酯酶 (AP)、 β 半乳糖苷酶 (LacZ)、 β 透明质酸酶 (GUS)、氯霉素乙酰基转移酶 (CAT)、绿色荧光蛋白 (GFP)、红色荧光蛋白 (RFP)、黄色荧光蛋白 (YFP)、青色荧光蛋白 (CFP)、辣根过氧化物酶 (HRP)、荧光素酶 (Luc)、胭脂碱合酶 (NOS)、真蛭碱合酶 (OCS)、以及它们的衍生物。多种可选择的标记可以赋予对氨基青霉素、博来霉素、氯霉素、庆大霉素、潮霉素、卡那霉素、洁霉素、甲氨蝶呤、草胺膦 (phosphinothricin)、嘌呤霉素和四环素的耐受性。报告基因的调制的测定方法是本领域公知的，包括但不限于荧光测定方法（例如荧光光谱法、荧光活化的细胞分类 (FACS)、荧光显微法）、抗生素耐受性测定。

[0262] 尽管对于潜在的 RNAi 的高通量筛选来说，生物基因组信息和模型基因是没有价值的，但是最终必须在表达靶核酸的细胞中实验性地形成抗靶核酸的干扰活性。为了测定 RNAi 序列的干扰活性，将含有 RNAi 的载体转染到表达靶核酸的合适的细胞系中。测定所选的各 RNAi 构建体对靶核酸的稳态 mRNA 的调制能力。此外，在第一轮测试中“幸存”的任何靶 mRNA 通过逆转录酶-PCR 进行扩增并测序（请见，例如 Sambrook, J. et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd addition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y. (1989)）。对这些序列进行分析，以确定使 mRNA 避开现有的 RNAi 库的个体多态性。该信息用于进一步修饰 RNAi 构建体，以同样靶向更稀少的多态性。

[0263] 用 RNAi 转染细胞的方法是本领域公知的，包括但不限于电穿孔、粒子轰击、微量注射、用病毒载体进行转染、用逆转录酶病毒基载体进行转染、以及脂质体介导的转染。介导 RNA 干扰的任何类型的核酸可以使用本领域公知的多种方法进行体外合成并直接插入到细胞中。此外，介导 RNA 干扰的 dsRNA 和其它分子可以从商家获得，例如 Ribopharma AG (Kulmach, Germany)、Eurogentec (Seraing, Belgium)、Sequitur (Natick, Mass.) 和

Invitrogen(Carlsbad, Calif.)。Eurogentec 提供也可以用于本发明的标记有荧光团的 dsRNA(例如, HEX/TET ;5' - 荧光素,6-FAM ;3' - 荧光素,6-FAM ;荧光素 dT 内部 ;5' TAMRA,若丹明 ;3' TAMRA,若丹明)。RNAi 分子可以通过固相合成的公知技术而制成。用于该合成的设备由几个商家出售,例如 AppliedBiosystems(Foster City, Calif.)。本领域已知的用于该合成的其它方法可以另外地或替代性地使用。公知的是使用制备寡核苷酸的相似技术,如磷硫酰(phosphorothioate)和烷基化的衍生物。

[0264] 直接插入到细胞中的 RNA 可以包括对磷酸酯-糖主链或核苷的修饰。例如,天然 RNA 的磷酸二酯键可以被修饰为包括氮或硫杂原子中的至少一种。干扰 RNA 可以通过酶法制得或者通过部分/全部有机合成方法制得。构建体可以通过细胞 RNA 聚合酶或噬菌体 RNA 聚合酶(例如, T3, 17, SP6)合成。如果通过化学合成或体外酶法合成,则可以在引入到细胞或动物之前对 RNA 进行纯化。例如,可以通过如本领域已知的用溶剂或树脂进行提取、沉淀、电泳、色谱或者它们的组合,从混合物中提纯出 RNA。替代性地,可以在不提纯或最小程度的提纯的条件下使用干扰 RNA 构建体,以避免由于样品加工而引起的损失。RNAi 构建体可以被干燥储存或溶解到水溶液中。所述溶液可以含有缓冲剂或盐,以促进双链的退火和/或稳定。可以用于本发明的缓冲剂或盐的例子包括但不限于:生理盐水、PBS、N-(2-羟乙基)哌嗪-e-N'-(2-乙烷磺酸)(HEPESTM)、3-(N-吗啉基)丙烷磺酸(MOPS)、2-二(2-羟乙基)氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇(bis-TRISTM)、磷酸钾(KP),磷酸钠(NaP)、磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)、磷酸二氢钠(NaH₂PO₄)、磷酸氢钠钾(NaK₂HPO₄)、磷酸镁(Mg₃(PO₄)₂-4H₂O)、醋酸钾(CH₃COOH)、D(+)-α-甘油磷酸钠(HOCH₂CH(OH)CH₂OPO₃Na₂)、以及本领域技术人员公知的其它生理缓冲剂。用于本发明的其它缓冲剂包括溶于水溶液中的盐M-X、其结合或离解产物,其中,M为碱金属(例如Li⁺、Na⁺、K⁺、Rb⁺),优选为钠或钾;X为选自自由磷酸盐、醋酸盐、碳酸氢盐、硫酸盐、丙酮酸盐、以及有机一磷酸盐酯、葡萄糖6-磷酸盐或DL-α-甘油磷酸盐所组成的组中的阴离子。

[0265] 由 RNAi 分子调节/靶向的基因

[0266] 在本发明的另一方面,提供了调节特定基因或基因家族的表达的 RNAi 分子,由此可以功能性地消除或上调基因的表达。在一种实施方式中,提供了靶向基因的相同区域的至少两种 RNAi 分子。在另一种实施方式中,提供了靶向相同基因的至少两个不同区域的至少两种 RNAi 分子。本发明的其它实施方式提供了上述基因靶向策略的组合。

[0267] 在一种实施方式中, RNAi 分子可以为相同的序列。在替代性的实施方式中, RNAi 分子可以为不同的序列。在其它实施方式中,提供了至少两种 RNAi 分子,其中一种或多种基因的家族可以被 RNAi 分子的表达所调节。在其它实施方式中,提供了至少三种、四种或五种 RNAi 分子,其中一种或多种基因的家族可以被 RNAi 分子的表达所调节。RNAi 分子可以与一种或多种基因中的保守序列具有同源性。使用本发明的方法调节的基因家族可以与细胞、相关的病毒基因的家族、在病毒属内保守的基因的家族、相关的真核寄生虫基因的家族、或者更特别的来自猪内源性逆转录酶病毒的基因的家族具有内源性。在一种特别的实施方式中,至少两种 RNAi 可以靶向至少两种不同的基因,所述两种不同的基因为相同基因家族的成员。RNAi 分子可以靶向基因家族内的同源区域,因此一种 RNAi 分子可以靶向多种基因的不同区域。

[0268] RNAi 分子可以选自但不限于以下类型的 RNAi :反义寡核苷酸核酶,小分子干扰

RNA (sRNAis), 双链 RNA (dsRNAs), 反向的复制, 短的发夹 RNA (shRNAs), 小的临时调节的 RNA, 以及聚簇的抑制 RNAs (cRNAis)。

[0269] 在另一实施方式中, 提供了在哺乳动物细胞系或转基因动物中调节靶基因的 RNAi 分子的表达, 由此靶基因的表达被功能性地消除或低于可检测的水平或上调, 即靶基因的表达降低或升高了至少约 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 或 99%。

[0270] 在本发明的这一方面的另一实施方式中, 提供了方法来生产其中干扰 RNA 分子得到表达以调节靶基因表达的细胞和动物。例如, 本发明的这一方面的方法可以包括: 鉴定细胞中的一种或多种靶核酸序列; 获得能够与所述靶核酸序列结合的至少一种 RNAi 分子; 将该 RNAi 分子 (选择性地装载在表达载体) 导入到细胞中; 在一定条件下, 在细胞中表达 RNAi, 由此 RNAi 与靶核酸序列相结合, 从而调节一种或多种靶基因的表达。

[0271] 在本发明的一种实施方式中, 能够被至少一种 RNAi 分子的表达所调节的内源基因包括但不限于: 细胞存活或细胞复制所需的基因; 病毒复制所需的基因; 编码免疫球蛋白基因座 (例如, K 轻链) 的基因; 编码细胞表面蛋白 (如血管细胞粘附分子 (VCAM)) 的基因; 以及, 对细胞、组织、器官和动物的结构和 / 或功能很重要的其它基因。本发明的方法还可以用于调节一种或多种非编码的 RNA 序列的表达。这些非编码的 RNA 序列可以为 RNA 病毒基因组、内源基因、真核寄生虫基因、或本领域已知的并且本领域技术人员熟悉的其它非编码的 RNA 序列的序列。根据本发明的一个方面, 在分子或动物中表达的 RNAi 分子可以降低、提高或维持一种或几种靶基因的表达。为了鉴定其中一种或多种基因、基因家族、所需的基因子集或基因的等位基因待调节的特定靶核酸区域, 可以得到各靶基因的序列的代表性样品。可以制备序列, 以发现相似的和不同的区域。该分析可以确定所有家族成员之间以及家族成员的子集内 (基因家族的组) 的具有同一性的区域。此外, 该分析可以确定各家族成员的等位基因之间的具有同一性的区域。通过考虑家族成员之间的、家族成员的子集之间的、以及整个家族中的具有同一性的区域, 可以鉴定出对整个家族、家族成员的子集、家族成员个体、家族成员个体的等位基因子集、或家族成员的等位基因个体具有特异性的靶区域。

[0272] 表达的调节可以降低一种或多种靶基因的表达。表达降低使得靶基因以及靶基因的最终产物蛋白转录后下调。由于下调, 鉴定出靶核酸序列, 由此 RNAi 与序列的结合将降低靶基因的表达。表达降低是指, 与没有引入 RNAi 相比, 不存在靶基因的蛋白和 / 或 mRNA 产物, 或者靶基因的蛋白和 / 或 mRNA 产物的水平出现明显的或可检测到的降低。利用本发明的方法, 可以完全压制 / 抑制靶基因或者使靶基因的表达受到部分抑制。“表达受到部分抑制”的意思是指靶基因受到约 10-99% 的抑制 (即, 靶基因的表达降低), 其中 100% 是指靶基因完全被压制 / 抑制。例如, 可以抑制一种或多种基因的约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 的基因表达。替代性地, 将表达压制或抑制到可检测的阈值以下。

[0273] 在本发明的另一实施方式中, 表达的调节可以提高一种或多种靶基因的表达。在下面的实例中将详细描述提高的表达。在本发明的该实施方式中, 靶核酸和感兴趣的基因可以为单独的序列。基因表达提高是指, 与没有引入 RNAi 相比, 存在靶基因的蛋白和 / 或 mRNA 产物, 或者靶基因的蛋白和 / 或 mRNA 产物的水平出现明显的或可检测到的提高。基因表达提高是指, 与没有引入 RNAi 相比, 表达的靶基因的可测定的量提高。例如, 与不存在

干扰 RNA 相比,基因的表达水平可以提高约 2 倍、5 倍、10 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍或 2000 倍。

[0274] 在本发明的另外其他方面,当一种或多种基因所处的环境条件一般使所述一种或多种基因的表达提高或降低时,表达的调节可以维持一种或几种基因的表达。在一般使一种或多种基因的表达提高或降低的环境条件下,可以维持一种或几种基因的表达,从而相对于使表达提高或降低的环境条件出现之前,基因表达处于稳态水平(即,表达没有随时间提高或降低)。可以使基因表达提高的环境条件的例子包括但不限于:存在生长因子,葡萄糖产量提高,高热和细胞周期变化。可以使基因表达降低的环境条件的例子包括但不限于:缺氧、低温、缺乏生长因子和葡萄糖损耗。

[0275] 通过对基因表达进行定量分析,可以确定含有一种或多种 RNAi 分子的细胞或动物中的基因表达的抑制(或增强)程度。材料的注射剂量较低或者 RNAi 给予或整合后的时间较长可以在较少部分的细胞或动物中形成抑制或增强(例如,至少 10%、20%、50%、75%、90%或 95%的靶向细胞或动物)。在靶 mRNA 积聚或靶蛋白的翻译的水平上,细胞或动物中的基因表达的定量分析可以表现相似量的抑制或增强。可以通过使用本领域已知的任何方法分析细胞或动物中的基因产物的量,从而确定抑制或增强的效率。例如,可以用具有用于干扰 RNA 以外的区域的核苷酸序列的杂交探针来检测 mRNA,或者,可以用抗所述区域的多肽序列的抗体来检测翻译的多肽。mRNA 和多肽的定量分析方法是本领域公知的,例如请见 Sambrook, J. et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd addition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y. (1989)。

[0276] 本发明还涉及对基因家族的表达的调节。术语“基因家族”是指具有相似的功能、序列或表现型的一种或多种基因。基因家族可以含有保守序列,即该基因家族的所有成员之间的相同的或高度同源的核苷酸序列。在特定的实施方式中, RNAi 可以与基因家族的该保守区域杂交,因此,一种 RNAi 序列可以靶向基因家族的一种以上的成员。

[0277] 本发明的方法还可以用于调节进化相关的基因家族内的基因表达。进化相关的基因是由共同的起源基因序列分出的基因,所述起源基因序列自身可以具有或没有编码一种或多种 mRNA 的序列。在该进化相关的家族中可以存在基因的子集,并且在该子集中可以存在保守的核苷酸序列。本发明还提供了一种通过将 RNAi 靶向到该保守的核苷酸序列而调节该基因子集的表达的方法。能够被本发明的方法调节的进化相关的基因可以为细胞或动物的内源的或外源的基因,并且可以为病毒基因家族的成员。此外,能够被本发明的方法调节的进病毒基因家族可以为细胞或动物的内源的家族成员。

[0278] 在其它实施方式中,本发明的方法可以用于调节细胞或动物的内源的基因或基因家族的表达。内源基因是与动物物种的基因组的组成元素一样可遗传的任何基因。用本发明的方法调节内源基因可以提供一种抑制或增强细胞或动物的表现型或生物状态的方法。能够被本发明的方法调节的内源基因包括但不限于:细胞存活或细胞复制所需的基因;病毒复制所需的基因;编码免疫球蛋白基因座的基因;以及,编码细胞表面蛋白的基因。内源基因的其他例子包括:进化基因,例如粘连分子、细胞周期蛋白激酶抑制剂、韦里特(Writ)家族成员、帕克斯(Pax)家族成员、有翼的(Winged)螺旋家族成员、Hox 家族成员、细胞因子/淋巴因子以及它们的受体、生长/分化因子以及它们的受体、神经传送体以及它们的受体;肿瘤抑制基因,例如 APC、BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NF1、NF2、RB1、TP53 和 WTI;以及,

酶,例如 ACC 合酶和氧化酶、ACP 去饱和酶和羟化酶、ADP-葡萄糖焦磷酸酶、腺苷三磷酸酶、醇脱氢酶、淀粉酶、戊基葡萄糖苷酶、过氧化氢酶、纤维素酶、查耳酮激酶、几丁质酶、环氧酶、脱羧基酶、糊精酶、DNA 和 RNA 聚合酶、半乳糖苷酶、葡聚糖酶、葡萄糖氧化酶、颗粒结合的淀粉合酶、GTP 酶、解螺旋酶 (helicases)、半纤维素酶、整合酶、菊糖酶 (inulinases)、转化酶、异构酶、激酶、乳糖酶、脂肪酶、脂肪氧合酶、溶菌酶、胭脂碱 (nopaline) 合酶、肉碱合酶、果胶酯酶、过氧化物酶、磷酸酯酶、磷脂酶、磷酸化酶、植酸酶、植物生长调节剂合酶、多聚半乳糖醛酸酶、蛋白酶和肽酶、淀粉酶 (pullanases)、重组酶、逆转录酶、核酮糖 -1,5-二磷酸羧化酶 (RUBISCOs)、拓扑异构酶和木聚糖酶。

[0279] 在其它实施方式中,可以优选调节(调控)细胞中的肿瘤抗原,因此,例如这些肿瘤细胞可以被宿主免疫系统所检测。许多肿瘤抗原是本领域公知的。例如,请见 Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. *Curr Opin Immunol*1997 ;9 :684-93 ;Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. *Curr Opin Immunol*2001 ;13 :134-140 ;van der BruggenP, ZhangY. ChauxP, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T. *Immunol Rev*2002 ;188 :51-64, 这些文献在此并入作为参考。替代性地,指向肿瘤抗原的许多抗体可以商购得到。

[0280] 肿瘤抗原的非限定性的例子包括突变形成的肿瘤抗原,例如: α -辅肌动蛋白 -4(肺癌); BCR-ABL 融合蛋白 (b3a2)(慢性骨髓白血病); CASP-8(头颈鳞状细胞癌); β -连环蛋白(黑素瘤); Cdc27(黑素瘤); CDK4(黑素瘤); dek-can 融合蛋白(骨髓白血病); 延长因子 2(肺鳞状瘤); ETV6-AML1 融合蛋白(急性淋巴细胞白血病); 低密度脂蛋白受体-墨角藻糖基转移 AS 融合蛋白(黑素瘤); HLA-A2^d 的过度表达(肾细胞癌); hsp70-2(肾细胞癌); KIAA0205(膀胱癌); MART2(黑素瘤); MUM-1f(黑素瘤); MUM-2(黑素瘤); MUM-3(黑素瘤); 新-PAP(黑素瘤); I 类肌动蛋白(黑素瘤); OS-9g(黑素瘤); pml-RAR α 融合蛋白(前髓细胞白血病); PTPRK(黑素瘤); K-ras(胰腺癌); N-ras(黑素瘤)。分化肿瘤抗原的例子包括但不限于: CEA(内脏癌); gp100/Pmel17(黑素瘤); 激肽释放酶 4(前列腺); 乳球蛋白 -A(乳房癌); 草木犀浆 -A/MART-I(黑素瘤); PSA(前列腺癌); TRP-1/gp75(黑素瘤); TRP-2(黑素瘤); 酪氨酸酶(黑素瘤)。过度表达的或过低表达的肿瘤抗原包括但不限于: CPSF(普遍存在的); EphA3 ; G250/MN/CAIX(胃、肝、胰腺.); HER-2/神经鞘; 肠内羧基酯酶(肝、肠、肾); α -胎蛋白(肝); M-CSF(肝、肾); MUC1(腺状上皮细胞); p53(普遍存在的); PRAME(睾丸、卵巢、子宫内膜、肾上腺); PSMA(前列腺、CNS、肝); RAGE-I(视网膜); RU2AS(睾丸、肾、膀胱); 存活素(普遍存在的); 调聚物酶(睾丸、胸腺、骨髓、淋巴结); WT1(睾丸、卵巢、骨髓、脾); CA125(卵巢)。

[0281] 本发明的方法还可以用于调节特定等位基因的表达。等位基因因为占据相同染色体基因座的基因的多态性变体。本发明的方法可以调节基因或基因家族的一种或多种特定等位基因的表达。在该实施方式中,可以制备 RNAi 的序列,由此调节基因或基因家族的一种或多种特定等位基因,而相同的基因或基因家族的其它等位基因没有被调节。

[0282] 通过描述的方式而不是限制的方式给出了以下的实施例。虽然提供了特定的实施例,但是以上的描述是示例性的而不是限定性的。如上描述的任意一种或多种特征可以与本发明的其它任意实施方式的一种或多种特征以任何方式进行组合。此外,对本领域技术人员而言,在阅读本发明的说明书的基础上,本发明的许多变化将变得明显。

[0283] 本申请中引用的所有公开文献和专利文献的相关部分都并入作为参考,如同各个公开文献或专利文献一个一个地描述了一样。通过在该文件中引用许多文献,本发明的申请人不承认任何特定的文献为它们的发明的“现有技术”。

[0284] 实施例

[0285] 材料和方法

[0286] 原位杂交

[0287] HeLa 细胞在涂覆有硅烷的载波片上生长过夜,并用 4% 仲甲醛 (pH7.4) 固定 4 分钟。将载波片气干之后,用脱氧核糖核酸酶将粘附的细胞在恒温箱中 37°C 下简单处理 16 小时。DNase Master Mix 含有 10xTurboDNase Buffer (Ambion)、100 单位 DNase I、100 单位 TurboDNase 和 100 单位 Suprasin,最终体积为 200 μ l。然后用 1X PBS 洗涤细胞并随后在 95°C 下孵育 5 分钟。利用最终体积为 200 μ l 的含有 10xRT Buffer (Applied Biosystems)、2.5mM MgCl₂、10mM dNTP 混合物、10pM 无规六聚物酶、100 单位 RNase 抑制剂和 500 单位逆转录酶的 RT-Master Mix,合成出 cDNA 的第一链。利用以下条件完成 RT 反应:室温下 30 分钟,42°C 下 3 小时,95°C 下 5 分钟。为了原位杂交,将细胞在封闭缓冲液中 65°C 下孵育 1 小时 (10mM Tris-HCl,50mM KCl,1.5mM MgCl₂,1% Triton-X,20 μ M Random DNA,最终体积为 200 μ l)。封闭之后,将细胞在 70°C 下与 10 μ M 特异性的内含子跨越探针 (序列如表 1 和 3 中所示) 杂交 1 小时。然后,用预先加温的 PBS 将载波片洗涤两次。

[0288] 稀释的单细胞 RT-PCR

[0289] 将 HeLa 培养物稀释至每个亮视野中有一些细胞。从在共焦显微镜的指引下挑取的 15 个细胞个体中提取 RNA。使用购自 Clontech 的 SMART 和 CDS III3 寡核苷酸以及 Powerscript 逆转录酶,根据厂家说明书由 RNA 完成 cDNA 的第一链的合成。然后将该 cDNA 的第一链用于 PCR 扩增,该 PCR 扩增使用购自 Clontech cDNA library kit 的 LD 引物、DSIII PCR 引物和 Advantage2 聚合酶混合物。

[0290] 细胞提取物的制备和分馏

[0291] 由转染有不同载体的 HeLa 细胞制备细胞质提取物。24 小时转染后收获细胞,在 4°C 下以 1000g 离心 5 分钟。将细胞球用冰冷的 PBS (pH7.2) 洗涤三次,然后在冰上用三倍细胞体积的溶解缓冲液 (20mM Tris-HCl,pH7.4;200mM NaCl;14mM MgCl₂,20 单位的氯吡胺 (suprasin);100 单位蛋白酶抑制剂;100 μ g/ml 环己酰胺;0.1% (v/v) Triton X-100) 溶解 10 分钟。通过在 4°C 下以 5000g 离心 10 分钟而分离细胞核。上清含有细胞质提取物,利用 Trizol (Invitrogen),将上清立即用于提取 RNA。通过将珠在溶解缓冲液中洗涤一次、在 1X PBS (pH7.2) 中洗涤两次,制得细胞核提取物。然后用 Trizol 试剂收集细胞核 RNA。用显微镜确定细胞核的纯度 (>98%) 和完整性。

[0292] 核糖核酸酶保护分析 (RPA)

[0293] 利用购自 Ambion 的 Direct Protect Lysate RPA 试剂盒,用核糖核酸酶 (RNase) 混合物 (cocktail) 缓冲液对细胞质溶解产物进行处理,并用 RNase A 和 T 混合物在 37°C 下孵育 30 分钟。通过用十二烷基肌氨酸钠 (sodium sacrosyl) 和蛋白酶在 37°C 下孵育 30 分钟,将核酸酶去除掉。在 10% 变性 PAGE/8M 脲上分离之前,利用 99% 乙醇和肝糖蓝以及接下来的由 TurboDNase (Ambion) 处理的 DNase,对 RNA 进行沉淀处理。

[0294] 用于切割产物 (Dicer product) 的 RNA 印迹

[0295] 使用 Trizol (Invitrogen) 收集总 RNA,并用 99%乙醇进行沉淀。每道上装填 30 μ g 总 RNA,并在 10% PAGE/ 脲凝胶上分离开。然后将 RNA 转移到尼龙膜上 (Amersham) 并用鲑鱼 (Salmon) 精液 DNA 封闭 6 小时。封闭的膜与放射性同位素标记的 S-AS 探针杂交过夜,所述探针跨越 TS 和 rTS α 基因的重叠区域。所述探针是通过用 32 P- 标记的核苷酸和 Amersham 随机引发试剂盒对重叠的 DNA 进行随机引发而制得的。所有的膜用低严格性的缓冲液洗涤一次,用高严格性的缓冲液洗涤两次,每次 1 小时,用台风 (Typhoon) 磷成像设备检测信号。

[0296] 细胞培养和转染

[0297] HeLa 细胞培养在补充有 10% FBS 的 D-MEM 中。用含有具有正义和 / 或反义重叠区域的荧光素酶基因的质粒转染对数生长的细胞。转染后的第 24 小时,将细胞用于进一步的应用。使用 pGL3 对照载体 (Promega) 来制备所有的 S-AS 构建体。我们设计了用于克隆的萤火虫荧光素酶的下游的 PstI 和 EcoRI 限制位点。使用 BamHI 序列来在重叠区域之间形成发夹并构建具有连续的 S-AS 序列的载体 (引物和探针序列列于表 3 中)。利用 MEGAscript 转录试剂盒 (Ambion),将相同的载体用作 S-AS 重叠 mRNA 的 IVT 的模板。

[0298] 实时 PCR

[0299] 利用 GeneAmp7000 设备 (Applied Biosystems),进行实时 PCR (RT-PCR)。PCR 反应包括 20ng cDNA、Sybrgreen 或 Universal Mastermix (Applied Biosystems)、300nM 正向和反向引物、以及 200nM 探针,最终的反应体积为 50 μ l (引物和探针序列列于表 1 和 3 中)。使用引物表达软件 (PrimerExpress software) (Applied Biosystem) 来设计所述引物和探针。它们是对各个 S-AS 对特异的链,所述探针覆盖了外显子的边界,以消除基因组 DNA 扩增的可能性。所有基因的 PCR 条件如下:50 $^{\circ}$ C 下 2 分钟;95 $^{\circ}$ C 下 10 分钟,95 $^{\circ}$ C 下 15 秒钟,40 个循环;60 $^{\circ}$ C 下 1 分钟。结果基于循环极限 (Ct) 值。实验基因的 Ct 值与参照基因 (β 2M 或 GAPDH) 的 Ct 值之间的差值计算为 $\Delta\Delta$ Ct。

[0300] 实施例 1:反义转录物的敲低

[0301] 在本发明的说明书中,影响反义转录物水平的唯一方法是使用旨在有效地敲低转录物的 siRNA。稍后的术语 - 敲低 - 是我们在二十世纪 90 年代早期研究反义寡核苷酸时引入的 (Wahlestedt, C. (1994) Antisense oligonucleotide strategies in neuropharmacology. Trends Pharmacol Sci 15(2):42-46),但是也同样适用于 siRNA。

[0302] 表达分布图显示了正义 / 反义对的频繁的一致的调节。利用 siRNA,我们提供了实验证据证明 siRNA 对反义 RNA 的扰乱可以改变相应的正义信使 RNA 的表达。然而,这种调节可以是不一致的 (反义敲低引起正义转录物升高) 或一致的 (反义敲低引起相伴的正义转录物降低)。表 2 中示出了已经被 siRNA 靶向的一些人和鼠反义转录物。在各种情况下,两种或两种以上 siRNA 被靶向至反义链的非重叠部分,并且通过使用 RT-PPCR 证实了敲低。表 2 描述了观察到编码的反义和非编码的反义可以以相同的方式进行靶向,并且不管是以一致的方式还是不一致的方式,两种都能够调节相应的正义转录物。基于 siRNA 对反义 RNA 转录物的敲低 (或者另外的 RNA 靶向原则),我们在此推荐两种新的有潜力的药理学策略:

[0303] 策略 1:在不一致调节的情况下,可以通过仅敲低反义转录物来提高常规 (正义) 基因的表达。如果后面的基因编码已知的或公认的药物靶,则其反义副本的敲低可以令人信服地模拟受体拮抗剂或酶刺激剂的作用。表 2 给出了其中反义 (编码和非编码) 转

录物的敲低被证实不一致地调节正义表达的例子。例如,在帕金森病中,线粒体局部性激酶 (PINK1) 的活性需要提高是有争议的,其非编码的反义拍档的敲低可能是实现该目的的一种方式。此外,在某些情况下,为了刺激血管形成,可以通过靶向其(编码)反义拍档 Ddx-339 而增强穿过 G- 蛋白偶联受体 (GPCR) CD97 的信号发送。

[0304] 策略 1 的例子 (PINK1 的提高,例如帕金森病):

[0305] PINK-AS siRNA-a :GGAAGCTGTAGCTAGAACATCTGTT (SEQ ID NO :1)

[0306] PINK-AS siRNA-b :CAGGTAAGT AGTCTCCTCTATCATT (SEQ ID NO :2)

[0307] PINK-AS siRNA-c :TCTCAACCCAAAGCCTGCTTTGTTA (SEQ ID NO :3)

[0308] 策略 2 :在一致调节的情况下,可以相伴地敲低反义转录物和正义转录物,从而实现常规(正义)基因表达的协同降低。这些理念如图 2A 和 2B 所示。如果使用 siRNA 来实现敲低,则还可以通过将靶向于正义转录物和另外的 siRNA 的一种 siRNA 施用于相应的反义转录物来对该策略进行检验,或者通过同时靶向重叠的正义和反义转录物的单独的高能对称 siRNA 来对该策略进行检验。从表 2 可以看出,例如,在可诱导缺氧的因子 1 α 的情况下,这样的双重相伴的靶向与追赶者有关,所述因子 1 α 为一种在各种病症中可能需要受到抑制的靶。表 2 为 Adrenomedulin AM1 受体,该 AM1 受体是一种已经被证实其信号发送降低有益于治疗的 GPCR。

[0309] 随着新兴的功能 RNA 世界,有新的潜在的药物靶将会被考虑。在这些药物靶中,有大量天然存在的能够调节正义转录物的表达的反义转录物,所述正义转录物包括编码常规药物靶的正义转录物。由于这些反义转录物中的许多都表示非编码的 RNA,因此不能对它们进行蛋白水平上的调控。通过使用 siRNA,我们已经发现反义转录物敲低能够使正义转录物表达升高(不一致的调节)或降低(一致的调节)。这些发现和理念可以形成新的药理学策略的基础。

[0310] 表 2 :siRNA 诱导的反义转录物敲低对正义转录物表达的作用

[0311]

正义	反义 (编码)	反义 (非编码)	不一致 调节 (正义增加)	一致调节 (正义减少)	物种 细胞系
CD97	Ddx-39	N/A*	是	否	小鼠; N2A
TS-α	rTS-α	N/A	是	否	人; HeLa
C/EBP δ	I530027A02	N/A	否	是	小鼠; Hepa1-6
CDC23	Klf20a	N/A	否	是	小鼠; Hepa1-6
PINK1	N/A	PINK-AS	是	否	人; SH- SY5Y
HIF1α	N/A	aHIF1α	否	是	人; HeLa
Gnbp3g	N/A	Gnbp3g-AS	否	是	小鼠; N2A
肾上腺髓质素 AM1受体	N/A	AdmR-AS	否	是	小鼠; N2A
6330439J10 (3-氧酸CoA 转移酶)	N/A	A230019L24	否	是	小鼠; N2A
CtpW85 (组织蛋白酶 W)	N/A	CtpW-AS	否	是	小鼠; N2A
BACE1	N/A	BACE1-AS1 BACE1-AS2	否	是	人和小鼠 ; SH- SY5Y, SK-N- MC, N2A

[0312] 策略 2 的例子 (用于阿尔茨海默疾病的反义和正义转录物的一致的敲低):

[0313]

<p>BACE1-AS:</p> <p>siRNA-a:CCCTCTGACACTGTACCATCTCTTT (SEQ ID NO :4)</p> <p>siRNA-b:AGAAGGGTCTAAGTGCAGACATCTG (SEQ ID NO :5)</p> <p>siRNA-c:CCAGAAGAGAAAAGGGCACT (SEQ ID NO :6)</p> <p>BACE1:</p> <p>siRNA-a:GAGCCTTTCTTTGACTCTCTGGTAA (SEQ ID NO :7)</p> <p>siRNA-b:CCACGGAGAAGTCCCTGATGTTT (SEQ ID NO :8)</p>

[0314] 实施例 2:哺乳动物中的基因表达的天然反义介导的调节

[0315] 已经报道了 20% 的人基因组的天然存在的反义转录物 (NAT)。最近的报告表明, 至少 72% 的鼠转录物存在 NAT。大多数的天然反义转录物为顺式编码的反义。顺式 -NAT 的定义是在相同的染色体基因座上具有重叠的转录单元的互补 mRNA。反式 -NAT 由不同的染色体位置转录的互补 mRNA。嵌合转录物为与基因组的一个以上的区域具有同一性的 mRNA, 并且可以为 cDNA 库产物的矫作物。70% 以上的顺式 -NAT 具有 3' 重叠的尾对尾的模式, 而 15% 具有 5' 重叠区域的头对头的模式。剩余的分子具有基因内区或编码序列的重叠。许多 NAT 没有表现出开放阅读框, 并被归类为非编码的 RNA。

[0316] 反义与相应的正义转录物搭档之间的相互作用没有遵从统一的可预测的模式。研究了人基因的两种 NAT 靶向 (即 HIF-1 α 和 TS) 之间的相互作用。HIF (aHIF) 的反义转录物是一种能够改变 HIF 接合以及 HIF 的两种结合形式之间的比例的非编码的 RNA。特别地, 已经假定了反义分子可以破坏 HIFmRNA 的一种接合变体的稳定性, 并使平衡移动有利于其它的变体。通过将腺苷转化为 mRNA 前体中的肌苷核苷酸, 编辑是 NAT 的另一种被提出的功能。TS (rTS α) 的反义序列诱导正义 RNA 分子的编辑, 从而促进 TS mRNA 下调。重要的是, TS 的 NAT 是蛋白编码, 而没有预测的用于 aHIF 的开放阅读框。选择来自 NAT 的编码和非编码的子群的这两种已知的候选物用作研究, 可以通过两种不同的作用模式潜在地调控 mRNA。

[0317] 近年来基因组生物学中的最令人振奋的发现之一是 RNA 干扰 (RNAi) 的发现, RNAi 已经被提议作为一种可能的机制, NAT 可以通过该机制来调节基因表达。RNAi 为在双链 RNA (dsRNA) 进入细胞时被激活的内在细胞过程。RNAi 最初在线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 被发现, 是一种进化保守的转录后的基因沉默机制。dsRNA 被称作切割酶 (Dicer) 的 III 型 RNase 酶加工成大约 21-22 个核苷酸的小的双链 RNA 分子, 称作干扰 RNA 小分子 (siRNA)。siRNA 然后与称作 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 的多蛋白复合体相互作用, 使得活化的 RISC 复合体与同源的 RNA 转录物的序列特异性地缔合。这种相互作用引起了靶转录物的序列特异性切割。已经表明源自内源 S-AS 双螺旋体的 dsRNA 通过作为切割酶的底物可以通过 RNAi 途径起作用, 并随后生成 siRNA。然后 siRNA 将调节 S-AS 转录物中的一种或两种。

[0318] 总之, 人们已经提出用 NAT 调节基因转录、RNA 接合、聚腺苷酸化、编辑、稳定性、运输和翻译。该研究旨在探究 NAT 作用的机制。NAT 的外显子中的共享的互补区域表明形成细胞质双螺旋体的概率, 基因内区的重叠序列表明细胞核 dsRNA 双螺旋体。理论上, 所有提出的调节机制都需要在细胞质或细胞核中形成 RNA 双螺旋体, 因此, 使用 HIF 和 TS 作为模型基因, 用于 RNA 双螺旋体的细胞证据是这项工作的主要焦点。

[0319] 结果: 使用原位杂交方法来分析内源 TS 和 rTS α 的同时存在。HeLa 在载波片的表面生长、固定并用 DNase 进行处理 (请见材料和方法)。合成出 cDNA 的第一链并用链特异性内含子跨越探针进行原位杂交 (用于 TS 正义 - 反义基因和探针的图表如图 3A 所示)。重要的是, 使用内含子跨越探针消除了对污染 DNA 的检测, 探针覆盖了两种转录物的至少一部分重叠区域, 确保了信号来自完全 mRNA。结果表明两种转录物同时共存于单独的细胞中 (图 4)。

[0320] 为了表达 S-AS 对共存于单独的细胞中, 与细胞群体相对地, 设计了一种方法来检测单独的细胞内的 NAT 的共表达。在显微镜引导下提取出 RNA, 以利用 TaqMan 技术通过实时 PCR 定量测定 TS 和 rTS α 转录物 (图 5)。引物为对正义和反义都具有特异性的链。S-AS

表达被规格化至非常丰富的 mRNA β 2- 微球蛋白 (P_2M), 作为内在对照。通过将 TS 和 rTS α 的表达与相对较少的基因 TATA 结合蛋白 (TBP) 进行比较而校准该方法的灵敏度。如图 5 所示, 如表达较低的基因所期待的, TS 和 rTS α 为 β_2M 表达的 7%, TBP 水平为 β_2M 的 5%。因此, 两种 S-AS 转录物在单独的细胞中的存在水平大致相似。

[0321] 接着研究 TS 和 HIF 转录物的细胞位置。从 HeLa 细胞中制得细胞质和细胞核提取物, 并且立即用于 RNA 提取。然后将 RNA 逆转录, 并用于通过实时 PCR 对 S-AS 转录物进行定量测定。重要的是, 两种基因的正义链在细胞质和细胞核中的表达水平相似, 相反地, 细胞核中的反义转录物水平比细胞质中的高 1000 倍。因此, 这些数据表明了 S-AS 对中的空间上的分化变异 (图 6)。

[0322] 接着, 通过核糖核酸酶保护分析 (RPA) 来探测在 HeLa 细胞中形成的 S-AS 双螺旋体。尽管 HeLa 内源性地表达 S-AS mRNA, 但是构建了三种在真核细胞中产生正义、反义或连续的 S-AS 重叠 mRNA 的载体 (图 3B)。对于构建体中的两种, TS 和 rTS α 的 3' 重叠区域位于荧光素酶的下流, 因此可以监控转染效率。将这两种载体共转染到 HeLa 细胞中, 形成具有重叠区域的过度表达的 RNA 的条件。对于第三种构建体, 正义和反义互补区域都设计在相同的载体中, 该载体在 S-AS 重叠部分之间具有较短的发夹结构。根据推测, 来自该载体的 RNA 将自身折叠, 以在细胞中形成 RNA 双螺旋体。对于另外的对照, 进行载体的体外转录 (IVT), 制得人造 RNA 双螺旋体, 然后转染到细胞中。为了研究 RNA 双螺旋体在转染的细胞和未处理的细胞中的存在, 分离出细胞质溶解产物, 接着用 RNase A 和 T 进行处理, 然后在聚丙烯酰胺凝胶上进行分离。利用用于 S-AS 重叠区域的放射性同位素标记的探针, 对存在的 RNA 双螺旋体进行检测。在转染有 IVT dsRNA 的细胞中检测出 S-AS 双螺旋体。在过度表达 S-AS 的细胞或表达内源水平的 NAT 的细胞中未检测出 RNA 双螺旋体 (图 7)。这些数据表明内源 NAT 和合成性过度表达的 S-AS RNA 没有在 HeLa 细胞的细胞质中形成双螺旋体。活体细胞中的假定的 RNA 可能是短暂的、不稳定的, 并且可能很快变成内源 siRNA 或其它中间体产物。为了研究这种可能性, 利用跨越 S-AS mRNA 的重叠区域的放射性同位素标记的探针设计了 Northern Blot 分析。这些随机设计的探针可以潜在性地检测从全长 RNA 至小于 20bp 的切割产物的任意长度的 S-AS 序列, 用于搜索加工的 RNA 的存在。假设如果存在 RNA 双螺旋体, 则它们最终将被切割酶加工成具有 21 个碱基对的寡核苷酸。HeLa 细胞用与前述实验中所用的相同载体进行转染, 所述载体产生正义、反义或 S-AS RNA。将来自 IVT 产生的 S-AS 重叠区域的 RNA 双螺旋体作为阳性对照, 并转染到细胞中。切割酶产物仅存在于由 IVT dsRNA 转染的细胞中或由产生内部发夹 dsRNA 的载体转染的细胞中 (图 8)。在过度表达的细胞中 1100bp 处 (源自载体的全长 RNA) 检测出阳性带, 在 IVT RNA 转染的细胞中 200bp 处检测出阳性带。然而, 在未转染的细胞或过度表达的细胞中缺乏 21bp RNA 分子则表明 S-AS 双螺旋体没有被切割酶加工。

[0323] 干扰素信号发送串联是细胞的抗病毒防御机制的一部分, 可以被 dsRNA 引发。测定过度表达 S-AS 转录物的细胞中的干扰素 - β (IFN- β) 和 2', 5' - 寡腺苷酸合酶 -2 (OAS2) mRNA 的水平 (图 9)。在由体外转录的 dsRNA 转染的细胞中, IFN- β mRNA 水平上调了 10000 倍, 而在过度表达 S-AS 转录物的细胞中没有变化。仅在由 IVT 双螺旋体 RNA 转染的细胞中, OAS2 水平也上调了 600 倍。这些数据表明不可能形成具有 S-AS mRNA 的细胞质 RNA 双螺旋体, 然而干扰素途径可能对细胞内 RNA 双螺旋体没有反应。

[0324] 总结起来,本研究表明 NAT 没有形成激发 RNAi 机制的细胞质 RNA 双螺旋体。反义取向中的重叠转录物具有形成 dsRNA 的潜能,所述重叠转录物为编码或非编码的蛋白,所述 dsRNA 为多种不同的 RNA 修饰途径的底物。用于 dsRNA 的一种明显的途径是用切割酶复合物将其分解为小的 RNA。几种实验方法用于尝试确定 RNA 双螺旋体在细胞质中的存在并检测参与 dsRNA 加工的切割酶产物。使用人工合成的 S-AS 构建体和内源 NAT 得出的结果不能支持存在细胞质 RNA 双螺旋体或 RNAi 机制参与的结论。

[0325] S-AS mRNA 相伴地存在是 NAT 调节的一个必要条件,只根据该标准就可以排除许多电子杂交预测的 NAT 候选物。由于 S-AS 的表达水平可以预测调节的模式,因此它们也是很重要的。我们的实验模式表明,单独细胞中的 S-AS 水平高,则表明没有 RNAi 参与。然而,对该现象的另外的解释是翻译受阻或者其它种类的 RNA 介导的基因表达调节,而没有改变 mRNA 的水平。表达评估和 mRNA 水平评价被推荐为研究其它预测的 S-AS 候选物的第一步。

[0326] 反义转录物水平的改变可以影响正义 mRNA 的水平;但是 S-AS 并不必然是相互的。近来,我们表明反义转录物敲低提高的正义转录物水平,但是没有观察到相反的相互作用。观察到的这种现象表明反义 mRNA 参与正义转录物调节,但是正义 mRNA 似乎没有控制反义表达。如果内源 RNAi 参与哺乳动物 S-AS 现象,则可以预料转录物在敲低实验中表现出相似的表达分布图。

[0327] 总的来说,以上观察结果与以下结论相一致:S-AS 基因调节没有利用 RNAi 机制。实际上,进一步的支持来自其它的两个观察结果:第一,即使对于高水平表达的 S-AS 也没有检测到 RNA 小分子,表明 RNA 处理不依赖于切割酶;第二,干扰素层叠没有被 NAT 激活。事实上,可以预料得到,如果至少 70% 的哺乳动物基因具有 NAT 并且所述机制经由 RNA 双螺旋体形成,则将有累积的干扰素反应。我们的研究显示出显著的 β -干扰素和具有 dsRNA 转染的 OAS2mRNA 感应,表明不存在 NAT 的双螺旋体。

[0328] 至今,在文献中还没有关于源自 NAT 的内源哺乳动物 siRNA 的报道 (Makalowska I, Lin CF, Makalowski W:Overlapping genes in vertebrate genomes. Comput Biol Chem 2005, 29(1):1-12.)。但是,可以将内源 siRNA 编程到 RISC 中,该效果可能是长期的并下调靶 RNA。理论上,500bp dsRNA 将形成 siRNA 库。该 siRNA 集合可以通过分解许多“脱靶的”mRNAs 或者阻滞翻译而在两种水平上削弱蛋白质产量。当考虑到已知许多基因具有反义序列时,该非特异性效果的程度将更强。

[0329] 与本研究的数据相一致的是,尽管已经报道了内源 miRNA 的存在,但是至今还没有描述内源哺乳动物 siRNA。该观察结果还表明在不依赖于切割酶的途径中没有对内源 RNA 双螺旋体进行处理,并且进一步证实了我们的发现。

[0330] 我们的数据表明反义表达与转录物降解途径没有联系。但是,我们的方法没有完全排除在细胞核中形成 RNA 双螺旋体,或者用于基因表达类似的编辑、细胞核保持物接合或运输的任何功能。尽管对于 NAT 已经建议了许多不同的功能和机制,但是至今没有建议用于对机制进行分类和预测的系统方法。我们的研究能够作为对 NAT 研究的功能性方法的开始,所述 NAT 研究能够基于 NAT 的生物信息特征而对它们进行分类。我们的方法学还可以延伸至提供用于基因表达的天然反义介导的调节的系统方法。

[0331] 表 3:用于原位杂交、实时 PCR 和克隆的引物和探针

[0332]

引物名称	序列	基因
具有 5' 德克萨斯红的肌动蛋白探针	GAAGATCAAGATCAITGTCTCCTC (SEQ ID NO :9)	人 β -肌动蛋白
HIF1 α -正义-F	CTGCACAAACTGGTTAGTTCAAATTT (SEQ ID NO :10)	HIF1 α _TaqMan 引物
HIF1 α -正义-R	ACTGCAATGCAATGGTTAAATACC (SEQ ID NO :11)	HIF1 α _Taq Man 引物
HIF1 α -正义-P	TTTTTTAGTATGTTCTTTAATGCTGGATCACAGACAGCTC (SEQ ID NO :12)	HIF1 α _Taq Man 探针
反义 HIF1 α -正义-F	ATACTCTTTCAATGGGATATTAATGGTTGT (SEQ ID NO :13)	aHIF1 α _Taq Man 引物
反义 HIF1 α -正义-R	TGGTACTGGTTATTTCTACATTTATCTTAGTG (SEQ ID NO :14)	aHIF1 α _Taq Man 引物
反义 HIF1 α -正义-F	TAACATGACATTTAGGACTCAACATACATTAAGGTGATG (SEQ ID NO :15)	aHIF1 α _Taq Man 探针
具有 5' 荧光的 TS-正义探针	GCCACTGAAAATTCAGTTCA (SEQ ID NO :16)	胸苷酸合成酶
TS-重叠-F	ATCCGCATCCAACCTATTAATGG (SEQ ID NO :17)	TS-重叠 TaqMan 引物
TS-重叠-R	CCAGCCCAACCCCTAAAGAC (SEQ ID NO :18)	TS-重叠 TaqMan 引物
具有 5 德克萨斯红的 rTS-反义探针	CCTCAGGAATCAGCTAAAGCAA (SEQ ID NO :19)	rTs α
PstTs 反义-F	aaactgeagAACTTTTACCTCGGCATCCA (SEQ ID NO :20)	TS 克隆引物
EcoTs 反义-R	cgggaattcAGCGAGAAGCCAGACCTTTC (SEQ ID NO :21)	TS 克隆引物
EcoTs 正义-F	cgggaattcAACTTTACCTCGGCATCCA (SEQ ID NO :22)	rTs α 克隆
PstTs 正义-R	aaactgeagAGCGAGAAGCCAGACCTTTC (SEQ ID NO :23)	rTs α 克隆
E-Ts 正义-F	cgggaattcAACTTTACCTCGGCATCCA (SEQ ID NO :24)	连续的 TS S-AS 克隆
P-Ts 反义-F	aaactgeagAACTTTACCTCGGCATCCA (SEQ ID NO :25)	连续的 TS S-AS 克隆
BamHI TS 正义-R	cgggatccAGCGAGAAGCCAGACCTTTC (SEQ ID NO :26)	连续的 TS S-AS 克隆
TS-正义-F	AAAACCAACCCCTGACGACAGA (SEQ ID NO :27)	TS Taq Man 引物
TS-正义-R	GCAGGCCATCAGAGAA (SEQ ID NO :28)	TS Taq Man 引物
TS-正义-P	CATCATGTGGCTTGGAAATCCAAGAGA (SEQ ID NO :29)	TS Taq Man 探针
rTS-a) 反义-F	GCATTTCAAGTATCCCGTGATG (SEQ ID NO :30)	TS Taq Man 引物
rTS-a) 反义-R	TGTTAGTAGCCGGGATCCT (SEQ ID NO :31)	rTs α _Taq Man 引物
rTS-a) 反义-P	ACGGGGCTTCCTACATGCCTCCC (SEQ ID NO :32)	rTs α _Taq Man 探针

[0333] 实施例 2:细胞核保持的非编码的 RNA 转录物通过前馈机制而调节 β -分泌物酶的表达

[0334] cDNA 末端的快速扩增 (RACE):使用 RLM-RACE ready cDNA(Ambion, Austin, TX), 将来自人大脑和鼠大脑的 cDNA 用于巢状 (nested)PCR 反应, 该巢状 PCR 反应利用基因特异性的试剂盒引物。将人和鼠的 3' 和 5' PCR 产物从凝胶上切下来, 纯化, 并克隆到 T-Easy 载体中 (Promega)。对来自各系列的 20 个阳性克隆进行测序。

[0335] 实时 PCR:利用 GeneAmp7000 设备 (Applied Biosystems), 进行实时 PCR (RT-PCR)。PCR 反应包括 20-40ng cDNA (Universal Mastermix (Applied Biosystems)), 300nM 正向和反向引物、以及 200nM 探针, 最终的反应体积为 50 μ l (引物和探针序列列于表 1 和 3 中)。使用引物表达软件 (PrimerExpress software) (Applied Biosystem) 来设计所述引物和探针。它们是对各个 S-AS 对特异的链, 所述探针覆盖了外显子的边界, 以消除基因组 DNA 扩增的可能性。所有基因的 PCR 条件如下: 50 $^{\circ}$ C 下 2 分钟; 95 $^{\circ}$ C 下 10 分钟, 95 $^{\circ}$ C 下 15 秒钟, 40 个循环; 60 $^{\circ}$ C 下 1 分钟。结果基于循环极限 (Ct) 值。实验基因的 Ct 值与参照基因 (β 2M 或 GAPDH) 的 Ct 值之间的差值计算为 $\Delta\Delta$ Ct。

[0336] 细胞培养和转染:SH-SY5Y 在添加有 10% FBS (胎牛血清)、1% NEAA、1% L-谷氨酸盐和 1% 碳酸氢钠的 MEM (改进的伊格尔培养基) 和 F12 的混合物 (培养基) 中培养。根据制造商的使用说明 (Invitrogen), 利用 0.2% Lipofectamine2000, 用 20nM siRNA 转染对数生长的细胞。在进一步使用之前, 细胞被孵育 48 小时。为了诱导神经元样分化, 将细胞在 20 μ M 维甲酸 (Sigma) 中暴露 2 周。为了应力诱导, 将细胞在含有 30mM KCl 的培养基中悬浮 5 分钟, 或者在含有 1 μ M β 1-42 肽的培养基中悬浮 5 分钟 (Tocris Co. California, USA), 然后如下所述进行分馏。为了援救实验, 细胞用 PBS 洗涤, 并在 37 $^{\circ}$ C 下在培养基中重悬浮 1 小时。将对照样品进行相似处理, 用于平行细胞分馏和 RNA 提取。亲代 CHO 细胞和 CHO-7PA2 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 中生长。为了调节, CHO-7PA2 细胞保持在没有血清的培养基中, 并在 24 小时后收集上清。在分馏之前, SH-SY5Y 细胞在有条件的培养基中暴露 24 小时。对照细胞来自亲代 CHO 细胞并用相同的有条件的培养基进行处理。

[0337] Northern blot:使用 Trizol 试剂分离总 RNA, 以每道 10 μ g 将总 RNA 装载在 1% 琼脂糖凝胶上。然后将 RNA 转移到 Hybond 膜上 (Ambion), 并用 Ultrahybrid (Ambion) 封闭 6 小时。封闭的膜与放射性同位素标记的 S-AS 探针杂交过夜, 所述探针跨越鼠 BACE-1 和 BACE-1-AS 的重叠区域。所述探针是通过用 32 p- 标记的核苷酸和 Amersham 随机引发试剂盒对重叠的 DNA 进行随机引发而制得的。所有的膜用低严格性的缓冲液洗涤一次, 用高严格性的缓冲液洗涤两次, 每次 10 分钟, 用磷成像设备检测信号。

[0338] 细胞提取物的制备和分馏

[0339] 由 SH-SY5Y 细胞制备细胞质提取物。收获细胞, 并在 4 $^{\circ}$ C 下以 1000g 离心 5 分钟。将细胞球用冰冷的 PBS (pH7.2) 洗涤三次, 然后在冰上用三倍细胞体积的溶解缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH7.4; 200mM NaCl; 14mM MgCl₂, 20 单位的氯吡胺; 0.1% (v/v) Triton X-100) 溶解 10 分钟。通过在 4 $^{\circ}$ C 下以 500g 离心 10 分钟而分离细胞核。上清含有细胞质提取物, 利用 Trizol (Invitrogen), 将上清立即用于提取 RNA。通过将珠在溶解缓冲液中洗涤一次, 制得细胞核提取物。然后用 RNAeasy 微型试剂盒细胞核 RNA。

[0340] RNA 捕获 (pull down) 和质谱:通过均浆器, 利用含有高浓度的 MgCl₂ 的低渗分馏

缓冲液使细胞破裂。立即将 SH-SY5Y 细胞溶解产物与用于 BACE-1 和 BACE-1-AS 的链特异性的生物素标记的 RNA 探针进行杂交,然后用抗生物素蛋白链菌素珠孵育 15 分钟。纯化的蛋白用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 进行分离。质谱用于检测由 RNA 转录物纯化的蛋白。靶向 Prl1tk 且不与人类基因组相配的 RNA 探针用作对照。

[0341] 稳定性和 α - 蝇蕈素处理 :将 HEK-293T 细胞接种到 24 孔板中。24 小时后,细胞用 $5 \mu\text{g/ml}$ 的 α - 蝇蕈素进行处理,并用来自 7PA2 或 CHO- 对照细胞的有条件的培养基孵育。收集细胞用于 RNA 纯化,并在处理 6、12 和 24 小时后进行 RT-PCR。对于每个数据点,取 3 个互不相关的样品,并且所有样品具有未处理的、未转染的、用于 RNA 纯化和数据分析的相配的样品。

[0342] 统计分析 :所有实验进行 6-20 次生物重复和 3-6 次技术重复。使用方差二元分析 (ANOVA) 中的主要作用对处理因素进行此后检验之后,将与对照处理组相比较的数据列于图表中。将各处理的显著性计算成 p 值并标于各图表中,其中 $p < 0.05$ 表示显著。

[0343] RNA 荧光原位杂交 (RNA-FISH) :SH-SY5Y 细胞在涂覆有硅烷的载波片上生长过夜,并用 4% 仲甲醛 (pH7.4) 固定 4 分钟。在室温下用 0.2% Triton-X 将细胞渗透 4 分钟。将载波片气干之后,用预杂交缓冲液 (50 甲酰胺,5X SCC,50 $\mu\text{g/ml}$ 鲑鱼精子 DNA,和 0.1% 吐温 -20) 将粘附的细胞在 65°C 下简单处理 1 小时。使用 T7 启动子和 BiotinUTP 以及 MEGAScript 试剂盒 (Ambion),通过体外转录克隆的 S-AS RNA,制得用于 BACE-1 和 BACE-1-AS 的 Prl1tkmRNA (作为阴性对照) 和非重叠部分的生物素化的探针。然后将探针加入到杂交缓冲液 ($2.5 \mu\text{g/ml}$) 中并在 65°C 下孵育 6 小时。然后用 65°C 的 PBS 将载波片洗涤 3 次,每次 10 分钟。

[0344] Western Blot :HEK-SW 细胞用 20nM 的 BACE-1 正义 BACE-1-AS 或者全部两种的转录物 siRNA 进行转染。转染 48 小时后,用来自含有 350mMDTT 的 BioRad 的 $200 \mu\text{l}$ Laemli 样品缓冲液对细胞进行溶解。然后细胞溶解产物在 10% SDS PAGE 上进行分离,并被转移到硝化纤维膜上过夜。将膜与用于 BACE-1 的一级抗体 (来自 Abeam) 和跟 HRP 共轭的二级抗体一起孵育。添加 HRP 底物之后,用 X- 光膜检测化学荧光信号。将相同的膜剥离并回收用于检测作为装载对照的 β - 肌动蛋白。

[0345] ELISA 和 HTRF 分析 :将人工过度表达 APP 瑞典变种的 HEK-SW 细胞种到 6 孔板上,24 小时后,用抗 BACE-1 正义、BACE1- 反义或全部两种转录物的 20nM siRNA 进行转染。转染 24 小时后,从培养的细胞中收集培养基,用于通过 A β 1-42 抗体进行夹层 (sandwich) ELISA。在碳酸缓冲液的存在下,将捕获抗体 (用于淀粉质 A β 的鼠单克隆 ;Abeam) 在 4°C 下在 Maxisorb96 干净板上孵育过夜。将收集到的培养基添加至板中,并与一级抗体 (来自 Abeam 的 A β 1-42) 和山羊抗兔 IgG 二级抗体一起孵育。添加 HRP 底物之后,利用 SpectraMax 读板器检测发光。从背景中减去 405 纳米下三次重复的平均值,并将其标准化为阴性对照 siRNA 样品。利用时间分辨荧光 (HTRF) 分析 (Cisbio) 进行 A β 1-42 检测。将抗 A β 1-42 的两种特异性单克隆抗体加在荧光上,在同时结合至 A β 肽时,基于它们之间的距离,第一种发射将激发第二种。利用来自 APptg 和野生型小鼠的纯化蛋白,按照产品说明书进行 HTRF 反应,而不用任何洗涤步骤,从而可以直接测定肽。

[0346] 动物研究 :在 Scripps Research Institute 获得动物研究的 IACUC 批准之后,将 18 只六月大的雄性小鼠用于体内实验。将小鼠分为 3 组,每组 6 只,用背部的第三室中的慢

性留置套管如外科手术般地植入渗透性微型泵 (Alzet)。逆着 BACE-1 (组 1)、BACE-1-AS (组 2) 或对照 siRNA (以前已知不能穿越人和鼠基因;组 3), 所述渗透性微型泵以 0.4mg/天的剂量不断地传递 siRNA 注射液 (0.25 μ l/h)。不断地传递 siRNA 注射液 14 天之后, 对小鼠实施安乐死, 并除去大脑。从每只小鼠上切得 5 个组织, 用于 RNA 定量测定; 背部海马状突起 (dorsal hippocampus)、腹部海马状突起、背内侧前额皮层、背部线条和小脑。将组织切割掉并在冰冷的 PBS 中清洗, 根据制造商的说明书在 Trizol 试剂 (Invitrogen) 中均质之后, 提取 RNA。提取的 RNA 样品通过 Qiagen RNeasy 柱, 并进行柱上 DNase 处理, 以除去 DNA 污染。用分光光度法测定 RNA 样品的浓度, 使用随机六聚酶和逆转录酶 (Applied Biosystems) 在最终体积为 40 μ l 的条件下, 用 800ng 的各样品合成 cDNA 的第一链。如上进行实时 PCR (RT-PCR) 测定。各个组织相对于对照小鼠的 RNA 水平变化百分率绘制在各个图表中。

[0347] 在单独系列的试验中, 牺牲掉四只 APP-tg 小鼠 (Tg19959) 和四只同窝出生者, 都为雌性 6w/o。大脑组织通过 HTRF 而用于 RNA 测定和 A β 1-42 检测。

[0348] BACE-1 非编码的天然反义转录物的鉴定: 人 BACE-1 基因座的基因组组织如图 12A 所示。我们的引物、探针和 siRNA 序列的位置如图 12B 所示, 还列于表 5 中。BACE-1-AS 在物种之间高度保守 (见图 12B)。

[0349] 人 BACE-1 (NM_012104)、小鼠 BACE-1 (NM_011792)、人 BACE-1-AS (CB960709) 和小鼠 BACE-1-AS (AK074428 and AK078885) 的序列信息可以从 UCSC 基因组生物信息学 (Genome Bioinformatics) 网站获得 (genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway)。为了完全描述 BACE-1-AS 的基因组组织, 我们进行了 cDNA 末端的快速扩增 (RACE) 实验, 以从 5' 到 3' 端定向地对 NAT 进行测序。如图 12C 所示, 对于人 BACE-1-AS, RACE 表明, 除了在其边界具有额外的核苷酸以外, 序列几乎与来自 UCSC 数据库 (CB960709) 的表达的序列标签 (EST) 完全相同。用于人和小鼠 BACE-1-AS 的两种接合变体相同, 即两种都与 BACE-1 正义转录物重叠。还发现用于小鼠 BACE-1-AS 的两种单独的 EST 对应于单个相邻的序列, 覆盖小鼠 BACE-1 基因的外显子 5 和 6 (图 12D)。对于人和小鼠的反义序列都发现了聚 -A 尾和帽结构, 表明 BACE-1-AS 为 RNA 聚合酶 II 的产物并且为完全处理的 RNA 转录物。但是, 没有开放阅读框, 表明 BACE-1-AS 为 ncRNA。而且, 在人和鼠 BACE-1-AS 中都检测到了与基因组序列的一些不相配, 表明由于与正义转录物形成细胞核双螺旋体, "A 至 I" 是可能的 (Kawahara and Nishikura, 2006FEBS Lett 580, 2301-2305)。后一发现可能与如下所述的 BACE-1-AS 的细胞核保持模式相关。增补的数据部分还描述了人和小鼠 BACE-1-AS 的所有新序列。

[0350] 表达分布图: 利用 RT-PCR, 我们在小鼠大脑和肝脏的各种区域中测定了 BACE-1 (正义) 和 BACE-1-AS (反义) RNA 转录物的相对表达。大脑的各个区域中的两种转录物都比肝脏中多 2-5 倍。在取样的大脑区域中, 两种转录物在大脑皮层和扁桃体中的表达最高 (图 10A)。Northern blot 分析证实了 BACE-1 和 BACE-1-AS 在小鼠大脑组织中的表达 (图 10A 和 10B)。BACE-1 和 BACE-1-AS 转录物还在未分化的和分化的人成神经细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中进行表达。人成神经细胞瘤 SH-SY5Y 细胞的分化的诱导与 BACE-1-AS 转录物表达降低约 50% 和 BACE-1 转录物表达降低约 20% 有关 (图 10B), 表明正义和 NAT 转录物的表达都是一致的。

[0351] BACE-1-AS 敲低在体外一致地降低 BACE-1 正义转录物：我们接着研究了 BACE-1-AS 在通过 siRNA 敲低而调节其正义搭档 (BACE-1mRNA) 的表达中所起的作用。图 13A 描述了三种不同的 siRNA 序列, 该三种 siRNA 序列将人 SH-SY5Y 细胞中的 BACE-1-AS 转录物敲低了约 60%。这三种 siRNA 序列都靶向反义转录物 (但不是 BACE-1mRNA), 都高效地、一致地、相伴地将正义转录物敲低到与反义转录物相似的程度。由于靶向反义转录物 (BACE-1-AS) 的三种不同的 siRNA 分子一致地敲低 BACE-1, 因此 siRNA 不可能通过非特异性 (或“脱靶”) 机制间接地敲低 BACE-1 转录物。因此, 我们表明, 在人 SH-SY5Y 成神经细胞瘤细胞中, 非编码的反义转录物起到调节 BACE-1mRNA 表达的作用, 并且可以通过敲低 BACE-1-AS 来影响 BACE-1 的表达, 而不靶向 BACE-1 转录物自身。

[0352] 也评价了敲低 BACE-1mRNA 的效果。图 13A 表示了将 SH-SY5Y 细胞中的 BACE-1mRNA 敲低了 70% 的正义靶向 siRNA (S-a)。靶向 BACE-1mRNA 的其他两种 siRNA 序列 S-b 和 S-c (如图 12B 所示) 相似地敲低 BACE-1mRNA。S-a 靶向 BACE-1 正义转录物的非 BACE-1-AS 重叠部分, 在施用 siRNA 48 小时后不会改变 BACE-1-AS 的表达。因此, 在 SH-SY5Y 细胞中, BACE-1mRNA 的敲低不会调控 BACE-1-AS 的表达。

[0353] BACE-1-AS 的敲低降低 BACE-1 蛋白和 A β 1-42 的产量：由于如 Westernblot 所测 (图 11), 当施用 NAT 特异性的 siRNA 时 BACE-1 蛋白水平也降低, 因此敲低 BACE-1-AS 对 BACE-1mRNA 表达的一致效果不限于 mRNA 水平。此外, 在用 siRNA 处理之后, 我们使用 ELISA 方法来测定 A β 1-42 的水平。A β 1-42 是 BACE-1 对 APP 的酶裂解产物, 可以预测 HEK-SW 细胞系中含有具有所谓瑞典变种的 APP。当用抗 BACE-1-AS 的 siRNA 对 HEK-SW 细胞系进行处理时, A β 1-42 水平显著降低 (图 13B)。

[0354] BACE-1 正义和反义转录物的结合靶向显示出协同效应：我们接着询问 BACE1 和 BACE-1-AS 转录物在 HEK-SW 细胞中的同时靶向是否能够达到协同效应。如图 13B 所示, 与单独的正义或反义转录物的敲低相比, 同时施用指向 BACE-1 正义和反义转录物的 siRNA 更大程度地减少 A β 肽 ($P < 0.001$)。这个观察结果提高了可以非有意地设计一些或许多 siRNA 分子由此它们同时靶向顺式 - 正义 / 反义对的概率。例如, 最近表明用 siRNA 体内靶向 BACE-1 改善 APP 转基因小鼠中的 AD 样神经病理学和行动不足 (Singer et al., (2005). *Nat Neurosci* 8, 1343-1349)。在他们的研究中, 最有效的 siRNA 分子靶向 BACE-1 正义 / 反义基因座的重叠区域, 提高了敲低有助于总体功效的正义和反义 BACE-1 转录物的概率。

[0355] 体内给予靶向 BACE-1 正义或反义转录物的 siRNA：以上观察结果表明, 对 BACE-1-AS 的破坏引起对 BACE-1mRNA 的体外下调。接着, 我们分析小鼠大脑中是否体内存在相同的关系。为了解答这个问题, 用背部第三室中的慢性留置套管制备小鼠。小鼠也皮下植入有渗透性微型泵, 该渗透性微型泵逆着 BACE-1 (组 1)、BACE-1-AS (组 2) 或对照 siRNA (以前已知不能穿越人和鼠基因; 组 3) 以 0.4mg/天的剂量传递 siRNA 注射液 (0.25 μ l/h) 两周 (Thakker et al., (2004). *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 17270-17275.; Thakker, D. R., et al. (2005). *Mol Psychiatry* 10, 782-789, 714)。管道与所述渗透性微型泵的出口相连并且皮下挖至所述留置套管, 因此直接将 siRNA 传递到大脑中。不断地传递 siRNA 注射液 14 天之后, 对小鼠实施安乐死, 并除去大脑。在背部海马状突起、腹部海马状突起、背内侧前额皮层、背部线条和小脑中分析 BACE-1 和 BACE-1-AS 的表达水平。

[0356] 显著地, 在给予选择性地抗 BACE-1 或 BACE-1-AS 的 siRNA 时, 所有四个大脑区域

中的 BACE-1 浓度都降低了 (图 14A 至 14D)。抗正义或反义转录物的 siRNA 使得 BACE-1 和 BACE-1-AS 的水平与对照处理组相比一致地降低了。另外,我们测定了作为对照组织的小脑中的 S-AS 转录物 (图 14E),发现 BACE-1 和 BACE-1-AS 的水平没有变化,对未直接浸在第三室的脑脊髓中的组织预料的结果。这些体内发现共同地复制了我们的体外观察结果,表明 BACE-1-AS 一致地调节 BACE-1mRNA。

[0357] BACE-1-AS 转录物积聚在细胞核中:为了检查 BACE-1 和 BACE-1-AS 在细胞中的分布,我们将 SH-SY5Y 细胞的溶解产物分离成细胞质馏分和细胞核馏分,并提取 RNA 用于 RT-PCR 分析。与细胞质馏分相比,细胞质部分富含 BACE-1-AS (图 15A)。SH-SY5Y 细胞的 RNA 荧光原位杂交 (RNA-FISH) 图像证实了 BACE-1-AS 保持在细胞核中 (图 15A 至 15D 插入物)。BACE-1-AS 在细胞核中比在细胞质中多大约 30 倍,而 BACE-1 正义转录物 (以及 β -生物素 mRNA 对照) 在细胞核和细胞质之间的分布大致相等。

[0358] 我们还设计了利用多色荧光探针的 RNA-FISH 实验,以显现正义和反义转录物的亚细胞定位。将细胞暴露于应激物,从而使 BACE-1-AS FISH 信号迁移 (图 15A-15D 插入物)。我们利用源自 Pr1tk 荧光素酶且不与人类基因组相配的 RNA 探针作为阴性对照探针。从图 15A 的显微图像可以看出,在细胞核中可以检测到绝大多数的反义转录物 BACE-1-AS。相反,正义 BACE-1 转录物更广泛地分布在整个细胞中。

[0359] 用质谱法描绘 RNA-蛋白的相互作用:为了鉴定出可能参与非编码反义转录物的细胞核保持和 / 或传输,我们取出 RNA 并描绘了与蛋白相互作用的 RNA。在实验操作过程中,所述方法的 $MgCl_2$ 高并且不会导致变性,有助于维持 RNA-蛋白的相互作用。表 4 列出了与 BACE-1 和 BACE-1-AS 转录物相关的蛋白。参与翻译过程的蛋白有选择地与 BACE-1mRNA 共同纯化。相反,细胞核高度丰富的蛋白与 BACE-1-AS 转录物相关。这些发现与反义转录物的非编码性质相一致,并且支持其细胞核保持的观点。

[0360] 亲环素 (Cyclophilin)-60 (Cyp60) 和 BACE-1-AS:目前对 BACE-1 表达和功能的调节机制了解很少。但是,最近的大规模 siRNA 筛选成果表明 Cyp60 敲低降低了 BACE-1mRNA 和蛋白水平 (Espeseth et al., (2006) *Mol. Cell Neurosci.* 33, 227-235)。亲环素 -60 (Cyp60) 是肽基脯氨酰基异构酶的亲环素家族的成员。亲环素组成高度保守的蛋白家族,该家族的成员在蛋白折叠、cyclosporin A 引起的免疫抑制、HIV-1 病毒体感染中发挥重要作用。Cyp60 蛋白与蛋白酶抑制剂水蛭素 c (eglin c) 相互作用,并定位于细胞核。据报道, Cyp60 还参与 CD147 (也已知作为细胞外基质金属蛋白酶诱导剂) 的细胞表面表达,表明 Cyp60 在 CD147 向细胞表面的迁移中发挥作用。

[0361] 假定 BACE-1-AS 在调节 BACE-1 表达中的作用,之前公开的 Cyp60 调节 BACE-1mRNA 表达的观察结果,我们假设 Cyp60 还可以在调节 BACE-1-AS 中发挥作用。为了检验该假设,我们检查了敲低 Cyp60 对 BACE-1 和 BACE-1-AS 表达的作用。首先,我们通过证明 siRNA 介导的 Cyp60 敲低降低了人胚胎肾细胞 (HEK293T) 中的 BACE-1mRNA 水平而证实了 Cyp60 在调节 BACE-1mRNA 表达中的作用。但是, Cyp60siRNA 暴露也减少 BACE-1-AS 转录物 (图 16A)。当与 Cyp60 敲低诱导的 BACE-1 mRNA 减少相比时, BACE-1-AS 减少的程度更大,并且发生的时间点更早 (图 16B)。由于 Cyp60 几乎专门地保留在细胞核中 (Wang et al., (1996) *Biochem J.* 314 (Pt1), 313-319), BACE-1-AS 也定位于细胞核中,表明 Cyp60 可能优选地对 BACE-1-AS 起作用,以调控 BACE-1mRNA 的表达。与该假设相一致, Cyp60 敲低显著地改变了

BACE-1-AS 转录物的细胞核保留模式。

[0362] 在此所示的人 BACE-1-AS 序列基于 5' ,3' RACE 克隆和测序结果并且与来自 UCSC 的 EST 序列 (cDNA CB960709) 相比较。

[0363] 人 BACE-1-AS 的主要变体 (10 倍克隆) SEQ ID NO :64 :TCTAGCGAGG TGACAGCGTA GAACCAGGCG GGGTCCCTCC CATTACATAC TACTGCTCTGGCCTCTGCC GTCATAGTTG CCATCTGGTC ATTCCTTCC CATAAAGCCA GGGCTCACCGCAACCTCCAC CGTCCTGAGT TAAAGTGATT CTCCTGTCTC AGCCCCCTGA GTAGCTAGGATTACAGGCGT GCGCCACCAC ACCCAGCTAA TTTTGTACT TTTAGTAGAG ATGGGATTTACCCTGTTGG TCAGGCTGGTC TTGAACTCCT GACCTAGTG ATCTGCCAC CTTGGCCTCCCAAAGTGCTG GGATTACAGG CGTGAGCCAC CACGCCTGGC TAGGGGAAGA GTGCTTTAAGAGCTCTGAG TAGAAGGGTC TAAGTGCAGA CATCTGGCT GTTGCTGAAG AATGTGACTCTCACCGCCTC CCTCTGACAC TGTACCATCT CTTTACCCC CATCCTTAGT CCACTCACGGAGGAGGCTGC CTTGATGGAT TTGACTAGCA GCTTCAAACA CTTTCTTGGG CAAACGAAGGTTGGTGGTGC CACTGTCCAC AATGCTCTTG TCATAGTTGT ACTAAGAGGG AAAAGAGAGAGTTAAAAGAG TCAAAAGGTT TTTGATGCTG GGCTCTGGGC AGTAGGGGGT TACTGCTGGGGCCCCAGCTG GGTTGGCATC TTGGCTTTGG CACCTCCTAA GTGTACCTGC TTGGACAAGTTAACCTCTGT GCCTCAGTTC CTTCATCTCT AAAGTGAGGA TAAAAATAGC ACCTACCTCAAAGGGTTATT GTAAGGATTA AATAAATCAG CAATGTAAAG CACTTAGAAT CGTGCCAGCAGAGAGAAGG CACTTGGTAA ATGTTTATTC TTGTAAATCT TGGGTGGGCA GGTAGTCTCCAACTTGAAA AAAAAAAAAA AGCACCTTAT AAATCGTGCC CCGCCAGAAG AGAAAGGGCACTTTGGGAAA AATGGTTTTA ATCCCTTGT TTAAATTCTT TGGGGGTGGG GGGCCAAGGTTAAGTTTCTT CCCCCAAAAC CTTTGAAAAA AAATT

[0364] 人 BACE-1-AS 的短变体 (6 倍克隆) SEQ ID NO :65 :CTTTTAAGAG CTCTGAGTAG AAGGGTCTAA GTGCAGACAT CTTGGCTTTT GCTGAAGAATGTGACTCTCA CCGCTCCCT CTGACACTGT ACCATCTCTT TTACCCCAT CTTAGTCCACTCCACGGAG GAGGCTGCCT TGATGGATTT GACTGCAGCT TCAAACACTT TCTTGGGCAAACGAAGGTTG GTGGTGCCAC TGTCCACAAT GCCTCTTGTC ATAGTTGTAC TAAGAGGGAAAAAAAAAAAA

[0365] 在此所示的鼠 BACE1-AS 序列基于 5' ,3' RACE 克隆和测序结果并且与来自 UCSC 的 EST 序列 (cDNA K077428.1 和 cDNA K078885.1) 相比较。

[0366] 鼠 BACE-1-AS 的主要变体 (10 倍克隆) SEQ ID NO :66 :GTCTACGGAT CAGGAGGAG AAAGTGAGATA CTGGCCTCAT AAAGCTGTGA GTGGGCATGGTGGCTCACAC TGCCTGTGGT CCCAGAACTT AGAAGGCTAA GGCATGAAGT TGTCAGTTCAATGCTAACC TGGGCTACGT TCATGACCCC ATCTCAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAAGGCATCTCAAT GCCAAGTCAA CAGAGCAGTG GTTTGTAAGC GCCTGATGGG AAGGATCTAC GTATCTTTAG GGCTTGCTGA GGAGTGTGAC TGTCACTGAC CGAGGAGGCT GCCTTGATGGACTTGACGGC AGCTTCAAAT ACTTTCTTGG GCAAGCGAAG GTTGGTGGTC CCACTGTCCACAATGCTCTT GTCGTAGTTG TACTGAGGAG AGAGGGGGGG AGAGGTGGGA GGGGTGAATCTGACAGCTAA GCATCCTACT GGGGTTGGCA TCTTAGCTTT CCCATTTTGT ATATGTGCGTCCTTGGGCAC GTTGCTTAACT CTCTGTGTAC CTGTTCTCTT GTTCTAAATT GAAGATAATAACAGTGCCTA CCTCAAAGGT TACCATAAGG ATTACATAGG TCAAAAGGCT GAAAGCACTAAGTAGGTCCT GGCAGATCCC AGGCACTTGG TAAGTACTAA CTTCGTCACC

TTGTGCGGGTAGGTGTTCTC TAAATCTAAA GCAGAAATGC CTTGTGTGGT ATTTGTA ACT
TCTAGTACTTTTATGTAGTT ATTCTCATT CACCATACATT ATAATGGAGA GAAGGGTGGC
TCAGCACGCACAAAGCCATG AGCTTGAGCT CTGATGCTGC ATGGTGGTAT ATGCCTGTAG
AGAGACACTTGAGAGTCAGA GAAAGGAGGA CCAGGAGTTC AAGGTCATCT TTAGCTACCT
AGCAAGTCTGAGGTCAGCGT GGGCTACATA AGATCCTCAA AAAAGCCAAA AAAGGGGGCT
GTTGAGATAGGTAAGGGCAC CTGCTACCAA GTCTGATGAC CTCAGTTCAA CCCCAGAGAG
ACCTACTAGTTACTGAAAAT TGTCTCTAA CCTCCATACA CAAGCTGTGG CACATGCCCC
ATCCTCATCCCAATAAAATGT AAAACAAAAT CTAGGGAAAAG AGACCCTAAG TGTTGGCATT
TGGGTATGCCAAGCATAACG ACTAACACTT CATAATTGG CTTTGACCTT TACAGTCTGT
GAGAACGCTTGTGTATTTCT ACCTCTGCCT TGTAGATGAG GAGTCTGGCA CTGTAGTGAG
GAGCCTGAGGGCACTTAGTA ACAGCAGGAC TCTAGTCAGG TCCAACCTCT GCCTCACAAA
AGCCTTGCCCAAGGCTGAAG AGGCAGTGAC TAGAGTCCAG AAAGGAACTC TTTCATGTTT
TCATTACTATACTTAAGTCA TGTGGTCCAG GCTCTGTGAC TGCTCTGCCA GGCCCCGCC
TTCACCTTAGGGATTGCCTC GTGATCCTGT GCTTCCACCC TCATGGCTCT CACACACTGT
GAGACTCCCCTTATGCTCAC GAGAATCCCC TCCATCCCAT TACCTCCTTG CAGTCCATCT
TGAGATCTTGACCATTGATT TCCACACGTA CAATGATCAC TTCATAATAC CACTCCCGCC
GGATGGGTGTGTACCAGAGA CTGCCCGTGT ATAGCGAGTG GTCGATACCA CCAATGATCT
AAAAGAAAAAAAAAAAA

[0367] 鼠 BACE-1-AS 的长变体 (2 倍克隆) SEQ ID NO :67 :GTCTACGGAT CAGGAGGAGA
AAGTGAGATA CTGGCCTCAT AAAGCTGTGA CTGGGCATGGTGGCTCACAC TGCTGTGGT CCCAGA ACTT
AGAAGGCTAA GGCATGAAGT TGTC AAGTTCAATGCTAACC TGGGCTACGT TCATGACCCC ATCTCAAAAA
AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAGGCATCTCAAT GCCAAGTCAA CAGAGCAGTG GTTTGTAAAGC GCCTGATGGG
AAGGATCTACGTATCTTTAG GGCTTGCTGA GGAGTGTGAC TGTC ACTGAC CGAGGAGGCT
GCCTTGATGGACTTGACGGC AGCTTCAAAT ACTTTCTTGG GCAAGCGAAG GTTGGTGGTC
CCACTGTCCACAATGCTCTT GTCGTAGTTG TACTGAGGAG AGAGGGGGG AGAGGTGGGA
GGGGTGAATCTGACAGCTAA GCATCCTACT GGGGTTGGCA TCTTAGCTTT CCCATTTTGT
ATATGTGCGTCCTTGGGCAC GTTGCTTAAC CTCTGTGTAC CTGTTCTCTT GTTCTAAATT
GAAGATAATAACAGTGCCTA CCTCAAAGGT TACCATAAGG ATTACATAGG TCAAAGGCT
GAAAGCACTAAGTAGGTCCT GGCAGATCCC AGGCACTTGG TAAGTACTAA CTTCGTCACC
TTGTGCGGGTAGGTGTTCTC TAAATCTAAA GCAGAAATGC CTTGTGTGGT ATTTGTA ACT
TCTAGTACTTTTATGTAGTT ATTCTCATT ACCATACATT ATAATGGAGA GAAGGGTGGC
TCAGCACGCACAAAGCCATG AGCTTGAGCT CTGATGCTGC ATGGTGGTAT ATGCCTGTAG
AGAGACACTTGAGAGTCAGA GAAAGGAGGA CCAGGAGTTC AAGGTCATCT TTAGCTACCT
AGCAAGTCTGAGGTCAGCGT GGGCTACATA AGATCCTCAA AAAAGCCAAA AAAGGGGGCT
GTTGAGATAGGTAAGGGCAC CTGCTACCAA GTCTGATGAC CTGAGTTCAA CCCCAGAGAG
ACCTACTAGTTACTGAAAAT TGTCTCTAA CCTCCATACA CAAGCTGTGG CACATGCCCC
ATCCTCATCCCAATAAAATGT AAAACAAAAT CTAGGGAAAAG AGACCCTAAG TGTTGGCATT
TGGGTATGCCAAGCATAACG ACTAACACTT CATAATTGG CTTTGACCTT TACAGTCTGT
GAGAACGCTTGTGTATTTCT ACCTCTGCCT TGTAGATGAG GAGTCTGGCA CTGTAGTGAG GAGCCTGAGG

GCACTCTAGT AACAGCAGGA CTCTAGTCAG GTCCAACCTC TGCCTCACAA AAGCCTTGCCCAAGGCTGAA
GAGGCAGTGA CTAGAGTCCA GAAAGGAACT CTTTCATGTT TTCATTACTATACTTAAGTC ATGTGGTCCA
GGCTCTGTGA CTGCTCTGCC AGGCCCCGCC CTTACCTTAGGGATTGCCT CGTGATCCTG TGCTTCCACC
CTCATGGCTC TCACACACTG TGAGACTCCCCTTATGCTCA CGAGAATCCC CTCATCCCA TTACCTCCTT
GCAGTCCATC TTGAGATCTTGACCATTGAT TTCCACACGT ACAATGATCA CTTCATAATA CCACTCCCGC
CGGAGTGGGTGTGTACCAGA GACTGCCCGT GTATAGCGAG TGGTCGATAC CACCAATGAT
CTAAAAGAAAAAGAGACAGA CACCTATGTC CTAGCACAGA AGGAGAGCAA GTTACCCAAG
ACTAAATAATAAGATCAGCC ATTTCTTGGG GTGCCAAGAT TCTCTCTAAT CTCCCATCAT
GCCCCATGCATGGTAATATT TAGTTTCCTA AATGTGTTCA GGAGAAGAAA CACATCGGGA
TTATTTGTATCAAAATCTAT AGCCCTTGAC CGAAAGTTAT TTAAGCCCTA AGCTAGTACA
ATAAACGTGGAATGAACTGA TTGTATGCTG CTTTCATACA TTTTCTTGTC TTTGCTTGTT
GGAGAATACTTGTACTGTC CTAATTAATA AATGGGCTTG AACTGAAAAA AAAAAAAA

[0368] 细胞应力诱导的 BACE-1-AS 细胞核保留模式的改变:长久以来,不同的细胞应力如缺氧、再氧化、氧化性应力和一些促凋亡因素已经涉入 AD 的发病机制。这些应激物提高了 BACE-1 活性和 A β 生成 (Tong et al., (2005)Neural Transm112,455-469)。如上所述的 BACE-1-AS 的细胞核保留是对最近由 Prasanth 及其同事报道的 CTN-RNA 的间隔分离 (Prasanth et al., (2005)Cell1123,249-263) 的回顾。这种非编码的 RNA 转录物如 BACE-1-AS 主要位于细胞核中并且含有用于腺苷至肌甙的编辑的成分,所述腺苷至肌甙的编辑是参与其细胞保留的一种关键的机制。表明 CTN-RNA 在细胞应力下被裂解,以生成蛋白编码转录物 mCAT2mRNA。基于这些观察结果,我们推测细胞应力可能将 BACE-1-AS 从细胞核中释放出来,从而对 BACE-1mRNA 的表达进行调控。细胞应力被认为是一种有助于 AD 病因学的重要的引发剂 (Xueet al., (2006)Neurosci Lett405,231-235)。

[0369] 为了研究细胞应力是否改变 BACE-1-AS 的细胞核保留,我们将 SH-SY5Y 细胞暴露与一种公认的高渗细胞应力,即去极化浓度的 KCl (30mM 连续 5min)。这种细胞应力显著地降低了保留在细胞核中的 BACE-1-AS 的比例,表明细胞应力将 BACE-1-AS 释放到细胞质中 (图 15B)。为了排除 KCl 处理后 BACE-1-AS 的细胞核保留的这种转变与非特异性的中毒现象和 / 或细胞膜破裂有关的可能性,我们用 KCl 对细胞进行处理,然后在常规的介 质中保持 60 分钟。反义转录物浓度的细胞核比细胞质模式的比例恢复至原始值。

[0370] 有充足的证据证明 A β 1-42 具有有效的细胞应激物作用。A β 1-42 确实增强 BACE-1mRNA 和蛋白活性,从而通过各种细胞应力相关的机制对神经元细胞造成损害 (Tamagno et al., (2006)Free Radic Biol Med41,202-212)。将纯化的 A β 肽直接注入到大鼠大脑中也表现出引起蛋白氧化和神经元细胞损害 (Boyd-Kimball et al., 2005Neuroscience132,313-324)。基于以上观察结果,我们假设在已知能够提高 BACE-1 蛋白表达并因此有助于 A β 1-42 合成的浓度下 (Tamagno et al.,2006),A β 1-42 还可以诱导 BACE-1-AS 的细胞核释放。

[0371] 与以上观察结果相一致,合成的 A β 1-42 (1 μ M, 2 小时) 以可逆的方式将 BACE-1-AS 从细胞核中释放出来并提高其在 SH-SY5Y 细胞中的细胞质浓度 (图 15C)。而且,将 SH-SY5Y 细胞在来自 CHO-7PA2 细胞的有条件的培养基中暴露 2 小时,还诱导 BACE-1-AS 转录物相似地从细胞核迁移到细胞质中,所述 CHO-7PA2 细胞过度表达 APP 并

且所含的 A β 1-42 二聚体和低聚体水平很高 (Walsh et al., 2005 *Biochem Soc Trans* 33, 1087-1090.)。作为对照, 模仿源自 CHO 细胞的有条件的培养基没有诱导任何迁移 (图 15D)。基于这些观察结果, 我们提出细胞应力和 / 或 A β 1-42 将 BACE-1-AS 从细胞核中释放出来。假定 BACE-1-AS 和 BACE-1mRNA 的表达被一致地调节, 则预料细胞质 BACE-1-AS 的增加将提高 BACE-1mRNA 的稳定性, 有助于进一步生成 A β 1-42 并形成前馈回路 (图 17)。该机制可以用来解释阿尔茨海默病的进展。

[0372] BACE-1 正义和 BACE-1-AS 反义转录物的稳定性: 假定 BACE-1-AS 和 BACE-1mRNA 之间存在一致的关系, BACE-1-AS 的细胞质浓度增加与细胞应力有关, 或者暴露与 A β 1-42 可能提高 BACE-1 的稳定性, 从而增加 A β 1-42 的产量。为了检验这种假设并分析 BACE-1-AS 的细胞质浓度增加可以通过哪种可能的机制提高 BACE-1 的表达和功能, 我们检查了 BACE-1-AS 是否提高 BACE-1mRNA 的稳定性和寿命。为了测定正义-反义转录物的稳定性, 我们用 α - 蝇蕈素 (5 μ g/ml) 阻滞了新的 RNA 合成, 并且在 24 小时内检测四种 RNA (18srRNA、 β - 肌动蛋白、BACE-1 和 BACE-1-AS) 的水平变化。BACE-1-AS 的基础半衰期比 BACE-1mRNA 短, 这个观察结果与其调节性能相一致 (图 16D)。此外, 用 α - 蝇蕈素阻滞 RNA 合成证实了 BACE-1-AS 是 RNA 聚合酶 II 的产物并且进一步证实了我们的上述 RACE 数据。RNA 聚合酶 III 的产物 18s 核糖体 RNA 确实没有受到 α - 蝇蕈素处理的影响。有趣的是, 在 α - 蝇蕈素介导的 RNA 聚合酶 II 阻滞过程中的 A β 1-42 介导的 BACE-1-AS RNA 迁移显著地提高了 BACE-1 的稳定性 (图 16E)。这些观察结果共同表明非编码 NAT 通过 NAT 的亚细胞划分 / 释放而对 BACE-1mRNA 的调节模式, 以及对正义转录物稳定性和寿命形成的调控 (图 17)。

[0373] APP 转基因小鼠大脑中的 BACE-1-AS 水平提高: 我们假定 BACE-1-AS 的水平提高可能使 BACE-1mRNA 稳定并因此增加 BACE-1 的表达和功能, 有助于增加 A β 1-42 的产量并因此有助于 AD 相关的病理生理学的进展。如果确实是这样, 那么过度表达 APP 的小鼠的 BACE-1-AS 细胞质浓度应该增加, 所述 APP 提高 A β 1-42 的水平。我们接着研究过度表达 APP 的小鼠 (Li et al., (2004a) *J. Neurochem* 89, 1308-1312) 中的 A β 1-42 水平提高是否改变 BACE-1 正义或反义转录物表达。从四只雄性 APP 小鼠和四只六周大的相配的野生型对照小鼠中切得整个大脑、小脑和肝脏, 用于蛋白和 RNA 提取。与预料的一样, 如均相时间分辨荧光 (HTRF) 分析 (图 15F) 所示, 与野生型小鼠相比, APP 小鼠的 A β 1-42 水平显著提高 (约 300 倍)。更重要的是, 与对照相比, APP 小鼠的大脑中的 BACE-1-AS 被上调了约 45%, BACE-1mRNA 增加了约 25% (图 15E)。这些观察结果与以下假设相一致: i) BACE-1-AS 和 BACE-1mRNA 被一致地调节; ii) A β 1-42 水平提高与 BACE-1-AS 的细胞质浓度提高有关; iii) BACE-1-AS 水平提高与 BACE-1 水平提高以及 A β 1-42 水平的一致性提高有关。最后, 需要说明的是, A β 1-42 在 AD 大脑中的积聚是一个长期的过程, 甚至很小的阳性反馈回路和 BACE-1 表达提高可能使淀粉质沉淀随时间显著地增多 (Li et al., (2006) *Faseb J* 20, 285-292)。

[0374] 结论: 我们已经描绘了 BACE-1 的高度保守的细胞核保留的非编码顺式反义转录物, 并且表明它在体内和体外一致地调节相应的正义 BACE-1mRNA。展示了几条证据来证明, BACE-1mRNA 被其天然反义转录物一致地调节。我们还提供了证据来证明 Alzheimer's 疾病进展的前馈模式, 其中包括 A β 1-42 暴露在内的细胞应激物将该天然反义转录物从细胞核中释放出来, 从而提高 BACE-1 的活性和 A β 1-42 的产量。即, 就我们所知, 第一报告基因

在 β -淀粉质途径中直接表示非编码 RNA。

[0375] 表 4:与 BACE-1 和 BACE-1-AS 转录物共纯化的蛋白的列表

[0376]

蛋白与BACE-1 mRNA的相互作用		
#	蛋白名称	重复
1	核糖核酸酶抑制剂	5
2	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	3
3	ATP合成酶 β 链, 线粒体前体	3
4	真核起始因子4A-I	2
5	热激蛋白HSP 90- α 2	2
6	60S 核糖体蛋白 L4	2
7	色素框蛋白同源物 1	2
8	磷脂酰乙醇胺-结合蛋白 1	2
9	60S 核糖体蛋白 L9	2
10	肌酸肌酶 B-型	2
11	肺癌肿瘤基因 7	2
蛋白与BACE-1-AS RNA的相互作用		
#	蛋白名称	重复
1	钙联接蛋白前体	3
2	果糖二磷酸醛缩酶 A	3
3	核糖核酸酶抑制剂	3
4	不均一核糖核蛋白 U 亚型 a	2
5	微管蛋白 β 2	2
6	谷光苷肽-S-转移酶 P	2
7	磷酸丙糖异构酶的亚型2	2
8	增殖细胞核抗原	2
9	DNA复制执照因子 MCM4	2
10	酪氨酸-3-单加氧酶/色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白, β 多肽	2
11	14-3-3蛋白 ϵ	2
12	无机焦磷酸酶	2
13	NCL 蛋白	2
14	DNA复制执照因子 MCM6	2

[0377] 参与迁移过程的蛋白(加粗的)有选择地与 BACE-1mRNA 一起共纯化。相反,细胞核丰富的蛋白(加粗的)专门地与 BACE-1-AS 转录物有关。

[0378] 表 5:siRNA、引物和探针以及它们的序列的列表(F:正向;R:反向;P:探针)

[0379]

#	引物名称	应用	序列
1	小鼠 BACE-1-AS_a -F	实时 PCR	GTAGGCAGGGAAGCTAGTACTGA (SEQ ID NO: 33)
2	小鼠 BACE-1-AS_a -R	实时 PCR	AGAGGCTTGCAGTCCAGTTC (SEQ ID NO: 34)
3	小鼠 BACE-1-AS_a -P	实时 PCR	CCTGGAAGGAGAAACAG (SEQ ID NO: 35)
4	小鼠 BACE-1-AS_b -F	实时 PCR	TCTGCCTTGTAGATGAGGAGTCT (SEQ ID NO: 36)
5	小鼠 BACE-1-AS_b -R	实时 PCR	CCTGACTAGAGTCCCTGCTGTACTA (SEQ ID NO: 37)
6	小鼠 BACE-1-AS_b -P	实时 PCR	CTCAGGCTCCTCACTACAG (SEQ ID NO: 38)
7	小鼠 BACE-1 target site	实时 PCR	CCACAGACGCTCAACATCCTGGTGG (SEQ ID NO: 39)
8	小鼠 BACE-1-AS siRNA	siRNA	GCTCGAGCTGCTATCAGTTTCCAAT (SEQ ID NO: 40)
9	人 BACE-1-AS siRNA_a	siRNA	CCCTCTGACACTGTACCATCTCTTT (SEQ ID NO: 41)
10	人 BACE-1-AS siRNA_b	siRNA	AGAAGGGTCTAAGTGCAGACATCTG (SEQ ID NO: 42)
11	人 BACE-1-AS siRNA_c	siRNA	CCAGAAGAGAAAGGGCACT (SEQ ID NO: 43)
12	人 BACE-1 siRNA_a	siRNA	GAGCCTTCTTTGACTCTCTGGTAA (SEQ ID NO: 44)
13	人 BACE-1 siRNA_b	siRNA	CCACGGAGAAGTCCCTGATGGTTT (SEQ ID NO: 45)
14	BACEASCLON-F	3'RACE	TAGCGAGGTGACAGCGTAGA (SEQ ID NO: 46)
15	BACEASCLON-R	5'RACE	GGGGAAGAAACTTAACCTTGG (SEQ ID NO: 47)
16	HBAS-F	3'RACE	TTGGCTGTTGCTGAAGAATG (SEQ ID NO: 48)
17	HBAS-R	5'RACE	CAGAGCCCACCATCAAAAAC (SEQ ID NO: 49)
18	BACE1AS-F	3'RACE	TACCATCTCTTTACCCCCATCCT (SEQ ID NO: 50)
19	BACE1AS-R	5'RACE	AAGCTGCAGTCAAATCCATCAA (SEQ ID NO: 51)
20	MBAS1-F	3'RACE	GCAGAGTGGCAACATGAAGA (SEQ ID NO: 52)
21	MBAS1-R	5'RACE	TTTCTCCTCCTGATCCGTAGAC (SEQ ID NO: 53)
22	MBAS检测-F	3'RACE	GTCTACGGATCAGGAGGAGAAA (SEQ ID NO: 54)
23	MBAS2-F	3'RACE	CCCTAAGTGTGGCATTGG (SEQ ID NO: 55)

[0380]

24	MBAS2-R	5'RACE	GGGCATGATGGGAGAATAGA (SEQ ID NO: 56)
25	MBAS检测-R	5'RACE	CCAAATGCCAACACTTAGGG (SEQ ID NO: 57)
26	MBAS	siRNA	CAGAGAGACCTACTAGTTATT (SEQ ID NO: 58)
27	MBAS	siRNA	TAACTAGTAGGICTCTCTGTT (SEQ ID NO: 59)
28	MBACE	siRNA	CACTGTGCGTGCCAACATTTT (SEQ ID NO: 60)
29	MBACE	siRNA	AATGTTGGCACGCACAGTGTT (SEQ ID NO: 61)
30	阴性对照	siRNA	CCTCTCCACGCGCAGTACATT (SEQ ID NO: 62)
31	阴性对照	siRNA	TGTACTGCGCGTGGAGAGGTT (SEQ ID NO: 63)

[0381] 其它实施方式

[0382] 需要理解的是,虽然结合具体描述对本发明进行了描述,但是之前的描述的目的是举例说明而不是为了限制本发明的范围。其它方面、优点和修改也在以下权利要求及其法律上的等价物的范围内。

[0383] 尽管以上的说明书中包括许多特别的例子,但是不应将它们理解为对本发明的范围的限制,而是本发明的优选实施方式的例子。可以有很多其它的改变。在此所引用的全部文献都并入作为参考。

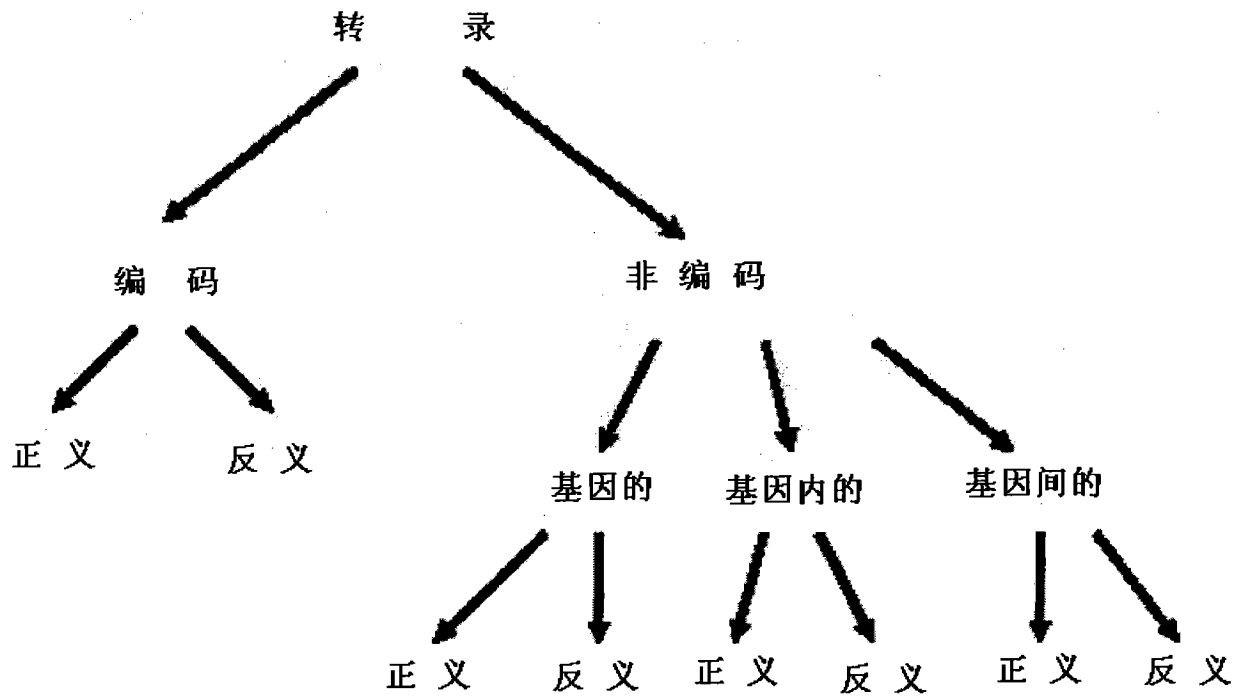


图 1A

(1) 头对头 (会聚的):



(2) 尾对尾 (偏离的):



(3) 完全重叠:



图 1B

不一致调节：



图 2A

一致调节：



图 2B

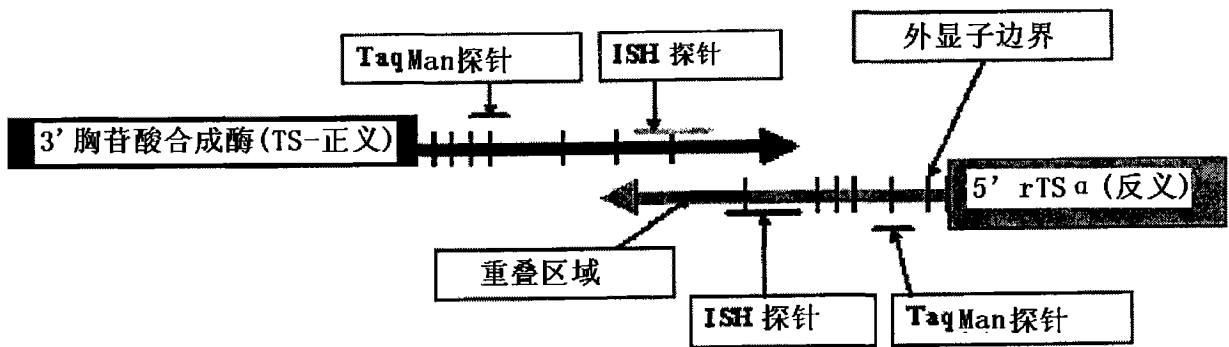


图 3A

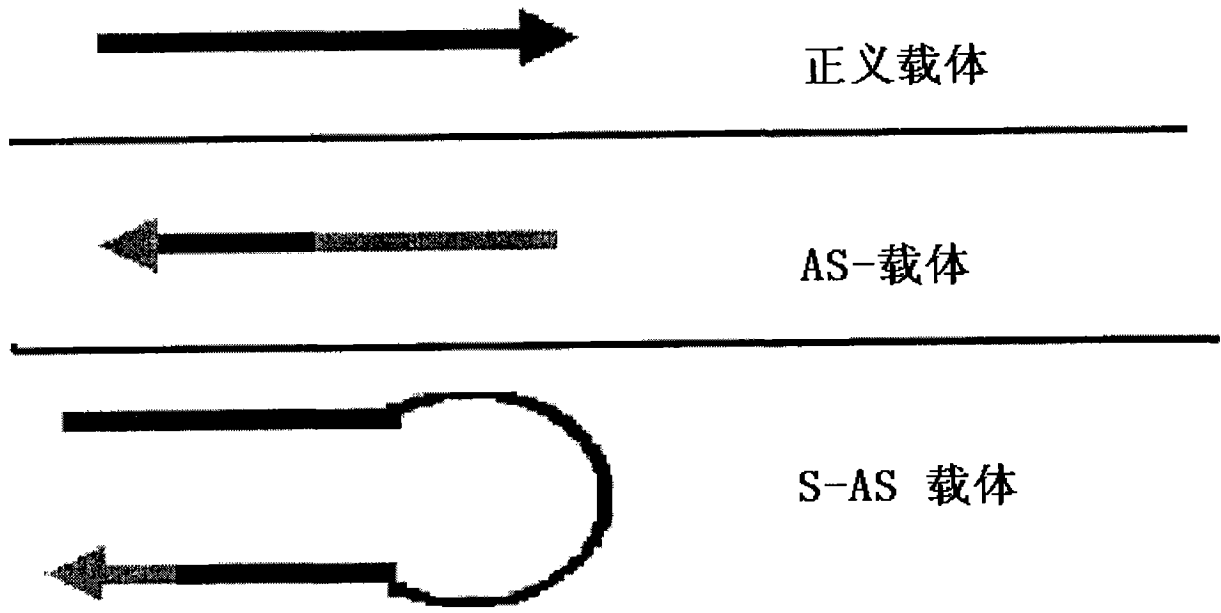


图 3B

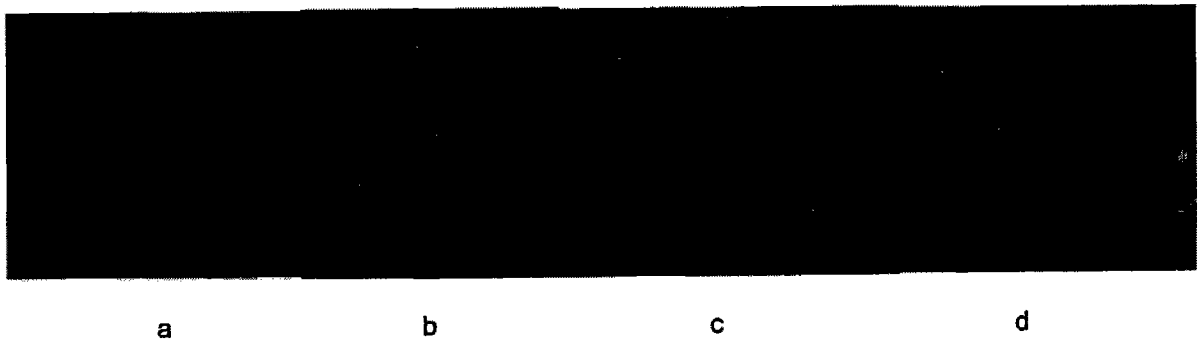


图 4

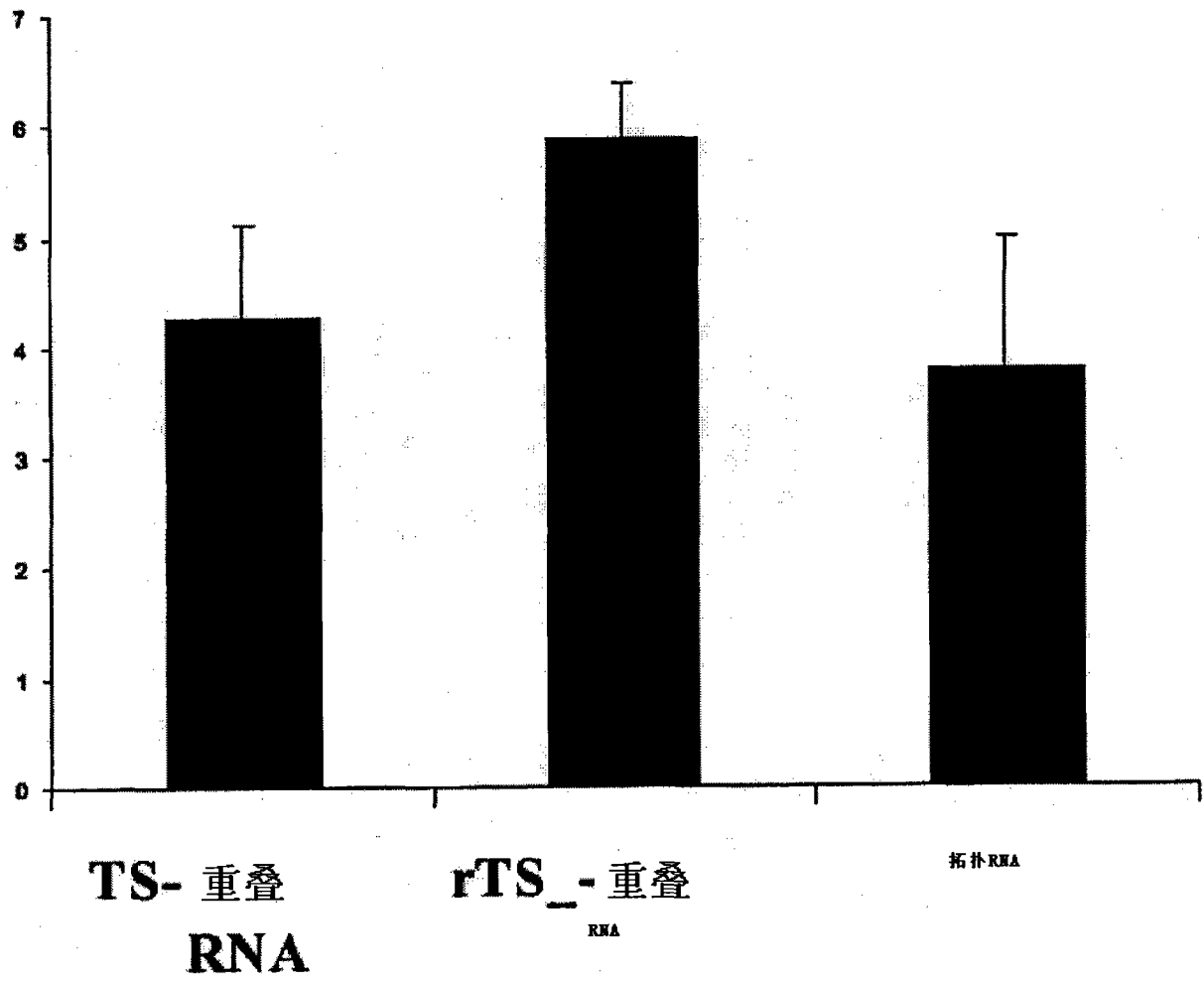


图 5

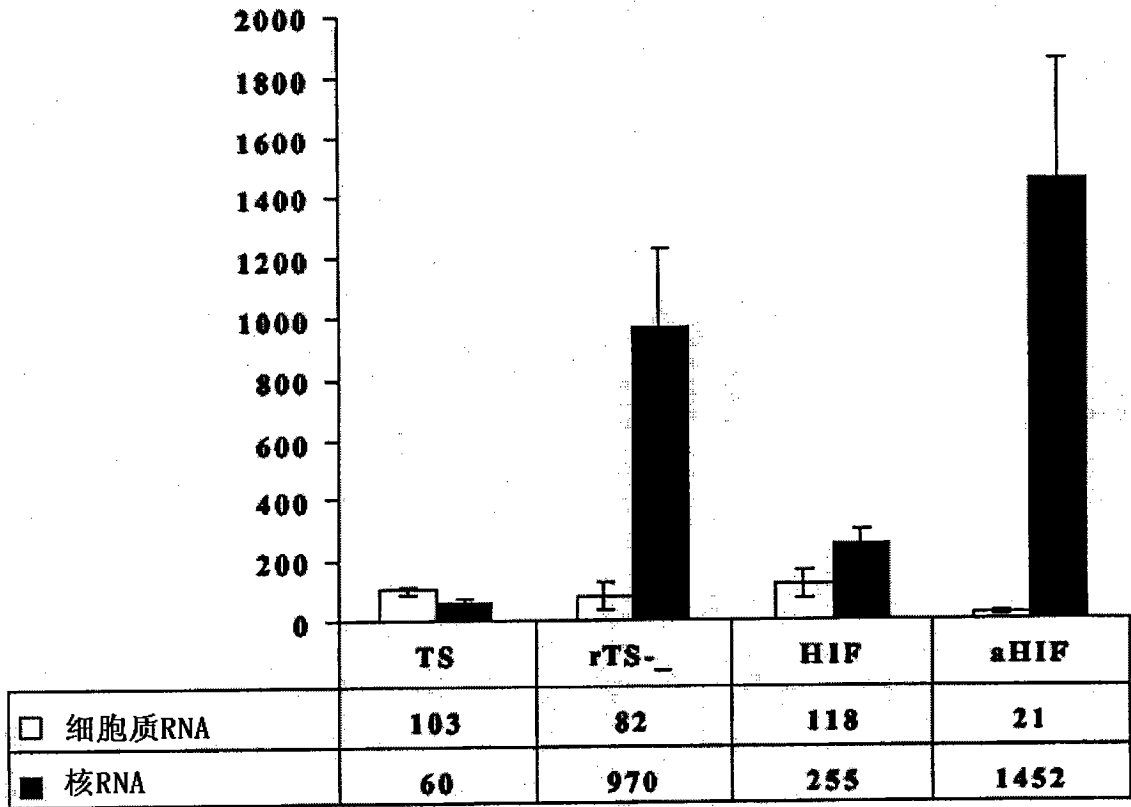


图 6

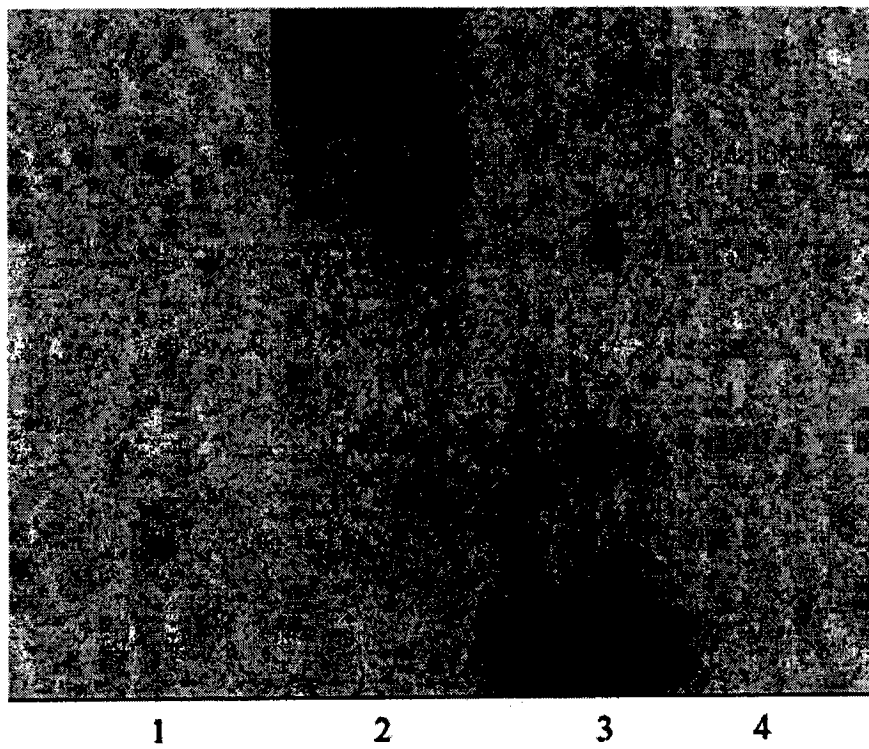


图 7

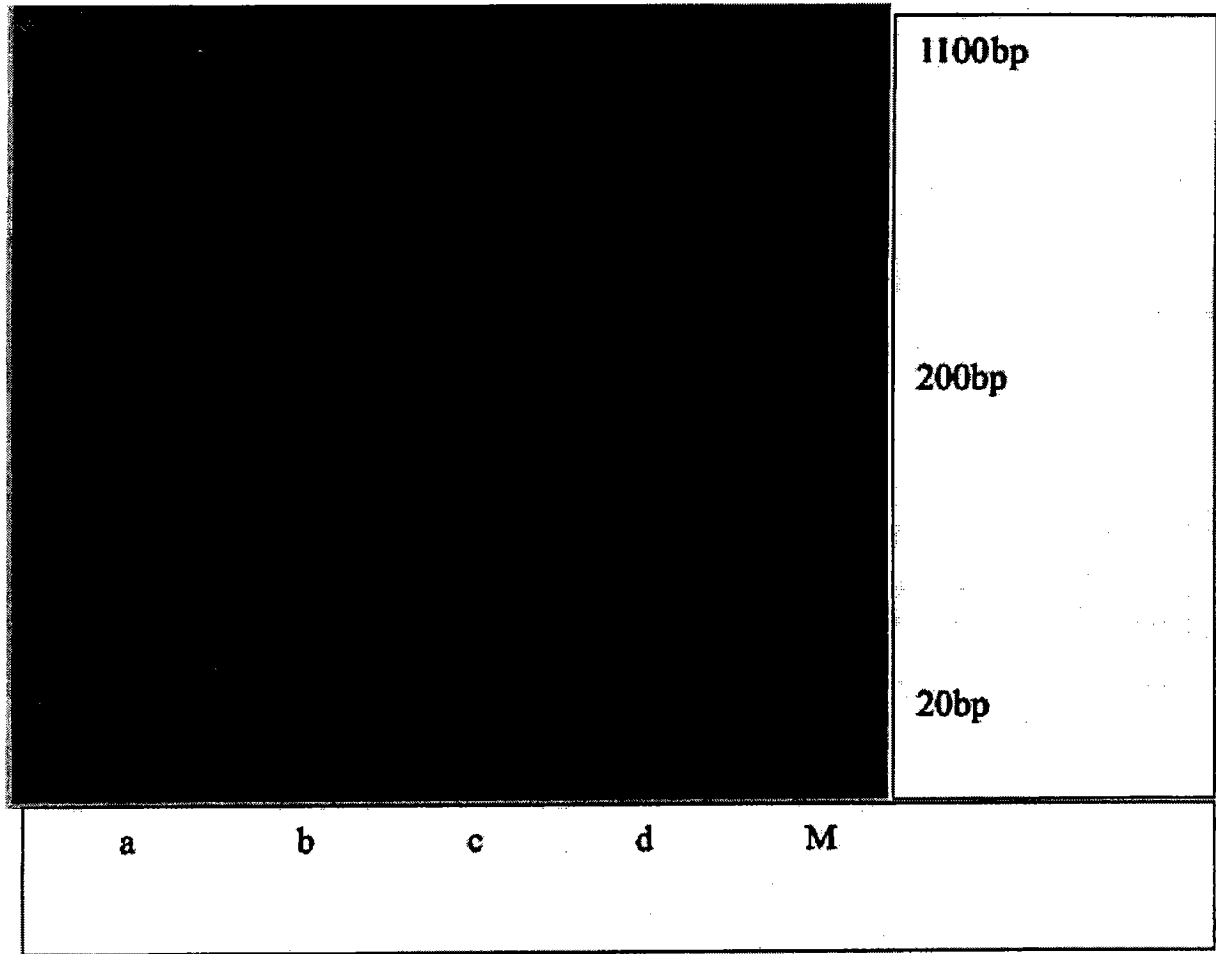


图 8

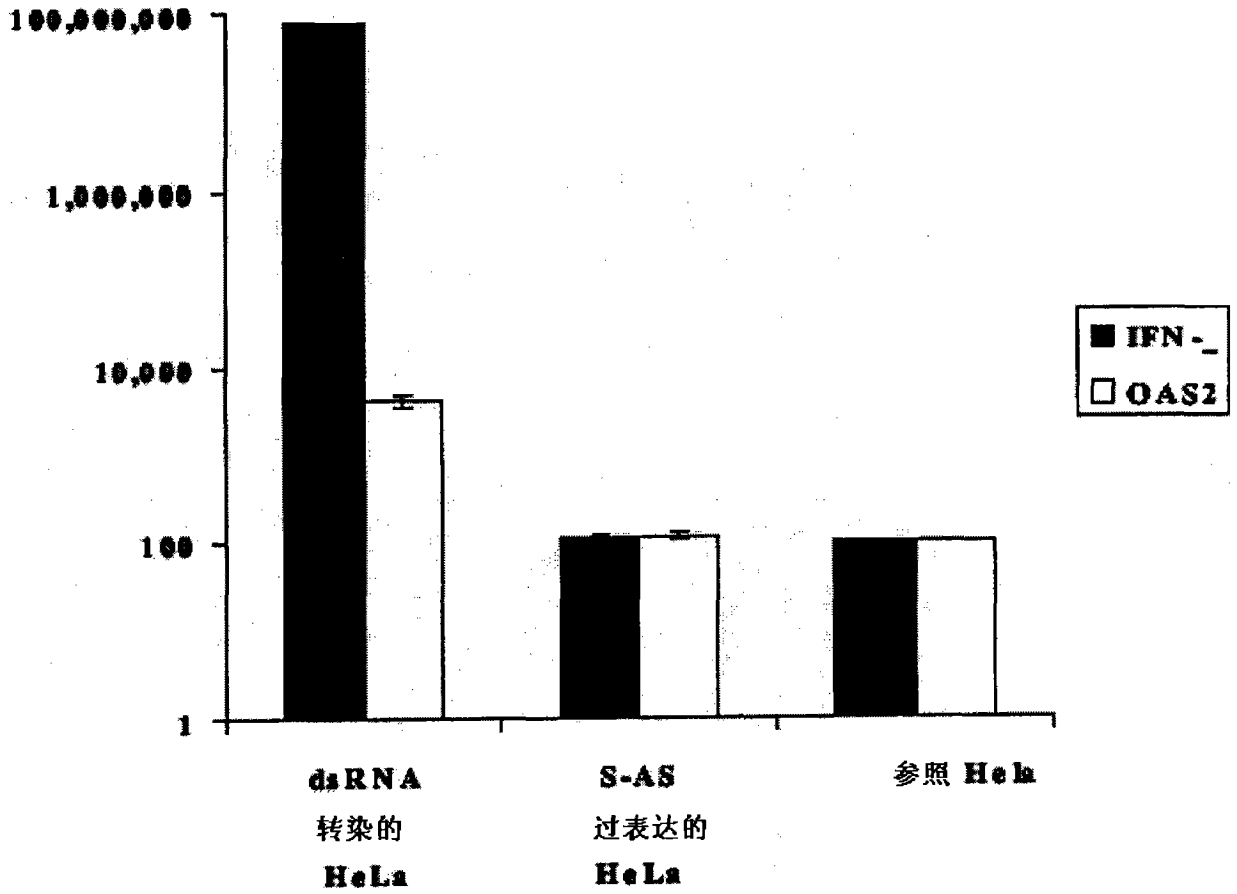


图 9

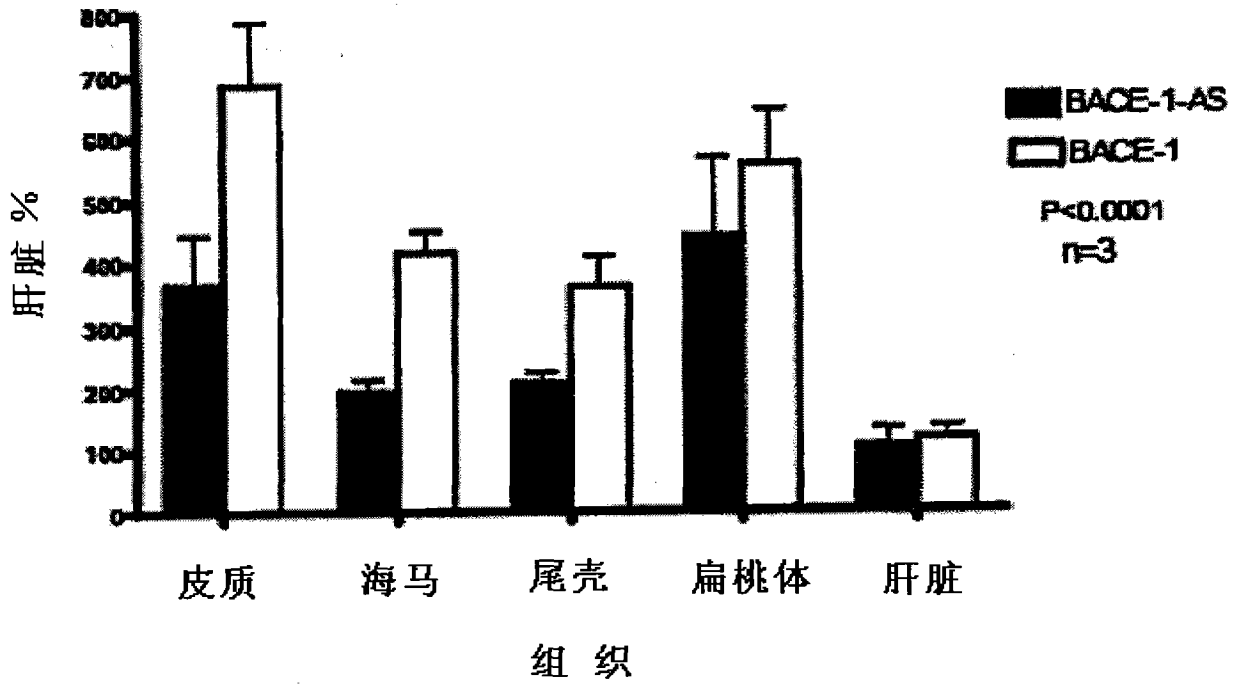


图 10A

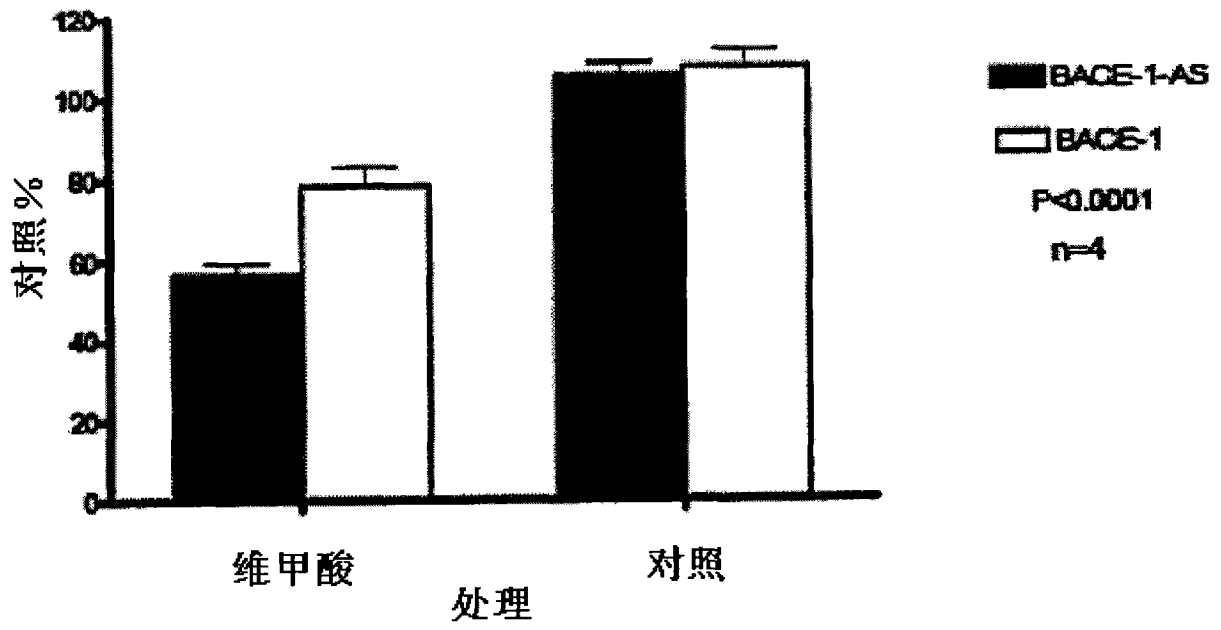


图 10B

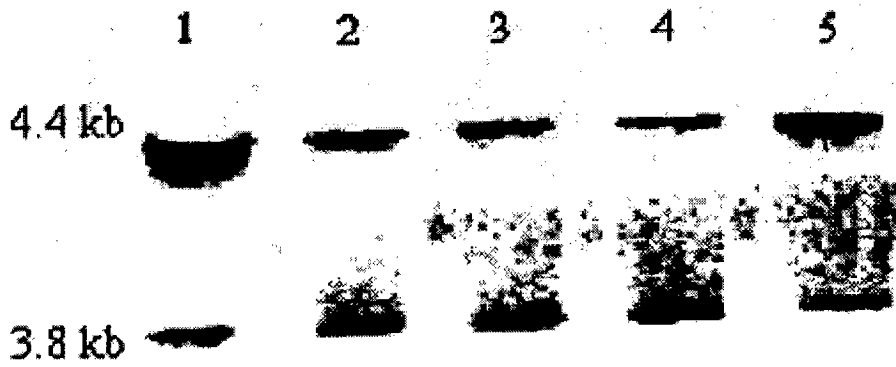


图 11A

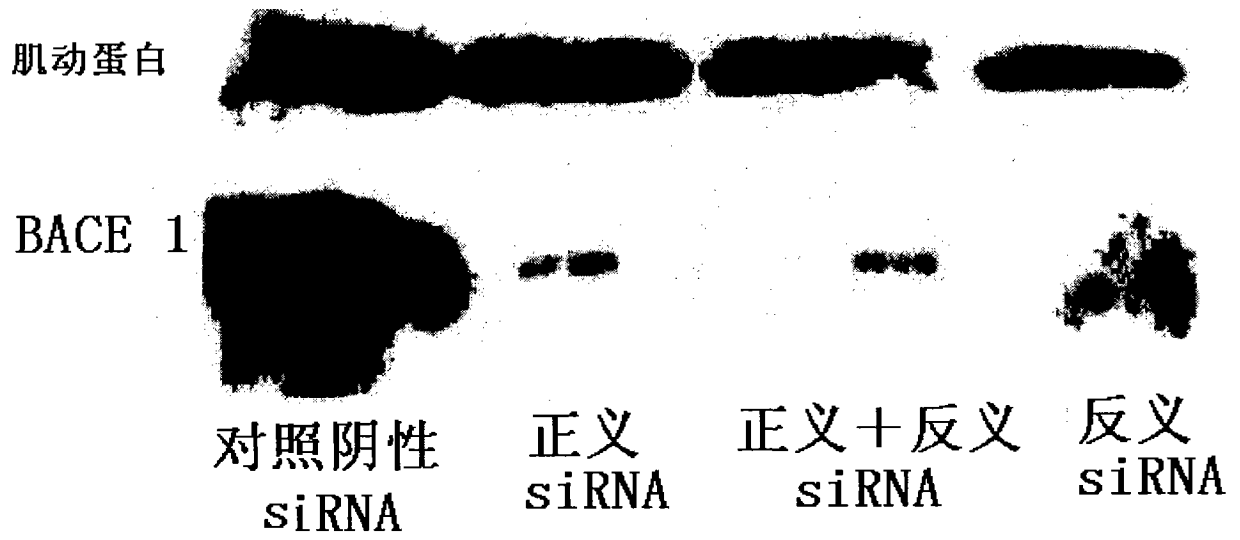


图 11B

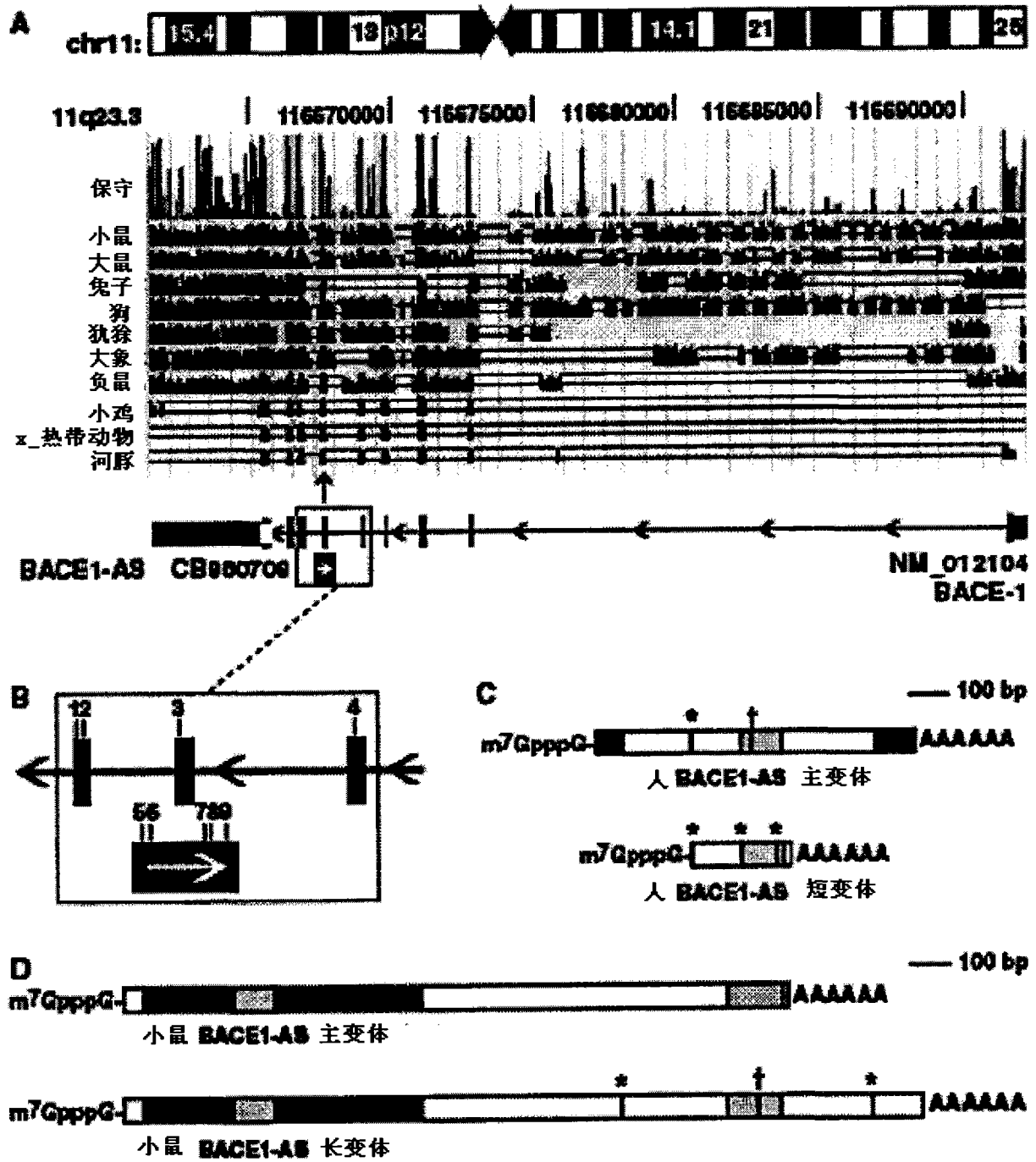


图 12A-12D

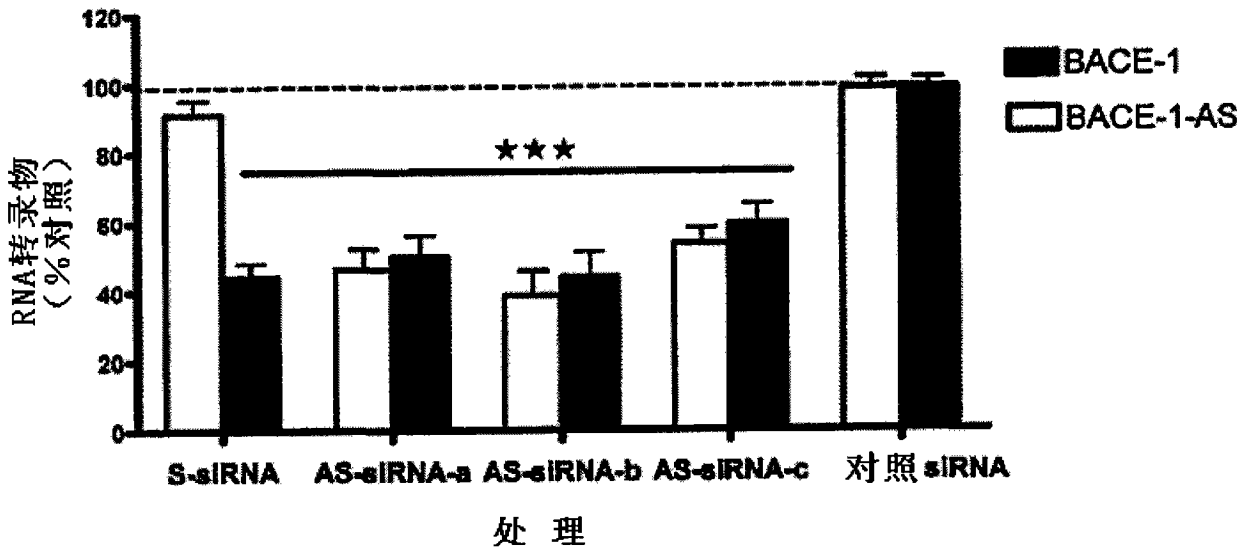


图 13A

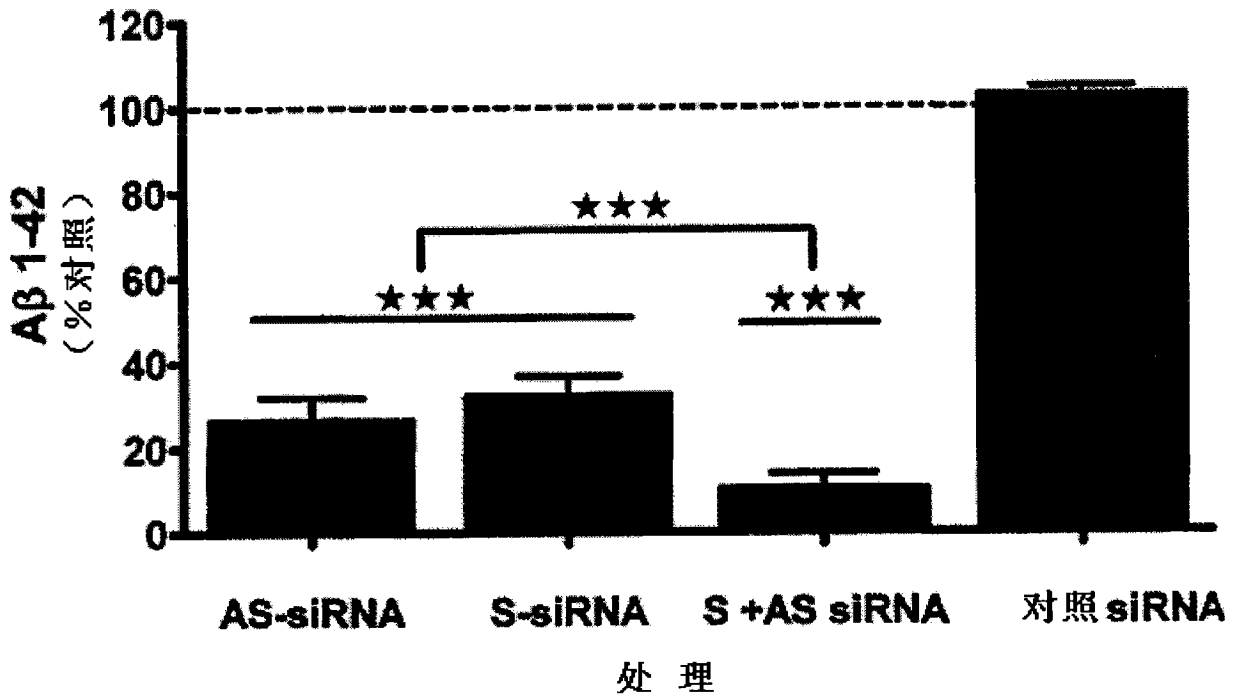


图 13B

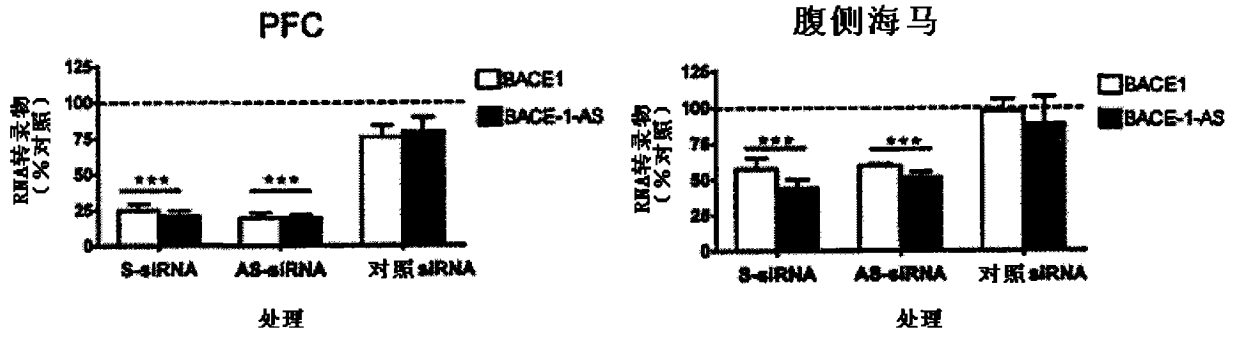


图 14A-14B

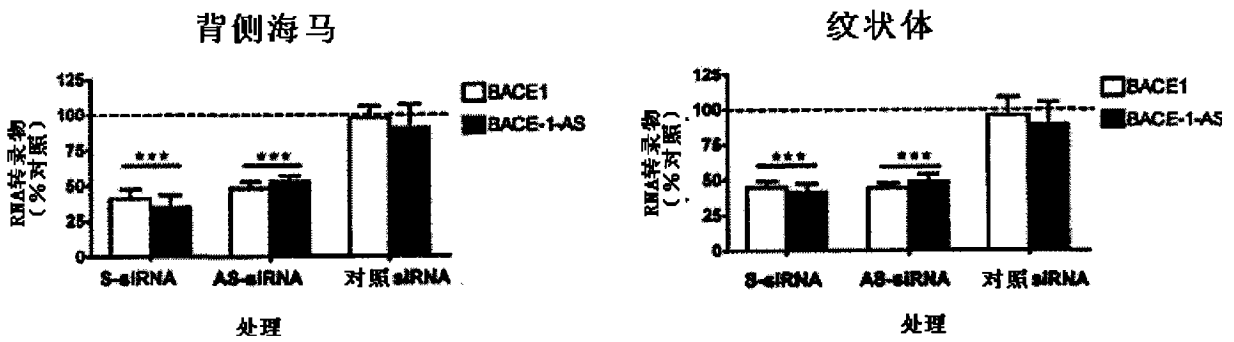


图 14C-14D

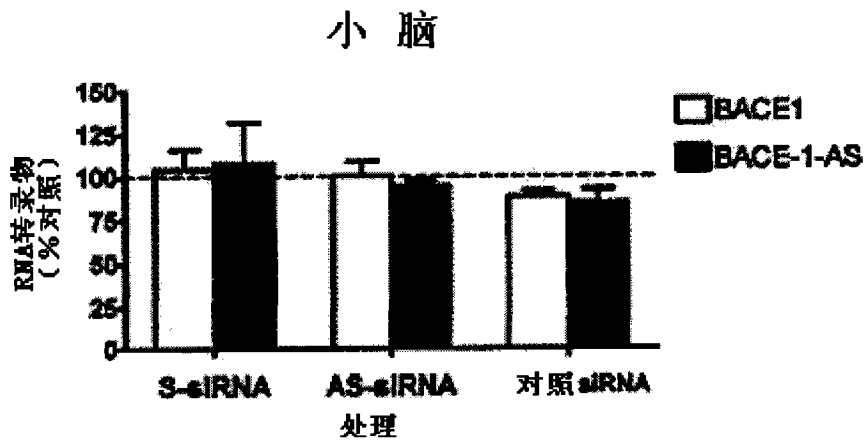


图 14E

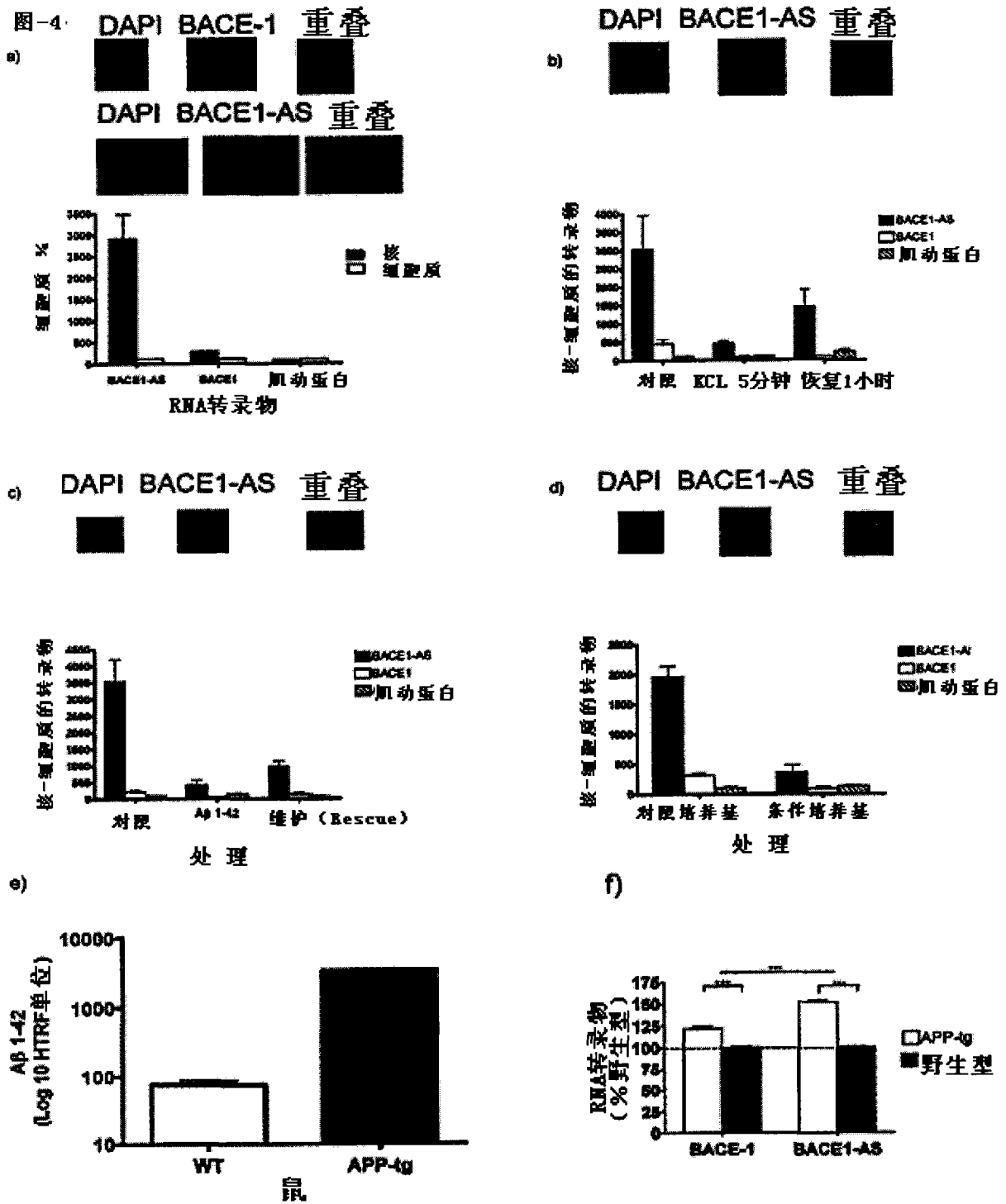
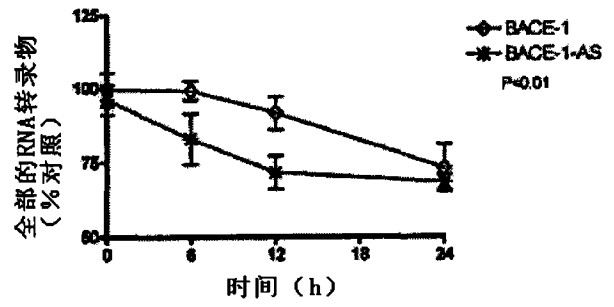
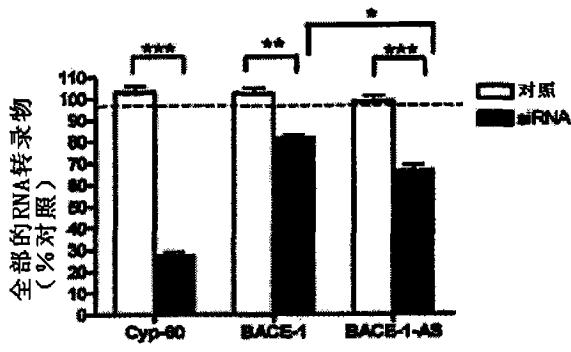
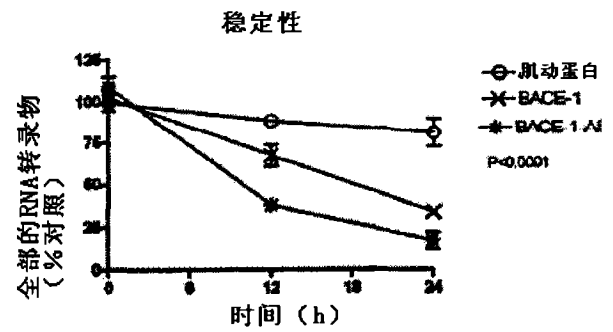
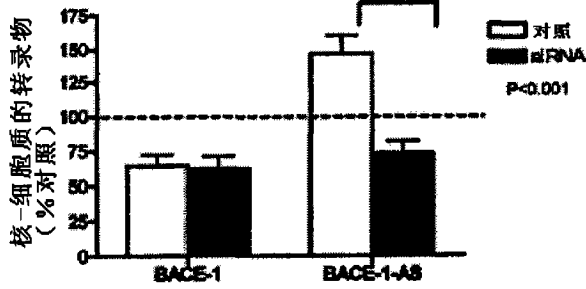


图 15A-15F



c)

d)



e)

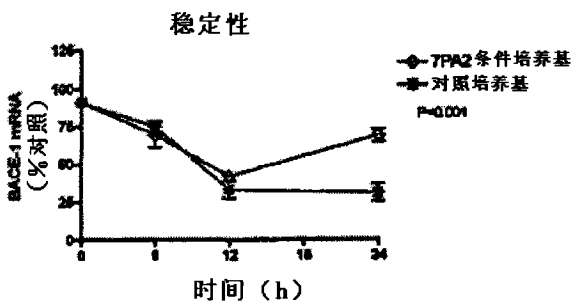


图 16A-16E

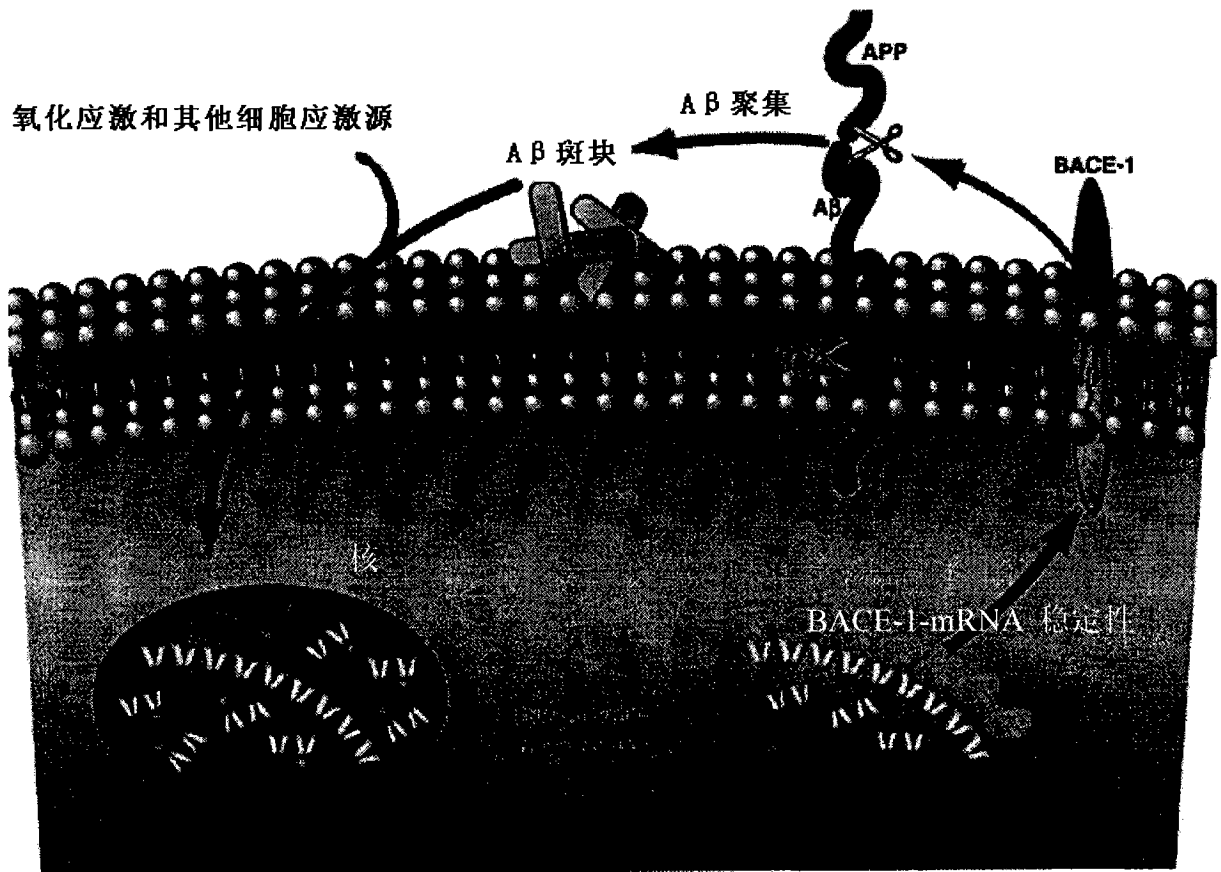


图 17