



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104293780 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201410395203. 5

(22) 申请日 2006. 05. 04

(30) 优先权数据

102005020874. 6 2005. 05. 04 DE

(62) 分案原申请数据

200680024585. 4 2006. 05. 04

(71) 申请人 诺松制药股份公司

地址 德国柏林

(72) 发明人 F·雅罗施 C·马奇 S·克鲁斯曼

A·沃特 D·尤尔伯格

W·普尔斯克 K·布赫纳

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁泉

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书88页

序列表16页 附图23页

(54) 发明名称

结合 HMGA 的核酸

(57) 摘要

在一个方面, 本发明涉及镜像异构体 (spiegelmer) 的新用途。在另一个方面, 本发明涉及结合 HMG- 蛋白的镜像异构体。具体而言, 本发明提供了能够特异性地与细胞内靶分子相互作用的物质类型。本发明涉及 L- 核酸作为细胞内活性剂的用途。

1. 结合 HMGA 的核酸,其特征在于,所述核酸包含盒 A1 区段和盒 A2 区段,其中盒 A1 区段和盒 A2 区段通过中间区段相互连接,和其中盒 A1 和盒 A2 单独地且相互独立地选自 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG,其特征不在于,所述中间区段由包含 6 或 7 个核苷酸的中间区段 Z1,或由包含 12 至 15 个核苷酸的中间区段 Z2 组成,并且所述核酸在盒 A1 区段的 5' - 末端具有第一区段,和在盒 A2 区段的 3' - 末端具有第二区段,其中优选地这两个区段相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸。

2. 权利要求 1 的结合 HMGA 的核酸,其特征不在于, HMGA 选自选自 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。

3. 权利要求 1 的结合 HMGA 的核酸,其特征不在于,中间区段 Z1 具有序列 $N_1N_2GN_8N_3N_4N_5$,其中

$N_1 = \text{U、C、A 或 G};$

$N_2 = \text{G 或 U};$

$N_3 = \text{U 或 C};$

$N_4 = \text{U 或 A};$

$N_5 = \text{G 或 A};$ 和

$N_8 = \text{U 或不存在}。$

4. 权利要求 3 的结合 HMGA 的核酸,其包含下列结构

螺旋 A1-N_x-螺旋 B1-N₆N₇盒 A1N₁N₂GN₈N₃N₄N₅盒 A2G-N_y-螺旋 B2-N_z-螺旋 A2

其中

$N_1 = \text{U、C、A 或 G};$

$N_2 = \text{G 或 U};$

$N_3 = \text{U 或 C};$

$N_4 = \text{U 或 A};$

$N_5 = \text{G 或 A};$

$N_6 = \text{G、A 或 U};$

$N_7 = \text{G 或 U};$

$N_8 = \text{U 或无核苷酸};$

$N_x = \text{0 至 5 个核苷酸};$

$N_y = \text{0 或 6 个核苷酸};$ 和

$N_z = \text{0 至 6 个核苷酸};$

盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自包括 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG 的核苷酸序列;

螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间完全或部分杂交;和

螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间完全或部分杂交并且杂交区域包含 4 至 8 个核苷酸,和其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

5. 权利要求 4 的结合 HMGA 的核酸, 其中结合 HMGA 的核酸的序列选自 SEQ. ID. No. 1、SEQ. ID. No. 2、SEQ. ID. No. 3、SEQ. ID. No. 5、SEQ. ID. No. 6、SEQ. ID. No. 7 和 SEQ. ID. No. 13。

6. 权利要求 3 的结合 HMGA 的核酸, 其由下列结构组成

螺旋 A1-N_x-螺旋 B1-N₆N₇盒 A1N₁N₂GN₈N₃N₄N₅盒 A2螺旋 B2-N_z-螺旋 A2

其中

N₁ = U、C、A 或 G ;

N₂ = G 或 U ;

N₃ = U 或 C ;

N₄ = U 或 A ;

N₅ = G 或 A ;

N₆ = G、A 或 U ;

N₇ = G 或 U ;

N₈ = U 或无核苷酸 ;

N_x = 0 至 5 个核苷酸 ; 和

N_z = 0 至 6 个核苷酸 ;

盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自包括 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG 的核苷酸序列 ;

螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸, 其中优选地螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间完全或部分杂交 ; 和

螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸, 其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间完全或部分杂交并且杂交区域包含 4 至 8 个核苷酸, 和其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

7. 权利要求 6 的结合 HMGA 的核酸, 其中结合 HMGA 的核酸的序列是 SEQ. ID. No. 3。

8. 权利要求 3 的结合 HMGA 的核酸, 其由下列结构组成

螺旋 B1-N₆N₇盒 A1N₁N₂GN₈N₃N₄N₅盒 A2G-N_y-螺旋 B2

其中

N₁ = U、C、A 或 G ;

N₂ = G 或 U ;

N₃ = U 或 C ;

N₄ = U 或 A ;

N₅ = G 或 A ;

N₆ = G、A 或 U ;

N₇ = G 或 U ;

N₈ = U 或无核苷酸 ; 和

N_y = 0 至 6 个核苷酸 ;

盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自包括 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG 的核

核苷酸序列 ;和

螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间完全或部分杂交并且杂交区域包含 4 至 8 个核苷酸,和其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

9. 权利要求 3 的结合 HMGA 的核酸,其由下列结构组成



其中

$\text{N}_1 = \text{U、C、A 或 G};$

$\text{N}_2 = \text{G 或 U};$

$\text{N}_3 = \text{U 或 C};$

$\text{N}_4 = \text{U 或 A};$

$\text{N}_5 = \text{G 或 A};$

$\text{N}_6 = \text{G、A 或 U};$

$\text{N}_7 = \text{G 或 U};$ 和

$\text{N}_8 = \text{U 或无核苷酸};$

盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自包括 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG 的核苷酸序列 ;和

螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间完全或部分杂交并且杂交区域包含 4 至 8 个核苷酸,和其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

10. 权利要求 8 的结合 HMGA 的核酸,其中结合 HMGA 的核酸的序列选自 SEQ. ID. No. 15 和 SEQ. ID. No. 16。

11. 权利要求 1 的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,中间区段 Z2 包含螺旋 C1 区段和螺旋 C2 区段。

12. 权利要求 11 的结合 HMGA 的核酸,其由下列结构组成 :



其中

$\text{N}_a = 1 \text{ 至 } 5 \text{ 个核苷酸};$

$\text{N}_b = 3 \text{ 个核苷酸};$

$\text{N}_c = 3 \text{ 至 } 5 \text{ 个核苷酸};$

$\text{N}_d = 2 \text{ 至 } 5 \text{ 个核苷酸};$ 和

$\text{N}_e = 1 \text{ 至 } 2 \text{ 个核苷酸, 优选 A 或 UU};$

盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG ;

螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 5 或 6 个核苷酸 ;和

螺旋 C1 和螺旋 C2 区段各包含 5 或 6 个核苷酸,其优选地相互之间完全或部分杂交。

13. 权利要求 12 的结合 HMGA 的核酸, 其中结合 HMGA 的核酸的序列选自 SEQ. ID. No. 8、SEQ. ID. No. 9、SEQ. ID. No. 10、SEQ. ID. No. 11、SEQ. ID. No. 14、SEQ. ID. No. 22 和 SEQ. ID. No. 24。

14. 权利要求 11 的结合 HMGA 的核酸, 其由下列结构组成:

螺旋 A1-N_i-螺旋 B1-N_j-盒 A1-A-螺旋 C1-N_c-螺旋 C2-G-盒 A2-G-螺旋 B2-A-螺旋 A2

其中

N_i 包含 2 个核苷酸, 优选是 CA;

N_j 包含 2 个核苷酸, 优选是 AG;

N_c 包含 4 个核苷酸, 优选是 GAUG;

盒 A1 和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自序列 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG;

螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且独立地各包含 6 个核苷酸, 其优选地相互杂交;

螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且独立地各包含 5 个核苷酸, 其中优选地螺旋 B1 区段和螺旋 B2 区段相互杂交; 和

螺旋 C1 和螺旋 C2 区段单独地且独立地各包含 3 个核苷酸, 其中优选地螺旋 C1 和螺旋 C2 区段相互杂交。

15. 权利要求 14 的结合 HMGA 的核酸, 其中结合 HMGA 的核酸的序列是 SEQ. ID. No. 12。

16. 用于检测 HMGA 的试剂盒, 其包括权利要求 1 至 15 中任一项的结合 HMGA 的核酸。

17. 包含 HMGA 蛋白和权利要求 1 至 15 中任一项的结合 HMGA 的核酸的复合物。

结合 HMGA 的核酸

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 5 月 4 日、申请号为 200680024585.4、发明名称为“镜像异构体的新用途”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 在一个方面,本发明涉及镜像异构体 (spiegelmer) 的新用途。在另一个方面,本发明涉及结合 HMG- 蛋白的镜像异构体。

背景技术

[0003] 随着分子医学的进步,使得可能鉴定牵涉疾病或疾病状态的靶分子和特异性地对这些分子产生影响从而治疗或预防所述疾病或疾病状态或者至少减轻与之相关的症状。原则上可将靶分子分成两类。第一类包括这样的靶分子,其存在于细胞外,并原则上可通过将活性物质施用入包含所述靶分子的体液或体腔中来使其与活性物质接触。第一类靶分子在此也称为细胞外靶分子。第二类靶分子包括存在于细胞内的靶分子,其中这些细胞与待治疗的疾病有关或与对于所述疾病的易感有关。因此并不要求,所述靶分子对于所述疾病状态直接负责或与对于所述疾病的易感直接相关。更确切地说,各个靶分子参与其过程受到活性物质影响的作用级联反应,从而所述活性物质适合用于治疗或预防该疾病,这就足够了。第二类靶分子在此也称为细胞内靶分子。

[0004] 靶分子即细胞外或细胞内靶分子的性质原则上决定了结合类型,通过所述结合类型可尝试提供对于治疗或预防作用来说必需的在活性物质(通常为药理学活性物质)和靶分子之间的相互作用。几乎普遍使用所谓的小分子,即分子量通常为 1000 道尔顿或更小的化合物。这些分子可以以希望的方式直接与细胞外靶分子相互作用,还与细胞内靶分子相互作用。

[0005] 在该背景下,通过生物技术工业已开发了新的活性物质类型,例如抗体,特别是单克隆抗体、反义分子、siRNA 分子、适体 (Aptamer) 和镜像异构体。尽管这些分子类型中的一些仍然处于临床研究的初期,但至少在抗体和反义分子的情况下存在已在临床中使用的产品。然而,当需要寻找细胞内靶分子时,使用这些新物质类型也存在重大问题。因此,例如,抗体的细胞内使用目前仍然还是不可能的,至少在允许在患者中常规使用针对细胞内靶分子的抗体以用于治疗和 / 或预防的范围内或方法和方式上是不可能的。此外,其他新的活性物质类型,特别是反义分子和 siRNA 分子,由于其作用机制,必须被导入各个包含靶分子或编码靶分子的基因的细胞内。活性物质的靶向给予(也称为递送)对于这些物质类型来说也是目前临床应用的限制因素。

[0006] 对于适体和镜像异构体,即具有允许与各自靶分子特异性地相互作用的确定的三维结构的功能性核酸,也是如此。为了找到细胞内存在靶分子而使用适体,在此利用基因技术学的方法,更明确地说基因疗法。通过基因技术学方法将针对细胞内靶分子的适体(也称为 intramer)引入各自的靶细胞中。然而种类型的方法同样也受到相当多的限制,尤其是由于缺乏基于基因疗法的治疗方法的接受性。特别地,因为不存在能够合成镜像异构体

即由 L- 核苷酸组成的适体的生物系统,所以在 intramer 的情况下所采用的在细胞内编码各适体的核酸的细胞内表达的途径对于镜像异构体基本上是关闭的。

[0007] 因此,本发明的目的是提供能够特异性地与细胞内靶分子即存在于细胞中的靶分子相互作用的物质类型。

发明内容

[0008] 根据本发明,通过所附的独立权利要求的主题而实现了该目的。在从属权利要求中公开了优选实施方案。

[0009] 根据本发明,根据独立权利要求的主题实现了该基本目的。优选的实施方案公开于从属权利要求中。

[0010] 根据本发明的第一个方面,通过使用 L- 核酸作为细胞内活性剂实现了该目的。

[0011] 在第一个方面的第一个实施方案中,所述 L- 核酸是镜像异构体。

[0012] 在第一个方面的第二个实施方案(其也是第一个实施方案的一个实施方案)中,所述 L- 核酸与细胞内受体相互作用。

[0013] 在第一个方面的第三个实施方案(其也是第二个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内受体选自分子受体、酶、伴侣分子、信号肽、细胞内结构和代谢中间体。

[0014] 在第一个方面的第四个实施方案(其也是第二个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内受体选自多肽、糖类、核酸、脂质和其组合。

[0015] 在第一个方面的第五个实施方案(其也是第二、第三和第四个实施方案的一个实施方案)中,所述 L- 核酸在细胞内与细胞内受体相互作用。

[0016] 在第一个方面的第六个实施方案(其也是第二、第三、第四和第五个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内受体选自转录因子和结合 AT- 钩的 DNA 结合蛋白。

[0017] 在第一个方面的第七个实施方案(其也是第六个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内受体选自 HMG- 蛋白,优选选自 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。

[0018] 根据本发明的第二个方面,通过用于结合细胞内受体的方法实现了该目的,所述方法包括:

[0019] - 提供包含至少一种细胞内受体的细胞,

[0020] - 提供 L- 核酸,和

[0021] - 将细胞和 L- 核酸一起温育。

[0022] 在第二个方面的第一个实施方案中,在使所述 L- 核酸在细胞内结合细胞内受体的条件下进行温育。

[0023] 在第二个方面的第二个实施方案(其也是第一个实施方案的一个实施方案)中,所述 L- 核酸是镜像异构体。

[0024] 在第二个方面的第三个实施方案(其也是第一和第二个实施方案的一个实施方案)中,在温育细胞和 L- 核酸后,测定所述 L- 核酸是否与所述细胞内受体结合,特别是细胞内结合。

[0025] 在第二个方面的第四个实施方案(其也是第一、第二和第三个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内受体选自分子受体、代谢中间体和酶。

[0026] 在第二个方面的第五个实施方案(其也是第一、第二、第三和第四个实施方案的

一个实施方案)中,所述细胞内受体选自多肽、糖类、核酸、脂质和其组合。

[0027] 在第二个方面的第六个实施方案(其也是第一、第二、第三、第四和第五个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内受体选自转录因子和结合 AT- 钩的 DNA 结合蛋白。

[0028] 在第二个方面的第七个实施方案(其也是第六个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内受体选自 HMG- 蛋白,优选选自 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。

[0029] 根据本发明的第三个方面,通过使用 L- 核酸来制备用于治疗 and / 或预防疾病的药物实现了该目的,其中所述药物的靶分子是细胞内靶分子。

[0030] 在第三个方面的第一个实施方案中,所述细胞内受体选自分子受体、酶、伴侣分子、信号肽、细胞内结构和代谢中间体。

[0031] 在第三个方面的第二个实施方案(其也是第一个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内受体选自多肽、糖类、核酸、脂质和其组合。

[0032] 在第三个方面的第三个实施方案(其也是第一和第二个实施方案的一个实施方案)中,所述靶分子选自转录因子和结合 AT- 钩的 DNA 结合蛋白。

[0033] 在第三个方面的第四个实施方案(其也是第三个实施方案的一个实施方案)中,所述靶分子选自 HMG- 蛋白,优选选自 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。

[0034] 在第三个方面的第五个实施方案(其也是第三和第四个实施方案的一个实施方案)中,所述疾病选自肿瘤疾病、病毒感染和动脉硬化。

[0035] 在第三个方面的第六个实施方案(其也是第五个实施方案的一个实施方案)中,所述肿瘤疾病选自间充质肿瘤、上皮肿瘤、良性肿瘤、恶性肿瘤和转移性肿瘤。

[0036] 在第三个方面的第七个实施方案(其也是第三、第四、第五和第六个实施方案的一个实施方案)中,所述靶分子是 HMGA,和所述疾病选自前列腺、胰腺、甲状腺、子宫颈、胃、乳腺、结肠 / 直肠、卵巢的癌症;成神经细胞瘤;淋巴瘤;子宫平滑肌瘤;脂肪瘤;子宫内膜息肉;肺的软骨样错构瘤;头唾液腺(Kopfspeicheldrüsen)的多形性腺瘤;血管外皮细胞瘤;软骨瘤;侵袭性血管粘液瘤;弥漫性星形细胞瘤;破骨细胞瘤;皮肤癌;伯基特淋巴瘤;路易斯肺癌(Lewis-Lungenkrebs);白血病;非小细胞肺癌;和各自地其转移和 / 或转移形式。

[0037] 在第三个方面的第八个实施方案(其也是第五个实施方案的一个实施方案)中,通过由 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 / 或 HMGA2 介导的动脉硬化斑的形成而引起或导致所述动脉硬化。

[0038] 在第三个方面的第九个实施方案(其也是第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七和第八个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内靶分子存在于细胞内。

[0039] 根据本发明的第四个方面,通过使用 L- 核酸来制备用于诊断的诊断剂实现了该目的,其中所述诊断剂的靶分子是细胞内靶分子。

[0040] 在第四个方面的第一个实施方案中,所述细胞内受体选自分子受体、酶、伴侣分子、信号肽、细胞内结构和代谢中间体。

[0041] 在第四个方面的第二个实施方案(其也是第一个实施方案的一个实施方案)中,所述细胞内受体选自多肽、糖类、核酸、脂质和其组合。

[0042] 在第四个方面的第三个实施方案(其也是第一和第二个实施方案的一个实施方案)中,所述靶分子选自转录因子和结合 AT- 钩的 DNA 结合蛋白。

[0043] 在第四个方面的第四个实施方案（其也是第三个实施方案的一个实施方案）中，所述靶分子选自 HMG- 蛋白，优选选自 HMGA、HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。

[0044] 在第四个方面的第五个实施方案（其也是第三和第四个实施方案的一个实施方案）中，所述疾病选自肿瘤疾病、病毒感染和动脉硬化。

[0045] 在第四个方面的第六个实施方案（其也是第五个实施方案的一个实施方案）中，所述肿瘤疾病选自间充质肿瘤、上皮肿瘤、良性肿瘤、恶性肿瘤和转移性肿瘤。

[0046] 在第四个方面的第七个实施方案（其也是第三、第四、第五和第六个实施方案的一个实施方案）中，所述靶分子是 HMGA，和所述疾病选自前列腺、胰腺、甲状腺、子宫颈、胃、乳腺、结肠 / 直肠、卵巢的癌症；成神经细胞瘤；淋巴瘤；子宫平滑肌瘤；脂肪瘤；子宫内膜息肉；肺的软骨样错构瘤；头唾液腺的多形性腺瘤；血管外皮细胞瘤；软骨瘤；侵袭性血管粘液瘤；弥漫性星形细胞瘤；破骨细胞瘤；皮肤癌；伯基特淋巴瘤；路易斯肺癌；白血病；非小细胞肺癌；和各自地其转移和 / 或转移形式。

[0047] 在第四个方面的第八个实施方案（其也是第五个实施方案的一个实施方案）中，通过由 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 / 或 HMGA2 介导的动脉硬化斑的形成而引起所述动脉硬化。

[0048] 在第四个方面的第九个实施方案（其也是第一、第二、第三、第四、第五、第六和第七个实施方案的一个实施方案）中，所述细胞内靶分子存在于细胞内。

[0049] 根据本发明的第五个方面，通过包含结合细胞内靶分子的 L- 核酸和递送媒介物的组合物实现了该目的。

[0050] 在第五个方面的第一个实施方案中，所述递送媒介物是适合于所述 L- 核酸的细胞内递送的递送媒介物。

[0051] 在第五个方面的第二个实施方案（其也是第一个实施方案的一个实施方案）中，所述递送媒介物选自载体、缀合物和物理手段。

[0052] 在第五个方面的第三个实施方案（其也是第二个实施方案的一个实施方案）中，所述递送媒介物是载体，其中所述载体选自脂质体、纳米颗粒、微粒、环糊精或树枝状聚合物，或者是由多肽、聚氮丙啶和 / 或两亲性分子组成的囊泡。

[0053] 在第五个方面的第四个实施方案（其也是第二个实施方案的一个实施方案）中，所述递送媒介物是缀合物，其中所述缀合物是用于受体介导的胞吞作用的缀合物，具有融合肽的缀合物，具有信号肽的缀合物，具有核酸的缀合物，优选具有镜像异构体的缀合物，或者是亲脂缀合物。

[0054] 在第五个方面的第五个实施方案（其也是第二个实施方案的一个实施方案）中，所述递送媒介物是物理手段，其中所述手段优选选自电穿孔、离子电渗、压力、超声波和冲击波。

[0055] 在第五个方面的第六个实施方案（其也是第三个实施方案的一个实施方案）中，所述递送媒介物包含聚氮丙啶。

[0056] 在第五个方面的第七个实施方案（其也是第六个实施方案的一个实施方案）中，所述聚氮丙啶是分子量为大约 25kDa 的分枝的聚氮丙啶。

[0057] 在第五个方面的第八个实施方案（其也是第六和第七个实施方案的一个实施方案）中，所述聚氮丙啶形成微团或微团样结构。

[0058] 在第五个方面的第九个实施方案（其也是第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七和第八个实施方案的一个实施方案）中，所述 L- 核酸是镜像异构体。

[0059] 在第五个方面的第十个实施方案（其也是第九个实施方案的一个实施方案）中，所述镜像异构体具有修饰，其中所述修饰选自 PEG- 残基。

[0060] 在第五个方面的第十一个实施方案（其也是第十个实施方案的一个实施方案）中，所述 PEG- 残基具有大约 1,000 至 10,000Da 的分子量，优选大约 1,500 至 2,500Da 的分子量，和最优选大约 2,000Da 的分子量。

[0061] 在第五个方面的第十二个实施方案（其也是第十和第十一个实施方案的一个实施方案）中，所述修饰结合至 L- 核酸的 5' 末端或 3' - 末端。

[0062] 在第五个方面的第十三个实施方案（其也是第九、第十、第十一和第十二个实施方案的一个实施方案）中，在所述组合物中，聚氮丙啶的氮基团的总数目对在所述组合物中包含的核酸的磷酸基团的总数目的比率为大约 1 至 20，优选大约 1.5 至 10，更优选大约 2 至 5，和最优选大约 2 至 3。

[0063] 在第五个方面的第十四个实施方案（其也是第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二和第十三个实施方案的一个实施方案）中，所述组合物在细胞内提供 L- 核酸。

[0064] 根据本发明的第六个方面，通过包含第五个方面的组合物和药学上可接受的载体的药物组合物实现了该目的。

[0065] 在第一个方面的用途的一个实施方案中，所述 L- 核酸是第五个方面的组合物。

[0066] 在第二个方面的方法的一个实施方案中，所述 L- 核酸是第五个方面的组合物。

[0067] 在第三个方面的用途的一个实施方案中，所述 L- 核酸是第五个方面的组合物。

[0068] 在第四个方面的用途的一个实施方案中，所述 L- 核酸是第五个方面的组合物。

[0069] 根据本发明的第七个方面，通过结合 HMGA 的核酸实现了该目的，其特征在于，所述核酸包含盒 A1 区段和盒 A2 区段，其中盒 A1 区段和盒 A2 区段通过中间区段相互连接，和其中盒 A1 和盒 A2 单独地且相互独立地选自 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG。

[0070] 在第七个方面的第一个实施方案中，所述中间区段由包含 6 或 7 个核苷酸的中间区段 Z1，或由包含 12 至 15 个核苷酸的中间区段 Z2 组成。

[0071] 在第七个方面的第二个实施方案（其也是第一个实施方案的一个实施方案）中，所述核酸在盒 A1 区段的 5' - 末端具有第一区段，和在盒 A2 区段的 3' - 末端具有第二区段，其中优选地这两个区段相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸。

[0072] 在第七个方面的第三个实施方案（其也是第二个实施方案的一个实施方案）中，所述两个区段相互之间至少部分或完全杂交，其中所述杂交在 4 至 8 个核苷酸对上延伸。

[0073] 在第七个方面的第四个实施方案（其也是第二和第二个实施方案的一个实施方案）中，所述核酸在盒 A1 区段的 5' - 末端具有螺旋 A1 区段，和在盒 A2 区段的 3' - 末端具有螺旋 A2 区段，其中优选地所述螺旋 A1 区段包含 4 至 8 个核苷酸和优选地所述螺旋 A2 区段包含 4 至 8 个核苷酸，和其中优选地所述螺旋 A1 区段是在盒 A1 区段的 5' - 末端的第一区段或其部分，和其中优选地所述螺旋 A2 区段是在盒 A2 区段的 3' - 末端的第二区段或其部分，其中螺旋 A1 区段的长度不依赖于螺旋 A2 区段的长度。

[0074] 在第七个方面的第五个实施方案（其也是第四个实施方案的一个实施方案）中，

螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间至少部分或完全杂交,其中所述杂交在 4 至 8 个核苷酸对上延伸。

[0075] 在第七个方面的第六个实施方案(其也是第四和第五个实施方案的一个实施方案)中,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间布置螺旋 B1 区段,和在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置螺旋 B2 区段,其中优选地所述螺旋 B1 和螺旋 B2 区段的长度单独地且独立地各包含 4 至 8 个核苷酸的长度。

[0076] 在第七个方面的第七个实施方案(其也是第六个实施方案的一个实施方案)中,螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间至少部分或完全杂交,其中所述杂交在 4 至 8 个核苷酸对上延伸。

[0077] 在第七个方面的第八个实施方案(其也是第六和第七个实施方案的一个实施方案)中,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和螺旋 B1 区段的 5'-末端之间布置 0 至 5 个核苷酸。

[0078] 在第七个方面的第九个实施方案(其也是第八个实施方案的一个实施方案)中,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和螺旋 B1 区段的 5'-末端之间布置 2 个核苷酸。

[0079] 在第七个方面的第十个实施方案(其也是第六、第七、第八和第九个实施方案的一个实施方案)中,在螺旋 B2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置 0 至 6 个核苷酸。

[0080] 在第七个方面的第十一个实施方案(其也是第十个实施方案的一个实施方案,优选地在第十个实施方案为第九个实施方案的一个实施方案的情况下)中,在螺旋 B2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置 1 个核苷酸。

[0081] 在第七个方面的第十二个实施方案(其也是第六、第七、第八、第九、第十和第十一个实施方案的一个实施方案)中,螺旋 A1 区段和螺旋 B1 区段的核苷酸总数为 10 至 12 个核苷酸,以及螺旋 A2 区段和螺旋 B2 区段的核苷酸总数为 10 至 12 个核苷酸。

[0082] 在第七个方面的第十三个实施方案(其也是第十二个实施方案的一个实施方案)中,来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

[0083] 在第七个方面的第十四个实施方案(其也是第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二和第十三个实施方案,优选地第六或第七个实施方案的一个实施方案)中,所述核酸不包含螺旋 A1 和螺旋 A2 区段,由此螺旋 B1 区段布置在所述核酸的 5'-末端并且螺旋 B2 布置在 3'-末端,其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段的长度单独地且独立地各包含 4 至 8 个核苷酸的长度。

[0084] 在第七个方面的第十五个实施方案(其也是第十四个实施方案的一个实施方案)中,螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间至少部分或完全杂交,其中所述杂交在 4 至 8 个核苷酸对上延伸。

[0085] 在第七个方面的第十六个实施方案(其也是第四和第五个实施方案的一个实施方案)中,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间布置 1 至 5 个核苷酸,和在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置 1 至 3 个核苷酸。

[0086] 在第七个方面的第十七个实施方案(其也是第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四和第十五个实施方案的一个实施方案)中,在螺旋 B1 区段和 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间布置 2 个核苷酸,在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 B2

区段的 5'-末端之间布置 1 至 7 个核苷酸。

[0087] 在第七个方面的第十八个实施方案（其也是下列实施方案的一个实施方案：第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八和第十个实施方案，在第十个实施方案为第六、第七和第八个实施方案的一个实施方案的情况下，第十二和第十三个实施方案，在它们为第六、第七、第八和第十个实施方案的实施方案的情况下，第十四和第十五个实施方案，在它们为第六、第七、第八、第十、第十一、第十二和第十三个实施方案的实施方案的情况下，或第十七个实施方案，在它为第六、第八、第十、第十二、第十三和第十五个实施方案的一个实施方案的情况下，各自在此处限定的范围内）中，中间区段 Z1 包含 6 或 7 个核苷酸。

[0088] 在第七个方面的第十九个实施方案（其也是第十八个实施方案的一个实施方案）中，中间区段 Z1 具有序列 $N_1N_2GN_3N_4N_5$ ，其中

[0089] $N_1 = \text{U、C、A 或 G}$ ；

[0090] $N_2 = \text{G 或 U}$ ；

[0091] $N_3 = \text{U 或 C}$ ；

[0092] $N_4 = \text{U 或 A}$ ；

[0093] $N_5 = \text{G 或 A}$ ；和

[0094] $N_8 = \text{U 或不存在}$ 。

[0095] 在第七个方面的第二十个实施方案（其也是第十九个实施方案的一个实施方案）中，所述核酸包含盒 A1 区段和盒 A2 区段，其中盒 A1 区段的 3'-末端直接与中间区段 Z1 的 5'-末端相连接，和中间区段 Z1 的 3'-末端直接与盒 A2 区段的 5'-末端相连接。

[0096] 在第七个方面的第二十个实施方案（其也是第十八、第十九和第二十个实施方案，特别是第二十个实施方案的一个实施方案）中，所述核酸包含螺旋 B1 区段和螺旋 B2 区段。

[0097] 在第七个方面的第二十二个实施方案（其也是第二十个实施方案的一个实施方案）中，螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸，其优选地相互之间完全或部分杂交。

[0098] 在第七个方面的第二十二个实施方案（其也是第二十一和第二十二个实施方案的一个实施方案）中，在螺旋 B1 区段的 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间以 5'-3' 方向布置两个核苷酸 N_6 、 N_7 ，其中 N_6 是 G、A 或 U，和 N_7 是 G 或 U。

[0099] 在第七个方面的第二十二个实施方案（其也是第二十一、第二十二和第二十二个实施方案的一个实施方案）中，在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 B2 区段的 5'-末端之间没有布置核苷酸，或以 5'-3' 方向布置核苷酸序列 GN_y ，其中 N_y 包含 0 至 6 个核苷酸，优选 0 或 6 个核苷酸。

[0100] 在第七个方面的第二十五个实施方案（其也是第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三和第二十二个实施方案的一个实施方案）中，所述核酸包含螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段。

[0101] 在第七个方面的第二十六个实施方案（其也是第二十五个实施方案的一个实施方案）中，螺旋 A1 和螺旋 A2 区段各自且相互独立地包含 4 至 8 个核苷酸，其中优选地螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间完全或部分杂交。

[0102] 在第七个方面的第二十七个实施方案（其也是第二十五和第二十六个实施方案

的一个实施方案)中,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和螺旋 B1 区段的 5'-末端之间布置核苷酸序列 N_x ,其中 N_x 包含 0 至 5 个核苷酸。

[0103] 在第七个方面的第二十八个实施方案(其也是第二十五、第二十六和第二十七个实施方案的一个实施方案)中,在螺旋 B2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置核苷酸序列 N_z ,其中 N_z 包含 0 至 6 个核苷酸。

[0104] 在第七个方面的第二十九个实施方案(其也是第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七和第二十八个实施方案的一个实施方案)中,来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

[0105] 在第七个方面的第三十个实施方案(其也是第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八和第二十九个实施方案的一个实施方案)中,在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 B2 区段的 5'-末端之间以 5'-3' 方向布置核苷酸序列 GN_y ,其中 N_y 包含 0 至 6 个核苷酸,优选 0 或 6 个核苷酸。

[0106] 在第七个方面的第三十一个实施方案(其也是第三十个实施方案的一个实施方案)中,所述结合 HMGA 的核酸包含下列结构

[0107]

螺旋 A1- N_x -螺旋 B1- N_6N_7 盒 A1 $N_1N_2GN_8N_3N_4N_5$ 盒 A2 $G-N_7$ -螺旋 B2- N_z -螺旋 A2

[0108] 其中

[0109] $N_1 = \text{U、C、A 或 G}$;

[0110] $N_2 = \text{G 或 U}$;

[0111] $N_3 = \text{U 或 C}$;

[0112] $N_4 = \text{U 或 A}$;

[0113] $N_5 = \text{G 或 A}$;

[0114] $N_6 = \text{G、A 或 U}$;

[0115] $N_7 = \text{G 或 U}$;

[0116] $N_8 = \text{U 或无核苷酸}$;

[0117] $N_x = \text{0 至 5 个核苷酸}$;

[0118] $N_y = \text{0 或 6 个核苷酸}$;和

[0119] $N_z = \text{0 至 6 个核苷酸}$;

[0120] 盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自包括 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG 的核苷酸序列;

[0121] 螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间完全或部分杂交;和

[0122] 螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间完全或部分杂交并且杂交区域包含 4 至 8 个核苷酸,和其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

[0123] 在第七个方面的第三十二个实施方案(其也是第三十和第三十一个实施方案

的一个实施方案)中,所述结合 HMGA 的核酸包含选自 SEQ. ID. No. 1、SEQ. ID. No. 2、SEQ. ID. No. 3、SEQ. ID. No. 5、SEQ. ID. No. 6、SEQ. ID. No. 7 和 SEQ. ID. No. 13 的序列。

[0124] 在第七个方面的第三十三个实施方案(其也是第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八和第二十九个实施方案的一个实施方案)中,盒 A2 区段的 3'-末端直接与螺旋 B2 区段的 5'-末端连接。

[0125] 在第七个方面的第三十四个实施方案(其也是第三十三个实施方案的一个实施方案)中,所述结合 HMGA 的核酸具有下列结构

[0126]

螺旋 A1-N_x-螺旋 B1-N₆N₇盒 A1N₁N₂GN₈N₃N₄N₅盒 A2螺旋 B2-N_z-螺旋 A2

[0127] 其中

[0128] N₁ = U、C、A 或 G ;

[0129] N₂ = G 或 U ;

[0130] N₃ = U 或 C ;

[0131] N₄ = U 或 A ;

[0132] N₅ = G 或 A ;

[0133] N₆ = G、A 或 U ;

[0134] N₇ = G 或 U ;

[0135] N₈ = U 或无核苷酸 ;

[0136] N_x = 0 至 5 个核苷酸 ;和

[0137] N_z = 0 至 6 个核苷酸 ;

[0138] 盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自包括 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG 的核苷酸序列 ;

[0139] 螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间完全或部分杂交 ;和

[0140] 螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间完全或部分杂交并且杂交区域包含 4 至 8 个核苷酸,和其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

[0141] 在第七个方面的第三十五个实施方案(其也是第三十三和第三十四个实施方案的一个实施方案)中,所述结合 HMGA 的核苷酸包含含有 SEQ. ID. No. 3 的序列。

[0142] 在第七个方面的第三十六个实施方案(其也是第三十一个实施方案的一个实施方案)中,所述结合 HMGA 的核酸包含下列结构 :

[0143]

螺旋 B1-N₆N₇盒 A1N₁N₂GN₈N₃N₄N₅盒 A2G-N_y-螺旋 B2。

[0144] 在第七个方面的第三十七个实施方案(其也是第三十四个实施方案的一个实施方案)中,所述结合 HMGA 的核酸包含下列结构 :

[0145]

螺旋 B1-N₆N₇ 盒 A1 N₁N₂GN₈N₃N₄N₅ 盒 A2 螺旋 B2。

[0146] 在第七个方面的第三十八个实施方案（其也是第三十六个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸包含选自 SEQ. ID. No. 15 和 SEQ. ID. No. 16 的序列。

[0147] 在第七个方面的第三十九个实施方案（其也是第七个方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三和第十六或第十七个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HGMA 的核酸包含中间区段 Z₂，所述中间区段 Z₂ 包含 12 至 25 个核苷酸。

[0148] 在第七个方面的第四十个实施方案（其也是第三十九个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HGMA 的核酸包含中间区段 Z₂，即螺旋 C1 区段和螺旋 C2 区段。

[0149] 在第七个方面的第四十一个实施方案（其也是第四十个实施方案的一个实施方案）中，在所述结合 HMGA 的核酸的螺旋 C1 区段和螺旋 C2 区段之间布置中央区段 N_c。

[0150] 在第七个方面的第四十二个实施方案（其也是第四十或第四十一个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HGMA 的核酸的螺旋 C1 和螺旋 C2 区段的长度是相同的。

[0151] 在第七个方面的第四十三个实施方案（其也是第四十、第四十一和第四十二个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HGMA 的核酸的螺旋 C1 和螺旋 C2 区段的长度单独地且独立地为 3 至 6 个核苷酸。

[0152] 在第七个方面的第四十四个实施方案（其也是第四十、第四十一、第四十二和第四十三个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸的螺旋 C1 和螺旋 C2 区段相互之间完全或部分杂交。

[0153] 在第七个方面的第四十五个实施方案（其也是第三十九、第四十、第四十一、第四十二、第四十三和第四十四个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸的中央区段 N_c 包含 3 至 5 个核苷酸。

[0154] 在第七个方面的第四十六个实施方案（其也是第三十九、第四十、第四十一、第四十二、第四十三、第四十四和第四十五个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸包含盒 A1 区段和盒 A2 区段，其中在盒 A1 区段的 3' - 末端和螺旋 C1 区段的 5' - 末端之间布置核苷酸序列 N_b 并且包含 3 个核苷酸。

[0155] 在第七个方面的第四十七个实施方案（其也是第三十九、第四十、第四十一、第四十二、第四十三、第四十四、第四十五和第四十六个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸包含盒 A1 区段和盒 A2 区段，其中在螺旋 C2 区段的 3' - 末端和盒 A2 区段的 5' - 末端之间布置核苷酸序列 N_d 并且包含 2 至 5 个核苷酸。

[0156] 在第七个方面的第四十八个实施方案（其也是第三十九、第四十、第四十一、第四十二、第四十三、第四十四、第四十五、第四十六和第四十七个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸包含螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段。

[0157] 在第七个方面的第四十九个实施方案（其也是第四十八个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸的螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 5 至 6 个核苷酸，其中优选地螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段相互之间完全或部分杂交。

[0158] 在第七个方面的第五十个实施方案（其也是第四十八和第四十九个实施方案的一个实施方案）中，在所述结合 HMGA 的核酸的螺旋 A1 区段的 3' - 末端和盒 A1 区段的 5' - 末

端之间布置核苷酸序列 N_a , 其中 N_a 包含 1 至 5 个核苷酸。

[0159] 在第七个方面的第五十一个实施方案 (其也是第四十八、第四十九和第五十个实施方案的一个实施方案) 中, 在所述结合 HMGA 的核酸的盒 A2 区段的 3' - 末端和螺旋 A2 区段的 5' - 末端之间以 5' - 3' 方向布置核苷酸序列 GN_e , 其中 N_e 包含 1 至 2 个核苷酸, 优选 A 或 UU。

[0160] 在第七个方面的第五十二个实施方案 (其也是第四十八、第四十九、第五十和第五十一个实施方案的一个实施方案) 中, 所述结合 HMGA 的核酸的螺旋 C1 区段和螺旋 C2 区段单独地且相互独立地各具有 5 或 6 个核苷酸的长度, 其中优选地螺旋 C1 和螺旋 C2 区段相互之间完全或部分杂交。

[0161] 在第七个方面的第五十三个实施方案 (其也是第五十二个实施方案的一个实施方案) 中, 所述结合 HMGA 的核酸具有下列结构:

[0162]



[0163] 其中

[0164] $N_a = 1$ 至 5 个核苷酸;

[0165] $N_b = 3$ 个核苷酸;

[0166] $N_c = 3$ 至 5 个核苷酸;

[0167] $N_d = 2$ 至 5 个核苷酸; 和

[0168] $N_e = 1$ 至 2 个核苷酸, 优选 A 或 UU;

[0169] 盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG;

[0170] 螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 5 或 6 个核苷酸; 和

[0171] 螺旋 C1 和螺旋 C2 区段各包含 5 或 6 个核苷酸, 其优选地相互之间完全或部分杂交。

[0172] 在第七个方面的第五十四个实施方案 (其也是第五十三个实施方案的一个实施方案) 中, 所述结合 HMGA 的核酸包含选自 SEQ. ID. No. 8、SEQ. ID. No. 9、SEQ. ID. No. 10、SEQ. ID. No. 11、SEQ. ID. No. 14、SEQ. ID. No. 22 和 SEQ. ID. No. 24 的序列。

[0173] 在第七个方面的第五十五个实施方案 (其也是第三十九、第四十、第四十一、第四十二、第四十三和第四十四个实施方案的一个实施方案) 中, 所述核酸包含所述结合 HMGA 的核酸的盒 A1 区段和螺旋 C1 区段, 其中在盒 A1 区段的 3' - 末端和螺旋 C1 区段的 5' - 末端之间布置核苷酸 A。

[0174] 在第七个方面的第五十六个实施方案 (其也是第五十五个实施方案的一个实施方案) 中, 所述结合 HMGA 的核酸包含螺旋 C2 区段和盒 A2 区段, 其中在螺旋 C2 区段的 3' - 末端和盒 A2 区段的 5' - 末端之间布置核苷酸 G。

[0175] 在第七个方面的第五十七个实施方案 (其也是第五十五或第五十六个实施方案的一个实施方案) 中, 所述结合 HMGA 的核酸的中央区段 N_c 包含 4 个核苷酸, 其中 N_c 优选是 GAUG。

[0176] 在第七个方面的第五十八个实施方案 (其也是第五十五、第五十六和第五十七个实施方案的一个实施方案) 中, 所述结合 HMGA 的核酸包含螺旋 B1 区段和螺旋 B2 区段。

[0177] 在第七个方面的第五十九个实施方案（其也是第五十八个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸的螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 5 个核苷酸，其中优选地螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段杂交。

[0178] 在第七个方面的第六十个实施方案（其也是第五十八或第五十九个实施方案的一个实施方案）中，在所述结合 HMGA 的核酸的螺旋 B1 区段的 3' - 末端和盒 A1 区段的 5' - 末端之间布置包含 2 个核苷酸的核苷酸序列 N_j ，其中 N_j 优选是 AG。

[0179] 在第七个方面的第六十一个实施方案（其也是第五十八、第五十九和第六十个实施方案的一个实施方案）中，在所述结合 HMGA 的核酸的盒 A2 区段的 3' - 末端和螺旋 B2 的 5' - 末端之间布置核苷酸 G。

[0180] 在第七个方面的第六十二个实施方案（其也是第五十五、第五十六、第五十七、第五十八、第五十九、第六十和第六十一个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HGMA 的核酸包含螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段。

[0181] 在第七个方面的第六十三个实施方案（其也是第六十二个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HGMA 的核酸的螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 6 个核苷酸，和优选地螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段相互杂交。

[0182] 在第七个方面的第六十四个实施方案（其也是第六十二和第六十三个实施方案的一个实施方案）中，在螺旋 A1 区段的 3' - 末端和螺旋 B1 区段的 5' - 末端之间布置包含 2 个核苷酸的核苷酸序列 N_i ，其中 N_i 优选是 CA。

[0183] 在第七个方面的第六十五个实施方案（其也是第六十二、第六十三和第六十四个实施方案的一个实施方案）中，在螺旋 B2 区段的 3' - 末端和螺旋 A2 区段的 5' - 末端之间布置核苷酸 A。

[0184] 在第七个方面的第六十六个实施方案（其也是第五十五个至第六十五个实施方案的一个实施方案）中，螺旋 C1 和螺旋 C2 区段各包含 3 个核苷酸，其中优选地螺旋 C1 和螺旋 C2 区段相互杂交。

[0185] 在第七个方面的第六十七个实施方案（其也是第六十六个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸具有下列结构：

[0186]

螺旋 A1- N_i -螺旋 B1- N_j -盒 A1-A-螺旋 C1- N_c -螺旋 C2-G-盒 A2-G-螺旋 B2-A-螺旋 A2

[0187] 其中

[0188] N_i 包含 2 个核苷酸，优选是 CA；

[0189] N_j 包含 2 个核苷酸，优选是 AG；

[0190] N_c 包含 4 个核苷酸，优选是 GAUG；

[0191] 盒 A1 和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自序列 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG；

[0192] 螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且独立地各包含 6 个核苷酸，其优选地相互杂交；

[0193] 螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且独立地各包含 5 个核苷酸，其中优选地螺旋 B1 区段和螺旋 B2 区段相互杂交；和

[0194] 螺旋 C1 和螺旋 C2 区段单独地且独立地各包含 3 个核苷酸，其中优选地螺旋 C1 和

螺旋 C2 区段相互杂交。

[0195] 在第七个方面的第六十八个实施方案（其也是第六十七个实施方案的一个实施方案）中，所述结合 HMGA 的核酸包含选自 SEQ. ID. No. 12 的序列。

[0196] 在第七个方面的第六十九个实施方案（其也是第二个至第六十七个实施方案的一个实施方案）中，所述核酸是结合转录因子，特别是具有 AT- 钩的转录因子的核酸。

[0197] 根据本发明的第八个方面，通过结合包含 AT- 钩的转录因子的核酸实现了该目的，其中所述核酸包含第七个方面的构造。

[0198] 在第六个方面的组合物的一个实施方案中，所述 L- 核酸第七个方面的核酸。

[0199] 在第一个方面的用途的一个实施方案中，所述 L- 核酸第七个方面的核酸。

[0200] 在第二个方面的方法的一个实施方案中，所述 L- 核酸第七个方面的核酸。

[0201] 在第三个方面的用途的一个实施方案中，所述 L- 核酸第七个方面的核酸。

[0202] 在第四个方面的方法的一个实施方案中，所述 L- 核酸第七个方面的核酸。

[0203] 根据本发明的第九个方面，通过用于筛选 HMGA- 拮抗剂或 HMGA- 激动剂的方法实现了该目的，所述方法包括下列步骤：

[0204] - 提供候选 HMGA- 拮抗剂和 / 或候选 HMGA- 激动剂，

[0205] - 提供第七个方面的核酸，

[0206] - 提供测试系统，该测试系统在 HMGA- 拮抗剂和 / 或 HMGA- 激动剂存在的情况下给出信号，和

[0207] - 确定所述候选 HMGA- 拮抗剂是否是 HMGA- 拮抗剂，和 / 或所述候选 HMGA- 激动剂是否是 HMGA- 激动剂。

[0208] 根据本发明的第十个方面，通过用于筛选 HMGA- 激动剂和 / 或 HMGA- 拮抗剂的方法实现了该目的，所述方法包括下列步骤：

[0209] - 提供固定在相优选固相上的 HMGA，

[0210] - 提供第七个方面的核酸，优选经标记的第七个方面的核酸，

[0211] - 加入候选 HMGA- 激动剂和 / 或候选 HMGA- 拮抗剂，和

[0212] - 确定所述候选 HMGA- 激动剂是否是 HMGA- 激动剂和 / 或所述候选 HMGA- 拮抗剂是否是 HMGA- 拮抗剂。

[0213] 在第十个方面的一个实施方案中规定，所述确定过程通过测试所述核酸是否被候选 HMGA- 激动剂或者被候选 HMGA- 拮抗剂替代来进行。

[0214] 根据本发明的第十一个方面，通过用于检测 HMGA 的、包含第七个方面的核酸的试剂盒实现了该目的。

[0215] 根据本发明的第十二个方面，通过可经过第十个方面的方法获得的 HMGA- 拮抗剂实现了该目的。

[0216] 根据本发明的第十三个方面，通过可经过第十个方面的方法获得的 HMGA- 激动剂实现了该目的。

[0217] 根据本发明的十四个方面，通过包含 HMGA- 蛋白和第七个方面的核酸的复合物实现了该目的。

[0218] 本发明基于令人吃惊的结果，即，与现有技术中的看法相反，可能使用 L- 核酸特别是镜像异构体来找到细胞内靶分子。细胞内靶分子优选地是存在于细胞中的靶分子。然

而,归因于它们的 L-核苷酸的构造而在功能性 L-核酸中固有的特性,例如与它们的靶分子的相互作用的高度特异性以及同时高稳定性和不存在有毒或免疫活性分解产物(当 L-核酸用于生物系统,特别是动物和人体时),并不允许利用细胞机制,如在 Intramer 的情况下,让 L-核酸由质粒或通常由载体编码,从而通过细胞内进行的转录过程提供真正有功能的核酸。

[0219] 通过本发明解决了该不可避免的困境:功能性 L-核酸,特别是镜像异构体,可运输通过细胞质膜而同时保持它们的与它们结合其靶分子有关的特异性以及它们的活性。功能性 L-核酸的该渗透性是镜像异构体所固有的,并且可通过使用递送媒介物或递送技术得到进一步加强。并不希望在下文中在这点上是确定的,本发明者从下列假设开始,即功能性 L-核酸本身能够越过细胞质膜,或者在内体转运机制参与越过细胞质膜的情况下,能够使该核酸从如此形成的载体结构中释放出来,所述载体结构采取允许所述功能性核酸与其靶分子特异性相互作用的二维或三维结构。通过此处公开的技术教导,有意避免了关于适体而发展出的使用细胞内转录机制来在细胞中产生适体的原理,从而第一次提供了用于在细胞中使用功能性 L-核酸特别是镜像异构体的方法。

[0220] 如此处在优选的实施方案中所使用的,术语“功能性核酸”是指与结构性特别是天然发生的结构性核酸例如 rRNA 或者与编码性核酸例如 mRNA 不同的核酸。特别地,功能性核酸是基于它们的二维和/或三维结构而能够结合靶分子的核酸。在特别优选的实施方案中,与靶分子的结合不通过基于 Watson-Crick 碱基配对或 Hoogsteen 碱基配对的杂交或碱基配对来进行。特别优选的功能性核酸是适体和镜像异构体。

[0221] 在一个优选的实施方案中,L-核酸是完全、基本上或部分地由 L-核苷酸构成的核酸。如果 L-核酸完全由 L-核苷酸组成则是特别优选的。术语“基本上”在此是指这样的实施方案,在所述实施方案中负责与靶分子相互作用的 L-核酸的该部分或介导与靶分子结合的该部分由 L-核苷酸组成或由 L-核苷酸构成。

[0222] 如此处所用的,功能性 L-核苷酸是完全、基本上或部分由 L-核苷酸构成的功能性核酸。

[0223] L-核酸的合成对于本领域技术人员来说是已知的,并且例如描述于 Nolte 等人,Nat. Biotech, 14, 1116-1119, 1996; 和 Klussmann 等人,Nat. Biotechnol, 14, 1112-1115, 1996。

[0224] 用于产生适体的基本方法例如描述于 Tuerck 等人,Science, 248, 505-510, 1990; 或 Ellington 等人,Nature, 346, 818-822, 1990, 而用于产生镜像异构体的基本方法例如描述于 Nolte 等人,Nat. Biotech, 14, 1116-1119, 1996; 或 Klussmann 等人,Nat. Biotechnol, 14, 1112-1115, 1996。因此,镜像异构体是由 L-核苷酸而不是 D-核苷酸组成的适体。关于适体和镜像异构体的产生,术语“靶分子”是指在用于产生适体或镜像异构体的选择方法中使用的这样的分子,或者指最终被适体或镜像异构体结合的这样的分子。

[0225] 在一个优选的实施方案中,细胞内活性剂是能够在细胞中结合分子的化合物。在此,如果所述细胞是以分离的形式存在于组织或器官中但优选地不存在于人或动物体中的细胞,则是特别优选的。如果细胞内活性剂是镜像异构体,那么优选地如果其能够结合细胞内靶分子,则其是细胞内活性剂。备选地,如果其能够在例如存在于细胞中的条件下结合其靶分子,那么该镜像异构体是细胞内活性剂。用于确定这些特性的测试对于本领域技术人

员来说是已知的,并且包括例如在缓冲条件例如在细胞内存在的缓冲条件(如实施例 1 中公开的)下的平衡结合测定法。

[0226] 在一个优选的实施方案中,L-核酸特别是功能性 L-核酸的靶分子是细胞内受体。细胞内受体,如此处所用的,优选地是与功能性 L-核酸相互作用的化学化合物或化学结构或各自地其部分,并且优选地是与功能性 L-核酸结合的化学化合物或化学结构或各自地其部分,其中所述细胞内受体,即化学化合物或化学结构或各自地其部分,以细胞内形式存在,即存在于细胞中,如其优选地在前面的段落中所描述的。在此,在本发明的范围内的是,在产生功能性核酸特别是功能性 L-核酸的情况下,细胞内受体是靶分子。

[0227] 在一个实施方案中,术语“受体”是指任何相互作用伙伴,优选地是指功能性核酸的特异地结合的相互作用伙伴,即与功能性核酸相互作用的相互作用伙伴,其具有特定的空间结构、电荷分布、疏水性分布等。在一个特别优选的实施方案中,相互作用伙伴相应于功能性核酸的靶分子,如其用于产生所述功能性核酸。在此,在本发明的范围内的是,受体也可以与用于产生功能性核酸的靶分子不同,然而特异性相互作用是由于功能性核酸在相互作用伙伴和用于产生功能性核酸的靶分子之间的交叉反应性而导致的。

[0228] 在一个优选的实施方案中,术语“细胞内受体”是指存在于细胞中的受体,或者可存在于细胞中的、在天然情形下出现在细胞中的或在此类情形下存在于细胞中的受体。在此,如果所述细胞是以分离的形式存在于组织或器官中但优选地不存在于人或动物体中的细胞,则是特别优选的。然而,如此处所用的,术语“细胞内受体”还指在例如存在于细胞中的条件下存在的受体。

[0229] 在一个优选的实施方案中,术语“细胞”是指选自原核细胞和真核细胞的细胞。优选地,真核细胞选自真菌细胞、植物细胞、动物细胞和人细胞。在一个备选的实施方案中,术语“细胞”在此处通常是指由磷脂双层膜(在优选的实施方案中,该膜相应于细胞质膜)限定的通过该膜与周围环境分离的区室。在此,与周围环境的分离不是完全隔离,而是允许细胞和周围环境之间的能量交换和物质交换。物质交换优选地受到限制。在通过细胞质膜或通过细胞质膜相似的膜将细胞与周围环境分开的情况下,由膜的转运特性确定了对物质交换的限制。在一个实施方案中,术语“细胞”在此处因此还包括如此处所定义的原核或真核细胞的小囊泡和/或区室,其存在于或能够存在于原核或真核细胞的内部以及此类原核或真核细胞的外部,例如原核或真核细胞的小囊泡或被细胞质膜包围的部分,它们在一个实施方案中可存在于体液中。在一个优选的实施方案中,在第二个备选实施方案的细胞中设想了,在此类细胞内的条件基本上相应于在原核或真核细胞中存在的条件,特别是关于影响功能性核酸与其靶分子的结合的因素。

[0230] 在一个优选的实施方案中,体液选自血液、尿、脑脊液、淋巴液、血清、血浆、阴道分泌物、唾液和精液。

[0231] 在一个实施方案中,受体通过其在细胞中的功能来定义。因此,受体可选自分子受体、酶、代谢中间体、信号肽、伴侣分子和细胞内结构,例如核糖体、线粒体、细胞骨架的组成部分例如微管蛋白和肌动蛋白纤丝、内体颗粒、溶酶体、其他细胞内结构例如小囊泡,特别是细胞内小囊泡。如此处所用的,术语“分子受体”在优选实施方案中是指接受信息并在细胞、组织、器官或生物体内传递该信息的分子。该信息通常由与分子受体相互作用的分子来介导。作为相互作用的结果,分子受体能够产生信号。这样的信号可以由于受体的构象和

/ 或活性的改变而产生或者可以表现在这些方面。信号本身能够以另一种方式传递接受到的或通过其加工的信号。作为分子受体的构象或活性的变化的结果,信号优选地可以是化学、生物化学或电信号。优选地,分子受体是反应级联的一部分,和更优选地是信号级联的一部分。由分子受体传递的信息可以是定量和 / 或定性的信息,例如关于化合物的存在和 / 或其浓度的信息。

[0232] 在一个优选的实施方案中,术语“代谢中间体”是指通过细胞中的代谢活性而作为分解代谢以及合成代谢的组分出现的任何化合物。

[0233] 在一个进一步的实施方案中,受体根据其化学性质来进行定义。优选地,受体选自多肽、糖类、核酸、脂质和其组合。如此处所用的,术语“多肽”优选地是指由两个或更多个氨基酸组成的任何聚合物。优选地,氨基酸是 L- 氨基酸,其中但是在该实施方案的范围内也可以使用 D- 氨基酸。如此处所用的,术语“核酸”优选是指两个或更多个核苷酸或核苷酸类似物(其对于本领域技术人员来说是已知的)组成的聚合物,其中核苷酸是 D- 核苷酸或 L- 核苷酸或其混合物。优选的组合包含糖基化的多肽和糖基化的脂质。

[0234] 特别的一组细胞内受体是转录因子和结合 AT- 钩的 DNA 结合蛋白。在下面的表 1 中提供了示例性的转录因子:

[0235] 表 1 :转录因子

[0236]

γ) OBP	ALF	AP-2 α A
(STAT5A) 4	ALL-1	AP-2 α B
120-kDa CRE-	α -CBF	AP-2 β

[0237]

结合蛋白	α -CP2b	AP-2 γ
14-3-3 ϵ	α H0	AP-2rep
14-3-3 ζ	α H2- α H3	AP-3 (1)
50-55K 蛋白	ALX3	AP-3 (2)
53BP1	A1x-4	AP-4
70-75K 蛋白	aMEF-2	AP-5
80-90K 蛋白	AML1	APC
AAF	AML1a	AR
ABF-1	AML1b	Arnt
ADA2	AML1c	Arnt (774 AA 形式)
ADA3	AML1 δ N	ARNT2
ADA-NF1	AML2	ASC-2
AFP1	AML3	ASPP1
AhR	AML3a	ASPP2
AhR: Arnt	AML3b	ATBF1-A
AIIN3	AMY-1L	ATBF1-B
Aiolos	A-Myb	ATF
AIRE	ANF	ATF-1
AKNA	AP-1	ATF2
ATF-2	BRCA1	cdk2
ATF-2: c-Jun	BRCA2	cdk9
ATF3	BRG1	Cdx-1
ATF3 δ ZIP	BRIP1	CDX2
ATF4	Brm	Cdx-4
ATF5	BTEB1	c-Ets-1
ATF6	BTEB2	c-Ets-2
ATF-a	BTEB3	CFF
ATF-a δ	BTEB4	c-Fos
ATOH1	B-TFIID	ChCh

[0238]

ATPF1	C/EBP α	CHOP-10
Bach1	C/EBP β	Chx10
Bach1t	C/EBP δ	CIITA
Bach2	C/EBP ϵ	c-Jun
BAF155	C/EBP γ	c-Jun: JunD
BAF47	CA150	CLIM1
BAF53a	c-ab1	CLIM2
BAF60A	CACCC-结合因子	CLOCK
Barh11	CAR	c-Myb
Barh12	CAR: RXR- α	c-Myc
Barx1	Cart-1	C-Myc 1
Barx2	CBAF	c-Myc: Max
Bcl-3	CBF (4)	CNBP
BCL-6	CBF (5)	CoS
β -联蛋白	CBP	COUP-TF1
Bin1	CCAAT-	COUP-TF2
BMAL2	结合因子	CP1A
B-Myb	CCF	CP1C
BNC	CCG1	CP2
BP1	CCK-1a	CPBP
BP2	CCK-1b	CPE 结合蛋白
BR140	CD28RC	CREB
Brachyury	Cdc5	CRE-BPa
c-Rel	DBP	DPBF
c-Rel: RelA	DbpA	DRIL1
CREM α	DbpAv	DSIF
CREST	DbpB	DSIF-p14
CRF	DCoHm	DSIF-p160
Crx	DDB	DTF

[0239]

CSA	DDB-1	DUX1
CSB	DDB-2	DUX2
CSBP-1	DEC1	DUX3
CSEN	DEC2	DUX4
c-Ski	DEF	E
CtBP1	δ CREB	E12
CtBP2	δ FosB	E2F
CTCF	δ Max	E2F+E4
CTF	Δ N p63 β	E2F+p107
CTF-1	Δ N p73 α	E2F-1
CTF-2	Δ N p73 β	E2F-1: DP-1
CTF-3	Δ N p73 γ	E2F-1: DP-2
CTF-5	Δ Np63 α	E2F-2
CTF-7	Δ Np63 γ	E2F-3a
CUP	Dermo-1	E2F-4
CUTL1	DF-1	E2F-4: DP-1
CUTL2	DF-2	E2F-4: DP-2
Cx	DF-3	E2F-5
细胞周期蛋白 A	D1x-1	E2F-6
细胞周期蛋白 T1	D1x-2	E2F-7
细胞周期蛋白 T2	D1x-3	E47
细胞周期蛋白 T2a	D1x-4 (长同种型)	E4BP4
细胞周期蛋白 T2b	D1x-4 (短同种型)	E4F
DAP	D1x-5	E4F1
DAX1	D1x-6	E4TF2
DB1	DP-1	E7; HPV-16, 乳头状瘤
DBF4	DP-2	病毒类型 16
EAR2	ER- β 2	FAC1
EBF	ER- β 3	因子 2

[0240]

EBP-80	ER- β 4	FBP
EC2	ER- β 5	f-EBP
EF1	ERF	FEV
Egr-1	Erg-1	Fgf3
Egr-2	Erg-2	FKBP59
Egr-3	ERM	FKHL18
Egr-4	ERR1	FKHRL1P2
EIIaE-A	ERR2	FKLF
EIIaE-B	ERR3	Fli-1
EIIaE-C α	ERR3-1	FosB
EIIaE-C β	ERR3-2	FOXb1
EivF	ERR3-3	FOXC1
EKLF	ERR α 1	FOXC2
ELF-1	ESE-1	FOXD1
ELFR	ESE-1a	FOXD2
elios	ESE-1b	FOXD3
Elk-1	ESE-2	FOXD4
Emx-1	ESE-2a	FOXb1
Emx-2	ESE-2b	FOXb3
En-1	ESE-3	FOXF1
En-2	ESE-3a	FOXF2
ENH-结合蛋白	ESE-3b	FOXG1a
ENKTF-1	ESXR1	FOXG1b
EP400	ETF	FOXG1c
EPAS1	Ets-1 δ VII	FOXH1
Epicardin	Evi-1	FOXI1
ϵ F1	EVX1	FOXJ1a
ER- α	EZF-2	FOXJ1b
ER- α : ER- β	EZH1	FOXJ2 (长同种型)

[0241]

ER- β	EZH2	FOXJ2 (短同种型)
ER- β 1	F2F	FOXJ3
FOXK1	GAAP-1	GRF-1
FOXK2a	GABP	Gsc
FOXK2b	GABP- α	Gsc1
FOXK2c	GABPB	GT-IC
FOXL1	GABP- β 1	GT-IIA
FOXL2	GABP- β 2	GT-IIB α
FOXM1a	GAF	GT-IIB β
FOXM1b	γ CAAT	H1TF1
FOXM1c	γ CAC1	H1TF2
FOXN1	γ CAC2	H1TF2A
FOXN2	GATA-1	H4TF-1
FOXN3	GATA-2	H4TF-2
FOX01a	GATA-3	HAF
FOX01b	GATA-4	HAND1
FOX02	GATA-5	HAND2
FOX03a	GATA-6	HB9
FOX03b	Gbx1	HDAC1
FOX04	Gbx2	HDAC2
FOXP1	GCF	HDAC3
FOXP2	GCMa	HDAC4
FOXP3	GCN5	HDAC5
FOXP4	GCNF-1	hDaxx
Fra-1	GCNF-2	HDBP1
Fra-2	GF1	HDBP2
FTF	GKLF	热诱导因子
FTS	GLI1	HEB
FXR	GLI2	HEB1-p67

[0242]

FXR: RXR- α	GLI3	HEB1-p94
FXR- α	GLIS2	HEF-1B
FXR- β 1	GMEB-1	HEF-1T
FXR- β 2	GR	HEF-4C
G 因子	GR- α	HEN1
G6 因子	GR- β	HEN2
HES-1	HNF-1 α -A	HOXA9B
HES-2	HNF-1 α -B	HOXB1
Hesx1	HNF-1 α -C	HOXB13
Hex	HNF-1 β -A	HOXB2
Hey1	HNF-1 β -B	HOXB3
Hey2	HNF-1 β -C	HOXB4
HeyL	HNF-3	HOXB5
HFH-1	HNF-3 α	HOXB6
HIC-1	HNF-3 β	HOXB7
Hic-5	HNF-3 γ	HOXB8
HIF-1	HNF-4	HOXB9
HIF-1 α	HNF-4 α	HOXC10
HiNF-A	HNF-4 α 1	HOXC11
HiNF-B	HNF-4 α 2	HOXC12
HiNF-C	HNF-4 α 3	HOXC13
HiNF-D	HNF-4 α 4	HOXC4
HiNF-D3	HNF-4 α 7	HOXC5
HiNF-E	HNF-4 γ	HOXC6
HiNF-P	HNF-6 α	HOXC8
HIP1	hnRNP K	HOXC9
HIV-EP2	HOX11	HOXD10
H1f	HOXA1	HOXD11
HLTF	HOXA10	HOXD12

[0243]

HLTF (Met123)	HOXA10 PL2	HOXD13
HLX	HOXA11	HOXD3
HMBP	HOXA13	HOXD4
HMG I	HOXA2	HOXD8
HMG I (Y)	HOXA3	HOXD9
HMG Y	HOXA4	Hp55
HMGB1	HOXA5	Hp65
HMGB2	HOXA6	HPX42B
HMG I-C	HOXA7	HrpF
HMX1	HOXA9A	HSBP1
HSF	IL-6 RE-BP	JunB
HSF1 (长)	IL-6 RF	JunB: Fra-1
HSF1 (短)	ING1	JunB: Fra-2
HSF2	ING1b	JunD
HSF4a	INSAF	JunD: Fra-2
HSF4b	IPCS-BF	κ Y FaKtor
HSF4c	IPF1	KBP-1
hsp56	IPF1: Pbx	KER1
Hsp90	IRF-1	KER-1
IA-1	IRF-1: C/EBP β	KLF15
iASPP	IRF-2	KLF7
iASPP-RAI	IRF-3	Kox1
IB1	IRF-4	KR3
IBP-1	IRF-5	KRF-1
ICER-II	IRF-6	KRN
ICER-II γ	IRF-7A	KSR-1
Id1	IRF-7B	Ku 自身抗原
Id1H	IRF-7H	Ku70
Id2	IRF-8	Ku80

[0244]

Id3	IRF-9	KUP
Id3 / Heir-1	ir1B	LAF-4
IF1	IRX-1	LANA; KSHV, 卡波西
IFI-16	IRX2a	肉瘤相关性
IgPE-1	Irx-3	疱疹病毒
IgPE-2	Irx-4	(疱疹病毒 8)
IgPE-3	ISGF-1	LBP-1
Ik-1	ISGF-3	LBP-1a
I κ B	ISGF-3 α	LBP-1d
I κ B- α	Isl-1 α	LBP-32
I κ B- β	ITF	LBP-9
I κ BR	ITF-1	LBX1
Il-1 RF	ITF-2	LCR-F1
IL-10E1	JRF	LEF-1
LEF-1B	MafG: MafG	Meis-2c
LF-A1	MafK	Meis-2d
LHX1	MAML1	Meis-2e
LHX2	MASH-1	Meis-3
LHX3a	Max	Mel-18
LHX3b	Max1	Meox1
LHX5	Max2	Meox1a
LHX6. 1a	MAZ	Meox2
LHX6. 1b	MAZi	MHox (K-2)
LIT-1	MAZR	MIF-1
LITAF	MBF1	MITF
LKLF	MBF2	MIXL1
Lmo1	MBF3	Miz-1
Lmo2	MBP-1 (1)	MLX
LM03	MBP-1 (2)	MM-1

[0245]

LMX1A	MBP-2	MondoA
LMX1B	MDBP	MOP3
L-Myc-1 (长形式)	MECP-2	MR
L-Myc-1 (短形式)	MEF-2A	MRF-2
L-Myc-2	MEF-2B1	Msx-1
LUN-1	MEF-2C	Msx-2
LUN-2	MEF-2C/ δ 32	MTA1-L1
LXR- α	MEF-2C/ δ 8	MTB-Zf
LXR- α :RXR- α	MEF-2C/ δ 8, 32	MTF-1
LXR- β	MEF-2D00	mtTFA
LXR- β :RXR- α	MEF-2D0B	Mxil
Ly1-1	MEF-2DA0	Myf-3
M 因子	MEF-2DA' 0	Myf-4
Mad1	MEF-2DAB	Myf-5
Maf	MEF-2DA' B	Myf-6
MafB	Meis-1	Myocardin, 剪接形式
MafF	Meis-2a	1
MafG	Meis-2b	MyoD
MyoD: E12	Nf β A	NF- κ E3
MyT1	NF-CLE0a	NF-MHCI1A
MZF-1	NF-CLE0b	NF-MHCI1B
NC1	NF δ E3A	NF-muE1
NC2	NF δ E3B	NF-muE2
NCOR1	NF δ E3C	NF-muE3
NCOR2	NF δ E4A	NF-S
NCX	NF δ E4B	NF-X
NELF	NF δ E4C	NF-X1
NERF	Nfe	NF-X2
NERF-1a	NF-E	NF-X3

[0246]

NERF-1b	NF-E2	NF-Xc
NERF-2	NF-E2 p45	NF-Y
Net	NF-E3	NF-YA
NeuroD1	NFE-6	NF-Zc
NEUROD-2	NF-Gma	NF-Zz
NEUROD-3	NF-GMb	NGN3
NF III-a	NFI/CTF	NHP-1
NF III-c	NFIA	NHP-2
NF III-e	NFIB	NHP3
NF-1	NF-IL-2°	NHP4
NF-4FA	NF-IL-2B	Nkx2-1
NF-4FB	NFIX	Nkx2-2
NF-4FC	NF-jun	Nkx2-3
NF-AB	NF-κ B	Nkx2-5
NF-AT1	NF-κ B (-样)	Nkx2-8
NF-AT1	NF-κ B1	Nkx3-1
NF-AT2	NF-κ B1 前体	Nkx3-1 v1
NF-AT2-α	NF-κ B2	Nkx3-1 v2
NF-AT2-β	NF-κ B2 (p49)	Nkx3-1 v3
NF-AT3	NF-κ B2 前体	Nkx3-1 v4
NF-AT4	NF-κ E1	Nkx3-2
NF-AT5	NF-κ E2	Nkx6-1
Nkx6-2	OCA-B	p65 δ
Nmi	Octa-因子	p73
N-Myc	Octamer-	p73 α
N-Oct-2 α	结合因子	p73 β
N-Oct-2 β	Oct-B1	p73 δ
N-Oct-4	oct-B2	p73 ε
NOR1	oct-B3	p73eta

[0247]

NOR1/MINOR	OLIG2	p73 γ
NPA3	Oligo1	p73 κ
NPAS1	Otx1	p73 ζ
NPAS2	Otx2	Pax-1
NP-TCII	Otx3	Pax-2
NRF	OZF	Pax-3
Nrf1	p107	Pax-3A
NRF-1	p130	Pax-3B
Nrf1: MafG	p160MBP	Pax-4a
Nrf1: MafK	p28 调节剂	Pax-5
Nrf2	p300	Pax-6
Nrf2: MafG	p38erg	Pax-6 / Pd-5a
Nrf2: MafK	p40x; HTLV-I, T-细胞	Pax-7
NRF-2 β 1	嗜淋巴细胞病毒	Pax-8
NRF-2 γ 1	Typ I	Pax-8a
Nrf3	p45	Pax-8b
Nrf3: MafK	p49erg	Pax-8c
NRL	p50: c-Rel	Pax-8d
NRSF	p53	Pax-8e
NRSF 形式 1	p55	Pax-8f
NRSF 形式 2	p55erg	Pax-9
NTF	p63	Pbx
Nur77	p63 α	Pbx1
NURR1	p63 β	Pbx1: HoxB1
OAZ	p63 δ	Pbx1: HoxB2
OC-2	p63 γ	Pbx1: HoxB3
Pbx1: HoxB4	PEA3	POU2F3, 同种型 d1
Pbx1: HoxB5	PEBP2 α	POU2F3, 同种型 d2
Pbx1: HoxB6	PEBP2 β	POU3F1

[0248]

Pbx1: HoxB8	PGC-1	POU3F2
Pbx1: PKNOX1	PITX1	POU3F2 (N-Oct-5a)
Pbx1: Tc13	PITX2	POU3F2 (N-Oct-5b)
Pbx1a	PITX2A	POU3F3
Pbx1A: HoxA5	PITX2A: Nkx2. 5	POU3F4
Pbx1a: Hoxb7	PITX2B	POU4F1 (1)
Pbx1a: Hoxb8	PITX2B: Nkx2. 5	POU4F1 (s)
Pbx1a: Hoxc6	PITX2C	POU4F2
Pbx1A: HoxC8	PITX2C: Nkx2. 5	POU4F3
Pbx1A: HoxD4	PITX3	POU5F1
Pbx1a: IPF1	PKNOX1	POU5F1A
Pbx1b	PKNOX2	POU5F1B
Pbx1B: HoxA5	PLAGL1	POU5F1C
Pbx1B: HoxB7	PLAGL2	POU6F1
Pbx1B: HoxB8	PLZF	PPAR- α
Pbx1B: HoxC8	PML	PPAR- α : RXR-
Pbx1B: HoxD4	PML-3	α
Pbx1b: PKNOX1	Pmx2a	PPAR- β
Pbx2	Pmx2b	PPAR- γ 1
Pbx2: HoxB8	PNR	PPAR- γ 2
Pbx2: Hoxc6	P0-B	PPAR- γ 3
Pbx2: PKNOX1	Pontin52	PPAR- γ 4
Pbx3a	POU1F1	PPUR
Pbx3a: Hoxc6	POU2F1	PR
Pbx3b	POU2F2	PR A
PC2	POU2F2 (Oct-2. 1)	PR B
PC4	POU2F2B	pRb
PC5	POU2F2C	PRDI-BF1
PCAF	POU2F3	PRDI-BFc

[0249]

PDEF	POU2F3, 同种型 a	Preb
Prop-1	RAR- γ	RREB-1
PROX1	RAR- γ :RXR-	RSRFC4
PSE1	α	RSRFC9
P-TEFb	RAR- γ 1	RVF
PTF	Rb: E2F-1: DP-1	RX
PTF α	RBP60	RXR- α
PTF β	RBP-J κ	RXR- β
PTF δ	Ref-1	RXR- γ
PTF γ	RelA	SAP-1a
Pu box 结合因子	RelB	SAP-1b
Pu box 结合因子 (BJA-B)	REVERB- α	SF-1
	REVERB- β	SHOX2a
PU. 1	RFX1	SHOX2b
PuF	RFX1: RFX2	SHOXa
Pur 因子	RFX1: RFX3	SHOXb
pX; HBV, 乙型肝炎 病毒	RFX2	SHP
	RFX3	SI11-p110
PXR-1	RFX4	SI11-p15
PXR-1: RXR- α	RFX5	SI11-p18
PXR-1: RXR- β	RFX5: RFXAP: RFXANK	SIM1
PXR-2	RFXANK	SIM2
R1	RFXAP	SIP1
R2	RFX-B- δ 5	Six-1
RAR- α	RF-Y	Six-2
RAR- α : RXR- α	ROR α 1	Six-3
RAR- α : RXR- β	ROR α 2	Six-4
RAR- α : RXR-	ROR α 3	Six-5
γ	ROR β	Six-6

[0250]

RAR- α 1	ROR γ	SKIP
RAR- α 2	Rox	SLUG
RAR- β	RP58	Smad1
RAR- β : RXR- α	RPF1	Smad2
RAR- β 2	RPG α	
Smad2 (437 个 氨基酸)	Sox8	STAT6
Smad3	Sox9	SXR
Smad3: Smad4	Sp1	SXR: RXR- α
Smad4	Sp2	SYT
Smad4 δ 3	Sp3	T3R- α
Smad4 δ 4	Sp4	T3R- α : RXR- α
Smad4 δ 4-6	Spi-B	T3R- α 1
Smad4 δ 4-7	SPT16	T3R- α 2
Smad4 δ 5-6	SRC-1	T3R- β 1
Smad4 δ 6	SRC-3	T3R- β 2
Smad5	SRCAP	TAF (I) 110
Smad6	SREBP-1a	TAF (I) 48
Smad7	SREBP-1b	TAF (I) 63
Smad8	SREBP-1c	TAF (II) 100
SMIF	SREBP-2	TAF (II) 125
Sna	SRE-ZBP	TAF (II) 135
SnoN	SRF	TAF (II) 170
Sox1	SRF: SRF	TAF (II) 18
Sox10	SRY	TAF (II) 20
Sox11	SSRP1	TAF (II) 250
Sox12	Staf-50	TAF (II) 250 Δ
Sox13	STAT1	TAF (II) 28
Sox14	STAT1: STAT1	TAF (II) 30
	STAT1: STAT3	TAF (II) 31

[0251]

Sox17	STAT1 α	TAF (II) 55
Sox18	STAT1 β	TAF (II) 70- α
Sox2	STAT2	TAF (II) 70- β
Sox20	STAT3	TAF (II) 70- γ
Sox21	STAT3: STAT3	TAF-I
Sox3	STAT4	TAF-II
Sox4	STAT5A	TAF-L
Sox5	STAT5B	Ta1-1
Sox7	STAT5B: STAT5B	Ta1-1 β
Ta1-2	TCF-1D	TFIID
TAR 因子	TCF-1E	TFIIE
tat; HIV-1,	TCF-1F	TFIIE- α
免疫缺陷病毒 1 型	TCF-1G	TFIIE- β
Tax; HTLV-I, T-细胞	TCF-2 α	TFIIF
嗜淋巴细胞性	TCF-3	TFIIF- α
病毒 I 型	TCF-4	TFIIF- β
T-bet	TCF-4 (K)	TFIIH
TBP	TCF-4B	TFIIH*
Tbr-1	TCF-4E	TFIIH-CAK
TBR2	TEF	TFIIH-细胞周期蛋白 H
TBX18	TEF-1	TFIIH-MAT1
TBX19	TEF-2	TFIIH-M015
TBX1A	TEF-3	TFIIH-p34
TBX1B	TEF-5	TFIIH-p44
TBX2	TEL1	TFIIH-p62
TBX20	Te1-2a	TFIIH-p80
Tbx22	Te1-2b	TFIIH-p80: CAK
TBX3 (722 个	Te1-2c	TFIIH-p90
氨基酸)	Te1-2d	TFII-I

[0252]

TBX3 (742 个 氨基酸)	Te1-2e	TFIIIA
TBX4	Te1-2f	Tf-LF1
TBX5 (长同种型)	TFE3	Tf-LF2
TBX5 (短同种型)	TFEB	TFP-95
Tbx5: Nkx2.5	TFEB-A	TGIF
TBX6	TFEC	TGIF2
TCF	TFIIA	TGT3
TCF-1	TFIIA- α / β	TIEG-1
TCF17	前体 (主要形式)	TIF1a
TCF-1A	TFIIA- α / β	TIF1g
TCF-1B	前体 (次要形式)	TIF2
TCF-1C	TFIIA- γ	TLB1
TLX3	TFIIB	TLX
TMF	Vav	ZER6 p52
TR2-11	Vax-2	ZER6 p71
TR2-5	VDR	ZF1
TR2-9	VITF; 痘苗病毒/, 智人	ZF2
TR4	Vpr; HIV-1,	ZFP-37
TRAP	免疫缺陷病毒 1 型	ZFX
TREB-1	WBSCR14	ZFY
TREB-2	WSTF	ZHX1
TREB-3	WT1	ZIC2
TREF1	WT1 I	ZID
TREF2	WT1 I -KTS	ZNF11a
TRF (2)	WT1 I-de12	ZNF124
TRRAP	WT1 -KTS	ZNF133
TWIST	WT1-de12	ZNF143
TxRE BP	XBP-1	ZNF174
		ZNF-20

[0253]

TxREF	XW, V	ZNF-24
UBF	YAF2	ZNF33a
UBP-1	YB-1	ZNF35
UEF-1	YEBP	ZNF43
UEF-2	YL-1	ZNF44
UEF-3	YY1	ZNF45
UEF-4	ZAC	ZNF7
USF1	ZBP89	ZNF76
USF1: USF2	ZBP99	ZNF83
USF2	ZEB (1124 AA)	ZNF85
USF2b	ZEB (1154 AA)	

[0254] 另一组细胞内受体是在下表 2 中列出的细胞内靶分子。

[0255] 表 2 :细胞内靶分子

[0256]

“长链”脂肪酸- CoA 连接酶	乙酰-CoA-苹果酸-柠檬酸- 合酶	淀粉状蛋白-前体蛋白 Ankarin
“主要碱性”蛋白	乙酰葡糖胺- 转移酶	精氨酸酶
“混合功能”- 加氧酶	乙酰精胺- 脱乙酰酶	精胺基琥珀酸- 合成酶
11 β -羟化酶 (EC 1.14.15.4)	乙酰基转酰基酶	精氨基琥珀酸-裂解酶
18-羟化酶	顺乌头酸酶	芳化酶
1-酰基甘油-3- 磷酸酰基转移酶	肌动蛋白	芳基硫酸酯酶
2, 3- 氧化角鲨烯羊毛固醇- 环化酶	腺苷脱氨酶	天冬氨酸- 氨基转移酶
21-类固醇-羟化酶 (EC 1.14.99.10)	腺苷高半胱氨酸- 水解酶	天冬氨酸- 转氨甲酰酶
24, 28-固醇还原酶	腺苷甲硫氨酸- 脱羧酶	ATP 酶
3-羟基丁酸-	腺苷酸环化酶	ATP-二磷酸水解酶
	腺苷酸脱氨酶	<i>bcl-2</i> 癌基因蛋白
	腺苷酸激酶	结缔组织- 激活肽

[0257]

脱氢酶	腺苷酸基琥珀酸-裂解酶	C5a-
3-酮硫解酶	腺苷酸基琥珀酸-合酶	失活因子
3- β -羟基-类固醇-	丙氨酰氨基转移酶	降钙素
脱氢酶	醛缩酶	钙调蛋白
(EC5.3.3.1)	醛糖还原酶	需钙蛋白酶 I
5'-核苷酸酶	碱性磷酸酶	钙网蛋白
8-氧鸟苷	醇脱氢酶	氯甲酰磷酸-
脱糖基酶	酰胺磷酸核糖基胺-	合成酶
<i>abl</i> 癌基因蛋白	转移酶	碳酸脱水酶
乙酰乳酸合酶	AMP	酪蛋白激酶 1
乙酰胆碱酯酶	磷酸二酯酶	酪蛋白激酶 2
乙酰-CoA-羧化酶	淀粉状蛋白 β /A4 蛋白	过氧化氢酶
儿茶酚-	二氢尿嘧啶-	甘油磷酸-
甲基转移酶	脱氢酶	酰基转移酶
组织蛋白酶	双加氧酶	甘油磷酸-
组织蛋白酶 B 和 L	多巴胺单加氧酶	脱氢酶
<i>cdc 10</i>	Dynenin	甘氨酸胺-
<i>cdc 13 p60</i>	弹性蛋白酶	核糖核甘酸-
<i>cdc 2 p34</i>	弹性蛋白	转甲酰酶
<i>cdc 25 p80</i>	延伸因子 Tu	GTP-结合蛋白
Chaparonin	Endo-Rhamosidase	血红蛋白 A
胆固醇-酯酶	烯醇化酶	血红蛋白 A1
胆固醇-	烯醇-ACP-水合酶	血红蛋白 Barcelona
单加氧酶	烯醇-ACP-水合酶	血红蛋白 Barts
柠檬酸合成酶	<i>ets</i> 癌基因蛋白	血红蛋白 Beth Israel
网格蛋白	铁蛋白	血红蛋白 Bunbury
胶原蛋白酶	Ferredoxin	血红蛋白 Cochin-Port
可的松脱氢酶	脂肪酸合成酶	Royal
<i>crk</i> 癌基因蛋白	<i>fgr</i> 癌基因蛋白	血红蛋白 Cowntown
细胞周期蛋白 A 和 B	<i>fps</i> 癌基因蛋白	血红蛋白 Cranston
亲环蛋白	果糖二磷酸-	血红蛋白 Creteil
胞苷脱氨酶	醛缩酶	血红蛋白 D
胞苷酸脱氨酶	反丁烯二酸酶	血红蛋白 D-
细胞色素 C-过氧化物酶	GABA-氨基转移酶	Los Angeles
细胞色素 P450	半乳糖苷酶	血红蛋白 D-Punjab

[0258]

胞嘧啶-	明胶酶	血红蛋白 F
甲基转移酶	凝溶胶蛋白	血红蛋白 Gower
<i>dbl</i> 癌基因蛋白	葡糖磷酸-异构酶	血红蛋白
防卫素	葡糖神经酰胺-	Hammersmith
二酰基甘油-	半乳糖基转移酶	血红蛋白 Hiroshima
酰基转移酶	谷氨酰胺酶	血红蛋白 Indianapolis
二氢叶酸还原酶	谷氨酰胺-	血红蛋白 Kansas
二氢乳清酸酶	磷酸核糖焦磷酸-	血红蛋白 Kariya
二氢乳清酸-	氨基转移酶	血红蛋白 Kempsey
脱氢酶		血红蛋白 Kenya
血红蛋白 Lepore	羟甲基戊二酰基-	髓过氧化物酶
血红蛋白 M	CoA-还原酶	肌丝
血红蛋白 M Hyde	羟甲基戊二酰基-	肉豆蔻酰基转移酶
Park	CoA-合成酶	Na/K ATP 酶
血红蛋白 M Iwate	羟基类固醇-	N-乙酰基葡糖醛酸糖苷酶
血红蛋白 M Saskatoon	脱氢酶	NAD-依赖性固醇-4-
血红蛋白 Nancy	次黄嘌呤-鸟嘌呤-	羧化酶
血红蛋白 Philly	磷酸核糖基转移酶	NAD 酶
血红蛋白 Quong Sze	IMP-脱氢酶	NADPH-依赖性 3-
血红蛋白 Raleigh	咧啉裂解酶	氧类固醇还原酶
血红蛋白 Ranier	肌醇磷酸-	连接蛋白
血红蛋白 S	磷酸酶	<i>N-ras</i> 癌基因蛋白
血红蛋白 Sealy	<i>int-1</i> 癌基因蛋白	核仁蛋白 B23
血红蛋白 Seattle	异柠檬酸裂解酶	核苷二磷酸-
血红蛋白 St. Louis	激肽形成酶	激酶
血红蛋白 St. Mande	<i>Ki-ras</i> 癌基因蛋白	鸟氨酸-
血红蛋白 Titusville	乳酸脱氢酶	氨基转移酶
血红蛋白 Torino	乳铁蛋白	鸟氨酸-
血红蛋白 Wayne	层粘连蛋白	氨甲酰转移酶
血红蛋白 York	白细胞-弹性蛋白酶	鸟氨酸脱羧酶
血红蛋白 Zurich	脂皮质蛋白	乳清酸脱羧酶
<i>Ha-ras</i> 癌基因蛋白	脂肪氧化酶	乳清酸-
己糖激酶	<i>L-myc</i> 癌基因蛋白	磷酸核糖基转移酶
组胺酶	溶菌酶	p53
组氨酸脱羧酶	苹果酸脱氢酶	肽基酰胺羟乙酸-

[0259]

HSP 27	苹果酸合酶	裂解酶
氢嘧啶-	丙二酰转酰基酶	肽基-脯氨酰基-异构酶
水解酶	甘露糖苷酶	PF4
羧酰基-CoA-	<i>met</i> 癌基因蛋白	苯丙氨酸-
脱氢酶	高铁血红蛋白	羧化酶
羧甲基戊二酰基-	甲硫氨酸-	磷脂酸-磷酸酶
CoA-分裂酶	腺苷转移酶	磷酸烯醇丙酮酸-
	<i>mos</i> 癌基因蛋白	羧激酶
磷酸果糖激酶	<i>rel</i> 癌基因蛋白	tRNA-合成酶
磷酸葡萄糖激酶	核糖核苷酸还原酶	原肌球蛋白
磷酸葡萄糖变位酶	磷酸核糖-	色氨酸合酶
磷酸甘油酸激酶	焦磷酸激酶	微管蛋白
磷酸甘油酸变位酶	蓖麻毒素弹性蛋白原	酪氨酸激酶
磷脂酶 A2	酸性磷酸酶	泛醌还原酶
磷脂酶 C	酸性蛋白酶	UPA
磷脂酶 CG1	重酶解肌球蛋白	尿苷一磷酸-
磷脂酶 D	丝氨酸/苏氨酸-激酶	激酶
磷脂酶 S	血影蛋白	维生素 K 还原酶
磷酸核糖变位酶	精胺-合酶	<i>wee-1</i> 基因产物
磷酸核糖基磷酸-	角鲨烯-环氧酶	黄嘌呤脱氢酶
转移酶	角鲨烯-单加氧酶	黄嘌呤氧化酶
<i>pim</i> 癌基因蛋白	<i>src</i> 癌基因蛋白	木糖基转移酶
纤溶酶原激活物-	固醇甲基转移酶	<i>yes</i> 癌基因蛋白
抑制剂	<i>suc</i> 1 p13	α -肌动蛋白
孔蛋白	琥珀酰-CoA-合成酶	α -甘露糖苷酶
pRB (成视网膜细胞瘤基因	超氧化物歧化酶	α -Melogenin
-产物)	酒石酸脱氢酶	α -微管蛋白
pRb 成视网膜细胞瘤基因	硫酯酶	β -肌动蛋白
-产物	硫氧还蛋白	β -葡萄糖醛酸糖苷酶
备解素	血小板反应蛋白	β -甘油磷酸酶
前列腺素合酶	血栓烷-A2-	β -酮脂酰-ACP-
蛋白激酶 C	合成酶	还原酶
嘌呤核苷-	胸苷酸合成酶	β -酮脂酰-ACP-
磷酸化酶	转酰基酶	合成酶
丙酮酸脱氢酶	磷酸丙糖异构酶	β -血影蛋白

[0260]

丙酮酸-激酶

raf 癌基因蛋白

磷酸丙糖-

脱氢酶

 β -原肌球蛋白 β -微管蛋白

[0261] 另一特别优选的一组细胞内受体是 HMG- 蛋白, 例如描述于国际专利申请 PCT/EP96/00716 中的 HMG- 蛋白, 特别是 HMGA- 蛋白。如此处所用的, 术语 HMGA- 蛋白优选地总的来说是指下列蛋白: HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。

[0262] HMGA- 蛋白具有模块化结构, 并且各具有 3 个 DNA 结合结构域和非常酸性的 C- 末端区域, 所述 DNA 结合结构域称为“AT- 钩 (AT-hooks 或 AT-Haken)”并且在图 2 中显示为 DBD1 至 DBD3。对于本领域技术人员很明显的是, 结合“AT- 钩”之一的拮抗剂不仅识别 HMGA1- 蛋白, 并且从而识别两个剪接变体 HMGA1A 和 HMGA1B (参见图 2), 而且还具有与相似的 DNA 结合分子例如 HMGA2 的交叉反应性。除了 HMGA2 外, 许多其他蛋白也具有类似于“AT- 钩”的序列, 和在各情况下为其他受体。除其他以外, 此类蛋白质列于表 3 中:

[0263] 表 3:

[0264] 第 1 栏: 蛋白质数据库-登录号; 第 2 栏: 蛋白质名称

[0265]

<u>Q9UKB0</u>	人 HMG-蛋白-R
<u>Q9UKY1</u>	ZHX1-人锌指-和同源框-蛋白 1
<u>P55198</u>	AF17-人 AF-17 蛋白 [MLLT6]
<u>Q59F28</u>	人 Trithorax 同源物 (片段)
<u>Q6PJQ2</u>	人 ZNF406 蛋白 (片段)
<u>Q75PJ9</u>	人 ZFAT-1 蛋白
<u>Q75PJ7</u>	人 ZFAT-3 蛋白
<u>Q75PJ6</u>	人 TR-ZFAT 蛋白
<u>Q9ULG1</u>	人 KIAA1259 蛋白
<u>Q9NUK2</u>	人的假设的蛋白 FLJ11314
<u>Q9NTG6</u>	人的假设的蛋白 DKFZp434B0616

[0266]

<u>Q8IX01</u>	SFR14-人的推测的剪接因子
<u>Q9H5J8</u>	人的假设的蛋白 FLJ23363
<u>Q6I9Y6</u>	人 MGC5306 蛋白
<u>Q8IX01-2</u>	Q8IX01 的剪接同种型 2
<u>Q8IX01-3</u>	Q8IX01 的剪接同种型 3
<u>Q8IX01-4</u>	Q8IX01 的剪接同种型 4
<u>Q15291</u>	RBBP5-人成视网膜细胞瘤结合蛋白 5 (RBBP-5)
<u>P51608</u>	MECP2-人甲基-CpG-结合蛋白 2
<u>Q6IPE2</u>	人 FLJ12800 蛋白
<u>Q6QHH9</u>	人甲基-CpG-结合蛋白 2, 同种型 B
<u>Q9H8H4</u>	人的假设的蛋白 FLJ13629
<u>Q7Z384</u>	人的假设的蛋白 DKFZp686A24160
<u>042043</u>	ENK7-人 HERV-K-1q23.3 原病毒
<u>P61569</u>	ENK16-人 HERV-K-10p14 原病毒
<u>Q86VM3</u>	人 MYB 结合蛋白 1a [MYBBP1A]
<u>Q9UNW3</u>	人外壳蛋白 RIC-2
<u>Q9BWE0</u>	人 REPIN1 蛋白 (假设的蛋白 ZNF464)
<u>Q9ULL5</u>	人 KIAA1205 蛋白
<u>Q9NZH2</u>	人 Dhfr Oribeta-结合蛋白 RIP60
<u>Q9NZI3</u>	人的由被覆上皮所包含的生长因子 p52
<u>Q9NY27</u>	蛋白磷酸酶-4 的人调控亚基 2
<u>Q86U91</u>	人 HMGA2/RAD51L1 融合蛋白
<u>095368</u>	人转录辅激活物 p52
<u>Q9P015</u>	人 HSPC145 (线粒体核糖体蛋白 L15)
<u>Q5U071</u>	人 HMG 蛋白 '盒 2'
<u>Q9H0Y1</u>	人的假设的蛋白 DKFZp564I206
<u>Q6ZP45</u>	人的假设的蛋白 FLJ26517
<u>P17096-2</u>	P17096 的剪接同种型 HMG-Y [HMGA1]
<u>Q9Y6X0</u>	SETBP-人 SET-结合蛋白 (SEB) [SETBP1]

[0267]

<u>Q8TEK3</u>	DOT1L-人组蛋白-赖氨酸 N-甲基转移酶
<u>Q8TEK3-2</u>	Q8TEK3 的剪接同种型 1 [DOT1L]
<u>Q03164</u>	HRX-人锌指-蛋白 HRX (ALL-1)
<u>Q86YP1</u>	人转录因子 MLL UPN96240
<u>Q86YN9</u>	人转录因子 MLL UPN95022
<u>Q03164-2</u>	Q03164 的剪接同种型 4P-18B [MLL]
<u>P04920</u>	B3A2-人阴离子交换剂-蛋白 2
<u>Q59GF1</u>	人阴离子交换剂-2 型 a-变体
<u>Q8TAG3</u>	人 SLC4A2 蛋白
<u>Q6P391</u>	人 PSIP1 蛋白
<u>075475</u>	人的由被覆上皮所包含的生长因子 p75
<u>Q9UEY6</u>	人阴离子交换剂-2 型 a [SLC4A2]
<u>Q9UEY5</u>	人阴离子交换剂-2 型 b2 [SLC4A2]
<u>Q9UEY4</u>	人阴离子交换剂-2 型 b1 [SLC4A2]
<u>Q9UER6</u>	人转录辅激活物 p75
<u>000256</u>	人 DFS70
<u>P04920-2</u>	P04920 的剪接同种型 B1 [SLC4A2]
<u>Q9BTB1</u>	人的假设的蛋白 MGC10561
<u>Q9UKB0</u>	人 HMG 蛋白-R
<u>043167</u>	包含 ZBT24-人锌指-和 BTB-结构域的蛋白
<u>Q8N455</u>	人 ZBTB24 蛋白 [ZBTB24]
<u>Q5TED5</u>	人锌指-蛋白 450 [ZNF450]
<u>Q96CK0</u>	人锌指-蛋白 653
<u>Q96AS7</u>	人锌指-蛋白 653
<u>P51888</u>	PRELP-人 Prolargine 前体
<u>Q5JPC9</u>	人的假设的蛋白 DKFZp667H216
<u>Q6FHG6</u>	人 PRELP-蛋白
<u>Q6ZR44</u>	人的假设的蛋白 FLJ46672
<u>Q8NEZ4</u>	MLL3-人骨髓/淋巴-白血病蛋白 3 同源物

[0268]

<u>Q96AC6</u>	KIFC2_人驱动蛋白样蛋白 KIFC2
<u>Q9C0H5</u>	K1688_人蛋白 KIAA1688
<u>P52926</u>	HMGIC_人 HMG 蛋白 I-C
<u>Q9UKV3</u>	细胞凋亡性染色质凝聚的 ACINU_人诱导剂
<u>Q59F82</u>	人 C21orf2-蛋白变体
<u>Q5VYT7</u>	人的 OTTHUMP00000021181
<u>Q96M56</u>	人的假设的蛋白 FLJ32810
<u>Q69YJ6</u>	人的假设的蛋白 DKFZp667N107
<u>Q8NEY3</u>	SPAT4_人精子发生相关蛋白 4
<u>Q12809</u>	KCNH2_人的钾电位控制的离子通道亚家族
<u>Q8IYY4</u>	人的类似于 DAZ-相互作用性蛋白 1 的蛋白 [DZIP1L]
<u>Q6ZN04</u>	人的假设的蛋白 FLJ16544
<u>Q5SXN7</u>	人的血清学确定的结肠癌抗原 3
<u>Q8IVG2</u>	人 KIAA2009 蛋白 (片段) [RKHD3]
<u>Q75VX8</u>	人 KIAA2038 蛋白 (片段) [KIAA2038]
<u>Q12809-2</u>	Q12809 的剪接同种型 2 [KCNH2]

[0269] 在此背景下,本发明还涉及针对表 1 至 3 中提及的任一种靶分子的 L- 核酸,特别是镜像异构体。

[0270] 通过将 L- 核酸用作细胞内活性剂,特别是在细胞内部用作细胞内活性剂,以便在细胞内结合细胞内受体,细胞内受体和其相互作用伙伴之间的相互作用的不同形式在细胞内可受到影响。依赖于细胞内受体的相互作用伙伴的性质,L- 核酸的细胞内使用从而使得蛋白质、核酸、脂质、糖类或者蛋白质、核酸、脂质、糖类的组合相互和彼此的相互作用受到影响。

[0271] 与根据本发明的 L- 核酸特别是镜像异构体用作细胞内试剂的用途或者用于结合细胞内受体的方法相关,应当指出,在此优选地涉及体外应用或体外方法。

[0272] 与根据本发明的 L- 核酸特别是镜像异构体在制备用于治疗 and / 或预防疾病的药物和 / 或制备用于诊断的药剂中的用途相关,靶分子是细胞内靶分子。在该点上,细胞内靶分子是有原因地或无原因地参与待预防、治疗或诊断的疾病或病症的靶分子,但在任何情况下其与特异性结合其的 L- 核酸的结合导致,在药物的情况下,疾病被减轻、预防或治愈,和 / 或在诊断剂的情况下,可确定或诊断疾病或易感性。如此处所用的,属于“诊断”包括初步诊断以及随后的诊断,特别是为了例如追踪或确定疾病的进程或疾病的阶段的诊断或检查。在本发明的范围内,靶分子是此处所描述的细胞内受体,特别是转录因子、细胞内靶分子或 HMG- 蛋白。在本发明的范围内,完全特别优选的是,靶分子在细胞内存在,即存在于

细胞内部,并且对于疾病和/或诊断具有影响的在 L- 核酸特别是镜像异构体与靶分子即受体之间的相互作用在细胞内发生。但是,如果靶分子存在于细胞外并且 L- 核酸特别是镜像异构体与靶分子即受体之间的相互作用在细胞外发生,也是在本发明的范围之内。

[0273] 根据细胞内靶分子在各自的适应症所基于的致病机制中的参与,本领域技术人员可获得根据适应症来使用 L- 核酸制备的药物,其中所述核酸针对细胞内靶分子。因此,例如对于 HMGA- 蛋白已知,这些蛋白质与癌(尤其是,乳腺、肺、皮肤、甲状腺)以及白血病和淋巴瘤以及其他恶性肿瘤例如尤其是肉瘤(横纹肌肉瘤、骨肉瘤)相关。此外, HMGA- 蛋白在各种各样的间充质肿瘤中表达,尤其是,错构瘤(乳腺和肺)、脂肪组织肿瘤(脂肪瘤)、唾液腺的多形性腺瘤、子宫平滑肌瘤、血管粘液瘤、乳腺的纤维腺瘤、子宫内膜的息肉和动脉粥样硬化斑块。HMGA 是感兴趣的治疗性靶。HMGA 的阻断可以是控制癌症的合适的起始点并防止其转移扩散。如此处详细描述,由于 HMGA- 蛋白参与许多病毒基因的转录的调控或者 HMGA 特别是 HMGA1 在受动脉硬化侵害的组织中的强表达,所以针对 HMGA- 蛋白的 L- 核酸也适合用于诊断和/或治疗病毒疾病和动脉硬化,所述组织与新内膜的血管平滑肌细胞、巨噬细胞和新血管相关。

[0274] 尽管——如由本发明者所令人吃惊地发现的——核酸,优选地 L- 核酸,特别是镜像异构体,能够就这样穿过磷脂双层膜例如细胞质膜,从而在与细胞内受体特异性地相互作用的意义上具有细胞内功能,但 L- 核酸的渗透效率可受到各种技术的使用的影响,特别是被增强。这些技术包括化学化合物或分子的使用以及物理手段的使用。无论其类型,这些技术在此处通常称为递送媒介物(Abgabevehikel)。在本发明的范围内,本发明者同样已确定,适体也具有该特性,并且与镜像异构体一样,同样地可与本发明的组合物一起用于或导致基本上相同的目的、应用和用途。

[0275] 在化学化合物或分子的使用中,进一步的差异可以是所述核酸是否必须进行修饰以进行递送。如果递送媒介物是小囊泡或包含小囊泡,例如在脂质体、多肽载体、环糊精、树枝状聚合物、纳米颗粒和微颗粒以及聚氮丙啶的情况下,那么为了使用递送媒介物而进行修饰通常不是必需的。如果递送媒介物使用受体介导的胞吞作用、融合肽、信号肽或亲脂缀合物,那么与此相反为了使用递送媒介物而进行修饰通常是必需的。该组物理技术特别地包括电穿孔和离子电渗。要承认,用于将化合物转运通过磷脂双层膜例如细胞质膜的其他技术对于本领域技术人员来说是已知的,所述技术原则上也适合用于转移功能性核酸,例如适体和/或镜像异构体。

[0276] 在下文中详细地描述可在本发明的不同方面的范围内使用的单独的递送媒介物。

[0277] 脂质体由人造阳离子脂质例如氯化 N-[1-(2, 3- 二油酰氧基) 丙基]-N, N, N- 三甲基铵 (DOTMA) 和硫酸 N-[1-(2, 3- 二油酰氧基) 丙基]-N, N, N- 三甲基铵 (DOTAP), 其中阳离子基团与带负电荷的核酸相互作用,从而中和它们的阴离子电荷。通过胞吞作用进行转运 (PNAS, 93:11493-11498, 1996)。然而,阳离子脂质体是有细胞毒性的,特别是在高浓度时,这限制了它们在体外和体内的用途 (Biochem Biophys Res Commun, 197:818, 1993; Biochem Biophys Res Commun, 1372:55-68, 1998)。与此相反,基于两亲性吡啶鎓的脂质 SAINT-2 是无毒性的制剂 (Nucleic Acids Res, 29:2079-2087, 2001)。pH 敏感性脂质体也是备选物,其由两亲性分子例如胆固醇半琥珀酸酯 (Cholesterylhemisuccinat) (CHEMS) 和二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 组成 (J Pharmacol Exp Ther, 297:1129-1136, 2001)。可在由

Dass 和 Torchili (Drug Delivery, 9:169-180, 2002 ;Nat Rev Drug Disc, 4:145-160, 2005) 的综述文章中找到差异很大的脂质体制剂。

[0278] 在受体介导的胞吞作用 (RME) 的情况下,使用已存在于细胞膜中的转运机制。为此,例如通过聚 L- 赖氨酸 (PPL)- 连接体将核酸共价偶联至转运蛋白 (“载体”蛋白)。在这点上,转运蛋白的选择依赖于与细胞膜的特定受体结合的能力和通过胞吞作用在细胞中积累的能力。因此,可实现细胞特异性转运。因而,例如,可将针对 c-myc 的反义-硫代磷酸酯导入 M-14 人黑色素瘤细胞中 (Anticancer Res, 17:29-35, 1997)。然而,通过 RME 进行的有效转运在此不仅依赖于受体对配体的亲和力,还依赖于所选择的受体对于细胞的限制 (特别是在体内)。此外,为了避免转运媒介物的可能的毒性,所选择的配体必须是非活性的或者对于治疗结果是增强的。因此,在体内,所选择的受体的选择和普遍分布对于成功的基于 RME 的转运是决定性的。此外,在基于 RME 的转运中可观察到核酸被隔离在内体区室中,这使得该方法似乎对于细胞内转运或细胞内给予或递送不是十分具有前景。最重要的是,必须这样选择受体和核酸之间的偶联,从而使受体或核酸的功能不被减少 (J Pharmaceutical Science, 92(8):1559-1573, 2003)。

[0279] 融合肽已被用于使肽-寡核苷酸缀合物能够与细胞膜融合,从而完成向细胞内的转运 (Bioconjug Chem, 9:466-475, 1998 ;Bioconjug Chem, 6:43-53, 1995 ;Nucleic Acids Research, 25:2730-2736, 1997)。

[0280] 核蛋白从胞质溶胶选择性地输入细胞核由称为核定位信号 (NLS) 的短肽序列介导。因此,为了将核酸转运入细胞核中可使用各种不同的 NLS-肽衍生物 (Bioconjug Chem, 10:1005-1012, 1999 ;Bioconjug Chem, 10:598-606, 1999 ;Bioconjug Chem, 6:101-108, 1995)。此外,还存在所谓的信号输入肽 (signal import peptide) (IP), 其可促进核酸的细胞吸收并且例如可从卡波西 (Kaposi) 成纤维细胞生长因子 (K-FGF) 衍生而来 (Adv Drug Deliv Rev, 44:35-49, 2000)。

[0281] 可以通过多肽的阻断 (**Blöcke**) 来形成与病毒衣壳相似的媒介物,其用于作用于细胞内转运的可能的转运媒介物的 (Nat Materials, 3(4):244-8, 2004)。

[0282] 寡核苷酸和阴离子磷酸二酯主链的亲水特征减少细胞渗透性。因此,亲脂缀合物是增加寡核苷酸结合脂蛋白的能力从而改善细胞内递送的一种可能的方法。研究得最彻底的缀合物是胆固醇 (Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 12:103-128, 2002)。

[0283] 环糊精是具有中央疏水腔和多个在外表面上的羟基的环状寡糖。因此,环糊精已用于将反义寡核苷酸转运入人 T- 细胞系中 (Antisense Res Dev, 5:185-192, 1995) 和还在体内用于免疫原性 CpG 序列的细胞内转运或者细胞内给予或递送 (Biochem Pharmacol, 52:1537-1544, 1996)。在由 Davis 和 Brewster (Nature Reviews Drug Discovery 3:1023-1035, 2004) 的综述中提供了各种各样的环糊精制剂。

[0284] 树枝状聚合物是高度分枝的大分子,其由通常为聚酰胺的重复单元组成。所述分子在它们的表面上具有官能团例如伯胺基,其通过静电相互作用而与其他分子相互作用。因此,复杂结构的形成快速地并且以高度可重现的方式发生,这导致低细胞毒性的复合物 (Nucleic Acids Research, 28:4225-4231, 2000 ;Clin Cancer Res, 7:3606-3612, 2001)。

[0285] 自 20 世纪 90 年代开始,就寡核苷酸的给予或递送对氰基丙烯酸酯纳米颗粒进行测试。寡核苷酸与纳米颗粒的相互作用通过寡核苷酸的阴离子电荷与各种疏水阳离子主要

是与带电荷的纳米颗粒的离子对来发生。聚氰基丙烯酸异己酯 (PIHCA)、聚氰基丙烯酸异丁基酯 (PIBCA) 或聚氰基丙烯酸己酯 (PHCA) 通常用于纳米颗粒的形成, 尽管也已测试了许多亲脂性阳离子寡核苷酸对 (Pharm Res., 1:1370-1378, 1994 ;PNAS, 91:10460-10464, 1994 ; Pharm Res, 9:441-449, 1992)。此外, 纳米颗粒还已用于体内用途 (Biochem Biophys Res Commun, 279:401-406, 2000 ;Pharm Res, 13:38-43, 1996)。

[0286] 微粒或所谓的微球通常由生物可降解的聚合物, 聚 (d, l- 丙交酯 - 共聚 - 乙交酯 [P(LA-GA)]), 组成, 并用于寡核苷酸的延迟给予 (J Pharm Sci, 91:790-799 ;2000 ;J Controlled Release, 69:197-207, 2000 ;J Drug Target, 5:291-302, 1998)。

[0287] 电穿孔是这样的转运技术, 其使用强电场以使脂双层膜不稳定从而穿透细胞膜, 由此实现待施用的物质 (其也可以以离子化的形式存在 (离子电渗)) 转运入细胞中。已成功地使用电穿孔用于实现寡核苷酸离体以及体内的经皮肤转运 (Int J Pharm, 184:147-156, 1999 ;J Drug Target, 5:275-289, 1998 ;Pharm Res, 15:1596-1602, 1998 ;Int J Cancer, 85:260-266, 2000 ;Biochem Biophys Res Commun, 212:286-292, 1995 ;Blood, 88:731-741, 1996)。

[0288] 可通过使用高压在体外和离体的情况下改善“裸露的”寡核苷酸至细胞中的吸收。为了使用该技术需要封闭系统是使得其只能用于离体应用 (PNAS, 96:6411-6416, 1999 ;Hum Gene Ther, 10:2355-2664, 1999)。

[0289] 同样地, 冲击波 (声波高压脉冲) 的使用使得能够将寡核苷酸转运至细胞内 (J Mol Med, 79:306-313, 2001 ;Cancer Res, 58:219-221, 1998)。超声波同样也是一种与冲击波相当的声学技术, 但使用更高的频率范围 (MHz 而不是 Hz) 和更短的使用时间 (从秒至分钟), 并且已在基因治疗方法中用于发挥支持作用 (Hum Gene Ther, 7:1339-1346, 1996 ; Invest Radiol, 32:723-727, 1997 ;Ultrasound Med Bio, 25:1451-1457, 1999)。

[0290] 在本发明的另一个方面, 提供了新的递送媒介物, 其特别适合用于转运功能性核酸例如适体, 优选地功能性 L- 核酸, 和十分特别优选地镜像异构体。在此, 所述递送媒介物是基于聚氮丙啶的微团样或脂质体样结构。不希望在下文中被限定于此, 现在本发明者的起始点在于, 核酸被包埋或包含在微团样或脂质体样结构中。聚氮丙啶原则上可以作为线性或分枝的聚氮丙啶而存在, 也可以以所述形式使用, 其中以分枝形式存在的分枝的聚氮丙啶是特别优选的。此外, 聚氮丙啶可以作为高分子量或低分子量的聚氮丙啶而存在, 也可以以所述形式使用。优选地, 高分子量聚氮丙啶具有大约 800kDa 的分子量, 而低分子量聚氮丙啶具有大约 3kDa 的分子量。在本发明的范围内, 具有大约 25kDa 的平均分子量的聚氮丙啶是优选的, 其中具有大约 25kDa 的分子量的分枝的聚氮丙啶是特别优选的。

[0291] 虽然对于正常运作不是必需的, 但是如果在本发明的递送媒介物的情况下待递送的核酸本身也具有修饰, 则是优选的。在此, 如果修饰选自 PEG- 残基则是优选的。在此, 如果 PEG- 残基具有大约 1000 至 10000Da, 优选地大约 1200 至 5000Da, 更优选地大约 1500 至 2500Da, 和最优特别地大约 2000Da 的分子量, 则是更优选的。

[0292] 当将核酸与递送媒介物混合以制备本发明的组合物时, 将聚氮丙啶的氮基团的总数与用或通过递送媒介物给予或待包装的核酸的磷酸基团的总数之商调整或实现为大约 1 至 20, 优选地大约 1.5 至 10, 更优选地 2 至 5, 和最优地大约 2 至 3。

[0293] 因此, 本发明的递送媒介物使得还对于功能性核酸例如适体, 特别是 L- 核酸例如

镜像异构体,能够使用核酸的细胞内递送的机制,其通过使用带电荷的颗粒或试剂进行浓集或包装从而伴随性地改变总复合物的电荷。通过胞吞作用可容易地吸收该复合物,从而到达细胞的胞质溶胶中。该方法的不利方面是 DNA/RNA 的稳定性或者核酸从内体区室中的释放。在细胞的胞质溶胶中,通过导入蛋白酶或核酸酶和通过区室的质子化,从紧缩的内体很快形成溶酶体。在那里,核酸酶消化核酸。然而这不适用于镜像异构体,因为由于它们的非天然构型,这些镜像异构体是核酸酶稳定的。此外,在溶酶体的酸性环境中,核酸是不稳定的。然而,这更确切地说对于由 DNA 构成的核酸是这样的,但对于由 RNA 形成的核酸并不完全是这样。通过胞吐作用或者在高尔基体中的降解再次将整个复合物快速转运出细胞,从而只有少数核酸到达细胞中。因此,合适的转染系统必须要克服的一个挑战是稳定核酸和将所述核酸从内体释放入胞质溶胶中。关于稳定性,RNA- 镜像异构体对于真核细胞的转染具有理想的性质,因为作为对映异构体,他们不被酶裂解。

[0294] 根据本发明使用 L- 核酸(特别是与本发明的组合物相关地使用)对于该活性物质类型是特别重要的,因为它们的作用机制基于化学计量方法而不是基于催化方法,其中仅仅少量分子的细胞内给予已足以获得想要的效果。就这点而言,本发明满足了迄今未被现有技术的技术满足的需要。

[0295] 用本发明的递送媒介物提供或产生的本发明的转染系统基于形成由核酸和分枝的聚氮丙啶(PEI)组成的微团。核酸的磷酸二酯主链与 PEI 的游离氮位点相互作用并通过交联而形成由于 PEI 而具有正电荷的小微团。这些微团通过质膜紧缩成内体而容易被细胞吸收。这时,PEI 缓冲流入的质子,由此许多在内体内部的氯离子导致由于渗透压而引起的区室的膨胀。PEI 的这种效应在文献中被描述为质子海绵效应,并最终导致内体的破裂和将镜像异构体释放入胞质溶胶中。(Pharm Res, 22(3):373-80, 2005; Eur J Cell Biol 83(3):97-111, 2004; Gene Ther 9(24):1700-7, 2002)。

[0296] 以气雾剂的形式施用本发明的组合物在本发明的范围之内。

[0297] 此外,可以使用用于细胞内和细胞核内递送的信号肽来衍生镜像异构体,还可以使用用于器官特异性递送的信号肽来衍生镜像异构体。可将信号肽直接与聚氮丙啶的偶联用于定向定位至器官或在细胞内。

[0298] 在另一个方面,本发明涉及针对 HMGA- 蛋白的 L- 核酸,特别是镜像异构体,和更优选 RNA- 镜像异构体。此处公开的针对 HMGA- 蛋白的镜像异构体是同样作为本申请基础的知识特别实例,所述知识为, L- 核酸特别是镜像异构体能够越过细胞的磷脂双层膜或细胞质膜并在细胞内结合细胞内受体,就其特异性结合来选择它们。关于 HMGA- 蛋白和针对 HMGA- 蛋白的 L- 核酸的构型,此处关于 L- 核酸的细胞内用途的公开内容也适用于本发明的本方面(反之亦然),并且在该点上再次被提及以避免不必要的重复。

[0299] DNA 结合性磷蛋白的 HMG(高迁移率组)- 家族作为染色质的非组蛋白组分普遍存在于哺乳动物细胞中(Grosschedl 等人 1994)。碱性 HMG- 蛋白再分为三种不同的家族,即 HMGB 家族(以前的 HMG-1/-2)、HMGN 家族(以前的 HMG-14/-17)和 HMGA 家族(以前的 HMG-I/Y/C)。各 HMG- 家族具有其特征性的功能序列基元:“HMG- 盒”(HMGB 家族)、“核小体结合结构域”(HMGN 家族)和“AT- 钩”(HMGA 家族)。

[0300] 根据目前的认识状况, HMGA 家族包括 2 个基因, HMGA1 和 HMGA2。通过可变剪接可由 HMGA1 表达出三种不同的蛋白质(HMGA1a[以前的 HMG-I]、HMGA1b[以前的 HMG-Y]、

HMGA1c[以前的 HMG-I/R]), 而由 HMGA2 只可表达一种蛋白质 (HMGA2[以前的 HMGI-C])。HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2 是长度为大约 100 个氨基酸的多肽并且具有这样的分子序列组织: 它们具有 3 个强碱性区域 (“AT-钩”), 其结合富含 AT 的双链 DNA 的狭小的沟 (Reeves&Nissen 1990)。与此相反, C-末端包含许多酸性氨基酸。当在溶液中游离时, 所述蛋白质不具有稳定的二级结构, 并且当它们以与 DNA 或其他蛋白质的复合物存在时才采取指定的构象 (Huth 等人 1997)。HMGA 蛋白属于哺乳动物细胞核中的经最强修饰的蛋白质, 并且被磷酸化、乙酰化和甲基化 (Reeves&Beckerbauer 2001)。

[0301] HMGA 蛋白自身不具有任何转录活性, 但却作为所谓的构筑转录因子 (architektonische Transcriptionsfactoren) 通过其蛋白质-蛋白质和蛋白质-DNA 相互作用来组织核蛋白-DNA 转录复合物的形成 (Wolffe 1994)。因此它们调控性地对大量基因的表达产生了激活或抑制性影响。正调控的最突出的例子是 HMGA1 参与 IFN- β 的调控 (Thanos&Maniatis, 1992)。因此, 例如在 IFN- β 启动子的情况下, HMGA1b 刺激 NF- κ B 和 ATF-2 对 DNA 双螺旋的结合, 并且同时以使 NF- κ B 和 ATF-2 可相互之间和还也许与转录机构的其他组分相互作用的方式来改变 DNA 结构 (Thanos&Maniatis 1992, Du 等人 1993)。与动脉硬化发病机理相关的另一个转录激活效应是由 HMGA1 诱导的 CD44 基因调控 (Foster 等人 1998)。CD44 是一种细胞表面糖蛋白, 并且在内皮损伤后参与平滑肌细胞的迁移和增殖 (Jain 等人 1996, Cuff 等人 2001)。CD44 的转录调控通过 c-Fos 和 c-Jun 对 CD44 启动子中的 AP-1 结合位点的结合来诱导, 并通过 HMGA1 的结合来增强。在大鼠中的研究已显示, 通过 CD44 的过表达导致平滑肌细胞的增强的募集, 并且这对于动脉硬化损伤的形成具有直接影响 (Pellacani 等人 1999; Foster 等人 1998; 2000)。

[0302] 对于定位在染色体带 6p21.3 中的 HMGA1 基因和定位在区域 12q14-15 中的 HMGA2 基因的表达式的研究显示, 这些基因主要在细胞分化过程中具有活性。因此, 在胚胎发育过程中和未分化的细胞中 (Chiappetta 等人 1996) 以及在经生长因子刺激的细胞中 (Friedman 等人 1993; Johnson 等人 1990; Ogram 等人 1995; Holth 等人 1997) 发现这些基因的强表达。在成人的、分化的组织中, HMGA1 只在视网膜中强烈地表达, 而在其他组织中根本未发现 HMGA2, 和只以非常低的浓度发现 HMGA1 (Bussemakers 等人 1991; Chiappetta 等人 1996; Rogalla 等人 1996; Zhou 等人 1995; Chau 等人 2000)。在此, 在分化的正常组织中再活化 HMGA 蛋白的表达与脂肪细胞的生长和分化 (Zhou 等人 1995; Anand&Chada 2000; Melillo 等人 2001)、血管损伤后在血管中平滑肌细胞的增殖 (Chin 等人 1999)、炎症反应中的免疫应答 (Pellacani 等人 1999) 以及细胞凋亡过程 (Diana 等人 2001; Sgarra 等人 2003) 有关。在此, HMGA1 的量依赖于细胞的增殖率而变化 (Johnson 等人 1990)。

[0303] 在胚胎发育过程中, HMGA1 的表达集中在外胚层、中胚层或内胚层来源的特定器官中, 而 HMGA2 局限在间充质组织中。迄今不存在关于敲除了 HMGA1 的小鼠的表型的信息, 很可能是因为该因子的缺乏严重损害了胚胎发育。与此相反, 敲除了 HMGA2 的小鼠是矮小的并且特别地具有很少的脂肪组织 (Zhou 等人 1995), 此外对于饮食诱导的肥胖具有抗性 (Anand&Chada 2000)。

[0304] 最后, 在正常小鼠的脂肪组织中未检测到 HMGA2 和 HMGA1b 的表达, 但所述表达在肥胖或糖尿病小鼠中显著增加 (Chada 等人 2004), 这表明肥胖症和 HMGA 表达之间的关联。

[0305] HMGA1 的过表达特别影响 (Reeves 等人 2001):

- [0306] • 细胞周期和生长的调节剂例如 cdc25A,
- [0307] • 中间纤维标记例如 1 型细胞角蛋白,
- [0308] • 细胞凋亡调节剂例如 TRAR15,
- [0309] • 癌基因和肿瘤抑制基因例如 MET,
- [0310] • 用于 DNA 修复和重组的基因例如 DNA 酶 X,
- [0311] • 细胞命运和发育的调节剂例如 frizzled-5,
- [0312] • 受体例如 FGFR1,
- [0313] • 细胞粘附、运动和侵袭基因例如 I 型胶原蛋白,
- [0314] • 血管发生调节剂例如 FGFR2,
- [0315] • 侵袭调节剂例如 MMP-16,
- [0316] • Rho 家族的小 GTP 酶和其调节剂例如 RhoC,
- [0317] • 细胞-细胞相互作用基因例如钙粘着蛋白 12,
- [0318] • 生长因子和细胞因子例如 IL-11。
- [0319] 因此, HMGA1 的异常调控可导致基因表达的普遍改变, 从而显著地促成了转化和 / 或转移的表型的形成。
- [0320] HMGA 蛋白似乎在间充质肿瘤和上皮肿瘤中起着不同的作用: 在恶性上皮肿瘤中, HMGA 的表达更确切地与癌症发生的较晚期阶段相关, 然而良性肿瘤 (更确切地说, 少见地为转化性间充质肿瘤) 已在早期超常增生中表达 HMGA。这表明, 在不同胚胎来源的组织中 HMGA 蛋白满足不同的功能, 由此还可直接得出本发明的 L-核酸在诊断和 / 或治疗相应疾病的相应用途, 这一点还在下文中进行更详细的说明。
- [0321] 在动物模型中研究 HMGA1 在各种不同的人 and 动物赘生物中的表达。在关于肿瘤发生 (Leman 等人 2003 ; Ram 等人 1993) 以及瘤形成进展 (Bussemakers 等人 1991 ; Nestl 等人 2001 ; Ram 等人 1993) 的动物模型中可以证明 HMGA-1 的作用。
- [0322] 已在下列部位的癌症中证明了 HMGA1 基因的提高了的表达:
- [0323] • 前列腺 (Bussemaker 等人 1991 ; Tamimi 等人 1996, Leman 等人 2003 ; Nestl 等人 2001)
- [0324] • 胰腺 (Nestl 等人 2001 ; Abe 等人 2000, 2002 ; Tarbe 等人 2001)
- [0325] • 甲状腺 (Chiappetta 等人 1998, 1995)
- [0326] • 子宫颈 (Bandiera 等人 1998)
- [0327] • 胃 (Xiang 等人 1997)
- [0328] • 乳腺 (Holth 等人 1997 ; Baldassarre 等人 2003 ; Reeves 等人 2001 ; Nestl 等人 2001 ; Ram 等人 1993 ; Dolde 等人 2002)
- [0329] • 结肠 / 直肠 (Fedele 等人 1996 ; Abe 等人 1999 ; Kim 等人 1999 ; Chiapetta 等人 2001)
- [0330] • 卵巢 (Masciullo 等人 2003)
- [0331] •
- [0332] 和, 进一步在下列中证明了这一点:
- [0333] • 成神经细胞瘤 (Giannini 等人 2000 ; 1999) 以及
- [0334] • 淋巴瘤 (Wood 等人 2000a ; b)。

[0335] 在肿瘤发病机理和转移过程中 HMGA1 基因的表达增加和作用的确切原因仍未完全阐明。然而各种研究表明,作为诊断标记的各肿瘤的 HMGA1 表达强度与其转移潜能相关,从而代表了恶性转化的细胞的特征性标志 (Giancotti 等人 1987)。

[0336] 此外, HMGA1 相关性间充质肿瘤 (在该良性肿瘤的情况下) 的特征在于在染色体 HMGA1- 区域 6p21.3 中的染色体改变。此类异常,迄今尤其在下列中进行了描述:

[0337] • 子宫平滑肌瘤 (Mark 等人 1988 ;Ozisik 等人 1993)

[0338] • 脂肪瘤 (Sreekantaiah 等人 1990)

[0339] • 子宫内膜息肉 (Fletcher 等人 1992 ;Dal Cin 等人 1995) 和

[0340] • 肺的软骨样错构瘤 (Fletcher 等人 1991 ;Johansson 等人 1992, 1993)。

[0341] 在控制生长和增殖的遗传机制中的异常是癌症发生的主要原因。HMGA 蛋白的表达强烈地与肿瘤发展相关,这已在许多文章中得到证明 (Giancotti 等人 1987, 1989, 1993)。因此,在化学或病毒导致的肿瘤中以及在自发发生的肿瘤中发现显著的 HMGA2 表达,然而在非转化细胞或健康细胞中未检测到该蛋白质 (Giancotti 等人 1989)。与此相一致,用致癌逆转录病毒感染的细胞缺乏各种关于转化的表型标记,在所述细胞中 HMGA2 表达的合成被特异地阻断 (Berlingieri 等人 1995)。

[0342] 已在小鼠模型中明确了 HMGA 蛋白在正常以及病理性生长中的至关重要的作用: HMGA2 敲除小鼠显示出矮小生长,即,这些动物的大小为野生型小鼠的大约 60%。然而,这些侏儒小鼠对化学诱导的皮肤肿瘤具有高度的抵抗能力。

[0343] 在近几年中,借助于细胞遗传学研究,对于大量的间充质来源的良性肿瘤 (其是人中最大一组的良性赘生物) 已发现涉及 HMGA2 基因的染色体区域 12q14-15 的结构异常。尽管存在大量的异常 (Schoenmakers 等人 1995 ;Kottickal 等人 1998 ;Klotzbüchel 等人 1999), 然而改变的形式总是具有共同特征: 它们保持所有三个 DNA 结合结构域,但同时丢失酸性 C- 末端结构域以及在 RNA 水平上丢失 3' UTR 的信息。

[0344] 对于许多 (大部分为良性的) 间充质 HMGA 相关性肿瘤,已发现此类改变:

[0345] • 子宫平滑肌瘤,妇女中最常见的下腹部肿瘤,并且是在美国每年超过 200,000 例子宫切除术的适应症 (Heim 等人 1988 ;Turc-Carel 等人 1986 ;Vanni 等人 1988)

[0346] • 脂肪瘤 (Heim 等人 1988 ;Turc-Carel 等人 1986 ;Mandahl 等人 1987 ; Sreekantaiah 等人 1991 ;Belge 等人 1992)

[0347] • 子宫内膜息肉 (Walter 等人 1989 ;Vanni 等人 1993 ;Dal Cin 等人 1995)

[0348] • 肺的软骨样错构瘤 (Fletcher 等人 1991, 1995 ;Dal Cin 等人 1993)

[0349] • 头唾液腺的多形性腺瘤 (Mark 等人 1980, 1986 ;Bullerdiek 等人 1987)

[0350] • 血管外皮细胞瘤 (Mandahl 等人 1993)

[0351] • 软骨瘤 (Mandahl 等人 1989 ;Bridge 等人 1992)

[0352] • 乳腺的良性肿瘤 (Birdsal 等人 1992 ;Rohen 等人 1995 ;Staats 等人 1996)

[0353] • 侵袭性血管粘液瘤 (Kazmierczak 等人 1995)

[0354] • 弥漫性星形细胞瘤

[0355] • 破骨细胞瘤 (Nuguera 等人 1989)。

[0356] 癌症患者的死亡率和发病率的主要原因是在体内原发性赘生物的转移扩散。转移并不是简单的过程,因为散布的赘生性细胞成功定殖至远距离的器官必须通过许多阶段。

赘生性细胞必须从原发性赘生物中释放,进入血流,在远距离的位点再次渗出,并最终在相应的器官的实质内再次增殖。许多表达蛋白酶、粘附分子、运动因子和血管生成因子的基因参与这种高度复杂的转移级联反应的各个阶段。

[0357] 这些基因中哪一个基因关于转移最终具有决定性仍然未知。然而, HMGA1 基因(作为控制该过程的最重要的因子之一)对此是可能的候选者。HMGA1 的基因产物影响许多对于成功的转移来说重要的基因的转录。例如,已显示,其他转移相关性基因在 HMGA1 表达受到抑制时以减少的水平表达它们本身 (Battista 1998 ;Vallone 1997)。

[0358] 因此, HMGA1 是感兴趣的治疗性靶分子。因此, HMGA1 的阻断原则上适合用于控制癌症和预防其转移扩散 (Evans 2004 ;Sgarra 2004)。因而,例如通过在癌细胞中使用针对 HMGA 转录物的反义 RNA,可在体外减少细胞增殖或甚至使所述细胞经历凋亡 (Masciullo 2003 ;Scala2000 ;Chau 2003)。在动物模型中显示,通过基因疗法(针对 HMGA 转录物的反义 RNA 的腺病毒表达)显著地减少了各种胰腺癌异种移植物的生长 (Trapasso 等人 2004)。

[0359] 为了确定将从更具攻击性的癌症疗法中获益的患者,可将 HMGA1 进一步用作预后诊断标记。在恶性转化的程度和表达的 HMGA1 的量之间存在密切相关性。反过来这可与许多人类癌症类型例如前列腺癌 (Tamimi 1996 ;Bussemakers 1991) 和结肠直肠癌 (Abe 1999) 或成神经细胞瘤 (Giannini 2000) 中的较差的预后有关联。

[0360] 通过许多病毒以及通过宿主细胞提供的用于病毒基因表达或作为辅因子的控制因子来使用 HMGA 蛋白,尤其是通过下列病毒:

[0361] • 人乳多空病毒 JC (Leger 等人 1995)

[0362] • EB 病毒 (Schaefer 等人 1997)

[0363] • 单纯疱疹病毒 (Panagiotidis 1999 ;French 等人 1996)

[0364] • HIV-1 病毒 (Henderson 等人 2000)。

[0365] 特别地, HMGA 蛋白在宿主细胞中与许多病毒基因的转录调控相关。其实例是人乳多空病毒 JC 的早期和晚期表达的基因的表达调控 (Leger 等人 1995)、EB 病毒 (EBV) 的 EBNA1 (EB 病毒核抗原 1) 基因的调控(所述基因共同负责控制病毒的潜伏期) (Schaefer 等人 1997)、单纯性疱疹-1 (HSV-1) 的 IE-3 (即时早期) 基因(所述基因编码很早表达的蛋白质 ICP4) 的调控 (Panagiotidis 等人 1999)、HSV-1 的在潜伏期具有活性的启动子 2 的调控 (French 等人 1996) 和人 HIV-1 病毒的 LTR (长末端重复)-启动子的调控 (Henderson 等人 2000)。

[0366] 在病毒疾病的情况下,在宿主细胞方面对于 HMGA 的需要不是只限于病毒基因的调控。HMGA1 还似乎在将 HIV-1 病毒、莫洛尼鼠白血病病毒 (MoMuLv) 和肉瘤性禽流感病毒 (ASV) 的病毒 DNA 整合入人基因组中作为构筑辅因子 (architektonischer Kofactor) 起着决定性的作用,从而看起来为抗病毒疗法的感兴趣的治疗手段 (Van Maele 等人 2006, Li 等人 1998, Hindmarsh 等人 1999)。

[0367] 因此, HMGA 蛋白的抑制剂也适合用于治疗和诊断病毒感染 (Reeves&Beckerbauer 2002)。

[0368] 由于前面证明了 HMGA 蛋白参与各种疾病和它们适合作为诊断标记,因而针对这些蛋白质的 L- 核酸特别是镜像异构体可用于预防、治疗和诊断上述疾病。在此,特别优选的镜像异构体是此处描述的镜像异构体。关于这一点,本领域技术人员会认识到,尽管已

产生了针对特定的 HMGA 蛋白的个别镜像异构体,但由于实施例 2 中所描述的结构域方法 (**Domänen**-Ansatzes),这些镜像异构体也允许与其他 HMGA 蛋白交叉反应,这可从图 2 中所描绘的比对中看出。

[0369] 此外,本领域技术人员会认识到,本发明的核酸具有一系列定义一类镜像异构体的结构基序,所述镜像异构体结合作为细胞内受体的 HMGA 蛋白。在实施例 1 中更详细地说明了各种结构基序。

[0370] 本发明的核酸在优选实施方案中还包括与此处具体公开的序列基本上同源的那些核酸。术语“基本上同源的”在此应当优选地理解为是指同源性为至少 75%,优选 85%,更优选 90%,和最优选超过 95、96、97、98 或 99%。

[0371] 本发明的核酸这一术语应当进一步还包括包含如此处公开的核酸序列的那些核酸或其部分,优选地在核酸或其所述部分参与对 HMGA 蛋白的结合这一范围内。这样的核酸可例如通过缩短或截短从此处公开的核酸而衍生出来。缩短可涉及核酸的一个或两个末端,如此处所公开。缩短也可涉及核苷酸的内部序列,即可涉及 5' 和 3' 末端核苷酸之间的核苷酸。此外,术语“缩短”也应当涉及从此处公开的核酸序列中删除少至一个单个核苷酸。缩短还可涉及本发明核酸的超过一个的区域,其中这些区域中的每一个区域可以小至一个核苷酸长。

[0372] 此外,本发明的核酸可以是 D- 核酸或 L- 核酸。优选地,本发明的核酸是 L- 核酸。此外,核酸的一个或多个部分可能以 D- 核酸的形式存在,或核酸的至少一个或多个部分可能是 L- 核酸。术语核酸的“部分”表示小至一个核苷酸。这样的核酸在此处通常分别称为 D- 核酸和 L- 核酸。因此,在一个优选的实施方案中,本发明的核酸由 L- 核苷酸组成并且包含至少一个 D- 核苷酸。优选地,这样的 D- 核苷酸被固定至与定义本发明核酸的区域不同的部分,和优选地被固定至其那些部分,通过所述部分进行与核酸的其他部分的相互作用。优选地,这样的 D- 核苷酸被固定至各区域或本发明的各核酸的末端。在一个优选的实施方案中,这样的 D- 核苷酸可用作间隔子或连接体,其优选地将修饰例如 PEG 和 HES 结合至本发明的核苷酸。

[0373] 在本发明的范围内,在一个实施方案中,本发明的核酸还包括为更长的核酸的一部分的那些核酸,其中这些更长的核酸可包含几个部分,其中至少一个部分是本发明的核酸或其部分。这些更长的核酸的其他部分可以是 D- 核酸或 L- 核酸。任何组合可以与本发明联合使用,和为了例如此处对于本发明的核酸所公开的目的或用途。更长的核酸的该其他部分或这些其他部分可具有与结合特别是与 HMGA 蛋白的结合不同的功能。可能的功能在于,例如为了固定、交联、检测、扩增或修饰或者分子量增加而允许与其他分子相互作用。

[0374] 特别是在这点上,如此处使用的,由 L- 核苷酸组成的核酸优选地完全由 L- 核苷酸组成。

[0375] 相应地,特别地,如此处使用的,由 D- 核苷酸组成的核酸优选地完全由 D- 核苷酸组成。

[0376] 不管本发明的核酸是由 D- 核苷酸、L- 核苷酸组成还是由两者的组合(其中所述组合是例如由至少一个 L- 核苷酸和至少一个 D- 核苷酸组成的区域的随机组合或确定的序列)组成,所述核酸都可由一个或多个脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和其组合组成。

[0377] 在进一步的方面,本发明涉及由至少一种本发明的核酸与一种或多种其他核苷酸

组合组成的药物组合物,其中所述其他核酸优选地结合不同于 HMG A 蛋白的靶分子或产生与本发明的核酸不同的功能。

[0378] 因为几个原因,将本发明的核酸构建为 L- 核酸是有利的。L- 核酸是天然发生的核酸的对映异构体。然而 D- 核酸在水溶液中特别是在生物系统和生物样品中不是非常稳定的,这是因为核酸酶的广泛存在。天然出现的核酸酶,特别是来自动物细胞的核酸酶,不能降解 L- 核酸。因为该原因, L- 核酸在包括人体和动物体的这样的系统中的生物半衰期显著增加。由于缺乏 L- 核酸的降解性,没有产生核酸酶降解产物,从而没有观察到由此所得的副作用。该方面事实上将 L- 核酸与用于治疗疾病和 / 或病症的所有其他化合物区分开, HMG A 的存在或其具有原因关系的牵连包括通过与 Watson-Crick 碱基配对不同的机制特异性地结合靶分子的 L- 核酸,或者部分或完全由 L- 核苷酸组成的适体,特别地其中参与该适体与靶分子结合的适体的那些部分称为镜像异构体。

[0379] 无论本发明的核酸是以 D- 核酸、L- 核酸还是以 D-L- 核酸的形式存在,以及无论它们是 DNA 还是 RNA,本发明的核酸可以以单链或双链核酸的形式存在,这也在本发明的范围之内。通常,本发明的核酸是单链核酸,其可以具有由于一级序列而确定的二级结构,从而还可以形成三级结构。然而,在相互之间互补或部分互补的两条链相互杂交这一意义上,本发明的核酸也可以是双链的。这为核酸提供了稳定性,如果核酸以天然发生的 D- 形式而不是 L- 形式存时,这是特别有利的。

[0380] 可修饰本发明的核酸。此类修饰可涉及核酸的单个核苷酸并且在现有技术中是熟知的。这样的修饰的实例尤其描述于下列文献中: Venkatesan N. 等人 (2003) Curr Med Chem. Oct; 10(19): 1973-91; Kusser, W. (2000) J Biotechnol, 74: 27-38; Aurup, H. 等人 (1994) Nucleic Acids Res, 22, 20-4; Cummins, L. L. 等人, (1995) Nucleic Acids Res, 23, 2019-24; Eaton, B. E. 等人 (1995) Chem Biol, 2, 633-8; Green, L. S. 等人, (1995) Chem Biol, 2, 683-95; Kawasaki, A. M. 等人, (1993) J Med Chem, 36, 831-41; Lesnik, E. A. 等人, (1993) Biochemistry, 32, 7832-8; Miller, L. E. 等人, (1993) J Physiol, 469, 213-43。这样的修饰示例性地可以是在该核酸中包含的单个核苷酸的 H 原子、F 原子或 O-CH₃ 基团或 2' 位置上的 NH₂ 基团。此外,本发明的核酸可包含至少一个 LNA- 核苷酸。在一个实施方案中,本发明的核酸由 LNA- 核苷酸组成,优选地完全由 LNA- 核苷酸组成。

[0381] 在一个实施方案中,本发明的核酸可以是多部分核酸。此处所用的,多部分核酸是由至少两个核酸链组成的核酸。这些至少两个核酸链形成了功能单元,其中所述功能单元是靶分子的配体。所述至少两个核酸链可从本发明的核酸之一衍生,这通过切割核酸从以产生两条链,或者通过合成相应于本发明核酸即总核酸的第一部分的核酸和相应于所述总核酸的第二部分的另一个核酸。要认识到,可使用切割和合成来产生多部分核酸,在所述多部分核酸中可存在多于上面示例性地描述的两条链。换句话说,所述至少两条核酸链优选地与相互互补和相互杂交的两条链不同,尽管互补性可以以某种程度存在于不同的核酸部分之间。

[0382] 本发明已确定,本发明的核酸具有非常有利的 K_D- 值范围或解离值范围,从而具有非常有利的结合常数。确定结合常数的一个实例是使用平衡结合测定法,在实施例 1 中描述了该测定法。

[0383] 本发明的核酸的 K_D -值优选地小于 $1\ \mu\text{M}$ 。大约 $1\ \mu\text{M}$ 的 K_D -值应当对于核酸与靶的非特异性结合来说是特征性的。如本领域技术人员将认识到的, 一组化合物例如本发明的核酸的 K_D -值可在一定范围内变化。上述大约 $1\ \mu\text{M}$ 的 K_D 是 K_D -值的优选的上限值。结合靶分子的核酸的 K_D 的优选下限值可以是大约 pM 或更低。在本发明的范围之内的是, 结合 HMGA 的单个核酸的 K_D -值优选地在该范围内。可通过选择该范围内的第一个数和该范围内的第二个数来选择出优选的范围。优选的上限值为 $0.25\ \mu\text{M}$ 、 $0.1\ \mu\text{M}$, 优选的下限值为 100nM 、 10nM 、 1nM 和 0.05nM 。

[0384] 优选地, 本发明的核酸在 37°C 下在溶液中以解离常数 $K_D < 20\text{nM}$ 结合 HMGA1b, 如实施例 2 中所描述的。

[0385] 本发明的核酸可以具有任意长度, 只要它们仍然能够结合靶分子。在现有技术中承认, 本发明的核酸的特定长度是优选的。通常, 长度在 15 和 120 个核苷酸之间。本领域技术人员会进一步认识到, 15 和 120 之间的任何整数是本发明核酸的优选的可能的长度。本发明核酸的长度的优选范围是大约 20 至 100 个核苷酸, 大约 20 至 80 个核苷酸, 大约 20 至 60 个核苷酸, 大约 20 至 50 个核苷酸和大约 30 至 50 个核苷酸的长度。

[0386] 在一个实施方案中, 本发明的核酸以经修饰的形式存在。特别优选的修饰形式是 PEG 化。这涉及通过与聚乙二醇 (PEG) 或其他基团偶联来修饰本发明的核酸。

[0387] 由于本发明的核酸的高度稳定性, 特别是在其中这些核酸以 L-核酸的形式存在的实施方案中, 因而可能直接给予本发明的核酸以治疗需要这样的治疗的患者。优选地, 将本发明的核酸配制为用于局部或全身性施用的生理溶液。

[0388] 除了将本发明的核酸直接用于治疗、预防和诊断此处描述的疾病外, 这些核酸还可单独地或与药物组合物中的其他物质相组合地存在或使用。因此本发明的药物组合物包含至少一种本发明的核酸和优选地药学上可接受的粘合剂。这样的粘合剂可以是任何已知的或本领域中已知的粘合剂。特别地, 这样的粘合剂是关于药物的制备所描述的任何粘合剂, 如此处公开的。在一个进一步实施方案中, 药物组合物包含另一种药物活性剂。在本发明的范围之内的是, 此处描述的药物是药物组合物, 如此处描述的。

[0389] 优选地所述药物组合物用于静脉内施用。然而, 肌内、腹膜内或皮下施用此类药物组合物也在本发明的范围之内。其他施用途径是口服或鼻内施用, 其中侵袭性最低但同时保持药物组合物和药物活性剂的功效的施用形式是优选的。

[0390] 优选地, 本发明的核酸就这样或与本发明的药物组合物相联合地包含或溶解在药学上可接受的溶剂中。此类溶剂特别地是选自水、生理盐水、PBS 或葡萄糖溶液特别是 5% 葡萄糖溶液的溶剂。这样的载体可以是例如水、缓冲液、PBS、葡萄糖溶液优选地 5% 的葡萄糖溶液 (等渗的)、淀粉、糖类、明胶或任何其他可接受的载体物质。此类载体通常是本领域技术人员已知的。

[0391] 在本发明的范围之内的是, 药物组合物在其各种实施方案中包含至少一种本发明的核酸, 包括但不限于作为缀合物的核酸, 如此处描述的。

[0392] 在进一步的实施方案中, 所述药物包含其他药物活性剂。这样的其他药物活性剂是例如蛋白酶抑制剂、增殖抑制剂和血管发生抑制剂和 / 或具有细胞生长抑制效应的药剂。备选地或此外, 这样的其他药物活性剂是本发明的其他核酸。备选地, 所述药物包含至少一种或多种核酸, 所述核酸结合不同于 HMGA 的靶分子或具有与本发明核酸不同的功能。

[0393] 本发明的药物组合物可用于治疗、诊断和 / 或预防此处所描述的疾病或病症中的每一种疾病。

[0394] 在其他方面,本发明涉及用于治疗需要此类治疗的活生物的方法,其中所述方法包括施用药物学活性量的至少一种本发明的核酸。在一个实施方案中,所述活生物遭受疾病,或其存在患此类疾病的风险,其中所述疾病是此处公开的疾病中的任一种,特别是相关于本发明核酸之一用于制备药物的用途而描述的疾病。

[0395] 尽管从上面举例说明的 HMGA 蛋白在各种疾病和病状中的参与已得出本发明的核酸的用途,但为了举例说明,在下文中进一步讨论该方面。

[0396] 特别地, HMGA 蛋白及其基因逐渐地被与瘤形成疾病的诊断和预后相联系和被建议作为潜在的生物标记。在健康组织中,如完全可检测的话, HMGA1a/b 蛋白的表达水平非常低。提高的 HMGA1a/b 蛋白表达对于许多肿瘤和各种不同癌症疾病的转移的表型来说是特征性的 (Sarhadi 等人 2006, Balcerzak 等人 2005, Briesse 等人 2006, Chang 等人 2005, Peters 等人 2005, Sato 等人 2005, Chiappetta 等人 2004, Li 等人 2004, Chuma 等人 2004, Donato 等人 2004, Czyz 等人 2004, Kettunen 等人 2004, Lee 等人 2004, Chen 等人 2004, Abe 等人 2003, Blacerczak 等人 2003, Flohr 等人 2003, Masciullo 等人 2003, Nam 等人 2003, Pierantoni 等人 2003)。高 HMGA 蛋白表达与不良的预后和转移的出现显著相关。活组织检查中 HMGA1a/b 的表达水平和其组织学特征的检测是瘤形成疾病特别是上文中讨论的疾病和病状的早期识别、预后和鉴定的诊断方法。

[0397] 此外,在文献中描述了 HMGA1 蛋白和动脉硬化斑之间的关联 (Schlueter 等人 2005)。HMGA1 调控 CD44,其为关于斑形成的主要靶基因之一。在这点上发现,与周围的组织相比,所涉及的区域例如新内膜、血管平滑肌细胞、巨噬细胞和新血管具有强的 HMGA1 的表达。因此, HMGA1 似乎是在斑形成中的介体之一,从而为用于诊断目的靶分子。

[0398] 此处描述的结合 HMGA1a/b 的 L- 核酸特别是镜像异构体,可在本领域技术人员已知的方法的范围之内与抗体相似地使用。迄今只有非常少的抗 HMGA1 的特异性 (区分性) 和亲和性抗体被鉴定和可商购获得。这似乎是由于 HMGA1 不存在二级结构而造成的,所述 HMGA1 不是抗体产生中 MHC 复合物的合适的靶。

[0399] 在该背景下,在这点上,令人吃惊地发现,生物素化的结合 HMGA1a/b 的镜像异构体 5'-bio-NOX-A50 在 Western 印迹法中于癌细胞系中作为单个条带识别 HMGA1a/b。此外,如实施例 2 中所描述的,可检测出重组表达的 HMGA1b 蛋白。例如通过用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗生物素抗体来检测生物素化的镜像异构体。

[0400] 进一步的方法是 HMGA1a/b 的体内诊断,其中可使用本发明的核酸。肿瘤和转移灶通常被包埋在释放 HMGA1a/b 至周围组织中的坏死肿瘤细胞中。细胞外 HMGA1a/b 的检测是诊断包埋在健康组织中的肿瘤和转移灶的一个方法。

[0401] 如此处优选地使用的,诊断剂或诊断试剂或诊断药剂能够直接或间接地检测 HMGA 蛋白,优选地如此处描述的 HMGA1a/b,和优选地如此处与各种病症和疾病相关描述的 HMGA1a/b。所述诊断剂适合用于检测和 / 或搜寻此处描述的任何疾病和病状。通过本发明的核酸与 HMGA1a/b 的结合可能进行这样的检测。可直接或间接地检测这样的结合。相应的方法和试剂对于本领域技术人员来说是熟知的。除其他以外,本发明的核酸可包含标记,这允许检测本发明的核酸,优选地结合至或可结合至 HMGA 蛋白 (优选地 HMGA1a/b) 的核

酸。这样的标记优选地选自放射性标记、酶促标记和荧光标记。原则上可以调整所有开发用于抗体的已知测试以适用于本发明的核酸，其中用结合靶分子的核酸替代结合靶分子的抗体。在使用未标记的结合靶分子的抗体的抗体测试中，优选地使用二抗来进行检测，所述二抗已用放射性标记、酶促标记或荧光标记进行了修饰，并且在其 Fc 片段处结合至结合靶分子的抗体。在核酸（优选地本发明的核酸）的情况下，核酸用这样的标记进行修饰，其中这样的标记优选地选自生物素、CY-3 和 CY-5，并且这样的标记通过针对此类标记的抗体例如抗生物素抗体、抗 CY-3 抗体或抗 CY-5 抗体来检测，或者在标记是生物素的情况下，通过天然结合生物素的链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白来检测所述标记。再次地，这样的抗体、链霉抗生物蛋白或抗生物素蛋白优选地与二抗类似地用相应标记例如放射性标记、酶促标记或荧光标记来进行修饰。

[0402] 在其他实施方案中，通过第二检测试剂来检测或分析本发明的核酸，其中所述检测试剂是分子信标。分子信标技术对于本领域技术人员来说是已知的。简而言之，这些分子信标是核酸探针，所述核酸探针为待检测的核酸样品的反向互补物，并因此当需要检测核酸样品时与待检测的核酸样品的部分杂交。在结合核酸样品后，分子信标上的荧光基团相互分离，这导致荧光信号的改变，优选地强度的改变。该改变与存在的核酸样品的量相关。

[0403] 在本发明的范围之内的是，本发明的核酸可在各种此处公开的方面的范围之内相应地用作 L- 核酸。

[0404] 本发明的核酸还可用作用于药物学活性物质的设计（药物设计）的起始材料。原则上对此存在两种可能的方法。一个方法在于筛选化合物文库，其中此类化合物文库优选地是低分子量化合物（低或小分子）的文库。此类文库对于本领域技术人员来说是已知的。在一个实施方案中，所述筛选是高通量筛选。优选地，所述高通量筛选是快速、有效的，并且在基于靶分子的测定法中作为活性物质的试错评估（Versuch-und-Fehler-Evaluation）来进行。

[0405] 备选地，根据本发明，可将核酸用于活性物质的合理设计。优选地，活性物质的合理设计是药物学活性物质候选物的设计。从靶分子的三维结构（所述三维结构通常通过诸如 X 射线结构分析或核磁共振光谱法（NMR）的方法来确定）开始，使用计算机程序来搜索包含大量不同化学化合物的结构的数据库。在此通过计算机进行选择。另外在实验室中对所选择的化合物进行测试。

[0406] 在此，活性物质的合理设计可将本发明的任何核酸用作其起始点，并且包括与本发明核酸的结构相似的或者与介导与 HMG 蛋白结合的本发明核酸的结构的该部分相同的结构，特别是三维结构。在任何情况下，这样的结构均显示出与本发明的核酸相同的或至少相似的结合行为。在进一步的步骤中或作为备选步骤，在活性物质的合理设计中，优选地通过化学基团来模仿结合 HMG 蛋白的核酸的那些部分的三维结构，所述化学基团优选地与核苷酸和核酸不同。通过该模仿（也称为模拟），可构建与用作活性物质合理设计的起始材料的核酸不同的化合物。这样的化合物或活性物质优选地是小分子或肽。

[0407] 在使用本领域技术人员已知的竞争测试来筛选化合物文库的情况下，可发现合适的 HMG 类似物、HMG 激动剂和 HMG 拮抗剂。可如下设计这些竞争测定法。将本发明的核酸，优选地镜像异构体，即结合靶分子的 L- 核酸，优选地偶联至固相。为了鉴定 HMG 类似物，将经标记的 HMG 蛋白加入该测试系统。备选地，还可将 HMG 蛋白偶联至固相，和可对本发明的

核酸进行标记。潜在的类似物或潜在的激动剂或拮抗剂将与结合镜像异构体的 HMG 分子竞争,这导致从相应的标记接受到的信号减少。激动剂或拮抗剂的筛选可包括使用本领域技术人员已知的细胞培养测试系统。

[0408] 在进一步的方面,本发明的核酸由于它们对 HMG 蛋白的特征性结合行为而可用于靶(靶分子)的验证。为了研究 HMG 蛋白的功能,可在离体器官模型中使用本发明的核酸。原则上,存在其中可测试 HMG 激动剂/拮抗剂的离体模型。

[0409] 本发明的试剂盒可包含至少一种或多种本发明的核酸。此外,试剂盒可包含至少一种或多种正或负对照。可例如将针对其来筛选本发明核酸或本发明核酸与之结合的 HMG 蛋白用作正对照,优选地以液体形式。除其他以外,可将在其生物物理性质方面的行为与 HMG 蛋白相似但不被本发明的核酸识别的肽用作负对照,或可将具有相同氨基酸组成但序列与 HMG 蛋白不同的肽用作负对照。

[0410] 此外,试剂盒可包含一种或多种缓冲液。在试剂盒中,不同的组分可以以无水或冷冻干燥的形式存在,或溶解于液体中。试剂盒可包含一个或多个容器,所述容器反过来可包含试剂盒的一种或多种组分。优选地,容器包含反应批料(**Reaktionsansätze**),如对于使用试剂盒的一种或多种组分进行单次实验所需的反应批料。

[0411] 要认识到,除非另外指出,此处列出的序列以 5' -3' 方向给出。进一步地要认识到,术语“两区段相互之间杂交”在此处被理解为是指,所述区段可以在体外基于普通的碱基配对规则进行杂交,或者所述区段在使用条件下杂交或可杂交,但不必需在使用条件下相互之间杂交或以杂交的形式存在。

[0412] 不同的 SEQ. ID.、此处公开的核酸的化学构造和此处使用的靶分子 HMGA1a/1b、真正的序列和内部参照概括于下表中。

[0413]

Seq. ID	内部参照	RNA/肽	序列
1	132-C3, NOX-h	L-RNA (镜像异构体)	GCUGCUGCAAUUGACGGGGGCGUGGUUGGGCGGUGCGAUUGCAGC
2	132-B3, NOX-f (48nt)	L-RNA (镜像异构体)	GCUGAAUGAGGAUCCGACGGGCGUGGCUUGGGUGGGCGACCGUUCAGC
3	132-C4	L-RNA (镜像异构体)	GCUGCGCAAGAGAGAGGGCGCGGUGUGGGGAGGCUCUAAGCGCUGCAGC
4	132-E2	L-RNA (镜像异构体)	GCUGGCGCUAUAGGACAGGGGUGCGGUUGGGCGGUCGCCGUGUCAGC
5	132-A2	L-RNA (镜像异构体)	GCUGGAUAGAACGACGGGUGCGGUUUGGGGUGGGCGUGAUUGCAGC
6	132-H1, NOX-i	L-RNA (镜像异构体)	GCUGCCGUAAGAGGGGUGAGGUUGGGGAGGCUUACGGUUUCAGC
7	132-F1	L-RNA (镜像异构体)	GCUGCAUGCCGCGAUCAGGGGAGCGGUUGGGCGGGAUCCGGCUCAGC
8	132-G2, NOX-g	L-RNA (镜像异构体)	GCUGCGAGGGAGGUAGCGGCUCUGCGCCGUGACGUGGGUGGUAUGCAGC
9	122-A1, NOX-A	L-RNA (镜像异构体)	GGCUGAUACGUGGGUGGAUAUGGGGCAGUCCAUUGUGGGUGGUUUCAGCC
10	122-C1, NOX-B	L-RNA (镜像异构体)	GGCUGAUACGUGGGUGGAUAUAUGGGGCAGUCCAUUGUGGGUGGUUUCAGCC
11	122-B2	L-RNA (镜像异构体)	GGCUGAUACGUGGGAGGAAAGGUGUAACUACCUUGUGGGAGGUUUCAGCC
12	122-E2, NOX-C	L-RNA (镜像异构体)	GGCUGGCACUCGACGGGGUGAAGUGAUAUGGGGUGGGCGAGACCAGCC
13	122-G2, NOX-E	L-RNA (镜像异构体)	GGCUGCCGAGUGGUUGGGUGGUGUAAGGGAGGUGGAUCCCGGGGAGCC
14	122-B4, NOX-D	L-RNA (镜像异构体)	GGCUGUUCGUGGGAGGAAGGCUCUUGGAUAAGAGUCGUGGGUGGUUUCAGCC
15	132-B3 32nt, NOX-f 32nt	L-RNA (镜像异构体)	GGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACC

[0414]

Seq. ID	内部参照	RNA/肽	序列
16	132-B3 33nt, NOX-f 33nt	L-RNA (镜像异构体)	GGAUCGCAGGGCGUGGUGGUGGCGGAUCC
17	HMGAla/b 靶分子 结构域, 生物素-D-HMGAla/b- 21 聚体	D-肽	生物素-EPSEVPTPKRPRGRPKGSKNK
18	HMGAla (A)	L-肽	(M)SESSKSSQLASKQEKDGTGTEKRGRGRPRKQPPVSPGTALVGSQKEPSEVPTPKRPRGRPK GSKNKGAATRKTTTTTPGRKPRGRPKLEKEEEEGISQESSEEEQ
19	HMGAlb (A)	L-肽	(M)SESSKSSQLASKQEKDGTGTEKRGRGRPRKQPPKEPSEVPTPKRPRGRPKGSKNKGAAT RKTTTTTPGRKPRGRPKK-LEKEEEEGISQESSEEEQ
20	HMGAla 人	L-肽	(M)SARGEGAGQFSTSAQQQAPAPQKRGGRPRKQQEPTGEPSPKPRGRPKGSKNKSPS KAAQKKAETGEKPRGRPRKWPQQVVKKPAQEETEETSSQESAEEED
21 50	bio-dsDNA (AT 钩)	D-DNA	5'生物素-TCGAAAAAGCAAAAAAAGAAAAAAGCTGGC) 和 5'GCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGCTTTTTT
22	NOX-A-3'PEG, NOX-A-3'PEG2000, NOX-A-2kDa PEG, NOX-A PEG	L-RNA	GGCUGAUACGUGGUGGAUAUGGGGCAGUCCAUUGUGGUGGUUUCAGCC-2kDa-PEG

[0415]

Seq. ID	内部参照	RNA/肽	序列
23	反向-3'-PEG INV 3'-PEG	L-RNA	CCGACUUUGGUGGUGUAACCUUGACGGGGUAUAGGUGGGUGCAUAGUCGG-2kDA-PEG
24	5'-生物素-NOX-A	L-RNA	生物素-GGCUGAUACGUGGGUGGAUAUGGGGCAGUCCAUUGUGGGUGGUUCAGCC
25	5'-生物素-NOX-A 反向	L-RNA	生物素-CCGACUUUGGUGGUGUACCUUGACGGGUUAUAGGUGGGUGCAUAGUCGG
26	反向	L-RNA	CCGACUUUGGUGGUGUAACCUUGACGGGGUAUAGGUGGGUGCAUAGUCGG
27	POC-3'-PEG	L-RNA	UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGUAGCGUGUGCAGAGCU-2kDA-PEG
28	捕获探针 NOX-A	L-RNA	CCCATATCCACCCACGTATCAGCCTTTTTTT-NH ₂
29	检测探针 NOX-A	L-RNA	生物素-TTTTTTTTGGCTGAAACCCACCCACATGG
30	捕获探针 POC	L-RNA	NH ₂ (C7)-TTTTTTTTTAGCTCTGCACAGCGCT
31	检测探针 POC	L-RNA	CCGCATCAGACCGAGTTTCCTTATTTTTTTT-生物素
32	HMG_fwd1 引物	D-DNA	TCGACACCATGGGTGAGTC
33	HMG_rev1 引物	D-DNA	GTCTAGAAAGCTTCCCAACTG

[0416]

Seq. ID	内部参照	RNA/肽	序列
34	132-C3, NOX-h	D-RNA (适体)	GCUGCUGCAAAUUGACGGGGCGUGGUUGGGGGGUCGAUUGCAGC
35	132-B3, NOX-f (48nt)	D-RNA (适体)	GCUGAAUAGAGGAUCGCAGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACCGUUCAGC
36	132-C4	D-RNA (适体)	GCUGCGCAAGGAGAGGGGCGCGGUUGGGGAGGCUCUAAGCGCUGCAGC
37	132-E2	D-RNA (适体)	GCUGGCGCUAUAGGACAGGGGUGCGGUUGGGGCGGUCCGUGUCAGC
38	132-A2	D-RNA (适体)	GCUGGAUAGAACGCAGGGGUGCGGUUUGGGUGGGCGUGAU AUGCAGC
39	132-H1, NOX-i	D-RNA (适体)	GCUGCCGUAAAGAGGGGUGAGGUUGGGGAGGCUUUACGGUUUCAGC
40	132-F1	D-RNA (适体)	GCUGCAUGCCGCGAUCAGGGGAGCGGUUGGGGCGGAUCCGGCUCAGC
41	132-G2, NOX-g	D-RNA (适体)	GCUGCGAGGGAGGUAGCGGCUCUGCGCGUGACGUGGGUGGAUGCAGC
42	122-A1, NOX-A	D-RNA (适体)	GGCUGAUACGUGGGUGGAUAUGGGGCGAUUCCAUUGUGGGUGGUUUCAGCC
43	122-C1, NOX-B	D-RNA (适体)	GGCUGAUACGUGGGUGAAUAUGGGGCGAUUCCAUUGUGGGUGGUUUCAGCC
44	122-B2	D-RNA (适体)	GGCUGAUACGUGGGAGGAAAGGUGUAACUACCUUGGGAGGUUUCAGCC
45	122-E2, NOX-C	D-RNA (适体)	GGCUGGCACUCGCAGGGGUGAAGUGAUAUGGGGUGGGCGAGACCAGCC
46	122-G2, NOX-E	D-RNA (适体)	GGCUGCCGAGUGGUUGGGUGGUUAAGGGAGGUGGAAUCCCGGGCAGCC
47	122-B4, NOX-D	D-RNA (适体)	GGCUGUUCGUGGGAGGAAGGCUCUUGGAUAAGAGUCGUGGGUGGUUCAGCC
48	132-B3 32nt, NOX-f 32nt	D-RNA (适体)	GGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACC
49	132-B3 33nt, NOX-f 33nt	D-RNA (适体)	GGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGAUCC

[0417] 在本发明的范围内的是,如果没有明确地给出本发明核酸的单个区段的序列,可按照此处公开的技术教导自由地选择这些序列,即可以这样选择所述序列以使它们展示出

对各自靶分子的必需的结合行为和 / 或能够形成此处描述的结构特别是二级结构。

[0418] 此外,在本发明的优选实施方案的范围内的是,当在被称为 RNA 序列的序列中 T 代替 U 的情况下,那么 T 将表示 U。

附图说明

[0419] 借助于下列附图和实施例进一步解释本发明,从所述附图和实施例中可获得其他特征、实施方案和优点。附图如下:

[0420] 图 1A 显示了通过针对 D-21AS-HMGA1a/b 的体外选择产生的、结合 21AS-HMGA1a/b- 结构域的适体。

[0421] 图 1B 描绘了通过针对 D-21AS-HMGA1a/b 的体外选择产生的、结合 21AS-HMGA1a/b- 结构域的适体的经鉴定的重复出现的序列区域。

[0422] 图 2 是 HMGA1a/b 和 HMGA2 的序列比较。

[0423] 图 3 是结合 HMGA1a/b 的适体 NOX-f 的缩短。

[0424] 图 4 显示了缩短的结合 HMGA1a/b 的适体 NOX-f 的结合特性。

[0425] 图 5 显示了用于在多孔平板测定法中测量 HMGA 对双链天然靶 DNA 的结合的竞争测定法;镜像异构体的结合竞争重组 HMGA1b 对生物素化的 dsDNA (AT- 钩基序) 的结合。经由将底物转化成荧光信号的镍-HRP,通过 His 标签来进行结合的 HMGA1b 的检测。

[0426] 图 6 显示了在竞争性多孔平板测定法中镜像异构体 NOX-A 和镜像异构体 NOX-f (48nt ;33nt) 的比较;在所述平板测定法中,镜像异构体 NOX-A 以及镜像异构体 NOX-f 和其缩短的变体镜像异构体 NOX-f33 在低 nM 范围内阻止重组 HMGA1b 与其天然出现的结合伙伴的结合。

[0427] 图 7 显示了在竞争性多孔平板测定法中偶联有 2kDa-PEG 的镜像异构体 NOX-A 以及无功能对照镜像异构体的活性;PEG 化的镜像异构体 NOX-A 竞争重组 HMGA1b 对 dsDNA 的 AT- 钩基序的结合,IC₅₀ 为 15nM;NOX-A 的反向对照镜像异构体在高镜像异构体浓度下显示出与 HMGA1b 的非特异性相互作用。

[0428] 图 8 显示了 Western 印迹;通过生物素化的镜像异构体来检测固定的 HMGA1b;重组 HMGA1b 在电泳场中以 20kDa 大小的蛋白迁移,并且在低浓度 (3nM) 下可被生物素化的镜像异构体 (此处例如为 NOX-A) 识别;反向对照镜像异构体不能识别 HGMGA1b。

[0429] 图 9 显示了在竞争性多孔平板测定法中游离的和 PEG 化的镜像异构体 NOX-A 的活性。

[0430] 图 10 显示了在“RiboGreen 排除测定法 (RiboGreen exclusion assay)”中 PEG 化的镜像异构体包装在微团中的研究。

[0431] 图 11 显示了在“RiboGreen 排除测定法”中 PEI- 镜像异构体-微团的稳定性。

[0432] 图 12 显示了包装在 PEI- 微团中的镜像异构体的有效吸收,更准确地是“裸露的”镜像异构体与包装在微团中的镜像异构体例如镜像异构体 NOX-A-3' PEG2kDa 的转染的比较;已用镜像异构体-微团转染的细胞,与只用纯的镜像异构体进行温育的细胞相比,在更低的照相机灵敏度 (照相机增益) 下在胞质溶胶中显示出更强的荧光;对于两种转染方法,效率都 >95%。

[0433] 图 13 显示了镜像异构体从内体区室中的释放;与纯的镜像异构体相比,镜像异构

体-微团显示出显著更高的荧光;镜像异构体-微团显示出点状、核周以及细胞质的分布模式;点状分布表明在内体区室中的定位;胞质溶胶中和质膜上的弥散性分布表示从内体中释放的镜像异构体。

[0434] 图 14 是使用“裸露的”镜像异构体的增殖测定法;在细胞培养基中 2 天后在高镜像异构体浓度下 MCF-7 细胞增殖的剂量依赖性抑制(通过刃天青定量)。

[0435] 图 15 显示了在用经 PEI 包装的 NOX-A-2kDa PEG 处理后, H1299 细胞(“非小细胞肺癌”)的增殖;在存在以 PEI-镜像异构体-微团(N/P2.5)的形式施用的 $1\mu\text{M}$ 镜像异构体的情况下, H-1299 细胞的增殖被抑制;与对照镜像异构体相比, NOX-A 显示出轻微的增殖抑制。

[0436] 图 16 显示了通过定量 RT-PCR 检测的对于 HMGA1a/b-诱导的 cdc25a 基因表达的抑制;借助于 RT-PCR 测定在 H-1299 细胞中 cdc25a mRNA 表达被 $1\mu\text{M}$ NOX-A 镜像异构体-微团(N/P 2.5)特异性抑制。

[0437] 图 17 显示了镜像异构体 NOX-A 对于 cdc25a mRNA 表达的剂量依赖性抑制;借助于 RT-PCR 来定量 H1299 细胞中 cdc25a mRNA 表达的剂量依赖性抑制;NOX-A 镜像异构体-微团(N/P 2.5)从 250nM 开始显示出 cdc25a mRNA 表达的特异性抑制;在浓度 $>4\mu\text{M}$ 时,发现对照镜像异构体的非特异性效应,以及在浓度 $>10\mu\text{M}$ 时聚氮丙啶(PEI)的毒性效应(数据未显示)。

[0438] 图 18 显示了在裸鼠中的异种移植模型之中肿瘤生长被镜像异构体 NOX-A 抑制;通过 2mg/kg 镜像异构体-微团(N/P 2.5)抑制了在皮下注射 PSN-1 细胞后的肿瘤生长。镜像异构体 NOX-A 显示出肿瘤生长的显著减少。

[0439] 图 19 显示了来自异种移植实验的数据的统计学分析;通过 2mg/kg 镜像异构体-微团(N/P 2.5)抑制了在皮下注射 PSN-1 细胞后的肿瘤生长;终点分析,并描绘为盒和须图(Box-and-Whisker plot)。NOX-A 导致肿瘤生长的高度显著的减小($p = 0.0098$, 与 PBS 相比, 和 $p = 0.022$, 与反向对照镜像异构体相比)。

[0440] 图 20 显示了在异种移植实验中镜像异构体 NOX-A 的组织分布;镜像异构体 NOX-A 在血浆和组织中的分布的定量分析;与其他组织和血浆相比,在肿瘤组织中可检测到高浓度的镜像异构体 NOX-A。

[0441] 图 21 显示了在异种移植实验中,在最后一次注射后 24 和 96 小时,包装在微团中的和未包装的镜像异构体的组织分布;无功能镜像异构体在血浆和组织中的分布的定量分析;与其他组织和血浆相比,在包装在微团中的镜像异构体的情况下,在 24 小时和 96 小时后,在肿瘤组织中可检测到显著升高的镜像异构体浓度。

[0442] 图 22 显示了在异种移植实验中,在最后一次注射后 24 和 96 小时,包装在微团中的和未包装的镜像异构体在血浆和肿瘤中的分布;无功能镜像异构体在血浆和肿瘤中的分布的定量分析;与未包装的镜像异构体相比,在包装在微团中的镜像异构体的情况下,在 24 小时和 96 小时后,在肿瘤组织中可检测到显著升高的镜像异构体浓度。

具体实施方式

[0443] 实施例 1:结合 HMGA1a/b 的镜像异构体

[0444] 1.1 结合 HMGA1a/b 的序列

[0445] 通过在体外针对 D-1AS-HMGA1a/b 进行筛选, 然后进行缩短步骤, 来产生结合 HMGA1a/b 的 RNA- 镜像异构体。产生的结合 21AS-HMGA1a/b 结构域的适体显示于图 1A 中。

[0446] 1.1.1 对于适体水平的分级

[0447] 借助于标准的亚磷酰胺合成将不同的克隆 (参见图 1A) 制备为适体 (D-RNA), 并通过磷酸化在 5' 末端对其进行放射性标记 (参见下面)。然后借助于平衡结合测定法在两种 D-bio-21aa HMGA1a/b 的浓度下就其亲和力和活性来分析克隆。

[0448] 通过磷酸化进行的放射性标记:

[0449]

物质	[终浓度]
RNA	5 μ M
T4 正向反应缓冲液 (Invitrogen)	1x
T4 多核苷酸激酶 (Invitrogen)	10U/10 μ l 反应批料
[γ - ³² P]-ATP	1 μ l/10 μ l 反应批料

[0450] 反应在 37°C 下进行 1 小时, 然后通过加热 (在 65°C 下 10 分钟) 来终止反应。通过分析型聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 将放射性核苷酸与经标记的寡核苷酸分离 (参见下文)。然后, 使用乙酸铵进行“粉碎和浸泡 (Crush-and-Soak)”- 凝胶洗脱, 并用乙醇进行沉淀 (参见下文)。通过沉淀物的放射性强度 (在沉淀后), 与切出的条带的放射性强度相比, 来估计纯化的 RNA 的量。

[0451] 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

[0452] 为了寡核苷酸的预备型纯化, 将用于变性 PAGE 的 1/2 至 2 体积浓缩的样品缓冲液加入反应批料中。此外, 当需要时准备大小标准 (各 250pmole), 并将其吸收入样品缓冲液中。在 95°C 下使批料变性 5 分钟, 然后在冰上冷却。通过在 40-50W 的情况下施加最大 600V 的电压来预热 (大约 1 小时) 制备型的、变性的 7% 或 10% PAA- 凝胶 (200x200x 1.5mm)。在用 1x TBE 漂洗上样孔后, 施加样品。在完成分离 (在 50W 下 50 分钟) 后, 将凝胶置于由透明膜保护的荧光的薄层层析板上 (染料 60F₂₅₄)。借助于 UV 光 (254nm), 可以将条带显现为阴影 (“UV 遮蔽 (UV-Shading)”), 并用解剖刀切出。然后进行使用乙酸铵的“粉碎和浸泡”- 凝胶洗脱。

[0453] “粉碎和浸泡”- 凝胶洗脱

[0454] 为了从 PAA- 凝胶中洗脱寡核苷酸, 在研碎切下的 PPA- 凝胶条带后, 使用吸管尖或刮勺加入 500 μ l 乙酸铵 (2M)。在热振荡器 (Thermoshüttler) (1000rpm) 中在 68°C 下进行“粉碎和浸泡”- 洗脱 2x 1.5 小时。通过在台式离心机 (16, 100x g) 中使用“Ultrafree-MC”小柱 (Millipore/Amicon, Schwalbach, Germany) 将上清液与凝胶残渣分离。然后通过乙醇沉淀来除去如此洗脱的 RNA 的盐分。

[0455] 乙醇沉淀

[0456] 为了进行乙醇沉淀, 将 1-2 μ l 糖原用作沉淀辅助剂。在加入 2.5 体积的无水乙醇和进行涡旋振荡后, 在 -80°C 下沉淀寡核苷酸 30 分钟, 并在 4°C 下以 16, 100x g 离心 30 分

钟。用 70%乙醇洗涤沉淀一次,并在 4℃下以 16,100x g 离心 5 分钟。

[0457] 平衡结合测定中结合等温线的记录

[0458] 将各 2pmole 的 5'-放射性标记的适体混合在由 Bachem(Weil am Rhein, Germany) 制备的生物素-D-HMGA1a/b-21 聚体 (EPSEVPTPKRPRGRPKGSKNK[Seq. ID. 17]; 参见图 2) 中。将浓度范围为 1 — 3000nM(或者对于使用 300nM 和 30nM 或 100nM 和 10nM 的肽的两点测量) 的溶液在选择缓冲液 (10mM Tris HCl pH7.4, 5mM KCl, 0.8mM MgCl₂, 0.1% Tween) 中在 37℃下温育 1 小时。不含生物素化的 D-HMGA1a/b-21 聚体的溶液用作背景对照。然后, 在 37℃下在 30 分钟内用 10 μl 链霉抗生物素蛋白 UltraLink 凝胶固定肽和复合物。测定悬浮液的放射性强度。取出上清液。然后用 100 μl 选择缓冲液洗涤基质一次, 然后用选择缓冲液补足。通过测量放射性强度, 对于每种肽浓度, 确定复合物中与生物素-D-HMGA1a/b-21 聚体一起存在的适体份额。通过图的绘制和拟合 (GraFit, 版本 4.0.10, Erithacus Software) 可确定活性物质种类的解离常数和活性分子的份额。

[0459] 结果

[0460] 对于所有作为适体 (D-RNA) 合成的克隆, 在平衡结合测定法中确定了与 HMGA1a/b 的 21 个氨基酸长的 D-片段 (生物素-D-HMGA1a/b-21 聚体) 的结合的解离常数为 8 — 22nM(图 1A)。

[0461] 1.1.2 在实例 132-B3 中的缩短

[0462] 所有选择的候选物展示出重复出现的序列基序 GGGCG 或 GGGUG 或 GGGAG, 其在 5'-末端和 3'-末端通过螺旋/茎基序得到稳定(图 3)。

[0463] 根据 Zuker(Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1;31(13):3406-15), RNA 适体的可能的结构和折叠的分析显示, 预先确定的茎/螺旋结构在有一些中延长(132-C3、132-B3、132-C4、132-E2、132-A2、132-H1、132-F1、122-G2、122-E2, 参见图 1A)。该茎-螺旋结构是进一步缩短这些候选物的基础。通过就与 HMGA1a/b 片段的结合对合成的 D-RNA 进行折叠分析并随后进行缺失分析来鉴定和稳定最小结合基序, 从而进行候选物的所述进一步缩短。通过平衡结合测定法来确定这些结合特性。图 3 示例性地显示了, 在候选物 NOX-f(132-B3) 中, 在稳定的茎结构的基础上缩短适体, 所述茎结构可在候选物 132-C3、132-B3、132-C4、132-E2、132-A2、132-H1、132-F1、122-G2、122-E2 中以增长的形式找到(参见图 1A)。缩短至 32 个核苷酸长的并具有 6 个核苷酸长的茎的 NOX-f 的适体变体(NOX-f 32nt) 不导致与 21aa HMGA1a/b 片段的结合特性的任何损失(图 3 和 4)。5'-位的茎的第 3 个位置上的腺苷的人工插入导致理论上形成没有成环区域的 7 个核苷酸长的茎, 并用于在 3' 区域完成茎(NOX-f 33nt, 图 3 和 4)。通过平衡测定法所进行的对于与 HMGA1a/b 的 21 个氨基酸长的结构域的结合特性(亲和力和活性)的测量结果不受这些改变影响。

[0464] 与此相反, 序列 132-G2、122-A1、122-C1、122-B2 和 122-B4 在重复出现的序列基序(GGGCG 或 GGGUG 或 GGGAG) 的 5'-末端和 3'-末端具有显著更短的茎结构。茎结构的缩短导致结合丧失。不进行在重复序列基序(GGGCG 或 GGGUG 或 GGGAG) 之间的、对于这些序列来说更长的中央区域的可能的缩短。

[0465] 此处公开的结合 HMGA 的核酸的适体序列的 Seq. ID 如下:

[0466]

Seq. ID	内部参照	RNA/ 肽
34	132-C3, NOX-h	D-RNA (适体)
35	132-B3, NOX-f (48nt)	D-RNA (适体)
36	132-C4	D-RNA (适体)
37	132-E2	D-RNA (适体)
38	132-A2	D-RNA (适体)
39	132-H1, NOX-i	D-RNA (适体)
40	132-F1	D-RNA (适体)
41	132-G2, NOX-g	D-RNA (适体)
42	122-A1, NOX-A	D-RNA (适体)
43	122-C1, NOX-B	D-RNA (适体)
44	122-B2	D-RNA (适体)
45	122-E2, NOX-C	D-RNA (适体)
46	122-G2, NOX-E	D-RNA (适体)
47	122-B4, NOX-D	D-RNA (适体)
48	132-B332nt, NOX-f 32nt	D-RNA (适体)
49	132-B333nt, NOX-f 33nt	D-RNA (适体)

[0467] 如此处已阐明的和对于本领域技术人员来说已知的, 针对 D- 肽而产生的适体 (即 D- 核酸) 的由 L- 核苷酸组成的对映异构体结合 D- 肽的成镜像的对映异构体, 即天然发生的 L- 肽。该 L- 核酸此处也称为镜像异构体, 并且此外原则上具有与适体相同的结合特性。

[0468] 1. 2 结合 HMGA/b 的镜像异构体的特征性质

[0469] 1. 2. 1 重复序列元件 : 盒 A1 和盒 A2

[0470] 序列 GGGCG 或 GGGUG 或 GGGAG 的重复序列元件对于结合 HMGA1a/b 的所有镜像异构体来说是特征性的。该序列元件在结合 HMGA1a/b 的镜像异构体中出现两次 (图 1A 和 1B)。位于靠近镜像异构体的 5' - 末端的序列元件此处称为盒 A1。与此不同, 位于靠近镜像异构体的 3' - 末端的序列元件此处称为盒 A2。盒 A1 和盒 A2 以及其相互排列可能代表了结合 HMGA1a/b 的镜像异构体的决定性特征。

[0471] 1. 2. 2 盒 A1 和盒 A2 之间的序列区段

[0472] 盒 A1 和盒 A2 之间存在长度为 6 至 7 个核苷酸或 12 至 22 个核苷酸的序列区段 (图 1A 和 1B)。因为这些序列区段不仅仅在其长度上相异, 因此分别讨论它们。

[0473] 实例 1: 序列区段包含 6 至 7 个核苷酸

[0474] 如果盒 A1 和盒 A2 之间存在的序列区段具有 6 个核苷酸的长度, 那么该序列区段具有序列 UGGUUG、UGGCUG、CGGUUG、AGGUUG 或 GUGUAA。一个核苷酸 (尿嘧啶) 插入至序列 CGGUUG 中 (其导致形成序列 CGGUUUG) 对镜像异构体的结合特性既没有负影响也没有正影响。

[0475] 实例 2: 序列区段包含 12 至 22 个核苷酸

[0476] 如果盒 A1 和盒 A2 之间存在的序列区段具有 12 至 22 个核苷酸的长度, 那么该序列区段包含等长的相互之间可以任选地杂交的两个序列区域 (螺旋 C)。在此, 所述杂交是通过各 3 至 6 个核苷酸来实现的。在形成螺旋 C 的核苷酸之间存在 3 至 5 个未配对的核苷酸。在盒 A1 的 3' - 末端和螺旋 C 的 5' - 末端之间存在 1 至 3 个未配对的核苷酸。在螺旋 C 的 3' - 末端和盒 A2 的 5' - 末端之间可以存在 1 至 5 个未配对的核苷酸。

[0477] 1.2.3 镜像异构体的 5' - 末端和 3' - 末端的螺旋结构

[0478] 所有结合 HMGA1a/b 的镜像异构体在其 5' - 和 3' - 末端的特征在于可相互杂交的序列区段 (螺旋 A1 和螺旋 A2) (图 1A 和 1B)。在此, 在各情况下相互杂交的核苷酸的数目可从 4 变化至 8。在此, 该假定双链的区域可延伸至盒 A1 的 5' - 末端和盒 A2 的 3' - 末端。如果情况不是这样, 那么盒 A1 和盒 A2 可在侧翼连接有额外地相互杂交的核苷酸 (螺旋 B1 和螺旋 B2)。这可涉及各 4 至 8 个核苷酸的区域 (图 1A 和 1B)。

[0479] 在作为本申请的基础的本发明的范围内, 已鉴定了结合所述靶分子的不同类型的核酸, 特别是 L- 核酸。此处也称为实例的这些类型的下列说明和描述就这点而言是本申请的整体组成部分。对于各个类型, 在下文中使用 L- 核酸的各自的缩写来给出它们的基本结构和该类型的示例性 L- 核酸。

[0480] 例子 1: 132-C3、132-B3、132-C4、132-E2、132-A2、132-H1、132-F1、122-G2、132-B332nt、132-B333nt

[0481]

螺旋 A1-N_x-螺旋 B1-N₆N₇ 盒 A1 N₁N₂GN₃N₄N₅ 盒 A2 G-N₇-螺旋 B2-N_z-螺旋 A2 (实例 1A)

[0482] 或

[0483]

螺旋 A1-N_x-螺旋 B1-N₆N₇ 盒 A1 N₁N₂GN₃N₄N₅ 盒 A2 螺旋 B2-N_z-螺旋 A2 (实例 1B)

[0484] N₁ = U、C、A、G ;

[0485] N₂ = G、U ;

[0486] N₃ = U、C ;

[0487] N₄ = U、A ;

[0488] N₅ = G、A ;

[0489] N₆ = G、A、U ;

[0490] N₇ = G、U ;

- [0491] $N_g = U$ 或无核苷酸；
 [0492] $N_x = 0$ 至 5 个核苷酸；
 [0493] $N_y = 0$ 或 6 个核苷酸；
 [0494] $N_z = 0$ 至 6 个核苷酸；
 [0495]

盒 A1 = 盒 A2 = GGGCG 或 GGGUG 或 GGGAG;

- [0496] 螺旋 A1 和螺旋 A2 = 各 4 至 8 个核苷酸, 其完全或部分地相互杂交, 其中由螺旋 A1和螺旋 A2 以及螺旋 B1 和螺旋 B2 构成的各相互杂交的核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸;
 [0497] 螺旋 B1 和螺旋 B2 = 各 4 至 8 个相互杂交的核苷酸, 其中由螺旋 A1 和螺旋 A2 以及螺旋 B1 和螺旋 B2 构成的各相互杂交的核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸。
 [0498] 该分子在 5' - 末端和 3' - 末端缩短后也是有活性的。在除去螺旋 A1 和 A2 以及区域 N_6N_7 和 GN_y 后, 缩短的分子保持它们的结合特性。缩短的变体 132-B332nt (NOX-f 32nt) 和 132-B333nt (NOX-f 33nt) 证明了这点 (参见图 3 和 4)。
 [0499] 实例 2A : 132-G2、122-A1、122-C1、122-B2、122-B4
 [0500]

螺旋 A1-N_a-盒 A1-N_b-螺旋 C1-N_c-螺旋 C2-N_d-盒 A2-G-N_e-螺旋 A2

- [0501] $N_a = 1$ 至 5 个核苷酸；
 [0502] $N_b = 3$ 个核苷酸；
 [0503] $N_c = 3$ 至 5 个核苷酸；
 [0504] $N_d = 2$ 至 5 个核苷酸；
 [0505] $N_e = 1$ 至 2 个核苷酸, 优选地 A 或 UU；
 [0506]

盒 A1 = 盒 A2 = GGGCG 或 GGGUG 或 GGGAG;

- [0507] 螺旋 A1 和螺旋 A2 = 各 5 至 6 个核苷酸, 其完全或部分地相互杂交；
 [0508] 螺旋 C1 和螺旋 C2 = 各 5 至 6 个核苷酸, 其相互杂交。
 [0509] 实例 2B : 122-E2
 [0510]

螺旋 A1-N_i-螺旋 B1-N_j-盒 A1-A-螺旋 C1-N_c-螺旋 C2-G-盒 A2-G-螺旋 B2-A-螺旋 A2

- [0511] $N_i = 2$ 个核苷酸, 优选地 CA；
 [0512] $N_j = 2$ 个核苷酸, 优选地 AG；
 [0513] $N_c = 4$ 个核苷酸, 优选地 GAUG；
 [0514]

盒 A1 = 盒 A2 = GGGCG 或 GGGUG 或 GGGAG;

- [0515] 螺旋 A1 和螺旋 A2 = 各 6 个核苷酸, 其相互杂交；

[0516] 螺旋 B1 和螺旋 B2 = 各 5 个核苷酸,其相互杂交;

[0517] 螺旋 C1 和螺旋 C2 = 各 3 个核苷酸,其相互杂交。

[0518] 实施例 2:结构域方法

[0519] 2.1 在竞争测定法中测定 HMGA1a/b- 镜像异构体与重组 HMGA1b 的相互作用

[0520] 实施 / 方法

[0521] 经 His6 标记的 HMGA1b 的克隆

[0522] 从 BioCat, Heidelberg 购买具有编码 HMGA1b 的序列的 BD-Freedom™ ORF 克隆 GH00552L1.0 (高迁移率组 AT 钩 1)。已对序列进行如此的改变,即将终止密码子转变成编码亮氨酸的密码子,以允许 C- 末端融合。该克隆的序列整体上相应于在 RefSeq 数据库中以编号 NM002131 贮存的序列。通过标准 PCR,使用引物 HMG_fwd1 (TCGACACCATGGGTGAGTC, Seq. ID 34) 和 HMG_rev1 (GTCTAGAAAGCTTCCCACTG, Seq. ID 35) 来扩增编码 HMGA1b 的序列。在此,将 ATG 后的碱基从 A 改变成 G,从而引入 NcoI 切割位点。按照厂商说明书使用限制性酶 NcoI 和 HindIII (两者都来自 NEB, Frankfurt am Main, Germany) 来切割 PCR 产物,并通过琼脂糖凝胶进行纯化。同样地使用 NcoI 和 HindIII 切割载体 pH02d (Fasshauer 等人 (1997) J. Biol. Chem. 272:28036-28041), 并通过琼脂糖凝胶进行纯化。载体 pH02d 允许在 C- 末端融合有由 6 个组氨酸残基组成的序列 (His6- 标签) 的蛋白质在 T7- 启动子的控制下进行表达 (Fasshauer 等人, 1997, JBC 272:28036)。

[0523] 按照厂商说明书 (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Germany), 借助于 T4 连接酶,通过在 15°C 下过夜而将经纯化且经切割的 PCR 产物连接入准备好的载体。用连接产物转化细菌株系 DH5。通过测序来确证来自所得菌落的质粒的正确性。由 pH02d/HMGA1b 编码的融合蛋白 HMGA1b-His6, 与天然的 HMGA1b 蛋白相比,在位置 2 上用甘氨酸 (G) 替代丝氨酸 (S), 和在 C- 末端谷氨酰胺 (Q) 后具有亮氨酸 (L) (见上), 接着是与 6 个组氨酸 (H) 连接的 5 个另外的氨基酸 (G S L N S) (由载体编码的)。

[0524] HMGA1b-His6 的表达和纯化

[0525] 为了表达所述融合蛋白,使用质粒 pH02d/HMGA1b 转化细菌株系 BL21。使用异丙基硫代-β-D- 半乳糖苷 (IPTG) 来诱导所述融合蛋白的表达。在 4 小时后,以 10,000x g 离心细菌 15 分钟,然后在 -20°C 下保存沉淀直至进一步使用。

[0526] 为了提取融合蛋白,向来自 500ml 培养物的冰冻细菌沉淀中加入提取缓冲液 (1% 正-辛基-β, D- 硫代吡喃葡萄糖苷 (OTG), 在 50mM Na_xPO₄ 缓冲液, pH 8.0, 250mM NaCl, 10mM 咪唑和微小蛋白酶抑制剂片剂 (MiniProteaseInhibitoren-Tabletten) (Roche, Mannheim, Germany) (5St./50ml) 中), 掺入 5μl Benzonase (1 级; MERCK, Darmstadt, Germany), 通过吸液和排液进行均质化,并在室温下温育 5 分钟。之后以 10,000 x g (室温) 离心 15 分钟。通过折叠式过滤器过滤上清液,然后加至用洗涤缓冲液 (50mM Na_xPO₄ 缓冲液, pH 8.0, 250mM NaCl, 10mM 咪唑, 所有都来自 MERCK, Darmstadt, Germany) 平衡的 HIS-SELECT 柱 (HIS-SELECT Cartridge, Sigma, Deisenhofen, Germany) 上。在用 10-15ml 洗涤缓冲液洗涤柱后,用洗脱缓冲液 (在洗涤缓冲液中的 250mM 咪唑) 将融合蛋白洗脱在 0.5-1ml 大小的级分中。通过凝胶电泳 (16% 的聚丙烯酰胺凝胶, 根据 Schägger & Jagow, 1987, Anal. Biochem. 166:368-379) 就纯度来检查含

有蛋白质的级分。纯化具有融合蛋白的级分,如果需要,逆合适的缓冲液进行透析,并在蛋白质测定之后就纯度再次进行检查。以等分试样将纯化的融合蛋白在 -20°C 下贮存。

[0527] 测定 HMGA1a/b- 镜像异构体与 HMGA1b-His6 的相互作用

[0528] 使用基于 96 孔平板的测试来更准确地分析 HMGA1a/b- 镜像异构体对 HMGA1b 的亲合力。在该测试中, HMGA1a/b 镜像异构体与 HMGA1b-His6 的结合阻止了其具有对于 HMGA1a/b 的结合位点的 DNA 寡核苷酸的相互作用。用生物素分子在一条链上标记该 DNA 寡核苷酸 (dsDNA AT 钩) (Fashena 等人, 1992), 通过所述生物素分子其可结合至用链霉抗生物素蛋白包被的平板。使用用镍修饰的辣根过氧化物酶 (镍-HRP) 来检测结合至 DNA 的 HMGA1b-His6, 所述辣根过氧化物酶转化发荧光的底物。在该测定法中, 镜像异构体将重组 HMGA1b 从其天然结合伙伴中置换出来。由于镜像异构体 /rHMGA1b/dsDNA AT- 钩的 1:1:1 的化学计量关系, 可进行关于镜像异构体与 HMGA1b 的亲合力的直接表明。图 5 描绘了该测定法的原理。

[0529] 为进行该测试, 在摇动的情况下, 在室温下, 将在 $100\ \mu\text{l}$ 总体积中的不同浓度的镜像异构体和 HMGA1b-His6 ($0.36\ \mu\text{g/ml}$; 大约 30nM) 在尖底平板中温育 10 分钟。温育溶液此外还包含: 25mM Tris/HCl, pH 7.0 (Ambion, Austin, TX, USA), 140mM KCl (Ambion, Austin, TX, USA), 12mM NaCl (Ambion, Austin, TX, USA), 0.8mM MgCl_2 (Ambion, Austin, TX, USA), 0.25mg/ml BSA (Roche, Mannheim, Germany), 1mM DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), $18 - 20\ \mu\text{g/ml}$ 聚 (dGdC) (Sigma, Deisenhofen, Germany), 0.05% Tween 20 (Roche, Mannheim, Germany)。然后加入 $2\ \mu\text{l}$ 生物素化的 DNA 寡核苷酸 dsDNA AT- 钩 (5' 生物素 -TCGAAAAAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGGC (34nt) 和 5' GCCAGTTTTT TTTTTTTTTTTTGTCTTTTTT (31nt) 的等摩尔混合物; 在 150mM NaCl (Ambion, Austin, TX, USA) 中 $75\ \mu\text{M}$), 然后在摇动的情况下在室温下再温育 10 分钟。然后将批料转移至用链霉抗生物素蛋白包被的黑色 96 孔平板 (ReactiBind v. Pierce, Bonn, Germany) 中, 并在轻微摇动的情况下在室温下温育 30 分钟。之后, 将平板中的小孔洗涤 3 次, 每次用 $200\ \mu\text{l}$ TBSTCM (20mM Tris/HCl, pH 7.6 (Ambion, Austin, TX, USA); 137mM NaCl (Ambion, Austin, TX, USA), 1mM MgCl_2 (Ambion, Austin, TX, USA), 1mM CaCl_2 (Sigma, Deisenhofen, Germany), 0.05% Tween 20 (Roche, Mannheim, Germany) 洗涤)。向各小孔中加入 $50\ \mu\text{l}$ 稀释的镍-HRP 溶液 (ExpressDetector 镍-HRP, (Medac, Hamburg, Germany), 在 TBSTCM 中的 10mg/ml BSA (Roche, Mannheim, Germany) 之中作 1:1000 稀释), 并在轻微摇动的情况下在室温下温育 1 小时。然后再洗涤小孔 3 次, 每次使用 $200\ \mu\text{l}$ TBSTCM。然后向各小孔中加入 $100\ \mu\text{l}$ 发荧光的 HRP 底物 (QuantaBlue, Pierce, Bonn, Germany), 在 15 分钟后测量荧光 (ex: $340/\text{em}: 405\text{nm}$)。

[0530] 结果

[0531] 可以显示出, 镜像异构体 NOX-A (50nt)、NOX-f (33nt) 和 NOX-f (48nt) 以浓度依赖性的方式竞争 HMGA1b-His6 与生物素化的 DNA- 寡核苷酸的结合 (图 6)。对于镜像异构体 NOX-A 得到大约 15nM 的 IC_{50} 。

[0532] 与活性镜像异构体相反, 具有与 NOX-A 相反的序列的对照镜像异构体显示出在高至 $0.5\ \mu\text{M}$ 的浓度下对 HMGA1b-His6 与 DNA- 寡核苷酸的结合没有影响, 而在高于 $1\ \mu\text{M}$ 的浓度下才出现与 HMGA1b-His6 的非特异性相互作用。(图 7)。

[0533] 2.2 镜像异构体用于通过 Western 印迹法来检测 MGA1b 的用途

[0534] 实施 / 方法

[0535] 通过在 16 % PAA-Tricin 凝胶上进行凝胶电泳来分离重组表达的 HMGA1b, 然后通过电印迹将其转移至硝酸纤维素膜上。然后用在 1xTBST (20mM Tris/HCl pH 7.6、137mM NaCl、0.1 % Tween) 中的 5 % 脱脂奶粉和 100nM 非特异性镜像异构体来封闭该膜 1 小时, 并用 1xTBST 洗涤 3 次, 进行 10 分钟。使用在 5' - 末端生物素化的镜像异构体 NOX-A (5' bioNOX-A) 来检测重组 HMGA1b。在各含有 1mM 钙和镁 (TBST+Ca/Mg) 和 100nM 非特异性镜像异构体的 1x TBST 中稀释 5' bioNOX-A, 并温育 1.5 小时。然后用 1x TBST+Ca/Mg 洗涤印迹 3 次, 进行 10 分钟, 并将结合的生物素化的镜像异构体在 TBST+Ca/Mg 中与抗生物素抗体温育 45 分钟。然后用 1x TBST+Ca/Mg 洗涤印迹 5 次, 进行 10 分钟, 并借助于 LumiGLO 检测试剂 (Cell Signaling Technology) 来检测偶联有辣根过氧化物酶 (HRP) 的二抗。

[0536] 结果

[0537] 通过上述方法可以表明 5' - 末端生物素化的镜像异构体与重组表达的 HMGA1b 的结合。类似于基于抗体的检测, 在转移至印迹膜后, 使用 3nM bio-NOX-A 检测 5 μ g HMGA1b。NOX-A 的反向镜像异构体不能识别 HMGA1b, 这证明了 NOX-A 的特异性结合 (图 8)。

[0538] 实施例 3 : PEI- 镜像异构体制剂

[0539] 3.1 聚氮丙啶介导的镜像异构体转染的原理

[0540] 靶分子 HMGA1a/b 在胞质溶胶中表达, 并被发现为其天然结合伙伴 (细胞核中的双链 DNA) 的转录因子。HMGA1a/b 介导的细胞应答应当受到下列的拮抗: 在胞质溶胶中镜像异构体与 HMGA1a/b 的结合, 和在细胞核中通过 AT- 钩结合在 DNA 上的 HMGA1a/b 的竞争。由于质膜带负电荷, 因此 DNA 和 RNA 分子不容易通过被动转运而被细胞吸收。细胞内转运核酸的一个方法是用带电荷的颗粒或试剂进行浓缩或包装, 这导致总复合物的电荷的改变。这种复合物容易通过胞吞作用被吸收, 从而到达细胞的胞质溶胶。这种方法的不利方面是 DNA/RNA 的稳定性和核酸从内体区室中的释放。在细胞的胞质溶胶中, 通过导入蛋白酶或核酸酶以及通过区室的质子化作用从紧缩的内体快速形成溶酶体。核酸酶在那里降解核酸, 此外核酸在酸性介质中是不稳定的。通过胞吐作用或者在高尔基体中的降解再次将整个复合物快速转运出细胞, 从而只有少数核酸到达细胞中。因此, 合适的转染系统必须要克服的一个挑战是稳定核酸和将所述核酸从内体释放入胞质溶胶中。关于稳定性, RNA- 镜像异构体对于真核细胞的转染具有理想的性质, 因为作为非天然对映异构体, 他们不被酶裂解。

[0541] 所选择的转染系统基于具有分枝的聚氮丙啶 (PEI) 的核酸微团的形成。核酸的磷酸主链与 PEI 的游离氮位置相互作用, 并通过交联形成小微团, 所述微团由于 PEI 而具有正电荷。在此, 使用分子量为 3 至 800kDa 的 PEI。所选择的 PEI 越小, 形成的微团就越小。使用 25kDa 交联的 PEI (Sigma-Aldrich Cat. No. 40 ; 872-7) 导致在加入核酸后形成大小为 100 至 500nm 的 Polyplexen, 但通常形成大小为 100 至 200nm 的 Polyplexen。通常使用 2:1 至 5:1 的氮 / 磷酸的比率, 在一些情况下甚至达到 20:1。将核酸包装在微团中导致复合物的 ζ 电位改变为 $\sim (+) 21\text{mV}$, 在 N/P 比率为 3 时。已知随着复合物的正 ζ 电位增加, 其对培养细胞的毒性上升。然而, 这些微团通过质膜紧缩成内体而容易地被细胞吸收。这时, PEI 缓冲流入的质子, 由此许多在内体内部的氯离子导致由于渗透压而引起的区室的膨胀。PEI 的

这种效应在文献中被描述为质子海绵效应 (Sonawane 等人, JBC, 2003, Vol. 278 ;No. 45 (7) pp. 44826-44831), 并最终导致内体的破裂和将镜像异构体释放入胞质溶胶中。

[0542] 核酸-PEI 复合物由于强的正电荷而倾向于与血清蛋白相互作用和聚集, 以及显示出已经描述过的细胞毒性。因此, 在文献中已描述了, 在大鼠中经皮下和静脉内注射后, 高剂量的核酸-PEI 微团可快速导致在肺中的积累, 从而导致栓塞 / 梗塞。该问题的解决方案是用 2kDa 聚乙二醇 (PEG) 对核酸进行衍生。这些残基像护甲一样围绕微团, 并防止与血清蛋白的结合 (Ogris 等人, Gene Therapy, 1999, 6 (595-605))。此外, ζ 电位减少至 $\pm 0\text{mV}$, 这导致更低的细胞毒性, 并同时在质子海绵效应方面保持 PEI 的缓冲能力。

[0543] 3.2 具有 PEG2000 的镜像异构体的活性

[0544] 以具有 3' - 末端氨基的适体和镜像异构体的形式合成制备先导候选物 NOX-A 和 NOX-f, 然后通过氨基残基对其进行 PEG 化。通过平衡结合测定法可以证明, PEG 化对于适体与 HMGA1a/b 片段的结合特性没有影响。此外, 通过使用重组全长 HMGA1a/b 的竞争测定法可以证明, 镜像异构体与全长 HMGA1a/b 的结合也不依赖于 3' - 末端 PEG 化 (图 9)。3.3 镜像异构体的包装

[0545] 通过以 2.5:1 (N/P 2.5) 的 PEI 的绝对氮份额对核糖核酸主链的绝对磷酸的比率加入 25 kDa 交联的聚氮丙啶 (PEI) (ALDRICH, Cat. :40, 872-7) 在 PBS 中进行无菌的、PEG 化的镜像异构体的包装。无菌的、高压灭菌的 PEI 溶液具有浓度为 200mM 的游离的氮基团, 并用 1M 盐酸将 pH 调整至 7.4。在此, 以在具有 Ca/Mg 的 1xPBS 中高至 700 μM 的浓度提供经无菌过滤的镜像异构体, 在加入经无菌过滤的 PE 后在室温下温育 30 - 60 分钟。理想情况下, 在尽可能小地提供的镜像异构体浓度下进行复合物的形成, 因为高浓度的镜像异构体非特异性地导致大的聚集物。通过染料排除测定法来测量镜像异构体-微团的形成。在此, 确定在包装入微团之前和之后可通过染料进行检测的镜像异构体的量。RiboGreen (M. Probes) 用作染料, 并使用 ELISA 读取器测定荧光。在各情况下在 100 μl 1xPBS 中提供 1 μM 镜像异构体, 并逐渐增加 PEI 的量。将 100 μl 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RiboGreen 置于适合用于荧光的 96 孔微量滴定板中, 并在室温下温育微团批料 30 分钟后, 用移液器各移取 10 μl 至微量滴定板中。从 2 的 N/P 比率开始, 超过 90% 的镜像异构体以微团形式存在 (图 10)。在此, 单独的 PEI 对染料的荧光没有影响。

[0546] 3.4 镜像异构体-微团的稳定性

[0547] 在图 11 中指定的条件下贮存 1 μM 镜像异构体微团。使用在 3.3 节中描述的染料排除测定法来测量镜像异构体-微团的稳定性。微团的稳定性研究证明, 在不同介质中以及在不同温度下贮存微团对于镜像异构体-微团没有影响。在文献中还描述了冷冻干燥核酶/PEI 复合物而不损失核酶特性 (Brus-C 等人, J. Control Release, 2004, Feb, 20, 95 (1), 199-31)。

[0548] 3.5 镜像异构体-微团的吸收

[0549] 在 HS578T 细胞的细胞培养系统中建立了镜像异构体-微团的细胞内吸收。使 1×10^4 个 HS578T 细胞生长在无菌的 20mm 盖玻片上至 30-40% 的汇合。以 2.5:1 的 N/P 比率将 5' - 标记的镜像异构体 NOX-A-3' -PEG 包装入微团中, 以 1 μM 的浓度加入至细胞中, 然后在 37°C 下温育 16 小时。作为镜像异构体的被动吸收的对照, 各将 1 μM 纯的经荧光标记的镜像异构体与细胞一起温育。然后用 1ml 1xPBS 洗涤细胞 3 次, 并用 3% 多聚甲醛

固定 30 分钟。再用 1ml 1xPBS 洗涤制备物 3 次,然后与 DAPI 溶液(1 μ l 母液加至 10ml 1xPBS 中)一起再温育 10-20 秒以对细胞核中的染色质进行染色,再洗涤一次,并用封片溶液(**Paramountlösung**)覆盖。在荧光显微镜下(发射 488nm/ 消光 514 — 522nm) 分析如此准备好的制备物。

[0550] 可以证明,与“裸露的”、未包装的镜像异构体相比,镜像异构体-微团具有更高的转染量(图 12)。

[0551] 在此,转染效率 >95 % 的全部细胞,并且对细胞的形态学没有显示出影响。5' -FITC- 偶联的镜像异构体主要在胞质溶胶中发现并且与质膜相关联。点状分布模式表明包含在区室内,弥散模式表示释放出的镜像异构体。在细胞核中只检测到微弱的镜像异构体信号。

[0552] 3.6 镜像异构体的释放

[0553] 镜像异构体在 H578T 细胞的胞质溶胶和核周腔中的点状分布表明了在该细胞的区室例如内体中的富集。为了检查镜像异构体从这些区室中的释放,分析单个强烈增大的细胞的分布模式(图 13)。除了镜像异构体的点状定位外,还检测到在胞质溶胶中和质膜上的弥散分布模式,这表明镜像异构体的内体释放。在“裸露的”镜像异构体的情况下未发现该模式。

[0554] 实施例 4 :体内生物活性

[0555] 4.1 无 PEI 的增殖测定法

[0556] 对 MCF-7 细胞的增殖的影响

[0557] 通过增殖测定法来研究 HMGA1a/b 在细胞分裂中的潜在作用。首先,以高剂量将镜像异构体作为“裸露的”核酸加入至细胞培养基中,并在一段时间内追踪细胞的生长。挑选乳腺癌细胞系 MCF-7 作为模型,因为在这些细胞中发现 HMGA1a/b 的少的(拮抗性)表达,或者说 HMGA1a/b 在这些细胞的增殖中的作用已在文献中进行了描述。Reeves 等人(Reeves-R 等人, *Molecular and Cellular Biology*, Jan 2001, p575-594) 可以证明, HMGA1a/b 在 MCF-7 细胞中的过表达导致增强的增殖,并且通过用表达的反义构建体抑制 HMGA1a/b 而抑制了 MCF-7 细胞的增殖。

[0558] 实施 / 方法

[0559] 将 0.5×10^4 个 MCF-7 细胞(ATCC)接种在具有平坦且透明的底部的 96 孔平板(Costar)上,并在具有 10% 胎牛血清(FCS)的 100 μ l RPMI1640 培养基中培养 16 — 24 小时。然后用 PBS 洗涤细胞,并在直接加入经过滤灭菌的镜像异构体的情况下使用标准细胞培养基再培养 48 小时。之后,将 10 μ l 刃天青溶液(0.44mM,在 PBS 中)加入各培养混合物中,再在 37°C 下温育 2 小时。通过细胞代谢进行的刃天青的转化与细胞的数目直接相关。在 Fluostar Optima 多检测平板读取装置(BMG)(发射 544nm,消光 590nm)中测量颜色的改变。每个实验测定各值 3 次,并将其与未处理对照细胞的值相联系。

[0560] 结果

[0561] 2 天后 NOX-A 以剂量依赖性方式抑制 MCF-7 细胞的增殖($n = 12$)(图 14)。在 40 μ M 下,测得最大增殖抑制为未处理细胞的值的大约 30%。在直至 40 μ M 的浓度下,没有发现反向对照镜像异构体的非特异性效应。

[0562] 4.2 有 PEI 的增殖测定法

[0563] 镜像异构体-微团对 H-1299 细胞的增殖的影响

[0564] 实施 / 方法

[0565] 将 1×10^4 个 NCI-H-1299 细胞 (肺癌细胞;ATCC) 接种在具有平且透明的底部的 24 孔平板 (Costar) 上,并在具有 10% FCS 的 1ml RPMI1640 培养基中培养 16 — 24 小时。然后用 PBS 洗涤细胞 2 次,并用含有 1% FCS 和镜像异构体-微团的细胞培养基再培养 3 天。首先,通过以 2.5:1 (N/P 2.5) 的 PEI 的绝对氮份额对核糖核酸主链的绝对磷酸的比率加入 25kDa 交联的聚氮丙啶 (PEI) (Sigma),在 PBS 中进行无菌的、PEG 化的镜像异构体的包装。在此,以 $30 \mu\text{M}$ 的浓度提供无菌的镜像异构体,并在加入 PEI 后在室温下温育 30 — 60 分钟。然后用含有 1% FCS 的细胞培养基将镜像异构体-微团稀释至 $1 \mu\text{M}$,将其直接加至经洗涤的细胞中,并在 37°C 下温育 3 天。

[0566] 之后,向各混合物中加入 $100 \mu\text{l}$ 刃天青溶液,并于 37°C 下再温育 2 小时。通过细胞代谢进行的刃天青的转化与细胞的数目直接相关。从混合物中取出 $100 \mu\text{l}$,转移至 96 孔平板中,并在 Fluostar Optima 多检测平板读取装置 (BMG) (发射 544nm,消光 590nm) 中测量颜色的改变。每次实验确定各值 2 次,并将其与未处理对照细胞的值相联系。

[0567] 结果

[0568] 在 $1 \mu\text{M}$ 镜像异构体的情况下使用 PEI (N/P 2.5) 最初对细胞增殖没有任何影响。通过将细胞培养基中的 FCS 的量减少至 1% 以下可以证明,使用镜像异构体-微团的转染对 H-1299 细胞的增殖具有影响,在先前使用 10% FCS 的情况下不能看到该结果 (图 15)。可能是 FCS 刺激增殖的程度是如此的强,以至不能观察到轻微的影响。在 MCF-7 细胞的情况下, FCS 浓度的减少导致细胞在 3 天的时期内死亡。

[0569] 4.3 抑制肿瘤标记 cdc25a (有 PEI)

[0570] 对于 HMGA1a/b 介导的细胞周期因子 (例如潜在的癌基因 cdc25a) 的调控的影响

[0571] 借助于 cDNA 阵列,通过 MCF-7 细胞中 HMGA1a/b 的过表达,Reeves 等人 (Molecular and Cellular Biology, Jan 2001, p575-594) 可以证明, HMGA1a/b 诱导许多基因的表达。在此,在控制细胞周期的 G1 期过渡到 S 期中起着决定性作用的细胞周期因子和生长因子例如 cdc25a (细胞分裂周期 25a 磷酸酶) (鉴定为潜在的癌基因) 也过表达高达 100 倍。这些控制点的激活在抑制细胞周期进程后导致参与 DNA 修复的基因转录,或者如果 DNA 损伤是不可修复的,那么导致细胞凋亡的诱导。为此,选择 H-1299 细胞作为细胞培养测试系统,因为它们已展现出增加的 HMGA1a/b 的表达。

[0572] 实施 / 方法

[0573] 将 1×10^4 个 H-1299 细胞接种在具有平且透明的底部的 24 孔平板 (Costar) 上,并在具有 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基 (体积 1ml) 中培养 16 — 24 小时。然后用 PBS 洗涤细胞 2 次,并用含有镜像异构体-微团和 10% FCS 的细胞培养基再培养 3 天。首先,通过以 2.5:1 (N/P2.5) 的 PEI 的绝对氮份额对核糖核酸主链的绝对磷酸的比率加入 25kDa 交联的聚氮丙啶 (PEI) (Sigma),在 1xPBS 中进行无菌的、PEG 化的镜像异构体的包装。在此,以 $30 \mu\text{M}$ 的浓度提供无菌的镜像异构体,并在加入 PEI 后在室温下温育 30 — 60 分钟。然后用含有 1% FCS 的细胞培养基将镜像异构体-微团稀释至各浓度,将其直接加至经洗涤的细胞中,并在 37°C 下温育 3 天。用 PBS 洗涤细胞 2 次,用细胞刮棒收获细胞。然后使用

Roti-Quick-kits (Roth, Cat. No. 979. 1) 从细胞中分离出细胞的 mRNA, 并将 0. 2-1 μ g 总 RNA 用作用于 cdc25a 和 GAPDH 的 PCR 的模板。

[0574] 用于扩增 GAPDH 的引物如下: 51 °C 的退火温度的正向引物: 5'-ACATGTTCCAATATGATTCC-3' 和反向引物: 5'-TGGACTCCACGACTACTCAG-3', 以及用于扩增 cdc25a 的引物如下: 59 °C 的退火温度的正向引物: 5'-GAGGAGTCTCACCTGGAAGTACA-3' 和反向引物: 5'-GCCATTCAAACAGATGCCATAA-3'。PCR 条件如下: 0. 2 - 0. 75 μ M 引物、1. 5mM $MgCl_2$ 和 0. 2mM dNTP。每 2 个 PCR 循环, 使用 PicoGreen 定量 5 μ l 的等分试样, 并与作为上样对照的 GAPDH 相关地来进行估量: 在此, 在第一步骤中, 对于每个被检查的样品, 从待检查的基因的 CP 值中减去参照基因的所谓的“交叉点 (crossing-point)”值 (CP) ($dCP = CP_{\text{靶基因}} - CP_{\text{参照基因}}$)。CP 定义为为了达到恒定确定的荧光值所需的 PCR 循环次数。在所有反应容器中的 CP 上都发现相同量的新合成的 DNA。在该标准化后, 从通过实验处理的样品的 dCP 值中减去对照 (在该情况下为 GAPDH) 的 dCP 值; 到达所谓的“ $\Delta - \Delta CT$ ”计算模型。对于参照基因进行标准化的并参照标准样品得到的处理组和对照组之间的样品的相对表达差异 (比率) 可通过运算公式 2^{-ddCP} 来计算。 $dCP = CP(cdc25a) - CP(GAPDH)$

[0575] $ddCP = dCP(\text{处理组: 镜像异构体 NOX-A}) - dCP(\text{对照组: PBS 或 NOX-A 反向})$

[0576] 比率 = 2^{-ddCP}

[0577] 结果

[0578] 通过 RT-PCR 可在 MCF-7 和 H-1299 细胞中检测 cdc25a 和 HMGA1a/b。MCF-7 细胞显示出在具有较低的 HMGA1a/b 表达的时候还具有较低的 cdc25a 表达, 然而, 在 H-1299 细胞中 HMGA1a/b 和 cdc25a 均强烈表达。使用结合 HMGA1a/b 的镜像异构体转染 H-1299 细胞 2 天, 导致 cdc25a mRNA 的表达的显著的剂量依赖性减少 (图 16 和图 17)。

[0579] 直到 4 μ M, 对照镜像异构体对 GAPDH 和 cdc25a mRNA 的表达没有显示出非特异性效应。由此, 可推断出, 借助于镜像异构体可抑制 HMGA1a/b 诱导的潜在癌基因 cdc25a 的过表达。

[0580] 实施例 5: 功效研究, 异种移植模型

[0581] 镜像异构体对体内肿瘤生长的影响

[0582] 为了检验结合 HMGA1a/b 的镜像异构体在体内抑制肿瘤生长的假说, 开发了关于强表达 HMGA1a/b 的胰腺癌细胞 PSN-1 的异种移植模型。基于该模型, 使用 N/P 2.5 的 2mg/kg NOX-A 镜像异构体 - 微团进行治疗实验 (参见实施例 3, 3.3 节)。

[0583] 实施 / 方法

[0584] 雄裸鼠 (NMRI: nu/nu) (组的大小 $n = 8$) 各在侧面经皮下注射 10^7 个 PSN-1 细胞 (ECACC), 然后在 22 天内追踪肿瘤生长。动物具有 25 - 27g 的平均重量和为 6 - 8 周龄。如上所述, 通过以 N/P 2.5 的比率加入 PEI 而将活性镜像异构体 NOX-A-3' PEG 和反向对照镜像异构体 INV-3' PEG 包装入微团中。在各情况下每天将 100 μ l 的镜像异构体 - 微团悬浮液 (相应于 3.46nmole/ 动物或 2mg/kg) 皮下注射入肿瘤附近。每周测量肿瘤体积和体重 3 次。在第 22 天杀死动物, 并对 NOX-A 在血浆、肝、肾和肿瘤中的分布进行定量。

[0585] 为了该目的, 在杂交缓冲液 (0.5 $\times$ SSC pH 7.0; 0.5% (w/v) SDSarcosinate) 中将组织进行匀浆, 然后以 4000 $\times$ g 离心 10 分钟。将获得的上清液在 -20°C 下贮存直至进一步使用。

[0586] 通过杂交测定法检测血浆样品和组织匀浆中的镜像异构体的量 (Drolet 等人 (2000) Pharm. Res. 17:1503)。杂交测定法基于下列原理:将待检测的镜像异构体 (L-RNA 分子) 与固定的 L-DNA 寡核苷酸探针 (=捕获探针 NOX-A;此处为:5'-CCCATATCCACCCACGTAT CAGCCTTTTTTTT-NH₂-3';与 HMGA1a/b-NOX-A 的 5' 末端互补) 进行杂交,并用生物素化的检测 L-DNA 探针 (=检测探针 NOX-A;此处为:5'-生物素-TTTTTTTTGGCTGAAACCACCCACATGG-3';与 HMGA1a/b-NOX-A 的 3' 末端互补) 进行检测。为此,在进一步步骤中将链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶缀合物与复合物结合。在加入化学发光底物后,产生光,并在发光计中测量光。

[0587] 寡核苷酸探针的固定:将 100 μ l 捕获探针 (0.75 pmole/ml,于偶联缓冲液中:500mM Na₂HPO₄,pH 8.5,0.5mM EDTA) 转移至各 DNA-BIND 平板 (Corning Costar) 中的各小孔 (平板中的凹洞) 中,并在 4°C 下温育过夜。然后每次用 200 μ l 的偶联缓冲液洗涤探针,洗涤 3 次,并各与 200 μ l 的封闭缓冲液 (0.5% (w/v) BSA,于偶联缓冲液中) 一起在 37°C 下温育 1 小时。在用 200 μ l 偶联缓冲液和 3 $\times$ 200 μ l 杂交缓冲液再次洗涤后,可将平板用于检测。

[0588] 杂交和检测:将 10 μ l EDTA 血浆或组织匀浆与 90 μ l 检测缓冲液 (2 pmole/ μ l 的检测探针,于杂交缓冲液中) 混合,然后离心。当需要时进行进一步的稀释。然后在 95°C 下使混合物变性 10 分钟,将其转移至相应地准备的 DNA-BIND 小孔 (参见上面) 中,并在大约 40°C 下温育 45 分钟。然后进行下列洗涤步骤:用 200 μ l 杂交缓冲液洗涤 2 次和用 200 μ l 1 $\times$ TBS/Tween 20 (20mM Tris-Cl pH 7.6,137mM NaCl,0.1% (v/v) Tween 20) 洗涤 3 次。用 5ml 1 $\times$ TBS/Tween 20 稀释 1 μ l 链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶缀合物 (Promega)。向各小孔中加入 100 μ l 稀释的缀合物,并在室温下温育 1 小时。然后进行下列洗涤步骤:用 200 μ l 1 $\times$ TBS/Tween 20 洗涤 2 次和用 200 μ l 1 $\times$ 测定法缓冲液 (20mM Tris-Cl pH 9.8,1mM MgCl₂) 洗涤 2 次。然后加入 100 μ l CSPD “即用底物” (Applied Biosystems),在室温下温育 30 分钟,并在 Fluostar Optima 多检测平板读取装置 (BMG) 中测量化学发光。

[0589] 结果

[0590] 在预实验中证明,在作为肿瘤进行移植后,H-1299 细胞生长明显比 PSN-1 慢,并且当比较单个动物时,显示出不均匀的肿瘤生长,从而显得不适合用于治疗研究的异种移植模型。PSN-1 细胞在 22 天内显示出侵袭性肿瘤生长。可证明,与 PBS 对照相比,2mg/kg 剂量的 NOX-A 微团显著减少了 PSN-1 肿瘤的生长 (图 18)。动物的重量不受使用镜像异构体-微团进行处理的影响。对照镜像异构体不显示出对肿瘤生长的任何非特异性抑制,并且对动物的体重同样没有影响。从使用 NOX-A3' PEG 微团进行处理的第 10 天开始,与未处理的动物 (PBS 对照) 相比,肿瘤大小的差异是显著的或非常显著的 (学生 t-检验)。22 天后的终点分析表明,肿瘤生长的非常显著的、特异性的减小 ($p = 0.0098$,与 PBS 相比,和 $p = 0.022$,与反向对照镜像异构体相比) (图 19)。在 22 天后,用 PBS 处理的小鼠显示 2.5cm³ 的平均肿瘤生长,用对照镜像异构体处理的动物上显示 2.6cm³ 的平均肿瘤体积,和用 NOX-A 处理的动物显示 1.2cm³ 的平均肿瘤体积 (盒和须分析)。这对应于肿瘤生长减少超过 50%。

[0591] NOX-A 的组织分布的分析显示在肿瘤中存在高浓度 (图 20)。

[0592] 实施例 6:包装的和未包装的镜像异构体的体内组织分布的比较

[0593] 为了检查镜像异构体微团的有效引入,用 PEG 2 kDa 在 3'-末端 PEG 化无功能镜像异构体(概念验证(Proof Of Concept) = POC),并以 2.5 的氮/磷酸比率(N/P)将其包装入微团中(参见实施例 3,3.3 节)。以与在实施例 5 中描述的实验方案相似的方式,使用包装在微团中的镜像异构体以及游离的、未包装的镜像异构体来施行该方法。

[0594] 实施/方法

[0595] 雄裸鼠(NMRI:nu/nu)(组的大小 $n = 8$)各在侧面经皮下注射 10^7 个 PSN-1 细胞(ECACC),然后在 25 天内追踪肿瘤生长。动物具有 25 – 27g 的平均重量和为 6 – 8 周龄。如上所述,通过以 N/P 2.5 的比率加入 PEI 而将无功能镜像异构体 POC-3' PEG 包装入微团中。将未包装在微团中的镜像异构体 POC-3' PEG 用作非 PEI 介导的镜像异构体引入的对照。在各情况下每天将 $100 \mu\text{l}$ 的镜像异构体-微团悬浮液或镜像异构体溶液(分别相应于 1500nmole/kg 和 2000nmole/kg)皮下注射入肿瘤附近。每周测量肿瘤体积和体重 3 次。在最后一次注射后 24 和 96 小时,从每个组中杀死两只动物,并对 POC-3' PEG(包装的/未包装的)在血浆、脑、心、肺、肝、肾、胆囊、胰腺和肿瘤中的分布进行定量。

[0596] 为了该目的,在杂交缓冲液($0.5\times\text{SSC}$ pH 7.0 ; 0.5% (w/v)SDSarcosinate)中将组织进行匀浆,然后以 $4000\times g$ 离心 10 分钟。将获得的上清液在 -20°C 下贮存直至进一步使用。

[0597] 通过杂交测定法检测血浆样品和组织匀浆中的镜像异构体的量(Drolet 等人(2000)Pharm. Res. 17:1503)。杂交测定法基于下列原理:将待检测的镜像异构体(L-RNA 分子)与固定的 L-DNA 寡核苷酸探针(=捕获探针 POC;此处为:5'-NH₂(C7)-TTTTTTTTTAGC TCTGCACAGCGCT-3';与 POC 的 3'-末端互补)进行杂交,并用生物素化的检测 L-DNA 探针(=检测探针 POC;此处为:5'-CCGCATCAGACCGAGTTTCCTTATTTTTTTT-生物素-3';与 POC 的 5'-末端互补)进行检测。为此,在进一步步骤中将链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶缀合物与复合物结合。在加入化学发光底物后,产生光,并在发光计中测量光。

[0598] 寡核苷酸探针的固定:将 $100 \mu\text{l}$ POC 捕获探针(0.75 pmole/ml ,于偶联缓冲液中: 500mM Na₂HPO₄, pH 8.5, 0.5mM EDTA)转移至各 DNA-BIND 平板(Corning Costar)中的各小孔(平板中的凹洞)中,并在 4°C 下温育过夜。然后每次用 $200 \mu\text{l}$ 的偶联缓冲液洗涤探针,洗涤 3 次,并各与 $200 \mu\text{l}$ 的封闭缓冲液(0.5% (w/v)BSA,于偶联缓冲液中)一起在 37°C 下温育 1 小时。在用 $200 \mu\text{l}$ 偶联缓冲液和 $3\times 200 \mu\text{l}$ 杂交缓冲液再次洗涤后,可将平板用于检测。

[0599] 杂交和检测:将 $10 \mu\text{l}$ EDTA 血浆或组织匀浆与 $90 \mu\text{l}$ 检测缓冲液($2 \text{ pmole}/\mu\text{l}$ 的 POC 检测探针,于杂交缓冲液中)混合,然后离心。当需要时进行进一步的稀释。然后在 95°C 下使混合物变性 10 分钟,将其转移至相应地准备的 DNA-BIND 小孔(参见上面)中,并在大约 40°C 下温育 45 分钟。然后进行下列洗涤步骤:用 $200 \mu\text{l}$ 杂交缓冲液洗涤 2 次和用 $200 \mu\text{l}$ $1\times\text{TBS}/\text{Tween } 20$ (20mM Tris-Cl pH 7.6, 137mM NaCl, 0.1% (v/v)Tween 20)洗涤 3 次。用 5ml $1\times\text{TBS}/\text{Tween } 20$ 稀释 $1 \mu\text{l}$ 链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶缀合物(Promega)。向各小孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 稀释的缀合物,并在室温下温育 1 小时。然后进行下列洗涤步骤:用 $200 \mu\text{l}$ $1\times\text{TBS}/\text{Tween } 20$ 洗涤 2 次和用 $200 \mu\text{l}$ $1\times$ 测定法缓冲液(20mM Tris-Cl pH 9.8, 1mM MgCl₂)洗涤 2 次。然后加入 $100 \mu\text{l}$ CSPD“即用底物”(Applied Biosystems),在室温下温育 30 分钟,并在 Fluostar Optima 多检测平板读取装置(BMG)中测量化学发光。

[0600] 结果

[0601] 包装在微团中的无功能镜像异构体 POC-3' PEG 的组织分布的分析表明,在 24 小时后,与未包装的镜像异构体 ($0.840 \pm 0.255 \text{ pmole/mg}$) 相比,在肿瘤组织中存在显著更高的浓度 ($24.925 \pm 13.301 \text{ pmole/mg}$) (图 21A)。在继续 3 天 (96 小时) 后,包装的镜像异构体的浓度减半 ($11.325 \pm 7.050 \text{ pmole/mg}$),然而只可检测到非常少量的未包装的镜像异构体 ($0.120 \pm 0.057 \text{ pmole/mg}$)。

[0602] 24 小时后,未包装的镜像异构体的血浆水平 ($2.950 \pm 0.438 \text{ pmole/ml}$) 与经 PEI 包装的镜像异构体 ($1.930 \pm 2.729 \text{ pmole/ml}$) 的血浆水平相当。在 96 小时后,显示出明显的差异,其中与未包装的镜像异构体相比,可以检测到大约 4 倍量的包装的镜像异构体。

[0603] 对于两种制剂,在 24 小时后在肾中观察到轻微的富集,然而只对于未包装的镜像异构体在肝和胆囊中发现少量富集。在 96 小时后,对于两种制剂,在肝和肾中只可检测到少量的镜像异构体。相反地,与未包装的镜像异构体相比,对于包装的镜像异构体,在胆囊和胰腺中观察到稍微升高的值 (但具有高标准差)。

[0604] 总之,在 PEI 存在和不存在的条件下,在镜像异构体的组织分布 (在最后一次注射后 24 和 96 小时) 的比较中可以证明,镜像异构体-微团与未包装的材料相比在血浆和肿瘤中具有显著延长的驻留时间 (图 21B),从而提供了用于使用针对细胞内靶分子的镜像异构体的具有前景的方法。

[0605] 下列文献列表在此引用作为参考。

[0606] Abe 等人 J Gastroenterol. 2003 ;38, 1144-9

[0607] Abe N 等人 (1999). Cancer Res 59:1169-1174

[0608] Abe N 等人 (2000). Cancer Res 60:3117-3122

[0609] Abe N 等人 (2002). Pancreas 25:198-204

[0610] Anand A&Chada K (2000). Nat Genet 24:377-380

[0611] Balcerzak 等人, Postepy Biochem, 2005 ;51 (3):261-9

[0612] Balcerzak 等人 Pathol Res Pract 2003 ;199, 641-6

[0613] Baldassarre G 等人 (2003). Mol Cell Biol 23:2225-2238

[0614] Bandiera S 等人 (1998). Cancer Res 58:426-431

[0615] Battista S 等人 (1998) Oncogene 17:377-385

[0616] Belge G 等人 (1992). Cell Biol Int Rep 16:339-347

[0617] Berlingieri MT 等人 (1995). Mol Cell Biol 15:1545-1553

[0618] Birdsall SH 等人 (1992). Cancer Gen Cytogen 60:74-77

[0619] Bridge JA 等人 (1992). Cancer Detect Prevent 16:215-219

[0620] Briese 等人 Int. J Gynevol Pathol 2006 Jan, 65-9

[0621] Bullerdiek J 等人 (1987). Cytogenet Cell Genet 45:187-190

[0622] Bussemakers MJG 等人 (1991). Cancer Res 51:606-611

[0623] Chada K 等人 (2004). 美国专利 6,756,355

[0624] Chang 等人 Dig Dis Sci, 2005 Oct, 1764-70

[0625] Chau KY 等人 (2000). J Neurosci 20:7317-7324

[0626] Chau KY 等人 (2003). Mol Med 9:154-165

- [0627] Chen 等人 Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004 Jan, 30-3
- [0628] Chiappetta 等人 Clin Cancer Res. 2004 Nov, 7634-44
- [0629] Chiappetta G 等人 (1995). Oncogene 10:1307-1314
- [0630] Chiappetta G 等人 (1996). Oncogene 13:2439-2446
- [0631] Chiappetta G 等人 (1998). Cancer Res 58:4193-4198
- [0632] Chiappetta G 等人 (2001). Int J Cancer 91:147-151
- [0633] Chin MT 等人 (1999). J Mol Cell Cardiol 31:2199-2205
- [0634] Chuma 等人, Keio J Med 2004 Jun, 90-7
- [0635] Cuff CA 等人 (2001). J Clin Invest 108:1031-1040
- [0636] Czyz 等人 Langenbecks Arch Surg 2004, Jun, 193-7
- [0637] Dal Cin P 等人 (1993). Genes Chromosomes Cancer 8:131-133
- [0638] Dal Cin P 等人 (1995). Cancer Res 55:1565-1568
- [0639] Diana F 等人 (2001). J Biol Chem 276:11354-11361
- [0640] Dolde CE 等人 (2002). Breast Cancer Res Treat 71:181-191
- [0641] Donato 等人 Oncol Rep 2004 Jun, 1209-13
- [0642] Du W 等人 (1993). Cell 74:887-898
- [0643] Evans A 等人 (2004). J Surg Oncol 88:86-99
- [0644] Fedele M 等人 (1996). Cancer Res 56:1896-1901
- [0645] Fletcher AJ 等人 (1991). Am J Pathol 138:1199-1207
- [0646] Fletcher AJ 等人 (1992). Cancer Res 52:6224-6228
- [0647] Fletcher AJ 等人 (1995). Genes Chromosomes Cancer 12:220-223
- [0648] Flohr 等人 Histol Histopathol 2003 Oct, 999-1004
- [0649] Foster LC 等人 (1998). J Biol Chem 273:20341-20346
- [0650] Foster LC 等人 (2000). FASEB J 14:368-378
- [0651] French 等人 Mol Cell Biol 1996, 5393-9
- [0652] Friedman M 等人 (1993). Nucleic Acids Res 21:4259-4267
- [0653] Giancotti V 等人 (1987). EMBO J 6:1981-1987
- [0654] Giancotti V 等人 (1989). Exp Cell Res 184:538-545
- [0655] Giancotti V 等人 (1993). Eur J Biochem 213:825-832
- [0656] Giannini G 等人 (1999). Cancer Res 59:2484-2492
- [0657] Giannini G 等人 (2000). Br J Cancer 83:1503-1509
- [0658] Grosschedl R 等人 (1994). Trends Genet 10:94-100
- [0659] Heim S 等人 (1988). Cancer Genet Cytogenet 32:13-17
- [0660] Henderson 等人 J Virol 2000, 10523-34
- [0661] Hindmarsh 等人 J. Virol 1999, 2994-3003
- [0662] Holth LT 等人 (1997). DNA Cell Biol 16:1299-1309
- [0663] Huth JR 等人 (1997). Nat Struct Biol 4:657-665
- [0664] Jain M 等人 (1996). J Clin Invest 97:596-603
- [0665] Johansson M 等人 (1992). Cancer Genet Cytogenet 60:219-220

- [0666] Johansson M 等人 (1993). Br J Cancer 67:1236-1241
- [0667] Johnson KR 等人 (1990). Exp Cell Res 187:69-76
- [0668] Kazmierczak B 等人 (1995). Cancer Res 55:2497-2499
- [0669] Kettunen 等人 Cancer Genet Cytogenet 2004 Mar, 98-106
- [0670] Kim DH 等人 (1999). Int J Cancer 84:376-380
- [0671] Klotzbücher M 等人 (1999). Am J Pathol 155:1535-1542
- [0672] Kottickal LV 等人 (1998). Biochem Biophys Res Commun 242:452-456
- [0673] Lee 等人 Int J Oncol 2004, Apr, 847-51
- [0674] Leger 等人 Mol Cell Biol 1995, 3738-47
- [0675] Leman ES 等人 (2003). J Cell Biochem 88:599-608
- [0676] Li 等人 J. Virol 1998, 2125-31
- [0677] Li 等人, Am J Dermatopathol 2004 Aug, 267-72
- [0678] Mandahl N 等人 (1987). Int J Cancer 39:685-688
- [0679] Mandahl N 等人 (1989). Cancer 65:242-248
- [0680] Mandahl N 等人 (1993). Cancer 71:3009-3013
- [0681] Mark J&Dahlenfors R (1986). Anticancer Res 6:299-308
- [0682] Mark J 等人 (1980). Cancer Genet Cytogenet 2:231-241
- [0683] Mark J 等人 (1988). Anticancer Res 8:621-626
- [0684] Masciullo 等人 Carcinogenesis 2003 Jul, 1191-8
- [0685] Masciullo V 等人 (2003). Carcinogenesis 24:1191-1198
- [0686] Melillo RM 等人 (2001). Mol Cell Biol 21:2485-2495
- [0687] Nam 等人 Histopathology 2003 May, 466-71
- [0688] Nestl A 等人 (2001). Cancer Res 61:1569-1577
- [0689] Noguera R 等人 (1989). Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 415:377-382
- [0690] Ogram SA 等人 (1997). J Biol Chem 270:14235-14242
- [0691] Ozisik YY 等人 (1993). Cancer Genet Cytogenet 79:136-138
- [0692] Panagiotidis 等人 Virology 1999, 64-74
- [0693] Pellacani A 等人 (1999). J Biol Chem 274:1525-1532
- [0694] Peters 等人 Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005, Jul 17, 17-23
- [0695] Pierantoni 等人 Biochem J 2003 May, 145-50
- [0696] Ram TG 等人 (1993). Cancer Res 53:2655-2660
- [0697] Reeves R&Beckerbauer K (2002). Progr Cell Cycle Res 5:279-286
- [0698] Reeves R&Beckerbauer L (2001). Biochim Biophys Acta 1519:13-29
- [0699] Reeves R&Nissen MS (1990). J Biol Chem 265:8573-8582
- [0700] Reeves R 等人 (2001). Mol Cell Biol 21:575-594
- [0701] Rogalla P 等人 (1996). Am J Pathol 149:775-779
- [0702] Rohen C 等人 (1995). Cancer Genet Cytogenet 84:82-84
- [0703] Sarhadi 等人 J Pathol Mar 6 2006, Epub ahead of print

- [0704] Sato 等人 Pathol Res Pract, 2005 ;201, 333-9
- [0705] Scala S 等人 (2000).Proc Natl Acad Sci USA 97:4256-4261
- [0706] Schaefer 等人 Mol Cell Biol. 1997, 873-86
- [0707] Schlueter 等人 Pathol Res Pract, 2005 ;201, 101-7
- [0708] Schoenmakers EFPM 等人 (1995).Nat Genet 10:436-444
- [0709] Sgarra R 等人 (2003).Biochemistry 42:3575-3585
- [0710] Sgarra R 等人 (2004).FEBS Lett 574:1-8
- [0711] Sreekantaiah C 等人 (1990).Cancer Genet Cytogenet45:81-84
- [0712] Sreekantaiah C 等人 (1991).Cancer Res 5:422-433
- [0713] Staats B 等人 (1996).Breast Cancer Res Treat 38:299-303
- [0714] Tamimi Y 等人 (1996).Br J Cancer 74:573-578
- [0715] Tapasso F 等人 (2004).Cancer Gene Ther 11:633-641
- [0716] Tarbe N 等人 (2001).Anticancer Res 21:3221-3228
- [0717] Thanos D&Maniatis T(1992).Cell 71:777-789
- [0718] Turc-Carel C 等人 (1986).Cancer Genet Cytogenet23:283-289
- [0719] Vallone D 等人 (1997).EMBO J 16:5310-5321
- [0720] Van Maele 等人 ,Trends Biochem Sci 2006, 98-105
- [0721] Vanni R 等人 (1988).Cancer Genet Cytogenet 32:33-34
- [0722] Vanni R 等人 (1993).Cancer Genet Cytogenet 68:32-33
- [0723] Walter TA 等人 (1989).Cancer Genet Cytogenet 41:99-103
- [0724] Wolffe AP(1994).Science 264:1100-1101
- [0725] Wood LJ 等人 (2000a).Cancer Res 60:4256-4261
- [0726] Wood LJ 等人 (2000b).Mol Cell Biol 20:5490-5502
- [0727] Xiang YY 等人 (1997).Int J Cancer 74:1-6
- [0728] Zhou X 等人 (1995).Nature 376:771-774
- [0729] 在前面说明书、权利要求书和附图中公开的本发明的特征,单独地和以任何组合,对于以其各种不同的实施方案来实现本发明是必需的。
- [0730] 1. L- 核酸作为细胞内活性剂的用途。
- [0731] 2. 项目 1 的用途,其特征在于,所述 L- 核酸是镜像异构体。
- [0732] 3. 项目 1 至 2 中任一项的用途,其特征在于,所述 L- 核酸与细胞内受体相互作用。
- [0733] 4. 项目 3 的用途,其特征在于,所述细胞内受体选自分子受体、酶、伴侣分子、信号肽、细胞内结构和代谢中间体。
- [0734] 5. 项目 3 的用途,其特征在于,所述细胞内受体选自多肽、糖类、核酸、脂质和其组合。
- [0735] 6. 项目 3 至 5 中任一项的用途,其特征在于,所述 L- 核酸在细胞内与细胞内受体相互作用。
- [0736] 7. 项目 3 至 6 中任一项的用途,其特征在于,所述细胞内受体选自转录因子和结合 AT- 钩的 DNA 结合蛋白。
- [0737] 8. 项目 7 的用途,其特征在于,所述细胞内受体选自 HMG- 蛋白,优选选自 HMGA1、

HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。

[0738] 9. 用于结合细胞内受体的方法,其包括:

[0739] - 提供包含至少一种细胞内受体的细胞,

[0740] - 提供 L- 核酸,和

[0741] - 将细胞和 L- 核酸一起温育。

[0742] 10. 项目 9 的方法,其特征在于,在使所述 L- 核酸在细胞内结合细胞内受体的条件下进行温育。

[0743] 11. 项目 9 和 10 的方法,其特征在于,所述 L- 核酸是镜像异构体。

[0744] 12. 项目 9 至 10 中任一项的方法,其特征在于,在温育细胞和 L- 核酸后,测定所述 L- 核酸是否与所述细胞内受体结合,特别是细胞内结合。

[0745] 13. 项目 9 至 12 中任一项的方法,其特征在于,所述细胞内受体选自分子受体、代谢中间体和酶。

[0746] 14. 项目 9 至 13 中任一项的方法,其特征在于,所述细胞内受体选自多肽、糖类、核酸、脂质和其组合。

[0747] 15. 项目 9 至 14 中任一项的方法,其特征在于,所述细胞内受体选自转录因子和结合 AT- 钩的 DNA 结合蛋白。

[0748] 16. 项目 15 的方法,其特征在于,所述细胞内受体选自 HMG- 蛋白,优选选自 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。

[0749] 17. L- 核酸在制备用于治疗 and / 或预防疾病的药物中的用途,其中所述药物的靶分子是细胞内靶分子。

[0750] 18. 项目 17 的用途,其特征在于,所述细胞内受体选自分子受体、酶、伴侣分子、信号肽、细胞内结构和代谢中间体。

[0751] 19. 项目 17 的用途,其特征在于,所述细胞内受体选自多肽、糖类、核酸、脂质和其组合。

[0752] 20. 项目 17 至 19 中任一项的用途,其特征在于,所述靶分子选自转录因子和结合 AT- 钩的 DNA 结合蛋白。

[0753] 21. 项目 20 的用途,其特征在于,所述靶分子选自 HMG- 蛋白,优选选自 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。

[0754] 22. 项目 20 至 21 中任一项的用途,其特征在于,所述疾病选自肿瘤疾病、病毒感染和动脉硬化。

[0755] 23. 项目 22 的用途,其特征在于,所述肿瘤疾病选自间充质肿瘤、上皮肿瘤、良性肿瘤、恶性肿瘤和转移性肿瘤。

[0756] 24. 项目 20 至 23 中任一项的用途,其特征在于,所述靶分子是 HMGA,和所述疾病选自前列腺、胰腺、甲状腺、子宫颈、胃、乳腺、结肠 / 直肠、卵巢的癌症;成神经细胞瘤;淋巴瘤;子宫平滑肌瘤;脂肪瘤;子宫内膜息肉;肺的软骨样错构瘤;头唾液腺的多形性腺瘤;血管外皮细胞瘤;软骨瘤;侵袭性血管粘液瘤;弥漫性星形细胞瘤;破骨细胞瘤;皮肤癌;伯基特淋巴瘤;路易斯肺癌;白血病;非小细胞肺癌;和各自地其转移和 / 或转移形式。

[0757] 25. 项目 22 的用途,其特征在于,通过由 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 / 或 HMGA2 介导的动脉硬化斑的形成而引起或导致所述动脉硬化。

- [0758] 26. 项目 17 至 25 中任一项的用途,其特征在於,所述细胞内靶分子存在于细胞内。
- [0759] 27. L- 核酸在制备用于诊断的诊断剂中的用途,其中所述诊断剂的靶分子是细胞内靶分子。
- [0760] 28. 项目 27 的用途,其特征在於,所述细胞内受体选自分子受体、酶、伴侣分子、信号肽、细胞内结构和代谢中间体。
- [0761] 29. 项目 27 的用途,其特征在於,所述细胞内受体选自多肽、糖类、核酸、脂质和其组合。
- [0762] 30. 项目 27 至 29 中任一项的用途,其特征在於,所述靶分子选自转录因子和结合 AT- 钩的 DNA 结合蛋白。
- [0763] 31. 项目 30 的用途,其特征在於,所述靶分子选自 HMG- 蛋白,优选选自 HMGA、HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA2。
- [0764] 32. 项目 30 至 31 中任一项的用途,其特征在於,所述疾病选自肿瘤疾病、病毒感染和动脉硬化。
- [0765] 33. 项目 32 的用途,其特征在於,所述肿瘤疾病选自间充质肿瘤、上皮肿瘤、良性肿瘤、恶性肿瘤和转移性肿瘤。
- [0766] 34. 项目 30 至 33 中任一项的用途,其特征在於,所述靶分子是 HMGA,和所述疾病选自前列腺、胰腺、甲状腺、子宫颈、胃、乳腺、结肠 / 直肠、卵巢的癌症;成神经细胞瘤;淋巴瘤;子宫平滑肌瘤;脂肪瘤;子宫内膜息肉;肺的软骨样错构瘤;头唾液腺的多形性腺瘤;血管外皮细胞瘤;软骨瘤;侵袭性血管粘液瘤;弥漫性星形细胞瘤;破骨细胞瘤;皮肤癌;伯基特淋巴瘤;路易斯肺癌;白血病;非小细胞肺癌;和各自地其转移和 / 或转移形式。
- [0767] 35. 项目 32 的用途,其特征在於,通过由 HMGA1、HMGA1a、HMGA1b 和 / 或 HMGA2 介导的动脉硬化斑的形成而引起所述动脉硬化。
- [0768] 36. 项目 27 至 34 中任一项的用途,其特征在於,所述细胞内靶分子存在于细胞内。
- [0769] 37. 包含结合细胞内靶分子的 L- 核酸和递送媒介物的组合物。
- [0770] 38. 项目 37 的组合物,其特征在於,所述递送媒介物是适合于所述 L- 核酸的细胞内递送的递送媒介物。
- [0771] 39. 项目 37 或 38 的组合物,其特征在於,所述递送媒介物选自载体、缀合物和物理手段。
- [0772] 40. 项目 39 的组合物,其特征在於,所述递送媒介物是载体,其中所述载体选自脂质体、纳米颗粒、微粒、环糊精或树枝状聚合物,或者是由多肽、聚氮丙啶和 / 或两亲性分子组成的载体。
- [0773] 41. 项目 39 的组合物,其特征在於,所述递送媒介物是缀合物,其中所述缀合物是用于受体介导的胞吞作用的缀合物,具有融合肽的缀合物,具有信号肽的缀合物,具有核酸的缀合物,优选具有镜像异构体的缀合物,或者是亲脂缀合物。
- [0774] 42. 项目 39 的组合物,其特征在於,所述递送媒介物是物理手段,其中所述手段优选选自电穿孔、离子电渗、压力、超声波和冲击波。
- [0775] 43. 项目 40 的组合物,其特征在於,所述递送媒介物包含聚氮丙啶。
- [0776] 44. 项目 43 的组合物,其特征在於,所述聚氮丙啶是分子量为大约 25kDa 的分枝的聚氮丙啶。

- [0777] 45. 项目 43 或 44 的组合物,其特征在於,所述聚氮丙啶形成微团或微团样结构。
- [0778] 46. 项目 37 至 45 中任一项的组合物,其特征在於,所述 L- 核酸是镜像异构体。
- [0779] 47. 项目 46 的组合物,其特征在於,所述镜像异构体具有修饰,其中所述修饰选自 PEG- 残基。
- [0780] 48. 项目 47 的组合物,其特征在於,所述 PEG- 残基具有大约 1,000 至 10,000Da 的分子量,优选大约 1,500 至 2,500Da 的分子量,和最优选大约 2,000Da 的分子量。
- [0781] 49. 项目 47 或 48 的组合物,其特征在於,所述修饰结合至 L- 核酸的 5' 末端或 3' - 末端。
- [0782] 50. 项目 46 至 49 中任一项的组合物,其特征在於,在所述组合物中,聚氮丙啶的氮基团的总数目对在所述组合物中包含的核酸的磷酸基团的总数目的比率为大约 1 至 20,优选大约 1.5 至 10,更优选大约 2 至 5,和最优选大约 2 至 3。
- [0783] 51. 项目 37 至 50 中任一项的组合物,其特征在於,所述组合物在细胞内提供 L- 核酸。
- [0784] 52. 包含项目 37 至 51 中任一项的组合物和药学上可接受的载体的药物组合物。
- [0785] 53. 项目 1 至 8 中任一项的用途,其中所述 L- 核酸是项目 37 至 52 中任一项的组合物。
- [0786] 54. 项目 9 至 16 中任一项的方法,其中所述 L- 核酸是项目 37 至 52 中任一项的组合物。
- [0787] 55. 项目 17 至 26 中任一项的方法,其中所述 L- 核酸是项目 37 至 52 中任一项的组合物。
- [0788] 56. 项目 27 至 36 中任一项的方法,其中所述 L- 核酸是项目 37 至 52 中任一项的组合物。
- [0789] 57. 结合 HMGA 的核酸,其特征在於,所述核酸包含盒 A1 区段和盒 A2 区段,其中盒 A1 区段和盒 A2 区段通过中间区段相互连接,和其中盒 A1 和盒 A2 单独地且相互独立地选自 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG。
- [0790] 58. 项目 57 的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,所述中间区段由包含 6 或 7 个核苷酸的中间区段 Z1,或由包含 12 至 15 个核苷酸的中间区段 Z2 组成。
- [0791] 59. 项目 57 至 58 的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,所述核酸在盒 A1 区段的 5' - 末端具有第一区段,和在盒 A2 区段的 3' - 末端具有第二区段,其中优选地这两个区段相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸。
- [0792] 60 项目 59 的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,所述两个区段相互之间至少部分或完全杂交,其中所述杂交在 4 至 8 个核苷酸对上延伸。
- [0793] 61. 项目 59 或 60 的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,所述核酸在盒 A1 区段的 5' - 末端具有螺旋 A1 区段,和在盒 A2 区段的 3' - 末端具有螺旋 A2 区段,其中优选地所述螺旋 A1 区段包含 4 至 8 个核苷酸和优选地所述螺旋 A2 区段包含 4 至 8 个核苷酸,和其中优选地所述螺旋 A1 区段是在盒 A1 区段的 5' - 末端的第一区段或其部分,和其中优选地所述螺旋 A2 区段是在盒 A2 区段的 3' - 末端的第二区段或其部分,其中螺旋 A1 区段的长度不依赖于螺旋 A2 区段的长度。
- [0794] 62. 项目 61 的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间至

少部分或完全杂交,其中所述杂交在 4 至 8 个核苷酸对上延伸。

[0795] 63. 项目 61 或 62 的结合 HMGA 的核酸,其特征在在于,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间布置螺旋 B1 区段,和在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置螺旋 B2 区段,其中优选地所述螺旋 B1 和螺旋 B2 区段的长度单独地且独立地各包含 4 至 8 个核苷酸的长度。

[0796] 64. 项目 63 的结合 HMGA 的核酸,其特征在在于,螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间至少部分或完全杂交,其中所述杂交在 4 至 8 个核苷酸对上延伸。

[0797] 65. 项目 63 或 64 的结合 HMGA 的核酸,其特征在在于,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和螺旋 B1 区段的 5'-末端之间布置 0 至 5 个核苷酸。

[0798] 66. 项目 65 的结合 HMGA 的核酸,其特征在在于,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和螺旋 B1 区段的 5'-末端之间布置 2 个核苷酸。

[0799] 67. 项目 63 至 66 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在在于,在螺旋 B2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置 0 至 6 个核苷酸。

[0800] 68. 项目 67 的结合 HMGA 的核酸,优选地在项目 67 引用项目 66 的情况下,其特征在在于,在螺旋 B2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置 1 个核苷酸。

[0801] 69. 项目 63 至 68 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其中螺旋 A1 区段和螺旋 B1 区段的核苷酸总数为 10 至 12 个核苷酸,以及螺旋 A2 区段和螺旋 B2 区段的核苷酸总数为 10 至 12 个核苷酸。

[0802] 70. 项目 69 的结合 HMGA 的核酸,其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

[0803] 71. 项目 63 至 70 中任一项,优选地项目 63 或 64 的结合 HMGA 的核酸,其特征在在于,所述核酸不包含螺旋 A1 和螺旋 A2 区段,由此螺旋 B1 区段布置在所述核酸的 5'-末端并且螺旋 B2 布置在 3'-末端,其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段的长度单独地且独立地各包含 4 至 8 个核苷酸的长度。

[0804] 72. 项目 71 的结合 HMGA 的核酸,其中螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间至少部分或完全杂交,其中所述杂交在 4 至 8 个核苷酸对上延伸。

[0805] 73. 项目 61 至 62 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在在于,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间布置 1 至 5 个核苷酸,和在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置 1 至 3 个核苷酸。

[0806] 74. 项目 63 至 72 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在在于,在螺旋 B1 区段和 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间布置 2 个核苷酸,在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 B2 区段的 5'-末端之间布置 1 至 7 个核苷酸。

[0807] 75. 项目 58 至 65,项目 67,在它引用项目 63 至 65 的情况下,项目 69 和 70,在它们引用项目 63 至 65 和 67 的情况下,项目 71 和 72,在它们引用项目 63 至 65 和 67 和 69 和 70 的情况下,或项目 74,在它引用项目 63 至 65、67、69 至 72 的情况下,中任一项的结合 HMGA 的核酸,各自在此处限定的范围内,其特征在在于,中间区段 Z1 包含 6 或 7 个核苷酸。

[0808] 76. 项目 75 的结合 HMGA 的核酸,其特征在在于,中间区段 Z1 具有序列 $N_1N_2GN_3N_4N_5$,其中

[0809] $N_i = \text{U、C、A 或 G}$;

[0810] $N_2 = G$ 或 U ;

[0811] $N_3 = U$ 或 C ;

[0812] $N_4 = U$ 或 A ;

[0813] $N_5 = G$ 或 A ;和

[0814] $N_6 = U$ 或不存在。

[0815] 77. 项目 76 的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,所述核酸包含盒 A1 区段和盒 A2 区段,其中盒 A1 区段的 3'-末端直接与中间区段 Z1 的 5'-末端相连接,和中间区段 Z1 的 3'-末端直接与盒 A2 区段的 5'-末端相连接。

[0816] 78. 项目 75 至 77 中任一项,特别是项目 77 的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,所述核酸包含螺旋 B1 区段和螺旋 B2 区段。

[0817] 79. 项目 78 的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其优选地相互之间完全或部分杂交。

[0818] 80. 项目 78 或 79 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,在螺旋 B1 区段的 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间以 5'-3' 方向布置两个核苷酸 N_6 、 N_7 ,其中 N_6 是 G 、 A 或 U ,和 N_7 是 G 或 U 。

[0819] 81. 项目 78 至 80 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 B2 区段的 5'-末端之间没有布置核苷酸,或以 5'-3' 方向布置核苷酸序列 GN_y ,其中 N_y 包含 0 至 6 个核苷酸,优选 0 或 6 个核苷酸。

[0820] 82. 项目 75 至 81 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,所述核酸包含螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段。

[0821] 83. 项目 82 的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,螺旋 A1 和螺旋 A2 区段各自且相互独立地包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间完全或部分杂交。

[0822] 84. 项目 82 或 83 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和螺旋 B1 区段的 5'-末端之间布置核苷酸序列 N_x ,其中 N_x 包含 0 至 5 个核苷酸。

[0823] 85. 项目 82 至 84 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,在螺旋 B2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置核苷酸序列 N_z ,其中 N_z 包含 0 至 6 个核苷酸。

[0824] 86. 项目 78 至 85 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

[0825] 87. 项目 81 至 86 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在於,在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 B2 区段的 5'-末端之间以 5'-3' 方向布置核苷酸序列 GN_y ,其中 N_y 包含 0 至 6 个核苷酸,优选 0 或 6 个核苷酸。

[0826] 88. 项目 87 的结合 HMGA 的核酸,其包含下列结构

[0827]

螺旋 A1- N_x -螺旋 B1- N_6N_7 盒 A1 $N_1N_2GN_8N_3N_4N_5$ 盒 A2 $G-N_T$ -螺旋 B2- N_z -螺旋 A2

[0828] 其中

[0829] $N_1 = U$ 、 C 、 A 或 G ;

[0830] $N_2 = G$ 或 U ;

- [0831] $N_3 = \text{U 或 C}$;
- [0832] $N_4 = \text{U 或 A}$;
- [0833] $N_5 = \text{G 或 A}$;
- [0834] $N_6 = \text{G、A 或 U}$;
- [0835] $N_7 = \text{G 或 U}$;
- [0836] $N_8 = \text{U 或无核苷酸}$;
- [0837] $N_x = \text{0 至 5 个核苷酸}$;
- [0838] $N_y = \text{0 或 6 个核苷酸}$;和
- [0839] $N_z = \text{0 至 6 个核苷酸}$;
- [0840] 盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自包括 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG 的核苷酸序列 ;
- [0841] 螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间完全或部分杂交 ;和
- [0842] 螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间完全或部分杂交并且杂交区域包含 4 至 8 个核苷酸,和其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。
- [0843] 89. 项目 87 或 88 的结合 HMGA 的核酸,其包含选自 SEQ. ID. No. 1、SEQ. ID. No. 2、SEQ. ID. No. 3、SEQ. ID. No. 5、SEQ. ID. No. 6、SEQ. ID. No. 7 和 SEQ. ID. No. 13 的序列。
- [0844] 90. 项目 81 至 86 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,盒 A2 区段的 3' - 末端直接与螺旋 B2 区段的 5' - 末端连接。
- [0845] 91. 项目 90 的结合 HMGA 的核酸,其包含下列结构
- [0846]



- [0847] 其中
- [0848] $N_1 = \text{U、C、A 或 G}$;
- [0849] $N_2 = \text{G 或 U}$;
- [0850] $N_3 = \text{U 或 C}$;
- [0851] $N_4 = \text{U 或 A}$;
- [0852] $N_5 = \text{G 或 A}$;
- [0853] $N_6 = \text{G、A 或 U}$;
- [0854] $N_7 = \text{G 或 U}$;
- [0855] $N_8 = \text{U 或无核苷酸}$;
- [0856] $N_x = \text{0 至 5 个核苷酸}$;和
- [0857] $N_z = \text{0 至 6 个核苷酸}$;
- [0858] 盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自包括 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG 的核苷酸序列 ;
- [0859] 螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优

选地螺旋 A1 和螺旋 A2 区段相互之间完全或部分杂交 ;和

[0860] 螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 4 至 8 个核苷酸,其中优选地螺旋 B1 和螺旋 B2 区段相互之间完全或部分杂交并且杂交区域包含 4 至 8 个核苷酸,和其中来自螺旋 A1 区段与螺旋 A2 区段的杂交以及螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段的杂交的杂交核苷酸的总数为 10 至 12 个核苷酸对。

[0861] 92. 项目 90 或 91 的结合 HMGA 的核酸,其包含含有 SEQ. ID. No. 3 的序列。

[0862] 93. 项目 88 的结合 HMGA 的核酸,其包含下列结构

[0863]



[0864] 94. 项目 91 的结合 HMGA 的核酸,其包含下列结构

[0865]



[0866] 95. 项目 93 的结合 HMGA 的核酸,其中所述序列选自 SEQ. ID. No. 15 和 SEQ. ID. No. 16。

[0867] 96. 项目 58 至 70 和 73 或 74 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,中间区段 Z₂ 包含 12 至 25 个核苷酸。

[0868] 97. 项目 96 的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,中间区段 Z2 包含螺旋 C1 区段和螺旋 C2 区段。

[0869] 98. 项目 97 的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,在螺旋 C1 区段和螺旋 C2 区段之间布置中央区段 N_c。

[0870] 99. 项目 97 或 98 的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,螺旋 C1 和螺旋 C2 区段的长度是相同的。

[0871] 100. 项目 97 至 99 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,螺旋 C1 和螺旋 C2 区段的长度单独地且独立地为 3 至 6 个核苷酸。

[0872] 101. 项目 97 至 100 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,螺旋 C1 和螺旋 C2 区段相互之间完全或部分杂交。

[0873] 102. 项目 96 至 101 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,中央区段 N_c 包含 3 至 5 个核苷酸。

[0874] 103. 项目 96 至 102 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,所述核酸包含盒 A1 区段和盒 A2 区段,其中在盒 A1 区段的 3' - 末端和螺旋 C1 区段的 5' - 末端之间布置核苷酸序列 N_b 并且包含 3 个核苷酸。

[0875] 104. 项目 96 至 103 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,所述核酸包含盒 A1 区段和盒 A2 区段,其中在螺旋 C2 区段的 3' - 末端和盒 A2 区段的 5' - 末端之间布置核苷酸序列 N_d 并且包含 2 至 5 个核苷酸。

[0876] 105. 项目 96 至 104 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,所述核酸包含螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段。

[0877] 106. 项目 105 的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 5 至 6 个核苷酸,其中优选地螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段相互之间完全

或部分杂交。

[0878] 107. 项目 105 至 106 中任一项的结合 HMGA 的核酸, 其特征在于, 在螺旋 A1 区段的 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间布置核苷酸序列 N_a , 其中 N_a 包含 1 至 5 个核苷酸。

[0879] 108. 项目 105 至 107 中任一项的结合 HMGA 的核酸, 其特征在于, 在盒 A2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间以 5'-3' 方向布置核苷酸序列 GN_e , 其中 N_e 包含 1 至 2 个核苷酸, 优选 A 或 UU。

[0880] 109. 项目 105 至 108 中任一项的结合 HMGA 的核酸, 其特征在于, 螺旋 C1 区段和螺旋 C2 区段单独地且相互独立地各具有 5 或 6 个核苷酸的长度, 其中优选地螺旋 C1 和螺旋 C2 区段相互之间完全或部分杂交。

[0881] 110. 项目 109 的结合 HMGA 的核酸, 其包含下列结构:

[0882]



[0883] 其中

[0884] $N_a = 1$ 至 5 个核苷酸;

[0885] $N_b = 3$ 个核苷酸;

[0886] $N_c = 3$ 至 5 个核苷酸;

[0887] $N_d = 2$ 至 5 个核苷酸; 和

[0888] $N_e = 1$ 至 2 个核苷酸, 优选 A 或 UU;

[0889] 盒 A1 区段和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG;

[0890] 螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 5 或 6 个核苷酸; 和

[0891] 螺旋 C1 和螺旋 C2 区段各包含 5 或 6 个核苷酸, 其优选地相互之间完全或部分杂交。

[0892] 111. 项目 110 的结合 HMGA 的核酸, 其包含选自 SEQ. ID. No. 8、SEQ. ID. No. 9、SEQ. ID. No. 10、SEQ. ID. No. 11、SEQ. ID. No. 14、SEQ. ID. No. 22 和 SEQ. ID. No. 24 的序列。

[0893] 112. 项目 96 至 101 中任一项的结合 HMGA 的核酸, 其特征在于, 所述核酸包含盒 A1 区段和螺旋 C1 区段, 其中在盒 A1 区段的 3'-末端和螺旋 C1 区段的 5'-末端之间布置核苷酸 A。

[0894] 113. 项目 112 的结合 HMGA 的核酸, 其特征在于, 所述核酸包含螺旋 C2 区段和盒 A2 区段, 其中在螺旋 C2 区段的 3'-末端和盒 A2 区段的 5'-末端之间布置核苷酸 G。

[0895] 114. 项目 112 或 113 的结合 HMGA 的核酸, 其特征在于, 中央区段 N_c 包含 4 个核苷酸, 其中 N_c 优选是 GAUG。

[0896] 115. 项目 112 至 114 中任一项的结合 HMGA 的核酸, 其包含螺旋 B1 区段和螺旋 B2 区段。

[0897] 116. 项目 115 的结合 HMGA 的核酸, 其特征在于, 螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且相互独立地各包含 5 个核苷酸, 其中优选地螺旋 B1 区段与螺旋 B2 区段杂交。

[0898] 117. 项目 115 或 116 的结合 HMGA 的核酸, 其特征在于, 在螺旋 B1 区段的 3'-末端和盒 A1 区段的 5'-末端之间布置包含 2 个核苷酸的核苷酸序列 N_j , 其中 N_j 优选是 AG。

[0899] 118. 项目 115 至 117 中任一项的结合 HMGA 的核酸, 其特征在于, 在盒 A2 区段的

3'-末端和螺旋 B2 的 5'-末端之间布置核苷酸 G。

[0900] 119. 项目 112 至 118 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其包含螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段。

[0901] 120. 项目 119 的结合 HMGA 的核酸,其中螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且相互独立地各包含 6 个核苷酸,和优选地螺旋 A1 区段和螺旋 A2 区段相互杂交。

[0902] 121. 项目 119 或 120 的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,在螺旋 A1 区段的 3'-末端和螺旋 B1 区段的 5'-末端之间布置包含 2 个核苷酸的核苷酸序列 N_i ,其中 N_i 优选是 CA。

[0903] 122. 项目 119 至 121 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,在螺旋 B2 区段的 3'-末端和螺旋 A2 区段的 5'-末端之间布置核苷酸 A。

[0904] 123. 项目 112 至 122 中任一项的结合 HMGA 的核酸,其特征在于,螺旋 C1 和螺旋 C2 区段各包含 3 个核苷酸,其中优选地螺旋 C1 和螺旋 C2 区段相互杂交。

[0905] 124. 项目 123 的结合 HMGA 的核酸,其包含下列结构:

[0906]

螺旋 A1- N_i -螺旋 B1- N_j -盒 A1-A-螺旋 C1- N_c -螺旋 C2-G-盒 A2-G-螺旋 B2-A-螺旋 A2

[0907] 其中

[0908] N_i 包含 2 个核苷酸,优选是 CA;

[0909] N_j 包含 2 个核苷酸,优选是 AG;

[0910] N_c 包含 4 个核苷酸,优选是 GAUG;

[0911] 盒 A1 和盒 A2 区段单独地且相互独立地各自选自序列 GGGCG、GGGUG 和 GGGAG;

[0912] 螺旋 A1 和螺旋 A2 区段单独地且独立地各包含 6 个核苷酸,其优选地相互杂交;

[0913] 螺旋 B1 和螺旋 B2 区段单独地且独立地各包含 5 个核苷酸,其中优选地螺旋 B1 区段和螺旋 B2 区段相互杂交;和

[0914] 螺旋 C1 和螺旋 C2 区段单独地且独立地各包含 3 个核苷酸,其中优选地螺旋 C1 和螺旋 C2 区段相互杂交。

[0915] 125. 项目 124 的结合 HMGA 的核酸,其包含选自 SEQ. ID. No. 12 的序列。

[0916] 126. 项目 57 至 125 中任一项的核酸,其特征在于,其结合转录因子,特别是具有 AT- 钩的转录因子。

[0917] 127. 结合包含 AT- 钩的转录因子的核酸,其中所述核酸包含项目 57 至 126 中任一项的构造。

[0918] 128. 项目 37 至 52 中任一项的组合物,其中所述 L- 核酸是项目 57 至 127 中任一项的核酸。

[0919] 129. 项目 1 至 8 中任一项的用途,其中所述 L- 核酸是项目 57 至 127 中任一项的核酸。

[0920] 130. 项目 9 至 16 中任一项的方法,其中所述 L- 核酸是项目 57 至 127 中任一项的核酸。

[0921] 131. 项目 17 至 26 中任一项的用途,其中所述 L- 核酸是项目 57 至 127 中任一项的核酸。

- [0922] 132. 项目 27 至 36 中任一项的用途,其中所述 L- 核酸是项目 57 至 127 中任一项的核酸。
- [0923] 133. 用于筛选 HMGA- 拮抗剂或 HMGA- 激动剂的方法,其包括下列步骤:
- [0924] - 提供候选 HMGA- 拮抗剂和 / 或候选 HMGA- 激动剂,
- [0925] - 提供项目 57 至 127 中任一项的核酸,
- [0926] - 提供测试系统,该测试系统在 HMGA- 拮抗剂和 / 或 HMGA- 激动剂存在的情况下给出信号,和
- [0927] - 确定所述候选 HMGA- 拮抗剂是否是 HMGA- 拮抗剂,和 / 或所述候选 HMGA- 激动剂是否是 HMGA- 激动剂。
- [0928] 134. 用于筛选 HMGA- 激动剂和 / 或 HMGA- 拮抗剂的方法,其包括下列步骤:
- [0929] - 提供固定在相优选固相上的 HMGA,
- [0930] - 提供项目 57 至 127 中任一项的核酸,优选经标记的项目 57 至 127 中任一项的核酸,
- [0931] - 加入候选 HMGA- 激动剂和 / 或候选 HMGA- 拮抗剂,和
- [0932] - 确定所述候选 HMGA- 激动剂是否是 HMGA- 激动剂和 / 或所述候选 HMGA- 拮抗剂是否是 HMGA- 拮抗剂。
- [0933] 135. 项目 134 的方法,其特征在于,所述确定过程通过测试所述核酸是否被候选 HMGA- 激动剂或者被候选 HMGA- 拮抗剂替代来进行。
- [0934] 136. 用于检测 HMGA 的试剂盒,其包括项目 57 至 127 中任一项的核酸。
- [0935] 137. HMGA- 拮抗剂,其可通过项目 134 或 135 中任一项的方法获得。
- [0936] 138. HMGA- 激动剂,其可通过项目 134 或 135 中任一项的方法获得。
- [0937] 139. 包含 HMGA 蛋白和项目 57 至 127 中任一项的核酸的复合物。

[0001]

序列表

<110> NOXXON Pharma AG

<120> 结合HMGA的核酸

<130> N 10048 PCT

<150> DE 10 2005 020 874.6

<151> 2005-05-04

<160> 50

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 47

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<223> 合成的

<400> 1

gcugcugcaaa ahuuacgggg gcgugguugg ggcgggucga uuucagc

47

<210> 2

<211> 48

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<223> 合成的

<400> 2

gcugaauagag gaucgcaggg gcguggcugg ggugggcgac cguucagc

48

<210> 3

[0002]

<211>	48	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	3	
	gcugcgcaag gagaggggcg cgguugggga ggcucuaagc gcugcagc	48
<210>	4	
<211>	47	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	4	
	gcugggcgua uaggacaggg gugcgguggg ggcggucgcg ugucagc	47
<210>	5	
<211>	48	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	5	
	gcuggauaga acgcaggggu gcgguuuggg gugggcguga uaugcagc	48
<210>	6	
<211>	46	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		

[0003]

<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 6	
gcugccguaa agagggguga gguuggggag gcuuuacggu uuucagc	46
<210> 7	
<211> 48	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 7	
gcugcagucc gcgaucaggg gagcgguugg ggcgggaucc ggcucagc	48
<210> 8	
<211> 48	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 8	
gcugcgaggg agguagcggc ucugcgccgu gacgugggug gaugcagc	48
<210> 9	
<211> 50	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 9	
ggcugauacg uggguggaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc	50

[0004]

<210>	10	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	10	
	ggcugauacg ugggugaaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc	50
<210>	11	
<211>	49	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	11	
	ggcugauacg ugggaggaaa gguguaacua ccugugggag gguuucagcc	49
<210>	12	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	12	
	ggcuggcacu cgcaggggug aagugaugau uggggugggc gagaccagcc	50
<210>	13	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	

[0005]

<220>		
<221> misc_feature		
<223> 合成的		
<400> 13		50
ggcugccgag ugguugggug guguaaggga gguggaaucc gcgggcagcc		
<210> 14		
<211> 50		
<212> RNA		
<213> 人工的		
<220>		
<221> misc_feature		
<223> 合成的		
<400> 14		50
ggcuguucgu gggaggaagg cucuuggaua gagucguggg ugguucagcc		
<210> 15		
<211> 32		
<212> RNA		
<213> 人工的		
<220>		
<221> misc_feature		
<223> 合成的		
<400> 15		32
ggaucgcagg ggcguggcug gggugggcga cc		
<210> 16		
<211> 33		
<212> RNA		
<213> 人工的		
<220>		
<221> misc_feature		
<223> 合成的		
<400> 16		32
ggaucgcagg ggcguggcug gggugggcga ucc		

[0006]

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 合成的

<400> 17

Glu Pro Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys
1 5 10 15

Gly Ser Lys Asn Lys
20

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> HMGA1a

<400> 18

Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln Glu
1 5 10 15

Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln Pro
20 25 30

Pro Val Ser Pro Gly Thr Ala Leu Val Gly Ser Gln Lys Glu Pro Ser
35 40 45

Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys
50 55 60

Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr Thr Thr Thr Pro Gly Arg
65 70 75 80

Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu Lys Glu Glu Glu Glu Gly
85 90 95

Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln
100 105

[0007]

<210> 19

<211> 95

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> HMGA1b

<400> 19

Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln Glu
1 5 10 15

Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln Pro
20 25 30

Pro Lys Glu Pro Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg
35 40 45

Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr Thr
50 55 60

Thr Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu Lys
65 70 75 80

Glu Glu Glu Glu Gly Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln
85 90 95

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> HMGA2

<400> 20

Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg
20 25 30

Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro Arg
35 40 45

[0008]

Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala Gln
50 55 60

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Arg
65 70 75 80

Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Glu Glu Thr
85 90 95

Glu Glu Thr Ser Ser Gln Glu Ser Ala Glu Glu Asp
100 105

<210> 21

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<223> 合成的

<400> 21

tcgaaaaaag caaaaaaaaa aaaaaaaac tggc

34

<210> 22

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<223> 合成的

<400> 22

ggcugauacg uggguggaau uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc

50

<210> 23

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<221> misc_feature

[0009]

<223> 合成的

<400> 23

ccgacuuugg uggguguacc uugacggggu auaggugggu gcauagucgg

50

<210> 24

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<223> 合成的

<400> 24

ggcugauacc uggguggaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc

50

<210> 25

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<223> 合成的

<400> 25

ccgacuuugg uggguguacc uugacggggu auaggugggu gcauagucgg

50

<210> 26

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<221> misc_feature

<223> 合成的

<400> 26

ccgacuuugg uggguguacc uugacggggu auaggugggu gcauagucgg

50

<210> 27

[0010]

<211>	40	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	27	
	uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcu gugcagagcu	40
<210>	28	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	28	
	cccataacca cccacgtatc agcctttttt tt	32
<210>	29	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	29	
	tttttttttg ctagaaaccac ccacatgg	28
<210>	30	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		

[0011]

<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	30	
	ttttttttta gctctgcaca ggcct	25
<210>	31	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	31	
	ccgcacacaga ccgagtttcc ttatTTTTTT t	31
<210>	32	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	32	
	tcgacacccat gggtagagtc	19
<210>	33	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	33	
	gtctagaaaag ctctcccaact g	21

[0012]

<210>	34	
<211>	47	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	34	
	gcugcugcaa auugacgggg gcgugguugg ggcgggucga uugcagc	47
<210>	35	
<211>	48	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	35	
	gcugaaugag gaugcaggg gcguggcugg ggugggegac cguucagc	48
<210>	36	
<211>	48	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	36	
	gcugcgcaag gagaggggcg cgguggggga ggcucuaagc gcugcagc	48
<210>	37	
<211>	47	
<212>	RNA	
<213>	人工的	

[0013]

<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 37	
gcuggcgcuu uaggacaggg ggcggguugg ggcgguccgc ugucagc	47
<210> 38	
<211> 48	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 38	
gcuggauaga acgcaggggu gcgguuuggg gugggcguga uuugcagc	48
<210> 39	
<211> 46	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 39	
gcugccguua agagggguga gguuggggag gcuuuacgu uuacgc	46
<210> 40	
<211> 48	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 40	
gcugcaugcc gcgaucaggg gagcgguggg ggcgggaucc ggcucagc	48

[0014]

<210>	41	
<211>	48	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	41	48
	ggcugcgaggg agguagcggc ucugcgccgu gacgugggug gaugcagc	
<210>	42	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	42	50
	ggcugauacg ugggugaaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc	
<210>	43	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	43	50
	ggcugauacg ugggugaaua uggggcaguu ccaugugggu gguuucagcc	
<210>	44	
<211>	49	
<212>	RNA	
<213>	人工的	

[0015]

<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	44	
	ggcugauacg ugggaggaaa gguguaacua ccugugggag guuucagcc	49
<210>	45	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	45	
	ggcuggcacu cgcaggggug aagugaugau uggggugggc gagaccagcc	50
<210>	46	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	
<400>	46	
	ggcugccgag ugguugggug guguaaggga gguggaaucc gcgggcagcc	50
<210>	47	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	合成的	

[0016]

<400> 47 ggcugguucgu gggaggaagg cucuuggaia gagucguggg ugguuicagcc	50
<210> 48	
<211> 32	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 48 ggaucgcagg ggcguggcug gggugggcga cc	32
<210> 49	
<211> 33	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 49 ggaucgcagg ggcguggcug gggugggcga ucc	33
<210> 50	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 合成的	
<400> 50 gccagttttt tttttttttt ttgcgttttt t	34

名称	别名	序列	实例	H	K _D	A
132-C3	NOX-h	GCUGCUGCAAAUUGACGGGGCGUGGUUGGGCGGGUCGAUUGCAGC	1A	12	12nM	78
132-B3	NOX-f	GCUGAAUGAGGAUCCAGGGCGUGGCUGGGUGGCCGACCGUUCAGC	1A	5	9nM	92
132-C4		GCUGCGCAAGGAGAGGGCGCGGUUGGGAGGCUCUAAGCGCUGCAGC	1A	1	14nM	78
132-E2		GCUGGCGCUAUAAGGACAGGGUGCGGUUGGGCGGUCCGCCUGUCAGC	1B	1	14nM	79
132-A2		GCUGGAUAGAACGCAGGGUGCGGUUGGGUGGGCGUGUAUAGCAGC	1A	1	13nM	82
132-H1	NOX-i	GCUGCCGUAAAGAGGGUGAGGUUGGGAGGCUUUAACGGUUCAGC	1A	1	8nM	77
132-F1		GCUGCAUGCCCGCAUCAGGGAGCGGUUGGGCGGGAUCCGGCUCAGC	1A	1	22nM	63
132-G2	NOX-g	GCUGCGAGGGAGGUA GCGGCUUGCGGCCGUGGAGGGUGGAUGCAGC	2A	1	12nM	64
122-A1	NOX-A	GGCUGAUACGU GGGUGGAU AUGGGGCAGUCCAU GU GGGUG GUUUCAGCC	2A	10	18nM	94
122-C1		GGCUGAUACGU GGGUGAAU AUGGGGCAGUCCAU GU GGGUG GUUUCAGCC	2A	1	16nM	87
122-B2	NOX-B	GGCUGAUACGU GGGAGGAA AGGUGUAACUACCU GU GGGAG GUUUCAGCC	2A	3	22nM	92
122-E2	NOX-C	GGCUGGCACUCGCGAGGGUGAAGU GAUGAUU GGGUG GCGAGACCGAGCC	2B	1	12nM	85
122-G2	NOX-E	GGCUGCCGAGUGGUUGGGUGGUGUAA GGGAGGUGGAUCCCGCGGCAGCC	1°	1	11nM	85
122-B4	NOX-D	GGCUGUUCGU GGGAGGAA GGCUCUUGGAUAGAGUC GU GGGUG GUUUCAGCC	2A	1	15nM	85

H = 序列的频率

螺旋 A1/A2 (整个序列的 5'+3'末端)

K_D = 在平衡结合测定法中测得的解离常数

盒 A1 和盒 A2 (结合基序)

A = 活性 [%]

螺旋 B1/B2 (盒 A 的 5'+3'末端)

螺旋 C1/C2 (在盒 A1 和盒 A2 之间)

图 1A

名称	别名	螺旋 A1	螺旋 B1	盒 A1	螺旋 C1	螺旋 C2	盒 A2	螺旋 B2	螺旋 A2
实例 1A									
	132-C3	NOX-h	X	X	-	-	X	X	X
	132-C4		X	X	-	-	X	X	X
	132-A2		X	X	-	-	X	X	X
	132-H1	NOX-i	X	X	-	-	X	X	X
	132-F1		X	X	-	-	X	X	X
	122-G2	NOX-E	X	X	-	-	X	X	X
	132-B3	NOX-f	X	X	-	-	X	X	X
实例 1A 缩进的									
	132-B3 32nt	NOX-f 32nt	-	X	-	-	X	X	-
	132-B3 32nt	NOX-f 33nt	-	X	-	-	X	X	-
实例 1B									
	132-E2		X	X	-	-	X	X	X
实例 2A									
	132-G2	NOX-g	X	-	X	X	X	-	X
	122-A1	NOX-A	X	-	X	X	X	-	X
	122-C1		X	-	X	X	X	-	X
	122-B2	NOX-B	X	-	X	X	X	-	X
	122-B4	NOX-D	X	-	X	X	X	-	X
实例 2B									
	122-E2	NOX-C	X	X	X	X	X	X	X

图 1B

HMGA1a	人	(Seq. ID 18):	(M) SESSSKSSQPLASKQEKDGT---EKRGRGRERKQFPVSPGTALVGSQKEPSEVPTT <u>KRPRGRPKGSKNK</u> (66)
HMGA1b	人	(Seq. ID 19):	(M) SESSSKSSQPLASKQEKDGT---EKRGRGRERKQFP-----KEPSEVPTT <u>KRPRGRPKGSKNK</u> (55)
HMGA2	人	(Seq. ID.20):	(M) SARGEGAGQPSSTAQGGPAAAPAP <u>KRGRGRERKQQQ</u> -----EPTGEPST <u>KRPRGRPKGSKNK</u> (57)
DBD1			
HMGA1a	人	(Seq. ID 18):	GAAKT--RKTTTTT <u>PKRPRGRERK</u> -----LEK-----EEEEGISQESSEEEQ 106
HMGA1b	人	(Seq. ID 19):	GAAKT--RKTTTTT <u>PKRPRGRERK</u> -----LEK-----EEEEGISQESSEEEQ 95
HMGA2	人	(Seq. ID.20):	SPSKAAQKKAETATG <u>ERKPRGRERK</u> WPQQVQKKPAQEETETETSSQESAEED 108
DBD3			
DBD1-3: DNA 结合结构域 1-3 ("AT-钩")			
HMGA1a/b 靶分子结构域 (Seq. ID 17): <u>EPSEVPTPKRPRGRPKGSKNK</u>			

图 2

112

名称	别名	序列			L	K _D	A
132-B3	NOX-f	GCUGAAUGAGGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACCGUUCAGC			48	9 nM	92
132-B3	NOX-f	GGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGACC			32	21 nM	90
132-B3	NOX-f	GGAUCGCAGGGGCGUGGCUGGGGUGGGCGAUCC			33	14 nM	90

螺旋 A1/A2 (整个序列的 5' + 3' 末端)

盒 A1 和盒 A2 (结合基序)

螺旋 B1/2 (盒 A1/2 的 5' + 3' 末端)

L = 长度 [核苷酸的数目]
K_D = 在平衡结合测定法中测得的解离常数
A = 活性 [%]

图 3

113

NOX-f 48nt GCUGAAUGAGGAUCGACAGGGGCGUGGCGUGGGUGGGCGACCGUUCAGC
NOX-f 32nt GGAUCGCAGGGGCGUGGCGUGGCGUGGGUGGGCGACCG
NOX-f 33nt GGAUCGCAGGGGCGUGGCGUGGCGUGGGUGGGCGGAUCC

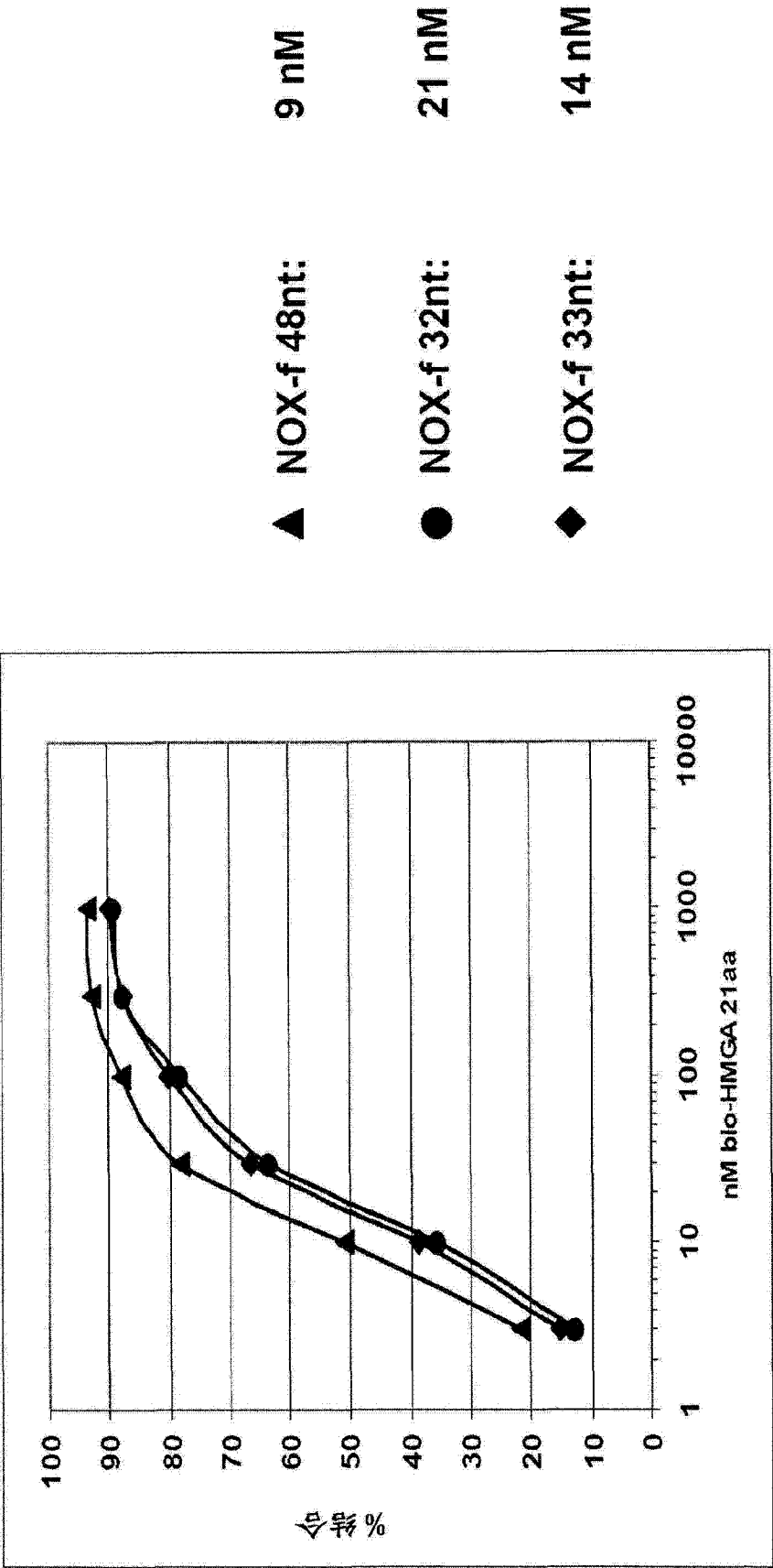


图 4

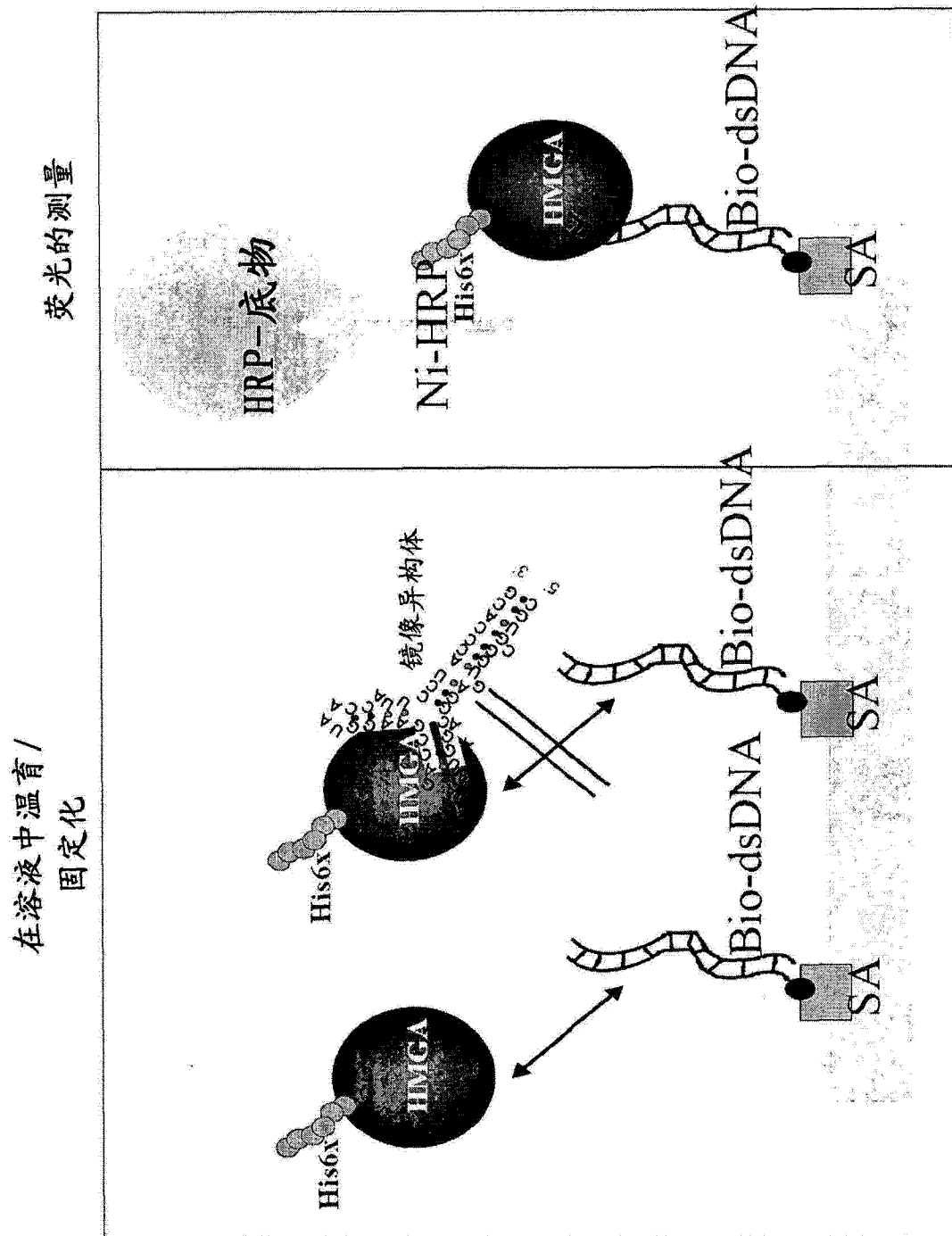


图 5

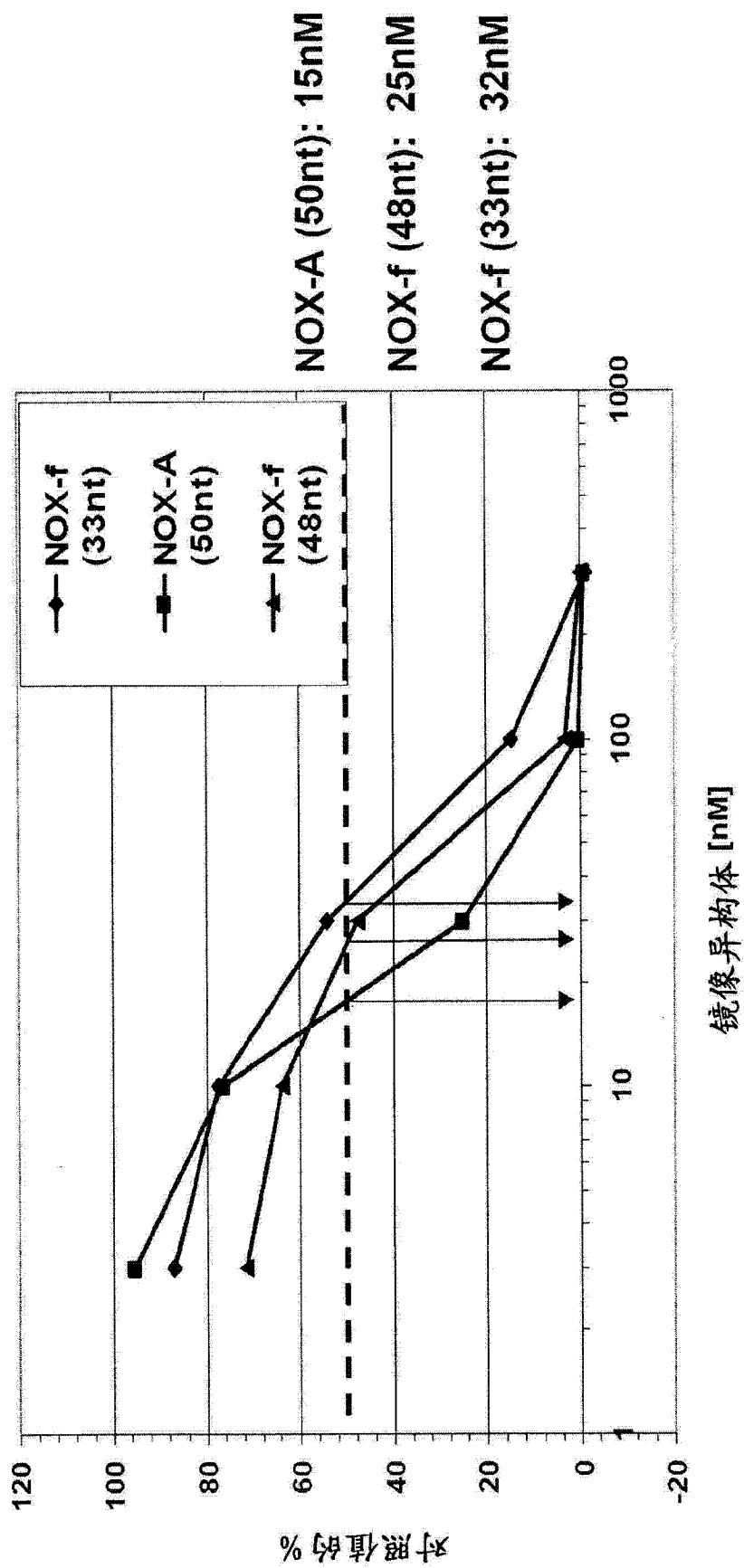


图 6

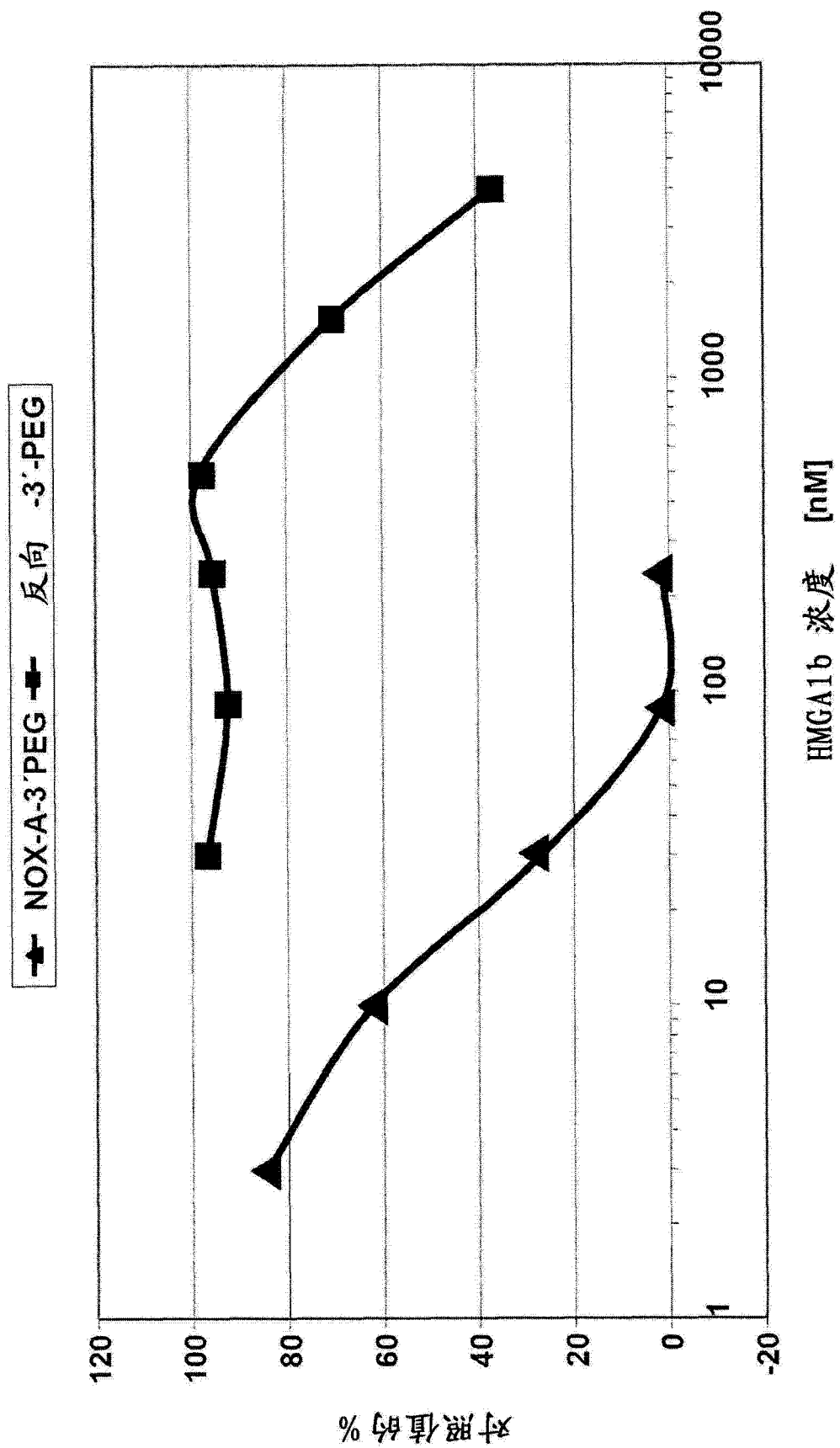


图 7

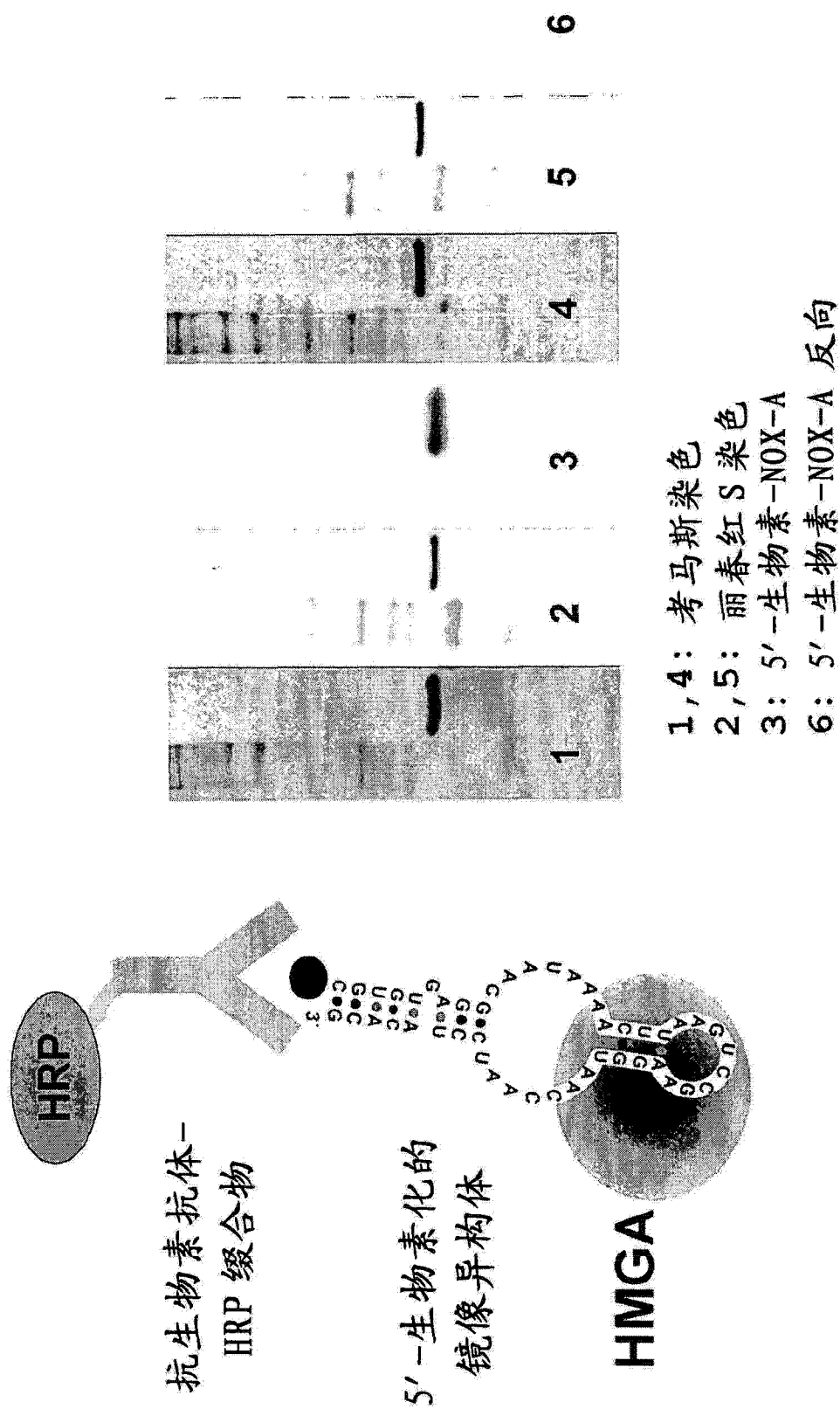


图 8

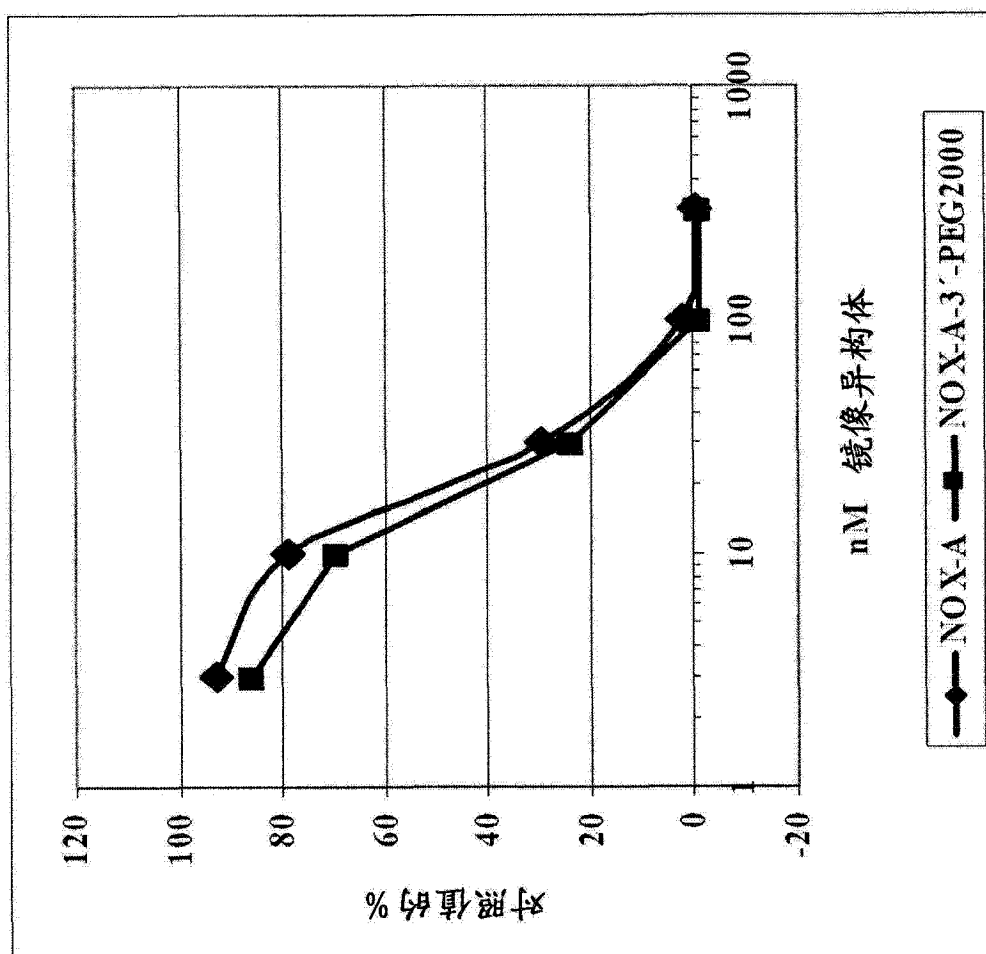


图 9

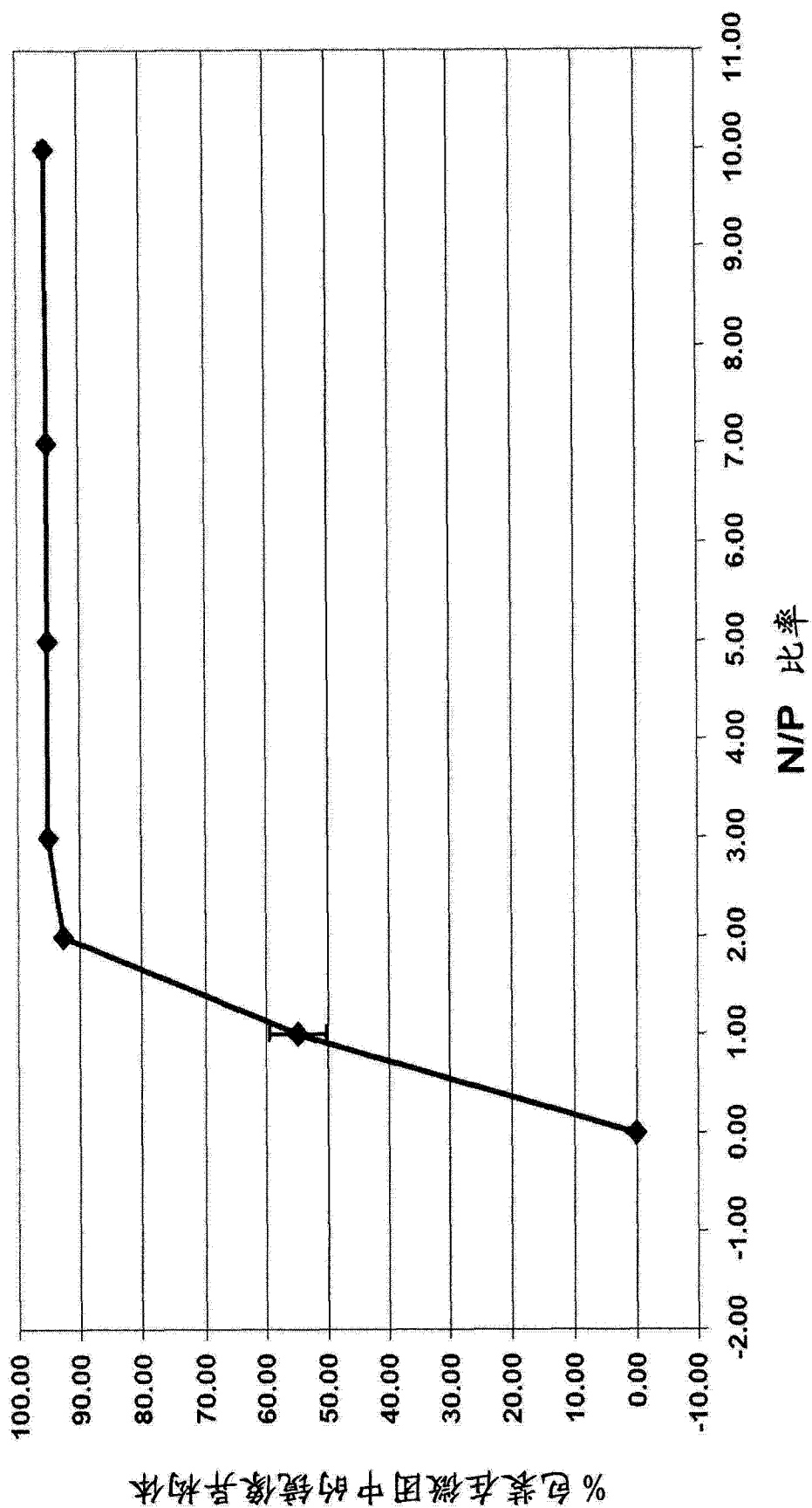


图 10

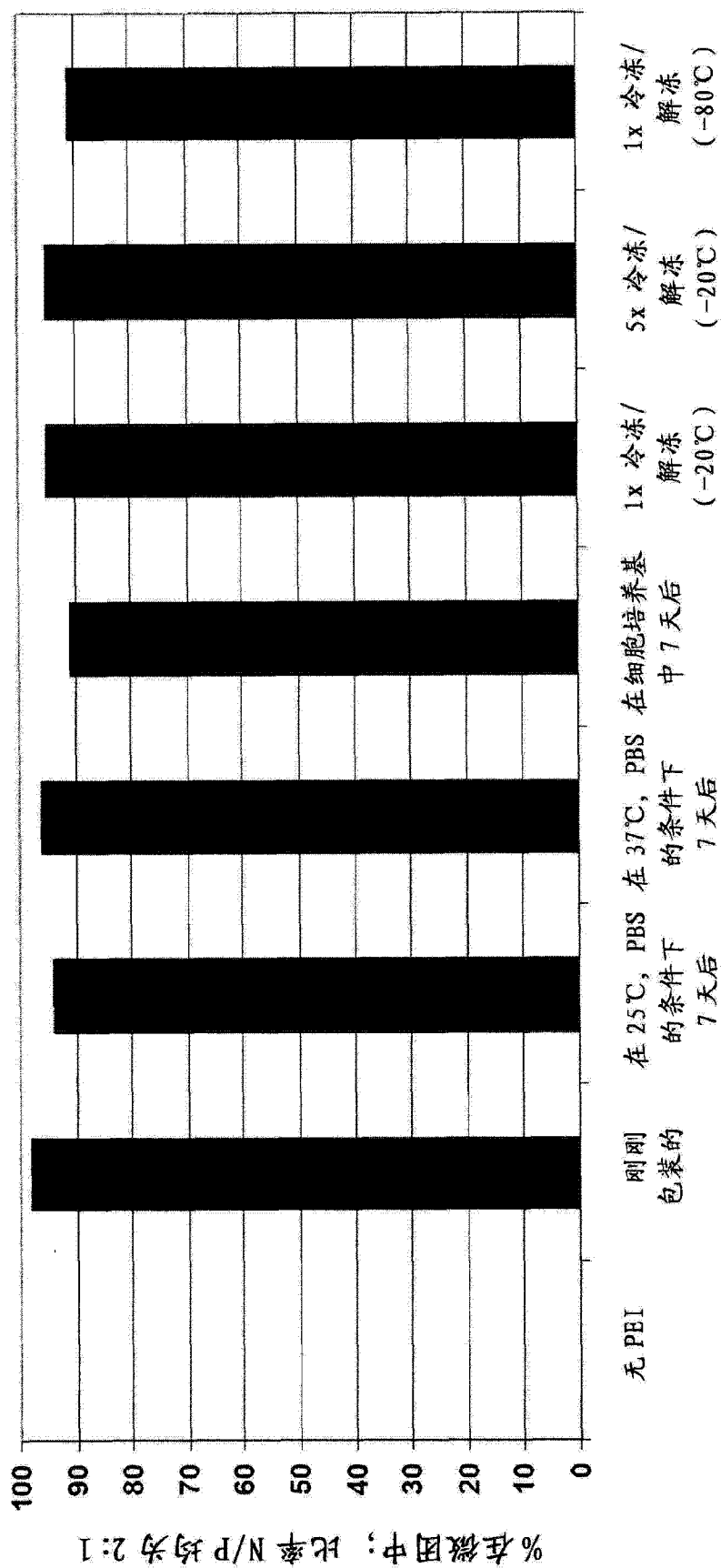


图 11

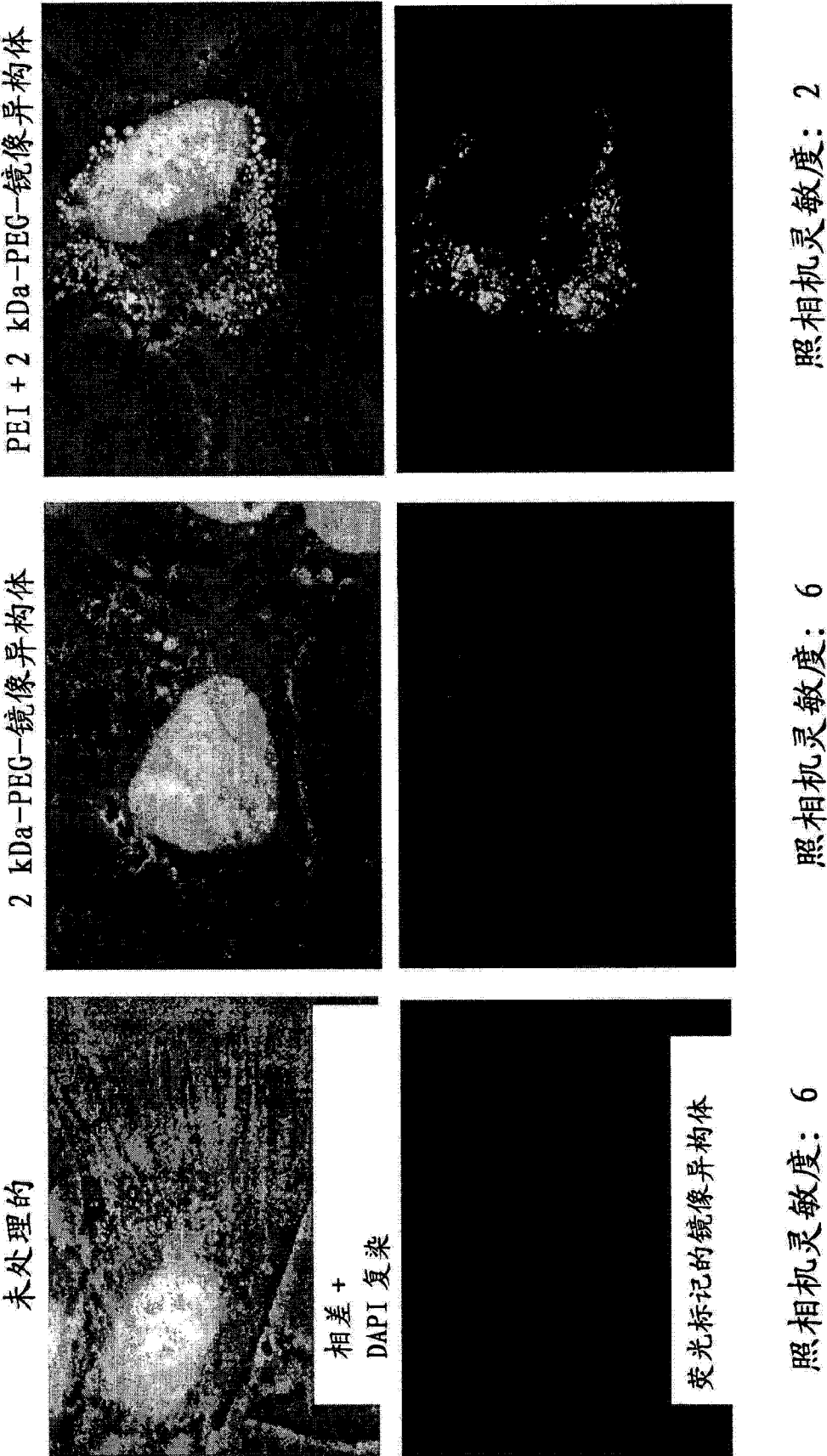


图 12

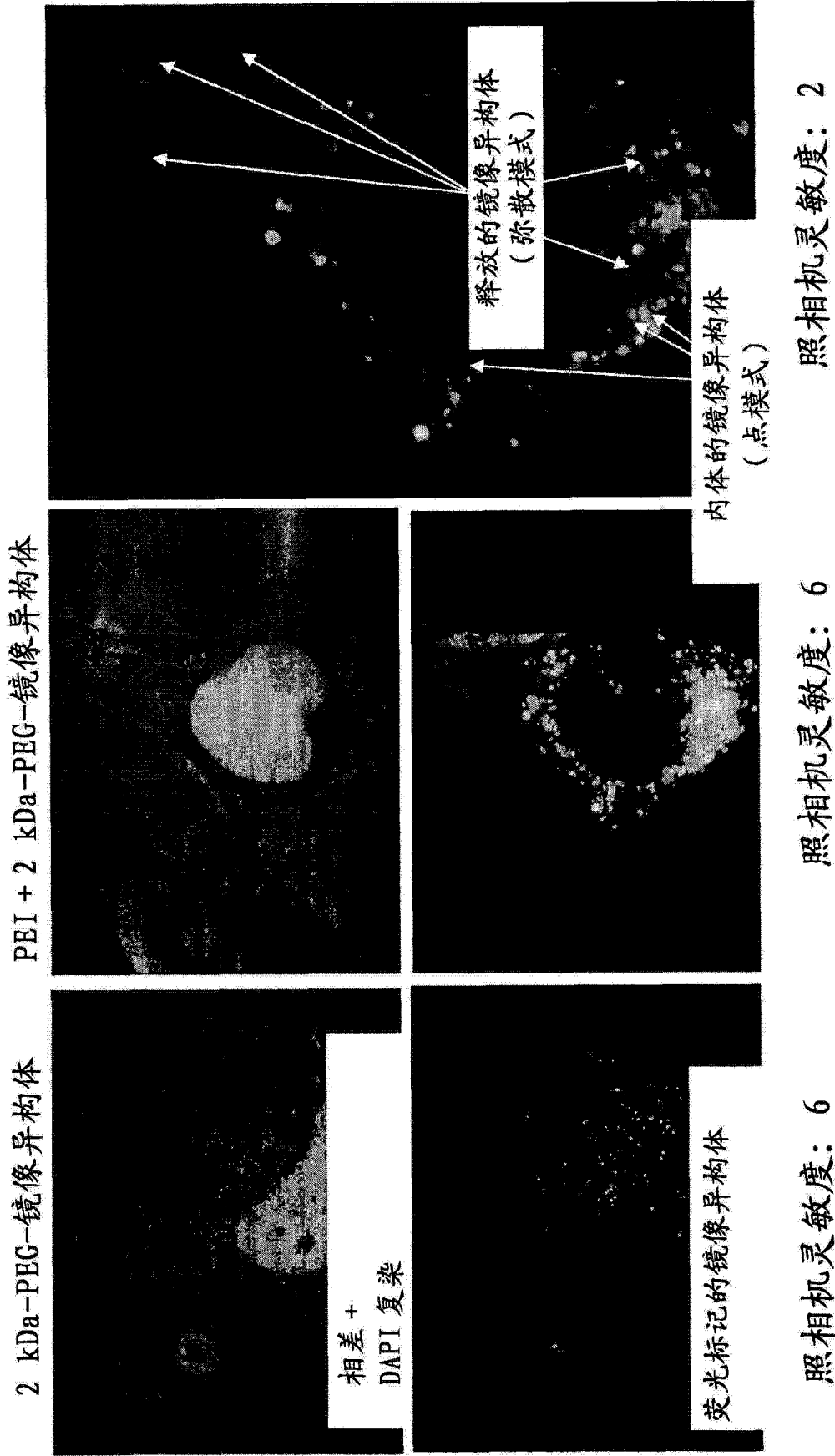


图 13

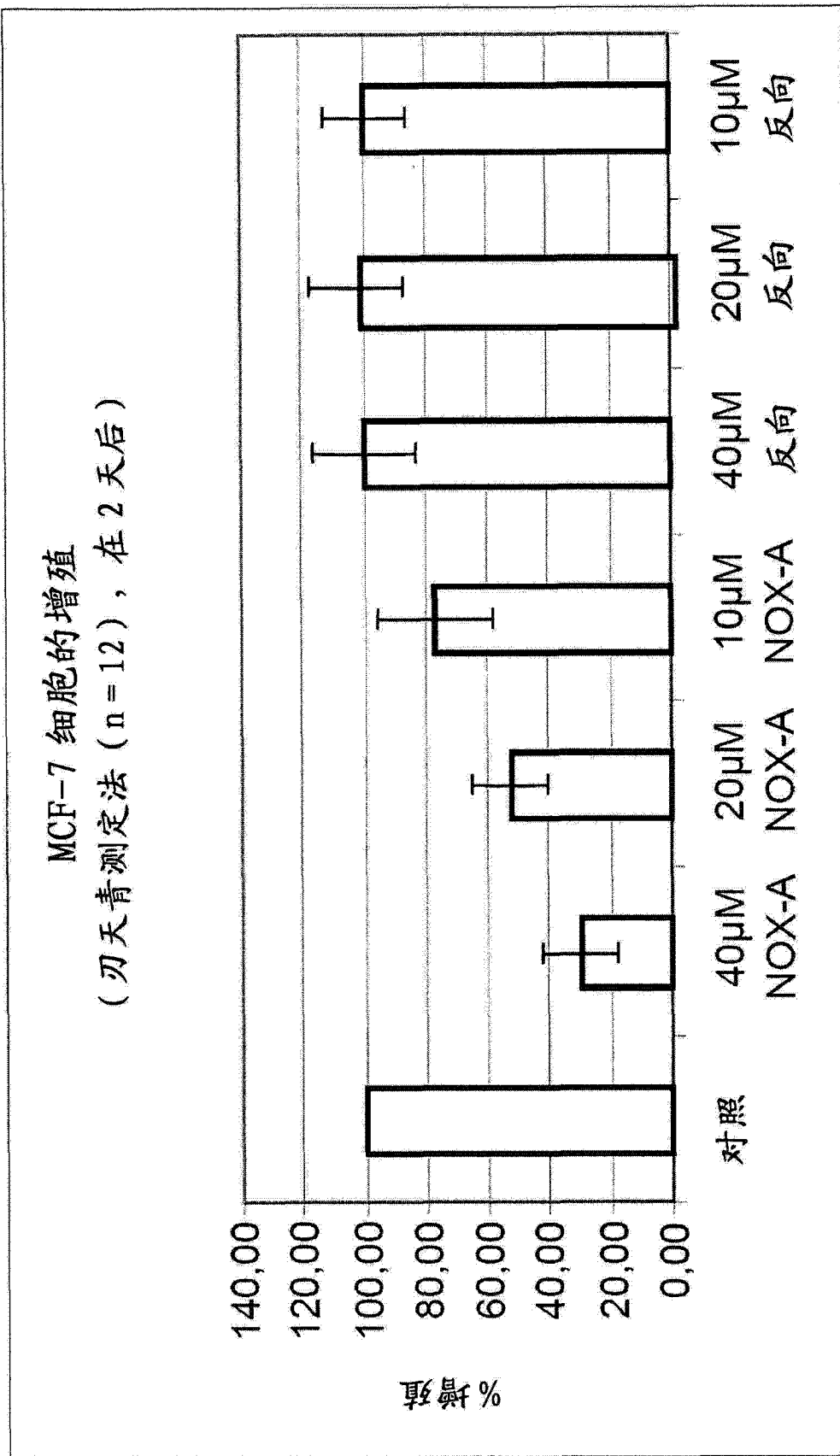


图 14

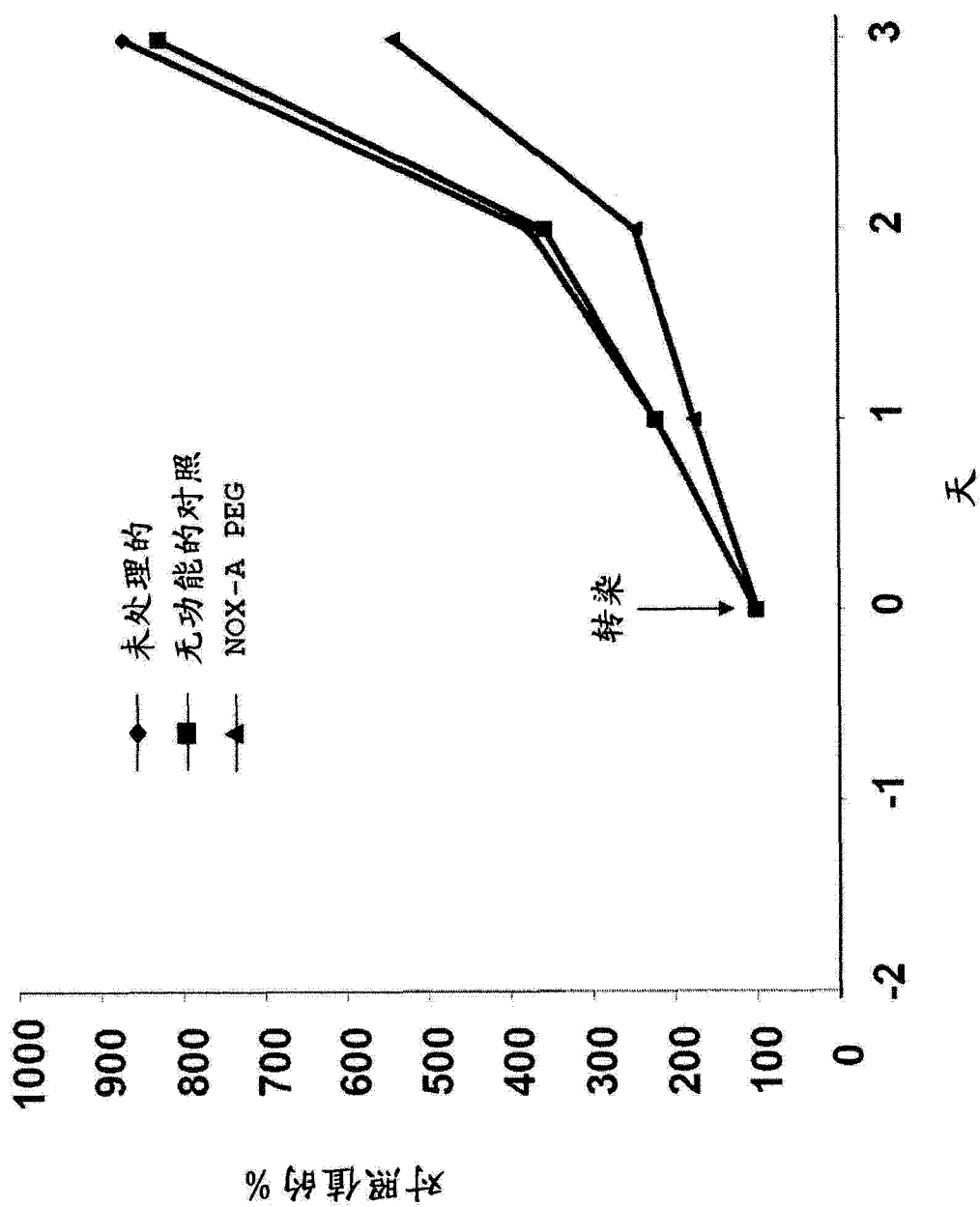


图 15

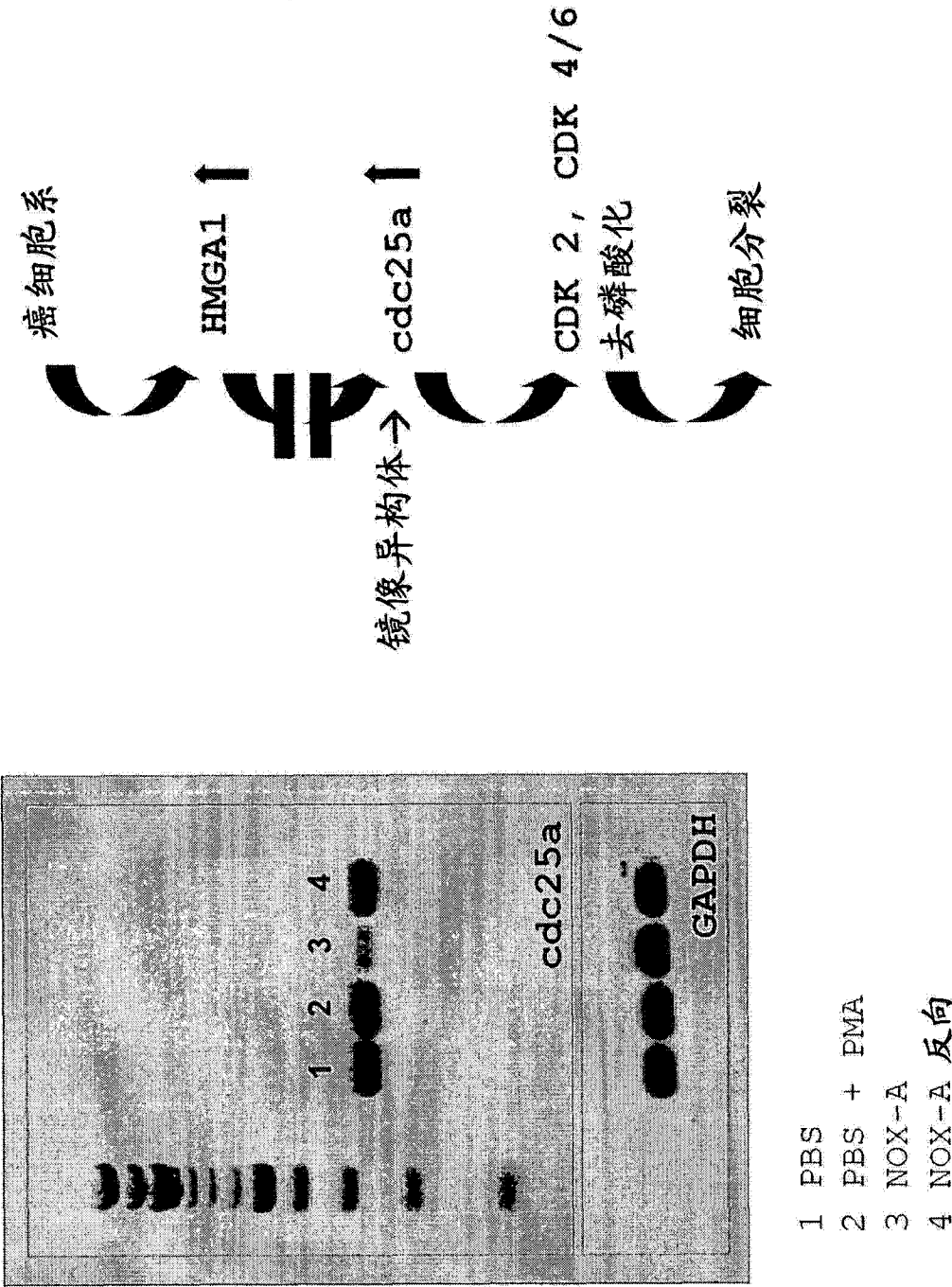
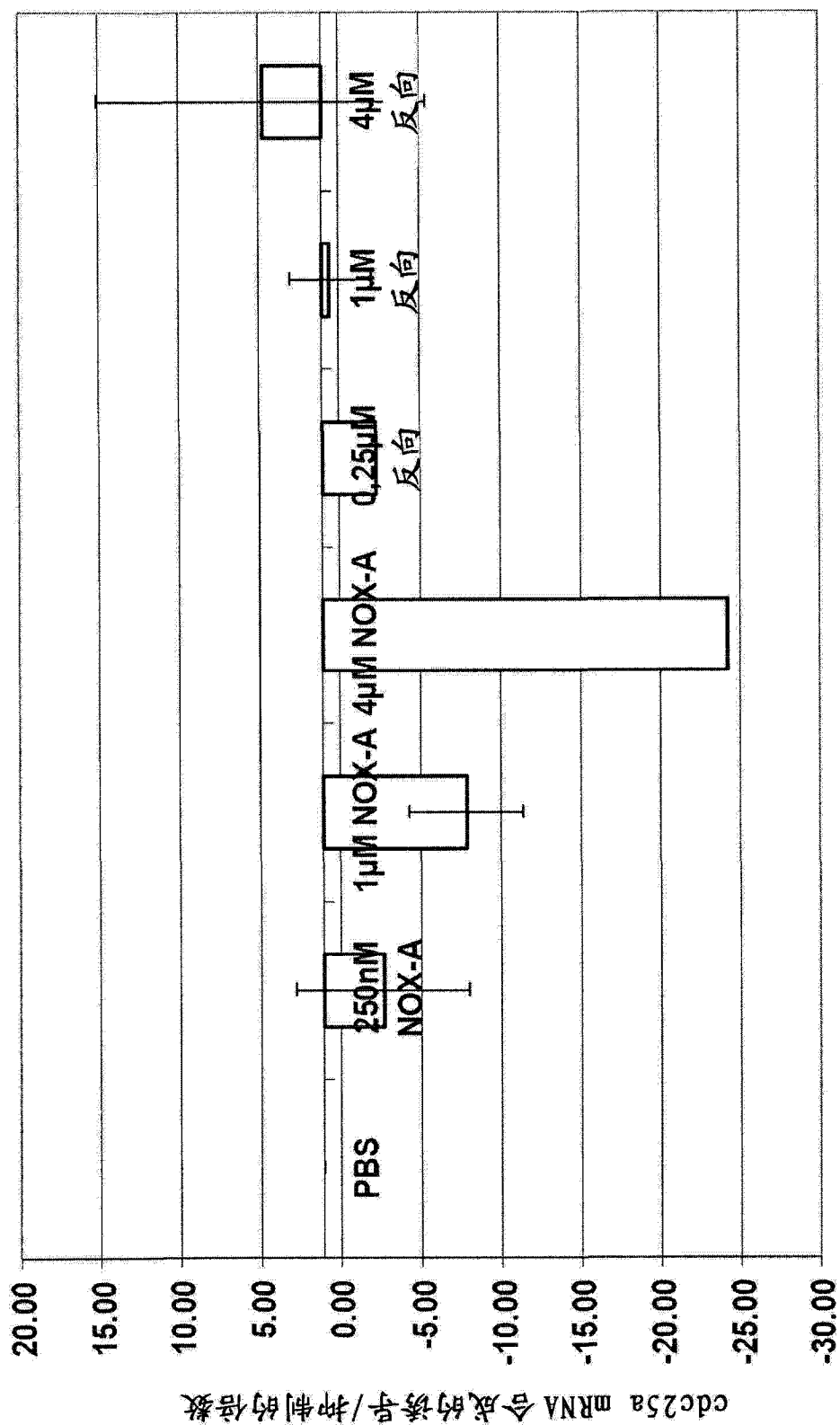


图 16



细胞系: H1299, 在 PEI-辅助的转染之后 2 天 (N/P = 2.5; n = 5)

图 17

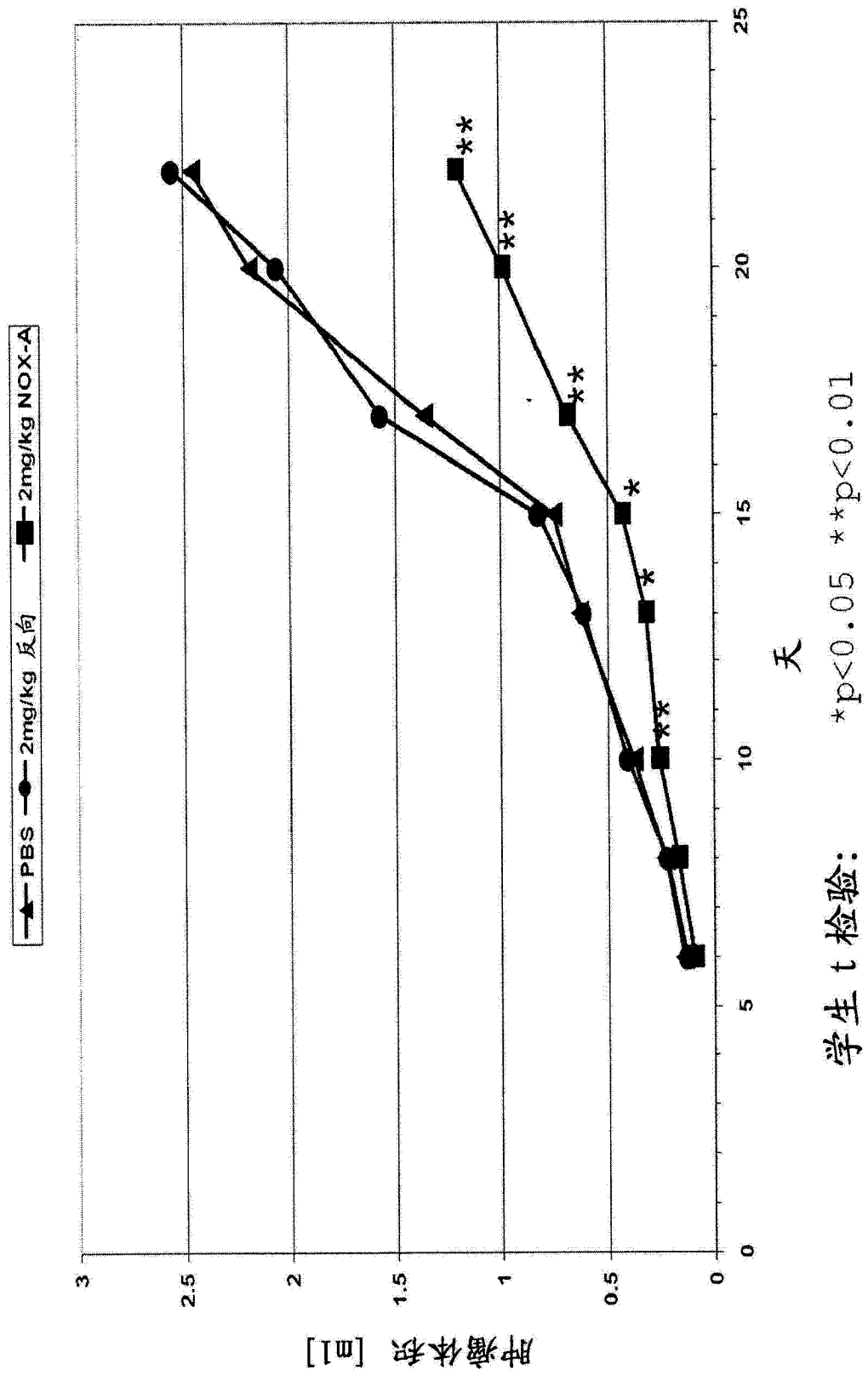


图 18

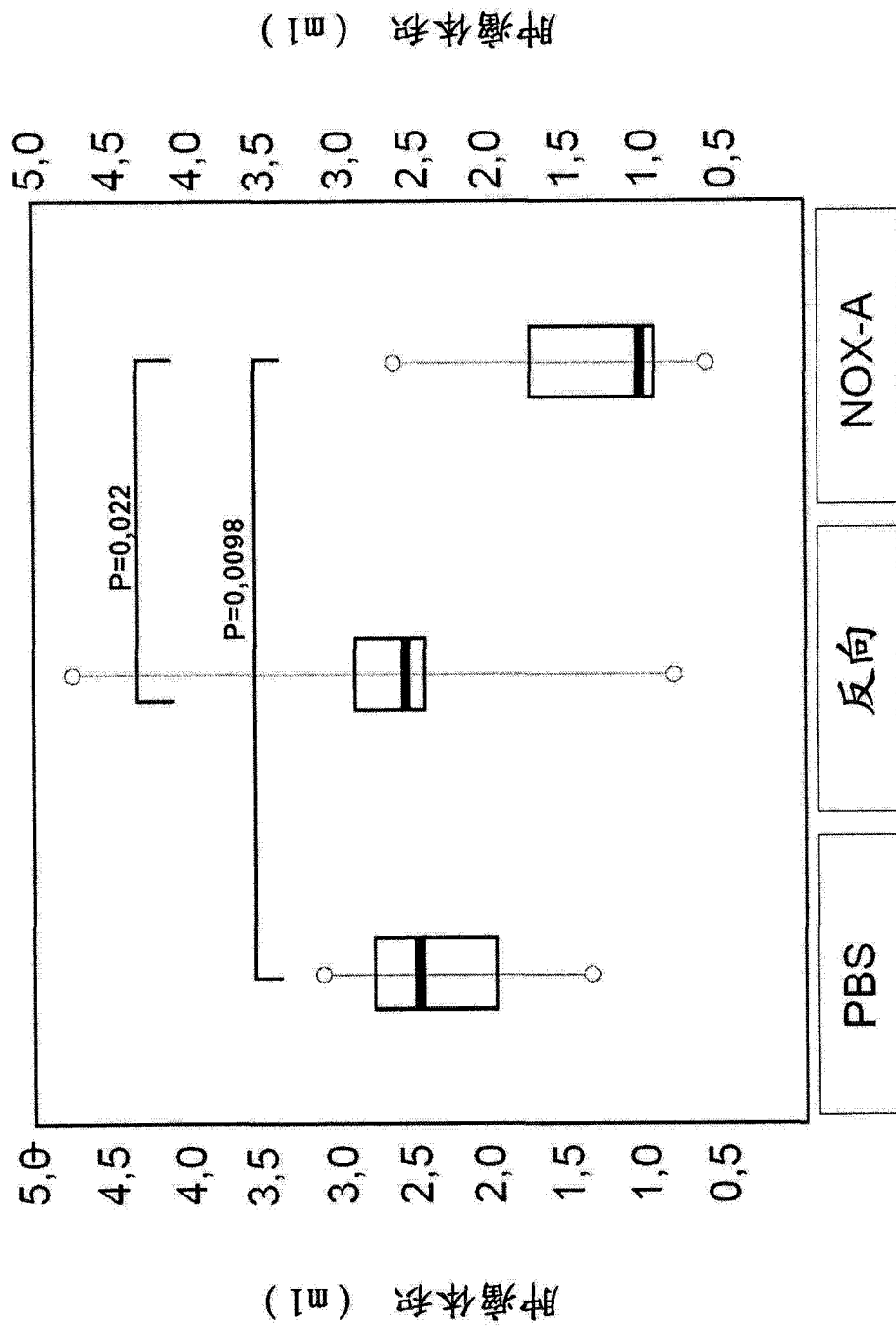


图 19

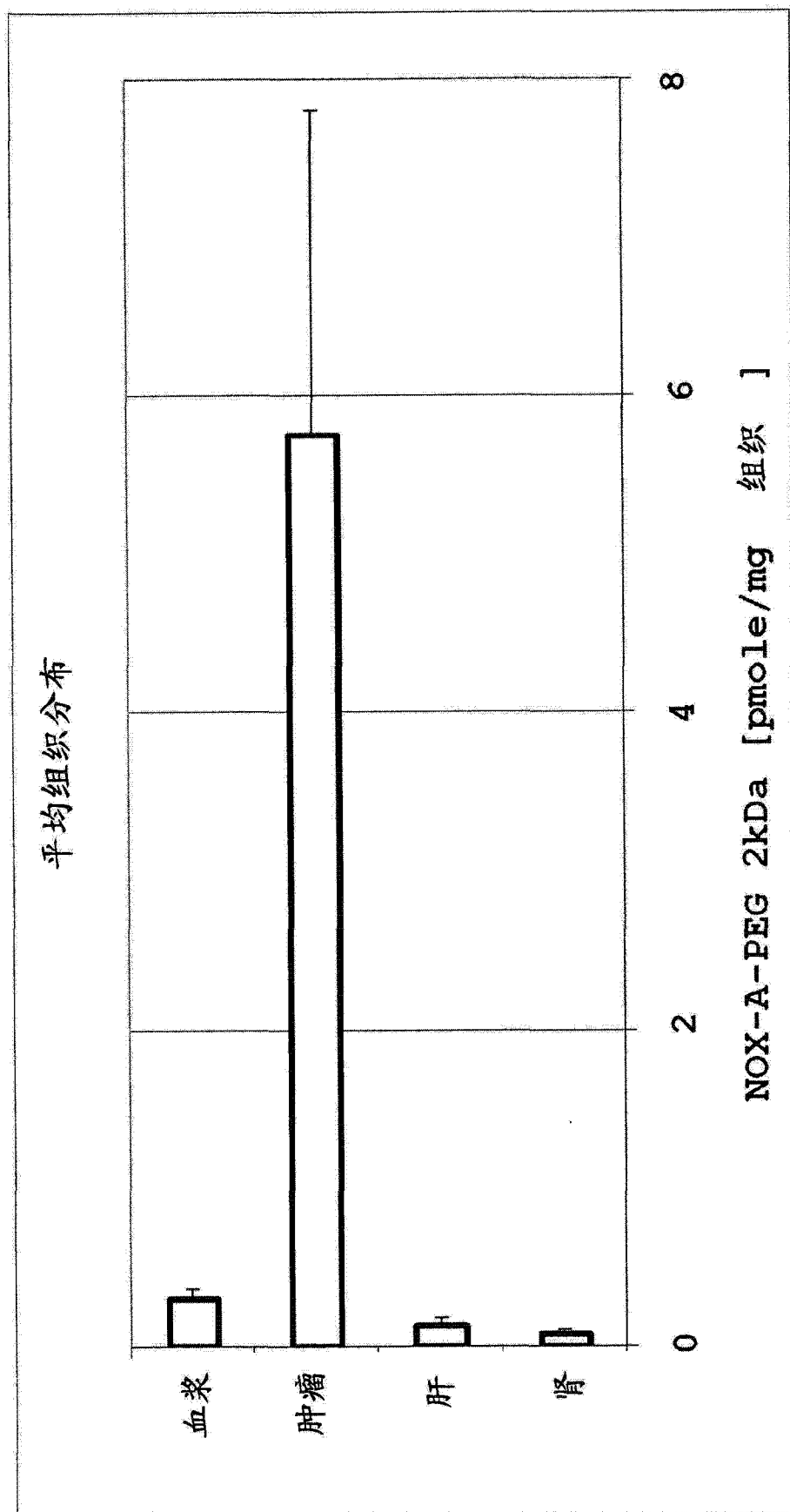


图 20

在最后一次注射后 24 和 96 小时，包装的和未包装的镜像异构体的组织分布

	在最后一次注射后 24 小时		在最后一次注射后 96 小时	
	镜像异构体 [pmol/mg 组织]	镜像异构体微团 [pmol/mg 组织]	镜像异构体 [pmol/mg 组织]	镜像异构体微团 [pmol/mg 组织]
血浆	2,950 ± 0,438	1,930 ± 2,729	0,150 ± 0,212	0,830 ± 0,778
脑	0,000 ± 0,000	0,030 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
心	0,055 ± 0,078	0,050 ± 0,000	0,040 ± 0,057	0,040 ± 0,057
肺	0,010 ± 0,014	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
肝	0,310 ± 0,014	0,025 ± 0,035	0,070 ± 0,042	0,070 ± 0,000
肾	0,595 ± 0,092	0,310 ± 0,212	0,105 ± 0,035	0,160 ± 0,085
胆囊	0,120 ± 0,057	0,070 ± 0,099	0,000 ± 0,000	0,560 ± 0,792
胰腺	0,070 ± 0,057	0,040 ± 0,000	0,000 ± 0,000	2,700 ± 2,531
肿瘤	0,840 ± 0,255	24,925 ± 13,301	0,120 ± 0,057	11,325 ± 7,050

图 21

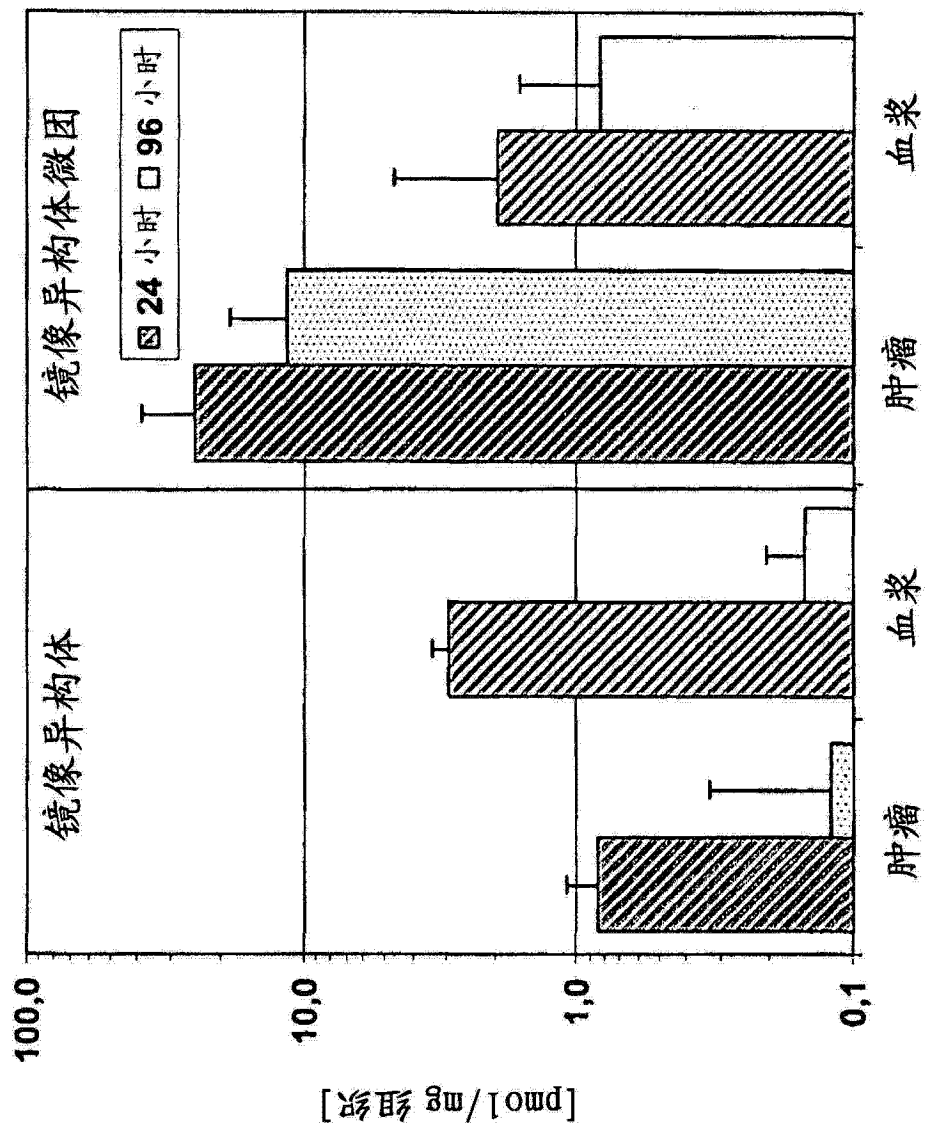


图 22