



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 109439664 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 08

(21) 申请号 201811220016.8	A61K 31/7088 (2006.01)
(22) 申请日 2014.03.12	A61P 29/00 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61P 35/00 (2006.01)
申请公布号 CN 109439664 A	A61P 31/00 (2006.01)
	A61P 37/02 (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.03.08	(56) 对比文件
(30) 优先权数据	US 2010055695 A1,2010.03.04
61/782,938 2013.03.14 US	CN 102858990 A,2013.01.02
61/789,244 2013.03.15 US	WO 2013021284 A2,2013.02.14
(62) 分案原申请数据	D J King ,et al.“Novel combinatorial
201480014093.1 2014.03.12	selection of phosphorothioate
(73) 专利权人 私募蛋白质体操作有限公司	oligonucleotide aptamers”.《Biochemistry》
地址 美国科罗拉多州	.1998,第37卷(第47期),
专利权人 大塚制药株式会社	Meehyein Kim, et al..“In vitro
(72) 发明人 沙希·古普塔 广田雅生	selection of DNA aptamers binding to the
丹尼尔·J·施奈德 铃木智树	recombinant human interleukin-6”.
塞尔·C·贾维斯 石川优一	《Molecules and Cells》.1995,第5卷(第6期),
村上育郎 埃米·热利纳	Meehyein Kim, et al..“In vitro
希拉·沃 内博伊沙·亚尼奇	selection of DNA aptamers binding to the
(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任	recombinant human interleukin-6”.
公司 11021	《Molecules and Cells》.1995,第5卷(第6期),
专利代理师 张莹	审查员 于地美
(51) Int.Cl.	权利要求书1页 说明书66页
C12N 15/115 (2010.01)	序列表(电子公布) 附图22页

(54) 发明名称

结合IL-6的适体及其在治疗或诊断IL-6介导的疾患中的用途

(57) 摘要

提供了结合IL-6的适体。提供了包含IL-6适体的药物组合物,以及还提供了使用所述适体治疗疾患的方法。

1. IL-6适体,其选自SEQ ID NO:7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:19至22、SEQ ID NO:26至39、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102至239或SEQ ID NO:400至446的核苷酸序列。

2. 权利要求1的IL-6适体,其中所述IL-6适体包含至少2至6个经修饰的嘧啶。

3. 权利要求1至2中任一项的IL-6适体,其中所述IL-6适体抑制选自以下的至少一种活性:IL-6对IL-6受体的结合、STAT3磷酸化和STAT介导的转录。

4. 药物组合物,所述药物组合物包含至少一种权利要求1至3中任一项的IL-6适体或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

5. 权利要求4的药物组合物在制备用于通过抑制IL-6而治疗选自炎性疾病、恶性疾病、感染和自身免疫性疾病的疾病或病症的药物或试剂盒中的用途,其中所述疾病或病症选自由多发性骨髓瘤,白血病,类风湿性关节炎,神经胶质瘤,肝癌和前列腺癌组成的组。

结合IL-6的适体及其在治疗或诊断IL-6介导的疾患中的用途

[0001] 本申请是国际申请号PCT/US2014/024669,国际申请日2014年3月12日,进入中国国家阶段申请号201480014093.1,发明名称为“结合IL-6的适体及其在治疗或诊断IL-6介导的疾患中的用途”的分案申请。

[0002] 领域

[0003] 本公开内容一般涉及核酸领域,更具体地涉及能够结合白细胞介素-6(IL-6)的适体。在一些实施方案中,此类适体作为治疗剂用于预防、治疗和/或改善炎症性疾病、恶性疾病、感染、自身免疫性疾病和其中已牵涉IL-6的其它疾病或疾患。在一些实施方案中,此类适体用于诊断IL-6相关疾病或疾患。

[0004] 背景

[0005] 以下描述提供信息的概述,并且不是承认任何本文中提供的信息或参考的出版物是本公开内容的现有技术。

[0006] 白细胞介素6(IL-6)属于细胞因子家族,其特征长链四螺旋束结构。该家族的其它成员包括IL-11、IL-17、IL-27、制瘤素-M(OSM)、睫状神经营养因子(CNTF)、白血病抑制因子(LIF)、心肌营养素-1(CT-1)和心肌营养素样细胞因子(CLC)。IL-6由B细胞、T细胞、单核细胞、成纤维细胞和其他细胞类型产生,并具有促炎或抗炎性质。它在广泛的生物活性(包括正常细胞的炎症过程、宿主免疫防御机制和细胞生长的调节)中起着多效性作用。其还参与各种恶性肿瘤细胞的增殖和分化(Guo,Y.,等人,Cancer Treatment Reviews, 2012.38:904-910)。在某些急性炎症情况下,其浓度可从pg/ml急剧地增加至μg/ml(Waage, [0007] A.,等人,Clinical Immu and Immunopath,1989.50:394-398)。

[0008] IL-6通过结合到存在于细胞膜上的非信号转导IL-6受体来激活细胞。该配体-受体复合物随后结合到信号转导蛋白gp130,并激活janus酪氨酸激酶(JAK),从而激活下游信号转导及转录激活蛋白3(STAT3)信号转导途径(Heinrich,P.C.,等人,Biochem J., 1998.334:297-314)。IL-6还激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径(Heinrich,P.C.,等人,Biochem J.,2003.374:1-20)。IL-6R仅在少数细胞类型(包括肝细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞/巨噬细胞和一些淋巴细胞)中表达为膜结合蛋白,然而gp130在所有细胞类型中广泛表达,并且用作IL-6细胞因子家族的其它成员的信号转导蛋白。经由膜结合IL-6R的IL-6信号转导在文献中被称为经典信号转导途径。除了膜结合IL-6R以外,IL-6R的可溶性形式(sIL-6R)以高浓度存在于血液和其它体液中(Honda 1992,Novick 1989),具有相似的对IL-6的亲合力。在与IL-6相互作用后,sIL-6R不充当拮抗剂,相反地,其增加IL-6的循环半衰期,并且同时激活在其中IL-6R不表达但gp130表达的细胞中的信号转导途径。该被IL-6:sIL-6R激活的信号转导途径被称为反式信号转导机制。gp130的普遍表达表明IL-6反式信号转导途径可激活身体中的所有或大部分细胞类型。细胞gp130的可溶性形式用作IL-6信号转导途径的拮抗剂。

[0009] 临床前研究已显示细胞因子在各种炎症性疾病中的作用,从而这些细胞因子已成为主要治疗靶标。市场上存在几种被广泛用于减轻炎症的抗-TNF-α剂。由于这些剂并非对所有患者有效,因此需要就其在炎症过程中的治疗作用研究其它细胞因子诸如IL-6。抗-IL-

6R抗体托珠单抗目前用于治疗类风湿关节炎。

[0010] 适体是以高亲和力和特异性结合它们的靶标的寡核苷酸。可使用SELEX(指数富集的配体系统进化)法选择适体。慢解离速率的经修饰的配体(SOMAmers)选自含有在天然DNA中不存在的官能团的随机文库(Gold等人,2010,PLoS ONE 5(12):e15004)。在某些情况下,这些新型的碱基修饰可介导适体与靶标之间的疏水相互作用,导致结合亲和力的显著增强。

[0011] 概述

[0012] 本公开内容提供结合白细胞介素-6(IL-6)的适体和包含结合IL-6的适体的组合物。公开的适体作为治疗剂用于预防、治疗和/或改善炎性疾病、恶性疾病、感染、自身免疫性疾病和/或其中牵涉IL-6的其它疾病或疾患。本公开内容还提供包含IL-6适体或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物或制剂。此类组合物可以制成任何适当的药学上可接受的剂型。

[0013] 提供了用于预防、治疗和/或改善由IL-6介导的疾病或疾患的方法和药物组合物或制剂。在一些实施方案中,方法包括向受试者诸如哺乳动物施用IL-6适体或包含IL-6适体的药物组合物或制剂。在一些实施方案中,受试者是人。

[0014] 在一些实施方案中,提供了用于预防、治疗和/或改善炎性疾病、恶性疾病、感染、自身免疫性疾病和/或其中牵涉IL-6的其它疾病或疾患的方法和药物组合物或制剂。可用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性炎性疾病包括类风湿关节炎、幼年特发性关节炎、全身发作幼年特发性关节炎、骨关节炎、败血症、哮喘、间质性肺疾病、炎性肠疾病、系统性硬化症、眼内炎症、格雷夫斯病、子宫内膜异位、系统性硬化症、成人斯蒂尔病、淀粉样蛋白A淀粉样变性、风湿性多肌痛、缓解型血清阴性对称性滑膜炎伴凹陷性水肿、白塞氏病、葡萄膜炎、移植物抗宿主病和TNFR(肿瘤坏死因子受体)-相关周期性综合征。可用本文中描述的IL-6适体治疗的恶性疾病包括癌症和癌症相关疾患。非限制性示例性癌症包括多发性骨髓瘤、白血病、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、恶病质、黑素瘤、子宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、胃肠道癌、肺癌、前列腺癌、肾细胞癌、转移性肾癌、实体瘤、非小细胞肺癌、非何杰金氏淋巴瘤、膀胱癌、口腔癌、骨髓增生性肿瘤、B细胞淋巴增生性疾病和浆细胞白血病。非限制性示例性癌症相关疾患包括非小细胞肺癌相关疲劳和癌症相关厌食症。可利用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性感染包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类T淋巴细胞病毒(HTLV)、脑型疟疾、泌尿道感染和脑膜炎球菌感染。可利用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性自身免疫性疾病包括系统性红斑狼疮、系统性硬化症、多肌炎、包括巨细胞性动脉炎、高安动脉炎在内的血管炎综合症、冷球蛋白血症、髓过氧化物酶抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关新月体性肾小球肾炎、类风湿血管炎、克罗恩病、复发性多软骨炎、获得性血友病A和自身免疫性溶血性贫血。可利用本文中描述的IL-6适体治疗的其它疾病包括,但不限于卡斯尔曼病(Castleman's disease)、强直性脊椎炎、冠心病、类风湿关节炎的心血管疾病、肺动脉高压、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、特应性皮炎、银屑病、坐骨神经痛、II型糖尿病、肥胖症、巨细胞动脉炎、急性移植物抗宿主病(GVHD)、非ST段抬高型心肌梗死、抗-嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关性血管炎、视神经脊髓炎、慢性肾小球肾炎和高安动脉炎。

[0015] 在一些实施方案中,提供了包括向受试者施用IL-6适体的治疗类风湿关节炎的方法。在一些实施方案中,提供了包括向受试者施用IL-6适体的治疗多发性骨髓瘤的方法。

[0016] 在一些实施方案中,本文中公开的适体具有从生物标志物的发现和诊断(Ostroff,R.M.,等人,PLoS One,2010.5(12):p.e15003;Mehan,M.,等人,PLoS One,2012.出版中)至组织化学和成像(Gupta,S.,等人,Appl Immunohistochem Mol Morphol,2011.19(3):第273-8页)的潜在应用。

[0017] 在一些实施方案中,治疗效果(例如,治疗、预防和/或改善炎性疾病、恶性疾病、感染、自身免疫性疾病和其中已牵涉IL-6的其它疾病或疾患)可通过施用至少一种IL-6适体(以便所述适体暴露于并可结合到IL-6)来实现。在一些实施方案中,无论向待治疗的受试者递送适体的方法如何,此类结合都会发生。在一些实施方案中,所述治疗效果可通过施用至少一种IL-6适体以使其暴露于并结合到IL-6并且阻止或减少IL-6对一种或多种细胞受体的结合来实现。

[0018] 在一些实施方案中,IL-6适体对IL-6的结合干扰IL-6对IL-6受体的结合。在一些实施方案中,IL-6适体减少沿着IL-6受体的信号转导途径的信号转导。在一些此类实施方案中,IL-6适体抑制JAK激酶的激活,和/或抑制STAT3和/或SHP2的磷酸化。

[0019] 在一些实施方案中,将IL-6适体与一种或多种另外的活性剂一起施用。此类施用可为连续的或组合的。非限制性示例性的另外的活性剂包括TNF- α 抑制剂、IL-1抑制剂、IL-23抑制剂、IFN- γ 抑制剂、IL-17抑制剂、IL-22抑制剂、IL-4/IL-13抑制剂、IL-13抑制剂、IL-5抑制剂和JAK抑制剂。非限制性示例性TNF- α 抑制剂包括英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、依那西普、赛妥珠单抗、AN0128(Anacor)、ART621(Arena Therapeutics)和抗-TNF- α 纳米抗体(诸如ATN-103、Pfizer)。非限制性示例性IL-1抑制剂包括阿那白滞素、卡那奴单抗、XOMA052(Xoma)和利纳西普。非限制性示例性IL-23抑制剂包括优特克单抗(uztekinumab)、布雷奴单抗(briakinumab)、阿吡莫德。非限制性示例性IFN- γ 抑制剂是AMG811(Amgen)。非限制性示例性IL-17抑制剂包括AIN457(Novartis)、伊克塞珠单抗(ixekizumab)、AMG827(Amgen)和Rg4934(Roche)。非限制性示例性IL-22抑制剂是非扎奴单抗。非限制性示例性IL-4/IL-13抑制剂包括AMG317(Amgen)、匹曲白滞素、Nuvance和AIR645(Altair)。非限制性示例性IL-13抑制剂包括安芦珠单抗、来金珠单抗、CAT-354(MedImmune)和IMA-026(Wyeth)。非限制性示例性IL-5抑制剂是美泊利单抗。非限制性示例性JAK抑制剂包括托法替尼(tofacitib)和鲁索利替尼。

[0020] 在一些实施方案中,提供了包括将IL-6适体与疑似包含IL-6的样品接触的体外或体内诊断方法。在一些实施方案中,提供了包括向疑似患有IL-6介导的疾病或病症的个体施用适当标记的IL-6适体的体内诊断法,其中出于诊断或评价个体的健康状态的目的检测所述标记的适体。可按照待使用的成像模式选择所用的标记。在一些实施方案中,提供了包含IL-6适体的诊断试剂盒或装置。

[0021] 在一些实施方案中,提供了特异性结合IL-6的适体。在一些实施方案中,适体特异性结合包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的IL-6。在一些实施方案中,适体特异性结合由SEQ ID NO:10的氨基酸16-31定义的IL-6的区域。在一些实施方案中,适体特异性结合包含SEQ ID NO:10的氨基酸16至31和氨基酸117至125的IL-6的表位。

[0022] 在一些实施方案中,提供了与SEQ ID NO:101的适体竞争对IL-6的结合的适体。在一些实施方案中,提供了与SEQ ID NO:400的适体竞争对IL-6的结合的适体。

[0023] 在本文描述的任何实施方案中,适体可包含至少一个经修饰的嘧啶。

[0024] 在一些实施方案中,适体包含G四分体基序。在一些实施方案中,G四分体基序包含选自以下的结构:

5'-GG-ZZZ-GG-Q_a-GG-Q_b-GG-3' (III) (SEQ ID NO: 702);

[0025] 5'-GG-Q_a-GG-ZZZ-GG-Q_b-GG-3' (IV) (SEQ ID NO: 703); 和

5'-GG-Q_a-GG-Q_b-GG-ZZZ-GG-3' (V) (SEQ ID NO: 704)。

[0026] 在一些实施方案中,每一个Z独立地选自U、T和经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自接头、经修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸。在一些实施方案中,a为1至50、1至40、1至30、1至20、1至15、1至10或1至5。在一些实施方案中,b为1至50、1至40、1至30、1至20、1至15、1至10或1至5。在一些实施方案中,所述适体包含序列:

[0027] 5'-GGCAGGZZZGGZQ_aGZGG-3' (I) (SEQ ID NO: 700)。

[0028] 在一些实施方案中,每一个Z独立地选自U、T和经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自接头、经修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸。在一些实施方案中,a为1至50、1至40、1至30、1至20、1至15、1至10或1至5。

[0029] 在一些实施方案中,提供了特异性结合IL-6的适体,其中所述适体包含选自以下的序列:

5'-YXAXGYARQ_aMGYAAGSCGRY-3' (VI) (SEQ ID NO: 705); 和

[0030]

5'-MGYAAGSCGRYQ_bYXAXGYAR-3' (VII) (SEQ ID NO: 706)。

[0031] 在一些实施方案中,每一个Y独立地选自经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个X独立地选自经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,M选自C和A并且S选自C和G,并且每一个R独立地选自G和A。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自接头、经修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸。在一些实施方案中,a为1至30、1至20、1至15、1至10或1至5。在一些实施方案中,b为1至30、1至20、1至15、1至10或1至5。

[0032] 在例如SEQ ID NO:700和SEQ ID NO:702至SEQ ID NO:706的一些实施方案中,每一个Q独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、亚烷基二醇和聚亚烷基二醇。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、1,3-丙二醇、具有2至100个1,3-丙二醇单元的聚(1,3-丙二醇)、乙二醇和具有2至100个乙二醇单元的聚乙二醇。在一些实施方案中,每一个被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头是被取代的或未被取代的C₂-C₈接头、被取代的或未被取代的C₂-C₆接头、被取代的或未被取代的C₂-C₅接头、被取代的或未被取代的C₂-C₄接头或被取代的或未被取代的C₃接头。

[0033] 在一些实施方案中,提供了特异性结合IL-6的适体,其中所述适体包含如下序列:

[0034] 5'-GGGYXAXGYAGCL_bGZGCGYAAGGCGGY-3' (II) (SEQ ID NO: 701)。

[0035] 在一些实施方案中,Z选自U、T和经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个Y独立地选自经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个X独立地选自经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个L独立地选自接头、经修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸。在一些实施方案中,b是1至20、1至15、1至10或1至5。

[0036] 在例如SEQ ID NO:701的一些实施方案中,每一个L独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、亚烷基二醇和聚亚烷基二醇。在一些实施方案中,每一个L独立地选自被取

代的或未被取代的 C_2-C_{20} 接头、1,3-丙二醇、具有2至100个1,3-丙二醇单元的聚(1,3-丙二醇)、乙二醇和具有2至100个乙二醇单元的聚乙二醇。在一些实施方案中,每一个被取代的或未被取代的 C_2-C_{20} 接头是被取代的或未被取代的 C_2-C_8 接头、被取代的或未被取代的 C_2-C_6 接头、被取代的或未被取代的 C_2-C_5 接头、被取代的或未被取代的 C_2-C_4 接头或被取代的或未被取代的 C_3 接头。

[0037] 在本文中描述的任何实施方案中,每一个X可独立地选自经芳族修饰的嘧啶。在本文中描述的任何实施方案中,每一个X可独立地选自图20和图24中显示的经芳族修饰的嘧啶。在本文中描述的任何实施方案中,每一个X可独立地选自图24中的Nap、2Nap、NE、BF和BT。

[0038] 在本文中描述的任何实施方案中,每一个Y可独立地选自图20和图24中显示的经修饰的嘧啶。在本文中描述的任何实施方案中,每一Y可独立地选自图24中显示的经修饰的嘧啶。

[0039] 在本文中描述的任何实施方案中,每一个Z可独立地选自U、T和图20和图24中显示的经修饰的嘧啶。在本文中描述的任何实施方案中,每一个Z可独立地选自U、T和图24中显示的经修饰的嘧啶。

[0040] 在本文中描述的任何实施方案中,每一个经修饰的嘧啶可独立地选自:

- [0041] 5-(N-苄基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(BndU),
- [0042] 5-(N-苄基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0043] 5-(N-苄基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0044] 5-(N-苄乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(PEdU),
- [0045] 5-(N-苄硫基甲基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(ThdU),
- [0046] 5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(iBudU),
- [0047] 5-(N-酪氨酸羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(TyrdU),
- [0048] 5-(N-3,4-亚甲基二氧基苄基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(MBndU),
- [0049] 5-(N-4-氟苄基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(FBndU),
- [0050] 5-(N-3-苄基丙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(PPdU),
- [0051] 5-(N-咪唑基乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(ImdU),
- [0052] 5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0053] 5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0054] 5-(N-色氨酸羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(TrpdU),
- [0055] 5-(N-R-苏氨酸羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(Thrdu),
- [0056] 5-(N-色氨酸羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0057] 5-(N-色氨酸羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0058] 氯化5-(N-[1-(3-三甲基铵)丙基]羧酰胺)-2'-脱氧尿苷,
- [0059] 5-(N-萘基甲基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(NapdU),
- [0060] 5-(N-萘基甲基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0061] 5-(N-萘基甲基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0062] 5-(N-[1-(2,3-二羟基丙基)]羧酰胺)-2'-脱氧尿苷),
- [0063] 5-(N-2-萘基甲基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(2NapdU),

- [0064] 5-(N-2-萘基甲基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0065] 5-(N-2-萘基甲基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0066] 5-(N-1-萘基乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (NEdU),
- [0067] 5-(N-1-萘基乙基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0068] 5-(N-1-萘基乙基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0069] 5-(N-2-萘基乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (2NEdU),
- [0070] 5-(N-2-萘基乙基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0071] 5-(N-2-萘基乙基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0072] 5-(N-3-苯并呋喃基乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (BFdU),
- [0073] 5-(N-3-苯并呋喃基乙基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0074] 5-(N-3-苯并呋喃基乙基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0075] 5-(N-3-苯并噻吩基乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (BTdU),
- [0076] 5-(N-3-苯并噻吩基乙基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,和
- [0077] 5-(N-3-苯并噻吩基乙基羧酰胺)-2'-氟尿苷。
- [0078] 在本文中描述的任何实施方案中,每一个X可独立地选自:
- [0079] 5-(N-1-萘基甲基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (NapdU),
- [0080] 5-(N-1-萘基甲基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0081] 5-(N-1-萘基甲基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0082] 5-(N-2-萘基甲基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (2NapdU),
- [0083] 5-(N-2-萘基甲基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0084] 5-(N-2-萘基甲基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0085] 5-(N-1-萘基乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (NEdU),
- [0086] 5-(N-1-萘基乙基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0087] 5-(N-1-萘基乙基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0088] 5-(N-2-萘基乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (2NEdU),
- [0089] 5-(N-2-萘基乙基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0090] 5-(N-2-萘基乙基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0091] 5-(N-3-苯并呋喃基乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (BFdU),
- [0092] 5-(N-3-苯并呋喃基乙基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,
- [0093] 5-(N-3-苯并呋喃基乙基羧酰胺)-2'-氟尿苷,
- [0094] 5-(N-3-苯并噻吩基乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷 (BTdU),
- [0095] 5-(N-3-苯并噻吩基乙基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷,和
- [0096] 5-(N-3-苯并噻吩基乙基羧酰胺)-2'-氟尿苷。
- [0097] 在一些实施方案中,提供了包含选自以下序列的适体:(a)选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625的核苷酸序列;或(b)选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625的核苷酸序列,其中1至20个核苷酸被取代、删除或插入;其中适体以低于20nM的亲合力(K_d)特异性结合IL-6;或(c)与选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625的核苷酸序列具有至少80%或更高同一性的核

苷酸序列;其中适体以低于10nM的亲合力(K_d)特异性结合IL-6。在一些实施方案中,适体具有低于10nM的IL-6拮抗剂活性(IC_{50})。

[0098] 在本文中描述的任何实施方案中,适体可包含至少2至6个经修饰的嘧啶和/或2'-OMe。在本文中描述的任何实施方案中,适体可包含至少一个或至少2至5个硫代磷酸酯键联。

[0099] 在一些实施方案中,适体以低于20nM的亲合力(K_d)结合IL-6。在一些实施方案中,适体抑制选自以下的至少一种活性:IL-6对IL-6受体的结合、STAT3磷酸化和STAT介导的转录。

[0100] 在一些实施方案中,提供了包含本文中描述的任何适体或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,所述药物组合物用于治疗由IL-6介导的疾病或疾患。

[0101] 在一些实施方案中,提供了治疗由IL-6介导的疾病或疾患的方法。在一些实施方案中,方法包括施用本文中描述的适体。在一些实施方案中,方法包括施用包含本文中描述的任何适体或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0102] 在一些实施方案中,由IL-6介导的疾病或疾患选自炎性疾病、恶性疾病、感染和自身免疫性疾病。

[0103] 在一些实施方案中,由IL-6介导的疾病或疾患选自卡斯尔曼病、强直性脊椎炎、冠心病、类风湿关节炎的心血管疾病、肺动脉高压、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、特应性皮炎、银屑病、坐骨神经痛、II型糖尿病、肥胖症、巨细胞动脉炎、急性移植物抗宿主病(GVHD)、非ST段抬高型心肌梗死、抗-嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关性血管炎、视神经脊髓炎、慢性肾小球肾炎和高安动脉炎。

[0104] 在一些实施方案中,由IL-6介导的疾病或疾患是选自以下的炎性疾病:类风湿关节炎、幼年特发性关节炎、全身发作幼年特发性关节炎、骨关节炎、败血症、哮喘、间质性肺疾病、炎性肠疾病、系统性硬化症、眼内炎症、格雷夫斯病、子宫内膜异位、系统性硬化症、成人斯蒂尔病、淀粉样蛋白A淀粉样变性、风湿性多肌痛、缓解型血清阴性对称性滑膜炎伴凹陷性水肿、白塞氏病、葡萄膜炎、移植物抗宿主病和TNFR-相关周期性综合征。

[0105] 在一些实施方案中,由IL-6介导的疾病或疾患是选自癌症和癌症相关疾患的恶性疾病。在一些实施方案中,恶性疾病是选自以下的癌症:多发性骨髓瘤、白血病、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、恶病质、黑素瘤、子宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、胃肠道癌、肺癌、前列腺癌、肾细胞癌、转移性肾癌、实体瘤、神经胶质瘤、肝癌、非小细胞肺癌、非何杰金氏淋巴瘤、膀胱癌、口腔癌、骨髓增生性肿瘤、B细胞淋巴增生性疾病和浆细胞白血病。在一些实施方案中,恶性疾病是选自非小细胞肺癌相关疲劳和癌症相关厌食症的癌症相关疾患。

[0106] 在一些实施方案中,由IL-6介导的疾病或疾患是选自人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类T淋巴细胞病毒(HTLV)、脑型疟疾、泌尿道感染和脑膜炎球菌感染的感染。

[0107] 在一些实施方案中,由IL-6介导的疾病或疾患是选自以下的自身免疫性疾病:系统性红斑狼疮、系统性硬化症、多肌炎、包括巨细胞性动脉炎、高安动脉炎在内的血管炎综合征、冷球蛋白血症、髓过氧化物酶抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关新月体性肾小球肾炎、类风湿血管炎、克罗恩病、复发性多软骨炎、获得性血友病A和自身免疫性溶血性贫血。

[0108] 在一些实施方案中,本公开内容提供以2.4 Å和2.55 Å的分辨率解析的结合到

IL-6的适体的两种共晶结构。

[0109] 在一些实施方案中,本公开内容提供特异性结合IL-6的适体,其中所述适体以低于或等于每 $100 \text{ \AA}^2$ 的界面面积1个极性接点结合到IL-6,其中所述极性接点由一个或多个氢键和一个或多个电荷间相互作用组成,并且界面面积为被适体占据的蛋白质表面的分数。作为非限制性实例,适体2573-20_136(SEQ ID NO:101)以0.0072的极性接点对界面面积的比率结合IL-6。因此,在一些实施方案中,本公开内容提供了以低于0.01、低于0.009、低于0.008或约0.007的极性接点对界面面积的比率结合IL-6的适体。

[0110] 附图概述

[0111] 图1显示结合IL-6的适体对TF-1细胞增殖的抑制,如实施例2中所描述。

[0112] 图2显示IL-6适体对STAT驱动的荧光素酶表达的抑制,如实施例2中所描述。

[0113] 图3显示某些dU修饰和主链修饰,如实施例5中所论述。

[0114] 图4显示具有替代5-dU修饰取代的2573-20_15(SEQ ID NO:22)变体的相对亲和力值,如实施例5中所描述。显示了每一个dU位置的亲和力比率(K_d 变体/ K_d 母体)。

[0115] 图5显示具有2'-O-甲基或C3-间隔子取代的2573-20_15(SEQ ID NO:22)变体的相对亲和力值,如实施例5中所描述。显示了每一个dA、dC或dG位置的亲和力比率(K_d 变体/ K_d 母体)。

[0116] 图6显示2573-20(SEQ ID NO:7)的变体的抑制活性,如实施例5中所描述(●2573-20_15(SEQ ID NO:22);○2573-20_137(SEQ ID NO:573);▲2573-20_136(SEQ ID NO:101))。

[0117] 图7显示2574-49(SEQ ID NO:8)的变体的抑制活性,如实施例6中所描述(●2574-49_3(SEQ ID NO:26);○2574-49_260(SEQ ID NO:400))。

[0118] 图8A和B显示某些含有经修饰的dU的适体和dT对照适体在90%人血清中的稳定性,如实施例7中所描述。图8C显示某些含有经修饰的dU的适体和dT对照适体在人、大鼠和食蟹猴血清中的稳定性,如实施例7中所描述。

[0119] 图9显示适体2573-20_136(SEQ ID NO:101)与2574-49_260(SEQ ID NO:400)之间的竞争性测定,如实施例8中所描述(●2573-20_136(SEQ ID NO:101);○2574-49_260(SEQ ID NO:400))。

[0120] 图10显示适体2573-20_136(SEQ ID NO:101)对IL-6与可溶性受体sIL-6R的结合的抑制,如实施例9中所描述。

[0121] 图11显示结合到人IL-6(形成A和B 2条链)的SOMAmer 2573-20_136(SEQ ID NO:101)的 $2.55 \text{ \AA}$ 晶体结构,如实施例13中所描述。

[0122] 图12显示与SOMAmer或与IL-6/IL-6Rα/gp130结构复合的人IL-6蛋白的叠合结构(Boulanger, M.J., 等人, Science. 2003. 300: 2101-2104), 如实施例13中所描述。螺旋(A-D)从N末端至C末端被标记并且着以蓝色(对于SOMAmer和受体复合物为深蓝和浅蓝;螺旋A)、绿色(螺旋B)、黄色(螺旋C)和红色(螺旋D)。在整个图中保持配色方案。

[0123] 图13显示SOMAmer的结构可被分成两个结构域,如实施例13中所描述。结构域1含有G四分体基序并且结构域2具有茎-环结构。经修饰的核苷酸被标记为如下颜色:Bn-dU(洋红色)、PE-dU(红色)和Nap-dU(绿色)。含有2'-O-甲基取代的位置以青色指示。在整个图中维持相同的配色方案。

[0124] 图14显示如实施例13中所描述的G四分体基序(结构域1)。(A)G四分体的每一个以顺式(洋红色)和反式构象(白色)包含2个G-碱基。碱基氢通过Watson-Crick面以及Hoogsteen面结合到相邻G碱基。每一个四分体与一个Na⁺离子配位。(B)SOMAmer结构中的G-四链体构象是带有三个侧环的上-上-下-下。(C)由经修饰的碱基Bn-dU7、Bn-dU8、Nap-dU12和Bn-dU30生成的疏水口袋。Pi-堆叠相互作用发生在Bn-dU7和Nap-dU12的尿苷环与Bn8之间。在堆叠的碱基与Bn7和Bn30之间存在边对面相互作用。(D)PE-dU9碱基堆叠在G32上并且经修饰的基团暴露于溶剂。

[0125] 图15显示结构域1中的蛋白质-SOMAmer相互作用,如实施例13中所描述。(A)G29的Hoogsteen面上的IL-6N-末端尾部氢键上的残基R16。Bn-dU30的苄基堆叠在R16的亚甲基侧链上。(B)IL-6的N末端尾部夹在SOMAmer的主链之间,保护疏水性经修饰的核苷酸不受溶剂影响。(C)IL-6的螺旋A上的R24在G5-G6上形成至SOMAmer主链的盐桥,进一步封闭疏水口袋以避免与溶剂接触。(D)IL-6的螺旋A上的Y31与转而与Bn8和Bn-dU7的尿苷环相堆叠的Nap12相堆叠。Bn7和Bn30与堆叠的残基具有边对面相互作用。(E)Nap12与IL-6的螺旋C上的M117的亚甲基侧链具有疏水相互作用。萘基也堆叠在Bn-dU8的尿苷环上。(F)Bn7和Bn8与螺旋C上的F125具有边对面相互作用并且Bn7与R24和K27的亚甲基侧链相互作用。

[0126] 图16显示茎-环基序(结构域2),如实施例13中所描述。(A)结构域2的茎环的底部在Bn27和C28上含有2个未配对的碱基。Bn27的尿苷环与G26相堆叠,然而苄基和C28被挤出。(B)茎环中的碱基配对。在SOMAmer茎环中在Bn-dU14:A25、Bn-dU15:A24、Bn-dU23:A16和Bn-dU22:C17之间存在4个Watson-Crick碱基对。(C)SOMAmer环区域含有4个未配对碱基C18至G21。A19和C20是被挤出的碱基。(D)来自Bn15、Bn22和Bn23的苄基的疏水簇。(E)Bn14的尿苷环与Bn15的酰胺相堆叠,而苄基的指向与Bn15、Bn22和Bn23的疏水簇相反。

[0127] 图17显示结构域2中的蛋白质-SOMAmer接触主要是疏水性的,如实施例13中所描述。(A)Bn15、Bn22和Bn23与IL-6蛋白上的螺旋A和螺旋D上的残基的亚甲基侧链具有疏水相互作用。(B)Bn14与Y31具有边对面相互作用以及与K27和R30的非极性侧链具有沿边(edgewise)相互作用。(C)IL-6上的K27和R30与A13和Bn-dU14上的SOMAmer主链之间的盐桥。

[0128] 图18显示SOMAmer与IL-6上的受体结合位点的重叠,如实施例13中所描述。IL-6与SOMAmer(A)以及IL-6受体IL-6R α 和gp130的相互作用的整体视图(B)。

[0129] 图19显示SOMAmer和受体结合位点的细节,如实施例13中所描述。(A)IL-6R α 上的残基F279和SOMAmer上的Bn22识别IL-6的螺旋A和D上的相同结合位点。(浅绿色表示IL-6R α ,其它颜色如在其它图中一样)。(B)SOMAmer和gp130识别IL-6蛋白上的相同结合位点。gp130的F169和SOMAmer的Bn7、Bn8和Nap12与Y31和IL-6的螺旋A上的L19和R24的亚甲基侧链相互作用。(玫瑰红=gp130)。(C)IL-6-SOMAmer结构中的G6与Bn7之间的SOMAmer主链占据与IL-6/IL-6R α /gp130结构中的W142相同的空间。

[0130] 图20显示可被整合进适体,诸如慢解离速率的适体的某些示例性的经修饰的嘧啶。

[0131] 图21显示人IL-6前体(SEQ ID NO:9)的示例性序列。该信号序列(氨基酸1至28)加以下划线。示例性的成熟人IL-6包含SEQ ID NO:9的氨基酸29至212,并且示于SEQ ID NO:10中。

[0132] 图22显示G四分体片段(2573-20_324(SEQ ID NO:319))中的经修饰的核苷酸的系统性替换的概述,如实施例13中所描述。显示的值 K_d 的比率为 $(K_d^{\text{变体}}/K_d^{\text{母体}})$ 。母体片段(2573-20_324(SEQ ID NO:319))的 K_d 值为 $2.7 \times 10^{-7} \text{M}$ 。

[0133] 图23显示独特的SOMAmer序列与来自最终SELEX库的G四分体基序的比对,如实施例14中所描述。

[0134] 图24显示某些示例性5-dU修饰,如实施例15中所论述。每一个修饰结构被附接于dU,如例如图3中显示。

[0135] 图25显示独特的SOMAmer序列与如实施例14中所描述的SOMAmer 2574-49(SEQ ID NO:8)相似的序列基序的比对。

[0136] 图26显示PEG-N-2573-20_136(2573-20_136(SEQ ID NO:101)5'末端缀合有40kDa PEG)对具有胶原诱导性关节炎的食蟹猴的关节炎症的作用。

[0137] 详述

[0138] 现将详细地参考本发明的代表性实施方案。虽然本发明将结合列举的实施方案进行描述,但应理解的是,本发明无意限定于这些实施例。与此相反,本发明意欲涵盖可被包括在如由权利要求确定的本发明的范围内的所有替代方案,修改和等同物。

[0139] 本领域技术人员将认识到可用于本发明的实践和在本发明的实践的范围内的与本文中描述的方法和材料相似或等同的许多方法和材料。本发明决不限于所描述的方法和材料。

[0140] 除非另有定义,否则本文所用的技术和科学术语具有与本发明所属的领域中的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。虽然可在本发明的实践或测试中使用与本文描述的方法、装置和材料相似或等同的任何方法、装置和材料,但现在描述优选的方法、装置和材料。

[0141] 本公开内容中引用的所有出版物、公开的专利文件和专利申请表示本公开内容所属领域内的技术人员的水平。本文中引用的所有出版物、公布的专利文件和专利申请在此通过引用并入,其程度如同每一个单独出版物、公布的专利文件或专利申请被具体且单独地指定通过引用并入。

[0142] 如本公开内容(包括所附权利要求)中所用,除非内容另外地明确指出,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数指代物,并且可与“至少一个”和“一个或多个”互换使用。因此,对“适体”的提及包括适体的混合物等。

[0143] 如本文中所用,术语“约”代表数值的不显著的改变或变化以便数值所涉及的项的基本功能不被改变。

[0144] 如本文中所用,术语“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“包括(includes)”、“包括(including)”、“含有(contains)”、“含有(containing)”及其任意变型意欲涵盖非排他性包含,以便包含、包括或含有元素或元素列表的过程、方法、工艺衍生产品或物质组合物不仅仅包括那些元素而且可包括未明确列出的或此类过程、方法、工艺衍生产品或物质组合物所固有的其它元素。

[0145] 如本文中所用,术语“核苷酸”是指核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或其修饰形式以及其类似物。核苷酸所包括的物质包括嘌呤(例如,腺嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤及其衍生物和类似物)以及嘧啶(例如,胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶及其衍生物和类似物)。当碱基被表示为

“A”、“C”、“G”、“U”或“T”时,其意欲包括核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸,以及其修饰形式和类似物。

[0146] 如本文中所用,“核酸”、“寡核苷酸”和“多核苷酸”可互换使用,意指核苷酸的聚合物,并且包括DNA、RNA、DNA/RNA杂交体和这些类型的核酸、寡核苷酸和多核苷酸的修饰物,其中包括各种实体或部分在任何位置处附接于核苷酸单元。术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”包括双链或单链分子以及三螺旋分子。核酸、寡核苷酸和多核苷酸是比术语适体更广泛的术语并且,从而,术语核酸、寡核苷酸和多核苷酸包括为适体的核苷酸的聚合物,但术语核酸、寡核苷酸和多核苷酸不限于适体。

[0147] 如本文中所用,术语“修饰”、“经修饰的”、“修饰”及其任何变型,当用于指寡核苷酸时,意指寡核苷酸的4种组成核苷酸碱基(即,A、G、T/U和C)的至少一种为天然存在的核苷酸的类似物或酯。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸赋予寡核苷酸对核酸酶的抗性。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸显著地导致适体与蛋白质靶标的疏水相互作用,从而导致高结合效率和稳定的共晶复合物。在C-5位置上发生取代的嘧啶是经修饰的核苷酸的实例。修饰可包括主链修饰、甲基化、不常见的碱基配对组合诸如异碱基异胞苷和异脒等。修饰还可包括3'和5'修饰,诸如加帽。其它修饰可包括以类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰诸如例如,具有不带电荷的键联的那些修饰(例如,甲基膦酸酯、磷酸三酯、亚磷酰胺、氨基甲酸酯等)和具有带电荷的键联的那些修饰(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、具有嵌入剂的那些修饰(例如,吡啶、补骨脂素等)、含有螯合剂的那些修饰(例如,金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)、含有烷化剂的那些修饰以及具有经修饰的键联的那些修饰(例如, α 异头核酸等)。此外,核苷酸的糖上通常存在的任何羟基可被膦酸酯基团或磷酸酯基团替代;被标准保护基团保护;或被激活以制备与另外的核苷酸或与固体载体的另外键联。5'和3'末端OH基团可被磷酸化或被胺类、具有约1至约20个碳原子的有机加帽基团部分、聚乙二醇(PEG)聚合物(在一些实施方案中,为从约10至约80kDa的PEG聚合物,在一些实施方案中,为从约20至约60kDa的PEG聚合物)或其它亲水性或疏水性生物或合成聚合物取代。在一个实施方案中,修饰在嘧啶的C-5位置上。这些修饰可通过C-5位置上的直接酰胺键联或通过其它类型的键联产生。

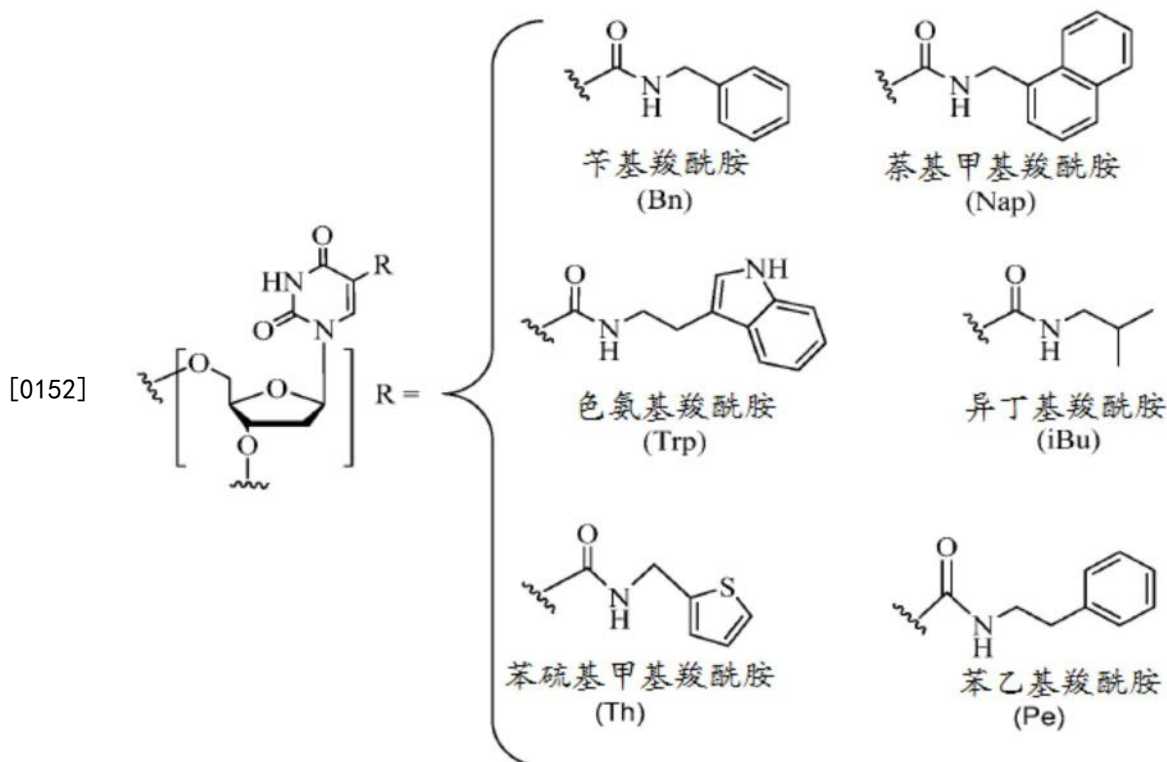
[0148] 多核苷酸还可包含在本领域中通常已知的核糖或脱氧核糖糖类的类似形式,包括2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-叠氮基-核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构体糖诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖糖类、呋喃糖糖类、景天庚酮糖、无环类似物和无碱基核苷类似物诸如甲基核苷。如上文中所指出,一种或多种磷酸二酯键联可被替代连接基团代替。这些替代连接基团包括其中磷酸酯被P(O)S(“硫酯基(thioate)”)、P(S)S(“二硫酯基”)、(O)NR₂(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛”)替代的实施方案,其中每一个R或R'独立地为H或被取代的或未被取代的任选地含有醚(-O-)键联的烷基(1-20个C)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。多核苷酸中的键联不必全部相同。糖、嘌呤和嘧啶的类似物形式的取代在设计终产物中是有利的,对于例如替代主链结构如聚酰胺主链,情况亦可如此。

[0149] 如本文中所用,术语“核酸酶”是指能够切割寡核苷酸的核苷酸亚基之间的磷酸二酯键的酶。如本文中所用,术语“内切核酸酶”是指切割在寡核苷酸内部的磷酸二酯键的酶。如本文中所用,术语“外切核酸酶”是指切割连接寡核苷酸的末端核苷酸的磷酸二酯键的

酶。生物液体通常含有内切核酸酶和外切核酸酶的混合物。

[0150] 如本文中所用,术语“抗核酸酶的”和“核酸酶抗性”是指寡核苷酸用作内切或外切核酸酶的底物的减弱的能力,以使得当与此类酶接触时,所述寡核苷酸不被降解或比由未被修饰的核苷酸组成的寡核苷酸更慢地被降解。

[0151] 如本文中所用,术语“C-5修饰的嘧啶”是指在C-5位置上具有修饰的嘧啶,包括但不限于图20和图24中所阐述的那些部分。C-5修饰的嘧啶的实例包括美国专利No. 5,719,273和5,945,527中描述的那些。C-5修饰的实例包括在C-5位置用取代基对脱氧尿苷的取代,所述取代基独立地选自:如紧接着在下文中阐述的苄基羧酰胺(或者苄基氨基羰基)(Bn)、萘基甲基羧酰胺(或者萘基甲基氨基羰基)(Nap)、色氨基羧酰胺(或者色氨基羰基)(Trp)、苯乙基羧酰胺(或者苯乙基氨基羰基)(Pe)、苯硫基甲基羧酰胺(或者苯硫基甲基氨基羰基)(Th)和异丁基羧酰胺(或者异丁基氨基羰基)(iBu)。



[0153] 还可将C-5修饰的嘧啶的化学修饰与单个的或任意组合的2'-位置糖修饰、环外胺上的修饰和4-硫尿苷的取代等组合。

[0154] 代表性C-5修饰的嘧啶包括:5-(N-苄基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(BndU)、5-(N-苄基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-苄基羧酰胺)-2'-氟尿苷、5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(iBudU)、5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-苯乙基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(PedU)、5-(N-苯硫基甲基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(ThdU)、5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-氟尿苷、5-(N-色氨基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(TrpdU)、5-(N-色氨基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-色氨基羧酰胺)-2'-氟尿苷、氯化5-(N-[1-(3-三甲基铵)丙基]羧酰胺)-2'-脱氧尿苷、5-(N-萘基甲基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(NapdU)、5-(N-萘基甲基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-萘基甲基羧酰胺)-2'-氟尿苷或5-(N-[1-(2,3-二羟基丙基)]羧酰胺)-2'-脱氧尿苷。

[0155] 可在寡核苷酸合成之前或之后修饰核苷酸。寡核苷酸中的核苷酸的序列可被一个

或多个非核苷酸组分中断。经修饰的寡核苷酸还可在聚合后进一步修饰,诸如,例如通过以任何合适的标记组分缀合。

[0156] 如本文中所用,术语“至少一个嘧啶”,当指核酸的修饰时,是指核酸中的一个、几个或全部嘧啶,表示核酸中的C、T或U的任一个或全部的任何或所有出现可被修饰或不被修饰。

[0157] 如本文中所用,“核酸配体”、“适体”和“克隆”可互换用于指对靶标分子具有期望的作用的非天然存在的核酸。期望的作用包括,但不限于对靶标的结合、催化改变靶标、以修饰或改变靶标或靶标的功能活性的方式与靶标反应、共价附接于靶标(如在自杀性抑制剂中)和促进靶标与另一种分子之间的反应。在一个实施方案中,所述作用是对于靶标分子的特异性结合亲和力,此类靶标分子是不同于通过不依赖于Watson/Crick碱基配对或三股螺旋形成的机制结合于核酸配体的多核苷酸的三维化学结构,其中适体不是具有被靶标分子结合的已知生理功能的核酸。针对给定的靶标的适体包括通过方法从候选核酸混合物中鉴定的核酸,其中适体是靶标的配体,所述方法包括:(a) 将候选混合物与靶标接触,其中可从候选混合物的其余部分中分离出相对于候选混合物中的其它核酸来说对于靶标具有增强的亲和力的核酸;(b) 从候选混合物的其余部分中分离出具有增强的亲和力的核酸;和(c) 扩增具有增强的亲和力的核酸以产生可籍以鉴定靶标分子的适体的配体富集的核酸的混合物。应认识到,亲和力相互作用是程度的问题;然而,在本说明书中,适体对于其靶标的“特异性结合亲和力”意指适体通常以比其结合混合物或样品中的其它非靶标组分高得多的程度的亲和力结合其靶标。“适体”或“核酸配体”是一组一种类型或种类的具有特定核苷酸序列的核酸分子的拷贝。适体可包括任何合适数目的核苷酸。“适体”是指不止一组此类分子。不同的适体可具有相同或不同数目的核苷酸。适体可为DNA或RNA,以及可为单链的、双链的,或含有双链或三链区域。

[0158] 如本文中所用,“SOMAmer”或慢解离速率修饰的适体是指具有 ≥ 30 分钟、 ≥ 60 分钟、 ≥ 90 分钟、 ≥ 120 分钟、 ≥ 150 分钟、 ≥ 180 分钟、 ≥ 210 分钟或 ≥ 240 分钟的解离速率($t_{1/2}$)的适体(包括包含至少一个具有疏水性修饰的核苷酸的适体)。在一些实施方案中,SOMAmer使用标题为“Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates”的美国专利7,947,447中描述的改进的SELEX法产生。

[0159] 如此处所用,“G四分体”是包含4对G核苷酸(每一对G核苷酸之间具有至少一个核苷酸或间隔子基团)的核苷酸序列基序。G四分体基序描述于例如Lane, A.N., 等人, NAR, 2008.36(17):5482:5515中。

[0160] 如本文中所用,“蛋白质”可与“肽”、“多肽”或“肽片段”同义地使用。“纯化的”多肽、蛋白质、肽或肽片段基本上不含来自从其获得所述氨基酸序列的细胞、组织或无细胞来源的细胞材料或其它污染蛋白质,或当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学药品。

[0161] 如本文中所用,“炎症性疾病”是指牵涉炎症反应的疾病或疾患。炎症反应可为急性的和/或慢性的。在一些实施方案中,慢性炎症牵涉IL-6的水平升高。可用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性炎症性疾病包括类风湿关节炎、幼年特发性关节炎、全身发作幼年特发性关节炎、骨关节炎、败血症、哮喘、间质性肺疾病、炎性肠疾病、系统性硬化症、眼内炎症、格雷夫斯病、子宫内膜异位、系统性硬化症、成人斯蒂尔病、淀粉样蛋白A淀粉样变性、风湿性多肌痛、缓解型血清阴性对称性滑膜炎伴凹陷性水肿、白塞氏病、葡萄膜炎、移

植物抗宿主病和TNFR-相关周期性综合征。

[0162] 如本文中所用,“恶性疾病”包括癌症和癌症相关疾患。

[0163] 如本文中所用,“癌症”意指牵涉不受调控和异常的细胞生长的疾病或疾患。可用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性癌症包括多发性骨髓瘤、白血病、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、恶病质、黑素瘤、子宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、胃肠道癌、肺癌、前列腺癌、肾细胞癌、转移性肾癌、实体瘤、非小细胞肺癌、非何杰金氏淋巴瘤、膀胱癌、口腔癌、骨髓增生性肿瘤、B细胞淋巴增生性疾病和浆细胞白血病。非限制性示例性癌症相关疾患包括非小细胞肺癌相关疲劳和癌症相关厌食症。

[0164] 如本文中所用,“感染”是指由病原体诸如细菌、病毒、真菌等引发的疾病或疾患。可用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性感染包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类T淋巴细胞病毒(HTLV)、脑型疟疾、泌尿道感染和脑膜炎球菌感染。

[0165] 如本文中所用,“自身免疫性疾病”是指由针对身体自身组分诸如组织和其它组分的不适当的免疫应答引发的疾病或疾患。在一些实施方案中,IL-6水平在自身免疫性疾病中被升高。可用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性自身免疫性疾病包括系统性红斑狼疮、系统性硬化症、多肌炎、包括巨细胞性动脉炎、高安动脉炎在内的血管炎综合症、冷球蛋白血症、髓过氧化物酶抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关新月体性肾小球肾炎、类风湿血管炎、克罗恩病、复发性多软骨炎、获得性血友病A和自身免疫性溶血性贫血。

[0166] 如本文中所用,“IL-6介导的疾病或疾患”是指其中至少一些症状和/或疾病或疾患的进展由IL-6介导的信号转导引发的疾病或疾患。非限制性示例性IL-6介导的疾病或疾患包括炎性疾病、恶性疾病(包括癌症和癌症相关疾患)、感染和自身免疫性疾病。其它非限制性示例性IL-6介导的疾病包括,但不限于卡斯尔曼病、强直性脊椎炎、冠心病、类风湿关节炎的心血管疾病、肺动脉高压、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、特应性皮炎、银屑病、坐骨神经痛、II型糖尿病、肥胖症、巨细胞动脉炎、急性移植物抗宿主病(GVHD)、非ST段抬高型心肌梗死、抗-嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关性血管炎、视神经脊髓炎、慢性肾小球肾炎和高安动脉炎。

[0167] 如本文中所用,“调节”意指通过升高或降低来改变肽或多肽的水平,或通过增强或减弱来改变肽或多肽的稳定性或活性。术语“抑制”意指降低肽或多肽的水平或减弱肽或多肽的稳定性或活性。如本文中所描述,被调节或抑制的蛋白质是IL-6。

[0168] 如本文中所用,术语“生物活性”表示对一个或多个细胞或细胞外过程的作用(例如,通过结合、信号传导等),该作用可影响生理或病理生理过程。

[0169] 如本文中所用,术语“白细胞介素-6”和“IL-6”是指天然存在的IL-6,包括天然存在的同种型和变体。如本文中所用,IL-6包括所有哺乳动物物种的IL-6,包括人类、犬科动物、猫科动物、鼠科动物、灵长类动物、马科动物和牛科动物。非限制性示例性人IL-6前体具有在图21中显示的Swiss-Prot登录号P05231.1中显示的序列(SEQ ID NO:9)。非限制性示例性成熟人IL-6包含Swiss-Prot登录号P05231.1的氨基酸29至212(SEQ ID NO:10)。

[0170] 如本文中所用,“IL-6受体”是指被IL-6结合并激活的受体,诸如IL-6受体,其包含两个亚基:IL-6R(也被称为IL-6受体亚基 α)和gp130(也被称为IL-6受体亚基 β)。IL-6受体包括任何哺乳动物物种(包括,但不限于人类、犬科动物、猫科动物、鼠科动物、马科动物、灵长类动物和牛科动物)的受体。非限制性示例性人IL-6R前体具有在Swiss-Prot登录号

P08887.1中显示的序列。非限制性示例性人IL-6R成熟蛋白具有Swiss-Prot登录号P08887.1的氨基酸20至468的序列。非限制性示例性人gp130前体具有在Swiss-Prot登录号P40189.2中显示的序列。非限制性示例性人gp130成熟蛋白具有Swiss-Prot登录号P40189.2的氨基酸23至918的序列。

[0171] “IL-6适体”是能够结合到并改变IL-6的活性的适体。在一些实施方案中,IL-6适体在体外抑制IL-6的至少一种活性。在一些实施方案中,IL-6适体在体内抑制IL-6的至少一种活性。IL-6的非限制性示例性活性包括对IL-6受体的结合、诱导细胞增殖(诸如体外TF-1细胞增殖)、诱导STAT3磷酸化和诱导STAT3-介导的转录。

[0172] 如本文中所使用,术语“药学上可接受的”意指被联邦或州政府的管理机构批准的或在美国药典或其它通常公认的药典中列出,以用于动物,更具体地,用于人。术语“载体”是指治疗剂与其一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物,其包括,但不限于诸如水和油的此类无菌液体。

[0173] IL-6适体的“药学上可接受的盐”或“盐”是适合于向个体施用的含有离子键的公开的化合物的产物,并且通常通过将公开的化合物与酸或碱反应来产生。药学上可接受的盐可包括,但不限于酸加成盐,包括盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、烷基磺酸盐、芳基磺酸盐、芳基烷基磺酸盐、醋酸盐、苯甲酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐,琥珀酸盐,乳酸盐,和酒石酸盐;碱金属阳离子诸如Li、Na、K,碱土金属盐诸如Mg或Ca或有机胺盐。

[0174] “药物组合物”是以适合于向个体施用的形式存在的包含IL-6适体的制剂。通常将药物组合物配制成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例包括,但不限于口服和胃肠外,例如,静脉内、真皮内、皮下、吸入、局部、经皮、经粘膜和直肠施用。

[0175] 如本文中所用,术语“治疗有效量”通常意指改善如本文中所述待预防、减轻或治疗的病症或疾患的至少一个症状所必需的量。短语“治疗有效量”,当其涉及本公开内容的IL-6适体时,意指在大量需要此种治疗的个体中提供施用所述适体所针对的特定药理反应的适体剂量。要强调的是,在具体情况下向特定个体施用的适体的治疗有效量在治疗本文中描述的疾患/疾病时将不总是有效的,即使这样的剂量被本领域技术人员认为是治疗有效量。

[0176] 术语“SELEX”和“SELEX法”在本文中可互换使用,通常指(1)以期望的方式与靶标分子相互作用,例如以高亲和力与蛋白质结合的核酸的选择,与(2)那些选择的核酸的扩增的组合。SELEX法可用于鉴定针对特定靶标分子具有高亲和力的适体。

[0177] SELEX通常包括制备核酸的候选混合物,使候选混合物结合到期望的靶标分子以形成亲和力复合物,将亲和力混合物与未结合的候选核酸分开,将核酸与亲和力复合物分离并离析,纯化核酸和鉴定特定适体序列。该方法可包括多个轮次以进一步调整选择的适体的亲和力的范围。所述方法可在该方法的一个或多个点上包括扩增步骤。参见,例如,标题为“Nucleic Acid Ligands”的美国专利No.5,475,096。SELEX法可用于产生共价地结合其靶标的适体以及非共价地结合其靶标的适体。参见,例如,标题为“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment:Chemi-SELEX”的美国专利No.5,705,337。

[0178] SELEX法可用于鉴定含有经修饰的核苷酸的高亲和力适体,所述经修饰的核苷酸

赋予适体改善的特征,诸如,例如,提高的体内稳定性或改善的递送特征。此类修饰的实例包括在核糖和/或磷酸酯和/或碱基位置上的化学取代。SELEX法鉴定的含有经修饰的核苷酸的适体描述于标题为“High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides”的美国专利No.5,660,985中,所述美国专利描述了含有在其嘧啶的C5和/或2'-位置上经化学修饰的核苷酸衍生物的寡核苷酸。美国专利No.5,580,737(参见上文)描述了含有一个或多个用2'-氨基(2'-NH₂)、2'-氟(2'-F)和/或2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的核苷酸的高度特异性的适体。也参见,标题为“SELEX and PHOTOSELEX”的美国专利申请公开No.20090098549,其描述了具有扩展的物理和化学性质的核酸文库以及其在SELEX和photoSELEX中的用途。

[0179] 2009年11月25日提交的标题为“Nuclease Resistant Oligonucleotides”的美国临时申请系列No.61/264,545描述了用于生产具有增强的核酸酶抗性的寡核苷酸的方法。抗核酸酶寡核苷酸包括至少一个在C-5位置上利用选自图20和图24中所示的基团修饰的嘧啶。在各种实施方案中,修饰包括在C-5位置上用取代基对脱氧尿苷的取代,所述取代基独立地选自:如上文中所阐述的苄基羧酰胺(Bn)、苄乙基(Pe)、苄硫基甲基(Th)、萘基甲基羧酰胺(Nap)、色氨酸羧酰胺(Trp)和异丁基羧酰胺。

[0180] SELEX还可用于鉴定具有期望的解离速率特征的适体。参见标题为“Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates”的美国专利7,947,447,其描述了用于产生可结合靶标分子的适体的改进的SELEX法。描述了用于生产具有更慢的与它们各自的靶标分子解离的速率的适体的方法。所述方法包括将候选混合物与靶标分子接触,使核酸-靶标复合物的形成发生,和进行低解离速率富集过程,其中具有快的解离速率的核酸-靶标复合物解离并且不再重组,然而具有慢的解离速率的复合物保持完整。此外,所述方法包括将经修饰的核苷酸用于生产候选核酸混合物,以产生具有改善的解离速率性能的适体(参见标题为“SELEX and PhotoSELEX”的美国专利公开No.2009/0098549)。(也参见美国专利No.7,855,054和美国专利公开No.2007/0166740)。这些申请的每一个通过引用整体并入本文。

[0181] 在一些实施方案中,提供了选择结合靶标分子的适体的方法,所述方法包括:(a)制备核酸的候选混合物,其中候选混合物包含其中所述候选混合物的至少一个或每一个核酸中的至少一个嘧啶在C5-位置被化学修饰的经修饰的核酸;(b)将候选混合物与靶标分子接触,其中具有相对于候选混合物中的其它核酸来说增强的对靶标分子的亲和力的核酸结合靶标分子,从而形成核酸-靶标分子复合物;(c)从候选混合物的其余部分中分离出增强的亲和力核酸;和(d)扩增增强的亲和力核酸以产生在能够以增强的亲和力结合靶标分子的核酸序列上富集的核酸的混合物,借此鉴定针对靶标分子的适体。在某些实施方案中,所述方法还包括进行慢解离速率富集过程。

[0182] “靶标(Target)”或“靶标分子”或“靶标(target)”在本文中指核酸可以以期望的方式对其起作用的任何化合物。靶标分子可为,但不限于蛋白质、肽、核酸、糖类、脂质、多糖、糖蛋白、激素、受体、抗原、抗体、病毒、病原体、有毒物质、底物、代谢产物、过渡状态类似物、辅因子、抑制剂、药物、染料、营养物、生长因子、细胞、组织、任何前述物质的任何部分或片段等。实际上任何化学或生物效应子可能是合适的靶标。任意大小的分子可用作靶标。还可以以特定方式修饰靶标,以增加靶标与核酸之间的相互作用的可能性或强度。靶标也可

包括特定化合物或分子的任何微小变化,诸如,在蛋白质的情况下,例如,氨基酸序列的微小变化、二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作或修饰,诸如与标记组分的缀合,其基本上不改变该分子特性。“靶标分子”或“靶标”是一组一种类型或种类的能够结合适体的分子或多分子结构的拷贝。“靶标分子”或“靶标”是指不止一组这样的分子。其中靶标是肽的SELEX法的实施方案描述于标题为“Modified SELEX Processes Without Purified Protein”的美国专利No.6,376,190中。

[0183] 示例性IL-6适体

[0184] 本公开内容的IL-6适体使用用于鉴定具有慢解离速率的适体的改进的SELEX法来鉴定,如实施例1中所描述。由Bn-dU(5-(N-苄基羧酰胺-2'-脱氧尿苷)、dA、dC和dG组成的随机DNA文库用于一个选择,并且由NapdU(5-(N-萘基羧酰胺-2'-脱氧尿苷)、dA、dC和dG组成的随机DNA文库用于另一个选择。因此,在各种实施方案中,本发明的IL-6适体包含至少一个经修饰的嘧啶。

[0185] 通过使用Bn-dU适体2573-20,进行研究以鉴定维持针对IL-6的强亲和力的截短的序列。来自5'和3'末端的系统性截短导致32个核苷酸序列(2573-20_15;SEQ ID NO:22)的鉴定。通过使用Nap-dU适体2574-49(SEQ ID NO:8),进行类似研究以鉴定维持针对IL-6的强亲和力的截短的序列。来自5'和3'末端的系统性截短导致30个核苷酸序列(2574-49_14;SEQ ID NO:35)的鉴定。

[0186] 此外,实施例15中描述的核苷酸取代研究显示适体2573-20_136(SEQ ID NO:101)和适体2574-49_260(SEQ ID NO:400)中的许多位置可被修饰和/或替代而几乎没有或没有IL-6结合活性的损失。因此,在一些实施方案中,IL-6适体包含序列:

[0187] I. 5'-GGCAGGZZZGGZQ_aGZGG-3' (SEQ ID NO: 700);

[0188] 其中每一个Z独立地选自U、T和经修饰的嘧啶(诸如5'-修饰的嘧啶);每一个Q独立地选自接头、经修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸;a为1至50。在一些实施方案中,a为2至50、1至40、2至40、1至30、2至30、1至20、2至20、1至15、2至15、1至10、2至10、1至5或2至5。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、亚烷基二醇和聚亚烷基二醇。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、1,3-丙二醇、具有2至100个1,3-丙二醇单元的,的聚(1,3-丙二醇)、乙二醇和具有2至100个乙二醇单元的聚乙二醇。在一些实施方案中,每一个Z独立地选自U、T和图20中显示的经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个Z独立地选自U、T和图24中显示的经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,IL-6适体的一个或多个核苷酸包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,IL-6适体中的一个或多个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0189] 在一些实施方案中,IL-6适体包含序列:

[0190] II. 5'-GGGYXAXGYAGCL_bGZGCGYAAGGCGGY-3' (SEQ ID NO: 701)

[0191] 其中每一个Z独立地选自U、T和经修饰的嘧啶(诸如5'-修饰的嘧啶);每一个Y独立地选自经修饰的嘧啶(诸如5'-修饰的嘧啶);每一个X独立地选自经修饰的嘧啶(诸如5'-修饰的嘧啶);每一个L独立地选自接头、经修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸;b为1至20。在一些实施方案中,b为1至15、1至12、1至10、1至9、1至8或1至7。在一些实施方案中,每一个L独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、亚烷基二醇和聚亚烷基二醇。在一些实施方案中,每一个L独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、1,3-丙二醇、具有2至100个1,3-

丙二醇单元的聚(1,3-丙二醇)、乙二醇和具有2至100个乙二醇单元的聚乙二醇。在一些实施方案中,每一个L为C₃接头并且b为2。在一些实施方案中,每一个L独立地为经修饰的或未修饰的核苷酸并且b为1至10。在一些实施方案中,每一个Z独立地选自U、T和图20中显示的经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个Z独立地选自U、T和图24中显示的经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个Y独立地选自图20中显示的经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个Y独立地选自图24中显示的经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个X独立地选自图20中显示的芳族修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个X独立地选自图24中显示的芳族修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个X独立地选自图24中的Nap、2Nap、NE、BF和BT。在一些实施方案中,每一个X为Nap。在一些实施方案中,L为C₃接头并且b为2。在一些实施方案中,IL-6适体的一个或多个核苷酸包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,IL-6适体中的一个或多个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0192] 对从其中选择2573-20 (SEQ ID NO: 7) 的序列库进行另外的测序研究。454个测序(其为使用平行焦磷酸测序的大规模高通量法)提供了无偏样品制备和非常准确的序列分析。测序数据用于鉴定参与IL-6结合的共有基序。在终SELEX库的许多成员中鉴定了保守的G四分体基序。根据实施例14和图23中描述的序列和实施例13中的晶体结构,鉴定了用于结合到IL-6的共有基序,其包含其中两对G侧翼连接3个U、T或5'-修饰的U核苷酸的G四分体(即,GGZZZGG,其中每一个Z独立地选自U、T和5'-修饰的嘧啶)。因此,在一些实施方案中,IL-6适体包含G四分体基序。在一些实施方案中,IL-6适体包含G四分体基序,其选自:

III. 5'-GG-ZZZ-GG-Q_a-GG-Q_b-GG-3' (SEQ ID NO: 702);

[0193] IV. 5'-GG-Q_a-GG-ZZZ-GG-Q_b-GG-3' (SEQ ID NO: 703); 和

V. 5'-GG-Q_a-GG-Q_b-GG-ZZZ-GG-3' (SEQ ID NO: 704);

[0194] 其中每一个Z独立地选自U、T和经修饰的嘧啶(诸如5'-修饰的嘧啶);每一个Q独立地选自接头、经修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸;a为1至50;并且b为1至50。在一些实施方案中,a为2至50、1至40、2至40、1至30、2至30、1至20、2至20、1至15、2至15、1至10、2至10、1至5或2至5。在一些实施方案中,b为2至50、1至40、2至40、1至30、2至30、1至20、2至20、1至15、2至15、1至10、2至10、1至5或2至5。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、亚烷基二醇和聚亚烷基二醇。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、1,3-丙二醇、具有2至100个1,3-丙二醇单元的聚(1,3-丙二醇)、乙二醇和具有2至100个乙二醇单元的聚乙二醇。在一些实施方案中,至少一个或至少两个Z核苷酸独立地选自经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,至少一个或至少两个Z核苷酸独立地选自图20中的经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,至少一个或至少两个Z核苷酸独立地选自图24中的经修饰的嘧啶。

[0195] Nap SELEX库的454个测序鉴定了一组共有两个保守基序的独特序列。参见图25。发现所述基序以任一顺序存在(比较,例如2574-49 (SEQ ID NO: 8) 与2574-104 (SEQ ID NO: 705))。在一些实施方案中,IL-6适体包含选自以下的序列:

[0196] VI. 5'-YXAXGYARQ_aMGYAAGSCGRY-3' (SEQ ID NO: 705); 或

[0197] VII. 5'-MGYAAGSCGRYQ_bYXAXGYAR-3' (SEQ ID NO: 706)”。

[0198] 其中每一个Y独立地选自经修饰的嘧啶(诸如5'-修饰的嘧啶);每一个X独立地选

自经修饰的嘧啶(诸如5'-修饰的嘧啶);M选自C和A;S选自C和G;每一个R独立地选自G和A;每一个Q独立地选自接头、经修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸;a为1至30;并且b为1至30。在一些实施方案中,a为1至20、1至10、4至10或6至7。在一些实施方案中,b为1至20或1至17。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、亚烷基二醇和聚亚烷基二醇。在一些实施方案中,每一个Q独立地选自被取代的或未被取代的C₂-C₂₀接头、1,3-丙二醇、具有2至100个1,3-丙二醇单元的聚(1,3-丙二醇)、乙二醇和具有2至100个乙二醇单元的聚乙二醇。在一些实施方案中,每一个Y独立地选自图20中显示的经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个Y独立地选自图24中显示的经修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个X独立地选自图20中显示的芳族修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个X独立地选自图24中显示的芳族修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个X独立地选自图24中的Nap、2Nap、NE、BF和BT。在一些实施方案中,每一个X为Nap。在一些实施方案中,每一个N独立地选自A、C和G。在一些实施方案中,L为C₃接头并且b为2。在一些实施方案中,IL-6适体的一个或多个核苷酸包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,IL-6适体中的一个或多个核苷间键联为硫代磷酸酯键联。

[0199] 在一些实施方案中,每一个X、Y和/或Z是经修饰的尿苷。在一些实施方案中,每一个X、Y和/或Z独立地选自如本文中定义的C-5修饰的嘧啶。在一些实施方案中,每一个X、Y和/或Z独立地选自5-(N-苄基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(BndU)、5-(N-苄基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-苄基羧酰胺)-2'-氟尿苷、5-(N-苄基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(PedU)、5-(N-苄基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(ThdU)、5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(iBudU)、5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-氟尿苷、5-(N-色氨基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(TrpdU)、5-(N-色氨基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-色氨基羧酰胺)-2'-氟尿苷、氯化5-(N-[1-(3-三甲基铵)丙基]羧酰胺)-2'-脱氧尿苷、5-(N-萘基甲基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(NapdU)、5-(N-萘基甲基羧酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-萘基甲基羧酰胺)-2'-氟尿苷和5-(N-[1-(2,3-二羟基丙基)]羧酰胺)-2'-脱氧尿苷。在一些实施方案中,每一个Z为5-(N-苄基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷(BndU)。

[0200] 在某些实施方案中,IL-6适体的部分(Y)对于维持结合可能不是必需的,并且连续IL-6适体的某些部分可被修饰,包括但不限于用间隔子或接头部分的替代。在这些实施方案中,例如,Y可被表示为Y'-Q-Y"-Q'-Y"',其中Y'、Y"和Y"'是IL-6适体的部分或不同IL-6适体的区段,并且Q和/或Q'是修饰原始IL-6适体的某些核酸特征的间隔子或接头分子。当Q和Q'不存在时,Y'、Y"和Y"'代表一个连续的IL-6适体(Y)。

[0201] 如本文中所用,"接头"是分子实体,其通过共价键或非共价相互作用连接两个或多个分子实体,并且可以以保持一种或多种分子实体的功能性质的方式允许分子实体空间分离。接头还可被称为间隔子。适当的接头序列可由本领域技术人员基于本公开内容容易地确定。

[0202] 如本文中所用,接头可包含选自组的一种或多种分子或亚组分,所述组包括,但不限于多核苷酸、多肽、肽核酸、锁核酸、寡糖、多糖、抗体、affybody、抗体模拟物、脂肪族、芳族或芳杂环碳分子、亚烷基二醇(例如,乙二醇、1,3-丙二醇)、聚亚烷基二醇(例如,聚乙二醇(PEG))、细胞受体、配体、脂质、这些结构的任何片段或衍生物、前述物质的任意组合或任何其它化学结构或组分。

[0203] 更具体地,如本文中所用,接头或间隔子可以是这样的主链,该主链包含2至20个碳原子(C_2 - C_{20})的链(饱和的、不饱和的、直链、支链的或环的)、0至10个芳基、0至10个杂芳基和0至10个杂环基,任选地包含醚(-O-)键联(例如,一个或多个亚烷基二醇单元,包括但不限于一个或多个乙二醇单元-O-(CH_2CH_2O)-;一个或多个1,3-丙二醇单元-O-($CH_2CH_2CH_2O$)-等;在一些实施方案中,接头包含1至100个单元、1至50个单元、1至40个单元、1至30个单元、1至20个单元、1至12个单元或1至10个单元);胺(-NH-)键联、酰胺(-NC(O)-)键联;和硫醚(-S-)键联;等;其中每一个主链碳原子可独立地不被取代(即,包含-H取代基)或可被选自 C_1 至 C_3 烷基、-OH、-NH₂、-SH、-O-(C_1 至 C_6 烷基)、-S-(C_1 至 C_6 烷基)、卤素、-OC(O)(C_1 至 C_6 烷基)、-NH-(C_1 至 C_6 烷基)等的一个或多个基团取代。在一些实施方案中, C_2 - C_{20} 接头为 C_2 - C_8 接头、 C_2 - C_6 接头、 C_2 - C_5 接头、 C_2 - C_4 接头或 C_3 接头,其中每一个碳可如上所述被独立地取代。

[0204] 在一些实施方案中,IL-6适体的一个或多个核苷包含选自2'-位置糖修饰(诸如2'-氨基(2'-NH₂)、2'-氟(2'-F)或2'-O-甲基(2'-OMe))、胞嘧啶环外胺上的修饰、核苷间键联修饰和5-甲基-胞嘧啶的修饰。在一些实施方案中,IL-6适体包含3'帽、5'帽和/或3'末端的倒置脱氧胸苷。

[0205] 在一些实施方案中,L可为接头诸如18个原子的六乙二醇接头。在一些实施方案中,L可为核苷酸和接头的组合。在一些实施方案中,IL-6适体具有选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625的序列的序列。在一些实施方案中,IL-6适体具有自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、400至446、573和599至625的序列的序列。在一些实施方案中,IL-6适体具有与选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的序列。在一些实施方案中,IL-6适体具有与选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、400至446、573和599至625的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的序列。与SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625中显示的至少一个核苷酸序列的序列同一性不受特别限制,只要适体以低于10nM的亲合力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM的IL-6拮抗剂活性(IC₅₀)。

[0206] 术语“序列同一性”、“百分比序列同一性”、“百分比同一性”、“%同一的”、“%同一性”及其变型,当在两个核酸序列的背景中使用,可互换地用于指当将查询核酸或查询核酸的部分就最大对应性与参照核酸相比较并比对时,在查询核酸或查询核酸的部分中是相同的核苷酸碱基的数目,除以(1)查询序列中在最5'对应的(即,对齐的)核苷酸碱基与最3'对应的(即,对齐的)核苷酸碱基之间(包括最5'对应的核苷酸碱基和最3'对应的核苷酸碱基)的核苷酸碱基的数目或(2)参照序列的总长度(以较大者为准)。可以例如通过Smith和Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482, 1981的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443, 1970的同源性比对算法,通过Pearson和Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444, 1988的相似性搜寻法,通过这些算法的计算机化执行(Wisconsin Genetics软件包, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. 中的GAP、

BESTFIT、FASTA和TFASTA)或通过目测观察(通常参见,Ausubel,F.M.等人,Current Protocols in Molecular Biology,由Greene Publishing Assoc.and Wiley-Interscience(1987)出版的)进行用于比较的序列的示例性比对。

[0207] 适合用于测定百分比序列同一性的算法的一个实例是用于基本局部比对搜索工具(在下文中称为“BLAST”)的算法,参见,例如,Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410,1990和Altschul等人,Nucleic Acids Res.,15:3389-3402,1997。用于进行BLAST分析的软件是可通过美国国家生物技术信息中心(在下文中称为“NCBI”)公共地获得的。用于使用可从NCBI获得的软件例如BLASTN(针对核苷酸序列)测定序列同一性的默认参数描述于McGinnis等人,Nucleic Acids Res.,32:W20-W25,2004中。

[0208] 如本文中所用,当描述核酸诸如IL-6适体(其序列与参照核苷酸序列具有至少例如约95%同一性)的百分比同一性时,意欲指除核酸序列可包括多达每100个参照核酸序列的核苷酸5个点突变外,所述核酸序列与参照序列相同。换句话说,为了获得期望的核酸序列(其序列与参照核酸序列具有至少约95%同一性),可删除或用另一种核苷酸取代参照序列中多达5%的核苷酸,或可将多达参照序列的核苷酸总数的5%的一定数目的核苷酸插入参照序列(在本文中被称为插入)。用于产生期望的序列的参照序列的这些突变可在参照核苷酸序列的5'或3'末端位置或这些末端位置之间的任何地方发生,单个地散布在参照序列的核苷酸之间或以一个或多个连续的组散布在参照序列内。此外,当核苷酸碱基(1)与参照序列中的核苷酸碱基相同时,或(2)来源于参照序列中的核苷酸碱基时,或(3)来源于参照序列中的核苷酸碱基所源自的相同核苷酸碱基时,为了测定百分比同一性,意欲将核苷酸碱基认为是“相同的”。例如为了计算百分比同一性,5-甲基胞嘧啶被认为与胞嘧啶“相同”。类似地,为了测定百分比同一性,图20和图24中显示的经修饰的尿苷被认为是彼此相同的。在一些实施方案中,参照序列可为SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、400至446、573和599至625中显示的核苷酸序列的任一个。在一些实施方案中,参照序列可为SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625中显示的核苷酸序列的任一个。

[0209] 在一些实施方案中,IL-6适体包含SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625的任一个中显示的核苷酸序列,其中1至20、1至15、1至12、1至8、1至5或1至3个核苷酸被取代、删除或插入。被取代、删除或插入的核苷酸的数目不受特别限制,只要适体以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC_{50})。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625的任一个的序列,IL-6适体包含不超过10个,在一些实施方案中,4、3、2或1个核苷酸取代、缺失和/或插入。

[0210] 在一些实施方案中,本公开内容提供了在结合IL-6后调节IL-6功能的IL-6适体。在一些实施方案中,本文中描述的IL-6适体抑制IL-6介导的STAT3的磷酸化。在各种实施方案中,适体在体内调节IL-6功能,诸如在体内抑制IL-6介导的STAT3磷酸化。在各种实施方案中,IL-6适体具有选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625的序列。在各种实施方案中,IL-6适体选自表2至4、10至13以及图23和25(例如,SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625)中显示的某些适体。在各种实施方案中,IL-6适体选自表2、10、或12或图23

或25中显示的适体,或以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6的表3和4的适体。在各种实施方案中,IL-6适体具有选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、400至446、573和599至625的序列。在一些实施方案中,IL-6适体包含选自表2至4、10至13以及图23和25(例如,SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625)中显示的某些适体的适体的12至80、或20至80、或25至80、或30至80个连续核苷酸,其中适体以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC50)。在一些实施方案中,IL-6适体包含选自表2至4、10至13以及图23和25(例如,SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625)中显示的某些适体的适体的至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个连续核苷酸,其中适体以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC50)。在一些实施方案中,IL-6适体由在核碱基序列上与选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、300至356、400至446、500至573和599至625的序列相同的至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个连续核苷酸组成,其中适体以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC50)。

[0211] 在一些实施方案中,IL-6适体包含选自表2至4、10、12以及图23和25(例如,SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、400至446、573和599至625)中显示的适体的某些适体的12至80、或20至80、或25至80、或30至80个连续核苷酸,其中适体以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC50)。在一些实施方案中,IL-6适体包含选自表2至4、10、12以及图23和25(例如,SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、400至446、573和599至625)中显示的某些适体的适体的至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个连续核苷酸,其中适体以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC50)。在一些实施方案中,IL-6适体由在核碱基序列上与选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、400至446、573和599至625的序列相同的至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个连续核苷酸组成,其中适体以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC50)。

[0212] 在一些实施方案中,IL-6适体包含选自表10或表12(SEQ ID NO:100至239、573和400至446)中显示的适体的适体的12至80、或20至80、或25至80、或30至80个连续核苷酸,其中适体以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC50)。在一些实施方案中,IL-6适体包含表10或表12(SEQ ID NO:100至239、573和400至446)中显示的适体的至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个连续核苷酸,其中适体以低于20nM的亲和力(K_d)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC50)。在一些实施方案中,IL-6适体由表10和12(SEQ

ID NO:100至239、573和400至446)中显示的适体的至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个连续核苷酸组成,其中适体以低于20nM的亲和力(Kd)特异性结合IL-6和/或具有低于10nM(10^{-8} M)的IL-6拮抗剂活性(IC50)。

[0213] 在本文中的任何实施方案中,IL-6适体可在适体的5'末端、3'末端或5'和3'末端上包含另外的核苷酸或其它化学部分。

[0214] IL-6适体,除了IL-6结合区以外,可含有任何数目的核苷酸。在各种实施方案中,IL-6适体可包含多达约100个核苷酸,多达约95个核苷酸,多达约90个核苷酸,多达约85个核苷酸,多达约80个核苷酸,多达约75个核苷酸,多达约70个核苷酸,多达约65个核苷酸,多达约60个核苷酸,多达约55个核苷酸,多达约50个核苷酸,多达约45个核苷酸,多达约40个核苷酸,多达约35个核苷酸,多达约30个核苷酸,多达约25个核苷酸和多达约20个核苷酸。

[0215] 在一些实施方案中,IL-6适体选自具有与选自SEQ ID NO:7、8、11、19至22、26至39、100至239、400至446、573和599至625的适体相似的结合特征和治疗IL-6相关炎症疾病、恶性疾病、感染、自身免疫性疾病和其中已牵涉IL-6的其它疾病或疾患的能力的适体。在一些实施方案中,提供了结合到与选自表2、10、12以及图23和25的任一个中显示的适体所结合的区域相同的IL-6的区域的IL-6适体。

[0216] 本发明的IL-6适体特异性结合成熟IL-6 (SEQ ID NO:10) (SEQ ID NO:9的氨基酸29至212;参见图21)。在一些实施方案中,提供了结合到与IL-6适体2573-20_136 (SEQ ID NO:101)所结合的区域相同的IL-6的区域的IL-6适体。在一些实施方案中,提供了结合包含成熟蛋白 (SEQ ID NO:10)的氨基酸16至31(前体序列 (SEQ ID NO:9)的氨基酸44至59;参见图21)的IL-6的区域(表位)的IL-6适体。该区域包括被IL-6适体2573-20_136 (SEQ ID NO:101)的“结构域1”衔接的相互作用表面。在一些实施方案中,提供了结合包含成熟蛋白 (SEQ ID NO:10)的氨基酸16至31和117至125(前体序列 (SEQ ID NO:9)的氨基酸44至59和145至153;参见图21)的IL-6表位的IL-6适体。该表位包括被IL-6适体2573-20_136 (SEQ ID NO:101)的“结构域1”和“结构域2”衔接的相互作用表面。极性接点被定义为氢键的总和与电荷间相互作用的总和。在一些实施方案中,提供了以小于0.01、小于0.009、小于0.008或约0.007的极性接点对界面面积的比率结合到IL-6的IL-6适体。

[0217] 在一些实施方案中,IL-6适体与IL-6适体2573-20_136 (SEQ ID NO:101)竞争对成熟IL-6,诸如包含SEQ ID NO:10(参见图21)的序列的IL-6的结合。在一些实施方案中,提供了结合到与IL-6适体2574-49_260 (SEQ ID NO:400)所结合的区域相同的IL-6的区域的IL-6适体。在一些实施方案中,IL-6适体与IL-6适体2574-49_260 (SEQ ID NO:400)竞争对成熟IL-6,诸如包含SEQ ID NO:10(参见图21)的序列的IL-6的结合。

[0218] 在一些实施方案中,提供具有下列特征的任意组合的IL-6适体:

[0219] (a) 结合到包含成熟蛋白的氨基酸16至31的成熟IL-6 (SEQ ID NO:10)的区域;

[0220] (b) 结合到包含成熟蛋白的氨基酸16至31和117至125的成熟IL-6 (SEQ ID NO:10)的表位;

[0221] (c) 与IL-6适体2573-20_136 (SEQ ID NO:101)竞争对成熟IL-6 (SEQ ID NO:10)的结合;和/或

[0222] (d) 以小于0.01、小于0.009、小于0.008或约0.007的极性接点对界面面积的比率

结合到成熟IL-6。

[0223] 在一些实施方案中,IL-6适体具有选自抑制IL-6对IL-6受体的结合、抑制STAT3磷酸化、抑制STAT3-驱动的转录和抑制IL-6-诱导的细胞增殖的活性。

[0224] 可选择IL-6适体具有任何合适的针对IL-6的解离常数(K_d)。在一些实施方案中,IL-6适体具有低于30nM、低于25nM、低于20nM、低于15nM、低于10nM、低于9nM、低于8nM、低于7nM、低于6nM、低于5nM、低于4nM、低于3nM、低于2nM或低于1nM的针对IL-6的解离常数(K_d)。可利用结合测定,使用多点滴定和拟合如下文实施例1中描述的公式 $y = (\text{最大值} - \text{最小值}) / (K_d + \text{蛋白质}) + \text{最小值}$,来测定解离常数。在一些实施方案中,IL-6适体是具有低于或等于表10和12(SEQ ID NO:100至239、573和400至446)中显示的适体的 K_d 的适体。在一些实施方案中,IL-6适体是具有低于或等于IL-6适体2573-20_136(SEQ ID NO:101)的 K_d 的适体。在一些实施方案中,IL-6适体是具有低于或等于IL-6适体2574-49_260(SEQ ID NO:400)的 K_d 的适体。

[0225] 在一些实施方案中,IL-6适体具有低于 10^{-8}M ($<10\text{nM}$)、低于 10^{-9}M 、低于 10^{-10}M 或低于 10^{-11}M 的IL-6拮抗剂活性(IC50)。在各种实施方案中,IL-6拮抗剂活性可使用例如细胞增殖测定和/或基因报告测定(参见,例如,实施例2和11)来测定。在示例性细胞增殖测定中,测量IL-6适体对IL-6响应细胞的细胞生长的抑制。在示例性基因报告测定中,在利用STAT基因转染的细胞中测定IL-6适体对STAT磷酸化的抑制。

[0226] 包含适体的药物组合物

[0227] 在一些实施方案中,提供了包含至少一种本文中描述的适体和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物。适合的载体描述于由Lippincott Williams&Wilkins出版的“Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版”,其通过引用并入本文。包含至少一种本文中描述的适体和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物还可包含一种或多种其它活性剂。

[0228] 本文中描述的适体可以以任何药学上可接受的剂型使用,所述剂型包括但不限于可注射剂型、液体分散体、凝胶、气溶胶、软膏剂、乳膏剂、冻干制剂、干粉剂、片剂、胶囊剂、控制释放制剂、快速融化制剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂、混合型即刻释放和控制释放制剂等。具体地,可将本文中所述的适体制剂:(a)以用于选自口服、经肺、静脉内、动脉内、鞘内、关节内、直肠、眼部、结肠、胃肠外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(local)、口腔、经鼻和局部(topical)施用的任一种的施用;(b)配制成选自液体分散体、凝胶剂、气溶胶、软膏剂、乳膏剂、片剂、囊片(sachet)和胶囊剂的任一种的剂型;(c)配制成选自冻干制剂、干粉剂、快速融化制剂、控制释放制剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂以及混合型即刻释放和控制释放制剂的任一种的剂型;或(d)其任意组合。

[0229] 用于肠胃外、真皮内或皮下应用的溶液或混悬剂可包括一种或多种下列成分:(1)无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;(2)抗菌剂诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;(3)抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;(4)螯合剂诸如乙二胺四乙酸;(5)缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和(5)用于调节张力的剂诸如氯化钠或右旋糖。pH可以用酸或碱,诸如盐酸或氢氧化钠来调节。肠胃外制剂可被封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制造的多剂量小瓶中。

[0230] 适于注射使用的药物组合物可包括无菌水溶液(当可溶于水)或分散液和用于临

时制备无菌注射液或分散液的无菌粉剂。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、聚乙氧基蓖麻油(Cremophor EL) (BASF,Parsippany,N.J.) 或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物应当是无菌的并且应当具有易于注射的流动性。所述药物组合物应在制造和储存条件下是稳定的,并且应当针对微生物诸如细菌和真菌的污染作用进行防腐保存。如本文中所用,术语“稳定的”意指保持在适合于向受试者施用的状态或条件。

[0231] 载体可为溶剂或分散介质,包括例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。适当的流动性可以例如通过使用包衣诸如卵磷脂,在分散体的情况下通过保持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来维持。微生物作用的防止可以利用各种抗菌剂和抗真菌剂来实现,例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下,优选地在组合物中包含等渗剂,例如糖,多元醇诸如甘露醇或山梨醇,和无机盐诸如氯化钠。注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包含延迟吸收的剂,例如,单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0232] 无菌注射液可通过将适当量的活性试剂(例如,IL-6适体)与根据需要的一种或一组上文中列举的成分掺入适当的溶剂中,然后过滤灭菌来制备。一般地,通过将至少一种IL-6适体掺入到含有基本分散介质和任何其它期望的成分的无菌媒介物中来制备分散液。在用于制备无菌注射液的无菌粉剂的情况下,示例性制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,所述两种方法都将产生IL-6适体加上来自其先前过滤灭菌的溶液的任何另外的所需成分的粉剂。

[0233] 口服组合物一般包括惰性稀释剂或可食用载体。它们可以被封装,例如,在明胶胶囊中或被压制成片剂。为了口服治疗施用的目的,IL-6适体可以掺入赋形剂并以片剂、锭剂或胶囊剂的形式使用。口服组合物还可使用流体载体来制备,以用作漱口水,其中流体载体中的化合物可被口服施用,以及漱口和吐出或吞下。可包含药学上相容的粘合剂和/或佐剂材料作为组合物的一部分。

[0234] 对于吸入施用,以气溶胶喷雾剂的形式从包含合适的推进剂,例如气体诸如二氧化碳、雾化液体的加压容器或分配器中,或以干粉形式从适当的装置递送所述化合物。对于经粘膜或经皮施用,将适合于待渗透屏障的渗透剂用于制剂中。此类渗透剂为本领域中通常已知的,且包括,例如,对于经粘膜施用,洗涤剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻用喷雾剂或栓剂来实现。对于经皮施用,将活性试剂配制成本领域通常已知的软膏、药膏、凝胶或乳膏。所述试剂也可制备成用于直肠递送的栓剂(例如,利用常规栓剂基质诸如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠剂的形式。

[0235] 在一些实施方案中,利用防止从体内快速消除的载体制备IL-6适体。例如,可使用控制释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用可生物降解的生物相容性聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对于本领域技术人员来说是显而易见的。材料也可以从Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc.商购获得。

[0236] 脂质体悬浮液(包括靶向受感染的细胞的具有单克隆抗体对病毒抗原的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。可根据本领域技术人员已知的方法,例如如美国专利No.4,522,811中描述的方法制备这些悬浮液。

[0237] 此外,适当时可IL-6适体的悬浮液制备成油性注射悬浮液。适合的亲脂性溶剂

或媒介物包括脂肪油,诸如芝麻油,或合成脂肪酸酯,诸如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。非脂质聚阳离子氨基聚合物也可用于递送。任选地,悬浮液还可包括适合的稳定剂或剂以增加化合物的溶解度并且允许制备高度浓缩的溶液。

[0238] 在一些情况下,可以特别有利的是以剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物以易于施用和剂量一致。如本文中使用的剂量单位形式是指适合作为单一剂量用于待治疗的受试者的物理上离散的单位;每一个单位含有与所需药用载体结合的经计算产生期望的治疗效果的预定量的IL-6适体。本文中描述的IL-6适体的剂量单位形式的规格取决于且直接依赖于特定IL-6适体的特征以及要实现的特定治疗效果,和配制用于治疗个体的此类活性试剂的技术上固有的局限。

[0239] 包含至少一种IL-6适体的药物组合物可包括一种或多种药用赋形剂。此类赋形剂的实例包括,但不限于粘合剂、填充剂、润滑剂、悬浮剂、甜味剂、调味剂、防腐剂、缓冲剂、润湿剂、崩解剂、泡腾剂和其它赋形剂。此类赋形剂在本领域中是已知的。示例性赋形剂包括:

(1) 粘合剂,其中包括各种纤维素和交联聚乙烯吡咯烷酮、微晶纤维素,诸如Avicel[®] PH101和Avicel[®] PH102、硅化微晶纤维素(ProSolv SMCC[™])、黄耆胶和明胶;(2) 填充剂诸如各种淀粉、乳糖、乳糖一水合物和无水乳糖;(3) 崩解剂,诸如藻酸、Primogel、玉米淀粉、轻度交联的聚乙烯吡咯烷酮、马铃薯淀粉、玉米淀粉和改性淀粉、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、羧基乙酸淀粉钠及其混合物;(4) 润滑剂,包括对待压制的粉末的流动性起作用的剂,包括硬脂酸镁、胶体二氧化硅,诸如Aerosil[®] 200、滑石、硬脂酸、硬脂酸钙和硅胶;(5) 助流剂诸如胶体二氧化硅;(6) 防腐剂,诸如山梨酸钾、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸及其盐,对羟基苯甲酸的其它酯类诸如对羟基苯甲酸丁酯、醇类诸如乙醇或苄醇、酚类化合物诸如苯酚,或四元化合物诸如苯扎氯铵;(7) 稀释剂诸如药学上可接受的惰性填充剂,诸如微晶纤维素、乳糖、磷酸氢钙、糖类,和/或任何上述物质的混合物;稀释剂的实例包括微晶纤维素,诸如Avicel[®] PH101和Avicel[®] PH102;乳糖诸如乳糖一水合物、无水乳糖和Pharmatose[®] DCL21;磷酸氢钙诸如Emcompress[®];甘露醇;淀粉;山梨醇;蔗糖;和葡萄糖;(8) 增甜剂,包括任何天然或人工甜味剂,诸如蔗糖、糖精蔗糖、木糖醇、糖精钠、环磺酸盐、阿斯巴甜和安赛蜜;(9) 调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯、橙香精、Magnasweet[®] (MAFCO的商标)、泡泡糖香精、水果香精等;和(10) 泡腾剂,包括泡腾剂对诸如有机酸和碳酸盐或碳酸氢盐。适合的有机酸包括,例如,柠檬酸、酒石酸、苹果酸、富马酸、己二酸、琥珀酸和海藻酸以及酸酐和酸式盐。适合的碳酸盐和碳酸氢盐包括,例如,碳酸钠,碳酸氢钠,碳酸钾,碳酸氢钾,碳酸镁,甘氨酸碳酸钠,L-赖氨酸碳酸盐和精氨酸碳酸盐。或者,只存在于所述泡腾剂对的碳酸氢钠组分。

[0240] 在各种实施方案中,本文中描述的制剂基本上是纯的。如本文中所用,“基本上纯的”意指活性成分(例如,IL-6适体)是存在的主要种类(即,以摩尔计,其比组合物中的任何其它单独的种类更加丰富)。在一个实施方案中,基本上纯的部分是在其中活性成分包含所有存在的大分子种类的至少50%(以摩尔计)的组合物。一般地,基本上纯的组合物将包含超过约80%的所有存在于组合物中的大分子种类。在各种实施方案中,基本上纯的组合物将包含至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%的所有存在于组合物中的大分

子种类。在各种实施方案中,将活性成分纯化至同质(通过常规检测方法不能在组合物中检测到污染种类),其中组合物基本上由单一的大分子种类组成。

[0241] 包含适体的试剂盒

[0242] 本公开内容提供包含本文中描述的IL-6适体中的任一种的试剂盒。此类试剂盒可包含例如(1)至少一种IL-6适体;和(2)至少一种药学上可接受的载体,诸如溶剂或溶液。另外的试剂盒组分可任选地包括,例如:(1)本文中鉴定的药学上可接受的赋形剂中的任何赋形剂,诸如稳定剂、缓冲剂等,(2)至少一个容器、小瓶或用于盛装和/或混合试剂盒组分的相似装置;和(3)递送装置。试剂盒组分可任选地包括,例如(1)可用于检测结合到适体的靶标分子的标记试剂,诸如荧光分子、染料等;(2)固体载体,诸如微阵列、珠粒等和(3)与聚合酶链式反应产物的定量相关的试剂,诸如嵌入荧光染料或荧光DNA探针等。

[0243] 治疗方法

[0244] 本公开内容提供了通过使用IL-6适体预防或治疗医学疾患(例如,缓解一个或多个医学疾患的症状)的方法。所述方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的IL-6适体。所述适体还可用于预防性疗法。在一些实施方案中,经腹膜内施用IL-6适体。在一些实施方案中,口服或经静脉内施用IL-6适体。

[0245] 用于治疗方法的IL-6适体可为:(1)本文中描述的IL-6适体,或其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0246] 个体或受试者可为任何动物(家养动物、家畜或野生动物),包括,但不限于猫、狗、马、猪和牛,优选地为人受试者。如本文中所用,术语患者、个体和受试者可互换使用。

[0247] 如本文中所用,“治疗”描述为了治疗疾病、疾患或病症的目的进行的患者的管理和护理,包括施用IL-6适体以预防疾病、疾患或病症的症状或并发症的发作;缓解疾病、疾患或病症的症状或并发症;或消除患者存在的疾病、疾患或病症。更具体地,“治疗”包括逆转、减弱、缓解、最小化、抑制或停止疾病(病症)状态、疾病进展、疾病病原体或其它异常状况的至少一个有害症状或效应。只要症状和/或病状改善,通常继续治疗。

[0248] 在各种实施方案中,公开的组合物和方法用于预防、治疗和/或改善炎性疾病、恶性疾病、感染、自身免疫性疾病和/或其中牵涉IL-6的其它疾病或疾患。可用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性炎性疾病包括类风湿关节炎、幼年特发性关节炎、全身发作幼年特发性关节炎、骨关节炎、败血症、哮喘、间质性肺疾病、炎性肠疾病、系统性硬化症、眼内炎症、格雷夫斯病、子宫内膜异位、系统性硬化症、成人斯蒂尔病、淀粉样蛋白A淀粉样变性、风湿性多肌痛、缓解型血清阴性对称性滑膜炎伴凹陷性水肿、白塞氏病、葡萄膜炎、移植物抗宿主病和TNFR-相关周期性综合征。可用本文中描述的IL-6适体治疗的恶性疾病包括癌症和癌症相关疾患。非限制性示例性癌症包括多发性骨髓瘤、白血病、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、恶病质、黑素瘤、子宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、胃肠道癌、肺癌、前列腺癌、肾细胞癌、转移性肾癌、实体瘤、非小细胞肺癌、非何杰金氏淋巴瘤、膀胱癌、口腔癌、骨髓增生性肿瘤、B细胞淋巴增生性疾病和浆细胞白血病。非限制性示例性癌症相关疾患包括非小细胞肺癌相关疲劳和癌症相关厌食症。可利用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性感染包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类T淋巴细胞病毒(HTLV)、脑型疟疾、泌尿道感染和脑膜炎球菌感染。可利用本文中描述的IL-6适体治疗的非限制性示例性自身免疫性疾病包括系统性红斑狼疮、系统性硬化症、多肌炎、包括巨细胞性动脉炎、高安动脉炎在内的血管炎综合症、

冷球蛋白血症、髓过氧化物酶抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关新月体性肾小球肾炎、类风湿血管炎、克罗恩病、复发性多软骨炎、获得性血友病A和自身免疫性溶血性贫血。可利用本文中描述的IL-6适体治疗的其它疾病包括,但不限于卡斯尔曼病、强直性脊椎炎、冠心病、类风湿关节炎的心血管疾病、肺动脉高压、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、特应性皮炎、银屑病、坐骨神经痛、II型糖尿病、肥胖症、巨细胞动脉炎、急性移植物抗宿主病(GVHD)、非ST段抬高型心肌梗死、抗-嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关性血管炎、视神经脊髓炎、慢性肾小球肾炎和高安动脉炎。

[0249] 在一些实施方案中,可将公开的化合物或其药学上可接受的盐或前体药物与其它活性剂组合施用。包含公开的IL-6适体的组合物可含有例如不止一种适体。在一些实施方案中,将含有一种或多种IL-6适体的组合物与一种或多种另外的剂组合施用以预防、治疗和/或改善炎症性疾病、恶性疾病、感染、自身免疫性疾病和/或其中牵涉IL-6的其它疾病或疾患。非限制性示例性另外的活性剂包括TNF- α 抑制剂、IL-1抑制剂、IL-23抑制剂、IFN- γ 抑制剂、IL-17抑制剂、IL-22抑制剂、IL-4/IL-13抑制剂、IL-13抑制剂、IL-5抑制剂和JAK抑制剂。非限制性示例性TNF- α 抑制剂包括英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、依那西普、赛妥珠单抗、AN0128(Anacor)、ART621(Arena Therapeutics)和抗-TNF- α 纳米抗体(诸如ATN-103、Pfizer)。非限制性示例性IL-1抑制剂包括阿那白滞素、卡那奴单抗、XOMA052(Xoma)和利纳西普。非限制性示例性IL-23抑制剂包括优特克单抗、布雷奴单抗、阿吡莫德。非限制性示例性IFN- γ 抑制剂是AMG811(Amgen)。非限制性示例性IL-17抑制剂包括AIN457(Novartis)、伊克塞珠单抗、AMG827(Amgen)和Rg4934(Roche)。非限制性示例性IL-22抑制剂是非扎奴单抗。非限制性示例性IL-4/IL-13抑制剂包括AMG317(Amgen)、匹曲白滞素、Nuvance和AIR645(Altair)。非限制性示例性IL-13抑制剂包括安芦珠单抗、来金珠单抗、CAT-354(MedImmune)和IMA-026(Wyeth)。非限制性示例性IL-5抑制剂是美泊利单抗。非限制性示例性JAK抑制剂包括托法替尼(tofacitinib)和鲁索利替尼。

[0250] 一般地,用于此类组合的已知治疗剂的目前可获得的剂型将是适合的。

[0251] “联合治疗”(或“协同治疗”)包括施用IL-6适体组合物和至少一种第二剂作为意欲从这些治疗剂的联合作用提供有益效果的特定治疗方案的部分。组合的有益效果包括,但不限于由治疗剂的组合产生的药代动力学或药效学联合作用。通常在确定的时期(通常为分钟、小时、天或周,这取决于选择的组合)中联合施用这些治疗剂。

[0252] “联合治疗”可以(但通常不)意欲包括施用这些治疗剂的两种或更多种作为单独的单一治疗方案的部分,其偶然地和任意地导致本公开内容的组合。“联合治疗”意欲包括以连续的方式施用这些治疗剂,即,其中在不同的时间施用每一种治疗剂,以及以基本上同时的方式施用这些治疗剂或至少两种治疗剂。基本上同时施用可以例如通过向受试者施用具有固定比率的每一种治疗剂的单次剂量或通过多次施用每一种治疗剂的单次剂量来实现。

[0253] 按照多个因素,包括例如受试者的类型、物种、年龄、体重、性别和医学病况、待治疗的疾患的严重度、施用途径、受试者的肾和肝功能以及所使用的具体适体或其盐来选择利用IL-6适体的给药方案。普通熟练医生或兽医可容易地确定和开出预防、抵抗或停滞疾患的进展所需的组合物的有效量。

[0254] 一般地,剂量,即治疗有效量,范围为每日约1ng/kg至约1g/kg的待治疗的受试者

的体重,在一些实施方案中,约1 μ g/kg至约1g/kg的待治疗的受试者的体重,在一些实施方案中,约1 μ g/kg至约100mg/kg的待治疗的受试者的体重,在一些实施方案中,约1 μ g/kg至约10mg/kg的待治疗的受试者的体重。

[0255] 用于诊断或检测的方法

[0256] 本文中描述的能够结合IL-6的适体可用作体外或体内诊断试剂。本文中鉴定的IL-6适体可用于可使用适体、寡核苷酸、抗体和配体(但不限于其)的任何诊断、检测、成像、高通量筛选或靶标确认技术或方法或测定。例如,可按照标题为“Multiplexed Analyses of Test Samples”的美国专利7,855,054(其通过引用整体并入本文)中详细描述的方法使用本文中鉴定的IL-6适体。

[0257] 本文中描述的能够结合IL-6的适体可用于多种测定,包括使用平面阵列、珠粒和其它类型的固体载体的测定。所述测定可用于多种环境,包括用于生命科学研究应用、临床诊断应用(例如,疾病的诊断测试,或预防性医疗保健的“健康”测试);ALONA和UPS测定以及体内成像应用。对于一些应用,可使用应用描述的IL-6适体的多重测定。

[0258] 在一些实施方案中,IL-6适体可作用于并入多种体外诊断法或试剂盒的非常灵敏和特异的试剂。在一些实施方案中,IL-6适体在许多感染性或其它类型的疾病检测法(其中针对IL-6的适体包括可检测材料和固定或捕获组分的一种或两种)中用作抗体的替代物。在这些实施方案中,将来自试剂盒的适体与临床样品混合后,可利用多种测定形式。在一个实施方案中,适体还包括可检测标记,诸如荧光团。在其它实施方案中,所述测定形式可包括荧光淬灭、杂交法、流式细胞术、质谱法、抑制或竞争法、酶联寡核苷酸测定、SPR、修饰波法等。在一些实施方案中,在试剂盒中将适体于溶液中提供。在其它实施方案中,将试剂盒中的适体固定至与用于测试样品的测定结合使用的固体载体上。在各种实施方案中,固体载体被设计用于检测一种或多种目标靶标。在其它实施方案中,试剂盒还可包括提取目标靶标的试剂、用于扩增适体的试剂、用于进行洗涤的试剂、检测试剂等。

[0259] 还提供了具有粘附于装置的固体表面的一种或多种IL-6适体的诊断或测定装置例如柱子、测试条或生物芯片。可这样放置适体以使其能够结合与固体表面接触的IL-6分子以形成保持粘附于装置表面的适体-靶标复合物,从而捕获靶标和使得能够检测和任选地定量靶标。可在这样的装置上提供一批适体(其可以相同或不同)。

[0260] 在用于检测IL-6的一个实施方案中,将适体亲和复合物或适体共价复合物与包含对于IL-6是特异的结合伴侣的标记剂接触。特异性结合伴侣可为任何适合的部分,包括抗体、抗体片段、合成抗体模拟物、生物模拟物、适体、分子印迹配体等。将特异性结合伴侣缀合或连接于另一种标记剂组分,通常为可检测部分或标记物。在用于检测IL-6的一个实施方案中,将适体亲和复合物或适体共价复合物与在无结合伴侣的情况下能够标记IL-6并且包含可检测部分或标记物的标记剂接触。

[0261] 所述可检测部分或标记物能够直接或间接地被检测到。一般地,可被检测的任何报告分子可为标记物。标记物包括,例如,(i)可通过产生信号直接检测的报告分子,(ii)可通过随后结合到含有报告分子的同源物来间接检测的特定结合对成员,(iii)可通过质谱法检测的质量标签,(iv)可提供用于扩增或连接的模板的寡核苷酸引物,和(v)可用作配体诸如,例如阻遏蛋白的特定多核苷酸序列或识别序列,其中在后二种情况中,寡核苷酸引物或阻遏蛋白将具有或能够具有报告分子等。报告分子可为催化剂,诸如酶、编码催化剂的多

核苷酸、启动子、染料、荧光分子、量子点、化学发光分子、辅酶、酶底物、放射性基团、小的有机分子、可扩增的多核苷酸序列、颗粒诸如乳胶或碳颗粒、金属溶胶、微晶、脂质体、细胞等，其可用或可以不用染料、催化剂或其它可检测基团、改变其所缀合于的分子的重量(为了质谱目的)的质量标签等来进一步标记。标记物可选自电磁或电化学材料。在一个实施方案中，可检测标记是荧光染料。基于本文中的公开内容，其它标记物和标记方案对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0262] 在另一个实施方案中，使用Q-PCR检测和/或定量适体亲和复合物或适体共价复合物。如本文中所用，“Q-PCR”是指以这样的方式和在这样的受控条件下进行的PCR反应，以便测定的结果是定量的，即，所述测定能够定量存在于测试样品中的适体的量或浓度。在用于检测和/或定量可存在于测试样品中的IL-6的示例性方法中，将测试样品与IL-6适体接触。使得能够形成包含结合到IL-6的适体的适体亲和复合物。如果测试样品含有IL-6，则适体亲和复合物将通常在测试样品中形成。使用适合于待使用的适体的方法将适体亲和复合物任选地转化成包含共价地结合到IL-6的适体的适体共价复合物。如本文中进一步所描述，在适体亲和复合物形成以及至适体共价复合物的任何任选的转化后，随后将可存在于测试样品中的任何游离适体从适体亲和复合物或适体共价复合物中分离出。随后使用用于多核苷酸的定量复制的已知技术定量适体亲和复合物或适体共价复合物。

[0263] 在一个实施方案中，使用TaqMan[®] PCR测定测试样品中的适体亲和复合物或适体共价复合物的量或浓度。该技术通常依赖于寡核苷酸复制酶的5'-3'外切核酸酶活性以从被靶向的序列产生信号。基于待定量的适体的序列选择TaqMan探针，所述探针通常包括5'-末端荧光剂，诸如例如6-羧基荧光素，和3'-末端淬灭剂，诸如，例如，6-羧基四甲基荧光素，用来当使用聚合酶链反应(PCR)扩增适体序列时产生信号。当聚合酶拷贝适体序列时，外切核酸酶活性使荧光剂从在PCR引物下游退火的探针游离出来，从而产生信号。随着复制产物产生，信号增强。PCR产物的量取决于进行的复制循环次数以及适体的起始浓度。

[0264] 在另一个实施方案中，在复制过程中使用嵌入荧光染料测定适体亲和复合物或适体共价复合物的量或浓度。所述嵌入染料，诸如，例如SYBR[®]绿在双链DNA存在的情况下产生相较于在单链DNA存在的情况下产生的荧光信号大的荧光信号。随着双链DNA产物在PCR过程中形成，由染料产生的信号增强。产生的信号的量级取决于PCR循环的次数以及适体的起始浓度。

[0265] 在另一个实施方案中，在复制过程中使用“分子信标”(参见，例如，Tyagi等人，Nat.Biotech.16:49-53,1998；美国专利No.5,925,517)来测定适体亲和复合物或适体共价复合物的量或浓度。分子信标是折叠成发夹环以及在发夹结构的一个末端含有荧光剂并且在另一个末端含有淬灭剂(以便当发夹形成时荧光剂几乎不产生或不产生信号)的特定核酸探针。环序列对于靶标多核苷酸序列是特异的并且，在与适体序列杂交后，发夹解折叠，从而产生荧光信号。

实施例

[0266] 提供下列实施例仅用于说明目的，并且无意限制如由所附权利要求确定的本发明的范围。本文中描述的所有实施例皆使用标准方法来进行，所述方法在对于本领域技术人

员来说是公知的和常规的。可如标准实验手册诸如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,(2001)中所描述,进行下列实施例中描述的常规分子生物学技术。

[0267] 实施例1.适体的选择和序列

[0268] A.候选混合物的制备

[0269] 通过与表1中显示的生物素化的ssDNA模板退火的DNA引物的聚合酶延伸来制备部分随机化的ssDNA寡核苷酸的候选混合物。候选混合物含有包含dATP、dGTP、dCTP和BndUTP (5-(N-苄基羧酰胺-2'-脱氧尿苷三磷酸)或NapdUTP (5-(N-萘基羧酰胺-2'-脱氧尿苷三磷酸)的40个核苷酸的随机化的盒。

[0270] 4nmol的具有2个生物素残基(在序列中指定为B')和40个随机位置(在序列中指定为N)的模板1(SEQ ID NO:1)和4.8nmol的包含Cy3荧光团的引物1(SEQ ID NO:2)于100 μ L 1X KOD DNA聚合酶缓冲液(Novagen)中组合,加热至95 $^{\circ}$ C,持续8分钟,随后在冰上冷却。将100 μ L引物:模板混合物添加至400 μ L的含有1X KOD DNA聚合酶缓冲液、0.125U/ μ L KOD XL DNA聚合酶和0.5mM的各dATP、dCTP、dGTP和BndUTP或NapdUTP的延伸反应中,并在70 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。通过添加1mL涂覆有链霉亲和素的磁珠(MagnaBind Streptavidin,Pierce,5mg/mL,于含有0.05%TWEEN-20的3M NaCl中)和在搅拌下于25 $^{\circ}$ C孵育10分钟来通过模板链生物素捕获双链产物。用0.75mL SB17T缓冲液(40mM HEPES,pH 7.5,102mM NaCl,5mM KCl,5mM MgCl₂,1mM EDTA,0.05%TWEEN-20)洗涤珠粒3次。利用1.2mL 20mM NaOH从珠粒洗脱适体链,用0.3mL 80mM HCl中和,以及用15 μ L 1M HEPES(pH 7.5)进行缓冲。用Centricon-30将候选混合物浓缩至约0.2mL,并且通过紫外吸收光谱来定量。

[0271] 表1.模板和引物的序列

核苷酸名称	序列(5'→3')	SEQ ID NO:
板1	AB'AB'TTTTTTTTGGTCTTGTCTTCTCTGTG-(N) ₄₀ -CTCGTCACACACTCACATC	1
物1	Cy3-GATGTGAGTGTGTGACGAG	2
物2	ATATATATGATGTGAGTGTGTGACGAG	3
物3	AB'AB'TTTTTTTTGGTCTTGTCTTCTCTGTG	4

[0273] B' = 生物素

[0274] B.靶标蛋白的制备

[0275] 通过将NHS-PE04-生物素(Pierce)共价偶联到赖氨酸残基来生物素化未标记的人IL-6(R&D Systems)。利用Sephadex G-25 microspin柱将蛋白质(300pmol,于50 μ L中)交换进SB17T中。将NHS-PE04-生物素添加至1.5mM并在4 $^{\circ}$ C下孵育反应16小时。利用Sephadex G-25 microspin柱除去未反应的NHS-PE04-生物素。

[0276] C.靶标蛋白的固定

[0277] 将靶标蛋白固定在MyOne-SA顺磁珠粒(MyOne SA,Invitrogen,或在下文中被称为SA珠粒)以进行第1轮SELEX。将IL-6于0.5mL SB17T中稀释至0.2mg/mL,并添加至0.5mL SA珠粒(用20mM NaOH预洗涤2次,并用SB17T洗涤1次)中。将混合物在25 $^{\circ}$ C下旋转30分钟,随后在4 $^{\circ}$ C下贮存直至使用。

[0278] D. 利用慢解离速率富集方法进行的适体选择

[0279] 利用候选混合物进行选择, 比较具有靶标蛋白的样品(信号S)与不具有靶标蛋白的样品(本底B)之间的结合。完成总共8轮SELEX过程, 选择亲和力和慢解离速率。

[0280] 对于每一个样品, 用10-20皮摩尔候选混合物(在第一轮中约100皮摩尔)于SB17T中制备90 μ L DNA混合物。将样品加热至95 $^{\circ}$ C持续3分钟, 随后以0.1C/秒的速率冷却至37 $^{\circ}$ C。将样品与10 μ L蛋白质竞争剂混合物(0.1% HSA, 10 μ M 酪蛋白和在SB17T中的10 μ M 凝血酶原)组合, 添加至0.5mg SA珠粒中, 并在37 $^{\circ}$ C搅拌下孵育5分钟。通过磁力分离取出珠粒。

[0281] 通过向40 μ L DNA混合物中添加10 μ L靶标蛋白(0.5 μ M, 于SB17T中)或SB17T以及在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟来进行结合反应。以不同的方式使用慢解离速率富集法。在第2至5轮中, 通过添加950 μ L SB17T(预加热至37 $^{\circ}$ C)将样品稀释20倍, 并在37 $^{\circ}$ C下孵育15分钟, 随后捕获复合物。在第6和第7轮, 通过添加950 μ L SB17T(预加热至37 $^{\circ}$ C)将样品稀释20倍。通过转移至950 μ L SB17T(预加热至37 $^{\circ}$ C)中将50 μ L的每一个稀释的样品再次稀释以产生总共400倍的稀释, 并在37 $^{\circ}$ C下孵育60分钟, 随后捕获复合物。在第8轮中, 通过添加950 μ L SB17T(预加热至37 $^{\circ}$ C)将样品稀释20倍。通过转移至950 μ L含有10mM硫酸葡聚糖(5kDa)的SB17T(预加热至37 $^{\circ}$ C)中将50 μ L的每一个稀释的样品再次稀释以产生总共400倍的稀释, 并在37 $^{\circ}$ C下孵育60分钟, 随后捕获复合物。

[0282] 通过添加0.25mg MyOne-SA珠粒(Invitrogen)并在搅拌下于25 $^{\circ}$ C孵育15分钟来经由蛋白质生物素将复合物捕获在SA珠粒上。通过用SB17T洗涤珠粒5次除去游离DNA。除非指出, 否则所有洗涤通过将珠粒重悬浮于100 μ L洗涤溶液中, 在25 $^{\circ}$ C下混合30秒, 利用磁铁分离珠粒和除去洗涤溶液来进行。适体链通过添加85 μ L 20mM NaOH并在搅拌下于37 $^{\circ}$ C孵育1分钟来从珠粒洗脱。在磁力分离后, 将80 μ L适体洗脱物转移至新管, 用20 μ L 80mM HCl中和, 随后用1 μ L 0.5M Tris-HCl(pH 7.5)进行缓冲。

[0283] E. 适体的扩增和纯化

[0284] 通过QPCR扩增和定量选择的适体DNA。将48 μ L DNA添加至12 μ L QPCR Mix(5X KOD DNA聚合酶缓冲液, 25mM MgCl₂, 10 μ M正向PCR引物(引物2, SEQ ID NO:3), 10 μ M生物素化反向PCR引物(引物3, SEQ ID NO:4), 5X SYBR Green I, 0.125U/ μ L KOD XL DNA聚合酶和1mM的每一种dATP、dCTP、dGTP和dTTP)中, 并利用下列方案在Bio-Rad MyIQ QPCR仪中进行热循环: 1个循环的99.9 $^{\circ}$ C, 15秒, 55 $^{\circ}$ C, 10秒, 68 $^{\circ}$ C, 30分钟, 30个循环的99.9 $^{\circ}$ C, 15秒, 72 $^{\circ}$ C, 1分钟。利用仪器软件进行定量, 并且将在靶标蛋白存在和不存在的条件下选择的DNA的拷贝数相比较以测定信号/本底比。

[0285] 扩增后, PCR产物经由生物素化的反义链被捕获在SA珠粒上。用0.5mL 20mM NaOH洗涤1.25mL SA珠粒(10mg/mL)2次, 用0.5mL SB17T洗涤1次, 将其重悬浮于1.25mL 3M NaCl + 0.05% Tween中, 并于4 $^{\circ}$ C下贮存。将25 μ L SA珠粒(10mg/mL, 于3M NaCl中)添加至50 μ L双链QPCR产物中, 并在搅拌下于25 $^{\circ}$ C孵育5分钟。用SB17T洗涤珠粒1次, 通过添加200 μ L 20mM NaOH并在搅拌下于37 $^{\circ}$ C孵育1分钟来从珠粒洗脱“正义”链。弃去洗脱的链, 用SB17T洗涤珠粒3次, 并用16mM NaCl洗涤1次。

[0286] 通过从固定的反义链进行引物延伸, 利用适当修饰的dUTP(BndUTP或NapdUTP)制备适体正义链。将珠粒重悬浮于20 μ L引物延伸反应混合物(1X引物延伸缓冲液, 1.5mM MgCl₂, 5 μ M正向引物(引物1, SEQ ID NO:2), 0.5mM的每一种dATP、dCTP、dGTP和BndUTP或

NapdUTP, 和0.125U/ μ L KOD XL DNA聚合酶)并在搅拌下于68℃孵育30分钟。用SB17T洗涤珠粒3次,随后通过添加85 μ L 20mM NaOH并在搅拌下于37℃孵育1分钟来从珠粒洗脱适体链。在磁力分离后将80 μ L适体洗脱物转移至新管中,用20 μ L 80mM HCl中和,随后用5 μ L 0.1M HEPES (pH 7.5) 进行缓冲。

[0287] F. 选择严格度和反馈

[0288] 选择步骤的相对靶标蛋白浓度如下在每一轮中响应S/B比率而下降,其中信号S和本底B在上文中D部分中进行了定义:

[0289] 如果 $S/B < 10$, 则 $[P]_{(i+1)} = [P]_i$

[0290] 如果 $10 \leq S/B < 100$, 则 $[P]_{(i+1)} = [P]_i / 3.2$

[0291] 如果 $S/B \geq 100$, 则 $[P]_{(i+1)} = [P]_i / 10$

[0292] 其中 $[P]$ = 蛋白质浓度并且 i = 当前轮数。

[0293] 在每一轮选择后,测定富集的DAN混合物的收敛状态。用含有1X SYBR Green I的4mM $MgCl_2$ 将10 μ L双链QPCR产物稀释至200 μ L。用75 μ L的硅油覆盖在样品上,并使用测量双链寡核苷酸的复杂混合物的杂交时间的 C_0t 分析来分析其收敛性。利用下列方案将样品进行热循环:3个循环的98℃,1分钟,85℃,1分钟;1个循环的93℃,1分钟,85℃,15分钟。在85℃下的15分钟内,以5秒的间隔测量荧光图像。将荧光强度作为 $\log$ (时间)的函数作图,对于每个SELEX轮观察到增加的杂交率,这表明序列收敛性。

[0294] G. 克隆筛选过程和适体鉴定

[0295] 在8轮SELEX后,将汇聚库进行克隆和测序。利用非生物素化的SELEX引物对选择的DNA进行PCR扩增以生成AGCT DNA,使用QIAquick 96PCR纯化试剂盒 (Cat#28181) 进行纯化,按照制造商的方案使用Stratagene PCR-Script克隆试剂盒 (Cat#211189) 克隆纯化的插入物。将连接的SELEX库送至测序供应商 (Cogenics, Houston, Texas) 进行转化,排列至96孔板中,进行DNA制备和测序。获得约42个克隆的序列,并使用测定序列计数/拷贝数和利用局部比对算法鉴定共同收敛模式的定制软件来分析其收敛。发现约42个克隆中的16个结合到链霉素和素。在其余克隆中,库中具有最高代表/拷贝数的序列和收敛于共同结合基序的序列被选择用于进一步表征。两个序列(一个Bn-dU和一个Nap-dU)被选择用于进一步分析,并且使用获自Cogenics的质粒DNA作为进行PCR扩增的模板来酶促制备。

[0296] H. 平衡结合常数 (K_d) 的测量

[0297] 在亲和力测定中测量选择的序列的平衡结合常数。将放射性标记的DNA在SB17T-0.002缓冲液 (40mM HEPES, pH 7.5, 125mM NaCl, 5mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 0.002% TWEEN-20) 中于95℃下加热3分钟,随后缓慢冷却至37℃。通过将低浓度的放射性标记的DNA ($\sim 1 \times 10^{-11}$ M) 与一系列浓度的靶标蛋白 (1×10^{-7} M至 1×10^{-12} M) 在SB17T-0.002缓冲液中混合,并在37℃下孵育30分钟来形成复合物。将每一个反应的一部分转移至尼龙膜,并干燥以测定每一个反应中的总的计数。复合物被捕获在ZORBAX树脂 (Agilent) 上,将其在真空下通过MultiScreen HV板 (Millipore),随后用200 μ L SB17T-0.002缓冲液洗涤以将蛋白质结合的复合物从未结合的DNA中分离出。对尼龙膜和MultiScreen HV板进行磷光成像,使用FUJI FLA-3000定量每一个样品中的放射量。将捕获的DNA的分数作为蛋白质浓度 (P_t) 的函数作图,并且使用 $y = (\text{最大值} - \text{最小值}) (P_t) / (K_d + P_t) + \text{最小值}$ 来测定平衡结合常数 (K_d)。两个选择的SOMAmer的序列及其针对IL-6的结合亲和力列于表2中。

[0298] 表2. 示例性Bn-dU和Nap-dU SOMAmer

寡核苷酸	序列 (5'→3')	SEQ ID NO:	K _d (nM)
[0299] 2573-20	GATGTGAGTG TGTGACGAGZ GGGCAGGZZZ GGZAZZAACA CGZZAAGZCG ZGGGGZCGCA CAGAGAAGAA ACAAGACC	7	3
2574-49	GATGTGAGTG TGTGACGAGG GGGPPAPGPA GCGAGPGCGP AAGGCGGPGG GCGAGGGAPC ACAGAGAAGA AACAAAGACC	8	2

[0300] Z=Bn-dU;和P=Nap-dU

[0301] 实施例2. 基于细胞的拮抗剂活性测定

[0302] 在体外细胞测定中筛选IL-6适体的对IL-6活性的抑制。

[0303] A. 细胞增殖测定

[0304] IL-6诱导人红白血病TF-1细胞增殖。将TF-1细胞在96孔板中以 1×10^4 个细胞/孔悬浮于含有10%FBS的RPMI1640培养基中,并在37℃下于5%CO₂培养箱中培养1天。在IL-6适体(2μM)存在或不存在的条件下将IL-6(0或10ng/mL)在水或SB18T缓冲液中于37℃下孵育30分钟,随后将其应用于含有0.5%FBS的RPMI 1640培养基中的细胞。在37℃下进行5天后,添加Alamar Blue™,将细胞在37℃下孵育另外3小时。利用照度计(Wallac 1420ARVO Light,Perkin Elmer)测量荧光(在560nm激发,在590nm发射)。结果示于图1中,其中每一比例尺代表针对无-SOMAmer对照标准化的4个实验的平均值±标准差。Bn-dU 2573-20(SEQ ID NO:7)和Nap-dU 2574-49(SEQ ID NO:8)都抑制IL-6诱导的TF-1细胞的增殖至无IL-6诱导的对照的水平。

[0305] B. 基因报告测定

[0306] IL-6通过转录因子STAT3发出信号。L4细胞是在STAT控制下用荧光素酶基因转染的HeLa细胞,其在通过IL-6诱导后表达荧光素酶,从而产生发光信号。将L4细胞在含有10%FBS的DMEM中以每孔 5×10^4 个细胞涂板在96孔板(Costar,No.3903)中,并在37℃下于CO₂培养箱中培养1天。在IL-6适体(10μM)存在或不存在的条件下将IL-6(0或10ng/mL)在水或SB18T中于37℃下孵育30分钟,随后将其应用于含有0.5%FBS的无酚DMEM中的细胞。在37℃下于CO₂培养箱中培养5小时后,弃去培养基,将荧光素酶底物试剂(Perkin Elmer#6016769)添加至细胞,在环境温度下进行1分钟。利用SpectraMax Plus(Molecular Devices)测量发光。结果示于图2中,其中每一个比例尺代表针对无-SOMAmer对照标准化的3个实验的平均值。这些结果与TF-1增殖测定一致。Bn-dU 2573-20(SEQ ID NO:7)和Nap-dU 2574-49(SEQ ID NO:8)抑制IL-6-介导的荧光素酶表达。

[0307] 实施例3. 序列截短研究

[0308] IL-6SOMAmer 2573-20(SEQ ID NO:7)的长度为78个核苷酸,具有Bn-dU修饰并且K_d= 3×10^{-9} M。产生2573-20(SEQ ID NO:7)的截短以确定较短的序列是否可维持高效的IL-6结合。在一些情况下,较短的适体显示增强的组织渗透和/或体内抗核酸酶活性的稳定性。较短的适体还可降低制造成本。

[0309] 通过从5'和/或3'末端产生一个或多个缺失来合成2573-20(SEQ ID NO:7)的一系列截短变体。某些截短适体的序列列于表3中。Z代表Bn-dU。在如上所述的亲和力结合测定中测试截短的适体对IL-6的亲和力。

[0310] 表3. SOMAmer 2573-20(SEQ ID NO:7)和截短的变体的序列和亲和力值(K_d)

[0311]

寡核苷酸	序列 (5'→3')	SEQ ID NO:	K _d (nM)
2573-20_3	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	11	1.5
2573-20_5	GCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	12	>1000
2573-20_6	CAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	13	>1000
2573-20_7	AGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	14	>1000
2573-20_8	GGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	15	>1000
2573-20_9	GZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	16	>1000
2573-20_10	ZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	17	>1000
2573-20_11	ZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZC	18	>1000
2573-20_12	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGGZ	19	1.4
2573-20_13	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGGG	20	1.9
2573-20_14	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGGG	21	2.8
2573-20_15	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZGG	22	1.0
2573-20_16	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZG	23	>1000
2573-20_17	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCGZ	24	>1000
2573-20_18	GGCAGGZZZGGZAZZAACACGZZAAGZCG	25	>1000

[0312] 变体2573-20_3 (SEQ ID NO:11) 保持IL-6结合活性,表明5'末端21个核苷酸 (2573-20 (SEQ ID NO:7) 的位置1-21) 不是结合IL-6所需要的。类似地,变体2573-20_15 (SEQ ID NO:22) 保持IL-6结合活性,表明3'末端25个核苷酸 (2573-20 (SEQ ID NO:7) 的位置54-78) 不是结合IL-6所需要的。变体2573-20_15 (SEQ ID NO:22) 被选择用于进一步表征。

[0313] IL-6 SOMAmer 2574-49 (SEQ ID NO:8) 的长度为79个核苷酸,具有Nap-dU修饰并且 $K_d = 2 \times 10^{-9} \text{M}$ 。产生2574-49 (SEQ ID NO:8) 的截短以确定较短的序列是否可维持高效的IL-6结合。某些截短变体的序列示于表4中。P代表Nap-dU。

[0314] 表4. SOMAmer 2574-49和截短变体的序列和亲和力值 (K_d)

[0315]

寡核苷酸	序列(5'→3')	SEQ ID NO:	K _d (nM)
2574-49_3	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	26	4.1
2574-49_6	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGG	27	3.5
2574-49_7	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGG	28	2.6
2574-49_8	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAG	29	1.2
2574-49_9	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGA	30	1.8
2574-49_10	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCG	31	1.9
2574-49_11	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGC	32	1.5
2574-49_12	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGG	33	1.1
2574-49_13	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGG	34	1.1
2574-49_14	GGGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPG	35	0.7
2574-49_15	GGGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	36	2.1
2574-49_16	GGPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	37	3.9
2574-49_17	GPPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	38	17
2574-49_18	PPAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	39	19
2574-49_19	PAPGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	40	>1000
2574-49_20	APGPAGCGAGPGCGPAAGGCGGPGGGCGAGGGA	41	>1000

[0316] 2574-49_14(SEQ ID NO:35)保持IL-6结合活性,表明至少2574-49(SEQ ID NO:8)的3'末端30个核苷酸(核苷酸50至79)不是结合IL-6所需要的。2574-49_18(SEQ ID NO:39)保持IL-6结合活性(尽管减小了约1/10),表明2574-49(SEQ ID NO:8)的5'末端23个核苷酸(核苷酸1至23)不是结合IL-6所需要的。截短变体2574-49_14(SEQ ID NO:35)被选择用于进一步表征。

[0317] 实施例4. SELEX库的深度测序

[0318] 为了更完全地评价2573-20和2574-49 SOMAmer家族内的序列,使用454焦磷酸测序技术对富集的库进行测序。对于每一个库,利用上述454引物扩增DNA,并纯化PCR产物和使用SequalPrep标准化板(Invitrogen, Cat#A10510-01)对其进行标准化。将洗脱物在凝胶上进行电泳以确认每一个扩增子的大小和纯度。在University of Colorado Health Science Center in Aurora CO的454焦磷酸测序设备上对纯化的PCR产物进行测序。

[0319] 实施例5. BndU SOMAmer 2573-20_15(SEQ ID NO:22)的修饰

[0320] A. 利用替代U修饰的单个取代

[0321] 在一些情况下,U修饰使得IL-6适体能够参与有利的与芳族氨基酸的相互作用和IL-6上的疏水性结合口袋。使用具有不同末端基团和接头长度的类似物的文库在不同的Bn-dU位置修饰适体2573-20_15(SEQ ID NO:22)。参见图3。在一些实施方案中,较长的接头可允许额外的旋转自由度和更好地接近蛋白质表面下的疏水区。

[0322] 评价了利用苯基乙基-dU(PE-dU)、苯基丙基-dU(PP-dU)或萘基甲基-dU(Nap-dU)对Bn-dU的单个取代对结合亲和力的作用。结果示于图4中。虽然未观察到亲和力的显著增强,但PE-dU在除8和14外的所有Bn-dU位置上被良好耐受,PP-dU在位置22、27和30上被耐受,以及Nap-dU在位置7、9和12上被耐受,其中观察到亲和力的略微增强。

[0323] B. 利用2'-O-甲基修饰的单个取代

[0324] DNA酶I (血浆中的主要核酸酶) 可以以不依赖于序列的方式水解DNA的磷酸二酯主链。核糖的2' 位置或非桥连氧上的主链修饰提供了对DNA酶I的核酸酶切割的抗性。核酸酶稳定性和血浆停留时间的显著增强已通过RNA适体的2'-F、2'-O-甲基和硫代磷酸酯修饰实现。评价了2573-20_15 (SEQ ID NO:22) 的每一个dA、dG和dC位置上的2'-O-甲基取代的耐受性。

[0325] 该实验的结果示于图5中。2'-O-甲基修饰在位置dC3、dG6、dA16-dC20和dC28上被良好耐受,甚至在位置dC3、dG6和dC28上引起亲和力的增强。

[0326] C. 利用C3-间隔子修饰的单个取代

[0327] 由被设计用来跨越与一个核苷酸相同的距离但缺少核糖糖或碱基的三碳接头组成的C3-间隔子取代提供DNA酶I抗性,并且还可被用于探测每一个位置上的核苷酸碱基相互作用,与用于蛋白质的丙氨酸扫描非常相似。评价了2573-20_15 (SEQ ID NO:22) 的每一个dA、dG和dC位置上的C3-间隔子取代的耐受性。

[0328] 实验的结果示于图5中。C3-间隔子修饰在位置dC18-dG21和dC28被耐受。该相同区域相对不受2'-O-甲基修饰影响,从而表明该区域可能未参与显著的蛋白质接触。

[0329] D. 被耐受的修饰的多个取代

[0330] 基于具有2'-O-甲基和C3-间隔子取代的某些变体的结合和抑制活性,通过组合被耐受的2'-O-甲基和C3-间隔子取代产生一系列变体。在基因报告测定中测试这些序列的结合和抑制活性。在变体2573-20_137 (SEQ ID NO:573) 的位置dC3、dG6、dA16、dA19、dC20和dC28上的6个2'-O-甲基取代的组合使结合亲和力提高了5倍。另外的2'-O-甲基或C3-间隔子取代在本实验中导致结合活性的丧失。还发现,变体2573-20_136 (SEQ ID NO:101) 中PE-dU对Bn-dU9的取代以及Nap-dU对Bn-dU12的取代导致增强的抑制活性,从而在基因报告测定中使IL-6的最大抑制增加至几乎100%, IC_{50} 值为 $5 \times 10^{-10} M$ 。参见图6 (●2573-20_15 (SEQ ID NO:22); ○2573-20_137 (SEQ ID NO:573); ▲2573-20_136 (SEQ ID NO:101))。除2573-136的位置12上的Nap-dU (2573-20_137 (SEQ ID NO:573) 中为Bn-dU) 外相同的变体2573-20_137 (SEQ ID NO:573) 与2573-20_136 (SEQ ID NO:101) 的比较显示,位置12上的NapdU取代导致增强的最大抑制。

[0331] 实施例6. NapdU SOMAmer 2574-49_14 (SEQ ID NO:35) 的修饰

[0332] 使用实施例5中描述的策略修饰截短的NapdU SOMAmer 2574-49_14 (SEQ ID NO:35)。适体2574-49_260 (SEQ ID NO:400) 是具有3个C3-间隔子修饰 (位置1、14和15) 的2574-49_14 (SEQ ID NO:35) 的变体并且以为2574-49_3 (SEQ ID NO:26) 的效力约30倍的效力抑制IL-6。参见图7 (●2574-49_3 (SEQ ID NO:26); ○2574-49_260 (SEQ ID NO:400))。2574-49_260 (SEQ ID NO:400) 的组成示于下表12中。

[0333] 实施例7. 适体在血清中的稳定性的评估

[0334] SELEX后适体截短和修饰对血清核酸酶的敏感性的作用通过将适体暴露于新鲜血清并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 将适体水解的程度定量为时间的函数进行评价。本研究中包括将所有Bn-dU残基被dT取代的Bn-dU SOMAmer 2573-20_15 (SEQ ID NO:22) 的变体 (2573-20_116 (SEQ ID NO:300)) 和所有Nap-dU残基被dT取代的Nap-dU SOMAmer 2574-49_14 (SEQ ID NO:35) 的变体 (2574-49_456 (SEQ ID NO:572)) 用作对照来测定经修饰的dU

位置对核酸酶稳定性的作用。在测定中测试的所有适体含有3'反向dT来保护适体免受3'至5'外切核酸酶活性的影响。

[0335] 将每一种适体在SB17T中稀释至0.5 μ M,并在37 $^{\circ}$ C下用90%的血清进行孵育。在从0至48小时的不同时间点吸取等分试样,用苯酚萃取一次,随后用氯仿萃取一次,用YM-10分子量截断过滤器进行浓缩。通过使用10%聚丙烯酰胺/尿素凝胶使PAGE变性来分析样品,并用SYBR金对适体染色。利用FUJI荧光成像分析仪FLA-3000对染色的DNA成像,并使用ImageGauge软件包测定每个时间点上完整适体的分数来定量。

[0336] 在37 $^{\circ}$ C下暴露于90%人血清48小时对SOMAmer 2573-20_136 (SEQ ID NO:101) (>95%完整)影响很小,而对照dT变体2573-20_116 (SEQ ID NO:300)几乎被完全降解(<5%完整),SOMAmer 2573-20_15 (SEQ ID NO:22)被部分降解(50%完整)。参见图8A(2573-20_136 (SEQ ID NO:101) (●)、2573-20_15 (SEQ ID NO:22) (○)、2573-20_116 (SEQ ID NO:300) (▲))。同样地,Nap-dU SOMAmer 2574-49_260 (SEQ ID NO:400)很大程度上不受该处理影响(>95%完整),而对照dT变体2574-49_456 (SEQ ID NO:572) (<5%完整)被明显水解。Nap-dU变体2574-49_14 (SEQ ID NO:35) (60%完整)也被少量水解。参见图8B(2574-49_260 (SEQ ID NO:400) (●)、2574-49_14 (SEQ ID NO:35) (○)、2574-49_456 (SEQ ID NO:572) (▲))。这些结果表明dU修饰可提供显著水平的抗内切核酸酶切割的保护作用,并且另外的主链2'-O-甲基修饰进一步稳定这些SOMAmer。在大鼠和食蟹猴血清中观察到类似结果。参见图8C。

[0337] 实施例8.2573-20_136 (SEQ ID NO:101)与2574-49_260 (SEQ ID NO:400)竞争对IL-6的结合

[0338] 为了确定在单独的SELEX实验中获得的SOMAmers 2573-20_136 (SEQ ID NO:101)和2574-49_260 (SEQ ID NO:400)是否结合IL-6上的重叠位点,进行结合竞争实验。通过被动吸附将IL-6蛋白耦合到微量滴定板(Nunc Maxisorp)的表面。将生物素化的SOMAmer 2573-20_136 (SEQ ID NO:101) (100pM)与不同浓度的SB18T缓冲液(40mM HEPES,pH 7.5, 102mM NaCl,5mM KCl,5mM MgCl₂,0.05%TWEEN-20)中的竞争剂(非生物素化的SOMAmer 2573-20_136 (SEQ ID NO:101)或2574-49_260 (SEQ ID NO:400),0.02-20nM)混合,随后添加到板。在500RPM振荡的情况下于25 $^{\circ}$ C孵育60分钟后,通过洗涤除去未结合的SOMAmer,随后将该板用耦合于辣根过氧化物酶(1 μ g/mL)的链霉亲和素孵育。按照标准方法,利用辣根过氧化物酶底物(TMB;3,3',5,5'-四甲基联苯胺)测量剩余的生物素化的2573-20_136 (SEQ ID NO:101)的量。将结合到IL-6的生物素化的2573-20_136 (SEQ ID NO:101)的百分比(相对于无竞争剂对照)作为竞争剂SOMAmer浓度的函数作图。参见图9(●2573-20_136 (SEQ ID NO:101);○2574-49_260 (SEQ ID NO:400))。随着2574-49_260 (SEQ ID NO:400)浓度的增加,结合的2573-20_136 (SEQ ID NO:101)的量减少,表明两种SOMAmer竞争对IL-6上的共同位点或重叠位点的结合。

[0339] 实施例9.适体2573-20_136 (SEQ ID NO:101)阻断IL-6对IL-6受体的结合

[0340] 以夹心测定形式测定SOMAmer 2573-20_136 (SEQ ID NO:101)对IL-6对可溶性IL-6受体(sIL-6R)的结合作用。通过被动吸附将sIL-6R(100ng)耦合到微量滴定板的表面。将生物素化的IL-6(50ng/mL)与不同浓度的PBST缓冲液(含有0.05%TWEEN-20的PBS)中的2573-20_136 (SEQ ID NO:101) (0-10 μ g)混合。在200RPM振荡的情况下于25 $^{\circ}$ C孵育120分钟

后,通过洗涤除去未结合的IL-6,按照标准方法,利用链霉亲和素辣根过氧化物酶测量剩余的生物素化的IL-6的量。将结合到sIL-6R的生物素化的IL-6的百分比(相对于无竞争剂对照)作为SOMAmer浓度的函数作图。参见图10。随着2573-20_136(SEQ ID NO:101)浓度的增加,结合的sIL-6R的量减少,表明SOMAmer阻断IL-6对其受体sIL-6R的结合。

[0341] 实施例10. 适体2573-20_136(SEQ ID NO:101)抑制猴的IL-6但不抑制大鼠的IL-6

[0342] 通过比较针对食蟹猴与大鼠的IL-6的结合和抑制性质来评价2573-20_136(SEQ ID NO:101)的直系同源交叉反应性。人与食蟹猴IL-6之间的氨基酸同一性为96%,而人与大鼠IL-6之间的同一性仅为39.9%。通过在CHO细胞中表达制备具有6-His标签的猴IL-6,并按照标准方案使用NTA柱进行纯化。通过ELISA测定IL-6蛋白的浓度。购买(R&D Systems)大鼠IL-6。

[0343] 2573-20_136(SEQ ID NO:101)以 $K_d=2 \times 10^{-9} \text{M}$ 结合到猴IL-6和 $K_d=6 \times 10^{-7} \text{M}$ 结合到大鼠IL-6。此外,在基因报告测定中2573-20_136(SEQ ID NO:101)以 $IC_{50}=9.7 \times 10^{-9} \text{M}$ 抑制猴IL-6活性。

[0344] 实施例11. 适体与抗体抑制效力的比较

[0345] 在细胞增殖测定中比较PEG-N-2573-20_136(2573-20_136(SEQ ID NO:101),其5'末端缀合有40kDa PEG)与抗-IL-6R抗体托珠单抗的IL-6抑制的效力。将U266B1细胞与PEG-N-2573-20_136或托珠单抗(0、1、10或100 $\mu\text{g/mL}$)一起按每孔 1×10^4 个细胞在96孔板中悬浮于含有10%FBS的RPMI 1640培养基中,随后在5%CO₂培养箱中于37℃下培养30分钟。在37℃下将IL-6(100ng/mL)应用于细胞,进行2天。添加Alamar Blue™,将细胞在37℃下孵育另外3小时。利用照度计(Wallac 1420 ARVO Light,Perkin Elmer)测量荧光(在560nm激发,在590nm发射)。结果示于表5中。值代表每一个浓度上3个实验(每一个实验3个孔)的平均值±标准误差。在无抑制剂对照组($0.0 \pm 15.7\%$, $n=3$)与PEG-N-2573-20_136或托珠单抗(Dunnett检验,双尾,* $p<0.05$,** $p<0.01$)之间观察到统计上显著的差异。PEG-N-2573-20_136在1 $\mu\text{g/mL}$ ($8.3 \times 10^{-8} \text{M}$)时实现了对IL-6的完全抑制,而托珠单抗在大致相等的摩尔浓度($6.7 \times 10^{-8} \text{M}$)时实现60%的抑制。

[0346] 表5. PEG-N-2573-20_136(2573-20_136(SEQ ID NO:101),其5'末端缀合有40kDa PEG)和托珠单抗对IL-6依赖性细胞增殖的抑制

[0347]	抑制剂	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	浓度 (M)	相对 IL-6 抑制(%)
	PEG-N-2573-20_136	1	8.3×10^{-8}	$101.2 \pm 3.8^{**}$
		10	8.3×10^{-7}	$121.2 \pm 6.2^{**}$
		100	8.3×10^{-6}	$126.9 \pm 4.9^{**}$
	托珠单抗	1	6.7×10^{-9}	15.1 ± 8.0
		10	6.7×10^{-8}	$60.7 \pm 21.6^*$
		100	6.7×10^{-7}	57.0 ± 4.7

[0348] 实施例12. 2573-20_136(SEQ ID NO:101)针对IL-6响应性肿瘤细胞的拮抗剂活性

[0349] IL-6受体在许多癌症(包括脑、前列腺和肾)中过表达,并且升高的IL-6配体和受体表达与差的患者存活相关。IL-6信号转导的抑制可遏制肿瘤细胞的生长、存活和/或转移潜能。针对PC3前列腺癌、HepG2肝癌和U87MG神经胶质瘤细胞测量PEG-N-2573-20_136

(2573-20_136 (SEQ ID NO:101), 其5'末端缀合有40kDa的聚乙二醇)对肿瘤细胞增殖的抑制。将细胞于含有10%FBS的F12K培养基(PC3细胞)或含有10%FBS的DMEM培养基(HepG2和U87MG细胞)中以每孔 1×10^4 个细胞涂板在96孔板中,并在5%CO₂培养箱中于37℃下培养1天。将PEG-N-2573-20_136 (SEQ ID NO:101) (10μg/mL)在37℃下应用于每一种培养基,进行7天。添加Alamar Blue™,将细胞在37℃下孵育另外1-3小时。利用照度计(Wallac 1420ARVO Light, Perkin Elmer)测量荧光(在560nm激发,在590nm发射)。结果示于表6中。值代表3个实验(每一个实验2个孔)的平均值±标准误差。PEG-N-2573-20_136遏制所有3种细胞类型的增殖。

[0350] 表6. 肿瘤细胞增殖的PEG-N-2573-20_136 (2573-20_136 (SEQ ID NO:101), 其5'末端缀合有40kDa的聚乙二醇)抑制

[0351]	细胞类型	缩写	相对增殖(%)
	前列腺癌	PC3	74.4±1.0
	肝癌	HepG2	85.0±6.6
	神经胶质瘤	U87MG	87.3±4.9

[0352] 在相同实验条件下,12种适体(10或100μg/mL)或抗-IL-6受体抗体托珠单抗(150或1500μg/mL)抑制肿瘤细胞增殖。结果示于表7中。值代表每一种适体或托珠单抗的3个实验(每一个实验3个孔)的平均值±标准误差。在对照(分别为U87MG:100.0±3.7%, HepG2:100.0±6.7%)与适体或托珠单抗(Dunnett检验,双尾,*p<0.05,**p<0.01)之间观察到统计上显著的差异。

[0353] 表7. 肿瘤细胞增殖的适体抑制

	抑制剂	SEQ ID NO	浓度 (μg/mL)	相对增殖(%)	
				U87MG	HepG2
[0354]	无	N/A	0	100.0 ± 3.7	100.0 ± 6.7
	托珠单抗	N/A	150	99.0 ± 3.2	88.5 ± 2.8
			1500	77.5 ± 4.6*	79.8 ± 3.9
	PEG-N-2573-20_136	101	10	87.3 ± 4.9	85.0 ± 6.6
			100	70.6 ± 1.9**	69.1 ± 0.4*
	PEG-N-2573-20_745	218	100	62.6 ± 3.4**	68.5 ± 0.4*
[0355]	PEG-N-2573-20_746	219	100	68.2 ± 1.0**	79.8 ± 2.9*
	PEG-N-2573-20_772	221	100	85.7 ± 3.3*	89.0 ± 8.0
	PEG-N-2573-20_773	222	100	67.8 ± 1.2**	72.1 ± 1.6*
	PEG-N-2573-20_780	224	100	67.1 ± 3.2**	75.6 ± 2.1*
	PEG-N-2573-20_834	232	100	84.9 ± 4.6	88.8 ± 8.6
	PEG-N-2573-20_835	233	100	80.5 ± 3.0*	79.9 ± 3.4*
	PEG-N-2573-20_836	234	100	67.6 ± 2.5**	77.6 ± 2.8*
	PEG-N-2573-20_837	235	100	71.4 ± 2.5**	84.6 ± 2.8
	PEG-N-2573-20_838	236	100	76.2 ± 2.0**	84.2 ± 6.1
	PEG-N-2574-49_260	400	100	76.3 ± 3.8*	72.4 ± 1.6*

[0356] 实施例13:结合到IL-6的适体2573-20_136 (SEQ ID NO:101)的晶体结构

[0357] 全长IL-6 (SEQ ID NO:9)由具有29个氨基酸的N末端信号肽和以上-上-下-下拓扑

结构排列的4个螺旋束的212个氨基酸组成(Somers等人,EMBO J.1997:989-997)。所述螺旋在历史上从N末端至C末端被称为A至D,每螺旋含有20-25个残基,以长环连接所述螺旋。N末端20个残基不采用任何二级结构并且在晶体结构中只有该柔性环的最后7个残基被分辨出。还有第5个具有11个残基(氨基酸141-152)的短螺旋存在于螺旋C与D之间的长环中,这是四螺旋束蛋白的长链家族中的共同特性(Mott,H.R.和Campbell,I.D.,Current Opinion in Str.Bio.,1995.5:114-121)。在该短螺旋之后C-D环的其余残基(氨基酸131-140)是无序的并且在晶体结构中是不可见的。同样地,长A-B环(氨基酸43-79)含有17个缺失残基(氨基酸44-60)。用于我们的结晶研究的形式包含基于全长人IL-6的氨基酸残基30-212。

[0358] 对于结晶研究,我们使用下文中显示的SOMAmer 2573-20_136(SEQ ID NO:101):

[0359] 5'-G₁G₂C₃A₄G₅G₆Z₇E₈G₁₀G₁₁P₁₂A₁₃Z₁₄Z₁₅A₁₆A₁₇C₁₈A₁₉C₂₀G₂₁Z₂₂Z₂₃A₂₄A₂₅G₂₆Z₂₇C₂₈G₂₉Z₃₀G₃₁G₃₂-3'
(SEQ ID NO: 101);

[0360] 其中Z为Bn-dU,E为PE-dU,P为Nap-dU,并且核苷酸3、6、16、19、20和28包含2'-OMe修饰。也参见表10。

[0361] 我们获得结合到SOMAmer 2573-20_136(SEQ ID NO:101)的人IL-6蛋白(编号基于成熟形式)的两种晶体结构(被称为1型和2型)。1型被解析成**2.40 Å**,并且每不对称单元含有一个IL-6分子和一个SOMAmer分子。2型被解析成**2.55 Å**,并且每不对称单元含有2个分子的IL-6(链A和C)和两个分子的SOMAmer(链B和D)。两个结构在总体上非常相似,并且可被分配至空间群P32。1型复合物可与来自2型的两个复合物(在898个原子上以**0.431 Å**的均方根偏差(RMSD)横跨链A(IL-6)和B(SOMAmer),在945个原子上以**0.456 Å**的RMSD横跨链C(IL-6)和D(SOMAmer))叠合。类似地,2型中的2个SOMAmer分子良好对齐,在655个原子上具有**0.537 Å**的RMSD。1型和2型结构都缺少IL-6的未结构化N末端的前13-15个残基以及连接螺旋的环区域中的残基和C末端上的残基(1型中的氨基酸130-135和2型中的氨基酸135-140)。此外,SOMAmer的核苷酸19和20在1型中缺失,但可在2型中被解析。由于1型和2型的结构几乎相同,因此使用2型中的完整IL-6:SOMAmer结构(特别地链A和B)进行此处报导的大部分分析。由链A(IL-6)和B(SOMAmer)组成的IL-6:SOMAmer复合物示于图11中。SOMAmer与IL-6四螺旋束的N和C末端极相互作用,包裹在与螺旋的长轴垂直的蛋白质周围。SOMAmer结合的结构中的IL-6的构象与在IL-6/IL-6Rα/gp130六聚体结构PDB ID 1P9M中观察到的基本相同(Boulanger,M.J.,等人,Science.2003.300:2101-2104)。这两个IL-6结构可在832个原子上以**0.717 Å**的RMSD叠合。参见图12。

[0362] 关于SOMAmer内的构象偏好,除2'-O-甲基C28、G1、G5、G10和G31(它们以顺式构象存在)外,所有碱基以反式核苷构象存在。大多数核糖以C2'-内构象(18/32)存在,其余以C1'-外切(6/32)、C3'-外切(3/32)、C3'-内切(2/32)、04'-内切(2/32)和C4'-外切(1/32)构象存在。参见下文中的表8。除以顺式构象存在的Bn-dU22外,所有经修饰的碱基以反式构象存在。

[0363] 表8:SOMAmer核糖构象

[0364]

折叠	残基	折叠	残基
C2'-内切	G1	C2'-内切	A17
C1'-外切	G2	C3'-内切	C18
C3'-内切	C3	C3'-外切	A19
C2'-内切	A4	C2'-内切	C20
C3'-外切	G5	C2'-内切	G21
C2'-内切	G6	O4'-内切	Z22
C3'-外切	Z7	C4'-外切	Z23
C2'-内切	Z8	C2'-内切	A24
C2'-内切	E9	C2'-内切	A25
C2'-内切	G10	C2'-内切	G26
C2'-内切	G11	C1'-外切	Z27
C2'-内切	P12	C2'-内切	C28
C1'-外切	A13	C2'-内切	G29
O4'-内切	Z14	C1'-外切	Z30
C1'-外切	Z15	C2'-内切	G31
C2'-内切	A16	C1'-外切	G32

[0365] SOMAmer可被分成基本上在IL-6的N末端 α -螺旋(螺旋A)上被劈开的两个结构上不同的结构域,每一个SOMAmer结构域与IL-6的螺旋A和一个其它螺旋相互作用。参见图11。结构域1包含核苷酸1-12和29-32并且含有由2个G四联体组成的G四分体基序以及5'和3'末端。结构域2采用由核苷酸13-28组成的茎-环基序。参见图13。

[0366] 结构域1:G四分体

[0367] 在结构域1中不存在Watson-Crick碱基对,其中大部分结构完整性来源于G四分体。每一个G四联体与位于该四联体的平面中的钠离子配位。四联体1含有G1、G6、G10和G32,而四联体2含有G2、G5、G11和G31。参见图14A。每一个G四分体以顺式构象含有2个碱基并以反式构象含有2个碱基。这允许每一个鸟苷碱基与在Watson-Crick面以及Hoogsteen面上的相邻鸟苷产生2个氢键。钠离子从而与C6上的羰基氧配位。

[0368] G四分体通过链的取向和糖苷的构象来分类。SOMAmer G四分体中的链按上-下-上-下运行,与3个侧环或沿边环(edgewise loop)生成反向平行G四分体核心。参见图14B。在对于具有连续G四链体链的3个环的26个可能的拓扑结构中,只有6个已凭经验确定。先前在凝血酶-结合DNA适体中看到该特殊的拓扑结构(Macaya, R.F., 等人, PNAS. 1993. 90(8): 3745-3749)。

[0369] 在G四分体结构域中存在5个经修饰的碱基,其中4个形成接触蛋白质的疏水表面。该疏水口袋被建立为来自Bn-dU7、Bn-dU8、Nap-dU12和Bn-dU30残基的侧链(被称为Bn7、Bn8、Nap12和Bn30)的不连续簇,所述侧链被G四分体的整体支架以产生一系列 π 堆积相互作用的方式相互拉近。参见图14C。Bn-dU8尿苷环与Nap12形成 π 堆积相互作用,而Bn8被夹在Nap-dU12与Bn-dU7的尿苷环之间,从而产生另外的 π 堆积相互作用。Bn8也被与其形成边对面 π 堆积相互作用的Bn7、Nap12和Bn30包围。在某种意义上,Bn-dU8核苷酸似乎用作同时衔接3个其它经修饰的核苷酸侧链以及2个碱基的疏水簇的核心。邻接结构域2的G29与Bn-dU30的碱基堆叠,所述碱基转而与G四分体的G11堆叠。该结构域中剩余的经修饰的核苷酸PE-dU9不与蛋白质相互作用,相反地在G四分体下方折起,尿苷环与G32堆叠并且经修饰的

侧链PE9被挤出进入溶剂。参见图14D。总之,结构域1的B-因子远低于结构域2的B-因子,最可能地因为G四分体为SOMAmer结构域的这一半提供刚性(数据未显示)。

[0370] 结构域1中的IL-6:SOMAmer相互作用

[0371] IL-6蛋白上的7个残基与SOMAmer的结构域1具有分子间接触。在N末端尾部中,R16氢与Hoogsteen面上的G29键合。参见图15A。此外,R16与堆叠在精氨酸的亚甲基侧链上的Bn30具有疏水性接触。疏水性分子间力在蛋白质-DNA相互作用中起着重要作用,如在与表面氨基酸的亚甲基侧链相互作用的经修饰的核苷酸的该重复主题中所看到的。IL-6蛋白质的N末端尾部存在于由DNA的异常弯曲产生的口袋中,其中其被夹在DNA主链之间并且遮蔽Bn7、Bn8、Nap12和Bn30的疏水簇以使之避免接触溶剂。参见图15B。SOMAmer主链的非典型弯曲被扭曲,以便磷酸基团相互靠近并指向溶剂,经修饰的碱基指向溶剂的相反方向,簇集在一起形成蛋白质样疏水核心。IL-6螺旋A的N末端上的R24与G5和G6之间的SOMAmer主链磷酸之间的盐桥赋予疏水核苷酸免于接触溶剂的额外保护作用。参见图15C。由位置7、8、12和30组成的经修饰的核苷酸簇明确地发挥SOMAmer本身的分子内结构基础以及接触蛋白质的疏水表面的双重功能。IL-6螺旋A上的Y31堆叠在Nap-dU12的尿苷环的顶部,从而将第四芳族环添加至也包括Bn8和Bn-dU7的碱基的 π 堆积相互作用的串。参见图15D。Nap-dU12的酰胺臂穿越至IL-6上的螺旋C,其中萘基,除了与Bn-dU8的尿苷环的 π 堆积相互作用外,还具有与M117的亚甲基侧链的疏水相互作用。参见图15B和14C。此外,Bn7堆叠在R24的侧链上,具有与K27的沿边相互作用和通过酰胺接头的羰基氧至R30的氢键。Bn7和Bn8也参与与螺旋C上的F125的边对面相互作用。参见图15F。

[0372] 结构域2:茎-环

[0373] SOMAmer的结构域2含有主要是B型DNA但在环区域具有轻微左扭转的茎-环。在3'末端上的茎的底部是2个未配对的碱基:Bn-dU27和C28。尽管形式上分配给结构域2,但这两个未配对的碱基连同茎的5'末端上的G26和A13可被认为是两个结构域之间的柔性铰链。G26和Bn-dU27的尿苷环具有弱的堆积相互作用,而Bn-dU27(Bn27)的苄基完全暴露于溶剂。参见图16A。类似地,C28不产生分子内或分子间接触,也被挤出进入溶剂。这两个未配对碱基随后是位于G26与A13之间的剪切的G-A碱基对(剪切:6.2 Å;弯曲:-34°;螺旋桨式扭转:-11°)以及采用B型螺旋构象的位于Bn-dU14与A25之间、Bn-dU15与A24之间、A16与Bn-dU23之间和A17与Bn-dU22之间的4个Watson-Crick碱基对。参见图16B。Watson-Crick碱基对还展示一系列与具有-14°(标准差(s.d.)26)的平均弯曲和-11°(s.d.9.2)的平均螺旋桨式扭转的理想B型角迥然不同的弯曲和螺旋桨式扭转参数。茎的顶部的四环由C18、A19、C20和G21形成。通常在四环内,C18和G21形成显著扭曲的碱基对,其特征是两个具有不规则剪切(1.1 Å)、拉伸(3.4 Å)、交错(1.4 Å)、弯曲(32°)、螺旋桨式扭转(-52°)和开口(-61°)参数的拉伸的氢键(3.5 Å和3.8 Å)。H键在C18的Watson-Crick面与G21的Hoogsteen边之间形成,而G21的Watson-Crick面参与对称配合的C20的晶体接触。此外,G21的顺式构象导致A17:Bn-dU21与C18:G21碱基对之间的略微左扭转(-18°)。G21碱基与茎中的Bn-dU22堆叠,然而,C18、A19和C20不参与任何分子内或分子间接触。C20碱基被部分挤出进入溶剂,而A19完全暴露于溶剂。参见图16C。

[0374] 结构域2茎-环结构在位置14、15、22、23和27上含有5个经修饰的苄基核苷酸。在这

些核苷酸中,只有铰链区中的Bn-dU27不接触蛋白质。其余经修饰的核苷酸全部通过尿苷环参与碱基配对,而苄基指向螺旋外并朝向蛋白质。疏水口袋通过来自Bn22、Bn23和Bn15的苄基的非堆叠成簇排列产生。参见图16D。Bn14的尿苷环与Bn15的酰胺堆叠,并且苄基指向Bn22、Bn23和Bn15的苄基簇的相反方向但指向IL-6蛋白。参见图16E。Bn-dU14核苷酸桥连结结构域1与结构域2的蛋白质相互作用,然而不参与任一疏水簇。

[0375] 结构域2中的IL-6:SOMAmer相互作用

[0376] 大部分IL-6与SOMAmer的结构域2的相互作用在性质上是疏水的。Bn15、Bn22和Bn23的苄基在由螺旋A上的R30、L33和D34以及螺旋D上的Q175、L178和R179的侧链的非极性部分产生的疏水口袋中紧靠着IL-6上的螺旋。参见图17A。在疏水簇外的Bn14的苄基与Y31具有边对面相互作用以及与K27和R30的亚甲基侧链具有沿边相互作用。参见图17B。两个盐桥也存在于位于主链A13磷酸与K27之间以及Bn-dU14磷酸与R30之间的该结构域中,两个氨基酸残基来自螺旋A。参见图17C。

[0377] 全部IL-6:SOMAmer相互作用的完整列表概述于表9中。经计算的溶剂可及表面积(S.A.S)对于IL-6蛋白为 $8696 \text{ \AA}^2$,对于SOMAmer为 $6672 \text{ \AA}^2$,以及对于复合物为 $12872 \text{ \AA}^2$ 。界面的溶剂排除表面从而为 $1248 \text{ \AA}^2$,计算为 $[(S.A.S_{IL-6} + S.A.S_{SOMAmer}) - S.A.S_{\text{复合物}}]/2$ 。该值与先前报告的 $1225 \text{ \AA}^2$ 的PDGF-BB SOMAmer的溶剂排除面积相似(Davies等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2012.109:19971-19976)。

[0378] 表9.蛋白质-SOMAmer相互作用

蛋白质-SOMAmer 相互作用**盐桥**

Arg24 至 G5-G6 上的 SOMAmer 主链磷酸

Arg30 至 Z14 上 SOMAmer 主链磷酸

Lys27 至 A13 上 SOMAmer 主链磷酸

氢键

G29 Haogsteen 面至 arg16

BndU7 羰基至 Arg30

疏水相互作用

[0379]

- | | | |
|----|---------|---|
| 1. | BndU7 | Arg24 的亚甲基侧链
Lys27 的的亚甲基侧链
与 Phe125 的边对面 |
| 2. | BndU8 | 与 Phe125 的边对面 |
| 3. | NapdU12 | 尿昔与 tyr31 堆叠
苺基至 Met117 的亚甲基侧链 |
| 4. | BndU14 | Lys27 的亚甲基侧链
Arg30 的亚甲基侧链
与 Tyr31 的边对面 |
| 5. | BndU15 | Arg30 的亚甲基侧链
Leu178 的亚甲基侧链 |
| 6. | BndU22 | Gin175 的亚甲基侧链
Leu178 的亚甲基侧链
Arg179 的亚甲基侧链 |
| 7. | BndU23 | Arg30 的亚甲基侧链
Asp34 的亚甲基侧链 |
| 8. | BndU30 | Arg16 的亚甲基侧链 |

[0380] 受体模仿

[0381] 被SOMAmer衔接的IL-6上的结合界面与参与IL-6对其两个细胞表面受体IL-6R α 和gp130的结合的区域广泛重叠。SOMAmer的结构域1占据专门参与对gp130的结合的结合位点,而结构域2主要占据IL-6R α 的结合位点。参见图18A和18B。当考虑结合表面的总体重叠时,SOMAmer以类似于受体的方式衔接IL-6的程度仅部分明显。特异性相互作用的考虑说明了甚至更大程度的受体模仿。

[0382] 结合到IL-6R α 受体和信号传导受体gp130的IL-6的六聚体结构鉴定了IL-6上参与蛋白质间相互作用的3个表面(Boulanger,M.J.,等人,Science.2003.300:p2101-2104)。位点I由螺旋A和D组成,其与IL-6R α 以埋藏 $\sim 1200 \text{ \AA}^2$ 。该界面上的IL-6R α 上的关键残基是F229和F279。F229与IL-6的螺旋D上的R179和Q183的亚甲基侧链具有沿边相互作用。F279也与对面上的R179的亚甲基侧链相互作用并位于由螺旋D上的R179、Q175、L178以及螺旋A上的L33和R30的非极性侧链产生的疏水口袋中。这是被SOMAmer结构的结构域1内的Bn22占据的相同疏水口袋,其中唯一的差异是Bn22的苺基相对于F279的 $\sim 70^\circ$ 的旋转。参见图19A。在SOMAmer中不存在在与F229相同的IL-6的表面上相互作用的核苷酸。

[0383] IL-6/IL-6R α 异二聚体是形成的第一复合物,随后gp130分别结合到IL-6和IL-6R α

上的位点IIa/b。位点IIa也隐藏 $\sim 1200 \text{ \AA}^2$ 并且包括IL-6的螺旋A和C。gp130上的残基F169主要通过与非极性侧链的疏水相互作用与螺旋A上含有L19、R24、K27和Y31的表面相互作用。这些残基是参与SOMAmer对IL-6的结合的相同残基中的许多残基。此外，F169占据IL-6/IL-6R α /gp130结构中IL-6-SOMAmer结构中的Bn7、Bn8和Nap12相同的结合口袋。参见图19B。IL-6:SOMAmer结构中的G6与Bn-dU7之间的SOMAmer主链占据与六聚体结构中的gp130上的W142相同的位点。参见图19C。W142与IL-6的F125具有边对面相互作用以及与螺旋C上的K128、和Q124的非极性侧链具有疏水相互作用。参见图19C。六聚体结构中的第二gp130分子结合到IL-6上的位点III，该位点位于四螺旋束的相对极并且不含与SOMAmer的重叠结合位点。被SOMAmer和受体衔接的IL-6上的表面的广泛重叠与观察到的SOMAmer抑制IL-6-介导的作用的能力相一致。

[0384] G四分体结构域片段的活性和其SELEX后修饰

[0385] 为了确定在SOMAmer中观察到的2个结构域是否代表独立的结合单元，我们分析结构域1和2的几个变体。代表茎-环结构域的各种形式的片段在高至 $1\mu\text{M}$ 的蛋白质浓度时不显示可察觉的对于IL-6的结合亲和力(数据未显示)。相反地，含有由位置1-12和29-32组成的G四分体结构域的片段(C3间隔子连接两个序列区域)(2573-20_324(SEQ ID NO:319))展示约200nM的对IL-6的结合亲和力。该16个核苷酸的片段对应于完整G四分体结构域，其中C3间隔子替代连接全长SOMAmer中的G四分体的两个区域的茎-环结构域。该G四分体片段的结合亲和力相较于全长SOMAmer约为其1/1000。然而，就结合自由能 ΔG (其对于全长SOMAmer为 -13.7kcal/mol 和对于G四分体片段为 -9.5kcal/mol)而言，G四分体结构域似乎为全长SOMAmer的总体结合亲和力作出主要贡献。G四分体片段的无规序列类似物直至 $1\mu\text{M}$ 的IL-6浓度未显示结合。

[0386] 除了维持大部分结合亲和力外，G四分体片段还在上述基因报告测定中维持其在体外抑制IL-6介导的作用的能力。

[0387] 始于2573-20_324(SEQ ID NO:319)，我们检查用替代5-位置取代基的集合取代5个经修饰的核苷酸的每一个的作用。在5个经修饰的dU残基的每一个上引入的15个替代5-位置取代基的作用概述于图22中，其中将参照(母体)序列的亲亲和力的变化表达为解离常数的比率(变体的 K_d 值除以参照配体2573-20_324(SEQ ID NO:319)的 K_d 值)。在15个替代部分的组中，G四分体片段的5个经修饰的核苷酸位置根据它们对取代的敏感性而变化。位置9是最耐受取代的，15个替代中有13个基本上是中性的并且显示低于2倍的对结合亲和力的作用。鉴于位置9上的经修饰的核苷酸侧链不与蛋白质接触反而暴露于溶剂的事实，这并不是预料之外的。然而，在位置8和12上，大多数取代是略微不利的，并且没有一个导致亲和力的增强(位置12在2573-20_324(SEQ ID NO:319)对3573-20(SEQ ID NO:7)中已从苄基改变成萘基)。对于位置30也是如此，除用更小的异丁基对苄基的替代外，所述替代导致约6倍的亲和力的增强。相反地，位置7对修饰有些敏感，在有利和不利的方向上观察到显著的亲和力变化。用非芳族侧链替代芳族苄基在位置7上通常是不利的并且导致 >100 倍的亲和力的降低。利用更大的芳族官能团的替代在另一方面导致亲和力增强。通过利用一个这样的取代(MBn-dU)，观察到100倍的亲和力增强。按照绝对亲和力，这翻译成1nM的 K_d 值。结合亲和力的增强也反映在体外抑制活性的20倍的增强。

[0388] 实施例14. 分析SELEX库以确定结合共有序列

[0389] 为了更完全地评价2573-20SOMAmer家族和2574-49SOMAmer家族内的序列,使用如上述在实施例4中所述的454焦磷酸测序技术对富集的库进行测序。

[0390] 随后分析序列以鉴定具有与2573-20_136 (SEQ ID NO:101) 中的基序相似的G四分体基序的另外的IL-6结合SOMAmer。鉴定了几个似乎具有G四分体基序的更加独特的SOMAmer序列,所述SOMAmer序列中的许多序列以多个拷贝存在于最终的SELEX库中。图23显示似乎具有G四分体基序的示例性独特的SOMAmer序列,所述序列代表最终的SELEX库中1600多个克隆。对于每一个SOMAmer,只显示随机区域的序列。

[0391] 图25显示与2574-49相似的示例性独特的SOMAmer序列。对于每一个SOMAmer,只显示随机区域的序列。

[0392] 实施例15.SOMAmer 2573-20_136 (SEQ ID NO:101) 对具有胶原诱导性关节炎的食蟹猴中的关节炎的作用

[0393] IL-6是与类风湿关节炎相关的炎症应答的重要调节剂。胶原诱导性关节炎 (CIA) 是已建立的用于研究食蟹猴的类风湿关节炎的自身免疫模型。在该模型中评价PEG-N-2573-20_136 (2573-20_136 (SEQ ID NO:101), 5'末端缀合有40kDa的PEG) 对关节炎的严重度的作用。

[0394] 3-5岁的雌性食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 购自Guangxi Grandforest Scientific Primate Company, Ltd (广西, 中国)。所有牵涉动物的方法由实验室动物管理和使用委员会批准。将牛II型胶原 (4mg/mL, K41S II型胶原, Collagen Research Center, Tokyo, Japan) 与弗氏完全佐剂 (Becton Dickinson, Grayson, GA, USA) 等比例混合, 随后使用冷却的注射器悬浮以制备乳剂。将乳剂皮内注射进背上的19个部位, 和尾根部上的一个部位 (总共2mL/只)。在第一次致敏后21天, 再次施用2mL的乳剂。以与第一次致敏相同的方式进行第二次致敏。在第一次致敏后将PEG-N-2573-20_136 (2573-20_136 (SEQ ID NO:101), 5'末端缀合有40kDa的PEG) (1或10mg/mL/kg) 注射进前臂头静脉, 每天4次, 进行11天半 (总共46次注射)。以相同方式 (1mL/kg) 给对照组施用用于PEG-N-2573-20_136给药溶液的媒介物。

[0395] 在第一次致敏前6天和致敏后第6、13、20、27和34天, 评价所有猴子的关节炎评分 (关节的肿胀和僵硬水平)。检查的关节包括掌指、近端指间、远端指间、腕、踝、肘和膝 (总共64个关节/只)。在通过肌肉注射盐酸氯胺酮 (Kamud Drugs Pvt., Ltd., 0.2mL/kg, 10mg/kg) 麻醉后, 根据下面显示的肿胀和僵硬的评价标准进行检查; 0分: 无异常, 1分: 肿胀不可见, 但可通过触摸来确定, 2分: 肿胀略微可见, 并且可以通过触摸来确认, 3分: 肿胀清晰可见, 关节可以完全挠曲, 4分: 肿胀清晰可见, 但关节不能完全挠曲, 5分: 关节僵硬。每只动物的关节炎评分为64个关节的单个评分的总和。关节炎评分由指定的技术人员以盲方式来判断。

[0396] 关节炎评分的结果示于图26中。每一个比例尺代表每一组中的关节评分的平均值±标准误差 (n=4)。通过重复测量ANOVA, 随后进行Dunnett检验 ($P < 0.05$ 对0mg/kg/时间组) 在10mg/kg/时间组的PEG-N-2573-20_136 (2573-20_136 (SEQ ID NO:101), 5'末端缀合有40kDa的PEG) 中注意到统计上显著的减少。

[0397] 实施例16. 增强核酸酶稳定性和拮抗剂活性的2573-20_136 (SEQ ID NO:101) 的另外修饰

[0398] 在一些情况下,可利用2'-O-甲基、2'-氟和硫代磷酸酯(PS)键联实现核酸酶保护作用。筛选具有2'-O-甲基U、硫代磷酸酯、C3-间隔子和HEG取代的组合的2573-20_136(SEQ ID NO:101)的变体的亲和力和抑制活性以鉴定另外的活性IL-6抑制剂。也在某些位置上测试替代U修饰。参见图24。表10显示一系列经发现具有在 10^{-11} M至 10^{-8} M范围内的 IC_{50} 的变体。SOMAmer 2573-20_745(SEQ ID NO:218)在每一个位置上具有保护性主链取代(18个2'-O-甲基,12个硫代磷酸酯和替代dA19和dC20的HEG),并且保持IL-6拮抗剂活性(在基因报告测定中 $IC_{50}=4 \times 10^{-9}$ M)。表11显示一系列经发现具有大于 10^{-8} M的 IC_{50} 的变体。

[0399] 表10.具有在 10^{-11} M至 10^{-8} M范围内的 IC_{50} 的2573-20_136(SEQ ID NO:101)的变体

变体	序列	IC_{50} (M)	SEQ ID NO
2573-20_135	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Bn-G-G-Bn-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2.4E-10	100
2573-20_136	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.0E-10	101
2573-20_137	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Bn-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.0E-10	573
2573-20_197	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-C3-C ¹ -G-Bn-G-G	6.5E-10	102
2573-20_198	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.2E-10	103
2573-20_199	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C3-G-Bn-G-G	2.7E-10	104
2573-20_200	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-C3-C3-G-Bn-G-G	5.5E-10	105
2573-20_202	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Heg-G-Bn-G-G	6.9E-10	106
2573-20_203	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2.2E-10	107
2573-20_204	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4.9E-10	108
2573-20_205	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C3-C3-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.1E-10	109
2573-20_208	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-BT-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.1E-10	110
2573-20_209	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-MBn-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.5E-10	111
2573-20_210	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-NE-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	6.1E-10	112
2573-20_217	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.6E-10	113

[0401]	2573-20_235	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Pe-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4.1E-10	114
	2573-20_258	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -U ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.5E-10	115
	2573-20_259	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-U ¹ -Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4.2E-09	116
	2573-20_263	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-U ¹ -A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.4E-09	117
	2573-20_264	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-U ¹ -Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.5E-09	118
	2573-20_265	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-U ¹ -A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.6E-09	119
	2573-20_268	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.9E-09	120
	2573-20_273	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5.6E-10	121
	2573-20_274	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.7E-09	122
	2573-20_278	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-FBn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	4.4E-10	123
	2573-20_280	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-FBn-Tyr-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.4E-10	124
	2573-20_282	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.2E-11	125
	2573-20_283	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.1E-11	126
	2573-20_284	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	8.9E-11	127
	2573-20_285	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-FBn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	2.2E-09	128
	2573-20_286	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Bn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	3.8E-10	129
	2573-20_287	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	3.9E-10	130
	2573-20_288	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-FBn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	6.0E-10	131
	2573-20_289	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1.1E-10	132
	2573-20_290	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.9E-10	133
	2573-20_291	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.8E-11	134

[0402]	2573-20_292	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1.4E-09	135
	2573-20_293	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1.1E-09	136
	2573-20_297	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Heg-G-Bn-G-G	5.1E-09	137
	2573-20_300	G ⁰ -G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	7.4E-09	138
	2573-20_301	G-G ⁰ -C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4.1E-09	139
	2573-20_304	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G ⁰ -Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.3E-09	140
	2573-20_305	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G ⁰ -Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	4.3E-09	141
	2573-20_306	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G ⁰ -Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2.6E-09	142
	2573-20_307	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G ⁰ -Bn-G-G	4.2E-09	143
	2573-20_309	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G ⁰	2.0E-09	144
	2573-20_310	G-G-C ¹ -A ⁰ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2.6E-09	145
	2573-20_311	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A ⁰ -Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.1E-09	146
	2573-20_312	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	8.3E-10	147
	2573-20_313	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.3E-09	148
	2573-20_314	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ⁰ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.9E-10	149
	2573-20_334	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.9E-09	150
	2573-20_337	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	4.3E-09	151
	2573-20_340	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5.8E-10	152
	2573-20_341	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A ¹ -G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.4E-09	153
	2573-20_348	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.1E-09	154
	2573-20_351	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	2.4E-09	155

[0403]	2573-20_354	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	2.4E-09	156
	2573-20_355	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	3.7E-09	157
	2573-20_359	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.4E-09	158
	2573-20_362	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5.7E-10	159
	2573-20_363	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.9E-10	160
	2573-20_364	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Tyr-G-G	8.0E-10	161
	2573-20_365	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	7.8E-11	162
	2573-20_366	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Tyr-G-G ¹	1.8E-10	163
	2573-20_367	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -Heg-Tyr-Tyr-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	9.0E-11	164
	2573-20_368	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Tyr-A ¹ -A ¹ -Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Tyr-G-G ¹	2.9E-10	165
	2573-20_369	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	3.1E-10	166
	2573-20_370	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Tyr-A ¹ -A ¹ -Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Tyr-G-G ¹	9.0E-09	167
	2573-20_375	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	7.0E-09	168
	2573-20_376	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Tyr-G-G	4.4E-09	169
	2573-20_377	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	1.8E-10	170
	2573-20_378	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C-A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	7.6E-10	171
	2573-20_379	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Tyr-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	5.2E-10	172
	2573-20_380	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C-A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Tyr-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	1.9E-10	173
	2573-20_381	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Tyr-A ¹ -A ¹ -C-A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C3-G-Tyr-G-G ¹	2.2E-09	174
	2573-20_382	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C3-G-Bn-G-G ¹	1.3E-09	175

[0404]	2573-20_386	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	3.9E-10	176
	2573-20_387	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	3.3E-10	177
	2573-20_388	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	7.1E-10	178
	2573-20_389	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5.6E-11	179
	2573-20_390	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2.6E-10	180
	2573-20_391	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2.8E-10	181
	2573-20_392	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -Heg-G-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	8.6E-10	182
	2573-20_393	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.9E-09	183
	2573-20_394	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	2.1E-10	184
	2573-20_395	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A-G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	8.6E-11	185
	2573-20_396	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	4.7E-11	186
	2573-20_399	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	3.3E-09	187
	2573-20_407	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -C ¹ -Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2.4E-10	188
	2573-20_408	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -Heg-G ⁰ -Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	7.2E-10	189
	2573-20_409	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	3.2E-09	190
	2573-20_410	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	9.8E-10	191
	2573-20_452	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G ² -Bn-G-G	4.1E-10	192
	2573-20_455	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ²	2.6E-10	193
	2573-20_478	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn ² -G-G	7.4E-11	194

	2573-20_489	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.6E-09	195
	2573-20_625	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -Heg-Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.2E-09	196
	2573-20_626	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -Heg-Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	3.7E-09	197
	2573-20_627	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -Heg-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.3E-09	198
	2573-20_628	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -Heg-Bn ¹ -Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	4.1E-09	199
	2573-20_629	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -Heg-Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.5E-09	200
	2573-20_630	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -Heg-Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.4E-09	201
	2573-20_633	G ² -G ² -C ¹ -A ¹ -G ² -G ¹ -Bn ² -Bn ² -Bn ² -G-G ² -Nap ² -A ² -Bn ² -Bn ² -A ¹ -A ¹ -Heg ² -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G ¹	3.0E-09	202
	2573-20_634	G ² -G ² -C ¹ -A ¹ -G ² -G ¹ -Bn ² -Bn ² -Bn ² -G ² -G ² -Nap ² -A ² -Bn ² -Bn ² -A ¹ -A ¹ -Heg ² -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G ¹	3.8E-09	203
[0405]	2573-20_635	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	5.4E-10	204
	2573-20_636	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	7.0E-09	205
	2573-20_637	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	9.0E-10	206
	2573-20_638	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	6.6E-10	207
	2573-20_639	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.3E-09	208
	2573-20_640	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2.9E-09	209
	2573-20_643	G ² -G ² -C ¹ -A ¹ -G ² -G ¹ -Bn ² -Bn ² -Bn ² -G-G ² -Nap ² -A ² -Bn ² -Bn ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg ² -G ¹ -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G ¹	1.7E-09	210
	2573-20_644	G ² -G ² -C ¹ -A ¹ -G ² -G ¹ -Bn ² -Bn ² -Bn ² -G ² -G ² -Nap ² -A ² -Bn ² -Bn ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg ² -G ¹ -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G ¹	1.2E-09	211
	2573-20_700	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.0E-08	212

[0406]	2573-20_702	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	6.8E-09	213
	2573-20_711	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn^2-G^2-G^1$	6.5E-09	214
	2573-20_719	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-MBn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-Bn-C^1-G-Bn-G-G^1$	6.1E-10	215
	2573-20_720	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-Bn-C^1-G-Ib-G-G^1$	1.2E-09	216
	2573-20_722	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-MBn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-Bn-C^1-G-Ib-G-G^1$	8.3E-09	217
	2573-20_745	$G^2-G^2-C^1-A^1-G^2-G^1-Bn^1-Bn^2-U^1-G^2-G^2-Nap^2-A^2-Bn^2-Bn^1-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn^1-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G^2-Bn^2-G^2-G^1$	4.3E-09	218
	2573-20_746	$G-G-C^1-A^1-G-G^1-Bn^1-Bn^2-U^1-G-G-Nap-A-Bn^2-Bn^1-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn^1-Bn^1-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G^2-Bn^2-G^2-G^1$	9.8E-10	219
	2573-20_771	$G-G-C^1-A-G-G^1-Bn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	2.2E-10	220
	2573-20_772	$G-G-C^1-A-G-G^1-MBn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn-G-G^1$	5.7E-11	221
	2573-20_773	$G-G-C^1-A-G-G^1-MBn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G^2-Bn^2-G^2-G^1$	1.1E-10	222
	2573-20_779	$G-G-C^1-A-G-G^1-Bn-Bn^2-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn^1-A^1-A-C^1-C^1-G-Bn-Bn^1-A^1-A-G-Bn-C^1-G^2-Bn^2-G^2-G^1$	6.3E-11	223
	2573-20_780	$G-G-C^1-A-G-G^1-Bn-Bn-Pe^2-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A-C^1-C^1-G-Bn-Bn^2-A-A-G-Bn-C^1-G-Bn^2-G-G$	8.7E-11	224
	2573-20_802	$G-G-C^1-A-G-G^1-MBn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn^2-G-G^1$	1.6E-10	225
	2573-20_803	$G-G-C^1-A-G-G^1-MBn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn^1-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn^2-G-G^1$	2.6E-10	226
	2573-20_804	$G-G-C^1-A-G-G^1-MBn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn^2-Bn^1-A^1-A^1-C^1-Heg-G^1-Bn-Bn-A^1-A^1-G^1-U^1-C^1-G-Bn^2-G-G^1$	1.1E-10	227
	2573-20_806	$G-G-C^1-A-G-G^1-Bn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A^1-A-C^1-C^1-G-Bn-Bn-A^1-A-G-Bn-C^1-G-Bn^2-G-G$	6.3E-10	228
	2573-20_807	$G-G-C^1-A-G-G^1-Bn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn-Bn^1-A^1-A-C^1-C^1-G-Bn-Bn-A^1-A-G-Bn-C^1-G-Bn^2-G-G$	1.2E-09	229
	2573-20_808	$G-G-C^1-A-G-G^1-Bn-Bn-U^1-G-G-Nap-A-Bn^2-Bn^1-A^1-A-C^1-C^1-G-Bn-Bn-A^1-A-G-Bn-C^1-G-Bn^2-G-G$	2.7E-09	230

[0407]	2573-20_809	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe ² -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn ² -A-A-G-Bn-C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G	1.8E-10	231
	2573-20_834	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap-A-Bn ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Tyr ² -G ² -G ¹	2.7E-11	232
	2573-20_835	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Tyr-A-Bn ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Tyr ² -G ² -G ¹	1.1E-10	233
	2573-20_836	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Tyr-A-Nap ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Tyr ² -G ² -G ¹	4.2E-10	234
	2573-20_837	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap-A-Nap ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Tyr ² -G ² -G ¹	6.9E-11	235
	2573-20_838	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap-A-Bn ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Tyr ² -Tyr ² -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Tyr ² -G-G ¹	4.8E-11	236
	2573-20_898	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap ² -A ² -Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G ¹	1.6E-10	237
	2573-20_899	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -U ¹ -G-G-Nap ² -A ² -Bn ² -MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE ¹ -MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -MOE ² -G ² -G ¹	3.3E-09	238
	2573-20_901	G-G-C ¹ -A ² -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -MOE ¹ -G-G-Nap ² -A ² -Bn ² -MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE ¹ -MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -MOE ² -G ² -G ¹	3.1E-09	239

- [0408] 无-上标-表示-脱氧核糖
- [0409] 上标-o-表示-2'-氟
- [0410] 上标-1-表示-2'-O-甲基
- [0411] 上标-2-表示-硫代磷酸酯-(脱氧核糖)
- [0412] C3=-三-碳-接头
- [0413] Heg=-六乙二醇-接头
- [0414] Nap=-萘基-dU
- [0415] Pe=-苯基乙基-dU
- [0416] BT=-苯并噻吩基-dU
- [0417] Ib=-异丁基-dU
- [0418] 2Nap=-2-萘基-dU
- [0419] NE=-萘基乙基-dU
- [0420] MBn=-亚甲基二氧基苄基-dU
- [0421] Tyr=-酪氨酸-dU
- [0422] FBn=-氟苄基-dU
- [0423] Bn=-苄基-dU
- [0424] Trp=-色氨酸-dU
- [0425] Th=-苯硫基-dU
- [0426] 2NE=-2-萘基乙基-dU
- [0427] PP=-苯丙基-dU
- [0428] Im=咪唑基-dU

[0429] Thr=苏氨酸-dU

[0430] CHM=环己基甲基-dU

[0431] Pyr=吡啶基-dU

[0432] RTM=R-四氢呋喃基-dU

[0433] MOE=吗啉代乙基

[0434] 表11.具有大于 10^{-8} M的 IC_{50} 的2573-20_136(SEQ ID NO:101)的变体

变体	序列	IC_{50} (M)	SEQ ID NO
2573-20_116	— G-G-C-A-G-G-T-T-T-G-G-T-A-T-T-A-A-C-A-C-G-T-T-A-A-G-T-C-G-T-G-G	>1.0E-06	300
2573-20_262	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-U ¹ -Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	301
2573-20_267	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A-A-G-Bn-C ¹ -G-U ¹ -G-G	4.0E-08	302
2573-20_269	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	5.1E-08	303
2573-20_270	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	6.8E-08	304
2573-20_271	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.6E-08	305
2573-20_272	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Tyr-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.6E-08	306
[0435] 2573-20_275	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.7E-08	307
2573-20_276	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	5.8E-08	308
2573-20_277	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-FBn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	309
2573-20_279	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-FBn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	310
2573-20_281	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-FBn-Tyr-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	311
2573-20_294	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.7E-08	312
2573-20_295	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Heg-G-Bn-G-G	>1.0E-06	313
2573-20_296	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Heg-G-Bn-G-G	>1.0E-06	314
2573-20_298	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-Heg-G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Heg-G-Bn-G-G	>1.0E-06	315

[0436]	2573-20_302	G-G-C ¹ -A-G ⁰ -G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	2.3E-08	316
	2573-20_303	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G ⁰ -G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	1.6E-08	317
	2573-20_308	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G ⁰ -G	1.9E-08	318
	2573-20_324	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-C3-G-Bn-G-G	1.9E-07	319
	2573-20_335	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G ¹ -Bn-G-G	5.1E-08	320
	2573-20_338	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	1.6E-08	321
	2573-20_339	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Pe-G-G-Nap-A ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A-Heg-Tyr-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	322
	2573-20_342	G ¹ -G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1.1E-08	323
	2573-20_349	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G ¹ -Bn-G-G	6.2E-08	324
	2573-20_352	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	6.7E-08	325
	2573-20_356	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C ¹ -A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-U ¹ -C3-G-Bn-G-G	1.1E-08	326
	2573-20_361	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G ¹ -G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-U ¹ -A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	>1.0E-06	327
	2573-20_383	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Tyr-A ¹ -A ¹ -C-A ¹ -C ¹ -G-Tyr-Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C3-G-Tyr-G-G ¹	>1.0E-06	328
	2573-20_488	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-Bn ¹ -G ¹ -G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A-C-A ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn-G-G	3.4E-08	329
	2573-20_666	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -Bn-A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	8.3E-08	330
	2573-20_669	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -U ¹ -A ¹ -A ⁰ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.0E-06	331
	2573-20_672	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.3E-07	332
	2573-20_675	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -U ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.6E-07	333
	2573-20_697	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -U ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	5.2E-07	334

[0437]	2573-20_698	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-U ¹ -A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.1E-07	335
	2573-20_699	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-U ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	4.6E-08	336
	2573-20_701	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn ¹ -Bn-Bn ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -U ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.4E-08	337
	2573-20_703	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -U ¹ -Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.8E-07	338
	2573-20_704	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-U ¹ -A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2.9E-07	339
	2573-20_705	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-U ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	2.6E-07	340
	2573-20_706	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -U ¹ -Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	6.1E-08	341
	2573-20_707	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-U ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-Bn-G-G ¹	9.4E-08	342
	2573-20_718	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -BF-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.1E-08	343
	2573-20_721	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -BF-Bn-Pe-G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-lb-G-G ¹	3.8E-08	344
	2573-20_723	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -BF-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Bn-G-G ¹	>1.0E-06	345
	2573-20_724	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-Bn-G-G ¹	1.1E-08	346
	2573-20_725	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-lb-G-G ¹	>1.0E-06	347
	2573-20_726	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -BF-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-lb-G-G ¹	>1.0E-06	348
	2573-20_727	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn-Bn-A ¹ -A ¹ -G ¹ -Bn-C ¹ -G-lb-G-G ¹	3.3E-03	349
	2573-20_776	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -Bn ¹ -Bn ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -Bn ² -G ² -G ¹	>1.0E-06	350
	2573-20_810	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -Bn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn ² -Bn ¹ -A ¹ -A-C ¹ -C ¹ -G-Bn-Bn-A ¹ -A-G-Bn-C ¹ -G-Bn ² -G-G ¹	1.8E-08	351
	2573-20_882	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-MOE-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE-MOE-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-MOE-G-G ¹	>1.0E-06	352

[0438]	2573-20_883	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn-Bn-U ¹ -G-G-Nap-A-Bn-MOE-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE-MOE-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-MOE-G-G ¹	2.5E-08	353
	2573-20_887	G-G-C ¹ -A-G-G ¹ -MBn-Bn-MOE-G-G-Nap-A-Bn-MOE-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE-MOE-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-MOE-G-G ¹	5.0E-07	354
	2573-20_888	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn-Bn-MOE-G-G-Nap-A-Bn-MOE-A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE-MOE-A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G-MOE-G-G ¹	4.6E-07	355
	2573-20_900	G-G-C ¹ -A ¹ -G-G ¹ -MBn ¹ -Bn ² -MOE ¹ -G-G-Nap ² -A ² -Bn ² -MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -C ¹ -Heg-G ¹ -MOE ¹ -MOE ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -C ¹ -G ² -MOE ² -G ² -G ¹	7.8E-08	356

[0439] 无上标-表示-脱氧核糖

[0440] 上标-_o-表示-2'-氟

[0441] 上标-1-表示-2'-O-甲基

[0442] 上标-2-表示-硫代磷酸酯-(脱氧核糖)

[0443] C3=-三-碳-接头

[0444] Heg=-六乙二醇-接头

[0445] Nap=-萘基-dU

[0446] Pe=-苯乙基-dU

[0447] BT=-苯并噻吩基-dU

[0448] Ib=-异丁基-dU

[0449] 2Nap=-2-萘基-dU

[0450] NE=-萘基乙基-dU

[0451] MBn=-亚甲基二氧基苄基-dU

[0452] Tyr=-酪氨酸-dU

[0453] FBn=-氟苄基-dU

[0454] Bn=-苄基-dU

[0455] Trp=-色氨酸-dU

[0456] Th=-苯硫基-dU

[0457] 2NE=-2-萘基乙基-dU

[0458] PP=-苯丙基-dU

[0459] Im=咪唑基-dU

[0460] Thr=苏氨酸-dU

[0461] CHM=环己基甲基-dU

[0462] Pyr=吡啶基-dU

[0463] RTM=R-四氢呋喃基-dU

[0464] MOE=吗啉代乙基

[0465] 实施例17.2574-49_260 (SEQ ID NO:101)的额外修饰

[0466] 使用实施例16中描述的策略进一步修饰NapdU SOMAmer 2574-49_260 (SEQ ID NO:400)。表12显示一系列经发现具有在 10^{-11} M至 10^{-8} M范围内的IC₅₀的变体。2574-49_411 (SEQ ID NO:443)是在除3个位置(13个2'-O-甲基,10个硫代磷酸酯和2个C3-间隔子)外的所有位置上具有保护性主链取代的28聚体,并且保持IL-6拮抗剂活性(在基因报告测定中IC₅₀=

$6 \times 10^{-9} \text{M}$)。表13显示一系列发现具有大于 10^{-8}M 的 IC_{50} 的变体。

[0467] 表12. 具有在 10^{-11}M 至 10^{-8}M 范围内的 IC_{50} 的2574-49_260 (SEQ ID NO:400) 的变体

变体	序列	IC_{50} (M)	SEQ ID NO
2574-49_260	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap-G	$9.0\text{E-}10$	400
2574-49_261	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	$5.6\text{E-}09$	401
2574-49_276	C3-G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap-Nap-A ¹ -Nap-G ¹ -Nap-A ¹ -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -Nap-G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap-A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap-G ¹	$5.0\text{E-}09$	402
2574-49_286	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A ⁰ -G ⁰ -C ⁰ -C3-C3-G ⁰ -Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	$6.3\text{E-}09$	403
2574-49_289	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	$2.2\text{E-}10$	404
2574-49_290	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$8.3\text{E-}11$	405
2574-49_293	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$2.5\text{E-}10$	406
2574-49_296	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$7.4\text{E-}10$	407
2574-49_297	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$7.0\text{E-}10$	408
[0468] 2574-49_298	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$4.0\text{E-}10$	409
2574-49_299	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	$5.6\text{E-}09$	410
2574-49_300	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ¹ -A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$9.8\text{E-}09$	411
2574-49_302	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$1.6\text{E-}10$	412
2574-49_304	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$2.4\text{E-}10$	413
2574-49_305	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	$1.9\text{E-}09$	414
2574-49_306	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$2.1\text{E-}09$	415
2574-49_313	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-U ¹ -G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	$2.9\text{E-}09$	416
2574-49_316	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	$3.9\text{E-}09$	417
2574-49_317	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	$3.0\text{E-}09$	418

	2574-49_318	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2.0E-09	419
	2574-49_326	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G-U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1.1E-10	420
	2574-49_338	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.0E-11	421
	2574-49_339	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap-G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1.1E-10	422
	2574-49_340	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	6.9E-10	423
	2574-49_374	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-MOE ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.3E-09	424
	2574-49_375	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3.8E-10	425
	2574-49_381	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-RTM ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.7E-09	426
	2574-49_382	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -RTM ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	5.5E-10	427
	2574-49_387	G-G ¹ -G-Pyr ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	6.4E-09	428
	2574-49_389	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -Pyr ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.8E-09	429
	2574-49_390	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Pyr ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3.3E-09	430
	2574-49_394	G-G ¹ -G-MBn ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.5E-09	431
	2574-49_395	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-MBn ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3.3E-09	432
[0469]	2574-49_396	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -MBn ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.2E-10	433
	2574-49_397	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-MBn ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3.5E-09	434
	2574-49_398	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -MBn ¹	3.0E-10	435
	2574-49_402	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1.6E-09	436
	2574-49_404	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.8E-09	437
	2574-49_406	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.4E-09	438
	2574-49_407	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.1E-09	439
	2574-49_408	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	9.2E-09	440
	2574-49_409	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	7.5E-09	441
	2574-49_410	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3.8E-09	442
	2574-49_411	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G-Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	5.8E-09	443
	2574-49_413	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3 ² -C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	8.6E-09	444
	2574-49_416	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	3.1E-09	445
	2574-49_417	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G-Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.4E-09	446

[0470] 无上标-表示-脱氧核糖

[0471] 上标-_o-表示-2' -氟

- [0472] 上标-1-表示-2'-0-甲基
 [0473] 上标-2-表示-硫代磷酸酯-(脱氧核糖)
 [0474] C3=-三-碳-接头
 [0475] Heg=-六乙二醇-接头
 [0476] Nap=-萘基-dU
 [0477] Pe=-苯乙基-dU
 [0478] BT=-苯并噻吩基-dU
 [0479] Ib=-异丁基-dU
 [0480] 2Nap=-2-萘基-dU
 [0481] NE=-萘基乙基-dU
 [0482] MBn=-亚甲基二氧基苄基-dU
 [0483] Tyr=-酪氨酰-dU
 [0484] FBn=-氟苄基-dU
 [0485] Bn=-苄基-dU
 [0486] Trp=-色氨基-dU
 [0487] Th=-苯硫基-dU
 [0488] 2NE=-2-萘基乙基-dU
 [0489] PP=-苯丙基-dU
 [0490] Im=咪唑基-dU
 [0491] Thr=苏氨酰-dU
 [0492] CHM=环己基甲基-dU
 [0493] Pyr=吡啶基-dU
 [0494] RTM=R-四氢呋喃基-dU
 [0495] MOE=吗啉代乙基
 [0496] 表13.具有大于 10^{-8} M的 IC_{50} 的2574-49_260 (SEQ ID NO:400)的变体

适体	序列	IC_{50} (M)	SEQ ID NO
2574-49_277	C3-C3-C3-C3-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	1.2E-08	500
[0497] 2574-49_281	C3-G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	1.1E-07	501
2574-49_282	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A ¹ -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	1.4E-08	502
2574-49_285	C3-G ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G-C-G-Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	1.0E-08	503

[0498]	2574-49_287	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ⁰ -C ⁰ -G ⁰ -Nap-A-A-G-G-C-G-G-Nap	1.1E-08	504
	2574-49_288	C3-G-G-G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G-C-G-Nap-A ⁰ -A ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -C ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -Nap	>1.0E-06	505
	2574-49_291	G ¹ -G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ¹ -A ¹ -Nap ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -A ¹ -G ¹ -Nap ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	506
	2574-49_292	G ¹ -G ¹ -G ¹ -G ¹ -U ¹ -U ¹ -A ¹ -U ¹ -G ¹ -U ¹ -A ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -U ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -G ¹ -U ¹	>1.0E-06	507
	2574-49_294	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap ¹ -A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2.8E-08	508
	2574-49_295	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap ¹ -G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	1.8E-08	509
	2574-49_301	C3-G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap ¹ -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	7.2E-08	510
	2574-49_303	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ¹ -A-Nap ¹ -G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2.4E-07	511
	2574-49_307	G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	2.5E-08	512
	2574-49_308	C3-G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ¹ -A-Nap ¹ -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G-Nap ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap ¹	8.8E-08	513
	2574-49_309	G-G ¹ -G-U ¹ -Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	>1.0E-06	514
	2574-49_310	G-G ¹ -G-Nap-U ¹ -A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	>1.0E-06	515
	2574-49_311	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-U ¹ -G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	>1.0E-06	516
	2574-49_312	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-U ¹ -A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	>1.0E-06	517
	2574-49_314	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-U ¹ -A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -Nap	1.9E-08	518
	2574-49_315	G-G ¹ -G-Nap-Nap-A-Nap-G-Nap-A-G-C-C3-C3-G-Nap-G ¹ -C-G-Nap-A-A-G-G-C-G ¹ -G ¹ -U ¹	>1.0E-06	519
	2574-49_319	G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ¹ -A ¹ -Nap ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.2E-07	520
	2574-49_325	G ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -Nap ¹ -Nap ¹ -A ⁰ -Nap ¹ -G ⁰ -Nap ¹ -A ⁰ -G ⁰ -C ⁰ -C3-C3-G ⁰ -U ¹ -G ⁰ -C ⁰ -G ⁰ -Nap ¹ -A ⁰ -A ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -C ⁰ -G ⁰ -G ⁰ -Nap ¹	9.2E-08	521
	2574-49_335	G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ¹ -A ¹ -Nap ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -A ¹ -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	6.2E-08	522
	2574-49_341	G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ² -A ¹ -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -Nap ¹ -A ¹ -A ¹ -G ¹ -G ¹ -C ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.3E-08	523
	2574-49_342	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A ¹ -A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1.4E-08	524
	2574-49_373	G-G ¹ -G-MOE ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1.5E-08	525
	2574-49_376	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-MOE ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	526
	2574-49_377	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -MOE ¹	1.8E-08	527

[0499]

2574-49_378	G-G ¹ -G-Nap ¹ -MOE ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	528
2574-49_379	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-MOE ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	529
2574-49_380	G-G ¹ -G-RTM ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1.8E-08	530
2574-49_383	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-RTM ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	531
2574-49_384	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -RTM ¹	5.7E-08	532
2574-49_388	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Pyr ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	9.7E-08	533
2574-49_391	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Pyr ¹	1.2E-08	534
2574-49_392	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Pyr ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.9E-08	535
2574-49_393	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Pyr ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	536
2574-49_399	G-G ¹ -G-Nap ¹ -MBn ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.9E-07	537
2574-49_400	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-MBn ² -G-Nap ¹ -A-G-C-C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	538
2574-49_403	G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.9E-08	539
2574-49_405	G ¹ -G ¹ -G ¹ -Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.4E-08	540
2574-49_412	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ² -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3 ² -C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	7.7E-08	541
2574-49_414	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ² -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.7E-08	542
2574-49_415	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A-Nap ² -G-Nap ¹ -A-G ¹ -C ¹ -C3 ² -C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C-G-Nap ¹ -A-A-G-G ² -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	1.7E-08	543
2574-49_418	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.0E-08	544
2574-49_419	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	4.0E-08	545
2574-49_420	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	8.0E-08	546
2574-49_421	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	9.7E-08	547
2574-49_422	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.6E-07	548
2574-49_423	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	2.4E-07	549
2574-49_424	G-G ¹ -G-Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	550
2574-49_425	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	551

[0500]	2574-49_426	G-G ¹ -G-Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	552
	2574-49_427	G-G ¹ -G-Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	553
	2574-49_428	G-G ¹ -G-Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -MBn ¹	>1.0E-06	554
	2574-49_429	G-G ¹ -G-Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -MBn ¹	5.4E-08	555
	2574-49_430	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	6.1E-07	556
	2574-49_431	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	557
	2574-49_432	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	558
	2574-49_433	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	559
	2574-49_434	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	560
	2574-49_435	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	561
	2574-49_436	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -MBn ¹	>1.0E-06	562
	2574-49_437	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3-G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -MBn ¹	1.3E-07	563
	2574-49_438	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	7.8E-07	564
	2574-49_439	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	565
	2574-49_440	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	566
	2574-49_441	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	567
	2574-49_442	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	568
	2574-49_443	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -Nap ¹	>1.0E-06	569
	2574-49_444	G ² -G ¹ -G ² -Pyr ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -MOE ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -MOE ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Pyr ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -MBn ¹	>1.0E-06	570
	2574-49_445	G ² -G ¹ -G ² -Nap ¹ -Nap ² -A ² -Nap ² -G ¹ -Nap ¹ -A ² -G ¹ -C ¹ -C3-C3 ² -G ¹ -U ¹ -G ¹ -C ² -G ² -Nap ¹ -A ² -A ² -G ² -G ¹ -C ² -G ¹ -G ¹ -MBn ¹	1.4E-07	571
	2574-49_456	— G-G-G-G-T-T-A-T-G-T-A-G-C-G-A-G-T-G-C-G-T-A-A-G-G-C-G-G-T-G	>1.0E-06	572

[0501] 无上标-表示-脱氧核糖

[0502] 上标-o-表示-2'-氟

[0503] 上标-1-表示-2'-O-甲基

[0504] 上标-2-表示-硫代磷酸酯-(脱氧核糖)

[0505] C3=-三-碳-接头

[0506] Heg=-六乙二醇-接头

[0507] Nap=-萘基-dU

[0508] Pe=-苯乙基-dU

[0509] BT=-苯并噻吩基-dU

[0510] Ib=-异丁基-dU

[0511] 2Nap=-2-萘基-dU

- [0512] NE=-萘基乙基-dU
[0513] MBn=-亚甲基二氧基苄基-dU
[0514] Tyr=-酪氨酰-dU
[0515] FBn=-氟苄基-dU
[0516] Bn=-苄基-dU
[0517] Trp=-色氨基-dU
[0518] Th=-苯硫基-dU
[0519] 2NE=-2-萘基乙基-dU
[0520] PP=-苯丙基-dU
[0521] Im=咪唑基-dU
[0522] Thr=苏氨酰-dU
[0523] CHM=环己基甲基-dU
[0524] Pyr=吡啶基-dU
[0525] RTM=R-四氢呋喃基-dU
[0526] MOE=吗啉代乙基

[0527] 前述实施方案和实施例意欲仅作为实例。特定实施方案、实施例或特定实施方案或实施例的元素将不被解释为任何权利要求的关键的、必需的或必要的元素或特征。可在不背离由所附权利要求确定的本发明的范围的情况下对公开的实施方案进行各种改变、修改、替换和其它变化。说明书,包括附图和实施例,将被认为是说明性的而非限制性的,并且所有这样的修改和替换旨在被包括在本发明的范围之内。因此,本发明的范围应当由所附权利要求及其合法等同物来确定,而不是由以上给出的实施例来确定。例如,任何方法或工艺权利要求中引用的步骤可以以任何可行的顺序执行并且不限于实施方案、实施例或权利要求的任一者中所呈现的顺序。

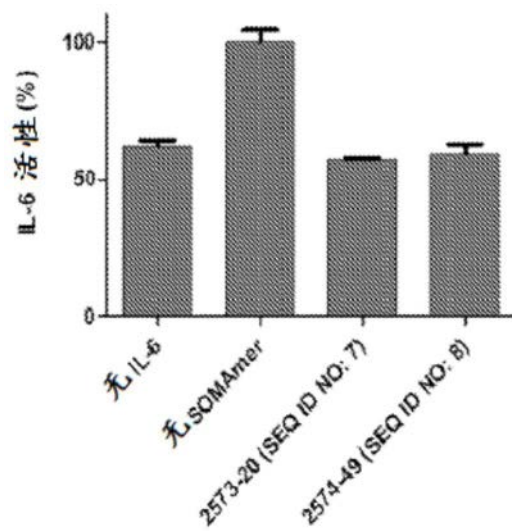


图1

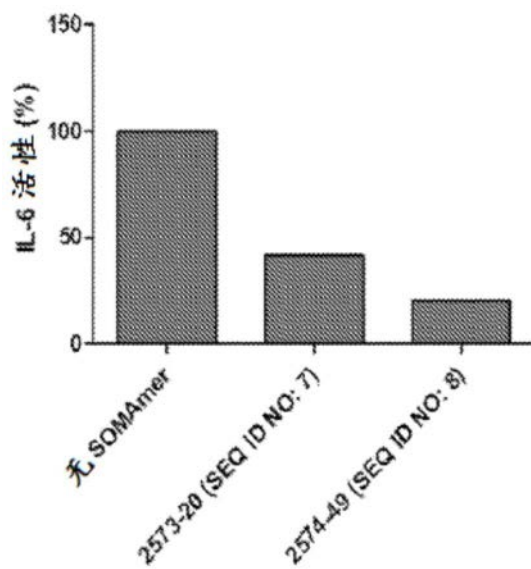
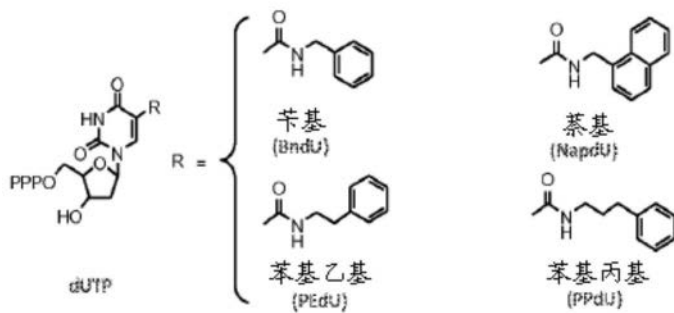


图2

经修饰的碱基取代



主链和无碱基取代

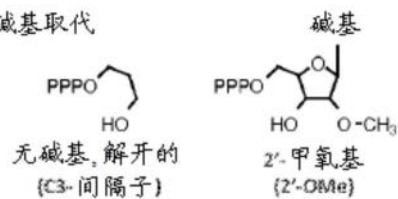


图3

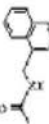
修饰	R基团	BndU7	BndU8	BndU9	BndU12	BndU14	BndU15	BndU22	BndU23	BndU27	BndU30
Bn-dU		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
PE-dU		1.4	42	0.9	1.9	12	1.7	0.9	2.1	1.2	1.2
PP-dU		3.4	1000	3.1	5.1	102	4.3	1.7	6.6	1.0	2.0
Nap-dU		1.9	29	2.5	0.7	3.3	4.8	3.6	4.8	12	18

图4

主链修饰	dG1	dG2	dC3	dA4	dG5	dG6	dG10	dG11	dA13	dA16	dA17	dC18	dA19	dC20	dG21	dA24	dA25	dG26	dC28	dG29	dG31	dG32
	1000	55	0.5	17	1000	0.7	29	55	205	2.7	1.9	1.9	1.1	1.0	12	9.2	37	32	0.7	97	161	ND
2'-OMe																						ND
3'-间隔子																						ND

图5

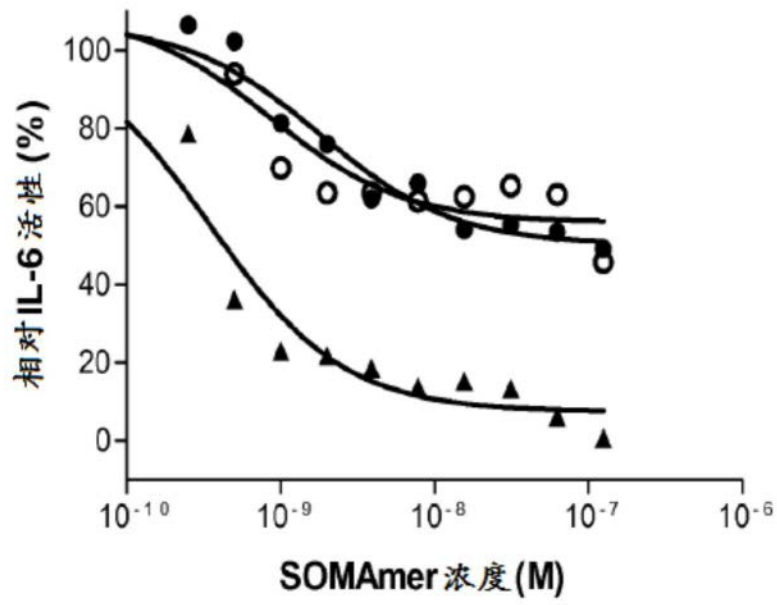


图6

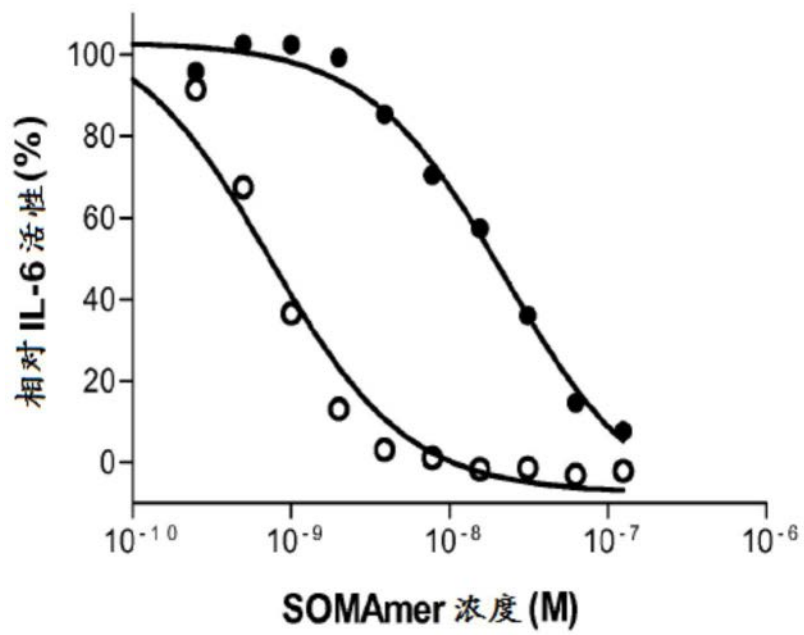


图7

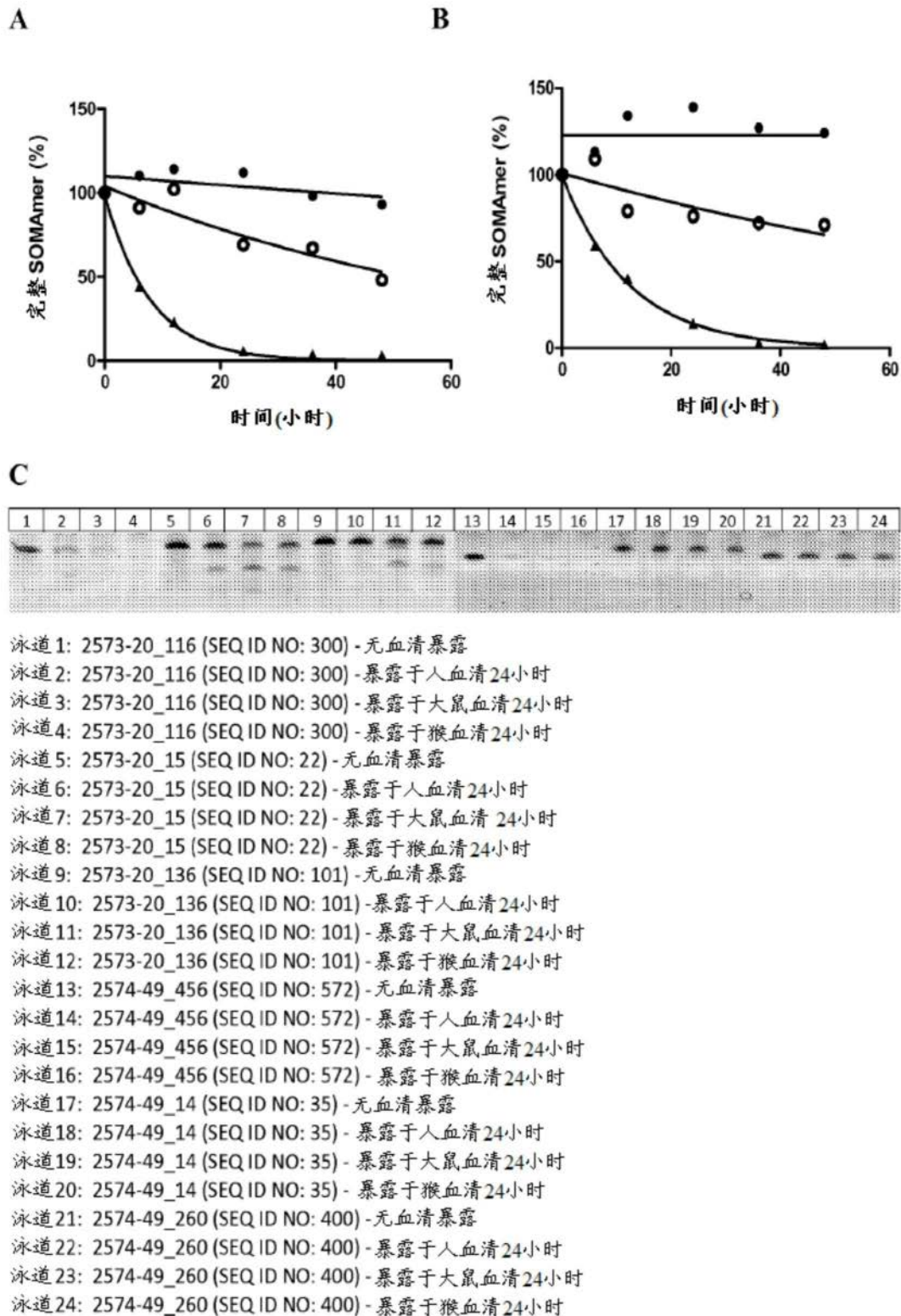


图8

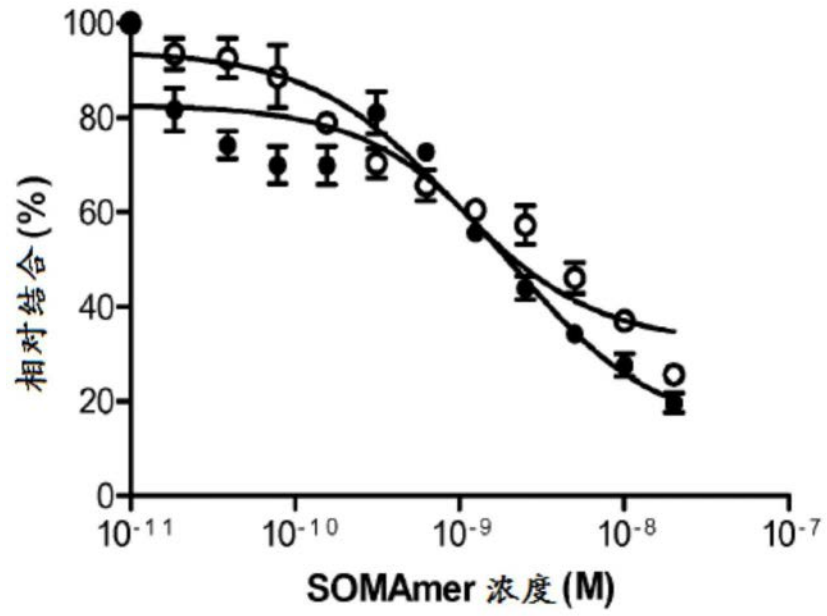


图9

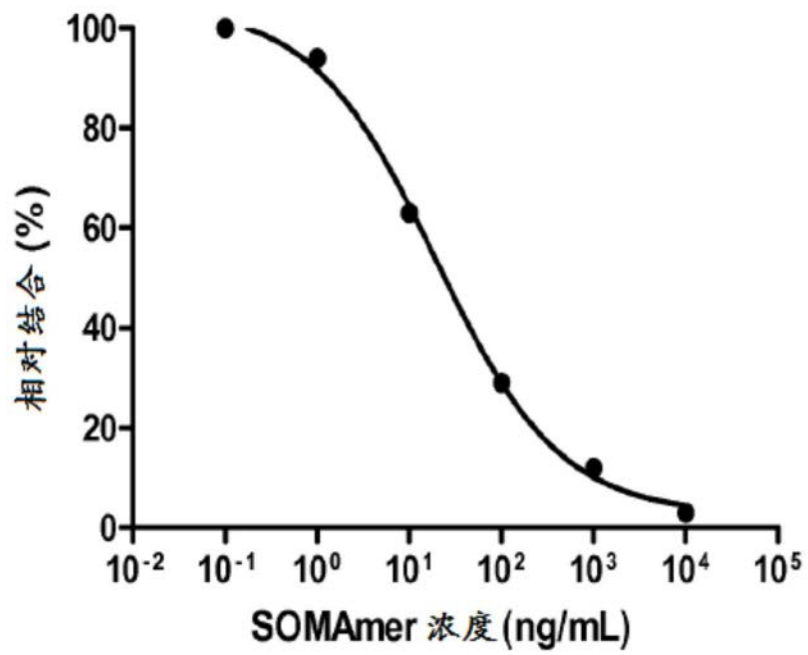


图10

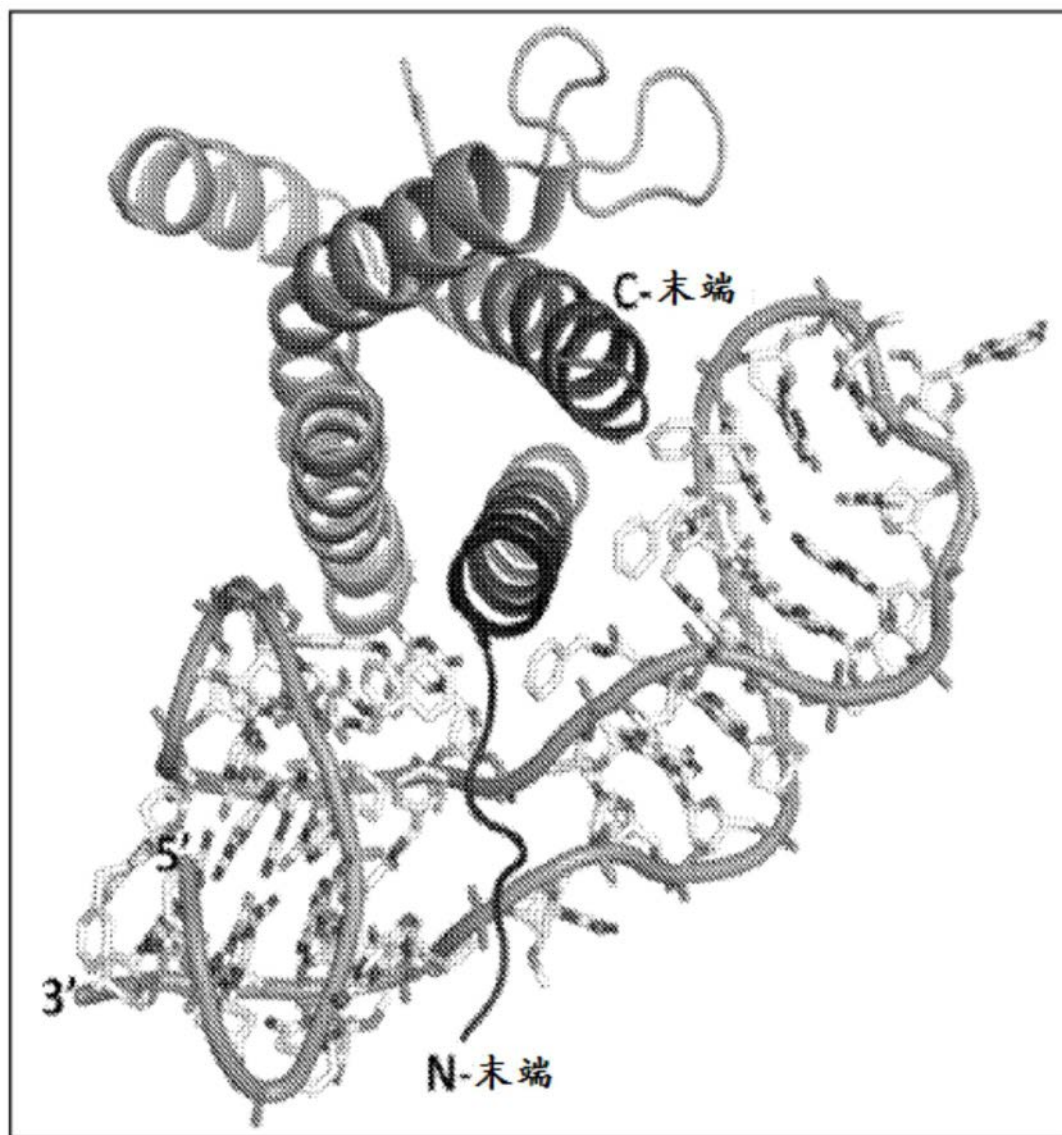


图11

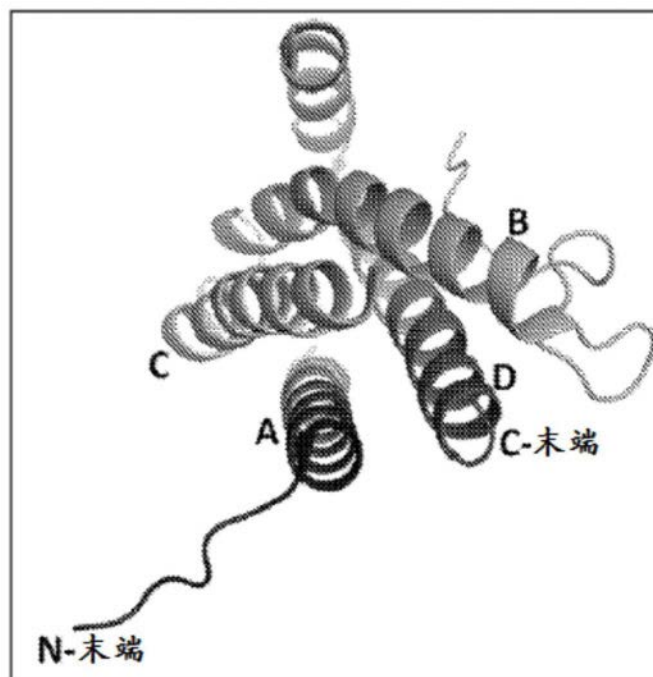


图12

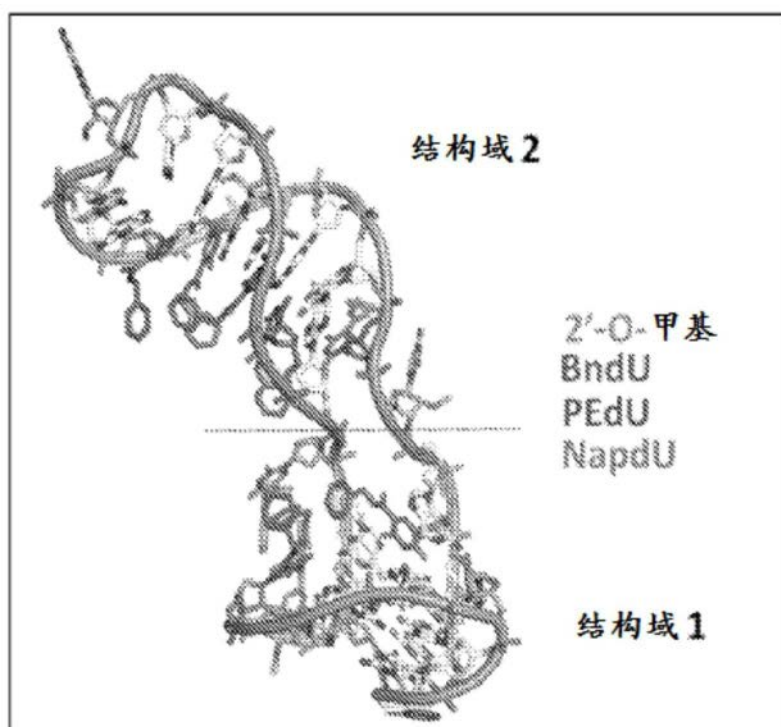


图13

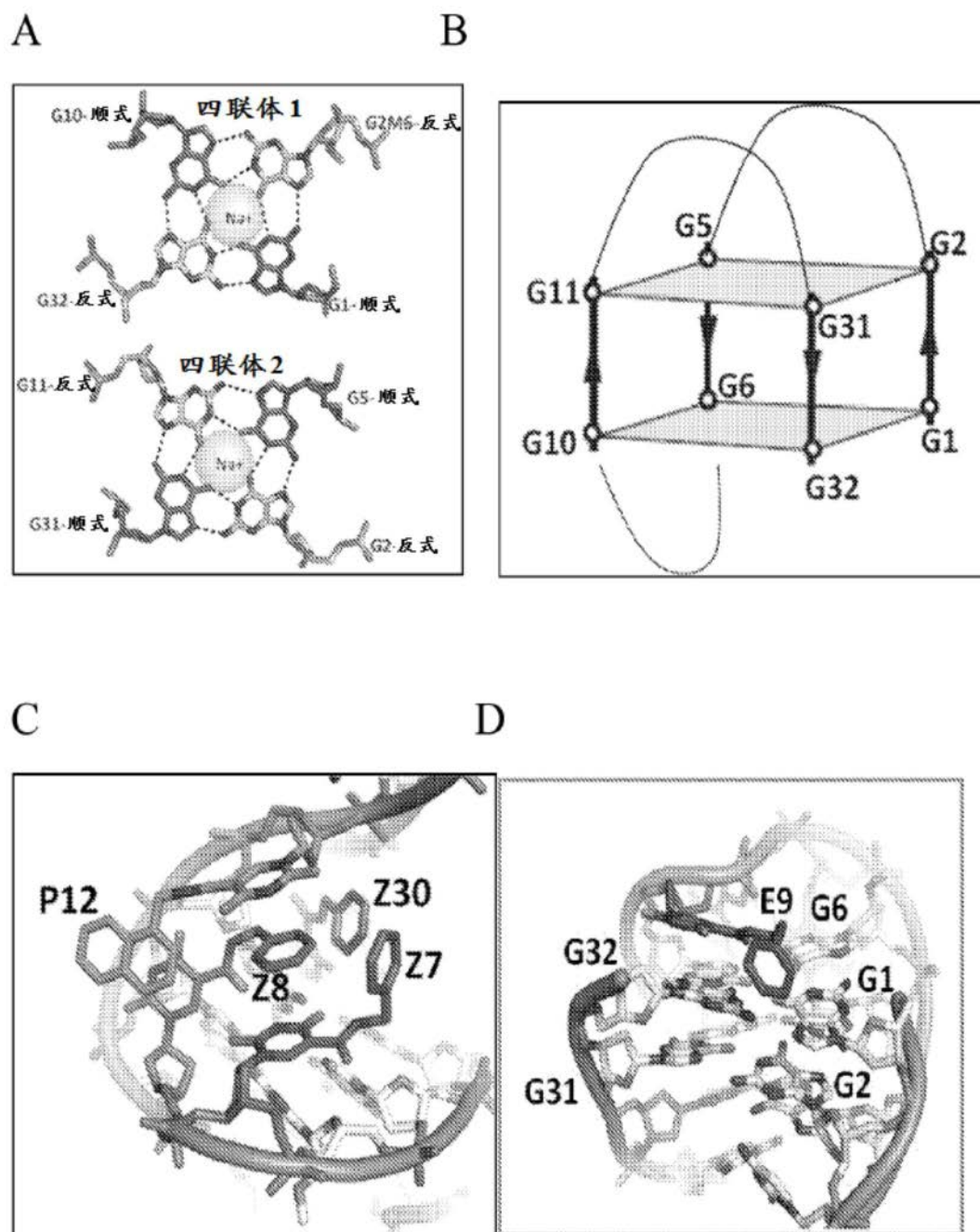


图14

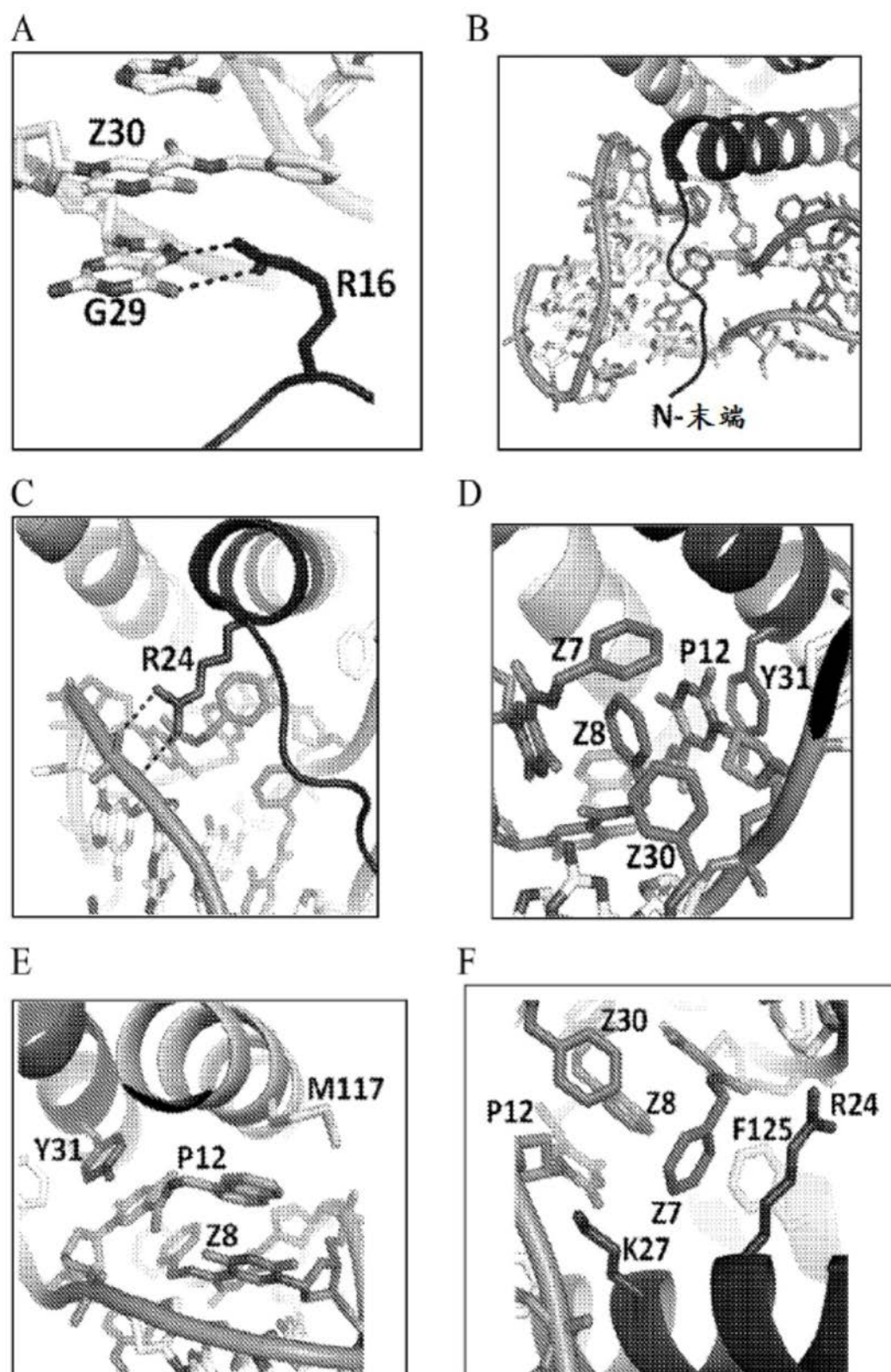


图15

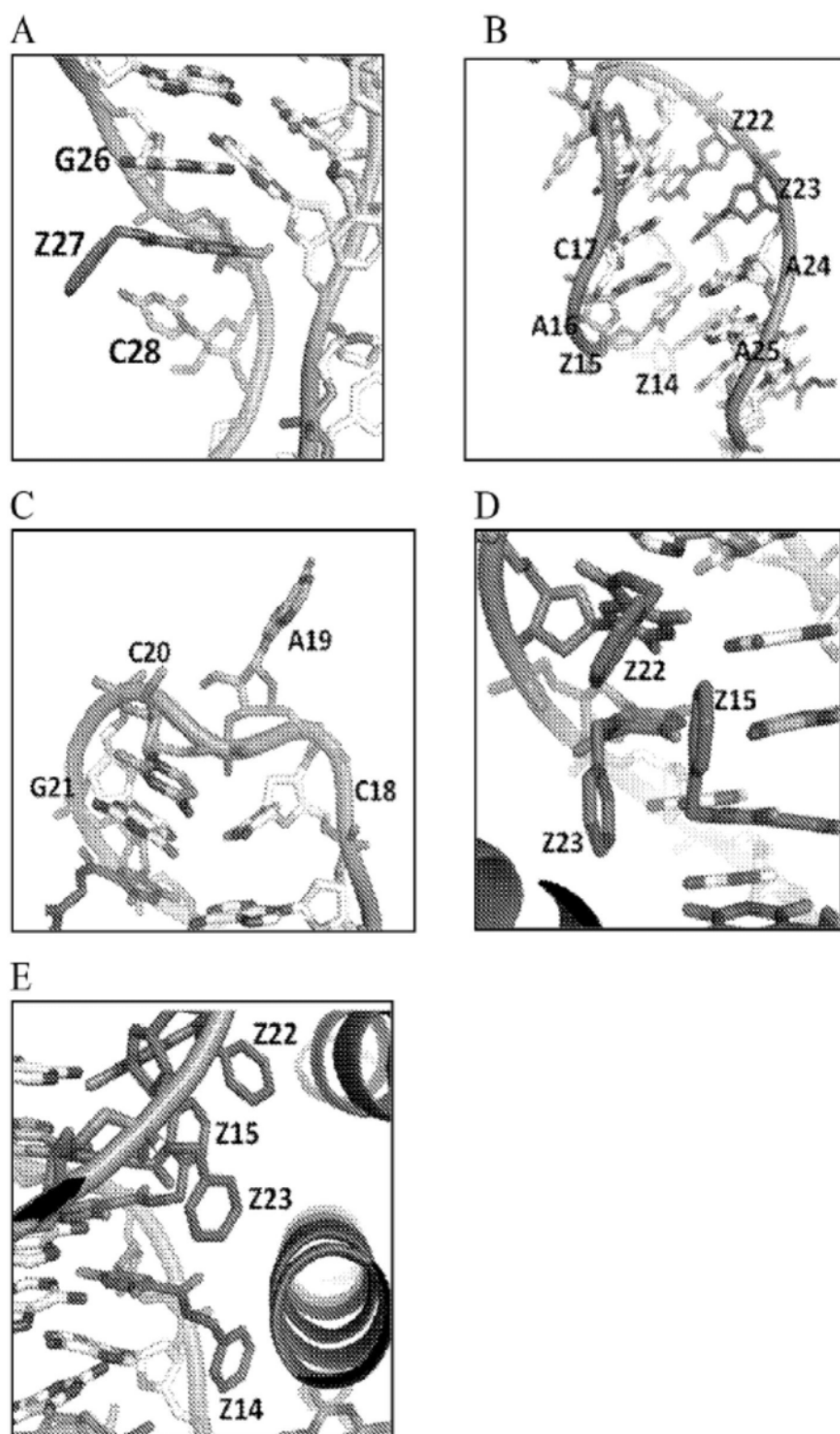


图16

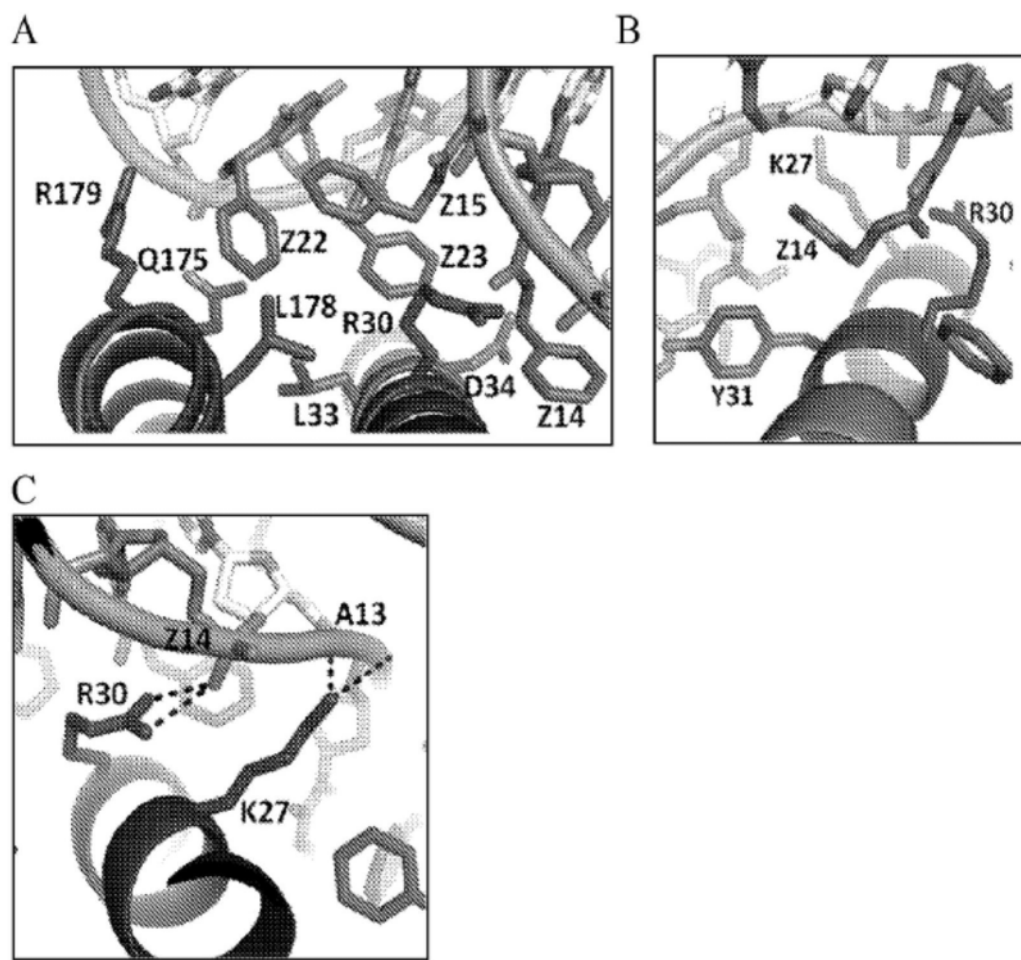


图17

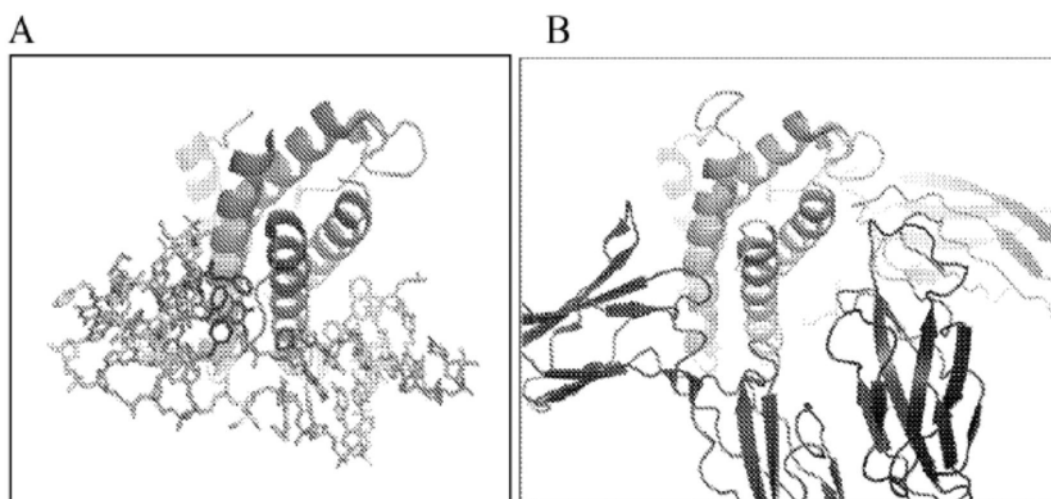


图18

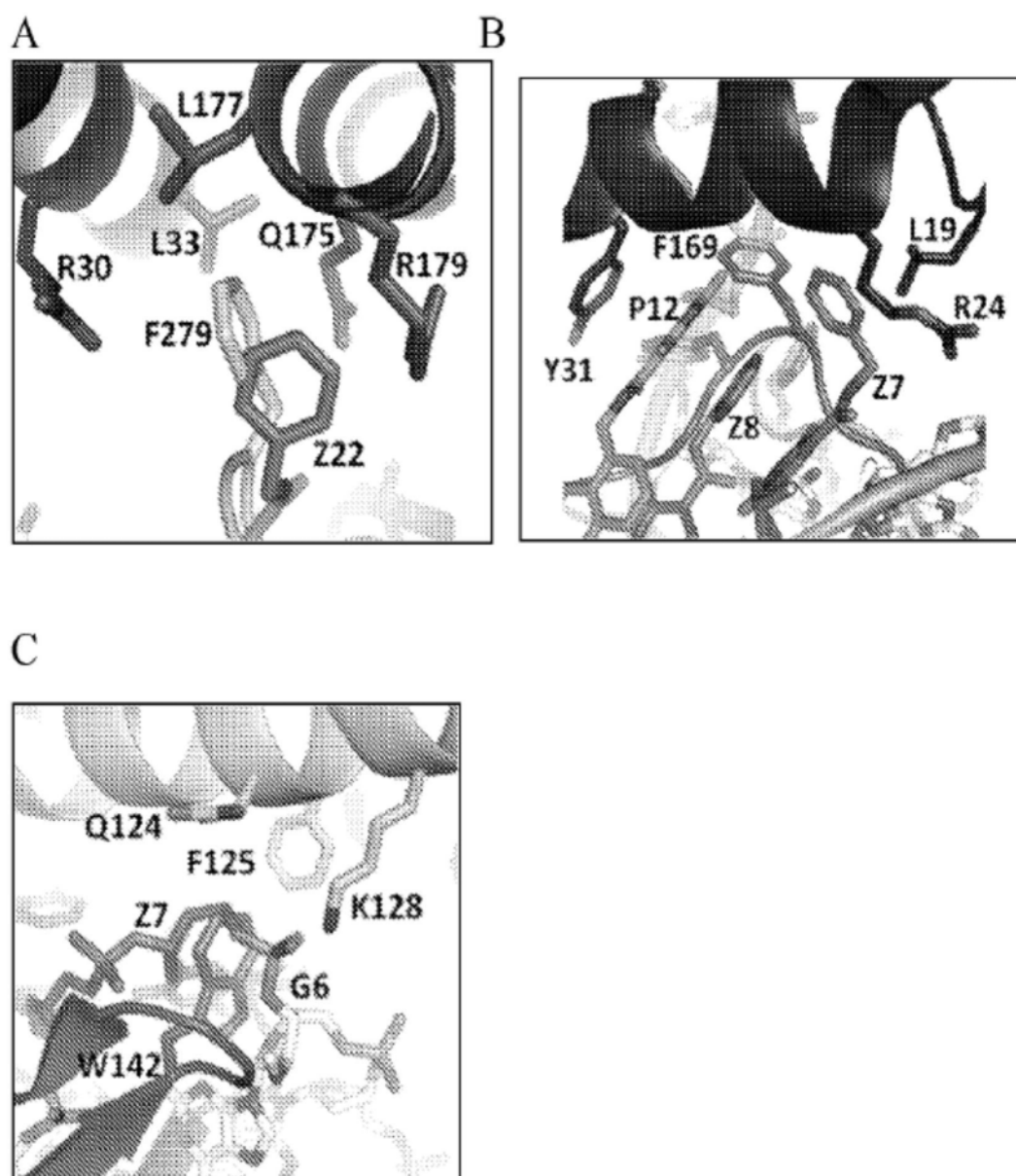


图19

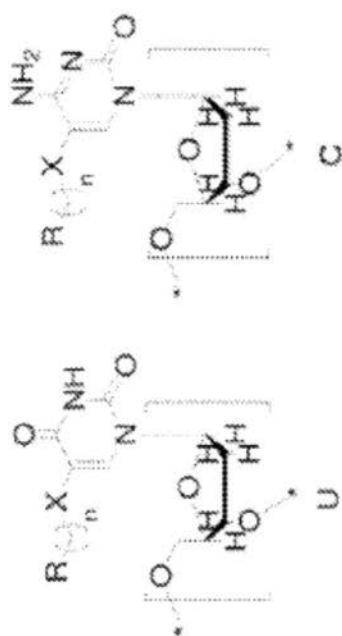
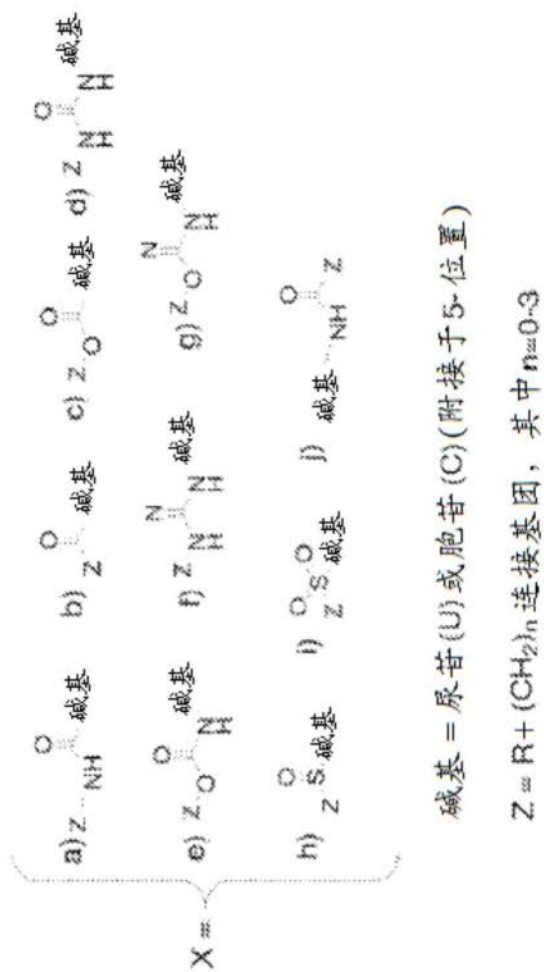


图20

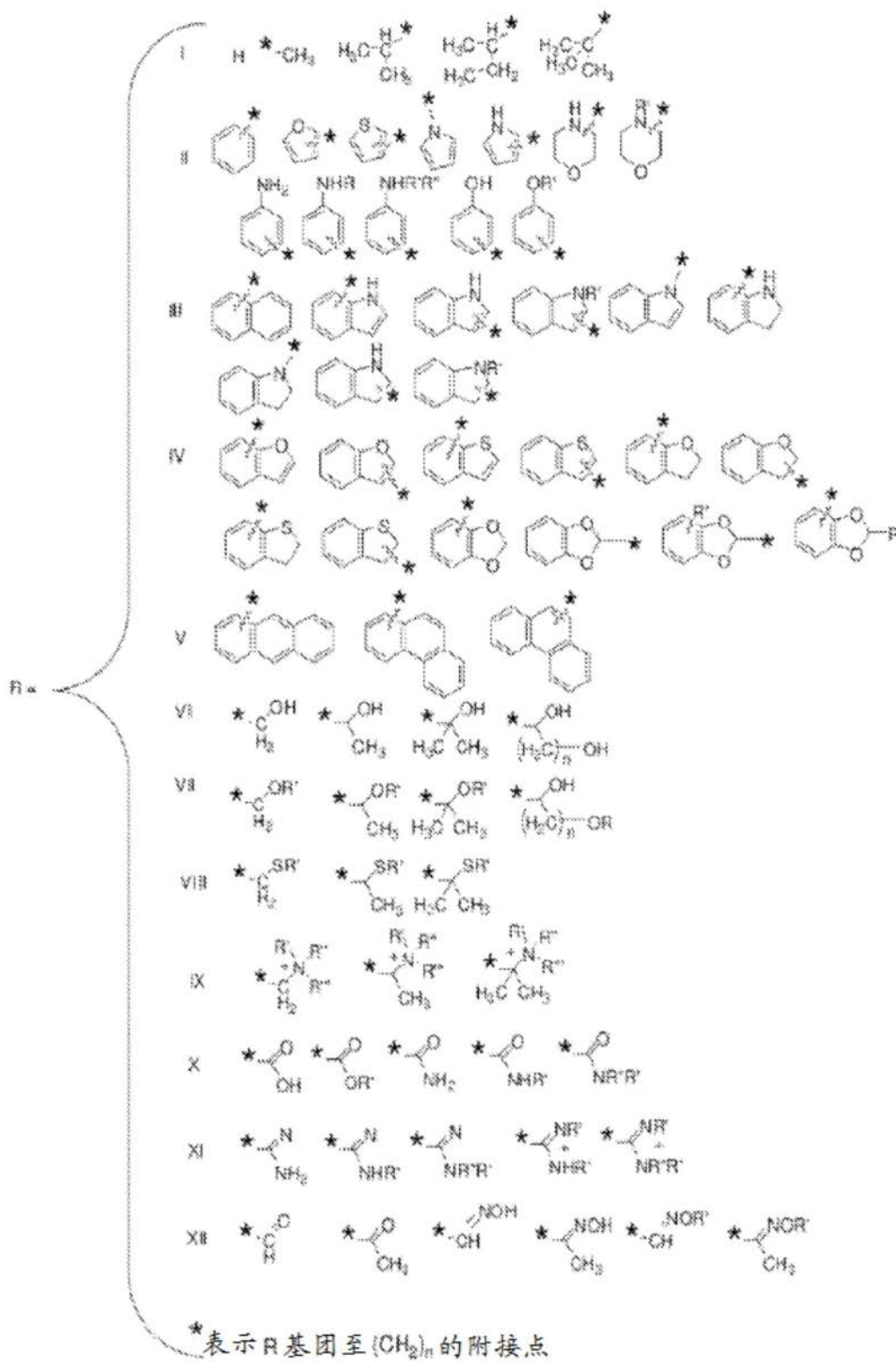


图20(续)

人IL-6 前体序列(Swiss-Prot登录号 P05231.1)

MNSFSTSAFG PVAFSLGLLL VLPAAFPAPV PPGEDSKDVA APHRQPLTSS
ERIDKQIRYI LDGISALRKE TCNKSNCES SKEALAENNL NLPKMAEKDG
CFQSGFNEET CLVKIITGLL EFEVYLEYLQ NRFESSEEQA RAVQMSTKVL
IQFLQKKAKN LDAITTPDPT TNASLLTKLQ AQNQWLQDMT THLILRSFKE
FLQSSLRALR QM (SEQ ID NO: 9)

人IL-6成熟序列(Swiss-Prot登录号P05231.1的氨基酸29至212)

PV PPGEDSKDVA APHRQPLTSS ERIDKQIRYI LDGISALRKE TCNKSNCES
SKEALAENNL NLPKMAEKDG CFQSGFNEET CLVKIITGLL EFEVYLEYLQ
NRFESSEEQA RAVQMSTKVL IQFLQKKAKN LDAITTPDPT TNASLLTKLQ
AQNQWLQDMT THLILRSFKE FLQSSLRALR QM (SEQ ID NO: 10)

图21

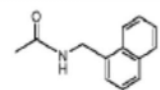
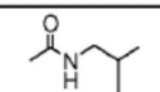
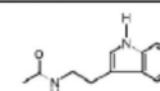
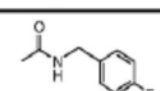
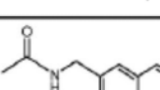
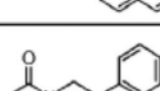
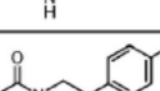
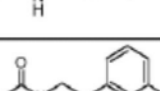
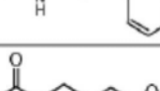
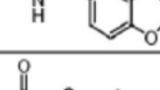
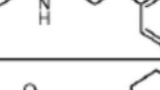
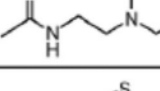
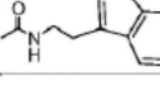
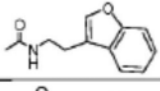
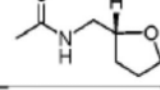
修饰	5'dU	代码	BndU7	BndU8	PEdU9	NapdU12	BndU30
NapdU		P	0.05	>100	1.3	1.0	3.4
iBudU		I	>100	>100	1.5	>100	0.15
TrpdU		W	0.35	>100	0.82	>100	2.4
FBndU		F	4.2	1.3	1.4	>100	1.2
2NapdU		i	0.57	>100	0.65	1.2	0.73
PEdU		E	0.84	>100	1.0	>100	2.5
TyrdU		Y	3.8	>100	1.6	>100	>100
NEdU		e	0.45	>100	0.8	2.5	1.3
MBndU		M	0.01	0.71	1.3	1.1	2.9
PPdU		J	1.8	>100	1.2	>100	1.3
MOEdU		n	>100	>100	1.4	>100	>100
BTdU		s	0.23	1.1	>100	1.1	>100
BEdu		f	0.04	>100	0.99	>100	1.8
RTHFdU		f ¹	>100	>100	1.3	>100	2.5
STHdU		f ²	>100	>100	2.5	>100	3.9

图22

ID	计数	SEQ ID NO	7	ZGGGCA	GGZZZGG	ZAZZAAACAGZAAAGZCGZGGGGZCG
2573-20	922		7			
2573-108	1	599		CZ	GGZZZGG	CZCGCGGAZZACAZAGGZGAAGCZGGAC
2573-103	1	600			GGZZZGG	ZGZCGAZGGCZZCGGAZACAGAGZCAC
2573-105	447			ZACCCZGGZG	GGZZZGG	CAACAZ
2573-100	217	AAZGGGAZCZCAGC		ZGZGGZZG	GGZZZGG	601
2573-117	37	ACCGA		ZGZGGZZG	GGZZZGG	602
2573-99	3	ZCAZGAG		ZGZGGZZG	GGZZZGG	603
2573-107	3			ZGZGGZZG	GGZZZGG	604
2573-116	2	GGZ		ZGZGGZZG	GGZZZGG	605
2573-98	2	ZCGGCC		ZGZGGZZG	GGZZZGG	606
2573-101	1	ZACCCZGAGZ		ZGZGGZZG	GGZZZGG	607
2573-104	1	AAZAGGAAGZCZCAGC		ZGZGGZZG	GGZZZGG	608
2573-115	11			ZAA GGA ZGZGGZZG	GGZZZGG	609
2573-111	84			ZAA GGA ZGZGGZZG	GGZZZGG	610
2573-109	34	ZAAG		GGZAGCGG	GGZZZGG	611
2573-113	16	ZAAG		GGAGGGZAA	GGZZZGG	612
2573-102	5	ZZAG		AGGG GGAGCGAGGA	GGZZZGG	613
2573-106	1	GZGCG		GGCA GCGGGGZGGA	GGZZZGG	614
2573-110	1	CZGZAGZGA		AGZZGG CACG GGZCZA	GGZZZGG	615
2573-112	1	CCZCGZGZCGGAGZG		ZGC GGZCZ	GGZZZGG	616
2573-114	1			AZZZZG AAAA GGC	GGZZZGG	617
2573-114	1			ZZAZGGGZGZCGZZGGGGAACAGGGC	GGZZZGG	618

图23

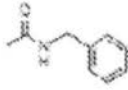
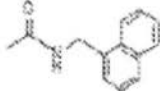
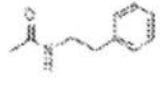
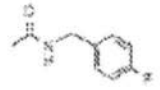
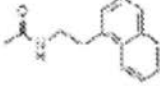
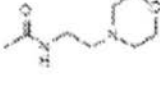
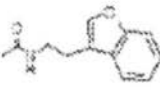
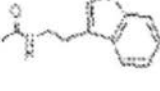
缩写	5-dU 修饰	化学结构
Bn	苄基甲基	
Nap	1-萘基甲基	
PE	2-苄基乙基	
PP	3-苄基丙基	
Ib	异丁基	
FBn	4-氟苄基甲基	
2Nap	2-氟苄基甲基	
Tyr	酪氨酰	
NE	1-萘基乙基	
MBn	3,4-亚甲基二氧基苄基	
MOE	吗啉代乙基	
BF	3-苯并呋喃基乙基	
BT	3-苯并噻吩基乙基	

图24

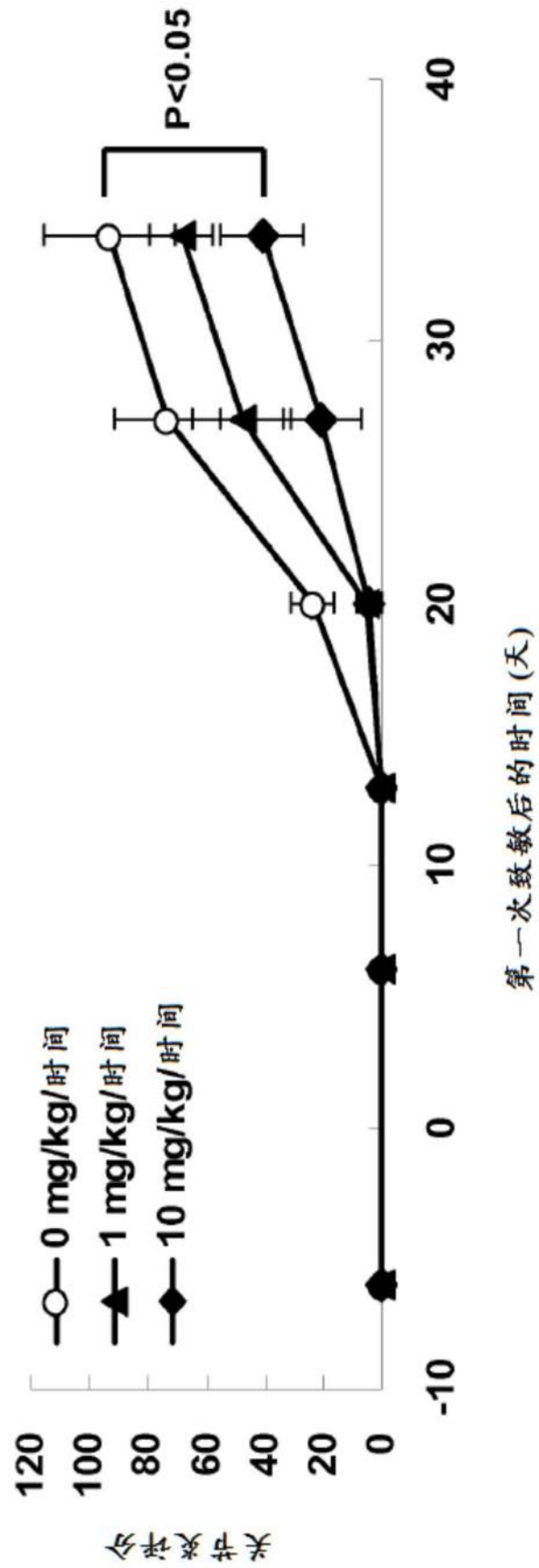


图26