



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 102906265 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201180024560.5

(22)申请日 2011.04.21

(30)优先权数据

10004253.0 2010.04.21 EP

11000117.9 2011.01.10 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.11.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/002068 2011.04.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/131371 EN 2011.10.27

(73)专利权人 诺松制药股份公司

地址 德国柏林

(72)发明人 W·普尔施克 S·克鲁斯曼

K·布驰尼尔 F·施沃布尔

K·赫利格

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 郝文博

(51)Int.Cl.

C12N 15/115(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

(56)对比文件

W0 2008124654 A1,2008.10.16,

US 20090074720 A1,2009.03.19,

US 6225063 B1,2001.05.01,

Barbara Visentin et al.Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages.《CANCER CELL》.2006,第9卷225-238.

Steffen Helmling et al.Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer.《PNAS》.2004,第101卷(第36期),13178页左栏.

Katsunori Horii et al.Development of a Sphingosylphosphorylcholine Detection System Using RNA Aptamers.《Molecules》.2010,第15卷摘要、图4、表1.

Dirk Eulberg andSven Klussmann.Spiegelmers Biostable Aptamers.《ChemBioChem》.2003,第4卷979-983.

Alexandre Vlassov et al.Binding and disruption of phospholipid bilayers by supramolecular RNA complexes.《PNAS》.2001,第98卷(第14期),摘要、图2、4.

审查员 潘天耀

权利要求书3页 说明书45页

序列表13页 附图10页

(54)发明名称

脂质结合核酸

(57)摘要

本发明涉及一种能够结合脂质的核酸分子。

1. 一种L-核酸分子,所述核酸分子能够结合1-磷酸鞘氨醇,其中所述核酸分子的序列选自SEQ. ID.No 12至26、27至37、39或40。

2. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含修饰基团,其中相较于不包含所述修饰基团的核酸分子,包含所述修饰基团的所述核酸分子自生物体的排泄率降低,其中所述修饰基团是聚乙二醇。

3. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含修饰基团,其中相较于不包含所述修饰基团的核酸分子,包含所述修饰基团的所述核酸分子在生物体中的保留时间增加,其中所述修饰基团是聚乙二醇。

4. 根据权利要求2或3所述的核酸分子,其中所述聚乙二醇的分子量为20,000Da至120,000Da。

5. 根据权利要求2至3中任一项所述的核酸分子,其中所述修饰基团通过连接子偶合于所述核酸分子。

6. 根据权利要求2至3中任一项所述的核酸分子,其中所述修饰基团偶合于所述核酸分子的5'末端核苷酸和/或3'末端核苷酸和/或偶合于所述核酸分子的介于所述核酸分子的5'末端核苷酸与所述核酸分子的3'末端核苷酸之间的核苷酸。

7. 根据权利要求2至3中任一项所述的核酸分子,其中所述生物体为动物或人体。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的核酸分子在制备用于治疗 and/或预防疾病的药物中的用途,其中所述疾病选自眼病、癌症、增生或炎性疾病。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述眼病选自包含以下的组:年龄相关的黄斑变性、伴有糖尿病性黄斑水肿的糖尿病性视网膜病变、年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜色素上皮脱离、增殖性玻璃体视网膜病变和年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜纤维化。

10. 根据权利要求8所述的用途,其中所述癌症选自包含乳癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌的组。

11. 根据权利要求8所述的用途,其中所述增生选自前列腺增生。

12. 根据权利要求8所述的用途,其中所述炎性疾病选自包含自体免疫性疾病、肺炎、败血症和创伤的组。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述创伤选自呼吸器诱发的肺损伤。

14. 根据权利要求12所述的用途,其中所述自体免疫性疾病选自包含多发性硬化症、类风湿性关节炎、银屑病、哮喘和炎性肠病的组。

15. 根据权利要求8所述的用途,其中所述药物用于人医学中或用于兽医学中。

16. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1至7中的任一项所定义的核酸分子和任选另一组分,其中所述另一组分选自包含药学上可接受的赋形剂、药学上可接受的载体和药学活性剂的组。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述药物组合物 包含如权利要求1至7中的任一项所定义的核酸分子和药学上可接受的载体。

18. 一种根据权利要求1至7中任一项所述的核酸分子的用途,所述核酸分子用于制造诊断工具,其中所述诊断工具用于诊断受试者中的眼病、癌症、增生或炎性疾病。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述眼病选自包含以下的组:年龄相关的黄斑变

性、伴有糖尿病性黄斑水肿的糖尿病性视网膜病变、年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜色素上皮脱离、增殖性玻璃体视网膜病变和年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜纤维化。

20. 根据权利要求18所述的用途,其中所述癌症选自包含乳癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌的组。

21. 根据权利要求18所述的用途,其中所述增生选自前列腺增生。

22. 根据权利要求18所述的用途,其中所述炎性疾病选自包含自体免疫性疾病、肺炎、败血症和创伤的组。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述创伤选自呼吸器诱发的肺损伤。

24. 根据权利要求22所述的用途,其中所述自体免疫性疾病选自包含多发性硬化症、类风湿性关节炎、银屑病、哮喘和炎性肠病的组。

25. 一种包含根据权利要求1至7中任一项所述的核酸分子和1-磷酸鞘氨醇的复合物。

26. 根据权利要求1至7中任一项所述的核酸分子在制备用于检测患有眼病、癌症、增生或炎性疾病的受试者中的1-磷酸鞘氨醇的诊断剂中的用途。

27. 一种用于筛选活性由1-磷酸鞘氨醇或所述1-磷酸鞘氨醇的类似物介导的拮抗剂的方法,所述方法包含下列步骤:

- 提供活性由所述1-磷酸鞘氨醇和/或所述1-磷酸鞘氨醇的类似物介导的候选拮抗剂,
- 提供如权利要求1至7中的任一项所定义的核酸分子,
- 提供在活性由所述1-磷酸鞘氨醇和/或所述1-磷酸鞘氨醇的类似物介导的拮抗剂存在下提供信号的测试系统,以及
- 确定活性由所述1-磷酸鞘氨醇介导的所述候选拮抗剂是否为活性由所述1-磷酸鞘氨醇和/或所述1-磷酸鞘氨醇的类似物介导的拮抗剂。

28. 一种用于检测1-磷酸鞘氨醇的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1至7中任一项所述的核酸分子。

29. 一种用于检测样品中的如权利要求1至7中的任一项所定义的核酸分子的方法,其中所述方法包含以下步骤:

a) 提供捕获探针,其中所述捕获探针至少部分互补于如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子的第一部分;和检测探针,其中所述检测探针至少部分互补于如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子的第二部分,或替代地,所述捕获探针至少部分互补于如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子的第二部分且所述检测探针至少部分互补于如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子的第一部分;

b) 单独或组合添加所述捕获探针和所述检测探针至含有如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子或假定含有如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子的样品中;

c) 使所述捕获探针和所述检测探针同时或以任何顺序依序与如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子或其一部分反应;

d) 任选检测所述捕获探针是否与步骤a)中提供的如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子杂交;以及

e) 检测步骤c)中形成的由如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子和所述

捕获探针及所述检测探针组成的复合物。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述检测探针包含检测工具, 和/或其中所述捕获探针固定于载体。

31. 根据权利要求29或30所述的方法, 其中自反应移除不为所述复合物的一部分的任何检测探针以使在步骤e)中仅检测为所述复合物的一部分的检测探针。

32. 根据权利要求29或30所述的方法, 其中步骤e)包含以下步骤: 比较当所述捕获探针和所述检测探针在如权利要求1至7中的任一项所定义的所述核酸分子或其一部分存在下杂交时由所述检测工具产生的信号与在不存在所述核酸分子或其一部分下由所述检测工具产生的信号。

脂质结合核酸

[0001] 本发明涉及一种能够结合脂质,优选磷脂、更优选1-磷酸鞘氨醇(sphingosine)的核酸分子;其用于分别制造药剂、诊断剂和检测剂的用途;一种包含所述核酸分子的组合物;一种包含所述核酸分子的复合物;一种用于使用所述核酸分子来筛选活性由脂质或脂质的类似物介导的拮抗剂的方法;以及一种用于检测所述核酸分子的方法。

[0002] 脂质和脂质衍生物因其作为细胞膜中的结构组分或作为 β 氧化作用或糖酵解的底物的功能而最为知名。近年来,脂质和脂质衍生物已被认定为一种在疾病中起重要作用的信号传导分子。存在生物活性脂质信号传导分子的许多实例,包括磷脂,诸如磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol)(缩写为PI)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine)(缩写为PS)、二脂酰甘油(diacylglyceride)(缩写为DAG)、磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerol)(缩写为PG)和磷脂酸(phosphatidic acid)(缩写为PA);溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidyl choline)、血小板活化因子和心磷脂(cardiolipin)。脂质信号传导分子的其它实例包括类二十烷酸(eicosanoid),其涵盖大麻素(cannabinoid)、前列腺素(prostaglandin)、异类二十烷酸(isoeicosanoid)和白三烯(leukotriene)。脂质可充当第二信使或通过直接与其自身特定受体相互作用来起作用。脂质信号传导路径是通过各种不同刺激物活化的且涉及于一系列不同细胞过程(包括粘着、运动性、增殖、细胞凋亡和分化)的调控中。鞘脂及其衍生物具有细胞外和细胞内信号传导功能且在人疾病中起重要作用。另一重要类别的脂质信号传导分子为鞘脂;其包括神经酰胺(ceramide)、神经酰胺-1-磷酸酯、鞘磷脂、鞘氨醇、鞘氨醇-1-磷酸酯、二氢鞘氨醇(sphinganine)和二氢鞘氨醇-1-磷酸酯。

[0003] 1-磷酸鞘氨醇(缩写为S1P)为一种380道尔顿(Dalton)的磷脂,分子式为 $C_{18}H_{38}NO_5P$ 。S1P曾经被认为仅是神经酰胺的一种分解产物,目前已知其在不同生物过程,诸如细胞生长、细胞增殖、血管生成和淋巴细胞迁移中具有重要功能(关于综述,参见Kim等, *Biochim Biophys Acta*.20091791:692-6;Maceyka等, *J Lipid Res*.2009 50增刊:S272-6;Takabe等, *Pharmacol Rev*.200860(2):181-95)。

[0004] 在S1P的其它功能之中,S1P具有抗细胞凋亡作用且促进细胞生长和增殖。其前体鞘氨醇和神经酰胺具有相反功能,从而诱导细胞周期阻滞和细胞死亡。因为S1P及其前体展现所述相反作用,所以认为主要由鞘氨醇磷酸酶和鞘氨醇激酶的相互影响控制的不同鞘氨醇代谢物的相对平衡而非其绝对量决定细胞命运。这个复杂调控系统称为“鞘脂变阻器(sphingolipid rheostat)”。

[0005] 新近研究已暗示S1P及其代谢物以及其前体神经酰胺为TNF- α 、IL1 β 和其它细胞因子的第二信使。各种证据支持S1P作为负责细胞增殖和存活的第二信使的作用。然而,同时,许多S1P的生物作用为充当细胞表面上S1P的五个G蛋白偶联受体(缩写为S1PR)的配体的结果。最初鉴定为孤儿受体且命名为内皮分化基因(缩写为EDG),其目前已重命名为EDG1/S1P₁、EDG5/S1P₂、EDG3/S1P₃、EDG6/S1P₄、EDG8/S1P₅,且加以表征。各受体偶联于杂二聚G蛋白(Gq、G12-13),从而活化下游信号传导分子,诸如Rho家族的小GTP酶(Zhou和Murthy, *Am J Physiol Cell Physiol*.2004,286:C1130-C1138;Kume等, *J Pharmacol Exp Ther*

r.2007320:766-773)、有丝分裂原(mitogen)活化的蛋白质激酶(Guo等,Eur J Biochem.1998257:403-408;Sato等,Mol Pharmacol.199955:126-133;Dikic等,Nature.1996383:547-550.)、磷脂酶C/D(Okamoto等,J Biol Chem.1998273:27104-27110;Gonda等,Biochem J.1999337:67-75;Banno等,JBiol Chem.1999274:27385-27391)等。S1PR的表达为广布的且S1P影响巨大范围的细胞反应,包括粘着、收缩、运动性、形态发生、增殖和分化,从而暗示S1P牵涉于血管张力的调控、伤口愈合、免疫细胞的迁移、神经元信号传导、血管生成、繁殖和心血管功能中。反应的范围取决于受体在细胞和组织中的表达样式和相应效应物。因此,在例如内皮细胞中,活化特定S1PR可具有与活化另一S1PR相反的作用(Lee等,Mol Cell.2001 8:693-704.;Kimura等,Biochem J.2000348:71-76.;Ryu等,Circ Res.2002 90:325-332.)。活化一种S1PR可差异性调控Rho家族的GTP酶(Garcia等,J Clin Invest.2001108:689-701;Gon等,Proc Natl Acad Sci USA.2005102:9270-9275;Liu等,J Clin Invest.2000 106:951-961)。此外,存在与其它生长因子信号传导路径的相互影响。

[0006] 存在于循环血液和淋巴中的S1P主要由血小板、活化的肥大细胞和单核吞噬细胞制备且分泌。发现S1P的浓度介于0.1mM至1mM之间,有时可达5mM,但仅一部分可用于活化S1PR,因为大多数S1P结合于白蛋白(albumin)或其它血浆蛋白。内源性S1P水平的改变可导致病理生理学病状,包括炎症和自体免疫性疾病、哮喘、血管生成、心脏病、癌症、眼病和脑血管疾病。

[0007] 因为S1P的许多作用被认为由S1P与一种或若干种S1PR的相互作用或结合介导,所以治疗方法已集中于靶向受体。已鉴定并描述众多不同S1P受体拮抗剂和激动剂。其对各种S1PR的特异性和亲和力不同且因此显示各种功能概况。最先进的化合物芬戈莫德(Fingolimod),也称为FTY720,为一种前药且在体内被磷酸化。磷酸化形式为S1PR S1P₁、S1P₃、S1P₄和S1P₅的激动剂且被证明在移植和自体免疫性疾病的模型中高度有效。其当前处于治疗多发性硬化症的3期临床试验中。由于不同S1PR具有相反作用,所以有兴趣鉴定对各种受体具有特定选择性的分子。干扰S1P依赖性病理生理学的另一方法在于影响内源性S1P水平。这个可通过靶向S1P激酶以改变通过使鞘氨醇磷酸化制备的S1P的量或通过靶向S1P磷酸酶以影响脱磷酸S1P的量来实现。影响内源性生物活性S1P水平的另一方法是通过由与中和剂的分子相互作用直接抑制S1P作用来实现。本发明描述一种中和S1P的方法。

[0008] 构成本发明的基础的问题在于提供一种工具,其特异性与脂质,优选磷脂、更优选S1P相互作用。更具体地,构成本发明的基础的问题在于提供一种基于核酸的工具,其特异性与脂质,优选磷脂、更优选S1P相互作用。

[0009] 构成本发明的基础的另一问题在于提供一种制造用于治疗人或非人疾病的药剂的工具,其中所述疾病的特征为脂质,优选磷脂、更优选S1P,直接或间接涉及于所述疾病的致病机制中。

[0010] 构成本发明的基础的另一问题在于提供一种制造用于诊断疾病的诊断剂的工具,其中所述疾病的特征为脂质,优选磷脂、更优选S1P,直接或间接涉及于所述疾病的致病机制中。

[0011] 构成本发明的基础的这些和其它问题由所附独立权利要求的主题解决。优选实施方案可取自附属权利要求。

[0012] 更具体地,在也为第一方面的第一实施方案的第一方面,构成本发明的基础的问

题由能够结合脂质的核酸分子解决。

[0013] 在第一方面的也为第一方面的第一实施方案的一实施方案的第二实施方案中,核酸为活性由脂质介导的拮抗剂。

[0014] 在第一方面的也为第一方面的第一和第二实施方案的一实施方案的第三实施方案中,脂质为磷脂,所述磷脂优选为1-磷酸鞘氨醇。

[0015] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二和第三实施方案的一实施方案的第四实施方案中,核酸分子包含中心核苷酸链段,其中所述中心核苷酸链段包含核苷酸序列

[0016] 5'WAUUGCCGAWUGUAAACGCCUWAGAGAAAGCACUAG3'或

[0017] 5'WAUUGCCGWUGUAAACGCCUWAGAGAAAGCACUAG3'

[0018] 且其中脂质优选为1-磷酸鞘氨醇。

[0019] 在第一方面的也为第一方面的第四实施方案的一实施方案的第五实施方案中,中心核苷酸链段包含选自5'AAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAAGCACUAG 3'、5'AAUAGCCGAUGAAACGCCUUUAGAGAAGCACUAG 3'和5'AAUAGCCGAAUGAAACGCCUUAAGAGAAGCACUAG 3'的组的核苷酸序列。

[0020] 在第一方面的也为第一方面的第四和第五实施方案的一实施方案的第六实施方案中,核酸分子在5'→3'方向上包含第一末端核苷酸链段、中心核苷酸链段和第二末端核苷酸链段,其中

[0021] 第一末端核苷酸链段包含三至六个核苷酸,且

[0022] 第二末端核苷酸链段包含三至六个核苷酸。

[0023] 在第一方面的也为第一方面的第四和第五实施方案的一实施方案的第七实施方案中,核酸分子在5'→3'方向上包含第二末端核苷酸链段、中心核苷酸链段和第一末端核苷酸链段,其中

[0024] 第一末端核苷酸链段包含三至六个核苷酸,且

[0025] 第二末端核苷酸链段包含三至六个核苷酸。

[0026] 在第一方面的也为第一方面的第六和第七实施方案的一实施方案的第八实施方案中,第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'X₁X₂X₃SUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CASX₄X₅X₆3',

[0027] 其中

[0028] X₁为A或不存在,X₂为G或不存在,X₃为S或不存在,X₄为S或不存在,X₅为C或不存在,且X₆为U或不存在。

[0029] 在第一方面的也为第一方面的第六、第七和第八实施方案的一实施方案的第九实施方案中,第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'X₁X₂X₃SUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CASX₄X₅X₆3',

[0030] 其中

[0031] a)X₁为A,X₂为G,X₃为S,X₄为S,X₅为C,且X₆为U或

[0032] b)X₁不存在,X₂为G,X₃为S,X₄为S,X₅为C,且X₆为U或

[0033] c)X₁为A,X₂为G,X₃为S,X₄为S,X₅为C,且X₆不存在或

[0034] d)X₁不存在,X₂为G,X₃为S,X₄为S,X₅为C,且X₆不存在。

[0035] 在第一方面的也为第一方面的第六、第七、第八和第九实施方案的一实施方案的

第十实施方案中,a)第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'AGCGUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CACGCU 3'或

[0036] b)第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'GCGUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CACGC 3'。

[0037] 在第一方面的也为第一方面的第六、第七和第八实施方案的一实施方案的第十一实施方案中,第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5' $X_1X_2X_3$ SUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CAS $X_4X_5X_6$ 3',

[0038] 其中

[0039] a) X_1 不存在, X_2 不存在, X_3 为S, X_4 为S, X_5 为C,且 X_6 不存在或

[0040] b) X_1 不存在, X_2 为G, X_3 为S, X_4 为S, X_5 不存在,且 X_6 不存在或

[0041] c) X_1 不存在, X_2 不存在, X_3 为S, X_4 为S, X_5 不存在,且 X_6 不存在。

[0042] 在第一方面的也为第一方面的第六、第七、第八和第十一实施方案的一实施方案的第十二实施方案中,a)第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CGUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CACG 3'或

[0043] b)第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'GCUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CAGC 3'或

[0044] c)第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'GGUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CACC 3',优选地

[0045] 第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CGUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CACG 3'。

[0046] 在第一方面的也为第一方面的第六、第七和第八实施方案的一实施方案的第十三实施方案中,第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5' $X_1X_2X_3$ SUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CAS $X_4X_5X_6$ 3',

[0047] 其中

[0048] X_1 不存在, X_2 不存在, X_3 为S或不存在, X_4 为S或不存在, X_5 不存在,且 X_6 不存在。

[0049] 在第一方面的也为第一方面的第六、第七、第八和第十三实施方案的一实施方案的第十四实施方案中,第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'GUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CAC 3'。

[0050] 在第一方面的也为第一方面的第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三和第十四实施方案的一实施方案的第十五实施方案中,中心核苷酸链段为结合1-磷酸鞘氨醇所必需。

[0051] 在第一方面的也为第一方面的第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四和第十五实施方案的一实施方案的第十六实施方案中,第一末端核苷酸链段和第二末端核苷酸链段任选彼此杂交,其中在杂交后,形成双链结构。

[0052] 在第一方面的也为第一方面的第十六实施方案的一实施方案的第十七实施方案中,双链结构由三至六个碱基对组成。

[0053] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六和第十七实施方案的一实施方案的第十八实施方案中,核酸分子包含根据SEQ.ID.No 12至26、41和42中的任一者的核苷酸

序列,优选根据SEQ.ID.No 12、13、15、18、19、23至26、41和42中的任一者的核苷酸序列,更优选根据SEQ ID No 12、18、23、24、41和42中的任一者的核苷酸序列。

[0054] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二和第三实施方案的一实施方案的第十九实施方案中,核酸分子包含根据SEQ.ID.NO.18的核苷酸序列或与其同源的核酸分子,其中同源性的至少85%。

[0055] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二和第三实施方案的一实施方案的第二十实施方案中,核酸分子包含根据SEQ.ID.NO.41的核苷酸序列或与其同源的核酸分子,其中同源性的至少85%。

[0056] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二和第三实施方案的一实施方案的第二十一实施方案中,核酸分子包含根据SEQ.ID.NO.42的核苷酸序列或与其同源的核酸分子,其中同源性的至少85%。

[0057] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二和第三实施方案的一实施方案的第二十二实施方案中,相较于参照核酸分子,核酸分子的亲和力增加,其中所述参照核酸分子包含根据SEQ.ID.NO.18的核苷酸序列且其中所述参照核酸分子由核糖核苷酸组成,其中所述核酸分子包含根据SEQ.ID.NO.18的核苷酸序列且其中根据SEQ.ID.No.18的核苷酸序列的一或多个核苷酸为脱氧核糖核苷酸而非核糖核苷酸。

[0058] 在第一方面的也为第一方面的第二十二实施方案的一实施方案的第二十三实施方案中,核酸分子包含根据SEQ.ID.No 27至37、39和40中的任一者的核苷酸序列,优选根据SEQ.ID.No 30、34至37、39和40中的任一者的核苷酸序列,更优选根据SEQ.ID.No.36、37、39和40中的任一者的核苷酸序列。

[0059] 在第一方面的也为第一方面的第二十三实施方案的一实施方案的第二十四实施方案中,核酸分子包含根据SEQ.ID.NO.36的核苷酸序列或与其同源的核酸分子,其中同源性的至少85%,其中所述同源核酸包含核糖核苷酸和至少一个脱氧核糖核苷酸。

[0060] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三和第二十四实施方案的一实施方案的第二十五实施方案中,核酸分子包含修饰基团,其中相较于不包含所述修饰基团的核酸,包含所述修饰基团的所述核酸分子自生物体的排泄率降低。

[0061] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三和第二十四实施方案的一实施方案的第二十六实施方案中,核酸分子包含修饰基团,其中相较于不包含所述修饰基团的核酸分子,包含所述修饰基团的所述核酸分子在生物体中的保留时间增加。

[0062] 在第一方面的也为第一方面的第二十五和第二十六实施方案的一实施方案的第二十七实施方案中,修饰基团选自包含生物可降解和非生物可降解修饰的组,所述修饰基团优选选自包含聚乙二醇、直链聚乙二醇、支链聚乙二醇、羟乙基淀粉、肽、蛋白质、多糖、固醇、聚氧化丙烯、聚氧基酰胺化物和聚(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺的组。

[0063] 在第一方面的也为第一方面的第二十七实施方案的一实施方案的第二十八实施方案中,修饰基团为聚乙二醇,优选由直链聚乙二醇或支链聚乙二醇组成,其中所述聚乙二

醇的分子量优选为约20,000Da至约120,000Da、更优选约30,000Da至约80,000Da且最优选约40,000Da。

[0064] 在第一方面的也为第一方面的第二十七和第二十八实施方案的一实施方案的第二十九实施方案中,其中修饰基团为羟乙基淀粉,其中优选地,羟乙基淀粉的分子量为约50kDa至约1000kDa、更优选约100kDa至约700kDa且最优选200kDa至500kDa。

[0065] 在第一方面的也为第一方面的第二十五、第二十六、第二十七、第二十八和第二十九实施方案的一实施方案的第三十实施方案中,修饰基团经由连接子偶合于核酸分子,其中所述连接子为生物可降解连接子。

[0066] 在第一方面的也为第一方面的第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九和第三十实施方案的一实施方案的第三十一实施方案中,修饰基团偶合于核酸分子的5'末端核苷酸和/或3'末端核苷酸和/或偶合于核酸分子的介于核酸分子的5'末端核苷酸与核酸分子的3'末端核苷酸之间的核苷酸。

[0067] 在第一方面的也为第一方面的第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十和第三十一实施方案的一实施方案的第三十二实施方案中,生物体为动物或人体,优选人体。

[0068] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一和第三十二实施方案的一实施方案的第三十三实施方案中,核苷酸或形成核酸分子的核苷酸为L-核苷酸。

[0069] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二和第三十三实施方案的一实施方案的第三十四实施方案中,核酸分子为L-核酸。

[0070] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三和第三十四实施方案的一实施方案的第三十五实施方案中,核酸分子包含至少一个能够结合1-磷酸鞘氨醇的结合部分,其中所述结合部分由L-核苷酸组成。

[0071] 在第一方面的也为第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三、第三十四和第三十五实施方案的一实施方案的第三十六实施方案中,核酸分子用于治疗 and/或预防疾病的方法中。

[0072] 在第一方面的也为第一方面的第三十六实施方案的一实施方案的第三十七实施方案中,通过抑制血管生成和/或纤维化来治疗或改善疾病。

[0073] 在第一方面的也为第一方面的第三十六和第三十七实施方案的一实施方案的第

三十八实施方案中,疾病为眼病,优选地,所述眼病选自包含以下的组:年龄相关的黄斑变性(age-related macular degeneration)、伴有糖尿病性黄斑水肿的糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy with diabetic macular edema)、年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜色素上皮脱离(retinal pigmented epithelium detachment)、增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy)和年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜纤维化。

[0074] 在第一方面的也为第一方面的第三十六实施方案的一实施方案的第三十九实施方案中,通过抑制血管生成和/或增殖来治疗或改善疾病。

[0075] 在第一方面的也为第一方面的第三十六、第三十七、第三十八和第三十九实施方案的一实施方案的第四十实施方案中,疾病为癌症,优选地,所述癌症选自包含乳癌、卵巢癌、黑素瘤(melanoma)、肺癌、增生(诸如前列腺增生)的组。

[0076] 在第一方面的也为第一方面的第三十六实施方案的一实施方案的第四十一实施方案中,疾病为炎症性疾病,其中所述炎症性疾病选自包含自体免疫性疾病、肺炎、败血症和创伤(诸如呼吸器诱发的肺损伤)的组。

[0077] 在第一方面的也为第一方面的第四十一实施方案的一实施方案的第四十二实施方案中,自体免疫性疾病选自包含多发性硬化症(multiple sclerosis)、类风湿性关节炎、银屑病、哮喘和炎症性肠病的组。

[0078] 在也为第二方面的第一实施方案的第二方面,构成本发明的基础的问题由包含如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子和任选另一组分的药物组合物解决,其中所述另一组分选自包含药学上可接受的赋形剂、药学上可接受的载体和药学活性剂的组。

[0079] 在第二方面的也为第二方面的第一实施方案的一实施方案的第二实施方案中,药物组合物包含如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子和药学上可接受的载体。

[0080] 在也为第三方面的第一实施方案的第三方面,构成本发明的基础的问题通过使用根据第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三、第三十四、第三十五、第三十六、第三十七、第三十八、第三十九、第四十、第四十一和第四十二实施方案中的任一者的用于制造药剂的核酸分子来解决。

[0081] 在第三方面的也为第三方面的第一实施方案的一实施方案的第二实施方案中,药剂用于人医学中或用于兽医学中。

[0082] 在也为第四方面的第一实施方案的第四方面,构成本发明的基础的问题通过使用根据第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三、第三十四、第三十五、第三十六、第三十七、第三十八、第三十九、第四十、第四十一和第四十二实施方案中的任一者的用于制造诊断工具的核酸分子来解决。

[0083] 在第三方面的也为第三方面的第一实施方案的一实施方案的第三实施方案中,药剂用于治疗 and/或预防眼病、癌症或炎症性疾病。

[0084] 在第三方面的也为第三方面的第三实施方案的一实施方案的第四实施方案中,眼

病选自包含以下的组：年龄相关的黄斑变性、伴有糖尿病性黄斑水肿的糖尿病性视网膜病变、年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜色素上皮脱离、增殖性玻璃体视网膜病变和年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜纤维化。

[0085] 在第三方面的也为第三方面的第三实施方案的一实施方案的第五实施方案中，癌症选自包含乳癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、增生（诸如前列腺增生）的组。

[0086] 在第三方面的也为第三方面的第三实施方案的一实施方案的第六实施方案中，炎症性疾病选自包含自体免疫性疾病、肺炎、败血症和创伤（诸如呼吸器诱发的肺损伤）的组。

[0087] 在第三方面的也为第三方面的第六实施方案的一实施方案的第七实施方案中，自体免疫性疾病选自包含多发性硬化症、类风湿性关节炎、银屑病、哮喘和炎性肠病的组。

[0088] 在也为第五方面的第一实施方案的第五方面，构成本发明的基础的问题由包含根据第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三、第三十四、第三十五、第三十六、第三十七、第三十八、第三十九、第四十、第四十一和第四十二实施方案中的任一者的核酸分子和脂质的复合物解决，其中所述复合物优选为结晶复合物。

[0089] 在第五方面的也为第五方面的第一实施方案的一实施方案的第二实施方案中，脂质为磷脂，所述磷脂优选为1-磷酸鞘氨醇。

[0090] 在也为第六方面的第一实施方案的第六方面，构成本发明的基础的问题通过使用根据第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三、第三十四、第三十五、第三十六、第三十七、第三十八、第三十九、第四十、第四十一和第四十二实施方案中的任一者的用于检测脂质的核酸分子来解决。

[0091] 在第六方面的也为第六方面的第一实施方案的一实施方案的第二实施方案中，脂质为磷脂，所述磷脂优选为1-磷酸鞘氨醇。

[0092] 在也为第七方面的第一实施方案的第七方面，构成本发明的基础的问题由一种筛选活性由脂质或所述脂质的类似物介导的拮抗剂的方法解决，所述方法包含下列步骤：

[0093] -提供活性由所述脂质和/或所述脂质的类似物介导的候选拮抗剂，

[0094] -提供如第一方面的任一实施方案中定义的核酸，

[0095] -提供在活性由所述脂质和/或所述脂质的类似物介导的拮抗剂存在下提供信号的测试系统，以及

[0096] 1.-确定活性由所述脂质介导的所述候选拮抗剂是否为所述脂质和/或所述脂质的类似物的拮抗剂。

[0097] 在第七方面的也为第七方面的第一实施方案的一实施方案的第二实施方案中，脂质为磷脂，所述磷脂优选为1-磷酸鞘氨醇。

[0098] 在也为第八方面的第一实施方案的第八方面，构成本发明的基础的问题由用于检测脂质的试剂盒解决，所述试剂盒包含根据第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八、

第十九、第二十、第二十一、第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三、第三十四、第三十五、第三十六、第三十七、第三十八、第三十九、第四十、第四十一和第四十二实施方案中的任一者的核酸分子,其中所述脂质优选为磷脂,其中所述磷脂更优选为1-磷酸鞘氨醇。

[0099] 在也为第九方面的第一实施方案的第九方面,构成本发明的基础的问题由一种检测样品中的如第一方面的任一实施方案中定义的核酸的方法,其中所述方法包含以下步骤:

[0100] a)提供捕获探针,其中所述捕获探针至少部分互补于如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子的第一部分;和检测探针,其中所述检测探针至少部分互补于如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子的第二部分,或替代地,所述捕获探针至少部分互补于如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子的第二部分且所述检测探针至少部分互补于如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子的第一部分;

[0101] b)单独或组合添加所述捕获探针和所述检测探针至含有如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子或假定含有如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子的样品中;

[0102] c)使所述捕获探针和所述检测探针同时或以任何顺序依序与如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子或其一部分反应;

[0103] d)任选检测所述捕获探针是否与步骤a)中提供的如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子杂交;以及

[0104] e)检测步骤c)中形成的由如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子和所述捕获探针及所述检测探针组成的复合物。

[0105] 在第九方面的也为第九方面的第一实施方案的一实施方案的第二实施方案中,检测探针包含检测工具,和/或其中捕获探针固定于载体,优选固体载体。

[0106] 在第九方面的也为第九方面的第一和第二实施方案的一实施方案的第三实施方案中,自反应移除不为复合物的一部分的任何检测探针以使在步骤e)中仅检测为复合物的一部分的检测探针。

[0107] 在第九方面的也为第九方面的第一、第二和第三实施方案的一实施方案的第四实施方案中,步骤e)包含以下步骤:比较当捕获探针和检测探针在如第一方面的任一实施方案中定义的核酸分子或其一部分存在下杂交时由检测工具产生的信号与在不存在所述核酸或其一部分下由检测工具产生的信号。

[0108] 本发明是基于以下惊人发现:

[0109] a)有可能产生特异性结合脂质且对脂质具有高亲和力的核酸分子,所述脂质优选为磷脂、更优选为S1P;

[0110] b)为根据本发明的核酸分子的所述核酸分子共有共同核苷酸序列,其中根据本发明的核酸分子的所述共同序列优选为根据本发明的核酸分子的结合特征所必需,更优选为结合S1P所必需;

[0111] c)根据本发明的核酸分子对脂质,优选对磷脂、更优选对S1P的结合亲和力将通过用2'-脱氧核糖核苷酸置换有限数目的核糖核苷酸来提高。

[0112] 所述核酸优选在本文中也称为根据本发明的核酸分子、根据本发明的核酸、本发

明核酸或本发明核酸分子。就此而言,如果不相反指示,那么术语核酸及核酸分子以同义方式在本文中使用。

[0113] 可在单独或以任何组合使用核酸的本发明的任何方面实现如本文所述的根据本发明的核酸的特征。

[0114] 短核酸分子对脂质、磷脂且特别是S1P具有高结合亲和力的研究结果可被鉴定,就此而言为惊人的,因为尽管如‘The aptamer handbook’(Klussmann,Klussmann,S.(编著); The Aptamer Handbook,第1版-2006年2月,Wiley-VCH,Weinheim)中所述鉴定了针对几乎所有靶标类别(诸如肽、蛋白质、核酸、小分子、抗生素、氨基酸、核苷酸)的核酸分子,但迄今为止无核酸分子可被鉴定结合脂质、磷脂且特别是S1P。脂质,特别是磷脂的结构和电荷说明为何鉴定脂质结合核酸分子迄今为止尚未成功和/或从未加以考虑。诸如S1P的磷脂的主要特征为其具有不带电荷的脂族部分和一个带负电荷的磷酸基团。在考虑电荷和所述脂质的磷酸基团的负电荷下,惊人的是发明者可鉴定结合脂质、且更具体地结合磷脂的核酸分子。归因于核酸分子的糖骨架中的磷酸,核酸分子本身带负电荷。因此,核酸分子结合另一带负电荷的分子或部分不大可能。除电荷排斥之外,粘附也影响具有三维结构的核酸分子到达靶分子。尽管已公布结合小分子的若干核酸分子,但通常,针对小分子的核酸分子的亲和力在微摩尔范围内(James,2000 Encyclopedia of Analytical Chemistry,第4848-4871页),此致使其不适合供治疗使用。然而,根据本发明的最佳S1P结合核酸分子显示由 K_D 值表示的高结合亲和力,此允许在体内使用所述核酸分子,更具体地在治疗或诊断哺乳动物,优选人的方法中使用所述核酸分子。优选地,根据本发明的核酸分子的 K_D 值小于100nM、更优选小于50nM。在一实施方案中,根据本发明的核酸分子的 K_D 值等于或小于由5nM至53nM的范围限定的任何值。在另一实施方案中,根据本发明的核酸分子的 IC_{50} 值等于或小于由5nM至31nM的范围限定的任何值。

[0115] 根据本发明的核酸分子特异性结合S1P(也称为D-赤-鞘氨醇-1-磷酸酯),而非缺乏磷酸基团的D-赤-鞘氨醇。

[0116] 因为认为诸如S1P的脂质的许多作用由脂质与一种或若干种脂质受体(优选S1P受体)的相互作用且更具体地脂质与一种或若干种脂质受体的结合介导,所以治疗方法已集中在靶向脂质受体,特别是S1P受体。因此,本领域技术人员应了解根据本发明的核酸分子优选为活性由脂质,优选由磷脂、更优选由S1P介导的拮抗剂。已鉴定并描述众多不同S1P受体拮抗剂和激动剂,其由于其结合所述脂质而对这些脂质介导的活性具有影响。其对各种S1PR(诸如S1P₁、S1P₃、S1P₄和S1P₅)的特异性和亲和力不同且因此显示各种功能概况。根据本发明的核酸分子的一个优势在于根据本发明的核酸分子为S1P的拮抗剂且由此介导所有S1P受体的功能而非处理且更具体地结合单一S1P受体。

[0117] 根据本发明的脂质优选选自包含蜡、固醇、脂溶性维生素(诸如维生素A、D、E和K)、单酸甘油酯、二酸甘油酯、磷脂等但不限于其的组。

[0118] 脂质可广泛定义为疏水性或两亲性小分子;一些脂质的两亲性性质允许其在水性环境中形成诸如囊泡、脂质体或膜的结构。生物脂质完全或部分自两种不同类型的生物化学亚单位或“构筑嵌段”:酮酰基和异戊二烯基团产生。使用此方法,脂质可分成八个种类:脂肪酰基、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂、糖脂、聚酮(由酮酰基亚单位缩合产生)、固醇脂质和异戊烯醇脂质(由异戊二烯亚单位缩合产生)。

[0119] 尽管术语脂质有时用作脂肪的同义词,但脂肪为称为甘油三酯的脂质亚组。脂质也涵盖诸如脂肪酸及其衍生物(包括甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯及磷脂)、以及其它含固醇代谢物(诸如胆固醇)的分子。

[0120] 磷脂为一类脂质且为所有细胞膜的主要组分,因为其可形成脂质双层。大多数磷脂含有甘油二酯、磷酸基团和简单有机分子(诸如胆碱);这个规则的一个例外为鞘磷脂,其由鞘氨醇而非甘油产生。

[0121] 鞘脂为一类由脂族氨基醇鞘氨醇产生的脂质。长链碱(有时简称为类鞘氨醇碱)为酵母与哺乳动物两者中重新鞘脂合成的第一非短暂产物。这些化合物,具体地称为植物鞘氨醇和二氢鞘氨醇(dihydrosphingosine)(也称为二氢鞘氨醇(sphinganine),但此术语较不常见),主要为C18化合物,同时有些较低水平的C20碱。神经酰胺和糖鞘脂为这些化合物的N-酰基衍生物。鞘氨醇骨架为O-连接于(通常)带电荷的头基(head group),诸如乙醇胺、丝氨酸或胆碱。骨架也为酰胺-连接于酰基,诸如脂肪酸。

[0122] 1-磷酸鞘氨醇(缩写为S1P)为一种380道尔顿的磷脂,分子式为 $C_{18}H_{38}NO_5P$ 。S1P的同义词为

[0123] D-赤-鞘氨醇-1-磷酸酯,

[0124] 4-十八烯-1,3-二醇,2-氨基-,1-(磷酸二氢酯),(2S,3R,4E)-,(2S,3R,4E)-2-氨基-3-羟基十八-4-烯-1-基磷酸二氢酯,

[0125] 4-十八烯-1,3-二醇,2-氨基-,1-(磷酸二氢酯),(R-(R*,S*-(E)))-,

[0126] 4-十八烯-1,3-二醇,2-氨基-,1-(磷酸二氢酯),[R-[R*,S*-(E)]]-,

[0127] 1-磷酸鞘-4-氨醇,

[0128] 1-磷酸C18-鞘氨醇,

[0129] 鞘氨醇,D-赤-1-磷酸酯,

[0130] 1-磷酸D-赤-二氢鞘氨醇,

[0131] (2S,3R,E)-2-氨基-3-羟基十八-4-烯基磷酸二氢酯,

[0132] (2S,3R,4E)-2-氨基-4-十八烯-1,3-二醇1-(磷酸二氢酯),

[0133] (2S,3R,4E)-2-氨基-3-羟基十八-4-烯-1-基磷酸氢酯,

[0134] (E)-(1S,2R)-2-羟基-1-磷酸氧基甲基-十七-3-烯基-胺。

[0135] 本发明的S1P结合核酸分子可用在本文中也称为盒(Box)的核苷酸链段来表征。不同类型的S1P结合核酸包含不同核苷酸链段。一般而言,本发明的S1P结合核酸分子在其5'末端和3'末端包含末端核苷酸链段:第一末端核苷酸链段和第二末端核苷酸链段。第一末端核苷酸链段和第二末端核苷酸链段可彼此杂交,借此在杂交后形成双链结构。然而,在生理和/或非生理条件下,所述杂交并非必定在分子中实现。S1P结合核酸的三个核苷酸链段-第一末端核苷酸链段、中心核苷酸链段和第二末端核苷酸链段-在5'→3'方向上彼此按以下进行排列:第一末端核苷酸链段-中心核苷酸链段-第二末端核苷酸链段。然而,或者,在5'→3'方向上彼此排列第二末端核苷酸链段、中心核苷酸链段和末端第一核苷酸链段。

[0136] 不同S1P结合核酸分子之间的确定盒或链段的序列差异影响对S1P的结合亲和力。基于对本发明的不同S1P结合核酸分子的结合分析,中心链段及其核苷酸序列个别地且更优选地以其整体方式为结合人S1P所必需。

[0137] 在本发明内的是根据本发明的核酸分子或其链段或其任何部分原则上可彼此杂

交。在所述杂交后,形成双链结构。本领域技术人员应了解所述杂交可能或可能不发生,特别在体外和/或体内条件下。此外,在所述杂交的情况下,情况并不必定是杂交历经两个链段的至少基于碱基配对的规则,原则上可发生所述杂交及因此双链结构的形成所处的整个长度而发生。如本文中优选所用,双链结构为由两个或更多个单独链或单一链的两个在空间上分开的链段形成的分子或结构的一部分,其中存在至少一个、优选两个或更多个优选根据沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对规则进行碱基配对的碱基对。本领域技术人员也应了解诸如Hoogsten碱基配对的其它碱基配对可存在于所述双链结构中或形成所述双链结构。

[0138] 在一优选实施方案中,如本文所用的术语排列意谓本文关于本文公开的核酸分子所述的结构或功能特征或组分的次序或顺序。

[0139] 本领域技术人员应了解根据本发明的核酸分子能够使本发明的分子结合S1P。在不希望受任何理论束缚下,本发明者假定S1P结合由个别核酸分子的三维结构特性或组分的组合所致,所述特性或组分由形成所述特性或组分的核苷酸序列的定向和折叠样式所产生,其中优选地,所述特性或组分为S1P结合核酸分子的第一末端核苷酸链段、中心核苷酸链段和第二末端核苷酸链段。明显的是个别特性或组分可因此由各种不同个别序列形成,所述序列的变化程度可视所述组分或特性必须形成的三维结构而变化。核酸分子的总体结合特征分别由各种组分和特性的相互影响所致,所述相互影响最终导致核酸分子与其靶标(即S1P)的相互作用且更具体地核酸分子与其靶标的结合。此外,在不希望受任何理论束缚下,为本发明的S1P结合核酸分子所特有的中心链段似乎对于介导和/或建立所要求的核酸与S1P的结合而言为重要的。实质上,根据本发明的核酸分子适于检测S1P。此外,本领域技术人员应了解根据本发明的核酸分子为活性由S1P介导的拮抗剂。由于这个原因,所以根据本发明的核酸分子适于分别治疗和预防与任一S1P相关或由任一S1P引起的任何疾病。科学推理可取自确定S1P分别涉及多种疾病和病状或与多种疾病和病状相关,且以引用的方式并入本文的先前技术。

[0140] 根据本发明的核酸分子也应包含实质上与特定序列,且优选本文公开的根据本发明的核酸分子的特定序列同源的核酸分子。术语实质上同源应理解成同源性的至少75%、优选85%、更优选90%且最优选超过95%、96%、97%、98%或99%。

[0141] 相对于根据本发明的参照核苷酸序列或参照核酸分子,根据本发明的核酸分子中存在的同源核苷酸的实际百分比将取决于核酸分子中存在的核苷酸总数。修饰百分比可基于核酸分子中存在的核苷酸总数。优选地,本发明的核酸分子的同源核苷酸选自包含核糖核苷酸和2'-脱氧核糖核苷酸的组。

[0142] 同源性可如本领域技术人员所知加以确定。更具体地,序列比较算法接着基于指定程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列一致性百分比。测试序列优选为据称其与另一核酸分子同源或将被测试其是否与另一核酸分子同源,且如果同源的话,同源程度有多少的序列或核酸分子,其中所述另一核酸分子也称为参照序列。在一实施方案中,参照序列为如本文所述的核酸分子、更优选具有根据任何SEQ.ID.No 12、18、36、41和42的序列的核酸分子。

[0143] 可例如通过Smith和Waterman的局部同源性算法(Smith和Waterman,1981)、通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法(Needleman和Wunsch,1970)、通过Pearson和Lipman

的搜寻类似性方法(Pearson和Lipman,1988)、通过这些算法的电脑化执行(Wisconsin Genetics软件包(Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,Wis.)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)或通过目视检查进行序列的最佳对准以实现比较。

[0144] 适于确定序列一致性百分比的算法的一个实例为用于基本局部比对搜寻工具(下文称为“BLAST”)中的算法,参见例如Altschul等(Altschul等1990和Altschul等,1997)。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(下文称为“NCBI”)公开获得。用于使用可自NCBI获得的软件(例如BLASTN(用于核苷酸序列)和BLASTP(用于氨基酸序列))确定序列一致性的缺省参数描述于McGinnis等(McGinnis等,2004)中。根据本发明的核酸分子也应包含含有一个或若干个本文公开的核酸序列或其一部分的那些核酸分子,优选就核酸分子或所述部分涉及于结合人S1P中而言。在一实施方案中,所述核酸分子为本文所述的核酸分子之一或其衍生物和/或代谢物,其中相较于本文所述的核酸分子,所述衍生物和/或代谢物优选为截短核酸分子。截短可涉及如本文公开的核酸分子的任一末端或两个末端。此外,截短可涉及核酸分子的内部核苷酸序列,即其可涉及分别5'末端核苷酸与3'末端核苷酸之间的核苷酸。此外,截短应包含自本文公开的核酸分子的序列缺失少至单一核苷酸。截短也可涉及一个或一个以上本发明的核酸分子的链段,其中所述链段的长度可少至一个核苷酸。

[0145] 根据本发明的核酸分子的结合可由本领域技术人员使用常规实验或通过使用或采用如本文所述,优选如本文在实施例部分中所述的方法加以测定。

[0146] 根据本发明的核酸分子可为D-核酸分子(D-核酸分子)或L-核酸(L-核酸分子)。优选地,核酸为L-核酸分子。此外,有可能的是核酸分子的一部分或若干部分以D-核酸形式存在或核酸的至少一部分或若干部分为L-核酸。术语核酸分子的“部分”应意谓至少一个核苷酸。所述核酸分子在本文中通常分别称为D-核酸和L-核酸。因此,在一特别优选实施方案中,根据本发明的核酸分子由L-核苷酸组成且包含至少一个D-核苷酸。所述D-核苷酸优选连接于不同于界定根据本发明的核酸的链段的部分,优选为其涉及与核酸分子的其它部分相互作用的那些部分。优选地,所述D-核苷酸分别在任何链段的末端和根据本发明的任何核酸分子的末端连接。在另一优选实施方案中,所述D-核苷酸可充当优选使修饰或修饰基团(诸如PEG和HES)连接于根据本发明的核酸的间隔子或连接子。

[0147] 本发明的一实施方案也为本文所述的各个及任何核酸分子就其核酸序列而言以其整体方式限于特定核苷酸序列。换句话说,在所述实施方案中,术语“包含”应以含有或由...组成的含义解释。

[0148] 在本发明内的还有根据本发明的核酸分子为较长核酸分子的一部分,其中这个较长核酸包含若干部分,其中至少一个所述部分为根据本发明的核酸分子或其一部分。这些较长核酸分子的其它部分可为一个或若干个D-核酸或一个或若干个L-核酸。任何组合可与本发明关联使用。较长核酸的这些其它部分单独或集合、以其整体形式或以特定组合形式可展现不同于结合,优选不同于结合S1P的功能。一个可能的功能在于允许与一个或其它分子相互作用(其中所述一个或其它分子优选不同于S1P)诸如以实现固定、交联、检测或扩增。在本发明的另一实施方案中,根据本发明的核酸分子包含呈个别或组合部分形式的本发明的若干核酸分子。包含本发明的若干核酸分子的所述核酸分子也由术语较长核酸分子涵盖。

[0149] 如本文所用的L-核酸或L-核酸分子为由L-核苷酸组成,优选完全由L-核苷酸组成的核酸。

[0150] 如本文所用的D-核酸或D-核酸分子为由D-核苷酸组成,优选完全由D-核苷酸组成的核酸。

[0151] 此外,如果不相反指示,那么任何核苷酸序列在本文中都以5'→3'方向阐述。

[0152] 如本文优选所用,核苷酸的任何位置都是相对于序列、链段或亚链段的5'末端确定或提及。因此,第二核苷酸为分别自序列、链段和亚链段的5'末端计数的第二核苷酸。此外,根据此规则,倒数第二核苷酸为分别自序列、链段和亚链段的3'末端计数的第二核苷酸。

[0153] 不管本发明的核酸分子是否由D-核苷酸、L-核苷酸或两者的组合(其中所述组合为例如随机组合或由至少一个L-核苷酸和至少一个D-核苷酸组成的确定链段序列)组成,核酸可由脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或其组合组成。

[0154] 将根据本发明的核酸分子设计成有利于若干原因的L-核酸分子。L-核酸分子为天然存在的核酸分子的对映异构体。然而,归因于普遍存在核酸酶,D-核酸分子在水溶液中且特别在生物系统或生物样品中不是很稳定。天然存在的核酸酶,特别是来自动物细胞的核酸酶不能降解L-核酸分子。由于这个原因,L-核酸分子在所述系统(包括动物体和人体)中的生物半衰期显著增加。归因于对L-核酸缺乏可降解性,无核酸酶降解产物自所述L-核酸分子产生且因此未观察到由此产生的副作用。这个方面限定事实上所有其它用于治疗涉及S1P或由S1P介导的疾病和/或病症的化合物的L-核酸分子。通过不同于沃森克里克碱基配对的机制特异性结合靶分子的L-核酸分子、或部分或完全由L-核苷酸组成的适体(特别是其中涉及于使适体结合于靶分子的那些适体部分)也称为镜像异构体(Spiegelmer)。

[0155] 在本发明内的还有不管本发明的本发明核酸分子是否以D-核酸、L-核酸或D,L-核酸形式存在或其是否为DNA或RNA,其可以单链或双链核酸形式存在。通常,根据本发明的核酸分子为单链核酸,其归因于一级序列而展现确定二级结构且因此也可形成三级结构。然而,在彼此互补或部分互补的两个链彼此杂交的意义上,根据本发明的核酸分子也可作为双链。这个会赋予核酸分子稳定性,如果核酸分子以天然存在的D型而非L型存在,那么此特别将为有利的。

[0156] 本发明的核酸分子可经修饰。所述修饰可涉及核酸分子的单一核苷酸且在本领域中为熟知的。所述修饰的实例尤其描述于Venkatesan(2003);Kusser(2000);Aurup(1994);Cummins(1995);Eaton(1995);Green(1995);Kawasaki(1993);Lesnik(1993);和Miller(1993)中。所述修饰可为在组成核酸分子的个别核苷酸的2'位置处的H原子、F原子或O-CH₃基团或NH₂-基团。此外,根据本发明的核酸分子可包含至少一个LNA核苷酸。在一实施方案中,根据本发明的核酸分子由LNA核苷酸组成。

[0157] 本发明者惊人地发现相较于根据本发明的母S1P结合RNA核酸分子,即由不具有非化学修饰或取代的核糖核苷酸组成的本发明的核酸分子,在本发明的S1P结合RNA分子,即由L-核糖核苷酸组成的本发明的L-核酸分子中进行所述非化学修饰或取代会导致本发明的S1P结合RNA分子的结合亲和力提高。非化学修饰或取代优选自由一个或多个L-脱氧核糖核苷酸置换根据本发明的RNA核酸分子(即由核糖核苷酸组成的本发明的核酸分子)中的一个或多个L-核糖核苷酸的组。

[0158] 在一优选实施方案中，S1P结合核酸—仅由核糖核苷酸组成的RNA镜像异构体L-S1P-215-F9-002—的结合亲和力通过由至多五个脱氧核糖核苷酸置换至多五个核糖核苷酸，优选通过由四个脱氧核糖核苷酸置换四个核糖核苷酸得以提高。

[0159] 在一实施方案中，根据本发明的核酸分子可为多分体核酸。如本文所用的多分体核酸分子为由至少两个核酸链组成的核酸。这至少两个核酸链形成功能单元，其中所述功能单元为靶分子的配体。至少两个核酸链可通过裂解核酸以产生两个链或通过合成对应于本发明(即)总体核酸分子的第一部分的一个核酸和对应于总体核酸分子的第二部分的另一核酸而由任何本发明核酸分子产生。应了解裂解与合成两者均可应用于产生存在如上所示例的两个以上链的多分体核酸。换句话说，至少两个核酸链通常不同于彼此互补和杂交的两个链，但在各种核酸部分之间可存在某一程度的互补性。

[0160] 最后，在本发明内的还有根据本发明的核酸的完全闭合(即环状)结构被实现，即根据本发明的核酸优选通过共价键联而闭合，其中更优选地，所述共价键联在如本文公开的核酸序列的5'末端与3'末端之间进行。

[0161] 本发明者已发现根据本发明的核酸展现极有利的 K_D 值范围。

[0162] 一种测定根据本发明的核酸分子的结合常数的可能性为使用如实施例4和6中所述的表面等离子体共振，其确认根据本发明的核酸展现有利 K_D 值范围的以上研究结果。用以表示个别核酸分子与靶标(在本情况下为S1P)之间的结合强度的一个适当量度为所谓 K_D 值，其本身以及其测定方法为本领域技术人员所知。

[0163] 根据本发明的核酸的特征为具有某一 K_D 值。优选地，由根据本发明的核酸所示的 K_D 值小于 $1\mu\text{M}$ 。约 $1\mu\text{M}$ 的 K_D 值据称为核酸非特异性结合靶标所特有。如本领域人员所应了解，一组化合物(诸如根据本发明的核酸)的 K_D 值在某一范围内。以上提及的约 $1\mu\text{M}$ 的 K_D 为 K_D 值的一优选上限。靶结合核酸的 K_D 的优选下限可为约10皮摩尔或10皮摩尔以上。在本发明内的是结合S1P的个别核酸的 K_D 值优选在这个范围内。优选范围可通过选择这个范围内的任何第一数值和这个范围内的任何第二数值来确定。优选上限值为250nM和100nM，优选下限值为50nM、10nM、1nM、100pM和10pM。

[0164] 根据本发明的核酸分子可具有任何长度，条件是其仍然能够结合靶分子。本领域中应了解根据本发明的核酸存在优选长度。通常，长度介于15个核苷酸与120个核苷酸之间。本领域技术人员应了解介于15与120之间的任何整数都为根据本发明的核酸的可能长度。根据本发明的核酸的更优选长度范围为具有约20至100个核苷酸、约20至80个核苷酸、约20至60个核苷酸、约20至50个核苷酸和约30至50个核苷酸的长度。

[0165] 在本发明内的是本文公开的核酸包含优选为高分子量部分和/或优选允许改进核酸的就尤其在动物体，优选人体中的保留时间而言的特征的部分。所述修饰的特别优选实施方案为根据本发明的核酸的PEG化和HES化。如本文所用，PEG代表聚(乙二醇)且HES代表羟乙基淀粉。如本文优选所用的PEG化为修饰根据本发明的核酸，其中所述修饰由连接于根据本发明的核酸的PEG部分组成。如本文优选所用的HES化为修饰根据本发明的核酸，其中所述修饰由连接于根据本发明的核酸的HES部分组成。诸如直链聚(乙二醇)、支链聚(乙二醇)、羟乙基淀粉、肽、蛋白质、多糖、固醇、聚氧化丙烯、聚氧基酰胺化物、聚(2-羟乙基)-L-谷氨酰胺和聚乙二醇的修饰以及使用所述修饰来修饰核酸的方法描述于欧洲专利申请EP 1 306 382中，其公开内容由此以引用的方式整体并入本文。

[0166] 在PEG为所述高分子量部分的情况下,分子量优选为约20,000Da至约120,000Da、更优选约30,000Da至约80,000Da且最优选约40,000Da。在HES为所述高分子量部分的情况下,分子量优选为约50kDa至约1000kDa、更优选约100kDa至约700kDa且最优选200kDa至500kDa。HES展现0.1至1.5、更优选1至1.5的摩尔取代度且展现表示为C2/C6比率约0.1至15、优选约3至10的取代样品。HES修饰的方法例如描述于德国专利申请DE 1 2004 006 249.8中,其公开内容由此以引用的方式整体并入本文。

[0167] 修饰在原则上可在本发明的核酸分子的任何位置处对其进行。优选地,对核酸分子的5'末端核苷酸、3'末端核苷酸和/或介于5'核苷酸与3'核苷酸之间的任何核苷酸进行所述修饰。

[0168] 修饰且优选PEG和/或HES部分可直接或通过连接子连接于本发明的核酸分子。在本发明内的还有根据本发明的核酸分子包含一个或多个修饰,优选一个或多个PEG和/或HES部分。在一实施方案中,个别连接子分子使一个以上PEG部分或HES部分连接于根据本发明的核酸分子。与本发明关联使用的连接子本身可为直链或支链。这种连接子为本领域技术人员所知且进一步描述于专利申请W02005074993和W02003035665中。

[0169] 在一优选实施方案中,连接子为生物可降解连接子。归因于修饰自根据本发明的核酸释放,生物可降解连接子允许改进根据本发明的核酸的就尤其在动物体中,优选在人体中的保留时间而言的特征。生物可降解连接子的使用可允许对根据本发明的核酸的保留时间进行较好控制。所述生物可降解连接子的一优选实施方案为如但不限于以下中所述的生物可降解连接子:国际专利申请W02006/052790、W02008/034122、W02004/092191和W02005/099768,其中在国际专利申请W02004/092191和W02005/099768中,连接子为由一或两个如本文所述的修饰、核酸分子和两者之间的生物可降解连接子组成的聚合寡核苷酸前药的一部分。

[0170] 在本发明内的是修饰或修饰基团为生物可降解修饰,其中所述生物可降解修饰可直接或通过连接子连接于本发明的核酸分子。归因于修饰自根据本发明的核酸释放,生物可降解修饰允许改进根据本发明的核酸的就尤其在动物体中,优选在人体中的保留时间而言的特征。生物可降解修饰的使用可允许对根据本发明的核酸的保留时间进行较好控制。如但不限于国际专利申请W02002/065963、W02003/070823、W02004/113394和W02000/41647(在W02000/41647中优选第18页第4至24行)中所述,所述生物可降解修饰的一优选实施方案为生物可降解的。

[0171] 除如上文所述的修饰之外,其它修饰可用于改进根据本发明的核酸的特征,其中所述修饰选自蛋白质、脂质(诸如胆固醇)和糖链(诸如淀粉酶、葡聚糖等)的组。

[0172] 在不希望受任何理论束缚下,似乎通过用高分子量部分,诸如聚合物且更特别本文公开的优选生理学上可接受的聚合物修饰根据本发明的核酸,排泄动力学得以改变。更特别地,似乎归因于所述经修饰本发明核酸的分子量增加及归因于核酸特别在呈L型时不经受代谢,自动物体,优选自哺乳动物体且更优选自人体的排泄降低。因为排泄通常通过肾进行,所以本发明者假定相较于不具有这种导致在体内的保留时间增加的高分子量修饰的核酸,如此修饰的核酸的肾小球滤过率显著降低。与此关联,特别值得注意的是不管所述高分子量修饰如何,根据本发明的核酸的特异性不以不利方式受到影响。就此而言,根据本发明的核酸具有惊人的特征-其通常不能自药理学活性的化合物预期-以致提供持续释放的医

药制剂并不必定为提供持续释放所需。更确切而言,呈其经修饰形式的包含高分子量部分的根据本发明的核酸可本身已用作持续释放制剂。就此而言,如本文公开的核酸分子的修饰和如此修饰的核酸分子及包含所述核酸分子的任何组合物可提供不同,优选受控制的药物动力学及其生物分布。这个也包括在循环中的保留时间和向组织的分布。所述修饰进一步描述于专利申请W02003035665中。

[0173] 然而,在本发明内的还有本文公开的核酸不包含任何修饰且特别是无高分子量修饰,诸如PEG化或HES化。当核酸显示向体内任何靶器官或组织的优先分布时或当需要核酸在施用之后自身体快速清除时,所述实施方案是特别优选的。如本文公开的具有向体内任何靶器官或组织的优先分布概况的核酸将允许在靶组织中建立有效局部浓度同时保持核酸的全身浓度较低。这个将允许使用不仅就经济观点来看有益,而且使其它组织向核酸剂的不必要暴露降低,由此降低潜在副作用风险的低剂量。在使用各自根据本发明的核酸或包含所述核酸的药剂的体内成像或特定治疗给药要求的情况下,可能需要如本文公开的核酸在施用之后自身体快速清除。

[0174] 在本文中也称为根据本发明的核酸和/或根据本发明的拮抗剂的本发明核酸可用于产生或制造药剂。所述根据本发明的药剂或药物组合物含有至少一种本发明核酸、任选以及其它药学活性的化合物,其中本发明核酸优选本身充当药学活性的化合物。在优选实施方案中,所述药剂包含至少药学上可接受的载体。所述载体可例如水、缓冲剂、PBS、葡萄糖溶液(优选5%葡萄糖盐平衡溶液)、淀粉、糖、明胶或任何其它可接受的载体物质。所述载体通常为本领域技术人员所知。本领域技术人员应了解本发明的药剂的或与之相关的任何实施方案、用途和方面也可适用于本发明的药物组合物且反之亦然。

[0175] 根据本发明或根据本发明制备的核酸、药物组合物和药剂所治疗和/或预防的适应症、疾病和病症由以相应致病机制直接或间接涉及S1P所致。

[0176] 本发明提供一种通过鉴定和使用S1P结合核酸来中和S1P的。因为根据本发明的核酸与人和动物S1P相互作用,所以预期熟练技术人员了解本发明的S1P结合核酸可用于治疗、预防和/或诊断本文所述的任何人和动物疾病。与此关联,应了解本发明的核酸可用于治疗和预防本文所述的疾病、病症或病状,不管构成所述疾病、病症或病状的基础的作用模式如何。

[0177] 在下文中且在不希望受任何理论束缚下,提供结合各种疾病、病症和病状使用根据本发明的核酸分子的推理,由此致使对根据本发明的核酸分子所要求的治疗、预防和诊断适用性似乎有理。为避免任何不必要的重述,应了解由于涉及如与此关联所概述的S1P及其受体S1P₁、S1P₂、S1P₃、S1P₄和S1P₅,所述相互作用可由根据本发明的核酸分子阐明以便实现所要求的治疗、预防和诊断作用。此外,应了解患者的疾病、病症和病状的特性及与此关联所述的治疗方案的任何详情可服从本申请的优选实施方案。

[0178] 根据本发明或根据本发明制备的核酸分子、药物组合物和药剂所治疗和/或预防的适应症、疾病和病症由以相应致病机制直接或间接涉及S1P所致。在特征至少部分为一个或多个病理学过程受S1P调控的疾病和病状(诸如过度增殖、异常新血管化、血管生成、纤维发生、纤维化、结疤、异常细胞迁移、异常血管完整性、炎症和自体免疫性反应)中,中和S1P可能有益。本文提供的分类是为了描述方便且不限本本发明。

[0179] S1P通过刺激细胞增殖和存活来促进细胞生长。因此,预期降低S1P的有效体内浓

度会有益于治疗或预防过度增殖病症。过度增殖病症定义为与不受控制的细胞增殖相关的疾病和/或病症和/或患病状况。S1P相关的过度增殖病症包括增生、瘤形成、与内皮细胞增殖相关的病症和与成纤维细胞增殖相关的病症。在大多数情况下,瘤形成将为癌症。

[0180] 与内皮细胞相关的过度增殖病症可导致血管生成疾病。所述疾病和病状的实例为由实体肿瘤或血液肿瘤引起的癌症、血管瘤、子宫内膜异位症、肥胖症、年龄相关的黄斑变性和各种视网膜病变、以及由于动脉粥样硬化的治疗中的支架术(stenting)导致再狭窄的内皮细胞和平滑肌细胞增殖。

[0181] 大量日益增长的证据暗示S1P为一种高度强力促血管生成剂。S1P刺激人静脉内皮细胞(HUVEC)的趋化运动性且诱导多细胞结构的分化[Liu等,J Clin Invest.2000 106:951-961]并促进EC前体迁移至新血管化部位[Annabi,Exp Hematol.2003年7月;31(7):640-9]。在一项用鼠类抗S1P抗体进行的新近研究中,显示在不同体外测定中,用抗体中和S1P会抑制细胞保护作用 and 血管内皮细胞的迁移。在体内研究中,相同抗体在基膜胶塞测定中抑制小鼠中VEGF诱导的血管生成以及促血管生成细胞因子(诸如VEGF、bFGF、IL-6和IL-8)自肿瘤细胞释放。在携带人癌细胞的异种移植小鼠中,用鼠类抗S1P抗体的治疗显著减缓肿瘤进展[Visentin,Cancer Cell.2006年3月;9(3):225-38]。因此,在病理病状,包括但不限于癌症和与视网膜和脉络膜新血管化相关的眼病(Caballero,Exp Eye Res 2009,88:367-377;Skoura,J Clin Invest 2007,117:2506-2516;Xie,J Cell Physiol 2009,218:192-198)(诸如年龄相关的黄斑变性)中的促血管生成活性的治疗中,直接结合且中和S1P的药剂适用于对抗S1P介导的效应。

[0182] 涉及成纤维细胞的过度增殖病症包括但不限于结疤过度(例如纤维化)的病症,诸如年龄相关的黄斑变性[Caballero,Exp Eye Res.2009年3月;88(3):367-77]、与心肌梗塞相关的心脏重塑和衰竭[Takuwa Cardiovasc Res.2010年2月1日;85(3):484-93]、硬皮病(scleroderma)[Bu,Arthritis Rheum.2010年7月;62(7):2117-26]、囊性纤维化[Uhlig,Am J Respir Crit Care Med.2008年12月1日;178(11):1100-14]、和过度伤口愈合,诸如通常由于手术或损伤、瘢痕瘤和类纤维肿瘤及支架术而发生。

[0183] S1P活化成纤维细胞迁移、增殖且刺激其产生胶原蛋白(collagen)。因此,在细胞损伤和/或炎症后,由受损细胞局部产生的S1P可导致异常伤口愈合、纤维发生和纤维化。因此,在与成纤维细胞的过度活性或数目相关的疾病和病状,包括但不限于眼病(诸如年龄相关的黄斑变性)、心血管疾病和硬皮病的治疗中,直接结合且中和S1P的药剂适用于对抗S1P介导的效应。

[0184] S1P调控淋巴细胞的运动性、粘着和迁移。认为淋巴细胞自淋巴组织的溢出遵循S1Pn梯度,其中组织中的S1P浓度较低且循环中的S1P浓度较高。这个理解由显示抑制S1P降解酶S1P裂解酶会导致淋巴细胞减少的研究支持[Schwab,Science 2005,309(5741):1735-9]。药物FTY720(芬戈莫德)通过作用于S1P受体而导致淋巴细胞减少且已成功用于移植和自体免疫性疾病中(Japtok和Kleuser,Curr Opin Investig Drugs.2009年11月;10(11):1183-94)。除淋巴细胞之外,S1P也通过这些调控新血管化和血管渗透性的手段来刺激其它免疫细胞(诸如嗜中性白细胞、肥大细胞和树突细胞)以及成纤维细胞、上皮细胞、周细胞和其它细胞类型的迁移、增殖和存活[Annabi,Exp Hematol.2003年7月;31(7):640-9;Paik,Genes Dev.2004年10月1日;18(19):2392-403;Chae,J Clin Invest 2004,114,1082-9]。

因此,由诸如S1P结合核酸分子的中和剂降低特定靶脂质(例如S1P)体内有效血浆浓度可用于引导效应T淋巴细胞离开炎症部位,由此适用于治疗疾病,包括但不限于自体免疫性疾病和具有炎性组分的眼病,诸如见于年龄相关的黄斑变性中的脉络膜新血管化。

[0185] S1P在内皮和上皮屏障的调控中起重要作用[Marsolais和Rosen,Nat Rev Drug Discov,2009年4月;8(4):297-307]。血管内皮细胞屏障使血管组分与小间隙分开。破坏这些屏障会导致血管渗透性变高,从而导致炎症及影响器官功能。S1P维持屏障的完整性。认为这个主要与其与S1P1的相互作用介导[Singleton,FASEB J.2005年10月;19(12):1646-56;Freistritzer和Riewald,Blood.2005年4月15日;105(8):3178-84],但也可能涉及其它S1PR。显示拮抗S1P1会诱导血管泄漏[Sanna等,Nat Chem Biol.2006年8月;2(8):434-41]且有证据表明S1P1与S1P2之间的平衡在S1P介导的血管渗透性调控中是重要的。在正常情况下,可能重要的是维持内皮和上皮屏障的完整性且血管渗透性增加会造成急性肺损伤和败血症[Wang,Microvasc Res.,2009年1月;77(1):39-45.]。另一方面,可存在所述屏障的暂时破坏为合乎需要或有益的疾病或病理学情形。在赘生疾病中,血管稳定化对于新血管生成和肿瘤转移为重要的[Paik,Genes Dev.2004年10月1日;18(19):2392-403]。用siRNA降低S1P1的表达会抑制肿瘤异种移植模型中的血管稳定化,从而导致显著抑制肿瘤生长[Chae,J Clin Invest 2004,114,1082-9]。功能性S1P受体拮抗剂FTY720已显示会抑制鼠类黑素瘤模型中VEGF诱导的血管渗透性、肿瘤血管化和生长[LaMontagne,Cancer Res.2006年1月1日;66(1):221-31]。此外,短暂直接中和S1P在以下情况下可能有益:其中单独或与一种或多种其它治疗药物联合破坏内皮或上皮屏障适用于治疗病理学状态,所述药物的作用或对病理学状态的治疗可由对屏障的所述破坏增强。尚未显示直接干扰S1P本身且因此阻断所有细胞外S1P受体活化的药剂对血管渗透性的影响。增加或降低血管渗透性仍为思考对象。两者均可能适用于治疗如上所示的疾病。

[0186] 归因于生物活性脂质涉及于各种病理学过程(包括过度增殖、新血管化、血管生成、异常纤维发生、炎症和血管稳定性)中,因此通过直接与中和剂(诸如S1P结合核酸分子)相互作用降低S1P的有效体内浓度可适于治疗其中S1P可导致或造成病状的病理学病状。所述疾病和病状可为全身性的或定位于一个或多个特定身体系统、部分或器官。可用所述方法治疗的疾病或病症的类别包括但不限于癌症、感染和炎症、自体免疫性病症、脑血管疾病、心血管疾病、眼病、结疤、通气诱发的肺损伤、皮肤病、与过度纤维发生和纤维化相关的疾病或病症、与病理性血管生成相关的疾病或病症、与异常新血管化相关的疾病或病症、与异常血管稳定性相关的疾病或病症、和与如下文中更详细所述的移植相关的疾病或病症。

[0187] 癌细胞常通过不断突变和进化,由此变得对细胞毒素或抗血管生成剂具有抗性而逃脱治疗方案。癌细胞如何变得对治疗具有抗性的一个重要机制为鞘氨醇激酶1(SphK 1)的上调和反过来使S1P释放入肿瘤微环境中[Raguz,Br J Cancer 2008,99:387-391;2008;Cuvillier,Curr Mol Pharmacol 2010,3:53-65]。S1P介导的化学抗性的一个可能机制涉及S1P与低氧可诱导转录因子(HIF)之间的相互影响,其中癌细胞对低氧的反应涉及S1P/SphK系统的上调[Ader,Cancer Res 2009,68:8635-8642]。总之,用诸如S1P结合核酸分子的S1P中和剂克服与S1P过度产生相关联的药物抗性可能为一种有希望的方法。

[0188] 受S1P调控的各种过程(诸如异常血管生成/新血管化、异常重塑、纤维化、结疤和炎症)与眼病关联发生[Eichler等(2006),Curr Pharm Des,第12卷:2645-60]。

[0189] 年龄相关的黄斑变性(AMD)为西方世界超过60岁患者的主要失明病因[Bylisma和Guymer(2005),*Clin Exp Optom*,第88卷:322-34;Gryziewicz(2005),*Adv Drug Deliv Rev*,第57卷:2092-8;及Liu和Regillo(2004),*Curr Opin Ophthalmol*,第15卷:221-6.].尽管未完全了解AMD的确切病因,但各种S1P调控的过程(诸如脉络膜新血管化(CNV)、视网膜下纤维化、水肿和炎症)会有助于AMD的发病机制和AMD相关的视力损失[Tezel和Kaplan(2004),*Trends Mol Med*,第10卷:417-20;及Ambati等(2003),*Surv Ophthalmol*,第48卷:257-93],VEGF通过增加CNV和血管渗透性(此举会导致出现视网膜内和视网膜下水肿)而有助于AMD的发病机制。因此,当前疗法集中在通过玻璃体内注射抗VEGF单克隆抗体来抑制VEGF。日益增长的证据表明S1P在渗出性(即湿性)AMD相关的CNV、纤维化和炎症中具有作用。S1P诱导上皮细胞募集至血管化部位并刺激早期血管结构的产生[Lee,*Biochem Biophys Res Commun* 1999,264:743-750]且其以VEGF非依赖性方式促进在上皮细胞与壁细胞之间形成N-钙粘着蛋白(cadherin)介导的接合[Paik,*Genes Dev*.2004年10月1日;18(19):2392-403]。此外,S1P通过交叉活化其它促血管生成因子(诸如bFGF和VEGF)来支持新血管化[Igarashi,*Proc Natl Acad Sci USA*2003,100:10664-9]。S1P与促纤维化因子(诸如TGFb、PDGF和结缔组织生长因子)的相互影响和视网膜色素上皮细胞通过S1P诱导胶原蛋白表达强烈表明S1P在AMD相关的纤维发生中具有作用[Xin,*JBiol Chem* 2004,279:35255-35262;Hobson,*Science* 2001,291:1800-1803;Katsuma,*FEBS Lett* 2005,579:2576-2582;Swaney,*Exp Eye Res* 2008,87:367-375]。此外,有累积的证据表明S1P介导的炎症事件有助于AMD的发病机制。全身性消除巨噬细胞会减弱激光诱导的CNV[Sakurai,*Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003,44:3578-3585]且中和抗S1P抗体会降低巨噬细胞浸润[Xie,*J Cell Physiol* 2009,218:192-198]。此外,已暗示S1P为C5a作用的一种主要下游介体[Vlasenko,*J Immunol* 2005,174:6456-6461],表明C5a-S1P轴可决定性地涉及于眼炎症过程中,因为所述过程例如在AMD期间发生。与这些数据一致,玻璃体内注射中和性抗S1P抗体会阻断在激光诱导的布鲁赫氏膜(Bruch's membrane)(一种渗出性AMD模型)破坏之后的CNV形成和视网膜下纤维化[Caballero,*Exp Eye Res* 2009,88:367-377;O'Brien,*J Lipid Res* 2009,50:2245-2257]。此外,在单剂量1a期临床试验中,S1P中和抗体在一些患者中导致新血管系统退化,此为一种用抗VEGF疗法在单剂量之后尚未观察到的效应[Sabbadini,*Br J Pharmacol*.2011年3月;162(6):1225-38]。总之,有强力证据表明降低玻璃体内S1P浓度的中和剂(诸如S1P结合核酸分子)将为一种治疗渗出性AMD和与新血管化、纤维化和炎症相关的其它眼病的有希望的方法。

[0190] 糖尿病性视网膜病变(DR)为糖尿病患者的一种常见并发症。DR为一种缺血性视网膜病变,因此特征为视网膜血流受损害。DR的病理学涉及VEGF驱动的视网膜新血管化,其可最终导致眼内出血、牵拉性视网膜脱离和血管渗透性增加。S1P在新血管化、血管渗透性和纤维化中的作用已表明拮抗S1P可有益于治疗DR。实际上,用SPHK的小分子拮抗剂抑制S1P形成会减弱大鼠链脲佐菌素(streptozotocin)诱发的糖尿病性视网膜病变中的VEGF诱导的血管化和视网膜血管泄漏的早期事件[Maines,*Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006,47:5022-5031]。糖尿病性视网膜病变患者视力损坏的一个主要病因为糖尿病性黄斑水肿(DME)的显现。VEGF诱导的新血管化和血管泄漏广泛涉及于DME显现和进展中[Aiello,*Diabetes* 1997,46:1473-1480]。因此,抗VEGF抗体(雷珠单抗(ranibizumab),诺适得

(Lucentis))治疗已在DME中成功[Massin,Diabetes Care.2010,33(11):2399-405]且新近已收到批准。鉴于中和性抗S1P抗体对VEGF介导的新血管化和血管泄漏的抑制作用[LaMontagne,Cancer Res.2006年1月1日;66(1):221-31;Visentin,Cancer Cell.2006年3月;9(3):225-38],预期降低玻璃体内和视网膜S1P浓度的中和剂(诸如S1P结合核酸分子)将为一种治疗DME的有希望的方法。

[0191] 视网膜色素上皮(RPE)脱离继发于与新血管化、血管渗透性增加和纤维发生的刺激相关的眼病,诸如AMD和DR。在激光诱导的损伤后,S1P受RPE强烈上调[Caballero,Exp Eye Res 2009,88:367-377]。证明拮抗S1P在RPE脱离中的有益作用的证据由单克隆抗S1P抗体松匹珠单抗(sonepcizumab)的I期临床试验提供。患有隐性疾病的患者经历RPE脱离的消散,此为一种尚未对抗VEGF治疗剂加以研究的效应[Sabbadini,Br J Pharmacol.2011年3月;162(6):1225-38]。

[0192] 增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)为视网膜脱离的最常见并发症。PVR病理生理学最终导致视网膜结疤过度。鉴于S1P与生长因子(诸如VEGF、bFGF、IL-6和IL-8)之间的所述相互影响和中和性抗S1P抗体对这些因子的抑制作用[Visentin,Cancer Cell 2006,第9卷:1-14;Milstien和Spiegel,Cancer Cell 2006,第9卷:148-150]。鉴于最终导致PVR中所见的过度结疤的病理生理学和功能S1P受体拮抗剂FTY720对这些相同关键介体的已知作用以及松匹珠单抗在视网膜脱离患者中的治愈作用[Sabbadini,Br J Pharmacol.2011年3月;162(6):1225-38],预期降低玻璃体内S1P浓度的中和剂(诸如S1P结合核酸分子)将为一种治疗PVR的有希望的方法。

[0193] 在AMD和DR中,视网膜纤维化导致不可逆的光受体破坏和视力损失。这个过程不由当前可用的治疗剂处理。中和性抗S1P抗体会阻断激光诱导的布鲁赫氏膜(一种渗出性AMD模型)破坏中的CNV形成和视网膜下纤维化[Caballero,Exp Eye Res 2009,88:367-377]。

[0194] 在一个早产儿视网膜病变(ROP)模型中,缺乏S1P2的小鼠显示玻璃体腔中的病理性新血管化降低[Skoura,J Clin Invest 2007,117:2506-2516]。在缺血诱导的血管生成的ROP模型中,中和性抗S1P抗体有效阻断视网膜新血管化和血管泄漏[Xie,J Cell Physiol 2009;218:192-198]。此外,中和性抗S1P抗体可限制在ROP期间巨噬细胞的浸润[Xie,J Cell Physiol 2009,218:192-198]。

[0195] 眼内压升高为青光眼中的主要风险因素。显示S1P会降低猪和人眼中的流出流畅性(outflow facility),由此增加流出阻力和眼内压[Mettu,Invest Ophthalmol Vis Sci.2004年7月;45(7):2263-71;Stamer,Exp Eye Res.2009年12月;89(6):980-8]。S1P2受体活化会增加常规流出阻力[Sumida,Am J Physiol Cell Physiol.2011年2月2日]。因此,用诸如S1P结合核酸分子的中和剂降低玻璃体内S1P浓度将为一种治疗青光眼的有希望的方法。

[0196] 鉴于S1P的已知多效性作用及其与VEGF和相关生长因子及细胞因子的相互作用,预期降低S1P的有效眼浓度将有效抑制与VEGF驱动的病理视网膜新血管化增殖相关的缺血性视网膜病变。这些包括但不限于镰状细胞视网膜病变、视网膜静脉闭塞性疾病、黄斑皱褶(玻璃纸样视网膜病变)、增殖性糖尿病性视网膜病变(PDR)和视网膜新血管疾病。

[0197] 特征至少部分为新血管化或血管生成异常的其它眼病状包括隐形眼镜佩戴过度、角膜感染(包括单纯性疱疹、带状疱疹和原虫感染)、翼状胬肉(ptyerygium)、感染性葡萄膜

炎、在角膜移植和移植排斥之后的淋巴管生成、慢性视网膜脱离、屈光手术的并发症(诸如朦胧、基质结疤和退化)、镰状细胞视网膜病变、静脉闭塞性疾病、视网膜血管瘤增殖和特发性息肉样脉络膜血管病变。

[0198] 具有炎性或免疫组分的其它眼病包括慢性玻璃体炎、自体免疫性葡萄膜视网膜炎、过敏性结膜炎、春季结膜炎、单纯性疱疹、带状疱疹和原虫感染[Ciulla等(2001), *Curr Opin Ophthalmol*, 第12卷:442-9]及眼组织胞浆菌病(histoplasmosis)。

[0199] S1P涉及于结疤的调控中。眼睛前端部分的结疤涉及于创伤(由在气载碎片至可例如由手术和化学品所致的钝创伤的范围内的各种危险所致)[Dart等(2003), *Eye*, 第17卷:886-92]、眼瘢痕类天疱疮(OCP)(一种主要影响结膜的慢性结疤性(疤形成)自体免疫性疾病)、史蒂文斯约翰逊综合症(Stevens Johnson Syndrome, SJS)和中毒性上皮坏死溶解(TEN)(对药物的危急生命的不良反应)、翼状赘肉(一种出现在睑间裂缝中的可导致视力损失的翼状三角形膜;VEGF可能在翼状赘肉的显现中起重要作用[Dougherty等(1996), *Cornea*, 第15卷:537-540;及Lee等(2001), *Cornea*, 第20卷:238-42])中。

[0200] S1P通过刺激细胞增殖和防止细胞凋亡来促进在增生和瘤形成期间的过度增殖。

[0201] 瘤形成是指异常、不受控制且混乱的细胞生长。在大多数情况下,瘤形成将为癌症。若干证据表明S1P相对于鞘氨醇和神经酰胺的平衡决定细胞命运[Morita等,2000; Melendez和Khaw,2002;Baumruker和Prieschl,2000]。已显示癌细胞会上调SPHK1,由此增加肿瘤微环境中的S 1P浓度[Pyne, *Nat Rev Cancer* 2010,10:489-503]。降低SPHK1表达会诱导乳腺癌细胞中的细胞周期阻滞和细胞凋亡且SPHK的小分子抑制剂降低乳腺癌、组织细胞白血病、成胶质细胞瘤异种移植和AML异种移植模型中的肿瘤生长[Sabbadini, *Br J Pharmacol*.2011年3月;162(6):1225-38]。

[0202] 与这些来自动物模型的结果一致,SPHK在实体肿瘤患者,尤其患有乳房肿瘤、结肠肿瘤、肺肿瘤、卵巢肿瘤、胃肿瘤、子宫肿瘤、肾肿瘤、前列腺肿瘤和直肠肿瘤的那些患者中过度表达[French等, *Cancer Res* 63:5962-5969,2003;Fyrst, *Nat Chemical Biology* 2010,489-497]。SPHK的表达增加与患有若干形式的癌症的患者的存活率显著降低相关联[Sabbadini, *Br J Pharmacol*.2011年3月;162(6):1225-38]。显示S1P中和抗体会抑制癌细胞系的增殖、其侵袭及其对阿霉素(doxorubicin)诱导的体外细胞凋亡的抗性,即A549、HT-29、MCF-7细胞[Visentin, *Cancer Cell*.2006年3月;9(3):225-38]。

[0203] 除S 1P的过度增殖作用之外,其也促进作为癌症病理学中的关键过程的新血管化、血管生成和转移。暗示S1P为最有力促血管生成剂之一的大量日益增长的新近证据来自直接比较S1P与诸如VEGF和bFGF的药剂的研究。S1P刺激DNA合成和人静脉内皮细胞(HUVEC)的趋化性运动性,同时诱导多细胞结构分化,所有这些都表明S1P在早期血管形成中具有作用(Argraves等,2004;Lee等,1999;Liu等, *J Clin Invest*.2000106:951-961)。此外,S1P促进骨髓源性EC前体迁移至新血管化部位(Annabi, *Exp Hematol*.2003年7月;31(7):640-9.)。过度表达S1P₁的细胞对抗血管生成剂沙利度胺(thalidomide)和新伐司他(Neovastat)具有抗性(Annabi, *Exp Hematol*.2003年7月;31(7):640-9.)。此外,已证明在S1P与其它促血管生成生长因子(诸如VEGF、EGF、PDGF、bFGF和IL-8)之间存在实质性相互影响。例如,S 1P会转活化EGF(Shida等,2004)和VEGF2受体(Spiegel和Milstien,2003),且VEGF会上调S1P₁受体表达(Igarashi等,2003)。此外,通过S1P₁和“VEGF轴”起作用的S1P为下

肢血管生成和新血管化所需(Chae等,2004)。抗血管生成药物单克隆抗VEGF抗体贝伐单抗(bevacizumab)(Avastin,Genentech)已批准用于与化学疗法联合治疗结肠癌。也已显示S1P涉及于转移中[Takuwa,Biochim Biophys Acta2002,1582:112-120]。

[0204] 在肝细胞癌、胚细胞危象慢性骨髓性白血病、费城染色体(Philadelphia chromosome)阳性急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、成淋巴细胞白血病/淋巴瘤和肺肿瘤模型中,功能性S1P受体拮抗剂FTY720抑制肿瘤生长和肿瘤相关的血管生成[Ho,MolCancer Ther 2005,4:1430-1438;Neviani,J Clin Invest 2007,117:2408-2421;Liu,Blood 2008,111:275-284;Lucas da Silva,J Exp TherOncol 2008,7:9-15]。尽管这些研究强烈表明S1P的大多数促肿瘤功能由其细胞表面受体介导,但应认为S1P也可充当细胞内第二信使[Hait,Science 2009,325:1254-1257;Alvarez,Nature 2010,465:1084-1088]。例如,已鉴定S1P为组蛋白(histone)脱乙酰酶的一种直接细胞内配体,所述组蛋白脱乙酰酶也牵涉于癌症的显现和进展中[Hait,Science 2009,325:1254-1257]。

[0205] 中和性抗S1P抗体显著阻断肿瘤生长和肿瘤相关的血管生成。在鼠类基膜胶塞测定中,抗体抑制bFGF和VEGF诱导的血管生成,且抗体在体外和在体内抑制促血管生成生长因子(VEGF、IL-8、IL-6)自肿瘤细胞释放。在小鼠乳癌、卵巢癌模型中,在肺腺癌异种移植模型中及在鼠类黑素瘤同种移植模型中,其抑制肿瘤进展[Visentin,Cancer Cell.2006年3月;9(3):225-38]。增生称为正常组织或器官中的细胞的过度增殖。一临床相关实例为良性前列腺增生。S1P的过度增殖作用已与增生相关联。已在不同类型的癌症和前列腺癌中测试导致S1P含量降低的苯妥帝尔(Phenoxodiol)[Marshall Edwards新闻稿,2010年6月1日]。

[0206] 总之,存在强力证据证明S1P促进过度增殖、血管生成和转移。不管个别过程对发病机制所起的作用如何,预期用诸如S1P结合核酸分子的中和剂直接靶向S1P会提供对特征为过度增殖、血管生成、转移和对细胞凋亡具有抗性的疾病(诸如大多数类型的肿瘤和癌症)的有效治疗。

[0207] S1P调控淋巴细胞的运动性、粘着和迁移。S1P调控淋巴细胞自淋巴器官的退出及其在炎症部位的停留[Matloubian,Nature 2004,427,355-360;Ledgerwood,Nat.Immunol.2008,9,42-53]。血浆S1P水平的降低会导致淋巴细胞减少,因此引导病源性T淋巴细胞离开炎症部位,由此适用于治疗炎症性疾病[Schwab,Science 2005,309(5741):1735-9;Japtok和Kleuser,Curr Opin Investig Drugs.2009年11月;10(11):1183-94]。此外,已显示S1P会诱导诸如前列腺素、TNF- α 和IL-6的促炎性因子的产生[Lai,J Immunol 2008,181:8010-17;Lai,J Immunol 2009,183:2097-2103]。

[0208] FTY720在体内被磷酸化且充当所有S1P受体1、3、4和5的激动剂。FTY720对S1P受体的活化反过来导致在细胞表面处的受体可用性的下调。这致使细胞对S1P不反应且阻断淋巴细胞自淋巴组织溢出,从而产生FTY720的免疫抑制作用[Mandala,Science 2002,296:346-349;Graler,Faseb J 2004,18:551-553]。FTY720在各种自体免疫性模型中显示功效且被批准用于治疗多发性硬化症。

[0209] 据报导相较于骨关节炎患者,在滑膜类风湿性关节炎中,S1P和S1P1受体表达在滑液衬细胞(synovial lining cell)、血管内皮细胞和炎性单核细胞中被上调[Kitano,Arthritis Rheum.2006年3月;54(3):742-53;Lai,J Immunol.2008年12月1日;181(11):8010-7]。在胶原蛋白诱发的关节炎模型中,鞘氨醇激酶抑制剂显著抑制疾病严重性且减轻

关节炎症和关节破坏[Lai, J Immunol. 2008年12月1日; 181(11):8010-7]。与此一致, 在SKG小鼠类风湿性关节炎模型中, 功能性S1P受体拮抗剂FTY720抑制骨破坏[Tsunemi, Clin Immunol. 2010年8月; 136(2):197-204]。

[0210] 归因于S1P受体功能性拮抗剂FTY720的免疫抑制作用, 建议用诸如S1P结合核酸分子的中和剂降低S1P的有效体内浓度将有益于治疗炎性皮肤病, 诸如红斑狼疮、银屑病和异位性皮炎[Herzinger, Am J Clin Dermatol. 2007; 8(6):329-36]。

[0211] 已显示全身性施用S1P会增加小鼠的支气管高反应性[Roviezzo, Am J Respir Cell Mol Biol. 2010年5月; 42(5):572-7]。在鼠类哮喘模型中, 通过吸入局部应用功能性S1P受体拮抗剂FTY720会抑制过敏性气道炎症[Idzko, J Clin Invest 2006, 116:2935-2944; Nishiuma, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008年6月; 294(6):L1085-93]。

[0212] 在炎性肠病(IBD)模型中, 缺乏SPH激酶的小鼠显现疾病显著改善[Snider, FASEB J. 2009年1月; 23(1):143-52]。与此一致, 在小鼠IBD模型中, 功能性S1P受体拮抗剂FTY720高效抑制疾病显现[Deguchi, Oncol Rep. 2006年10月; 16(4):699-703]。

[0213] 在低剂量下, 已显示在小鼠呼吸器诱发的肺损伤(VILI)模型中, 功能性S1P受体拮抗剂FTY720会增强内皮屏障功能且降低肺渗透性(Müller, Pulm Pharmacol Ther. 2011年3月23日, 电子版先于印刷版)。因此, 降低有效肺S1P浓度可抑制炎症且增强不同临床相关情形(诸如肺炎、慢性阻塞性肺病(COPD)或肺动脉高血压(PAH))下的肺内皮屏障功能。存在其它证据表明抑制鞘氨醇激酶且由此降低有效S1P水平可能改善在创伤和出血性休克之后的肺损伤[Lee, J Trauma. 2004, 57(5):955-60]。

[0214] 在体外在人吞噬细胞中以及在败血症患者中, 细菌产物增加SphK1表达和功能。SphK1的阻断抑制人吞噬细胞中LPS诱导的细胞因子产生且增加腐败性小鼠的存活率。重要的是在败血症中, 抗生素治疗剂对存活的治疗作用由SphK1阻断剂增强[Puneet, Science, 2010年6月4日; 328(5983):1290-4]。

[0215] 在动物器官移植模型中, S1P1拮抗剂延长皮肤和心脏同种移植物存活且减弱慢性排斥[Shimizu, Circulation 2005, 111, 222-229]。类似地, 在原位小鼠角膜移植模型中及在大鼠至小鼠角膜异种移植模型中, 功能性S1P受体拮抗剂FTY720显著延长移植物存活率[Zhang等(2003), Transplantation, 第76卷:1511-3; Sedlakova等(2005), Transplantation, 第79卷, 297-303]。

[0216] 在继承性转移小鼠1型糖尿病模型中, 功能性S1P拮抗剂芬戈莫德减缓疾病进展[Morris, Autoimmunity. 2011年3月; 44(2):115-28]。

[0217] 在炎性前列腺炎模型中, 用芬戈莫德治疗显著降低炎性浸润和组织破坏[Zhang, Scand J Immunol. 2011年2月15日]。

[0218] 用功能性S1P受体拮抗剂FTY720治疗显著降低链脲佐菌素处理的大鼠的蛋白尿和小管损伤。这个指示在糖尿病性肾病变中, 用诸如S1P结合核酸分子的中和剂抑制S1P可为有益的。

[0219] 已报导抑制鞘氨醇激酶-2会减弱大鼠中与碘乙酸单钠诱发的骨关节炎相关的膝关节组织学破坏和疼痛[Fitzpatrick, Pharmacology. 2011; 87(3-4):135-43]。

[0220] S1P2受体信号传导已牵涉于动脉粥样硬化的发病机制中[Skoura, Arterioscler Thromb Vase Biol. 2011年1月; 31(1):81-5]。

[0221] 过度表达SPHK1的小鼠显示与心肌纤维化相关的深度心脏重塑[Takuwa, Cardiovasc Res 2009,85:484-493]。中和性抗S1P抗体抑制初级心脏成纤维细胞产生胶原蛋白[Gellings Lowe, Cardiovasc Res 2009,82:303-312]。

[0222] 因此,根据本发明的药剂可用于治疗和/或预防的疾病和/或病症和/或患病状况包括但不限于

[0223] a)眼病,所述眼病优选选自包含以下的组:年龄相关的黄斑变性、伴有糖尿病性黄斑水肿的糖尿病性视网膜病变、年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜色素上皮脱离、增殖性玻璃体视网膜病变和年龄相关的黄斑变性或糖尿病性视网膜病变中的视网膜纤维化,

[0224] b)癌症,所述癌症优选选自包含乳癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、增生(诸如前列腺增生)的组,

[0225] c)炎性疾病,其中所述炎性疾病优选选自包含自体免疫性疾病、多发性硬化症、类风湿性关节炎、银屑病、哮喘、炎性肠病、肺炎、败血症和创伤(诸如呼吸器诱发的肺损伤)和败血症的组,其中所述自体免疫性疾病优选选自包含多发性硬化症、类风湿性关节炎、银屑病、哮喘和炎性肠病的组。

[0226] 在另一实施方案中,药剂包含另一药学活性的化合物。

[0227] 或者或另外,所述另一药学活性的化合物为另一根据本发明的核酸。或者,药剂包含至少另一种核酸,其结合不同于S1P的靶分子或展现不同于根据本发明的核酸的功能的功能。所述至少另一种核酸优选展现与本文公开的其它药学活性的化合物的一种或若干种功能之一类似或一致的功能。

[0228] 在本发明内的是药剂在原则上可选或另外用于预防与使用药剂治疗所述疾病关联公开的任何疾病。因此,即相应疾病的相应标记物为本领域技术人员所知。相应标记物优选为S1P。

[0229] 在本发明的药剂的一个实施方案中,所述药剂与用于本文公开的任何疾病,特别是本发明的药剂将用于的那些疾病的其它治疗剂联合使用。

[0230] 根据本发明的组合物也可与另一治疗剂或治疗方案联合施用。此外,通过中和剂调节S1P可适用于诱导对血管渗透性的暂时调节以允许或增强用作用可通过所述联合治疗得以增加或提高的第二治疗试剂的治疗。

[0231] 根据本发明的药剂可与第二药剂或第二药学活性剂联合用于治疗 and/或预防癌症,其中所述第二药剂或第二药学活性剂会破坏、毁坏和/或标记癌细胞。所述第二药剂或第二药学活性剂优选选自但不限于包含以下的组

[0232] a)抗体,诸如利妥昔单抗(Rituximab)(靶向CD20)、西妥昔单抗(Cetuximab)(靶向上皮生长因子受体)、替伊莫单抗(Ibritumomab-Tiuxetan)(靶向CD20)、托西莫单抗(Tositumomab)(靶向CD20)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)(靶向HER2/neu)、贝伐单抗(靶向VEGF);

[0233] b)烷化剂,诸如顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、氮芥(mechlorethamine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、阿霉素(Doxorubicin)、美法仑(Melphalan);

[0234] c)抗代谢物,诸如嘌呤硫唑嘌呤、巯基嘌呤(mercaptopurine)、氟达拉滨

(Fludarabine);

[0235] d)植物生物碱(诸如长春花生物碱)、植物类萜(诸如紫杉烷(taxane),优选多西他赛(Docetaxel)、紫杉醇(Paclitaxel)、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、埃博霉素(epothilone));

[0236] e)拓扑异构酶抑制剂,诸如喜树碱(camptothecins)、伊立替康(Irinotecan);

[0237] f)和其它药剂或活性剂,诸如亚叶酸(Leucovorin)、甲氨蝶呤(Methotrexate)、他莫昔芬(Tamoxifen)、索拉非尼(Sorafenib)、来那度胺(Lenalidomide)、硼替佐米(Bortezomib)、地塞米松(Dexamethasone)、氟尿嘧啶(Flurouracil)。

[0238] 根据本发明的药剂可与第二药剂或第二药理学活性剂联合用于治疗 and/或预防眼病,其中所述第二药剂或第二药理学活性剂优选选自但不限于包含以下的组

[0239] a)已知会抑制免疫系统的那些药剂或活性剂,诸如钙调神经磷酸酶(calcineurin)抑制剂、环孢霉素(cyclosporin)、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤(azathioprin)、他克莫司(tacrolimus)、雷帕霉素(rapamycin)、苯丁酸氮芥、来氟米特(leflunomide)、霉酚酸吗乙酯(mycophenolate mofetil)、布隆那(brequinar)、咪唑立宾(mizoribin)、沙利度胺或脱氧精胍菌素(deoxyspergualin);皮质类固醇(corticosteroid),如泼尼松(prednisone)、甲基强的松龙(methylprednisolone)、氢化可的松(hydrocortisone)、地塞米松、曲安奈德(triamcinolone)、倍他米松(betamethasone)(泡腾)或布地缩松(budesonide)。

[0240] b)消炎或抗血管生成生物制品可联合使用,诸如IL-10、厄利珠单抗(erlizumab)、托勒单抗(tolermab)、利妥昔单抗、鲁昔单抗(gomiliximab)、巴利昔单抗(basiliximab)、达利珠单抗(daclizumab)、HuMax-TAC、维利珠单抗(visilizumab)、HuMaxCD4、克立昔单抗(clenoliximab)、MAX 16H5、TNX 100、托利珠单抗(toralizumab)、阿仑珠单抗(alemtuzumab)、CY 1788、加利昔单抗(galiximab)、培克珠单抗(pexelizumab)、依库珠单抗(eculizumab)、PMX-53、ETI 104、FG3019、柏替木单抗(bertilimumab)、249417(抗因子IX)阿昔单抗(abciximab)、YM 337、奥马珠单抗(omalizumab)、他利珠单抗(talizumab)、芳妥珠单抗(fontolizumab)、J695(抗IL12)、HuMaxIL-15、美泊利单抗(mepolizumab)、伊斯利莫单抗(elsilimomab)、HuDREG、阿那白滞素(anakinra)、Xoma-052、阿达木单抗(adalimumab)、英夫利昔单抗(infliximab)、赛妥珠单抗(certolizumab)、阿非莫单抗(afelimomab)、CytoFab、AME 527、伐利昔单抗(Vapaliximab)、贝伐单抗、雷珠单抗、维塔辛(vitaxin)、贝利木单抗(belimumab)、MLN 1202、伏洛昔单抗(volociximab)、F200(抗 $\alpha\beta$ 1)、依法珠单抗(efalizumab)、m60.11(抗CD 11b)、依那西普(etanercept)、奥那西普(onercept)、那他珠单抗(natalizumab)或希普利珠单抗(siplizumab)、托珠单抗(tocilizumab)、优特克单抗(ustekinumab)、ABT-874、眼用VEGF捕集剂(VEGF-trap eye)。

[0241] “联合疗法”(或“共疗法”)包括施用本发明的药剂和作为特定治疗方案的一部分的至少一种第二药剂,所述治疗方案欲提供由这些治疗剂(即本发明的药剂和所述第二药剂)的共同作用产生的有益作用。联合的有益作用包括但不限于由治疗剂的联合所产生的药物动力学或药动学共同作用。这些治疗剂的联合施用通常历经确定时期(视所选联合而定通常数分钟、数小时、数天或数周)进行。

[0242] “联合疗法”可但通常不欲涵盖施用这些治疗剂中的两者或更多者作为附带且任

意产生本发明的联合的单独单药疗法方案的一部分。“联合疗法”欲包括以依序方式施用这些治疗剂,即其中各治疗剂在不同时间施用,且以实质上同时的方式施用这些治疗剂或治疗剂中的至少两者。实质上同时施用可例如通过向受试者施用各治疗剂的比率固定的单一胶囊或各治疗剂的多个单一胶囊来实现。

[0243] 依序或实质上同时施用各治疗剂可通过包括但不限于表面途径、经口途径、静脉内途径、肌肉内途径和直接通过粘膜组织吸收的任何适当途径来实现。治疗剂可通过相同途径或通过不同途径施用。例如,所选联合的第一治疗剂可通过注射来施用而联合的其它治疗剂可以表面方式施用。

[0244] 或者,例如,所有治疗剂都可以表面方式施用或所有治疗剂都可通过注射来施用。除非另外指示,否则施用治疗剂所依的顺序并不为严格关键的。“联合疗法”也可包括进一步与其它生物活性成分联合施用如上所述的治疗剂。当联合疗法进一步包含非药物治疗时,所述非药物治疗可在任何适合时间进行,只要实现由治疗剂与非药物治疗的联合的共同作用产生的有益作用即可。例如,在适当情况下,当非药物治疗暂时自治疗剂的施用移除优选数天或甚至数周时,有益作用仍然会实现。

[0245] 如以上概括所述,根据本发明的药剂在原则上可以本领域技术人员已知的任何形式施用。一优选施用途径为全身性施用,更优选通过胃肠外施用,优选通过注射进行。或者,药剂可局部施用。其它施用途径包含肌肉内、腹膜内和皮下、口服、鼻内、气管内或经肺,优选给予侵袭性最小,同时确保功效的施用途径。

[0246] 胃肠外施用通常用于皮下、肌肉内或静脉内注射和输注。另外,一种用于胃肠外施用的方法采用植入本领域普通技术人员熟知的缓释或持续释放系统,其保证恒定剂量水平得以维持。

[0247] 此外,本发明的优选药剂可通过表面使用适合鼻内媒介物、吸入剂以鼻内形式施用,或使用本领域普通技术人员熟知的那些经皮皮肤贴片形式通过经皮途径施用。为以经皮传递系统形式施用,在整个剂量方案期间,剂量施用将当然为连续的而非间歇的。其它优选表面制剂包括乳膏剂、软膏剂、洗剂、气雾剂喷雾剂和凝胶剂。

[0248] 本发明的药剂将通常包含疗法的有效量的活性组分,包括但不限于溶解或分散于药学上可接受的介质中的本发明的核酸分子。药学上可接受的介质或载体包括任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。所述介质和试剂针对医药活性物质的使用在本领域中为熟知的。补充性活性成分也可并入本发明的药剂中。

[0249] 在另一方面,本发明涉及一种药物组合物。所述药物组合物包含至少一种根据本发明的核酸和优选药学上可接受的媒介物。所述媒介物可为本领域中使用和/或已知的任何媒介物或任何粘合剂。更特别地,所述粘合剂或媒介物为如与本文公开的药剂的制造关联论述的任何粘合剂或媒介物。在另一实施方案中,药物组合物包含另一药学活性剂。

[0250] 药剂和药物组合物的制备将为本领域技术人员根据本公开内容所知。通常,所述组合物可制备成呈液体溶液或悬浮液形式的可注射物;适于在注射之前溶解或悬浮于液体中的固体形式;用于经口施用的片剂或其它固体;定时释放胶囊;当前使用的任何其它形式,包括滴眼剂、乳膏剂、洗剂、油膏剂、吸入剂等。也可特别适用的是由外科医生、医师或卫生保健工作者使用用以处理手术区域中的特定区域的无菌制剂,诸如基于生理盐水的洗涤剂。组合物也可通过微装置、微粒或海绵传递。

[0251] 在配制后,药剂将以与剂量配制相容的方式且以诸如药理学上有效的量施用。制剂易于以多种剂型,诸如上述可注射溶液类型施用,但也可采用药物释放胶囊等。

[0252] 本发明的药剂也可以诸如定时释放和持续释放片剂或胶囊、丸剂、粉末、颗粒剂、酏剂、酊剂、悬浮液、糖浆和乳液的经口剂型施用。栓剂方便地由脂肪乳液或悬浮液制备。

[0253] 药物组合物或药剂可经灭菌和/或含有佐剂,诸如防腐剂、稳定剂、湿润剂或乳化剂、溶液促进剂、用于调控渗透压的盐和/或缓冲剂。此外,其也可含有其它有治疗价值的物质。组合物是根据常规混合、粒化或包覆方法来制备的,且通常含有约0.1%至75%,优选约1%至50%的活性成分。

[0254] 液体,特别是可注射组合物可例如通过溶解、分散等制备。将活性化合物溶解于药学纯溶剂中或与其混合以由此形成可注射溶液或悬浮液,所述溶剂诸如水、生理盐水、右旋糖水溶液、甘油、乙醇等。另外,可配制适于在注射之前溶解于液体中的固体形式。

[0255] 本发明的分别药剂和核酸分子也可以脂质体传递系统(诸如小单层囊泡、大单层囊泡和多层囊泡)形式施用。脂质体可由多种含有胆固醇、十八胺或磷脂酰胆碱的磷脂形成。在一些实施方案中,脂质组分的薄膜用药物水溶液水合以形成本领域普通技术人员熟知的囊封药物的脂质层。例如,本文所述的核酸分子可以使用本领域已知方法构建的与亲脂性化合物或非免疫原性高分子量化合物的复合物形式提供。另外,脂质体可在其表面上携带所述核酸分子以内部靶向和运载细胞毒性剂来介导细胞杀伤。核酸缔合的复合物的一实例提供于美国专利No.6,011,020中。

[0256] 本发明的分别药剂和核酸分子也可与作为可靶向药物载体的可溶性聚合物偶合。所述聚合物可包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基-甲基丙烯酰胺-苯酚、聚羟乙基天冬酰胺苯酚或经十六酰基残基取代的聚氧化乙烯聚赖氨酸。此外,本发明的分别药剂和核酸分子可偶合于一类适用于实现药物的控制释放的生物可降解聚合物,例如聚乳酸、聚ε己内酯、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基丙烯酸酯和水凝胶的交联或两亲性嵌段共聚物。

[0257] 在治疗本文公开的任何疾病时,根据本发明的核酸的有效血浆水平优选在500fM至200μM、优选1nM至20μM、更优选5nM至20μM、最优选50nM至20μM的范围内。

[0258] 本发明的分别核酸分子和药剂可优选以单一每日剂量、每两天或每三天、每周、每两周、以单一每月剂量或每三个月施用。

[0259] 在本发明内的是如本文所述的药剂构成本文公开的药物组合物。

[0260] 在另一方面,本发明涉及一种用于治疗需要所述治疗的受试者的方法,其中所述方法包含施用医药有效量的至少一种根据本发明的核酸。在一实施方案中,受试者罹患疾病或处于显现所述疾病的风险中,其中所述疾病为本文公开的疾病的任一者,特别是与使用根据本发明的任何核酸制造药剂关联公开的那些疾病的任一者。

[0261] 应了解根据本发明的核酸以及拮抗剂可不仅用作药剂或用于制造药剂,而且也用于美容目的,特别是关于发炎区域性皮肤病变中涉及S1P。因此,根据本发明的核酸、药剂和/或药物组合物可用于治疗或预防的另一病状或疾病为发炎区域性皮肤病变。

[0262] 如本文优选所用,诊断法或诊断剂或诊断手段适于直接或间接检测S1P,优选如本文所述的S1P且更优选如本文与本文所述的各种病症和疾病关联所述的S1P。诊断剂适于检测和/或追踪本文所述的分别病症和疾病的任一者。通过根据本发明的核酸结合S1P,所述

检测为可能的。所述结合可直接或间接被检测。相应方法和手段为本领域技术人员所知。其中,根据本发明的核酸可包含允许检测根据本发明的核酸,优选与S1P结合的核酸的标记。所述标记优选选自包含放射性标记、酶标记和荧光标记的组。在原则上,针对抗体开发的所有已知测定都可用于根据本发明的核酸,而靶结合抗体替换成靶结合核酸。在使用未标记靶结合抗体的抗体测定中,检测优选通过用放射性标记、酶标记和荧光标记修饰且在其Fc片段处结合靶结合抗体的二抗来进行。在核酸,优选根据本发明的核酸的情况下,用所述标记修饰核酸,其中所述标记优选选自包含生物素(biotin)、Cy-3和Cy-5的组,且所述标记由针对所述标记的抗体,例如抗生物素抗体、抗Cy3抗体或抗Cy5抗体检测,或-在标记为生物素的情况下-标记由天然结合生物素的抗生蛋白链菌素(streptavidin)或抗生蛋白(avidin)检测。所述抗体、抗生蛋白链菌素或抗生蛋白反过来优选采用相应标记,例如放射性标记、酶标记或荧光标记修饰(如同二抗)。

[0263] 在另一实施方案中,根据本发明的核酸分子由第二检测工具检测或分析,其中所述检测工具为分子信标。分子信标的方法学为本领域技术人员所知且由Mairal等综述(Mairal等,2008,Anal Bioanal Chem390(4),989-1007)。

[0264] 应了解使用根据本发明的核酸检测S1P将特别允许检测如本文定义的S1P。

[0265] 与S1P的检测相关联,一优选方法包含下列步骤:

[0266] (a)提供将被测试S1P的存在性的样品,

[0267] (b)提供根据本发明的核酸,

[0268] (c)使所述样品与所述核酸,优选在反应容器中反应

[0269] 其中步骤(a)可在步骤(b)之前进行,或步骤(b)可在步骤(a)之前进行。

[0270] 在一优选实施方案中,提供另一步骤d),其包括检测样品与核酸的反应。优选地,使步骤b)的核酸固定于表面。表面可为反应容器(诸如反应管、板的孔)的表面、或所述反应容器中含有的装置(诸如微珠)的表面。可通过本领域技术人员已知的任何手段,包括但不限于非共价或共价键联使核酸固定于表面。优选地,通过表面与核酸之间的共价化学键来建立键联。然而,在本发明内的还有核酸间接固定于表面,其中所述间接固定涉及使用另一组分或一对相互作用伴侣。所述另一组分优选为与欲经固定的核酸特异性相互作用的也称为相互作用伴侣,且因此介导核酸连接于表面的化合物。相互作用伴侣优选选自包含核酸、多肽、蛋白质和抗体的组。优选地,相互作用伴侣为抗体,更优选为单克隆抗体。或者,相互作用伴侣为核酸,优选为功能性核酸。更优选地,所述功能性核酸选自包含至少部分互补于核酸的适体、镜像异构体和核酸的组。在另一替代性实施方案中,核酸与表面的结合由多分体相互作用伴侣介导。所述多分体相互作用伴侣优选为由第一成员和第二成员组成的一对相互作用伴侣或一相互作用伴侣,其中所述第一成员由核酸组成或连接于核酸且所述第二成员连接于表面或由表面组成。多分体相互作用伴侣优选选自包含生物素和抗生蛋白、生物素和抗生蛋白链菌素、及生物素和中和亲和素(neutravidin)的数对相互作用伴侣的组。优选地,相互作用伴侣对的第一成员为生物素。

[0271] 所述方法的一优选结果为形成S1P与核酸的经固定复合物,其中更优选地,检测所述复合物。在一实施方案内的是自复合物检测S1P。

[0272] 依照这个要求的一相应检测工具为例如对S1P的那个/那些部分具有特异性的任何检测工具。一特别优选检测工具为选自包含核酸、多肽、蛋白质和抗体的组的检测工具,

所述检测工具的产生为本领域技术人员所知。

[0273] 用于检测S1P的方法也包含自优选已用于进行步骤c)的反应容器移除样品。

[0274] 在另一实施方案中,方法也包含使S1P的相互作用伴侣固定在表面,优选如上定义的表面上的步骤,其中所述相互作用伴侣如本文所定义且优选如上与相应方法关联所定义且更优选在其各种实施方案中包含核酸、多肽、蛋白质和抗体。在这个实施方案中,一特别优选检测工具为根据本发明的核酸,其中所述核酸可优选经标记或未经标记。在所述核酸经标记的情况下,其可直接或间接被检测。在本文所述的各种实施方案中,所述检测也可涉及使用第二检测工具,其优选也选自包含核酸、多肽、蛋白质和实施方案的组。所述检测工具优选对根据本发明的核酸具有特异性。在一更优选实施方案中,第二检测工具为分子信标。在一优选实施方案中,核酸或第二检测工具或两者可包含检测标记。检测标记优选选自包含生物素、溴脱氧尿苷标记、地高辛(digoxigenin)标记、荧光标记、UV标记、放射标记和螯合剂分子的组。或者,第二检测工具与优选由核酸含有、包含或连接的检测标记相互作用。特别优选的组合如下:

[0275] 检测标记为生物素且第二检测工具为针对生物素的抗体,或其中

[0276] 检测标记为生物素且第二检测工具为抗生蛋白或携带抗生蛋白的分子,或其中

[0277] 检测标记为生物素且第二检测工具为抗生蛋白链菌素或携带抗生蛋白链菌素的分子,或其中

[0278] 检测标记为生物素且第二检测工具为中和亲和素或携带中和亲和素的分子,或

[0279] 其中检测标记为溴脱氧尿苷且第二检测工具为针对溴脱氧尿苷的抗体,或其中

[0280] 检测标记为地高辛且第二检测工具为针对地高辛的抗体,或其中

[0281] 检测标记为螯合剂且第二检测工具为放射核素,其中优选的是所述检测标记连接于核酸。应了解这种组合也可适用于核酸连接于表面的实施方案。在所述实施方案中,优选的是检测标记连接于相互作用伴侣。

[0282] 最后,在本发明内的还有使用第三检测工具检测第二检测工具,优选地,所述第三检测工具为酶,更优选在检测第二检测工具后显示酶促反应,或所述第三检测工具为用于检测放射,更优选由放射核素发出的放射的工具。优选地,第三检测工具特异性检测第二检测工具和/或与第二检测工具相互作用。

[0283] 此外,在S1P的相互作用伴侣固定在表面上且优选添加根据本发明的核酸至在相互作用伴侣与S1P之间形成的复合物中的实施方案中,样品可自反应,更优选自进行步骤c)和/或d)所处的反应容器移除。

[0284] 在一实施方案中,根据本发明的核酸包含荧光部分且其中所述荧光部分的荧光在核酸与S1P和游离S1P之间形成复合物后为不同的。

[0285] 在另一实施方案中,核酸为根据本发明的核酸的衍生物,其中核酸的所述衍生物包含至少一种置换腺苷的腺苷荧光衍生物。在一优选实施方案中,腺苷荧光衍生物为亚乙烯基腺苷。

[0286] 在另一实施方案中,使用荧光检测由根据本发明的核酸的衍生物和S1P组成的复合物。

[0287] 在方法的一实施方案中,在步骤(c)或步骤(d)中产生信号且所述信号优选与样品中的S1P的浓度相关。

[0288] 在一优选方面,可在96孔板中进行测定,其中组分固定在如上所述的反应容器中且孔充当反应容器。

[0289] 本发明核酸可进一步用作药物发现的起始物质。基本上,存在两种可能的方法。一种方法为筛选化合物库,而所述化合物库优选为低分子量化合物库。在一实施方案中,筛选为高通量筛选。优选地,高通量筛选为在基于靶标的测定中对化合物进行快速高效试验与误差(trial-and-error)评估。在最佳情况下,分析通过比色测量来进行。如与此关联使用的库为本领域技术人员所知。

[0290] 在筛选化合物库的情况下,诸如通过使用本领域技术人员已知的竞争性测定,可发现适当S1P类似物、S1P激动剂或S1P拮抗剂。所述竞争性测定可如下建立。使本发明核酸,优选作为靶结合L-核酸的镜像异构体偶合于固相。为鉴定S1P类似物,可添加经标记S1P至测定中。潜在类似物将与结合镜像异构体的S1P分子竞争,所述镜像异构体将连同由相应标记获得的信号一起降低。筛选激动剂或拮抗剂可涉及使用如本领域技术人员已知的细胞培养测定。

[0291] 根据本发明的试剂盒可包含至少一种或若干种优选用于检测脂质,更优选用于检测S1P的本发明核酸。另外,试剂盒可包含至少一种或若干种阳性或阴性对照。阳性对照可例如为S1P,特别是选择本发明核酸所针对或本发明核酸所结合的优选呈液体形式的S1P。阴性对照可例如为依据生物物理性质类似于S1P加以定义,但不由本发明核酸识别的肽。此外,所述试剂盒可包含一种或若干种缓冲剂。各种成分可以干燥或冻干形式或溶解于液体中含于试剂盒中。试剂盒可包含一个或若干个容器,其反过来可含有试剂盒的一种或若干种成分。在另一实施方案中,试剂盒包含向使用者提供关于如何使用试剂盒及其各种成分的信息的说明书或说明书活页。

[0292] 药理学性和生物分析性测定根据本发明的核酸基本上是为了用于评估其在人体和非人体的若干体液、组织和器官中的药物动力学和生物动力学概况。出于所述目的,本文公开或本领域技术人员已知的任何检测方法都可加以使用。在本发明的另一方面,提供用于检测根据本发明的核酸的夹心式杂交测定。在检测测定内使用捕获探针和检测探针。捕获探针互补于根据本发明的核酸的第一部分且检测探针互补于第二部分。使捕获探针固定于表面或基质。检测探针优选携带可如本文先前所述加以检测的标记分子或标记。

[0293] 对根据本发明的核酸的检测可如下进行:根据本发明的核酸以其一个末端与捕获探针杂交且以另一末端与检测探针杂交。之后,通过例如一个或若干个洗涤步骤移除未结合检测探针。优选携带标记或标记分子的结合检测探针的量可随后如例如WO/2008/052774中更详细概述加以测量,所述专利以引用的方式并入本文。

[0294] 如本文优选所用,在一优选实施方案中,术语治疗另外或替代地包含预防和/或追踪。

[0295] 如本文优选所用,如果不相反指示,那么术语疾病和病症应以可互换方式使用。

[0296] 如本文所用,术语包含优选不欲限制随后主题或由所述术语描述的主题。然而,在一替代性实施方案中,术语包含应以含有的含义加以理解且因此应理解为限制随后主题或由所述术语描述的主题。

[0297] 根据本发明的核酸分子的各种SEQ. ID. No.、化学性质和如本文所用的靶分子S1P、其实际序列和内部参考编号概述于下表中。

[0298]

SEQ. ID.No.	物质	结构/序列	内部参考
1	D-RNA	AGCGUGAAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGCU	215-F9-001, S1P- 215-F9-001
2	D-RNA	AGCGUGAAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGCU	215-H11-001
3	D-RNA	AGCGUGAAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGCU	215-H9-001
4	D-RNA	AGCGUGAAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGCU	215-F10-001
5	D-RNA	GGGUGUUAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGC	222-A10-002
6	D-RNA	GGGUGUUAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGC	222-A12-002
7	D-RNA	GGGUGUUAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGC	215-F9-002
8	D-RNA	CGUGAAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGC	215-F9-003
9	D-RNA	GUGAAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGC	215-F9-004
10	D-RNA	GCUGAAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGC	215-F9-008
11	D-RNA	GGUGAAUAGCCGUGUUGAAACGCCCUUUAGAGAAAGCAGCAGCGC	215-F9-009

[0299]

SEQ. ID.No.	物质	结构/序列	内部参考
12	L-RNA	AGCGUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCU	215-F9-001, L-S1P-215-F9-001
13	L-RNA	AGCGUGRAUAGCCCAUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCU	215-H11-001
14	L-RNA	AGCGUGAAUAGCCGAUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCU	215-H9-001
15	L-RNA	AGCGUGAAUAGCCGAUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCU	215-F10-001
16	L-RNA	GGGUGUAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCG	222-A10-002
17	L-RNA	GGGUGAAUAGCCGAUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCG	222-A12-002
18	L-RNA	GGGUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCG	215-F9-002, L-S1P-215-F9-002
19	L-RNA	CGUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCG	215-F9-003
20	L-RNA	GUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCG	215-F9-004
21	L-RNA	GCUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCG	215-F9-008
22	L-RNA	GGUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCG	215-F9-009
23	L-RNA	5'-PEG-AGCGUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAACGACUAGCAGCGU	215-F9-001-5'-PEG; NOX-S92

[0300]

SEQ. ID.No.	物质	结构/序列	内部参考
24	L-RNA	5'-PEG-GCGUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAGACUAGCACGC	215-F9-002-5'-PEG, 5'-40kDa-PEG-L-S1P~ 215-F9-002, NOX-S91
25	L-RNA	5'-NH ₂ -AGCGUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAGACUAGCACGC	215-F9-001-5'-氨基
26	L-RNA	5'-NH ₂ -GCGUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAGACUAGCACGC	215-F9-002-5'-氨基
27	L-RNA/L-DNA	<u>dg</u> GUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D01
28	L-RNA/L-DNA	GCGUGAAUAG <u>dc</u> CGUUGAAACGCCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D11
29	L-RNA/L-DNA	GCGUGAAUAGCCGUUGAA <u>da</u> CGCCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D19
30	L-RNA/L-DNA	GCGUGAAUAGCCGUUGAAAC <u>dg</u> CCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D21
31	L-RNA/L-DNA	GCGUGAAUAGCCGUUGAAAC <u>ddc</u> CCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D22
32	L-RNA/L-DNA	GCGUGAAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAGAG <u>da</u> GACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D32
33	L-RNA/L-DNA	GCGUGAAUAGCCGUUGAAAC <u>dg</u> hCCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D21- 22

[0301]

SEQ. ID. No.	物质	序列: 5'-3'	内部参考
34	L-RNA/L-DNA	GGUGAAUAGCCGUGAA <u>da</u> <u>cdg</u> CCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D21-19
35	L-RNA/L-DNA	GGUGAAUAGCCGUGAA <u>da</u> <u>cdg</u> CCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D21-19-22
36	L-RNA/L-DNA	<u>dg</u> CGUGAAUAGCCGUGAA <u>da</u> <u>cdg</u> CCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32
37	L-RNA/L-DNA	<u>dg</u> CGUGAAUAG <u>cdg</u> CGUGAA <u>da</u> <u>cdg</u> CCUUUAGAGAGACUAGCACGC	L-S1P-215-F9-002-D01-11-19-21-32
38	D-RNA/L-RNA	GG-GCGUGAAUAGCCGUGAAACGCCUUUAGAGAGACUAGCACGC 5'-GG 为 D-RNA	L-S1P-215-F9-002-5'diD-G
39	L-RNA/L-DNA	NH2 <u>dg</u> CGUGAAUAGCCGUGAA <u>da</u> <u>cdg</u> CCUUUAGAGAGACUAGCACGC 5'-	L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32-5'-氨基
40	L-RNA/L-DNA	PEG <u>dg</u> CGUGAAUAGCCGUGAA <u>da</u> <u>cdg</u> CCUUUAGAGAGACUAGCACGC 5'-	5'~40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32, S1P-215-F9-002-D01-19-21-32-5'-PEG, NDX-S93
41	L-RNA	WAUUGCCGAWUGUAACGCCUUNAGAGAAAGCACUAG	共有序列 I
42	L-RNA	WAUUGCCGAWUGUAACGCCUUNAGAGAAAGCACUAG	共有序列 II

[0302] 本发明进一步由可自其获得其它特征、实施方案和优势的附图、实施例和序列表说明,其中

- [0303] 图1显示S1P结合核酸的序列比对;
- [0304] 图2显示S1P结合核酸215-F9-001及其衍生物的最小结合序列;
- [0305] 图3显示由直接和竞争性下拉测定对S1P结合适体215-F9-001(也称为S1P-215-F9-001)的分析;
- [0306] 图4显示在用EDG3受体进行的体外细胞培养抑制测定中,镜像异构体215-F9-001-5'-PEG(也称为NOX-S92)和215-F9-002-5'-PEG(也称为NOX-S91)对S1P活性的影响;
- [0307] 图5显示镜像异构体NOX-S92(也称为215-F9-001-5'-PEG)和NOX-S93(也称为215-F9-002-D01-19-21-32-5'-PEG)对体内S1P活性的影响,其中NOX-S92和NOX-S93由于与S1P结合而诱导淋巴细胞减少;
- [0308] 图6显示S1P结合镜像异构体215-F9-002(也称为L-S1P-215-F9-002)的由核糖核苷酸(A、U、G、C)和至少一个2'-脱氧核糖核苷酸(dA、dT、dG、dC)组成的衍生物;
- [0309] 图7显示用S1P结合镜像异构体215-F9-002(也称为L-S1P-215-F9-002)的由核糖核苷酸(A、U、G、C)和至少一个2'-脱氧核糖核苷酸(dA、dT、dG、dC)组成的衍生物进行的竞争性镜像异构体下拉测定的结果:如所指示,在37℃下由50nM未标记镜像异构体(一式三份)加以竞争,0.3nM经放射性标记的L-S1P-215-F9-002-5'-diD-G结合8nM生物素化D-e-S1P;
- [0310] 图8显示竞争性镜像异构体下拉测定的结果,S1P结合镜像异构体215-F9-002(也称为L-S1P-215-F9-002)的衍生物由核糖核苷酸(A、U、G、C)和至少一个2'-脱氧核糖核苷酸(dA、dT、dG、dC)组成,其中
- [0311] (A)如所指示,在37℃下由36nM未标记镜像异构体(一式三份)加以竞争,0.3nM经放射性标记的L-S1P-215-F9-002-5'-diD-G结合8nM生物素化D-e-S1-P3小时;
- [0312] (B)在37℃下由滴定浓度的5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002(也称为NOX-S91,圆形)和5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S93;正方形)加以竞争,0.5nM经放射性标记的L-S1P-215-F9-002-5'-diD-G结合7nM生物素化D-e-S1-P2.5小时
- [0313] 图9显示以下抑制的结果(显示一式三份培养的平均值±SD):
- [0314] 由以下对10nM D-e-S1P诱导的β-抑制蛋白(arrestin)在表达EDG1的报导体细胞系中的募集的抑制:
- [0315] (A)5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002(也称为NOX-S91)和
- [0316] (B)5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S93)
- [0317] 由以下对10nM D-e-S1P诱导的于表达EDG3的细胞系中的钙释放的抑制:
- [0318] (C)5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002 8(也称为NOX-S91)且
- [0319] (D)5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S93);
- [0320] 图10显示镜像异构体NOX-S91和NOX-S93在基于球状体的细胞血管生成体外测定中的影响,其中测试镜像异构体抑制VEGF-A(血管内皮生长因子-A)和S1P(鞘氨醇-1-磷酸酯)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)萌芽的能力。
- [0321] 实施例1:结合1-磷酸鞘氨醇(S1P)的核酸
- [0322] 使用生物素化L-e-S1P作为靶标,可产生若干S1P结合核酸及其衍生物:其核苷酸序列描述于图1、2和6中。核酸表征为
- [0323] a)适体,即呈D-核酸形式,使用直接下拉测定(实施例3)和/或竞争性下拉测定(实施例3)

[0324] b) 镜像异构体, 即L-核酸, 使用竞争性下拉测定(实施例6)、用S1P受体EDG-3/S1P₃或EDG-1/S1P₁进行的体外测定(实施例4)。此外, 在体外(实施例7)和体内(实施例5)血管生成测定中测试镜像异构体。如实施例2中所述合成镜像异构体和适体。

[0325] 由此产生的核酸分子展现略微不同的序列, 其中鉴定一种主要类型并定义为S1P结合核酸, 且描述于图1、2和6中。

[0326] 对于核苷酸序列基序的定义, 使用歧义核苷酸的IUPAC缩写:

[0327] S 强 G或C;

[0328] W 弱 A或U;

[0329] R 嘌呤 G或A;

[0330] Y 嘧啶 C或U;

[0331] K 酮基 G或U;

[0332] M 亚氨基 A或C;

[0333] B 不为A C或U或G;

[0334] D 不为C A或G或U;

[0335] H 不为G A或C或U;

[0336] V 不为U A或C或G;

[0337] N 全部 A或G或C或U

[0338] 如果不相反指示, 那么以5'→3'方向指示分别任何核酸序列或链段和盒的序列。

[0339] 1.1 S1P结合核酸

[0340] 如图1和图2中所描述, S1P结合核酸包含一个界定潜在S1P结合基序的中心核苷酸链段。

[0341] 一般而言, S1P结合核酸在其5'末端和3'末端包含末端核苷酸链段: 第一末端核苷酸链段和第二末端核苷酸链段。第一末端核苷酸链段和第二末端核苷酸链段可彼此杂交, 借此在杂交后形成双链结构。然而, 所述杂交并非必定在分子中产生。

[0342] S1P结合核酸的三个核苷酸链段—第一末端核苷酸链段、中心核苷酸链段和第二末端核苷酸链段—在5'→3'方向上彼此按以下进行排列: 第一末端核苷酸链段-中心核苷酸链段-第二末端核苷酸链段。然而, 或者, 第一末端核苷酸链段、中心核苷酸链段和末端第二核苷酸链段在5'→3'方向上彼此按以下进行排列: 第二末端核苷酸链段-中心核苷酸链段-第一末端核苷酸链段。

[0343] S1P结合核酸之间的会影响对S1P的结合亲和力的确定盒或链段的序列可不同。基于对不同S1P结合核酸的结合分析, 如下文中所述的中心链段及其核苷酸序列个别地且更优选地以其整体方式为结合人S1P所必需。

[0344] 根据本发明的S1P结合核酸展示于图1和2中。其所有都作为适体被测试其结合S1P, 更确切而言生物素化L-e-S1P(也称为L-e-S1P(bio))的能力。经表征其对S1P的结合亲和力的第一S1P结合核酸为核酸215-F9-001。平衡结合常数K_D由直接和竞争性下拉结合测定加以测定(K_D直接=34nM, K_D竞争=45nM; 图1和3)。

[0345] 在比较竞争下拉测定中相对于S1P结合核酸215-F9-001测试作为适体的S1P结合核酸215-H11-001、215-H9-001、215-F10-001、222-A10-002和222-A12-002。S1P结合核酸215-F10-001和215-H11-001显示与215-F9-001类似的结合亲和力(图1)。相较于S1P结合核

酸215-F9-001, S1P结合核酸215-H9-001、222-A10-002和222-A12-002显示结合亲和力降低(图1)。

[0346] S1P结合核酸215-F9-001的衍生物215-F9-002和215-F9-003显示与215-F9-001类似的与S1P的结合, 而衍生物215-F9-004、215-F9-008和215-F9-009在竞争性下拉测定中相较于S1P结合核酸215-F9-001显示结合亲和力降低(图2)。

[0347] 根据本发明的S1P结合核酸包含长度为34或35个核苷酸的中心核苷酸链段。

[0348] 根据本发明的S1P结合核酸的中心核苷酸链段共有序列5' WAUUGCCGA WUGUAAACGCCUUWAGAGAAAGCACUAG 3' 或 5' WAUUGCCGWUGUAAACGCCUUWAGAGAAAGCACUAG 3'。S1P结合核酸215-F9-001、215-H11-001、215-F10-001和215-F9-001的对S1P显示最佳结合亲和力的衍生物的中心链段包含下列序列:

[0349] a) 215-F9-001及衍生物: AAUAGCCGUUGAAACGCCUUUAGAGAAGCACUAG

[0350] b) 215-H11-001: AAUAGCCGAUGAAACGCCUUUAGAGAAGCACUAG

[0351] c) 215-F10-001: AAUAGCCGAAUGAAACGCCUUUAGAGAAGCACUAG。

[0352] S1P结合核酸的5'和3'末端链段包含三个(例如215-F9-004)、四个(例如215-F9-003)、五个(例如215-F9-002)或六个(例如215-F10-001)核苷酸(图1和图2), 其中链段任选彼此杂交, 借此在杂交后形成双链结构。这个双链结构可由三至六个碱基对组成。然而, 所述杂交并非必定在分子中产生。

[0353] 组合所有测试S1P结合核酸的第一末端核苷酸链段与第二末端核苷酸链段, 通式为5' X₁X₂X₃SUG 3' (第一末端核苷酸链段)和5' CASX₄X₅X₆3' (第二核苷酸链段), 其中

[0354] X₁为A或不存在, X₂为G或不存在, X₃为S或不存在, X₄为S或不存在, X₅为C或不存在, 且X₆为U或不存在。

[0355] 相较于具有六个核苷酸长度的末端链段的S1P结合序列215-F9-001, 具有三个核苷酸长度的末端链段和与S1P结合序列215-F9-001相同的中心链段的S1P结合序列215-F9-004显示结合亲和力降低(图2)。因此, 根据本发明的S1P结合核酸的末端链段的优选长度为4-6个核苷酸。

[0356] 组合S1P结合核酸的具有五至六个核苷酸的第一末端核苷酸链段与第二末端核苷酸链段, 通式为5' X₁X₂X₃SUG 3' (第一末端核苷酸链段)和5' CASX₄X₅X₆3' (第二核苷酸链段), 其中

[0357] a) X₁为A, X₂为G, X₃为S, X₄为S, X₅为C, 且X₆为U或

[0358] b) X₁不存在, X₂为G, X₃为S, X₄为S, X₅为C, 且X₆为U或

[0359] c) X₁为A, X₂为G, X₃为S, X₄为S, X₅为C, 且X₆不存在或

[0360] d) X₁不存在, X₂为G, X₃为S, X₄为S, X₅为C, 且X₆不存在,

[0361] 其中优选地

[0362] a) 第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5' AGCGUG 3' 且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5' CACGCU 3' (参见例如215-F9-001)或

[0363] b) 第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5' GCGUG 3' 且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5' CACGC 3' (参见例如215-F9-002)。

[0364] 组合S1P结合核酸的具有四至五个核苷酸的第一末端核苷酸链段与第二末端核苷酸链段, 通式为5' X₁X₂X₃SUG 3' (第一末端核苷酸链段)和5' CASX₄X₅X₆ 3' (第二核苷酸链

段),其中

[0365] a) X_1 不存在, X_2 不存在, X_3 为S, X_4 为S, X_5 为C, 且 X_6 不存在或

[0366] b) X_1 不存在, X_2 为G, X_3 为S, X_4 为S, X_5 不存在, 且 X_6 不存在,

[0367] c) X_1 不存在, X_2 不存在, X_3 为S, X_4 为S, X_5 不存在, 且 X_6 不存在,

[0368] 其中优选地

[0369] a) 第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CGUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CACG 3'(参见215-F9-003)或

[0370] b) 第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'GCUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CAGC 3'(参见215-F9-008)或

[0371] c) 第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'GGUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CACC 3'(参见215-F9-009),

[0372] 更优选地

[0373] 第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CGUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CACG 3'(参见215-F9-003)。

[0374] 组合S1P结合核酸的具有三至四个核苷酸的第一末端核苷酸链段与第二末端核苷酸链段, 通式为5' $X_1X_2X_3$ SUG 3'(第一末端核苷酸链段)和5' $CASX_4X_5X_6$ 3'(第二核苷酸链段), 其中

[0375] X_1 不存在, X_2 不存在, X_3 为S或不存在, X_4 为S或不存在, X_5 不存在, 且 X_6 不存在,

[0376] 其中优选地, 第一末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'GUG 3'且第二末端核苷酸链段包含核苷酸序列5'CAC 3'(参见215-F9-009)。

[0377] 为证明S1P结合核酸的功能性, 将镜像异构体215-F9-001、215-F9-002合成为在其5'末端包含氨基的镜像异构体。使40kDa PEG部分偶合于氨基修饰的镜像异构体215-F9-001-5'-氨基和215-F9-002-5'-氨基, 从而产生S1P结合镜像异构体215-F9-001-5'-PEG(也称为NOX-S92)和215-F9-002-5'-PEG(也称为NOX-S91)。镜像异构体的合成和PEG化描述于实施例2中。

[0378] 测试S1P结合镜像异构体体外和体内抑制/拮抗S1P的功能。如实施例4中所示, S1P结合镜像异构体体外抑制S1P与受体EDG-3/S1P₃和EDG-1/S1P₁的相互作用和信号传导(图4和9)。如实施例7中所示, S1P结合镜像异构体215-F9-002-5'-PEG(也称为NOX-S91)体外抑制血管生成。体内测试镜像异构体215-F9-001-5'-PEG(也称为NOX-S92)的功效, 其中215-F9-001-5'-PEG(也称为NOX-S92)由于与S1P结合而诱导淋巴细胞减少(实施例5, 图5)。

[0379] 1.2通过用2'-脱氧核糖核苷酸置换核糖核苷酸使S1P结合核酸215-F9-002的亲合力增加

[0380] 镜像异构体215-F9-002(也称为L-S1P-215-F9-002)结合S1P的亲合力为 31.5 ± 3.1 nM(n=4), 如通过竞争性镜像异构体下拉测定所测定(方案参见实施例6, 图6)。

[0381] 发明者惊人地观察到通过用2'-脱氧核糖核苷酸置换核糖核苷酸, S1P结合镜像异构体L-S1P-215-F9-002的结合亲合力得以提高, 特别是用2'-脱氧核糖核苷酸置换S1P结合镜像异构体L-S1P-215-F9-002中四个位置处的核糖核苷酸导致结合亲合力提高五倍以上。发明者已惊人地发现用一个2'-脱氧核糖核苷酸置换镜像异构体L-S1P-215-F9-002的序列中的一个核糖核苷酸导致对生物素化D-e-S1P的结合亲合力提高(参见图6; 镜像异构体L-

S1P-215-F9-002-D01、L-S1P-215-F9-002-D11、L-S1P-215-F9-002-D19、L-S1P-215-F9-002-D21、L-S1P-215-F9-002-D22和L-S1P-215-F9-002-D32)。对于镜像异构体L-S1P-215-F9-002-D19和L-S1P-215-F9-002-D21,观察到对生物素化D-e-S1P的结合亲和力提高两至三倍(图6和7)。用一个2'-脱氧核糖核苷酸置换位置19或位置21处的一个核糖核苷酸导致结合亲和力提高分别为16nM(n=2)和 11.3 ± 2.1 nM(n=3)(图6)。

[0382] 为评估自证明适于增加结合亲和力的单一核苷酸置换起始,用一个以上2'-脱氧核糖核苷酸置换S1P结合镜像异构体L-S1P-215-F9-002的序列中的一个以上核糖核苷酸是否将导致对D-e-S1P的结合亲和力进一步提高,合成由核糖核苷酸和两个至五个2'-脱氧核糖核苷酸组成的镜像异构体:L-S1P-215-F9-002-D21-22、L-S1P-215-F9-002-D21-19、L-S1P-215-F9-002-D21-19-22、L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32和L-S1P-215-F9-002-01-11-19-21-32(图6)。竞争性镜像异构体下拉分级测定显示相较于镜像异构体L-S1P-215-F9-002的仅包含一个2'-脱氧核糖核苷酸或两个2'-脱氧核糖核苷酸的衍生物,用2'-脱氧核糖核苷酸置换L-S1P-215-F9-002镜像异构体的多个位置处的核糖核苷酸(其中所述位置的各者本身已证明适于增加结合亲和力)导致结合亲和力进一步提高(图6和7)。然而,相较于镜像异构体L-S1P-215-F9-002-D21,如对于镜像异构体L-S1P-215-F9-002-D21-19所示,用两个2'-脱氧核糖核苷酸置换两个核糖核苷酸导致结合亲和力提高。未观察到也包含两个2'-脱氧核糖核苷酸的镜像异构体L-S1P-215-F9-002-D21-22具有这个效应(图6和8)。相较于镜像异构体L-S1P-215-F9-002-D21-19(图6和8),用三个2'-脱氧核糖核苷酸置换三个核糖核苷酸(参见镜像异构体L-S1P-215-F9-002-D21-19-22)未导致结合亲和力进一步提高。然而,相较于具有两个2'-脱氧核糖核苷酸的L-S1P-215-F9-002-D21-19,对于包含四个2'-脱氧核糖核苷酸的镜像异构体L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32,观察到对D-e-S1P的结合亲和力提高(图6和8)。在竞争性镜像异构体下拉测定中,L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32显示结合亲和力为5.4nM(n=2)(图6)。用五个2'-脱氧核糖核苷酸置换五个核糖核苷酸(参见镜像异构体L-S1P-215-F9-002-D01-11-19-21-32,图6)未导致与D-e-S1P的结合进一步提高(图6和8)。总之,发明者惊人地观察到通过用2'-脱氧核糖核苷酸置换位置1、19、21和32处的核糖核苷酸,D-e-S1P结合镜像异构体L-S1P-215-F9-002的结合亲和力提高五倍以上(参见镜像异构体L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32,图6)。

[0383] 体外细胞培养测定(方案参见实施例4)确认对D-e-S1P的亲和力提高转化成对S1P功能的抑制增强。5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002(也称为NOX-S91)和5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S93)抑制S1P诱导的抑制蛋白在表达人S1P受体EDG1的报导体细胞系中募集的IC₅₀值分别为22.5nM和10.3nM(图9A、9B)。在表达人S1P受体EDG3的细胞系中,5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002(也称为NOX-S91)和5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S93)抑制S1P诱导的钙释放的IC₅₀值分别为10nM和5.5nM(图9C、9D)。

[0384] 在体外血管生成测定中,S1P结合镜像异构体5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002(也称为NOX-S91)和5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S93)得以成功测试(参见实施例7,图10)。在体内研究中,S1P结合镜像异构体5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-001(也称为NOX-S92)和5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S93)得以成功测试(参见实施例5,图5)。

[0385] 实施例2:适体和镜像异构体的合成及衍生化

[0386] 小规模合成

[0387] 使用2' TBDMS RNA和DNA亚磷酰胺化学及标准环外胺保护基(Damha和Ogilvie, 1993)用ABI 394合成仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)通过固相合成产生适体(D-RNA核酸或D-DNA修饰的D-RNA核酸)和镜像异构体(L-RNA核酸或L-DNA修饰的L-RNA核酸)。对于寡核苷酸的RNA部分,使用呈D-构型和L-构型的rA(N-Bz)-亚磷酰胺、rC(N-Ac)-亚磷酰胺、rG(N-ibu)-,亚磷酰胺和rU-亚磷酰胺,而对于DNA部分,应用呈D-构型和L-构型的dA(N-Bz)-亚磷酰胺、dC(N-Ac)-亚磷酰胺、dG(N-ibu)-亚磷酰胺和dT亚磷酰胺。所有亚磷酰胺都自ChemGenes, Wilmington, MA购买。在合成和脱除保护之后,适体和镜像异构体通过凝胶电泳纯化。

[0388] 大规模合成加修饰

[0389] 使用2' TBDMS RNA和DNA亚磷酰胺化学及标准环外胺保护基用ÄktaPilot100合成仪(GE Healthcare, Freiburg)通过固相合成产生镜像异构体(Damha和Ogilvie, 1993)。自ChemGenes, Wilmington, MA购买L-rA(N-Bz)-亚磷酰胺、L-rC(N-Ac)-亚磷酰胺、L-rG(N-ibu)-亚磷酰胺、L-rU-亚磷酰胺、L-dA(N-Bz)-亚磷酰胺、L-dC(N-Ac)-亚磷酰胺、L-dG(N-ibu)-亚磷酰胺和L-dT-亚磷酰胺。自American International Chemicals Inc. (Framingham, MA, USA)购买5'-氨基-修饰剂。在L-核糖A、L-核糖C、L-核糖G、L-核糖U、L-2'脱氧A、L-2'脱氧C、L-2'脱氧G或L-2'脱氧T修饰的CPG(孔径1000 Å)(Link Technology, Glasgow, UK)上开始未经修饰或5'-氨基修饰的镜像异构体的合成。对于RNA和DNA亚磷酰胺的偶合(每个循环15分钟),使用含0.3M苄巯基四唑(CMS-Chemicals, Abingdon, UK)的乙腈、和2当量相应0.2M亚磷酰胺的乙腈溶液。使用氧化加帽循环。自Biosolve(Valkenswaard, NL)购买用于寡核苷酸合成的其它标准溶剂和试剂。DMT-ON合成的镜像异构体;在脱除保护之后,其通过使用Source15RPC介质(Amersham)进行制备型RP-HPLC来纯化(Wincott等, 1995)。用80%乙酸移除5' DMT基团(在室温下30分钟)。在5'氨基修饰的镜像异构体的情况下,用80%乙酸移除5' MMT基团(在室温下90分钟)。随后,添加2M NaOAc水溶液且通过使用5K再生纤维素膜(Millipore, Bedford, MA)进行切向流过滤来使镜像异构体脱盐。

[0390] 镜像异构体的PEG化

[0391] 为延长镜像异构体在体内的血浆保留时间,在镜像异构体的5'末端共价偶合40kDa聚乙二醇(PEG)部分。

[0392] 镜像异构体的5'PEG化

[0393] 对于PEG化(用于PEG化的方法的技术详情参见欧洲专利申请EP 1 306 382),将纯化5'-氨基修饰的镜像异构体溶解于H₂O(2.5ml)、DMF(5ml)和缓冲液A(5ml;通过混合柠檬酸·H₂O[7g]、硼酸[3.54g]、磷酸[2.26ml]和1M NaOH[343ml]且添加水至最终体积11来制备;用1M HCl调整pH=8.4)的混合物中。

[0394] 用1M NaOH使镜像异构体溶液的pH值达到8.4。接着,在37℃下以六份0.25当量每30分钟添加40kDa PEG-NHS酯(Jenkem Technology, Allen, TX, USA)直至达到最大产率75%至85%。在添加PEG-NHS酯期间用1M NaOH保持反应混合物的pH值在8-8.5下。

[0395] 使反应混合物与4ml脲溶液(8M)和4ml缓冲液B(含0.1M乙酸三乙铵的H₂O)掺合且加热至95℃持续15分钟。PEG化镜像异构体接着通过使用乙腈梯度(缓冲液B;缓冲液C:含

0.1M乙酸三乙铵的乙腈),用Source 15RPC介质(Amersham)进行RP-HPLC来纯化。过量PEG在5%缓冲液C下经洗脱,PEG化镜像异构体在10%-15%缓冲液C下经洗脱。组合纯度>95%(如通过HPLC所评估)的产物级分且与40ml 3M NaOAC混合。通过切向流过滤(5K再生纤维素膜,Millipore,Bedford MA)来使PEG化镜像异构体脱盐。

[0396] 实施例3:由下拉结合测定对S1P结合适体的分析

[0397] 直接下拉测定

[0398] 使用适体(D-RNA核酸)和生物素化L-e-S1P,在37℃下在下拉测定形式中测量S1P结合核酸的亲和力。使用[γ - 32 P]标记的ATP(Hartmann Analytic,Braunschweig,Germany),通过T4聚核苷酸激酶(Invitrogen,Karlsruhe,Germany)在5'末端处对适体进行放射性标记。经标记适体的比放射性为200,000-800,000cpm/pmol。在变性和复性之后在37℃下在300pM浓度下连同不同量的生物素化L-e-S1P一起在选择缓冲液(20mM Tris-HCl(pH7.4);150mM NaCl;5mMKCl;1mM MgCl₂;1mM CaCl₂;0.1%[w/vol]吐温20;4mg/ml牛血清白蛋白)中培育适体3-12小时以在低浓度下达到平衡。选择缓冲液补充以10 μ g/ml酵母RNA(Ambion,Austin,USA)以防止结合伴侣吸附至所用塑料器皿或固定基质的表面。生物素化L-e-S1P的浓度范围自192pM至3000nM加以设置;总反应体积为0.1ml。使生物素化L-e-S1P和适体与生物素化L-e-S1P的复合物固定在已在添加至结合反应之前用选择缓冲液预平衡的2 μ l抗生蛋白链菌素Ultralink Plus微珠(Pierce Biotechnology,Rockford,USA)上。微珠在热混合器中在相应温度下保持悬浮20分钟以固定生物素化L-e-S1P和生物素化L-e-S1P与经结合适体的复合物。在移除上清液并适当洗涤之后,在闪烁计数器中定量固定的放射性。结合的百分比或归一化结合相对于生物素化L-e-S1P的浓度进行绘图且使用软件算法(GRAFIT;Erithacus Software;Surrey U.K.)在假定1:1化学计量下获得解离常数。

[0399] 竞争性下拉测定

[0400] 另一下拉测定形式用于通过经标记适体与不同量的未标记适体的竞争来测定S1P结合核酸的亲和力常数。未标记适体与经标记适体竞争结合生物素化L-e-S1P,由此降低根据适体对L-e-S1P的亲合力的结合信号。在37℃下用150pM经放射性标记的适体以及恒定量的20nM生物素化L-e-S1P在0.4ml选择缓冲液中进行测定3-12小时。这些条件导致在中和亲和素琼脂糖或抗生蛋白链菌素Ultralink Plus(两者均来自Pierce)上固定和洗涤之后约5%-10%结合生物素化L-S1P。对于竞争,未标记适体连同在96pm至1500nM的范围内的恒定量的经标记适体一起添加至结合反应中。在完成结合、固定、适当洗涤和测定微珠上的固定放射性之后,测定结合的百分比或归一化结合且相对于未标记适体的浓度绘图。使用软件算法(参见上文)在假定1:1化学计量下获得解离常数。

[0401] 相同测定形式用于对一组不同适体进行比较分级,然而例外之处为代替完全浓度范围,各未标记适体仅有三个不同浓度(例如5nM、50nM、500nM)连同充当参照的一种经标记适体一起施加于测试管。在测试中被发现最具活性的适体可接着充当对其它适体变异体的比较分析的新参照。

[0402] 实施例4:S1P体外细胞培养测定

[0403] 4.1由S1P结合镜像异构体抑制S1P诱导的钙释放。

[0404] 表达人S1P3受体(EDG3/S1P₃)和人G蛋白G α ₁₅的稳定转染CHO细胞以每孔 5×10^4 个细胞接种于具有透明底部的黑色96孔板(Greiner)中且在37℃和5%CO₂下在此外也含有100单

位/毫升青霉素、100 μ g/ml链霉素和10 μ g/ml灭瘟素(blasticidin)的UltraCHO培养基(Lonza)中培养过夜。

[0405] 在96孔“低通量(low profile)”PCR板中在含有20mM HEPES和5mM丙磺舒(Probenecid)(CHO-U+)的UltraCHO培养基中将刺激溶液(D-e-S1P+各种浓度的镜像异构体)配制成10 $\times$ 浓缩溶液。充分混合溶液且在热混合器上在37 $^{\circ}$ C下培育30至60分钟。在各(垂直)行中,包括缓冲液对照(无D-e-S1P)和D-e-S1P对照(无镜像异构体)。

[0406] 在用钙指示剂染料FluoForte(Enzo Life Sciences)装载之前,细胞用200 μ l CHO-U+洗涤一次。接着添加90 μ l指示剂染料溶液(含5.56 μ g/ml FluoForte、0.044%普洛尼克(pluronic)127(Invitrogen)的CHO-U+)且在37 $^{\circ}$ C下培育细胞60分钟。

[0407] 在Fluostar Optima多检测板读取器(BMG)中,在激发波长485nm和发射波长520nm下对荧光信号进行测量。

[0408] 对于若干样品的平行分析,同时记录96孔板的一列(垂直行)的各孔。

[0409] 通过读取基线测定的3个值来起始测量。接着中断测量且将板移出仪器。借助于多通道移液管添加来自“低通量”板的一行的10 μ l刺激溶液至行的各孔中以进行刺激。在混合(温和旋转板)之后,使板返回至仪器中且继续测量(在4秒间隔下进行总计20次测量)。

[0410] 对于各孔,测定最大荧光与基线值之间的差异且相对于镜像异构体浓度绘图。在大多数情况下,无镜像异构体的样品(仅D-e-S1P)的值设置为100%且具有镜像异构体的样品的值计算成这个的百分比。对于剂量-反应曲线,百分比值相对于镜像异构体浓度绘图且IC₅₀值(存在无镜像异构体下50%活性所处的镜像异构体浓度)以绘图方式根据所得曲线确定。

[0411] 为显示抗S1P镜像异构体的功效,细胞用10nM D-e-S1P或与各种量的镜像异构体215-F9-001-5'-PEG(也称为NOX-S92)和215-F9-002-5'-PEG(也称为5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002和NOX-S91)一起预培育或与各种量的215-F9-002-5'-PEG(也称为5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002NOX-S91)和5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S93)一起预培育的D-e-S1P刺激。结果显示为相对于在无镜像异构体下获得的信号进行归一化的荧光信号百分比。

[0412] 发现镜像异构体215-F9-001-5'-PEG(也称为NOX-S92)和215-F9-002-5'-PEG(也称为5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002和NOX-S91)抑制S1P诱导的Ca⁺⁺释放的IC₅₀为约10nM(来自三个独立实验的平均值 $\pm$ 标准偏差)(图4和9C)。发现镜像异构体5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S93)抑制S1P诱导的Ca⁺⁺释放的IC₅₀为约5.5nM(图9D)。

[0413] 4.2由S1P结合镜像异构体抑制由S1P通过EDG1受体诱导的 β -抑制蛋白募集

[0414] 在每孔1 $\times$ 10⁴个细胞下将PathHunterTM eXpress EDG-1 CHO-K1 β -抑制蛋白GPCR细胞(DiscoverX)接种于具有透明底部的白色96孔板(Greiner)中且在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下在100 μ l培养基(DiscoverX)中培养48小时。在补充有1mg/ml BSA和20mM HEPES的HBSS(Gibco)中将刺激溶液(D-e-S1P+各种浓度的镜像异构体)配制成11 $\times$ 浓缩溶液,充分混合且在37 $^{\circ}$ C下培育30分钟。每孔添加10 μ l刺激溶液(一式三份)且在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下培育细胞90分钟。

[0415] 在由D-e-S1P活化受体后,活化EDG1与 β -抑制蛋白的相互作用导致 β -半乳糖苷酶

片段互补。

[0416] 对于 β -半乳糖苷酶活性的定量,添加55 μ l工作检测试剂溶液(DiscoverX)且在室温下培育90分钟。随后在Fluostar Optima多检测板读取器(BMG)中测量发光。

[0417] 为显示抗S1P镜像异构体的功效,细胞用10nM D-e-S1P或与各种量的215-F9-002-5'-PEG(也称为5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002或NOX-S91和5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(NOX-S93)一起预培育的D-e-S1P刺激。结果显示为相对于在未添加镜像异构体下获得的信号进行归一化的发光信号百分比。显示来自一式三份培养的平均值 $\pm$ SD。

[0418] 5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002(也称为215-F9-002-5'-PEG和NOX-S91)和5'-40kDa-PEG-L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32(也称为NOX-S91)抑制S1P(D-e-S1P)诱导的抑制蛋白在表达人S1P受体EDG1的报导体细胞系中的募集的IC₅₀值分别为22.5nM和10.3nM(图9A、9B)。

[0419] 实施例5:S1P结合镜像异构体的体内活性

[0420] 进行设计用以测试镜像异构体NOX-S92或NOX-S93改变小鼠中的淋巴细胞迁移的能力的药动学研究。每组和每个时间点五只体重(bw)20-28g的成年雌性小鼠接受向尾部静脉的静脉内团式注射(每千克体重10mL)。镜像异构体NOX-S92或NOX-S93的注射剂量为每千克体重20mg且5%注射用葡萄糖用作媒介物。在指定时间点,抽取EDTA-血液样品以用scil Vet abc血液学分析器(scil动物护理公司)测定淋巴细胞计数。用镜像异构体NOX-S92或NOX-S93处理诱导淋巴细胞减少,如通过在八小时之后每微升淋巴细胞数自基态水平 8.6×10^3 降低至 4.9×10^3 (NOX-S92)或在用药之后二十四小时每微升血液的淋巴细胞数自 8.7×10^3 降低至 4.6×10^3 所指示(NOX-S93)(参见图5)。

[0421] 使用杜耐特氏多重比较检验(Dunnett's Multiple Comparison Test)确定显著性。

[0422] 实施例6:竞争性镜像异构体下拉测定

[0423] 通过竞争性下拉测定来测定S1P结合镜像异构体的亲和力常数。为允许T4聚核苷酸激酶对镜像异构体进行放射性标记,添加呈D-构型的两个鸟苷残基至L-S1P-215-F9-002镜像异构体的5'末端中。接着测试未标记镜像异构体与300-600pM经放射标记的镜像异构体L-S1P-215-F9-002-5'-diD-G竞争结合恒定量的生物素化D-e-S1P,即降低根据未标记镜像异构体对D-e-S1P的结合亲和力的结合信号的能力。D-e-S1P在8nM的浓度下使用,导致在不存在竞争剂镜像异构体下约10%经放射标记的镜像异构体L-S1P-215-F9-002-5'-diD-G的最终结合。在37°C下在250 μ l选择缓冲液(20mM Tris-HCl(pH7.4);150mM NaCl;5mM KCl;1mM MgCl₂;1mM CaCl₂;0.1%[w/vol]吐温20;4mg/ml牛血清白蛋白;10 μ g/ml酵母RNA)中进行测定3-4小时。使生物素化D-e-S1P和镜像异构体与生物素化S1P的复合物固定在已在添加至结合反应之前用选择缓冲液预平衡的5 μ l中和亲和素UltraLink Plus微珠(Pierce Biotechnology, Rockford, USA)上。微珠在热混合器中在37°C下保持悬浮30分钟。在移除上清液并适当洗涤之后,在闪烁计数器中定量固定放射性。经结合的经放射标记的镜像异构体L-S1P-215-F9-002-5'-diD-G的结合百分比或归一化百分比相对于竞争剂镜像异构体的相应浓度绘图。使用GraphPad Prism软件获得解离常数。相同测定形式用于一组不同镜像异构体的比较分级。在这个情况下,竞争剂镜像异构体在如所指示的单一浓度下使用。

[0424] 实施例7:NOX-S91和NOX-S93体外抑制血管生成

[0425] 在基于球状体的细胞血管生成测定中测试镜像异构体NOX-S91和NOX-S93体外抑制VEGF-A(血管内皮生长因子-A)和S1P(鞘氨醇-1-磷酸酯)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)萌芽的能力。

[0426] 实验在修改最初公布的方案(Korff和Augustin,J Cell Sci 112:3249-58,1999)下进行。简言之,如所述(Korff和Augustin,J Cell Biol143:1341-52,1998)通过将呈悬滴形式的500个HUVEC吸移在塑料盘上以允许过夜球状体聚集来制备球状体。接着将50个HUVEC球状体接种于0.9ml胶原蛋白凝胶中且吸移至24孔板的个别孔中以允许聚合。

[0427] 在30分钟之后通过将100 μ l 10倍浓缩的工作稀释液吸移在聚合凝胶的上方来添加血管生成刺激剂S1P[100nM最终测定浓度]或VEGF-A[25ng/mL最终测定浓度]。同样,添加一定剂量范围(10nM-10 μ M,增量为对数一半)的S1P结合镜像异构体以允许计算IC₅₀。单独媒介物和单独血管生成刺激剂加镜像异构体媒介物充当对照孔(基态萌芽和最大萌芽诱导)。舒尼替尼(Sunitinib)用作VEGF诱导的萌芽测定中的阳性对照物质。在37℃下培育板24小时且通过添加4%Roti-Histofix加以固定。通过使用由倒置显微镜和数字成像软件分析3.2(Soft imaging system,Münster,Germany)组成的图象分析系统测定每个球状体的累积萌芽长度来定量经处理HUVEC球状体的萌芽强度。10个随机选择的球状体的累积萌芽长度的平均值被分析成个别数据点。用GraphPad Prism 5.02版软件,在将底部约束成0且顶部约束成100下,使用希尔斜率(hill slope)可变的非线性回归曲线拟合进行IC₅₀确定。方程为四参数逻辑方程。对于计算,自所有其它数据点减去基态萌芽的中值。中值对照VEGF-A或S1P萌芽设置成100%。

[0428] NOX-S91与NOX-S93两者均抑制由S1P或VEGF-A诱导的萌芽。NOX-S93显示对S1P诱导的EC萌芽的抑制强于NOX-S91。在S1P诱导的萌芽测定中,NOX-S93显示抑制(3.4×10^7 M)强于NOX-S91(7.5×10^7 M)。在VEGF-A诱导的萌芽中,两种药物均展现较低IC₅₀值(参见图10)。NOX-S91和NOX-S93关于VEGF-A诱导的EC萌芽的IC₅₀值为 2.1×10^{-7} M和 2.4×10^{-7} M。舒尼替尼用作阳性对照且显示在相同范围内抑制HUVEC萌芽,IC₅₀值为 2.5×10^{-7} M(参见图10)。

[0429] 在细胞血管生成测定中,测试的镜像异构体抑制S1P或VEGF-A诱导的EC萌芽。这些结果与对于S1P抗体公布的数据(Visentin等,Cancer Cell 20069(3):225-38)一致。

[0430] 说明书、权利要求、序列表和/或附图中公开的本发明的特征可单独及以其任何组合地为用于以本发明的各种形式实现本发明的材料。

序列表

	<110>	NOXXON Pharma AG	
	<120>	脂质结合核酸	
	<130>	N 10091 PCT	
	<150>	EP 10 004 253.0	
	<151>	2010-04-21	
	<150>	EP 11 000 117.9	
	<151>	2010-01-10	
	<160>	42	
	<170>	PatentIn 3.3 版	
	<210>	1	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	D RNA	
	<400>	1	
		agcgugaaua gccguugaaa cgcuuuaga gaagcacuag caagcu	46
[0001]	<210>	2	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	D-RNA	
	<400>	2	
		agcgugaaua gccgaugaaa cgcuuuaga gaagcacuag caagcu	46
	<210>	3	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	D-RNA	
	<400>	3	
		agcgugaaua gccgaugaaa cgcuuuag agaagcacua gcaagcu	47
	<210>	4	
	<211>	47	

	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<223> D-RNA	
	<400> 4	
	agcgugaaua gccgaaugaa acgceuuag agaagcaua gcacgc	47
	<210> 5	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<223> D-RNA	
	<400> 5	
	gcgugtauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
[0002]	<210> 6	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<223> D-RNA	
	<400> 6	
	gcgugaauag ccgaauaaaa cgccuuuaga gaagcacuag caagc	45
	<210> 7	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<223> D-RNA	
	<400> 7	
	gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210> 8	
	<211> 42	
	<212> DNA	

	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	D-RNA	
	<400>	8	
		cgugaaauagc cguugaaacg ccuuuagaga agcacuagca cg	42
	<210>	9	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	D-RNA	
	<400>	9	
		gugaauagee guugaaaegc cuuuagagaa gcacuagcac	40
[0003]	<210>	10	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	D-RNA	
	<400>	10	
		gcugaauagc cguugaaacg ccuuuagaga agcacuagca gc	42
	<210>	11	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	D-RNA	
	<400>	11	
		ggugaauagc cguugaaacg ccuuuagaga agcacuagca cc	42
	<210>	12	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	

	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	12	
		agcgugaaua gccguugaaa cgcuuuaga gaagcacuag cacgcu	46
	<210>	13	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	13	
		agegugaaua gccgaugaaa cgcuuuaga gaagcacuag cacgcu	46
	<210>	14	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
[0004]	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	14	
		agegugaaua gccgaaugaa acgcuuuag agaagcacua gcacgcu	47
	<210>	15	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	15	
		agegugaaua gccgaaugaa acgcuuuag agaagcacua gcacgcu	47
	<210>	16	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		

	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	16	
		gcguguauag ccgungaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	17	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	17	
		gcgugaauag ccgaaugaaa egccuuuaga gaagcacuag cacgc	45
	<210>	18	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
[0005]	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	18	
		gcgugaauag ccgungaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	19	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	19	
		cgugaauagc cguugaaacg ccuuuagaga agcacuagca cg	42
	<210>	20	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	

	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	20	
		gugaauagee guugaaaege cuuuagagaa gcacuuagcac	40
	<210>	21	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	21	
		gcugaauiagc cguugaaacg ccuuuagaga agcacuuagca gc	42
	<210>	22	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
[0006]	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	22	
		ggugaauiagc cguugaaacg ccuuuagaga agcacuuagca cc	42
	<210>	23	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	23	
		agcgugaaua gccguugaaa cgcuuuaga gaagcacuag cacgcu	46
	<210>	24	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	

	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	24	
		gcgugaauag ccgugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	25	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	25	
		agcgugaaua gccguugaaa cgcuuuaga gaagcacuag caagcu	46
	<210>	26	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
[0007]	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	26	
		gcgugaauag ccgugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	27	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	27	
		gcgugaauag ccgugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	28	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	

	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(11)..(11)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	28	
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aggcacuuagc acgc	44
	<210>	29	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(19)..(19)	
[0008]	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	29	
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aggcacuuagc acgc	44
	<210>	30	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(21)..(21)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	30	
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aggcacuuagc acgc	44
	<210>	31	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	

	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(22)..(22)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	31	
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	32	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(32)..(32)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	32	
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
[0009]			
	<210>	33	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(21)..(21)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(22)..(22)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	33	
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	34	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	

	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(19)..(19)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(21)..(21)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	34	
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	35	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
[0010]	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(19)..(19)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(21)..(21)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(22)..(22)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	35	
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	36	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	

	<220>			
	<221>	misc_feature		
	<222>	(19)..(19)		
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸		
	<220>			
	<221>	misc_feature		
	<222>	(21)..(21)		
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸		
	<220>			
	<221>	misc_feature		
	<222>	(32)..(32)		
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸		
	<400>	36		
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc		44
	<210>	37		
	<211>	44		
	<212>	DNA		
	<213>	人工		
	<220>			
	<223>	合成		
	<220>			
	<221>	misc_feature		
	<223>	L-RNA/L-DNA		
[0011]	<220>			
	<221>	misc_feature		
	<222>	(1)..(1)		
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸		
	<220>			
	<221>	misc_feature		
	<222>	(11)..(11)		
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸		
	<220>			
	<221>	misc_feature		
	<222>	(19)..(19)		
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸		
	<220>			
	<221>	misc_feature		
	<222>	(21)..(21)		
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸		
	<220>			
	<221>	misc_feature		
	<222>	(32)..(32)		
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸		
	<400>	37		
		gcgugaauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc		44
	<210>	38		
	<211>	46		
	<212>	DNA		
	<213>	人工		
	<220>			
	<223>	合成		

	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	D-RNA/L-RNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(1)..(2)	
	<223>	D-RNA	
	<400>	38	
		gggcgugauu agccguugaa acgccuuuag agaagcacua gcacgc	46
	<210>	39	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
[0012]	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(19)..(19)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(21)..(21)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(32)..(32)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	39	
		gcgugauuag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	40	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<223>	L-RNA/L-DNA	
	<220>		
	<221>	misc feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(19)..(19)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(21)..(21)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(32)..(32)	
	<223>	2' 脱氧核糖核苷酸	
	<400>	40	
		gcgugaaauag ccguugaaac gccuuuagag aagcacuagc acgc	44
	<210>	41	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
[0013]	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	41	
		wauugccgaw uguaacgccu uwagagaaag cacuag	36
	<210>	42	
	<211>	35	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	L-RNA	
	<400>	42	
		wauugccgwi guaacgccuu wagagaaagc acuag	35

SIP 结合核酸

名称	nt.	序列: 5'-3'	比较	PD _{直接} K _D [nM]	PD _{竞争} K _D [nM]	EDG3/SIP; IC ₅₀ [nM]
215-F9-001	46	AGCGUG[AAUAGCCG-UUGAAACGCCUUAGAGAGCAGCUAG]CAGCGCU	=	34	45	25
215-H11-001	46	AGCGUG[AAUAGCCG-AGGAAACGCCUUAGAGAGCAGCUAG]CAGCGCU	=		49	
215-H9-001	47	AGCGUG[AAUAGCCG-AGGAAACGCCUUAGAGAGAGCAGCUAG]CAGCGCU	<			
215-F10-001	47	AGCGUG[AAUAGCCG-AGGAAACGCCUUAGAGAGAGCAGCUAG]CAGCGCU	=	21	47	20
222-A10-002	44	GGGUG[AAUAGCCG-UUGAAACGCCUUAGAGAGAGCAGCGC	<			
222-A12-002	45	GGGUG[AAUAGCCG-AGGAAACGCCUUAGAGAGAGCAGCUAG]CAGCGC	<			

可彼此杂交的核苷酸的链段;

[可主要包含SIP结合基序的核苷酸的链段]

nt.: =核苷酸; [] =可变位置; 比较: =在竞争结合测定中作为递体测试的分子相对于215-F9-001;

=: =结合亲和与215-F9-001相等; <: =结合亲和弱于215-F9-001;

PD_{直接}: =在直接下拉测定中测量递体结合l-e-SIP-bio的解离常数K_D;

PD_{竞争}: =在用l-e-SIP-bio进行的竞争性下拉结合测定中测量递体的解离常数K_D;

EDG3: =在体外Ca释放测定中用表达EDG3受体的细胞测试的作为镜像异构体的抑制SIP的分子

图1

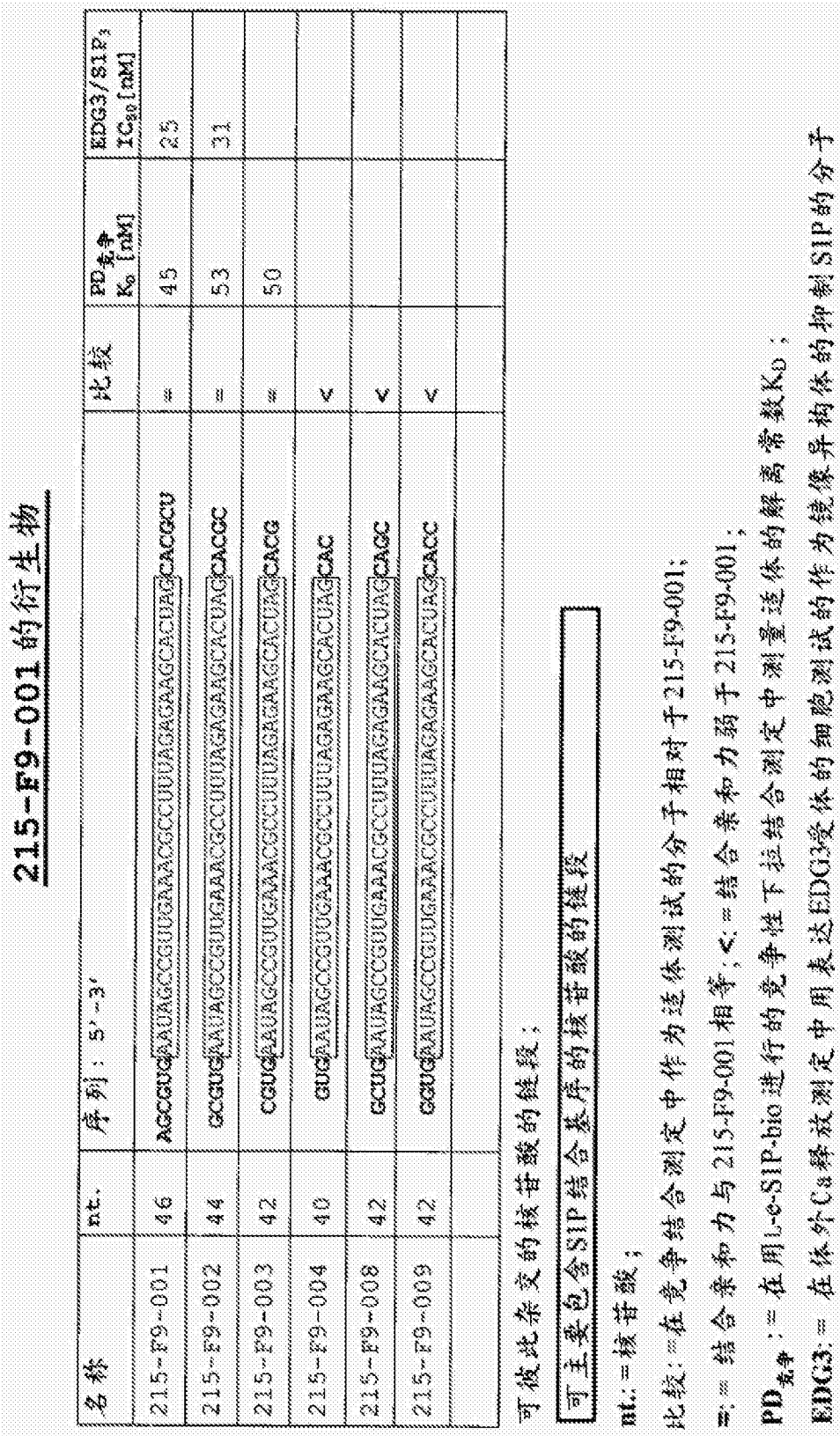


图2

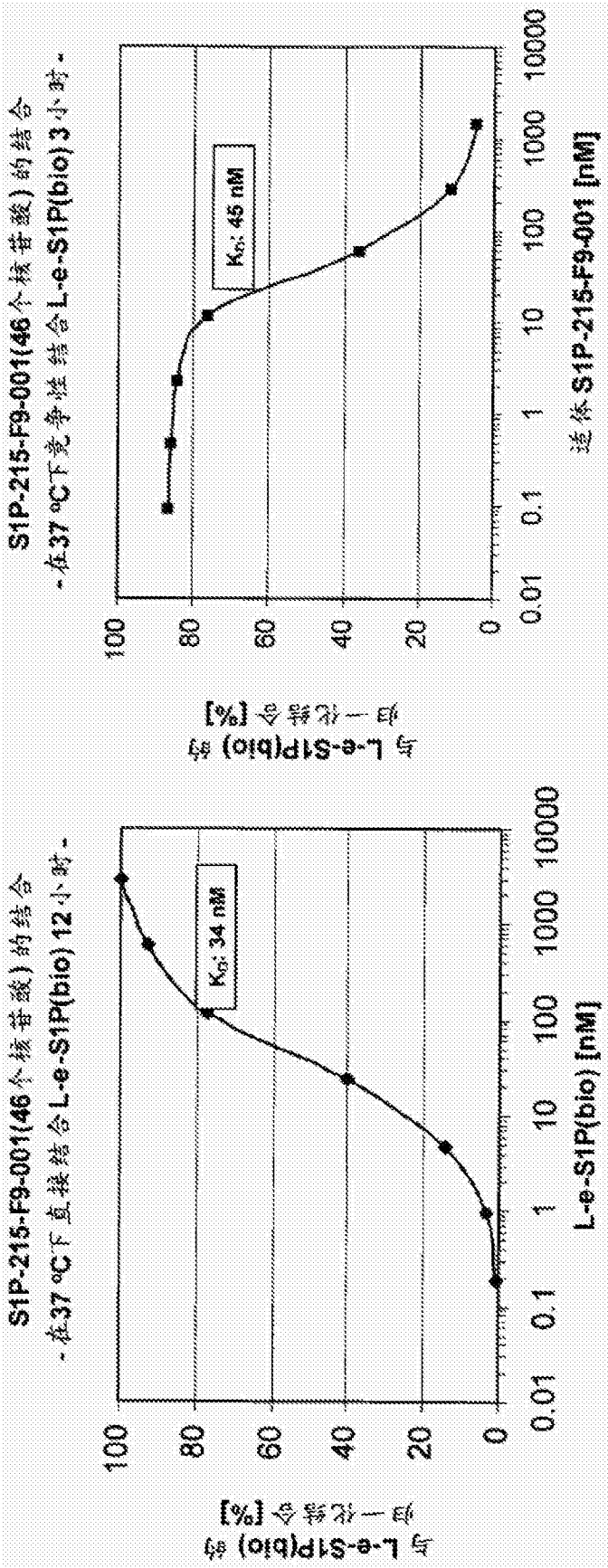


图3

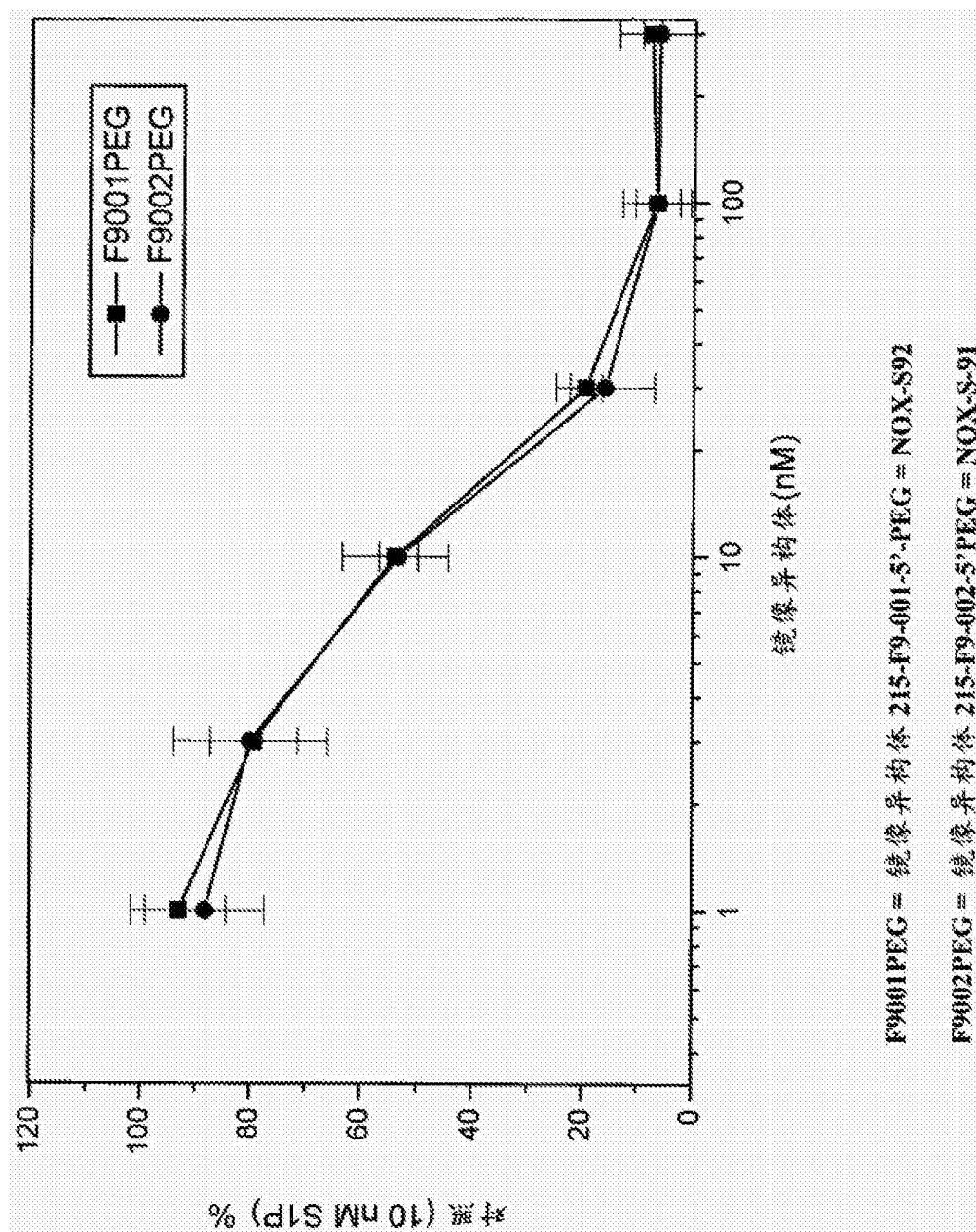
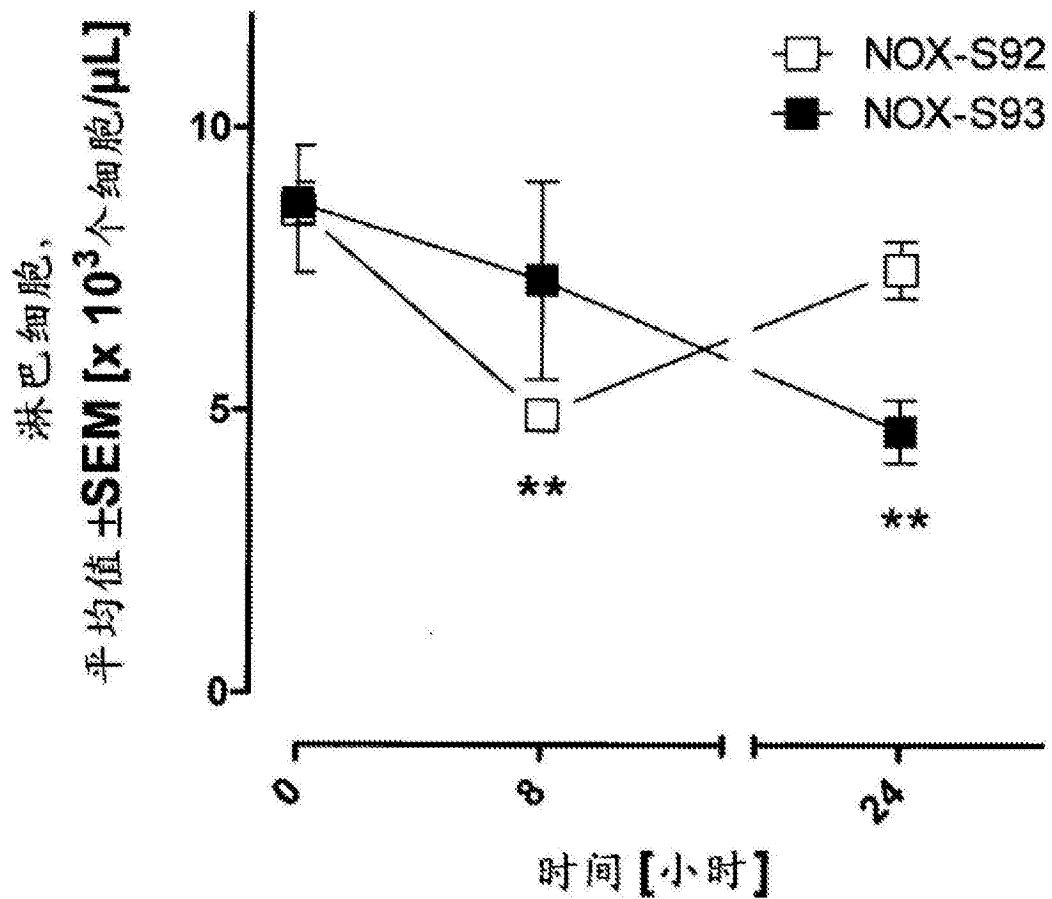


图4



剂量: iv., 20 mg/kg 体重
施用体积: 10 ml/kg 体重
数据: 平均值±SEM, n=5
统计: 杜耐特氏多重比较检验,
**p<0.01 (相较于给药前)
物种: C57BL-6, 雌性
体重: 20-28 g

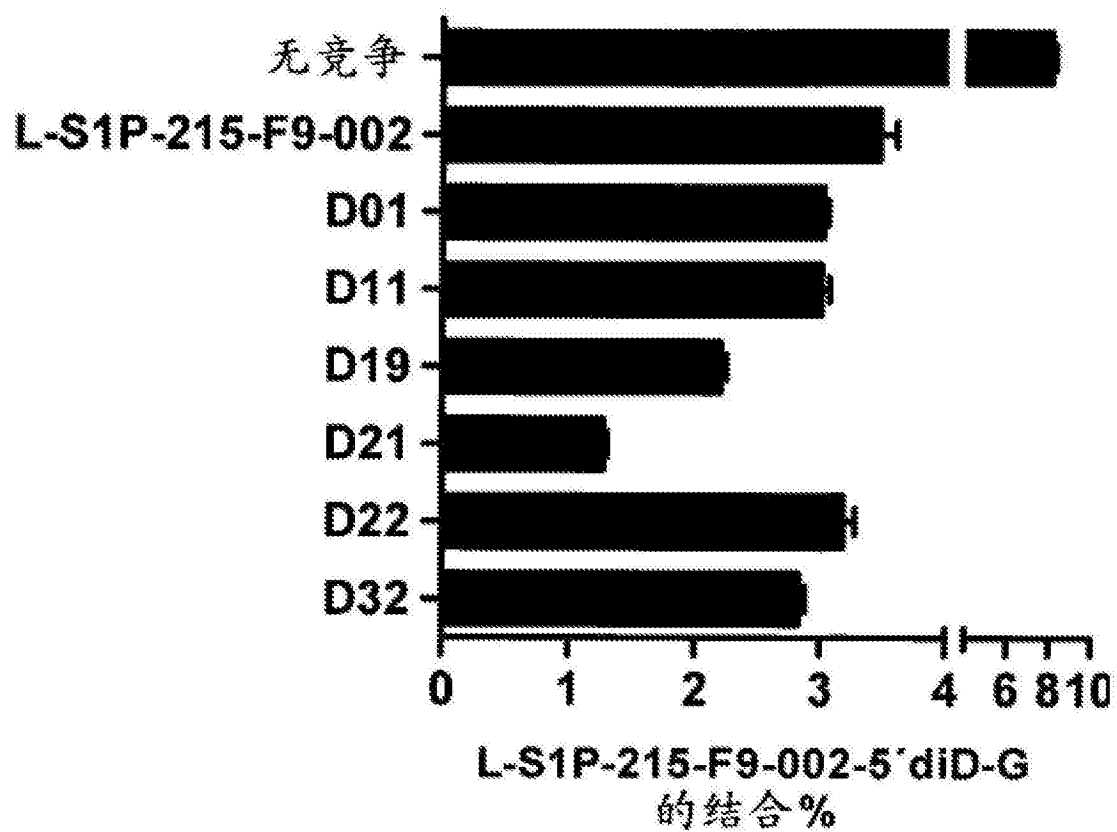
图5

名称	序列: 5'-3'	下拉分级	竞争性 下拉测定 (K _d)
L-S1P-215-F9-002	GGGUAUAGCCGUGAAACCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC		31.5±3.1 nM
L-S1P-215-F9-002-D01	<u>dg</u> CGUAAUAGCCGUGAAACCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	+ (F9-002)	
L-S1P-215-F9-002-D11	GGUGAAUAG <u>dc</u> CGUUGAAACGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	+ (F9-002)	
L-S1P-215-F9-002-D19	GGUGAAUAGCCGUGAA <u>ada</u> CGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	+ (F9-002)	16nM
L-S1P-215-F9-002-D21	GGUGAAUAGCCGUGAAAC <u>dc</u> CGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	+ (F9-002)	11.3±2.1 nM
L-S1P-215-F9-002-D22	GGUGAAUAGCCGUGAAAC <u>gd</u> CGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	+ (F9-002)	30nM
L-S1P-215-F9-002-D32	GGUGAAUAGCCGUGAAACCGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	+ (F9-002)	
L-S1P-215-F9-002-D21-22	GGUGAAUAGCCGUGAAAC <u>gd</u> CGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	= (D21)	
L-S1P-215-F9-002-D21-19	GGUGAAUAGCCGUGAA <u>ada</u> <u>dc</u> CGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	+ (D21)	6nM
L-S1P-215-F9-002-D21-19-22	GGUGAAUAGCCGUGAA <u>ada</u> <u>dc</u> <u>gd</u> CGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	= (D21-D19)	
L-S1P-215-F9-002-D01-19-21-32	<u>dg</u> CGUAAUAGCCGUGAA <u>ada</u> <u>dc</u> CGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	+ (D21-D19)	5nM
L-S1P-215-F9-002-D01-11-19-21-32	<u>dg</u> CGUAAUAG <u>dc</u> CGUGAA <u>ada</u> <u>dc</u> CGCCUUAGAGAAGCACUAGCACGC	+ (D21-D19)	5nM

= 结合与镜像异构体 L-S1P-215-F9-002-D21 (= D21) 或镜像异构体 L-S1P-215-F9-002-D21-19 (= D21-D19) 相等, 通过竞争性下拉分级测定来测定

+ 相较于镜像异构体 L-S1P-215-F9-002 (= F9-002), L-S1P-215-F9-002-D21 (= D21) 或镜像异构体 L-S1P-215-F9-002-D21-19 (= D21-D19), 结合提高, 通过竞争性下拉分级测定来测定

图6



D01 = L-S1P-215-F9-002-D01

D11 = L-S1P-215-F9-002-D11

D19 = L-S1P-215-F9-002-D19

D21 = L-S1P-215-F9-002-D21

D22 = L-S1P-215-F9-002-D22

D23 = L-S1P-215-F9-002-D23

图7

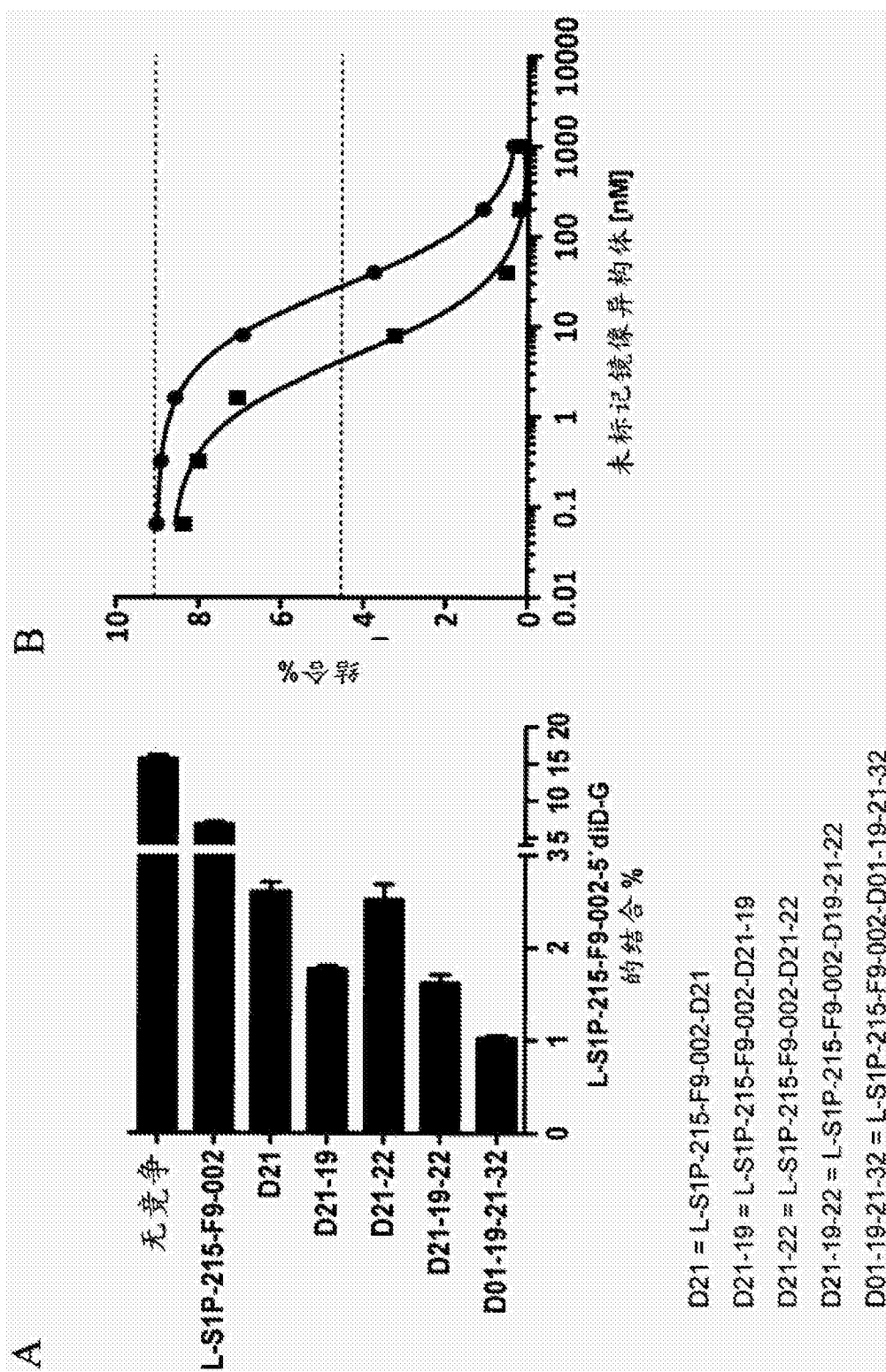


图8

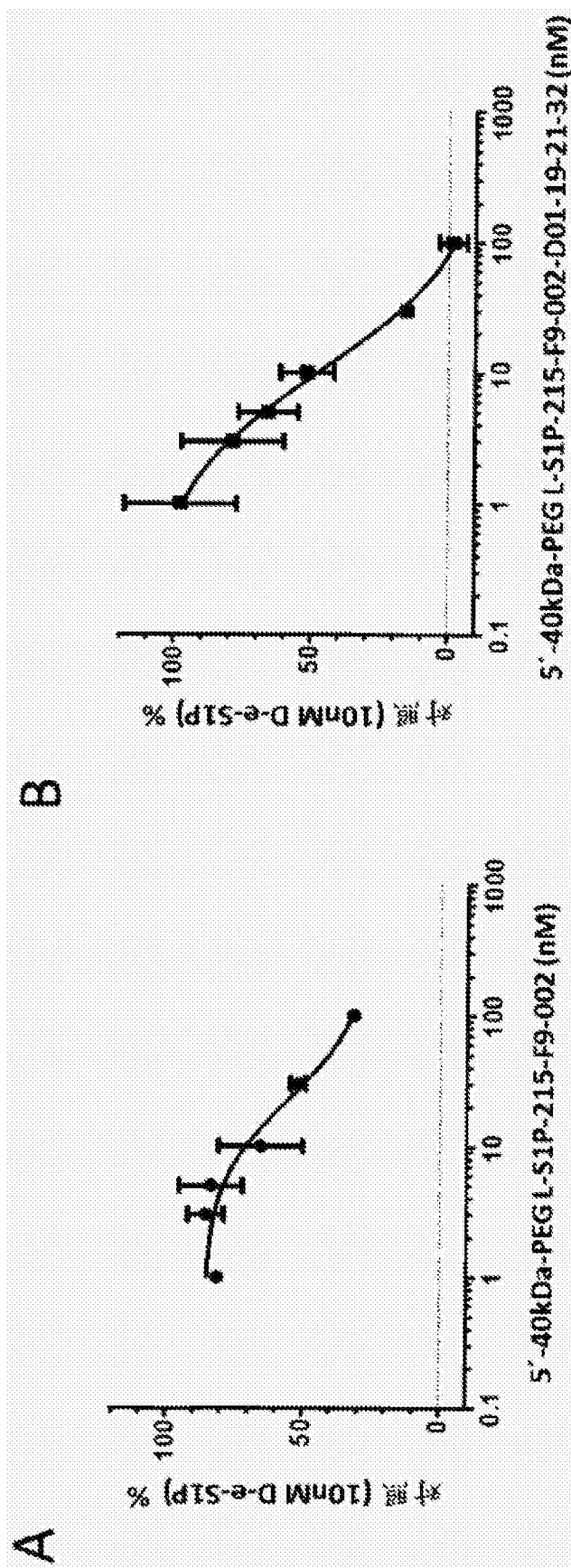


图9(A和B)

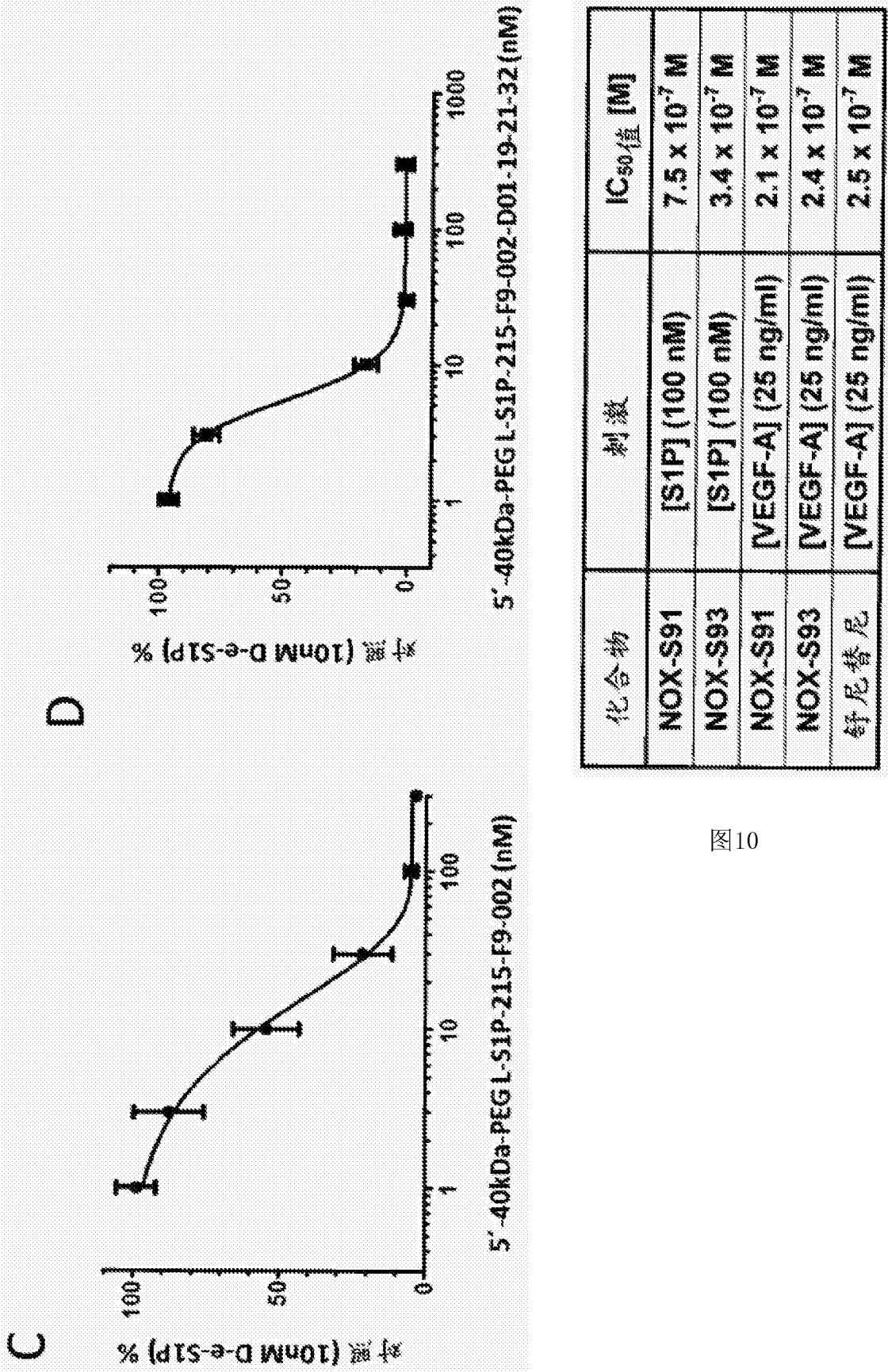


图10

图9(C和D)