

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/10

C12N 15/11 C07H 21/04

A61K 31/713



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00815433.3

[43] 公开日 2003 年 1 月 8 日

[11] 公开号 CN 1390253A

[22] 申请日 2000. 11. 13 [21] 申请号 00815433.3

[30] 优先权

[32]1999. 11. 13 [33]GB [31]9926810.4

[32]2000. 5. 10 [33]GB [31]0011126.0

[86] 国际申请 PCT/EP00/11197 2000. 11. 13

[87] 国际公布 WO01/36624 英 2001. 5. 25

[85] 进入国家阶段日期 2002. 5. 8

[71] 申请人 默克专利股份公司

地址 德国达姆施塔特

[72] 发明人 F·J·卡尔

G·卡特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 3 页

[54] 发明名称 高级核酸型结构

[57] 摘要

本发明涉及与其它分子实体、尤其是除核酸本身以外的实体结合的核酸型分子结构。本发明尤其涉及通过与特定分子靶结合并由此影响疾病状态的具有药学活性的核酸型分子结构。本发明也涉及具有诊断效用的核酸型分子结构。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种三维多核酸结构，该核酸结构由核酸分子或其区段通过两个或两个以上分子的特定碱基配对相互作用而相互连接的多个核酸分子链组成，其特征不在于所述结构不是共价闭合的。
2. 权利要求 1 的多核酸结构，其特征不在于所述结构由两条或两条以上核酸分子链形成。
3. 权利要求 2 的多核酸结构，其特征不在于所述结构由三条或三条以上核酸分子链形成。
- 10 4. 权利要求 1-3 中任一项的多核酸结构，其特征不在于所述结构是立方体或基本上为立方体形式。
5. 权利要求 3 的多核酸结构，其中所述立方体结构由六条核酸分子链形成，其中每条分子链的作用如同六面立方体的各个侧面。
6. 权利要求 1-5 中任一项的多核酸结构，其中每个核酸序列包含两个或两个以上的可以与其组内的其它分子退火的结构域。
- 15 7. 权利要求 6 的多核酸结构，其中每个核酸序列包含四个结构域。
8. 权利要求 1-7 中任一项的多核酸结构，其中所述结构包含由单链核酸序列段以及间插在所述单链核酸序列段中的双链结构序列段组成的核酸分子。
- 20 9. 权利要求 1-8 中任一项的多核酸结构，其中每条核酸链小于 80 个核苷酸。
10. 权利要求 9 的多核酸结构，其中每条核酸链小于 50 个核苷酸。
- 25 11. 权利要求 1-10 中任一项的多核酸结构，其中所述结构的装配为图 1 所示的(A1+B1+C1)+(A2+B2+C2)。
12. 权利要求 1-11 中任一项的多核酸结构，其中所述结构含有由可变随机序列段组成的亚单位，以便得到能够与靶分子相互作用的半

随机分子或其区段。

13. 一种三维多核酸结构，该核酸结构由核酸分子或其区段通过两个或两个以上分子的特定碱基配对相互作用而相互连接的多个核酸分子链组成，其中所述结构是共价闭合结构，并且含有由可变随机序列段组成的亚单位，以便得到能够与靶分子相互作用的半随机分子或其区段。

14. 权利要求 1-13 中任一项的多核酸结构，其中所述序列组成和序列长度是可变的。

15. 权利要求 14 的多核酸结构，其中所述可变序列组成是通过对所
10 所述序列内核苷酸进行一个或多个修饰来实现的。

16. 权利要求 1-15 中任一项的多核酸结构，其中所述结构含有多个可以与其它分子或固体基质结合或连接的核酸位点或基团。

17. 权利要求 16 的多核酸结构，其中所述其它分子是蛋白质、酶、脂蛋白、糖基化蛋白、免疫球蛋白或其片段。

18. 权利要求 16 的多核酸结构，其中所述其它分子是核酸。

19. 权利要求 16-18 中任一项的多核酸结构，其中所述分子是药
学有效分子。

20. 一种药用组合物，该组合物包含权利要求 19 的多核酸结构以及
及任选合适的载体、赋形剂、稀释剂和/或其它药学有效化合物。

21. 权利要求 1-18 中任一项的多核酸结构的用途，该用途为所述
20 多核酸结构用作诊断剂。

22. 权利要求 12 或 13 的多核酸结构的用途，该用途为所述多核
酸结构用来提供影响特异性随机化拓扑学多样性的文库，以便获得不
同的功能性和/或活性。

25

高级核酸型结构

5 本发明涉及与其它分子实体、尤其是除核酸本身以外的实体结合的核酸型分子结构。本发明尤其涉及通过与特定分子靶结合并由此影响疾病状态的具有药学活性的核酸型分子结构。本发明也涉及具有诊断效用的核酸型分子结构。

10 非常需要提供能够特异性改变特定蛋白质的活性或调节特定基因产物表达的物质的组合物。特别希望有能够与其它分子形成特异性结合相互作用的分子，尤其是在体内环境中能够表现出特异性结合的这类分子。

15 针对这些需求，已经开发出多种方法，使得能够制备从中选出这样的物质组合物的各类分子文库。一个有关的实例是见于抗体分子的非常灵敏的结合特异性，并且目前已有数种有效技术用于开发单克隆抗体及其重组衍生物。已提供了大量治疗药物和许多诊断及研究工具。所有这样的制品都是蛋白质分子，因此仅可以利用生物系统来产生。另一方面，已经生产出全合成结合分子。这些结合分子是选自相同化学类别的相似或变异分子的不同文库的分子，并且
20 一般采用筛选系统来进行选择，获得所需治疗靶的替代物或其某些方面活性的替代物。庞大的小分子化学文库的筛选一直是开发常规小分子药物的经典途径，而目前合成肽文库和合成核酸分子文库也用来筛选潜在有效的药物。

25 对于核酸文库，一般技术手段是利用已知单位长度的单链 RNA 或 DNA 分子。与靶分子结合的基础不在构型前，而是可能依赖于促进与其它分子实体结合的 DNA (或 RNA) 分子本身内的二级结构形成 (Bock L.C.等 1992 *Nature* 355: 564-566; Kubrik, M.F.等 1994 *Nucleic Acids Res.* 22: 2619-2626)。以前没有尝试过制备治疗和诊断效用、含

二级(或高级)结构构型前序列段的核酸分子, 这就是本发明的目的。

本发明涉及新型高级核酸结构以及这种结构的新用途。

5 几种类型的高级核酸结构是现有技术领域已知的。一种这样的核酸称为适合(aptamer), 而就其大小、制备和拓扑复杂度而论与本发明的分子不同。涉及从庞大的随机文库中体外进化或者选择的方法适用于开发 RNA 适体和 DNA 适体两者。能够促进酶过程例如多核苷酸激酶活性的 RNA 分子已经通过重复性选择循环进化(Lorsch J.R. 和 Szostak J.W. 1994 *Nature* 371: 31-36), 并且已经筛选出能够高度特异性抑制人磷脂酶 A₂ 的短单链 DNA 分子(Bennett C.F 等 1994 *Nucleic Acids Res.* 22: 3202-3209)。其它研究者已经独立开发出能够结合并抑制人凝血酶的某些功能的 RNA 型适体或 DNA 型适体 (Bock L.C.等 10 1992 *Nature* 355: 564-566; Kubrik, M.F.等 1994 *Nucleic Acids Res.* 22: 2619-2626)。

其它类型的高级核酸结构包括“分支 DNA”(Horn, T.和 Urdea, M.S. 15 1989, *Nucleic-Acids-Res.* 17: 6959-6967), 由此与互补核酸分子杂交的 DNA 分子的一个或多个区域(“探针”)本身可以与其它 DNA 分子杂交, 以便扩增与所述 DNA 探针结合的 DNA 的量。然而, Horn 和 Urdea (出处同上)描述的复合物是线性延伸的, 从而设计的新杂交核酸分子不与先前退火的分子杂交, 而与输入的其它新分子杂交形成分支 DNA 20 结构。实际上, 就是设计这样的复合物而形成尽可能多的分支, 以便提供更多信号核酸探针的退火点。

材料科学和纳米技术领域已经采用核酸碱基配对特性所提供的其它几何结构(Aliviatis, A.P.等 1996 *Nature* 382: 609-611; Mao C.等 25 2000 *Nature* 407: 493-496; Yurke, B.等 2000 *Nature* 406: 605-608)。已有关于生产和分析高级核酸型结构(包括多重连接成网格的四边形、立方八面体和三角形基序)的精巧技术方法的介绍(Chen J.等 1989, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 6402-6407; Zhang 等 1994, *J. Am. Chem. Soc.* 116: 1661-1669; 美国专利第 5,278051 号; 美国专利第 5,468,851 号; 美国

专利第 5,386,020 号和美国专利第 6,072,044 号)。所述几何体是采用涉及限制性酶和 DNA 连接的迭代方法装配的闭合结构。可以通过产生刚性结构的链间交叉连接或者通过交叉退火明显不同的支链获得更柔性的分支固定所述结构中的节点。现有技术不包括未闭合(即末端连接)的几何结构。现有技术不包括包含修饰核酸区的几何结构, 并且不包括与其它分子实体结合的几何核酸结构。现有技术不包括应用随机或半随机核酸结构文库。

关于高级核酸结构的新用途, 已知采用“低级”核酸本身作为治疗和诊断分子是本领域已知的。具体地说, 有许多具有潜在治疗活性和或实际治疗活性的核酸分子的实例。这些分子作为反义分子、三链体试剂或作为具有内切核糖核酸酶活性的 RNA 分子(“核酶”)起作用。在所有这些分子的外观中, 治疗核酸的模式属于通过减弱或阻断蛋白质翻译的作用机制的蛋白质表达调节剂。在所有这些情况下, 靶结合特异性是核酸与核酸的结合特异性。这些特征(翻译调节、核酸与核酸结合)与本发明模式不同。本发明的一个特殊发明特征是应用与靶分子具有结合活性的高级核酸结构。

已经测试获得用作治疗和诊断分子的其它“低级”核酸结构、尤其是适体。已鉴定出某些其它核酸分子、尤其是核酶因为具有酶活性, 而具有潜在药学价值。对于闭合的几何结构, 虽然美国专利第 5,278,051 号推测了其作为用于小分子治疗药物的增溶剂或控释载体的可能效用, 但是没有考虑其药学效用。

本发明的第一方面涉及新型高级核酸型结构、特别是开放型几何结构。此外, 本发明还涉及这类结构用作药物和/或诊断剂的用途。本发明也涉及包括修饰核苷酸的高级核酸型结构。本发明也涉及包括随机化或半随机化核苷酸区的高级核酸型结构。本发明也涉及与其它分子实体(例如蛋白质)缀合的高级核酸型结构。

本发明的结构在双链结构的工程区利用 Watson-Crick 碱基配对法则。单链核酸分子借助碱基间的互补性可与其它单链分子退火(杂

交)。尽管两种单链分子的这样的碱基退火通常产生线型双链分子，但是还可以产生其它结构，例如在一个分子具有内部碱基对互补性的情况下，可产生发夹环；而在每个单链分子的两个末端具有相互互补性的情况下，则可以产生环状结构。利用单链核酸序列策略设计，可以设计可与两个或两个以上其它分子同时退火的单个分子，如果这些其它分子进而还可以与包括已经参与退火的分子在内的其它分子退火，则可以形成核酸复合物。

双链 DNA 分子的整体空间结构和拓扑学是众所周知的。双链 DNA 分子是相当柔性的，DNA 分子双螺旋能够采取沿螺旋相邻碱基对之间旋转角不同的许多构象。天然存在的单链核酸分子例如 RNA 在溶液中采用最适构象。所述构象取决于同一分子内部碱基对相互作用，由此产生由双链茎和单链环组成的稳定结构。所述分子将采用最低能量的构象，并且已知 RNA 序列的这种最低能量结构可计算方法来预测(Jaeger J.A.等 1989 Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 7706-7710)。已经尝试生产预测 DNA 折叠的软件，并且已经获得一定成功(Nielsen D.A.等 1995 Nucleic Acids Res. 23: 2287-2291)。核酸分子和蛋白质分子之间的空间结构比较说明，这两类分子间的结构排列差异非常显著，而且支持本发明的基本构思。典型球状蛋白例如分子量为 17kDa 的肌红蛋白，其最长维度为 3nm。较大的球状蛋白例如分子量为 68 kDa 的牛血清白蛋白，其最长维度为 5nm (Cohen C., 载于 Wolstenholme G.E.W.和 O'Connor M. (编著), Ciba Foundation Symposium, London, J & A Churchill, 1966)。双链螺旋的直径本身为 2nm，碱基对数少(例如 100 个)DNA 链的伸直长度约为 30nm。因此，虽然 DNA 或任何其它核酸分子的密度比典型蛋白质低得多，但是 DNA 分子的拓扑学、甚至其最常见天然结构形式双螺旋时，DNA 分子可以容易地覆盖几乎任何蛋白质分子暴露表面的大部分。尤其是如果常见单丝 DNA 的拓扑学也如此改变时，所述 DNA 可以以更类似于密度高得多的蛋白质分子的方式占据大部分空间区域。已知装

本发明高级核酸结构的核酸亚单位可以是天然同型或异源核酸亚单位，例如含有 RNA 序列段的 DNA。已知 DNA 螺旋内的 RNA 序列段改变在溶液中的螺旋形成(Wang, A.等, 1982 Nature 299: 601-04)。限定核酸序列段存在构象多样性在改变与靶蛋白的结合特异性方面可能具有重要意义，这种现象是本领域已知的，凝血酶适体结合特异性依赖于高级三级结构的短段(Griffin, L.等 1993 Gene 137:25-31)。另外，非天然磷酸主链类似物可用来增强稳定性，并且还可改变与所需靶蛋白的结合特异性。Latham 等(Latham, J.A.等 1994 Nucleic-Acids-Res. 22: 2817-22)提供了一个实例，藉此在随机寡核苷酸库中用修饰核苷酸 5-(1-戊炔基)-2'-脱氧尿苷代替胸苷。本发明包括由单链核酸序列段以及间插在所述单链核酸序列段中的双链结构序列段组成的分子，以及合成含有不同化学亚结构但采用常规碱基配对法则连接的其它嵌合分子。这类结构也可以组合含有 DNA 分子和 RNA 分子。

本发明的更高级分子结构可按照本领域的任何方案由单个或多个核酸分子装配而成，并且可以包括来自非常大的分子例如重组质粒的各种合成核酸或片段。在单一线型 DNA 分子的自折叠(自动装配)或易化折叠后可以构建所述结构。易化折叠可以通过蛋白质实体(酶类，例如连接酶、拓扑异构酶、内切核酸酶、聚合酶)或通过与非蛋白物理化学条件(pH、温度、离子条件)相互作用来介导。另一方面，或者综合以上所述方法，可以通过与结合在固体基质上的分子相互作用装配所述分子，或者在整个或部分装配过程中折叠成更高级结构的 DNA 在空间上被限定或锚定。

本发明的第二方面是提供含有各式各样的半随机分子的核酸分子文库，其中某些分子可能具有能够以特定方式与靶分子相互作用的所需拓扑学。在本发明的这一方面包括核酸分子文库，所述核酸分子的特征为促进装配共同结构亚单位的引导骨架。在每个亚单位内掺入随机序列段，使得就选择性结合测定中的活性而论，文库多

配由多条互相连接链(每条链为非常短(<50)的核苷酸序列段)组成的核酸结构,可以容易地获得总体维度10-500 nm的结构。本发明的一个特别目的是提供这样的核酸分子制剂。

5 本发明的结构基础是制备由于两个或两个以上核酸分子相互作用或者由于各个核酸分子内不同限定区段相互作用形成的DNA或RNA二级结构分子。在本发明中,DNA或RNA的信息内容不是用作表达治疗蛋白的编码实体,也不是用作核酸代谢和基因表达的阻断实体(反义),而是用以指导装配特定三维形状分子结构。

10 本发明包括通过其组内分子中特定碱基配对形成三维(非平面)分子结构的核酸分子、尤其是合成的DNA分子。准确地说,设计DNA分子,使其含有1个或多个可以与其组内的其它分子退火、最终形成复合三维核酸结构的序列区(“结构域”)。在该方案中,近似立方体结构可以通过6个合成DNA分子自我退火而形成,每个合成DNA分子含有4个互补(complimentarity)结构域,从而每个分子与4个其它分子相互作用,并且每个分子有效发挥作用,如同六面立方体的各个侧面。所述结构是开放的(未共价闭合)、柔性的,特别还体现在
15 适合通过添加其它官能团或结构基团来进行修饰。

在本发明的一种高级核酸型结构中,提供了每个核酸分子包含2个或2个以上的自我互补序列结构域的多个核酸分子,使得所述核酸分子可以自我折叠以及通过特定碱基配对过程相互作用形成特殊的三维分子结构。对于某些应用,已知未修饰DNA分子的化学不稳定性对于用作诸如治疗药物的用途已是一个相当大的问题。目前已有数种方法用以保护DNA分子免受酶攻击降解。这些方法一般包括
20 应用修饰磷酸二酯主链(磷酸甲酯、硫代磷酸酯、肽核酸)、或采用亚磷酰胺、硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯键合在5'端或3'端加帽。本发明的一个特别目的是在所述高级核酸型结构中采用修饰核酸或非天然核酸。此外,一个特别需要的特征是在结合特异性方面通过应用
25 混合化学和替代非天然核酸主链达到增加柔性。

多样性和潜在功能效用最大化。在本发明的第二方面中，采用 n 个合成 DNA 分子(亚单位)独立群体(组)混合形成的文库的实施方案。在该方面，合成核酸亚单位的群体数大，而群体数取决于所述亚单位可变区段内存在的随机化程度。在其它实施方案中通过改变所述可变结构域的位置、改变可变结构域数量(间插固定序列段)和改变任何给定可变结构域长度进一步构建亚单位多样性。最好在一个退火循环中混合 n 个独立的亚单位群体，以产生具有多个核酸结构和各个序列多样性的文库。显然其它实施方案可以包括多个退火循环和整数 n 的倍数。在该方案中，所述文库的一个特别特征是通过合理设计和布置互补序列段或引导序列段能够调节亚单位间相互作用复杂程度。

本发明的第三方面是高级核酸型结构的新用途，尤其是药学和诊断用途。在该方面，这些结构能够与特定靶分子结合，通常是与蛋白或蛋白质性靶分子结合。在优选的实施方案包括单一蛋白靶的情况下，设想了进一步的实施方案，其中所述靶是由多个蛋白质亚基组成的蛋白质复合物(例如细胞表面受体)，而该蛋白复合物作为一个整体被本发明第一方面的分子结合。第三方面的其它实施方案包括结合通过结合本发明第一方面分子的能力鉴定的细胞靶或各种细胞。进一步的实施方案包括与细胞、尤其是细胞表面的靶或靶复合物(包括非蛋白组分例如糖类或脂质组分)的结合。蛋白质、糖类和脂质实体和或其复合物可以是疾病特异性实体或组织或细胞正常成分。所述靶或靶复合物包括病毒颗粒或病毒衍生组分(例如衣壳蛋白)或病毒壳体中的宿主性组分。所述靶或靶复合物在其组成中可以包括金属离子或其它无机化学物质或化学基团，并且可以是天然存在的或通过用外源因子处理而引入的。靶受体可以包括例如 IL-2 受体或其它细胞因子受体例如 IL-3 受体、M-CSF 受体、GM-CSF 受体和许多其它受体。同样，诸如通过阻断 IgE 结合 IgE 受体，而同时阻断交联活化过程的 IgE 表面分子应是非常需要的表面分子。包括簇分化

(CD 抗原)系列成员在内的其它表面分子是所需要的调节疾病、尤其是自身免疫成分性疾病的靶。

本发明的设计使得在治疗分子领域具有特别广泛的应用。希望本发明的分子结构激动或拮抗特定受体或酶过程以产生治疗效应，
5 同时没有常规蛋白质药物的缺点例如免疫原性。因此，本发明延伸涉及用于治疗或预防疾病或病症的方法，所述方法包括给予受治疗者有效量的所述分子结构。本发明还延伸涉及这类结构在体内和体外诊断方面的应用。

本发明的第四方面包含在所述结构内含修饰核苷酸的高级核酸型结构。特别需要通过所述文库亚单位的衍生化和或通过在其合成过程包括修饰碱基(硫羟化碱基、生物素酰化碱基、 ϵ -氨基衍生化碱基等)而赋予多样性，这可独立于上述第二方面赋予的多样性或与所述多样性同时存在。因此，获得序列组成水平和序列长度水平上都具有多样性的高度多样性文库。这类参数可以因为不同文库和用于
10 不同靶而固定于限定范围。高级核酸结构除了提供上述稳定性或结合调节作用的特征外，还可含有能够赋予所述结构特定需要特性的修饰核苷酸。这种额外所需修饰可以在本发明的第一或第二方面中实施，包括应用疏水序列段、包含补骨脂素或吡啶基团、连接半抗原基团例如生物素或与不同的带电侧链例如氨基或羧基连接的基团，以促进与特定靶分子的结合。在一个进一步的优选实施方案中，
15 这类基团可以用作其它分子的连接点，所述其它分子例如其它核酸分子或诸如抗体或酶的蛋白质。

本发明分子的一个所需特征是在体外和体内都具有高度稳定性。所述核酸结构的化学组成不仅是高度有影响力的，而且所述分子
20 的物理大小需要控制到在溶液中的剪切损害最小化，而在体内功能效用最大化。为此，本发明优选为普通的小($< 80\text{mer}$)亚单位构建成的多链核酸结构。另一方面，可能需要采用由较大亚单位($> 80\text{mer}$)组成的结构，而同样属于本发明范畴。

本发明的第五方面包括与其它分子实体连接的高级核酸型结构。具体地说，这个方面包括在一个或多个特定定位点与另一分子实体上的一个或多个特定定位点连接的核酸，而本发明第四方面的修饰核苷酸促进与所述核酸的特异性连接。这个方面特别包括与药

5 学上或诊断学上相关分子实体连接的高级核酸型结构，从而所述核酸与疾病相关性特定分子靶结合，然后所述连接分子实体用来抵抗或检测所述疾病。

药上相关的实体包括细胞因子、抗体的 Fc 部分、其它抗体相关实体、毒素、酶、药物和前体药物、受体激动剂或拮抗剂、受体

10 分子本身(尤其是配体结合结构域)、放射性同位素、药学活性核酸、药物转运载体例如脂质体、活微生物或减毒微生物、光活性部分以及其它诱导疫苗效应的分子实体。诊断学上的相关实体特别包括放射性同位素、光活性部分例如产生化学发光信号的部分、荧光染料、酶以及信号转运载体例如微珠。

15 概括地讲，本发明包括下列目的：

- 一种三维多核酸结构，所述结构由核酸分子或其区段通过两个或两个以上分子的特定碱基配对相互作用的多个相互连接链组成，其特征在于所述结构不是共价闭合的。

- 一种相应的多核酸结构，其特征在于所述结构由两条或两条

20 以上核酸分子链形成。

- 一种相应的多核酸结构，其特征在于所述结构由三条或三条以上核酸分子链形成。

- 一种相应的多核酸结构，其特征在于所述结构是立方体形式或基本上为立方体形式。

- 一种相应的多核酸结构，其中所述立方体结构由 6 条核酸分子链形成，其中每条分子链的作用如同六面立方体的各个侧面。

25

- 一种相应的多核酸结构，其中每个核酸序列包含两个或两个以上的可以与其组内的其它分子退火的结构域。

- 一种相应的多核酸结构，其中每个核酸序列包含四个结构域。
 - 一种相应的多核酸结构，其中所述结构包括由单链核酸序列段以及间插在所述单链核酸序列段中的双链结构序列段组成的核酸分子。
- 5
- 一种相应的按照权利要求 1-8 中任一项的多核酸结构，其中每条核酸链小于 80 个核苷酸、最好是小于 50 个核苷酸。
 - 一种相应的多核酸结构，其中所述结构具有图 1 所示的装配 $(A1+B1+C1)+(A2+B2+C2)$ 。
 - 一种如上定义的多核酸结构，其中所述结构含有由可变随机化序列段组成的亚单位，以便得到能够与靶分子相互作用的半随机分子或其区段。
- 10
- 一种三维多核酸结构，所述结构含有核酸分子或其区段通过两个或两个以上分子的特定碱基配对相互作用的多个相互连接链组成的亚单位，其中所述结构是共价闭合的，并且含有由可变随机化序列段组成的亚单位，以便得到能够与靶分子相互作用的半随机分子或其区段。
- 15
- 一种如上定义的多核酸结构，其中所述序列组成和序列长度是可变的。
 - 一种相应的多核酸结构，其中所述可变序列组成通过所述序列内核苷酸的一个或多个修饰来获得。
- 20
- 一种如上定义的多核酸结构，其中所述结构含有多个可以与其它分子或固体基质结合或连接的核酸位点或基团。
 - 一种相应的多核酸结构，其中所述其它分子是蛋白质、酶、脂蛋白、糖基化蛋白、免疫球蛋白或其片段。
- 25
- 一种相应的多核酸结构，其中所述其它分子是核酸。
 - 一种相应的多核酸结构，其中所述分子是药学上有效的分子。
 - 一种药用组合物，所述组合物包含一种如上定义的、本权利要求书中的多核酸结构以及任选合适的载体、赋形剂和稀释剂和/或

其它药学上有效的化合物。

- 一种相应的多核酸结构用作诊断剂的用途。
- 一种如上定义的多核酸结构的用途，用来提供影响特定随机化拓扑学多样性的文库，以便获得不同的功能和/或活性。

5

附图简述

图 1

10 图示分别由六条称为 A_1 、 A_2 、 B_1 、 B_2 、 C_1 和 C_2 的单链分子分步装配为开放的立方形核酸结构。通过核酸分子之间的常规反向平行碱基配对进行装配。显示了分子 B_1 和 C_1 以及 B_2 和 C_2 之间形成的二聚中间体。显示了分子 A_1 、 B_1 和 C_1 以及 A_2 、 B_2 和 C_2 之间形成的三聚体结构。立方形结构的装配通过所述两个三聚体部分连接完成，表示为分子 $(A_1+B_1+C_1)+(A_2+B_2+C_2)$ 。

15

图 2

寡核苷酸亚单位 IL2R-1 和 IL2R-2 的序列，包含与 IL-2 受体具有结合活性的 DNA 结构。

图 3

20 寡核苷酸亚单位 TB-R1 和 TB-R2 的序列，包含与人凝血酶具有结合活性的 DNA 结构。

实施例

25 通过以下实施例说明本发明，但不应认为实施例是在任何范围内限制本发明。

实施例 1

采用选自 DNA 结构文库的 DNA 结构抑制 IL2 依赖性细胞系的方法。

合成两个合成 DNA 分子文库，每个文库包含一个随机化序列区。

文库 A 包含以下结构分子:

5'AGTCCCAAGCTGGCT(N)₁₃CTCCATCGTGAAGTCAGCCAG
CTTTGGACT

文库 B 包含以下结构分子:

5'GACTTCACGATGGAGGTCAGAATGTGAATA(N)₁₀TATTCA
CATTCTGAC

这些序列设计用以促进交叉退火, 并且代表通过将按照本发明方案的不同的亚单位混合和交叉退火而形成的结构文库的亚单位。

合成具有硫代磷酸酯键的寡核苷酸(亚单位)文库, 以在存在血清因子时达到最大稳定性, 并通过 HPLC 进行纯化。纯化寡核苷酸得自 GenoSys Biotechnologies (Cambridge, 英国)。采用单一循环的交叉退火装配 DNA 结构文库。将亚单位文库 A 和 B 进行变性、混合以及在 50mM Tris pH 7.4、100mM NaCl、5mM EDTA 的溶液中于温度为 37°C 时退火。以等摩尔浓度(1 μ M)进行亚单位文库 A 和 B 的混合。在其它实验中, 采用不同的摩尔比进行混合。通过凝胶电泳确证所述亚单位的装配。

筛选 DNA 结构文库中能够与 IL-2 受体(IL2R)胞外域结合的结构。这种筛选采用按照已公布的方法(Meidel, M.C.等 1988 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 372-379; Meidel, M.C.等 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 21097-21105)制备的可溶性重组 IL2R 进行。采用供应商 (Bangs Labs, Fishers, IN, USA)建议的方案, 使重组 IL2R 与表面活化磁珠共价结合, IL2R-磁珠用作亲和性表面, 以从所述 DNA 结构文库选择结合结构。将 IL2R-磁珠在包括存在离液盐的各种实验条件下在控制反应中与所述文库进行反应。所述文库(DNA)浓度在如上所述的退火溶液中约为 100nmol。用 75mM Tris.HCl、200mM NaCl、0.5% 正辛基葡糖苷 pH8.0 的溶液进行彻底洗涤循环后, 通过聚合酶链式反应(PCR)直接从所述磁珠回收结合分子。采用标准试剂系统和条件, 使用引物 PRA1 (5'-AGTCCCAAGCTGGCT)进行所述 PCR 以回收文库 A 组分。在独立反应中, 引物 PRB1 (5'GACTTCACGATGGAG)

和 PRB2 (5'GTCAGAATGTGAATA)用来回收文库 B 组分。采用标准试剂系统和方法, 对所述 PCR 产物进行克隆和测序。

回收了许多序列, 并鉴定为源自亚单位文库 A 和亚单位文库 B。采用如前所述的硫代磷酸酯化学合成其中一对序列。如先前所述纯化并装配寡核苷酸 IL2-R1 和 IL2-R2 (图 2 所示序列), 然后将其用于 IL-2 拮抗作用的细胞测定。

TALL-104 (ATCC# CRL-11386)是一种人 T 细胞白血病细胞系。所述细胞在悬浮培养中生长, 其最适生长需要 IL-2。无 IL-2 时所述细胞可以生长一段时间, 但其生长明显减慢。让细胞在含有 50-100u/ml 重组人 IL-2 (Life Technologies, Paisley, 英国)并补充 10% (v/v)加热灭活的胎牛血清的 Iscoves 改良 Dulbeccos 培养基(Life Technologies, Paisley, 英国)中生长。在 8-10% CO₂ 的环境下培养细胞。以含 IL-2 的培养基制备退火 IL2-R1/IL2-R2 DNA 制备物和含有相同外形长度的随机序列的对照 DNA 样品的稀释液。运用没有 IL-2 的培养基制备平行稀释系列。稀释系列浓度范围为 50 μ M DNA 至 390nM DNA。在 96 孔微量滴定板中, 采用前一天平板接种的不完全融合 TALL-104 细胞进行测定。通过离心收集细胞, 用预温热(37 $^{\circ}$ C)磷酸缓冲盐水洗涤, 然后加入含 DNA 的培养基处理 48 小时。处理以四个复份进行。在 48 小时结束时, 以比色测定, 采用可商业性获得的四氮唑化合物并按照供应商(Promega, Southampton, 英国)提供的说明书评价增殖。微量滴定板在 540nm 处读数。

结果表明, 在各个合成寡核苷酸 IL2-R1 和 IL2-R2 无活性的条件下, 所述退火 DNA 制剂抑制 TALL-104 细胞系的生长。

25 实施例 2

选择与人凝血酶结合的 DNA 结构的方法。

用实施例 1 中描述的文库选择能够与人凝血酶结合的 DNA 结构。按照实施例 1, 使用与表面活化的磁珠结合的人凝血酶制剂(Sigma,

Poole, 英国)筛选所述文库。按照实施例 1 使凝血酶-磁珠与所述 DNA 结构文库反应, 只是结合后的洗涤在 20mM Tris 乙酸、pH7.4、140mM NaCl、5mM KCl、1mM MgCl₂ 的溶液中进行。采用如实施例 1 所用的反应和引物组, 通过 PCR, 直接从所述磁珠中回收结合分子。采用标准试剂系统和方法, 对所述 PCR 产物进行克隆和测序。

回收了许多序列, 并鉴定为源自亚单位文库 A 和亚单位文库 B。采用如前所述的硫代磷酸酯化学合成其中一对序列。纯化并装配寡核苷酸 TB-R1 和 TB-R2 (图 3 所示序列)。将 TB-R1/TB-R2 复合物用于凝血酶抑制测定。采用纤维计(fibrometer)于 37°C 以及从健康供体新鲜制备的成人血浆测定凝固时间。采用凝固时间对凝血酶浓度作图绘制的凝血酶标准曲线, 测定凝血酶抑制程度。在所述测定中, 对三个对数的 DNA 结构测定凝固时间。

结果表明, 在存在所述 TB-R1/TB-R2 DNA 复合物时, 凝血活性受抑制。

15

实施例 3

选择与重组可溶性 CD4 结合的 DNA 结构的方法。

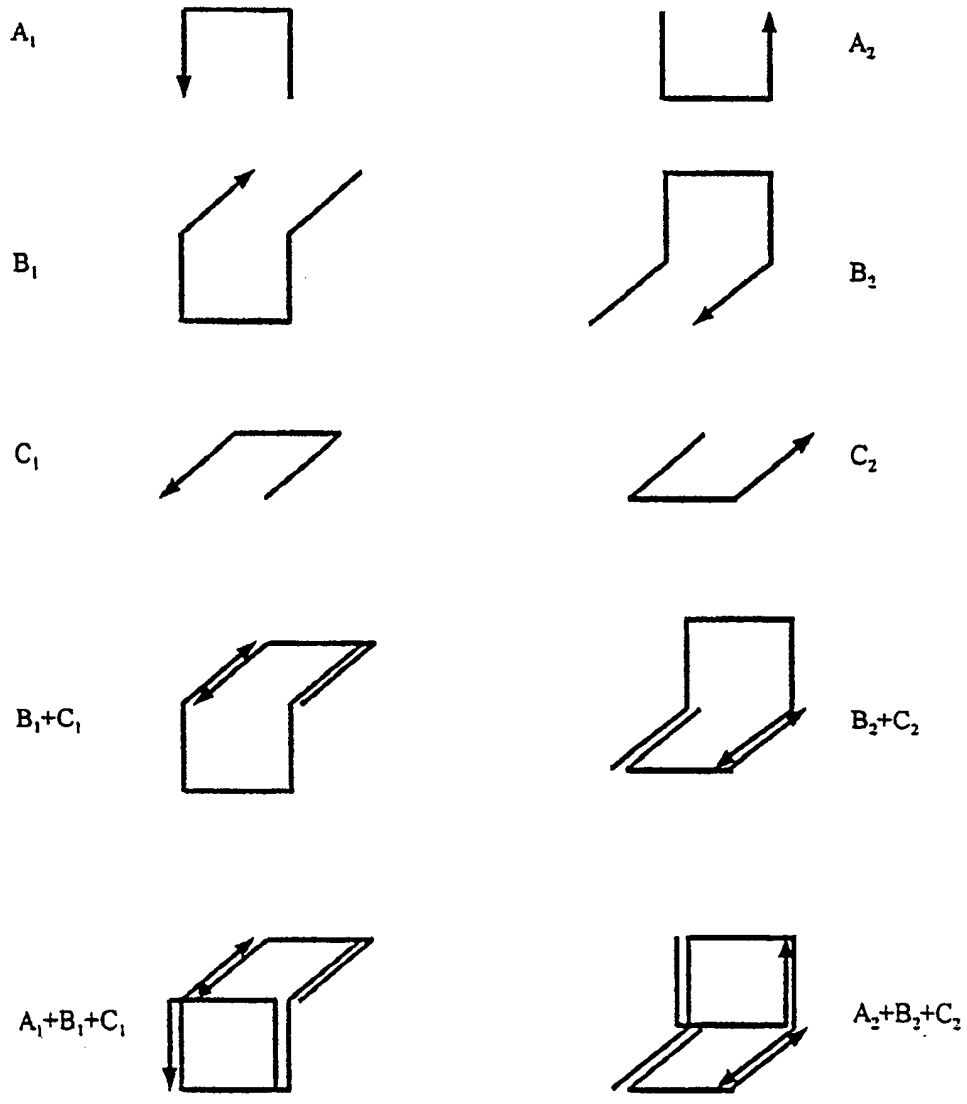
用实施例 1 中描述的文库选择能够与重组可溶性 CD4 (rsCD4) 制剂结合的 DNA 结构。如先前所述, 采用固定在活化磁珠上的 CD4 制剂(BioDesign, Saco, ME, 美国)筛选所述 DNA 结构文库。文库筛选、洗涤和 PCR 选择均如实施例 2 所述。合成并装配源自 A 亚单位文库和 B 亚单位文库的单一寡核苷酸对。在酶联免疫吸附测定(ELISA)中, 用所述结构抑制抗 CD4 单克隆 RPAT4 (Serotech, Abingdon, 英国)的结合。

25

在包被缓冲液(0.05M 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 pH9.0)中, 用 0.2mg/ml rsCD4 溶液将 96 孔 ELISA 板于 4°C 包被过夜。用 TBS-T (tris 缓冲盐水 pH8.0 .05% (v/v) Tween 20)彻底洗涤各板, 将待测 DNA 结构和对照 DNA 结构在 TBS 中从起始浓度为 100 μ M 在所述板中进行

稀释(1:2)。将各板于 37℃保温 40 分钟后,用 TBS 洗涤。将抗体 RPAT4 在 PBS 中的 100ng/ml 制剂加入所述板中,于 37℃保温 40 分钟。洗涤板后,采用碱性磷酸酶标记的绵羊抗小鼠制剂(Sigma, Poole, 英国)和显色底物 Sigma Fast OPD (Sigma, Poole, 英国),检测结合的 RPAT4。在有些测定中,将所述 DNA 与 RPAT4 单克隆抗体共孵育。运用板读出器读出显色强度,并比较待测孔和对照孔的信号。结果表明,在存在所述 DNA 结构时,显著抑制 RPAT4 与 rsCD4 的结合。

图 1



$$(A_1+B_1+C_1) + (A_2+B_2+C_2)$$

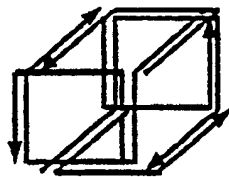


图 2

IL2R-1

5'AGTCCCAAGCTGGCTGATATTGCGTTAGCTCCATCGTGAAGTCAGCCAGCTTTGG
ACT

IL2R-2

5'GACTTCACGATGGAGGTCAGAATGTGAATAGTCGAGCTAGTATTCACATTCTGAC

图 3

TB-R1

5'AGTCCCAAGCTGGCTGGATCAAGGTCTACTCCATCGTGAAGTCAGCCAGC
TTTGGACT

TB-R2

5'GACTTCACGATGGAGGTCAGAATGTGAATAGGAGAAGTAGTATTCACATT
CTGAC