

1 5 SEP 2004

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12P 19/34

[12] 发明专利说明书

C07H 21/02 C07H 21/04

A61K 31/7115 A61P 9/10

A61P 17/06 A61P 35/00



[21] ZL 专利号 00810979.6

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1164760C

[22] 申请日 2000.1.28 [21] 申请号 00810979.6

[30] 优先权

[32] 1999. 7. 29 [33] US [31] 09/364,902

[86] 国际申请 PCT/US2000/002167 2000.1.28

[87] 国际公布 WO2001/009390 英 2001.2.8

[85] 进入国家阶段日期 2002.1.29

[71] 专利权人 吉利德科学公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 布赖恩·希克 史蒂芬·沃伦

戴维·帕马 拉里·戈尔德

审查员 孙俊荣

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 10 页 说明书 58 页 附图 8 页

[54] 发明名称 腱生蛋白 - C 核酸配体

[57] 摘要

本发明描述了鉴别和分离腱生蛋白 - C (tenascin - C) 核酸配体的方法。 本发明包括通过 SELEX 方法鉴别的腱生蛋白 - C 的 RNA 配体。 进一步包括检测表达腱生蛋白 - C 的生物组织是否存在疾病状况的方法。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1、一种纯化的且非天然存在的腱生蛋白-C 的核酸配体，其中所述的配体选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65。

2、权利要求 1 的核酸配体，其中所述的配体基本上与选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65 的配体同源并基本上具有与其相同的结合腱生蛋白-C 的能力。

3、权利要求 1 的核酸配体，其中所述的配体基本上具有与选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65 的配体相同的结构并基本上具有与其相同的结合腱生蛋白-C 的能力。

4、权利要求 1 的纯化的且非天然存在的腱生蛋白-C 的核酸配体，其中所述的配体是

5'-B-G667667CG-(CH₂CH₂O)₆-CGUCGCCGU77U667U6UUUU6CUCCCU65

其中：

所有的嘧啶是 2' F；

6=2' OMe G；

7=2' OMe A；

5=3'-3' dT；且

B=接头。

5、权利要求 4 的纯化的且非天然存在的腱生蛋白-C 的核酸配体，其中 B 选自己胺和 (CH₂CH₂O)₆。

6、权利要求 5 的纯化的且非天然存在的腱生蛋白-C 的核酸配体，其中 B 是己胺。

7、用于体内诊断剂的复合物，其包含一种腱生蛋白-C 的核酸配体和一种标记物，其中所述的腱生蛋白-C 的核酸配体选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65。

8、权利要求 7 的复合物，其中所述的腱生蛋白-C 的配体基本

上与选自SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:65的配体同源并基本上具有与其相同的结合腱生蛋白-C的能力。

9、权利要求7的复合物，其中所述的腱生蛋白-C的配体基本上具有与选自SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:65的配体相同的结构并基本上具有与其相同的结合腱生蛋白-C的能力。

10、权利要求7至9中任一项的复合物，其中所述的标记物选自放射性核素、荧光团、磁性化合物和生物素。

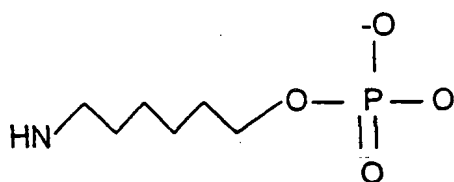
11、权利要求10的复合物，其中所述的放射性核素选自锝-99m (Tc-99m)、Re-188、Cu-64、Cu-67、F-18、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{32}P 和 ^{186}Re 。

12、权利要求11的复合物，其中所述的标记物是锝-99m。

13、权利要求12的复合物，其中所述的腱生蛋白-C的核酸配体包含一种接头。

14、权利要求13的复合物，其中所述的接头是 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ 。

15、权利要求13的复合物，其中所述的接头的结构为



16、权利要求13的复合物，其中所述的核酸配体是

5'-B-G667667CG-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)₆-CGUCGCCGU77U667U6UUUU6CUCCCU65

其中：

所有的嘧啶是 2' F；

6=2' OMe G；

7=2' OMe A；

5=3'-3' dT；且

B=接头。

22、权利要求 21 的方法，其中所述的腱生蛋白-C 的配体基本上与选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65 的配体同源并基本上具有与其相同的结合腱生蛋白-C 的能力。

23、权利要求 21 的方法，其中所述的腱生蛋白-C 的配体基本上具有与选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65 的配体相同的结构并基本上具有与其相同的结合腱生蛋白-C 的能力。

24、权利要求 21 至 23 中任一项的方法，其中所述的标记物选自放射性核素、荧光团、磁性化合物和生物素。

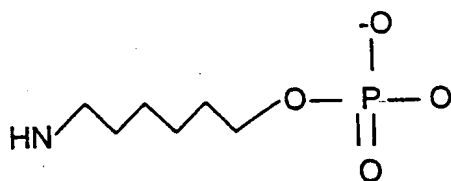
25、权利要求 24 的方法，其中所述的放射性核素选自锝-99m (Tc-99m)、Re-188、Cu-64、Cu-67、F-18、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{32}P 和 ^{186}Re 。

26、权利要求 25 的方法，其中所述的标记物是锝-99m。

27、权利要求 26 的方法，其中所述的腱生蛋白-C 的核酸配体包含一种接头。

28、权利要求 27 的方法，其中所述的接头是 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ 。

29、权利要求 27 的方法，其中所述的接头的结构为



30、权利要求 27 的方法，其中所述的腱生蛋白-C 的核酸配体是

5'-B-G667667CG-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)₆-CGUCGCCGU77U667U6UUUU6CUCCCU65

其中：

所有的嘧啶是 2' F；

6=2' OMe G；

7=2' OMe A；

35、一种标记物-核酸复合物在生产用于在可能患有表达髓生蛋白-C 的疾病的生物组织中检测此疾病存在的诊断剂中的用途，检测步骤包括：

- a) 将可用作体内诊断剂的一种标记物与一种髓生蛋白-C 的核酸配体相附着以产生所述的复合物，其中所述的髓生蛋白-C 的核酸配体选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65；
- b) 将可能患有所述的疾病组织暴露于所述的复合物；并
- c) 在所述的组织中检测所述复合物的存在，由此鉴别表达髓生蛋白-C 的疾病。

36、权利要求 35 的用途，其中所述的髓生蛋白-C 的配体基本上与选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65 的配体同源并基本上具有与其相同的结合髓生蛋白-C 的能力。

37、权利要求 35 的用途，其中所述的髓生蛋白-C 的配体基本上具有与选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65 的配体相同的结构并基本上具有与其相同的结合髓生蛋白-C 的能力。

38、权利要求 35 至 37 中任一项的用途，其中所述的标记物选自放射性核素、荧光团、磁性化合物和生物素。

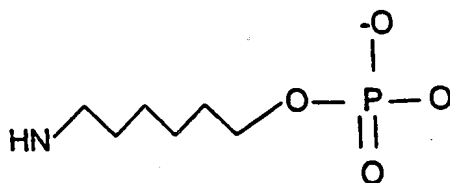
39、权利要求 38 的用途，其中所述的放射性核素选自锝-99m (Tc-99m)、Re-188、Cu-64、Cu-67、F-18、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{32}P 和 ^{186}Re 。

40、权利要求 39 的用途，其中所述的标记物是锝-99m。

41、权利要求 40 的用途，其中所述的髓生蛋白-C 的核酸配体包含一种接头。

42、权利要求 41 的用途，其中所述的接头是 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ 。

43、权利要求 41 的用途，其中所述的接头的结构为



44、权利要求 41 的用途，其中所述的腱生蛋白-C 的核酸配体是



其中：

所有的嘧啶是 2' F；

6=2' OMe G；

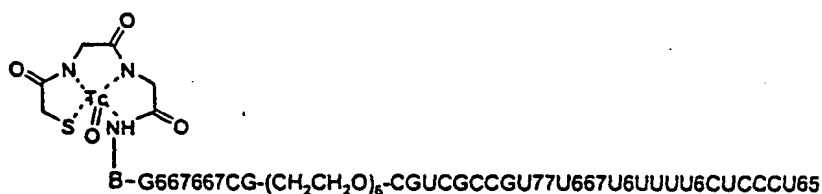
7=2' OMe A；

5=3'-3' dT；且

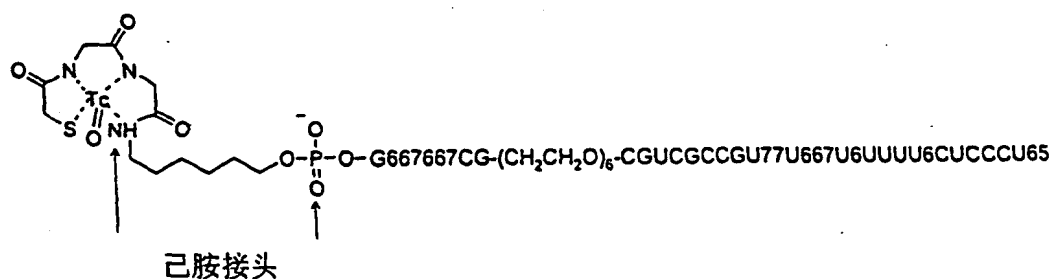
B=接头。

45、权利要求 44 的用途，其中所述的锝-99m 与一种螯合剂相结合。

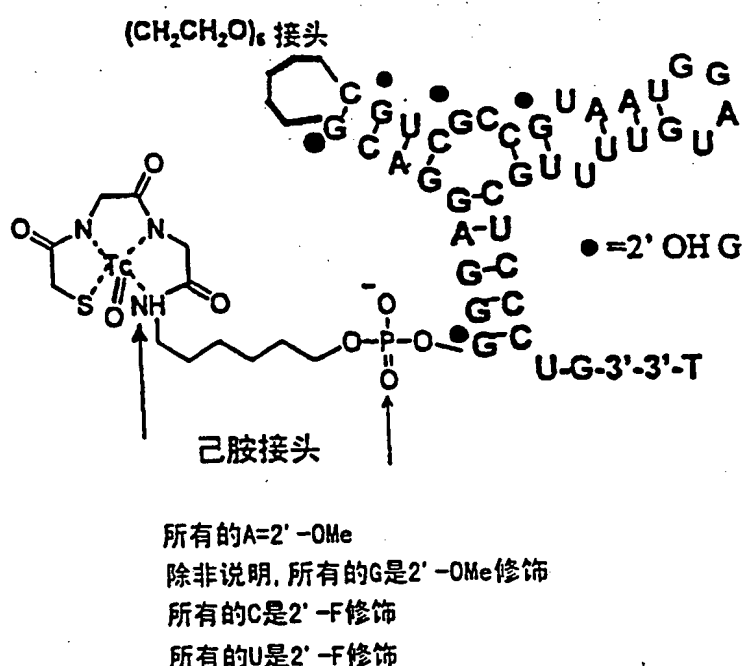
46、权利要求 45 的用途，其中所述的复合物是



47、权利要求 46 的用途，其中所述的复合物是



48、权利要求 47 的用途，其中所述的复合物是



49、权利要求 35 的用途, 进一步包含将一种治疗剂或诊断剂与所述的复合物相附着。

50、权利要求 35 的用途，其中所述的疾病选自癌症、牛皮癣和动脉粥样硬化。

51、权利要求 50 的用途，其中所述的疾病是癌症。

52、一种腱生蛋白-C 的核酸配体在生产一种用于将一种治疗剂运送至表达腱生蛋白-C 的疾病处的复合物中的用途，输送方法包括：

(a) 将所述的腱生蛋白-C 的核酸配体与一种治疗剂共价连接以产生所述的复合物，其中所述的腱生蛋白-C 的核酸配体选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65；并

(b) 将所述的复合物施用给患者。

53、权利要求 52 的用途，其中所述的腱生蛋白-C 的配体基本上与选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65 的配体同源并基本上具有与其相同的结合腱生蛋白-C 的能力。

54、权利要求 52 的用途，其中所述的髓生蛋白-C 的配体基本

上具有与选自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:65 的配体相同的结构并基本上具有与其相同的结合腱生蛋白-C 的能力。

55、权利要求 52 至 54 中任一项的用途，其中所述的标记物选自放射性核素、荧光团、磁性化合物和生物素。

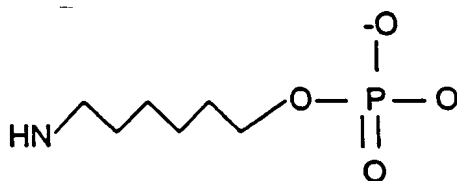
56、权利要求 55 的用途，其中所述的放射性核素选自锝-99m (Tc-99m)、Re-188、Cu-64、Cu-67、F-18、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{32}P 和 ^{186}Re 。

57、权利要求 56 的用途，其中所述的标记物是锝-99m。

58、权利要求 57 的用途，其中所述的腱生蛋白-C 的核酸配体包含一种接头。

59、权利要求 58 的用途，其中所述的接头是 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ 。

60、权利要求 58 的用途，其中所述的接头的结构为



61、权利要求 58 的用途，其中所述的腱生蛋白-C 的核酸配体是

5'-B-G667667CG- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ -CGUCGCCGU77U667U6UUUU6CUCCCU65

其中：

所有的嘧啶是 2' F；

6=2' OMe G；

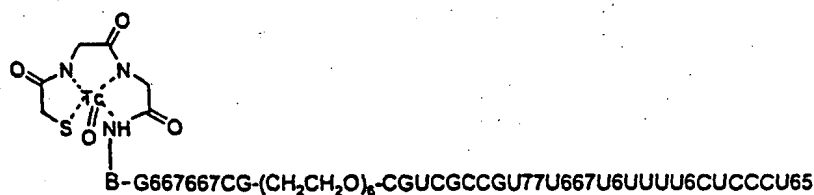
7=2' OMe A；

5=3'-3' dT；且

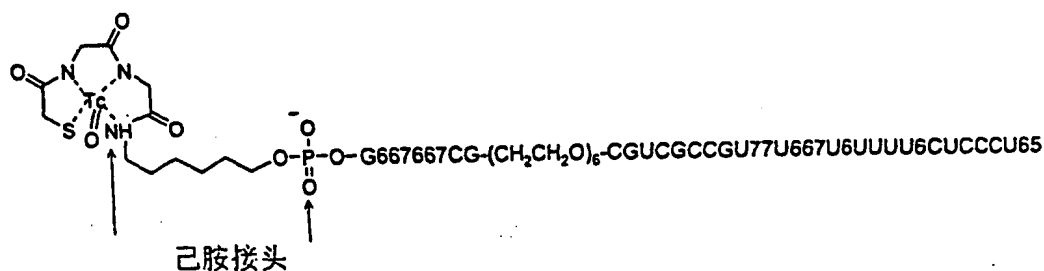
B=接头。

62、权利要求 61 的用途，其中所述的锝-99m 与一种螯合剂相结合。

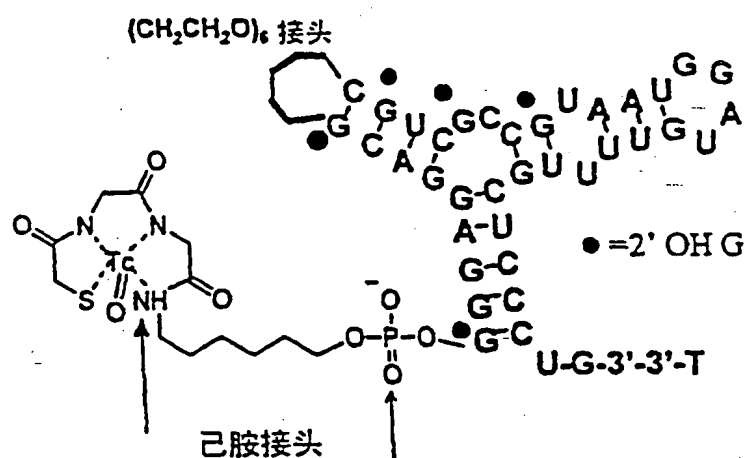
63、权利要求 62 的用途，其中所述的复合物是



64、权利要求 63 的用途，其中所述的复合物是



65、权利要求 64 的用途，其中所述的复合物是



所有的A=2' -OMe

除非说明, 所有的G是2' -OMe修饰

所有的C是2' -F修饰

所有的U是2' -F修饰

66、权利要求 52 的用途，其中所述的疾病选自癌症、牛皮癣和动脉粥样硬化。

67、权利要求 66 的用途，其中所述的疾病是癌症。

腱生蛋白-C 核酸配体

发明领域

本发明描述的是腱生蛋白-C (tenascin-C) 的高亲和力核酸配体。本文还描述了鉴别和制备腱生蛋白-C 高亲和力配体的方法。本文使用的鉴别这种核酸配体的方法称作 SELEX, 即配体指数富集系统生成法 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment)。本发明进一步公开了腱生蛋白-C 的高亲和力核酸配体。另外公开了腱生蛋白-C 的 RNA 配体。本发明还包括含嘌呤和嘧啶 2' 位置经化学修饰的核苷酸衍生物的寡核苷酸。另外公开了含 2' F 和 2' OMe 修饰的腱生蛋白-C RNA 配体。本发明的寡核苷酸是有用的诊断和/或治疗剂。

发明背景

腱生蛋白-C 1.1-1.5 百万道尔顿, 是主要存在于胞外基质中的六面体糖蛋白。腱生蛋白-C 在胚胎发生、伤口愈合和肿瘤形成过程中表达, 说明这种蛋白在组织重塑中发挥功能 (Erickson 和 Bourdon (1989) 细胞生物学综述年报 5: 71-92)。肿瘤形成过程也涉及组织重塑, 和腱生蛋白-C 在包括肺癌、乳腺癌、前列腺癌、和结肠癌、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、和肉瘤中的过表达 (Soini 等 (1993) 美国临床病理学杂志 100 (2): 145-50; Koukoulis 等 (1991) 人类病理学 22 (7): 636-43; Borsi 等 (1992) 国际癌症杂志 52 (5): 688-92; koukoulis 等 (1993) 显微细胞病理学杂志 25 (2): 285-95; Ibrahim 等 (1993) 人类病理学 24 (9): 982-9; Riedl 等 (1998) 结肠直肠疾病 41 (1): 86-92; Tuominen 和 Kallioinen (1994) 皮肤病理学杂志 21 (5): 424-9; Natali 等 (1990) 国际癌症杂志 46 (4): 586-90;

Zagzag 等 (1995) 癌症研究 55 (4): 907-14; Hasegawa 等 (1997) 神经病理学报 (柏林) 93 (5): 431-7; Saxon 等 (1997) 儿童病理实验室医学 17 (2): 259-66; Hasegawa 等 (1995) 人类病理学 26 (8): 838-45)。另外, 腱生蛋白-C 在高度增殖的皮肤疾病中过表达, 例如牛皮癣 (Schalkwijk 等 (1991) 英国皮肤学杂志 124 (1): 13-20), 及在动脉粥样硬化损伤中 (Fukumoto 等 (1998) 动脉粥样硬化血栓症杂志 5 (1): 29-35; Wallner 等 (1999) 循环 99 (10): 1284-9)。结合腱生蛋白-C 的放射性标记抗体在临床中用于肿瘤的显影和治疗 (Paganelli 等 (1999) 欧洲核酸医学杂志 26 (4): 348-57; Paganelli 等 (1994) 欧洲核酸医学杂志 21 (4): 314-21; Bigner 等 (1998) 临床肿瘤学杂志 16 (6): 2202-12; Merlo 等 (1997) 国际癌症杂志 71 (5): 810-6)。

抗腱生蛋白-C 的适体 (aptamer) 具有潜在的诊断和治疗癌症和动脉粥样硬化及治疗牛皮癣的用途。相对抗体而言, 适体较小 (7-20kDa), 易于从血中清除, 并且是化学合成的。从血中迅速清除对体内显影诊断很重要, 适体的血液水平是阻碍显影的主要决定性背景。迅速从血液中清除对治疗也是很重要的, 血液水平可能产生毒性。SELEX 技术可以迅速分离适体, 而化学合成可以方便的在特定位点将适体与不同的惰性和生物活性分子偶联。抗腱生蛋白-C 的适体因此在肿瘤治疗或体内或回体显影诊断和/或输送各种用于治疗表达腱生蛋白-C 的疾病的偶联腱生蛋白-C 核酸配体的治疗剂中是有用的。

核酸的主要作用是储存信息, 这一定理已存在多年。通过已知的配体指数富集系统生成法方法, 术语 SELEX 程序, 核酸不同于蛋白具有三维结构多样性这一点愈加清晰。SELEX 程序是与目的分子高特异性结合的核酸分子的一种体外进化方法, 而且在 1990 年 6 月申请的美国专利申请号 07/536.428 中有描述, 发明名称是“配体指

数富集系统生成法”，现已放弃。发明名称为“核酸配体”的美国专利 5, 475, 096, 和发明名称为“鉴别核酸配体的方法”的美国专利 5, 270, 163 (参见 WO91/19813), 均专门附于本文作参考文献。所有这些申请本文统称为 SELEX 专利申请, 它们描述了完全新型的制备任何目的分子核酸配体的方法。SELEX 程序提供了一类称为核酸配体或适体的产物, 每一个有特定序列, 并具有特异结合目的化合物和分子的功能。每一种 SELEX 鉴别的核酸配体是特定目的化合物和分子的特异性配体。SELEX 程序的根据是这样的特定认识, 核酸具有很强的形成多种二维和三维结构的能力并且其单体具有足够的化学通用性, 其实际上可与任何单体或聚合物化合物偶联, 用作配体 (形成特异的结合对)。任何大小或组成的分子可以作为 SELEX 方法的鉴别对象。SELEX 方法在高亲和力结合试验中的应用包括从候选寡核酸混合物中进行筛选和逐步重复结合、分离及扩增步骤, 利用相同的常用筛选方法, 实际上可以获得任何预期标准的结合亲和力和选择性。SELEX 方法起始于核酸混合物, 优选含有一部分随机序列, 包括的步骤有使靶与混合物接触, 接触条件应适于结合, 分离与靶特异结合的核酸与未结合的核酸, 解离核酸-靶复合物, 扩增从核酸-靶复合物中解离的核酸, 以产生配体富集的核酸混合物, 然后再按照预期循环数完全重复结合、分离、解离等步骤产生靶分子高特异性高亲和力配体。

本发明人发现 SELEX 方法证明作为化合物的核酸能形成多种形状、大小和构型, 并具有更宽广的结合能力及生物系统中的核酸所没有的其它功能。

修改基本的 SELEX 方法可以达成大量特定目的。例如美国专利申请 07/960, 093, 1992 年 10 月 14 日申请, 现已放弃, 和美国专利 5, 707, 796, 发明名称均是“以结构为基础进行核酸筛选的方法”, 描述了联合使用 SELEX 程序和凝胶电泳筛选有特定结构特征

的核酸分子,如弯曲的 DNA。美国专利申请 08/123,935,1993 年 9 月 17 日申请,发明名称是“光筛选核酸配体”,现已放弃,美国专利 5,763,177,发明名称是“配体指数富集系统生成法:光筛选核酸配体和溶液 SELEX”和美国专利申请 09/093,293,1998 年 6 月 8 日申请,发明名称是“配体指数富集系统生成法:光筛选核酸配体和溶液 SELEX”描述了以 SELEX 为基础方法筛选含有能够与目的分子结合和/或光耦联和/或光灭活的光反应基团的核酸配体。美国专利 5,580,737,发明名称是“可以区分茶碱和咖啡因的高亲和力核酸配体”,描述了鉴别能够分辨极为相近的,可能不是多肽分子的高特异性核酸配体的方法,称作反向-SELEX。美国专利 5,567,588,发明名称是“指数富集配体系统进化:溶液 SELEX”描述了一种以 SELEX 为基础的方法,可以高效分离对目的分子有高亲和力和低亲和力的寡核苷酸。

SELEX 方法包括含修饰核苷酸的高亲和力核酸配体的鉴别,该修饰使配体性质改善,诸如体内稳定性增强或输送性能提高。这种修饰的实例包括核糖和/或磷酸和/或碱基位置的化学替代。发明名称是“含修饰核苷酸的高亲和力核酸配体”的美国专利 5,660,985 描述了 SELEX 程序-鉴别含修饰核苷酸的核酸配体,详述了 5-和 2'-嘧啶化学修饰的核苷酸衍生物。美国专利 5,580,737,见上,描述了含一个或多个 2'-氨基(2'-NH₂),2'-氟(2'-F),和/或 2'-O-甲基(2'-OMe)核苷酸修饰的高特异性核酸配体。美国专利申请 08/264,029,1994 年,6 月 22 日申请,发明名称是“制备已知和新型分子内 2' 亲核置换修饰核苷的新方法”,现已放弃,描述了含各种 2' 修饰嘧啶的寡核苷酸。

SELEX 方法包括,如美国专利 5,637,459,发明名称是“指数富集配体系统进化:嵌合 SELEX”,和美国专利 5,683,867,发明名称是“配体指数富集系统生成法:混合 SELEX”分别所述的,

将筛选的寡核苷酸与筛选的其它寡核苷酸及非寡核苷酸功能单位结合起来。这些申请将寡核苷酸的形状多样性和其它特性，及有效扩增和复制的特性与其它分子的目的特征结合起来。

SELEX 方法进一步包括如美国专利申请 08/434, 465, 1995 年 5 月 4 日申请，发明名称是“核酸配体复合物”中所描述的，在诊断或治疗复合物中将核酸配体与亲脂复合物或非免疫原的、高分子化合物结合。上述每一个描述了基本 SELEX 程序的专利和申请其全文引入本文作参考。

发明简述

本发明描述了分离高特异性结合腱生蛋白-C 的核酸配体的方法。本文进一步描述了腱生蛋白-C 的核酸配体。还描述了腱生蛋白-C 的高亲和力 RNA 配体。而且描述了腱生蛋白-C 的 2'-氟修饰嘧啶和 2'-OMe-修饰嘌呤 RNA 配体。本文使用的鉴别这些核酸配体的方法称作 SELEX，是配体指数富集系统生成法的缩写。本文包括显示于表 3 和表 4 及图 10 中的配体。

本发明进一步包括检测可能含有表达腱生蛋白-C 的疾病的生物组织中该疾病的存在的方法。本发明还进一步包括检测可能含有表达腱生蛋白-C 的肿瘤的生物组织中该肿瘤的存在的方法。本发明进一步包括用作体内或回体(ex vivo)诊断剂的复合物。而且本发明还包括向表达腱生蛋白-C 的疾病组织输送治疗或预防使用的治疗剂的方法。本发明还进一步包括向表达腱生蛋白-C 的疾病组织输送用于治疗或预防的治疗剂时所用的复合物。

附图简述

图 1 显示结合 U251 细胞的细胞 SELEX RNA 库。

图 2 显示预测的适体 TTA1 和 TTA1.NB 二级结构。图中包括适

体与螯合剂的缀合。所有的 A 是 2' OMe 修饰的。除非说明，所有的 G 是 2' OMe 修饰的。所有的 C 是 2' F 修饰的。

图 3 是注射 Tc-99m 标记的 TTA1 和 TTA1.NB 三小时后，小鼠体内 U251 肿瘤移植物的显影图。

图 4 显示静脉注射若丹明-Red-X-标记的 TTA1 三小时后取出的 U251 胶质母细胞瘤的荧光显微切片图。

图 5 显示 Tc-99m 与接头通过 TTA1 5' G 的连接方式。

图 6 描述了小鼠体内各种人肿瘤移植体摄取 TTA1/GS7641 3 小时，与摄取非结合的对照适体的比较结果，ID/g=注射剂量/克。

图 7 显示了使用 DOTA 或 DTPA 作为放射金属螯合剂的 In-111 标记的 TTA1/GS7641 三小时后的生物分布。

图 8 示出适体和 DTPA 的缀合。¹¹¹In 与 DTPA 螯合。

图 9 示出适体和 DOTA 的缀合。¹¹¹In 与 DOTA 螯合。

图 10 是推测的适体 TTA1 的二级结构图。图中包括适体与 Tc-99m 螯合剂的缀合。适体为 Tc-99m 标记形式。所有的 A 是 2' OMe 修饰的。所有的 G，除说明外，是 2' OMe 修饰的。所有的 C 和 U 是 2' F 修饰的。

优选实施方案详述

本文所用的鉴别腱生蛋白-C 核酸配体的主要方法称作 SELEX 程序，配体指数富集系统生成法的缩写，包括 (a) 使腱生蛋白-C 与候选核酸混合物接触 (b) 根据与腱生蛋白-C 的亲合力分离上述的候选混合物组分，及 (c) 扩增筛选出的分子产生对结合腱生蛋白-C 亲合力相对较高的核酸序列富集的核酸复合物。本发明包括腱生蛋白-C 的 RNA 配体。本发明进一步包括表 3 和 4 及图 10 中所示的腱生蛋白-C 的特异 RNA 配体。尤其特别的是，本发明包括与表 3 和 4 及图 10 中所示的特异核酸配体具有相当大的同源性和基本相同

的结合活性的核酸序列。相当大的同源性是指一级序列同源性大于70%，优选大于80%，更为优选大于90%，95%，或99%。本文中所述的同源性百分数是根据两条序列较短者中发现的与进行对比的序列中相同核苷酸残基对比的核苷酸百分数计算，为便于对比引入1个10个核苷酸间隔。结合腱生蛋白-C的能力基本相同是指在本文中描述的配体亲和力的一到两个数量级以内的亲和力。本领域一般技术人员都熟知，确定一段与此处描述的特异序列基本同源的序列是否具有与腱生蛋白-C相同的结合能力的方法。

表3和4和图10总述了腱生蛋白-C的核酸配体的序列同源性，其显示具有很小同源性的序列或无同源性的序列结合腱生蛋白-C的能力基本相同。由于这些原因，本发明还包括具有与表3和4以及图10中所示核酸配体基本相同假定结构或结构基元并能够与腱生蛋白-C结合的核酸配体。使用Zukerfold程序（参照Zuker（1989）科学244：48-52）进行序列同源性比较能够推测基本相同的结构或结构基元。正如本领域所知，也可使用其它计算机程序预测二级结构或结构基元。使用本领域所知的NMR或其它技术同样能够推测溶液中核酸配体基本相同的结构或结构基元或结合时的结构。

本发明进一步包括检测可能含有表达腱生蛋白-C的疾病的生物组织中该疾病的存在的方法，该方法包括（a）从候选核酸混合物中鉴别核酸配体，该核酸配体是腱生蛋白-C的配体，使用的鉴别方法为（i）将候选核酸混合物与腱生蛋白-C接触，其中相对于候选混合物与腱生蛋白-C的亲和力高的核酸可从剩余的候选混合物中分离出来；（ii）将高亲和力核酸与剩余的候选混合物分离开；（iii）扩增高亲和力核酸，产生富集结合腱生蛋白-C的亲和力和特异性均相对较高的核酸的核酸混合物，由此鉴别腱生蛋白-C的核酸配体；（b）将可用于体内诊断的标记物附着于在第（iii）步鉴别的核酸配体，形成标记物-核酸配体复合物；（c）将可能含有该疾病的组织暴露

于该标记物-核酸配体复合物；以及（d）在该组织中检测标记物-核酸配体复合物的存在，从而鉴别表达髓生蛋白-C 的疾病。

本发明的另一个目的是提供用于体内或回体诊断的含有一个或多个髓生蛋白-C 核酸配体和一个或多个标记物的复合物。还包括于本发明中的是输送治疗或预防表达髓生蛋白-C 的疾病状况的治疗剂的方法。本发明还进一步包括用于输送治疗或预防表达髓生蛋白-C 的疾病状况的治疗剂的复合物。

定义

本文使用的各种术语涉及本发明的多个方面。为了使本发明组成部分的描述清晰易懂，提供有下述定义：

正如本文所用的，“核酸配体”是指非天然存在的对靶有预期作用的核酸。核酸配体通常也称为“适体(aptamer)”。本发明的靶是髓生蛋白-C，因此该术语指髓生蛋白-C 的核酸配体。预期作用包括，但不限制在，结合靶、催化改变靶、通过修饰/改变靶或靶功能活性的方式与靶反应、与靶共价偶联如在自杀抑制物中、促进靶与其它分子的反应。在优选实施例中，所述作用是与靶以特异性亲和力结合，这种靶是三维化学结构而不是通过主要决定于 Watson/Crick 碱基配对或三螺旋结合机制结合核酸配体的多核苷酸，其中核酸配体不是已知的与靶在生理条件下结合的核酸。从核酸混合物中鉴别核酸配体，这个核酸配体是髓生蛋白-C 的配体，使用的鉴别方法包括：a) 将候选核酸混合物与髓生蛋白-C 接触，其中相对于候选混合物与髓生蛋白-C 的亲和力高的核酸可从剩余的候选混合物中分离出来；b) 将高亲和力核酸与剩余的候选混合物分离开；c) 扩增高亲和力核酸，产生配体富集的核酸混合物（参照美国专利申请号 08/434, 425, 1995 年 5 月 3 日申请，现为美国专利 5, 789, 157, 此专利引入本文作参考）。

如本文所用的,“候选混合物”是序列不同的核酸混合物,从中可以筛选所需配体。候选混合物来源可以是天然存在的核酸或它们的片段、化学合成核酸、酶合成核酸或综合上述技术合成的核酸。优选实施例中,每一条核酸在随机区附近具有辅助扩增的固定序列。

如本文使用的,“核酸”是指 DNA、RNA、单链或双链、及其任何化学修饰形式。修饰包括,但不局限在,向核酸配体碱基或整个核酸配体提供其它化学基团使加入额外电荷、极性、氢键、静电作用、和不定性。这种修饰包括,但不限于,2' 位置糖基化修饰、5 位嘧啶修饰、8 位嘌呤修饰、修饰外环氨基、4-硫尿苷代、5-溴或5-碘-尿嘧啶替代;基本骨架修饰、甲基化、异常碱基配对组合如胞嘧啶同一碱基之间和胍之间及类似情况。修饰还包括 3' 和 5' 修饰如帽子结构。

“SELEX”方法学涉及将与靶以预订方式反应的核酸配体的筛选过程,例如结合蛋白,与筛选出的核酸的扩增过程相结合。优化的重复循环筛选/扩增步骤能够使与靶反应最强的一种或少数核酸从含有极大量核酸的库中筛选出来。继续循环筛选/扩增程序直到获得预期筛选结果。本发明中,应用 SELEX 方法学获得了腱生蛋白-C 的核酸配体。

SELEX 方法学在 SELEX 专利申请中有描述。

“SELEX 靶分子”或“靶”是指任何可与配体结合的目的复合物和分子。靶可以是蛋白、多肽、碳水化合物、多糖、糖蛋白、激素、受体、抗原、抗体、病毒、底物、代谢产物、过渡态类似物、辅助因子、抑制子、药物、染料、营养物等,没有限制。在本申请中,SELEX 靶是腱生蛋白-C。

本文使用的“复合物”是指一个或多个腱生蛋白-C 核酸配体与一个或多个标记物共价偶联形成的分子实体。在本发明的特定实施例中,复合物描述为 A-B-Y,其中 A 是标记物;B 任选包括接头;

Y 是腓生蛋白-C 配体。

“标记物”在本文中是与腓生蛋白-C 核酸配体直接或通过接头（一个或多个）或间隔物（一个或多个）形成复合物的分子实体或多个分子实体，标记物使得可以通过视觉或化学方法在体内或回体设置中检测到复合物。标记物的实例包括，但不局限于放射性物质，包括 Tc-99m, Re-188, Cu-64, Cu-67, F-18, ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{32}P ；荧光团，包括荧光素，若丹明，得克萨斯红；上述荧光团的衍生物，包括若丹明-Red-X, 磁性化合物, 和生物素。

如本所用的，“接头”是分子实体，它通过共价键或非共价键作用连接两个或更多分子实体，能够使得分子之间有一定的空间分隔从而保留一个或多个分子实体的功能活性。接头还可以是已知的间隔物。接头的实例包括，但不局限在，图 2 所示的 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ 和己氨结构。

本文使用的“治疗的”，包括治疗和/或预防。在使用时，治疗涉及人和其它动物。

“共价键”是一对原子间形成的化学键。

“非共价键作用”是指分子实体通过这种作用而不是包括离子作用和氢键的共价键聚在一起。

在优选实施例中，本发明的核酸配体衍生于 SELEX 方法学。SELEX 程序在美国专利申请系列号 07/536, 428，发明名称是“配体指数富集系统生成法”，现已放弃，美国专利 5, 475, 096，发明名称是“核酸配体”及美国专利 5, 270, 163，（参照 WO 91/19813），发明名称是“鉴别核酸配体的方法”中有描述。这些申请，每一个都专门附于本文的参考文献中，总称为 SELEX 专利申请。

SELEX 程序提供一类核酸分子产品，每一条核酸分子有特定序列，而且具有特异结合预期目的复合物和分子的活性。靶优选是蛋白，但也可以包括其它碳水化合物，肽聚糖和不同的小分子。SELEX

方法学还能够通过与该生物结构完整部分的分子特异作用而用于生物结构打靶，如细胞表面或病毒。

SELEX 程序最基本的形式可以定义为下列步骤：

1) 制备序列不同的核酸候选混合物。候选混合物通常包括固定序列区（例如，每一个候选混合物组成在相同区段含有相同的序列）和随机序列区。所选的随机序列区可以是：（a）有助于下文所述的扩增步骤，或（b）模拟已知的结合靶的序列，或（c）增强候选混合物中特定结构排列的核酸的浓度。随机序列区可以是完全随机的（例如，任何一个位置上发现的碱基可能是四个中的一个）或仅仅是部分随机（例如，在任何一个位置上发现的碱基可以在 0 和 100% 间的任何水平选择）。

2) 候选混合物在适合靶与候选混合物成员结合的条件下与靶接触。在这些环境下，靶和候选混合物核酸之间的反应可以认为是在靶和对靶有较强亲和力的核酸间形成核酸-靶配对。

3) 从对靶亲和力较弱的核酸中分离对靶亲和力最强的核酸。因为只有极少数相当于最高亲和力核酸的序列（而且可能只有一个核酸分子）存在于候选混合物中，通常最好设置分离标准这样在分离过程中显著量的核酸保留在混合物中（约 5-50%）。

4) 分离过程中筛选的核酸具有相对较高的靶亲和力，然后通过扩增产生新的富集了具有相对较高靶亲和力的核酸候选混合物。

5) 重复上述分离扩增步骤，新形成的候选混合物含有越来越少的特有序列，核酸对靶的平均亲和力程度通常会有所升高。分离扩增的极限，SELEX 程序会产生含有一个或少数特定的对靶亲和力最高，代表原始候选混合物中的核酸分子的核酸候选混合物。

为了实现一些特殊目的，对基本 SELEX 方法进行了修改。例如，美国专利申请 07/960, 093, 1992 年 10 月 14 日申请，现已放弃，及美国专利 5, 707, 796，发明名称均是“根据结构筛选核酸的方

法”，描述了联合使用 SELEX 程序和凝胶电泳筛选有特定结构特征的核酸分子，如弯曲的 DNA。美国专利 08/123, 935, 1993 年 9 月 17 日申请，发明名称是“核酸配体的光筛选”，现已放弃。美国专利 5, 763, 177, 发明名称是“配体指数富集系统生成法：核酸配体的光筛选和溶液 SELEX”和美国专利申请 09/093, 293, 1998 年 6 月 8 日，发明名称是“配体指数富集系统生成法：核酸配体的光筛选和溶液 SELEX”，都描述了以 SELEX 为根据的筛选含光活性基团能够结合和/或光耦联和/或光灭活靶的核酸配体。美国专利 5, 580, 737, 发明名称是“区分茶碱和咖啡因的高亲和力核酸配体”，描述了鉴别能够区分非常相近的分子的高特异性亲和力核酸配体的方法，称为反向-SELEX。美国专利 5, 567, 588, 发明名称是“配体指数富集系统生成法：溶液 SELEX”，描述了以 SELEX 为基础的方法可以获得高效分离对靶有高亲和力和低亲和力的寡核苷酸。美国专利 5, 496, 938, 发明名称是：“HIV-RT 和 HIV-1 Rev 的核酸配体”，描述了使用 SELEX 程序后获得改良核酸配体的方法。美国专利 5, 705, 337 发明名称是“配体指数富集系统生成法：化学-SELEX”，描述了配体与靶共价偶联的方法。

SELEX 法包括鉴别含有使配体特性改良的修饰核苷酸的高亲和力核酸配体，例如体内稳定性增强或输送性能提高。这种修饰的实例包括在核糖和/或磷酸和/或碱基位置进行化学替代。SELEX 鉴别含修饰核苷酸的核酸配体在美国专利 5, 660, 985, 发明名称是“含修饰核苷酸的高亲和力核酸配体”中有描述，该专利详述了含有 5'-和 2'-化学修饰嘧啶核苷酸衍生物的寡核苷酸。美国专利 5, 637, 459, 如上所述，描述了含一个或多个 2'-氨基 (2'-NH₂)、2'-氟基 (2'-F)，和/或 2'-O-甲基 (2'-OMe) 修饰核苷酸的高特异性核酸配体。美国专利申请 08/264, 029, 1994 年 6 月 22 日申请，发明名称是“制备已知和新型 2' 分子内亲核替代修饰核苷酸的新

方法”，描述了含各种修饰嘧啶的寡核苷酸。

SELEX 方法包括将筛选出的核苷酸与筛选的其它核苷酸和非核苷酸功能单位结合，正如美国专利 5, 637, 459，发明名称是“配体指数富集系统生成法：嵌合 SELEX”，和美国专利 5, 683, 867，发明名称是“配体指数富集系统生成法：混合 SELEX”分别描述的。这些申请能够将寡核苷酸的性状多样性和其它特性，及有效扩增和复制的特性与所需的其它分子的特性结合起来。

美国专利 5, 496, 938 描述了 SELEX 程序处理后获得改良核酸配体的方法。此专利，发明名称是“HIV-RT 和 HIV-1Rev 核酸配体”，专门附于本文的参考文献中。

美国专利申请号 08/434, 425，发明名称是“配体指数富集系统生成法：组织 SELEX”，1995 年 5 月 3 日申请，现是美国专利 5, 789, 157，描述了鉴别组织大分子组分核酸配体的方法，包括癌细胞，和这种方法鉴别的核酸配体。此专利已专门附于本文的参考文献中。

在使用核酸进行诊断或治疗时可能碰到的潜在问题是体液中以磷酸二酯键存在的核酸在显示目的效应之前可能被胞内和胞外的酶如核酸内切酶和核酸外切酶降解。核酸配体的某种化学修饰能够提高核酸配体体内的稳定性或增强或辅助核酸配体的输送。参照，例如，美国专利申请 08/117, 991，1993 年 9 月 8 日申请，现已放弃，和美国专利 5, 660, 985，发明名称均是“含修饰核苷酸的高亲和力核酸配体”，已通过专门附于本文的参考文献中。本发明关注的核酸配体修饰包括，但不局限于，向核酸配体碱基或整个核酸配体提供其它化学基团使加入额外电荷、极性、氢键、静电作用、和不定性。这种修饰包括，但不局限于，2' 位置糖基化修饰、5 位密定修饰、8 位嘌呤修饰、修饰外环氨基、4-硫尿苷代、5-溴或 5-碘-尿嘧啶替代；基本骨架修饰、甲基化、异常碱基配对组合如胞嘧啶同

一碱基之间和胍之间及类似情况。修饰还包括 3' 和 5' 修饰如帽子结构。本发明优选实施例中，核酸配体是在嘧啶残基糖分子上有 2' 氟基 (2' -F) 修饰的 RNA 分子。

修饰可以在 SELEX 程序前后进行。SELEX 程序前修饰产生 SELEX 靶特异性和体内稳定性增强的核酸配体。SELEX 程序后修饰产生 2' -OH 核酸配体能够使体内稳定性增强而对核酸配体的结合能力无相反的影响。

其它修饰是本领域任何普通技术人员熟知的。这种修饰可以在 SELEX 程序之后 (修饰上述鉴别的未修饰配体) 或融合于 SELEX 程序中进行。

本发明中的核酸配体是通过 SELEX 方法学制备的，此方法学上文已有概述并在 SELEX 申请中授予权力，本文将它们附于本文的参考文献中。

本发明的腱生蛋白-C 适体与腱生蛋白-C COOH 末端的肝磷脂结合位点结合。

在本发明的特定实施例中，本文的腱生蛋白-C 核酸配体可用于诊断目的并能用于病理状态的显影 (如人肿瘤显影)。除诊断之外，腱生蛋白-C 核酸配体可用于预后和检测腱生蛋白-C 表达的病理状况。

诊断药剂只需要能够让使用者可以鉴别在特定位置出现的特定靶或其浓度。只要与靶形成的结合键足以引发用于诊断的阳性信号即可。本领域的熟练技术人员能够使用本领域熟知的方法用腱生蛋白-C 核酸配体与标记物偶联显示核酸配体的出现。这种标记物能够用于某些诊断过程，诸如检测原发肿瘤和发生转移的肿瘤及动脉硬化损伤。本文的标记物实例是钆-99m 和 ^{111}In ，然而，其它标记物如附加的放射性核素、磁性化合物、荧光团、生物素、及类似物可以与腱生蛋白-C 核酸配体偶联，显影在体内或回体设定的表达腱生蛋

白-C 的疾病状态（例如，癌症，动脉硬化症，和牛皮癣）。标记物可以共价偶联于腱生蛋白-C 核酸配体的多个位置，诸如碱基外环氨基基团、嘧啶核苷酸 5-位、嘌呤核苷酸 8-位，磷酸的羟基，或腱生蛋白-C 核酸配体 5' 或 3' 末端的其它基团。在标记物是镓-99m 或 ^{111}In 的实施例中，优选结合于磷酸基团的 5' 或 3' 羟基或修饰嘧啶的 5 位。在最优选的实施例中，标记物通过接头或不通过接头结合于磷酸基团的 5' 羟基。在另一个实施例中，标记物通过含 5 位原始氨基的嘧啶与核酸配体结合，并应用氨基与标记物连接。可以与标记物直接连接或使用接头。实施例中使用镓-99m 或 ^{111}In 作为标记物，优选接头是如图 10 所示的己氨接头。

在其它实施例中，腱生蛋白-C 核酸配体有助于向表达腱生蛋白-C 的组织或器官输送治疗复合物（包括，但不限制在，细胞毒性复合物，免疫增强物质和用于治疗的放射性核素）。腱生蛋白-C 可能表达的疾病状态包括，但不局限在，癌症、动脉硬化，和牛皮癣。本领域的熟练技术人员能够使用本领域熟知的程序选用腱生蛋白-C 核酸配体与治疗复合物结合形成新的复合物。治疗复合物可以共价结合于腱生蛋白-C 核酸配体的多个位置，诸如碱基的外环氨基、嘧啶核苷酸 5-位、嘌呤核苷酸 8-位、磷酸羟基，或腱生蛋白-C 核酸配体 5' 或 3' 末端羟基或其它基团。在优选实施中，治疗剂结合于核酸配体 5' 氨基。可以直接与治疗剂结合或使用接头。在以癌症为目的疾病的实施例中，已知有抗肿瘤活性的 5-氟脱氧尿嘧啶或其它核苷酸类似物可以分子内连接于腱生蛋白-C 核酸配体内存在的 U' s 或分子内加入或直接或通过接头结合于其它末端。另外，可以结合嘧啶类似物 2', 2' -双氟胞嘧啶和嘌呤类似物（脱氧考福霉素）。再者，美国专利申请 08/993, 765, 1997 年 11 月 8 日申请，已完全附于参考文献中，描述了，尤其是，核苷酸类原药包括直接与肿瘤结合的核酸配体，例如腱生蛋白-C，用于精确定位的化学放射性感光剂，

及放射性感光剂和放射性核素和其它抗肿瘤的放射性治疗剂。

同样受关注的是标记物与治疗剂都与腱生蛋白-C 核酸配体结合，这样疾病状态的检测和输送治疗试剂可以在一个适体中一起完成或形成两个或多个同一适体的不同改良方式的混合物。还受关注的是标记物或治疗试剂或两者一起连接于非免疫原性的，高分子量复合物或亲脂性复合物，如脂质体。核酸配体与亲脂性复合物或非免疫原性复合物结合形成诊断或治疗复合物的方法在美国专利申请 08/434, 465, 1995 年 5 月 4 日申请，发明名称是“核酸配体复合物”中有描述，该专利申请已其全文引入本文作参考。

本文描述的治疗或诊断组分可以不经肠道注射施用（例如，静脉、皮下、皮内、损伤内注射），尽管其它有效的施用形式，诸如关节内注射、吸入薄雾、口服活性配方、皮肤电离离子渗入或栓剂，也是可以预想的。还可以应用定点直接注射，可以从装置中释放出来，例如灌输支架或导管，或使用输液泵直接定点输送。一个优选的载体是生理盐水溶液，但预期其它药剂学承认的载体也可以使用。在一个实施例中，设想载体和腱生蛋白-C 核酸配体与治疗复合物结合在一起形成适用于生理条件的缓释配方。这种载体的基本溶剂可以是天然的水溶液或非-水溶液。另外，载体可以含有其它药剂学接受的赋形剂进行修饰或保持配方的 pH、克分子渗透压浓度、粘性、透明度、颜色、无菌性、稳定性、溶解速率，或气味。同样的，载体可以含有其它药剂学接受的赋形剂进行修饰或保持腱生蛋白-C 核酸配体的稳定性、溶解速率、释放，或吸附。这种赋形剂是经常并通常用在按配方配制的，以单位剂量和多剂量形式，不经肠道施用的药物中的物质。

一旦治疗或诊断的组分配制好，应储存在无菌小瓶中，可以是溶液、悬浮液、胶状、乳剂、固体，或脱水或冻干的粉末。这种配药可以以使用形式储存或在施用前立即配置。含系统输送腱生蛋白-

C 核酸配体的配药的施用方式可以是通过皮下、肌肉内、静脉、关节内，鼻内或阴道内或直肠内栓剂。

下文提供的实施例用于解释和阐明本发明而本发明并不限于此。实施例 1 描述了实施例 2 中使用的、用以产生腱生蛋白-C RNA 配体的材料和试验程序。实施例 2 描述了腱生蛋白-C RNA 配体及预测筛选的核酸配体的二级结构。实施例 3 描述了确定筛选核酸配体的高亲和力必须的最小大小，和嘌呤 2' -OH 替代为嘌呤 2' -OMe。实施例 4 描述了荷瘤小鼠体内 Tc-99m 标记的腱生蛋白-C 核酸配体的生物分布。实施例 5 描述了使用荧光标记的腱生蛋白-C 核酸配体定位肿瘤组织中的腱生蛋白-C。实施例 6 描述了通过适体 TTA1（即已知的 GS7641）检测肿瘤。实施例 7 描述了使用 ^{111}In 进行另一种标记。

实施例

实施例 1.应用 SELEX 获得腱生蛋白-C 的核酸配体和 U251 胶质母细胞瘤细胞的核酸配体。

材料和方法

腱生蛋白-C 购自 Chemicon(Temecula, CA)。单链 DNA 引物和模板在 Operon 技术公司 (Alameda, CA) 合成。

SELEX 程序在 SELEX 专利申请中有详细的描述。简言之，通过 Klenow 片段延伸 40N7a ssDNA 制备双链转录模板：

5' -TCGCGCGAGTCGTCTG[40N]CCGCATCGTCCTCCC 3' (SEQ ID NO:1)

使用 5N7 引物：

5' -TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-(SEQ ID NO:2)，它含有 T7 聚合酶启动子（划线部分）。如 Fitzwater 和 Polisky(1996)方法酶学 267: 275-301 所述，用 T7RNA 聚合酶制备

RNA, 此文已其全文引入本文作参考。所有的转录反应均在糖分子有 2'-氟 (2'-F) 修饰的嘧啶核苷酸存在下进行的。这个替代提供了更强的核糖核酸酶抗性, 该酶在 2'-羟基处切割磷酸二酯键。尤其是, 每个转录混合物含有 3.3mM 2'-F UTP 和 3.3mM 2'-F CTP 和 1mM GTP 及 ATP。这样产生的初始随机 RNA 文库含 3×10^{14} 个分子。用硝酸纤维素滤膜分离的标准方法测定腱生蛋白-C 每个配体的亲和力 (Tuerk 和 Gold(1990)科学 249 (4968): 505-10)。

每一个 SELEX 循环, 在 Lumino 平皿中加入 200ul 含腱生蛋白-C 的 Dulbecco 氏 PBS, 浓度如表 1 所示, 室温包被 2 小时。包被后, 1-6 个循环用 HBSMC+ 缓冲液 [20mM Hepes, pH7.4, 137mM NaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2] 和 1g/升人血清白蛋白 (Sigma, 片段 V) 封闭小孔而第 7 和第 8 个循环用 HBSMC+ 含 1g/升酪蛋白的缓冲液封闭小孔。结合和漂洗缓冲液包括 HBSMC+ 含 0.05% Tween20 的缓冲液。每一个 SELEX 循环, RNA 稀释于 100ul 结合缓冲液中并在预先用结合缓冲液洗过的蛋白包被小孔中 37°C 孵育 2 小时。结合后, 用 200ul 漂洗缓冲液分别洗 6 次。漂洗步骤之后, 小孔放于 95°C 加热器中干燥 5 分钟。标准 AMV 逆转录酶反应 (50ul) 于 48°C 直接在小孔中进行, 反应产物用于标准 PCR 和转录反应。两个合成引物 5N7 (见上) 和 3N7a:

5'-TCGCGCGAGTCGTCTG-3' (SEQ ID NO:3)

用于这些模板的扩增和逆转录步骤。

对细胞 SELEX 而言, U251 人胶质母细胞瘤细胞 (人类遗传 (1971) 21: 238) 在添加 10% 胎牛血清 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 的 Dulbecco 改良 Eagle 氏培养基和六孔组织培养皿 (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) 中生长至汇合状态并用补充 CaCl_2 的 Dulbecco 氏 PBS 缓冲液 (DPBS, GIBCO BRL) 洗三次。转录得到的分子内标记 RNA (Fitzwater(1996)如上述) 与细胞 37°C

孵育一小时。接着去除标记 RNA, 37°C 用 DPBS 洗细胞六次, 每次十分钟。然后加入含 5mM EDTA 的 DPBS, 并与细胞孵育 30 分钟洗脱漂洗步骤后仍结合于细胞上的 RNA。用标准液闪计数程序计数 RNA 并用 RT-PCR 扩增。

U251 细胞的结合分析。分子内标记的 RNA 在六孔组织培养皿 (Becton I Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) 中与浓度增高的汇合态 U251 细胞 37°C 孵育一小时。用 DPBS+CaCl₂, 37°C 洗三次, 每次十分钟, 洗去未结合的 RNA, 用 Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 破坏细胞收集结合的 RNA。结合的 RNA 用液闪计数定量。

克隆和测序。用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶分离扩增出的亲和力富集的寡核苷酸库, 反转录成 ssDNA 并用含 BamHI 和 HindIII 限制性内切酶位点的引物通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 DNA。克隆 PCR 片段, 根据标准技术 (Sambrook 等, (1989) 分子克隆: 实验室手册, 第二版, 3 卷, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港) 进行质粒的制备和序列分析。

实施例 2. 髓生蛋白-C 的 RNA 配体

通过 SELEX 程序获得 U251 细胞的核酸配体, 在美国专利申请 08/434, 425, 发明名称是“配体指数富集系统生成法: 组织 SELEX”, 1995 年 5 月 3 日申请, 现是美国专利 5, 789, 157, 中有描述。接着确定获得的配体是髓生蛋白-C 核酸配体。

为了获得人髓生蛋白-C 的寡核酸配体, 使用在上文材料和方法中描述的随机核苷酸文库进行了八个 SELEX 循环。每一循环中加入的 RNA 和蛋白如表 1 所示。8 个 SELEX 循环后, 寡核苷酸库对髓生蛋白-C 的亲和力是 10nM, 而这种亲和力没有随着增加的 SELEX 循环增强。

为了获得 U251 胶质母细胞瘤细胞的配体, 用随机核苷酸库进

行了 9 个 SELEX 循环。经过 9 个循环的与 U251 细胞结合和 EDTA 洗脱后,测试了第 3、5 和 9 个循环与 U251 细胞结合的能力。图 1 显示 SELEX 循环数增加, RNA 结合量的浓度也有显著增加。由于目的组织的复杂性,不可能估计寡核苷酸库对细胞表面未知分子的亲和力。

接着用 E9 库(九轮循环中结合于 U251 细胞又被 EDTA 洗脱的 RNA 配体)作为以纯化的腱生蛋白-C 为靶的 SELEX 的起点。如上所述使用纯化腱生蛋白-C 进行两个 SELEX 循环。两个 SELEX (E9P1 和 E9P2) 循环中加入的蛋白和 RNA 浓度如表 2 所述。

总而言之,进行三种不同的 SELEX 试验:一个用纯化的腱生蛋白-C 为靶,一个用 U251 胶质母细胞瘤作靶,另一个实验中纯化的腱生蛋白-C 作靶,用来自 U251 胶质母细胞瘤的 SELEX 库启动 SELEX 试验。

通过克隆和测序分析三个 SELEX 试验,配体来自纯化腱生蛋白-C SELEX (“TN” 序列) 的第 8 轮循环, U251 细胞 SELEX (“E9” 序列) 的第 9 轮循环,和 U251/腱生蛋白-C 混合 SELEX 第 2 轮循环 (“E9P2 序列”)。表 3 中显示了 34 个特定克隆的序列,并分成两个大组:腱生蛋白-C 配体 (“TN” 和 “E9P2” 序列) 和 U251 细胞配体 (“E9”)。腱生蛋白-C 配体中,大多数克隆(共 65 个)代表命名为家族 1 和家族 2 的两个不同序列类型中的一个(图 1)。检查家族 1 中 12 个克隆可变区揭示了与保守序列 GACNYUUCCNGCYAC (SEQ ID NO: 12) 相近的 7 个特定序列。检查家族 II 中 18 个克隆的可变区揭示这些序列中均含有保守序列 CGUCGCC (表 3)。E9 序列由于在可变区内有保守的 GAY 和 CAU 序列能够分入相近的一组。其余的序列似乎与其它序列没有关联被分为孤儿一类。三种主要的序列, E9P2-1、E9P2-2, 和 TN9 各自代表 14、16, 和 10 倍。“孤儿”一类中,一个序列, TN18, 代表两

倍。总之，这些数据代表高度富集的序列库。

大部分个体的解离常数很低显示是十亿分之一，三种最普遍的序列亦是如此。TN9 和 E9P2-1 和-2，具有最高的亲和力，分别是 5nM, 2nM, 和 8nM(表 3)。这些结果显示 U251 细胞 SELEX 是髓生蛋白-C 适体的储备，而且只需要两个 SELEX 循环分离细胞 SELEX 库中的髓生蛋白特异性配体。其它蛋白的寡核苷配体用纯化蛋白为靶同样可以从 E9 库中分离出来。

实施例 3. 确定 TN9 的最小大小，用 2' -OMe 嘌呤替代 2' -OH: 合成适体 TTA1

寡核苷酸合成程序是本领域熟练技术人员使用的标准方法 (Green 等 (1995) 生物化学 2 (10): 683-95)。2' -氟嘧啶 phosphoramidite 单体来自 JBL Scientific(San Luis Obispo, CA); 2' -OMe 嘌呤, 2' -OH 嘌呤, 己氨, 和 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6$ 单体, 及 dT 聚苯乙烯固相支持物, 来自 Glen Research(Sterling, VA)。适体亲和力用硝酸纤维素滤膜分离 (Green 等, 如上述) 确定。

根据 TN9 对髓生蛋白-C 的高亲和力, 选择它做进一步分析。我们首先研究了高亲和力结合所需的最小序列。使用标准技术 (Green 等, 如上述), 发现核苷酸 55 的 3' 核苷是结合髓生蛋白-C 所需要的, 然而去除 5' 末端的任何核酸都会造成亲和力的损失。进一步从 55 位核苷酸缩短 TN9 的长度并保留高亲和力结合活性, 接着我们尝试界定了 TN9 分子内的缺失。将 TN9 的前 55 个核苷酸, 与相近的家族 II 配体 TN7, TN21, 和 TN41 的前 55 个核苷酸输入计算机运算以确定可能的 RNA 二级结构折叠 (mfold 3.0, 可在 <http://www.ibc.wustl.edu/~zucker/> 网址下载 M.Zuker, D.H.Mathews&D.H.Turner RNA 二级结构预测的运算法则和热力学: 应用指南。在: RNA 生物化学和生物技术, J.Barciszewski&B.F.C. Clark,

著, NATO ASI 系列, Kluwer 学院出版社, (1999))。运算法则推测出的许多可能的 RNA 折叠中, 发现了每一个核苷酸都有的结构。图 2 的寡核苷酸代表的这个结构, 含有三个茎部结构并在一个交叉点汇合, 所以称为 3-茎交叉。这个折叠使家族 II 寡核苷酸中的高度保守核苷酸处于交叉区。比较 TN9、TN7、TN21, 和 TN41, 第二个茎部结构的长度和序列是可变的, 说明腱生蛋白-C 的结合不需要第二个茎部的延伸。应用 TN9 测试这个假设, 我们发现核苷酸 10-26 可以被乙烯乙二醇接头, $((\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6)$ 替代。接头是环状替代物, 减小了适体大小。另外, 替代 10-26 位核苷酸的四-核苷酸环 (CACU 或 GAGA) 产生对腱生蛋白-C 高亲和力的序列。确定其它核苷酸环或其它间隔子能够替代 10-26 位核苷酸形成腱生蛋白-C 高亲和力序列的技术完全属于本领域的熟练技术。

为了增强抗核酸酶的活性, 嘌呤位置可以定点替换成相应的 2', -OMe。寡核苷酸可任意分为五部分而每一部分中的所有嘌呤都替换成相应的 2', -OMe 嘌呤核苷酸, 总共五个寡核苷酸 (表 4, 相 I 合成)。确定每个寡核苷酸的腱生蛋白-C 的亲和力, 发现 1、3 和 5 部分的所有嘌呤可以在不损失亲和力的情况下被替换。2 和 4 部分中, 逐个将嘌呤替换成 2', -OMe 嘌呤并检测有效的亲和力 (表 4, 相 III 合成)。从这些实验中, 推测将 G9、G28、G31、和 G34 替换成 2', -OMe G 造成腱生蛋白-C 亲和力的损失。因此在适体 TTA1 中保留这些核苷酸的 2', -OH。

然后将适体 TTA1 (表 4) 与 $((\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6)$ 接头 (间隔子 18)、核酸外切酶保护的 3', -3' dT 帽、5', 己氨 (表 4), 和除表 4 中显示的 5Gs 外的所有 2', -OH 嘌呤一起合成。一种不能结合的对照适体, TTA1.NB, 通常是通过删去 3' 末端的 5 个核苷酸产生的。TTA1 结合腱生蛋白-C 的平衡解离常数 (K_d) 是 5nM, 而 TTA1.NB 结合腱生蛋白-C 的 $K_d > 5\mu\text{M}$ 。

核苷酸 10-26 能替换成非核苷酸的乙烯乙二醇接头。因此可以将两个部分独立合成，断开处引入乙烯乙二醇接头并产生新的 5' 和 3' 末端。合成后，共同孵育两个分子形成杂合体。本方法可以在新的 5' 和 3' 末端引入其它氨基基团和核苷酸。新功能可以用于生物连接。另外，由于两部分合成缩短了分子的长度，增强了化学合成的产量。

实施例 4 荷瘤小鼠中 Tc-99m 标记适体的生物分布

如图 2 所示将 Tc-99m 螯合剂 (Hi15:Hilger 等 (1998) Tet Lett39:9403-9406) 结合于寡核苷酸的 5' 末端检测适体的生物分布。Tc-99m 标记的适体形式示于图 10 中。TTA1 和 TTA1.NB 与 50mg/ml 的适体结合，该适体存在于含 5 摩尔当量 Hi_{15} -N-hydroxysuccinimide 的 30%二甲基甲酰胺中，并用 pH 9.0 的 100mM 硼酸钠在室温平衡 30 分钟。Tc-99m 标记形式的适体如图 10 所示。反相 HPLC 纯化产生 Hi_{15} -TTA1 和 Hi_{15} -TTA1.NB。接着以下列方式用 Tc-99m 标记寡核苷酸：1nmole Hi_{15} -适体中加入 200uL 100mM 磷酸钠缓冲液，pH8.5，23mg/mL 酒石酸钠，和从 Mo 99 柱子 (Symcor, Denver) 洗脱的，需在 12 小时内使用的 Tc-99m 高锝酸盐 (5.0mCi) 50uL。标记反应需另加 10uL 5mg/mL SnCl_2 启动。反应混合物 90℃孵育 15 分钟。通过截流分子量是 30,000 的膜 (Centrex, Schleicher&Scheull) 进行旋转透析，用 300uL 洗两次，将反应混合物与未反应的 Tc-99m 分离。这个标记过程使得 30-50%加入的 99m Tc 以 2-3mCi/nmoleRNA 的特定活性结合于寡核苷酸。

生物分布实验中，U251 肿瘤移植按如下方法制备：U251 细胞培养于的 Dulbecco 改良 Eagle 氏培养基中，其中添加了体积比是 10%的胎牛血清。给去除胸腺的小鼠皮下注射 1×10^6 U251 细胞。当肿瘤大小达到 200-300mg (1-2 周) 时，3.25mg/kg 静脉注射 Tc-99m

标记的适体。在指示的时间，用异氟醚麻醉小鼠（Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA），通过心脏穿刺收集血液，处死动物并收获组织。Tc-99m 水平用伽玛计数计算（Wallac Oy, Turku, Finland）。用每克组织注射剂量百分数计算组织摄取的适体（%ID/g）。

用伽玛摄像机获取小鼠影像。将麻醉（异氟醚）的小鼠放置于摄像机（西门子, LEM⁺）上。收集数据（30 秒-10 分钟）并在 Power MAC G3（苹果计算机, CA）上用版本 3.22.2 的核 MAC 软件（科学显影, CA）分析。

生物分布实验，如表 5，说明适体在肿瘤组织中的快速和特异摄取；肿瘤中没有残留的未结合的适体。血液中的 Tc-99m 同样被快速的清除掉了。三小时后，使用 Hi_{15} -TTA1 带入肿瘤中的 Tc-99m 水平半衰期很长（18 小时）。这说明一旦适体穿透进入肿瘤，偶联的标记物在肿瘤中保持较长时间。此数据显示与适体偶联的细胞毒性试剂，包括放射性核物质和非放射性试剂可以在肿瘤中以较长的半衰期存在。

Tc-99m 的放射性也在其它组织中出现，值得注意的是小肠和大肠。本领域熟练技术人员可以简易的改变本文所用的肝胆管清除模式，例如改变 Tc-99m 螯合剂的亲水性、改变螯合剂、或同时改变放射性金属/螯合剂的配对。

整个动物显影在注射 Tc-99m 标记的 Hi_{15} -TTA13 小时后可以获取。注射 Hi_{15} -TTA1 的小鼠的显影，而不是注射 Hi_{15} -TTA1.NB 的小鼠的显影，清楚的显示了肿瘤（图 3）。正如生物分布实验预测的，胃肠道中的放射性很明显。

实施例 5. 使用荧光标记的 TTA1 定位肿瘤组织中的髓生蛋白-C

材料和方法

TTA1 和 TTA1.NB 如上合成。SuccinimdyI 若丹明-Red-X(分子

探针, Eugene, OR)如上述连接于适体的 5' 氨基形成 H_{15} -NHS 偶联。用反相 HPLC 纯化若丹明-Red-X-偶联的适体, TTA1-Red 和 TTA1.NB-Red。U251 细胞的培养和肿瘤在裸鼠中的生长如上文所述。5nmol TTA1-Red 或 TTA1.NB-Red 静脉注射于裸鼠中并在预期时间麻醉动物, 灌注 0.9%NaCl, 再处死。切除肿瘤放置于福尔马林中。24 小时浸泡后, 切下 10uM 部分并用荧光显微镜检测若丹明-Red-X (Eclipse E800, 尼康, 日本)。

结论: TTA1-Red 与 5nM 未结合的原始适体, TTA1 有相同的腱生蛋白-C 亲和力。我们比较注射 TTA1-Red 和 TTA1.NB-Red 10 分钟后的肿瘤荧光水平。结合的适体, TTA1-Red, 使肿瘤而不是邻近组织有强烈的荧光着色(图 4)。这些结果说明应用适体进行体内腱生蛋白-C 荧光检测, 相同的适体可以用于回体组织染色。

实施例 6. 用适体 TTA1 (现已知为 GS7641) 进行肿瘤的体内检测: 其它肿瘤类型。

适体标记、生物分布, 和裸鼠肿瘤移植物的操作如实施例 4 所述。

已知许多人类肿瘤表达腱生蛋白-C。为了评定 TTA1/GS7641 进入除胶质母细胞瘤之外的其它肿瘤的能力, 在裸鼠中种植人肿瘤细胞形成肿瘤。检测肿瘤组织人腱生蛋白-C 的表达, 并检测表达腱生蛋白-C 的肿瘤对适体的摄取。图 6 显示适体在几种肿瘤中的摄取情况, 包括胶质母细胞瘤、乳腺癌、结肠癌, 和横纹肌肉瘤。通过比较结合 (TTA1/GS7641) 和不能结合的适体 (TTA1.NB) 说明肿瘤的特异性摄取。要注明的是 KB, 表达小鼠而不是人腱生蛋白-C 的移植物, 并没有摄取。本实验将胶质母细胞瘤的摄取实验结果扩展到其它肿瘤和肉瘤, 并进一步说明所有表达人腱生蛋白-C 的肿瘤均显示有 TTA1/GS7641 的摄取。

实施例 7. 选用 In-111 进行标记

实施例 4 中描述了肿瘤异种移植和生物分布研究。DTPA 和 DOTA 中的环酐与 TTA1/GS7641 上的氨基在中性 pH 条件下用标准方法孵育, 把 DTPA 和 DOTA 耦联于 TTA1/GS7641。DTPA 和结合物的结构分别见图 8 和图 9 所示, 其中每一种都用 In-111 标记。DOTA 结合物与 DTPA 结合物的接头相同。DOTA-和 DTPA-复合物与 In-111 在 95°C, pH5.5, 0.5M 的 NaOAc 中孵育 30 分钟, 进行标记。用 30K 截留膜旋转透析去除未结合的放射性标记物, 标记好的适体溶于磷酸盐缓冲液, 注射荷瘤小鼠。

In-111 标记适体与实施例 4 中描述的 Tc 标记适体相比, 其生物分布显著不同。图 7 显示 In-111 标记的 TTA1/GS7641 与 Tc-99m 标记的 TTA1/GS7641 相比, 其放射活性在小肠中大大减少, 在肝脏和肾脏中的吸收共同增加。这个实验表明在动物体内螯合物的化学特性对 TTA1/GS7641 放射标记物的分布有很大影响。与 Hi15-TTA1/GS7641 的生物分布方式不同, 在某些不需要肝胆清除的临床情况下, 可能用于肿瘤的打靶。这些情况包括但不只限于放疗和小肠、前列腺和其它腹区的成像。

表 1. 腱生蛋白-C SELEX RNA 和蛋白投入

	腱生蛋白-C	RNA
循环	(皮摩尔/孔)	(皮摩尔/孔)
1	12	200
2	12	200
3	12	200
4	12	200
5	2	33
6	2	33
7	2	33
8	0.2	3.3

表 2. 细胞 SELEX/腱生蛋白-C SELEX RNA 和蛋白投入

	腱生蛋白-C	RNA
循环	(皮摩尔/孔)	(皮摩尔/孔)
E9P1	2	33
E9P2	2	33

表3续

TN20	28	gggaggacgaugcgg	UCGACCUCGAAUGACUCUCCACCUAUUAACAGCCUUC	cagacgacucgccccga	>10 uM
TN51	29	gggaggacgaugcgg	AGAACUCAUCCUAACCGCUCUAACAAUUCUUGUCCGACCG	cagacgacucgccccga	110 nM
TN8	30	gggaggacgaugcgg	AUAUUUGACACCAACCGAGGUCGCGGAAUAUCCUCUG	cagacgacucgccccga	
TN27	31	gggaggacgaugcgg	AAACCAACCGUUGACAC CUUUCGUUUCGGAAGUCCC	cagacgacucgccccga	
TN39	32	gggaggacgaugcgg	AAAGCAACCCUCUAGUCAGCCUUCGUUUCGACGCC	cagacgacucgccccga	10 nM
TN24	33	gggaggacgaugcgg	9ACCAACUAACUGUUGGAAAGCUGGAACAUGUCCUGACGC	cagacgacucgccccga	
TN5	34	gggaggacgaugcgg	ACCAACUAACUGUUGGAAAGCUGGAACAUGUCCUGACGC	cagacgacucgccccga	
TN36	35	gggaggacgaugcgg	ACCAACUAACUGUUGGAAAGCUGGAACAUGUCCUGACGC	cagacgacucgccccga	
TN6	36	gggaggacgaugcgg	ACCAACUAACUGUUGGAAAGCUGGAACAUGUCCUGACGC	cagacgacucgccccga	
TN10	37	gggaggacgaugcgg	ACCAACUAACUGUUGGAAAGCUGGAACAUGUCCUGACGC	cagacgacucgccccga	
TN1	38	gggaggacgaugcgg	AAGUUUA GUGCUCAGUUCGACACUCCUCUACUCAGGCC	cagacgacucgccccga	>10 uM
TN109	39	gggaggacgaugcgg	AGCCAGAGCCUCUcUcAGUUCUaCAGAACUuACCCACUGG	cagacgacucgccccga	
TN110	40	gggaggacgaugcgg	ACCUAACUCAAUACAGGAACCAACCUAGCACUCUCAUGGC	cagacgacucgccccga	

U251 SELEX 适体, EDTA 洗脱 (E9)

E9-8 (3)	41	gggaggacgaugcgg	GAGAUCAACAUAUCCUCUAGUUUGGUUCCAACCUACACCCC	cagacgacucgccccga	
E9-15	42	gggaggacgaugcgg	AUCUCGAUCCUUCAGCACUUCAUUUCAUUUCCUUUcUGCCC	cagacgacucgccccga	
E9-6	43	gggaggacgaugcgg	ACGAUCCUUUCCUUA CAUUUCAUAUUUCUUGUGCCC	cagacgacucgccccga	
E9-5 (2)	44	gggaggacgaugcgg	UGACGACAAACUCGACUG CAUAUCUACAAACUCCUGUGCCC	cagacgacucgccccga	
E9-3 (6)	45	gggaggacgaugcgg	ACUAGACCGCGAGUC CAUUCAACUUGCCCCAAACCUCUCCC	cagacgacucgccccga	
E9-9	46	gggaggacgaugcgg	GGCAUCGAGCAACAUCGGAUUCGGAUUCUCCUCCACUCCCC	cagacgacu gccccga	

表4. 2'-OMe取代, 内部缺失, TTA1和TTA1.NB

序列	SEQ ID NO:	Kd
TN9.3	47	>10 uM
TN9.4	48	2 nM
TN9.4M1	49	6 nM
TN9.4M2	50	20 nM
TN9.4M3	51	7 nM
TN9.4M4	52	nb
TN9.4M5	53	4 nM
TN9.4Me	54	10 nM

6=mG; 7=mA; 5=3'3'帽, 1=己胺

相II. 2'-OMe亲和性

TN9.4M1235	55	16667667C67U6C6677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	16.5 nM
TN9.4M135G6	56	1666766ACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	2.2 nM
TN9.4M135A7	57	166676G7CGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	1.7 nM
TN9.4M135G9	58	166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	7.7 nM
TN9.4M135A10	59	166676GACG7UGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	1.3 nM
TN9.4M135G12G14	60	166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	2.5 nM
TN9.4M135G28	61	166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	37 nM
TN9.4M135G31	62	166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	55 nM
TN9.4M135G34	63	166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	7 nM
TTA1:	64	5'-1G667667CG-(CH ₂ CH ₂ O) ₆ -CGUCGCCGU77U667U6UUU6CUCCCU65	5 nM
TTA1.NB:	65	5'-1G667667CG-(CH ₂ CH ₂ O) ₆ -CGUCGCCGU77U667U6UUU6CU5	>5 uM

表5. Tc-99m-TTA1和-TTA.NB的生物分布

	min	TTA1	TTA1.NB		min	TTA1	TTA1.NB
肿瘤	2	4.470 ± 0.410	4.510 ± 0.300	肾	2	44.430 ± 4.280	54.470 ± 1.210
	10	5.940 ± 0.590	3.020 ± 0.210		10	18.810 ± 0.940	14.320 ± 2.080
	60	2.689 ± 0.310	0.147 ± 0.018		60	1.514 ± 0.040	0.637 ± 0.111
	180	1.883 ± 0.100	0.043 ± 0.004		180	0.288 ± 0.028	0.221 ± 0.021
	570	1.199 ± 0.086	0.018 ± 0.001		570	0.140 ± 0.008	0.100 ± 0.013
	1020	1.150 ± 0.060	N/A		1020	0.081 ± 0.005	N/A
血液	2	18.247 ± 1.138	15.013 ± 0.508	小肠	2	3.690 ± 0.250	3.120 ± 0.100
	10	2.265 ± 0.245	2.047 ± 0.195		10	7.010 ± 0.070	8.440 ± 0.250
	60	0.112 ± 0.003	0.102 ± 0.019		60	15.716 ± 2.036	14.849 ± 0.532
	180	0.032 ± 0.001	0.034 ± 0.003		180	1.479 ± 0.710	1.243 ± 0.405
	570	0.013 ± 0.001	0.011 ± 0.001		570	0.219 ± 0.147	0.159 ± 0.067
	1020	0.006 ± 0.001	N/A		1020	0.280 ± 0.243	N/A
肺	2	8.970 ± 1.210	8.130 ± 0.960	大肠	2	2.340 ± 0.240	2.280 ± 0.180
	10	2.130 ± 0.080	1.940 ± 0.230		10	0.890 ± 0.040	0.770 ± 0.070
	60	0.157 ± 0.011	0.120 ± 0.005		60	10.799 ± 5.381	21.855 ± 11.676
	180	0.048 ± 0.008	0.041 ± 0.003		180	28.182 ± 7.839	18.023 ± 3.485
	570	0.028 ± 0.008	0.017 ± 0.002		570	1.263 ± 0.706	0.716 ± 0.179
	1020	0.007 ± 0.001	N/A		1020	0.298 ± 0.167	N/A
肝	2	9.120 ± 0.530	7.900 ± 0.350	肌肉	2	1.270 ± 0.130	1.490 ± 0.050
	10	12.460 ± 1.250	9.100 ± 0.830		10	0.870 ± 0.090	1.840 ± 1.000
	60	1.234 ± 0.091	0.423 ± 0.095		60	0.084 ± 0.003	0.050 ± 0.004
	180	0.401 ± 0.084	0.211 ± 0.059		180	0.016 ± 0.002	0.011 ± 0.001
	570	0.104 ± 0.017	0.058 ± 0.003		570	0.011 ± 0.002	0.007 ± 0.001
	1020	0.075 ± 0.003	N/A		1020	0.003 ± 0.0003	
脾	2	5.100 ± 0.410	4.860 ± 0.130				
	10	2.460 ± 0.210	1.220 ± 0.120				
	60	0.643 ± 0.076	0.110 ± 0.015				
	180	0.198 ± 0.026	0.036 ± 0.005				
	570	0.062 ± 0.004	0.020 ± 0.001				
	1020	0.030 ± 0.003	N/A				

序列表

<110> 耐克斯达制药公司

<120> 腱生蛋白-C 核酸配体

<130> NEX 86/PCT

<140>

<141>

<150> 09/364,902

<151> 1999-07-29

<160> 65

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(56)

<223> 在 17-56 位的 N 是 A, C, T, 或 G

<400> 1

```
tcgcgcgagt cgtctgnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnccgc 60
atcgtcctcc c 71
```

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<400> 2

```
taatacgact cactataggg aggacgatgc gg
```

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<400> 3

tcgcgcgagt cgtctg

16

<210> 4

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 4

gggaggacga ugcggcaauc aaaacucacg uuauucccuc aucuauuagc uuccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 5

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 5

gggaggacga ugcggcaauc uccgaaaaag acucuuccug cauccucuca cccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 6

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 6

gggaggacga ugcggcaacc ucgaaagacu uuucccgcau cacuguguac uccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 7

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 7

gggaggacga ugcggcaacc ucgauagacu uuucccgcau cacuguguac uccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 8

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 8

gggaggacga ugcggcaacc ucaaucuuga cauuucccg accuaaaauu gccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 9

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 9

gggaggacga ugcggcaaac gaucacuuac cuuuccugca ucugcuagcc uccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 10

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 10

gggaggacga ugcggacgcc agccauugac ccucguucc acuaauccau cccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 11

<211> 70

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (70)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 11

ggaggacga ugcggccaac cucauuuuga cacuucgccg caccuaauug cccccagacg 60
acucgcccgga 70

<210> 12

<211> 15

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (15)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (15)

<223> 在 4 和 10 位的 N 是 A, G, 2'-F-U 或 2'-F-C

<400> 12

gacnyuuccn gcayc

15

<210> 13

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 13

gggaggacga ugcggaaccc auaacgcgaa ccgaccaaca ugccucccg gccccagac 60
gacugcccg a 71

<210> 14

<211> 70

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (70)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 14

gggaggacga ugcggugccc auagaagcgu gccgcuaaug cuaacgccc cccccagacg 60
acucgcccga 70

<210> 15

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 15

gggaggacga ugcggugccc acuaugcgug ccgaaaaaca uuucccccuc uaccccagac 60
gacugcccg a 71

<210> 16

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 16

```
gggaggacga ugcggaacac uuucccaugc gucgccauac cggauauauu gcucccagac 60
gacucgccccg a 71
```

<210> 17

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 17

```
gggaggacga ugcggacugg accaaaccgu cgccgauacc cggauacuuu gcucccagac 60
gacucgccccg a 71
```

<210> 18

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 18

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccugcagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 19

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 19

gggaggacga ugcgguuaag ucucgguuga augcccaucc cagaucaccc ugacccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 20

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 20

gggaggacga ugcggauggc aagucgaacc aucccccacg cuucuccugu ucccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 21

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 21

gggaggacga ugcgggaagu uuucucugcc uugguuucga uggcgccuc cccccagac 60
gacugccccg a 71

<210> 22

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 22

gggaggacga ugcggucgag cggucgaccg ucaacaagaa uaaagcgugu ccugcagac 60
gacugccccg a 71

<210> 23

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 23

gggaggacga ugcggauggc aagucgaacc aucccccacg cuucuccugu ucccccagac 60

gacucgcccg a

71

<210> 24

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (76)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 24

gggaggacga ugcggacuag accgcgaguc cauucaacuu gcccaaaaaa aaaccucccc 60
cagacgacuc gcccga 76

<210> 25

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 25

gggaggacga ugcgggagau caacauuccu cuaguuggu uccaaccuac acccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 26

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F.

<400> 26

gggaggacga ugcggacgag cgucucauga ucacacuaau ucgucucagu ggcacagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 27

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 27

gggaggacga ugcggucgac cucgaaugac ucuccaccua ucuaacauc cccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 28

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 28

gggaggacga ugcggucgac cucgaaugac ucuccaccua ucuaacagcc uccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 29

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 29

```
gggaggacga ugcggagaac ucauccuaac cgcucuaaca aaucuugucc gaccgcagac 60
gacucgccccg a 71
```

<210> 30

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 30

```
gggaggacga ugcggauaau ucgacaccaa ccaggucccg gaaaucaucc cucugcagac 60
gacucgccccg a 71
```

<210> 31

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 31

gggaggacga ugcggaacc aaccguugac caccuuuucg uuuccgaaa guccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 32

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 32

gggaggacga ugcggaagcc aaccucucag ucagccuuuc guuucccacg ccacccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 33

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (72)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 33

gggaggacga ugcgggacca acuaaacugu ucgaaagcug gaacaugucc ugacgccaga 60
cgacucgccc ga 72

<210> 34

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 34

gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcugg aacacguccu gacgccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 35

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 35

gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcuag aacacgucca gacgccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 36

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 36

gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcugg aacacguucu gacgccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 37

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 37

gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcugg aaucguccu gacgccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 38

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 38

gggaggacga ugcggaaguu uagugucca guuccgacac uccucuacuc agccccagac 60
gacucgccc a 71

<210> 39

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 39

gggaggacga ugcggagcca gagccucucu caguucuaca gaacuuaccc acuggcagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 40

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 40

gggaggacga ugcggaccua acucaaucag gaaccaaacc uagcacucuc auggccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 41

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 41

gggaggacga ugcgggagau caacauuccu cuaguuggu uccaaccuac acccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 42

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 42

gggaggacga ugcggaucuc gaucuuucag cacuucauuu cauuccuuuc ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 43

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 43

gggaggacga ugcggacgau ccuuuccuua acauuucauc auuucucuug ugccccagac 60
gacucgcccg a 71

<210> 44

<211> 71

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(71)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 44

gggaggacga ugcggugacg acaacucgac ugcauauuc acaacuccug ugccccagac 60
gacucgccccg a 71

<210> 45

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(72)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 45

gggaggacga ugcggacuag accgcgaguc cauucaacu gcccacaaac cuccccaga 60
cgacucgccc ga 72

<210> 46

<211> 70

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(70)

<223> 所有嘧啶均是 2' F

<400> 46

gggaggacga ugcgggcgca ucgagcaaca uccgauucgg auuccuccac uccccagac 60
gacugcccga 70

<210> 47

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(50)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 50 和 51 位的键是 3'-3'.

<400> 47

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu

50

<210> 48

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 48

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug

55

<210> 49

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5 和 55 的 g 是 2' OMe;
位置 4 的 a 是 2' OMe; 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 49

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 50

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 6, 9, 12 和 14 的 g 是 2' OMe;
位置 7 和 10 的 a 是 2' OMe; 位的键是 3'-3'.

<400> 50

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 51

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 15 和 22 的 g 是 2' OMe;
位置 16-17, 19-20 和 24 的 a 是 2' OMe; 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 51

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 52

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 38, 41 和 44 的 g 是 2' OMe;
55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 52

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 53

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 39-40, 43 和 48 的 g 是 2' OMe;
位置 36-37 和 41 的 a 是 2' OMe; 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 53

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 54

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5-6, 9, 12, 14-15, 22, 28, 31, 34,
39-40, 43, 48 和 55 的 g 是 2' OMe.

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (55)

<223> 位置 7, 10, 16-17, 19-20, 24, 36-37, 和 41 的 a 是 2' OMe;

55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 54

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 55

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5-6, 9, 12, 14-15, 22, 39-40, 43, 48 和 55 的 g 是 2' OMe; 位置 4, 7, 10, 16-17, 19-20, 24-36-37, 40 的 a 是 2' OMe.

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 55

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 56

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5-6, 15, 22, 39-40, 43, 48 和 55 的 g 是 2' OMe; 位置 4, 16-17, 19-20, 24 36-37 和 40 的 a 是 2' OMe; 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 56

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 57

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5, 15, 22, 39-40, 43, 48, 55 的 g 是 2' OMe;
位置 4, 7, 16-17, 19-20, 24, 36-37, 40 的 a 是 2' OMe; 55, 56 位的键是 3'-3'.

<400> 57

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 58

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220> -

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5, 9, 15, 22,
39-40, 43, 48, 55 的 g 是 2' OMe; 位置 4, 16-17,
19-20, 24, 36-37, 41 的 a 是 2' OMe; 55, 56 位的键是 3'-3'.

<400> 58

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 59

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5, 15, 22,
39-40, 43, 48 和 55 的 g 是 2' OMe; 位置 4, 10,
16-17, 19-20, 24, 36-37, 和 41 的 a 是 2' OMe;
55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 59

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 60

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基 -

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5, 12, 14-15,
22, 39-40, 43, 48 和 55 的 g 是 2' OMe; 位置 4,
16-17, 19-20, 24, 36-37 和 41 的 a 是 2' OMe; 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 60

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 61

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 6, 15, 22,
28, 39-40, 43, 48, 和 55 的 g 是 2' OMe; 位置 4,
16-17, 19-20, 24, 36-37 和 40 的 a 是 2' OMe; 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 61

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 62

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5, 15, 22,
39-40, 43, 48 和 55 的 g 是 2' OMe; 位置 4, 16-17,
19-20, 27, 36-37 和 40 的 a 是 2' OMe; 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 62

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 63

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1)..(55)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 1-3, 5, 15, 22,
39-40, 43, 48 和 55 的 g 是 2' OMe; 位置 4, 16-17,
19-20, 24, 36-37, 和 40 的 a 是 2' OMe; 55 和 56 位的键是 3'-3'.

<400> 63

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

<210> 64

<211> 39

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (39)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 2-3, 5-6, 23-24, 27, 32, 和 39 的 g 是 2' OMe;
位置 4, 7, 20-21, 和 25 的 a 是 2' OMe;.

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (39)

<223> 39 和 40 位的键是 3'-3'.

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (39)

<223> 在 10 位的 N 是 (CH₂CH₂O)₆

<400> 64

gggaggacgn cgucgccgua auggauguuu ugcucccug

39

<210> 65

<211> 34

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 核酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (34)

<223> 所有嘧啶均是 2' F; 位置 2-3, 5-6, 23-24, 27 和 32 的 g 是 2' OMe;
位置 4, 7, 20-21, 和 25 的 a 是 2' OMe

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (34)

<223> 在 10 位的 N 是 (CH₂CH₂O)₆

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (1).. (34)

<223> 34 和 35 位的键是 3' - 3'

<400> 65

gggaggacgn cgucgccgua auggauguuu ugcu

34

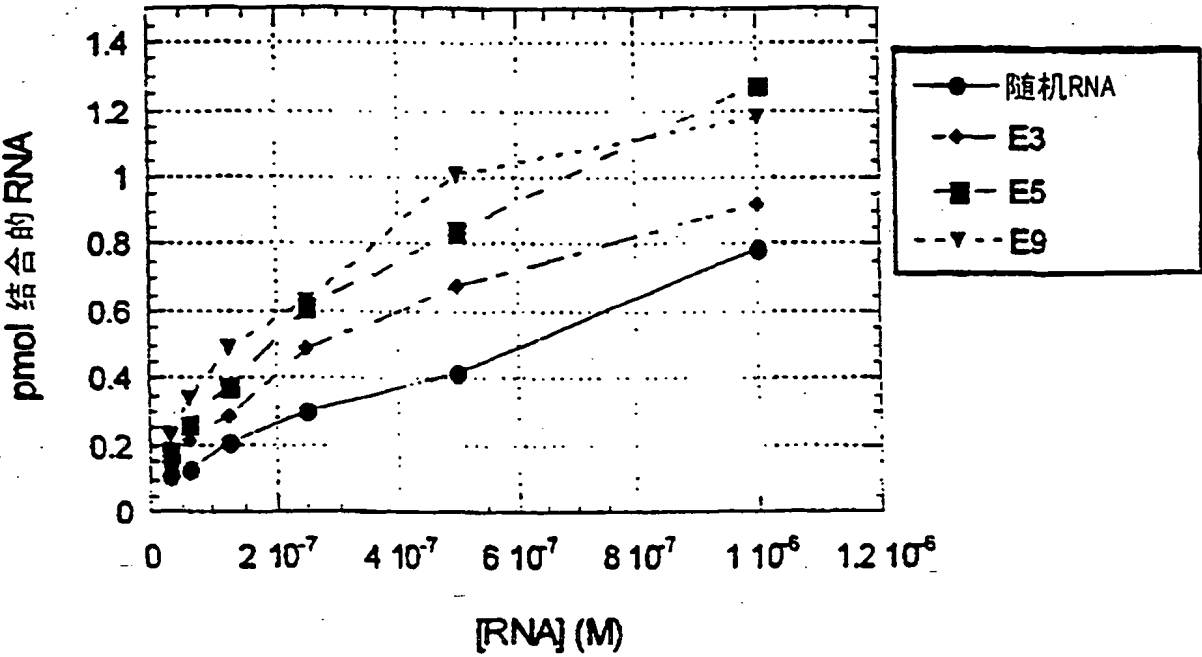


图1

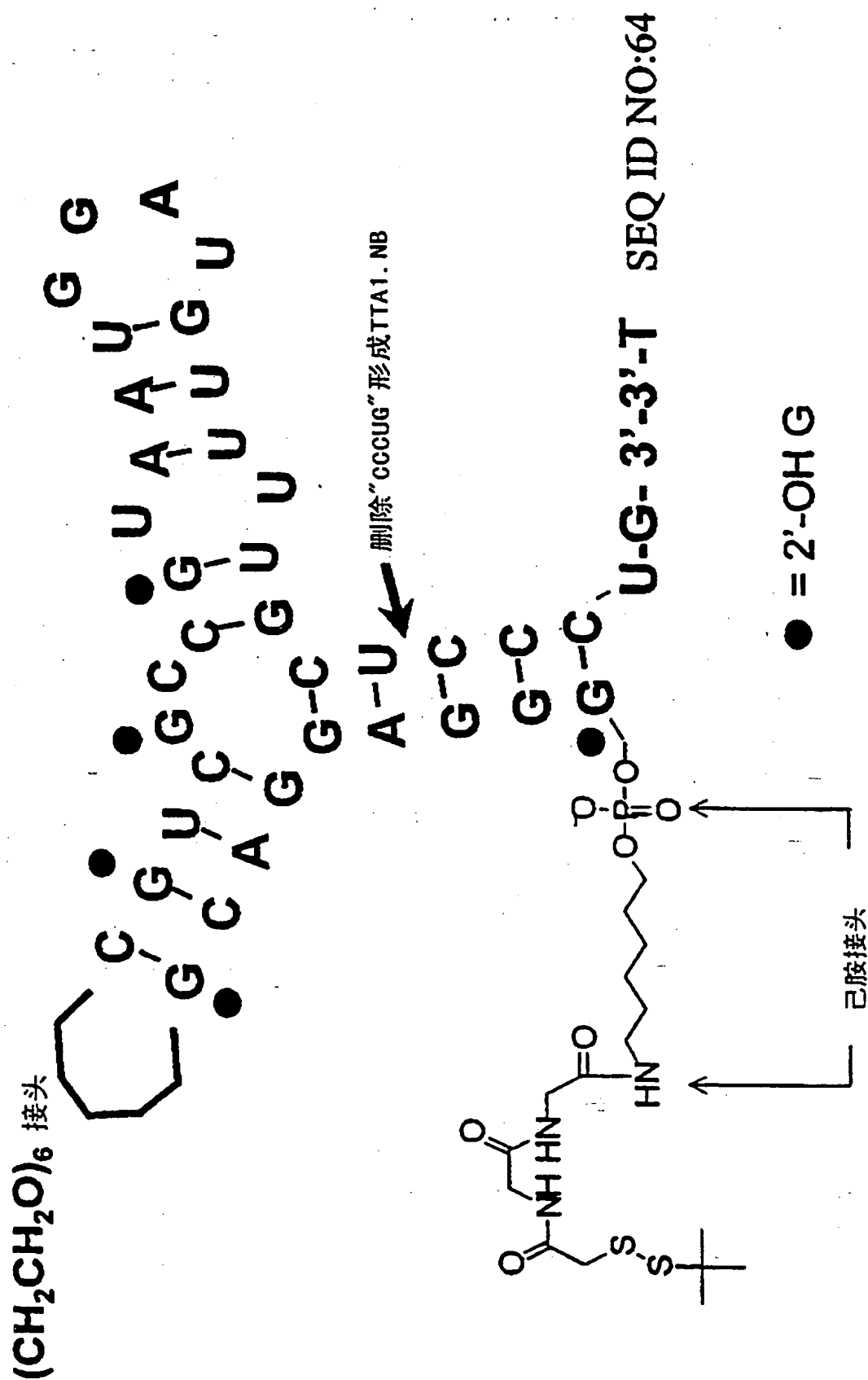


图2

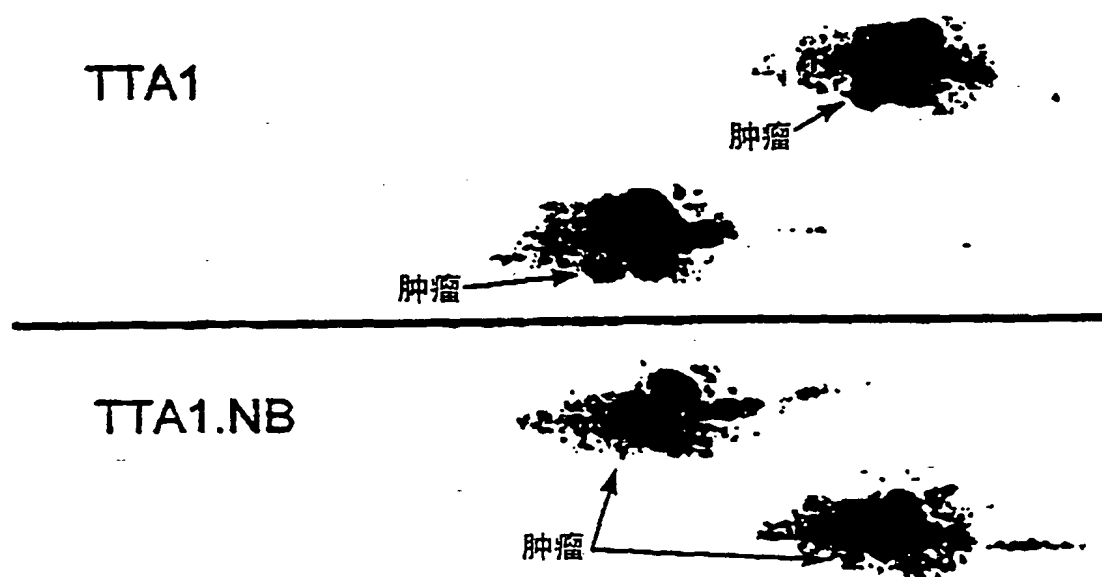


图3



4
图

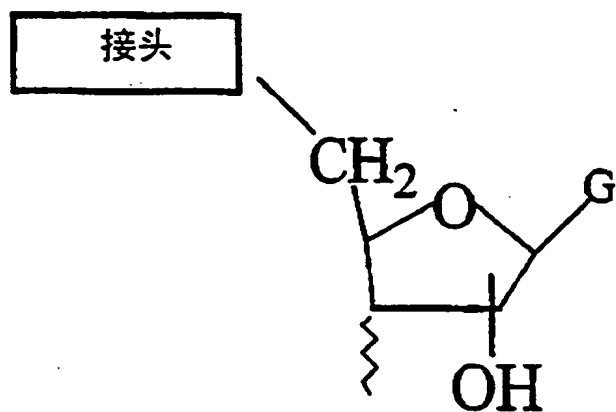


图5

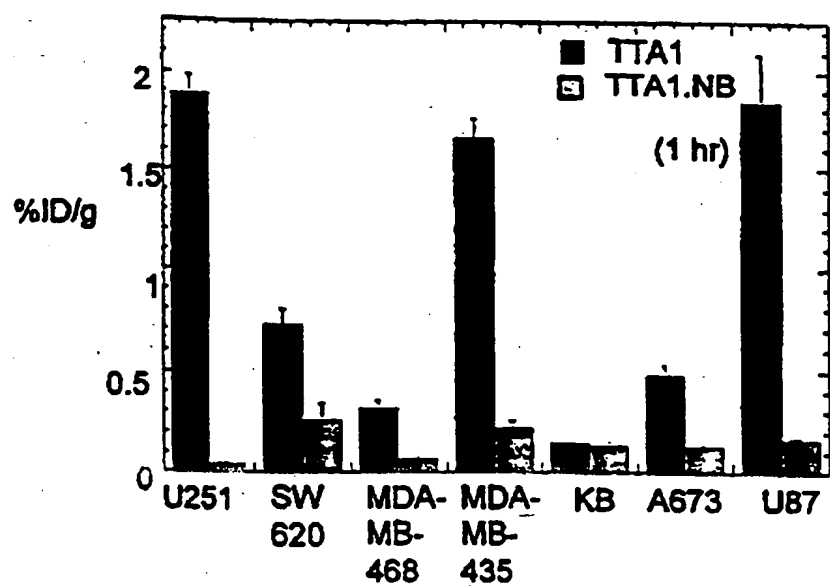


图6

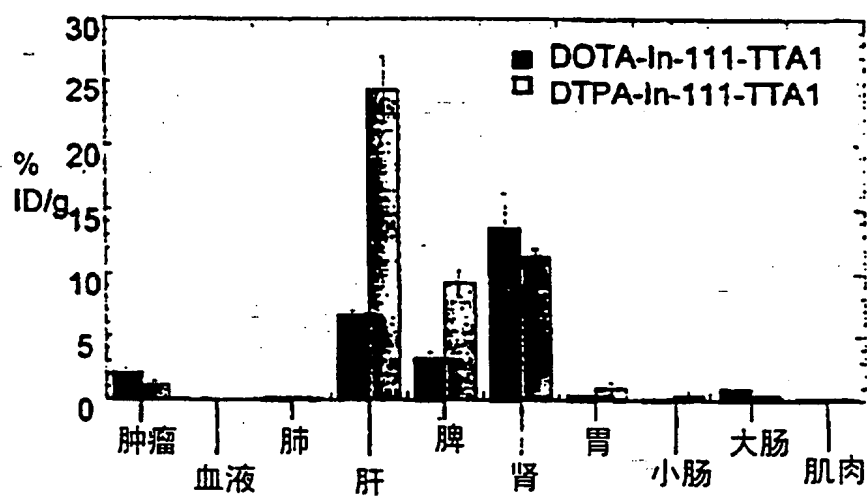


图7

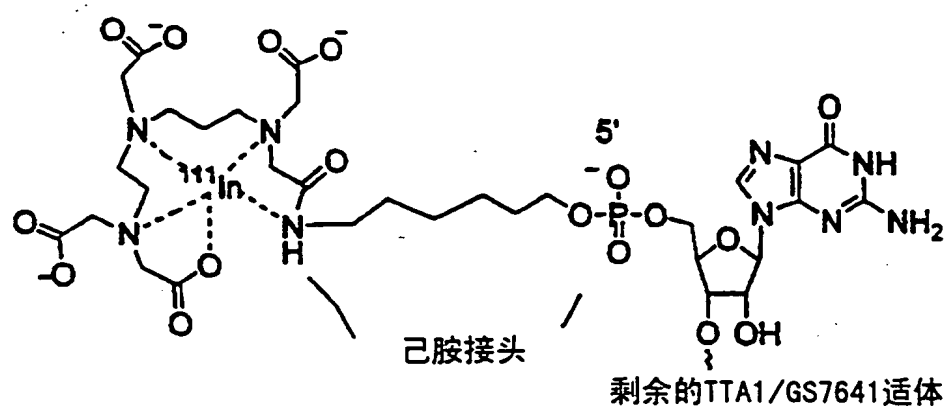


图8

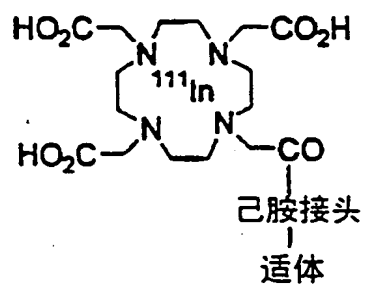
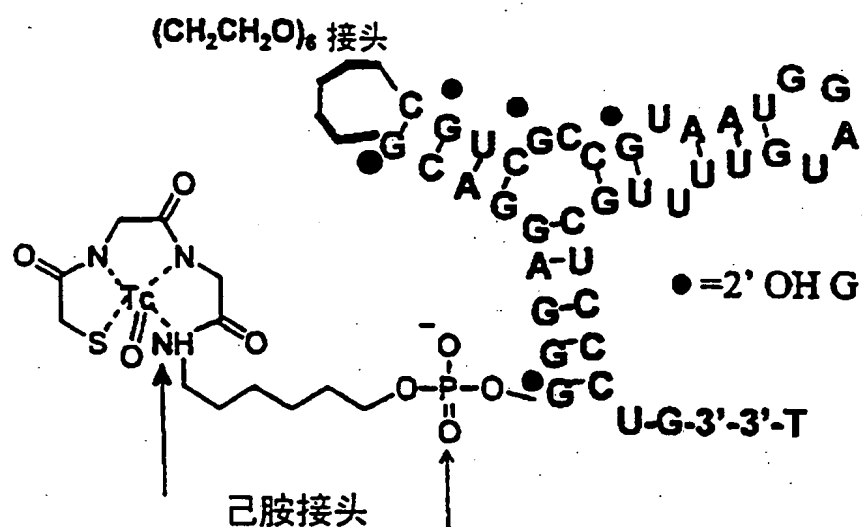


图9



所有的A=2' -OMe

除非说明, 所有的G是2' -OMe修饰

所有的C是2' -F修饰

所有的U是2' -F修饰

图10