



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102971424 A

(43) 申请公布日 2013.03.13

(21) 申请号 201180025929.4 *A61K 31/7125*(2006.01)  
(22) 申请日 2011.05.23 *A61P 19/10*(2006.01)  
(30) 优先权数据 *A61P 19/08*(2006.01)  
61/349058 2010.05.27 US  
(85) PCT申请进入国家阶段日  
2012.11.26  
(86) PCT申请的申请数据  
PCT/CN2011/000879 2011.05.23  
(87) PCT申请的公布数据  
W02011/147193 EN 2011.12.01  
(71) 申请人 香港大学  
地址 中国香港薄扶林道  
(72) 发明人 J. A. 坦纳 沈家滔 S. C. 陈  
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001  
代理人 杜艳玲 权陆军  
(51) Int. Cl.  
*C12N 15/115*(2006.01)  
*A61K 31/711*(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页  
序列表 6 页 附图 5 页

(54) 发明名称  
针对硬骨素蛋白质的高亲和力核酸适配体

(57) 摘要

描述的是能够与硬骨素结合且抑制硬骨素功能的核酸适配体,所述硬骨素是骨生长的重要负调节物。适配体具有作为用于骨疾病的疗法的应用,所述骨疾病包括骨质疏松症、骨质减少、骨关节炎及其他骨质疏松症相关状况和并发症。

1. 一种组合物,其包含:  
包含具有序列 5'-GGXGGXXGGXTGGG-3' (SEQ ID NO:1) 的寡核苷酸的 DNA 适配体或其盐,  
其中所述适配体抑制硬骨素,  
优选地,所述适配体具有约 14 - 约 50 个核苷酸重复单位;  
优选地,所述适配体与选自脱氧胸苷核苷酸、反向胸苷和聚乙二醇的一种或多种缀合;  
优选地,所述适配体是具有由脱氧核糖 - 磷酸键构成的主链的寡核苷酸;  
优选地,所述适配体是具有通过选自硫酯键和酰胺键中的一种或多种稳定的一个或多个脱氧核糖 - 磷酸键的寡核苷酸;  
优选地,所述适配体具有平行的 G- 四链体结构。
2. 一种能够结合硬骨素的适配体,所述适配体选自包含下述序列之一的组:  
5'-GTTTCAAAGCCGGGGGGGTGGGATGGGTT-3' (SEQ ID NO: 2) (Scl 1);  
5'-TTGCGCGTTAATTGGGGGGGTGGGTTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 3) (Scl 2);  
5'-TGCCTTGTTATTGTGGTGGGCGGGTGGGAC-3' (SEQ ID NO: 4) (Scl 3);  
5'-GGGGGGGGTGGGGTGGGTCAATATTCTCGTC-3' (SEQ ID NO: 5) (Scl 4);  
5'-TTGCGCGTTAATTGGGGGGGTGGGTTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 6) (Scl 5);  
5'-CCCTCAAAGCCGGGGGGGGTGGGTGGGCAG-3' (SEQ ID NO: 7) (Scl 6); 和  
5'-TTCTGTCACATGTGGGGGGGGGGTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 8) (Scl 7),  
或 SEQ ID NOS:2-8 之一的变体。
3. 权利要求 2 的适配体,其中所述适配体与选自脱氧胸苷核苷酸、反向胸苷和聚乙二醇中的一种或多种缀合。
4. 权利要求 3 的适配体,其中所述适配体在 3' 末端与选自脱氧胸苷核苷酸、反向胸苷和聚乙二醇中的一种或多种缀合。
5. 权利要求 2 的适配体,其中所述适配体是具有由脱氧核糖 - 磷酸键构成的主链的寡核苷酸。
6. 权利要求 2 的适配体,其中所述适配体是具有通过选自硫酯键和酰胺键中的一种或多种稳定的一个或多个脱氧核糖 - 磷酸键的寡核苷酸。
7. 权利要求 2 的适配体,其中所述适配体具有平行的 G- 四链体结构。
8. 用于治疗其中硬骨素引起不希望的病理学效应的骨相关疾病、病症或状况的权利要求 1 的组合物或根据权利要求 2-7 中任一项的适配体,所述治疗包括:给个体施用权利要求 1 的组合物和或根据权利要求 2-7 中任一项的适配体,其中所述个体需要用于其中硬骨素引起不希望的病理学效应的骨相关疾病、病症或状况的治疗,  
优选地,其中所述组合物进一步包含药学载体。
9. 权利要求 8 的组合物或适配体,其中所述适配体选自具有下述序列之一的寡核苷酸:

5'-GTTTCCAAAGCCGGGGGGGTGGGATGGGTT-3' (SEQ ID NO: 2) (Scl 1);  
5'-TTGCGCGTTAATTGGGGGGGTGGGTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 3) (Scl 2)  
5'-TGCCTTGTTATTGTGGTGGGCGGGTGGGAC-3' (SEQ ID NO: 4) (Scl 3);  
5'-GGGGGGGGTGGGGTGGGTCAATATTCTCGTC-3' (SEQ ID NO: 5) (Scl 4);  
5'-TTGCGCGTTAATTGGGGGGGTGGGTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 6) (Scl 5);  
5'-CCCTCCAAAGCCGGGGGGGTGGGTGGGCAG-3' (SEQ ID NO: 7) (Scl 6); 和  
5'-TTCTGTCACATGTGGGGGGGGGGTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 8) (Scl 7),

或 SEQ ID NOS :2-8 之一的变体。

10. 权利要求 9 的组合物或适配体,其中所述适配体在 3' 末端与选自脱氧胸苷核苷酸、反向胸苷和聚乙二醇中的一种或多种缀合;

优选地,所述适配体是具有由脱氧核糖 - 磷酸键构成的主链的寡核苷酸;

优选地,所述适配体是具有通过选自硫酯和酰胺键中的一种或多种稳定的一个或多个脱氧核糖 - 磷酸键的寡核苷酸;

优选地,所述骨相关疾病、病症或状况包含选自下述中的至少一种:骨质疏松症、骨质减少、骨关节炎、骨软化、骨营养不良、骨骨髓瘤、骨折、Paget's 病、成骨不全、骨硬化、发育不全型骨病症、体液血钙过高性骨髓瘤、多发性骨髓瘤和骨变薄;

优选地,所述骨相关疾病、病症或状况包含骨质疏松症。

## 针对硬骨素蛋白质的高亲和力核酸适配体

### [0001] 与相关申请的交叉参考

本申请要求于 2010 年 5 月 27 日提交的临时申请系列号 61/349, 058 的优先权, 其引入本文作为参考。

### [0002] 技术领域

本文描述的是针对硬骨素的新核酸适配体(适配体), 硬骨素是骨生长的细胞外负调节物。公开的适配体有希望直接刺激骨形成且用于治疗骨疾病例如骨质疏松症的疗法。

### [0003] 背景技术

核酸适配体是能够结合且抑制蛋白质功能的体外演化的核酸。

[0004] 在过去 20 年已开发核酸适配体, 以开发针对多种靶的治疗适配体用于许多疾病, 尤其包括黄斑变性、HIV、癌症、心血管疾病。由 Gilead Sciences 发现, 授权给 Eyetech Pharmaceuticals 且通过 Pfizer 在美国外销售的一种适配体, 培加尼布(MACUGEN) 在临床上用于治疗黄斑变性。其他基于适配体的药物在针对凝血因子、生长因子、炎症标记及其他靶的临床试验中。就我们所知, 仍未开发与骨质疏松症有关的适配体。

[0005] 骨质疏松症在全世界具有显著的医学和经济影响。在发达国家, 约 4% 的人口具有骨质疏松症, 并且单独对于美国的经济负荷已估计在每年 \$140 亿。目前, 目前在临床中使用的大多数药物试剂是基于二磷酸盐的抗吸收剂, 包括阿屈膦酸盐(alendronate, FOSAMAX)、利塞膦酸盐(risedronate, ACTONEL) 或伊班膦酸盐(ibandronate, BONIVA)。

[0006] 已确立的药物试剂可以在控制骨量中略微有效, 但它们具有许多缺点, 包括弱口腔吸收、食管炎和颞的骨坏死。因此, 存在朝向刺激骨形成的促合成剂(anabolic agents) 的进展, 所述骨形成会潜在地加速骨生长。近来, 特立帕肽(重组甲状旁腺激素, FORTEO) 被批准作为进入临床的第一种促合成剂, 但存在关于 FORTEO 仅在前 12 个月治疗过程中有效重塑骨并且随后功效下降的一些关注。

[0007] 硬骨素是骨形成的骨细胞特异性负调节物, 这使得其成为用于骨质疏松症治疗的有吸引力的药物靶。Amgen 在开发用于骨质疏松症治疗的针对硬骨素的基于蛋白质的抗体(人临床 2 期)。Novartis 和 Eli Lilly 也在开发硬骨素阻断抗体(临床前)。OsteogeneX 在开发针对硬骨素的小分子抑制剂, 其目前在临床前和先导优化中。

[0008] 抗体一般具有许多局限性, 包括免疫应答的危险, 分批间变异和有限的保存期限。小分子具有结合亲和力和特异性的明显问题。

### [0009] 概述

本发明提供了在本文中称为“硬骨素适配体”, 与蛋白质硬骨素结合的适配体, 包括其制剂和 / 或组合物, 和关于使用此类硬骨素适配体用于治疗和预防骨质疏松症及其他相关骨疾病的方法。

[0010] 本发明提供了可替代的分子方法, 其通过抑制硬骨素功能来刺激骨生长, 并且对于骨质疏松症及其他相关疾病具有更少的副作用。这随着特异性且有效地靶向且抑制硬骨素的核酸适配体的开发得到解决。本发明具体涉及能够与硬骨素结合且抑制硬骨素功能的适配体, 所述硬骨素是骨生长的重要负调节物且牵涉骨疾病例如骨质疏松症。本发明请求

保护作为独特的新物质组分的适配体,其抑制硬骨素功能且具有作为用于骨质疏松症和相关疾病的疗法的明确牵涉。

[0011] 本发明涉及使用抗硬骨素适配体作为疗法用于刺激骨形成的方法。该方法包括给人施用有效引起骨形成速率增加的抗硬骨素适配体的量。

[0012] 本文描述的制剂包含硬骨素适配体或其药学可接受的盐。制剂可以包含与硬骨素或其变体或片段结合的任何适配体。优选地,适配体与硬骨素结合且抑制其活性。

[0013] 本发明还提供了使用抗硬骨素适配体用于治疗其中硬骨素的存在引起不希望的病理学效应的骨相关疾病、病症或状况的方法。此类疾病、病症和状况包括但不限于骨质疏松症、骨质减少、骨关节炎、骨软化、骨营养不良、骨骨髓瘤(osteomyeloma)、骨折、Paget's 病、成骨不全、骨硬化、发育不全型骨病症、体液血钙过高性骨髓瘤、多发性骨髓瘤和在引起或诱导骨变薄的病症后的骨变薄。此类骨变薄(hinning)疾病、病症和状况包括但不限于转移、血钙过多、慢性肾疾病、肾透析、原发性甲状旁腺功能亢进、继发性甲状旁腺功能亢进、炎性肠病、克罗恩病、皮质类固醇的长期使用或促性腺素释放激素(GnRH)激动剂或拮抗剂的长期使用。受试者可以是任何年龄的男性或女性。

[0014] 本发明可以给人受试者施用单独或与其他药物组合的一定量的抗硬骨素适配体。

[0015] 本发明还提供了定量硬骨素表达的诊断方法。抗硬骨素适配体可以通过可检测物质进行标记,所述可检测物质包括但不限于荧光材料、酶、发光材料和放射性材料。本发明的此类实施方案可以用于检测生物学样品中的硬骨素水平。

[0016] 附图简述

图 1 是显示用于硬骨素适配体选择的方法的图。

[0017] 图 2 是显示在针对硬骨素的 15 轮选择后从 ssDNA 库中分离且在本发明中请求保护的适配体序列的表。保守核苷酸由星号标记。

[0018] 图 3 是显示使用适配体酶联测定来测定适配体针对硬骨素的相对结合强度的图表。就其结合活性和交叉反应性估计硬骨素适配体、凝血酶结合适配体、GST-硬骨素和 GST 蛋白质的组合(通过在图表下的加号指示)。数据由一式三份样品求平均值。

[0019] 图 4 是显示修饰的适配体的稳定性的图:在补充有 5% FBS 的 MC3T3-E1 细胞中估计的 A.) 未修饰的 Sc1 2 适配体和 B.) 3' 反向胸苷修饰的 Sc1 2 适配体。

[0020] 图 5 是显示 Wnt 报道分子测定的原理和硬骨素适配体在细胞培养物中的效应的图。A.) 示意性显示在报道分子萤光素酶活性测定后的原理。B.) 3' 反向胸苷修饰的硬骨素适配体对 MC3T3-E1 细胞中 Wnt3a 介导的活性的作用。所示数据代表独立测定的一式三份的值。\*\*\* 代表通过具有 95% 置信度的不配对 t 检验分析的彼此统计学显著的值。C.) 不同浓度的 3' 反向胸苷修饰的 Sc1 2 适配体针对硬骨素功能的效应。

[0021] 图 6 是测定 Sc1 2 适配体的二级结构的图表。A.) Sc1 2 适配体的 CD 光谱。B.) Sc1 2 适配体的 CD 解链光谱。

[0022] 图 7 是显示通过等温滴定量热法以测量在硬骨素和硬骨素适配体之间的结合的数据的图表。用硬骨素的系列注射滴定 Sc1 2 适配体(上)。在就适配体稀释度的热校正后,起因于原始量热法数据整合的结合等温线(下)。

[0023] 详述

本发明现在就下述实验程序和结果而言进一步描述。下述实验细节预期是本发明的实

实践的例示,并且不应解释为以任何方式限制本发明的范围。

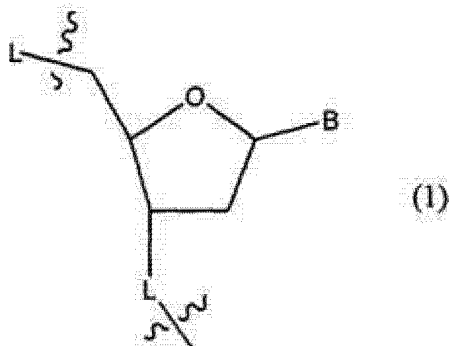
[0024] 使用图 1 中的方案,伴随图 2 中的细节,在本发明中鉴定且请求保护 DNA 适配体的七个不同序列。值得注意的是,适配体 Sc1 1 和 Sc1 2 是占优势序列,其占库中的总共 79%。此外,观察到高水平的序列同源性,其中在几乎所有克隆中在随机区域中的大致相同位置上存在保守基序(5'-GGXGGXXGGXTGGG-3') (SEQ ID NO :1),其中 X 是任何核苷酸碱基。

[0025] 酶联结合测定显示硬骨素适配体与硬骨素的特异性结合。结果暗示其对于硬骨素的相对结合强度以下述次序:Sc14> Sc1 1=Sc1 2 > Sc1 3(图 3)。适配体显示与 GST 可忽略不计的结合,暗示适配体与硬骨素特异性结合。此外,具有真正的 G- 四链体结构的凝血酶结合适配体不与硬骨素蛋白质交叉反应。

[0026] 硬骨素适配体通过用 3' 反向胸苷(3'-InT)给 3' 末端戴帽得到稳定,且在补充有 5% FBS 的 MC3T3-E1 细胞中进行估计(图 4)。如果没有任何修饰,适配体通过血清中的核酸酶快速降解,如通过涂片注意到的。在 3' 反向胸苷适配体的情况下,该寡核苷酸保持完整 28 小时,暗示适配体的稳定性可以得到极大增强。

[0027] 还可以对适配体作出几个不同种类的修饰,以减少外切核酸酶降解且增加在个体的血清中的寿命。降解可以伴随适配体的肌内、静脉内和口服施用出现。用反向胸苷、脱氧胸苷核苷酸和聚乙二醇(PEG)修饰适配体的 3' 末端可以减少寡核苷酸适配体的降解,增加适配体的稳定性。在一个实施方案中,PEG 具有约 20 - 80 kDa 的平均分子量。

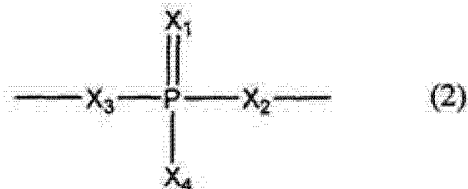
[0028] 进一步地,还可以修饰适配体的脱氧核糖-磷酸主链的磷酸二酯键,以改善稳定性。如在本文件中使用的,术语“适配体”指具有式 1 中所示结构的重复单位的分子。波浪线区别一个核苷酸和 / 或重复单位与邻近的核苷酸和 / 或重复单位。



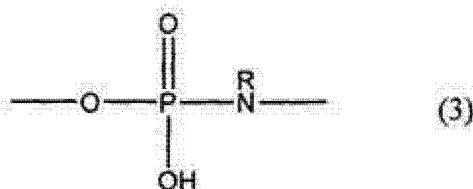
[0029] 式 1 的每个重复单位具有与常见核苷酸碱基(B):鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤和 / 或尿嘧啶之一连接的脱氧核糖部分。关于每个重复单位的碱基(B)不依赖于其他重复单位。本文公开的核苷酸序列描述碱基(B)在适配体中从适配体的 5' 末端到适配体的 3' 末端上的重复单位的出现次序。

[0030] “L”是连接邻近重复单位的脱氧核糖部分的接头基团。在众所周知的 DNA 结构中,L 基团是磷酸基  $PO_4H$ ,其可以作为盐或以中性质子化形式存在。脱氧核糖部分连同接头基团一起构成适配体的主链,在其中核苷酸碱基“B”独立地改变在重复单位之间的屏障。在适配体中构成式 1 的重复单位的大部分接头基团(L)是磷酸基。像这样,适配体的大部分主链可以被称为脱氧核糖-磷酸主链。存在可以降解寡核苷酸分子的许多核酸酶,而无对于寡核苷酸分子的特异性核苷酸碱基序列的特异性。不希望受任何一种具体理论束缚,除磷酸盐外的接头基团“L”可以掺入寡核苷酸或适配体内,以防止通过核酸酶的降解。

[0031] 在一个实施方案中, L 可以替换为如式 2 中所示的基团, 其中  $X_{1-4}$  独立地是 O 或 S。  $X_2$  和  $X_3$  可以与脱氧核糖部分的 3' 碳或 5' 碳中的任一键合。在一个实施方案中,  $X_1$  是 O, 并且  $X_4$  是 O, 其可以是质子化或未质子化的。在另一个实施方案中,  $X_2$  和 / 或  $X_3$  中的一个或多个是 S, 并且  $X_1$  和  $X_4$  是 O, 其中 O 可以是质子化或未质子化的。当  $X_2$  和 / 或  $X_3$  之一是 S 时, 适配体可以被称为在脱氧核糖 - 磷酸主链中具有硫酸酯键。



[0032] 在另一个实施方案中, 接头基团“L”是如式 3 中所示的含酰胺基团, 其中 R 是氢和取代或未被取代的  $C_1$ - $C_{20}$  烃基中的一种或多种。烃基是含碳基团, 其是直链或分支的、饱和或不饱和的、环状或非环状的、芳香族或非芳香族的, 其中碳可以与 1 个或多个杂原子包括 O、N、S 和卤离子结合。当接头基团“L”是具有式 3 的基团时, 适配体可以被称为在脱氧核糖 - 磷酸主链中具有酰胺键。式 3 的“NR”基团可以与脱氧核糖部分的 3' 碳或 5' 碳中的任一键合。在一个实施方案中, R 是甲氧甲基或甲氧乙基。



[0033] 在一个实施方案中, 适配体具有约 20 - 约 50 个核苷酸碱基和 / 或重复单位。在其他实施方案中, 适配体具有约 14 - 约 50 个核苷酸碱基和 / 或重复单位。在另一个实施方案中, 适配体具有约 30 - 约 35 个核苷酸碱基和 / 或重复单位。在一个实施方案中, 适配体具有约 1 - 约 15 个重复单位, 其具有选自式 2-3 的接头“L”。在另一个实施方案中, 适配体具有约 1 - 约 10 个重复单位, 其具有选自式 2-3 的接头“L”。在另一个实施方案中, 适配体具有约 1 - 约 5 个重复单位, 其具有选自式 2-3 的接头“L”。在另外一个实施方案中, 适配体具有超过 10 个重复单位, 其具有选自式 2-3 的接头“L”。重复单位中不选自式 2-3 的接头基团是磷酸盐。

[0034] 在一个实施方案中, 适配体具有约 10 - 约 100% 的重复单位具有选自式 2-3 的接头“L”。在另一个实施方案中, 适配体具有约 10 - 约 70% 的重复单位具有选自式 2-3 的接头“L”。在另外一个实施方案中, 适配体具有约 10 - 约 50% 的重复单位具有选自式 2-3 的接头“L”。在另外一个实施方案中, 适配体具有约 10 - 约 30% 的重复单位具有选自式 2-3 的接头“L”。在进一步的实施方案中, 适配体具有约 10 - 约 20% 的重复单位具有选自式 2-3 的接头“L”。重复单位中不选自式 2-5 的接头基团是磷酸盐。

[0035] 许多核酸酶是从 5' 或 3' 末端降解寡核苷酸的外切核酸酶。像这样, 在一个实施方案中, 选自式 2-3 的接头基团 L 位于距离适配体 5' 或 3' 末端约 5 个重复单位内。在另一个实施方案中, 选自式 2-3 的接头基团 L 位于距离适配体 5' 或 3' 末端约 3 个重复单位内。在另外一个实施方案中, 选自式 2-3 的接头基团 L 位于适配体 5' 或 3' 末端上的重复单位的部分中。

[0036] 适配体的降解还可以通过包括修饰的核苷酸碱基(B)得到减少。嘧啶核苷酸碱基胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶可以替换为烷基化嘧啶。烷基化嘧啶的例子包括假异胞嘧啶; N4, N4- 桥亚乙基胞嘧啶; 4- 乙酰基胞嘧啶; 5- (羧基羟甲基)尿嘧啶; 5- 氟尿嘧啶; 5- 溴尿嘧啶; 5- 羧甲氨基甲基-2- 硫尿嘧啶; 5- 羧甲氨基甲基尿嘧啶; 二氢尿嘧啶; 1- 甲基假尿嘧啶; 3- 甲基胞嘧啶; 5- 甲基胞嘧啶; 5- 甲氨基甲基尿嘧啶; 5- 甲氧基氨基甲基-2- 硫尿嘧啶; 5- 甲氧基羰基甲基尿嘧啶; 5- 甲氧基尿嘧啶; 尿嘧啶-5- 羟乙酸甲酯; 假尿嘧啶; 2- 硫胞嘧啶; 5- 甲基-2 硫尿嘧啶; 2- 硫尿嘧啶; 4- 硫尿嘧啶; 5- 甲基尿嘧啶; N- 尿嘧啶-5- 羟乙酸甲酯; 尿嘧啶-5- 羟乙酸; 2- 硫胞嘧啶; 5- 丙基尿嘧啶; 5- 丙基胞嘧啶; 5- 乙基尿嘧啶; 5- 乙基胞嘧啶; 5- 丁基尿嘧啶; 5- 戊基尿嘧啶; 5- 戊基胞嘧啶; 甲基假尿嘧啶; 和 1- 甲基胞嘧啶。嘌呤核苷酸碱基腺嘌呤和鸟嘌呤可以替换为烷基化嘌呤。示例性烷基化嘌呤包括 8- 羟基-N6- 甲基腺嘌呤; 肌苷; N6- 异戊基-腺嘌呤; 1- 甲基腺嘌呤; 1- 甲基鸟嘌呤; 2, 2- 二甲基鸟嘌呤; 2- 甲基腺嘌呤; 2- 甲基鸟嘌呤; N6- 甲基腺嘌呤; 7- 甲基鸟嘌呤; 2 甲基硫代-N6- 异戊烯基腺嘌呤; 和 1- 甲基鸟嘌呤。

#### [0037] 适配体序列和性质

适配体是与非核酸生物学靶结合的寡核苷酸。在双链 DNA 分子中,核苷酸碱基通过众所周知的沃森-克里克碱基配对构成分子间嘧啶-嘌呤对。适配体被认为通过核苷酸碱基与非核酸分子的键合识别非核酸生物学靶。适配体可以是单链、双链的,或在适配体序列的部分中构成分子内碱基配对。七个不同的适配体序列鉴定为能够与硬骨素结合,其在下述工作实施例中详细举例说明。

[0038] 术语“抗硬骨素活性”、“硬骨素抑制剂”、“拮抗剂”、“中和”和“下调”指相对于在不存在相同抑制剂的情况下的硬骨素活性,充当硬骨素的抑制剂的化合物(或适当时其性质)。术语“变体”指由于亲本序列中一个或多个核苷酸碱基的添加、缺失和/或置换,在核苷酸序列中不同于“亲本”多核苷酸或适配体的多核苷酸或适配体。变体多核苷酸或适配体具有与亲本多核苷酸或适配体相似或等同的功能。变体多核苷酸或适配体具有与亲本相似的核苷酸碱基序列,且满足下述中的至少一个:具有至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、和至少约 98% 等同中的一种或多种的核苷酸碱基序列的多核苷酸或适配体。关于 SEQ ID NOS:2-8 的同一性在本文中定义为,在比对序列以实现最大限度序列同一性百分比后,在候选或变体序列中与亲本序列等同的核苷酸碱基百分比。5' 末端和/或 3' 末端添加无一应解释为影响序列同一性,任何适配体的 3' 或 5' 末端与非核苷酸基团的化学连接也不应解释为影响序列同一性。

[0039] 在一个实施方案中,变体是含有 SEQ ID NO:2-8 之一的适配体,其中另外的核苷酸重复单位在适配体的 5' 或 3' 末端上插入或加入。在另一个实施方案中,变体是含有 SEQ ID NO:2-8 之一的适配体,其中一个或多个嘧啶核苷酸碱基置换另一个嘧啶核苷酸碱基,或修饰的嘧啶核苷酸碱基和/或一个或多个嘌呤核苷酸碱基置换另一个嘌呤核苷酸碱基或修饰的嘌呤核苷酸碱基。

[0040] 本文教导的适配体可以在含有该适配体或其盐和药学可接受的载体的组合中施用于患者。例如,适配体可以与含水或醇介质组合用于施用。类似地,适配体可以以片剂形式连同粘合剂例如基于糖或淀粉的粘合剂一起施用。一般来说,本发明可以使用本领域已知的任何途径直接施用于哺乳动物受试者,包括例如通过注射(例如静脉内、腹膜内、皮



下、肌内或皮内)、吸入、经皮(局部)应用、直肠施用或口服施用。药学可接受的载体部分通过待施用的具体组合物以及通过用于施用组合物的具体方法决定。相应地,存在本发明的药物组合物的广泛多样的合适制剂(参见例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, 1989)。如本文使用的,“载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬液、胶体等。此类介质和试剂用于药学活性物质的使用是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑其在治疗组合物中的使用。补充性活性成分也可以掺入组合物内。短语“药学可接受的”指当施用于人时,不产生变应性或相似的不利反应的分子实体和组合物。含有蛋白质作为活性成分的水性组合物的制备是本领域充分了解的。一般地,此类组合物制备为注射物,作为液体溶液或悬液;还可以制备适合于在注射前在液体中溶解或悬浮的固体形式。制备物还可以是乳化的。

[0041] 本发明的化合物还可以以脂质体递送系统的形式施用,例如小单层囊泡、大单层囊泡和多层囊泡。脂质体可以由多种磷脂例如胆固醇、硬脂胺或磷脂酰胆碱构成。

[0042] 本发明的化合物还可以与作为可靶向药物载体的可溶性聚合物偶联。此类聚合物可以包括聚乙烯吡咯烷酮,吡喃共聚物,聚羟基丙基甲基丙烯酸酰胺,聚羟基乙基天冬酰胺,或聚氧化乙烯聚赖氨酸,其由棕榈酰残基取代。此外,本发明的化合物可以与在实现药物的控制释放中有用的生物可降解的聚合物类别偶联,例如聚乳酸、聚  $\epsilon$ -己内酯、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚腈基丙烯酸酯和水凝胶的交联或两亲嵌段共聚物。

[0043] 虽然已显示且描述了本发明的至少一个实施方案,但应当理解可以对其作出许多改变和修饰,而不背离如附加权利要求中定义的本发明的原理和范围。

## 实施例

### [0044] 实施例 1:硬骨素的制备

本发明描述了与硬骨素结合的适配体。通过克隆得自小家鼠 (*Mus musculus*) 6 天新生儿头 cDNA 的 SOST 的 cDNA 获得硬骨素。通过 PCR 用正向引物 5' -GTATGTATGAATTCATGCATGCAGCCCTCACTAGCCCC-3' (SEQ ID NO :9) 和反向引物 5' -GTATGTATCTCGAGCTAGTAGCGGTTCTCCAGCT-3' (SEQ ID NO :10) 扩增 SOST 的编码区。将 PCR 产物凝胶纯化,用 EcoR1/XhoI 消化,并且与同样消化的 pGEX-4T1 载体连接,以制备质粒 pGEX-SOST。

[0045] 对于硬骨素的异源表达,将补充有氨苄青霉素 (ampilicin) (50  $\mu$ g/ml) 的 2 升 LB 肉汤用饱和的 pGEX-SOST/BL21 (DE3) 培养物 (1/200 稀释) 接种,并且在 37°C 生长直至  $A_{600} = 0.6$  时。通过加入异丙基 -1- 硫代 - $\beta$ -D- 半乳糖吡喃糖苷 (0.25 mM) 诱导蛋白质表达,并且将培养物在 25°C 温育 4 小时。在冷却至 4°C 后,通过离心收获细胞并且重悬浮于具有蛋白酶抑制剂的缓冲液 A:磷酸盐缓冲盐水 (PBS ;pH7.3) 中,1 g 湿细胞团块 /5 ml 缓冲液。

[0046] 对于硬骨素的纯化,将细胞通过超声处理裂解且随后离心 (30 分钟,30,000  $\times$  g),并且将上清液过滤并且随后施加于 5ml GSTrap HP 柱。将 5-ml 柱用 40 ml 缓冲液 A,随后为 50 ml 缓冲液 B (50 mM Tris-HCl,pH 8.0,10 mM 还原型谷胱甘肽 (Calbiochem) 洗涤,以洗脱蛋白质。将纯馏分 (通过 SDS-PAGE) 合并,并且对于短期贮存于 4°C 或对于长期贮存于 -80°C 冷冻。

**[0047] 实施例 2:硬骨素适配体的制备和鉴定**

使用固定在 GST- 磁珠上的硬骨素通过磁性分离选择硬骨素适配体。选择过程的起点是随机的简并 ssDNA 文库 (SelexApt), 其是化学合成且 HPLC 纯化的。(SelexApt :5' -CCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AGC TCG GTA CCG AAT TC- (N30) -AAG CTT TGC AGA GAG GAT CCT T-3') (SEQ ID NO:11)。描述 SEQ ID NO:11 的另一种方法是 SEQ ID NO:11 是与 SEQ ID NO:14 偶联的 SEQ ID NO:12, 在两者之间具有另一个序列 (N30 序列)。在选择和克隆过程中使用的对于侧接 SelexApt 简并区的 5' - 和 3' - 序列退火的引物是 "SelexF", 5' -CCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AGC TCG GTA CCG AAT TC-3' (SEQ ID NO:12); "SelexR", 5' -AAG GAT CCT CTC TGC AAA GCT T-3' (SEQ ID NO:13); 分别以非生物素化和 5' - 生物素化的形式 (HPLC 纯化的)。将 1 nmol DNA 文库与固定在 GST 磁珠上的 GST- 硬骨素一起在室温温育 30 分钟。将未结合的 DNA 分离并且通过用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤去除。将结合的序列用 10 mM 还原型谷胱甘肽 (GSH) 洗脱且使用生物素化的引物 PCR 扩增。通过链霉抗生物素蛋白 - 磁珠纯化获得单链 DNA 库。

[0048] 执行 15 个循环的迭代, 其中针对磁珠的计数器选择在第 3、6、9 和 12 轮时。在最后一轮 SELEX 过程中, 使用非生物素化的引物 PCR 扩增回收的 DNA 分子, 并且克隆到 pCR-Blunt II TOPO 载体 (Invitrogen) 内且测序。通过 clustalw2 执行多重序列比对。

[0049] 对于适配体酶联测定, 将用谷胱甘肽琼脂糖介质预包装的 96 孔板 (GE healthcare) 用溶于 200  $\mu$ l 包被缓冲液 (50 mM Tris-Cl pH 8.5、100 mM NaCl 和 100 mM KCl) 中的 500 ng 纯化的蛋白质 (GST- 硬骨素或 GST) 在室温包被 1.5 小时。将孔用包被缓冲液洗涤 4 次。将生物素化的寡脱氧核苷酸 (Sc1 1、2、3、4 适配体, 凝血酶结合适配体和寡脱氧核苷酸 35 聚体随机序列) 加热至 90°C, 并且随后快速冷却至 4°C。将 50 nM 适配体与蛋白质一起在 96 孔板中在 4°C 温育过夜, 轻轻振荡。将孔用 200  $\mu$ l 包被缓冲液在板涡旋上洗涤 6 次, 每次洗涤 10 分钟。将链霉抗生物素蛋白辣根过氧化物酶在缓冲液中 1:2000 稀释, 并且将 200  $\mu$ l 等分试样应用于每个孔。将测试条在室温温育 30 分钟, 并且再次如上所述洗涤。随后, 将 150  $\mu$ l Turbo- 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 加入每个孔中, 并且在室温在黑暗中温育 20 分钟。通过加入 150  $\mu$ l 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 猝灭反应, 并且通过测定在 450 nm 处的吸光度定量蛋白质结合的适配体 - 链霉抗生物素蛋白复合物。

[0050] 七个不同的适配体序列鉴定为能够与硬骨素结合:

5'-GTTTCCAAAGCCGGGGGGGTGGGATGGGTT-3' (SEQ ID NO: 2) (Sc1 1);

5'-TTGCGCGTTAATTGGGGGGGTGGGTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 3) (Sc1 2)

5'-TGCCTTGTTATTGTGGTGGGCGGGTGGGAC-3' (SEQ ID NO: 4) (Sc1 3);

5'-GGGGGGGGTGGGGTGGGTCAATATTCTCGTC-3' (SEQ ID NO: 5) (Sc1 4);

5'-TTGCGCGTTAATTGGGGGGGTGGGTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 6) (Sc1 5);

5'-CCCTCCAAAGCGGGGGGGGTGGGTGGGCAG-3' (SEQ ID NO: 7) (Sc1 6); 和

5'-TTCTGTCACATGTGGGGGGGGGGGTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 8) (Sc1 7)。

[0051] SEQ ID NOS :2-8 都含有作为保守序列的 SEQ ID NO :1。除了 SEQ ID NOS :2-8 外, SEQ ID NOS :2-8 的变体也被认为具有抗硬骨素活性。

**[0052] 实施例 3:硬骨素适配体的修饰**

经修饰为在 3' 末端上与反向胸苷缀合的适配体抑制细胞培养物中的硬骨素功能。我们采用淋巴样增强因子/T 细胞因子(LEF/TCF)萤光素酶报道分子测定,以研究适配体对成骨细胞 MC3T3-E1 细胞中 Wnt3a 介导的活性的作用,所述 MC3T3-E1 细胞视为骨发育的体外模型。LEF 和 TCF 都是活化的 Wnt/ $\beta$ -联蛋白途径的核转导子,因为它们与  $\beta$ -联蛋白相互作用(图 5A)。

[0053] 为了进一步研究修饰的适配体, TOP 闪光萤光素酶报道分子含有用于 TCF/LEF 转录因子的三个 Wnt 特异性结合位点,和在来自单纯疱疹病毒胸苷激酶的控制下的萤火虫萤光素酶报道分子(*Fluc*);而 FOP 闪光构建体等同于具有突变的三个 TCF 结合位点的 TOP 构建体,且从而充当阴性对照。萤光素酶基因通过启动子驱动,所述启动子通过经由 Wnt 活化的  $\beta$ -联蛋白结合而特异性活化。我们最初使用 Wnt-报道分子测定比较 3' InT 适配体(图 5B)。

[0054] 对于 T 细胞因子萤光素酶报道分子测定,将 MC3T3-E1 细胞种植到 24 孔板中,并且使用 Lipofectamine 试剂,用 100 ng TOP-Wnt 诱导的萤光素酶质粒或 FOP (对照质粒)瞬时转染。当需要时,将 Wnt3a (800ng)、硬骨素(800ng)表达载体共转染。将 10 ng 海肾萤光素酶载体共转染,以校正转染效率。转染后 6 小时,将培养基更换为补充有合适量的适配体的含抗生素培养基,并且温育 24 小时。将细胞用 100  $\mu$ l 被动裂解缓冲液裂解,并且将 20  $\mu$ l 用于分析。使用萤光素酶报道分子系统执行萤光素酶测定。

**[0055] 实施例 4:硬骨素适配体针对硬骨素的效应**

适配体 Sc1 2 显著抑制在 Wnt 信号传导中的硬骨素功能,恢复类似于 Wnt 对照的萤光素酶活性。在 Wnt 的存在下,信号传导途径活化,具有大量萤光素酶信号。硬骨素是经典 Wnt 信号传导的拮抗剂,与 LRP5/6 结合。因此,萤光素酶活性下降。适配体的功效以 1.5  $\mu$ M 的固定浓度测试。

[0056] 为了进一步研究 3' InT 适配体 Sc1 2 针对硬骨素对 Wnt 信号传导的拮抗效应的作用,将 3' InT 适配体 Sc1 2 以从 0.1  $\mu$ M 到 1.5  $\mu$ M 的不同浓度加入。随着浓度增加,适配体特异性减弱硬骨素针对 Wnt 信号传导的拮抗效应。适配体的抑制效应可以在 1.5  $\mu$ M 时饱和。

[0057] 对于适配体稳定性评估,将 1  $\mu$ M Sc1 2 和 3' 反向胸苷修饰的 Sc1 2 加入在 80% 汇合时的 MC3T3-E1 细胞。细胞在 6 孔板中且伴随 2ml 完全培养基( $\alpha$ -MEM, 补充有 5% FBS、青霉素/链霉素和两性霉素 b)在 37 $^{\circ}$ C 补充有 5% CO<sub>2</sub> 生长。在所示时间点时,将 10  $\mu$ l 培养基装载到脲-PAGE 上且电泳。将凝胶用 1:10000 SYBR Gold 染色 20 分钟,并且在 UV 下观察图像。

[0058] 对于圆二色性,将寡核苷酸(10  $\mu$ M)重悬浮于含有 KCl (100 mM)的 Tris-HCl (10 mM, pH7.5) 缓冲液中。将样品在 90 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟,随后逐步冷却至室温。通过使用以 100 nm/分钟、1 秒响应时间、1nm 带宽的 4 次扫描,在 310 nm - 220 nm 处在配备水套细胞支架的 JASCO J810 分光偏振计(spectropolarometer) (JASCO, MD, USA)上收集 CD 光谱。具有 1mm 光径长度的石英池用于测量。缓冲液单独的扫描从关于样品的平均扫描中扣除。在波长 260 nm 处获得的 CD 解链曲线允许估计解链温度, T<sub>m</sub>, 解折叠过程的中点温度。

[0059] 硬骨素适配体的生物物理学性质的特征在于圆二色性,以在实验上证实 G-四链

体结构是否在适配体序列中形成。在其 CD 光谱中,适配体 Sc1 2 显示接近 265nm 的正最大峰(图 6A)。这是平行 G- 四链体结构的光谱证据。此外,我们通过解链 CD 测定适配体 Sc1 2 的 G- 四链体结构的热稳定性且显示适配体 Sc1 2 的  $T_m$  值是 75°C,暗示该结构是非常稳定的,适合于在细胞环境中的潜在治疗用途(图 6B)。

[0060] G- 四链体结构是四个鸟嘌呤核苷酸碱基的正方形排列。构成 G- 四链体结构的四个鸟嘌呤核苷酸碱基可以来自一条 DNA 适配体链或两条或更多条 DNA 适配体链。即,G- 四链体结构可以是分子内结构或分子间结构。

[0061] 对于等温滴定量热法,在 MicroCal VP-ITC 上执行在抗硬骨素适配体和硬骨素之间的平衡结合研究。在一般的 ITC 实验中,将 15  $\mu$ M GST-硬骨素或 20  $\mu$ M GST 装载到在滴定注射器中具有 200  $\mu$ M 适配体或随机序列的池内。用 MWCO 10,000 将 GST-硬骨素和 GST 透析到 PBS 缓冲液内。滴定实验在 25°C 用最初 0.2  $\mu$ l 注射执行,随后为三十次 1.2  $\mu$ l 注射。在注射之间的间隔是 200 秒。在滴定过程中的搅拌速度是 900 rpm。应当理解本文描述的实施例和实施方案仅用于举例说明目的,并且根据其的多种修饰或变化对于本领域技术人员是显而易见的,并且应包括在本申请的精神和范围内。

[0062] 通过经由等温滴定量热法研究适配体 Sc1 2 与硬骨素的相互作用的热力学来研究硬骨素-适配体相互作用。在图 7 的上图中,在 25°C 进行适配体进入硬骨素溶液内的量热滴定。在适配体每次注射到蛋白质溶液内之后观察到放热的热脉冲。使用简单的单位点结合模型拟合结合化学计量学。我们的结果显示适配体-蛋白质复合物的结合化学计量学 ( $n$ ) 明确指出在溶液中  $n = 0.91 \pm 0.02$  个 Sc1 2 适配体分子与一个硬骨素分子结合。关于适配体 Sc1 2 与硬骨素的相互作用的解离常数是 500nM,其是 DNA-蛋白质相互作用中的竞争值。此外,  $\Delta H$  和  $\Delta S$  的值揭示结合过程是焓驱动的,具有通过不利的反应熵 ( $T\Delta S = -2.3$  kcal/mol) 抵消(offset) 的在 25°C -10.9 kcal/mol 的有利反应焓 ( $\Delta H$ )。

[0063] 本文提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物包括下文列出的那些整体(包括所有图和表)引入作为参考,至它们与本说明书的明确教导并非不一致的程度。

[0064] 1. Goltzman, D., *Nat Rev Drug Discov* 1, 784-796. (2002).

2. Harada, S., and Rodan, G.A., *Nature* 423, 349-355. (2003).

3. Balemans, W., Ebeling, M., Patel, N., Van Hul, E., Olson, P., Dioszegi, M., Lacza, C., Wuyts, W., Van Den Ende, J., Willems, P., Paes-Alves, A.F., Hill, S., Bueno, M., Ramos, F.J., Tacconi, P., Dijkers, F.G., Stratakis, C., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foernzler, D., and Van Hul, W., *Hum Mol Genet* 10, 537-543. (2001).

4. Brunkow, M.E., Gardner, J.C., Van Ness, J., Paeper, B.W., Kovacevich, B.R., Proll, S., Skonier, J.E., Zhao, L., Sabo, P.J., Fu, Y., Alisch, R.S., Gillett, L., Colbert, T., Tacconi, P., Galas, D., Hamersma, H., Beighton, P., and Mulligan, J., *Am J Hum Genet* 68, 577-589. (2001).

5. Hamersma, H., Gardner, J., and Beighton, P., *Clin Genet* 63, 192-197. (2003).

6. Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E., and Wu, D., *J Biol Chem* 280, 19883-19887. (2005).

7. Semenov, M., Tamai, K., and He, X., *J Biol Chem* 280, 26770–26775. (2005).
8. Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., and Lifton, R.P., *N Engl J Med* 346, 1513–1521. (2002).
9. Gong, Y., Slee, R.B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A.M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F.H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W.N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J.A., Beighton, P., Black, G.C., Boles, R.G., Boon, L.M., Borrone, C., Brunner, H.G., Carle, G.F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M.L., Hall, B., Hennekam, R.C., Hirose, T., Jans, A., Juppner, H., Kim, C.A., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R.S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M.J., Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B.R., and Warman, M.L., *Cell* 107, 513–523. (2001).
10. Li, X., Ominsky, M.S., Warmington, K.S., Morony, S., Gong, J., Cao, J., Gao, Y., Shalhoub, V., Tipton, B., Haldankar, R., Chen, Q., Winters, A., Boone, T., Geng, Z., Niu, Q.T., Ke, H.Z., Kostenuik, P.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L., and Paszty, C., *J Bone Miner Res* 24, 578–588. (2009).
11. Nimjee, S.M., Rusconi, C.P., and Sullenger, B.A., *Annu Rev Med* 56, 555–583. (2005).
12. Ellington, A.D., and Szostak, J.W., *Nature* 346, 818–822. (1990).
13. Tuerk, C., and Gold, L., *Science* 249, 505–510. (1990).
14. Que-Gewirth, N.S., and Sullenger, B.A., *Gene Ther* 14, 283–291. (2007).
15. Shum, K.T., and Tanner, J.A., *Chembiochem* 9, 3037–3045. (2008).
16. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G., *Bioinformatics* 23, 2947–2948. (2007).
17. Choi, M.Y., Chan, C.C., Chan, D., Luk, K.D., Cheah, K.S., and Tanner, J.A., *Biochem J* 423, 233–242. (2009).
18. Murphy, M.B., Fuller, S.T., Richardson, P.M., and Doyle, S.A., *Nucleic Acids Res* 31, e110. (2003).
19. Shafer, R.H., and Smirnov, I., *Biopolymers* 56, 209–227. (2000).
20. Veverka, V., Henry, A.J., Slocombe, P.M., Ventom, A., Mulloy, B., Muskett, F.W., Muzylak, M., Greenslade, K., Moore, A., Zhang, L., Gong, J., Qian, X., Paszty, C., Taylor, R.J., Robinson, M.K., and Carr, M.D., *J Biol Chem*

---

284, 10890-10900. (2009).

21. Rey, J.P., and Ellies, D.L., *Dev Dyn* 239, 102-114. (2010).

## 序列表

<110> University of Hong Kong

<120> 针对硬骨素蛋白质的高亲和力核酸适配体

<130> VERSP109USA

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的核苷酸序列

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> n 是任何核苷酸残基

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)..(7)

<223> n 是任何核苷酸残基

<220>

<221> misc\_feature

<222> (10)..(10)

<223> X 是任何核苷酸残基

<220>

<221> misc\_feature

<222> (10)..(10)

<223> n 是任何核苷酸残基

<400> 1	
ggnggnnggn tggg	14
<210> 2	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的核苷酸序列	
<400> 2	
gtttccaaag ccgggggggt gggatgggtt	30
<210> 3	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的核苷酸序列	
<400> 3	
ttgcgcgtta attggggggg tgggtgggtt	30
<210> 4	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的核苷酸序列	
<400> 4	
tgccttgta ttgtggtggg cgggtgggac	30



- <210> 5  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工合成的核苷酸序列
- <400> 5  
ggggggggtg ggtgggtca atattctcgt c 31
- <210> 6  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工合成的核苷酸序列
- <400> 6  
ttgcgcgtta attggggggg tgggtgggtt 30
- <210> 7  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工合成的核苷酸
- <400> 7  
ccctccaaag cggggggggt ggtgggcag 30
- <210> 8

- <211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工合成的核苷酸序列
- <400> 8  
ccctccaaag cggggggggt gggtagggcag 30
- <210> 9  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 小家鼠
- <400> 9  
gtatgtatga attcatgcat gcagccctca ctagcccc 38
- <210> 10  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 小家鼠
- <400> 10  
gtatgtatct cgagctagta ggcgtttctcc agct 34
- <210> 11  
<211> 64  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工合成的核苷酸序列
- <220>

- <221> misc\_feature  
 <222> (42)..(42)  
 <223> n 是 30 个核苷酸残基的随机序列
- <400> 11  
 ccgtaatacg actcactata ggggagctcg gtaccgaatt cnaagctttg cagagaggat 60  
  
 cctt 64
- <210> 12  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 人工合成的核苷酸序列
- <400> 12  
 ccgtaatacg actcactata ggggagctcg gtaccgaatt c 41
- <210> 13  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 人工合成的核苷酸序列
- <400> 13  
 aaggatcctc tctgcaaage tt 22
- <210> 14  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的核苷酸序列

<400> 14

aagctttgca gagaggatcc tt

22

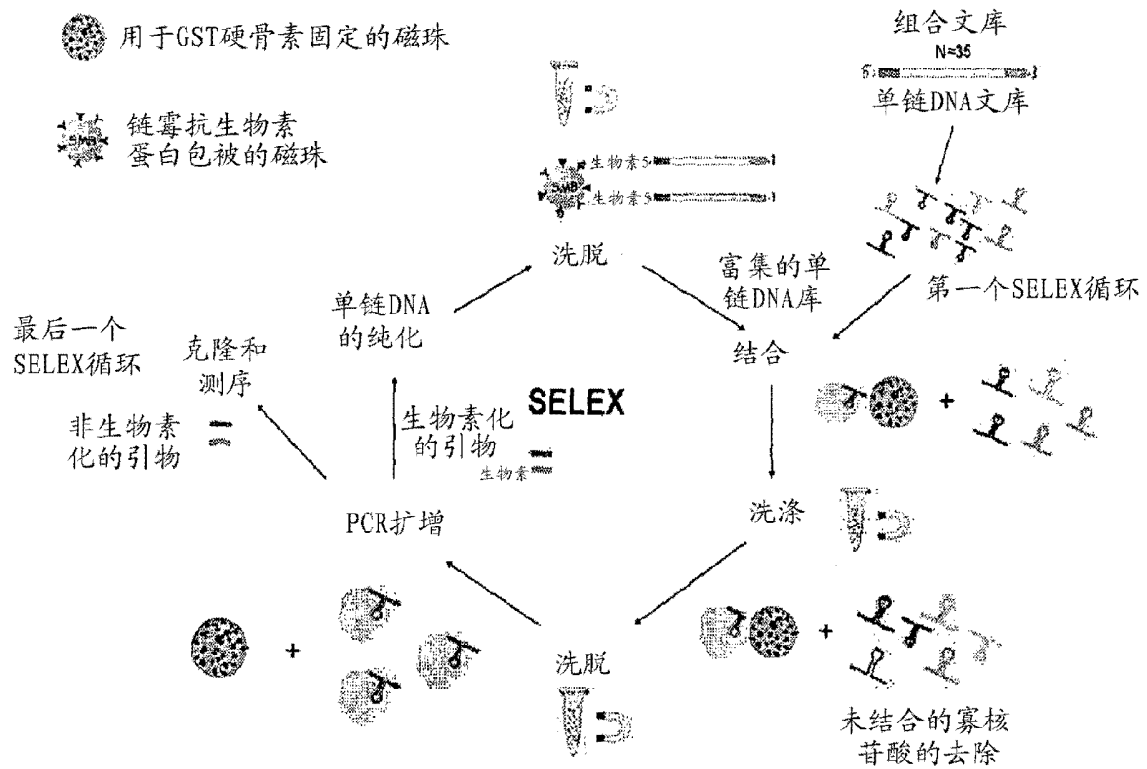


图 1

适配体克隆	适配体序列的核心区 (5' 到 3')	核苷酸数目	百分比
Scl 1	GTTTCCAAAGCCGGGGGGTGGGATGGGTT-----	30	55%
Scl 2	TTGCGCGTTAATTGGGGGGTGGGTGGGTT-----	30	24%
Scl 3	TGCCTTGTTATTGTGGTGGGCGGGTGGGAC-----	30	7%
Scl 4	-----GGGGGGGTGGGGTGGGTCAATATTCTCGTC	31	3%
Scl 5	TTGCGCGTTAATTGGGGGGTGGGTGGGTT-----	30	3%
Scl 6	CCCTCCAAAGCGGGGGGGTGGG-TGGGCAG-----	30	3%
Scl 7	TTCTGTCACATGTGGGGGGGGGGTGGGTT-----	30	3%

\*\* \*\* \* \* \*\* \*\* \*

图 2

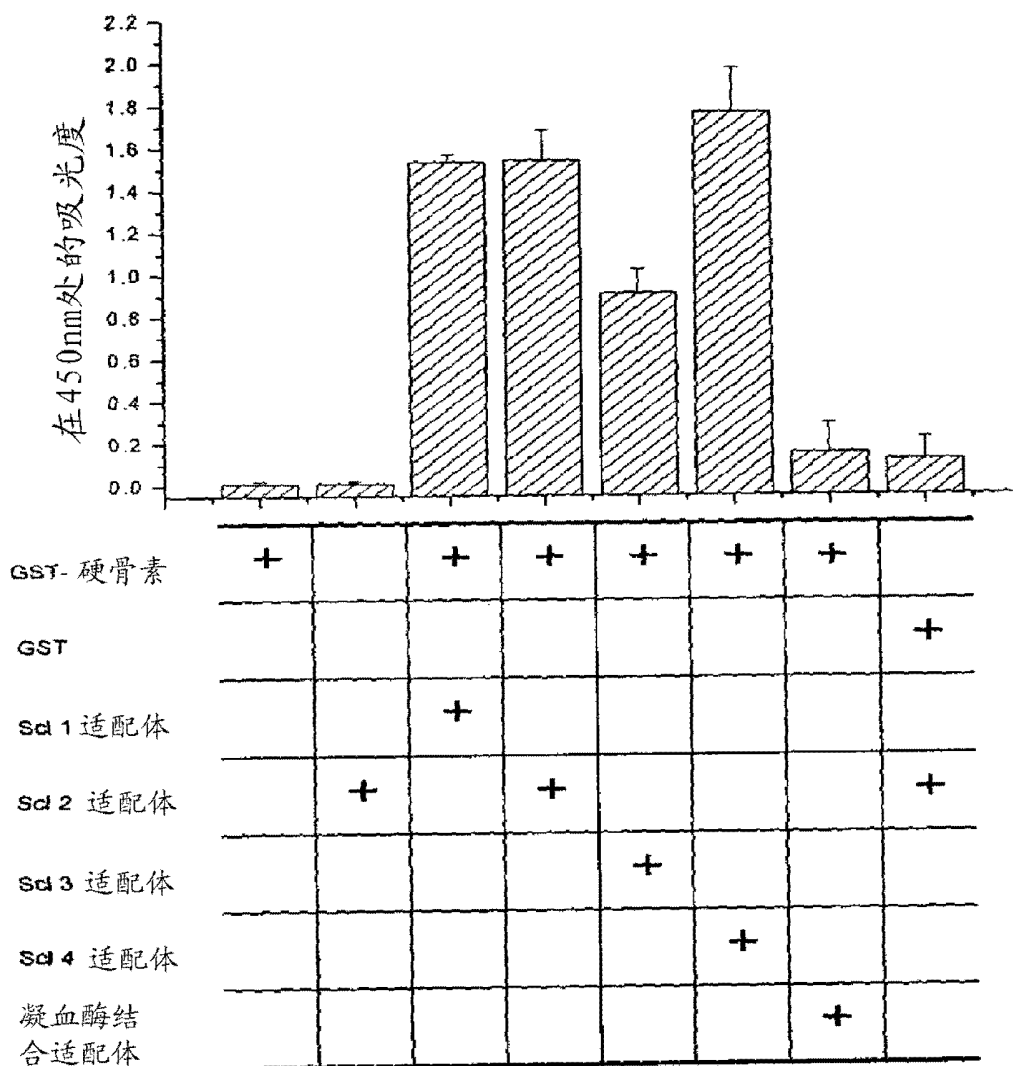


图 3

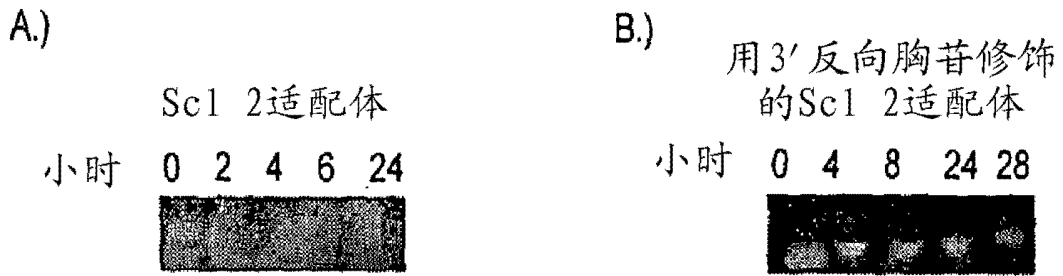


图 4

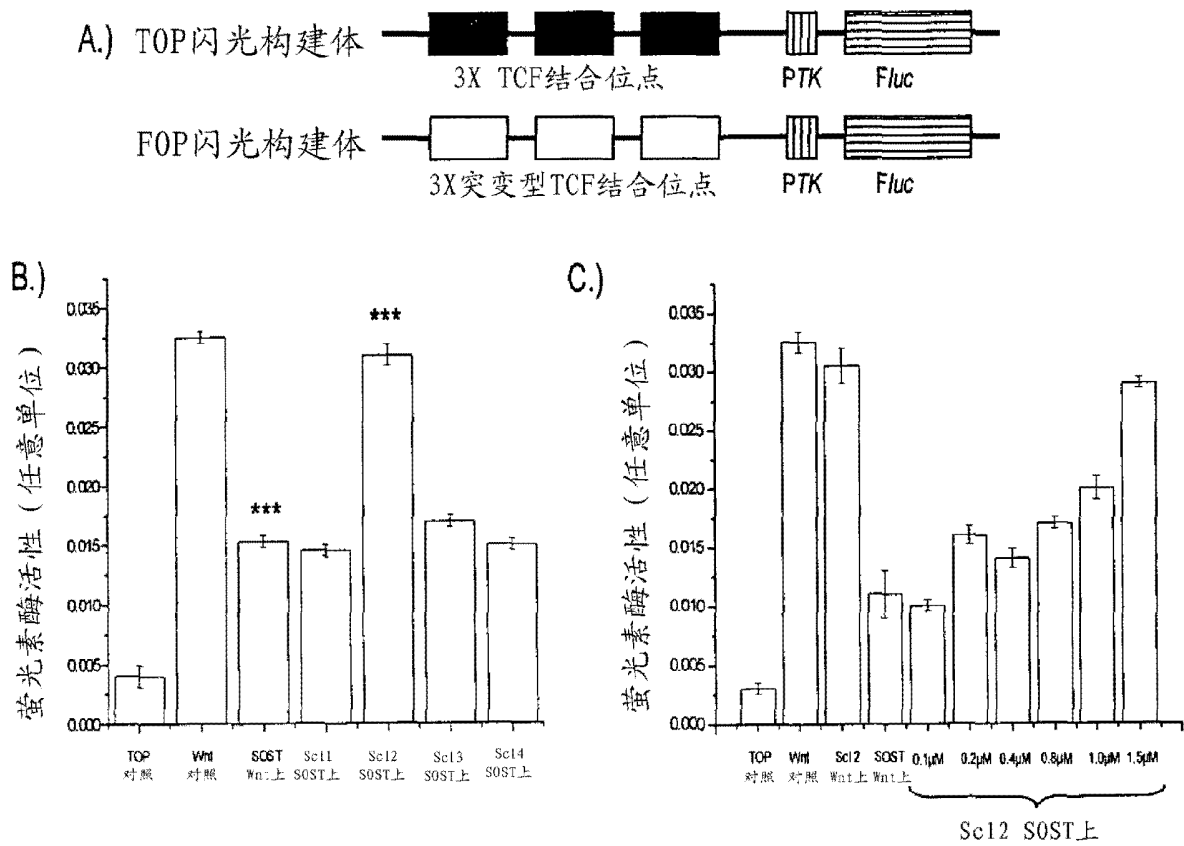


图 5

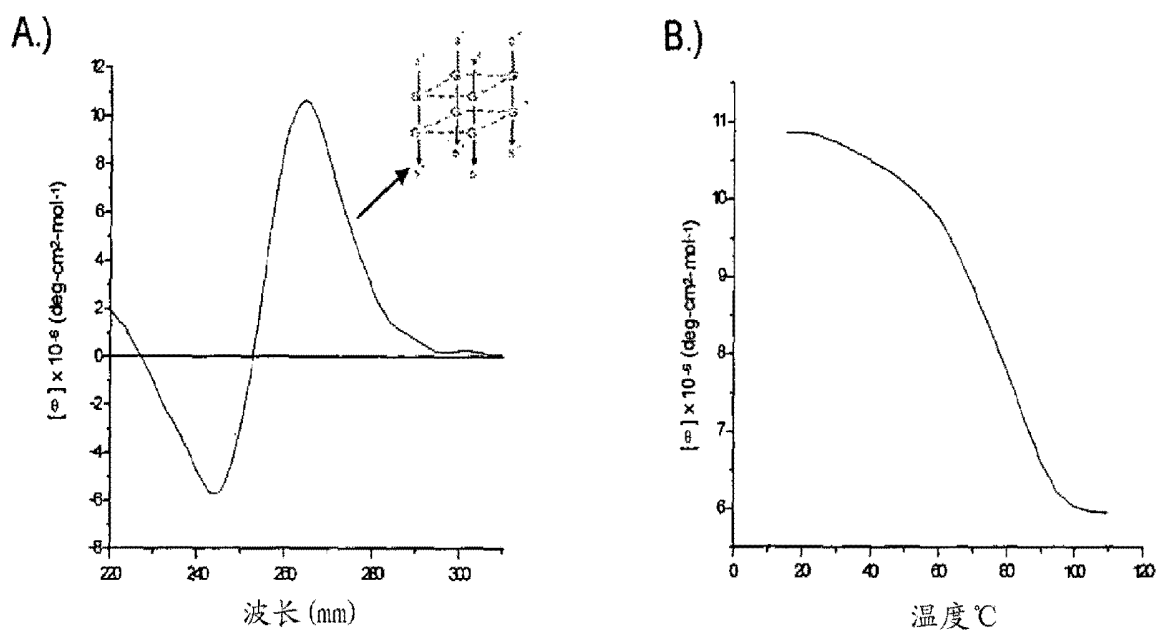


图 6



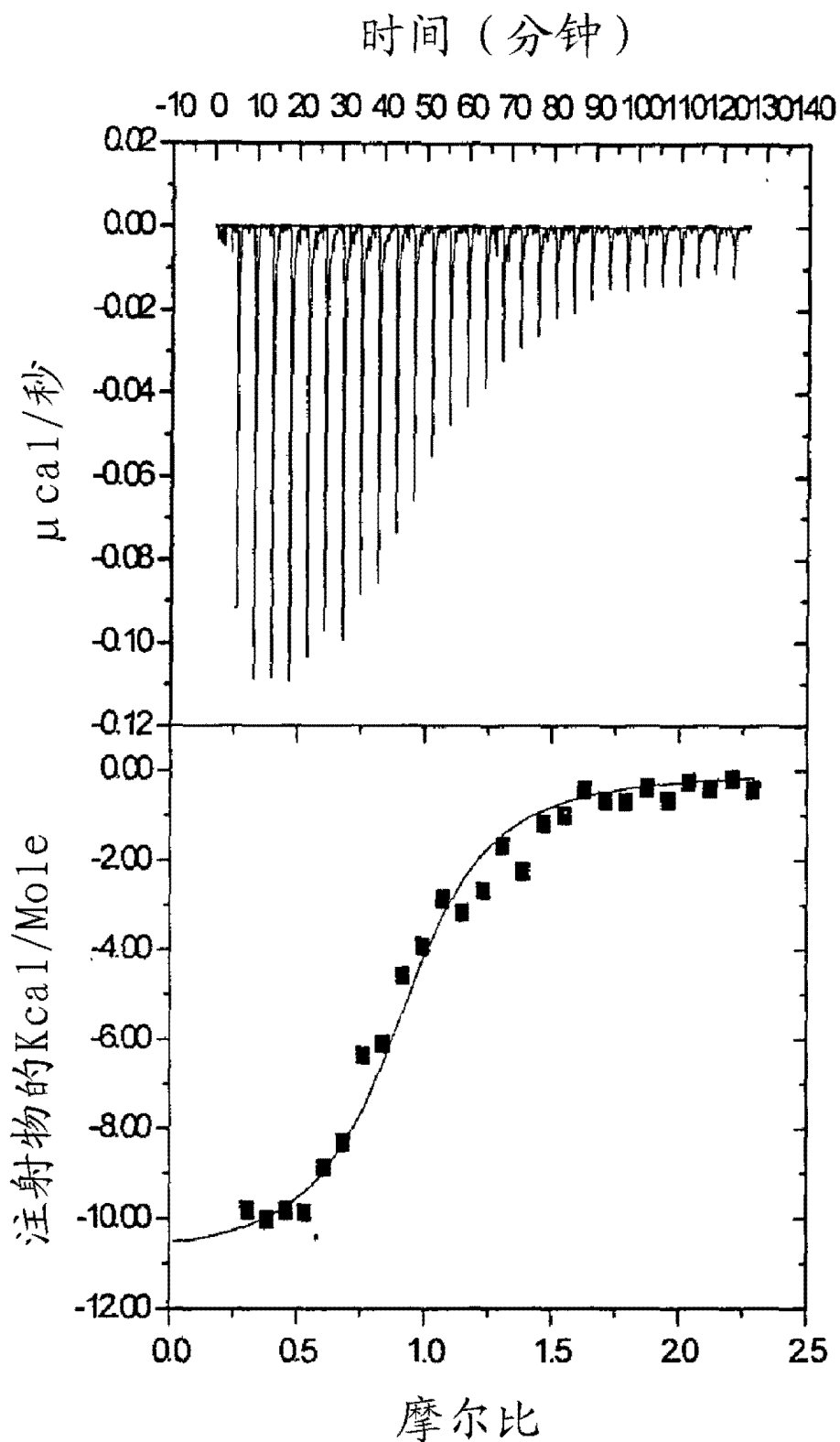


图 7