



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105264072 A

(43) 申请公布日 2016.01.20

(21) 申请号 201480017486.8 *A61K 48/00*(2006.01)

(22) 申请日 2014.03.20 *A61P 29/00*(2006.01)

(30) 优先权数据 *A61P 31/00*(2006.01)
2013-060817 2013.03.22 JP *A61P 35/00*(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *A61P 37/08*(2006.01)
2015.09.22 *C07K 14/54*(2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据 *C12N 15/115*(2006.01)
PCT/JP2014/057919 2014.03.20 *C12Q 1/68*(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/148638 JA 2014.09.25

(71) 申请人 国立大学法人东京大学
地址 日本东京都
申请人 全药工业株式会社

(72) 发明人 石黑亮 中村义一 春田和彦
大泷菜月

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 权陆军 李炳爱

(51) Int. Cl.
C12N 15/00(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)

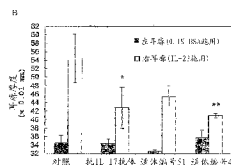
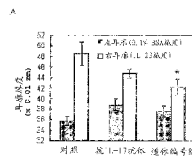
权利要求书3页 说明书39页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称
针对 IL-17 的适体及其用途

(57) 摘要

本发明提供了与 IL-17 结合以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合的适体;含有适体和功能物质(例如亲和性物质、标记物质、酶、药物递送介质或药物)的复合物;含有适体或含有适体和功能物质的复合物的药剂、诊断剂、标记剂等。

图1 小鼠IL-17受体与牛痘病毒结合的特异性



1. 一种适体,其包含由下式 (Ia) 表示的序列,其与 IL-17 结合,以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合:

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'g(M)a'(X_4)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7) \\ a'(X_2)g(X_6)u'(F)r(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中

a、g、c 和 u 各自为 RNA,其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶,

r 是 RNA,其中碱基是腺嘌呤或鸟嘌呤,

a'、g' 和 c' 各自为 RNA 或 DNA,其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶,

u' 是其中碱基是尿嘧啶的 RNA,其中碱基是尿嘧啶的 DNA,或其中碱基是胸腺嘧啶的 DNA,

核苷酸中的圆括号指示所述核苷酸的修饰,

(M) 指示当所述核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代,

(F) 指示当所述核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代,

(X₁) 指示核苷酸是未经修饰的或硫代磷酸酯化的,或当所述核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代,

(X₂) 指示核苷酸是未经修饰的,或当所述核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代,

(X₃) 指示核苷酸是未经修饰的,或当所述核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代,

(X₄) 指示核苷酸是未经修饰的,或当所述核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子或 0- 甲基取代,

(X₅) 指示核苷酸是未经修饰的或硫代磷酸酯化的,

(X₆) 指示核苷酸是未经修饰的或硫代磷酸酯化的,或当所述核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代,和

(X₇) 指示当所述核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子或 0- 甲基取代。

2. 根据权利要求 1 的适体,其包含由下式 (Ia') 表示的序列:

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_4)gg(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a(X_2) \\ g(X_5)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中 a、g、c、u 和 r、a'、c' 和 u', 以及 (M)、(F) 和 (X₂)-(X₅) 和 (X₇) 如对于式 (Ia) 限定的,和

G 是 DNA,其中碱基是鸟嘌呤。

3. 根据权利要求 1 的适体,其包含由下式 (I) 表示的序列:

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'g(M)a'(X_2)gg(M)a(M)gu'(F)c(F)a'(X_2) \\ gu'(F)a(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(F)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中 a、g、c 和 u、a'、g'、c' 和 u', 以及 (M)、(F) 和 (X₁)-(X₃) 如对于式 (Ia) 限定的。

4. 根据权利要求 1 的适体,其包含由下式 (Ia'') 表示的序列:

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_7)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7) \\ a(F)g(X_6)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中 a、g、c、u 和 r、a'、c' 和 u'，以及 (M)、(F)、(X₃) 和 (X₅)-(X₇) 如对于式 (Ia) 限定的，和

G 是 DNA，其中碱基是鸟嘌呤。

5. 根据权利要求 4 的适体，其中在式 (Ia'') 中，在 3' 末端侧的 c' (M)c' (M)c' (M) 是 c(M)c(M)c(M)。

6. 根据权利要求 1 - 5 中任一项的适体，其中当所述核苷酸是在其中核糖的 2'-位置处的羟基任选由 0- 甲基取代，并且碱基是鸟嘌呤的 RNA 时，将所述核苷酸加入由式 (Ia)、(Ia')、(I) 或 (Ia'') 表示的序列的 5' 末端，和 / 或将其其中碱基是胞嘧啶的核苷酸加入其 3' 末端。

7. 根据权利要求 1 的适体，其包含适体编号 52 - 94 中任一序列。

8. 根据权利要求 3 的适体，其包含适体编号 3 - 49 中任一序列。

9. 根据权利要求 1 - 8 中任一项的适体，其具有不超过 70 的碱基长度。

10. 一种适体，其包含由下式 (II) 表示的序列，其与 IL-17 结合，以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合：

$$g(x_1)g(x_1)g(x_1)u(F)ag(S)c(F)c(F)g'(S)g(x_2)aggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)ac'(x_3)c'(x_3)c'(x_3)$$

其中

a、g、c 和 u 各自为 RNA，其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶，

g' 和 c' 各自为 RNA 或 DNA，其中碱基分别为鸟嘌呤或胞嘧啶，

核苷酸中的圆括号指示核苷酸的修饰，

(F) 指示在所述核苷酸中的核糖的 2'-位置处的羟基由氟原子取代，

(S) 指示当核苷酸是 RNA 时，他是硫代磷酸酯化的，

(x₁) 指示核苷酸用锁定核酸 (LNA) 进行修饰，或当所述核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2'-位置处的羟基由 0- 甲基取代；

(x₂) 指示核苷酸是未经修饰的，或当所述核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2'-位置处的羟基由 0- 甲基取代；和

(x₃) 指示核苷酸是未经修饰的，或用 LNA 进行修饰。

11. 根据权利要求 10 的适体，其包含由适体编号 1 或 2 显示的序列。

12. 根据权利要求 10 或 11 的适体，其具有不超过 70 的碱基长度。

13. 根据权利要求 1 - 12 中任一项的适体，其用反向的 dT 或聚乙二醇进行修饰。

14. 根据权利要求 13 的适体，其中所述反向的 dT 或聚乙二醇与所述适体的 5' 末端和 / 或 3' 末端结合。

15. 一种复合物，其包含根据权利要求 1 - 14 中任一项的适体和功能物质。

16. 根据权利要求 15 的复合物，其中所述功能物质是亲和性物质、用于标记的物质、酶、药物递送媒介物或药物。

17. 一种药剂，其包含根据权利要求 1 - 14 中任一项的适体或者根据权利要求 15 或 16 的复合物。

18. 一种用于治疗或预防疾病包括炎性疾病、自身免疫性疾病、癌症、过敏或感染的药剂，其包含根据权利要求 1 - 14 中任一项的适体或者根据权利要求 15 或 16 的复合物。

19. 一种诊断试剂,其包含根据权利要求 1 - 14 中任一项的适体或者根据权利要求 15 或 16 的复合物。

20. 一种检测探针,其包含根据权利要求 1 - 14 中任一项的适体或者根据权利要求 15 或 16 的复合物。

21. 一种用于 IL-17 纯化的载体,其包含根据权利要求 1 - 14 中任一项的适体或者根据权利要求 15 或 16 的复合物。

22. 一种检测 IL-17 的方法,其包括使用根据权利要求 1 - 14 中任一项的适体或者根据权利要求 15 或 16 的复合物。

23. 一种纯化 IL-17 的方法,其包括使用根据权利要求 1 - 14 中任一项的适体或者根据权利要求 15 或 16 的复合物。

针对 IL-17 的适体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及针对白介素(IL-17)的适体、利用其的方法等。

背景技术

[0002] IL-17(或 CTLA-8),由 Th17 细胞等分泌的细胞因子,与炎性疾病、自身免疫性疾病和传染病显著相关。人 IL-17 是 20-30 kDa 糖蛋白,由 155 个氨基酸构成,其包含在 N 末端的信号肽。在其分子结构中,存在六个半胱氨酸残基和一个 N 结合糖链结合位点。成熟形式由 136 个氨基酸组成,通常作为二聚体出现。

[0003] 作为 IL-17 家族的蛋白质,六类蛋白质是已知的:IL-17A、B、C、D、E 和 F。一般地,IL-17 指 IL-17A。IL-17E 也称为 IL-25。人 IL-17 与人 IL-17B、C、D、E 和 F 的氨基酸序列同源性分别为 25、28、22、27 和 44%,IL-17F 具有最高同源性。人 IL-17 与小鼠 IL-17 具有 63% 的同源性。作为其受体,IL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD 和 IL-17RE 是已知的。IL-17 和 IL-17F 形成同二聚体或异二聚体,并且与 IL-17RA 和 IL-17RC 结合。IL-17 和 IL-17RA 的结合很弱,以约 10^7 的 Kd 值,并且 IL-17RC 的涉及可以是重要的。

[0004] Th17 细胞是产生 IL-17 的 $CD4^+$ T 细胞。当 Th17 细胞在体外用 IL-23 进行刺激时,IL-17 生产被诱导。同时, TGF- β 和 IL-6 在 Th17 细胞的分化诱导中起重要作用。TGF- β 和 IL-6 作用于首次用于实验的 T 细胞,以诱导 ROR γ t(转录因子)的表达。因为 ROR γ t 的缺陷阻止 Th17 细胞分化,并且还因为首次用于实验的 T 细胞可以通过被迫表达 ROR γ t,而相反分化成 IL-17 生产细胞,所以该转录因子被认为对于 Th17 细胞的分化是重要的。尽管通过 IL-6 的 STAT3 活化对于诱导 ROR γ t 的表达是重要的,但通过 IL-2 的 STAT5 活化相反抑制表达。IL-2 是调节 T 细胞分化所需的;IL-2 缺陷小鼠显示严重自身免疫;这被认为是由于调节 T 细胞中的减少连同 Th17 细胞的过度分化。当首次用于实验的 T 细胞在体外单独用 TGF- β 进行刺激时,不是诱导 Th17 细胞而是诱导调节 T 细胞。通过 Th1 细胞产生的 IFN- γ 、通过 Th2 细胞产生的 IL-4 等对 Th17 细胞的分化起抑制作用。

[0005] 当 IL-17 与 IL-17 受体结合时,NF- κ B 途径、MAP 激酶途径和 C/EBP 途径经由 Act-1 和 TRAF6 活化,导致炎性细胞因子和趋化因子的诱导。例如,IL-17 作用于巨噬细胞,以诱导 IL-1、TNF 等的表达。另外,已知 IL-17 还作用于结缔组织细胞和上皮组织细胞,例如成纤维细胞和内皮细胞,并且作用于免疫系统细胞例如树突状细胞祖细胞(dendritic cell progenitor),以诱导各种受体和细胞因子例如 IL-6 和 IL-1 的表达。

[0006] 细胞因子例如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 涉及 IL-17 的产生。同时,这些细胞因子的产生由 IL-17 诱导。已知 IL-17 与其他细胞因子协同作用。

[0007] 已发现 IL-17 与炎性疾病、自身免疫疾病等显著相关。已知 IL-17 的表达在患有下述疾病的患者中是升高的:类风湿性关节炎、年龄相关性黄斑变性、牛皮癣、全身性红斑狼疮、白塞氏病(Behcet's disease)、移植物排斥、肾病综合征、炎性肠病、哮喘、多发性硬化、牙周病等。在 IL-17 缺陷小鼠中,据报道其为类风湿性关节炎模型的胶原诱导关节炎(CIA);其为多发性硬化模型的实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE);通过 DNFB 或 TNCB 的接触型过敏

反应 ;通过甲基化 BSA 的迟发型过敏反应 ;通过 OVA 诱导的气道过敏反应等被显著抑制。

[0008] IL-17 也与癌症相关。已报道非小细胞肺癌细胞对 SCID 小鼠的皮下移植促进在其中具有 IL-17 高度表达的小鼠中的癌细胞增殖。还已报道 IL-17 也与宫颈癌和卵巢癌相关。

[0009] IL-17 与传染病相关。IL-17 受体敲除小鼠对肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) 感染、白色念珠菌(*Candida albicans*) 感染、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*) 感染等高度敏感。IL-17 生产通过脂多糖(LPS) 和例如伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*) 和肺炎克雷伯氏菌的细菌细胞体组分诱导。这些组分被认为通过作用于抗原呈递细胞以诱导 IL-23 来促进 IL-17 生产。在 IL-17R 敲除小鼠中,在肺炎克雷伯氏菌感染后,在肺中的感染部位中,在嗜中性粒细胞的迁移和功能中起重要作用的 CXCL1、CXCL2、G-CSF 等的产生被降低,并且嗜中性粒细胞的迁移被抑制。

[0010] 近年来, RNA 适体对治疗药物、诊断试剂和测试试剂的应用已引起关注 ;一些 RNA 适体已经处于临床研究阶段或实际使用中。在 2004 年 12 月,全世界的首个 RNA 适体药物 Macugen 在美国被批准作为用于年龄相关性黄斑变性的治疗药物。RNA 适体指与靶分子例如蛋白质特异性结合的 RNA,并且其可以使用 SELEX(指数富集的配体系统进化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment))方法(参照专利文件 1、2 和 3)进行制备。在 SELEX 方法中,与靶分子特异性结合的 RNA 选自具有约 10^{14} 种不同核苷酸序列的 RNA 库。使用的 RNA 具有约 40 个残基的随机序列,其侧面为引物序列。允许该 RNA 库与靶分子混合,并且使用过滤器等收集仅与靶分子结合的 RNA。收集的 RNA 通过 RT-PCR 进行扩增,并且这用作下一轮的模板。通过将该操作重复约 10 次,可以获得与靶分子特异性结合的 RNA 适体。

[0011] 适体药物,如抗体药物,可以靶向细胞外因子。关于公众域中的许多科学论文及其他参考材料,存在适体药物在一些方面超过抗体药物的可能性。例如,适体通常显示比抗体更高的结合力和更高的特异性。适体不太可能经历免疫消除,并且使用适体不发生不良反应,其为抗体特有的,且起因于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC) 和补体依赖性细胞毒性(CDC)。从递送方面来看,因为适体在大小中是抗体的约 1/10,所以药物对目标位点的递送更容易。因为适体通过化学合成产生,所以各种修饰可以容易地完成,并且通过大规模生产的成本降低是可能的。同时,适体的血液半衰期一般比抗体的那些更短 ;然而,考虑到毒性,这种特性有时是有利的。这些事实导致下述结论 :即使当靶向相同分子时,适体药物潜在地超过抗体药物。

[0012] 专利文件 4 描述了通过上述 SELEX 方法获得的适体,其与 IL-17 结合,以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合。

[0013] [文件列表]

[专利文件]

专利文件 1: W091/19813

专利文件 2: W094/08050

专利文件 3: W095/07364

专利文件 4: W02010/008001。

[0014] 发明概述

待由本发明解决的问题

本发明涉及提供针对 IL-17 的适体和关于利用其的方法等。特别地,本发明旨在提供具有更高质量的适体,其适合用作药物产品。

[0015] 解决问题的方式

本发明人已在解决上述问题的尝试中进行深入研究,且成功产生抗 IL-17 适体,与常规已知的抗 IL-17 适体相比较,其具有极高的质量以及针对 IL-17 和 IL-17 受体的显著高的结合抑制活性,并且能够抑制 IL-17 的生理活性,这导致本发明的完成。

[0016] 相应地,本发明如下:

[1] 包含由下式 (Ia) 表示的序列的适体,其与 IL-17 结合,以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合:

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'(M)g'(M)a'(X_4)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a'(X_2)g(X_6)u'(F)r(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中

a、g、c 和 u 各自为 RNA,其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶,

r 是 RNA,其中碱基是腺嘌呤或鸟嘌呤,

a'、g' 和 c' 各自为 RNA 或 DNA,其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶,

u' 是其中碱基是尿嘧啶的 RNA,其中碱基是尿嘧啶的 DNA,或其中碱基是胸腺嘧啶的 DNA,

核苷酸中的圆括号指示核苷酸的修饰,

(M) 指示当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代,

(F) 指示当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代,

(X₁) 指示核苷酸是未经修饰的或硫代磷酸酯化的,或当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代,

(X₂) 指示核苷酸是未经修饰的,或当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代,

(X₃) 指示核苷酸是未经修饰的,或当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代,

(X₄) 指示核苷酸是未经修饰的,或当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子或 0- 甲基取代,

(X₅) 指示核苷酸是未经修饰的或硫代磷酸酯化的,

(X₆) 指示核苷酸是未经修饰的或硫代磷酸酯化的,或当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代,和

(X₇) 指示当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子或 0- 甲基取代;

[2] 上述 [1] 的适体,其包含由下式 (Ia') 表示的序列:

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_4)gg(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a(X_2)g(X_5)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中 a、g、c、u 和 r、a'、c' 和 u',以及 (M)、(F) 和 (X₂)-(X₅) 和 (X₇) 如对于式 (Ia) 限定的,和

G 是 DNA, 其中碱基是鸟嘌呤 ;

[3] 上述 [1] 的适体, 其包含由下式 (I) 表示的序列 :

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'g(M)a'(X_2)gg(M)a(M)gu'(F)c(F)a'(X_2)gu'(F)a(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(F)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中 a、g、c 和 u、a'、g'、c' 和 u', 以及 (M)、(F) 和 (X₁)-(X₃) 如对于式 (Ia) 限定的 ;

[4] 上述 [1] 的适体, 其包含由下式 (Ia'') 表示的序列 :

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_7)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a(F)g(X_6)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中 a、g、c、u 和 r、a'、c' 和 u', 以及 (M)、(F)、(X₃) 和 (X₅)-(X₇) 如对于式 (Ia) 限定的, 和

G 是 DNA, 其中碱基是鸟嘌呤 ;

[5] 上述 [4] 的适体, 其中在式 (Ia'') 中, 在 3' 末端侧面上的 c'(M)c'(M)c'(M) 是 c(M)c(M)c(M) ;

[6] 上述 [1] - [5] 中任一项的适体, 其中当核苷酸是 RNA 时, 将核苷酸(在其中核糖的 2' - 位置处的羟基任选由 0- 甲基取代, 并且碱基是鸟嘌呤)加入由式 (Ia)、(Ia')、(I) 或 (Ia'') 表示的序列的 5' 末端, 和 / 或将其碱基是胞嘧啶的核苷酸加入其 3' 末端 ;

[7] 上述 [1] 的适体, 其包含适体编号 52 - 94 中任一序列 ;

[8] 上述 [3] 的适体, 其包含适体编号 3 - 49 中任一序列 ;

[9] 上述 [1] - [8] 中任一项的适体, 其具有不超过 70 的碱基长度 ;

[10] 包含由下式 (II) 表示的序列的适体, 其与 IL-17 结合, 以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合 :

$$g(x_1)g(x_1)g(x_1)u(F)ag(S)c(F)c(F)g'(S)g(x_2)aggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)ac'(x_3)c'(x_3)c'(x_3)$$

其中

a、g、c 和 u 各自为 RNA, 其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶,

g' 和 c' 各自为 RNA 或 DNA, 其中碱基分别为鸟嘌呤或胞嘧啶,

核苷酸中的圆括号指示核苷酸的修饰,

(F) 指示在核苷酸中的核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代,

(S) 指示当核苷酸是 RNA 时, 他是硫代磷酸酯化的,

(x₁) 指示核苷酸用锁定核酸(LNA)进行修饰, 或当核苷酸是 RNA 时, 在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代 ;

(x₂) 指示核苷酸是未经修饰的, 或当核苷酸是 RNA 时, 在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代 ; 和

(x₃) 指示核苷酸是未经修饰的, 或用 LNA 进行修饰 ;

[11] 上述 [10] 的适体, 其包含由适体编号 1 或 2 显示的序列 ;

[12] 上述 [10] 或 [11] 的适体, 其具有不超过 70 的碱基长度 ;

[13] 上述 [1] - [12] 中任一项的适体, 其用反向的 dT 或聚乙二醇(PEG)进行修饰 ;

[14] 上述 [13] 的适体, 其中所述反向的 dT 或聚乙二醇与适体的 5' 末端和 / 或 3' 末端结合 ;

[15] 复合物,其包含 [1] - [14] 中任一项的适体和功能物质;

[16] [15] 的复合物,其中所述功能物质是亲和性物质、用于标记的物质、酶、药物递送媒介物或药物;

[17] 药剂,其包含 [1] - [14] 中任一项的适体或者 [15] 或 [16] 的复合物;

[18] 用于治疗或预防疾病包括炎性疾病、自身免疫性疾病、癌症、过敏、感染等的药剂,其包含 [1] - [14] 中任一项的适体或者 [15] 或 [16] 的复合物;

[19] 诊断试剂,其包含 [1] - [14] 中任一项的适体或者 [15] 或 [16] 的复合物;

[20] 检测探针,其包含 [1] - [14] 中任一项的适体或者 [15] 或 [16] 的复合物;

[21] 用于 IL-17 纯化的载体,其包含 [1] - [14] 中任一项的适体或者 [15] 或 [16] 的复合物;

[22] 检测 IL-17 的方法,其包括使用 [1] - [14] 中任一项的适体或者 [15] 或 [16] 的复合物;和

[23] 纯化 IL-17 的方法,其包括使用 [1] - [14] 中任一项的适体或者 [15] 或 [16] 的复合物。

[0017] 发明效果

本发明的适体或复合物可以用作药剂或试剂,例如用于疾病包括炎性疾病、自身免疫性疾病、癌症、过敏或感染等的诊断试剂。本发明的适体或复合物还可以用于纯化和浓缩 IL-17、IL-17 的标记、以及检测和定量 IL-17。

[0018] 附图简述

图 1 显示了当本发明的适体经由接头聚乙二醇化时,代表性 5' 末端修饰的聚乙二醇化适体的结构,以及 5' 末端和 3' 末端修饰的聚乙二醇化适体的结构。

[0019] 图 2 显示了本发明的聚乙二醇化适体对小鼠 IL-23 诱导牛皮癣模型的抑制作用,其中水平轴显示盐水施用组(阴性对照组)、抗 IL-17 抗体施用组(阳性对照组)、和聚乙二醇化适体(A:适体编号 8 ;B:适体编号 51 和适体编号 48)施用组,并且垂直轴显示小鼠耳廓的厚度。在该图中,每个值显示平均值 \pm 平均值的标准误(n=4 或 5),和通过单向方差分析和 Dunnett 氏方法分析统计学显著差异(*:P<0.05)。

[0020] 图 3 显示了本发明的聚乙二醇化适体对小鼠中的葡糖-6-磷酸异构酶诱导关节炎模型的关节炎抑制作用。在该图中,空心正方形显示盐水施用组(对照组),并且实心圆圈显示聚乙二醇化适体(适体编号 8)施用组。在该图中,每个值显示平均值 \pm 平均值的标准误(n=10),并且通过威-怀-曼三氏方法(Wilcoxon-Mann-Whitney's method)分析统计学显著差异(*:P<0.05, **:P<0.01)。

[0021] 图 4 显示了本发明的聚乙二醇化适体对小鼠中的胶原诱导关节炎模型的关节炎抑制作用。在该图中,空心正方形显示盐水施用组(对照组),实心圆圈显示本发明的聚乙二醇化适体(A:适体编号 8 ;B:适体编号 64)施用组,并且黑色菱形显示已知适体(适体编号 51)施用组。在该图中,每个值显示平均值 \pm 平均值的标准误(n=9 或 10),并且通过威-怀-曼三氏方法分析统计学显著差异(*:P<0.05, **:P<0.01)。

[0022] 实施方案描述

在第一个实施方案中,本发明提供了包含由下式 (Ia) 表示的序列的适体,其与 IL-17 结合,以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合:

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'(M)g(M)a'(X_4)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7) \\ a'(X_2)g(X_6)u'(F)r(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中

a、g、c 和 u 各自为 RNA，其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶，

r 是 RNA，其中碱基是腺嘌呤或鸟嘌呤，

a'、g' 和 c' 各自为 RNA 或 DNA，其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶，

u' 是其中碱基是尿嘧啶的 RNA，其中碱基是尿嘧啶的 DNA，或其中碱基是胸腺嘧啶的 DNA，

核苷酸中的圆括号指示核苷酸的修饰，

(M) 指示当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代，

(F) 指示当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代，

(X₁) 指示核苷酸是未经修饰的或硫代磷酸酯化的，或当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代，

(X₂) 指示核苷酸是未经修饰的，或当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代，

(X₃) 指示核苷酸是未经修饰的，或当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代，

(X₄) 指示核苷酸是未经修饰的，或当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子或 0- 甲基取代，

(X₅) 指示核苷酸是未经修饰的或硫代磷酸酯化的，

(X₆) 指示核苷酸是未经修饰的或硫代磷酸酯化的，或当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代，

(X₇) 指示当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子或 0- 甲基取代。

[0023] 在一个优选实施方案中，本发明提供了包含由下式 (Ia') 表示的序列的适体，其与 IL-17 结合，以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合：

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_4)gg(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7)a(X_2) \\ g(X_5)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中 a、g、c、u 和 r、a'、c' 和 u'，以及 (M)、(F) 和 (X₂)-(X₅) 和 (X₇) 如对于式 (Ia) 限定的，和

G 是 DNA，其中碱基是鸟嘌呤。

[0024] 在一个优选实施方案中，本发明提供了包含由下式 (I) 表示的序列的适体，其与 IL-17 结合，以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合：

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g'(X_1)c(M)c(M)g'(M)g(M)a'(X_2)gg(M)a(M)gu'(F)c(F)a'(X_2) \\ gu'(F)a(X_3)a'(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u'(F)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中 a、g、c 和 u、a'、g'、c' 和 u'，以及 (M)、(F) 和 (X₁)-(X₃) 如对于式 (Ia) 限定的。

[0025] 在一个优选实施方案中，此外，本发明提供了包含由下式 (Ia'') 表示的序列的适体，其与 IL-17 结合，以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合：

$$g(M)g(M)g(M)u(M)a'(M)g(X_5)c(M)c(M)Gg(M)a(X_7)g(X_5)g(M)a(M)g(X_5)u'(F)c(X_7) \\ a(F)g(X_6)u'(F)r(X_3)a(X_3)u(M)c(M)g(M)g(M)u(X_7)a'(M)c'(M)c'(M)c'(M)$$

其中 a、g、c、u 和 r、a'、c' 和 u'，以及 (M)、(F)、(X₃) 和 (X₅)-(X₇) 如对于式 (Ia) 限定的，和

G 是 DNA，其中碱基是鸟嘌呤。

[0026] 在一个优选实施方案中，此外，本发明提供了与 IL-17 结合，以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合的适体，其中在式 (Ia'') 中，在 3' 末端侧面上的 c' (M)c' (M)c' (M) 是 c(M)c(M)c(M)。

[0027] 适体指对于特别的靶分子具有结合活性的核酸分子。适体可以通过与特定靶分子结合，来抑制特定靶分子的活性。本发明的适体可以是 RNA、DNA、经修饰的核酸或其混合物。本发明的适体还可以采取线性或环状形式。

[0028] IL-17 指由 Th17 细胞等分泌的细胞因子，并且是例如具有由登录代码 AAH67505 或 NP002181 显示的氨基酸序列的蛋白质。IL-17 有时被称为 IL-17A 或 CTLA-8。除在动物体内产生之外，如本发明中使用的 IL-17 可以通过使用小鼠及其他哺乳动物细胞、昆虫细胞、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 细胞等产生，并且还可以通过化学合成进行制备。当 IL-17 通过细胞培养或化学合成进行制备时，可以容易地制备突变体。此处，突变体意指其中几个氨基酸已被取代的序列或部分氨基酸序列，并且意指具有基本上由 IL-17 具有的活性中的至少一种的蛋白质或肽。当氨基酸被取代时，取代氨基酸可以是天然出现的氨基酸，或可以是非天然出现的氨基酸。如本发明中提及的，IL-17 包括这些突变体。

[0029] IL-17 受体意指 IL-17 与之结合的细胞表面蛋白质和介导细胞内信号传导的蛋白质。作为 IL-17 受体家族的成员，IL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD 和 IL-17RE 是已知的。如本发明中提及的，IL-17 受体可以是包含天然存在的氨基酸序列的蛋白质，或可以是其突变体。此处，突变体意指其中几个氨基酸已被取代的序列或部分氨基酸序列，并且意指具有关于 IL-17 的结合活性的蛋白质或肽。本发明的适体抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合。

[0030] 本发明的适体是否抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合可以例如通过下述测试进行评估。

[0031] 对于测量，使用由 BIAcore 制造的 BIAcore2000 或 T100。将蛋白 A(21181, PIERCE) 固定到 CM5 传感器芯片上，并且在其上固定其中 IL-17 受体和 IgG 的 Fc 部分融合的蛋白质 (例如重组人 IL-17R-Fc 嵌合体 (177-IR, R&D systems))。待固定的量为约 20 (对于 2000) 或约 200RU。作为分析物，将 IL-17 (约 100 或 150 nM) 和适体 (约 50 或 100 nM) 混合，维持 15 分钟，并且将混合物注入 BIAcore2000 内。检测 IL-17 与 IL-17 受体的结合。

[0032] 随着值变得更低，适体被判断为更强抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合。

[0033] 在一个优选实施方案中，本发明的适体与 IL-17 结合，以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合，由此他可以抑制衍生自任何哺乳动物的 IL-17 的信号传导活性。哺乳动物的例子包括灵长类动物 (例如人、猴)、啮齿类动物 (例如小鼠、大鼠、豚鼠)、以及伴侣动物、驯养动物和工作动物 (例如犬、猫、马、牛、山羊、绵羊、猪)。

[0034] IL-17 信号传导活性的抑制意指针对 IL-17 具有的任何信号传导活性的抑制能力。例如，IL-17 已知与 IL-17 受体结合，并且经由 TRAF6 等活化 NF- κ B 途径和 MAP 激酶途径，并且随后经由此类信号转导途径诱导各种细胞因子和趋化因子的产生。因此，IL-17 信号传导抑制活性指抑制这些细胞因子、趋化因子等的产生的活性，所述细胞因子、趋化因子等存在于 IL-17 信号转导途径下游。因为这些细胞因子和趋化因子的表达诱导炎症细胞

的迁移和活化,所以针对 IL-17 的信号传导抑制活性还意指其活性的抑制。

[0035] 在本发明的适体中,核苷酸的部分如上文提及的式 (Ia)、(Ia')、(I) 和 (Ia'') 中所示进行修饰,以增强与 IL-17 的结合特性、针对 IL-17 和 IL-17 受体的结合抑制活性等。

[0036] 在本说明书中,未经修饰的核苷酸意指在核糖核苷酸中的核糖的 2'-位置处的羟基,或在脱氧核糖核苷酸中的核糖的 2'-位置处的氢未被其他元素取代,并且经修饰的核苷酸意指例如在核糖核苷酸中的核糖的 2'-位置处的羟基由氟原子或 O-甲基取代,核苷酸是硫代磷酸酯化的,用锁定核酸(LNA)进行修饰的等。“核苷酸是硫代磷酸酯化的”意指邻近核苷酸之间的结合位点中的磷酸基是硫化的,即磷酸二酯键转换为硫代磷酸酯键,并且用 LNA 修饰意指在核糖的 2'-位置处的氧原子和在核苷酸的 4'-位置处的碳原子是亚甲基交联的。

[0037] 由式 (Ia)、(Ia')、(I) 和 (Ia'') 显示的各种修饰可以根据本身已知的方法(例如 Sproat 等人(1991), Nucl. Acid. Res. 19,733-738; Cotton 等人(1991), Nucl. Acid. Res. 19,2629-2635; Hobbs 等人(1973), Biochemistry 12,5138-5145 等)来执行。

[0038] 本发明还提供了与 IL-17 结合以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合的适体,其包含这样的序列,其中当核苷酸是 RNA 时,将核苷酸(在其中核糖的 2'-位置处的羟基任选由 O-甲基取代,并且碱基是鸟嘌呤)加入由式 (Ia)、(Ia')、(I) 或 (Ia'') 表示的序列的 5' 末端,和 / 或将其中碱基是胞嘧啶的核苷酸加入其 3' 末端。

[0039] 优选地,本发明的适体可以是含有选自下文所示的适体编号 3 - 49 和 52 - 94 的序列的适体,或多个此类适体的缀合物,只要他与 IL-17 结合且抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合。

[0040] 在多个此类适体的上述缀合物中,缀合可以通过串联合来实现。在缀合中,可以利用接头。作为接头,可以提及核苷酸链(例如 1 至约 20 个核苷酸)和非核苷酸链(例如 $-(CH_2)_n-$ 接头、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 接头、六甘醇接头、TEG 接头、含肽接头、含 -S-S- 键接头、含 -CONH- 键接头、含 $-OPO_3-$ 键接头)。如上述多个缀合物中提及的多个并无具体限制,只要他是两个或更多个,并且多个可以是例如 2、3 或 4 个。

[0041] 本发明的适体的长度并无具体限制,并且通常可以为不超过约 200 个核苷酸。当核苷酸的总数目更小时,化学合成和大量生产将更容易,并且存在在成本方面的主要优点。还考虑化学修饰很容易,并且在体内的稳定性很高。因此,从应用于药物产品使用的方面来看,本发明的适体更期望具有比 70 个核苷酸更短的碱基长度,优选不超过约 50 个核苷酸,更优选不超过约 40 个核苷酸(例如不超过 40 个核苷酸、不超过 39 个核苷酸、不超过 38 个核苷酸、不超过 37 个核苷酸、不超过 36 个核苷酸),最优选不超过约 35 个核苷酸(例如不超过 35 个核苷酸、不超过 34 个核苷酸、不超过 33 个核苷酸)。

[0042] 在另一个实施方案中,此外,本发明提供了包含由下式 (II) 表示的序列的适体,其与 IL-17 结合,以抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合:

$$g(x_1)g(x_1)g(x_1)u(F)ag(S)c(F)c(F)g'(S)g(x_2)aggagu(F)c(F)agu(F)aau(F)c(F)ggu(F)ac'(x_3)c'(x_3)c'(x_3)$$

其中

a、g、c 和 u 各自为 RNA,其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶,

g' 和 c' 各自为 RNA 或 DNA,其中碱基分别为鸟嘌呤或胞嘧啶,

核苷酸中的圆括号指示核苷酸的修饰，

(F) 指示在核苷酸中的核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代，

(S) 指示当核苷酸是 RNA 时，他是硫代磷酸酯化的，

(x₁) 指示核苷酸用 LNA 进行修饰，或当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 O- 甲基取代；

(x₂) 指示核苷酸是未经修饰的，或当核苷酸是 RNA 时，在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 O- 甲基取代；和

(x₃) 指示核苷酸是未经修饰的，或用 LNA 进行修饰。

[0043] 此外，在含有由上述式 (II) 表示的序列的适体中，核苷酸是部分修饰的，如在含有由上文提及的式 (Ia)、(Ia')、(I) 或 (Ia'') 表示的序列的适体中。式 (II) 中所示的修饰可以根据如上文提及的本身已知的方法来执行。

[0044] 优选地，本发明的适体可以是含有选自下文所示的适体编号 1 或 2 的序列的适体，或多个此类适体的缀合物，只要他与 IL-17 结合且抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合。

[0045] 在多个此类适体的上述缀合物中，缀合可以通过串联合来实现。在缀合中，可以利用接头。作为接头，可以提及核苷酸链（例如 1 至约 20 个核苷酸）和非核苷酸链（例如 -(CH₂)_n- 接头、-(CH₂CH₂O)_n- 接头、六甘醇接头、TEG 接头、含肽接头、含 -S-S- 键接头、含 -CONH- 键接头、含 -OPO₃- 键接头）。如上述多个缀合物中提及的多个并无具体限制，只要他是两个或更多个，并且多个可以是例如 2、3 或 4 个。

[0046] 在本发明的适体中，核酸碱基可以进一步改变（例如化学取代），以增强与 IL-17 的结合特性、针对 IL-17 和 IL-17 受体的结合抑制活性、稳定性等。此类改变包括 3' 末端和 5' 末端的那种例如加帽。

[0047] 改变可以通过对末端添加下述进一步执行：聚乙二醇、氨基酸、肽、反向 dT、核酸、核苷、多核苷酸、豆蔻酰基、石胆酸油烯基、二十二烷基、月桂酰基、硬脂酰基、棕榈酰基、油酰基、亚油酰基、其他脂质、类固醇、胆固醇、咖啡因、维生素、色素、荧光物质、抗癌剂、毒素、酶、放射性物质、生物素等。对于此类改变，参见例如美国专利 5,660,985 和 5,756,703。

[0048] 特别地，当改变通过 PEG 的末端添加来执行时，PEG 的分子量并无具体限制，并且优选为 1000 - 100000，更优选 20000 - 90000。PEG 可以是线性的或支化成两条或更多条链（多臂 PEG）。关于 PEG 的末端添加，他可以加入 3' 末端和 5' 末端中的仅一个，或 3' 末端和 5' 末端两者中。

[0049] 此类 PEG 并无具体限制，并且本领域普通技术人员可以适当选择且使用商购可得或已知的 PEG（例如 http://www.peg-drug.com/peg_product/branched.html）。待应用于本发明的适体的 PEG 的特定优选例子包括分子量为 20000 的 CS 型 PEG 和 GS 型 PEG（由 NOF CORPORATION 制造的 SUNBRIGHT ME-200GS），分子量为 40000 的 2 支化 GS 型 PEG（由 NOF CORPORATION 制造的 SUNBRIGHT GL2-400GS2），分子量为 40000 的 2 支化 TS 型 PEG（由 NOF CORPORATION 制造的 SUNBRIGHT GL2-400TS），分子量为 40000 的 4 支化 TS 型 PEG（由 NOF CORPORATION 制造的 SUNBRIGHT GL4-400TS），分子量为 80000 的 2 支化 TS 型 PEG（由 NOF CORPORATION 制造的 SUNBRIGHT GL2-800TS），分子量为 80000 的 4 支化 TS 型 PEG（由 NOF CORPORATION 制造的 SUNBRIGHT GL4-800TS）等。

[0050] 在这种情况下，在本发明的适体中，PEG 可以直接加入末端中。更优选具有可以与

PEG 等结合的基团的接头应加入其末端,并且 PEG 应经由接头加入本发明的适体中。

[0051] 关于 PEG 和本发明的适体的接头并无具体限制,并且碳链数目、官能团等可以根据结合位点、PEG 种类等适当地加以选择。此类接头的例子包括具有氨基的接头。具体地,当加入 5' 末端时,可以提及 ssH 接头(SAFC)或 DMS(O)MT-AMINO-MODIFIER(GLEN RESEARCH),并且当加入 3' 末端时,可以提及 TFA Amino C-6 lcaa CPG (ChemGenes) 等。当选择这种接头时,例如将 N-羟基琥珀酰亚胺的活性基团加入 PEG 中,并且与在接头侧的氨基反应,由此本发明的适体可以经由接头与 PEG 结合。

[0052] 作为 PEG 和接头,优选使用商购可得的产品。与 PEG、接头和本发明的适体结合相关的反应条件等可以由本领域普通技术人员适当地确定。

[0053] 本发明的适体可以如本文公开的且通过本领域本身已知的方法进行化学合成。适体以广泛多样的结合模式与靶分子结合,例如基于磷酸基的负电荷的离子键、基于核糖的疏水键和氢键、以及基于核酸碱基的氢键和堆积相互作用。特别地,在与构成核苷酸数目相同的数目存在的,基于磷酸基的负电荷的离子键很强,并且与蛋白质的正电荷表面上存在的赖氨酸和精氨酸结合。为此,不涉及与靶分子直接结合的核酸碱基可以是被取代的。特别地,因为茎结构的区域已经形成碱基对,并且面对双螺旋结构的内部,所以核酸碱基不太可能与靶分子直接结合。因此,即使当碱基对替换为另一个碱基对时,适体的活性通常也不减少。在其中不形成碱基对的结构例如环结构中,如果核酸碱基不涉及与靶分子直接结合,碱基取代是可能的。关于核糖的 2' - 位置的修饰,在核糖的 2' - 处的官能团很少与靶分子直接相互作用,但在许多情况下,他是无关的,并且可以由另一种经修饰的分子取代。因此,除非涉及与靶分子直接结合的官能团被取代或缺失,适体通常保留其活性。总体三维结构不广泛改变也是重要的。

[0054] 适体可以通过利用 SELEX 方法或其改善的版本(例如 Ellington 等人(1990) Nature, 346, 818-822; Tuerk 等人(1990) Science, 249, 505-510)进行制备。在 SELEX 方法中,通过增加轮数或使用竞争物质,浓缩且选择对于靶分子显示出更强的结合潜力的适体。因此,通过调整 SELEX 的轮数和 / 或改变竞争条件,在一些情况下,可以获得具有不同结合力的适体、具有不同结合模式的适体、以及具有相同结合力或结合模式但不同碱基序列的适体。SELEX 方法包括通过 PCR 的扩增过程;通过在过程中经由使用锰离子等引起突变,能够以更高的多样性执行 SELEX。

[0055] 通过 SELEX 获得的适体是对于靶分子显示出高亲和力的核酸,但这不意指与靶分子的生物活性位点结合。因此,通过 SELEX 获得的适体不一定对靶物质的功能起作用。IL-17 是碱性蛋白质,并且被认为可能也许允许核酸与其非特异性结合。不与活性位点结合的适体不影响靶物质的活性。事实上,用于对照的 RNA 不抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合。

[0056] 可以对因此选择的活性适体实施 SELEX 优化,以实现高功能。对于 SELEX 优化,制备其中具有确定的序列的适体部分随机化的模板或掺杂约 10 - 30% 的随机序列的模板,并且再次执行 SELEX。

[0057] 通过 SELEX 获得的适体具有约 70 个核苷酸的长度,并且这不容易像这样制备为药剂。因此,必须重复尝试错误努力,以将适体缩短为能够容易的化学合成的约 50 个核苷酸或更少的长度。

[0058] 取决于关于通过 SELEX 获得的适体的引物设计,后续最小化操作的容易性改变。

除非设计适当引物,否则即使通过 SELEX 选择具有活性的适体,后续开发也是不可能的。在本发明中,即使具有 31 个核苷酸(适体编号 1 - 4、6 - 15、19 - 49 和 52 - 94)或 33 个核苷酸(适体编号 5 和 16 - 18),也可以获得能够维持活性的适体。

[0059] 适体是可容易修饰的,因为他们允许化学合成。对于适体,通过使用 MFOLD 程序预测二级结构,或通过经由 X 射线分析或 NMR 分析预测构象,能够在一定程度上预测哪个核苷酸可以被取代或缺失,并且在哪儿插入新核苷酸。具有新序列的预测适体可以容易地化学合成,并且可以使用现有测定系统确定适体是否保留活性。

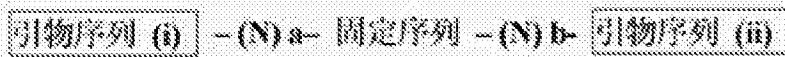
[0060] 当通过如上所述的反复尝试错误努力鉴定所获得的适体与靶分子结合的重要区域时,即使当新序列加入序列的两个末端时,活性在许多情况下也保持不变。新序列的长度并无具体限制。

[0061] 修饰如序列提供广泛范围的设计或改变。

[0062] 如上所述,适体允许广泛范围的设计或改变。本发明还提供了适体的生产方法,其允许广泛范围的适体设计或改变,所述适体包含特定序列(例如对应于选自下述的一部分的序列:茎区、内部环区、发夹环区和单链区;下文根据需要缩写为固定序列)。

[0063] 例如,此类适体的生产方法包括:通过使用由下文所示的核苷酸序列组成的单一一种类的核酸分子,来产生包含固定序列的适体:

表 1



其中(N) a 表示由“a”个单位的 N 组成的核苷酸链;(N) b 表示由“b”个单位的 N 组成的核苷酸链;N 的单位各自无论相同还是不同,是选自 A、G、C、U 和 T (优选 A、G、C 和 U) 的核苷酸。“a”和“b”各自无论相同还是不同,可以是任何数目,并且可以是例如 1 至约 100,优选 1 至约 50,更优选 1 至约 30,再更优选 1 至约 20 或 1 至约 10,或多类核酸分子(例如在 a、b 等数目中不同的核酸分子文库)和分别对应于引物序列(i)和(ii)的引物对。

[0064] 本发明还提供了包含本发明的适体和与之结合的功能物质的复合物。在本发明的复合物中的适体和功能物质之间的键可以是共价键或非共价键。本发明的复合物可以是其中本发明的适体和相同种类或不同种类的一个或多个(例如 2 或 3 个)功能物质结合在一起的复合物。功能物质并无具体限制,只要他对本发明的适体新近添加某一功能,或能够改变(例如改善)本发明的适体可以具有的某一特征。作为功能物质的例子,可以提及蛋白质、肽、氨基酸、脂质、糖、单糖、多核苷酸和核苷酸。作为功能物质的例子,可以提及亲和性物质(例如生物素、链霉抗生物素蛋白、对于靶互补序列具有亲和力的多核苷酸、抗体、谷胱甘肽琼脂糖、组氨酸)、用于标记的物质(例如荧光物质、发光物质、放射性同位素)、酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶)、药物递送媒介物(例如脂质体、微球体、肽、聚乙二醇)、药物(例如在导弹疗法(missile therapy)使用的那些,例如卡奇霉素和多卡米星;氮芥类似物例如环磷酰胺、美法仑、异环磷酰胺或曲磷胺;乙烯亚胺例如噻替派;亚硝基脲例如卡莫司汀;烷化剂例如替莫唑胺或达卡巴嗪;叶酸样代谢拮抗剂例如氨甲蝶呤或雷替曲塞;嘌呤类似物例如硫鸟嘌呤、克拉屈滨或氟达拉滨;嘧啶类似物例如氟尿嘧啶、替加氟或吉西他滨;长春花生物碱例如长春碱、长春新碱或长春瑞滨及其类似物;鬼臼毒素衍生物例如依托泊苷、紫杉类、多西他赛或紫杉醇;葱环例如多柔比星、表柔比星、伊达比星和米托蒽醌及其类似

物；其他细胞毒性抗生素例如博来霉素和丝裂霉素；铂化合物例如顺铂、卡铂和奥沙利铂；喷司他丁、米替福新、雌莫司汀、托泊替康、伊立替康和比卡鲁胺、和毒素（例如蓖麻毒素、*lia* 毒素（*liatoxin*）和 Vero 毒素（*Vero toxin*））。在一些情况下，这些功能分子最终被去除。此外，分子可以是可以被酶识别且切割的肽，所述酶例如凝血酶、基质金属蛋白酶（MMP）和因子 X，并且可以是可以被核酸酶或限制性酶切割的多核苷酸。

[0065] 本发明的适体或复合物可以用作例如药剂、诊断药物、检查药物或试剂。本发明的适体或复合物可特别用于作用于治疗炎症疾病，自身免疫性疾病等的药剂、诊断药物、检查药物或试剂。

[0066] 炎症疾病和自身免疫疾病等的例子包括多发性硬化（MS）、系统性红斑狼疮（SLE）、强直性脊柱炎（AS）、干燥综合症、多肌炎（PM）、皮炎（DM）、风湿关节炎（RA）、骨关节炎（OA）、炎性肠病（克罗恩氏病等）、系统性硬化症（PSS）、硬皮病、结节性动脉周围炎（PN）、甲状腺疾病（格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎等）、格林-巴利综合征、原发性胆汁性肝硬化（PBC）、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、重症肌无力（MG）、肌萎缩性侧索硬化症（ALS）、I 型糖尿病、斑块性牛皮癣、脓疱性牛皮癣、哮喘、嗜中性粒细胞功能异常、嗜酸细胞性肺炎、特发性肺纤维化、过敏性肺炎、癌症（例如食道癌、甲状腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、胸部癌、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌、肾母细胞瘤、前列腺癌、骨肉瘤）、移植病（例如移植物排斥、移植物抗宿主病）、过敏（例如过敏性鼻炎、特应性皮炎、食物过敏、荨麻疹、过敏性肺炎）、ANCA 相关疾病、杜氏肌营养不良、肺气肿、肺水肿、肺结核、肺泡蛋白沉积症、肺淋巴管肌瘤病（LAM）、气胸、胸膜炎、手术后粘连、子宫内膜异位症、成人牙周炎、支气管炎、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、感染、年龄相关性黄斑变性、视网膜病变、青光眼、白内障、葡萄膜炎、白塞氏病、肝炎、肝硬化、肝衰竭、肾梗塞、肾炎、肾衰竭、膀胱炎、脑梗塞、脑出血、颅内出血、蛛网膜下腔出血、高血压性脑病、脑栓塞、短暂性脑缺血发作、骨髓炎、化脓性关节炎、骨质疏松症、椎间盘突出症、痛风等。

[0067] 本发明的适体或复合物还可以用作药物递送媒介物、用于体内成像的探针、用于确定 IL-17 的血液浓度的探针、用于组织学染色的探针、用于 ELISA 的探针以及用于 IL-17 分离和纯化的配体。

[0068] IL-17 已知作用于各种细胞，例如成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞、软骨细胞、成骨细胞、树突细胞祖细胞、骨髓衍生的间质细胞、T 细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞。IL-17 通过作用于这些细胞，诱导各种细胞因子、趋化因子、受体、粘附分子、酶等的产生和表达。具体地，可以提及 CXCL1（KC 或 Gro α ）、CXCL2（MIP2 或 Gro β ）、CXCL5（LIX）、CXCL6（GCP-2）、CXCL8（IL-8）、CXCL9（MIG）、CXCL10（IP10）、CXCL11（I-TAC）、CCL2（MCP-1）、CCL5（RANTES）、CCL7（MCP-3）、CCL11（嗜中性粒细胞趋化因子）、CXCL12（SDF-1）、CCL20（MIP3 α ）、IL-1、IL-6、IL-19、TNF、CSF2（GM-CSF）、CSF3（G-CSF）、ICAM-1、VCAM-1、PTGS2（COX2）、NOS2（iNOS）、LCN2（24p3）、DEFB4（BD2）、S100A7（牛皮癣素）、S100A8（钙粒蛋白 A）、S100A9（钙粒蛋白 B）、MUC5AC、MUC5B、EREG、SOCS3、TNFSF11（RANKL）、MMP1、MMP3、MMP9、MMP13、TIMP1、ADAMTS4、PGE2、SCF、CD80、CD86、MHC 等。因此，本发明的适体或复合物可以用作药剂、诊断药物、检查药物或试剂，用于与这些细胞和细胞因子、趋化因子等相关的疾病。

[0069] 通过与 IL-17 受体结合，IL-17 活化 Act1 和 TRAF6，并且活化 NF- κ B 途径、MAP 激

酶途径、C/EBP 途径等。因此,本发明的适体或复合物可以用作药剂、诊断药物、检查药物或试剂,用于与这些信号转导途径的活化相关的疾病。

[0070] 本发明的适体或复合物可以用于预防或治疗炎症性疾病和自身免疫疾病等(例如多发性硬化(MS)、系统性红斑狼疮(SLE)、强直性脊柱炎(AS)、干燥综合症、多肌炎(PM)、皮肌炎(DM)、风湿关节炎(RA)、骨关节炎(OA)、炎性肠病(克罗恩氏病等)、系统性硬化症(PSS)、硬皮病、结节性动脉周围炎(PN)、甲状腺疾病(格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎等)、格林-巴利综合征、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、重症肌无力(MG)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、I 型糖尿病、斑块性牛皮癣、脓疱性牛皮癣、哮喘、嗜中性粒细胞功能异常、嗜酸细胞性肺炎、特发性肺纤维化、过敏性肺炎)、癌症(例如食道癌、甲状腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、胸部癌、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌、肾母细胞瘤、前列腺癌、骨肉瘤)、移植病(例如排斥、移植物抗宿主病)、过敏(例如过敏性鼻炎、特应性皮炎、食物过敏反、荨麻疹、过敏性肺炎)、ANCA 相关疾病、杜氏肌营养不良、肺气肿、肺水肿、肺结核、过敏性肺炎、肺蛋白沉积症、肺淋巴管肌瘤病(LAM)、气胸、胸膜炎、手术后粘连、子宫内膜异位症、成人牙周炎、支气管炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、感染、年龄相关性黄斑变性、视网膜病变、青光眼、白内障、葡萄膜炎、白塞氏病、肝炎、肝硬化、肝衰竭、肾梗塞、肾炎、肾衰竭、膀胱炎、脑梗塞、脑出血、颅内出血、蛛网膜下腔出血、高血压性脑病、脑栓塞、短暂性脑缺血发作、骨髓炎、化脓性关节炎、骨质疏松症、椎间盘突出症和痛风。

[0071] 本发明的药剂可以是用药学可接受的载体配制的药剂。药学可接受的载体的例子包括但不限于赋形剂例如蔗糖、淀粉、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、葡萄糖、纤维素、滑石、磷酸钙和碳酸钙;粘合剂例如纤维素、甲基纤维素、羟丙基纤维素、聚丙烯吡咯烷酮(polypropylpyrrolidone)、明胶、阿拉伯树胶、聚乙二醇、蔗糖和淀粉;崩解剂例如淀粉、羧甲基纤维素、羟丙基淀粉、钠-乙二醇-淀粉、碳酸氢钠、磷酸钙和柠檬酸钙;润滑剂例如硬脂酸镁、气相二氧化硅(Aerosil)、滑石和十二烷基硫酸钠;调味剂例如柠檬酸、薄荷醇、甘草甜素-铵盐、甘氨酸和橙粉;防腐剂例如苯甲酸钠、亚硫酸氢钠、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯;稳定剂例如柠檬酸、柠檬酸钠和乙酸;悬浮剂例如甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和硬脂酸铝;分散剂例如表面活性剂;稀释剂例如水、盐水和橙汁;蜡基质例如可可脂、聚乙二醇和白煤油;等。

[0072] 适合于经口施用的制备物是通过将有效量的配体溶解于稀释剂例如水、盐水或橙汁中制备的溶液;以固体或颗粒形式的包含有效量的配体的胶囊、囊剂或片剂;通过将有效量的活性成分悬浮于适当分散剂中制备的悬浮液;通过将有效量的活性成分的溶液在适当分散剂中分散且乳化制备的乳状液等。

[0073] 本发明的药剂可以通过本身已知的方法进行包被,用于味道掩蔽、肠溶解、持续释放等的目的。作为用于包被的包被试剂的例子,使用羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、聚氧化乙烯二醇、Tween 80、Pluronic F68、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟甲基纤维素乙酸琥珀酸酯、Eudragit(由 Rohm, 德国制造,甲基丙烯酸/丙烯酸共聚物)、色素(例如、氧化铁红、二氧化钛等)等。药剂可以是快速释放制备物或持续释放制备物。持续释放基质的例子包括脂质体、去端肽胶原、明胶、羟磷灰石、PLGA 等。

[0074] 作为适合于肠胃外施用(例如静脉内施用、皮下施用、肌肉施用、局部施用、腹腔内施用、鼻内施用、肺施用等)的制备物,可获得水性和非水性等渗无菌可注射液体,其可以包含抗氧化剂、缓冲溶液、杀菌剂、等渗剂等。还可以提及水性和非水性无菌悬浮液,其可以包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、抗菌剂等。制备物可以以单位剂量体积或几个分份剂量包括在容器例如安瓿或小瓶中。活性成分和药学可接受的载体还可以以这样的状态冷冻干燥且贮存,其可以紧在使用前溶解于或悬浮于适当的无菌媒介物中。除液体注射剂之外,吸入剂和软膏也是可接受的。在吸入剂的情况下,以冷冻干燥状态的活性成分可以是微粒化的,并且通过吸入使用适当吸入装置施用,使用喷雾器吸入等。根据需要,吸入剂可以适当地与常规使用的表面活性剂、油、调味品、环糊精或其衍生物等混合。

[0075] 此处,表面活性剂的例子包括油酸、卵磷脂、二甘醇二油酸酯、四氢糠基油酸酯、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、三油酸甘油酯、单月桂酸甘油酯、单油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、单赖氨酸甘油酯(glyceryl monolysinoate)、鲸蜡醇、硬脂醇、聚乙二醇400、西吡氯铵、脱水山梨醇三油酸酯(商品名, Span 85)、脱水山梨醇单油酸酯(商品名, Span 80)、脱水山梨醇单月桂酸酯(商品名, Span 20)、聚氧化乙烯硬化蓖麻油(商品名, HCO-60)、聚氧化乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯(商品名, Tween 20)、聚氧化乙烯(20)脱水山梨醇单油酸酯(商品名, Tween 80)、天然资源来源的卵磷脂(商品名, EPICLON)、油烯基聚氧化乙烯(2)醚(商品名, Brij 92)、硬脂酰基聚氧化乙烯(2)醚(商品名, Brij 72)、月桂基聚氧化乙烯(4)醚(商品名, Brij 30)、油烯基聚氧化乙烯(2)醚(商品名, Genapol 0-020)、氧化乙烯和氧化丙烯的嵌段共聚物(商品名, Synperonic)等。油的例子包括玉米油、橄榄油、棉籽油、葵花子油等。在软膏的情况下,将适当的药学可接受的基质(黄凡士林、白凡士林、石蜡、塑料基质(plastibase)、硅酮、白软膏、蜂蜡、猪油、植物油、亲水性软膏、亲水性矿脂、纯化羊毛脂、水解羊毛脂、吸水性软膏、亲水塑料基质、聚乙二醇软膏等)与活性成分掺和,且用作制备物。

[0076] 吸入剂可以根据常规方法产生。具体地,吸入剂可以通过下述产生:将上述本发明的适体或复合物粉末化或液化,将其在吸入推进剂和/或载体中掺和,并且将其填充到适当的吸入器皿中。当上述本发明的适体或复合物是粉末时,可以使用普通的机械粉末吸入器;在液体的情况下,可以使用吸入器例如喷雾器。此处,作为推进剂,可以广泛使用常规已知的推进剂;可以提及氯氟烃系列化合物,例如氯氟烃-11、氯氟烃-12、氯氟烃-21、氯氟烃-22、氟氯化碳-113、氯氟化碳-114、氯氟烃-123、氯氟烃-142c、氯氟烃-134a、氯氟烃-227、氯氟烃-C318和1,1,1,2-四氟乙烷,烃类例如丙烷、异丁烷和正丁烷,醚类例如二乙醚,压缩气体例如氮气和二氧化碳气体等。

[0077] 取决于活性成分的种类和活性、疾病的严重性、作为施用对象的动物物种、施用受试者的药物耐受性、体重、年龄等的、和通常的剂量,基于每天关于成人的活性成分量,本发明的药物的剂量可以为约0.0001至约100 mg/kg,例如约0.0001至约10 mg/kg,优选约0.005至约1 mg/kg。

[0078] 本发明还提供了在其上固定有本发明的适体或复合物的固相载体。作为固相载体的例子,可以提及基底、树脂、平板(例如多孔平板)、滤器、药筒、柱和多孔材料。基底可以是在DNA芯片、蛋白质芯片等中使用的基底;例如可以提及镍-PTFE(聚四氟乙烯)基底、玻璃基底、磷灰石基底、硅基底、氧化铝基底等、以及通过用聚合物等包被这些基底制备的基底等。作为树脂的例子,可以提及琼脂糖颗粒、二氧化硅颗粒、丙烯酰胺和N,N'-亚甲基双

丙烯酰胺的共聚物、聚苯乙烯-交联二乙烯苯颗粒、与表氯醇交联的葡聚糖颗粒、纤维素纤维、烯丙基葡聚糖和 N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺的交联聚合物、单分散的合成聚合物、单分散的亲水性聚合物、琼脂糖凝胶、Toyopearl 等, 并且还包括通过使各种官能团与这些树脂结合制备的树脂。本发明的固相载体可以用于例如纯化、检测和定量 IL-17。

[0079] 本发明的适体或复合物可以通过本身已知的方法固定到固相载体上。例如, 可以提及这样的方法, 其将亲和性物质(例如上文描述的那些)或预定官能团引入本发明的适体或复合物内, 并且随后经由亲和性物质或预定官能团, 将适体或复合物固定到固相载体上。本发明还提供了此类方法。预定官能团可以是实施偶联反应的官能团, 例如可以提及氨基、硫醇基、羟基和羧基。本发明还提供了具有对其引入的此类官能团的适体。

[0080] 本发明还提供了纯化和浓缩 IL-17 的方法。特别地, 本发明使得能够使 IL-17 与其他家族蛋白质的蛋白质分离。

[0081] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了 IL-17 的纯化方法, 其包括(a)使本发明的适体或复合物与含有 IL-17 的样品接触的步骤, 以允许样品中的 IL-17 与适体或复合物结合, 和(b)使与适体或复合物结合的 IL-17 与样品分离的步骤。

[0082] 本发明的纯化和浓缩方法可以包括将 IL-17 吸附至本发明的固相载体, 并且用洗脱剂洗脱吸附的 IL-17。IL-17 对本发明的固相载体的吸附可以通过本身已知的方法来实现。例如, 将含有 IL-17 的样品(例如细菌或细胞培养物、培养上清液或血液)引入本发明的固相载体或含有其的组合体内。IL-17 可以使用洗脱剂例如中性溶液进行洗脱。对中性洗脱剂不存在限制, 其可以具有例如约 6 至约 9、优选约 6.5 至约 8.5、且更优选约 7 至约 8 的 pH。中性溶液还可以包含例如钾盐(例如 KCl)、钠盐(例如 NaCl)、镁盐(例如 MgCl₂)、表面活性剂(例如 Tween 20、Triton、NP40)和丙三醇。本发明的纯化和浓缩方法可以进一步包括在 IL-17 吸附后, 使用洗涤溶液洗涤固相载体。洗涤溶液的例子包括含有尿素、螯合剂(例如 EDTA)、Tris、酸、碱、转移 RNA、DNA、表面活性剂例如 Tween 20、盐例如 NaCl 等的那些。本发明的纯化和浓缩方法可以再进一步包括加热固相载体。这个步骤允许固相载体的再生和灭菌。

[0083] 本发明的适体或复合物可以用作检测探针, 特别是用于检测 IL-17 的探针。标记适体的方法并无具体限制; 可以应用本身已知的方法。此类方法包括例如用放射性同位素标记、用荧光染料或荧光蛋白质标记等。

[0084] 本发明还提供了检测和定量 IL-17 的方法。特别地, 本发明使得能够与其他家族蛋白质的蛋白质分开检测且定量 IL-17。本发明的检测和定量方法可以包括通过利用本发明的适体(例如通过使用本发明的复合物和固相载体)测量 IL-17。

[0085] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了 IL-17 的检测方法, 其包括(a)使本发明的适体或复合物与测试样品接触的步骤, 以允许样品中的 IL-17 与适体或复合物结合, 和(b)检测与适体或复合物结合的 IL-17 的步骤。

[0086] 检测和定量 IL-17 的方法可以以与免疫学方法相同的方式执行, 除了使用本发明的适体代替抗体之外。因此, 通过使用本发明的适体代替抗体, 与此类方法例如酶免疫测定(EIA)(例如直接竞争性 ELISA、间接竞争性 ELISA、夹心 ELISA)、放射免疫测定(RIA)、荧光免疫测定(FIA)、蛋白质印迹(代替在蛋白质印迹技术的二次抗体使用)、免疫组织化学染色方法和细胞分选方法相同的方式, 可以执行检测和定量。这些方法不仅可以用于例如

测量活生物或生物样品中的 IL-17 含量,以及诊断与 IL-17 相关的疾病,还可以用于除疾病诊断外的目的例如科学目的、实验和研究目的等,包括通过使用本发明的适体代替抗体的 IL-17 检测或定量,以及衍生自人或除人外的动物的生物样品、或者除生物样品外的样品。

[0087] 在本文提及的所有出版物包括专利和专利申请说明书中的公开内容在本发明中通过引用并入本文,至所有这些明确给出的程度。

[0088] 本发明借助于下述实施例在下文更详细地进行描述,然而,所述实施例从不限制本发明的范围。

实施例

[0089] 实施例 1-1:抑制 IL-17和 IL-17受体的结合的适体的制备 - 1

通过使用自动合成仪,根据亚磷酰胺方法如下合成由下述适体编号 1 - 49 表示的适体。使用固相合成仪和具有由树脂携带的 3' 末端的核苷酸作为起始材料,将核苷酸设置在合成柱上,并且使反应溶液经过合成柱,次序为脱保护溶液、活化溶液和与 3' 末端邻近的核苷酸的 β -氰乙基亚磷酰胺、氧化溶液或硫酸化试剂、以及未反应的核苷酸的加帽溶液,以形成在核苷酸间的磷酸二酯键或硫代磷酸酯键。以相同方式,每次以 3' \rightarrow 5' 方向延伸且合成一个碱基。其后,将他从固相载体中切除,并且去除碱基部分的保护基团和磷酸部分的保护基团。其后,通过药筒纯化获得预定适体(参见例如 JP-A-2011-50381)。

[0090] 所获得的适体各自的核苷酸序列显示于下文。应当指出 a、g、c、u 各自为 RNA,其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶,A、G、C、T 各自为 DNA,其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶,mc 是 RNA,其中碱基是甲基胞嘧啶。核苷酸中的圆括号指示核苷酸的修饰。(M) 指示当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代,并且 (F) 指示当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代。(S) 指示核苷酸是硫代磷酸酯化的,并且 (L) 指示用 LNA 修饰。例如,c(F) 是其中在核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代的胞苷,a(M) 是其中核糖的 2' - 位置由 0- 甲基取代的腺苷,并且 g(M) 是其中核糖的 2' - 位置由 0- 甲基取代的鸟苷(下文相似地描述)。

[0091] 每个序列从 5' 末端开始,并且末端是 3' 末端。

[0092] 适体编号 1 (SEQ ID NO: 1):

g(L) g(L) g(L) u(F) ag(S) c(F) c(F) g(S) gaggagu(F) c(F) agu(F) aau(F) c(F) ggu(F) amc(L) mc(L) mc(L)

适体编号 2:

g(M) g(M) g(M) u(F) ag(S) c(F) c(F) Gg(M) aggagu(F) c(F) agu(F) aau(F) c(F) ggu(F) aCCC

适体编号 3:

g(M) g(M) g(M) u(M) a(M) gc(M) c(M) Gg(M) a(F) gg(M) a(M) gu(F) c(F) a(F) gu(F) a(M) a(M) u(M) c(M) g(M) g(M) u(F) ACCC

适体编号 4:

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) Gg(M) a(F) gg(M) a(M) gu(F) c(F) a(F) gu(F) a(M) a(M) u(M) c(M) g(M) g(M) u(F) a(M) CCC

适体编号 5 (SEQ ID NO: 2):

g(M) g(M) g(M) g(M) u(M) a(M) g(S) c(M) c(M) Gg(M) a(F) gg(M) a(M) gTc(F) a(F) gTa(M)

a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)ACCCC

适体编号 6 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)
c(M)g(M)g(M)u(F)ACCC

适体编号 7 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)aa(M)
c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

适体编号 8 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTaa(M)c(M)g(M)
g(M)u(F)a(M)CCC

适体编号 9 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)
c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

适体编号 10 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)
c(M)g(M)g(M)u(F)ACCC

适体编号 11 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)
g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

适体编号 12 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)c(M)
g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

适体编号 13 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)g(M)
g(M)u(F)a(M)CCC

适体编号 14 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(F)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)u(M)
c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

适体编号 15 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(F)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)c(M)
g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

适体编号 16 :

g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)
u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCCC

适体编号 17 :

g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)Au(M)
c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCCC

适体编号 18 :

g(M)g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTaa(M)c(M)

g(M) g(M) u(F) a(M) CCCC

适体编号 19 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) a(F) gTa(M) a(M) u(M) c(M)
g(M) g(M) u(F) a(M) CCC

适体编号 20 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) a(F) gTa(M) Au(M) c(M) g(M)
g(M) u(F) a(M) CCC

适体编号 21 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTaa(M) c(M) g(M) g(M)
Ta(M) c(M) c(M) c(M)

适体编号 22 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Agc(M) c(M) gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTaa(M) c(M) g(M) g(M) Ta(M)
c(M) c(M) c(M)

适体编号 23 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTaa(M) c(M) g(M) g(M)
TAc(M) c(M) c(M)

适体编号 24 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Agc(M) c(M) gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTaa(M) c(M) g(M) g(M)
TAc(M) c(M) c(M)

适体编号 25 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Agc(M) c(M) gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTa(M) Au(M) c(M) g(M) g(M)
TAc(M) c(M) c(M)

适体编号 26 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTaa(M) c(M) g(M) g(M)
Ta(M) c(M) c(M) c(M)

适体编号 27 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTa(M) Au(M) c(M) g(M)
g(M) Ta(M) c(M) c(M) c(M)

适体编号 28 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Agc(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTaa(M) c(M) g(M) g(M) Ta(M)
c(M) c(M) c(M)

适体编号 29 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Agc(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTa(M) a(M) u(M) c(M) g(M)
g(M) Ta(M) c(M) c(M) c(M)

适体编号 30 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Agc(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTa(M) Au(M) c(M) g(M) g(M)
Ta(M) c(M) c(M) c(M)

适体编号 31 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTaa(M) c(M) g(M) g(M)

TAc(M)c(M)c(M)

适体编号 32 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)
g(M)TACCC

适体编号 33 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)
TACCC

适体编号 34 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)a(M)u(M)c(M)g(M)
g(M)Ta(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 35 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)
Ta(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 36 :

g(M)g(M)g(M)u(M)AGc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)Au(M)c(M)g(M)g(M)
Ta(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 37 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTaAu(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)
c(M)c(M)c(M)

适体编号 38 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)
Ta(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 39 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTaa(M)u(M)c(M)g(M)g(M)
Ta(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 40 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)Agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)
Ta(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 41 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaa(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)
c(M)c(M)c(M)

适体编号 42 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTaAu(M)c(M)g(M)g(M)Ta(M)
c(M)c(M)c(M)

适体编号 43 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)agTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)
Ta(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 44 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Agc(M)c(M)Gg(M)agg(M)a(M)gTc(F)AgTa(M)au(M)c(M)g(M)g(M)

Ta(M) c(M) c(M) c(M)

适体编号 45 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) Gg(M) agg(M) a(M) gTc(F) agTaa u(M) c(M) g(M) g(M) u(F) a(M) CCC

适体编号 46 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Ag(S) c(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTaa u(M) c(M) g(M) g(M) u(F) a(M) CCC

适体编号 47 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Agc(M) c(M) Gg(M) a(F) gg(M) a(M) gTc(F) a(F) gTaa u(M) c(M) g(M) g(M) u(F) a(M) CCC

适体编号 48 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Agc(M) c(M) Gg(M) agg(M) a(M) gTc(F) agTaa u(M) c(M) g(M) g(M) u(F) a(M) CCC

适体编号 49 :

g(M) g(M) g(M) u(M) Agc(M) c(M) Gg(M) Agg(M) a(M) gTc(F) agTaa u(M) c(M) g(M) g(M) u(F) a(M) CCC

通过表面等离子体共振方法评估由适体编号 1 - 49 显示的适体是否抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合。

[0093] 对于测量,使用由 BIAcore 制造的 BIAcore2000。将蛋白 A (21181, PIERCE) 固定到 CM5 传感器芯片上,并且其中融合 IgG 的 Fc 部分的人 IL-17R-Fc 嵌合体(177-IR, R&D systems)以约 20 RU 在其上固定。作为分析物,将 IL-17 (100 或 150 nM)和由适体编号 1 - 49 显示的适体(50 或 100 nM)混合,维持 15 分钟,并且其后使混合物流动。

[0094] IL-17 和 IL-17 受体的结合能力的结果显示于下表 2 中。在表 2 中,本发明的适体对 IL-17 和 IL-17 受体的结合能力的作用显示为针对作为 100 的 IL-17 和 IL-17 受体结合量的相对值。另外,产生现有技术参考文献 W0 2010/008001 中所述的 IL-17 适体,且用于与本发明的适体比较。所产生的适体的序列在下文描述。

[0095] 适体编号 50 (SEQ ID NO: 3) :

ggu(F) c(F) u(F) agc(F) c(F) ggaggagu(F) c(F) agu(F) aa u(F) c(F) ggu(F) agac(F) c(F)。

[0096] 表 2 中所示的值指示当值变得更低时,适体与 IL-17 更强结合,即适体具有针对 IL-17 和 IL-17 受体的高结合抑制活性。

[0097] [表 2-1]

IL-17 和 IL-17 受体的结合活性

	IL-17 和 IL-17 适体的结合能力(%)
IL-17	100
适体编号 50	37.12
适体编号 1	28.63
适体编号 2	32.02
适体编号 3	25.26
适体编号 4	26.78
适体编号 5	32.31
适体编号 6	25.31

适体编号 7	18.37
适体编号 8	15.35
适体编号 9	8.94
适体编号 10	25.23
适体编号 11	16.75
适体编号 12	24.38
适体编号 13	13.75
适体编号 14	16.50
适体编号 15	14.22
适体编号 16	27.95
适体编号 17	4.21
适体编号 18	13.62
适体编号 19	8.46
适体编号 20	18.53
适体编号 21	22.75
适体编号 22	11.58
适体编号 23	13.44
适体编号 24	15.23
适体编号 25	11.73
适体编号 26	13.60
适体编号 27	13.35
适体编号 28	13.24
适体编号 29	13.30
适体编号 30	14.08
适体编号 31	16.18
适体编号 32	13.16
适体编号 33	15.95
适体编号 34	19.52
适体编号 35	14.96
适体编号 36	18.59
适体编号 37	15.53
适体编号 38	15.09
适体编号 39	14.76
适体编号 40	15.49
适体编号 41	13.19

[0098] [表 2-2]

IL-17 和 IL-17 受体的结合活性(续)

	IL-17 和 IL-17 适体的结合能力(%)
适体编号 42	12.99
适体编号 43	15.24
适体编号 44	17.88
适体编号 45	19.21
适体编号 46	20.03
适体编号 47	17.65
适体编号 48	19.24
适体编号 49	19.04

[0099] 作为测量结果,与常规已知的适体(适体编号 50)相比较,所有新近改变的经修饰的适体显示增加的结合抑制活性。具有高抑制活性的适体显示高约 8 倍的结合抑制活性。

[0100] 根据前述,与常规已知的适体相比较,已显示本发明的适体具有针对 IL-17 和 IL-17 受体结合的高抑制活性。

[0101] 实施例 1-2:抑制 IL-17和 IL-17受体的结合的适体的制备 - 2

通过与实施例 1-1 中相同的方法,并且使用自动合成仪,合成由下述适体编号 52 - 94 表示的适体。

[0102] 所获得的适体各自的核苷酸序列显示于下文。应当指出 a、g、c、u 各自为 RNA,其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶,A、G、C、U、T 各自为 DNA,其中碱基分别为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶,mc 是 RNA,其中碱基是甲基胞嘧啶。核苷酸中的圆括号指示核苷酸的修饰。(M) 指示当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由 0- 甲基取代,并且 (F) 指示当核苷酸是 RNA 时,在其中核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代。(S) 指示核苷酸是硫代磷酸酯化的,并且 (L) 指示用 LNA 修饰。例如,c (F) 是其中在核糖的 2' - 位置处的羟基由氟原子取代的胞苷,a (M) 是其中核糖的 2' - 位置由 0- 甲基取代的腺苷,并且 g (M) 是其中核糖的 2' - 位置由 0- 甲基取代的鸟苷(下文相似地描述)。

[0103] 每个序列从 5' 末端开始,并且末端是 3' 末端。

[0104] 适体编号 52 :

g (M) g (M) g (M) u (M) Ag (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) g (S) Tc (F) a (F) gTa (M) a (M)
u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) CCC

适体编号 53 :

g (M) g (M) g (M) u (M) Ag (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) gTc (F) a (F) g (S) Ta (M) a (M)
u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) CCC

适体编号 54 :

g (M) g (M) g (M) u (M) Ag (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) gUc (F) a (F) gUa (M) a (M) u (M)
c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) CCC

适体编号 55 :

g (M) g (M) g (M) u (M) Ag (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) gTc (F) a (F) gTgau (M) c (M) g (M)
g (M) u (F) a (M) CCC

适体编号 56 :

g (M) g (M) g (M) u (M) Ag (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) g (S) Tc (F) a (F) g (S) Ta (M) a (M)
u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) CCC

适体编号 57 :

g (M) g (M) g (M) u (M) Ag (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) g (S) Tc (F) a (F) g (M) Ta (M) a (M)
u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) CCC

适体编号 58 :

g (M) g (M) g (M) u (M) Ag (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) g (S) g (M) a (M) g (S) Tc (F) a (F) g (M) Ta (M)
a (M) u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) CCC

适体编号 59 :

g (M) g (M) g (M) u (M) Ag (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) g (S) Tc (F) a (F) g (M) Ta (M) a (M)
u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 60 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) g (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) g (S) Tc (F) a (F) g (M) Ta (M)
a (M) u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 61 :

g(M)g(M)g(M)u(M)Ag(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(M)Ta(M)a(M)
u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)CCC

适体编号 62 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)
u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 63 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)
a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 64 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)
a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 65 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gTc(F)a(F)gTa(M)a(M)
u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 66 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(F)a(F)g(S)Ta(M)
a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 67 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)
a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 68 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)
u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)Ac(M)c(M)c(M)

适体编号 69 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)
a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 70 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)
u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 71 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(M)a(F)g(S)
u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 72 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)gu(F)c(F)a(F)gu(F)a(M)
a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 73 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(F)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)
u(F)a(M)a(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 74 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) gc (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) gTc (F) a (F) gTa (M) a (M) u (M)
c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 75 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) gc (M) c (M) gg (M) a (F) gg (M) a (M) gTc (F) a (F) gTa (M) a (M) u (M)
c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 76 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) gc (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) gu (F) c (F) a (F) gu (F) a (M) a (M)
u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) Ac (M) c (M) c (M)

适体编号 77 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) gc (M) c (M) gg (M) a (F) gg (M) a (M) gu (F) c (F) a (F) gu (F) a (M) a (M)
u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) Ac (M) c (M) c (M)

适体编号 78 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) gc (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) gTc (F) a (F) gTa (M) a (M) u (M)
c (M) g (M) g (M) u (M) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 79 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) gc (M) c (M) gg (M) a (F) gg (M) a (M) gu (F) c (F) a (F) gu (F) a (M) a (M)
u (M) c (M) g (M) g (M) u (M) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 80 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) g (S) c (M) c (M) Gg (M) a (F) gg (M) a (M) gu (F) c (F) a (F) gu (F) a (M)
a (M) u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) Ac (M) c (M) c (M)

适体编号 81 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) g (S) c (M) c (M) Gg (M) a (M) gg (M) a (M) g (S) Tc (M) a (F) g (S) Ta (M)
a (M) u (M) c (M) g (M) g (M) u (M) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 82 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) g (S) c (M) c (M) Gg (M) a (M) gg (M) a (M) g (S) Tc (F) a (F) g (S) Ta (M)
a (M) u (M) c (M) g (M) g (M) u (M) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 83 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) g (S) c (M) c (M) Gg (M) a (M) gg (M) a (M) g (S) u (F) c (M) a (F) g (S)
u (F) a (M) a (M) u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 84 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) g (S) c (M) c (M) Gg (M) a (M) gg (M) a (M) g (S) u (F) c (F) a (F) g (S)
u (F) a (M) a (M) u (M) c (M) g (M) g (M) u (M) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 85 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) g (S) c (M) c (M) Gg (M) a (M) gg (M) a (M) g (S) u (F) c (F) a (F) g (S)
u (F) a (M) a (M) u (M) c (M) g (M) g (M) u (F) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 86 :

g (M) g (M) g (M) u (M) a (M) g (S) c (M) c (M) Gg (M) a (M) gg (M) a (M) g (S) Tc (M) a (F) g (S) Tg (M)
a (M) u (M) c (M) g (M) g (M) u (M) a (M) c (M) c (M) c (M)

适体编号 87 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Tga(M)
u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 88 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(M)a(F)g(S)
u(F)ga(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 89 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Taa(M)
u(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 90 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)Ta(M)
au(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 91 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)Tc(M)a(F)g(S)
Taa(M)c(M)g(M)g(M)u(M)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 92 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)
u(F)aa(M)u(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 93 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)
u(F)a(M)au(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

适体编号 94 :

g(M)g(M)g(M)u(M)a(M)g(S)c(M)c(M)Gg(M)a(M)gg(M)a(M)g(S)u(F)c(F)a(F)g(S)
u(F)aa(M)c(M)g(M)g(M)u(F)a(M)c(M)c(M)c(M)

通过表面等离子体共振方法评估由合成的适体是否抑制 IL-17 和 IL-17 受体的结合。

[0105] 对于测量,使用由 GE Healthcare Bio Sciences 制造的 BIAcore T100。将蛋白 A (21181, PIERCE) 固定到 CM5 传感器芯片上,并且其中融合 IgG 的 Fc 部分的人 IL-17R-Fc 嵌合体(177-IR, R&D systems) 以约 750 RU 在其上固定。作为分析物,将 IL-17 (150 nM) 和由表 3 显示的适体(12.5 或 50 nM) 混合,维持 15 分钟,并且其后使混合物流动。

[0106] IL-17 和 IL-17 受体的结合能力的结果显示于下表 3 中。在表 3 中,本发明的适体对 IL-17 和 IL-17 受体的结合能力的作用显示为针对作为 100 的 IL-17 和 IL-17 受体结合量的相对值。为了与本发明的适体比较,使用常规已知的针对 IL-17 的适体(适体编号 50)。

[0107] 表 3 中所示的值指示当值变得更低时,适体与 IL-17 更强结合,即适体具有针对 IL-17 和 IL-17 受体的高结合抑制活性。

[0108] [表 3]

IL-17 和 IL-17 受体的结合活性

	IL-17 和 IL-17 受体的结合能力(%)
IL-17	100
适体编号 50	37.12
适体编号 52	27.55

适体编号 53	22.65
适体编号 54	25.15
适体编号 55	18.99
适体编号 56	26.96
适体编号 58	33.72
适体编号 59	36.54
适体编号 60	31.88
适体编号 62	25.92
适体编号 63	27.10
适体编号 64	29.32
适体编号 65	20.29
适体编号 66	28.71
适体编号 68	37.00
适体编号 69	18.44
适体编号 70	34.97
适体编号 72	26.12
适体编号 73	31.96
适体编号 75	21.57
适体编号 76	24.12
适体编号 77	23.95
适体编号 78	23.28
适体编号 79	28.23
适体编号 80	25.26
适体编号 81	34.26
适体编号 82	5.28
适体编号 83	33.53
适体编号 84	27.74
适体编号 85	27.80
适体编号 86	35.71
适体编号 87	32.40
适体编号 89	35.10
适体编号 90	41.23
适体编号 91	35.10
适体编号 92	31.63
适体编号 93	30.62
适体编号 94	29.32

[0109] 作为测量结果,与常规已知的适体(适体编号 50)相比较,所有新近改变的经修饰的适体显示增加的结合抑制活性。具有高抑制活性的适体显示高约 7 倍的结合抑制活性。

[0110] 根据前述,与常规已知的适体相比较,已显示本发明的适体具有针对 IL-17 和 IL-17 受体结合的高抑制活性。

[0111] 实施例 2-1:使用小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞系的本发明的适体的抑制作用 - 1

小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞系通过用 IL-17 和 TNF α 的细胞刺激而细胞外释放 IL-6。利用这种特性,选择具有 IL-17 抑制作用的适体。

[0112] 首先,使人 IL-17 和实施例 1-1 中产生的适体在 37°C 下预温育 30 分钟,并且连同小鼠 TNF α (2 ng/mL) 一起加入 NIH3T3 细胞(ATCC, CRL1658)中。随后,在温育 24 小时后,收集培养上清液,并且通过 BD Cytometric Bead Array (BD Biosciences) 测量 IL-6 的量。由 IL-6 的量测量每种适体的 IL-17 抑制作用。50% 抑制浓度(IC₅₀值)显示于下表 4 和 5 中。为了与本发明的适体的比较,使用常规已知的针对 IL-17 的适体(适体编号 50)。

[0113] [表 4]

各种适体在小鼠 NIH3T3 细胞系中的 IL-17 抑制作用

	IC ₅₀ (nM)
适体编号 50	7.36
适体编号 1	1.17
适体编号 2	0.68
适体编号 3	2.08
适体编号 4	2.78
适体编号 5	0.13
适体编号 6	0.77
适体编号 7	0.30
适体编号 8	0.49
适体编号 9	0.64
适体编号 10	0.63
适体编号 11	0.34
适体编号 12	0.52
适体编号 13	0.40
适体编号 14	0.50
适体编号 15	0.63
适体编号 16	0.25
适体编号 17	0.30
适体编号 18	0.15
适体编号 19	2.78
适体编号 20	0.37
适体编号 21	0.39
适体编号 22	1.66
适体编号 23	1.34
适体编号 24	1.77
适体编号 25	1.64

[0114] [表 5]

各种适体在小鼠 NIH3T3 细胞系中的 IL-17 抑制作用(续)

	IC ₅₀ (nM)
适体编号 26	0.78
适体编号 27	2.45
适体编号 28	2.11
适体编号 29	2.53
适体编号 30	1.49
适体编号 31	0.30
适体编号 32	4.62
适体编号 33	4.31
适体编号 34	2.41
适体编号 35	2.47
适体编号 37	1.64
适体编号 38	0.31
适体编号 39	3.91
适体编号 40	3.75
适体编号 41	0.40
适体编号 42	0.51
适体编号 43	0.49
适体编号 44	1.83
适体编号 45	0.76

适体编号 46	1.13
适体编号 47	0.59
适体编号 48	0.30
适体编号 49	0.65

[0115] 作为测量结果,与常规已知的适体(适体编号 50)相比较,新近改变的经修饰的适体显示增加约 2 倍至 50 倍的活性。

[0116] 根据前述,与常规已知的适体相比较,已显示本发明的适体极其强烈地抑制 IL-17 的生理活性。

[0117] 实施例 2-2:使用小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞系的本发明的适体的抑制作用 - 2

首先,使实施例 1-2 中产生的适体在 37°C 下预温育 30 分钟,并且连同小鼠 TNF α (2 ng/mL) 一起加入 NIH3T3 细胞(ATCC, CRL1658)中。随后,在温育 24 小时后,收集培养上清液,并且通过下文描述的 ELISA 方法测量 IL-6 的生产量。由 IL-6 的生产量确定每种适体的 IL-17 抑制作用。50% 抑制浓度(IC₅₀值)显示于下表 6 中。为了与本发明的适体的比较,使用常规已知的针对 IL-17 的适体(适体编号 50)。

[0118] 用于验证适体的 IL-17 抑制作用的 ELISA 方法:用 PBS 稀释的大鼠抗小鼠 IL-6 抗体(BD Biosciences, 2 μ g/mL; 100 μ L/孔)包被使用于 ELISA 的微量滴定板,并且在 4°C 下温育过夜。第二天,将微量滴定板用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤 3 次,并且在室温下应用由 PBS/1% BSA (200 μ L/孔)的封闭 2 小时。随后,将平板用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤 3 次。将用 PBS/1% BSA/0.05% Tween 20 或培养上清液(100 μ L/孔)系列稀释的重组小鼠 IL-6 (BD Biosciences; 100 μ L/孔)加入平板中。在室温下温育 2 小时后,将平板用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤 3 次。随后将 100 μ L/孔的生物素缀合的大鼠抗小鼠 IL-6 抗体(BD Biosciences)以 1/500 的最终稀释度加入平板中,并且使混合物在室温下反应 1 小时。在用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤 3 次后,将 100 μ L/孔的碱性磷酸酶缀合的链霉抗生物素蛋白以 1/1000 的最终稀释度加入平板中。在室温下 30 分钟后,将平板再次用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤 4 次,并且加入底物(1-Step PNPP; Thermo Fisher Scientific Inc; 100 μ L/孔)。在 15 分钟后,加入氢氧化钠水溶液(2N: 50 μ L/孔),以停止反应,并且通过使用 405 nm 滤波器,在微量滴定板阅读器(Bio-Rad)上读出平板。

[0119] [表 6]

各种适体在小鼠 NIH3T3 细胞系中的 IL-17 抑制作用

	IC ₅₀ (nM)
适体编号 50	8.63
适体编号 52	1.11
适体编号 53	1.67
适体编号 55	0.11
适体编号 56	0.52
适体编号 57	2.36
适体编号 59	1.19
适体编号 60	2.35
适体编号 61	3.41
适体编号 62	0.69
适体编号 63	0.81
适体编号 64	4.64
适体编号 65	0.67
适体编号 66	1.21

适体编号 67	5.95
适体编号 68	2.40
适体编号 69	1.73
适体编号 70	3.28
适体编号 71	5.54
适体编号 72	2.24
适体编号 73	3.46
适体编号 74	1.06
适体编号 75	1.33
适体编号 76	1.70
适体编号 77	4.66
适体编号 78	1.36
适体编号 79	2.25
适体编号 80	1.52
适体编号 81	2.26
适体编号 82	0.48
适体编号 84	1.04
适体编号 85	0.96
适体编号 86	5.16
适体编号 87	3.23
适体编号 88	2.88
适体编号 89	6.21
适体编号 90	1.08
适体编号 91	3.86
适体编号 92	2.60
适体编号 93	0.22
适体编号 94	0.29

[0120] 作为测量结果,与常规已知的适体(适体编号 50)相比较,所有新近改变的经修饰的适体显示增加的活性。具有高抑制活性的适体显示高约 80 倍的活性。

[0121] 根据前述,与常规已知的适体相比较,已显示本发明的适体极其强烈地抑制 IL-17 的生理活性。

[0122] 实施例 3:本发明的适体针对结缔组织衍生的细胞的 IL-17抑制作用

正常人皮肤成纤维细胞(NHDF)通过用 IL-17 的细胞刺激而细胞外释放 IL-6。因此,使用 NHDF 作为结缔组织衍生的细胞的例子,根据 Arthritis Rheum. 63,455-466 (2011)中所述的方法,确定每种适体的 IL-17 抑制作用。

[0123] 首先,将 NHDF(Lonza Japan Ltd.)接种到 48 孔微板中,并且温育 24 小时。随后,使人 IL-17 (1 或 2 ng/mL)和通过下文提及的实施例 5 中所述的方法修饰的聚乙二醇化适体(5 或 10 ng/mL)在 37°C 下预温育 60 分钟,并且加入 NHDF 中。在进一步温育 24 小时后,收集培养上清液,并且通过酶免疫测定(ELISA)方法(Endogen Human IL-6 ELISA Kit: Thermo scientific)测量 IL-6 的生产量。由 IL-6 的生产量计算 IL-17 抑制能力,并且结果作为对于作为 1 的常规已知的适体(适体编号 50)针对 IL-17 的 IL-17 抑制能力的相对比显示于表 7 中。

[0124] [表 7]

各种适体在正常人皮肤成纤维细胞中的 IL-17 抑制作用

	IL-17 抑制能力
适体编号 50	1.00

适体编号 1	1.19
适体编号 3	1.13
适体编号 4	1.21
适体编号 5	1.17
适体编号 7	1.37
适体编号 8	1.38
适体编号 9	1.33
适体编号 10	1.30
适体编号 11	1.37
适体编号 12	1.36
适体编号 13	1.32
适体编号 14	1.12
适体编号 16	1.32
适体编号 17	1.34
适体编号 18	1.34
适体编号 19	1.28
适体编号 20	1.33
适体编号 21	1.73
适体编号 22	1.66
适体编号 23	1.82
适体编号 24	1.70
适体编号 25	1.62
适体编号 26	1.67
适体编号 27	1.78
适体编号 28	1.78
适体编号 29	1.39
适体编号 30	1.46
适体编号 31	1.80
适体编号 32	1.25
适体编号 33	1.30
适体编号 34	1.14
适体编号 37	1.87
适体编号 38	1.84
适体编号 39	1.29
适体编号 40	1.34
适体编号 41	1.53
适体编号 42	1.57
适体编号 43	1.40
适体编号 45	1.79
适体编号 46	1.88
适体编号 47	1.91
适体编号 48	1.78
适体编号 49	1.72

[0125] 作为测量结果,与常规已知的适体(适体编号 50)相比较,新近改变的经修饰的适体显示增加的 IL-17 抑制能力。

[0126] 根据前述,与常规已知的适体相比较,已显示本发明的适体针对结缔组织衍生的细胞极其强烈地抑制 IL-17 的生理活性。

[0127] 实施例 4:本发明的适体对上皮组织衍生的细胞的 IL-17抑制作用

正常人上皮角化细胞(NHEK)通过用 IL-17 和 TNF α 的细胞刺激而细胞外释放 IL-6、IL-8 和 CCL20,并且正常人肾近端小管上皮细胞通过用 IL-17 的细胞刺激而释放 IL-6、IL-8

和 MCP-1。因此,使用 NHEK 和 HRPTEC 作为上皮组织的例子,确定本发明的适体的 IL-17 抑制作用。

[0128] 首先,将 NHEK (KURABO INDUSTRIES LTD.)或 HRPTEC (KURABO INDUSTRIES LTD.) 接种到 96 孔微板中,并且温育 24 小时。随后,使人 IL-17 (100 ng/mL)和实施例 1-1 中产生的适体在 37°C 下预温育 30 分钟,并且连同 TNF α (10 ng/mL)一起加入 NHEK 中。类似地,使人 IL-17 (100 ng/mL)和实施例 1-1 中产生的适体在 37°C 下预温育 30 分钟,并且加入 HRPTEC 中。在温育 24 小时和 48 小时后,收集培养上清液,并且通过 ELISA(Quantikine Human CCL20/MIP-3 ELISA, R&D systems)或 BD Cytmetric Bead Array 测量 CCL20、IL-6、IL-8 和 MCP-1。

[0129] 各种适体对 NHEK 的 IL-17 抑制作用显示于下文。为了与本发明的适体比较,使用常规已知的针对 IL-17 的适体(适体编号 50)。

[0130] [表 8]

IL-6 生产抑制比

加入的适体量	IL-6 生产抑制比 (%)	
	300 nM	30 nM
适体编号 50	13.9	0.0
适体编号 8	--	24.9
适体编号 28	--	14.4
适体编号 41	--	29.8
适体编号 45	--	24.1
适体编号 47	--	20.0
适体编号 48	--	33.4

--: 未执行

[0131] [表 9]

IL-8 生产抑制比

加入的适体量	IL-8 生产抑制比 (%)	
	300 nM	30 nM
适体编号 50	45.8	0.0
适体编号 8	--	58.0
适体编号 28	--	22.3
适体编号 37	--	18.9
适体编号 38	--	25.8
适体编号 41	--	47.2
适体编号 45	--	55.0
适体编号 47	--	50.8
适体编号 48	--	49.5

--: 未执行

[0132] [表 10]

CCL20 生产抑制比

加入的适体量	CCL20生产抑制比 (%)	
	300 nM	30 nM
适体编号50	1.0	0.0
适体编号8	--	35.2
适体编号28	--	28.7
适体编号37	--	12.1
适体编号38	--	12.4
适体编号41	--	79.4
适体编号45	--	28.9
适体编号47	--	34.1
适体编号48	--	71.2

--: 未执行

[0133] 各种适体对HRPTEC的IL-17抑制作用显示于下文。为了与本发明的适体比较,使用常规已知的针对IL-17的适体(适体编号50)。

[0134] [表11]

IL-6生产抑制比

加入的适体量	IL-6生产抑制比 (%)	
	300 nM	30 nM
适体编号50	47.4	17.5
适体编号8	--	53.5
适体编号25	--	33.1
适体编号28	--	42.8
适体编号37	--	30.7
适体编号38	--	42.7
适体编号41	--	58.9
适体编号45	--	48.2
适体编号47	--	47.1
适体编号48	--	53.8

--: 未执行

[0135] [表12]

IL-8生产抑制比

加入的适体量	IL-8生产抑制比 (%)	
	300 nM	30 nM
适体编号50	63.6	40.3
适体编号8	--	73.1
适体编号25	--	56.5
适体编号28	--	60.8
适体编号37	--	55.4
适体编号38	--	64.3
适体编号41	--	79.7
适体编号45	--	70.6
适体编号47	--	71.7
适体编号48	--	72.7

--: 未执行

[0136] [表13]

MCP1 生产抑制比

加入的适体量	MCP1生产抑制比 (%)	
	300 nM	30 nM
适体编号50	67.9	36.5
适体编号8	---	69.6
适体编号25	---	53.2
适体编号28	---	62.7
适体编号37	---	56.9
适体编号38	---	64.8
适体编号41	---	74.1
适体编号45	---	63.8
适体编号47	---	69.8
适体编号48	---	70.6

---: 未执行

[0137] 作为测量结果,与常规已知的适体(适体编号 50)相比较,新近改变的经修饰的适体更强烈抑制通过 IL-17 诱导的细胞因子(IL-6、IL-8)和趋化因子(CCL20、MCP1)产生。

[0138] 根据前述,与常规已知的适体相比较,已显示本发明的适体针对上皮组织细胞极其强烈地抑制 IL-17 的生理活性。

[0139] 实施例 5:血清稳定性测试 I

在体外评估每种适体在人血清中的稳定性。

[0140] 通过经由接头(ssH 氨基接头或 C6 氨基接头),将具有分子量为 40 或 80 kDa 的 PEG (由 NOF Corporation 制造的 SUNBRIGHT GL2-400GS2、由 NOF Corporation 制造的 SUNBRIGHT GL2-400TS、由 NOF Corporation 制造的 SUNBRIGHT GL2-800GS2、由 NOF Corporation 制造的 SUNBRIGHT GL4-800GS2、或由 Jenkem 制造的 Y-NHS-40K :Y 形)加入实施例 1-1 中产生的适体的 5' 末端,并且将 idT (反向 dT)加入 3' 末端(关于生产方法,参考例如 JP-B-3626503),来产生改变的经修饰的适体。

[0141] 将实施例 1-1 中产生的适体或上文提及的聚乙二醇化适体(100 μ M 2 μ L)加入人血清(36 μ L)中,并且将混合物贮存于 37°C 下。在经过 0 小时、24 小时、48 小时、96 小时后,各收集 4.5 μ L 并且保存于 -80°C 下。其后,将 0.5 μ L 蛋白酶 K(6 mg/mL)加入各自解冻样品中,并且将他们在 37°C 下贮存 10 分钟。此外,加入 25.5 μ L 反应猝灭溶液(8M 尿素、10 mM EDTA :乙二胺四乙酸、0.05% BPB :溴酚蓝),并且将混合物在 95°C 下热处理 10 分钟。每种样品在 8M 尿素的条件下在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,以分离样品中含有的适体。将凝胶用 SYBR Green II(Takara Bio Inc.)染色 30 分钟,并且通过 Storm840 Phosphorimager (GE Healthcare Japan)检测 RNA 的荧光。根据获得的图像,定量完整适体的条带,并且计算半衰期且评估每种样品的稳定性。每种样品的半衰期显示于下表 14 中。在表 14 中,除上述常规已知的针对 IL-17 的适体(适体编号 50)之外,产生 WO 2010/008001 中所述的其他 IL-17 适体,并且用于与本发明的适体的比较。所产生的适体的序列如下所述。

[0142] 适体编号 51 (SEQ ID NO: 4):

GGGGu (F) agc (F) c (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) aau (F) c (F) ggu (F) aCCCC)。

[0143] [表 14]

适体在人血清中的半衰期

	含 PEG 的时间(小时)	不含 PEG 的时间(小时)
适体编号 50	9.78	8.22
适体编号 51	9.59	6.17
适体编号 8	57.28	30.14
适体编号 25	19.92	14.91
适体编号 28	25.30	16.86
适体编号 37	22.50	13.03
适体编号 38	23.74	11.73
适体编号 41	38.72	17.33
适体编号 45	52.12	20.09
适体编号 47	37.27	26.87
适体编号 48	30.27	26.06

[0144] 作为测量结果,与常规已知的适体(适体编号 50 和 51)相比较,所有新近改变的经修饰的适体显示在血清中延长 2 至 5 倍的半衰期。此外,通过 PEG 修饰的半衰期延长在新近改变的经修饰的适体中更明显。

[0145] 根据前述,与常规已知的适体相比较,已显示本发明的适体显著改善在血清中的稳定性。

[0146] 实施例 6:血清稳定性测试 II

向小鼠血清、人血清或磷酸盐缓冲液(33 μ L)中,加入实施例 1-1 或 1-2 中产生的适体(100 μ M 2.5 μ L),并且将混合物在 37°C 下贮存 24 小时。其后,收集 4 μ L,并且加入 24 μ L 反应猝灭溶液(8M 尿素、10 mM EDTA:乙二胺四乙酸、0.05% BPB:溴酚蓝)。在 -70°C 下保存后,每种样品在 8M 尿素的条件下在丙烯酰胺凝胶上进行电泳,以分离样品中含有的适体。将凝胶用 SYBR Green II (Takara Bio Inc.) 染色 30 分钟,并且通过 MOLECULAR IMAGER FX (BIO-RAD) 检测 RNA 的荧光。根据获得的图像,对于对应于残留适体的条带,使用由 Fujifilm 制造的 Science Lab 2005 Multi Gauge Ver3.0,定量完整适体的条带,并且基于作为 100% 的用磷酸盐缓冲液获得的结果,测量血清中的每种分析物的残留量。

[0147] [表 15]

	小鼠血清中的残留量(%) 24 小时后
适体编号 50	7.3
适体编号 51	5.5
适体编号 8	17.1
适体编号 48	17.3
适体编号 56	17.0
适体编号 57	14.6
适体编号 58	28.4
适体编号 59	59.4
适体编号 60	43.4
适体编号 61	22.3
适体编号 62	81.5
适体编号 63	49.5
适体编号 64	94.7
适体编号 65	48.6
适体编号 66	49.1
适体编号 67	87.0
适体编号 68	63.9
适体编号 69	76.8
适体编号 70	89.0

适体编号 71	83.7
适体编号 72	32.3
适体编号 73	65.3
适体编号 74	33.9
适体编号 75	44.4
适体编号 76	66.6
适体编号 77	50.8
适体编号 78	36.6
适体编号 79	26.8
适体编号 80	66.2
适体编号 81	86.8
适体编号 82	67.7
适体编号 83	76.9
适体编号 84	82.9
适体编号 85	86.1
适体编号 86	79.9
适体编号 87	81.1
适体编号 88	84.2
适体编号 89	92.4
适体编号 90	95.4
适体编号 91	78.6
适体编号 92	79.9
适体编号 93	66.8
适体编号 94	64.4

[0148] [表 16]

	人血清中的残留量(%) 24 小时后
适体编号 50	24.9
适体编号 51	29.0
适体编号 8	76.6
适体编号 48	57.7
适体编号 56	48.4
适体编号 58	37.2
适体编号 59	57.1
适体编号 60	48.4
适体编号 61	52.1
适体编号 62	59.6
适体编号 63	57.8
适体编号 64	90.4
适体编号 65	68.2
适体编号 66	57.9
适体编号 67	107.9
适体编号 68	90.1
适体编号 69	36.1
适体编号 71	79.7
适体编号 73	91.4
适体编号 76	31.7
适体编号 80	52.7
适体编号 81	98.9
适体编号 82	51.1
适体编号 83	81.3
适体编号 84	89.1
适体编号 85	80.8

适体编号 86	94.8
适体编号 87	98.5
适体编号 88	73.3
适体编号 89	99.0
适体编号 90	106.8
适体编号 91	94.8
适体编号 92	92.9
适体编号 93	90.6
适体编号 94	101.1

[0149] 作为测量结果,与常规已知的适体(适体编号 50 和 51)相比较,所有新近改变的经修饰的适体显示 24 小时后增加的残留量。最稳定的适体显示 24 小时后在血清中增加约 15 倍的残留量。

[0150] 根据前述,与常规已知的适体相比较,已显示本发明的适体显著改善在血清中的稳定性。

[0151] 实施例 7:小鼠药物代谢动力学测试

将适体以 1 mg/mL 溶解于盐水中,并且以 1 mg/kg 的剂量静脉内施用于雄性 C57BL/6 小鼠(8 周龄,Charles River)。5、15、30 分钟后,1、2、4、6、8、24 小时后,或 48、72、96 小时后收集血液。将血浆分离且保存于 -70°C 下,并且关于本发明的适体,根据由 Judith M. Healy 等人(Pharmaceutical Research, December 2004, 第 21 卷, Issue 12, 第 2234-2246 卷)报道的方法,并且使用 ELOSA 方法(杂交方法),测量血浆中的残留核酸浓度。

[0152] [表 17]

在小鼠血液中的半衰期

	$t_{1/2}$ (小时)
适体编号 50	1.79
适体编号 51	0.85
适体编号 8	6.38
适体编号 48	4.29
适体编号 9	3.50
适体编号 57	3.12
适体编号 58	4.24
适体编号 64	9.26

[0153] 作为测量结果,与常规已知的适体(适体编号 50 和 51)相比较,所有新近改变的经修饰的适体显示增加约 2 至 5 倍的半衰期。

[0154] 根据前述,与常规已知的适体相比较,已显示本发明的适体在血液中的稳定性显著改善。

[0155] 实施例 8:本发明的适体在小鼠气囊炎症模型中的 IL-17 抑制效应

通过参考 Biochemical Pharmacology 77, 878-887 (2009), 用小鼠气囊炎症模型证实改变的经修饰的适体是否可以在体内抑制 IL-17 的生物活性。

[0156] 在小鼠气囊炎症模型中,使用雄性 C57BL/6J 小鼠(7 周龄, Charles River) (n=4 或 5)。将背部剃毛,并且第二天和 4 天后,将空气(2.5 mL)皮下注射到背部内。在从第二次空气注射开始 3 天时,通过实施例 5 中所述的方法腹膜内施用本发明的聚乙二醇化适体,并且 1 小时后,将 2% 含有 IL-17 (0.5 mg) 的羧甲基纤维素水溶液注射到气囊内,以诱导 IL-6 生产。在 IL-17 注射后 24 小时收集气囊中的渗出液,并且通过 ELISA 测量渗出液中的 IL-6 量。计算 IL-6 生产抑制比(%),并且结果显示于下表 18 和 19 中。在表 18 和 19 中,

常规已知的针对 IL-17 的适体(适体编号 50 和 51)用于与本发明的适体比较。

[0157] [表 18]

各种适体在 10 mg/kg 的剂量时对 IL-6 生产的抑制效应

10 mg/kg 施用	IL-6 生产抑制比(%)
适体编号 50	50.20
适体编号 51	42.86
适体编号 8	88.16

[0158] [表 19]

各种适体在 1 mg/kg 的剂量时对 IL-6 生产的抑制效应

1 mg/kg 施用	IL-6 生产抑制比(%)
适体编号 50	17.48
适体编号 51	22.74
适体编号 8	70.05
适体编号 9	42.77
适体编号 16	49.20
适体编号 21	36.20
适体编号 22	40.98
适体编号 23	47.33
适体编号 24	32.45
适体编号 25	41.94
适体编号 26	56.05
适体编号 27	52.97
适体编号 28	33.29
适体编号 37	36.68
适体编号 38	45.28
适体编号 45	81.74
适体编号 46	72.84
适体编号 47	63.03
适体编号 48	67.50
适体编号 49	32.21

[0159] 作为测量结果,证实当他们以相同浓度施用时,与常规已知的适体(适体编号 50 和 51)相比较,所有新近改变的经修饰的适体具有高 2 至 5 倍的 IL-6 生产抑制比。此外,证实即使当常规已知的适体(适体编号 50 和 51)的施用浓度增加 10 倍时,改变的经修饰的适体的 IL-6 生产抑制比也更高,并且本发明的适体的 IL-17 抑制活性在体内也显著增加。

[0160] 实施例 9-1:对小鼠中的 IL-23 诱导牛皮癣模型的抗炎作用 - 1

根据由 Heather L. Rizzo 等人(J Immunol. 186,1495-1502 (2011))报道的方法,检查本发明的适体对 IL-23 诱导牛皮癣模型的抑制作用。

[0161] 首先,将含有单独的 0.1% 牛血清白蛋白的 PBS (20 μ L)皮内施用于雄性 C57BL/6 小鼠(7 周龄,Charles River)的左耳廓,并且将小鼠 IL-23 (eBioscience,1 μ g/20 μ L)皮内施用于右耳廓,每天一次,连续 4 天。其后,腹膜内施用通过实施例 2-1 中所述的方法聚乙二醇化的本发明的适体(适体编号 8) (5 mg/kg),每天一次,每一天。作为阳性对照,腹膜内施用抗 IL-17 抗体(eBioscience,100 μ g/头),每天一次,每隔一天,并且作为阴性对照,腹膜内施用盐水(10 mL/kg),每天一次,每一天。在距离小鼠 IL-23 末次施用 24 小时后,通过刻度盘式测厚仪(Dial Thickness Gauge) (G-1A,PEACOCK)测量两个耳廓的厚度,并且评估本发明的适体用于牛皮癣样皮炎的功效。

[0162] 与用盐水施用的阴性对照组的耳廓厚度相比较,本发明的聚乙二醇化适体(适体编号 8)施用组中的耳廓厚度显著减少(图 2A)。在用作阳性对照的抗 IL-17 抗体施用组中,在本研究中使用的剂量下无法证实显著效应。在该图中,每个值显示平均值 \pm 平均值的标准误($n=4$ 或 5),并且通过单向方差分析和 Dunnett 氏方法分析统计学显著差异(*: $P<0.05$)。

[0163] 上述结果强烈提示针对 IL-17 的本发明的适体可以用作治疗药物,用于免疫皮肤病例如牛皮癣。

[0164] 实施例 9-2:对小鼠中的 IL-23 诱导牛皮癣模型的抗炎作用 - 2

根据由 Heather L. Rizzo 等人(J Immunol. 186,1495-1502 (2011))报道的方法,检查本发明的适体对 IL-23 诱导牛皮癣模型的抑制作用。

[0165] 即,将含有 0.1% 牛血清白蛋白的 PBS (20 μ L) 皮内施用于雄性 C57BL/6 小鼠(7 周龄,Charles River)的左耳廓,并且将小鼠 IL-23 (eBioscience,1 μ g/20 μ L) 皮内施用于右耳廓,每天一次,连续 4 天。其后,腹膜内施用通过实施例 2-2 中所述的方法聚乙二醇化的本发明的适体(适体编号 48)(10 mg/kg),以及通过相似方法聚乙二醇化的常规已知的适体(适体编号 51)(10 mg/kg),每天一次,连续 5 天,从皮内施用前一天开始。作为阳性对照,腹膜内施用抗 IL-17 抗体(eBioscience,100 μ g/头),每天一次,每隔一天,从皮内施用前一天开始,并且作为阴性对照,腹膜内施用盐水(10 mL/kg),每天一次,连续 5 天,从皮内施用前一天开始。在距离小鼠 IL-23 末次施用 24 小时后,通过刻度盘式测厚仪(Dial Thickness Gauge) (G-1A, PEACOCK) 测量两个耳廓的厚度,并且评估本发明的适体用于牛皮癣样皮炎的功效。

[0166] 与用盐水施用的阴性对照组的耳廓厚度相比较,本发明的聚乙二醇化适体(适体编号 48)施用组和抗 IL-17 抗体施用组中的耳廓厚度显著减少,但聚乙二醇化的常规已知的适体(适体编号 51)施用组的耳廓厚度未显示显著差异(图 2B)。在该图中,每个值显示平均值 \pm 平均值的标准误($n=5$),并且通过单向方差分析和 Dunnett 氏方法分析统计学显著差异(*: $P<0.05$, **: $P<0.01$)。

[0167] 上述结果强烈提示针对 IL-17 的本发明的适体可以用作治疗药物,用于免疫相关皮肤疾病例如牛皮癣。

[0168] 实施例 10:对小鼠中的葡糖 -6-磷酸异构酶诱导关节炎模型的抗炎作用

根据由 A Ishiguro 等人(Arthritis Rheum. 63,455-466 (2011))报道的方法,检查本发明的适体对葡糖 -6-磷酸异构酶(GPI) 诱导关节炎模型的抑制作用。

[0169] 首先,雄性 DBA/1 小鼠(8 周龄,Charles River)用由完全佐剂(Difco)乳化的小鼠 GPI (300 μ g/头)在尾根部处皮内施用,并且起始通过实施例 2 中所述的方法聚乙二醇化的本发明的适体(适体编号 8) (5 mg/kg)的给药。腹膜内施用适体,每天一次,每隔一天。作为对照,腹膜内施用盐水,每天一次,以 10 mL/kg 的剂量,每隔一天。每天观察动物,并且每只爪的炎症以从 0 (无症状)到 2 (整个肢体的发红和最大限度肿胀)的 3 个水平进行评分,并且评估本发明的适体对关节炎的功效。

[0170] 与用盐水施用的对照组相比较,本发明的聚乙二醇化适体(适体编号 8)施用组的关节炎得分显著减少(在免疫后第 11 天和第 12 天,图 3)。在该图中,每个值显示平均值 \pm 平均值的标准误($n=10$),并且通过威 - 怀 - 曼三氏方法分析统计学显著差异(*: $P<0.05$,

** : $P < 0.01$)。

[0171] 上述结果强烈提示针对 IL-17 的本发明的适体可以用作治疗药物,用于自身免疫相关关节炎例如类风湿性关节炎。

[0172] 实施例 11-1:对小鼠中的胶原诱导关节炎模型的抗炎作用 - 1

根据由 S Toyama 等人(Arthritis Res Ther 12, R92 (2010))报道的方法,检查本发明的适体对胶原诱导关节炎模型的抑制作用。

[0173] 首先,雄性 DBA/1 小鼠(8 周龄, Charles River)用由完全佐剂(Chondrex)乳化的牛 II 型胶原(200 $\mu\text{g}/\text{头}$, Collagen Research Center)在尾根部处皮内施用(实验第 1 天)。在实验第 22 天时,小鼠用由不完全佐剂乳化的牛 II 型胶原进行加强,以及腹膜内施用通过实施例 2-1 中所述的方法聚乙二醇化的本发明的适体(适体编号 8)(5 mg/kg),每天一次,连续 16 天。作为对照,腹膜内施用盐水,每天一次,以 10 mL/kg 的剂量,每一天。每天观察动物,并且每只爪的炎症以从 0 (无症状)到 4 (整个肢体的发红和最大限度肿胀)的 5 个水平进行评分,并且评估本发明的适体对关节炎的功效。

[0174] 与用盐水施用的对照组相比较,本发明的聚乙二醇化适体(适体编号 8)施用组的关节炎得分显著减少(图 4A)。在该图中,每个值显示平均值 \pm 平均值的标准误($n=9$ 或 10),并且通过威-怀-曼三氏方法分析统计学显著差异(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)。

[0175] 实施例 11-2:对小鼠中的胶原诱导关节炎模型的抗炎作用 - 2

通过类似于实施例 11-1 中那种的方法,检查本发明的适体对胶原诱导关节炎模型的抑制作用。作为本发明的适体,使用通过实施例 2-2 中所述的方法聚乙二醇化的本发明的适体(适体编号 64) (5 mg/kg),以及通过相似方法聚乙二醇化的常规已知的适体(适体编号 51) (5 mg/kg),并且作为对照,腹膜内施用盐水,每天一次,以 10 mL/kg 的剂量,连续 16 天。

[0176] 当与用盐水施用的对照组相比较时,本发明的聚乙二醇化适体(适体编号 64)施用组的关节炎得分显著减少。然而,聚乙二醇化的常规已知的适体(适体编号 51)施用组的关节炎得分未显示显著差异(图 4B)。在该图中,每个值显示平均值 \pm 平均值的标准误($n=9$),并且通过威-怀-曼三氏方法分析统计学显著差异(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)。

[0177] 因为 GPI 诱导关节炎模型(实施例 10)和胶原诱导关节炎模型(实施例 11-1 和 11-2)均广泛用作关节炎的动物模型,证实本发明的适体的有效性,所以进一步证实针对 IL-17 的本发明的适体可以用作治疗药物,用于自身免疫相关关节炎例如类风湿性关节炎。特别地,明确本发明的适体显示比常规已知的适体更强的活性。

[0178] 工业适用性

本发明的适体或复合物可以用作药剂或试剂,例如用于疾病包括炎性疾病、自身免疫性疾病、癌症、过敏、感染等的诊断试剂。本发明的适体或复合物还可以用于纯化和浓缩 IL-17、IL-17 的标记、以及检测和定量 IL-17。

[0179] 本申请基于在日本提交的专利申请号 2013-060817 (提交日期 :2013 年 3 月 22 日),其内容完全并入本文。

[0001]

序列表

- <110> THE UNIVERSITY OF TOKYO
 ZENYAKU KOGYO KABUSHIKIKAISHA
- <120> 针对IL-17的适体及其用途
- <130> 092157
- <150> JP 2013-060817
 <151> 2013-03-22
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 针对白介素-17的适体
- <400> 1
 gggguagccgg aggagucagu raucgguacc c 31
- <210> 2
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工的
- <220>
 <223> 针对白介素-17的适体
- <400> 2
 gggguagccg gaggagtcag taaucgguac ccc 33
- <210> 3
 <211> 33
 <212> RNA
 <213> 人工的
- <220>
 <223> 针对白介素-17的适体
- <400> 3
 ggucuagccg gaggagucag uaaucgguag acc 33
- <210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0002]

<220>

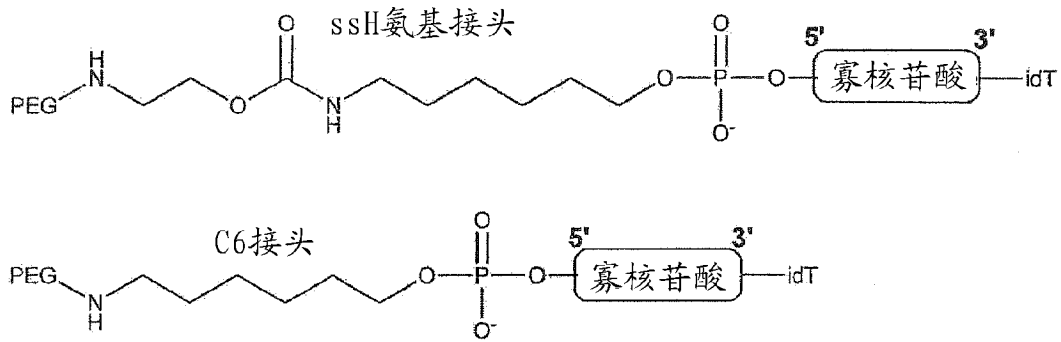
<223> 针对白介素-17的适体

<400> 4

gggguagccg gaggagucag uaucgguac ccc

33

代表性5'-PEG形式的结构（两类接头）



代表性的5', 3'-PEG形式的结构

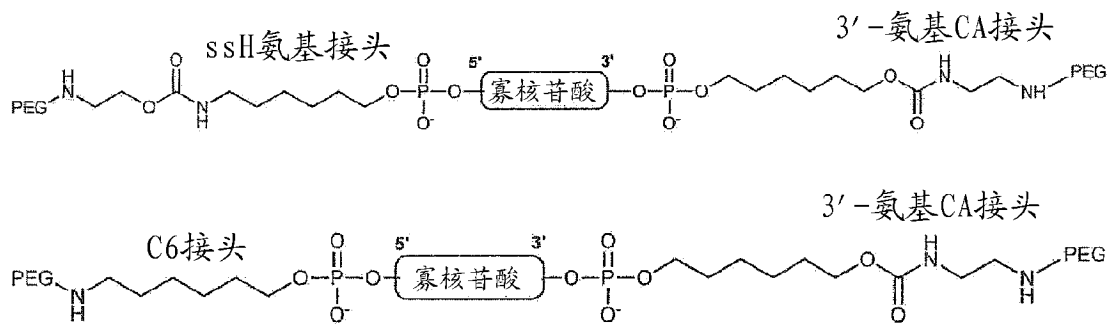
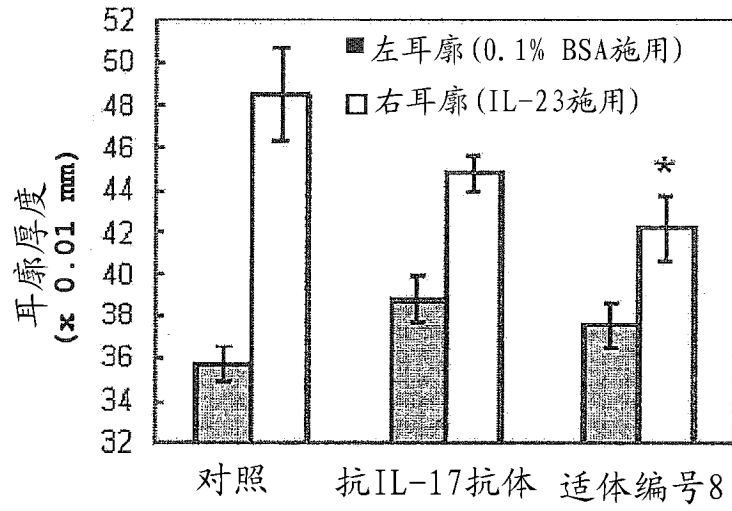


图 1

对小鼠IL-23诱导牛皮癣模型的抑制作用

A



B

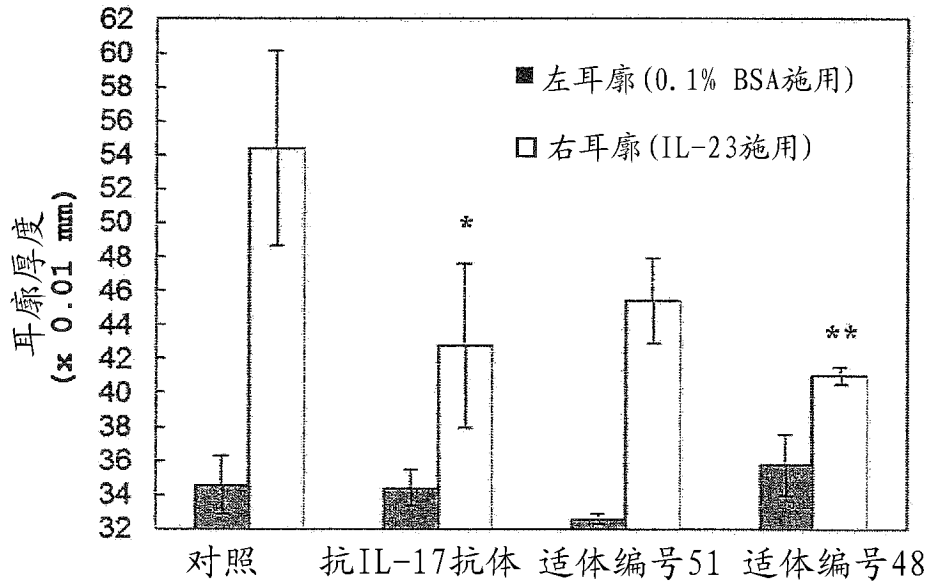


图 2

对小鼠中葡糖-6-磷酸异构酶诱导关节炎模型的关节炎抑制作用

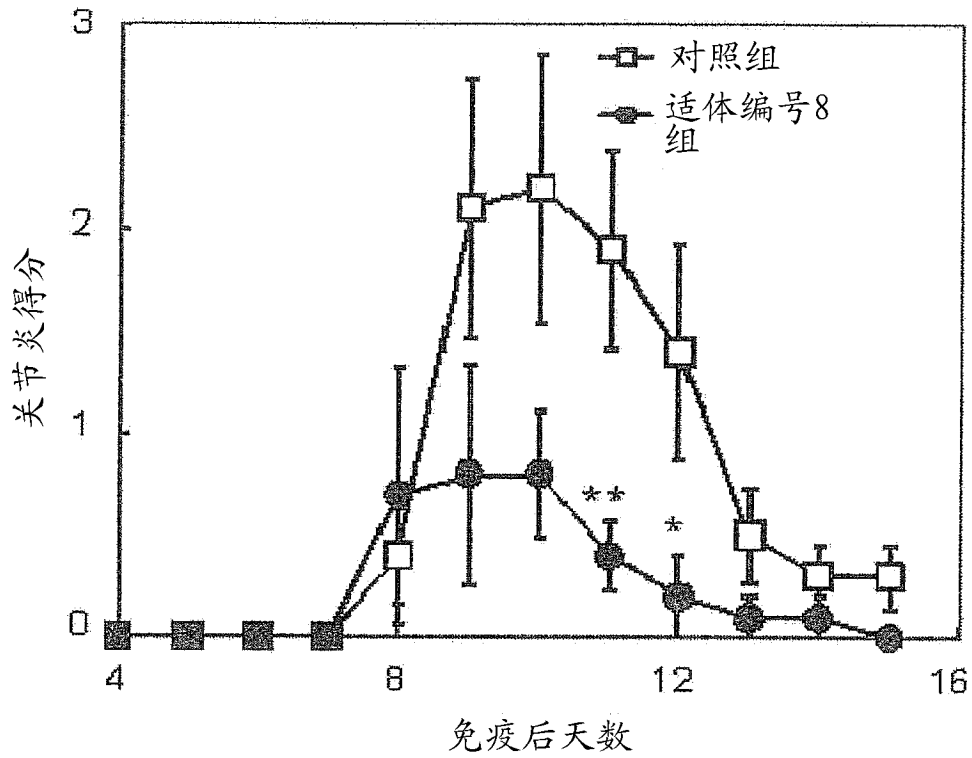
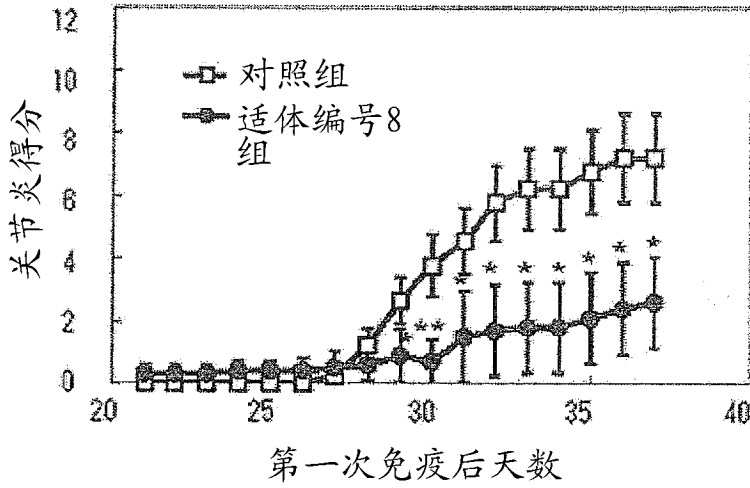


图 3

对小鼠中胶原诱导关节炎模型的关节炎发作抑制作用

A



B

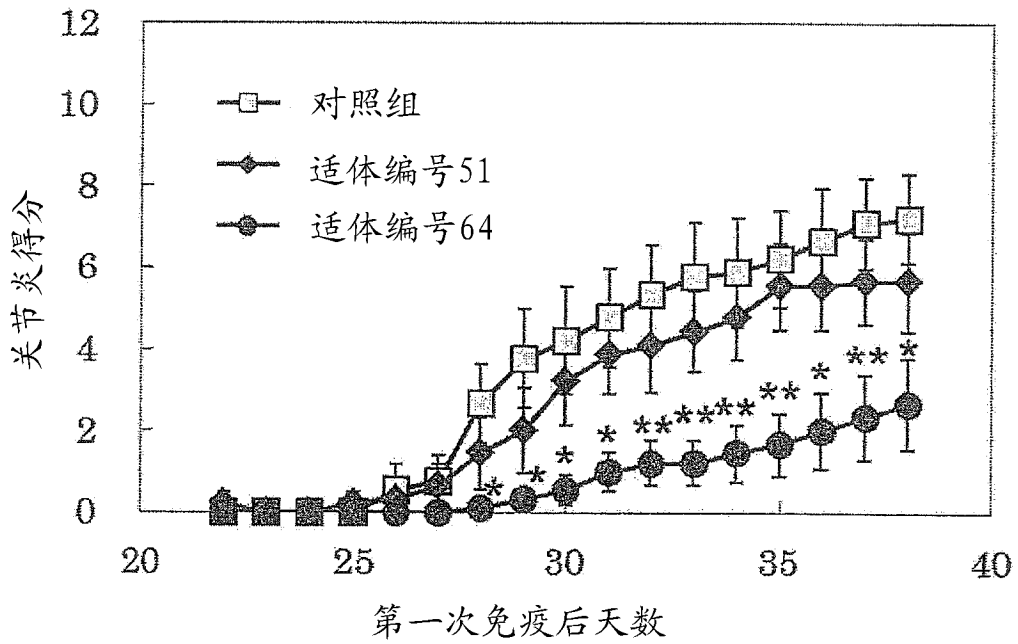


图 4

专利名称(译)	针对IL-17的适体及其用途		
公开(公告)号	CN105264072A	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201480017486.8	申请日	2014-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京大学 全药工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京大学 全药工业株式会社		
[标]发明人	石黑亮 中村义一 春田和彦 大泷菜月		
发明人	石黑亮 中村义一 春田和彦 大泷菜月		
IPC分类号	C12N15/00 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/54 C12N15/115 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/7088 A61K45/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/315 C12N2310/321 C12N2310/322 C12N2310/3231 C12N2310/3521 C12N2310/3533 G01N33/6869 C07K14/54 C12N2310/344 C12N2320/30 G01N2333/54		
优先权	2013060817 2013-03-22 JP		
其他公开文献	CN105264072B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了与IL-17结合以抑制IL-17和IL-17受体的结合的适体；含有适体和功能物质（例如亲和性物质、标记物质、酶、药物递送介质或药物）的复合物；含有适体或含有适体和功能物质的复合物的药剂、诊断剂、标记剂等。

对小鼠IL-23诱导牛皮癣模型的抑制作用

