



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102099471 A

(43) 申请公布日 2011.06.15

---

(21) 申请号	200980128279.9	<i>A61K 31/7105</i> (2006.01)
(22) 申请日	2009.07.14	<i>A61K 48/00</i> (2006.01)
(30) 优先权数据		<i>A61K 49/00</i> (2006.01)
	2008-183233 2008.07.14 JP	<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
		<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日		<i>A61P 37/02</i> (2006.01)
	2011.01.14	<i>A61P 37/08</i> (2006.01)
(86) PCT申请的申请数据		<i>C12Q 1/68</i> (2006.01)
	PCT/JP2009/062764 2009.07.14	<i>G01N 33/53</i> (2006.01)
(87) PCT申请的公布数据		
	W02010/008001 JA 2010.01.21	
(71) 申请人	国立大学法人东京大学	
	地址 日本东京都	
(72) 发明人	中村义一 大内将司 石黑亮	
(74) 专利代理机构	中国专利代理(香港)有限公司	
	司 72001	
	代理人 卢曼 郭文洁	
(51) Int. Cl.		
	<i>C12N 15/09</i> (2006.01)	
	<i>A61K 9/107</i> (2006.01)	

权利要求书 2 页 说明书 23 页  
序列表 19 页 附图 10 页

---

### (54) 发明名称

针对 IL-17 的适配体及其用途

### (57) 摘要

本发明提供了针对 IL-17 的高质量适配体。具有针对 IL-17 的抑制活性的适配体;包含具有针对 IL-17 的结合活性或抑制活性的适配体和功能性物质(例如亲和性物质、标记用物质、酶、药物递送介质、药物等)的复合物;药物、诊断试剂或标记试剂,其中包含:具有针对 IL-17 的结合活性或抑制活性的适配体、或者含该适配体和功能性物质的复合物。

1. 与 IL-17 结合的适配体。
2. 抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合的适配体。
3. 抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合但不抑制 IL-17F 与 IL-17 受体结合的适配体。
4. 抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合并且包含 SEQ ID NO :58 的序列的适配体。
5. 抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合并包含 SEQ ID NO :59 或 60 的序列的适配体。
6. 权利要求 4 或 5 所述的适配体,其中嘧啶核苷酸是修饰的核苷酸。
7. 权利要求 1 所述的适配体,其是以下的 (a) 或 (b) 的任一种:
  - (a) 包含选自 SEQ ID NO :1-54 中的核苷酸序列(条件是尿嘧啶可以是胸腺嘧啶)的适配体,其中所述适配体中包含的核苷酸是这样的:
    - (i) 各嘧啶核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且是氟原子或被选自氢原子、羟基和甲氧基的原子或基团取代,和
    - (ii) 各嘌呤核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且是羟基或被选自氢原子、甲氧基和氟原子的原子或基团取代;
  - (b) 包含选自 SEQ ID NO :1-54 中的核苷酸序列(条件是尿嘧啶可以是胸腺嘧啶)的适配体,其中一个或数个核苷酸被替换、缺失、插入或添加,其中所述适配体中包含的核苷酸是这样的:
    - (i) 各嘧啶核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且是氟原子或被选自氢原子、羟基和甲氧基的原子或基团取代,和
    - (ii) 各嘌呤核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且是羟基或被选自氢原子、甲氧基和氟原子的原子或基团取代。
8. 权利要求 7 所述的适配体,其包含 SEQ ID NO :58、59 或 60 的序列。
9. 权利要求 7 所述的适配体,其包含 SEQ ID NO :40 或 44 的序列。
10. 权利要求 1 至 9 中任一项所述的适配体,其中所述适配体中包含的核苷酸是修饰的。
11. 包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的适配体和功能性物质的复合物。
12. 权利要求 11 所述的复合物,其中所述功能性物质是亲和性物质、标记用物质、酶、药物递送介质或药物。
13. 包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的适配体或权利要求 11 或 12 所述的复合物的药物。
14. 用于治疗或预防自身免疫疾病、癌症、过敏症或其它与炎症相关的疾病的药物,其包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的适配体或权利要求 11 或 12 所述的复合物。
15. 包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的适配体或权利要求 11 或 12 所述的复合物的诊断试剂。
16. 包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的适配体或权利要求 11 或 12 所述的复合物的 IL-17 检测探针。
17. 包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的适配体或权利要求 11 或 12 所述的复合物的用于纯化 IL-17 的固相载体。
18. 检测 IL-17 的方法,包括使用权利要求 1 至 10 中任一项所述的适配体或权利要求 11 或 12 所述的复合物。

19. 纯化 IL-17 的方法,包括使用权利要求 1 至 10 中任一项所述的适配体或权利要求 11 或 12 所述的复合物。

## 针对 IL-17 的适配体及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及针对 IL-17 的适配体以及利用该适配体的方法等。

### 背景技术

[0002] 白细胞介素 17 (IL-17 或 CTLA-8) 是由 Th17 细胞分泌的细胞因子, 与炎性疾病、自身免疫疾病和感染性疾病密切相关。人 IL-17 是由在 N 末端包含信号肽的 155 个氨基酸构成的 20-30kDa 的糖蛋白。在其分子结构中, 存在 6 个半胱氨酸残基和 1 处结合 N 的糖链结合位点。成熟形式由 136 个氨基酸组成, 通常以二聚体存在。

[0003] 作为 IL-17 家族的蛋白, 已知有 6 种蛋白: IL-17A、B、C、D、E 和 F。一般而言, IL-17 是指 IL-17A。IL-17E 也称作 IL-25。人 IL-17 与人 IL-17B、C、D、E 和 F 的氨基酸序列的同源性分别是 25%、28%、22%、27% 和 44%, IL-17F 的同源性最高。人 IL-17 与小鼠 IL-17 和狨猴 IL-17 的同源性分别是 63% 和 90%。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 形成同源双体或异源双体, 并且与 IL-17RA 和 IL-17RC 结合。IL-17 与 IL-17RA 的结合较弱, 其 Kd 值为大约  $10^{-7}$ , 这说明 IL-17RC 的参与可能具有重要意义。

[0004] Th17 细胞是产生 IL-17 的 CD4<sup>+</sup>T 细胞。当在体外用 IL-23 刺激记忆 CD4<sup>+</sup>T 细胞时, 会诱导 IL-17 的产生。另一方面, TGF- $\beta$  和 IL-6 在 Th17 细胞的分化诱导中具有重要作用。TGF- $\beta$  和 IL-6 作用于幼稚 T 细胞 (naive T cell) 以诱导 RORgt (转录因子) 的表达。由于 RORgt 的缺乏导致 Th17 细胞不能分化, 另外通过强制表达的 RORgt 使幼稚 T 细胞能够被相反地分化为产生 IL-17 的细胞, 所以该转录因子被认为对于 Th17 细胞分化具有重要意义。虽然通过 IL-6 激活 STAT3 对于诱导 RORgt 的表达具有重要意义, 但是通过 IL-2 激活 STAT5 相反地抑制表达。IL-2 对于调节性 T 细胞的分化是必需的; IL-2 缺失型小鼠会遭受严重的自身免疫; 这被认为是由于调节性 T 细胞的减少和同时发生的 Th17 细胞的过度分化。当在体外用单独的 TGF- $\beta$  刺激幼稚 T 细胞时, 会诱导调节性 T 细胞而非 Th17。Th1 细胞产生的 IFN- $\gamma$ 、Th2 细胞产生的 IL-4 等对于 Th17 细胞的分化具有抑制作用。

[0005] 当 IL-17 结合至受体时, NF- $\kappa$ B 途径、MAP 激酶途径和 C/EBP 途径经由 Act-1 和 TRAF6 被激活, 这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、MMP-9 等的表达。此外, 已知 IL-17 还作用于结缔组织系统细胞, 例如成纤维细胞和内皮细胞, 并且作用于免疫系统细胞, 例如树突细胞祖细胞, 以诱导各种细胞因子和受体例如 IL-6、IL-1 和 ICAM-1 的表达。

[0006] 诸如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IFN- $\gamma$  的细胞因子参与 IL-17 的产生。另一方面, IL-17 诱导这些细胞因子的产生。已知 IL-17 与其它细胞因子协同作用。

[0007] 已经发现 IL-17 与炎性疾病、自身免疫疾病等密切相关。已知在具有慢性风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、贝赫切特病、移植排斥、肾炎综合征、炎性肠病、哮喘、多发性硬化、牙周病等的患者中, IL-17 的表达升高。已经报道在 IL-17 缺失型小鼠中, 胶原诱导的关节炎 (CIA) (其为慢性风湿性关节炎的模型)、实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) (其为多

发性硬化的模型)、DNFB 或 TNCB 引起的接触型超敏反应、甲基化的 BSA 引起的延迟型超敏反应、OVA 诱导的呼吸道超敏反应等被显著抑制。

[0008] IL-17 还与癌症相关。已经报道:向 SCID 小鼠皮下移植非小细胞肺癌细胞会促进高度表达 IL-17 的小鼠中癌细胞的增殖。还已经报道:IL-17 也与宫颈癌和卵巢癌相关。

[0009] IL-17 与感染性疾病相关。IL-17R 敲除小鼠对于肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 感染、白色念珠菌 (*Candida albicans*) 感染、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 感染等具有高度易感性。脂多糖 (LPS) 和细菌细胞体成分、例如伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 和肺炎克雷伯氏菌的细胞体成分诱导 IL-17 的产生。认为这些成分通过作用于抗原呈递细胞以诱导 IL-23, 从而促进 IL-17 的产生。在 IL-17R 敲除小鼠中, 在感染肺炎克雷伯氏菌之后, 在肺部的感染位点上, CXCL1、CXCL2、G-CSF 等 (它们在嗜中性粒细胞的迁移和功能中具有重要作用) 的产生会下降, 发现嗜中性粒细胞的迁移被破坏。

[0010] 近年来, RNA 适配体 (aptamer) 应用于治疗药物、诊断试剂和测试试剂已经引起了人们的注意; 一些 RNA 适配体已经处于临床研究阶段或处于实际应用中。在 2004 年 12 月, 世界上首例 RNA 适配体药物即 Macugen 在美国被批准作为用于年龄相关的黄斑变性的治疗药物。RNA 适配体是指特异性结合靶分子例如蛋白质的 RNA, 并且其可以使用 SELEX 法 (指数富集配体系统进化法) 来制备 (国际专利公布 W091/19813、W094/08050、W095/07364)。在 SELEX 法中, 从具有大约 10<sup>14</sup> 个不同的核苷酸序列的 RNA 库中选择特异性结合靶分子的 RNA。使用的 RNA 具有大约 40 个残基的随机序列, 其两翼为引物序列。使该 RNA 库与靶分子混合, 只有那些与靶分子结合的 RNA 被回收 (使用过滤器等)。通过 RT-PCR 扩增所回收的 RNA, 将其用作下一轮的模板。通过重复该操作大约 10 次, 可以获得特异性结合靶分子的 RNA 适配体。

[0011] [ 现有技术文献 ]

[0012] [ 专利文献 ]

[0013] 专利文献 1 :W091/19813

[0014] 专利文献 2 :W094/08050

[0015] 专利文献 3 :W095/07364

## 发明内容

[0016] 本发明要解决的技术问题

[0017] 本发明旨在提供针对 IL-17 的适配体, 和利用该适配体的方法等。

[0018] 解决技术问题方法

[0019] 本发明人长期不懈地研究以解决以上描述的问题, 并且成功地制备了针对 IL-17 的高质量适配体, 这使本发明得以完成。

[0020] 因此, 本发明提供了以下内容:

[0021] [1] 与 IL-17 结合的适配体;

[0022] [2] 抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合的适配体;

[0023] [3] 抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合但不抑制 IL-17F 与 IL-17 受体结合的适配体;

[0024] [4] 抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合并包含 SEQ ID NO :58 的序列的适配体;

- [0025] [5] 抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合并包含 SEQ ID NO :59 或 60 的序列的适配体；
- [0026] [6][4] 或 [5] 中描述的适配体,其中嘧啶核苷酸是修饰的核苷酸；
- [0027] [7][1] 的适配体,其是以下的 (a) 或 (b) 的任一种：
- [0028] (a) 包含选自 SEQ ID NO :1-54 中的核苷酸序列 (条件是尿嘧啶可以是胸腺嘧啶) 的适配体,其中所述适配体中包含的核苷酸是这样的：
- [0029] (i) 各嘧啶核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且是氟原子或被选自氢原子、羟基和甲氧基的原子或基团取代,和
- [0030] (ii) 各嘌呤核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且是羟基或被选自氢原子、甲氧基和氟原子的原子或基团取代；
- [0031] (b) 包含选自 SEQ ID NO :1-54 中的核苷酸序列 (条件是尿嘧啶可以是胸腺嘧啶) 的适配体,其中一个或数个核苷酸被替换、缺失、插入或添加,其中所述适配体中包含的核苷酸是这样的：
- [0032] (i) 各嘧啶核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且是氟原子或被选自氢原子、羟基和甲氧基的原子或基团取代,和
- [0033] (ii) 各嘌呤核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且是羟基或被选自氢原子、甲氧基和氟原子的原子或基团取代；
- [0034] [8][7] 中描述的适配体,其包含 SEQ ID NO :58、59 或 60 的序列；
- [0035] [9][7] 中描述的适配体,其包含 SEQ ID NO :40 或 44 的序列；
- [0036] [10][1] 至 [9] 中任一项描述的适配体,其中所述适配体中包含的核苷酸是被修饰的；
- [0037] [11] 包含 [1] 至 [10] 中任一项描述的适配体和功能性物质的复合物；
- [0038] [12] 根据 [11] 的复合物,其中所述功能性物质是亲和性物质、标记用物质、酶、药物递送介质或药物；
- [0039] [13] 包含 [1] 至 [10] 中任一项描述的适配体或者 [11] 或 [12] 中描述的复合物的药物；
- [0040] [14] 用于治疗或预防自身免疫疾病、癌症、过敏症或其它与炎症相关的疾病的药物,其包含 [1] 至 [10] 中任一项描述的适配体或者 [11] 或 [12] 中描述的复合物；
- [0041] [15] 包含 [1] 至 [10] 中任一项描述的适配体或者 [11] 或 [12] 中描述的复合物的诊断试剂；
- [0042] [16] 包含 [1] 至 [10] 中任一项描述的适配体或者 [11] 或 [12] 中描述的复合物的 IL-17 检测探针；
- [0043] [17] 包含 [1] 至 [10] 中任一项描述的适配体或者 [11] 或 [12] 中描述的复合物的用于纯化 IL-17 的固相载体；
- [0044] [18] 检测 IL-17 的方法,该方法包括使用 [1] 至 [10] 中任一项描述的适配体或者 [11] 或 [12] 中描述的复合物；和
- [0045] [19] 纯化 IL-17 的方法,该方法包括使用 [1] 至 [10] 中任一项描述的适配体或者 [11] 或 [12] 中描述的复合物。
- [0046] 发明效果
- [0047] 本发明的适配体或复合物可用作药物或诸如诊断试剂的试剂,该药物或试剂用于

炎性疾病和诸如癌症、过敏症、感染性疾病等疾病。本发明的适配体或复合物还可用于纯化和浓缩 IL-17、标记 IL-17, 以及检测和定量 IL-17。

### 附图说明

[0048] 图 1 显示了由 MFOLD 程序预测的 SEQ ID NO :1 所示的适配体的二级结构, 其中黑色圆圈中包括的部分表示共同序列。

[0049] 图 2 显示了由 MFOLD 程序预测的 SEQ ID NO :2 所示的适配体的二级结构, 其中黑色圆圈中包括的部分表示共同序列。

[0050] 图 3 显示了由 MFOLD 程序预测的 SEQ ID NO :29 所示的适配体的二级结构, 其中黑色圆圈中包括的部分表示共同序列。

[0051] 图 4 显示了由 MFOLD 程序预测的 SEQ ID NO :7 所示的适配体的二级结构, 其中方框中包括的部分和 \*(星号) 表示共同序列。

[0052] 图 5 显示了由 MFOLD 程序预测的 SEQ ID NO :13 所示的适配体的二级结构, 其中方框中包括的部分和 \*(星号) 表示共同序列。

[0053] 图 6 显示了由 MFOLD 程序预测的 SEQ ID NO :30 所示的适配体的二级结构, 其中方框中包括的部分和 \*(星号) 表示共同序列。

[0054] 图 7 是传感图, 其显示了 SEQ ID NO :1 所示的适配体 (Apt1) 与人 IL-17 结合。

[0055] 图 8 是传感图, 其显示了 SEQ ID NO :1 所示的适配体 (Apt1) 不与人 IL-17F 结合。

[0056] 图 9 显示了由 MFOLD 程序预测的 SEQ ID NO :40 所示的适配体的二级结构, 其中黑色圆圈中包括的部分表示共同序列。

[0057] 图 10 显示了由 MFOLD 程序预测的 SEQ ID NO :44 所示的适配体的二级结构, 其中方框中包括的部分和 \*(星号) 表示共同序列。

[0058] 图 11 是传感图, 其显示了 SEQ ID NO :1 所示的适配体 (Apt1) 抑制人 IL-17 与人 IL-17R 的结合。

[0059] 图 12 显示 :SEQ ID NO :44 所示的适配体具有对 IL-17 信号传导的抑制活性。黑色圆圈表示对照 DNA 的结果, 黑色三角形表示抗 IL-17 中和抗体的结果, 黑色方框表示适配体的结果。

[0060] 图 13 显示了适配体在小鼠 EAE 模型中的发病抑制实验的结果。黑色圆圈表示对照组的的结果, 黑色方框表示 1mg/kg 适配体给药组的结果, 黑色三角形表示 3mg/kg 适配体给药组的结果, × 表示 10mg/kg 适配体给药组的结果。各个 \*(星号) 代表  $P < 0.05$ , 各个 \*\* 代表  $P < 0.01$ 。

### 具体实施方式

[0061] 本发明提供了对 IL-17 具有结合活性的适配体。本发明的适配体能够抑制 IL-17 的活性。

[0062] 适配体是指具有对于特定靶分子的结合亲和性的核酸分子。适配体还可以通过与特定靶分子结合而抑制特定靶分子的活性。本发明的适配体可以是 RNA、DNA、修饰的核酸或它们的混合物。本发明的适配体还可以是直链状或环状的形态。

[0063] 针对 IL-17 的抑制活性是指, 抑制 IL-17 所具有的任意选择的活性的能力。例如,

IL-17 作用于免疫系统细胞、结缔组织系统细胞等以诱导产生各种细胞因子和趋化因子。因此,针对 IL-17 的抑制活性是指抑制产生这些细胞因子、趋化因子等的活性。由于这些细胞因子和趋化因子的表达诱导炎性细胞的迁移和激活,所以针对 IL-17 的抑制活性意味着抑制其活性。

[0064] IL-17 是指 Th17 细胞产生的细胞因子, Th17 细胞是 CD4<sup>+</sup>T 细胞, IL-17 是例如具有登记号 AAH67505 或 NP002181 所示的氨基酸序列的蛋白质。IL-17 有时被称作 IL-17A 或 CTLA-8。本发明所示的 IL-17 除了在动物体内产生之外,还可以使用小鼠和其它哺乳动物细胞、昆虫细胞、大肠杆菌等的细胞来制备,还可以通过化学合成来制备。当通过细胞培养或化学合成来制备 IL-17 时,可以容易地制备突变体。在本文中,突变体是指其中数个氨基酸被替换的序列,或者部分氨基酸序列,并且意指具有本来 IL-17 所具有的至少一种活性的蛋白或肽。当氨基酸被替换时,替换氨基酸可以是天然存在的氨基酸,或者可以是非天然存在的氨基酸。在本发明中提及的 IL-17 包括这些突变体。

[0065] IL-17 受体意思是 IL-17 所结合的细胞表面蛋白。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。在本发明中提及的 IL-17 受体可以是包含天然存在的氨基酸序列的蛋白,或者是其突变体。在本文中,突变体是指其中数个氨基酸被替换的序列,或者部分氨基酸序列,并且意指具有对于 IL-17 的结合活性的蛋白或肽。本发明提供了抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合的适配体。

[0066] 本发明的适配体可以显示出针对源自任何哺乳动物的 IL-17 的抑制活性。此类哺乳动物包括灵长类(例如,人、猴)、啮齿类(例如,小鼠、大鼠和豚鼠)、宠物、家畜和役畜(例如,狗、猫、马、牛、山羊、绵羊、猪)。

[0067] 本发明的适配体没有特别限制,只要其能够结合 IL-17 的任意选择的部分以抑制其活性。适配体优选为抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合的适配体,其包含序列 ggauagcgaagucauugagcgcc (SEQ ID NO :40)。该序列包括后述的 SEQ ID NO :1、2 和 29 所示的核苷酸序列的共同序列 (SEQ ID NO :58),并且具有使用 MFOLD 程序所预测的相同的二级结构(见图 9)。

[0068] 虽然本发明的适配体没有特别限制,只要其能够结合 IL-17 的任意选择的部分以抑制其活性,但所述适配体优选为抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合、并且包含序列 ggucuaagcggaggagucaguaaucgguagacc (SEQ ID NO :44) 的适配体。该序列包括后述的 SEQ ID NO :6-21、30 和 31 所示的核苷酸序列的共同序列 (SEQ ID NO :59)(或者后述的 SEQ ID NO :7、9、13、21 和 30 所示的核苷酸序列的共同序列 (SEQ ID NO :60),并且具有使用 MFOLD 程序所预测的相同的二级结构(见图 10)。

[0069] 虽然本发明的适配体没有特别限制,只要其能够结合 IL-17 的任意选择的部分以抑制其活性,但所述适配体优选为抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合的适配体,其包含序列 gauagcgaagucauugagcgc (SEQ ID NO :58)。该序列是后述的 SEQ ID NO :1、2 和 29 所示的核苷酸序列的共同序列,并且具有使用 MFOLD 程序所预测的相同的二级结构(见图 1-3)。

[0070] 虽然本发明的适配体没有特别限制,只要其能够结合 IL-17 的任意选择的部分以抑制其活性,但所述适配体优选为抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合的适配体,其包含序列 ggagucag (SEQ ID NO :59)。该序列是后述的 SEQ ID NO :6-21、30 和 31 所示的核苷酸序列的共同序列,并且具有使用 MFOLD 程序所预测的相同的二级结构(见图 4-6)。

[0071] 本发明的适配体优选为抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合的适配体,其包含序列 ggaggagucaguaauc (SEQ ID NO :60)。该序列是后述的 SEQ ID NO :7、9、13、21 和 30 所示的核苷酸序列的共同序列,并且具有使用 MFOLD 程序所预测的相同的二级结构(见图 4-6)。

[0072] 本发明的适配体的长度没有特别限制,通常可以是大约 10 至大约 200 个核苷酸,可以是例如,不超过大约 100 个核苷酸,优选不超过大约 50 个核苷酸,更优选不超过大约 40 个核苷酸,最优选不超过大约 35 个核苷酸。当核苷酸的总数目较小时,化学合成和大量生产将较容易,就成本而言具有较大的优势。还考虑到化学修饰容易,体内稳定性高,毒性低。

[0073] 本发明的适配体中包含的各核苷酸是相同的或不同的,并且可以是在核糖(例如嘧啶核苷酸的核糖,嘌呤核苷酸的核糖)的 2' 位包含羟基的核苷酸(即,非取代的核苷酸),或者,通过任意原子或基团在核糖的 2' 位进行取代(修饰)的核苷酸(在本发明中有时称作“取代的核苷酸”或“修饰的核苷酸”)。

[0074] 任意此类原子或基团的实例,可以提及被氢原子、氟原子或者 -O- 烷基(例如 -O- 甲基)、-O- 酰基(例如 -O-CHO 基团)、氨基(例如 -NH<sub>2</sub> 基团)取代的核苷酸。本发明的适配体还可以是修饰的核苷酸,其中至少一种(例如 1、2、3 或 4 种)核苷酸包括在核糖的 2' 位的羟基,或上述的任意原子或基团,例如,选自氢原子、氟原子、羟基和 -O- 甲基的至少两种(例如,2、3 或 4 种)基团。

[0075] 在本发明的适配体中,所有的嘧啶核苷酸是相同的或不同的,每个可以是在核糖的 2' 位被氟原子取代的核苷酸,或在核糖的 2' 位被上述任意原子或基团(优选选自氢原子、羟基和甲氧基的原子或基团)取代的核苷酸。

[0076] 在本发明的适配体中,所有的嘌呤核苷酸是相同的或不同的,每个可以是在核糖的 2' 位被羟基取代的核苷酸,或者在核糖的 2' 位被上述任意原子或基团(优选选自氢原子、甲氧基和氟原子的原子或基团)取代的核苷酸。

[0077] 本发明的适配体还可以是这样的适配体,其中所有的核苷酸在核糖的 2' 位都包含羟基,或上述任意原子或基团,例如,选自氢原子、氟原子、羟基和 -O- 甲基的相同基团。

[0078] 本发明的适配体还可以具有“能够抑制 IL-17 的活性,但不能抑制 IL-17F 的活性”的特征。本发明的适配体还可以具有“能够抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合,但不能抑制 IL-17F 与 IL-17 受体结合”的特征。IL-17F 是具有 44% 的同源性的 IL-17 家族的蛋白,与 IL-17 最为相似。

[0079] 本发明的适配体还可以是:

[0080] (a) 包含选自 SEQ ID NO :1-54 的核苷酸序列(条件是尿嘧啶可以是胸腺嘧啶)的适配体;

[0081] (b) 包含选自 SEQ ID NO :1-54 的核苷酸序列(条件是尿嘧啶可以是胸腺嘧啶)的适配体,其中一个或数个核苷酸被替换、缺失、插入或添加;或

[0082] (c) 选自下列的缀合物:上述适配体(a)的多缀合物、上述适配体(b)的多缀合物、以及上述适配体(a)和(b)的多缀合物。

[0083] 上述(a)至(c)中优选的是这样的(a)至(c),其中选自 SEQ ID NO :1-54 的核苷酸序列是 SEQ ID NO :58、59 或 60 的序列。

[0084] 上述(a)至(c)中优选的是这样的(a)至(c),其中选自 SEQ ID NO :1-54 的核苷酸序列是 SEQ ID NO :40 或 44 的序列。

[0085] 在上述 (b) 中,对于替换、缺失、插入或添加的核苷酸的数目没有限制。核苷酸的数目可以是例如,不超过大约 30 个,优选不超过大约 20 个,更优选不超过大约 10 个,更优选不超过大约 5 个,最优选为 4、3、2 或 1 个。在上述 (c) 中,可以通过串联合达到缀合。在缀合时可以使用连接体。作为连接体,有核苷酸链(例如 1 至大约 20 个核苷酸)和非核苷酸链(例如  $-(CH_2)_n-$  连接体、 $-(CH_2CH_2O)_n-$  连接体、六甘醇连接体、TEG 连接体、含肽的连接体、含  $-S-S-$  键的连接体、含  $-CONH-$  键的连接体、含  $-OPO_3-$  键的连接体)。上述多缀合物中提及的多个没有特别限制,只要其是 2 个以上,例如可以是 2、3 或 4 个。

[0086] 上述 (a) 至 (c) 的各核苷酸,不论是相同还是不同,可以是在核糖(例如,嘧啶核苷酸的核糖)的 2' 位包含羟基的核苷酸,或者在核糖的 2' 位被任意基团(例如氢原子、氟原子或  $-O-$  甲基)取代的核苷酸。

[0087] 例如,本发明的适配体可以是这样的适配体,其中上述 (a) 至 (c) 中包含的核苷酸是这样的:

[0088] (i) 各嘧啶核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且被氟原子取代,或被任意上述原子或基团、优选选自氢原子、羟基和甲氧基的原子或基团取代;和

[0089] (ii) 各嘌呤核苷酸的核糖的 2' 位是相同的或不同的,并且被羟基取代,或被任意上述原子或基团、优选选自氢原子、甲氧基和氟原子的原子或基团取代。本发明还提供了上述适配体。

[0090] 本发明的适配体可以是这样的适配体,其中每个核苷酸的糖残基(例如核糖)被修饰以增加对 IL-17 的结合活性、稳定性、药物递送性等。糖残基中被修饰的实例有:糖残基的 2' 位、3' 位和 / 或 4' 位的氧原子替换为另一种原子等等。作为修饰的种类有:氟化、 $O-$  烷基化(例如  $O-$  甲基化、 $O-$  乙基化)、 $O-$  芳基化、 $S-$  烷基化(例如  $S-$  甲基化、 $S-$  乙基化)、 $S-$  芳基化、胺化(例如  $-NH_2$ )。可以通过本身已知的方法进行糖残基中的此类改变(参见,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)。

[0091] 本发明的适配体还可以具有改变的(例如化学替换)核酸碱基(例如嘌呤或嘧啶)以增加对 IL-17 的结合活性等。此类改变的实例有:5- 位的嘧啶改变、6- 和 / 或 8- 位的嘌呤改变、用环外胺(extracyclic amine)的改变、用 4- 硫尿苷的替换、用 5- 溴尿嘧啶或 5- 碘尿嘧啶的替换。本发明的适配体中包含的磷酸基团(phosphate group)可以改变以赋予对核酸酶和水解的抗性。例如  $P(O)O$  基团可以用  $P(O)S$ (硫代酯(thioate))、 $P(S)S$ (二硫代酯)、 $P(O)NR_2$ (酰胺化物)、 $P(O)R$ 、 $R(O)OR'$ 、 $CO$  或  $CH_2$ (甲缩醛(formacetal)) 或 3' - 胺( $-NH-CH_2-CH_2-$ ) 替换[其中每个 R 或 R' 单元独立地是 H 或者是取代或非取代的烷基(例如甲基、乙基)]。

[0092] 连接基团是例如  $-O-$ 、 $-N-$  或  $-S-$ , 并且核苷酸可以通过这些连接基团结合至相邻的核苷酸。

[0093] 改变还可以包括这样的改变:例如在 3' 和 5' 加帽。

[0094] 改变还可以通过进一步向末端添加聚乙二醇、氨基酸、肽、反向 dT、核酸、核苷、十四酰、石胆酸 - 油烯基(Lithocolic-oleyl)、二十二酰(docosanyl)、月桂酰、硬脂酰、棕榈酰、油酰、亚油酰(linoleoyl)、其它脂质、甾族化合物、胆固醇、咖啡因、维生素、色素、荧光物质、抗癌剂、毒素、酶、放射活性物质、生物素等进行。对于此类改变,参见例如美国专

利 5,660,985 和 5,756,703。

[0095] 本发明的适配体可以按照本说明书中的公开和本领域中本身已知的方法化学合成。适配体与靶分子结合的方式是多种多样的,例如基于磷酸基团的负电荷的离子键、基于核糖的疏水键和氢键、基于核酸碱基的氢键和堆积相互作用 (stacking interaction)。特别地,基于磷酸基团的负电荷的离子键(其以与构成核苷酸的数目相同的数目存在)是较强的,并且与存在于蛋白质表面的赖氨酸和精氨酸的正电荷结合。因此,不参与直接与靶分子结合的核酸碱基可以被替换。特别地,由于主干 (stem) 结构的部分已经形成碱基对并且朝向双螺旋结构的内侧,所以核酸碱基不可能直接与靶分子结合。因此,即使碱基对被替换为另一碱基对,适配体的活性通常也不会降低。在其中不形成碱基对的结构中(例如环结构),只要核酸碱基不参与直接与靶分子的结合,就可能进行碱基替换。关于核糖的 2' 位的修饰,核糖的 2' 位的官能团甚少直接与靶分子相互作用,但是在很多情况下,其没有相关性,可以被另一种修饰的分子替换。因此,除非参与直接与靶分子结合的官能团被替换或删除,否则适配体通常会保持其活性。另外,重要的是,整体的立体结构不会发生巨大改变。

[0096] 可以使用 SELEX 方法或其改进形式(例如, Ellington 等人, (1990) Nature, 346, 818-822 ; Tuerk 等人, (1990) Science, 249, 505-510) 来制备适配体。在 SELEX 方法中,通过增加轮次 (round) 的数目或使用竞争性物质,对于靶分子显示出更强结合力的适配体被浓缩并被选择。因此,通过调节 SELEX 的轮次的数目和 / 或改变竞争状态,可以在一些情况下获得具有不同结合力的适配体、具有不同结合形态的适配体、具有相同结合力或结合形态但是具有不同碱基序列的适配体。SELEX 方法包括通过 PCR 进行扩增的过程;在该过程中通过使用锰离子等引起突变,从而可以进行具有丰富的多样性的 SELEX。

[0097] 通过 SELEX 获得的适配体是对于靶分子显示出高亲和性的核酸,但是这并不意味着与靶分子的生物活性位点结合。因此,通过 SELEX 获得的适配体并不一定对于靶物质的功能起作用。IL-17 是碱性蛋白,其被认为容易与核酸非特异性地结合。不结合至活性位点的适配体不会影响靶物质的活性。事实上,用于对照的 RNA 不抑制 IL-17 与 IL-17 受体的结合。

[0098] 由此选择的活性适配体可以通过进行 SELEX 优化以达到高功能。对于 SELEX 优化,制备其中具有确定序列的适配体被部分地随机排列的模板、或者掺杂了大约 10% 至 30% 的随机序列的模板;然后再次进行 SELEX。

[0099] 通过 SELEX 获得的适配体的长度是大约 70 个核苷酸,这难以直接制成药物。因此,需要重复尝试误差法以将适配体缩短至大约 50 个核苷酸的长度或更短,以能够容易地化学合成。

[0100] 通过 SELEX 获得的适配体取决于其引物设计,随后的最小化操作的容易性会变化。除非成功地设计了引物,否则随后的开发是不可能的,即使通过 SELEX 选出了具有活性的适配体。在本发明中发现:可以获得甚至具有 23 个核苷酸 (SEQ ID NO:40) 或 33 个核苷酸 (SEQ ID NO:44) 的保持活性的适配体,这些序列对于与 IL-17 的结合是特别重要的。

[0101] 适配体由于可化学合成因而容易改变。对于适配体而言,通过使用 MFOLD 程序来预测二级结构,或者通过使用 X 射线分析或 NMR 分析来预测立体结构,从而可以在一定程度上预测哪些核苷酸可以被替换或缺失,以及在哪里可以插入新的核苷酸。可以容易地化学合成具有新序列的预测的适配体,并且可以使用现有的测定系统来确认该适配体是否保持

活性。

[0102] 如果通过重复如上所述的尝试误差法鉴定出对于获得的适配体与靶分子结合具有重要意义的区域,则活性在很多情况下保持不变,即使向其序列两端添加新的序列。新序列的长度没有特别限制。

[0103] 关于修饰,与序列同样可以进行众多设计或改变。

[0104] 如上所述,适配体可以进行众多设计或改变。本发明还提供了制备适配体的方法,其能够对包含特定序列(例如,与选自主干区域、内环区、发夹环区和单链区的部分对应的序列;如有需要,以下简称为固定序列)的适配体进行众多的设计或改变。

[0105] 例如,此类适配体的制备方法包括制备包含固定序列的适配体:通过使用如下所示的核苷酸序列组成的单一种类的核酸分子:**引物序列(i)**-(N)<sub>a</sub>-固定序列-(N)<sub>b</sub>-**引物序列(ii)**[其中(N)<sub>a</sub>代表由“a”个N的单元组成的核苷酸链;(N)<sub>b</sub>代表由“b”个N的单元组成的核苷酸链;N的单元中的每一个,无论相同或不同,是选自A、G、C、U和T(优选A、G、C和U)的核苷酸。每个“a”和“b”,无论相同或不同,可以是任何数字,并且可以是例如1至大约100,优选1至大约50,更优选1至大约30,进一步优选1至大约20或1至大约10],或多个种类的核酸分子(例如,a、b数目不同的核酸分子库等),以及分别对应于引物序列(i)和(ii)的引物对。

[0106] 本发明还提供了包含本发明的适配体和与其结合的功能性物质的复合物。在本发明的复合物中,适配体与功能性物质之间的结合可以是共价键或非共价键。本发明的复合物可以是这样的复合物,其中本发明的适配体与一个或多个(例如2或3个)相同种类或不同种类的功能性物质结合在一起。所述功能性物质没有特别限制,只要其另外赋予本发明的适配体一定的功能,或者能够改变(例如改善)本发明的适配体可以具有的某些特性。所述功能性物质的实例有:蛋白、肽、氨基酸、脂质、糖、单糖、多核苷酸和核苷酸。所述功能性物质的实例有:亲和性物质(例如生物素、链霉亲和素、对于靶互补序列具有亲和性的多核苷酸、抗体、谷胱甘肽琼脂糖、组氨酸)、标记用物质(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)、药物递送介质(例如,脂质体、微球体、肽、聚乙二醇类)、药物(例如,用于导弹疗法(missile therapy)的那些药物,例如刺孢霉素和倍癌霉素;氮芥类似物,例如环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、异环磷酰胺或曲磷胺;氮丙啶,例如噻替派;亚硝基尿,例如卡莫司汀;烷基化试剂,例如替莫唑胺或达卡巴嗪;叶酸样代谢拮抗剂,例如甲氨蝶呤或雷替曲塞;嘌呤类似物,例如硫代鸟嘌呤、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、紫杉烷、多西紫杉醇或紫杉醇;萘环类,例如多柔比星、表柔比星、伊达比星和米托蒽醌,及其类似物;其它细胞毒性抗生素,例如博莱霉素、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、拓扑替康、伊立替康和比卡鲁胺),和毒素(例如蓖麻蛋白毒素、liatoxin和Vero毒素)。在一些情况下,这些功能性分子最后被除掉。此外,分子可以是可被酶识别并切割的肽,所述酶例如凝血酶、基质金属蛋白酶(MMP)和因子X,并且可以是可被核酸酶或限制酶切割的多核苷酸。

[0107] 本发明的适配体或复合物可以用作例如药物、诊断性药物、检测性药物、或试剂。

其特别可用于作用于自身免疫疾病和伴有炎症的疾病的药物、诊断性药物、检测性药物、或试剂。

[0108] 在本文中,自身免疫疾病和伴有炎症的疾病包括多发性硬化、系统性红斑狼疮(SLE)、硬皮病、舍格伦综合征、多肌炎(PM)、皮肌炎(DM)、风湿性关节炎(慢性风湿性关节炎(RA)、骨关节炎(OA))、炎性小肠结肠炎(克罗恩病等)、进行性系统性硬化症(PSS)、结节性动脉外膜炎(PN)、甲状腺疾病(巴泽多病等)、吉-巴综合征、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)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、I型糖尿病、牛皮癣、哮喘、嗜中性粒细胞功能异常、嗜酸性肺炎、突发性肺纤维化、超敏性肺炎、食道癌、甲状腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、神经母细胞瘤、neuroglastoma、胶质母细胞瘤、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌、肾母细胞瘤、前列腺癌、移植中的移植物排斥反应、移植物抗宿主病、哮喘、过敏性鼻炎、过敏性皮炎、食物过敏、荨麻疹、术后粘连、子宫内膜异位症、成人牙周炎、支气管炎、慢性阻塞性肺病、传染病等等。特别是,多发性硬化症、风湿性关节炎、炎性小肠结肠炎、硬皮病、哮喘、和移植物抗宿主病。

[0109] 本发明的适配体或复合物还可用作药物递送介质、用于体内成像的探针、用于测定血液中 IL-17 浓度的探针、用于组织学染色的探针、用于 ELISA 的探针,以及用于分离和纯化 IL-17 的配体。

[0110] 已知 IL-17 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而诱导多种细胞因子、趋化因子、受体的产生及表达。特别地,其中有 CXCL1(KC 或 Gro $\alpha$ )、CXCL2(MIP2 或 Gro $\beta$ )、CXCL5(LIX)、CXCL6(GCP-2)、CXCL8(IL-8)、CXCL9(MIG)、CXCL10(IP10)、CXCL11(I-TAC)、CCL2(MCP-1)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL11(Eotaxin)、CXCL12(SDF-1)、CCL20(MIP3 $\alpha$ )、IL-1、IL-6、IL-8、IL-19、TNF、CSF2(GM-CSF)、CSF3(G-CSF)、ICAM-1、VCAM-1、PTGS2(COX2)、NOS2(iNOS)、LCN2(24p3)、DEFB4(BD2)、S100A7(Psoriasin)、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 等等。因此,本发明的适配体或复合物可以用作与这些细胞和细胞因子、趋化因子等相关的疾病的药物、诊断性药物、检测性药物、或试剂。

[0111] IL-17 通过与其受体结合而激活 Act1 和 TRAF6,并且激活 NF- $\kappa$ B 途径、MAP 激酶途径、C/EBP 途径等。因此,本发明的适配体或复合物可以用作与这些信号传导途径的激活相关的疾病的药物、诊断性药物、检测性药物、或试剂。

[0112] 本发明的适配体或复合物还可用于预防或治疗多种疾病,包括自身免疫疾病(例如,多发性硬化、系统性红斑狼疮(SLE)、硬皮病、舍格伦综合征、多肌炎(PM)、皮肌炎(DM)、风湿性关节炎(慢性风湿性关节炎(RA)、骨关节炎(OA))、炎性小肠结肠炎(克罗恩病等)、进行性系统性硬化症(PSS)、结节性动脉外膜炎(PN)、甲状腺疾病(巴泽多病等)、吉-巴综合征、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)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、I型糖尿病、牛皮癣、哮喘、嗜中性粒细胞功能异常、嗜酸性肺炎、突发性肺纤维化、超敏性肺炎),癌症(例如食道癌、甲状腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、神经母细胞瘤、

neuroglastoma、胶质母细胞瘤、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌、肾母细胞瘤、前列腺癌), 移植疾病(例如移植物排斥反应、移植物抗宿主病), 过敏症(例如, 哮喘、过敏性鼻炎、过敏性皮炎、食物过敏、荨麻疹), 其它炎症相关疾病(例如, 术后粘连、子宫内膜异位症、成人牙周炎、支气管炎、慢性阻塞性肺病), 传染病等等。特别是, 本发明的适配体可用于预防或治疗多发性硬化症、风湿性关节炎、炎性小肠结肠炎、硬皮病、哮喘、和移植物抗宿主病。

[0113] 本发明的药物可以是配合了药学上可接受的载体的药物。药学上可接受的载体的实例有: 赋形剂, 如蔗糖、淀粉、甘露醇、山梨醇、乳糖、葡萄糖、纤维素、滑石、磷酸钙和碳酸钙; 粘合剂, 如纤维素、甲基纤维素、羟丙基纤维素、聚丙烯吡咯烷酮、明胶、阿拉伯胶、聚乙二醇、蔗糖和淀粉; 崩解剂, 如淀粉、羧甲基纤维素、羟丙基淀粉、钠-甘醇-淀粉、碳酸氢钠、磷酸钙和柠檬酸钙; 润滑剂, 如硬脂酸镁、二氧化硅气凝胶、滑石、十二烷基硫酸钠; 矫味剂, 如柠檬酸、薄荷醇、甘草甜素-铵盐、甘氨酸和橙粉; 防腐剂, 如苯甲酸钠、亚硫酸氢钠、羟苯甲酯和羟苯丙酯; 稳定剂, 如柠檬酸、柠檬酸钠和醋酸; 悬浮剂, 如甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和硬脂酸铝; 分散剂, 如表面活性剂; 稀释剂, 如水、生理盐水和橙汁; 基质蜡(base wax), 例如可可脂、聚乙二醇和煤油; 等等, 但这些不是限制性的。

[0114] 适合于口服给药的制剂是: 将有效量的配体溶解于例如水、生理盐水或橙汁之类的稀释液中而制备的溶液; 包含有效量的固体或粒状的配体的胶囊、小药囊或片剂; 将有效量的有效成分混悬于合适的分散剂中而制备的混悬剂; 将有效量的有效成分的溶液在合适的分散剂中分散并乳化而制备的乳液; 等等。

[0115] 可以通过本身已知的方法对本发明的药物进行包衣, 目的是为了掩盖味道、肠溶、缓释等等。作为用于包衣的包衣剂的实例, 可以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、聚氧化亚乙基二醇、吐温 80、普流罗尼克 F68、醋酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟甲基纤维素醋酸琥珀酸酯、尤特奇(由 Rohm, Germany 生产的甲基丙烯酸/丙烯酸共聚物)、色素(例如, 红色氧化铁、二氧化钛等等)等等。药物可以是速释制剂或缓释制剂。缓释的基材的实例包括脂质体、去端肽胶原(atelocollagen)、明胶、羟磷灰石、PLGA 等。

[0116] 作为适合于胃肠外给药(例如, 静脉内给药、皮下给药、肌肉内给药、局部给药、腹腔内给药、鼻内给药、肺部给药等)的制剂, 有水性和非水性的等渗的无菌注射液体制剂, 其可以包含抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、等渗剂等。还可以列举水性和非水性的无菌混悬剂, 其可以包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、杀菌剂等。该制剂可以以单元剂量体积或以数个分割的剂量包括在容器中, 例如安瓿或小瓶。还可以将有效成分与药学上可接受的载体冷冻干燥并储存于“可以在临使用前溶解于或悬浮于合适的无菌介质”的状态。除了注射液体制剂之外, 吸入剂和软膏剂也是可以接受的。在吸入剂的情况下, 处于冷冻干燥状态的有效成分被微粒化并且通过使用合适的吸入设备通过吸入来给药。吸入剂中可以根据需要而适当配合常规使用的表面活性剂、油、调味品、环糊精或其衍生物等。

[0117] 在本文中, 表面活性剂的实例有: 油酸、卵磷脂、二甘醇二油酸酯、油酸四氢呋喃甲酯、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、glyceryl monolysinoate、十六烷醇、硬脂醇、聚乙二醇 400、西吡氯铵、三油酸山梨坦(商品名司盘 85)、单油酸山梨坦(商品名司盘 80)、单月桂酸山梨坦(商品名司盘 20)、聚氧乙烯硬化蓖麻油(商品名 HCO-60)、聚氧乙烯(20) 失水山梨糖醇单月桂酸酯(商品名

吐温 20)、聚氧乙烯 (20) 失水山梨糖醇单油酸酯 (商品名吐温 80)、天然来源的卵磷脂 (商品名 EPICLON)、油烯基聚氧乙烯 (2) 醚 (商品名 Brij 92)、硬脂基聚氧乙烯 (2) 醚 (商品名 Brij 72)、月桂基聚氧乙烯 (4) 醚 (商品名 Brij30)、油烯基聚氧乙烯 (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) 等等。油的实例有:玉米油、橄榄油、棉籽油、葵花子油等。在软膏剂的情形中,将适当的药理学上可接受的基质 (黄凡士林、白凡士林、石蜡、塑性基质 (plastibase)、硅氧烷、白软膏、蜂蜡、猪油、植物油、亲水软膏、亲水凡士林、纯化的羊毛脂、水解的羊毛脂、吸水软膏、亲水塑性基质、聚乙二醇软膏等) 与活性成分混合,并用作制剂。

[0118] 可以根据常规方法制备吸入剂。具体而言,吸入剂可以这样制备:将上述的本发明的适配体或复合物粉末化或液体化,将其配合至吸入推进剂和 / 或载体中,将它们填充在合适的吸入容器中。在上述的本发明的适配体或复合物是粉末的情形中,可以使用普通的机械粉末吸入器;在是液体的情形中,可以使用诸如喷雾器的吸入器。在本文中,可以广泛使用通常已知的推进剂: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、氯氟烃 -113、氯氟烃 -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,例如二乙醚;压缩气体,例如氮气和二氧化碳气体;等等。

[0119] 本发明的药物的给药量根据有效成分的种类和活性、疾病的严重程度、给药对象的动物物种、给药对象的药物耐受性、体重、年龄等而变化,基于成人的每日的有效成分量的通常给药量可以是大约 0.0001 至大约 100mg/kg,例如大约 0.0001 至大约 10mg/kg,优选大约 0.005 至大约 1mg/kg。

[0120] 本发明还提供了其中固定了本发明的适配体或复合物的固相载体。固相载体的实例有:基板、树脂、平板 (例如多孔平板)、滤器、药筒、柱、多孔材料。基板可以是用于 DNA 芯片、蛋白质芯片等中的那些;例如,镍 -PTFE (聚四氟乙烯) 基板、玻璃基板、磷灰石基板、硅基板、氧化铝基板等,以及通过使用聚合物等包覆这些基板而制备的基板。树脂的实例有:琼脂糖颗粒、二氧化硅颗粒、丙烯酰胺与 N,N' - 亚甲基双丙烯酰胺的共聚物、聚苯乙烯交联的二乙烯基苯颗粒、使用表氯醇交联的葡聚糖颗粒、纤维素纤维、芳基葡聚糖与 N,N' - 亚甲基双丙烯酰胺的交联聚合物、单分散系的合成聚合物、单分散系的亲水性聚合物、琼脂糖 (Sephacrose)、Toyopearl 等,还包括通过将各种官能团结合至这些树脂而制备的树脂。本发明的固相载体可用于例如 IL-17 的纯化、检测和定量。

[0121] 可以通过本身已知的方法将本发明的适配体或复合物固定到固相载体上。例如,有一种方法是,将亲和性物质 (例如上述的那些) 或预先确定的官能团导入本发明的适配体或复合物,然后利用所述亲和性物质或预先确定的官能团将所述适配体或复合物固定在固相载体上。本发明也提供了这样的方法。预先确定的官能团可以是能够进行偶联反应的官能团;例如,氨基、巯基、羟基和羧基。本发明还提供了其中导入了此类官能团的适配体。

[0122] 本发明还提供了纯化和浓缩 IL-17 的方法。特别地,本发明可以将 IL-17 从其它家族蛋白的蛋白中分离出来。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,使用洗脱剂洗脱吸附的 IL-17。可以通过本身已知的方法实现 IL-17 向本发明的固相载体的吸附。例如,将含有 IL-17 的样品 (例如细菌或细胞培养物或培养物上清液,血液) 导入本发明的固相载体、或包含本发明的固相载体的组合物。可以使用诸如中性溶

液的洗脱剂来洗脱 IL-17。对于中性洗脱液没有限制,其 pH 可以是例如大约 6 至大约 9,优选大约 6.5 至大约 8.5,更优选大约 7 至大约 8。所述中性溶液还可以包含例如钾盐(例如 NaCl、KCl)、镁盐(例如  $MgCl_2$ )、表面活性剂(例如吐温 20、Triton、NP40)和甘油。本发明的纯化和浓缩方法还可以包括,在 IL-17 吸附之后使用洗涤液洗涤固相载体。洗涤液的实例包括那些含有脲、螯合剂(例如 EDTA)、Tris、酸、碱、转运 RNA、DNA、表面活性剂例如吐温 20、盐例如 NaCl 等的洗涤液。本发明的纯化和浓缩方法还可以包括,对固相载体进行加热处理。该步骤能够使固相载体再生和灭菌。

[0123] 本发明的适配体或复合物还可以用作检测探针,特别是用于检测 IL-17 的探针。标记适配体的方法没有特别限制,可以应用本身已知的方法。此类方法包括例如,使用放射性同位素进行标记、使用荧光色素或荧光蛋白进行标记,等等。

[0124] 本发明还提供了检测和定量 IL-17 的方法。特别地,本发明可以将 IL-17 与其它家族蛋白区别开并检测及定量。本发明的检测和定量方法可以包括,使用本发明的适配体(例如,通过使用本发明的复合物和固相载体)来测定 IL-17。可以通过与免疫学方法相同的方式进行检测和定量 IL-17 的方法,不同之处在于,使用本发明的适配体,而非使用抗体。因此,通过使用本发明的适配体(代替抗体)作为探针,通过与酶免疫测定(EIA)(例如,直接竞争性 ELISA、间接竞争性 ELISA、夹心式 ELISA)、放射免疫测定(RIA)、荧光免疫测定(FIA),Western 印迹法(例如在 Western 印迹法中用以代替二抗)、免疫组织化学染色法、细胞分选法等方法相同的方式可以进行检测和定量。这些方法可用于例如,测定生物体或生物样品中的 IL-17 的量,以及用于诊断与 IL-17 相关的疾病。

[0125] 本文提及的所有公开物中的公开内容,包括专利和专利申请说明书,通过引用并入本发明,达到明文记载所有这些公开物的程度。

[0126] 以下通过下面的实施例更详细地描述本发明,但是,这些实施例并不限制本发明的范围。

[0127] 实施例

[0128] 实施例 1:特异性结合 IL-17 的核酸的制备

[0129] 使用 SELEX 方法制备特异性结合 IL-17 的核酸。对 Ellington 等人的方法(Ellington and Szostak, Nature 346,818-822,1990)和 Tuerk 等人的方法(Tuerk and Gold, Science 249,505-510,1990)加以改进,进行 SELEX。人 IL-17(由 Peprtech Company 生产)用作靶物质。通过氨基偶联将 IL-17 固定于琼脂糖树脂(NHS- 激活的琼脂糖,由 GE Healthcare 生产)。根据 GEHealthcare Company 的说明书的指导进行氨基偶联。通过使用 SDS-PAGE 检测固定前的 IL-17 溶液以及固定之后即刻的上清液来确认固定的量。SDS-PAGE 的结果表明,在上清液中检测不到 IL-17 的条带;可以确认:几乎所有的所用的 IL-17 都被偶联。这意味着大约 400pmol 的 IL-17 被固定于大约 10  $\mu$  L 的树脂上。

[0130] 使用 DuraScribe™ T7 转录试剂盒(由 Epicentre 生产)通过转录由化学合成得到的 DNA 来获得用于第一轮 RNA(30N-RNA)。通过该方法获得的 RNA 的嘧啶核苷酸的核糖的 2' 位被氟原子取代。将长度为 89 个核苷酸的下列 DNA(其在 30 个核苷酸的随机序列的两端具有引物序列)用作 DNA 模板。通过化学合成来制备所用的 DNA 模板和引物。以下显示了所用的 DNA 模板和引物。

[0131] DNA 模板:

[0132] 5'-tcacactagcagcatagg-30N-catctgacctctctcctgctccc-3' (SEQ ID NO :55)

[0133] 正向引物 :

[0134] 5'-taatacgactcactatagggagcaggagagaggtcagatg-3' (SEQ ID NO :56)

[0135] 反向引物 :

[0136] 5'-tcacactagcagcatagg-3' (SEQ ID NO :57)

[0137] N 代表 A、G、C 和 T 中的任一种。正向引物包含 T7RNA 聚合酶的启动子序列。理论上,用于第一轮的 RNA 库的差异是  $10^{14}$ 。

[0138] 将 RNA 库加入到固定有 IL-17 的树脂中,并将其在室温静置 30 分钟。30 分钟之后,使用溶液 A 洗涤树脂以除去未与 IL-17 结合的 RNA。在本文中,溶液 A 是 145mM 氯化钠、5.4mM 氯化钾、1.8mM 氯化钙、0.8mM 氯化镁、20mM Tris(pH 7.6) 和 0.05%吐温 20 的混合溶液。在室温加入洗脱液并搅拌 10 分钟,由此回收与 IL-17 结合的 RNA。通过加入 6M 的盐酸胍将溶液 A 调为 pH 7.6 之后,将其用作洗脱液。通过 RT-PCR 扩增回收的 RNA 并使用 DuraScribe™ T7 转录试剂盒进行转录,将其用作下一轮的库。将这些步骤的每一轮重复 8 轮。结束 SELEX 之后,将 PCR 产物克隆进入 pGEM-T Easy 载体(由 Promega 生产),并使用该载体转化大肠杆菌菌株 DH5  $\alpha$  (由 Toyobo 生产)。从单菌落提取质粒之后,使用 DNA 测序仪 (3130xl Genetic Analyzer,由 ABI 生产) 检查 48 个克隆的碱基序列。

[0139] 在进行 6 轮 SELEX 后,检测序列;发现了序列的集中。存在 11 个如 SEQ ID NO :1 所示的序列,其中一个具有 2- 碱基取代。存在 6 个如 SEQ IDNO :2 所示的序列。存在 2 个如 SEQ ID NO :3-6 所示的序列。存在 1 个如 SEQ ID NO :7-28 所示的序列。在 SEQ ID NO :1 和 2 所示的序列中,包含共同序列 gauagcgaaguc auugagcgc (SEQ ID NO :58 ;21 个核苷酸)。在 SEQ IDNO :6-21 所示的序列中,包含共同序列 ggagucag (SEQ ID NO :59 ;8 个核苷酸)。当使用 MFOLD 程序 (M. Zuker, Nucleic Acids Res. 31(13), 3406-3415, 2003) 预测 SEQ ID NO :1 和 2 所示的序列的二级结构时,发现共同序列部分在形态上是相同的 (见图 1 和 2)。

[0140] 接下来,检查 8 轮 SELEX 之后获得的序列。比 6 轮过后观察到更多的集中性;分别存在 25 个和 7 个 SEQ ID NO :1 和 2 所示的序列。存在 1 个由 SEQ ID NO :1 所示的序列的 2- 碱基取代产生的序列,存在 1 个由 SEQ ID NO :2 所示的序列的 1- 碱基取代产生的序列。分别存在 4 个、3 个和 2 个 SEQ ID NO :29-31 所示的序列。存在 1 个 SEQ ID NO :32-36 所示的序列。SEQ ID NO :29 所示的序列包含共同序列 SEQ ID NO :58。当使用 MFOLD 程序预测 SEQ ID NO :29 所示序列的二级结构时,发现共同序列部分在形态上与 SEQ ID NO :1 和 2 所示序列中包含的共同序列是相同的 (见图 3)。SEQ ID NO :30 和 31 所示的序列包含 SEQ ID NO :59 的共同序列。此外,SEQ ID NO :7、9、13、21 和 30 所示的序列包含共同序列 ggaggagucagaauc (SEQ ID NO :60 ;16 个核苷酸)。SEQ ID NO :60 所示的共同序列包含 SEQ ID NO :59。当使用 MFOLD 程序预测这些序列的二级结构时,发现共同序列部分在形态上是相同的 (见图 4-6)。SEQ ID NO :59 所示的共同序列的碱基显示于方框中,SEQ ID NO :60 所示的共同序列的其余序列的碱基标记为 \*(星号)。

[0141] 以下显示了各个核苷酸序列。每个核苷酸的括号表示在核糖的 2' 位的修饰。F 代表氟原子, M 代表 OMe。具体而言, c(F) 代表胞苷,其中核糖的 2' 位被氟原子取代, u(F) 代表尿苷,其中核糖的 2' 位被氟原子取代。a(M) 代表腺苷,其中核糖的 2' 位被 OMe 取代; g(M) 代表鸟苷,其中核糖的 2' 位被 OMe 取代; c(M) 代表胞苷,其中核糖的 2' 位被 OMe 取代

(同样的表示适用于下文)。

[0142] 每个序列的起始端是 5' 末端, 终止端是 3' 末端。

[0143] SEQ ID NO :1 :

[0144] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gggc (F) agc (F) agaggau (F) agc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gaggc (F) gc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0145] SEQ ID NO :2 :

[0146] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggu (F) gc (F) ac (F) au (F) gggau (F) agc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gaggc (F) gc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0147] SEQ ID NO :3 :

[0148] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gu (F) gu (F) aaggu (F) c (F) ggaagu (F) c (F) au (F) gaac (F) ggc (F) c (F) c (F) ggac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0149] SEQ ID NO :4 :

[0150] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gc (F) u (F) au (F) agc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gaggc (F) gagac (F) au (F) aggc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0151] SEQ ID NO :5 :

[0152] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gaggc (F) gc (F) c (F) au (F) aggggu (F) agagaagc (F) c (F) au (F) u (F) gau (F) c (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0153] SEQ ID NO :6 :

[0154] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggu (F) gau (F) gc (F) au (F) aggagu (F) ggagu (F) c (F) agau (F) au (F) agc (F) c (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0155] SEQ ID NO :7

[0156] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gu (F) gu (F) ac (F) gu (F) u (F) agggaggagu (F) c (F) agu (F) aau (F) c (F) gc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0157] SEQ ID NO :8

[0158] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaggagu (F) c (F) agc (F) aau (F) c (F) gu (F) u (F) ggc (F) c (F) u (F) u (F) c (F) u (F) gc (F) gac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0159] SEQ ID NO :9

[0160] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) aau (F) c (F) gu (F) u (F) ggc (F) c (F) c (F) u (F) gc (F) u (F) u (F) c (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0161] SEQ ID NO :10

[0162] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) gau (F) c (F) agu (F) gac (F) c (F) u (F) c (F) u (F) u (F) gu (F) ggc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0163] SEQ ID NO :11

[0164] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggu (F) ggagu (F) c (F) agu (F) gagc (F) gu (F) u (F) gac (F) c (F) ggc (F) aau (F) c (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0165] SEQ ID NO :12

[0166] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) gau (F) c (F) gu (F) u (F) gc (F) c (F) ggac (F) u (F) u (F) gc (F) c (F) c (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0167] SEQ ID NO :13

[0168] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) aau (F) c (F) gu (F) u (F) gaac (F) c (F) ggagc (F) au (F) c (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0169] SEQ ID NO :14

[0170] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gau (F) gac (F) aggagu (F) c (F) agau (F) au (F) au (F) gc (F) ac (F) au (F) u (F) u (F) gac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0171] SEQ ID NO :15

[0172] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggu (F) u (F) aggu (F) ggagu (F) c (F) agggaaaaaac (F) c (F) gu (F) u (F) u (F) gc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0173] SEQ ID NO :16

[0174] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gu (F) agagu (F) ggagu (F) c (F) agau (F) au (F) agc (F) c (F) u (F) ac (F) aagu (F) c (F) c (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0175] SEQ ID NO :17

[0176] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gu (F) aau (F) aggggagu (F) c (F) agau (F) au (F) ac (F) c (F) aac (F) gaagac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0177] SEQ ID NO :18

[0178] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gu (F) aggu (F) gu (F) gagu (F) ggagu (F) c (F) agaaau (F) agc (F) c (F) gc (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0179] SEQ ID NO :19

[0180] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gc (F) gau (F) c (F) gu (F) ac (F) gc (F) ggggggggagu (F) c (F) agau (F) au (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0181] SEQ ID NO :20

[0182] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gu (F) gau (F) agu (F) ac (F) gc (F) ggaaggggagu (F) c (F) agau (F) au (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0183] SEQ ID NO :21

[0184] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gc (F) aaggaggagu (F) c (F) agu (F) aau (F) c (F) gu (F) gac (F) au (F) u (F) ggc (F) c (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0185] SEQ ID NO :22

[0186] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gc (F) u (F) au (F) gc (F) c (F) gc (F) ac (F) aaac (F) ac (F) gu (F) au (F) gagu (F) gc (F) u (F) c (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0187] SEQ ID NO :23

[0188] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggu (F) u (F) ac (F) u (F) u (F) c (F) c (F) c (F) aaaagu (F) c (F) au (F) aaau (F) ggggu (F) u (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0189] SEQ ID NO :24

[0190] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaggagac (F) agu (F) aau (F) c (F) gu (F) u (F) gac (F) c (F) gc (F) u (F) u (F) c (F) gu (F) gc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0191] SEQ ID NO :25

[0192] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gu (F) gau (F) agc (F) gaaggc (F) au (F) u (F) gagc (F) gc (F) ac (F) au (F) u (F) aaac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0193] SEQ ID NO :26

[0194] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gggc (F) agc (F) agaggau (F) gc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gagc (F) gc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0195] SEQ ID NO :27

[0196] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gc (F) c (F) u (F) ggu (F) aggc (F) gu (F) agagaagu (F) c (F) au (F) u (F) gau (F) c (F) agc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0197] SEQ ID NO :28

[0198] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gu (F) u (F) au (F) aaaagc (F) u (F) u (F) aagu (F) gc (F) u (F) gu (F) c (F) aac (F) u (F) u (F) c (F) u (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0199] SEQ ID NO :29 :

[0200] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gc (F) gau (F) agc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gagc (F) gc (F) gu (F) gu (F) c (F) c (F) aac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0201] SEQ ID NO :30 :

[0202] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggu (F) c (F) u (F) agc (F) c (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) aau (F) c (F) ggu (F) agac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0203] SEQ ID NO :31 :

[0204] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaagu (F) ggagu (F) c (F) agau (F) au (F) agc (F) aau (F) au (F) u (F) au (F) gac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0205] SEQ ID NO :32 :

[0206] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gggc (F) agc (F) ggaggau (F) ggc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gggc (F) gc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) ggu (F) ggag

[0207] SEQ ID NO :33 :

[0208] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaggagc (F) c (F) agu (F) gau (F) c (F) gu (F) u (F) gac (F) c (F) u (F) c (F) aau (F) gc (F) ac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0209] SEQ ID NO :34 :

[0210] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaggagac (F) agu (F) gau (F) c (F) gu (F) u (F) gac (F) c (F) c (F) ac (F) c (F) ggu (F) c (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0211] SEQ ID NO :35 :

[0212] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) ggaggagc (F) agu (F) aau (F) c (F) gu (F) u (F) gac (F) u (F) ggu (F) aaac (F) c (F) c (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0213] SEQ ID NO :36 :

[0214] gggagc (F) aggagagaggu (F) c (F) agau (F) gu (F) au (F) agc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gagc (F) gac (F) aaagc (F) c (F) ggc (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) gc (F) u (F) agu (F) gu (F) ga

[0215] 通过表面等离子共振法来评价 SEQ ID NO :1-6 和 29-36 所示的核酸对于 IL-17 的结合活性。使用 BIAcore 2000 进行测定。使用 SA 芯片作为传感器芯片,其中固定了链霉亲和素。其中结合的是大约 600RU 的在 5' 末端结合了生物素的 16 个核苷酸的多聚 dT。配体核酸的 3' 末端添加 16 个核苷酸的多聚 A,并且通过 dT 和 A 的结合而固定于 SA 芯片。固定的量是大约 800RU。注射以 0.5  $\mu$ M 制备的用于分析的 20  $\mu$ L 人 IL-17,并加入 0.1mg/mL tRNA 以减少非特异性吸附。溶液 A 用作运行缓冲液。测定结果发现,SEQ ID NO :1-6 和 29-36 所示的所有核酸都结合至 IL-17,其结合显著高于阴性对照 30N。在本文中,30N 是指用于第一轮 SELEX 的核酸库,其包含 30 个核苷酸的随机序列。作为实例,图 7 中显示了传感图,其显示了 SEQ ID NO :1 所示的适配体 (Apt1) 与人 IL-17 的结合状态。从以上可以显示出,SEQ ID NO :1-6 和 29-36 所示的核酸是与 IL-17 结合的适配体。

[0216] 通过表面等离子共振法测定了 SEQ ID NO :1-6 和 29-36 所示的 IL-17 适配体是否与同一家族的 IL-17F 结合。IL-17 与 IL-17F 之间的氨基酸序列同源性是 50%。使用 R&D 公司生产的 IL-17F (1335-INS/CF) 进行实验,如上所述,加入 tRNA 以减少非特异性

吸附。结果发现,SEQ ID NO:1-6 和 29-36 所示的适配体没有一个与 IL-17F 结合。作为实例,图 8 中显示了传感图,其显示了 SEQ ID NO:1 所示的适配体不与人 IL-17F 结合。从以上发现,SEQ ID NO:1-6 和 29-36 所示的适配体特异性地结合 IL-17。

**[0217] 实施例 2:SEQ ID NO:1、2 和 30 所示适配体的缩短**

[0218] 进行 SEQ ID NO:1、2 和 30 所示的适配体的缩短,以通过化学合成来制备 SEQ ID NO:37-44 所示的核酸。按照与实施例 1 相同的方式通过表面等离子共振法测定这些核酸是否具有对 IL-17 的结合活性。结果发现:所有这些核酸都具有对 IL-17 的结合活性。SEQ ID NO:40 所示的适配体包含 SEQ ID NO:1、2 和 29 所示适配体中所含的共同序列 (SEQ ID NO:58),其长度是 23 个核苷酸。SEQ ID NO:44 所示的适配体包含 SEQ ID NO:30 所示适配体中所含的共同序列,其长度是 33 个核苷酸。SEQ ID NO:44 所示的适配体包含 SEQ ID NO:6-21、30 和 31 中所含的 8 个核苷酸的共同序列 (SEQ ID NO:59),以及 SEQ ID NO:7、9、13、21 和 30 中所含的 16 个核苷酸的共同序列 (SEQ ID NO:60)。使用 MFOLD 程序预测的 SEQ ID NO:40 和 44 所示适配体的二级结构分别显示于图 9 和 10。在图 9 中,通过黑色圆圈标示出了每个共同序列。在图 10 中,在 SEQ ID NO:6-21、30 和 31 中共有的序列的碱基以方框标出,仅仅在 SEQ ID NO:7、9、13、21 和 30 中共有的序列的碱基以 \* 号 (星号) 标出。

[0219] 以下显示了各个核苷酸序列。

[0220] SEQ ID NO:37:长度为 54 个核苷酸的适配体,其为 SEQ ID NO:1 所示适配体的变体

[0221] c(F) agau(F) gggc(F) agc(F) agaggau(F) agc(F) gaagu(F) c(F) au(F) u(F) gagc(F) gc(F) c(F) u(F) au(F) gc(F) gu(F) gc(F) u(F) agu(F) gu(F) g

[0222] SEQ ID NO:38:长度为 40 个核苷酸的适配体,其为 SEQ ID NO:37 所示适配体的变体

[0223] gc(F) agc(F) agaggau(F) agc(F) gaagu(F) c(F) au(F) u(F) gage(F) gc(F) c(F) u(F) au(F) gc(F) gu(F) gc(F)

[0224] SEQ ID NO:39:长度为 33 个核苷酸的适配体,其为 SEQ ID NO:38 所示适配体的变体

[0225] gc(F) agaggau(F) agc(F) gaagu(F) c(F) au(F) u(F) gage(F) gc(F) c(F) u(F) au(F) gc(F)

[0226] SEQ ID NO:40:长度为 23 个核苷酸的适配体,其为 SEQ ID NO:39 所示适配体的变体

[0227] ggau(F) agc(F) gaagu(F) c(F) au(F) u(F) gagc(F) gc(F) c(F)

[0228] SEQ ID NO:41:长度为 27 个核苷酸的适配体,其为 SEQ ID NO:39 所示适配体的变体

[0229] ggggau(F) agc(F) gaagu(F) c(F) au(F) u(F) gagc(F) gc(F) c(F) c(F) c(F)

[0230] SEQ ID NO:42:长度为 41 个核苷酸的适配体,其为 SEQ ID NO:2 所示适配体的变体

[0231] gu(F) gc(F) ac(F) au(F) gggau(F) agc(F) gaagu(F) c(F) au(F) u(F) gage(F) gc(F) c(F) u(F) au(F) gc(F) gu(F) gc(F)

[0232] SEQ ID NO:43:长度为 52 个核苷酸的适配体,其为 SEQ ID NO:30 所示适配体的

变体

[0233] agaggu (F) c (F) agau (F) ggu (F) c (F) u (F) agc (F) c (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) aaau (F) c (F) ggu (F) agac (F) c (F) u (F) au (F) gc (F) gu (F) g

[0234] SEQ ID NO :44 :长度为 33 个核苷酸的适配体,其为 SEQ ID NO :30 所示适配体的变体

[0235] ggu (F) c (F) u (F) agc (F) c (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) aaau (F) c (F) ggu (F) agac (F) c (F)

[0236] 实施例 3 :SEQ ID NO :40 所示适配体的突变体的制备

[0237] 通过向 SEQ ID NO :40 所示适配体中引入 1 处突变来制备突变体,通过表面等离子共振法评估其对 IL-17 的结合活性。以下显示了突变体的序列和修饰。

[0238] SEQ ID NO :45 :通过向 SEQ ID NO :40 所示适配体中引入突变 (u (F) 16 : c (F) 16) 而制备的适配体

[0239] ggau (F) agc (F) gaagu (F) c (F) au (F) c (F) gagc (F) gc (F) c (F)

[0240] SEQ ID NO :46 :通过向 SEQ ID NO :40 所示适配体中引入突变 (g21 : a21) 而制备的适配体

[0241] ggau (F) agc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gagc (F) ac (F) c (F)

[0242] SEQ ID NO :47 :通过向 SEQ ID NO :40 所示适配体中引入突变 (c (F) 7 : a (M) 7) 而制备的适配体

[0243] ggau (F) aga (M) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gagc (F) gc (F) c (F)

[0244] SEQ ID NO :48 :通过向 SEQ ID NO :40 所示适配体中引入突变 (u (F) 12 : a (M) 12) 而制备的适配体

[0245] ggau (F) agc (F) gaaga (M) c (F) au (F) u (F) gagc (F) gc (F) c (F)

[0246] SEQ ID NO :40-2 :通过向 SEQ ID NO :40 所示适配体的 a3 添加 OMe 修饰而制备的适配体

[0247] gga (M) u (F) agc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gagc (F) gc (F) c (F)

[0248] SEQ ID NO :40-3 :通过以 c (M) 7 替换 SEQ ID NO :40 所示适配体的 c (F) 7 而制备的适配体

[0249] ggau (F) agc (M) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gagc (F) gc (F) c (F)

[0250] SEQ ID NO :40-4 :通过向 SEQ ID NO :40 所示适配体的 g19 添加 OMe 修饰而制备的适配体

[0251] ggau (F) agc (F) gaagu (F) c (F) au (F) u (F) gag (M) c (F) gc (F) c (F)

[0252] 所有这些适配体都与 IL-17 结合。这表明,即使引入数个突变或者改变修饰方法,SEQ ID NO :40 所示的适配体仍然保持对于 IL-17 的结合活性。

[0253] 实施例 4 :抑制 IL-17 与 IL-17 受体结合的适配体

[0254] 通过表面等离子共振法测定 SEQ ID NO :1-6 和 29-44 所示的适配体是否抑制 IL-17 与 IL-17 受体 (IL-17R) 的结合。

[0255] 按照 BIAcore 公司的操作说明,将蛋白 A (21181, PIERCE) 固定于 CM5 传感器芯片上。在其上固定大约 900RU 的融合了 IgG 的 Fc 部分的人 IL-17R-Fc (177-IR, R&D systems)。作为分析物,将 IL-17 (0.11  $\mu$ M) 与每种适配体 (0.33  $\mu$ M) 的混合物静置 15 分钟,然后流入

该混合物。如果适配体抑制 IL-17 与 IL-17R 的结合,则预期传感图上的信号不会上升;如果适配体不抑制其结合,则会形成三体复合物,预期信号会上升。在开始抑制实验之前,确认 IL-17 确实与 IL-17R 结合。对于阴性对照,使用 IL-17 与 30N 的混合物。30N 是指用于第一轮 SELEX 的核酸库,其包含 30 个核苷酸的随机序列。实验结果发现,SEQ ID NO :1-6 和 29-44 所示的所有适配体都抑制 IL-17 与 IL-17R 的结合。同时,30N 未显示出抑制活性。作为一个实例,图 11 显示了传感图,其显示了 SEQ ID NO :1 所示的适配体抑制 IL-17 与 IL-17R 的结合。

[0256] 从上文可以看出,SEQ ID NO :1-6 和 29-44 所示的适配体可以用作 IL-17 的抑制剂。

[0257] 实施例 5 :SEQ ID NO :44 所示适配体的突变体的制备

[0258] 通过向 SEQ ID NO :44 所示适配体中引入突变来制备突变体,按照与实施例 6 相同的方式,使用表面等离子共振法检测其是否抑制 IL-17 与 IL-17R 的结合。以下显示了突变体的序列和修饰。

[0259] SEQ ID NO :49 :通过向 SEQ ID NO :44 所示适配体中引入 (g7) 缺失突变而制备的适配体

[0260] ggu (F) c (F) u (F) ac (F) c (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) aa u (F) c (F) ggu (F) agac (F) c (F)

[0261] SEQ ID NO :50 :通过向 SEQ ID NO :44 所示适配体中引入突变 (g14 : a14) 而制备的适配体

[0262] ggu (F) c (F) u (F) agc (F) c (F) ggagaagu (F) c (F) agu (F) aa u (F) c (F) ggu (F) agac (F) c (F)

[0263] SEQ ID NO :51 :通过向 SEQ ID NO :44 所示适配体中引入突变 (g20 : a20) 而制备的适配体

[0264] ggu (F) c (F) u (F) agc (F) c (F) ggaggagu (F) c (F) aa u (F) aa u (F) c (F) ggu (F) agac (F) c (F)

[0265] SEQ ID NO :52 :通过向 SEQ ID NO :44 所示适配体中引入突变 (g1g2u (F) 3c (F) 4 : G1G2G3G4, g30a31c (F) 32c (F) 33 :C30C31C32C33) 而制备的适配体。在此,每个大写字母表示脱氧核苷酸。

[0266] GGGGu (F) agc (F) c (F) ggaggagu (F) c (F) agu (F) aa u (F) c (F) ggu (F) aCCCC

[0267] SEQ ID NO :44-1 : 通过向 SEQ ID NO :44 所示适配体中引入 (a19g20 : a (M) 19g (M) 20) 突变而制备的适配体

[0268] ggu (F) c (F) u (F) agc (F) c (F) ggaggagu (F) c (F) a (M) g (M) u (F) aa u (F) c (F) ggu (F) agac (F) c (F)

[0269] SEQ ID NO :44-2 : 通过向 SEQ ID NO :44 所示适配体中引入 (a15g16 : a (M) 15g (M) 16) 突变而制备的适配体

[0270] ggu (F) c (F) u (F) agc (F) c (F) ggagga (M) g (M) u (F) c (F) agu (F) aa u (F) c (F) ggu (F) agac (F) c (F)

[0271] SEQ ID NO :53 :通过缺失 SEQ ID NO :44 所示适配体的 (g27) 及其后的序列而制备的适配体

[0272] ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)gg

[0273] SEQ ID NO:54: 通过从 SEQ ID NO:44 所示适配体中缺失 (g1g2u(F)3) 和 (a31c(F)32c(F)33) 而制备的适配体

[0274] c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)ag

[0275] SEQ ID NO:44-3: 通过向 SEQ ID NO:44 所示适配体中引入 (a6g7 : a(M)6g(M)7) 突变而制备的适配体

[0276] ggu(F)c(F)u(F)a(M)g(M)c(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)

[0277] SEQ ID NO:44-4: 通过向 SEQ ID NO:44 所示适配体中引入 (g10g11 : g(M)10g(M)11) 突变而制备的适配体

[0278] ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)g(M)g(M)aggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)

[0279] SEQ ID NO:44-5: 通过向 SEQ ID NO:44 所示适配体中引入 (a12g13 : a(M)12g(M)13) 突变而制备的适配体

[0280] ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)gga(M)g(M)gagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)

[0281] SEQ ID NO:44-6: 通过向 SEQ ID NO:44 所示适配体中引入 (g14a15 : g(M)14a(M)15) 突变而制备的适配体

[0282] ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggagg(M)a(M)gu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)

[0283] SEQ ID NO:44-7: 通过向 SEQ ID NO:44 所示适配体中引入 (a22a23 : a(M)22a(M)23) 突变而制备的适配体

[0284] ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggagga(M)gu(F)c(F)agu(F)a(M)a(M)u(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)

[0285] SEQ ID NO:44-8: 通过向 SEQ ID NO:44 所示适配体的 5' 末端添加 PEG40(SUNBRIGHT GL2-400GS2, 由 NOF Corporation Company 生产), 并向其 3' 末端添加 idT(反向 dT) 而制备的适配体

[0286] PEG40-ggu(F)c(F)u(F)agc(F)c(F)ggaggagu(F)c(F)agu(F)aa(F)c(F)ggu(F)agac(F)c(F)-idT

[0287] 所有这些适配体都抑制 IL-17 与 IL-17 受体 (IL-17R) 的结合。这表明, 即使引入数个突变或者改变修饰方法, SEQ ID NO:44 所示的适配体仍然保持对于 IL-17 与 IL-17 受体 (IL-17R) 结合的抑制活性。

[0288] 实施例 6: 适配体抑制培养细胞中的 IL-17 信号传导

[0289] 使用正常人皮肤成纤维细胞 (NHDF, Sanko Junyaku) 测定 SEQ ID NO:44 所示适配体是否能够抑制由 IL-17 引起的细胞刺激。当使用 IL-17 刺激时, NHDF 细胞在细胞外产生白细胞介素 6 (IL-6)。当使用人 IL-17 (由 Peprtech Company 生产) (40ng/ml) 刺激 NHDF 细胞时, 向培养基中加入适配体 (SEQ ID NO:44 所示的适配体), 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法 (Endogen Human IL-6ELISA Kit: Thermo scientific) 测定 24 小时之后产生的 IL-6。图 12 显示了对 IL-6 的产生的抑制结果。测量结果确认: 当加入适配体时, 以浓

度依赖性方式抑制了 IL-6 的产生。获得了比抗 -IL-17 中和抗体 (MAB421, 由 R&D Systems 生产) 更高的抑制效果。另一方面, 对照 RNA 未显示出抑制活性。在此, 对照 RNA 是指用于第一轮 SELEX 的核酸库, 其包含 30 个核苷酸的随机序列。这些发现显示: 本发明的适配体在活细胞中同样具有针对 IL-17 信号传导的高抑制活性。

#### [0290] 实施例 7: 适配体诱导的 EAE (实验性自身免疫性脑脊髓炎) 的小鼠模型中的发病抑制实验

[0291] 使用小鼠 EAE 模型 (已知其为人类多发性硬化的小鼠模型) 分析适配体对于发病的影响。使用含有 500  $\mu$ g 结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的氟氏不完全佐剂将 300  $\mu$ g 的髓鞘少突胶质糖蛋白肽 35-55 (MOG<sub>35-55</sub>) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) 乳化, 将此乳液皮下给予野生型 C57BL/6 小鼠 (雌性, 8 周龄) 的腋窝和腰部, 以将动物致敏。另外, 在致敏后的即刻和 48 小时之后, 将 200ng 百日咳毒素 (*pertussis toxin*) 溶解于 200  $\mu$ L PBS 并尾静脉给予以诱导 EAE。然后, 使用以下所示的标准每日评估临床症状。

[0292] 对于野生型小鼠组 ( $n = 10$ ) 和接受 SEQ ID NO:44-8 所示适配体的小鼠组 (对于 1mg/kg、3mg/kg 和 10mg/kg, 各  $n = 10$ ), 每日记录临床评分, 并且评估临床症状。临床分值按照如下评定: 0: 无症状; 0.5: 尾巴半低垂; 1: 尾巴完全低垂; 2: 步态紊乱; 3: 单肢瘫痪; 4: 双后肢瘫痪; 5: 前肢偏瘫; 6: 前肢瘫痪/死亡; 记录所有动物的评分, 直至给予 MOG<sub>35-55</sub> 后第 25 天的时候停止。

[0293] 将 SEQ ID NO:44-8 所示的适配体溶解于生理盐水, 从给予 MOG<sub>35-55</sub> 之日起, 以 2 天的间隔总共给予该适配体 13 次。对于对照组, 按照相同的方式给予同量的生理盐水。

[0294] 图 13 显示了随时间进程对临床症状的评估情况。与对照组相比, 在接受 1mg/kg 的 SEQ ID NO:44-8 所示适配体的小组中没有观察到显著差异。另一方面, 在接受 3mg/kg 和 10mg/kg 的 SEQ ID NO:44-7 所示适配体的小组中, 见到了临床症状的减轻, 具有统计学上显著的差异。使用 Mann-Whitney U- 检验和 Dunnett 的方法分析统计学上显著的差异。在图中显示了统计学上显著的差异 (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ )。以上结果强烈说明, 针对 IL-17 的适配体可用作自身免疫疾病例如多发性硬化的治疗性药物。

#### [0295] 工业适用性

[0296] 本发明的适配体或复合物可用作炎症疾病和诸如癌症、过敏症、感染性疾病等疾病的药物或试剂, 例如诊断试剂。本发明的适配体或复合物还可用于纯化和浓缩 IL-17、标记 IL-17, 以及检测和定量 IL-17。

[0297] 本申请基于在日本提交的专利申请号 2008-183233, 其内容通过引用全文并入本文。

[0001]

## 序列表

- <110> 东京大学
- <120> 针对 IL-17 的适配体及其用途
- <130> 091430
- <150> JP2008-183233
- <151> 2008-07-14
- <160> 60
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 72
- <212> RNA
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 1
- gggagcagga gagaggucag augggcagca gaggauagcg aagucauuga gcgccuaugc 60
- gugcuagugu ga 72
- <210> 2
- <211> 72
- <212> RNA
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 2
- gggagcagga gagaggucag auggucaca ugggauagcg aagucauuga gcgccuaugc 60
- gugcuagugu ga 72
- <210> 3

[0002]

<211>	72	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	具有针对白细胞介素-17的结合活性的核酸	
<400>	3	
	gggagcagga gagaggucag auguguaagg ucggaaguca ugaacggccc ggaccuaugc	60
	 gugcuagugu ga	72
<210>	4	
<211>	72	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	具有针对白细胞介素-17的结合活性的核酸	
<400>	4	
	gggagcagga gagaggucag augcuauagc gaagucauug agcgagacau aggccuaugc	60
	 gugcuagugu ga	72
<210>	5	
<211>	72	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	具有针对白细胞介素-17的结合活性的核酸	
<400>	5	
	gggagcagga gagaggucag augagcgcca uagguagag aagccauuga ucaccuaugc	60
	 gugcuagugu ga	72
<210>	6	
<211>	72	
<212>	RNA	

[0003]

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 6

gggagcagga gagaggucag auggugaugc auaggagugg agucagauau agcccaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 7

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 7

gggagcagga gagaggucag auguguacgu uaggaggag gagucaguaa ucgccaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 8

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 8

gggagcagga gagaggucag auggaggagu cagcaaucgu uggccuucug cgaccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 9

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

[0004]

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 9

gggagcagga gagaggucag auggaggagu caguaaucgu uggcccugcu ucaccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 10

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 10

gggagcagga gagaggucag auggaggagu cagugaucag ugaccucuug uggccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 11

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 11

gggagcagga gagaggucag augguggagu cagugagcgu ugaccggcaa ucaccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 12

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

[0005]

<400> 12	
gggagcagga gagaggucag auggaggagu cagugaucgu ugccggacu gcccuaugc	60
 gugcuagugu ga	 72
<210> 13	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 13	
gggagcagga gagaggucag auggaggagu caguaaucgu ugaaccggag cauccuaugc	60
 gugcuagugu ga	 72
<210> 14	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 14	
gggagcagga gagaggucag augaugacag gagucagaua uaucacauu ugaccuaugc	60
 gugcuagugu ga	 72
<210> 15	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 15	

[0006]

gggagcagga gagaggucag augguuaggu ggagucaggg aaaaaaccgu ugccuauge	60
<b>gugcuagugu ga</b>	<b>72</b>
<210> 16	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 16	
gggagcagga gagaggucag auguagagug gagucagaua uagccuaca gucccuauge	60
<b>gugcuagugu ga</b>	<b>72</b>
<210> 17	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 17	
gggagcagga gagaggucag auguaauagg ggagucagau auaccaacga agaccuauge	60
<b>gugcuagugu ga</b>	<b>72</b>
<210> 18	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 18	
gggagcagga gagaggucag auguaauagg ggagucagau auaccaacga agaccuauge	60

[0007]

<b>gugcuagugu ga</b>	<b>72</b>
<210> 19	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 19	
gggagcagga gagaggucag augcgaucgu acgcgggggg ggagucagau auaccuaugc	60
<b>gugcuagugu ga</b>	<b>72</b>
<210> 20	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 20	
gggagcagga gagaggucag augugauagu acgcggaagg ggagucagau auaccuaugc	60
<b>gugcuagugu ga</b>	<b>72</b>
<210> 21	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 21	
gggagcagga gagaggucag augcaaggag gagucaguaa ucgugacauu ggcccuaugc	60
<b>gugcuagugu ga</b>	<b>72</b>

[0008]

<210>	22	
<211>	72	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400>	22	
	gggagcagga gagaggucag augcuauGCC gcacaaacac guaugagugc ucaccuaugc	60
	<b>gugcuagugu ga</b>	72
<210>	23	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400>	23	
	gggagcagga gagaggucag augguuacuu cccaaaaguc auaaaugggg uuaccuaugc	60
	<b>gugcuagugu ga</b>	72
<210>	24	
<211>	72	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400>	24	
	gggagcagga gagaggucag auggaggaga caguaaucgu ugaccgcuuc gugccuaugc	60
	<b>gugcuagugu ga</b>	72
<210>	25	
[0009]		

<211>	72	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400>	25	
	gggagcagga gagaggucag augugauagc gaaggcauug agcgcacauu aaaccuaugc	60
	 gugcuagugu ga	72
<210>	26	
<211>	71	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400>	26	
	gggagcagga gagaggucag augggcagca gaggaugcga agucauugag cgccuaugcg	60
	 ugcuagugug a	71
<210>	27	
<211>	72	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400>	27	
	gggagcagga gagaggucag augccuggua ggcguaagaga agucauugau cagccuaugc	60
	 gugcuagugu ga	72
<210>	28	
<211>	72	
<212>	RNA	
[0010]		

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 28

gggagcagga gagaggucag auguuauaaa agcuuaagug cugucaacuu cuaccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 29

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 29

gggagcagga gagaggucag augcgauagc gaagucauug agcgcguguc caaccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 30

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 30

gggagcagga gagaggucag auggucuagc cggaggaguc aguaaucggu agaccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 31

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

[0011]

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 31

gggagcagga gagaggucag auggaagugg agucagauau agcaauauua ugaccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 32

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 32

gggagcagga gagaggucag augggcagcg gaggauggcg aagucuuugg gcgccuaugc 60

gugcuggugg ag 72

<210> 33

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 33

gggagcagga gagaggucag auggaggagc cagugaucgu ugaccucaau gcaccuaugc 60

gugcuagugu ga 72

<210> 34

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

[0012]

<400> 34	
gggagcagga gagaggucag auggaggaga cagugaucgu ugacccaccg gguccuaugc	60
 gugcuagugu ga	 72
<210> 35	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 35	
gggagcagga gagaggucag auggaggagg caguaaucgu ugacugguaa accccuaugc	60
 gugcuagugu ga	 72
<210> 36	
<211> 72	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 36	
gggagcagga gagaggucag auguauagcg aagucauuga gcgacaaagc cggccuaugc	60
 gugcuagugu ga	 72
<210> 37	
<211> 54	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 37	

[0013]

cagaugggca gcagaggaua gcgaagucan ugagcgccua ugcgugcuag ugug 54

<210> 38  
 <211> 40  
 <212> RNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 38  
 gcagcagagg auagcgaagu caungagcgc cuaugcgugc 40

<210> 39  
 <211> 33  
 <212> RNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 39  
 gcagaggaua gcgaagucan ugagcgccua ugc 33

<210> 40  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸

<400> 40  
 ggauagcгаа gucaugagc gcc 23

<210> 41  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> 人工的

[0014]

- <220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 41  
 ggggauagcg aagucuuuga gcgcccc 27
- <210> 42  
 <211> 41  
 <212> RNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 42  
 gugcacaugg gauagcgaag ucauugagcg ccuaugcgug c 41
- <210> 43  
 <211> 52  
 <212> RNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 43  
 agaggucaga uggucuagcc ggaggaguca guaaucggua gaccuaugcg ug 52
- <210> 44  
 <211> 33  
 <212> RNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 44  
 ggucuagccg gaggagucag uaaucgguag acc 33
- <210> 45

[0015]

- <211> 23  
<212> RNA  
<213> 人工的
- <220>  
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 45  
ggauagcgaa gucaucgagc gcc 23
- <210> 46  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> 人工的
- <220>  
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 46  
ggauagcgaa gucauugagc acc 23
- <210> 47  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> 人工的
- <220>  
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 47  
ggauagagaa gucauugagc gcc 23
- <210> 48  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> 人工的
- <220>  
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 48

[0016]

ggauagcgaa gacauugagc gcc	23
<210> 49	
<211> 32	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 49	
ggucuaccgg aggagucagu aaucgguaga cc	32
<210> 50	
<211> 33	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 50	
ggucuagccg gagaagucag uaaucgguag acc	33
<210> 51	
<211> 33	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸	
<400> 51	
ggucuagccg gaggagucaa uaaucgguag acc	33
<210> 52	
<211> 33	
<212> RNA	
<213> 人工的	

[0017]

- <220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 52  
 gggguagccg gaggagucag uaaucgguac ccc 33
- <210> 53  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 53  
 ggucuagccg gaggagucag uaaucgg 27
- <210> 54  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223> 具有针对白细胞介素-17 的结合活性的核酸
- <400> 54  
 cuagccggag gagucaguaa ucgguag 27
- <210> 55  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223> 模板 DNA
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(49)  
 <223> n 是 a、c、g 或 t

[0018]

<400> 55  
 tcacactagc acgcataggn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnc atctgacctc 60  
 tctcctgctc cc 72

<210> 56  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 引物

<400> 56  
 taatacgact cactataggg agcaggagag aggtcagatg 40

<210> 57  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 引物

<400> 57  
 tcacactagc acgcatagg 19

<210> 58  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 共同序列

<400> 58  
 gauagcgaag ucauugagcg c 21

<210> 59

[0019]

<211> 8

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 共同序列

<400> 59

ggagucag

8

<210> 60

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 共同序列

<400> 60

ggaggaguca gaauc

16

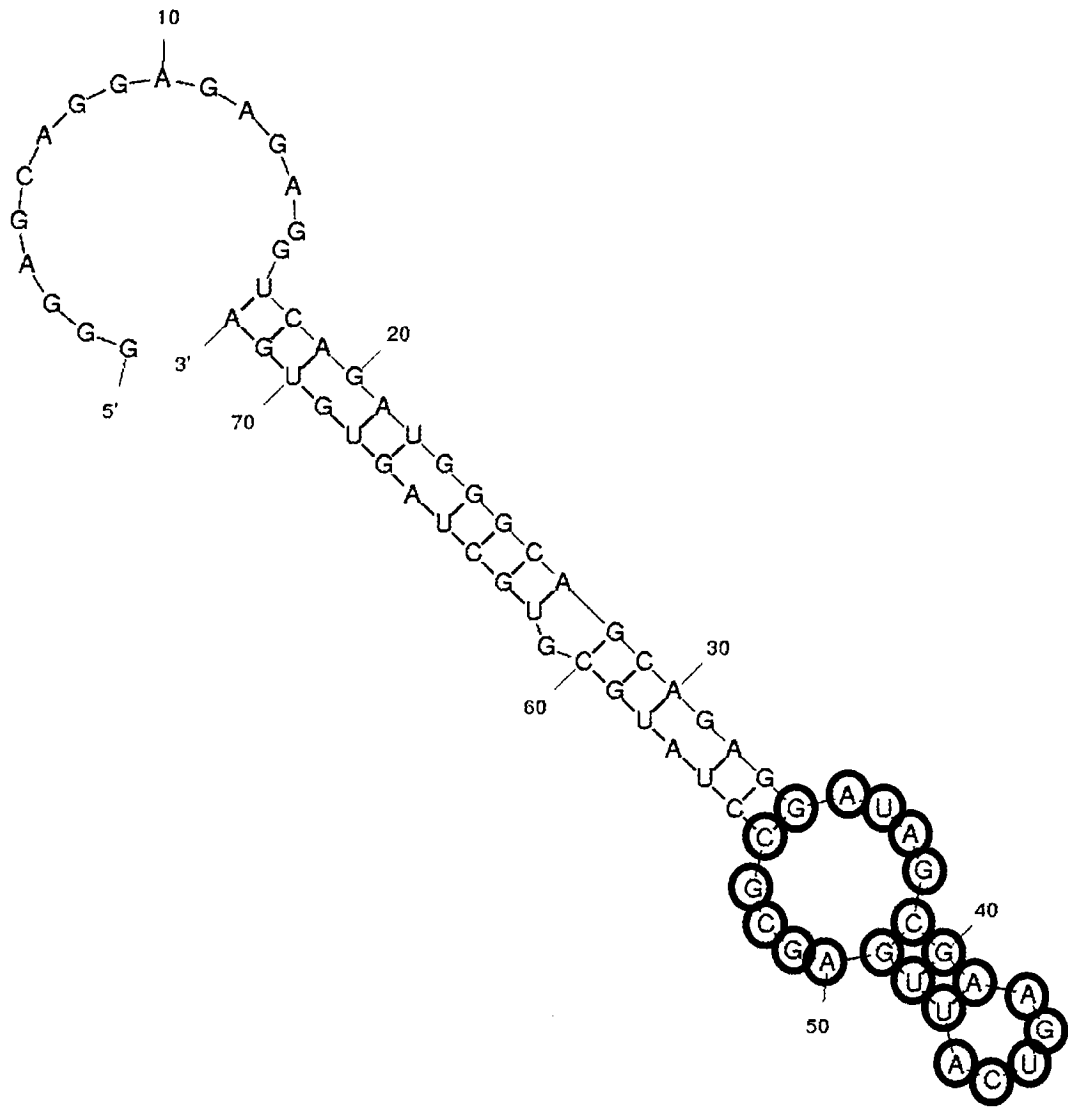


图 1

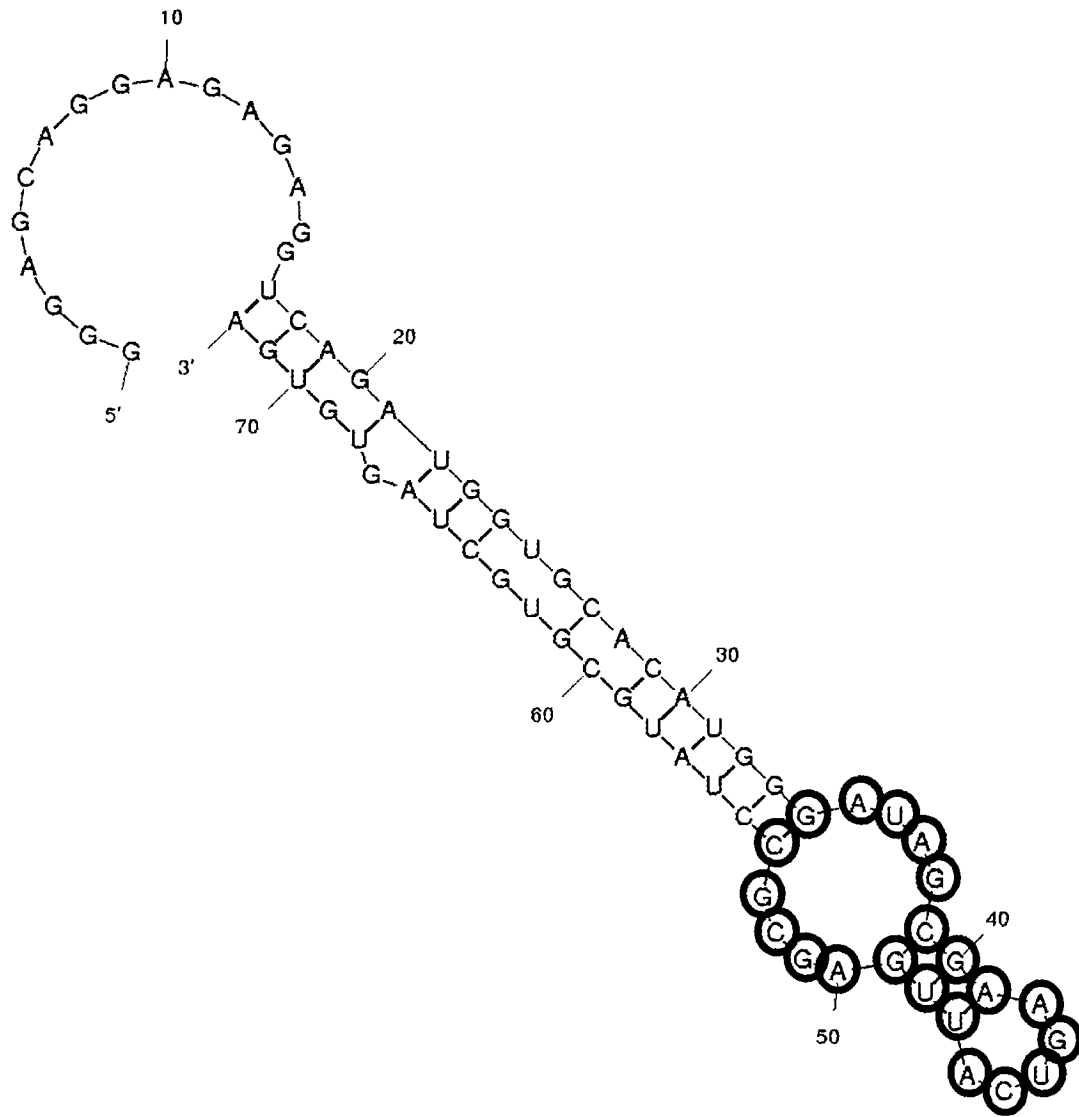


图 2

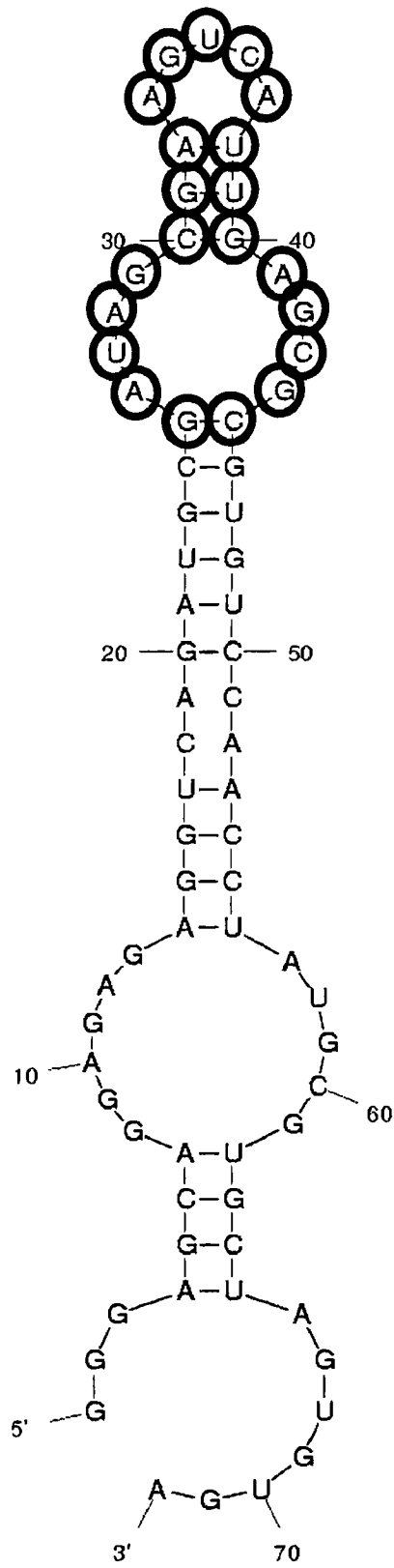


图 3

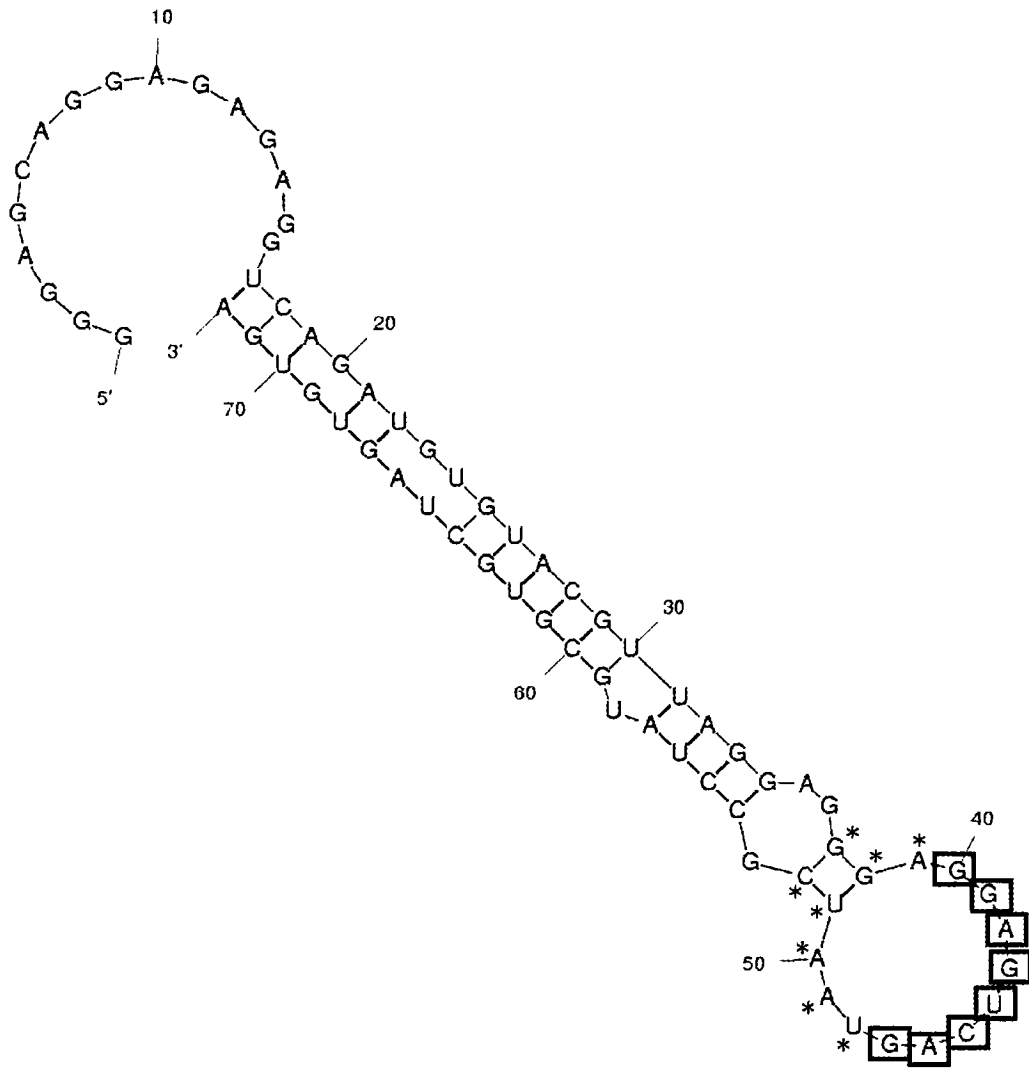


图 4



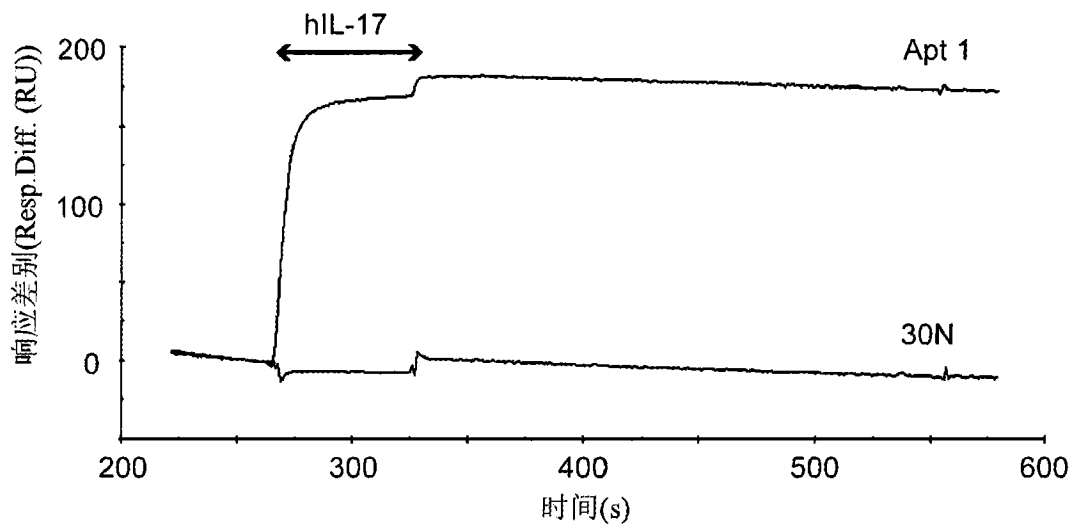


图 7

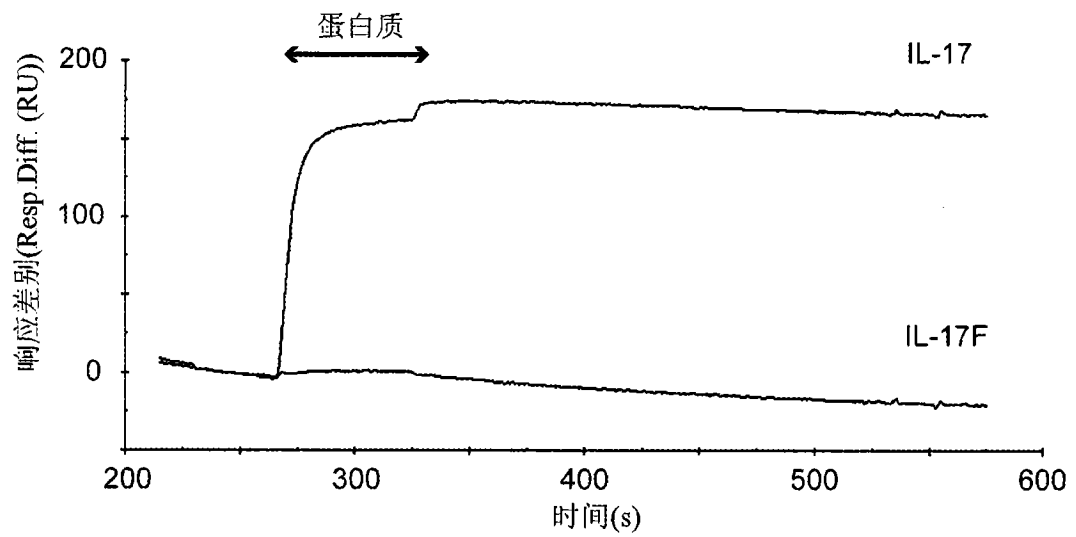


图 8

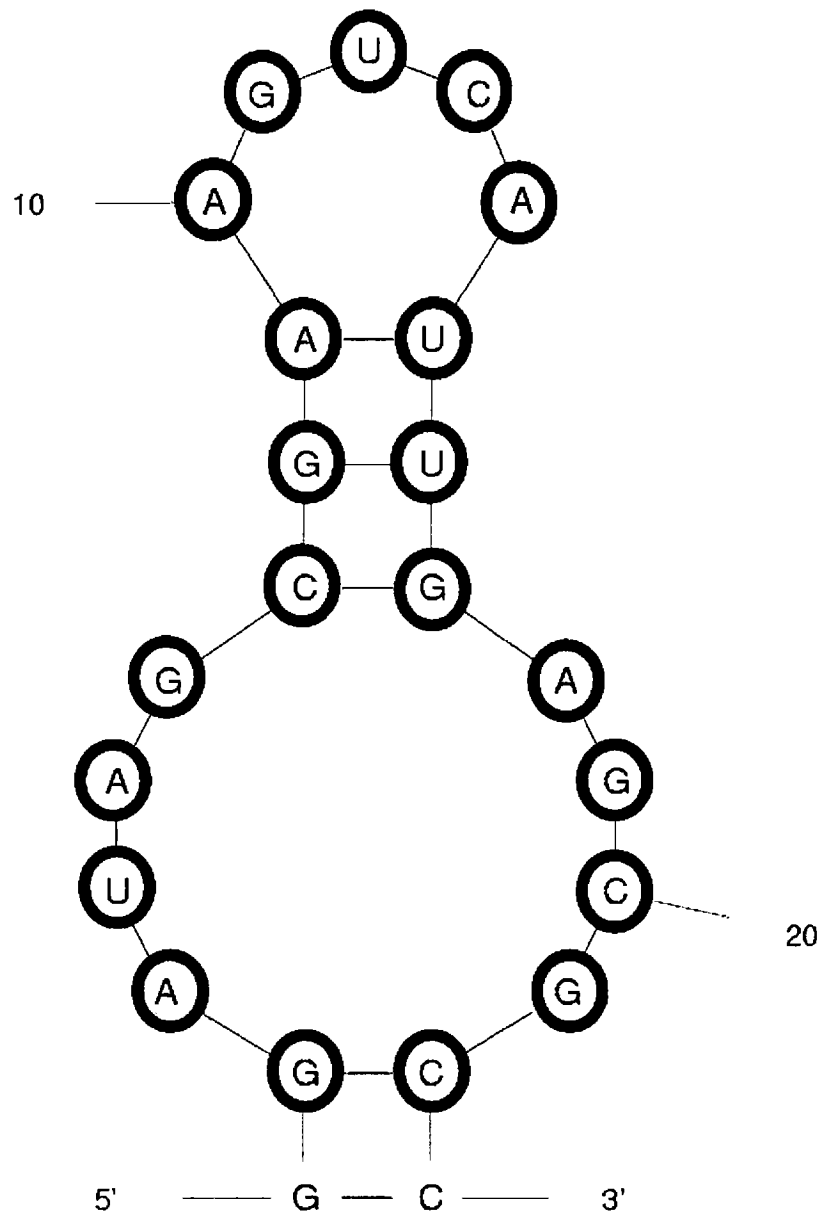


图 9

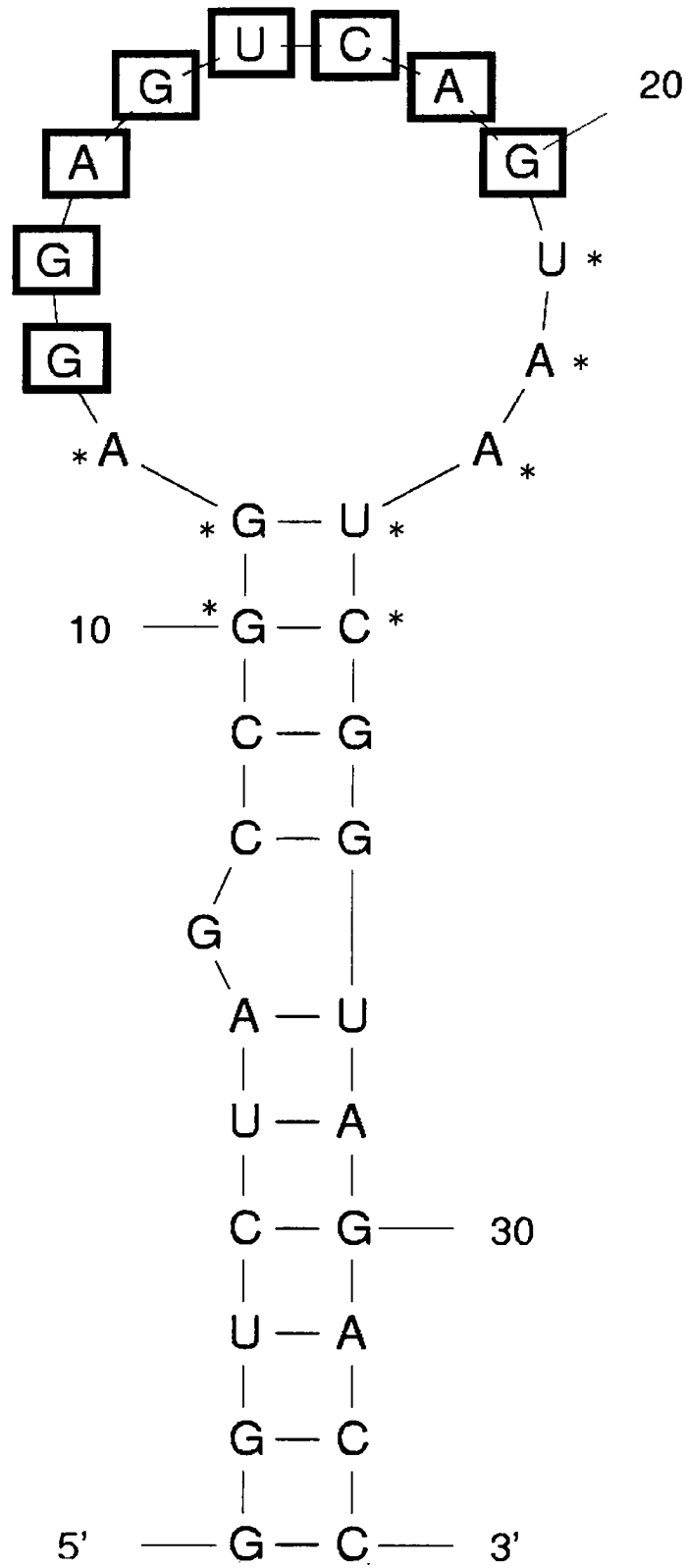


图 10

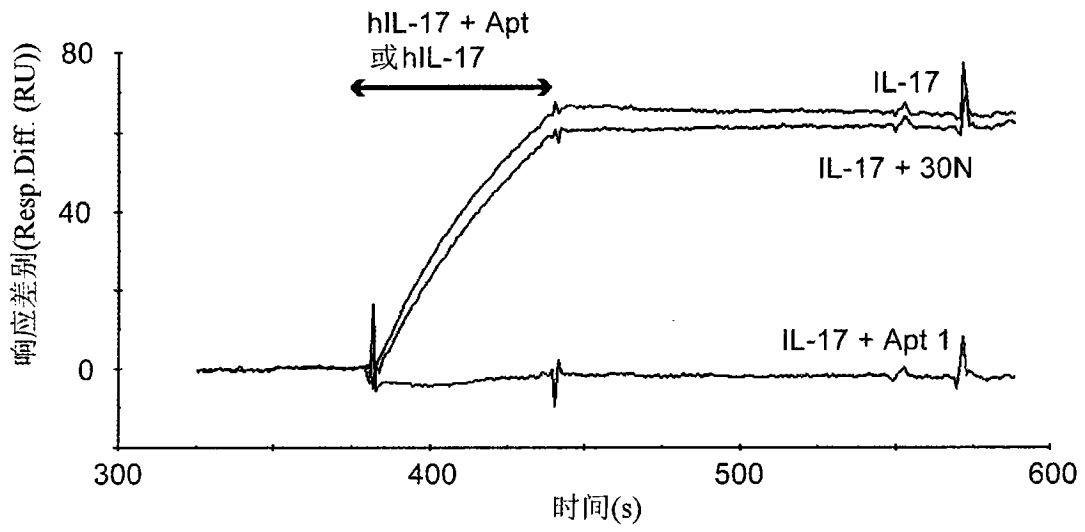


图 11

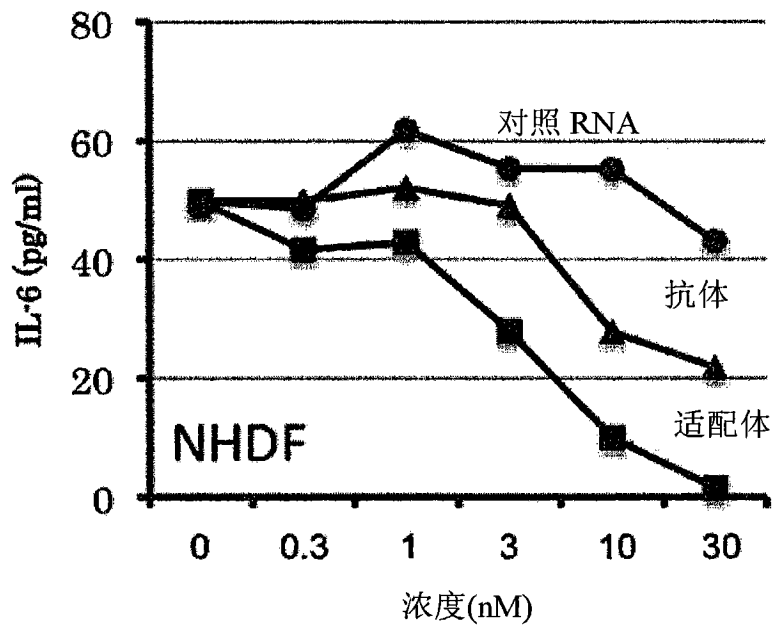


图 12

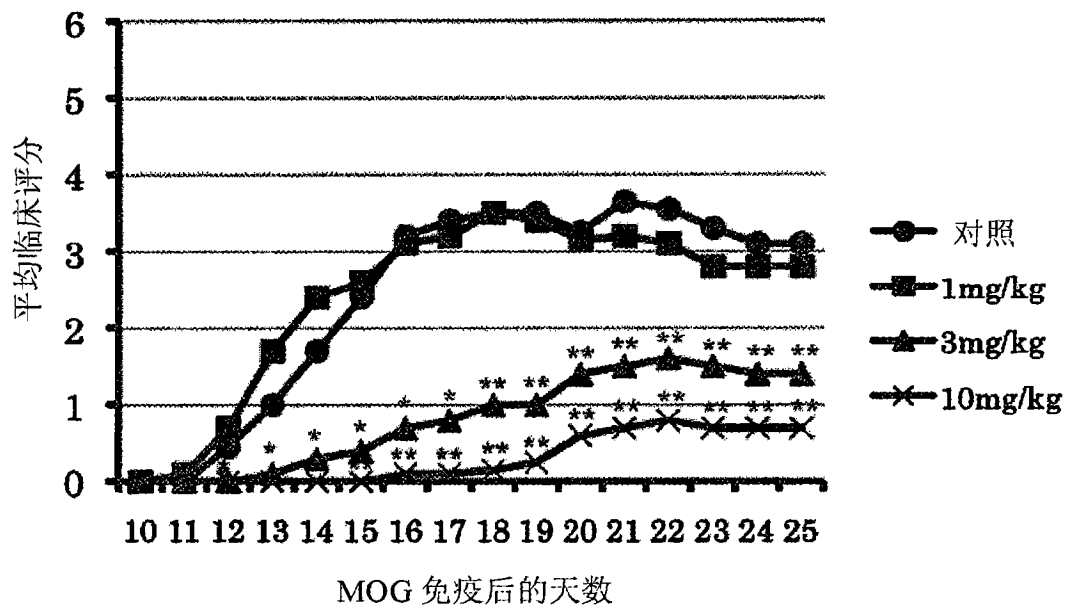


图 13

专利名称(译)	针对IL-17的适配体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN102099471A</a>	公开(公告)日	2011-06-15
申请号	CN200980128279.9	申请日	2009-07-14
[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		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京大学		
[标]发明人	中村义一 大内将司 石黑亮		
发明人	中村义一 大内将司 石黑亮		
IPC分类号	C12N15/09 A61K9/107 A61K31/7105 A61K48/00 A61K49/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/7105 C12N2310/16 G01N33/6869 A61K47/48092 C12N15/115 G01N2333/54 A61K47/549 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61K48/00		
代理人(译)	卢曼 郭文洁		
优先权	2008183233 2008-07-14 JP		
其他公开文献	CN102099471B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了针对IL-17的高质量适配体。具有针对IL-17的抑制活性的适配体；包含具有针对IL-17的结合活性或抑制活性的适配体和功能性物质(例如亲和性物质、标记用物质、酶、药物递送介质、药物等)的复合物；药物、诊断试剂或标记试剂，其中包含：具有针对IL-17的结合活性或抑制活性的适配体、或者含该适配体和功能性物质的复合物。

