

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101946001 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 12

- (21) 申请号 200880127067. 4 A61P 25/28 (2006. 01)
- (22) 申请日 2008. 12. 19 A61P 35/00 (2006. 01)
- (30) 优先权数据 A61P 35/04 (2006. 01)
  - 61/008, 825 2007. 12. 20 US C07H 21/00 (2006. 01)
- (85) PCT申请进入国家阶段日 C07K 14/00 (2006. 01)
  - 2010. 08. 19 C07K 7/06 (2006. 01)
- (86) PCT申请的申请数据 C07K 7/08 (2006. 01)
  - PCT/CA2008/002269 2008. 12. 19 A61K 31/337 (2006. 01)
- (87) PCT申请的公布数据 C12N 15/18 (2006. 01)
  - W02009/079790 EN 2009. 07. 02 C12N 15/54 (2006. 01)
- (71) 申请人 安吉奥开米公司 C12N 15/57 (2006. 01)
  - 地址 加拿大魁北克 C12N 15/87 (2006. 01)
- (72) 发明人 理查德·贝利沃 米歇尔·德默勒
- 克里斯蒂安·切 安东尼·雷吉纳
- (74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
- 责任公司 11240
- 代理人 李丙林 张英
- (51) Int. Cl.
- C12N 15/00 (2006. 01)
- A61K 47/48 (2006. 01)
- A61K 48/00 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 21 页

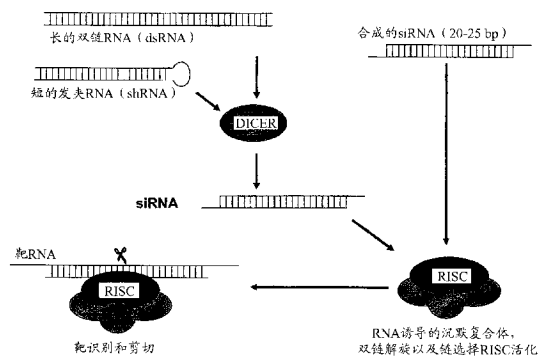
(54) 发明名称

多肽 - 核酸结合物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及多肽 - 核酸结合物。这些结合物能够允许治疗性 RNAi 药剂穿过血脑屏障的靶向应用, 从而治疗, 例如癌症、神经变性疾病、或溶酶体贮积障碍。

RNAi抑制基因表达的机制



1. 一种包含结合至核酸分子的多肽的化合物,所述多肽包含与 SEQ ID NO :1-105 和 SEQ ID NO :107-112 中列出的任一序列具有至少 70%序列同一性的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述氨基酸序列同一性为至少 80%。
3. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述氨基酸序列同一性为至少 90%。
4. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述多肽包含 SEQ ID NO :1-105 和 SEQ ID NO :107-112 中列出的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 4 所述的化合物,其中,所述多肽包含 SEQ ID NO :5、8、67、75、76、77、78、79、81、82、90、91、和 97 中列出的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 5 所述的化合物,其中,所述多肽包含 SEQ ID NO :97 中列出的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述组合物能够有效地穿过哺乳动物的血脑屏障。
8. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述多肽的长度为 10 至 50 个氨基酸。
9. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述核酸是核糖核酸 (RNA) 分子。
10. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述核酸的长度为 15 至 25 个氨基酸。
11. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述核酸是短干扰 RNA 分子 (siRNA)。
12. 根据权利要求 11 所述的化合物,其中,所述 siRNA 分子使哺乳动物表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮生长因子 (VEGF)、超氧化物歧化酶 1 (SOD-1)、亨廷顿蛋白 (Htt)、 $\alpha$ -分泌酶、 $\beta$ -分泌酶 (BACE)、 $\gamma$ -分泌酶、淀粉样前蛋白 (APP)、分拣连接蛋白 -6 (SNX6)、LINGO-1、Nogo-A、Nogo 受体 1 (NgR-1), 和  $\alpha$ -突触核蛋白沉默。
13. 根据权利要求 11 所述的化合物,其中,所述 siRNA 分子使哺乳动物表皮生长因子受体 (EGFR) 沉默。
14. 根据权利要求 11 所述的化合物,其中,所述 siRNA 分子包含一核苷酸序列,所述核苷酸序列与 SEQ ID NO :117-119 中列出的任一序列包含至少 80%的序列同一性。
15. 根据权利要求 11 所述的化合物,其中,所述 siRNA 分子包含一核苷酸序列,所述核苷酸序列包含 SEQ ID NO :117-119 中列出的任一序列。
16. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述核酸是短发夹 RNA 分子 (shRNA)。
17. 根据权利要求 16 所述的化合物,其中,所述 shRNA 分子使哺乳动物表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮生长因子 (VEGF)、转化生长因子 - $\beta$  (TGF- $\beta$ )、Her2/neu (ErbB)、VEGF 受体 (VEGFR)、血小板 - 衍生的生长因子受体 (PDGFR)、粘着斑激酶、细胞周期蛋白依赖性激酶、src 激酶、syk-ZAP70 激酶、btk 激酶、raf 激酶、map 激酶、wnt 激酶、ras 鸟苷三磷酸酶、c-myc、雌激素、雌激素受体、存活素、Bcl-2、Bcl-xL、或 mdm2 沉默。
18. 根据权利要求 16 所述的化合物,其中,所述 shRNA 分子使哺乳动物表皮生长因子受体 (EGFR) 沉默。
19. 根据权利要求 16 所述的化合物,其中,所述 shRNA 分子包含一核苷酸序列,所述核苷酸序列与 SEQ ID NO :117-119 中列出的任一序列具有至少 80%的序列同一性。
20. 根据权利要求 16 所述的化合物,其中,所述 shRNA 分子包含一核苷酸序列,所述核苷酸序列包含 SEQ ID NO :117-119 中列出的任一序列。
21. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述核酸是双链 RNA 分子 (dsRNA)。

22. 根据权利要求 21 所述的化合物,其中,所述 dsRNA 分子使哺乳动物表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮生长因子 (VEGF)、超氧化物歧化酶 1 (SOD-1)、亨廷顿蛋白 (Htt)、 $\alpha$ -分泌酶、 $\beta$ -分泌酶 (BACE)、 $\gamma$ -分泌酶、淀粉样前蛋白 (APP)、分拣连接蛋白 -6 (SNX6)、LINGO-1、Nogo-A、Nogo 受体 1 (NgR-1)、或  $\alpha$ -突触核蛋白沉默。

23. 根据权利要求 21 所述的化合物,其中,所述 dsRNA 分子使哺乳动物表皮生长因子受体 (EGFR) 沉默。

24. 根据权利要求 21 所述的化合物,其中,所述 dsRNA 分子包含一核苷酸序列,所述核苷酸序列与 SEQ ID NO :117-119 中列出的任一序列包含至少 80% 的序列同一性。

25. 根据权利要求 21 所述的化合物,其中,所述 dsRNA 分子包含一核苷酸序列,所述核苷酸序列包含 SEQ ID NO :117-119 中列出的任一序列。

26. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述核酸是微小 RNA 分子 (miRNA)。

27. 根据权利要求 26 所述的化合物,其中,所述 miRNA 分子使哺乳动物表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮生长因子 (VEGF)、超氧化物歧化酶 1 (SOD-1)、亨廷顿蛋白 (Htt)、 $\alpha$ -分泌酶、 $\beta$ -分泌酶 (BACE)、 $\gamma$ -分泌酶、淀粉样前蛋白 (APP)、分拣连接蛋白 -6 (SNX6)、LINGO-1、Nogo-A、Nogo 受体 1 (NgR-1)、或  $\alpha$ -突触核蛋白沉默。

28. 根据权利要求 26 所述的化合物,其中,所述 miRNA 分子使哺乳动物表皮生长因子受体 (EGFR) 沉默。

29. 根据权利要求 26 所述的化合物,其中,所述 miRNA 分子包含一核苷酸序列,所述核苷酸序列与 SEQ ID NO :117-119 中列出的任一序列包含至少 80% 的序列同一性。

30. 根据权利要求 26 所述的化合物,其中,所述 miRNA 分子包含一核苷酸序列,所述核苷酸序列包含 SEQ ID NO :117-119 中列出的任一序列。

31. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述化合物是经纯化的。

32. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述多肽通过重组基因技术产生。

33. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述多肽通过化学合成产生。

34. 一种包含权利要求 1 所述的化合物和药用载体的组合物。

35. 一种包含权利要求 1 所述的化合物的组合物,其中,所述多肽进一步结合于药剂。

36. 根据权利要求 35 所述的组合物,其中,所述药剂是烷化剂、抗生素、抗肿瘤剂、抗代谢剂、抗增殖剂、微管蛋白抑制剂、拓扑异构酶 I 或 II 抑制剂、生长因子、激素激动剂或激素拮抗剂、凋亡剂、免疫调节剂、或放射性药剂。

37. 根据权利要求 35 所述的组合物,其中,所述药剂是选自由多柔比星、甲氨蝶呤、喜树碱、高喜树碱、硫代秋水仙碱、秋水仙碱、考布他汀、长春碱、依托泊苷、环磷酰胺、泰索帝、美法仑、苯丁酸氮芥、微管抑制剂 A-4、鬼臼毒素、根霉素、根霉素 -d、多拉斯他丁、泰素、紫杉醇、CC1065、安丝菌素 p3、类美登醇、及它们的任意组合构成的组中的治疗剂。

38. 根据权利要求 35 所述的组合物,其中,所述药剂是紫杉醇。

39. 根据权利要求 35 所述的组合物,其中,所述药剂是抗体或抗体片段。

40. 一种治疗患有神经变性疾病的对象的方法,包括向所述对象给予治疗有效量的权利要求 1 所述的化合物。

41. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述神经变性疾病是多发性硬化症、精神分裂症、癫痫、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏舞蹈病、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、或中

风。

42. 一种治疗患有溶酶体贮积病的哺乳动物的方法,包括向所述哺乳动物给予治疗有效量的权利要求 1 所述的化合物。

43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中,所述溶酶体贮积病是粘多糖沉积症 (MPS-I; 即,赫尔利综合症、沙伊综合症)、MPS-II(亨特综合症)、MPS-IIIA(山菲立普综合症 A)、MPS-IIIB(山菲立普综合症 B)、MPS-IIIC(山菲立普综合症 C)、MPS-IIID(山菲立普综合症 D)、MPS-VII(Sly 综合症)、高歇氏病、尼曼-皮克病、法布里病、法伯氏病、沃尔曼氏病、泰-萨二氏病、桑德霍夫病、异染性脑白质病变、或克拉伯病。

44. 一种治疗患有癌症的哺乳动物的方法,包括向所述哺乳动物给予治疗有效量的权利要求 1 所述的化合物。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中,所述癌症是脑或中枢神经系统 (CNS) 的癌症。

46. 根据权利要求 44 所述的方法,其中,所述癌症是脑肿瘤、脑转移肿瘤、或已转移到脑的肿瘤。

47. 根据权利要求 44 所述的方法,其中,所述癌症是神经胶质瘤或神经胶母细胞瘤。

48. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述癌症是肝细胞癌。

49. 根据权利要求 44 所述的方法,其中,所述癌症是肺癌。

50. 一种合成权利要求 1 所述化合物的方法,包括使包含与 SEQ ID NO:1-105 和 107-112 中列出的任一序列包含至少 80% 的序列同一性的氨基酸序列的多肽结合到核酸上。

51. 根据权利要求 50 所述的方法,其中,所述结合包含共价键。

52. 根据权利要求 51 所述的方法,其中,所述共价键是二硫键。

## 多肽 - 核酸结合物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药物递送领域中的改进。更具体地,本发明涉及多肽 - 核酸结合物以及其在治疗诸如癌症、神经变性疾病、和溶酶体贮积病的疾病中将核酸运输穿过血脑屏障或进入对象的其他组织中的应用。

### 背景技术

[0002] 在脑病理学的新疗法的开发中,血脑屏障 (BBB) 被认为是用于治疗中枢神经系统 (CNS) 疾病的药物潜在用途的主要障碍。1998 年 CNS 药物的全球市场为 330 亿美元,约为心血管药物全球市场的一半,仅在美国,CNS 疾病患者就几乎是心血管疾病患者的两倍。这种不平衡的原因,部分是因为超过 98% 的所有潜在的 CNS 药物没有穿过血脑屏障。另外,世界上超过 99% 的 CNS 药物开发仅致力于 CNS 药物发现,而少于 1% 的开发涉及 CNS 药物递送。这可以解释为什么主要的神经学疾病缺乏可用的治疗策略。

[0003] 大脑通过两个屏障系统的存在来保护其免受潜在毒性物质的影响,这两个屏障系统为:血脑屏障 (BBB) 和血脑脊液屏障 (BCSFB)。BBB 被认为是摄取血清配体的主要途径,因为它的表面积比 BCSFB 的大出约 5000 倍。构成 BBB 的脑内皮代表了对抗多种 CNS 疾病的潜在药物应用的主要障碍。作为一般规则,只有小的亲脂性分子可以穿过 BBB,即,由全身血液 (systemic blood) 循环至脑。许多具有较大尺寸或较高疏水性的药物在治疗 CNS 疾病的动物研究中都表现出有前途的结果。因而,一般将肽和蛋白质治疗从血液到脑的运输中排除,因为脑毛细管内皮壁对这些药物的通透性可忽略不计。脑毛细管内皮细胞 (BCEC) 被紧密接头 (tight junction) 紧密地密封,与其他器官的毛细管相比,其具有较少的小孔和较少的内吞膜泡 (或胞吞泡, endocytic vesicle)。BCEC 被细胞外基质、星形细胞、周细胞、和小神经胶质细胞包围。内皮细胞与星形细胞足突和毛细管基底膜的紧密关联对于允许血 - 脑交换的严密控制的 BBB 特性的发展和维持是很重要的。

[0004] 治疗诸如癌症、神经变性疾病、或溶酶体贮积病的一种方法是利用 RNA 干扰 (RNAi) 的基因沉默。可以利用被称为短干扰或“siRNA”的同源短 (21-23bp) dsRNA 片段来实现 RNAi 基因沉默。当长 dsRNA 被引入细胞系中时,细胞酶 Dicer 将其剪切成长短干扰 RNA (siRNA) 分子。此时这种短干扰 RNA 分子被称为引导 RNA (guided RNA)。引导 RNA 将 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 引导到同源的靶 mRNA 上。其与同源 mRNA 序列形成杂合结构后, RISC 就会剪切 mRNA。结果是,不再产生 mRNA 编码的蛋白质,从而引起基因的沉默。

[0005] RNA 干扰指的是,动物体内由短干扰 RNA (siRNA) 介导的序列特异性转录后基因沉默的过程。转录后基因沉默的过程被认为是一种保守进化的细胞防御机制,用于阻止外来基因的表达并普遍地为不同的生物群和门所共有。这种阻止外来基因表达的保护作用可能是响应于源自病毒感染或源自转座子元件随机整合进宿主基因组的双链 RNA (dsRNA) 的生成而进化的,其通过特异性地破坏同源单链 RNA 或病毒基因组 RNA 的细胞响应而实现。细胞中存在的 dsRNA 通过目前尚未完全了解的机制触发 RNAi 响应。这种机制似乎不同于其他已知的涉及双链 RNA 特异性的核糖核酸酶的机制,例如,由 dsRNA 介导的蛋白激酶 PKR 和

2',5'-寡腺苷酸合成酶的活化引起的干扰素响应,导致核糖核酸酶L对mRNA的非特异性剪切(参见,例如,美国专利第6,107,094号;第5,898,031号;Clemens等人,J. Interferon & Cytokine Res.,17:503-524;1997;Adah等人,Curr. Med. Chem. 8:1189,2001)。

## 发明内容

[0006] 本发明涉及多肽-核酸结合物。这些结合物可用于将RNAi药剂,例如,siRNA药剂运输到细胞、组织或器官,从而治疗癌症、神经变性疾病或溶酶体贮积病。本发明进一步涉及合成多肽-核酸结合物的方法。

[0007] 在一方面,本发明涉及多肽-核酸结合物。在一种优选实施方式中,该多肽与SEQ ID NO:1-105和107-112(例如,血管肽-1(SEQ ID NO:67)、血管肽-2(SEQ ID NO:97)、血管肽-3(SEQ ID NO:107)、血管肽-4a(SEQ ID NO:108)、血管肽-4b(SEQ ID NO:109)、血管肽-5(SEQ ID NO:110)、血管肽-6(SEQ ID NO:111)和血管肽-7(SEQ ID NO:112))中列出的序列中任一个序列基本上相同。该多肽具有在SEQ ID NO:5、8、67、75、76、77、78、79、81、82、90、91、或97(例如,SEQ ID NO:67和97)中列出的氨基酸序列。该结合物可包括本文描述的多肽中任一个多肽的片段(例如,被有效地运输穿过血脑屏障的片段或被有效地运输到特定细胞类型中的片段)。本发明多肽-核酸结合物可被有效地运输到特定细胞类型中(例如,肝、肺、肾、脾和肌肉细胞中的任一种、两种、三种、四种或五种)或可有效地穿过哺乳动物血脑屏障(BBB)(例如,血管肽-1、-2、-3、-4a、-4b、-5和-6)。在另一实施方式中,该结合物能够进入特定细胞类型(例如,肝、肺、肾、脾和肌肉细胞中的任一种、两种、三种、四种或五种)中,但不能有效穿过BBB(例如血管肽-7)。该多肽可以为任何长度,例如,至少6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、35、50、75、100、200或500个氨基酸长度。优选地,该多肽的长度为10~50个氨基酸。同样地,该核酸也可以为任何长度(例如,15到25个核苷酸)。该核酸可以是DNA分子、RNA分子、修饰的核酸(例如,含有核苷酸类似物),或它们的组合。该核酸可以是单链、双链、线性、环形(例如,质粒)、缺口环形(nicked circular)、螺旋的(coiled)、超螺旋的、连环体形的(concatemered)或带电荷的(charged)。另外,核酸可含有5'和3'有义链和反义链末端修饰并具有平的(blunt)或突出的(overhanging)末端核苷酸、或它们的组合。该核酸可以是短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、双链RNA(dsRNA)、或微小RNA(miRNA)分子。本发明的siRNA、shRNA、dsRNA和miRNA分子可以使下列靶标中的一种沉默:血管内皮生长因子(VEGF)、超氧化物歧化酶(SOD-1)、亨廷顿蛋白(huntingtin)(Htt)、 $\alpha$ -分泌酶、 $\beta$ -分泌酶(BACE)、 $\gamma$ -分泌酶、淀粉样前蛋白(APP)、分拣连接蛋白-6(sorting nexin-6,SNX6)、LINGO-1、Nogo-A、Nogo受体1(NgR-1)和 $\alpha$ -突触核蛋白(synuclein),且最优选使表皮生长因子受体(EGFR)沉默。在另一种实施方式中,本发明的siRNA、shRNA、dsRNA或miRNA分子所具有的核苷酸序列与SEQ ID NO:117-119中列出的序列中的任何一个序列具有至少70%、80%、90%、95%或100%的序列同一性。本发明的多肽-核酸结合物可以是基本上纯的。在另一种实施方式中,该多肽通过重组基因技术或化学合成而制备。本发明的多肽-核酸结合物可以与药用载体混合或配制。

[0008] 在其他实施方式中,该结合物包括具有下式的氨基酸序列的多肽:

[0009] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19

[0010] 其中, X1-X19 (例如, X1-X6、X8、X9、X11-X14、和 X16-X19) 中每一个都独立地为任意氨基酸 (例如, 天然存在的氨基酸, 如 Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 和 Val) 或不存在, 且 X1、X10 和 X15 中的至少一个是精氨酸。在一些实施方式中, X7 是 Ser 或 Cys; 或 X10 和 X15 各自独立地为 Arg 或 Lys。在一些实施方式中, 从 X1 到 X19 的残基 (包括 X1 和 X19 在内) 与 SEQ ID NO :1-105 和 107-112 (例如, 血管肽 -1、血管肽 -2、血管肽 -3、血管肽 -4a、血管肽 -4b、血管肽 -5、血管肽 -6、和血管肽 -7) 中的任一个氨基酸序列中的任一个基本上相同。在一些实施方式中, 氨基酸 X1-X19 中至少一个 (例如, 2、3、4 或 5) 是 Arg (例如, X1、X10 和 X15 中任一个、两个或三个)。

[0011] 其他示例性多肽在位置 10、位置 15 或位置 10 和位置 15 处为赖氨酸或精氨酸 (就 SEQ ID NO :1 氨基酸序列而言)。本发明的多肽也可以在位置 7 处为丝氨酸或半胱氨酸 (就 SEQ ID NO :1 氨基酸序列而言)。如果期望多肽的多聚化, 则该多肽可包括半胱氨酸 (例如, 位于位置 7 处)。

[0012] 在某些实施方式中, 该结合物可以包括经修饰 (例如, 如本文所描述的) 的多肽 (例如, 本文描述的任何多肽)。该多肽可被酰胺化、乙酰化或既被酰胺化又被乙酰化。对多肽的这种修饰可以在所述多肽的氨基或羧基末端上进行。本发明结合物也包括本文描述的多肽中任何一个的模拟肽 (peptidomimetic) (例如, 本文描述的那些)。该多肽可以是多聚体形式。例如, 多肽可以是二聚体形式 (例如, 通过半胱氨酸残基的二硫键结合而形成)。

[0013] 本发明的多肽可以被有效地运输到特定细胞中 (例如, 肝、肾、肺、肌肉或脾细胞) 或可有效地穿过 BBB (例如, SEQ ID NO :5、8、67、75、76、77、78、79、81、82、90、91、107-111)。在一些实施方式中, 该多肽可被有效地运输到特定细胞中 (例如, 肝、肾、肺、肌肉或脾细胞) 而不能被有效地运输穿过 BBB (例如, 血管肽 -7 ; SEQ ID NO :112)。该多肽可被有效地运输到选自自由肝、肾、肺、肌肉或脾细胞组成的组中的细胞或组织中的至少一个 (例如, 至少二个、三个、四个或五个) 中。

[0014] 对于本文描述的多肽和结合物中的任何一个, 氨基酸序列可以具体排除包括 SEQ ID NO :1-105 和 107-112 (例如, SEQ ID NO :1-96、血管肽 -1、血管肽 -2、血管肽 -3、血管肽 -4a、血管肽 -4b、血管肽 -5、血管肽 -6 和血管肽 -7 中的任何一个) 的多肽或由它们组成的多肽。在一些实施方式中, 本发明的多肽和结合物排除了 SEQ ID NO :102、103、104 和 105 的多肽。在其他实施方式中, 本发明的多肽和结合物包括这些肽。

[0015] 在某些实施方式中, 本发明的结合物包括具有本文描述的具有至少一个氨基酸置换 (例如, 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个置换) 的氨基酸序列的多肽。在某些实施方式中, 该多肽在对应于 SEQ ID NO :1、血管肽 -1、血管肽 -2、血管肽 -3、血管肽 -4a、血管肽 -4b、血管肽 -5、血管肽 -6 和血管肽 -7 中任何一个的氨基酸序列位置 1、10 和 15 的 1 个、2 个或 3 个位置上为精氨酸。例如, 该多肽可含有 1 ~ 12 个氨基酸置换 (例如, SEQ ID NO :91)。例如, 该氨基酸序列可含有 1 ~ 10 个 (例如, 9、8、7、6、5、4、3、2 个) 氨基酸置换或 1 ~ 5 个氨基酸置换。根据本发明, 该氨基酸置换是保守或非保守的氨基酸置换。

[0016] 在第二方面, 本发明涉及一种通过向患有癌症的对象提供一种或多种治疗有效量的本发明的多肽-核酸结合物来治疗 (例如, 预防性) 所述对象的方法。在一种实施方式中, 多肽-核酸结合物用于治疗脑或中枢神经系统 (例如, 其中该多肽被有效地运

输穿过 BBB) 的癌症。在另一种实施方式中,该癌症是脑肿瘤、脑肿瘤转移 (brain tumor metastasis)、或已转移的肿瘤。在其他实施方式中,多肽-核酸结合物用于治疗患有神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、肝细胞癌、肺癌,或本文描述的任何一种癌症的对象。

[0017] 在第三方面,本发明涉及一种通过向患有神经变性疾病的对象提供一种或多种治疗有效量的本发明的多肽-核酸结合物来治疗(例如,预防性)所述对象的方法。在一种实施方式中,该结合物用于治疗患有多发性硬化症、精神分裂症、癫痫、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer' s disease)、帕金森氏病、亨廷顿氏舞蹈病 (Huntington' s disease)、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、中风、或本文中描述的任何神经变性疾病的对象。

[0018] 在第四方面,本发明涉及一种通过向患有溶酶体贮积病的对象提供一种或多种治疗有效量的本发明的多肽-核酸结合物来治疗(例如,预防性)所述对象的方法。在一种实施方式中,该结合物用于治疗患有粘多糖贮积病 (MPS-I ;即,赫尔利综合症、沙伊综合症)、MPS-II (亨特综合症)、MPS-IIIA (山菲立普综合症 A)、MPS-IIIB (山菲立普综合症 B)、MPS-IIIC (山菲立普综合症 C)、MPS-IIID (山菲立普综合症 D)、MPS-VII (Sly 综合症)、高歇氏病 (Gaucher' s disease)、尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease)、法布里病 (Fabry disease)、法伯氏病 (Farber' s disease)、沃尔曼氏病 (Wolman' s disease)、泰-萨二氏病 (Tay-Sachs disease)、桑德霍夫病 (Sandhoff disease)、异染性脑白质病变 (metachromatic leukodystrophy)、克拉伯病 (Krabbe disease)、或本文中描述的任一种溶酶体贮积病的对象。

[0019] 在第五方面,本发明涉及合成本发明的多肽-核酸结合物的方法,其是通过使本文描述的多肽(例如,与 SEQ ID NO :1-105 和 107-112 序列中的任一个序列基本上相同的氨基酸序列)结合到核酸上实现的。在一种实施方式中,该多肽以共价键结合到核酸上。在另一种实施方式中,该多肽以二硫键结合到核酸上。可使用(或连接子, linker)(例如,本领域已知或本文描述的任何接头)来结合多肽。

[0020] 在上述方面的任一方面中,本发明的多肽-核酸结合物可进一步与药剂(例如,治疗剂、可检测标记、蛋白质或蛋白质复合物)结合。治疗剂可包括细胞毒素剂、烷化剂、抗生素、抗肿瘤剂、抗代谢剂、抗增殖剂、微管蛋白抑制剂、拓扑异构酶 I 或 II 抑制剂、生长因子、激素激动剂或激素拮抗剂、凋亡剂、免疫调节剂、和放射性药剂。其他细胞毒素剂包括多柔比星、甲氨蝶呤、喜树碱、高喜树碱 (homocamptothecin)、硫代秋水仙碱、秋水仙碱、考布他汀、长春碱、依托泊苷、环磷酰胺、泰索帝、美法仑、苯丁酸氮芥、微管抑制剂 (combretastin) A-4、鬼臼毒素、根霉素、根霉素-d、多拉斯他丁 (dolistatin)、泰素 (taxol)、CC1065、安丝菌素 p3、类美登醇 (maytansinoid)、和它们的任意组合。最优选地,该细胞毒素剂是紫杉醇。在另一种实施方式中,该多肽-核酸结合物与抗体或抗体片段结合。

[0021] “血脑屏障”或“BBB”是指一种主要用于保护脑免受血液中化学物的损害,同时仍允许必要的代谢功能的膜结构。它由非常紧密地填塞在脑毛细血管中的内皮细胞组成。这种较高的密度对来自血流的物质通过的限制,远远超过身体中其他部位的毛细血管中的内皮细胞对来自血流的物质通过的限制。

[0022] 术语“癌症”或“增殖性疾病”是指其独特特征是失去正常控制任何细胞的增殖,这会导致无节制的生长、缺乏分化和/或入侵局部组织和转移的能力。癌症可以在任何组织、任何器官、或任何细胞类型中发展。

[0023] “结合物”是指载体和另一种化合物或药剂（例如，RNAi 药剂）的结合。结合可以本质上是化学性结合，例如经由接头，或者本质上是遗传性结合，例如通过重组基因技术，例如在具有如报告分子（例如，绿色荧光蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶、或组胺标签）的融合蛋白中。

[0024] “双链 RNA”(dsRNA) 是指能够用于通过 RNA 干扰使基因产物沉默的双链 RNA 分子。

[0025] “片段”是指来源于原始或亲本序列的一部分或来源于所述亲本序列类似物的多肽。片段包括具有一个或多个（例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、或 19）氨基酸的截头（truncation）的多肽，其中该截断可来源于氨基末端（N-末端）、羧基末端（C-末端），或来源于蛋白质内部。片段可包含与原始序列的相应部分相同的序列。本发明包括本文描述的载体（即，多肽）的生物活性片段。

[0026] “溶酶体贮积病”是指由溶酶体功能的缺陷引起的任何障碍。示例性的溶酶体贮积病包括粘多糖贮积病（MPS，例如，亨特综合症）、脑白质病变（例如，异染性脑白质病变）、神经节苷脂贮积病（gangliosidoses）（例如，泰-萨二氏病）、粘脂贮积病、脂质沉积病（lipidoses）（例如，高歇氏病（Gaucher's disease））、和甘油蛋白沉积症（glycoproteinoses）。本文中也描述了其他的溶酶体贮积病。

[0027] “微小 RNA”(miRNA) 是指能够用于通过 RNA 干扰使基因产物沉默的单链 RNA 分子。

[0028] “调节”是指基因的表达、或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的 RNA 分子或等价 RNA 分子的水平、或一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的活化被上调或下调，使得表达、水平，或活性大于或小于在不存在调节剂时所观察到的。例如，术语调节可包括抑制。

[0029] “神经变性疾病”是指影响哺乳动物的脑、中枢神经系统（CNS）、外周神经系统、或神经元丢失或退化的自主神经系统的任何疾病或病症。示例性神经变性疾病包括阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、克拉伯病、多发性硬化症、发作性睡病和与 HIV- 相关的痴呆病。

[0030] “非天然存在的氨基酸”是指不是在哺乳动物中天然存在或发现的氨基酸。

[0031] “对象（subject）”是指任何人或非人动物（例如，哺乳动物）。可使用本发明的方法和组合物治疗的其他动物包括马、狗、猫、猪、山羊、兔子、仓鼠、猴、豚鼠、大鼠、小鼠、蜥蜴、蛇、羊、牛、鱼、和鸟。

[0032] “药用载体”是在保持所给予的化合物治疗特性的同时患者生理上可以接受的载体。

[0033] 在本发明的结合物的上下文中，“提供”是指使结合物与体内或体外靶细胞或组织接触。可通过向对象给予载体或结合物来提供载体或结合物。

[0034] “RNAi 药剂”是指经过 RNA 干扰途径施加基因沉默影响的任何药剂或化合物。RNAi 药剂包括能够介导序列特异性的 RNAi 的任何核酸分子，该序列特异性的 RNAi 例如是短干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、微小 RNA (miRNA)、短发夹 RNA (shRNA)、短干扰寡核苷酸、短干扰核酸、短干扰经修饰的寡核苷酸、经化学修饰的 siRNA 和转录后基因沉默的 RNA (ptgsRNA)。

[0035] “沉默”或“基因沉默”是指在 RNAi 药剂的存在下使基因的表达、或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的 RNA 分子或等价 RNA 分子的水平、或一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的活性降至低于在不存在 RNAi 药剂（例如，siRNA）时所观察到的。在一种实施方式中，应用 siRNA 分子的基因沉默使基因产物表达降低至低于在存在无活性的或活性减

弱的分子时所观察到的,或低于在存在,例如,含有乱序序列(scrambled sequence)或含有错配的 siRNA 分子时所观察到的。

[0036] “短发夹 RNA”或“shRNA”是指可产生能够用于通过 RNA 干扰使基因产物沉默的紧密的发夹形转角的 RNA 序列。

[0037] “小抑制 RNA”、“短干扰 RNA”或“siRNA”是指一类长度为 10 ~ 40(例如,15 ~ 25,例如 21)个核苷酸的双链 RNA 分子。最特别地,siRNA 通常涉及 RNA 干扰(RNAi)途径,通过该途径,siRNA 干扰特异性基因产物(例如,EGFR)的表达。

[0038] “基本相同”或“基本上相同”是指分别具有与参照序列相同的多肽或多核苷酸序列的多肽或多核苷酸序列,或当该两种序列最佳比对时,该多肽或多核苷酸序列分别具有与在参照序列内相应位置上相同的特定百分比的氨基酸残基或核苷酸。例如,与参照序列“基本上相同”的氨基酸序列具有与参照氨基酸序列至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 的同一性。对于多肽,对比序列的长度一般为至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个邻接氨基酸,更优选至少 25、50、75、90、100、150、200、250、300 或 350 个邻接氨基酸,最优选为全长氨基酸序列。对于核酸,对比序列长度一般为至少 5 个邻接核苷酸,优选至少 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个邻接核苷酸,最优选为全长核苷酸序列。可使用序列分析软件在缺省设置下(例如,遗传学计算机组序列分析软件包(Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group),威斯康辛大学生物技术中心(University of Wisconsin Biotechnology Center),1710 University Avenue, Madison, WI 53705)来测量序列同一性。此种软件可使通过指定与不同取代、缺失和其他修饰的同源程度而使相似的序列相匹配。

[0039] “基本上纯的”或“分离的”是指与其他化学组分分开的化合物(例如,多肽或结合物)。通常,当该化合物以重量计至少 30% 没有其他组分时,该化合物是基本上纯的。在某些实施方式中,该制剂以重量计至少 50%、60%、75%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 没有其他组分。纯化的多肽可通过例如编码此种多肽的重组多核苷酸的表达或通过化学合成多肽而获得。纯度能够通过任何合适的方法,例如柱色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳,或通过 HPLC 分析测得。

[0040] “有义区”是指与另一个核酸的反义区具有互补性的本发明的核酸的核苷酸序列。另外,本发明的核酸的有义区可包括与靶基因核苷酸序列有同源性的核苷酸序列。“反义区”是指与靶基因核苷酸序列具有互补性的本发明的核酸的核苷酸序列。

[0041] “靶核酸”是指待调节其表达或活性的任何核酸序列。靶核酸可以是 DNA 或 RNA。

[0042] “药剂”是指任何化合物,例如抗体、或治疗剂、可检测标记(例如,标记物、示踪剂或显像化合物)。

[0043] “治疗剂”是指具有生物活性的任何化合物。治疗剂包括对于疾病或障碍的广谱(full spectrum)治疗。治疗剂可以以预防或防止的方式发挥作用,包括那些与被设计为靶向于被鉴定为处于危险中(药物基因学)的个体的步骤结合的治疗剂;或者以本质上改善或治愈的方式发挥作用;或可用于使疾病或障碍发展的速率或程度变慢;或可起到使任何不适或疼痛的所需时间、发生或程度、或与疾病、障碍或身体创伤复原相关联的身体限制减少到最小的作用;或可用作其他治疗和处理的佐剂。

[0044] “治疗”和类似术语是指获得期望的药理学和 / 或生理学效果, 例如, 抑制癌细胞生长、癌细胞的死亡或改善神经变性疾病或溶酶体贮积病。治疗包括抑制疾病 (例如, 遏制疾病发展) 和缓解疾病 (例如, 减轻与疾病关联的症状)。本文中使用的治疗涵盖了任何向个体给予药物药剂或化合物从而治疗、治愈、缓解、改善、减轻或抑制个体中的病症, 其包括向个体给予载体 - 药剂结合物。“治疗癌症”、“预防癌症”或“抑制癌症”是指减小肿瘤尺寸或癌细胞数目、减慢或抑制肿瘤尺寸的增大或癌细胞增殖、延长肿瘤或其他癌症消失与其复发之间的无病存活时间、防止或减少肿瘤或其他癌症的最初或随后发生的可能性、或减少与肿瘤或其他癌症关联的有害症状。在一种期望的实施方式中, 在治疗之后存活的肿瘤或癌细胞的百分比相比于肿瘤或癌细胞的初始数目少至少 20%、40%、60%、80% 或 100%, 如使用任何标准试验测定的。可期望的是, 通过给予本发明的化合物引起的肿瘤或癌细胞数目的减少比非肿瘤或非癌细胞数目的减少大至少 2、5、10、20 或 50 倍。可期望的是, 本发明的方法导致如使用标准方法测定的肿瘤尺寸或癌细胞数目减少 20%、40%、60%、80% 或 100%。可期望的是, 经治疗对象的至少 20%、40%、60%、80%、90% 或 95% 完全好转, 其中肿瘤或癌症出现的所有迹象均消失。可期望的是, 该肿瘤或癌症不复发或者在不少于 5、10、15 或 20 年之后复发。

[0045] “预防性治疗”是指通过在疾症症状出现之前给予药剂来降低疾病发生的频率或疾病的严重程度。预防性治疗可完全防止或降低疾病或其症状的出现和 / 或就部分或完全治愈疾病和 / 或由疾病引起的反作用而言, 预防性治疗可以是治疗性的。预防性治疗可包括降低或防止易患该疾病但还没有诊断为患有此病的个体中该疾病或病症的发生 (例如, 预防癌症)。

[0046] “载体 (vector)”是指能够运输另一化合物的化合物或分子, 如多肽。例如, 使用载体运输 (例如, RNAi 药剂的运输) 可穿过血脑屏障或到达特定组织或器官 (例如, 肝、肺、肾、脾或肌肉)。该载体可与脑内皮细胞上存在的受体结合并因此通过转胞吞作用 (或跨细胞作用, transcytosis) 被运输穿过血脑屏障。该载体可以是为此在不影响血脑屏障完整性的情况下可获得高水平的经内皮运输的分子。该载体可以是蛋白质、肽或模拟肽 (peptidomimetic) 并且可以是天然存在的, 或者通过化学合成或重组基因技术 (基因工程) 产生的。

[0047] “被有效地运输穿过 BBB”的载体是指能够至少以与血管肽 -6 相同的效率穿过 BBB (即, 大于美国专利申请第 11/807, 597 号中描述的原位脑灌注试验中的血管肽 -1 (250nM) 的 38.5%, 该专利申请于 2007 年 5 月 29 日提交, 其以引用方式结合于本文)。因此, “没有被有效地运输穿过 BBB”的载体或结合物以较低的水平运输到脑 (例如, 以比血管肽 -6 低的效率运输)。

[0048] “被有效地运输到特定细胞类型中”的载体或结合物是指能够在该细胞类型中积累 (由于进入该细胞的运输量增加、从该细胞流出量的减少, 或它们的结合) 的载体或结合物, 其积累程度比对照物质、或者如果是结合物的情况下则与未结合的药剂相比, 至少大 10% (例如, 25%、50%、100%、200%、500%、1,000%、5,000%、或 10,000%)。PCT 公开 WO 2007/009229 中详细描述了这样的活性, 该公开内容以引用方式结合于本文。

[0049] 如果对于特定特征 (例如, 温度、浓度、时间等) 提及了“范围”或“物质的组”, 则本发明涉及并且本文中明确地并入每个具体的成员和其中的子范围或子组的结合。因而,

例如,对于 9 ~ 18 个氨基酸的长度,应当理解为这里具体并入各个及每个单个长度,例如,18、17、15、10、9 的长度和在其间的任何数目。因此,除非特别指出,本文提及的每个范围应当理解为包括端值在内。例如,5 ~ 19 个氨基酸长度的表达应被理解为包括 5 和 19 个氨基酸。类似地,这也适用于其他参数,例如序列、长度、浓度、元件等。

[0050] 本文中定义的序列、区域和部分各自包括其中描述的各个及每个单个序列、区域和部分和各个及每个可能的亚序列、亚区域和亚部分,而不论这样的亚序列、亚区域和亚部分是否被定义为肯定包括特定的可能性、排除特定的可能性或是它们的组合。例如,对于区域的排除定义可表述如下:“所述多肽不短于 4、5、6、7、8 或 9 个氨基酸”。否定性限制的进一步实例如下:包括 SEQ ID. :X 的序列,排除 SEQ ID. :Y 的多肽;等。否定性限制的其他实例如下:所述多肽不是(不包含或不由其构成)SEQ ID NO. :Z。

### 附图说明

[0051] 图 1 是示出通过 RNA 干扰 (RNAi) 的抑制机制的示意图。

[0052] 图 2 是示出血管肽 -2 (SEQ ID NO :97) 与含有交联剂磺基 -LC-SPDP (sulfo-LC-SPDP) 的 siRNA 分子的结合的示意图。这种交联剂的使用导致在 siRNA 分子与血管肽 -2 之间产生可剪切的二硫键。

[0053] 图 3 是交联剂磺基 -LC-SPDP 的图。这种交联剂可用来通过形成可剪切的二硫键连接本发明的多肽和 RNAi 药剂。

[0054] 图 4 是示出示例性可剪切的和不可剪切的血管肽 -2-siRNA 结合物的示意图,其中血管肽 -2 结合到 siRNA 的有义链上。

[0055] 图 5 是示出可剪切的 siRNA 结合物、不可剪切的 siRNA 结合物和对照(未结合的 siRNA) 的 siRNA 活化的图组。

[0056] 图 6 是示出可剪切的和不可剪切的 siRNA 结合物摄取量 (uptake) 的图表。

[0057] 图 7 是血管肽 -2 的修饰形式的示意图;并示出 Cys- 血管肽 -2 (SEQ ID NO :113) 和 6- 马来酰亚胺基己酸 (6-MHA)- 衍生的血管肽 -2。

[0058] 图 8 是示出示例性衍生的 RNA 分子与还原剂三 (2- 羧乙基) 膦 (TCEP) 反应得到游离硫醇,接着进一步与 2,2' - 联吡啶二硫化物 (py-S-S-Py) 反应以形成活化的 siRNA 的反应的示意图。

[0059] 图 9A ~ 图 9C 示出了含有游离硫醇的 siRNA (图 9A)、活化 siRNA 的合成 (图 9B), 和 Cys- 血管肽 -2 (图 9C) 的 HPLC 迹线。

[0060] 图 10 是示出活化 siRNA 与 Cys- 血管肽 -2 结合反应的示意图。

[0061] 图 11A- 图 11C 是示出活化 siRNA (图 11A)、Cys- 血管肽 -2 (图 11B) 和 siRNA 结合物 (图 11C) 的 HPLC 迹线和相对保留时间的图表。

[0062] 图 12 是示出在 siRNA 结合物上进行的质谱的结果的图表。

[0063] 图 13 是示出含有游离硫醇的 siRNA 与用马来酰亚胺衍生的血管肽 -2 的结合反应的示意图。

[0064] 图 14A ~ 图 14C 是示出含有游离硫醇的 siRNA (图 14A)、血管肽 -2- 马来酰亚胺 (图 14B)、和 siRNA+ 多肽粗反应混合物 (图 14C) 的 HPLC 迹线和相对保留时间的图表。

[0065] 图 15A ~ 图 15B 是示出纯化的 siRNA- 多肽结合物 (图 15A) 的 HPLC 迹线和在该

结合物上进行的质谱的结果（图 15B）的图表。

[0066] 图 16 是示出结合到荧光标记 Alexa 488 上的反义链 siRNA 结构的示意图。

[0067] 图 17A ~ 图 17B 是示出其他的可剪切（图 17A）和不可剪切（图 17B）血管肽 -2 结合物的 HPLC 迹线的图表。也示出了未结合的血管肽 -2 肽和对照 siRNA。

[0068] 图 18 是示出可剪切的和不可剪切的荧光标记的 siRNA- 血管肽 -2 结合物的 HPLC 迹线的图表。

[0069] 图 19A ~ 图 19B 是示出在本文描述的碘化步骤之前和之后可剪切的（图 19A）和不可剪切的（图 19B）siRNA 结合物的 HPLC 迹线的图组。

[0070] 图 20 是示出使用放射性标记的 siRNA 结合物在小鼠上进行的原位脑灌注试验的结果的图表。示出的菊粉用作对照。

[0071] 图 21 是示出使用放射性标记的 siRNA 结合物在小鼠上进行的原位灌注试验的结果的图表。测定全脑、主质 (parenchyma) 和脑毛细血管中放射性标记的 siRNA 结合物的量。菊粉用作对照。

[0072] 图 22 是示出使用放射性标记的 siRNA 结合物在小鼠上进行的原位灌注试验的结果的图表。Alex-488 和未标记的 siRNA 用作对照。

[0073] 图 23 是示出使用可剪切的和不可剪切的 siRNA 结合物的体外血脑屏障模型产生的结果的图表。全 - 转铁蛋白 (Holo-transferrin) 用作对照。

[0074] 图 24 是示出在体外 BBB 模型中放射性标记的 siRNA 结合物的可饱和运输的图表。

[0075] 图 25 是示出在体外 BBB 模型中荧光标记的 siRNA 结合物的运输的图表。荧光标记的未结合的 siRNA 用作对照。

## 具体实施方式

[0076] 本发明涉及可用作将 RNA 干扰 (RNAi) 药剂运输到脑、中枢神经系统 (CNS) 或其他器官中的载体的多肽结合物。RNAi 的不同模式, 例如 siRNA、shRNA、dsRNA 和 miRNA 可用于在治疗癌症、神经变性疾病、溶酶体贮积病和其他病症时使特定的细胞基因沉默。除了运输 RNAi 药剂之外, 该结合物的多肽组分还可以稳定、保护 (例如, 核酸酶保护) RNAi 治疗剂或使 RNAi 治疗剂靶向所治疗个体的特定细胞、组织或器官。另外, 自身不能穿过或不能有效穿过血脑屏障的其他药剂在连接或结合到这些多肽 - 核酸结合物上时就能够被运输穿过血脑屏障。在其他情况下, 还能够观察到能够穿过血脑屏障的药剂在结合到本文描述的多肽载体上时的运输增加。这样的结合物能够是组合物形式, 例如药物组合物, 用于治疗或诊断病症或疾病。

### [0077] 多肽载体

[0078] 本发明的化合物、结合物和组合物涉及本文所述的多肽中的任一种, 例如, 表 1 中所述的多肽中的任一种 (例如, 在 SEQ ID NO :1-105 和 107-112, 例如血管肽 -1 或血管肽 -2 中的任一个中定义的肽), 或它们的任何片段、类似物、衍生物或变体。在某些实施方式中, 该多肽可与本文描述的多肽具有至少 35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、或甚至 100% 的同一性。相对本文描述的序列之一, 该多肽可具有一个或多个 (例如, 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15) 置换。其他修饰将在下面进行更详细的描述。

[0079] 本发明还涉及这些多肽的片段 (例如, 功能片段)。在某些实施方式中, 该片段能

够被有效地运输到或积累在特定细胞类型（例如，肝、眼、肺、肾或脾）中或被有效地运输穿过 BBB。多肽的截头可以是来自多肽的 N- 末端、多肽的 C- 末端，或它们的组合的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更多的氨基酸。其他片段包括多肽的内在部分缺失的序列。

[0080] 使用本文描述的试验或方法中的一种可识别另外的多肽。例如，候选载体可通过常规的肽合成来生产，可与紫杉醇结合并给予实验动物。例如，可基于生物活性载体对于提高注射了肿瘤细胞并用结合物治疗的动物的成活率与用结合物治疗的对照相比（例如，用未结合的药剂治疗）的效能来识别生物活性载体。例如，在原位脑灌注试验中，生物活性多肽可基于它在主质中的定位而被识别。

[0081] 也可进行试验来确定其他组织中的积累物。可向动物给予多肽的标记结合物并测量不同器官中的积累物。例如，结合于可检测标记的多肽（例如，近 IR 荧光光谱标记，如 Cy5.5）能够实时（live）体内显影。可将这样的多肽给予动物，并检测器官中该多肽的存在，从而能够确定在所期望器官中多肽积累的速率和数量。在其他实施方式中，可用放射性同位素（例如，<sup>125</sup>I）标记多肽。然后将该多肽给予动物。一段时间之后，处死该动物并取出其器官。可使用本领域已知的任何方式测量每个器官中放射性同位素的量。通过比较特定器官中标记的候选多肽的量和标记的对照多肽的量，可确定候选多肽进入和积累在特定组织中的能力。合适的阴性对照包括已知不能被有效地运输到特定细胞类型中的任何肽或多肽。

[0082] 表 1：示例性多肽

[0083] SEQ ID

[0084] NO：

[0085]	1	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D
[0086]	2	T	F	Q	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	T	E	K	E
[0087]	3	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	R	N	N	F	D	T	E	E	Y
[0088]	4	S	F	Y	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	E	E	E
[0089]	5	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
[0090]	6	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
[0091]	7	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	Y	K	R	A	K	Y
[0092]	8	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
[0093]	9	T	F	Q	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
[0094]	10	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
[0095]	11	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
[0096]	12	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
[0097]	13	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
[0098]	14	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	Y	K	R	A	K	Y
[0099]	15	P	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
[0100]	16	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	E	K	Y
[0101]	17	P	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	F	K	R	A	K	E
[0102]	18	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	D
[0103]	19	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	A	K	Y

[0104] 20 T F F Y G G C R G K K N N F K R A E Y  
 [0105] 21 P F F Y G G C G A N R N N F K R A K Y  
 [0106] 22 T F F Y G G C G G K K N N F K T A K Y  
 [0107] 23 T F F Y G G C R G N R N N F L R A K Y  
 [0108] 24 T F F Y G G C R G N R N N F K T A K Y  
 [0109] 25 T F F Y G G S R G N R N N F K T A K Y  
 [0110] 26 T F F Y G G C L G N G N N F K R A K Y  
 [0111] 27 T F F Y G G C L G N R N N F L R A K Y  
 [0112] 28 T F F Y G G C L G N R N N F K T A K Y  
 [0113] 29 T F F Y G G C R G N G N N F K S A K Y  
 [0114] 30 T F F Y G G C R G K K N N F D R E K Y  
 [0115] 31 T F F Y G G C R G K R N N F L R E K E  
 [0116] 32 T F F Y G G C R G K G N N F D R A K Y  
 [0117] 33 T F F Y G G S R G K G N N F D R A K Y  
 [0118] 34 T F F Y G G C R G N G N N F V T A K Y  
 [0119] 35 P F F Y G G C G G K G N N Y V T A K Y  
 [0120] 36 T F F Y G G C L G K G N N F L T A K Y  
 [0121] 37 S F F Y G G C L G N K N N F L T A K Y  
 [0122] 38 T F F Y G G C G G N K N N F V R E K Y  
 [0123] 39 T F F Y G G C M G N K N N F V R E K Y  
 [0124] 40 T F F Y G G S M G N K N N F V R E K Y  
 [0125] 41 P F F Y G G C L G N R N N Y V R E K Y  
 [0126] 42 T F F Y G G C L G N R N N F V R E K Y  
 [0127] 43 T F F Y G G C L G N K N N Y V R E K Y  
 [0128] 44 T F F Y G G C G G N G N N F L T A K Y  
 [0129] 45 T F F Y G G C R G N R N N F L T A E Y  
 [0130] 46 T F F Y G G C R G N G N N F K S A E Y  
 [0131] 47 P F F Y G G C L G N K N N F K T A E Y  
 [0132] 48 T F F Y G G C R G N R N N F K T E E Y  
 [0133] 49 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E D  
 [0134] 50 P F F Y G G C G G N G N N F V R E K Y  
 [0135] 51 S F F Y G G C M G N G N N F V R E K Y  
 [0136] 52 P F F Y G G C G G N G N N F L R E K Y  
 [0137] 53 T F F Y G G C L G N G N N F V R E K Y  
 [0138] 54 S F F Y G G C L G N G N N Y L R E K Y  
 [0139] 55 T F F Y G G S L G N G N N F V R E K Y  
 [0140] 56 T F F Y G G C R G N G N N F V T A E Y  
 [0141] 57 T F F Y G G C L G K G N N F V S A E Y  
 [0142] 58 T F F Y G G C L G N R N N F D R A E Y

[0143] 59 T F F Y G G C L G N R N N F L R E E Y  
 [0144] 60 T F F Y G G C L G N K N N Y L R E E Y  
 [0145] 61 P F F Y G G C G G N R N N Y L R E E Y  
 [0146] 62 P F F Y G G S G G N R N N Y L R E E Y  
 [0147] 63 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I  
 [0148] 64 A R I I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G  
 [0149] 65 Y G G C R A K R N N Y K S A E D C M R T C G  
 [0150] 66 P D F C L E P P Y T G P C V A R I I R Y F Y  
 [0151] 67 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 [0152] 68 K F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 [0153] 69 T F Y Y G G C R G K R N N Y K T E E Y  
 [0154] 70 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 [0155] 71 C T F F Y G C C R G K R N N F K T E E Y  
 [0156] 72 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y C  
 [0157] 73 C T F F Y G S C R G K R N N F K T E E Y  
 [0158] 74 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C  
 [0159] 75 P F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 [0160] 76 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y  
 [0161] 77 T F F Y G G K R G K R N N F K T E E Y  
 [0162] 78 T F F Y G G C R G K R N N F K T K R Y  
 [0163] 79 T F F Y G G K R G K R N N F K T A E Y  
 [0164] 80 T F F Y G G K R G K R N N F K T A G Y  
 [0165] 81 T F F Y G G K R G K R N N F K R E K Y  
 [0166] 82 T F F Y G G K R G K R N N F K R A K Y  
 [0167] 83 T F F Y G G C L G N R N N F K T E E Y  
 [0168] 84 T F F Y G C G R G K R N N F K T E E Y  
 [0169] 85 T F F Y G G R C G K R N N F K T E E Y  
 [0170] 86 T F F Y G G C L G N G N N F D T E E E  
 [0171] 87 T F Q Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 [0172] 88 Y N K E F G T F N T K G C E R G Y R F  
 [0173] 89 R F K Y G G C L G N M N N F E T L E E  
 [0174] 90 R F K Y G G C L G N K N N F L R L K Y  
 [0175] 91 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y  
 [0176] 92 K T K R K R K K Q R V K I A Y E E I F K N Y  
 [0177] 93 K T K R K R K K Q R V K I A Y  
 [0178] 94 R G G R L S Y S R R F S T S T G R  
 [0179] 95 R R L S Y S R R R F  
 [0180] 96 R Q I K I W F Q N R R M K W K K  
 [0181] 97 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y

[0182] 98 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I  
 [0183] I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G G  
 [0184] C R A K R N N F K S A E D C M R T C G G A  
 [0185] 99 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y  
 [0186] 100 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y  
 [0187] 101 T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y  
 [0188] 102 N A K A G L C Q T F V Y G G C L A K R N N F  
 [0189] E S A E D C M R T C G G A  
 [0190] 103 Y G G C R A K R N N F K S A E D C M R T C G  
 [0191] G A  
 [0192] 104 G L C Q T F V Y G G C R A K R N N F K S A E  
 [0193] 105 L C Q T F V Y G G C E A K R N N F K S A  
 [0194] 107 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 [0195] 108 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 [0196] 109 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 [0197] 110 R F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y  
 [0198] 111 T F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y  
 [0199] 112 T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y  
 [0200] 113 C T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 [0201] 114 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C  
 [0202] 115 C T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y  
 [0203] 116 T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y C

[0204] 注释：多肽编号 5、67、76 和 91 分别包括 SED ID NO :5、67、76 和 91 的序列，并在 C- 末端被酰胺化。

[0205] 多肽编号 107、109 和 110 分别包括 SED ID NO :97、109 和 110 的序列并在 N- 末端被乙酰化。

[0206] 经修饰的多肽

[0207] 本发明也包括具有本文描述的氨基酸序列的修饰的多肽（例如，具有在 SEQ ID NO :1-105 和 107-112 中任何一个，例如血管肽 -1 (SEQ ID NO :67) 或血管肽 -2 (SEQ ID NO :97) 中描述的序列的多肽）。在某些实施方式中，该修饰没有显著破坏期望的生物活性。在一些实施方式中，该修饰会导致生物活性降低（例如，降低至少 5%、10%、20%、25%、35%、50%、60%、70%、75%、80%、90% 或 95%）。在其他实施方式中，该修饰对生物活性没有影响，或会提高（例如，提高至少 5%、10%、25%、50%、100%、200%、500% 或 1000%）原始多肽的生物活性。经修饰的肽可以具有或可最优化本发明的多肽的一个或多个特性，在一些情况下所述特性可能是所需要的或者所期望的。这些特性包括体内稳定性、生物利用率、毒性、免疫活性、和免疫识别性 (immunological identity)。

[0208] 本发明的多肽可包括经天然过程，例如翻译后加工或通过本领域已知的化学修饰技术修饰的氨基酸或序列。修饰可以发生在多肽的任何位置，包括多肽主链、氨基酸侧链和氨基 - 或羧基 - 末端。在指定的多肽中的几个位点上可以存在相同或不同程度的相同

类型的修饰,且多肽可以含有多于一种类型的修饰。由于泛素化(ubiquitination,遍在蛋白化作用),多肽可以被支化,并且它们可以是具有或不具有分支的环状。环状、支化和支化环状多肽可由翻译后天然过程产生或可合成制得。其他修饰包括聚乙二醇化、乙酰化、酰化、加入乙酰氨基甲基(acetamidomethyl)(Acm)基团、ADP-核糖基化、烷基化、酰胺化、生物素化、甲氨酰化、羧乙基化、酯化、共价连接于黄素、共价连接于血红素部分、共价连接于核苷酸或核苷酸衍生物、共价连于药物、共价连接于标记物(例如,荧光性或放射性标记物)、共价连接于脂质或脂质衍生物、共价连接于磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、脱甲基、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 $\gamma$ -羧基化、糖基化、GPI锚形成(anchor formation)、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白质水解处理、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化(selenoylation)、硫酸盐化、转移-RNA介导的氨基酸添加至蛋白质如精氨酰化和泛素化。

[0209] 修饰的多肽可进一步包括多肽序列中的氨基酸插入、缺失、或置换,保守性或非保守性的(例如,D-氨基酸、脱氨基酸(desamino acid))(例如,其中这样的变化基本不改变多肽的生物活性)。

[0210] 置换可以是保守性的(即,其中残基被相同的通用类型或组的另一个残基替换)或非保守性的(即,其中残基被另一种类型的氨基酸替换)。另外,非天然存在的氨基酸可置换天然存在的氨基酸(即,非天然存在的保守性氨基酸置换或非天然存在的非保守性氨基酸置换)。

[0211] 合成制得的多肽可以包括不是由DNA天然编码的氨基酸(例如,非天然存在的氨基酸或非天然氨基酸)的置换。非天然存在的氨基酸的实例包括D-氨基酸、具有连接到半胱氨酸的硫原子上的乙酰氨基甲基基团的氨基酸、PEG化氨基酸、化学式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 的 $\omega$ 氨基酸(其中n为2~6)、中性非极性氨基酸如肌氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、和正亮氨酸。苯基甘氨酸可以置换Trp、Tyr、或Phe;瓜氨酸和蛋氨酸亚砷是中性非极性的,半胱氨酸是酸性的,而鸟氨酸是碱性的。脯氨酸可以被羟基脯氨酸置换并保留构象赋予的特性。

[0212] 类似物可通过置换突变产生并可保留原始多肽的生物活性。被确认为是“保守置换”的置换实例示于表2。如果这样的置换导致不期望的变化,则引入表2中的被称为“示例性置换”或如本文进一步描述的关于氨基酸类别的其他类型的置换并筛选产物。

[0213] 可以通过选择置换来实现功能或免疫学特性的实质性修饰,这些置换对于维持(a)置换区域内多肽主链的结构,例如,作为片层或螺旋构象,(b)靶位点上分子的电荷或疏水性,或(c)侧链大小(bulk)的效果显著不同。基于常见的侧链特性可将天然存在的残基分成几组:

[0214] (1) 疏水性:正亮氨酸、蛋氨酸(Met)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、组氨酸(His)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe),

[0215] (2) 中性亲水性:半胱氨酸(Cys)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)

[0216] (3) 酸性/带负电荷:天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)

[0217] (4) 碱性:天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)

[0218] (5) 影响链取向的残基:甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro);

- [0219] (6) 芳香族 :色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe)、组氨酸 (His),
- [0220] (7) 极性 :Ser、Thr、Asn、Gln
- [0221] (8) 碱性带正电荷 :Arg、Lys、His、和 ;
- [0222] (9) 带电荷 :Asp、Glu、Arg、Lys、His
- [0223] 其他保守性氨基酸置换在表 2 中列出。
- [0224] 表 2 :氨基酸置换

[0225]

原始残基	示例性置换	保守置换
Ala(A)	Val、Leu、Ile	Val
Arg(R)	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn(N)	Gln、His、Lys、Arg	Gln
Asp(D)	Glu	Glu
Cys(C)	Ser	Ser
Gln(Q)	Asn	Asn
Glu(E)	Asp	Asp
Gly(G)	Pro	Pro
His(H)	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile(I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys(K)	Arg、Gln、Asn	Arg
Met(M)	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe(F)	Leu、Val、Ile、Ala	Leu
Pro(P)	Gly	Gly
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr	Tyr

Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、正亮氨酸	Leu

[0226] 另外的类似物

[0227] 本发明的多肽、结合物和组合物可包括现有技术中已知的抑肽酶的多肽类似物。例如,美国专利第 5,807,980 号描述了牛胰蛋白酶抑制剂(抑肽酶)-衍生的抑制剂及其制备方法和治疗用途,其包括 SEQ ID NO:102 的多肽。这些肽已用于治疗以组织因子和/或因子 VIIIa 的异常表现或量为特征的病症,例如异常的血栓形成。美国专利第 5,780,265 号描述了能够抑制血浆激肽释放酶的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其包括 SEQ ID NO:103。美国专利第 5,118,668 号描述了牛胰蛋白酶抑制剂变体,其包括 SEQ ID NO:105。抑肽酶氨基酸序列 (SEQ ID NO:98)、血管肽-1 氨基酸序列 (SEQ ID NO:67)、和 SEQ ID NO:104,以及生物活性类似物的一些序列可在国际申请公开 WO 2004/060403 中找到。编码抑肽酶类似物的示例性核苷酸序列由 SEQ ID NO:106 示出 (atgagaccag atttctgect cgagccgccg tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcadc cgttacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgtcagacct tcgtatacgg cggctgcaga gctaagcgta acaacttcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgccg tggtgcttag; Genbank 登录号 X04666)。

[0228] 通过使用国际申请 PCT/CA2004/000011 中公开的合成抑肽酶序列(或其部分)进行蛋白质 BLAST (Genbank:www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/),可找到抑肽酶类似物的其他实例。根据登录号 CAA37967 (GI:58005) 和 1405218C (GI:3604747) 可找到示例性抑肽酶类似物。

[0229] 多肽衍生物和模拟肽的制备

[0230] 除了仅由天然存在的氨基酸组成的多肽之外,本发明还包括模拟肽或多肽类似物。多肽类似物通常在医药工业中用作非肽药物,其性能与模板多肽 (template polypeptide) 的性能类似。非肽化合物被称为“肽模拟物”或“模拟肽”(Fauchere 等人, Infect. Immun. 54:283-287, 1986; Evans et al, J. Med. Chem. 30:1229-1239, 1987)。可使用在结构上与治疗有用的肽或多肽相关的肽模拟物产生等效的或增强的治疗或预防效果。通常,模拟肽在结构上与范例多肽 (paradigm polypeptide) (即,具有生物或药物活性的多肽) 如与天然存在的受体结合的多肽相似,但其具有一个或多个肽键 (peptide linkage), 该肽键可选地通过本领域熟知的方法 (Spatola, Peptide Backbone Modifications, Vega Data, 1(3):267, 1983; Spatola 等人, Life Sci. 38:1243-1249, 1986; Hudson 等人, Int. j. Pept. Res. 14:177-185, 1979; 和 Weinstein. B., 1983, Chemistry and Biochemistry, of Amino Acids, Peptides and Proteins, Weinstein eds, Marcel Dekker, New-York) 被诸如  $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$  (顺式和反式)、 $-CH_2SO-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 、 $-COCH_2-$  等键 (或连接, linkage) 替换。与天然存在的多肽相比,此种多肽模拟物具有明显的优点,包括更经济的生产、更高的化学稳定性、增强的药理特性 (例如,半衰期、吸收、效能、效率)、降低的抗原性等等。

[0231] 尽管本文描述的多肽可有效地靶向于特定细胞类型 (例如,本文描述的这些),但由于蛋白酶的存在会使其效力降低。血清蛋白酶具有特殊的底物要求。该底物必须具有 L-氨基酸和用于剪切的肽键。而且,外肽酶表示血清中具有蛋白酶活性的最重要组分,通

常作用于多肽的第一肽键且需要自由的 N- 末端 (Powell 等人, Pharm. Res. 10 :1268-1273, 1993)。鉴于此,使用多肽的修饰形式 (version) 往往是有利的。经修饰的多肽保留了赋予与 IGF-1 有关的生物活性的原始 L- 氨基酸多肽的结构特性,但有利地的是,其不容易受到蛋白酶和 / 或外肽酶的剪切。

[0232] 用相同类型的 D- 氨基酸 (例如,对映体 ;D- 赖氨酸代替 L- 赖氨酸) 的系统置换 (Systematic substitution) 保守序列的一种或多种氨基酸可用于产生更加稳定的多肽。因而,本文描述的多肽衍生物或模拟肽可以都是 L-, 都是 D-, 或都是混合的 D, L 多肽。N- 末端或 C- 末端 D- 氨基酸的存在使多肽的体内稳定性增加,这是因为肽酶不能利用 D- 氨基酸作为底物 (Powell 等人, Pharm. Res. 10 :1268-1273, 1993)。反向 (reverse)-D 多肽是在相对于含有 L- 氨基酸的多肽的反向序列中含有 D- 氨基酸的多肽。因而, L- 氨基酸多肽的 C- 末端残基变成 D- 氨基酸多肽的 N- 末端, 等等。反向 D- 多肽保留了与 L- 氨基酸多肽相同的三级结构 (tertiary conformation), 因而保留了与 L- 氨基酸多肽相同的活性, 但对在体内和体外的酶促降解更为稳定, 因而具有比原始多肽更强的治疗效能 (Brady 和 Dodson, Nature 368 :692-693, 1994 ; Jameson 等, Nature 368 :744-746, 1994)。除了反向 -D- 多肽之外, 包含保守序列或基本相同的保守序列变体的约束多肽 (constrained polypeptide) 可通过本领域中所熟知的方法产生 (Rizo 和 Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61 :387-418, 1992)。例如, 约束多肽可通过添加能够形成二硫桥的半胱氨酸残基并从而产生环状多肽而产生。环状多肽没有自由的 N- 或 C- 端。因此, 它们不易受到通过外肽酶的蛋白水解的影响, 然而它们当然易受不在多肽末端进行剪切的内肽酶的影响。除了存在 N- 末端或 C- 末端的 D- 氨基酸残基, 或它们的环状结构外, 带有 N- 末端或 C- 末端的 D- 氨基酸多肽和环状多肽的氨基酸序列通常分别与它们对应的多肽序列相同。

[0233] 含有分子内二硫键的环状衍生物可通过常规的固相合成来制备, 而在所选择的成环的位置 (例如氨基和羧基端) 并入了合适的 S- 保护的半胱氨酸或高半胱氨酸残基 (Sah 等人, J. Pharm. Pharmacol. 48 :197, 1996)。链装配完成后, 可通过 (1) 选择性去除 S- 保护基团, 随后对相应的两个自由 SH- 官能团进行担载氧化 (on-support oxidation), 从而形成 S-S 键, 接着从载体中常规去除产物并进行合适的纯化步骤, 或 (2) 从载体中去除多肽并完成侧链脱保护, 接着在高度稀释的水溶液中氧化自由的 SH- 官能团, 而进行环化。

[0234] 含有分子内酰胺键的环状衍生物可通过常规的固相合成来制备, 同时也在所选择的成环的位置并入了合适的氨基和羧基侧链被保护的氨基酸衍生物。含有分子内 -S- 烷基键的环状衍生物可通过常规的固相化学制备, 同时也在所选择的成环的位置并入了带有合适的氨基 - 被保护的侧链和合适的 S- 被保护的半胱氨酸或高半胱氨酸残基的氨基酸残基。

[0235] 为作用于多肽的 N- 末端或 C- 末端残基赋予肽酶抗性的另一种有效方法是在多肽末端添加化学基团, 从而使经修饰的多肽不再是肽酶的底物。一种这样的化学修饰是在一端或在两端进行多肽的糖基化。某些化学修饰, 特别是 N- 末端糖基化, 已显示出可增加多肽在人体血清中的稳定性 (Powell 等人, Pharm. Res. 10 :1268-1273, 1993)。可提高血清稳定性的其他化学修饰包括, 但不限于, 添加由 1 ~ 20 个碳原子的低级烷基组成的 N- 末端烷基基团, 如乙酰基, 和 / 或添加 C- 末端酰胺或取代的酰胺基团。特别地, 本发明包括由带有 N- 末端乙酰基基团和 C- 末端酰胺基团的多肽组成的经修饰的多肽。

[0236] 本发明也包括其他类型的多肽衍生物, 这些多肽衍生物含有另外的不是多肽常规

部分的化学部分,条件是该衍生物保留该多肽的期望的功能活性。此种衍生物的实例包括(1)氨基末端或另一个自由氨基的N-酰基衍生物,其中该酰基可以是烷酰基(例如,乙酰基、己酰基、辛酰基)、芳酰基(例如,苯甲酰基)或封端基团(blocking group),例如F-moc(芴甲基-O-CO-);(2)羧基末端或另一个自由羧基或羟基的酯;(3)羧基末端或另一个通过与氨或与合适的胺反应制得的自由羧基的酰胺;(4)磷酸化衍生物;(5)结合到抗体或其他生物配体上的衍生物和其他类型的衍生物。

[0237] 本发明也包括由在本文描述的多肽中加入另外的氨基酸残基产生的较长的多肽序列。可以预期此种较长的多肽序列具有与上述多肽相同的生物活性和特异性(例如,细胞嗜性和)。尽管没有排除具有相当数量的另外氨基酸的多肽,但认识到一些大的多肽会呈现出一种遮盖有效序列的构象,从而阻止其结合到靶上(例如,LRP受体家族的成员,例如LRP或LRP2)。这些衍生物可用作竞争性拮抗剂。因而,当本发明包括本文描述的具有延伸(extension)的多肽或多肽衍生物时,该延伸不毁坏多肽或其衍生物的细胞靶向活性是所期望的。

[0238] 包括在本发明中的其他衍生物是由本文描述的两个相同的,或两个不同的多肽组成的双重多肽(dual polypeptides),其中这两个多肽彼此直接共价连接,或通过间隔物(spacer),例如通过丙氨酸残基的短伸展(short stretch)或通过用于蛋白质水解的推定位点(putative site)(例如,通过组织蛋白酶,参见例如美国专利第5,126,249号和欧洲专利第495 049号)连接。本文描述的多肽多聚体由相同或不同多肽或其衍生物形成的分子聚合体组成。

[0239] 本发明也包括含有本文描述的多肽、或其片段的作为嵌合或融合蛋白的多肽衍生物,其中该多肽、或其片段的氨基-或羧基端、或二者连接到不同蛋白质的氨基酸序列。这样的嵌合或融合蛋白可通过编码蛋白质的核酸的重组表达产生。例如,嵌合或融合蛋白可含有至少6个与所述多肽之一共用的氨基酸,所述的多肽可期望的是产生具有等价或更强的功能活性的嵌合或融合蛋白。

[0240] 通过借助于取代、添加、或缺失改变氨基酸序列或通过改变氨基酸残基,以根据需要提供功能等价的分子、或功能增强或减小的分子,从而能够制得本文描述的多肽衍生物。该多肽衍生物包括,但不限于,含有本文描述的多肽的氨基酸序列的全部或部分(例如,VEGFR多肽2.1、2.2或2.3,或者APG-201、APG-202、APG-203、APG-204、APG-205或APG-206肽,或者API-101、API-103或API-106肽,或者API-401、API-402、API-403、API-404或API-405多肽)作为主要的氨基酸序列,包括含有功能等价的氨基酸残基的置换的改变序列的那些多肽衍生物。例如,在该序列内的一个或多个氨基酸残基能够被另一个相似极性的氨基酸所置换,该相似极性的氨基酸作为功能等价物,导致沉默改变(silent alteration)。序列内氨基酸的置换可选自该氨基酸所属类别的其他成员。例如,带正电荷的(碱性的)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。非极性的(疏水性的)氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸、色氨酸和蛋氨酸。不带电荷的极性氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带负电荷的(酸性)氨基酸包括谷氨酸和天冬氨酸。氨基酸甘氨酸可包括在非极性氨基酸家族或不带电荷的(中性的)极性氨基酸家族中。氨基酸家族中进行的置换通常应理解为保守置换。

[0241] 识别模拟肽的试验

[0242] 如上文所述,生成的用于复制本文描述的多肽的骨架几何结构和药效团表现(模拟肽)的非肽基化合物通常具有的性质为更高的代谢稳定性、更高的效力、更长的作用持久性和更好的生物利用率。

[0243] 使用本领域中已知的组合文库(combinatorial library)方法中许多途径中的任一途径可获得本发明的模拟肽化合物,该组合文库方法包括:生物文库;空间可定位平行固相或液相文库(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries);需要去卷积的合成库方法;“一珠一化合物”(one-bead one-compound)库方法;和使用亲和色谱选择的合成库方法。生物文库途径限于肽文库,而其他四个途径可适用于肽、非肽低聚体或化合物的小分子文库(Lam, Anticancer Drug Des. 12:145,1997)。在本领域中可找到合成分子库的方法实例,例如:DeWitt 等人,(Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:6909,1993);Erb 等人,(Proc. Natl Acad. Sci. USA 91:11422,1994);Zuckermann 等人,(J. Med. Chem. 37:2678,1994);Cho 等人,(Science 261:1303,1993);Carell 等人,(Angew. Chem, Int. Ed. Engl. 33:2059,1994 and ibid 2061);和在 Gallop 等人,(Med. Chem. 37:1233,1994)。化合物文库可存在于溶液中(例如,Houghten, Biotechniques 13:412-421,1992)或珠(bead)上(Lam, Nature 354:82-84,1991)、芯片(chip)上(Fodor, Nature 364:555-556,1993)、细菌或孢子上(美国专利 No. 5,223,409)、质粒上(Cull 等人, Proc. Natl Acad. Sci. USA 89:1865-1869,1992)或噬菌体上(Scott 和 Smith, Science 249:386-390,1990)、或萤光素酶上、以及酶标记上,该酶标记可通过确定合适的底物转化为产物来检测。

[0244] 识别了本文描述的多肽后,可通过许多标准方法对其进行分离和纯化,这些方法包括,但不限于,差别溶解度法(例如,沉淀)、离心法、色谱法(例如,亲和色谱、离子交换色谱、体积排阻色谱等),或可通过纯化肽、模拟肽或蛋白质的任何其他标准技术来进行。使用本领域中已知的任何功能试验,可评估经识别的感兴趣的多肽的功能特性。理想的是,使用评估细胞内信号传导(intracellular signaling)中的下游受体功能的试验(例如,细胞增殖)。

[0245] 例如,本发明的模拟肽化合物可使用下面三阶段过程获得:(1)扫描本文描述的多肽,从而识别靶向于本文描述的特定细胞类型所需要的二级结构区域;(2)使用构象约束的二肽替代物以修饰(refine)主链几何结构并提供对应于这些替代物的有机平台(organic platform);和(3)利用最佳有机平台显示设计的候选物库中的有机药效团,从而模拟天然多肽的期望活性。这三个阶段更详细地说明如下。在阶段1中,扫描导向候选多肽(lead candidate polypeptide)并删减它们的结构从而识别它们的活性要求。合成一系列原始的多肽类似物。在阶段2中,利用构象约束二肽替代物来研究最佳的多肽类似物。吡啶里西啶-2-酮(indolizidin-2-one)、吡啶里西啶-9-酮和喹诺里西啶氨基酸(quinolizidinone amino acid)(分别为 I<sup>2</sup>aa、I<sup>9</sup>aa 和 Qaa)可用作平台,用以研究最佳肽候选物的主链几何结构。可在多肽的特异区域引入这些和相关的平台(在 Halab 等人, Biopolymers 55:101-122,2000;和 Hanessian 等人, Tetrahedron 53:12789-12854,1997 中综述),从而使药效团在不同方向取向。这些类似物的生物学评价识别模拟活性要求的几何结构的改进的导向多肽。在并行的合成形式(format)下组合药效团和支架(scaffold)。使用本领域中已知方法通过其他手段也可完成多肽和上述阶段的衍生。

[0246] 从多肽、多肽衍生物、模拟肽或本文描述的其他小分子确定的结构功能关系可用于改进 (refine) 和制备具有相似或更佳特性的类似分子结构。因此,本发明的化合物也包括共有本文描述的多肽的结构、极性、电荷特性和侧链特性的分子。

[0247] 总之,基于本文的公开内容,本领域技术人员可开发用于识别使药剂靶向于特定细胞类型(例如,本文公开的这些)的化合物的肽和模拟肽的筛选试验。本发明的试验可发展用于低产量、高产量或超高产量的筛选形式。本发明的试验包括可适合于自动化的试验。

#### [0248] 核酸

[0249] 本文描述的多肽可结合到任何核酸上。因此,多肽可用作载体,从而使结合的核酸靶向于特定的细胞、组织或器官并将其运输到特定的细胞、组织或器官,或穿过 BBB。结合的核酸可包括表达载体(例如,质粒)和治疗性核酸(例如, RNAi 药剂)。核酸包括本领域已知的任何类型,例如任何长度、构象、电荷或形状(即,线性、连环体(concatemer)、圆形(例如,质粒)、缺口圆、螺旋、超螺旋或带电荷的)的双链和单链 DNA 和 RNA 分子。另外,该核酸可含有 5' 和 3' 末端修饰且包括在这些末端的平的和突出的核苷酸,或其结合。在本发明的某些实施方式中,该核酸是能够使靶向基因产物沉默的 RNA 干扰序列(例如, siRNA、shRNA、miRNA 或 dsRNA 核苷酸序列)或编码该序列。该核酸可以是,例如, DNA 分子、RNA 分子或其修饰形式。

#### [0250] 表达载体

[0251] 在某些实施方式中,核酸能够在细胞中被表达。该核酸可以编码多肽(例如,治疗性多肽)或可以编码治疗性核酸(例如, RNAi 药剂,例如本文描述的这些)。可使用本领域中已知的任何表达系统(例如,质粒)并可使用本领域中已知的表达系统(例如,质粒)治疗任何合适的疾病。在示例性途径(Horton 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 1553-1558, 1999)中,向患有癌症的对象给予编码细胞因子(干扰素  $\alpha$ )的质粒。进入细胞之后,该细胞因子基因通过细胞转录和翻译途径而表达,从而产生细胞因子蛋白质,该细胞因子蛋白质又抑制肿瘤增殖。其他途径描述在,例如 Mahvi 等人, Cancer Gene Ther. 14 : 717-723, 2007 中。此时,将表达 IL-12 的质粒注入转移性肿瘤中,从而导致肿瘤尺寸减小。因为本发明的结合物能够使核酸靶向于包括癌细胞的特定细胞类型,因此使核酸结合到载体上就能够系统递送这样的核酸。诸如心血管障碍等疾病可使用相似的治疗方法来治疗。使用编码生长因子的质粒载体,诸如 FGF-2 等生长因子可给予遭受心肌缺血之苦的患者。将质粒 DNA 运输至诸如肝等组织中,对于治疗或预防癌症,例如肝细胞瘤,或其他肝癌,也是合乎需要的。参见,例如, Chou <http://www.nature.com/cgt/journal/v13/n8/abs/7700927a.html-aff1> 等, Cancer Gene Ther. 13 : 746-752, 2006。

[0252] 其他途径包括使用结合到 DNA 质粒的多肽,该 DNA 质粒编码 shRNA 核苷酸序列(例如, EGFR)。在靶细胞中局部化后, shRNA 分子由质粒转录,在经 Dicer 处理之后,导致靶基因产物的下调。在另一个实施方式中,本发明的多肽载体结合到病毒核酸或病毒颗粒上(例如,腺病毒、逆转录病毒),该病毒颗粒携带病毒基因组,该病毒基因组携带重组 siRNA 序列。运输到靶细胞中或通过 BBB 后,病毒核酸或颗粒结合并转导(transduce)靶细胞。该病毒基因组因而在靶细胞中表达,允许治疗性分子的转录。

#### [0253] RNA 干扰

[0254] RNA干扰 (RNAi) 是通过引起特异性 RNA 分子降解或阻碍特异基因的转录来抑制基因表达的机制。在性质上, RNAi 靶通常是来自病毒和转座子 (一种固有免疫应答的形式) 的 RNA 分子, 然而它在调节发育和基因组维持中也发挥作用。RNAi 机制的关键是小干扰 RNA 链 (siRNA), 小干扰 RNA 链具有与靶向的信使 RNA (mRNA) 分子互补的核苷酸序列。在 RNAi 途径内 siRNA 引导蛋白质到靶向 mRNA 并降解它们, 将它们分解成不再能被翻译成蛋白质的更小部分。

[0255] 该 RNAi 途径由酶 Dicer 启动, 酶 Dicer 将长的双链 RNA (dsRNA) 分子剪切成长度通常为约 21 ~ 约 23 个核苷酸并含有约 19 个碱基对双链体的 siRNA 分子。每个片段的双链中的被称为引导链 (guide strand) 的那一条然后被合并到 RNA 诱导沉默复合体 (RISC) 中并与互补的序列配对。RISC 介导具有与 siRNA 双链体的反义链互补的序列的单链 RNA 的剪切。靶 RNA 的剪切发生在与 siRNA 双链体的反义链互补的区域中间。这种识别事件的结果是转录后基因沉默。这将发生在引导链特异性地与 mRNA 分子配对时, 并通过 RISC 复合体的催化组分 Argonaute 诱导降解。

[0256] 本发明中的 RNAi 技术的应用可以多种方式出现, 每种方式均导致感兴趣的基因 (表皮生长因子受体 (EGFR)) 的功能沉默。用结合到本文描述的载体多肽上的 siRNA 分子 (例如, 血管肽 -2, SEQ ID NO :97) 可实现 RNAi。在另一个实施方式中, RNAi 药剂被构建成含有发夹序列 (即, shRNA, 例如 21-bp 发夹), 该发夹序列表示指向 (direct against) 感兴趣基因的序列。siRNA、shRNA、dsRNA、miRNA, 或其他 RNAi 药剂被引入靶细胞中并降低靶 mRNA 和蛋白质表达。

[0257] 由 RNAi 药剂引起的功能基因沉默不必包括靶向基因产物的完全抑制。在一些情况下, 在宿主细胞、组织、器官, 或动物体内, 由 RNAi 药剂引起的基因产物表达的微小降低会转化为显著的功能或表型变化。所以, 基因沉默应当理解为功能等价物且实现沉默的基因产物的降解程度在基因靶或宿主细胞类型之间有所不同。基因沉默可使基因产物表达降低 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、或 10%。优选地, 使基因产物表达降低 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或 100% (即, 完全抑制)。

[0258] siRNA

[0259] 在本发明中, 小干扰 RNAs (siRNA) 代表一种重要的 RNAi 方式。某些 siRNA 基序 (motif) 被普遍使用。例如, siRNA 可以是短的 (通常为 21-nt)、双链 RNA (dsRNA)。许多 siRNA 分子, 例如, 在 3' 端具有 1 或 2 个核苷酸突出, 但也可可是平端的。每个链都具有 5' 磷酸基和 3' 羟基 (-OH)。大多数 siRNA 分子的长度为 18 ~ 23 个核苷酸, 然而技术人员可改变序列长度, 从而提高或降低基因沉默的整体水平。可通过各种方法将 siRNA 外源性 (即, 人工) 引入到细胞中, 从而引起感兴趣基因的特异性抑制 (knockdown)。因此可基于与经过适当改进 (tailored) 的 siRNA 的序列互补性, 对已知序列的几乎任何基因进行靶向 (targeted)。siRNA 是指能够以序列特异性方式抑制或下调基因表达的核酸分子, 参见, 例如, Zamore 等人, Cell 101:25-33 (2000); Bass, Nature 411:428-429 (2001); Elbashir 等人, Nature 411:494-498 (2001); 和 Kreutzer 等人, 国际 PCT 公开 WO 00/44895; Zernicka-Goetz 等人, 国际 PCT 公开 WO 01/36646; Fire, 国际 PCT 公开 WO 99/32619; Plaetinck 等人, 国际 PCT 公开 WO 00/01846; Mello 和 Fire, 国际 PCT 公开 WO 01/29058; Deschamps-Depaillette, 国际 PCT 公开 WO 99/07409; 以及 Li 等人, 国际 PCT 公开 WO

00/44914。制备用于基因沉默的 siRNA 分子的方法描述在美国专利第 7,078,196 号中,其通过引用合并于本文中。

[0260] shRNA

[0261] 可使用短发夹 RNA (shRNA) 分子代替 siRNA,从而实现靶向的基因沉默。shRNA 是单链 RNA 分子,其中存在紧密的发卡环结构,使得同一链内的互补的核苷酸可以成键。对于某些应用,shRNA 可以优于 siRNA,因为该发夹结构降低了 RNA 分子对核酸酶降解的敏感性。一旦 shRNA 在靶细胞内时,shRNA 就被处理并通过与上述描述的 siRNA 机制相同的机制进行基因沉默。细胞酶 Dicer 负责将进入靶细胞的 shRNA 分子剪切成用于基因沉默的最佳 siRNA 分子。

[0262] dsRNA

[0263] 双链 RNA (dsRNA) 可用作 RNAi 药剂。任何可被酶 Dicer 剪切成更小的最佳 siRNA 分子的双链 RNA 均可结合到用作 RNAi 药剂的本发明的多肽上,其中该 siRNA 分子靶向于特定的 mRNA。制备用作 RNAi 药剂的 dsRNA 的方法描述在美国专利第 7,056,704 号中,其通过引用合并于本文中。

[0264] miRNA

[0265] 微小 RNA (miRNA) 表示本发明的另一种 RNAi 药剂。miRNA 是单链 RNA 分子,其可使用与 siRNA 和 shRNA 药剂相同或相似的机制沉默靶基因。miRNA 可结合到本发明的多肽上,从而沉默靶基因。长度为 21 ~ 23 个核苷酸的 miRNA 分子对于基因沉默应用通常是最有效的。然而,技术人员可改变该序列长度,从而增大或减少基因沉默的整体水平。

[0266] RNAi 基因靶

[0267] 本发明的特征为疾病组织或器官中的靶基因的沉默,该沉默是用多肽-核酸结合物治疗而实现的。该结合物能够穿过 BBB 或有效地靶向于特定的细胞(例如,肝细胞)。一旦进入细胞, RNAi 药剂就能够脱离于载体并进入上文中讨论的 RNAi 沉默途径。本发明的治疗潜力在已知或被认为涉及疾病状态(例如,癌症)的建立或维持的特异性 mRNA 分子和靶向基因被 RNAi 药剂降解时实现。可与本发明一起使用的 RNAi 靶的实例包括生长因子(例如,表皮生长因子 (EGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ))、生长因子受体,包括受体酪氨酸激酶(例如,EGF 受体 (EGFR),包括 Her2/neu (ErbB)、VEGF 受体 (VEGFR)、血小板-衍生的生长因子受体 (PDGFR)、细胞因子、趋化因子、激酶,包括细胞质酪氨酸和丝氨酸/苏氨酸激酶(例如粘着斑激酶、细胞周期蛋白依赖性激酶、SRC 激酶、syk-ZAP70 激酶、BTK 激酶、RAF 激酶、MAP 激酶(包括 ERK)和 Wnt 激酶)、磷酸酶、调节性鸟苷三磷酸酶 (GTPases)(例如 Ras 蛋白)、转录因子(例如 MYC)、激素和激素受体(例如雌激素与雌激素受体)、抗凋亡分子(例如,存活素、Bcl-2、Bcl-xL)、肿瘤基因(例如肿瘤抑制调节剂,例如 mdm2)、酶(例如超氧化物歧化酶 1 (SOD-1)、 $\alpha$ ,  $\beta$  (BACE),和  $\gamma$ -分泌酶、 $\alpha$ -L-艾杜糖苷酸酶、艾杜糖醛酸硫酸酯酶、乙酰肝素 N-硫酸酯酶、 $\alpha$ -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、乙酰基-Co(辅) $\alpha$ -葡萄糖氨基苷乙酰转移酶、N-乙酰葡萄糖氨基 6-硫酸酯酶、N-乙酰半乳糖氨基 4-硫酸酯酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、鞘磷脂酶、葡萄糖脑苷脂酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶-A、神经酰胺酶、半乳糖(基)神经酰胺酶、芳香基硫酸酯酶 A、天冬氨酸酰胺酶、植烷酸辅酶 A 羟化酶 (phytanoyl-CoA hydroxylase)、peroxin-7、 $\beta$ -己糖胺酶 A、天冬氨酸酰胺葡萄糖苷酶、岩藻糖苷酶、和  $\alpha$ -甘露糖苷酶、唾液酸酶),和其他蛋白质(例如亨廷顿蛋白 (Htt 蛋白)、淀

粉样前蛋白 (APP)、分拣连接蛋白 (包括 SNX6)、 $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein)、LINGO-1、Nogo-A、和 Nogo 受体 1 (NgR-1), 和胶质细胞原纤维酸性蛋白。表 3 示出了示例性 RNAi 靶与疾病之间的关系, 其不是要限制本发明的范围。

[0268] 用于沉默 EGFR 的示例性 RNAi 序列是 SEQ ID NO:117 (GGAGCUGCCCAUGAGAAAU) 和 SEQ ID NO:118 (AUUUCUCAUGGGCAGCUCC)。相似地, 可用具有诸如 SEQ ID NO:119 (GGAGTACCCTGATGAGATC) 中列出的序列的 RNAi 分子沉默 VEGF。用在本发明的药剂中的另外的 RNAi 序列可以是商购的 (例如, Dharmacon、Ambion) 或技术人员可使用多个可公开获得的软件工具之一, 用以构建可行的 RNAi 序列 (例如, MIT/Whitehead 维护的 siRNA 选择服务器; 可在 <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/> 中获得)。表 3 中示出了疾病或病症的实例和在这样的疾病的治疗中有用的 RNAi 靶。

[0269] 表 3: 示例性疾病和靶分子

[0270]

疾病/病症	RNAi 靶分子
<b>癌症</b>	
恶性胶质瘤	表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮生长因子 (VEGF)
神经胶质瘤	EGFR、VEGF
星形细胞瘤	EGFR、VEGF
成神经母细胞瘤	EGFR、VEGF
肺癌	EGFR、VEGF
乳腺癌	EGFR、VEGF
肝细胞癌	EGFR、VEGF
<b>神经变性疾病</b>	
亨廷顿氏舞蹈病	亨廷顿蛋白 (Htt)
帕金森氏病	$\alpha$ -突触核蛋白
阿尔茨海默氏病	淀粉样前蛋白 (APP)、早老素-1 或-2、载脂蛋白 E (ApoE)
肌萎缩侧索硬化症	超氧化物歧化酶 1 (SOD-1)
多发性硬化症	分拣连接蛋白-6(SNX6)、LINGO-1、Nogo-A、NgR-1、APP
<b>溶酶体贮积病</b>	
MPS-I (赫尔利综合症、沙伊综合症)	$\alpha$ -L-艾杜糖苷酸酶
MPS-II (亨特综合症)	艾杜糖醛酸硫酸酯酶
MPS-IIIA (山菲立普综合症 A)	乙酰肝素 N-硫酸酯酶
MPS-IIIB (山菲立普综合症 B)	$\alpha$ -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶
MPS-IIIC (山菲立普综合症 C)	乙酰基-辅 (Co) $\alpha$ -氨基葡萄糖苷乙酰转移酶
MPS-IIID (山菲立普综合症 D)	N-乙酰葡萄糖氨基 6-硫酸酯酶
MPS-VI (马洛托--拉米氏症)	N-乙酰葡萄糖氨基 4-硫酸酯酶
MPS-VII (Sly 综合症)	$\beta$ -葡萄糖醛酸酶
尼曼-皮克病	鞘磷脂酶
高歇氏病 (Gaucher's disease)	葡萄糖脑苷脂酶
法布里病(Fabry disease)	$\alpha$ -半乳糖苷酶-A
法伯氏病(Farber's disease)	神经酰胺酶
克拉伯病(Krabbe disease)	半乳糖 (基) 神经酰胺酶
异染性脑白质病变	芳香基硫酸酯酶 A
亚历山大病 (Alexander disease)	胶质细胞原纤维酸性蛋白
卡纳万病(Canavan disease)	天冬氨酸酰胺酶
雷弗素姆氏病(Refsum's disease)	植烷酸辅酶 A 羟化酶或 peroxin-7
GM1 神经节苷脂贮积病	$\beta$ -半乳糖苷酶
GM2 神经节苷脂贮积病 (例如, 泰-萨二氏病和桑德霍夫病)	$\beta$ -氨基己糖苷酶 A
天冬氨酸葡萄糖胺尿症	天冬氨酸氨基葡萄糖苷酶 (AGA) .
墨角藻糖苷酶缺乏病	岩藻糖苷酶
甘露糖苷过多症	$\alpha$ -甘露糖苷酶
粘脂贮积病 (唾液酸沉积症)	唾液酸酶

[0271] 经修饰的核酸

[0272] 在本发明的结合物中可使用包括经修饰的 RNA 分子的经修饰的核酸 (即, 核苷酸类似物)。经修饰的核酸可改进本文描述的核酸的半衰期、稳定性、特异性、递送、溶解性

和抗核酸酶性质。例如, siRNA 药剂可以部分或全部由赋予上述有利性质的核苷酸类似物组成。如 Elmen 等人, (Nucleic Acids Res. 33(1) :439-447 (2005)) 中所描述的, 合成的、RNA-样 (RNA-like) 核苷酸类似物 (例如, 锁核酸 (LNA)) 可用于构建显示沉默靶基因产物的活性的 siRNA 分子。

[0273] 经修饰的核酸包括这样的分子, 即其中核酸组分中一个或多个, 即, 糖、碱基和磷酸盐部分不同于天然存在的, 优选不同于人体中存在的。核苷替代物是其中核糖磷酸骨架被非核糖磷酸构建体, 例如, 不带电荷的核糖磷酸骨架的模拟物替代的分子, 其中非核糖磷酸构建体允许碱基存在于恰当的 (correct) 空间关系中, 使得杂交与用核糖磷酸骨架所观察到的基本相似。

[0274] 修饰能够被合并到任何双链 RNA (例如, 任何 RNAi 药剂 (siRNA、shRNA、dsRNA 或 miRNA)) 中。RNA-样 DNA 和本文描述的 DNA-样分子, 修饰核酸的反义链和有义链中的一条或全部是理想的。因为核酸是亚基或单体的聚合物, 下述许多修饰发生在核酸内重复的位置上, 例如, 碱基、或磷酸盐部分、或磷酸盐部分的未连接 O 的修饰。在一些情况下, 该修饰可发生在核酸中所有目标位置 (subject position) 上, 但是在许多, 实际上是在大部分情况下, 该修饰并没有发生在核酸中所有目标位置上。例如, 修饰可以仅发生在 3' 或 5' 末端位置上, 可以仅发生在末端区域, 例如在末端核苷酸, 或链中最后 2、3、4、5 或 10 个核苷酸的位置上。修饰可以发生在双链区域、单链区域、或这二者上。例如, 在未连接的 O 位置上的磷硫酰修饰可以仅发生在一端或二端, 可以仅发生在末端区域, 例如在末端核苷酸或在链中最后 2、3、4、5 或 10 个核苷酸位置上, 或可以发生在双链或单链区域中, 特别是在末端。相似地, 修饰可发生在有义链、反义链, 或二者上。在一些情况下, 有义链和反义链可以具有相同的修饰或相同类别的修饰, 但在其他情况下, 有义链和反义链可以具有不同的修饰, 例如, 在一些情况下, 仅修饰一个链 (例如有义链) 是理想的。

[0275] 在本文描述的核酸中引入修饰的两个主要目的是增强对其的保护以免受生物环境中的降解以及改进药理特性, 例如在下面进一步讨论的药效特性。对于核酸的糖、碱基或骨架的其他合适的修饰描述在 PCT 申请 PCT/US2004/01193 中, 该申请通过引用合并于本文。核酸可包括非天然存在的碱基, 例如 PCT 申请 PCT/US2004/011822 中描述的碱基, 该申请通过引用合并于本文。核酸可包括非天然存在的糖, 例如, 非碳水化合物环形载体分子。用于本文描述的核酸中的非天然存在的糖的示例性特征描述在 PCT 申请 PCT/US2004/11829 中, 该申请通过引用合并于本文。

[0276] 本文描述的核酸中的任何一个可包括对提高抗核酸酶性有用的核苷酸间连接 (例如, 磷硫酰键)。另外, 或可替代地, 核酸可包括用于提高抗核酸酶性的核糖模拟物 (ribose mimic)。用于提高抗核酸酶性的示例性核苷酸间连接和核糖模拟物描述在美国专利申请公开 2005/0164235 中, 该申请通过引用合并于本文。

[0277] 本文描述的任何核酸可包括配体结合的单体亚基和用于寡核苷酸合成的单体。示例性单体描述在美国专利申请公开 2005/0107325 中, 该申请通过引用合并于本文。

[0278] 任何核酸可具有 ZXY 结构, 例如美国专利申请公开 2005/0164235 中所描述的。

[0279] 任何核酸均可与两亲部分 (amphipathic moiety) 复合, 示例性的用于与 RNAi 药剂一起使用的两亲部分描述在美国专利申请公开 2005/0164235 中。

[0280] 多肽与核酸的结合

[0281] 本发明的多肽与核酸的结合可通过本领域已知的任何方式完成。核酸可直接结合到多肽上或可通过接头结合到多肽上。

[0282] 多肽与核酸之间的连接是可剪切的或不可剪切的。在一个实例中,引入了多肽与 siRNA 分子之间的二硫键。图 2 中使用血管肽-2(SEQ ID NO:97) 和靶向 EGFR 的 siRNA 作为实例,示出了这个过程。用交联剂磺基-LC-SPDP 修饰血管肽-2,允许两个分子经由可剪切的二硫键结合。一般地,该结合物已进入靶细胞后,本发明的多肽与 RNAi 药剂之间的化学结合是可剪切的,从而使得 RNAi 药剂(例如,siRNA)发挥它的基因沉默功能。可剪切的连接包括酯键,该酯键可结合到核酸分子上的任何自由羟基上。其他可剪切接头包括二硫键。不可剪切连接可通过硫化物-氨基键发生。

[0283] 在使用接头的实施方式中,该接头可以是双功能的接头(例如,同型双功能和异型双功能接头)。异型双功能接头交联剂包括 EMCS([N-ε-马来酰亚胺基己酰氧基]琥珀酸亚胺酯)、马来酰亚胺基-己酸(MHA)、MBS(m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酸亚胺酯)、磺基 MBS(m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酸亚胺酯)、GMBS(N-γ-马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酸亚胺酯、磺基 GMBS(N-γ-马来酰亚胺基丁酰氧基磺基琥珀酸亚胺酯)、EMCH(N-(ε-马来酰亚胺基己酸)酰肼)、EMCS(N-(ε-马来酰亚胺基己酰氧基)琥珀酸亚胺酯)、磺基 EMCS(N-(ε-马来酰亚胺基己酰氧基)磺基琥珀酸亚胺酯)、PMPI(N-(对-马来酰亚胺基苯基)异氰酸酯)、SIAB(N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)、SMCC(琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)、SMPB(琥珀酰亚胺基 4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯)、磺基 SIAB(N-磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)、磺基 SMCC(磺基琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)、磺基 SMPB(磺基琥珀酰亚胺基 4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯)、EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺盐酸盐)、MAL-PEG-SCM(马来酰亚胺 PEG 琥珀酰亚胺基羧甲基)、ABH(p-叠氮基苯甲酰肼)、ANB-NOS(N-5-叠氮基-2-硝基苄氧基琥珀酰亚胺)、APDP(N-(4-[对-叠氮基水杨酰胺基]丁基)-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺)、NHS-ASA(N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸)、磺基 HSAB(N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯)、磺基 SAED(磺基琥珀酰亚胺基 2-(7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸胺基)乙基-1,3-二硫代丙酸酯)、磺基 SAND(磺基琥珀酰亚胺基 2-(m-叠氮基-邻-硝基苯甲酰氨基)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯)、磺基 SANPAH(磺基琥珀酰亚胺基 6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯氨基)己酸酯、磺基 SADP(磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫代丙酸酯)和磺基 SASD(磺基琥珀酰亚胺基-2-(对-叠氮基水杨酰胺基)乙基-1,3-二硫代丙酸酯)。示例性同型双功能交联剂包括 BSOCOES(双(2-[琥珀酰亚胺基氧基羰氧基]乙基)砒)、DPDPB(1,4-二-(3'-[2'-吡啶基二硫代]-丙酰胺基)丁烷)、DSS(二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、DST(二琥珀酰亚胺基酒石酸酯)、磺基 DST(磺基二琥珀酰亚胺基酒石酸酯)、DSP(二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯))、DTSSP(3,3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯))、EGS(乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯))、和 BASED(双(β-[4-叠氮基水杨酰胺基]-乙基)二硫化物)。

[0284] 在一个实例中,使用酸酐接头(琥珀酐和戊二酐)将羟基(例如,在 siRNA 分子上)可剪切地连接到胺基(例如,在肽载体上)。

[0285] 在一些情况下,有利的是,将 siRNA、shRNA 或 dsRNA 分子的有义链连结到多肽,因

为反义链在基因沉默之前首先需要磷酸化。

[0286] 其他方法和交联剂也可用于连结本发明的多肽和 RNAi 药剂。例如,含有 5' 和 3' 硫醇的 siRNA 有义链可在多肽的氨基或羧基末端上通过二硫键连接到半胱氨酸残基上。Muratovska 等人., (FEBS Letters 558 :63-68(2004)) 和 Turner 等人., (Blood Cells, Molecules, and Diseases 38 :1-7(2007)) 提供了用于将多肽结合到 RNA 分子上的示例性化学键合方法并通过引用合并于本文。

[0287] 基因治疗方式

[0288] 除了向对象给予多肽 - 核酸结合物之外,本发明还包括增加其他的基因治疗方式,从而改进到靶细胞、组织或器官的运输和对靶细胞、组织或器官的特异性。

[0289] 脂质复合体 (lipoplexes) 和聚合物复合体 (polyplexes)

[0290] 为了改进本发明的结合物递送进入细胞,必须保护核酸不受损害且必须使核酸容易进入细胞。为了这个目的,创建了具有在转染过程保护核酸免受不希望的降解损害的能力的新分子,脂质复合体 (lipoplex) 和聚合物复合体 (polyplex)。例如,本发明的结合物可被脂质覆盖成类似于胶团 (micelle) 或脂质体的组织结构。当该组织结构与核酸复合时,它被称为脂质复合体。有三种类型的脂质,阴离子型的 (带负电荷的)、中性的,或阳离子型的 (带正电荷的)。利用阳离子脂质的脂质复合体已证明对基因转移是有用的。由于阳离子脂质带正电荷,因此其容易地 (naturally) 与带负电荷的核酸复合。也由于它们带电荷,它们与细胞膜相互作用,发生脂质复合体的内吞作用,且多肽 - 核酸结合物被释放到细胞质中。阳离子脂质也可防止核酸被该细胞降解。

[0291] 聚合物与核酸的复合体称为聚合物复合体 (polyplexes)。大部分聚合物复合体由阳离子聚合物组成且它们的产生被离子相互作用调节。聚合物复合体和脂质复合体的作用方法之间的一个巨大差异是聚合物复合体不能将它们的核酸成分释放到细胞质中,出于这个目的,必须发生诸如灭活腺病毒的带有内涵体 - 裂解药剂 (endosome-lytic) (使在内吞作用期间制得的内涵体裂解 (lyse)) 的共转染。然而,这并不是经常发生的情况,聚合物如聚氮丙啶具有它们特有的内涵体破裂方法,就像脱乙酰壳多糖和三甲基脱乙酰壳多糖那样。

[0292] 杂交方法

[0293] 一些杂交方法联合了两种或多种技术且可用于向对象的细胞、组织或器官给予本发明的结合物。例如病毒颗粒联合了脂质体和灭活病毒。在呼吸上皮细胞中这已显示出比单独的病毒或脂质体方法具有更有效的基因转移。其他方法涉及其他病毒载体与阳离子脂质的混合或病毒的杂交。

[0294] 树状分子 (dendrimers)

[0295] 树状分子是高度支化的具有球状的大分子。该颗粒的表面可以许多方式被官能化,且所得构建体的许多特性可通过其表面确定。特别地,可以构建阳离子型树状分子 (即,具有正表面电荷的那种)。当存在遗传物质,例如 DNA 或 RNA 的情况下,电荷互补性导致核酸与阳离子树状分子的临时结合。到达它的目的地后,树状分子 - 核酸复合体即通过内吞作用被带入细胞中。

[0296] 最近几年中,转染药剂的基准是阳离子脂质。已报道的这些竞争药剂的不足之处包括:缺乏转染大量细胞类型的能力,缺乏强大的主动靶向能力,与动物模型的不兼容性和

毒性。树状分子提供了强大的共价构建体和对分子结构,和因此对尺寸的最大程度的控制。与现有途径相比,这些共同给出令人瞩目的优势。

#### [0297] 癌症

[0298] 本发明的化合物、结合物和组合物可用于治疗任何癌症,但在包括被有效地运输穿过 BBB 的载体的结合物的情况下,对于治疗脑癌和其他被 BBB 保护的癌症特别有用。这些包括星形细胞瘤、毛细胞型星形细胞瘤、胚胎发育不良性神经上皮肿瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、多形性成胶质母细胞瘤、混合神经胶质瘤、少突星形细胞瘤、成髓细胞瘤、成视网膜细胞瘤、成神经细胞瘤、成神经母细胞瘤、胚组织瘤和畸胎瘤。其他类型的癌症包括肝细胞癌、乳腺癌、包括各种淋巴瘤的头颈部癌如套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、腺瘤、鳞状细胞癌、喉癌、视网膜癌症、食道癌症、多发性骨髓瘤、卵巢癌、子宫癌、黑色素瘤、结肠直肠癌、膀胱癌、前列腺癌、肺癌(包括非小细胞肺癌)、胰脏癌、宫颈癌、头颈部癌、皮肤癌、鼻咽癌、脂肪肉瘤、上皮癌、肾细胞癌、胆囊腺癌、腮腺癌、子宫内膜肉瘤、多重耐药性肿瘤;和增殖性疾病和病症,例如,与肿瘤血管生成关联的新血管形成、黄斑变性(例如,湿/干燥 AMD)、角膜新生血管形成、糖尿病视网膜病变、新生血管青光眼,近视变性和其他增殖性疾病和病症,例如再狭窄(restenosis)和多囊肾病。

#### [0299] 神经变性疾病

[0300] 因为本文描述的多肽能够运送药剂穿过 BBB,本发明的化合物、结合物和组合物也对治疗神经变性疾病,或者影响哺乳动物脑、中枢神经系统(CNS)、外周神经系统或其中神经元丢失或退化的自主神经系统的其他病症有用。许多神经变性疾病的特征是运动失调(即,不协调的肌肉运动)和/或记忆丧失。神经变性疾病包括亚历山大病、阿尔珀疾病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩侧索硬化症(ALS:即,卢-格里格病)、共济失调毛细血管扩张、巴滕病(Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten disease)、牛脑海绵状病(BSE)、卡纳万病、科克因综合症、皮质基底节变性、克罗伊茨费尔特-雅各布病、亨廷顿氏舞蹈病、HIV-关联的痴呆、肯尼迪氏病、克拉伯病、路易体痴呆、马查多-约瑟夫病(Machado-Joseph disease)(3型脊髓小脑性共济失调)、多发性硬化症、多系统萎缩、发作性睡病、神经疏螺旋体病、帕金森氏病、佩-梅氏病、皮克氏病、原发性侧索硬化症、朊毒体病、雷弗素姆氏病、谢耳德氏病(即,肾上腺脑白质营养不良)、精神分裂症、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩、斯-里-奥三氏综合症(进行性核上性麻痹,Steele-Richardson-Olszewski disease)、和脊髓痨。

#### [0301] 溶酶体贮积病

[0302] 本发明的化合物、结合物和组合物可用于治疗溶酶体贮积病或障碍,它们中的许多影响中枢神经系统(CNS)和引起或加重神经变性疾病。溶酶体贮积病包括下列疾病中的任何一种,即,粘多糖贮积症(MPS;包括MPS-I(赫尔利综合症、沙伊综合症),MPS-II(亨特综合症),MPS-IIIA(山菲立普综合症A),MPS-IIIB(山菲立普综合症B),MPS-IIIC(山菲立普综合症C),MPS-IIID(山菲立普综合症D)、MPS-IV(莫尔基奥氏综合症)、MPS-VI(马洛托-拉米氏症)、MPS-VII(Sly综合症)和MPS-IX(透明质酸酶缺乏症))、脂质沉积病(包括高歇氏病、尼曼-皮克病、法布里病、法伯氏病和沃尔曼氏病)、神经节苷脂贮积病(包括GM1和GM2神经节苷脂贮积病、泰-萨二氏病和桑德霍夫病)、脑白质病(包括肾上腺脑白质营养不良(即,谢耳德氏病)、亚历山大病、异染性脑白质病变、克拉伯病、佩-梅氏病、卡纳万病、儿童共济失调伴中枢神经系统髓鞘化不良(childhood ataxia with

central hypomyelination) (CACH)、雷弗素姆氏病和脑腱性黄瘤症 (cerebrotendineous xanthomatosis)、粘脂贮积病 (mucopolysaccharidoses) (ML; 包括 ML-I (唾液酸沉积症)、ML-II (I- 细胞病)、ML-III (假胡尔勒氏多种营养不良) 和 ML-IV)、和甘油蛋白沉积症 (包括天冬氨酸葡萄糖胺尿症、墨角藻糖苷酶缺乏病和甘露糖苷过多症)。

[0303] 其他的适应症

[0304] 本发明的多肽-核酸结合物也可用于治疗其他器官或组织中发现的疾病。例如, 血管肽-7 (SEQ ID NO: 112) 有效地被运输到肝、肺、肾、脾和肌肉细胞中, 允许优先治疗与这些组织关联的疾病 (肝细胞癌和肺癌)。本发明的组合物和方法也可用于治疗遗传障碍, 例如唐氏综合症 (即, 三体性 21), 其中特定基因转录本的下调可以是有用的。

[0305] 给予和剂量

[0306] 本发明还涉及含有治疗有效量的多肽-核酸结合物的药物组合物。该组合物可被配制成用于多种药物递送系统。一个或多个生理上可接受的赋形剂 (excipient) 或载体也可包括在用于适当剂型的组合物中。用于本发明中的合适剂型可在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第 17 版., 1985 中找到。对于药物递送方法的简要综述可参见, 例如, Langer, Science 249:1527-1533, 1990。

[0307] 药物组合物可用于肠胃外、鼻内、表面 (topical)、口服或局部 (local) 给予, 例如通过经皮方式, 用于预防性和 / 或治疗性处理。该药物组合物可通过肠胃外 (例如, 通过静脉注射、肌肉注射或皮下注射), 或通过口服, 或表面施用或通过在被血管或癌症病症影响的区域中关节腔内注射给予。另外的给予路径包括血管内、动脉内、瘤内、腹腔内、腔室内、硬脑膜内 (intraepidural), 以及鼻、眼、巩膜内 (intrascleral)、眶内、直肠、表面或喷雾吸入给予。本发明也特别包括通过如积存注射 (depot injection) 或可侵蚀植入 (erodible implant) 或组分 (component) 的方式持续释放给予。因而, 本发明提供用于肠胃外给予的组合物, 该组合物包括溶解或悬浮在可接受的载体, 优选含水的载体, 即, 水、缓冲液、盐水、PBS 等中的上述药剂。该组合物可含有如需要接近生理条件的药学上可接受的辅助物质, 例如 PH 调节和缓冲剂, 张力 (tonicity) 调节剂、润湿剂、清洁剂等。本发明也提供用于口服递送的组合物, 该组合物可含有惰性成份, 例如用于药片、胶囊等剂型的粘合剂 (binder) 或填充剂。而且, 本发明提供了用于局部给予的组合物, 该组合物可含有惰性成份, 例如用于乳膏剂 (cream)、软膏剂 (ointment) 等剂型的溶剂或乳化剂。

[0308] 这些组合物可通过常规的灭菌技术灭菌, 或无菌过滤。所得水溶液可照原样封装 (packaged) 待用, 或被冻干, 在给予之前, 将冻干的制剂与无菌含水的载体结合。该制剂的 pH 通常在 3 和 11 之间, 更优选在 5 和 9 之间或 6 和 8 之间, 且最优选在 7 和 8 之间, 例如 7 ~ 7.5。所得固体形式组合物可封装在多个单次剂量的单元中, 例如在药片或胶囊的密封包装中, 每个单元均含有固定量的上述药剂或多种药剂。固体形式组合物也可封装在用于可变量 (flexible quantity) 的容器中, 例如封装在设计用于可表面使用的乳油或软膏的可挤压管中。

[0309] 可给予含有有效量的组合物用于预防性或治疗性处理。在预防应用中, 组合物可给予有临床上确定的易患病体质或对肿瘤或癌症或神经变性疾病发展的敏感性提高的患者。本发明的组合物可给予患者 (例如, 人), 给予量应足以延缓、降低、或优选防止临床疾

病发作或肿瘤形成。在治疗应用中,组合物可给予已遭受癌症或神经变性疾病的患者(例如,人),给予量应足以治愈或至少部分遏制该病症及其并发症的症状。足以完成这个目的的量被定义为“治疗有效剂量”,即,足以显著改善与疾病或医学病症关联的一些病症的量。例如,在癌症、神经变性疾病或溶酶体贮积病的治疗中,减少、防止、延缓、抑制或遏制疾病或病症的任何症状的药剂或化合物都是治疗有效的。治疗有效量的药剂或化合物并不要求治愈疾病或病症,但将对疾病或病症提供治疗,以便延缓、阻碍,或防止疾病或病症的发作,或改善疾病或病症的症状,或改变疾病或病症的期限,或例如,使疾病或病症严重程度降低,或加速个体的恢复。有效用于这种用途的量可取决于疾病或病症的严重程度和患者的体重和总体状况,但一般每位患者的每剂量为约 0.5mg ~ 约 3000mg 范围的药剂或多种药剂。最初给予和加强给予的合适方案典型地为,初期给予之后,接着通过以一个或多个按小时、天、周或月的间隔随后给予重复剂量。存在于本发明组合物中的药剂的总有效量可作为单次剂量,以丸剂或通过输注形式在相对短的时段内给予哺乳动物,或可使用分次治疗方案给予,其中多剂量可在更长的时段(例如,每 4-6 小时、8-12 小时、14-16 小时或 18-24 小时,或每 2-4 天、每 1-2 周、每月一次剂量)内给予。可替换地,可以考虑足以维持血液中治疗有效浓度的连续的静脉内输注。

[0310] 存在于本发明的组合物内和在应用于哺乳动物(例如,人)的本发明的方法中使用的一种或多种药剂的治疗有效量可通过普通技术人员在考虑哺乳动物年龄、体重和病症的个体差异的情况下确定。给予对象(例如,哺乳动物,例如人)有效量的本发明的药剂,该有效量是在所治疗对象中产生理想结果的量(例如,癌症或神经变性障碍的减慢或缓解)。这样的治疗有效量可由本领域技术人员凭经验确定。

[0311] 患者也可接受每周一次或更多次(例如,每周 2 次、3 次、4 次、5 次、6 次,或 7 次或更多次)每剂量为约 0.1mg ~ 3,000mg 范围的药剂,每周剂量为 0.1mg ~ 2,500mg 范围(例如,2,000、1,500、1,000、500、100、10、1、0.5,或 0.1)mg 的药剂。患者也可接受每两周或三周一次的每剂量为 0.1 ~ 3,000mg 范围的组合物药剂。

[0312] 包含有效量的本发明的组合物的单次或多次给予可在治疗医师所选择的剂量水平和模式下进行。剂量和给予计划可基于患者疾病或病症的严重程度来确定和调整,在治疗的过程中,可根据医师普遍实行的方法或本文描述的方法对病人疾病或病症的严重程度进行监控。

[0313] 本发明的载体和结合物可与处理或治疗的传统方法联合使用,或可与处理或治疗的传统方法分开使用。

[0314] 当本发明的结合物与其他药剂一起联合治疗给予时,它们可相继或同时给予个体。可替换地,根据本发明的药物组合物可由如本文中描述的与药学上可接受的赋形剂关联的本发明的载体-药剂结合物、以及本领域已知的另一种治疗或预防药剂的组合构成。

[0315] 进一步结合

[0316] 本发明的多肽-核酸结合物可进一步连接到另一种药剂上,例如,治疗剂、可检测标记或本文描述的任何其他药剂。该结合物可用可检测标记例如放射性显像剂(例如发出辐射的那些)进行标记,用于检测疾病或病症。在其他实施方式中,本发明的载体或其功能衍生物或它们的混合物可连接到治疗剂上,从而治疗疾病或病症,或者可连接到它们的混合物或用它们的混合物标记。在能够将药剂运输穿过血脑屏障或运输到此种治疗在其中是

有利的其他细胞或组织上的条件下,可通过向个体给予已进一步与治疗化合物结合的本发明的多肽-核酸结合物来完成治疗。

[0317] 本文使用的治疗剂可以是能够杀死细胞的药品 (drug)、药物 (medicine)、发出辐射的药剂、细胞毒素 (例如,化疗剂) 和 / 或它们的生物活性片段,和 / 或它们的混合物,或者它可以是治疗、治愈、缓解、改善、减轻或抑制所治疗个体的疾病或病症的药剂。治疗剂可以是合成产物或真菌、细菌或其他微生物如支原体、病毒等、动物如爬行动物、或植物来源的产物。治疗剂和 / 或其生物活性片段可以是酶活性药剂和 / 或其片段,或可以通过抑制或阻断重要的和 / 或必需的细胞路径,或者通过与重要的和 / 或必需天然存在的细胞组分竞争而起作用。

[0318] 发出辐射的放射性显像剂 (可检测的放射性-标记) 的合适的实例可以以铟-111、镓-99、或低剂量的碘-131 为例。用在本发明中的可检测标记 (labels) 或标记物 (markers), 可以是放射性标记、荧光标记、核磁共振活性标记、发光标记、发色团标记、用于 PET 扫描仪的发射正电子的同位素、化学发光标记,或酶标记。荧光标记包括但不限于,绿色荧光蛋白 (GFP)、荧光素和罗丹明。化学发光标记包括但不限于,荧光素酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶。酶标记包括但不限于过氧化物酶和磷酸酶。组胺标记物也可以是可检测标记。例如,结合物可包含载体部分和抗体部分 (抗体或抗体片段) 并可进一步包含标记。该标记可以是,例如医用同位素,例如但不限于,镓-99、碘-123 和碘-131、铊-201、镓-67、氟-18、铟-111 等。

[0319] 药剂在运输穿过血脑屏障之后可从多肽-核酸结合物中释放出来,例如通过载体与药剂之间化学键的酶剪切或断裂而释放。然后释放的药剂可在不存在载体的情况下发挥其预期的能力。

[0320] 多肽-核酸结合物的共价修饰包括在本发明的范围内。使用本领域已知的方法,通过直接的化学合成可以方便地制备化学衍生物。通过使靶氨基酸残基和能够与所选的侧链或末端残基反应的有机衍生的药剂反应,可将这样的修饰,例如引入到多肽、药剂或多肽-药剂结合物中。载体化学衍生物能够,例如穿过血脑屏障并连接到另外的药剂或与另外的药剂结合,从而运输该药剂穿过血脑屏障。本发明的多肽-核酸药剂可在没有限制的情况下,通过巯基、氨基 (胺类)、和 / 或碳水化合物连结 (即,结合) 到合适的可检测标记或治疗剂上。同型双功能和异型双功能交联剂 (结合剂) 可从许多商业来源获得。可供交联的区域可以在本发明的载体上找到。该交联剂可包含柔性臂,例如,短臂 (< 2 碳链)、中等尺寸的臂 (2 ~ 5 碳链),或长臂 ( $\geq 6$  碳链)。示例性交联剂包括 BS3 ([双(磺基琥珀亚酰胺基)辛二酸酯]; BS3 是靶向可到达伯胺的同型双功能 N-羟基琥珀亚酰胺酯)、NHS/EDC (N-羟基琥珀亚酰胺和 N-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺; NHS/EDC 允许伯胺基团与羧基的结合)、磺基-EMCS ([N-ε-马来酰亚胺基己酸] 酰肼; 磺基-EMCS 是反应朝向巯基和氨基的异型双功能反应性基团 (马来酰亚胺和 NHS-酯))、酰肼 (大部分蛋白质含有暴露的碳水化合物,且酰肼是用于将羧基连接到伯胺的有用试剂)、和 SATA (N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯; SATA 反应朝向胺并添加了被保护的巯基))。

[0321] 以下实施例旨在示例说明,而不是要限制本发明。

[0322] 实施例 1

[0323] 多肽-核酸结合

[0324] 于 90°C 下在退火缓冲剂 (100mM 乙酸钾、30mM pH 7.2 的 HEPES-KOH、2mM 乙酸镁) 中温育 35  $\mu$ M 编码含有 5' 硫醇基团的表皮生长因子受体 (EGFR) siRNA 序列的单链 RNA 寡核苷酸 1min, 接着在 37°C 下温育 1h。在 Eppendorf 管中, 将杂交混合物在预制的 1% 琼脂糖的 100mM 葡萄糖中在冰上充分温育 7 分钟, 对退火的 siRNA 寡核苷酸进行脱盐 (在熔化的琼脂糖混合物中留出 100  $\mu$ L 的空余 (tip) 并允许其调整 (set))。在经脱盐的 siRNA 分子中, 添加 1 体积的反应缓冲剂 (10mM HEPES, 1mM EDTA, pH 8.0), 从而将 siRNA 的最终浓度调整到 17.5  $\mu$ M。混合等摩尔量的 EGFR siRNA、血管肽 -2 多肽和硫醇氧化剂二酰胺 (sigma, USA) 并在 40°C 下温育 1h。将多肽 - 核酸结合物 / 二酰胺溶液与培养基 (culture media) 混合并施加于靶细胞、组织、器官或患者。

[0325] 实施例 2

[0326] siRNA 的 N- 末端和 C- 末端结合到肽载体上

[0327] 如图 4 所示, 具有 N- 末端或 C- 末端半胱氨酸的肽载体 (例如, SEQ ID NO :113 和 114) 可直接或通过接头结合到 SH-siRNA 上。根据所选择的接头, 该连接可以是可剪切的或不可剪切的。这里, 肽载体结合到 siRNA 双链体的有义链上。

[0328] 实施例 3

[0329] siRNA 结合物的活性

[0330] 在转染到测试系统之后, 测试可剪切的结合物和不可剪切的 siRNA 结合物的沉默活性 (图 5)。血管肽 -2 的结合没有显著影响 siRNA 的沉默活性, 因为两种接头的  $IC_{50}$  值都在未结合 siRNA 的  $IC_{50}$  值的 2 ~ 3 倍内。因而, 这种沉默活性似乎与所用接头的类型 (可剪切的或不可剪切的) 无关。

[0331] 实施例 4

[0332] 穿过 BBB 的 siRNA 结合物的运送

[0333] 利用在鼠中原位脑灌注, 在体内测量该结合物的运送。结果表明 siRNA- 血管肽 -2 结合物被有效地运送穿过 BBB。在排空 (depletion) 脑毛细血管减液之后确定存在于脑软组织中的量 (图 6)。

[0334] 实施例 5

[0335] siRNA 结合到肽载体的其他策略

[0336] 在另一个实施例中, Cys- 血管肽 -2 (SEQ ID NO :113) 或其 N 末端用 6- 马来酰亚胺基己酸衍生的血管肽 -2 用作肽载体 (图 7)。这些肽结合到示例性 siRNA 有义链构建体上。带有活化二硫化物的 siRNA 分子可从所示衍生的 siRNA 制得。简单地说, 用三 (2- 羧乙基) 膦 (TCEP) 处理 siRNA 分子, 以产生游离的硫醇, 然后用 2, 2' - 联吡啶 - 二硫化物活化, 以形成活化的化合物 (图 8)。

[0337] 也示出了含有游离硫醇的 siRNA 的 HPLC 曲线、活化 siRNA 的合成和 Cys- 血管肽 -2 分子 (图 9A- 图 9C)。活化 siRNA 与 Cys- 血管肽 -2 反应, 形成 siRNA 结合物 (图 10)。图 11A ~ 图 11C 示出了活化 siRNA、Cys- 血管肽 -2 和所得结合物的 HPLC 曲线。质谱分析用于确定该结合物的组成 (图 12)。

[0338] 在另一个示例性结合中, 含有自由硫醇的 siRNA 结合到用 6- 马来酰亚胺基己酸衍生的血管肽 -2 上 (图 13)。反应物的 HPLC 曲线 (图 14A 和图 14B) 和反应混合物的 HPLC 曲线 (图 14C) 表明反应成功。进一步纯化之后, 通过 HPLC (图 15A) 和质谱 (图 15B) 分析

该结合物,确定该结合物的组成。

[0339] 实施例 6

[0340] 其他的 siRNA 结合物

[0341] 还制备了表 4 中列出的 siRNA 分子和结合物。

[0342] 表 4 :siRNA 结合物

[0343]

名称	描述	荧光
siRNA-血管肽-2 可剪切的结合物	结合在血管肽-2 的 C-末端上的 siRNA (MW16080)	无
siRNA-血管肽-2 不可剪切的结合物	结合在血管肽-2 的 N-末端上的 siRNA (MW16172)	无
无修饰的 (裸, Naked) siRNA 对照	未结合的 siRNA (MW13475)	无
siRNA alexa488-血管肽-2 可剪切的结合物	结合在血管肽-2 的 C-末端上的 siRNA, Alexa488 标记的 (MW16857)	有
siRN Aalexa488-血管肽-2 不可剪切的结合物	结合在血管肽-2 的 N-末端上的 siRNA, Alexa4881 标记的 (MW16949)	有
SiRN Aalexa488	siRNA 标记 (MW14252)	有

[0344] 图 16 中示出示例性 RNA-Alexa 488 结合物。使用 50mM 的三乙胺乙酸盐 (TEAA)、pH 7.0 的缓冲剂和乙腈梯度在 C18 柱上通过 HPLC 分析上表中描述的这些分子。可剪切的结合物、血管肽-2-cys (An2-Cys (C-末端)) 和 siRNA 对照的洗脱在图 17A 中示出。不可剪切的结合物、血管肽-MHA 和 siRNA 对照的类似分析在图 17B 中示出。在 Alexa 488 标记的结合物上也进行了 HPLC 分析 (图 18)。

[0345] 实施例 7

[0346] siRNA 结合物的碘化

[0347] 使用碘珠在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中对实施例 5 中描述的 siRNA 结合物进行碘化。为了去除游离碘,使用凝胶过滤色谱在交联葡聚糖凝胶 G25 柱上分离结合物,并使用 10,000Da 分子量截止值使结合物对 PBS 进行透析 (dialysis)。88%的放射性与凝胶过滤之后的结合物关联,且 93 ~ 95%的放射性与透析之后的结合物关联 (数据未示出)。

[0348] 为了确定是否使用 HPLC 检查该结合的结合物完整性。对于可剪切的或不可剪切的结合物,在碘化之前、碘化和凝胶过滤之后,或碘化、凝胶过滤、和透析之后,在该结合物的 HPLC 曲线中,没有观察到任何差异。这些结果表明碘化不影响这些结合物的完整性。

[0349] 也测量了碘化结合物的特异活性,如下表 5 中所示。

[0350] 表 5 :碘化 siRNA 结合物的特异活性

[0351]

siRNA-血管肽-2 结合物	特异活性	
	CPM/mg	CPM/mmol
可剪切的	$1.1 \times 10^8$	$1.8 \times 10^{12}$
不可剪切的	$1.4 \times 10^8$	$2.3 \times 10^{12}$
血管肽-2	$5.2 \times 10^8$	$1.2 \times 10^{12}$

[0352] 实施例 8

[0353] siRNA 结合物的原位灌注

[0354] 使用 125nM 可剪切和不可剪切的结合物进行原位灌注并对脑的摄取量进行测量。菊粉用作对照。在原位模型中对穿过 BBB 的可剪切和不可剪切的 siRNA 结合物进行观察 (图 20)。测量每种蛋白的  $K_{in}$  值:可剪切的结合的  $K_{in}$  值为  $1.1 \times 10^{-4}$  ml/s/g, 不可剪切的结合的  $K_{in}$  值为  $4.7 \times 10^{-5}$  ml/s/g, 菊粉的  $K_{in}$  值为  $2.1 \times 10^{-5}$  ml/s/g。

[0355] 也测量了毛细血管排空之后进入脑室的 siRNA 的分配量 (partition)。这种灌注也在 125nM 下进行。与菊粉对照相比,在全脑、脑毛细血管和主质中观察到了更多量的可剪切和不可剪切的 siRNA 结合物 (图 21)。

[0356] 也使用荧光 siRNA 进行原位灌注。与对照 siRNA、Alexa 488 和不可剪切的 siRNA 结合物相比,可剪切的 siRNA 结合物进入脑中的灌注量 (perfusion) 增大 (图 22)。然而,在实验中观测到了高的内源性荧光和荧光猝灭。

[0357] 实施例 9

[0358] siRNA 结合物运输穿过体外 BBB 模型使用体外血脑屏障模型 (例如,如美国专利申请公开 2006/0189515 所描述的),随着时间测量 siRNA 结合物的运送。全-转铁蛋白用作对照。这个实验在 250nM 下进行。对所有部分 (fraction) 进行 TCA 的沉淀,并测量放射性标记的量。观测到不可剪切和可剪切的 siRNA 结合物比全-转铁蛋白更有效地穿过体外 BBB (图 23)。

[0359] 在体外 BBB 模型中测试在 0 和 1000nM 之间的放射性标记的 siRNA 结合物的浓度,并测量运输速率 (图 24)。基于这些数据,穿过 BBB 的 siRNA 运输似乎是使用可饱和的机制 (saturable mechanism); 并从而计算可剪切和不可剪切结合物的  $K_m$  和  $V_{max}$  值。测得不可剪切 siRNA 结合物的  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为 480nM 和 3.9pmol/cm/h。测得可剪切 siRNA 结合物的  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为 240nM 和 0.9pmol/cm<sup>2</sup>/h。

[0360] 还测量了荧光标记的 siRNA 结合物的运输 (图 25)。与放射性标记的结合物一样,荧光标记的结合物也表现为与未结合的 siRNA 对照相比穿过 BBB 的运输增加。

[0361] 实施例 10

[0362] 用血管肽 -2/EGFR 结合物治疗胶质母细胞瘤

[0363] 用实施例 1 的血管肽 -2/EGFR siRNA 结合物治疗诊断患有胶质母细胞瘤的人类患者。治疗后,该结合物通过血脑屏障 (BBB) 并到达脑中的癌细胞中。降低表皮生长因子受体 (EGFR)mRNA 的 siRNA 的存在导致癌细胞中该分子的标记的功能沉默。治疗导致胶质母细胞瘤的发展减慢或其尺寸减小、或完全好转。

[0364] 其他实施方式

[0365] 所有出版物、专利申请、和本说明书中提到的专利通过引用合并在本文中,包括于 2007 年 12 月 20 日提交的美国临时专利申请 61/008,880 和于 2007 年 12 月 20 日提交的美

国临时申请 61/008, 825。

[0366] 在不偏离本发明的范围和精神的情况下,所描述的本发明的方法和系统的各种修饰和变化对本领域技术人员是明显的。尽管本发明结合具体的期望的实施方式已进行描述,但应当理解要求保护的本发明不应过分地局限于这些具体实施方式。事实上,所描述的用于实施本发明的模式的各种修饰,对于医学、药学或相关领域中技术人员是显而易见的,旨在将它们包括在本发明的范围内。

RNAi抑制基因表达的机制

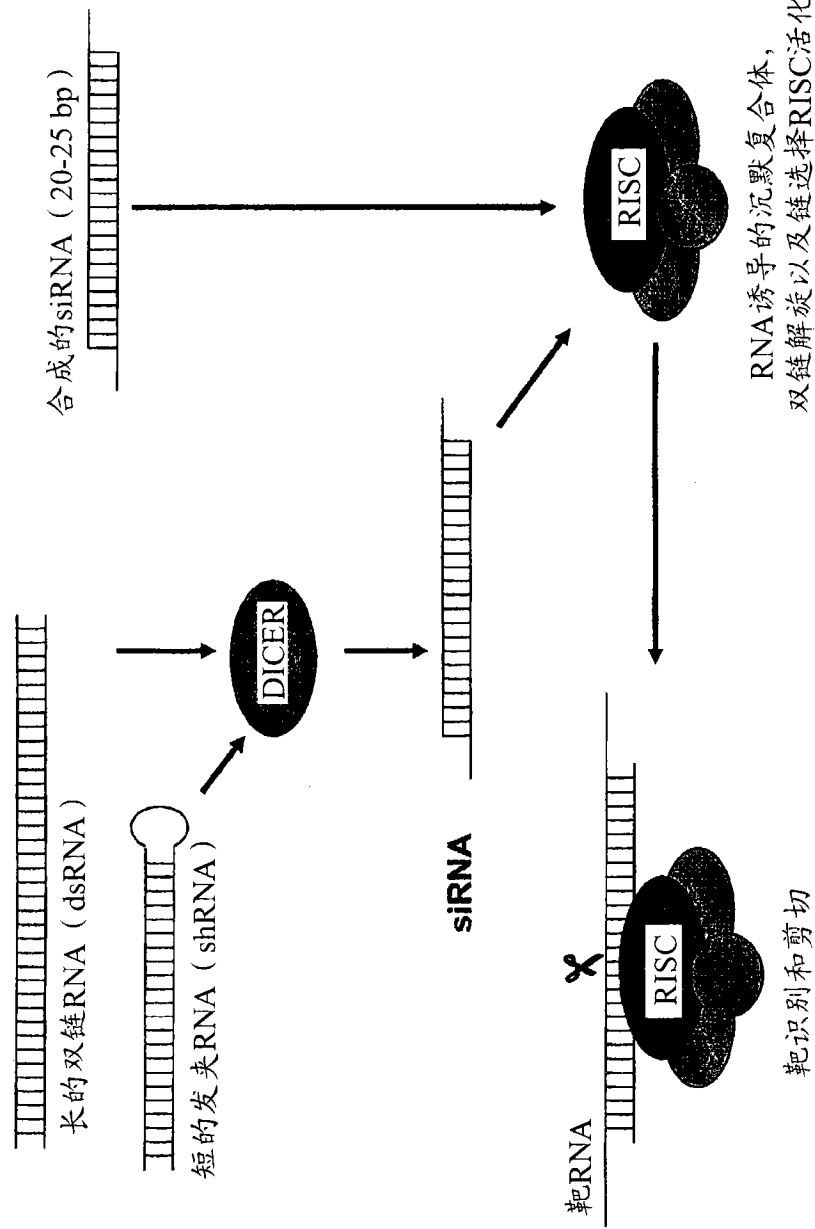


图 1

siRNA与血管肽-2的结合

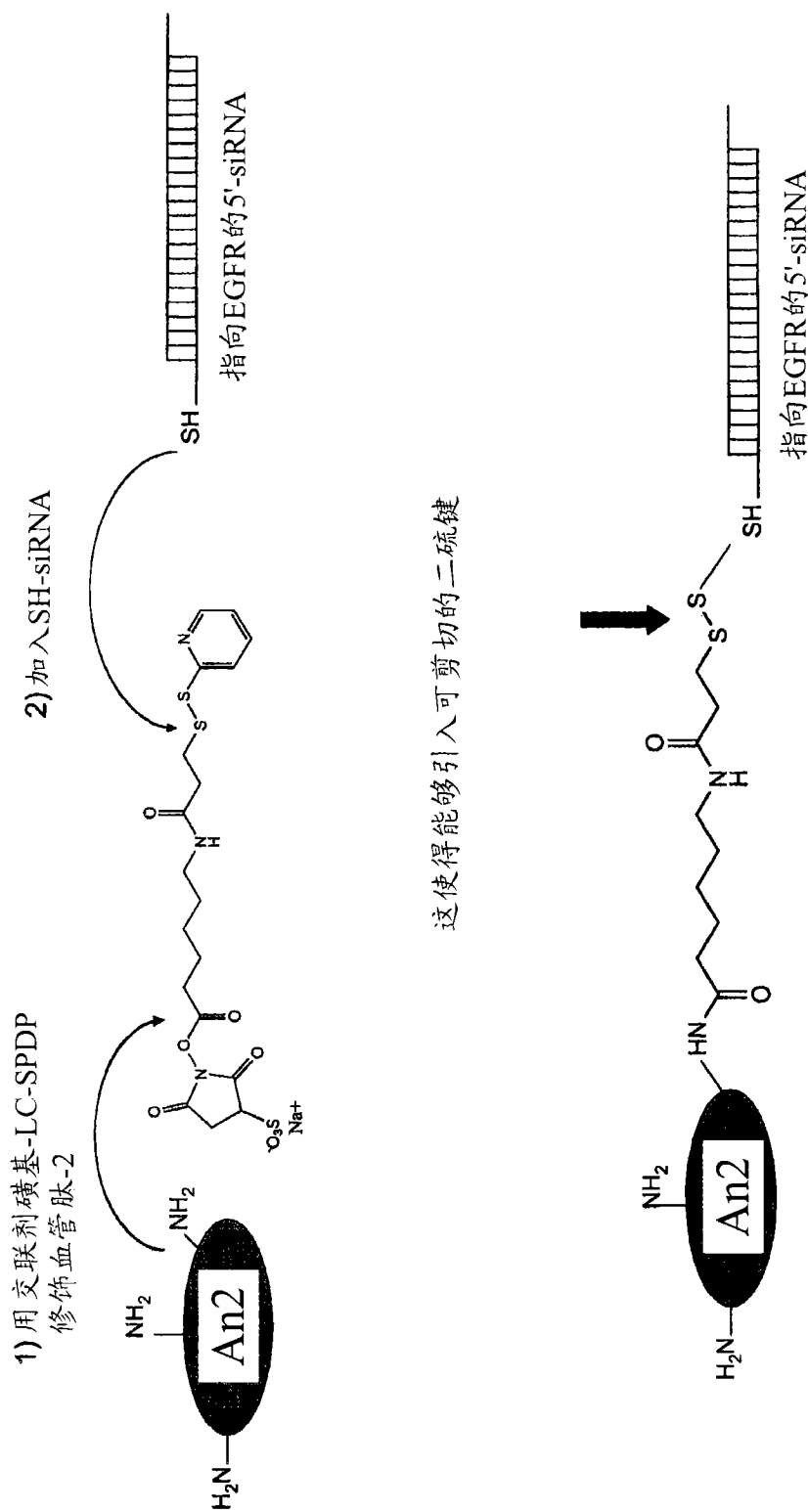


图 2

交联剂磺基-LC-SPDP

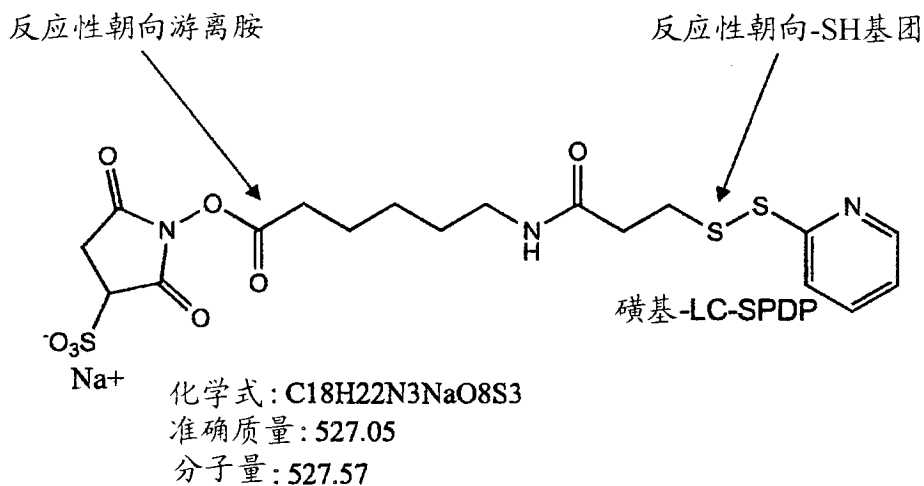
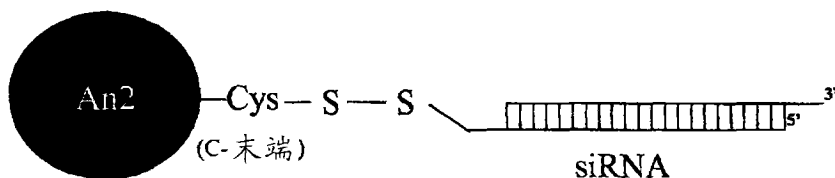


图 3

siRNA结合物（在有义链上的血管肽-2结合）：

1) siRNA-血管肽-2可剪切的结合物



2) siRNA-血管肽-2不可剪切的结合物

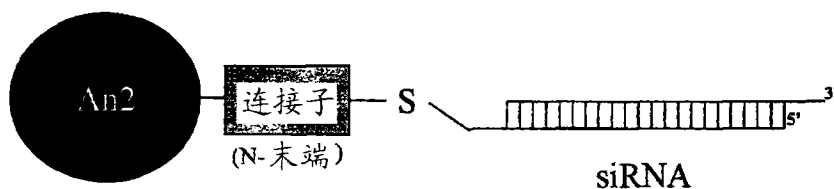


图 4

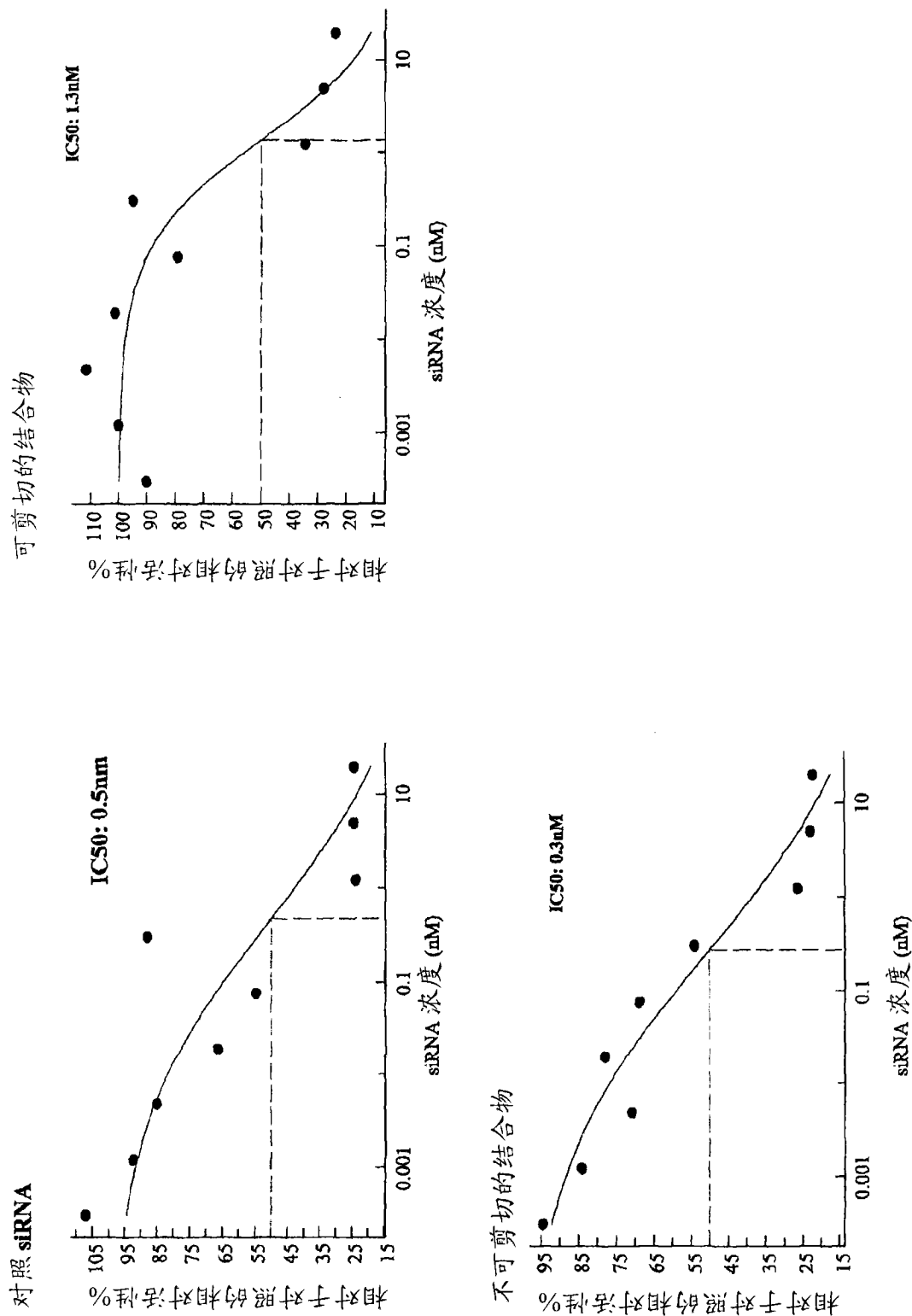
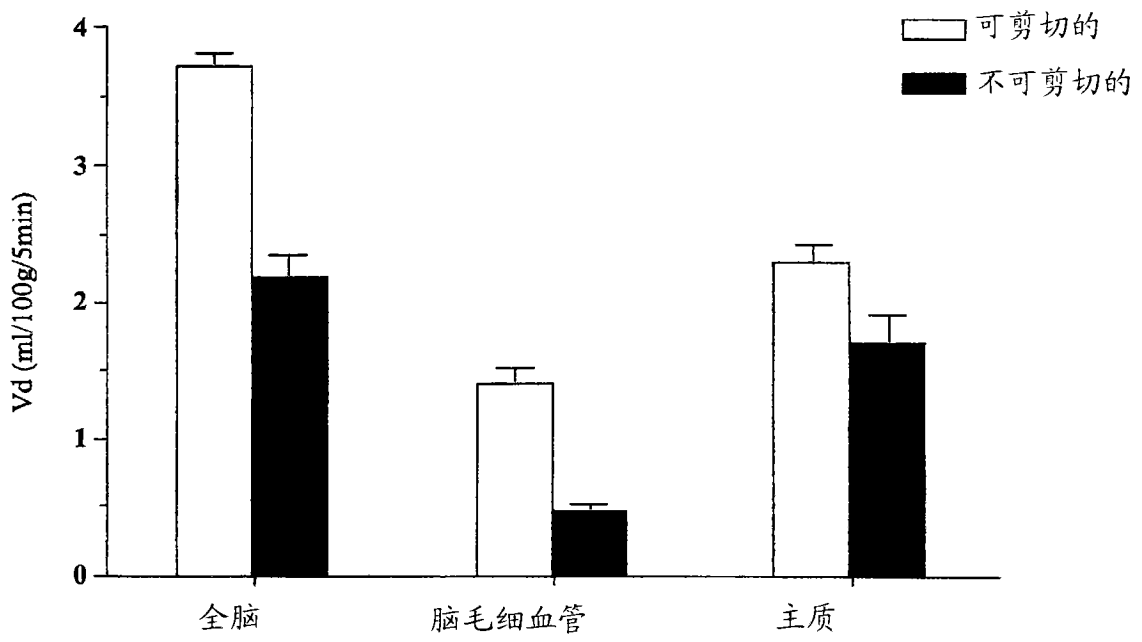


图 5



以 125 nM 实施的结合物的灌注

Vd : 3.8 ml/100g/5min

量 : 0.48 nmol/100g/5min

图 6

Cys-Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr

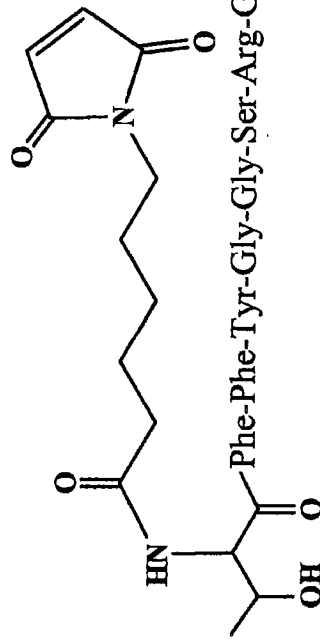


图 7

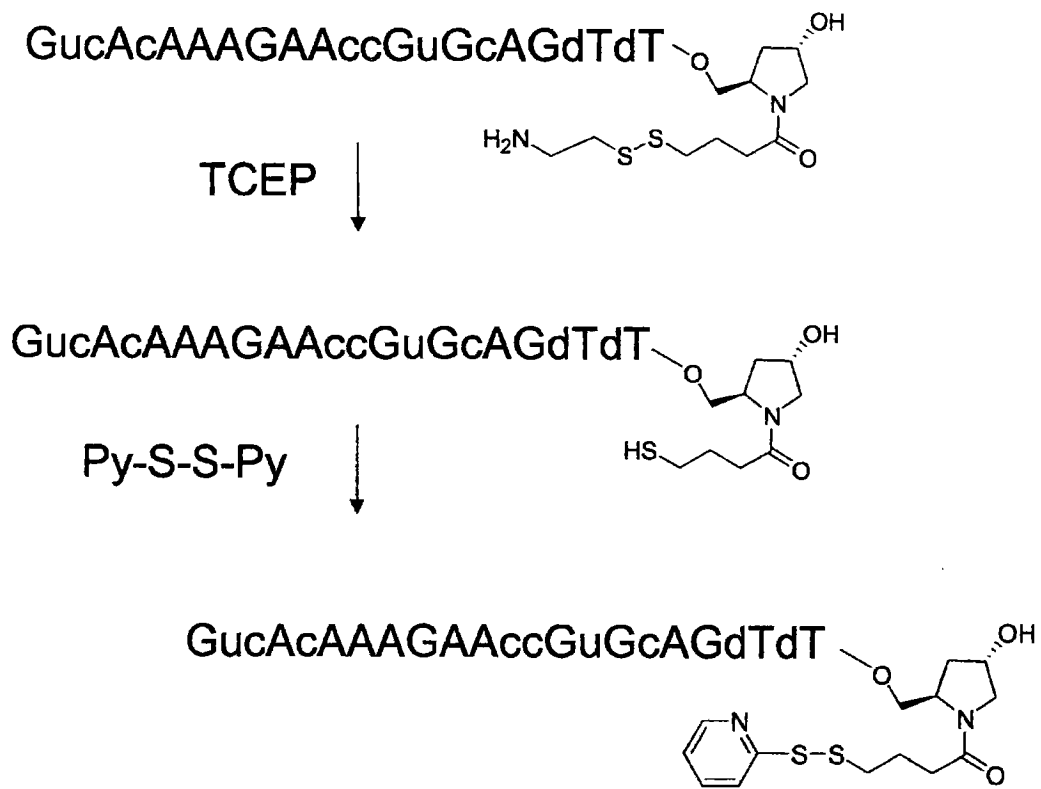


图 8

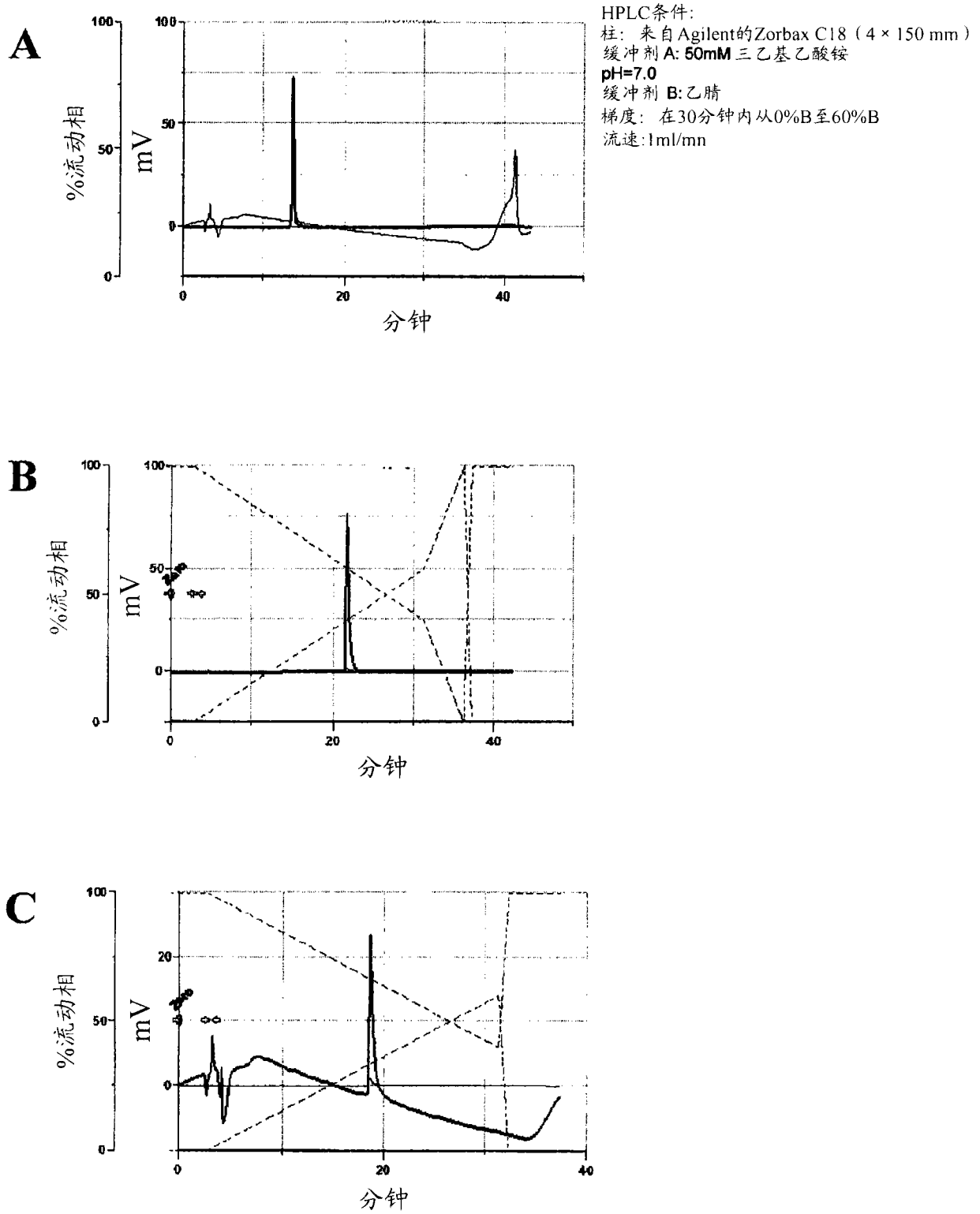


图 9A-9C

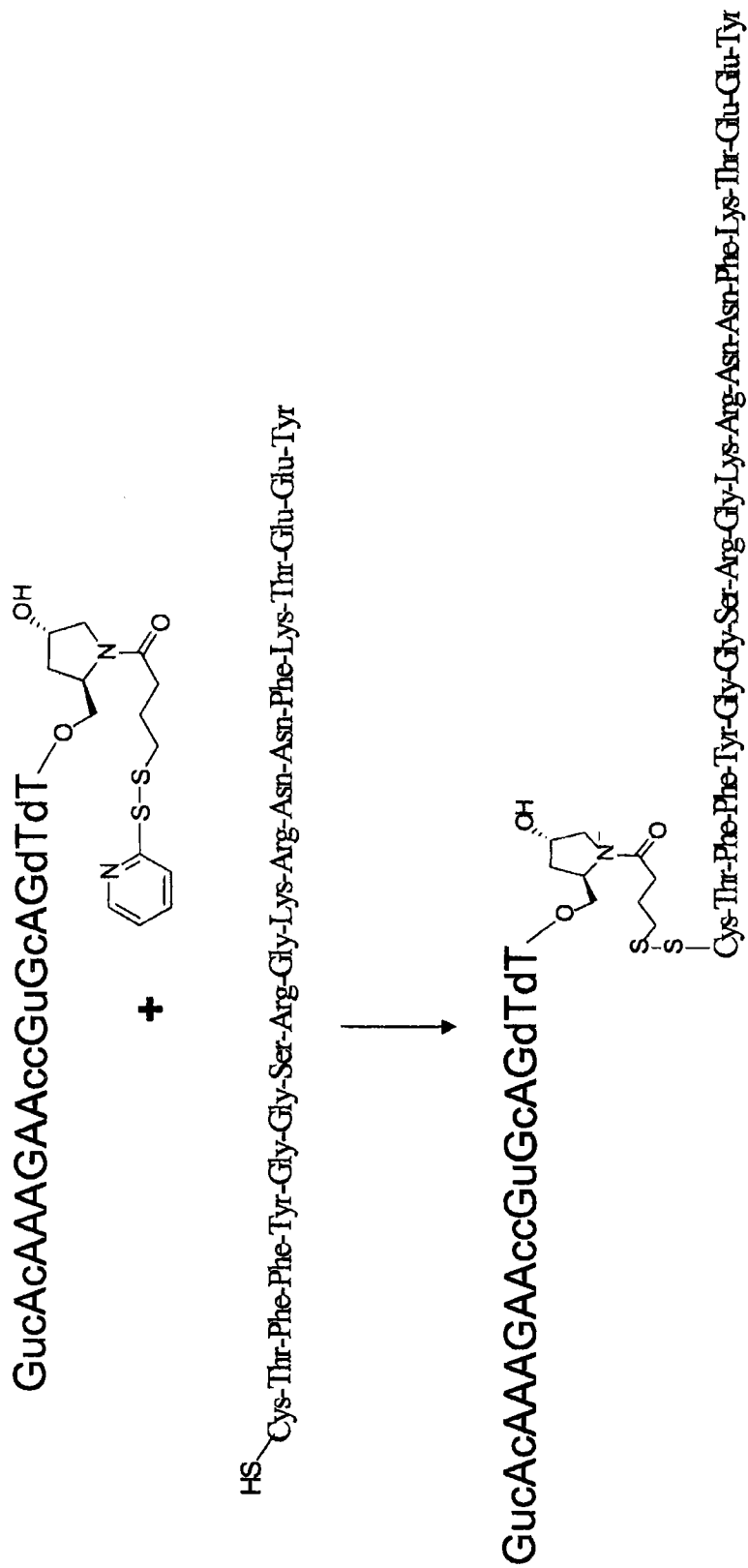


图 10

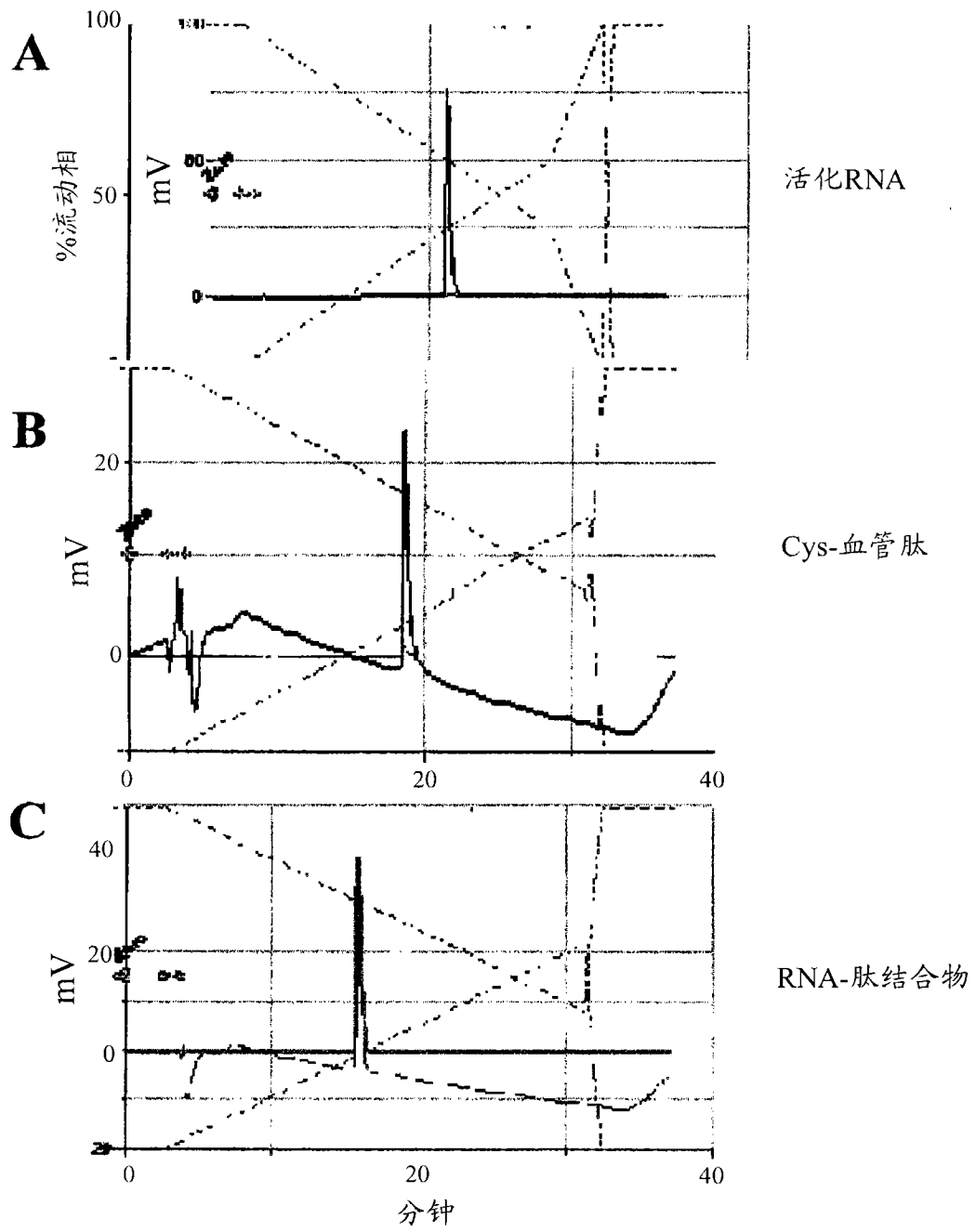
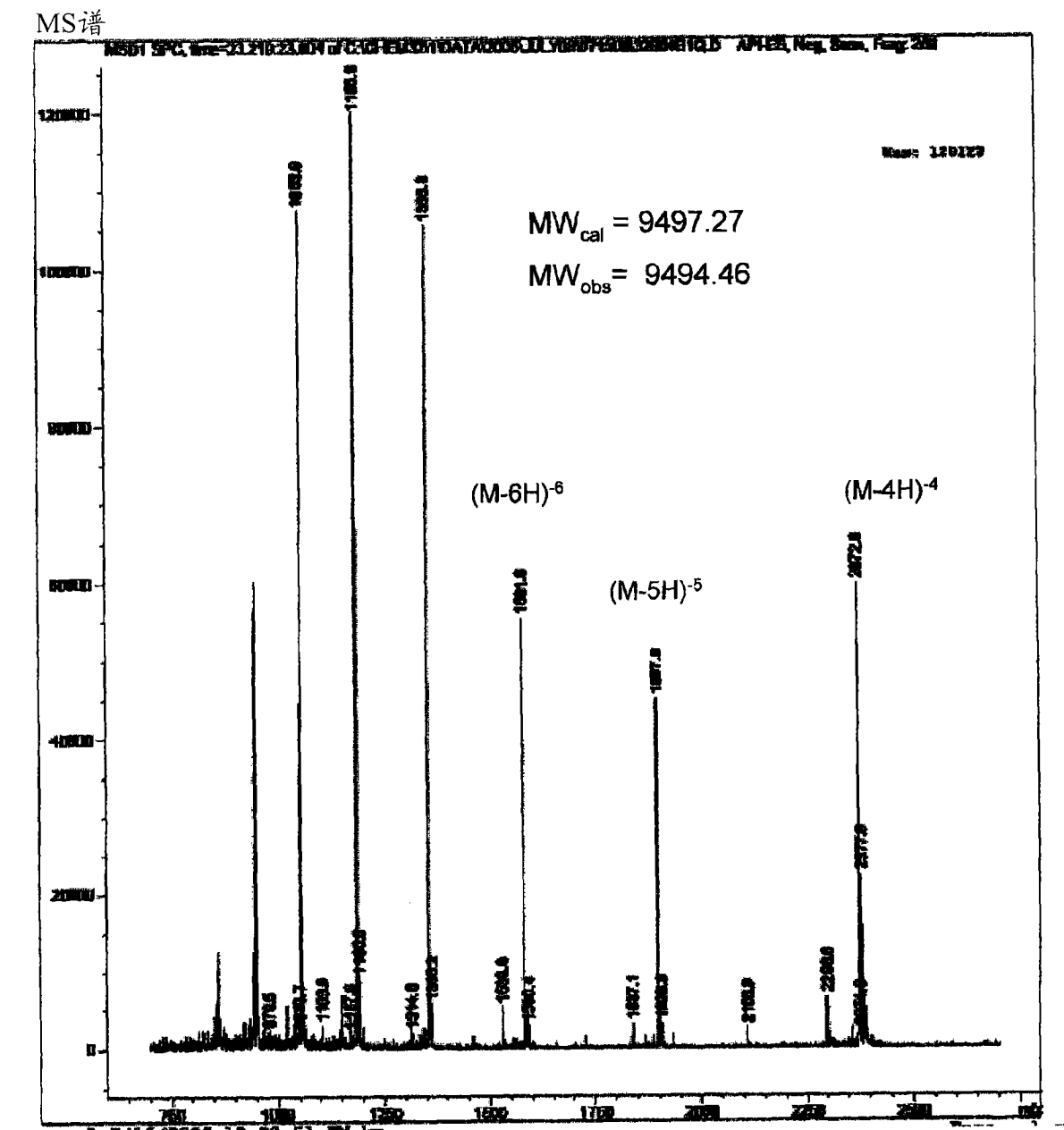


图 11A-11C



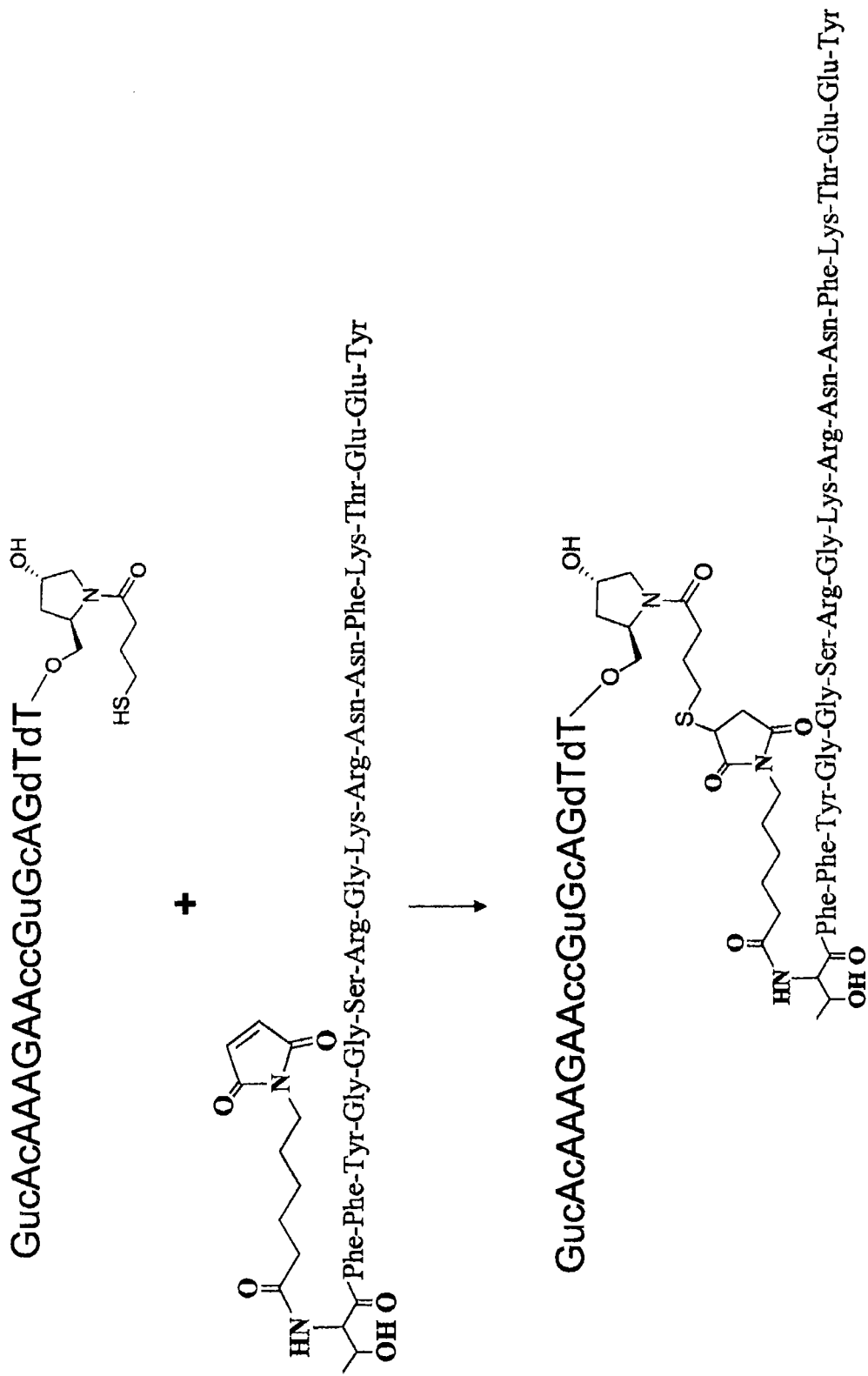


图 13

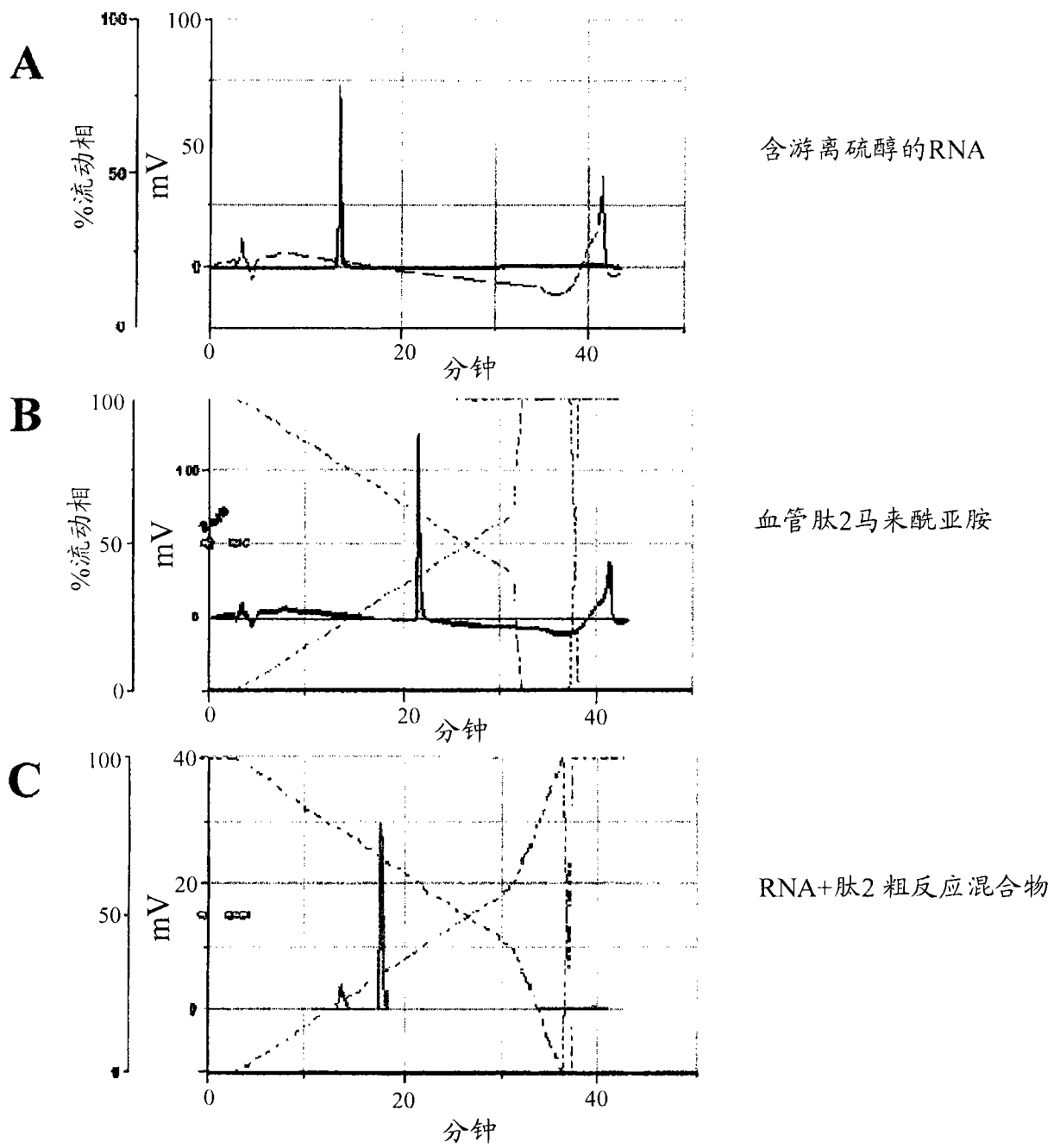


图 14A-14C

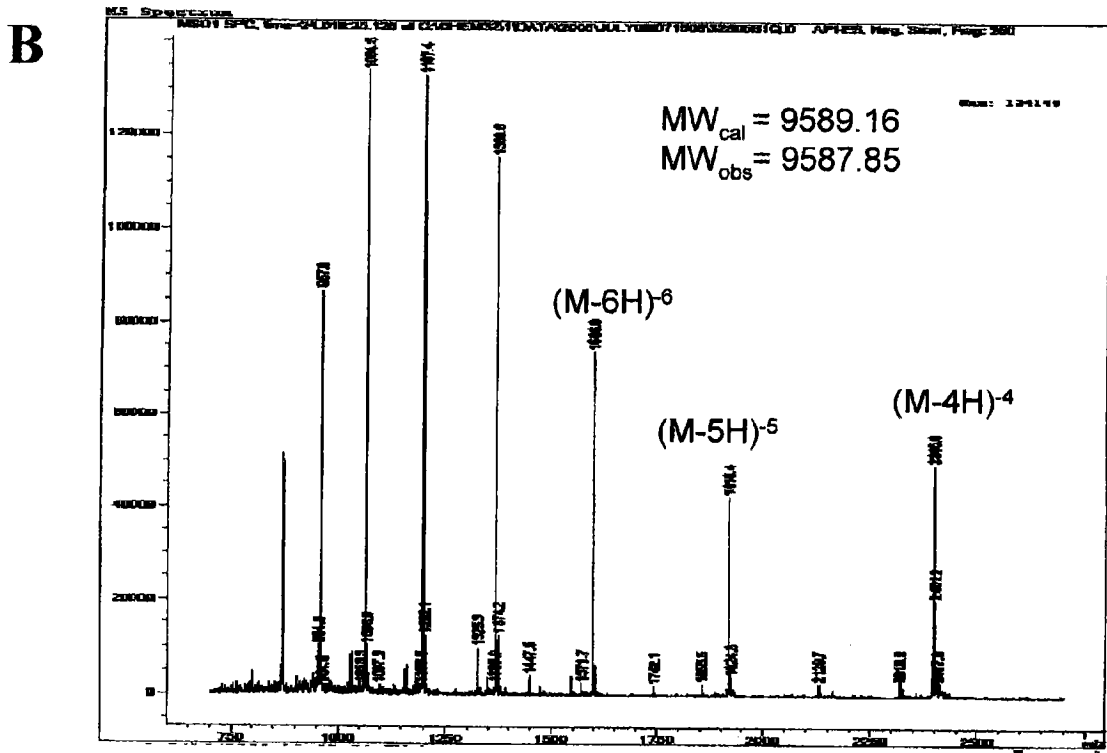
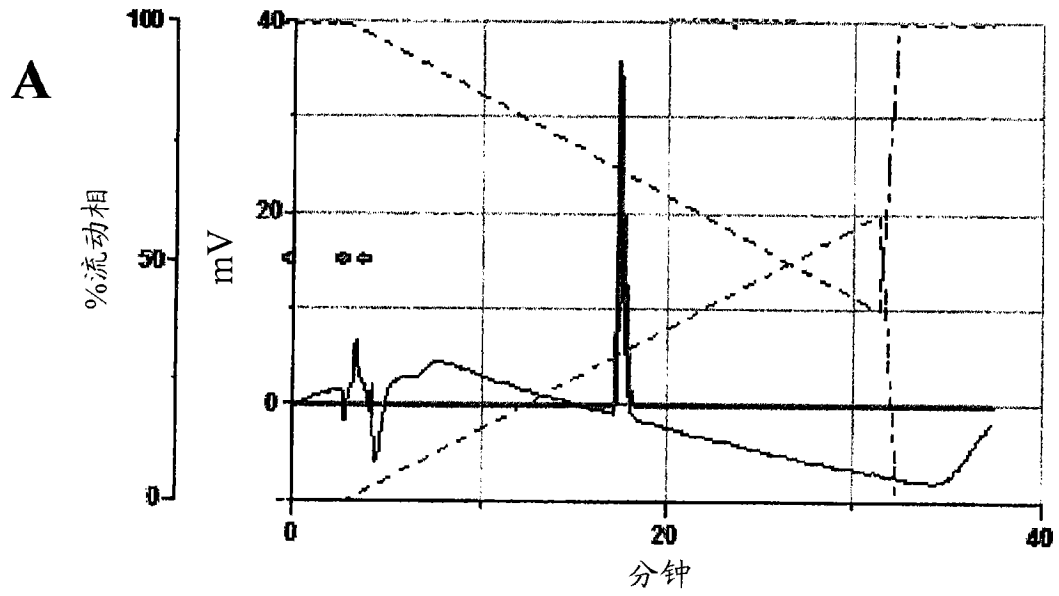


图 15A-15B

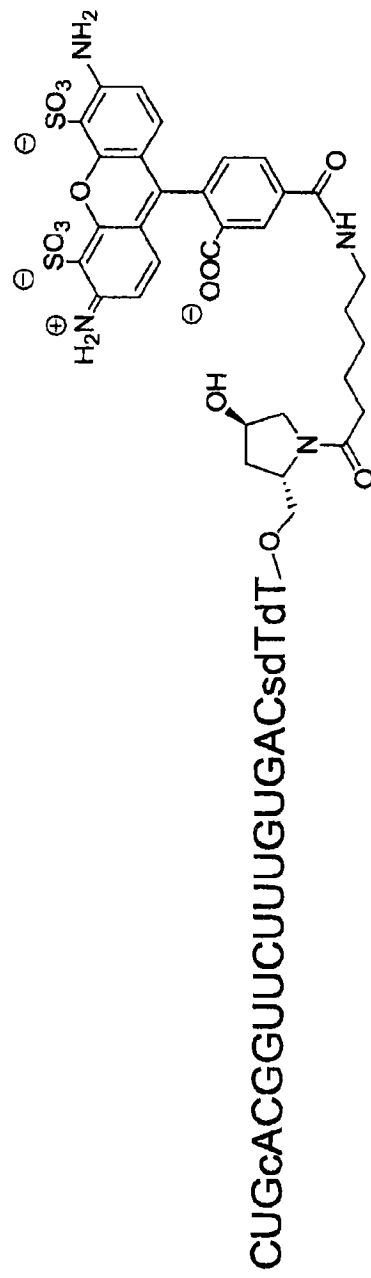


图 16

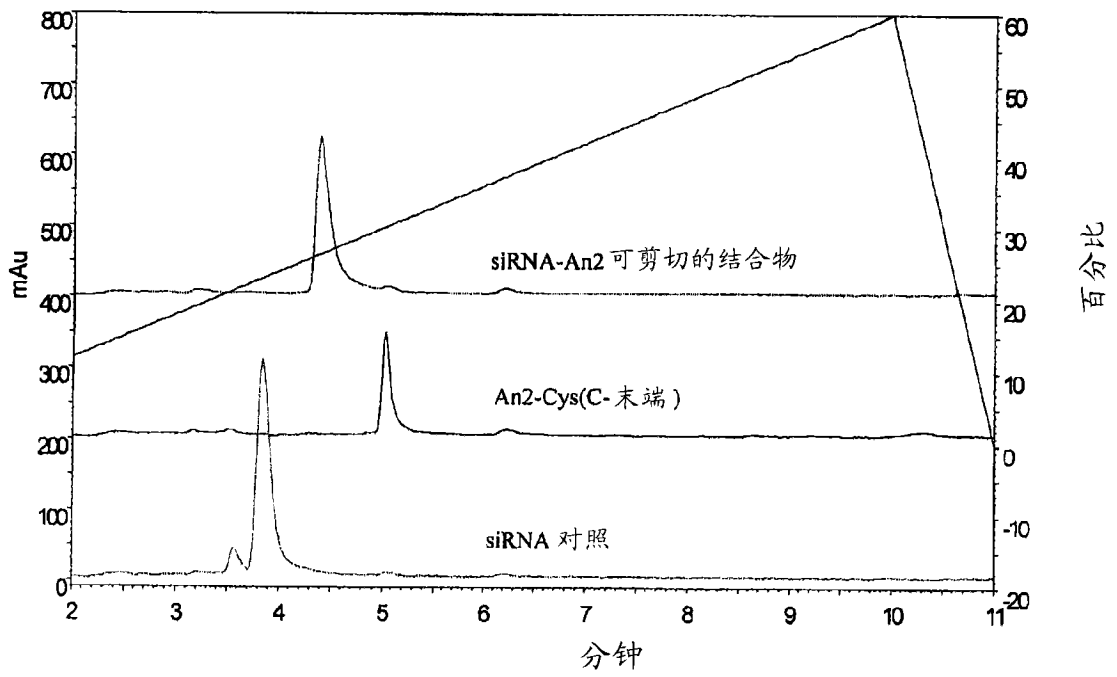


图 17A

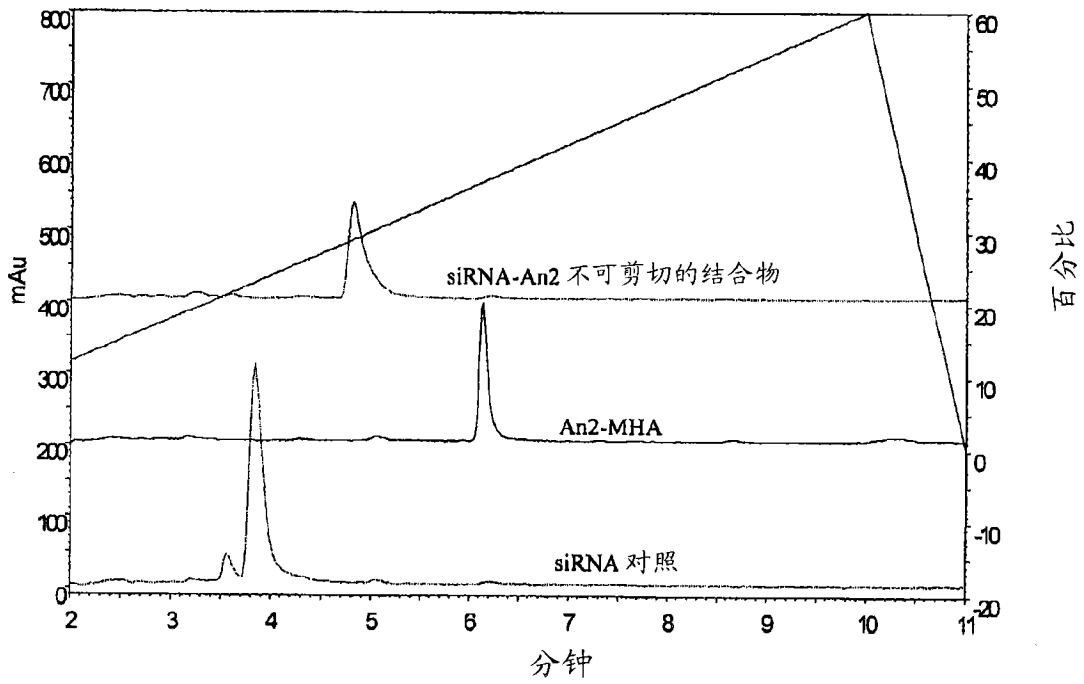


图 17B

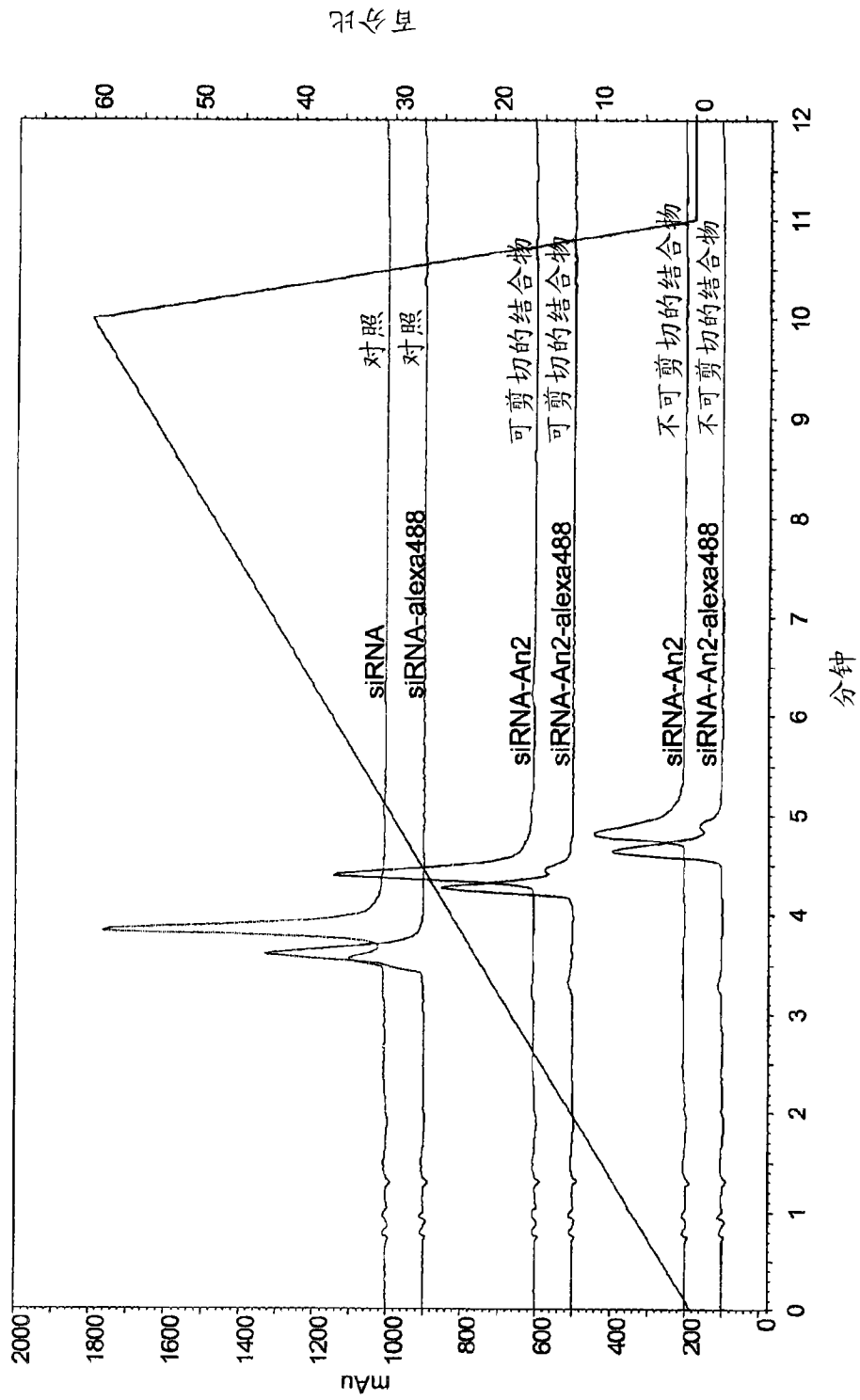


图 18

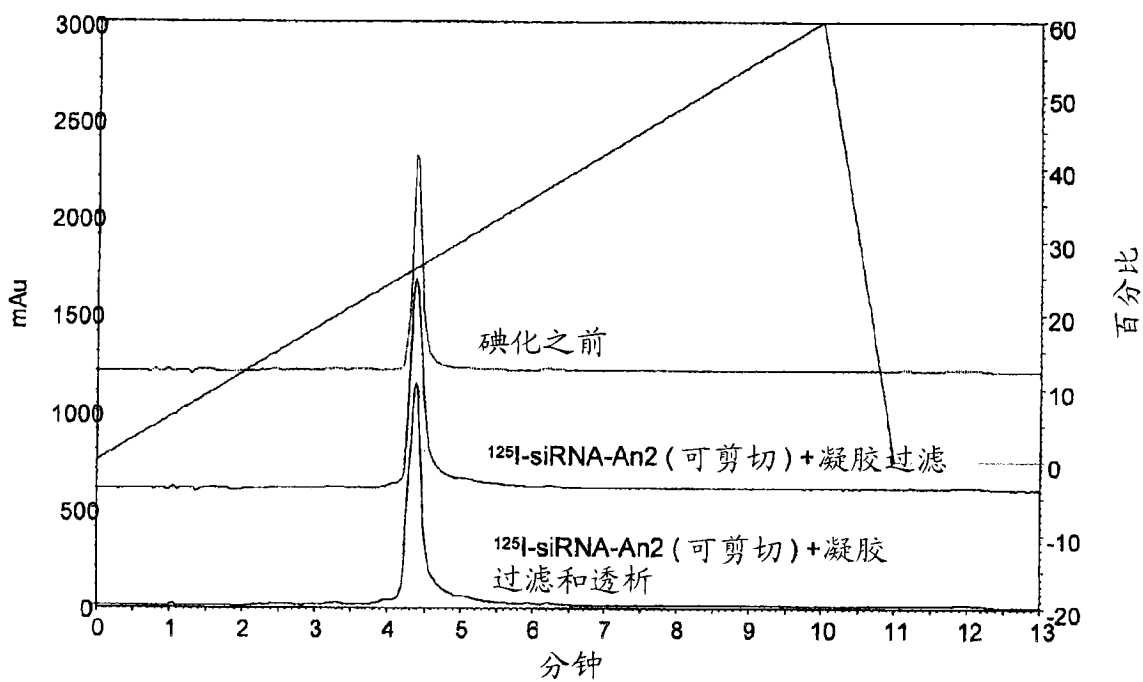


图 19A

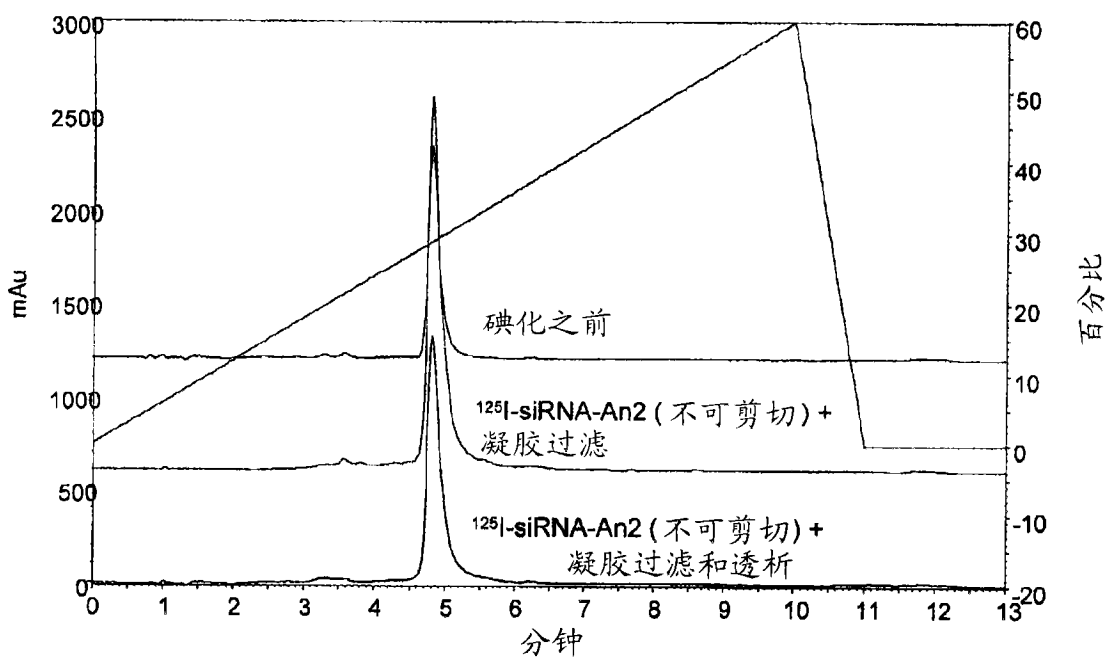


图 19B

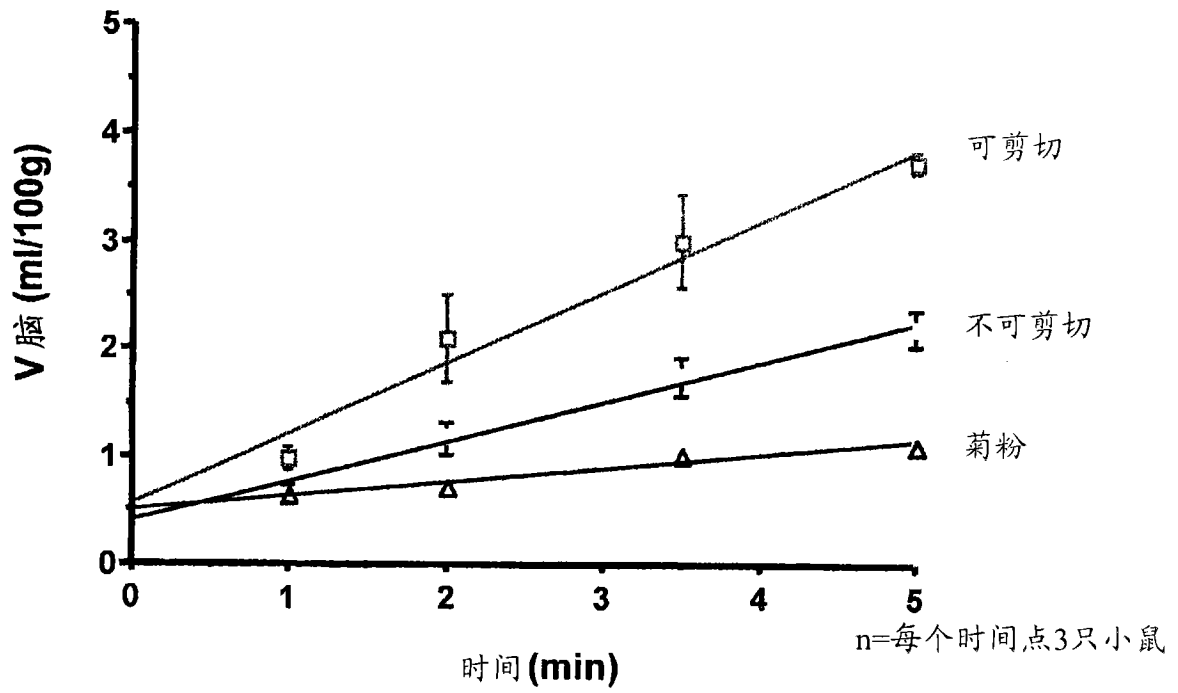


图 20

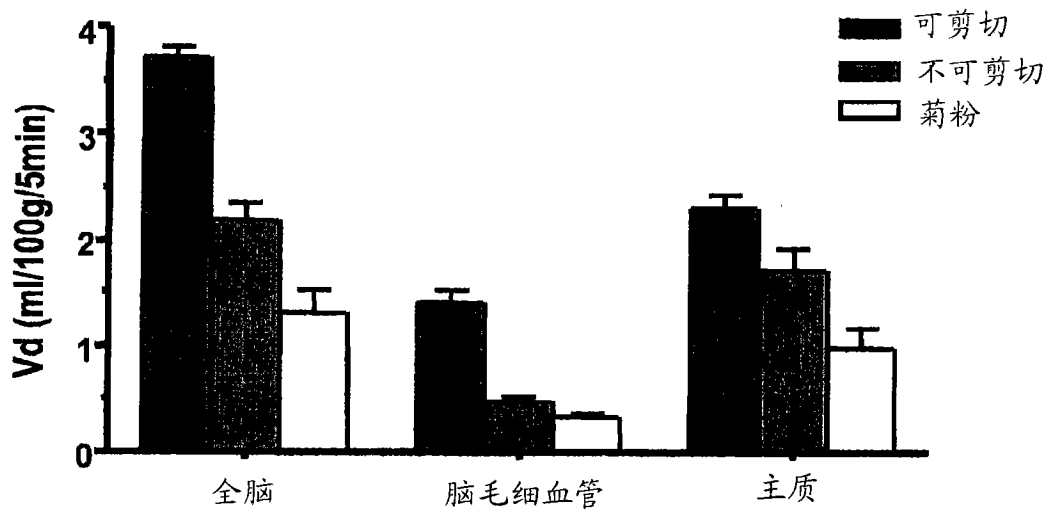


图 21

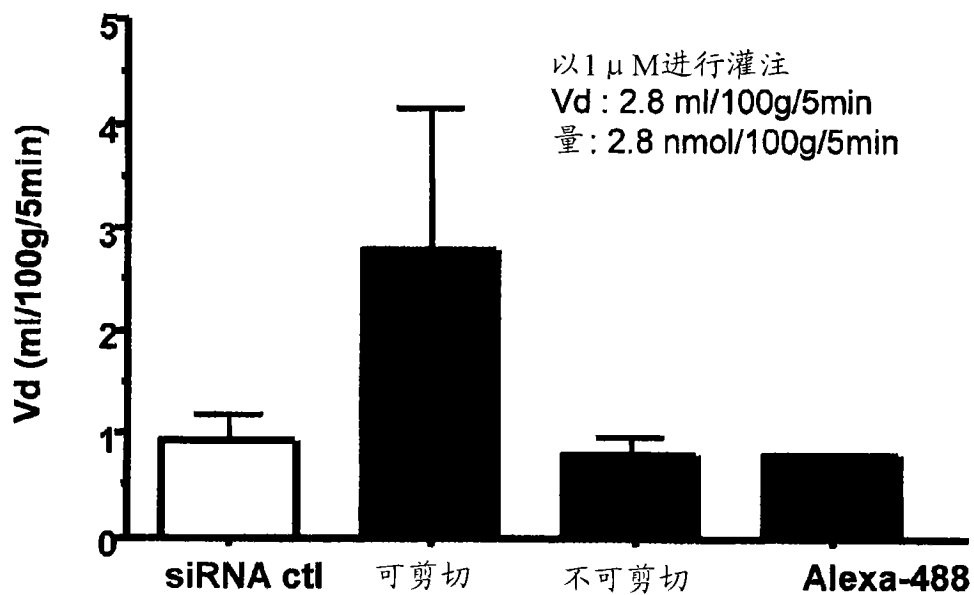


图 22

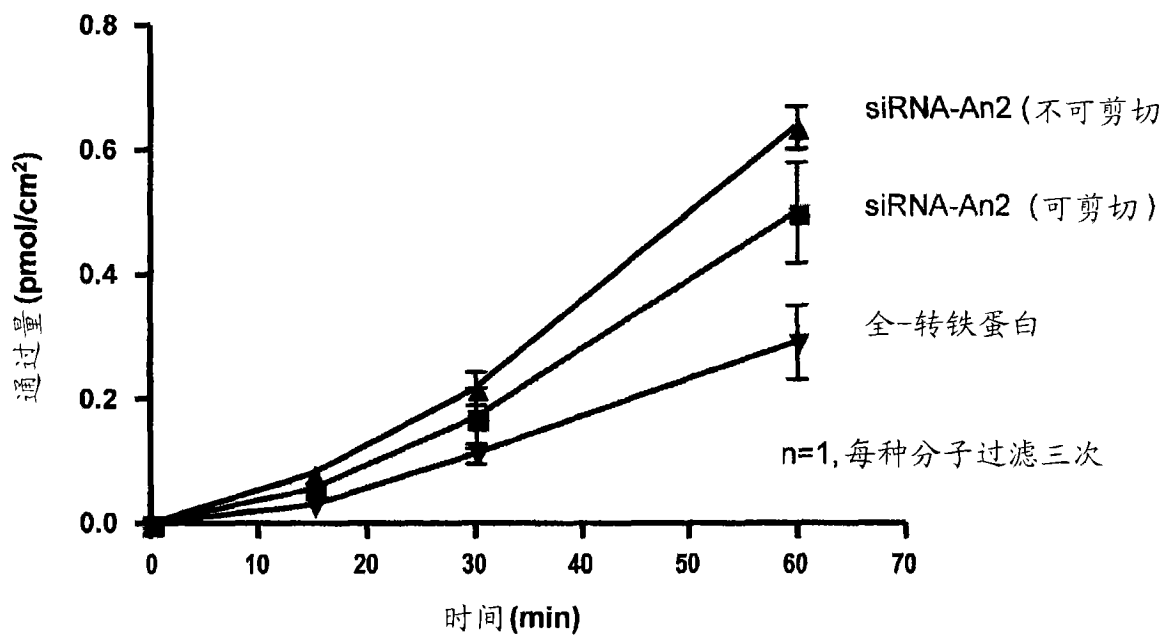


图 23

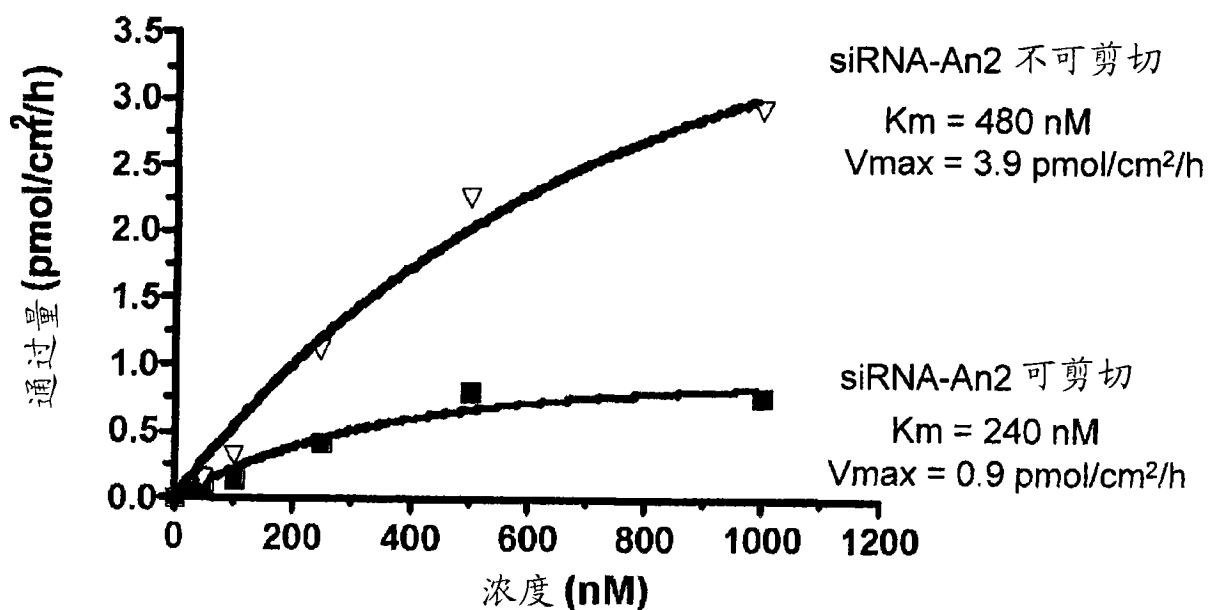


图 24

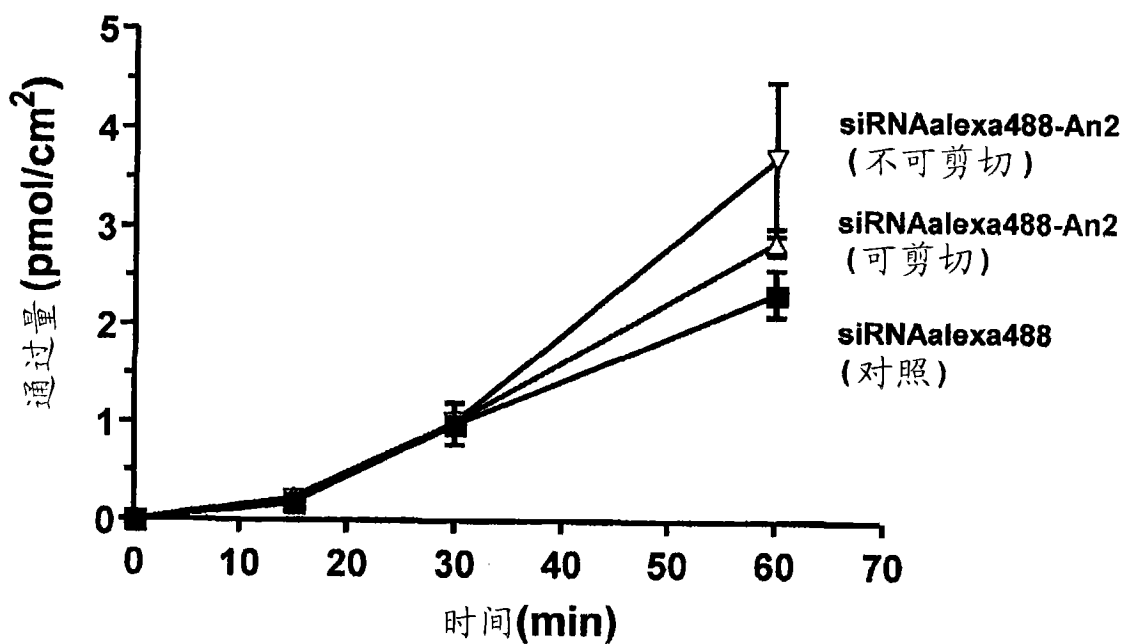


图 25