



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104797603 B

(45) 授权公告日 2020.11.10

(21) 申请号 201380058754.6

(22) 申请日 2013.09.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104797603 A

(43) 申请公布日 2015.07.22

(30) 优先权数据
61/706,506 2012.09.27 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015.05.11(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2013/050741 2013.09.27(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/047741 EN 2014.04.03(73) 专利权人 不列颠哥伦比亚大学
地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 王玉田 范雪莱 金武阳

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

(续)

(56) 对比文件

CN 101008012 A, 2007.08.01

CN 101134780 A, 2008.03.05

Bauer P O. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. 《Nature biotechnology》. 2010, 第28卷 (第3期), 256-263.

Shaltiel-Karyo R. Inhibiting α -synuclein oligomerization by stable cell-penetrating β -synuclein fragments recovers phenotype of Parkinson's disease model flies. 《PLoS One》. 2010, 第5卷 (第11期), 1-13.

Bauer P O. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. 《Nature biotechnology》. 2010, 第28卷 (第3期), 256-263.

Tu W. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. 《Cell》. 2010, 第140卷 (第2期), 222-234.

审查员 吕健

权利要求书2页 说明书33页

序列表16页 附图13页

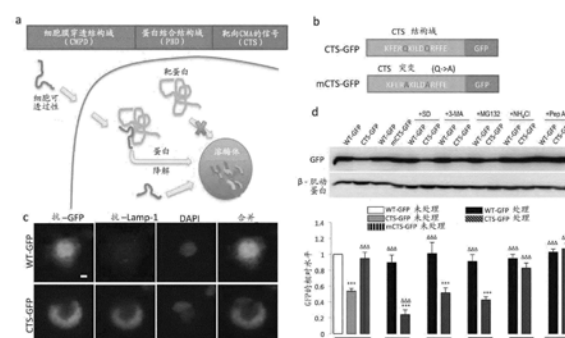
(54) 发明名称

肽导向的蛋白敲低

(57) 摘要

在一个方面, 本发明提供肽, 其包含: 分子伴侣介导的自噬 (CMA) 靶向信号结构域; 选择性结合至靶胞浆蛋白的蛋白结合结构域; 以及细胞膜穿透结构域 (CMPD)。在另一个方面, 本发明提供用于降低体外和动物中内源性靶蛋白的细胞内表达水平的方法, 其中所述方法涉及所述肽的施用。本发明还提供用于治疗动物中病理状况的方法, 所述方法包括将所述肽施用于所述动物。在一个实施方案中, 所述病理状况是神经退行性疾病。

病。在本发明的另一个实施方案中, 所述靶胞浆蛋白是死亡相关蛋白激酶1, 并且所述CMPD是HIV-1Tat蛋白的蛋白转导结构域。



[转续页]

[接上页]

(51) Int.Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

1. 肽,其从N端至C端依次包含以下的(c)、(b)和(a):
 - (a) 分子伴侣介导的自噬靶向信号结构域,其氨基酸序列为KFERQKILDQRFFE;
 - (b) 选择性结合至靶胞浆蛋白的蛋白结合结构域,其氨基酸序列为KKNRNKLRRQHSY;以及
 - (c) 细胞膜穿透结构域。
2. 肽,其包含:
 - (a) 分子伴侣介导的自噬靶向信号结构域;
 - (b) 选择性结合至靶胞浆蛋白的蛋白结合结构域;以及
 - (c) 细胞膜穿透结构域;其中所述自噬靶向信号结构域与所述蛋白结合结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。
3. 如权利要求1或2所述的肽,其中所述细胞膜穿透结构域选自:
HIV-1Tat蛋白的蛋白转导结构域,GRKKRRQRRRPPQ;
Antp,RQIKWFQNRMRKWK;
Buforin II,TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK;
人Clock蛋白DNA结合肽,KRVSRNKSEKRR;
模型两亲肽,KLALKLALKALKAALKLA;
K-FGF,AAVALLPAVLLALLAP;
Ku70衍生的肽,其选自以下的肽:VPMLKE、VPMLK、PMLKE或PMLK;
朊病毒,小鼠Prpe,MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKRKP;
pVEC,LLIILRRRIRKQAHAAHSK;
Pep-I,KETWWETWWTEWSQPKKKRKV;
SynB1,RGGRLSYRRRFSTSTGR;
转运素,GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL;
转运素-10,AGYLLGKINLKALAALAKKIL;
CADY,Ac-GLWRALWRLRLSLWRLWRA-半胱胺;
Pep-7,SDLWEMMMVSLACQY;
HN-1,TSPLNIHNGQKL;
VT5,DPKGDGPKGVTVTVTVTVTGKGDGPKPD;或,
pISL,RVIRVWFQNKRCDDKK。
4. 如权利要求1或2所述的肽,其中所述肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。
5. 如权利要求1或2所述的肽,其中所述靶胞浆蛋白是细胞中的内源性蛋白,并且其中所述肽用于降低内源性靶蛋白的细胞内表达水平。
6. 如权利要求1或2所述的肽,其中所述靶胞浆蛋白是胞浆蛋白激酶。
7. 如权利要求6所述的肽,其中所述胞浆蛋白激酶为活性形式。
8. 如权利要求7所述的肽,其中所述胞浆蛋白激酶是死亡相关蛋白激酶1。
9. 如权利要求8所述的肽,其中所述肽用于动物的全身施用。
10. 权利要求1-9任一项所述的肽在制备用于降低动物中内源性靶胞浆蛋白的细胞内表达水平以治疗所述动物的疾病的药物中的用途,所述内源性靶胞浆蛋白是死亡相关蛋白

激酶1。

11. 如权利要求10所述的用途,其中所述疾病是神经退行性疾病。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述神经退行性疾病是阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症、帕金森氏病或亨廷顿氏病。

13. 如权利要求10所述的用途,其中所述疾病是脊髓损伤、中风、创伤性脑损伤、酒精中毒和酒精戒断。

14. 如权利要求10所述的用途,其中所述疾病是与细胞死亡有关的疾病。

15. 如权利要求10所述的用途,其中所述疾病是中风。

16. 包含权利要求1-9任一项所述的肽和药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

17. 权利要求16所述的药物组合物在制备用于降低动物中内源性靶胞浆蛋白的细胞内表达水平以治疗所述动物的疾病的药物中的用途,所述内源性靶胞浆蛋白是死亡相关蛋白激酶1。

肽导向的蛋白敲低

发明领域

[0001] 本发明属于分子细胞生物学领域,涉及可被用于调节细胞中蛋白表达的重组核酸和蛋白构建体。具体地,本发明的方面涉及采用将靶向蛋白引导至溶酶体进行降解的构建体的肽介导的内源性细胞蛋白的敲低(knockdown)。

[0002] 发明背景

[0003] 用于改变内源性蛋白的表达水平的快速和可逆的方法,不仅对于研究复杂的生物系统是不可或缺的工具,而且可以潜在地推动许多疾病治疗的新疗法的研发。通过靶向DNA或mRNA来操作蛋白表达和功能的技术已经被证明是强大的工具,但通常被如缺乏特异性、速度、可逆性和可调性的问题困扰¹。另外,它们的在治疗人类疾病中的治疗用途可能被缺乏有效的全身递送系统所阻碍²。

[0004] 为了克服基于DNA和mRNA的蛋白操作的缺点²,已经尝试利用(harness)细胞蛋白降解系统来降低感兴趣的蛋白的水平³⁻⁶。这些建议的系统中许多要求蛋白的遗传操作以便于它们靶向和经特异性细胞蛋白降解系统进行降解¹。

[0005] 细胞膜穿透结构域(CMPDs)(也称作细胞穿透肽(CPPs)或蛋白转导结构域(PTDs))是介导穿过细胞膜的易位的蛋白结构域,如来自HIV-1病毒的Tat蛋白和黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)触足(Antennapedia)同源结构域(homeodomain)^{38,39,40}。

[0006] 发明概述

[0007] 在一个方面,本发明涉及基于肽的系统,其能够通过采用内源性溶酶体依赖的自噬系统、分子伴侣介导的自噬(CMA)产生非遗传修饰的天然蛋白的快速和可逆的敲低(图1a)。CMA是一类导致底物蛋白以一个分子接着一个分子为基础的选择性摄取的自噬作用。这种特异性是通过CMA-靶向信号(CTS)实现的,其在一些实例中可以涉及五肽基序KFERQ。CTS对于诱导CMA是必须的,并被发现于迄今为止CMA的所有底物蛋白中。为了将CMA用于靶蛋白降解,本发明的肽包含能够特异性识别并结合至靶蛋白的蛋白结合结构域,所述结构域被融合至能够将肽-蛋白复合体递送进入溶酶体进行降解的CTS。本发明的肽可以进一步包含能够将肽递送穿过质膜的细胞膜穿透结构域(CMPD)(如图1中所示的实施例)。CMPD可以是HIV-1Tat蛋白的蛋白转导结构域,GRKKRRQRRRPPQ;黑腹果蝇触足结构域Antp(第43-58位氨基酸),RQIKWFFQNRRMKWKK;抗菌肽Buthionin II,TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK;hClock-(第35-47位氨基酸)(人Clock蛋白DNA结合肽),KRVSRNKSEKKRR;MAP(模型两亲肽),KLALKLALKALKAALKLA;K-FGF,AAVALLPAVLLALLAP;Ku70衍生的肽,包含选自以下的肽:VPMLKE、VPMLK、PMLKE或PMLK;朊病毒(Prion),小鼠Prpe(第1-28位氨基酸),MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP;pVEC,LLIILRRRIRKQAHASHK;Pep-I,KETWWETWWTEWSQPKKKRKV;SynB1,RGGRLSYSRRRFSTSTGR;转运素(Transportan),GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL;转运素-10,AGYLLGKINLKALAALAKKIL;CADY,Ac-GLWRALWRLRLSLWRLLWRA-半胱胺(cysteamide);Pep-7,SDLWEMMMVSLACQY;HN-1,TSPLNIHNGQKL;VT5,DPKGD PKGVTVTVTVTVTGKGD PKPD;pISL,RVIRVWFQNKRCCKDKK;或任何其它已知的CMPD。

[0008] 因此,在本发明的一个方面,提供了敲低靶向肽组合物,其包含融合至蛋白结合结构域(PBD)的CMA-靶向信号(CTS),其中所述蛋白结合结构域是能够选择性结合至内源性蛋白的多肽序列,从而在细胞环境中将所述敲低靶向肽与所述内源性蛋白的接触会引起内源性蛋白的溶酶体降解。所述靶向肽组合物可以进一步包含细胞膜穿透结构域(CPMD)。CPMD可以是HIV-1Tat蛋白的蛋白转导结构域,GRKKRRQRRRPPQ;黑腹果蝇触足结构域Antp(第43-58位氨基酸),RQIKWQNRMMKWKK;Buforin II,TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK;hClock-(第35-47位氨基酸)(人Clock蛋白DNA结合肽),KRVSRNKSEKKRR;MAP(模型两亲肽),KLALKLALKALKAAALKLA;K-FGF,AAVALLPAVLLALLAP;Ku70衍生的肽,包含选自以下的肽:VPMLKE、VPMLK、PMLKE或PMLK;朊病毒,小鼠Prpe(第1-28位氨基酸),MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP;pVEC,LLIILRRRIRKQAHAAHSK;Pep-I,KETWWETWWTEWSQPKKKRKV;SynB1,RGGRLSYSRRRFSTSTGR;转运素(Transportan),GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL;转运素-10,AGYLLGKINLKALAALAKKIL;CADY,Ac-GLWRALWRLRLSLWRLLWRA-半胱胺(cysteamide);Pep-7,SDLWEMMMVSLACQY;HN-1,TSPLNIHNGQKL;VT5,DPKGD PKGVTVTVTVTVTGKGD PKPD;pISL,RVIRVWFQNKRCCKDKK;或任何其它已知的CPMD。

[0009] 因此,本发明提供了肽,其包含CMA-靶向信号结构域、选择性结合至靶蛋白的蛋白结合结构域,以及细胞膜穿透结构域。在本发明的一个方面,所述靶蛋白是内源性靶蛋白。在另一个方面,所述肽是被全身施用至动物,以降低内源性靶蛋白的细胞表达水平。

[0010] 在本发明的另一个方面,提供了用于在体外或体内降低有需要的动物中靶蛋白的细胞内表达水平的方法。当被体外使用时,所述方法包括靶蛋白和包含CTS结构域和选择性结合至靶蛋白的PBD的肽的共表达。所述体内方法包括给有需要的动物施用本文所述的肽,其包括CTS结构域、选择性结合至靶蛋白的PBD,以及细胞膜穿透结构域。

[0011] 还提供了包含CTS结构域、选择性结合至靶蛋白的PBD以及细胞膜穿透结构域的肽用于体外或体内降低靶蛋白的细胞内表达水平的用途。还提供了本文所述的肽用于制备降低靶蛋白的细胞内表达水平的药物的用途。在另一个方面,提供了用于在体外或体内降低靶蛋白的细胞内表达水平的本文所述的肽。

[0012] 在本发明的另一个方面,提供了期望敲低特定内源性蛋白的细胞表达的治疗疾病的方法,所述方法包括给患有或被怀疑患有这样的疾病的对象施用治疗有效量的敲低靶向肽,其中所述敲低靶向肽包含融合至蛋白结合结构域(PBD)的CMA-靶向信号(CTS),其中所述蛋白结合结构域是能够选择性结合至内源性蛋白的多肽序列。所述敲低靶向肽可以进一步包含能够将所述肽递送穿过质膜的细胞膜穿透结构域(CPMD)。CPMD可以是HIV-1Tat蛋白的蛋白转导结构域,GRKKRRQRRRPPQ;黑腹果蝇触足结构域Antp(第43-58位氨基酸),RQIKWQNRMMKWKK;Buforin II,TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK;hClock-(第35-47位氨基酸)(人Clock蛋白DNA结合肽),KRVSRNKSEKKRR;MAP(模型两亲肽),KLALKLALKALKAAALKLA;K-FGF,AAVALLPAVLLALLAP;Ku70衍生的肽,包含选自以下的肽:VPMLKE、VPMLK、PMLKE或PMLK;朊病毒,小鼠Prpe(第1-28位氨基酸),MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP;pVEC,LLIILRRRIRKQAHAAHSK;Pep-I,KETWWETWWTEWSQPKKKRKV;SynB1,RGGRLSYSRRRFSTSTGR;转运素(Transportan),GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL;转运素-10,AGYLLGKINLKALAALAKKIL;CADY,Ac-GLWRALWRLRLSLWRLLWRA-半胱胺;Pep-7,SDLWEMMMVSLACQY;HN-1,TSPLNIHNGQKL;

VT5,DPKGD PKGVTVTVTVTVTGKGD PKPD;pISL,RVIRVWFQNKRC DKK;或任何其它已知的CMPD。

[0013] 在另一个方面,提供了包含CTS结构域、选择性结合至内源性靶蛋白的PBD以及细胞膜穿透结构域的肽用于降低动物中内源性靶蛋白的细胞内表达水平以治疗所述动物的疾病的用途。还提供了本文所述的肽用于制备降低内源性靶蛋白的细胞内表达水平以治疗所述动物的疾病的药物的用途。在另一个方面,提供了用于在体外或体内降低内源性靶蛋白的细胞内表达水平以治疗所述动物的疾病的本文所述的肽。

[0014] 本文所述的化合物可以被用于体内或体外研究用途(即非临床的)以研究期望敲低内源性蛋白的疾病的备选治疗。另外,这些分离的多肽可以被单独地或作为试剂盒的一部分用于体内或体外研究以研究溶酶体降解、编码所分离的多肽的核苷酸、培养物中和/或动物模型中所维持的细胞的机制。

[0015] 内源性靶蛋白可以是任意内源性天然蛋白,其具有结合伴侣(partner)或其结合结构域序列是已知的或能够获得的。例如,所述靶蛋白可以是 α -突触核蛋白、突触后密度蛋白(PSD 95)、死亡相关蛋白激酶1(DAPK1)或其肽结合结构域已经或者能够被鉴定的任何胞浆蛋白激酶。

[0016] 因此,本发明还涉及能够靶向并敲低 α -突触核蛋白(涉及神经退行性突触核蛋白病如帕金森氏病的蛋白)的新的敲低靶向肽组合物。在一个方面,提供了与SEQ ID NO:1具有实质性相似性的分离的多肽。在另一个方面,提供了与SEQ ID NO:1任一具有至少90%同一性的分离的多肽,其中所述同一性可以针对序列的整个长度进行计算,并且其中所述分离的多肽引起 α -突触核蛋白的降解。在另一个方面,提供了与SEQ ID NO:1任一具有至少95%同一性的分离的多肽,其中所述同一性可以针对序列的整个长度进行计算,并且其中所述分离的多肽引起 α -突触核蛋白的降解。在另一个方面,提供了包含SEQ ID NO:1任一的分离的多肽。

[0017] 所述分离的多肽可以引起 α -突触核蛋白的降解或敲低。所述分离的多肽可以进一步包括缀合至所述分离的多肽的递送和靶向部分(moiety)。所述递送和靶向部分可以选自以下一种或多种:配体;蛋白转导结构域;或抗体。所述蛋白转导结构域可以是HIV-1Tat蛋白的细胞膜转导结构域。在一个方面,提供了与SEQ ID NO:2具有实质性相似性的分离的多肽。在另一个方面,提供了与SEQ ID NO:2任一具有至少90%同一性的分离的多肽;其中所述同一性可以针对序列的整个长度进行计算,并且其中所述分离的多肽引起 α -突触核蛋白的降解。在另一个方面,提供了与SEQ ID NO:2任一具有至少95%同一性的分离的多肽;其中所述同一性可以针对序列的整个长度进行计算,并且其中所述分离的多肽引起 α -突触核蛋白的降解。在另一个方面,提供了包含SEQ ID NO:2任一的分离的多肽。

[0018] 在本发明的另一个方面,提供了治疗期望降低 α -突触核蛋白的水平的患有或被怀疑患有疾病的对象的方法,所述方法包括给所述对象施用治疗有效量的靶向 α -突触核蛋白的敲低靶向肽。所述肽可以引起 α -突触核蛋白的降解或敲低。所述肽可以进一步包括缀合至所述分离的多肽的递送和靶向部分。所述敲低靶向肽可以实质性相似于SEQ ID NO:1或2。所述敲低靶向肽可以与SEQ ID NO:1或2具有90%、95%、99%或100%同一性。所述疾病可以是帕金森氏病。

[0019] 本发明还涉及能够选择性靶向并敲低胞浆蛋白激酶的新的敲低靶向肽组合物。在某些实施方案中,本发明涉及活化的胞浆蛋白激酶的选择性敲低。例如,所述蛋白激酶可以

是死亡相关蛋白激酶1 (DAPK1)。DAPK1是钙-钙调素调节的蛋白激酶,当处在非活性态时其不与N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体NR2B亚基相互作用。DAPK1是许多细胞类型中的细胞死亡促进蛋白激酶,并已知为在病理条件(如兴奋性毒性/缺血神经元损伤或氧化应激)下细胞死亡所必需的。已知这些过程参与各种神经退行性疾病,如阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)以及其它疾病如中风。在一个方面,提供了与SEQ ID NO:3具有实质性相似性的分离的多肽。在另一个方面,提供了与SEQ ID NO:3任一具有至少90%同一性的分离的多肽;其中所述同一性可以针对序列的整个长度进行计算,并且其中所述分离的多肽引起DAPK1的降解。在另一个方面,提供了与SEQ ID NO:3任一具有至少95%同一性的分离的多肽;其中所述同一性可以针对序列的整个长度进行计算,并且其中所述分离的多肽引起DAPK1的降解。在另一个方面,提供了包含SEQ ID NO:3任一的分离的多肽。

[0020] 所述分离的多肽可以引起DAPK1的降解或敲低。所述分离的多肽可以进一步包括缀合至所述分离的多肽的递送和靶向部分。所述递送和靶向部分可选自以下一种或多种:配体;蛋白转导结构域;或抗体。所述蛋白转导结构域可以是HIV-1Tat蛋白的细胞膜转导结构域。在一个方面,提供了与SEQ ID NO:4具有实质性相似性的分离的多肽。在另一个方面,提供了与SEQ ID NO:4任一具有至少90%同一性的分离的多肽;其中所述同一性可以针对序列的整个长度进行计算,并且其中所述分离的多肽引起DAPK1的降解。在另一个方面,提供了与SEQ ID NO:4任一具有至少95%同一性的分离的多肽;其中所述同一性可以针对序列的整个长度进行计算,并且其中所述分离的多肽引起DAPK1的降解。在另一个方面,提供了包含SEQ ID NO:4任一的分离的多肽。

[0021] 在本发明的另一个方面,提供了治疗期望敲低DAPK1的水平患有或被怀疑患有疾病的对象的方法,所述方法包括给所述对象施用治疗有效量的靶向DAPK1的敲低靶向肽。所述肽可以引起DAPK1的降解或敲低。所述肽可以进一步包括缀合至所述分离的多肽的递送和靶向部分。所述敲低靶向肽可以实质性相似于SEQ ID NO:3或4。所述敲低靶向肽可以与SEQ ID NO:3或4具有90%、95%、99%或100%同一性。所述疾病可以是阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、ALS或中风。

[0022] 在本发明的另一个方面,提供了治疗有需要的动物中病理状况的方法,所述方法包括给所述动物施用治疗有效量的包含CTS结构域、选择性结合至靶蛋白的PBD和细胞膜穿透结构域的肽,其中所述肽降低所述动物中靶蛋白的细胞内表达水平。所述病理状况可以是中枢神经系统的神经退行性疾病,如阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病或亨廷顿氏病。所述病理状况还可以是脊髓损伤、中风、创伤性脑损伤、酒精中毒(alcoholism)和酒精戒断。

[0023] 在另一个方面,提供了分离的多核苷酸,包括编码本文所述的多肽的一系列核苷酸。

[0024] 在另一个方面,提供了包含如本文所述的多肽和载剂(carrier)的组合物。所述载剂可以是药学上可接受的载剂。因此,本文还提供了包含本文所述的肽和药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0025] 在另一个方面,提供了用于治疗疾病的方法,其包括共同施用本文所述的药物组合物和另一种药学活性剂。

[0026] 在另一个方面,提供了包含如本文所述的分离的多核苷酸的载体(vector)。在另

一个方面,提供了包括如本文所述的载体的细胞。在另一个方面,提供了包括如本文所述的多核苷酸的细胞,其中所述多核苷酸可以被可操作地连接至表达控制序列。

[0027] 在另一个方面,提供了保护细胞免于细胞死亡和/或凋亡的方法,所述方法包括将如本文所述的分离的多肽递送至所述细胞。

[0028] 在另一个方面,提供了保护细胞免于细胞死亡和/或凋亡的方法,所述方法包括:(a)将如本文所述的载体递送至所述细胞;以及(b)表达由所述载体所携带的多核苷酸。

[0029] 在另一个方面,提供了表达多肽的方法,所述方法包括:(a)将如本文所述的载体递送至所述细胞;以及(b)在允许表达由所述载体所携带的多核苷酸条件下维持所述细胞。

[0030] 将所述载体递送至所述细胞可以在体内进行。将所述载体递送至所述细胞可以离体(ex vivo)进行。将所述载体递送至所述细胞可以在体外进行。

[0031] 在另一个方面,提供了包含靶向蛋白酶体的信号结构域、选择性结合至靶蛋白的蛋白结合结构域和细胞膜穿透结构域的靶向蛋白酶体的肽,其中所述靶向蛋白酶体的肽用于采用蛋白酶体降解来降低靶蛋白的细胞内表达水平。

[0032] 在另一个方面,提供了用于降低靶蛋白的细胞内表达水平的方法,其包括共同施用本文所述的包含CTS结构域的肽和靶向蛋白酶体的肽。

[0033] 对于本领域普通技术人员来说,在其结合所附图浏览本发明的以下具体实施方案的说明之后,本发明的其它方面和特征将变得更加明显。

[0034] 附图简述

[0035] 图1.根据本发明的示例性的实施方案,通过肽导向的溶酶体蛋白降解来快速和可逆敲低感兴趣的内源性蛋白的方法。(a)所述靶向肽介导的蛋白降解的示意图。施用之后,所述靶向肽通过其细胞膜穿透结构域(CMPD)进入细胞,通过其蛋白结合结构域(PBD)而结合至靶蛋白,并通过其分子伴侣介导的自噬靶向信号(CTS)伴侣(chaperone)肽-蛋白复合物至溶酶体进行降解。(b-d)所述CTS足以引导标记的GFP蛋白至溶酶体进行降解。(b)构建体CTS-GFP和mCTS-GFP的线性代表图。CTS-GFP是通过将CTS的氨基酸序列连接至GFP的C末端而构建的。mCTS-GFP是通过将CTS-GFP的两个谷氨酰胺氨基酸残基(Q,以红色突出)突变为丙氨酸(A,以红色突出)使得所述CTS(mCTS)功能上无能而构建的。(c)在野生型GFP(WT-GFP;顶图)或者CMA标记的GFP(CTS-GFP;底图)转染的COS7细胞中,GFP与溶酶体标记物lamp1的共定位的代表性共聚焦图像。CTS-GFP而不是WT-GFP被导入溶酶体隔室。比例条:20 μ M。(d)在分别用WT-GFP、mCTS-GFP或CTS-GFP(individual)转染24小时后的COS7细胞中,相对于WT-GFP的CTS-GFP和mCTS-GFP水平的定量。用WT-GFP或CTS-GFP转染的细胞,没有进行(未处理)或进行血清饥饿(+SD;n=5;以增强CMA活性)或用巨自噬抑制剂(+3-MA;10mM;n=5)、蛋白酶体抑制剂(+MG132;5 μ M;n=6)、或溶酶体抑制剂氯化铵(+NH₄Cl;20mM;n=6)或胃蛋白酶抑制剂A(+PepA;10 μ M;n=5)进行处理。顶图是细胞裂解物针对GFP的代表性免疫印迹。针对 β -肌动蛋白的膜再检测(re-probing)被用作上样对照。底图中的柱代表相对蛋白水平,其被标准化为WT-GFP(被任意设为1;白色柱)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001相对于WT-GFP(白色柱);相对于非处理的CTS-GFP水平[△]p<0.05、^{△△}p<0.01、^{△△△}p<0.001(灰色柱)。柱代表平均值 $\pm$ s.e.m(标准误差均值)。

[0036] 图2.含有CTS的肽能够靶向其结合伴侣,以通过肽-蛋白相互作用进行CMA介导的

溶酶体降解。(a-c).由靶向肽导向的溶酶体蛋白降解引起的 α -突触核蛋白的剂量依赖性敲低。FLAG- β syn36和FLAG- β syn36-CTS构建体的示意代表图示于a中。 β -突触核蛋白36-45氨基酸序列组成性地结合至 α -突触核蛋白,形成靶向肽的 α -突触核蛋白结合结构域。 α -突触核蛋白在HEK细胞中以各种比例与FLAG- β syn36-CTS (b) 或者FLAG- β syn36 (c) 进行共表达,并且在转染之后48hrs进行针对 α -突触核蛋白的免疫印迹。在顶部的柱状图中相对于单独 α -突触核蛋白(比例0:1;白色柱)的 α -突触核蛋白水平的定量和底部所示的代表性免疫印迹显示, β syn36-CTS (b;n=8) 而不是 β syn36 (c;n=4) 肽与 α -突触核蛋白在HEK细胞中的共表达以剂量依赖性的方式组成性地降低了 α -突触核蛋白。FLAG- β syn36-CTS诱导的 α -突触核蛋白的降低被溶酶体抑制剂NH₄Cl (b;20mM;n=7) 所阻止。(d-h) 由靶向肽导向的溶酶体降解引起的活性而不是非活性的DA PK1的剂量依赖性敲低。抗-HA被用于检测HA-NR2Bct-CTS和HA-NR2Bct-CTSm,而抗-FLAG被用于检测wtDA PK和cDA PK。(d) 示例性DA PK1靶向肽HA-NR2Bct-CTS及其非功能性CTS (CTSm) 对照肽HA-NR2Bct-CTSm的示意图。HA-NR2Bct-CTS的DA PK1结合结构域含有只能够特异性结合至活性而不是非活性的DA PK1的、NMDA受体NR2B亚基的羧基尾区域1242-1342残基之间的氨基酸序列。Flag标记的野生型(非活性的) DA PK1 (wtDA PK1) 或组成型活性突变体的DA PK1 (cDA PK1) 在HEK细胞中以各种比例与HA-NR2Bct-CTS或者HA-NR2Bct-CTSm共表达,并在其后24小时进行免疫共沉淀和/或免疫印迹。免疫印迹之后的相互免疫共沉淀显示,NR2Bct与cDA PK1而不是wtDA PK1进行特异性相互作用,(e) HA-NR2Bct-CTS特异性并且剂量依赖性地降低cDA PK1 (f;n=4) 而不是wtDA PK1 (g;n=3) 的水平。HA-NR2Bct-CTS介导的cDA PK1敲低被用NH₄Cl的溶酶体抑制(20mM;n=4;与HA-NR2Bct-CTS:cDA PK1=8:1组相比, $\Delta\Delta p<0.001$) 和CMA-靶向信号的突变灭活(h;HA-NR2Bct-CTSm;n=8) 所显著阻止。与pcDNA3.0载体(0:1,白色柱)共转染的 α -突触核蛋白(b-c)、cDA PK1或wtDA PK1(e-g)的水平代表对照值,被任意设为1。针对 β -肌动蛋白的膜再检测被用作上样对照。与对照相比,* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ 。柱代表相对平均值 $\pm$ s.e.m。

[0037] 图3.在培养的皮层神经元中由质膜穿透重组CMA靶向肽引起的天然DA PK1的可逆的和剂量与活性依赖性的敲低。(a) NMDA处理(50 μ M;30min)活化DA PK1,并诱导其与NMDA受体的结合。顶图中针对磷酸化的DA PK1 (pDA PK1) 和针对总DA PK1 (DA PK1) 的连续(sequential)免疫印迹显示,NMDA刺激活化了DA PK1,如其磷酸化水平中的时间依赖性的降低所证实的。底图:与抗-NR2B的DA PK1免疫共沉淀,接着针对DA PK1 (DA PK1) 和NR2B亚基(NR2B)的连续免疫印迹,显示在NMDA刺激之后DA PK1和NR2B之间降低的结合。(b) 采用大肠杆菌(E.coli)表达系统,可透过膜的重组TATNR2Bct-CTS和TAT-NR2Bct肽(示意于底图中)的设计和产生。肽的纯度采用考马斯蓝对SDS-PAGE染色进行可视化(顶图)。(c-f) TAT-NR2Bct-CTS而不是TAT-NR2Bct,通过引导其进行溶酶体降解而以NMDA活化依赖性的方式降低DA PK1的水平。在所有的图中,DA PK1的相对水平被标准化为未处理的天然组中的DA PK1水平(白色柱,被任意设为1),并与天然组(白色柱,*)或NMDA处理组(灰色柱, Δ)进行对比。针对 β -肌动蛋白的膜再检测被用作上样对照。(c) TAT-NR2Bct-CTS (n=9) 而不是TAT-NR2Bct (n=6) 敲低了通过NMDA刺激活化的DA PK1,并且该敲低在溶酶体抑制剂NH₄Cl (20mM;n=5) 的存在下被阻止。在NMDA刺激之前60min和期间(50 μ M;30min),肽被以200 μ M灌流至神经元,然后在洗出NMDA和肽之后2小时确定DA PK1的水平。TAT-NR2Bct-CTS介导的DA PK1的敲低是剂量依赖性的(d;n=4) 和时间依赖性的(e;n=6)。(f) 在TAT-NR2Bct-CTS的存在下DA PK1的

敲低持续存在。在洗出NMDA和肽之后7小时确定DAPK1的水平。His-TAT-NR2Bct-CTS的单独预处理(单独;200 μ M,在30min的NMDA刺激之前60min和期间)导致DAPK1的瞬时降低,在7小时内回复至未处理水平($n=4$;与NMDA处理组(灰色柱)相比 $p=0.888$)。但是,NMDA洗出之后另外剂量的肽产生了DAPK1的持续降低,在7小时仍然保持低水平($n=4$;与NMDA处理组相比 $\Delta\Delta p=0.002$)。

[0038] 图4.短的合成的NR2B-CTS肽的细胞内递送特异性地敲低培养的神经元中的活性天然DAPK1。(a)合成的NR2B-CTS、TAT-NR2B和TAT-NR2B-CTS肽的示意图。(b-e)当被递送进入皮层神经元时,NR2B-CTS以NMDA刺激依赖性的方式特异性降低天然DAPK1的水平。NR2B-CTS与细胞内递送载体肽Pep-1以1:4的比例混合30min,以形成可透过质膜的肽复合体,然后所述复合体在NMDA处理之前60min和期间(50 μ M;30min)被灌流进入神经元。通过每个柱状图中免疫印迹的定量来确定DAPK1的水平,并且在柱下给出相应的代表性免疫印迹。将代表相对DAPK1水平的柱标准化为未处理的天然组(白色柱,被任意设为1),并与天然的(白色柱,*)或NMD处理组(灰色柱, Δ)进行比较。针对 β -肌动蛋白的膜检测被用作上样对照。NR2B-CTS加Pep-1(但不是单独Pep-1)在NMDA处理之后,剂量(b; $n=5$)和时间依赖性地(c; $n=4$)降低培养的皮层神经元中内源性DAPK1的水平。所述降低要求NMDA刺激(b),并且被用NH₄Cl抑制溶酶体功能所恢复(d;NH₄Cl 20mM; $n=8$;与NMDA处理组相比 $p=0.118$)。(e)合成的细胞穿透肽TAT-NR2B-CTS(25 μ M; $n=6$;与NMDA处理组相比 $p=0.001$),而不是缺乏CTS的对照TAT-NR2B(25 μ M; $n=4$;与NMDA处理组相比 $p=0.223$),降低了天然DAPK1,并且该降低在溶酶体抑制剂NH₄Cl(20mM; $n=5$;与NMDA处理组相比 $p=0.302$)的存在下被阻止。

[0039] 图5.TAT-NR2Bct-CTS肽敲低H₂O₂活化的天然DAPK1,保护神经元免受H₂O₂诱导的神经毒性。(a)针对磷酸化的DAPK1(pDAPK1)的免疫印迹显示,H₂O₂处理(300 μ M;30min; $n=4$)所引起的天然DAPK1的时间依赖性活化(磷酸化的降低)。(b)DAPK1印迹显示,在100 μ M的H₂O₂处理之前60min和期间,TAT-NR2Bct-CTS(36.54 $\pm$ 7.1%, $n=8$;与对照相比 $p=0.001$)而不是TAT-NR2Bct($n=7$;89.13 $\pm$ 10.78%;与对照相比 $p=0.311$)产生了位于2小时的DAPK1水平显著降低,并且这被溶酶体抑制剂NH₄Cl(20mM; $n=8$;与对照相比 $p=0.003$;并且与H₂O₂组相比 $p=0.106$)显著抑制。柱代表相对于未处理的天然组(白色柱,被任意设为1)的DAPK1水平,并与天然的(白色柱,*)或H₂O₂处理组(灰色柱, Δ)进行比较。针对 β -肌动蛋白的膜再检测被用作上样对照。(c)LDH细胞死亡测定显示,H₂O₂处理(300 μ M;30min)导致处理之后12小时神经元死亡的显著升高($n=4$;2.38 $\pm$ 2.70;与对照相比 $p=0.001$),其能够被加入H₂O₂分解酶过氧化氢酶($n=4$;1.17 $\pm$ 1.76;与H₂O₂组相比 $p=0.001$)所恢复。这种H₂O₂诱导的神经毒性被用TAT-NR2Bct-CTS(50 μ M;在实验之前60min使用并在整个实验中保持; $n=3$;1.56 $\pm$ 0.08;与H₂O₂组相比 $p=0.001$)而不是TAT-NR2Bct(50 μ M; $n=3$;2.63 $\pm$ 17.85;与H₂O₂组相比 $p=0.105$)处理神经元或者用NMDA受体拮抗剂APV(50 μ M; $n=4$;2.16 $\pm$ 13.8;与H₂O₂组相比 $p=0.169$)处理神经元而显著降低。* $\Delta p<0.05$,**, $\Delta\Delta p<0.01$ 和***, $\Delta\Delta\Delta p<0.001$;柱代表相对平均值 $\pm$ s.e.m.,其被标准化为天然未处理对照(白色柱,被任意设为1)。

[0040] 图6.在用CTS-GFP瞬时转染的COS7细胞中,CTS-GFP以时间依赖性的方式被降解,而内源性CMA底物GAPDH保持稳定。柱代表蛋白水平,其被标准化为12hr WT-GFP组(白色柱),并与12hr WT-GFP组(白色柱,*)或12hr CTS-GFP组(灰色柱, Δ)进行比较。*, $\Delta p<0.05$,**, $\Delta\Delta p<0.01$ 和***, $\Delta\Delta\Delta p<0.001$,柱代表相对平均值 $\pm$ s.e.m.。

[0041] 图7. TAT-NR2BCTM诱导的DAPK1的降解降低了神经培养物中各种亚细胞隔室中DAPK1的水平。(a) 各种亚细胞部分(fraction)的免疫印迹显示, NMDA处理(50 μ M, 30min)产生了DAPK1从细胞核部分(细胞核; 左图)至胞浆(胞浆; 中图)和线粒体(线粒体; 右图)部分的时间依赖性易位。 β -肌动蛋白用作上样对照。LB1、HSP90和VDAC分别用作细胞核、胞浆和线粒体部分的上样对照。用NMDA处理之后, 在2hrs细胞核中DAPK1水平显著降低(左图: $n=4$; $p<0.001$, $F(5, 18)=12.349$), 其保持达8小时。相反, 在4小时胞浆中DAPK1水平显著升高(中图: $n=4$; $p=0.034$, $F(5, 18)=3.112$)并在8小时回复至基线, 而在NMDA洗出之后线粒体中DAPK1立即升高(右图: $n=5$; $p=0.020$, $F(5, 20)=3.499$), 其保持至NMDA洗出后6小时。(b) 与天然对照和NMDA处理组相比(灰色柱), TAT-NR2BCTM的灌流(25 μ M, NMDA处理之前1hr和期间)显著降低了在NMDA处理和洗出后2小时细胞核(左图, $n=4$, $p<0.001$, $F(2, 9)=19.139$)、胞浆(中图, $n=4$, $p=0.006$, $F(2, 8)=10.417$)和线粒体(右图, $n=4$, $p<0.001$, $F(2, 9)=18.597$)亚细胞部分中的DAPK1。采用单因素方差分析(One way ANOVA)以及图基事后检验法(Tukey post-hoc)。*与对照相比, Δ 与NMDA处理组相比(灰色柱)。*, $\Delta p<0.05$, **, $\Delta\Delta p<0.01$; ***, $\Delta\Delta\Delta p<0.001$ 柱代表相对平均值 $\pm$ s.e.m., 其被标准化为天然未处理对照(被任意设为1)。

[0042] 图8. siRNA导向的Lamp2a敲低减少了TAT-NR2BCTM诱导的DAPK1降解。(a和b) Lamp2a的免疫印迹显示, 在siRNA处理之后3天siRNA(60pmol)导向的Lamp2a敲低, 而没有明显的由LDH测定所测量的细胞毒性。(b) 阳性对照通过用Triton X-100在LDH测定之前裂解细胞获得。 $n=3$, 单因素方差分析, $p=0.024$, $F(3, 8)=5.474$ 。Scrb-siRNA: 乱序的siRNA, Lamp2a-siRNA: 靶向Lamp2a的siRNA。(c) 连续(sequential)免疫印迹显示, 用siRNA介导的Lamp2a敲低特异性阻断CMA抑制了TAT-NR2BCTM诱导的DAPK1敲低。siRNA处理之后3天, 细胞在NMDA之前和期间(50 μ M; 30min)于TAT-NR2BCTM(25 μ M)中孵育1小时。肽和NMDA洗出之后2小时收获细胞。 β -肌动蛋白用作上样对照。Lamp2a敲低: $n=7$, 单因素方差分析 $p<0.001$, $F(3, 24)=13.455$; DAPK1敲低: $n=7$, 针对秩(Ranks)用图基事后检验法进行Kruskal-Wallis单因素方差分析, $p=0.002$, $H(3)=15.047$; *与天然对照相比, Δ 与NMDA处理组相比(灰色柱)。*, $\Delta p<0.05$, ** $p<0.01$ 和*** $p<0.001$; 柱代表相对平均值 $\pm$ s.e.m., 其被标准化为天然未处理对照(被任意设为1)。

[0043] 图9. 在培养的神经元中靶肽介导的 α -突触核蛋白和PSD95的各自降解。(a) 顶图: 合成的细胞穿透 α -突触核蛋白靶向肽TAT- β syn-CTM及其对照TAT- β syn的示意图。中图: 免疫印迹证实, 在4小时TAT- β syn-CTM(25 μ M; $n=5$)但不是缺乏CTM的对照肽TAT- β syn(25 μ M; $n=5$)特异性降低靶向的内源性 α -突触核蛋白(单因素方差分析图基事后检验法, $p<0.001$, $F(3, 16)=12.435$), 而不影响不相关的对照蛋白PSD-95(底图)。该降低在溶酶体抑制剂NH₄Cl(20mM; $n=5$)存在下被阻止。(b) 顶图: PSD-95靶向肽TAT-NR2B9c-CTM及对照TAT-NR2B9c的示意图。中图: TAT-NR2B9c-CTM(25 μ M; $n=4$)而不是Tat-NR2B9c(25 μ M; $n=4$)有效地降解了内源性PSD95(单因素方差分析图基事后检验法, $p<0.001$, $F(3, 12)=18.154$), 而不影响未靶向的蛋白 α -突触核蛋白(底图)。NH₄Cl恢复了PSD95降解。针对 β -肌动蛋白的膜再检测被用作另外的特异性和上样对照。* $p<0.05$, **, $\Delta\Delta p<0.01$ 和*** $p<0.001$; 柱代表相对平均值 $\pm$ s.e.m., 其被标准化为天然未处理对照(被任意设为1)。

[0044] 图10. 免疫印迹显示, 巨自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)不能恢复靶向肽介导的

降解。(a) α -突触核蛋白靶向肽TAT- β syn-CTM (25 μ M) 在3-MA存在 (10mM) 下显著降低天然 α -突触核蛋白。 α -突触核蛋白的基础水平显示出在加入3-MA下非显著升高的倾向 ($N=5$, $p<0.001$, $F(3, 16)=47.013$)。(b) 3-MA并不通过其靶向肽TAT-NR2BCTM来改变DAPK1的基础水平或者NMDA活化依赖性敲低 ($n=4$, $p<0.001$, $F(3, 12)=21.675$)。(c) 类似地, 3-MA并不影响PSD95的基础水平或者TAT-NR2B9c降低的水平 ($n=4$, $p<0.001$, $F(3, 12)=14.836$)。 β -肌动蛋白用作上样对照。采用图基事后检验法的单因素方差分析。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ 和 $***p<0.001$;柱代表相对平均值 $\pm$ s.e.m., 其被标准化为天然未处理对照(被任意设为1)。

[0045] 图11. 处理之后24小时, 靶向肽并不显示显著细胞毒性。用25 μ M的重组(左图, $n=4$, $p=0.005$, $H(3)=12.706$) 或合成(右图, $n=4$, $p<0.001$, $H(7)=28.074$) 肽处理皮层神经元, 并且24小时之后, 通过乳酸脱氢酶 (LDH) 测定评估细胞死亡。对于阳性对照, 按照制造商的说明书用Triton-X 100裂解细胞。采用针对秩 (Ranks) 的Kruskal-Wallis单因素方差分析进行分析。 $*p<0.05$ 。柱代表相对平均值 $\pm$ s.e.m., 其被标准化为天然未处理对照(被任意设为1)。每组中 $N=4$ 。

[0046] 图12. TAT-NR2BCTM的全身应用特异性敲低缺血脑区域中的DAPK1, 并降低大鼠中脑动脉闭塞局灶性缺血体外模型中的缺血性神经元损伤。(a) 显示包括经受1小时短暂MCAO的大鼠中DAPK1降解的针对免疫印迹和免疫组化分析的组织收集以时间为轴的实验操作步骤示意图。(b) 显示MCAO冲击 (challenge) 在同侧脑中可靠地诱导损伤/梗塞区域的一系列大鼠脑横截面切片的2,3,5-氯化三苯四唑 (TTC) 染色的图。(c) 在代表性TTC染色的脑切片中黑色虚线显示针对免疫印迹取出 (removed) 的脑区域。(d) 针对DAPK1的免疫印迹证实, 在全身应用TAT-NR2BCTM (10mg/kg, i.v. (静脉注射); $n=3$; 双尾学生 (Student) t 检验, $t(4)=14.459$, $p<0.001$) 而不是其对照TAT-NR2B (10mg/kg, i.v.; $n=3$; 双尾学生 t 检验, $t(4)=0.739$, $p=0.501$) 之后, 仅在从梗塞侧 (MCAO) 而不是对侧 (对照) 收集的组织中DAPK1的特异性敲低。针对 β -肌动蛋白的膜再检测被用作上样对照。 $***p<0.001$; 柱代表相对平均值 $\pm$ s.e.m., 其被标准化为未闭塞的对照侧(被任意设为1)。(e) 相邻脑切片大鼠的苏木精&伊红 (H&E染色; 粉色; 左图) 和免疫组化DAPK1染色 (DAPK1的IHC; 绿色; 右图) 的代表图显示, 与盐水 (顶图) 和TAT-NR2B处理 (中图) 对照相比, TAT-NR2BCTM处理 (底图) 选择性降低脑的MCAO侧中的DAPK1 (右图; 绿色) 的水平 and 梗塞区域 (左图; 粉色)。注意: TAT-NR2BCTM仅降低相应于梗塞脑区的区域中的DAPK1。DAPK1的有效敲低与脑损伤的显著降低相关。

[0047] 发明详述

[0048] 如本文所使用的术语“敲低 (knockdown)”是用来指细胞中蛋白的表达水平中的降低。因此, “敲低”可以与短语“蛋白水平的降低”、“蛋白的表达水平的降低”、“细胞内蛋白的表达水平的降低”或这些短语的任意变化互换使用。

[0049] 如本文所使用的术语“同一性”是指测量两条肽之间或两个核酸分子之间的序列同一性。通过比较每条序列中为比较目的可被对齐 (align) 的位置能够确定同一性。两条氨基酸或核酸序列被认为是基本上相同, 如果它们共享至少大约80%的序列同一性、或至少大约81%的序列同一性、或至少大约82%的序列同一性、或至少大约83%的序列同一性、至少大约84%的序列同一性、或至少大约85%的序列同一性、或至少大约86%的序列同一性、或至少大约87%的序列同一性、或至少大约88%的序列同一性、或至少大约89%的序列同一性、或至少大约90%的序列同一性。或者, 两条氨基酸或核酸序列被认为基本上相同, 如

果它们共享至少大约91%的序列同一性、或至少大约92%的序列同一性、或至少大约93%的序列同一性、至少大约94%的序列同一性、或至少大约95%的序列同一性、或至少大约96%的序列同一性、或至少大约97%的序列同一性、或至少大约98%的序列同一性、或至少大约99%的序列同一性。

[0050] 序列同一性可以通过目前使用并且最初描述于Altschul et al. (1990) J.Mol.Biol.215:403-410中的BLAST算法进行确定。可以采用公开的默认设置使用BLAST算法。当在所比较的序列中的位置被同一碱基或氨基酸占据时,分子被认为在该位置具有共享的同一性。序列之间同一性的程度是由序列所共享的匹配位置数和序列之间重叠程度的函数。此外,当考虑SEQ ID NOs:1-4的同一性程度时,是打算分别比较SEQ ID NOs:1-4的氨基酸当量数。当确定SEQ ID NOs:1-4的同一性程度时,并不打算考虑另外的序列(即,其它分别不是相应于SEQ ID NOs:1-4的20、10或15个氨基酸)。给定序列的序列同一性可以基于参考序列(即SEQ ID NOs:1-4)的长度进行计算。

[0051] 在某些实施方案中,提供了具有与SEQ ID NO:1-4基本上相似的氨基酸组成的分离的多肽组合物。当等价区域(即分别~20或10或15个氨基酸)进行比较时,其中基本上相似是指包括(encompass)序列同一性的程度。此外,基本上相似是指包括保守取代和修饰的氨基酸,只要本文所述的细胞保护活性或其它活性被保持。

[0052] 如本文所使用,‘肽’或‘多肽’可以互换使用,并且一般是指由肽键或修饰的肽键共价连接的至少两个氨基酸残基组成的化合物。但是,当具体用于指特定SEQ ID NO,其是指包含由SEQ ID NO:1或2表示的 α -突触核蛋白、或由SEQ ID NO:3或4表示的DAPK1的氨基酸序列,其中所述多肽具有细胞保护活性。修饰的肽键可以包括例如,可以给所述肽提供另外的期望性质(如提高的半衰期)的肽电子等排体(isostere)(修饰的肽键)。肽可以包含至少两个氨基酸。包含本文所述的肽或多肽的多个氨基酸还可以或者由天然过程(如翻译后加工)或者由本领域公知的化学修饰技术来进行修饰。修饰可以发生在肽的任何地方,包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。应该理解的是,相同类型的修饰可以在给定肽中几个位点以相同或变化的程度存在。

[0053] 氨基酸是含有胺基团、羧基团和在不同氨基酸之间变化的侧链的分子。氨基酸可以其天然形式存在或者它可以是合成的氨基酸。氨基酸可以被描述成例如极性的、非极性的、酸性的、碱性的、芳香族的或中性的。极性氨基酸是可以通过氢键与水在生物学或近中性pH下相互作用的氨基酸。氨基酸的极性是生物学或近中性pH下氢键程度的指示(indicator)。极性氨基酸的实例包括丝氨酸、脯氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、酪氨酸和谷氨酸。非极性氨基酸的实例包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。酸性氨基酸具有在中性pH下的净负电荷。酸性氨基酸的实例包括天冬氨酸和谷氨酸。碱性氨基酸具有在中性pH下净正电荷。碱性氨基酸的实例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。芳香族氨基酸一般是非极性,并可能参与疏水相互作用。芳香族氨基酸的实例包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。酪氨酸也可以通过芳香族侧链上的羟基参与氢键。中性、脂肪族氨基酸一般是非极性和疏水性。中性氨基酸的实例包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和蛋氨酸。氨基酸可以被超过一个描述性分类进行描述。共享共同的描述性分类的氨基酸可以在肽中彼此取代。根据下表A,氨基酸残基一般可以由一字母或三字母的名称来表示,对应于该氨基酸的俗名。包含本文所述

的肽的多个氨基酸应当被理解为以L-或D-构型存在。本文所述的氨基酸可以通过用可改变所述肽的循环半衰期而不影响其生物学活性的甲基化、酰胺化、乙酰化或用其它化学基团取代来进行修饰。另外,在本发明的肽中可以存在或者不存在二硫键。非标准氨基酸可以发生于自然界中,并且可以或者可以不被遗传编码。遗传编码的非标准氨基酸的实例包括硒半胱氨酸,有时被掺入至一些蛋白的UGA密码子(其正常为终止密码子),或吡咯赖氨酸,有时被掺入一些蛋白的UAG密码子(其正常为终止密码子)。例如,一些没有被遗传编码的非标准氨基酸可来自于对已掺入肽中的标准氨基酸的修饰,或可以是代谢中间物或前体。非标准氨基酸的实例包括4-羟基脯氨酸、5-羟基赖氨酸、6-N-甲基赖氨酸、 γ -羧基谷氨酸、锁链素、硒半胱氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸、羊毛硫氨酸、1-氨基环丙烷-1-羧酸、 γ -氨基丁酸、肉碱、肌氨酸或N-甲酰蛋氨酸。标准和非标准氨基酸的合成变体也是已知的,并且可以包括化学衍生的氨基酸、加标记以用于识别或追踪的氨基酸、或在 α 碳上的具有各种侧基的氨基酸。这样的侧基的实例是本领域已知的,并且可以包括脂肪族、单芳香族、多环芳香族、杂环、异核、氨基、烷氨基、羧基、羧酰胺、羧基酯、胍、脒、羟基、烷氧基、巯基、烷基巯基,或其它含杂原子的侧链。其它合成的氨基酸可以包括 α -氨基酸、非 α -氨基酸如 β -氨基酸、脱羧基或脱氨基氨基酸。氨基酸的合成变体可以采用本领域已知的一般方法合成,或可以商业供应商处购买,例如RSP氨基酸LLC (Shirley, MA)。

[0054] 本领域技术人员应当理解的是,本文所述的肽或多肽中的单个(individual)氨基酸的方面可以是被取代的。氨基酸序列同一性可以采用利用BLAST(基本局部比对搜索工具)2.0算法的BLASTP和TBLASTN程序进行计算。用于计算氨基酸序列相似性或同一性的技术是本领域技术人员公知的,并且BLAST算法的用途被描述于ALTSCHUL et al.1990, J Mol. Biol.215:403-410和ALTSCHUL et al. (1997), Nucleic Acids Res.25:3389-3402中。

[0055] 此外,本领域技术人员应当理解的是,某些取代更可能导致活性的保持。例如,氨基酸可以被描述成例如极性的、非极性的、酸性的、碱性的、芳香族的或中性的。极性氨基酸是可以通过氢键与水在生物学或近中性pH下相互作用的氨基酸。氨基酸的极性是生物学或近中性pH下氢键程度的指标。极性氨基酸的实例包括丝氨酸、脯氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、酪氨酸和谷氨酸。非极性氨基酸的实例包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。酸性氨基酸具有在中性pH下的净负电荷。酸性氨基酸的实例包括天冬氨酸和谷氨酸。碱性氨基酸具有在中性pH下净正电荷。碱性氨基酸的实例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0056] 芳香族氨基酸一般是非极性,并可能参与疏水相互作用。芳香族氨基酸的实例包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。酪氨酸也可以通过芳香族侧链上的羟基参与氢键。中性、脂肪族氨基酸一般是非极性和疏水性的。中性氨基酸的实例包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和蛋氨酸。氨基酸可以被超过一个描述性分类进行描述。共享共同的描述性分类的氨基酸可以在肽中彼此取代。

[0057] 被用于描述肽或多肽的命名法可遵循其中氨基被呈现给各氨基酸残基的左侧和羧基呈现给右侧的常规实践。在代表本发明所选定的具体实施方案的序列中,除非另有规定,否则尽管没有具体示出,应当理解的是,氨基和羧基末端基团是以它们假定在生理pH值下的形式存在。根据表A,在氨基酸结构式中,每个残基一般可以由一字母或三字母的名称来表示,对应于该氨基酸的名称。

[0058] 表A.天然存在的肽中通常发现的20个标准L-氨基酸的命名法和缩写

	全名	三字母缩写	一字母缩写
	丙氨酸	Ala	A
	半胱氨酸	Cys	C
	天冬氨酸	Asp	D
	谷氨酸	Glu	E
	苯丙氨酸	Phe	F
	甘氨酸	Gly	G
	组氨酸	His	H
[0059]	异亮氨酸	Ile	I
	赖氨酸	Lys	K
	亮氨酸	Leu	L
	蛋氨酸	Met	M
	天冬酰胺	Asp	N
	脯氨酸	Pro	P
	谷氨酰胺	Gln	Q
	精氨酸	Arg	R
	丝氨酸	Ser	S
	苏氨酸	Thr	T
	缬氨酸	Val	V
[0060]	色氨酸	Trp	W
	酪氨酸	Tyr	T

[0061] 肽可用本领域技术人员公知的各种常规方式进行修饰。修饰的实例包括以下内容。肽和/或氨基酸侧链的末端氨基和/或羧基可通过烷基化、酰胺化、或酰基化进行修饰以提供酯、酰胺或取代的氨基。杂原子可以被包括于脂肪族修饰基团中。这是采用常规化学合成方法完成的。其它修饰包括谷氨酰残基和天冬酰胺残基分别至相应的谷氨酰和天冬氨酰残基的脱氨基化；脯氨酸和赖氨酸的羟基化；丝氨酸或苏氨酸羟基的磷酸化；和赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链氨基的甲基化(参见例如T.E.Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co. San Francisco, Calif., 1983)。

[0062] 如本文所使用, ‘分离的’是指包括已经被基本上从其它成分(如生物学成分)中分离或纯化出来的物质, 否则其可能与所述成分结合在一起例如在体内(in vivo), 使得所述

分离的物质自身可以被操作或加工。因此,术语‘分离的’包括用本领域已知的纯化方法纯化的物质,以及在宿主中通过重组表达制备的物质,以及化学合成的物质。在一些实施方案中,当化合物从天然伴随的成分中被分离出来时,它是‘分离的’,使得它占样品中总相关材料重量的至少60%、更一般地75%或超过90%。因此,例如,化学合成或由重组技术生产的多肽一般可以基本上不含其天然结合成分。当多核苷酸没有与本发明的DNA所衍生自的生物体(organism)的天然发生的基因组中正常邻近(contiguous)的编码序列紧邻(即,共价连接至编码序列)时,它可以是基本上纯的。例如,分离的化合物能够这样获得:通过从天然来源的提取;通过编码多肽化合物的重组核酸分子的表达;或通过化学合成。采用任何合适的方法(柱层析、凝胶电泳或HPLC)能够测量纯度。

[0063] 肽的一个或者两个但通常是一个末端可以被亲脂性基团通常是脂肪族或烷基所取代,其可以包括杂原子。链可以是饱和的或者不饱和的。便利地,可以采用市售可获得的脂肪族脂肪酸、醇类和胺类,如辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸和肉豆蔻醇、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸和硬脂基胺、油酸、亚油酸、二十二碳六烯酸等(参见例如美国专利第6,225,444号)。优选的是无分支的、天然存在的长度在14—22个碳原子之间的脂肪酸。其它亲脂性分子包括甘油酯和固醇,如胆固醇。亲脂性基团可以根据常规方法与寡肽上的适当官能团进行反应,经常在支持物上的合成过程中,取决于寡肽附着(attachment)至支持物的位点。当寡肽可以被用于引入至脂质体的腔、与其它治疗剂一起用于施用所述肽和药剂进入宿主时,脂质附着是有用的。

[0064] 取决于它们的预期用途,特别是用于施用于哺乳动物宿主,对象肽也可以通过附着于其它化合物进行修饰,目的在于掺入至载体分子、改变肽的生物利用度、延长或缩短半衰期、控制向各种组织或血流的分配、减少或增强结合到血液成分等。之前的实例作为例子并且是非限制性的。

[0065] 肽可以许多方式进行制备。肽的化学合成是本领域公知的。常用的是固相合成并且各种市售合成设备是可用的,例如Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.; Beckman等的自动合成仪。还可以使用溶液相合成方法,特别是用于大规模生产的。

[0066] 肽还可以盐的形式存在,一般是药学上可接受的盐形式。这些包括钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰等的无机盐。肽的各种有机盐也可以用包括但不限于乙酸、丙酸、丙酮酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、水杨酸等进行制备。

[0067] 如本文所述的示例性分离的多肽可以引起靶蛋白的溶酶体降解。所述多肽包含特异性结合至期望要被降解或敲低的靶内源性蛋白的、被融合至分子伴侣介导的自噬(CMA)靶向信号(CTS)的蛋白结合结构域。CTS对于诱导CMA是必须的,并且其被发现于迄今为止的CMA的所有底物蛋白中。CTS的许多例子是本领域已知的,并且这些一般是与五肽基序KFERQ生化相关的⁷。如在SEQ ID NOs:1-4中所述的本发明的肽包含包括KFERQ基序的某种CTS,但是CTS的其它例子是本领域已知的(例如,Kaushik, S and Cuervo, A.M. Trends in Cell Biology 22(8), 407-17),并因此本发明的肽可以包括附着于蛋白结合结构域的替代性CTS结构域,并且这样的CTS结构域的识别和替换在本领域技术人员的能力范围内。因此,本发明的范围涵盖包含替代性CTS结构域的这些肽。如本文所用,CMA-靶向信号(CTS)和CMA-靶向基序(CTM)可互换用于指上述CTS。

[0068] 一旦被递送至所述靶蛋白所位于的细胞的胞浆,本发明的示例性的肽还可以是可

溶形式的。

[0069] 因此,分离的多肽还可以包含缀合至所述分离的多肽以协助所述示例性多肽跨细胞膜转运的递送和靶向部分。任选地,所述递送和靶向部分可以选自以下的一个或多个:配体、蛋白转导结构域或抗体。任选地,所述蛋白转导结构域可以是HIV-1Tat蛋白的细胞膜转导结构域。HIV-1Tat蛋白可以与本文所述的分离的多肽形成融合蛋白(例如,SEQ ID NOs:2和4)。

[0070] 以合理的有效方式将生物活性分子(如本文所述的多肽或肽)递送至一个或多个细胞可能比仅仅将裸露的肽“倾倒(dumping)”到细胞上或将裸露的肽施用进入患者或测试对象有更多要求。能够以合适的方式递送或靶向生物活性分子进入细胞以提高有效量(如药学上有效量)的药剂(agent)是本领域已知的,并被描述于例如:Dietz et al. (2004) .Mol Cell.Neurosci27:85-131。本文所述的肽或多肽可以被缀合至这样的细胞膜穿透结构域(CPMD)。如本文所使用,术语细胞膜穿透结构域(CPMD)是指包括协助将本文所述的肽或多肽递送和/或靶向至靶细胞或组织或靶细胞内或靶组织内的细胞的任何部分。此外,细胞膜穿透结构域(CPMD)可以凭借促进本文所述的肽或多肽的生物学效力来“协助”递送和/或靶向。

[0071] 细胞膜穿透结构域(CPMD)的实例可以包括脂质体、脂质颗粒、抗体、受体配体、蛋白转导结构域(PTD)和病毒载体。例如,当期望递送至脑时,本文所述的分离的肽或多肽可以被缀合至结合脑内皮细胞受体而导致所述受体和结合的配体的细胞内吞(endocytosis)/转胞吞作用(transcytosis)的抗体(例如美国专利第7,744,879号)。肽或多肽可以被缀合至PTD,例如HIV TAT蛋白(反式激活转录激活因子蛋白),其允许肽经细胞内吞横跨(transverse)细胞膜。

[0072] PTDs的实例包括但不限于:触足同源结构域(Perez et al. (1992) J. Cell Sci102:717-722);转运素(Pooga et al. (1998) FASEB J 12:67-77);白喉毒素的易位结构域(Stenmark et al. (1991) J Cell Biol113:1025-1032和Wiedlocha et al. (1994) Cell 76:1039-1051));和HIV-TAT(Demarchi et al. (1996) J Virol.70:4427-4437)。这样的蛋白转导结构域의其它实例和相关详细内容被描述于Dietz(同上)和其中(therein)所引用的参考文献中。此外,为了在全身(whole body)递送过程中降低肽的降解,可以采用修饰的PEG将肽缀合至小胶束或脂质体,或经受末端修饰(如C-末端酰胺化或N-末端乙酰化)。另外,递送部分可以是不要求融合至包含CTS和PBD的肽的肽载体,例如短的两亲肽载体,Pep-1。

[0073] 配体可以通过选择性结合或具有对另一种底物的特异性亲和力而作为递送和靶向部分发挥功能。配体可以被特异性结合体或结合伴侣、或受体识别和结合。适合用于靶向的配体实例可以选自:抗原、半抗原、生物素、生物素衍生物、凝集素、半乳糖胺和果糖胺(fucosylamine)部分、受体、底物、辅酶和辅因子等。

[0074] 另一种类型的递送和靶向部分是抗体,其被定义为包括所有类的抗体,包括但不限于:单克隆抗体、嵌合抗体、Fab部分(fraction)、及其片段和衍生物。其它递送和靶向部分可以包括酶,尤其是细胞表面的酶,如神经氨酸酶、血浆蛋白、亲和素(avidin)、链霉素(streptavidin)、抑素(chalone)、穴状配体(cavitand)、甲状腺球蛋白、内因子、球蛋白、螯合剂、表面活性剂、有机金属物质、葡萄球菌蛋白A、蛋白G、细胞色素、凝集素、某些树脂和有

机聚合物。

[0075] 递送和靶向部分还可以包括各种物质,如对被本文所述的肽或多肽要靶向的任意细胞或组织的表面具有亲和力的任意蛋白、蛋白片段或多肽。这些蛋白可以通过本领域已知的重组DNA、遗传和分子工程技术来产生。例如SEQ ID NOs:2和4显示被缀合至HIV TAT蛋白的SEQ ID NOs:1和3的分离的多肽。特别有用的是促进本文所述的肽或多肽转移至靶细胞内部的任何合适的膜转移蛋白(例如,本文所述的PTD)。

[0076] 在某些实施方案中,肽还可以包含归巢肽基序以协助所述肽递送至体内特定组织。这样的归巢肽可以包括例如被缀合至CMPDs的归巢肽(如AHNP:FCDGFYACYKDV;DV1:lgaswhrpdckclgyqkrplp;DV3:lgaswhrpdck;PEGA:CPGPEGAGC;和CREKA)和其自身具有细胞穿透性质的归巢肽(如TCP-1:CTPSPFSHC;HAP-1:SFHQFARATLAS;HAP-2:HIQLSPFQSWR;PYEE、LKPK、EPKK*和ELK*K*(K*=N-烷基甘氨酸赖氨酸样拟肽);F3:CKDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK;Pep42:CTVALPGGYVRVC;CAP:DWRVIIPRPSA;RGD-4C:CDCRGDCFC;iRGD:CRGDK/RGPD/EC;cRGD:cRGDf(NMeV);和NGR)(参见例如Svensen et al.,Trends in Pharmacological Sciences,33(4):186-192,2012)。

[0077] 如本文所述,本发明的示例性肽包含对特定靶蛋白或感兴趣的蛋白具有特异性的蛋白结合结构域。这样的靶蛋白可以是任何内源性的、天然蛋白,其具有结合伴侣,或其结合结构域序列是已知的或能够获得的。所述结合伴侣或结合结构域序列能够被用于所述肽的蛋白结合结构域的设计。本领域已知的常规方法可以被用于识别针对感兴趣的特异性靶蛋白的潜在的结合结构域序列,如酵母双杂交法(例如:Protein Kinase C Protocols, Methods in Molecular Biology,Volume 233,2003,pp 327-343,Detection of Protein Kinase-Binding Partners by the Yeast Two-Hybrid Analysis,Chang and Cartwright)、免疫共沉淀、体外结合测定、蛋白交联和蓝色天然凝胶电泳。示例性靶蛋白是 α -突触核蛋白、突触后密度蛋白95(PSD95)、死亡相关蛋白激酶1(DAPK1)和用肽结合结构域识别的其它蛋白激酶(例如,Bogoyevitch et al.,Biochimica et BiophysicaActa 1754:79-99,2005中所述的蛋白激酶)。

[0078] 所述示例性肽的蛋白结合结构域将所述肽靶向至感兴趣的蛋白。如下文所列举的,所述示例性肽中这样的蛋白结合结构域特异性针对靶蛋白而不影响非靶蛋白,从而证明了示例性肽的可靠性和特异性。因此,本发明的示例性肽特异性针对它们的靶蛋白,从而提供了靶向的药物递送机制。如下文所进一步列举的,本发明的所述肽还可以是有条件的,并被设计为仅靶向那些活性形式的感兴趣的蛋白,而不是非活性形式的,从而提高示例性肽的特异性。靶向患病形式的(例如,活性形式)而不是非患病形式的(例如,非活性形式)蛋白的能力是所述示例性肽的有用的治疗应用。

[0079] 在治疗应用中,本文所述的组合物可以被施用于患有疾病的一种或多种症状的对象,例如,细胞死亡和/或凋亡相关的疾病。本文所述的组合物可以足以治愈或至少部分预防或阻止所述疾病和/或其并发症或帮助缓解其相关症状的量被施用于对象。因此,本文所述的示例性肽和组合可以被用作治疗或预防以降低疾病的风险或减少疾病的症状。足以实现治疗、治愈性或预防性治疗的量被定义为“治疗有效剂量”或“治疗有效量”。有效地用于这个用途的量将会取决于疾病的严重程度、预期用途(症状的治疗、治愈、预防、缓解等)和对象的一般健康状态。所述组合物的单个或多个施用可取决于由患者所要求和耐受的剂量

和频率来进行施用。组合物一般会提供足量的本文所述的活性肽或多肽以在对象中进行有效治疗(例如,至少改善一个或多个症状)。

[0080] 本文所述的肽或多肽的浓度可以变化很大,并且可以主要根据所选择施用的特定模式和对象的需要基于流体体积、粘度、体重等进行选择。但是,一般所选择浓度提供范围从大约0.1或1mg/kg/天至大约50mg/kg/天,并且有时更高的剂量。典型的剂量范围为:从大约3mg/kg/天至大约3.5mg/kg/天,优选地从大约3.5mg/kg/天至大约7.2mg/kg/天,更优选地从大约7.2mg/kg/天至大约11.0mg/kg/天,以及最优选地从大约11.0mg/kg/天至大约15.0mg/kg/天。在某些优选的实施方案中,剂量范围为从大约10mg/kg/天至大约50mg/kg/天。在某些实施方案中,剂量范围可以为从大约20mg至大约50mg,每天两次口服给予。可以理解的是,可以改变这样的剂量以优化特定对象或对象组中的治疗方案。

[0081] 因此,本发明的示例性肽可以被配制用于治疗用途。因此本发明的某些示例性实施方案涉及包含本发明的示例性肽和药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂(excipient)的药物组合物。所述药物组合物可以采用公知的和易于获取的成分通过已知步骤进行制备。

[0082] 在某些实施方案中,包含本文所述的肽或多肽的药物组合物可以被配制用于以含有常规无毒的药学上可接受的载剂、佐剂和媒介物(vehicle)的单位剂量制剂形式进行口服(包括例如通过片剂或胶囊剂经颊部或舌下给药)、局部、肠胃外、鼻内或通过吸入或喷雾施用。如本文所用,术语肠胃外包括皮下注射、腹膜内注射、皮内、关节内、静脉内、肌肉内、血管内、胸骨内、鞘内注射或输注技术,如脑脊液输注技术。示例性肽可以被配制成例如糖浆、酏剂、片剂、锭剂(troche)、锭剂(lozenge)、硬或软胶囊剂、丸剂、油性或水性悬浮液、可分散粉末或颗粒、乳剂、注射剂或溶液。

[0083] 在一些实施方案中,本文所述的肽或多肽可以采用常规透皮药物递送系统(即透皮“贴剂”)通过皮肤进行递送,其中活性剂通常包含于层叠(laminated)结构内,所述层叠结构用作被贴于皮肤的肽或多肽递送装置(device)。在这样的结构中,所述组合物通常被包含于上部背衬层下(underlying)的一层或“贮库(reservoir)”中。应该理解的是,在该背景中的术语“贮库”是指最终可用于递送到皮肤表面的一定量的“活性成分”。因此,例如,所述“贮库”可以包括贴剂的背衬层上粘合剂中或本领域技术人员已知的任何各种不同基质制剂中的活性成分。所述贴剂可以含有单个贮库,或者它可以含有多个贮库。

[0084] 在一些实施方案中,本文所述的示例性肽或多肽可以被口服施用。示例性肽的口服施用可以包括使用保护性赋形剂。通常,这是通过用组合物使多肽复杂化使得它对酸性和酶促水解具有抗性或者通过将多肽包装于合适的抗性载体(如脂质体)中得以实现。保护用于口腔递送的多肽的手段是本领域公知的。

[0085] 可以固体或者流体单位剂量形式进行口服施用。流体单位剂量形式能够根据本领域用于药物组合物制备已知的步骤进行制备,并且这样的组合物可以含有一种或多种选自以下的药剂:增甜剂、调味剂、着色剂和防腐剂,以提供药学上美观和可口的制剂。酏剂是通过使用水醇(例如乙醇)的媒介物(vehicle)与合适的甜味剂(如糖和糖精)以及芳香族调味剂一起制备的。悬浮液可以用水性媒介物(vehicle)借助悬浮剂(如阿拉伯胶、黄蓍胶、甲基纤维素等)进行制备。

[0086] 固体制剂(如片剂)含有与适于制备片剂的无毒的药学上可接受的赋形剂混合的

示例性肽。这些赋形剂可以是例如，惰性稀释剂如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；成粒剂和崩解剂例如玉米淀粉或藻酸；结合剂，例如淀粉、明胶或阿拉伯胶，和润滑剂，例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石和其它常规成分，如磷酸二钙、硅酸镁铝、硫酸钙、淀粉、乳糖、甲基纤维素，和功能上相似的材料。片剂可以是未包衣的，或者它们可以通过已知技术进行包衣以延迟在胃肠道中的崩解和吸收，从而提供较长时期的持续作用。例如，可以采用时间延迟材料，如单硬脂酸甘油酯和二硬脂酸甘油酯。

[0087] 用于口服的制剂还可以呈现为硬明胶胶囊剂，其中示例性肽与惰性固体稀释剂（例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土）进行混合，或呈现为软明胶胶囊剂，其中示例性肽与水或油性介质（例如花生油、液体石蜡或橄榄油）进行混合。软明胶胶囊剂是由化合物的浆液与可接受的植物油、轻液体石蜡或其它惰性油进行机器封装而制备。

[0088] 水性悬浮液含有与适于制备水性悬浮液的赋形剂混合的示例性肽。这样的赋形剂是悬浮剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶和阿拉伯树胶；分散剂或湿润剂可以是天然存在的磷脂例如卵磷脂，或烯化氧与脂肪酸的缩合产物例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷与长链脂肪族醇的缩合产物例如十七碳乙烯氧基鲸蜡醇，或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯，或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。水性悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂（例如乙基或正丙基-对羟基苯甲酸）、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂或一种或多种增甜剂（如蔗糖和糖精）。

[0089] 油性悬浮液可以通过在植物油（例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油）或矿物油（如液体石蜡）中悬浮示例性肽来进行配制。油性悬浮液可以含有增稠剂，例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以加入如上所述的增甜剂和调味剂以提供可口的口服制剂。这些组合物可以通过加入抗氧化剂（如抗坏血酸）来进行保存。

[0090] 适于通过加入水制备水性悬浮液的可分散粉末和颗粒提供与分散剂或湿润剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的示例性肽。合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂由上述已经提及的举例说明。也可以存在另外的赋形剂，例如增甜剂、调味剂和着色剂。

[0091] 药物组合物也可以水包油乳剂的形式存在。油相可以是植物油（例如橄榄油或花生油）或矿物油（例如液体石蜡）或这些的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶例如阿拉伯树胶或黄蓍树胶，天然存在的磷脂例如大豆、卵磷脂和由脂肪酸和己糖醇、酐衍生的酯或偏酯，例如山梨糖醇单油酸酯，和所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。所述乳剂也可含有甜味剂和调味剂。

[0092] 药物组合物也可以无菌可注射的水性或油性悬浮液的形式存在。该悬浮液可以根据已知技术采用上述已经提到的那些合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂进行配制。无菌可注射的制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂（例如作为在1,3-丁二醇中的溶液）中的无菌可注射溶液或悬浮液。在可接受的媒介物（vehicle）和溶剂中，可以采用的是水、林格氏（Ringer's）溶液和等渗氯化钠溶液。此外，无菌、不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的，可以施用任何温和的不挥发油，包括合成的单或者二甘油酯。此外，在可注射剂的制备中使用脂肪酸（如油酸）。佐剂（如局部麻醉剂、防腐剂和缓冲剂）也能够包含于可注射的溶液或悬浮液中。

[0093] 制备药物组合物的其它药物组合物和方法是本领域已知的，并且被描述于例如

“Remington: The Science and Practice of Pharmacy” (之前为“Remingtons Pharmaceutical Sciences”); Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000) 中。

[0094] 另外的药理学活性剂可以与主要活性剂例如本文所述的示例性肽或多肽一起进行递送。所述示例性肽或多肽可以与另一种药学活性剂共同施用, 以通过递送具有相似或互补活性的第二化合物来增强靶细胞或组织上的治疗作用。在一个实施方案中, 这样的药剂包括但不限于降低中风或缺血性损伤和/或其并发症的风险的药剂。这样的药剂包括但不限于: 抗凝血剂 (例如, 醋硝香豆素、杀鼠迷、双香豆素、双香豆素乙酯、苯丙香豆素、杀鼠灵、氯茛二酮、二苯茛酮、苯茛二酮、噻氯香豆素、贝米肝素 (Bemiparin)、舍托肝素 (Certoparin)、达肝素、依诺肝素、那屈肝素 (Nadroparin)、帕肝素 (Parnaparin)、瑞肝素 (Reviparin)、亭扎肝素 (Tinzaparin)、磺达肝素 (Fondaparinux)、艾卓肝素 (Idraparinux)、达那肝素 (Danaparoid)、舒洛地特 (Sulodexide)、硫酸皮肤素 (Dermatansulfate)、阿哌沙班 (Apixaban)、贝曲西班 (Betrixaban)、伊杜沙班 (Edoxaban)、奥米沙班 (Otamixaban)、利伐沙班 (Rivaroxaban)、水蛭素、比伐卢定 (Bivalirudin)、来匹卢定 (Lepirudin)、地西卢定 (Desirudin)、阿加曲班、达比加群 (Dabigatran)、美拉加群 (Melagatran)、希美加群 (Ximelagatran)、REG1、去纤苷、雷马曲班 (Ramatroban)、抗凝血酶 III 和 Drotrecogin alfa)、抗血小板药物 (例如, 阿昔单抗、依菲巴特 (Eptifibatide)、替罗非班、氯吡格雷、普拉格雷 (Prasugrel)、噻氯匹定、替卡格雷 (Ticagrelor)、贝前列素、前列环素、伊洛前列素、曲前列环素 (Trepstinil)、乙酰水杨酸/阿司匹林、阿洛普令、卡巴匹林钙、吲哚布芬、三氟柳、双嘧达莫、吡考他胺、特鲁曲班 (Terutroban)、西洛他唑、双嘧达莫、三氟柳、氯克罗孟、地他唑), 和溶栓和溶纤维蛋白 (Fibrinolytic) 药物 (例如, 组织纤溶酶原激活剂 (tPA) 或重组组织纤溶酶原激活物 (rtPA), 如阿替普酶、瑞替普酶、替奈普酶、尿激酶、沙芦普酶、链激酶、阿尼普酶、莫替普酶、安克洛酶、纤溶酶以及纤维蛋白酶) 等或其他神经保护剂组合使用。

[0095] 取决于它们的预期用途, 特别是用于施用给哺乳动物宿主, 对象肽也可以通过附着于其它化合物进行修饰, 目的在于掺入至载体分子、改变肽生物利用度、延长或缩短半衰期、控制向各种组织或血流的分配、减少或增强结合到血液成分等。之前的实例作为例子并且是非限制性的。

[0096] 分离的多核苷酸可以包含编码如本文所述的分离的多肽的核苷酸序列。本文所述的组合物可以包括如本文所述的多肽和载剂 (carrier)。任选地, 所述载剂可以是药学上可接受的载剂。

[0097] 载体 (vector) 可以包括如本文所述的分离的多核苷酸。细胞可以包括本文所述的载体。另外, 包含本文所述的多核苷酸的细胞可以具有可操作性连接至表达控制序列的多核苷酸。

[0098] 本文描述了靶向内源性蛋白以进行溶酶体降解的方法。所述方法可以涉及将如本文所述的分离的多肽递送至细胞。这样的递送可以引起所述多肽结合靶内源性蛋白, 然后其可以引起结合蛋白被转运至溶酶体并在其中被降解。方法可以涉及: (a) 将本文所述的载体递送至所述细胞; 以及 (b) 表达由所述载体携带的多核苷酸。方法可以涉及: (a) 将本文所述的载体递送至细胞; 以及 (b) 在允许由所述载体携带的多核苷酸表达的条件下维持所述

细胞。任选地,所述方法可以涉及将载体在体内环境(setting)下递送给细胞。任选地,方法可以涉及将所述载体在离体环境下递送给所述细胞。任选地,方法可以涉及将所述载体在体内环境下递送给所述细胞。

[0099] 本发明的某些实施方案涉及本文所述的示例性肽用于抑制或减少体外和体内细胞中天然蛋白的表达的用途。本发明的某些实施方案还涉及本文所述的示例性肽用于抑制或减少体外和体内细胞中天然内源性蛋白的表达的用途。

[0100] 本发明另一个示例性实施方案涉及本文所述的示例性肽的治疗疾病的用途。

[0101] 如本文所用,‘兴奋性毒性应激’是病症如中风和其它神经退行性疾病的重要组成部分(component)。有证据表明,当针对兴奋性神经递质谷氨酸的受体(谷氨酸受体)如NMDA受体和AMPA受体被过度活化时,兴奋性毒性应激的毒性作用可以通过导致急性和延迟形式的细胞死亡来进行施加。兴奋性毒素如结合至这些受体的NMDA和红藻氨酸(kainic acid),以及生理高水平的谷氨酸,能够通过允许高水平的钙离子(Ca^{2+})进入细胞而引起兴奋性毒性。流入细胞的 Ca^{2+} 能够活化许多酶,包括磷脂酶、核酸内切酶和蛋白酶(如钙蛋白酶)。这些酶能够破坏细胞结构如细胞骨架、细胞膜和DNA。兴奋性毒性可涉及脊髓损伤、中风、创伤性脑损伤、酒精中毒(alcoholism)或酒精戒断,和中枢神经系统(CNS)的神经退行性疾病,如多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病和亨廷顿氏病。

[0102] 因此,本发明的某些实施方案包括了本文所述肽的以下治疗用途:治疗病理状况,如中枢神经系统(CNS)的神经退行性疾病,包括多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病和亨廷顿氏病,或治疗脊髓损伤、中风、创伤性脑损伤、酒精中毒(alcoholism)和酒精戒断。

[0103] 因此,本发明的示例性实施方案还涉及治疗细胞死亡和/或凋亡相关疾病的方法。所述方法包括:将生物学有效量的本文所述的多肽或本文所述的药物组合物施用给有需要的对象。生物学有效量可以是足以防止细胞死亡和/或凋亡的量。细胞死亡和/或凋亡相关的疾病可以选自而限于以下疾病:肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆症、中风、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、脊髓损伤、创伤性脑损伤、酒精中毒(alcoholism)或酒精戒断。

[0104] 操作实施例

[0105] 材料与方法

[0106] 一般性抗体和试剂。抗-GFP(Clontech,632381)、抗 α -突触核蛋白(BD Transduction Laboratories,610786)、单克隆抗-FLAG M2抗体(Sigma-Aldrich,F1804-200UG)、抗-DAPK1(Sigma,D1319-200UL)、单克隆抗磷酸化-DAPK1(pSer308,Sigma,D4941)、抗-NR2B(实验室自产)、抗-HA(Roche applied science,11867431001)、抗-lamp1(Abcam,ab13523)、抗-GAPDH(Abcam,ab9485)、抗肌动蛋白(Abcam,ab8227)、抗-lamp2a(Abcam,ab18528)、抗-Labmin B1(Abcam,ab16048)、抗-HSP90(BD Transduction Laboratories,610418)、抗-VDAC1(Porin)(MitoSciences,MSA03)。根据制造商的产品说明书和/或实验室操作步骤验证抗体的预期目的(免疫印迹、免疫细胞化学、免疫组化和免疫共沉淀)。氯化铵(Sigma,A0171)、3-甲基腺嘌呤(Sigma,M9281)、MG132(Sigma,C2211)、胃蛋白酶抑制剂A(Sigma)、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA,Tocris Asc-052)、 H_2O_2 (Sigma,7722-84-1)、过氧化氢酶(Sigma,C1345)、(2R)-氨基-5-膦酰基戊酸(phosphonopentanoic acid)(APV,Ascent

Scientific, Asc-003)。TAT-NR2B-CTS和TAT-NR2B由位于UBC的GL生化和脑研究中心肽合成设施合成。

[0107] 质粒构建。通过将含有CTS编码序列的BamHI片段引入至pEGFP-N2载体(Clontech# 6081-1)构建CTS-GFP。通过退火定制设计的寡核苷酸(Integrated DNA Technologies)制备所述CTS编码序列。通过对CTS-GFP质粒进行单点突变构建mCTS-GFP。通过退火寡核苷酸并采用HindIII和NotI限制性位点(HindIII, Fermentas, FD0504; NotI Fermentas, FD0594)插入至pcDNA3.0来构建FLAG- β syn36。通过采用FLAG- β syn36作为模板并将CTS编码序列加至反向引物的PCR来构建FLAG- β syn36-CTS。通过从WT-DAPK1中删除自抑制结构域(789-936bp)构建FLAG-cDAPK1。通过采用NR2B表达载体的PCR来制备NR2Bct(1242-1342aa)。通过采用EcoRI和BglIII限制性位点(EcoRI, Fermentas, FD0274; BglIII, Fermentas, FD0084)将NR2Bct片段插入至CTS-GFP, 然后PCR, 向所述片段引入NcoI和EcoRI(NcoI, Fermentas, FD0574)而获得NR2Bct-CTS片段。通过采用NcoI和EcoRI位点将NR2Bct-CTS克隆至pTAT/pTAT-HA质粒(S. Dowdy, Washington University, St. Louis, MO³¹的慷慨礼物)构建His-TAT-NR2Bct-CTS。通过将CTS序列的第一个氨基酸突变为终止密码子来构建His-TAT-NR2Bct。采用His-TAT-NR2Bct-CTS作为模板、用带有BamHI位点的正向和反向引物进行PCR, 然后用BamHI(Fermentas, FERFD0054)插入至pcDNA3.0来构建HA-NR2Bct-CTS。通过点突变构建HA-NR2Bct-CTSm。

[0108] His肽纯化。将His-TAT-NR2Bct和His-TAT-NR2Bct-CTS质粒转化至BL21, 接种于Amp弹性板上并在37℃孵育过夜。来自每个质粒的单个菌落被悬浮于LB(Amp+)中, 并在37℃孵育直到OD₆₀₀达到0.5。通过加入IPTG(1mM)诱导表达, 并孵育5小时。然后通过离心收集沉淀(pellet), 并弃去培养基。在纯化前对沉淀进行超声处理并离心。根据制造商的操作步骤(Thermo Scientific, 88223)完成His肽纯化。简而言之, 在所制备的肽提取物被加至树脂之前, 平衡Ni-NTA树脂柱。然后, 在洗脱之前采用洗脱缓冲液洗涤柱。然后采用考马斯染色监测所纯化的肽的纯度, 并通过280nm的吸光度测量肽浓度。

[0109] 细胞培养、转染和处理。在补充有10%胎牛血清(Invitrogen, 12483020)的DMEM(Sigma, D6429-24X500ML)中培养HEK293细胞和COS7细胞。如根据制造商的操作步骤, 在用Lipofectamine 2000(Invitrogen, 11668019)瞬时转染之前, 细胞在6孔板中长至80%的汇合度。在将其收获用于生化分析之前, 在37℃转染24或48小时。对于涉及TAT或His-TAT肽的实验, 除非另外指明, 否则在NMDA损伤(insult)之前1小时加入肽。

[0110] 皮层神经元的原代培养。如先前所述³⁵, 从由受精后18天处死的母大鼠收集的Sprague Dawley大鼠胚胎制备大鼠皮层神经元的解离培养物。简而言之, 从胚胎提取海马和脑皮质, 并在0.25%的胰酶-EDTA中孵育30min。通过研磨解离消化的组织, 并接种于聚-D-赖氨酸包被的(Sigma, P7280)板上。接种培养基由补充有B27(Invitrogen, 17504044)、谷氨酸(Sigma, G8415)和GlutaMax(Invitrogen, 35050-061)的神经基础培养基(Invitrogen, 21103-049)组成。2天后, 培养基的2/3用新鲜的、由神经基础培养基、B27和GlutaMax组成的神经基础供给培养基替换。在37℃、在湿润的5%CO₂气氛中维持培养。成熟的神经元(体外14-18天(DIV))被用于实验。

[0111] 免疫印迹。如先前所述进行免疫印迹测定³⁶。简而言之, 采用由150mM NaCl、50mM Tris, pH 7.4、0.1%SDS、1%NP-40、0.5%脱氧胆酸钠、1mM EDTA、1mM Na₃VO₄和蛋白酶抑制

剂混合物(Thermo Fisher,PI78442)组成的裂解缓冲液从神经元提取蛋白。在10%SDS-PAGE凝胶上分离样品,转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,并用各自的抗体进行免疫印迹。用化学发光检测试剂盒(Fisher,32106)增强印迹,并用Bio-Rad成像仪和Quantity One软件进行可视化。用Bio-Rad图像实验室软件定量每条带的信号强度,并相对于来自同一膜和实验的对照分析所述带。

[0112] 免疫共沉淀。如先前所述并进行少许修改进行免疫共沉淀(Co-IP)测定³⁷。将皮层神经元培养物在无SDS的冰冷裂解缓冲液中裂解。用10 μ l蛋白A-琼脂糖珠(GE Life Sciences,17-0780-01)预澄清提取物(0.5mg)1小时,然后用非特异性IgG(4 μ g)、多克隆抗-NR2B(实验室,4 μ g)于4 $^{\circ}$ C孵育过夜,接着加入60 μ l蛋白A-琼脂糖珠(Sigma)于4 $^{\circ}$ C持续3小时。用裂解缓冲液洗涤样品两次、用无菌PBS洗涤两次,并用SDS样品缓冲液进行变性。随后进行如上所述的SDS-PAGE和免疫印迹。

[0113] 免疫细胞化学。如先前所述进行免疫细胞化学³⁷。用冰冷的PBS洗涤COS细胞,并在预热的4%PFA/PBS溶液中37 $^{\circ}$ C固定60min,在0.1%Triton X-100中通透5min,并用于PBS中的5%胎牛血清(FBS)于37 $^{\circ}$ C封闭30min,每一步之间用PBS进行充分洗涤。将一抗稀释于3%FBS中。用抗-lamp1a(1:50)于4 $^{\circ}$ C孵育细胞24-48小时,然后用PBS 6 $\times$ 2min进行洗涤。将二抗Alexa 555以1:1000稀释于3%FBS/PBS中并于37 $^{\circ}$ C孵育30min,然后充分洗涤。在装载至ProLong Gold培养基(Invitrogen,P36930)中的载片上之前,用DAPI(1:5000,10min RT)对细胞核进行染色。从共聚焦显微镜(Leica DMIRE2&CTRMIC)获得捕获的图片。代表性图像已经进行了调整,以最大限度地提高信噪比。

[0114] 细胞分级分离。对培养的皮层神经元(6.0 $\times 10^6$ 个细胞/100mm皿)进行胞浆/细胞核分级分离。简而言之,用冰冷的PBS洗涤细胞,并在裂解缓冲液中摇动30min。然后收集细胞并离心,以获得粗细胞质和细胞核级分。收集上清液并进一步离心以获得纯化的胞浆级分。洗涤原始沉淀并涡旋,以获得细胞核裂解物。如用于培养细胞的Pierce线粒体分离试剂盒(Thermo Scientific,89874)用户指南中所述进行线粒体分级分离。通过针对LB1(仅细胞核)、HSP90(仅胞浆)和VDAC1(仅线粒体)的存在的免疫印迹来评估纯度。

[0115] 神经元死亡的评估。如先前所述通过测量释放入培养基的LDH来评估原代神经元培养物的细胞毒性损伤³⁸。在His-TAT-NR2Bct-CTS、对照肽His-TAT-NR2Bct(50 μ M,1小时预处理并贯穿实验)、APV(1mM,30min预处理并贯穿实验)或过氧化氢酶(100U,15min预处理并贯穿实验)的存在和不存在下将皮层神经元暴露给H₂O₂诱导的兴奋性毒性,损伤后12小时收集它们的培养基用于LDH酶促活性。通过用25 μ M合成肽或200 μ M重组肽处理神经元24hrs来评估肽毒性。收集培养基用于LDH测定。在培养基收集之前,通过用100%Trixton X-100裂解所述细胞来获得阳性对照。根据制造商的说明书,采用LDH细胞毒性检测试剂盒(Sigma, TOX7)确定培养基中LDH的量。采用酶标仪(μ Quant,Bio-TEK instruments)(其通过背景读数扣除进行调节)确定490nm的吸光度。

[0116] 中脑动脉闭塞(MCAO)。根据由不列颠哥伦比亚大学动物护理委员会(University of British Columbia Committee on Animal Care)所批准的操作步骤,进行所有动物实验。在手术之前,成年本地雄性Sprague-Dawley大鼠(300-350g,Charles River)以12hr:12hr的明暗周期进行分组饲养(3-4个动物/笼),并自由获取大鼠颗粒饲料(pellet chow)和水。如先前所述用缝线插入(suture-insertion)法进行可逆MCAO³⁷。简而言之,具有钝尖

端的尼龙缝线通过麻醉大鼠的右颈外动脉进入,并推进到右颈内动脉,直到右MCA被闭塞。60min的闭塞之后,老鼠被再次麻醉以帮助除去闭塞。在整个手术过程中用加热垫维持体温在36.5至37.5℃之间。经颈静脉注入肽(10mg/kg)或载体对照(盐水;1ml/kg)。然后,将大鼠缝起来并允许恢复直到组织收集。

[0117] 免疫组化。麻醉大鼠并灌注双过滤盐水和4%PBS中的多聚甲醛(PFA)。收集脑,在经受30%蔗糖/PBS的冷冻保护之前,浸于4%PFA中。在脑已经下沉之后,在冻于-80℃过夜之前用干冰对它们进行闪(flash)冻。然后用冷冻切片器将它们在30μm进行切片,并存储于0.1M PB(磷酸氢二钠和磷酸二氢钠)中。在染色之前,用0.1M PB洗涤切片3x10min,在具有1%BSA和0.2%Triton X-100的0.1M PB中通透和封闭30min,并用抗-DAPK1(1:100)于4℃染色3天。然后洗涤它们,并在洗涤和装片之前用Alexa 488(1:1000)于4℃染色过夜。

[0118] 苏木精&伊红(H&E)染色。在染色之前装载切片,并在载玻片上干燥。将切片浸入苏木精溶液(Sigma,MHS1-100ML)避光15min,接着在自来水下变蓝5分钟。然后,用0.5%伊红Y(Sigma,E4009-5G)复染切片,蘸入ddH₂O直到伊红停止拖尾(streaking)。然后用EtOH(50%、70%、95%和100%)将它们脱水,并用二甲苯透明2次。封片剂Permount(Fischer Scientific,SP15-500)被用于盖玻片。

[0119] 统计学分析。数据表示为平均值±s.e.m.采用至少三个独立实验进行量化。除非另外指明,统计学意义被定义为*或^ΔP<0.05、**或^{ΔΔ}P<0.01、***或^{ΔΔΔ}p<0.001。除非另外指明,否则采用方差分析(ANOVA)(Fischer LSD方法)。除非另外指明,否则采用单因素方差分析(One way ANOVA)(Fischer LSD方法),在开始方差分析之前针对正态(Shapiro-Wilk检验,功效0.05)和等方差(功效0.05)测试数据。

[0120] 结果/讨论

[0121] 如图1a所示,我们设计了包含细胞膜穿透结构域(CMPD)、特异性针对靶蛋白的蛋白结合结构域(PBD)和CMA-靶向信号(CTS)或CMA-靶向基序(CTM)的靶向肽。如本文所使用的,在示例性肽中的“CTS”和“CTM”可互换使用。当本发明的靶向肽(如图1a所示被体外(in vitro)或体内(in vivo)应用于细胞环境时,所述靶向肽经由其CMPD进入细胞,其中它与其靶蛋白经由PBD形成稳定复合体,并且通过它的CTS与胞浆热休克伴侣(hsc)70和各种共伴侣之间的相互作用⁸,将靶蛋白递送入溶酶体隔室(compartment)进行经由CMA介导的蛋白降解的快速敲低。

[0122] 蛋白CTS靶向至溶酶体进行降解。采用HEK细胞,我们显示了CTS能够通过在其氨基末端将CTS融合至绿色荧光蛋白(GFP)(CTS-GFP)有效地将含有CTS的蛋白引导至溶酶体进行降解。为了提高靶向效率,我们同时用三个不同CMA-靶向信号标记GFP,所述信号由三个不同CMA底物蛋白—核酸酶A(KFERQ)⁹、hsc 70(QKILD)¹⁰和血红蛋白(QRFFE)¹¹鉴定(图1b)。然后我们在HEK或COS-7细胞中瞬时表达CTS-GFP构建体,与作为对照的非CTS标记的野生型GFP构建体(WT-GFP)一起。如图1c所示,免疫荧光共染色显示WT-GFP在所述细胞的大多数隔室包括细胞核中弥散表达,而如其与溶酶体标记物蛋白lamp1a的高度共定位所证实的,CTS-GFP主要被导入至溶酶体隔室。与所述CTS引导CTS-GFP进行溶酶体降解的能力一致,免疫印迹分析显示CTS-GFP蛋白水平以时间依赖的方式降低,在转染24小时后降低了WT-GFP水平的47.97%±5.66%(平均±s.e.m.)。(补充图1)。

[0123] 一些证据表明,CTS-GFP水平的降低是增加的溶酶体靶向和降解的结果。第一,

CTS-GFP水平的降低被用溶酶体降解抑制剂氯化铵¹² (NH_4Cl ; 20mM; $82.65\% \pm 6.28\%$; $n=6$; 与未处理的CTS-GFP组相比 $p=0.001$) 或胃蛋白酶抑制剂A (Pep A) (两个初级溶酶体蛋白酶(组织蛋白酶A和E)的抑制剂)^{13,14} (Pep A; 10 μM ; $106.98\% \pm 6.68\%$; $n=5$; 与未处理的CTS-GFP组相比 $p=0.001$) 进行处理所完全阻止(图1d)。相反,抑制其它蛋白降解系统,如用3-甲基腺嘌呤(3-MA; 10mM)抑制巨自噬,或用MG132 (MG132; 5 μM)抑制蛋白酶体降解,并未阻止CTS-GFP水平的降低(在3-MA和MG132组中分别降低至野生型GFP水平的 $51.61\% \pm 6.09\%$ 和 $42.55\% \pm 3.78\%$; 在每个组中 $n=6$; 与未处理的CTS-GFP组相比,3-MA和MG132分别为 $p=0.610$ 和 $p=0.213$) (图1d)。第二,在应激的条件(如在培养基中去除血清所诱导的饥饿)下,CMA能够被激活或增强¹⁵。实际上,血清饥饿(serum deprivation, SD)引起CTS-GFP水平的进一步降低(SD; WT-GFP水平的 $23.95\% \pm 5.94\%$; $n=5$; 与WT-GFP相比 $p=0.001$) (图1d)。第三,CMA底物蛋白的CTS中谷氨酰胺残基(Q)的突变损害了突变体蛋白与溶酶体膜的相关性,并因此降低了它们靶向进入溶酶体腔并通过CMA降解¹⁶。与之一致的是,我们发现在CTS-GFP的CTS内2Qs突变成丙氨酸(2A) (mCTS-GFP)阻止了mCTS-GFP水平的降低(图1d; mCTS-GFP; WT-GFP的 $94.87\% \pm 7.82\%$; $n=9$; 与WT-GFP相比 $p=0.990$)。这个结果确认了CTS在特异性引导CTS标记的GFP进行溶酶体降解中的必要作用。最后,CTS-GFP的过表达并没有显著改变内源性CMA底物甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的稳定性¹⁷ (图6),表明CTS-GFP中的CTS仅特异性提高CTS标记的GFP的溶酶体降解,而不是通常地在转染细胞中提高CMA的活性。总之,这些实验显示,将CTS加至非CMA底物蛋白足以通过CMA通路特异性引导(channel)蛋白进行降解。

[0124] 采用包含CTS和对DAPIK1具有特异性的结合结构域的肽将DAPIK1间接靶向至溶酶体。已经确认CTS在靶向CTS融合蛋白以进行溶酶体降解中的有效性和特异性,我们继续证实了非CMA蛋白底物能够采用由CTS和至靶蛋白的结合结构域组成的短肽被间接标记而进行CMA介导的溶酶体降解。

[0125] 死亡相关蛋白激酶1 (DAPIK1) 是正常情况下在脑中为非活性的钙-钙调素调节的蛋白激酶。当其为非活性时,DAPIK1并不与N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体NR2B亚基相互作用²⁰。但是,在某种病理条件(如用NMDA进行兴奋性毒性刺激或脑缺血)下²⁰,DAPIK1能够通过其与NR2B亚基的C-末端(CT)残基1292-1304 (NR2Bct₁₂₉₂₋₁₃₀₄)相互作用被活化,并被募集进入NMDA受体复合体²⁰。因为NR2B不仅能够结合活性形式的而且能够结合非活性形式的DAPIK1,我们显示了含有NR2B的DAPIK1结合序列和CTS的肽能够有条件地靶向活性(而不是非活性的)形式的DAPIK1,以进行CMA介导的溶酶体降解。设计了携带HA标签的两个NR2B羧基尾构建体,含有用于结合至DAPIK1的100个氨基酸序列的NR2B (NR2Bct₁₂₄₂₋₁₃₄₂)的CT片段,以及功能性(HA-NR2Bct-CTS)或者非功能性突变的CTS (HA-NR2Bct-CTSm) (图2d)。

[0126] HA-NR2Bct-CTSm(其不能通过溶酶体系统降解)与Flag标记的组成型活性形式DAPIK1 (cDAPIK1)²¹或者野生型DAPIK1共表达于HEK细胞中,以证明所述肽能够经由NR2Bct和活性DAPIK1之间的相互作用充分并且特异性结合至活性形式的DAPIK1。进行与抗-Flag或HA的相互(reciprocal)免疫共沉淀实验。如图2e所示,免疫共沉淀实验显示了HA-NR2Bct-CTSm与cDAPIK1而不是wtDAPIK1的相互作用,确认了先前关于NR2B和DAPIK1结合有条件地依赖于后者的活化的结果²⁰。

[0127] 与NR2Bct和cDAPIK1而不是wtDAPIK1相互作用一致的是,在转染之后24小时,各种比

率的HA-NR2Bct-CTS共表达以剂量依赖的方式有效降低了cDAPK1的水平(图2f)。在1:2的转染比,cDAPK1的水平降低了单独转染cDAPK1的 $29.18 \pm 1.91\%$ ($n=4$;与cDAPK1单独表达相比 $p=0.021$ (0:1,白色柱)),而在8:1的转染比,cDAPK1的水平减少了 $92.85\% \pm 2.30\%$ ($n=4$;与cDAPK1单独表达相比 $p=0.001$ (0:1,白色柱))。相反,HA-NR2Bct-CTS与wtDAPK1甚至最高比(8:1)的共表达,并未显著影响wtDAPK1的表达水平(图2g; $n=3$; $p=0.933$),这有力地表明,所述肽与DAPK1相互作用的能力是该肽诱导cDAPK1的降低所必需的。HA-NR2Bct-CTS诱导cDAPK1的降低似乎由增加的溶酶体降解所介导,因为它被溶酶体抑制剂 NH_4Cl (图2f; $n=4$)或在该肽内突变CTS(图2h;HA-NR2Bct-CTSm; $n=8$)所显著阻止。综上所述,这些数据表明,cDAPK1的特异性降低是由于增加的溶酶体降解,并且这依赖于所述肽-蛋白相互作用和所述肽的功能性CTS。

[0128] 因此,本发明的示例性实施方案是采用含有能够有效靶向蛋白以进行溶酶体降解的蛋白结合肽的CTS,间接标记非CMA底物蛋白即DAPK1,因而代表了快速降低细胞中蛋白的表达水平的新方法。

[0129] 靶肽介导的原代神经元培养物中内源性DAPK1水平的降低。培养的皮层神经元被用来说明本发明的肽介导的系统的示例性实施方案在原位(in situ)有效降低原代细胞中内源性蛋白(DAPK1)的表达水平中的用途。

[0130] 如先前所报道的²⁰,我们首次显示了,在我们的实验条件下培养的皮层神经元中NR2B能够与活化的(而不是非活化的)DAPK1相互作用。如先前所述,我们通过用 $50\mu\text{M}$ NMDA处理神经元30min活化了培养的皮层神经元中的DAPK1²⁰。如图3a中的免疫印迹所示,NMDA处理导致DAPK1的显著活化,如磷酸化形式的DAPK1水平降低所证实的²⁰。此外,NMDA处理之后,DAPK1的总量显著降低,与先前的报道一致²²。在亚细胞水平,DAPK1的NMDA刺激导致线粒体和胞浆中DAPK1的水平增加,以及细胞核中的水平降低(图7a)。免疫共沉淀实验进一步显示,虽然在基础条件下NR2B和DAPK1之间没有明显相关性,但是NMDA处理导致这两个蛋白之间的复合体的形成(图3b)。因此,这些结果证实,与先前的研究类似²⁰,在培养的皮层神经元中,NMDA受体活化不仅活化DAPK1,而且募集活性DAPK1至含有NR2B的NMDA受体。

[0131] 鉴于NR2B和DAPK1之间的该活性依赖相关性,我们然后显示了上述NR2Bct-CTS肽可以被用于以NMDA刺激(兴奋性毒性)依赖的方式降低DAPK1的细胞内表达水平。我们将无CTS的NR2Bct-CTS或NR2Bct,与细胞膜穿透序列TAT(以使得构建体可穿透质膜)一起,亚克隆至细菌表达载体,然后表达并纯化它们为His标记的重组肽(TAT-NR2Bct-CTS和TAT-NR2Bct;图3b)。如图3c中所示,TAT-NR2Bct-CTS的灌流(bath application) ($200\mu\text{M}$;90min; $n=4$; $p=0.47$)就其自身而言没有对DAPK1的基础水平产生任何可观察到的作用。但是,当与NMDA共同应用时,在NMDA洗出(washout)之后2小时,TAT-NR2Bct-CTS ($200\mu\text{M}$;30min NMDA处理之前60min和期间)降低了DAPK1水平 $57.50\% \pm 6.70\%$ ($n=9$;与不存在TAT-NR2Bct-CTS的NMDA处理组相比 $p=0.007$;图3c)。相反,与NMDA共应用相同量的对照肽TAT-NR2Bct(即无CTS)并没有产生相对于单独NMDA处理的任何显著的DAPK1降低($n=6$;与NMDA单独处理组相比 $p=0.897$;图3c)。TAT-NR2Bct-CTS介导的DAPK1表达水平的降低被溶酶体抑制剂 NH_4Cl 恢复(rescued) ($n=5$;与NMDA处理组相比 $p=0.118$)。这些结果有力地表明,在DAPK1中所观察到的降低是由溶酶体降解所介导的,并且它需要NR2Bct与活化的DAPK1的特异性相互作用和靶向肽中CTS的存在。

[0132] 如下所述,本发明的示例性的实施方案是活性DAPK1 TAT-NR2Bct-CTS的剂量依赖性和时间依赖性的有条件敲低。如图3d中所示,NMDA刺激之后,从25 μ M增高至200 μ M的TAT-NR2Bct-CTS产生了剂量依赖性的DAPK1降解。另外,单剂量的TAT-NR2Bct-CTS (200 μ M; NMDA刺激之前60min和期间30min) 导致DAPK1水平的时间依赖性降低,其在2小时变得显著 ($n=6$; 与0小时组相比 $p=0.018$), 峰值在4小时 ($n=6$; 与0小时组相比 $p=0.001$), 然后在处理后7小时内逐渐恢复至基线水平 (图3e)。但是,在NMDA洗出之后立即施用第二剂量的His-TAT-NR2Bct-CTS, 允许DAPK1的降解在高达7小时的观察时间中持续存在 (图3f; $n=4$; 与NMDA处理组相比 $p=0.002$)。DAPK1水平降低的可逆性和时间依赖性有力地支持这样的推测: 所述降低不是由于非特异性的细胞过程 (如毒性诱导的细胞死亡), 而是TAT-NR2Bct-CTS介导其靶蛋白的快速和可逆降解的结果。如图所示, 所示降低的程度和时间进程还能够通过改变所述肽应用的浓度和/或次数 (times) 来很容易地控制。

[0133] 尽管以上实验已经证实了重组肽TAT-NR2Bct-CTS有效且有条件地敲低细胞中天然DAPK1的活性形式的功能, 但是对以所要求的质量和量表达和纯化这样的重组蛋白的分子生物学设备的需求可能会限制其广泛使用。此外, NR2B C-末端内的100个氨基酸含有多个蛋白酶裂解位点³⁶, 使得它易于快速从细胞清除、降低其生物利用度并增加脱靶作用的机会。由于通过NR2B结合至活化的DAPK1仅要求NR2B₁₂₉₂₋₁₃₄₀的18个氨基酸残基的短伸展 (stretch)²⁰, 我们设计并合成了最少28氨基酸的DAPK1降解靶向肽NR2B-CTS, 其包含NR2B的DAPK1结合序列 (NR2B₁₂₉₂₋₁₃₄₀) 和CTS (图4a)。TAT细胞穿透序列被直接加至NR2B-CTS的N-末端, 以产生短的合成细胞膜穿透肽TAT-NR2B-CTS及其对照TAT-NR2B (缺少CTS序列) (图4a)。如图4e中所示, TAT-NR2B-CTS的灌流 (25 μ M; 在NMDA应用之前和期间) 导致NMDA处理之后DAPK1的显著降低 ($n=6$; 与NMDA处理组相比 $p=0.001$), 而TAT-NR2B对照肽并没有影响DAPK1水平 ($n=5$; 与NMDA处理组相比 $p=0.223$)。再者, TAT-NR2B-CTS诱导的DAPK1降低被NH₄Cl应用所恢复 ($n=5$; 与NMDA处理组相比 $p=0.302$) (图4e)。进一步的分析显示, TAT-NR2B-CTS诱导了在细胞核、胞浆和线粒体部分中DAPK1水平降低 (图7b)。siRNA介导的Lamp2a (CMA机制中的关键成分) 的敲低, 显著恢复了DAPK1的敲低 (图8), 其进一步支持了溶酶体依赖的降解的介导 (mediation)。因此, 使用TAT细胞穿透序列被递送入神经元的合成肽NR2B-CTS, 足以经由CMA快速并可逆地降低活性DAPK1的蛋白水平。

[0134] 我们进一步显示, 其它细胞穿透肽可以替换TAT以使得这种靶向敲低方法更加普及。例如, 我们采用短的细胞内递送载体肽Pep-1, 以1:4的比例将小肽NR2B-CTS递送至细胞内隔室 (图4a)^{23,24}。在NMDA刺激之前1小时和期间施用NR2B-CTS:Pep-1复合体, 然后与NMDA一起洗出。如图4b中所示, NMDA洗出之后2小时, 内源性DAPK1的水平以NR2B-CTS浓度依赖的方式显著降低, 在10 μ M、25 μ M和50 μ M分别降低了 $33.60 \pm 14.48\%$ 、 $43.65 \pm 2.05\%$ 和 $63.88 \pm 6.18\%$ 。与重组肽TAT-NR2Bct-CTS类似, 由Pep-1递送的NR2B-CTS并未影响对照、非NMDA处理的神经元中的DAPK1水平 (图4b)。单独应用NR2B-CTS或者Pep-1未产生活化的DAPK1的降低 (图4b; $n=4$; 与NMDA处理组相比分别为 $p=0.941$ 和 $p=0.981$), 表明载体Pep-1不负责DAPK1降解, 但它是将NR2B-CTS肽递送入神经元的细胞内隔室所必需的。与重组TAT-NR2B-CTS类似, 用Pep-1递送的NR2B-CTS导致活化的DAPK1水平的快速和可逆降低。因此, NMDA和肽洗出之后1小时内, DAPK1降低是明显的 ($n=3$; $58.27 \pm 5.48\%$ 的降低), 在2小时达到最大水平 ($n=3$; $78.79 \pm 1.15\%$ 的降低), 然后在接下来的4小时逐渐恢复 (图4c)。另外, NR2B-

CTS介导的降低被NH₄Cl应用完全恢复,进一步支持了我们的假设,即蛋白水平的降低是增加的溶酶体依赖性降解的结果(图4d)。

[0135] 因此,本发明的示例性实施方案是使用NR2B-CTS降解肽(His标记的重组肽、或Pep-1、或TAT介导的合成肽)在原代神经元培养物中以剂量、时间和条件依赖性方式快速并可逆地降解其内源性结合伙伴DAPK1。

[0136] 靶肽介导的内源性 α -突触核蛋白和PSD95水平在体外和原位的降低。确认本发明的靶肽介导的DAPK1降解系统的成功之后,通过示例含有CTS的肽介导两个其它蛋白(α -突触核蛋白和突触后密度蛋白(PSD95))的溶酶体靶向和降解的能力,我们显示了我们的方法的普适性。

[0137] 最近发现 α -突触核蛋白(涉及于神经退行性突触核蛋白病如帕金森氏病的蛋白¹⁸)与 β -突触核蛋白的短的氨基酸伸展(氨基酸36-45之间)(β syn36)有力地相互作用¹⁹。因此,本发明的示例性实施方案是含有 β -突触核蛋白的 α -突触核蛋白结合结构域(β syn36)和CTS二者的短肽(FLAG- β syn36-CTS),我们显示其能够靶向 α -突触核蛋白以进行溶酶体降解。相反,含有 β syn36但不含CTS的肽(FLAG- β syn36),其虽然具有与 α -突触核蛋白进行相互作用的能力,但是其不足以靶向其而进行溶酶体降解(图2a)。我们显示了在HEX细胞中共转染48小时后,FLAG- β syn36-CTS共表达以剂量依赖的方式显著降低 α -突触核蛋白水平(图2b;对于FLAG- β syn36-CTS: α -突触核蛋白的共表达之比分别为1:1、2:1、4:1、8:1, α -突触核蛋白降低了对照 α -突触核蛋白水平的32.40% $\pm$ 7.14%、42.89% $\pm$ 11.34%、46.49% $\pm$ 5.72%和52.18% $\pm$ 6.61%;n=8)。相反,FLAG- β syn36的共表达并没有显著影响 α -突触核蛋白的表达水平(图2c;n=4)。FLAG- β syn36-CTS诱导的 α -突触核蛋白降低,被加入溶酶体抑制剂NH₄Cl(20mM 24小时)完全恢复,这表明所述降低是增加的溶酶体依赖性蛋白降解的结果(图2b)。

[0138] 我们进一步设计了含有 β syn36和CMA-靶向信号或CMA-靶向基序(CTM)的靶向肽(TAT- β syn-CTM;图9a,上图)以在原代培养的神经元中靶向内源性 α -突触核蛋白。TAT- β syn-CTM但不是对照TAT- β syn,足以靶向 α -突触核蛋白至溶酶体进行降解。具体地,当灌流时,TAT- β syn-CTM(25 μ M;n=5;p<0.001)但不是其对照TAT- β syn(25 μ M;n=5),显著降低原代培养的神经元中的天然 α -突触核蛋白(图9a,中图)。此外,TAT- β syn-CTM的灌流降解天然 α -突触核蛋白(其预期的靶标),而不影响非预期的靶标PSD95(图9a,下图)。 α -突触核蛋白水平的降低被用溶酶体抑制剂NH₄Cl联合处理(图9a,中图)而不是被用3-甲基腺嘌呤抑制巨自噬(图10a)所恢复,进一步证实了蛋白水平的所述降低是增加的溶酶体依赖性降解的结果。

[0139] PSD95是浓缩于谷氨酸性突触的膜相关鸟苷酸激酶(MAGUK),并涉及突触稳定和可塑性。PSD95充当组装围绕NMDAR的一组特异性信号蛋白的支架,并结合至NR2B亚基C-末端尾的9个氨基酸³¹(NR2B9c)。因此,我们合成了PSD-95靶向肽TAT-NR2B9c-CTM(图9b,上图)。TAT-NR2B9c-CTM而不是其对照TAT-NR2B9c,足以靶向PSD95至溶酶体进行降解。具体地,TAT-NR2B9c-CTM(25 μ M;n=4;p<0.01)而不是其对照TAT-NR2B9c(25 μ M;n=4),以溶酶体依赖的形式显著降低PSD95而不是 α -突触核蛋白水平(图9b)。PSD95水平的降低被用溶酶体NH₄Cl联合处理(图9b,下图)而不是被用3-甲基腺嘌呤抑制巨自噬(图10c)所恢复,进一步证实了蛋白水平的所述降低是增加的溶酶体依赖性降解的结果。重要的是, β syn或NR2B9c

肽没有一个显示出在所使用浓度上明显的毒性,即便是在应用的24小时之后(图11)。

[0140] 因此,本发明的靶向肽介导的降解可以被推广到原位降解大部分的(如果不是所有的)天然胞浆蛋白,并且包含蛋白结合结构域的靶向肽是特异性针对其预期的靶蛋白。

[0141] 靶向肽介导的DA PK1的体外和体内降解的神经保护行为。因此,以上结果证实,包含特异性针对感兴趣的蛋白的蛋白结合结构域和CTS的靶向肽能够导致感兴趣的蛋白的降解,并且该系统能够被用于降解各种天然蛋白。如下所述,该肽介导的天然蛋白水平的降低还能够具有生理和/或病理相关表型。

[0142] 如上所述,DA PK1是许多细胞类型中的细胞死亡促进蛋白激酶,并且已知是病理条件(如兴奋性毒性/缺血神经元损伤²⁰或氧化应激²⁵)下细胞死亡所必需的。因此,示例性实施方案是上述可透过膜的DA PK1敲低肽,用于通过快速降低神经元中活化的DA PK1水平来保护神经元免受各种破坏性的损伤。由于NMDA诱导的兴奋性毒性神经元损伤需要DA PK1,可由无CTS的可透过膜的NR2B肽从NMDARs上解离所述激酶来阻止它^{20,26}。因此,很难区分阻断DA PK1-NR2B蛋白相互作用的效果和DA PK1敲低的效果。为了避免这种复杂化(complication),我们采用非NMDA受体依赖性氧化应激诱导的神经元死亡(已经参与了各种广泛的人神经退行性疾病如阿尔茨海默氏病和肌萎缩性侧索硬化症(ALS)²⁵的过程),通过TAT-NR2Bct-CTS证实了DA PK1敲低的这种神经保护作用。氧化应激是过量活性氧(ROS)产生的结果,并且因此细胞过度地直接暴露于能够诱导随后神经元死亡的自由基。过氧化氢(H₂O₂)是ROS的有效生成器(potent generator)²⁷,细胞暴露于H₂O₂能够活化DA PK1,导致细胞死亡²⁸。如图5a中所示,如其磷酸化水平的降低所证实的,培养的皮层神经元暴露于H₂O₂(300μM;30min)显著活化了DA PK1。与NMDA相反,H₂O₂并没有显著影响总DA PK1(n=8;与对照相比p=0.125)。用TAT-NR2Bct-CTS而不是TAT-NR2Bct预处理这些神经元,导致H₂O₂处理的神经元中DA PK1的水平降低超过60%(36.54±7.1%;n=8;与对照相比p=0.001)(图5b)。与特定的溶酶体降解的结果一致,TAT-NR2Bct-CTS诱导的DA PK1的降低被NH₄Cl显著抑制(n=8;与TAT-NR2Bct-CTS组相比p=0.005)(图5b)。如图5c中所描绘的,H₂O₂损伤之后12小时所进行的基于LDH(乳酸脱氢酶)的细胞死亡测定显示,H₂O₂暴露显著提高神经元的死亡(n=4;2.38±2.70;与对照相比p=0.001),并且这种神经元损伤被过氧化氢酶所降低(n=4;1.17±1.76;与H₂O₂组相比p=0.001),所述过氧化氢酶催化的H₂O₂分解²⁹。H₂O₂诱导的神经毒性可以被用TAT-NR2Bct-CTS处理神经元而显著降低(50μM;H₂O₂洗出之前60min和其期间连续存在,并在其之后;n=3;1.56±0.08;与H₂O₂组相比p=0.001)。相反,用对照肽TAT-NR2Bct进行同样的处理显示没有保护作用(n=3;2.63±17.85;与H₂O₂组相比p=0.105)。另外,用TAT-NR2Bct-CTS所见到的神经保护作用不是由于所述肽从NMDARs破坏DA PK1,因为NMDAR选择性拮抗剂(2R)-氨基-5-磷酸基戊酸(APV)并没有防止H₂O₂诱导的神经毒性(n=4;2.16±13.8;与H₂O₂组相比p=0.169)。因此,TAT-NR2B-CTS经由DA PK1的降解保护神经元免受氧化应激。

[0143] 通过采用良好表征的局灶性缺血大鼠模型(中脑动脉闭塞;MCAO)(其先前被显示为可靠地体内活化DA PK1²⁰),我们进一步显示了TAT-NR2BCTM的全身应用能够敲低DA PK1,因而产生针对体内缺血损伤的神经保护。为了采用Western印迹和免疫细胞化学测量DA PK1敲低的有效性,我们采用了相对较小(60min单侧闭塞)的缺血损伤。如图12a中所示,经受60min的MCAO的大鼠在再灌注之后用盐水、TAT-NR2BCTM、或者TAT-NR2B静脉注射(i.v.)1小

时。来自盐水处理的大鼠脑横截面切片的2,3,5-氯化三苯四唑 (TTC) 染色显示,单侧MCAO可靠地诱导了大多发生在同侧纹状体 (ipsilateral striatum) 中的缺血脑损伤 (图12b)。因为DA PK1被MCAO诱导的缺血刺激所活化,并且DA PK1的TAT-NR2BCTM敲低是DA PK1活化依赖性的,我们推测,在大多数受缺血损伤影响的区域中DA PK1将最大限度地被活化并降解。为了确定由TAT-NR2BCTM引起的缺血诱导的DA PK1敲低,我们从如图12c中所示的MCAO冲击的和对侧纹状体及皮层附近切下组织,并对DA PK1水平进行免疫印迹。虽然TATNR2B (10mg/kg, i.v.) 在无论是缺血还是对侧的脑组织中没有导致DA PK1水平明显改变,但是TAT-NR2BCTM (10mg/kg; i.v.) 导致仅在脑的缺血侧中DA PK1水平的显著降低;DA PK1水平降低至对侧上DA PK1水平的43.3% (图12d; $p < 0.001$, $n = 3$; 双尾学生T检验)。鉴于所收集的组织包括一些非梗塞的区域 (图12c), 靶向肽介导的DA PK1水平降低的实际效率预期会更大。

[0144] 为了进一步以更直接 (straightforward) 的方式评估区域特异性DA PK1降解,我们采用了免疫组化探测脑横截面脑切片中的DA PK1 (图12e, 右图)。正如所料,DA PK1敲低是特异性针对中风-损伤区域的,如相邻切片用苏木精&伊红 (H&E) 染色所呈现的 (图12e, 左图), 这进一步确认了证实TAT-NR2BCTM能够特异性敲低活性 (而不是非活性) 形式DA PK1的体外结果。如先前所报道,虽然TAT-NR2B还通过从NR2BR解偶联DA PK1来部分降低缺血损伤²⁰, TAT-NR2BCTM的神经保护作用显得更为突出 (图12e, 左图)。

[0145] 总之,以上数据提供了基于靶向肽体内敲低蛋白的策略可行性的概念验证 (proof-of-concept) 的证据。另外,所述数据阐明了所述方法用于实现内源性蛋白的区域和/或疾病特异性敲低的效用,取决于靶向肽及其蛋白底物之间的相互作用特性。最后,鉴于在靶向肽的全身应用之后获得了有效的蛋白敲低,所述数据表明靶向肽可以适用于设计临床相关疗法。

[0146] 讨论

[0147] 在以上实验和结果中,基于新靶向肽的方法被证实降低细胞中天然蛋白的表达水平。这种方法提供了天然蛋白的强有力的、可逆的、剂量和时间依赖性的和有条件的降解。小 (19kDa, α -突触核蛋白) 和大 (160kDa, DA PK1) 细胞质蛋白二者以及突触支架蛋白PSD95的有效敲低,进一步证实了这种基于靶向肽的方法的可行性和通用性,提供了用于使用它使得有效调节许多不同内源性胞浆蛋白的表达水平的概念验证的证据,它们的结合伴侣和结合结构域序列是已知的或能够获得的。例如,这种方法可以特别适用于调节不同胞浆蛋白激酶的表达水平。

[0148] 我们的将TAT转导结构域作为CMPD的概念验证的实验证实,当在体外原代细胞培养物中进行灌流或在体内完整动物中外周给予灌流时,无需病毒感染,靶向肽能够容易地穿过质膜。实际上,我们和其他人先前已经显示了TAT能够在体外和体内以高度有效的方式将生物活性货物 (cargo) 穿过血脑屏障和质膜递送入细胞内部^{30,31,32}。但是,如所述结果所证实的,CMPD并不限于TAT。因为Pep-1也能够有效递送靶向肽,似乎TAT能够被备选的细胞穿透肽 (CPP) 所替换。这在当CPP和货物之间的共价连接不是期望的情况下尤其有用。与先前使用小的化学品控制蛋白水平的方法相比^{3,34,35},肽能够被更容易地设计为靶向蛋白,其中不能发现适于小分子抑制的结合口袋⁴¹。

[0149] 本文所述方法有效降低感兴趣的内源性蛋白水平还提供了以下有力的支持证据: 本研究中所使用的CMA-靶向信号 (CTS) 能够靶向非CMA底物蛋白以进行CMA介导的溶酶体降

解,不仅在它被直接融合至靶蛋白时,而且在它被经由含有CTS的蛋白结合肽间接地连接至靶蛋白时。以上结果进一步证实,包含针对靶蛋白的特定蛋白结合结构域的靶向肽对其自己的预期靶蛋白是特异性的,没有脱靶效应(off-target effect)。重要的是,TAT-NR2B-CTS特异性针对活性的而不是非活性形式的DAPK1,其不能通过DNA或者mRNA靶向而被实现。此外,无需遗传修饰靶蛋白以使得其易于降解。本发明的方法能够原位研究天然蛋白而无需事先修饰,其排除了遗传操作靶蛋白所引起的潜在的伪像(artifact)。

[0150] 因此,本文所述的用于降低天然蛋白的表达水平的本方法,由于其通用性、快速影响蛋白水平及其可逆性和剂量依赖性,可以是生物医学研究中特别有用和有效的研究工具,并且能够容易地被用于临床应用。特别地,所述肽能够通过各种手段产生;它能够在cDNA质粒转染之后被过表达,或者采用通用细菌表达系统作为重组蛋白被表达和纯化,或作为短合成肽被商业合成。因此,它是能够被几乎所有的生物医学实验室甚至是那些没有复杂分子生物学设施的实验室广泛利用的通用系统。另外,所述方法是快速的,蛋白水平的降低可以快至处理后1小时得以实现。这样的速度是不能用任何先前所述的蛋白操作在DNA或者mRNA水平得以实现的。因此,预计该方法具有与这些较慢的基于DNA或mRNA的蛋白敲低经常相关的补偿方面更少的问题。此外,可逆性和剂量依赖性意味着蛋白敲低的水平和持续时间能够被通过改变肽应用的剂量和/或时间来容易地控制,因而使得其成为旨在阐明生理过程和疾病发病机制中蛋白功能的生物医学研究中的有用和有效的研究工具。这种方法也比先前的方法更容易翻译(translational)。许多先前所述的蛋白敲低方法通常要求预先遗传修饰的cDNA通过病毒感染进入靶细胞表达(在大多数情况下)¹,并因此不易对人类患者的治疗用途采用。但是,在我们的方法中采用TAT细胞膜穿透结构域或Pep-1,使得靶向肽可以容易地通过许多药物递送途径被递送进入各种器官的细胞内部,包括最常用的静脉内应用^{30,31,32},并因此对治疗人类疾病有用,尤其是对那些发病机制至少部分是由于特定蛋白的过表达和/或突变所带来的功能的获得所引起的疾病。我们的MCAO(局灶性缺血的通用模型)的概念验证的实验显示,靶向肽能够敲低脑中的诱导死亡的DAPK1,但特别是在损伤的区域中,使得DAPK1在非缺血区域保持完整。因此,实现这样的疾病相关、区域特异性敲低的能力降低了DPAK1的一般基因缺失的不良影响。

[0151] 我们的含有CTS的肽策略的固有局限性在于,它不能有效用于操作涉及CMA机制(machinery)和溶酶体稳定性的蛋白(如Hsc70和lamp-2),或针对能够抑制CMA的蛋白⁸。但是,这些蛋白可以通过利用其它细胞蛋白降解系统(如蛋白酶体),采用类似的靶向肽策略而被快速敲低。为此目的,最近已经描述了短的基于氨基酸的强蛋白酶体靶向信号³。另外,由于本文所述方法采用内体-溶酶体系统代替蛋白酶体,这种方法可以被用于补充其它蛋白敲低方法。例如,含有CTS的肽和含有蛋白酶体靶向信号的肽的组合可以极大地提高某些蛋白的敲低效率。此外,本方法还可以在所述细胞在应激之下和/或蛋白酶体被抑制的病理条件下特别强大。

[0152] 在本说明书中所引用的所有专利、专利申请、出版物和数据库条目的公开,在此以全文引用的方式特别地并入本文,如同每个该单个专利、专利申请、出版物和数据库条目被通过引用的方式特别地并且单独地被明确并入本文。

[0153] 尽管本发明已经参考某些特定实施方案进行描述,在不偏离本发明的范围的情况下其各种修饰对于本领域技术人员将是明显的。所有的对于本领域技术人员将是明显的这

样的修饰均被包含于所附权利要求书的范围内。

[0154] 序列列表

[0155] SEQ ID NO:1 (靶向 α -突触核蛋白的靶向敲低肽,无TAT PTD。CMA-靶向信号 (CTS) 被加下划线):GVLYVGSKTRKFERQKILDQRFFE

[0156] SEQ ID NO:2 (靶向 α -突触核蛋白的靶向敲低肽,有TAT PTD(斜体)。CMA-靶向信号 (CTS) 被加下划线):

[0157] YGRKKRRQRRRGVLYVGSKTRKFERQKILDQRFFE

[0158] SEQ ID NO:3 (靶向DAPK1的靶向敲低肽,无TAT PTD。CMA-靶向信号 (CTS) 被加下划线):KKNRNKLRRQHSYKFERQKILDQRFFE

[0159] SEQ ID NO:4 (靶向DAPK1的靶向敲低肽,有TAT PTD(斜体)。CMA-靶向信号 (CTS) 被加下划线):YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSYKFERQKILDQRFFE

[0160] 参考文献:

[0161] 1.Banaszynski,L.A.&Wandless,T.J.Conditional Control of Protein Function.Chemistry&Biology 13,11-21 (2006) .

[0162] 2.Castanotto,D.&Rossi,J.J.The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics.Nature 457,426-433 (2009) .

[0163] 3.Bonger,K.M.,Chen,L.-C.,Liu,C.W.&Wandless,T.J.Small-molecule displacement of a cryptic degron causes conditional protein degradation.Nature Chemical Biology 7,531-537 (2011) .

[0164] 4.Banaszynski,L.A.,Chen,L.-C.,Maynard-Smith,L.A.,Ooi,A.G.L.&Wandless,T.J.A Rapid,Reversible,and Tunable Method to Regulate Protein Function in Living Cells Using Synthetic Small Molecules.Cell 126,995-1004 (2006) .

[0165] 5.Neklesa,T.K.et al.Small-molecule hydrophobic tagging-induced degradation of HaloTag fusion proteins.Nature Chemical Biology 7,538-543 (2011) .

[0166] 6.Hannah,J.&Zhou,P.Maximizing target protein ablation by integration of RNAi and protein knockout.Nature Publishing Group 21,1152-1154 (2011) .

[0167] 7.Fred,D.J.Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis.Trends in biochemical sciences 15,305-309 (1990) .

[0168] 8.Majeski,A.E.&Fred,D.J.Mechanisms of chaperone-mediated autophagy.The International Journal of Biochemistry&Cell Biology 36,2435-2444 (2004) .

[0169] 9.Backer,J.,Bourret,L.&Dice,J.F.Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino-terminal 20 amino acids.Proc Natl Acad Sci 80,2166-2170 (1983) .

[0170] 10.Cuervo,A.M.&Dice,J.F.Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms.J.Cell.Sci.113Pt 24,4441-4450 (2000) .

[0171] 11.Slot,L.A.,Lauridsen,A.-M.&Hendil,K.Intracellular protein degradation in serum-deprived human fibroblasts.Journal of Biochemistry237,

491-498 (1986) .

[0172] 12.Seglen,P.O.&Reith,A.Ammonia inhibition of protein degradation in isolated rat hepatocytes.Quantitative ultrastructural alterations in the lysosomal system.Exp.Cell Res.100,276-280 (1976) .

[0173] 13.Bauer,P.O.et al.Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein.Nat.Biotechnol.28,256-263 (2010) .

[0174] 14.Cataldo,A.M.&Nixon,R.A.Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87,3861-3865 (1990) .

[0175] 15.Neff,N.T.,Bourret,L.,Miao,P.&Dice,J.F.Degradation of proteins microinjected into IMR-90 human diploid fibroblasts.The Journal of cell biology 91,184-194 (1981) .

[0176] 16.Cuervo,A.M.Impaired Degradation of Mutant-Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy.Science 305,1292-1295 (2004) .

[0177] 17.Cuervo,A.M.,Terlecky,S.R.,Dice,J.F.&Knecht,E.Selective binding and uptake of ribonuclease A and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by isolated rat liver lysosomes.J.Biol.Chem.269,26374-26380 (1994) .

[0178] 18.Spillantini,M.G.et al. α -Synuclein in Lewy bodies.Nature388,839-840 (1997) .

[0179] 19.Shaltiel-Karyo,R.et al.Inhibiting α -Synuclein Oligomerization by Stable Cell-Penetrating β -Synuclein Fragments Recovers Phenotype of Parkinson's Disease Model Flies.PLoS ONE 5,e13863 (2010) .

[0180] 20.Tu,W.et al.DAPK1 Interaction with NMDA Receptor NR2B Subunits Mediates Brain Damage in Stroke.Cell 140,222-234 (2010) .

[0181] 21.Cohen,O.,Feinstein,E.&Kimchi,A.DAP-kinase is a Ca^{2+} /calmodulin-dependent,cytoskeletal-associated protein kinase,with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity.The EMBO journal 16,998-1008 (1997) .

[0182] 22.Shamloo,M.et al.Death-associated protein kinase is activated by dephosphorylation in response to cerebral ischemia.J.Biol.Chem.280,42290-42299 (2005) .

[0183] 23.Morris,M.C.,Depollier,J.,Mery,J.,Heitz,F.&Divita,G.A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells.Nat.Biotechnol.19,1173-1176 (2001) .

[0184] 24.Wang,Y.-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic Acid Subtype Glutamate Receptor (AMPA) Endocytosis Is Essential for N-Methyl-D-aspartate-induced Neuronal Apoptosis.Journal of Biological Chemistry 279,41267-41270 (2004) .

- [0185] 25. Barnham, K. J., Masters, C. L. & Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3, 205-214 (2004).
- [0186] 26. Martin, H. G. S. & Wang, Y. T. Blocking the Deadly Effects of the NMDA Receptor in Stroke. *Cell* 140, 174-176 (2010).
- [0187] 27. Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E. & Offen, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40, 959-975 (2001).
- [0188] 28. Eisenberg-Lerner, A. & Kimchi, A. DAP kinase regulates JNK signaling by binding and activating protein kinase D under oxidative stress. *Cell Death Differ* 14, 1908-1915 (2007).
- [0189] 29. Ricart, K. C. & Fiszman, M. L. Hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cultured cortical cells grown in serum-free and serum-containing media. *Neurochem. Res.* 26, 801-808 (2001).
- [0190] 30. Vivès, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272, 16010-16017 (1997).
- [0191] 31. Aarts, M. et al. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. *Science* 298, 846 (2002).
- [0192] 32. Brebner, K. Nucleus Accumbens Long-Term Depression and the Expression of Behavioral Sensitization. *Science* 310, 1340-1343 (2005).
- [0193] 33. Hill, M. Evaluating Neuroprotection in Aneurysm Coiling Therapy (ENACT) Trial Final Results. International Stroke Conference (2012).
- [0194] 34. Banaszynski, L. A., Sellmyer, M. A., Contag, C. H., Wandless, T. J. & Thorne, S. H. Chemical control of protein stability and function in living mice. *Nature Medicine* 14, 1123-1127 (2008).
- [0195] 35. Sakamoto, K. M. et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8554-8559 (2001).
- [0196] 36. Traynelis, S. F. et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews* 62, 405-496 (2010).
- [0197] 37. Taghibiglou, C. et al. Role of NMDA receptor-dependent activation of SREBP1 in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *Nature Medicine* 1-9 (2009). doi:10.1038/nm.2064.
- [0198] 38. Vivès, E. Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: "Is the Trojan horse too wild to go only to Troy?" *Journal of Controlled Release* 109, 77-85 (2005).
- [0199] 39. Vivès, E. et al. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta* 1786, 126-138 (2008).
- [0200] 40. Rajendran, L. et al. Subcellular targeting strategies for drug design

and delivery.Nature Reviews 9,29-42 (2010) .

序列表

<110> 不列颠哥伦比亚大学

<120> 肽导向的蛋白敲低

<130> V86633W0

<140> PCT/CA2013/050741

<141> 2013-09-27

<150> US 61/706, 506

<151> 2012-09-27

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001] <220>

<223> 靶向 α -突触核蛋白的敲低蛋白，无TAT蛋白转导结构域

<400> 1

Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Lys Phe Glu Arg Gln Lys

1 5 10 15

Ile Leu Asp Gln Arg Phe Phe Glu

20

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向 α -突触核蛋白的敲低蛋白，有TAT蛋白转导结构域

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Val Leu Tyr Val

1 5 10 15

Gly Ser Lys Thr Arg Lys Phe Glu Arg Gln Lys Ile Leu Asp Gln Arg
20 25 30

Phe Phe Glu
35

<210> 3
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向DAPK1的敲低蛋白，无TAT蛋白转导结构域

<400> 3

Lys Lys Asn Arg Asn Lys Leu Arg Arg Gln His Ser Tyr Lys Phe Glu
1 5 10 15

Arg Gln Lys Ile Leu Asp Gln Arg Phe Phe Glu
20 25

[0002]

<210> 4
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向DAPK1的敲低蛋白，有TAT蛋白转导结构域

<400> 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Lys Asn Arg Asn
1 5 10 15

Lys Leu Arg Arg Gln His Ser Tyr Lys Phe Glu Arg Gln Lys Ile Leu
20 25 30

Asp Gln Arg Phe Phe Glu
35

<210> 5
<211> 13

<212> PRT
<213> 人流感病毒

<400> 5

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)

<400> 6

Arg Gln Ile Lys Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> 未知

[0003]

<220>
<223> Buforin II细胞膜穿透结构域

<400> 7

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
20

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Lys Arg Val Ser Arg Asn Lys Ser Glu Lys Lys Arg Arg
1 5 10

<210> 9

<211> 18
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 模型两亲肽细胞膜穿透结构域

<400> 9

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> K-FGF细胞膜穿透结构域

[0004]

<400> 10

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> Ku70-衍生的肽细胞膜穿透结构域

<400> 11

Val Pro Met Leu Lys Glu
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知

	<220>	
	<223>	Ku70-衍生的肽细胞膜穿透结构域
	<400>	12
	Val Pro Met Leu Lys	
	1	5
	<210>	13
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	未知
	<220>	
	<223>	Ku70-衍生的肽细胞膜穿透结构域
	<400>	13
	Pro Met Leu Lys Glu	
	1	5
[0005]	<210>	14
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	未知
	<220>	
	<223>	Ku70-衍生的肽细胞膜穿透结构域
	<400>	14
	Pro Met Leu Lys	
	1	
	<210>	15
	<211>	28
	<212>	PRT
	<213>	未知
	<220>	
	<223>	朊病毒, 小鼠Prpe 细胞膜穿透结构域
	<400>	15
	Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp	
	1	5 10 15

Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro
20 25

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> pVEC细胞膜穿透结构域

<400> 16

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
1 5 10 15

Ser Lys

[0006] <210> 17
<211> 21
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> Pep-I细胞膜穿透结构域

<400> 17

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> SynB1细胞膜穿透结构域

<400> 18

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 19
<211> 27
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 转运素细胞膜穿透结构域

<400> 19

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

[0007]

<210> 20
<211> 21
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 转运素-10细胞膜穿透结构域

<400> 20

Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Lys Lys Ile Leu
20

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> 未知

<220>

<223> CADY细胞膜穿透结构域

<400> 21

Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu
1 5 10 15

Leu Trp Arg Ala
20

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> Pep-7细胞膜穿透结构域

<400> 22

Ser Asp Leu Trp Glu Met Met Met Val Ser Leu Ala Cys Gln Tyr
1 5 10 15

[0008]

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> HN-1细胞膜穿透结构域

<400> 23

Thr Ser Pro Leu Asn Ile His Asn Gly Gln Lys Leu
1 5 10

<210> 24

<211> 26

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> VT5细胞膜穿透结构域

<400> 24

Asp Pro Lys Gly Asp Pro Lys Gly Val Thr Val Thr Val Thr
1 5 10 15

Val Thr Gly Lys Gly Asp Pro Lys Pro Asp
20 25

<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> pISL细胞膜穿透结构域

<400> 25

Arg Val Ile Arg Val Trp Phe Gln Asn Lys Arg Cys Lys Asp Lys Lys
1 5 10 15

[0009]

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 分子伴侣介导的自噬靶向信号, 五肽基序

<400> 26

Lys Phe Glu Arg Gln
1 5

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 缀合至细胞穿透肽的AHNP归巢肽

<400> 27

Phe Cys Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Lys Asp Val
1 5 10

<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 缀合至细胞穿透肽的DV1归巢肽

<400> 28

Leu Gly Ala Ser Trp His Arg Pro Asp Lys Cys Cys Leu Gly Tyr Gln
1 5 10 15

Lys Arg Pro Leu Pro
20

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 未知

[0010] <220>
<223> 缀合至细胞穿透肽的DV3归巢肽

<400> 29

Leu Gly Ala Ser Trp His Arg Pro Asp Lys
1 5 10

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 缀合至细胞穿透肽的PEGA归巢肽

<400> 30

Cys Pro Gly Pro Glu Gly Ala Gly Cys
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 缀合至细胞穿透肽的CREKA归巢肽

<400> 31

Cys Arg Glu Lys Ala
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> TCP-1细胞穿透归巢肽

<400> 32

Cys Thr Pro Ser Pro Phe Ser His Cys
1 5

[0011]

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> HAP-1细胞穿透归巢肽

<400> 33

Ser Phe His Gln Phe Ala Arg Ala Thr Leu Ala Ser
1 5 10

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> HAP-2细胞穿透归巢肽

<400> 34

His Ile Gln Leu Ser Pro Phe Gln Ser Trp Arg

	1	5	10
	<210>	35	
	<211>	4	
	<212>	PRT	
	<213>	未知	
	<220>		
	<223>	细胞穿透归巢肽	
	<400>	35	
	Pro Tyr Glu Glu		
	1		
	<210>	36	
	<211>	4	
	<212>	PRT	
	<213>	未知	
	<220>		
	<223>	细胞穿透归巢肽	
[0012]	<400>	36	
	Leu Lys Lys Pro		
	1		
	<210>	37	
	<211>	4	
	<212>	PRT	
	<213>	未知	
	<220>		
	<223>	细胞穿透归巢肽	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<222>	(4)..(4)	
	<223>	N-烷基甘氨酸赖氨酸样类肽	
	<400>	37	
	Glu Pro Lys Xaa		
	1		

<210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 细胞穿透归巢肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(4)
<223> N-烷基甘氨酸赖氨酸样类肽

<400> 38

Glu Leu Xaa Xaa
1

<210> 39
<211> 32
<212> PRT
<213> 未知

[0013]

<220>
<223> F3细胞穿透归巢肽

<400> 39

Cys Lys Asp Glu Pro Gln Arg Arg Ser Ala Arg Leu Ser Ala Lys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Pro Lys Pro Glu Pro Lys Pro Lys Lys Ala Pro Ala Lys Lys
20 25 30

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> Pep42细胞穿透归巢肽

<400> 40

Cys Thr Val Ala Leu Pro Gly Gly Tyr Val Arg Val Cys

1 5 10

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> CAP细胞穿透归巢肽

<400> 41

Asp Trp Arg Val Ile Ile Pro Pro Arg Pro Ser Ala
1 5 10

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> RGD-4C细胞穿透归巢肽

[0014]

<400> 42

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> iRGD细胞穿透归巢肽

<400> 43

Cys Arg Gly Asp Lys Gly Pro Asp Cys
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> iRGD细胞穿透归巢肽

<400> 44

Cys Arg Gly Asp Arg Gly Pro Asp Cys
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> iRGD细胞穿透归巢肽

<400> 45

Cys Arg Gly Asp Lys Gly Pro Glu Cys
1 5

[0015] <210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> iRGD细胞穿透归巢肽

<400> 46

Cys Arg Gly Asp Arg Gly Pro Glu Cys
1 5

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 从核糖核酸酶A鉴定的分子伴侣介导的自噬靶向信号

<400> 47

Lys Phe Glu Arg Gln
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 从hsc70鉴定的分子伴侣介导的自噬靶向信号

<400> 48

Gln Lys Ile Leu Asp
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 从血红蛋白鉴定的分子伴侣介导的自噬靶向信号

[0016] <400> 49

Gln Arg Phe Phe Glu
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> cRGDF细胞穿透归巢肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 甲基化, MeVal

<400> 50

Arg Gly Asp Phe Xaa
1 5

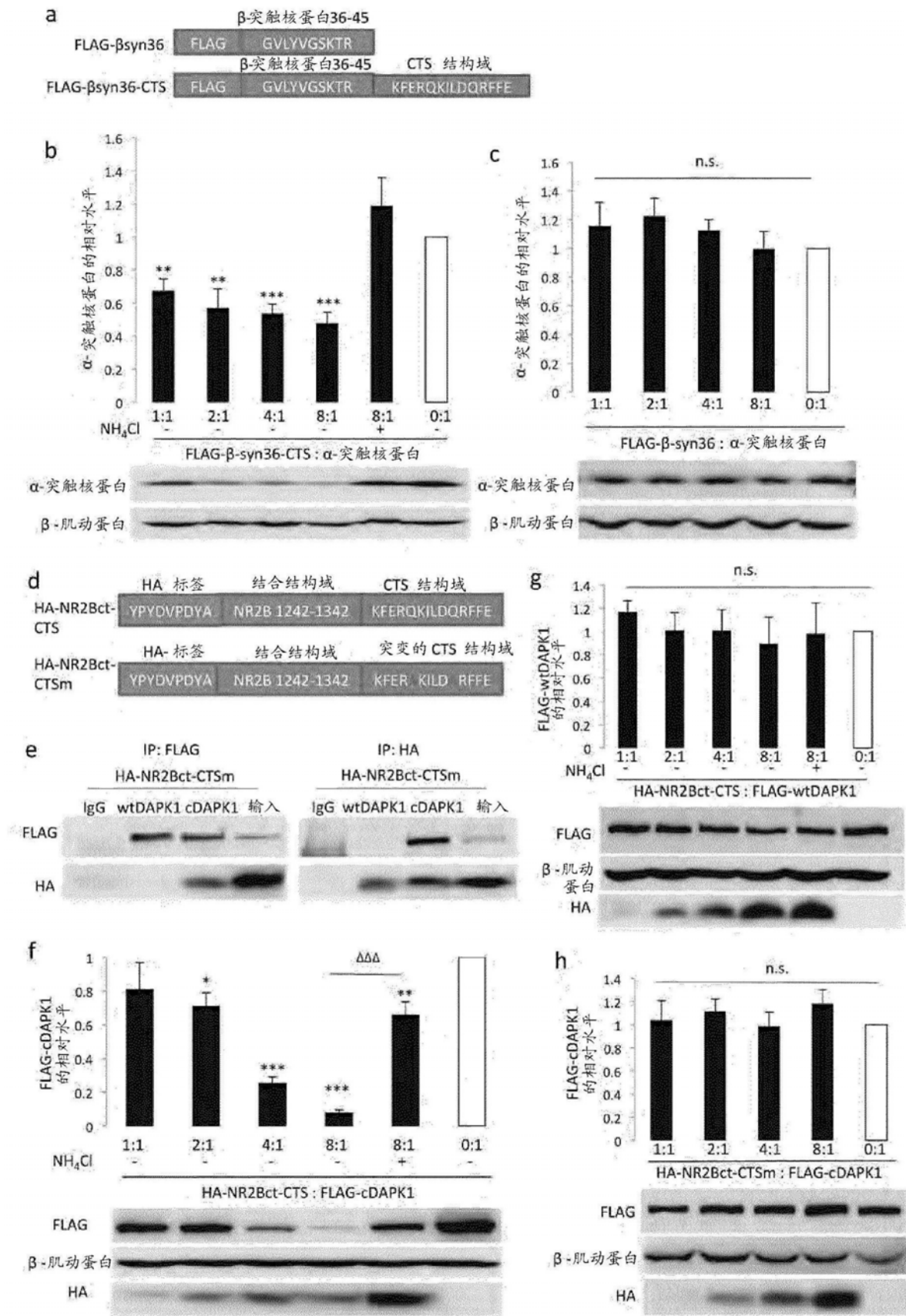


图2

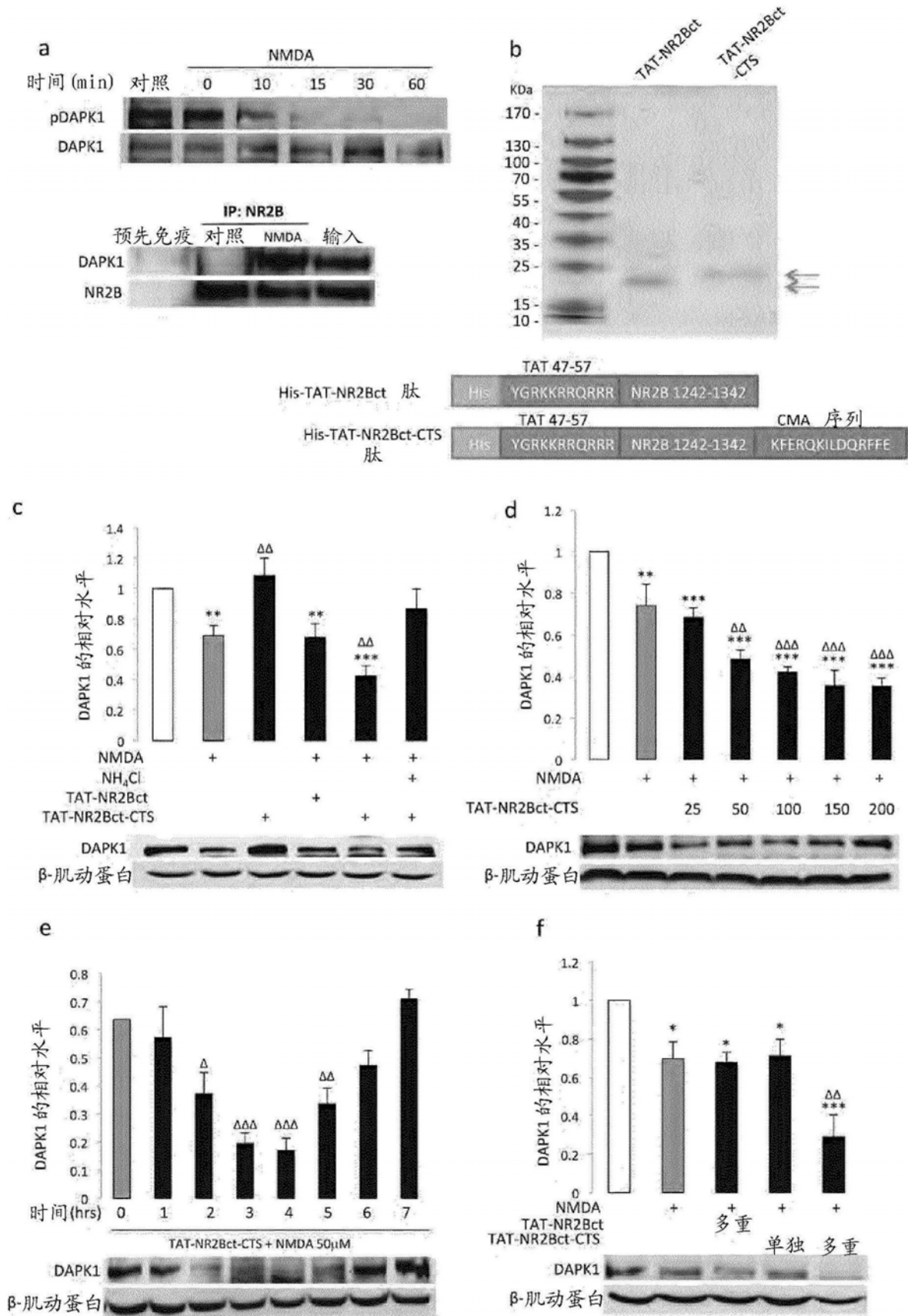


图3

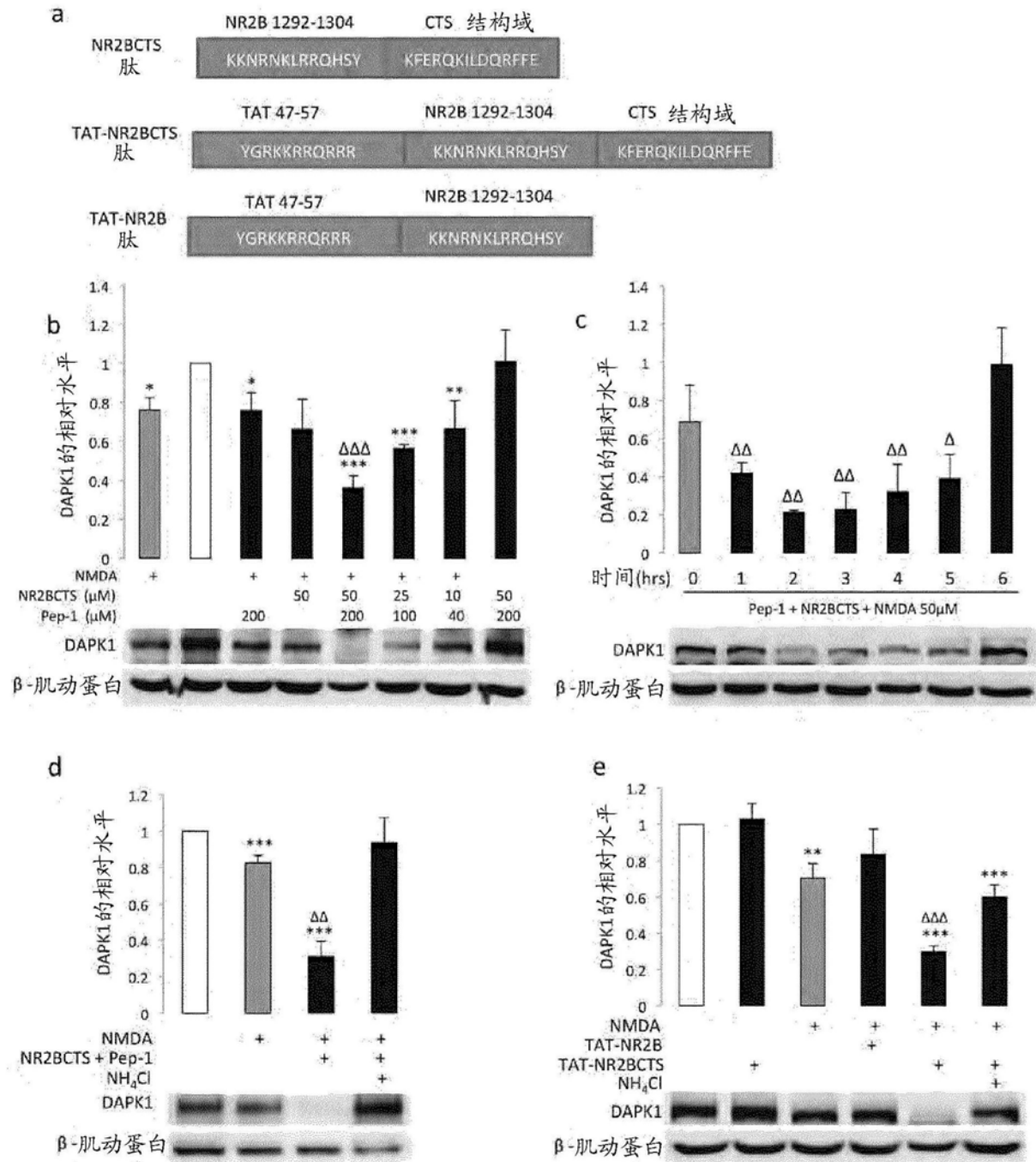


图4

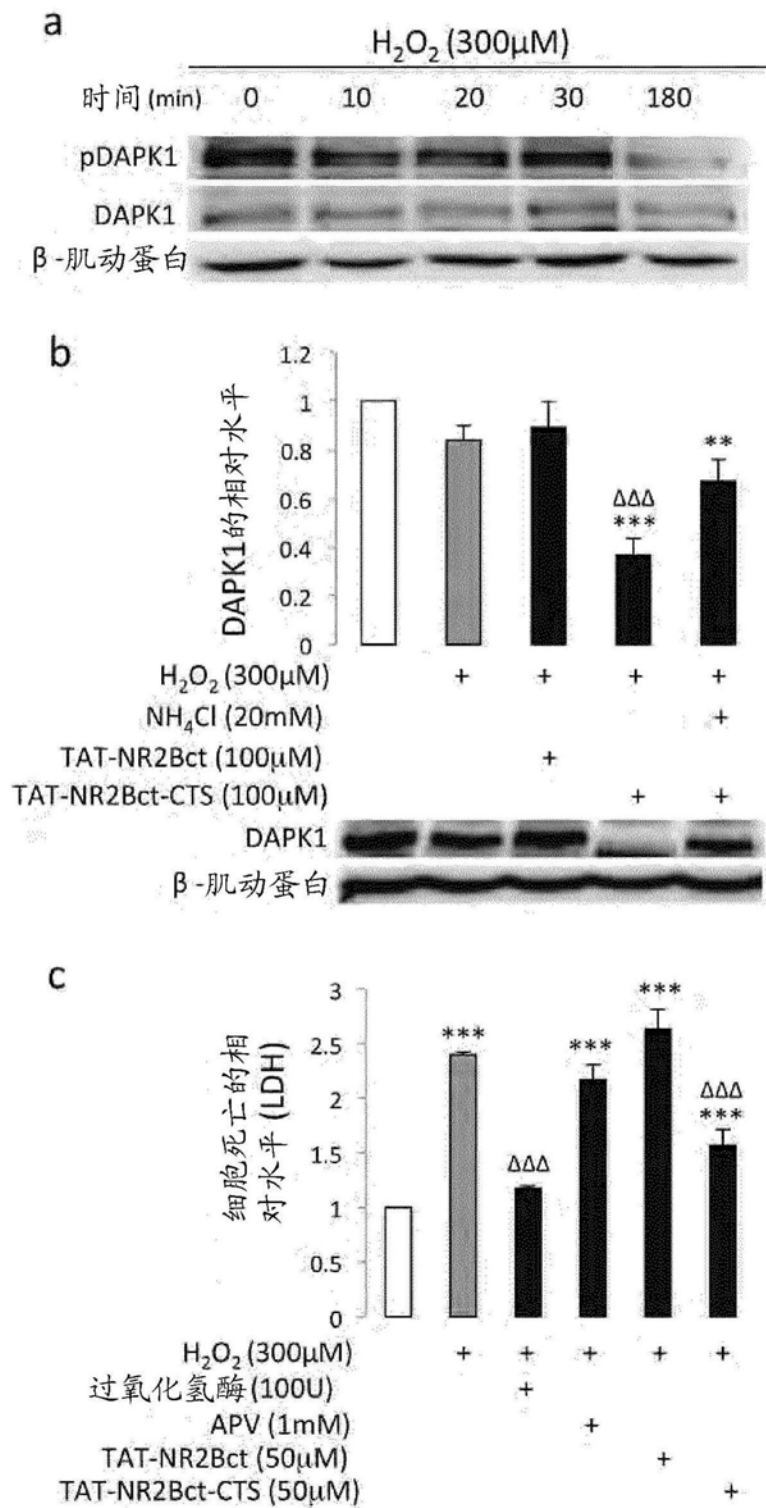


图5

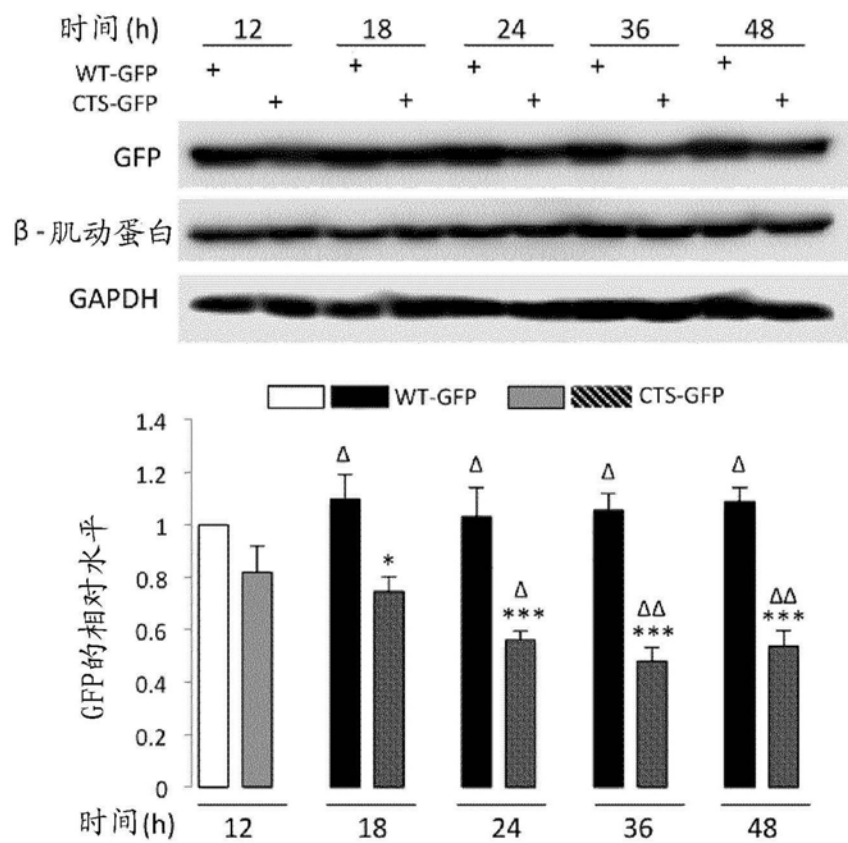


图6

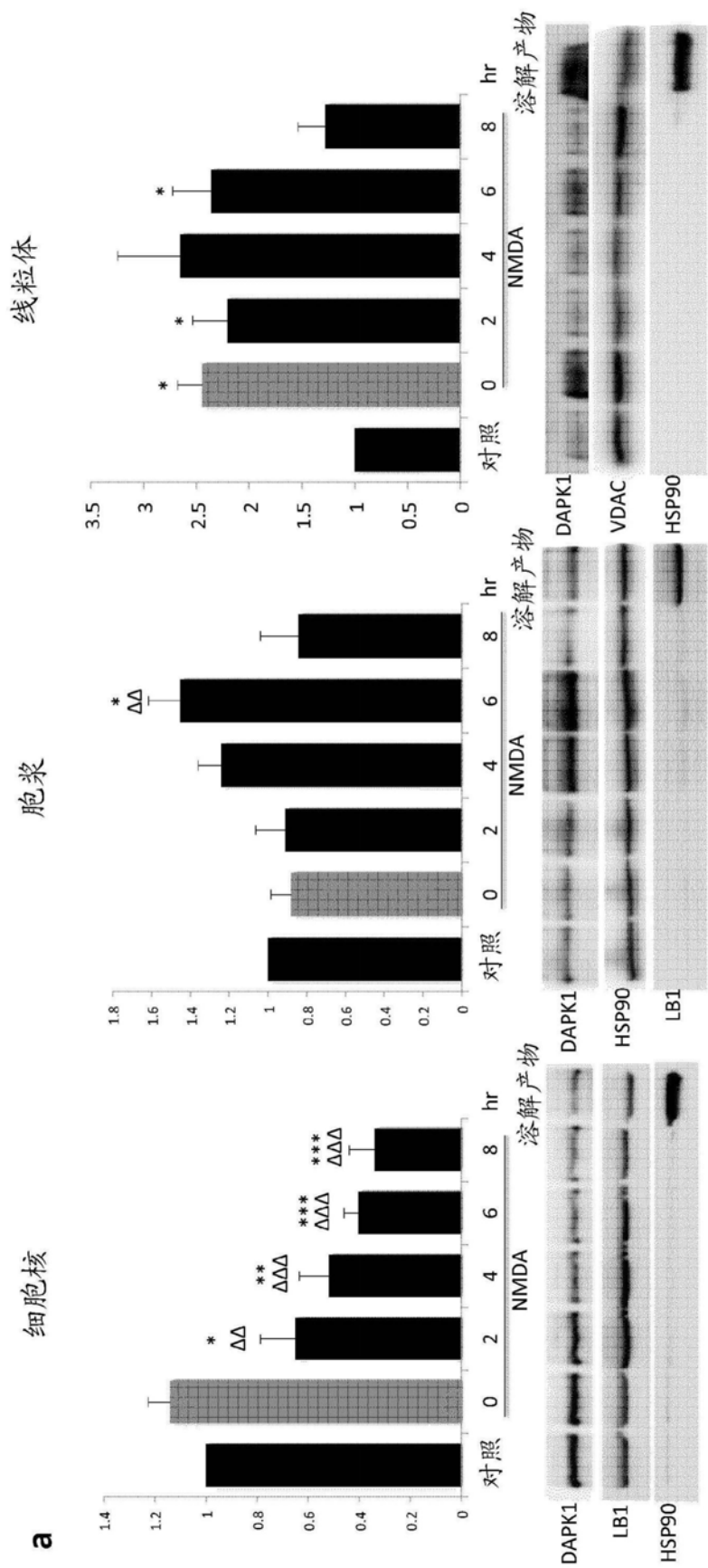


图7 (a)

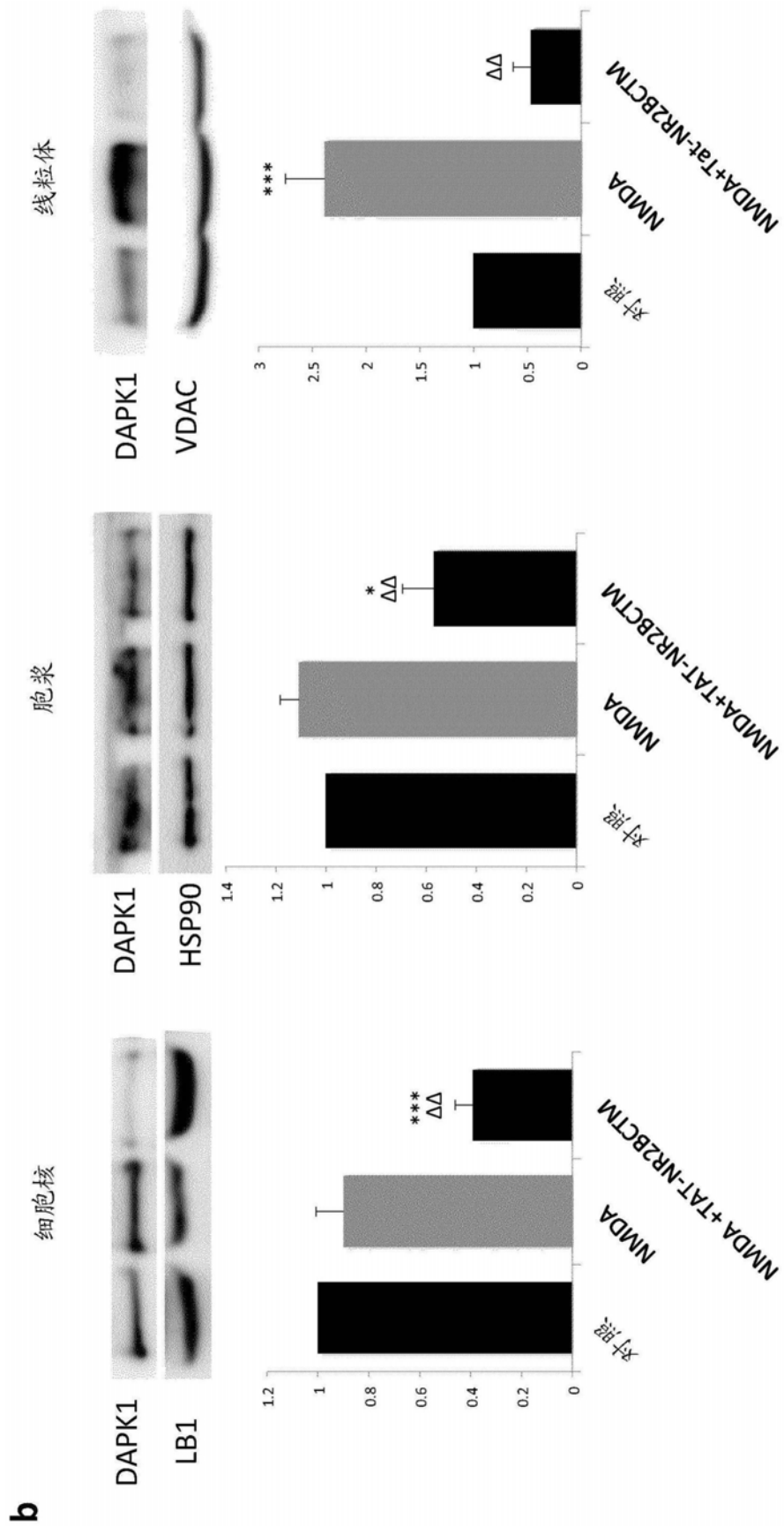


图7 (b)

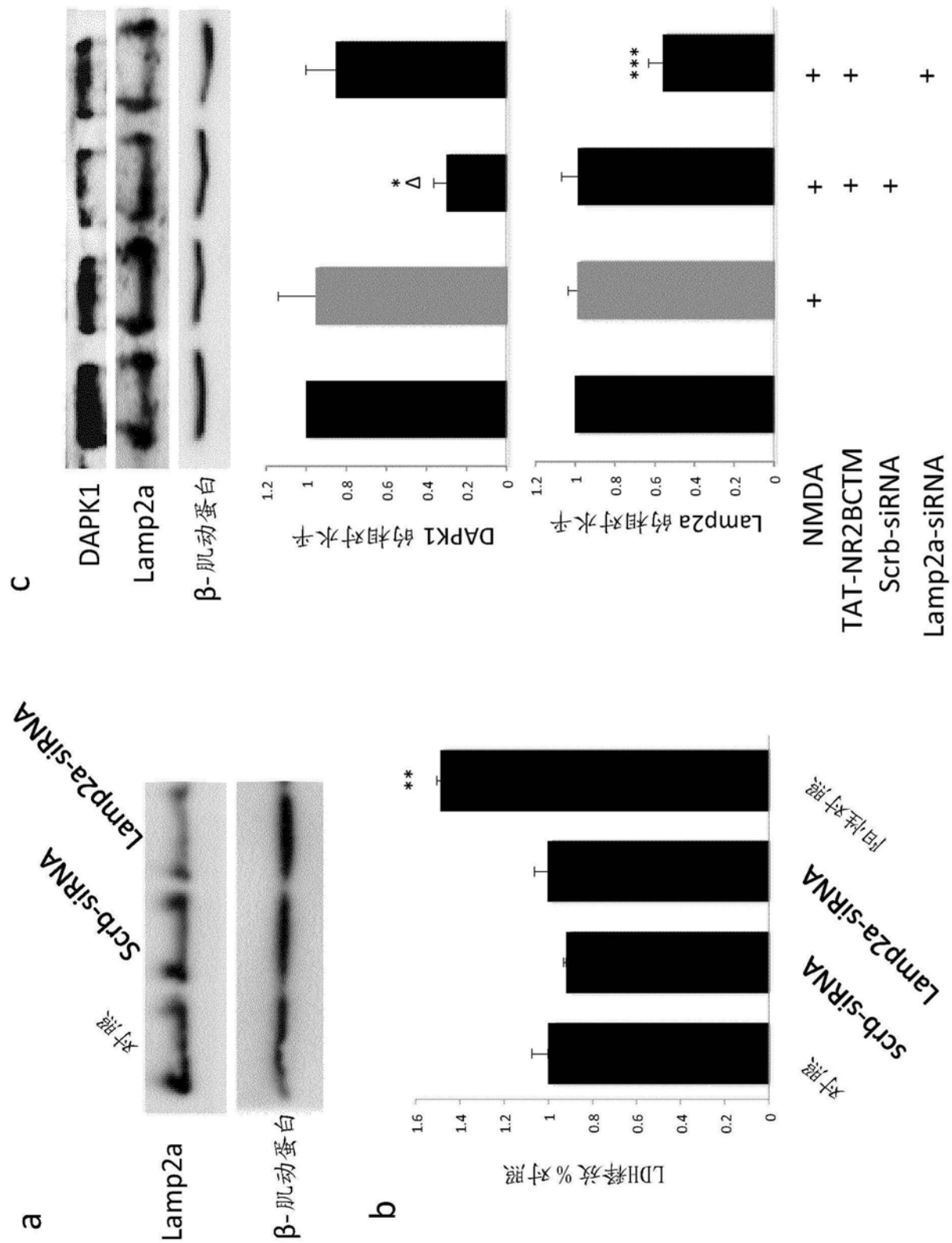


图8

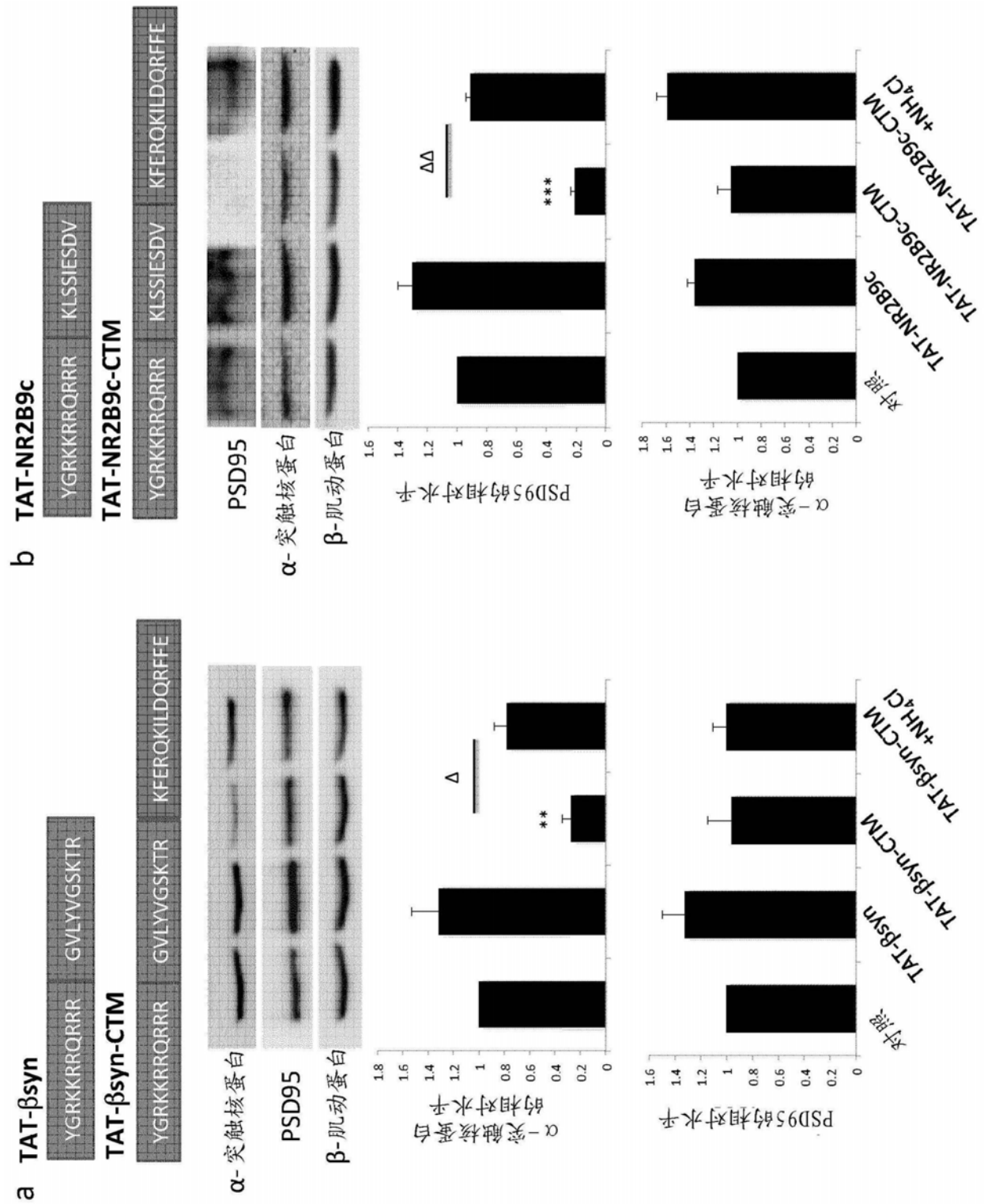


图9

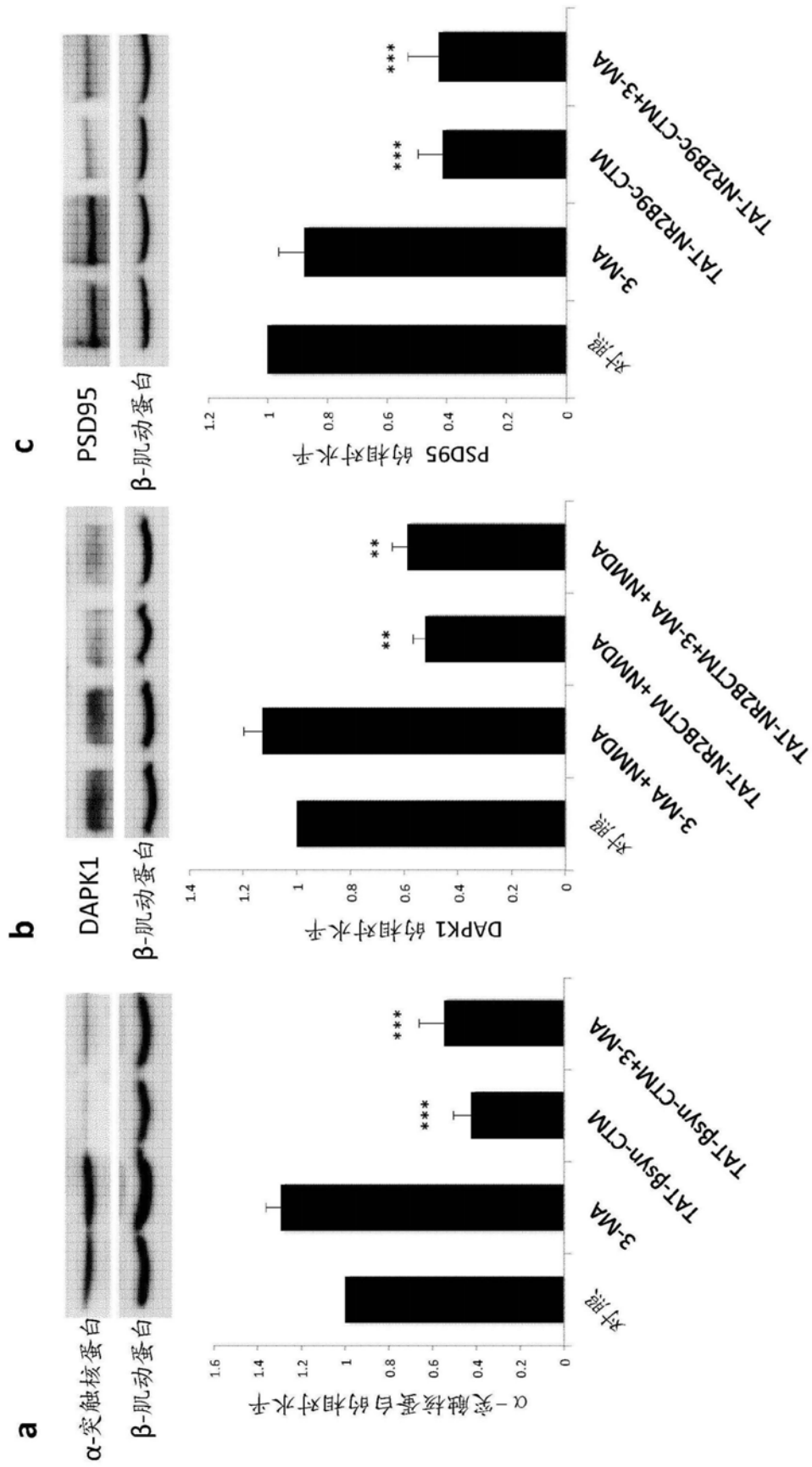


图10

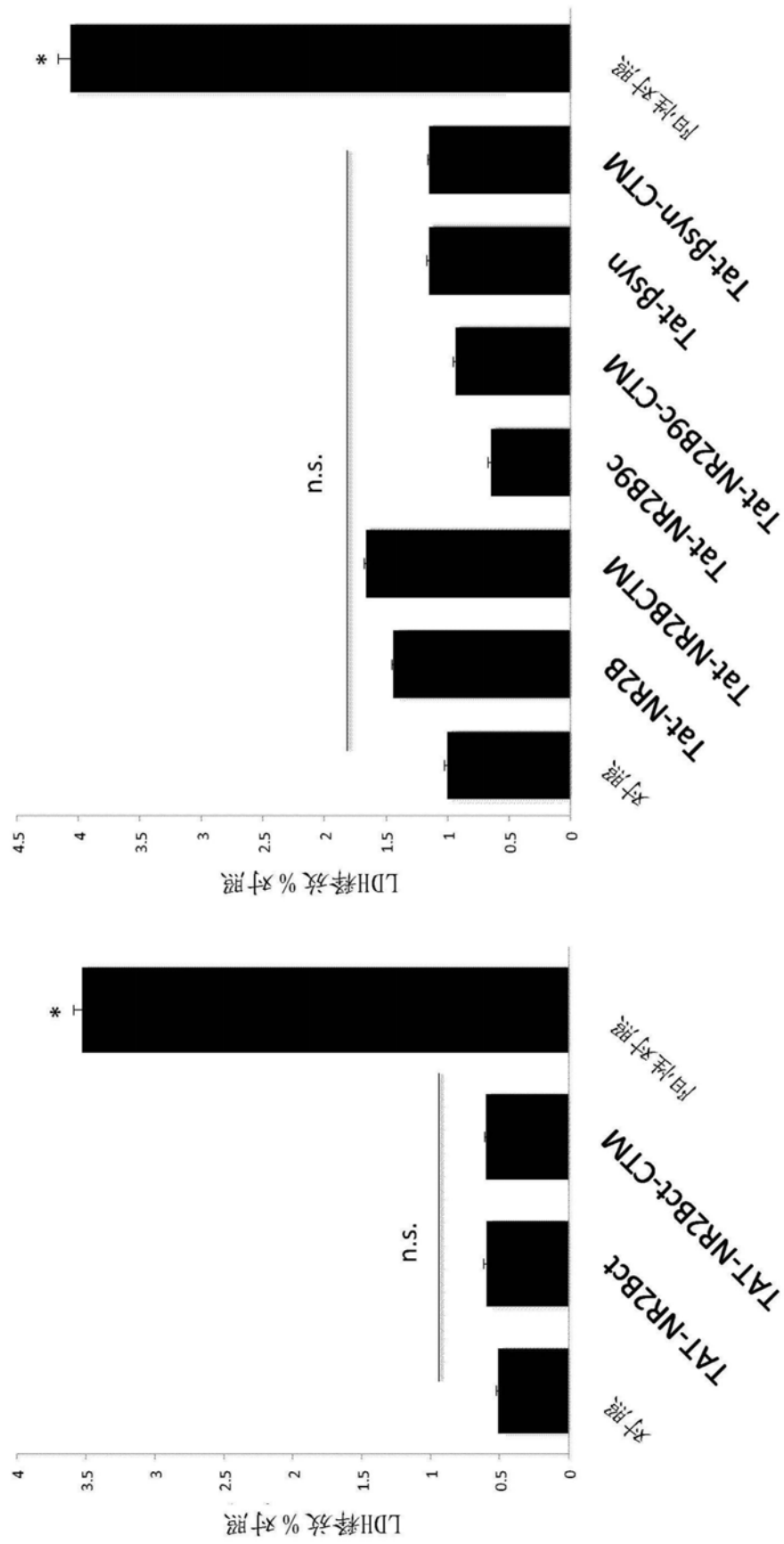


图11

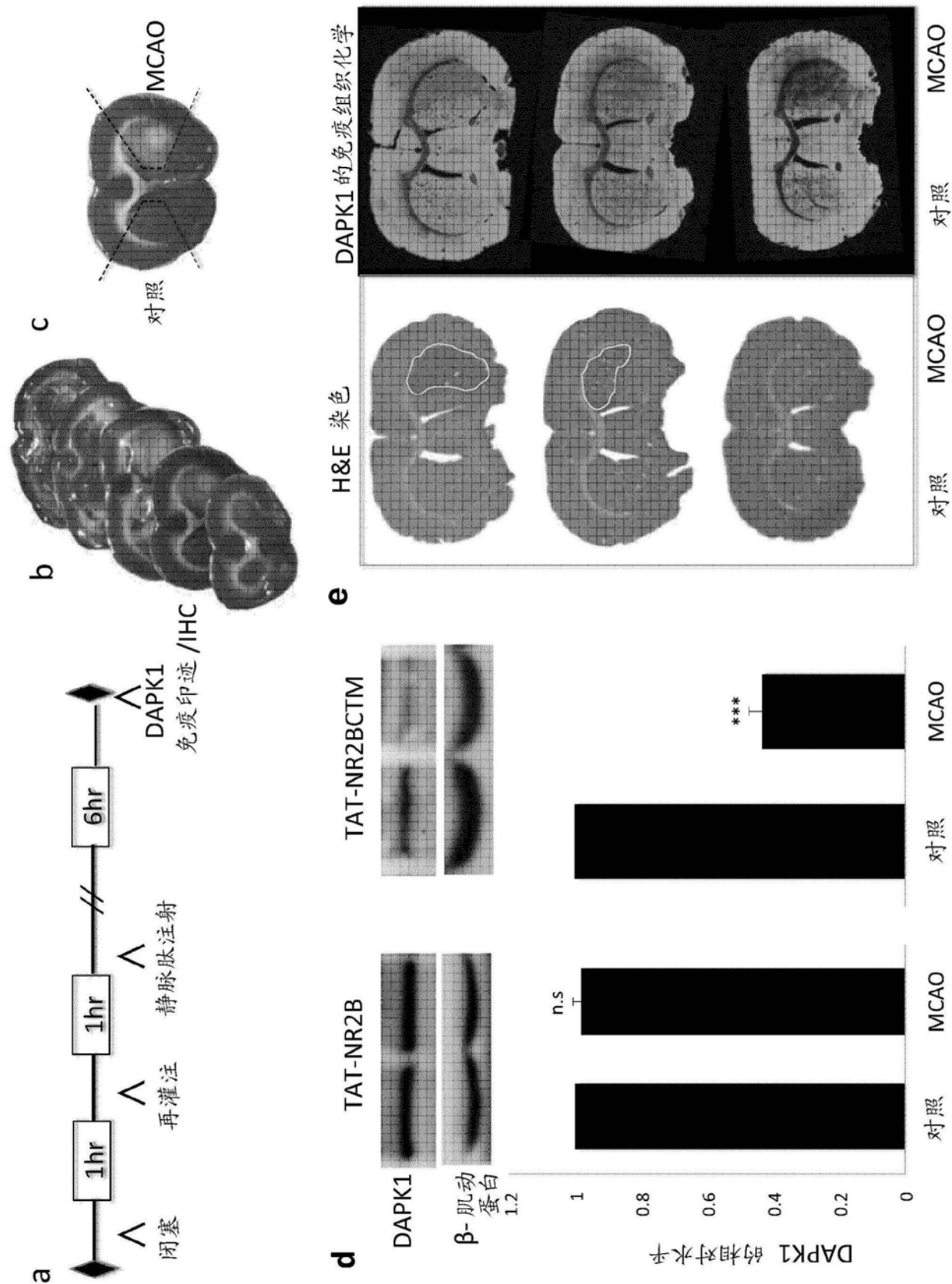


图12