



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I726844 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 05 月 11 日

(21)申請案號：104116447

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 22 日

(51)Int. Cl. : C07K19/00 (2006.01)

C12N15/113 (2010.01)

A61K31/713 (2006.01)

A61K47/50 (2017.01)

(30)優先權：2014/05/23 美國

62/002,296

(71)申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：維登 提摩太 WEEDEN, TIMOTHY E. (US)；尼爾森 卡蘿 NELSON, CAROL A.

(US)；溫特沃思 布魯斯 WENTWORTH, BRUCE M. (US)；克萊頓 尼古拉斯

CLAYTON, NICHOLAS P. (US)；萊哲 安德魯 LEGER, ANDREW (US)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

WO 2014052276A

審查人員：官速貞

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：3 共 92 頁

(54)名稱

胜肽載體上之多重寡核苷酸部分

(57)摘要

本揭示文係關於反義寡核苷酸(AON)，例如磷醯二胺嗎福啉基寡核苷酸(PMO)。本揭示文進一步係關於多重 PMO 與陽離子細胞穿透胜肽(CPP)接合用以增進 PMO 吸收至骨骼肌和心肌細胞。

The present disclosure relates to antisense oligonucleotides (AONs), such as phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides (PMOs). The present disclosure further relates to the conjugation of multiple PMOs to cationic cell penetrating peptides (CPPs) to enhance the uptake of PMOs into skeletal and cardiac muscle cells.

指定代表圖：

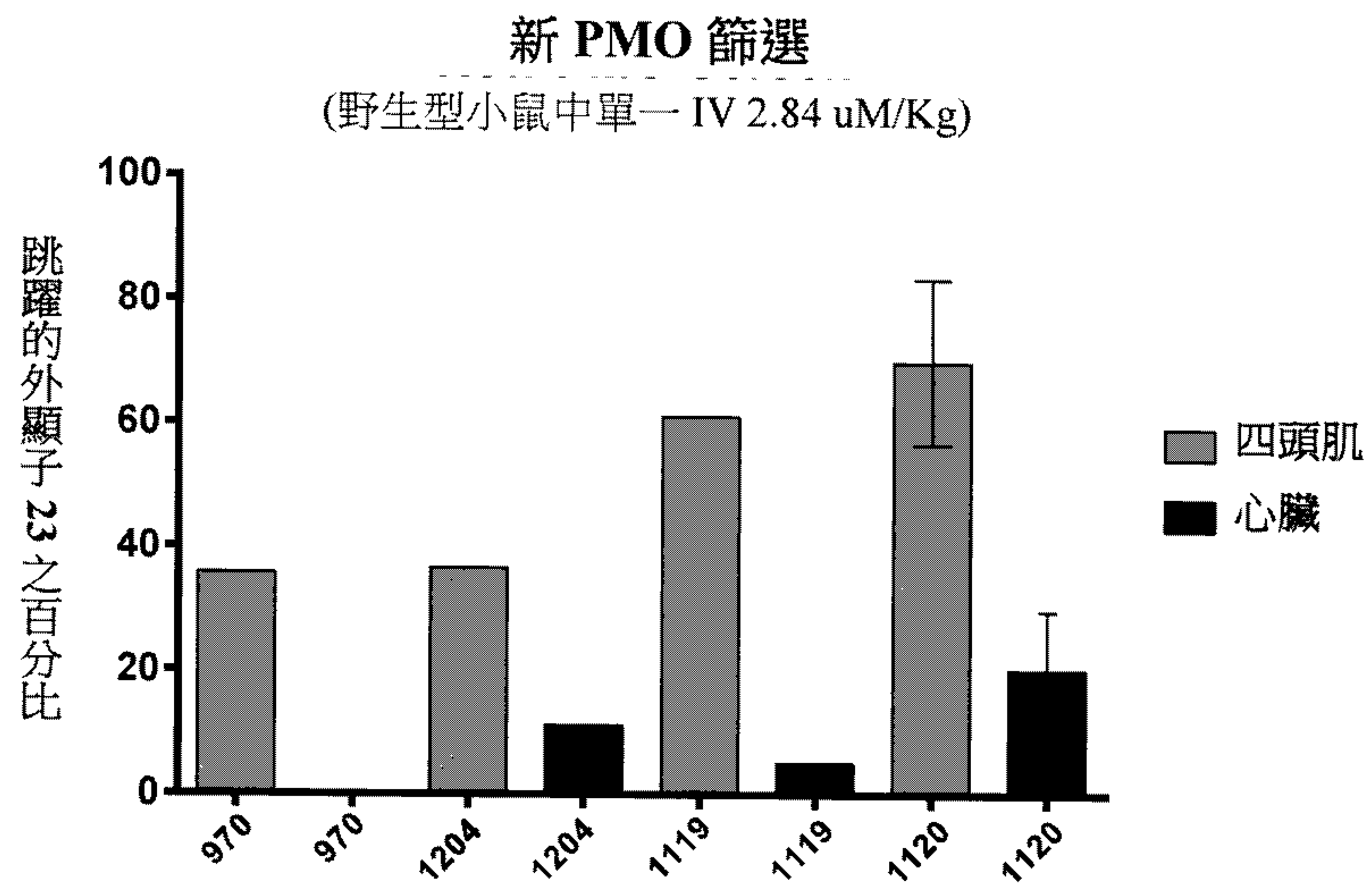


圖 3

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※ I P C 分類：

【發明名稱】（中文/英文）

胜肽載體上之多重寡核苷酸部分

MULTIPLE OLIGONUCLEOTIDE MOIETIES ON PEPTIDE CARRIER

【中文】

本揭示文係關於反義寡核苷酸(AON)，例如磷醯二胺嗎福啉基寡核苷酸(PMO)。本揭示文進一步係關於多重PMO與陽離子細胞穿透胜肽(CPP)接合用以增進PMO吸收至骨骼肌和心肌細胞。

【英文】

The present disclosure relates to antisense oligonucleotides (AONs), such as phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides (PMOs). The present disclosure further relates to the conjugation of multiple PMOs to cationic cell penetrating peptides (CPPs) to enhance the uptake of PMOs into skeletal and cardiac muscle cells.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 3 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 (中文/英文)

胜肽載體上之多重寡核苷酸部分

MULTIPLE OLIGONUCLEOTIDE MOIETIES ON PEPTIDE CARRIER

【技術領域】

【0001】 本申請案係聲請2014年5月23日申請的美國臨時專利申請案第62/002,296號之優先利益，其係以全文引用的方式併入本文中。

【0002】 本揭示文係關於反義寡核苷酸(AON)，例如(但不限於)磷醯二胺嗎福啉基寡核苷酸(PMO)。本揭示文進一步係關於多重PMO與陽離子細胞穿透胜肽(CPP)接合用以增進PMO吸收至相關組織中，例如骨骼肌和心肌細胞。本揭示文係涵蓋此等接合物，以及其使用方法，包括，例如將其用於調節基因表現。本揭示文進一步係包括藉由將該多重PMO-CPP接合物投予有此需要之人類或動物來治療各種疾病之方法。

【先前技術】

【0003】 AON 已顯示於活體外和活體內在各種疾病，包括，例如裘馨氏肌肉失養症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)中成功地調節基因表現。特言之，設計以框內外顯子 23 為目標並將之移除之 PMO 在 DMD 的 *mdx* 小鼠模型中已成功恢復肌縮蛋白(dystrophin)功能。

【0004】 然而，AON 亦已顯現在骨骼肌和心肌細胞中吸收差之性質，該性質妨礙了其運作 mRNA 轉錄和轉譯之能力(WO 2009/147368)。特言之，PMO，2-O-甲基寡核苷酸及胜肽核酸(PNA)不會顯著地累積在骨骼肌中且其在心肌中的吸收微乎其微。

【0005】 在 1980 年代晚期發現了細胞穿透胜肽(CPP)[Frankel and

Pabo Cell 1988; Green and Loewenstein Cell 1988]。這些化合物幫助轉運不同部分穿過細胞膜，否則就其本身很難穿過細胞膜。在發現 CPP 約 20 年後，使用 *mdx* 小鼠模型的數個研究顯示，稱為「K」(RXRRXRRXRRXRXB, SEQ ID NO.: 43)和「B」(RXRRBRRXRRBRXB, SEQ ID NO.: 44)的 CCP 拴連單一個 PMO，其係設計用於跳過編碼肌縮蛋白之 mRNA 的外顯子 23 (PMO23)，大大地增加骨骼肌和心肌之外顯子跳躍[Jearawiriyapaisarn 等人 Mol Therapy 2008]。這些研究結果驗證了單一 PMO-CPP 接合物在骨骼肌中展現>85%外顯子 23 之跳躍，而裸 PMO 化合物則造成<15%外顯子跳躍。相較於裸 PMO (其在心肌中並未造成外顯子 23 跳躍)，在心肌中亦觀察到適度的效用(~60%)[如前面之引用文]。

【0006】 WO 2009/144481 係關於包括一細胞遞送胜肽與一生物活性化合物，例如 AON，包括例如 PMO 複合之結構。WO 2004/097017 (US 2004/0265879 和 US 2009/0082547)係關於促進分子遞送之方法，包括揭示一生物試劑，例如 PMO 及一胜肽轉運子之接合物。WO 2009/147368 揭示了新穎的 CPP，其可與例如 PNA 和 PMO 接合。US 2010/0130591 揭示了能在人類肌縮蛋白中結合一選擇目標位置之 PMO，其可與一 CPP 接合。

【0007】 除了促進單一 PMO-CPP 接合物所觀察到的效用外，此等接合物，相較於裸 PMO 具有增加的毒性[引述]。例如，就使用 CPP-PMO23B 或 CPP-PMO23K 之 *mdx* 小鼠外顯子 23 跳躍研究，最大耐受劑量顯示為 30 mg/kg。在 60 mg/kg 之量時，小鼠體重減失而 150 mg/kg 的劑量則為致命的[Amantana 等人 Bioconjugate Chem 2007]。相反的，裸 PMO23 以高如 250 mg/kg 之量給藥而仍無任何明顯的毒性效應[Op. Cit.]。WO 2009/005793 揭示了具有下列四個 X (6-胺基己酸)殘基之 CPP，包括 CPP 「B」具有比之前所辨識出的 CPP 更低之毒性。然而，如上所示，這些與

單一 PMO 耦合的 CPP，相較於裸 PMO 仍顯示不可接受的毒性[如前面之引用文及 Moulton and Moulton Biochemica et Biophysica Acta 2010]。

【發明內容】

【0008】 因此，本揭示文的主要目標為克服裸 PMO 吸收差及與單一 PMO-CPP 結構有關的毒性增加之問題。藉由在 D-或 L-鏡像異構位置加入麩胺酸導入 CPP 之多重接合位置以降低 CPP 端點上緊靠的多重 PMO 之立體位阻。使用在 P1 帶有胺基酸苯丙胺酸-離胺酸之胜肽酶裂解位置，將-P1 位置導入 CPP 和 PMO 之間。胜肽酶裂解位置之裂解將 PMO 從 CPP 釋放出。例如，CPP 可經由一馬來醯亞胺酯化連接子，以可導入在半胱胺酸位置之酵素裂解位置苯丙胺酸-離胺酸或纈胺酸-瓜胺酸，與 PMO 相連接。CPP 亦可經由醯胺鍵相連接。

【0009】 使用胜肽內化進入細胞可產生一細胞內蛋白酶，包括溶酶體酵素，裂解該裂解位置及此游離的 PMO 會具有較低的來自胜肽鏈接合物之立體位阻。此較低的立體侷限可能對細胞核和細胞溶質以較低的毒性，增加外顯子跳躍效能。

【0010】 在至少一方面，此項係藉由發現如文中另外所述之多重 PMO-CPP 接合物來達成。本揭示文亦涵蓋藉由根據本揭示的取代接合物而增加單一 PMO-CPP 接合物之安全邊際的方法。本揭示文進一步包括調節基因表現之方法，例如該等編碼肝醣合成酶(GYS1 或 GYS2)、轉化生長因子(TGFβ)、基質金屬蛋白酶(MMP2 或 MMP9)、骨橋蛋白(osteopontin)、強直性肌營養不良蛋白激酶(DMPK)、類 Elav 家族成員 2 (亦稱為 CUG 三聚體重複 RNA-結合蛋白或 CUGBP)、雙同源箱 4 (DUX4)及/或(Frzl)之基因者。下列基因：肝醣合成酶(GYS1 或 GYS2)、轉化生長因子(TGFβ)、基質金屬蛋白酶(MMP2 或 MMP9)、骨橋蛋白、強直性肌營養不良蛋白激

酶(DMPK)、類 Elav 家族成員 2 (亦稱為 CUG 三聚體重複 RNA-結合蛋白或 CUGBP)、雙同源箱 4 (DUX4)及/或(Frzl)之基因可經由本發明之 PMO-CPP 接合物以媒介外顯子跳躍為目標，產生框架轉移突變。任何的框架轉移突變可能造成 AON 序列目標之 mRNA 量的功能下降。本揭示文之範圍亦包括多重 PMO-CPP 接合物在各種疾病狀態中供抑制微 RNA 之用途。在另外方面，本揭示文係包括治療各種疾病及/或症狀之方法，例如該等與上文所提之基因和微 RNA 有關的疾病及/或症狀。

【0011】 本揭示文之另外的目標和優點部份將於下列說明中列出，且部份將自然地源自於說明中，或可藉由揭示的具體實施例之施行得知。本揭示文之目標和優點將藉由所附的申請專利範圍中所指出之要素和組合而了解及獲知。

【0012】 應了解，如宣稱，前述的一般說明和下列詳細說明二者僅為示例性和說明性並非本發明之限制。

【0013】 伴隨的圖式，其係併入及構成此說明書之部份，乃說明本發明之一(數個)實施例，並與該說明書共同用於解釋本發明之原理。

具體實施例之說明/本發明詳細說明

【0014】 如上所提，本揭示文之一目標為促進單一 PMO-CPP 接合物之安全性質，而對於於接合物進入目標細胞之吸收無妥協。一般較佳的係在有效劑量和無不良效應量(NOAEI)之間，具有至少 10-倍安全邊際。在上述 mdx/外顯子 23 實驗中，有效劑量被發現為 30 mg/kg 而 NOAEI 亦為 30 mg/kg。因此，僅有少許或無安全邊際。在至少一本揭示文之具體實施例中，多重 PMO-CPP 接合物具有比上述 mdx/外顯子 23 實驗較好之安全邊際，例如大於 2-倍，例如大於 5-倍，例如大於 6-倍，例如大於 10-倍。10-倍安全邊際係指該有效劑量係低於 NOAEI 的 10 倍。因此，當在適當

的模型中檢測時，根據本揭示文之多重 PMO-CPP 接合物可具有大於對應單一 PMO-CPP 接合物至少 2-倍的安全邊際。本發明係包括與單一 CPP 相連接之多重 AON，包含 PMO AON。

【0015】 在至少一本揭示文之具體實施例中，此多重 AON-CPP 接合物進一步係包括一可裂解的连接子。在某些具體實施例中，此连接子為一含有裂解模體(cleavage motif)之序列。在某些具體實施例中，此裂解模體可被任何水解酵素裂解。在某些具體實施例中，此裂解模體可被任何胜肽酶或蛋白酶，例如組織蛋白酶(cathepsin)或胰蛋白酶(trypsin)裂解。在某些具體實施例中，此连接子可經設計包括一可被特定絲胺酸蛋白酶、蘇胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天門冬胺酸蛋白酶、麩胺酸蛋白酶或金屬蛋白酶或一個以上的胜肽酶群組所辨識之裂解模體。在某些具體實施例中，此连接子可包括二或多個重疊或非重疊的裂解模體。在某些具體實施例中，此连接子可不含有裂解模體。在某些具體實施例中，此连接子可經設計使得少於 100%、少於 75%、少於 50%或少於 10%的连接子可被裂解。在某些具體實施例中，此连接子可經設計使得多於 90%或 99%的连接子可被裂解。

【0016】 在至少一本揭示文之具體實施例中，此多重 AON-CPP 接合物進一步係包括一可裂解的连接子，例如在 P1/P1'位置之 FK，或在另外的具體實施例中，P1/P1'位置之 FX，其中 X 為任何天然生成的胺基酸。可裂解连接子，其中該连接子可被水解酵素例如組織蛋白酶裂解，可發生在 AON 和 CPP 之間或其可發生在一序列中，例如 AON-可裂解连接子-AON-可裂解连接子-CPP。在另外的具體實施例中，此多重 PMO-CPP 接合物進一步係包括一可裂解连接子，例如組織蛋白酶或 P1/P1'位置之 FK 或在另外的實施例中，在 P1/P1'位置之 FX，其中 X 為任何天然生成的胺

基酸。可裂解連接子可發生在 PMO 和 CPP 之間或其可發生在一序列中，例如 PMO-可裂解連接子-PMO-可裂解連接子-CPP，例如為 PMO-組織蛋白酶連接子-PMO-組織蛋白酶連接子-CPP。本揭示文並未限制 AON (包括 PMO)、可裂解連接子和 CPP 之順序，且熟習本項技術者將能設計根據申請專利範圍使用文中所揭示的資訊之具有至少一個組織蛋白酶裂解位置之適合的多重 AON-CPP 接合物。

【0017】 令人驚訝地已發現，根據本揭示文之帶有可裂解連接子位置之多重 PMO-CPP 接合物在某些情況下具有甚至比無可裂解連接子位置之多重 PMO-CPP 接合物效用更佳。此結果為意想不到的，因為其已顯示，若胜肽部分降解太快，則單一 PMO-CPP 接合物係被吸入溶酶體中並可能留陷於其中。換言之，若單一 PMO-CPP 接合物的 CPP 部份快速降解，則 PMO 變成陷入溶酶體中且無法到達其細胞目標，因而減低效用 (Youngblood 等人, 2007)。由於此現象，已預期在接合物中加入一可裂解連接子位置應能幫助 CPP 的降解，導致效用降低。然而，情況並非如此；根據本發明文之帶有可裂解連接子位置的特定多重 PMO-CPP 接合物將描述於下列特定的實例中。因此，在至少一本揭示文之具體實施例中，多重 PMO-CPP 接合物具有至少一個可裂解連接子位置。在至少另外的本揭示文之具體實施例中，多重 PMO-CPP 接合物具有至少一個組織蛋白酶可裂解連接子位置。

【0018】 本揭示文進一步係包括調節基因表現之方法，例如該等編碼肝醣合成酶(GYS1 或 GYS2)、轉化生長因子(TGF β)、基質金屬蛋白酶(MMP2 或 MMP9)、骨橋蛋白、強直性肌營養不良蛋白激酶(DMPK)、類 Elav 家族成員 2 (亦稱為 CUG 三聚體重複 RNA-結合蛋白或 CUGBP)、雙同源箱 4 (DUX4)及/或(Frzl)之基因，其中本發明之多重 AON-CPP 接合物

係媒介外顯子跳躍產生框架轉移突變。任何的框架轉移突變可能導致目標 mRNA 減弱。本揭示文之範圍亦包括多重 PMO-CPP 接合物在各種疾病狀態中供抑制微 RNA 之用途。在至少一個具體實施例中，本揭示文係包括治療各種疾病及/或症狀之方法，例如該等與上文所提之基因和微 RNA 有關的疾病及/或症狀。本揭示文之多重 CPP-PMO 接合物可以任何適合的方式投予有此需要的人類或動物。投予人類或動物患者可選自非經腸、肌肉內、腦內、血管內、皮下或經皮。在至少一個具體實施例中，給藥路徑係藉由注射，例如靜脈內或肌肉內。治療醫師能決定適當的給藥路徑。

【0019】 當用作為醫藥時，文中所揭示的多重 CPP-PMO 接合物反義寡核苷酸可與醫藥上可接受賦形劑或載劑調配成醫藥組成物。

【0020】 當用作為醫藥時，多重 CPP-PMO 接合物反義寡核苷酸可以醫藥組成物的形式來給藥。這些化合物可藉由各種路徑來投予，包括口服、直腸、經皮、皮下、靜脈內、肌肉內和鼻內。當作為可注射和口服組成物二者時這些化合物為有效的。此等組成物係以醫藥技術中熟知的方式所製備並包括至少一種活性化合物。

【0021】 本發明亦包括醫藥組成物，其含有作為活性成份之一或多種的多重 CPP-PMO 接合物反義寡核苷酸與一或多種醫藥上可接受賦形劑或載劑結合。在製造本發明組成物上，活性成份通常係與一賦形劑或載劑混合，以賦形劑或載劑稀釋或包含在此一賦形劑或載劑中，其可為膠囊、袋劑、紙或其他容器之形式。當賦形劑或載劑係作為稀釋劑時，其可為固體、半固體或液體物質，其係作為活性成份之媒劑、載劑或介質。因此，組成物可為錠劑、藥丸、散劑、口含錠、袋劑、藥包、酏劑、懸浮液、乳液、溶液、糖漿、噴霧(或固體或於液體媒劑中)、含有例如至高 10%重量

比活性化合物之軟膏、軟式和硬式膠囊、栓劑、無菌可注射溶液及無菌包裝散劑。

【0022】 就製備調配物，在與其他的活性成份組合之前，可能需要研磨活性化合物以提供適當的顆粒大小。若活性化合物實質上為不溶性的，其一般係研磨成 200 網孔以下的顆粒大小。若活性化合物實質上為水溶性的，此顆粒大小一般可藉由研磨來調整，以提供實質上均勻的調配物分布，例如約 40 網孔。

【0023】 某些適合的賦形劑或載劑之實例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、澱粉、阿拉伯膠、磷酸鈣、藻酸鹽、黃蓍膠、明膠、矽酸鈣、微晶纖維素、聚乙烯吡咯酮、纖維素、無菌水、糖漿和甲基纖維素。調配物可另外包括：潤滑劑例如滑石、硬脂酸鎂和礦物油；濕潤劑；乳化劑和懸浮劑；防腐劑例如甲基-和丙基羥基-苯甲酸酯；及甜味劑和調味劑。本發明組成物可藉由使用本項技術中已知的程序調配，以便於在投予病患後，提供快速、持續或延遲釋放活性成份。

【0024】 組成物較佳地係調配成單位劑型，各劑量含有從約 5 mg 至約 100 mg 或更多，例如約 5 mg 至約 10 mg，約 5 mg 至約 20 mg，約 5 mg 至約 30 mg，約 5 mg 至約 40 mg，約 5 mg 至約 50 mg，約 5 mg 至約 60 mg，約 5 mg 至約 70 mg，約 5 mg 至約 80 mg，或約 5 mg 至約 90 mg 之任一者，，包括這些值(包含在內)之間任何範圍的活性成份。術語「單位劑型」係指適合作為個體單位劑量之物理上離散單位，各單位含有經計算用以產生所欲治療效用之預定量的活性物質與適合的醫藥賦形劑或載劑組合。

【0025】 多重 CPP-PMO 接合物反義寡核苷酸在一廣泛的劑量範圍內為有效的，且一般係以治療上有效量來給藥。然而，應了解，實際上投

予的多重 CPP-PMO 接合物反義寡核苷酸之量將由醫師，依照相關的情況，包括所欲治療的症狀、所選的給藥路徑、實際投予的化合物、個別病患之年齡、重量和反應、病患癥狀之嚴重度等等來決定。

【0026】 就製備固體組成物例如錠劑，係將主要活性成份/多重 CPP-PMO 接合物反義寡核苷酸與醫藥賦形劑或載劑混合，形成一含有本發明化合物均質混合物之固體預調配組成物。當指出這些預調配組成物為均質時，係指此活性成份平均地分散在整個組成物，使得組成物可容易地細分成相等有效的單位劑型，例如錠劑、藥丸和膠囊。

【0027】 本發明之錠劑或藥丸可經塗覆或另外經混合，以提供給與延長作用利益之劑型。例如，錠劑或藥丸可包括一內部劑量及外部劑量組份，後者可為覆蓋前者上之封套形式。二種組份可被作為在胃中抗崩解並讓內部組份完整通過進入十二指腸或延遲釋放之腸衣層分開。各種物質可用於此腸衣層或塗層，此等物質包括許多聚合酸及聚合酸與此等物質如蟲膠、鯨蠟醇和乙酸纖維素之混合物。

【0028】 其中可併入本發明新穎組成物供口服或注射給藥之液體形式包括水溶液、適當調味的糖漿、水性或油性懸浮液及含有食用油類例如玉米油、棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油之調味乳液，以及酞劑及類似醫藥媒劑。

【0029】 供吸入或吹入之組成物包括溶於醫藥上可接受水性或有機溶劑或其混合物中之溶液和懸浮液。液體或固體組成物可含有如前文所述之適合的醫藥上可接受賦形劑。組成物可藉由口部或鼻內呼吸路徑給藥供局部或全身作用。溶於醫藥上可接受溶劑之組成物可藉由使用惰性氣體加以霧化。霧化溶液可直接由霧化裝置吸入或此霧化裝置可連接一面罩吸入器或間歇式正壓呼吸機。溶液、懸浮液或粉末組成物亦可從遞送此調配

物之裝置以適合的方式以口部或鼻內給藥。

【0030】 根據本揭示文多重 CPP-AON，包括 CPP-PMO 接合物可以範圍從 1- 200 mg/kg，例如從 10-50 mg/kg 之每日劑量來給藥。CPP-AON 接合物，包括 CPP-PMO，可以團注(bolus)形式或於一段延長的注射期間來給藥。例如每日劑量可以一個團注劑量來給藥。另一種選擇，每日劑量可經由注射，例如靜脈內或皮下來給藥。在另外的具體實施例中，每日劑量可分成數次給藥，例如每天二次、三次或四次。由治療醫師決定，當需要時，可每天重複給劑。治療可為短期的，例如少於 6 個月。在另外的實施例中，治療可為長期的，例如超過 6 個月，例如超過 1 年，例如超過 10 年，例如在需要治療的人類或動物之有生之年。

【0031】 本揭示文之多重 AON 接合物，包括 PMO-CPP 接合物，係專一與一或多個從目標基因或基因座轉錄之前-mRNA、mRNA 及/或微 RNA 或長鏈非編碼 RNA 雜交。如文中所用，當多重 PMO-CPP 接合物於生理條件下與目標雜交時，多重 PMO-CPP 接合物係專一與一目標聚核苷酸例如前-mRNA 或 mRNA 雜交。在本揭示文的內文中，雜交係經由氫鍵發生，其可為介於互補的嘌呤和嘧啶鹼基間之 Watson-Crick、Hoogsteen 或反 Hoogsteen 氫鍵。例如，腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)為互補的核鹼基，其係經由形成氫鍵來配對。根據本揭示文，多重 PMO-CPP 接合物之 PMO 部份係專一與目標核苷酸雜交。CPP 部份仍可與多重 PMO-CPP 接合物拴連或其可在雜交前裂解，例如在組織蛋白裂解位置。

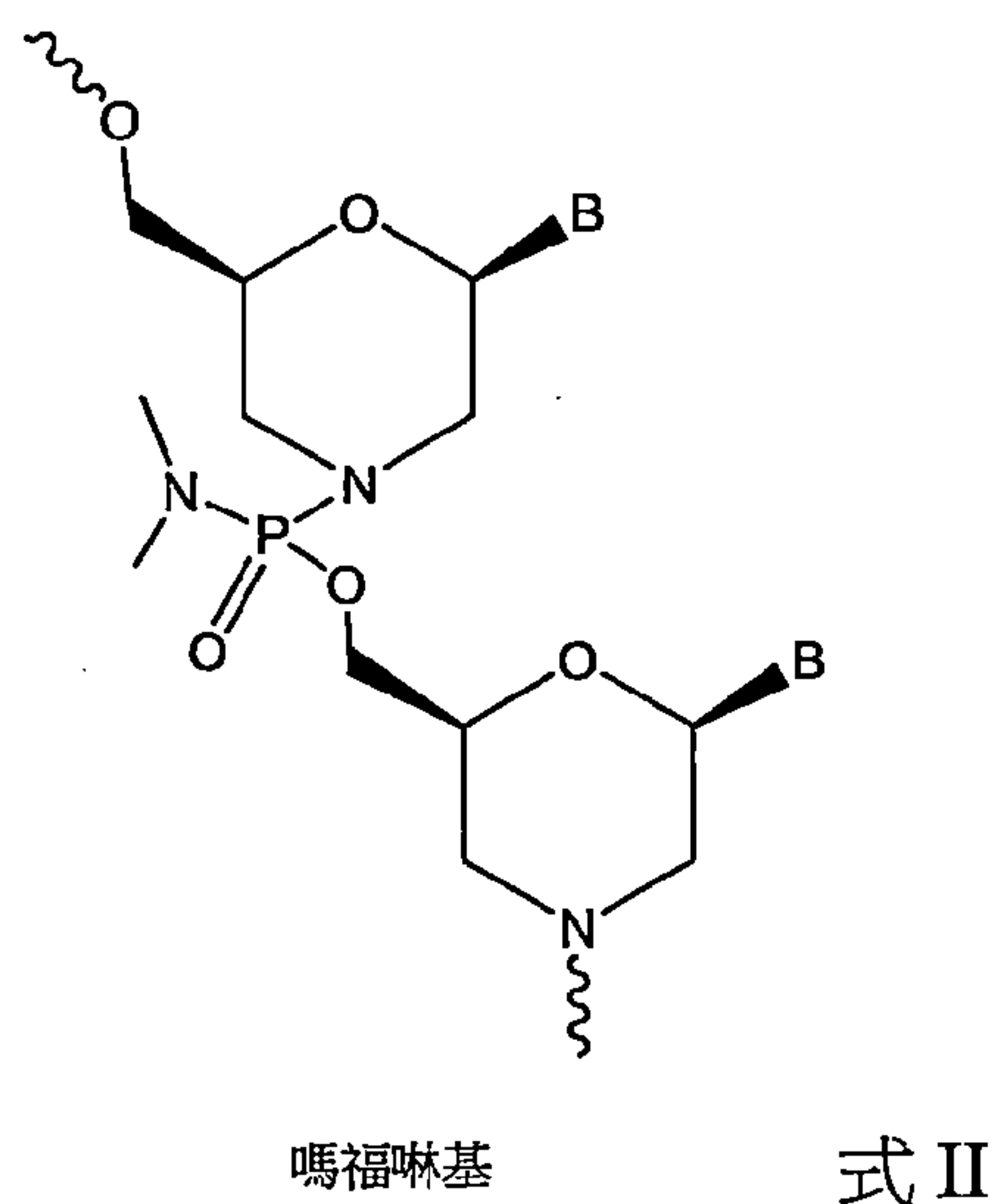
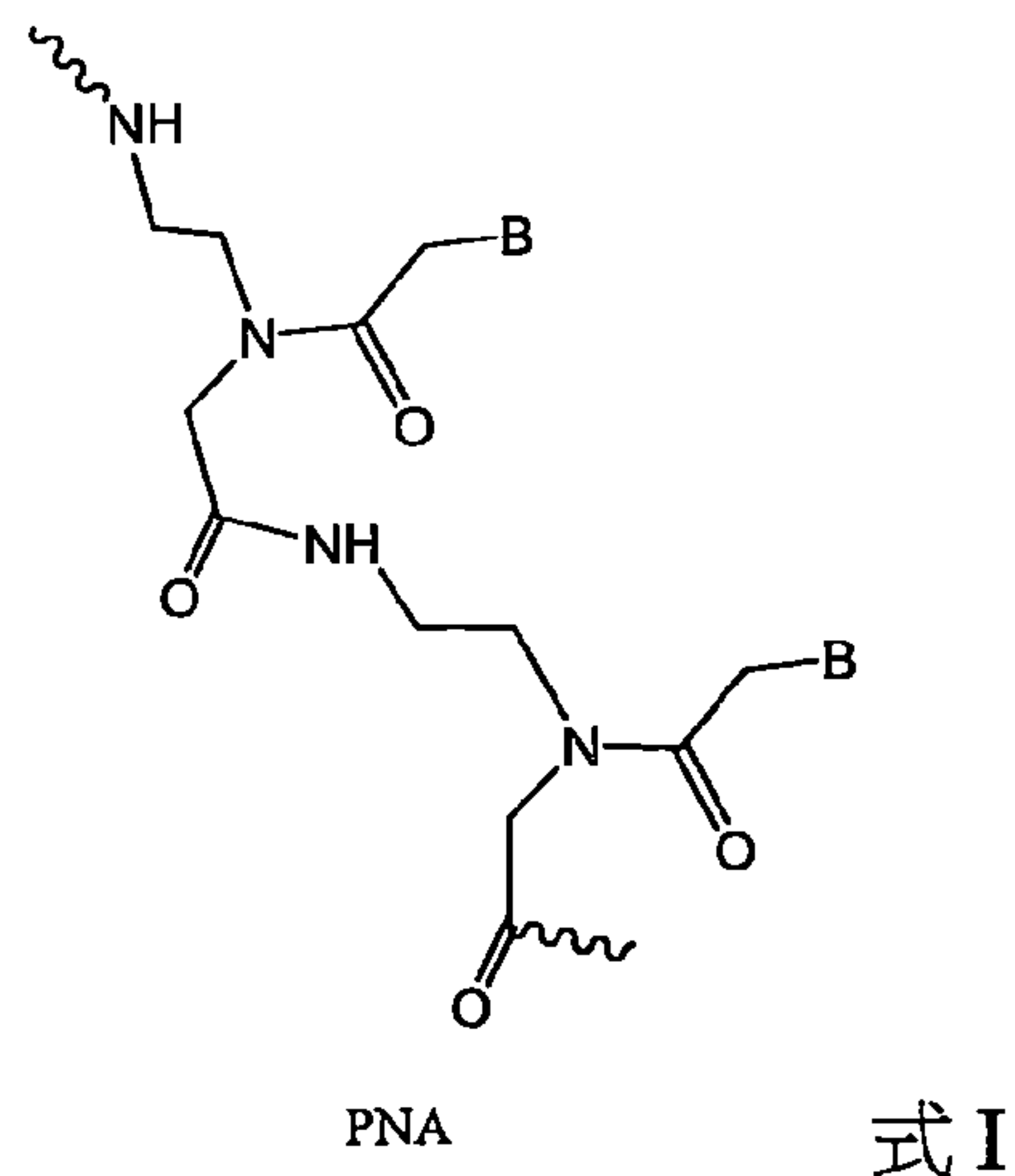
【0032】 當雜交發生時根據一般可接受的鹼基配對規則，例如腺嘌呤(A)-胸腺嘧啶(T)，胞嘧啶(C)-鳥嘌呤(G)，腺嘌呤(A)-尿嘧啶(U)，本揭示文之 PMO 化合物係與目標聚核苷酸，例如前-mRNA、mRNA 或微 RNA 或長鏈非編碼 RNA 互補。特言之，「互補」如文中所用係指二個核鹼基

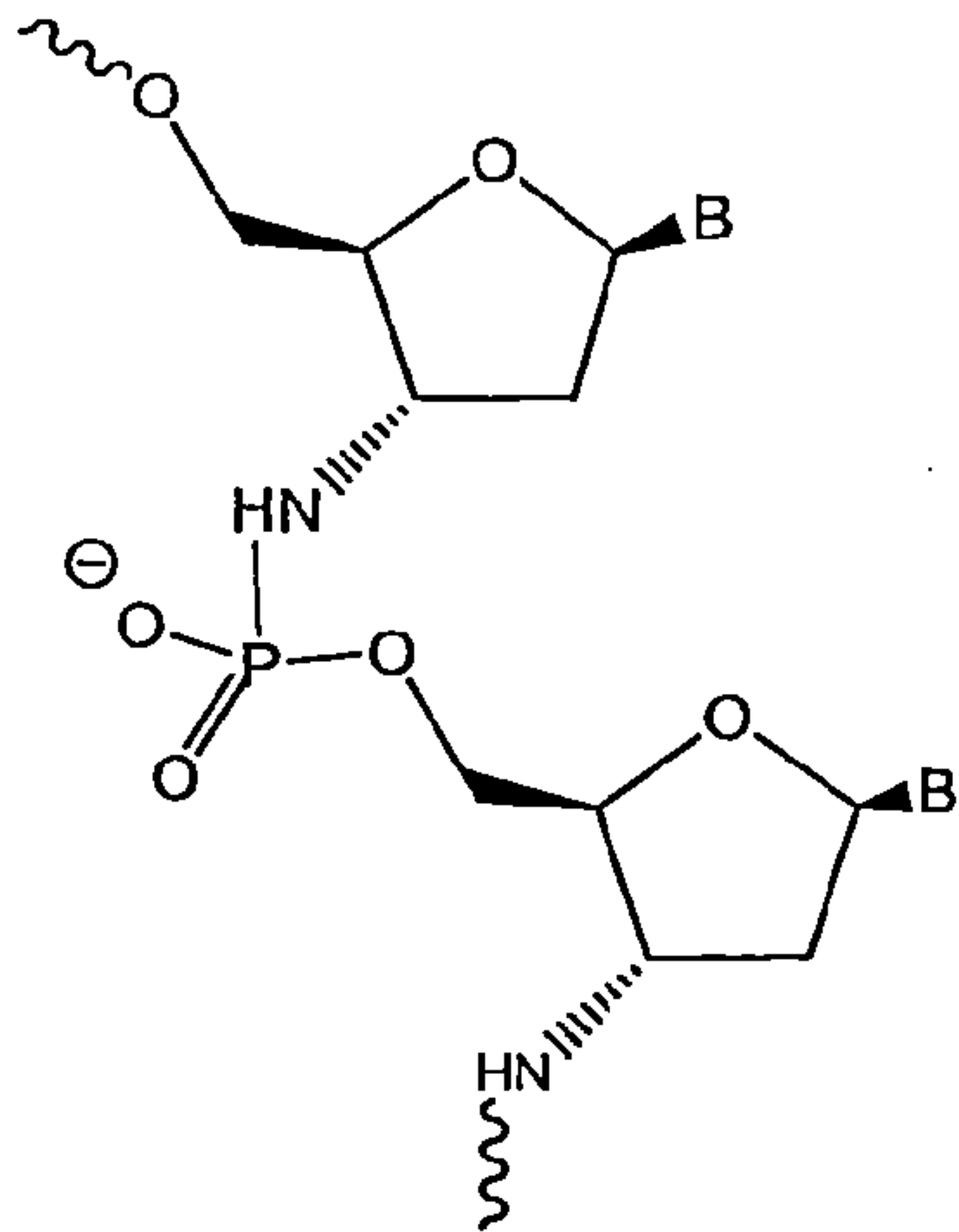
間精確配對的能力。例如，若在 PMO 化合物特定位置的一鹼基(B)能與一核苷酸在前-mRNA 或 mRNA 分子之相同位置的以氫鍵結合，則 PMO 和目標聚核苷酸分子係視為在該位置為彼此互補的。當在各分子中足夠數量的對應位置係被可以氫鍵彼此鍵結之鹼基佔據時，則 PMO 化合物和目標聚核苷酸分子為彼此互補的。因此，「專一可雜交」和「互補的」為可用於表示足夠程度的互補性或精確配對，而使得 PMO 和聚核苷酸目標之間發生安定或專一結合。絕對互補性，亦即 100%互補鹼基配對，其並非必需的，只要在目標聚核苷酸分子和 PMO 間形成的異源雙股具有所欲的安定性足以引發所欲作用即可。根據本揭示文，在其中專一結合為所希望的條件下，例如於活體內應用之生理條件下，或於活體外應用之進行分析的條件下，當一 PMO 化合物與聚核苷酸分子之結合改變目標聚核苷酸分子的正常功能，且具有足夠程度的互補性以避免 PMO 與非目標序列的不欲非專一結合，則此 PMO 為專一可雜交的。

【0033】 此 PMO 和目標聚核苷酸分子例如 mRNA 或前-mRNA 間的雜交係干擾其正常功能，例如從 mRNA 轉譯蛋白和剪接前-mRNA 產生一或多個 mRNA。在至少一本揭示文之具體實施例中，PMO 和前-mRNA 間的雜交造成前-mRNA 剪接而形成 RNA。在另外的實施例中，此雜交造成從 mRNA 轉譯一蛋白。在本揭示文的另外具體實施例中，此多重 CPP-AON 接合物與前-mRNA 或 mRNA 上微 RNA 結合位置之雜交可能將目標前-mRNA 或 mRNA 從後續的微 RNA 調控解除。在此情況下此效應可能促進由前 mRNA 或 mRNA 所編碼的基因產物之表現。相反的，若多重 CPP-AON，例如一多重-CPP PMO，係以微 RNA 內的序列為目標，使得微 RNA 的生物活性受阻，則此效應可能在受到該特定微 RNA 之抑制下，增進各種基因產物之表現。

【0034】 此等干擾目標聚核苷酸之整體效應為選擇性調節基因表現。在本揭示文的內文中，「調節」係指增加(刺激)或降低(抑制)一基因表現。

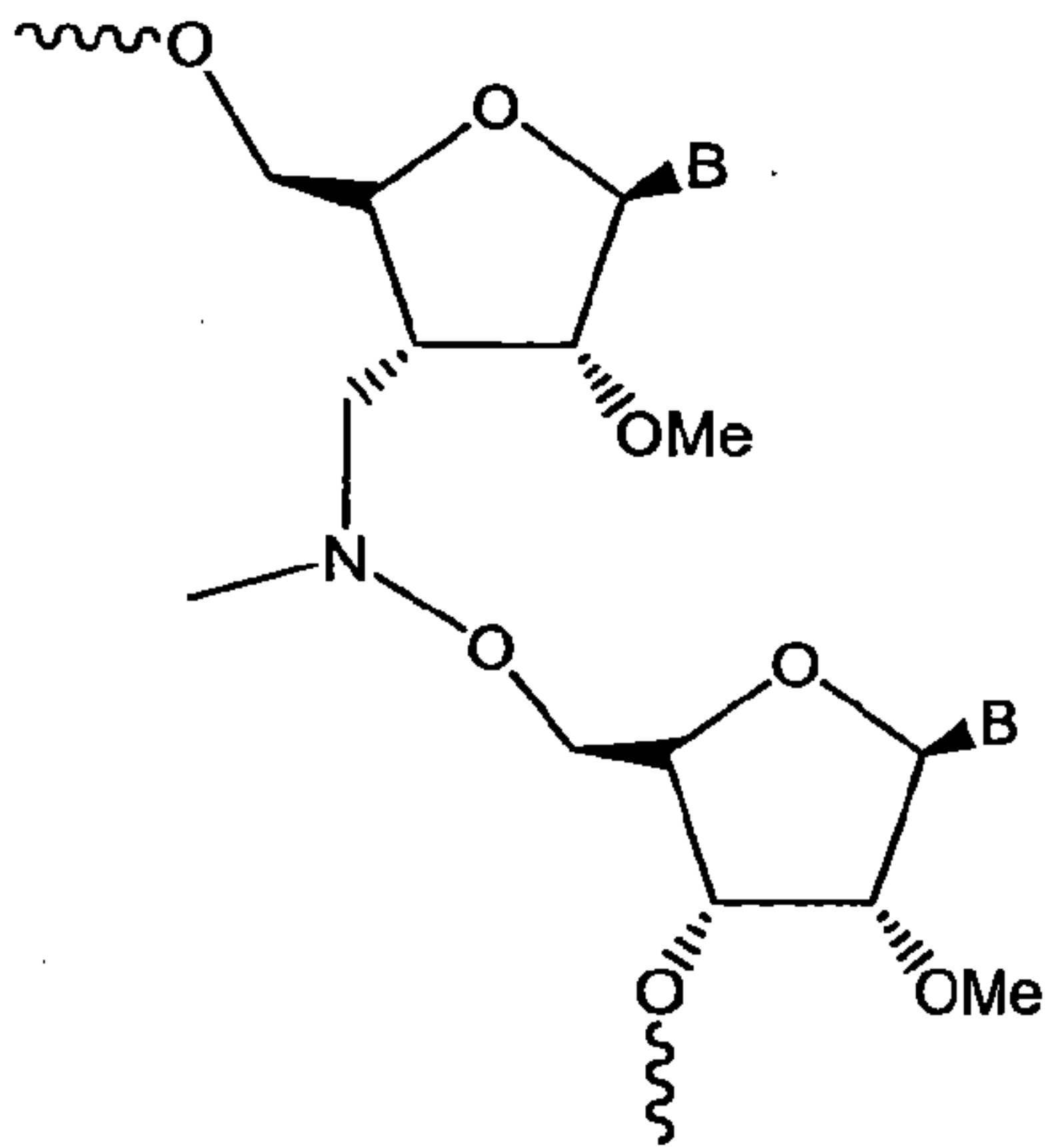
【0035】 根據本揭示文 AON 係包括 PMO 化合物以及 PNA 化合物，胺基磷酸酯化合物、伸甲基甲基亞胺基(“MMI”)化合物、2-O-甲基化合物和 2-甲氧基乙基化合物，其中各亞單位之寡核鹼基係列於圖 2 中。寡核苷酸化合物為天然核酸之合成的類似物。特言之，取代去氧核糖環和磷酸-鍵連，此寡核苷酸化合物係包括由如下所示之個別的寡核苷酸亞單位所組成的亞單位：





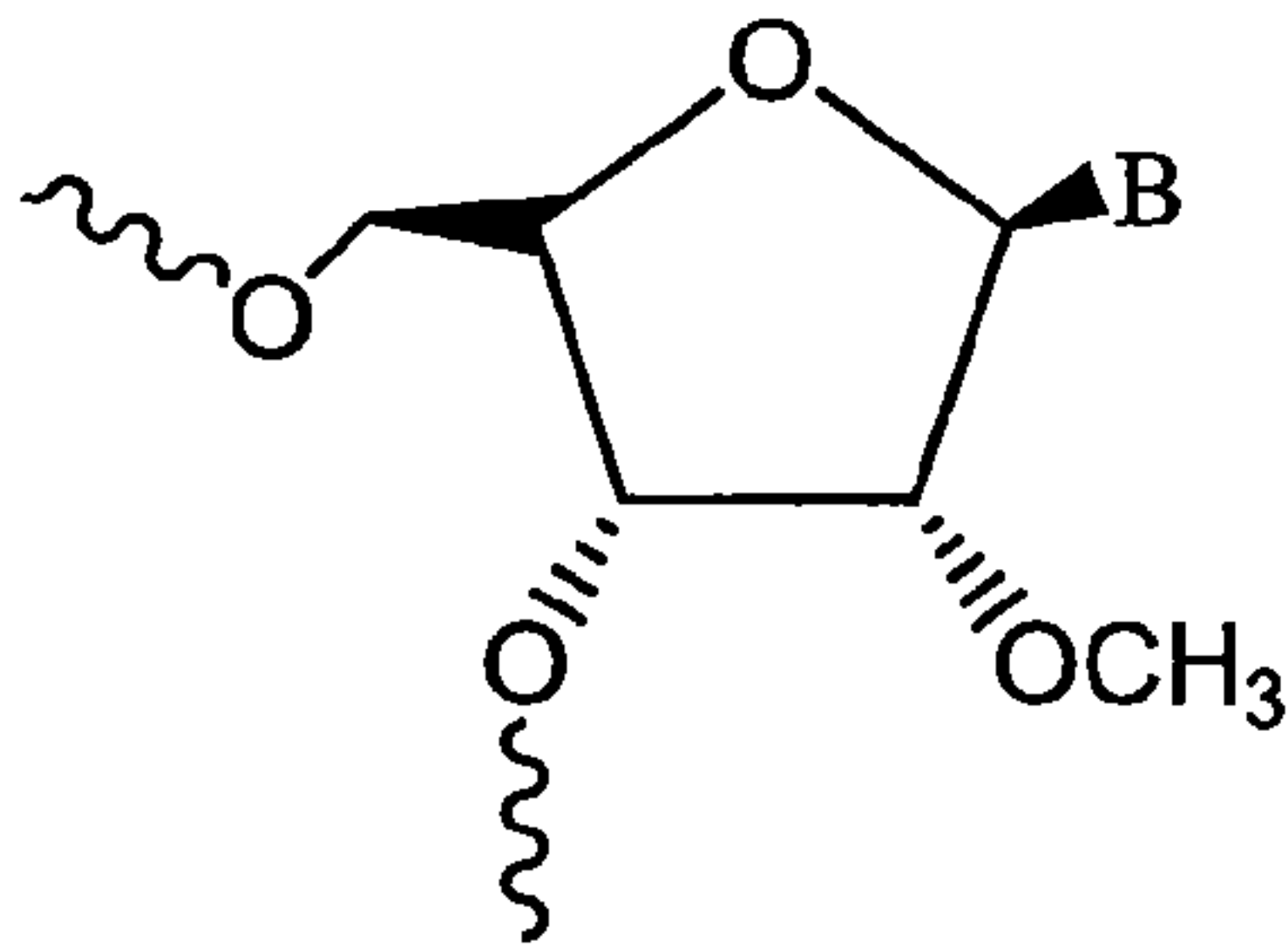
胺基磷酸酯

式 III



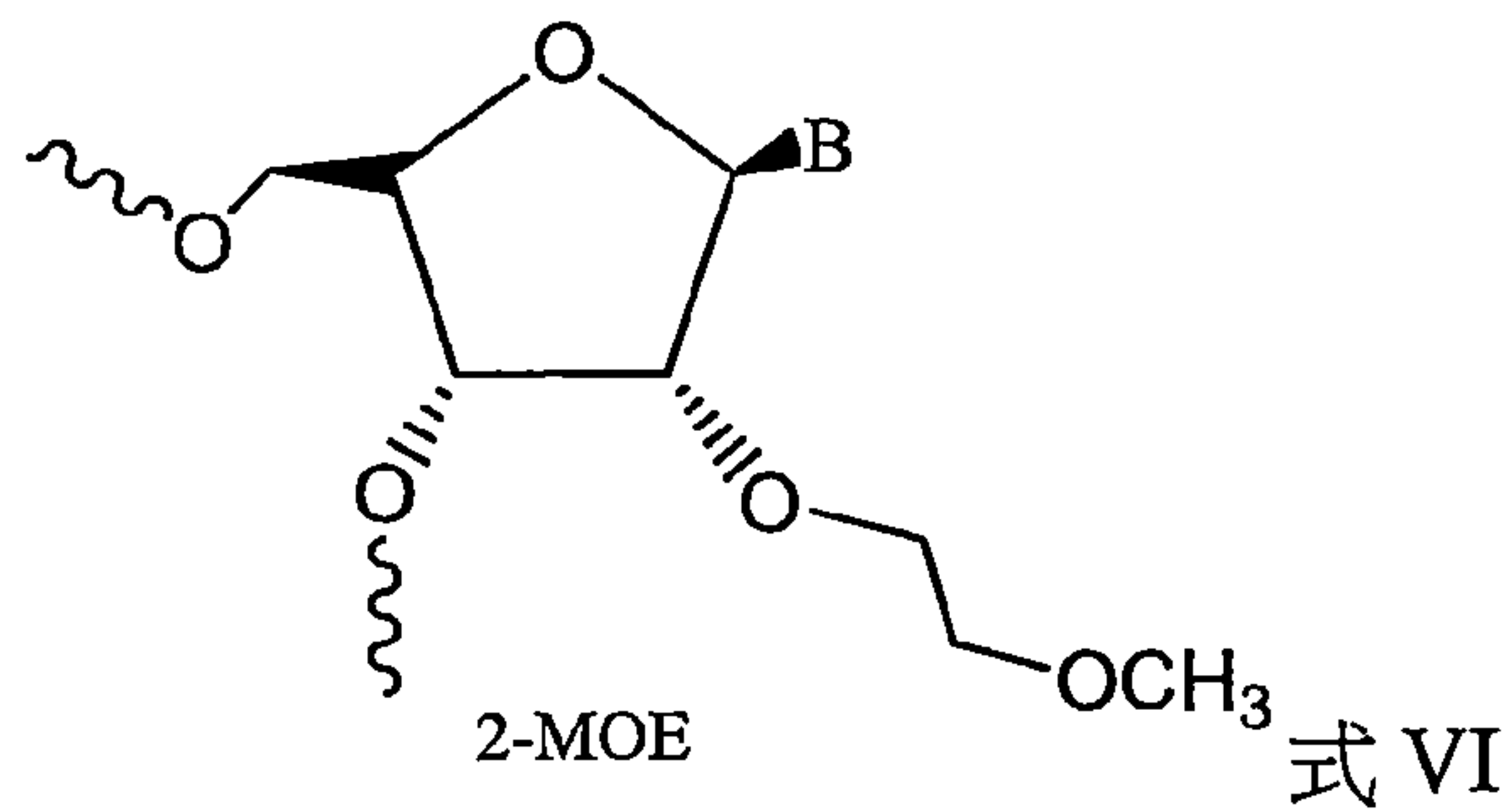
MMI

式 IV



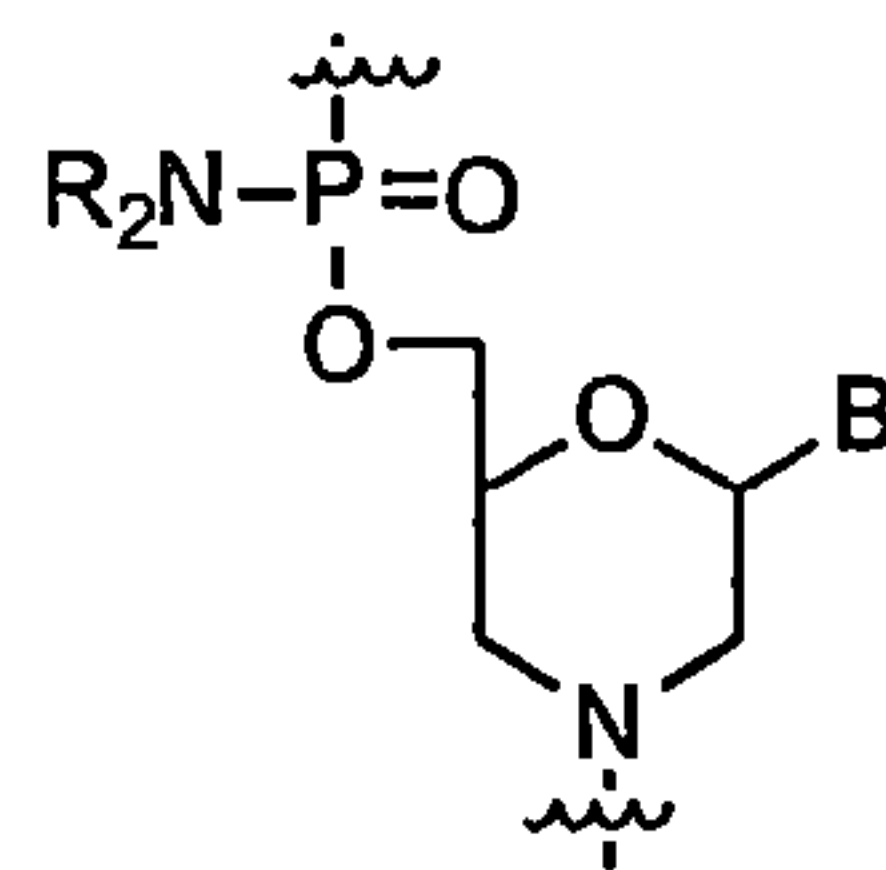
2-OMe

式 V



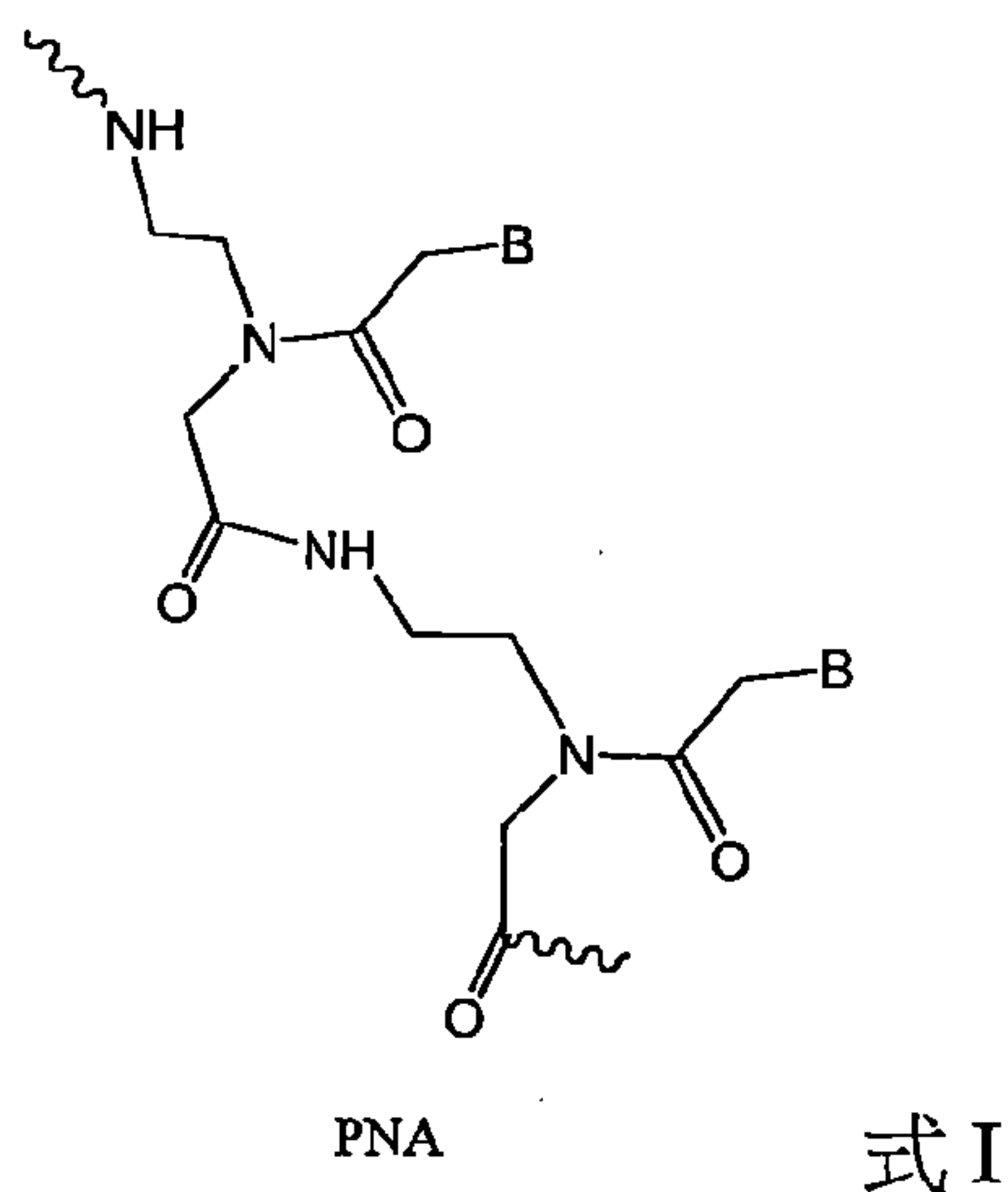
【0036】 在各式 1-VI 之情況下，B 為一核苷酸鹼基。主要的核鹼基有胞嘧啶(DNA 和 RNA)、鳥嘌呤(DNA 和 RNA)、腺嘌呤(DNA 和 RNA)、胸腺嘧啶(DNA)和尿嘧啶(RNA)，縮寫分別為 C、G、A、T 和 U。A、G、C 和 T 出現在 DNA 中，這些分子稱為 DNA-鹼基；A、G、C 和 U 稱為 RNA-鹼基。尿嘧啶在 RNA 中替代胸腺嘧啶。除了尿嘧啶缺乏 5'甲基基團外，這二個鹼基為相同的。腺嘌呤和鳥嘌呤係屬於雙環類分子稱為嘌呤(縮寫為 R)。胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶皆為嘧啶類(縮寫為 Y)。

【0037】 PMO 化合物具有分別由嗎啉環和磷醯二胺-連接基團所組成的亞單位。例如，本揭示文包括，包含 15 至 30 個式(II)亞單位之 PMO 化合物：



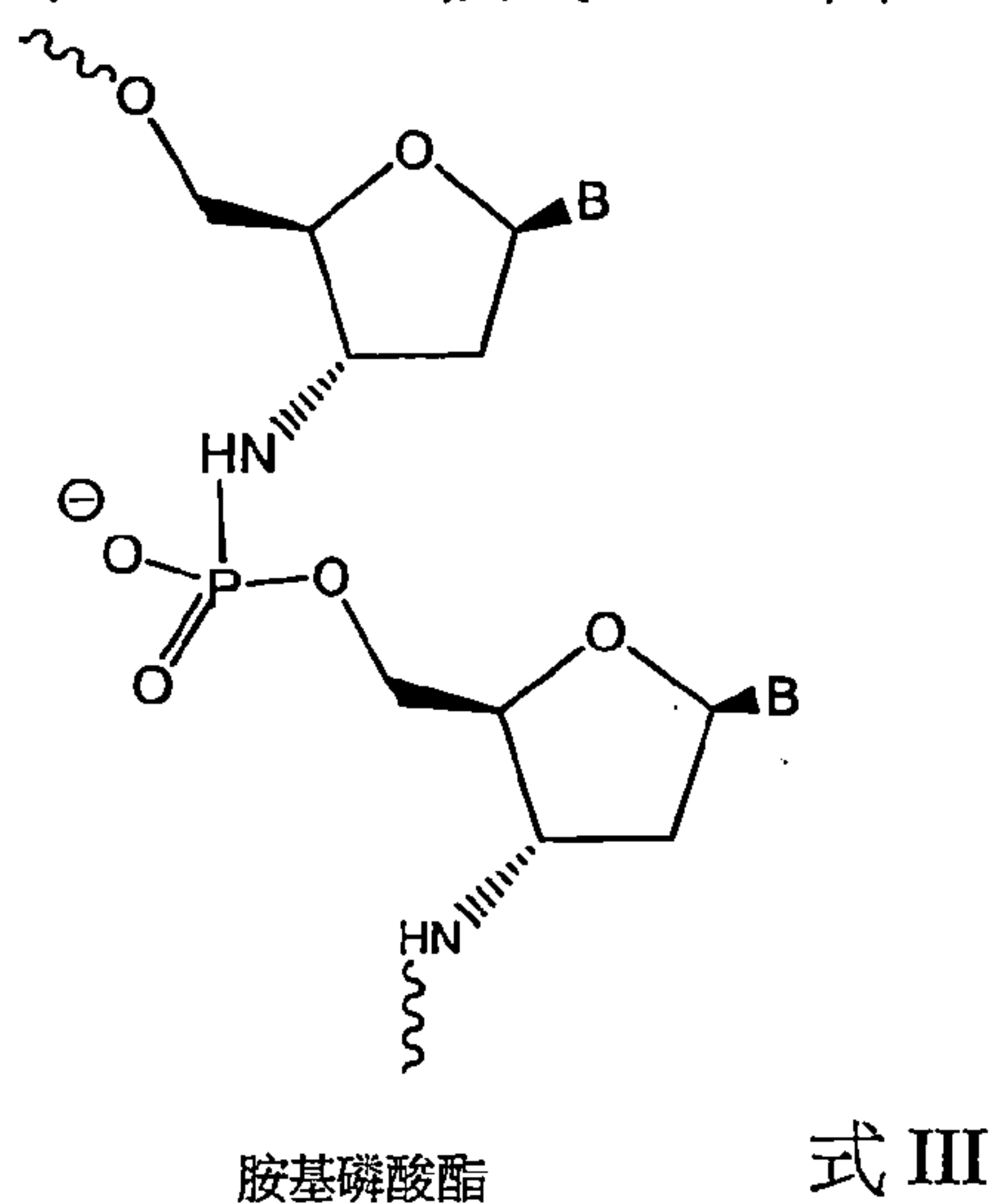
其中 R 為烷基基團而 B 為選自胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)或胸腺嘧啶(T)之天然生成的嘌呤或嘧啶核苷鹼基。

【0038】 PNA 化合物具有式 I 亞單位所組成的亞單位。就本揭示文係包括，包含 15 至 30 個式(I)亞單位之 PMO 化合物：



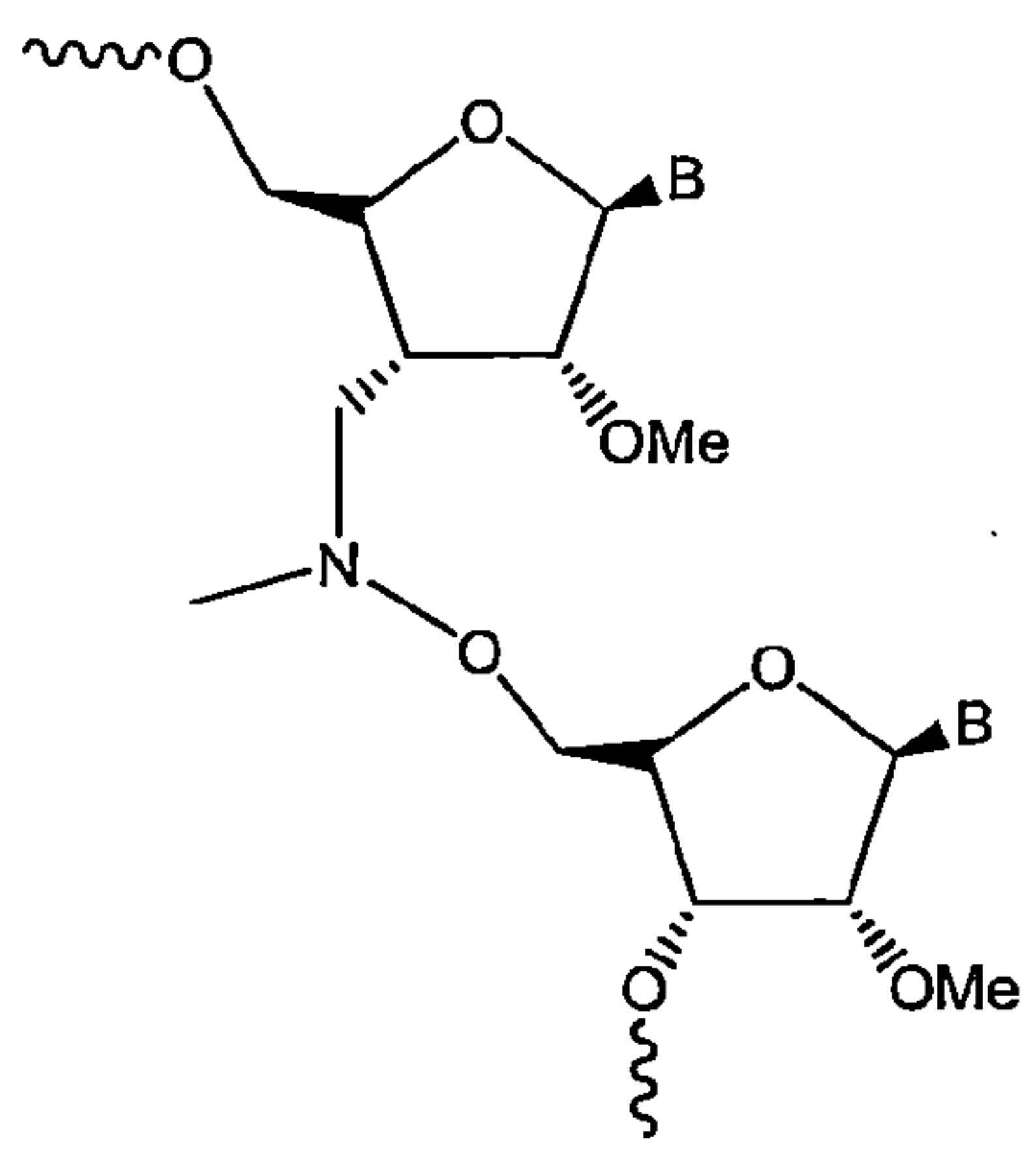
其中 B 為選自胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)或胸腺嘧啶(T)之嘌呤或嘧啶核苷鹼基。

【0039】 胺基磷酸酯化合物具有由式 III 亞單位所組成的亞單位。就本揭示文係包括，包含 15 至 30 個式 III 亞單位之胺基磷酸酯化合物：



其中 B 為選自胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)或胸腺嘧啶(T)之嘌呤或嘧啶核苷鹼基。

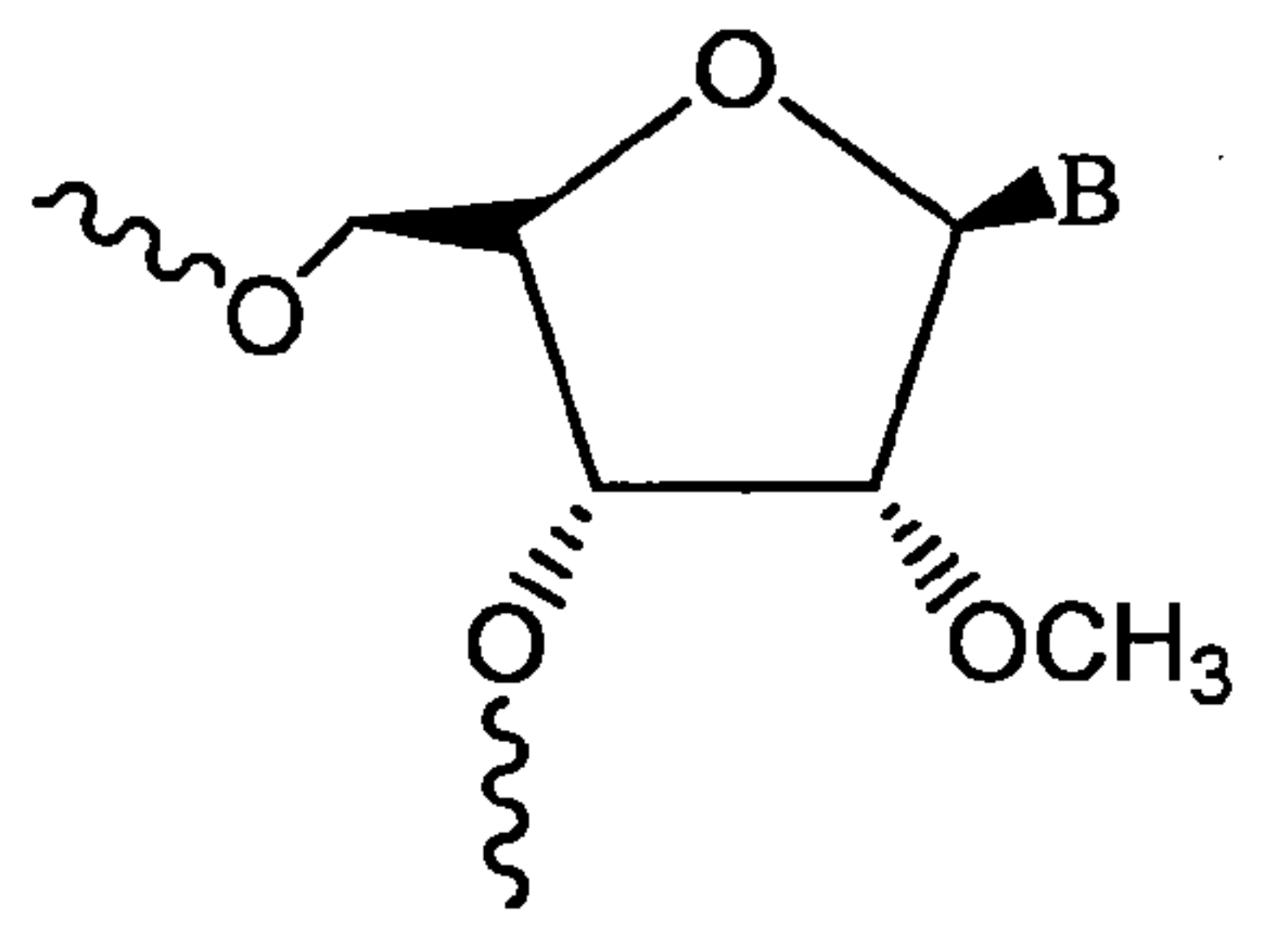
【0040】 MMI 化合物具有由式 IV 亞單位所組成的亞單位。就本揭示文係包括，包含 15 至 30 個式(IV)亞單位之 MMI 化合物：



MMI 式 IV

其中 B 為選自胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)或胸腺嘧啶(T)之嘌呤或嘧啶核苷鹼基。

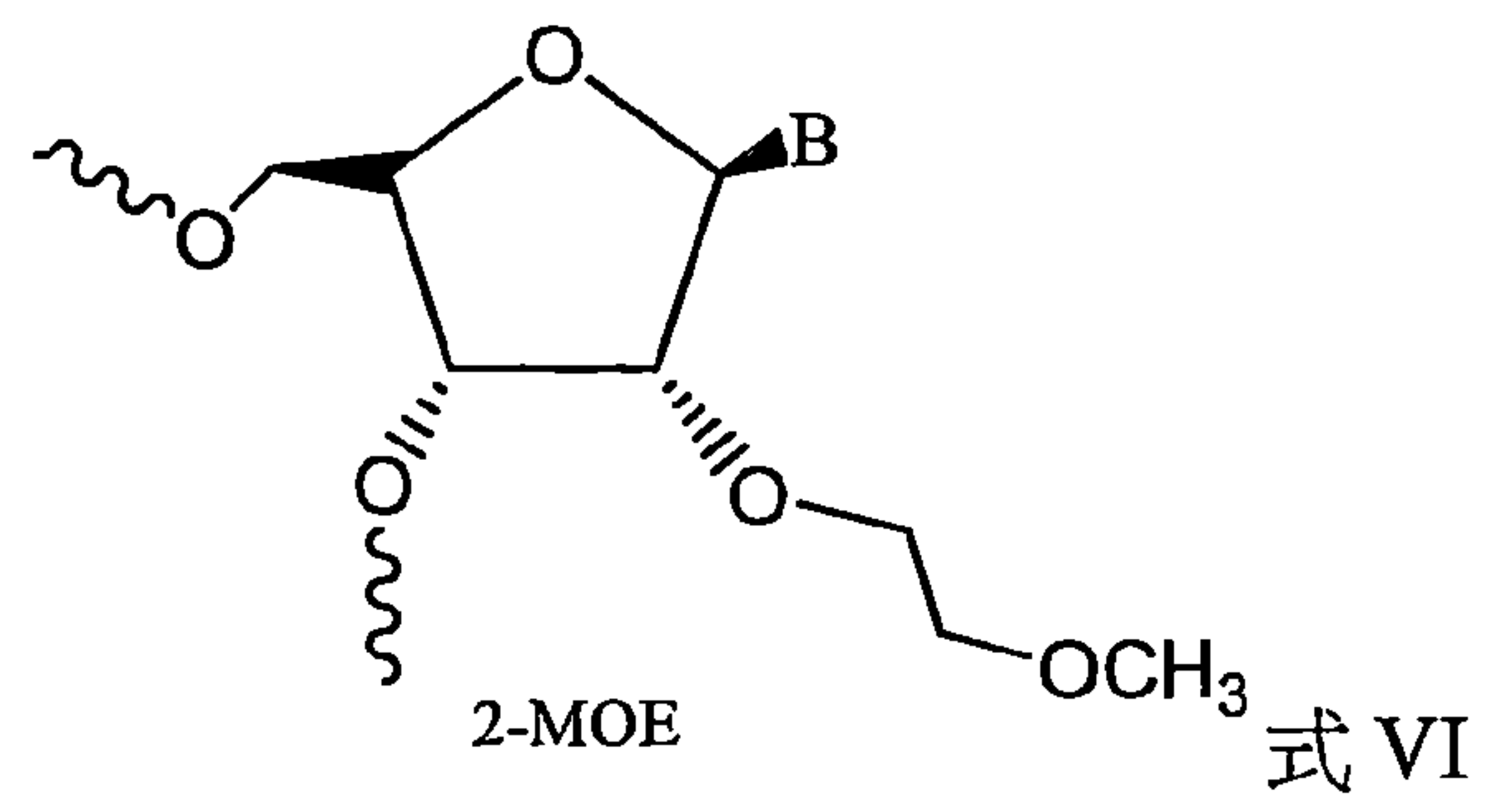
【0041】 2-OMe 化合物具有由式 V 亞單位所組成的亞單位。就本揭示文係包括，包含 15 至 30 個式(V)亞單位之 2-OMe 化合物：



2-OMe 式 V

其中 B 為選自胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)或胸腺嘧啶(T)之嘌呤或嘧啶核苷鹼基。

【0042】 2-MOE 化合物具有由式 VI 亞單位組成的亞單位。就本揭示文係包括，包含 15 至 30 個式(VI)亞單位之 2MOE 化合物：



2-MOE 式 VI

其中 B 為選自胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)或胸腺嘧啶(T)之嘌呤或嘧啶核苷鹼基。

【0043】 上述各種 AON 之說明可各自經取代，其中 AON-CPP 係陳述於說明書中，例如 2MOE-CPP、MMI-CPP、2-OMe-CPP、PNA-CPP 和胺基磷酸酯-CPP。

【0044】 在至少一實施例中，此 AON 化合物具有 15-25 個式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)之亞單位。在另外的實施例中，此 AON 化合物具有 20-25 個式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)之亞單位。又在另外的實施例中，此 AON 化合物具有約 25 個式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)之亞單位，例如 24-26 個亞單位。

【0045】 根據本揭示文，多重 PMO-CPP 接合物具有少於 60%的 PMO 亞單位，其中核鹼基(B)為 C 或 G。在至少一實施例中，多重 PMO-CPP 接合物具有低於 50%的 PMO 亞單位，其中核鹼基為 C 或 G。

【0046】 根據本揭示文，多重 AON-CPP 接合物具有低於 60%的 AON(的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI))亞單位，其中該核鹼基(B)為 C 或 G。在至少一實施例中，此多重 AON-CPP 接合物具有低於 50%的 AON 亞單位，其中核鹼基為 C 或 G。

【0047】 本揭示文之多重 PMO-CPP 接合物具有至少 2 個 PMO 化合物，該 PMO 化合物具有 0 至 3 個重複亞單位，其中核鹼基為 G。在至少一實施例中，此多重 PMO-CPP 接合物具有 0 個重複亞單位，其中 B 為 G。在另外的實施例中，此多重 PMO-CPP 接合物具有 1、2 或 3 個重複亞單位，其中 B 為 G。在 CPP 上的多重接合物位置係藉由在 D-或 L-鏡像異構位置加入麩胺酸導入，用以降低在 CPP 端點緊接的多重 PMO 接合物之立體位阻。使用在 P1，帶有胺基酸苯丙胺酸-離胺酸之胜肽酶裂解位置，-

P1 位置係導入 CPP 和 PMO 之間。胜肽酶裂解位置裂解將 PMO 從 CPP 釋放出。例如 CPP 可經由一馬來醯亞胺酯化連接子，以可導入在半胱胺酸位置之酵素裂解位置苯丙胺酸-離胺酸或纈胺酸-瓜胺酸，與 PMO 相連接。CPP 亦可經由醯胺鍵連相連接。

【0048】 本揭示文之多重 AON-CPP 接合物具有至少 2 個 AON 化合物，該 AON 化合物具有 0 至 3 個重複亞單位，其中核鹼基為 G。在至少一實施例中，此多重 AON-CPP 接合物具有 0 個重複亞單位，其中 B 為 G。在另外的實施例中，此多重 AON-CPP 接合物具有 1、2 或 3 個重複亞單位，其中 B 為 G。在 CPP 上的多重接合物位置係藉由在 D-或 L-鏡像異構位置加入麩胺酸導入，用以降低在 CPP 端點緊接的多重 PMO 接合物之立體位阻。使用在 P1 帶有胺基酸苯丙胺酸-離胺酸之胜肽酶裂解位置，-P1 位置係導入 CPP 和 AON 之間。胜肽酶裂解位置裂解將 AON 從 CPP 釋放出。例如 CPP 可經由一馬來醯亞胺酯化連接子，以可導入在半胱胺酸位置之酵素裂解位置苯丙胺酸-離胺酸或纈胺酸-瓜胺酸，與 AON 相連接。CPP 亦可經由醯胺鍵連相連接。

【0049】 使用胜肽內化進入細胞可產生一細胞內蛋白酶，包括溶酶體酵素，裂解該裂解位置且此 PMO 或 AON 應具有較低的來自胜肽鏈接合物之立體位阻。此較低的立體侷限可能以對細胞核和細胞溶質較低的毒性，增加外顯子跳躍效能。

【0050】 根據本揭示文，多重 PMO-CPP 接合物之 CPP 組份可選自已知的 CPP，例如該等命名為 A-N，具有表 1、2、圖 1 或文中所述的 K 系列或 B 系列 CPP 之序列。

【0051】 根據本揭示文，多重 AON-CPP 接合物之 CPP 組份可選自已知的 CPP，例如該等命名為 A-N，具有表 1、2、圖 1 或文中所述的 K 系列或 B 系列 CPP 之序列。

【0052】 在至少一個具體實施例中，此 CPP 組份為胜肽 K：RXRRXRRXRRXRXB (SEQ ID NO: 43)，其中 R 為 D-精胺酸，X 為 6-胺基己酸而 B 為 β -丙胺酸。在另外的實施例中，此 CPP 組份為胜肽 B：RXRRBRRXRRBRXB (SEQ ID NO: 44)，其中 R、X 和 B 係如上文中所定義。

【0053】 本揭示文之多重 PMO-CPP 或 AON-CPP 接合物的 CPP 組份亦可為包括化學式可變序列-間隔鏈(spacer)-連接子之化合物，其中可變序列為 Ac-R(O) n R，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基。在某些具體實施例中，此連接子為含有裂解模體之序列。在某些具體實施例中，此裂解模體可被水解酵素裂解。在某些具體實施例中，此裂解模體可被胜肽酶或蛋白酶，例如組織蛋白酶或胰蛋白酶裂解。在某些具體實施例中，此連接子可經設計包括一可被特定絲胺酸蛋白酶、蘇胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天門冬胺酸蛋白酶、麩胺酸蛋白酶或金屬蛋白酶或一個以上的胜肽酶群組所辨識之裂解模體。在某些具體實施例中，此連接子可包括二或多個重疊或非重疊的裂解模體。在某些具體實施例中，此連接子可不含有裂解模體。在某些具體實施例中，此連接子可經設計使得少於 100%，少於 75%，少於 50%，或少於 10%的連接子可被裂解。在某些實施例中，此連接子可經設計使得多於 90%或 99%的連接子可被裂解。

【0054】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己胺，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中可變序列係包括一 α -、 β -、 γ -或 δ -胺基酸或一環烷基結構。

【0055】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該可變序列使得化合物係以細胞核為目標。

【0056】 在某些具體實施例中，此 CPP 組可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該可變序列使得化合物係以細胞溶質為目標。

【0057】 在某些實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該可變序列使得化合物係以粒腺體為目標。

【0058】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基

環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羧基；且其中該間隔鏈係包括一胺基己酸(Ahx)。

【0059】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羧基；且其中該間隔鏈係包括(Ahx)B，其中 B 係選自 β -丙胺酸或 β -甘胺酸。

【0060】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羧基；且其中該連接子係包括一裂解模體。

【0061】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羧基；且其中該連接子係包括一裂解模體；且其中該裂解模體可被水解酶裂解。

【0062】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羧基；且其中該連接子係包括 FS。

【0063】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中

O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該連接子係包括 FSQ。

【0064】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 Ac-R(O) n R，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該連接子係包括 FSQK。

【0065】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 Ac-R(O) n R，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該連接子係包括 FxyB，x 為任何的胺基酸，y 係選自麩胺酸(E)、天門冬胺酸(D)、離胺酸(K)、絲胺酸(S)及蘇胺酸(T)，而 B 為 β -丙胺酸。

【0066】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 Ac-R(O) n R，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該連接子係包括 FxyB，x 為任何的胺基酸，y 係選自麩胺酸(E)、天門冬胺酸(D)、離胺酸(K)、絲胺酸(S)及蘇胺酸(T)，而 B 為 β -丙胺酸；且其中 y 為麩胺酸之非天然類似物。

【0067】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 Ac-R(O) n R，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該連接子係包括 FxyB，

x 為任何的胺基酸，y 係選自麩胺酸(E)、天門冬胺酸(D)、離胺酸(K)、絲胺酸(S)及蘇胺酸(T)，而 B 為 β -丙胺酸；且其中 y 為天門冬胺酸之非天然類似物。

【0068】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該連接子係包括 FxyB ，x 為任何的胺基酸，y 係選自麩胺酸(E)、天門冬胺酸(D)、離胺酸(K)、絲胺酸(S)及蘇胺酸(T)，而 B 為 β -丙胺酸；且其中 y 為離胺酸之非天然類似物。

【0069】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該連接子係包括 FxyB ，x 為任何的胺基酸，y 係選自麩胺酸(E)、天門冬胺酸(D)、離胺酸(K)、絲胺酸(S)及蘇胺酸(T)，而 B 為 β -丙胺酸；且其中 y 為絲胺酸之非天然類似物。

【0070】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該連接子係包括 FxyB ，x 為任何的胺基酸，y 係選自麩胺酸(E)、天門冬胺酸(D)、離胺酸(K)、絲胺酸(S)及蘇胺酸(T)，而 B 為 β -丙胺酸；且其中 y 為 E、D、K、S 或 T 之非天然類似物。

【0071】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該間隔鏈係包括一胺基己酸(Ahx)；及其中該連接子係包括 FSQG-OH。

【0072】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中該連接子係包括 FxyB，x 為任何的胺基酸，y 係選自麩胺酸(E)、天門冬胺酸(D)、離胺酸(K)、絲胺酸(S)及蘇胺酸(T)，而 B 為 β -丙胺酸；且其中 y 為蘇胺酸之非天然類似物；及其中 n 為 7，而間隔鏈為(Ahx)。

【0073】 在某些具體實施例中，此 CPP 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基；且其中可變序列、間隔鏈和連結子係包括選自 SEQ ID NO：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 和 11 之序列。

【0074】 在某些具體實施例中，CPP-PMO 或 CPP-AON 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 $\text{Ac-R(O)}_n\text{R}$ ，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-環己胺，而 Z 為順式-2-環戊胺-1-羰基，進一步係包括與連接子接合之載物，其中該貨物係包括磷醯二胺嗎福啉基寡聚物(PMO)。

【0075】 在某些具體實施例中，CPP-PMO 或 CPP-AON 可為包括化學式可變序列-間隔鏈-連接子之化合物，其中可變序列為 Ac-R(O)_nR，其中 $n \geq 7$ ；其中 O 為選自 R、X 和 Z 殘基之序列；其中 R 為 L-精胺酸，X 為 3-順式-胺基環己烷，而 Z 為順式-2-胺基環戊烷-1-羰基，進一步係包括與連接子接合之載物(cargo)，其中該載物進一步係包括一或多個另外的 PMO。

【0076】 在某些具體實施例中，CPP 可包括如任何表 1 之序列的可變序列-間隔鏈-連接子：

表 1：

Hit	序列	定位	SEQ ID NO:
2C4	Ac-RXXXXXXRRR(Ahx)FSQG-OH	細胞核	1
4G9	Ac-RXXXXXXRR(Ahx)FSQG-OH	細胞核	2
9F5	Ac-RXXXRXRXR(Ahx)FSQG-OH	細胞核	3
12G4	Ac-RRXXZXXXR(Ahx)FSQG-OH	細胞核	4
12D10	Ac-RRRXXXXXXR(Ahx)FSQG-OH	細胞核	5
12D11	Ac-RXRXXXXXXR(Ahx)FSQG-OH	細胞核	6
12E4	Ac-RRZXXXXXXR(Ahx)FSQG-OH	細胞核	7
21A5	Ac-RXXXXZXZR(Ahx)FSQG-OH	細胞核	8
11G1	Ac-RXXZXRXRXR(Ahx)FSQG-OH	細胞溶質	9
12D4	Ac-RRXRXXXXXXR(Ahx)FSQG-OH	細胞溶質	10
13D2	Ac-RRZXXZXRXR(Ahx)FSQG-OH	細胞溶質	11

【0077】 在某些實施例中，CPP 可包括下列表 2 所列的序列

表 2

Hit	序列	SEQ ID NO:
9H8	Ac-RXXXXXXRXR(Ahx)	12
9H9	Ac-RZXXXXXXRXR(Ahx)	13
9H11	Ac-RXZXXXXXXRXR(Ahx)	14
1A2	Ac-RRRRRRRRRR(Ahx)	15
12D12	Ac-RZRXXXXXXR(Ahx)	16
13D3	Ac-RXZXZXZXRXR(Ahx)	17

12D10	Ac-RRRXXXXXR(Ahx)	18
2C4	Ac-RXXXXXRRR(Ahx)	19
4G9	Ac-RXXXXXRR(Ahx)	20
11F4	Ac-RXXXXRXXR(Ahx)	21
9F5	Ac-RXXXXRXXR(Ahx)	22
12D11	Ac-RXRXXXXXR(Ahx)	23
20B7	Ac-RXXXXXXZR(Ahx)	24
20C4	Ac-RXXZXXXZR(Ahx)	25
5D4	Ac-RXXXXRZXR(Ahx)	26
9H7	Ac-RRXXXXRXXR(Ahx)	27
5B1	Ac-RXXXXZXXRR(Ahx)	28
4H6	Ac-RXXZXXXRR(Ahx)	29
12D4	Ac-RRXRXXXXR(Ahx)	30
15A8	Ac-RXXXXXZXR(Ahx)	31
12D8	Ac-RXZRXXXXR(Ahx)	32
12E3	Ac-RZXXXXXXXXR(Ahx)	33
12H2	Ac-RXXZZXXXR(Ahx)	34
4G10	Ac-RZXXXXXXXXRR(Ahx)	35
15H5	Ac-RXXXXZZXR(Ahx)	36
11F1	Ac-RXRXXRXXR(Ahx)	37
21C7	Ac-RRXXZZXZR(Ahx)	38
12E2	Ac-RXXXXXXXXR(Ahx)	39
12E4	Ac-RRZXXXXXXXXR(Ahx)	40
12G4	Ac-RRXXZXXXR(Ahx)	41
21A5	Ac-RXXXXZXZR(Ahx)	42

【0078】 本項技術之一般技術者應能設計達到本揭示文目標之另外的 CPP 序列，例如促進細胞穿透。因此，目前所揭示的多重 PMO-CPP 和 AON-CPP 接合物並不限於文中所揭示的 CPP 組份。

【0079】 如文中所式，NOAEL 係指無觀察到不利效應之劑量含量。換言之，NOAEL 為最大安全劑量。

【0080】 在某些實施例中，此連接子為含有裂解模體之序列。在某些具體實施例中，此裂解模體可被任何水解酵素裂解。在某些具體實施例中，此裂解模體可被胜肽酶或蛋白酶，例如組織蛋白酶或胰蛋白酶裂解。如文中所用，組織蛋白酶可裂解連接子係與組織蛋白酶裂解位置同義。本揭示文之可裂解連接子能被胞內酵素裂解，亦即化學性降解。在某些實施

例中，此連接子可經設計包括一可被特定絲胺酸蛋白酶、蘇胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天門冬胺酸蛋白酶、麩胺酸蛋白酶或金屬蛋白酶或一個以上的胜肽酶群組所辨識之裂解模體。在某些實施例中，此連接子可包括二或多個重疊或非重疊的裂解模體。在某些實施例中，此連接子可不含有裂解模體。在某些實施例中，此連接子可經設計使得少於 100%、少於 75%、少於 50%或少於 10%的連接子可被裂解。在某些實施例中，此連接子可經設計使得多於 90%或 99%的連接子可被裂解。

【0081】 在某些具體實施例中，此連接子係包括 FS 序列(SEQ ID NO.:45)。在某些具體實施例中，此連接子係包括 FSQ 序列(SEQ ID NO.: 46)或 FSQK (SEQ ID NO.:47)。在某些具體實施例中，此連接子係包括 FxyB 序列(SEQ ID NO.: 48)，其中 x 為任何標準或非標準胺基酸，y 為麩胺酸(E)、天門冬胺酸(D)、離胺酸(K)、絲胺酸(S)及蘇胺酸(T)，而 B 為 β -丙胺酸或 β -甘胺酸。在某些具體實施例中，適合的組織蛋白酶裂解位置包括 FKE (SEQ ID NO.: 49)、FAE (SEQ ID NO.: 50)、FVE (SEQ ID NO.: 51)、FLE (SEQ ID NO.: 52)、FSE (SEQ ID NO.: 53)及 V[Cit]E (SEQ ID NO.: 54)，其中 F 為苯丙胺酸，K 為離胺酸，E 為麩胺酸，A 為丙胺酸，V 為纈胺酸，L 為白胺酸，S 為絲胺酸及 Cit 為胍胺酸。本揭示文不限於文中所揭示的組織蛋白酶連接子，並亦包括能被胞內蛋白酶裂解之另外的胺基酸序列。

【圖式簡單說明】

【0082】 圖 1 為連接連單一 CPP 之多重 AON 組態的示意圖。

【0083】 圖 2 為可寡聚化並用於本發明多重 AON 組態之各種反義寡核苷酸亞單位的示意圖。

【0084】 圖 3 係描繪在野生型小鼠中某些 CPP-PMO 接合物對外顯子 23 跳躍之效應。

【實施方式】

實例

胜肽合成

【0085】 使用 Ranin Symphony 自動胜肽合成器，使用標準 Fmoc 化學於預載入 CLEAR (交鏈的聚氧乙烯醚丙烯酸酯樹脂)(Peptides International, Louisville, KY)上合成胜肽。將胺基酸(EMD Biosciences, San Diego, CA or Anaspec, San Jose, CA)以第三-丁氧基羰基(BOC)、第三丁基(tBu) 2,2,4,6,7-五甲基二氫-苯并呋喃-5-磺醯基(Pbf)或三苯甲基(Trt)基團正交保護。使用 5/5/10/1 之胺基酸/HCTU/N-甲基嗎福啉/樹脂的莫耳比率進行偶合。使用 20%哌啶、2% 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]-十一-7-烯(DBU)於 DMF 中於各循環中從胺端移除 Fmoc。於樹脂上使用 30/8/1 莫耳比之乙酸酐/NMM/樹脂在 DMF 中進行 N-端乙醯化。使用 15 ml/0.1 mM 樹脂之 2.5% 水/2.5% TIS/5% 苯甲醚/90%TFA 體積/體積比的混合物從樹脂進行去保護/裂解歷時 3 hr。上清物沉澱在二乙醚(-80°C)中並以 3000 rpm 形成團狀歷時 10 min。將乙醚傾析出並再次清洗團塊。將粗胜肽凍乾並使用半-製備式逆相 HPLC (XBridge C18, 10 x 250 mm, 5 μ m 粒子大小)純化。於 5 ml/min 以 99%緩衝液-A (水, 0.1% TFA)和 1%緩衝液-B (乙腈, 0.1% TFA)之載入梯度(梯度斜率, 0.3% B/min)進行純化。以逆相分析式 HPLC 和 MALDI-TOF (Waters Synapt)評估胜肽純度>95%。將分溶液收集一起、凍乾並再溶解於適合的接合緩衝液中。(所有的溶劑為 HPLC 等級，係購自加州聖地牙哥 EMD Biosciences 公司或密蘇里州聖路易市 Sigma Aldrich 公司)

胜肽(CPP)-PMO 接合物

【0086】 PMO 以 5'-端初級胺排序並如上述合成胜肽。在單一 PMO-CPP 接合物中，相較於 PMO 係使用 2-倍過量的胜肽，在多重

PMO-CPP 接合物中，使用下列方程式計算 PMO 莫耳數： $(1.2\text{-倍}) \times (\text{接合物數目}) \times (\text{胜肽莫耳數})$ 。將 PMO 溶於 DMSO (5 mM) 並放置一旁。將胜肽溶於 DMF (50 mM) 並與 1 莫耳當量的銨-基底偶合劑 2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸銨混合。將 2 莫耳當量的 4-甲基嗎福啉 (NMM) 加入胜肽混合物中並立刻加入 PMO 溶液。反應於 37°C 進行 1.5 hr 並使用 4 體積當量的水停止。將混合物加入 CM 瓊脂糖(sepharose)(密蘇里州聖路易市 Sigma Aldrich 公司)管柱並以 10 個管柱體積沖洗，移除未接合的 PMO 和反應物。從管柱以 1M 胍-HCL、1M NaCl 溶離胜肽 CPP-PMO 接合物及以 100 mM NH_4HCO_3 透析用 3 個緩衝液交換，移除鹽類和未接合的胜肽。將透析物質凍乾並以分析式 HPLC 分析。

【0087】 根據上述之通用胜肽合成方法合成下列 CPP：

- No. 1215 : Ac-(RXRRBR)₂XFKEG-OH (SEQ ID NO.: 55)
- No. 1216 : Ac-(RXRRBR)₂XFD(d-Glu)EG-OH (SEQ ID NO.: 56)
- No. 1217 : Ac-E(RXRRBR)₂XFKG-醯胺(SEQ ID NO.: 57)
- No. 1218 : Ac-E(RXRRBR)₂XFKG-OH (SEQ ID NO.: 58)
- No. 1219 : Ac-E(RXRRBR)₂XFKEG-OH (SEQ ID NO.: 59)
- No. 1220 : Ac-E(RXRRBR)₂XFK(d-Glu)EG-OH (SEQ ID NO.: 60)
- No. 1221 : Ac-(d-Glu)E(RXRRBR)₂XFKG-醯胺(SEQ ID NO.: 61)
- No. 1222 : Ac-(dGlu)E(RXRRBR)₂XFKG-OH (SEQ ID NO.: 62)
- No. 1223 : Ac-(d-Glu)E(RXRRBR)₂XFKEG-OH (SEQ ID NO.: 63)
- No. 1224 : Ac-(d-Glu)E(RXRRBR)₂XFK((d-Glu)EG-OH (SEQ ID NO.: 64)
- No. 1225-B : Biot-(RXRRBR)₂XFKG-OH (SEQ ID NO.: 65)
- No. 1225-F : FITC-(RXRRBR)₂XFKG-OH (SEQ ID NO.: 66)
- No. 1226-B : Ac-(RXRRBR)₂XFK(Biot)G-OH (SEQ ID NO.: 67)

- No. 1226-F : Ac-(RXRRBR)₂XFK(FITC)G-OH (SEQ ID NO.: 68)

其中 Ac 為乙醯基，R 為 D-精胺酸，X 為 6-胺基己酸，B 為 β-丙胺酸，FK 為組織蛋白酶裂解位置，E 為麩胺酸，G 為甘胺酸，Biot 為生物素，而 FITC 為螢光異硫氰酸鹽。

【0088】 使用上述的合成製程將上列的 CPP 與 PMO23 接合，形成 PMO-CPP 接合物。根據此製程所形成的接合物具有下列序列：

- No. 1215 : Ac-(RXRRBR)₂XFKE(PMO)G(PMO) (SEQ ID NO.: 69)
- No. 1216 : Ac-(RXRRBR)₂XFD(d-Glu)(PMO)E(PMO)G(PMO) (SEQ ID NO.: 70)
- No. 1217 : Ac-E(PMO)(RXRRBR)₂XFKG (SEQ ID NO.: 71)
- No. 1218 : Ac-E(PMO)(RXRRBR)₂XFKG(PMO) (SEQ ID NO.: 72)
- No. 1219 : Ac-E(PMO)(RXRRBR)₂XFKE(PMO)G(PMO) (SEQ ID NO.: 73)
- No. 1220 : Ac-E(PMO)(RXRRBR)₂XFK(d-Glu)(PMO)E(PMO)G(PMO) (SEQ ID NO.: 74)
- No. 1221 : Ac-(d-Glu)(PMO)E(PMO)(RXRRBR)₂XFKG (SEQ ID NO.: 75)
- No. 1222 : Ac-(dGlu)(PMO)E(PMO)(RXRRBR)₂XFKG(PMO) (SEQ ID NO.: 76)
- No. 1223 : Ac-(d-Glu)(PMO)E(PMO)(RXRRBR)₂XFKE(PMO)G(PMO) (SEQ ID NO.: 77)
- No. 1224 : Ac-(d-Glu)(PMO)E(PMO)(RXRRBR)₂XFK(d-Glu)(PMO)E(PMO)G(PMO) (SEQ ID NO.: 78)
- No. 1225-B : Biot-(RXRRBR)₂XFKG(PMO) (SEQ ID NO.: 79)
- No. 1226-B : Ac-(RXRRBR)₂XFK(Biot)G(PMO) (SEQ ID NO.: 80)

【0089】 將上述參照的 CPP-PMO 接合物以及 No. 1120 (Ac-(RXR)₄XFKE-((PEG)₂-PMO)G-(PMO)) (SEQ ID NO.: 81) 和 (Ac-(RXRRBR)₂XBA-PMO) (SEQ ID NO.: 82)以 2.84 μM/kg 劑量由靜脈內投予野生型小鼠。

【0090】 在給劑結束後，於麻醉下收取組織並於液態氮中冷凍。處理冷凍心臟和四頭肌以分離 RNA。使用 nanodrop ND1000 分光光度計定量樣本。將樣本進一步稀釋成 15 ng/μl 的濃度。將樣本使用具有下列序列之引子增幅：CAGAATTCTGCCAATTGCTGAG (SEQ ID NO.: 83)及 TTCTTCAGCTTGTGTCATCC (SEQ ID NO.: 84)。以 55°C /30 min.; 94°C/2 min ; 94°C/15 s x 30 次 ; 55°C/30 s ; 68°C/1.5 min 之執行順序進行 PCR。

【0091】 各接合物之外顯子 23 跳躍之百分比係如表 3 中所示。

表 3

接合物	%外顯子 23 跳躍(平均)	
	四頭肌	心臟
PBS 緩衝液(對照組)	0	0
1120	48.7	1.3
1204	75.7	33.7
1215	25.5	0.8
1216	69.5	28.5
1217	0	0
1218	4.3	0
1219	36.5	0.8
1220	10.7	0.7
1221	11.3	5
1222	9.5	0
1223	40	0
1224	15	0
1225-B	66.7	6.7
1226-B	39	1.2

【0092】 與 CPP 之 N-端接合的 PMO 表現不如與 C-端接合之相同數目 PMO 接合物。編號 1212 接合物表現不如 K-胜肽編號 1120 接合物。

僅帶有一 PMO 之編號 1204 表現優於帶有 2 個 PMO 之編號 1120。編號 1225-B 表現優於編號 1226-B。

【0093】 根據上述製程合成下列另外的 CPP-PMO 接合物。用於下列接合物之 PMO 為 GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT (SEQ ID NO.: 85)。

K 系列(PMO 為 PMO23):

- No. 1118 : Ac-(RXR)₄XEG-(PMO) (SEQ ID NO.: 86)
- No. 1119 : Ac-(RXR)₄XE-((PEG)₂-PMO)G-(PMO) (SEQ ID NO.: 87)
- No. 1120 : Ac-(RXR)₄XFKE-((PEG)₂-PMO)G-(PMO) (SEQ ID NO.: 81)
- No. 970-S : 硬脂醯基-(RXR)₄XA-PMO (SEQ ID NO.: 88)

B 系列(PMO 為 PMO23):

- No. 1204 : Ac-(RXRRBR)₂XBA-PMO (SEQ ID NO.: 82)
- E(PMO)(RXRRBR)₂XFKG, “n-端 PPMO-B” (SEQ ID NO.: 89)
- No. 1239 : Ac-(RXRRBR)₂XE(PMO)G(PMO) (SEQ ID NO.: 90)
- Ac-(RXRRBR)₂FKEG-(PMO)₂, “二-PMO-B + FK” (SEQ ID NO.: 91)

其中 Ac 為乙醯基，R 為 D-精胺酸，X 為 6-胺基己酸，B 為 β-丙胺酸，FK 為組織蛋白酶裂解位置，E 為麩胺酸，而 G 為甘胺酸。

【0094】 在某些具體實施例中，X 亦可包括其他類型的殘基，例如脯胺酸、甘胺酸或丙胺酸，或另外經修飾或非標準胺基酸。在某些實施例中，可變序列係包括 α、β、γ 或 δ 胺基酸，或環烷結構。在某些具體實施例中，連接子係包括 FS 序列(SEQ ID NO.: 45)。在某些具體實施例中，連接子係包括 FSQ 序列(SEQ ID NO.: 46)或 FSQK 序列(SEQ ID NO.: 47)，其中 F 為苯丙胺酸，S 為絲胺酸，K 為離胺酸而 Q 為麩醯胺酸。在某些具體實施例中，連接子係包括 FxyB 序列(SEQ ID NO.: 48)，其中 x 為任何標準

或非標準的胺基酸，y 為麩胺酸(E)、天門冬胺酸(D)及離胺酸(K)、絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)，而 B 為 β -丙胺酸或 β -甘胺酸。以 2.84 μ M/kg 之劑量由靜脈內投予野生型小鼠編號 1204、1119、1120、1239 和 1215 接合物。收取組織並如上述分離 RNA。跳躍的外顯子 23 百分比係如表 4 所示。

表 4:

接合物	%外顯子 23 跳躍(平均)	
	四頭肌	心臟
PBS 緩衝液(對照組)	0	0
1204	54.3	0
1119	44.9	0.4
1120	68	16.6
1239	2.6	0
1215	21.3	0

【0095】 圖 3 亦描述在野生型小鼠中某些多重 CPP-PMO 接合物對外顯子 23 跳躍之效應。

【0096】 如上所示，藉由將一個以上的 PMO 與單一的 CPP-K 而非 CPP-B 相連接，增進了功效。藉由 IV 注射所遞送的單一劑量 CPP-B，與 2 個 PMO 外顯子 23 部分接合(編號 1239)效用遠不及與單一 PMO 外顯子 23 接合的 CPP-B (編號 1204)。另人驚訝地，吾等發現以確切相同的化學方法與 2 個 PMO 接合的單一劑量 CPP-K (編號 1119)，功效大約為與單一 PMO 外顯子 23 部分接合的單一劑量 CPP-K (編號 1118)的 2 倍。有趣地，就單體結構，CPP-PMO23B 比 CPP-PMO23K 更有效。在其中 3 個 PMO 係與 CPP 拴連的多重 CPP-PMO 接合物研究中，3 個 PMO23 部分與單一胜肽 B 接合(編號 1216)，相較於二-PMO B (雖然三-PMO23-B 就外顯子跳躍能力而言，與二-PMO23-K 類似)使活性加倍。這些結果顯示，何種多重 CPP-PMO 接合物將具有所欲的性質為無法事先預知的，且因此，熟習本項技術之一般技術者必須使用 本揭示文所述的方法進行初步研究，以測

定各製備的接合物之功效。

【0097】 從考量文中所揭示的本發明說明和施行，本發明之其他的具體實施例對於熟習本項技術者為顯而易見的。希望，此等說明和實施例僅視為示例性，本發明真正的範圍及精神係如下列申請專利範圍所示。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

<110> GENZYME

<120> 胜肽載體上之多重寡核苷酸部分

<130> US2013/054 WO PCT

<140>

<141>

<150> 62/002,296

<151> 2014-05-23

<160> 96

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> 6-胺基己酸

<400> 1

Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Arg	Arg	Xaa	Phe	Ser	Gln	Gly
1				5				10					

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

$\langle 220 \rangle$

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)

```

104224-序列表

<223> 6-胺基己酸

<400> 4
Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Ser Gln Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 5
Arg Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Ser Gln Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>  
<221> MOD_RES
```

第 6 頁

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> 6-胺基己酸
```

104224-序列表

<400> 8
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Ser Gln Gly
1 5 10

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羧基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 9
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Arg Xaa Phe Ser Gln Gly
1 5 10

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 10
Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Ser Gln Gly
1 5 10

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

22

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-氨基己酸

<400> 11
Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Ser Gln Gly
1 5 10

<210>	12
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 12
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210> 13

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)

<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-氨基己酸

<400> 14
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210>	15
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸
```

<400> 15
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Xaa
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2):(2)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羧基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 16
Arg Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210>	17
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>  
<221> MOD_RES
```

<400> 18
Arg Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210>	19
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5).(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> 6-氨基己酸
```

<400> 19
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Arg Xaa
1 5 10

<210>	20
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

 $\langle 220 \rangle$

<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 20
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Xaa
1 5 10

<210>	21
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2).(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (8)..(8)
```



```
<220>
<221> MOD_RES
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 25
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 26
Arg Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Arg Arg Xaa
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)



```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> 6-氨基己酸
```

<400> 28
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Xaa
1 5 10

<210>	29
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羧基

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> 6-胺基己酸
```

104224-序列表

<400> 29
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Xaa
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 30
Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES



```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

$\langle 220 \rangle$ 

<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 33
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羧基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羧基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-胺基己酸

<400> 34
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT

<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

<223> 3-順式-胺基環己烷

<223> 3-順式-胺基環己烷

<223> 3-順式-胺基環己烷

<223> 3-順式-胺基環己烷

<223> 3-順式-胺基環己烷

<223> 6-氨基己酸

Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Arg Xaa
1 5 10

<213> 人工序列

<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<223> 3-順式-胺基環己烷

<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (4).(4)  
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羧基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羧基

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-氨基己酸

<400> 36
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210>	37
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>  
<221> MOD_RES
```

第 28 頁

<210>	39
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

$\langle 220 \rangle$

<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5):(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-氨基己酸

<400> 40
Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210>	41
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)

<223> 3-順式-胺基環己烷

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (8).(8)  
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> 6-氨基己酸
```

<400> 41
Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210>	42
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).(4)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 3-順式-胺基環己烷

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 3-順式-胺基環己烷
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 順式-2-胺基環戊烷-1-羰基

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> 6-胺基己酸
```

104224-序列表

<400> 42
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210> 43
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(4)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(10)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> MOD_RES

104224-序列表

<222> (14)..(14)
<223> Beta-Ala

<400> 43
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Ala
1 5 10

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(4)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(10)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 6-氨基己酸

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Beta-Ala

```

<400> 44
Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Xaa Ala
1 5 10

<210>	45
<211>	2
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<400> 45
Phe Ser
1

<210>	46
<211>	3
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<400> 46
Phe Ser Gln
1

<210>	47
<211>	4
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<400> 47
Phe Ser Gln Lys
1

<210>	48
<211>	4
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> 變體
<222> (3)..(3)
<223> /取代="Asp"或"Lys"或"Ser"或"Thr"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> 變體
<222> (4)..(4)
<223> /取代="Beta-Gly"

<220>
<221> 其他特徵
<222> (1)..(4)
<223> /註="序列中給定的變體殘基關於變體位置的註解中者並無偏好"

<400> 48
Phe Xaa Glu Ala
1

<210> 49
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<400> 49
Phe Lys Glu
1

<210> 50
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<400> 50
Phe Ala Glu
1

<210> 51
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<400> 51
Phe Val Glu
1

<210> 52
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<400> 52
Phe Leu Glu
1

<210> 53
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"
peptide"

<400> 53
Phe Ser Glu
1

<210> 54
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Citruline

<400> 54
Val Xaa Glu
1

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"



<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 6-氨基己酸

<400> 55

104224-序列表

Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Xaa Phe Lys Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 56
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-Arg

104224-序列表

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> D-Glu

<400> 56
Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Xaa Phe Asp Glu
1 5 10 15

Glu Gly

<210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES

104224-序列表

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 6-氨基己酸

<400> 58
Glu Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Xaa Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 59
<211> 18
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> 6-胺基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Arg



<400> 59
Glu Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Xaa Phe Lys
1 5 10 15

Glu Gly

<210>	60
<211>	19
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> D-Arg
```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 6-氨基己酸

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> D-Arg
```

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> D-Arg
```

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Beta-Ala
```

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> D-Arg
```

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> D-Arg
```

```
<220>  
<221> MOD_RES  
<222> (9)..(9)  
<223> 6-氨基己酸
```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)

```

<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> D-Glu

<400> 60
Glu Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Xaa Phe Lys
1 5 10 15

Glu Glu Gly

<210> 61
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> D-Arg

<220>

26

<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> 6-氨基己酸

<400> 61
Glu Glu Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Xaa Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> D-Arg

<220>



104224-序列表

<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> 6-氨基己酸

<400> 62
Glu Glu Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Xaa Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 63
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-氨基己酸

第 48 頁

<220>
<221> MOD_RES

104224-序列表

<222> (6)..(6)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> D-Glu

<400> 64
Glu Glu Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Xaa Arg Arg Ala Arg Xaa Phe
1 5 10 15

Lys Glu Glu Gly
 20

<210> 65
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註="人工序列說明：合成肽"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Beta-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Arg

<220>
<221> MOD_RES



申請專利範圍

1. 一種胜肽-反義寡核苷酸(胜肽-AON)接合物，其包含與至少兩個反義寡核苷酸(AON)共價接合的陽離子細胞穿透胜肽(CPP)，

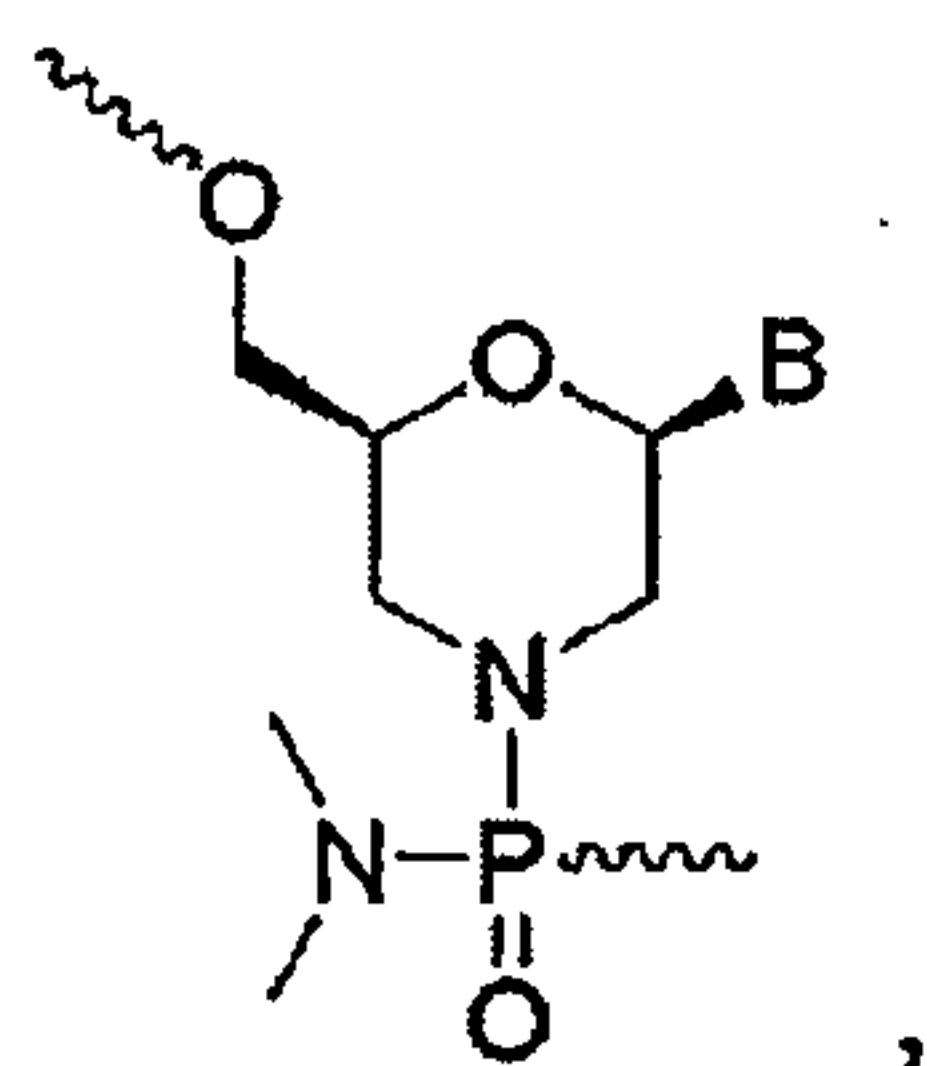
其中該胜肽-AON 接合物係選自以下組成之群組：

- (i) $(\text{Ac}-(\text{RXR})_4\text{XFKE}-((\text{PEG})_2-\text{AON})\text{G}-(\text{AON}))$ ；
- (ii) $\text{Ac}-(\text{RXRRBR})_2\text{XFKE}(\text{AON})\text{G}(\text{AON})$ ；
- (iii) $\text{Ac}-(\text{RXRRBR})_2\text{XFD}(\text{D-Glu})(\text{AON})\text{E}(\text{AON})\text{G}(\text{AON})$ ；
- (iv) $\text{Ac-E}(\text{AON})(\text{RXRRBR})_2\text{XFKG}(\text{AON})$ ；
- (v) $\text{Ac-E}(\text{AON})(\text{RXRRBR})_2\text{XFKE}(\text{AON})\text{G}(\text{AON})$ ；
- (vi) $\text{Ac-E}(\text{AON})(\text{RXRRBR})_2\text{XFK}(\text{D-Glu})(\text{AON})\text{E}(\text{AON})\text{G}(\text{AON})$ ；
- (vii) $\text{Ac}-(\text{D-Glu})(\text{AON})\text{E}(\text{AON})(\text{RXRRBR})_2\text{XFKG}$ -醯胺；
- (viii) $\text{Ac}-(\text{D-Glu})(\text{AON})\text{E}(\text{AON})(\text{RXRRBR})_2\text{XFKG}(\text{AON})$ ；
- (ix) $\text{Ac}-(\text{D-Glu})(\text{AON})\text{E}(\text{AON})(\text{RXRRBR})_2\text{XFKE}(\text{AON})\text{G}(\text{AON})$ ；及
- (x) $\text{Ac}-(\text{D-Glu})(\text{AON})\text{E}(\text{AON})(\text{RXRRBR})_2\text{XFK}(\text{D-Glu})(\text{AON})\text{E}(\text{AON})\text{G}(\text{AON})$ ；

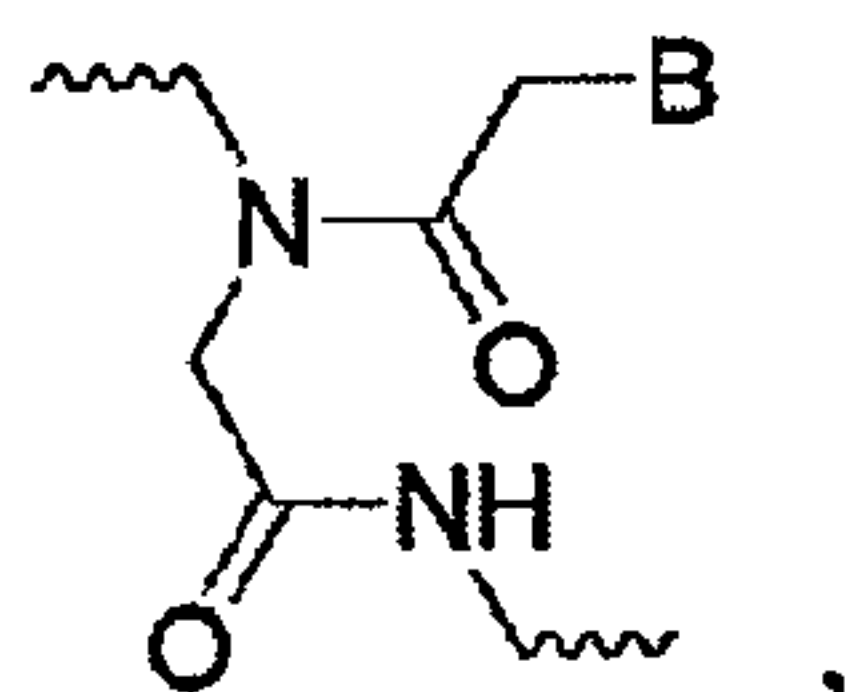
其中 Ac 為乙醯基，R 為 D-精胺酸，X 為 6-胺基己酸，B 為 β -丙胺酸，E 為麩胺酸，D-Glu 為 D-麩胺酸，G 為甘胺酸，且 FK 及 FX 為裂解模體(cleavage motif)，

其中各 AON 係包含 15 至 30 個磷醯二胺嗎福啉基寡聚物(PMO)、胜肽核酸(PNA)、嗎福啉基、胺基磷酸酯(phosphoramidate)、亞甲基甲基亞胺基(MMI)、2-O-甲基(2-OMe)或 2-甲氧基乙基(2-MOE)之亞單位，

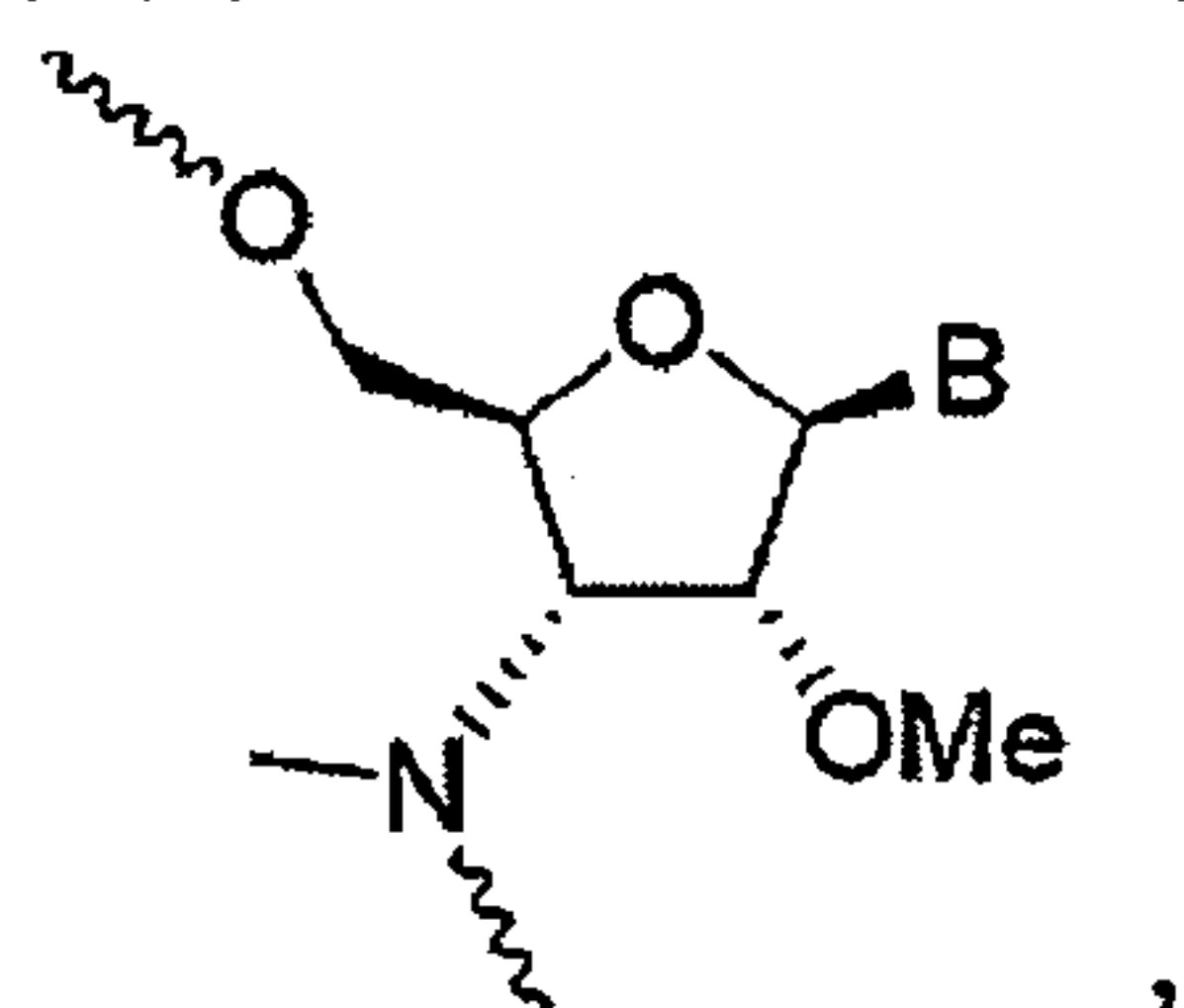
其中該 PMO 的亞單位係由以下結構所代表：



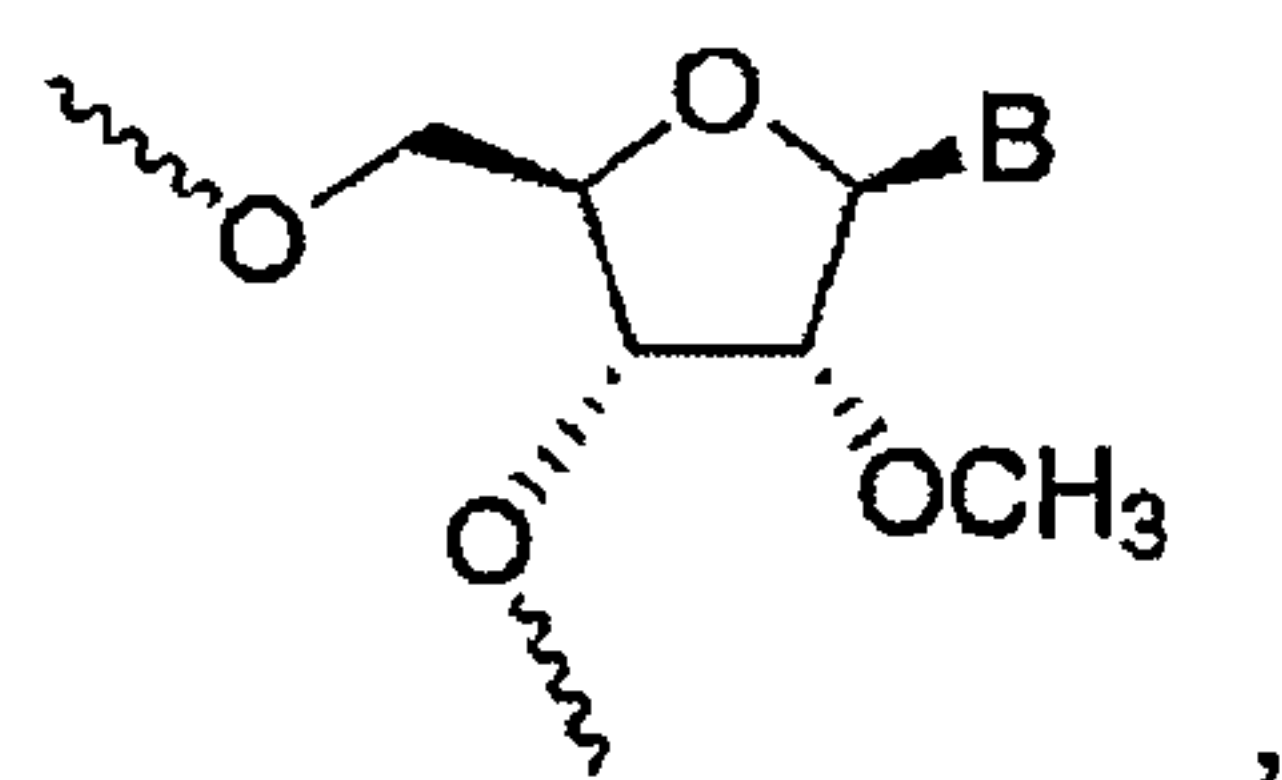
其中該 PNA 的亞單位係由以下結構所代表：



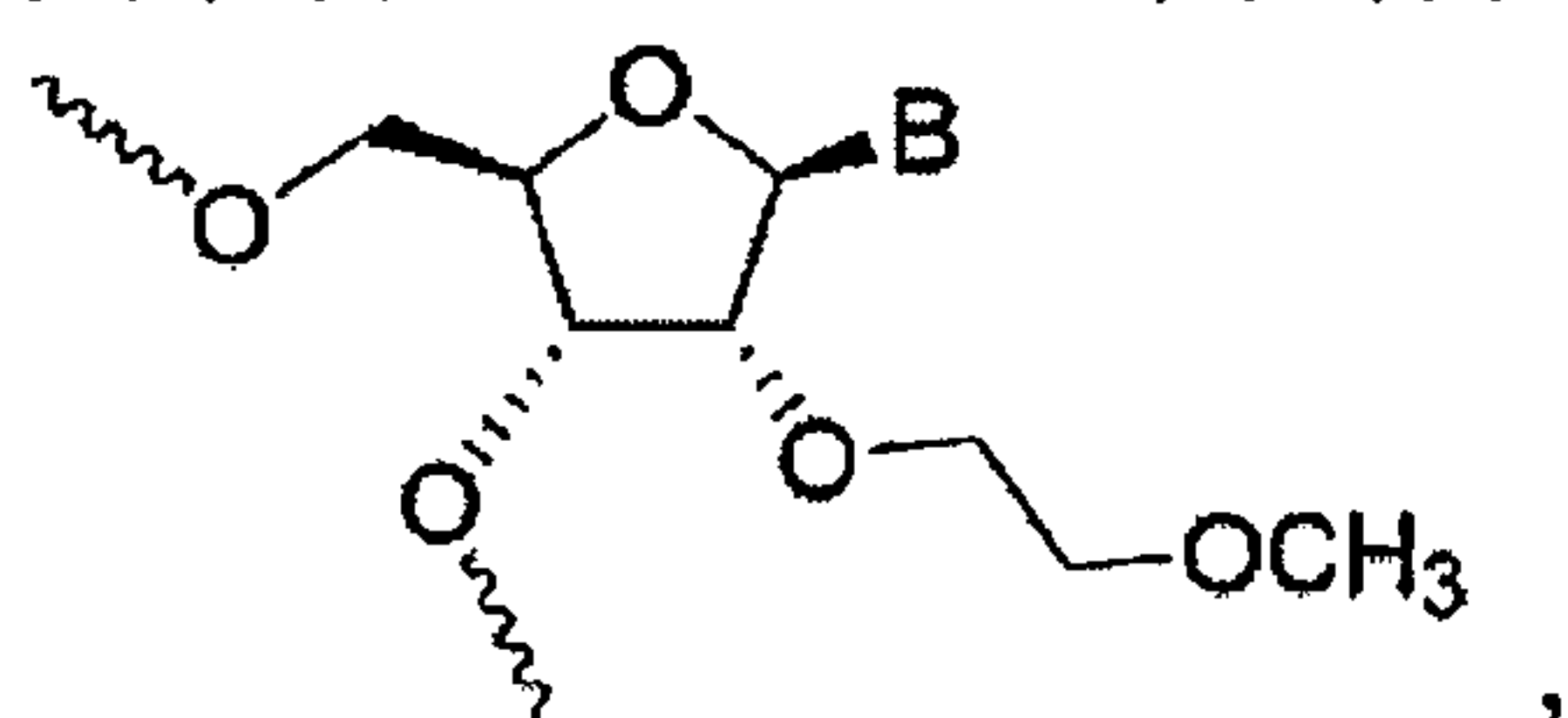
其中該 MMI 的亞單位係由以下結構所代表：



其中該 2-OMe 的亞單位係由以下結構所代表：



其中該 2-MOE 的亞單位係由以下結構所代表：



其中 B 代表選自 C、G、A 或 T 之天然生成的嘌呤或嘧啶核苷酸鹼基；

其中各 AON 包含：

- (i) 一核苷酸鹼基序列，其與基因之至少 75% 的目標前-mRNA、mRNA、微 RNA 或長鏈非編碼 RNA 之核苷酸鹼基為互補

的；

- (ii) 0 至 3 個重複的亞單位，其中 B 為 G；
- (iii) 其少於 60%的該亞單位，其中 B 為 C 或 G；
- (iv) 非自我互補的序列；及

其中該胜肽-AON 接合物包含至少一個可裂解的連接子，其包含含有水解酵素的該裂解模體之序列。

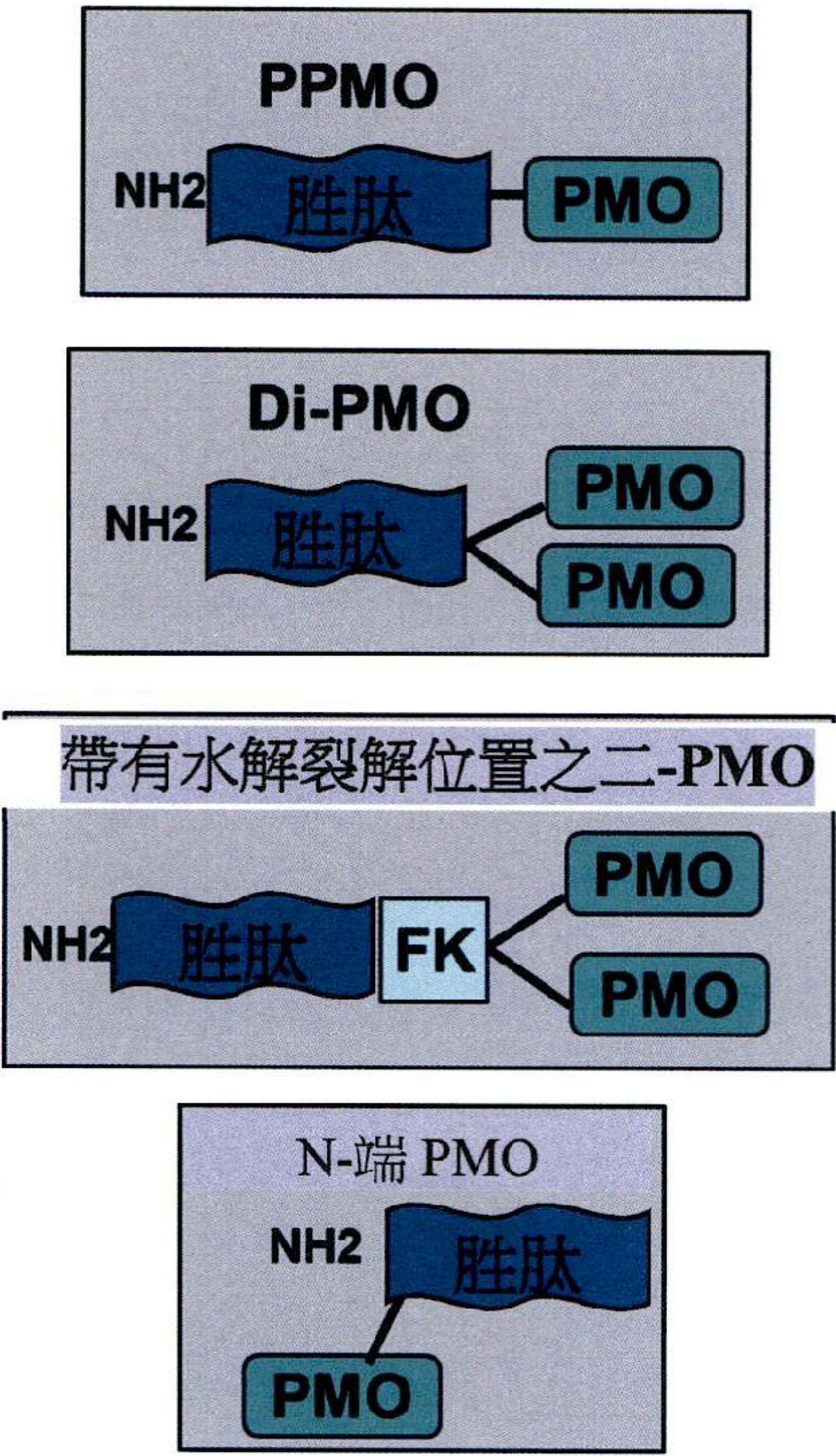
2. 如請求項 1 之胜肽-AON 接合物，其中該裂解模體可被胜肽酶或蛋白酶裂解。
3. 如請求項 2 之胜肽-AON 接合物，其中該裂解模體可被組織蛋白酶或胰蛋白酶裂解。
4. 如請求項 1-3 中任一項之胜肽-AON 接合物，其中該裂解模體為在 P1/P1'位置之 FK 或 FX，其中 X 為任何天然生成的胺基酸。
5. 如請求項 1-3 中任一項之胜肽-AON 接合物，其中該 AON 為 PMO。
6. 如請求項 5 之胜肽-AON 接合物，其中該 PMO 為 PMO23，且其中 PMO23 為 SEQ ID NO: 85。
7. 如請求項 1-3 中任一項之胜肽-AON 接合物，其中各 AON 係經由醯胺鍵與 CPP 接合。
8. 如請求項 1-3 中任一項之胜肽-AON 接合物，其中各 AON 係經由馬來醯亞胺酯化連接子與 CPP 接合。
9. 如請求項 1-3 中任一項之胜肽-AON 接合物，其中該基因係選自由以下組成之群組：肝醣合成酶(GYS1 或 GYS2)、轉化生長因子(TGF β)、基質金屬蛋白酶(MMP2 或 MMP9)、骨橋蛋白(osteopontin)、強直性肌營養不良蛋白激酶(DMPK)、類 Elav 家族成員 2 (亦稱為 CUGBP)、雙同源箱 4 (DUX4)及/或(Frzl)。

圖式

K 系列
Ac-(RXR) 4 XA-PMO - PPMO-K
Ac-(RXR)4 XEG-(PMO)2 – PPMO-Di-K
Ac-(RXR)4 FKEG-(PMO)2 – PPMO-Di-K + “FK”
組織蛋白酶位置

B 系列
Ac-(RXRRBR)2XBA-PMO - PPMO-B
E(PMO)(RXRRBR)2XFKG- n-端 PPMOB
Ac-(RXRRBR)2XEG-(PMO)2 – Di-PMO-B
Ac-(RXRRBR)2 FKEG-(PMO)2 -Di-PMO-K帶有
組織蛋白酶位置

X=胺基己酸
E=麩胺酸
FK=組織蛋白酶位置
B=β-丙胺酸



由上而下之 K 系列 SEQ ID NOS

SEQ ID NO.: 92

SEQ ID NO.: 93

SEQ ID NO.: 94

由上而下之 B 系列 SEQ ID NOS

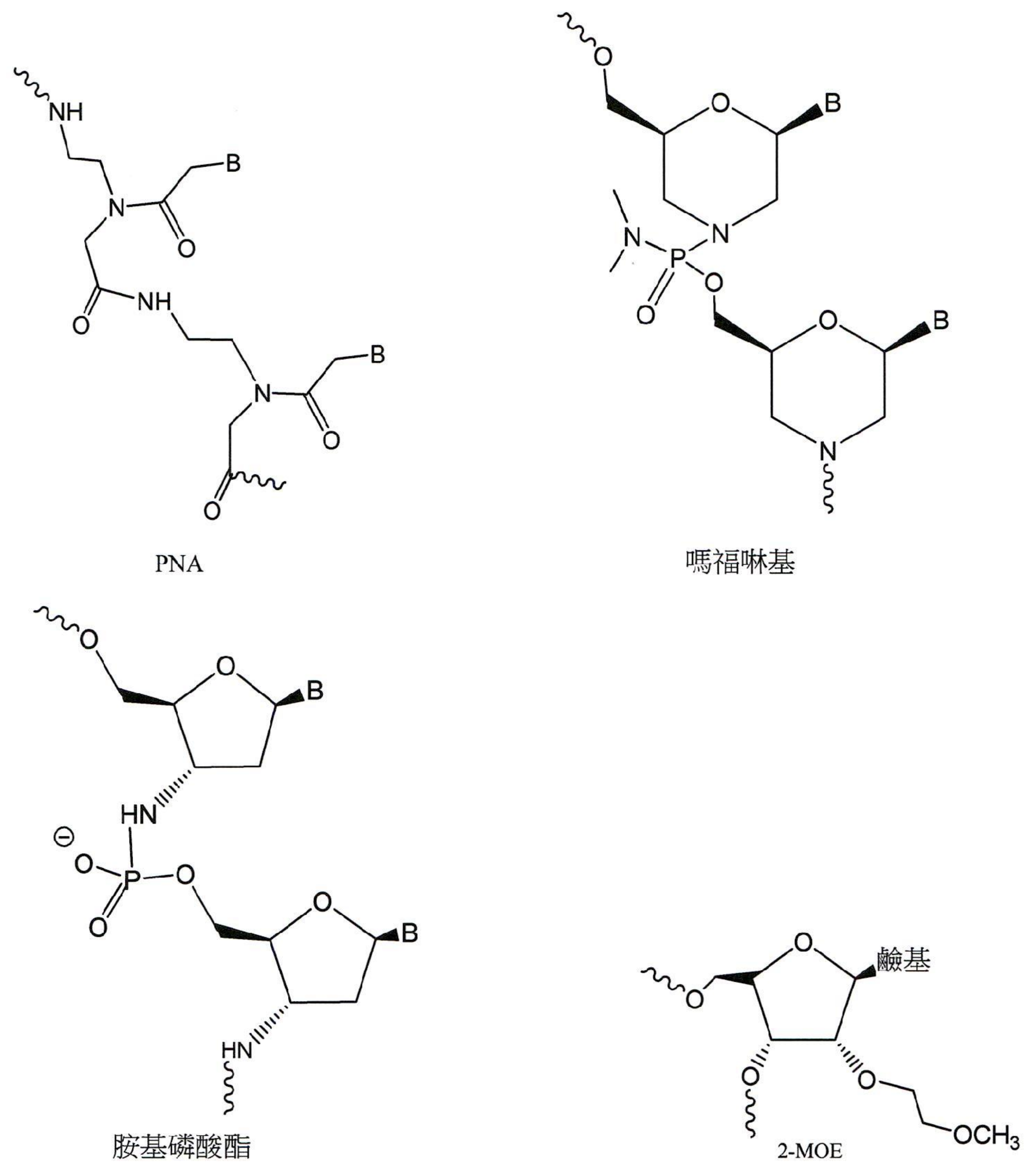
SEQ ID NO.: 82

SEQ ID NO.: 89

SEQ ID NO.: 90

SEQ ID NO.: 91

圖 1



B, 鹼基 = 核苷酸鹼基：A、G、T、C

圖 2

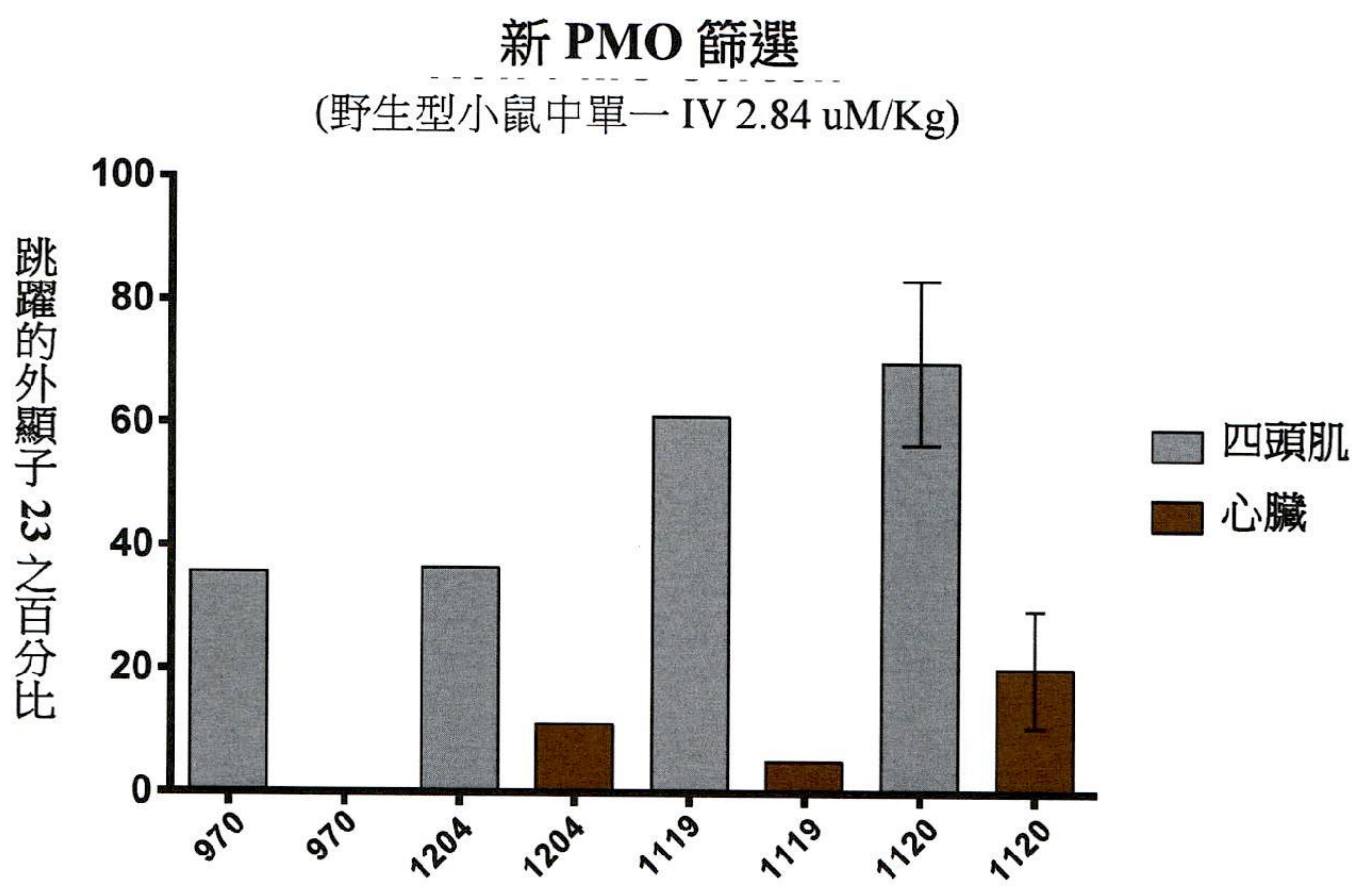


圖 3