(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113347989 A
(43)申请公布日 2021.09.03

(21)申请号 201980066823.5

(22)申请日 2019.08.09

(30)优先权数据
1812972.6 2018.08.09 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2019/052247 2019.08.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/030927 EN 2020.02.13

(71)申请人 牛津大学科技创新有限公司
地址 英国牛津郡
申请人 英国研究与创新组织

(72)发明人 马修·伍德 拉克尔·曼扎诺
卡罗琳·戈弗雷 格雷厄姆·麦克洛里
理查德·拉兹 迈克尔·盖特
安德烈·阿尔祖马诺夫
利兹·奥多诺万 加雷思·哈泽尔
阿诗玲·霍兰德 米格尔·瓦雷拉

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332
代理人 刘明海 胡彬

(51)Int.Cl.
A61K 38/16(2006.01)
A61K 47/64(2006.01)
C07K 7/04(2006.01)
C07K 14/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书34页
序列表62页 附图15页

(54)发明名称

细胞穿透肽

(57)摘要

本发明涉及肽,特别是细胞穿透肽,并且涉及这种细胞穿透肽与治疗性分子的缀合物。本发明进一步涉及这种肽或缀合物在治疗方法中或作为药物的用途,特别是在遗传性病症并且尤其是肌营养不良症例如杜氏肌营养不良症的治疗中的用途。

1.一种总长为40个氨基酸残基或更短的肽，所述肽包括：

两个或更多个阳离子结构域，每个阳离子结构域包含至少4个氨基酸残基；以及

一个或多个疏水性结构域，每个疏水性结构域包含至少3个氨基酸残基；

其中所述肽不包含人工氨基酸残基。

2.根据权利要求1所述的肽，其中所述肽不包含氨基己酸(X)残基，优选其中所述肽不包含6-氨基己酸残基。

3.根据权利要求1或2所述的肽，其中所述肽由天然氨基酸残基组成。

4.根据任一前述权利要求所述的肽，其中每个阳离子结构域的长度为4至12个氨基酸残基，优选为4至7个氨基酸残基。

5.根据任一前述权利要求所述的肽，其中每个阳离子结构域包含至少40％、至少45％、至少50％的阳离子氨基酸。

6.根据权利要求1-4的任一项所述的肽，其中每个阳离子结构域包含大部分阳离子氨基酸，优选地包含至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％的阳离子氨基酸。

7.根据任一前述权利要求所述的肽，其中每个阳离子结构域包含精氨酸、组氨酸、β-丙氨酸、羟脯氨酸和/或丝氨酸残基，优选地其中每个阳离子结构域由精氨酸、组氨酸、β-丙氨酸、羟脯氨酸和/或丝氨酸残基组成。

8.根据任一前述权利要求所述的肽，其中每个阳离子结构域都富含精氨酸和/或富含组氨酸，优选地每个阳离子结构域包含至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少60％、至少65％、至少70％的精氨酸和/或组氨酸残基。

9.根据任一前述权利要求所述的肽，其中所述肽包含两个阳离子结构域。

10.根据任一前述权利要求所述的肽，其中每个阳离子结构域包含以下序列之一：RBRRBRR(SEQ ID NO:1)、RBRBR(SEQ ID NO:2)、RBRR(SEQ ID NO:3)、RBRRBR(SEQ ID NO:4)、RRBRBR(SEQ ID NO:5)、RBRRB(SEQ ID NO:6)、BRBR(SEQ ID NO:7)、RBHBH(SEQ ID NO:8)、HBHBR(SEQ ID NO:9)、RBRHBHR(SEQ ID NO:10)、RBRBBHR(SEQ ID NO:11)、RBRRBH(SEQ ID NO:12)、HBRRBR(SEQ ID NO:13)、HBHBH(SEQ ID NO:14)、BHBH(SEQ ID NO:15)、BRBSB(SEQ ID NO:16)、BRB[Hyp]B(SEQ ID NO:17)、R[Hyp]H[Hyp]HB(SEQ ID NO:18)、R[Hyp]RR[Hyp]R(SEQ ID NO:19)或其任意组合；优选地，其中每个阳离子结构域由以下序列之一组成：RBRRBRR(SEQ ID NO:1)、RBRBR(SEQ ID NO:2)、RBRR(SEQ ID NO:3)、RBRRBR(SEQ ID NO:4)、RRBRBR(SEQ ID NO:5)、RBRRB(SEQ ID NO:6)、BRBR(SEQ ID NO:7)、RBHBH(SEQ ID NO:8)、HBHBR(SEQ ID NO:9)、RBRHBHR(SEQ ID NO:10)、RBRBBHR(SEQ ID NO:11)、RBRRBH(SEQ ID NO:12)、HBRRBR(SEQ ID NO:13)、HBHBH(SEQ ID NO:14)、BHBH(SEQ ID NO:15)、BRBSB(SEQ ID NO:16)、BRB[Hyp]B(SEQ ID NO:17)、R[Hyp]H[Hyp]HB(SEQ ID NO:18)、R[Hyp]RR[Hyp]R(SEQ ID NO:19)或其任意组合。

11.根据任一前述权利要求所述的肽，其中每个疏水性结构域的长度为3-6个氨基酸，优选地每个疏水性结构域的长度为5个氨基酸。

12.根据任一前述权利要求所述的肽，其中每个疏水性结构域包含大部分疏水性氨基酸残基，优选地每个疏水性结构域包含至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、100％的疏水性氨基酸。

13.根据任一前述权利要求所述的肽，其中每个疏水性结构域包含苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、色氨酸、脯氨酸和谷氨酰胺残基；优选地其中每个疏水性结构域由苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、色氨酸、脯氨酸和/或谷氨酰胺残基组成。

14.根据任一前述权利要求所述的肽，其中所述肽包含一个疏水性结构域。

15.根据任一前述权利要求所述的肽，其中所述或每个疏水性结构域包含以下序列之一：YQFLI(SEQ ID NO:20)、FQILY(SEQ ID NO:21)、ILFQY(SEQ ID NO:22)、FQIY(SEQ ID NO:23)、WWW、WWPWW(SEQ ID NO:24)、WPWW(SEQ ID NO:25)、WWPW(SEQ ID NO:26)或其任意组合；优选地，所述或每个疏水性结构域由以下序列之一组成：YQFLI(SEQ ID NO:20)、FQILY(SEQ ID NO:21)、ILFQY(SEQ ID NO:22)、FQIY(SEQ ID NO:23)、WWW、WWPWW(SEQ ID NO:24)、WPWW(SEQ ID NO:25)、WWPW(SEQ ID NO:26)或其任意组合。

16.根据任一前述权利要求所述的肽，其中所述肽由两个阳离子结构域和一个疏水性结构域组成，优选地，其中所述肽由一个疏水性核心结构域和位于其侧翼的两个阳离子臂结构域组成。

17.根据任一前述权利要求所述的肽，其中所述肽由一个疏水性核心结构域和位于其侧翼的两个阳离子臂结构域组成，所述疏水性核心结构域包含选自以下的序列：YQFLI(SEQ ID NO:20)、FQILY(SEQ ID NO:21)、ILFQY(SEQ ID NO:22)、FQIY(SEQ ID NO:23)、WWW、WWPWW(SEQ ID NO:24)、WPWW(SEQ ID No:25)和WWPW(SEQ ID NO:26)，每个阳离子臂结构域包含选自以下的序列：RBRRBRR(SEQ ID NO:1)、RBRBR(SEQ ID NO:2)、RBRR(SEQ ID NO:3)、RBRRBR(SEQ ID NO:4)、RRBRBR(SEQ ID NO:5)、RBRRB(SEQ ID NO:6)、BRBR(SEQ ID NO:7)、RBHBH(SEQ ID NO:8)、HBHBR(SEQ ID NO:9)、RBRHBHR(SEQ ID NO:10)、RBRBBHR(SEQ ID NO:11)、RBRRBH(SEQ ID NO:12)、HBRRBR(SEQ ID NO:13)、HBHBH(SEQ ID NO:14)、BHBH(SEQ ID NO:15)、BRBSB(SEQ ID NO:16)、BRB[Hyp]B(SEQ ID NO:17)、R[Hyp]H[Hyp]HB(SEQ ID NO:18)和R[Hyp]RR[Hyp]R(SEQ ID NO:19)。

18.根据任一前述权利要求所述的肽，其中所述肽由以下序列之一组成：RBRRBRRFQILYRBRBR(SEQ ID NO:27)、RBRRBRRYQFLIRBRBR(SEQ ID NO:31)、RBRRBRRILFQYRBRBR(SEQ ID NO:32)、RBRRBRFQILYBRBR(SEQ ID NO:35)、RBRRBRRFQILYRBHBH(SEQ ID NO:37)、RBRRBRRFQILYHBHBR(SEQ ID NO:38)、RBRRBRFQILYRBHBH(SEQ ID NO:44)。

19.一种缀合物，其包含根据权利要求1-18中任一项所述的肽，所述肽与治疗性分子共价连接。

20.根据权利要求19所述的缀合物，其进一步包含接头，优选地，其中所述接头将所述缀合物连接至所述治疗性分子。

21.根据权利要求19或20所述的缀合物，其中所述接头选自G、BC、XC、C、GGC、BBC、BXC、XBC、X、XX、B、BB、BX和XB。

22.根据权利要求19-21的任一项所述的缀合物，其中治疗性分子选自：核酸、肽核酸、反义寡核苷酸(例如PNA、PMO)、短干扰RNA、微小RNA、肽、环肽、蛋白质、药物或药品，优选地，其中所述治疗性分子是反义寡核苷酸。

23.根据权利要求19-22的任一项所述的缀合物在制备药物中的用途。

24.根据权利要求23所述的用途，其中所述药物用于治疗神经肌肉系统或肌肉骨骼系

统的疾病，优选地是神经肌肉系统或肌肉骨骼系统的遗传疾病，优选地是神经肌肉系统或肌肉骨骼系统的遗传性遗传疾病，优选地是神经肌肉系统或肌肉骨骼系统的遗传性X连锁遗传疾病。

25.根据权利要求23或24所述的用途，其中所述药物用于治疗DMD。

细胞穿透肽

技术领域

[0001] 本发明涉及肽，特别是细胞穿透肽(cell-penetrating peptide)，并且涉及这种细胞穿透肽与治疗分子的缀合物。本发明进一步涉及这种肽或缀合物在治疗方法中或作为药物的用途，特别是在遗传性病症并且尤其是肌营养不良症(例如杜氏肌营养不良症)的治疗中的用途。

背景技术

[0002] 核酸药物是具有改变人类医疗保健的潜能的基因组药物。研究表明，此类疗法可能在包括神经肌肉疾病的广泛疾病领域中得到应用。基于反义寡核苷酸的方法在神经肌肉疾病杜氏肌营养不良症(DMD)中调节前mRNA剪接的应用已将这种单基因疾病置于精准医疗发展的前沿。

[0003] 但是，细胞穿透性不足和分布特性差阻碍了这些有前途的反义疗法的治疗发展——DMD中肌肉组织基质的大体积和分散性质进一步凸显了这一挑战。

[0004] 每3500个新生男孩中DMD就会影响一个。这种严重的X连锁隐性遗传病是由编码肌营养不良蛋白的DMD基因的突变引起的。该疾病的特征在于进行性肌肉变性和消耗，伴随呼吸衰竭和心脏并发症的出现，最终导致过早死亡。DMD背后的大多数突变是基因组框架外(out-of-frame)缺失，它们会引起不成熟的开放阅读框的截短，从而导致肌营养不良蛋白的缺失。

[0005] 外显子跳跃疗法利用剪接转换反义寡核苷酸(SSO)靶向DMD转录物的特定区域，诱导排除单个外显子，导致异常阅读框的恢复，并导致产生内部缺失但具有部分功能的肌营养不良蛋白。尽管针对DMD的反义寡核苷酸外显子跳跃疗法无疑具有潜力，但该方法的成功应用目前受限于骨骼肌的靶向效率相对较低，以及单链寡核苷酸无法充分靶向其他受影响的组织(例如心脏)。

[0006] 2016年9月，美国食品药品监督管理局(FDA)批准了对“eteplirsen”的加速审批，其是一种用于调节外显子51剪接的单链寡核苷酸。尽管这预示着美国第一个批准的可调节剪接的寡核苷酸，但肌营养不良蛋白的恢复水平却令人失望，仅具有约1％的正常肌营养不良蛋白水平。与等位基因病症贝克肌营养不良症的比较以及在mdx小鼠中进行的实验表明，需要至少～15％野生型的同质肌膜肌营养不良蛋白表达来保护肌肉免受运动引起的损伤。

[0007] 因此，迫切需要改善反义寡核苷酸的递送，以便为毁灭性遗传疾病例如DMD提供更有效的疗法。

[0008] 已经提出使用病毒作为递送媒介物，但是由于病毒外壳蛋白的免疫毒性和潜在的致癌作用，其使用受到限制。备选地，已经开发了多种非病毒递送载体，其中显示了肽由于其尺寸小、靶向特异性和大生物货物的跨毛细血管递送的能力是最有前景的。已经报道了几种肽的能力，这些肽可以单独地或携带生物货物穿透细胞。

[0009] 多年来，细胞穿透肽(CPP)已与SSO(尤其是电荷中性的磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO)和肽核酸(PNA))缀合，以增强此类寡核苷酸类似物的细胞递送，所述增强通过有效地

携带此类寡核苷酸类似物跨细胞膜到达其在细胞核中的前mRNA靶位。已经显示，在DMD的mdx小鼠模型中全身施用后，与某些富含精氨酸的CPP缀合的PMO治疗剂(称为P-PMO或肽-PMO)可以增强骨骼肌中肌营养不良蛋白的产生。

[0010] 特别地，已经开发了PNA/PMO内化肽(Pip)，其是富含精氨酸的CPP，其由两个被中央短疏水序列隔开的富含精氨酸的序列组成。这些“Pip”肽的设计旨在提高血清稳定性，同时保持高水平的外显子跳跃，最初是通过将其附着到PNA货物上来实现的。这些肽的其他衍生物被设计为PMO的缀合物，所述PMO的缀合物显示在小鼠全身性施用后，可导致全身骨骼肌肌营养不良蛋白的产生，并且重要的是还包括心脏。尽管这些肽是有效的，但是其相关的毒性阻碍了它们的治疗应用。

[0011] 还已经产生了具有单个精氨酸富集结构域的替代性细胞穿透肽，例如R_6Gly。这些CPP已被用于生产毒性降低的肽缀合物，但是与Pip肽相比，这些缀合物显示出较低的功效。

[0012] 因此，尚未证明当前可用的CPP适合用于人类治疗诸如DMD的疾病。

[0013] 细胞穿透肽技术领域的挑战是使功效和毒性分离。现在，本发明人已经鉴定、合成和测试了许多根据本发明的具有特定结构的改进的CPP，其至少解决了这个问题。

[0014] 当用货物治疗分子在体内和体外测试时，这些肽在骨骼肌中保持良好的功效水平。此外，当用于相同的缀合物中时，与以前可获得的CPP相比，这些肽表现出功效上的改善。同时，这些肽在体内有效发挥作用，其在全身注射后具有减轻的临床症状，并通过测量生化标记物观察到了较低的毒性。关键地，与以前的CPP相比，在类似的全身注射入小鼠后，本发明的肽被证明显示出惊人地降低的毒性。因此，本发明的肽与先前可获得的肽相比提供了改进的适用性以用作用于人类的疗法，并且可以用于治疗性缀合物中以安全有效地治疗人类受试者。

发明内容

[0015] 根据本发明的第一方面，提供了一种总长为40个氨基酸残基或更短的肽，所述肽包括：

[0016] 两个或更多个阳离子结构域，每个阳离子结构域包含至少4个氨基酸残基；

[0017] 以及

[0018] 一个或多个疏水性结构域，每个疏水性结构域包含至少3个氨基酸残基；其中所述肽不包含人工氨基酸残基。

[0019] 根据本发明的第二方面，提供了一种缀合物，其包含共价连接至治疗分子的第一方面的肽。

[0020] 根据本发明的第三方面，提供了一种缀合物，其包含共价连接至成像分子的第一方面的肽。

[0021] 根据本发明的第四方面，提供了一种药物组合物，其包含第二方面的缀合物。

[0022] 根据本发明的第五方面，提供了根据第二方面的缀合物，其用作药物。

[0023] 在第五方面的一个实施方案中，提供了根据第四方面的药物组合物，其用作药物。

[0024] 根据本发明的第六方面，提供了一种在受试者中治疗疾病的方法，所述方法包括以治疗有效量向所述受试者施用第二方面的缀合物。

[0025] 在第六方面的一个实施方案中，提供了一种在受试者中治疗疾病的方法，其包括

以治疗有效量向所述受试者施用根据第四方面的药物组合物。

[0026] 根据本发明的第七方面，提供了分离的核酸，其编码第一方面的肽或第二方面的缀合物或第三方面的缀合物。

[0027] 根据本发明的第八方面，提供了一种表达载体，其包含第七方面的核酸序列。

[0028] 根据本发明的第九方面，提供了一种宿主细胞，其包含第八方面的表达载体。

具体实施方式

[0029] 本发明人已经制备了一系列肽，其适合被用作细胞穿透肽以将治疗性分子递送到细胞中。

[0030] 令人惊讶地，本发明人发现了一组肽，其具有至少两个阳离子结构域和至少一个限定长度的疏水性结构域，而没有任何人工氨基酸，所述肽与目前可获得的细胞穿透肽相比，提供了增强的细胞穿透进入肌肉。当作为与反义寡核苷酸治疗剂的缀合物被递送到细胞中时，或在体内施用时，观察到该效果。

[0031] 在疾病DMD的情况下，由与合适的治疗分子连接的本发明的肽所增强的细胞穿透性可以通过转录物内特定外显子排除(exon exclusion)来显示。将反义寡核苷酸引导至合适的序列导致外显子的强制跳跃、开放阅读框的校正和肌营养不良蛋白的内部缺失但具有部分功能的同工型的恢复。

[0032] 本文显示，本发明的肽，当作为与旨在靶向肌营养不良蛋白基因的反义寡核苷酸治疗剂的缀合物使用时，具有高水平的外显子排除和肌营养不良蛋白恢复。

[0033] 特别地，与当前可获得的、与相同的反义寡核苷酸治疗剂缀合的肽相比，包含本发明的肽的缀合物显示出显著增加的细胞穿透。在本发明中，通过在各种不同肌肉群中的肌营养不良蛋白基因的外显子跳跃的增加证明了这一点。

[0034] 在体内，本文所述的结果显示外显子跳跃水平和功能性肌营养不良蛋白的表达水平在使用本发明的肽缀合物时接近由使用与先前可获得的细胞穿透肽缀合的相同反义寡核苷酸治疗剂产生的水平的两倍。

[0035] 这是这种肽载体在神经肌肉疾病发生时穿透肌肉细胞的功效的显著提高。

[0036] 不希望受理论的束缚，发明人认为，除去通常用于细胞穿透肽的人工氨基酸，如6-氨基己酸残基，并用例如天然存在的β-丙氨酸残基替代，具有降低肽的总体毒性和增加其细胞穿透性的有益效果。

[0037] 但是，完全没有预料到的是，这种不包含任何人工氨基酸残基的肽结构会提高先前报道的细胞穿透肽的递送特性，从而将治疗性分子货物(例如寡核苷酸)转运到肌肉中。肽的有效性在很大程度上取决于在其进入细胞所需的时间长度内具有血清稳定性的能力。可以预期的是，在没有人工氨基酸的情况下所形成的肽在体内太不稳定并且易被蛋白酶降解，以至于没有足够的量穿透肌肉细胞和组织而且也无法产生增强的治疗效果。与此预期相反，本发明人发现所要求保护的具有特定结构的肽足够稳定以至可以进入细胞并保持良好的甚至改善的功效，而且还由于缺乏人工氨基酸而具有毒性降低的优点。

[0038] 出乎意料的是，如本文所证明的，这样的转运将会增加，从而导致治疗分子(如反义寡核苷酸)在各种不同的肌肉中成功地增加了外显子跳跃和功能性肌营养不良蛋白的产生。

[0039] 另外,出乎意料的是,当在体内运输治疗性货物至用这种缀合物可以对人类进行治疗的程度时,这种肽结构会显著降低细胞穿透肽的毒性。在体内,本文所述的结果显示出通过生化标记物测定的肾毒性降低。

[0040] 为了避免疑问,并且为了阐明解释本公开的方式,现在将进一步限定根据本发明使用的某些术语。

[0041] 本发明包括所描述的方面和特征的任何组合,除了明显不允许或明确避免这种组合的情况。

[0042] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应被解释为限制所描述的主题。

[0043] 始终以"X"表示任何形式的人工的、合成制备的氨基酸氨基己酸。

[0044] 始终以"B"表示天然但非遗传编码的氨基酸β-丙氨酸。

[0045] 始终以"Ac"表示相关肽的乙酰化。

[0046] 始终以"Hyp"表示天然但非遗传编码的氨基酸羟脯氨酸。

[0047] 始终以大写字母表示根据公认的字母氨基酸代码的相关遗传编码的氨基酸残基。

[0048] 人工氨基酸

[0049] 本发明涉及具有特定结构的短的细胞穿透肽,其中不存在人工氨基酸残基。

[0050] 本文提及的"人工"氨基酸或残基表示不是天然存在的任何氨基酸,并且包括合成氨基酸、修饰氨基酸(例如用糖修饰的氨基酸)、非天然氨基酸、人造氨基酸、间隔子和非肽键合的间隔子。

[0051] 合成氨基酸可以是由人化学合成的那些。

[0052] 为了避免疑义,在本发明的背景中,氨基己酸(X)是人工氨基酸。为了避免疑义,β-丙氨酸(B)和羟脯氨酸(Hyp)是天然存在的,因此在本发明的背景中不是人工氨基酸,而是天然氨基酸。

[0053] 人工氨基酸可包括例如6-氨基己酸(X)、四氢异喹啉-3-羧酸(TIC)、1-(氨基)环己烷羧酸(Cy)和3-氮杂环丁烷-羧酸(Az)、11-氨基十一烷酸。

[0054] 适当地,所述肽不包含氨基己酸残基。适当地,所述肽不包含任何形式的氨基己酸残基。适当地,所述肽不包含6-氨基己酸残基。

[0055] 适当地,所述肽仅包含天然氨基酸残基,并因此由天然氨基酸残基组成。

[0056] 适当地,通常在细胞穿透肽中使用的人工氨基酸如6-氨基己酸被天然氨基酸替代。适当地,通常在细胞穿透肽中使用的人工氨基酸例如6-氨基己酸被选自β-丙氨酸、丝氨酸、脯氨酸、精氨酸和组氨酸或羟脯氨酸的氨基酸替代。

[0057] 在一个实施方案中,氨基己酸被β-丙氨酸代替。适当地,6-氨基己酸被β-丙氨酸代替。

[0058] 在一个实施方案中,氨基己酸被组氨酸代替。适当地,6-氨基己酸被组氨酸代替。

[0059] 在一个实施方案中,氨基己酸被羟脯氨酸代替。适当地,6-氨基己酸被羟脯氨酸代替。

[0060] 适当地,通常在细胞穿透肽中使用的人工氨基酸例如6-氨基己酸可以用β-丙氨酸、丝氨酸、脯氨酸、精氨酸和组氨酸或羟脯氨酸的任何的组合代替,适当地,β-丙氨酸、组氨酸和羟脯氨酸的任何的组合。

[0061] 在一个实施方案中,提供了一种总长为40个氨基酸残基或更短的肽,所述肽包括:

[0062] 两个或更多个阳离子结构域，每个阳离子结构域包含至少4个氨基酸残基；以及

[0063] 一个或多个疏水性结构域，每个疏水性结构域包含至少3个氨基酸残基；其中至少一个阳离子结构域包含组氨酸残基。

[0064] 适当地，其中至少一个阳离子结构域富含组氨酸。

[0065] 适当地，富含组氨酸的含义在本文中是关于阳离子结构域来限定的。

[0066] 阳离子结构域

[0067] 本发明涉及具有特定结构的短的细胞穿透肽，其中存在至少两个具有一定长度的阳离子结构域。

[0068] 本文提及的“阳离子”表示在生理pH下具有总体正电荷的氨基酸或氨基酸的结构域。

[0069] 适当地，所述肽包含多达4个阳离子结构域，多达3个阳离子结构域。

[0070] 适当地，所述肽包含2个阳离子结构域。

[0071] 如上所限定的，所述肽包含两个或更多个阳离子结构域，每个阳离子结构域具有至少4个氨基酸残基的长度。

[0072] 适当地，每个阳离子结构域的长度为4至12个氨基酸残基，适当地，长度为4至7个氨基酸残基。

[0073] 适当地，每个阳离子结构域具有4、5、6或7个氨基酸残基的长度。

[0074] 适当地，每个阳离子结构域具有相似的长度，适当地，每个阳离子结构域具有相同的长度。

[0075] 适当地，每个阳离子结构域包含阳离子氨基酸，并且还可以包含极性和/或非极性氨基酸。

[0076] 非极性氨基酸可以选自：丙氨酸、β-丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸。适当地，非极性氨基酸不具有电荷。

[0077] 极性氨基酸可以选自：丝氨酸、天冬酰胺、羟脯氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺。适当地，所选择的极性氨基酸不具有负电荷。

[0078] 阳离子氨基酸可以选自：精氨酸、组氨酸、赖氨酸。适当地，阳离子氨基酸在生理pH下具有正电荷。

[0079] 适当地，每个阳离子结构域不包含阴离子或带负电荷的氨基酸残基。

[0080] 适当地，每个阳离子结构域包含精氨酸、组氨酸、β-丙氨酸、羟脯氨酸和/或丝氨酸残基。

[0081] 适当地，每个阳离子结构域由精氨酸、组氨酸、β-丙氨酸、羟脯氨酸和/或丝氨酸残基组成。

[0082] 适当地，每个阳离子结构域包含至少40％、至少45％、至少50％的阳离子氨基酸。

[0083] 适当地，每个阳离子结构域包含大部分的阳离子氨基酸。适当地，每个阳离子结构域包含至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％的阳离子氨基酸。

[0084] 适当地，每个阳离子结构域的等电点(pI)为至少7.5、至少8.0、至少8.5、至少9.0、至少9.5、至少10.0、至少10.5、至少11.0、至少11.5、至少12.0。

[0085] 适当地，每个阳离子结构域的等电点(pI)为至少10.0。

[0086] 适当地，每个阳离子结构域的等电点(pI)为10.0至13.0。

[0087] 在一个实施方案中，每个阳离子结构域的等电点(pI)为10.4至12.5。

[0088] 适当地，可以通过本领域可用的任何适当的方法在生理pH下计算阳离子结构域的等电点。适当地，通过使用IPC(www.isoelectric.org)，由Lukasz Kozlowski,Biol Direct.2016;11:55.DOI:10.1186/s13062-016-0159-9开发的基于网络的算法。

[0089] 适当地，每个阳离子结构域包含至少1个阳离子氨基酸，适当地包含1-5个阳离子氨基酸。适当地，每个阳离子结构域包含至少2个阳离子氨基酸，适当地包含2-5个阳离子氨基酸。

[0090] 适当地，每个阳离子结构域富含精氨酸和/或富含组氨酸。适当地，阳离子结构域可包含组氨酸和精氨酸两者。

[0091] “富含精氨酸”或“富含组氨酸”是指至少40％的阳离子结构域由所述残基形成。

[0092] 适当地，每个阳离子结构域包含大部分的精氨酸和/或组氨酸残基。

[0093] 适当地，每个阳离子结构域包含至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少60％、至少65％、至少70％的精氨酸和/或组氨酸残基。

[0094] 适当地，阳离子结构域包含至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少60％、至少65％、至少70％的精氨酸残基。

[0095] 适当地，阳离子结构域包含至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少60％、至少65％、至少70％的组氨酸残基。

[0096] 适当地，阳离子结构域可包含总共1-5个组氨酸和1-5个精氨酸残基。适当地，阳离子结构域可包含1-5个精氨酸残基。适当地，阳离子结构域可包含1-5个组氨酸残基。适当地，阳离子结构域可包含总共2-5个组氨酸和3-5个精氨酸残基。适当地，阳离子结构域可包含3-5个精氨酸残基。适当地，阳离子结构域可包含2-5个组氨酸残基。

[0097] 适当地，每个阳离子结构域包含一个或多个β-丙氨酸残基。适当地，每个阳离子结构域可包含总共2-5个β-丙氨酸残基，适当地，总共2个或3个β-丙氨酸残基。

[0098] 适当地，阳离子结构域可包含一个或多个羟脯氨酸残基或丝氨酸残基。

[0099] 适当地，阳离子结构域可包含1-2个羟脯氨酸残基。适当地，阳离子结构域可包含1-2个丝氨酸残基。

[0100] 适当地，给定阳离子结构域中的所有阳离子氨基酸可以是组氨酸，或者，适当地，给定阳离子结构域中的所有阳离子氨基酸可以是精氨酸。

[0101] 适当地，所述肽可包含至少一个富含组氨酸的阳离子结构域。适当地，所述肽可包含至少一个富含精氨酸的阳离子结构域。

[0102] 合适地，所述肽可包含至少一个富含精氨酸的阳离子结构域和至少一个富含组氨酸的阳离子结构域。

[0103] 在一个实施方案中，所述肽包含两个富含精氨酸的阳离子结构域。

[0104] 在一个实施方案中，所述肽包含两个富含组氨酸的阳离子结构域。

[0105] 在一个实施方案中，所述肽包含两个富含精氨酸和组氨酸的阳离子结构域。

[0106] 在一个实施方案中，所述肽包含一个富含精氨酸的阳离子结构域和一个富含组氨酸的阳离子结构域。

[0107] 适当地，每个阳离子结构域包含不超过3个连续的精氨酸残基，适当地不超过2个

连续的精氨酸残基。

[0108] 适当地,每个阳离子结构域不包含连续的组氨酸残基。

[0109] 适当地,每个阳离子结构域包含精氨酸、组氨酸和/或β-丙氨酸残基。适当地,每个阳离子结构域包含大部分的精氨酸、组氨酸和/或β-丙氨酸残基。适当地,每个阳离子结构域中的至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、100%的氨基酸残基是精氨酸、组氨酸和/或β-丙氨酸残基。适当地,每个阳离子结构域由精氨酸、组氨酸和/或β-丙氨酸残基组成。

[0110] 在一个实施方案中,所述肽包含含有精氨酸和β-丙氨酸残基的第一阳离子结构域以及含有精氨酸和β-丙氨酸残基的第二阳离子结构域。

[0111] 在一个实施方案中,所述肽包含含有精氨酸和β-丙氨酸残基的第一阳离子结构域以及含有组氨酸、β-丙氨酸以及任选地精氨酸残基的第二阳离子结构域。

[0112] 在一个实施方案中,所述肽包含含有精氨酸和β-丙氨酸残基的第一阳离子结构域以及含有组氨酸和β-丙氨酸残基的第二阳离子结构域。

[0113] 在一个实施方案中,所述肽包含由精氨酸和β-丙氨酸残基组成的第一阳离子结构域以及由精氨酸和β-丙氨酸残基组成的第二阳离子结构域。

[0114] 在一个实施方案中,所述肽包含由精氨酸和β-丙氨酸残基组成的第一阳离子结构域以及由精氨酸、组氨酸和β-丙氨酸残基组成的第二阳离子结构域。

[0115] 适当地,所述肽包含至少两个阳离子结构域,适当地,这些阳离子结构域形成所述肽的臂。适当地,所述阳离子结构域位于所述肽的N末端和C末端。适当地,因此所述阳离子结构域可以被称为阳离子臂结构域。

[0116] 在一个实施方案中,所述肽包含两个阳离子结构域,其中一个位于所述肽的N末端,而一个位于所述肽的C末端。适当地,在所述肽的任一末端。适当地,在所述肽的N-末端和C-末端不存在其他氨基酸或结构域,除了其他基团例如末端修饰、接头和/或治疗性分子之外。为避免疑义,除本文所述和要求保护的"肽"外,还可存在这样的其他基团。适当地,因此每个阳离子结构域形成所述肽的末端。适当地,这并不妨碍如本文所述的其他的接头基团的存在。

[0117] 适当地,所述肽可以包含多达4个阳离子结构域。适当地,所述肽包含两个阳离子结构域。

[0118] 在一个实施方案中,所述肽包含两个均富含精氨酸的阳离子结构域。

[0119] 在一个实施方案中,所述肽包含一个富含精氨酸的阳离子结构域。

[0120] 在一个实施方案中,所述肽包含两个均富含精氨酸和组氨酸两者的阳离子结构域。

[0121] 在一个实施方案中,所述肽包含一个富含精氨酸的阳离子结构域和一个富含组氨酸的阳离子结构域。

[0122] 适当地,所述阳离子结构域包含选自以下的氨基酸单元:R、H、B、RR、HH、BB、RH、HR、RB、BR、HB、BH、RBR、RBB、BRR、BBR、BRB、RBH、RHB、HRB、BRH、HRR、RRH、HRH、HBB、BBH、RHR、BHB、HBH或其任意组合。

[0123] 适当地,阳离子结构域还可包括丝氨酸、脯氨酸和/或羟脯氨酸残基。适当地,所述阳离子结构域可以进一步包含选自以下的氨基酸单元:RP、PR、RPR、RRP、PRR、PRP、Hyp;R

[Hyp]R、RR[Hyp]、[Hyp]RR、[Hyp]R[Hyp]、[Hyp][Hyp]R、R[Hyp][Hyp]、SB、BS或其任意组合，或具有上面所列出的氨基酸单元的任意组合。

[0124] 适当地，每个阳离子结构域包含以下序列的任一个：RBRRBRR(SEQ ID NO:1)、RBRBR(SEQ ID NO:2)、RBRR(SEQ ID NO:3)、RBRRBR(SEQ ID NO:4)、RRBRBR(SEQ ID NO:5)、RBRRB(SEQ ID NO:6)、BRBR(SEQ ID NO:7)、RBHBH(SEQ ID NO:8)、HBHBR(SEQ ID NO:9)、RBRHBHR(SEQ ID NO:10)、RBRBBHR(SEQ ID NO:11)、RBRRBH(SEQ ID NO:12)、HBRRBR(SEQ ID NO:13)、HBHBH(SEQ ID NO:14)、BHBH(SEQ ID NO:15)、BRBSB(SEQ ID NO:16)、BRB[Hyp]B(SEQ ID NO:17)、R[Hyp]H[Hyp]HB(SEQ ID NO:18)、R[Hyp]RR[Hyp]R(SEQ ID NO:19)或其任意组合。

[0125] 适当地，每个阳离子结构域由以下序列的任一个组成：RBRRBRR(SEQ ID NO:1)、RBRBR(SEQ ID NO:2)、RBRR(SEQ ID NO:3)、RBRRBR(SEQ ID NO:4)、RRBRBR(SEQ ID NO:5)、RBRRB(SEQ ID NO:6)、BRBR(SEQ ID NO:7)、RBHBH(SEQ ID NO:8)、HBHBR(SEQ ID NO:9)、RBRHBHR(SEQ ID NO:10)、RBRBBHR(SEQ ID NO:11)、RBRRBH(SEQ ID NO:12)、HBRRBR(SEQ ID NO:13)、HBHBH(SEQ ID NO:14)、BHBH(SEQ ID NO:15)、BRBSB(SEQ ID NO:16)、BRB[Hyp]B、R[Hyp]H[Hyp]HB、R[Hyp]RR[Hyp]R(SEQ ID NO:19)或其任意组合。

[0126] 适当地，每个阳离子结构域由以下序列的一个组成：RBRRBRR(SEQ ID NO:1)、RBRBR(SEQ ID NO:2)、RBRRBR(SEQ ID NO:4)、BRBR(SEQ ID NO:7)、RBHBH(SEQ ID NO:8)、HBHBR(SEQ ID NO:9)。

[0127] 适当地，所述肽中的每个阳离子结构域可以相同或不同。适当地，所述肽中的每个阳离子结构域是不同的。

[0128] 疏水性结构域

[0129] 本发明涉及具有特定结构的短的细胞穿透肽，其中存在至少一个具有一定长度的疏水性结构域。

[0130] 本文所提及的“疏水性”表示具有排斥水的能力的或不与水混合的氨基酸或氨基酸的结构域。

[0131] 适当地，所述肽包含多达3个疏水性结构域，多达2个疏水性结构域。

[0132] 适当地，所述肽包含1个疏水性结构域。

[0133] 如上所限定的，所述肽包含两个或更多个疏水性结构域，每个疏水性结构域具有至少3个氨基酸残基的长度。

[0134] 适当地，每个疏水性结构域具有3-6个氨基酸的长度。适当地，每个疏水性结构域具有5个氨基酸的长度。

[0135] 适当地，每个疏水性结构域可包含非极性、极性和疏水性氨基酸残基。

[0136] 疏水性氨基酸残基可以选自：丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、蛋氨酸和色氨酸。

[0137] 非极性氨基酸残基可以选自：脯氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸。

[0138] 极性氨基酸残基可以选自：丝氨酸、天冬酰胺、羟脯氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺。

[0139] 适当地，所述疏水性结构域不包含亲水性氨基酸残基。

[0140] 适当地,每个疏水性结构域包含大部分疏水性氨基酸残基。适当地,每个疏水性结构域包含至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、100%的疏水性氨基酸。适当地,每个疏水性结构域由疏水性氨基酸残基组成。

[0141] 适当地,每个疏水性结构域的疏水性为至少0.3、至少0.4、至少0.5、至少0.6、至少0.7、至少0.8、至少0.8、至少1.0、至少1.1、至少1.2、至少1.3。

[0142] 适当地,每个疏水性结构域的疏水性为至少0.3,至少0.35,至少0.4,至少0.45。

[0143] 适当地,每个疏水性结构域的疏水性为至少1.2,至少1.25,至少1.3,至少1.35。

[0144] 适当地,每个疏水性结构域的疏水性为0.4至1.4。

[0145] 在一个实施方案中,每个疏水性结构域的疏水性为0.45至0.48。

[0146] 在一个实施方案中,每个疏水性结构域的疏水性为1.27至1.39。

[0147] 适当地,疏水性是如White和Wimley:W.C.Wimley和S.H.White,"Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces"Nature Struct Biol 3:842(1996)所测量的。

[0148] 适当地,每个疏水性结构域包含至少3个、至少4个疏水性氨基酸残基。

[0149] 适当地,每个疏水性结构域包含苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、色氨酸、脯氨酸和谷氨酰胺残基。适当地,每个疏水性结构域由苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、色氨酸、脯氨酸和/或谷氨酰胺残基组成。

[0150] 在一个实施方案中,每个疏水性结构域由苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸和/或谷氨酰胺残基组成。

[0151] 在一个实施方案中,每个疏水性结构域由色氨酸和/或脯氨酸残基组成。

[0152] 适当地,所述肽包含一个疏水性结构域。适当地,所述或每个疏水性结构域位于所述肽的中心。适当地,因此所述疏水性结构域可以被称为核心疏水性结构域。适当地,所述或每个疏水性核心结构域在任一侧侧接臂结构域。适当地,所述臂结构域可以包含一个或多个阳离子结构域和一个或多个其他的疏水性结构域。适当地,每个臂结构域包含阳离子结构域。

[0153] 在一个实施方案中,所述肽包含两个臂结构域,其位于疏水性核心结构域的侧翼,其中每个臂结构域包含阳离子结构域。

[0154] 在一个实施方案中,所述肽由位于疏水性核心结构域侧翼的两个阳离子臂结构域组成。

[0155] 适当地,所述或每个疏水性结构域包含以下序列的一个:YQFLI(SEQ ID NO:20)、FQILY(SEQ ID NO:21)、ILFQY(SEQ ID NO:22)、FQIY(SEQ ID NO:23)、WWW、WWPWW(SEQ ID NO:24)、WPWW(SEQ ID NO:25)、WWPW(SEQ ID NO:26)或其任意组合。

[0156] 适当地,所述或每个疏水性结构域由以下序列的一个组成:YQFLI(SEQ ID NO:20)、FQILY(SEQ ID NO:21)、ILFQY(SEQ ID NO:22)、FQIY(SEQ ID NO:23)、WWW、WWPWW(SEQ ID NO:24)、WPWW(SEQ ID NO:25)、WWPW(SEQ ID NO:26)或其任意组合。

[0157] 适当地,所述或每个疏水性结构域由以下序列的一个组成:FQILY(SEQ ID NO:21)、YQFLI(SEQ ID NO:20)、ILFQY(SEQ ID NO:22)。

[0158] 适当地,所述或每个疏水性结构域由FQILY(SEQ ID NO:21)组成。

[0159] 适当地,所述肽中的每个疏水性结构域可以具有相同的序列或不同的序列。

[0160] 肽

[0161] 本发明涉及短的细胞穿透肽，用于在医学病况的治疗中运输治疗性货物分子。

[0162] 所述肽的序列是连续的单个分子，因此所述肽的结构域是连续的。适当地，所述肽在N末端和C末端之间包含呈线性排列的几个结构域。适当地，所述结构域选自上述阳离子结构域和疏水性结构域。适当地，所述肽由阳离子结构域和疏水性结构域组成，其中所述结构域如上所限定。

[0163] 每个结构域都具有上面相关部分所述的共有序列特征，但是每个结构域的确切序列都可以进行变异和修饰。因此，每个结构域都可能有一系列序列。每个可能的结构域序列的组合产生一系列肽结构，每个肽结构形成本发明的一部分。所述肽结构的特征描述如下。

[0164] 适当地，疏水性结构域分隔任意两个阳离子结构域。适当地，每个疏水性结构域在其任一侧都侧接有阳离子结构域。

[0165] 适当地，没有阳离子结构域与另一个阳离子结构域相邻。

[0166] 在一个实施方案中，所述肽包含侧接有两个阳离子结构域的一个疏水性结构域，其呈如下排列：

[0167] [阳离子结构域]-[疏水性结构域]-[阳离子结构域]

[0168] 因此，适当地，所述疏水性结构域可以被称为核心结构域，并且每个阳离子结构域可以被称为臂结构域。适当地，所述疏水性臂结构域位于阳离子核心结构域的侧翼，在其两侧。

[0169] 在一个实施方案中，所述肽由两个阳离子结构域和一个疏水性结构域组成。

[0170] 在一个实施方案中，所述肽由侧接有两个阳离子臂结构域的一个疏水性核心结构域组成。

[0171] 在一个实施方案中，所述肽由包含选自以下的序列的一个疏水性核心结构域组成：YQFLI(SEQ ID NO:20)、FQILY(SEQ ID NO:21)、ILFQY(SEQ ID NO:22)、FQIY(SEQ ID NO:23)、WWW、WWPWW(SEQ ID NO:24)、WPWW(SEQ ID No:25)和WWPW(SEQ ID NO:26)，所述疏水性核心结构域侧接有两个阳离子臂结构域，每一个阳离子臂结构域包含选自以下的序列：RBRRBRR(SEQ ID NO:1)、RBRBR(SEQ ID NO:2)、RBRR(SEQ ID NO:3)、RBRRBR(SEQ ID NO:4)、RRBRBR(SEQ ID NO:5)、RBRRB(SEQ ID NO:6)、BRBR(SEQ ID NO:7)、RBHBH(SEQ ID NO:8)、HBHBR(SEQ ID NO:9)、RBRHBHR(SEQ ID NO:10)、RBRBBHR(SEQ ID NO:11)、RBRRBH(SEQ ID NO:12)、HBRRBR(SEQ ID NO:13)、HBHBH(SEQ ID NO:14)、BHBH(SEQ ID NO:15)、BRBSB(SEQ ID NO:16)、BRB[Hyp]B(SEQ ID NO:17)、R[Hyp]H[Hyp]HB(SEQ ID NO:18)和R[Hyp]RR[Hyp]R(SEQ ID NO:19)。

[0172] 在一个实施方案中，所述肽由包含选自以下的序列的一个疏水性核心结构域组成：FQILY(SEQ ID NO:21)、YQFLI(SEQ ID NO:20)和ILFQY(SEQ ID NO:22)，所述疏水性核心结构域侧接有两个阳离子臂结构域，所述阳离子臂结构域包含选自以下的序列：RBRRBRR(SEQ ID NO:1)、RBRBR(SEQ ID NO:2)、RBRRBR(SEQ ID NO:4)、BRBR(SEQ ID NO:7)、RBHBH(SEQ ID NO:8)、HBHBR(SEQ ID NO:9)。

[0173] 在一个实施方案中，所述肽由包含以下序列的一个疏水性核心结构域组成：FQILY(SEQ ID NO:21)，所述疏水性核心结构域侧接有两个阳离子臂结构域，所述阳离子臂结构域包含选自以下的序列：RBRRBRR(SEQ ID NO:1)、RBRBR(SEQ ID NO:2)、RBRRBR(SEQ ID

NO:4)、BRBR(SEQ ID NO:7)、RBHBH(SEQ ID NO:8)。

[0174] 在任何这样的实施方案中,可以存在其他基团,例如接头、末端修饰和/或治疗性分子。

[0175] 适当地,所述肽是N-末端修饰的。

[0176] 适当地,所述肽是N-乙酰化的、N-甲基化的、N-三氟乙酰化的、N-三氟甲基磺酰化的或N-甲基磺酰化的。适当地,所述肽是N-乙酰化的。

[0177] 任选地,所述肽的N末端可以是未修饰的。

[0178] 在一个实施方案中,所述肽是N-乙酰化的。

[0179] 适当地,所述肽是C-末端修饰的。

[0180] 适当地,所述肽包含选自以下的C末端修饰:羧基-、硫代酸-、氨基氧基-、肼基-、硫酯-、叠氮化物、张力炔烃、张力烯烃、醛-、硫醇或卤代乙酰基。

[0181] 有利地,C-末端修饰提供了用于将肽连接至治疗性分子的手段。

[0182] 因此,所述C-末端修饰可包含接头,反之亦然。适当地,所述C-末端修饰可由接头组成,反之亦然。适当的接头在本文的其他地方描述。

[0183] 适当地,所述肽包含C-末端羧基。

[0184] 适当地,所述C-末端羧基由甘氨酸或β-丙氨酸残基提供。

[0185] 在一个实施方案中,所述C-末端羧基由β-丙氨酸残基提供。

[0186] 适当地,所述C末端β-丙氨酸残基为接头。

[0187] 适当地,因此,每个阳离子结构域可进一步包含N或C末端修饰。适当地,所述阳离子结构域在C末端包含C-末端修饰。适当地,所述阳离子结构域在N末端包含N-末端修饰。适当地,所述阳离子结构域在C末端包含接头基团,适当地,所述阳离子结构域在C末端包含C末端β-丙氨酸。适当地,所述阳离子结构域在N末端是N-乙酰化的。

[0188] 本发明的肽被限定为具有40个氨基酸残基或更少的总长。因此,所述肽可以被认为是寡肽。

[0189] 适当地,所述肽的总长为3-30个氨基酸残基,适当地为5-25个氨基酸残基、10-25个氨基酸残基、13-23个氨基酸残基、15-20个氨基酸残基。

[0190] 适当地,所述肽的总长度为至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个氨基酸残基。

[0191] 适当地,所述肽能够穿透细胞。因此,所述肽可以被认为是细胞穿透肽。

[0192] 适当地,所述肽用于附接到治疗性分子。适当地,所述肽用于将治疗性分子转运到靶细胞中。适当地,所述肽用于将治疗性分子递送到靶细胞中。因此,所述肽可以被认为是载体肽。

[0193] 适当地,所述肽能够穿透进入到细胞和组织中,适当地进入到细胞的核中。适当地,进入肌肉组织中。

[0194] 适当地,所述肽可以选自以下序列的任一个:

[0195] RBRRBRRFQILYRBRBR (SEQ ID NO:27)

[0196] RBRRBRRFQILYRBRR (SEQ ID NO:28)

[0197] RBRRBRFQILYRRBRBR (SEQ ID NO:29)

[0198] RBRBRFQILYRBRRBRR (SEQ ID NO:30)

[0199] RBRRBRRYQFLIRBRBR (SEQ ID NO:31)

[0200] RBRRBRRILFQYRBRBR (SEQ ID NO:32)

[0201] RBRRBRFQILYRBRBR (SEQ ID NO:33)

[0202] RBRRBFQILYRBRRBR (SEQ ID NO:34)

[0203] RBRRBRFQILYBRBR (SEQ ID NO:35)

[0204] RBRRBFQILYRBRBR (SEQ ID NO:36)

[0205] RBRRBRRFQILYRBHBH (SEQ ID NO:37)

[0206] RBRRBRRFQILYHBHBR (SEQ ID NO:38)

[0207] RBRRBRRFQILYHBRBH (SEQ ID NO:39)

[0208] RBRRBRRYQFLIRBHBH (SEQ ID NO:40)

[0209] RBRRBRRILFQYRBHBH (SEQ ID NO:41)

[0210] RBRHBHRFQILYRBRBR (SEQ ID NO:42)

[0211] RBRBBHRFQILYRBHBH (SEQ ID NO:43)

[0212] RBRRBRFQILYRBHBH (SEQ ID NO:44)

[0213] RBRRBRFQILYHBHBH (SEQ ID NO:45)

[0214] RBRRBHFQILYRBHBH (SEQ ID NO:46)

[0215] HBRRBRFQILYRBHBH (SEQ ID NO:47)

[0216] RBRRBFQILYRBHBH (SEQ ID NO:48)

[0217] RBRRBRFQILYBHBH (SEQ ID NO:49)

[0218] RBRRBRYQFLIHBHBH (SEQ ID NO:50)

[0219] RBRRBRILFQYHBHBH (SEQ ID NO:51)

[0220] RBRRBRRFQILYHBHBH (SEQ ID NO:52)。

[0221] 适当地,所述肽可以选自以下额外的序列的任一个:

[0222] RBRRBRFQILYBRBS (SEQ ID NO:53)

[0223] RBRRBRFQILYBRB[Hyp] (SEQ ID NO:54)

[0224] RBRRBRFQILYBR[Hyp]R (SEQ ID NO:55)

[0225] RRBRRBRFQILYBRBR (SEQ ID NO:56)

[0226] BRRBRRFQILYBRBR (SEQ ID NO:57)

[0227] RBRRBRWWWBRBR (SEQ ID NO:58)

[0228] RBRRBRWWPWWBRBR (SEQ ID NO:59)

[0229] RBRRBRWPWWBRBR (SEQ ID NO:60)

[0230] RBRRBRWWPWBRBR (SEQ ID NO:61)

[0231] RBRRBRRWWWRBRBR (SEQ ID NO:62)

[0232] RBRRBRRWWPWWRBRBR (SEQ ID NO:63)

[0233] RBRRBRRWPWWRBRBR (SEQ ID NO:64)

[0234] RBRRBRRWWPWRBRBR (SEQ ID NO:65)

[0235] RBRRBRRFQILYBRBR (SEQ ID NO:66)

[0236] RBRRBRRFQILYRBR (SEQ ID NO:67)

[0237] BRBRBWWPWWRBRRBR (SEQ ID NO:68)

[0238] RBRRBRRFQILYBHBH (SEQ ID NO:69)

[0239] RBRRBRRFQIYRBHBH (SEQ ID NO:70)

[0240] RBRRBRFQILYBRBH (SEQ ID NO:71)

[0241] RBRRBRFQILYR[Hyp]H[Hyp]H (SEQ ID NO:72)

[0242] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYRBHBH (SEQ ID NO:73)

[0243] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYR[Hyp]H[Hyp]H (SEQ ID NO:74)

[0244] RBRRBRWWWRBHBH (SEQ ID NO:75)

[0245] RBRRBRWWPRBHBH (SEQ ID NO:76)

[0246] RBRRBRPWWRBHBH (SEQ ID NO:77)

[0247] RBRRBRWWPWWRBHBH (SEQ ID NO:78)

[0248] RBRRBRWWPWRBHBH (SEQ ID NO:79)

[0249] RBRRBRWPWWRBHBH (SEQ ID NO:80)

[0250] RBRRBRRWWWRBHBH (SEQ ID NO:81)

[0251] RBRRBRRWWPWWRBHBH (SEQ ID NO:82)

[0252] RBRRBRRWPWWRBHBH (SEQ ID NO:83)

[0253] RBRRBRRWWPWRBHBH (SEQ ID NO:84)

[0254] RRBRRBRFQILYRBHBH (SEQ ID NO:85)

[0255] BRRBRRFQILYRBHBH (SEQ ID NO:86)

[0256] RRBRRBRFQILYBHBH (SEQ ID NO:87)

[0257] BRRBRRFQILYBHBH (SEQ ID NO:88)

[0258] RBRRBHRFQILYRBHBH (SEQ ID NO:89)

[0259] RBRRBRFQILY[Hyp]R[Hyp]R (SEQ ID NO:101)

[0260] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYBRBR (SEQ ID NO:102)

[0261] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILY[Hyp]R[Hyp]R (SEQ ID NO:103)

[0262] RBRRBRWWWBRBR (SEQ ID NO:104)

[0263] RBRRBRWWPWWBRBR (SEQ ID NO:105)。

[0264] 适当地,所述肽由以下序列之一组成:

[0265] RBRRBRRFQILYRBRBR (SEQ ID NO:27)

[0266] RBRRBRRYQFLIRBRBR (SEQ ID NO:31)

[0267] RBRRBRRILFQYRBRBR (SEQ ID NO:32)

[0268] RBRRBRFQILYBRBR (SEQ ID NO:35)

[0269] RBRRBRRFQILYRBHBH (SEQ ID NO:37)

[0270] RBRRBRRFQILYHBHBR (SEQ ID NO:38)

[0271] RBRRBRFQILYRBHBH (SEQ ID NO:44)。

[0272] 在一个实施方案中,所述肽由以下序列组成:RBRRBRFQILYBRBR(SEQ ID NO:35)。

[0273] 在一个实施方案中,所述肽由以下序列组成:RBRRBRRFQILYRBHBH(SEQ ID NO:37)。

[0274] 在一个实施方案中,所述肽由以下序列组成:RBRRBRFQILYRBHBH(SEQ ID NO:44)。

[0275] 缀合物

[0276] 本发明的肽可以与治疗性分子共价连接以提供缀合物。

[0277] 所述治疗性分子可以是用于治疗疾病的任何分子。所述治疗性分子可以选自:核酸、肽核酸、反义寡核苷酸(例如PNA、PMO)、mRNA、gRNA(例如,在使用CRISPR/Cas9技术时)、短干扰RNA、微小RNA、antagomiRNA、肽、环肽、蛋白质、药品、药物或纳米颗粒。

[0278] 在一个实施方案中,所述治疗性分子是反义寡核苷酸。

[0279] 合适地,所述反义寡核苷酸由磷酰二胺吗啉代寡核苷酸(PMO)组成。

[0280] 或者,所述寡核苷酸可以是修饰的PMO或任何其他电荷中性的寡核苷酸,例如肽核酸(PNA)、化学修饰的PNA如γ-PNA(Bahal,Nat.Comm.2016)、寡核苷酸氨基磷酸酯(其中磷酸根的非桥接氧被胺或烷基胺取代)如WO2016028187A1中所述的那些,或任何其他部分或完全电荷中和的寡核苷酸。

[0281] 所述治疗性反义寡核苷酸序列可以选自任何可用的序列,例如,用于DMD中外显子跳跃的反义寡核苷酸,描述于https://research-repository.uwa.edu.au/en/publications/antisense-oligonucleotide-induced-exon-skipping-across-the-human,或用于治疗SMA的与ISSN1或IN7序列互补的治疗性反义寡核苷酸,描述于Zhou,HGT,2013;以及Hammond等人,2016;以及Osman等人,HMG,2014。

[0282] 适当地,所述反义寡核苷酸序列用于诱导外显子跳跃以用于DMD的治疗。

[0283] 适当地,所述反义寡核苷酸序列用于诱导肌营养不良蛋白基因中的外显子跳跃以用于DMD的治疗。适当地,所述反义寡核苷酸序列可以诱导一个或多个外显子的外显子跳跃。

[0284] 在一个实施方案中,所述反义寡核苷酸序列用于诱导肌营养不良蛋白基因的单个外显子的外显子跳跃以用于DMD的治疗。适当地,所述单个外显子选自与DMD有关的任何外显子,其可以是肌营养不良蛋白基因中的任何外显子,例如外显子45、51或53。可以购买任何序列的PMO寡核苷酸(例如,购自Gene Tools Inc.美国)。

[0285] 在一个实施方案中,所述缀合物的治疗性分子是与基因靶标的前mRNA互补的寡核苷酸。

[0286] 适当地,与基因靶标的前mRNA互补的寡核苷酸引起空间阻塞事件,其改变了前mRNA,从而导致了改变的mRNA,并因此导致了改变了序列的蛋白质。适当地,所述基因靶标是肌营养不良蛋白基因。适当地,所述空间阻塞事件可以是外显子保留(exon inclusion)或外显子跳跃。在一个实施方案中,所述空间阻塞事件是外显子跳跃,适当地是肌营养不良蛋白基因的单个外显子的外显子跳跃。

[0287] 任选地,可在附接至肽之前将赖氨酸残基添加至治疗性分子(例如PMO或PNA)的一端或两端以改善水溶性。

[0288] 适当地,所述治疗性分子的分子量小于5000Da,适当地小于3000Da或适当地小于1000Da。

[0289] 适当地,所述肽在C末端共价连接至所述治疗性分子。

[0290] 适当地,如果需要,所述肽通过接头共价连接至所述治疗性分子。所述接头可以充当间隔子以将所述肽序列与所述治疗性分子分开。

[0291] 所述接头可以选自任何合适的序列。

[0292] 适当地,所述接头存在于肽和治疗性分子之间。适当地,所述接头是肽和治疗性分

子的间隔基团。因此,所述接头可以包含人工氨基酸。

[0293] 在一个实施方案中,所述缀合物包含通过接头共价连接至治疗性分子的肽。在一个实施方案中,所述缀合物包含以下结构:

[0294] [肽]-[接头]-[治疗性分子]。

[0295] 在一个实施方案中,所述缀合物由以下结构组成:

[0296] [肽]-[接头]-[治疗性分子]。

[0297] 适当地,本文列出的任何肽均可用于根据本发明的缀合物。在一个实施方案中,所述缀合物包含选自以下序列之一的肽:RBRRBRFQILYBRBR(SEQ ID NO:35)、RBRRBRRFQILYRBHBH(SEQ ID NO:37)和RBRRBRFQILYRBHBH(SEQ ID NO:44)。

[0298] 适当地,在任何情况下,所述肽可进一步包含如上所述的N-末端修饰。

[0299] 适当的接头包括,例如,C末端半胱氨酸残基,其可形成二硫化物、硫醚或硫醇-马来酰亚胺连接;包括C-末端醛,以形成肟,与肽上的碱性氨基酸或肽上的羧酸部分发生点击反应或形成吗啉代连接,所述肽共价缀合至氨基以形成羧酰胺连接。

[0300] 适当地,所述接头的长度为1-5个氨基酸。适当地,所述接头可以包括本领域已知的任何接头。

[0301] 适当地,所述接头选自以下序列的任一个:G、BC、XC、C、GGC、BBC、BXC、XBC、X、XX、B、BB、BX和XB。适当地,其中X是6-氨基己酸。

[0302] 适当地,所述接头可以是聚合物,例如PEG。

[0303] 在一个实施方案中,所述接头是β-丙氨酸。

[0304] 在一个实施方案中,所述肽通过羧酰胺键与治疗性分子缀合。

[0305] 所述缀合物的接头可以形成所述肽所附接的治疗性分子的一部分。或者,所述治疗性分子附接物可以直接连接至肽的C末端。适当地,在这样的实施方案中,不需要接头。

[0306] 或者,可以将肽化学缀合至治疗性分子。化学连接可以通过例如二硫化物、烯基、炔基、芳基、醚、硫醚、三唑、酰胺、羧酰胺、脲、硫脲、氨基脲、卡巴肼、肼、肟、磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯、亚氨基磷酸酯或硫醇-马来酰亚胺连接。

[0307] 任选地,可以在治疗性分子的N-末端添加半胱氨酸以允许与肽形成二硫键,或者可以对N-末端进行溴乙酰化以将硫醚缀合至肽。

[0308] 本发明的肽同样可以与成像分子共价连接以提供缀合物。

[0309] 适当地,所述成像分子可以是能够使缀合物可视化的任何分子。适当地,所述成像分子可以指示缀合物的位置。适当地,所述缀合物在体外或体内的位置。适当地,提供了一种监测包含成像分子的缀合物的位置的方法,所述方法包括:将所述缀合物施用于受试者并且对所述受试者进行成像以定位所述缀合物。

[0310] 所述成像分子的实例包括检测分子、对比分子(contrast molecule)或增强分子。适当的成像分子可以选自放射性核素;荧光团;纳米颗粒(例如纳米壳);纳米笼;发色剂(例如酶)、放射性同位素、染料、不透射线的材料、荧光化合物及其组合。

[0311] 适当地,使用成像技术使所述成像分子可视化,所述成像技术可以是细胞成像技术或医学成像技术。适当的细胞成像技术包括例如成像细胞术、荧光显微镜、相差显微镜、SEM、TEM。适当的医学成像技术包括例如X射线、荧光检查、MRI、闪烁扫描术、SPECT、PET、CT、CAT、FNRI。

[0312] 在某些情况下，所述成像分子可被视为诊断分子。适当地，诊断分子能够使用所述缀合物诊断疾病。适当地，可以通过使用成像分子确定所述缀合物的位置来实现疾病的诊断。适当地，提供了一种诊断疾病的方法，所述方法包括将有效量的包含成像分子的缀合物施用于受试者并监测所述缀合物的位置。

[0313] 适当地，诸如包含成像分子的缀合物的连接之类的更多细节与以上所描述的关于包含治疗性分子的缀合物的那些相同。

[0314] 适当地，本发明的肽可以与治疗性分子和成像分子共价连接以提供缀合物。

[0315] 适当地，所述缀合物能够穿透进入到细胞和组织中，适当地进入到细胞的核中。适当地，进入肌肉组织中。

[0316] 药物组合物

[0317] 本发明的缀合物可以配制成药物组合物。

[0318] 适当地，所述药物组合物包含本发明的缀合物。

[0319] 适当地，所述药物组合物可以进一步包含药学上可接受的稀释剂、佐剂或载体。

[0320] 适当的药学上可接受的稀释剂、佐剂和载体是本领域众所周知的。

[0321] 如本文所用，短语“药学上可接受的”是指那些配体、材料、配方和/或剂型，其在合理的医疗判断范围内，适用于与人类和动物的组织接触，而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症，符合合理的收益/风险比。

[0322] 如本文所用，短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、配方或媒介物，如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料，其涉及将所述缀合物从身体的一个器官或部位携带或运输到身体的另一个器官或部位。在与所述组合物的其他组分(例如肽和治疗性分子)相容的意义上来说，每个细胞穿透肽必须是“可接受的”，并且对个体无害。可以重构和施用的冻干组合物也在本发明组合物的范围内。

[0323] 药学上可接受的载体可以是例如赋形剂、媒介物、稀释剂及其组合。例如，当将所述组合物口服施用时，它们可以被配制成片剂、胶囊剂、颗粒剂、粉末剂或糖浆剂；或者用于肠胃外施用时，它们可以被配制成注射剂、滴注制剂或栓剂。这些组合物可以通过常规方法制备，并且如果需要，可以将活性化合物(即缀合物)与任何常规添加剂混合，例如赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂、增溶剂、助悬剂、乳化剂、包衣剂或其组合。

[0324] 应当理解，本公开的药物组合物可以进一步包括其他已知的治疗剂、药物，将化合物修饰成前药等，用于在医学用途下减轻、调停、预防和治疗本文所述的疾病、病症和病况。

[0325] 适当地，所述药物组合物用作药物。适当地，以与本文对于缀合物所述相同的方式，用作药物。本文所述的与使用缀合物的医学治疗有关的所有特征均适用于所述药物组合物。

[0326] 因此，在本发明的另一方面，提供了根据第四方面的药物组合物，用于用作药物。在另一方面，提供了一种治疗受试者的疾病状况的方法，其包括向所述受试者施用有效量的根据第四方面的药物组合物。

[0327] 医学用途

[0328] 包含本发明的肽的缀合物可以被用作用于治疗疾病的药物。

[0329] 所述药物可以是如上限定的药物组合物的形式。

[0330] 还提供了治疗需要治疗疾病状况的患者或受试者的方法，所述方法包括向所述患

者或受试者施用治疗有效量的所述缀合物的步骤。

[0331] 适当地，医学治疗需要将所述治疗性分子递送到细胞中，适当地递送到细胞的核中。

[0332] 待治疗的疾病可以包括任何疾病，其中由治疗性分子对细胞和/或核膜的穿透性改善可以导致治疗效果改善。

[0333] 适当地，所述缀合物用于治疗神经肌肉系统的疾病。

[0334] 包含本发明的肽的缀合物适用于治疗神经肌肉系统的遗传疾病。包含本发明的肽的缀合物适用于治疗神经肌肉遗传疾病。在适当的实施方案中，提供了根据第二方面的缀合物，用于治疗神经肌肉系统的遗传疾病。适当地，所述缀合物用于治疗遗传性遗传疾病。适当地，所述缀合物用于治疗神经肌肉系统的遗传性遗传疾病。适当地，所述缀合物用于治疗遗传性神经肌肉遗传疾病。适当地，所述缀合物用于治疗神经肌肉系统的遗传性X连锁遗传疾病。适当地，所述缀合物用于治疗遗传性X连锁神经肌肉疾病。

[0335] 适当地，所述缀合物用于治疗由剪接缺陷引起的疾病。在这样的实施方案中，所述治疗性分子可以包含能够预防或纠正剪接缺陷和/或增加正确剪接的mRNA分子的产生的寡核苷酸。

[0336] 适当地，所述缀合物用于治疗以下疾病的任一种：杜氏肌营养不良症(DMD)、Bucher肌营养不良症(BMD)、Menkes病、β地中海贫血、痴呆、帕金森氏病、脊髓性肌萎缩症(SMA)、强直性肌营养不良症(DM)、亨廷顿舞蹈症、Hutchinson-Gilford早衰症、共济失调毛细血管扩张症或癌症。

[0337] 在一个实施方案中，所述缀合物用于治疗DMD。

[0338] 在一个实施方案中，提供了根据第二方面的缀合物，用于治疗DMD。适当地，在这样的实施方案中，所述缀合物的治疗性分子可用于增加肌营养不良蛋白的表达。适当地，在这样的实施方案中，所述缀合物的治疗性分子可用于增加功能性肌营养不良蛋白的表达。

[0339] 适当地，所述缀合物将肌营养不良蛋白表达增加10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％。适当地，所述缀合物将肌营养不良蛋白表达增加多达50％。

[0340] 适当地，所述缀合物将肌营养不良蛋白表达恢复10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％。适当地，所述缀合物将肌营养不良蛋白表达恢复多达50％。

[0341] 适当地，所述缀合物将肌营养不良蛋白功能恢复10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％。适当地，所述缀合物将肌营养不良蛋白功能恢复多达50％。

[0342] 适当地，所述缀合物的治疗性分子可通过在肌营养不良蛋白转录期间引起一个或多个外显子的跳跃来实现此目的。

[0343] 适当地，所述缀合物的治疗性分子引起10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％的肌营养不良蛋白基因的一个或多个外显子的跳跃。适当地，所述缀合物的治疗性分子引起多达50％的肌营养不良蛋白基因的一个或多个外显子的跳跃。

[0344] 适当地，待治疗的患者或受试者可以是任何动物或人类。适当地，所述患者或受试

者可以是非人类哺乳动物。适当地，所述患者或受试者可以是男性或女性。在一个实施方案中，所述受试者是男性。

[0345] 适当地，待治疗的患者或受试者可以是任何年龄。适当地，待治疗的患者或受试者的年龄为0-40岁，适当地为0-30岁，适当地为0-25岁，适当地为0-20岁。

[0346] 适当地，所述缀合物用于全身性施用于受试者，例如，通过髓内、鞘内、心室内、玻璃体内、肠内、肠胃外、静脉内、动脉内、肌内、肿瘤内、皮下、口服或经鼻途径。

[0347] 在一个实施方案中，所述缀合物用于静脉内施用于受试者。

[0348] 在一个实施方案中，所述缀合物用于通过注射静脉内施用于受试者。

[0349] 适当地，所述缀合物以“治疗有效量”施用于受试者，对于此这是指该量足以显示出对个体的益处。实际施用的量以及施用的速率和时间过程将取决于所治疗疾病的性质和严重性。对剂量的决定在全科医生和其他医生的责任范围内。技术和方案的示例可以在Remington’s Pharmaceutical Sciences，20th Edition，2000，pub.Lippincott，Williams&Wilkins中找到。

[0350] 示例性剂量可以为0.01mg/kg-50mg/kg、0.05mg/kg-40mg/kg、0.1mg/kg-30mg/kg、0.5mg/kg-18mg/kg、1mg/kg-16mg/kg、2mg/kg-15mg/kg、5mg/kg-10mg/kg、10mg/kg-20mg/kg、12mg/kg-18mg/kg、13mg/kg-17mg/kg。

[0351] 有利地，本发明的缀合物的剂量比由单独施用治疗性分子起效所需的剂量低一个级别或数量级。

[0352] 适当地，在施用本发明的缀合物之后，与使用当前可获得的肽载体的现有缀合物相比，一种或多种毒性标志物显著降低。

[0353] 适当的毒性标志物可以是肾毒性标志物。

[0354] 适当的毒性标志物包括KIM-1、NGAL、BUN、肌酐、碱性磷酸酶、丙氨酸转移酶和天冬氨酸转氨酶。

[0355] 适当地，当与使用当前可获得的肽载体的现有缀合物相比时，在施用本发明的缀合物之后，KIM-1、NGAL和BUN中至少一种的水平降低了。

[0356] 适当地，当与使用当前可获得的肽载体的现有缀合物相比时，在施用本发明的缀合物之后，KIM-1、NGAL和BUN的每一种的水平降低了。

[0357] 适当地，当与使用当前可获得的肽载体的现有缀合物相比时，所述或每个标志物的水平显著降低。

[0358] 适当地，当与使用当前可获得的肽载体的现有缀合物相比时，在施用本发明的缀合物之后，所述或每个标志物的水平降低了多达5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％。

[0359] 有利地，与现有的细胞穿透肽和缀合物相比，所述肽的毒性以及因此得到的缀合物的毒性显著降低。特别地，KIM-1和NGAL-1是毒性的标志物，与使用当前可获得的肽载体的现有缀合物相比，它们显著降低了多达120倍。

[0360] 核酸和宿主

[0361] 本发明的肽可以通过任何标准的蛋白质合成方法(例如化学合成、半化学合成)或通过使用表达系统来制备。

[0362] 因此，本发明还涉及包含编码所述肽的DNA或由其组成的核苷酸序列、表达系统

(例如包含所述序列以及表达和控制表达所需序列的载体)以及由所述表达系统转化的宿主细胞和宿主生物体。

[0363] 因此,还提供了编码根据本发明的肽的核酸。

[0364] 适当地,所述核酸可以分离或纯化的形式提供。

[0365] 还提供了包含编码根据本发明的肽的核酸的表达载体。

[0366] 适当地,所述载体是质粒。

[0367] 适当地,所述载体包含调节序列(例如启动子),其可操作地连接至编码根据本发明的肽的核酸。适当地,当转染到合适的细胞(例如哺乳动物、细菌或真菌细胞)中时,所述表达载体能够表达所述肽。

[0368] 还提供了包含本发明的表达载体的宿主细胞。

[0369] 可以根据可将本发明的核酸插入其中的宿主细胞,来选择表达载体。宿主细胞的这种转化涉及常规技术,例如Sambrook等人[Sambrook,J.,Russell,D.(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY,USA]中教导的技术。选择合适的载体在本领域技术人员的能力范围内。合适的载体包括质粒、噬菌体、粘粒和病毒。

[0370] 产生的肽可以通过任何适当的方法从宿主细胞中分离和纯化,所述方法例如沉淀或色谱分离,所述色谱例如亲和色谱。

[0371] 适当的载体、宿主和重组技术是本领域众所周知的。

[0372] 在本说明书中,术语“可操作地连接”可以包括这样的情况,其中所选择的核苷酸序列和调节性核苷酸序列以使核苷酸编码序列的表达处于调节序列的控制之下的方式共价连接,这样,所述调节序列能够影响形成部分或全部所选核苷酸序列的核苷酸编码序列的转录。然后,在适当情况下,可以将所得的转录物翻译成所需的肽。

附图说明

[0373] 现在将参考以下附图和表格描述本发明的某些实施方案,其中:

[0374] 图1:显示了,如通过巢式RT-PCR的光密度法分析所测量的,在H2K-mdx细胞中以0.25μM、0.5μM和1μM与反义治疗性PMO缀合的DPEP1系列某些肽的体外外显子23跳跃功效(误差条:标准偏差,n≥3)。

[0375] 图2:显示了,如通过巢式RT-PCR的光密度法分析所测量的,在H2K-mdx细胞中以0.25μM、0.5μM和1μM与反义治疗性PMO缀合的DPEP3系列某些肽的体外外显子23跳跃功效(误差条:标准偏差,n≥3)。

[0376] 图3显示了,如通过western印迹和qRT-PCR测量的,在将单次10mg/kg静脉注射剂量注射到mdx小鼠中后,与反义治疗性PMO缀合的DPEP1系列某些肽在(A)胫骨前肌、(B)膈肌和(C)心脏肌肉中的体内功效(误差条:标准偏差,n=3)。

[0377] 图4显示了,如通过western印迹和qRT-PCR测量的,在将单次10mg/kg静脉注射剂量注射到mdx小鼠中后,与反义治疗性PMO缀合的DPEP3系列某些肽在(A)胫骨前肌、(B)膈肌和(C)心脏肌肉中的体内功效(误差条:标准偏差,n=3)。

[0378] 图5显示了,在施用单剂量30mg/kg的与反义治疗性PMO缀合的各种DPEP肽后2天和7天,在C57BL/6小鼠的尿液中测得的相对KIM-1水平,将其与施用目前可获得的、与相同的

反义治疗性PMO缀合的肽载体的和施用盐水的进行比较(误差条:标准偏差,n=6)。

[0379] 图6显示了,在施用单剂量30mg/kg的与反义治疗性PMO缀合的各种DPEP肽后2天和7天,在C57BL/6小鼠的尿液中测得的相对NGAL水平,将其与施用目前可获得的、与相同的反义治疗性PMO缀合的肽载体的和施用盐水的进行比较(误差条:标准偏差,n=6)。

[0380] 图7显示了,在施用单剂量30mg/kg的与反义治疗性PMO缀合的各种DPEP肽后7天,在C57BL/6小鼠中测得的BUN血清水平,将其与施用目前可获得的、与相同的反义治疗性PMO缀合的肽载体的和施用盐水的进行比较(误差条:标准偏差,n=6)。

[0381] 图8显示了,在施用单剂量30mg/kg的与反义治疗性PMO缀合的各种DPEP肽后7天,在C57BL/6小鼠中测得的肌酐血清水平,将其与施用目前可获得的、与相同的反义治疗性PMO缀合的肽载体的和施用盐水的进行比较(误差条:标准偏差,n=6)。

[0382] 图9显示了,在施用单剂量30mg/kg的与反义治疗性PMO缀合的各种DPEP肽后7天,在C57BL/6小鼠中测得的(A)丙氨酸转移酶、(B)碱性磷酸酶和(C)天冬氨酸转氨酶血清水平,将其与施用目前可获得的、与相同的反义治疗性PMO缀合的肽载体的和施用盐水的进行比较(误差条:标准偏差,n=6)。

[0383] 图10显示了,在静脉内施用单次30mg/kg的与反义治疗性PMO缀合的各种DPEP肽后,在C57BL/6小鼠的(A)胫骨前肌、(B)膈肌和(C)心脏中通过qRT-PCR评估的外显子23跳跃的体内功效,将其与施用目前可获得的、与相同的反义治疗性PMO缀合的肽载体的和施用盐水的进行比较。

[0384] 图11A和B:在对8-10周龄的C57BL6小鼠(n=4-6)单剂量施用2.5-50mg/kg之间的不同剂量的肽-PMO后的第2天或第7天,评估尿KIM-1水平,将其与施用目前可获得的、与相同的反义治疗性PMO缀合的肽载体的进行比较。通过ELISA确定KIM-1水平,并将其相对于尿肌酐水平归一化。数据表示为相对于注射盐水的小鼠对照KIM-1水平(n=10)的倍数变化。

[0385] 图12:在对8-10周龄的C57BL6小鼠(n=3-6)单剂量施用2.5-50mg/kg之间的递增剂量的肽-PMO后,进行肽-PMO的体内外显子跳跃功效的剂量-反应比较研究,将其与施用目前可获得的、与相同的反义治疗性PMO缀合的肽载体的进行比较。施用后7天,在(A)胫骨前肌、(B)膈肌和(C)心脏中评估外显子23排除的qPCR分析。

[0386] 图13:显示了,不同的DPEP1/3-$[CAG]_7$PMO缀合物在不同浓度下、在来自DM1患者的DM1患者成肌细胞中,体外纠正了Mbnl1转录物的剪接缺陷,其中在DMPK基因中有2600个重复(n=1-3);

[0387] 图14:显示了,不同的DPEP1/3-$[CAG]_7$PMO缀合物在不同浓度下、在来自DM1患者的DM1患者成肌细胞中,体外纠正了DMD转录物的剪接缺陷,其中在DMPK基因中有2600个重复(误差条:平均值±SEM,n=1-3);

[0388] 图15:显示了,在C57BL6雌性小鼠中注射不同DPEP1/3-$[CAG]_7$PMO缀合物后第2天和第7天的尿中评估的相对KIM-1水平,这是用稀释至适合标准曲线的样品通过ELISA测量的。将值相对于尿肌酐水平归一化,以计算尿蛋白浓度。与现有的Pip系列肽载体诱导的倍数增加相比,KIM-1水平与盐水对照注射液的相似(误差条:平均值±SEM,n=4-10)。

[0389] 图16:显示了,在C57BL6雌性小鼠中注射不同DPEP1/3-$[CAG]_7$PMO缀合物后第2天和第7天的尿中测量的相对NGAL水平,这是用稀释至适合标准曲线的样品通过ELISA测量的。将值相对于尿肌酐水平归一化,以计算尿蛋白浓度。与现有的Pip系列肽载体诱导的倍

数增加相比，NGAL水平与盐水对照注射液的相似(误差条：平均值±SEM，n＝4-10)。

[0390] 图17：显示了，与盐水相比，在C57BL6雌性小鼠中注射不同DPEP1/3-$[CAG]_7$PMO缀合物后第7天的血清中评估的BUN水平。与现有的Pip系列肽载体诱导的倍数增加相比，BUN水平与盐水对照注射液的相似(误差条：平均值±SEM，n＝4-10)。

[0391] 图18：显示了，与盐水相比，在C57BL6雌性小鼠中注射不同DPEP1/3-$[CAG]_7$PMO缀合物后第7天的血清中评估的肌酐水平。与现有的Pip系列肽载体诱导的倍数增加相比，肌酐水平与盐水对照注射液的相似(误差条：平均值±SEM，n＝4-10)。

[0392] 图19：显示了在通过推注IV(尾静脉)注射施用了不同的DPEP1/3-$[CAG]_7$PMO缀合物的C57BL6雌性小鼠的血清中评估的(A)丙氨酸转移酶(ALT)、(B)碱性磷酸酶(ALP)和(C)天冬氨酸转氨酶(AST)的水平，在注射后7天采集血清，并将其与注射盐水的进行比较。与现有的Pip系列肽载体诱导的倍数增加相比，ALP、ALT、AST水平与盐水对照注射液的相似。

[0393] 在本说明书的整个描述和权利要求书中，词语“包括”和“包含”及其变体表示“包括但不限于”，并且它们并不旨在(并且不)排除其他部分、添加剂、组分、整数或步骤。在本说明书的整个描述和权利要求书中，单数形式包括复数形式，除非上下文另有要求。特别地，在使用不定冠词的地方，本发明应被理解为既包含复数也包含单数，除非上下文有其他要求。

[0394] 结合本发明的特定方面、实施方案或实施例描述的特征、整数、特性、化合物、化学部分或基团应理解为适用于本文所述的任何其他方面、实施方案或实施例，除非与其不相容。本说明书中公开的所有特征(包括任何随附的权利要求书、摘要和附图)和/或如此公开的任何方法或过程的所有步骤可以任意组合进行组合，除了这些特征和/或步骤中的至少一些是互斥的组合之外。

[0395] 本发明不限于任何前述实施方案的细节。本发明扩展到本说明书(包括任何所附权利要求、摘要和附图)中公开的特征的任何新颖的一个或任何新颖的组合，或者扩展到如此公开的任何方法或过程的步骤的任何新颖的一个或任何新颖的组合。读者应注意与本申请相关的与本说明书同时提交或在本说明书之前提交的所有论文和文献，这些论文和文献与本说明书一起公开供公众查阅，并且所有这些论文和文献的内容通过引用并入本文。

[0396] 实施例

[0397] 1.材料和方法

[0398] 1.1 P-PMO的合成与制备

[0399] 9-芴基甲氧羰基(Fmoc)保护的L-氨基酸、苯并三唑-1-基-氧基-三吡咯烷基磷(PyBOP)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)以及Fmoc-β-Ala-OH预装王氏树脂(0.19或0.46mmol g^{-1})从Merck(Hohenbrunn，德国)获得。HPLC级乙腈、甲醇和合成级N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)购自Fisher Scientific(Loughborough，英国)。肽合成级N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和乙醚是从VWR(Leicestershire，英国)获得的。哌啶和三氟乙酸(TFA)从Alfa Aesar(Heysham，英国)获得。PMO购自Gene Tools Inc.(Philomath，美国)。鸡胚提取物和马血清获自Sera Laboratories International Ltd(West Sussex，英国)。干扰素购自Roche Applied Science(Penzberg，德国)。除非另有说明，所有其他试剂均获自Sigma-Aldrich(St.Louis，MO，美国)。使用Voyager DE Pro BioSpectrometry工作站，进行MALDI-TOF质谱分析。将在50％乙腈水溶液中的10mg mL^{-1}的α-氰基-4-羟基肉桂酸或芥子

酸储液用作基质。误差条为±0.1%。

[0400] 1.2用于在H2k mdx细胞中筛选的P-PMO肽的合成

[0401] a)制备肽变体文库

[0402] 通过应用标准Fmoc化学方法并遵循制造商的建议，使用Fmoc-β-Ala-OH预装的王氏树脂(0.19或0.46mmol g^{-1}，Merck Millipore)，使用Intavis平行肽合成仪以10μmol规模制备肽，或使用CEM Liberty Blue™肽合成仪(Buckingham，英国)以100μmol规模制备肽。在使用Intavis平行肽合成仪进行合成的情况下，将双偶联步骤与PyBOP/NMM偶联混合物一起使用，然后在每个步骤之后进行乙酸酐封端。对于使用CEM Liberty Blue肽合成仪进行的合成，所有氨基酸(精氨酸除外，它是通过双偶联进行的)均采用单一标准偶联。所述偶联进行一次，其是在60瓦微波功率下于75℃保持5分钟进行的；精氨酸残基除外，其每个被偶联两次。每个去保护反应在75℃进行两次，一次30秒，然后3分钟，在35瓦微波功率下进行。一旦合成完成，将树脂用DMF(3x50mL)洗涤，并将固相结合肽的N末端在室温下在DIPEA存在下用乙酸酐乙酰化。N末端乙酰化后，将肽树脂用DMF(3x20mL)和DCM(3x20mL)洗涤。通过在室温下用分离混合物(a cleavage cocktail)处理3小时，将所述肽与固体支持物分离，所述分离混合物由以下组成：三氟乙酸(TFA)：H_2O：三异丙基硅烷(TIPS)(95%：2.5%：2.5%：3-10mL)。肽释放后，将过量的TFA通过用氮气吹扫除去。粗制的肽通过加入冷乙醚(15-40mL，取决于合成规模)沉淀，并以3200rpm离心5分钟。将粗制的肽沉淀物用冷乙醚(3×15mL)洗涤三次，并使用Varian 940-LC HPLC系统通过RP-HPLC纯化，所述Varian 940-LC HPLC系统配备445-LC放大模块和440-LC级分收集器。通过半制备型HPLC在RP-C18色谱柱(10x250mm，Phenomenex Jupiter)上纯化肽，使用线性梯度的在0.1%TFA/H_2O中的CH_3CN，流速为15mL min^{-1}。在220nm和260nm处进行检测。合并含有所需肽的级分并冻干，得到呈白色固体的肽。

[0403]

肽的编号	序列 ID号，合并的	测试序列（具有额外的C和N末端修饰）
D-PEP 1.1	27	Ac-RBRRBRRFOILYRBRBR-B
D-PEP 1.2	28	Ac-RBRRBRRFOILYRBRR-B
D-PEP 1.3	29	Ac-RBRRBRFOILYRRBRBR-B
D-PEP 1.4	30	Ac-RBRBRFOILYRBRRBRR-B
D-PEP 1.5	31	Ac-RBRRBRRYOFLIRBRBR-B
D-PEP 1.6	32	Ac-RBRRBRRILFOYRBRBR-B
D-PEP 1.7	33	Ac-RBRRBRFOILYRBRBR-B
D-PEP 1.8	34	Ac-RBRRBFOILYRBRRBR-B
D-PEP 1.9	35	Ac-RBRRBRFOILYBRBR-B
D-PEP 1.10	36	Ac-RBRRBFOILYRBRBR-B
D-PEP 3.1	37	Ac-RBRRBRRFOILYRBHBH-B
D-PEP 3.2	38	Ac-RBRRBRRFOILYHBHBR-B
D-PEP 3.3	39	Ac-RBRRBRRFOILYHBRBH-B
D-PEP 3.4	40	Ac-RBRRBRRYOFLIRBHBH-B
D-PEP 3.5	41	Ac-RBRRBRRILFOYRBHBH-B
D-PEP 3.6	42	Ac-RBRHBHRFOILYRBRBR-B
D-PEP 3.7	43	Ac-RBRBBHRFOILYRBHBH-B
D-PEP 3.8	44	Ac-RBRRBRFOILYRBHBH-B
D-PEP 3.9	45	Ac-RBRRBRFOILYHBHBH-B
D-PEP 3.10	46	Ac-RBRRBHFOILYRBHBH-B
D-PEP 3.11	47	Ac-HBRRBRFOILYRBHBH-B
D-PEP 3.12	48	Ac-RBRRBFOILYRBHBH-B
D-PEP 3.13	49	Ac-RBRRBRFOILYBHBH-B
D-PEP 3.14	50	Ac-RBRRBRYOFLIHBHBH-B
D-PEP 3.15	51	Ac-RBRRBRILFOYHBHBH-B
D-PEP 3.16	52	Ac-RBRRBRRFOILYHBHBH -B
Pip9b2	113	Ac-RXRRBRR-FOILY-RBRXR-B
R6Gly	114	RRRRRR-G

[0404] 表1:为实施例中的测试而合成的肽,其具有N末端乙酰化和C末端β-丙氨酸接头。Pip9b2和R6Gly是比较肽。R6Gly使用C端甘氨酸作为接头。

[0405] b)合成PMO-肽缀合物文库

[0406] 使用了针对小鼠肌营养不良蛋白外显子23的25聚体PMO反义序列(GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT(SEQ ID NO:90))。所述肽通过其C末端羧基与PMO的3'末端缀合。这是通过在NMP中分别使用2.3和2当量的PyBOP和HOAt来实现的,其中存在有相对于肽的2.3当量的DIPEA以及相对于溶于DMSO的PMO的2.5倍过量的肽。在一些实施例中,使用2.3当量的HBTU代替PyBOP用于激活肽的C末端羧基。通常,向溶于N-甲基吡咯烷酮(NMP,80μL)中的肽(2500nmol)的溶液中加入PyBOP(19.2μL的0.3M的NMP溶液)、HOAt(16.7μL的0.3M的NMP溶液)、DIPEA(1.0μL)以及PMO(100μL的10mM的DMSO溶液)。将混合物在40℃下放置2.5小时,并通过添加0.1%TFA的H_2O溶液(300μL)淬灭反应。使用改装的Gilson HPLC系统通过离子交换色谱法纯化所述溶液。将所述PMO-肽缀合物在离子交换柱上进行纯化(Resource S 4mL,GE Healthcare),使用含有20%CH3CN的磷酸钠缓冲液(25mM,pH 7.0)中的氯化钠的

线性梯度(0到1M),流速为4mL min-1。合并含有所需化合物的级分并冻干,得到呈白色固体的肽-PMO衍生物。通过使用Amicon®ultra-15 3K离心过滤装置过滤离子交换后收集的级分,可以从所述肽-PMO缀合物中去除过量的盐。将缀合物冻干并通过MALDI-TOF分析。使用前,将所述缀合物溶解在无菌水中,并通过0.22μm的醋酸纤维素膜过滤。肽-PMO的浓度是通过缀合物在0.1N HCl溶液中在265nm处的摩尔吸收来确定的。

[0407]　(产率参见表2)

[0408]

肽-PMO	产率
D-Pep 1.1-PMO	36 %
D-Pep 1.2-PMO	--
D-Pep 1.3-PMO	25 %[a]
D-Pep 1.4-PMO	24 %[a]
D-Pep 1.5-PMO	24 %[a]
D-Pep 1.6-PMO	25 %[a]

[0409]

D-Pep 1.7-PMO	33 %
D-pep 1.8-PMO	41 %
D-Pep 1.9-PMO	35 %
D-Pep 1.10-PMO	33 %
D-Pep 3.1-PMO	28 %
D-Pep 3.2-PMO	33 %
D-Pep 3.3-PMO	33 %
D-Pep 3.4-PMO	35 %
D-Pep 3.5-PMO	37 %
D-Pep 3.6-PMO	34 %
D-Pep 3.7-PMO	26 %
D-pep 3.8-PMO	34 %
D-Pep 3.9-PMO	28 %
D-Pep 3.10-PMO	28 %
D-Pep 3.11-PMO	29 %
D-Pep 3.12-PMO	29 %
D-Pep 3.13-PMO	31 %
D-Pep 3.14-PMO	34 %
D-Pep 3.15-PMO	32 %
D-Pep 3.16-PMO	--

[0410] 表2.用于细胞培养分析的P-PMO缀合物的产率。(所述产率基于冻干的纯化的ppmo的干重。如通过正相HPLC在220nm和260nm处测定的，P-PMO的纯度大于95％。(a)使用HBTU活化而不是PyBOP来合成P-PMO)。

[0411] 1.3细胞培养

[0412] 将小鼠H2k mdx成肌细胞在涂覆有明胶(0.01％)的烧瓶中于33℃，10％CO_2下在杜氏改良的Eagle培养基(DMEM PAA laboratories)中培养，所述培养基补充有20％的热灭活胎牛血清(FBS Gold，PAA laboratories)、2％的鸡胚提取物(Seralab)、1％的青霉素-链霉素-新霉素抗生素混合物(PSN，Gibco)以及3pg/μL的γ-干扰素(Roche)。将细胞以$2x10^5$个细胞/mL的密度接种在涂覆有明胶(0.01％)的24孔板中，并在33℃，10％CO_2下放置2天。为了分化成肌管，使细胞在补充有5％马血清(Sigma)和1％PSN的DMEM中于37℃，5％CO_2下进

一步生长2天。

[0413] 1.4细胞转染

[0414] 将细胞与如上所述制备的肽-PMO缀合物(其是在无血清的Opti-MEM中制成的)一起孵育,并向每个孔中一式两份加入350μL,并在37℃孵育4小时。然后将转染培养基替换为补充有5%马血清和1%PSN的DMEM,并将细胞在37℃另外孵育20小时。用PBS洗涤细胞,并向每个孔中加入0.5mL的TRI RNA(Sigma)分离试剂。将细胞在-80℃冷冻1小时。

[0415] 1.5 RNA提取和巢式RT-PCR分析

[0416] 用TRI试剂提取细胞总RNA,并用乙醇进一步沉淀。使用Nanodrop®ND-1000(Thermo Scientific)对纯化的RNA进行定量。使用所述RNA(400ng)作为模板,使用OneStep RT-PCR试剂盒(Roche,Indianapolis,美国),进行RT-PCR。有关引物序列,请参见表4。用于初始逆转录的循环条件是50℃30分钟和94℃7分钟,进行1个循环,然后是94℃20秒、55℃40秒和68℃80秒,进行30个循环。将一微升的RT-PCR产物用作第二步PCR的模板。使用0.5U的SuperTAQ在25个循环中进行扩增,每个循环为94℃30秒、55℃1分钟和72℃1分钟。使用1.5%琼脂糖凝胶通过电泳分离所述产物。所述琼脂糖凝胶的图像在Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+成像系统(BioRad,英国)上取得,并使用Image Lab(V4.1)分析图像。使用Microsoft Excel来分析和绘制外显子跳跃试验数据,这些数据表示为来自至少三个独立实验中的外显子23跳跃的百分比。

[0417] 1.6用于在H2k mdx小鼠中进行测试的PMO-肽缀合物的合成

[0418] a)肽变体的合成

[0419] 使用CEM Liberty Blue™微波肽合成仪(白金汉,英国)和Fmoc化学法,按照制造商的建议,以100μmol的规模合成肽。所用的侧链保护基对三氟乙酸处理是不稳定的,并且使用5倍过量的Fmoc-保护的氨基酸(0.25mmol)合成肽,所述Fmoc-保护的氨基酸在DIPEA存在下用PyBOP(5倍过量)活化。使用哌啶(20%v/v,在DMF中)以除去N-Fmoc保护基。所述偶联进行一次,其是在60瓦微波功率下于75℃保持5分钟进行的;精氨酸残基除外,其每个被偶联两次。每个去保护反应在75℃进行两次,一次30秒,然后一次3分钟,在35瓦微波功率下进行。一旦合成完成,将树脂用DMF(3x50mL)洗涤,并将固相结合肽的N末端在室温下在DIPEA存在下用乙酸酐乙酰化。N末端乙酰化后,将肽树脂用DMF(3x20mL)和DCM(3x20mL)洗涤。通过在室温下用分离混合物处理3小时,将所述肽与固体支持物分离,所述分离混合物由以下组成:三氟乙酸(TFA):水:三异丙基硅烷(TIPS)(95%:2.5%:2.5%:10mL)。将过量的TFA通过用氮气吹扫除去。所述分离的肽通过加入冰冷的二乙醚沉淀,并以3000rpm离心5分钟。将粗制的肽沉淀物用冷乙醚(3×40mL)洗涤三次,并使用Varian 940-LC HPLC系统通过RP-HPLC纯化,所述Varian 940-LC HPLC系统配备445-LC放大模块和440-LC级分收集器。通过半制备型HPLC在RP-C18色谱柱(10x250mm,Phenomenex Jupiter)上纯化肽,使用CH_3CN在0.1%TFA/H_2O中的线性梯度,流速为15mL min^{-1}。在220nm和260nm处进行检测。

[0420] b)PMO-肽缀合物的合成

[0421] 使用了针对小鼠肌营养不良蛋白外显子23的25聚体PMO反义序列(GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT(SEQ ID NO:90))。所述肽通过其C末端羧基与PMO的3'末端缀合。这是通过在NMP中分别使用2.3和2当量的PyBOP和HOAt来实现的,其中存在有相对于肽的2.3当量的DIPEA以及相对于溶于DMSO的PMO的2.5倍过量的肽。在一些实施例中,使用

HBTU(2.3当量)代替PyBOP用于激活肽的C末端羧基。通常,向溶于N-甲基吡咯烷酮(NMP,100μL)中的肽(10μmol)的溶液中加入PyBOP(76.6μL的0.3M的NMP溶液)、HOAt(66.7μL的0.3M的NMP溶液)、DIPEA(4.0μL)以及PMO(400μL的10mM的DMSO溶液)。将混合物在40℃下放置2小时,并通过添加0.1%TFA(1mL)淬灭反应。将所述反应在阳离子交换色谱法柱上进行纯化(Resource S 6mL,GE Healthcare),使用含有20%CH3CN的磷酸钠缓冲液(25mM,pH 7.0)中的氯化钠的线性梯度(0到1M),流速为6mL min-1。通过使用Amicon®ultra-15 3K离心过滤装置过滤离子交换后收集的级分,可以从所述肽-PMO缀合物中去除过量的盐。将缀合物冻干并通过MALDI-TOF分析。使用前,将所述缀合物溶解在无菌水中,并通过0.22μm的醋酸纤维素膜过滤。肽-PMO的浓度是通过缀合物在0.1N HCl溶液中在265nm处的摩尔吸收来确定的。基于PMO,总产率(表3)为25-36%。

[0422]

肽-PMO	产量
D-Pep 1.1-PMO	36%
D-Pep 1.3-PMO	25%[a]
D-Pep 1.4-PMO	24%[a]
D-Pep 1.5-PMO	25%[a]
D-Pep 1.6-PMO	25%[a]
D-Pep 3.1-PMO	28%
D-Pep 3.2-PMO	33%
D-Pep 3.7-PMO	26%
D-pep 3.8-PMO	34%
D-Pep 3.9-PMO	28%
D-Pep 3.10-PMO	28%

[0423] 表3.用于体内分析的大规模合成的P-PMO缀合物的产率(所述产率基于冻干的纯化的ppmo的干重。如通过正相HPLC在220nm和260nm处测定的,PPMO的纯度大于95%。(a)使用HBTU活化而不是PyBOP来合成PPMO)。

[0424] 1.7通过P-PMO对肌营养不良蛋白恢复的体内评估

[0425] 经过机构伦理审查后,根据内政部项目许可授权,在牛津大学生物医学科学系进行了实验。将小鼠收容在最小的疾病设施中;将环境进行温度控制,具有12小时的明暗循环。所有动物均随意获得商购的啮齿动物食物和水。

[0426] 实验是在10-12周龄的雌性mdx小鼠中进行的。在单次尾静脉注射10mg/kg的P-PMO之前,先对Mdx小鼠进行约束。注射后1周,牺牲小鼠,取出TA、心脏和膈肌,并在干冰冷却的异戊烷中速冻,并保存在-80℃下。

[0427] 1.8 Western印迹分析

[0428] 为了评估单次给药后肌营养不良蛋白恢复的持续时间,将三分之一的肌肉(TA和膈肌)或九十个7μm厚的横向冰冻切片(心脏)溶解在300μl缓冲液(50mM Tris pH 8、150mM NaCl、1%NP40、0.5%脱氧胆酸钠,10%SDS和蛋白酶/磷酸酶抑制剂)中,然后以13000rpm(Heraeus,#3325B)离心10分钟。收集上清液并在100℃加热3分钟。如前所述(19),将蛋白质通过BCA方法定量,并将每份样品40μg蛋白质溶解在NuPage 3-8%Tris-醋酸凝胶中。如前所述(37),将蛋白质转移到0.45μm孔径的PVDF膜上,在30V下1h,然后在100V下1h,然后用单

克隆抗肌营养不良蛋白(1:200,NCL-DYS1,Novocastra)和抗黏着斑蛋白(Vinculin)(上样对照,1:100 000,hVIN-1,Sigma)抗体进行探测。使用二抗IRDye 800CW山羊抗小鼠,稀释度为1:20000(LiCOR)。

[0429] P-PMO处理的mdx小鼠中的肌营养不良蛋白恢复水平以相对于C57BL/10野生型对照小鼠的水平表示,所述对照小鼠的水平被认为是100%。为此,通过将平行于P-PMO处理的mdx样品的5个连续的C57BL/10蛋白稀释包括在内来生成标准曲线。稀释系列如下:每个泳道上样的40μg总蛋白中分别有75%、40%、15%、5%或0%来自C57BL/10蛋白裂解物,其余来自未处理的mdx蛋白裂解物。将这些标准品等分,并在每个Western印迹中与处理的mdx样品平行使用。对于所有标准样品和处理过的样品,肌营养不良蛋白强度定量通过Fluorescent Odyssey成像系统进行,并通过计算与所有样品中黏着斑蛋白荧光强度的比率进行归一化。将标准归一化值相对于其已知的肌营养不良蛋白浓度作图,以获得最佳拟合的数学表达式,该表达式用于内插P-PMO处理的mdx小鼠的每个样品的归一化值。

[0430] 1.9体内Dmd外显子23跳跃的RT-qPCR分析

[0431] 在用肽-PMO处理的骨骼肌和心脏组织上进行了小鼠Dmd转录物外显子23排除的定量分析。简而言之,使用基于Trizol的提取方法从匀浆的组织中提取RNA,并使用随机引物合成cDNA。引物/探针是由Integrated DNA Technologies合成的,并且旨在扩增跨越外显子23-24的区域,代表未跳跃的产物(mDMD23-24,请参见表4),或使用跨越外显子22和24边界的探针特异性扩增缺少外显子23的转录物(mDMD22-24)。通过与标准曲线进行校准,来确定各个转录物的水平,所述标准曲线使用已知的转录物数量,以及由[skip]/[skip+unskip]得出的跳跃百分比来制成。

[0432]

试验ID	引物序列(5'-3')	序列ID号
巢式RT-PCR		
Exon20Fo	CAGAATTCTGCCAATTGCTGAG	91
Exon26Ro	TTCTTCAGCTTGTGTCATCC	92
Exon20Fi	CCCAGTCTACCACCCTATCAGAGC	93
Exon26Ri	CCTGCCTTTAAGGCTTCCTT	94
qRT-PCR		
mDMD23-	引物 1 CAGGCCATTCCTCTTTCAGG	95

[0433]

24	引物 2 GAAACTTTCCTCCCAGTTGGT 探针 /5FAM/TCAACTTCA/ZEN/GCCATCCATTTCTGTAAGGT/3IABkFQ/	96 97
mDMD22-24	引物 1 CTGAATATGAAATAATGGAGGAGAGACTCG 引物 2 CTTCAGCCATCCATTTCTGTAAGGT 探针 /5FAM/ATGTGATTC/ZEN/TGTAATTTCC/3IABkFQ/	98 99 100

[0434] 表4:用于通过巢式RT-PCR或定量RT-PCR方法定量外显子23跳跃的引物和探针序

列。

[0435] 1.10肽-PMO的毒理学评估

[0436] 通过静脉内推注尾静脉注射，对8-10周龄的雌性C57BL/6小鼠施用单次30mg/kg剂量的0.9％盐水中的肽-PMO。在代谢笼(Tecniplast，英国)中放置20小时后，在施用后第2天和第7天在冷藏条件下非侵入性收集尿液。在第7天，在尸体剖检时从颈静脉采集血清，胫骨前肌、膈肌和心脏组织也一样。

[0437] 通过静脉内尾静脉注射，以0.9％盐水中的2.5mg/kg至50mg/kg范围内的不同单剂量的肽-PMO进行相同的程序。

[0438] 在适当稀释尿液以符合标准曲线后，通过ELISA对KIM-1(肾损伤分子-1)和NGAL(中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白)的尿液水平进行定量(KIM-1 R&D cat#MKM100，NGAL R&D cat#MLCN20)。将值相对于尿肌酐水平进行归一化，所述尿肌酐水平量化于MRC Harwell研究所，Mary Lyon Centre，Oxfordshire，英国。血清血液尿素氮水平量化于MRC Harwell研究所，Mary Lyon Centre，Oxfordshire，英国。

[0439] 所有水平均在AU680临床化学分析仪Beckman Coulter上进行了定量。

[0440] 外显子跳跃功效的定量通过外显子23跳跃和未跳跃的转录物的定量RT-PCR来确定，并表示为跳跃转录物相对于全部(跳跃的和未跳跃的)转录物的百分比(序列请参见表4)。

[0441] 2.结果

[0442] 本文提供的结果证明，本文产生的肽-PMO缀合物在细胞内外显子跳跃活性中具有明显的剂量反应作用(图1、2和12)。这些图还突出表明，所有DPEP1和DPEP3系列(即本发明的肽)在考虑用于治疗用途的细胞中均具有足够的细胞穿透功效。

[0443] 本文提供的结果进一步突出了所述肽-PMO缀合物在相关疾病小鼠模型中的体内活性(图3-4)。总体而言，结果表明，这种缀合物的活性在胫骨前肌中最大，活性大小顺序为:胫骨前肌>膈肌>心脏。这些图表明，本发明的DPEP肽缀合物在体内具有良好的外显子跳跃活性，并在体内提供了肌营养不良蛋白表达的增加。此外，本发明的DPEP缀合物与先前的细胞穿透肽(如‘PIP’肽和R6Gly，当在相同的缀合物中使用时)相比在两个方面均具有优势。

[0444] 本文还证明了，KIM-1和NGAL的水平(它们是肾毒性的指标)在施用DPEP肽缀合物化合物之后均显著低于具有先前的细胞穿透肽的缀合物。DPEP 1.9和3.8缀合物显示出最低水平的此类标志物(图5、6和11)。血清血液尿素氮水平(肾功能不全的另一标志物)也仅对于具有Pip9b2的缀合物而升高，而对于具有本发明的DPEP肽的缀合物则未升高(图7)。第二个主要发现是，施用后7天，对于所有DPEP肽缀合物，KIM-1和NGAL水平均降低至接近生理盐水水平，这表明肾脏相关毒性也有一定程度的逆转和改善。使用先前的细胞穿透肽的缀合物未观察到这种作用。当以50mg/kg的高剂量给予时，使用本发明的DPEP肽仍能看到毒性逆转的效果(图11)。先前的细胞穿透肽在7天后显示毒性没有降低，并且在整个过程中毒性标志物仍然保持高得多的水平。

[0445] 进一步证明，在30和50mg/kg的较高剂量下，TA和膈肌中所有DPEP肽缀合物的外显子跳跃活性仍然很高(图10和12)，当用肾脏损伤标志物的水平降低来证实时，这表明这些化合物的治疗指数较宽，因为毒性标志物降低了许多倍。还值得注意的是，所有的DPEP肽缀

合物比缀合物中的已知的R6Gly比较物具有更高的活性，同时至少保持毒性标志物的水平相似，并且与缀合物中的已知的PIP肽比较物的活性相似，同时具有低得多的毒性标志物水平。在某些情况下，与已知的R6Gly缀合物相比，本发明的DPEP肽缀合物不仅显示出活性增加，而且显示出毒性标志物降低。

[0446] 因此，本发明的DPEP1和3肽提供了有前景的细胞穿透肽，用于提高用于治疗人类神经肌肉疾病的治疗性缀合物的功效并降低其毒性。

[0447] 3.进一步的实施例

[0448] P-PMO的合成与制备

[0449] 9-芴基甲氧羰基(Fmoc)保护的L-氨基酸、苯并三唑-1-基-氧基-三吡咯烷基磷(PyBOP)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)以及Fmoc-β-Ala-OH预装王氏树脂(0.19或0.46mmol g-1)从Merck(Hohenbrunn，德国)获得。1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)从Sigma-Aldrich获得。HPLC级乙腈、甲醇和合成级N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)购自Fisher Scientific(Loughborough，英国)。肽合成级N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和乙醚是从VWR(Leicestershire，英国)获得的。哌啶和三氟乙酸(TFA)从Alfa Aesar(Heysham，英国)获得。PMO购自Gene Tools Inc.(Philomath，美国)。除非另有说明，所有其他试剂均获自Sigma-Aldrich(St.Louis，MO，美国)。使用Voyager DE Pro BioSpectrometry工作站，进行MALDI-TOF质谱分析。将在50％乙腈水溶液中的10mg mL^{-1}的α-氰基-4-羟基肉桂酸或芥子酸储液用作基质。误差条为±0.1％。

[0450] 用于在细胞中筛选的P-PMO肽的合成

[0451] a)制备肽变体文库

[0452] 通过应用标准Fmoc化学方法并遵循制造商的建议，使用Fmoc-β-Ala-OH预装的王氏树脂(0.19或0.46mmol g-1，Merck Millipore)，使用Intavis平行肽合成仪以10μmol规模制备肽，或使用CEM Liberty BlueTM肽合成仪(Buckingham，英国)以100μmol规模制备肽。在使用Intavis平行肽合成仪进行合成的情况下，将双偶联步骤与PyBOP/NMM偶联混合物一起使用，然后在每个步骤之后进行乙酸酐封端。对于使用CEM Liberty Blue肽合成仪进行的合成，所有氨基酸(精氨酸除外，它是通过双偶联进行的)均采用单一标准偶联。所述偶联进行一次，其是在60瓦微波功率下于75℃保持5分钟进行的；精氨酸残基除外，其每个被偶联两次。每个去保护反应在75℃进行两次，一次30秒，然后3分钟，在35瓦微波功率下进行。一旦合成完成，将树脂用DMF(3x50mL)洗涤，并将固相结合肽的N末端在室温下在DIPEA存在下用乙酸酐乙酰化。N末端乙酰化后，将肽树脂用DMF(3x20mL)和DCM(3x20mL)洗涤。通过在室温下用分离混合物处理3小时，将所述肽与固体支持物分离，所述分离混合物由以下组成：三氟乙酸(TFA):H2O:三异丙基硅烷(TIPS)(95％:2.5％:2.5％:3-10mL)。肽释放后，将过量的TFA通过用氮气吹扫除去。粗制的肽通过加入冷乙醚(15-40mL，取决于合成规模)沉淀，并以3200rpm离心5分钟。将粗制的肽沉淀物用冷乙醚(3×15mL)洗涤三次，并使用Varian 940-LC HPLC系统通过RP-HPLC纯化，所述Varian 940-LC HPLC系统配备445-LC放大模块和440-LC级分收集器。通过半制备型HPLC在RP-C18色谱柱(10x250mm，Phenomenex Jupiter)上纯化肽，使用线性梯度的在0.1％TFA/H2O中的CH3CN，流速为15mL min-1。在220nm和260nm处进行检测。合并含有所需肽的级分并冻干，得到呈白色固体的肽(产率参见表5)。

[0453]

肽的编号	序列ID号，合并的	测试序列（具有额外的C和N末端修饰）
D-PEP 1.1	27	Ac-RBRRBRRFOILYRBRBR-B
D-PEP 1.7	33	Ac-RBRRBRFOILYRBRBR-B

[0454]

D-PEP 1.8	34	Ac-RBRRBFOILYRBRRBR-B
D-PEP 1.9	35	Ac-RBRRBRFOILYBRBR-B
D-PEP 1.9W3	104	Ac-RBRRBRWWWBRBR-B
DPEP 1.9W4P	105	Ac-RBRRBRWWPWWBRBR-B
D-PEP 3.1	37	Ac-RBRRBRRFOILYRBHBH-B
D-PEP 3.8	44	Ac-RBRRBRFOILYRBHBH-B
D-PEP 5.70	106	Ac-RBRBRS*RBRBR-B
Pip6a	112	Ac-RXRRBRRXR-YOFLI-RXRBRXR-B
Pip9b2	113	Ac-RXRRBRR-FOILY-RBRXR-B

[0455] 表5:实施例中为测试而合成的肽,其具有N末端乙酰化(Ac)和C末端β-丙氨酸接头(B),S*是糖基化的丝氨酸残基。DPEP5.7、Pip9b2和Pip6a是比较肽。

[0456] b)合成肽-PMO缀合物文库

[0457] 使用了用于三联体重复序列的21聚体PMO反义序列CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG(SEQ ID NO.107),也称为[CAG]7。所述肽通过其C末端羧基与PMO的3’末端缀合。这是通过在NMP中分别使用2.5和2当量的PyBOP和HOAt来实现的,在使用了2.5当量的DIPEA以及相对于溶于DMSO的PMO的2.5倍过量的肽的情况下。通常,向溶于N-甲基吡咯烷酮(NMP,80μL)的肽(2500nmol)的溶液中加入PyBOP(19.2μL的0.3M的NMP溶液)、HOAt(16.7μL的0.3M的NMP溶液)、DIPEA(1.0mL)以及PMO(180μL的10mM的DMSO溶液)。将混合物在40℃下放置2.5小时,并通过添加0.1%TFA的H2O溶液(300μL)淬灭反应。使用改装的Gilson HPLC系统,通过离子交换色谱法纯化所述溶液。将所述PMO-肽缀合物在离子交换柱上进行纯化(Resource S 4mL,GE Healthcare),使用含有20%CH3CN的磷酸钠缓冲液(25mM,pH 7.0)的线性梯度。使用氯化钠溶液(1M)从柱中洗脱所述缀合物,流速为4mL min-1或6mL min-1。立即将包含所需化合物的级分合并,脱盐。通过使用Amicon® ultra-15 3K离心过滤装置过滤离子交换后收集的级分,可以从所述肽-PMO缀合物中去除过量的盐。将缀合物冻干并通过MALDI-TOF分析。使用前,将所述缀合物溶解在无菌水中,并通过0.22μm的醋酸纤维素膜过滤。肽-PMO的浓度是通过缀合物在0.1N HCl溶液中在265nm处的摩尔吸收来确定的。(产率参见表6)

[0458]

肽	产率
D-Pep 1.1	36%
D-Pep 1.7	41%
D-pep 1.8	38%
D-Pep 1.9	40%
D-Pep 1.9W3	43%
D-Pep 1.9W4P	23%
D-Pep 3.1	31%

D-Pep 3.8	36%
D-Pep 5.70	31%

[0459] 表6.用于细胞培养分析和体内实验的P-PMO缀合物的产率(所述产率基于冻干的纯化的P-PMO的干重。如通过正相HPLC在220nm和260nm处所测定的,P-PMO的纯度大于95%。

[0460] 肽-PMO缀合物的合成

[0461] 如前所述,合成肽并将其与PMO缀合。靶向CUG/CTG扩展重复序列的PMO序列(5′-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3′(SEQ ID NO:107))购自Gene Tools LLC。这是本文其他地方提到的[CAG]7PMO。

[0462] 细胞培养和肽-PMO处理。

[0463] 将来自健康个体或具有2600个CTG重复的DM1患者的永生化成肌细胞培养在由M199:DMEM混合物(1:4的比例,Life technologies)组成的生长培养基中,所述培养基补充有20%FBS(Life technologies)、50μg/ml庆大霉素(Life Technologies)、25μg/ml胎球蛋白、0.5ng/ml bFGF、5ng/ml EGF和0.2μg/ml地塞米松(Sigma-Aldrich)。对于成肌细胞,通过将汇合的细胞培养物切换为补充有5μg/ml胰岛素(Sigma-Aldrich)的DMEM培养基,来诱导成肌分化。为了处理,将WT或DM1细胞分化4天。然后,用新鲜的分化培养基更换培养基,所述新鲜的分化培养基含有浓度为1、2、5、10、20或40μM的肽-PMO缀合物。处理后48小时,收获细胞,用于分析。使用基于荧光的测定法,在人类肝细胞中以40uM浓度或在人类成肌细胞中以1、2、5、10、20或40μM浓度的肽-PMO转染2天后,对细胞活力进行定量。

[0464] RNA分离、RT-PCR和qPCR分析。

[0465] 对于小鼠组织:在RNA提取之前,使用Fastprep系统和Lysing Matrix D管(MP biomedicals)在TriReagent(Sigma-Aldrich)中破坏肌肉。对于人类细胞:在RNA提取之前,将细胞在蛋白酶K缓冲液(500mM NaCl、10mM Tris-HCl、pH 7.2、1.5mM MgCl2、10mM EDTA、2%SDS和0.5mg/ml蛋白酶K)中于55℃裂解45分钟。根据制造商的方案,使用TriReagent分离了总RNA。根据制造商的说明,使用M-MLV第一链合成系统(Life Technologies)将一微克RNA反转录,总体积20μL。随后根据标准方案(ReddyMix,Thermo Scientific)将一微升cDNA制备物用于半定量PCR分析中。在每个基因的线性扩增范围内,PCR扩增进行了25-35个循环。将PCR产物在1.5-2%的琼脂糖凝胶上分离,用溴化乙锭染色,并用ImageJ软件定量。将外显子保留的比率定量为保留相对于同工型信号总强度的百分比。引物在下表7中示出:

[0466]

引物名称	SEQ ID NO.	物种/基因/外显子	序列（5’-3’）
Mbnl1.F	108	小鼠-人类/mbnl1/外显子5	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC
Mbnl1.R	109	小鼠-人类/mbnl1/外显子5	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC
DMD.F	110	人类/DMD/外显子78	TTAGAGGAGGTGATGGAGCA
DMD.R	111	人类/DMD/外显子78	GATACTAAGGACTCCATCGC

[0467] 表7:用于PCR的引物

[0468] 毒理学

[0469] 如上文第1.10节所述,进行毒理学评估。

[0470] 结果

[0471] 经处理的、DM1患者来源的肌肉细胞(成肌细胞)显示,DPEP 1或3肽-$[CAG]_7$PMO缀合物特异性靶向突变的CUGexp-DMPK转录物,从而消除了核RNA团簇(foci)对MBNL1剪接因子的有害隔离(sequestration)以及因此导致的MBNL1功能丧失,所述MBNL1功能丧失造成了剪接缺陷和肌肉功能障碍。DPEP1/3肽-$[CAG]_7$PMO缀合物穿透细胞并高效诱导剪接正常化(图13)。这些新一代的所谓“DPEP1和DPEP3”肽,当与CAG7重复序列反义寡核苷酸PMO缀合时,在体外纠正剪接缺陷方面显示出很高的功效,这表明了用于治疗DM1的潜在治疗用途。

[0472] 此外,对与DPEP1/3形成的缀合物的初步毒理学评估表明,ALP、ALT、AST、KIM-1、BUN、NGAL和肌酐水平与生理盐水对照注射液的相似,与目前可获得的来自Pip系列的肽载体通常引起的成倍增加形成对照。借助这些初步数据,我们证明了由DPEP肽与$[CAG]_7$PMO形成的缀合物与由现有的肽(如Pip6a)形成的缀合物一样有效,但由于其毒性较低,因此具有更宽的治疗窗(图15-19)。

序列表

<110> 牛津大学科技创新有限公司
英国研究与创新组织

<120> 细胞穿透肽

<130> P236820WO

<150> GB 1812972.6

<151> 2018-08-09

<160> 114

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<400> 1

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg
1   5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)
<223> X是bAla
<400> 2
Arg Xaa Arg Xaa Arg
1 5
<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<400> 3
Arg Xaa Arg Arg
1
<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<400> 4
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5
<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<400> 5
Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg
1 5
<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<400> 6
Arg Xaa Arg Arg Xaa
1 5
<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> X是bAla

<400> 7

Xaa Arg Xaa Arg

1

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> X是bAla

<400> 8

Arg Xaa His Xaa His

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> X是bAla

<400> 9

His Xaa His Xaa Arg
1 5

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<400> 10

Arg Xaa Arg His Xaa His Arg
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(5)
<223> X是bAla
<400> 11

Arg Xaa Arg Xaa Xaa His Arg
1 5

<210> 12
<211> 6

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<400> 12
Arg Xaa Arg Arg Xaa His
1 5
<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<400> 13
His Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5
<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>

<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> X是bAla
<400> 14
His Xaa His Xaa His
1 5
<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> X是bAla
<400> 15
Xaa His Xaa His
1
<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<400> 16
Xaa Arg Xaa Ser Xaa
1 5
<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<400> 17
Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> X是bAla
<400> 18
Arg Xaa His Xaa His Xaa
1 5
<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是羟脯氨酸
<400> 19
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5
<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽

<400> 20
Tyr Gln Phe Leu Ile
1 5
<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 21
Phe Gln Ile Leu Tyr
1 5
<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 22
Ile Leu Phe Gln Tyr
1 5
<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 23
Phe Gln Ile Tyr
1
<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 24
Trp Trp Pro Trp Trp
1 5

<210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 25
Trp Pro Trp Trp
1
<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 26
Trp Trp Pro Trp
1
<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)

<223> X是bAla

<400> 27

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa Arg Xaa

1 5 10 15

Arg

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<400> 28

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa Arg Arg

1 5 10 15

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> X是bAla

<400> 29

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15

Arg

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> X是bAla

<400> 30

Arg Xaa Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10 15

Arg

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 31
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Tyr Gln Phe Leu Ile Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Arg
<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)

<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 32
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Ile Leu Phe Gln Tyr Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Arg
<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 33
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 34

<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 34
Arg Xaa Arg Arg Xaa Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>

<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 35
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 36
Arg Xaa Arg Arg Xaa Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 37
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa
1 5 10 15
His
<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)

<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 38
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr His Xaa His Xaa
1 5 10 15
Arg
<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 39
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr His Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
His
<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> X是bAla

<400> 40

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Tyr Gln Phe Leu Ile Arg Xaa His Xaa

1 5 10 15

His

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> X是bAla

<400> 41

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Ile Leu Phe Gln Tyr Arg Xaa His Xaa
1 5 10 15

His

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> X是bAla

<400> 42

Arg Xaa Arg His Xaa His Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15

Arg

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 43
Arg Xaa Arg Xaa Xaa His Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa
1 5 10 15
His
<210> 44
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)

<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 44
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 45
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr His Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 46
<211> 16

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 46
Arg Xaa Arg Arg Xaa His Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 47
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 47
His Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 48
Arg Xaa Arg Arg Xaa Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 49
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 50
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> X是bAla

<400> 50

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Tyr Gln Phe Leu Ile His Xaa His Xaa His

1 5 10 15

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> X是bAla

<400> 51

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Ile Leu Phe Gln Tyr His Xaa His Xaa His

1 5 10 15

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 52

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr His Xaa His Xaa
1   5   10   15
His

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<400> 53

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Ser
1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x 羟脯氨酸

<400> 54

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是羟脯氨酸
<400> 55
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 56
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> X是bAla

<400> 56

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Arg

1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<400> 57

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Arg

1 5 10 15

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<400> 58
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Trp Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10
<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 59

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Pro Trp Trp Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15

<210> 60
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<400> 60

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Pro Trp Trp Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<400> 61
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Pro Trp Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10
<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 62
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Trp Trp Trp Arg Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 63

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 63
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Trp Trp Pro Trp Trp Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Arg
<210> 64
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 64
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Trp Pro Trp Trp Arg Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 65
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 65
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Trp Trp Pro Trp Arg Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 66
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 66
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<400> 67

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa Arg
1 5 10 15

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> X是bAla

<400> 68

Xaa Arg Xaa Arg Xaa Trp Trp Pro Trp Trp Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10 15

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 69
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 70
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> X是bAla

<400> 70

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Tyr Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<400> 71

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa His
1 5 10 15

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是羟脯氨酸
<400> 72
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 73
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 73

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15

<210> 74
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是羟脯氨酸
<400> 74

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<400> 75
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Trp Arg Xaa His Xaa His
1 5 10
<210> 76
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<400> 76
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Pro Arg Xaa His Xaa His
1 5 10
<210> 77

<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<400> 77
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Pro Trp Trp Arg Xaa His Xaa His
1 5 10
<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>

<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 78
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Pro Trp Trp Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 79
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Pro Trp Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 80
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Pro Trp Trp Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 81
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 81
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Trp Trp Trp Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 82
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 82
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Trp Trp Pro Trp Trp Arg Xaa His Xaa
1 5 10 15
His
<210> 83
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 83
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Trp Pro Trp Trp Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 84
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Trp Trp Pro Trp Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 85
Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa
1 5 10 15
His
<210> 86
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla
<400> 86
Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa His
1 5 10 15
<210> 87
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> X是bAla

<400> 87

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa His Xaa His

1 5 10 15

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<400> 88

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa His Xaa His

1 5 10 15

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X是bAla

<220>

<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> X是bAla
<400> 89
Arg Xaa Arg Arg Xaa His Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa His Xaa
1 5 10 15
His
<210> 90
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 针对小鼠肌营养不良蛋白外显子23的25聚体PMO反义序列
<400> 90
ggccaaacct cggcttacct gaaat 25
<210> 91
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 外显子20Fo引物
<400> 91
cagaattctg ccaattgctg ag 22
<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 外显子26Ro引物
<400> 92
ttcttcagct tgtgtcatcc 20

<210> 93
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 外显子20Fi引物
<400> 93
cccagtctac caccctatca gagc 24
<210> 94
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 外显子26Ri引物
<400> 94
cctgccttta aggcttcctt 20
<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mDMD23-24引物 1
<400> 95
caggccattc ctctttcagg 20
<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mDMD23-24引物 2
<400> 96
gaaactttcc tcccagttgg t 21
<210> 97
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mDMD23-24探针
<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 以FAM标记
<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> 残基9和10通过内部淬灭剂ZEN连接
<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> 以IABkFQ标记
<400> 97
tcaacttcag ccatccattt ctgtaaggt 29
<210> 98
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mDMD22-24引物 1
<400> 98
ctgaatatga aataatggag gagagactcg 30
<210> 99
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mDMD22-24引物 2
<400> 99
cttcagccat ccatttctgt aaggt 25
<210> 100
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mDMD22-24探针
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 以FAM标记

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> 残基9和10通过内部淬灭剂ZEN连接
<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> 以IABkFQ标记
<400> 100
atgtgattct gtaatttcc 19
<210> 101
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X是bAa
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X是bAa
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X是羟脯氨酸
<400> 101
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 102
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 102
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 103
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X是羟脯氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X是羟脯氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X是羟脯氨酸
<400> 103
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 104
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<400> 104
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Trp Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10
<210> 105
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X是bAla
<400> 105
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Pro Trp Trp Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10 15
<210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 葡糖基化的丝氨酸残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)

<223> X是bAla
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X是bAla
<400> 106
Arg Xaa Arg Xaa Arg Ser Arg Xaa Arg Xaa Arg
1 5 10
<210> 107
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 21聚体PMO反义序列
<400> 107
cagcagcagc agcagcagca g 21
<210> 108
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 Mbnl1.F
<400> 108
gctgcccaat accaggtcaa c 21
<210> 109
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 Mbnl1.R
<400> 109
tggtgggaga aatgctgtat gc 22
<210> 110
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 DMD.F
<400> 110

ttagaggagg tgatggagca 20

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 DMD.R

<400> 111

gatactaagg actccatcgc 20

<210> 112

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X是氨基己酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X是氨基己酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X是氨基己酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> X是bAla

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> X是氨基己酸

<400> 112

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Tyr Gln Phe Leu Ile Arg Xaa
1 5 10 15

Arg Xaa Arg Xaa Arg
20

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X是氨基己酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X是bAla

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> X是bAla

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X是氨基己酸

<400> 113

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Gln Ile Leu Tyr Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15

Arg

<210> 114

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 114

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

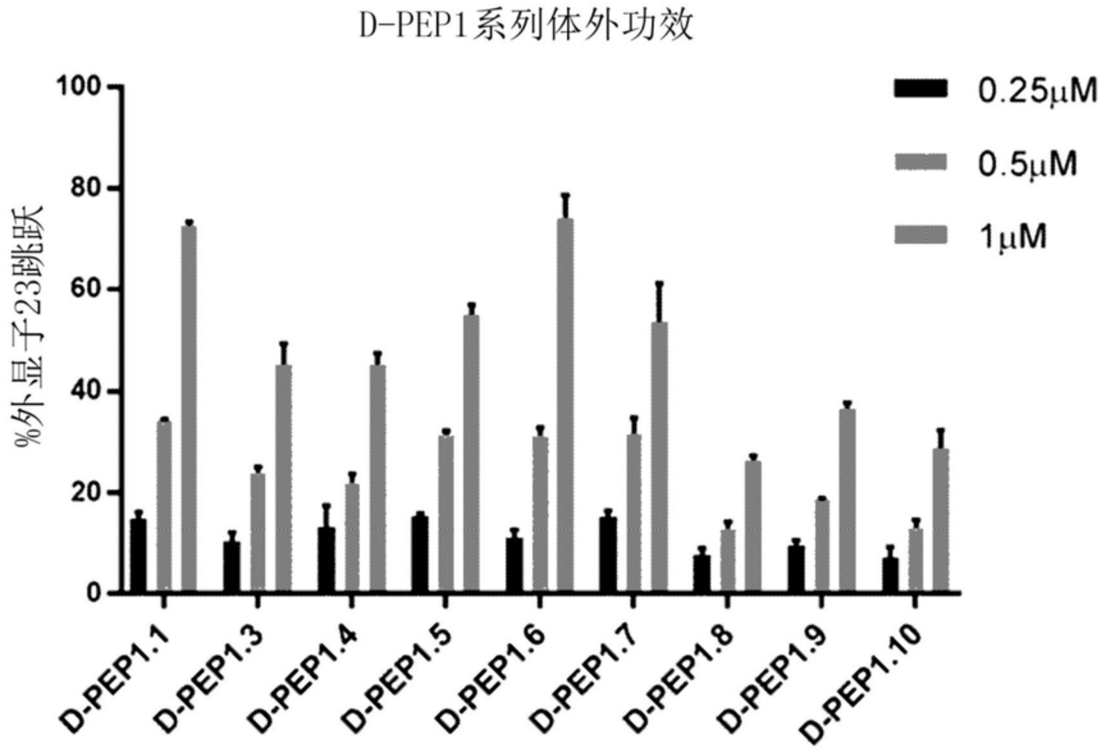
D-PEP1系列体外功效
%外显子23跳跃
100
80
60
40
20
0
0.25μM
0.5μM
1μM
D-PEP1.1
D-PEP1.3
D-PEP1.4
D-PEP1.5
D-PEP1.6
D-PEP1.7
D-PEP1.8
D-PEP1.9
D-PEP1.10

图1

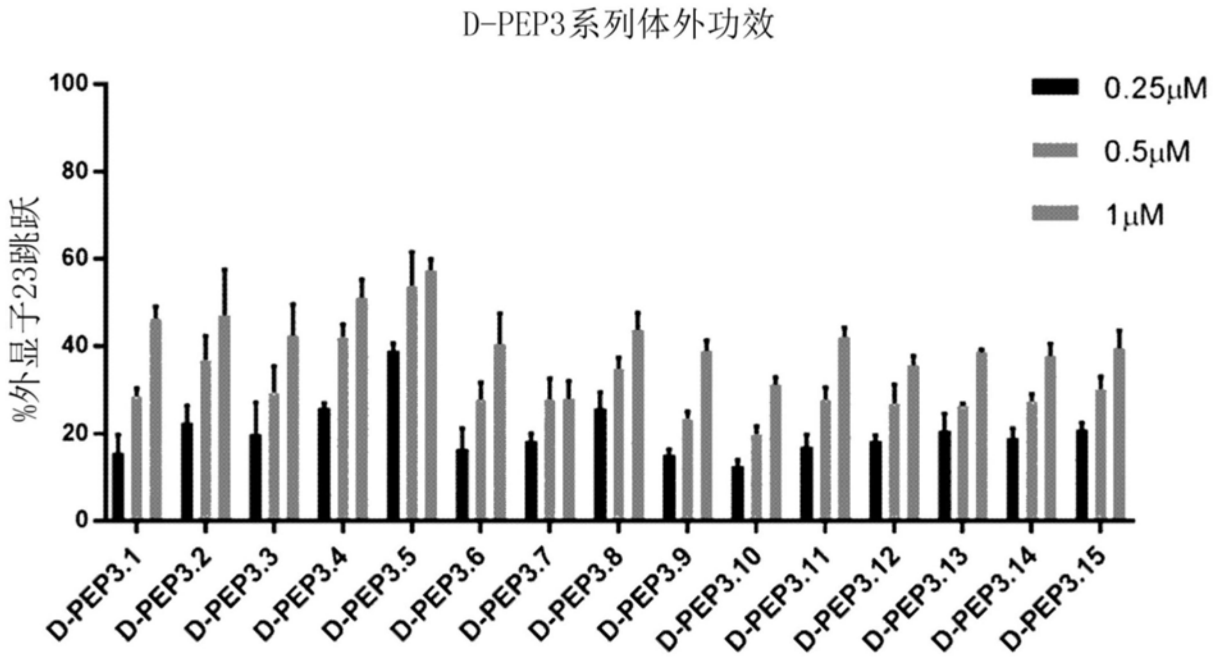
D-PEP3系列体外功效
%外显子23跳跃
100
80
60
40
20
0
0.25μM
0.5μM
1μM
D-PEP3.1
D-PEP3.2
D-PEP3.3
D-PEP3.4
D-PEP3.5
D-PEP3.6
D-PEP3.7
D-PEP3.8
D-PEP3.9
D-PEP3.10
D-PEP3.11
D-PEP3.12
D-PEP3.13
D-PEP3.14
D-PEP3.15

图2

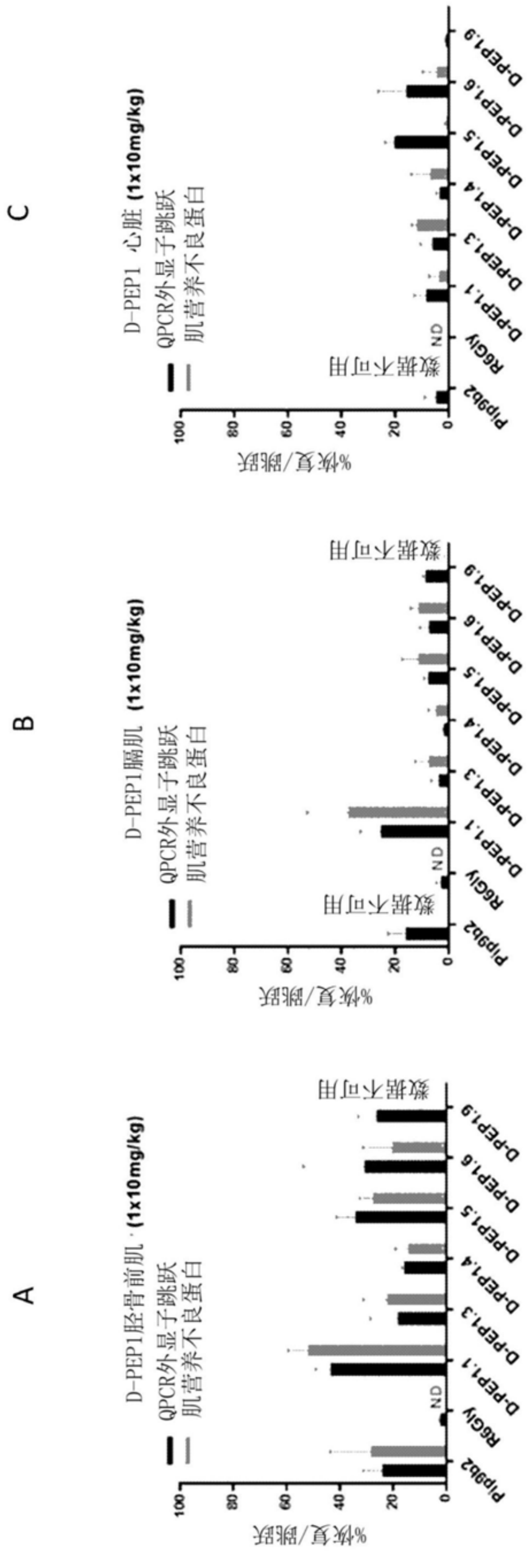
A
D-PEP1胫骨前肌 (1x10mg/kg)
QPCR外显子跳跃
肌营养不良蛋白
数据不可用
%恢复/跳跃
100
80
60
40
20
0
ND
Pip9b2
R6Gly
D-PEP1.1
D-PEP1.3
D-PEP1.4
D-PEP1.5
D-PEP1.6
D-PEP1.9
B
D-PEP1膈肌 (1x10mg/kg)
QPCR外显子跳跃
肌营养不良蛋白
数据不可用
%恢复/跳跃
100
80
60
40
20
0
ND
Pip9b2
R6Gly
D-PEP1.1
D-PEP1.3
D-PEP1.4
D-PEP1.5
D-PEP1.6
D-PEP1.9
C
D-PEP1 心脏 (1x10mg/kg)
QPCR外显子跳跃
肌营养不良蛋白
数据不可用
%恢复/跳跃
100
80
60
40
20
0
ND
Pip9b2
R6Gly
D-PEP1.1
D-PEP1.3
D-PEP1.4
D-PEP1.5
D-PEP1.6
D-PEP1.9

图3

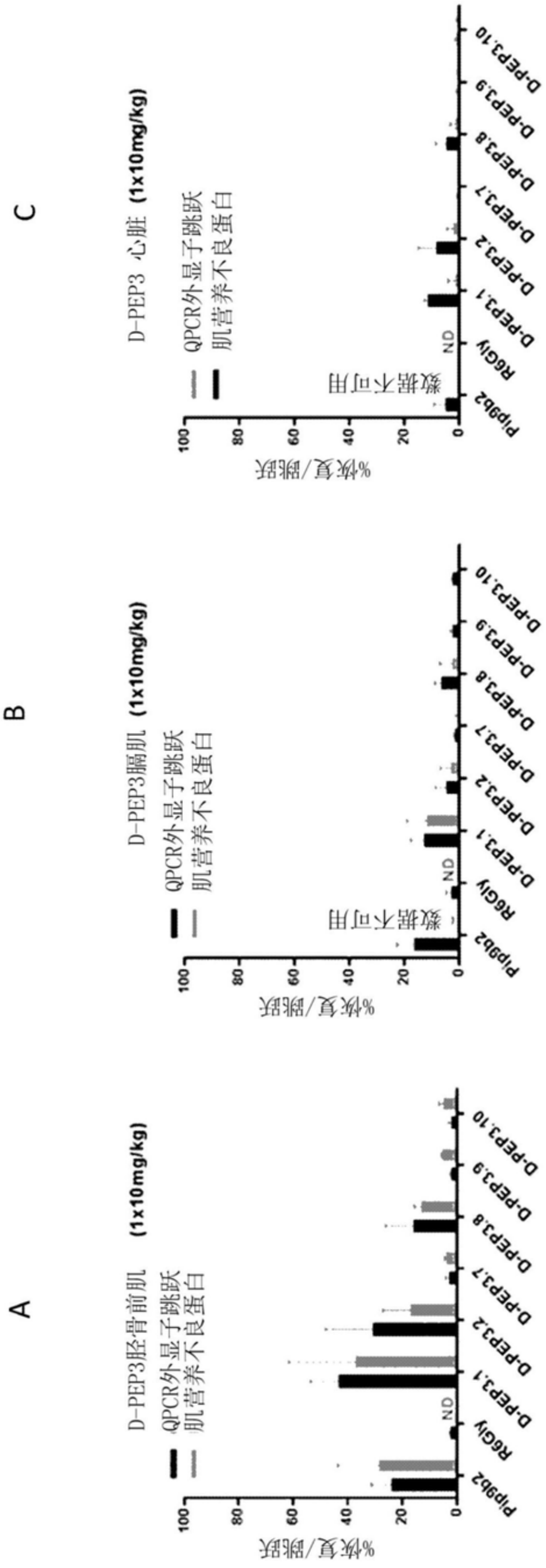
A
D-PEP3胫骨前肌 (1x10mg/kg)
QPCR外显子跳跃
肌营养不良蛋白
%恢复/跳跃
ND
Pip9b2
R6Gly
D-PEP3.1
D-PEP3.2
D-PEP3.7
D-PEP3.8
D-PEP3.9
D-PEP3.10
B
D-PEP3膈肌 (1x10mg/kg)
QPCR外显子跳跃
肌营养不良蛋白
%恢复/跳跃
数据不可用
C
D-PEP3 心脏 (1x10mg/kg)
QPCR外显子跳跃
肌营养不良蛋白
%恢复/跳跃
数据不可用

图4

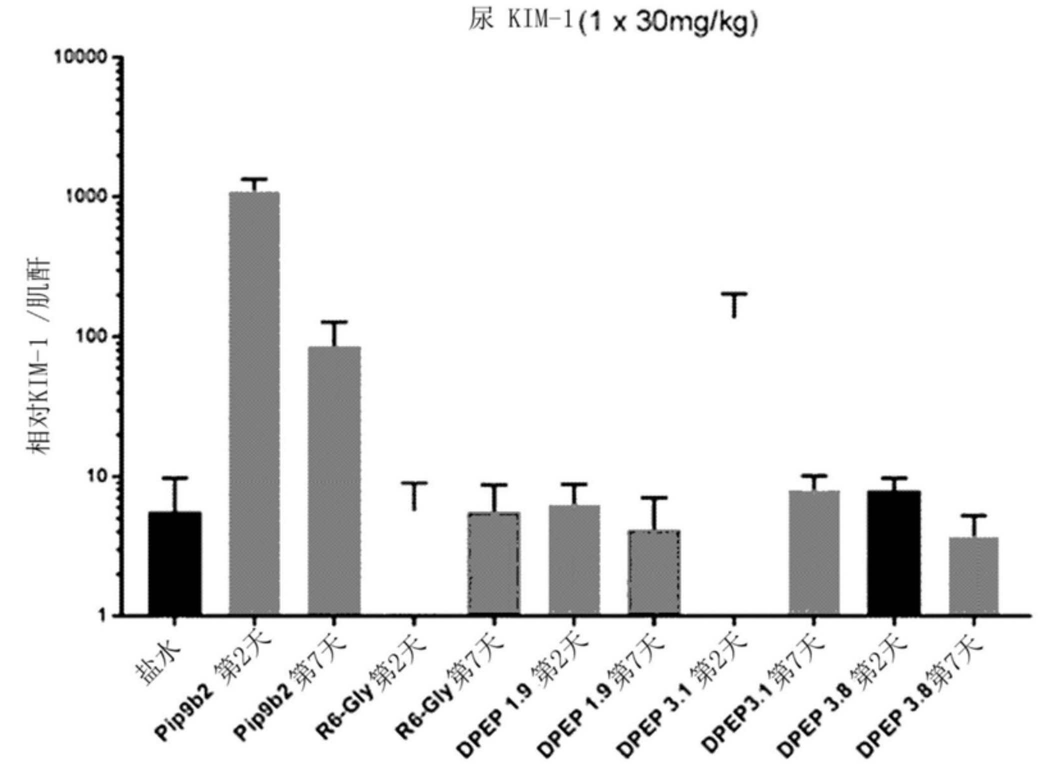
尿 KIM-1(1 x 30mg/kg)
10000
1000
100
10
1
相对KIM-1 /肌酐
盐水
Pip9b2 第2天
Pip9b2 第7天
R6-Gly 第2天
R6-Gly 第7天
DPEP 1.9 第2天
DPEP 1.9 第7天
DPEP 3.1 第2天
DPEP3.1 第7天
DPEP 3.8 第2天
DPEP 3.8 第7天

图5

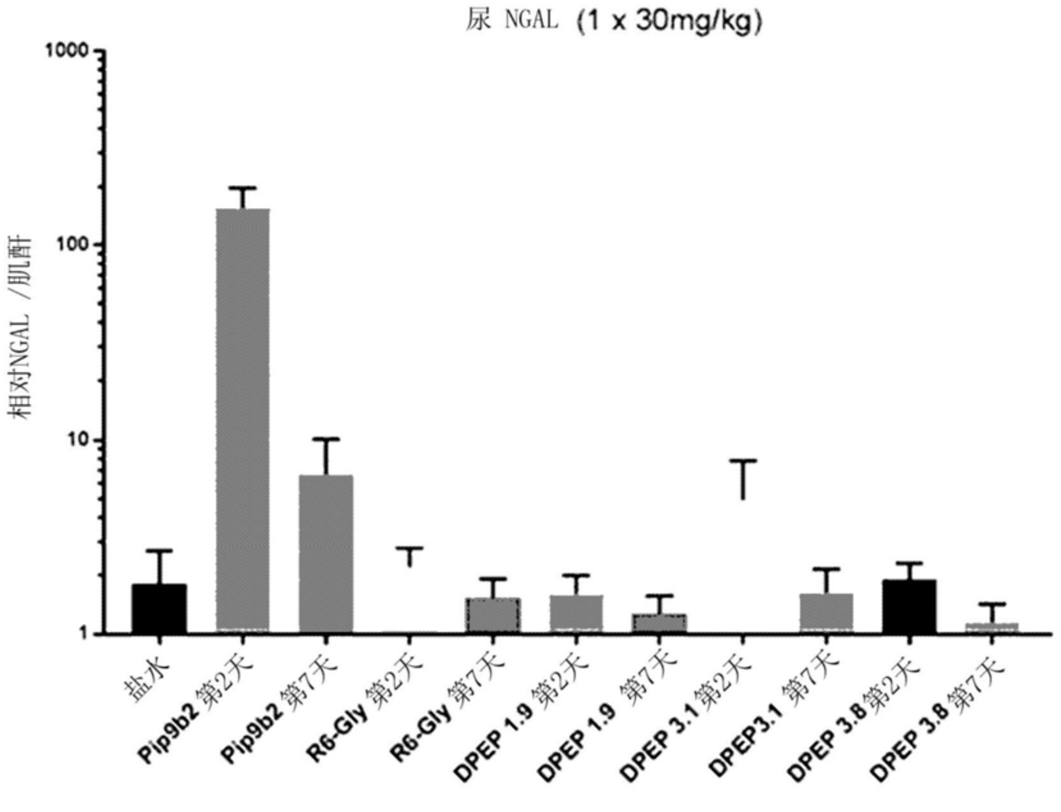
尿 NGAL (1 x 30mg/kg)
1000
100
10
1
相对NGAL /肌酐
盐水
Pip9b2 第2天
Pip9b2 第7天
R6-Gly 第2天
R6-Gly 第7天
DPEP 1.9 第2天
DPEP 1.9 第7天
DPEP 3.1 第2天
DPEP3.1 第7天
DPEP 3.8 第2天
DPEP 3.8 第7天

图6

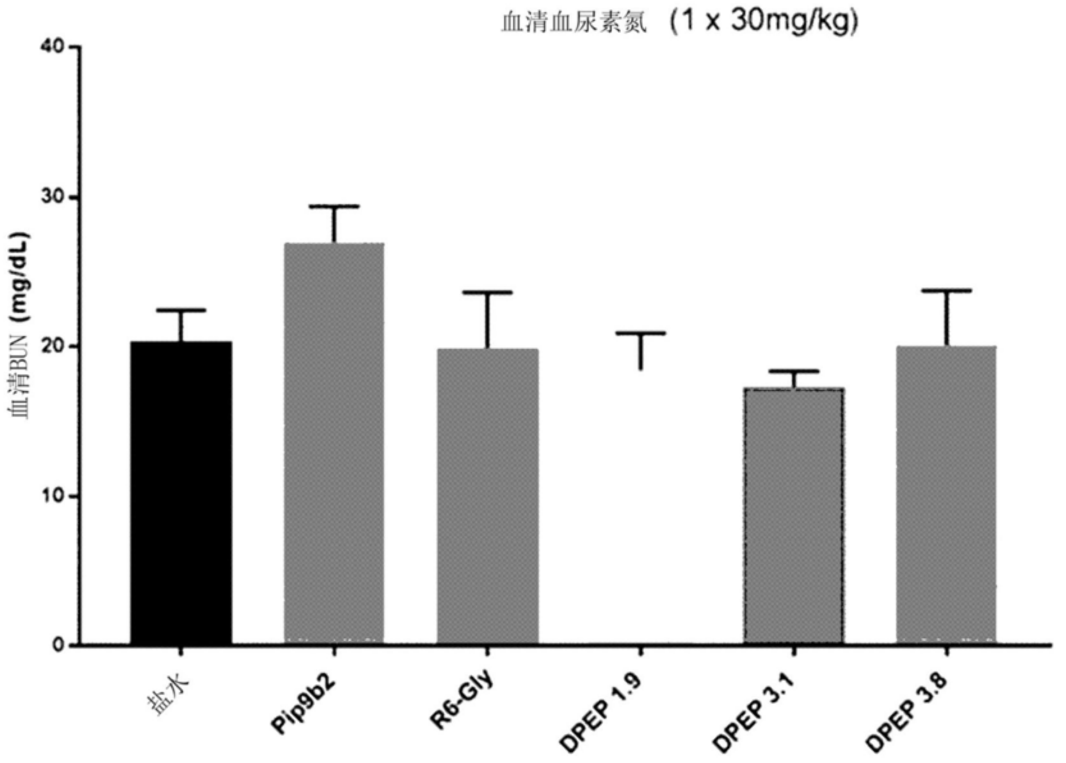
血清血尿素氮 (1 x 30mg/kg)
血清BUN (mg/dL)
40
30
20
10
0
盐水
Pip9b2
R6-Gly
DPEP 1.9
DPEP 3.1
DPEP 3.8

图7

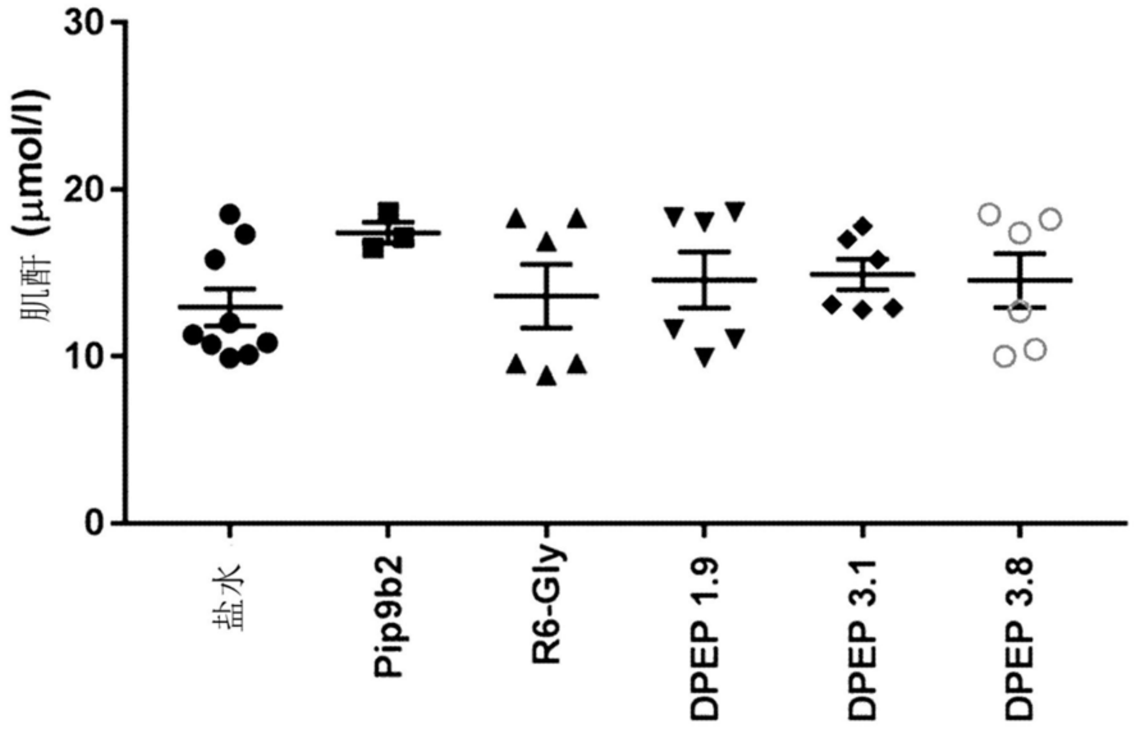
肌酐 (μmol/l)
30
20
10
0
盐水
Pip9b2
R6-Gly
DPEP 1.9
DPEP 3.1
DPEP 3.8

图8

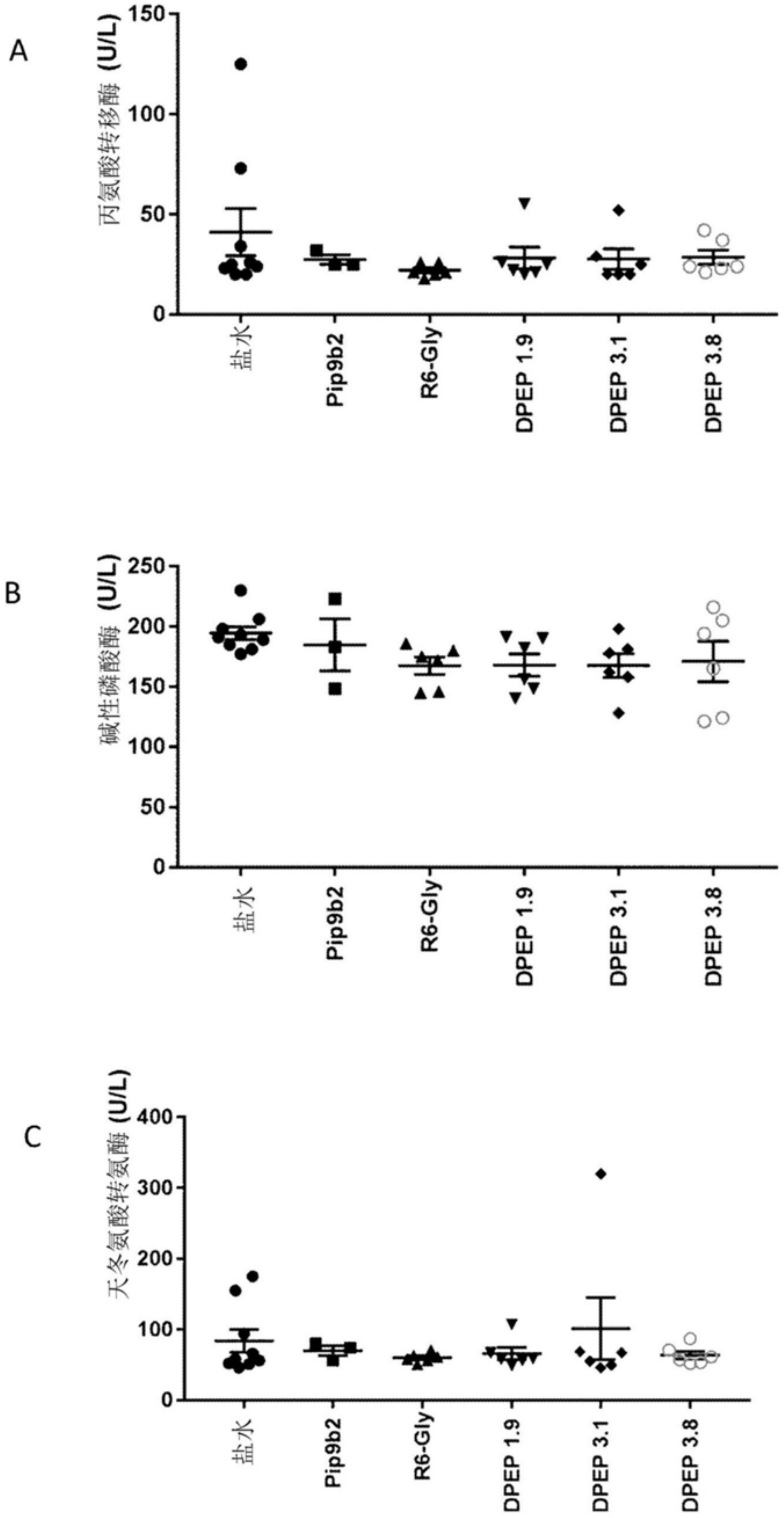
A
丙氨酸转移酶 (U/L)
150
100
50
0
盐水
Pip9b2
R6-Gly
DPEP 1.9
DPEP 3.1
DPEP 3.8
B
碱性磷酸酶 (U/L)
250
200
150
100
50
0
盐水
Pip9b2
R6-Gly
DPEP 1.9
DPEP 3.1
DPEP 3.8
C
天冬氨酸转移氨酶 (U/L)
400
300
200
100
0
盐水
Pip9b2
R6-Gly
DPEP 1.9
DPEP 3.1
DPEP 3.8

图9

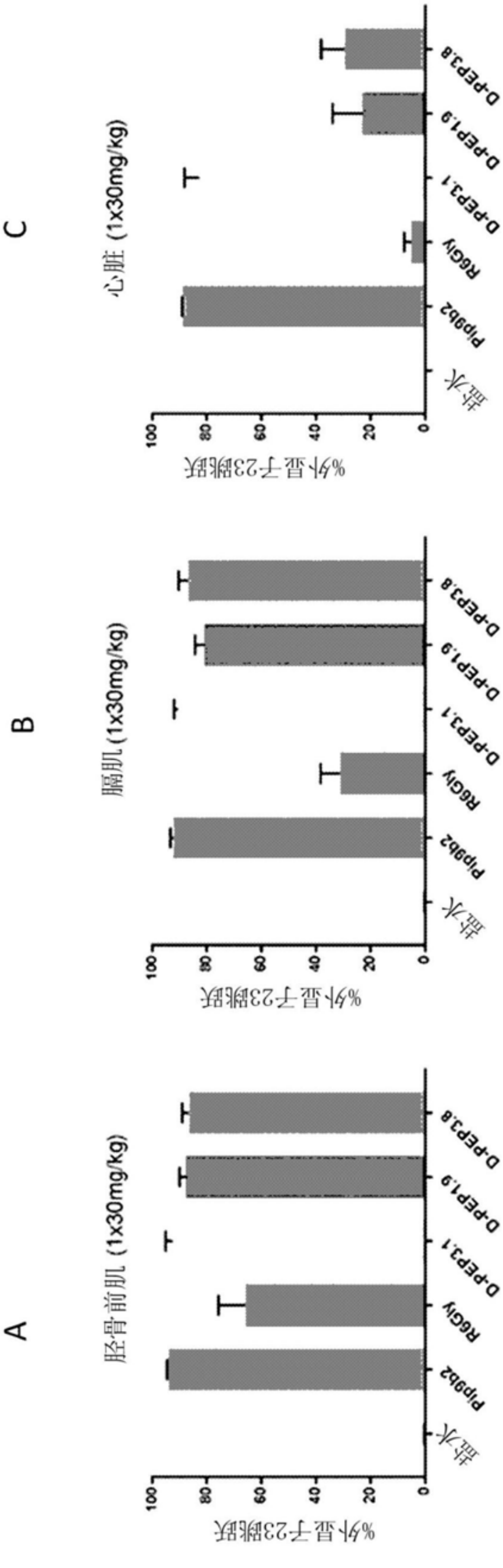
A
胫骨前肌 (1x30mg/kg)
B
膈肌 (1x30mg/kg)
C
心脏 (1x30mg/kg)
%外显子23跳跃
0
20
40
60
80
100
盐水
Pip9b2
R6Gly
D-PEP3.1
D-PEP1.9
D-PEP3.8

图10

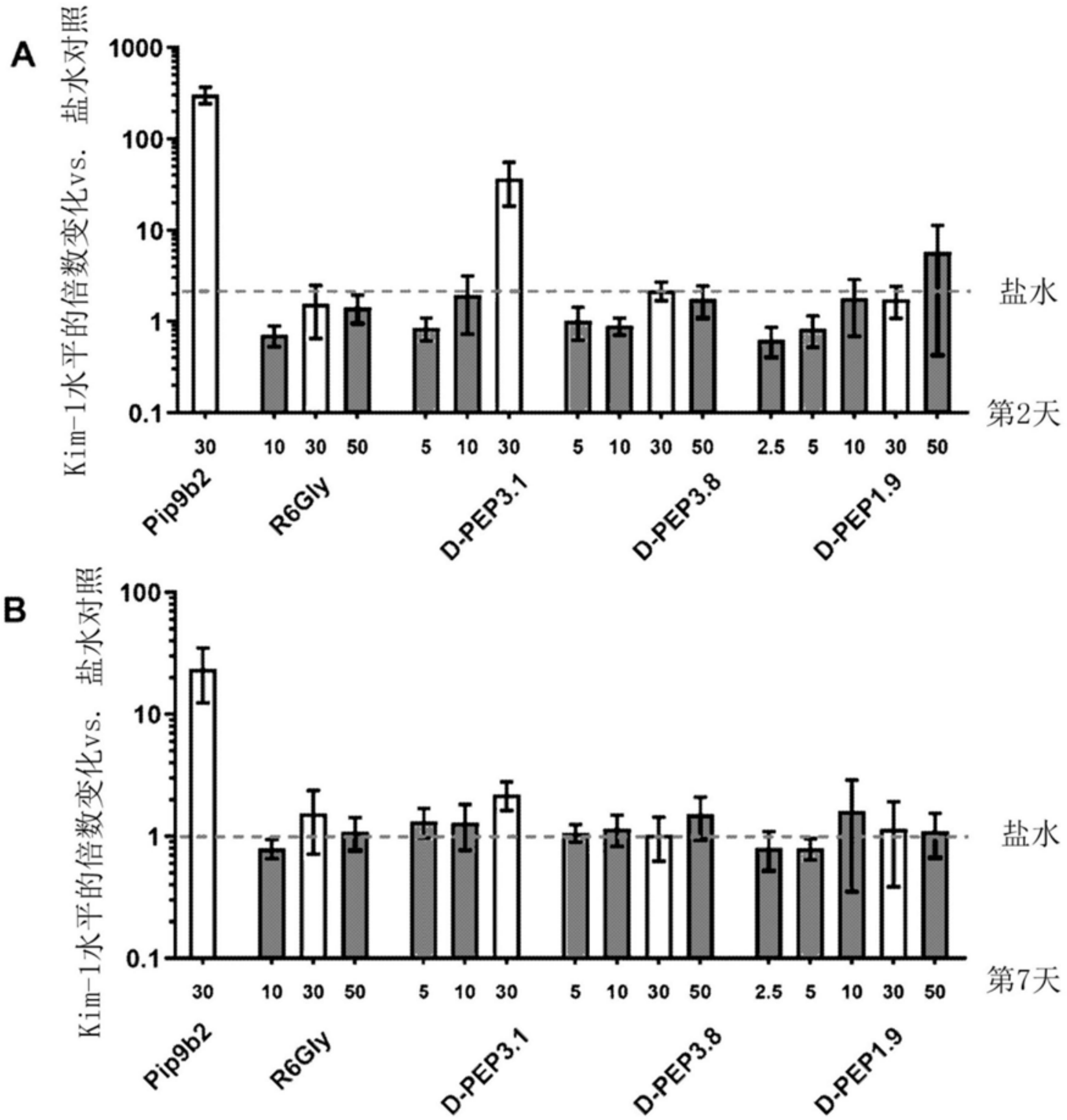
A
Kim-1水平的倍数变化vs. 盐水对照
1000
100
10
1
0.1
盐水
第2天
30
10 30 50
5 10 30
5 10 30 50
2.5 5 10 30 50
Pip9b2
R6Gly
D-PEP3.1
D-PEP3.8
D-PEP1.9
B
Kim-1水平的倍数变化vs. 盐水对照
100
10
1
0.1
盐水
第7天
30
10 30 50
5 10 30
5 10 30 50
2.5 5 10 30 50
Pip9b2
R6Gly
D-PEP3.1
D-PEP3.8
D-PEP1.9

图11

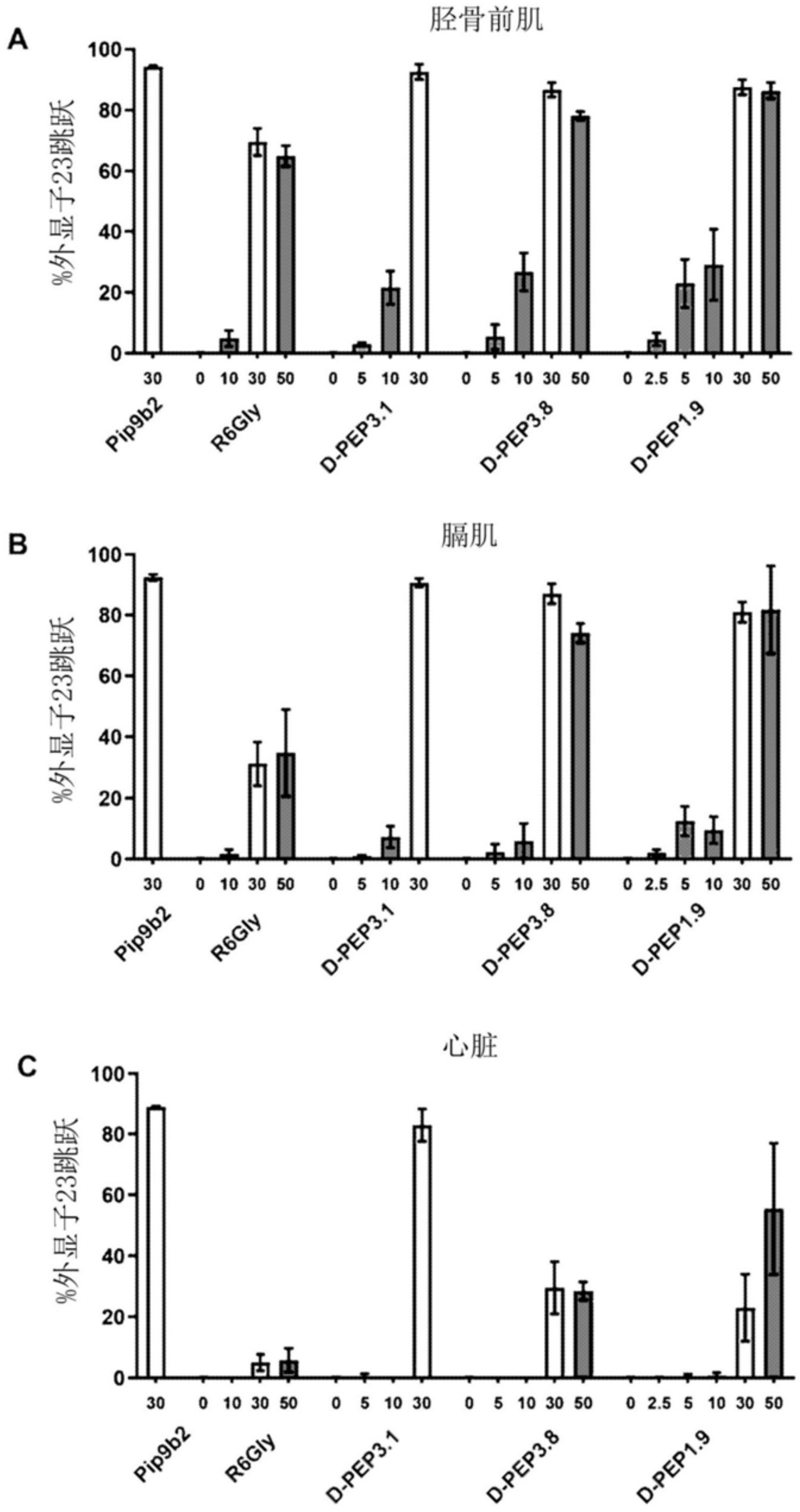
A
胫骨前肌
%外显子23跳跃
0
20
40
60
80
100
30
0 10 30 50
0 5 10 30
0 5 10 30 50
0 2.5 5 10 30 50
Pip9b2
R6Gly
D-PEP3.1
D-PEP3.8
D-PEP1.9
B
膈肌
%外显子23跳跃
0
20
40
60
80
100
30
0 10 30 50
0 5 10 30
0 5 10 30 50
0 2.5 5 10 30 50
Pip9b2
R6Gly
D-PEP3.1
D-PEP3.8
D-PEP1.9
C
心脏
%外显子23跳跃
0
20
40
60
80
100
30
0 10 30 50
0 5 10 30
0 5 10 30 50
0 2.5 5 10 30 50
Pip9b2
R6Gly
D-PEP3.1
D-PEP3.8
D-PEP1.9

图12

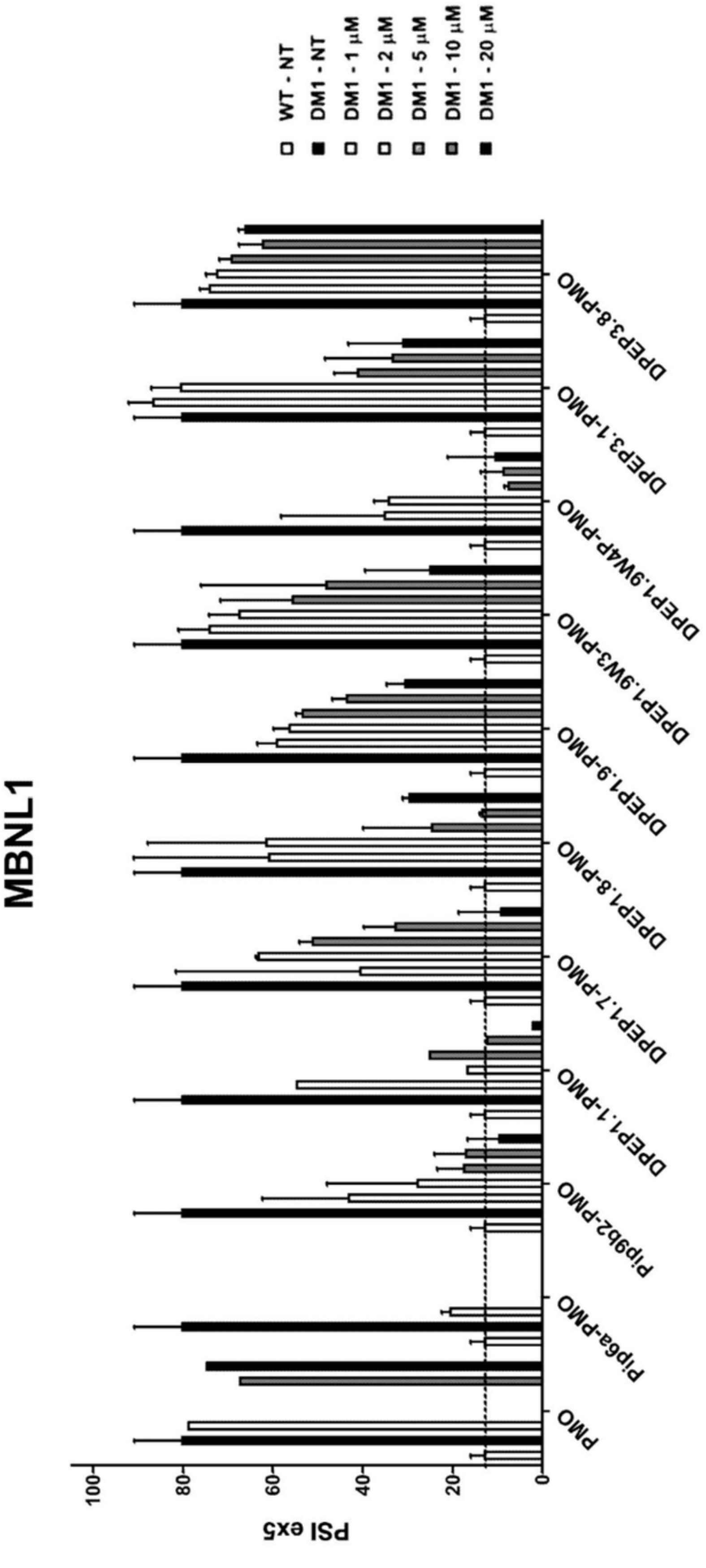
MBNL1
PSI ex5
0
20
40
60
80
100
PMO
Pip6a-PMO
Pip9b2-PMO
DPEP1.1-PMO
DPEP1.7-PMO
DPEP1.8-PMO
DPEP1.9-PMO
DPEP1.9W3-PMO
DPEP1.9W4P-PMO
DPEP3.1-PMO
DPEP3.8-PMO
WT - NT
DM1 - NT
DM1 - 1 μM
DM1 - 2 μM
DM1 - 5 μM
DM1 - 10 μM
DM1 - 20 μM

图13

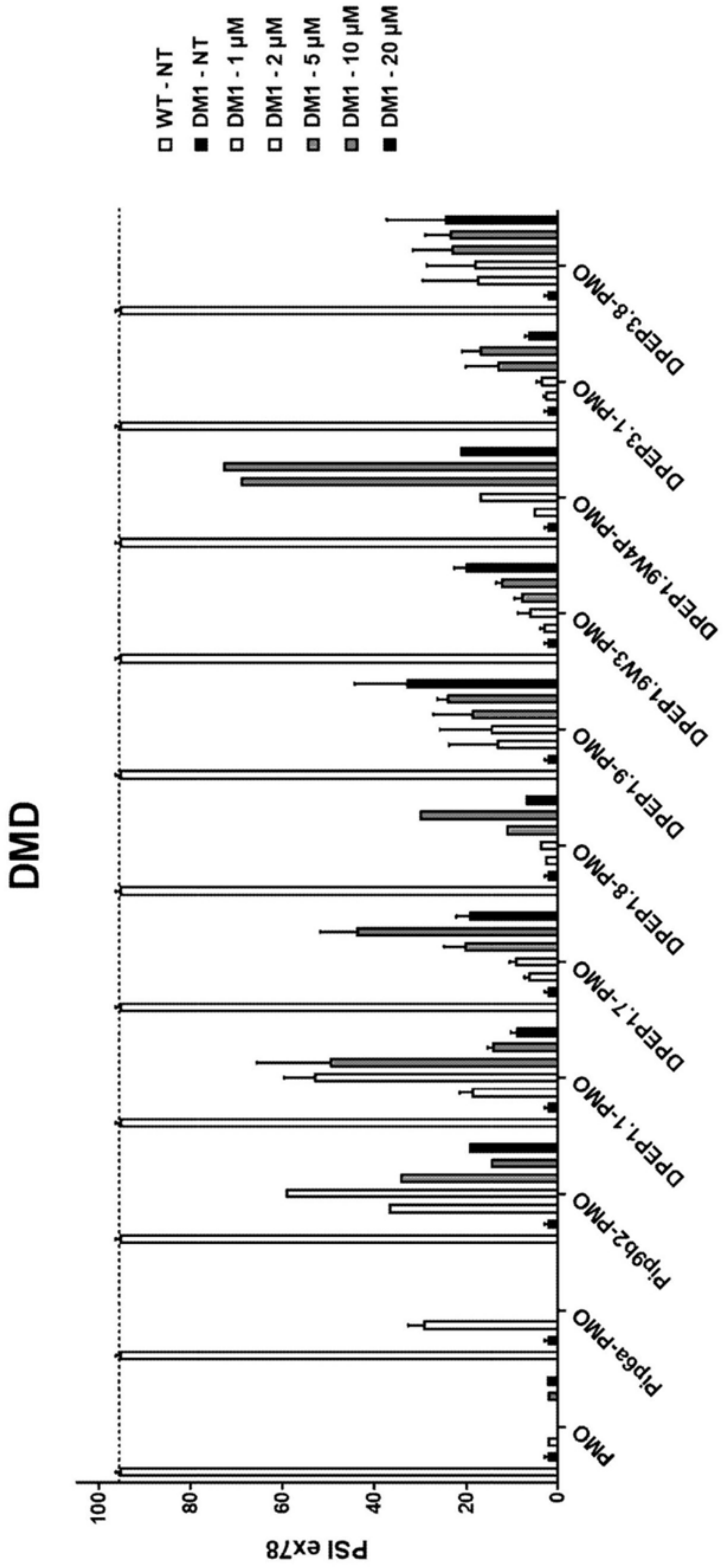
DMD
PSI ex78
100
80
60
40
20
0
PMO
Pip6a-PMO
Pip9b2-PMO
DPEP1.1-PMO
DPEP1.7-PMO
DPEP1.8-PMO
DPEP1.9-PMO
DPEP1.9W3-PMO
DPEP1.9W4P-PMO
DPEP3.1-PMO
DPEP3.8-PMO
WT - NT
DM1 - NT
DM1 - 1 μM
DM1 - 2 μM
DM1 - 5 μM
DM1 - 10 μM
DM1 - 20 μM

图14

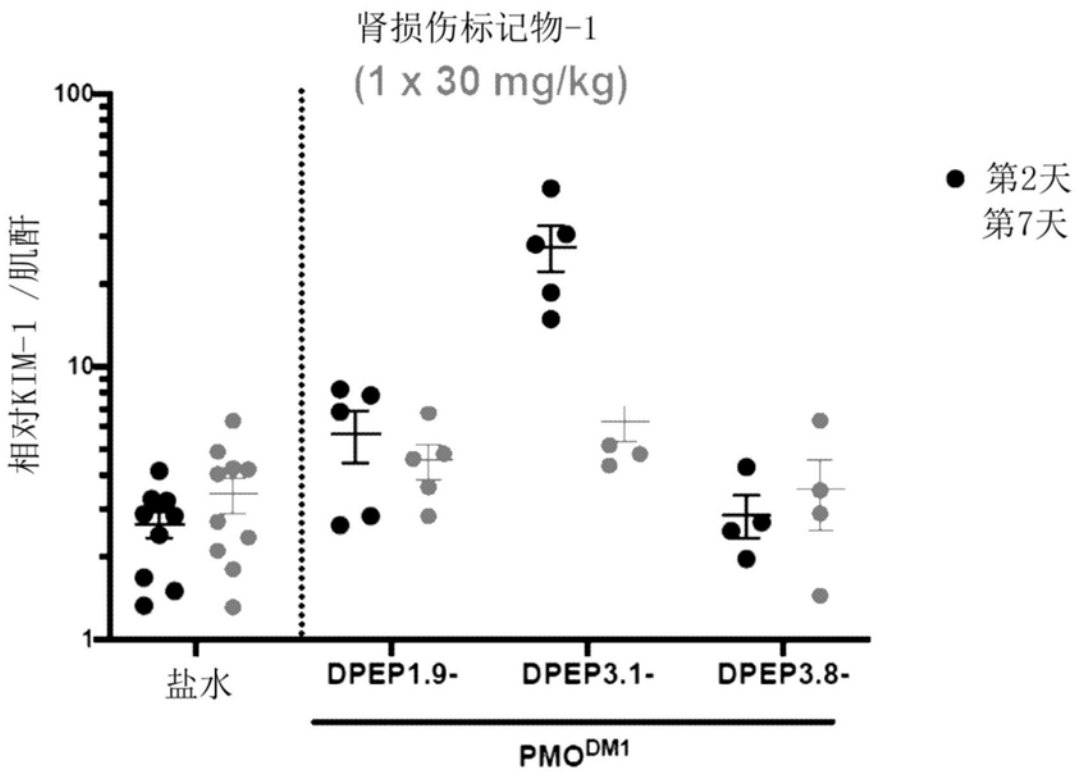
肾损伤标记物-1
(1 x 30 mg/kg)
100
10
1
相对KIM-1 /肌酐
第2天
第7天
盐水
DPEP1.9-
DPEP3.1-
DPEP3.8-
PMO^DM1

图15

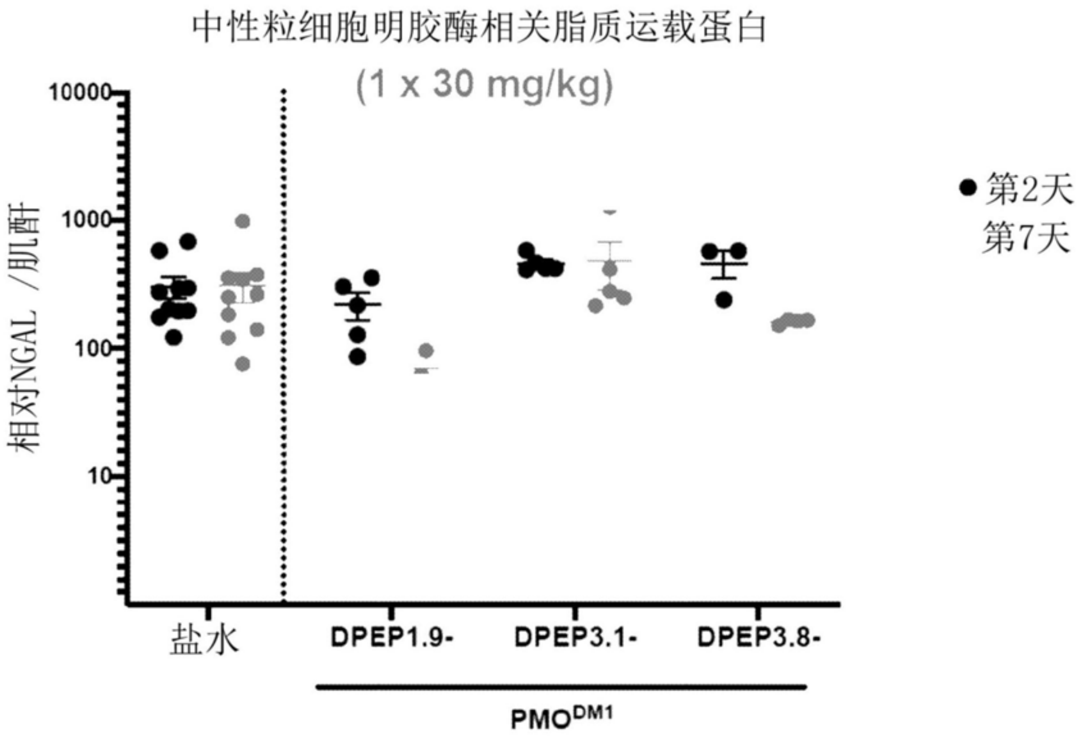
中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白
(1 x 30 mg/kg)
10000
1000
100
10
相对NGAL /肌酐
第2天
第7天
盐水
DPEP1.9-
DPEP3.1-
DPEP3.8-
PMO^DM1

图16

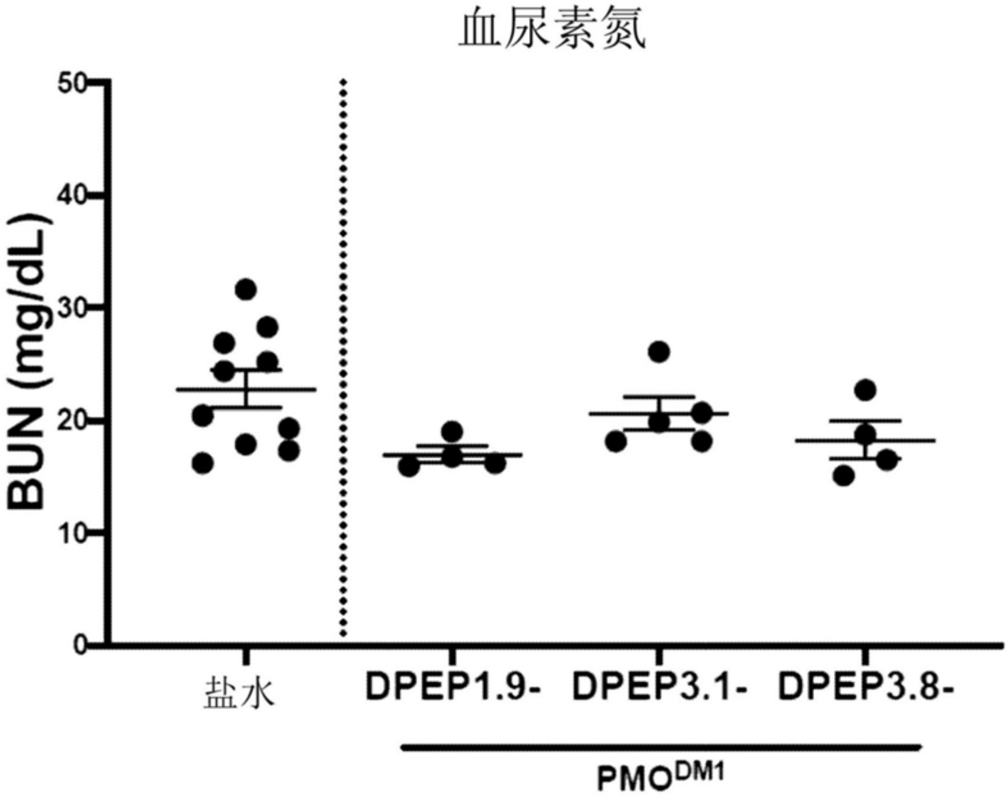

图17

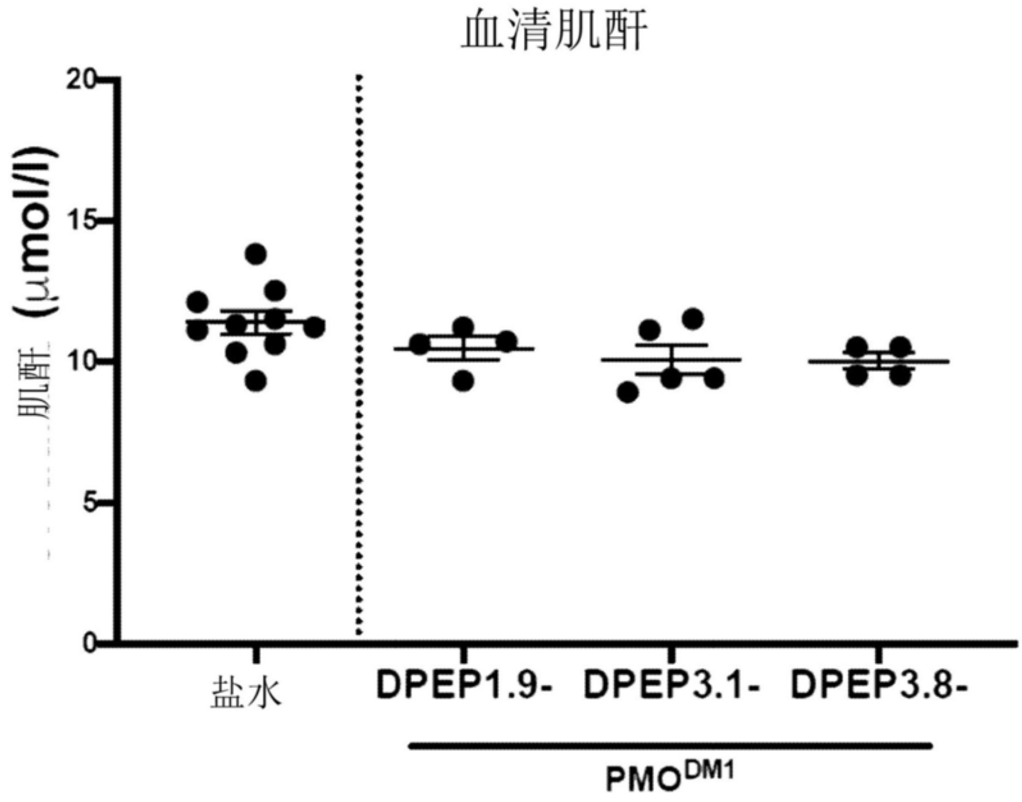

图18

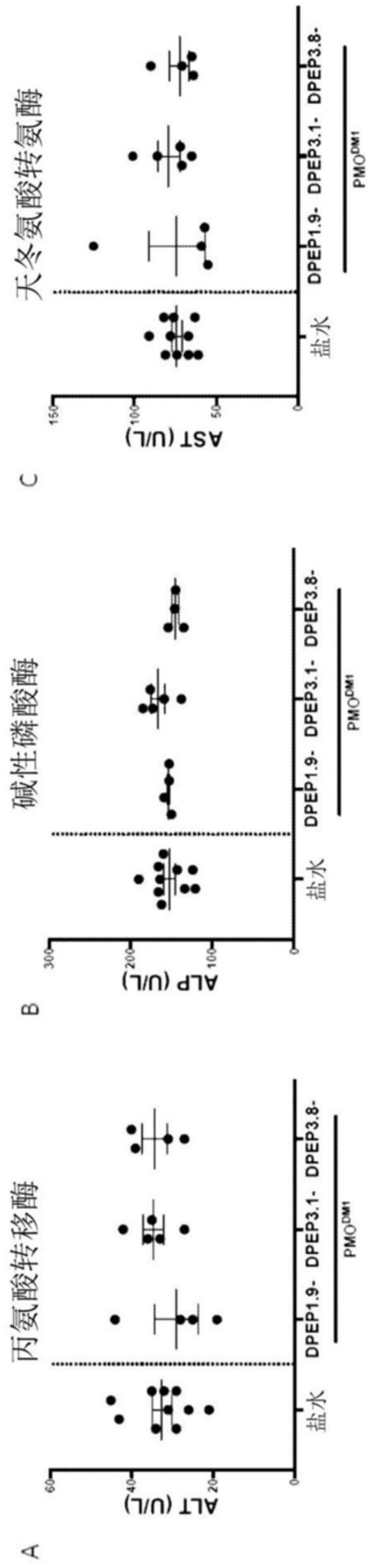
A
丙氨酸转移酶
ALT (U/L)
60
40
20
0
盐水
DPEP1.9-
DPEP3.1-
DPEP3.8-
PMO^DM1
B
碱性磷酸酶
ALP (U/L)
300
200
100
0
盐水
DPEP1.9-
DPEP3.1-
DPEP3.8-
PMO^DM1
C
天冬氨酸转氨酶
AST (U/L)
150
100
50
0
盐水
DPEP1.9-
DPEP3.1-
DPEP3.8-
PMO^DM1

图19