(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115243699 A
(43)申请公布日 2022.10.25

(21)申请号 202080069792.1
(22)申请日 2020.07.31
(30)优先权数据
62/908,687 2019.10.01 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/044510 2020.07.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/066931 EN 2021.04.08
(71)申请人 斯坦福国际研究院
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 凯瑟琳·C·布朗
迈克尔·麦圭尔 李顺子
因杜·维努戈帕尔
柯蒂斯·奥尔雷德
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞
(51)Int.Cl.
A61K 38/00(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

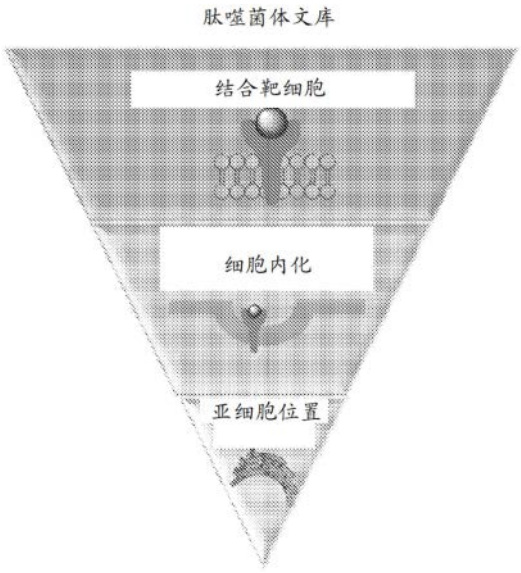
权利要求书2页 说明书21页
序列表19页 附图7页

(54)发明名称

分子导向系统肽及其用途

(57)摘要

公开了组合物，所述组合物包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列。公开了修饰目标基因的基因表达的方法，所述方法包括向细胞施用包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列的组合物，其中所述核酸序列结合至从所述目标基因转录的RNA、所述目标基因或所述目标基因上游的序列。公开了靶向细胞内靶标中的目标基因的方法，所述方法包括向细胞施用包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列的组合物，其中所述MGS肽靶向所述细胞内靶标，其中所述核酸序列结合至从细胞内靶标中的所述目标基因转录的RNA。



CN 115243699 A

1.一种组合物,所述组合物包含与一个或多个分子导向系统(MGS)肽缀合的核酸序列。

2.如权利要求1所述的组合物,其中所述核酸序列是反义寡核苷酸。

3.如权利要求1或2所述的组合物,其中所述核酸序列靶向细胞内靶标。

4.如权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个MGS肽包含序列:

YAAWPASGAWTGTAPCSAGT(SEQ ID NO:9);

LQWRRDDNVHNFGVWARYRL(SEQ ID NO:20);

RGDLATLRQLAQEDGVVGVR(SEQ ID NO:1);

ATEPRKQYATPRVFWTDAPG(SEQ ID NO:13);

FHAVPQSFYTAP(SEQ ID NO:17);

EHPWFNMWSWATQVQE(SEQ ID NO:30);或它们的组合。

5.如权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个MGS肽与YAAWPASGAWTGTAPCSAGT(SEQ ID NO:9)、LQWRRDDNVHNFGVWARYRL(SEQ ID NO:20)、RGDLATLRQLAQEDGVVGVR(SEQ ID NO:1)、ATEPRKQYATPRVFWTDAPG(SEQ ID NO:13)、FHAVPQSFYTAP(SEQ ID NO:17)、EHPWFNMWSWATQVQE(SEQ ID NO:30)或它们的组合具有至少95%至99%同一性的序列同一性。

6.如权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个MGS肽是乙酰化的。

7.如权利要求1-6中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个MGS肽是聚乙二醇化的。

8.如权利要求6-7中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个MGS肽包含序列:

CH_3CO-YAAWPASGAWT-PEG_{11}-C-NH2(SEQ ID NO:12);

CH_3CO-LQWRRNFGVWARYRL-PEG_{11}-C-NH2(SEQ ID NO:22);

CH_3CO-RGDLATLRQL-PEG_{11}-YC-NH2(SEQ ID NO:4);

CH_3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-YC-NH2(SEQ ID NO:6);

CH_3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-Y-NH_2(SEQ ID NO:7);

CH_3CO-KQYATPRVFWT-PEG_{11}-C-NH2(SEQ ID NO:16);

CH_3CO-FHAVPQSFYT-PEG_{11}-C-NH2(SEQ ID NO:19);或它们的组合。

9.如权利要求6-7中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个MGS肽与CH3CO-YAAWPASGAWT-PEG11-C-NH2(SEQ ID NO:12);CH3CO-LQWRRNFGVWARYRL-PEG11-C-NH2(SEQ ID NO:22);CH3CO-RGDLATLRQL-PEG11-YC-NH2(SEQ ID NO:4);CH3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG11-YC-NH2(SEQ ID NO:6);CH3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG11-Y-NH2(SEQ ID NO:7);CH3CO-KQYATPRVFWT-PEG11-C-NH2(SEQ ID NO:16);CH3CO-FHAVPQSFYT-PEG11-C-NH2(SEQ ID NO:19);或它们的组合具有至少95%至99%同一性的序列同一性。

10.如权利要求1-9中任一项所述的组合物,其中所述核酸序列通过接头与一个或多个MGS肽缀合。

11.如权利要求1-10中任一项所述的组合物,其中所述核酸序列包含标记。

12.如权利要求11所述的组合物,其中所述标记是荧光染料。

13.如权利要求1-12中任一项所述的组合物,其中所述核酸序列的长度是10-30个核苷酸。

14.如权利要求1-13中任一项所述的组合物,其中所述核酸序列是DNA或RNA。

15.一种降低目标基因的基因表达的方法,所述方法包括向细胞施用与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列,其中所述核酸序列与从所述目标基因转录的RNA结合。

16.一种靶向细胞内靶标中的目标基因的方法,所述方法包括向细胞施用与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列,其中所述MGS肽靶向所述细胞内靶标,其中所述核酸序列结合至从细胞内靶标中的所述目标基因转录的RNA。

17.如权利要求16所述的方法,其中所述细胞内靶标是溶酶体、高尔基体、内质网、细胞质或细胞核。

18.如权利要求16或17所述的方法,其中所述目标基因是其表达或过表达对所述细胞有害的任何基因。

19.一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用有效量的与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列,其中所述MGS肽靶向参与疾病过程的细胞内靶标。

20.如权利要求19所述的方法,其中所述细胞内靶标是溶酶体、高尔基体、内质网、细胞质或细胞核。

21.如权利要求19或20所述的方法,其中所述核酸序列与从所述细胞内靶标内的目标基因转录的RNA结合。

22.如权利要求21所述的方法,其中所述目标基因是其表达或过表达参与所述疾病过程的任何基因。

23.如权利要求21或22所述的方法,其中所述核酸序列与从所述目标基因转录的所述RNA的结合导致所述目标基因的表达降低。

24.如权利要求15-23中任一项所述的方法,其中所述MGS肽是表1中描述的MGS肽中的一者或多者。

分子导向系统肽及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年10月1日提交的美国临时专利申请号62/908,687的权益,所述申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助研究的声明

[0004] 本发明是在美国医学研究收购活动(USA Medical Research Acq uisition Activity,USAMRAA)授予的合同号W81XWH-16-1-0262和美国国立卫生研究院(The National Institutes of Health)授予的授权号7R01CA164447和7R01EB014244下在政府支持下进行的。政府对本发明具有某些权利。

[0005] 对序列表的引用

[0006] 以名为“37794_0094P1_Sequence_Listing.txt”、2020年7月30日创建的并且大小为18,505字节的文本文件于2020年7月31日提交的序列表根据37C.F.R.§1.52(e)(5)特此以引用的方式并入。

背景技术

[0007] 需要将治疗性核酸递送至特定细胞类型和此细胞内的特定位置的系统性细胞靶向系统。

[0008] 将治疗剂递送至特定靶细胞以及此细胞内的正确区室的能力可具有许多社会健康益处。分子导向系统(MGS)组合可创建一类新的安全且有效的细胞内作用疗法,具有治疗迄今为止“不可用药”靶标的潜力。这为治疗新出现的传染病和生物恐怖主义,用于癌症、糖尿病、神经和神经变性疾病以及甚至遗传疾病的新疗法开辟了新的治疗策略。MGS组合治疗剂可创造全新的市场,影响几乎所有的疾病状态,并在现代医学中取得重大突破。

发明内容

[0009] 公开了组合物,所述组合物包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列。

[0010] 公开了修饰目标基因的基因表达的方法,所述方法包括向细胞施用包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列的组合物,其中所述核酸序列结合至从所述目标基因转录的RNA、所述目标基因或所述目标基因上游的序列。

[0011] 公开了靶向细胞内靶标中的目标基因的方法,所述方法包括向细胞施用包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列的组合物,其中所述MGS肽靶向所述细胞内靶标,其中所述核酸序列结合至从细胞内靶标中的所述目标基因转录的RNA。

[0012] 公开了治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用有效量的与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列,其中所述MGS肽靶向参与疾病过程的细胞内靶标。

[0013] 所公开方法和组合物的另外优点将在以下描述中部分阐述,并且将从描述中部分地理解,或者可通过实践所公开的方法和组合物来习得。所公开的方法和组合物的优点将借助在所附权利要求书中特别指出的要素和组合来实现和达到。应理解,以上概述和以下

详述都仅是示例性和解释性的，并且不限制要求保护的本发明。

附图说明

[0014] 并入本说明书中并且构成本说明书的一部分的附图说明所公开方法和组合物的一些实施方案，并且与描述一起用于阐释所公开方法和组合物的原理。

[0015] 图1是分子导向系统(MGS)的示意图。分子靶向肽将通过FOX-Three技术进行鉴定。所述肽将货物特异性地递送至靶细胞，同时避免吸收在其他细胞中。内化后，肽将货物引导至所述细胞内的所需位置。

[0016] 图2是示出可通过使治疗性核酸序列靶向特定亚细胞器来进行操纵的细胞过程的实例的图。

[0017] 图3示出与没有MGS帮助的荧光团标记的核酸序列的内化特征相比，具有荧光团标记的核酸序列货物的MGS的实例在两种不同的温度下被内化到四种不同的细胞类型中。T^{m}CAG^{m}CATT^{m}CTAATAG ^{m}CAG^{m}C-Cy3(SEQ ID NO:X)是与己基氨基或MGS缀合使用的核酸序列，其中“m”表示甲基化。cEt-BNA是限制性乙基桥联核酸;PSASO是硫代磷酸酯反义寡核苷酸;PO:磷酸二酯键联。位置4-6和17-19中的核苷酸是cEt BNA，黑色具有硫代磷酸酯键联，并且黑色/加下划线具有磷酸二酯键联。

[0018] 图4示出图3中描述的实验的实际荧光数据，其示出荧光团内化至不同细胞类型中。

[0019] 图5示出在与MGS缀合和未缀合的情况下，siRNA递送至不同细胞类型中。

[0020] 图6示出MGS递送增加反义寡核苷酸(ASO)在靶细胞中的效力并降低在非靶细胞中的作用。

[0021] 图7示出免疫荧光研究，其中MGS改进了ASO递送至靶细胞类型。

具体实施方式

[0022] 通过参考特定实施方案的以下详细描述和其中包括的实施例以及附图和其先前和以下描述可更容易地理解所公开的方法和组合物。

[0023] 应理解，除非另有说明，否则所公开的方法和组合物不限于具体的合成方法、具体的合成技术或特定的试剂，并且因此这些可以变化。还应理解本文使用的术语仅出于描述特定的实施方案的目的并且不意图具有限制性。

[0024] 本发明公开了可用于、可结合用于、可用于制备的材料、组合物和组分，或是所公开方法的产品和组合物。本文公开了这些和其他材料，并且应当理解当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时，尽管可能不能明确地公开每个不同的个体和这些化合物的各种组合和排列的具体参考，但是每个都应特别考虑并在本文描述。例如，如果公开并讨论了肽，并且讨论了可对包括MGS肽的多个分子进行的多种修饰，那么特别设想组合物的每个和每种组合和排列以及可能的修改，除非相反地明确指出。因此，如果公开了一类分子A、B和C以及一类分子D、E和F并且公开了组合分子的实例A-D，那么即使没有单独列举每种情况，每种情况都单独和整体地包括在本发明的预想之中。因此，在此实例中，特别考虑组合A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F中的每一个，并且应认为将其从公开A、B和C;D、E和F中公开;以及示例性组合A-D。同样，还特别设想并公开了这些的任何子集或组合。因此，例如，特别

设想子组A-E、B-F和C-E，并且应认为将其从公开A、B和C；D、E和F中公开；以及示例性组合A-D。此概念适用于本申请的所有方面，包括但不限于制备和使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此，如果存在多个可执行的额外步骤，应当理解，这些额外步骤中的每一个可以所公开的方法的任何具体的实施方案或实施方案的组合来执行，并且特别考虑且应认为公开每个这样的组合。

[0025] A.定义

[0026] 应当理解，所公开的方法和组合物不限于所描述的特定方法、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解，本文中使用的术语仅为了描述特定实施方案的目的，并非旨在限定本发明的范围，本发明的范围只受所附权利要求书限定。

[0027] 必须注意的是，除非上下文另外清楚指出，否则如本文和随附权利要求书中所用，单数形式“一(a/an)”和“所述”包括复数个指代对象。因此，例如，提及“MGS”包括多种此类MGS，提及“核酸序列”是提及一个或多个核酸序列及本领域技术人员已知的其等效物等。

[0028] 如本文所用，“治疗”意指将本发明的组合物施用于患有疾病或疾患的受试者，如人或其他哺乳动物(例如，动物模型)，以预防或延缓疾病或疾患的影响的恶化，或部分或完全逆转疾病或疾患的影响。在一些方面中，疾病或疾患可以是癌症。可出于降低发展与疾病、病症和/或疾患相关的病理的风险的目的，向未表现出疾病、病症和/或疾患的体征的受试者和/或向仅表现出疾病、病症和/或疾患的早期体征的受试者施用治疗。在一些实施方案中，治疗包括将一种或多种所公开的组合物递送至受试者。

[0029] 如本文所用，“预防”意指使具有增加的发展疾病、病症或疾患的易感性的受试者将发展所述疾病、病症或疾患的机会最小化。

[0030] 如本文所用，术语“受试者”是指施用的靶标，例如人。因此所公开方法的受试者可以是脊椎动物，诸如哺乳动物、鱼、鸟、爬行动物或两栖动物。术语“受试者”还包括家养动物(例如，猫、犬等)、家畜(例如，牛、马、猪、绵羊、山羊等)和实验室动物(例如，小鼠、兔、大鼠、豚鼠、果蝇等)。在一个方面中，所述受试者为哺乳动物。在另一个方面中，所述受试者为人类。所述术语不指示特定年龄或性别。因此，旨在涵盖成人、儿童、青少年和新生儿受试者，以及胎儿，无论是雄性还是雌性。

[0031] 如本文所用，术语“患者”是指患有疾病或病症的受试者。术语“患者”包括人和兽医受试者。在所公开的方法的一些方面中，在施用步骤之前，“患者”已被诊断为需要治疗。

[0032] 如本文所用，术语“氨基酸序列”是指表示氨基酸残基的缩写、字母、字符或单词的列表。本文使用的氨基酸缩写是氨基酸的常规单字母代码，并且表示如下：A，丙氨酸；C，半胱氨酸；D，天冬氨酸；E，谷氨酸；F，苯丙氨酸；G，甘氨酸；H，组氨酸；I，异亮氨酸；K，赖氨酸；L，亮氨酸；M，甲硫氨酸；N，天冬酰胺；P，脯氨酸；Q，谷氨酰胺；R，精氨酸；S，丝氨酸；T，苏氨酸；V，缬氨酸；W，色氨酸；Y，酪氨酸。

[0033] 如本文所用，“多肽”是指任何肽、寡肽、多肽、基因产物、表达产物或蛋白质。多肽由连续氨基酸组成。术语“多肽”涵盖天然存在的或合成的分子。

[0034] 此外，如本文所用，术语“多肽”是指通过肽键或经修饰的肽键(例如肽等排体等)彼此连接的氨基酸，并且可含有除20种基因编码的氨基酸以外的经修饰的氨基酸。所述多肽可通过天然过程(如翻译后加工)或通过本领域中熟知的化学修饰技术进行修饰。修饰可发生于多肽中的任何地方，包括肽主链、氨基酸侧链以及氨基或羧基末端。同一类型的修饰

可在给定多肽中的若干位点处以相同或不同程度存在。此外，给定多肽可具有许多类型的修饰。修饰包括但不限于乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价交联或环化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、二硫键形成、脱甲基、半胱氨酸或焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ-羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化以及转移RNA介导的向蛋白质添加氨基酸(如精氨酰化)。(参见Proteins—Str ucture and Molecular Properties第2版，T.E.Creighton,W.H.Free man and Company,New York(1993);Posttranslational Covalent Modification of Proteins,B.C.Johnson,编辑,Academic Press,New York,第1-12页(1983))。

[0035] 如本文所用的短语“核酸序列”是指天然存在的或合成的寡核苷酸或多核苷酸，无论是DNA或RNA或DNA-RNA杂合体、单链或双链、有义或反义，其能够通过沃森-克里克碱基配对与互补核酸杂交。本发明的核酸序列还可包括核苷酸类似物(例如，BrdU)和非磷酸二酯核苷间键联(例如，肽核酸(PNA)或硫二酯键联)。特别地，核酸序列可包括但不限于DNA、RNA、cDNA、gDNA、ssDNA、dsDNA或它们的任何组合。

[0036] 如本文所用，组合物的“有效量”是指足以提供所需效果的组合物的量。所需要的精确量将根据受试者的种类、年龄和一般状况、所治疗的疾病的严重性(或潜在遗传缺陷)、所使用的特定化合物、其施用方式等而在受试者与受试者之间变化。因此，不能指定精确的“有效量”。然而，适当的“有效量”可由本领域普通技术人员仅仅使用常规实验来确定。

[0037] 如本文所用，“选择性地结合”是指核酸序列(例如货物)或MGS识别其靶标(例如特定细胞类型)并与其靶标物理相互作用，并且不回显著识别其他靶标并与其他靶标相互作用。

[0038] 术语“同源性百分比(%)”在本文中与术语“同一性百分比(%)”可互换使用，并且是指当使用序列比对程序与野生型序列或目标序列比对时的核酸或氨基酸序列同一性的水平。例如，如本文所用，80％同源性意指相同的事物为通过定义的算法确定的80％序列同一性，并且因此给定序列的同源物在给定序列的长度上具有大于80％序列同一性。序列同一性的示例性水平包括但不限于与给定序列，例如如本文所述的MGS多肽中的任一者的80％、85％、90％、95％、98％或更大序列同一性。可用于确定两个序列之间的同一性的示例性计算机程序包括但不限于BLAST程序套件，例如可在因特网上公开获得的BLA STN、BLASTX和TBLASTX、BLASTP和TBLASTN。还参见Altsc hul等，1990和Altschul等，1997。当相对于GenBankDNA序列和其他公开数据库中的核酸序列评估给定的核酸序列时，通常使用BLAS TN程序来实施序列查找。BLASTX程序优选用于查找已经在针对GenBank蛋白质序列和其他公开数据库中的氨基酸序列的所有阅读框中翻译的核酸序列。BLASTN和BLASTX两者均使用默认参数11.0的开放空位罚分和1.0的延伸空位罚分来运行，并利用BLOSUM-62矩阵。(参见例如，Altschul,S.F.等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997。)为了确定两个或更多个序列之间的“同一性％”而进行的所选序列的优选比对使用例如以默认参数操作的Mac Vector版本13.0.7的CLUSTAL-W程序以及BLOSUM 30相似性矩阵来进行，所述默认参数包括10.0的开放缺口罚分、0.1的延伸缺口罚分。

[0039] 取代、缺失、插入或它们的任何组合可用于得到最终衍生物、变体或类似物。一般

而言，这些变化是在一些核苷酸上进行的，以使分子的改变最小化。但是，在某些情况下可以容忍更大的变化。

[0040] 通常，个别变体序列之间的核苷酸同一性可以是至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％。因此，“变体序列”可以是这样的序列，所述序列与本发明的亲本或参考序列(例如野生型序列)具有特定同一性并且共享生物学功能，包括但不限于亲本序列的特异性和/或活性的至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％。例如，“变体序列”可以是与本发明的亲本或参考序列相比含有1、2或3、4个核苷酸碱基变化并且共享或改善了亲本序列的生物学功能、特异性和/或活性的序列。因此，“变体序列”可以是这样的序列，所述序列与本发明的亲本序列具有特定同一性并且共享生物学功能，包括但不限于亲本序列的特异性和/或活性的至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％。变体序列也可共享参考序列(例如MGS序列)的特异性和/或活性的至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％。

[0041] 如本文所用，“调节”意指通过增加或减少来改变。

[0042] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件、情况或材料可发生或可不发生或存在，并且描述包括其中事件、情况或材料发生或存在的情况和其中不发生或不存在的情况。

[0043] 范围可在本文中表达为自“约”一个特定值起和/或至“约”另一个特定值止。除非上下文另外明确指出，否则当表达、还特别考虑并认为公开的范围是自一个特定值起和/或至另一个特定值止的范围。类似地，在通过使用先行词“约”将值表示为近似值时，应理解，除非上下文另外明确指出，否则具体值形成另一个应认为公开的特别设想的实施方案。应进一步理解，除非上下文另外明确指出，否则每个范围的端点相对于另一个端点并独立于另一个端点均为重要的。最后，应理解，除非上下文另外明确指出，否则明确公开的范围内包含的所有单个值和值的子范围也被特别设想，并且应认为公开。无论是否在特定情况下明确公开这些实施方案中的一些或所有，前述内容均适用。

[0044] 除非另外定义，否则本文所用的所有技术性和科学性术语具有与本公开方法和组合物所属领域中的技术人员通常所理解相同的含义。尽管在本发明方法和组合物的实践或测试中可使用与本文中所描述的那些方法和材料相似或相等的任何方法和材料，但特别有用的方法、装置和材料如所描述。本文中引述的公布及其中引述的材料在此特别地通过引用并入。本文中的任何内容均不得解释为承认本发明无权凭借在先发明而先于这个公开。不承认任何参考文献构成先前技术。参考文献的论述内容陈述了作者所主张的观点，并且申请人保留对所引用文件的准确性和相关性提出质疑的权利。应明确理解的是，虽然本文提到了许多公布，但这种引用并不构成承认这些文献中的任何一个构成本领域公知常识的一部分。

[0045] 贯穿本说明书的描述和权利要求书，词“包括”和所述词的变型诸如“包含/包括(comprising/comprises)”意指“包括但不限于”并且不旨在排除例如其他添加剂、组分、整数或步骤。具体地，在被叙述为包括一个或多个步骤或操作的方法中，特别考虑每个步骤包括所列出的事物(除非步骤包括限制性术语，诸如“由.....组成”)，这意指每个步骤并非旨在排除例如步骤中未列出的其他添加剂、组分、整数或步骤。

[0046] B.组合物

[0047] 公开了组合物,所述组合物包含与一个或多个MGS肽缀合的货物。在一些方面中,所述货物是核酸。因此,公开了组合物,所述组合物包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列。在一些方面中,所公开的组合物可被称为膜可渗透组合物或缀合物,因为它们可用于跨脂质膜转运。

[0048] 公开了待用于制备所公开组合物的组分以及将在本文公开的方法内使用的组合物本身。本文公开了这些和其他材料,并且应当理解

[0049] 当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,尽管可能不能明确地公开每个不同的个体和这些化合物的各种组合和排列的具体参考,但是每个都应特别设想并在本文描述。

[0050] 1.MGS肽

[0051] 本文公开了MGS肽或靶向肽。这些肽可选择性地结合至细胞。可在所公开的组合物中使用或修饰的MGS肽的实例可包括但不限于McGuire等人,Sci Rep.2014年3月27日;4:4480中公开的一个或多个MGS肽。还可用于所公开的组合物和方法中的MGS肽的实例包括但不限于表1中所示的MGS序列。

[0052] 表1.MGS肽序列。

[0053]

肽名称	肽序列	SRI 参	SEQ ID NO:

[0054]

		考号:	
MGS_H 2009.1	RGDLATLRQLAQEDGVVGVR	44	1
	D-Leu-RGDLATLRQL	12	2
	CH_3CO- D-Leu-RGDLATLRQL	13	3
MGS_20 09.1 V4	CH3CO-RGDLATLRQL-PEG_{11}-YC-NH_2	80	4
	CH3CO-RGDLATLRQL-PEG_{11}-Y-NH_2		5
MGS_H 2009.1 V5	CH3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-YC-NH_2	81	6
	CH3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-Y-NH_2		7
	CH_3CO-RGDLATLRQL	新编号	8
MGS_12 99.2	YAAWPASGAWTGTAPCSAGT	41	9
	YAAWPASGAWT	9	10
	CH_3CO-YAAWPASGAWT	10	11
MGS_12 99.2 V4	CH3CO-YAAWPASGAWT-PEG_{11}-C-NH_2	78	12
MGS_H CC15.1	ATEPRKQYATPRVFWTDAPG	49	13
	KQYATPRVFWT	38	14
	CH_3CO- KQYATPRVFWT	39	15
MGS_H CC15.1 V4	CH_3CO- KQYATPRVFWT -PEG_{11}-C-NH_2	82	16
MGS_H CC15.2	FHAVPQSFYTAP	50	17
	CH_3CO-FHAVPQSFYT	6	18
MGS_H CC15.2 V8	CH3CO-FHAVPQSFYT-PEG_{11}-C-NH_2	83	19
MGS_12 99.3	LQWRRDDNVHNFGVWARYRL	42	20
	LQWRRNFGVWARYRL	36	21
MGS_12 99.3 V2	CH3CO-LQWRRNFGVWARYRL-PEG_{11}-C-NH_2	79	22

[0055]

MGS_H460.1	EAMNSAEQSAAVVQWEKRRI	51	23
MGS_H1299.1	VSQTMRQTAVPLLWFWTGSL	40	24
MGS_A549.1	MTVCNASQRQAHAQATAVSL	52	25
MGS_HCC95.1	MRGQTGKLPTEHFTDTGVAF	60	26
MGS_H1155.1	MTGKAAAPHQEDRHANGLEQ	61	27
MGS_H1155.2	MEKLPLSKTGRTVSEGVSPP	62	28
MGS_H666.1	TNSCRGDWLCDAVPEKARV	63	29
MGS_H2009.2	EHPWFNMWSWATQVQE	45	30
	EHPWFNMWSWATQVQEKKK	27	31
MGS_H2009.3	YPGSPTQYPSSMHEYHSSSE	46	32
MGS_H2009.4	AHTIDDEWASYHMQQWNSPP	47	33
MGS_H2009.5	FEEFYSRQSNTIPYPQQYKG	48	34
MGS_H1993.1	SVEYWGERMYYDVMESLGFS	54	35
MGS_H1993.2	FAAKRAEWWDPGQLWDAVWN	55	36
MGS_H1993.3	QEALEEWFWKMMPWSGPSGQ	56	37
MGS_H1993.4	TWTDFGQWPWPFGAEGTRAF	57	38
MGS_H1993.5	MDGATWWTQLDPLLVWEGET	58	39
MGS_H1993.6	SADWFQGPAEWLLEGWMGPL	59	40
MGS_MCF7.1	LTVHGRGPEYNPSWNRRAFP	53	41
MGS_A	SAKTAVSQRVWLPSHRGGEP	64	42

[0056]

20.1			
MGS_A20.2	KSREHVNNSACPSKRITAAL	65	43
MGS_PCM.1	WLSEAGPVVTVRALRGTGSW	66	44
MGS_C2C12.1	TGGETSGIKKAPYASTTRNR	67	45
MGS_C2C12.2	SHHGVAGVDLGGGADFKSIA	68	46
MGS_C2C12.3	SNSPLGLKDEATQRLVLEQAKWLA	69	47
MGS_XS52.1	GPEDTSRAPENQQKTFHRRW	70	48
MGS_XS52.2	SGETGSNLVGHELDFRPGSPSP	71	49
MGS_XS106.1	RYSPAATAEGRSVSKELLRV	72	50
MGS_717US.1	GQELGAWTRSKGPEVQTSVL	73	51
MGS_717S.1	ASTWRGTSAGGNRLEKMEVT	74	52
MGS_RIP.1	LSGTPERSGQAVKVKLKAIP	75	53
MGS_RIP.2	GAWEAVRDRIAEWGSWGIPS	76	54
MGS_MArg.1_细菌	AMDMYSIEDRYFGGYAPEVG	77	55

[0057] 在一些方面中,所述一个或多个MGS肽包含YAAWPASGAWT GTAPCSAGT(SEQ ID NO:9);LQWRRDDNVHNFGVWARYRL(SEQ ID NO:20);RGDLATLRQLAQEDGVVGVR(SEQ ID NO:1);ATEPRKQYATPRVFWTDAPG(SEQ ID NO:13);FHAVPQSFYTA P(SEQ ID NO:17);EHPWFNMWSWATQVQE(SEQ ID NO:30)或它们的组合的序列。

[0058] 在一些方面中,所述一个或多个MGS肽与YAAWPASGAWTG TAPCSAGT(SEQ ID NO:9);LQWRRDDNVHNFGVWARYRL(SE Q ID NO:20);RGDLATLRQLAQEDGVVGVR(SEQ ID NO:1);ATEPRKQYATPRVFWTDAPG(SEQ ID NO:13);FHAVPQSFYTAP(SEQ ID NO:17);或EHPWFNMWSWATQVQE(SEQ ID NO:30)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列同一性。在一些方面中,所述一个或多个MGS肽与本文公开的任何MGS肽具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列同一性。

[0059] 在一些方面中,可优化MGS肽。例如,优化了SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、11、12、15、16、18、19和22。通过对FOX-3平台技术鉴定的单个亲本肽序列进行修饰而获得优化的肽。这些修饰用于鉴定亲本序列中细胞特异性结合和内化所需的必需氨基酸。这些修饰是通过丙

氨酸扫描和亲本肽的氨基末端区域和c-末端区域的截短的组合而获得的。PEG11提供对MGS肽的C-末端的保护，在肽与通过C-末端处的半胱氨酸连接的货物分子之间提供间隔区，并提高MGS肽的溶解度。通过乙酰化(CH3CO-)和/或d-氨基酸如d(Leu)在氨基末端进行修饰可防止被血液中的肽酶降解。没有可应用于所有MGS肽的均一长度的优化肽，并且所有变化都需要进行测试以确认对肽吸收和稳定性的影响。在肽73中，YC用于让我们通过280nm处的光吸收来监测肽合成和浓度。在不添加酪氨酸(Y)的情况下，此肽将显著更难以监测。

[0060] 公开了包含以下序列的经修饰的肽：CH_3CO-YAAWPASGAWT-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:12)、CH3CO-LQWRRNFGVWARYRL-PE G_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:22)、CH3CO-RGDLATLRQL-PEG_{11}-YC-NH_2(SEQ ID NO:4)、CH3CO-RGDLATLRQL-PEG_{11}-Y-NH_2(SEQ ID NO:5)、CH_3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-YC-NH_2(SEQ ID NO:6)、CH_3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-Y-NH_2(SEQ ID NO:7)、CH_3CO-KQYATPRVFWT-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:16)或CH_3CO-FHAVPQSFYT-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:19)。因此，在一些方面中，所公开的组合物的一个或多个MGS肽可以是CH_3CO-YAAWPASGA WT-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:12)、CH3CO-LQWRRNFGVWARYR L-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:22)、CH3CO-RGDLATLRQL-PEG_{11}-YC-NH_2(SEQ ID NO:4)、CH3CO-RGDLATLRQL-PEG_{11}-Y-NH_2(SEQID NO:5)、CH_3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-YC-NH_2(SEQ IDNO:6)、CH_3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-Y-NH_2(SEQ ID NO:7)、CH_3CO-KQYATPRVFWT-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:16)或CH_3CO-FHAVPQSFYT-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:19)或它们的组合。

[0061] 在一些方面中，所述一个或多个MGS肽与CH_3CO-YAAWPAS GAWT-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:12)、CH3CO-LQWRRNFGVWA RYRL-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:22)、CH3CO-RGDLATLRQL-PE G_{11}-YC-NH_2(SEQ ID NO:4)、CH3CO-RGDLATLRQL-PEG_{11}-Y-NH_2(SEQ ID NO:5)、CH_3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-YC-NH_2(SEQ ID NO:6)、CH_3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{11}-Y-NH_2(SEQ ID NO:7)、CH_3CO-KQYATPRVFWT-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:16)或CH_3CO-FHAVPQSFYT-PEG_{11}-C-NH_2(SEQ ID NO:19)具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列同一性。

[0062] 在一些方面中，所述一个或多个MGS肽可通过N-末端的乙酰化来进行修饰。因此，在一些方面中，所述一个或多个MGS肽可被乙酰化。在一些方面中，所述一个或多个MGS肽可化学缀合至核酸序列。在一些方面中，化学缀合物可以是聚乙二醇(PEG)。因此，在一些方面中，所述一个或多个MGS肽可被聚乙二醇化。在一些方面中，PEG单元的数量可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或更多。在一些方面中，PEG单元的数量可具有足够长度以将一个或多个MG S肽与核酸序列分开以防止所述一个或多个MGS肽与所述核酸序列之间的任何空间干扰。例如，本文公开了包含化学缀合物的组合物，其中所述化学缀合物是PEG并且所述PEG包含十一个PEG单元。在一个方面中，所述一个或多个MGS肽包含SEQ ID NO:9或10，其中SEQ ID NO:9或10可在N-末端上乙酰化并且可化学缀合至PEG；并且核酸序列可共价连接至PEG。

[0063] 在一个方面中，本文公开的一个或多个MGS肽可被截短。在一些方面中，MGS肽的活性部分可用于所公开的组合物中。在一些方面中，所述活性部分可使用本领域众所周知的技术来确定，例如丙氨酸扫描或截短研究。MGS肽的活性部分是保留其与特定细胞结合并靶向所述细胞内的特定位置的能力的部分。例如，SEQ ID NO:9可在C-末端上被截短至少九个氨基酸。因此，本文描述为SEQ ID NO:10的SEQ ID NO:9的11聚体可用作MGS肽。在一些方面中，SEQID NO:13可在N-末端和/或C-末端被截短约三个、四个或五个氨基酸。

[0064] 公开了表1中描述的任何MGS肽或其组合。因此，在一些方面中，所述一个或多个MGS肽可包含SEQ ID NO:1-55中的任一者或它们的组合。

[0065] 在一些方面中，所述组合物可包含一个或多个MGS肽，例如，在一些方面中，所述组合物可包含一个、两个、三个、四个或五个MGS肽。在一些方面中，所述一个或多个MGS肽可形成四聚体支架蛋白。在一些方面中，所述MGS肽可以是单体或二聚体。在一些方面中，多个MGS肽可一起使用，如但不限于二聚体或三聚体。在一些方面中，两个或更多个MGS肽可一起使用，其中所述两个或更多个MGS肽具有相同序列。在一些方面中，两个或更多个MGS肽可一起使用，其中所述两个或更多个MGS肽具有不同序列。在一些方面中，多个MGS肽(如二聚体)包含两个或更多个相同的MGS序列。在一些方面中，多个MGS肽(如二聚体)包含至少两个不同的MGS序列。

[0066] 在一些方面中，一个或多个MGS肽定位至一个或多个细胞内靶标。例如，细胞内靶标可以是但不限于溶酶体、高尔基体、内质网、细胞质或细胞核。可靶向任何亚细胞区室。

[0067] FOX-Three平台是基于已建立的含有10^9-10^{12}个基于肽的候选MGS成员的噬菌体展示文库，所述成员可针对靶细胞和亚细胞系统快速筛选以鉴定特异性靶向MGS(图2)。肽是一类众所周知的生物分子，所述生物分子容易得通过生物过程和人造化学过程合成。因此，FOX-Three平台的强大之处体现在其速度和灵活性上。它可应用于任何细胞类型，而不管对所述细胞的分子特征了解多少，在2-4周内产生先导MGS。所选择的基于肽的MGS然后容易地工程化以获得最佳性能。表2示出使用FOX-Three技术鉴定的MGS。

[0068] 表2.通过FOX-Three技术鉴定的MGS

[0069]

适应症	所靶向的细胞类型	MSG 代码和细胞位置	所递送的货物
癌和实体瘤	非小细胞肺癌 乳腺癌(包括三阴性) 胰腺癌 前列腺癌 卵巢癌 结肠直肠癌 肝癌 (另外的靶标是 WIP)	MGS_H1299.1_细胞内 MGS_H1299.2_细胞内 MGS_1299.3_自噬体 MGS_H2009.1_高尔基体 MGS_H2009.2_溶酶体 MGS_H2009.3_溶酶体 MGS_H2009.4_高尔基体/ER MGS_H2009.5_ER/溶酶体 MGS_H1993.1_溶酶体 MGS_H1993.2_细胞内 MGS_H1993.3_细胞内 MGS_H1993.4_仅有丝分裂前细胞 MGS_H1993.5_细胞	● 单克隆抗体 ● 小分子疗法(阿霉素、紫杉醇、DM1、鹅膏蕈碱、奥瑞斯他汀和倍癌霉素) ● 荧光团 ● 纳米颗粒(脂质体、胶束、量子点、SPIO) ● 显像剂(PET、NIR、MR) ● 肽和蛋白质 ● 蛋白质毒素 ● 抗原肽 ● 基于珠粒的捕获

		内 MGS_H1993.6_细胞内 MGS_H460.1_质膜 MGS_HCC15.1_细胞内 MGS_HCC15.2_溶酶体 MGS_A549.1_细胞内 MGS_HCC95.1 MGS_H1155.1 MGS_H1155.2 MGS_H666.1 MGS_MCF7	
淋巴瘤和白血病	淋巴瘤细胞	MGS_A20.1_质膜 MGS_A20.2_质膜 MGS_PCM.1_质膜	● 蛋白质 ● 荧光团 ● 基于珠粒的捕获
疫苗开发	树突细胞	MGS_XS52.1_细胞内 MGS_XS52.3_细胞内	● 脂质体 ● DNA ● 蛋白质抗原 ● 荧光团
糖尿病	郎格罕氏胰岛的β细胞	MSG_RII.1 MGS_RII.2	● 蛋白质 ● 放射性核素
病原体感染的细胞	支原体精氨酸感染的细胞	MGS_MArg.1_细菌	● 荧光染料 ● 基于珠粒的捕获
心血管疾病	心肌细胞	MGS_PCM.1_细胞内	● DNA ● 荧光团

[0070]

细胞内表示已确认细胞摄取，但尚未确定确切的细胞内区室。没有位置信息的 MGS 表明已确认细胞结合但未确定细胞位置。

在动物模型中，以蓝色突出显示的 MGS 已显示为归巢至其靶细胞。

靶向 NSCLC 的 MGS 还结合至源自其他器官部位的癌症，如胰腺癌、结肠直肠癌、乳腺癌和卵巢癌。

[0071]

[0072] 在一些方面中，一个或多个MGS肽可以蛋白质通常缀合或连接至核酸的任何方式缀合至核酸序列。在一些方面中，核酸序列可通过接头与一个或多个MGS肽缀合。例如，在一些情况下，接头可以是肽接头或核酸接头。在一些方面中，接头可以是可裂解接头。在一些方面中，可使用任何已知方法将MGS肽与核酸序列缀合，包括但不限于共价连接、生物缀合化学。

[0073] 在一些方面中，货物分子可与一个或多个MGS序列缀合。在一些方面中，货物分子可以是但不限于核酸序列、蛋白质、抗体、肽、纳米颗粒、染料或小分子。如本文所述，货物是核酸序列。

[0074] 2.核酸序列

[0075] 在一些方面，所公开的组合物的核酸序列可以是DNA、RNA或DNA/RNA杂合体。在一些方面中，核酸序列是反义寡核苷酸。在一些方面中，核酸序列是siRNA或miRNA。在一些方面中，核酸序列可以是任何核酸治疗剂。

[0076] 在一些方面中，核酸序列靶向细胞内靶标。在一些方面中，细胞内靶标可以是但不限于溶酶体、高尔基体、内质网、细胞质或细胞核。可靶向任何亚细胞区室。

[0077] 在一些方面中，核酸序列的长度是10-30个核苷酸。在一些方面中，核酸序列的长度是10-50个核苷酸。在一些方面中，核酸序列的长度是10-100个核苷酸。在一些方面中，核酸序列的长度是8-50个核苷酸。在一些方面中，核酸序列的长度是5-50个核苷酸。在一些方面中，核酸序列的长度是5-250个核苷酸。在一些方面中，核酸序列的长度是5-500个核苷酸。在一些方面中，核酸序列的长度达1Kb核苷酸。在一些方面中，核酸的大小不是限制。

[0078] 在所公开的组合物的一些方面中，核酸序列还可包含标记。例如，本文公开的组合物可包括可检测标记。在一些方面中，标记可以是荧光染料。此类可检测标记可包括但不限于被设计用于检测(例如纯化或定位)表达的多肽或序列的标签序列。标签序列包括例如绿色荧光蛋白、谷胱甘肽S-转移酶、聚组氨酸、c-myc、血凝素或Flag™标签，并且可与编码的核酸融合。此类可检测标记可包括但不限于荧光剂、酶标记或放射性同位素。

[0079] 可由本领域普通技术人员考虑个体在年龄、体重和其他一般情况(如上所述)方面的差异来确定本文所述并且用于在如本文所公开的方法中施加至哺乳动物(例如，人)的组合物内存在的核酸的治疗有效量。因为本公开的组合物可在血清和血流中稳定并且在一些情况下更具特异性，所以包括任何单独组分的组合物的剂量可低于(或高于)未结合时任何单独组分的有效剂量。

[0080] 在一些方面中，核酸序列可以是T^{m}CAG^{m}CATT^{m}CTAATAG^{m}CA G^{m}C(SEQ ID NO:56)。SEQ ID NO:56是MALAT 1的序列。

[0081] 3.药物组合物

[0082] 在一些方面中，所公开的组合物可以是药物组合物。例如，在一些方面中，公开了包含组合物的药物组合物，所述组合物包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列和药学上可接受的载体。“药学上可接受的”是指将如本领域的技术人员熟知的选择以使活性成分的任何降解最小化并且使受试者中的任何不利的副作用最小化的材料或载体。载体的实例包括二肉豆蔻酰磷脂酰(DMPC)、磷酸盐缓冲盐水或多囊泡脂质体。例如，PG:PC:胆固醇:肽或PC:肽可在本发明中用作载剂。其他适合的药学上可接受的载剂及其制剂描述于Remington:The Sc ience and Practice of Pharmacy(第19版)编A.R.Gennaro,Mack

Publishing Company,Easton,PA 1995中。通常,在制剂中使用适当量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的载剂的其他实例包括但不限于盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和右旋糖溶液。溶液的pH可为约5至约8、或约7至约7.5。其他载剂包括持续释放制品,诸如含有组合物的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质呈成形制品的形式,例如膜、支架(其在血管成形术期间植入血管中)、脂质体或微粒。对于本领域技术人员而言将显而易见的是,某些载剂可为更优选的,这取决于例如施用途径和所施用组合物的浓度。这些最典型地将为用于向人施用药物的标准载剂,包括诸如无菌水、盐水的溶液以及在生理pH下的缓冲溶液。

[0083] 药物组合物还可包含载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂等,只要不损害本发明的多肽、肽、或缀合物的预期活性即可。药物组合物还可包含一种或多种活性成分(除了本发明的组合物之外),诸如抗菌剂、抗炎剂、麻醉剂等。

[0084] 如本文所公开的药物组合物可经制备以用于口服或肠胃外施用。被制备用于肠胃外施用的药物组合物包括被制备用于静脉内(或动脉内)、肌内、皮下、腹膜内、经粘膜(例如,鼻内、阴道内或直肠)或经皮(例如,局部)施用的那些药物组合物。气溶胶吸入也可用于递送融合蛋白。因此,可制备用于肠胃外施用的组合物,所述组合物包含溶解或悬浮在可接受的载体中的融合蛋白,所述可接受的载体包括但不限于水性载体,诸如水、缓冲水、盐水、缓冲盐水(例如,PBS)等。所包含的赋形剂中的一种或多种赋形剂可有助于接近生理条件,诸如为pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂、湿润剂、去污剂等。在组合物包含固体组分(当它们可用于口服施用时)的情况下,赋形剂中的一种或多种赋形剂可充当粘合剂或填充剂(例如,用于片剂、胶囊等的制剂)。在配制用于施加至皮肤或粘膜表面的组合物的情况下,赋形剂中的一种或多种赋形剂可为用于配制乳膏、软膏等的溶剂或乳化剂。

[0085] 药物组合物可为无菌的,并且可以通过常规的灭菌技术进行灭菌或进行无菌过滤。水溶液可按原样被包装使用或被冻干,本公开所涵盖的冻干制备物可在施用之前与无菌溶液混合。药物组合物的pH通常将介于3与11之间(例如,介于约5与9之间)或介于6与8之间(例如,介于约7与8之间)。可以将固体形式的所得组合物以多个单剂量单位进行包装,每个单剂量单位包含固定量的一种或多种上述药剂,诸如在片剂或胶囊的密封包装中。固体形式的组合物也可以包装在容器中以实现灵活的量,例如在设计用于可局部施用的乳膏或软膏的可挤压管中。

[0086] 可将上述药物组合物配制成包含治疗有效量的本文所公开的组合物。在一些方面中,治疗性施用涵盖预防性施加。基于遗传测试和其他预后方法,与其患者会诊的医师可选择预防性施用,其中患者对某种一种或多种自身免疫性疾病具有临床确定的易患病体质或增加的易感性(在一些情况下,大大增加的易感性),或者其中患者对癌症具有临床确定的易患病体质或增加的易感性(在一些情况下,大大增加的易感性)。

[0087] 本文所述的药物组合物可以以足以延迟、减少或优选预防临床疾病发作的量施用于受试者(例如,人受试者或人患者)。因此,在一些方面中,受试者是人受试者。在治疗应用中,将组合物以足以至少部分地改善疾患的体征或症状或抑制(并且优选阻止)疾患的症状、其并发症和后果的进展的量施用于已患有或被诊断患有自身免疫性疾病的受试者(例如,人受试者)。将足够实现此的量定义为“治疗有效剂量”。药物组合物的治疗有效量可为达到治愈的量,但该结局只是可达到的多个结局中的一种。如上所述,治疗有效量包括提供

治疗的量，其中癌症的发作或进展被延迟、阻碍或预防，或自身免疫性疾病或自身免疫性疾病的症状得到改善。症状中的一种或多种可能不太严重。可加快被治疗的个体的恢复。

[0088] 本文公开的药物组合物中的缀合物的总有效量可作为单剂量，作为大丸剂或通过在相对较短的时间段内进行输注来施用于哺乳动物，或者可以使用分次治疗方案来施用，其中在长时间段内施用多次剂量(例如，每4-6小时、8-12小时、14-16小时或18-24小时，或每2-4天、1-2周或一个月一次的剂量)。或者，足以维持血液中治疗有效浓度的连续静脉内输注也在本公开的范围内。

[0089] C.方法

[0090] 公开了使用所公开的组合物的方法。本文公开的任何组合物均可用于本文公开的方法中。

[0091] 公开了降低目标基因的基因表达的方法，所述方法包括向细胞施用包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列的组合物，其中所述核酸序列结合至从所述目标基因转录的RNA、所述目标基因或所述目标基因上游的序列。在一些方面中，核酸序列可以是任何治疗性核酸序列，如但不限于反义寡核苷酸、适体和小干扰RNA。在一些方面中，降低基因表达是通过测量蛋白质水平来确定的。因此，基因表达的降低导致蛋白质水平的降低。

[0092] 公开了增加目标基因的基因表达的方法，所述方法包括向细胞施用包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列的组合物，其中所述核酸序列结合至所述目标基因或所述目标基因上游的序列。

[0093] 因此，公开了修饰目标基因的基因表达的方法，所述方法包括向细胞施用包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列的组合物，其中所述核酸序列结合至从所述目标基因转录的RNA、所述目标基因或所述目标基因上游的序列。在一些方面中，修饰目标基因的基因表达包括增加或降低目标基因的基因表达。

[0094] 在一些方面中，目标基因上游的序列可以是DNA的负责调控目标基因的基因表达的区域。在一些方面中，与目标基因上游的序列结合可增加或降低目标基因的基因表达。

[0095] 公开了靶向细胞内靶标中的目标基因的方法，所述方法包括向细胞施用包含与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列的组合物，其中所述MGS肽靶向所述细胞内靶标，其中所述核酸序列结合至从细胞内靶标中的所述目标基因转录的RNA。在一些方面中，细胞内靶标可以是但不限于溶酶体、高尔基体、内质网、细胞质或细胞核。

[0096] 在所公开方法的一些方面中，目标基因可以是其表达或过表达对细胞有害或参与疾病过程的任何基因。例如，目标基因可以是在所公开的细胞内靶标(例如溶酶体、高尔基体、内质网、细胞质或细胞核)中的一者中过表达或表达不足、从而导致疾病的基因。在一些方面中，目标基因可以是但不限于KRAS或MYC。

[0097] 公开了治疗有需要的受试者的方法，所述方法包括向所述有需要的受试者施用有效量的与一个或多个MGS肽缀合的核酸序列，其中所述MGS肽靶向参与疾病过程的细胞内靶标。在一些方面中，有需要的受试者患有感染性疾病、癌症、糖尿病、神经或神经变性疾病、遗传疾病、溶酶体疾病、线粒体疾病或已经暴露于生物恐怖剂。

[0098] 在一些方面中，所公开的方法可使用表1中描述的一个或多个MGS肽。

[0099] 在一些方面中，细胞内靶标可以是但不限于溶酶体、高尔基体、内质网、细胞质或细胞核。

[0100] 在一些方面中，核酸序列与从细胞内靶标内的目标基因转录的RNA结合。在一些方面中，核酸序列与从目标基因转录的RNA的结合导致目标基因的表达降低。在一些方面中，核酸序列与细胞内靶标内的目标基因结合。在一些方面中，核酸序列与细胞内靶标内的目标基因上游的序列结合。在一些方面中，目标基因上游的序列可以是DNA的负责调控目标基因的基因表达的区域。在一些方面中，与目标基因上游的序列结合可增加或降低目标基因的基因表达。

[0101] 在一些方面中，目标基因是其表达不足或过表达参与疾病过程的任何基因。例如，目标基因可以是在所公开的细胞内靶标(例如溶酶体、高尔基体、内质网、细胞质或细胞核)中的一者中过表达或表达不足、从而导致疾病的基因。在一些方面中，目标基因可以是但不限于KRAS或MYC。

[0102] 在一些方面中，所公开的治疗方法还可包括施用一种或多种另外的疗法。在一些方面中，所公开的组合物可单独施用或与其他生物活性剂组合施用。在一些方面中，所公开的组合物可单独或与一种或多种另外的疗法(例如生物活性剂)组合配制成适合施用于受试者的组合物。在一个方面中，针对治疗患有癌症或有患癌症风险的受试者的方法，本文公开的组合物可与例如治疗有效量的放射疗法、免疫疗法或化学疗法或它们的组合进行组合。组合疗法可作为共制剂施用，或单独施用。当单独施用时，组合疗法可同时或顺序施用。可使用本领域中常规的方法制备制剂。

[0103] D.载体

[0104] 公开了载体，所述载体包含编码所公开的组合物中的一者或多者的核酸序列。在一些方面中，所述载体仅包含能够编码所公开的MG S肽中的一者或多者核酸序列。

[0105] E.药盒

[0106] 上述材料以及其他材料可以任何合适的组合包装在一起，作为可用于执行或帮助执行所公开方法的药盒。如果给定药盒中的药盒组分被设计并适用于在所公开的方法中一起使用，则它是有用的。例如，公开了包含所公开的组合物中的一者或多者的药盒。

[0107] 在一些方面中，所公开的药盒可包含所公开的MGS肽中的一者或多者和/或所公开的核酸序列中的一者或多者。

[0108] 实施例

[0109] FOX-Three平台已针对靶向细胞和亚细胞组分进行了验证。许多经过验证的MGS处于各种细胞靶向系统的不同开发阶段(表1)。已经建立了在不破坏其靶向能力的情况下将各种有效载荷与肽MGS缀合的方法。已证明选定的MGS将药物、显像剂、纳米颗粒、DNA和蛋白质递送至培养物和动物模型中的靶细胞。FOX-Three筛选过程最近进行了改进，以包括亚细胞位置靶向作为选择标准。已分离出MGS，所述MGS在癌细胞内的溶酶体、自噬体和高尔基体中累积，以及靶向质膜。MGS的治疗功效已被证明取决于递送至正确的亚细胞位置。

[0110] 凭借丰富的细胞类型、疾病状态、细胞内细胞器和可递送的有效载荷，FOX-Three平台的潜力是巨大的。可开发稳健的平台来创建优化的MGS的“工具箱”，所述平台可针对选定的疾病细胞类型和亚细胞组分递送焦点。为此，FOX-Three平台可用于扩大可靶向的亚细胞的细胞器的数量。可进行一组具有定量里程碑的实验。

[0111] 在一些方面中，可研究靶向非小肺癌细胞系并在溶酶体、高尔基体和线粒体中累积的3个MGS的合成、表征和优化。

[0112] 此外，亚细胞位置可扩展以包括溶酶体、高尔基体、线粒体、内质网、细胞质和细胞核。

[0113] FOX-Three以前所未有的速度发现并提供细胞内靶向人类治疗性抗体的快速发展，以对新兴威胁做出极其安全且快速的响应。

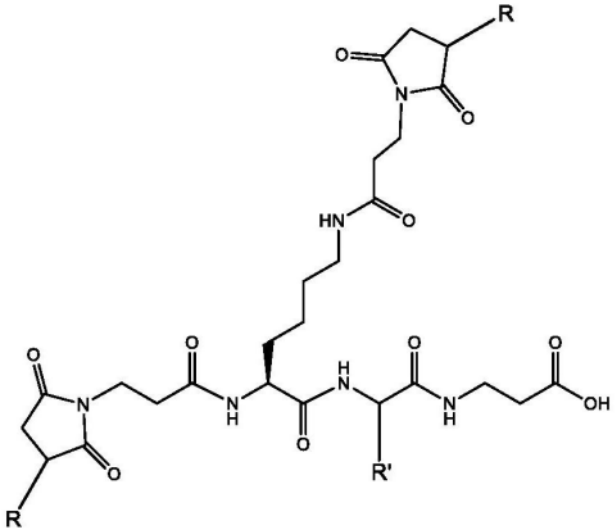
[0114] 开发的FOX-Three MGS工具箱可递送各种其他有效载荷。虽然递送一直是主要焦点，但重要的是注意MGS可递送许多不同的有效载荷并具有其他临床应用(表1)。MGS可递送小分子药物、显像剂、纳米颗粒、DNA、放射性核素和其他蛋白质。MGS可用于疾病的早期检测和用作伴随诊断。早期疾病检测通常是临床结果的主要决定因素。伴随诊断可跟踪对治疗的响应，从而允许在必要时快速改变治疗，从而节省时间和成本。MGS-治疗剂可用于靶向治疗剂(小分子、核酸。合成大分子如聚合物和蛋白质)以用于各种疾病状态、体外和体内诊断、个性化癌症疗法、细胞内纳米颗粒递送和创新免疫疗法。

[0115] 表3.MGS序列

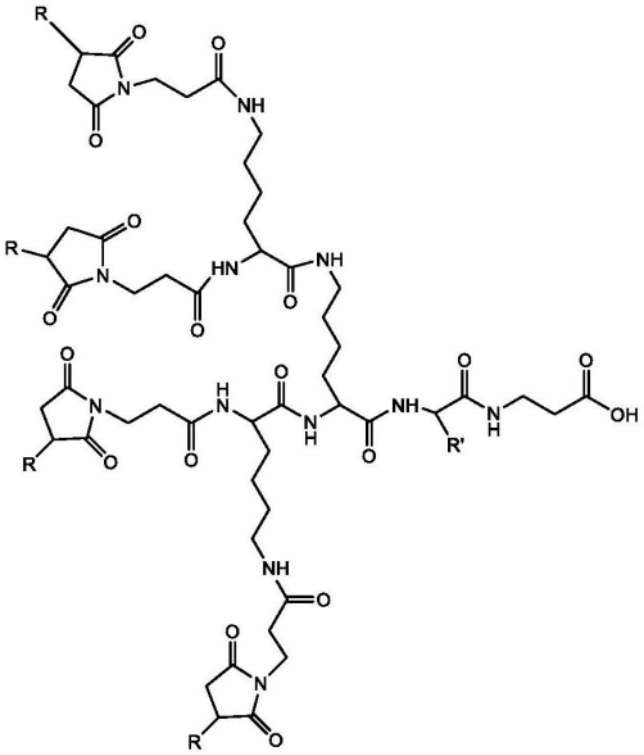
[0116]

原始 MGS 名称	选定序列	优化序列	最优化合价	细胞位置	体内靶向
癌和实体瘤					
MGS_1299.2	YAAWPASGAWTGTAPC SAG T (SEQ ID NO:9)	SRI_MGS2 V4 CH3CO-YAAWPASGAWT-PEGII-C-NH2 (SEQ ID NO:12)	二聚体	溶酶体	是
MGS_1299.3	LQWRRDDNV HNFGVWARY RL (SEQ ID NO:20)	SRI_MGSS V2 CH3CO-LQWRRNFGVWARYRL-PEG_{II}-C-NH_2 (SEQ ID NO:22)	二聚体	自噬体	是
MGS_H2009.1	RGDLATLRQL AQEDGVVGV R (SEQ ID NO:1)	SRI_MGS1 V4 CH3CO- RGDLATLRQL-PEG_{II}-YC-NH_2 (SEQ ID NO:4) SRI_MGS1 V5 CH3CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG_{II}-YC-NH_2 (SEQ ID NO:6)	二聚体 二聚体	高尔基体	是
MGS_HCC15.1	ATEPRKQYAT PRVFWTDAPG (SEQ ID NO:13)	SRI_MGS3_V4 CH3CO- KQYATPRVFWT-PEGII-C-NH2 (SEQ ID NO:16)	二聚体	溶酶体	是
MGS_HCC15.2	FHAVPQSFYT AP (SEQ ID NO:17)	SRI_MGS4 V8 CH3CO-FHAVPQSFYT -PEGII-C-NH2 (SEQ ID NO:19)	单体 二聚体	溶酶体	是
MGS_H2009.2	EHPWFNMWS WATQVQE (SEQ ID NO:30)			溶酶体	

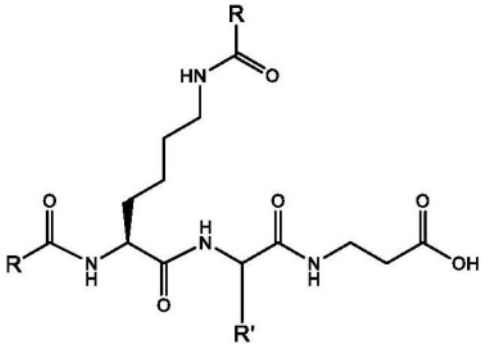
[0117] 下文是多聚化核心的结构的实例，其中R表示通过半胱氨酸的巯基基团缀合的MGS。R'是货物(例如MAb、蛋白质、其他肽、药物、纳米颗粒、显像剂、核酸或染料)的连接位点。连接可通过马来酰亚胺化学、点击化学、酰胺化学和通过脎发生。



[0118]



[0119] 还使用线性肽化学(无马来酰亚胺基团)合成了二聚体。下文是使用线性肽化学(无马来酰亚胺基团)制备的二聚体的结构的实例，其中R表示MGS，并且R'表示货物(例如MAb、蛋白质、其他肽、药物、纳米颗粒、显像剂、核酸或染料)的连接位点。

[0120] 

[0121] 1.实施例1:MGS 2的有效剂量、化学计量和摄取率.

[0122] 下面的表4示出用于各种细胞系的MGS的EC50值。正如数字所示,内化的分子介于大约50,000至大约125,000之间,并且具有介于11与37分钟之间的半衰期。

[0123] 表4:SRI_MGS2_V4特征

[0124]

	SRI_MGS2_V4				
细胞系	EC_{50} (nM)	[1]饱和(分子)	[2]内化的分子, 6 H	$t_{1/2}$	[3]特异性
H2009 细胞	0.72	68300 ± 3030	49500 ± 2230	13	560
H358 细胞	0.89	99900 ± 9640	97100 ± 4830	11	1100
H1993 细胞	1.2	141600 ± 28200	134300 ± 6300	12	2300
H1299 细胞	1.4	112800 ± 15500	125500 ± 5430	37	1400

1. 在 1 H 在饱和浓度下, 每个细胞内化的 MGS 分子的平均数量。

2. 在持续孵育 20 nM MGS 的情况下在 6 H 时内化的分子的平均数量。

3. 关于指定癌细胞系对比未转化的、永生化的正常人支气管上皮细胞系(HBEC)的 MGS 摄取的比率。

[0125] 图3示出四种不同细胞类型在两种不同温度以及没有MGS的对照下的内化。此外,图4示出在两种不同温度下内化至细胞中的荧光团的存在。

[0126] 实施例2:作为货物的MGS和核酸

[0127] MGS的概念适用于核酸。核酸成为疗法的良好候选者,因为已知它们调控基因表达,但由于其药理性质差(例如,较大的尺寸、高电荷和从体内快速清除),核酸疗法作为治疗剂的进展较慢。如果MGS可应用于核酸并帮助治疗性核酸的内化,这将为在新疗法中使用核酸打开大门。

[0128] 有了这个目标,新的MGS被应用于促进siRNA的细胞特异性递送。如前所述,这些MGS具有与特定上皮来源的癌细胞类型结合的独特能力,并且在结合后,触发快速内化和运输至特定亚细胞位置。经化学优化的MGS对其细胞靶标具有1-2nM亲和力,血清稳定性大于48小时,并且相对于正常对照细胞,对靶向癌细胞的特异性为大约50-1000倍。靶细胞快速内化这些肽配体,达到高达1.5μM的细胞内浓度,并且$t_{1/2}$为约10-30分钟。图5示出siRNA进入没有MGS和具有在siRNA的5′或3′末端被生物素化的MGS的细胞的比较。首先使用H1993细胞进行内化实验。对于这组实验,最右侧的一组条形图是5′-生物素化的siRNA+SA-647和

3′-生物素化的siRNA+SA-647，没有MGS。中间和最左侧的条形组示出与第一MGS(SRI_MGS1_V4，右)和第二MGS(SRI_MGS2_V4，中间)缀合的SA-647、5′-生物素化的siRNA+SA-647和3′-生物素化的siRNA+SA-647。可以看出，没有siRNA自身被内化到H1993细胞中。通过将三种不同形式的siRNA与SRI_MGS1_V4缀合，数据显示对于所有三种形式的siR NA，每个细胞内化了大约25000个分子，而将三种不同形式的siRN A与SRI_MGS2_V4缀合，显示了每个细胞内化介于大约150,000与210,000个之间分子的更好内化。对于使用H1299细胞的实验观察到了类似的结果，其中对于没有MGS的siRNA形式，内化接近于零，并且对于与SRI_MGS2_V4缀合的siRNA形式，内化接近约80,000至约95,000。

[0129] 总之，这种技术能够快速生成靶向病原体感染细胞的MGS，从而在数周而不是数年内改善针对现有和新出现病原体的治疗。目前的技术太慢而无法开发针对进化病毒的靶向治疗。

[0130] 这种技术通过递送先前细胞不可渗透的化合物而为治疗多种疾病开辟了新类别的治疗剂，从而为保护战士提供了全新的武器库

[0131] 这种技术提供了检测和中和潜在细胞内病毒感染的能力，否则所述感染可能会在整个社区中重新激活或传播/重新传播。

[0132] 这种技术可快速开发可用于生物读数的诊断学和传感器技术的MGS。

[0133] 对于本领域的技术人员将显而易见的是，在不脱离本发明的范围或精神的情况下，可对本发明作出各种修改和变型。对于本领域的技术人员而言，考虑到说明书和本文所公开的本发明的实践，本发明的其他方面将显而易见。本说明书和实施例旨在被视为仅为示例性的，本发明的真实范围和精神是由以下权利要求来指示。

[0134] 本领域的技术人员将认识到或者仅仅使用常规实验就能够确定本文描述的方法和组合物的具体实施方案的许多等效方案。此类等效方案意图由以下权利要求书涵盖。

序列表

<110> 斯坦福国际研究院(SRI International)

<120> 分子导向系统肽及其用途

<130> 37794.0094P1

<150> 62/908,687

<151> 2019-10-01

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体;MGS肽

<400> 1

Arg Gly Asp Leu Ala Thr Leu Arg Gln Leu Ala Gln Glu Asp Gly Val
1 5 10 15

Val Gly Val Arg
20

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体;MGS肽

<220>

<221> misc

<222> (1)..(1)

<223> D-Leu

<400> 2

Leu Arg Gly Asp Leu Ala Thr Leu Arg Gln Leu
1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体;MGS肽

<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> D-Leu
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化
<400> 3
Leu Arg Gly Asp Leu Ala Thr Leu Arg Gln Leu
1 5 10
<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;优化的MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化
<220>
<221> misc
<222> (10)..(11)
<223> PEG介于氨基酸10与11之间
<220>
<221> misc
<222> (12)..(12)
<223> C末端氨基基团
<400> 4
Arg Gly Asp Leu Ala Thr Leu Arg Gln Leu Tyr Cys
1 5 10
<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;优化的MGS肽
<220>

<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰基基团
<220>
<221> misc
<222> (10)..(11)
<223> PEG介于氨基酸10与11之间
<220>
<221> misc
<222> (11)..(11)
<223> C末端氨基基团
<400> 5
Arg Gly Asp Leu Ala Thr Leu Arg Gln Leu Tyr
1 5 10
<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;优化的MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰化
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> D-Leu
<220>
<221> misc
<222> (11)..(12)
<223> PEG介于氨基酸11与12之间
<220>
<221> misc
<222> (12)..(12)
<223> C末端氨基基团
<400> 6
Arg Gly Asp Leu Ala Thr Leu Arg Gln Leu Tyr Cys
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;优化的MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰化
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> D-Leu
<220>
<221> misc
<222> (11)..(12)
<223> PEG介于氨基酸11与12之间
<220>
<221> misc
<222> (12)..(12)
<223> N末端氨基基团
<400> 7
Leu Arg Gly Asp Leu Ala Thr Leu Arg Gln Leu Tyr
1 5 10
<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰化
<400> 8
Arg Gly Asp Leu Ala Thr Leu Arg Gln Leu
1 5 10
<210> 9

<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 9
Tyr Ala Ala Trp Pro Ala Ser Gly Ala Trp Thr Gly Thr Ala Pro Cys
1 5 10 15
Ser Ala Gly Thr
20
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 10
Tyr Ala Ala Trp Pro Ala Ser Gly Ala Trp Thr
1 5 10
<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;优化的MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰化
<400> 11
Tyr Ala Ala Trp Pro Ala Ser Gly Ala Trp Thr
1 5 10
<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<220>

<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N-末端乙酰化
<220>
<221> misc
<222> (11)..(12)
<223> PEG
<220>
<221> misc
<222> (12)..(12)
<223> C末端氨基基团
<400> 12
Tyr Ala Ala Trp Pro Ala Ser Gly Ala Trp Thr Cys
1 5 10
<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 13
Ala Thr Glu Pro Arg Lys Gln Tyr Ala Thr Pro Arg Val Phe Trp Thr
1 5 10 15
Asp Ala Pro Gly
20
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 14
Lys Gln Tyr Ala Thr Pro Arg Val Phe Trp Thr
1 5 10
<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体;优化的MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰化
<400> 15
Lys Gln Tyr Ala Thr Pro Arg Val Phe Trp Thr
1 5 10
<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;优化的MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰化
<220>
<221> misc
<222> (11)..(12)
<223> PEG
<220>
<221> misc
<222> (12)..(12)
<223> C末端氨基基团
<400> 16
Lys Gln Tyr Ala Thr Pro Arg Val Phe Trp Thr Cys
1 5 10
<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 17
Phe His Ala Val Pro Gln Ser Phe Tyr Thr Ala Pro
1 5 10
<210> 18

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰化
<400> 18
Phe His Ala Val Pro Gln Ser Phe Tyr Thr
1 5 10
<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;优化的MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰化
<220>
<221> misc
<222> (10)..(11)
<223> PEG
<220>
<221> misc
<222> (11)..(11)
<223> C末端氨基基团
<400> 19
Phe His Ala Val Pro Gln Ser Phe Tyr Thr Cys
1 5 10
<210> 20
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽

<400> 20
Leu Gln Trp Arg Arg Asp Asp Asn Val His Asn Phe Gly Val Trp Ala
1 5 10 15
Arg Tyr Arg Leu
20
<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 21
Leu Gln Trp Arg Arg Asn Phe Gly Val Trp Ala Arg Tyr Arg Leu
1 5 10 15
<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;优化的MGS肽
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1)
<223> N末端乙酰化
<220>
<221> misc
<222> (15)..(16)
<223> PEG
<220>
<221> misc
<222> (16)..(16)
<223> C末端氨基基团
<400> 22
Leu Gln Trp Arg Arg Asn Phe Gly Val Trp Ala Arg Tyr Arg Leu Cys
1 5 10 15
<210> 23
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 23
Glu Ala Met Asn Ser Ala Glu Gln Ser Ala Ala Val Val Gln Trp Glu
1 5 10 15
Lys Arg Arg Ile
20
<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 24
Val Ser Gln Thr Met Arg Gln Thr Ala Val Pro Leu Leu Trp Phe Trp
1 5 10 15
Thr Gly Ser Leu
20
<210> 25
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 25
Met Thr Val Cys Asn Ala Ser Gln Arg Gln Ala His Ala Gln Ala Thr
1 5 10 15
Ala Val Ser Leu
20
<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 26
Met Arg Gly Gln Thr Gly Lys Leu Pro Thr Glu His Phe Thr Asp Thr
1 5 10 15
Gly Val Ala Phe

20

<210> 27
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 27
Met Thr Gly Lys Ala Ala Ala Pro His Gln Glu Asp Arg His Ala Asn
1 5 10 15
Gly Leu Glu Gln
20

<210> 28
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 28
Met Glu Lys Leu Pro Leu Ser Lys Thr Gly Arg Thr Val Ser Glu Gly
1 5 10 15
Val Ser Pro Pro
20

<210> 29
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 29
Thr Asn Ser Cys Arg Gly Asp Trp Leu Cys Asp Ala Val Pro Glu Lys
1 5 10 15
Ala Arg Val

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽

<400> 30
Glu His Pro Trp Phe Asn Met Trp Ser Trp Ala Thr Gln Val Gln Glu
1 5 10 15
<210> 31
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 31
Glu His Pro Trp Phe Asn Met Trp Ser Trp Ala Thr Gln Val Gln Glu
1 5 10 15
Lys Lys Lys
<210> 32
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 32
Tyr Pro Gly Ser Pro Thr Gln Tyr Pro Ser Ser Met His Glu Tyr His
1 5 10 15
Ser Ser Ser Glu
20
<210> 33
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 33
Ala His Thr Ile Asp Asp Glu Trp Ala Ser Tyr His Met Gln Gln Trp
1 5 10 15
Asn Ser Pro Pro
20
<210> 34
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 34
Phe Glu Glu Phe Tyr Ser Arg Gln Ser Asn Thr Ile Pro Tyr Pro Gln
1 5 10 15
Gln Tyr Lys Gly
20
<210> 35
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 35
Ser Val Glu Tyr Trp Gly Glu Arg Met Tyr Tyr Asp Val Met Glu Ser
1 5 10 15
Leu Gly Phe Ser
20
<210> 36
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 36
Phe Ala Ala Lys Arg Ala Glu Trp Trp Asp Pro Gly Gln Leu Trp Asp
1 5 10 15
Ala Val Trp Asn
20
<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 37
Gln Glu Ala Leu Glu Glu Trp Phe Trp Lys Met Met Pro Trp Ser Gly
1 5 10 15
Pro Ser Gly Gln

20

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 38
Thr Trp Thr Asp Phe Gly Gln Trp Pro Trp Pro Phe Gly Ala Glu Gly
1 5 10 15
Thr Arg Ala Phe
20

<210> 39
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 39
Met Asp Gly Ala Thr Trp Trp Thr Gln Leu Asp Pro Leu Leu Val Trp
1 5 10 15
Glu Gly Glu Thr
20

<210> 40
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 40
Ser Ala Asp Trp Phe Gln Gly Pro Ala Glu Trp Leu Leu Glu Gly Trp
1 5 10 15
Met Gly Pro Leu
20

<210> 41
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 41
Leu Thr Val His Gly Arg Gly Pro Glu Tyr Asn Pro Ser Trp Asn Arg
1 5 10 15
Arg Ala Phe Pro
20
<210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 42
Ser Ala Lys Thr Ala Val Ser Gln Arg Val Trp Leu Pro Ser His Arg
1 5 10 15
Gly Gly Glu Pro
20
<210> 43
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 43
Lys Ser Arg Glu His Val Asn Asn Ser Ala Cys Pro Ser Lys Arg Ile
1 5 10 15
Thr Ala Ala Leu
20
<210> 44
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 44
Trp Leu Ser Glu Ala Gly Pro Val Val Thr Val Arg Ala Leu Arg Gly
1 5 10 15
Thr Gly Ser Trp
20

<210> 45
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 45
Thr Gly Gly Glu Thr Ser Gly Ile Lys Lys Ala Pro Tyr Ala Ser Thr
1 5 10 15
Thr Arg Asn Arg
20
<210> 46
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 46
Ser His His Gly Val Ala Gly Val Asp Leu Gly Gly Gly Ala Asp Phe
1 5 10 15
Lys Ser Ile Ala
20
<210> 47
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 47
Ser Asn Ser Pro Leu Gly Leu Lys Asp Glu Ala Thr Gln Arg Leu Val
1 5 10 15
Leu Glu Gln Ala Lys Trp Leu Ala
20
<210> 48
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽

<400> 48
Gly Pro Glu Asp Thr Ser Arg Ala Pro Glu Asn Gln Gln Lys Thr Phe
1 5 10 15
His Arg Arg Trp
20
<210> 49
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 49
Ser Gly Glu Thr Gly Ser Asn Leu Val Gly His Glu Leu Asp Phe Arg
1 5 10 15
Pro Gly Ser Pro Ser Pro
20
<210> 50
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 50
Arg Tyr Ser Pro Ala Ala Thr Ala Glu Gly Arg Ser Val Ser Lys Glu
1 5 10 15
Leu Leu Arg Val
20
<210> 51
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 51
Gly Gln Glu Leu Gly Ala Trp Thr Arg Ser Lys Gly Pro Glu Val Gln
1 5 10 15
Thr Ser Val Leu
20
<210> 52

<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 52
Ala Ser Thr Trp Arg Gly Thr Ser Ala Gly Gly Asn Arg Leu Glu Lys
1 5 10 15
Met Glu Val Thr
20
<210> 53
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 53
Leu Ser Gly Thr Pro Glu Arg Ser Gly Gln Ala Val Lys Val Lys Leu
1 5 10 15
Lys Ala Ile Pro
20
<210> 54
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 54
Gly Ala Trp Glu Ala Val Arg Asp Arg Ile Ala Glu Trp Gly Ser Trp
1 5 10 15
Gly Ile Pro Ser
20
<210> 55
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MGS肽
<400> 55

Ala Met Asp Met Tyr Ser Ile Glu Asp Arg Tyr Phe Gly Gly Tyr Ala
1 5 10 15
Pro Glu Val Gly
20

<210> 56
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体;MALAT 1序列
<220>
<221> misc
<222> (2)..(2)
<223> C被甲基化
<220>
<221> misc
<222> (5)..(5)
<223> C被甲基化
<220>
<221> misc
<222> (9)..(9)
<223> C被甲基化
<220>
<221> misc
<222> (16)..(16)
<223> C被甲基化
<220>
<221> misc
<222> (19)..(19)
<223> C被甲基化
<400> 56
Thr Cys Ala Gly Cys Ala Thr Thr Cys Thr Ala Ala Thr Ala Gly Cys
1 5 10 15
Ala Gly Cys

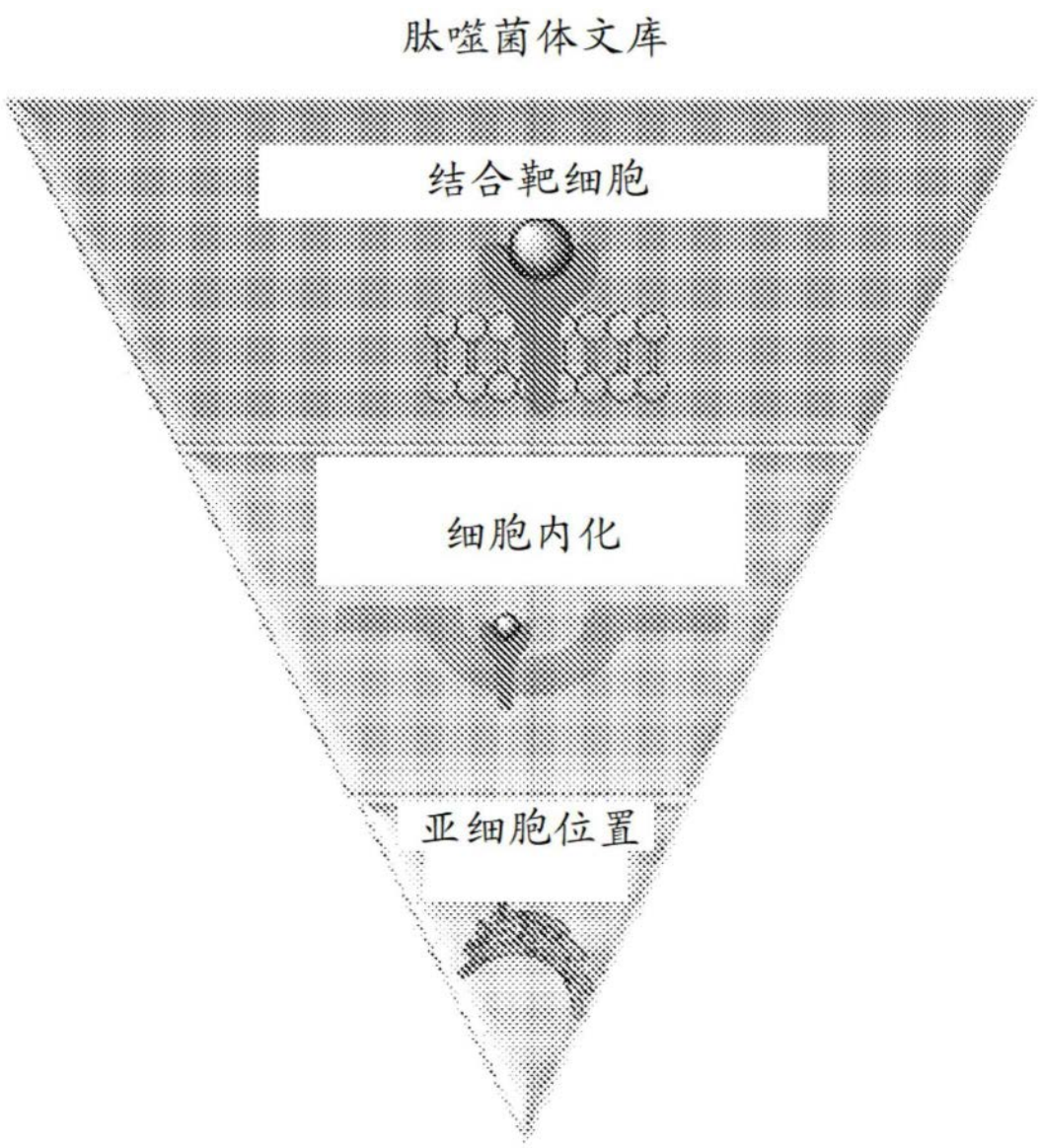


图1

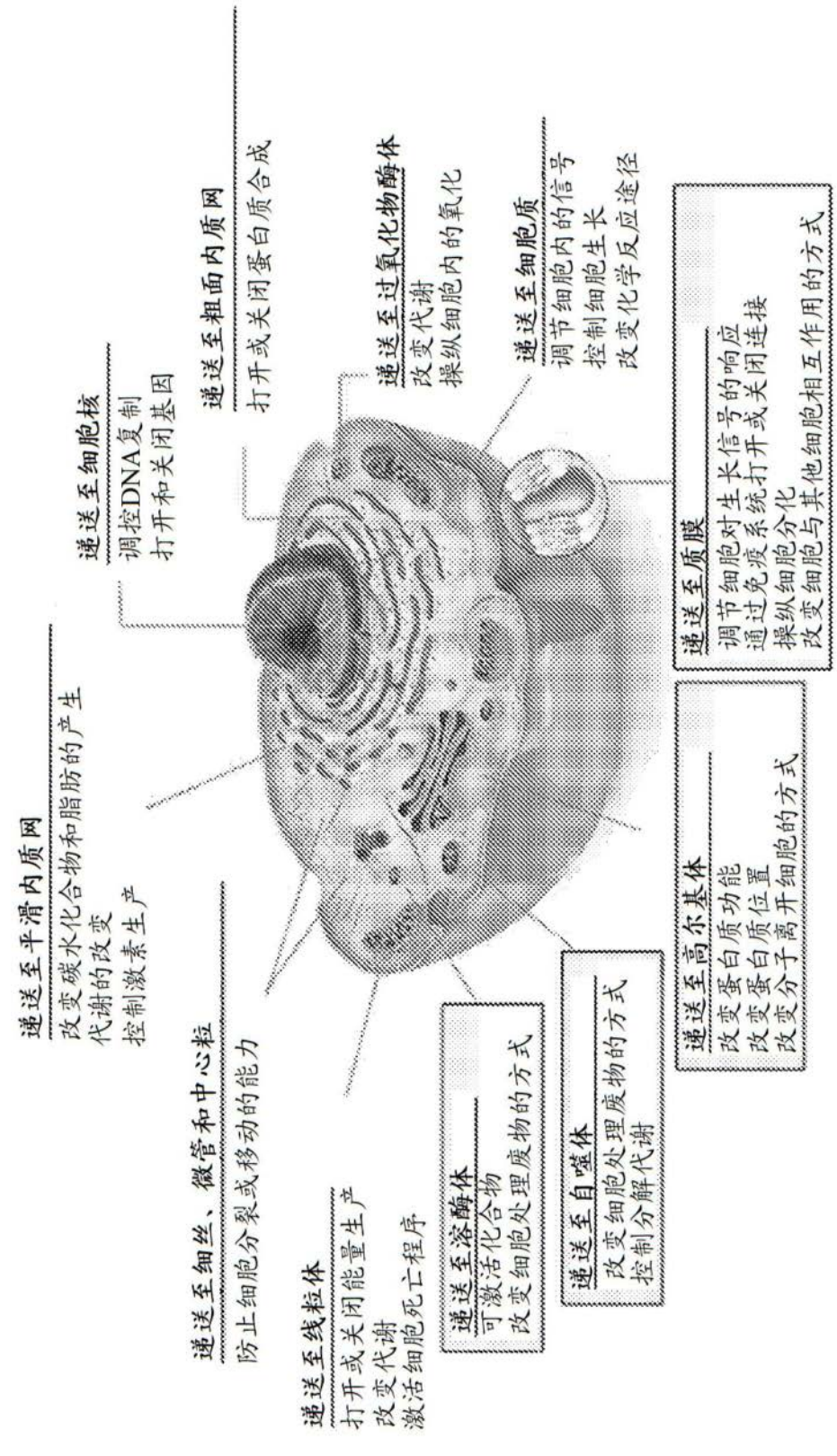

递送至平滑内质网
改变碳水化合物和脂肪的产生
代谢的改变
控制激素生产
递送至细胞核
调控DNA复制
打开和关闭基因
递送至粗面内质网
打开或关闭蛋白质合成
递送至过氧化物酶体
改变代谢
操纵细胞内的氧化
递送至细胞质
调节细胞内的信号
控制细胞生长
改变化学反应途径
递送至质膜
调节细胞对生长信号的响应
通过免疫系统打开或关闭连接
操纵细胞分化
改变细胞与其他细胞相互作用的方式
递送至高尔基体
改变蛋白质功能
改变蛋白质位置
改变分子离开细胞的方式
递送至自噬体
改变细胞处理废物的方式
控制分解代谢
递送至溶酶体
可激活化合物
改变细胞处理废物的方式
递送至线粒体
打开或关闭能量生产
改变代谢
激活细胞死亡程序
递送至细丝、微管和中心粒
防止细胞分裂或移动的能力

图2

序列 (5′-3′)	=
X-T^{m}CAG^{m}CATT^{m}CTAATAG^{m}CAG^{m}C-Cy3	己基氨基
X-T^{m}CAG^{m}CATT^{m}CTAATAG^{m}CAG^{m}C-Cy3	SRI_MGS2_V4
DNA, cEt BNA, PS ASO, 下划线 PO	

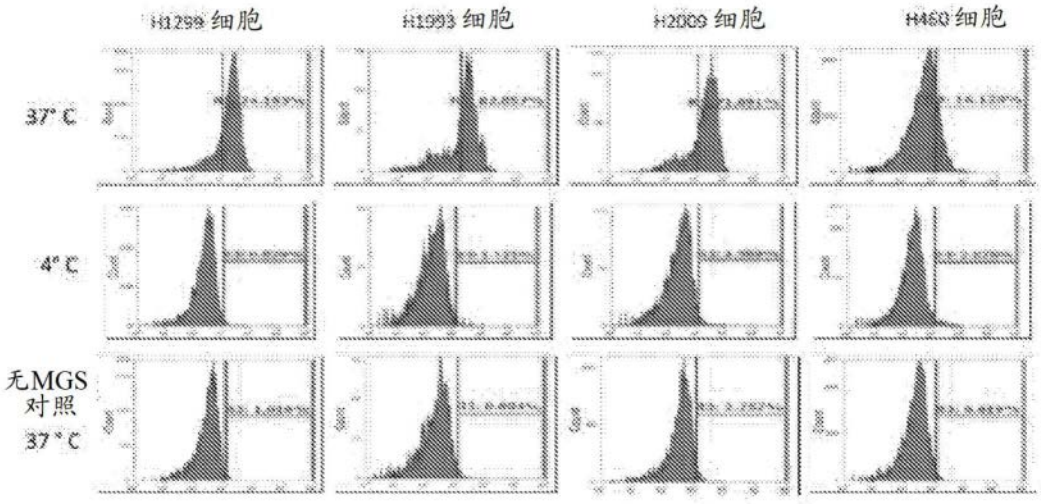


图3

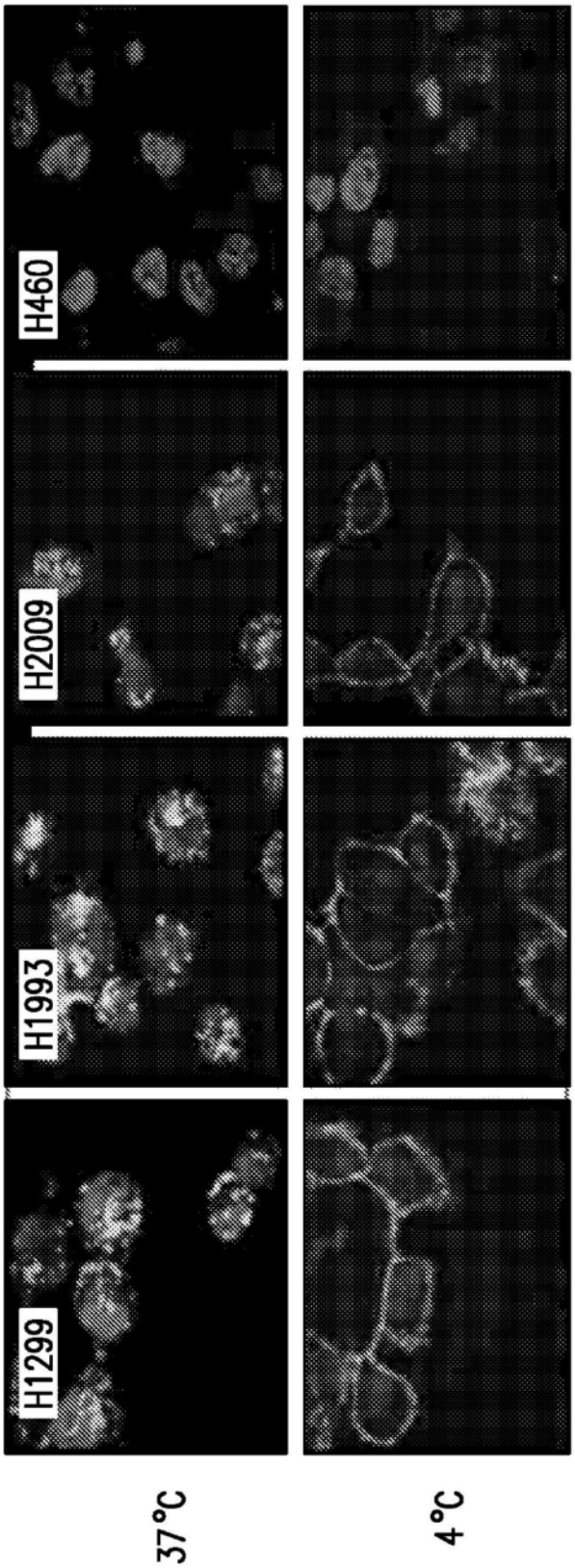


图4

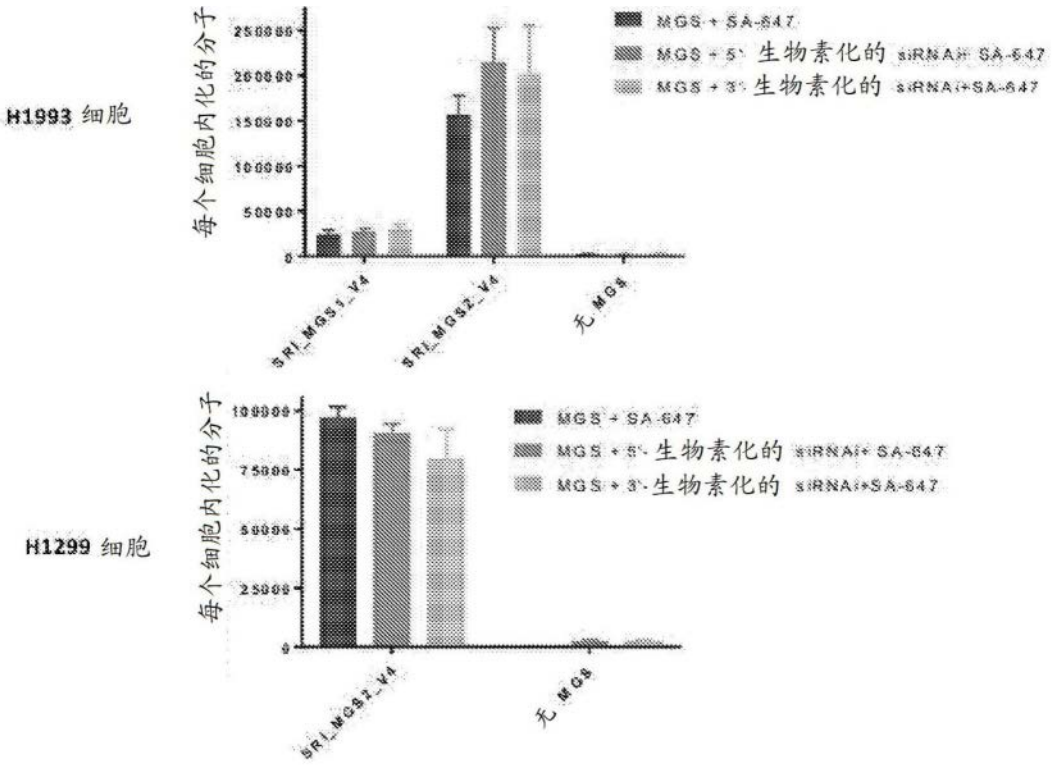
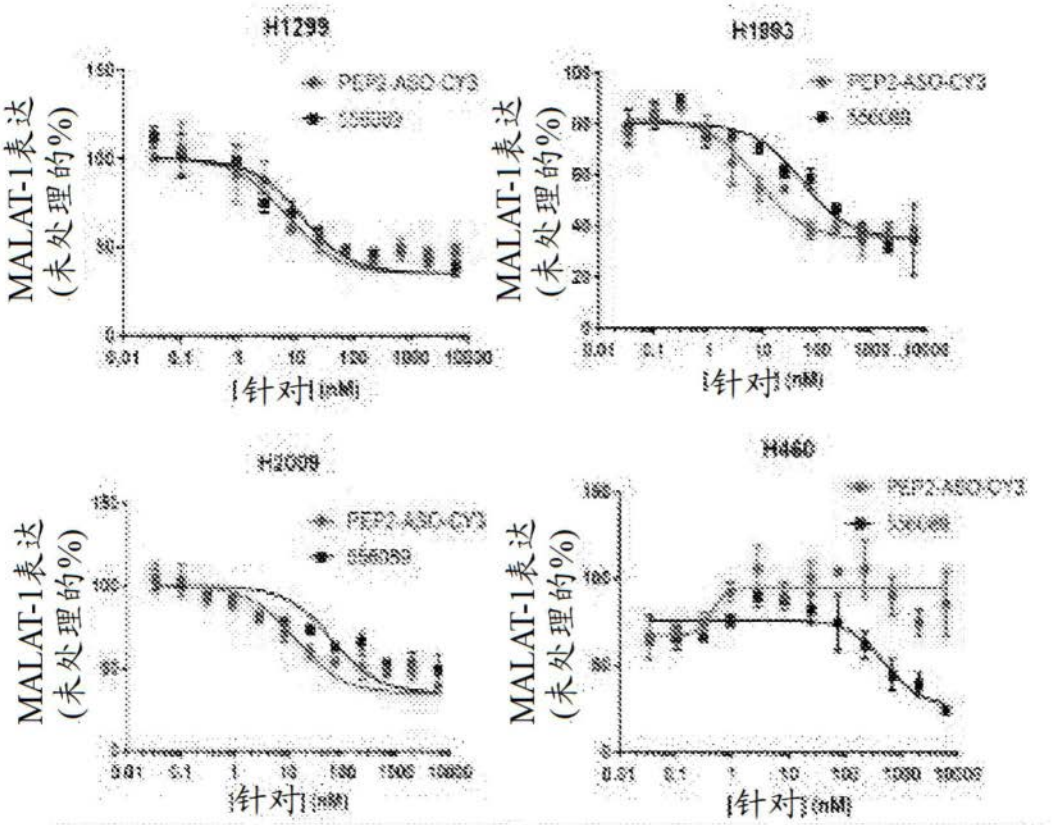
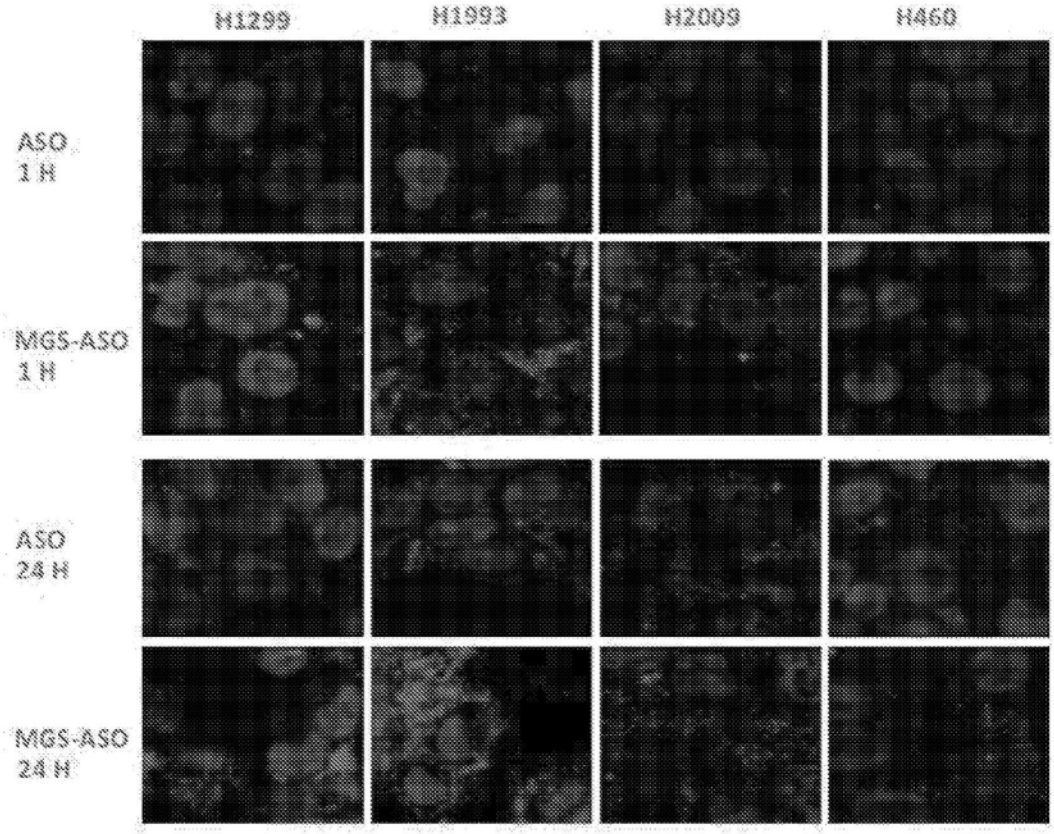

H1993 细胞
每个细胞内化的分子
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
MGS + SA-647
MGS + 5` 生物素化的 siRNAi+ SA-647
MGS + 3` 生物素化的 siRNAi+SA-647
SRI_MGS1_V4
SRI_MGS2_V4
无 MGS
H1299 细胞
每个细胞内化的分子
100000
75000
50000
25000
0
MGS + SA-647
MGS + 5` 生物素化的 siRNAi+ SA-647
MGS + 3` 生物素化的 siRNAi+SA-647
SRI_MGS2_V4
无 MGS

图5



细胞系	IC50 MGS-ASO	IC50 ASO	倍数增加
H1299	7.19	12.21	1.69
H1993	7.56	52.24	6.91
H2009	13.64	64.29	4.71
H460	未检测	499.3	未检测

图6


H1299
H1993
H2009
H460
ASO
1 H
MGS-ASO
1 H
ASO
24 H
MGS-ASO
24 H