

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0079524
(43) 공개일자 2022년06월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/64 (2017.01) A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/6455 (2017.08)
A61P 21/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7007655
- (22) 출원일자(국제) 2020년08월07일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년03월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2020/051891
- (87) 국제공개번호 WO 2021/028666
국제공개일자 2021년02월18일
- (30) 우선권주장
1911403.2 2019년08월09일 영국(GB)

- (71) 출원인
옥스포드 유니버시티 이노베이션 리미티드
영국 옥스2 0제이비 옥스포드 웨스트 웨이 3 벽
스턴 코트
유나이티드 킹덤 리서치 앤드 이노베이션
영국 에스엔2 1에프엘 스윈던 노쓰 스타 애비뉴
폴라리스 하우스
(뒷면에 계속)
- (72) 발명자
우드, 매튜
영국, 옥스1 3큐엑스, 옥스포드셔, 옥스포드,
사우스 파크스 로드, 르 그로스 클라크 빌딩, 유
니버시티 오브 옥스퍼드, 디파트먼트 오브 피디에
트릭스
바렐라, 미구엘
영국, 옥스1 3큐엑스, 옥스포드셔, 옥스포드,
사우스 파크스 로드, 르 그로스 클라크 빌딩, 유
니버시티 오브 옥스퍼드, 디파트먼트 오브 피디에
트릭스
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이내영, 한윤호, 류종우

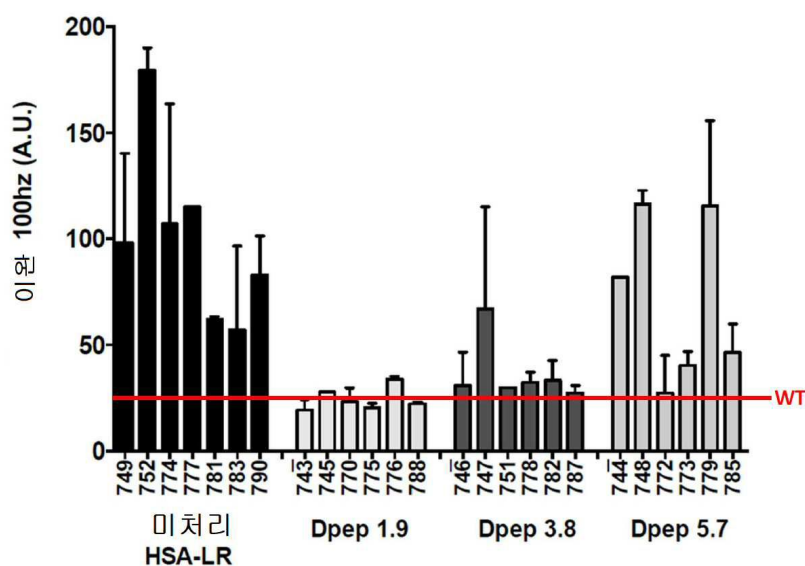
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 접합체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 치료용 분자에 연결된 세포-투과 펩티드 운반체로부터 형성된 접합체에 관한 것으로서, 상기 펩티드 운반체는 특정 도메인에 의해 정의되고, 상기 치료용 분자는 트리뉴클레오타이드 반복으로 형성된 핵산이다. 본 발명은 또한 치료 방법에서 또는 의약으로서, 특히 트리뉴클레오타이드 반복 장애 예컨대 근긴장성 이영양증(DM 1)의 치료에서 이러한 접합체의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

(71) 출원인

아쑈씨아쑈옹 앙스티뛰 드 미올로지

프랑스공화국, 에프-75013 빠리, 불르바르 드 로베
딸, 47, 바띠망 바빈스키

**인제름 (앙스티뛰 나쑈오날 드 라 쌍떼 에 드 라
호쉴르슈 메디칼)**

프랑스, 75013 파리, 뤼 드 톨비악 101

쑈호본느 유니베호시테

프랑스 75006 파리 뤼 드 르'에폴르 드 메드쑈느
21

(72) 발명자

홀랜드, 애셜링

영국, 오엑스1 3큐엑스, 옥스포드셔, 옥스포드, 사
우스 파크스 로드, 르 그로스 클라크 빌딩, 유니버
시티 오브 옥스퍼드, 디파트먼트 오브 피디에트릭
스

라즈, 리차드

영국, 오엑스1 3큐엑스, 옥스포드셔, 옥스포드, 사
우스 파크스 로드, 르 그로스 클라크 빌딩, 유니버
시티 오브 옥스퍼드, 디파트먼트 오브 피디에트릭
스

펠링, 데니스

프랑스, 75651 파리 세텍스 13, 지.에이치.
피티에-살페트리에르, 비엘디 드 로베딸, 47-83,
상트르 드 호쉴르슈 영 미올로지 - 앙스티뛰 드 미
올로지

클라인, 아르노

프랑스, 75651 파리 세텍스 13, 지.에이치.
피티에-살페트리에르, 비엘디 드 로베딸, 47-83,
상트르 드 호쉴르슈 영 미올로지 - 앙스티뛰 드 미
올로지

게이트, 마이클

영국, 쑈비2 0큐, 캠브리지셔, 캠브리지, 프랜시스
크릭 애비뉴, 메디칼 리서치 카운실 라보라토리 오
브 몰레클라 바이올로지

명세서

청구범위

청구항 1

치료용 분자에 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체를 포함하는 집합체로서,

상기 펩티드 운반체는 40개 이하의 아미노산의 총 길이를 갖고, 적어도 4개의 아미노산 잔기를 각각 포함하는 2개 이상의 양이온성 도메인 및 적어도 3개의 아미노산 잔기를 각각 포함하는 1개 이상의 소수성 도메인을 포함하며, 상기 펩티드 운반체는 인공 아미노산 잔기를 함유하지 않으며;

상기 치료용 분자는 핵산을 포함하고, 상기 핵산은 복수의 트리뉴클레오티드 반복 (trinucleotide repeats)을 포함하는 집합체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 핵산은 GTC, CAG, GCC, GGC, CTT, 및 CCG 반복으로부터 선택되는 복수의 트리뉴클레오티드 반복을 포함하는 것인 집합체.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 핵산은 복수의 CAG 반복을 포함하는 것인 집합체.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산은 5-20회의 트리뉴클레오티드 반복, 바람직하게는 5-10회의 트리뉴클레오티드 반복, 바람직하게는 7회의 트리뉴클레오티드 반복을 포함하는 것인 집합체.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산은 트리뉴클레오티드 반복 확장에 결합하는 것인 집합체.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 운반체는 천연 아미노산 잔기로 구성된 것인 집합체.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 양이온성 도메인은 4 내지 12개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 4 내지 7개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는 것인 집합체.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 양이온성 도메인은 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%의 양이온성 아미노산을 포함하는 것인 집합체.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘, 베타-알라닌, 하이드록시프롤린 및/또는 세린 잔기를 포함하고, 바람직하게는 상기 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘, 베타-알라닌, 하이드록시프롤린 및/또는 세린 잔기로 구성된 것인 집합체.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 운반체는 2개의 양이온성 도메인을 포함하는 것인 집합체.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 양이온성 도메인은 하기 서열들 중 하나를 포함하고:

RBRBRBR (서열번호: 1), RBRBR (서열번호: 2), RBRR (서열번호: 3), RBRBRBR (서열번호: 4), RRBRBR (서열번호: 5), RBRRB (서열번호: 6), BRBR (서열번호: 7), RBHBH (서열번호: 8), HBHBR (서열번호: 9), RBRHBHR (서열번호: 10), RBRBBHR (서열번호: 11), RBRRBH (서열번호: 12), HBRRBR (서열번호: 13), HBHBH (서열번호: 14), BHBH (서열번호: 15), BRBSB (서열번호: 16), BRB[Hyp]B (서열번호: 17), R[Hyp]H[Hyp]HB (서열번호: 18), R[Hyp]RR[Hyp]R (서열번호: 19) 또는 이들의 임의의 조합;

바람직하게는 상기 각 양이온성 도메인은 하기 서열들 중 하나로 구성된 것인 집합체:

RBRBRBR (서열번호: 1), RBRBR (서열번호: 2), RBRR (서열번호: 3), RBRBRBR (서열번호: 4), RRBRBR (서열번호: 5), RBRRB (서열번호: 6), BRBR (서열번호: 7), RBHBH (서열번호: 8), HBHBR (서열번호: 9), RBRHBHR (서열번호: 10), RBRBBHR (서열번호: 11), RBRRBH (서열번호: 12), HBRRBR (서열번호: 13), HBHBH (서열번호: 14), BHBH (서열번호: 15), BRBSB (서열번호: 16), BRB[Hyp]B (서열번호: 17), R[Hyp]H[Hyp]HB (서열번호: 18), R[Hyp]RR[Hyp]R (서열번호: 19) 또는 이들의 임의의 조합.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 소수성 도메인은 3-6개의 아미노산의 길이를 갖고, 바람직하게는 상기 각 소수성 도메인은 5개의 아미노산의 길이를 갖는 것인 집합체.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 소수성 도메인은 대다수의 소수성 아미노산 잔기를 포함하고, 바람직하게는 상기 각 소수성 도메인은 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 100%의 소수성 아미노산을 포함하는 것인 집합체.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 소수성 도메인은 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 티로신, 트립토판, 프롤린 및 글루타민 잔기를 포함하고; 바람직하게는 상기 각 소수성 도메인은 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 티로신, 트립토판, 프롤린 및/또는 글루타민 잔기로 구성된 것인 집합체.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 운반체는 1개의 소수성 도메인을 포함하는 것인 집합체.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 또는 각 소수성 도메인은 하기 서열들 중 하나를 포함하고:

YQFLI (서열번호: 20), FQILY (서열번호: 21), ILFQY (서열번호: 22), FQIY (서열번호: 23), WWW, WWPWW (서열번호: 24), WPWW (서열번호: 25), WWPW (서열번호: 26) 또는 이들의 임의의 조합;

바람직하게는 상기 또는 각 소수성 도메인은 하기 서열들 중 하나로 구성된 것인 집합체:

YQFLI (서열번호: 20), FQILY (서열번호: 21), ILFQY (서열번호: 22), FQIY (서열번호: 23), WWW, WWPWW (서열번호: 24), WPWW (서열번호: 25), WWPW (서열번호: 26) 또는 이들의 임의의 조합.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 운반체는 2개의 양이온성 도메인 및 1개의 소수성 도메인으로 구성되고, 바람직하게는 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인 (cationic arm domains)에 의해 플랭킹된 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성된 것인 집합체.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 운반체는 하기 서열들 중 하나로 구성된 것인 펩티드: RBRBRBFQILYBRBR (서열번호: 35), RBRBRBFQILYRBHBH (서열번호: 37), 및 RBRBRBFQILYRBHBH (서열번호: 44).

청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드 운반체는 링커에 의해 치료용 분자에 공유 결합으로 연결된 것인 접합체.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 링커는 G, BC, XC, C, GGC, BBC, BXC, XBC, X, XX, B, BB, BX, XB, E, GABA 및 숙신산으로부터 선택되는 것인 접합체.

청구항 21

의약으로서 사용하기 위한, 청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 따른 접합체.

청구항 22

트리뉴클레오티드 반복 장애 (trinucleotide repeat disorder)의 예방 또는 치료에 사용하기 위한, 청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 따른 접합체.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 트리뉴클레오티드 반복 장애는 폴리글루타민 질환 (polyglutamine disease) 또는 비-폴리글루타민 질환 (non-polyglutamine disease)으로부터 선택되는 것인 접합체.

청구항 24

청구항 22 또는 23에 있어서, 상기 트리뉴클레오티드 반복 장애는 DRPLA (치아적핵담창구루이체 위축증), HD (헌팅턴병), HDL2 (헌팅턴병 유사 증후군 2), SBMA (척추-연수 근위축증), SCA1 (척수소뇌성 운동실조증 타입 1), SCA2 (척수소뇌성 운동실조증 타입 2), SCA3 (척수소뇌성 운동실조증 타입 3 또는 마카도-조셉병 (Machado-Joseph disease)), SCA6 (척수소뇌성 운동실조증 타입 6), SCA7 (척수소뇌성 운동실조증 타입 7), SCA17 (척수소뇌성 운동실조증 타입 17), HDL2 (헌팅턴병 유사 증후군 2), FRAXA (취약 X 증후군 (Fragile X syndrome)), FXTAS (취약 X 진전/운동실조 증후군 (Fragile X tremor/ataxia syndrome)), FRAXE (취약 XE 정신 지체 (Fragile XE mental retardation)), FRDA (프리드리히 운동실조증 (Friedrich's ataxia)), DM1 (근긴장성 이영양증 타입 1), SCA8 (척수소뇌성 운동실조증 타입 8) 및 SCA12 (척수소뇌성 운동실조증 타입 12)로부터 선택되는 것인 접합체.

청구항 25

청구항 22 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 트리뉴클레오티드 반복 장애는 근긴장성 이영양증 타입 1 (myotonic dystrophy type 1: DM1)인 것인 접합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 펩티드 운반체 (peptide carrier)와 치료용 분자 (therapeutic molecule)의 접합체 (conjugate)에 관한 것으로서, 상기 펩티드 운반체는 특정 도메인에 의해 정의되고, 상기 치료용 분자는 트리뉴클레오티드 반복으로 형성된 핵산이다. 본 발명은 또한 치료 방법에서 또는 의약으로서, 특히 트리뉴클레오티드 반복 장애 예컨대 근긴장성 이영양증 (myotonic dystrophy) (DM1)의 치료에서 이러한 접합체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 핵산 치료제는 인간의 건강 관리를 변화시킬 수 있는 잠재력을 가진 유전체 의약품이다. 연구에 따르면 이러한 치료제는 광범위한 질병 영역에 적용될 수 있다. 구체적으로, 안티센스 올리고뉴클레오티드-기반 방법의 mRNA 발현을 조절하기 위한 적용은 정밀 의약 (precision medicine)의 최전선에서 바람직한 치료 수단이 되었다.

[0003] 그러나, 이러한 유망한 안티센스 치료제의 불충분한 세포-투과 (cell-penetrance) 및 불량한 분포 특성은 이들을 치료제로 개발하는데 있어서 장애가 되었다.

- [0004] 그러므로 파괴적인 트리뉴클레오티드 반복 장애 (trinucleotide repeat disorders)와 같은 유전 질환에 대해 보다 효과적인 치료법을 제공하기 위해, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 전달을 개선하는 것에 대한 강력하고 시급한 요구가 있다.
- [0005] 트리뉴클레오티드 반복 장애는 게놈 DNA내 3개의 뉴클레오티드의 특정 서열의 반복 횟수가 비정상적으로 높게 존재하는 것을 특징으로 하는 유전 질환으로, 트리뉴클레오티드 반복 확장 (trinucleotide repeat expansion)으로도 알려져 있다. 트리뉴클레오티드 반복 확장은 특정 타입의 미소부수체 반복 (microsatellite repeat)으로, 종종 미소부수체 확장 (microsatellite expansions)으로 알려져 있다. 전형적으로, 정상인 건강한 대상체에서 발견되는 역치 반복 횟수 (threshold number of repeats)가 있으며, 이 횟수를 초과하는 경우 질병이 발병한다. 상기 역치 횟수는 질병과 영향을 받은 유전자에 따라 다르다. 또한, 이들 질병에서 상기 반복 횟수가 질병의 중증도를 나타낼 수 있다는 것이 일반적이다. 일반적으로, 반복 횟수가 높을수록 더 심각한 질병 양상을 나타낸다. 상기 반복 횟수는 또한 질병의 발병 연령을 예측하는데 사용될 수 있으며, 반복 횟수가 더 높을수록 조기에 발병하는 것을 나타낸다.
- [0006] 현재, 인간에게 영향을 미치는 것으로 알려진 14 가지의 트리뉴클레오티드 반복 장애가 있다. 이들 장애는 몇 가지 방법으로 그룹화될 수 있으며, 예를 들어 상기 트리뉴클레오티드 반복이 유전자내에 위치하는 경우, 이들이 단백질 코딩 ORF (protein coding ORF) 내에; 엑손 (exon) 내에; 또는 비-번역 영역 (untranslated region) 내에 존재하는지 여부에 따라 그룹화될 수 있다. 대안으로서, 이들은 삼중항 반복 (triplet repeat)의 서열에 의해 그룹화될 수 있다. 많은 트리뉴클레오티드 장애에서, 상기 삼중항 반복은 'CAG'이고, 글루타민을 코딩하며, 이러한 장애 그룹은 통상 폴리글루타민 장애 (polyglutamine disorders)로 알려져 있다. 그러나, 다른 서열을 갖는 트리뉴클레오티드 반복이 알려져 있고, 이는 비-폴리글루타민 반복 장애 (non-polyglutamine repeat disorders)로 그룹화될 수 있다.
- [0007] 비-폴리글루타민 반복 장애로 알려진 트리뉴클레오티드 장애들 중 하나로는 근긴장성 이영양증 타입 1 (myotonic dystrophy type 1: DM1)이 있다. DM1은 DMPK 유전자의 3' UTR 내에 존재하는 'CTG'의 트리뉴클레오티드 반복에 의해 야기된다. 이 유전자에 대한 정상 반복 횟수는 5 내지 34회 반복이다. 34회를 초과하여 반복하면 질병의 일부 증상이 나타날 수 있고, 50회를 초과하여 반복하면 질병이 발병한다.
- [0008] DM1, 및 다른 트리뉴클레오티드 반복 장애는 전형적으로 신경근계 (neuromuscular system)에 영향을 미치며, 현재 효과적인 치료법은 없다.
- [0009] 반복 영역에 결합하여 스플라이싱 또는 번역을 방해할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 사용이 이론적으로 제안되고, 인 비트로 (in vitro)에서 제시되었지만, 이러한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이들 분자를 이환된 세포로 전달하는데 어려움이 있기 때문에 이의 치료제로서의 사용은 가능하지 않았다. 이는 트리뉴클레오티드 반복 장애를 포함한, 다양한 유전 질환의 치료에서 그러하다.
- [0010] 전달 비히클로서 바이러스의 사용이 제안되었지만, 이의 사용은 바이러스 외피 단백질의 면역독성 및 잠재적인 발암 효과로 인해 제한된다. 대안으로서, 다양한 비-바이러스 전달 벡터가 개발되었으며, 그 중 펩티드는 이의 작은 크기, 표적화 특이성 및 큰 바이오-카고 (bio-cargo)의 경-모세관 전달 (trans-capillary delivery) 능력으로 인해 가장 유망한 것으로 나타났다. 몇몇 펩티드가 단독으로 또는 바이오-카고를 운반하여 세포를 투과하는 이들의 능력에 대해 보고되었다.
- [0011] 수년 동안, 이러한 올리고뉴클레오티드 유사체를 세포막을 통해 효과적으로 운반하여 세포핵내 이들의 pre-mRNA 표적 부위에 도달시킴으로써 이러한 올리고뉴클레오티드 유사체의 세포 전달을 증진시키기 위해, 세포-투과성 펩티드를 안티센스 올리고뉴클레오티드 (구체적으로, 전하 중성 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (phosphorodiamidate morpholino oligomer: PMO) 및 펩티드 핵산 (peptide nucleic acid: PNA))에 접합시켰다. 소정의 아르기닌-풍부 펩티드에 접합된 PMO 치료제 (P-PMO 또는 펩티드-PMO로 알려짐)는 관련 세포로 효과적으로 투과할 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0012] 구체적으로, 증상의 짧은 소수성 서열에 의해 분리된, 2개의 아르기닌-풍부 서열을 포함하는 아르기닌-풍부 CPP인 PNA/PMO 내재화 펩티드 (PNA/PMO internalization peptides: Pips)가 개발되었다. 이들 'Pip' 펩티드는 초기에 PNA 카고에의 부착에 의해, 엑손 스킵핑 (exon skipping)을 높은 수준으로 유지하면서 혈청 안정성을 개선하도록 디자인되었다. 이들 펩티드의 추가 유도체가 PMO의 접합체로 디자인되었고, 이는 마우스에서 전신 투여 후에, DMD 모델에서 중요하게는 심장을 포함하는, 전신 골격근 치료로 이어지는 것으로 밝혀졌다.
- [0013] 이들 운반체 펩티드가 효과적임에도 불구하고, 이들의 치료적 적용은 이들의 관련 독성이 장애가 되었다.

- [0014] R6Gly와 같은 단일 아르기닌 풍부 도메인을 갖는 대체 운반체 펩티드가 또한 생성되었다. 이들 펩티드는 독성이 감소된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 갖는 펩티드 접합체를 생성하는데 사용되었지만, 이들 접합체는 Pip 펩티드와 비교하여 낮은 효능을 나타내었다.
- [0015] 또한, 운반체 펩티드의 거의 모든 개발은 DMD를 치료하는 맥락에서 이루어졌다. 소수성 코어 도메인을 갖는 펩티드는 DMD와 관련하여 특히 활성이 있는 것으로 입증되었다. 다양한 원인 및 상이한 병리를 갖는 다른 신경근 질환에서 이러한 운반체 펩티드의 사용에 대한 연구는 아직 수행되지 않았다.
- [0016] 따라서, 현재 이용 가능한 운반체 펩티드는 유전 장애, 특히 트리뉴클레오타이드 반복 장애와 같이 상이한 병리로부터 기인한 질병의 치료를 위해서는 핵산 치료제와의 접합체에 사용하기에 적합한 것으로 아직 입증되지 않았다.
- [0017] 운반체 펩티드 기술 분야의 과제는 효능과 독성을 분리시켜 왔다. 본 발명자들은 본원에서 적어도 이러한 문제를 해결하는, 트리뉴클레오타이드 장애의 치료를 위한 치료제 핵산에 공유 결합으로 연결된, 특정 구조를 갖는 개선된 운반체 펩티드를 포함하는 접합체를 규명하고, 합성하며, 시험하였다.

발명의 내용

- [0018] 본 발명의 제1 양상에 따르면, 치료용 분자에 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체를 포함하는 접합체가 제공되며;
- [0019] 상기 펩티드 운반체는 40개 이하의 아미노산의 총 길이를 갖고, 적어도 4개의 아미노산 잔기를 각각 포함하는 2개 이상의 양이온성 도메인 (cationic domains) 및 적어도 3개의 아미노산 잔기를 각각 포함하는 1개 이상의 소수성 도메인 (hydrophobic domains)을 포함하며, 상기 펩티드 운반체는 인공 아미노산 잔기를 함유하지 않으며;
- [0020] 상기 치료용 분자는 핵산을 포함하고, 상기 핵산은 복수의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함한다.
- [0021] 본 발명의 제2 양상에 따르면, 의약으로서 사용하기 위한 제1 양상에 따른 접합체가 제공된다.
- [0022] 본 발명의 제3 양상에 따르면, 대상체에서 질병의 치료 방법이 제공되며, 상기 방법은 제1 양상에 따른 접합체의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0023] 본 발명의 제4 양상에 따르면, 트리뉴클레오타이드 반복 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제1 양상에 따른 접합체가 제공된다.
- [0024] 본 발명의 제5 양상에 따르면, 대상체에서 트리뉴클레오타이드 반복 장애의 예방 또는 치료 방법이 제공되며, 상기 방법은 제1 양상에 따른 접합체의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 제6 양상에 따르면, 제1 양상에 따른 접합체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [0026] 제2, 제3, 제4 또는 제5 양상의 일 구체예에서, 상기 접합체가 약학적 조성물에 포함된다.
- [0027] 본 발명의 추가 특징 및 구체예가 본원에서 하기 표제 섹션들에서 서술될 것이다. 달리 명시적으로 언급되지 않는 한, 임의의 특징은 상기 양상들 또는 본원에서 다른 특징과, 임의의 양립가능한 조합으로 결합될 수 있다. 개별 특징들은 임의의 특정 구체예로 제한되지 않는다. 본원에서 사용된 섹션의 표제는 구성 목적만을 위한 것이며, 기재된 청구 대상을 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0028] 본원 전체에 걸쳐 '펩티드 운반체 (peptide carrier)'에 대한 언급은 이에 결합된 분자를 세포 내로 수송하기에 적합한 펩티드, 즉 세포-투과 펩티드 (cell-penetrating peptide)를 나타낸다. 용어 '세포 투과 펩티드' 및 '펩티드 운반체' 및 '펩티드'는 본원 전체적으로 상호교환 가능하게 사용될 수 있다.
- [0029] 전체에 걸쳐 'X'에 대한 언급은 인공, 합성으로 생성된 아미노산 아미노헥사노산 (aminohexanoic acid)의 임의의 형태를 나타낸다.
- [0030] 전체에 걸쳐 'B'에 대한 언급은 천연이지만, 유전자로 코딩되지 않는 아미노산 베타-알라닌 (beta-alanine)을 나타낸다.
- [0031] 전체에 걸쳐 'Ac'에 대한 언급은 관련 펩티드의 아세틸화를 나타낸다.
- [0032] 전체에 걸쳐 'Hyp'에 대한 언급은 천연이지만, 유전자로 코딩되지 않는 아미노산 하이드록시프롤린을 나타낸다.
- [0033] 전체에 걸쳐 다른 대문자에 대한 언급은 인정된 알파벳 아미노산 코드에 따라 관련 유전자 코딩된 아미노산 잔

기를 나타낸다.

[0034] 본원에서 '인공 (artificial)' 아미노산 또는 잔기에 대한 언급은 천연에 존재하지 않는 임의의 아미노산을 나타내고, 합성 아미노산, 변형된 아미노산 (예컨대 당으로 변형된 아미노산), 비-천연 아미노산, 인조 아미노산, 스페이서 및 비-펩티드 결합된 스페이서를 포함한다. 의심의 여지를 피하기 위해, 아미노헥사노산 (X)은 본 발명의 맥락에서 인공 아미노산이다. 의심의 여지를 피하기 위해, 베타-알라닌 (B) 및 하이드록시프롤린 (Hyp)은 천연에 존재하므로, 본 발명의 맥락에서 인공 아미노산이 아닌 천연 아미노산이다. 인공 아미노산은 예를 들어 6-아미노헥사노산 (X), 테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복실산 (TIC), 1-(아미노)사이클로헥산카르복실산 (Cy), 및 3-아제티딘-카르복실산 (Az), 11-아미노운데카노산을 포함할 수 있다.

[0035] 본원에서 '양이온성 (cationic)'에 대한 언급은 생리학적 pH에서 전반적으로 양전하를 갖는 아미노산 또는 아미노산 도메인을 나타낸다.

[0036] '아르기닌 풍부 (arginine rich)' 또는 '히스티딘 풍부 (histidine rich)'는 양이온성 도메인의 적어도 40%가 상기 잔기(들)로 형성되는 것을 의미한다.

[0037] 본원에서 '소수성 (hydrophobic)'에 대한 언급은 물에 반발하는 능력을 갖거나 또는 물과 혼합되지 않는 아미노산 또는 아미노산 도메인을 나타낸다.

[0038] 상세한 설명

[0039] 본 발명은 트리뉴클레오타이드 반복 장애의 예방 및 치료에 적합한 핵산에 특정 펩티드 운반체를 부착하면 상기 핵산이 표적 세포에 효과적으로 투과하여 이환된 대상체의 유전자에 존재하는 표적 트리뉴클레오타이드 반복 확장에 결합하도록 한다는 발견에 기반한다. 이러한 활성은 세포에 존재하는 반복 확장 전사체 및/또는 단백질의 수준을 감소시킴으로써, 세포의 스플라이싱 기구 (splicing machinery)와 이들의 병리학적 상호작용을 차단하여, 스플라이싱을 정상화하고, 상기 대상체의 생리학적 상태를 개선한다.

[0040] 유리하게는, 본원에 기재된 펩티드 운반체는 치료용 핵산이 분해에 저항하고, 표적 세포를 투과하며, 표적 트리뉴클레오타이드 확장에 도달하는 능력을 증가시켜서 치료를 제공하는 것으로 보인다. 또한, 본 발명의 접합체는 알려진 펩티드 운반체로 형성된 접합체보다 독성이 훨씬 더 낮다. 그러므로, 상기 접합체는 대상체에게 비-독성을 유지하면서 트리뉴클레오타이드 반복 장애에 대한 핵산 요법의 효과적인 전달 수단을 제공한다.

[0041] 본 발명자들은 소수성 코어를 가진 임의의 펩티드 운반체가 DMD의 맥락을 넘어서 신경근 질환 치료에 효과가 있다는 것을 밝힌 것은 처음이라고 여겼다. 이전 연구는 DMD를 치료하기 위해 치료제를 전달하기 위한 펩티드 운반체의 사용에 중점을 두었다. 트리뉴클레오타이드 반복 장애의 병리와 비교한 DMD의 병리는 상당한 차이가 있다. 구체적으로 DMD는 염증을 비롯한, 활동 근육 퇴행 및 근육 턴오버(turnover) 및 복구를 포함하는 반면에, 트리뉴클레오타이드 반복 장애 예컨대 근긴장성 이영양증 타입 1 (DM1)은 명시적 퇴행 없이 근육의 기능 장애를 포함한다. 본 발명자들은 펩티드 운반체가 근육막과 상호작용하여 치료용 분자를 효과적으로 전달하도록 하고, 그러므로 이들이 상호작용하는 막의 타입은 퇴행성 근육 및 비-퇴행성 근육 간에, 즉 DMD 및 트리뉴클레오타이드 반복 장애 간에 크게 상이한 것으로 여겼다. 퇴행성 질환 예컨대 DMD와 달리, DM1에서는 근육막이 파괴되지 않으므로, 근육 조직으로의 접합체 투과가 억제되어, 이를 달성하는 것이 훨씬 더 어려울 것으로 예상되었다. 그러나, 본원에 제시된 데이터에 기반하여, 상기 펩티드 운반체는 DM1을 치료하기 위해 비-퇴행성 근육으로의 전달에 효과적임을 처음으로 밝혔을 뿐만 아니라, 예기치 않게 DMD보다 DM1에 대해 더 효과적으로 작용하는 것으로 나타났다.

[0042] 본원에 제시된 데이터에서, 본 발명의 접합체는 트리뉴클레오타이드 장애에 의해 이환된 주요 표적 조직 예컨대 비복근 (gastrocnemius) 및 사두근 (quadriceps) 골격근에의 전달 및 효능을 우수한 수준으로 유지하였다. 더욱이, 이들 접합체는 동일한 접합체에 사용되는 경우 이전에 이용 가능한 운반체 펩티드와 비교하여 효능이 개선된 것으로 나타났다. 본 발명의 접합체는 돌연변이체 CUGexpanded-DMPK 전사체를 표적으로 하여, 핵 병소 (nuclear foci)의 형성을 방지함으로써, 핵 RNA 병소에 의한 MBNL1 스플라이싱 인자의 유해한 격리 (sequestration)를 방지하고, 결과적으로 다수의 유전자에서의 스플라이싱 결함 및 근육 기능장애의 원인인 MBNL1 기능 손실을 완화시킨다.

[0043] 이는 본 발명의 접합체 투여 후에 확장을 포함하는 DMPK 전사체에 의해 형성된 핵 병소 수의 감소, 및 본 발명의 접합체 투여 후에 유전자의 스플라이싱 교정 (splicing correction)에 의해 본원에서 입증되며, 상기 유전자는 전형적으로 트리뉴클레오타이드 반복 확장 전사체에 의해 격리된 MBNL1의 이용 가능성 감소로 인해 DM1에서 미스스플라이싱 (missplicing)된다. 구체적으로, 본원에서 입증된 상기 접합체는 미처리 세포/대상체와

비교하여, clicn1 엑손 7a 및 mbln1 엑손5를 제외하고 serca 엑손22를 포함하는 건강한 대조군에 대해 50-90%의 스플라이싱 교정을 보여주는 것으로 입증되었다. 이는 또한 마우스의 근긴장증 (myotonia)이 본원에 기재된 접합체의 단회 주사 후에조차 정상화되고 완전 회복 지점으로 교정된 DM1 모델에서 본원에 개시된 바와 같이, 트리뉴클레오티드 장애의 생리학적 상태의 개선에 의해 추가로 입증된다.

[0044] 놀랍게도, 본 발명자들은 접합체에 사용된 펩티드 운반체가 치료용 분자를, CUG 돌연변이와의 유리한 화학량론적 상호작용을 허용하기에 충분한 농도로, 핵 구획 및 DMPK 전사체의 핵 응집체로 효과적으로 전달한다는 것을 발견하였다.

[0045] 동시에, 본 발명의 접합체는 전신 주사 후 임상 징후의 감소 및 생화학적 마커의 측정을 통해 관찰되는 더 낮은 독성으로, 인 비보(in vivo)에서 효과적으로 작용한다. 결정적으로, 본 발명의 접합체는 동일 접합체에서의 이전의 운반체 펩티드와 비교하여 마우스에게 유사한 전신 주사 후에 놀랍도록 감소된 독성을 나타냄이 입증되었다. 본원에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 접합체는 치료적으로 적절한 용량에서 식염수와 비교하여 독성 마커의 유의미한 증가를 일으키지 않았고, 세포 생존율을 유지한 반면에, 이전의 펩티드 운반체를 사용한 접합체는 상당한 세포 사멸을 나타내었다. 상기 접합체를 마우스에게 투여하는 경우, 마우스는 회복 시간 (recovery time)이 빨랐고, 이는 이전에 이용 가능한 펩티드로 형성된 접합체를 투여한 후보보다 훨씬 빠르다.

[0046] 따라서, 본 발명의 접합체는 인간에서 트리뉴클레오티드 반복 장애에 대한 안전하고 효과적인 치료법으로서 사용하기 위한 개선된 적합성을 제공하여, 달리 치료할 수 없었던 이들 파괴적인 질병의 치료를 위한 수단을 제공한다.

[0047] 인공 아미노산

[0048] 본 발명은 인공 아미노산 잔기가 존재하지 않는 특정 구조를 가진 운반체 펩티드를 포함하는 접합체에 관한 것이다.

[0049] 적합하게는, 상기 펩티드는 아미노핵사노산 잔기를 함유하지 않는다. 적합하게는, 상기 펩티드는 임의 형태의 아미노핵사노산 잔기를 함유하지 않는다. 적합하게는, 상기 펩티드는 6-아미노핵사노산 잔기를 함유하지 않는다.

[0050] 적합하게는, 상기 펩티드는 천연 아미노산 잔기만을 함유하고, 그러므로 천연 아미노산 잔기로 구성된다.

[0051] 적합하게는, 세포-투과 펩티드에 전형적으로 사용되는 인공 아미노산 예컨대 6-아미노핵사노산은 천연 아미노산으로 대체된다. 적합하게는, 세포-투과 펩티드에 전형적으로 사용되는 인공 아미노산 예컨대 6-아미노핵사노산은 베타-알라닌, 세린, 프롤린, 아르기닌 및 히스티딘 또는 하이드록시프롤린으로부터 선택된 아미노산으로 대체된다.

[0052] 일 구체예에서, 아미노핵사노산은 베타-알라닌으로 대체된다. 적합하게는, 6-아미노핵사노산은 베타-알라닌으로 대체된다.

[0053] 일 구체예에서, 아미노핵사노산은 히스티딘으로 대체된다. 적합하게는, 6-아미노핵사노산은 히스티딘으로 대체된다.

[0054] 일 구체예에서, 아미노핵사노산은 하이드록시프롤린으로 대체된다. 적합하게는, 6-아미노핵사노산은 하이드록시프롤린으로 대체된다.

[0055] 적합하게는, 세포-투과 펩티드에 전형적으로 사용되는 인공 아미노산 예컨대 6-아미노핵사노산은 베타-알라닌, 세린, 프롤린, 아르기닌 및 히스티딘 또는 하이드록시프롤린 중 임의의 것의 조합, 적합하게는 베타-알라닌, 히스티딘 및 하이드록시프롤린 중 임의의 것의 조합으로 대체될 수 있다.

[0056] 일 구체예에서, 상기 펩티드 운반체는 40개 이하의 아미노산 잔기의 총 길이를 가질 수 있고, 상기 펩티드는 하기를 포함하며:

[0057] 적어도 4개의 아미노산 잔기를 각각 포함하는 2개 이상의 양이온성 도메인; 및

[0058] 적어도 3개의 아미노산 잔기를 각각 포함하는 1개 이상의 소수성 도메인;

[0059] 여기서 적어도 1개의 양이온성 도메인은 히스티딘 잔기를 포함한다.

[0060] 적합하게는, 상기 적어도 1개의 양이온성 도메인은 히스티딘 풍부(histidine rich)이다.

- [0061] 적합하게는, 히스티딘 풍부한 의미는 양이온성 도메인과 관련하여 본원에서 정의된다.
- [0062] **양이온성 도메인**
- [0063] 본 발명은 소정의 길이를 갖는 양이온성 도메인이 적어도 2개 존재하는 특정 구조를 갖는 짧은 펩티드 운반체를 포함하는 집합체에 관한 것이다.
- [0064] 적합하게는, 상기 펩티드는 최대 4개의 양이온성 도메인, 최대 3개의 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0065] 적합하게는, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0066] 상기 정의된 바와 같이, 상기 펩티드는 적어도 4개의 아미노산 잔기의 길이를 각각 갖는 2개 이상의 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0067] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 4 내지 12개의 아미노산 잔기의 길이, 적합하게는 4 내지 7개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는다.
- [0068] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 4, 5, 6, 또는 7개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는다.
- [0069] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 유사한 길이를 가지며, 적합하게는 각 양이온성 도메인은 동일한 길이를 갖는다.
- [0070] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 양이온성 아미노산을 포함하고, 또한 극성 및/또는 비-극성 아미노산을 함유할 수 있다.
- [0071] 비-극성 아미노산은 하기로부터 선택될 수 있다: 알라닌, 베타-알라닌, 프롤린, 글리신, 시스테인, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 트립토판, 페닐알라닌. 적합하게는, 비-극성 아미노산은 전하를 갖지 않는다.
- [0072] 극성 아미노산은 하기로부터 선택될 수 있다: 세린, 아스파라긴, 하이드록시프롤린, 히스티딘, 아르기닌, 트레오닌, 티로신, 글루타민. 적합하게는, 선택된 극성 아미노산은 음전하를 갖지 않는다.
- [0073] 양이온성 아미노산은 하기로부터 선택될 수 있다: 아르기닌, 히스티딘, 리신. 적합하게는, 양이온성 아미노산은 생리학적 pH에서 양전하를 갖는다.
- [0074] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 음이온성 또는 음으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하지 않는다.
- [0075] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘, 베타-알라닌, 하이드록시프롤린 및/또는 세린 잔기를 포함한다.
- [0076] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘, 베타-알라닌, 하이드록시프롤린 및/또는 세린 잔기로 구성된다.
- [0077] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%의 양이온성 아미노산을 포함한다.
- [0078] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 대다수의 양이온성 아미노산을 포함한다. 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%의 양이온성 아미노산을 포함한다.
- [0079] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 적어도 7.5, 적어도 8.0, 적어도 8.5, 적어도 9.0, 적어도 9.5, 적어도 10.0, 적어도 10.5, 적어도 11.0, 적어도 11.5, 적어도 12.0의 등전점 (isoelectric point; pI)을 포함한다.
- [0080] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 적어도 10.0의 등전점 (pI)을 포함한다.
- [0081] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 10.0 내지 13.0의 등전점 (pI)을 포함한다.
- [0082] 일 구체예에서, 각 양이온성 도메인은 10.4 내지 12.5의 등전점 (pI)을 포함한다.
- [0083] 적합하게는, 양이온성 도메인의 등전점은 당해 분야에서 이용 가능한 임의의 적절한 수단에 의해 생리학적 pH에서 계산된다. 적합하게는, Lukasz Kozlowski, Biol Direct. 2016; 11: 55. DOI: 10.1186/s13062-016-0159-9에 의해 개발된 웹-기반 알고리즘인 IPC (www.isoelectric.org)를 사용하여 계산된다.
- [0084] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%의 아르기닌 및/또는 히스티딘 잔기를 포함한다.
- [0085] 적합하게는, 양이온성 도메인은 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 60%, 적

어도 65%, 적어도 70%의 아르기닌 잔기를 포함할 수 있다.

- [0086] 적합하게는, 양이온성 도메인은 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%의 히스티딘 잔기를 포함할 수 있다.
- [0087] 적합하게는, 양이온성 도메인은 총 1-5개의 히스티딘 및 1-5개의 아르기닌 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 양이온성 도메인은 1-5개의 아르기닌 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 양이온성 도메인은 1-5개의 히스티딘 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 양이온성 도메인은 총 2-5개의 히스티딘 및 3-5개의 아르기닌 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 양이온성 도메인은 3-5개의 아르기닌 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 양이온성 도메인은 2-5개의 히스티딘 잔기를 포함할 수 있다.
- [0088] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 1개 이상의 베타-알라닌 잔기를 포함한다. 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 총 2-5개의 베타-알라닌 잔기, 적합하게는 총 2 또는 3개의 베타-알라닌 잔기를 포함할 수 있다.
- [0089] 적합하게는, 양이온성 도메인은 1개 이상의 하이드록시프롤린 잔기 또는 세린 잔기를 포함할 수 있다.
- [0090] 적합하게는, 양이온성 도메인은 1-2개의 하이드록시프롤린 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 양이온성 도메인은 1-2개의 세린 잔기를 포함할 수 있다.
- [0091] 적합하게는, 해당 양이온성 도메인에서 양이온성 아미노산 모두는 히스티딘일 수 있고, 대안으로서 적합하게는, 해당 양이온성 도메인에서 양이온성 아미노산 모두는 아르기닌일 수 있다.
- [0092] 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 1개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인을 포함할 수 있다.
- [0093] 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인 및 적어도 1개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함할 수 있다.
- [0094] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0095] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0096] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 아르기닌 및 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0097] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인 및 1개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0098] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 3개 이하의 연속하는 아르기닌 잔기, 적합하게는 2개 이하의 연속하는 아르기닌 잔기를 포함한다.
- [0099] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 연속하는 히스티딘 잔기를 포함하지 않는다.
- [0100] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘 및/또는 베타-알라닌 잔기를 포함한다. 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 대다수의 아르기닌, 히스티딘 및/또는 베타-알라닌 잔기를 포함한다. 적합하게는, 각 양이온성 도메인에서 아미노산 잔기의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 100%는 아르기닌, 히스티딘 및/또는 베타-알라닌 잔기이다. 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘 및/또는 베타-알라닌 잔기로 구성된다.
- [0101] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기를 포함하는 제1 양이온성 도메인, 및 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기를 포함하는 제2 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0102] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기를 포함하는 제1 양이온성 도메인, 및 히스티딘, 베타-알라닌, 및 선택적으로 아르기닌 잔기를 포함하는 제2 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0103] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기를 포함하는 제1 양이온성 도메인, 및 히스티딘 및 베타-알라닌 잔기를 포함하는 제2 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0104] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기로 구성된 제1 양이온성 도메인, 및 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기로 구성된 제2 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0105] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기로 구성된 제1 양이온성 도메인, 및 아르기닌, 히스티딘 및 베타-알라닌 잔기로 구성된 제2 양이온성 도메인을 포함한다.

- [0106] 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 2개의 양이온성 도메인을 포함하고, 적합하게는 이러한 양이온성 도메인은 펩티드의 아암 (arms)을 형성한다. 적합하게는, 상기 양이온성 도메인은 상기 펩티드의 N 및 C 말단에 위치한다. 그러므로 적합하게는, 상기 양이온성 도메인은 양이온성 아암 도메인 (cationic arm domains)으로 알려져 있을 수 있다.
- [0107] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함하되, 하나는 펩티드의 N-말단에 위치하고, 다른 하나는 펩티드의 C-말단에 위치한다. 적합하게는, 펩티드의 각 단부에 위치한다. 적합하게는, 말단 변형, 링커 및/또는 치료용 분자와 같은 다른 그룹을 제외하고, 상기 펩티드의 N-말단 및 C-말단에 추가의 아미노산 또는 도메인이 존재하지 않는다. 의심의 여지를 피하기 위해, 이러한 다른 그룹은 본원에 기재되고 청구된 '펩티드'에 추가하여 존재할 수 있다. 그러므로 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 펩티드의 말단을 형성한다. 적합하게는, 이는 본원에 기재된 추가 링커 그룹의 존재를 배제하지 않는다.
- [0108] 적합하게는, 상기 펩티드는 최대 4개의 양이온성 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0109] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함하고, 이들 모두는 아르기닌 풍부(arginine rich)이다.
- [0110] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0111] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함하고, 이들 모두는 아르기닌 및 히스티딘이 모두 풍부이다.
- [0112] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인 및 1개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0113] 적합하게는, 상기 양이온성 도메인은 하기로부터 선택되는 아미노산 단위를 포함한다: 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, 또는 이들의 임의의 조합.
- [0114] 적합하게는, 양이온성 도메인은 또한 세린, 프롤린 및/또는 하이드록시프롤린 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 상기 양이온성 도메인은 하기로부터 선택되는 아미노산 단위를 추가로 포함할 수 있다: 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, 또는 이들의 임의의 조합, 또는 상기 열거된 아미노산 단위와의 임의의 조합.
- [0115] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 하기 서열들 중 임의의 서열을 포함한다: RBRRBRR (서열번호: 1), RBRBR (서열번호: 2), RBRR (서열번호: 3), RBRRBR (서열번호: 4), RRBRBR (서열번호: 5), RBRRB (서열번호: 6), BRBR (서열번호: 7), RBHBH (서열번호: 8), HBHBR (서열번호: 9), RBRHBHR (서열번호: 10), RBRBBHR (서열번호: 11), RBRRBH (서열번호: 12), HBRRBR (서열번호: 13), HBHBH (서열번호: 14), BHBH (서열번호: 15), BRBSB (서열번호: 16), BRB[Hyp]B (서열번호: 17), R[Hyp]H[Hyp]HB (서열번호: 18), R[Hyp]RR[Hyp]R (서열번호: 19) 또는 이들의 임의의 조합.
- [0116] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 하기 서열들 중 임의의 서열로 구성된다: RBRRBRR (서열번호: 1), RBRBR (서열번호: 2), RBRR (서열번호: 3), RBRRBR (서열번호: 4), RRBRBR (서열번호: 5), RBRRB (서열번호: 6), BRBR (서열번호: 7), RBHBH (서열번호: 8), HBHBR (서열번호: 9), RBRHBHR (서열번호: 10), RBRBBHR (서열번호: 11), RBRRBH (서열번호: 12), HBRRBR (서열번호: 13), HBHBH (서열번호: 14), BHBH (서열번호: 15), BRBSB (서열번호: 16), BRB[Hyp]B, R[Hyp]H[Hyp]HB, R[Hyp]RR[Hyp]R (서열번호: 19) 또는 이들의 임의의 조합.
- [0117] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 하기 서열들 중 하나의 서열로 구성된다: RBRRBRR (서열번호: 1), RBRBR (서열번호: 2), RBRRBR (서열번호: 4), BRBR (서열번호: 7), RBHBH (서열번호: 8), HBHBR (서열번호: 9).
- [0118] 적합하게는, 상기 펩티드에서 각 양이온성 도메인은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 적합하게는, 상기 펩티드에서 각 양이온성 도메인은 상이하다.
- [0119] **소수성 도메인**
- [0120] 본 발명은 소정의 길이를 갖는 소수성 도메인이 적어도 1개 존재하는 특정 구조를 갖는 짧은 펩티드 운반체를 포함하는 집합체에 관한 것이다.

- [0121] 적합하게는, 상기 펩티드는 최대 3개의 소수성 도메인, 최대 2개의 소수성 도메인을 포함한다.
- [0122] 적합하게는, 상기 펩티드는 1개의 소수성 도메인을 포함한다.
- [0123] 상기 정의된 바와 같이, 상기 펩티드는 각각 적어도 3개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는, 1개 이상의 소수성 도메인을 포함한다.
- [0124] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 3-6개의 아미노산의 길이를 갖는다. 적합하게는, 각 소수성 도메인은 5개의 아미노산의 길이를 갖는다.
- [0125] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 비-극성, 극성 및 소수성 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0126] 소수성 아미노산 잔기는 하기로부터 선택될 수 있다: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 티로신, 메티오닌 및 트립토판.
- [0127] 비-극성 아미노산 잔기는 하기로부터 선택될 수 있다: 프롤린, 글리신, 시스테인, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 트립토판, 페닐알라닌, 메티오닌.
- [0128] 극성 아미노산 잔기는 하기로부터 선택될 수 있다: 세린, 아스파라긴, 하이드록시프롤린, 히스티딘, 아르기닌, 트레오닌, 티로신, 글루타민.
- [0129] 적합하게는, 상기 소수성 도메인은 친수성 아미노산 잔기를 포함하지 않는다.
- [0130] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 대다수의 소수성 아미노산 잔기를 포함한다. 적합하게는, 각 소수성 도메인은 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 100%의 소수성 아미노산을 포함한다. 적합하게는, 각 소수성 도메인은 소수성 아미노산 잔기로 구성된다.
- [0131] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 적어도 0.3, 적어도 0.4, 적어도 0.5, 적어도 0.6, 적어도 0.7, 적어도 0.8, 적어도 0.8, 적어도 1.0, 적어도 1.1, 적어도 1.2, 적어도 1.3의 소수도 (hydrophobicity)를 포함한다.
- [0132] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 적어도 0.3, 적어도 0.35, 적어도 0.4, 적어도 0.45의 소수도를 포함한다.
- [0133] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 적어도 1.2, 적어도 1.25, 적어도 1.3, 적어도 1.35의 소수도를 포함한다.
- [0134] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 0.4 내지 1.4의 소수도를 포함한다.
- [0135] 일 구체예에서, 각 소수성 도메인은 0.45 내지 0.48의 소수도를 포함한다.
- [0136] 일 구체예에서, 각 소수성 도메인은 1.27 내지 1.39의 소수도를 포함한다.
- [0137] 적합하게는, 소수도는 White and Wimley: W.C. Wimley and S.H. White, "Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces" Nature Struct Biol 3:842 (1996)에 의해 측정되는 바와 같다.
- [0138] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 적어도 3개, 적어도 4개의 소수성 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0139] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 티로신, 트립토판, 프롤린 및 글루타민 잔기를 포함한다. 적합하게는, 각 소수성 도메인은 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 티로신, 트립토판, 프롤린 및/또는 글루타민 잔기로 구성된다.
- [0140] 일 구체예에서, 각 소수성 도메인은 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 티로신 및/또는 글루타민 잔기로 구성된다.
- [0141] 일 구체예에서, 각 소수성 도메인은 트립토판 및/또는 프롤린 잔기로 구성된다.
- [0142] 적합하게는, 상기 펩티드는 1개의 소수성 도메인을 포함한다. 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 펩티드의 중심에 위치한다. 그러므로 적합하게는, 상기 소수성 도메인은 코어 소수성 도메인으로 알려져 있을 수 있다. 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 코어 도메인은 각 측면이 아암 도메인에 의해 플랭킹된다. 적합하게는, 상기 아암 도메인은 1개 이상의 양이온성 도메인 및 1개 이상의 추가의 소수성 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 각 아암 도메인은 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0143] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 아암 도메인에 의해 플랭킹된 소수성 코어 도메인을 포함하고, 상기 각 아암 도메인은 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0144] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된 소수성 코어 도메인으로 구성된다.

- [0145] 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 하기 서열들 중 하나를 포함한다: YQFLI (서열번호: 20), FQILY (서열번호: 21), ILFQY (서열번호: 22), FQIY (서열번호: 23), WWW, WWPWW (서열번호: 24), WPWW (서열번호: 25), WWPW (서열번호: 26) 또는 이들의 임의의 조합.
- [0146] 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 하기 서열들 중 하나로 구성된다: YQFLI (서열번호: 20), FQILY (서열번호: 21), ILFQY (서열번호: 22), FQIY (서열번호: 23), WWW, WWPWW (서열번호: 24), WPWW (서열번호: 25), WWPW (서열번호: 26) 또는 이들의 임의의 조합.
- [0147] 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 하기 서열들 중 하나로 구성된다: FQILY (서열번호: 21), WWW, WWPWW (서열번호: 24).
- [0148] 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 하기 서열로 구성된다: FQILY (서열번호: 21).
- [0149] 적합하게는, 상기 펩티드에서 각 소수성 도메인은 동일한 서열 또는 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [0150] **펩티드 운반체**
- [0151] 본 발명은 의학적 병태의 치료에 있어서 트리뉴클레오타이드 반복으로 형성된 치료용 핵산을 수송하는데 사용하기 위한 펩티드 운반체를 포함하는 접합체에 관한 것이다.
- [0152] 상기 펩티드는 연속하는 단일 분자인 서열을 가지므로 상기 펩티드의 도메인은 연속적이다. 적합하게는, 상기 펩티드는 N-말단과 C-말단 사이에 선형 배열로 수 개의 도메인들을 포함한다. 적합하게는, 상기 도메인은 상기 기재된 양이온성 도메인 및 소수성 도메인으로부터 선택된다. 적합하게는, 상기 펩티드는 양이온성 도메인 및 소수성 도메인으로 구성되며, 여기서 상기 도메인은 상기 정의된 바와 같다.
- [0153] 각 도메인은 상기 관련 섹션에서 기재된 공통 서열 특징을 갖지만, 각 도메인의 정확한 서열은 변이 및 변형이 가능하다. 따라서 각 도메인에 대해 다양한 서열이 가능하다. 각 가능한 도메인 서열의 조합은 다양한 펩티드 구조를 생성하고, 이들 각각은 본 발명의 일부를 형성한다. 상기 펩티드 구조의 특징이 하기에 기재되어 있다.
- [0154] 적합하게는, 소수성 도메인은 임의의 2개의 양이온성 도메인을 분리한다. 적합하게는, 각 소수성 도메인은 이의 각 측면이 양이온성 도메인들에 의해 플랭킹된다.
- [0155] 적합하게는, 양이온성 도메인은 다른 양이온성 도메인과 연속하지 않는다.
- [0156] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 하기 배열로 2개의 양이온성 도메인에 의해 플랭킹된 하나의 소수성 도메인을 포함한다:
- [0157] [양이온성 도메인] - [소수성 도메인] - [양이온성 도메인]
- [0158] 그러므로 적합하게는, 상기 소수성 도메인은 코어 도메인으로 알려져 있을 수 있고, 각 양이온성 도메인은 아암 도메인으로 알려져 있을 수 있다. 적합하게는, 상기 소수성 아암 도메인이 각 측면에서 상기 양이온성 코어 도메인에 플랭킹된다.
- [0159] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인 및 1개의 소수성 도메인으로 구성된다.
- [0160] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성된다.
- [0161] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된, YQFLI (서열번호: 20), FQILY (서열번호: 21), ILFQY (서열번호: 22), FQIY (서열번호: 23), WWW, WWPWW (서열번호: 24), WPWW (서열번호: 25), 및 WWPW (서열번호: 26)으로부터 선택되는 서열을 포함하는 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성되며, 상기 각 양이온성 아암 도메인은 RBRRBRR (서열번호: 1), RBRBR (서열번호: 2), RBRR (서열번호: 3), RBRRBR (서열번호: 4), RRBRBR (서열번호: 5), RBRB (서열번호: 6), BRBR (서열번호: 7), RBHBH (서열번호: 8), HBHBR (서열번호: 9), RBRHBHR (서열번호: 10), RBRBBHR (서열번호: 11), RBRRBH (서열번호: 12), HBRRBR (서열번호: 13), HBHBH (서열번호: 14), BHBH (서열번호: 15), BRBSB (서열번호: 16), BRB[Hyp]B (서열번호: 17), R[Hyp]H[Hyp]HB (서열번호: 18), 및 R[Hyp]RR[Hyp]R (서열번호: 19)로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0162] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된, FQILY (서열번호: 21), WWW, 및 WWPWW (서열번호: 24)로부터 선택되는 서열을 포함하는 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성되며, 상기 각 양이온성 아암 도메인은 RBRRBRR (서열번호: 1), RBRBR (서열번호: 2), RBRRBR (서열번호: 4), RBRRB (서열번호:

6), BRBR (서열번호: 7), 및 RBHBH (서열번호: 8)로부터 선택되는 서열을 포함한다.

- [0163] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된, FQILY (서열번호: 21)의 서열을 포함하는 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성되고, 상기 각 양이온성 아암 도메인은 RBRRBR (서열번호: 1), RBRBR (서열번호: 2), RBRBR (서열번호: 4), RBRBR (서열번호: 6), BRBR (서열번호: 7), RBHBH (서열번호: 8)로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0164] 이러한 임의의 구체예에서, 링커, 말단 변형 및/또는 치료용 분자와 같은 추가 그룹이 존재할 수 있다.
- [0165] 적합하게는, 상기 펩티드는 N-말단이 변형된다.
- [0166] 적합하게는, 상기 펩티드는 N-아세틸화, N-메틸화, N-트리플루오로아세틸화, N-트리플루오로메틸설폰화, 또는 N-메틸설폰화된다. 적합하게는, 상기 펩티드는 N-아세틸화된다.
- [0167] 선택적으로, 상기 펩티드의 N-말단은 변형되지 않을 수 있다.
- [0168] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 N-아세틸화된다.
- [0169] 적합하게는, 상기 펩티드는 하기로부터 선택되는 C-말단 변형을 포함한다: 카복시-, 티오산-(thioacid-), 아미노옥시-, 하이드라지노-, 티오에스테르-, 아지드, 스트레인드 알킨 (strained alkyne), 스트레인드 알켄 (strained alkene), 알데하이드-, 티올 또는 할로아세틸-기.
- [0170] 유리하게는, 상기 C-말단 또는 N-말단 변형은 상기 펩티드의 치료용 분자에의 연결 수단을 제공할 수 있다.
- [0171] 따라서, 상기 C-말단 변형 또는 상기 N-말단 변형은 링커를 포함할 수 있고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 적합하게는, 상기 C-말단 변형 또는 상기 N-말단 변형은 링커로 구성될 수 있거나, 또는 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 적합한 링커는 본원에 기재되어 있다.
- [0172] 적합하게는, 상기 펩티드는 C-말단 카복실기를 포함한다.
- [0173] 적합하게는, 상기 C-말단 카복실기는 글리신, 베타-알라닌, 글루탐산, 또는 감마-아미노부티르산 잔기에 의해 제공된다.
- [0174] 일 구체예에서, 상기 C 말단 카복실기는 베타-알라닌 잔기에 의해 제공된다.
- [0175] 적합하게는, 상기 C 말단 잔기는 링커이다. 적합하게는, 상기 C 말단 베타-알라닌 잔기는 링커이다.
- [0176] 적합하게는, 그러므로 각 양이온성 도메인은 N 또는 C 말단 변형을 추가로 포함할 수 있다. 적합하게는, C 말단에서 양이온성 도메인은 C-말단 변형을 포함한다. 적합하게는, N 말단에서 양이온성 도메인은 N-말단 변형을 포함한다. 적합하게는, C 말단에서 양이온성 도메인은 링커 기를 포함하고, 적합하게는 C 말단에의 양이온성 도메인은 C-말단 베타-알라닌을 포함한다. 적합하게는, N 말단에서의 양이온성 도메인은 N-아세틸화된다.
- [0177] 본 발명의 펩티드는 40개 이하의 아미노산 잔기의 총 길이를 갖는 것으로 정의된다. 그러므로 상기 펩티드는 올리고펩티드로 간주될 수 있다.
- [0178] 적합하게는, 상기 펩티드는 3-30개의 아미노산 잔기, 적합하게는 5-25개의 아미노산 잔기, 10-25개의 아미노산 잔기, 13-23개의 아미노산 잔기, 15-20개의 아미노산 잔기의 총 길이를 갖는다.
- [0179] 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개의 아미노산 잔기의 총 길이를 갖는다.
- [0180] 적합하게는, 상기 펩티드는 세포를 투과할 수 있다. 그러므로 상기 펩티드는 세포-투과 펩티드로 간주될 수 있다.
- [0181] 적합하게는, 상기 펩티드는 치료용 분자에 부착하기 위한 것이다. 적합하게는, 상기 펩티드는 치료용 분자를 표적 세포로 수송하기 위한 것이다. 적합하게는, 상기 펩티드는 치료용 분자를 표적 세포로 전달하기 위한 것이다. 그러므로 상기 펩티드는 펩티드 운반체로 간주된다.
- [0182] 적합하게는, 상기 펩티드 운반체는 세포 및 조직으로, 적합하게는 세포핵으로, 적합하게는 근육 조직으로 투과할 수 있다.
- [0183] 적합하게는, 상기 펩티드 운반체는 하기 서열들 중 임의의 것으로부터 선택될 수 있다:

[0184]	RBRRBRRFQILYRBRBR (서열번호: 27)
[0185]	RBRRBRRFQILYRBRR (서열번호: 28)
[0186]	RBRRBRRFQILYRRBRBR (서열번호: 29)
[0187]	RBRBRFQILYRBRBRBR (서열번호: 30)
[0188]	RBRRBRRYQFLIRBRBR (서열번호: 31)
[0189]	RBRRBRRILFQYRBRBR (서열번호: 32)
[0190]	RBRRBRRFQILYRBRBR (서열번호: 33)
[0191]	RBRRBFRQILYRBRBR (서열번호: 34)
[0192]	RBRRBRRFQILYBRBR (서열번호: 35)
[0193]	RBRRBFRQILYRBRBR (서열번호: 36)
[0194]	RBRRBRRFQILYRBHBH (서열번호: 37)
[0195]	RBRRBRRFQILYHBHBR (서열번호: 38)
[0196]	RBRRBRRFQILYHBRBH (서열번호: 39)
[0197]	RBRRBRRYQFLIRHBH (서열번호: 40)
[0198]	RBRRBRRILFQYRBHBH (서열번호: 41)
[0199]	RBRHBHRRFQILYRBRBR (서열번호: 42)
[0200]	RBRBBHRRFQILYRBHBH (서열번호: 43)
[0201]	RBRRBRRFQILYRBHBH (서열번호: 44)
[0202]	RBRRBRRFQILYHBHBH (서열번호: 45)
[0203]	RBRRBHFRQILYRBHBH (서열번호: 46)
[0204]	HBRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 47)
[0205]	RBRRBFRQILYRBHBH (서열번호: 48)
[0206]	RBRRBRRFQILYBHBH (서열번호: 49)
[0207]	RBRRBRYQFLIHBHBH (서열번호: 50)
[0208]	RBRRBRRILFQYHBHBH (서열번호: 51)
[0209]	RBRRBRRFQILYHBHBH (서열번호: 52)
[0210]	적합하게는, 상기 펩티드는 하기 추가의 서열들 중 임의의 것으로부터 선택될 수 있다:
[0211]	RBRRBRRFQILYBRBS (서열번호: 53)
[0212]	RBRRBRRFQILYBRB[Hyp] (서열번호: 54)
[0213]	RBRRBRRFQILYBR[Hyp]R (서열번호: 55)
[0214]	RRBRRBRRFQILYBRBR (서열번호: 56)
[0215]	BRRBRRFQILYBRBR (서열번호: 57)
[0216]	RBRRBRRWWWBRBR (서열번호: 58)
[0217]	RBRRBRRWWPWWBRBR (서열번호: 59)
[0218]	RBRRBRRWPWWBRBR (서열번호: 60)
[0219]	RBRRBRRWWPWWBRBR (서열번호: 61)

- [0220] RBRBRRWWRBRBR (서열번호: 62)
- [0221] RBRBRRWPPWRBRBR (서열번호: 63)
- [0222] RBRBRRWPPWRBRBR (서열번호: 64)
- [0223] RBRBRRWPPWRBRBR (서열번호: 65)
- [0224] RBRBRRFQILYBRBR (서열번호: 66)
- [0225] RBRBRRFQILYRBR (서열번호: 67)
- [0226] BRBRBWWWRBRBR (서열번호: 68)
- [0227] RBRBRRFQILYBHBH (서열번호: 69)
- [0228] RBRBRRFQIYRBHBH (서열번호: 70)
- [0229] RBRBRFQILYBRBH (서열번호: 71)
- [0230] RBRBRFQILYR[Hyp]H[Hyp]H (서열번호: 72)
- [0231] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYRBHBH (서열번호: 73)
- [0232] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYR[Hyp]H[Hyp]H (서열번호: 74)
- [0233] RBRBRWWWRBHBH (서열번호: 75)
- [0234] RBRBRWWPRBHBH (서열번호: 76)
- [0235] RBRBRPWWRBHBH (서열번호: 77)
- [0236] RBRBRWWPWWRBHBH (서열번호: 78)
- [0237] RBRBRWWPWRBHBH (서열번호: 79)
- [0238] RBRBRWPWWRBHBH (서열번호: 80)
- [0239] RBRBRRWWRBHBH (서열번호: 81)
- [0240] RBRBRRWPPWRBHBH (서열번호: 82)
- [0241] RBRBRRWPPWRBHBH (서열번호: 83)
- [0242] RBRBRRWPPWRBHBH (서열번호: 84)
- [0243] RBRBRRFQILYRBHBH (서열번호: 85)
- [0244] BRBRRFQILYRBHBH (서열번호: 86)
- [0245] RRBRBRFQILYBHBH (서열번호: 87)
- [0246] BRBRRFQILYBHBH (서열번호: 88)
- [0247] RBRBRHRFQILYRBHBH (서열번호: 89)
- [0248] RBRBRFQILY[Hyp]R[Hyp]R (서열번호: 90)
- [0249] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYBRBR (서열번호: 91)
- [0250] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILY[Hyp]R[Hyp]R (서열번호: 92)
- [0251] RBRBRWWWBRBR (서열번호: 93)
- [0252] RBRBRWWPWWBRBR (서열번호: 94)
- [0253] 적합하게는, 상기 펩티드는 하기 서열들 중 하나로 구성된다:
- [0254] RBRBRRFQILYRBRBR (서열번호: 27)
- [0255] RBRBRRYQFLIRBRBR (서열번호: 31)

- [0256] RBRBRILFQYRBRBR (서열번호: 32)
- [0257] RBRBRFQILYBRBR (서열번호: 35)
- [0258] RBRBRFQILYRBHBH (서열번호: 37)
- [0259] RBRBRFQILYHBHBR (서열번호: 38)
- [0260] RBRBRFQILYRBHBH (서열번호: 44)
- [0261] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 하기 서열로 구성된다: RBRBRFQILYBRBR (서열번호: 35).
- [0262] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 하기 서열로 구성된다: RBRBRFQILYRBHBH (서열번호: 37).
- [0263] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 하기 서열로 구성된다: RBRBRFQILYRBHBH (서열번호: 44).
- [0264] 치료용 분자
- [0265] 상기 펩티드 운반체는 본 발명의 접합체를 제공하기 위해 치료용 분자에 공유 결합으로 연결되며, 여기서 상기 치료용 분자는 복수의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하는 핵산이다.
- [0266] 적합하게는, 상기 핵산은 하기로부터 선택될 수 있다: 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (예컨대 PNA, PMO), mRNA, gRNA (예를 들어 CRISPR/Cas9 기술의 사용에서), 짧은 간섭 RNA (short interfering RNA), 마이크로 RNA (micro RNA) 및 antagomiRNA.
- [0267] 적합하게는, 상기 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0268] 적합하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드 (PMO) 이다.
- [0269] 대안으로서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 PMO 또는 임의의 다른 전하-중성 안티센스 올리고뉴클레오타이드 예컨대 펩티드 핵산 (PNA), 화학적으로 변형된 PNA 예컨대 감마-PNA (Bahal, Nat.Comm. 2016), 올리고뉴클레오타이드 포스포라미데이트 (상기 포스페이트의 비-가교 산소(non-bridging oxygen) 는 WO 2016/028187A1에 기재된 것과 같은 아민 또는 알킬아민에 의해 치환됨), 또는 임의의 다른 부분적으로 또는 완전히 전하-중성화된 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0270] 적합하게는, 상기 핵산은 복수의 트리뉴클레오타이드 반복으로 구성된다.
- [0271] 적합하게는, 상기 핵산은 임의의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함한다. 적합하게는, 상기 핵산은 하기로부터 선택되는 트리뉴클레오타이드 반복을 포함한다: GTC, CAG, GCC, GGC, CTT 및 CCG 반복. 적합하게는, 상기 핵산은 하기로부터 선택되는 트리뉴클레오타이드 반복으로 구성된다: GTC, CAG, GCC, GGC, CTT 및 CCG 반복.
- [0272] 적합하게는, 상기 핵산은 CAG 반복을 포함한다. 적합하게는, 상기 핵산은 CAG 반복으로 구성된다.
- [0273] 일 구체예에서, 상기 핵산은 CAG 반복을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 일 구체예에서, 상기 핵산은 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0274] 적합하게는, 상기 핵산은 복수의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하거나, 또는 이로 구성된다. 적합하게는, 상기 핵산은 적어도 2회의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하거나, 또는 이로 구성된다. 적합하게는, 상기 핵산은 5-50회의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하거나, 또는 이로 구성된다. 적합하게는, 상기 핵산은 5-40회의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하거나, 또는 이로 구성된다. 적합하게는, 상기 핵산은 5-30회의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하거나, 또는 이로 구성된다. 적합하게는, 상기 핵산은 5-20회의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하거나, 또는 이로 구성된다. 적합하게는, 상기 핵산은 5-10회의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하거나, 또는 이로 구성된다. 적합하게는, 상기 핵산은 7회의 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하거나, 또는 이로 구성된다.
- [0275] 일 구체예에서, 상기 핵산은 7회의 CAG 반복을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 일 구체예에서, 상기 핵산은 7회의 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 적합하게는, 이러한 일 구체예에서, 상기 핵산은 [CAG]₇로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0276] 적합하게는, 상기 핵산은 미소부수체 영역에, 적합하게는 반복 확장에, 적합하게는 트리뉴클레오타이드 반복 확장에 상보적이다.
- [0277] 적합하게는, 상기 핵산은 미소부수체 영역을 표적으로 하고, 이에 결합한다. 적합하게는, 상기 미소부수체 영

역은 반복 확장을 포함하고, 적합하게는 이들은 트리뉴클레오타이드 반복 확장을 포함한다.

- [0278] 일부 구체예에서, 상기 반복 확장은 1 반복당 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드를 각각 포함하는 테트라, 펜타, 헥사, 헵타, 옥토, 노나 또는 데카 등의 반복 확장과 같은 고차의 반복 확장을 포함할 수 있다.
- [0279] 그러므로, 일부 구체예에서, 상기 치료용 분자는 복수의 테트라, 펜타, 헥사, 헵타, 옥토, 노나 또는 데카 뉴클레오타이드 반복을 포함하는 핵산이다. 그러므로, 일부 구체예에서, 상기 치료용 분자는 복수의 테트라, 펜타, 헥사, 헵타, 옥토, 노나 또는 데카 뉴클레오타이드 반복으로 구성된 핵산이다.
- [0280] 트리뉴클레오타이드 반복을 포함하는 핵산에 관한 본원의 모든 진술은 고차의 뉴클레오타이드 반복을 포함하는 핵산에 동일하게 적용된다.
- [0281] 적합하게는, 상기 핵산은 상보적 미소부수체 영역, 적합하게는 반복 확장의 상보적 영역, 적합하게는 트리뉴클레오타이드 반복 확장의 상보적 영역에 결합한다.
- [0282] 적합하게는, 상기 미소부수체 영역은 DNA 또는 RNA에 존재한다. 적합하게는, 상기 미소부수체 영역은 RNA에 존재한다.
- [0283] 적합하게는, 상기 미소부수체 영역은 코딩 또는 비-코딩 서열에 존재할 수 있다. 적합하게는, 상기 미소부수체 영역은 비-코딩 서열 예컨대 3' 또는 5' UTR에 존재한다. 적합하게는, 상기 미소부수체 영역은 3' UTR에 존재한다.
- [0284] 적합하게는, 상기 핵산은 상보적 트리뉴클레오타이드 반복 확장에 결합하는 트리뉴클레오타이드 반복으로 형성될 수 있다.
- [0285] 적합하게는, 상기 핵산은 RNA에서 상보적 트리뉴클레오타이드 반복 확장에 결합하는 트리뉴클레오타이드 반복으로 형성될 수 있다.
- [0286] 적합하게는, 상기 핵산은 RNA의 비-코딩 서열에서 상보적 트리뉴클레오타이드 반복 확장에 결합하는 트리뉴클레오타이드 반복으로 형성될 수 있다.
- [0287] 적합하게는, 상기 핵산은 RNA의 비-번역 영역에서 상보적 트리뉴클레오타이드 반복 확장에 결합하는 트리뉴클레오타이드 반복으로 형성될 수 있다.
- [0288] 일 구체예에서, 상기 핵산은 RNA의 3'UTR에서 상보적 트리뉴클레오타이드 반복 확장에 결합하는 트리뉴클레오타이드 반복으로 형성될 수 있다.
- [0289] 선택적으로, 리신 잔기가 펩티드 운반체에 부착되기 전에 핵산 (예컨대 PMO 또는 PNA)의 한쪽 또는 양쪽 단부에 부가되어 수 용해성을 향상시킬 수 있다.
- [0290] **트리뉴클레오타이드 반복 장애**
- [0291] 본 발명의 접합체는 의약으로서, 바람직하게는 트리뉴클레오타이드 반복 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0292] 적합하게는, 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 삼중항 반복 확장으로도 알려져 있는, 트리뉴클레오타이드 반복 확장에 의해 야기되는 유전 장애이다.
- [0293] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장이 유전자에 존재한다. 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장은 하기로부터 선택되는 유전자에 존재한다: ATN1, HTT, AR, ATXN1, ATXN2, ATXN3, CACNA1A, ATXN7, TBP, FMR1, AFF2, FXN, DMPK, SCA8, JPH3, 및 PPP2R2B.
- [0294] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장이 AR, SCA8 또는 DMPK 유전자에 존재한다.
- [0295] 일 구체예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장이 DMPK 유전자에 존재한다.
- [0296] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장은 하기로부터 선택되는 반복으로 형성된다: CAG, CTG, CGG, CCG, GAA, TTC 및 GGC.
- [0297] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장은 CAG 또는 CTG 반복으로 형성된다.
- [0298] 일 구체예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장은 CTG 반복으로 형성된다.
- [0299] 전형적으로 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 특정 유전자에서 발견되는 특정 트리뉴클레오타이드 반복 확장의 존재

로 인해 발생한다. 전형적으로 상기 유전자에 존재하는 트리뉴클레오티드 반복 횟수는 정상의 건강한 대상체의 동일 유전자에 존재하는 트리뉴클레오티드 반복 횟수보다 더 높다.

[0300] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오티드 반복 확장은 하기로부터 선택되는 유전자에서 CAG 반복이다: ATN1, HTT, AR, ATXN1, ATXN, ATXN3, CACNA1A, ATXN7, JPH3, 및 TBP.

[0301] 적합하게는, CAG 반복으로 인한 트리뉴클레오티드 반복 장애는 '폴리글루타민 질환 (polyglutamine diseases)'으로 지칭된다. 그러므로 적합하게는, 상기 트리뉴클레오티드 반복 장애는 폴리글루타민 장애일 수 있다. 적합하게는, 상기 폴리글루타민 장애는 하기로부터 선택될 수 있다: DRPLA (치아적핵담창구루이체 위축증), HD (헌팅턴병), HDL2 (헌팅턴병 유사 증후군 2), SBMA (척추-연수 근위축증), SCA1 (척수소뇌성 운동실조증 타입 1), SCA2 (척수소뇌성 운동실조증 타입 2), SCA3 (척수소뇌성 운동실조증 타입 3 또는 마카도-조셉병 (Machado-Joseph disease)), SCA6 (척수소뇌성 운동실조증 타입 6), SCA7 (척수소뇌성 운동실조증 타입 7), 및 SCA17 (척수소뇌성 운동실조증 타입 17).

[0302] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장은 FMR1으로부터 선택되는 유전자에서 CGG 반복이다.

[0303] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장은 AFF2로부터 선택되는 유전자에서 CCG 반복이다.

[0304] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장은 FXN으로부터 선택되는 유전자에서 GAA 반복이다.

[0305] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장은 DMPK 및 ATXN8로부터 선택되는 유전자에서 CTG 반복이다.

[0306] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장은 JPH3으로부터 선택되는 유전자에서 GTC 반복이다.

[0307] 적합하게는, CAG 반복 이외의 트리뉴클레오티드 반복으로 인한 트리뉴클레오티드 반복 장애는 '비-폴리글루타민 질환 (non-polyglutamine diseases)'으로 지칭된다. 그러므로 적합하게는, 상기 트리뉴클레오티드 반복 장애는 비-폴리글루타민 장애일 수 있다. 적합하게는, 상기 비-폴리글루타민 장애는 하기로부터 선택될 수 있다: HDL2 (헌팅딘병 유사 증후군 2), FRAXA (취약 X 증후군 (Fragile X syndrome)), FXTAS (취약 X 전전/운동실조 증후군 (Fragile X tremor/ataxia syndrome)), FRAXE (취약 XE 정신 지체 (Fragile XE mental retardation)), FRDA (프리드리히 운동실조증 (Friedrich's ataxia)), DM1 (근긴장성 이영양증 타입 1), SCA8 (척수소뇌성 운동실조증 타입 8) 및 SCA12 (척수소뇌성 운동실조증 타입 12).

[0308] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 건강한 대상체와 비교하여 트리뉴클레오타이드 반복 횟수의 증가로 인해 발생한다. 적합하게는, 건강한 대상체의 동일 유전자와 비교하여 해당 유전자에서 트리뉴클레오타이드 반복 횟수의 증가로 인해 발생한다. 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장에서 트리뉴클레오타이드 반복 횟수는 정상인 건강한 대상체에서 트리뉴클레오타이드 반복 횟수와 비교하여 증가된다.

[0309] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장에서의 반복 횟수는 정상의 건강한 대상체에서의 반복 횟수의 적어도 1.5배이다. 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장에서의 반복 횟수는 정상의 건강한 대상체에서의 반복 횟수의 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 또는 50배이다.

[0310] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 트리뉴클레오타이드 반복 확장에서의 반복 횟수가 정상의 건강한 대상체에서의 반복 횟수의 적어도 1.5배 증가함으로 인해 발생한다.

[0311] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오티드 반복 장애는 트리뉴클레오티드 반복 확장에서의 반복 횟수가 정상의 건강한 대상체에서의 반복 횟수의 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 또는 50배 증가로 인해 발생한다.

[0312] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 확장에서의 반복 횟수는 정상의 건강한 대상체에서의 반복 횟수의 1.5배 내지 15배이다.

[0313] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 정상의 건강한 대상체에 존재하는 반복 횟수의 1.5배 내지 15배를 포함하는 트리뉴클레오타이드 반복 확장으로 인해 발생한다.

[0314] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 확장에서의 반복 횟수는 50회 초과, 75회 초과, 100회 초과, 125회 초과, 150회 초과, 175회 초과, 200회 초과, 225회 초과, 250회 초과이다.

[0315] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 50회 초과, 75회 초과, 100회 초과, 125회 초과, 150회 초과, 175회 초과, 200회 초과, 225회 초과, 250회 초과의 반복을 포함하는 트리뉴클레오타이드 반복 확장으로 인해 발

생한다.

- [0316] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 확장에서의 반복 횟수는 50회 초과이다.
- [0317] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 50회 초과를 포함하는 트리뉴클레오타이드 반복 확장으로 인해 발생한다.
- [0318] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 확장에서의 반복 횟수는 50 내지 250회이다.
- [0319] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 50 내지 250회의 반복을 포함하는 트리뉴클레오타이드 반복 확장으로 인해 발생한다.
- [0320] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 비-폴리글루타민 장애이다.
- [0321] 적합하게는, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 DM1 또는 SCA8이다.
- [0322] 일 구체예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애는 DM1이다.
- [0323] 일 구체예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애가 DM1인 경우, 상기 트리뉴클레오타이드 확장에서 반복 횟수는 50회 초과이다. 일 구체예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애가 DM1인 경우, 상기 트리뉴클레오타이드 확장에서 CTG 반복 횟수는 50회 초과이다. 일 구체예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애가 DM1인 경우, DMPK 유전자의 트리뉴클레오타이드 확장에서 CTG 반복 횟수는 50회 초과이다.
- [0324] 일 구체예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애가 SCA8인 경우, 상기 트리뉴클레오타이드 확장에서 반복 횟수는 110 내지 250회이다. 일 구체예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애가 SCA8인 경우, 상기 트리뉴클레오타이드 확장에서 CTG 반복 횟수는 110 내지 250회이다. 일 구체예에서, 상기 트리뉴클레오타이드 반복 장애가 SCA8인 경우, ATXN8의 트리뉴클레오타이드 확장에서 CTG 반복 횟수는 110 내지 250회이다.
- [0325] 일부 구체예에서, 본 발명의 접합체는 의약으로서, 바람직하게는 뉴클레오타이드 반복 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0326] 적합하게는, 뉴클레오타이드 반복 장애는 반복 확장 또는 미소부수체 반복 확장으로 알려져 있는, 뉴클레오타이드 반복 확장에 의해 야기되는 유전 장애이다.
- [0327] 적합하게는, 상기 뉴클레오타이드 반복 장애는 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 뉴클레오타이드의 반복 확장에 의해 야기될 수 있다.
- [0328] 적합하게는, 상기 뉴클레오타이드 반복 확장은 테트라, 펜타, 헥사, 헵타, 옥타, 노나 또는 데카 뉴클레오타이드 반복 확장과 같은, 상기 논의된 바와 같은 고차의 반복 확장일 수 있다.
- [0329] 그러므로 적합하게는, 본 발명의 접합체는 의약으로서, 바람직하게는 테트라, 펜타, 헥사, 헵타, 옥타, 노나 또는 데카 뉴클레오타이드 반복 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0330] 적합하게는, 상기 뉴클레오타이드 반복 확장은 테트라뉴클레오타이드 반복이고, 적합하게는 상기 테트라뉴클레오타이드 반복은 CCTG 반복이다.
- [0331] 그러므로 적합하게는, 본 발명의 접합체는 의약으로서, 바람직하게는 DM2 (근긴장성 이영양증 타입 2)의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0332] 적합하게는, 상기 뉴클레오타이드 반복 확장은 펜타뉴클레오타이드 반복이고, 적합하게는 상기 펜타뉴클레오타이드 반복은 ATTCT 반복이다.
- [0333] 그러므로 적합하게는, 본 발명의 접합체는 의약, 바람직하게는 SCA10 (척수소뇌성 운동실조증 타입 10)의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0334] 그러므로 적합하게는, 본 발명의 접합체는 의약으로서, 바람직하게는 SCA31 (척수소뇌성 운동실조증 타입 31)의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0335] 적합하게는, 상기 뉴클레오타이드 반복 확장은 헥사뉴클레오타이드 반복이고, 적합하게는 상기 헥사뉴클레오타이드 반복은 GGCCTG 반복 또는 GGGCC 반복이다.
- [0336] 그러므로 적합하게는, 본 발명의 접합체는 의약으로서, 바람직하게는 SCA36 (척수소뇌성 운동실조증 타입 36)의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.

- [0337] 그러므로 적합하게는, 본 발명의 접합체는 의약으로서, 바람직하게는 C9ORF72-ALS (근위축성 측삭 경화증)의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0338] 트리뉴클레오타이드 반복 장애의 치료에 관한 본원의 모든 진술은 테트라, 펜타, 헥사, 헵타, 옥타, 노나 또는 데카 뉴클레오타이드 반복 장애와 같은 고차의 뉴클레오타이드 반복 장애의 치료에 동일하게 적용된다.
- [0339] **공유 결합 연결**
- [0340] 본 발명의 접합체에 존재하는 펩티드 운반체는 치료용 분자에 공유 결합으로 연결된다.
- [0341] 적합하게는, 상기 펩티드 운반체는 C-말단 또는 N-말단에서 치료용 분자에 공유 결합으로 연결된다. 적합하게는, 상기 펩티드 운반체는 C-말단에서 치료용 분자에 공유 결합으로 연결된다.
- [0342] 적합하게는, 상기 펩티드 운반체는 필요한 경우 링커를 통해 치료용 분자에 공유 결합으로 연결된다. 상기 링커는 펩티드 서열을 치료용 분자로부터 분리하기 위한 스페이서 (spacer)로 작용할 수 있다.
- [0343] 상기 링커는 임의의 적절한 서열로부터 선택될 수 있다.
- [0344] 적합하게는, 상기 링커는 펩티드와 치료용 분자 사이에 존재한다. 적합하게는, 상기 링커는 펩티드 및 치료용 분자에 대해 별개의 기이다. 따라서, 상기 링커는 인공 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0345] 일 구체예에서, 상기 접합체는 링커를 통해 치료용 분자에 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체를 포함한다.
- [0346] 일 구체예에서, 상기 접합체는 하기 구조를 포함한다:
- [0347] [펩티드] - [링커]-[치료용 분자]
- [0348] 일 구체예에서, 상기 접합체는 하기 구조로 구성된다:
- [0349] [펩티드] - [링커]-[치료용 분자]
- [0350] 적합하게는, 본원에 열거된 임의의 펩티드가 본 발명에 따른 접합체에 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 접합체는 하기 서열들 중 하나로부터 선택되는 펩티드 운반체를 포함한다: RBRBRBFQILYBRBR (서열번호: 35), RBRBRBFQILYRBHBH (서열번호: 37) 및 RBRBRBFQILYRBHBH (서열번호: 44).
- [0351] 적합하게는, 임의의 경우에, 상기 펩티드 운반체는 상기 기재된 바와 같은 N-말단 변형을 추가로 포함할 수 있다.
- [0352] 적합한 링커로는 예를 들어 디설파이드, 티오에테르 또는 티올-말레이미드 연결의 형성을 허용하는 C-말단 시스템인 잔기, 펩티드 상의 염기성 아미노산과의 모르폴리노 연결의 형성 또는 클릭 반응, 옥심을 형성하는 C-말단 알데하이드, 또는 카르복사미드 연결을 형성하기 위해 아미노기에 공유 결합으로 접합되는 펩티드 상의 카르복실산 모이어티를 포함한다.
- [0353] 적합하게는, 상기 링커는 1-5개의 아미노산 길이이다. 적합하게는, 상기 링커는 당해 분야에 알려진 임의의 링커를 포함할 수 있다.
- [0354] 적합하게는, 상기 링커는 하기 서열들 중 임의의 것으로부터 선택된다: G, BC, XC, C, GGC, BBC, BXC, XBC, X, XX, B, BB, BX, XB, 숙신산, GABA 및 E. 적합하게는, 상기 X는 6-아미노헥사노산이다.
- [0355] 적합하게는, 상기 링커는 폴리머, 가령 예를 들어 PEG일 수 있다.
- [0356] 적합하게는, 상기 링커는 하기로부터 선택된다: 베타-알라닌 (B), 숙신산 (Succ), GABA (Ab), 및 글루탐산 (E).
- [0357] 일 구체예에서, 상기 링커는 베타-알라닌 (B)이다.
- [0358] 일 구체예에서, 상기 펩티드 운반체는 카르복사미드 연결을 통해 치료용 분자에 접합된다.
- [0359] 상기 접합체의 링커는 펩티드가 부착되는 치료용 분자의 일부를 형성할 수 있다. 대안으로서, 상기 치료용 분자의 부착은 펩티드 운반체의 C-말단 또는 N-말단에 직접 연결될 수 있다. 적합하게는, 이러한 구체예에서는 링커를 필요로 하지 않는다.
- [0360] 대안으로서, 상기 펩티드 운반체는 치료용 분자에 화학적으로 접합될 수 있다. 화학적 연결 (chemical linkage)은 예를 들어, 디설파이드, 알케닐, 알킬닐, 아릴, 에테르, 티오에테르, 트리아졸, 아미드, 카르복사미드, 우레아, 티오우레아, 세미카바지드, 카바지드, 하이드라진, 옥심, 포스페이트, 포스포르아미테이트, 티오폴

스페이트, 보라노포스페이트, 이미노포스페이트, 또는 티올-말레이미드 연결을 경유할 수 있다.

- [0361] 선택적으로, 시스테인이 치료용 분자의 N-말단에 부가되어 상기 펩티드 운반체에 디설파이드 결합 형성을 허용할 수 있거나, 또는 상기 N-말단은 펩티드 운반체와의 티오에테르 접합을 위해 브로모아세틸화가 수행될 수 있다.
- [0362] 일 구체예에서, 상기 접합체는 하기 서열들 중 하나로부터 선택되는 펩티드 운반체를 포함하고: RRRRBRFQILYBRBR (서열번호: 35), RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 37) 및 RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 44), 이는 링커에 의해 CAG 반복을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 공유 결합으로 연결되며, 상기 링커는 베타-알라닌 (B), GABA (Ab) 및 글루탐산 (E)으로부터 선택된다.
- [0363] 일 구체예에서, 상기 접합체는 하기 서열들 중 하나로부터 선택되는 펩티드 운반체를 포함하고: RRRRBRFQILYBRBR (서열번호: 35), RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 37) 및 RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 44), 이는 링커에 의해 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 공유 결합으로 연결되며, 상기 링커는 베타-알라닌 (B), GABA (Ab) 및 글루탐산 (E)으로부터 선택된다.
- [0364] 일 구체예에서, 상기 접합체는 하기 서열들 중 하나로부터 선택되는 펩티드 운반체를 포함하고: RRRRBRFQILYBRBR (서열번호: 35), RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 37) 및 RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 44), 이는 링커에 의해 7회의 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 공유 결합으로 연결되며, 상기 링커는 베타-알라닌 (B), GABA (Ab) 및 글루탐산 (E)으로부터 선택된다.
- [0365] 일 구체예에서, 상기 접합체는 7회의 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 베타-알라닌 (B)에 의해 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체 RRRRBRFQILYBRBR (서열번호: 35)을 포함한다. (DPEP1.9)
- [0366] 일 구체예에서, 상기 접합체는 7회의 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 글루탐산 (E)에 의해 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체 RRRRBRFQILYBRBR (서열번호: 35)를 포함한다. (DPEP1.9b) 일 구체예에서, 이러한 접합체는 횡격막 조직으로의 투과를 증가시켰다. 적합하게는 횡격막으로의 투과 증가는 근긴장성 이영양증과 같은 호흡기계에 영향을 미치는 근육 장애를 치료하는데 유용하다.
- [0367] 일 구체예에서, 상기 접합체는 7회의 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 베타-알라닌 (B)에 의해 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체 RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 37)를 포함한다. (DPEP3.1) 일 구체예에서, 이러한 접합체는 근육 조직으로의 투과를 증가시켰다. 적합하게는, 근육으로의 투과 증가는 근육 장애를 치료하는데 유용하다.
- [0368] 일 구체예에서, 상기 접합체는 7회의 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 글루탐산 (E)에 의해 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체 RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 37)를 포함한다. (DPEP3.1b) 일 구체예에서, 이러한 접합체는 근육 조직으로의 투과를 증가시켰다. 적합하게는, 근육으로의 투과 증가는 근육 장애를 치료하는데 유용하다.
- [0369] 일 구체예에서, 상기 접합체는 7회의 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 GABA (Ab)에 의해 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체 RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 37)를 포함한다. (DPEP3.1a)
- [0370] 일 구체예에서, 상기 접합체는 7회의 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 베타-알라닌 (B)에 의해 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체 RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 44)를 포함한다. (DPEP3.8) 일 구체예에서, 이러한 접합체는 근육 조직으로의 투과를 증가시켰다. 적합하게는, 근육으로의 투과 증가는 근육 장애를 치료하는데 유용하다.
- [0371] 일 구체예에서, 상기 접합체는 7회의 CAG 반복으로 구성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 글루탐산 (E)에 의해 공유 결합으로 연결된 펩티드 운반체 RRRRBRFQILYRBHBH (서열번호: 44)를 포함한다. (DPEP.3.8b) 일 구체예에서, 이러한 접합체는 횡격막 조직으로의 투과를 증가시켰다. 적합하게는, 횡격막으로의 투과 증가는 근긴장성 이영양증과 같은 호흡기계에 영향을 미치는 근육 장애를 치료하는데 유용하다.
- [0372] 상기 접합체들 중 임의의 접합체는 N-말단에서 아세틸화될 수 있다.
- [0373] **약학적 조성물 및 투여**
- [0374] 본 발명의 접합체는 상기 언급된 바와 같이 약학적 조성물로 제제화될 수 있다.
- [0375] 본 발명의 제6 양상에 따르면, 상기 약학적 조성물은 본 발명의 접합체를 포함한다.

- [0376] 적합하게는, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 성분들 예컨대 하나 이상의 희석제, 아췌반트 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0377] 적합한 약학적으로 허용 가능한 희석제, 아췌반트 및 담체는 당해 분야에 잘 알려져 있다.
- [0378] 본원에서 사용된, 문구 "약학적으로 허용 가능한"은 유효한 의학적 판단 범위 내에서, 합리적인 유익/위험 비율에 따라, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이, 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 이러한 리간드, 물질, 제제 및/또는 투여 형태를 지칭한다.
- [0379] 본원에서 사용된, 문구 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 상기 접합체를 하나의 장기 또는 신체의 일부로부터 다른 장기 또는 신체의 다른 부분으로 운반 또는 수송하는데 관여하는, 약학적으로 허용 가능한 물질, 제제 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질을 지칭한다. 각 펩티드는 조성물의 다른 성분, 예컨대 펩티드 및 치료용 분자와 적합할 수 있고, 개체에게 유해하지 않다는 의미에서 "허용 가능"해야 한다.
- [0380] 재구성하여 투여될 수 있는 동결건조된 조성물이 또한 본 조성물의 범위 내에 있다.
- [0381] 약학적으로 허용 가능한 담체는 예를 들어 부형제, 비히클, 희석제 및 이들의 조합일 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물이 경구로 투여되는 경우, 이들은 정제, 캡슐, 과립, 분말 또는 시럽으로 제제화될 수 있고; 또는 비경구로 투여되는 경우, 이들은 주사제, 점적 주입 제제 또는 좌제로 제제화될 수 있다. 이들 조성물은 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있고, 원하는 경우 활성 화합물 (즉, 접합체)은 임의의 통상적인 첨가제, 예컨대 부형제, 결합제, 붕해제, 윤활제, 교정제 (corrigent), 가용화제, 현탁 조제, 유화제, 코팅제 또는 이들의 조합과 혼합될 수 있다.
- [0382] 본 개시내용의 약학적 조성물은 의학적 용도에서 본원에 기재된 질병, 장애 및 병태를 경감, 중재, 예방 및 치료하기 위한 추가로 알려진 치료제, 약물, 화합물의 프로드러그로의 변형 등을 추가로 포함할 수 있다는 것을 이해해야 한다.
- [0383] 적합하게는, 상기 약학적 조성물은 의약으로서 사용하기 위한, 적합하게는 상기 접합체에 대해 본원에 기재된 것과 동일한 방식으로 의약으로서 사용하기 위한 것이다. 상기 접합체를 사용한 의학적 치료와 관련하여 본원에 기재된 모든 특징은 본 약학적 조성물에 적용된다.
- [0384] 따라서, 본 발명의 추가 양상에서 의약으로서 사용하기 위한 제6 양상에 따른 약학적 조성물이 제공된다. 추가적 양상에서, 제6 양상에 따른 약학적 조성물의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질병 병태에 대해 대상체를 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다.
- [0385] 적합하게는, 상기 약학적 조성물은 트리뉴클레오티드 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이고, 적합하게는 예방 또는 치료 방법은 대상체의 트리뉴클레오티드 장애에 대한 것이다.
- [0386] **예방 또는 치료**
- [0387] 본 발명의 접합체는 질병, 바람직하게는 트리뉴클레오티드 반복 장애의 예방 또는 치료를 위한 의약으로서 사용될 수 있다.
- [0388] 상기 의약은 상기 정의된 바와 같은 약학적 조성물의 형태일 수 있다.
- [0389] 질병 병태에 대해 치료가 필요한 대상체의 예방 또는 치료 방법이 또한 제공되며, 상기 방법은 상기 접합체의 치료적으로 유효한 양을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0390] 적합하게는, 상기 접합체는 트리뉴클레오티드 반복 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0391] 트리뉴클레오티드 반복 확장을 포함하는 적합한 유전자 및 이로부터 발생하는 트리뉴클레오티드 반복 장애의 세부사항은 본원에 상세히 기재되어 있다.
- [0392] 대안으로서, 상기 접합체는 다른 뉴클레오티드 반복 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다. 이러한 고차의 반복 확장 및 이에 기인한 뉴클레오티드 반복 장애의 적절한 세부사항은 상기에 상세하게 기재되어 있다.
- [0393] 트리뉴클레오티드 반복으로 형성된 핵산이 트리뉴클레오티드 반복 장애를 치료하기 위해 작용할 수 있는 방식에 대한 특정 기전 (mechanism)은 해당 트리뉴클레오티드 반복 장애에 따라 상이할 것이다. 적합하게는, 상기 핵

산은 유전자 또는 전사체에서 트리뉴클레오티드 반복 확장에 결합한다. 적합하게는, 상기 핵산은 트리뉴클레오티드 반복 확장을 포함하는 전사체의 수준을 감소시킨다. 적합하게는, 상기 핵산은 트리뉴클레오티드 반복 확장의 병리학적 효과, 그러므로 트리뉴클레오티드 반복 장애를 예방한다. 이는 다른 뉴클레오티드 반복 장애에도 동일하게 적용된다.

[0394] 그러므로 적합하게는, 상기 접합체는 대상체의 생리학적 상태를 개선한다.

[0395] 예를 들어, 상기 접합체 중 치료용 핵산은 트리뉴클레오티드 반복 장애로 인한 스플라이싱 결함을 교정하도록 작동가능(operable)하다. 적합하게는, 상기 접합체 중 치료용 핵산은 트리뉴클레오티드 반복 장애를 가진 대상체에서 스플라이싱을 정상화하도록 작동가능하다.

[0396] 적합하게는, 상기 접합체 중 치료용 핵산은 DMPK 유전자의 전사체에 결합하도록 작동가능하다. 적합하게는, 상기 접합체 중 치료용 핵산은 DMPK 유전자의 전사체에 존재하는 반복 확장에 결합하도록 작동가능하다. 적합하게는, 상기 접합체 중 치료용 핵산은 DMPK 유전자의 전사체에 존재하는 CUG 반복 확장에 결합하도록 작동가능하다.

[0397] 그러므로 적합하게는, 상기 접합체는 DMPK 전사체의 수준을 감소시킨다. 그러므로 적합하게는, 상기 접합체는 반복 확장을 갖는 DMPK 전사체의 수준을 감소시킨다. 그러므로 적합하게는, 상기 접합체는 CUG 반복 확장을 갖는 DMPK 전사체의 수준을 감소시킨다.

[0398] 그러므로 적합하게는, 상기 접합체는 핵 병소의 수를 감소시킨다. 적합하게는, 상기 접합체는 핵 병소가 세포의 스플라이싱 기구와 상호작용하는 것을 방지한다. 적합하게는, 상기 접합체는 핵 병소가 MBNL1과 상호작용하는 것을 방지한다. 적합하게는, 상기 접합체는 핵 병소가 MBNL1을 격리하는 것을 방지한다.

[0399] 적합하게는, 이러한 효과는 DM1의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0400] 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 근긴장증(myotonia)을 건강한 대상체와 비교하여 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 100% 감소시킨다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 근긴장증을 적어도 50% 감소시킨다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 근긴장증을 50-100% 감소시킨다.

[0401] 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체의 근모세포(myoblasts)에서 핵 병소를 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90% 감소시킨다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체의 근모세포에서 핵 병소를 적어도 50% 감소시킨다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체의 근모세포에서 핵 병소를 50-90% 감소시킨다.

[0402] 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체의 심장 전도(cardiac conduction)를 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 교정한다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 심장 전도를 적어도 10% 개선한다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 심장 전도를 10-50% 개선한다.

[0403] 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 운동 기능(motor function)을 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 개선한다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 운동 기능을 적어도 10% 개선한다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 운동 기능을 10-50% 개선한다.

[0404] 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 체중 대비 근력(muscle force relative to weight)을 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 만큼 개선하였다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 체중 대비 근력을 적어도 10% 만큼 개선하였다. 적합하게는, 상기 접합체는 DM1을 가진 대상체에서 체중 대비 근력을 10-50% 만큼 개선하였다.

[0405] 적합하게는, 치료할 대상체는 임의의 동물 또는 인간일 수 있다. 적합하게는, 상기 대상체는 비-인간 포유동물(non-human mammal)일 수 있다. 적합하게는, 상기 대상체는 남성 또는 여성일 수 있다.

[0406] 적합하게는, 치료할 대상체는 임의의 연령일 수 있다. 적합하게는, 치료할 대상체의 연령은 0-40세, 적합하게는 0-30세, 적합하게는 0-25세, 적합하게는 0-20세이다.

[0407] 적합하게는, 상기 접합체는 대상체에게 전신으로 예를 들어 골수내, 척수강내, 심실내, 유리체내, 장내, 비경구, 정맥내, 동맥내, 근육내, 종양내, 피하, 경구 또는 비강 경로로 투여하기 위한 것이다.

[0408] 일 구체예에서, 상기 접합체는 대상체에게 정맥내 투여하기 위한 것이다.

- [0409] 일 구체예에서, 상기 접합체는 대상체에게 주사로 정맥내 투여하기 위한 것이다.
- [0410] 적합하게는, 상기 접합체는 "치료적으로 유효한 양"으로 대상체에게 투여하기 위한 것이며, 이는 그 양이 개체에게 유익을 나타내기에 충분한 양임을 의미한다. 투여되는 실제 양, 투여 속도 및 시간 과정은 치료할 질병의 특성 및 중증도에 따라 좌우될 것이다. 투여량에 대한 결정은 일반 전문의 및 다른 의사의 책임내에 있다. 상기 기법 및 프로토콜의 예는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins에서 찾을 수 있다.
- [0411] 예시되는 용량은 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg, 0.05 mg/kg 내지 40 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 30 mg/kg, 0.5 mg/kg 내지 18 mg/kg, 1 mg/kg 내지 16 mg/kg, 2 mg/kg 내지 15 mg/kg, 5 mg/kg 내지 10 mg/kg, 10 mg/kg 내지 20 mg/kg, 12 mg/kg 내지 18 mg/kg, 13 mg/kg 내지 17 mg/kg일 수 있다.
- [0412] 유리하게는, 본 발명의 접합체의 투여량은 치료용 핵산 단독으로부터의 임의의 효과를 확인하는데 필요한 투여량보다 더 낮은 차수 또는 규모이다.
- [0413] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 하나 이상의 독성 마커가 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 유의미하게 감소된다.
- [0414] 적합한 독성 마커는 신독성 (nephrotoxicity) 마커일 수 있다.
- [0415] 적합한 독성 마커에는 혈청 KIM-1, NGAL, BUN, 크레아티닌, 알칼리성 포스파타제, 알라닌 트랜스퍼라제 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 수준을 포함한다.
- [0416] 적합한 추가의 독성 마커에는 요중 (urine) 나트륨, 칼륨, 염화물, 우레아, 크레아티닌, 칼슘, 인, 글루코스, 요산, 마그네슘 및 단백질 수준을 포함한다.
- [0417] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, KIM-1, NGAL 및 BUN 중 적어도 하나의 수준이 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 감소된다.
- [0418] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 각 KIM-1, NGAL 및 BUN의 수준이 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 감소된다.
- [0419] 적합하게는, 상기 또는 각 마커/마커들의 수준이 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 유의미하게 감소된다.
- [0420] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 상기 또는 각 마커/마커들의 수준이 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 감소된다.
- [0421] 유리하게는, 상기 접합체의 독성이 이전의 펩티드 및 접합체와 비교하여 유의미하게 감소된다. 구체적으로, KIM-1 및 NGAL-1은 독성 마커이고, 이들은 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 최대 120배 유의미하게 감소된다.
- [0422] 적합하게는, 상기 접합체의 장기간 독성 (long term toxicity)은 무시할 수 있는 정도이다. 적합하게는, 상기 접합체의 장기간 독성 효과는 없다.
- [0423] 적합하게는, 상기 접합체는 표적 트리뉴클레오타이드 반복 확장에 대한 의도된 효과를 넘어서서, 대상체의 유전자 발현에 유의미한 영향을 미치지 않는다. 적합하게는, 상기 접합체는 대상체의 유전자 발현에 부정적인 영향을 미치지 않는다.
- [0424] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 세포 생존율 (cell viability)이 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 유의미하게 개선된다.
- [0425] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 근모세포 및 간세포(hepatocyte) 생존율이 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 유의미하게 개선된다. 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 근모세포 및 간세포 생존율이 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 증가한다.
- [0426] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 세포 생존율이 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체와 비교하여 유의미하게 개선된다.
- [0427] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 회복 시간이 현재 이용 가능한 펩티드 운반체를 사용하는 접합체

와 비교하여 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 감소된다.

[0428] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 회복 시간은 60분 미만, 50분 미만, 40분 미만, 30분 미만, 20분 미만, 10분 미만 또는 5분 미만이다. 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 회복 시간이 없다.

[0429] **핵산 및 숙주**

[0430] 본 발명의 펩티드 운반체는 임의의 표준 단백질 합성 방법, 예를 들어 화학적 합성, 반-화학적 합성에 의해, 또는 발현 시스템의 사용을 통해 생성될 수 있다.

[0431] 따라서, 본 발명은 또한 접합체를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이로 구성된 뉴클레오타이드 서열, 발현 시스템, 예를 들어 발현 및 발현 제어에 필요한 서열이 수반된 상기 서열을 포함하는 벡터, 및 상기 발현 시스템이 형질전환된 숙주 세포 및 숙주 유기체에 관한 것이다.

[0432] 따라서, 본 발명에 따른 접합체를 코딩하는 핵산이 또한 제공된다.

[0433] 적합하게는, 상기 핵산은 단리된 형태 또는 정제된 형태로 제공될 수 있다.

[0434] 본 발명에 따른 접합체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터가 또한 제공된다.

[0435] 적합하게는, 상기 벡터는 플라스미드이다.

[0436] 적합하게는, 상기 벡터는 본 발명에 따른 접합체를 코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 조절 서열, 예를 들어 프로모터를 포함한다. 적합하게는, 상기 발현 벡터는 적합한 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아 또는 진균 세포로 형질감염되는 경우 상기 접합체를 발현할 수 있다.

[0437] 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다.

[0438] 발현 벡터는 본 발명의 핵산이 삽입될 수 있는 숙주 세포에 따라 선택될 수 있다. 상기 숙주 세포의 이러한 형질전환은 Sambrook et al [Sambrook, J., Russell, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA]에 교시된 바와 같은 통상의 기술을 포함한다. 적합한 벡터의 선택은 해당 분야의 지식을 가진 자의 기술 범위 내에 있다. 적합한 벡터에는 플라스미드, 박테리오파지, 코스미드 및 바이러스를 포함한다.

[0439] 생성된 접합체는 임의의 적절한 방법, 예를 들어 침전 또는 크로마토그래피 분리, 예컨대 친화도 크로마토그래피에 의해 숙주 세포로부터 단리 및 정제될 수 있다.

[0440] 적합한 벡터, 숙주 및 재조합 기술이 당해 분야에 잘 알려져 있다.

[0441] 본 명세서에서, 용어 "작동 가능하게 연결된 (operably linked)"은 선택된 뉴클레오타이드 서열 및 조절 뉴클레오타이드 서열이 조절 서열의 제어 하에 뉴클레오타이드 코딩 서열의 발현을 배치하는 방식으로 공유 결합으로 연결된 상황을 포함할 수 있고, 상기 조절 서열은 선택된 뉴클레오타이드 서열의 일부 또는 전부를 형성하는 뉴클레오타이드 코딩 서열의 전사에 영향을 줄 수 있다. 적합한 경우, 수득된 전사체는 그 다음에 원하는 접합체로 번역될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0442] 본 발명은 본원에 첨부된 도면 및 실시예를 참조하여 설명될 것이며, 여기에서:

도 1은 2600회의 CTG 반복을 가진 DM1 환자 근모세포에서 병원성 핵 병소의 수의 감소, 및 MBNL 재분포를 나타낸다. 결과는 근모세포 또는 간세포의 세포 생존율을 감소시키지 않는, 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체의 용량들로 형질감염된 48시간 후를 나타낸다 (10 μ M에서 나타냄).

도 2의 A, B, C, D 및 E, 및 도 3의 A, B, C 및 D는 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체가 이전의 펩티드 운반체인 Pip6a 및 Pip9b2로 형성된 접합체와 비교하여, 다양한 농도에서 DMPK 유전자에서 2600회의 반복을 가진 DM1 환자 유래의 DM1 환자 근모세포에서 Mbn1-의존성 전사체의 스플라이싱 결함을 교정함을 나타낸다.

도 4는 30 mg/kg (IV, 꼬리 정맥)으로 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체의 전신 전달이 HSA-LR 마우스의 비복근 (gast.) 및 사두근 (quad.)에서 Mbn1-의존성 전사체의 스플라이싱 결함을 교정함을 나타낸다. clcn1 엑손 7a, serca 엑손22, 및 mbn11 엑손 5 (가장 널리 사용되는 DM1 바이오마커)의 스플라이싱에 대한 RT-PCR 분석은 DPEP1 및 3 기반 접합체의 경우 야생형 수준으로 스플라이싱이 정상화됨을 나타낸다. 펩티드-PMO당 6마리의

HSA-LR 마우스의 데이터를 미처리 HSA-LR 마우스와 비교하여 ANOVA 및 Tukey's post-test에 의해 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM이다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. 유의미하지 않음).

도 5는 2600회의 CTG 반복을 가진 DM1 환자 근모세포를 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체의 다양한 용량으로 형질감염시키고 48시간 후에, 근모세포 세포 생존율 퍼센트를 나타낸다. DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체 농도는 이전의 펩티드 운반체인 Pip6a 및 Pip9b2로 형성된 접합체와 대조적으로, 근모세포에서 세포 사멸을 유발하지 않고 치료 수준으로부터 수 배 증가될 수 있다.

도 6은 2600회의 CTG 반복을 가진 DM1 환자 근모세포를 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ 접합체 및 비교 접합체로 형질감염시키고 48시간 후에, 간세포 세포 생존율 퍼센트를 나타낸다. DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체 농도는 이전의 펩티드 운반체인 Pip6a 및 Pip9b2로 형성된 접합체와 대조적으로, 간세포에서 세포 사멸을 유발하지 않고 치료 수준으로부터 수 배 증가될 수 있다.

도 7 및 9는 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체를 단회 투여 (30 mg/kg, n=6, IV, 꼬리 정맥)하고 2주 후에, HSA-LR 마우스의 비복근에서의 근전도 근긴장도 (electromyographic myotonia) 측정값을 나타낸다. 상기 데이터는 미처리 HAS-LR 마우스 및 DPEP5.7과의 비교 접합체와 비교하여, ANOVA 및 Tukey's post-test에 의해 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM이다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. 유의미하지 않음). 도 10은 시험한 개체별 세부적 데이터를 보여준다.

도 8은 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체를 단회 투여 (30 mg/kg, n=6, IV, 꼬리 정맥)하고 2주 후에, HSA-LR 마우스에서 도 8 및 10의 데이터에 대한 상응하는 근긴장도 등급 측정값을 나타낸다. 상기 데이터는 미처리 HAS-LR 마우스 및 DPEP5.7과의 비교 접합체와 비교하여, unpaired Student's t test에 의해 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM이다.

도 10의 A, B 및 C는 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체의 볼루스 IV (꼬리 정맥) 주사를 투여한 C57BL6 암컷 마우스 (8-10주령, 그룹당 n=5)에서 주사 7일 후에 혈청을 수집하여 식염수와 비교하여 평가한 혈청 중 ALP, ALT 및 AST 수준을 나타낸다. ALP, ALT 및 AST 수준은 이전의 펩티드 운반체 Pip 시리즈에 의해 유도된 배수 증가와 비교하여 식염수 대조군 주사와 유사하였다.

도 11A는 표준 곡선내에 맞게 희석된 샘플을 사용하여 ELISA (R&D cat# MKM100)에 의해 측정된, 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체를 C57BL6 암컷 마우스에게 주사한 2일 및 7일 후에 혈청 및 소변 중에서 평가된 KIM-1 수준을 나타낸다. 요중 단백질 농도를 설명하도록 값을 요중 크레아티닌 수준 (Harwell)으로 정규화하였다. KIM-1 수준은 이전의 펩티드 운반체 Pip 시리즈에 의해 유도된 배수 증가와 비교하여 식염수 대조군 주사와 유사하였다.

도 11의 B 및 C는 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체를 C57BL6 암컷 마우스 (Harwell)에게 주사한 7일 후에 혈청 중에서 평가된 BUN 및 크레아티닌 수준을 식염수와 비교하여 나타낸다. BUN 및 크레아티닌 수준은 이전의 펩티드 운반체 Pip 시리즈에 의해 유도된 배수 증가와 비교하여 식염수 대조군 주사와 유사하였다.

도 12 및 13은 30 mg/kg 또는 5 mg/kg의 6회 투여로, DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체를 C57BL6 암컷 마우스에게 주사로 투여한 2일, 7일 및 14일 후에 소변 중에서 평가된 KIM-1/크레아티닌의 비율을 식염수와 비교하여 나타낸다. 크레아티닌 및 KIM-1 수준은 이전의 펩티드 운반체 Pip 시리즈에 의해 유도된 배수 증가와 비교하여 식염수 대조군 주사와 유사하였다.

도 14의 A, B, C 및 D는 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체를 5, 7.5 및 30 mg/kg으로 C57BL6 암컷 마우스 (8-12주령, 그룹당 n=5)에 주사로 투여한 후에 요중 나트륨, 칼륨, 염화물, 우레아, 크레아티닌, 칼슘, 인, 글루코스, 요산, 마그네슘 및 요중 단백질 수준을 식염수와 비교하여 나타낸다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 15는 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체 처리 후에 HSA-LR 마우스 체중을 나타낸다. 30 mg/kg의 단회 투여로 주사한 5마리의 HSA-LR 마우스의 장기간 체중은 식염수를 주사한 5마리의 HSA-LR 마우스와 비교하여 어떠한 유의미한 감소를 보이지 않았다.

도 16은 HSA-LR 마우스에서 30 mg/kg의 접합체 또는 3x200 mg/kg의 네이키드 (naked) PMO를 투여(IV)한 2주 후에 ELISA에 의해 측정된, 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체의 생체분포 전달 분석 (biodistribution delivery

analysis)을 나타낸다. DPEP1.9 및 DPEP3.8 접합체 생체분포의 평가는 DM1에서 심각하게 이환된 조직으로의 최적의 전달을 보여주었다. PMO들은 디곡시게닌 (digoxigenin) 및 바이오틴 (biotin)으로 표지된 프로브를 사용한 맞춤형 ELISA 분석에 의해 검출되었다. 처리 2주 후에, 근육 조직에서 PMO의 농도는 여전히 >1nM임에 비해 9, (네이키드 PMO 대 DPEP-PMO 접합체 처리의 몰 농도 차이가 >20배임에도 불구하고) 네이키드 PMO 주사 후에는 낮은 pM으로 검출되었다 (n=4). 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계: Tukey post-test로 One-way ANOVA.

도 17은 5 mg/kg의 단회 투여 후에 혈청에서 측정된 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체의 약동학적 특성을 나타낸다. 맞춤형 제작된 ELISA를 사용하여 혈청 중 농도를 정량화하였는데, 5 mg/kg의 IV 주사 5분 후에 500-800 nM에 도달하였고, 1시간 후에 100 nM으로 강하하고, 3시간 후에 10nM으로 강하하였다. 처리 6시간 후에 농도는 ~1 nM이었고, 대부분의 화합물은 이미 제거되거나 또는 관심 조직으로 전달되었다.

도 18의 A, B, C 및 D는 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체의 전신 전달이 HSA-LR 마우스의 비복근에서 Mbnl1-의 존성 전사체의 스플라이싱 결함을 교정하는 것을 보다 상세히 나타낸다. Clcn1 엑손 7a, Serca 엑손22, Mbnl1 엑손 5 및 Ldb3 엑손11의 스플라이싱에 대한 RT-PCR 분석은 30 및 40 mg/kg으로 DPEP1.9 및 DPEP3.8 기반 접합체를 사용하여 야생형 수준으로 스플라이싱이 정상화되는 것을 보여주었다. 상기 스플라이싱 교정은 처리 후 적어도 3개월 동안 지속되며, 단회 저용량 (5 및 7.5 mg/kg) 투여 후에도 유의미하였다 (박스는 사분위수 (quartiles)로의 데이터 분포를 나타내며, 평균을 강조 표시하고, 오차 막대는 상한 및 하한 사분위수 밖의 변동성을 나타내며, 그룹당 n=5).

도 19의 A, B 및 C는 HSA-LR 마우스에서 근긴장도 등급이 DPEP3.8 및 DPEP1.9 기반 접합체의 30 또는 40 mg/kg 단회 투여 후에 야생형 수준으로 교정되는 것(4에서 0으로)을 나타낸다. 이러한 교정은 처리 후 적어도 3개월 동안 지속된다 (A). 상기 용량을 4회로 나누어 주사하면 (4X7.5 mg/kg), 근긴장도가 50%로 감소(B)하는 반면에, 상기 용량을 4X5 mg/kg으로 낮추면, 최종 주사 2주 후에 20-25% 감소가 발생하였다 (C) (오차 막대는 SEM을 나타냄); (n=6, IV, 꼬리 정맥).

도 20은 HSA-LR 마우스 (8-12주령, 그룹당 n=5)에서 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체를 IV 투여한 2일 및 1주 후에 혈청 및 소변에서의 독성 스크리닝 결과가 HSA-LR 마우스의 표현형을 정상화할 수 있는 용량에서 유의미한 변화를 보이지 않았음을 나타낸다. 30 mg/kg 또는 40 mg/kg의 DPEP1.9, DPEP3.8, DPEP3.1 및 DPEP3.1b로 처리한 후에만, 그리고 처리 2일 후에만 식염수 처리된 HSA-LR 마우스와 비교하여 KIM1 수준에서 유의미한 변화가 있었다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 21은 하기를 포함하는 다양한 투여 요법의 첫번째 주사 후 수 주의 과정에 걸쳐서 HSA-LR 마우스에서 DM1 표현형 (근긴장도) 교정을 나타낸다: 5 mg/kg의 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체 4회 투여, 7.5 mg/kg의 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체 4회 투여, 7.5 mg/kg의 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체 단회 투여, 30 mg/kg의 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체 단회 투여, 또는 40 mg/kg의 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체 단회 투여. 근긴장도의 감소는 임의의 독성과 관련이 없는 저용량의 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체 (5-7.5 mg/kg)로 처리한 후에 달성될 수 있다.

도 22는 하기를 포함하는 다양한 투여 요법의 첫번째 주사 후 수 주의 과정에 걸쳐서 HSA-LR 마우스에서 DM1 표현형 (근긴장도) 교정을 나타낸다: 5 mg/kg의 DPEP1.9-[CAG]₇ PMO 접합체 4회 투여, 7.5 mg/kg의 DPEP1.9-[CAG]₇ PMO 접합체 4회 투여, 7.5 mg/kg의 DPEP1.9-[CAG]₇ PMO 접합체 단회 투여, 또는 40 mg/kg의 DPEP1.9-[CAG]₇ PMO 접합체 단회 투여. 근긴장도의 감소는 임의의 독성과 관련이 없는 저용량의 DPEP1.9-[CAG]₇ PMO 접합체 (5-7.5 mg/kg)로 처리한 후에 달성될 수 있다.

도 23은 네이키드 PMO (200 mg/kg 3회 투여), 30 mg/kg의 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체, 30 mg/kg의 DPEP3.8b-[CAG]₇ PMO 접합체, 7.5 mg/kg의 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체, 및 40 mg/kg의 DPEP3.8-[CAG]₇ PMO 접합체를 HSA-LR 마우스에게 IV 투여한 2주 후에 다양한 조직에서 PMO 농도 (pM)를 나타낸다. 펩티드들 모두 (DPEP3.8 및 DPEP3.8b)는 PMO를 근육에 성공적으로 전달할 수 있어서, 골격근에서 >6nM의 농도에 도달하였다.

도 24는 네이키드 PMO (200 mg/kg 3회 투여), 30 mg/kg의 DPEP1.9-[CAG]₇ PMO 접합체, 30 mg/kg의 DPEP1.9b-[CAG]₇ PMO 접합체, 7.5 mg/kg의 DPEP1.9-[CAG]₇ PMO 접합체, 및 40 mg/kg의 DPEP1.9-[CAG]₇ PMO 접합체를 HSA-LR 마우스에게 IV 투여한 2주 후에 다양한 조직에서 PMO 농도 (pM)를 나타낸다. 펩티드들 모두 (DPEP1.9 및

DPEP1.9b)는 PMO를 근육에 성공적으로 전달할 수 있다. DPEP1.9b-[CAG]₇ PMO는 특히 횡격막에 우수하게 도달하였다 (30 mg/kg의 단위 IV 주사 2주 후에 >15nM).

도 25는 네이키드 PMO (200 mg/kg 3회 투여), 30 mg/kg의 DPEP3.1-[CAG]₇ PMO 접합체, 30 mg/kg의 DPEP3.1a-[CAG]₇ PMO 접합체, 및 30 mg/kg의 DPEP3.1b-[CAG]₇ PMO 접합체를 HSA-LR 마우스에게 IV 투여한 2주 후에 다양한 조직에서 PMO 농도 (pM)를 나타낸다. 3개의 펩티드들 (DPEP3.1, DPEP3.1a 및 DPEP3.1b)은 PMO를 골격근 및 심장근 모두에 전달할 수 있었다 (>1nM).

도 26, 27 및 28은 HSA-LR 마우스에게 본 발명의 상이한 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체를 상이한 용량으로 전신 IV 투여한 후에 다양한 시간에서 소변 중에서 측정된 크레아티닌 수준에 대한 KIM-1의 독성 스크린을, 식염수와 비교하여, 네이키드 [CAG]₇ PMO와 비교하여, 그리고 Pip 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체와 비교하여 나타낸다. 본 발명의 DPEP 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체는 특히 Pip6a-[CAG]₇ PMO 접합체와 비교하여, 더 높은 용량에서도 낮은 독성을 유지하였다. DPEP 접합체는 DM1 표현형을 건강한 수준으로 역전시킬 수 있는 용량 요법을 사용 시 독성 바이오마커에 영향을 미치지 않았다.

본 명세서의 기재내용 및 청구범위 전반에 걸쳐, 단어 "포함한다" 및 "함유한다" 및 이들의 변형은 "포함하지만, 이에 한정되지 않음"을 의미하고, 이는 다른 모이어티, 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하려는 의도는 아니다 (배제하지 않는다). 본 명세서의 기재내용 및 청구범위 전반에 걸쳐, 단수는 문맥상 달리 요구하지 않는 한 복수를 포함한다. 특히, 부정 관사가 사용되는 경우, 명세서는 문맥상 달리 요구하지 않는 한 단수 뿐만 아니라 복수를 고려하는 것으로 이해되어야 한다.

본 발명의 특정 양상, 구체예 또는 실시예와 관련하여 기재된 특징, 정수, 특성, 화합물, 화학적 모이어티 또는 그룹은 서로 양립가능하지 않은 경우가 아니라면 본원에 기재된 임의의 다른 양상, 구체예 또는 실시예에 적용 가능한 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서 (임의의 수반되는 청구범위, 요약서 및 도면 포함)에 개시된 모든 특징, 및/또는 그와 같이 개시된 임의의 방법 또는 공정의 모든 단계는 임의의 조합으로 결합될 수 있되, 단 이러한 특징들 및/또는 단계들의 적어도 일부가 상호 배타적인 경우의 조합을 제외한다.

본 발명은 임의의 전술한 구체예의 세부 사항에 제한되지 않는다. 본 발명은 본 명세서 (임의의 수반되는 청구범위, 요약서 및 도면 포함)에 개시된 특징들 중 임의의 신규한 하나 또는 임의의 신규한 조합으로, 또는 그와 같이 개시된 임의의 방법 또는 공정의 단계들 중 임의의 신규한 하나 또는 임의의 신규한 조합까지 확장된다. 독자는 본 출원과 관련하여 본 명세서와 동시에 또는 이전에 제출되고, 본 명세서와 함께 공공 열람에 개방된 모든 논문 및 문헌에 주목하고, 이러한 모든 논문 및 문헌의 내용은 본원에 참조로 통합된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

1. 재료 및 방법

P-PMO 합성 및 준비

9-플루로에닐메톡시카보닐 (Fmoc) 보호된 L-아미노산, 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄 (PyBOP), 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HBTU), 및 Fmoc-β-Ala-OH 사전-로딩된 Wang 수지 (0.19 또는 0.46 mmol g⁻¹)는 Merck (Hohenbrunn, Germany)로부터 입수하였다. 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸 (HOAt)은 Sigma-Aldrich로부터 입수하였다. HPLC 등급 아세트ونی트릴, 메탄올 및 합성 등급 N-메틸-2-피롤리돈 (NMP)은 Fisher Scientific (Loughborough, UK)로부터 구입하였다. 펩티드 합성 등급 N,N-디메틸포름아미드 (DMF) 및 디에틸 에테르는 VWR (Leicestershire, UK)로부터 입수하였다. 피페리딘 및 트리플루오로아세트산 (TFA)은 Alfa Aesar (Heysham, England)로부터 입수하였다. PMO는 Gene Tools Inc. (Philomath, USA)로부터 구입하였다. 모든 다른 시약은 달리 언급하지 않는 한 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 입수하였다. MALDI-TOF 질량 분광분석은 Voyager DE Pro BioSpectrometry workstation을 사용하여 수행하였다. 수 중 50% 아세트ونی트릴 중에 α-시아노-4-하이드록시신남산 또는 시나편산의 10 mg mL⁻¹의 스톱 용액을 매트릭스 (matrix)로서 사용하였다. 오차 막대는 ± 0.1%이다.

스크리닝을 위한 P-PMO 펩티드의 합성

[0448] a) 펩티드 변이체 라이브러리의 제조

[0449] 펩티드들은 Intavis Parallel 펩티드 합성장치를 사용하여 10 μmol 스케일로, 또는 CEM Liberty BlueTM 펩티드 합성장치 (Buckingham, UK)를 사용하여 100 μmol 스케일로, Fmoc- β -Ala-OH 사전 로딩된 Wang 수지 (0.19 또는 0.46 mmol g^{-1} , Merck Millipore)를 사용하고 표준 Fmoc 화학을 적용하고 제조자의 권장 사항에 따라 제조하였다. Intavis Parallel 펩티드 합성장치를 사용한 합성의 경우, PyBOP/NMM 커플링 혼합물로 이중 커플링 단계 (double coupling steps)를 사용하고, 각 단계 후에 아세트산 무수물 캡핑 (acetic anhydride capping)을 수행하였다. CEM Liberty Blue 펩티드 합성장치를 사용한 합성의 경우, 이중 커플링으로 수행되는 아르기닌을 제외한 모든 아미노산에 대해 단일 표준 커플링을 수행하였다. 상기 커플링은 아르기닌 잔기를 제외하고 60-와트 마이크로파 전력에서 75°C에서 5분 동안 1회 수행하였고, 아르기닌 잔기는 각 2회 커플링하였다. 각 탈보호 반응은 35-와트 마이크로파 전력에서, 75°C에서 2회로, 한번은 30초, 그 다음에 3분 동안 수행하였다. 합성이 완료되면, 상기 수지를 DMF (3 x 50 mL)로 세척하고, 고체상 결합된 펩티드의 N-말단을 실온에서 DIPEA의 존재하에 아세트산 무수물로 아세틸화하였다. N-말단의 아세틸화 후에, 상기 펩티드 수지를 DMF (3 x 20 mL) 및 DCM (3 x 20 mL)으로 세척하였다. 트리플루오로아세트산 (TFA):H₂O:트리이소프로필실란 (TIPS) (95%: 2.5%: 2.5%: 3-10 mL)으로 구성된 절단 각테일 (cleavage cocktail)로 상기 펩티드를 실온에서 3시간 동안 처리하여 고체 지지체로부터 절단하였다. 펩티드를 방출시킨 후에, 질소를 살포하여 과량의 TFA를 제거하였다. 냉 디에틸 에테르 (합성 스케일에 따라 15-40 mL)를 첨가하여 조(crude) 펩티드를 침전시키고, 3200 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 상기 조 펩티드 펠렛을 냉 디에틸 에테르 (3 x 15 mL)로 3회 세척하고, 445-LC 스케일-업 모듈 및 440-LC 분획 수집기가 장착된 Varian 940-LC HPLC 시스템을 사용하는 RP-HPLC로 정제하였다. 15 mL min^{-1} 의 유속으로 0.1% TFA/H₂O 중에 CH₃CN의 선형 구배를 사용하여 RP-C18 컬럼 (10 x 250 mm, Phenomenex Jupiter)에서 반-분취용 HPLC (semi-preparative HPLC)로 펩티드를 정제하였다. 검출은 220 nm 및 260 nm에서 수행하였다. 원하는 펩티드를 함유하는 분획들을 조합하고, 동결건조하여 펩티드를 백색 고체로 수득하였다 (수율은 하기 표 1 참조).

표 1

[0450]

펩티드 번호	포함된 서열번호	테스트된 서열 (추가 C 및 N 말단 변형을 포함)
D-PEP 1.1	27	Ac-RBRRBRFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.7	33	Ac-RBRRBRFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.8	34	Ac-RBRRBFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.9	35	Ac-RBRRBRFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.9a	35	Ac-RBRRBRFQILYRBRBR-Ab
D-PEP 1.9b	35	Ac-RBRRBRFQILYRBRBR-E
D-PEP 1.9W3	93	Ac-RBRRBRWWWBRBR-B
DPEP 1.9W4P	94	Ac-RBRRBRWWPWWBRBR-B
D-PEP 3.1	37	Ac-RBRRBRRFQILYRBHBH-B
D-PEP3.1a	37	Ac-RBRRBRRFQILYRBHBH-Ab
D-PEP3.1b	37	Ac-RBRRBRRFQILYRBHBH-E
D-PEP3.1d	37	Succ-RBRRBRRFQILYRBHBH-NH ₂
D-PEP 3.8	44	Ac-RBRRBRFQILYRBHBH-B
D-Pep 3.8b	44	Ac-RBRRBRFQILYRBHBH-E
D-PEP 5.70	97	Ac-RBRBRS*RBRBR-B
Pip6a	98	Ac-RXRRBRXR-YQFLI-RXRBRXR-B
Pip9b2	99	Ac-RXRRBR-RFQILY-RBRXR-B

[0451]

표 1: 실시예에서 시험을 위해 N-말단 아세틸화 (Ac), N-말단 숙신산 링커 (Succ), C-말단 β -알라닌 링커 (B), 감마-아미노부티르산 링커 (Ab) 및 글루탐산 링커 (E)를 사용하여 합성된 펩티드. S*는 글루코실화된 세린 잔기이다. DPEP5.7, Pip6a 및 Pip9b2로 형성된 접합체는 비교예이다.

[0452]

b) 펩티드-PMO 접합체 라이브러리의 합성

[0453] [CAG]₇로도 알려져 있는 삼중항 반복 서열에 대한 21-mer PMO 안티센스 서열 (CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG (서열번호: 95))을 사용하였다. CUG/CTG 확장 반복을 표적으로 하는 PMO 서열 (5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' (서열번호: 95))을 Gene Tools LLC.로부터 구입하였다. 이는 본원의 다른 곳에서 참조되는 [CAG]₇ PMO이다. 상기 펩티드는 C-말단 카복실기를 통해 PMO의 3'-말단에 접합되었다. 이는 2.5 당량의 DIPEA의 존재하에 NMP 중 각각 2.5 당량 및 2 당량의 PyBOP 및 HOAt를 사용하여 수행하였고, DMSO 중에 용해된 PMO 대비 2.5배 과량의 펩티드를 사용하였다. 일반적으로, *N*-메틸피롤리돈 (NMP, 80 μ L) 중 펩티드 (2500 nmol)의 용액에, PyBOP (NMP 중 0.3M의 19.2 μ L), HOAt (0.3M NMP 중 16.7 μ L), DIPEA (1.0 mL) 및 PMO (DMSO 중 10 mM의 180 μ L)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 40°C에서 2.5시간 동안 방치하고, H₂O 중 0.1% TFA (300 μ L)를 첨가하여 반응을 켄칭 (quenching)하였다. 이 용액을 변환된 Gilson HPLC 시스템을 사용하여 이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 상기 PMO-펩티드 접합체는 20% CH₃CN을 함유하는 인산나트륨 버퍼 (25 mM, pH 7.0)의 선형 구배를 사용하여 이온 교환 컬럼 (Resource S 4 mL, GE Healthcare)에서 정제하였다. 염화나트륨 용액 (1M)을 사용하여 4 mL min⁻¹ 또는 6 mL min⁻¹의 유속으로 컬럼으로부터 접합체를 용출하였다. 원하는 화합물을 함유하는 분획들을 조합하고, 즉시 탈염하였다. Amicon® ultra-15 3K 원심분리 필터 장치를 사용하여 이온 교환 후에 수집된 분획들의 여과를 통해 펩티드-PMO 접합체로부터 과량의 염을 제거하였다. 상기 접합체를 동결건조시키고, MALDI-TOF로 분석하였다. 상기 접합체를 멸균수 중에 용해시키고, 사용하기 전에 0.22 μ m 셀룰로스 아세테이트 막을 통해 여과하였다. 펩티드-PMO의 농도는 0.1N HCl 용액 중 265 nm에서 접합체의 몰 흡수 (molar absorption)에 의해 측정하였다. (수율은 하기 표 2 참조).

표 2

[0454]

펩티드	수율
D-Pep 1.1	36 %
D-Pep 1.7	41 %
D-pep 1.8	38 %
D-Pep 1.9	40 %
D-Pep 1.9b	34 %
D-Pep 1.9W3	43 %
D-Pep 1.9W4P	23 %
D-Pep 3.1	31 %
D-Pep 3.1a	17 %
D-Pep 3.1b	25 %
D-Pep 3.1d	37 %
D-Pep 3.8	36 %
D-Pep 3.8b	35 %
D-Pep 5.70	31 %

[0455] 표 2. 세포 배양 분석 및 인 비보 실험을 위한 P-PMO 접합체의 수율 (상기 수율은 동결건조된 정제된 P-PMO의 건조 중량에 기반함). 상기 P-PMO의 순도는 220 nm 및 260 nm에서 정상 HPLC (normal phase HPLC)로 확인한 바와 같이 95% 초과이다.

[0456] **동물 모델 및 ASO 주사.** 본 실험은 각각 영국 및 프랑스 법에 따라 University of Oxford 또는 "Centre d'etudes fonctionnelles" (Faculte de Medecine Sorbonne University)에서 수행하였다 (윤리위원회 승인 #1760-2015091512001083v6). HSA-LR 또는 C57BL/6 마우스의 정맥 주사는 꼬리 정맥을 통한 단회 또는 다회 투여로 수행하였다. 5, 7.5, 12.5, 30 또는 40 mg/kg 용량의 펩티드-PMO-CAG7, 및 12.5 또는 200 mg/kg 용량의 PMO를 0.9% 식염수 중에 희석하고, 체중 1g 당 5-6 μ L의 부피로 제공하였다. 다회 주사는 2주 간격으로 하였다. 근긴장도를 평가하고, 최종 주사 2주 후에 조직을 수확하였다. 장기간 실험을 위해, 주사 3개월 후에 조직을 수확하였다. 독성 측정을 위해, 1주일 후에 조직을 수확하였다. 표준 곡선에 맞도록 희석된 샘플을 사용하여 ELISA (R&D cat# MKM100)로 소변을 시험하였다. 요중 단백질 농도를 설명하도록 값을 요중 크레아티닌 수준 (Harwell)으로 정규화하였다.

[0457] **인 시투 (in situ) 근긴장도/근육 이완 측정.** 비복근의 등척성 수축 특성 (isometric contractile properties)을 인 시투 연구하였다. 마우스를 케타민/자일라신 용액 (각각 80 mg/kg 및 15 mg/kg)으로 마취하였다. 무릎과 발을 클램프와 핀으로 고정하였다. 비복근의 원위 힘줄 (distal tendon)을 서보모터 시스템

(servomotor system) (305B, Dual-Mode Lever)의 레버 아암에 부착하였다. PowerLab 시스템 (4SP, ADInstruments) 및 소프트웨어 (Chart 4, ADInstruments)를 사용하여 데이터를 기록하고 분석하였다. 0.1 ms 지속 시간의 초극대 (10-V) 구형파 펄스를 사용하여 양극성 은 전극으로 좌골 신경 (근위부 부서짐)을 자극하였다. 절대 최대 등척성 강축력 (absolute maximal isometric tetanic force: P0)을, 전기 자극 (25 내지 150 Hz 주파수, 500 ms의 자극 트레인)에 반응하는 등척성 수축 중에 측정하였다. 근긴장도는 P0의 측정 후에 이완 근육의 지연으로 측정되었다.

[0458] **세포 배양 및 펩티드-PMO 처리.** 건강한 개체 또는 2600회의 CTG 반복을 갖는 DM1 환자로부터 유래된 불멸화된 근모세포를, 20% FBS (Life Technologies), 50 µg/ml의 겐타마이신 (Life Technologies), 25 µg/ml의 페투인 (fetuin), 0.5 ng/ml의 bFGF, 5 ng/ml의 EGF 및 0.2 µg/ml의 텍사메타손 (Sigma-Aldrich)이 보충된 M199:DMEM의 믹스 (1:4 비율; Life technologies)로 구성된 성장 배지에서 배양하였다. 근모세포의 경우 5 µg/ml의 인슐린 (Sigma-Aldrich)이 보충된 DMEM 배지로 융합성 세포 배양물 (confluent cell cultures)로 변경하여 근육 세포 분화 (Myogenic differentiation)를 유도하였다. 처리를 위해, WT 또는 DM1 세포를 4일 동안 분화시켰다. 그 다음에, 1, 2, 5, 10, 20 또는 40 µM 농도의 펩티드-PMO 접합체를 갖는 새로운 분화 배지로 배지를 교체하였다. 처리 48시간 후에, 분석을 위해 세포를 수집하였다. 세포 생존율은 형광-기반 에세이 (Promega)를 사용하여, 인간 간세포에서 40 µM, 또는 인간 근모세포에서 1, 2, 5, 10, 20 또는 40 µM 농도에서 펩티드-PMO로 형질감염 2일 후에 정량화하였다.

[0459] **RNA 단리, RT-PCR 및 qPCR 분석.** 마우스 조직의 경우: RNA 추출 전에, Fastprep 시스템 및 Lysing Matrix D 튜브 (MP biomedical)를 사용하여 TriReagent (Sigma-Aldrich)에서 근육을 파괴하였다. 인간 세포의 경우: RNA 추출 전에, 세포를 프로테나제 K 버퍼 (500 mM NaCl, 10 mM 트리스-HCl, pH 7.2, 1.5 mM MgCl2, 10 mM EDTA, 2% SDS 및 0.5 mg/ml의 프로테나제 K)에서 55°C에서 45분 동안 용해시켰다. 제조자의 프로토콜에 따라 TriReagent를 사용하여 전체 RNA를 단리하였다. 제조자의 지침에 따라 총 20 µL의 M-MLV 제1-가닥 합성 시스템 (Life Technologies)을 사용하여 1 마이크로그램의 RNA를 역전사시켰다. 이어서 1 마이크로리터의 cDNA 제제를 표준 프로토콜에 따라 반-정량적 PCR 분석에 사용하였다 (ReddyMix, Thermo Scientific). 프라이머는 하기 표 3에 나타낸다.

표 3

프라이머 명칭	서열 번호	종/유전자/엑손	서열 (5'-3')
Mbn11.F	100	마우스-인간/mbn11/엑손5	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC
Mbn11.R	101	마우스-인간/mbn11/엑손5	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC
Clcn1.F	102	마우스/clcn1/엑손7a	TTCACATCGCCAGCATCTGTGC
Clcn1.R	103	마우스/clcn1/엑손7a	CACGGAACACAAAGGCACTGAATGT
Serca.F	104	마우스/serca1/엑손22	GCTCATGGTCTCAAGATCTCAC
Serca.R	105	마우스/serca1/엑손22	GGGTGAGTGCCTCAGCTTTG
Ldb3.F	106	마우스/ldb3/엑손11	GGAAGATGAGGCTGATGAGTGG
Ldb3.R	107	마우스/ldb3/엑손11	TGCTGACAGTGGTAGTGCTCTTTC
BIN.F	108	인간/BIN/엑손11	AGAACCTCAATGATGTGCTGG
BIN.R	109	인간/BIN/엑손11	TCGTGTTGACTCTGATCTCGG
DMD.F	110	인간/DMD/엑손78	TTAGAGGAGGTGATGGAGCA
DMD.R	111	인간/DMD/엑손78	GATACTAAGGACTCCATCGC
INSR.F	112	인간/INSR/엑손11	CCAAAGACAGACTCTCAGAT
INSR.R	113	인간/INSR/엑손11	AACATCGCCAAGGGACCTGC
LDB3.F	114	인간/LDB3/엑손11	GCAAGACCTGATGAAGAAGCTC
LDB3.R	115	인간/LDB3/엑손11	GACAGAAGGCCGGATGCTG
SERCA.F	116	인간/SERCA/엑손22	ATCTTCAAGCTCCGGGCCCT
SERCA.R	117	인간/SERCA/엑손22	CAGCTCTGCCTGAAGATGTG
SOS1.F	118	인간/SOS1/엑손25	CAGTACCACAGATGTTGTCAGTG
SOS1.R	119	인간/SOS1/엑손25	TCTGGTCGTCTTCGTGGAGGAA
TNNT2.F	120	인간/TNNT2/엑손5	ATAGAAGAGGTGGTGAAGAGTAC
TNNT2.R	121	인간/TNNT2/엑손5	GTCTCAGCCTCTGCTTCAGCATCC

[0461] PCR 증폭은 각 유전자에 대한 선형 증폭 범위 내에서 25-35회의 사이클을 수행하였다. PCR 산물은 1.5-2%의 아가로스 겔에서 분리되었고, 에티듐 브로마이드-염색하고, ImageJ 소프트웨어로 정량화하였다. 엑손 봉입 (exon

inclusion)의 비율은 이소형 (isoform) 신호의 전체 강도에 대한 봉입 퍼센트로 정량화하였다. mRNA 발현을 정량화하기 위해, 제조자의 지침에 따라 실시간 PCR을 수행하였다. PCR 사이클은 15분의 변성 단계에 이어서, 94℃에서 15초 변성, 58℃에서 20초 어닐링 및 72℃에서 20초 연장의 50회의 사이클을 수행하였다.

[0462] **형광 인 situ 혼성화/면역형광.** 형광 인 situ 혼성화 (Fluorescent in situ hybridization: FISH) 실험은 Cy3-표지된 2'OMe(CAG)₇ 프로브 (Eurogentec)를 사용하여 이전에 기술된 바와 같이(6) 수행하였다. 조합된 FISH-면역형광 실험의 경우, FISH 마지막 세척 후에 래빗 폴리클로날 항-MBNL1 항체에 이어서 2차 Alexa Fluor 488-접합된 고우트 항-래빗 (1:500, Life Technologies) 항체를 사용하여 면역형광 염색을 수행하였다.

[0463] **조직에서 올리고뉴클레오타이드 농도의 ELISA 기반 측정.** 맞춤형 혼성화-기반 ELISA는 디옥시게닌 및 바이오틴으로 이중-표지된 포스포로티오에이트 연결을 가진 포스포로티오에이트 프로브(서열 (5'→3') [DIG]C*T*G*C*T*G*C*T*GCTGCT*G*C*T*G*C*T*G[BIO] (서열번호: 96))를 사용하여 PMO 올리고뉴클레오타이드의 농도를 측정하기 위해 개발되었다. 본 예세이는 마우스의 혈청 및 조직 용해물에서 5-250 pM (R₂ >0.99)의 선형 검출 범위를 가졌다. 상기 프로브를 사용하여 처리된 HSA-LR 마우스 유래의 8가지 상이한 조직 (뇌, 신장, 간, 폐, 심장, 횡격막, 비복근 및 사두근)에서 펩티드-PMO 또는 네이키드 PMO 농도를 검출하였다.

[0464] 2. 결과

[0465] 본 연구에서, 본 발명자들은 특정 구조를 가진 아르기닌-풍부 세포-투과 펩티드를 사용하였고, [CAG]₇ 모르폴리노 포스포로디아미테이트 올리고머에 접합된 이러한 펩티드 (PMO)가 전신 투여 후에 비-접합 PMO 및 다른 펩티드 운반체 접합체 전략과 비교하여, HSA-LR 마우스 DM1 모델의 횡문근 (striated muscles)으로의 ASO 전달을 극적으로 향상시킨 것을 보여주었다. 따라서, 병리학적 확장을 표적으로 하는 본원에 청구된 펩티드-[CAG]₇ PMO로 형성된 접합체의 저용량 치료가 DM1 마우스 (HSA-LR)에서 스플라이싱 결함 및 근긴장도 모두를 역전시키기에 충분하였고 전체 질병-중 전사체 (transcriptome)를 정상화하였다. 더욱이, 처리된 DM1 환자 유래 근육 세포 (근모세포)는 본원에 청구된 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체가 돌연변이체 CUGexp-DMPK 전사체를 특이적으로 표적화하여 핵 RNA 병소에 의한 MBNL1 스플라이싱 인자의 유해한 격리, 결과적으로 스플라이싱 결함 및 근육 기능장애의 원인인 MBNL1 기능 손실을 저지하는 것을 보여주었다. 본 발명의 결과는 본원에 청구된 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체가 분자 및 기능 수준 모두에서 DM1-관련 표현형의 높은 효능 및 장기-지속되는 교정 효과를 유도함을 입증하고, DM1에서 전신 교정 요법을 위한 이러한 펩티드-접합체의 사용을 강력하게 뒷받침한다.

[0466] 본 발명자들은 X 장기와 같은 인공 아미노산을 함유하지 않는 펩티드 운반체를 포함하는 접합체가 이전의 세포 투과 펩티드보다 더 넓은 치료 범위 (therapeutic window) 및 더 안전한 독성 프로파일을 가지므로, DM1 환자에서 시험할 더 유망한 후보를 구성하는 데이터를 생성하였다. 이러한 차세대 소위 'DPEP1 및 DPEP3' 펩티드는 CAG₇ 반복 안티센스 올리고뉴클레오타이드 PMO에 접합되는 경우 병원성 병소 수의 감소 (도 1) 및 인 비트로 스플라이싱 결함의 교정 (도 2, 3, 4 및 19)에서 높은 효능을 보였다. 40 μM에서 유의미한 세포 사멸 (>50%)을 유도하였던 알려진 'Pip' 운반체 펩티드인 Pip6a-PMO 및 Pip9b2-PMO로 형성된 유사한 비교 접합체와 달리, 시험한 농도 중 어느 것도 인간 간세포에서 세포 생존율의 감소를 일으키지 않았다 (1-40 μM) (도 7). 시험한 다수의 농도는 인간 근모세포의 세포 생존율을 감소시키지 않았으며, 더 낮은 용량에서 세포 사멸을 유도하는 알려진 'Pip' 운반체 펩티드인 Pip6a-PMO 및 Pip9b2-PMO로 형성된 유사한 비교 접합체와 비교하여 더 양호한 결과를 보여주었다 (도 5 및 6).

[0467] 이어서, 본 발명자들은 이러한 새로운 펩티드들이 HSA-LR 마우스의 근긴장도 및 스플라이싱 변화를 교정하는 데에 활성이 있는지를 시험하였다. 이를 수행하기 위해, 본 발명자들은 DPEP 1 및 3 시리즈의 선도 펩티드 운반체인 DPEP1.9 및 DPEP3.8을 이전의 펩티드 운반체인 DPEP 5.70과 비교하여 시험하였다. 본 발명자들은 DPEP3.8 및 DPEP1.9 모두로 형성된 접합체 30 mg/kg 처리 2주 후에 스플라이싱 결함 (도 4) 및 근긴장도 (도 8, 9 및 10)가 야생형 수준으로 교정되었음을 보여주었다.

[0468] 네이키드 PMO 대 운반체 펩티드 DPEP1.9 및 DPEP3.8로 형성된 접합체의 생체분포를 ELISA로 평가하여, 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체의 전달을 정량화하였다. 심장 및 뇌와 같이 DM1에서 심각하게 이환되는 조직에서 PMO의 검출은 약물 전달 개발에 있어서 중요하다. 30 mg/kg의 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체의 단회 정맥내 주사, 또는 200 mg/kg의 네이키드 PMO로 3회 주사 (총 600 mg/kg)를 HAS-LR 마우스에 투여하였다. 비복근, 사두근, 횡격막, 심장 및 뇌를 투여 2주 후에 PMO 검출을 위해 분석하였다. 비-접합된 네이키드 [CAG]₇ PMO는 시험한 모든 조직에서 낮거나 또는 전혀 검출되지 않는 수준이었지만, 펩티드 운반체 DPEP1.9 및 DPEP3.8에 접합된 [CAG]₇ PMO는

더 낮은 용량 (>20배 몰 농도)으로 주사하였음에도 불구하고 더 높은 수준으로 검출되었다. 일반적으로, 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체는 30 mg/kg 주사 2주 후에 사두근, 비복근 및 횡격막에서 1nM-4nM으로 검출되었고, 심장에서는 1nM으로 검출되었다 (도 17).

표 4

조직 중 pM	네이키드 PMO 600mg/kg	Dpep3.8 30mg/kg	Dpep1.9 30mg/kg
신장	426748	443553	1142917
간	252	24295	101072
폐	113	3956	6215
심장	198	1225	1167
횡격막	30	1808	4033
비복근	18	1057	1999
사두근	ND	1513	2727
뇌	ND	226	394

[0469]

[0470]

본 발명자들은 또한 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체의 저용량 (5 mg/kg) 투여 후 혈청에서 측정된 본 발명의 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체의 약동학적 특성을 연구하였다. 본 발명자들은 혈청 중 농도를 정량화하였는데, IV 주사 5분 후에 500-800nM에 도달하였고, 1시간 후에 100nM으로 강하하고, 3시간 후에 10nM으로 강하하였다. 처리 6시간 후에, 농도는 ~1nM이었고, 대부분의 화합물은 이미 제거되었거나 또는 관심 조직으로 전달되었다 (도 18).

[0471]

야생형 마우스에서 DPEP3.8 및 DPEP1.9 운반체 펩티드로 형성된 접합체의 예비 독성 평가는 ALP, ALT, AST, KIM-1, 크레아티닌, BUN 및 NGAL 수준이 Pip 시리즈 유래의 현재 이용 가능한 펩티드 운반체에 의해 전형적으로 유도되는 배수 증가와 대조적으로, 식염수 대조군 주사와 유사한 것으로 나타났다. 이러한 예비 데이터를 통해, 본 발명자들은 [CAG]₇ PMO를 가진 DPEP 펩티드로 형성된 접합체가 Pip6a만큼 인 비보 활성이 있지만, 더 넓은 치료 범위를 갖는 것을 보여주었다 (도 11, 12 및 21).

[0472]

또한, DPEP3.8-[CAG]₇로부터 형성된 접합체의 30 mg/kg 단회 용량을 주사한 5마리의 HSA-LR 마우스의 체중은 식염수를 주사한 5마리의 HSA-LR 마우스와 비교하여 어떠한 유의미한 경향도 나타내지 않았다 (도 16).

[0473]

또한, DPEP 기반 [CAG]₇ PMO 접합체를 주사한 후에 HSA-LR 마우스의 회복 시간이 Pip6a와 같은 이전의 펩티드 운반체로 형성된 접합체를 주사한 후보다 더 짧았다 (표 5).

표 5

펩티드-PMOCAG7 주사 후에 회복 시간의 요약	마우스	연령	시간 AV±SD
DPEP1.9 6X 5mg/kg 반복 주사	HSA-LR	8-12 주령	0min
DPEP3.8 6X 5mg/kg 반복 주사	HSA-LR	8-12 주령	0min
DPEP1.9 4X 7.5mg/kg 반복 주사	HSA-LR	8-12 주령	0min
DPEP3.8 4X 7.5mg/kg 반복 주사	HSA-LR	8-12 주령	0min
DPEP1.9 7.5mg/kg	HSA-LR	8-12 주령	0min
DPEP3.8 7.5mg/kg	HSA-LR	8-12 주령	0min
DPEP1.9 30mg/kg	WT	8-12 주령	17.5min ±2.5
DPEP1.9b 30mg/kg	WT	8-12 주령	15min
DPEP3.8 30mg/kg	WT	8-12 주령	7.5min ±2.5
DPEP3.1a 30mg/kg	WT	8-12 주령	10min
DPEP3.8 30mg/kg	HSA-LR	8-12 주령	60min ±10
DPEP1.9 40mg/kg	HSA-LR	8-12 주령	57.5min ±26
DPEP3.8 40mg/kg	HSA-LR	8-12 주령	60min ±15.5
DPEP3.8 30mg/kg	HSA-LR	30 주령	60min
DPEP1.9 30mg/kg	HSA-LR	30 주령	>60min
pip6a 12.5mg/kg	HSA-LR	8-12 주령	>60min

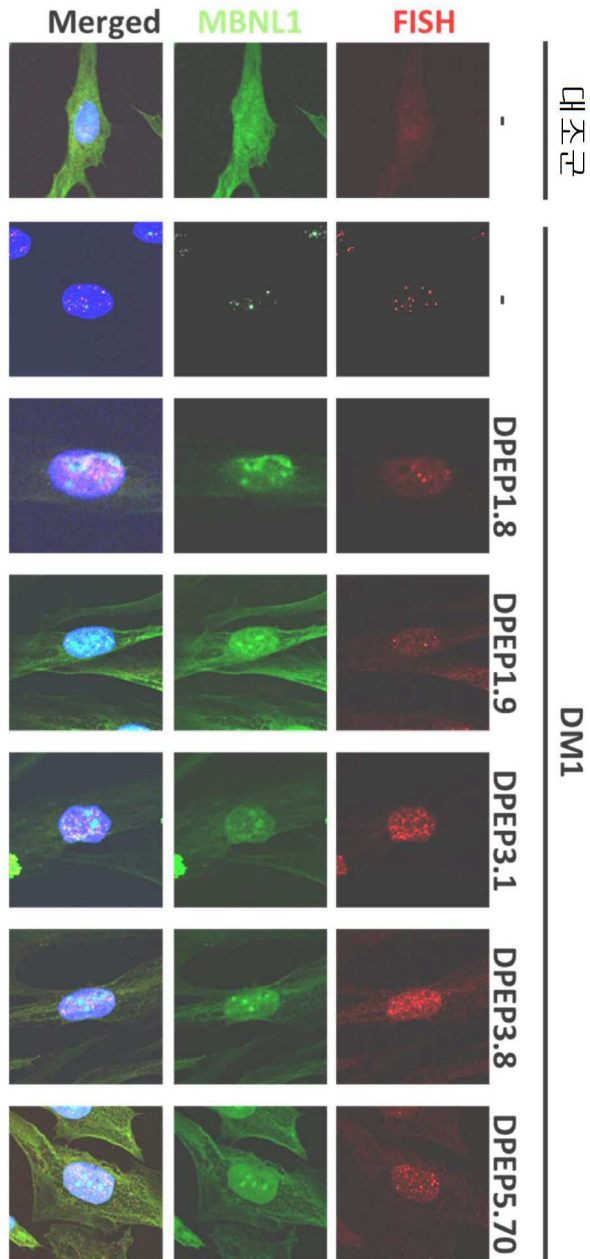
[0474]

- [0475] 본 발명의 접합체의 효능을 보다 상세하게 평가하여, 본 발명자들은 또한 DPEP 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체 투여 후에 스플라이싱 결함 및 근긴장도가 적어도 3개월 동안 야생형 수준으로 교정된다는 것을 발견하였다 (각각 도 19 및 20). 본 발명자들은 또한 7.5 mg/kg 투여 후에 미스스플라이싱 및 근긴장도가 50% 감소됨을 측정하였다.
- [0476] 특히, Pip6a-[CAG]₇ PMO와 같은 이전의 펩티드 운반체로 형성된 접합체는 마우스에서 높은 사망율을 유발하지 않고 >20 mg/kg에서 시험될 수 없는데, 이는 사망을 유발하지 않으면서 상기 농도를 5배 이상 증가시킬 수 있는 본 발명의 접합체와는 대조적이다. 또한 독성 스크리닝에서, 본 발명자들은 처리 2일 후에 Kim1 수준에 있어서 30 mg/kg 초과 용량을 사용하여 단지 식염수 수준의 변화만을 검출하였다 (도 21).
- [0477] 효능 및 독성 데이터는 청구된 DPEP1 및 DPEP3 시리즈의 운반체 펩티드로 형성된 접합체는 특히 DM1이 이환된 개체에서 확장된 CTG 반복에 의한 MBNL1의 격리를 차단하는데 활성이 있고, 낮은 독성을 유도하는 것으로 나타났다. 이들 접합체는 스플라이싱의 정상화를 통한 분자 수준 및 근긴장도 교정을 통한 근육 수준 모두에서 DM1 표현형을 야생형 수준으로 완전히 교정할 수 있다. 이러한 새로운 접합체는 이전의 펩티드 운반체로 형성된 접합체보다 더 넓은 치료 범위를 가지므로, 임상 실현이 더 가까워졌다.
- [0478] 요약하자면, 본 발명자들은 하기를 뒷받침하는 강력한 증거를 보여주었다: (1) 펩티드-[CAG]₇ PMO는 MBNL1과 핵 돌연변이체 CUGexp-RNA의 병리학적 상호작용을 차단하여, RNA-스플라이싱에 대한 다운스트림 효과를 구제 (rescue)하고; (2) 상기 펩티드 접합된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 접근법은 횡격막내 심장과 같이 접근할 수 없는 조직에 치료를 전달 가능하게 하며; (3) 높은 효능과 함께 치료를 인 비보 전달하는 펩티드 운반체 기술의 능력과 조합되어, 질병 돌연변이를 직접 표적으로 하는 [CAG]₇ PMO의 강력한 효과는 치료를 중단하고 수 개월이 지난 후에도 골격근 DM1 마우스 (HSA-LR)의 DM1 표현형을 야생형 수준으로 강력히 역전시키는 것으로 수렴된다. 이러한 증거는 펩티드-[CAG]₇ 접합체가 DM1에서 강력한 질병 수정 효과를 가질 수 있음을 강력하게 시사한다.
- [0479] 사실상, 본 발명의 실험으로 본 발명자들은 HSA-LR 마우스에서 관찰한 효과가 DM1 병리의 악화를 예방할 뿐만 아니라 실제로 질병 표현형의 역전을 야기하는 것을 보여주었다. 확장된 CUG-전사체는 이미 새끼 (pups)에서 발현되고, HSA-LR 마우스는 1개월령까지 상당한 근긴장도가 존재한다. 이러한 적용을 뒷받침하는 결과를 생성하는데 사용한 동물은 DM1의 분자 및 기능 표현형이 발생하는 시점을 훨씬 넘어서, 적어도 2개월령 및 심지어 7개월령에 치료되었다.
- [0480] **3. 결론**
- [0481] * DPEP 운반체 펩티드 및 [CAG]₇ PMO (10 μM)를 포함하는 접합체는 DM1 환자의 근모세포 및 대조군에서 (세포 생존율을 감소시키지 않는 용량으로) 핵 병소의 수를 >50% 감소시킬 수 있다. 시험한 농도 (1-40 μM) 중 어느 것도 세포 생존율의 감소를 유발하지 않는 반면에, 다른 운반체 펩티드로 형성된 비교 접합체는 20 μM 또는 초과 농도에서 유의미한 세포 사멸 (>50%)을 유발하였다.
- [0482] * DPEP 운반체 펩티드 및 [CAG]₇ PMO를 포함하는 접합체는 긍정적인 약동학을 나타내었고, 생체분포 평가는 DM1의 심각하게 이환된 조직으로의 최적의 전달을 보여주었다.
- [0483] * DPEP 운반체 펩티드 및 [CAG]₇ PMO를 포함하는 접합체는 HSA-LR 마우스에서 다른 운반체 펩티드로 형성된 비교 접합체 12.5 mg/kg보다 독성이 더 적은 용량 (30 mg/kg, IV)으로 Clcn1 엑손 7a, Serca 엑손22, Mbnl1 엑손 5 및 Ldb3 엑손11의 50%-90%의 스플라이싱 교정을 유도하였다. 또한, RT-PCR 분석은 30 및 40 mg/kg의 DPEP1.9 및 DPEP3.8을 포함하는 접합체를 사용하여 야생형 수준으로 스플라이싱이 정상화되는 것을 보여주었다. 스플라이싱 교정은 치료 후 적어도 3개월 동안 지속되며, 이는 단회 저용량 (5 및 7.5 mg/kg) 투여 후에도 유의미하였다.
- [0484] * 근긴장도 정성적 관찰 및 근전도 근긴장도 측정에 따르면, DPEP 운반체 펩티드 및 [CAG]₇ PMO를 포함하는 접합체는 40 mg/kg 또는 30 mg/kg (IV)의 단회 주사 후에 근긴장도를 야생형 수준으로 감소시켰다. DPEP3.8 또는 DPEP1.9를 포함하는 접합체를 7.5 mg/kg으로 4회 주사한 후에도 근긴장도의 중등도의 교정이 발생하였다.
- [0485] * DPEP 운반체 펩티드 및 [CAG]₇ PMO를 포함하는 접합체를 30 mg/kg (IV)으로 주사함으로써, 다른 운반체 펩티드로 형성된 비교 접합체 12.5 mg/kg을 단회 주사한 경우보다 야생형 마우스에서 더 짧은 무기력 시간

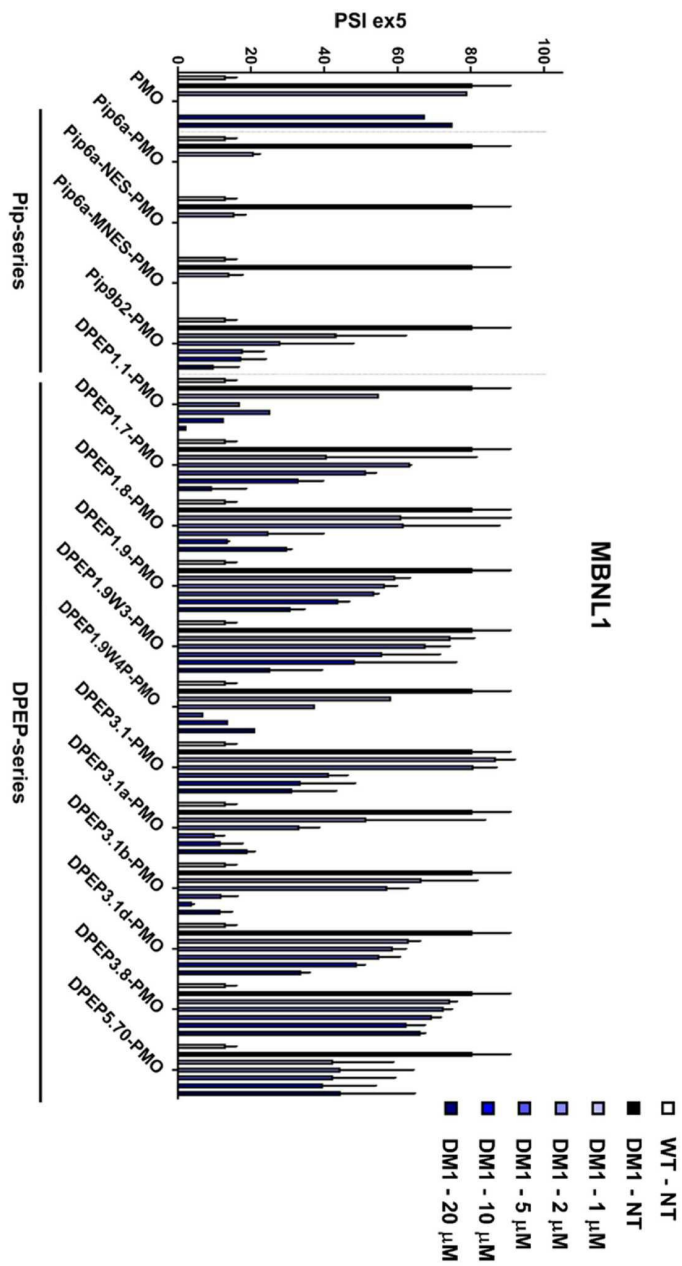
(lethargy times)을 유도하였다 (>1hr). 신장 기능에 대한 요중 생화학적 시험 및 혈액 분석은 야생형 마우스에서 식염수와 비교하여 변화가 없었고, =>30 mg/kg 투여 후에 HSA-LR Kim1 수준 및 요중 단백질에서 약간의 변화를 보였다.

도면

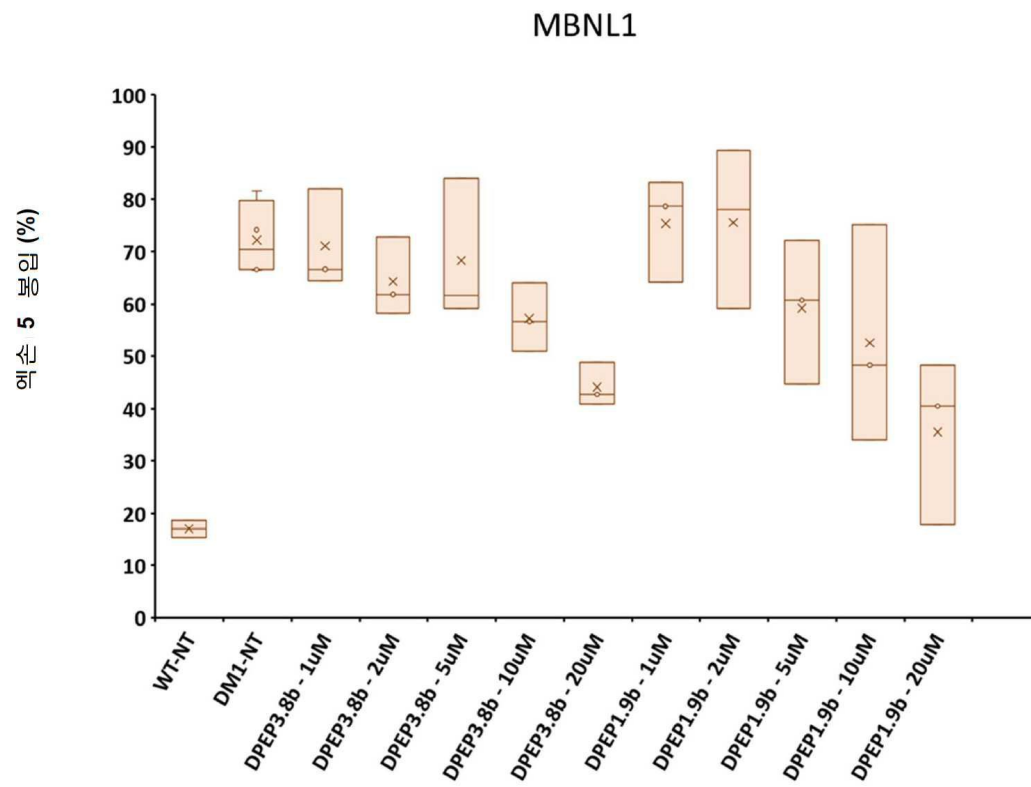
도면1



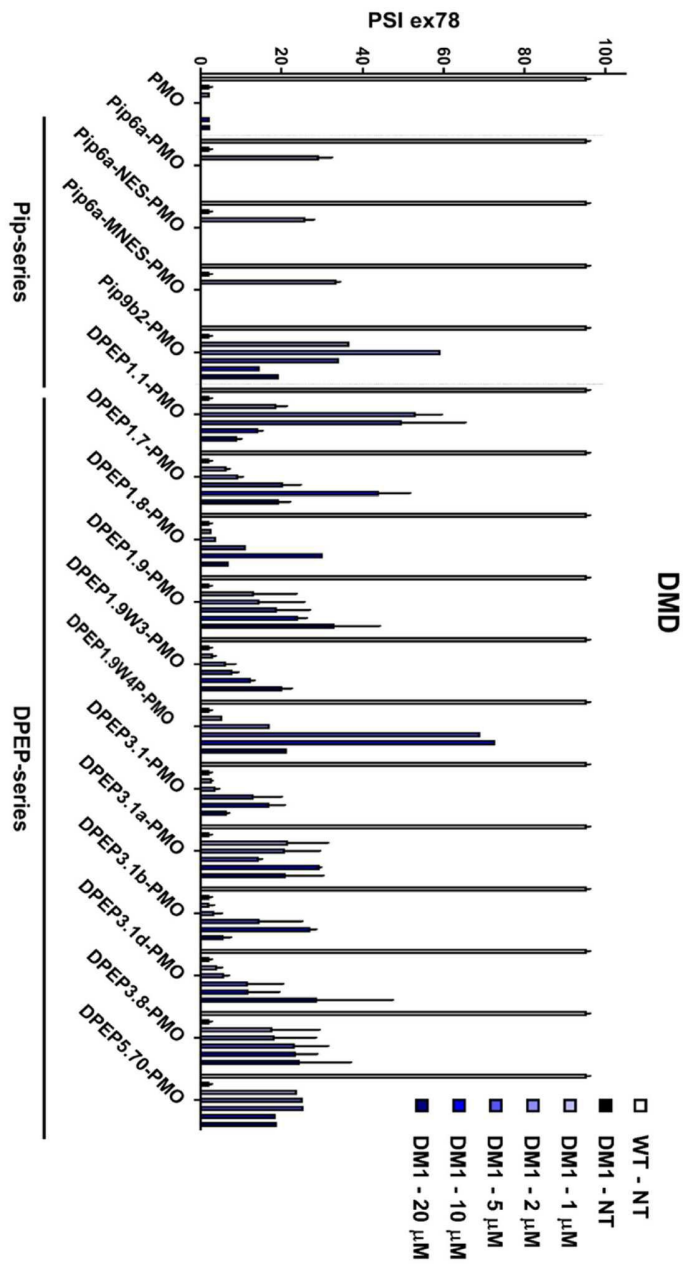
도면2a



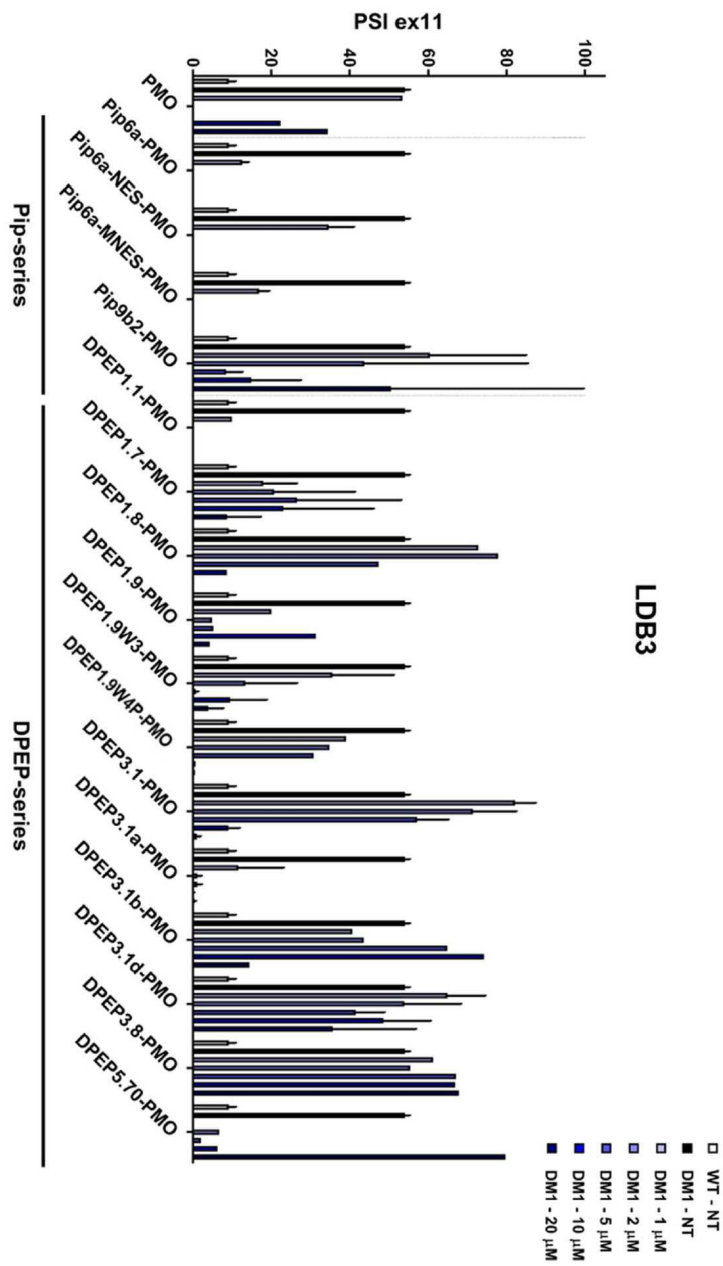
도면2b



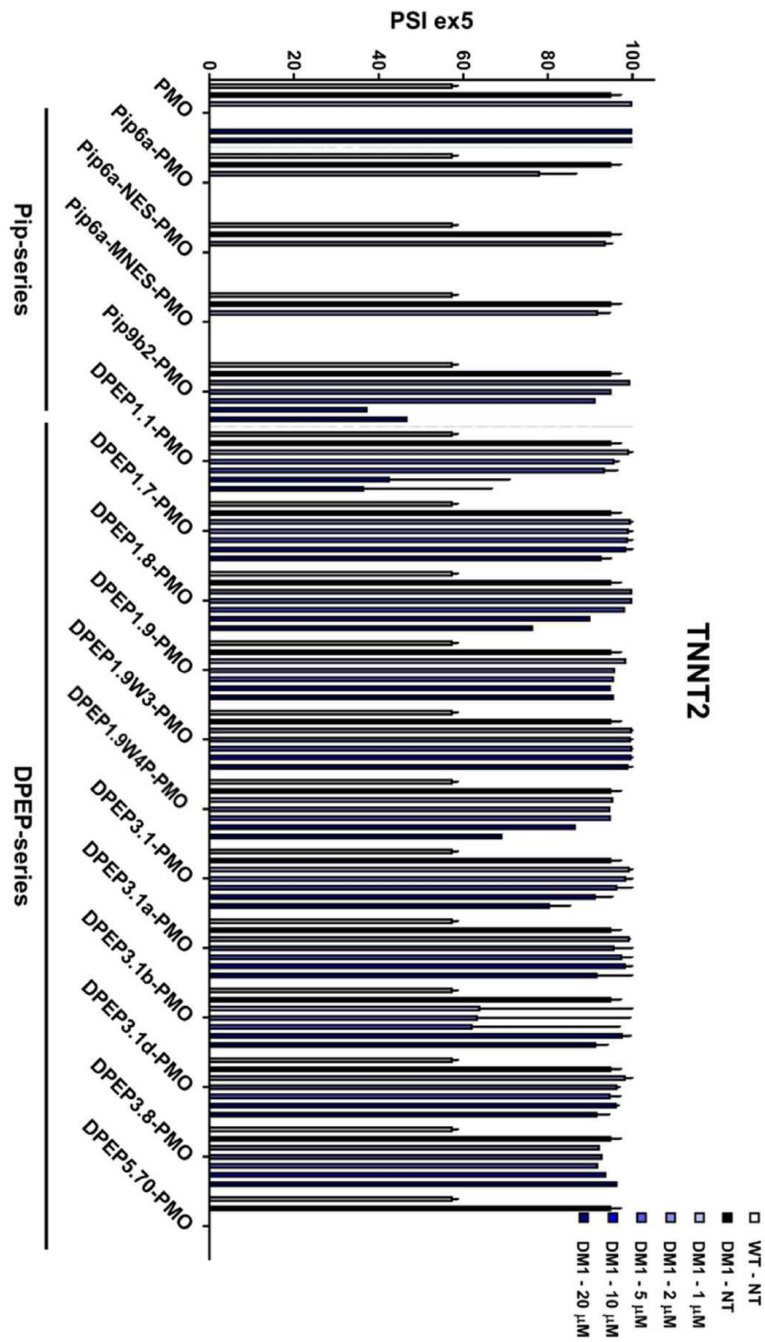
도면2c



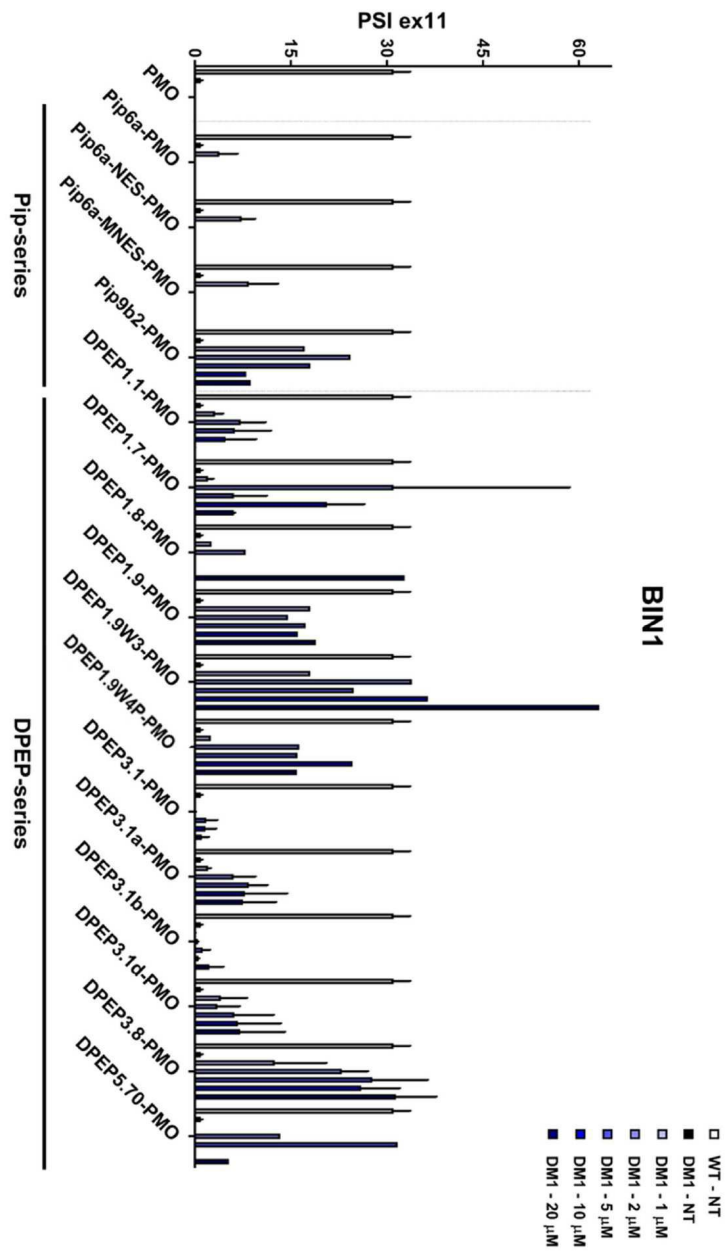
도면3a



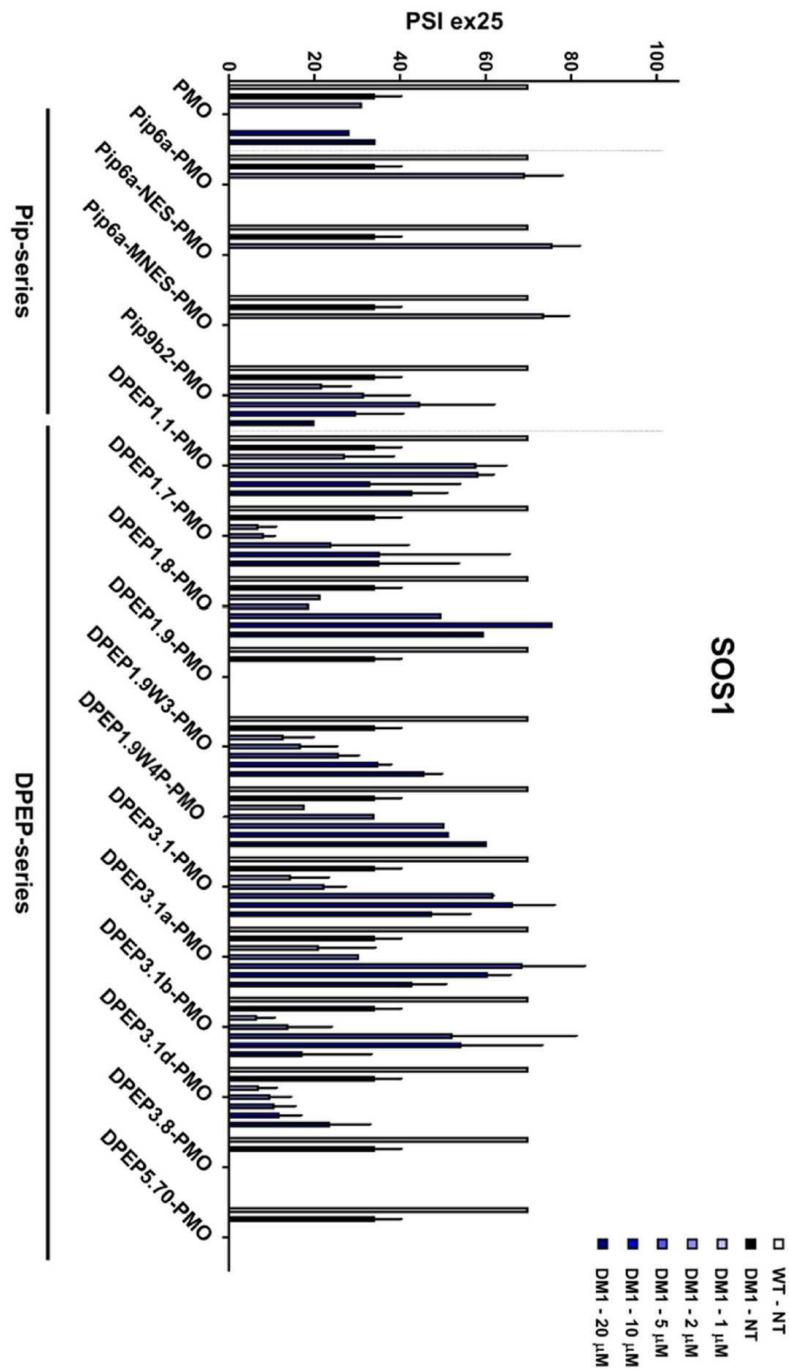
도면3b



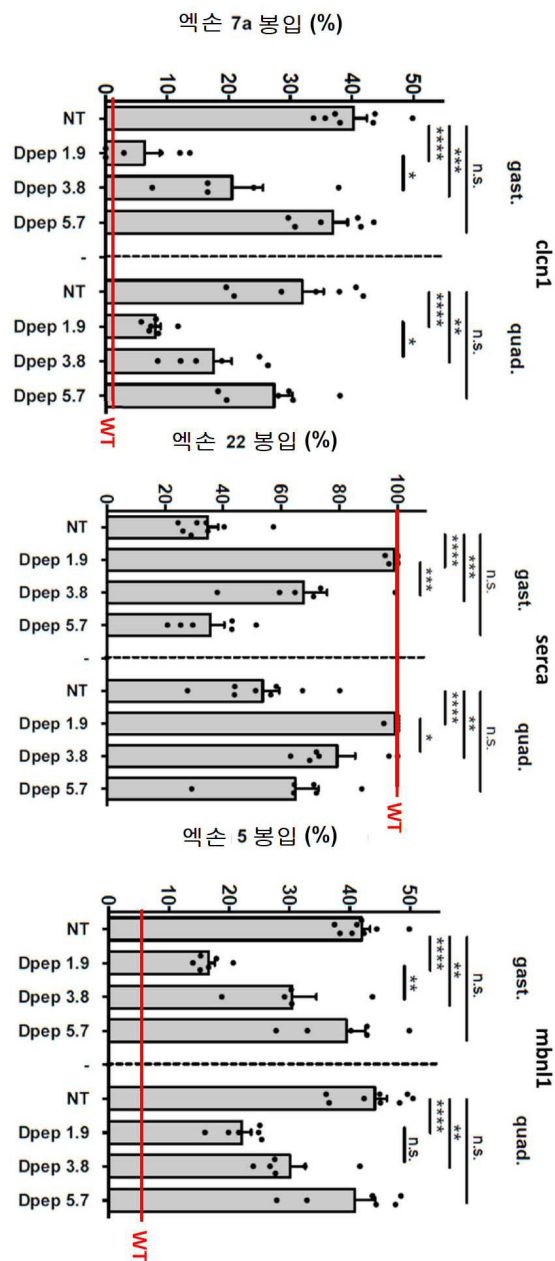
도면3c



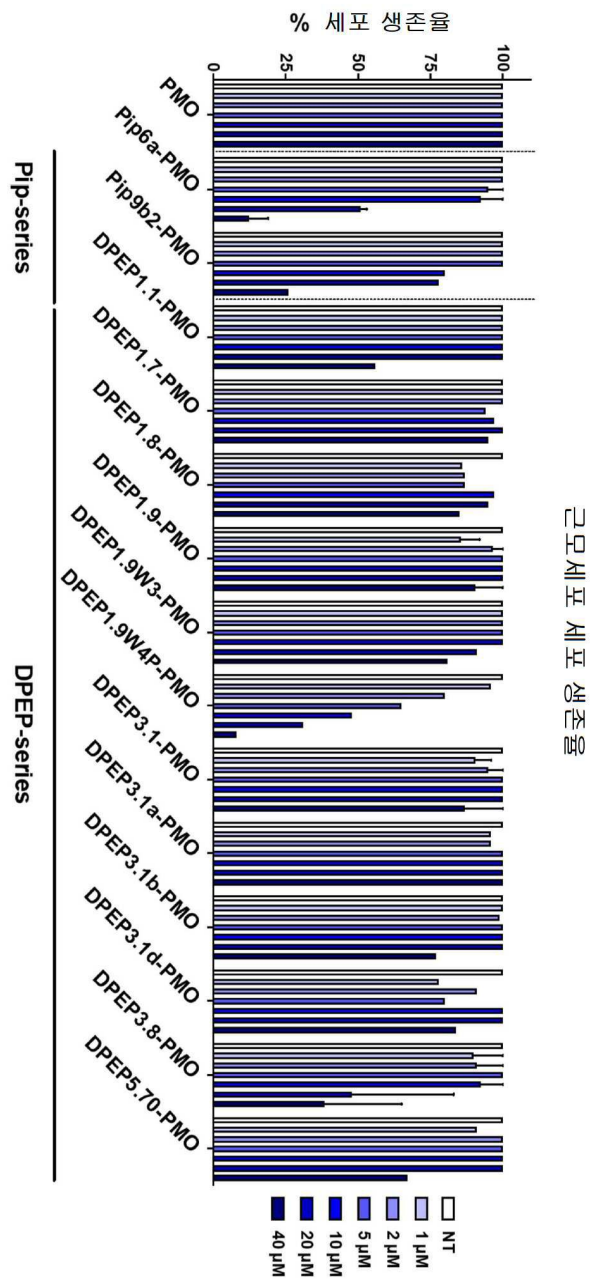
도면3d



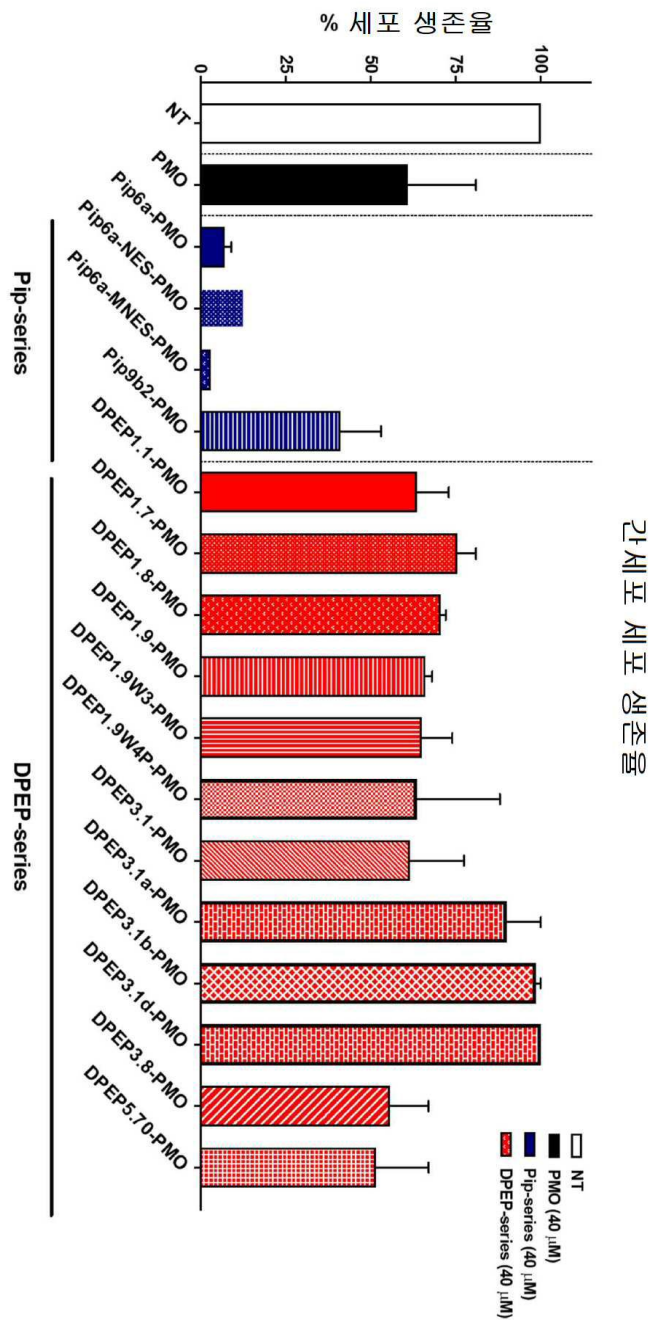
도면4



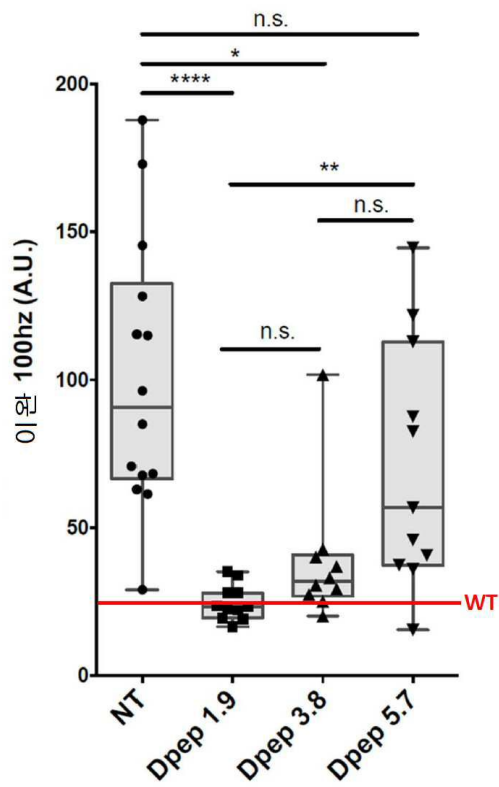
도면5



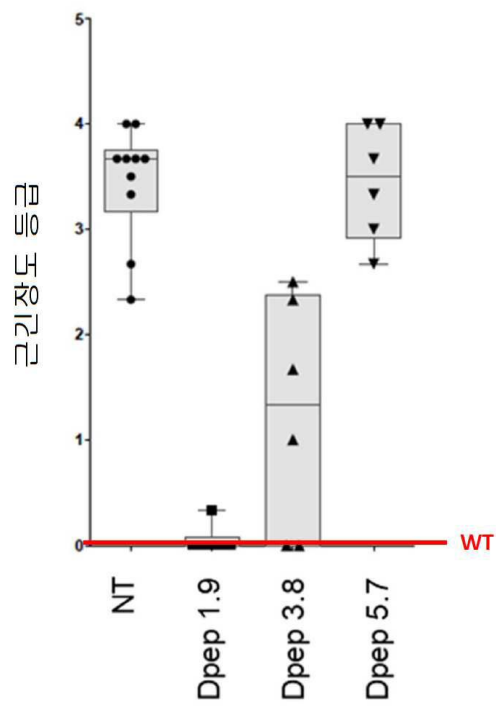
도면6



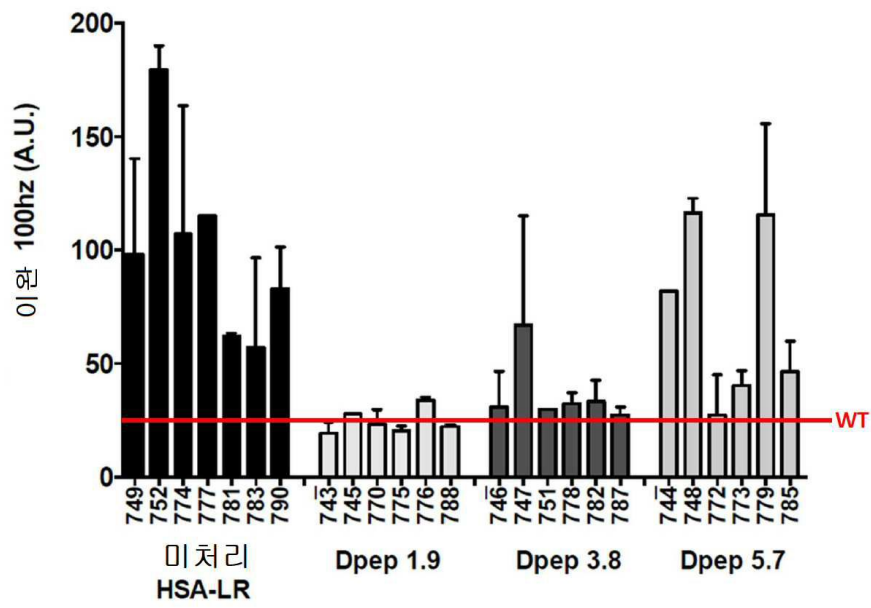
도면7



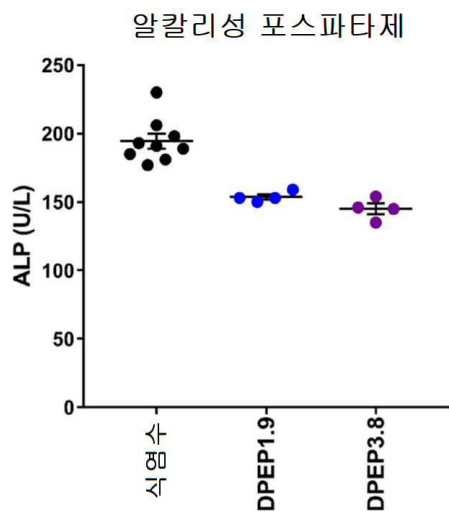
도면8



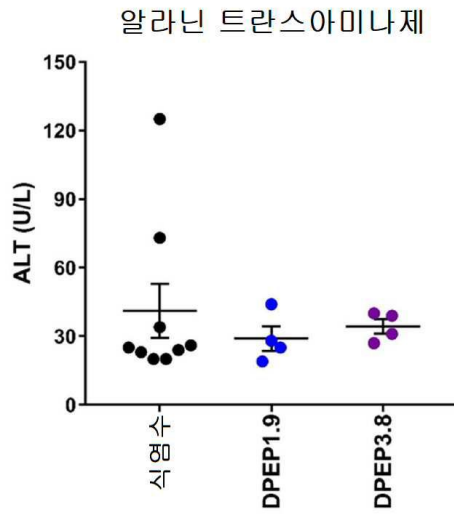
도면9



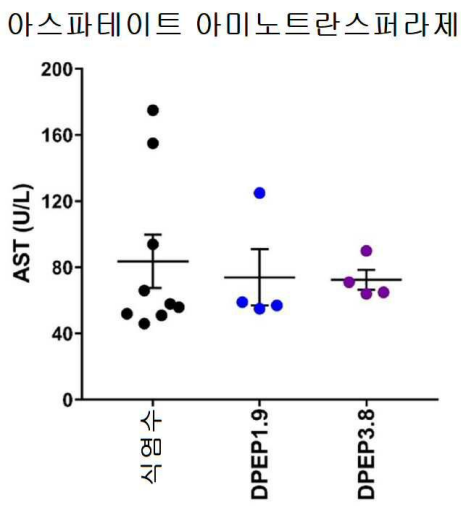
도면10a



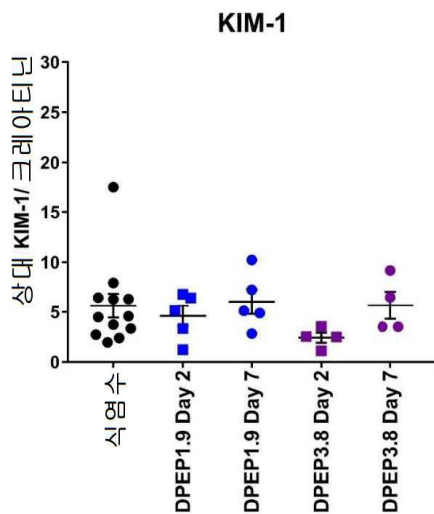
도면10b



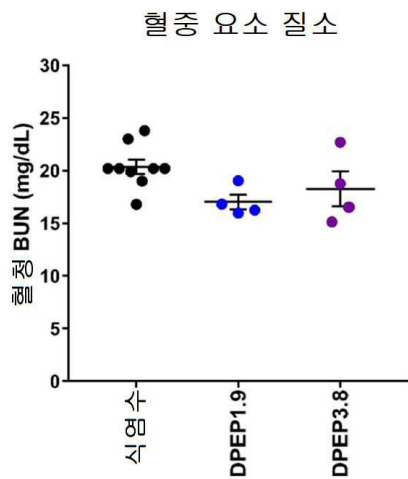
도면10c



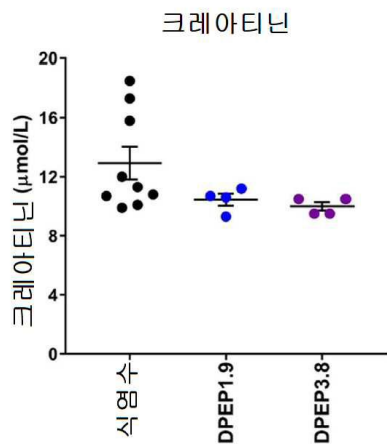
도면11a



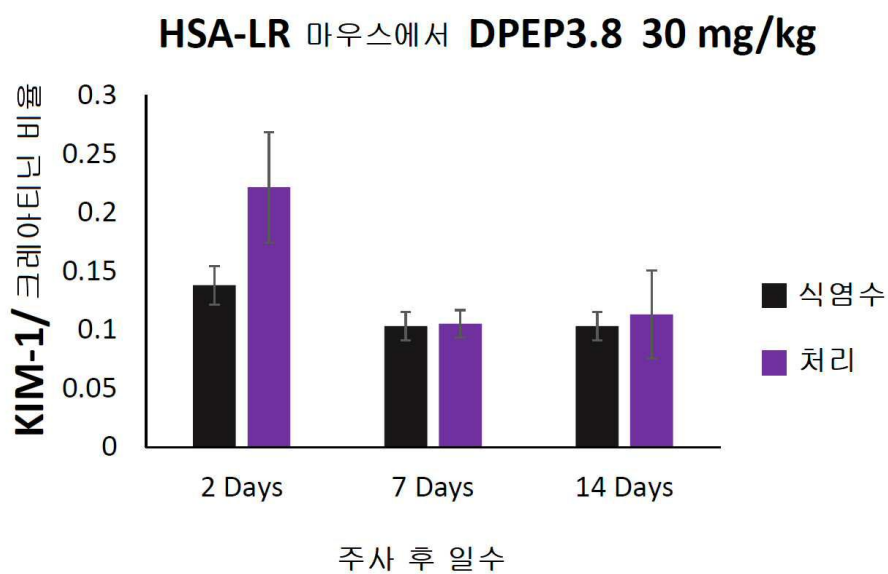
도면11b



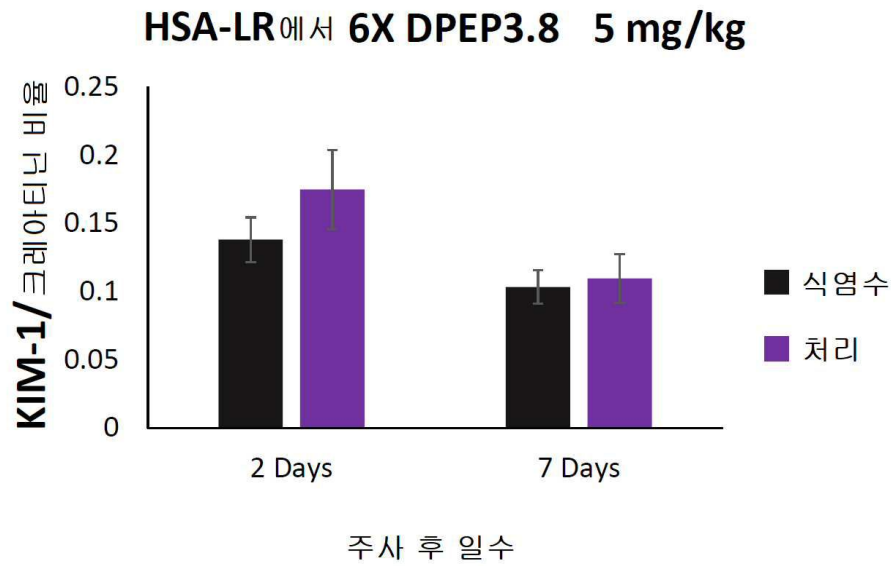
도면11c



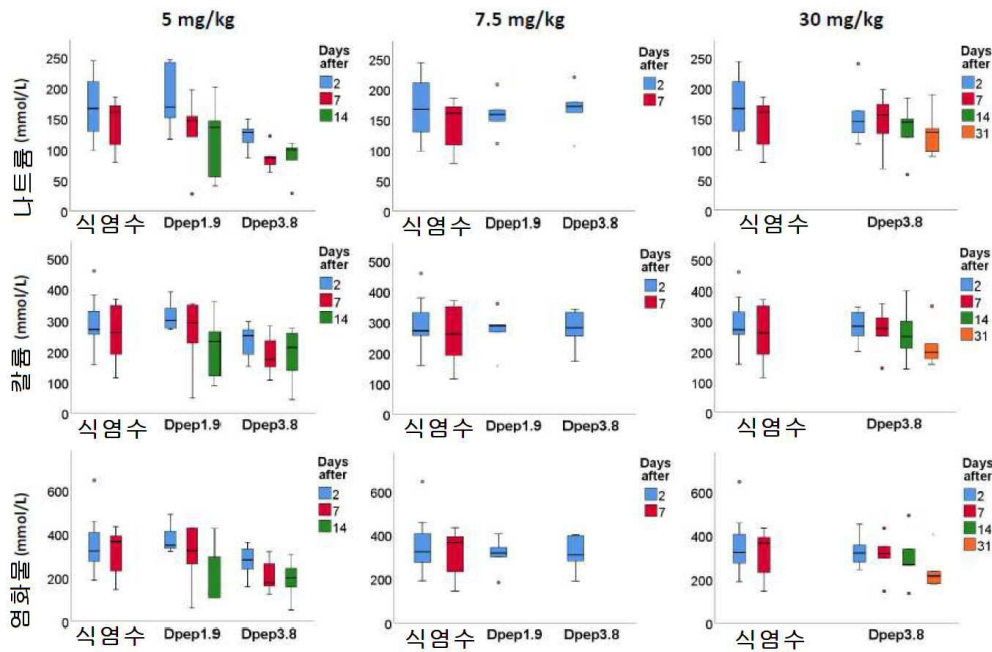
도면12



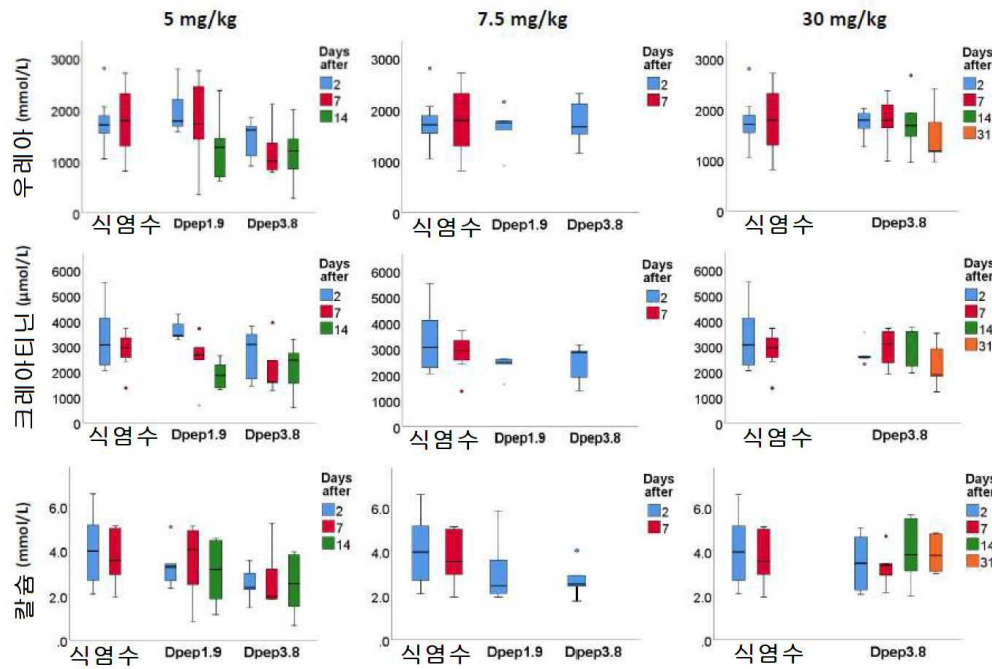
도면13



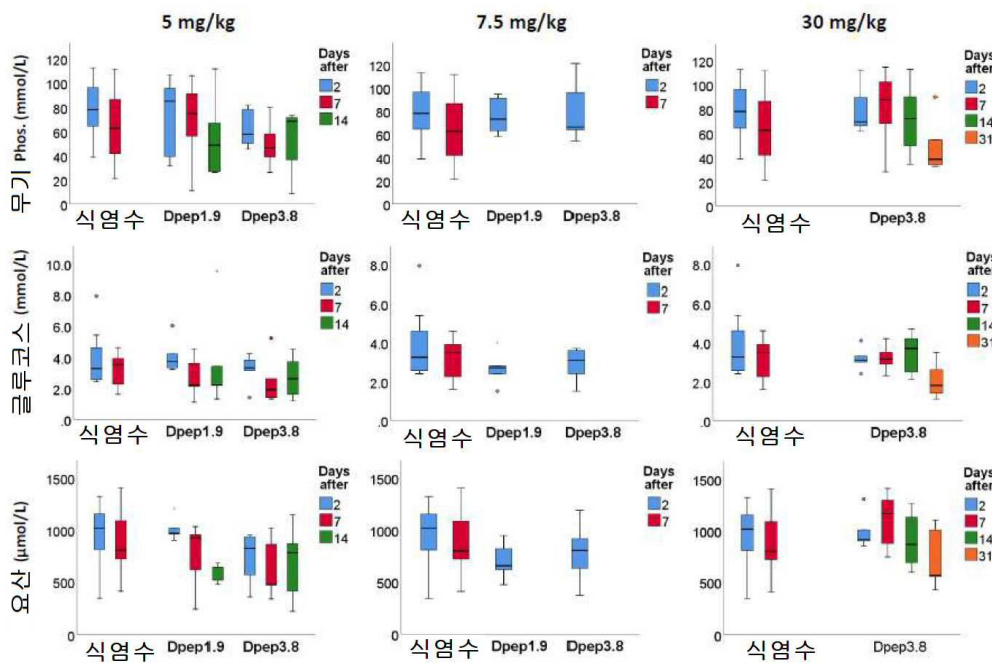
도면14a



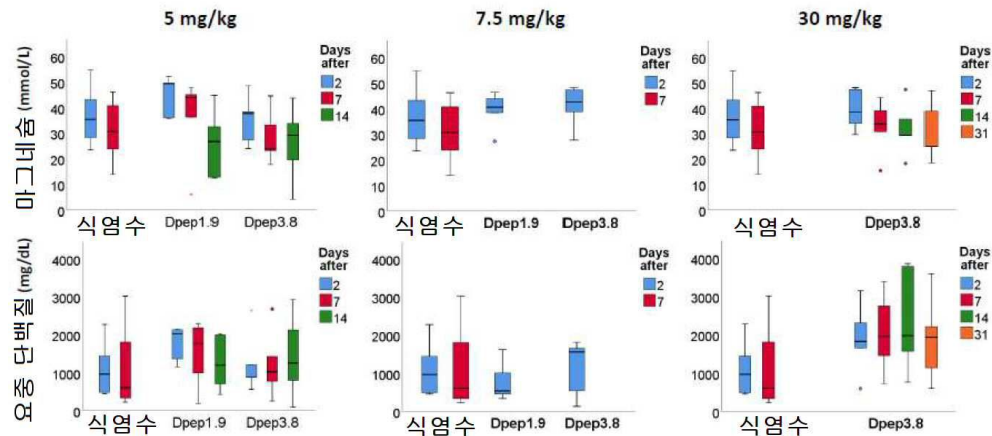
도면14b



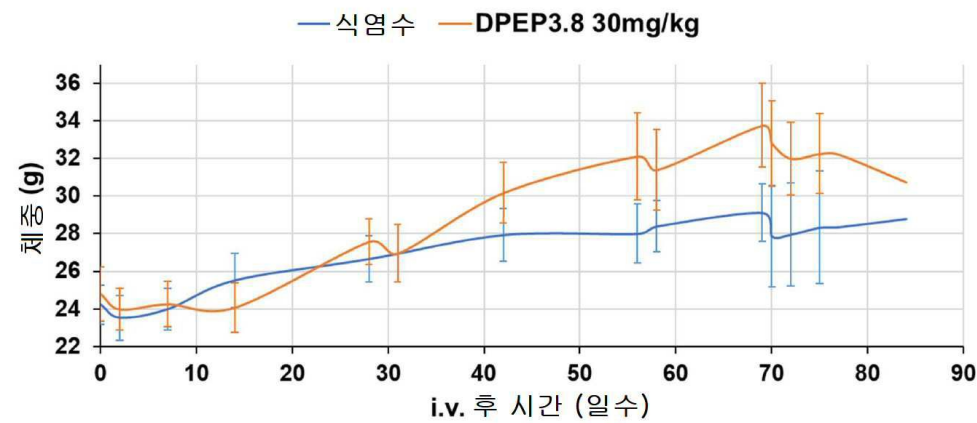
도면14c



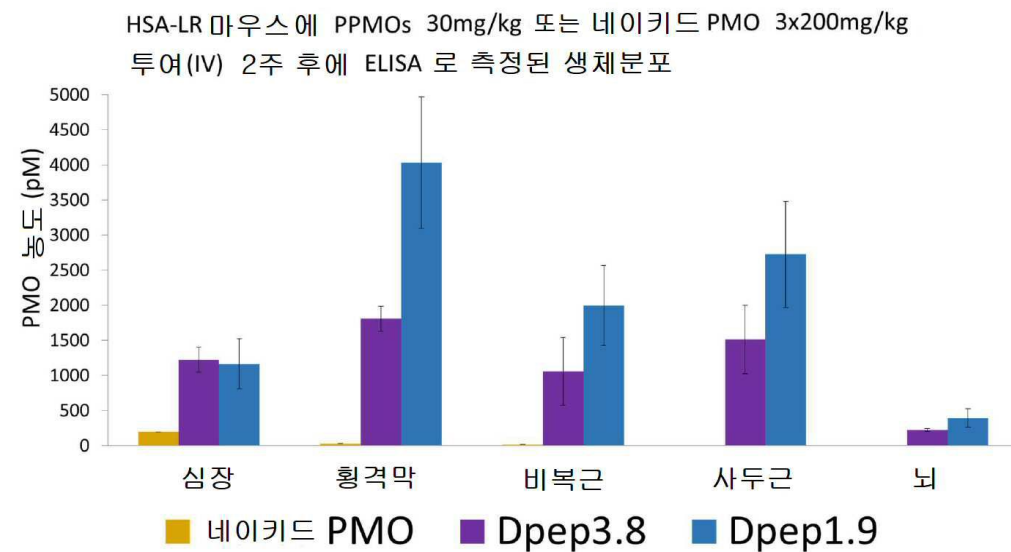
도면14d



도면15

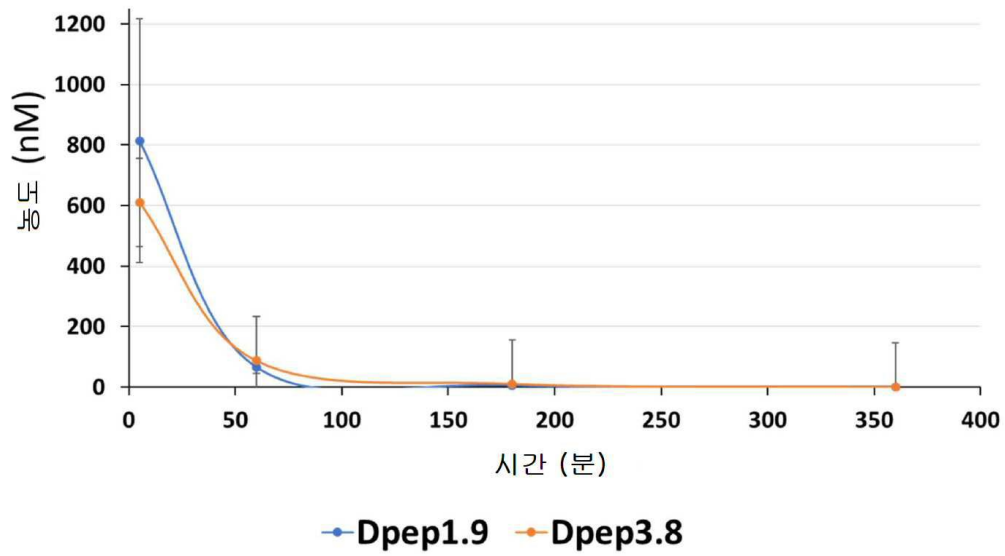


도면16

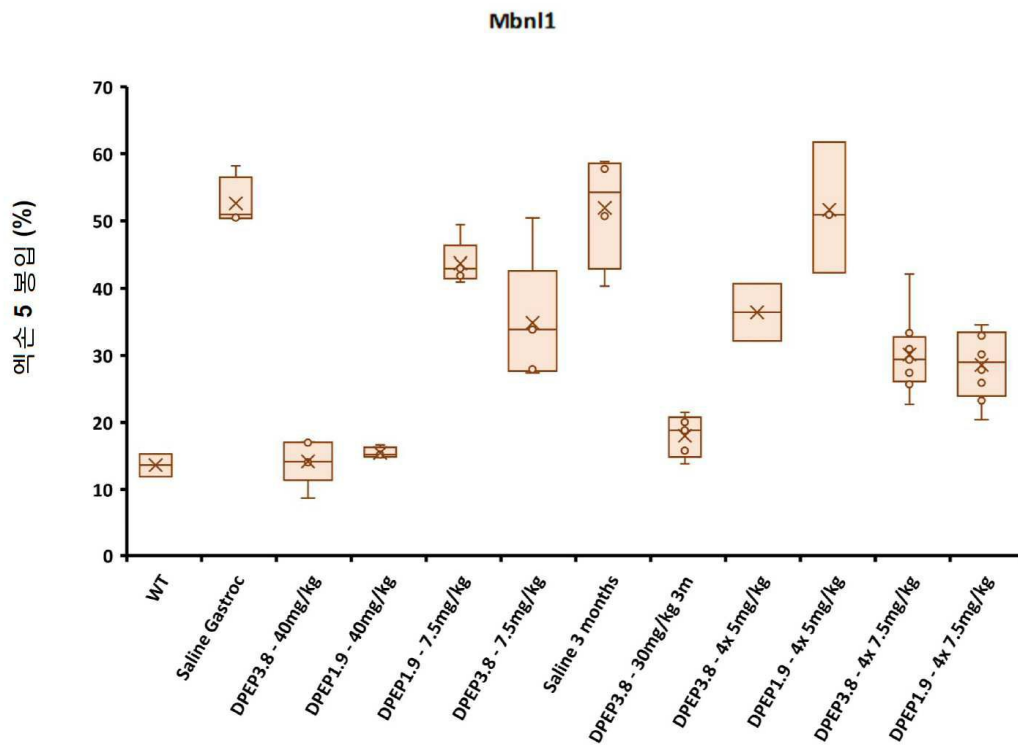


도면17

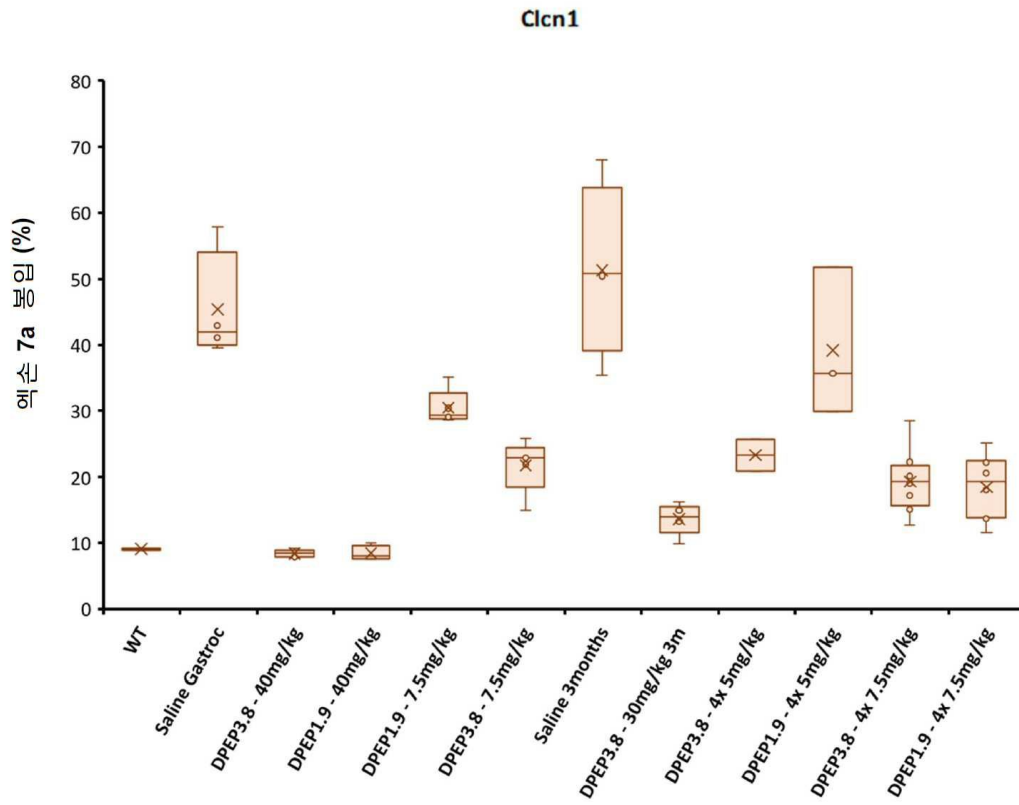
HSA-LR 마우스에서 PPMO, 5mg/kg (IV)의 혈청 중 농도



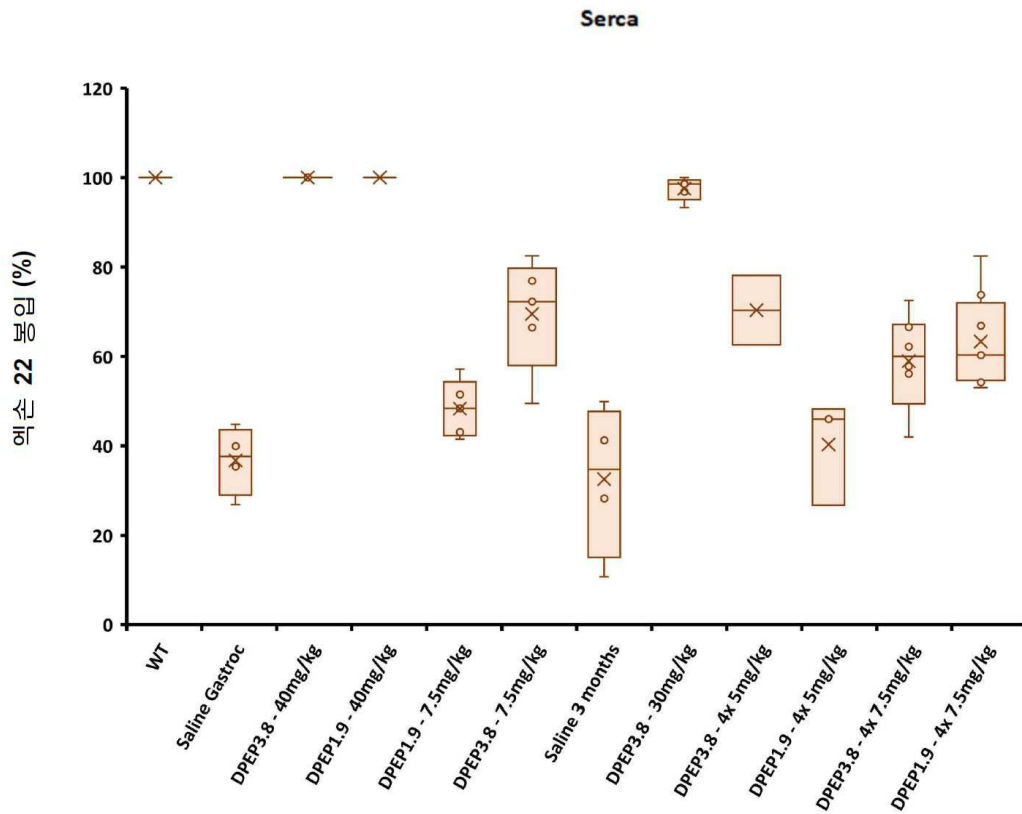
도면18a



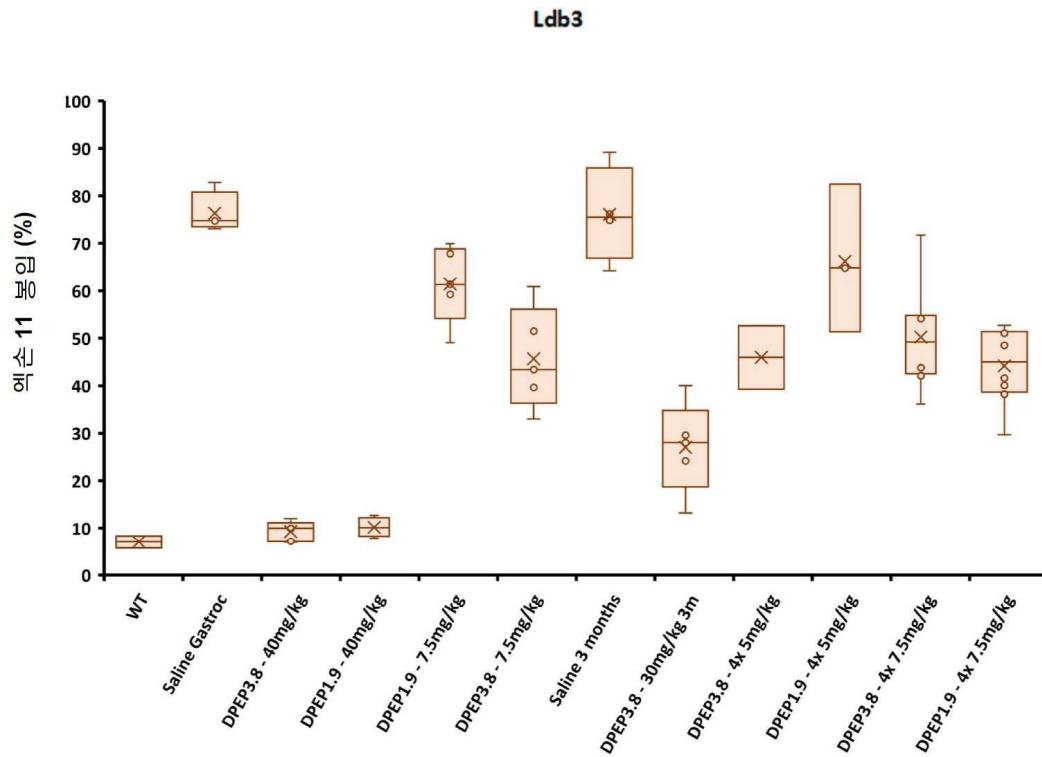
도면18b



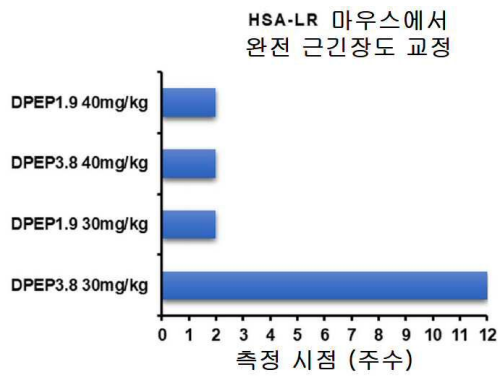
도면18c



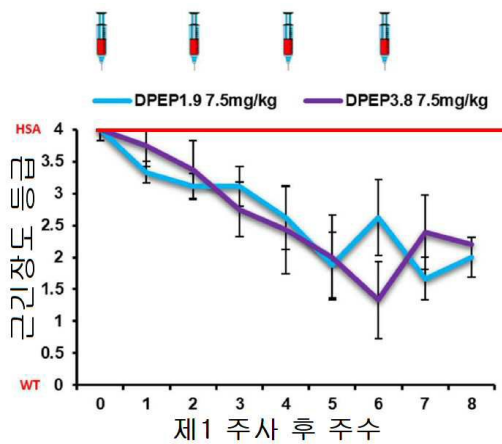
도면18d



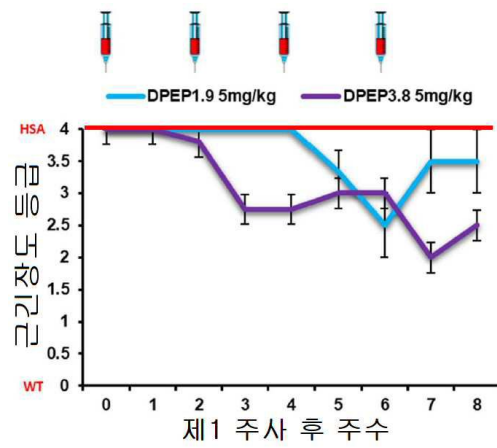
도면19a



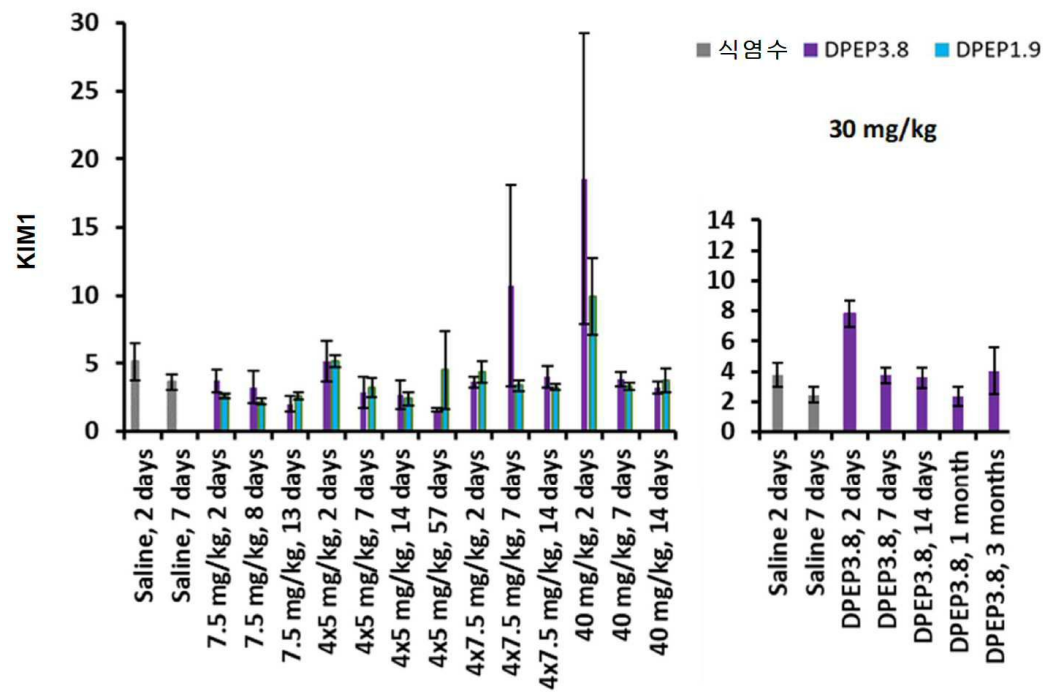
도면19b



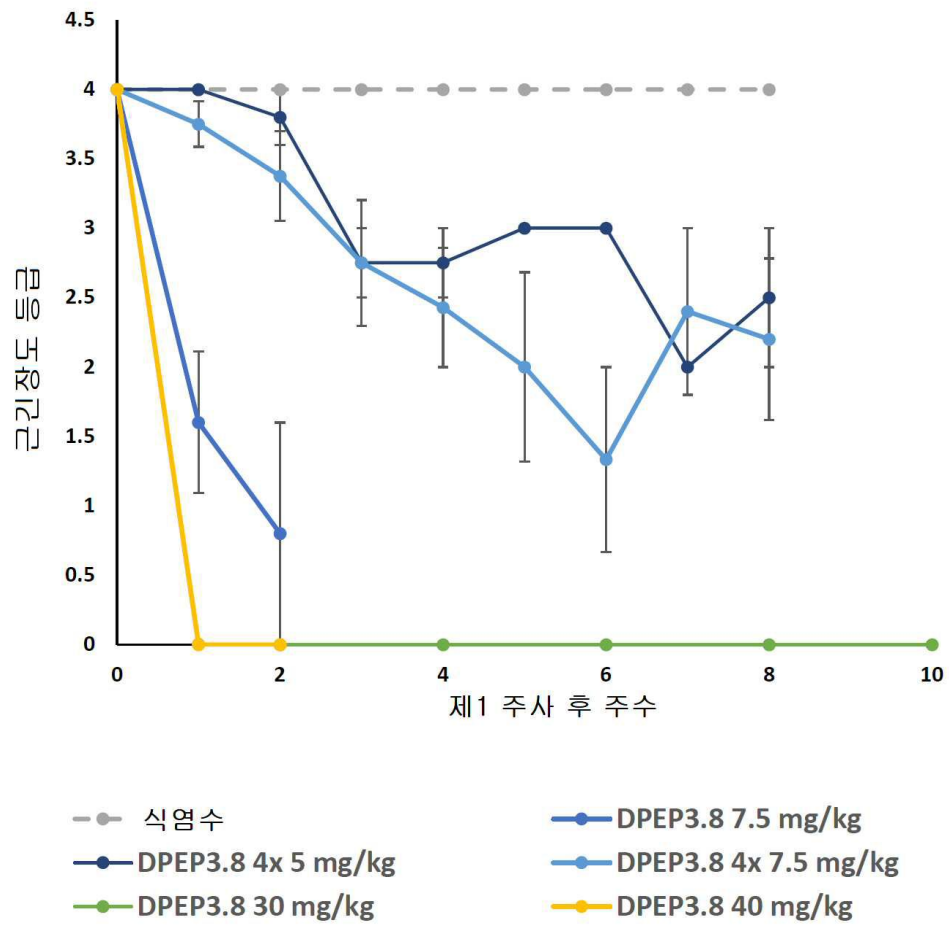
도면19c



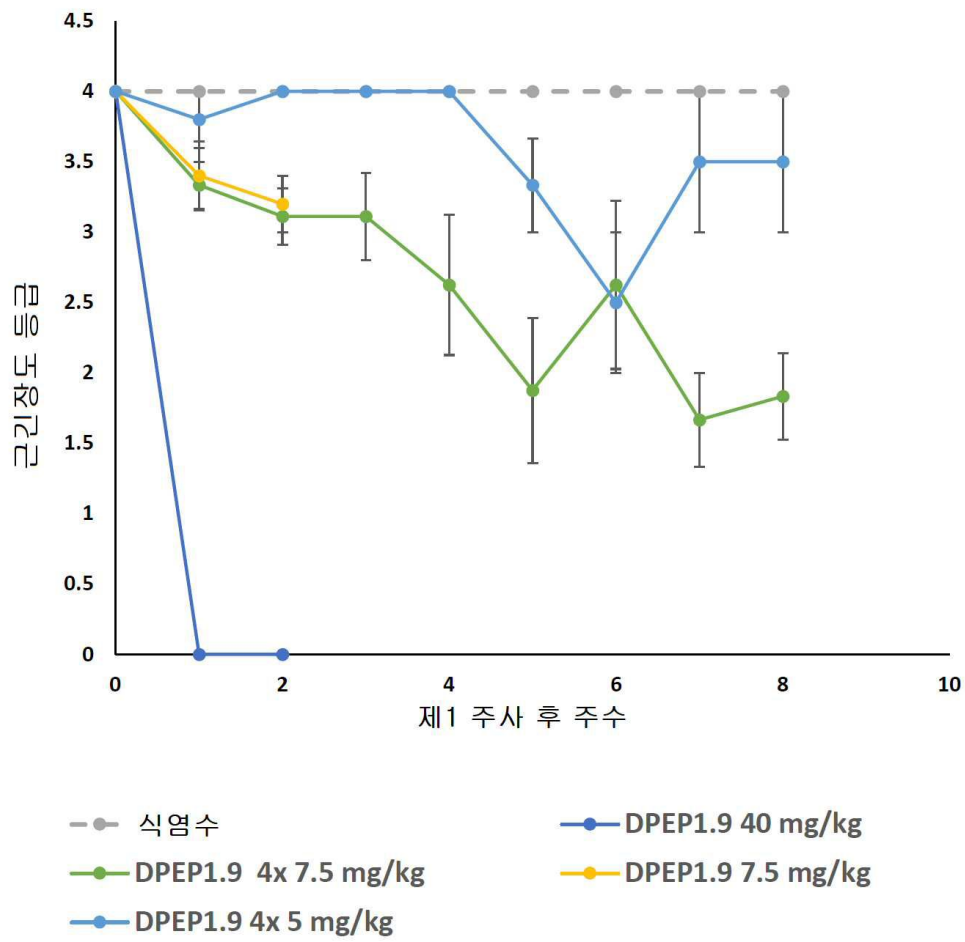
도면20



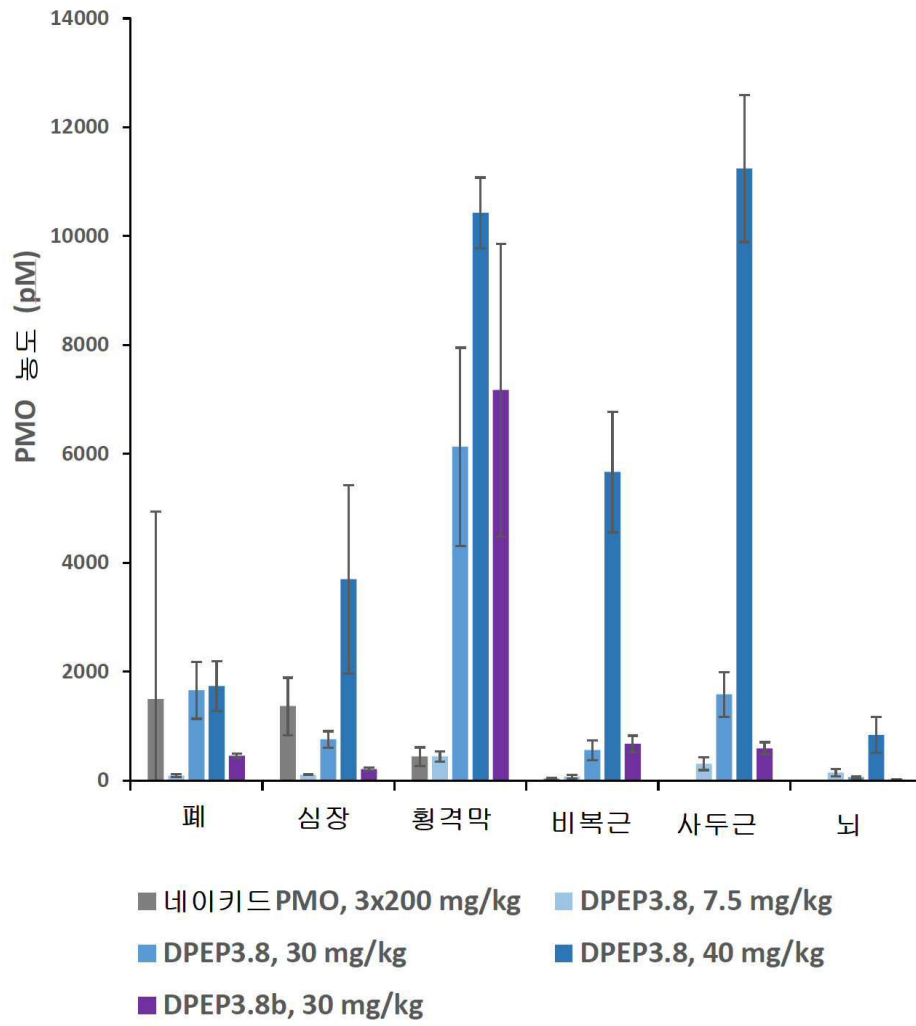
도면21



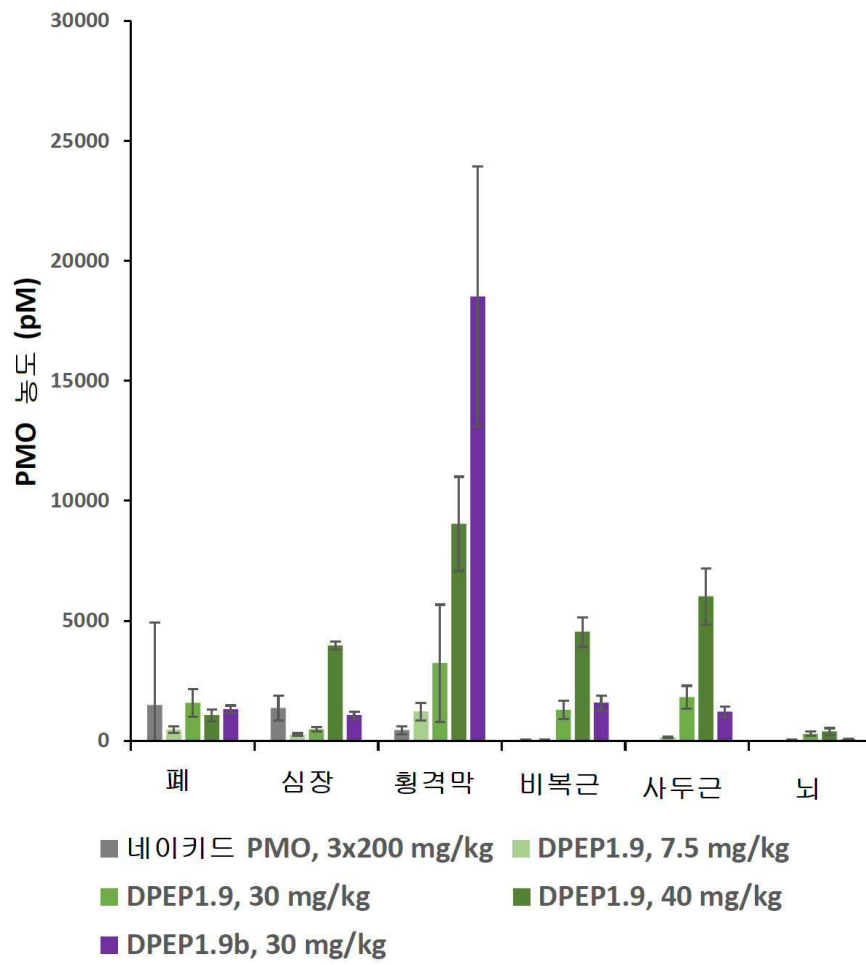
도면22



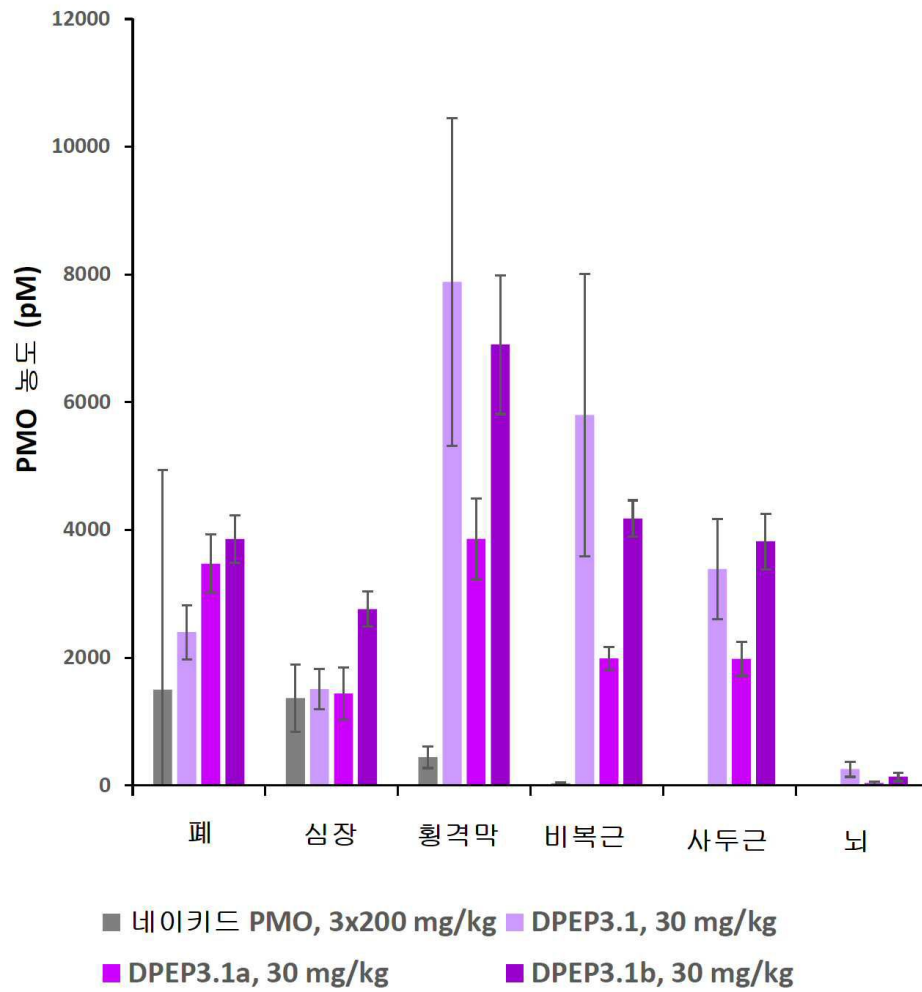
도면23



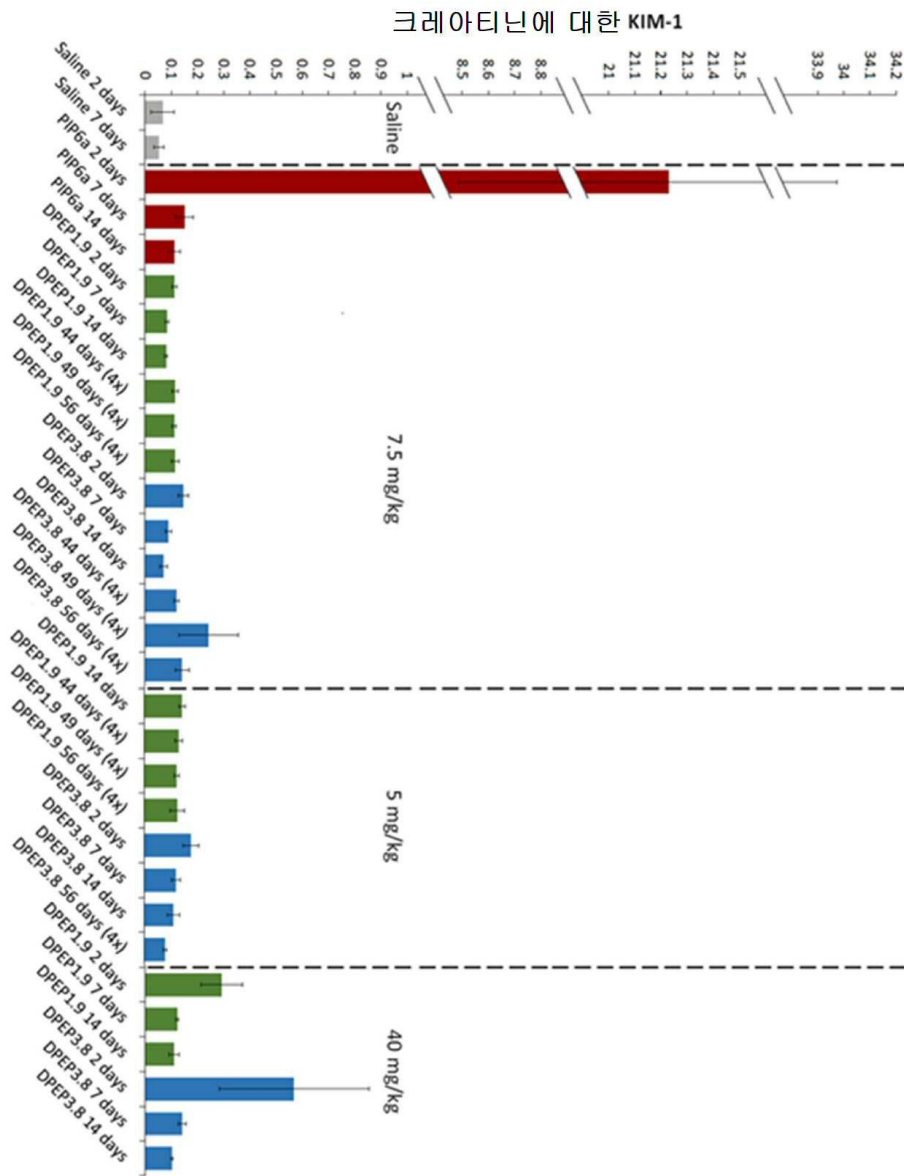
도면24



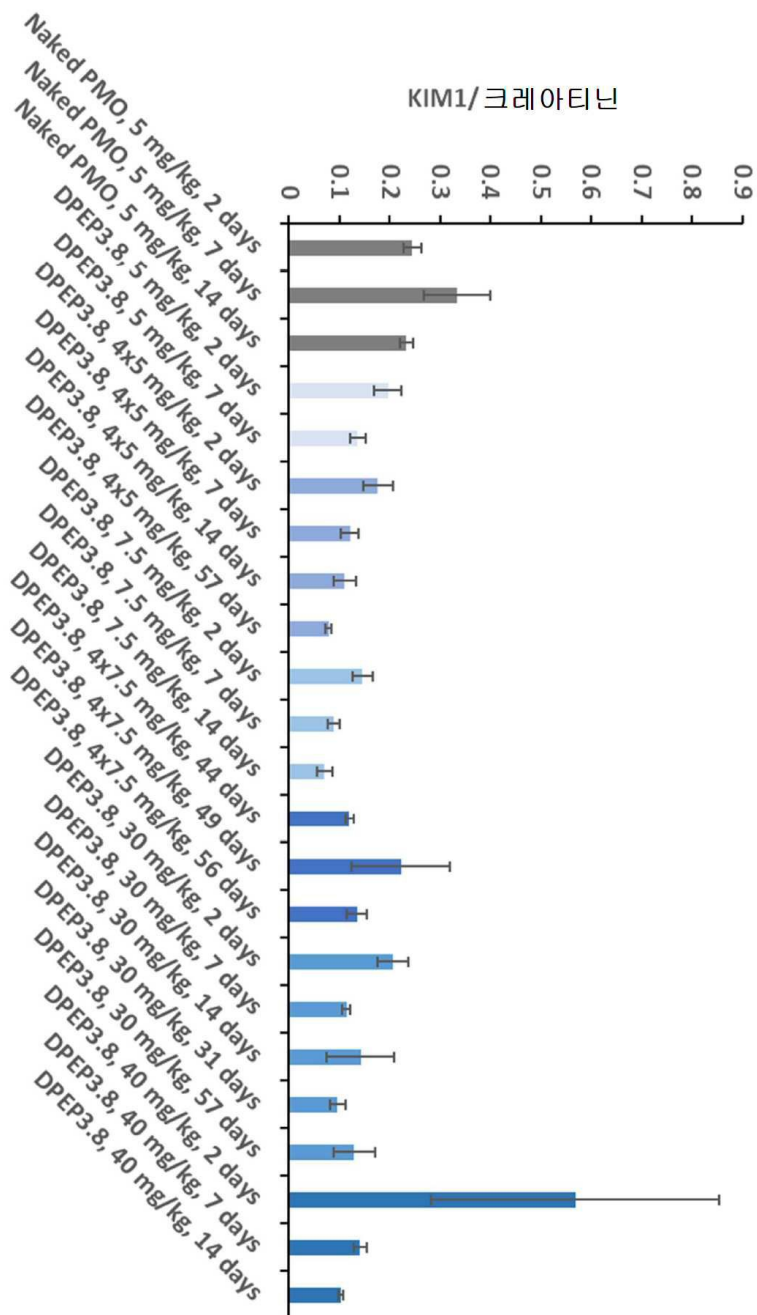
도면25



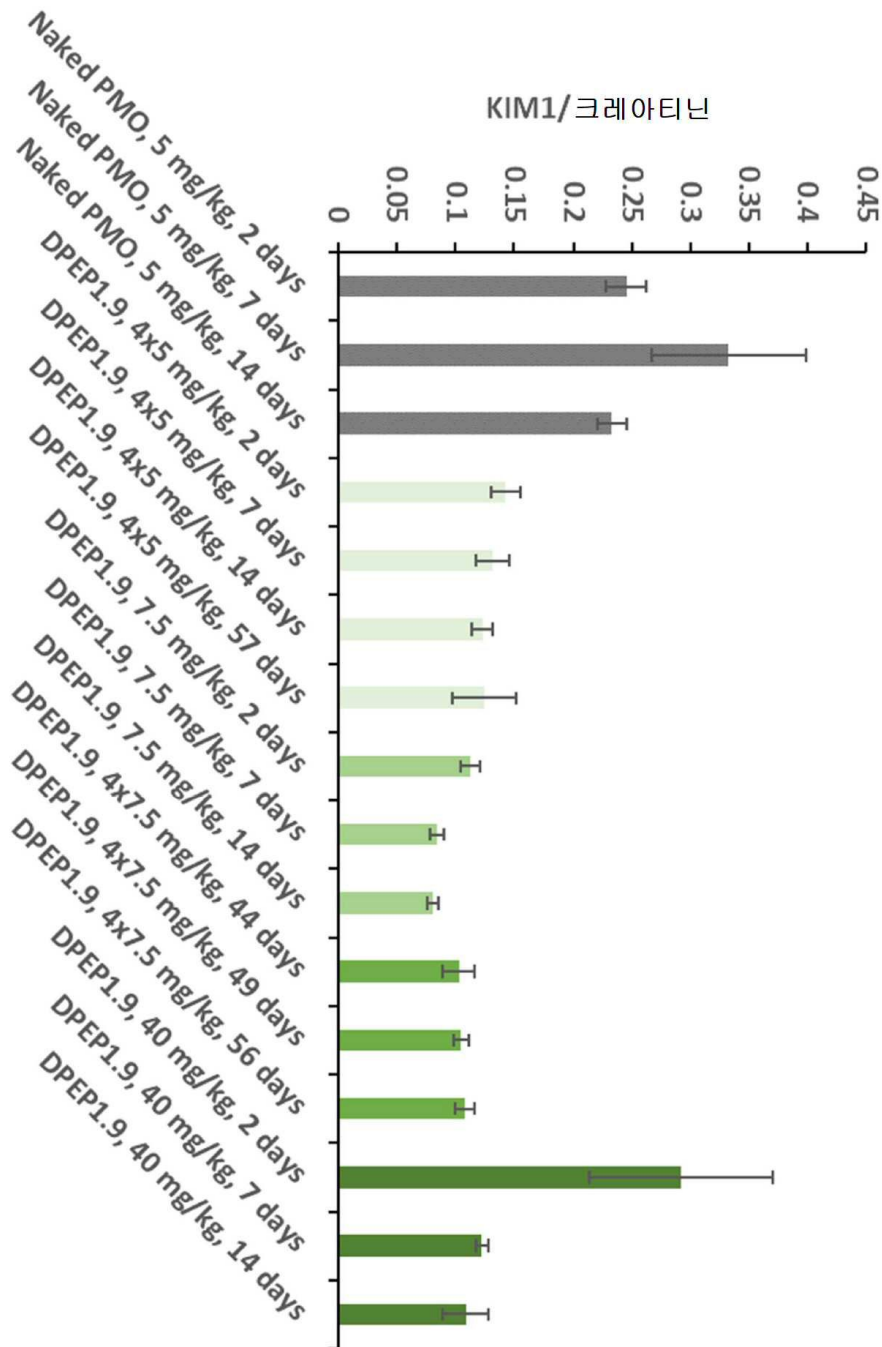
도면26



도면27



도면28



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Oxford University Innovation Limited

<120> Conjugate and uses thereof

<130> P266149GB

<160> 121

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X is bAla

<400> 1

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> X is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> X is bAla

<400> 2

Arg Xaa Arg Xaa Arg

1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

```

<222> (2)..(2)

<223> X is bAla

<400> 3

Arg Xaa Arg Arg

1

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223>

> X is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> X is bAla

<400> 4

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg

1          5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<400> 5

Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg

1          5

<210> 6

```

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <400> 6

Arg Xaa Arg Arg Xaa
 1 5

<210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> x is bAla
 <400> 7

Xaa Arg Xaa Arg
 1

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES

<

222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> x is bAla
 <400> 8
 Arg Xaa His Xaa His
 1 5
 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> x is bAla
 <400> 9
 His Xaa His Xaa Arg
 1 5
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES

 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <400> 10

Arg Xaa Arg His Xaa His Arg

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(5)

<223> x is bAla

<400> 11

Arg Xaa Arg Xaa Xaa His Arg

1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<400> 12

Arg Xaa Arg Arg Xaa His

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<400> 13

His Xaa Arg Arg Xaa Arg

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> x is bAla

<400> 14

His Xaa His Xaa His

1 5

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> x is bAla
 <400> 15
 Xaa His Xaa His
 1
 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <400> 16
 Xaa Arg Xaa Ser Xaa
 1 5
 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222>

```

> (4)..(4)

<223> x is hydroxyproline
<220><221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> x is bAla
<400> 17
Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
1          5
<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> peptide
<220><221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> x is hydroxyproline
<220><221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> x is hydroxyproline
<220><221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> x is bAla
<400> 18
Arg Xaa His Xaa His Xaa
1          5
<210>
19
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> peptide
<220><221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> x is hydroxyproline
<220><221> MOD_RES

```

<222> (5)..(5)

<223> x is hydroxyproline

<400> 19

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 20

Tyr Gln Phe Leu Ile

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 21

Phe Gln Ile Leu Tyr

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 22

Ile Leu Phe Gln Tyr

1 5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 23

Phe Gln Ile Tyr

1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 24

Trp Trp Pro Trp Trp

1 5

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 25

Trp Pro Trp Trp

1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 26

Trp Trp Pro Trp

1

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221>

MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223>
 x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222

> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> x is bAla
 <220><221
 > MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

```

<222> (13)..(13)
<223> x is bAla
<220><221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> x is 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> Artificial Sequence
<220><223> peptide
<220><221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> x is bAla
<220><221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> x is bAla
<220><221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> x is bAla
<220><221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> x is 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> Artificial Sequence
<220>
><223> peptide

```

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220

><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x hydroxyproline

<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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is hydroxyproline

<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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220
 ><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220>
 ><221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223>
 > x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222
 > (14)..(14)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> x is hydroxyproline
 <220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is hydroxyproline

<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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is hydroxyproline

<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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> x is 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> Artificial Sequence

 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)

<223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> x is bAla
 <220><221
 > MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> x is 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> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220>

><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is 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> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> x is 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> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> x is hydroxyproline

<400> 90

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

1 5 10 15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<400> 91

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

1 5 10 15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> x is hydroxyproline

<400> 92

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

1 5 10 15

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221>

> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<400> 93

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Trp Xaa Arg Xaa Arg

1 5 10

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<400> 94

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Pro Trp Trp Xaa Arg Xaa Arg

1 5 10 15

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 21-mer PMO antisense sequence

<400> 95

cagcagcagc agcagcagca g

21

<210> 96

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phosphorothioate probe

<220><221>

> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> labelled with digoxigenin

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> labelled with biotin

<400> 96

ctgctgctgc tgctgctgct g

21

<210> 97

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> D-PEP 5.70

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> glucosylated serine residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> x is bAla

<400> 97

Arg Xaa Arg Xaa Arg Ser Arg Xaa Arg Xaa Arg

1 5 10

<210> 98

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pip6a

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> x is aminohexanoic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223>

x is aminohexanoic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> x is aminohexanoic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> x is aminohexanoic acid

<400> 98

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> 99

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Pip9b2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> x is aminohexanoic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> x is aminohexanoic acid

<400> 99

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

1 5 10 15

Arg

<210> 100

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer Mbn11.F

<400> 100

gctgccaat accaggtcaa c 21

<210> 101

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer Mbn11.R

<400> 101

tggtgggaga aatgctgtat gc 22

<210> 102

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer Clcn1.F

<400> 102

ttcacatcgc cagcatctgt gc 22

<210> 103

<211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer Clcn1.R
 <400> 103
 cacggaacac aaaggcactg aatgt 25
 <210> 104
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer Serca.F
 <400> 104
 gctcatggtc ctcaagatct cac 23
 <210> 105
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer Serca.R
 <400> 105
 gggtcagtgc ctcagctttg 20

 <210> 106
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer Ldb3.F
 <400> 106
 ggaagatgag gctgatgagt gg 22
 <210> 107
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer Ldb3.R
 <400> 107
 tgctgacagt ggtagtgctc tttc 24
 <210> 108

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer BIN.F
 <400> 108
 agaacctcaa tgatgtgctg g 21

<210> 109
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer BIN.R
 <400> 109
 tcgtgttgac tctgatctcg g 21

<210> 110
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer DMD.F
 <400> 110
 ttagaggagg tgatggagca 20

<210> 111
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer DMD.R
 <400> 111
 gatactaagg actccatcgc 20

<210> 112
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer INSR.F
 <400> 112

ccaaagacag actctcagat	20
<210> 113	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer INSR.R	
<400> 113	
aacatcgcca agggacctgc	20
<210> 114	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer LDB3.F	
<400> 114	
gcaagaccct gatgaagaag ctc	23
<210> 115	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer LDB3.R	
<400> 115	
gacagaaggc cggatgctg	19
<210> 116	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer SERCA.F	
<400> 116	
atcttcaagc tccgggcct	20
<210> 117	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer SERCA.R	

<400> 117	
cagctctgcc tgaagatgtg	20
<210> 118	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer SOS1.F	
<400> 118	
cagtaccaca gatgtttgca gtg	23
<210> 119	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer SOS1.R	
<400> 119	
tctggtcgtc ttcgtggagg aa	22
<210> 120	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer TNNT2.F	
<400> 120	
atagaagagg tgggtgaaga gtac	24
<210> 121	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer TNNT2.R	
<400> 121	
gtctcagcct ctgcttcagc atcc	24