



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0090157
(43) 공개일자 2021년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) A61K 47/64 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 47/645 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2021-7007003
(22) 출원일자(국제) 2019년08월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년03월08일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2019/052247
(87) 국제공개번호 WO 2020/030927
국제공개일자 2020년02월13일

(30) 우선권주장
1812972.6 2018년08월09일 영국(GB)

(71) 출원인
옥스포드 유니버시티 이노베이션 리미티드
영국 옥섹스2 0제이비 옥스포드 보틀리 웨스트 웨이 3 벅스턴 코트

유나이티드 킹덤 리서치 앤드 이노베이션
영국 에스엔2 1에프엘 스윈던 노쓰 스타 애비뉴 폴라리스 하우스

(72) 발명자
우드 매튜
영국 옥섹스2 6에이치와이 옥스포드 옥스퍼드셔 렉포드 로드 13

만자노 라헬
스페인 자라고자 50692 빌라라파 라스 에스큐엘라스 스트리트 24
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
이내영, 한윤호, 류종우

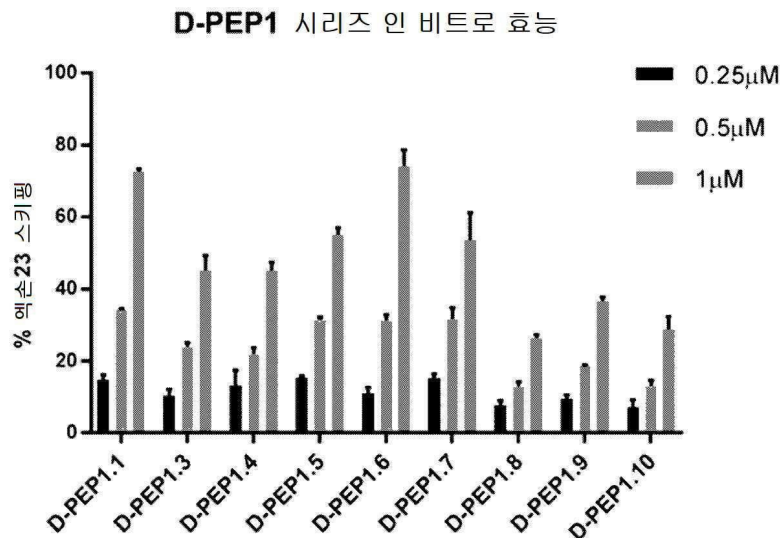
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 세포 투과 펩티드

(57) 요약

본 발명은 펩티드, 구체적으로 세포-투과 펩티드, 및 이러한 세포-투과 펩티드와 치료용 분자의 접합체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 치료 방법에서 또는 약제로서, 특히 유전자 질환, 구체적으로 근이영양증 예컨대 뒤시엔스 근이영양증의 치료에서 이러한 펩티드 또는 접합체의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 48/0008 (2013.01)

A61P 21/00 (2018.01)

C12N 15/87 (2013.01)

C07K 2319/10 (2013.01)

(72) 발명자

고드프리 캐틀라인

영국 오엑스2 8피피 올버코트 옥스포드셔 메도우
프로스펙트 40

맥로리 그라함

영국 오엑스4 4에이치에스 옥스포드 옥스포드셔 로
즈힐 10

라즈 리차드

영국 더블유7 3제이엔 런던 그레이터 런던 론 가든
즈 27 그라운드 플로어 플랫

게이트 마이클

영국 씨비1 8에이피 캠브리지 캠브리지셔 세인트
마가렛스 스퀘어 1에이

알주마노브 앤드리

영국 씨비21 5디티 캠브리지 캠브리지셔 폴번 윈드
밀 레인 1

오도너번 리즈

영국 씨비2 0큐에이치 캠브리지 캠브리지셔 엠알씨
분자생물학연구소

하젤 가렛

영국 오엑스1 3피티 옥스포드 옥스포드셔 세링턴
로드 세링턴 빌딩 생리, 해부, 유전학부

홀랜드 에셀링

영국 오엑스2 6큐유 옥스포드 옥스포드셔 플래터
드라이브 79

바렐라 미구엘

영국 오엑스1 3큐엑스 옥스포드 옥스포드셔 사우스
파크스 로드 엘지씨 빌딩 소아학부

명세서

청구범위

청구항 1

40개 이하의 아미노산 잔기의 총 길이를 갖는 펩티드로서,
 각각 적어도 4개의 아미노산 잔기를 포함하는, 2개 이상의 양이온성 도메인 ; 및
 각각 적어도 3개의 아미노산 잔기를 포함하는, 하나 이상의 소수성 도메인을 포함하고,
 인공 아미노산 잔기를 함유하지 않는 것인 펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 펩티드는 아미노헥사노산 (X) 잔기를 함유하지 않고, 바람직하게는 상기 펩티드는 6-아미노헥사노산 잔기를 함유하지 않는 것인 펩티드.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 펩티드는 천연 아미노산 잔기로 구성되는 것인 펩티드.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 각 양이온성 도메인은 4 내지 12개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 4 내지 7개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는 것인 펩티드.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 각 양이온성 도메인은 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%의 양이온성 아미노산을 포함하는 것인 펩티드.

청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 각 양이온성 도메인은 다수의 양이온성 아미노산, 바람직하게는 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%의 양이온성 아미노산을 포함하는 것인 펩티드.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘, 베타-알라닌, 히드록시프롤린 및/또는 세린 잔기를 포함하고, 바람직하게는 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘, 베타-알라닌, 히드록시프롤린 및/또는 세린 잔기로 구성되는 것인 펩티드.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 각 양이온성 도메인은 아르기닌 풍부이고/이거나 히스티딘 풍부이며, 바람직하게는 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 포함하는 것인 펩티드.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함하는 것인 펩티드.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 양이온성 도메인은 RBRBR (서열 번호: 1), RBRBR (서열 번호: 2), RBRR (서열 번호: 3), RBRBR (서열 번호: 4), RRBRBR (서열 번호: 5), RBRBR (서열 번호: 6), BRBR (서열 번호: 7), RBHBH (서열 번호: 8), HBHBR (서열 번호: 9), RBRHBHR (서열 번호: 10), RBRBBHR (서열

번호: 11), RBRRBH (서열 번호: 12), HBRRBR (서열 번호: 13), HBHBH (서열 번호: 14), BHBH (서열 번호: 15), BRBSB (서열 번호: 16), BRB[Hyp]B (서열 번호: 17), R[Hyp]H[Hyp]HB (서열 번호: 18), R[Hyp]RR[Hyp]R (서열 번호: 19)의 서열들 중 하나 또는 이들의 임의의 조합을 포함하고;

바람직하게는 각 양이온성 도메인은 RBRRBRR (서열 번호: 1), RBRBR (서열 번호: 2), RBRR (서열 번호: 3), RBRBR (서열 번호: 4), RRBRBR (서열 번호: 5), RBRRB (서열 번호: 6), BRBR (서열 번호: 7), RBHBH (서열 번호: 8), HBHBR (서열 번호: 9), RBRHBHR (서열 번호: 10), RBRBBHR (서열 번호: 11), RBRRBH (서열 번호: 12), HBRRBR (서열 번호: 13), HBHBH (서열 번호: 14), BHBH (서열 번호: 15), BRBSB (서열 번호: 16), BRB[Hyp]B (서열 번호: 17), R[Hyp]H[Hyp]HB (서열 번호: 18), R[Hyp]RR[Hyp]R (서열 번호: 19)의 서열들 중 하나 또는 이들의 임의의 조합으로 구성되는 것인 펩티드.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 각 소수성 도메인은 3-6개 아미노산의 길이를 가지며, 바람직하게는 각 소수성 도메인은 5개 아미노산의 길이를 갖는 것인 펩티드.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 각 소수성 도메인은 다수의 소수성 아미노산 잔기를 포함하고, 바람직하게는 각 소수성 도메인은 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 100%의 소수성 아미노산을 포함하는 것인 펩티드.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 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 구성되는 것인 펩티드.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드는 1개의 소수성 도메인을 포함하는 것인 펩티드.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 또는 각 소수성 도메인은 YQFLI (서열 번호: 20), FQILY (서열 번호: 21), ILFQY (서열 번호: 22), FQIY (서열 번호: 23), WWW, WWPWW (서열 번호: 24), WPWW (서열 번호: 25), WWPW (서열 번호: 26)의 서열들 중 하나 또는 이들의 임의의 조합을 포함하고; 바람직하게는 상기 또는 각 소수성 도메인은 YQFLI (서열 번호: 20), FQILY (서열 번호: 21), ILFQY (서열 번호: 22), FQIY (서열 번호: 23), WWW, WWPWW (서열 번호: 24), WPWW (서열 번호: 25), WWPW (서열 번호: 26)의 서열들 중 하나 또는 이들의 임의의 조합으로 구성되는 것인 펩티드.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인 및 1개의 소수성 도메인으로 구성되고, 바람직하게는 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성되는 것인 펩티드.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된 YQFLI (서열 번호: 20), FQILY (서열 번호: 21), ILFQY (서열 번호: 22), FQIY (서열 번호: 23), WWW, WWPWW (서열 번호: 24), WPWW (서열 번호: 25) 및 WWPW (서열 번호: 26)으로부터 선택된 서열을 포함하는 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성되고, 상기 각 양이온성 아암 도메인은 RBRRBRR (서열 번호: 1), RBRBR (서열 번호: 2), RBRR (서열 번호: 3), RBRBR (서열 번호: 4), RRBRBR (서열 번호: 5), RBRRB (서열 번호: 6), BRBR (서열 번호: 7), RBHBH (서열 번호: 8), HBHBR (서열 번호: 9), RBRHBHR (서열 번호: 10), RBRBBHR (서열 번호: 11), RBRRBH (서열 번호: 12), HBRRBR (서열 번호: 13), HBHBH (서열 번호: 14), BHBH (서열 번호: 15), BRBSB (서열 번호: 16), BRB[Hyp]B (서열 번호: 17), R[Hyp]H[Hyp]HB (서열 번호: 18) 및 R[Hyp]RR[Hyp]R (서열 번호:

19)로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 펩티드.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩티드는 RBRBRRFQILYRBRBR (서열 번호: 27), RBRBRRYQFLIRBRBR (서열 번호: 31), RBRBRRILFQYRBRBR (서열 번호: 32), RBRBRFQILYRBRBR (서열 번호: 35), RBRBRRFQILYRBHBH (서열 번호: 37), RBRBRRFQILYHBHBR (서열 번호: 38), RBRBRFQILYRBHBH (서열 번호: 44)의 서열들 중 하나로 구성되는 것인 펩티드.

청구항 19

치료용 분자에 공유 결합된 청구항 1 내지 18 중 어느 한 항의 펩티드를 포함하는 집합체.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 링커를 추가로 포함하고, 바람직하게는 상기 링커는 상기 집합체를 상기 치료용 분자에 연결하는 것인 집합체.

청구항 21

청구항 19 또는 20에 있어서, 상기 링커는 G, BC, XC, C, GGC, BBC, BXC, XBC, X, XX, B, BB, BX 및 XB로부터 선택되는 것인 집합체.

청구항 22

청구항 19 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료용 분자는 핵산, 펩티드 핵산, 안티센스 올리고뉴클레오티드 (예: PNA, PMO), 짧은 간섭 RNA, 마이크로 RNA, 펩티드, 사이클릭 펩티드, 단백질, 의약품 또는 약물로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 치료용 분자는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것인 집합체.

청구항 23

약제로 사용하기 위한, 청구항 19 내지 22 중 어느 한 항에 따른 집합체.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 신경근계 또는 근골격계의 질환, 바람직하게는 신경근계 또는 근골격계의 유전자 질환, 바람직하게는 신경근계 또는 근골격계의 유전성 유전자 질환, 바람직하게는 신경근계 또는 근골격계의 유전성 X-연관 유전자 질환의 치료에 사용하기 위한 집합체.

청구항 25

청구항 23 또는 24에 있어서, DMD 치료에 사용하기 위한 집합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 펩티드, 구체적으로 세포-투과 펩티드 (cell-penetrating peptides), 및 이러한 세포-투과 펩티드와 치료용 분자의 집합체 (conjugates)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 치료 방법에서 또는 약제로서, 특히 유전자 질환, 구체적으로 근이영양증 (muscular dystrophy), 예컨대 뒤시엔느 근이영양증 (Duchenne muscular dystrophy: DMD)의 치료에서 이러한 펩티드 또는 집합체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 핵산 약물은 유전체 의약품 (genomic medicines)으로서, 인간의 건강관리를 혁신할 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 연구에 따르면 이러한 치료제는 신경근 질환을 포함한 광범위한 질병 영역에 적용될 수 있다. 신경근 질환인 뒤시엔느 근이영양증 (DMD)에서 pre-mRNA 스플라이싱을 조절하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드-기반 방법의 적용은 이러한 단일유전자 질환 (monogenic disorder)을 정밀 의학 발전의 선두에 두었다.

[0003] 그러나 이러한 유망한 안티센스 치료제의 치료적 개발은 세포-투과성이 충분하지 않고 분포 특성이 떨어진다는

제한이 있었고, 이는 DMD에서 근육 조직 기질의 대량 및 분산된 특성에 의해 더욱 강조되는 문제이다.

- [0004] DMD는 3500명의 남아 신생아 중 1명이 이환된다. 이러한 심각한 X-연관 열성 질환은 디스트로핀 (dystrophin) 단백질을 코딩하는 DMD 유전자의 돌연변이로 인해 발생한다. 상기 질환은 호흡 부전 및 심장 합병증의 발생과 함께 점진적인 근육 퇴화 및 소모를 특징으로 하고, 궁극적으로 조기 사망으로 이어진다. DMD의 기초가 되는 돌연변이의 대부분은 디스트로핀 단백질의 부재를 초래하는 오픈 리딩 프레임에서의 조기 절단을 유도하는 게놈 프레임의 결실 (genomic out-of-frame deletions)이다.
- [0005] 엑손 스킵핑 요법 (exon skipping therapy)은 스플라이스 스위칭 안티센스 올리고뉴클레오티드 (splice switching antisense oligonucleotides: SSO)를 활용하여 DMD 전사체의 특정 영역을 표적으로 하여, 개별 엑손의 배제를 유도하여, 비정상적인 리딩 프레임을 복구하고, 결과적으로 내부 결실되었지만 아직 부분적으로 기능하는 디스트로핀 단백질을 생성한다. DMD에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 엑손 스킵핑 요법의 의심할 여지없는 잠재력에도 불구하고, 이 접근법의 성공적인 적용은 현재 골격근의 상대적으로 비효율적인 표적화 뿐만 아니라 심장과 같은 다른 이환 조직에 대한 단일-가닥 올리고뉴클레오티드의 불충분한 표적화로 인해 제한된다.
- [0006] 2016년 9월에, 미국 식품의약국 (the Food and Drug Administration: FDA)은 엑손 51의 스플라이싱을 조절하기 위한 단일-가닥 올리고뉴클레오티드인 '에테플리센 (eteplirsen)'에 대해 신속 승인하였다. 이는 미국에서 스플라이싱을 조절하는 최초 승인된 올리고뉴클레오티드를 예고했지만, 디스트로핀 복구 수준이 정상 디스트로핀 수준의 대략 1%로 실망스러웠다. 대립형질 질환 (allelic disorder)인 베커 근이영양증 (Becker muscular dystrophy)과의 비교 및 mdx 마우스 실험에서, 운동으로 인한 손상으로부터 근육을 보호하기 위해 야생형의 적어도 ~15%의 동종 횡문근형질막 디스트로핀 발현이 필요한 것으로 나타났다.
- [0007] 그러므로 파괴적인 유전자 질환, 예컨대 DMD에 대해 더 효과적인 요법을 제공하기 위해 안티센스 올리고뉴클레오티드의 전달을 개선해야 하는 강력하고 시급한 요구가 있다.
- [0008] 바이러스를 전달 비히클 (delivery vehicles)로서 사용하는 것이 제시되었지만, 이는 바이러스 외피 단백질의 면역독성과 잠재적인 발암 효과로 인해 사용이 제한된다. 대안으로서, 다양한 비-바이러스 전달 벡터가 개발되었으며, 그 중에서 펩티드가 이의 작은 크기, 표적화 특이성 및 큰 바이오-카고 (bio-cargoes)의 모세관 전달 (trans-capillary delivery) 능력으로 인해 가장 유망한 것으로 나타났다. 몇 가지 펩티드는 단독으로 세포를 투과하거나, 또는 바이오-카고를 운반하는 능력이 보고되었다.
- [0009] 수년 동안, 올리고뉴클레오티드 유사체를 세포막을 가로질러 효과적으로 운반하여 세포핵 내에 이의 pre-mRNA 표적 부위에 도달시킴으로써 이러한 올리고뉴클레오티드 유사체의 세포 전달을 증진시키기 위해, 세포-투과 펩티드 (cell-penetrating peptides: CPP)를 SSO (구체적으로, 전하 중성 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고머 (phosphorodiamidate morpholino oligomers: PMO) 및 펩티드 핵산 (peptide nucleic acids: PNA))에 접합시켰다. 소정의 아르기닌-풍부 CPP에 접합된 PMO 치료제 (P-PMO 또는 펩티드-PMO로 알려짐)는 DMD의 mdx 마우스 모델에서 전신 투여 후에 골격근에서 디스트로핀 생성을 향상시킬 수 있음이 밝혀졌다.
- [0010] 특히, PNA/PMO 내재화 펩티드 (PNA/PMO internalization peptides: Pips)가 개발되었고, 이는 2개의 아르기닌-풍부 서열들이 중양의 짧은 소수성 서열에 의해 분리되는 아르기닌-풍부 CPP이다. 이러한 'Pip' 펩티드는 초기에 PNA 카고에 부착하여, 높은 수준의 엑손 스킵핑을 유지하면서 혈청 안정성을 개선하도록 설계되었다. 이러한 펩티드들의 추가 유도체가 PMO의 접합체로 설계되었고, 이는 마우스에서 전신 투여 후에 중요하게는 심장도 포함하는 전신 골격근 디스트로핀 생성을 유도하는 것으로 나타났다. 이러한 펩티드들이 효과적임에도 불구하고, 이들의 치료적 적용은 이들의 관련 독성으로 인해 제한되었다.
- [0011] R₆Gly와 같은 단일 아르기닌 풍부 도메인을 갖는 대체 세포-투과 펩티드가 또한 제조되었다. 이러한 CPP는 독성이 감소된 펩티드 접합체를 생성하는데 사용되었지만, 이러한 접합체는 Pip 펩티드에 비해 낮은 효능을 나타내었다.
- [0012] 따라서, 현재 이용 가능한 CPP는 인간에서 DMD와 같은 질병 치료에 사용하기에 적합한 것으로 아직 입증되지 않았다.
- [0013] 세포-투과 펩티드 기술 분야의 과제는 효능과 독성을 분리시키는 것이었다. 본 발명자들은 적어도 상기 문제를 해결하는 본 발명에 따른 특정 구조를 가진 다수의 개선된 CPP를 동정, 합성 및 시험하였다.
- [0014] 이러한 펩티드들은 카고 치료용 분자와 함께 인 비트로(in vitro) 및 인 비보(in vivo)에서 시험될 때 골격근에서 양호한 수준의 효능을 유지한다. 더욱이, 이러한 펩티드들은 동일한 접합체에 사용될 때 이전에 이용 가능

한 CPP에 비해 효능이 향상되었음을 보여준다. 동시에, 이러한 펩티드들은 전신 주사 후에 임상적 징후의 감소와 함께 인 비보에서 효과적으로 작용하고, 생화학적 마커의 측정을 통해 관찰되는 바와 같이 독성이 더 적었다. 결정적으로, 본 펩티드는 이전 CPP와 비교할 때 마우스에 유사한 전신 주사 후에 놀랍도록 감소된 독성을 보이는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 펩티드는 이전에 이용 가능한 펩티드보다 인간을 위한 요법으로서 사용하기에 개선된 적합성을 제공하고, 인간 대상의 안전하고 효과적인 치료를 위해 치료용 접합체에 사용될 수 있다.

발명의 내용

발명의 요약

- [0015] **발명의 요약**
- [0016] 본 발명의 제1 양상에 따르면, 40개 이하의 아미노산 잔기의 총 길이를 갖는 펩티드를 제공하고, 상기 펩티드는 하기를 포함하며:
- [0017] 각각 적어도 4개의 아미노산 잔기를 포함하는, 2개 이상의 양이온성 도메인 (cationic domains); 및
- [0018] 각각 적어도 3개의 아미노산 잔기를 포함하는, 하나 이상의 소수성 도메인 (hydrophobic domains);
- [0019] 상기 펩티드는 인공 아미노산 잔기를 함유하지 않는다.
- [0020] 본 발명의 제2 양상에 따르면, 상기 제1 양상의 펩티드를 치료용 분자 (therapeutic molecule)에 공유 결합시킨 접합체를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 제3 양상에 따르면, 상기 제1 양상의 펩티드를 이미징 분자 (imaging molecule)에 공유 결합시킨 접합체를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 제4 양상에 따르면, 상기 제2 양상의 접합체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 제5 양상에 따르면, 약제로서 사용하기 위한 상기 제2 양상에 따른 접합체를 제공한다.
- [0024] 상기 제5 양상의 일 구체예에서, 약제로서 사용하기 위한 상기 제4 양상에 따른 약학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 제6 양상에 따르면, 상기 제2 양상의 접합체를 치료적으로 유효한 양으로 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서 질병을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0026] 상기 제6 양상의 일 구체예에서, 상기 제4 양상에 따른 약학적 조성물을 치료적으로 유효한 양으로 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서 질병을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 제7 양상에 따르면, 상기 제1 양상의 펩티드 또는 상기 제2 양상의 접합체 또는 상기 제3 양상의 접합체를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 제8 양상에 따르면, 상기 제7 양상의 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 제9 양상에 따르면, 상기 제8 양상의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명자들은 치료용 분자를 세포에 전달하기 위한 세포-투과 펩티드로서 사용하기에 적합한 일련의 펩티드를 제조하였다.
- [0031] 놀랍게도, 본 발명자들은 임의의 인공 아미노산을 함유하지 않고, 한정된 길이의 적어도 2개의 양이온성 도메인 및 적어도 1개의 소수성 도메인을 갖는 펩티드 그룹을 발굴하였고, 이는 현재 이용 가능한 세포-투과 펩티드와 비교하여, 근육으로의 향상된 세포 투과를 제공하였다. 이러한 효과는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료제와의 접합체로서 세포에 전달되는 경우, 또는 인 비보 투여되는 경우에 관찰된다.
- [0032] 질병 DMD의 맥락에서, 적절한 치료용 분자에 연결된 본 발명의 펩티드에 의한 세포 투과 향상은 전사체 내에 특정 엑손 배제에 의해 나타날 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 적절한 서열로 디렉팅(directing)하면 엑손의 강제 스킵핑, 오픈 리딩 프레임의 교정, 및 내부적으로 결실되었지만 아직 부분적으로 기능하는 디스트로핀 이소형(isoform)의 복구를 초래한다.
- [0033] 본 발명의 펩티드가 디스트로핀 유전자를 표적화하도록 설계된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 치료제와의 접합체로서 사용되는 경우, 높은 수준의 엑손 배제 및 디스트로핀 단백질 복구를 갖는 것으로 본원에서 나타났다.

- [0034] 특히, 본 발명의 펩티드를 포함하는 접합체는 동일한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료제에 접합된 현재 이용 가능한 펩티드와 비교할 때 유의하게 증가된 세포 투과를 나타낸다. 이는 본 발명에서 다양한 상이한 근육 그룹의 디스트로핀 유전자에서 엑손 스킵핑 증가에 의해 입증된다.
- [0035] 본원에 기재된 인 비보 결과는 본 발명의 펩티드 접합체를 사용할 때 엑손 스킵핑 및 기능성 디스트로핀 발현 수준이 이전에 이용 가능한 세포-투과 펩티드에 접합된 동일한 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료제의 사용으로부터 기인한 수준의 두 배에 근접하는 것을 보여준다.
- [0036] 이는 이러한 펩티드 담체가 신경근 질환이 영향을 줄 수 있는 근육 세포를 투과하는 효능에 있어서 상당한 개선을 나타낸다.
- [0037] 이론에 국한되지 않고, 본 발명자들은 세포-투과 펩티드에 전형적으로 사용되는 6-아미노헥사노산 잔기와 같은 인공 아미노산의 제거 및 예를 들어 천연 베타-알라닌 잔기에 의한 대체가 전반적인 독성 감소 및 펩티드의 세포 투과 증가의 유익한 효과를 갖는 것으로 사료한다.
- [0038] 그러나 임의의 인공 아미노산 잔기를 함유하지 않는 이러한 펩티드 구조가 올리고뉴클레오티드와 같은 치료용 분자 카고를 근육으로 수송하는 이전에 보고된 세포-투과 펩티드의 전달 특성을 증가시킬 것으로 전혀 예상하지 못했다. 펩티드의 유효성은 펩티드가 세포에 도달하는데 필요한 시간 동안 이의 혈청-안정성을 유지하는 능력에 크게 좌우된다. 인공 아미노산 없이 형성된 펩티드는 인 비보에서 프로테아제 분해에 대해 너무 불안정하고 취약해서 충분한 양이 근육 세포 및 조직을 투과하여 치료 효과를 증진시키는 것은 어려울 것으로 예상되었다. 이러한 예상과는 달리, 본 발명자들은 청구된 특정 구조를 가진 펩티드가 세포에 진입하는데 충분히 안정해서, 양호한, 심지어 향상된 효능을 유지하면서, 인공 아미노산의 결여로 인해 독성 프로파일은 감소한다는 이점을 갖는 것을 발견하였다.
- [0039] 이러한 수송의 증가로 안티센스 올리고뉴클레오티드와 같은 치료용 분자가 본원에서 입증된 바와 같이 다양한 상이한 근육에서 엑손 스킵핑 및 기능성 디스트로핀 단백질 생성을 성공적으로 증가시킬 것이라는 것은 예상치 못한 일이었다.
- [0040] 또한, 이러한 접합체를 사용한 인간 치료가 실행 가능할 정도로 인 비보에서 치료용 카고를 수송할 때 이러한 펩티드 구조가 세포-투과 펩티드의 독성을 유의하게 감소시킬 것이라는 것은 예상치 못한 일이었다. 본원에 기재된 인 비보 결과는 생화학적 마커에 의해 결정된 바와 같이 신독성 (nephrotoxicity)의 감소를 보여준다.
- [0041] 의심의 여지를 없애기 위해, 본 개시내용이 해석되는 방식을 명확하게 하기 위해, 본 발명에 따라 사용되는 소정의 용어가 추가로 정의될 것이다.
- [0042] 본 발명은 기재된 양상들 및 특징들의 임의의 조합을 포함하며, 단 이러한 조합이 명확하게 허용되지 않거나 또는 명백하게 회피되는 경우는 제외한다.
- [0043] 본원에서 사용된 섹션 제목은 구성 목적으로만 사용되고, 기재된 주제를 제한하는 것으로 해석되지는 안된다.
- [0044] 전체에서 'X'에 대한 언급은 인공 합성으로 생성된 아미노산 아미노헥사노산의 임의의 형태를 나타낸다.
- [0045] 전체에서 'B'에 대한 언급은 천연의, 그러나 유전자로 코딩되지 않은 아미노산 베타-알라닌을 나타낸다.
- [0046] 전체에서 'Ac'에 대한 언급은 관련 펩티드의 아세틸화를 나타낸다.
- [0047] 전체에서 'Hyp'에 대한 언급은 천연의, 그러나 유전자로 코딩되지 않은 아미노산 히드록시프롤린을 나타낸다.
- [0048] 전체에서 다른 대문자에 대한 언급은 인정된 알파벳 아미노산 코드에 따라 관련 유전자 코딩된 아미노산 잔기를 나타낸다.
- [0049] *인공 아미노산*
- [0050] 본 발명은 인공 아미노산 잔기가 존재하지 않는, 특정 구조를 가진 짧은 세포-투과 펩티드에 관한 것이다.
- [0051] 본원에서 '인공 (artificial)' 아미노산 또는 잔기에 대한 언급은 천연에 존재하지 않는 임의의 아미노산을 나타내고, 합성 아미노산, 변형된 아미노산 (예: 당으로 변형된 아미노산), 비-천연 아미노산, 인조 아미노산, 스페이서 및 비-펩티드 결합된 스페이서를 포함한다.
- [0052] 합성 아미노산은 인간이 화학적으로 합성한 아미노산일 수 있다.
- [0053] 의심의 여지를 없애기 위해, 아미노헥사노산 (X)은 본 발명의 맥락에서 인공 아미노산이다. 의심의 여지를 없

이기 위해, 베타-알라닌 (B) 및 히드록시프롤린 (Hyp)은 천연에 존재하므로, 본 발명의 맥락에서 인공 아미노산이 아닌 천연 아미노산이다.

- [0054] 인공 아미노산은 예를 들어 6-아미노헥사노산 (X), 테트라히드로이소퀴놀린-3-카복실산 (TIC), 1-(아미노)시클로헥산카복실산 (Cy) 및 3-아제티딘-카복실산 (Az), 11-아미노운데카노산을 포함할 수 있다.
- [0055] 적합하게는, 상기 펩티드는 아미노헥사노산 잔기를 함유하지 않는다. 적합하게는, 상기 펩티드는 임의 형태의 아미노헥사노산 잔기를 함유하지 않는다. 적합하게는, 상기 펩티드는 6-아미노헥사노산 잔기를 함유하지 않는다.
- [0056] 적합하게는, 상기 펩티드는 천연 아미노산 잔기만을 함유하므로, 천연 아미노산 잔기로 구성된다.
- [0057] 적합하게는, 세포-투과 펩티드에 전형적으로 사용되는 6-아미노헥사노산과 같은 인공 아미노산은 천연 아미노산으로 대체된다. 적합하게는 세포-투과 펩티드에 전형적으로 사용되는 6-아미노헥사노산과 같은 인공 아미노산은 베타-알라닌, 세린, 프롤린, 아르기닌 및 히스티딘 또는 히드록시프롤린으로부터 선택된 아미노산으로 대체된다.
- [0058] 일 구체예에서, 아미노헥사노산은 베타-알라닌으로 대체된다. 적합하게는, 6-아미노헥사노산은 베타-알라닌으로 대체된다.
- [0059] 일 구체예에서, 아미노헥사노산은 히스티딘으로 대체된다. 적합하게는, 6-아미노헥사노산은 히스티딘으로 대체된다.
- [0060] 일 구체예에서, 아미노헥사노산은 히드록시프롤린으로 대체된다. 적합하게는, 6-아미노헥사노산은 히드록시프롤린으로 대체된다.
- [0061] 적합하게는, 세포-투과 펩티드에 전형적으로 사용되는 6-아미노헥사노산과 같은 인공 아미노산은 임의의 베타-알라닌, 세린, 프롤린, 아르기닌 및 히스티딘 또는 히드록시프롤린의 조합, 적합하게는 임의의 베타-알라닌, 히스티딘 및 히드록시프롤린의 조합으로 대체될 수 있다.
- [0062] 일 구체예에서, 40개 이하의 아미노산 잔기의 총 길이를 갖는 펩티드를 제공하고, 상기 펩티드는 하기를 포함하며:
- [0063] 각각 적어도 4개의 아미노산 잔기를 포함하는, 2개 이상의 양이온성 도메인; 및
- [0064] 각각 적어도 3개의 아미노산 잔기를 포함하는, 하나 이상의 소수성 도메인;
- [0065] 상기 적어도 하나의 양이온성 도메인은 히스티딘 잔기를 포함한다.
- [0066] 적합하게는, 상기 적어도 하나의 양이온성 도메인은 히스티딘 풍부이다.
- [0067] 적합하게는, 히스티딘 풍부한 의미는 본원에서 양이온성 도메인과 관련하여 정의된다.
- [0068] *양이온성 도메인*
- [0069] 본 발명은 소정의 길이를 갖는 양이온성 도메인이 적어도 2개 존재하는, 특정 구조를 가진 짧은 세포-투과 펩티드에 관한 것이다.
- [0070] 본원에서 '양이온성 (cationic)'에 대한 언급은 생리학적 pH에서 전반적으로 양전하를 갖는 아미노산 또는 아미노산 도메인을 나타낸다.
- [0071] 적합하게는, 상기 펩티드는 최대 4개의 양이온성 도메인, 최대 3개의 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0072] 적합하게는, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0073] 상기에 정의된 바와 같이, 펩티드는 각각 적어도 4개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는, 2개 이상의 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0074] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 4 내지 12개의 아미노산 잔기의 길이, 적합하게는 4 내지 7개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는다.
- [0075] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 4, 5, 6 또는 7개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는다.
- [0076] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 유사한 길이를 가지며, 적합하게는 각 양이온성 도메인은 동일한 길이를 갖

는다.

- [0077] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 양이온성 아미노산을 포함하고, 또한 극성 및/또는 비극성 아미노산을 함유할 수 있다.
- [0078] 비극성 아미노산은 하기로부터 선택될 수 있다: 알라닌, 베타-알라닌, 프롤린, 글리신, 시스테인, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 트립토판, 페닐알라닌. 적합하게는, 비극성 아미노산은 전하를 갖지 않는다.
- [0079] 극성 아미노산은 하기로부터 선택될 수 있다: 세린, 아스파라긴, 히드록시프롤린, 히스티딘, 아르기닌, 트레오닌, 티로신, 글루타민. 적합하게는, 선택된 극성 아미노산은 음전하를 갖지 않는다.
- [0080] 양이온성 아미노산은 하기로부터 선택될 수 있다: 아르기닌, 히스티딘, 리신. 적합하게는, 양이온성 아미노산은 생리학적 pH에서 양전하를 갖는다.
- [0081] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 음이온성 또는 음으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하지 않는다.
- [0082] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘, 베타-알라닌, 히드록시프롤린 및/또는 세린 잔기를 포함한다.
- [0083] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘, 베타-알라닌, 히드록시프롤린 및/또는 세린 잔기로 구성된다.
- [0084] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%의 양이온성 아미노산을 포함한다.
- [0085] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 다수의 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.
- [0086] 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 (pI)을 포함한다.
- [0087] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 적어도 10.0의 등전점 (pI)을 포함한다.
- [0088] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 10.0 내지 13.0의 등전점 (pI)을 포함한다.
- [0089] 일 구체예에서, 각 양이온성 도메인은 10.4 내지 12.5의 등전점 (pI)을 포함한다.
- [0090] 적합하게는, 상기 양이온성 도메인의 등전점은 생리학적 pH에서 당 분야에서 이용 가능한 임의의 적절한 수단에 의해 계산된다. 적합하게는, IPC (www.isoelectric.org)를 사용하여, 웹-기반 알고리즘이 Lukasz Kozlowski, Biol Direct. 2016; 11: 55. DOI: 10.1186/s13062-016-0159-9에 의해 개발되었다.
- [0091] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 적어도 1개의 양이온성 아미노산, 적합하게는 1-5개의 양이온성 아미노산을 포함한다. 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 적어도 2개의 양이온성 아미노산, 적합하게는 2-5개의 양이온성 아미노산을 포함한다.
- [0092] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 아르기닌 풍부이고/이거나 히스티딘 풍부이다. 적합하게는, 양이온성 도메인은 히스티딘과 아르기닌 모두를 함유할 수 있다.
- [0093] '아르기닌 풍부 (arginine rich)' 또는 '히스티딘 풍부 (histidine rich)'는 상기 양이온성 도메인의 적어도 40%가 상기 잔기/잔기들로 형성된다는 것을 의미한다.
- [0094] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 다수의 아르기닌 및/또는 히스티딘 잔기를 포함한다.
- [0095] 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.
- [0096] 적합하게는, 양이온성 도메인은 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%의 아르기닌 잔기를 포함할 수 있다.
- [0097] 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.
- [0098] 적합하게는, 양이온성 도메인은 총 1-5개의 히스티딘 및 1-5개의 아르기닌 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 양이온성 도메인은 1-5

개의 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.

- [0099] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 하나 이상의 베타-알라닌 잔기를 포함한다. 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 총 2-5개의 베타-알라닌 잔기, 적합하게는 총 2개 또는 3개의 베타-알라닌 잔기를 포함할 수 있다.
- [0100] 적합하게는, 양이온성 도메인은 하나 이상의 히드록시프롤린 잔기 또는 세린 잔기를 포함할 수 있다.
- [0101] 적합하게는, 양이온성 도메인은 1-2개의 히드록시프롤린 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 양이온성 도메인은 1-2개의 세린 잔기를 포함할 수 있다.
- [0102] 적합하게는, 주어진 양이온성 도메인에서 모든 양이온성 아미노산은 히스티딘일 수 있고, 대안으로서, 적합하게는 주어진 양이온성 도메인에서 모든 양이온성 아미노산은 아르기닌일 수 있다.
- [0103] 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 1개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인을 포함할 수 있다.
- [0104] 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인 및 적어도 1개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함할 수 있다.
- [0105] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0106] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0107] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 아르기닌 및 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0108] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인 및 1개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0109] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 3개 이하의 연속하는 아르기닌 잔기, 적합하게는 2개 이하의 연속하는 아르기닌 잔기를 포함한다.
- [0110] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 연속하는 히스티딘 잔기를 포함하지 않는다.
- [0111] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 아르기닌, 히스티딘 및/또는 베타-알라닌 잔기를 포함한다. 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 다수의 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.
- [0112] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기를 포함하는 제1 양이온성 도메인, 및 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기를 포함하는 제2 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0113] 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.
- [0114] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기를 포함하는 제1 양이온성 도메인, 및 히스티딘 및 베타-알라닌 잔기를 포함하는 제2 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0115] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기로 구성된 제1 양이온성 도메인, 및 아르기닌 및 베타-알라닌 잔기로 구성된 제2 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0116] 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.
- [0117] 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 2개의 양이온성 도메인을 포함하고, 적합하게는 이러한 양이온성 도메인들은 상기 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 알려질 수 있다.
- [0118] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함하고, 여기서 하나는 상기 펩티드의 N-말단에 위치

하고, 다른 하나는 상기 펩티드의 C-말단에 위치한다. 적합하게는 상기 펩티드의 각 단부에 위치한다. 적합하게는, 말단 변형, 링커 및/또는 치료용 분자와 같은 다른 그룹을 제외하고, 상기 펩티드의 N-말단 및 C-말단에 추가 아미노산 또는 도메인이 존재하지 않는다. 의심의 여지를 없애기 위해, 이러한 다른 그룹은 본원에 기재되고 청구된 '펩티드'에 추가하여 존재할 수 있다. 그러므로 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 상기 펩티드의 말단을 형성한다. 적합하게는, 이는 본원에 기재된 추가 링커 그룹의 존재를 배제하지 않는다.

- [0119] 적합하게는, 상기 펩티드는 최대 4개의 양이온성 도메인을 포함할 수 있다. 적합하게는, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0120] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함하고, 이들 모두는 아르기닌 풍부이다.
- [0121] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0122] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인을 포함하고, 이들 모두는 아르기닌 및 히스티딘이 둘다 풍부이다.
- [0123] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 1개의 아르기닌 풍부 양이온성 도메인 및 1개의 히스티딘 풍부 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0124] 적합하게는, 상기 양이온성 도메인은 하기로부터 선택된 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.
- [0125] 적합하게는, 양이온성 도메인은 또한 세린, 프롤린 및/또는 히드록시프롤린 잔기를 포함할 수 있다. 적합하게는, 상기 양이온성 도메인은 하기로부터 선택된 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 단위들과의 임의의 조합.
- [0126] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 임의의 하기 서열을 포함한다: RBRRBRR (서열 번호: 1), RBRBR (서열 번호: 2), RBRR (서열 번호: 3), RBRRBR (서열 번호: 4), RRBRBR (서열 번호: 5), RBRRB (서열 번호: 6), BRBR (서열 번호: 7), RBHBH (서열 번호: 8), HBHBR (서열 번호: 9), RBRHBHR (서열 번호: 10), RBRBBHR (서열 번호: 11), RBRRBH (서열 번호: 12), HBRRBR (서열 번호: 13), HBHBH (서열 번호: 14), BHBH (서열 번호: 15), BRBSB (서열 번호: 16), BRB[Hyp]B (서열 번호: 17), R[Hyp]H[Hyp]HB (서열 번호: 18), R[Hyp]RR[Hyp]R (서열 번호: 19) 또는 이들의 임의의 조합.
- [0127] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 임의의 하기 서열로 구성된다: RBRRBRR (서열 번호: 1), RBRBR (서열 번호: 2), RBRR (서열 번호: 3), RBRRBR (서열 번호: 4), RRBRBR (서열 번호: 5), RBRRB (서열 번호: 6), BRBR (서열 번호: 7), RBHBH (서열 번호: 8), HBHBR (서열 번호: 9), RBRHBHR (서열 번호: 10), RBRBBHR (서열 번호: 11), RBRRBH (서열 번호: 12), HBRRBR (서열 번호: 13), HBHBH (서열 번호: 14), BHBH (서열 번호: 15), BRBSB (서열 번호: 16), BRB[Hyp]B, R[Hyp]H[Hyp]HB, R[Hyp]RR[Hyp]R (서열 번호: 19) 또는 이들의 임의의 조합.
- [0128] 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 하기 서열들 중 하나로 구성된다: RBRRBRR (서열 번호: 1), RBRBR (서열 번호: 2), RBRRBR (서열 번호: 4), BRBR (서열 번호: 7), RBHBH (서열 번호: 8), HBHBR (서열 번호: 9).
- [0129] 적합하게는, 상기 펩티드에서 각 양이온성 도메인은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 적합하게는, 상기 펩티드에서 각 양이온성 도메인은 상이하다.
- [0130] 소수성 도메인
- [0131] 본 발명은 소정의 길이를 갖는 소수성 도메인이 적어도 1개 존재하는, 특정 구조를 가진 짧은 세포-투과 펩티드에 관한 것이다.
- [0132] 본원에서 '소수성 (hydrophobic)'에 대한 언급은 물에 반발하는 능력을 갖거나 또는 물과 혼합되지 않는 아미노산 또는 아미노산 도메인을 나타낸다.
- [0133] 적합하게는, 상기 펩티드는 최대 3개의 소수성 도메인, 최대 2개의 소수성 도메인을 포함한다.
- [0134] 적합하게는, 상기 펩티드는 1개의 소수성 도메인을 포함한다.
- [0135] 상기에 정의된 바와 같이, 상기 펩티드는 각각 적어도 3개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는, 하나 이상의 소수성

도메인을 포함한다.

- [0136] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 3-6개 아미노산의 길이를 갖는다. 적합하게는, 각 소수성 도메인은 5개 아미노산의 길이를 갖는다.
- [0137] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 비극성, 극성 및 소수성 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0138] 소수성 아미노산 잔기는 하기로부터 선택될 수 있다: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 티로신, 메티오닌 및 트립토판.
- [0139] 비극성 아미노산 잔기는 하기로부터 선택될 수 있다: 프롤린, 글리신, 시스테인, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 트립토판, 페닐알라닌, 메티오닌.
- [0140] 극성 아미노산 잔기는 하기로부터 선택될 수 있다: 세린, 아스파라긴, 히드록시프롤린, 히스티딘, 아르기닌, 트레오닌, 티로신, 글루타민.
- [0141] 적합하게는, 상기 소수성 도메인은 친수성 아미노산 잔기를 포함하지 않는다.
- [0142] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 다수의 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.
- [0143] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 적어도 0.3, 적어도 0.4, 적어도 0.5, 적어도 0.6, 적어도 0.7, 적어도 0.8, 적어도 0.9, 적어도 1.0, 적어도 1.1, 적어도 1.2, 적어도 1.3의 소수도 (hydrophobicity)를 포함한다.
- [0144] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 적어도 0.3, 적어도 0.35, 적어도 0.4, 적어도 0.45의 소수도를 포함한다.
- [0145] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 적어도 1.2, 적어도 1.25, 적어도 1.3, 적어도 1.35의 소수도를 포함한다.
- [0146] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 0.4 내지 1.4의 소수도를 포함한다.
- [0147] 일 구체예에서, 각 소수성 도메인은 0.45 내지 0.48의 소수도를 포함한다.
- [0148] 일 구체예에서, 각 소수성 도메인은 1.27 내지 1.39의 소수도를 포함한다.
- [0149] 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.
- [0150] 적합하게는, 각 소수성 도메인은 적어도 3개, 적어도 4개의 소수성 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0151] 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.
- [0152] 일 구체예에서, 각 소수성 도메인은 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 티로신 및/또는 글루타민 잔기로 구성된다.
- [0153] 일 구체예에서, 각 소수성 도메인은 트립토판 및/또는 프롤린 잔기로 구성된다.
- [0154] 적합하게는, 상기 펩티드는 1개의 소수성 도메인을 포함한다. 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 상기 펩티드의 중심에 위치한다. 그러므로 적합하게는, 상기 소수성 도메인은 코어 소수성 도메인 (core hydrophobic domain)으로 알려질 수 있다. 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 코어 도메인은 각 측면에 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.
- [0155] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 아암 도메인이 플랭킹된 소수성 코어 도메인을 포함하고, 상기 각 아암 도메인은 양이온성 도메인을 포함한다.
- [0156] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인이 플랭킹된 소수성 코어 도메인으로 구성된다.
- [0157] 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 하기 서열들 중 하나를 포함한다: YQFLI (서열 번호: 20), FQILY (서열 번호: 21), ILFQY (서열 번호: 22), FQIY (서열 번호: 23), WWW, WWPWW (서열 번호: 24), WPWW (서열 번호: 25), WWPW (서열 번호: 26) 또는 이들의 임의의 조합.

- [0158] 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 하기 서열들 중 하나로 구성된다: YQFLI (서열 번호: 20), FQILY (서열 번호: 21), ILFQY (서열 번호: 22), FQIY (서열 번호: 23), WWW, WWPWW (서열 번호: 24), WPWW (서열 번호: 25), WWPW (서열 번호: 26) 또는 이들의 임의의 조합.
- [0159] 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 하기 서열들 중 하나로 구성된다: FQILY (서열 번호: 21), YQFLI (서열 번호: 20), ILFQY (서열 번호: 22).
- [0160] 적합하게는, 상기 또는 각 소수성 도메인은 FQILY (서열 번호: 21)로 구성된다.
- [0161] 적합하게는, 상기 펩티드에서 각 소수성 도메인은 동일한 서열 또는 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [0162] 펩티드
- [0163] 본 발명은 의학적 병태의 치료에서 치료용 카고 분자를 수송하는데 사용하기 위한 짧은 세포-투과 펩티드에 관한 것이다.
- [0164] 상기 펩티드는 연속하는 단일 분자인 서열을 가지므로, 상기 펩티드의 도메인들은 연속한다. 적합하게는, 상기 펩티드는 N-말단과 C-말단 사이에 선형 배열로 수개의 도메인들을 포함한다. 적합하게는, 상기 도메인은 상기에 기재된 양이온성 도메인 및 소수성 도메인으로부터 선택된다. 적합하게는, 상기 펩티드는 양이온성 도메인 및 소수성 도메인으로 구성되며, 여기서 이들 도메인은 상기에 정의된 바와 같다.
- [0165] 각 도메인은 상기 관련 섹션에 기재된 바와 같이 공통 서열 특성을 갖지만, 각 도메인의 정확한 서열은 변이 및 변형이 가능하다. 따라서 각 도메인에 대해 다양한 서열이 가능하다. 각 가능한 도메인 서열의 조합은 다양한 펩티드 구조를 생성하며, 이들 각각은 본 발명의 일부를 형성한다. 상기 펩티드 구조의 특징은 하기에 기재되어 있다.
- [0166] 적합하게는, 소수성 도메인은 임의의 2개의 양이온성 도메인들을 분리한다. 적합하게는, 각 소수성 도메인은 이의 각 측면에 양이온성 도메인들에 의해 플랭킹된다.
- [0167] 적합하게는, 양이온성 도메인은 다른 양이온성 도메인과 연속하지 않는다.
- [0168] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 하기 배열로 2개의 양이온성 도메인들에 의해 플랭킹된 하나의 소수성 도메인을 포함한다:
- [0169] [양이온성 도메인] - [소수성 도메인] - [양이온성 도메인]
- [0170] 그러므로 적합하게는, 상기 소수성 도메인은 코어 도메인으로 알려질 수 있고, 상기 각 양이온성 도메인은 아암 도메인으로 알려질 수 있다. 적합하게는, 소수성 아암 도메인이 각 측면에서 양이온성 코어 도메인에 플랭킹된다.
- [0171] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 도메인 및 1개의 소수성 도메인으로 구성된다.
- [0172] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성된다.
- [0173] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된 YQFLI (서열 번호: 20), FQILY (서열 번호: 21), ILFQY (서열 번호: 22), FQIY (서열 번호: 23), WWW, WWPWW (서열 번호: 24), WPWW (서열 번호: 25), 및 WWPW (서열 번호: 26)으로부터 선택된 서열을 포함하는 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성되고, 상기 각 양이온성 아암 도메인은 RBRBR (서열 번호: 1), RBRBR (서열 번호: 2), RBRR (서열 번호: 3), RBRRBR (서열 번호: 4), RRBRBR (서열 번호: 5), RBRRB (서열 번호: 6), BRBR (서열 번호: 7), RBHBH (서열 번호: 8), HBHBR (서열 번호: 9), RBRHBHR (서열 번호: 10), RBRBBHR (서열 번호: 11), RBRRBH (서열 번호: 12), HBRRBR (서열 번호: 13), HBHBH (서열 번호: 14), BHBH (서열 번호: 15), BRBSB (서열 번호: 16), BRB[Hyp]B (서열 번호: 17), R[Hyp]H[Hyp]HB (서열 번호: 18), 및 R[Hyp]RR[Hyp]R (서열 번호: 19)로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0174] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된 FQILY (서열 번호: 21), YQFLI (서열 번호: 20), 및 ILFQY (서열 번호: 22)로부터 선택된 서열을 포함하는 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성되고, 상기 각 양이온성 아암 도메인은 RBRBR (서열 번호: 1), RBRBR (서열 번호: 2), RBRRBR (서열 번호: 4), RBRR (서열 번호: 7), RBHBH (서열 번호: 8), HBHBR (서열 번호: 9)로부터 선택된 서열을 포함한다.

- [0175] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 2개의 양이온성 아암 도메인에 의해 플랭킹된 FQILY (서열 번호: 21)의 서열을 포함하는 1개의 소수성 코어 도메인으로 구성되고, 상기 각 양이온성 아암 도메인은 RBRRBRR (서열 번호: 1), RBRBR (서열 번호: 2), RBRRBR (서열 번호: 4), BRBR (서열 번호: 7), RBHBH (서열 번호: 8)로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0176] 이러한 임의의 구체예에서, 링커, 말단 변형 및/또는 치료용 분자와 같은 추가 그룹이 존재할 수 있다.
- [0177] 적합하게는, 상기 펩티드는 N-말단이 변형된다.
- [0178] 적합하게는, 상기 펩티드는 N-아세틸화, N-메틸화, N-트리플루오로아세틸화, N-트리플루오로메틸설폰화 또는 N-메틸설폰화된다. 적합하게는, 상기 펩티드는 N-아세틸화된다.
- [0179] 선택적으로, 상기 펩티드의 N-말단은 변형되지 않을 수 있다.
- [0180] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 N-아세틸화된다.
- [0181] 적합하게는, 상기 펩티드는 C-말단이 변형된다.
- [0182] 적합하게는, 상기 펩티드는 하기로부터 선택된 C-말단 변형을 포함한다: 카복시-, 티오산- (Thioacid-), 아미노옥시-, 히드라지노-, 티오에스테르-, 아지드, 스트레인드 알킨 (strained alkyne), 스트레인드 알켄 (strained alkene), 알데히드-, 티올 또는 할로아세틸-기.
- [0183] 유리하게는, 상기 C-말단 변형은 상기 펩티드를 상기 치료용 분자에 연결하기 위한 수단을 제공한다.
- [0184] 따라서, 상기 C-말단 변형은 링커를 포함할 수 있고, 그 반대도 마찬가지일 수 있다. 적합하게는, 상기 C-말단 변형은 링커로 구성될 수 있고, 그 반대도 마찬가지일 수 있다. 적합한 링커는 본원에 기재되어 있다.
- [0185] 적합하게는, 상기 펩티드는 C-말단 카복실기를 포함한다.
- [0186] 적합하게는, 상기 C-말단 카복실기는 글리신 또는 베타-알라닌 잔기에 의해 제공된다.
- [0187] 일 구체예에서, 상기 C-말단 카복실기는 베타-알라닌 잔기에 의해 제공된다.
- [0188] 적합하게는, 상기 C-말단 베타-알라닌 잔기는 링커이다.
- [0189] 그러므로 적합하게는, 각 양이온성 도메인은 N 또는 C 말단 변형을 추가로 포함할 수 있다. 적합하게는, 상기 C 말단에서 양이온성 도메인은 C-말단 변형을 포함한다. 적합하게는, 상기 N 말단에서 양이온성 도메인은 N-말단 변형을 포함한다. 적합하게는, 상기 C 말단에서 양이온성 도메인은 링커 그룹을 포함하고, 적합하게는, 상기 C 말단에서 양이온성 도메인은 C-말단 베타-알라닌을 포함한다. 적합하게는, 상기 N 말단에서 양이온성 도메인은 N-아세틸화된다.
- [0190] 본 발명의 펩티드는 40개 이하의 아미노산 잔기의 총 길이를 갖는 것으로 정의된다. 그러므로 상기 펩티드는 올리고펩티드로 간주될 수 있다.
- [0191] 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.
- [0192] 적합하게는, 상기 펩티드는 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개의 아미노산 잔기의 총 길이를 갖는다.
- [0193] 적합하게는, 상기 펩티드는 세포를 투과할 수 있다. 그러므로 상기 펩티드는 세포-투과 펩티드로 간주될 수 있다.
- [0194] 적합하게는, 상기 펩티드는 치료용 분자에 부착하기 위한 것이다. 적합하게는, 상기 펩티드는 치료용 분자를 표적 세포에 수송하기 위한 것이다. 적합하게는, 상기 펩티드는 치료용 분자를 표적 세포에 전달하기 위한 것이다. 그러므로 상기 펩티드는 담체(carrier) 펩티드로 간주될 수 있다.
- [0195] 적합하게는, 상기 펩티드는 세포 및 조직, 적합하게는 세포 핵, 적합하게는 근육 조직으로 투과할 수 있다.
- [0196] 적합하게는, 상기 펩티드는 하기 서열들 중 어느 하나로부터 선택될 수 있다:
- [0197] RBRRBRRFQILYRBRBR (서열 번호: 27)
- [0198] RBRRBRRFQILYRBR (서열 번호: 28)

- [0199] RBRBRBFQILYRRBRBR (서열 번호: 29)
- [0200] RBRBRBFQILYRBRBR (서열 번호: 30)
- [0201] RBRBRBRYQFLIRBRBR (서열 번호: 31)
- [0202] RBRBRBRRILFYRBRBR (서열 번호: 32)
- [0203] RBRBRBFQILYRBRBR (서열 번호: 33)
- [0204] RBRBRBFQILYRBRBR (서열 번호: 34)
- [0205] RBRBRBFQILYBRBR (서열 번호: 35)
- [0206] RBRBRBFQILYRBRBR (서열 번호: 36)
- [0207] RBRBRBRRFQILYRBHBH (서열 번호: 37)
- [0208] RBRBRBRRFQILYHBHBR (서열 번호: 38)
- [0209] RBRBRBRRFQILYHBRBH (서열 번호: 39)
- [0210] RBRBRBRYQFLIRBHBH (서열 번호: 40)
- [0211] RBRBRBRRILFYRBHBH (서열 번호: 41)
- [0212] RBRHBHRFQILYRBRBR (서열 번호: 42)
- [0213] RBRBBHRFQILYRBHBH (서열 번호: 43)
- [0214] RBRBRBFQILYRBHBH (서열 번호: 44)
- [0215] RBRBRBFQILYHBHBH (서열 번호: 45)
- [0216] RBRRBHFQILYRBHBH (서열 번호: 46)
- [0217] HBRRBRFQILYRBHBH (서열 번호: 47)
- [0218] RBRBRBFQILYRBHBH (서열 번호: 48)
- [0219] RBRBRBFQILYBHBH (서열 번호: 49)
- [0220] RBRRBRYQFLIHBHBH (서열 번호: 50)
- [0221] RBRBRBRRILFYHBHBH (서열 번호: 51)
- [0222] RBRBRBRRFQILYHBHBH (서열 번호: 52)
- [0223] 적합하게는, 상기 펩티드는 하기 추가 서열들 중 어느 하나로부터 선택될 수 있다:
- [0224] RBRBRBFQILYBRBS (서열 번호: 53)
- [0225] RBRBRBFQILYBRB[Hyp] (서열 번호: 54)
- [0226] RBRBRBFQILYBR[Hyp]R (서열 번호: 55)
- [0227] RRBRBRBFQILYBRBR (서열 번호: 56)
- [0228] BRBRBRBFQILYBRBR (서열 번호: 57)
- [0229] RBRBRBRRWWWBRBR (서열 번호: 58)
- [0230] RBRBRBRRWPPWBRBR (서열 번호: 59)
- [0231] RBRBRBRRWPWBRBR (서열 번호: 60)
- [0232] RBRBRBRRWPPWBRBR (서열 번호: 61)
- [0233] RBRBRBRRWWWBRBR (서열 번호: 62)
- [0234] RBRBRBRRWPPWBRBR (서열 번호: 63)

- [0235] RBRBRRRWPWWRBRBR (서열 번호: 64)
- [0236] RBRBRRRWPWWRBRBR (서열 번호: 65)
- [0237] RBRBRRRFQILYBRBR (서열 번호: 66)
- [0238] RBRBRRRFQILYRBR (서열 번호: 67)
- [0239] BRBRBWWPWRBRBR (서열 번호: 68)
- [0240] RBRBRRRFQILYBHBH (서열 번호: 69)
- [0241] RBRBRRRFQIYRBHBH (서열 번호: 70)
- [0242] RBRBRRFQILYBRBH (서열 번호: 71)
- [0243] RBRBRRFQILYR[Hyp]H[Hyp]H (서열 번호: 72)
- [0244] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYRBHBH (서열 번호: 73)
- [0245] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYR[Hyp]H[Hyp]H (서열 번호: 74)
- [0246] RBRBRWWWRBHBH (서열 번호: 75)
- [0247] RBRBRWWRBHBH (서열 번호: 76)
- [0248] RBRBRPWRBHBH (서열 번호: 77)
- [0249] RBRBRWWPWRBHBH (서열 번호: 78)
- [0250] RBRBRWWRBHBH (서열 번호: 79)
- [0251] RBRBRWPWRBHBH (서열 번호: 80)
- [0252] RBRBRWWWRBHBH (서열 번호: 81)
- [0253] RBRBRRRWPWRBHBH (서열 번호: 82)
- [0254] RBRBRRRWPWRBHBH (서열 번호: 83)
- [0255] RBRBRRRWPWRBHBH (서열 번호: 84)
- [0256] RRBRBRFQILYRBHBH (서열 번호: 85)
- [0257] BRBRBRFQILYRBHBH (서열 번호: 86)
- [0258] RRBRBRFQILYBHBH (서열 번호: 87)
- [0259] BRBRBRFQILYBHBH (서열 번호: 88)
- [0260] RBRBRHRFQILYRBHBH (서열 번호: 89)
- [0261] RBRBRRFQILY[Hyp]R[Hyp]R (서열 번호: 101)
- [0262] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYBRBR (서열 번호: 102)
- [0263] R[Hyp]RR[Hyp]RFQILY[Hyp]R[Hyp]R (서열 번호: 103)
- [0264] RBRBRWWWBRBR (서열 번호: 104)
- [0265] RBRBRWWPWRBRBR (서열 번호: 105)
- [0266] 적합하게는, 상기 펩티드는 하기 서열들 중 하나로 구성된다:
- [0267] RBRBRRRFQILYRBRBR (서열 번호: 27)
- [0268] RBRBRRYQFLIRBRBR (서열 번호: 31)
- [0269] RBRBRRIILFYRBRBR (서열 번호: 32)
- [0270] RBRBRRFQILYBRBR (서열 번호: 35)

- [0271] RBRBRRFQILYRBHBH (서열 번호: 37)
- [0272] RBRBRRFQILYHBHBR (서열 번호: 38)
- [0273] RBRBRRFQILYRBHBH (서열 번호: 44)
- [0274] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 하기 서열로 구성된다: RBRBRRFQILYBRBR (서열 번호: 35).
- [0275] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 하기 서열로 구성된다: RBRBRRFQILYRBHBH (서열 번호: 37).
- [0276] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 하기 서열로 구성된다: RBRBRRFQILYRBHBH (서열 번호: 44).
- [0277] **접합체**
- [0278] 본 발명의 펩티드는 접합체를 제공하기 위해 치료용 분자에 공유 결합될 수 있다.
- [0279] 상기 치료용 분자는 질병 치료를 위한 임의의 분자일 수 있다. 상기 치료용 분자는 하기로부터 선택될 수 있다: 핵산, 펩티드 핵산, 안티센스 올리고뉴클레오티드 (예: PNA, PMO), mRNA, gRNA (예: CRISPR/Cas9 기술의 사용에서), 짧은 간섭 RNA (short interfering RNA), 마이크로 RNA, antagomiRNA, 펩티드, 사이클릭 펩티드, 단백질, 의약품, 약물 또는 나노 입자.
- [0280] 일 구체예에서, 상기 치료용 분자는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.
- [0281] 적합하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 포스포로디아미테이트 모르폴리노 올리고뉴클레오티드 (PMO) 로 이루어진다.
- [0282] 대안으로서 상기 올리고뉴클레오티드는 변형된 PMO 또는 임의의 다른 전하-중성 올리고뉴클레오티드, 예컨대 펩티드 핵산 (PNA), 화학적으로 변형된 PNA, 예컨대 감마-PNA (Bahal, Nat. Comm. 2016), 올리고뉴클레오티드 포스포로디아미테이트 (상기 포스페이트의 비-가교 산소 (non-bridging oxygen)가 WO 2016/028187A1에 기재된 것과 같은 아민 또는 알킬아민으로 치환되는 경우), 또는 임의의 다른 부분적으로 또는 완전히 전하-중성화된 (charge-neutralized) 올리고뉴클레오티드일 수 있다.
- [0283] 상기 치료용 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 이용 가능한 임의의 것으로부터 선택될 수 있으며, 예를 들어 DMD에서 엑손 스킵핑을 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 <https://research-repository.uwa.edu.au/en/publications/antisense-oligonucleotide-induced-exon-skipping-across-the-human>에 기재되어 있거나, 또는 SMA 치료를 위한 ISSN1 또는 IN7 서열에 상보적인 치료용 안티센스 올리고뉴클레오티드는 Zhou, HGT, 2013; and Hammond et al, 2016; and Osman et al, HMG, 2014에 기재되어 있다.
- [0284] 적합하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 DMD 치료에 사용하기 위한 엑손 스킵핑을 유도하기 위한 것이다.
- [0285] 적합하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 DMD 치료에 사용하기 위한 디스트로핀 유전자에서 엑손 스킵핑을 유도하기 위한 것이다. 적합하게는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 하나 또는 다수의 엑손의 엑손 스킵핑을 유도할 수 있다.
- [0286] 일 구체예에서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 DMD 치료에 사용하기 위한 디스트로핀 유전자의 단일 엑손의 엑손 스킵핑을 유도하기 위한 것이다. 적합하게는, 상기 단일 엑손은 DMD와 관련된 임의의 엑손으로부터 선택되고, 이는 디스트로핀 유전자에서 임의의 엑손, 예를 들어 엑손 45, 51 또는 53일 수 있다. 임의의 서열의 PMO 올리고뉴클레오티드는 (예를 들어, 미국 Gene Tools Inc로부터) 구입할 수 있다.
- [0287] 일 구체예에서, 상기 접합체의 치료용 분자는 유전자 표적의 pre-mRNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드이다.
- [0288] 적합하게는, 유전자 표적의 pre-mRNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 pre-mRNA를 변경하여 변경된 mRNA가 유도되고, 그러므로 변경된 서열의 단백질로 이어지는 입체 차단 이벤트 (steric blocking event)를 발생시킨다. 적합하게는, 상기 유전자 표적은 디스트로핀 유전자이다. 적합하게는, 상기 입체 차단 이벤트는 엑손 봉입 (exon inclusion) 또는 엑손 스킵핑 (exon skipping)일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 입체 차단 이벤트는 엑손 스킵핑, 적합하게는 디스트로핀 유전자의 단일 엑손의 엑손 스킵핑이다.
- [0289] 선택적으로, 치료용 분자 (예: PMO 또는 PNA)가 상기 펩티드에 부착되기 전에, 수 용해도를 개선하기 위해 치료용 분자의 한쪽 또는 양쪽 단부에 리신 잔기가 부가될 수 있다.
- [0290] 적합하게는, 상기 치료용 분자는 5,000 Da 미만, 적합하게는 3,000 Da 미만, 또는 적합하게는 1,000 Da 미만의

분자량을 갖는다.

- [0291] 적합하게는, 상기 펩티드는 C-말단에서 치료용 분자에 공유 결합된다.
- [0292] 적합하게는, 상기 펩티드는 필요한 경우 링커를 통해 상기 치료용 분자에 공유 결합된다. 상기 링커는 상기 펩티드 서열을 상기 치료용 분자로부터 분리하기 위한 스페이서 (spacer)로서 작용할 수 있다.
- [0293] 상기 링커는 임의의 적절한 서열로부터 선택될 수 있다.
- [0294] 적합하게는, 상기 링커는 상기 펩티드와 상기 치료용 분자 사이에 존재한다. 적합하게는, 상기 링커는 상기 펩티드 및 상기 치료용 분자에 대한 별개의 그룹이다. 따라서, 상기 링커는 인공 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0295] 일 구체예에서, 상기 접합체는 링커를 경유하여 치료용 분자에 공유 결합된 펩티드를 포함한다. 일 구체예에서, 상기 접합체는 하기 구조를 포함한다:
- [0296] [펩티드] - [링커]-[치료용 분자]
- [0297] 일 구체예에서, 상기 접합체는 하기 구조로 구성된다:
- [0298] [펩티드] - [링커]-[치료용 분자]
- [0299] 적합하게는, 본원에 열거된 임의의 펩티드가 본 발명에 따른 접합체에 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 접합체는 하기 서열들 중 하나로부터 선택된 펩티드를 포함한다: RBRBRFQILYRBR (서열 번호: 35), RBRBRFQILYRBHBH (서열 번호: 37) 및 RBRBRFQILYRBHBH (서열 번호: 44).
- [0300] 적합하게는, 임의의 경우에, 상기 펩티드는 전술한 바와 같이 N-말단 변형을 추가로 포함할 수 있다.
- [0301] 적합한 링커는 예를 들어, 디설파이드, 티오에테르 또는 티올-말레이미드 연결의 형성을 허용하는 C-말단 시스테인 잔기, 클릭 반응의 옥심을 형성하거나 또는 상기 펩티드 상의 염기성 아미노산과 모르폴리노 연결을 형성하는 C-말단 알데히드, 또는 카복사미드 연결을 형성하기 위해 아미노기에 공유 접합되는 펩티드 상의 카복실산 모이어티를 포함한다.
- [0302] 적합하게는, 상기 링커는 1 내지 5개 아미노산의 길이이다. 적합하게는, 상기 링커는 당 분야에 알려져 있는 임의의 링커를 포함할 수 있다.
- [0303] 적합하게는, 상기 링커는 하기 서열들 중 어느 하나로부터 선택된다: G, BC, XC, C, GGC, BBC, BXC, XBC, X, XX, B, BB, BX 및 XB. 적합하게는, 상기 X는 6-아미노헥사노산이다.
- [0304] 적합하게는, 상기 링커는 폴리머, 예를 들어 PEG일 수 있다.
- [0305] 일 구체예에서, 상기 링커는 베타-알라닌이다.
- [0306] 일 구체예에서, 상기 펩티드는 카복사미드 연결을 통해 치료용 분자에 접합된다.
- [0307] 상기 접합체의 링커는 상기 펩티드가 부착되는 치료용 분자의 일부를 형성할 수 있다. 대안으로서, 상기 치료용 분자의 부착은 상기 펩티드의 C-말단에 직접 연결될 수 있다. 적합하게는, 이러한 구체예에서, 링커는 필요하지 않다.
- [0308] 대안으로서, 상기 펩티드는 상기 치료용 분자에 화학적으로 접합될 수 있다. 화학적 연결은 예를 들어 디설파이드, 알케닐, 알키닐, 아릴, 에테르, 티오에테르, 트리아졸, 아미드, 카복사미드, 우레아, 티오우레아, 세미카바지드, 카바지드, 히드라진, 옥심, 포스페이트, 포스포르아미데이트, 티오포스페이트, 보라노포스페이트, 이미노포스페이트 또는 티올-말레이미드 연결을 경유할 수 있다.
- [0309] 선택적으로, 상기 펩티드에 대한 디설파이드 결합 형성을 허용하기 위해 치료용 분자의 N-말단에 시스테인이 부가될 수 있거나, 또는 상기 펩티드에 대한 티오에테르 접합을 위해 상기 N-말단에서 브로모아세틸화가 수행될 수 있다.
- [0310] 본 발명의 펩티드는 이미징 분자에 동등하게 공유 결합되어 접합체를 제공할 수 있다.
- [0311] 적합하게는, 상기 이미징 분자는 상기 접합체의 시각화를 가능하게 하는 임의의 분자일 수 있다. 적합하게는, 상기 이미징 분자는 상기 접합체의 위치를 나타낼 수 있다. 적합하게는, 인 비트로 또는 인 비보에서 상기 접합체의 위치를 나타낼 수 있다. 적합하게는, 본 발명은 이미징 분자를 포함하는 접합체의 위치를 모니터링하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 접합체를 대상에게 투여하는 단계 및 상기 접합체의 위치를 찾기 위해 상기

대상을 이미징하는 단계를 포함한다.

- [0312] 이미징 분자의 예로는 검출용 분자, 조영제 분자 (contrast molecules) 또는 증강 분자 (enhancing molecules)를 포함한다. 적절한 이미징 분자는 방사성 핵종; 형광단; 나노입자 (예: 나노셸 (nanoshell)); 나노케이지 (nanocages); 발색제 (예: 효소), 방사성 동위원소, 염료, 방사선 불투과성 물질 (radiopaque materials), 형광 화합물 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다.
- [0313] 적합하게는, 이미징 분자는 이미징 기술을 사용하여 시각화되며, 이들은 세포 이미징 기술 또는 의료용 이미징 기술일 수 있다. 적합한 세포 이미징 기술은 예를 들어 이미지 세포분석기 (image cytometry), 형광 현미경, 위상차 현미경, SEM, TEM을 포함한다. 적합한 의료용 이미징 기술은 예를 들어 X-선, 형광경 (fluoroscopy), MRI, 신티그래피 (scintigraphy), SPECT, PET, CT, CAT, FNRI를 포함한다.
- [0314] 일부 경우에, 상기 이미징 분자는 진단용 분자로 간주될 수 있다. 적합하게는, 상기 진단용 분자는 상기 접합체를 사용하여 질병의 진단을 가능하게 한다. 적합하게는, 질병의 진단은 이미징 분자를 사용하여 상기 접합체의 위치를 결정함으로써 달성될 수 있다. 적합하게는, 이미징 분자를 포함하는 접합체의 유효한 양을 대상에게 투여하는 단계 및 상기 접합체의 위치를 모니터링하는 단계를 포함하는 질병의 진단 방법을 제공한다.
- [0315] 적합하게는, 이미징 분자를 포함하는 접합체의 연결과 같은 추가 구체적 내용은 치료용 분자를 포함하는 접합체와 관련하여 상기에 기재한 바와 같다.
- [0316] 적합하게는, 본 발명의 펩티드는 치료용 분자 및 이미징 분자에 공유 결합되어 접합체를 제공할 수 있다.
- [0317] 적합하게는, 상기 접합체는 세포 및 조직, 적합하게는 세포 핵, 적합하게는 근육 조직으로 투과할 수 있다.
- [0318] *약학적 조성물*
- [0319] 본 발명의 접합체는 약학적 조성물로 제제화될 수 있다.
- [0320] 적합하게는, 상기 약학적 조성물은 본 발명의 접합체를 포함한다.
- [0321] 적합하게는, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 희석제, 아주반트 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0322] 적합한 약학적으로 허용 가능한 희석제, 아주반트 및 담체는 당 분야에 잘 알려져 있다.
- [0323] 본원에서 사용된, 문구 "약학적으로 허용 가능한"은 유효한 의학적 판단 범위 내에서, 합리적인 이익/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.
- [0324] 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 세포-투과 펩티드는 조성물의 다른 성분, 예컨대 펩티드 및 치료용 분자와 적합할 수 있고, 개체에게 유해하지 않다는 의미에서 "허용 가능"해야 한다. 재구성되어 투여될 수 있는 동결 건조된 조성물도 또한 본 조성물의 범위 내에 있다.
- [0325] 약학적으로 허용 가능한 담체는 예를 들어 부형제, 비히클, 희석제 및 이들의 조합일 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물이 경구 투여되는 경우, 이들은 정제, 캡슐, 과립, 분말 또는 시럽으로 제제화될 수 있고; 또는 비경구 투여의 경우, 이들은 주사제, 점적 주입 제제 또는 좌제로 제제화될 수 있다. 이러한 조성물은 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있고, 원하는 경우 활성 화합물 (즉, 접합체)은 임의의 통상적인 첨가제, 예컨대 부형제, 결합제, 붕해제, 유허제, 교정제 (corrigent), 가용화제, 현탁 조제, 유화제, 코팅제 또는 이들의 조합과 혼합될 수 있다.
- [0326] 본 개시내용의 약학적 조성물은 의학적 용도에서 본원에 기재된 질병, 장애 및 병태를 경감, 중재, 예방 및 치료하기 위한 추가로 알려진 치료제, 약물, 화합물의 프로드러그로의 변형을 추가로 포함할 수 있다.
- [0327] 적합하게는, 상기 약학적 조성물은 약제로서 사용하기 위한, 적합하게는 상기 접합체에 대해 본원에 기재된 것과 동일한 방식으로 약제로서 사용하기 위한 것이다. 상기 접합체를 사용한 의학적 치료와 관련하여 본원에 기재된 모든 특징은 상기 약학적 조성물에 적용된다.
- [0328] 따라서, 본 발명의 추가적 양상에서, 약제로서 사용하기 위한, 제4 양상에 따른 약학적 조성물을 제공한다. 추

가적 양상에서, 제4 양상에 따른 약학적 조성물의 유효한 양을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 질병 상태에 대해 대상을 치료하는 방법을 제공한다.

- [0329] *의학적 용도*
- [0330] 본 발명의 펩티드를 포함하는 접합체는 질병 치료용 약제로서 사용될 수 있다.
- [0331] 상기 약제는 상기에 정의된 바와 같은 약학적 조성물의 형태일 수 있다.
- [0332] 질병 상태에 대해 치료가 필요한 환자 또는 대상의 치료 방법이 또한 제공되며, 상기 방법은 치료적으로 유효한 양의 상기 접합체를 환자 또는 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0333] 적합하게는, 상기 의학적 치료는 상기 치료용 분자를 세포로, 적합하게는 세포 핵에 전달하는 것을 필요로 한다.
- [0334] 치료될 질병은 치료용 분자가 세포 및/또는 핵막의 투과가 개선되어 치료적 효과 개선으로 이어질 수 있는 임의의 질병을 포함할 수 있다.
- [0335] 적합하게는, 상기 접합체는 신경근계 (neuromuscular system) 질환 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0336] 본 발명의 펩티드를 포함하는 접합체는 신경근계의 유전자 질환 치료에 적합하다. 본 발명의 펩티드를 포함하는 접합체는 유전자 신경근 질환 치료에 적합하다. 적합한 일 구체예에서, 신경근계의 유전자 질환 치료에 사용하기 위한 제2 양상에 따른 접합체를 제공한다. 적합하게는, 상기 접합체는 유전성 유전자 질환(hereditary genetic diseases)의 치료에 사용하기 위한 것이다. 적합하게는, 상기 접합체는 신경근계의 유전성 유전자 질환 치료에 사용하기 위한 것이다. 적합하게는, 상기 접합체는 유전성 유전자 신경근 질환의 치료에 사용하기 위한 것이다. 적합하게는, 상기 접합체는 유전성 X-연관 신경근 질환의 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0337] 적합하게는, 상기 접합체는 스플라이싱 결함 (splicing deficiencies)으로 인한 질병의 치료에 사용하기 위한 것이다. 이러한 구체예에서, 상기 치료용 분자는 스플라이싱 결함을 방지 또는 교정하고 및/또는 올바르게 스플라이싱된 mRNA 분자의 생성을 증가시킬 수 있는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0338] 적합하게는, 상기 접합체는 하기 질병의 치료에 사용하기 위한 것이다: 뒤시엔느 근이영양증 (Duchenne Muscular Dystrophy: DMD), 부처 근이영양증 (Bucher Muscular Dystrophy: BMD), 멘케스병 (Menkes disease), 베타-지중해 빈혈 (Beta-thalassemia), 치매, 파킨슨병, 척추 근위축증 (Spinal Muscular Atrophy: SMA), 근긴장성 이영양증 (myotonic dystrophy: DM), 헌팅턴병 (Huntington's Disease), 허친슨-길포드 조로 증후군 (Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome), 모세혈관확장성 운동실조 (Ataxia-telangiectasia) 또는 암 (cancer).
- [0339] 일 구체예에서, 상기 접합체는 DMD 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0340] 일 구체예에서, DMD 치료에 사용하기 위한 제2 양상에 따른 접합체가 제공된다. 적합하게는, 이러한 일 구체예에서, 상기 접합체의 치료용 분자는 디스트로핀 단백질의 발현을 증가시키도록 작동 가능하다. 적합하게는, 이러한 일 구체예에서, 상기 접합체의 치료용 분자는 기능성 디스트로핀 단백질의 발현을 증가시키도록 작동 가능하다.
- [0341] 적합하게는, 상기 접합체는 디스트로핀 발현을 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%까지 증가시킨다. 적합하게는, 상기 접합체는 디스트로핀 발현을 최대 50%까지 증가시킨다.
- [0342] 적합하게는, 상기 접합체는 디스트로핀 단백질 발현을 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%까지 복구시킨다. 적합하게는, 상기 접합체는 디스트로핀 단백질 발현을 최대 50%까지 복구시킨다.
- [0343] 적합하게는, 상기 접합체는 디스트로핀 단백질 기능을 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%까지 복구시킨다. 적합하게는, 상기 접합체는 디스트로핀 단백질 기능을 최대 50%까지 복구시킨다.
- [0344] 적합하게는, 상기 접합체의 치료용 분자는 디스트로핀 전사 중에 하나 이상의 엑손의 스킵핑을 유발함으로써 그와 같이 수행하도록 작동 가능하다.
- [0345] 적합하게는, 상기 접합체의 치료용 분자는 디스트로핀 유전자의 하나 이상의 엑손의 스킵핑을 10%, 15%, 20%,

25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 유발한다. 적합하게는, 상기 접합체의 치료용 분자는 디스트로핀 유전자의 하나 이상의 엑손의 스킵핑을 최대 50% 유발한다.

- [0346] 적합하게는, 치료될 환자 또는 대상은 임의의 동물 또는 인간일 수 있다. 적합하게는, 상기 환자 또는 대상은 비-인간 포유동물일 수 있다. 적합하게는, 상기 환자 또는 대상은 남성 또는 여성일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 대상은 남성이다.
- [0347] 적합하게는, 치료될 환자 또는 대상은 임의의 연령일 수 있다. 적합하게는, 치료될 환자 또는 대상은 0-40세, 적합하게는 0-30세, 적합하게는 0-25세, 적합하게는 0-20세이다.
- [0348] 적합하게는, 상기 접합체는 대상에게 전신으로 예를 들어 골수내, 척수강내, 심실내, 유리체내, 장내, 비경구, 정맥내, 동맥내, 근육내, 종양내, 피하, 경구 또는 비강 경로로 투여하기 위한 것이다.
- [0349] 일 구체예에서, 상기 접합체는 대상에게 정맥내 투여하기 위한 것이다.
- [0350] 일 구체예에서, 상기 접합체는 대상에게 주사로 정맥내 투여하기 위한 것이다.
- [0351] 적합하게는, 상기 접합체는 "치료적 유효량"으로 대상에게 투여하기 위한 것이며, 이는 그 양이 개체에게 유익을 나타내기에 충분한 양을 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.
- [0352] 예시적 용량은 0.01mg/kg 내지 50mg/kg, 0.05mg/kg 내지 40mg/kg, 0.1mg/kg 내지 30mg/kg, 0.5mg/kg 내지 18mg/kg, 1mg/kg 내지 16mg/kg, 2mg/kg 내지 15mg/kg, 5mg/kg 내지 10mg/kg, 10mg/kg 내지 20mg/kg, 12mg/kg 내지 18mg/kg, 13mg/kg 내지 17mg/kg일 수 있다.
- [0353] 유리하게는, 본 발명의 접합체의 투여량은 치료용 분자 단독으로부터의 임의의 효과를 확인하는데 필요한 투여량보다 낮은 차수 또는 규모이다.
- [0354] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 하나 이상의 독성 마커가 현재 이용 가능한 펩티드 담체를 사용하는 이전 접합체에 비해 유의하게 감소된다.
- [0355] 적합한 독성 마커는 신독성 마커일 수 있다.
- [0356] 적합한 독성 마커에는 KIM-1, NGAL, BUN, 크레아티닌, 알칼리성 포스파타제, 알라닌 트랜스퍼라제 및 아스파르트아미노트랜스퍼라제를 포함한다.
- [0357] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, KIM-1, NGAL 및 BUN 중 적어도 하나의 수준이 현재 이용 가능한 펩티드 담체를 사용하는 이전 접합체에 비해 감소된다.
- [0358] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 각 KIM-1, NGAL 및 BUN의 수준이 현재 이용 가능한 펩티드 담체를 사용하는 이전 접합체에 비해 감소된다.
- [0359] 적합하게는, 상기 또는 각 마커/마커들의 수준이 현재 이용 가능한 펩티드 담체를 사용하는 이전 접합체에 비해 유의하게 감소된다.
- [0360] 적합하게는, 본 발명의 접합체를 투여한 후에, 상기 또는 각 마커/마커들의 수준이 현재 이용 가능한 펩티드 담체를 사용하는 이전 접합체에 비해 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%까지 감소된다.
- [0361] 유리하게는, 상기 펩티드의 독성, 그에 따라 수득된 접합체의 독성은 이전의 세포-투과 펩티드 및 접합체에 비해 유의하게 감소된다. 특히, KIM-1 및 NGAL-1은 독성 마커이고, 이들은 현재 이용 가능한 펩티드 담체를 사용하는 이전 접합체에 비해 최대 120배까지 유의하게 감소된다.
- [0362] **핵산 및 숙주**
- [0363] 본 발명의 펩티드는 임의의 표준 단백질 합성 방법, 예를 들어 화학적 합성, 반-화학적 합성 또는 발현 시스템의 사용을 통해 제조될 수 있다.
- [0364] 따라서, 본 발명은 또한 상기 펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이로 구성된 뉴클레오티드 서열, 발현 시스템, 예컨대 발현 및 발현 조절에 필요한 서열이 수반된 상기 서열을 포함하는 벡터, 및 상기 발현 시스템에 의해 형질전환된 숙주 세포 및 숙주 유기체에 관한 것이다.

- [0365] 따라서, 본 발명에 따른 펩티드를 코딩하는 핵산이 또한 제공된다.
- [0366] 적합하게는, 상기 핵산은 단리된 형태 또는 정제된 형태로 제공될 수 있다.
- [0367] 본 발명에 따른 펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터가 또한 제공된다.
- [0368] 적합하게는, 상기 벡터는 플라스미드이다.
- [0369] 적합하게는, 상기 벡터는 본 발명에 따른 펩티드를 코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 조절 서열, 예컨대 프로모터를 포함한다. 적합하게는, 상기 발현 벡터는 적절한 세포, 예컨대 포유동물, 박테리아 또는 진균 세포로 형질감염될 때 상기 펩티드를 발현할 수 있다.
- [0370] 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다.
- [0371] 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. 적절한 벡터의 선택은 해당 분야의 지식을 가진 자의 기술 범위 내에 있다. 적절한 벡터는 플라스미드, 박테리오파지, 코스미드 및 바이러스를 포함한다.
- [0372] 생성된 펩티드는 임의의 적절한 방법, 예를 들어 침전 또는 크로마토그래피 분리, 예컨대 친화도 크로마토그래피에 의해 숙주 세포로부터 단리 및 정제될 수 있다.
- [0373] 적절한 벡터, 숙주 및 재조합 기술은 당 분야에 잘 알려져 있다.
- [0374] 본 명세서에서, 용어 "작동 가능하게 연결된 (operably linked)"은 선택된 뉴클레오티드 서열 및 조절 뉴클레오티드 서열이 조절 서열의 제어하에 뉴클레오티드 코딩 서열의 발현을 배치하는 방식으로 공유 결합된 상황을 포함할 수 있고, 상기 조절 서열은 선택된 뉴클레오티드 서열의 일부 또는 전부를 형성하는 뉴클레오티드 코딩 서열의 전사에 영향을 줄 수 있다. 적절한 경우, 수득된 전사체는 그 다음에 원하는 펩티드로 번역될 수 있다.
- [0375] **도면의 간단한 설명**
- [0376] 본 발명의 소정의 구체예는 이제 하기 도면 및 표를 참조하여 설명될 것이다:
- [0377] **도 1:** nested RT-PCR의 밀도측정 분석 (densitometry analysis)에 의해 측정된, H2K-mdx 세포에서 0.25 μ M, 0.5 μ M 및 1 μ M의 안티센스 치료용 PMO에 접합된 펩티드의 일부 DPEP1 시리즈의 인 비트로 엑손 23 스킵핑 효능 (in vitro exon 23 skipping efficacy)을 나타낸다 (오차 막대: 표준 편차, $n \geq 3$).
- [0378] **도 2:** nested RT-PCR의 밀도측정 분석에 의해 측정된, H2K-mdx 세포에서 0.25 μ M, 0.5 μ M 및 1 μ M의 안티센스 치료용 PMO에 접합된 펩티드의 일부 DPEP3 시리즈의 인 비트로 엑손 23 스킵핑 효능을 나타낸다 (오차 막대: 표준 편차, $n \geq 3$).
- [0379] **도 3:** 웨스턴 블롯 (western blot) 및 qRT-PCR로 측정된, mdx 마우스에게 단일 10 mg/kg의 정맥내 투여 후에 (A) 전경골근 (Tibalis anterior muscle), (B) 횡격막, 및 (C) 심근에서 안티센스 치료용 PMO에 접합된 펩티드의 일부 DPEP1 시리즈의 인 비보 효능을 나타낸다 (오차 막대: 표준 편차, $n=3$).
- [0380] **도 4:** 웨스턴 블롯 및 qRT-PCR로 측정된, mdx 마우스에게 단일 10 mg/kg의 정맥내 투여 후에 (A) 전경골근, (B) 횡격막, 및 (C) 심근에서 안티센스 치료용 PMO에 접합된 펩티드의 일부 DPEP3 시리즈의 인 비보 효능을 나타낸다 (오차 막대: 표준 편차, $n=3$).
- [0381] **도 5:** 안티센스 치료용 PMO에 접합된 다양한 DPEP 펩티드의 30 mg/kg의 단일 용량을 투여하고 2일 및 7일 후에, C57BL/6 마우스의 소변에서 측정된 상대 KIM-1 수준을, 동일한 안티센스 치료용 PMO에 접합된 현재 이용 가능한 펩티드 담체 및 식염수와 비교하여 나타낸다 (오차 막대: 표준 편차, $n=6$).
- [0382] **도 6:** 안티센스 치료용 PMO에 접합된 다양한 DPEP 펩티드의 30 mg/kg의 단일 용량을 투여하고 2일 및 7일 후에, C57BL/6 마우스의 소변에서 측정된 상대 NGAL 수준을, 동일한 안티센스 치료용 PMO에 접합된 현재 이용 가능한 펩티드 담체 및 식염수와 비교하여 나타낸다 (오차 막대: 표준 편차, $n=6$).
- [0383] **도 7:** 안티센스 치료용 PMO에 접합된 다양한 DPEP 펩티드의 30 mg/kg의 단일 용량을 투여하고 7일 후에, C57BL/6 마우스에서 측정된 BUN 혈청 수준을, 동일한 안티센스 치료용 PMO에 접합된 현재 이용 가능한 펩티드 담체 및 식염수와 비교하여 나타낸다 (오차 막대: 표준 편차, $n=6$).

- [0384] **도 8:** 안티센스 치료용 PMO에 접합된 다양한 DPEP 펩티드의 30 mg/kg의 단일 용량을 투여하고 7일 후에, C57BL/6 마우스에서 측정된 크레아티닌 혈청 수준을, 동일한 안티센스 치료용 PMO에 접합된 현재 이용 가능한 펩티드 담체 및 식염수와 비교하여 나타낸다 (오차 막대: 표준 편차, n=6).
- [0385] **도 9:** 안티센스 치료용 PMO에 접합된 다양한 DPEP 펩티드의 30 mg/kg의 단일 용량을 투여하고 7일 후에, C57BL/6 마우스에서 측정된 (A) 알라닌 트랜스퍼라제, (B) 알칼리성 포스파타제 및 (C) 아스파르테이트 아미노 트랜스퍼라제 혈청 수준들을, 동일한 안티센스 치료용 PMO에 접합된 현재 이용 가능한 펩티드 담체 및 식염수와 비교하여 나타낸다 (오차 막대: 표준 편차, n=6).
- [0386] **도 10:** 안티센스 치료용 PMO에 접합된 다양한 DPEP 펩티드의 단일 30 mg/kg의 정맥내 투여 후에, C57BL/6 마우스의 (A) 전경골근, (B) 횡격막, 및 (C) 심장에서 qRT-PCR에 의해 평가된 엑손 23 스킵핑의 인 비보 효능을, 동일한 안티센스 치료용 PMO에 접합된 현재 이용 가능한 펩티드 담체 및 식염수와 비교하여 나타낸다.
- [0387] **도 11A 및 B:** 8-10주령의 C57BL6 마우스 (n=4-6)에게 2.5-50 mg/kg 사이의 상이한 양의 펩티드-PMO의 단일 용량 투여 후 2일차 또는 7일차에, 요중 (urinary) KIM-1 수준을, 동일한 안티센스 치료용 PMO에 접합된 현재 이용 가능한 펩티드 담체와 비교한 평가. KIM-1 수준은 ELISA에 의해 결정되었고, 요중 크레아티닌 수준에 대해 정규화되었다. 데이터는 식염수가 주입된 마우스 대조군 KIM-1 수준에 대한 배수-변화로써 제시된다 (n=10).
- [0388] **도 12:** 8-10주령의 C57BL6 마우스 (n=3-6)에게 2.5-50 mg/kg의 증가하는 양의 단일 용량 투여 후에, 펩티드-PMO의 인 비보 엑손 스킵핑 효능을, 동일한 안티센스 치료용 PMO에 접합된 현재 이용 가능한 펩티드 담체와 비교한 용량-반응 비교 연구. 엑손 23 배제의 qPCR 분석은 투여 7일 후에, (A) 전경골근, (B) 횡격막 및 (C) 심장에서 평가되었다.
- [0389] **도 13:** 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체가 다양한 농도에서 DMPK 유전자에서 2600개의 반복부를 갖는 DM1 환자로부터 유래된 DM1 환자 근모세포 (myoblasts)에서 인 비트로 Mbn11 전사체의 스플라이싱 결함을 수정하는 것을 나타낸다 (n=1-3).
- [0390] **도 14:** 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체가 다양한 농도에서 DMPK 유전자에서 2600개의 반복부를 갖는 DM1 환자로부터 유래된 DM1 환자 근모세포에서 인 비트로 DMD 전사체의 스플라이싱 결함을 수정하는 것을 나타낸다 (오차 막대: 평균 ± SEM, n=1-3).
- [0391] **도 15:** 표준 곡선에 맞게 희석된 샘플로 ELISA에 의해 측정된, C57BL6 암컷 마우스에서 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체의 주사 후 2일차 및 7일차로부터 소변에서 평가된 상대 KIM-1 수준을 나타낸다. 요중 단백질 농도를 설명하기 위해 요중 크레아티닌 수준에 대해 값을 정규화하였다. KIM-1 수준은 펩티드 담체의 이전 Pip 시리즈에 의해 유도된 배수 증가와 비교하여 식염수 대조군 주입과 유사하였다 (오차 막대: 평균 ± SEM, n=4-10).
- [0392] **도 16:** 표준 곡선에 맞게 희석된 샘플로 ELISA에 의해 측정된, C57BL6 암컷 마우스에서 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체의 주사 후 2일차 및 7일차로부터 소변에서 측정된 상대 NGAL 수준을 나타낸다. 요중 단백질 농도를 설명하기 위해 요중 크레아티닌 수준에 대해 값을 정규화하였다. NGAL 수준은 펩티드 담체의 이전 Pip 시리즈에 의해 유도된 배수 증가와 비교하여 식염수 대조군 주입과 유사하였다 (오차 막대: 평균 ± SEM, n=4-10).
- [0393] **도 17:** C57BL6 암컷 마우스에서 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체들의 주사 후 7일차로부터 혈청에서 평가된 BUN 수준을 식염수와 비교하여 나타낸다. BUN 수준은 펩티드 담체의 이전 Pip 시리즈에 의해 유도된 배수 증가와 비교하여 식염수 대조군 주입과 유사하였다 (오차 막대: 평균 ± SEM, n=4-10).
- [0394] **도 18:** C57BL6 암컷 마우스에서 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체들의 주사 후 7일차로부터 혈청에서 평가된 크레아티닌 수준을 식염수와 비교하여 나타낸다. 크레아티닌 수준은 펩티드 담체의 이전 Pip 시리즈에 의해 유도된 배수 증가와 비교하여 식염수 대조군 주입과 유사하였다 (오차 막대: 평균 ± SEM, n=4-10).
- [0395] **도 19:** 상이한 DPEP1/3-[CAG]₇ PMO 접합체를 볼루스 IV (꼬리 정맥) 주사로 투여한 C57BL6 암컷 마우스로부터의 혈청에서, 주사 후 7일차 컬렉션에서 평가된 (A) 알라닌 트랜스퍼라제 (ALT), (B) 알칼리성 포스파타제 (ALP) 및 (C) 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST) 수준들을 식염수와 비교하여 나타낸다. ALP, ALT, AST 수준은 펩티드 담체의 이전 Pip 시리즈에 의해 유도된 배수 증가와 비교하여 식염수 대조군 주입과 유사하였다.
- [0396] 본 명세서의 기재내용 및 청구범위 전반에 걸쳐, 단어 "포함한다 (comprise)" 및 "함유한다 (contain)" 및 이들

의 변형은 "포함하지만, 이에 한정되 않음 (including but not limited to)"을 의미하고, 이는 다른 모어어티, 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하려는 의도는 아니다 (배제하지 않는다). 본 명세서의 기재내용 및 청구 범위 전반에 걸쳐, 단수 (singular)는 문맥상 달리 요구하지 않는 한 복수 (plural)를 포함한다. 특히, 부정 관사 (indefinite article)가 사용되는 경우, 명세서는 문맥상 달리 요구하지 않는 한 단수뿐만 아니라 복수를 고려하는 것으로 이해되어야 한다.

[0397] 본 발명의 특정 양상, 구체예 또는 실시예와 관련하여 기재된 특징, 정수, 특성, 화합물, 화학적 모어어티 또는 그룹은 이와 적합하다면 본원에 기재된 임의의 다른 양상, 구체예 또는 실시예에 적용 가능한 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서 (임의의 수반되는 청구범위, 요약 및 도면 포함)에 개시된 모든 특징, 및/또는 그와 같이 개시된 임의의 방법 또는 공정의 모든 단계는 임의의 조합으로 조합될 수 있고, 단 이러한 특징들 및/또는 단계들의 적어도 일부가 상호 배타적인 경우의 조합은 제외한다.

[0398] 본 발명은 임의의 전술한 구체예의 세부 사항에 제한되지 않는다. 본 발명은 본 명세서 (임의의 수반되는 청구 범위, 요약 및 도면 포함)에 개시된 특징들 중 임의의 신규한 하나 또는 임의의 신규 조합, 또는 그와 같이 개시된 임의의 방법 또는 공정의 단계들 중 임의의 신규한 하나 또는 임의의 신규 조합까지 확장된다. 독자는 본 출원과 관련하여 본 명세서와 동시에 또는 이전에 제출되고, 본 명세서와 함께 공개 심사를 받을 수 있는 모든 논문 및 문헌에 주목하고, 이러한 모든 논문 및 문헌의 내용은 본원에 참조로 통합된다.

[0399] 실시예

[0400] 1. 물질 및 방법

[0401] 1.1 P-PMO 합성 및 준비

[0402] 9-플루오렌닐메톡시카보닐 (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. HPLC 등급 아세트니트릴, 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. 닭 배아 추출물 (Chicken Embryo Extract) 및 말 혈청 (horse serum)은 Sera Laboratories International Ltd (West Sussex, UK)로부터 입수하였다. 인터페론은 Roche Applied Science (Penzberg, Germany)로부터 입수하였다. 모든 다른 시약은 달리 명시하지 않는 한 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 입수하였다. MALDI-TOF 질량 분광분석은 Voyager DE Pro BioSpectrometry workstation을 사용하여 수행하였다. 수 중 50% 아세트니트릴 중 에 α-시아노-4-히드록시신남산 또는 시나편산의 10 mg mL⁻¹의 스톱 용액을 매트릭스 (matrix)로서 사용하였다. 오차 막대는 ± 0.1%이다.

[0403] 1.2 H2k mdx 세포에서 스크리닝을 위한 P-PMO 펩티드의 합성

[0404] a) 펩티드 변이체 라이브러리의 제작

[0405] 펩티드들은 Intavis Parallel Peptide Synthesizer를 사용하여 10 μmol 스케일로, 또는 CEM Liberty BlueTM Peptide Synthesizer (Buckingham, UK)를 사용하여 100 μmol 스케일로, Fmoc-β-Ala-OH 사전로딩된 Wang 수지 (0.19 또는 0.46 mmol g⁻¹, Merck Millipore)를 사용하고 표준 Fmoc 화학을 적용하고 제조자의 권장 사항에 따라 제조하였다. 상기 Intavis Parallel Peptide Synthesizer를 사용한 합성의 경우, PyBOP/NMM 커플링 혼합물을 사용한 이중 커플링 단계 (double coupling steps)를 사용하고, 각 단계 후에 아세트산 무수물 캡핑 (acetic anhydride capping)을 수행하였다. CEM Liberty Blue Peptide Synthesizer를 사용한 합성의 경우, 이중 커플링이 수행되는 아르기닌을 제외한, 모든 아미노산에 대해 단일 표준 커플링이 수행되었다. 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 2회, 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 : 트리이소프로필

실란 (TIPS) (95% : 2.5% : 2.5% : 3-10 mL)으로 구성된 절단 콕테일 (cleavage cocktail)로 상기 펩티드를 실온에서 3시간 동안 처리하여 고체 지지체로부터 절단하였다. 상기 펩티드를 방출시킨 후에, 질소를 살포하여 과량의 TFA를 제거하였다. 냉 디에틸 에테르 (합성 스케일에 따라 15-40 mL)를 첨가하여 조(crude) 펩티드를 침전시키고, 3200 rpm에서 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⁻¹의 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, 동결 건조하여 펩티드를 백색 고형물로 수득하였다.

표 1

펩티드 번호	통합된 서열 번호	시험된 서열(추가 C 및 N 말단 변형을 가짐)
D-PEP 1.1	27	Ac-RBRRBRRFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.2	28	Ac-RBRRBRRFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.3	29	Ac-RBRRBRFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.4	30	Ac-RBRBRFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.5	31	Ac-RBRRBRRYQFLIRBRBR-B
D-PEP 1.6	32	Ac-RBRRBRRILFYRBRBR-B
D-PEP 1.7	33	Ac-RBRRBRFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.8	34	Ac-RBRRBFQILYRBRBR-B
D-PEP 1.9	35	Ac-RBRRBRFQILYBRBR-B
D-PEP 1.10	36	Ac-RBRRBFQILYRBRBR-B
D-PEP 3.1	37	Ac-RBRRBRRFQILYRBHBH-B
D-PEP 3.2	38	Ac-RBRRBRRFQILYHBHBR-B
D-PEP 3.3	39	Ac-RBRRBRRFQILYHBRBH-B
D-PEP 3.4	40	Ac-RBRRBRRYQFLIRBHBH-B
D-PEP 3.5	41	Ac-RBRRBRRILFYRBHBH-B
D-PEP 3.6	42	Ac-RBRHBHRFQILYRBRBR-B
D-PEP 3.7	43	Ac-RBRBBHRFQILYRBHBH-B
D-PEP 3.8	44	Ac-RBRRBRFQILYRBHBH-B
D-PEP 3.9	45	Ac-RBRRBRFQILYHBHBH-B
D-PEP 3.10	46	Ac-RBRRBHFQILYRBHBH-B
D-PEP 3.11	47	Ac-HBRRBRFQILYRBHBH-B
D-PEP 3.12	48	Ac-RBRRBFQILYRBHBH-B
D-PEP 3.13	49	Ac-RBRRBRFQILYBHBH-B
D-PEP 3.14	50	Ac-RBRRBRYQFLIHBHBH-B
D-PEP 3.15	51	Ac-RBRRBRILFYHBHBH-B
D-PEP 3.16	52	Ac-RBRRBRRFQILYHBHBH-B
Pip9b2	113	Ac-RXRRBRR-FQILY-RBRXR-B
R6Gly	114	RRRRRR-G

[0406]

[0407]

표 1: 실시예에서 시험을 위해 N-말단 아세틸화 및 C-말단 베타-알라닌 링커를 사용하여 합성된 펩티드. Pip9b2 및 R6Gly는 비교 펩티드이다. R6Gly는 C-말단 글리신을 링커로 사용한다.

[0408]

b) PMO-펩티드 접합체 라이브러리의 합성

[0409]

마우스 디스트로핀 엑손-23에 대한 25-mer PMO 안티센스 서열 (GGCCAAACCTCGGCTTACTGAAAT (서열 번호: 90))을

사용하였다. 상기 펩티드는 이의 C-말단 카복실기를 통해 PMO의 3'-말단에 접합되었다. 이는 펩티드에 대해 2.3 당량의 DIPEA, 및 DMSO에 용해된 PMO에 대해 2.5배 과량의 펩티드의 존재하에 NMP 중에 각각 2.3 당량 및 2 당량의 PyBOP 및 HOAt를 사용하여 수행되었다. 몇몇 예에서, 상기 펩티드의 C-말단 카복실기의 활성화를 위해 PyBOP 대신에 2.3 당량의 HBTU를 사용하였다. 일반적으로, *N*-메틸피롤리돈 (NMP, 80 μ L) 중 펩티드 (2500 nmol) 용액에 PyBOP (NMP 중 0.3 M의 19.2 μ L), HOAt (16.7 μ L의 0.3 M NMP), DIPEA (1.0 μ L) 및 PMO (DMSO 중 10 mM의 100 μ L)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 40°C에서 2.5시간 동안 정치시키고, 상기 반응은 H₂O 중 0.1% TFA (300 μ L)를 첨가하여 퀀칭하였다. 상기 용액은 변환된 Gilson HPLC 시스템을 사용하여 이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 상기 PMO-펩티드 접합체를 4 mL min⁻¹의 유속으로 20% CH₃CN을 함유하는 인산나트륨 버퍼 (25 mM, pH 7.0) 중에 염화나트륨 (0 내지 1M)의 선형 구배를 사용하여 이온 교환 컬럼 (Resource S 4 mL, GE Healthcare)에서 정제하였다. 상기 원하는 화합물을 함유하는 분획물들을 조합하고, 동결 건조하여 펩티드-PMO 유도체를 백색 고형물로 수득하였다. Amicon® ultra-15 3K 원심분리 필터 장치를 사용하여 이온 교환 후에 수집된 분획물의 여과를 통해 펩티드-PMO 접합체로부터 과량의 염을 제거하였다. 상기 접합체를 동결 건조시키고, MALDI-TOF로 분석하였다. 상기 접합체를 멸균수 (sterile water)에 용해시키고, 사용 전에 0.22 μ m 셀룰로스 아세테이트 막을 통해 여과하였다. 펩티드-PMO의 농도는 0.1 N의 HCl 용액에서 상기 접합체의 265 nm에서의 몰 흡광도 (molar absorption)에 의해 결정되었다. (수율은 하기 표 2 참조).

표 2

펩티드-PMO	수율
D-Pep 1.1-PMO	36 %
D-Pep 1.2-PMO	--
D-Pep 1.3-PMO	25 % ^a
D-Pep 1.4-PMO	24 % ^a
D-Pep 1.5-PMO	24 % ^a
D-Pep 1.6-PMO	25 % ^a
D-Pep 1.7-PMO	33 %
D-pep 1.8-PMO	41 %
D-Pep 1.9-PMO	35 %
D-Pep 1.10-PMO	33 %
D-Pep 3.1-PMO	28 %
D-Pep 3.2-PMO	33 %
D-Pep 3.3-PMO	33 %
D-Pep 3.4-PMO	35 %
D-Pep 3.5-PMO	37 %
D-Pep 3.6-PMO	34 %
D-Pep 3.7-PMO	26 %
D-pep 3.8-PMO	34 %
D-Pep 3.9-PMO	28 %
D-Pep 3.10-PMO	28 %
D-Pep 3.11-PMO	29 %
D-Pep 3.12-PMO	29 %
D-Pep 3.13-PMO	31 %
D-Pep 3.14-PMO	34 %
D-Pep 3.15-PMO	32 %
D-Pep 3.16-PMO	--

[0410]

[0411]

표 2. 세포 배양 분석을 위한 P-PMO 접합체의 수율 (상기 수율은 동결 건조된 정제된 P-PMO의 건조 중량을 기준으로 함. 상기 P-PMO의 순도는 220 nm 및 260 nm에서 정상 (normal phase) HPLC로 확인된 바와 같이 95% 초과임. (a) 상기 P-PMO는 PyBOP 대신에 HBTU 활성화를 사용하여 합성되었음.)

[0412]

1.3 세포 배양

[0413]

20% 열-불활성화 우태아 혈청 (FBS Gold, PAA laboratories), 2% 닭 배아 추출물 (Seralab), 1% 페니실린-스트렙토마이신-네오마이신 항생제 혼합물 (PSN, Gibco) 및 3pg/ μ L의 γ -인터페론 (Roche)이 보충된 Dulbecco 변형된 Eagles 배지 (DMEM PAA laboratories) 중에서 10% CO₂ 하에 33°C에서 젤라틴 (0.01%) 코팅된 플라스크에서 뮤린 H2k mdx 근모세포를 배양하였다. 세포를 젤라틴 (0.01%) 코팅된 24-웰 플레이트에 2 x 10⁵ 세포/mL의 밀도로 시딩하고, 33°C, 10% CO₂에서 2일 동안 정치하였다. 근관 (myotubes)으로 분화시키기 위해, 세포를 5% 말혈청 (Sigma) 및 1% PSN이 보충된 DMEM 중에서 37°C, 5% CO₂ 하에 2일 동안 추가로 성장시켰다.

[0414] **1.4 세포 형질감염**

[0415] 무혈청 Opti-MEM 중에서 상기에 기재된 바와 같이 제조된 펩티드-PMO 접합체와 세포를 인큐베이션하고, 350 μ L를 듀플리케이트(duplicates)로서 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음에 형질감염 배지를 5% 말 혈청 및 1% PSN이 보충된 DMEM으로 교체하고, 상기 세포를 37°C에서 추가 20시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 0.5 mL의 TRI RNA (Sigma) 단리 시약을 각 웰에 첨가하였다. 세포를 -80°C에서 1시간 동안 동결시켰다.

[0416] **1.5 RNA 추출 및 nested RT-PCR 분석**

[0417] 전체 세포 RNA를 TRI 시약을 사용하여 추출하면서 에탄올을 사용하여 추가로 침전시켰다. 상기 정제된 RNA는 Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific)을 사용하여 정량화하였다. 상기 RNA (400 ng)는 OneStep RT-PCR 키트 (Roche, Indianapolis, USA)를 사용한 RT-PCR을 위한 주형으로 사용하였다. 프라이머 서열은 표 4를 참조한다. 초기 역전사를 위한 사이클 조건은 50°C에서 30분 및 94°C에서 7분의 1회 사이클, 그 다음에 94°C에서 20초, 55°C에서 40초 및 68°C에서 80초의 30회 사이클로 수행하였다. 1 마이크로리터의 RT-PCR 산물을 제2 PCR 단계를 위한 주형으로 사용하였다. 증폭은 0.5 U의 SuperTAQ를 사용하여 94°C에서 30초, 55°C에서 1분 및 72°C에서 1분의 25회 사이클로 수행하였다. 상기 산물들을 1.5% 아가로스 겔을 사용하여 전기영동으로 분리하였다. 아가로스 겔의 이미지는 Molecular Imager ChemiDoc™ XRS⁺ 이미징 시스템 (BioRad, UK)에서 촬상하였고, 이미지는 Image Lab (V4.1)을 사용하여 분석하였다. Microsoft Excel을 사용하여 엑손-스키핑 에세이 데이터를 분석하고 플롯팅하였고, 이는 적어도 3회의 독립적인 실험으로부터의 엑손-23 스키핑의 퍼센트로 표시되었다.

[0418] **1.6 H2k mdx 마우스에서 시험하기 위한 PMO-펩티드 접합체의 합성**

[0419] *a) 펩티드 변이체의 합성*

[0420] 펩티드들은 제조자의 권장 사항에 따라 CEM Liberty Blue™ microwave Peptide Synthesizer (Buckingham, UK) 및 Fmoc 화학을 사용하여 100 μ mol 스케일로 합성하였다. 사용된 측쇄 보호기는 트리플루오로아세트산 처리에 불안정하였고, 상기 펩티드는 DIPEA의 존재하에 PyBOP (5배 과량)를 사용하여 활성화된 5배 과량의 Fmoc-보호된 아미노산 (0.25 mmol)을 사용하여 합성하였다. 피페리딘 (DMF 중 20% v/v)을 사용하여 N-Fmoc 보호기를 제거하였다. 커플링은 아르기닌 잔기를 제외하고 60-와트 마이크로파 전력에서 75°C에서 5분 동안 1회 수행하였고, 아르기닌 잔기는 각각 2회 커플링되었다. 각 탈보호 반응은 35-와트 마이크로파 전력에서 75°C에서 2회, 1회는 30초 동안, 그 다음에 1회는 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. 상기 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%, 10 mL)으로 구성된 절단 각테일로 상기 펩티드를 실온에서 3시간 동안 처리하여 고체 지지체로부터 절단하였다. 질소를 살포하여 과량의 TFA를 제거하였다. 빙냉 디에틸 에테르의 첨가를 통해 상기 절단된 펩티드를 침전시키고, 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 조 펩티드 펠렛을 냉 디에틸 에테르 (3 x 40 mL)로 3회 세척하고, 445-LC 스케일-업 모듈 및 440-LC 분획 수집기가 장착된 Varian 940-LC HPLC 시스템을 사용하여 RP-HPLC로 정제하였다. 15 mL min⁻¹의 유속으로 0.1% TFA/H₂O 중에 CH₃CN의 선형 구배를 사용하여 RP-C18 컬럼 (10 x 250 mm, Phenomenex Jupiter)에서 반-분취용 HPLC로 펩티드들을 정제하였다. 검출은 220 nm 및 260 nm에서 수행하였다.

[0421] *b) PMO-펩티드 접합체의 합성*

[0422] 마우스 디스트로핀 엑손-23에 대한 25-mer PMO 안티센스 서열 (GGCCAAACCTCGGCTTACTGAAAT (서열 번호: 90))을 사용하였다. 상기 펩티드는 이의 C-말단 카복실기를 통해 PMO의 3'-말단에 접합되었다. 이는 펩티드에 대해 2.3 당량의 DIPEA, 및 DMSO에 용해된 PMO에 대해 2.5배 과량의 펩티드의 존재하에 NMP 중에 각각 2.3 및 2배 당량의 PyBOP 및 HOAt를 사용하여 수행하였다. 몇몇 예에서, 상기 펩티드의 C-말단 카복실기의 활성화를 위해 PyBOP 대신에 HBTU (2.3 당량)를 사용하였다. 일반적으로, N-메틸피롤리돈 (NMP, 100 μ L) 중 펩티드 (10 μ mol) 용액에, PyBOP (NMP 중 0.3 M의 76.6 μ L), HOAt (66.7 μ L의 0.3 M NMP), DIPEA (4.0 μ L) 및 PMO (DMSO 중 10 mM의 400 μ L)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 정치시키고, 상기 반응은 0.1% TFA (1 mL)를 첨가하여 퀸칭하였다. 상기 반응은 6 mL min⁻¹의 유속에서 20 % CH₃CN을 함유하는 인산나트륨 버퍼 (25 mM, pH 7.0) 중 염화나트륨 (0 내지 1 M)의 선형 구배를 사용하는 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼

(Resource S 6 mL column, GE Healthcare)에서 정제하였다. Amicon® ultra-15 3K 원심분리 필터 장치를 사용하여 이온 교환 후에 수집된 분획물의 여과를 통해 펩티드-PMO 접합체로부터 과량의 염을 제거하였다. 상기 접합체를 동결 건조시키고, MALDI-TOF로 분석하였다. 상기 접합체를 멸균수에 용해시키고, 사용 전에 0.22 µm 셀룰로스 아세테이트 막을 통해 여과하였다. 펩티드-PMO의 농도는 0.1 N의 HCl 용액에서 상기 접합체의 265 nm에서의 물 흡광도에 의해 결정하였다. 전체 수율 (표 3)은 PMO에 기초하여 25-36%이었다.

표 3

펩티드-PMO	수율
D-Pep 1.1-PMO	36 %
D-Pep 1.3-PMO	25 % ^a
D-Pep 1.4-PMO	24 % ^a
D-Pep 1.5-PMO	25 % ^a
D-Pep 1.6-PMO	25 % ^a
D-Pep 3.1-PMO	28 %
D-Pep 3.2-PMO	33 %
D-Pep 3.7-PMO	26 %
D-pep 3.8-PMO	34 %
D-Pep 3.9-PMO	28 %
D-Pep 3.10-PMO	28 %

[0423]

[0424]

표 3. 인 비보 분석을 위해 대규모로 합성된 P-PMO 접합체의 수율 (상기 수율은 동결 건조된 정제된 P-PMO의 건조 중량을 기초로 함. 상기 PPMO의 순도는 220 nm 및 260 nm에서 정상 HPLC로 확인된 바와 같이 95% 초과임. (a) 상기 PPMO는 PyBOP 대신에 HBTU 활성화를 사용하여 합성되었음.)

[0425]

1.7 P-PMO에 의한 디스트로핀 복구의 인 비보 평가

[0426]

실험은 옥스포드 대학의 생물학 과학부에서 기관 윤리 검토 후에 홈 오피스 프로젝트 라이선스 승인하에 수행되었다. 마우스는 최소 질병 시설 (minimal disease facility)에 수용되었다; 환경은 12시간의 명암 주기로 온도를 조절하였다. 모든 동물에게 시판되는 설치류 사료 및 물을 자유롭게 제공하였다.

[0427]

실험은 10-12주령의 암컷 mdx 마우스에서 수행하였다. 10 mg/kg의 P-PMO의 단일 꼬리 정맥 주사 전에 Mdx 마우스를 구속하였다. 주사 1주일 후에 마우스를 희생시키고, TA, 심장 및 횡격막 근육을 꺼내고, 드라이-아이스로 냉각된 이소펜탄에서 순간 동결시키고, -80°C에서 보관하였다.

[0428]

1.8 웨스턴 블롯 분석

[0429]

단일 투여 후에 디스트로핀 복구 기간을 평가하기 위해, 상기 근육 (TA 및 횡격막의 경우)의 1/3 또는 90개의 7 µm 두께의 횡단 크리오섹션 (cryosections) (심장의 경우)을 300 µl 버퍼 (50mM 트리스 (Tris) pH 8, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% 테옥시콜레이트 나트륨, 10% SDS 및 프로테아제/포스파타제 억제제) 중에 용해시킨 후에 13000 rpm (Heraeus, #3325B)에서 10분 동안 원심분리하였다. 상등액을 수집하고, 100°C에서 3분 동안 가열하였다. 단백질은 BCA 방법으로 정량하고, 40 µg의 단백질/샘플을 이전에 기재된 바(19)와 같이 NuPage 3-8% 트리스-아세테이트 겔에서 분리시켰다. 단백질을 0.45 µm 공극 크기의 PVDF 막으로 30V에서 1시간 동안, 이어서 100V에서 1시간 동안 전달하고, 이전에 기재된 바와 같이 (37) 모노클로날 항-디스트로핀 (1:200, NCL-DYS1, Novocastra) 및 항-빈쿨린 (로딩 대조군, 1:100 000, hVIN-1, Sigma) 항체로 프로브하였다. 2차 항체 IRDye 800CW 염소 항-마우스를 1:20000 (LicOR)으로 희석하여 사용하였다.

[0430]

P-PMO 처리된 mdx 마우스에서 디스트로핀 복구 수준은 100%로 간주되는 C57BL/10 야생형 대조군 마우스의 수준에 대해 표시하였다. 이를 위해, P-PMO 처리된 mdx 샘플과 병렬로 5개의 일련의 C57BL/10 단백질 희석물들을

포함시킴으로써 표준 곡선을 생성하였다. 희석 시리즈는 하기와 같았다: 레인 (lane) 당 로딩된 40 µg의 총 단백질의 각각 75%, 40%, 15%, 5% 또는 0%는 C57BL/10 단백질 용해물들로부터 유래되었고, 나머지는 처리되지 않은 mdx 단백질 용해물로부터 유래되었다. 이들 표준을 분취하고, 처리된 mdx 샘플과 병행하여 각 웨스턴 블롯에서 사용하였다. 모든 표준 및 처리된 샘플에 대해, 디스트로핀 세기 정량화 (Dystrophin intensity quantification)는 형광 오디세이 이미징 시스템에 의해 수행되었고, 모든 샘플에서 빈출된 형광 세기에 대한 비율을 계산하여 정규화하였다. 최적의 수학적 표시를 얻기 위해 디스트로핀의 알려진 농도에 대해 표준 정규화된 값을 플롯팅하였고, 이러한 표시를 사용하여 P-PMO 처리된 mdx 마우스의 각 샘플의 정규화된 값을 보간 (interpolate)하였다.

[0431] 1.9 인 비보 Dmd 엑손 23 스킵핑의 RT-qPCR 분석

[0432] 마우스 Dmd 전사체로부터 엑손 23 배제의 정량화는 펩티드-PMO로 처리된 골격근 및 심장 조직에서 수행되었다. 간단하게, 트리졸-기반 추출 방법을 사용하여 균질화된 조직으로부터 RNA를 추출하고, 랜덤 프라이머를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 프라이머/프로브는 Integrated DNA Technologies에 의해 합성되었고, 스킵핑되지 않은 산물을 나타내는 엑손 23 - 24에 걸친 영역을 증폭하거나 (mDMD23-24, 표 4 참조), 또는 엑손 22 및 24의 경계에 걸쳐있는 프로브를 사용하여 엑손 23이 결여된 전사체를 특별히 증폭하도록(mDMD22-24) 디자인하였다. 각 전사체들의 수준은 알려진 전사체 양을 사용하여 제작된 표준 곡선에 대한 보정으로 결정되었고, 스킵핑 퍼센트는 [skip]/[skip+unskip]에 의해 유도되었다.

표 4

분석 ID	프라이머 서열 (5'-3')	서열 번호
<i>Nested RT-PCR</i>		
Exon20Fo	CAGAATTCTGCCAATTGCTGAG	91
Exon26Ro	TTCTTCAGCTTGTGTCATCC	92
Exon20Fi	CCCAGTCTACCACCCTATCAGAGC	93
Exon26Ri	CCTGCCTTTAAGGCTTCCTT	94
<i>qRT-PCR</i>		
mDMD23-24	프라이머 1 CAGGCCATTCTCTTTCAGG	95
	프라이머 2 GAACTTTCCTCCAGTTGGT	96
	프로브 /5FAM/TCAACTTCA/ZEN/GCCATCCATTTCTGTAAGGT/3IABkFQ/	97
mDMD22-24	프라이머 1 CTGAATATGAAATAATGGAGGAGAGACTCG	98
	프라이머 2 CTTCAGCCATCCATTTCTGTAAGGT	99
	프로브 /5FAM/ATGTGATTC/ZEN/TGTAATTTCC/3IABkFQ/	100

[0433]

[0434] 표 4: nested RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 방법에 의한 엑손 23 스킵핑의 정량화를 위한 프라이머 및 프로브 서열.

[0435] 1.10 펩티드-PMO의 독성학적 평가

[0436] 8-10 주령의 암컷 C57BL/6 마우스에 꼬리 정맥으로 블루스 정맥내 주사하여 0.9% 식염수 중에 30 mg/kg 단일 용량의 펩티드-PMO를 투여하였다. 대사 케이지 (Tecniplast, UK)에서 20시간 동안 수용한 후에 투여 후 2일차 및 7일차에 냉장 조건에서 소변을 비-침습적으로 수집하였다. 7일차에 부검시에 경정맥으로부터 혈청을 수집하였고, 전경골근, 횡격막, 및 심장 조직도 수집하였다.

- [0437] 0.9% 식염수 중에 2.5 mg/kg 내지 최대 50 mg/kg의 펩티드-PMO의 다양한 단일 투여량으로 정맥내 꼬리 정맥 주사에 의해 동일한 절차를 따랐다.
- [0438] 요중 KIM-1 (Kidney injury molecule-1) 및 NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) 수준은 표준 곡선에 맞게 소변을 적절히 희석한 후에 ELISA (KIM-1 R&D cat# MKM100, NGAL R&D cat# MLCN20)로 정량화하였다. MRC Harwell Institute, Mary Lyon Centre, Oxfordshire, UK에서 정량된 요중 크레아티닌 수준에 대해 상기 값들을 정규화하였다. 혈청 혈중 요소 질소 수준은 MRC Harwell Institute, Mary Lyon Centre, Oxfordshire, UK에서 정량하였다.
- [0439] 모든 수준은 AU680 Clinical Chemistry Analyser, Beckman Coulter에서 정량하였다.
- [0440] 엑손 스키피ng 효능의 정량은 엑손 23 스키피ng 및 비-스키피ng 전사체의 정량적 RT-PCR에 의해 결정되었고, 전체 (스키피ng 및 비스키피ng) 전사체에 대한 스키피ng된 전사체의 퍼센트로서 표시되었다 (서열은 표 4 참조).
- [0441] **2. 결과**
- [0442] 본원에 제공된 결과는 세포내 엑손 스키피ng 활성화에 있어서 본원에서 생성된 펩티드-PMO 접합체의 명확한 용량 반응 효과를 입증하였다 (도 1, 2 및 12). 이들 도면은 또한 모든 DPEP1 및 DPEP3 시리즈, 즉 본 발명의 펩티드가 세포에서 충분한 세포-투과 효능을 가지므로, 치료적 용도로 고려될 수 있음을 강조하였다.
- [0443] 본원에 제공된 결과는 질병의 관련 마우스 모델에서 인 비보 펩티드-PMO 접합체의 활성을 추가로 강조하였다 (도 3-4). 전반적으로 결과는 이러한 접합체의 활성이 전경골근 > 횡격막 > 심장에서 가장 크다는 것을 시사한다. 이들 도면은 본 발명의 DPEP 펩티드 접합체가 인 비보에서 양호한 엑손 스키피ng 활성을 가지며, 인 비보에서 디스트로핀 단백질 발현의 증가를 제공함을 나타내었다. 또한, 본 발명의 DPEP 접합체는 동일한 접합체에서 사용될 때 두 양상들 모두에서 'PIP' 펩티드 및 R6Gly와 같은 이전의 세포-투과 펩티드보다 우수하다.
- [0444] 또한 본원에서 DPEP 펩티드 접합체 화합물 투여 후에 KIM-1 및 NGAL (신독성의 지표)의 수준이 이전의 세포-투과 펩티드들과의 접합체보다 모두 유의하게 더 낮다는 것이 입증되었다. DPEP 1.9 및 3.8 접합체들은 이러한 마커들의 최저 수준을 나타내었다 (도 5, 6 및 11). 혈청 혈중 요소 질소 수준 (신장 기능장애의 또 다른 마커)은 Pip9b2와의 접합체에 대해서만 상승하고, 본 발명의 DPEP 펩티드와의 접합체에 대해서는 상승하지 않았다 (도 7). 두 번째 주요 발견은 투여 7일 후에 KIM-1 및 NGAL 수준이 모든 DPEP 펩티드 접합체에 대해 식염수 수준에 가깝게 감소되었고, 이는 또한 신장-관련 독성의 일부 역전 및 개선이 있음을 시사한다. 이전의 세포-투과 펩티드를 사용한 접합체에서는 이러한 효과가 나타나지 않았다. 이러한 독성 역전의 효과는 50 mg/kg의 고용량으로 투여될 때 본 발명의 DPEP 펩티드에서 여전히 볼 수 있었다 (도 11). 이전의 세포-투과 펩티드는 7일 후에 독성 감소를 나타내지 않았고, 독성 마커가 계속 훨씬 더 높게 유지되었다.
- [0445] 추가로 엑손 스키피ng 활성은 30 및 50 mg/kg의 더 높은 용량에서 TA 및 횡격막 (도 10 및 12)에서 모든 DPEP 펩티드 접합체에 대해 높은 수준으로 유지된다는 것을 입증하였고, 이는 감소된 수준의 신장 손상 마커로 입증될 때, 독성 마커가 여러 배 더 낮기 때문에 이러한 화합물들에 대한 더 넓은 치료 지수를 시사한다. 또한, 모든 DPEP 펩티드 접합체는 접합체 중에 알려진 R6Gly 비교인자보다 더 높은 활성을 가지면서도, 적어도 유사한 수준의 독성 마커를 유지하고, 접합체에서 알려진 PIP 펩티드 비교인자와 유사한 활성을 가지면서, 훨씬 낮은 수준의 독성 마커를 갖는다는 것도 주목할 만하다. 일부 경우에, 본 발명의 DPEP 펩티드 접합체는 알려진 R6Gly 접합체와 비교하여 증가된 활성뿐만 아니라 감소된 독성 마커도 나타내었다.
- [0446] 그러므로, 본 발명의 DPEP1 및 3 펩티드들은 인간의 신경근 질환 치료를 위한 치료용 접합체의 효능을 개선하고 독성을 감소시키는 유망한 세포-투과 펩티드를 제공한다.
- [0447] **3. 추가 실시예**
- [0448] **P-PMO 합성 및 준비**
- [0449] 9-플루오렌일메톡시카보닐 (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-히드록시-7-아자벤조트리아졸 (HOAt)은 Sigma-Aldrich로부터 입수하였다. HPLC 등급 아세트니트릴, 메탄올 및 합성 등급 N-메틸-2-피롤리돈 (NMP)은 Fisher Scientific (Loughborough, UK)으로부터 구입하였다. 펩티드 합성 등급 N,N-디메틸포름아미드 (DMF) 및 디에틸 에테르는 VWR (Leicestershire, UK)로부터 입수하였다. 피페

리딘 및 트리플루오로아세트산 (TFA)은 Alfa Aesar (Heysham, England)로부터 입수하였다. PMO는 Gene Tools Inc. (Philomath, USA)로부터 구입하였다. 모든 다른 시약은 달리 명시하지 않는 한 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 입수하였다. MALDI-TOF 질량 분광분석은 Voyager DE Pro BioSpectrometry workstation 을 사용하여 수행하였다. 수 중 50% 아세토니트릴 중에 α -시아노-4-히드록시신남산 또는 시나핀산의 10 mg mL⁻¹의 스톱 용액을 매트릭스로서 사용하였다. 오차 막대는 $\pm 0.1\%$ 이다.

[0450] 세포에서 스크리닝을 위한 P-PMO 펩티드의 합성

[0451] a) 펩티드 변이체 라이브러리의 제작

[0452] 펩티드들은 Intavis Parallel Peptide Synthesizer를 사용하여 10 μ mol 스케일로, 또는 CEM Liberty BlueTM Peptide Synthesizer (Buckingham, UK)를 사용하여 100 μ mol 스케일로, Fmoc- β -Ala-OH 사전로딩된 Wang 수지 (0.19 또는 0.46 mmol g⁻¹, Merck Millipore)를 사용하고 표준 Fmoc 화학을 적용하고 제조자의 권장 사항에 따라 제조하였다. 상기 Intavis Parallel Peptide Synthesizer를 사용한 합성의 경우, PyBOP/NMM 커플링 혼합물을 사용한 이중 커플링 단계를 사용하고, 각 단계 후에 아세트산 무수물 캡핑을 수행하였다. CEM Liberty Blue Peptide Synthesizer를 사용한 합성의 경우, 이중 커플링이 수행되는 아르기닌을 제외한, 모든 아미노산에 대해 단일 표준 커플링이 수행되었다. 상기 커플링은 아르기닌 잔기를 제외하고 60-와트 마이크로파 전력에서 75°C에서 5분 동안 1회 수행하고, 아르기닌 잔기는 각 2회 커플링하였다. 각 탈보호 반응은 35-와트 마이크로파 전력에서, 75°C에서 2회, 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 카테일로 상기 펩티드를 실온에서 3시간 동안 처리하여 고체 지지체로부터 절단하였다. 상기 펩티드를 방출시킨 후에, 질소를 살포하여 과량의 TFA를 제거하였다. 냉 디에틸 에테르 (합성 스케일에 따라 15-40 mL)를 첨가하여 조 펩티드를 침전시키고, 3200 rpm에서 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 사용하여 RP-HPLC로 정제하였다. 15 mL min⁻¹의 유속으로 0.1% TFA/H₂O 중에 CH₃CN의 선형 구배를 사용하는 RP-C18 컬럼 (10 x 250 mm, Phenomenex Jupiter)에서 반-분취용 HPLC로 펩티드를 정제하였다. 검출은 220 nm 및 260 nm에서 수행하였다. 원하는 펩티드를 함유하는 분획들을 조합하고, 동결 건조하여 펩티드를 백색 고형물로 수득하였다 (수율은 표 5 참조).

표 5

펩티드 번호	통합된 서열 번호	시험된 서열(추가 C 및 N 말단 변형을 가짐)
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-RBRRBRFQILYBRBR-B
D-PEP 1.9W3	104	Ac-RBRRBRWWWRBRBR-B
DPEP 1.9W4P	105	Ac-RBRRBRWWPWWRBRBR-B
D-PEP 3.1	37	Ac-RBRRBRFQILYRBHBR-B
D-PEP 3.8	44	Ac-RBRRBRFQILYRBHBR-B
D-PEP 5.70	106	Ac-RBRBR* [*] RBRBR-B
Pip6a	112	Ac-RXRRBRXR-YQFLI-RXRBRXR-B
Pip9b2	113	Ac-RXRRBR-FQILY-RBRXR-B

[0453]

[0454] 표 5: 실시예에서 시험하기 위해 N-말단 아세틸화 (Ac), C-말단 β -알라닌 링커 (B)를 사용하여 합성된 펩티드.

S*는 글루코실화 세린 잔기임. DPEP5.7, Pip9b2 및 Pip6a는 비교 펩티드임.

[0455] b) 펩티드-PMO 접합체 라이브러리의 합성

[0456] [CAG]7로도 알려진 삼중자(triplet) 반복 서열에 대한 21-mer PMO 안티센스 서열 (CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG (서열 번호: 107))을 사용하였다. 상기 펩티드는 이의 C-말단 카복실기를 통해 PMO의 3'-말단에 접합되었다. 이는 2.5 당량의 DIPEA의 존재하에 NMP 중에 각각 2.5 당량 및 2 당량의 PyBOP 및 HOAt를 사용하여 달성되었고, DMSO에 용해된 PMO에 대해 2.5배 과량의 펩티드가 사용되었다. 일반적으로, N-메틸피롤리돈 (NMP, 80 µL) 중 펩티드 (2500 nmol) 용액에, PyBOP (NMP 중 0.3 M의 19.2 µL), HOAt (16.7 µL의 0.3 M NMP), DIPEA (1.0 mL) 및 PMO (DMSO 중 10 mM의 180 µL)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 40°C에서 2.5시간 동안 정치시키고, 상기 반응은 H₂O 중 0.1% TFA (300 µL)를 첨가하여 쿼칭하였다. 상기 용액은 변환된 Gilson HPLC 시스템을 사용하여 이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 상기 PMO-펩티드 접합체를 이온 교환 컬럼 (Resource S 4 mL, GE Healthcare)에서 20% CH₃CN을 함유하는 인산나트륨 버퍼 (25 mM, pH 7.0)의 선형 구배를 사용하여 정제하였다. 염화나트륨 용액 (1 M)을 사용하여 4 mL min⁻¹ 또는 6 mL min⁻¹의 유속으로 컬럼으로부터 접합체를 용출시켰다. 원하는 화합물을 함유하는 분획물들을 조합하여, 즉시 탈염하였다. Amicon® ultra-15 3K 원심분리 필터 장치를 사용한 이온 교환 후에 수집된 분획물의 여과를 통해 상기 펩티드-PMO 접합체로부터 과량의 염을 제거하였다. 상기 접합체를 동결 건조시키고, MALDI-TOF로 분석하였다. 상기 접합체를 멸균수에 용해시키고, 사용 전에 0.22 µm 셀룰로스 아세테이트 막을 통해 여과하였다. 펩티드-PMO의 농도는 0.1 N의 HCl 용액에서 상기 접합체의 265 nm에서의 물 흡광도에 의해 결정되었다. (수율은 표 6 참조).

표 6

펩티드	수율
D-Pep 1.1	36 %
D-Pep 1.7	41 %
D-pep 1.8	38 %
D-Pep 1.9	40 %
D-Pep 1.9W3	43 %
D-Pep 1.9W4P	23 %
D-Pep 3.1	31 %
D-Pep 3.8	36 %
D-Pep 5.70	31 %

[0457]

[0458] 표 6. 세포 배양 분석 및 인 비보 실험을 위한 P-PMO 접합체의 수율 (상기 수율은 동결 건조된 정제된 P-PMO의 건조 중량을 기초로 함. 상기 P-PMO의 순도는 220 nm 및 260 nm에서 정상 HPLC로 확인된 바와 같이 95% 초과임.)

[0459] 펩티드-PMO 접합체의 합성

[0460] 펩티드를 앞서 기재된 바와 같이 합성하고, PMO에 접합시켰다. CUG/CTG 연장된 반복부를 표적으로 하는 PMO 서열(5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' (서열 번호: 107))은 Gene Tools LLC로부터 구입하였다. 이는 본원의 다른 부분에 언급된 [CAG]7 PMO이다.

[0461] 세포 배양 및 펩티드-PMO 처리

[0462] 건강한 개인 또는 2600 CTG 반복부를 가진 DM1 환자로부터 유래된 불멸화 근모세포를, 20% FBS (Life Technologies), 50 µg/ml의 겐타마이신 (Life Technologies), 25 µg/ml의 페투인, 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)을 변경하여 근육세포 분화를 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-PMO의 형질감염 2일 후에 정량하였다.

[0463] RNA 단리, RT-PCR 및 qPCR 분석

[0464] 마우스 조직의 경우: RNA 추출 전에, Fastprep 시스템 및 Lysing Matrix D 튜브 (MP biomedical)를 사용하여 TriReagent (Sigma-Aldrich)에서 근육을 파쇄하였다. 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 μL 의 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). PCR 증폭은 각 유전자에 대한 선형 증폭 범위 내에서 25-35회의 사이클을 수행하였다. PCR 산물은 1.5-2%의 아가로스 겔에서 분리되었고, 에티뮴 브로마이드 염색하고, ImageJ 소프트웨어로 정량하였다. 엑손 봉입의 비율은 이소형 신호의 전체 세기에 대한 봉입 퍼센트로 정량되었다. 프라이머는 하기 표 7에 개시되어 있다.

표 7

프라이머 명칭	서열 번호	종/유전자/엑손	서열 (5'-3')
Mbnl1.F	108	마우스-인간/mbnl1/exon5	GCTGCCAATACCAGGTCAAC
Mbnl1.R	109	마우스-인간/mbnl1/exon5	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC
DMD.F	110	인간/DMD/exon78	TTAGAGGAGGTGATGGAGCA
DMD.R	111	인간/DMD/exon78	GATACTAAGGACTCCATCGC

[0465]

표 7: PCR용 프라이머

[0466]

독성학

[0467]

독성 평가는 상기 섹션 1.10에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0468]

결과

[0469]

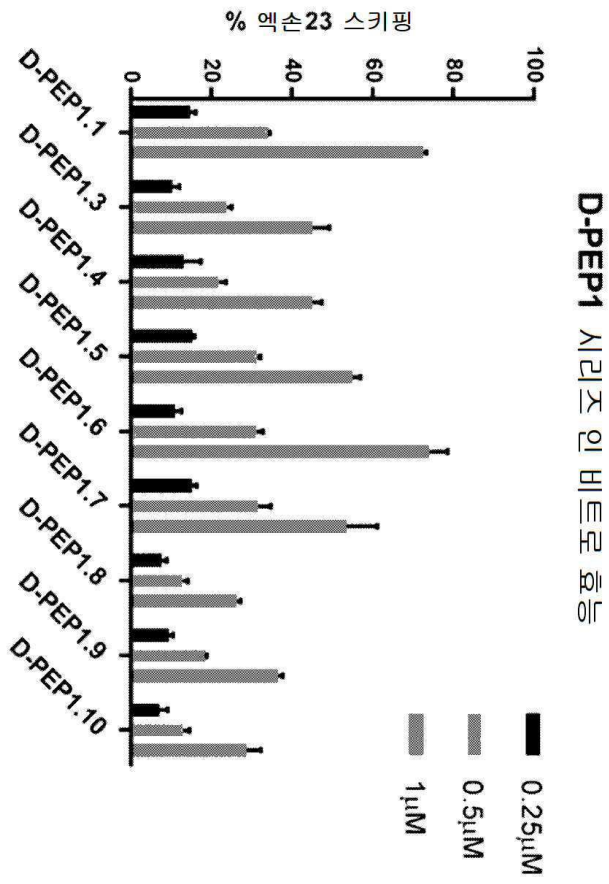
[0470] 처리된 DM1 환자 유래 근육 세포 (근모세포)는 상기 DPEP 1 또는 3 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체가 돌연변이 CUGexp-DMPK 전사체를 특이적으로 표적화하여 핵 RNA 초점(foci)에 의한 MBNL1 스플라이싱 인자의 유해한 격리를 폐기하고, 결과적으로 스플라이싱 결함 및 근육 기능장애의 원인인 MBNL1 기능 소실을 방지함을 보여주었다. 상기 DPEP1/3 펩티드-[CAG]₇ PMO 접합체는 세포를 투과하여, 높은 효능으로 스플라이싱 정상화를 유도하였다 (도 13). 소위 'DPEP1 및 DPEP3' 펩티드의 이러한 새로운 생성은 CAG7 반복 안티센스 올리고뉴클레오티드 PMO에 접합될 때 인 비트로 스플라이싱 결함을 교정하는데 높은 효능을 보였으며, 이는 DM1 치료를 위한 강력한 치료적 용도를 나타낸다.

[0471]

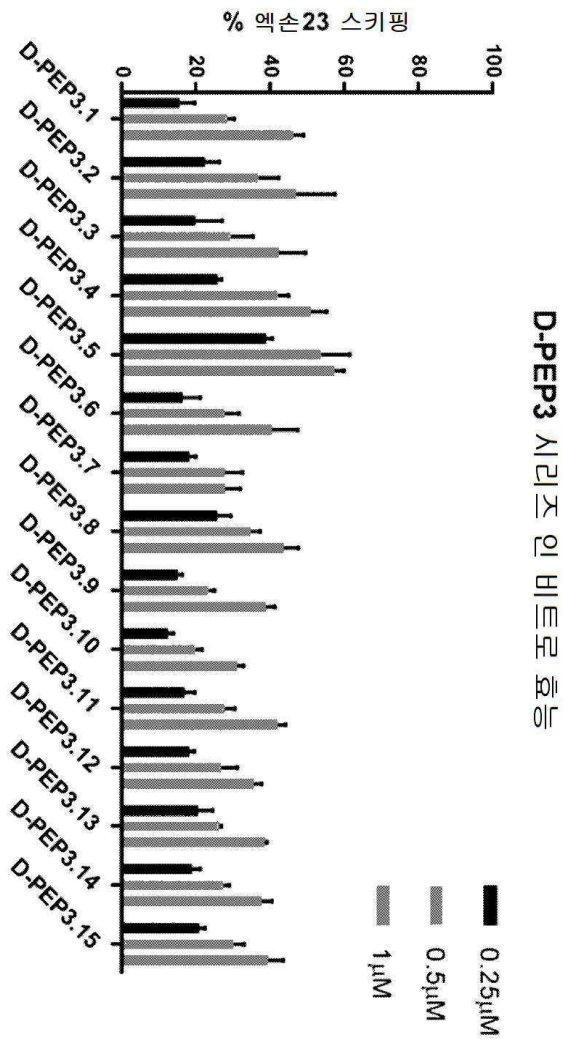
더욱이, DPEP1/3으로 형성된 접합체의 예비 독성 평가는 ALP, ALT, AST, KIM-1, BUN, NGAL 및 크레아티닌 수준이 전형적으로 Pip 시리즈로부터 현재 이용 가능한 펩티드 담체에 의해 유도된 배수 증가와 대조적으로, 식염수 대조군 주입과 유사하였음을 나타낸다. 이러한 예비 데이터를 통해, 본 발명자는 [CAG]₇ PMO와 함께 DPEP 펩티드로부터 형성된 접합체가 Pip6a와 같은 이전의 펩티드로 형성된 접합체만큼 활성을 가지면서도 독성이 적기 때문에 더 넓은 치료 범위를 가지는 것을 보여주었다 (도 15-19).

도면

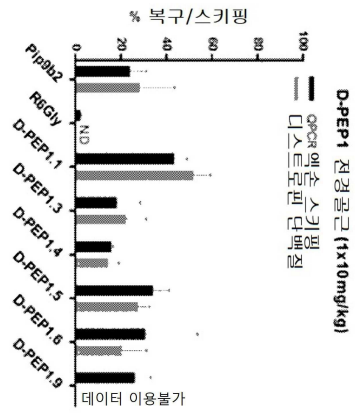
도면1



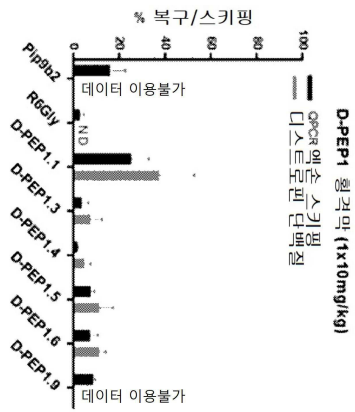
도면2



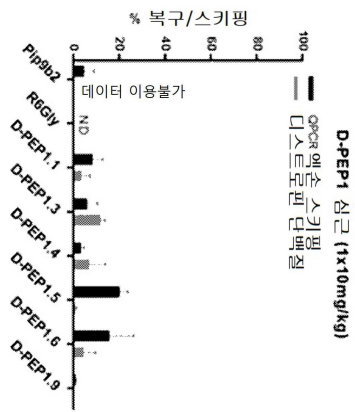
도면3



A

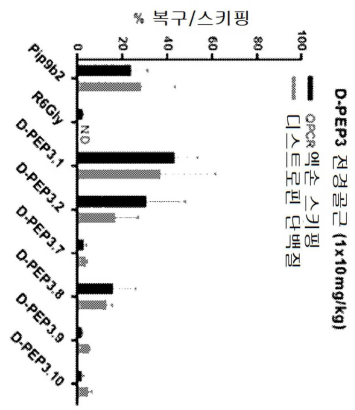


B

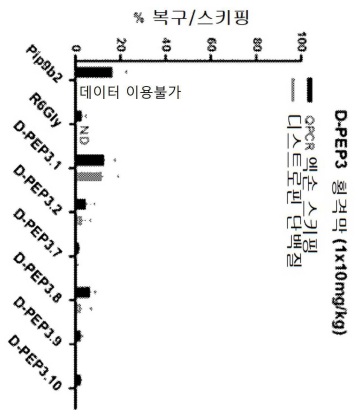


C

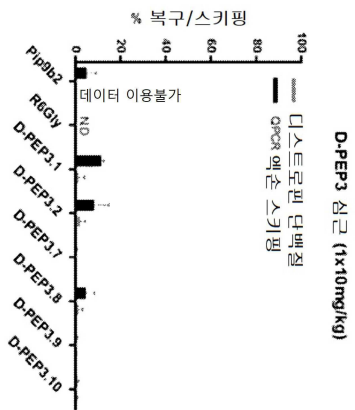
도면4



A

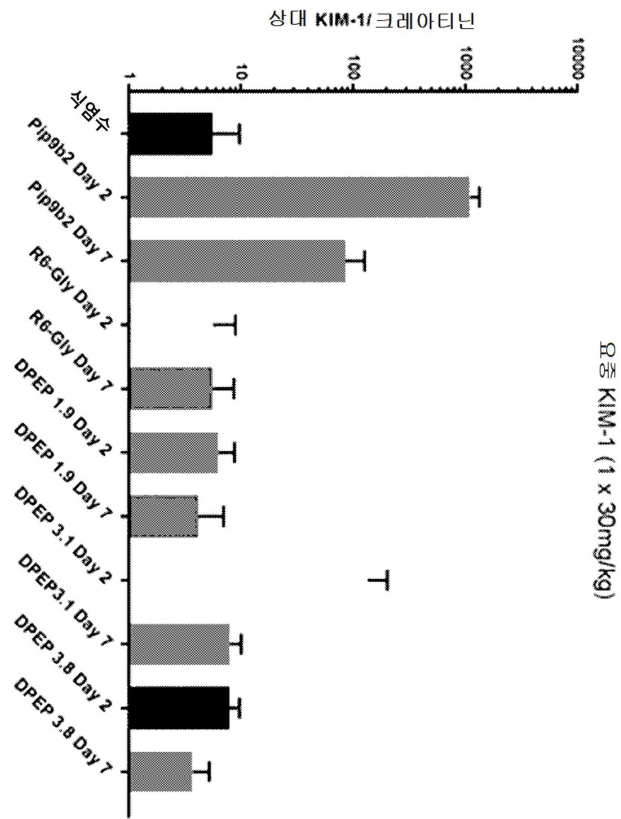


B

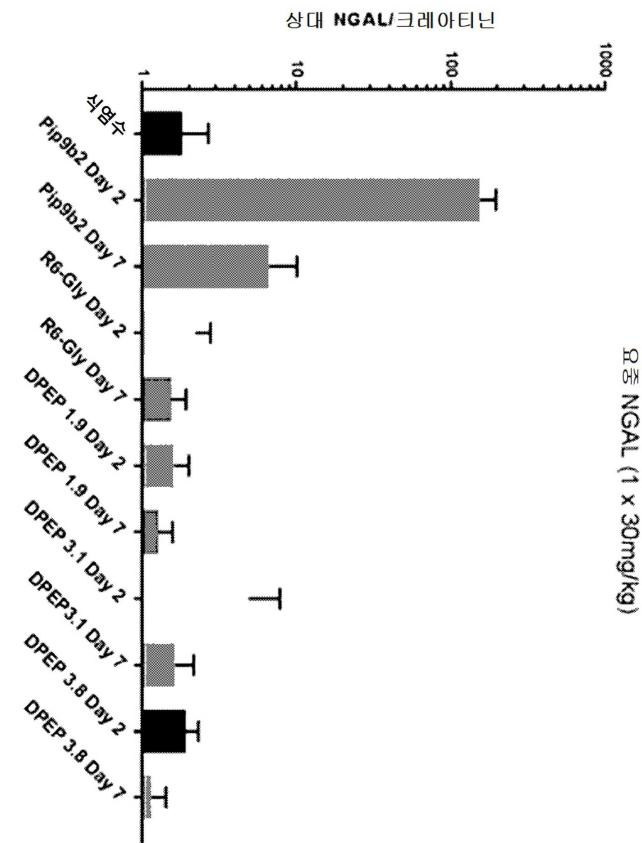


C

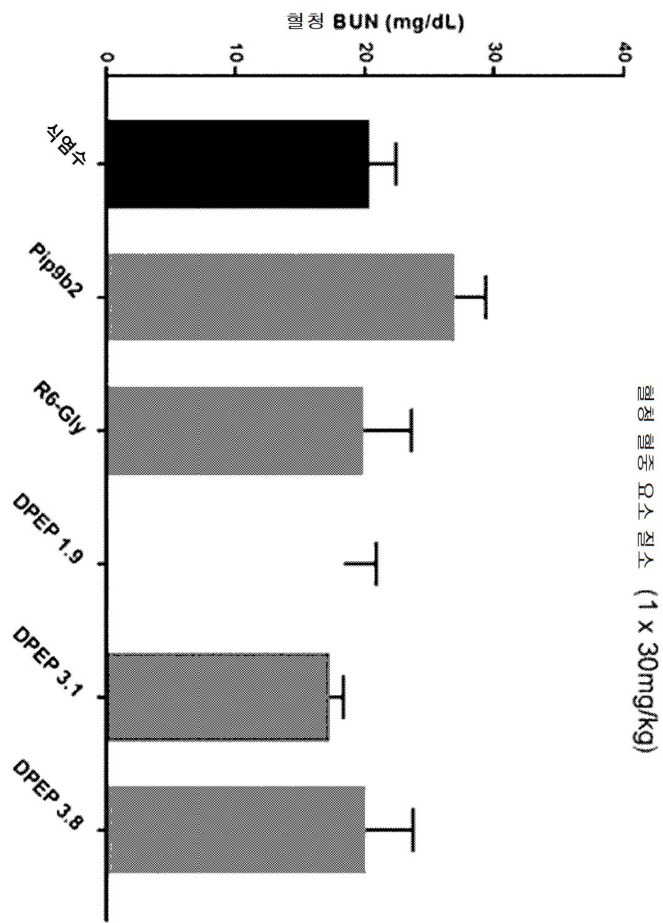
도면5



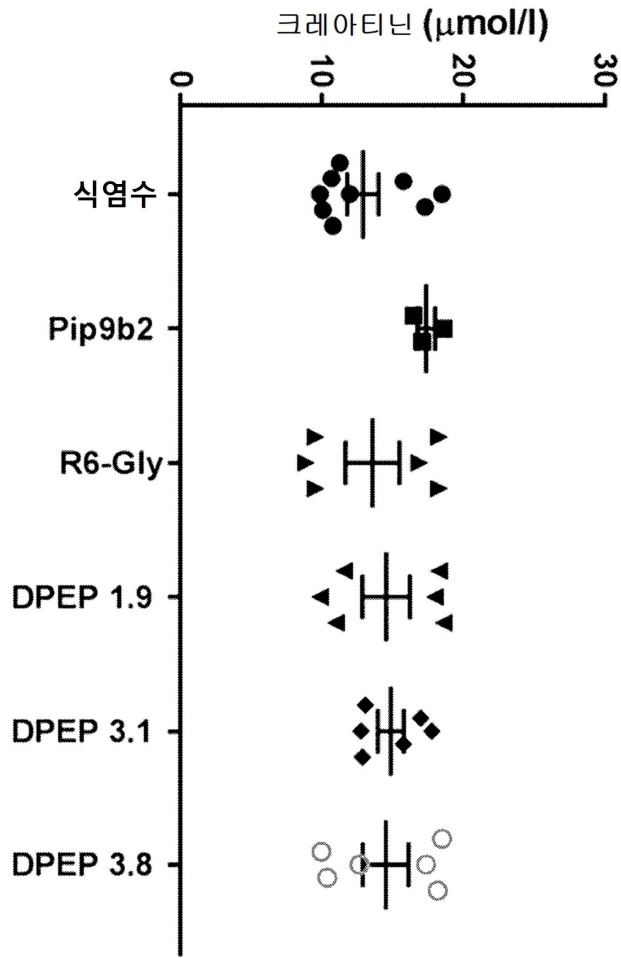
도면6



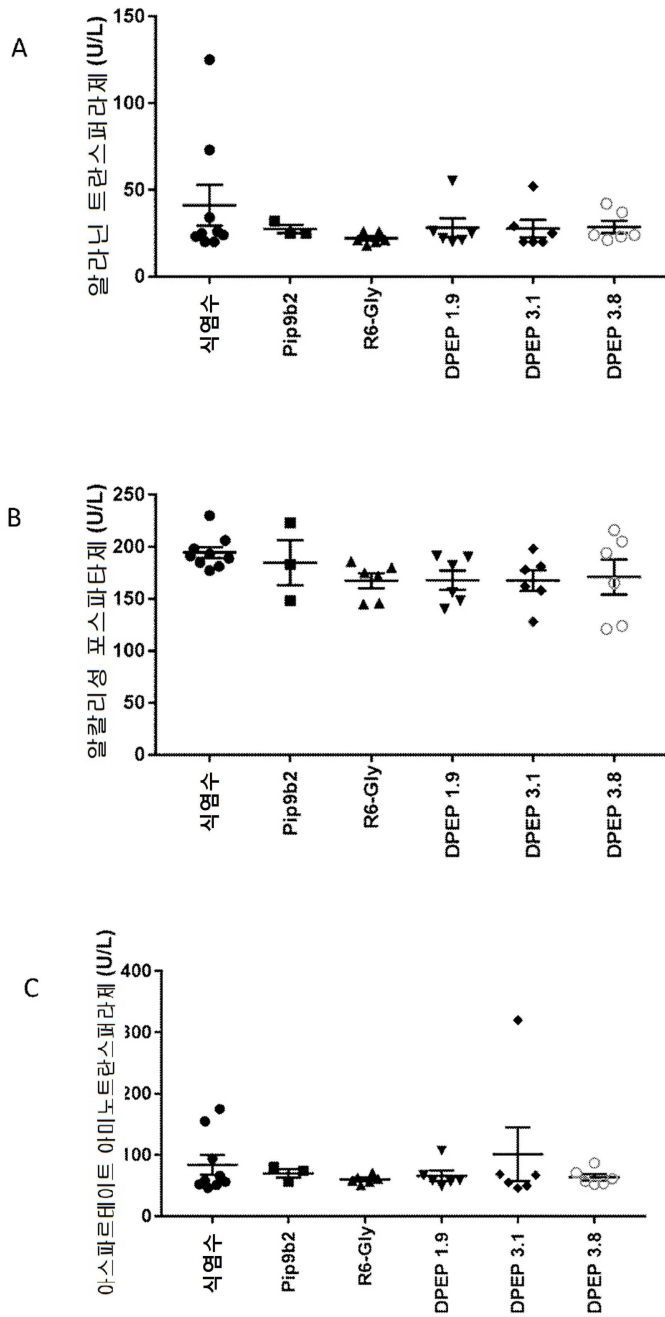
도면7



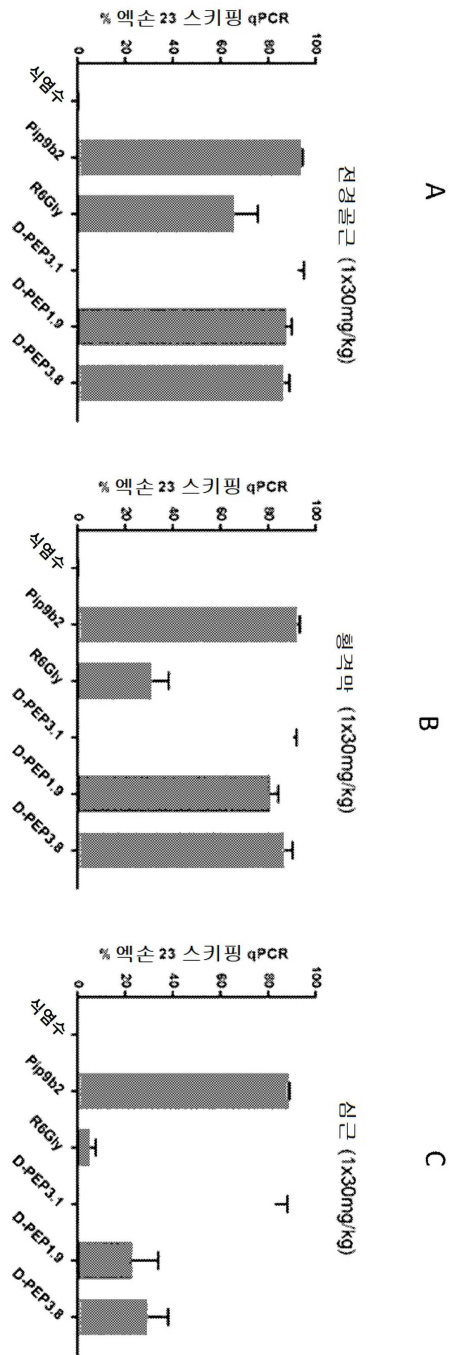
도면8



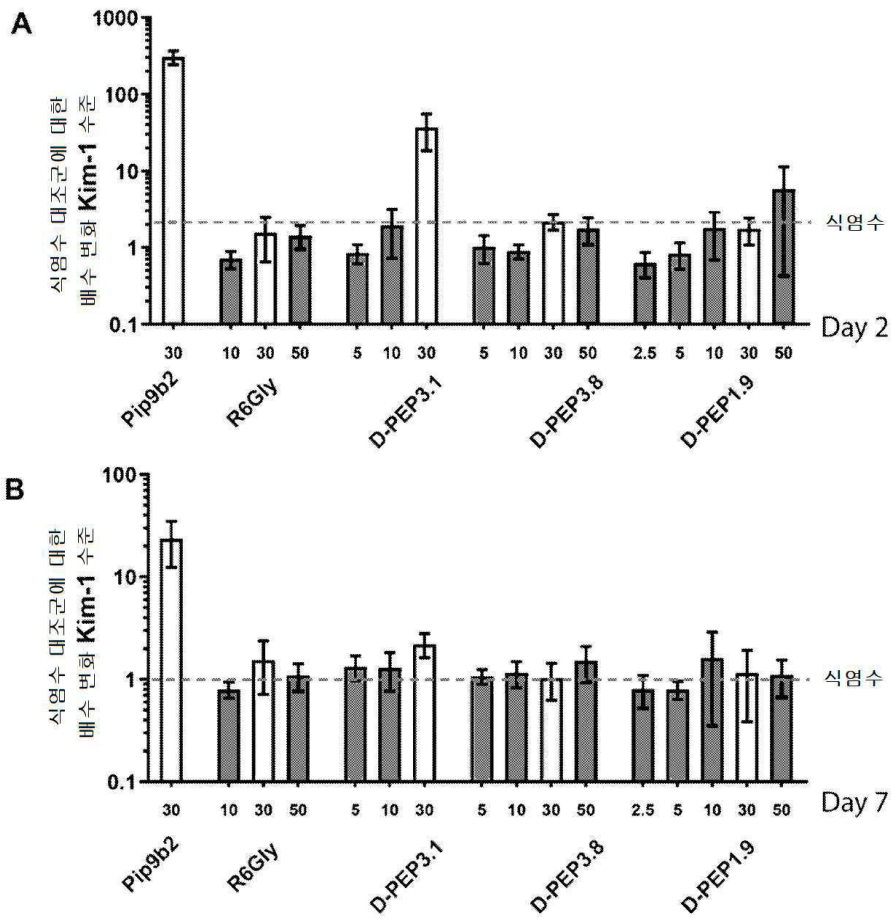
도면9



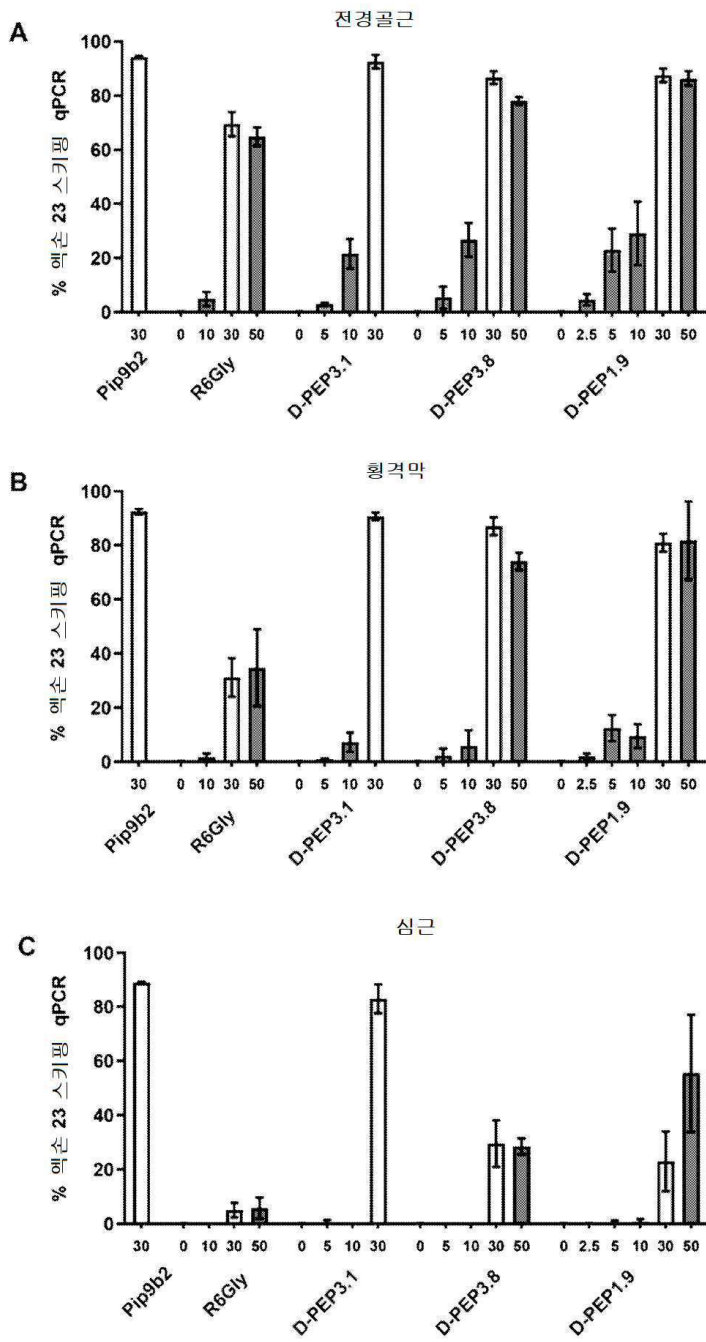
도면10



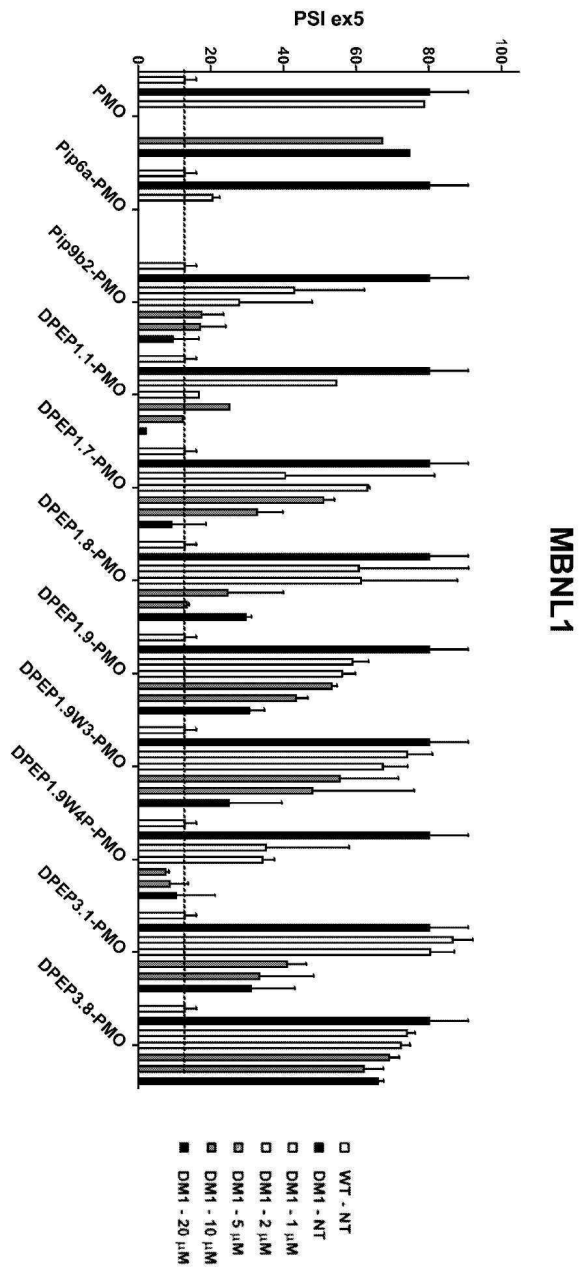
도면11



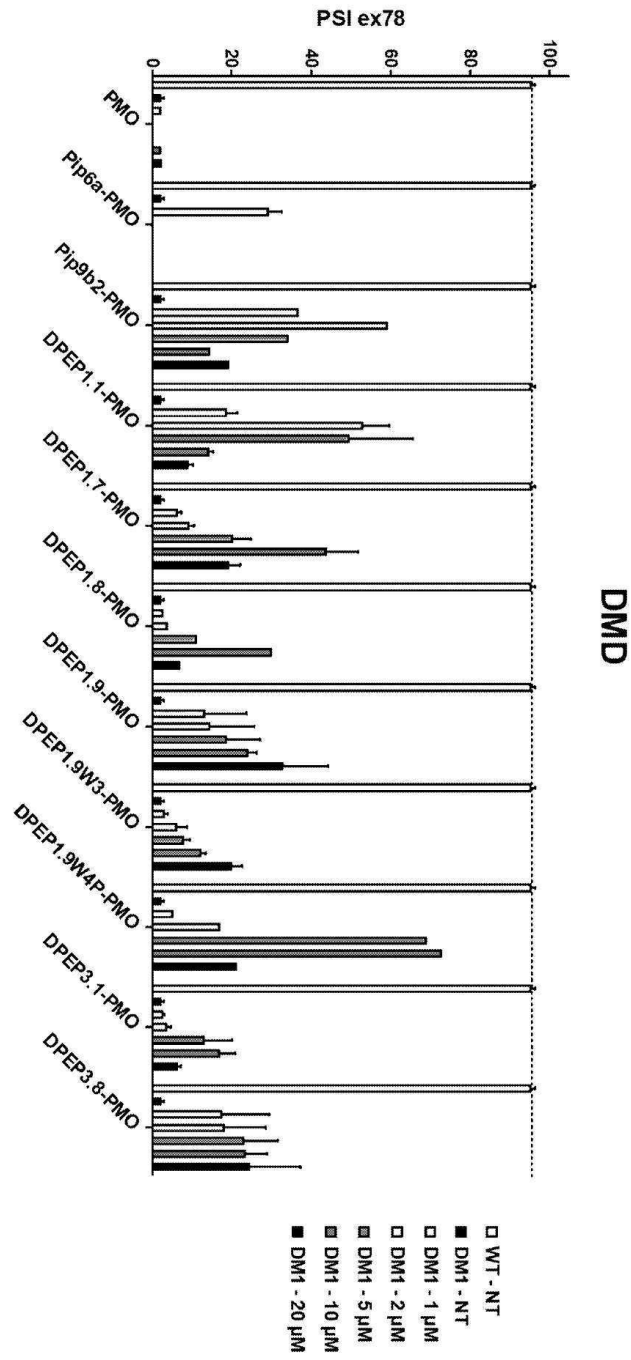
도면12



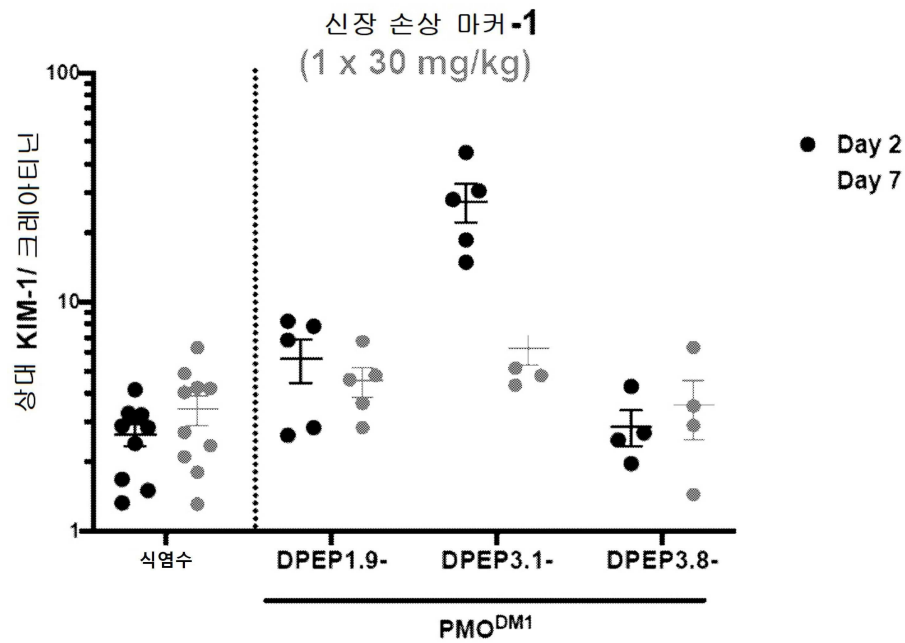
도면13



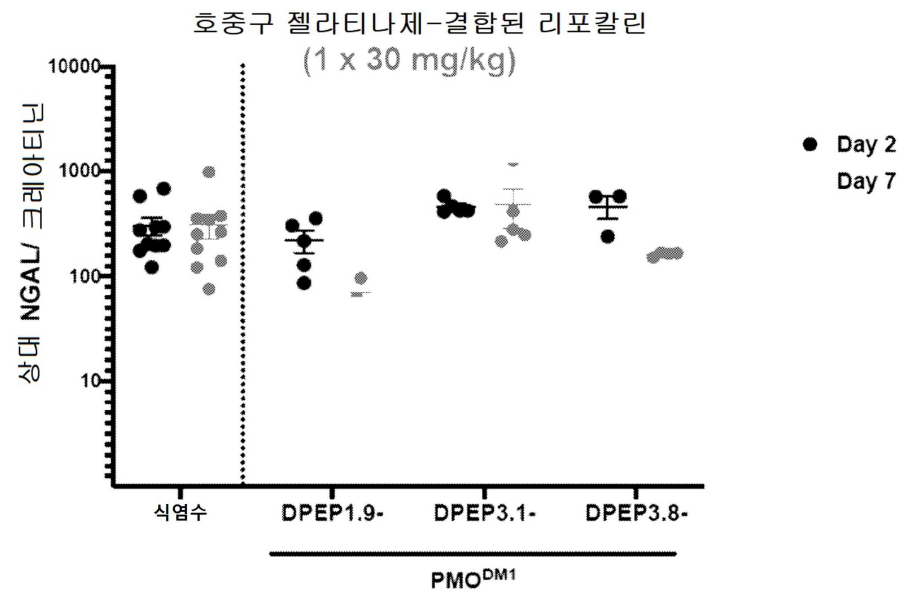
도면14



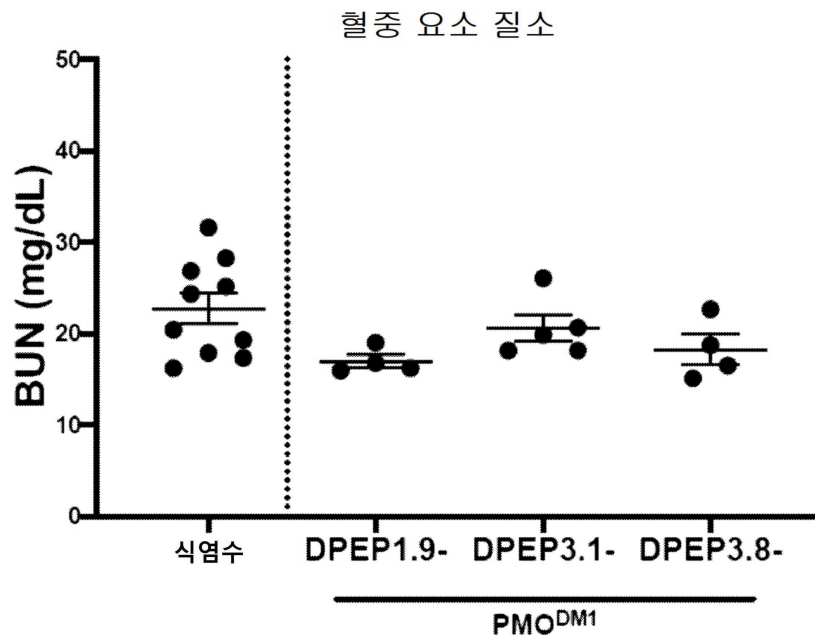
도면15



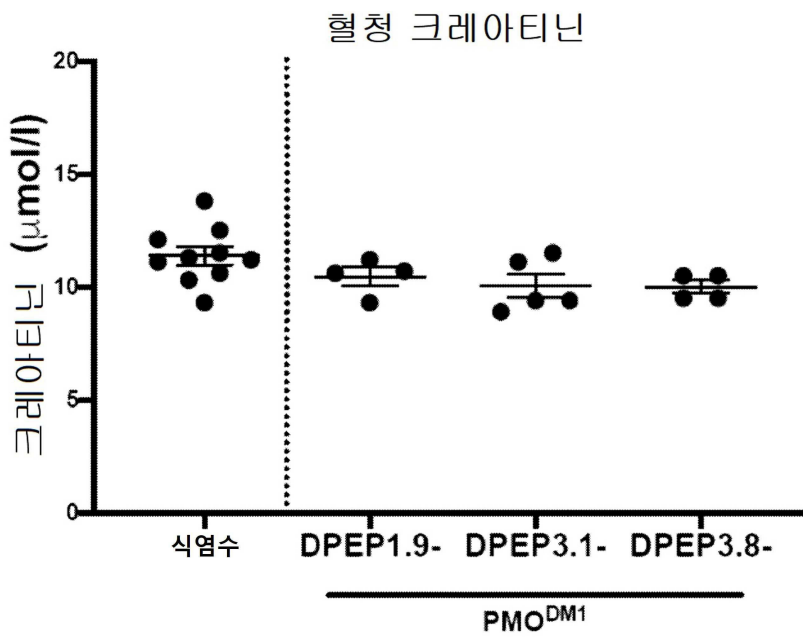
도면16



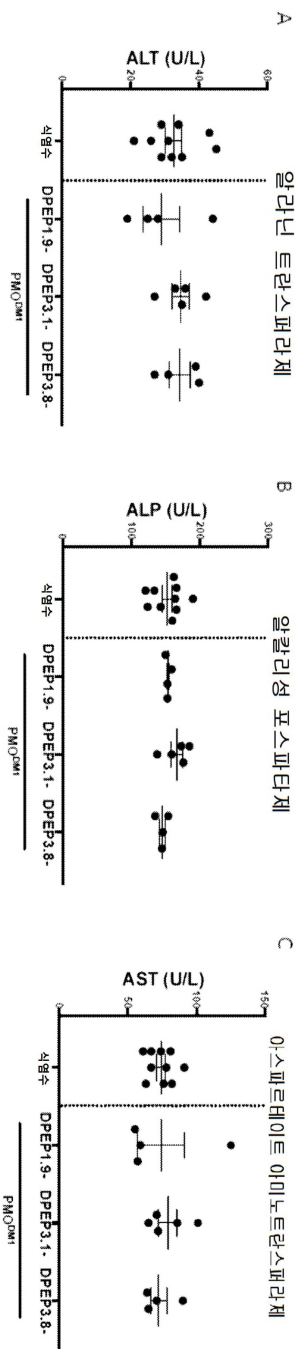
도면17



도면18



도면19



서열 목록

- <110> Oxford University Innovation Limited
United Kingdom Research and Innovation
- <120> CELL-PENETRATING PEPTIDES
- <130> P236820W0
- <150> GB 1812972.6
- <151> 2018-08-09
- <160> 114

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)

<223> X is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> X is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<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)

<223> X is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (3)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (3)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)
<223> x is hydroxyproline
<220><221> MOD_RES
<222> (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)
<223> x is hydroxyproline
<220><221> MOD_RES
<222> (4)
<223> x is hydroxyproline
<220><221> MOD_RES
<222> (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)
<223> x is hydroxyproline
<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <223>
 > x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220>
 ><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)

<223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)

 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)

<223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221>
 MOD_RES
 <222> (12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)
 <223>
 x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

<222> (14)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (4)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)

<
 223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

 <222> (5)
 <223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> x is bAla

<220><221>

MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222>

(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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> x is bAla

<220>

><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (6)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (10)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (11)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (11)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223>

> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223>
 > x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

 <222> (13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)		
<223>	x is bAla		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(5)		
<223>	x is bAla		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(13)		
<223>	x is bAla		

<220><221>	MOD_RES
<222>	(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)		
<223>	x is bAla		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(5)		
<223>	x is bAla		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (3)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)

<223> x is hydroxyproline
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is hydroxyproline
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is hydroxyproline
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is hydroxyproline
 <220><221> MOD_RES

<222> (5)
 <223> x is hydroxyproline
 <220><221> MOD_RES

<222> (13)
 <223> x is hydroxyproline
 <220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

<222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

<222> (11)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES

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

<223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla

<220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla

<220><221> MOD_RES
 <222> (13)
 <223>
 > x is bAla

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

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> x is bAla

<220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (6)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (4)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (13)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (6)

<223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (13)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)
 <223> x is bAla
 <220><221>
 MOD_RES
 <222> (4)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MOD_RES
 <222> (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)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (14)

<223> x is bAla

<220><221> MOD_RES

<222> (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> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 25-mer PMO antisense sequence for mouse dystrophin exon-23

<400> 90

ggccaaacct cggcttacct gaaat 25

<210> 91

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exon20Fo primer

<400> 91

cagaattctg ccaattgctg ag 22

<210> 92

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exon26Ro primer
 <400> 92
 ttcttcagct tgtgtcatcc 20
 <210> 93
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exon20Fi primer
 <400> 93

 cccagtctac cacctatca gagc 24
 <210> 94
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exon26Ri primer
 <400> 94
 cctgccttta aggettcctt 20
 <210> 95
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mDMD23-24 primer 1
 <400> 95
 caggccattc ctcttcagg 20
 <210> 96
 <211> 21
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mDMD23-24 primer 2
 <400> 96

gaaactttcc tcccagttgg t 21

<210> 97

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mDMD23-24 probe

<220><221> misc_feature

<222> (1)

<223> Labelled with FAM

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> Residues no. 9 and no. 10 are linked through an internal quencher
ZEN

<220><221> misc_feature

<222> (29)

<223> Labelled with IABkFQ

<400> 97

tcaacttcag ccatccattt ctgtaaggt 29

<210> 98

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mDMD22-24 primer 1

<400> 98

ctgaatatga aataatggag gagagactcg 30

<210> 99

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mDMD22-24 primer 2

<400> 99

cttcagccat ccatttctgt aaggt 25

<210> 100

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mDMD22-24 probe
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> Labelled with FAM
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> residues no. 9 and no. 10 are linked through an internal quencher
 ZEN
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)
 <223> Labelled with IABkFQ
 <400> 100

atgtgattct gtaatttcc

19

<210> 101
 <211>
 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> x is bAa
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> x is bAa
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (12)
 <223> x is hydroxyproline
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (14)
 <223> x is hydroxyproline
 <400> 101

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

1 5 10 15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)

<223> x is bAla

<400> 102

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

1 5 10 15

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> x is hydroxyproline

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)

<223> x is hydroxyproline

<400> 103

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

1 5 10 15

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> x is bAla

<400> 104

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

1 5 10

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (12)
 <223> x is bAla
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (14)
 <223> x is bAla
 <400> 105
 Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Trp Trp Pro Trp Trp Xaa Arg Xaa Arg
 1 5 10 15
 <210> 106
 <211> 11
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> x is bAla
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)
 <223> x is bAla
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (6)
 <223> glucosylated serine residue
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (8)
 <223> x is bAla
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)
 <223> x is bAla
 <400> 106
 Arg Xaa Arg Xaa Arg Ser Arg Xaa Arg Xaa Arg
 1 5 10
 <210> 107

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 21-mer PMO antisense sequence
 <400> 107
 cagcagcagc agcagcagca g 21
 <210> 108
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer Mbn11.F
 <400> 108
 gctgcccaat accaggtcaa c 21
 <210> 109
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer Mbn11.R
 <400> 109

 tgggtgggaga aatgctgtat gc 22
 <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
 gataactaagg actccatcgc

20

<210> 112
 <211> 21
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> x is aminohexanoic acid
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> x is bAla
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (8)
 <223> x is aminohexanoic acid
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (16)
 <223> x is aminohexanoic acid
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (18)
 <223> x is bAla
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (20)
 <223> x is aminohexanoic acid
 <400> 112

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

1 5 10 15

Arg Xaa Arg Xaa Arg

20

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> x is aminohexanoic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)

<223> x is bAla

<220><221> MISC_FEATURE

<222

> (16)

<223> x is aminohexanoic acid

<400> 113

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

1

5

10

15

Arg

<210> 114

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 114

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1

5