

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7684971号
(P7684971)

(45)発行日 令和7年5月28日(2025.5.28)

(24)登録日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	Z N A
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
請求項の数 9 (全30頁)		

(21)出願番号	特願2022-538169(P2022-538169)	(73)特許権者	522243532 ピーワイシー セラピューティクス リミテッド オーストラリア国 6 0 0 9 ウェスタン・オーストラリア, ネットランズ, パーダン・ストリート 6
(86)(22)出願日	令和2年12月18日(2020.12.18)	(74)代理人	110002572 弁理士法人平木国際特許事務所
(65)公表番号	特表2023-511501(P2023-511501 A)	(72)発明者	ストーン, シェイン オーストラリア国 6 1 6 3 ウェスタンオーストラリア, クールベラップ, ウィリアムズ ロード 9エー
(43)公表日	令和5年3月20日(2023.3.20)	(72)発明者	ホール, クリントン オーストラリア国 6 1 4 7 ウェスタンオーストラリア, ラングフォード, リル
(86)国際出願番号	PCT/AU2020/051397		最終頁に続く
(87)国際公開番号	WO2021/119756		
(87)国際公開日	令和3年6月24日(2021.6.24)		
審査請求日	令和5年12月13日(2023.12.13)		
(31)優先権主張番号	2019904882		
(32)優先日	令和1年12月20日(2019.12.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)		

(54)【発明の名称】 新規の細胞内送達方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

最大40アミノ酸残基の長さを有し、以下のアミノ酸配列を含む、単離された、天然に存在しない細胞膜透過性ペプチド(CPP)：

(i)アミノ酸配列RRSRTARAGRPGRNSSRPSAPR[配列番号1]；

または

(ii)配列番号1と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列であって、前記ペプチドのアミノ酸配列中のアミノ酸が全てD型であるアミノ酸配列。

【請求項2】

前記CPPのアミノ酸配列が配列番号1のアミノ酸配列と、少なくとも95%または98%同一である、請求項1に記載のCPP。

【請求項3】

配列番号1と少なくとも99%の同一性を有する、請求項2に記載のCPP。

【請求項4】

配列番号1のアミノ酸配列を含み、前記ペプチドのアミノ酸配列中のアミノ酸が全てD型である、請求項1に記載のCPP。

【請求項5】

in vitroで分子カーゴを哺乳動物細胞に送達するための、請求項1~4のいずれか一項に記載のCPPの使用。

【請求項6】

前記哺乳動物細胞が、網膜色素上皮細胞である、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

薬剤または診断薬の製造における、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の CPP の使用。

【請求項 8】

疾患の治療または診断のための、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の CPP を含む医薬組成物。

【請求項 9】

(i) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の CPP、及び、(i i) 使用説明書、を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本開示は、一般に、細胞膜透過性ペプチド及び関連組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ペプチドは、高い効能及び標的特異性のために、魅力的な診断薬及び治療薬である。しかし、治療薬としてペプチドをより広く採用するための課題の 1 つは、様々な組織層が一般にペプチドの細胞内侵入に対する障壁として機能するので、ほとんどのペプチドが臓器（例えば、眼）内の種々の組織にアクセスできないことである。さらに、既存ペプチド及び結合している任意のカーゴは、通常、細胞のエンドソーム及びリソソーム区画にトラップされる。

20

【0003】

細胞膜透過性ペプチド (CPP) は、様々な分子カーゴ (ナノサイズの粒子から小さな化学分子、他のペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、及び DNA のフラグメントまで) の細胞への摂取 / 取り込みを促進するペプチドのクラスである。「カーゴ」は、共有結合を介した化学結合または非共有結合性相互作用のいずれかを介してペプチドと結合している。CPP の機能は、カーゴを細胞に送達することであり、通常は、エンドサイトーシスにより生じるプロセスである。CPP 媒介性カーゴ送達において、細胞特異性がないことにより、現在の使用が制限される。

【0004】

30

ほとんどの *in vitro* で検証された CPP モダリティの *in vivo* での失敗は、診療所において、CPP で送達された薬物がないことにより証明される。単一細胞への侵入が *in vitro* 環境から *in vivo* 環境に進むと、CPP 媒介性送達の問題の複雑さが大幅に増加することが問題である。R8、Tat、及びペネトラチンなどのカノニカル CPP は、蛍光標識された CPP 追跡により証明されるように、*in vitro* 及び *in vivo* での取り込みを示す。しかし、治療用カーゴと組み合わせる場合、これらの例はいずれも、病状の意味ある機能的変化につながっていない。CPP 媒介性カーゴ送達の有用性が、既存のペプチドでは制限され、細胞特異性がないことと組み合わせられると、任意の関連カーゴが、通常、細胞エンドソーム及びリソソーム区画にトラップされるように見える。

40

【0005】

in vivo での、連続する正荷電アミノ酸を有する電荷密度の高いカチオン性ペプチドを含む線状 CPP は、糖鎖結合により隔離され、エンドソーム / リソソームにトラップされることが既知であり、膜変形を引き起こすリン脂質頭部基を結合することが実証されている。両親媒性を高めることで CPP 活性を増強することは、*in vitro* での取り込みを増加させるための既知の設計方策であり、おそらくは、膜変形及び破壊の増加により引き起こされる毒性のために、*in vivo* での送達を改善しない。

【0006】

さらに、トリプシン及びセリンエンドペプチダーゼ、ならびに *in vivo* の他のプロテアーゼの遍在的な存在は、カチオン富化ペプチドの急速な分解を引き起こす。

50

【 0 0 0 7 】

従って、細胞膜透過性ペプチド送達治療薬の利点を十分に活用するために、*in vivo*での組織、及び臓器内の特定の組織への、ペプチド及び結合しているペイロードの送達のための組成物及び方法を開発する継続的な必要性がある。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、改善されたまたは代替の細胞膜透過性ペプチドの提供を試みる。

【 0 0 0 9 】

背景技術の以前の議論は、本発明の理解を容易にすることのみを目的としている。考察により、参照された資料のいずれかが、出願の優先日における一般的な知識の一部であるか、またはそれであったことが承認または容認されるものではない。

10

【 0 0 1 0 】

本発明は、アミノ酸配列

RRSRTARAGRPGRNSSSRPSAPR [配列番号 1]

及び配列番号 1 と少なくとも 6 0 % の類似性を有する配列

を含む、単離された、天然に存在しない細胞膜透過性ペプチド (CPP) を提供する。

【 0 0 1 1 】

本発明の配列は、アミノ酸レベルが、配列番号 1 と、少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、または 8 5 % の類似性、好ましくは、少なくとも約 9 0、9 5 %、または 9 8 % の類似性を有してもよい。

20

【 0 0 1 2 】

好ましくは、CPPは、以下の非カノニカルアミノ酸、脂肪酸、検出可能な標識、オリゴヌクレオチド、コレステロール、及び反応性基の使用のうちの1つ以上で修飾される。

【 0 0 1 3 】

好ましくは、CPPは、目的の分子にコンジュゲートされる。目的の分子は、以下の治療薬、オリゴヌクレオチド、さらなるペプチドもしくはタンパク質、反応性基、脂肪酸、コレステロール、または検出可能な標識から選択されてもよい。好ましくは、コンジュゲートは、共有結合または非共有結合性相互作用を使用して実施される。

【 0 0 1 4 】

本発明は、さらに、配列番号 1 の CPP 及び配列番号 1 と少なくとも 6 0 % の類似性を有する配列、または、目的の分子にコンジュゲートされた、配列番号 1 の CPP 及び配列番号 1 と少なくとも 6 0 % の類似性を有する配列、を含む改変細胞を提供する。

30

【 0 0 1 5 】

本発明は、さらに、薬剤または診断薬の製造における、配列番号 1 の CPP 及び配列番号 1 と少なくとも 6 0 % の類似性を有する配列、目的の分子にコンジュゲートされた、配列番号 1 の CPP 及び配列番号 1 と少なくとも 6 0 % の類似性を有する配列、またはこれらのいずれかを含む改変細胞の使用を提供する。

【 0 0 1 6 】

薬剤または診断薬としての、配列番号 1 の CPP 及び配列番号 1 と少なくとも 6 0 % の類似性を有する配列、目的の分子にコンジュゲートされた、配列番号 1 の CPP 及び配列番号 1 と少なくとも 6 0 % の類似性を有する配列、または、これらのいずれかを含む改変細胞の使用。

40

【 0 0 1 7 】

(i) 配列番号 1 の CPP 及び配列番号 1 と少なくとも 6 0 % の類似性を有する配列、目的の分子にコンジュゲートされた、配列番号 1 の CPP 及び配列番号 1 と少なくとも 6 0 % の類似性を有する配列、またはこれらのいずれかを含む改変細胞、ならびに、(i i) 使用説明書、を含むキット。

【 0 0 1 8 】

本発明のさらなる特徴は、より完全には、そのいくつかの非限定的な実施形態の以下の説明で説明される。この説明は、本発明を例示する目的でのみ含まれる。これは、上記の

50

発明の大まかな要約、開示、または説明に対する制限として理解されるべきではない。説明は、添付の図面を参照して行われるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】ペプチド-SMN1コンジュゲート及びSMN1のみで処置した48時間後のSMN1エクソン7スキップの有効性のグラフである。

【図2】ペプチド-SMN1コンジュゲート及びSMN1のみで処置した48時間後の細胞生存率のグラフである。

【図3】RPE/脈絡膜細胞において*in vivo*でSmn PMOにコンジュゲートされた配列番号1のCPPで生成されたSmnエクソン7スキップの有効性のグラフである。

10

【図4】網膜細胞において*in vivo*でSmn PMOにコンジュゲートされた配列番号1のCPPで生成されたSmnエクソン7スキップの有効性のグラフである。

【図5】注射の5日後にSmn PMOにコンジュゲートされた配列番号1のCPPのGFAP *in vivo* 毒性のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

細胞膜透過性ペプチド

*in vitro*での性能の増強に關与する細胞膜透過性ペプチド(CPP)の特徴、例えば、連続する正荷電アミノ酸を有する電荷密度の高いカチオン性ペプチドを含む線形CPPは、多くの場合、*in vivo*での結果につながらない。CPPの有効性は、毒性と密接に關連し、良好な*in vitro*及び*in vivo*の両方のCPPに対し、有効性及び毒性間の最適のバランスが必要とされる。克服すべき重要なハードルの1つは、エンドソーム及びリソソーム内にCPPカーゴ部分をトラップすることである。ここで、本発明者らは、機能的な読み出しを行うためにCPPカーゴの核への局在化を必要とするアッセイを提示し、従って、効果的な場合、エンドソーム/リソソームの脱出及び/または核送達を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むアミノ酸配列などの細胞の核へのカーゴの良好な送達をもたらすCPPを、本発明者らは同定している。

20

【0021】

従って、アミノ酸配列：

RRSRTARAGRPGRNSSSRPSAPR [配列番号1]

30

及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列

を含む、単離された、天然に存在しない細胞膜透過性ペプチド(CPP)が提供される。

【0022】

好ましくは、CPPは、10~100の残基を含む。例えば、CPPは、10~50残基、20~30残基、20~40残基、30~70残基、40~60残基、または25~50残基を含んでもよい。

【0023】

配列番号1のアミノ酸配列アナログは、アミノ酸のうちの1つ以上が別のアミノ酸で置換されているアミノ酸配列を有するものを含み、この置換は、分子の生物学的活性(細胞浸透能力)を実質的に変化させない。これらのアミノ酸配列アナログは、配列番号1と比較した場合、好ましくは、保存的アミノ酸置換を有する。

40

【0024】

本発明の文脈では、アナログ配列は、少なくとも20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、100、または200アミノ酸にわたり、アミノ酸レベルが、配列番号1に記載のアミノ酸配列と、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、または85%の類似性、好ましくは、少なくとも約90%、95%、または98%の類似性を有するCCPアミノ酸配列を含むと解釈される。特に、類似性は、通常、非必須の隣接配列よりはむしろ、配列番号1によりコードされるCPPの機能に必須であることが既知である配列のそれらの領域に関して考慮されるべきである。

50

【0025】

類似の配列は、配列番号1と、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%の同一性、好ましくは、少なくとも約90%、95%、または98%の同一性を有する配列（すなわち、同一の残基）を有してもよい。アナログ配列は、配列番号1と、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%の類似性、好ましくは、少なくとも約90%、95%、または98%の類似性を有する配列（すなわち、同様の物理化学的特性で保存された残基）を有してもよい。

【0026】

類似性の比較は、目視で、または、より一般には、すぐに利用できる配列比較プログラムを用いて、実施することができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間の%類似性を計算し得る。%類似性は、連続する配列について計算されてもよく、すなわち、1つの配列が、他の配列とアラインされ、1つの配列の各アミノ酸が、一度に1つの残基で、もう1つの配列の対応するアミノ酸と直接比較される。これは、「ギャップのない」アラインメントと呼ばれる。通常、そのようなギャップのないアラインメントは、比較的短い数の残基（例えば、50未満の連続するアミノ酸）に対してのみ実行される。

10

【0027】

これは、非常に単純で一貫性のある方法であるが、例えば、他の点では、ほぼ同一の配列のペアにおいて、1つの挿入または削除により、以下のアミノ酸残基がアラインメントから外れ、それにより、潜在的に、グローバルアラインメントが実施される場合の%類似性及び同一性の大幅な低減がもたらされることは考慮に入れない。従って、ほとんどの配列比較法は、全体的な類似性スコアに過度のペナルティを課すことなく、可能な挿入及び削除を考慮した最適なアラインメントを生成するように設計される。これは、配列アラインメントに「ギャップ」を挿入して、局所的な相同性を最大化しようとすることにより達成される。

20

【0028】

アミノ酸配列の同一性及び類似性は、欧州分子生物学研究所の一部である欧州バイオインフォマティクス研究所（EMBL-EBI）から入手可能なEMBOS Sペアワイズアラインメントアルゴリズムツールを使用して決定されてもよい。このツールは、www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/にあるウェブサイトからアクセス可能である。このツールは、Needleman-Wunschグローバルアラインメントアルゴリズム（Needleman and Wunsch, 1970）を利用する。Gap Open: 10.0及びGap Extend 0.5を含むデフォルト設定が利用される。デフォルトのマトリックス「Blosum62」は、アミノ酸配列及びデフォルトマトリックスに利用される。

30

【0029】

「細胞膜透過性ペプチド」（CPP）という用語は、細胞膜を通過することが可能なペプチドを指す。一例では、CPPは、哺乳動物の細胞膜を通過して移行し、細胞に入ることが可能である。別の例では、CPPは、コンジュゲートを所望の細胞内区画に導き得る。従って、CPPは、リン脂質、細胞、ミトコンドリア、エンドソーム、リソソーム、小胞、または核膜を通過する目的の分子の浸透を導くか、または促進し得る。CPPは、膜を通過して移行されてもよく、アミノ酸配列が、完全で無傷であるか、あるいは部分的に分解される。

40

【0030】

CPPは、細胞の外側から原形質膜を通過して、細胞質または所望の細胞内区画に目的の分子を導き得る。代替的または追加的に、CPPは、血液脳、経粘膜、血液網膜、皮膚、胃腸及び/または肺関門を通過して目的の分子を導き得る。

【0031】

CPPが膜を通過して移行する能力は、エネルギー依存性もしくは非依存性、及び/または、受容体依存性もしくは非依存性であってよい。いくつかの例では、CPPは、本明

50

細書に記載の方法で決定されるように、原形質膜を通過して移行することが実証されるペプチドである。CPPは、(i)細胞に内在化されるが、その後エンドソームまたはリソソーム内にトラップされるペプチド、ならびに、(ii)細胞に内在化されるだけでなく、細胞に内在化されると、エンドソーム及び/またはリソソーム区画から脱出することが可能であり、さらに、細胞質ゾル及び核、ミトコンドリア、ゴルジ体、及び他の細胞内区画への細胞内送達を媒介することも可能なペプチド、を含む。

【0032】

いくつかの例では、ペプチドは、本明細書に記載の任意の配列と比較して、1~2、1~5、または10の保存的アミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20の保存的アミノ酸置換、を含む。保存的置換(保存的変異または保存的置換とも呼ばれる)は、アミノ酸残基が、同様の物理化学的特性を有する側鎖のある別のアミノ酸残基で置換されて、異なるアミノ酸配列を有するタンパク質をもたらすアミノ酸置換であるが、それは、同様の生化学的特性(例えば、電荷、疎水性、及びサイズ)を有する。

10

【0033】

同様の物理化学的特性を有する側鎖のあるアミノ酸残基は、当該技術分野で既知であり、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、無極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸を有するものを含み、これは、天然に存在しないアミノ酸及び非タンパク質新生アミノ酸で置換されており、それ故、これは、遺伝コードにコードされた通常のアミノ酸にはない。保存的アミノ酸置換は、さらに、D-アミノ酸を含む。

20

【0034】

「塩基性アミノ酸」という用語は、6.3を超える等電点(Kice & Marvel 1 "Modern Principles of organic Chemistry" (Macmillan, 1974)またはMatthews and van Holde "Biochemistry" Cummings Publishing Company, 1996に従って測定)を有する天然及び非天然アミノ酸を含む任意のアミノ酸に関する。アルギニン、リジン、ヒスチジン、及びホモアルギニン(Har)、ならびに、それらの誘導体が、この定義に含まれる。好適な非天然塩基性アミノ酸は、米国特許第6,858,396号に記載される。

30

【0035】

いくつかの例では、CPPペプチドのいずれかのアミノ酸配列は、20~100残基、例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または20~100の別の数の残基からなる。他の例では、上述のペプチドのいずれかのアミノ酸配列は、30~70残基、例えば、35、40、45、48、50、52、60、65、または30~70残基の別の数の残基からなる。他の例では、上述のペプチドのいずれかのアミノ酸配列は、40~60残基、例えば、42、43、45、48、50、52、54、57、58、または40~60残基の別の数の残基からなる。いくつかの例では、上述のペプチドのいずれかのアミノ酸配列は、35~50残基、例えば、36、38、40、42、43、45、57、58、または35~50残基の別の数の残基からなる。さらに他の例では、上述のペプチドのいずれかのアミノ酸配列は、20~50残基、例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、35、37、38、40、42、46、48、または20~50の別の数の残基からなる。

40

【0036】

50

一例では、ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1に対応するアミノ酸配列からなる。誤解を避けるために、そのような例では、ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1に対応するアミノ酸配列からなるが、ペプチドは、それにもかかわらず、アミノ酸配列を変更しない化学改変を含み得ることが理解されるべきである。そのような改変には、非カノニカルアミノ酸、脂肪酸、検出可能な標識、ポリヌクレオチド、コレステロール、及び反応性基の使用；非ペプチドリンカーとのCPPのコンジュゲーション；CPPの目的の分子とのコンジュゲーション（治療薬、オリゴヌクレオチド、及び検出可能な標識を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。他の例では、CPPは、配列番号1に対応するアミノ酸配列からなる。

【0037】

一実施形態では、CCPは、配列番号1に対応するアミノ酸配列の複数のコピー、及び、本明細書では多量体ペプチドと呼ばれる配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、を含む。いくつかの例では、多量体ペプチドは、配列番号1に対応するアミノ酸配列の2～10コピー、例えば、配列番号1に対応するアミノ酸配列の2、3、4、5、6、7、8、9、または10コピーを含む。一実施形態では、CCPは、配列番号1に対応するアミノ酸配列の複数のコピー、及び、配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、を含む。

【0038】

改変CPP

CPPは、非カノニカルアミノ酸、脂肪酸、検出可能な標識、ポリヌクレオチド、コレステロール、及び反応性基を使用することにより改変されてもよい。そのような修飾ペプチドは、ペプチドの侵入の検出の促進、細胞内での局在化、細胞への侵入の増強、及び/または*in vitro*もしくは*in vivo*でのペプチド分解の低減などの、CPPに追加の機能を付与してもよい。

【0039】

非カノニカルアミノ酸

いくつかの例では、CPPは、非カノニカルアミノ酸を含む改変ペプチドである。好適な非カノニカルアミノ酸には、 α -アミノ-n-酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、アロイソロイシン、t-ロイシン、オルニチン、アロトレオニン、 β -アラニン、 γ -アミノ-n-酪酸、n-イソプロピルグリシン、イソセリン、サルコシン、6-アミノヘキサ酸、ガンマ-アミノ酪酸、及び5-アミノ吉草酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0040】

反応性基

他の例では、改変CPPは、反応性基を含んでもよい。好適な反応性基には、アジド基、アミン反応性基、チオール反応性基、及びカルボニル反応性基が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、反応性基は、化学タグの一部である。好適な化学タグには、SNAPタグ、CLIPタグ、Halotag、またはTMPタグが挙げられるが、これらに限定されない。一例では、化学タグは、SNAPタグまたはCLIPタグである。SNAP及びCLIP融合タンパク質は、例えばCorrea 2015 (Methods Mol Biol, 1266: 55-79)に記載されるように、目的のタンパク質またはペプチドへの事実上いかなる分子の特異的な共有結合も可能にする。別の例では、化学タグは、Halotagである。Halotagには、溶液中、生細胞内、または化学的に固定された細胞内で、種々の分子を共有結合させることが可能なモジュラータンパク質タグシステムを含む。別の例では、化学タグは、TMPタグである。TMPタグは、細胞表面ではなく、細胞内のタンパク質を高い選択性で標識することができる。

【0041】

脂肪酸

いくつかの例では、改変CPPは、脂肪酸を含んでもよい。改変ペプチドに好適な脂肪酸には、パルミチン酸、ミリスチン酸、カプリル酸、ラウリン酸、n-オクタン酸、及びn-デカン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0042】

コレステロール

他の例では、改変CPPは、コレステロールを含んでもよい。

【0043】

オリゴヌクレオチド

いくつかの例では、改変CPPは、オリゴヌクレオチドを含んでもよい。そのような場合では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、マイクロRNA、RNAi、一本鎖DNAもしくはRNAオリゴヌクレオチド、二本鎖DNAオリゴヌクレオチド、mRNA、またはプラスミドであってよい。

【0044】

検出可能な標識

いくつかの例では、改変CPPは、検出可能な標識を含んでもよい。「検出可能な標識」という用語は、光学的、蛍光的、同位体イメージングにより、または質量分析手法により、または単純な酵素アッセイを実施することにより、検出することができる任意のタイプの分子を指す。当該技術分野で既知の任意の検出可能な標識が使用されてもよい。いくつかの例では、検出可能な標識は、レポータータンパク質、フルオロフォア、蛍光基質、発光基質、及びビオチンの中から選択される。

【0045】

検出可能な標識は、レポータータンパク質であってよい。好適なレポータータンパク質には、本明細書に記載の蛍光タンパク質、Qureshi (2007), Biotechniques, 42(1): 91-95に記載のラクタマーゼ、ハロアルカンデハロゲナーゼ、またはルシフェラーゼが挙げられる。いくつかの例では、レポータータンパク質は、ラクタマーゼのアミノ酸配列を含む。

【0046】

検出可能な標識は、蛍光タグであってよい。例えば、蛍光タグは、フルオロフォア、例えば、フルオレセインイソチオシアナート、フルオレセインチオセミカルバジド、ローダミン、Texas Red、CyDye、例えば、Cy3、Cy5、及びCy5.5、Alexa Fluor (例えば、Alexa488、Alexa555、Alexa594、及びAlexa647)、または近赤外蛍光色素であってよい。蛍光タグは、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、増強緑色蛍光タンパク質(EGFP)、AcGFPまたはTurboGFP、エメラルド、アザミグリーン、ZsGreen、EBFP、サファイア、T-サファイア、ECFP、mCFP、セルリアン、CyPet、AmCyan1、ミドリイシシアン、mTFP1(Teal)、増強黄色蛍光タンパク質(EYFP)、Topaz、Venus、mCitrine、YPet、PhiYFP、ZsYellow1、mBanana、Kusabira、ange、mOrange、dTomato、dTomato-Tandem、AsRed2、mRFP1、Jred、mCherry、HcRed1、mRaspberry、HcRed1、HcRed-Tandem、mPlum、AQ143であってよい。蛍光タグは、量子ドットであってよい。蛍光タグは、pH感受性フルオロフォア、例えば、ナフトフルオレセイン、pHrodo(商標)Green(ThermoFisher)、及びpHrodo(商標)Red(ThermoFisher)であってよい。蛍光タグは、蛍光顕微鏡、例えば、落射蛍光または共焦点顕微鏡、蛍光スキャナー、例えば、マイクロアレイリーダー、分光蛍光光度計、マイクロプレートリーダー、及び/またはフローサイトメーターを使用して検出されてもよい。

【0047】

検出可能な標識は、発光基質であってよい。好適な発光基質には、D-ルシフェリン、L-ルシフェリン、セレンテラジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0048】

検出可能な標識は、エピトープタグであってよい。例えば、エピトープタグは、ポリヒスチジンタグ、例えば、ヘキサヒスチジンタグもしくはドデカヒスチジン、FLAGタグ

10

20

30

40

50

、Mycタグ、HAタグ、GSTタグ、またはV5タグであってよい。エピトープタグは、規定通りに、市販の抗体で検出される。エピトープタグが、精製及び/または検出を容易にし得ることを、当業者は認識するであろう。例えば、ヘキサヒスチジンタグを含むCPPは、例えば、固体または半固体支持体に固定化されたヘキサヒスチジンタグに特異的に結合するニッケル-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA)と、タンパク質を含む試料を接触させ、試料を洗浄して未結合タンパク質を除去し、続いて結合タンパク質を溶出させることにより、当該技術分野で既知の方法を使用して精製されてもよい。代替的または追加的に、エピトープタグに結合するリガンドまたは抗体は、アフィニティー精製法で使用されてもよい。

【0049】

検出可能な標識は、マスタグまたは等圧タグであってよい。そのようなタグは、相対絶対定量(iTRAQ)に使用されてもよい。マスタグは、タンパク質及びペプチドの質量分析ベースの定量に使用される化学標識である。そのような方法では、質量分析計は、タンパク質またはペプチドの標識型及び非標識型間の質量差を認識し、例えば、Bantscheff et al. 2007に記載されているように、それぞれのシグナル強度を比較することにより定量化が達成される。マスタグの例には、TMTzero、TMTduplex、TMTsixplex、及びTMT10-plexが挙げられる。相対・絶対定量化の等圧タグ(iTRAQ)は、例えば、Wiese et al. 2007に記載されるように、単一の実験で、種々の供給源に由来するタンパク質の量を決定するために、タンデム質量分析による定量的プロテオミクスで使用される化学タグである。

【0050】

コンジュゲートされたカーゴ

CPPは、細胞への目的の分子の送達を増加させるために、目的の分子(すなわち、「カーゴ」)にコンジュゲートされてもよい。目的の分子は、治療薬、オリゴヌクレオチド、さらなるペプチドもしくはタンパク質、反応性基、脂肪酸、コレステロール、または検出可能な標識を含む。コンジュゲーションは、共有結合または非共有結合性相互作用を介するものであってよい。例えば、CPPは、「ペプチドリinker」を介してオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされてもよい。部分は、特定の細胞内標的に作用するように、または輸送を特定の細胞内区画に向けるように設計されてもよい。

【0051】

目的の分子は、CPPペプチドのアミノ酸に共有結合していてもよい。一例では、目的の共有結合した分子は、CPPアミノ酸配列のN末端に共有結合している。別の例では、目的の共有結合している分子は、CPPアミノ酸配列のC末端に共有結合している。他の例では、目的の共有結合している分子は、CPPのアミノ酸残基側鎖を介して(例えば、内部のリジンまたはシステイン残基で)共有結合している。当業者らは、これが、限定されないが、ペプチド結合形成、アミド結合形成、反応性アミンを介した結合、ヒドラゾン形成、ジスルフィド形成、エーテル結合、クリックケミストリー(銅触媒及び歪促進の両方)、スタウディンガー反応、ネイティブケミカルライゲーション、ならびにコンジュゲーションケミストリー、例えば、SpyCatcher/SpyTagイソペプチド結合形成を含む様々な化学反応を通して達成することができることを認識している。

【0052】

いくつかの例では、目的の分子は、例えば、CPP中の1つ以上の荷電アミノ酸残基と、1つ以上のCPPアミノ酸残基と反対の電荷である目的の分子内の1つ以上の官能基との間の非共有結合性相互作用を介して、CPPに非共有結合的に結合している。非共有結合性相互作用は、静電相互作用、ファンデルワールス力、パイ結合相互作用、及び疎水性相互作用であってよい。

【0053】

治療薬

いくつかの例では、目的のコンジュゲート分子は、治療薬、好ましくは、小分子化合物(一般にサイズが約900ダルトン未満)であってよい。いくつかの例では、小分子治療

10

20

30

40

50

薬は、化学療法剤、細胞傷害性分子、または細胞増殖抑制性分子である。

【0054】

オリゴヌクレオチド

いくつかの例では、目的のコンジュゲート分子は、オリゴヌクレオチドであってよい。オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、マイクロRNA、*RNAi*、一本鎖DNAもしくはRNAオリゴヌクレオチド、二本鎖DNAオリゴヌクレオチド、mRNA、またはプラスミドであってよい。オリゴヌクレオチドは、モルフォリノオリゴヌクレオチド(PMO)、ペプチド核酸(PNA)、ロックされた核酸(LNA)、及び2'-O-メチルオリゴヌクレオチドを含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、(i) 改変骨格構造、例えば、天然に存在するオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドに見られる標準的なホスホジエステル結合以外の骨格、ならびに/または、(ii) 改変糖部分、例えば、リボースまたはデオキシリボース部分ではなくモルフォリノ部分、を有してもよい。

10

【0055】

ペプチドまたはタンパク質

いくつかの例では、目的のコンジュゲート分子は、タンパク質またはペプチドであってよい。タンパク質またはペプチドは、アポトーシス促進ペプチド、標的タンパク質、細胞傷害性タンパク質、酵素タンパク質、レポータータンパク質、ペプチドベースのタンパク質-タンパク質相互作用阻害剤、タンパク質分解標的キメラ(PROTAC)ペプチド、及びドミナントネガティブペプチドであってよい。

20

【0056】

いくつかの例では、酵素タンパク質は、ASS-1(Quinonez and Thoenes 2004)またはベータ-ラクタマーゼ(Stone et al 2018)であってよく; ペプチド相互作用阻害剤は、KRAS/SOS-1タンパク質相互作用遮断ペプチドであってよく(例えば、Leshchiner et al 2015); タンパク質分解標的キメラ(PROTAC)ペプチド配列は、Sakamoto et al 2001またはGuet al. 2018のものであってよい。

【0057】

いくつかの例では、タンパク質またはペプチドは、プロアポトーシスペプチドであってよい。

30

【0058】

いくつかの例では、タンパク質またはペプチドは、標的タンパク質であってよい。標的タンパク質は、特定の細胞表面抗原(例えば、受容体)に結合することにより、ペプチドコンジュゲートに特異性の増加をもたらす得、次に、これは、エンドソームに内在化される。標的タンパク質の例には、アフィボディ、scFv、一本鎖抗体、及び代替の足場(例えば、ペプチドアプタマー)を使用する他の選択的結合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、標的化タンパク質は、ゲノム標的化タンパク質(例えば、Cas9ゲノム標的化タンパク質またはCpf1ゲノム標的化タンパク質)であってよい。

【0059】

他の例では、タンパク質またはペプチドは、内在化及びエンドソームからの脱出時に急速な細胞死を誘導する細胞傷害性タンパク質(例えば、ブガニンまたはジフテリア毒素)であってよい。

40

【0060】

いくつかの例において、タンパク質またはペプチドは、ドミナントネガティブペプチドであってよい。ドミナントネガティブペプチドは、一般に、それらが由来するタンパク質の1つ以上の機能、及び/または全長タンパク質の相互作用パートナーの機能を阻害するように作用する。通常、それらは、タンパク質とその結合パートナーのうちの1つ以上との相互作用を阻害することにより作用する。いくつかの例では、ドミナントネガティブ転写因子ペプチドは、抗がんペプチドである。好適な抗がんペプチドには、以下の、Mas

50

sler et al (2016), Clin Cancer Res, 22(18): 4698-4711に記載の活性化転写因子5(ATF5)ドミナントネガティブペプチド/n-ATF5-S1、Adler et al(2008), Cancer Chemother Pharmacol, 62(3): 491-498に記載のras-p2196-110(PNC-2)及びras-p2135-47などの抗Ras-p21ドミナントネガティブペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0061】

反応性基

いくつかの例では、目的のコンジュゲート分子は、反応性基であってよい。好適な反応性基には、アジド基、アミン反応性基、チオール反応性基、及びカルボニル反応性基が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、反応性基は、化学タグの一部である。好適な化学タグには、SNAPタグ、CLIPタグ、Halotag、またはTMPタグが挙げられるが、これらに限定されない。一例では、化学タグは、SNAPタグまたはCLIPタグである。SNAP及びCLIP融合タンパク質は、例えばCorrea 2015(Methods Mol Biol, 1266: 55-79)に記載されるように、目的のタンパク質またはペプチドへの事実上いかなる分子の特異的な共有結合も可能にする。別の例では、化学タグは、Halotagである。Halotagには、溶液中、生細胞内、または化学的に固定された細胞内で、種々の分子を共有結合させることが可能なモジュラータンパク質タグシステムを含む。別の例では、化学タグは、TMPタグである。TMPタグは、細胞表面ではなく、細胞内のタンパク質を高い選択性で標識することができる。

10

20

【0062】

脂肪酸

いくつかの例では、目的のコンジュゲート分子は、脂肪酸であってよい。改変ペプチドに好適な脂肪酸には、パルミチン酸、ミリスチン酸、カプリル酸、ラウリン酸、n-オクタ酸、及びn-デカン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0063】

コレステロール

いくつかの例では、目的のコンジュゲート分子は、コレステロールであってよい。

【0064】

検出可能な標識

いくつかの例では、目的のコンジュゲート分子は、検出可能な標識である。検出可能な標識は、光学、蛍光、同位体イメージングにより、または質量分析手法により、または単純な酵素アッセイを実行することにより、検出することができる任意のタイプの分子であってよい。当該技術分野で既知の任意の検出可能な標識が使用されてもよい。いくつかの例では、検出可能な標識は、レポータータンパク質、フルオロフォア、蛍光基質、発光基質、及びビオチンの中から選択される。

30

【0065】

検出可能な標識は、レポータータンパク質であってよい。好適なレポータータンパク質には、本明細書に記載の蛍光タンパク質、Qureshi(2007), Biotechniques, 42(1): 91-95に記載のラクタマーゼ、ハロアルカンデハロゲンナーゼ、またはルシフェラーゼが挙げられる。いくつかの例では、レポータータンパク質は、ラクタマーゼのアミノ酸配列を含む。

40

【0066】

検出可能な標識は、蛍光タグであってよい。例えば、蛍光タグは、フルオロフォア、例えば、フルオレセインイソチオシアナート、フルオレセインチオセミカルバジド、ローダミン、Texas Red、CyDye、例えば、Cy3、Cy5、及びCy5.5、Alexa Fluor(例えば、Alexa488、Alexa555、Alexa594、及びAlexa647)、または近赤外蛍光色素であってよい。蛍光タグは、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、増強緑色蛍光タンパク質(EGFP

50

)、AcGFPまたはTurboGFP、エメラルド、アザミグリーン、ZsGreen、EBFP、サファイア、T-サファイア、ECFP、mCFP、セルリアン、CyPet、AmCyan1、ミドリイシシアン、mTFP1(Teal)、増強黄色蛍光タンパク質(EYFP)、Topaz、Venus、mCitrine、YPet、PhiYFP、ZsYellow1、mBanana、Kusabira、ange、mOrange、dTomato、dTomato-Tandem、AsRed2、mRFP1、Jred、mCherry、HcRed1、mRaspberry、HcRed1、HcRed-Tandem、mPlum、AQ143であってよい。蛍光タグは、量子ドットであってよい。蛍光タグは、pH感受性フルオロフォア、例えば、ナフトフルオレセイン、pHrodo(商標)Green(ThermoFisher)、及びpHrodo(商標)Red(ThermoFisher)であってよい。蛍光タグは、蛍光顕微鏡、例えば、落射蛍光または共焦点顕微鏡、蛍光スキャナー、例えば、マイクロアレイリーダー、分光蛍光光度計、マイクロプレートリーダー、及び/またはフローサイトメーターを使用して検出されてもよい。

【0067】

検出可能な標識は、発光基質であってよい。好適な発光基質には、D-ルシフェリン、L-ルシフェリン、セレンテラジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0068】

検出可能な標識は、エピトープタグであってよい。例えば、エピトープタグは、ポリヒスチジンタグ、例えば、ヘキサヒスチジンタグもしくはドデカヒスチジン、FLAGタグ、Mycタグ、HAタグ、GSTタグ、またはV5タグであってよい。エピトープタグは、規定通りに、市販の抗体で検出される。エピトープタグが、精製及び/または検出を容易にし得ることを、当業者は認識するであろう。例えば、ヘキサヒスチジンタグを含むCPPは、例えば、固体または半固体支持体に固定化されたヘキサヒスチジンタグに特異的に結合するニッケル-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA)と、タンパク質を含む試料を接触させ、試料を洗浄して未結合タンパク質を除去し、続いて結合タンパク質を溶出させることにより、当該技術分野で既知の方法を使用して精製されてもよい。代替的または追加的に、エピトープタグに結合するリガンドまたは抗体は、アフィニティー精製法で使用されてもよい。

【0069】

検出可能な標識は、マスタグまたは等圧タグであってよい。そのようなタグは、相対絶対定量(iTRAQ)に使用されてもよい。マスタグは、タンパク質及びペプチドの質量分析ベースの定量に使用される化学標識である。そのような方法では、質量分析計は、タンパク質またはペプチドの標識型及び非標識型間の質量差を認識し、例えば、Bantscheff et al. 2007に記載されているように、それぞれのシグナル強度を比較することにより定量化が達成される。マスタグの例には、TMTzero、TMTduplex、TMTsixplex、及びTMT10-plexが挙げられる。相対・絶対定量化の等圧タグ(iTRAQ)は、例えば、Wiese et al. 2007に記載されるように、単一の実験で、種々の供給源に由来するタンパク質の量を決定するために、タンデム質量分析による定量的プロテオミクスで使用される化学タグである。

【0070】

合成

本開示の任意のCPPは、当業者に既知の化学的方法を使用して合成されてもよい。例えば、合成ペプチドは、固相、液相、もしくはペプチド濃縮の既知の手法、またはそれらの任意の組み合わせを使用して調製され、天然及び/または非天然アミノ酸を含み得る。

【0071】

本開示の任意のペプチドは、組み換え手段により発現されてもよい。例えば、ペプチドをコードする核酸は、細胞系または生物における発現を調節することが可能なプロモーターまたは他の調節配列と作動可能に接続して配置されてもよい。細菌細胞での発現に適する代表的なプロモーターには、例えば、lacZプロモーター、Ippプロモーター、温

10

20

30

40

50

度感受性 L もしくは R プロモーター、T7 プロモーター、T3 プロモーター、SP6 プロモーター、または半人工プロモーター、例えば、IPTG 誘導性 tac プロモーターもしくは lacUV5 プロモーターが挙げられる。細菌細胞において本発明のペプチドを発現させるための他の多くの遺伝子構築物システムは、当該技術分野で周知であり、例えば、Ausubel et al. (1988)、及び Sambrook et al. (2001) に記載される。

【0072】

細菌細胞での組み換えペプチドの発現のための多数の発現ベクターが記載されており、とりわけ、例えば、PKC3、pKK173-3、pET28、pCRベクタースイート (Invitrogen)、pGEM-T Easyベクター (Promega)、pL 10
発現ベクタースイート (Invitrogen)、またはアラビノース誘導性プロモーター (Invitrogen) を含有する pBAD/チオ-TOPO シリーズのベクターを含む。

【0073】

例えば、Pichia pastoris、S. cerevisiae、及び S. pombe を含む群から選択される酵母細胞などの酵母細胞における発現に適する代表的なプロモーターには、ADH1 プロモーター、GAL1 プロモーター、GAL4 プロモーター、CUP1 プロモーター、PH05 プロモーター、nmt プロモーター、RPR1 プロモーター、または TEF1 プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0074】

酵母細胞で発現するための発現ベクターが好ましく、例えば、pACTベクター (Clontech)、pDBleu-Xベクター、pPICベクタースイート (Invitrogen)、pGAPZベクタースイート (Invitrogen)、pHYBベクター (Invitrogen)、pYD1ベクター (Invitrogen)、及び pNMT1、pNMT41、pNMT81 TOPOベクター (Invitrogen)、pPC86-Yベクター (Invitrogen)、pRHシリーズのベクター (Invitrogen)、pYESTrpシリーズのベクター (Invitrogen) を含む。

【0075】

哺乳動物細胞での発現に好ましいベクターには、例えば、pcDNAベクタースイート (Invitrogen)、pTARGETシリーズのベクター (Promega)、及び pSVベクタースイート (Promega) が挙げられる。

【0076】

宿主細胞を形質転換及びトランスフェクトするための好適な方法は、Sambrook et al. 2001 及び他の実験室のテキストに見出すことができる。一例では、核酸は、例えば、エレクトロポレーションまたは塩化カルシウム媒介性形質転換を使用して、原核細胞に導入されてもよい。別の例では、核酸は、例えば、マイクロインジェクション、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムの共沈、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、例えば、Lipofectamine (Invitrogen) 及び/またはセルフェクチン (Invitrogen)、PEG 媒介性 DNA 取り込み、エレクトロポレーション、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、トガウイルス、またはレトロウイルスによる形質導入を使用することによる、リボソームにより媒介されるトランスフェクション、ならびに、例えば、DNA コーティングされたタングステンまたは金粒子を使用することによるマイクロ粒子照射を使用して、動物細胞に導入されてもよい。あるいは、核酸は、例えば、エレクトロポレーション、及び PEG 媒介性形質転換などの従来の手法を使用して酵母細胞に導入されてもよい。

【0077】

生成/発現/合成の後に、本開示の任意のタンパク質またはペプチドは、HPLC などの当該技術分野で既知の方法を使用して精製することができる。(タンパク質精製: principles and practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994 の) 範囲を参照のこと。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 8 】

細胞発現

また、C P P、または本明細書に記載の目的の分子にコンジュゲートされたC P Pのいずれかを含む改変細胞が本明細書に記載される。

【 0 0 7 9 】

それ故、本発明は、配列番号1のC P P及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、または、目的の分子にコンジュゲートされた、配列番号1のC P P及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、を含む改変細胞を提供する。

【 0 0 8 0 】

本発明は、さらに、薬剤または診断薬の製造における、配列番号1のC P P及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、目的の分子にコンジュゲートされた、配列番号1のC P P及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、またはこれらのいずれかを含む改変細胞の使用を提供する。

10

【 0 0 8 1 】

いくつかの例では、改変細胞は、原核細胞である。他の例では、改変細胞は、真核細胞である。好適な真核細胞には、酵母細胞、及び、限定されないが、ヒト細胞を含む哺乳動物細胞が挙げられる。いくつかの例では、改変哺乳動物細胞は、細胞株に由来する。好適な細胞株には、ARPE - 19、CHO - K1、HEK - 293、COS7、HeLa、N2a、及びNIH 3T3が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 2 】

いくつかの例では、改変細胞は、1つ以上の遺伝的にコードされたC P Pまたは目的の分子にコンジュゲートされたC P Pを発現する。他の例では、改変細胞は、初代哺乳動物細胞である。

20

【 0 0 8 3 】

他の例では、改変細胞は、C P Pまたは目的の分子にコンジュゲートされたC P Pをコードする外因性核酸を含まないが、C P Pまたは目的の分子にコンジュゲートされたC P Pのタンパク質形質導入で改変される。

【 0 0 8 4 】

好ましくは、改変細胞は、真核細胞である。より好ましくは、真核細胞は、哺乳動物細胞である。最も好ましくは、哺乳動物細胞は、ヒト細胞である。いくつかの例では、ヒト細胞は、ヒト幹細胞である。そのようなヒト幹細胞には、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、及び間葉系幹細胞が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる例では、ヒト細胞には、心筋細胞、ニューロン、肝細胞、及び膵島細胞が挙げられるが、これらに限定されない。他の例では、哺乳動物細胞は、がん細胞（例えば、ヒトがん細胞）である。

30

【 0 0 8 5 】

使用

本開示は、C P P、目的の分子にコンジュゲートされたC P P、または薬剤もしくは診断薬として使用される改変細胞のいずれか1つも提供する。本開示は、C P P、目的の分子にコンジュゲートされたC P P、または薬剤もしくは診断薬の製造に使用される改変細胞のいずれか1つも提供する。

40

【 0 0 8 6 】

それ故、本発明は、薬剤または診断薬の製造における、配列番号1のC P P及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、目的の分子とコンジュゲートされた、配列番号1のC P P及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、またはこれらのいずれかを含む改変細胞の使用を提供する。

【 0 0 8 7 】

本発明は、さらに、薬剤または診断薬としての、配列番号1のC P P及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、目的の分子とコンジュゲートされた、配列番号1のC P P及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、またはこれらのいずれかを含む改変細胞の使用を提供する。

50

【0088】

本発明の配列は、アミノ酸レベルが、配列番号1と、少なくとも65%、70%、75%、80%、または85%の類似性、好ましくは、少なくとも約90、95%、または98%の類似性を有してもよい。

【0089】

好ましくは、CPPは、以下の非カノニカルアミノ酸、脂肪酸、検出可能な標識、オリゴヌクレオチド、コレステロール、及び反応性基の使用のうちの1つ以上で修飾される。

【0090】

好ましくは、CPPは、目的の分子にコンジュゲートされる。目的の分子は、以下の治療薬、オリゴヌクレオチド、さらなるペプチドもしくはタンパク質、反応性基、脂肪酸、コレステロール、または検出可能な標識から選択されてもよい。好ましくは、コンジュゲートは、共有結合または非共有結合性相互作用を使用して実施される。

【0091】

キット

本開示は、本発明のCPP及び使用説明書を含むキットも提供する。

【0092】

それ故、本発明は、(i)配列番号1のCPP及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、目的の分子にコンジュゲートされた、配列番号1のCPP及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列、またはこれらのいずれかを含む改変細胞、ならびに、(ii)使用説明書、を含むキットを提供する。

【0093】

本発明の配列は、アミノ酸レベルが、配列番号1と、少なくとも65%、70%、75%、80%、または85%の類似性、好ましくは、少なくとも約90、95%、または98%の類似性を有してもよい。

【0094】

好ましくは、CPPは、以下の非カノニカルアミノ酸、脂肪酸、検出可能な標識、オリゴヌクレオチド、コレステロール、及び反応性基の使用のうちの1つ以上で修飾される。

【0095】

好ましくは、CPPは、目的の分子にコンジュゲートされる。目的の分子は、以下の治療薬、オリゴヌクレオチド、さらなるペプチドもしくはタンパク質、反応性基、脂肪酸、コレステロール、または検出可能な標識から選択されてもよい。好ましくは、コンジュゲートは、共有結合または非共有結合性相互作用を使用して実施される。

【0096】

定義

「カノニカルアミノ酸」という用語は、普遍的な遺伝コードのコードに直接コードされたアミノ酸を指す。カノニカルアミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンである。

【0097】

ヌクレオチドまたはアミノ酸配列に関する「内因性」または「内因的にコードされた」という用語は、問題の配列が、問題のアミノ酸配列をコードまたは発現するように実験的に改変されていないウイルス、細胞、または生物に固有であることを示す。

【0098】

ペプチドに関する「天然に存在しない」という用語は、(i)問題のペプチドのアミノ酸配列からなるアミノ酸配列をコードする内因性遺伝子またはオープンリーディングフレームがないこと、及び、(ii)これのアミノ酸配列が問題のペプチドからなる内因性タンパク質フラグメントがないこと、を示すと理解されるであろう。例えば、内因的に発現されたタンパク質のフラグメントのアミノ酸配列からなるペプチドは、タンパク質フラグメント自体が自然に発現されないか、または、通常は、内因的に発現されたタンパク質の

10

20

30

40

50

副産物として生じない場合、天然に存在しないペプチドと見なされる。

【0099】

「ペプチド」という用語は、アミド結合で結合されているアミノ酸残基から構成される化合物を含むことが意図される。ペプチドは、天然または非天然のリボソームでコードされても、合成で誘導されてもよい。通常、ペプチドは、2～200アミノ酸からなるであろう。例えば、ペプチドは、該範囲（複数可）内の任意の長さを含む、10～20アミノ酸または10～30アミノ酸または10～40アミノ酸または10～50アミノ酸または10～60アミノ酸または10～70アミノ酸または10～80アミノ酸または10～90アミノ酸または10～100アミノ酸の範囲の長さを有してもよい。ペプチドは、約150アミノ酸未満または約125アミノ酸未満または約100アミノ酸未満または約90アミノ酸未満または約80アミノ酸未満または約70アミノ酸未満または約60アミノ酸未満または約50アミノ酸未満を含んでも、それらからなってもよい。

10

【0100】

本明細書で言及されるペプチドは、全てのL-アミノ酸が対応するD-アミノ酸で置換されている「インベルソ」ペプチド、及び、アミノ酸の配列が逆になっており、全てのL-アミノ酸がD-アミノ酸で置換されている「レトロ-インベルソ」ペプチドを含む。

【0101】

ペプチドは、L型及び/またはD型の両方のアミノ酸を含んでもよい。例えば、L型及びD型の両方は、同じペプチド配列内の種々のアミノ酸に使用されてもよい。いくつかの例では、ペプチド配列内のアミノ酸は、天然アミノ酸などのL型である。いくつかの例では、ペプチド配列内のアミノ酸は、L型及びD型の組み合わせである。いくつかの例では、ペプチド配列内のアミノ酸は、全てD型である。

20

【0102】

ペプチドは、周知の固相ペプチド合成手法及び精製手法を使用して合成されてもよい。

【0103】

「タンパク質」という用語は、単一のポリペプチド鎖、すなわち、ペプチド結合で結合している一連の連続するアミノ酸、または互いに共有結合もしくは非共有結合的に結合している一連のポリペプチド鎖（すなわち、ポリペプチド複合体）を含むと解釈されなければならない。例えば、一連のポリペプチド鎖は、好適な化学結合またはジスルフィド結合を使用して共有結合的に結合させることができる。非共有結合の例には、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、及び疎水性相互作用が挙げられる。

30

【0104】

全般

本明細書に記載の発明が、具体的に記載されるもの以外の変形及び修正を受けやすいことを、当業者らは理解するであろう。本発明は、そのような全ての変形及び修正を含む。本発明は、本明細書で、個別または集合的に言及または示される全てのステップ、特徴、製剤、及び化合物、ならびに、ステップまたは特徴のうちのありとあらゆる組み合わせまたはそれらのうちの任意の2つ以上も含む。

【0105】

本文で引用された各文書、参考文献、特許出願、または特許は、全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれ、このことは、それが、本文の一部として読者により読まれて、検討されなければならないことを意味する。本文で引用された文書、参考文献、特許出願、または特許が、本文で繰り返されないことは、単に、簡潔さの理由によるものである。

40

【0106】

本明細書または本明細書に参照により組み込まれる任意の文書に記載の任意の製品についての製造業者の指示、説明、製品仕様、及び製品シートは、本明細書で参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施に用いられてもよい。

【0107】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態のいずれかにより範囲が限定されるべきではない。これらの実施形態は、例示のみを目的とすることが意図される。機能的に同等の

50

製品、製剤、及び方法は、本明細書に記載の本発明の範囲内にあることは明らかである。

【0108】

本明細書に記載の発明は、1つ以上の範囲の値（例えば、サイズ、変位、及び電界強度など）を含んでもよい。値の範囲は、範囲を定義する値、及び範囲の境界を定義するその値に直接隣接する値と同じまたは実質的に同じ結果をもたらす範囲に隣接する値を含む、範囲内の全ての値を含むことが理解されるであろう。従って、反対の指示がない限り、明細書及び特許請求の範囲に記載の数値パラメータは、本発明により得られることが求められる所望の特性に応じて変化し得る近似値である。従って、「約80%」は、「約80%」及び「80%」も意味する。控えめに言っても、各数値パラメータは、有効桁数及び通常の四捨五入アプローチに照らして解釈されるべきである。

10

【0109】

本明細書全体にわたって、文脈に別途要求のない限り、「含む」という単語または「含む」もしくは「含むこと」などの変形形態は、規定した整数または整数群を含むが、他の任意の整数または整数群を除外することを意味すると理解されるだろう。また、本開示、特に、特許請求の範囲及び/または段落において、「含む」、「含まれた」、「含むこと」などの用語は、米国特許法におけるそれに起因する意味を有し得、例えば、それらは、「含む」、「含まれた」、「含むこと」などを意味し得ること、ならびに、「から本質的になること」及び「本質的にかつらなる」などの用語は、米国特許法におけるそれらに起因する意味を有し、例えば、それらは、明示的に列挙されていない要素を可能にするが、先行技術に見られる要素または本発明の基本的または新規の特徴に影響を与える要素は除外されること、が強調される。

20

【0110】

本明細書で使用される選択された用語の他の定義は、本発明の詳細な説明内に見出され、全体に適用してもよい。別途定義のない限り、本明細書で使用される他の全ての科学及び技術用語は、本発明が属する当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。「活性薬」という用語は、1つの活性薬を意味しても、2つ以上の活性薬を含んでもよい。

【0111】

以下の例は、本発明の様々な態様を実施するために企図される最良のモードを記載するのに限らず、上記の発明を使用する仕方をより完全に説明するのに役立つ。これらの方法は、本発明の真の範囲を制限するのに役立つことは決してなく、むしろ、例示の目的で提示されることが理解される。

30

本発明は、例えば以下の実施形態を包含する：

[1] アミノ酸配列：

RRSRTARAGRPRGRNSSSRPSAPR [配列番号1]

及び配列番号1と少なくとも60%の類似性を有する配列

を含む、単離された、天然に存在しない細胞膜透過性ペプチド(CPP)。

[2] アミノ酸レベルで、配列番号1と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または98%の類似性を有する、[1]に記載のCPP。

[3] 以下の非カノニカルアミノ酸、脂肪酸、検出可能な標識、オリゴヌクレオチド、コレステロール、及び反応性基の使用のうちの1つ以上で修飾される、[1]に記載のCPP。

40

[4] 目的の分子にコンジュゲートされる、[1]に記載のCPP。

[5] 前記目的の分子が、以下の治療薬、オリゴヌクレオチド、さらなるペプチドもしくはタンパク質、反応性基、脂肪酸、コレステロール、または検出可能な標識から選択される、[4]に記載のCPP。

[6] 前記コンジュゲーションが、共有結合または非共有結合性相互作用を使用して実施される、[4]に記載のCPP。

[7] [1]に記載のCPPまたは[4]に記載の目的の分子にコンジュゲートされたCPPを含む、改変細胞。

[8] 薬剤または診断薬の製造における、[1]に記載のCPP、[4]に記載の目的の

50

分子にコンジュゲートされたCPP、または[7]に記載の改変細胞の使用。

[9]薬剤または診断薬としての、[1]に記載のCPP、[4]に記載の目的の分子にコンジュゲートされたCPP、または[7]に記載の改変細胞の使用。

[10](i)[1]に記載のCPP、[4]に記載の目的の分子にコンジュゲートされたCPP、または[7]に記載の改変細胞、及び、(ii)使用説明書、を含む、キット。

【実施例】

【0112】

本発明のさらなる特徴は、以下の非限定的な実施例においてより完全に説明される。この説明は、本発明を例示する目的でのみ含まれる。上記のように、本発明の大きな説明に対する制限として理解されるべきではない。

【0113】

実施例1

潜在的なCPPペプチドは、歪促進(SPAAC)クリックケミストリー(Agard et al 2004, Dommerholt et al. 2016)を使用して、SMN1遺伝子のエクソン7を標的とするホスホロジアミダートオリゴヌクレオチド(PMO)に結合された(Flynn et al 2018)。ペプチド-PMOコンジュゲートを、完全培地のARPE-19細胞上で2日間インキュベートした。内在化の有効性を、RNA抽出によるSMN1遺伝子RNA転写産物のエクソン7スキップの程度で測定した。%d7の転写産物がPMO処置単独よりも高いペプチド-PMOは、CPPと見なされた。

【0114】

in vitro CPP-SMN1アッセイの導入

生存運動ニューロン(SMN1)遺伝子は、遍在的に発現され、スプライセオソームの集合及びリボ核タンパク質の生合成において重要な役割を果たす。SMN1遺伝子のスプライシング調節が解明されている(Singh et al 2012)。エクソン7がスキップされるSMN1のスプライスバリエーションは、D7-SMN1と呼ばれるより短いSMNタンパク質をもたらす既知のアイソフォームである。細胞膜透過性ペプチド送達ホスホロジアミダートモルフォリノオリゴマー(PMO)を使用するエクソンスキップは、CPPの有効性をテストするための実行可能な経路として確立されている(Wu et al. 2007)。

【0115】

SMN1遺伝子を使用して、種々のCPPにコンジュゲートされたホスホロジアミダートモルフォリノオリゴヌクレオチド(PMO)を使用するエクソン7でSMN1遺伝子(Flynn et al 2018)を標的とするエクソンスキップアッセイを、本発明者らは構築した。PMOカーゴを核に効率的に送達し、SMN1のエクソンスキップに影響を与える得るCPPを同定するために、このアッセイを使用した。RNA抽出、cDNA生成、及びSMN1特異的プライマーを使用するPCRを使用して、D7-SMN1 RNA転写産物の変化を測定することにより、送達及び機能の効率を決定した。効率は、D7-SMN1転写産物の割合が高いほど、CPPによる核への送達が良好であると解釈された。

【0116】

このアッセイの特性を考えると、フルメディアの存在下でのプロテアーゼ消化のために、天然のL-ペプチドの特徴は望ましくない。ペプチドのCPP能力を適切に評価するために、全ての塩基性残基がD-アミノ酸である混合L/Dアミノ酸含有ペプチド、または完全Dアミノ酸含有ペプチドのいずれかとして、ペプチドを合成した。アプローチの両方は、細胞でのインキュベーション中にペプチドをタンパク質分解から保護した。

【0117】

方法

哺乳動物の組織培養

ATCC(ATCC(登録商標)CRL-2302)からARPE-19細胞を得た。

10

20

30

40

50

5%のCO₂を含む37℃の加湿インキュベーターで、細胞株を維持し、完全培地(DMEM/F12 1:1、10%のFCS; 10mMのHEPES、1xのGlutaMAX(商標)、Pen/Strep 100u/ml; Gibco, Thermo Fisher Scientific、米国マサチューセッツ州ウォルサム)で培養した。

【0118】

ペプチド及びPMOの合成、ならびにPPMOのコンジュゲート

標準のFmoc SPPSベースの方法(Pepscan GmbH、蘭国レリスタット、及びMimotopes、オーストラリアビクトリア州モルグレイベ)を使用して、CPPを合成した。全ての配列は、PMOへのカップリングを可能するC末端アジドリジン残基を含有していた。全てのN末端をアセチル化し、C末端をアミド化した。

10

【0119】

Summerton and Weller(1997)が開発した方法を使用して、Gene Tools(Gene Tools LLC、米国オレゴン州フィロマス)で、5'-シクロオクチンハンドルを含むSMN1-PMO(ACCTTCCTTCTTTTAA TTTTGTCT)[配列番号2]を生成した。

【0120】

歪促進クリックケミストリー(SPAAC; Agard et al. 2004; Dommerholt et al. 2016)を使用して、C末端アジドリジンを有するCPPペプチドを、5'-シクロオシチンPMOと化学選択的にコンジュゲートした。アジド官能化ペプチド及びシクロオクチン官能化PMO間の環化付加反応は、5%のDMSOを含むリン酸緩衝生理食塩水中、37℃で3~4日間実施した。未反応の物質からペプチド-PMO(PPMO)コンジュゲートをイオン交換クロマトグラフィー(IEC)で分離し、脱塩した。最終画分を、分析用逆相HPLC及びLC/MSで分析した。

20

【0121】

in vitro SMN1有効性アッセイ

公開されたプロトコール(Mann et al. 2002, Gene Med, 4, 644-654)に従って、エクソンスキップアッセイ及びPCR検出を実施した。

【0122】

網膜色素上皮細胞(ARPE-19)不死化細胞を、様々な濃度(4uM、2uM、1uM、2回ずつ)のCPP-PMOコンジュゲートで処置し、RNA抽出及び精製による処置の48時間後に、SMN1転写産物レベル、続いて、cDNAの生成及びPCRを評価した。

30

【0123】

細胞を24ウェルプレート(ARPE-19、2.5x10⁴細胞/ウェル)の完全培地(DMEM/F12 1:1、10%のFCS; 10mMのHEPES、1xGlutaMAX(商標)、Pen/Strep 100u/ml; Gibco, Thermo Fisher Scientific、米国マサチューセッツ州ウォルサム)に播種した。細胞を一晩(37℃、5%のCO₂)インキュベートして、細胞を接着させた。アッセイ当日に、培地を吸引し、処置培地(DMEM/F12 1:1、10%のFCS; 10mMのHEPES、1xGlutaMAX(商標)、Pen/Strep 100u/ml; Gibco, Thermo Fisher Scientific、米国マサチューセッツ州ウォルサム)で希釈されたCPP-PMOまたはPMOのみで置換し、続いて、24時間インキュベーションした(37℃、5%のCO₂)。翌日、新鮮な培地1:1を添加し、細胞をさらに24時間インキュベーターに戻した。

40

【0124】

処置の48時間後、細胞培地を慎重に吸引し、細胞をPBSですすいだ。製造者のプロトコールに従って市販のRNA抽出キット(Bio-Rad Aurum total RNA 96キット; RNA収量の定量化; Quant-iT RNA BRキット)を使用して、処置された細胞からのRNAを得た。

【0125】

50

抽出されたRNAを精製し、定量し、次に、10 ng / μ lに希釈した。製造者のプロトコール (BioRad iScript) に従い、市販の逆転写キットを使用して、cDNAを生成した。目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを用いたテンプレートとして、生成されたcDNAを使用して、DNAを増幅した。SMN1遺伝子 (LC-GX核酸アナライザー) の全長 (FL SMN1) 及びエクソン - 7スキップフラグメント (D7 - SMN1) を定量し、割合を計算することにより、エクソンスキップの有効性を決定した。D7 - SMN1 DNAの割合が高いほど、CPP送達効率が高くなる。

【0126】

in vitro SMN1生存率アッセイ

細胞を96ウェルプレート (ARPE - 19、 4×10^3 細胞/ウェル) の完全培地 (DMEM / F12 1 : 1、10%のFCS ; 10 mMのHEPES、1 x GlutaMAX (商標)、Pen / Strep 100 u / ml ; Gibco、Thermo Fisher Scientific、米国マサチューセッツ州ウォルサム) に播種した。細胞を一晩 (37、5%のCO₂) インキュベートして、細胞を接着させた。アッセイ当日に、培地を吸引し、様々な濃度 (32、16、8、4、2、及び1 μ M) の処置培地 (DMEM / F12 1 : 1、10%のFCS ; 10 mMのHEPES、1 x GlutaMAX (商標)、Pen / Strep 100 u / ml ; Gibco、Thermo Fisher Scientific、米国マサチューセッツ州ウォルサム) で希釈されたCPP - PMOまたはPMOのみで置換し、続いて、24時間インキュベーションした (37、5%のCO₂)。翌日、新鮮な培地 1 : 1を添加し、細胞をさらに24時間インキュベーターに戻した。

【0127】

処置の48時間後、市販のCellTiter - Glo (登録商標) 発光細胞生存率アッセイ (Promega、オーストラリア) を使用して、細胞の生存率を測定した。簡単に説明すると、CellTiter - Glo試薬は、細胞を溶解させ、存在するATPの量に比例する発光シグナルを生じ、これは、培養中に存在する生細胞数に正比例する。既知の細胞傷害剤であるメリチン (Renata et al. 2007)、及び細胞のみの対照を用いて、全てのアッセイを実施した。細胞生存率を使用して、CPP - PMOコンジュゲートにより引き起こされる毒性のレベルを決定した。高生存率は、低毒性に相当し、低生存率は、高毒性に相当する。

【0128】

結果

図1及び表1では、4 μ M、2 μ M、及び1 μ Mで、SMN1 PMOにコンジュゲートされた配列番号1のCPPは、SMN1 PMO単独よりも多くの切断型D7 - SMN1転写産物を生じる。誘導されたSMN1エクソンスキップの有効性は、適用されたペプチド - PMOコンジュゲートの用量反応曲線に従う。ペプチド - PMOコンジュゲートは、SMN1エクソンスキップの誘導において、SMN1 PMOのみの処置よりも効率的である (2 μ Mで1.2倍)。従って、配列番号1に記載のペプチドは、効果的な細胞膜透過性及び核送達剤である。

【0129】

図2及び表2では、32 μ Mのペプチド - PMOコンジュゲート 対 PMO単独で48時間処置されたARPE - 19細胞の生存率は、ペプチド - PMOコンジュゲートの添加が、PMOのみよりも細胞生存率への有害性が低い (1.05倍) ことを明らかに示す。これは、ペプチドの細胞膜透過性及び核送達作用が、細胞の健康に有害ではなく、カチオン性細胞膜透過性ペプチドに通常関連する固有の毒性を引き起こさないことを示す。

【0130】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1 : SMN1 アンチセンスオリゴヌクレオチドの CPP 増強送達の有効性結果

配列番号	配列	エクソン7スキップSMN1転写産物 (%) (±SD)		
		4 uM (±SD)	2 uM (±SD)	1 uM (±SD)
1[azk]2	rrrtaraGrpGrnssrpsapr[azk]ACTTTCCTTCT TTTTTATTTTGCT	29.99 (±3.96)	21.38 (±2.10)	19.44 (±3.82)
2	ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGCT	18.34 (±5.99)	17.35 (±4.97)	16.59 (±4.07)

【 0 1 3 1 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 : SMN1 アンチセンスオリゴヌクレオチドの CPP 増強送達の生存率結果

配列番号	配列	平均生存率 (%) (± SD)					
		32 uM (± SD)	16 uM (± SD)	8 uM (± SD)	4 uM (± SD)	2 uM (± SD)	
1 [azk]2	rrrtaraGrpGrnssrpsapr[a zk]ACTTTCCTTCTTT TTTATTTTGICT	98.20 (± 7.21)	102.52 (± 5.24)	103.34 (± 8.75)	105.23 (± 7.32)	102.61 (± 7.91)	
2	ACTTTCCTTCTTTT TATTTTGICT	93.61 (± 7.14)	97.42 (± 5.23)	99.11 (± 4.66)	100.01 (± 6.03)	99.41 (± 6.53)	

10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

実施例 2

実施例 1 に記載の *in vitro* SMN1 有効性アッセイは、マウス体内における *Smn* 遺伝子の遍在的分布を考えると、*in vivo* 環境に等しく適用可能であり、*Smn* は、ヒト SMN1 のマウスオルソログである。体内に膨大な数のプロテアーゼが存在するため、*in vivo* 環境では、天然の L - ペプチドの使用は望ましくない。ペプチドの細胞膜透過性能を適切に評価するために、全ての塩基性残基が D - アミノ酸である混合 L / D アミノ酸含有ペプチド、または、完全 D アミノ酸含有ペプチドのいずれかとしてペプチドを合成した。動物への全身投与中のタンパク質分解からペプチドを保護するために、両方のアプローチが確立されている。

50

【0133】

マウスの硝子体液に投与して、5、7、21、及び28日後の網膜、RPE、及び脈絡膜細胞層のSmn転写産物レベルの変化を測定することにより、CPP-PMOがSmnカーゴを、眼内の後部のRPE細胞に*in vivo*送達する能力を評価した。Smn PMO（配列番号2）にコンジュゲートされた本発明のCPP（配列番号1）及び対照CPP Pip6a（配列番号3）を、眼毎に1.6ug（0.5ul体積）の硝子体内注射で投与した。処置後の所望の時点で、動物を殺処分し、眼を解剖し、組織層を均質化し、実施例1と同じプロトコールを使用してRNAを抽出した。

【0134】

対照CPP Pip6aは、非天然アミノ酸（X及びB）：

RXRBRRRXYQFLIRXRBRXRBR [配列番号3]

Arg Ahx Arg Arg ベータ-Ala Arg Arg Ahx Arg Tyr Gln Phe Leu Ile Arg Ahx Arg ベータ-Ala Arg Ahx Arg ベータ-Ala

（式中、X = Ahx = アミノヘキサン酸；B = ベータ-アラニン = ベータ-アラニン）を含有する。

【0135】

RNA抽出、cDNA生成、及びSmn特異的プライマーを使用するPCRを使用して、全長からエクソン-7スキップフラグメント（D7-Smn）RNA転写産物へのSmn RNA転写産物の変化を測定することにより、様々な臓器への送達及び作用の効率を決定した。効率は、D7-Smn転写産物の割合が高いほど、CPPによる組織への送達が良好であると解釈された。

【0136】

グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）は、中間径フィラメントの細胞骨格タンパク質である。GFAPのレベルは、いくつかの細胞型の損傷またはストレスに強く影響され、GFAPの発現は、中枢神経系の損傷の重要なマーカーになっている。眼内では、網膜損傷後にかなり増加するミューラーグリア細胞は通常、低レベルのGFAPを発現する。硝子体内（IVT）投与後に比較的増加したGFAP発現を誘発するペプチドは、より毒性が高いと見なされる。

【0137】

方法

ペプチド及びPMOの合成ならびにペプチド-PMOコンジュゲーション

標準のFmoc SPPSベースの方法（Pepscan GmbH、蘭国レリスタット、及びMimotopes、オーストラリアビクトリア州モルグレイベ）を使用して、CPPを合成した。全ての配列は、PMOへのカップリングを可能するC末端アジドリジン残基を含有していた。全てのN末端をアセチル化し、C末端をアミド化した。

【0138】

5'シクロオクチンハンドルを含むSmn PMO（ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTTGTCT；配列番号2）は、Gene Tools（Gene Tools LLC、米国オレゴン州フィロマス）が生成した。

【0139】

歪促進クリックケミストリー（SPAAC；Agard et al. 2004；Dommerholt et al. 2016）を使用して、C末端アジドリジンを含むCPPペプチドを5'-シクロオシチンPMOと化学選択的にコンジュゲートし、イオン交換クロマトグラフィーで精製し、LC-MSで定量した。

【0140】

in vivo Smn有効性アッセイ（IVT投与）

公開されたプロトコール（Mann et al. 2002, Gene Med, 4, 644-654）に従って、エクソンスキップアッセイ及びRT-PCR検出を実施した。

【0141】

10

20

30

40

50

マウス (C57B/6; 7週齢) は、Australian BioResource s (ABR) から供給された。選択された CPP - PMO を、処置群当たり 1 ~ 3 匹のマウスの硝子体に 1 眼当たり 1.6 μ g (0.5 μ l) で注射した。

【0142】

処置の 48 時間後、マウスを殺処分し、以下の眼組織：網膜、RPE 層、または RPE / 脈絡膜の組み合わせを採取した。組織を均質化し、製造者のプロトコールに従って市販の RNA 抽出キット (Bio-Rad Aurum total RNA 96 キット; RNA 収量の定量化; Quant-iT RNA BR キット) を使用して、RNA を取得した。

【0143】

抽出された RNA を精製し、定量し、次に、10 ng / μ l に希釈した。製造者のプロトコール (BioRad iScript) に従い、市販の逆転写キットを使用して、cDNA を生成した。目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを用いたテンプレートとして、生成された cDNA を使用して、DNA を増幅した。Smn 遺伝子 (LC - GX 核酸アナライザー) の全長 (FL Smn) 及びエクソン - 7 スキップフラグメント (D7 - Smn) を定量し、割合を計算することにより、エクソンスキップの有効性を決定した。D7 - Smn DNA の割合が高いほど、CPP 送達効率が高くなる。

10

【0144】

GFAP *in vivo* 毒性アッセイ

上記の *in vivo* Smn 有効性アッセイの一部として得られた cDNA の増幅を介して、GFAP mRNA の発現を定量した。BioRad 液滴生成装置及びリーダー (QX200 DG8) 及びサーモサイクラー (T100)、マウス Gfap (dMmuCPE5116126) の特定のプローブ及びハウスキーピング遺伝子 Gapdh、Eef1a1 及び Rpl27 (dMmuCPE5195283、dMmuCPE5101732、及び dMmuCPE5197083)、ならびに、ddPCR プローブに対するマスターミックス (#1863024) 及び BioRad 製の他の ddPCR 専用消耗品 (#1863005、12001925、1863004、1864007) を使用して、ddPCR を実施した。

20

【0145】

BioRad ddPCR ソフトウェアによりコピー / μ l で、アッセイ結果を得た。次に、実験間で比較するために、これをハウスキーピング遺伝子に正規化した。比較的増加した GFAP 発現を誘発するペプチドは、より毒性が高いと見なされる。

30

【0146】

結果

図 3 及び 4 ならびに表 3 及び 4 では、Smn PMO にコンジュゲートされた配列番号 1 の CPP は、Smn PMO 単独よりも多くの短縮型 D7 - Smn 転写産物を作成する。ペプチド - PMO コンジュゲートは、Smn PMO のみの処置、または競合物質の CPP Pip6a よりも Smn エクソンスキップを誘導するのにより効率的である (Betts et al. 2012)。従って、配列番号 1 に記載のペプチドは、効果的な *in vivo* 細胞膜透過性及び核送達剤である。

【0147】

40

図 5 及び表 5 では、Smn PMO にコンジュゲートされた配列番号 1 の CPP は、GFAP の発現をほとんど誘発せず、5 日で PMO 単独よりも高くなく、競合物質 CPP Pip6a よりもはるかに低い。従って、配列番号 1 に記載のペプチドは、臨床的に適切な濃度で硝子体内に投与された場合、*in vivo* で非毒性であると見なされる。

【0148】

50

【表 3】

表 3 : *in vivo* (RPE/脈絡膜) での Smn アンチセンスオリゴヌクレオチドの CPP 増強送達の有効性結果

配列番号	配列	エクソン7スキップ SMN1 転写産物 (%) (±SD)	
		5日 (±SD)	7日 (±SD)
1[azk]2	rrsrtaraGrpGrnssrpsapr[azk]ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGTCT	13.05 (± 5.14)	12.22 (± 3.61)
2	ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGTCT	0.00 (± 0.00)	0.00 (± 0.00)
3[azk]2	RXRRBRRXRYQFLIRXRBRXRB[azk]ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGTCT	9.94 (± 3.99)	6.70 (± 6.35)

10

【0149】

【表 4】

表 4 : *in vivo* (網膜) での Smn アンチセンスオリゴヌクレオチドの CPP 増強送達の有効性結果

配列番号	配列	エクソン7スキップ SMN1 転写産物 (%) (±SD)	
		5日 (±SD)	28日 (±SD)
1[azk]2	rrsrtaraGrpGrnssrpsapr[azk]ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGTCT	19.61 (± 7.26)	13.71 (± 10.86)
2	ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGTCT	0.00 (± 0.00)	0.77 (± 1.33)
3[azk]2	RXRRBRRXRYQFLIRXRBRXRB[azk]ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGTCT	21.66 (± 11.44)	3.39 (± 2.94)

20

【0150】

【表 5】

表 5 : *in vivo* (GFAP) での Smn アンチセンスオリゴヌクレオチドの CPP 増強送達の生存率結果

配列番号	配列	GFAPスコア (±SD)
		5日 (±SD)
1[azk]2	rrsrtaraGrpGrnssrpsapr[azk]ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGTCT	0.0324 (± 0.0095)
2	ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGTCT	0.0262 (± 0.0052)
3[azk]2	RXRRBRRXRYQFLIRXRBRXRB[azk]ACTTTCCTTCTTTTTTATTTTGTCT	0.1637 (± 0.0911)

40

【0151】

参考文献

・ Verdurmen WPR, Thanos M, Ruttekolck IR, Gulbins E, Brock R. Cationic cell-penetrating peptides induce ceramide formation via acid sphingomyelinase: implications for uptake. J Control Release. 2010; 147: 171-179. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.06.030.

50

- Zakeri, B.; Fierer, J. O.; Celik, E.; Chittock, E. C.; Schwarz-Linek, U.; Moy, V. T.; Howarth, M. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, E690 - E697
- Milech, N.; Longville, B. A. C.; Cunningham, P. T.; Scobie, M. N.; Bogdawa, H. M.; Winslow, S.; Anastasas, M.; Connor, T.; Ong, F.; Stone, S. R.; et al. GFP-complementation assay to detect functional CPP and protein delivery into living cells. *Sci. Rep.* 2015, 5, 18329. 10
- Stone, S. R. et al. - Lactamase tools for establishing cell internalization and cytosolic delivery of cell penetrating peptides. *Biomolecules* 8, 51 - 62 (2018).
- Hoffmann K, Milech N, Juraja SM, Cunningham PT, Stone SR, Francis RW, Anastasas M, Hall CM, Heinrich T, Bogdawa HM, Winslow S, Scobie MN, Dewhurst RE, Florez L, Ong F, Kerfoot M, Champain D, Adams AM, Fletcher S, Viola HM, Hol LC, Connor T, Longville BAC, Tan YF, Kroeger K, Morath V, Weiss GA, Skerra A, Hopkins RM, Watt PM. A platform for discovery of functional cell-penetrating peptides for efficient multi-cargo intracellular delivery. *Sci Rep.* 2018 Aug 22; 8(1): 12538. doi: 10.1038/s41598-018-30790-2. PMID: 30135446; PMCID: PMC6105642. 20
- Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. *Trends Pharmacol Sci.* 2017; 38: 406 - 424. doi: 10.1016/j.tips.2017.01.003. 30
- van den Berg A, Dowdy SF. Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules. *Curr Opin Biotechnol.* 2011; 22: 888 - 893. doi: 10.1016/j.copbio.2011.03.008.
- Erazo-Oliveras A, et al. Protein delivery into live cells by incubation with an endosomolytic agent. *Nat Methods.* 2014; 11: 861 - 867. doi: 10.1038/nmeth.2998. 40
- Wu et al. Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity, *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol. 35, No. 15: 5182 - 5191 doi: 10.1093/nar/gkm478
- Singh NN, Seo J, Rahn SJ, Singh RN (2012) A Multi-Exon-Skipping Detection Assay Reveals Surprising Diversity of Splice Isoforms 50

- of Spinal Muscular Atrophy Genes. *PLoS One* 7(11):e49595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049595>
- Summerton, J. & Weller, D., 1997. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense & nucleic acid drug development*, 7(3), pp. 187-195
 - Moulton, H. M. et al., 2004. Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides. *Bioconjugate chemistry*, 15(2), pp. 290-299. 10
 - Dommerholt, J., Rutjes, F. P. J. T. & Delft, F. L., 2016. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Topics in Current Chemistry*, 374(2), pp. 1-20.
 - Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R., 2004. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *Journal of the American Chemical Society*, 126(46), pp. 15046-15047. 20
 - Roman C. Hillig, Brice Sautier, Jens Schroeder, Dieter Moosmayer, Andre Hilpmann, Christian M. Stegmann, Nicolas D. Werbeck, Hans Briem, Ulf Boemer, Joerg Weiske, Volker Badock, Julia Mastouri, Kirstin Petersen, Gerhard Siemeister, Jan D. Kahmann, Dennis Wegener, Niels Bohnke, Knut Eis, Keith Graham, Lars Wortmann, Franz von Nussbaum, and Benjamin Bader 30
 - PNAS February 12, 2019 116(7)2551-2560; first published January 25, 2019 <https://doi.org/10.1073/pnas.1812963116>
 - Leshchiner ES, Parkhitko A, Bird GH, Luccarelli J, Bellairs JA, Escudero S, Opoku-Nsiah K, Godes M, Perrimon N, Walensky LD. Direct inhibition of oncogenic KRAS by hydrocarbon-stapled SOS1 helices. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb 10; 112(6):1761-6. doi:10.1073/pnas.1413185112. Epub 2015 Jan 26. PMID: 25624485; PMCID: PMC4330742. 40
 - Shanshan Gu, Danrui Cui, Xiaoyu Chen, Xiufang Xiong, and Yongchao Zhao, PROTACs: An Emerging Targeting Technique for Protein Degradation in Drug Discovery, *BioEssays*, 40(4), 2018, <https://doi.org/10.1002/bies.201700247>
 - K. M. Sakamoto, K. B. Kim, A. Kumagai, F. Mercurio, C. M. Crews, R. J. Deshaies, *Proc. Natl.* 50

Acad. Sci. USA 2001, 98, 8554.

・Renata M.S.Terra, Jorge A.Guimaraes, Hugo Verli, Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin, (2007,) Journal of Molecular Graphics and Modelling, 25(6):767-772

・Chandler, R., Tarasenko, T., Cusmano-Ozog, K. et al. Liver-directed adeno-associated virus serotype 8 gene transfer rescues a lethal murine model of citrullinemia type 1. Gene Ther 20, 1188-1191(2013)doi:10.1038/gt.2013.53

10

・Stone, S.R. et al. -Lactamase tools for establishing cell internalization and cytosolic delivery of cell penetrating peptides. Biomolecules 8, 51-62(2018).

・Quinonez SC, Thoene JG. Citrullinemia Type I. 2004 Jul 7 [Updated 2016 Sep 1]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews (登録商標) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1458/

20

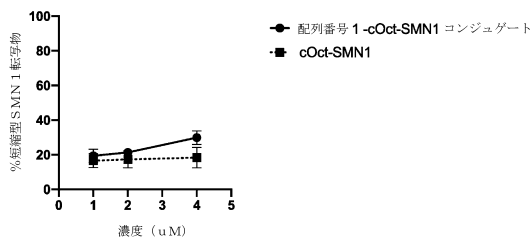
・Flynn LL, Mitropant C, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD. Antisense Oligonucleotide-Mediated Terminal Intron Retention of the SMN2 Transcript. Mol Ther Nucleic Acids. 2018 Jun 1;11:91-102. doi:10.1016/j.omtn.2018.01.011. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29858094; PMCID: PMC5854547.

30

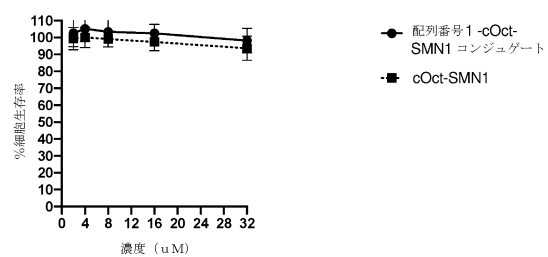
・Betts, C., Saleh, A.F., Arzumanov, A.A., Hammond, S.M., Godfrey, C., Coursindel, T., et al. (2012). Pip6-PMO, A New Generation of Peptide-oligonucleotide Conjugates With Improved Cardiac Exon Skipping Activity for DMD Treatment. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 1, e38-13. http://doi.org/10.1038/mtna.2012.30

【図面】

【図 1】



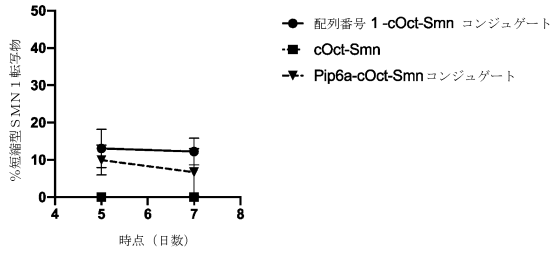
【図 2】



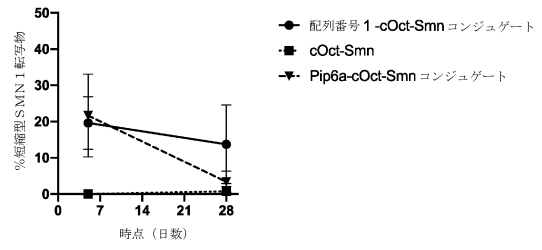
40

50

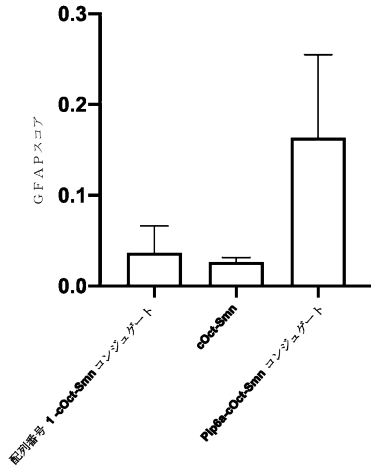
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0007684971000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- ブレイス 7ピー
- (72)発明者 スターンワイズ, アニャ
オーストラリア国 6 0 0 8 ウェスタン オーストラリア, サビアコ, チャーチル アベニュー 2 7 7
- (72)発明者 カニンガム, ポーラ
オーストラリア国 6 0 0 8 ウェスタン オーストラリア, サビアコ, バーカー ロード 1 2
- 審査官 藤澤 雅樹
- (56)参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 1 4 3 6 5 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 3 4 9 6 2 8 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 1 9 / 0 1 8 8 9 8 (W O , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 0 7 3 4 5 (U S , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 4 4 1 7 1 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 0 1 / 0 8 1 5 8 1 (W O , A 2)
国際公開第 2 0 1 8 / 2 2 3 0 9 2 (W O , A 1)
Biochimica et Biophysica Acta , 2013年 , Vol.1828 , pp.1484-1493
SCIENTIFIC REPORTS , 2018年 , Vol.8, No.11256 , pp.1-10
J. Nanobiotechnol. , 2017年 , Vol.15, No.34 , pp.1-18
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 0 7 K 1 4 / 0 0
A 6 1 K 4 7 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)