

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-509645
(P2025-509645A)

(43)公表日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	7/04 (2006.01)	C 0 7 K	7/04	Z N A	4 C 0 7 6
C 0 7 K	5/06 (2006.01)	C 0 7 K	5/06		4 H 0 4 5
C 0 7 K	5/08 (2006.01)	C 0 7 K	5/08		
C 0 7 K	5/10 (2006.01)	C 0 7 K	5/10		
C 0 7 K	14/78 (2006.01)	C 0 7 K	14/78		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全80頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-554922(P2024-554922)		(71)出願人	516046846	
(86)(22)出願日	令和5年3月17日(2023.3.17)			オハイオ ステート イノベーション フ	
(85)翻訳文提出日	令和6年11月11日(2024.11.11)			ァウンダーション	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/064659			アメリカ合衆国 オハイオ州 4 3 2 1 0	
(87)国際公開番号	WO2023/178327			コロンバス カーマック ロード 1 0 5 0	
(87)国際公開日	令和5年9月21日(2023.9.21)			マウント ホール ファースト フロア	
(31)優先権主張番号	63/320,978		(74)代理人	110000578	
(32)優先日	令和4年3月17日(2022.3.17)			名古屋国際弁理士法人	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		(72)発明者	ベイ ディーファ	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ			アメリカ合衆国 オハイオ州 4 3 2 1 0	
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),			コロンバス カーマック ロード 1 0 5 0	
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(			マウント ホール ファースト フロア シ	
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,			ー/オー オハイオ ステート イノベ	
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			ション ファウンダーション	
	最終頁に続く		(72)発明者	バート ブラバート	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 膜移行ドメイン及びその使用

(57)【要約】

1つ以上の細胞透過性ペプチドモチーフを有する膜移行ドメインを含むペプチドが記載され、ここで、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが3〜10個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも3つのアルギニン及び／またはリジン残基を有し、または、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが3〜10個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも2つのアルギニン及び／またはリジン残基を有し、少なくとも1つの他の細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが2〜8個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも2つの疎水性残基を有する。開示されたペプチドに結合したカーゴモチーフを含む組成物も開示される。また、カーゴ部分を細胞に送達するための方法も開示され、この方法は、細胞を本明細書に開示されるペプチドと接触させることを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つ以上の細胞透過性ペプチドモチーフを有する膜移行ドメインを含むペプチドであって、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが3～10個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも3つのアルギニン及び／またはリジン残基を有し、または、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが3～10個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも2つのアルギニン及び／またはリジン残基を有し、少なくとも1つの他の細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが2～8個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも2つの疎水性残基を有する、ペプチド。

【請求項 2】

前記膜移行ドメインが哺乳動物膜移行ドメインである、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

前記膜移行ドメインがヒトフィブロネクチンⅢⅢⅢ型である、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 4】

前記ヒトフィブロネクチンⅢⅢⅢ型が配列番号 118 と 90 % の配列類似性を有する、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 5】

前記細胞透過性モチーフが、3～10個の隣接するアルギニン残基を有する、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 6】

前記膜移行ドメインが、BC、DE、CD、及びFGループを有するヒトフィブロネクチンⅢⅢⅢ型であり、BC、DE、CD、またはFGループのうちの1つ以上が細胞透過性ペプチドモチーフを有する、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 7】

前記膜移行ドメインが、BC、DE、CD、及びFGループを有するヒトフィブロネクチンⅢⅢⅢ型であり、BC、DE、CD、またはFGループのうちの2つが細胞透過性ペプチドモチーフを有する、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 8】

前記膜移行ドメインが、BC、DE、CD、及びFGループを有するヒトフィブロネクチンⅢⅢⅢ型であり、BC、及びDE、CD、またはFGループのいずれかが細胞透過性ペプチドモチーフを有する、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 9】

前記膜移行ドメインが、BC、DE、CD、及びFGループを有するヒトフィブロネクチンⅢⅢⅢ型であり、BC及びFGループが細胞透過性ペプチドモチーフを有する、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 10】

前記BCループ内の前記細胞透過性ペプチドモチーフが2～8個のアミノ酸残基を有し、かつ少なくとも2つの疎水性アミノ酸残基を有し、前記FGループ内の前記細胞透過性ペプチドモチーフが3～10個のアミノ酸残基を有し、かつ少なくとも2つの隣接するアルギニン及び／またはリジン残基を有する、請求項 9 に記載のペプチド。

【請求項 11】

前記FGループ内の前記細胞透過性ペプチドモチーフが2～8個のアミノ酸残基を有し、かつ少なくとも2つの疎水性アミノ酸残基を有し、前記BCループ内の前記細胞透過性ペプチドモチーフが3～10個のアミノ酸残基を有し、かつ少なくとも2つの隣接するアルギニン及び／またはリジン残基を有する、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 12】

第2の細胞透過性ペプチドモチーフが存在し、WW、FF、WF、FW、WWF、WFF、FWW、FFW、WYW、WWH、YWW、またはWYHである、前述の請求項のい

10

20

30

40

50

ずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 13】

前記細胞透過性ペプチドモチーフが RRRWWW（配列番号 104）または WWWRRR（配列番号 105）である、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 14】

TGRRRRWWWSKPI（配列番号 111）、APWWWRRRRYYY（配列番号 112）、GRRRRWWWVQE（配列番号 113）、APAWYWRYYY（配列番号 114）、TGRRRRRSKPI（配列番号 115）、APARRRRYYY（配列番号 116）、または TGWYWR SKPI（配列番号 117）を含む、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

10

【請求項 15】

配列番号 119、120、121、122、123、124、または 125 を含む、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 16】

前記膜移行ドメインに連結されたカーゴ部分をさらに含む、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 17】

前記カーゴ部分が、前記膜移行ドメインの N 末端もしくは C 末端で、または前記膜移行ドメイン内の側鎖で前記膜移行ドメインに連結されている、請求項 16 に記載のペプチド。

20

【請求項 18】

前記カーゴ部分が、検出可能な部分、標的化部分、治療用部分、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 16 または 17 に記載のペプチド。

【請求項 19】

配列番号 126、127、または 128 を含む、前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 20】

カーゴに共有結合した配列番号 122 を含む、カーゴ部分を細胞に送達するための組成物であって、前記カーゴ部分が、検出可能な部分、標的化部分、治療用部分、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、組成物。

30

【請求項 21】

カーゴ部分を細胞に送達するための方法であって、前記細胞を前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチドと接触させることを含む、方法。

【請求項 22】

農産物を植物細胞に送達するための方法であって、前記細胞を前述の請求項のいずれか一項に記載のペプチドと接触させることを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】

関連出願の相互参照

40

本出願は、2022 年 3 月 17 日に提出された米国仮出願第 63 / 320, 978 号に対する優先権の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府支援に関する声明

本発明は、国立衛生研究所から授与された助成金番号 GM122459 の下で政府支援を受けてなされた。政府は、本発明に対して一定の権利を有する。

【0003】

電子的に提出された配列リストへの参照

本出願は、ファイル名が「103361-223WO1__ST26.xml」、作成日が 2023 年 3 月 17 日、サイズが 392417 バイトの ASCII 形式の配列リストと

50

してEFS-Web経由で電子的に提出された配列リストを含む。EFS-Web経由で提出された配列リストは、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

〔背景技術〕

【0004】

生体分子（例えば、ペプチド、タンパク質、及び核酸）を細胞内部（例えば、サイトゾル及び核）に効果的に送達できれば、現在治療が困難な多くの疾患を治療できる新世代の治療法への扉が開かれるであろう。過去数十年にわたり、研究者らは、細胞透過性ペプチド（Muhammad M. N., et al. (2021) Cell penetrating peptides: A versatile vector for co-delivery of drug and genes in cancer. J. Contr. Rel. 330:1220-1228、Heitz, F., et al. (2009) Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. Br. J. Pharmacol. 157:195-206）、細菌毒素（Pavlik, B. J., et al. (2017) Repurposed bacterial toxins for human therapeutics. Curr. Topics Peptide Protein Res. 18:1-15、Shorter S. A., et al. (2017) The potential of toxin-based drug delivery systems for enhanced nucleic acid therapeutic delivery. Expert Op. Drug Deliv. 14 (5):685-696）、ウイルス（Wang, D., et al. (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nat. Rev. Drug Discov. 18:358-378）、ポリプレックス（Ita, K. (2020) Polyplexes for gene and nucleic acid delivery: Progress and bottlenecks, Eur. J. Pharm. Sci. 150:105358）、リポソーム（Pattni, B. S., et al. (2015) New Developments in Liposomal Drug Delivery. Chem. Rev. 115 (19):10938-66）、及び様々な生体分子カーゴ用のナノ粒子（Mitchell, M. J., et al. (2021) Engineering precision nanoparticles for drug delivery. Nat. Rev. Drug Discov. 20:101-124）を含めて、様々な送達モダリティを研究してきた。いくつかの送達方法は臨床的に成功しているが（例えば、mRNAワクチンのリポソーム送達（Kim, E. M., et al. (2021) Liposomes: Biomedical Applications. Chonnam Med. J. 57 (1):27-35）、遺伝子治療のウイルス送達（Wang, D., 同上）及び細菌毒素ベースの抗癌剤（Pavlik B. J., 同上）など、依然として大きな限界が残っている。例えば、ウイルス、リポソーム、及びナノ粒子ベースの送達システムは、肝臓及び脾臓によって隔離されることが多く、他の疾患組織への生体内分布が制限される一方、非ウイルス送達システムはさらに、エンドソーム閉じ込めという大きな課題に直面している（Patra, J. K., et al. (2018) Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. J. Nanobiotechnol. 16, 71、Pei D., et al. (2019) Overcoming Endosomal Entrapment in Drug Delivery. Bioconjug. Chem. 30 (2):273-283）。

【0005】

エンドサイトーシスによって哺乳動物細胞に入り、小胞の出芽及び崩壊メカニズムによ

10

20

30

40

50

って初期エンドソームから効率的にサイトゾルに逃れる環状CPPのファミリーが発見された (Qian Z., et al. (2013) Efficient delivery of cyclic peptides into mammalian cells with short sequence motifs. ACS Chem. Biol. 8 (2): 423-31、Qian, Z., et al. (2016) Discovery and Mechanism of Highly Efficient Cyclic Cell-Penetrating Peptides. Biochem. 55 (18): 2601-2612、Sahni, A., et al. (2020) Cell-Penetrating Peptides Escape the Endosome by Inducing Vesicle Budding and Collapse. ACS Chem. Biol. 15 (9): 2485-2492)。これらの環状CPPは、インビトロ及びインビボでの主要な薬物モダリティ (例えば、小分子、ペプチド、タンパク質、及び核酸) のサイトゾル送達に非常に効果的であることが証明されている。しかしながら、環状CPPにはタンパク質を構成しないアミノ酸が含まれており、化学的に合成され、目的のカーゴ分子にコンジュゲートされなければならない、タンパク質を他の実体に部位特異的にコンジュゲートさせることがそれ自体大きな課題となっているため、環状CPPは、タンパク質送達にはあまり理想的ではない。この限界を克服するために、短いCPPモチーフ (例えば、Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp または R₄W₃) (配列番号 133) を標的タンパク質の表面ループに遺伝的に挿入して、標的タンパク質を細胞透過性にした (Chen, K., et al. (2020) Engineering Cell-Permeable Proteins through Insertion of Cell-Penetrating Motifs into Surface Loops. ACS Chem. Biol. 15 (9): 2568-2576)。このアプローチでは、タンパク質の翻訳後修飾の必要性が回避されるが、依然としていくつかの欠点がある。第1に、CPP挿入のための適切な表面ループ (複数可) を同定するために、一般に、標的タンパク質の構造情報が利用可能であることが必要である。第2に、構造情報がすでに利用可能であっても、挿入部位とCPP配列の最適な組み合わせを見つけるために、いくつかの異なる挿入部位及び複数のCPP配列を実験的に試験することが依然として必要である可能性がある。一部のタンパク質については、それらの安定性及び／または活性を損なうことなく挿入変異体を生成することは不可能であり得る。最後に、各標的タンパク質は、構造及び特性において独特であり、異なる操作／最適化キャンペーンが必要である。上記の欠点の一部またはすべてを排除することができる、非常に効果的で汎用的なタンパク質送達システムが必要とされる。本明細書に開示される組成物及び方法は、これらのニーズ及び他のニーズに対応する。

【発明の概要】

【0006】

本明細書では、化合物、組成物、ならびにそのような化合物及び組成物を製造及び使用するための方法が開示される。一態様では、1つ以上の細胞透過性ペプチドモチーフを有する膜移行ドメインを含むペプチドが開示され、ここで、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが3～10個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも3つのアルギニン及び／またはリジン残基を有し、または、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが3～10個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも2つのアルギニン及び／またはリジン残基を有し、少なくとも1つの他の細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが2～8個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも2つの疎水性残基を有する。開示されたペプチドに結合したカーゴモチーフを含む組成物も開示される。また、カーゴ部分を細胞に送達するための方法も開示され、この方法は、細胞を本明細書に開示されるペプチドと接触させることを含む。

【0007】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面及び以下の説明に記載されている。本発明の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び図面、ならびに特許請求の範囲から明ら

かになるであろう。

【0008】

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する添付の図面は、いくつかの態様を示しており、説明とともに本発明の原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】WT FN3及びMTD1～10の構造である。FN3構造はPDBファイル1ttgから生成され、MTD1～10の構造はPhyre2によって予測された。MTD1～10の挿入されたCPPモチーフは濃い線で強調表示されている。

【図2A】MTD4の発現及び精製である。

10

【図2B】MTD4の発現及び精製である。図2Aは、Ni-NTAカラムからのMTD4の溶出を示すFPLCクロマトグラムである（MTD4は広いピークとして溶出する）。図2Bは、Ni-NTAカラムでの精製中の発現レベル及び様々な画分を示すSDS-PAGEである。L、分子量マーカー；U、未誘導細胞の粗溶解物；I、IPTG誘導細胞の粗溶解物；CL、遠心分離後の粗細胞溶解物；FT、フロースルー画分；1～10、Ni-NTAカラム溶出画分（強いバンドはMTD4である）。

【図3】A～Iは、5 μ MのFN3^{TMR}（図3A）、MTD2^{TMR}（図3B）、MTD4^{TMR}（図3C）、MTD4^{TMR}（図3D）、MTD6^{TMR}（図3E）、MTD7^{TMR}（図3F）、MTD8^{TMR}（図3G）、MTD9^{TMR}（図3H）、またはMTD10^{TMR}（図3I）とともに2時間インキュベートした後のHeLa細胞の生細胞共焦点顕微鏡画像である。すべての画像は、レーザー出力及び信号増幅を含む同じ条件下で得られた。

20

【図4】フローサイトメトリーで測定したTMR標識タンパク質ドメインの総細胞取り込み効率である。値は処理された細胞の平均蛍光強度を表す。

【図5】MTD4-PTP1Bの濃度を増加させながら（0～5mM）、4時間処理した後のNIH3T3細胞における全体的なpYレベルのウェスタンブロット分析である。pY検出には抗pY抗体4G10を使用した。同じ膜を抗GAPDH抗体で再度ウェスタンブロットし、均等にロードされていることを確認した。L、分子量マーカー。

【図6】A～Cは、MTD4-RBDV（図6A）、MTD4-NS1（図6B）、及びNS1-MTD4（図6C）が様々な癌細胞株細胞の生存率に及ぼす影響である。細胞を指定濃度の融合タンパク質またはビヒクル（PBS）で37℃で72時間処理した。その後、細胞をCell Titer Glo溶液とともに15分間インキュベートし、発光を測定した。報告された生存率の値は、ビヒクル（PBS）で処理した細胞の生存率に対するものである。

30

【図7】MTD4-RBDV及びMTD4-NS1によるHEK293T細胞におけるRas-Raf相互作用の阻害である。細胞にpEF-RLUC8-L15-KrasG12V（またはG12D）及びpEF-CRAF-RBD（1-149）-L15-GFPをトランスフェクトし、37℃で24時間インキュベートした。次に、細胞を指定濃度の融合タンパク質で20～24時間処理した。基質として10 μ Mのセレンテラジン400aを添加した後、BRETシグナルを測定した。

40

【図8】A～Bは、ウェスタンブロット分析である。MiaPaCa-2細胞におけるAkt及びMEKのリン酸化に対するMTD4-RBDV（図8A）及びMTD4-NS1（図8B）の影響である。GAPDHをローディング対照として使用した。

【図9】MTD4-RBDV及びMTD4-NS1が肺癌H358細胞のアポトーシスを引き起こすことを示す図である。約10,000個の細胞を10%FBSの存在下で指定濃度のMTD4-RBDVまたはMTD4-NS1で24時間処理し、その後Alexa Fluor（登録商標）488-アネキシンV及びヨウ化プロピジウムで染色してからフローサイトメトリー分析を行った。

【図10】A～Dは、緩衝液（図10A）、10 μ MのGFP11（図10B）、CPP12-GFP11（図10C）、またはMTD4-GFP11（図10D）とともに6時

50

間インキュベートした後のHEK293T細胞の生細胞共焦点顕微鏡画像である。

【図11】HiBitまたは異なる送達ビヒクルにコンジュゲートされたHiBitによる、LgBitを一過性に発現するHEK293T細胞におけるルシフェラーゼ活性の用量依存的誘導である。y軸の値はすべて、未処理細胞（HiBitなし）の値に対するものであり、3つの独立した実験の平均±SDを表す。

【図12】A～Cは、緩衝液（図12A）、5μMのSEP（図12B）、または5μMのMTD4-SEP（図12C）とともに2時間インキュベートした後のHeLa細胞の生細胞共焦点顕微鏡画像である。上パネル、Hoechstによる核染色；下パネル、SEPの蛍光。

【図13】A～Bは、MTD4-PTP1BによるHEK293T細胞におけるpYタンパク質の脱リン酸化である。図13Aは、細胞を緩衝液、PTP1B（WT、5mM）、または増加する濃度のMTD4-PTP1B（0～5mM）で6時間処理した後の細胞溶解物のウェスタンブロット分析である。図13Bは、図13AにおけるSDS-PAGEゲルのクマシーブルー染色であり、同様の量のタンパク質サンプルがすべてのレーンにロードされたことを示す。

【図14】トランスジェニックマウスの様々な臓器におけるMENCタンパク質の生体内分布である。緑色及び赤色チャンネルはそれぞれ、EGFP及びmCherryからのシグナルに対応する。3時間後（EGFP）及び48時間後（mCherry）に安楽死させたマウスについて、様々な組織の蛍光をモニタリングした。

【図15】A～Bは、MTD4（図15A）及びFN3（図15B）をヒト血清と様々な時間（0～24時間）インキュベートした後のSDS-PAGE分析である。ボックス内のタンパク質バンドは、MTD4/FN3及びそれらの分解産物に対応する。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、以下の本発明の詳細な説明及びそこに含まれる実施例を参照することによって、より容易に理解することができる。

【0011】

本発明の化合物、組成物、物品、システム、デバイス、及び／または方法を開示及び説明する前に、それらは、別段の指定がない限り、特定の合成方法に限定されず、または別途の指定がない限り、特定の試薬に限定されず、したがって、当然のことながら変化する可能性があることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の態様を説明するためだけのものであり、限定することを意図したものではないことを理解されたい。本明細書に記載されている方法及び材料と類似または同等のいかなる方法及び材料も本発明の実施または試験において使用することができるが、ここでは例示的な方法及び材料について説明する。

【0012】

本明細書で言及されるすべての刊行物は、引用された刊行物に関連して方法及び／または材料を開示及び説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で議論される刊行物は、本出願の出願日以前に開示されるためにのみ提供される。本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明によりそのような刊行物に先行する権利を有しないことを認めるものと解釈されるべきではない。さらに、本明細書で提供される発行日の日付は、実際の発行日とは異なる場合があり、独立した確認が必要になる可能性がある。

定義

【0013】

本明細書全体を通じて、「約」及び／または「およそ」という用語は、数値及び／または範囲と併せて使用される場合がある。「約」という用語は、記載された値だけでなく、記載された値に近い値も意味すると理解される。

【0014】

本明細書全体を通じて、特定の量について数値範囲が提供される。これらの範囲には、その中のすべての値及び部分範囲が含まれることを理解されたい。したがって、「50～

10

20

30

40

50

80」の範囲には、その範囲内のすべての可能な値（例えば、50、51、52、53、54、55、56など）及びその範囲内のすべての可能な範囲（例えば、51～79、52～78、53～77、54～76、55～75、60～70など）が含まれる。さらに、所与の範囲内のすべての値は、その範囲に含まれる範囲の端点であり得る（例えば、範囲50～80には、端点が55～80、50～75などの範囲が含まれる）。

【0015】

「a」または「an」という用語は、その実体のうちの1つ以上を指し、例えば、「a polypeptide conjugate（ポリペプチドコンジュゲート）」は、1つ以上のポリペプチドコンジュゲートまたは少なくとも1つのポリペプチドコンジュゲートを指す。したがって、「a」（または「an」）、「1つ以上」、及び「少なくとも1つ」という用語は、本明細書では同じ意味で使用される。さらに、不定冠詞「a」または「an」による「a polypeptide conjugate（ポリペプチドコンジュゲート）」への言及は、文脈上、ポリペプチドコンジュゲートが1つだけであることを明確に要求しない限り、複数のポリペプチドコンジュゲートが存在する可能性を排除するものではない。

10

【0016】

本明細書で使用される場合、「隣接」という用語は、共有結合によって連結された2つの連続したアミノ酸を指す。「隣接」はまた、「連続」と同じ意味で使用される。

【0017】

「担体」という用語は、化合物または組成物と組み合わせた場合に、その意図される用途または目的のために、その化合物または組成物の調製、保管、投与、送達、有効性、選択性、または任意の他の特徴を補助または促進する化合物、組成物、物質、または構造を意味する。例えば、担体は、活性成分のあらゆる分解を最小限に抑え、対象におけるあらゆる有害な副作用を最小限に抑えるように選択することができる。

20

【0018】

本明細書で使用される場合、「治療する（treat）」、「治療すること（treating）」、「治療（treatment）」またはそれらの変形は、本明細書に記載の疾患または状態の1つ以上の症状または特徴を部分的または完全に軽減し、改善し、予防し、緩和し、阻害し、その発症を遅延させ、その重症度を軽減し、及び／またはその発生率を低下させる本開示のポリペプチドコンジュゲートの任意の投与を指す。

30

【0019】

本明細書で使用される場合、「治療的に有効な」とは、患者に治療効果を与える量の治療用核酸を送達することができる、本開示のポリペプチドコンジュゲートまたはその複合体の量を指す。

【0020】

本明細書で使用される場合、「細胞透過性ペプチド」または「CPP」は、細胞膜を透過することができる任意のペプチドを指す。本明細書で使用される場合、「環状細胞透過性ペプチド」または「cCPP」は、細胞膜を透過することができる任意の環状ペプチドを指す。

【0021】

本明細書で使用される場合、「リンカー」または「L」は、本明細書に開示されるポリペプチドコンジュゲートの2つ以上の成分を共有結合させる部分を指す（例えば、リンカーは、CPPと、静電相互作用によって核酸配列に結合する基（すなわち、P）とを共有結合させることができる）。いくつかの実施形態では、リンカーは、天然または非天然のアミノ酸またはポリペプチドであり得る。他の実施形態では、リンカーは、例えばCPP及び独立してPに結合するのに適した2つ以上の適切な官能基を含む合成化合物である。いくつかの実施形態では、リンカーは、直線長が約3～約100個（例えば、約3～約20個）の原子である（分岐原子または置換基を除く）。いくつかの実施形態では、リンカーは、それが連結する2つの基の距離を約1 Å～約400 Åとする。

40

【0022】

50

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって互いに結合された少なくとも2つのアミノ酸の鎖である。ポリペプチドに含まれ得るアミノ酸の数に上限はない。さらに、ポリペプチドには、非天然アミノ酸、アミノ酸類似体、またはポリペプチドに組み込むことができる他の合成分子が含まれる場合がある。

【0023】

本明細書で使用される場合、「モノマー」とは、ポリペプチド中のアミノ酸残基を指す。いくつかの実施形態では、アミノ酸モノマーは二価である。他の実施形態では、アミノ酸モノマーは、モノマーがさらに置換される場合、三価であってもよい。例えば、システインモノマーは、N末端及びC末端で独立してペプチド結合を形成することができ、またジスルフィド結合を形成することもできる。

【0024】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸類似体」または「類似体」（例えば、「アルギニン類似体」、「リジン類似体」または「ヒスチジン類似体」）とは、静電相互作用を通じてオリゴヌクレオチドに結合する能力など、アミノ酸の少なくとも1つの機能を保持するアミノ酸の変異体を指す。そのような変異体は、伸長した側鎖またはより短い側鎖（例えば、静電相互作用を通じてオリゴヌクレオチドに結合する能力を保持する1つ以上の $-CH_2-$ 基によって）を有してもよく、あるいは、この改変は、静電相互作用を通じてオリゴヌクレオチドに結合する能力を向上させることができる。例えば、アルギニン類似体は、主鎖とグアニジン／グアニジニウム基の間に追加のメチレンまたはエチレンを含んでもよい。他の例としては、1つ以上の追加の置換基（例えば、Me、Et、ハロゲン、チオール、メトキシ、エトキシ、 C_1 -ハロアルキル、 C_2 -ハロアルキル、アミン、グアニジンなど）を有するアミノ酸が挙げられる。アミノ酸類似体は、一価、二価、または三価であり得る。

【0025】

本明細書全体を通じて、ペプチド及びアミノ酸モノマーは電荷中性種として示される。そのような種は、条件に応じて正電荷または負電荷を帯びる可能性があることを理解されたい。例えば、pH7では、アミノ酸のN末端はプロトン化されて正電荷（ $-NH_3^+$ ）を帯び、アミノ酸のC末端は脱プロトン化されて負電荷（ $-CO_2^-$ ）を帯びる。同様に、特定のアミノ酸の側鎖は正電荷または負電荷を帯びる可能性がある。

【0026】

各アミノ酸は、天然アミノ酸または非天然アミノ酸であり得る。「非天然アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸と類似の構造を有し、その結果、天然アミノ酸の構造及び反応性を模倣するという点で天然アミノ酸の同族体である有機化合物を指す。非天然アミノ酸は、20種類の一般的な天然に存在するアミノ酸、または希少な天然アミノ酸であるセレノシステインもしくはピロリシンのいずれでもない修飾アミノ酸及び／またはアミノ酸類似体であり得る。非天然アミノ酸は、天然アミノ酸のD-異性体であってもよい。したがって、本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、天然及び非天然アミノ酸、ならびにそれらの類似体及び誘導体を指す。適切なアミノ酸の例としては、アラニン、アロイソロイシン、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、グルタミン酸、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、ナフチルアラニン、フェニルアラニン、プロリン、ピログルタミン酸、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、誘導体、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。アミノ酸の類似体は、例えば、アミノ酸上の側鎖または主鎖への修飾により、アミノ酸に類似するが同一ではない構造を有するものを包含する。そのような修飾は、1つ以上の炭化水素による側鎖の伸長、または例えば第2の芳香環をコンジュゲートさせることもしくは芳香環のサイズを大きくすることによって側鎖に芳香環を有するアミノ酸の溶媒接触可能表面積（本明細書に記載のSASA）を増やすことを含めて、側鎖の疎水性を増加させることができる。アミノ酸の誘導体は、本明細書に記載の疎水性基を含むように（例えば、置換によって）修飾された天然及び非天然アミノ酸を包含する。例えば、リジンの誘導体には、側鎖がアルキルカルボキサミジルで置換され

10

20

30

40

50

タリジンが含まれる。これら及び他のものは、本明細書で使用されるそれらの略語とともに表 1 に列挙されている。

【0027】

【表 1】

表 1. アミノ酸の略語

アミノ酸	略語* L-アミノ酸	略語* D-アミノ酸
アラニン	A l a (A)	a l a (a)
アロイソロイシン	A l l e	A i l e
アルギニン	A r g (R)	a r g (r)
アスパラギン	A s n (N)	a s n (n)
アスパラギン酸	A s p (D)	a s p (d)
システイン	C y s (C)	c y s (c)
シクロヘキシルアラニン	C h a	C h a
2, 3-ジアミノプロピオン酸	D a p	D a p
4-フルオロフェニルアラニン	F p a (Σ)	P f a
グルタミン酸	G l u (E)	g l u (e)
グルタミン	G l n (Q)	g l n (q)
グリシン	G l y (G)	g l y (g)
ヒスチジン	H i s (H)	h i s (h)
ホモプロリン (別名ピペコリン酸)	P i p (Θ)	p i p (θ)
イソロイシン	I l e (I)	i l e (i)
ロイシン	L e u (L)	l e u (l)
リジン	L y s (K)	l y s (k)
メチオニン	M e t (M)	m e t (m)
ナフチルアラニン	N a l (Φ)	n a l (φ)
ノルロイシン	N l e (Ω)	n l e
フェニルアラニン	P h e (F)	p h e (f)
フェニルグリシン	P h g (Ψ)	p h g
4-(ホスホノジフルオロメチル) フェニルアラニン	F ₂ P m p (Λ)	f ₂ p m p
プロリン	P r o (P)	p r o (p)
サルコシン	S a r (Ξ)	s a r
セレノシステイン	S e c (U)	s e c (u)
セリン	S e r (S)	s e r (s)
トレオニン	T h r (T)	t h r (y)
チロシン	T y r (Y)	t y r (y)
トリプトファン	T r p (W)	t r p (w)
バリン	V a l (V)	v a l (v)
3-(3-ベンゾチエニル)-アラニン	B t a	B t a
4-フルオロフェニルアラニン	F p a または L-F p a	f p a または D-F p a
1-ナフチルアラニン	L-1-N a l または 1-N a l	D-1-N a l または 1-n a l
2-ナフチルアラニン	L-2-N a l または 2-N a l	D-2-N a l または 2-n a l
2-ピリジルアラニン	L-2-P y a	D-2-P y a

10

20

30

40

50

アミノ酸	略語＊L－アミノ酸	略語＊D－アミノ酸
	または 2－P y a	または 2－p y a
4－ピリジルアラニン	L－4－P y a または 4－P y a	D－4－P y a または 4－p y a

＊一文字略語：本明細書で大文字で示されている場合はL－アミノ酸の形態を示し、小文字で示されている場合はD－アミノ酸の形態を示す。

10

【0028】

「アルキル」または「アルキル基」とは、1～12個の炭素原子を有し、かつ単結合によって分子の残りの部分に結合している、完全に飽和した直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖ラジカルを指す。1～12の任意の数の炭素原子を含むアルキルが含まれる。最大12個の炭素原子を含むアルキルはC₁～C₁₂アルキルであり、最大10個の炭素原子を含むアルキルはC₁～C₁₀アルキルであり、最大6個の炭素原子を含むアルキルはC₁～C₆アルキルであり、最大5個の炭素原子を含むアルキルはC₁～C₅アルキルである。C₁～C₅アルキルには、C₅アルキル、C₄アルキル、C₃アルキル、C₂アルキル、及びC₁アルキル（すなわち、メチル）が含まれる。C₁～C₆アルキルには、C₁～C₅アルキルについて上記で説明したすべての部分が含まれるが、C₆アルキルも含まれる。C₁～C₁₀アルキルには、C₁～C₅アルキル及びC₁～C₆アルキルについて上記で説明したすべての部分が含まれるが、C₇、C₈、C₉及びC₁₀アルキルも含まれる。同様に、C₁～C₁₂アルキルには、前述のすべての部分が含まれるが、C₁₁及びC₁₂アルキルも含まれる。C₁～C₁₂アルキルの非限定的な例としては、メチル、エチル、n－プロピル、i－プロピル、sec－プロピル、n－ブチル、i－ブチル、sec－ブチル、t－ブチル、n－ペンチル、t－アミル、n－ヘキシル、n－ヘプチル、n－オクチル、n－ノニル、n－デシル、n－ウンデシル、及びn－ドデシルが挙げられる。本明細書において特に別段の記載がない限り、アルキル基は、任意に置換されていてもよい。

20

【0029】

「アルキレン」または「アルキレン鎖」とは、1～40個の炭素原子を有する、完全に飽和した直鎖または分岐鎖の二価炭化水素鎖ラジカルを指す。C₂～C₄₀アルキレンの非限定的な例としては、エチレン、プロピレン、n－ブチレン、ペンチレンなどが挙げられる。本明細書において特に別段の記載がない限り、アルキレン鎖は、本明細書に記載されるように任意に置換されていてもよい。

30

【0030】

「アルケニル」または「アルケニル基」とは、2～12個の炭素原子を有し、かつ1つ以上の炭素－炭素二重結合を有する直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖ラジカルを指す。各アルケニル基は、単結合によって分子の残りの部分に結合している。2～12の任意の数の炭素原子を含むアルケニル基が含まれる。最大12個の炭素原子を含むアルケニル基はC₂～C₁₂アルケニルであり、最大10個の炭素原子を含むアルケニルはC₂～C₁₀アルケニルであり、最大6個の炭素原子を含むアルケニルはC₂～C₆アルケニルであり、最大5個の炭素原子を含むアルケニルはC₂～C₅アルケニルである。C₂～C₅アルケニルには、C₅アルケニル、C₄アルケニル、C₃アルケニル、及びC₂アルケニルが含まれる。C₂～C₆アルケニルには、C₂～C₅アルケニルについて上記で説明したすべての部分が含まれるが、C₆アルケニルも含まれる。C₂～C₁₀アルケニルには、C₂～C₅アルケニル及びC₂～C₆アルケニルについて上記で説明したすべての部分が含まれるが、C₇、C₈、C₉及びC₁₀アルケニルも含まれる。同様に、C₂～C₁₂アルケニルには、前述のすべての部分が含まれるが、C₁₁及びC₁₂アルケニルも含まれる。C₂～C₁₂アルケニルの非限定的な例としては、エテニル（ビニル）、1－プロペニル、2－プロペニル（アリル）、イソ－プロペニル、2－メチル－1－プロペニル、1－ブ

40

50

テニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、1-ヘプテニル、2-ヘプテニル、3-ヘプテニル、4-ヘプテニル、5-ヘプテニル、6-ヘプテニル、1-オクテニル、2-オクテニル、3-オクテニル、4-オクテニル、5-オクテニル、6-オクテニル、7-オクテニル、1-ノネニル、2-ノネニル、3-ノネニル、4-ノネニル、5-ノネニル、6-ノネニル、7-ノネニル、8-ノネニル、1-デセニル、2-デセニル、3-デセニル、4-デセニル、5-デセニル、6-デセニル、7-デセニル、8-デセニル、9-デセニル、1-ウンデセニル、2-ウンデセニル、3-ウンデセニル、4-ウンデセニル、5-ウンデセニル、6-ウンデセニル、7-ウンデセニル、8-ウンデセニル、9-ウンデセニル、10-ウンデセニル、1-ドデセニル、2-ドデセニル、3-ドデセニル、4-ドデセニル、5-ドデセニル、6-ドデセニル、7-ドデセニル、8-ドデセニル、9-ドデセニル、10-ドデセニル、及び11-ドデセニルが挙げられる。本明細書において特に別段の記載がない限り、アルケニル基は、任意に置換されていてもよい。

10

【0031】

「アルケニレン」または「アルケニレン鎖」とは、2～40個の炭素原子を有し、かつ1つ以上の炭素-炭素二重結合を有する直鎖または分岐鎖の二価炭化水素鎖ラジカルを指す。 $C_2 \sim C_{40}$ アルケニレンの非限定的な例としては、エテニレン($-CH=CH-$)、プロペニレン、ブテニレンなどが挙げられる。本明細書において特に別段の記載がない限り、アルケニレン鎖は、任意に置換されていてもよい。

20

【0032】

「アルキニル」または「アルキニル基」とは、2～12個の炭素原子を有し、かつ1つ以上の炭素-炭素三重結合を有する直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖ラジカルを指す。各アルキニル基は、単結合によって分子の残りの部分に結合している。2～12の任意の数の炭素原子を含むアルキニル基が含まれる。最大12個の炭素原子を含むアルキニル基は $C_2 \sim C_{12}$ アルキニルであり、最大10個の炭素原子を含むアルキニルは $C_2 \sim C_{10}$ アルキニルであり、最大6個の炭素原子を含むアルキニルは $C_2 \sim C_6$ アルキニルであり、最大5個の炭素原子を含むアルキニルは $C_2 \sim C_5$ アルキニルである。 $C_2 \sim C_5$ アルキニルには、 C_5 アルキニル、 C_4 アルキニル、 C_3 アルキニル、及び C_2 アルキニルが含まれる。 $C_2 \sim C_6$ アルキニルには、 $C_2 \sim C_5$ アルキニルについて上記で説明したすべての部分が含まれるが、 C_6 アルキニルも含まれる。 $C_2 \sim C_{10}$ アルキニルには、 $C_2 \sim C_5$ アルキニル及び $C_2 \sim C_6$ アルキニルについて上記で説明したすべての部分が含まれるが、 C_7 、 C_8 、 C_9 及び C_{10} アルキニルも含まれる。同様に、 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニルには、前述のすべての部分が含まれるが、 C_{11} 及び C_{12} アルキニルも含まれる。 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニルの非限定的な例としては、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニルなどが挙げられる。本明細書において特に別段の記載がない限り、アルキニル基は、任意に置換されていてもよい。

30

【0033】

「アルキニレン」または「アルキニレン鎖」とは、2～40個の炭素原子を有し、かつ1つ以上の炭素-炭素三重結合を有する直鎖または分岐鎖の二価炭化水素鎖ラジカルを指す。 $C_2 \sim C_{40}$ アルキニレンの非限定的な例としては、エチニレン($-C \equiv C-$)、プロパルギレンなどが挙げられる。本明細書において特に別段の記載がない限り、アルキニレン鎖は、任意に置換されていてもよい。

40

【0034】

「アリール」とは、水素、6～40個の炭素原子及び少なくとも1つの芳香族環を含む炭化水素環系を指す。本開示の目的のために、アリールは、一価または二価のラジカル（置換基を除く）であってもよく、これは、単環式、二環式、三環式または四環式の環系であってもよく、また、縮合環系または架橋環系を含んでもよい。アリール基としては、アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、ベンゼン、クリセン、フルオランテン、フルオレン、a s-インダセン、s-インダセン、

50

インダン、インデン、ナフタレン、フェナレン、フェナントレン、プレイアデン、ピレン、及びトリフェニレンから誘導されるラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アリールラジカルは、リンカーとしてまたはリンカーの一部として使用される場合、二価であってもよい。本明細書において特に別段の記載がない限り、アリール基は、任意に置換されていてもよい。

【0035】

本明細書で使用される場合、「芳香族」とは、 $4n + 2\pi$ 個の電子を有する不飽和環状分子を指し、ここで n は任意の整数である。「非芳香族」という用語は、芳香族の定義に該当しない任意の不飽和環状分子を指す。

【0036】

「カルボシクリル」、「炭素環式環」または「炭素環」とは、環を形成する原子がそれぞれ炭素である環構造を指す。炭素環式環は、環内に 3 ～ 20 個の炭素原子を含むことができる。炭素環式環には、アリール、シクロアルキル、ならびに完全に不飽和、部分的に不飽和、及び完全に飽和した環が含まれる。いくつかの実施形態では、カルボシクリルは、リンカーとしてまたはリンカーの一部として使用される場合、二価であってもよい。本明細書において特に別段の記載がない限り、カルボシクリル基は、任意に置換されていてもよい。

【0037】

「シクロアルキル」とは、3 ～ 40 個の炭素原子及び少なくとも 1 つの環を有する安定した非芳香族の単環式または多環式の完全飽和炭化水素ラジカルを指し、ここで環は炭素原子及び水素原子のみからなり、縮合環系または架橋環系を含むことができる。本開示の目的のために、シクロアルキルは、一価または二価のラジカル（置換基を除く）であり得る。単環式シクロアルキルラジカルとしては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが挙げられる。多環式シクロアルキルラジカルとしては、例えば、アダマンチル、ノルボルニル、デカリニル、7, 7-ジメチル-ビシクロ[2. 2. 1]ヘプタニルなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、シクロアルキルラジカルは、リンカーとしてまたはリンカーの一部として使用される場合、二価であってもよい。本明細書において特に別段の記載がない限り、シクロアルキル基は、任意に置換されていてもよい。

【0038】

「シクロアルケニル」とは、3 ～ 40 個の炭素原子、少なくとも 1 つの環、及び 1 つ以上の炭素-炭素二重結合を有する、安定した非芳香族の単環式または多環式炭化水素ラジカルを指し、ここで環は炭素原子と水素原子のみからなり、縮合環系または架橋環系を含むことができる。本開示の目的のために、シクロアルケニルは、一価または二価のラジカル（置換基を除く）であり得る。単環式シクロアルケニル基としては、例えば、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニルなどが挙げられる。多環式シクロアルケニル基としては、例えば、ビシクロ[2. 2. 1]ヘプト-2-エニルなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、シクロアルケニルラジカルは、リンカーとしてまたはリンカーの一部として使用される場合、二価であってもよい。本明細書において特に別段の記載がない限り、シクロアルケニル基は、任意に置換されていてもよい。

【0039】

「シクロアルキニル」とは、3 ～ 40 個の炭素原子、少なくとも 1 つの環、及び 1 つ以上の炭素-炭素三重結合を有する、安定した非芳香族の単環式または多環式炭化水素ラジカルを指し、ここで環は炭素原子と水素原子のみからなり、縮合環系または架橋環系を含むことができる。本開示の目的のために、シクロアルキニルは、一価または二価のラジカル（置換基を除く）であり得る。単環式シクロアルキニル基としては、例えば、シクロヘプチニル、シクロオクチニルなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、シクロアルキニルラジカルは、リンカーとしてまたはリンカーの一部として使用される場合、二価であってもよい。本明細書において特に別段の記載がない限り、シクロアルキニル基は、任意に置換されていてもよい。

10

20

30

40

50

【0040】

「ヘテロシクリル」、「複素環式環」または「複素環」とは、2～12個の炭素原子と、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選択される1～6個のヘテロ原子とからなる、安定した3～20員芳香族環ラジカルを指す。本開示の目的のために、ヘテロシクリル基は、一価または二価のラジカル（置換基を除く）であり得る。ヘテロシクリルまたは複素環式環には、以下に定義するヘテロアリールが含まれる。本明細書において特に別段の記載がない限り、ヘテロシクリルラジカルは、単環式、二環式、三環式または四環式環系であってもよく、これは、縮合環系または架橋環系を含むことができ、ヘテロシクリルラジカル中の窒素、炭素または硫黄原子は任意に酸化されていてもよく、窒素原子は任意に四級化されていてもよく、ヘテロシクリルラジカルは部分的にまたは完全に飽和されていてもよい。そのようなヘテロシクリルラジカルの例としては、ジオキサニル、チエニル〔1, 3〕ジチアニル、デカヒドロイソキノリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、オクタヒドロインドリル、オクタヒドロイソインドリル、2-オキソピペラジニル、2-オキソピペリジニル、2-オキソピロリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリチアニル、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル、チアモルホリニル、1-オキソチオモルホリニル、及び1, 1-ジオキソチオモルホリニルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヘテロシクリルラジカルは、リンカーとしてまたはリンカーの一部として使用される場合、二価であってもよい。本明細書において特に別段の記載がない限り、ヘテロシクリル基は、任意に置換されていてもよい。

10

20

【0041】

「ヘテロアリール」とは、水素原子と、1～14個の炭素原子と、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選択される1～6個のヘテロ原子と、少なくとも1つの芳香族環とを含む5～20員環系ラジカルを指す。本発明の目的のために、ヘテロアリールラジカルは、一価または二価のラジカル（置換基を除く）であってもよく、また、単環式、二環式、三環式または四環式環系であってもよく、これは縮合環系または架橋環系を含むことができ、ヘテロアリールラジカル中の窒素、炭素または硫黄原子は、任意に酸化されていてもよく、窒素原子は、任意に四級化されていてもよい。例としては、アゼピニル、アクリジニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンズインドリル、ベンゾジオキサニル、ベンゾフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾ〔b〕〔1, 4〕ジオキセピニル、1, 4-ベンゾジオキサニル、ベンゾナフトフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾジオキサニル、ベンゾジオキシニル、ベンゾピラニル、ベンゾピラノニル、ベンゾフラニル、ベンゾフラノニル、ベンゾチエニル（ベンゾチオフエニル）、ベンゾトリアゾリル、ベンゾ〔4, 6〕イミダゾ〔1, 2-a〕ピリジニル、カルバゾリル、シンノリニル、ジベンゾフラニル、ジベンゾチオフエニル、フラニル、フラノニル、イソチアゾリル、イミダゾリル、インダゾリル、インドリル、インダゾリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、イソキノリル、インドリジニル、イソオキサゾリル、ナフチリジニル、オキサジアゾリル、2-オキソアゼピニル、オキサゾリル、オキシラニル、1-オキシドピリジニル、1-オキシドピリミジニル、1-オキシドピラジニル、1-オキシドピリダジニル、1-フェニル-1H-ピロリル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、フタラジニル、プテリジニル、プリニル、ピロリル、ピラゾリル、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、キノリニル、キヌクリジニル、イソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、チアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニル、及びチオフエニル（すなわち、チエニル）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールラジカルは、リンカーとしてまたはリンカーの一部として使用される場合、二価であってもよい。本明細書において特に別段の記載がない限り、ヘテロアリール基は、任意に置換されていてもよい。

30

40

【0042】

50

本明細書で使用される「エーテル」という用語は、直鎖または分岐鎖の二価ラジカル部分 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n)_z-$ を指し、ここで、 m 、 n 、及び z はそれぞれ独立して 1～40 から選択される。例としては、ポリエチレングリコールが挙げられるが、これに限定されない。本明細書において特に別段の記載がない限り、エーテルは、任意に置換されていてもよい。

【0043】

本明細書で使用される「置換された」という用語は、上記の基（すなわち、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、カルボシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、及び／またはエーテル）のいずれかを意味し、ここで、少なくとも 1 つの水素原子は、限定されないが、F、Cl、Br、及び I などのハロゲン原子；ヒドロキシル基、アルコキシ基、及びエステル基などの基中の酸素原子；チオール基、チオアルキル基、スルホン基、スルホニル基、及びスルホキシド基などの基中の硫黄原子；アミン、アミド、アルキルアミン、ジアルキルアミン、アリールアミン、アルキルアリールアミン、ジアリールアミン、N-オキシド、イミド、及びエナミンなどの基中の窒素原子；トリアルキルシリル基、ジアルキルアリールシリル基、アルキルジアリールシリル基、及びトリアリールシリル基などの基中のケイ素原子；ならびに様々な他の基中の他のヘテロ原子のような非水素原子への結合に置き換えられる。「置換された」はまた、1 つ以上の水素原子が、オキソ、カルボニル、カルボキシル、及びエステル基中の酸素；ならびにイミン、オキシム、ヒドラゾン、及びニトリルなどの基中の窒素のようなヘテロ原子への高次結合（例えば、二重結合または三重結合）に置き換えられた上記の基のいずれかを意味する。例えば、「置換された」には、1 つ以上の水素原子が $-NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)R_h$ 、 $-NR_gC(=O)NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)OR_h$ 、 $-NR_gSO_2R_h$ 、 $-OC(=O)NR_gR_h$ 、 $-OR_g$ 、 $-SR_g$ 、 $-SOR_g$ 、 $-SO_2R_g$ 、 $-OSO_2R_g$ 、 $-SO_2OR_g$ 、 $=NSO_2R_g$ 、及び $-SO_2NR_gR_h$ で置き換えられた上記の基のいずれかが含まれる。「置換された」はまた、1 つ以上の水素原子が、 $-C(=O)R_g$ 、 $-C(=O)OR_g$ 、 $-C(=O)NR_gR_h$ 、 $-CH_2SO_2R_g$ 、 $-CH_2SO_2NR_gR_h$ で置き換えられた上記の基のいずれかを意味する。上記において、 R_g 及び R_h は、同じであるか、または異なり、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルアミノ、チオアルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、シクロアルキルアルキル、ハロアルキル、ハロアルケニル、ハロアルキニル、ヘテロシクリル、N-ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、N-ヘテロアリール及び／またはヘテロアリールアルキルである。「置換された」はさらに、1 つ以上の水素原子が、アミノ、シアノ、ヒドロキシル、イミノ、ニトロ、オキソ、チオキソ、ハロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルアミノ、チオアルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、シクロアルキルアルキル、ハロアルキル、ハロアルケニル、ハロアルキニル、ヘテロシクリル、N-ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、N-ヘテロアリール及び／またはヘテロアリールアルキル基への結合に置き換えられた上記の基のいずれかを意味する。さらに、前述の置換基のそれぞれは、上記置換基の 1 つ以上で任意に置換されていてもよい。さらに、当業者であれば、「置換された」には、上記のいずれかの基の 1 つ以上の原子がこの段落に列挙された置換基に置き換えられ、その置換基が C P P、P、または L と共有結合を形成する場合も含まれることを認識するであろう。例えば、特定の実施形態では、上記の基のいずれかは、第 1 の位置で、C P P 中のリジンとアミド結合を形成するカルボン酸（すなわち、 $-C(=O)OH$ ）で置換されていてもよく、または、基は、第 2 の位置で、システイン（またはチオール基を有するアミノ酸類似体）とジスルフィド結合を形成するチオール基で置換されていてもよい。

【0044】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、投与の標的、例えば、被検体を指す。したがって、本明細書に開示される方法の対象は、哺乳動物、魚類、鳥類、爬虫類、

10

20

30

40

50

または両生類等の脊椎動物であり得る。あるいは、本明細書に開示される方法の対象は、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ネコ、モルモット、魚、鳥、げっ歯類、またはショウジョウバエであり得る。この用語は、特定の年齢または性別を示すものではない。したがって、成人及び新生児の対象、ならびに胎児（雌雄を問わず）が包含されることが意図される。いくつかの例では、対象は、哺乳動物である。患者とは、疾患または障害に罹患している対象を指す。「患者」という用語は、ヒト及び獣医学的対象を含む。開示された方法のいくつかの例では、投与ステップの前に、対象は癌、自己免疫疾患、及び／または炎症の治療が必要であると診断されている。開示された方法のいくつかの例では、投与ステップの前に、対象は癌と診断されている。「対象」という用語には、細胞、例えばヒト細胞などの動物細胞も含まれる。

10

【0045】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、疾患、病的状態、または障害を治癒、改善、または安定化することを目的とした患者の医学的管理を指す。この用語には、積極的治療、すなわち、特に疾患、病的状態、または障害の改善を目的とした治療が含まれ、また、原因治療、すなわち、関連する疾患、病的状態、または障害の原因の除去を目的とした治療も含まれる。さらに、この用語には、緩和治療、すなわち、疾患、病的状態、または障害を治癒するのではなく症状を軽減するために設計された治療と、支持治療、すなわち、関連する疾患、病的状態、または障害の改善を目的とした別の特定の治療法を補うために使用される治療とが含まれる。様々な態様において、この用語は、哺乳動物（例えば、ヒト）を含む対象の任意の治療を包含し、（i）疾患にかかりやすい可能性があるが、まだ罹患していると診断されていない対象においてその疾患が発生するのを防ぐこと、（ii）疾患を阻害すること、すなわち、その発症を阻止すること、または（iii）疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こすことを含む。

20

【0046】

本明細書で使用される場合、「予防する（prevent）」または「予防すること（preventing）」という用語は、特に事前の措置によって、何かが起こるのを妨げ、回避し、排除し、未然に防ぎ、阻止し、または妨害することを指す。

【0047】

本明細書で使用される場合、「診断された」という用語は、当業者、例えば、医師による身体検査を受け、本明細書に開示される化合物、組成物、または方法によって診断または治療することができる状態を有することが見出されたことを意味する。例えば、「癌と診断された」とは、当業者、例えば、医師による身体検査を受け、癌を治療または予防することができる化合物または組成物によって診断または治療することができる状態を有することが見出されたことを意味する。さらに別の例として、「癌を治療または予防する必要があると診断された」とは、当業者、例えば、医師による身体検査を受け、癌または他の疾患を特徴とする状態を有し、癌を治療または予防することが対象にとって有益であることが判明したことを指す。

30

【0048】

本明細書で使用される場合、「障害の治療が必要であると特定された」などの語句は、障害の治療の必要性に基づいて対象を選択することを指す。例えば、対象は、当業者による以前の診断に基づいて、障害（例えば、癌に関連する障害）の治療が必要であると特定され、その後、その障害の治療を受けることができる。いくつかの例では、特定は、診断を行う人とは異なる人によって実施できることが企図される。いくつかの例では、投与は、その後投与を行った人によって実施できることも企図される。

40

【0049】

本明細書で使用される場合、「投与すること（administering）」及び「投与（administration）」という用語は、医薬品を対象に提供する任意の方法を指す。そのような方法は、当業者に周知であり、経口投与、経皮投与、吸入による投与、経鼻投与、局所投与、腔内投与、点眼投与、耳内投与、脳内投与、直腸投与、舌下投与、頬側投与、ならびに静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、及び皮下投与などの注

50

射投与を含む非経口投与を含むが、これらに限定されない。投与は、連続的でも間欠的でもよい。いくつかの例では、調製物は治療的に投与することができ、すなわち、既存の疾患または状態を治療するために投与することができる。いくつかの例では、調製物は予防的に投与することができ、すなわち、疾患または状態を予防するために投与することができる。

【0050】

本明細書で使用される「接触」という用語は、開示された化合物及び標的（例えば、細胞、標的受容体、転写因子、または他の生物学的実体）を、化合物が直接に（すなわち、標的自体と相互作用することによって）、または間接的に（標的の活性が依存する別の分子、補因子、因子、またはタンパク質と相互作用することによって）標的の活性に影響を与えることができるような方法で組み合わせることを指す。

10

【0051】

本明細書で使用される場合、「有効量」及び「有効な量」という用語は、所望の結果を達成するか、または望ましくない状態に影響を及ぼすのに十分な量を指す。例えば、「治療有効量」は、所望の治療結果を達成するか、または望ましくない症状に影響を及ぼすのに十分であるが、一般に有害な副作用を引き起こすには不十分な量を指す。任意の特定の患者への具体的な治療的に有効な投与量レベルは、治療される障害及び障害の重症度、使用される特定の組成物、患者の年齢、体重、全般的な健康状態、性別及び食事、投与時間、投与経路、使用される特定の化合物の排泄率、治療期間、使用される特定の化合物と組み合わせるまたは同時に使用される薬物、ならびに医学分野において周知の同様の因子を含む様々な因子に依存する。例えば、所望の治療効果を達成するために必要なレベルよりも低いレベルで化合物の投与を開始し、所望の効果が達成されるまで徐々に投与量を増加させることは、十分に当該技術分野の技術の範囲内である。必要に応じて、有効な1日用量は、投与のために複数の用量に分割することができる。したがって、単回投与組成物は、1日用量を構成するためにそのような量またはその約数を含むことができる。何らかの禁忌がある場合には、個々の医師が投与量を調整することができる。投与量は変化する可能性があり、1日または数日間、1日1回以上の用量で投与することができる。ガイドランスは、所与のクラスの医薬品の適切な投与量についての文献に見出すことができる。いくつかの例では、調製物は「予防有効量」、すなわち、疾患または状態の予防に有効な量で投与することができる。

20

30

【0052】

「薬学的に許容される」という用語は、生物学的にまたは他の点で望ましくない物質ではなく、すなわち、許容できないレベルの望ましくない生物学的効果を引き起こしたり、有害な方法で相互作用したりしない物質を表す。

【0053】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、滅菌水性または非水性溶液、分散液、懸濁液、またはエマルジョン、ならびに使用直前に滅菌注射用溶液または分散液に再構成するための滅菌粉末を指す。適切な水性及び非水性担体、希釈剤、溶媒またはビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、カルボキシメチルセルロース及びそれらの適切な混合物、植物油（オリーブ油など）、ならびにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料を使用することによって、分散液の場合には必要とされる粒径を維持することによって、及び界面活性剤を使用することによって維持することができる。これらの組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤などのアジュバントを含むこともできる。微生物の作用の予防は、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの様々な抗菌剤及び抗真菌剤を含めることによって確実にすることができる。また、糖類、塩化ナトリウムなどの等張剤を含めることが望ましい場合もある。吸収を遅らせるモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの薬剤を含めることによって、注射可能な医薬形態の吸収を延長させることができる。注射可能なデポー形態は、ポリラクチド-ポリグリコリ

40

50

ド、ポリ（オルトエステル）、及びポリ（無水物）などの生分解性ポリマー中で薬物のマイクロカプセルマトリックスを形成することによって作製される。薬物対ポリマーの比、及び使用される特定のポリマーの性質に応じて、薬物放出速度を制御することができる。デポー注射用製剤も、体組織と適合性のあるリポソームまたはマイクロエマルジョン中に薬物を封入することによって調製される。注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルタを通して濾過することによって、または使用直前に滅菌水もしくは他の滅菌注射用媒体に溶解もしくは分散することができる滅菌固体組成物の形態で滅菌剤を組み込むことによって、滅菌することができる。適切な不活性担体としては、ラクトースなどの糖類を挙げることができる。

【0054】

本明細書及び最終の特許請求の範囲で使用される場合、化学種の残基とは、特定の反応スキームまたはその後の製剤もしくは化学製品における化学種の結果として得られる生成物である部分を指し、その部分が実際に化学種から得られるか否かは関係ない。したがって、ペプチドまたはタンパク質中のアミノ酸残基とは、ペプチドまたはタンパク質中の1つ以上の $-OC(O)CH(R)NH-$ 単位を指す。

【0055】

本明細書で使用される場合、記号「

【0056】

【化1】



」（以下、「結合点結合」と呼ぶことができる）は、2つの化学物質間の結合点である結合を示し、そのうちの1つの化学物質は結合点結合に結合しているものとして示され、もう1つは結合点結合に結合していないものとして示される。例えば、「

【0057】

【化2】



」は、化学物質「XY」が結合点結合を介して別の化学物質に結合していることを示す。さらに、示されていない化学物質への特定の結合点は、推論によって特定することができる。例えば、化合物 CH_3-R^3 （式中、 R^3 はHである）または「

【0058】

【化3】



」は、 R^3 が「XY」の場合、結合点結合が、 R^3 と CH_3 を結合していると示される結合と同じ結合であることを示す。

【0059】

反対の記載がない限り、くさび形や破線ではなく、実線としてのみ示される化学結合を有する式は、それぞれの可能な異性体、例えば、それぞれのエナンチオマー及びジアステレオマー、ならびに異性体の混合物、例えば、ラセミまたはスケールミック（scalemic）混合物を企図する。本明細書に記載の化合物は、1つ以上の不斉中心を含むことができ、したがってジアステレオマー及び光学異性体が生じる可能性がある。反対の記載がない限り、本明細書に開示される化合物及び組成物には、そのようなすべての可能なジアステレオマー及びそれらのラセミ混合物、それらの実質的に純粋な分割されたエナンチオマー、すべての可能な幾何異性体及びそれらの薬学的に許容される塩が含まれる。立体異性体の混合物及び単離された特定の立体異性体も含まれる。そのような化合物を調製す

10

20

30

40

50

るために使用される合成手順の過程中、または当業者に周知のラセミ化もしくはエピマー化手順を使用する際に、そのような手順の生成物は、立体異性体の混合物であり得る。

【0060】

多くの有機化合物は、平面偏光の平面を回転させる能力を有する光学活性な形態で存在する。光学活性な化合物を説明する際、接頭辞 D 及び L または R 及び S は、キラル中心（複数可）の周りの分子の絶対配置を示すために使用される。接頭辞 d 及び l または (+) 及び (−) は、化合物による平面偏光の回転の符号を示すために使用され、(−) または l は、化合物が左旋性であることを意味する。接頭辞 (+) または d が付いた化合物は右旋性である。所与の化学構造の場合、立体異性体と呼ばれるこれらの化合物は、それらが互いに重ね合わせることができない鏡像であることを除いて、同一である。特定の立体異性体はエナンチオマーとも呼ばれてもよく、そのような異性体の混合物は、エナンチオマー混合物と呼ばれることが多い。エナンチオマーの 50 : 50 の混合物は、ラセミ混合物と呼ばれる。本明細書に記載の化合物の多くは、1 つ以上のキラル中心を有することができ、したがって、異なるエナンチオマー形態で存在することができる。必要に応じて、キラル炭素をアスタリスク (*) で示すことができる。開示された式においてキラル炭素への結合が直線として示される場合、キラル炭素の (R) 及び (S) 配置の両方、したがって、そのエナンチオマー及び混合物の両方が式に包含されることが理解される。当該技術分野で使用されるように、キラル炭素についての絶対配置を特定することが望ましい場合、キラル炭素への結合のうちの一方を、くさび形として示すことができ（平面より上の原子への結合）、他方を、一連の短い平行線または短い平行線のくさび形として示すことができる（平面より下の原子への結合）。カーン-インゴールド-プレローグシステムを使用して、(R) または (S) 配置をキラル炭素に割り当てることができる。

10

20

【0061】

本明細書に記載の化合物は、天然同位体存在比と非天然存在比の両方の原子を含む。開示された化合物は、1 つ以上の原子が、自然界に典型的に見られる原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子に置き換えられていることを除けば、記載されたものと同一の同位体標識化合物または同位体置換化合物であり得る。本明細書に開示される化合物に組み込むことができる同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、リン、フッ素、及び塩素の同位体、例えばそれぞれ ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、及び ^{36}Cl が挙げられる。化合物は、そのプロドラッグをさらに含み、前述の同位体及び／または他の原子の他の同位体を含む当該化合物または当該プロドラッグの薬学的に許容される塩は、本発明の範囲内である。特定の同位体標識化合物、例えば ^3H 及び ^{14}C などの放射性同位体が組み込まれた化合物は、薬物及び／または基質の組織分布アッセイに有用である。トリチウム同位体（すなわち、 ^3H ）及び炭素-14 同位体（すなわち、 ^{14}C ）は、調製が容易で検出しやすいため、特に好ましい。さらに、重水素、すなわち、 ^2H などのより重い同位体で置換すると、代謝安定性の向上から生じる特定の治療上の利点、例えばインビボ半減期の延長または必要投与量の低減などが得られるため、状況によっては好ましい場合がある。同位体標識化合物及びそのプロドラッグは、一般に、容易に入手可能な同位体標識試薬を非同位体標識試薬の代わりに使用して、以下の手順を実施することによって調製することができる。

30

40

【0062】

本明細書に開示される組成物を調製するために使用される成分、ならびに本明細書に開示される方法内で使用される組成物自体が開示される。これら及び他の物質が本明細書に開示され、これらの物質の組み合わせ、サブセット、相互作用、群などが開示される場合、これらの化合物の様々な個々の及び集合的な組み合わせ及び順列のそれぞれの具体的な参照は明示的に開示できないが、それぞれが具体的に企図され、本明細書に記載されることが理解される。例えば、特定の化合物が開示され、議論され、その化合物を含む多数の分子に対して行うことができるいくつかの修飾が議論されている場合、特に反対のことが示されていない限り、その化合物のあらゆる組み合わせと順列、及び可能な修飾が具体的に企図される。したがって、分子 A、B、及び C のクラスが開示されるだけでなく、分子

50

D、E、及びFのクラス、ならびに組み合わせ分子の一例A～Dも開示される場合、それぞれが個別に記載されていなくても、それぞれが個別にかつ集合的に企図され、すなわち、組み合わせA～E、A～F、B～D、B～E、B～F、C～D、C～E、及びC～Fが開示されているとみなされる。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせも開示される。したがって、例えば、A～E、B～F、及びC～Eのサブグループが開示されているとみなされる。この概念は、本明細書に開示される組成物の製造方法及び使用方法におけるステップを含むがこれらに限定されない、本出願のすべての態様に適用される。したがって、実施できる様々な追加ステップがある場合、これらの追加ステップのそれぞれは、本明細書に開示される方法の任意の特定の実施形態または実施形態の組み合わせを用いて実施することができることが理解される。

10

【0063】

ここで、開示された物質、化合物、組成物、物品、及び方法の特定の態様について詳細に言及し、それらの例を添付の実施例及び図面に示す。

【0064】

組成物

細胞透過性ペプチド及びそれらを含む組成物が開示され、これらは、潜在的に任意のペプチドまたはタンパク質カーゴ、ならびに他の生体分子のサイトゾル送達のための一般的なビヒクルを提供することができる。開示された組成物は、単純な細胞透過性ペプチドよりも優れたサイトゾル送達効率及びインビボ安定性を有し得る。さらに、開示された組成物は、細胞のエンドソームからより完全に脱出ことができ、したがって、開示された組成物がいない場合よりも、コンジュゲートされたカーゴをエンドソームからより効率的に輸送することができる。開示された組成物はまた、はるかに幅広いカーゴ適合性（本質的にあらゆるペプチドまたはタンパク質）を有し得る。また、合成はより簡単になる可能性があり、すなわち、膜移行ドメインをカーゴタンパク質のN末端、C末端、または内部位置に遺伝的に融合させる。さらに、開示された組成物は、免疫原性の可能性が低い可能性があり、毒素の特定の受容体（複数可）を発現する細胞に限定される細菌毒素とは異なり、ほぼあらゆる真核細胞（例えば、哺乳動物及び植物）にカーゴを送達することができる。細菌毒素の送達能力が標的細胞表面上の受容体の存在量によって制限される可能性があるため、開示された組成物はまた、細菌毒素よりも高い送達能力を有し得る。さらなる例では、開示された組成物は垂鉛などの補因子を必要とせず、または含まない。

20

30

【0065】

特定の態様では、1つ以上の細胞透過性ペプチドモチーフを有する膜移行ドメインを含むペプチドが開示され、ここで、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが3～10個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも3つのアルギニン及び／またはリジン残基を有する。CPPモチーフが各標的タンパク質に挿入される方法とは異なり、開示された組成物及び方法は、目的の任意の標的カーゴに遺伝的または合成的に融合することができる操作された膜移行ドメインを含む。本明細書に開示される別の戦略は、CPPモチーフを2つに分割し、それらを膜移行ドメインの2つの異なる領域に挿入することを含み、その結果、サイトゾル送達効率が大幅に向上する。

【0066】

膜移行ドメイン

開示されたペプチドの膜移行ドメイン部分は、本明細書に記載される少なくとも1つの細胞透過性モチーフを含むように修飾された任意の膜移行ドメイン、すなわち、脂質二重層を横断し得るペプチド配列であり得る。好ましい例では、膜移行ドメインに2つまたは3つの細胞透過性モチーフがある。例えば、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが3～10個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも3つのアルギニン及び／またはリジン残基、例えば4つ、5つ、または6つのアルギニン及び／またはリジン残基を有し得る。あるいは、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが3～10個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも2つのアルギニン及び／またはリジン残基を有してもよく、少なくとも1つの他の細胞透過性ペプチドモチーフは、長さが2～8個の

40

50

アミノ酸残基であり、かつ少なくとも2つの疎水性残基を有してもよい。細胞透過性ペプチドモチーフが2つ以上ある場合、3～10個のアミノ酸のスパン内に2つ以上のアルギニン残基及び／またはリジン残基がある可能性があり、2～8個のアミノ酸のスパン内に2つ以上の疎水性残基がある別の細胞透過性ペプチドモチーフがある可能性がある。細胞透過性ペプチドモチーフは、膜移行ドメイン内のどこにでも存在してもよい。

【0067】

いくつかの例では、膜移行ドメインは、フィブロネクチンIII型などのヒト膜移行ドメインであり得る。特定の例では、膜移行ドメインは、配列番号118と少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の配列類似性を有する。他の例では、膜移行ドメインは、BC、DE、CD、及びFGループを有するヒトフィブロネクチンIII型であり、細胞透過性ペプチドモチーフは、BC、DE、CD、またはFGループのうちの1つ以上にあり、例えば、細胞透過性ペプチドモチーフは、BC、DE、CD、またはFGループのうちの2つ、特にBCループ及びFGループにある。これらのループは、以下の配列を有するものとして定義することができる：BC=AVTVR（配列番号31）、CD=GGNSPVQ（配列番号32）、DE=PGSK（配列番号33）、FG=GRGDSPAS（配列番号34）。

【0068】

他の例では、膜移行ドメインは、好ましくは細菌内で効率的に発現できる、安定して折り畳まれた任意のタンパク質であり得る。膜移行ドメインのいくつかのさらなる例は、ナノボディ足場、DARPin足場、及びCTPRタンパク質である（コンセンサステラトリコペプチドリピート、Acc. Chem. Res. 2021, 54, 4166-4177）。

【0069】

細胞透過性ペプチドモチーフ

細胞透過性ペプチド（CPP）モチーフは、少なくとも2個のアミノ酸、少なくとも3個のアミノ酸、少なくとも4個のアミノ酸、または少なくとも6個のアミノ酸、より具体的には3～8個、3～6個、4～8個、4～6個、または6～8個のアミノ酸を含むことができる。ほとんどの例では、CPPモチーフは、膜移行ドメインに置換され、その結果、得られるペプチドは天然の膜移行ドメインと同じ数のアミノ酸を有する。

【0070】

いくつかの例では、CPPモチーフの少なくとも2、3、4、5、6、または7個のアミノ酸が隣接するアルギニン残基である。好ましい例では、CPPモチーフには3つ、4つ、または5つの隣接するアルギニン残基がある。他の例では、CPPモチーフにおいてアルギニン残基が隣接していない。CPPモチーフ中の各アミノ酸は、独立して天然アミノ酸または非天然アミノ酸であり得る。そのような隣接するアルギニンまたはリジン残基がCPPモチーフである場合、いかなる追加のCPPモチーフ（例えば、疎水性残基を含むもの）も必要ないが、そのような疎水性CPPモチーフは依然として使用され得る。CPPモチーフに2つのアルギニン残基が含まれる場合、2～8個のアミノ酸内に少なくとも2つの疎水性残基を有する別のCPPモチーフが存在することが好ましい。

【0071】

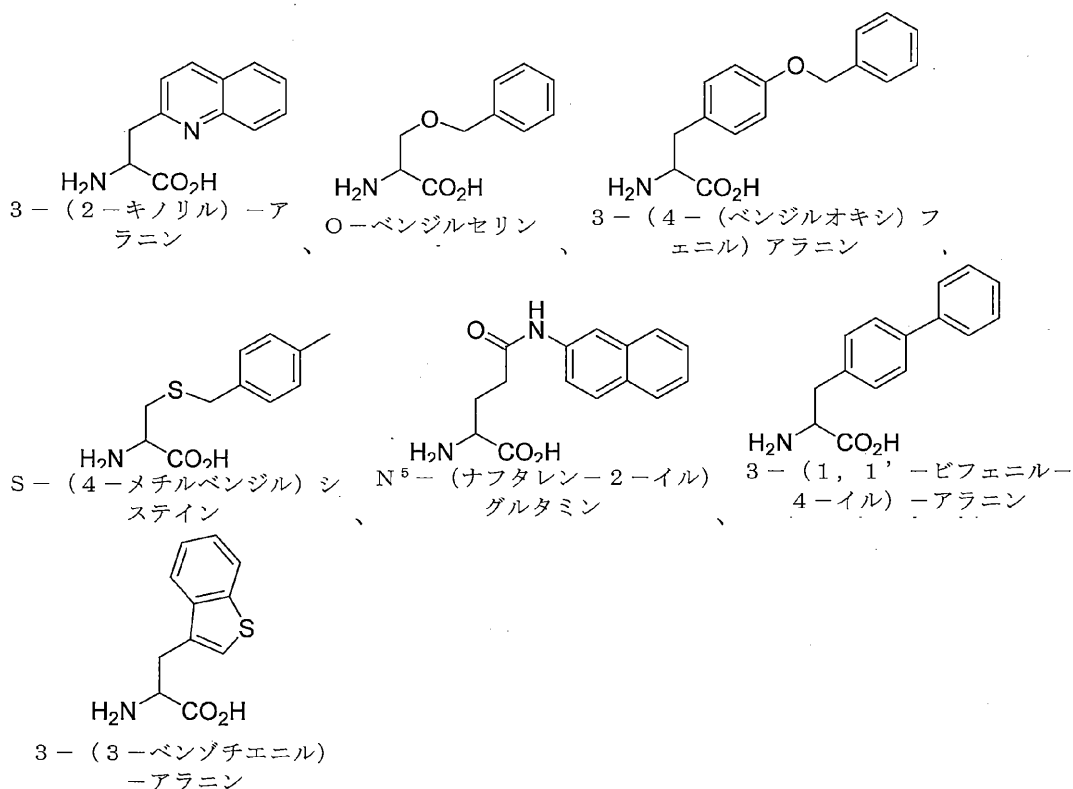
他の例では、CPPモチーフの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、またはそれ以上のアミノ酸が疎水性アミノ酸であり、すなわち疎水性側鎖を有する。いくつかの例では、疎水性側鎖を有するアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、ナフチルアラニン、フェニルグリシン、ホモフェニルアラニン、チロシン、シクロヘキシルアラニン、ピペリジン-2-カルボン酸、シクロヘキシルアラニン、ノルロイシン、3-（3-ベンゾチエニル）-アラニン、3-（2-キノリル）-アラニン、O-ベンジルセリン、3-（4-（ベンジルオキシ）フェニル）-アラニン、S-（4-メチルベンジル）システイン、N-（ナフタレン-2-イル）グルタミン、3-（1,1'-ビフェニル-4-イル）-アラニン、tert-ロイシン、またはニコチノイルリジンから独立して選択され

、それらはそれぞれ、1つ以上の置換基で任意に置換される。特定の例では、疎水性側鎖を有する各アミノ酸は、独立して芳香族側鎖を有するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、芳香族側鎖を有するアミノ酸は、3-ベンゾチエニル-L-アラニン、ナフチルアラニン、フェニルグリシン、ホモフェニルアラニン、フェニルアラニン、トリプトファン、またはチロシンであり、それらはそれぞれ、1つ以上の置換基で任意に置換される。したがって、いくつかの例では、疎水性側鎖を有するアミノ酸は、フェニルアラニン、ナフチルアラニン、トリプトファン、またはそれらの類似体もしくは誘導体である。他の例では、CPPモチーフは、少なくとも1つのフェニルアラニン、フェニルグリシン、またはヒスチジン、またはそれらの類似体もしくは誘導体をさらに含む。

【0072】

10

【化4】



20

30

【0073】

いくつかの例では、CPPモチーフは、少なくとも3つの隣接するアルギニンの任意の組み合わせを含むことができ、少なくとも2つのアミノ酸は、アリールまたはヘテロアリールから選択される疎水性側鎖を有し、ここでアリール及びヘテロアリールは任意に置換され、CPPモチーフ中のアミノ酸の総数は5～約8個のアミノ酸の範囲である。

【0074】

40

いくつかの例では、膜移行ドメインは、BC、DE、CD、及びFGグループを有するヒトフィブロネクチンIII型であり、CPPは、BC、DE、CD、またはFGグループのうちの1つ以上にある。例えば、CPPモチーフは、BC、DE、CD、またはFGグループのうちの2つにある。特定の例では、CPPモチーフは、BC、ならびにDE、CD及びFGグループのいずれかにあり、好ましくはBC及びFGグループにある。

【0075】

2つ以上のCPPモチーフがある場合、1つのCPPモチーフは、少なくとも2つのアルギニン及び／またはリジン残基を有する3～10個のアミノ酸セグメントであってもよく、もう1つは、少なくとも2つの疎水性残基を有する2～8個のアミノ酸セグメントであってもよい。例えば、膜移行ドメインは2つ以上のCPPを有することができ、モチー

50

フのうちの少なくとも1つは2～8個のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも2つの疎水性アミノ酸残基を有する。

【0076】

この一例では、膜移行ドメインは、BC、DE、CD、及びFGループを有するヒトフィブロネクチンIII型であってもよく、CPPモチーフは、BCループ内に存在することができ、2～8個のアミノ酸残基を有し、かつ少なくとも2つの疎水性アミノ酸残基を有し、また、CPPモチーフは、FGループ内に存在することができ、3～10個のアミノ酸残基を有し、かつ少なくとも3つの隣接するアルギニン及び／またはリジン残基を有する。あるいは、CPPモチーフは、FGループ内に存在することができ、2～8個のアミノ酸残基を有し、かつ少なくとも2つの疎水性アミノ酸残基を有し、また、CPPモチーフは、BCループ内に存在することができ、3～10個のアミノ酸残基を有し、かつ少なくとも3つの隣接するアルギニン及び／またはリジン残基を有する。

10

【0077】

CPPモチーフが2～8個のアミノ酸残基を含み、かつ少なくとも2つの疎水性アミノ酸残基を有する場合、それは、WW、FF、WF、FW、WWW、FFF、WFW、FWF、WWF、WFF、FWW、FFW、WYW、WWH、YWW、またはWYHであり得る。このCPPモチーフはBCループ内に存在することが望ましい。このCPPモチーフは、WW、FW、WF、WYW、WWW、WWH、YWW、WYH、またはYWHであることがさらに好ましい。

【0078】

3～10個のアミノ酸残基を有し、かつ少なくとも3つの隣接するアルギニン及び／またはリジン残基を有するCPPモチーフは、RRR、RRRR（配列番号159）、RRRRR（配列番号160）を含むことができる。また、アルギニン残基とリジン残基の任意の組み合わせであってもよい。このCPPモチーフがFGループ内にある場合、Iは、長さが3～10個の残基であり、ArgとLys（及び場合によっては他の非酸性残基）の任意の組み合わせであり得る。CPPモチーフ（例えば、WWWRRRR）（配列番号161）は、Arg／Lys残基のいくつかはFGループからBCループに移動されるように、選択的に分割されてもよく（例えば、WWWRRRR（配列番号161）、WWWRRRRRR（配列番号161）、WWWRRRRRRRR（配列番号161）など）、CPPモチーフ（例えば、WWWRRRR）（配列番号161）は、疎水性残基のいくつかはBCループからFGループに移動されるように、選択的に分割されてもよい（例えば、WWWRRRR、WRRRR、WWWRRRRRR、WWWRRRRRRRRなど）（配列番号161）。CPPモチーフ（例えば、WWWRRRR）は、BCループまたはFGループのいずれかが疎水性残基と正に帯電した残基の組み合わせを含むように、選択的に分割されてもよい（例えば、WWWRRRR、WWWRRRRRR、WWWRRRRRRRR、RRRRRRRRRR、RRRRRRRRRRRRなど）（配列番号161）。

20

30

【0079】

特定の例では、CPPモチーフは、配列番号104、105、11、112、113、114、115、116、または117を含む。

【0080】

いくつかの例では、CPPモチーフは、表2に列挙されている配列のいずれかであるか、またはそれを含むことができる。いくつかの例では、細胞透過性ペプチドは、表2に列挙されている配列のいずれかの逆配列であるか、またはそれを含むことができる。

40

【0081】

50

【表 2】

表 2. CPPモチーフ配列

配列番号	CPP配列	#R残基
配列番号 1	FΦRRR	3
配列番号 2	FΦRRRC	3
配列番号 3	FΦRRRU	3
配列番号 4	RRRΦF	3
配列番号 5	RRRRΦF	4
配列番号 6	FΦRRRR	4
配列番号 7	FφrRrR	3
配列番号 8	FφrRrR	3
配列番号 9	FΦRRRR	4
配列番号 10	fΦRrRr	4
配列番号 11	RRFRΦR	4
配列番号 12	FRRRRΦ	4
配列番号 13	rRFRΦR	4
配列番号 14	RRΦFRR	4
配列番号 15	CRRRRFW	4
配列番号 16	FfΦRrRr	4
配列番号 17	FFΦRRRR	4
配列番号 18	RFRFRΦR	4
配列番号 19	URRRRFW	4
配列番号 20	CRRRRFW	4
配列番号 21	FΦRRRRQK	4
配列番号 22	FΦRRRRQC	4
配列番号 23	fΦRrRrR	5
配列番号 24	FΦRRRRR	5
配列番号 25	RRRRΦFDΩC	4
配列番号 26	FΦRRR	3
配列番号 27	FWRRR	3
配列番号 28	RRRΦF	3
配列番号 29	RRRWF	3
配列番号 30	FΦRRRR	4
配列番号 31	FFRRR	3
配列番号 32	FFrRr	3
配列番号 33	FFRrR	3
配列番号 34	FRFRR	3
配列番号 35	FRRFR	3
配列番号 36	FRRRF	3
配列番号 37	GΦRRR	3
配列番号 38	FFFRA	1
配列番号 39	FFFRR	2
配列番号 40	FFRRRR	4
配列番号 41	FRRFRR	4
配列番号 42	FRRRFR	5
配列番号 43	RFFRRR	4

10

20

30

40

50

配列番号 4 4	R F R R F R	4
配列番号 4 5	F R F R R R	4
配列番号 4 6	F F F R R R	3
配列番号 4 7	F F R R R F	3
配列番号 4 8	F R F F R R	3
配列番号 4 9	R R F F F R	3
配列番号 5 0	F F R F R R	3
配列番号 5 1	F F R R F R	3
配列番号 5 2	F R R F F R	3
配列番号 5 3	F R R F R F	3
配列番号 5 4	F R F R F R	3
配列番号 5 5	R F F R F R	3
配列番号 5 6	G Φ R R R R	4
配列番号 5 7	F F F R R R R	4
配列番号 5 8	R F F R R R R	5
配列番号 5 9	R R F F R R R	5
配列番号 6 0	R F F F R R R	4
配列番号 6 1	R R F F F R R	4
配列番号 6 2	F F R R F R R	4
配列番号 6 3	F F R R R R F	4
配列番号 6 4	F R R F F R R	4
配列番号 6 5	F F F R R R R R	5
配列番号 6 6	F F F R R R R R R	6
配列番号 6 7	F Φ R r R r	4
配列番号 6 8	X X R R R R	4
配列番号 6 9	F f F R r R	3
配列番号 7 0	f F f r R r	2
配列番号 7 1	f F f R r R	3
配列番号 7 2	F f F r R r	3
配列番号 7 3	f F ϕ r R r	3
配列番号 7 4	f Φ f r R r	3
配列番号 7 5	ϕ F f r R r	3
配列番号 7 6	F Φ r R r	3
配列番号 7 7	f Φ r R r	3
配列番号 7 8	A c - L y s - f F R r R r D	4
配列番号 7 9	A c - D a p - f F R r R r D	4
配列番号 8 0	P i p - N a l - A r g - G l u - a r g - a r g - g l u	3
配列番号 8 1	P i p - N a l - A r g - A r g - a r g - a r g - g l u	3
配列番号 8 2	P i p - N a l - N a l - A r g - a r g - a r g - g l u	3
配列番号 8 3	P i p - N a l - N a l - A r g - a r g - a r g - G l u	3
配列番号 8 4	P i p - N a l - P h e - A r g - a r g - a r g - g l u	3
配列番号 8 5	P i p - N a l - P h e - A r g -	3

10

20

30

40

50

	a r g - a r g - G l u	
配列番号 86	P i p - N a l - p h e - A r g - a r g - a r g - g l u	3
配列番号 87	P i p - N a l - p h e - A r g - a r g - a r g - G l u	3
配列番号 88	P i p - N a l - n a l - A r g - a r g - a r g - G l u	3
配列番号 89	P i p - N a l - n a l - A r g - a r g - a r g - g l u	3
配列番号 90	[P - C h a - r - C h a - r - C h a - r - C h a - r - G] ^d	4
配列番号 91	T m (S v P - F ₂ P m p - H) - D a p - (F Φ R R R R - D a p)] ^f	4
配列番号 92	[T m (a - S a r - D - p T h r - P i p - Φ R A a) - D a p - (F Φ R R R R - D a p)] ^f	5
配列番号 93	[C R R S R R G C G R R S R R C G] ^g	8
配列番号 94	[K (D o d) R R R R]	4
配列番号 95	L K K L C K L L K K L C K L A G	0
配列番号 96	R R R R - [K R R R E] ^c	7
配列番号 97	R R R - [K R R R R E] ^c	7
配列番号 98	R R - [K R R R R R E] ^c	7
配列番号 99	R - [K R R R R R R E] ^c	7
配列番号 100	[C R C R C R C R]	4
配列番号 101	[P r a - L R K R L R K F R N - A z K] ^h	
配列番号 102	T - D a p - [D a p - D a p - f - L - D a p - D a p - T]	
配列番号 103	T - A g p - [D a p - A g p - f - L - A g p - A g p - T]	

Φ = L-ナフチルアラニン; φ = D-ナフチルアラニン; Ω = L-ノルロイシン;
r = D-アルギニン; F = L-フェニルアラニン; f = D-フェニルアラニン; q
= D-グルタミン; X = L-4-フルオロフェニルアラニン; D a p = L-2, 3
-ジアミノプロピオン酸; S a r, サルコシン; F₂ P m p, L-ジフルオロホスホ
ノメチルフェニルアラニン; D o d, ドデカノイル; P r a, L-プロパルギルグ
リシン; A z K, L-6-アジド-2-アミノヘキサ酸; A g p, L-2-アミ
ノ-3-グアニジニルプロピオン酸; ^b P i m と N l y s の間の環化; ^e L y s と G
l u の間の環化; ^d アジリジンアルデヒド及びイソシアニドとの多成分反応による大
環状化; ^e G l n 残基の主鎖間の環化; ^f T m で二環化された2つのD a p 残基のN
末端アミン及び側鎖; ^g トリス (プロモメチル) ベンゼンで二環化された3つのC y
s 側鎖; ^h P r a と A z k の間のクリック反応による環化。

【0082】

アミノ酸のキラリティーは、サイトゾル取り込み効率を改善するように選択することができる。いくつかの実施形態では、アミノ酸のうちの少なくとも2つは、反対のキラリティーを有する。いくつかの実施形態では、反対のキラリティーを有する少なくとも2つのアミノ酸は、互いに隣接していてもよい。いくつかの実施形態では、少なくとも3つのアミノ酸は、互いに対して交互の立体化学を有する。いくつかの実施形態では、互いに対して交互のキラリティーを有する少なくとも3つのアミノ酸は、互いに隣接していてもよい。いくつかの実施形態では、アミノ酸のうちの少なくとも2つは同じキラリティーを有する。いくつかの実施形態では、同じキラリティーを有する少なくとも2つのアミノ酸は、互いに隣接していてもよい。いくつかの実施形態では、少なくとも2つのアミノ酸は、同じキラリティーを有し、かつ少なくとも2つのアミノ酸は、反対のキラリティーを有する

。いくつかの実施形態では、反対のキラリティーを有する少なくとも2つのアミノ酸は、同じキラリティーを有する少なくとも2つのアミノ酸に隣接していてもよい。したがって、いくつかの実施形態では、c C P P中の隣接するアミノ酸は、以下の配列のいずれかを有し得る。D-L、L-D、D-L-L-D（配列番号153）、L-D-D-L（配列番号154）、L-D-L-L-D（配列番号155）、D-L-D-D-L（配列番号156）、D-L-L-D-L（配列番号157）、またはL-D-D-L-D（配列番号158）。

【0083】

カーゴ部分

また、本明細書に開示されるペプチドであるが、膜移行ドメインに連結されたカーゴ部分をさらに含むペプチドも記載される。カーゴ部分は、膜移行ドメイン内のアミノ基（例えば、N末端）、カルボキシレート基（例えば、C末端）、または1つ以上のアミノ酸の側鎖に連結することができる。

【0084】

カーゴ部分が膜移行ドメイン内のアミノ酸の側鎖に結合される場合、膜移行ドメインは、カーゴと共有結合（コンジュゲーション）を形成するための適切な官能基を有する側鎖、またはカーゴと共有結合を形成する適切な官能基を提供するように修飾され得る（例えば、リンカーのコンジュゲーションを介して）側鎖を有するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、カーゴのコンジュゲーションに適した側鎖を有する膜移行ドメイン上のアミノ酸は、システイン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、リジン残基、または2,3-ジアミノプロピオン酸残基である。そのような実施形態では、カーゴはアミノ酸の側鎖に直接コンジュゲートされてもよく（例えば、システイン残基とのジスルフィド結合、またはグルタミン酸残基もしくは2,3-ジアミノプロピオン酸残基とのアミド結合を形成することによって）、または、カーゴはリンカー（例えば、PEG）を介してアミノ酸側鎖にコンジュゲートされてもよい。

【0085】

カーゴ部分は、目的の任意のカーゴ、例えばリンカー部分、検出可能な部分、治療用部分、標的化部分など、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。いくつかの例では、カーゴ部分は、1つ以上の追加のアミノ酸（例えば、K、UK、TRV）、リンカー（例えば、二官能性リンカーLC-SMCC）、補酵素A、ホスホクマリンアミノプロピオン酸（pCAP）、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（miniPEG）、L-2,3-ジアミノプロピオン酸（DapまたはJ）、L-β-ナフチルアラニン、L-ピペコリン酸（Pip）、サルコシン、トリメチン酸、7-アミノ-4-メチルクマリン（Amc）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、L-2-ナフチルアラニン、ノルロイシン、2-アミノ酪酸、ローダミンB（Rhod）、デキサメタゾン（DEX）、またはそれらの組み合わせを含むことができる。

【0086】

検出可能な部分

検出可能な部分は、任意の検出可能な標識を含むことができる。適切な検出可能な標識の例としては、UV-Vis標識、近赤外標識、発光基、リン光基、磁気スピン共鳴標識、光増感剤、光開裂性部分、キレート中心、重原子、放射性同位体、同位体検出可能なスピン共鳴標識、常磁性部分、発色団、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、標識は、さらなる試薬を添加することなく検出可能である。

【0087】

いくつかの実施形態では、検出可能な部分は生体適合性の検出可能な部分であり、その結果、化合物は、様々な生物学的用途での使用に適し得る。本明細書で使用される場合、「生体適合性」及び「生物学的に適合する」とは、一般に、化合物が、その任意の代謝産物または分解産物とともに、細胞及び組織に対して一般に無毒であり、細胞及び組織がそれらの存在下でインキュベート（例えば、培養）される場合に、細胞及び組織に対してい

10

20

30

40

50

かなる重大な悪影響も及ぼさないことを指す。

【0088】

検出可能な部分は、蛍光標識または近赤外標識などの発光団を含むことができる。適切な発光団の例としては、金属ポルフィリン；ベンゾポルフィリン；アザベンゾポルフィリン；ナフトポルフィリン；フタロシアニン；ペリレン、ペリレンジイミン、ピレンなどの多環芳香族炭化水素；アゾ染料；キサンテン染料；ホウ素ジピロメテン、アザーホウ素ジピロメテン、シアニン染料、ビピリジンなどの金属-配位子錯体、ビピリジル、フェナントロリン、クマリン、ルテニウム及びイリジウムのアセチルアセトネート；アクリジン、ベンゾフェノキサジンなどのオキサジン誘導体；アザーアヌレン、スクアライン；8-ヒドロキシキノリン、ポリメチン、量子ドットなどの発光性ナノ粒子、ナノ結晶；カルボスチリル；テルビウム錯体；無機蛍光体；クラウンエーテル関連または誘導体化染料などのイオノフォア；またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。適切な発光団の具体的な例としては、Pd(II)オクタエチルポルフィリン、Pt(II)-オクタエチルポルフィリン、Pd(II)テトラフェニルポルフィリン、Pt(II)テトラフェニルポルフィリン、Pd(II)メソ-テトラフェニルポルフィリンテトラベンゾポルフィン、Pt(II)メソ-テトラフェニルメチルベンゾポルフィリン、Pd(II)オクタエチルポルフィリンケトン、Pt(II)オクタエチルポルフィリンケトン、Pd(II)メソ-テトラ(ペンタフルオロフェニル)ポルフィリン、Pt(II)メソ-テトラ(ペンタフルオロフェニル)ポルフィリン、Ru(II)トリス(4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン)(Ru(dpp)₃)、Ru(II)トリス(1,10-フェナントロリン)(Ru(phen)₃)、トリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II)塩化物六水和物(Ru(bpy)₃)、エリスロシンB、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、エオシン、イリジウム(III)((N-メチル-ベンズイミダゾール-2-イル)-7-(ジエチルアミノ)-クマリン)、インジウム(III)((ベンゾチアゾール-2-イル)-7-(ジエチルアミノ)-クマリン)-2-(アセチルアセトネート)、ルモゲン染料、マクロレックス蛍光レッド、マクロレックス蛍光イエロー、テキサスレッド、ローダミンB、ローダミン6G、硫黄ローダミン、m-クレゾール、チモールブルー、キシレノールブルー、クレゾールレッド、クロロフェノールブルー、プロモクレゾールグリーン、プロモクレゾールレッド、プロモチモールブルー、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7、4-ニチロフェノール、アリザリン、フェノールフタレイン、o-クレゾールフタレイン、クロロフェノールレッド、カルマナイト、プロモ-キシレノール、フェノールレッド、ニュートラルレッド、ニトラジン、3,4,5,6-テトラプロモフェノールフタレイン、コンゴレッド、フルオレセイン、エオシン、2',7'-ジクロロフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、カルボキシナフトフルオレセイン、8-ヒドロキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸、セミナフトロダフルオール、セミナフトフルオレセイン、トリス(4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン)ルテニウム(II)ジクロリド、(4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン)ルテニウム(II)テトラフェニルボロン、白金(II)オクタエチルポルフィリン、ジアルキルカルボシアニン、ジオクタデシルシクロキサカルボシアニン、フルオレニルメチルオキシカルボニルクロリド、7-アミノ-4-メチルクマリン(Amc)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、及びそれらの誘導体または組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0089】

いくつかの例では、検出可能な部分は、ローダミンB(Rho)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、7-アミノ-4-メチルクマリン(Amc)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、ナフトフルオレセイン(NF)、またはそれらの誘導体もしくは組み合わせを含むことができる。

【0090】

検出可能な部分は、細胞透過性ペプチド部分の任意のアミノ酸のアミノ基、カルボキシル基、または側鎖(例えば、CPP中の任意のアミノ酸のアミノ基、カルボキシル

10

20

30

40

50

ト基、または側鎖)で細胞透過性ペプチド部分に結合することができる。

【0091】

治療用部分

開示された化合物はまた、治療用部分を含むことができる。いくつかの例では、カーゴ部分は治療用部分を含む。検出可能な部分は治療用部分に連結されてもよく、または検出可能な部分は治療用部分としても機能することができる。治療用部分とは、対象に投与されると、疾患または障害の1つ以上の症状を軽減する基を指す。

【0092】

治療用部分は、拮抗薬、例えば酵素阻害剤、及び作動薬、例えば、所望の遺伝子産物の発現を増加させる転写因子(ただし、当業者には理解されるように、拮抗性転写因子も使用可能である)を含めて、様々な薬剤を含むことができる。さらに、治療用部分には、体内の健康な細胞及び／または不健康な細胞に対して直接毒性を及ぼすことが可能であり、及び／または毒性を誘発することが可能な薬剤が含まれる。また、治療用部分は、潜在的な病原体に対して免疫系を誘導及び／またはプライミングすることができる。

【0093】

治療用部分は、例えば、抗癌剤、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、麻酔剤、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

【0094】

いくつかの例では、治療用部分は、腫瘍抑制剤、小分子またはペプチドベースの阻害剤、細胞内酵素補充療法用の酵素、オリゴヌクレオチドであり得る。

【0095】

治療用部分は、抗癌剤を含むことができる。例示的な抗癌剤としては、13-シス-レチノイン酸、2-アミノ-6-メルカプトプリン、2-CdA、2-クロロデオキシアデノシン、5-フルオロウラシル、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アキュテイン、アクチノマイシン-D、アドリアマイシン、アドルシル、アグリリン、アラ-コート、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アルカバン(Alkaban)-AQ、アルケラン、オールートランスレチノイン酸、アルファインターフェロン、アルトレタミン、アメトプテリン、アミフォスチン、アミノグルテチミド、アナグレリド、アナンドロン、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、アラネスプ、アレディア、アリミデックス、アロマシン、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、ATRA、アバスチン、BCG、BCNU、ベバシズマブ、ベキサロテン、ビカルタミド、BiCNU、ブレノキサシン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、ブスルフェクス、C225、ロイコボリンカルシウム、カンパス、カンプトサル、カンプトテシン-11、カペシタビン、カラック(Carac)、カルボプラチン、カルムスチン、カルムスチンウェハー、カソデックス、CCNU、CDDP、CeeNU、セルビジン、セツキシマブ、クロラムブシル、シスプラチン、シトロバラム因子、クラドリビン、コルチゾン、コスメゲン、CPT-11、シクロホスファミド、シタドレン、シタラビン、シタラビンリポソーム、サイトサルU、サイトキサン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、ダウノマイシン、ダウノルビシン、ダウノルビシン塩酸塩、ダウノルビシンリポソーム、ダウノキソーム、デカドロン、デルター-コルテフ、デルタゾン、デニロイキンジフチトクス、デポサイト、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、デキサゾン、デクスラゾキサシン、DHAD、DIC、ジオデックス、ドセタキセル、ドキシル、ドキソルビシン、ドキソルビシンリポソーム、ドロキシア、DTIC、DTIC-ドーム、デュラロン、エフデックス、エリガード、エレンス、エロキサチン、エルスパ-、エムサイト、エピルビシン、エポエチンアルファ、エルビタックス、エルウィニア-アスパラギナーゼ、エストラムスチン、エチオール、エトポホス、エトポシド、リン酸エトポシド、ユーレキシン、エビスタ、エキセメスタン、ファレストン、ファスロデックス、フェマーラ、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラ、フルダラビン、フルオロプレックス、フルオロウラシル、フルオロウラシル(クリーム)、フルオキシメステロン、フルタミド、フォリン酸、FUDR、フルベストラント、G-CSF、ゲフィチ

ニブ、ゲムシタビン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ジェムザール、グリベック、リユープリン、リユープリンデボ、マチュレーン、マキシデックス、メクロレタミン、－メクロレタミン塩酸塩、メドラロン、メドロール、メガス、メゲストロール、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メスネックス、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、メチルブレドニゾロン、ミロセル、レトロゾール、ネオサル、ニューラスト、ニューメガ、ニューボジェン、ニランドロン、ニルタミド、ナイトロジェンマスタード、ノバルデックス、ノバントロン、オクトレオチド、酢酸オクトレオチド、オンキャスパ、オンコビン、オンタック、オンキサル（Onxal）、オプレベルキン（Oprevekin）、オラブレド（Orapred）、オラゾン（Orasone）、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、パンレチン（Panretin）、パラプラチン、ペディアブレド（Pediapred）、PEGインターフェロン、ペグアスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、PEG－イントロン、PEG－ルーアスパラギナーゼ、フェニルアラニンマスタード、プラチノール、プラチノール－AQ、ブレドニゾロン、ブレドニゾン、プレロン、プロカルバジン、プロクリット（PROCRIT）、プロロイキン、カルムスチンインプラント付きプロライフプロスパン（Prolifeprospan）20、プリネソール（Purinethol）、ラロキシフェン、リウマトレックス、リツキサン、リツキシマブ、ロベロン（Roveron）－A（インターフェロンアルファ－2a）、ルベックス、ルビドマイシン塩酸塩、サンドスタチン、サンドスタチンLAR、サルグラモスチム、ソルコート、ソルメドロール、STE－571、ストレプトゾシン、タモキシフェン、タルグレチン、タキソール、タキソテル、テモダール、テモゾロミド、テニポシド、TESPA、サリドマイド、タロミド、セラシス（TheraCys）、チオグアニン、チオグアニンタブロイド、チオホスホアミド、チオプレックス、チオテパ、TICE、トポサル、トポテカン、トレミフェン、トラスツズマブ、トレチノイン、トレキソール（Trexall）、トリセノックス、TSPA、VCR、ベルバン、ベルケイド、ベプシド、ベサノイド、ビアデュル（Viadur）、ビンブラスチン、ビンブラスチン硫酸塩、ビンカサルPfs（VincasarPfs）、ピンクリスチン、ビノレルビン、ビノレルビン酒石酸塩、VLB、VP－16、ブモン（Vumon）、ゼローダ、ザノサー、ゼバリン、ジンカード、ゾラデックス、ゾレドロン酸、ゾメタ、グリアデルウェハー、グリベック、GM－CSF、ゴセレリン、顆粒球コロニー刺激因子、ハロテスト、ハーセプチン、ヘキサドロール、ヘキサレン、ヘキサメチルメラミン、HMM、ハイカムチン、ハイドレア、酢酸ハイドロコート、ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、リン酸ハイドロコートン、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、イダマイシン、イダルビシン、イフェックス、IFN－アルファ、イホスファミド、IL2、IL－11、イマチニブメシル酸塩、イミダゾールカルボキサミド、インターフェロンアルファ、インターフェロンアルファ－2b（PEGコンジュゲート）、インターロイキン2、インターロイキン－11、イントロンA（インターフェロンアルファ－2b）、ロイコボリン、リユーケラン、ロイキン、ロイプロリド、ロイロクリスチン、ロイスタチン、リボソームAra－C、液状ブレド、ロムスチン、L－PAM、L－サルコリシン、メチコルテン、マイトマイシン、マイトマイシン－C、ミトキサントロン、M－ブレドニゾール、MTC、MTX、マスタゲン、ムスチン、ムタマイシン、マイレラン、イレッサ、イリノテカン、イソトレチノイン、キドロラーゼ、ラナコート、L－アスパラギナーゼ、及びLCRが挙げられる。治療用部分はまた、例えば抗体などのバイオ医薬品を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0096】

いくつかの例では、治療用部分は、ガンシクロビル、アジドチミジン（AZT）、ラミブジン（3TC）などの抗ウイルス剤を含むことができる。

【0097】

いくつかの例では、治療用部分は、抗菌剤、例えば、アセダプソン、アセトスルホンナトリウム、アラメシン、アレキシジン、アムジノシリン、アムジノシリンピボキシル、ア

ミシクリン、アミフロキサシン、アミフロキサシンメシル酸塩、アミカシン、アミカシン硫酸塩、アミノサリチル酸、アミノサリチル酸ナトリウム、アモキシシリン、アンホマイシン、アンピシリン、アンピシリンナトリウム、アパルシリンナトリウム、アブラマイシン、アスパルトシン、アストロマイシン硫酸塩、アピラマイシン、アボパルシン、アジスロマイシン、アズロシリン、アズロシリンナトリウム、バカンピシリン塩酸塩、バシトラシン、バシトラシンメチレンジサリチル酸塩、バシトラシン亜鉛、バンベルマイシン、ベンゾイルパスカルシウム、ベリスロマイシン、ベタマイシン硫酸塩、ビアペネム、ビニラマイシン、塩酸ビフェナミン、ビスピリチオンマグスルフェクス、ブチカシン、ブチロシン硫酸塩、硫酸カプレオマイシン、カルバドックス、カルベニシリン二ナトリウム、カルベニシリンインダニルナトリウム、カルベニシリンフェニルナトリウム、カルベニシリンカリウム、カルモナムナトリウム、セファクロル、セファドロキシル、セファマンドール、セファマンドールナファト、セファマンドールナトリウム、セファパロール、セファトリジン、セファザフルールナトリウム、セファゾリン、セファゾリンナトリウム、セフペラゾン、セフジニル、セフェピム、セフェピム塩酸塩、セフェテコール、セフィキシム、セフメノキシム塩酸塩、セフメタゾール、セフメタゾールナトリウム、セフォニシドナトリウム、セフォニシドナトリウム、セフォペラゾンナトリウム、セフォラニド、セフォタキシムナトリウム、セフォテタン、セフォテタン二ナトリウム、セフォチアム塩酸塩、セフォキシチン、セフォキシチンナトリウム、セフピミゾール、セフピミゾールナトリウム、セフピラミド、セフピラミドナトリウム、セフピロム硫酸塩、セフポドキシムプロキセチル、セフプロジル、セフロキサジン、セフスロジンナトリウム、セフトラジウム、セフチブテン、セフチゾキシムナトリウム、セフトリアキソンナトリウム、セフロキシム、セフロキシムアキセチル、セフロキシムピボキセチル、セフロキシムナトリウム、セファセトリルナトリウム、セファレキシン、塩酸セファレキシン、セファログリシン、セファロリジン、セファロチンナトリウム、セファピリンナトリウム、セフラジン、セトシクリン塩酸塩、セトフェニコール、クロラムフェニコール、パルミチン酸クロラムフェニコール、パントテン酸クロラムフェニコール複合体、コハク酸クロラムフェニコールナトリウム、ホスファニル酸クロルヘキシジン、クロロキシレノール、重硫酸クロルテトラサイクリン、塩酸クロルテトラサイクリン、シノキサシン、シプロフロキサシン、塩酸シプロフロキサシン、シロレマイシン、クラリスロマイシン、クリナフロキサシン塩酸塩、クリンダマイシン、塩酸クリンダマイシン、塩酸クリンダマイシン、パルミチン酸クリンダマイシン塩酸塩、リン酸クリンダマイシン、クロファジミン、クロキサシリンベンザチン、クロキサシリンナトリウム、クロキシキン、コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム、コリスチン硫酸塩、クメルマイシン、クメルマイシンナトリウム、シクラシリン、サイクロセリン、ダルホブリスチン、ダブソン、ダプトマイシン、デメクロサイクリン、デメクロサイクリン塩酸塩、デメサイクリン、デノフンギン、ジアベリジン、ジクロキサシリン、ジクロキサシリンナトリウム、硫酸ジヒドロストレプトマイシン、ジピリチオン、ジリスロマイシン、ドキシサイクリン、ドキシサイクリンカルシウム、ドキシサイクリンホスファテックス、ドキシサイクリン水和物、ドロキサシンナトリウム、エノキサシン、エピシリン、エピテトラサイクリン塩酸塩、エリスロマイシン、エリスロマイシンアシストラート、エリスロマイシンエストレート、エリスロマイシンエチルコハク酸塩、エリスロマイシングルセブタート、エリスロマイシンラクトビオン酸塩、エリスロマイシンプロピオン酸塩、エリスロマイシンステアリン酸塩、エタンブトール塩酸塩、エチオナミド、フレロキサシン、フロキサシリン、フルダラニン、フルメキン、ホスホマイシン、ホスホマイシントロメタミン、フモキシシリン、塩化フラゾリウム、酒石酸フラゾリウム、フシジン酸ナトリウム、フシジン酸、ゲンタマイシン硫酸塩、グロキシモナム、グラミシジン、ハロプロジン、ヘタシリン、ヘタシリンカリウム、ヘキセジン、イバフロキサシン、イミペネム、イソコナゾール、イセパマイシン、イソニアジド、ジョサマイシン、カナマイシン硫酸塩、キタサマイシン、レボフラルタドン、レボプロピルシリンカリウム、レキシスロマイシン、リンコマイシン、リンコマイシン塩酸塩、ロメフロキサシン、ロメフロキサシン塩酸塩、メシル酸ロメフロキサシン、ロラカルベフ、マフェニド、メクロサイクリン、メク

10

20

30

40

50

ロサイクリンスルホサリチル酸塩、メガロマイシンリン酸カリウム、メキドクス、メロペネム、メタサイクリン、塩酸メタサイクリン、メテナミン、ヒプル酸メテナミン、メテナミンマンデル酸塩、メチシリンナトリウム、メチオプリム、メトロニダゾール塩酸塩、リン酸メトロニダゾール、メズロシリン、メズロシリンナトリウム、ミノサイクリン、ミノサイクリン塩酸塩、ミリンカマイシン塩酸塩、モネンシン、モネンシンナトリウム、ナフシリンナトリウム、ナリジクス酸ナトリウム、ナリジクス酸、ナタイナイン、ネブラマイシン、パルミチン酸ネオマイシン、ネオマイシン硫酸塩、ウンデシレン酸ネオマイシン、ネチルマイシン硫酸塩、ノイトラマイシン、ニフィラデン、ニフルデゾン、ニフラテル、ニフラトロン、ニフルダジル、ニフリミド、ニフィウピリノル (n i f i u p i r i n o l)、ニフルキナゾール、ニフルチアゾール、ニトロシクリン、ニトロフラントイン、ニトロミド、ノルフロキサシン、ノボピオシンナトリウム、オフロキサシン、オンネトプリム、オキサシリン、オキサシリンナトリウム、オキシモナム、オキシモナムナトリウム、オキシソリン酸、オキシテトラサイクリン、オキシテトラサイクリンカルシウム、オキシテトラサイクリン塩酸塩、パルジマイシン、パラクロロフェノール、パウロマイシン、ペフロキサシン、メシル酸ペフロキサシン、ペナメシリン、ペニシリンGベンザチン、ペニシリンGカリウム、ペニシリンGプロカイン、ペニシリンGナトリウム、ペニシリンV、ペニシリンVベンザチン、ペニシリンVヒドラバミン、ペニシリンVカリウム、ペンチジドンナトリウム、アミノサリチル酸フェニル、ピペラシリンナトリウム、ピルベニシリンナトリウム、ピリジシリンナトリウム、ピルリマイシン塩酸塩、ピバンピシリン塩酸塩、ピバンピシリンパモ酸塩、ピバンピシリンプロベネート、ポリミキシンB硫酸塩、ポルフィロマイシン、プロピカシン、ピラジナミド、ピリチオン亜鉛、酢酸キンデカミン、キヌプリスチン、ラセフェニコール、ラモブラニン、ラニマイシン、レロマイシン、レプロマイシン、リファブチン、リファメタン、リファメキシル、リファミド、リファンピン、リファペンチン、リファキシミン、ロリテトラサイクリン、硝酸ロリテトラサイクリン、ロサラミシン、ロサラミシンブチラート、ロサミシンプロピオナート、ロサラミシンリン酸ナトリウム、ロサラミシンステアラート、ロソキサシン、ロキササルソン、ロキシスロマイシン、サンサイクリン、サンフェトリネムナトリウム、サルモキシシリン、サルピシリン、スコパフンギン、シソマイシン、シソマイシン硫酸塩、スパルフロキサシン、スペクチノマイシン塩酸塩、スピラマイシン、スタリマイシン塩酸塩、ステフィマイシン、ストレプトマイシン硫酸塩、ストレプトニコジド、スルファベンズ、スルファベンズアミド、スルファセタミド、スルファセタミドナトリウム、スルファシチン、スルファジアジン、スルファジアジンナトリウム、スルファドキシム、スルファレン、スルファメラジン、スルファメータ、スルファメタジン、スルファメチゾール、スルファメトキサゾール、スルファモノメトキシム、スルファモキソール、スルファニラート亜鉛、スルファニトラン、スルファサラジン、スルファソミゾール、スルファチアゾール、スルファザメト、スルフィソキサゾール、アセチルスルフィソキサゾール、スルフィソキサゾールジオラミン、スルホミキシン、スロペネム、スルタミシリン、サンシリンナトリウム、タランピシリン塩酸塩、テイコブラニン、テマフロキサシン塩酸塩、テモシリン、テトラサイクリン、テトラサイクリン塩酸塩、テトラサイクリンリン酸複合体、テトロキソプリム、チアンフェニコール、チフェンシリンカリウム、チカルシリンクレシルナトリウム、チカルシリンニナトリウム、チカルシリンナトリウム、チクラトン、塩化チオドニウム、トブラマイシン、硫酸トブラマイシン、トスフロキサシン、トリメトプリム、硫酸トリメトプリム、トリスルファピリミジン、トロレアンドマイシン、トロスペクトマイシン硫酸塩、チロトリシン、バンコマイシン、バンコマイシン塩酸塩、バージニアマイシン、またはゾルバマイシンを含むことができる。

10

20

30

40

50

【0098】

いくつかの例では、治療用部分は抗炎症剤を含むことができる。

【0099】

いくつかの例では、治療用部分はデキサメタゾン (D e x) を含むことができる。

【0100】

他の例では、治療用部分は治療用タンパク質を含む。このタンパク質は、MTDのN末端またはC末端に遺伝的に融合されてもよい。非天然アミノ酸を含む合成ペプチドも、側鎖、例えば、MTDのC末端における固有のシステインに化学的にコンジュゲートされてもよい。本明細書では、開示された細胞透過性ペプチドモチーフまたはMTDの1つにそのような酵素／タンパク質を連結することによって、酵素／タンパク質をヒト細胞に送達することが開示される。開示された細胞透過性ペプチドモチーフは、タンパク質（例えば、GFP、PTP1B、アクチン、カルモジュリン、トロポニンC）を用いて試験され、機能することが示されている。

【0101】

標的化部分

いくつかの例では、治療用部分は標的化部分を含む。標的化部分は、例えば、1つ以上の酵素ドメインを標的とすることができる一連のアミノ酸を含むことができる。いくつかの例では、標的化部分は、癌、嚢胞性線維症、糖尿病、肥満、またはそれらの組み合わせなどの疾患において役割を果たすことができる酵素に対する阻害剤を含むことができる。例えば、標的化部分は、表3に列挙されている配列のいずれかを含むことができる。

【0102】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. 例示的な標的化部分

略語*	配列	配列番号
PΘGΛYR	Pro-Pip-Gly-F ₂ Pmp-Tyr-Arg	162
SΘIΛAR	Ser-Pip-Ile-F ₂ Pmp-F ₂ Pmp-Arg	163
IHIΛIR	Ile-His-Ile-F ₂ Pmp-Ile-Arg	164
AaIΛΘR	Ala-(D-Ala)-Ile-F ₂ Pmp-Pip-Arg	165
ΣSΘΛvR	Fpa-Ser-Pip-F ₂ Pmp-(D-Val)-Arg	166
ΘnPΛAR	Pip-(D-Asn)-Pro-F ₂ Pmp-Ala-Arg	167
TΨAΛGR	Tyr-Phg-Ala-F ₂ Pmp-Gly-Arg	168
AHIΛaR	Ala-His-Ile-F ₂ Pmp-(D-Ala)-Arg	169
GnGΛpR	Gly-(D-Asn)-Gly-F ₂ Pmp-(D-Pro)-Arg	170
fQΘΛIR	(D-Phe)-Gln-Pip-F ₂ Pmp-Ile-Arg	171
SPGΛHR	Ser-Pro-Gly-F ₂ Pmp-His-Arg	172
ΘYIΛHR	Pip-Tyr-Ile-F ₂ Pmp-His-Arg	173
SvPΛHR	Ser-(D-Val)-Pro-F ₂ Pmp-His-Arg	174
AIPΛnR	Ala-Ile-Pro-F ₂ Pmp-(D-Asn)-Arg	175
ΣSIΛQF	Fpa-Ser-Ile-F ₂ Pmp-Gln-Arg	176
AaΨΛfR	Ala-(D-Ala)-Phg-F ₂ Pmp-(D-Phe)-Arg	177
ntΨΛΨR	(D-Asn)-(D-Thr)-Phg-F ₂ Pmp-Phg-Arg	178
IPΨΛQR	Ile-Pro-Phg-F ₂ Pmp-Nle-Arg	179
QΘΣΛΘR	Gln-Pip-Fpa-F ₂ Pmp-Pip-Arg	180
nAΣΛGR	(D-Asn)-Ala-Fpa-F ₂ Pmp-Gly-Arg	181
ntYΛAR	(D-Asn)-(D-Thr)-Tyr-F ₂ Pmp-Ala-Arg	182
eAΨΛvR	(D-Glu)-Ala-Phg-F ₂ Pmp-(D-Val)-Arg	183
IvΨΛAR	Ile-(D-Val)-Phg-F ₂ Pmp-Ala-Arg	184

10

20

30

40

50

略語*	配列	配列番号
YtΨΛAR	Tyr-(D-Thr)-Phg-F ₂ Pmp-Ala-Arg	185
nΘΨΛIR	(D-Asn)-Pip-Phg-F ₂ Pmp-Ile-Arg	186
ΘnWΛHR	Pip-(D-Asn)-Trp-F ₂ Pmp-His-Arg	187
YΘvΛIR	Tyr-Pip-(D-Val)-F ₂ Pmp-Ile-Arg	188
nSΛAGR	(D-Asn)-Ser-(D-Ala)-F ₂ Pmp-Gly-Arg	189
tnvΛaR	(D-Thr)-(D-Asn)-(D-Val)-F ₂ Pmp-(D-Ala)-Arg	190
ntvΛtR	(D-Asn)-(D-Thr)-(D-Val)-F ₂ Pmp-(D-Thr)-Arg	191
SI tAYR	Ser-Ile-(D-Thr)-F ₂ Pmp-Tyr-Arg	192
nΣnΛIR	(D-Asn)-Fpa-(D-Asn)-F ₂ Pmp-(D-Leu)-Arg	193
YnnΛQR	Tyr-(D-Asn)-(D-Asn)-F ₂ Pmp-Nle-Arg	194
nYnAGR	(D-Asn)-Tyr-(D-Asn)-F ₂ Pmp-Gly-Arg	195
AWnΛAR	Ala-Trp-(D-Asn)-F ₂ Pmp-Ala-Arg	196
vtHAYR	(D-Val)-(D-Thr)-His-F ₂ Pmp-Tyr-Arg	197
PΨHAΘR	Pro-Phg-His-F ₂ Pmp-Pip-Arg	198
nΨHAGR	(D-Asn)-Phg-His-F ₂ Pmp-Gly-Arg	199
PAHAGR	Pro-Ala-His-F ₂ Pmp-Gly-Arg	200
AYHAIR	Ala-Tyr-His-F ₂ Pmp-Ile-Arg	201
nΘeAYR	(D-Asn)-Pip-(D-Glu)-F ₂ Pmp-Tyr-Arg	202
vSSAtR	(D-Val)-Ser-Ser-F ₂ Pmp-(D-Thr)-Arg	203
aΞt' θΦ' YNK	((D-Ala)-Sar-(D-pThr)-Pp-Nal-Tyr-Gln)-Lys	204
Tm(aΞt' θΦ' RA) Dap	Tm((D-Ala)-Sar-(D-pThr)-Pp-Nal-Arg-Ala)-Dap	205
Tm(aΞt' θΦ' RAa) Dap	Tm((D-Ala)-Sar-(D-pThr)-Pp-Nal-Arg-Ala-(D-Ala))-Dap	206
Tm(aΞtθΦ' R	Tm((D-Ala)-Sar-(D-Th	207

10

20

30

40

50

略語*	配列	配列番号
Aa) Dap	r) - Pp - Na1 - Arg - Ala - (D - Ala) - Dap	
Tm (a E t a Φ' R Aa) Dap	Tm ((D - Ala) - Sar - (D - Thr) - (D - Ala) - Na1 - Arg - Ala - (D - Ala)) - Dap	208

* Fpa、Σ：L-4-フルオロフェニルアラニン；Pip、Θ：L-ホモプロリン；Nle、Ω：L-ノルロイシン；Phg、Ψ：L-フェニルグリシン；F₂Pmp、Λ：L-4-(ホスホノジフルオロメチル)フェニルアラニン；Dap、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸；Na1、Φ'：L-β-ナフチルアラニン；Pp、θ：L-ピペコリン酸；Sar、E：サルコシン；Tm、トリメシ酸。

10

【0103】

標的化部分及び細胞透過性ペプチド部分は重なり合うことができる。すなわち、細胞透過性ペプチド部分を形成する残基は、標的化部分を形成する配列の一部でもある可能性があり、その逆も同様である。

【0104】

治療用部分は、細胞透過性ペプチド部分の任意のアミノ酸のアミノ基、カルボキシレート基、または側鎖（例えば、C P Pの任意のアミノ酸のアミノ基、カルボキシレート基、または側鎖）で細胞透過性ペプチド部分に結合することができる。いくつかの例では、治療用部分は検出可能な部分に結合することができる。

20

【0105】

いくつかの例では、治療用部分は、Ras（例えば、K-Ras）、PTP1B、Pin1、Grb2 SH2、CAL PDZなど、またはそれらの組み合わせに対する阻害剤として作用することができる標的化部分を含むことができる。

【0106】

Rasは、ヒトにおいてRAS遺伝子によってコードされるタンパク質である。正常なRasタンパク質は、正常な組織シグナル伝達において重要な機能を果たし、Ras遺伝子の変異は多くの癌の発生に関与する。Rasは分子のオン／オフスイッチとして機能することができる。いったんオンになると、Rasは、成長因子及び他の受容体のシグナルの伝播に必要なタンパク質を動員して活性化する。Rasの変異型は、肺癌、結腸癌、膵臓癌、及び様々な白血病を含む様々な癌に関与している。

30

【0107】

タンパク質チロシンホスファターゼ1B（PTP1B）は、PTPスーパーファミリーの典型的なメンバーであり、真核細胞のシグナル伝達において様々な役割を果たす。PTP1Bはインスリンシグナル伝達経路の負の調節因子であり、特に2型糖尿病の治療のための有望な潜在的治療標的であると考えられている。PIP1Bは乳癌の発生にも関与している。

【0108】

Pin1は、タンパク質のサブセットに結合し、タンパク質機能の調節においてリン酸化後制御としての役割を果たす酵素である。Pin1活性はプロリン指向性キナーゼシグナル伝達の結果を調節することができ、その結果として細胞増殖及び細胞生存を調節することができる。Pin1の調節解除は、様々な疾患において役割を果たすことができる。Pin1のアップレギュレーションは特定の癌に関与している可能性があり、Pin1のダウンレギュレーションはアルツハイマー病に関与している可能性がある。Pin1の阻害剤は、癌及び免疫疾患の治療に対して治療的意義を有し得る。

40

【0109】

Grb2は、シグナル伝達及び細胞情報伝達に関与するアダプタータンパク質である。Grb2タンパク質は、チロシンリン酸化配列に結合することができる1つのSH2ドメインを含む。Grb2は広く発現しており、複数の細胞機能に不可欠である。Grb2機

50

能の阻害は、発達過程を損なうことができ、様々な細胞型の形質転換及び増殖を阻止することができる。

【0110】

最近、嚢胞性線維症（CF）患者で変異した塩化物イオンチャネルタンパク質である嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）の活性は、CFTR関連リガンド（CAL）によってそのPDZドメイン（CAL-PDZ）を介して負に調節されることが報告された（Wolde, M et al. J. Biol. Chem. 2007, 282, 8099）。CFTR/CAL-PDZ相互作用の阻害は、CFTR変異の最も一般的な形態である Δ Phe508-CFTRの活性を、そのプロテアソーム媒介性分解を低減することによって（Cushing, P et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9907）改善することが示された（Cheng, S et al. Cell 1990, 63, 827、Kerem, B et al. Science 1989, 245, 1073）。したがって、本明細書では、有効量の本明細書に開示される化合物または組成物を投与することによって嚢胞性線維症を患う対象を治療する方法が開示される。対象に投与される化合物または組成物は、CAL-PDZに対する阻害剤として作用することができる標的化部分を含むことができる治療用部分を含むことができる。

10

【0111】

いくつかの例では、治療用部分は核酸である。いくつかの実施形態では、核酸はアンチセンス化合物である。いくつかの実施形態では、アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、免疫刺激核酸、アンタゴミール、アンチミール、マイクロRNA模倣物、スーパーミール（supermir）、U1アダプター、及びアプタマーからなる群から選択される。

20

【0112】

また、本明細書では、本明細書に記載の化合物を含む組成物も開示される。

【0113】

また、本明細書では、開示された化合物の薬学的に許容される塩及びプロドラッグも開示される。薬学的に許容される塩には、化合物に見られる特定の置換基に応じて、酸または塩基を用いて調製される開示された化合物の塩が含まれる。本明細書に開示される化合物が、安定した非毒性の酸性塩または塩基塩を形成するのに十分に塩基性または酸性である条件下では、化合物を塩として投与することが適切であり得る。薬学的に許容される塩基付加塩の例としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、またはマグネシウム塩が挙げられる。生理学的に許容される酸付加塩の例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、リン酸、炭酸、硫酸、及び有機酸（酢酸、プロピオン酸、安息香酸、コハク酸、フマル酸、マンデル酸、シュウ酸、クエン酸、酒石酸、マロン酸、アスコルビン酸、 α -ケトグルタル酸、 α -グリコリン酸、マレイン酸、トシル酸、メタンスルホン酸など）が挙げられる。したがって、本明細書では、塩酸塩、硝酸塩、リン酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、硫酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、マンデル酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、マロン酸塩、アスコルビン酸塩、 α -ケトグルタル酸塩、 α -グリコリン酸、マレイン酸塩、トシル酸塩、及びメシル酸塩が開示される。化合物の薬学的に許容される塩は、当該技術分野で周知の標準的な手順を使用して、例えば、アミンなどの十分に塩基性の化合物を、生理学的に許容されるアニオンを与える適切な酸と反応させることによって得ることができる。カルボン酸のアルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウム、またはリチウム）またはアルカリ土類金属（例えば、カルシウム）塩も製造することができる。

30

40

【0114】

リンカー

様々な実施形態では、リンカーは、膜移行ドメイン上のアミノ酸に共有結合している。リンカーは、膜移行ドメインのうちの2つ以上をカーゴ部分にコンジュゲートさせる任意

50

の部分であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸であり得る。他の実施形態では、リンカーの前駆体は、膜移行ドメイン及びカーゴ部分内のアミノ酸と2つ以上の結合を形成することができる任意の適切な分子であり得る。したがって、様々な実施形態では、リンカーの前駆体は、2つ以上の官能基を有し、そのそれぞれは、膜移行ドメイン及びカーゴ部分と共有結合を形成することができる。例えば、リンカーは、膜移行ドメイン内の任意のアミノ酸のN末端、C末端、もしくは側鎖、またはそれらの組み合わせに共有結合することができる。特定の実施形態では、リンカーは膜移行ドメインとカーゴ部分との間に共有結合を形成する。

【0115】

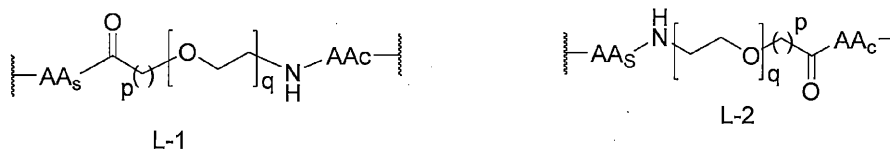
いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも1つのアミノ酸、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、エーテルからなる群から選択され、それらのそれぞれは、上記で定義したように任意に置換されていてもよい。例えば、これらのリンカーのそれぞれは、長さが1～500個の原子、例えば1～100個、1～250個、10～200個、25～300個の原子であり得る。リンカーの非限定的な例としては、任意にリジン残基にコンジュゲートされたポリエチレングリコールが挙げられる。他の例では、リンカーは、二価または三価のC₁～C₅₀飽和または不飽和の直鎖または分岐鎖アルキルであってもよく、ここで、1～25個のメチレン基は、任意にかつ独立して、-N(H)-、-N(C₁-C₄アルキル)-、-N(シクロアルキル)-、-O-、-C(O)-、-C(O)O-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(C₁-C₄アルキル)-、-S(O)₂N(シクロアルキル)-、-N(H)C(O)-、-N(C₁-C₄アルキル)C(O)-、-N(シクロアルキル)C(O)-、-C(O)N(H)-、-C(O)N(C₁-C₄アルキル)、-C(O)N(シクロアルキル)、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはシクロアルケニルに置き換えられる。

【0116】

いくつかの実施形態では、リンカーは、CPPモチーフ上のアミノ酸のN末端もしくはC末端、またはグルタミン、アスパラギン、もしくはリジンの側鎖、またはグルタミンもしくはアスパラギンの修飾された側鎖（例えば、アミノ基を有する還元された側鎖）に共有結合している。特定の実施形態では、リンカーは、CPPモチーフ上のグルタミンの側鎖と結合を形成する。他の特定の実施形態では、本明細書に記載のリンカーは、L-1またはL-2の構造を有し、

【0117】

【化5】



式中、

AA_sはペプチドまたはステーブル上のアミノ酸の側鎖または末端であり、

AA_cはc CPPのアミノ酸の側鎖または末端であり、

pは0～10の整数であり、

qは1～50の整数である。

【0118】

他の実施形態では、リンカーは、タンパク質分解的に安定なペプチド配列、例えば、(GGS)_n、(GGGS)_n、(GSS)_n、または(PAS)_n (nは0～100)であり得る。

【0119】

いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリペプチドコンジュゲートが細胞のサイトゾルに入った後に、膜移行ドメインからカーゴ部分を放出することができる。いくつかの実施形態では、リンカーは、膜移行ドメイン及びカーゴ部分に結合した後に基を含むか、または基を形成し、この基は、ポリペプチドコンジュゲートのサイトゾル取り込み後に切断され、それによってカーゴ部分を放出する。生理学的に切断可能な連結基の非限定的な例としては、カーボネート、チオカーボネート、チオエーテル、チオエステル、ジスルフィド、スルホキシド、ヒドラジン、プロテアーゼ切断可能なジペプチドリinkerなどが挙げられる。

【0120】

例えば、実施形態では、リンカーは、例えば膜移行ドメインまたはカーゴ部分に位置するシステインまたはシステイン類似体の側鎖とのジスルフィド結合を介して膜移行ドメインに共有結合している。いくつかの実施形態では、ジスルフィド結合は、リンカーの前駆体上のチオール基と、ペプチド上にチオール基を有するシステインまたはアミノ酸類似体の側鎖との間に形成され、ここで、各チオール基上の水素への結合は、硫黄原子への結合に置き換えられる。本明細書に開示されるポリペプチドコンジュゲートとともに使用することができるチオール基を有するアミノ酸類似体の非限定的な例は、上記で議論されている。

10

【0121】

製造方法

本明細書に記載の化合物は、有機合成の当業者に知られている様々な方法、または当業者に理解されるようなそれらの変形で調製することができる。本明細書に記載の化合物は、容易に入手可能な出発物質から調製することができる。最適な反応条件は、使用される特定の反応物または溶媒によって異なる場合があるが、そのような条件は、当業者によって決定することができる。

20

【0122】

本明細書に記載の化合物の変形には、各化合物について記載されている様々な成分の追加、除去、または移動が含まれる。同様に、分子内に1つ以上のキラル中心が存在する場合、分子のキラリティーは変化する可能性がある。さらに、化合物の合成は、様々な化学基の保護及び脱保護を含むことができる。保護及び脱保護の使用、ならびに適切な保護基の選択は、当業者によって決定することができる。保護基の化学は、例えば、Wuts and Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., Wiley & Sons, 2006 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に見出すことができる。

30

【0123】

開示された化合物及び組成物を調製する際に使用される出発物質及び試薬は、商業的供給業者、例えば、Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, WI)、Acros Organics (Morris Plains, NJ)、Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)、Sigma (St. Louis, MO)、Pfizer (New York, NY)、GlaxoSmithKline (Raleigh, NC)、Merck (Whitehouse Station, NJ)、Johnson & Johnson (New Brunswick, NJ)、Aventis (Bridgewater, NJ)、AstraZeneca (Wilmington, DE)、Novartis (Basel, Switzerland)、Wyeth (Madison, NJ)、Bristol-Myers-Squibb (New York, NY)、Roche (Basel, Switzerland)、Lilly (Indianapolis, IN)、Abbott (Abbott Park, IL)、Schering Plough (Kenilworth, NJ)、もしくはBoehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany)から入手可能であるか、またはFieser and Fieser's *Reagents for Organic Synthesis*, Volumes 1-17 (John Wi

40

50

ley and Sons, 1991)、Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Volumes 1-5 and Supplements (Elsevier Science Publishers, 1989)、Organic Reactions, Volumes 1-40 (John Wiley and Sons, 1991)、March's Advanced Organic Chemistry (John Wiley and Sons, 4th Edition)、及び Larock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989)などの参考文献に記載されている手順に従って当業者に知られている方法によって調製される。本明細書に開示される医薬担体などの他の物質は、商業的供給源から入手することができる。

10

【0124】

本明細書に記載の化合物を生成するための反応は、溶媒中で実施することができ、溶媒は、有機合成の当業者によって選択することができる。溶媒は、反応が実施される条件、すなわち温度及び圧力下で、出発物質（反応物）、中間体、または生成物と実質的に反応しない可能性がある。反応は、1つの溶媒または複数の溶媒の混合物中で行うことができる。生成物または中間体の形成は、当該技術分野で周知の任意の適切な方法に従ってモニタリングすることができる。例えば、生成物の形成は、核磁気共鳴分光法（例えば、 ^1H または ^{13}C ）、赤外分光法、分光測光法（例えば、UV-可視）、もしくは質量分析などの分光学的手段によって、または高速液体クロマトグラフィー（HPLC）もしくは薄層クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーによってモニタリングすることができる。

20

【0125】

開示された化合物は、任意の他のタンパク質と同様に発現及び精製することによって調製することができる。Chen, K., & Pei, D. (2020)を参照のこと。Engineering Cell-Permeable Proteins through Insertion of Cell-Penetrating Motifs into Surface Loops. ACS chemical biology, 15 (9), 2568-2576は、タンパク質を調製する方法の教示として、その全体が本明細書に参照により組み込まれる。開示された組成物を調製するための他の方法には、アミノ酸 α -N末端が酸感受性保護基または塩基感受性保護基によって保護される固相ペプチド合成が含まれる。そのような保護基は、ペプチド結合形成の条件に対して安定であると同時に、成長中のペプチド鎖を破壊したり、そこに含まれるキラル中心のいずれかをラセミ化したりすることなく容易に除去できる特性を有する必要がある。適切な保護基は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)、*t*-ブチルオキシカルボニル (Boc)、ベンジルオキシカルボニル (Cbz)、ビフェニルイソプロピルオキシカルボニル、*t*-アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、 α , α -ジメチル-3, 5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、*o*-ニトロフェニルスルフェニル、2-シアノー-*t*-ブチルオキシカルボニルなどである。開示された化合物の合成には、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 保護基が特に好ましい。他の好ましい側鎖保護基は、リジン及びアルギニンのような側鎖アミノ基の場合、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル (pmc)、ニトロ、*p*-トルエンスルホニル、4-メトキシベンゼン-スルホニル、Cbz、Boc、及びアダマンチルオキシカルボニルであり、チロシンの場合、ベンジル、*o*-ブromoベンジルオキシカルボニル、2, 6-ジクロロベンジル、イソプロピル、*t*-ブチル (*t*-Bu)、シクロヘキシル、シクロペニル、及びアセチル (Ac) であり、セリンの場合、*t*-ブチル、ベンジル、及びテトラヒドロピラニルであり、ヒスチジンの場合、トリチル、ベンジル、Cbz、*p*-トルエンスルホニル、及び2, 4-ジニトロフェニルであり、トリプトファンの場合、ホルミルであり、アスパラギン酸及びグルタミン酸の場合、ベンジル及び*t*-ブチルであり、システインの場合、トリフェニルメチル (トリチル) である。固相ペプチド合成法では、 α -C末端アミノ酸を適切な固体支持体または樹脂に結合させる。上記の合成に有用な適切

30

40

50

な固体支持体は、段階的な縮合－脱保護反応の試薬及び反応条件に対して不活性であり、かつ使用される媒体に不溶性の物質である。 α -C末端カルボキシペプチドの合成用の固体支持体は、Applied Biosystems (Foster City, Calif.) から入手可能な4-ヒドロキシメチルフェノキシメチルコポリ(スチレン-1%ジビニルベンゼン)または4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)フェノキシアセトアミドエチル樹脂である。 α -C末端アミノ酸は、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)またはビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィンクロリド(BOPCL)の存在下または非存在下で、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)、またはO-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)を用いて、ジクロロメタンまたはDMFなどの溶媒中、10℃～50℃の温度で約1～約24時間媒介カップリングによって樹脂にカップリングされる。固体支持体が4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)フェノキシアセトアミドエチル樹脂である場合、Fmoc基は、上記のように α -C末端アミノ酸とカップリングする前に、第二級アミン、好ましくはピペリジンで切断される。脱保護された4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)フェノキシアセトアミドエチル樹脂にカップリングする1つの方法は、DMF中のO-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU、1当量)と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT、1当量)である。連続的な保護アミノ酸のカップリングは、自動ポリペプチド合成装置で行うことができる。一例では、成長中のペプチド鎖のアミノ酸の α -N末端がFmocで保護される。成長中のペプチドの α -N末端側からFmoc保護基を除去することは、第二級アミン、好ましくはピペリジンで処理することによって達成される。次に、各保護アミノ酸を約3倍のモル過剰で導入し、カップリングを好ましくはDMF中で実施する。カップリング剤は、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU、1当量)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT、1当量)であり得る。固相合成の最後に、樹脂からポリペプチドを除去し、連続的にまたは単一の操作で脱保護する。ポリペプチドの除去及び脱保護は、樹脂に結合したポリペプチドをチアニソール、水、エタンジチオール、及びトリフルオロ酢酸を含む切断試薬で処理することによって、単一の操作で達成することができる。ポリペプチドの α -C末端がアルキルアミドである場合、樹脂はアルキルアミンによるアミノリシスによって切断される。あるいは、ペプチドは、例えばメタノールによるエステル交換、続いてアミノリシスまたは直接のアミド基転移によって除去することができる。保護されたペプチドをこの時点で精製するか、または直接次のステップで使うことができる。側鎖保護基の除去は、上記の切断カクテルを使用して達成することができる。完全に脱保護されたペプチドは、以下のタイプのいずれかまたはすべてを使用する一連のクロマトグラフィーステップによって精製することができる：弱塩基性樹脂(酢酸塩形態)上でのイオン交換、非誘導体化ポリスチレン-ジビニルベンゼン(例えば、Amberlite XAD)上での疎水性吸着クロマトグラフィー、シリカゲル吸着クロマトグラフィー、カルボキシメチルセルロース上でのイオン交換クロマトグラフィー、例えばSephadex G-25、LH-20上での分配クロマトグラフィーまたは向流分配、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、特にオクチル-シリカまたはオクタデシルシリル-シリカ結合相カラム充填物上での逆相HPLC。

【0126】

使用方法

また、本明細書では、本明細書に記載の化合物または組成物の使用方法も提供される。また、本明細書では、治療を必要とする対象における疾患または病状を治療するための方法も提供され、この方法は、有効量の本明細書に記載の化合物または組成物のいずれかを

10

20

30

40

50

対象に投与することを含む。

【0127】

また、本明細書では、対象における癌を治療、予防、または改善する方法も提供される。この方法は、有効量の本明細書に記載の化合物もしくは組成物のうちの1つ以上またはそれらの薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む。本明細書に記載の化合物及び組成物、またはそれらの薬学的に許容される塩は、ヒト（例えば小児及び老年集団）及び動物（例えば獣医学的用途）における癌の治療に有用である。開示された方法は任意選択で、癌の治療を必要とするか、または必要とする可能性がある患者を特定することを含むことができる。本明細書に記載の化合物及び組成物によって治療可能な癌の種類の例としては、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、大腸癌、子宮頸癌、胃腸癌、泌尿生殖器癌、頭頸部癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌、皮膚癌、及び精巣癌が挙げられる。さらなる例としては、肛門、胆管、骨、骨髓、腸（結腸及び直腸を含む）、眼、胆嚢、腎臓、口、喉頭、食道、胃、精巣、子宮頸部、中皮腫、神経内分泌、陰茎、皮膚、脊髄、甲状腺、膺、外陰部、子宮、肝臓、筋肉、血液細胞（リンパ球及び他の免疫系細胞を含む）の癌及び／または腫瘍が挙げられる。本明細書に記載の化合物及び組成物によって治療可能な癌のさらなる例としては、癌腫、カルポジ肉腫、黒色腫、中皮腫、軟部組織肉腫、膵臓癌、肺癌、白血病（急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、及びその他）、リンパ腫（ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫）、及び多発性骨髄腫が挙げられる。

10

【0128】

本明細書に記載の癌の治療または予防の方法は、1つ以上の追加の薬剤（例えば、抗癌剤または電離放射線）による治療をさらに含むことができる。1つ以上の追加の薬剤、ならびに本明細書に記載の化合物及び組成物またはそれらの薬学的に許容される塩は、同時投与、及び最大数日間の時間間隔を空けて投与するなど、任意の順序で投与することができる。この方法はまた、1つ以上の追加の薬剤及び／または本明細書に記載の化合物及び組成物もしくはそれらの薬学的に許容される塩の複数回の投与を含むことができる。1つ以上の追加の薬剤ならびに本明細書に記載の化合物及び組成物またはそれらの薬学的に許容される塩の投与は、同じ経路または異なる経路によって行うことができる。1つ以上の追加の薬剤で治療する場合、本明細書に記載の化合物及び組成物またはそれらの薬学的に許容される塩は、上記1つ以上の追加の薬剤を含む医薬組成物に組み合わせることができる。

20

30

【0129】

例えば、本明細書に記載の化合物もしくは組成物またはそれらの薬学的に許容される塩は、追加の抗癌剤、例えば、13-シス-レチノイン酸、2-アミノ-6-メルカプトプリン、2-CD A、2-クロロデオキシアデノシン、5-フルオロウラシル、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アキュテイン、アクチノマイシン-D、アドリアマイシン、アドルシル、アグリリン、アラ-コート、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アトレチノイン、アルカバン（Alkaban）-AQ、アルケラン、オールートランスレチノイン酸、アルファインターフェロン、アルトレタミン、アメトプテリン、アミフォスチン、アミノグルテチミド、アナグレリド、アナンドロン、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、アラネスブ、アレディア、アリミデックス、アロマシン、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、ATRA、アバスチン、BCG、BCNU、ベバシズマブ、ベキサロテン、ピカルタミド、BiCNU、ブレノキサン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、ブスルフェクス、C225、ロイコボリンカルシウム、カンパス、カンプトサル、カンプトテシン-11、カペシタビン、カラック（Carac）、カルボプラチン、カルムスチン、カルムスチンウェハー、カソデックス、CCNU、CDDP、CeeNU、セルビジン、セツキシマブ、クロラムブシル、シスプラチン、シトロボラム因子、クラドリビン、コルチゾン、コスメゲン、CPT-11、シクロホスファミド、シタドレン、シタラビン、シタラビンリボソーム、サイトサールU、サイトキサン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、ダウノマイシン、ダウノルビシン、ダウノル

40

50

ビシン塩酸塩、ダウノルビシンリポソーム、ダウノキソーム、デカドロロン、デルターコル
 テフ、デルタゾン、デニロイキンジフチトクス、デポサイト、デキサメタゾン、酢酸デキ
 サメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、デキサゾン、デクスラゾキサン、DHA
 D、DIC、ジオデックス、ドセタキセル、ドキシル、ドキソルビシン、ドキソルビシン
 リポソーム、ドロキシア、DTIC、DTICードーム、デュラロン、エフデックス、エ
 リガード、エレンス、エロキサチン、エルスパー、エムサイト、エピルビシン、エポエチ
 ンアルファ、エルビタックス、エルウィニアL-アスパラギナーゼ、エストラムスチン、
 エチオール、エトボホス、エトボシド、リン酸エトボシド、ユーレキシン、エビスタ、エ
 キセメスタン、ファレストン、ファスロデックス、フェマール、フィルグラスチム、フロ
 クスウリジン、フルダラ、フルダラビン、フルオロプレックス、フルオロウラシル、フル
 オロウラシル（クリーム）、フルオキシメステロン、フルタミド、フォルリン酸、FUDR
 、フルベストラント、G-CSF、ゲフィチニブ、ゲムシタピン、ゲムツズマブオゾガマ
 イシン、ジェムザール、グリベック、リユープリン、リユープリンデポ、マチュレーン、
 マキシデックス、メクロレタミン、メクロレタミン塩酸塩、メドラロン、メドロール、
 メガス、メゲストロール、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メス
 ナ、メスネックス、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、メチルプレドニゾ
 ロン、ミロセル、レトロゾール、ネオサル、ニューラスト、ニューメガ、ニューボジェ
 ン、ニランドロン、ニルタミド、ナイトロジェンマスタード、ノバルデックス、ノバント
 ロン、オクトレオチド、酢酸オクトレオチド、オンキャスパー、オンコビン、オンタック
 、オンキサル（Onxal）、オプレベルキン（Oprevelkin）、オラブレド
 （Olapred）、オラゾン（Orasone）、オキサリプラチン、パクリタキセル
 、パミドロネート、パンレチン（Panretin）、パラプラチン、ペディアブレド（
 Pediapred）、PEGインターフェロン、ペグアスパルガーゼ、ペグフィルグラ
 スチム、PEG-イントロン、PEG-L-アスパラギナーゼ、フェニルアラニンマスタ
 ード、プラチノール、プラチノール-AQ、プレドニゾロン、プレドニゾン、プレロン、
 プロカルバジン、プロクリット（PROCRIT）、プロロイキン、カルムスチンインプ
 ラント付きプロライフプロスパン（Prolifeprospan）20、プリネソール
 （Purinethol）、ラロキシフェン、リウマトレックス、リツキサン、リツキ
 シマブ、ロベロン（Roveron）-A（インターフェロンアルファ-2a）、ルベッ
 クス、ルビドマイシン塩酸塩、サンドスタチン、サンドスタチンLAR、サルグラモスチ
 ム、ソルコーテフ、ソルメドロール、STI-571、ストレプトゾシン、タモキシフェ
 ン、タルグレチン、タキソール、タキソテル、テモダール、テモゾロミド、テニボシド
 、TESPA、サリドマイド、タロミド、セラシス（Theracys）、チオグアニン
 、チオグアニンタブロイド、チオホスホアミド、チオプレックス、チオテパ、TICE、
 トボサル、トボテカン、トレミフェン、トラスツズマブ、トレチノイン、トレキソール
 （Trexall）、トリセノックス、TSPA、VCR、ベルバン、ベルケイド、ベプ
 シド、ベサノイド、ピアデュル（Viadur）、ビンブラスチン、ビンブラスチン硫酸
 塩、ビンカサルPfs（Vincasar Pfs）、ピンクリスチン、ビノレルビン
 、ビノレルビン酒石酸塩、VLB、VP-16、ブモン（Vumon）、ゼローダ、ザノ
 サー、ゼバリン、ジンカード、ゾラデックス、ゾレドロン酸、ゾメタ、グリアデルウェハ
 ー、グリベック、GM-CSF、ゴセレリン、顆粒球コロニー刺激因子、ハロテストン、
 ハーセプチン、ヘキサドロール、ヘキサレン、ヘキサメチルメラミン、HMM、ハイカム
 チン、ハイドレア、酢酸ヒドロコルト、ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾンナ
 トリウム、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、リン酸ヒドロコルトン、ヒドロキシ
 ウレア、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、イダマイシン、イダルビシン、
 イフェックス、IFN-アルファ、イホスファミド、IL2、IL-11、イマチニブメ
 シル酸塩、イミダゾールカルボキサミド、インターフェロンアルファ、インターフェロン
 アルファ-2b（PEGコンジュゲート）、インターロイキン2、インターロイキン-1
 1、イントロンA（インターフェロンアルファ-2b）、ロイコボリン、リユーケラン、
 ロイキン、ロイプロリド、ロイロクリスチン、ロイスタチン、リポソームAra-C、液

10

20

30

40

50

状ブレド、ロムスチン、Ｌ－ＰＡＭ、Ｌ－サルコリシン、メチコルテン、マイトマイシン、マイトマイシン－Ｃ、ミトキサントロン、Ｍ－ブレドニゾール、ＭＴＣ、ＭＴＸ、マスタゲン、ムスチン、ムタマイシン、マイレラン、イレッサ、イリノテカン、イソトレチノイン、キドロラーゼ、ラナコート、Ｌ－アスパラギナーゼ、及びＬＣＲと組み合わせることで医薬組成物にすることができる。追加の抗癌剤には、例えば抗体などのバイオ医薬品も含まれてもよい。

【０１３０】

多くの腫瘍及び癌では、腫瘍または癌細胞にウイルスゲノムが存在する。例えば、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）は、多くの哺乳動物の悪性腫瘍と関連している。本明細書に開示される化合物はまた、細胞の形質転換を引き起こす可能性のあるウイルスに感染した患者を治療するために、及び／または細胞内のウイルスゲノムの存在に関連する腫瘍もしくは癌を患っている患者を治療するために、単独で、またはガンシクロビル、アジドチミジン（ＡＺＴ）、ラミブジン（３ＴＣ）などの抗癌剤もしくは抗ウイルス剤と組み合わせて使用することもできる。本明細書に開示される化合物は、腫瘍性疾患のウイルスベースの治療と組み合わせて使用することもできる。

【０１３１】

また、本明細書では、対象内の腫瘍細胞を死滅させる方法も記載される。この方法は、腫瘍細胞を有効量の本明細書に記載の化合物または組成物と接触させることを含み、必要に応じて、腫瘍細胞を有効量の電離放射線で照射するステップを含む。さらに、本明細書では、腫瘍の放射線療法の方法が提供される。この方法は、腫瘍細胞を有効量の本明細書に記載の化合物または組成物と接触させ、腫瘍を有効量の電離放射線で照射することを含む。本明細書で使用される場合、電離放射線という用語は、十分なエネルギーを有するか、または核相互作用を介して十分なエネルギーを生成して電離を生じさせることができる粒子または光子を含む放射線を指す。電離放射線の一例はＸ線である。有効量の電離放射線とは、本明細書に記載の化合物と組み合わせて投与すると、細胞損傷または細胞死の増加をもたらす電離放射線の量を指す。電離放射線は、放射性標識抗体及び放射性同位体の投与を含めて、当該技術分野で周知の方法に従って送達することができる。

【０１３２】

本明細書に記載の方法及び化合物は、予防的処置及び治療的処置の両方に有用である。本明細書で使用される場合、「治療すること（treating）」または「治療（treatment）」という用語には、予防、発症の遅延、発症後の兆候または症状の軽減、根絶、または悪化の遅延、及び再発の予防が含まれる。予防的使用の場合、治療有効量の本明細書に記載の化合物及び組成物またはそれらの薬学的に許容される塩は、発症前（例えば、癌の明らかな兆候が現れる前に）、発症初期（例えば、癌の初期兆候及び症状が現れたとき）、または癌の進行が確立した後に対象に投与される。予防的投与は、感染の症状が現れる数日前から数年前まで行うことができる。予防的投与は、例えば、前癌病変を示す対象、初期段階の悪性腫瘍と診断された対象、及び特定の癌に対する感受性（例えば、家族、人種、及び／または職業）を有するサブグループの化学予防的処置に使用することができる。治療的処置は、癌が診断された後に、治療有効量の本明細書に記載の化合物及び組成物またはそれらの薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む。

【０１３３】

対象における癌または腫瘍を治療、予防、または改善する方法のいくつかの例では、対象に投与される化合物または組成物は、Ｒａｓ（例えば、Ｋ－Ｒａｓ）、ＰＴＰ１Ｂ、Ｐｉｎ１、Ｇｒｂ２ ＳＨ２、またはそれらの組み合わせに対する阻害剤として作用することができる標的化部分を含むことができる治療用部分を含むことができる。

【０１３４】

開示される主題は、代謝障害または状態を患っている対象を治療するための方法にも関する。一実施形態では、有効量の本明細書に開示される１つ以上の化合物または組成物が、代謝障害を患っており、その治療を必要とする対象に投与される。いくつかの例では、代謝障害は、２型糖尿病を含むことができる。対象における代謝障害を治療、予防、また

は改善する方法のいくつかの例では、対象に投与される化合物または組成物は、PTPBに対する阻害剤として作用することができる標的化部分を含むことができる治療用部分を含むことができる。この方法の1つの特定の例では、対象は肥満であり、この方法は、本明細書に開示される組成物を投与することによって対象の肥満を治療することを含む。

【0135】

開示される主題は、嚢胞性線維症を患っている対象を治療するための方法にも関する。一実施形態では、有効量の本明細書に開示される1つ以上の化合物または組成物が、嚢胞性線維症を患っており、その治療を必要とする対象に投与される。対象における嚢胞性線維症を治療する方法のいくつかの例では、対象に投与される化合物または組成物は、CALPDZに対する阻害剤として作用することができる標的化部分を含むことができる治療用部分を含むことができる。

10

【0136】

さらに、開示された組成物を使用して農産物を植物細胞に送達する方法が開示され、この方法は、細胞を本明細書に開示されるペプチドと接触させることを含む。植物に送達することができる化合物には、生体防御活性化剤及び生体刺激剤が含まれる。

【0137】

組成物、製剤及び投与方法

また、本明細書では、本明細書に記載の化合物を含む組成物も開示される。

【0138】

また、本明細書では、開示された化合物の薬学的に許容される塩及びプロドラッグも開示される。薬学的に許容される塩には、化合物に見られる特定の置換基に応じて、酸または塩基を用いて調製される開示された化合物の塩が含まれる。本明細書に開示される化合物が、安定した非毒性の酸性塩または塩基塩を形成するのに十分に塩基性または酸性である条件下では、化合物を塩として投与することが適切であり得る。薬学的に許容される塩基付加塩の例としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、またはマグネシウム塩が挙げられる。生理学的に許容される酸付加塩の例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、リン酸、炭酸、硫酸、及び有機酸（酢酸、プロピオン酸、安息香酸、コハク酸、フマル酸、マンデル酸、シュウ酸、クエン酸、酒石酸、マロン酸、アスコルビン酸、 α -ケトグルタル酸、 α -グリコリン酸、マレイン酸、トシル酸、メタンスルホン酸など）が挙げられる。したがって、本明細書では、塩酸塩、硝酸塩、リン酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、硫酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、マンデル酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、マロン酸塩、アスコルビン酸塩、 α -ケトグルタル酸塩、 α -グリコリン酸、マレイン酸塩、トシル酸塩、及びメシル酸塩が開示される。化合物の薬学的に許容される塩は、当該技術分野で周知の標準的な手順を使用して、例えば、アミンなどの十分に塩基性の化合物を、生理学的に許容されるアニオンを与える適切な酸と反応させることによって得ることができる。カルボン酸のアルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウム、またはリチウム）またはアルカリ土類金属（例えば、カルシウム）塩も製造することができる。

20

30

【0139】

開示された化合物及びそれらを含む組成物のインビボ適用は、当業者に現在または将来的に知られている任意の適切な方法及び技術によって達成することができる。例えば、開示された化合物は、生理学的にまたは薬学的に許容される形態で製剤化することができ、また、例えば経口、経鼻、直腸、局所、及び非経口投与経路を含めて、当該技術分野で知られている任意の適切な経路によって投与することができる。本明細書において、非経口という用語には、例えば注射による皮下、皮内、静脈内、筋肉内、腹腔内、及び胸骨内投与が含まれる。開示された化合物または組成物の投与は、当業者が容易に決定できるように、単回投与であってもよく、または連続的もしくは異なる間隔で投与されてもよい。

40

【0140】

本明細書に開示される化合物及びそれらを含む組成物は、リポソーム技術、徐放性カプセル、埋め込みポンプ、及び生分解性容器を利用して投与することもできる。これらの送

50

達方法は、有利には、長期間にわたって均一な投与量を提供することができる。化合物は、それらの塩誘導体形態または結晶形態で投与することもできる。

【0141】

本明細書に開示される化合物は、薬学的に許容される組成物を調製するための既知の方法に従って製剤化することができる。製剤は多くの情報源に詳細に記載されており、それらの情報源は当業者に周知であり、容易に入手可能である。例えば、Remington's Pharmaceutical Science by E. W. Martin (1995) には、開示された方法に関連して使用することができる製剤が記載されている。一般に、本明細書に開示される化合物は、化合物の有効な投与を容易にするために、有効量の化合物が適切な担体と組み合わせられるように製剤化することができる。使用される組成物は、様々な形態であってもよい。これらには、例えば、錠剤、丸薬、粉末、液体溶液または懸濁液、坐剤、注射可能及び注入可能な溶液、及びスプレーなどの固体、半固体、及び液体の剤形が含まれる。好ましい形態は、意図される投与方法及び治療用途に依存する。組成物はまた、好ましくは、当業者に周知の従来の薬学的に許容される担体及び希釈剤を含む。化合物とともに使用される担体または希釈剤の例としては、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、アルミナ、デンプン、生理食塩水、ならびに同等の担体及び希釈剤が挙げられる。所望の治療的処置のためにこのような投与量を投与するために、本明細書に開示される組成物は、有利には、担体または希釈剤を含む全組成物の重量に基づいて、1種以上の対象化合物を合計重量の約0.1%～100%含むことができる。

10

20

【0142】

投与に適した製剤としては、例えば、抗酸化剤、緩衝剤、殺菌剤、及び製剤を対象の受容者の血液と等張にする溶質を含むことができる水性滅菌注射液、ならびに懸濁剤及び増粘剤を含むことができる水性及び非水性滅菌懸濁液が挙げられる。製剤は、単位用量または複数用量容器、例えば、密封されたアンプル及びバイアルで提供することができ、使用前に滅菌液体担体、例えば注射用水の条件のみを必要とする凍結乾燥（凍結乾燥）状態で保存することができる。即時注射液及び懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、錠剤などから調製することができる。特に上記で言及した成分に加えて、本明細書に開示される組成物は、論議されている製剤の種類を考慮して、当該技術分野で慣用の他の薬剤を含むことができることを理解すべきである。

30

【0143】

本明細書に開示される化合物及びそれらを含む組成物は、細胞との直接接触を通して、または担体手段を介して細胞に送達することができる。化合物及び組成物を細胞に送達するための担体手段は、当該技術分野で周知であり、例えば、組成物をリポソーム部分に封入することが含まれる。本明細書に開示される化合物及び組成物を細胞に送達するための別の手段は、標的細胞への送達を目的とするタンパク質または核酸に化合物を結合させることを含む。米国特許第6,960,648号、米国特許出願公開第20030032594号及び同第20020120100号は、別の組成物にカップリングすることができ、その組成物が生体膜を横切って移行できるようにするアミノ酸配列を開示している。米国特許出願公開第20020035243号も、細胞内送達のために細胞膜を横切って生物学的部分を輸送するための組成物を記載している。化合物はポリマーに組み込むこともでき、ポリマーの例としては、頭蓋内腫瘍用のポリ（D-Lラクチド-co-グリコリド）ポリマー、モル比20:80のポリ[ビス（p-カルボキシフェノキシ）プロパン:セバシン酸]（GLIADELで使用）、コンドロイチン、キチン、及びキトサンが挙げられる。

40

【0144】

腫瘍性疾患の治療のために、本明細書に開示される化合物は、他の抗腫瘍物質もしくは抗癌物質、及び／または放射線療法、及び／または光線力学的療法、及び／または腫瘍を除去する外科的治療と組み合わせて、治療を必要とする患者に投与することができる。これらの他の物質または治療は、本明細書に開示される化合物と同時に、または異なる時間

50

に投与することができる。例えば、本明細書に開示される化合物は、タキソールまたはビンブラスチンなどの有糸分裂阻害剤、シクロホスファミドまたはイホスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシルまたはヒドロキシウレアなどの代謝拮抗剤、アドリアマイシンまたはブレオマイシンなどのDNA挿入剤、エトポシドまたはカンプトテシンなどのトポイソメラーゼ阻害剤、アンジオスタチンなどの血管新生阻害剤、タモキシフェンなどの抗エストロゲン剤、及び／または、例えば、それぞれGLEEVEC (Novartis Pharmaceuticals Corporation) 及びHERCEPTIN (Genentech, Inc.) などの他の抗癌剤もしくは抗体、またはイピリムマブ及びボルテゾミブなどの免疫療法薬と組み合わせて使用することができる。

【0145】

特定の例では、本明細書に開示される化合物及び組成物は、任意に不活性希釈剤などの薬学的に許容される担体と組み合わせて、望ましくない細胞増殖の部位（腫瘍部位または良性皮膚腫瘍など、例えば、腫瘍または皮膚腫瘍に注射または局所的に適用される）などの1つ以上の解剖学的部位に局所投与することができる。本明細書に開示される化合物及び組成物は、任意に不活性希釈剤などの薬学的に許容される担体、または経口送達用の吸収可能な食用担体と組み合わせて、静脈内または経口などで全身投与することができる。これらは、硬質または軟質シェルのゼラチンカプセルに封入することも、錠剤に圧縮することも、患者の食事の食品に直接組み込むこともできる。経口治療投与の場合、活性化合物は、1種以上の賦形剤と組み合わせることができ、また、摂取可能な錠剤、パッカル錠、トローチ、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、カシェ剤、エアロゾルスプレーなどの形態で使用することができる。

【0146】

開示された組成物は生物学的に利用可能であり、また、経口的に送達することができる。経口組成物は、錠剤、トローチ、丸薬、カプセル剤などであってもよく、また、トラガカントゴム、アカシア、コーンスターチ、またはゼラチンなどの結合剤、リン酸二カルシウムなどの賦形剤、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、及びスクロース、フルクトース、ラクトース、もしくはアスパルテームなどの甘味料、またはペパーミント、ウィンターグリーン油、もしくはチェリー香料などの香味料を含むことができる。単位剤形がカプセルである場合、それは、上記の種類の物質に加えて、植物油またはポリエチレングリコールなどの液体担体を含むことができる。様々な他の物質が、コーティングとして、またはそうでなければ固体単位剤形の物理的形態を改変するために存在することができる。例えば、錠剤、丸薬、またはカプセルは、ゼラチン、ワックス、シェラック、または糖類などでコーティングすることができる。シロップまたはエリキシル剤は、活性化合物、甘味料としてのスクロースまたはフルクトース、防腐剤としてのメチルパラベンまたはプロピルパラベン、染料、及びチェリーまたはオレンジ香料などの香味料を含むことができる。もちろん、あらゆる単位剤形の調製に使用されるあらゆる物質は、薬学的に許容され、使用される量において実質的に非毒性である必要がある。さらに、活性化合物は、徐放性製剤及びデバイスに組み込むことができる。

【0147】

本明細書に開示される化合物及び組成物は、それらの薬学的に許容される塩またはプロドラッグを含め、注入または注射により静脈内、筋肉内または腹腔内に投与することができる。活性剤またはその塩の溶液は、任意に非毒性界面活性剤と混合して、水中で調製することができる。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、及びそれらの混合物中、ならびに油中で調製することができる。通常の保管及び使用条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を防ぐための防腐剤を含有することができる。

【0148】

注射または注入に適した医薬剤形は、活性成分を含む滅菌水性溶液または分散液または滅菌粉末を含むことができ、これらは、任意選択でリポソームに封入された、滅菌注射用

10

20

30

40

50

または注入用溶液または分散液の即時調製に適している。最終的な剤形は、製造及び保管の条件下で、無菌で流動性があり、かつ安定している必要がある。液体担体またはビヒクルは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステル、及びそれらの適切な混合物を含む溶媒または液体分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えばリポソームの形成によって、分散液の場合には必要な粒径を維持することによって、または界面活性剤の使用によって維持することができる。必要に応じて、微生物の作用の防止は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどの様々な他の抗菌剤及び抗真菌剤によってもたすことができる。多くの場合、糖類、緩衝液、または塩化ナトリウムなどの等張剤を含めることが望ましいであろう。吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることにより、注射用組成物の吸収を延長することができる。

10

【0149】

滅菌注射液は、本明細書に開示される化合物及び／または薬剤を、必要に応じて、上記に列挙した様々な他の成分とともに適切な溶媒中に必要量で組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製される。滅菌注射液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥及び凍結乾燥技術であり、これにより、活性成分と、事前に滅菌濾過された溶液中に存在する任意の追加の所望の成分との粉末が得られる。

【0150】

局所投与の場合、本明細書に開示される化合物及び薬剤は、液体または固体として適用することができる。しかしながら、それらを、固体または液体であり得る皮膚科学的に許容される担体と組み合わせて、組成物として皮膚に局所的に投与することが一般的に望ましい。本明細書に開示される化合物、薬剤及び組成物は、悪性または良性腫瘍のサイズを縮小（完全な除去を含むことができる）するために、または感染部位を治療するために、対象の皮膚に局所的に適用することができる。本明細書に開示される化合物及び薬剤は、増殖部位または感染部位に直接適用することができる。好ましくは、化合物及び薬剤は、軟膏、クリーム、ローション、溶液、チンキ剤などの製剤で増殖部位または感染部位に適用される。

20

【0151】

有用な固体担体としては、タルク、粘土、微結晶セルロース、シリカ、アルミナなどの微細固体が挙げられる。有用な液体担体としては、水、アルコールもしくはグリコール、または水とアルコール／グリコールのブランドが挙げられ、必要に応じて非毒性界面活性剤の助けを借りて、化合物を有効なレベルでこれらの中に溶解または分散させることができる。香料及び追加の抗菌剤などのアジュバントを添加して、所与の用途に合わせて特性を最適化することができる。得られた液体組成物は、吸収性パッドから塗布することができ、包帯及び他の包帯に染み込ませるために使用することができ、または、例えばポンプ式もしくはエアゾール式スプレーを使用して患部にスプレーすることができる。

30

【0152】

合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩及びエステル、脂肪アルコール、変性セルロースまたは変性鉱物材料などの増粘剤も、液体担体とともに使用して、使用者の皮膚に直接適用するための塗布可能なペースト、ゲル、軟膏、石鹸などを形成することができる。

40

【0153】

本明細書に開示される化合物、薬剤及び医薬組成物の有用な投与量は、それらのインビトロ活性と動物モデルにおけるインビボ活性とを比較することによって決定することができる。マウス及び他の動物における有効投与量をヒトに外挿する方法は、当該技術分野で周知である。

【0154】

組成物投与の投与量範囲は、症状または障害に影響を及ぼす所望の効果を生み出すのに十分な量である。投与量は、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応などの有害な副作用を引き起こすほど大量であってはならない。一般に、投与量は患者の年齢、状態、

50

性別、及び疾患の程度によって異なり、これは当業者によって決定することができる。何らかの禁忌がある場合、個々の医師が投与量を調整することができる。投与量は変化する可能性があり、1日または数日間、1日1回以上の用量で投与することができる。

【0155】

また、本明細書に開示される化合物を薬学的に許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物も開示される。ある量の化合物を含む、経口、局所または非経口投与に適した医薬組成物は、好ましい態様を構成する。患者、特にヒトに投与される投与量は、致死的な毒性を伴わず、好ましくは副作用及び病的状態が許容レベルを超えない範囲で、合理的な時間枠にわたって患者において治療反応を達成するのに十分な量であるべきである。当業者であれば、投与量は、対象の状態（健康）、対象の体重、併用療法の種類（もしあれば）、治療頻度、治療可能比、ならびに病状の重症度及び段階を含む様々な要因に依存することを認識するであろう。

10

【0156】

また、本明細書に開示される化合物を1つ以上の容器に含むキットも開示される。開示されたキットは、任意に薬学的に許容される担体及び／または希釈剤を含むことができる。一実施形態では、キットは、本明細書に記載の1種以上の他の成分、補助剤、またはアジュバントを含む。別の実施形態では、キットは、本明細書に記載の薬剤などの1種以上の抗癌剤を含む。一実施形態では、キットは、キットの化合物または組成物の投与方法を説明する使用説明書または包装材料を含む。キットの容器は、例えばガラス、プラスチック、金属などの任意の適切な材料であってもよく、また、任意の適切なサイズ、形状、または構成であってもよい。一実施形態では、本明細書に開示される化合物及び／または薬剤は、キット内に錠剤、丸薬、または粉末形態などの固体として提供される。別の実施形態では、本明細書に開示される化合物及び／または薬剤は、キット内に液体または溶液として提供される。一実施形態では、キットは、本明細書に開示される化合物及び／または薬剤を液体または溶液の形態で含むアンプルまたはシリンジを含む。

20

【0157】

本発明のいくつかの実施形態について説明してきた。それにもかかわらず、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、様々な変更が行われ得ることが理解されるであろう。したがって、他の実施形態は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【実施例】

30

【0158】

以下の実施例は、本明細書で請求される化合物、組成物、物品、デバイス、及び／または方法がどのように製造され、評価されるかについての完全な開示及び説明を当業者に提供するために提示されており、本発明の単なる例示を意図しており、本発明者らが彼らの発明とみなすものの範囲を制限することを意図したものではない。しかしながら、当業者は、本開示に照らして、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、開示された特定の実施形態において多くの変更を行うことができ、それでも同様または類似の結果を得ることができることを理解すべきである。

【0159】

数値（例えば、量、温度など）に関しては精度を確保するために努力がなされているが、いくつかの誤差及び偏差を考慮する必要がある。特に明記しない限り、部は重量部であり、温度は℃単位または周囲温度であり、圧力は大気圧または大気圧付近である。

40

【0160】

ヒトフィブロネクチンIII型（FN3）ドメインを膜移行ドメイン（MTD）の足場として選択した（Koide, A., et al. (1998) The physicine type III domain as a scaffold for novel binding protein. J. Mol. Biol. 284 (4): 1141-1151）。FN3は、小型（90～100aa）で高度に安定したタンパク質であり、高い親和性と特異性で標的タンパク質に結合するモノボディを開発するために広く使用されている（Chandler, P. G., et al. (2020) Developm

50

ent and Differentiation in Monobodies Based on the Fibronectin Type 3 Domain. Cells 9 (3) : 610)。これまでの研究では、FN3のいくつかのループ領域は変異に対して耐性があることが実証されている (Steven, A., et al. (2012) Design of novel FN3 domains with high stability by a consensus sequence approach, Protein Engineering, Design and Selection, 25 (3) : 107-117)。さらに、FN3は、いかなるシステインまたはジスルフィド結合も含まず、したがって細胞内環境において安定である。FN3は、いかなる物理的または化学的な補助もなしに容易にその天然型に容易に折り畳まれ、大腸菌で高収量で産生することができる。最後に、FN3は豊富なヒト細胞外タンパク質に由来し、免疫反応を引き起こす可能性が低い。

10

【0161】

MTDの設計、発現、及び精製

FN3のBC、DE、及びFGループは、配列変異に対して非常に耐性があることが以前に示されている。FGループのGDSPAS配列をRRRWWW（配列番号104）で置き換えて、MTD1を得た（表4）。FGループ内にすでに存在するアルギニン残基と組み合わせると、ループのサイズを変化させることなく推定CPPモチーフ（R₄W₃）が生成される。同様に、BCループのテトラペプチドAVTVをWWWRRR（配列番号105）で置き換えて、ループ内の既存のアルギニンを利用して推定CPP、W₃R₄を形成した（表4）。得られた変異体MTD2におけるBCループのサイズは2残基増加している。FN3のもう一方の端にCPPモチーフをグラフトする可能性を調べるために、CDループ内のトリペプチドNSPをCPPモチーフR₄W₃で置き換えてMTD3を得た。CPP配列を2つの異なるループにグラフトすることの実現可能性を試験するために、BCループ（VTV）内の比較的疎水性のトリペプチドをWYWで置き換え、FGループ内の親水性モチーフ（GDSPAS、配列番号106）をRRRで置き換えてMTD4を得た。最後に、MTD4のWYWモチーフとRRRモチーフを切り替えることによってMTD5を生成した。RRRRモチーフとWYWモチーフの相対的重要性を試験するために、BCループとFGループにそれぞれCPPモチーフの半分だけを含む2つの変異体MTD4aとMTD4bも生成した。WYWモチーフはWWWよりも親水性が高く、細胞透過性抗体の「エンドソーム脱出モチーフ」として以前に報告されている (Kim, J.-S., et al. (2016) Endosomal acidic pH-induced conformational changes of a cytosol-penetrating antibody mediate endosomal escape. J. Control. Rel. 235 : 165-175)。ループ挿入変異体をオンラインプログラムPhyre2で分析し、配列の相同性に基づいてそれらの折り畳み構造を予測した。すべての変異体は野生型FN3と同様の全体的な折り畳みを維持し、CPPモチーフがそれらの表面に提示され、「環状」トポロジーに拘束されていた（図1）。

20

30

【0162】

MTD4の特性（例えば、細胞侵入効率、代謝安定性、及び発現収量）をさらに改善するために、FN3のBCループとFGループをY、W、A、及びR残基の異なる組み合わせで置き換えてMTD6～10を生成した（表4）。テトラメチルローダミン-5-マレイミド（TMR）を用いて固有のC末端システインでMTDを標識することによってMTD6～10の総細胞侵入効率を評価した。HeLa細胞をTMR標識タンパク質（5mM）で2時間処理し、生細胞共焦点顕微鏡で分析した。MTD7^{TMR}及びMTD9^{TMR}は、MTD4^{TMR}と同様の取り込みを示したが、MTD6^{TMR}、MTD8^{TMR}、及びMTD10^{TMR}は細胞侵入がはるかに少なかった（図3A～3I）。さらに、MTD6～10の単離収量は、大腸菌細胞培養液1Lあたり0.6～6.2mgの範囲であった（表4）。MTD4及びMTD6は、BCループ配列においてわずかに異なるだけ（「WY

40

50

W」対「YWW」)であるが、単離収量(9.4 mg/L対0.9 mg/L)及び細胞侵入効率においては劇的な差があることに留意されたい。同様に、MTD4のBCループとFGループの間でCPPモチーフを交換すると、発現が不十分で、活性はるかに低い変異体(表4のMTD5)が得られた。これらの結果は、MTDの適切な折り畳み/安定性と高い細胞侵入効率には、両親媒性CPPモチーフの存在だけでなく、タンパク質表面上での適切な提示も必要であることを示す。

【0163】

【表4】

表4. MTDのループ配列及び発現収量

タンパク質	挿入部位	元の配列*(配列番号)	変異体配列*(配列番号)	発現の質
MTD 1	FGループ	TGRGDSPA SSKPI (108)	TGRRRRWWW SKPI (111)	発現なし
MTD 2	BCループ	APAVTVRY Y (109)	APWWRRRR YY (112)	可溶性、収量 6.4 mg/L
MTD 3	CDループ	GGNSPVQE (110)	GGRRRRWWW VQE (113)	可溶性、収量 2 mg/L
MTD 4	BCループ	APAVTVRY Y (109)	APAWYWRYY (114)	可溶性、収量 9.4 mg/L
	FGループ	TGRGDSPA SSKPI (108)	TGRRRRSKP I (115)	
MTD 5	BCループ	APAVTVRY Y (109)	APARRRRYY (116)	可溶性、収量 0.6 mg/L
	FGループ	TGRGDSPA SSKPI (108)	TGWYWRSKP I (117)	
MTD 6	BCループ	APAVTVRY Y (109)	APAYWWRY (134)	可溶性、収量 0.9 mg/L
	FGループ	TGRGDSPA SSKPI (108)	TGRRRRSKP I (135)	
MTD 7	BCループ	APAVTVRY Y (109)	APAWWARY (136)	可溶性、収量 2.5 mg/L
	FGループ	TGRGDSPA SSKPI (108)	TGRRRRSKP I (137)	
MTD 8	BCループ	APAVTVRY Y (109)	APAWWWRRY Y (138)	可溶性、収量 3.6 mg/L
	FGループ	TGRGDSPA SSKPI (108)	TGRRASSKP I (139)	
MTD 9	BCループ	APAVTVRY Y (109)	APAWWARY (140)	可溶性、収量 6.2 mg/L
	FGループ	TGRGDSPA SSKPI (108)	TGWRRRRSK PI (141)	
MTD 10	BCループ	APAVTVRY Y (109)	APAWWRRYY (142)	可溶性、収量 0.6 mg/L
	FGループ	TGRGDSPA SSKPI (108)	TGRRWWSKP I (150)	

*変異誘発中に下線のある残基は削除され、太字の残基は挿入された。

【0164】

WT FN3をコードするDNA配列を化学的に合成し、原核生物発現ベクターpET

10

20

30

40

50

ー15bに連結した。タンパク質精製及びカーゴタンパク質との遺伝子融合を容易にするため、FN3のN末端に6ヒスチジンタグ及びトロンピン切断部位を付加し、一方、そのC末端には柔軟なリンカー配列（GGSGGSGGS、配列番号107）、続いて制限エンドヌクレアーゼSacIの認識部位及びシステインを付加した（表5）。すべてのループ挿入変異体をワンステップポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によって生成し（Qi, D., et al. (2008) *A one-step PCR-based method for rapid and efficient site-directed fragment deletion, insertion, and substitution mutagenesis*. *J. Virol. Meth.* 149:85-9020）、大腸菌で発現させた。変異タンパク質のうち、MTD1は、かなりの量の可溶性タンパク質を生成することができなかったが、WT FN3及びMTD2-5は、可溶性タンパク質を良好な収量で産生した（表4）。図2A～図2Bは、一例としてMTD4の発現及び精製を示す。すべてのタンパク質を、Ni-NTAカラムでの金属アフィニティークロマトグラフィーによってほぼ均質になるまで精製した。

10

【0165】

MTDのクローニング、発現、及び精製

すべてのループ挿入変異体を、ワンステップポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によって生成した（Qi, D., 同上）。プラスミドDNAのコード領域全体を配列決定することによって各構築物のペプチド配列（表5）を確認した。変異タンパク質の発現レベルを確認するためにパイロット規模のタンパク質発現を実施し、すべての変異体を5mLの大腸菌BL21（DE3）細菌培養液で発現させた。誘導を0.25mMのIPTGの存在下で37℃で実施した。発現レベルを、誘導前と誘導後の全細胞溶解物をSDSゲル上で比較することによって確認した（図2A～図2B）。

20

【0166】

30

40

50

【表 5】

表 5. WT FN3、MTD、及びMTD-Cargo融合のアミノ酸配列

タンパク質	配列番号	配列
FN3	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD
	1	LEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRIT
	8	YGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK PGVDYTTITVYAVTG <u>RGDSPASSKPI</u> SIN YRTGGSGGSGGSELC
MTD1	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD
	1	LEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRIT
	9	YGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK PGVDYTTITVYAVTG <u>RRRRWWW</u> SKPI SIN YRTGGSGGSGGSELC
MTD2	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD
	2	LEVVAATPTSLLSWDAP <u>WWWRRRR</u> YYR
	0	ITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISG LKPGVDYTTITVYAVTG <u>RGDSPASSKPI</u> S IN YRTGGSGGSGGSELC
MTD3	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD
	2	LEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRIT
	1	YGETGG <u>RRRRWWW</u> VQEFTVPGSKSTATI SGLKPGVDYTTITVYAVTG <u>RGDSPASSKPI</u> SIN YRTGGSGGSGGSELC
MTD4	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD
	2	LEVVAATPTSLLSWDAP <u>AWYWR</u> YYRIT
	2	YGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK PGVDYTTITVYAVTG <u>RRRR</u> SKPI SIN YRTGGSGGSGGSELC
MTD4a	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRDLEV
	2	AATPTSLLSWDAP <u>AWYWR</u> YYRITYGETGGNS
	3	PVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAV TG <u>RGDSPASSKPI</u> SIN YRTGGSGGSGGSELC
MTD4b	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRDLEV
	2	AATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGETGGNS
	4	PVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAV TG <u>RRRR</u> SKPI SIN YRTGGSGGSGGSELC
MTD5	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRDLEV
	2	AATPTSLLSWDAP <u>ARRRR</u> YYRITYGETGGNS
	5	PVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAV TG <u>WYWR</u> SKPI SIN YRTGGSGGSGGSELC
MTD6	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRDLEV
	4	AATPTSLLSWDAP <u>AYWW</u> RYRITYGETGGNS
	3	PVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAV TG <u>RRRR</u> SKPI SIN YRTGGSGGSGGSELC
MT	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRDLEV

10

20

30

40

50

D7	4	AATPTSLLISWDAPAWWARYYRITYGETGGNS
	4	PVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAV
		TGRRRRRSKPISINYRTGGSGGSGGSELC
MT	1	MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRDLEV
D8	4	AATPTSLLISWDAPAWWRRYYRITYGETGGN
	5	SPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYA
		VTGRRASSKPISINYRTGGSGGSGGSELC
MT	1	MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRDLEV
D9	4	AATPTSLLISWDAPAWWARYYRITYGETGGNS
	6	PVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAV
		TGWRRRRSKPISINYRTGGSGGSGGSELC
MT	1	MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRDLEV
D1	4	AATPTSLLISWDAPAWWRRYYRITYGETGGNS
0	7	PVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAV
		TGRRWWSKPISINYRTGGSGGSGGSELC
MT	1	MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD
D4	2	LEVVAATPTSLLISWDAPAWYWRYYRIT
-P	6	YGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK
TP		PGVDYTITVYAVTGRRRRRSKPISINYRT
1B		GGSGGSGGSELMEKEKEFEQIDKSGSWA
		AIYQDIRHEASDFPCRVAKL PKNKNRNR
		YRDVSPFDHSRIKLHQEDNDYINASLIK
		MEEAQRSYILTQGPLPNTCGHFWEMVWE
		QKSRGVVMLNRVMEKGS LKCAQYWPQKE
		EKEMIFEDTNLKLTLISEDIKSYT VRQ
		LELENLTTQETREILHFHYTTWPDFGVP
		ESPASFLNFLFKVRESGSL SPEHGPVVV
		HCSAGIGRSGTFCCLADTCLLLMDKRKDP
		SSVDIKKVLLEM RKFRMGLIQTADQLRF
		SYLAVIEGAKFIMGDSSVQDQWKEL SHE
		DLEPPPEHI PPPPRPPKRILEPHN
MT	1	MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD
D4	2	LEVVAATPTSLLISWDAPAWYWRYYRIT
-N	7	YGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK
S1		PGVDYTITVYAVTGRRRRRSKPISINYRT
		GGSGGSGGSELGSSVSSVPTKLEVVAATP
		TSLLISWDAPAVTVDYVITYGETGGNS
		PVQKFEPVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT
		VYAWGWHGQVYYMGSPI SINYRT
MT	1	MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD
D4	2	LEVVAATPTSLLISWDAPAWYWRYYRIT
-R	8	YGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK
BD		PGVDYTITVYAVTGRRRRRSKPISINYRT
V		GGSGGSGGSELKTSNTIRVLLPNQEWTV
		VKVRNGMSLHDSLMKALKKRHGLQPES SA
		VFRLLEHEHKGKKARLDWNTDAASLIGEE
		LQVDFLDHVPLTTHNFARKTFLKLG IHR
		D
MT	1	MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD
D4	4	LEVVAATPTSLLISWDAPAWYWRYYRIT

10

20

30

40

50

-S	8	YGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK	
EP		PGVDYTITVYAVTGRRRRRSKPISINYRT	
		GGSGGSGGSEL SKGEELFTGVVPILVEL	
		DGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKF	
		ICTTGKLPVPWP T LVTTLTYGVQCFSRY	
		PDHMKRHDFFK SAMPEGYVQERTIFFKD	
		DGNYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGIDF	
		KEDGNILGHKLEYNYNNDHQVYIMADKQK	
		NGIKANFKIRHNI EDGGVQLADHYQQNT	
		PIGDGPVLLPDNHYLFTTSTLSKDPNEK	
		RDHMLVLL E FVTAAGITHGMDELYK	10
ME	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPRD	
NC	4	LEVVAATPTSLLISWDAPAWYWRYYRIT	
	9	YGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK	
		PGVDYTITVYAVTGRRRRRSKPISINYRT	
		GGSGGSGGSELMVSKGEELFTGVVPILV	
		ELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT L	
		KFICTTGKLPVPWP T LVTTLTYGVQCFS	
		RYPDHMKQHDFFK SAMPEGYVQERTIFF	
		KDDGNYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGI	
		DFKEDGNILGHKLEYNYNNSHNVYIMADK	
		QKNGIKVNFKIRHNI EDGSVQLADHYQQ	20
		NTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPN	
		EKRDHMLVLL E FVTAAGITLGMDELYKSG	
		EQKLISEEDLGGPKKKRKVSNNLLTVHQN	
		LPALPVDATSD EVRKNLMDMFRDRQAFS	
		EHTWKMLLSVCRSWAAWCKLNNRKWFP A	
		EPEDVRDYLLYLQARGLAVKTIQQHLGQ	
		LNMLHRRSGLPRPSDSNAVSLVMRRIRK	
		ENV DAGERAKQALAFERTDFDQVRS LME	
		NSDRCQDIRNL AFLGIA YNTLLRI AEIA	
		RIRVKDISRTDGG RMLI HIGRTKTLVST	
		AGVEKALS LGVTKLVERWISVSGVADDP	
		NNYLFCRV RKNGVAAPSATSQ LSTRALE	30
		GIFEATHRLIYGAKDDSGQRYLAWSGHS	
		ARVGAARDMARAGVSIPEIMQAGGWTNV	
		NI VMNYIRNL DSETGAMVRLLEDGD	

【0167】

大規模発現条件は小規模発現で使用したものと同一であり、大腸菌細胞を遠心分離し、
 -80℃で保存した。これらの細胞を、溶解緩衝液（洗浄緩衝液50mL、リゾチーム0
 .2mg/mL、β-メルカプトエタノール2mM、PMSF 2mM、Roche c
 ompleteプロテアーゼ阻害剤カクテル2錠）を使用して溶解した。細胞ペレットを
 溶解緩衝液に均一に再懸濁した後、細胞を2回超音波処理した（増幅率70%）。粗細胞
 溶解物を遠心分離し（12000gで20分間）、可溶性細胞溶解物を収集した。高速タン
 パク質液体クロマトグラフィー（FPLC）を使用してタンパク質の精製を実施し、可
 溶性細胞溶解物をNi-NTAカラム（15mMイミダゾールを含む）にロードした。カ
 ラムを洗浄緩衝液（50mMトリス、pH7.4、300mM NaCl、5%グリセロ
 ール、及び50mMイミダゾール）で徹底的に洗浄した。タンパク質を、50~500m
 Mの直線勾配のイミダゾール（pH7.4）を含む洗浄緩衝液で30分かけて溶出した。

【0168】

MTD4-PTP1B、MTD4-NS1、MTD4-RBDV、MTD4-SEP、
 MTD4-GFP11、及びMENCのクローニング、発現、及び精製

鋳型としてのプラスミドDNA、及びPTP1Bコード配列の5'末端と3'末端にそれ
 ぞれSacIとBamHI制限部位を含むプライマーを使用してPTP1Bのコード配列

(アミノ酸 1～321) を PCR によって増幅した。PCR 産物を制限酵素 *SacI* 及び *BamHI* で消化し、同じ 2 つの酵素で線状化したプラスミド pET-15b-MTD4 に連結した。これにより、PTP1B が MTD4 の C 末端に融合された。MTD4-RBDV、MTD4-NS1、MTD4-SEP、及び MENC 融合タンパク質をコードする他の pET15b ベースのプラスミドも同様に構築し、ただし、RBDV、NS1、SEP、及び ENC コード配列の 3' 末端に *BamHI* ではなく *XhoI* 制限部位を付加した。GFP11 ペプチドをワンステップ PCR 反応によって MTD4 の C 末端に挿入した (D. Qi, et al., 「A one-step PCR-based method for rapid and efficient site-directed fragment deletion, insertion, and substitution mutagenesis」, J Virol Methods, 149 (1): 85-90, 2008)。制限酵素マッピング及び全コード配列の配列決定によって DNA 構築物の信頼性を確認した。

10

【0169】

適切なプラスミドで形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) 細胞を、75 mg/L のアンピシリンを補充した LB 培地中で 37℃ で増殖させた。OD₆₀₀ が 0.6 に達したら、0.25 mM の IPTG を添加して細胞を 37℃ で 4 時間誘導した。細胞を遠心分離によってペレット化した。MTD4-RBDV の場合、細胞ペレットを 50 mL (細胞培養液 1 リットルあたり) の溶解緩衝液 [50 mM トリス (pH 7.4)、150 mM NaCl、25 mM イミダゾール、3 mM β-メルカプトエタノール、プロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤、及び 20 mg/mL リゾチーム] に再懸濁した。細胞を短時間超音波処理し、12,000 g で 20 分間遠心分離した。粗溶解物を FPLC に取り付けた 5 mL の HisTrap Ni-NTA カラムにロードした。カラムを洗浄緩衝液 (50 mM トリス、pH 7.4、300 mM NaCl、5% グリセロール、及び 50 mM イミダゾール) で徹底的に洗浄した。タンパク質を、500 mM のイミダゾールを含む洗浄緩衝液で溶出した。MTD4-PTP1B、MTD4-SEP、MENC、MTD4-GFP11、及び MTD4-NS1 も同様に精製し、ただし、MTD4-NS1 については、細胞ペレットを 50 mM トリス (pH 8)、500 mM NaCl、25 mM イミダゾール、3 mM β-メルカプトエタノール、プロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤、及び 20 mg/mL リゾチームに再懸濁した。MENC タンパク質を BL21 Rosetta pLysS 細胞株で発現させ、誘導を 18℃ で一晩実施した。MTD4-PTP1B の比活性を、p-ニトロフェニルリン酸 (pNPP) を基質として使用して測定し、WT PTP1B の比活性と同等であることがわかった。

20

30

【0170】

MTD の細胞侵入効率

野生型 FN3 及び MTD を、テトラメチルローダミン-5-マレイミド (TMR) を用いてそれらの単一の C 末端システインで蛍光標識した。HeLa (ヒト子宮頸癌) 細胞を TMR 標識タンパク質とともに培養し、共焦点顕微鏡で固定せずに画像化した。興味深いことに、WT FN3 は細胞内蛍光パターンが点状であるにもかかわらず、顕著な細胞侵入を示し、これは、内部移行したタンパク質のほとんどがエンドソーム/リソソーム内に閉じ込められていることを示す (図 3A)。対照的に、MTD4^{TMR} で処理した HeLa 細胞は、点状蛍光に加えて、細胞体積全体 (核を含む) にわたって容易に視認できる拡散蛍光を示した (図 3B)。拡散した細胞内蛍光の存在は、内部移行した MTD4^{TMR} のかなりの部分がエンドソームから出てサイトゾル (及び核) にうまく到達したことを示す。MTD2^{TMR} で処理した細胞の蛍光パターンは、FN3 で処理した細胞と MTD4 で処理した細胞の蛍光パターンの間であり、いくらかの拡散した蛍光が見えるが、蛍光は主に点状である (図 3B)。MTD5^{TMR} は有意な細胞内蛍光を生じなかった (データは示されていない)。

40

【0171】

細胞侵入効率を定量化するために、次に細胞をフローサイトメトリーによって分析し、

50

その結果を、以前に報告された高効率環状CPPであるCPP12の結果と比較した。タンパク質の染料標識の程度を調整した後の予備データは、MTD4がFN3またはMTD2よりも効率的にHeLa細胞に侵入したが、CPP12ほど効率的ではなかったことを示した(図4)。

【0172】

PTP1Bの細胞内送達

MTDによる哺乳動物細胞のサイトゾルへのタンパク質カーゴの機能的送達を実証するために、タンパク質チロシンホスファターゼ1B(PTP1B)をカーゴとして選択し、MTD4のC末端に遺伝的に融合させた。チロシンリン酸化は、通常、サイトゾル及び核タンパク質、または膜貫通タンパク質のサイトゾルドメインに限定される。PTP1Bは、多くの細胞内タンパク質の脱リン酸化を触媒する広範囲特異性ホスファターゼである(Selner, N. G., et al. (2014) Diverse levels of sequence selectivity and catalytic efficiency of protein-tyrosine phosphatases. *Biochem.* 53 (2): 397-412)。PTP1Bのサイトゾル送達は細胞内タンパク質のホスホチロシン(pY)レベルを低下させると予想され、これは抗pYウェスタンブロット法によって容易にモニタリングすることができる。NIH3T3細胞を、異なる濃度のMTD4-PTP1Bで4時間処理し、洗浄し、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤の存在下で溶解した。細胞タンパク質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗pY抗体4G10でブロットした。MTD4-PTP1Bは、HeLa細胞におけるpYレベルを用量依存的に低下させ、5mMではpYがほぼ完全に消失した(図5)。

【0173】

Ras阻害剤の細胞内送達

MTD4の有用性をさらに実証し、治療可能性のある細胞透過性タンパク質を生成するために、MTD4を、変異KRasに高い親和性と特異性で結合する2つの以前に報告されたタンパク質に融合させた。Ras(K-, H-, NRasを含む)の変異は、すべてのヒト癌の約30%に見られ、Rasは最も重要な癌治療薬の標的の1つとなっている(従来技術、I. A., et al. (2012) A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 72 (10): 2457-67、Khan, I., et al. (2020) Therapeutic targeting of RAS: New hope for drugging the "undruggable. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1867, 118570)。残念ながら、Rasは細胞内にあり、その表面には小分子が結合するための主要な結合ポケットがないため、最も困難な(かつ創薬不可能な)薬物標的の1つである。現在までに、G12C変異KRasを共有結合的に修飾(及び阻害)するいくつかの小分子が臨床に導入されており、そのうちの1つはFDAによって承認されており、これは、Rasが、Ras変異癌を治療するための実行可能な標的であることを実証している(Moore, A. R., et al. (2020) RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nature Rev. Drug Disc.* 19 (8): 533-552)。KRas G12D変異体に対して選択的な強力な非共有結合阻害剤も最近報告された(Wang, X., et al. (2021) Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRASG12D Inhibitor. *J. Med. Chem.* 10.1021/acs.jmedchem.1c01688)。しかし、多くの他のRas変異体(例えば、G12V、G12S、G13C、及びQ61H)には、そのような薬剤は存在しない。

【0174】

これまでの研究者らは、ファージディスプレイスクリーニングによってKRasの強力

なタンパク質阻害剤を生成してきた。Wiechmannらは、C-Raf Ras 結合ドメイン (RBD) のファージディスプレイライブラリをスクリーニングし、GTP 結合 HRas のエフェクター結合部位に WT C-Raf RBD (K_D 約 3 nM) よりも約 20 倍高い親和性で結合するいくつかの変異体、RBDV を同定した (Wiechmann, S., et al. (2020) Conformation-specific inhibitors of activated Ras GTPases reveal limited Ras dependency of patient-derived cancer organoids. J. Biol. Chem. 295 (14) : 4526-4540)。Ras 変異癌細胞における RBDV の発現は Ras シグナル伝達を阻害し、癌細胞のアポトーシスをもたらした。同様に、Koide 氏及び共同研究者らは、HRas に対してファージディスプレイされた FN3 変異体の大規模なライブラリをスクリーニングし、アロステリック部位に結合して原形質膜上の Ras の二量体化を防止する「NS1」と呼ばれる強力な結合剤を発見した (Spencer-Smith, R., et al. (2017) Inhibition of RAS function through targeting an allosteric regulatory site. Nat. Chem. Biol. 13: 62-68)。細胞内で発現すると、NS1 はまた、Ras シグナル伝達を阻害し、Ras 変異癌細胞のアポトーシス死を誘導した (Khan, I., et al. (2019) Targeting the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ dimerization interface of K-RAS inhibits tumor formation in vivo. Oncogene 38 (16) : 2984-2993)。GTP 結合状態ですべての Ras アイソフォーム (K-, H-, 及び NRas) に結合する RBDV とは異なり、NS1 は、ヌクレオチドの同一性に関係なく、HRas (K_D = 13 nM) 及び KRAS (K_D = 65 nM) に特異的である。残念ながら、RBDV 及び NS-1 は細胞膜を透過して標的タンパク質に到達することができないため、治療薬としては適していない。

10

20

30

40

【0175】

RBDV の 1 つ (RBDV3) または NS1 を MTD4 の C 末端に遺伝的に融合させ、それぞれ MTD4-RBDV と MTD4-NS1 を生成した。タンパク質を大腸菌で発現させ、金属アフィニティークロマトグラフィーによってほぼ均質になるまで精製した。次に、融合タンパク質を Ras 変異癌細胞の生存率を低下させる能力について試験した。MTD4-RBDV は、非小細胞肺癌 (H358)、膵管腺癌 (Mia PaCa-2)、非小細胞肺癌 (A549)、及び大腸癌細胞 (SW480) の生存率を用量依存的に低下させ、 IC_{50} 値はそれぞれ、 1.2 ± 0.2 、 1.2 ± 0.1 、 1.7 ± 0.2 、及び $2.2 \pm 0.4 \mu M$ であった (図 6A)。同様に、MTD4-NS1 は、前述の細胞の生存率を用量依存的に低下させ、 IC_{50} 値はそれぞれ、 1.4 ± 0.2 、 1.5 ± 0.1 、 1.8 ± 0.1 、 $0.9 \pm 0.2 \mu M$ であった (図 6B)。NRas ではなく KRas 及び HRas に対する NS1 の選択性を検証するために、H1915 非小細胞肺癌細胞 (HRAS^{Q61L}) 変異体及び H1299 非小細胞肺癌細胞 (NRAS^{Q61K}) 変異体における両方の融合タンパク質を試験した。MTD4-RBDV は両方の細胞で活性を示し、 IC_{50} はそれぞれ、 $4.7 \pm 1.1 \mu M$ 及び $2.4 \pm 0.3 \mu M$ であった。驚くべきことに、MTD4-NS1 は両方の細胞で活性を示し、 IC_{50} は $1.5 \pm 0.2 \mu M$ 及び $1.6 \pm 0.2 \mu M$ であった。NS1 を MTD4 の N 末端に融合させて NS1-MTD4 を生成した。NS1-MTD4 も、H358 及び Mia PaCa-2 の生存率を用量依存的に低下させ、 IC_{50} はそれぞれ、 $1.1 \pm 0.1 \mu M$ 及び $1.8 \pm 0.2 \mu M$ であった (図 6C)。NS1-MTD4 はまた、H1299 細胞の生存率を低下させ、 IC_{50} は $1.6 \pm 0.2 \mu M$ であった。

【0176】

癌細胞の生存率の低下が Ras エフェクタータンパク質相互作用及び Ras シグナル伝達のオンターゲット阻害によって引き起こされるか否かを判断するために、Rabbits 氏及び共同研究者らが開発した生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) アッセイを

50

使用した (Bery, N., et al. (2018) BRET-based RAS biosensors that show a novel small molecule is an inhibitor of RAS-effector protein-protein interactions. *eLife* 7:e37122)。
Ras 変異を持たず、Ras 阻害剤に対して比較的感受性の低いヒト胎児腎臓 (HEK 293T) 細胞に、KRas G12V (またはG12D) ルシフェラーゼ及びc-Raf RBD緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合をコードするプラスミドDNAをトランスフェクトした。KRas 変異体とRBDとの間の相互作用により、膜透過性ルシフェラーゼ基質であるセレンテラジン400aを添加すると、ルシフェラーゼ供与体からGFP受容体へのBRETシグナルが生成される。Ras-RBD相互作用を遮断する阻害剤は、BRETシグナルを低下させると予想される。図7に示すように、MTD4-RBDVは、KRas G12VまたはG12D変異体のいずれかをトランスフェクトしたHEK 293T細胞におけるBRETシグナルを用量依存的に低下させ、IC₅₀値は5~10 μMであった。MTD4-NS1もBRETシグナルを低下させたが、MTD4-RBDVほど強力ではなく、これは、それらの相対的なRas結合親和性とよく一致している。さらに、RBDVとは異なり、NS1はエフェクター結合部位に結合せず、HRasまたはKRasへの結合に関してRafと直接競合しない。代わりに、NS1はHRas/KRasの二量体化部位に結合し、Ras-Raf相互作用を間接的に阻害する。MTD4-NS1の場合、10 μMタンパク質でBRET比が突然低下したことに留意されたい。これは、高い阻害剤濃度でHEK 293T細胞の生存率が部分的に低下したことによって引き起こされる可能性がある。後者は、Rasシグナル伝達のオンターゲット阻害に加えて、MTD4-NS1がオフターゲット効果も有する可能性があることを再び示唆している。

10

20

30

40

50

【0177】

ウェスタンブロット分析によってRasの下流のシグナル伝達タンパク質のリン酸化レベルを調べることによって融合タンパク質のオンターゲット活性をさらに評価した。Rasは、Raf/MEK/ERK及びPI3K/Aktシグナル伝達経路を活性化し、タンパク質キナーゼMEK、ERK、及びAktのリン酸化を増加させる。Ras機能の阻害は、Akt及びMEKのリン酸化レベルを低下させるはずである。実際、MiaPaCa-2細胞をMTD4-RBDVで処理すると、Akt及びMEKのリン酸化は用量依存的に低下し、IC₅₀値は1~3 μMであったが、Akt及びMEKの総レベルは比較的一定のままであった (図8A)。MTD4-NS1もp-Akt及びp-MEKレベルを低下させたが、MTD4-RBDVほど強力ではなかった (図8B)。

【0178】

MTD4-RBDV及びMTD4-NS1がRas変異癌細胞のアポトーシスを誘導するか否かを試験した。したがって、H358肺癌細胞を融合タンパク質で24時間処理し、フローサイトメトリー分析の前にAlexa Fluor (商標) 488-アネキシンV及びヨウ化プロピジウムで染色した。MTD4-RBDVは、アネキシンV陽性細胞集団の用量依存的な増加を示し、これは、Cell Gloアッセイで観察された生存率低下の原因がアポトーシスであることを示す (図9)。MTD4-NS1はまた、2.5 μMという低濃度で強力なアポトーシスを引き起こした (図9)。

【0179】

MTD4のサイトゾル送達効率

生成された10個のMTDのうち、MTD4は大腸菌内での発現収量が比較的高く、共焦点顕微鏡で監視すると総細胞侵入効率が優れている。したがって、さらなる評価のためにMTD4を選択し、2つの異なる方法を使用してそのサイトゾル送達効率を測定した。まず、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 相補性アッセイを使用し、このアッセイは、16-aaペプチドGFP11 (GFPの11番目のβ鎖に対応する) をスーパーフォルダーGFP1~10に結合させて機能的なGFPを形成することを含む。GFP11をMTD4のC末端に遺伝的に融合させた。比較として、GFP11もCYP12に化学的にコンジ

ュゲートさせた。HEK293T細胞を一過性にトランスフェクトしてGFP1～10タンパク質を発現させ、10mMのGFP11、MTD4-GFP11、またはCPP12-GFP11とともに6時間インキュベートし、生細胞共焦点顕微鏡で調べた。MTD4-GFP11で処理した細胞は、細胞体積全体にわたって強くかつ拡散した蛍光を示した(図10A～図10D)。CPP12-GFP11で処理した細胞も強い蛍光を示したが、シグナルはより点状であった。対照的に、未処理細胞、及び非コンジュゲートGFP11で処理した細胞はほとんど蛍光を示さなかった。

【0180】

NanoLuc (VSGWRLFKKIS) (配列番号151) 由来の11残基ペプチドであるHiBitをジスルフィド結合を介してFN3、MTD、及びCPP12にコンジュゲートさせることによって、以前に報告されたルシフェラーゼ相補性アッセイを使用した(S. L. Y. Teo, Jet al., 「Unravelling cytosolic delivery of cell penetrating peptides with a quantitative endosomal escape assay」, Nat Commun, 12 (1): 3721, 2021)。HEK293T細胞にNanoLucの18-kDaサブユニット(LgBit)をコードするプラスミドDNAをトランスフェクトし、次にHiBitまたはHiBitコンジュゲートとともにインキュベートした。サイトゾルへの送達に成功すると、HiBitペプチドは細胞内チオール(例えば、グルタチオン)によってコンジュゲートから放出され、サイトゾルLgBitに特異的に結合して触媒活性ルシフェラーゼを形成し、その活性は、細胞透過性基質フリマジンの添加によってリアルタイムで定量化される。CPP12-S-S-HiBit、MTD4-S-S-HiBit、及びMTD2-S-S-HiBitは、HEK293T細胞におけるルシフェラーゼ活性を用量依存的に増加させたが、FN3-S-S-HiBitは増加させなかった(図11)。興味深いことに、MTD4及びCPP12は高濃度(例えば、5 μ M)では同様のサイトゾル送達効率を示したが、低濃度(例えば、0.19 μ M及び0.56 μ M)では、MTD4はCPP12よりも活性が5～10倍高かった(図10A～図10D)。非コンジュゲートHiBitも、高濃度ではある程度のルシフェラーゼ活性を示し、これはおそらく、HiBitの両親媒性配列を考慮すると、HiBitの本来の細胞透過活性が弱いためである(M. K. Schwinn et al., 「CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide」, ACS Chem Biol, 13 (2): 467-474, 2018)。

【0181】

追加のタンパク質カーゴの細胞内送達

最初に、MTD4をタンパク質カーゴであるSuperecliptic pHluorin (SEP)を送達する能力について試験した。SEPは、GFPのpH感受性変異体(pKa約7.2)であり、哺乳動物のサイトゾルの中性環境(pH7.4)では高度に蛍光性であるが、エンドソーム(pH5.5～6.5)またはリソソーム(pH4.5～5.5)内では基本的に非蛍光性である(S. Sankaranarayanan, et al., 「The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity」, Biophys J, 79 (4): 2199-208, 2000)。したがって、細胞内蛍光は主に、サイトゾルにうまく到達したSEPの量を反映している。SEPをMTD4のC末端に遺伝的に融合させ、大腸菌からMTD4-SEP融合タンパク質を精製した。HeLa細胞を5mMのSEPまたはMTD4-SEPとともに2時間インキュベートし、生細胞共焦点顕微鏡で画像化した。MTD4-SEPで処理した細胞は、細胞体積全体にわたって強い蛍光を示したが、未処理細胞またはSEPで処理した細胞では蛍光は検出されなかった(図12A～図12C)。

【0182】

哺乳動物細胞のサイトゾルへのタンパク質カーゴの機能的送達を実証するために、タン

パク質チロシンホスファターゼ1B (PTP1B) をカーゴとして選択し、MTD4のC末端に遺伝的に融合させた。チロシンリン酸化は、通常、サイトゾル及び核タンパク質、または膜貫通タンパク質のサイトゾルドメインに限定される。PTP1Bは、多くの細胞内タンパク質の脱リン酸化を触媒する広範囲特異性ホスファターゼである (N. G. Selenner et al., 「Diverse levels of sequence selectivity and catalytic efficiency of protein-tyrosine phosphatases」, *Biochemistry*, 53 (2) : 397-412, 2014)。PTP1Bのサイトゾル送達には細胞内タンパク質のホスホチロシン (pY) レベルを低下させると予想され、これは抗pYウェスタンブロット法によって容易にモニタリングすることができる。HEK293T細胞を、異なる濃度のMTD4-PTP1Bで6時間処理し、洗浄し、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤の存在下で溶解した。細胞タンパク質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗pY抗体4G10でブロットした。MTD4-PTP1Bは、HEK293T細胞における全体的なpYレベルを用量依存的に低下させ、EC₅₀値は5 nM以下であった (図13A~図13B)。5 nM MTD4-PTP1Bで処理した細胞は5 mM非コンジュゲートPTP1B (WT) で処理した細胞よりもpYレベルが低かったという事実に基づいて、MTD4は、PTP1Bのサイトゾル侵入を1000倍超増加させると推定した。

10

【0183】

MTD4-EGFP-NLS-Creのin-vivo生体内分布

20

マウスにおけるMTD4の生体内分布を研究するために、EGFP-NLS-Creタンパク質をMTD4のC末端に遺伝的に融合させた。Creリコンビナーゼは、P1バクテリオファージ由来の酵素であり、部位特異的DNA組換えを触媒する (K. Abremski, et al., 「Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein」, *J Biol Chem*, 259 (3) : 1509-14, 1984)。MTD4-EGFP-NLS-Cre (MENC) 融合タンパク質をトランスジェニックマウスの細胞に送達することに成功すると、DNA組換え事象が発生し、赤色蛍光タンパク質 (mCherry) の発現が活性化されると予想される。トランスジェニックマウス由来の初代細胞をインビトロで1 μ M MENCで処理すると、48時間後にmCherryが軽度発現した (データは示されていない)。

30

【0184】

インビトロデータに後押しされ、MENC (8 mg/kg) を4匹のトランスジェニックマウスの尾静脈に注射し、2匹のマウスを3時間後に安楽死させ、他のマウスを処置から48時間後に安楽死させた。様々な臓器を採取し、固定、包埋し、スライスして共焦点顕微鏡下で可視化した。組織からのあらゆる自己蛍光を減らすために、サンプルをトゥールブラック染料で処理した。脳を除くほとんどの組織で強いEGFP蛍光が観察され、これは、MENCが様々な臓器に広く生体内分布していることを示す (図14)。一方、mCherryシグナルは48時間後でもほとんどの臓器で弱く、これはおそらく、核局在化配列 (NLS) が2つのタンパク質ドメインに挟まれており、核局在化効率が低いためである。それにもかかわらず、共焦点画像は、様々なマウス臓器におけるMENCの生体内分布を明確に示す。

40

【0185】

MTD4の血清安定性

MTD4をヒト血清とともに様々な時間インキュベートし、SDS-PAGEによって分析した。切断産物がMTD4よりわずかに小さく、そのN末端の6xHisタグを介してニッケル親和性カラムに結合することができるため、MTD4は、C末端付近の単一位でタンパク質分解を受けるようである (図15A)。MTD4の分解は $t_{1/2}$ が約3時間で起こり、24時間後にはほぼ完了する。比較として、FN3は同様の切断を受ける

50

ようであるが、 $t_{1/2}$ は24時間を超える(図15B)。質量分析により、FN3及びMTD4の切断を確認した。

【0186】

他の適切なMTD足場

現在のMTDはすべてヒトフィブロネクチンの10番目のFN3ドメインに由来しているが、他の多くのタンパク質ドメインも、追加のMTDを操作するための適切な足場として機能し得ると仮定されている。一般に、優れた足場は、2つ以上の隣接する表面ループ(2つのCPPモチーフを組み込むため)を含み、ジスルフィドを含まないが安定して折り畳まれ(配列変化に耐えるため)、大腸菌または真核生物宿主で高収量で発現し、それ自体の生物学的機能を持たないものでなければならない。これらの基準に基づいて、適切なMTD足場の例としては、フィブロネクチンの他のFN3ドメイン(Kornblitt AR, et al., Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. EMBO J. 4 (7): 1755-1759, 1985)、ナノボディ(Muyldermans S., 「Nanobodies: natural single-domain antibodies」. Annu Rev Biochem. 82: 775-797, 2013)、設計アンキリン反復タンパク質(DARPin s)(Stumpp MT, et al., 「DARPin s: a true alternative to antibodies」. Curr Opin Drug Discov Devel. 10 (2): 153-159, 2007)、コンセンサステトラトリコペプチドリピート(CTPR)(Uribe KB, et al., 「Engineered Repeat Protein Hybrids: The New Horizon for Biologic Medicines and Diagnostic Tools」. Acc Chem Res. 54 (22): 4166-4177, 2021)、アンチカリン(Rothe C, et al., Anticalin™ Proteins as Therapeutic Agents in Human Diseases. BioDrugs. 32 (3): 233-243, 2018)、ナノフィチン/アフィチン(Goux M, et al., 「Nanofitin as a New Molecular-Imaging Agent for the Diagnosis of Epidermal Growth Factor Receptor Over-Expressing Tumors」. Bioconjug Chem. 28 (9): 2361-2371, 2017)、アフィマー(Tiede C, et al., 「Affimer proteins are versatile and renewable affinity reagents」. Elife. 6: e24903, 2017)、アフィリン(Ebersbach H, et al., 「Affilin-novel binding molecules based on human gamma-B-crystallin, an all beta-sheet protein」. J Mol Biol. 372 (1): 172-185, 2007)、FHAドメイン(Durocher D, et al., 「The FHA domain」. FEBS Lett. 513 (1): 58-66, 2002)、及びSH2ドメイン(Pawson T, et al., 「SH2 domains, interaction modules and cellular wiring」. Trends Cell Biol. 11 (12): 504-511, 2001)が挙げられる。

【0187】

アッセイ

共焦点顕微鏡観察

HeLa細胞を、4つの区画を有する35/10mmのガラス底マイクロウェルディッシュに 5×10^4 細胞/mLの密度で播種し、10% FBS及び1% Absを含有するDMEM中で一晩培養した。細胞をDPBSで2回洗浄し、1% FBS及び1% Absを

有するフェノールレッド不含DMEM中で5 μ MのTMR標識タンパク質で2時間処理した。細胞をDPBSで2回洗浄し、フェノールレッド不含DMEMを補充し、Nikon A1R生細胞イメージング共焦点顕微鏡で画像化した。画像解析にはNIS Elements ARを使用した。

【0188】

フローサイトメトリー

HeLa細胞を24ウェルプレートに7.5 $\times$ 10⁴細胞／ウェルの密度で播種した。実験当日、1% FBS及び1% Absを補充したDMEM培地中の細胞を5 μ MのTMR標識タンパク質とともに2時間インキュベートした。細胞を冷DPBSで洗浄し、トリプシン処理により採取した。剥離した細胞をDPBSで2回洗浄し、DPBSに再懸濁し、フローサイトメトリー (BD FACS Aria III) によって分析した。

10

【0189】

ウェスタンブロット法

NIH-3T3細胞を、10% FBS及び1% Absを補充した標準DMEM中で、6ウェルプレートに10⁶細胞／ウェルの密度で37℃、5% CO₂で播種した。細胞を無血清培地中で3時間飢餓状態にした。細胞を異なる濃度のMTD4-PTP1Bで4時間処理し、EGF (50 ng/mL) で10分間刺激した。細胞を採取し、PBSで洗浄し、プロテアーゼ、ホスファターゼ阻害剤、及び過バナジン酸ナトリウムを含有する100 μ LのPierce RIPA緩衝液 (Thermo) 中で氷上で30分間溶解した。溶解物を15,000 rpmで20分間遠心分離した。各サンプルの総タンパク質濃度を、BCAタンパク質アッセイキット (Thermo) を使用して測定した。等量のタンパク質を10% SDS-PAGEゲルの各レーンにロードした (120 V、2.5時間)。タンパク質を4℃で電気泳動によりニトロセルロース膜に転写した (90 V、2.5時間)。膜を、TBS-T緩衝液 (20 mM トリス pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% (v/v) Tween-20) 中の5% BSAで室温で1時間ブロックした。最後に、膜を抗pY抗体4G10 (1:1000希釈) とともに4℃で一晩インキュベートした。膜をTBS-Tで3回洗浄し、蛍光標識二次抗体 (1:10,000希釈) とともに室温で2時間インキュベートした。膜を再びTBS-Tで3回洗浄し、LICOR Odyssey CLx装置を使用してシグナルを得た。

20

【0190】

抗p-Akt抗体及び抗p-MEK抗体を用いたウェスタンブロット法の場合。Mia PaCa-2細胞を、10% FBS及び1% ABSを補充したDMEM培地中で12ウェルプレートに150,000細胞／ウェルの密度で播種し、37℃、5% CO₂でインキュベートした。翌日、細胞をPBSまたは様々濃度のMTD4-RBDVもしくはMTD4-NS1で4時間処理し、その後EGF (50 ng/mL) で10分間刺激した。MTD4-PTP1Bについて説明したように、細胞を採取し、溶解し、抗p-Akt抗体及び抗p-MEK抗体を用いたウェスタンブロット法によって分析した。

30

【0191】

HEK293T細胞を、10% FBS及び1% Absを補充した標準DMEM中で、6ウェルプレートに30 $\times$ 10⁵細胞／ウェルの密度で37℃、5% CO₂で播種した。細胞を無血清培地中で異なる濃度のMTD4-PTP1Bで6時間処理した。細胞を採取し、PBSで洗浄し、プロテアーゼ、ホスファターゼ阻害剤、及び過バナジン酸ナトリウムを含有する100 μ LのPierce RIPA緩衝液 (Thermo) 中で氷上で30分間溶解した。溶解物を15,000 rpmで20分間遠心分離した。各サンプルの総タンパク質濃度を、BCAタンパク質アッセイキット (Thermo) を使用して測定した。等量のタンパク質を10% SDS-PAGEゲルの各レーンにロードした (120 V、2.5時間)。タンパク質を4℃で電気泳動によりニトロセルロース膜に転写した (90 V、2.5時間)。膜を、TBS-T緩衝液 (20 mM トリス pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% (v/v) Tween-20) 中の5% BSAで室温で1時間ブロックした。最後に、膜を抗pY抗体4G10 (1:1000希釈) とともに4℃で一晩イン

40

50

キュベートした。膜をTBSTで3回洗浄し、蛍光標識二次抗体（1：10，000希釈）とともに室温で2時間インキュベートした。膜を再びTBSTで3回洗浄し、LICOR Odyssey CLx装置を使用してシグナルを得た。

【0192】

細胞生存率アッセイ

H358、MiaPaCa-2、H1915、またはH1299細胞を白色96ウェルプレートに播種した（5000細胞／ウェル）。翌日、細胞を段階希釈したタンパク質溶液またはPBSで処理した。細胞を37℃、5%CO₂で72時間インキュベートした。Cell Titer Gloを添加してさらに15分間インキュベートした後、TECAN機器で発光を測定した。報告された生存率の値は、PBSで処理した対照細胞の生存率に対するものである。

10

【0193】

BRETアッセイ

HEK293Tを6ウェルプレートに播種し（650，000／ウェル）、37℃、5%CO₂でインキュベートした。翌日、細胞にpEF-RLUC8-L15-KrasG12D及びpEF-CRAF-RBD（1-149）-L15-GFP、またはpEF-RLUC8-L15-KrasG12V及びpEF-CRAF-RBD（1-149）-L15-GFPを1：2の比率（50ngのKRAS及び100ngのCRAF-RBD-GFP）でトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を37℃で24時間インキュベートした。翌日、細胞を白色96ウェルプレートに播種し（50，000細胞／ウェル）、37℃で4時間インキュベートし、続いて様々な濃度のMTD4-RBDVまたはMTD4-NS1を添加した。20～24時間インキュベートし、10μMのセレンテラジン400a基質を添加した後、TECAN機器でBRETシグナルを測定した。

20

【0194】

アネキシン-V／PI染色

H358細胞を、10%FBS及び1%Absを含有する1mLのRPMI中で、12ウェルマイクロプレートに10×10⁴細胞／ウェルの密度で播種し、37℃、5%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、培地を除去し、細胞をDPBSで洗浄し、10%FBSを含有する1mLのDMEM培地中で様々な濃度のMTD4-RBDVまたはMTD4-NS1で、37℃、5%CO₂で24時間処理した。細胞を採取するために、培地を15mLファルコンチューブに収集した。細胞をDPBSで洗浄し、洗浄液を対応するファルコンチューブ中の培地と合わせた。接着細胞を、0.25%トリプシン250μL／ウェルで37℃で3分間処理し、それぞれのファルコンチューブに戻した。細胞を、300g、4℃で5分間遠心分離することによってペレット化し、DPBSで2回洗浄して残留トリプシンを除去した。次に、Invitrogenのプロトコルに従って、アネキシンV染色を行った。細胞ペレットを100μLの1Xアネキシン結合緩衝液に再懸濁した。次に、5μLのAlexa Fluor（登録商標）488 Annexin V及び1μLのヨウ化プロピジウム（PI、100μg／mL）を細胞懸濁液に添加し、室温で15分間インキュベートした。最後に、各チューブに400μLのアネキシン結合緩衝液を添加した直後に、BD LSR Fortessaフローサイトメーターで530nmと575nmでの蛍光発光を分析した。

30

40

【0195】

HiBitペプチドのペプチド合成及びコンジュゲーション

標準的なFmoc化学を使用して、すべてのペプチドをrinkアミド樹脂上で手動で合成した。典型的なカップリング反応は、5当量のFmocアミノ酸、5当量のHATU、及び10当量のジイソプロピルエチルアミン（DIPEA）を含み、典型的なカップリング反応を室温（RT）で30分間混合しながら進行させた。C末端に単一のシステインを有するCPP12の場合、最後の（N末端）残基を付加した後、暗所で無水DCM中の0.3当量のPd（PPh₃）₄及び10当量のフェニルシランで処理する（3×15分）ことによって、C末端Glu残基上のアリル基を除去した。樹脂をジメチルジチオカル

50

バミン酸ナトリウム (SDDCM、DMF中0.5M) で2回洗浄し、NDMF中の20%ピペリジンで処理することによって末端Fmoc基を除去した。樹脂をDMF及びDCMで徹底的に洗浄し、DMF中の1M 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) 中で20分間インキュベートした。ペプチドを、DMF中の10当量のPyBOP、10当量のHOBt、及び20当量のDIPEAを使用して室温で1時間環化した。92.5/2.5/2.5/2.5 (v/v) TFA/トリイソプロピルシラン/1,3-ジメトキシベンゼン/水を使用して、ペプチドの切断及び脱保護を樹脂上で室温で3時間行った。N末端システイン (CVSGWRLFKKIS) (配列番号152) を有するHiBitペプチドを、上記のように合成した。精製したHiBitペプチドを、2,2'-ジピリジルジスルフィド (PyS-HiBit) で活性化し、単離した。コンジュゲーションのために、1当量のPyS-HiBitペプチドを、2%酢酸を含有するメタノール中でCPP12-Cysとともにインキュベートし、コンジュゲートされたペプチドをセミ分取Waters XBridge C18カラム上の逆相HPLCによって精製した。同様に、3当量のPyS-HiBitを還元剤なしでMTDとともに3時間インキュベートし、反応混合物をスピン脱塩カラムに通して過剰のHiBitペプチドを除去した。非還元SDS-PAGEゲルを泳動し、約1.3kDaのシフトをモニタリングすることによってコンジュゲーションを確認した。

10

【0196】

HiBit送達アッセイ。

HEK293T細胞を、播種培地 (10% FBS及び1% Absを補充したDMEM) 中で 60×10^4 細胞/ウェルの密度で6ウェルプレートに播種した。翌日、リポフェクタミン2000を使用して細胞に0.5 µgのLgBitプラスミドDNAを24時間トランスフェクトした。細胞を、播種培地中で10,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに一晩再播種した。細胞を、1% FBS及び1% Absを補充した培地中で、様々な濃度のコンジュゲートまたは非コンジュゲートHiBitペプチドで4時間処理した。細胞をDPBSで2回洗浄した後、ウェルごとに100 µLのOPTIMEM及び25 µLのNanoLuc試薬を添加した。Tecan Infinite M1000 Proマイクロプレートリーダーを使用して発光を直ちに測定した。値を未処理細胞の値に対して正規化し、GraphPad Prismソフトウェアを使用して平均±SDとしてペプチド濃度に対してプロットした。

20

30

【0197】

GFP相補性アッセイ。

HEK293T細胞を、10% FBS及び1% Absを補充した培地中で 60×10^4 細胞/ウェルの密度で6ウェルプレートに播種した。翌日、リポフェクタミン2000を使用して細胞に1 µgのGFP1~10プラスミドDNAを24時間トランスフェクトした。細胞を、4つの区画を有する35/10mmのガラス底マイクロウェルディッシュに 5×10^4 細胞/mLの密度で播種し、10% FBS及び1% Absを含有するDMEM中で一晩培養した。細胞をDPBSで2回洗浄し、1% FBS及び1% Absを補充した培地中で、DPBS (無処理対照) または10 µMのGFP11、CPP12-GFP11、もしくはMTD4-GFP11で6時間処理した。細胞をDPBSで2回洗浄し、フェノールレッド不含培地を補充し、Nikon A1R生細胞イメージング共焦点顕微鏡で画像化した。画像解析にはNIS Elements ARを使用した。

40

【0198】

生体内分布研究

すべての動物実験を、施設の動物ケアガイドラインに準拠し、委員会が承認したプロトコルに従って実施した。Pierce高容量エンドトキシン除去樹脂を使用して濃縮MENCTANパク質からエンドトキシンを除去した。エンドトキシンフリーMENCTANパク質 (8 mg/kg) を、4匹のfloxedマウス (loxP改変トランスジェニックマウス) に尾静脈を介して静脈内注射した。2匹のマウスを3時間後に、他の2匹を48時間後に殺した。様々な臓器を採取し、4%パラホルムアルデヒド中で24時間固定し、

50

70%エタノール溶液に移した。固定したサンプルを、包埋、スライス作製、及びスライド作製のために i H i s t o I n c . に送った。画像化のために、スライドを100%キシレン、100%エタノール、95%エタノール、及び d d H₂O で2回洗浄することによって処理した。スライドをトゥルーブラック染料 (B i o t i u m) で染色し、マウントしてトルエンで密封した。スライドを N i k o n A 1 R 共焦点顕微鏡で画像化し、N I S E l e m e n t s A R ソフトウェアを使用して分析した。

【0199】

血清安定性アッセイ

F N 3 または M T D 4 (1 0 μ M) を 2 5 % 清澄化ヒト血清とともに総量 1 0 0 μ L でインキュベートした。混合物を 3 7 ° C でインキュベートし、異なる時点で 1 0 μ L のアリコート采取了。アリコートを直ちに 1 0 μ L の 2 x S D S ロードイング緩衝液と混合し、5分間煮沸し、- 2 0 ° C で保存した。最大 2 4 時間の培養後、すべてのアリコートを 1 5 % S D S - P A G E ゲルで分析し、ゲルをクマシーブルーで染色した。ゲルを、O d y s s e y C l x I m a g e r (L I - C O R) 上で 7 0 0 n m チャンネルでスキャンした。

【0200】

10

20

30

40

50

【表 6】

配列

配列番号	配列
配列番号 1	FΦRRR
配列番号 2	FΦRRRC
配列番号 3	FΦRRRU
配列番号 4	RRRΦF
配列番号 5	RRRRΦF
配列番号 6	FΦRRRR
配列番号 7	FφrRrR
配列番号 8	FφrRrR
配列番号 9	FΦRRRR
配列番号 10	fΦRrRr
配列番号 11	RRFRΦR
配列番号 12	FRRRRΦ
配列番号 13	rRFRΦR
配列番号 14	RRΦFRR
配列番号 15	CRRRRFW
配列番号 16	FfΦRrRr
配列番号 17	FFΦRRRR
配列番号 18	RFRRFRΦR
配列番号 19	URRRRFW
配列番号 20	CRRRRFW
配列番号 21	FΦRRRRQK
配列番号 22	FΦRRRRQC
配列番号 23	fΦRrRrR
配列番号 24	FΦRRRRR
配列番号 25	RRRRΦFDΩC
配列番号 26	FΦRRR
配列番号 27	FWRRR
配列番号 28	RRRΦF
配列番号 29	RRRWF
配列番号 30	FΦRRRR
配列番号 31	FFRRR
配列番号 32	FFrRr
配列番号 33	FFRrR
配列番号 34	FRFRR
配列番号 35	FRFRF
配列番号 36	FRRRF
配列番号 37	GΦRRR
配列番号 38	FFFRA
配列番号 39	FFFRR
配列番号 40	FFRRRR
配列番号 41	FRFRFR
配列番号 42	FRRRFR
配列番号 43	RFFRRR

10

20

30

40

50

配列番号 4 4	R F R R F R
配列番号 4 5	F R F R R R
配列番号 4 6	F F F R R R
配列番号 4 7	F F R R R F
配列番号 4 8	F R F F R R
配列番号 4 9	R R F F F R
配列番号 5 0	F F R F R R
配列番号 5 1	F F R R F R
配列番号 5 2	F R R F F R
配列番号 5 3	F R R F R F
配列番号 5 4	F R F R F R
配列番号 5 5	R F F R F R
配列番号 5 6	G Φ R R R R
配列番号 5 7	F F F R R R R
配列番号 5 8	R F F R R R R
配列番号 5 9	R R F F R R R
配列番号 6 0	R F F F R R R
配列番号 6 1	R R F F F R R
配列番号 6 2	F F R R F R R
配列番号 6 3	F F R R R R F
配列番号 6 4	F R R F F R R
配列番号 6 5	F F F R R R R R
配列番号 6 6	F F F R R R R R R
配列番号 6 7	F Φ R r R r
配列番号 6 8	X X R R R R
配列番号 6 9	F f F R r R
配列番号 7 0	f F f r R r
配列番号 7 1	f F f R r R
配列番号 7 2	F f F r R r
配列番号 7 3	f F ϕ r R r
配列番号 7 4	f Φ f r R r
配列番号 7 5	ϕ F f r R r
配列番号 7 6	F Φ r R r
配列番号 7 7	f Φ r R r
配列番号 7 8	A c - L y s - f F R r R r D
配列番号 7 9	A c - D a p - f F R r R r D
配列番号 8 0	P i p - N a l - A r g - G l u - a r g - a r g - g l u
配列番号 8 1	P i p - N a l - A r g - A r g - a r g - a r g - g l u
配列番号 8 2	P i p - N a l - N a l - A r g - a r g - a r g - g l u
配列番号 8 3	P i p - N a l - N a l - A r g - a r g - a r g - G l u
配列番号 8 4	P i p - N a l - P h e - A r g - a r g - a r g - g l u
配列番号 8 5	P i p - N a l - P h e - A r g - a r g - a r g - G l u
配列番号 8 6	P i p - N a l - p h e - A r g - a r g - a r g - g l u
配列番号 8 7	P i p - N a l - p h e - A r g - a r g - a r g - G l u
配列番号 8 8	P i p - N a l - n a l - A r g - a r g - a r g - G l u
配列番号 8 9	P i p - N a l - n a l - A r g - a r g - a r g - g l u

10

20

30

40

50

配列番号 90	[P-Cha-r-Cha-r-Cha-r-Cha-r-G] ^d
配列番号 91	Tm(SvP-F ₂ Pmp-H)-Dap-(FΦRRRR-Dap)] ^f
配列番号 92	[Tm(a-Sar-D-pThr-Pip-ΦRAa)-Dap-(FΦRRRR-Dap)] ^f
配列番号 93	[CRRSRRGCGRRSRRCG] ^g
配列番号 94	[K(Dod)RRRR]
配列番号 95	LKKLCKLLKKLCKLAG
配列番号 96	RRRR-[KRRRE] ^e
配列番号 97	RRR-[KRRRRE] ^e
配列番号 98	RR-[KRRRRRE] ^e
配列番号 99	R-[KRRRRRRE] ^e
配列番号 100	[CRCRCRCR]
配列番号 101	[Pra-LRKRLRKFRN-AzK] ^h
配列番号 102	T-Dap-[Dap-Dap-f-L-Dap-Dap-T]
配列番号 103	T-Agp-[Dap-Agp-f-L-Agp-Agp-T]
配列番号 104	RRRWWW
配列番号 105	WWWRRR
配列番号 106	GDSPAS
配列番号 107	GGSGGSGGS
配列番号 108	TGRGDSPASSKPI
配列番号 109	APAVTVRY
配列番号 110	GGNSPVQE
配列番号 111	TGRRRRWWWKPI
配列番号 112	APWWWRRRRYY
配列番号 113	GGRRRRWWWVQE
配列番号 114	APAWYWRYY
配列番号 115	TGRRRRSKPI
配列番号 116	APARRRRYY
配列番号 117	TGWYWRKPI
配列番号 118	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSD VPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAV TVRYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYITVYAV TGRGDSPASSKPI SINRYRTGGSGG SGGSELC
配列番号 119	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSD VPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAV TVRYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYITVYAV TGRRRRRWWWKPI SINRYRTGGSGG SGGSELC
配列番号 120	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSD VPRDLEVVAATPTSLLSWDAPWW WRRRRYYRITYGETGGNSPVQEFT

10

20

30

40

50

	V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T G G S G G S G G S E L C
配列番号 1 2 1	M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S W D A P A V T V R Y Y R I T Y G E T G G <u>R R R R W W W</u> V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T G G S G G S G G S E L C
配列番号 1 2 2	M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S W D A P A <u>W</u> <u>Y W</u> R Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G <u>R R R R</u> S K P I S I N Y R T G G S G G S G G S E L C
配列番号 1 2 3	M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S W D A P A <u>W Y W</u> R Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T G G S G G S G G S E L C
配列番号 1 2 4	M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S W D A P A V T V R Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G <u>R R R R</u> S K P I S I N Y R T G G S G G S G G S E L C
配列番号 1 2 5	M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S W D A P A <u>R R R R</u> Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G <u>W Y W</u> R S K P I S I N Y R T G G S G G S G G S E L C
配列番号 1 2 6	M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S W D A P A <u>W</u> <u>Y W</u> R Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G <u>R R R R</u> S K P I S I N Y R T G G S G G S G G S E L M E M E K E F E Q I D K S G S W A A I Y Q D I R H E A S D F P C R V A K L P K N K N R N R Y R D V S P F D H S R I K L H Q E D N D Y I N A S L I K M E E A Q R S Y I L T Q G P L P N T C G H F W E M V W E Q K S R G V V M L N R V M E K G S L K C A Q Y W P Q K E E K E M I F E D T N L K L T L I S E D I K S Y Y T V R Q L E L E N L T T Q E T R E I L H F H Y T T W P D F G V P E S P A S F L N F L F K V R E S G S L S P E H G P V V V H C S A G I G R S G T F C L A D T C L L L M D K R K D P S S V D I K K V L L E M R K F R M G L I Q T A D Q L R F S Y L A V I E G A K F I M G D S S V Q D Q W K E L S H E D L E P P P E H I P P P P R P P K R I L E P H N
配列番号 1 2 7	M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M V S D

10

20

30

40

50

	VPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAW YWRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAV TGRRRRRSKPISINYRTGGSGGSGG SELGSVSSVPTKLEVVAATPTSLL ISWDAPAVTVDYYVITYGETGGNS PVQKFEVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAWGWHGQVYYMGSPI SINYRT
配列番号128	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSD VPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAW YWRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAV TGRRRRRSKPISINYRTGGSGGSGG SELKTSNTIRVLLPNQEWTVVKVR NGMSLHDSLMKALKRHGLQPESSA VFRLLHEHKGKKARLDWNTDAASL IGEELQVDFLDHVPLTTHNFARKT FLKLG IHRD
配列番号129	AVTVR
配列番号130	GGNSPVQ
配列番号131	PGSK
配列番号132	GRGDSPAS
配列番号133	RRRRWWWW
配列番号134	APAYWWRY
配列番号135	TGRRRRRSKPI
配列番号136	APAWWARY
配列番号137	TGRRRRRSKPI
配列番号138	APAWWRRRY
配列番号139	TGRRRASSKPI
配列番号140	APAWWARY
配列番号141	TGWRRRRSKPI
配列番号142	APAWWRRRY
配列番号143	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPR DLEVVAATPTSLLISWDAPAYWWRYR ITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS GLKPGVDYTITVYAVTGRRRRSKPISI NYRTGGSGGSGGSELC
配列番号144	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPR DLEVVAATPTSLLISWDAPAWWARYR ITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS GLKPGVDYTITVYAVTGRRRRSKPISI NYRTGGSGGSGGSELC
配列番号145	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPR DLEVVAATPTSLLISWDAPAWWWRRRY RITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATI SGLKPGVDYTITVYAVTGRRASSKPI SINYRTGGSGGSGGSELC
配列番号146	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPR

10

20

30

40

50

	DLEVVAATPTSLLISWDAPAWWARYYR ITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS GLKPGVDYTTITVYAVTGWRRRRSKPIS INYRTGGSGGSGGSELC
配列番号 1 4 7	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSDVPR DLEVVAATPTSLLISWDAPAWWRRYYR ITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS GLKPGVDYTTITVYAVTGRRWWSKPISI NYRTGGSGGSGGSELC
配列番号 1 4 8	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSD VPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAW YWRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAV TGRRRRSKPISINYRTGGSGGSGG SELSKGEELFTGVVPILEVELDGDV NGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKF ICTTGKLPVPWPPTLVTTLTYGVCQ FSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQ ERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQDT LVNRIELKIDFKEDGNILGHKLE YNYNDHQVYIMADKQKNGIKANFK IRHNIEDGGVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNHYLFTTSTLSKDPNEK RDHMLVLEFVTAAGITHGMDELYK
配列番号 1 4 9	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVSD VPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAW YWRYYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAV TGRRRRSKPISINYRTGGSGGSGG SELMVSKGEELFTGVVPILEVELDG DVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCL KFICTTGKLPVPWPPTLVTTLTYGVC QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGY VQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQ DTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLE YNYNSHNVYIMADKQKNGIKVN FKIRHNIEDGGSVQLADHYQQNTPI GDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPN EKRDHMLVLEFVTAAGITLGMDEL YKSGEQKLISEEDLGGPKKKR KVS NLLTVHQNL PALPVDATSDEV RKN LMDMFRDRQAFSEHTWKMLLSVCR SWAAWCKLNNR KWFP AEPE DVRDY LLYLQARGLAVKTIQQHLGQLNML HRRSGLPRPSDSNAVSLVMRRIRK ENVDAGERAKQALAFERTDFDQVR SLMENS DRCQDIRNL AFLG IAYNT LLRIA E IARIRVKDISRTD GGRML IHIGRTKTLVSTAGVEKALS LGVT KLVERWISVSGVADDPNNYLFCRV

10

20

30

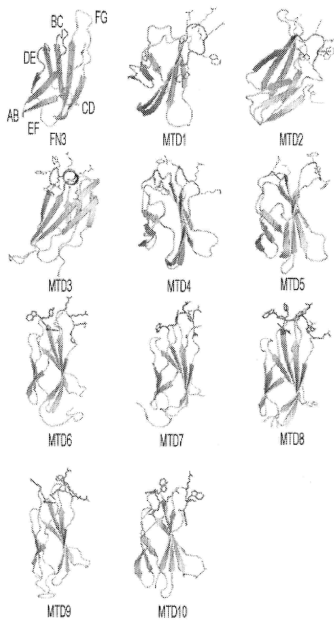
40

	RKNGVAAPSATSQ LSTRALEGIFE ATHRLIYGAKDDSGQRYLAWSGHS ARVGAARDMARAGVSIPEIMQAGG WTNVNIVMNYIRNLDSETGAMVRL LEDGD
--	--

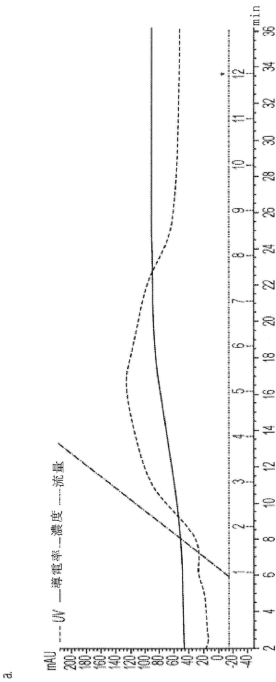
50

【図面】

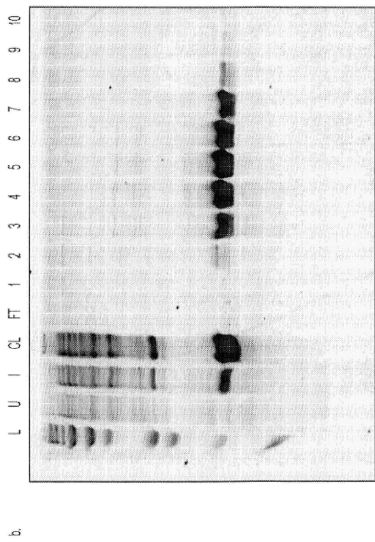
【図 1】



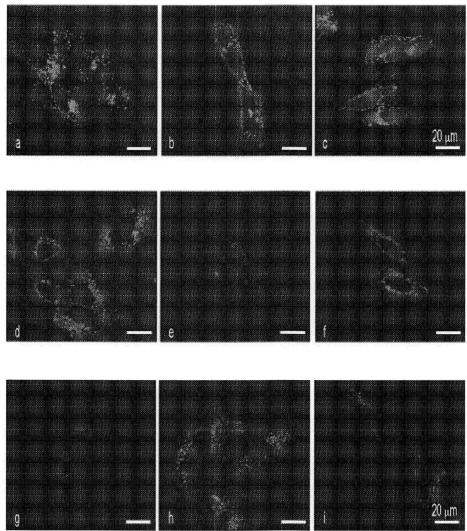
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 3】



10

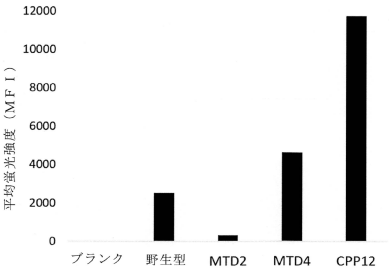
20

30

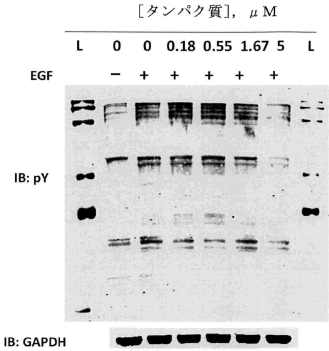
40

50

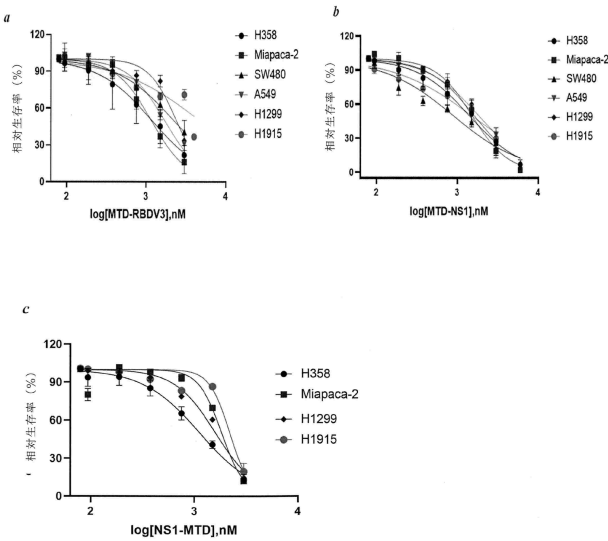
【図 4】



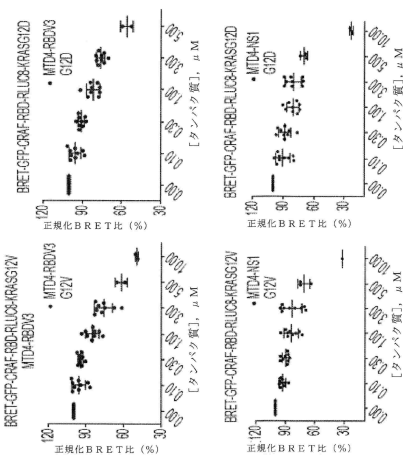
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

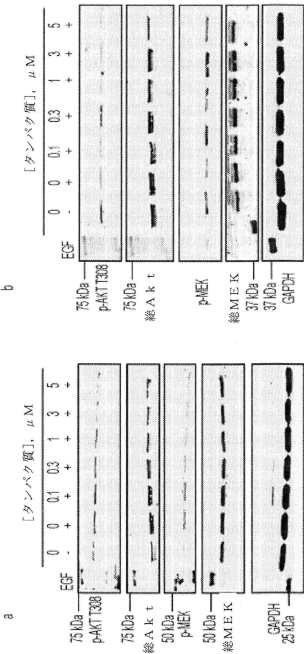
20

30

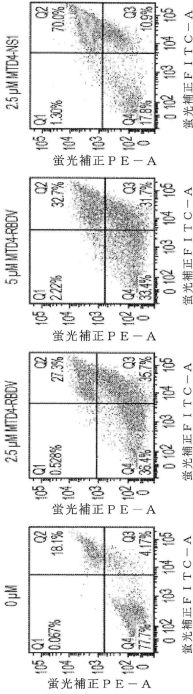
40

50

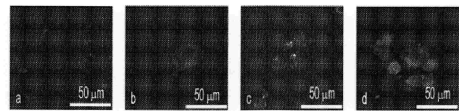
【図 8】



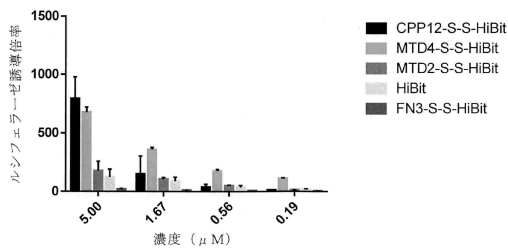
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

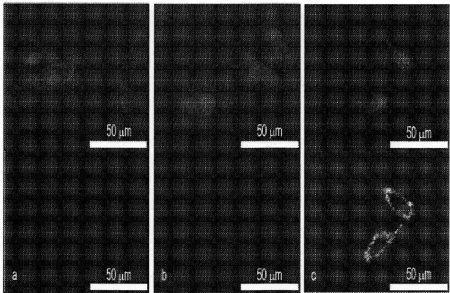
20

30

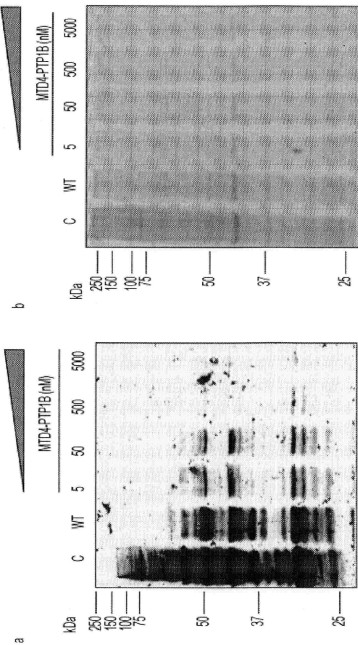
40

50

【図 1 2】



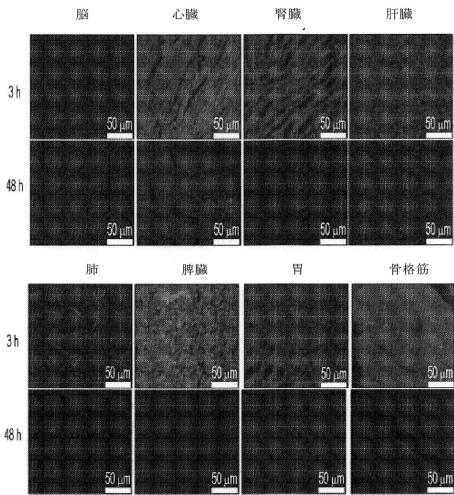
【図 1 3】



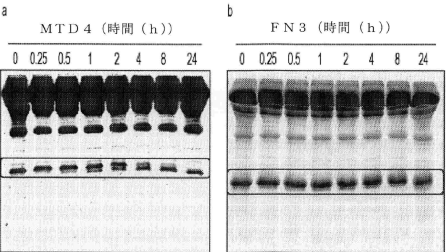
10

20

【図 1 4】



【図 1 5】



30

【配列表】

2025509645000001.xml

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 23/64659
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 39/395, C07K 7/64, C07K 1/107 (2023.01) ADD. C07K 2/00, A61K 47/64 (2023.01) CPC - INV. A61K 39/395, C07K 1/107 ADD. C07K 1/047, A61K 38/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2015/0165062 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 18 June 2015 (18.06.2015) Abstract; para [0022]; para [0034]; para [0113]; para [0116]; para [0138]; para [0181]	1-3
Y	US 2017/0190743 A1 (CYCLOPORTERS, INC.) 6 July 2017 (06.07.2017) Abstract; Claim 62	1-3
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 July 2023		Date of mailing of the international search report JUL 21 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Karl Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/64659

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Applicant did not timely respond to the PCT/ISA/225 issued on 18 April 2023 and the very late response also resulted in a defective sequence listing. Therefore, the international search was not carried out on the basis of that non-compliant electronic sequence listing.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/64659

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 20
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 20 is held unsearchable due to defective sequence listing
3. ☒ Claims Nos.: 4-19, 21-22
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

20

30

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

(51) 国際特許分類

テーマコード（参考）

Z

A 6 1 K 47/64

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW
,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL
,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

1. TWEEN

アメリカ合衆国 オハイオ州 43210 コロンバス カーマック ロード 1050 マウント ホール ファースト フロア シー／オー オハイオ ステート イノベーション ファウンデーション

Fターム (参考) 4C076 AA95 EE41 EE59

4H045 AA10 AA20 AA30 BA11 BA12 BA13 BA14 BA15 BA41 CA40

EA05 EA20 FA74 GA26