

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-511955
(P2024-511955A)

(43)公表日 令和6年3月18日(2024.3.18)

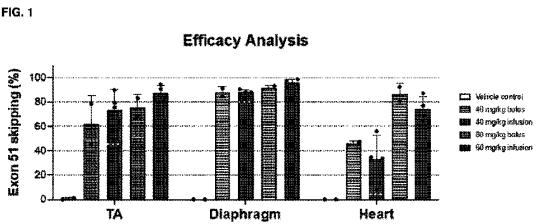
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/62 (2017.01)	A 6 1 K	47/62	4 C 0 7 6	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 8 6	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	4 H 0 4 5	
A 6 1 P	9/06 (2006.01)	A 6 1 P	9/06		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全97頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-555748(P2023-555748)	(71)出願人	523346755
(86)(22)出願日	令和4年3月11日(2022.3.11)		ペプゲン インコーポレイテッド.
(85)翻訳文提出日	令和5年11月10日(2023.11.10)		アメリカ 0 2 1 1 6 マサチューセッツ
(86)国際出願番号	PCT/US2022/020061		ボストン パークレー ストリート 2 0 0
(87)国際公開番号	WO2022/192749		1 8 階
(87)国際公開日	令和4年9月15日(2022.9.15)	(74)代理人	110001139
(31)優先権主張番号	63/194,039		S K弁理士法人
(32)優先日	令和3年5月27日(2021.5.27)	(74)代理人	100130328
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 奥野 彰彦
(31)優先権主張番号	63/160,705	(74)代理人	100130672
(32)優先日	令和3年3月12日(2021.3.12)		弁理士 伊藤 寛之
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ゴドフリー, キャロライン
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		アメリカ 0 2 1 1 6 マサチューセッツ
	最終頁に続く		ボストン パークレー ストリート 2 0 0
			1 8 階 シー/オー ペプゲン インコー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ペプチドーオリゴヌクレオチド複合体を用いるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療法

(57)【要約】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する対象を治療する方法が開示される。前記方法は、オリゴヌクレオチドと、前記オリゴヌクレオチドに共有結合又はリンカーを介して連結されたペプチドとの複合体1 mg/kgから60 mg/kgを、前記対象（例えば、エクソン51スキッピングが適応となる対象）に投与することを含む。前記ペプチドは、少なくとも4個のアミノ酸残基を含む少なくとも1個のカチオン性ドメイン、及び少なくとも3個のアミノ酸残基を含む少なくとも1個の疎水性ドメインを含み、但し、前記ペプチドは合計7から40個のアミノ酸残基を含み、且つ、前記の少なくとも1個のカチオン性ドメインは、アルギニン残基及び／又はヒスチジン残基と組み合わせてβ-アラニン残基を含む。前記オリゴヌクレオチドは、合計12から40個の連続した核酸塩基を含み、少なくとも12個の連続する核酸塩基は、ヒトジストロフィン遺伝子の標的配列に相補的である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する対象を治療する方法であって、前記方法は、オリゴヌクレオチドと、前記オリゴヌクレオチドに共有結合又はリンカーを介して連結されたペプチドとの複合体を 1 mg/kg から 60 mg/kg 投与することを含み、

前記ペプチドは、少なくとも 4 個のアミノ酸残基を含む少なくとも 1 個のカチオン性ドメイン、及び少なくとも 3 個のアミノ酸残基を含む少なくとも 1 個の疎水性ドメインを含み、但し、前記ペプチドは合計 7 から 40 個のアミノ酸残基を含み、且つ、前記の少なくとも 1 個のカチオン性ドメインは、アルギニン残基及び／又はヒスチジン残基と組み合わせ、 β -アラニン残基を含み、及び、

10

前記オリゴヌクレオチドは、合計 12 から 40 個の連続した核酸塩基を含み、少なくとも 12 個の連続する核酸塩基は、ヒトジストロフィン遺伝子の標的配列に相補的である、方法。

【請求項 2】

前記オリゴヌクレオチドは、

5' -CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号 106)、又は、
5' -ACCAGAGUACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号 107)、5' -CUCAUACC
UUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号 108)、

5' -UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号 109)、5' -ACAUCAAG
GAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3' (配列番号 110)、

20

5' -ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号 111)、

5' -CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号 112)、5' -AU
CAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号 113)、

5' -AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号 114)、

5' -CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号 115)、

5' -AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号 116)、及びそれらのチミン置換アナログからなる群から選択される配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

各カチオン性ドメインは、4 から 12 アミノ酸残基の間の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 4】

各カチオン性ドメインは、4 から 7 アミノ酸残基の間の長さを有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

各カチオン性ドメインは、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、又は少なくとも 95% のカチオン性アミノ酸を含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

各カチオン性ドメインは、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70% のアルギニン及び／又はヒスチジン残基を含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 7】

各カチオン性ドメインは、以下の配列の 1 つを含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。RBRRBRR (配列番号 1)、RBRBR (配列番号 2)、RBRR (配列番号 3)、RBRRBRR (配列番号 4)、RRBRBR (配列番号 5)、RBRRB (配列番号 6)、BRBR (配列番号 7)、RBHBH (配列番号 8)、HBHBR (配列番号 9)、RBRHBHR (配列番号 10)、RBRBBHR (配列番号 11)、RBRRBH (配列番号 12)、HBRRB (配列番号 13)、HBHBH (配列番号 14)、BHBH (配列番号 15)、BRBSB (配列番号 16)、BR

50

B[Hyp]B（配列番号17）、R[Hyp]H[Hyp]HB（配列番号18）、R[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）又はそれらの任意の組み合わせ。

【請求項 8】

各カチオン性ドメインは、以下の配列の1つを含むか、又は以下の配列の1つからなる、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBRR（配列番号3）、RBRBR（配列番号4）、RRBRBR（配列番号5）、RBRRB（配列番号6）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、HBHBR（配列番号9）、RBRHBHR（配列番号10）、RBRBBHR（配列番号11）、RBRRBH（配列番号12）、HBRRBR（配列番号13）、HBHBH（配列番号14）、BHBH（配列番号15）、BRBSB（配列番号16）、BRB[Hyp]B（配列番号17）、R[Hyp]H[Hyp]HB（配列番号18）、R[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）又はそれらの任意の組み合わせ。

10

【請求項 9】

前記ペプチドは、2個のカチオン性ドメインを含む、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

各疎水性ドメインは、3から6アミノ酸の長さを有し、好ましくは、各疎水性ドメインは、5アミノ酸の長さを有する、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

各疎水性ドメインは、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%の疎水性アミノ酸を含む、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 12】

各疎水性ドメインは、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、トリプトファン、プロリン、及び/又はグルタミン残基を含み、好ましくは、各疎水性ドメインは、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、トリプトファン、プロリン、及び/又はグルタミン残基を含む又はからなる、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ペプチドは、1個の疎水性ドメインを含む、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 14】

各疎水性ドメインは、以下の配列の1つを含む、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、WWPW（配列番号26）又はそれらの任意の組み合わせ。

【請求項 15】

各疎水性ドメインは、以下の配列の1つを含むか、又は以下の配列の1つからなる、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、WWPW（配列番号26）又はそれらの任意の組み合わせ。

40

【請求項 16】

前記ペプチドは、2個のカチオン性ドメイン及び1個の疎水性ドメインを含む又はからなる、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 17】

前記ペプチドは、2個のカチオン性アームドメインに挟まれた1個の疎水性コアドメインを含む又はからなる、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

前記ペプチドは、RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBRR（配列番号3）、RBRBR（配列番号4）、RRBRBR（配列番号5）、RBRRB（配列番号6）、BR

50

BR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、HBHBR（配列番号9）、RBRHBHR（配列番号10）、RBRBBHR（配列番号11）、RBRRBH（配列番号12）、HBRRBR（配列番号13）、HBHBH（配列番号14）、BHBH（配列番号15）、BRBSB（配列番号16）、BRB[Hyp]B（配列番号17）、R[Hyp]H[Hyp]HB（配列番号18）、及びR[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）から選択される配列をそれぞれ含む2個のカチオン性アームドメインによって挟まれた、YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、及びWWPWW（配列番号26）から選択される配列を含む1個の疎水性ドメインを含む又はからなる、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

10

前記ペプチドは、以下の配列の1つを含むか、又は以下の配列の1つからなる、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。RBRRBRRFQILYRBRBR（配列番号27）、RBRBRRYQFLIRBRBR（配列番号31）、RBRBRRILFQYRBRBR（配列番号32）、RBRBRRFQILYBRBR（配列番号35）、RBRBRRFQILYRBHBH（配列番号37）、RBRBRRFQILYHBHBR（配列番号38）、及びRBRBRRFQILYRBHBH（配列番号44）。

【請求項20】

前記ペプチドは、以下のアミノ酸配列RBRBRRFQILYRBRBR（配列番号35）を有する、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記ペプチドは、以下のアミノ酸配列RBRBRRFQILYRBHBH（配列番号37）を有する、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項22】

前記ペプチドは、以下のアミノ酸配列RBRBRRFQILYRBHBH（配列番号44）を有する、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記ペプチドは、そのN末端を介して前記複合体の残りの部分に結合する、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記ペプチドのC末端は、-NH₂である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

30

前記ペプチドは、そのC末端を介して前記複合体の残りの部分に結合する、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記ペプチドは、そのN末端でアシル化される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記複合体は、以下の構造を含むか、以下の構造である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【化1】

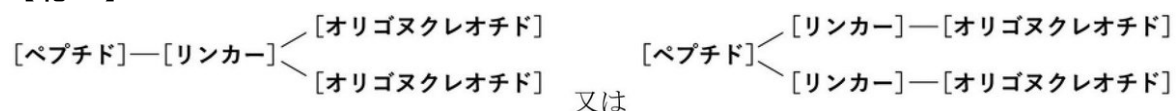
[ペプチド]—[リンカー]—[オリゴヌクレオチド]

40

【請求項28】

前記複合体は、以下の構造を含むか、以下の構造である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【化2】



【請求項29】

前記複合体は、以下の構造を含むか、以下の構造である、請求項1から4のいずれか1

50

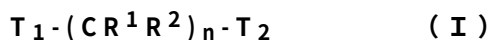
項に記載の方法。

【化 3】

[ペプチド]—[リンカー]—[ペプチド]—[リンカー]—[オリゴヌクレオチド]

【請求項 30】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、各リンカーは、独立して下記式 (I) で示される、方法。



(式中、 T_1 は、前記ペプチドに結合するための 2 価の基であり、 $-NH-$ 及びカルボニルからなる群から選択され、

10

T_2 は、オリゴヌクレオチドに結合するための 2 価の基であり、 $-NH-$ 及びカルボニルからなる群から選択され、

n は、1、2 又は 3 であり、

各 R^1 は、独立して $-Y^1-X^1-Z^1$ であり、

ここで、

Y^1 は、存在しないか、又は $-(CRA^1RA^2)_m-$ であり、 m は、1、2、3 又は 4 であり、 RA^1 及び RA^2 は、それぞれ独立して水素、OH、又は $(1-2C)$ アルキルであり、

X^1 は、存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-CH(ORA^3)-$ 、 $-N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)-C(O)-$ 、 $-N(RA^3)-C(O)O-$ 、 $-C(O)-N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)C(O)N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)C(NRA^3)N(RA^3)-$ 、 $-SO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(O)_2N(RA^3)-$ 、又は $-N(RA^3)SO_2-$ であり、各 RA^3 は、独立して水素及びメチルから選択され、及び

20

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル、又はヘテロアリールであり、

ここで、各 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル、又はヘテロアリールは、 $(1-4C)$ アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 $NR^{A4}R^{A5}$ 、及び $(1-4C)$ アルコキシからなる群より選択される 1 つ以上 (例えば、1、2、3、4、又は 5) の置換基によって置換されていてもよく、 RA^4 及び RA^5 はそれぞれ独立して水素及び $(1-4C)$ アルキルからなる群より選択され、及び

30

各 R^2 は、独立して $-Y^2-X^2-Z^2$ であり、ここで、

Y^2 は、存在しないか、式 $-[CR^{B1}R^{B2}]_m-$ で示される基であり、 m は、1、2、3 又は 4、から選択される整数であり、 R^{B1} 及び R^{B2} はそれぞれ独立して水素、OH 又は $(1-2C)$ アルキルから選択され、

X^2 は、存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-CH(ORB^3)-$ 、 $-N(RB^3)-$ 、 $-N(RB^3)-C(O)-$ 、 $-N(RB^3)-C(O)O-$ 、 $-C(O)-N(RB^3)-$ 、 $-N(RB^3)C(O)N(RB^3)-$ 、 $-N(RB^3)C(NRB^3)N(RB^3)-$ 、 $-SO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(O)_2N(RB^3)-$ 、又は $-N(RB^3)SO_2-$ であり、それぞれ RB^3 は独立して水素又はメチルから選択され、及び

Z^2 は、水素、 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル又はヘテロアリールから選択され、各 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル又はヘテロアリールは、 $(1-4C)$ アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 $NR^{B4}R^{B5}$ 、及び $(1-4C)$ アルコキシからなる群より選択される 1 つ以上 (例えば、1、2、3、4、又は 5) の置換基によって置換されていてもよく、 RB^4 及び RB^5 は、それぞれ独立して水素又は $(1-2C)$ アルキルであり、ただし、 $n=1$ かつ、 T_1 及び T_2 は互いに異なるとき、 R^1 及び R^2 は、両方とも H ではなく、 $n=1$ かつ、 T_1 及び T_2 は互いに異なり、 R^1 及び R^2 の一方は H であるとき、 R^1 及び R^2 の他方はメチルではなく、又は $n=2$ かつ、 R^1 及び R^2 の各存在は H であるとき T_1 及び T_2 は両方とも $-C(O)-$ 、又は両方とも $-NH-$ である。))

40

50

【請求項 3 1】

T₂は、-C(O)-である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

各R¹は、独立して-Y¹-X¹-Z¹であり、

Y¹は、存在しないか、又は-(CRA¹RA²)_m-であり、mは1、2、3又は4であり、R^{A1}とR^{A2}はそれぞれ水素又は(1-2C)アルキルであり、

X¹は、存在しないか、-O-、-C(O)-、-C(O)O-、-N(R^{A3})-、-N(R^{A3})-C(O)-、-C(O)-N(R^{A3})-、-N(R^{A3})C(O)N(R^{A3})-、-N(R^{A3})C(NR^{A3})N(R^{A3})-又は-S-であり、各R^{A3}は独立して水素又はメチルであり、及び、

Z¹は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、(1-6C)アルキル、(2-6C)アルケニル、(2-6C)アルキニル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、(3-6C)シクロアルケニル、又はヘテロアリールであり、各(1-6C)アルキル、(2-6C)アルケニル、(2-6C)アルキニル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、(3-6C)シクロアルケニル、及びヘテロアリールは(1-4C)アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、NR^{A4}RA⁵、及び(1-4C)アルコキシ、からなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4、又は5)の置換基によって置換されていてもよく、R^MとR^{A5}は、それぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルである、請求項 3 0 に記載の方法。

10

【請求項 3 3】

各R¹は、独立して-Y¹-X¹-Z¹であり、

Y¹は存在しないか、又は-(CRA¹RA²)_m-であり、mは1、2、3、又は4であり、R^{A1}とR^{A2}は、それぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルであり、

X¹は存在しないか、-O-、-C(O)-、-C(O)O-、-N(R^{A3})-、-N(R^{A3})-C(O)-、-C(O)-N(R^{A3})-、

-N(R^{A3})C(O)N(R^{A3})-、-N(R^{A3})C(NR^{A3})N(R^{A3})-、又は-S-であり、各R^{A3}は、独立して水素又はメチルであり、及び、

Z¹は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、(1-6C)アルキル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、又はヘテロアリールであり、それぞれ(1-6C)アルキル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、及びヘテロアリールは、(1-4C)アルキル、ハロ、及びヒドロキシからなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4又は5)の置換基によって置換されていてもよい、請求項 3 0 に記載の方法。

20

30

【請求項 3 4】

各R¹は独立して-Y¹-X¹-Z¹であり、

Y¹は存在しないか、式-(CRA¹RA²)_m-で示される基であり、mは、1、2、3又は4であり、R^{A1}とR^{A2}は、それぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルであり、

X¹は存在しないか、-C(O)-、-C(O)O-、-N(R^{A3})-C(O)-、-C(O)-N(R^{A3})-であり、各R^{A3}は水素又はメチルであり、及び、

Z¹は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、(1-6C)アルキル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、又はヘテロアリールであり、それぞれ(1-6C)アルキル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、及びヘテロアリールは、(1-4C)アルキル、ハロ、及びヒドロキシからなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4、又は5)の置換基によって置換されていてもよい、請求項 3 0 に記載の方法。

40

【請求項 3 5】

各R¹は、独立して-Y¹-X¹-Z¹であり、

Y¹は、存在しないか、-(CH₂)-、又は-(CH₂CH₂)-であり、

X¹は、存在しないか、-N(R^{A3})-C(O)-、-C(O)-N(R^{A3})-であり、各R^{A3}は独立して水素又はメチルであり、及び、

Z¹は、水素又は(1-2C)アルキルである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 6】

各R²は、独立して-Y²-Z²であり、

50

Y^2 は、存在しないか、 $-(CR^{B1}R^{B2})_m-$ であり、 m は、1、2、3又は4であり、 R^{B1} と R^{B2} はそれぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルであり、及び、 Z^2 は水素又は(1-6C)アルキルである、請求項30に記載の方法。

【請求項37】

各 R^2 は、水素である、請求項30に記載の方法。

【請求項38】

n は2又は3である、請求項30に記載の方法。

【請求項39】

n は1である、請求項30に記載の方法。

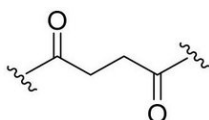
【請求項40】

前記リンカーは、グルタミン酸、コハク酸、及び γ -アミノ酪酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】

前記リンカーは、以下の構造である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

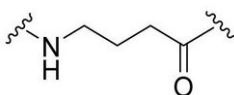
【化4】



【請求項42】

前記リンカーは、以下の構造である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

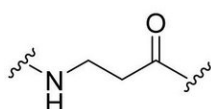
【化5】



【請求項43】

前記リンカーは、以下の構造である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

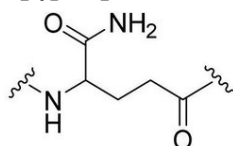
【化6】



【請求項44】

前記リンカーは、以下の構造である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

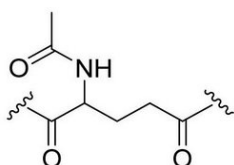
【化7】



【請求項45】

前記リンカーは、以下の構造である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【化8】



【請求項46】

10

20

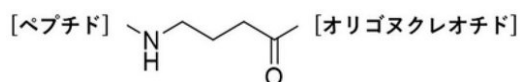
30

40

50

前記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

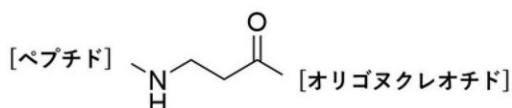
【化 9】



【請求項 47】

前記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 10】

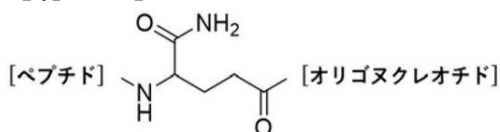


10

【請求項 48】

前記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 11】

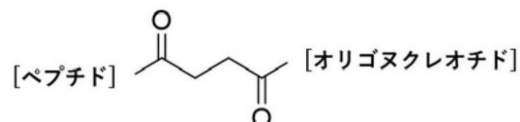


20

【請求項 49】

前記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 12】

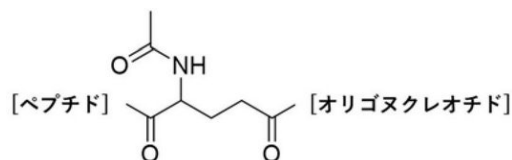


30

【請求項 50】

前記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 13】



【請求項 51】

前記オリゴヌクレオチドは、その 3' 末端で前記リンカー又は前記ペプチドに結合する、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 52】

前記複合体は、ペプチド Ac-RBRRBRFQILYBRBR の C 末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した 3' 末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号 106)、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号 107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号 108)、5'-UUCUGUC CAAGCCCGGUUGAAAUC-3' (配列番号 109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAU UUCUAGUUUGG-3' (配列番号 110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG -3' (配列番号 111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配

40

50

列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUC AUCUCGUUGAUAUCCUCA-3' (配列番号116)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項1に記載の方法。

【請求項53】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項52に記載の方法。

10

【請求項54】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項52に記載の方法。

【請求項55】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項52に記載の方法。

20

【請求項56】

前記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)、5'-ACCAGAGUACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号108)、5'-UUCUGUCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUC AUCUCGUUGAUAUCCUCA-3' (配列番号116)又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項57】

前記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項56に記載の方法。

40

【請求項58】

前記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項56に記載の方法。

【請求項59】

前記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号

50

115)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項56に記載の方法。

【請求項60】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号108)、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUC AUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号116)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、請求項1に記載の方法。

10

【請求項61】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又ははからなる、請求項60に記載の方法。

20

【請求項62】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、請求項60に記載の方法。

【請求項63】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、請求項60に記載の方法。

【請求項64】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号108)、5'-UUCUGUCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUC AUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号116)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項1に記載の方法。

30

40

【請求項65】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介

50

して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC-3'（配列番号109）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項64に記載の方法。

【請求項67】

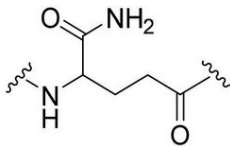
前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、前記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、請求項64に記載の方法。

10

【請求項68】

前記リンカーは、以下の構造である、請求項1から4又は52から67のいずれか1項に記載の方法。

【化14】



【請求項69】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）、5'-ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGC-3'（配列番号107）、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3'（配列番号108）、5'-UUCUGUCAAGCCCGGUUGAAAUC-3'（配列番号109）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUCUAGUUUGG-3'（配列番号110）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号111）、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUCUAG-3'（配列番号112）、5'-AUCAUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3'（配列番号113）、5'-AUCAUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3'（配列番号114）、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、もしくは5'-AUC AUCUGUUGAUAUCCUCAA-3'（配列番号116）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、請求項1に記載の方法。

20

30

【請求項70】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）を含む又ははからなる、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC-3'（配列番号109）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、請求項69に記載の方法。

40

【請求項72】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、請求項69に記載の方法。

【請求項73】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）、5'-ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGC-3'（配列番号107）、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3'（配列番号108）、5'-UUCUGUCAAGCCCGGUUGAAAUC-3'（配列番号109）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAU

50

UUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUC AUCUCGUUGAUAUCCUCAAA-3' (配列番号116)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、請求項1に記載の方法。

【請求項74】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又ははからなる、請求項73に記載の方法。

10

【請求項75】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、請求項73に記載の方法。

【請求項76】

前記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、請求項73に記載の方法。

20

【請求項77】

前記オリゴヌクレオチドは、モルホリノである、請求項1から4、52から67、及び69から76のいずれか1項に記載の方法。

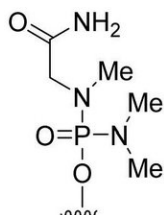
【請求項78】

全てのモルホリノヌクレオシド間結合は、-P(O)(NMe₂)O-である、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

前記ヌクレオチドは、その5'末端として下記の基を含む、請求項78に記載の方法。

【化15】

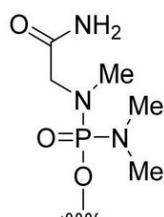


30

【請求項80】

前記ヌクレオチドは、その5'末端として下記の基を含む、請求項1から4、52から67、及び69から76のいずれか1項に記載の方法。

【化16】



40

【請求項81】

前記複合体は、腹腔内投与される、請求項1から4、52から67、及び69から76のいずれか1項に記載の方法。

【請求項82】

50

前記複合体は、注入により投与される、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記複合体は、静注によって投与される、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記対象は、エクソン 51 スキッピングが適応となる、請求項 1 から 4、5 2 から 6 7、及び 6 9 から 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記複合体は、毎週から 3 ヶ月ごとの頻度で前記対象に投与される、請求項 1 から 4、5 2 から 6 7、及び 6 9 から 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記複合体は、毎週から毎月の頻度で前記対象に投与される、請求項 1 から 4、5 2 から 6 7、及び 6 9 から 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記頻度は、毎週、隔週、又は毎月である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記頻度は 3 ヶ月ごとである、請求項 1 から 4、5 2 から 6 7、及び 6 9 から 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 9】

40 mg/kg から 60 mg/kg、30 mg/kg から 50 mg/kg、30 mg/kg から 40 mg/kg、40 mg/kg から 50 mg/kg、50 mg/kg から 60 mg/kg、35 mg/kg から 45 mg/kg、45 mg/kg から 55 mg/kg、35 mg/kg から 55 mg/kg、30 mg/kg から 45 mg/kg、35 mg/kg から 50 mg/kg、40 mg/kg から 55 mg/kg、45 mg/kg から 60 mg/kg、1 mg/kg から 30 mg/kg、1 mg/kg から 20 mg/kg、5 mg/kg から 25 mg/kg、10 mg/kg から 30 mg/kg、1 mg/kg から 15 mg/kg、5 mg/kg から 20 mg/kg、10 mg/kg から 25 mg/kg、15 mg/kg から 30 mg/kg、1 mg/kg から 10 mg/kg、5 mg/kg から 15 mg/kg、10 mg/kg から 20 mg/kg、15 mg/kg から 25 mg/kg、20 mg/kg から 30 mg/kg、1 mg/kg から 25 mg/kg、4 mg/kg から 20 mg/kg、6 mg/kg から 15 mg/kg、又は 8 mg/kg から 10 mg/kg の複合体が投与される、請求項 1 から 4、5 2 から 6 7、及び 6 9 から 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 0】

1 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、30 mg/kg、35 mg/kg、40 mg/kg、45 mg/kg、50 mg/kg、又は 60 mg/kg の複合体が投与される、請求項 1 から 4、5 2 から 6 7、及び 6 9 から 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 1】

1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、又は 20 mg/kg の複合体が投与される、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記方法は、例えば、心筋症（例えば、拡張型、肥大型、又は拘束型心筋症）、心不全及び／又は心臓不整脈を含む DMD の心臓への影響に対する治療に使用するためのものである、請求項 1 から 4、5 2 から 6 7、及び 6 9 から 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドのペプチド複合体、それを含む組成物、及びそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸医薬品は、ヒトのヘルスケアを一変させる可能性を持つゲノム医薬品である。このような治療薬は、神経筋疾患を含む広範な疾患領域に応用できる可能性が研究により示さ

10

20

30

40

50

れている。神経筋疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）におけるpre-mRNAスプライシングを調節するためのアンチセンス・オリゴヌクレオチドに基づく方法の応用により、この単遺伝性疾患は精密医療の進歩の最前線に位置づけられるようになった。

【0003】

しかし、これらの有望なアンチセンス療法の治療開発は、不十分な細胞透過性と乏しい分布特性－DMDの筋肉組織基質の体積の大きさと分散性によってさらに強調される課題－によって妨げられてきた。

【0004】

DMDは新生児男児3500人に1人の割合で発症する。この重篤なX連鎖性劣性疾患は、ジストロフィンタンパク質をコードするDMD遺伝子の突然変異に起因する。この疾患は、進行性の筋変性と筋力低下を特徴とし、呼吸不全や心合併症が出現し、最終的には早死に至る。DMDの基礎となる変異の大部分は、オープンリーディングフレームの早期切断を引き起こすゲノムアウトオブフレーム欠失であり、その結果ジストロフィンタンパク質が欠損する。

【0005】

エクソンスキッピング療法は、スプライススイッチングアンチセンスオリゴヌクレオチド(SSO)を用いて、DMD転写産物の特定の領域を標的とし、個々のエクソンの排除を誘導し、異常なリーディングフレームの回復をもたらす。その結果、内部で欠失しているが部分的に機能するジストロフィンタンパク質の産生をもたらす。DMDに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドによるエクソンスキッピング療法の可能性は疑いようのないものであるにもかかわらず、このアプローチの成功的応用は、骨格筋に対する比較的非効率的な標的化と、心臓などの他の罹患組織に対する一本鎖オリゴヌクレオチドの不十分な標的化によって、現在のところ制限されている。2016年9月、米国食品医薬品局（FDA）は、エクソン51スプライシングの調節薬であるエテプリルセンの早期承認を認めた。これは、スプライシングを調節するオリゴヌクレオチドとして米国初のFDA承認となったが、ジストロフィンの回復レベルは期待外れで、正常レベルの約1%であった。対立遺伝子疾患であるベッカー型筋ジストロフィー（BMD）との比較やmdxマウスでの実験から、運動によって誘発される損傷から筋肉を守るためには、野生型の少なくとも-15%の均質な筋細胞膜ジストロフィン発現が必要であることが示された。

【0006】

したがって、DMDのような深刻な遺伝性疾患には、新しいアンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いた治療法が必要である。

【発明の概要】

【0007】

典型的には、本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する対象を治療する方法を提供する。

【0008】

1つの態様において、上記方法は、オリゴヌクレオチドと、上記オリゴヌクレオチドに共有結合又はリンカーを介して連結されたペプチドとの複合体を1 mg/kgから60 mg/kg投与することを含み、上記ペプチドは、少なくとも4個のアミノ酸残基を含む少なくとも1個のカチオン性ドメイン、及び少なくとも3個のアミノ酸残基を含む少なくとも1個の疎水性ドメインを含み、但し、上記ペプチドは合計7から40個のアミノ酸残基を含み、且つ、上記の少なくとも1個のカチオン性ドメインは、アルギニン残基及び／又はヒスチジン残基と組み合わせてβ-アラニン残基を含み、及び、上記オリゴヌクレオチドは、合計12から40個の連続した核酸塩基を含み、少なくとも12個の連続する核酸塩基は、ヒトジストロフィン遺伝子の標的配列に相補的である。

【0009】

いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、以下の配列を含む。

5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）。いくつかの

10

20

30

40

50

実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、

配列番号	配列
107	5' - ACCAGAGU AACAGUCUGAGUAGGAGC - 3'
108	5' - CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC - 3'
109	5' - UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC - 3'
110	5' - ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG - 3'
111	5' - ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG - 3'
112	5' - CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG - 3'
113	5' - AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG - 3'
114	5' - AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG - 3'
115	5' - CACCCACCAUCACCCUCUGUG - 3'
116	5' - AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCA - 3'

10

及びそれらのチミン置換アナログからなる群から選択される配列を含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、4から12アミノ酸残基の間の長さを有する。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、4から7アミノ酸残基の間の長さを有する。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%のカチオン性アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%のアルギニン及び／又はヒスチジン残基を含む。

20

【0011】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、以下の配列の1つを含む。RBRBR (配列番号1)、RBRBR (配列番号2)、RBRR (配列番号3)、RBRBR (配列番号4)、RRBRBR (配列番号5)、RBRBR (配列番号6)、BRBR (配列番号7)、RBHBH (配列番号8)、HBHBR (配列番号9)、RBRHBHR (配列番号10)、RBRBBHR (配列番号11)、RBRRBH (配列番号12)、HBRRBR (配列番号13)、HBHBH (配列番号14)、BHBH (配列番号15)、BRBSB (配列番号16)、BRB[Hyp]B (配列番号17)、R[Hyp]H[Hyp]HB (配列番号18)、R[Hyp]RR[Hyp]R (配列番号19)、又はそれらの任意の組み合わせ。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、以下の配列の1つを含むか、又は以下の配列の1つからなる。RBRBR (配列番号1)、RBRBR (配列番号2)、RBRR (配列番号3)、RBRBR (配列番号4)、RRBRBR (配列番号5)、RBRBR (配列番号6)、BRBR (配列番号7)、RBHBH (配列番号8)、HBHBR (配列番号9)、RBRHBHR (配列番号10)、RBRBBHR (配列番号11)、RBRRBH (配列番号12)、HBRRBR (配列番号13)、HBHBH (配列番号14)、BHBH (配列番号15)、BRBSB (配列番号16)、BRB[Hyp]B (配列番号17)、R[Hyp]H[Hyp]HB (配列番号18)、R[Hyp]RR[Hyp]R (配列番号19)、又はそれらの任意の組み合わせ。

30

【0012】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のカチオン性ドメインを含む。

40

【0013】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、3から6アミノ酸の長さを有し、好ましくは、各疎水性ドメインは、5アミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%の疎水性アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、トリプトファン、プロリン、及び／又はグルタミン残基を含み、好ましくは、各疎水性ドメインは、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、トリプトファン、プロリン、及び／又はグルタミン残基を含む又はからなる。いくつか

50

の実施形態において、上記ペプチドは、1個の疎水性ドメインを含む。いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、以下の配列の1つを含む。YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、W WPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、WWPW（配列番号26）又はそれらの任意の組み合わせ。いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、以下の配列の1つを含む又ははからなる。YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、WWPW（配列番号26）又はそれらの任意の組み合わせ。

【0014】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のカチオン性ドメイン及び1個の疎水性ドメインを含む又ははからなる。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のカチオン性アームドメインに挟まれた1個の疎水性コアドメインを含む又ははからなる。

10

【0015】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、RBRBR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBR（配列番号3）、RBRBR（配列番号4）、RRBR（配列番号5）、RBRB（配列番号6）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、HBHBR（配列番号9）、RBRHBHR（配列番号10）、RBRBBHR（配列番号11）、RBRRBH（配列番号12）、HBRRBR（配列番号13）、HBHBH（配列番号14）、BHBH（配列番号15）、BRBSB（配列番号16）、BRB[Hyp]B（配列番号17）、R[Hyp]H[Hyp]HB（配列番号18）、及びR[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）から選択される配列をそれぞれ含む2個のカチオン性アームドメインによって挟まれた、YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、及びWWPW（配列番号26）から選択される配列を含む1個の疎水性ドメインを含む又ははからなる。

20

【0016】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下の配列の1つを含むか、又は以下の配列の1つからなる。RBRBRRFQILYRBRBR（配列番号27）、RBRBRRYQFLIRBRBR（配列番号31）、RBRBRRIILFQYRBRBR（配列番号32）、RBRBRRFQILYBRBR（配列番号35）、RBRBRRFQILYRBHBH（配列番号37）、RBRBRRFQILYHBHBR（配列番号38）、及びRBRBRRFQILYRBHBH（配列番号44）。

30

【0017】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下のアミノ酸配列RBRBRRFQILYBRBR（配列番号35）を含むか、又は有する。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下のアミノ酸配列RBRBRRFQILYRBHBH（配列番号37）を含むか、又は有する。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下のアミノ酸配列RBRBRRFQILYRBHBH（配列番号44）を含むか、有する。

【0018】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、そのN末端を介して上記複合体の残りの部分に結合する。いくつかの実施形態において、上記ペプチドのC末端は、-NH₂である。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、そのC末端を介して上記複合体の残りの部分に結合する。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、そのN末端でアシル化される。

40

【0019】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を含むか、以下の構造である。

【化1】

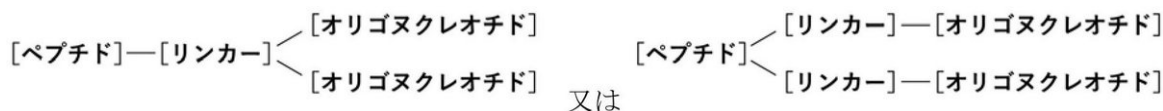
[ペプチド]—[リンカー]—[オリゴヌクレオチド]

【0020】

50

いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を含むか、以下の構造である。

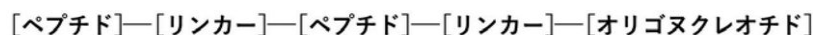
【化 2】



【0021】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を含むか、以下の構造である。

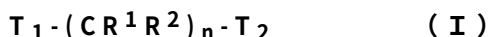
【化 3】



10

【0022】

いくつかの実施形態において、各リンカーは、独立して下記式 (I) で示される。



(式中、 T_1 は、前記ペプチドに結合するための2価の基であり、 $-NH-$ 及びカルボニルからなる群から選択され、

T_2 は、オリゴヌクレオチドに結合するための2価の基であり、 $-NH-$ 及びカルボニルからなる群から選択され、

n は、1、2又は3であり、

各 R^1 は、独立して $-Y^1-X^1-Z^1$ であり、

ここで、

Y^1 は、存在しないか、又は $-(CRA^1RA^2)_m-$ であり、 m は、1、2、3又は4であり、 RA^1 及び RA^2 は、それぞれ独立して水素、OH、又は $(1-2C)$ アルキルであり、

X^1 は、存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-CH(ORA^3)-$ 、 $-N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)-C(O)-$ 、 $-N(RA^3)-C(O)O-$ 、 $-C(O)-N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)C(O)N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)C(NRA^3)N(RA^3)-$ 、 $-SO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(O)_2N(RA^3)-$ 、又は $-N(RA^3)SO_2-$ であり、各 RA^3 は、独立して水素及びメチルから選択され、及び

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル、又はヘテロアリールであり、

ここで、各 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル、又はヘテロアリールは、 $(1-4C)$ アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 $NR^{A4}R^{A5}$ 、及び $(1-4C)$ アルコキシからなる群より選択される1つ以上（例えば、1、2、3、4、又は5）の置換基によって置換されていてもよく、 RA^4 及び RA^5 はそれぞれ独立して水素及び $(1-4C)$ アルキルからなる群より選択され、及び

各 R^2 は、独立して $-Y^2-X^2-Z^2$ であり、ここで、

Y^2 は、存在しないか、式 $-[CR^{B1}R^{B2}]_m-$ で示される基であり、 m は、1、2、3又は4、から選択される整数であり、 R^{B1} 及び R^{B2} はそれぞれ独立して水素、OH又は $(1-2C)$ アルキルから選択され、

X^2 は、存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-CH(ORB^3)-$ 、 $-N(RB^3)-$ 、 $-N(RB^3)-C(O)-$ 、 $-N(RB^3)-C(O)O-$ 、 $-C(O)-N(RB^3)-$ 、 $-N(RB^3)C(O)N(RB^3)-$ 、 $-N(RB^3)C(NRB^3)N(RB^3)-$ 、 $-SO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(O)_2N(RB^3)-$ 、又は $-N(RB^3)SO_2-$ であり、それぞれ RB^3 は独立して水素又はメチルから選択され、及び

Z^2 は、水素、 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル又はヘテロアリールから選択され、各 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル又はヘテロアリールは、 $(1-4C)$ アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒ

20

30

40

50

ドロキシ、カルボキシ、 $\text{NR}^{\text{B}4}\text{R}^{\text{B}5}$ 、及び(1-4C)アルコキシからなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4、又は5)の置換基によって置換されていてもよく、 $\text{R}^{\text{B}4}$ 及び $\text{R}^{\text{B}5}$ は、それぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルであり、ただし、 $n=1$ かつ、 T_1 及び T_2 は互いに異なるとき、 R^1 及び R^2 は、両方ともHではなく、 $n=1$ かつ、 T_1 及び T_2 は互いに異なり、 R^1 及び R^2 の一方はHであるとき、 R^1 及び R^2 の他方はメチルではなく、又は $n=2$ かつ、 R^1 及び R^2 の各存在はHであるとき T_1 及び T_2 は両方とも-C(O)-、又は両方とも-NH-である。)

【0023】

いくつかの実施形態において、 T_2 は、-C(O)-である。

【0024】

いくつかの実施形態において、各 R^1 は、独立して $-\text{Y}^1-\text{X}^1-\text{Z}^1$ であり、

Y^1 は、存在しないか、又は $-(\text{CRA}^1\text{RA}^2)_m-$ であり、 m は1、2、3又は4であり、 RA^1 と RA^2 はそれぞれ水素又は(1-2C)アルキルであり、

X^1 は、存在しないか、-O-、-C(O)-、-C(O)O-、-N(RA^3)-、-N(RA^3)-C(O)-、-C(O)-N(RA^3)-、-N(RA^3)C(O)N(RA^3)-、-N(RA^3)C(N RA^3)N(RA^3)-又は-S-であり、各 RA^3 は独立して水素又はメチルであり、及び、

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、(1-6C)アルキル、(2-6C)アルケニル、(2-6C)アルキニル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、(3-6C)シクロアルケニル、又はヘテロアリールであり、各(1-6C)アルキル、(2-6C)アルケニル、(2-6C)アルキニル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、(3-6C)シクロアルケニル、及びヘテロアリールは(1-4C)アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 NRA^4RA^5 、及び(1-4C)アルコキシ、からなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4、又は5)の置換基によって置換されていてもよく、 R^{M} と RA^5 は、それぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルである。

【0025】

いくつかの実施形態において、各 R^1 は、独立して $-\text{Y}^1-\text{X}^1-\text{Z}^1$ であり、

Y^1 は存在しないか、又は $-(\text{CRA}^1\text{RA}^2)_m-$ であり、 m は1、2、3、又は4であり、 RA^1 と R^{H} は、それぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルであり、

X^1 は存在しないか、-O-、-C(O)-、-C(O)O-、-N(RA^3)-、-N(RA^3)-C(O)-、-C(O)-N(RA^3)-、-N(RA^3)C(O)N(RA^3)-、-N(RA^3)C(N RA^3)N(RA^3)-、又は-S-であり、各 RA^3 は、独立して水素又はメチルであり、及び、

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、(1-6C)アルキル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、又はヘテロアリールであり、それぞれ(1-6C)アルキル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、及びヘテロアリールは、(1-4C)アルキル、ハロ、及びヒドロキシからなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4又は5)の置換基によって置換されていてもよい。

【0026】

いくつかの実施形態において、各 R^1 は独立して $-\text{Y}^1-\text{X}^1-\text{Z}^1$ であり、

Y^1 は存在しないか、式 $-(\text{CRA}^1\text{RA}^2)_m-$ で示される基であり、 m は、1、2、3又は4であり、 RA^1 と RA^2 は、それぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルであり、

X^1 は存在しないか、-C(O)-、-C(O)O-、-N(RA^3)-C(O)-、-C(O)-N(RA^3)-であり、各 RA^3 は水素又はメチルであり、及び、

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、(1-6C)アルキル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、又はヘテロアリールであり、それぞれ(1-6C)アルキル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、及びヘテロアリールは、(1-4C)アルキル、ハロ、及びヒドロキシからなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4、又は5)の置換基によって置換されていてもよい。

【0027】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、各 R^1 は、独立して $-Y^1-X^1-Z^1$ であり、
 Y^1 は、存在しないか、 $-(CH_2)-$ 、又は $-(CH_2CH_2)-$ であり、
 X^1 は、存在しないか、 $-N(R^{A3})-C(O)-$ 、 $-C(O)-N(R^{A3})-$ であり、各 R^{A3} は独立して
 水素又はメチルであり、及び、
 Z^1 は、水素又は(1-2C)アルキルである。

【0028】

いくつかの実施形態において、各 R^2 は、独立して $-Y^2-Z^2$ であり、
 Y^2 は、存在しないか、 $-(CR^{B1}R^{B2})_m-$ であり、 m は、1、2、3又は4であり、 R^{B1}
 と R^{B2} はそれぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルであり、及び、
 Z^2 は水素又は(1-6C)アルキルである。

10

【0029】

いくつかの実施形態において、各 R^2 は、水素である。

【0030】

いくつかの実施形態において、 n は2又は3である。いくつかの実施形態において、 n は
 1である。

【0031】

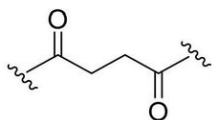
いくつかの実施形態において、上記リンカーは、グルタミン酸、コハク酸、及び γ -ア
 ミノ酪酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基である。

【0032】

いくつかの実施形態において、上記リンカーは、以下の構造を含むか、又は以下の構造
 である。

20

【化4】

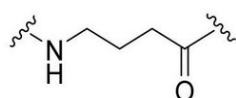


【0033】

いくつかの実施形態において、上記リンカーは、以下の構造を含むか、又は以下の構造
 である。

【化5】

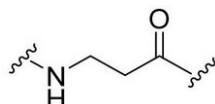
30



【0034】

いくつかの実施形態において、上記リンカーは、以下の構造を含むか、又は以下の構造
 である。

【化6】

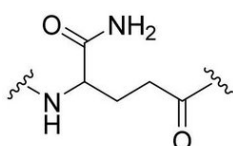


40

【0035】

いくつかの実施形態において、上記リンカーは、以下の構造を含むか、又は以下の構造
 である。

【化7】

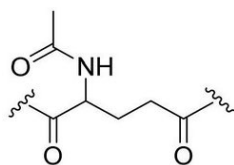


50

【 0 0 3 6 】

いくつかの実施形態において、上記リンカーは、以下の構造を含むか、又は以下の構造である。

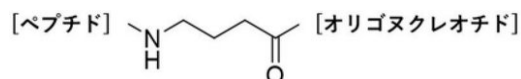
【 化 8 】



【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である。

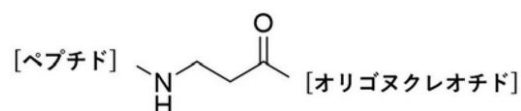
【 化 9 】



【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である。

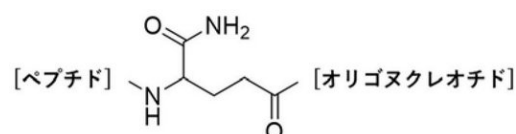
【 化 1 0 】



【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である。

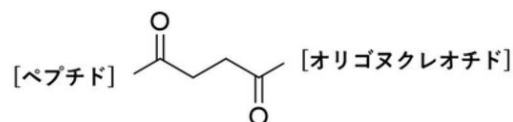
【 化 1 1 】



【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である。

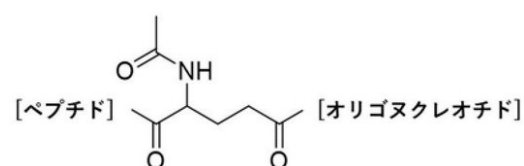
【 化 1 2 】



【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である。

【 化 1 3 】



10

20

30

40

50

【0042】

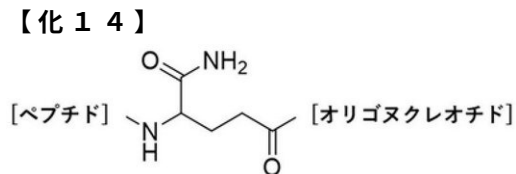
いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、その3'末端で上記リンカー又は上記ペプチドに結合する。

【0043】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3'（配列番号107）、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3'（配列番号108）、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3'（配列番号109）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3'（配列番号110）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号111）、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号112）、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3'（配列番号113）、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAG-3'（配列番号114）、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、もしくは5'-AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAAA-3'（配列番号116）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を有する。

10

20

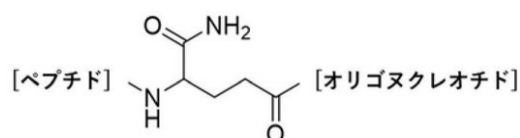


【0044】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）を含む又はからなり、ここで、グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3'（配列番号109）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。この段落のいくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を有する。

30

【化15】



40

【0045】

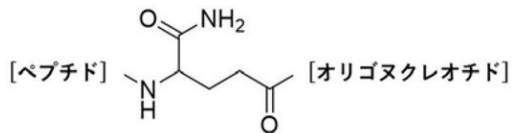
いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3'（配列番号107）、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3'（配列番号108）、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3'（配列番号109）、5'-A

50

CAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号116) 又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を有する。

【化16】

10



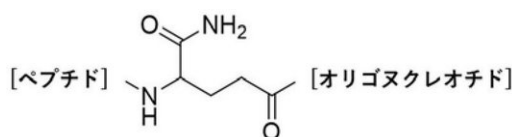
【0046】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106) を含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAUC-3' (配列番号109)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。この段落のいくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を有する。

20

【化17】

30



【0047】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)、5'-ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号108)、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAUC-3' (配列番号109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号116)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる。

40

【0048】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHの

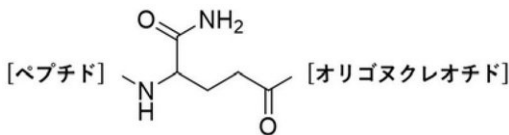
50

C末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）を含む又はからなる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAUC-3'（配列番号109）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる。

【0049】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）、5'-ACCAGAGUACAGUCUGAGUAGGAGC-3'（配列番号107）、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3'（配列番号108）、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAUC-3'（配列番号109）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3'（配列番号110）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号111）、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGUUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号112）、5'-AUCAUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3'（配列番号113）、5'-AUCAUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAG-3'（配列番号114）、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、もしくは5'-AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAAA-3'（配列番号116）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。いくつかの実施形態において、上記複合体は以下の構造を有する。

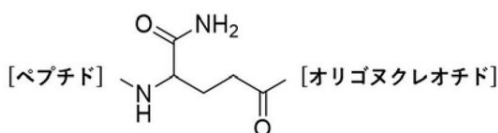
【化18】



【0050】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）を含む又はからなり、ここで、グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAUC-3'（配列番号109）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。この段落のいくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の構造を有する。

【化19】



【0051】

いくつかの実施形態において、上記リンカーは、以下の構造である。

10

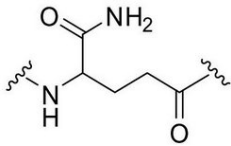
20

30

40

50

【化 20】



【0052】

上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号108)、5'-UUCUGUCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAU UUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAU UUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAU UUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUC AUCUGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号116)、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる。

【0053】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又はからなる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる。

【0054】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号108)、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAU UUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAU UUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUUGGCAU UUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUCAUCUGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号116)、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる。

【0055】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又はからなる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニ

ン残基を介して共有結合した3'末端を有する5' -CACCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる。

【0056】

いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、モルホリノである。

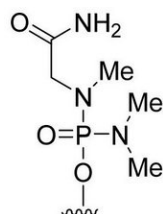
【0057】

いくつかの実施形態において、全てのモルホリノヌクレオシド間結合は、-P(O)(NMe₂)O-である。

【0058】

いくつかの実施形態において、上記ヌクレオチドは、その5'末端として下記の基を含む。

【化21】



【0059】

本明細書に記載される上記及び他のオリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー (PMO) である。

【0060】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、腹腔内投与される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、注入 (例えば、静注であり、任意にボラス注入又は持続注入であり、後者は任意に10分間から3時間、例えば0.25~2時間、又は0.5~1時間である) により投与される。いくつかの実施形態において、上記複合体は、静注によって投与される。いくつかの実施形態において、上記対象は、エクソン51スキッピングが適応となる。

【0061】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、毎週から毎月の頻度で上記対象に投与される。いくつかの実施形態において、上記頻度は、毎週、隔週、3週間ごと、又は毎月であるいくつかの実施形態において、上記頻度は3ヶ月ごとである。

【0062】

いくつかの実施形態において、40 mg/kgから60 mg/kg、30 mg/kgから50 mg/kg、30 mg/kgから40 mg/kg、40 mg/kgから50 mg/kg、50 mg/kgから60 mg/kg、35 mg/kgから45 mg/kg、45 mg/kgから55 mg/kg、35 mg/kgから55 mg/kg、30 mg/kgから45 mg/kg、35 mg/kgから50 mg/kg、40 mg/kgから55 mg/kg、45 mg/kgから60 mg/kg、1 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから20 mg/kg、5 mg/kgから25 mg/kg、10 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから15 mg/kg、5 mg/kgから20 mg/kg、10 mg/kgから25 mg/kg、15 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから10 mg/kg、5 mg/kgから15 mg/kg、10 mg/kgから20 mg/kg、15 mg/kgから25 mg/kg、20 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから25 mg/kg、4 mg/kgから20 mg/kg、6 mg/kgから15 mg/kg、又は8 mg/kgから10 mg/kgの複合体が投与される。

【0063】

いくつかの実施形態において、1 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg、50 mg/kg、又は60 mg/kgの複合体が投与される。いくつかの実施形態において、1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、又は20 mg/kgの複合体が投与される。

【0064】

いくつかの実施形態において、上記方法は、例えば、心筋症（例えば、拡張型、肥大型、又は拘束型心筋症）、心不全及び／又は心臓不整脈を含むDMDの心臓への影響に対する治療に使用するためのものである。

【0065】

いくつかの実施形態において、上記及び本明細書の他の箇所に記載された方法は、BMDの治療に使用される。

【0066】

本発明はまた、本明細書に記載の方法における本明細書に記載の複合体の使用も含む。従って、本明細書における各治療方法の請求項は、示された方法（例えば、DMD又はBMDの治療、予防又は改善）での使用のために、そこに規定された通りの組成物の形態における請求項を支持するものと考えることができる。

10

【0067】

定義

本明細書全体を通して、「X」とは、6-アミノヘキサン酸などのアミノ酸アミノヘキサン酸の任意の形態を示す。

【0068】

本明細書全体を通して、「B」とは、アミノ酸β-アラニンを示す。

【0069】

本明細書全体を通して、「[Hyp]」とは、アミノ酸ヒドロキシプロリンを示す。

【0070】

本明細書全体を通して、「Ac」とは、アセチル基（CH₃-C(O)-）を示す。

20

【0071】

本明細書全体を通して、他の大文字は、一般に受け入れられているアルファベットのアミノ酸コードに従って、遺伝子的にコード化された関連するアミノ酸残基を示す。

【0072】

「アルキル」という用語は、本明細書において、特に指定がない限りは、合計1から20個の炭素原子を含有する直鎖又は分岐鎖炭化水素基（例えば、（1-6C）アルキル、（1-4C）アルキル、（1-3C）アルキル、又は（1-2C）アルキル）を指す。アルキルの非限定的な例としては、メチル、エチル、1-メチルエチル、プロピル、1-メチルブチル、1-エチルブチルなどが挙げられる。「プロピル」のような個々のアルキル基への言及は、直鎖基のみに特有であり、「イソプロピル」のような個々の分岐鎖アルキル基への言及は、分岐鎖基にのみ特有である。

30

【0073】

「アルケニル」という用語は、本明細書において、特に指定がない限りは、1、2、又は3個の炭素-炭素二重結合を持ち、合計2から20個の炭素原子を含有する脂肪族基を指す（例えば、（2-6C）アルケニル、（2-4C）アルケニル、又は（2-3C）アルケニル）。アルケニルの非限定的な例としては、ビニル、アリル、ホモアリル、イソプレニルなどが挙げられる。特に指定がない限りは、アルケニルはカルボシクリル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、オキソ、ハロゲン、及びヒドロキシルからなる群から選択される1、2、3、4又は5個の基によって置換されていてもよい。

40

【0074】

「アルキニル」という用語は、本明細書において、特に指定がない限りは、1、2、又は3個の炭素-炭素三重結合を含有し、合計2から20の炭素原子を含有する脂肪族基（例えば、（2-6C）アルキニル、（2-4C）アルキニル、又は（2-3C）アルキニル）を指す。アルキニルの非限定的な例としては、エチニル、プロパルギル、ホモプロパルギル、ブター-2-イン-1-イル、2-メチル-プロプ-2-イン-1-イルなどが挙げられる。特に指定がない限りは、アルキニルカルボシクリル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、オキソ、ハロゲン、及びヒドロキシルからなる群から選択される1、2、3、4、又は5個の基によって置換されていてもよい。

【0075】

50

カチオン性ドメインに関して「アルギニンリッチ」とは、カチオン性ドメインの少なくとも40%がアルギニン残基で形成されていることを意味する。

【0076】

「人工アミノ酸」という用語は、本明細書において、非生体アミノ酸（例えば、非タンパク原性）を指す。例えば、人工アミノ酸は、合成アミノ酸、修飾アミノ酸（例えば、糖で修飾されたアミノ酸）、非天然アミノ酸、人造アミノ酸、スパーサー、及び非ペプチド結合スパーサーを含んでもよい。合成アミノ酸は、人によって化学的に合成されたものを含んでもよい。疑義を避けるため、アミノヘキサン酸（X）は、本発明の文脈においては人工アミノ酸である。疑義を避けるため、 β -アラニン（B）及びヒドロキシプロリン（Hyp）は、自然界に存在するので、本発明の文脈においては、人工アミノ酸ではなく天然アミノ酸である。人工アミノ酸は、例えば、6-アミノヘキサン酸（X）、テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸（TIC）、1-（アミノ）シクロヘキサンカルボン酸（Cy）、3-アゼチジンカルボン酸（Az）、及び11-アミノウンデカン酸を含んでもよい。

10

【0077】

「アリール」という用語は、本明細書において、1、2、又は3個の環を含有する炭素環式環系を指し、環のうちの少なくとも1個は芳香族である。非置換アリールは、合計6から14個の炭素原子を含む。アリールという用語は、1価の種と2価の種の両方を含む。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、インダニル、などが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、置換されていてもよいアリールは、置換されていてもよいフェニルである。

20

【0078】

本明細書において、「架橋環系」とは、2個の環が2個以上の原子を共有する環系を意味する、例えば、Advanced Organic Chemistry、Jerry March著、第4版、Wiley Interscience、131-133ページ、1992年を参照されたい。架橋ヘテロシクリル環系の例としては、アザ-ビスシクロ[2.2.1]ヘプタン、2-オキサ-5-アザビスシクロ[2.2.1]ヘプタン、アザ-ビスシクロ[2.2.2]オクタン、アザ-ビスシクロ[3.2.1]オクタン、キヌクリジン、などが挙げられる。

【0079】

本明細書において、「カルボニル」という用語は、以下の構造の基、 $-C(=O)-$ を指す。カルボニル基の非限定的な例としては、例えば、アセトン、エチルアセテート、タンパク原性アミノ酸、アセトアミド、などに見られるカルボニル基が挙げられる。

30

【0080】

本明細書において、「カチオン性」とは、生理的pHにおいて全体として正電荷を有するアミノ酸又はアミノ酸ドメインを示す。

【0081】

単独又は接頭語として使用される「(m-nC)」又は「(m-nC)基」という用語は、置換されない場合に、合計mからn個の炭素原子を有する基を指す。

【0082】

「相補的」という用語は、本明細書において核酸塩基配列に関して使用される場合、核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが、生理的条件において他のオリゴヌクレオチド又は核酸にハイブリダイズして、二重鎖構造を形成することを可能にする、連続した核酸塩基のパターンを有する核酸塩基配列を指す。相補的配列には、天然及び/又は修飾された核酸塩基から形成されるワトソン-クリック塩基対が含まれる。相補配列には、また、ウォブル塩基対（グアノシン-ウラシル、ヒポキサンチン-ウラシル、ヒポキサンチン-アデニン、ヒポキサンチン-シトシン）やフーグスティーン塩基対などの非ワトソンクリック塩基対も含まれる場合もある。

40

【0083】

「シクロアルキル」という用語は、本明細書において、特に指定がない限りは、1又は2個の環を含有し、合計3から10個の炭素原子を含有する飽和炭素環式環系を指す。二環式シクロアルキルは縮合環系（2個の橋頭炭素原子は互いに直接結合している）、架橋

50

環系（２個の橋頭炭素原子は、少なくとも１つの炭素原子を含む共有結合性リンカーを介して互いに結合している）、及びスピロ環（２個の環は同一の炭素原子で縮合している）系として配置されうる。シクロアルキルの非限定的な例としては、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、ビスシクロ[2.2.1]ヘプチル、などが挙げられる。

【００８４】

「シクロアルケニル」という用語は、本明細書において、特に指定がない限りは、非芳香族、非置換、炭素環式環系を指し、１又は２個の環を含有し、１、２、又は３個の環内二重結合を含有し、及び、合計３から１０個の炭素原子を含有する。二環式シクロアルケニルは縮合環系（２個の橋頭炭素原子は互いに直接結合している）、架橋環系（２個の橋頭炭素原子は、少なくとも１つの炭素原子を含有する共有結合性リンカーを介して互いに結合している）、及びスピロ環（２個の環は同一の炭素原子で縮合している）系として配置されうる。シクロアルケニルの非限定的な例としては、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、３-シクロヘキセン-１-イル、シクロオクテニル、などが挙げられる。

【００８５】

「ジストロフィン」は棒状の細胞質タンパク質であり、そして筋線維の細胞骨格を細胞膜を通して周囲の細胞外マトリックスに連結するタンパク質複合体の重要な一部である。ジストロフィンは複数の機能ドメインを含有している。例えば、ジストロフィンは約１４～２４０アミノ酸にアクチン結合ドメイン及び約２５３～３０４０アミノ酸に中央ロッドドメインを含有する。この大きな中央ドメインは、約１０９アミノ酸からなる２４個のスペクトリン様三重らせん要素によって形成されており、 α -アクチニン及びスペクトリンと相同性を持つ。リピートは通常、ヒンジドメインとも呼ばれる４個のプロリンリッチな非リピートセグメントによって分断されている。リピート１５及び１６は、ジストロフィンのタンパク質分解切断の主要な部位を提供すると思われる１８アミノ酸の伸長によって隔てられている。ほとんどのリピート間の配列同一性は１０-２５％の範囲である。１つのリピートは３個の α -ヘリックス、１、２及び３を含有する。 α -ヘリックス１及び３は、それぞれ７つのヘリックスターンによって形成されており、おそらく疎水性界面を介してコイルドコイルとして相互作用している。 α -ヘリックス２はより複雑な構造を有し、グリシン残基又はプロリン残基で区切られた４回転及び３回転の配列によって形成されている。各リピートは、２つのエクソンによってコードされており、通常、 α -ヘリックス２の最初の部分のアミノ酸４７及び４８の間のイントロンによって分断されている。もう１つのイントロンは、リピート内の異なる位置にあり、通常はヘリックス３上に散在している。ジストロフィンはまた、約アミノ酸３０８０－３３６０にシステインにリッチなドメインを含有し、粘菌（*Dictyostelium discoideum*）の α -アクチニンのＣ末端ドメインと相同性を示すシステインリッチなセグメント（すなわち、２８０アミノ酸中１５システイン）を含む。カルボキシ末端ドメインは、約アミノ酸３３６１－３６８５にある。

【００８６】

ジストロフィンのアミノ末端はＦ-アクチンに結合し、カルボキシ末端は筋細胞膜のジストロフィン関連タンパク質複合体（ＤＡＰＣ）に結合する。ＤＡＰＣには、ジストログリカン、サルコグリカン、 α -ジストロブレビン、サルコスパン、ラミニン、シントロフィン、インテグリン、及びカベオリンが含まれ、これらの構成要素のいずれかに変異があると、常染色遺伝性の筋ジストロフィーが引き起こされる。ジストロフィンが欠損するとＤＡＰＣは不安定化し、その結果、構成タンパク質のレベルが低下し、線維の損傷及び膜漏出が進行する。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）及びベッカー型筋ジストロフィー（ＢＭＤ）などの様々な型の筋ジストロフィーでは、主に遺伝子配列の変異により誤ったスプライシングがなされるため、筋細胞は変性した機能欠損型のジストロフィンを産生するか、又はジストロフィンを全く産生しない。欠損ジストロフィントタンパク質の優勢な発現、又は、ジストロフィン又はジストロフィン様タンパク質の完全な欠損は、上述のように筋変性の急速な進行につながる。この点で、「欠損した」ジストロフィントタンパク質

は、当該技術分野で知られているように、DMD又はBMDを有する特定の対象で産生されるジストロフィンの形態か、又は検出可能なジストロフィンが存在しないことによって特徴付けられ得る。

【0087】

「エクソン」とは、タンパク質をコードする核酸の定義された部位、又は前処理された（又は前駆体）RNAのいずれかの部位がスプライシングにより除去された後のRNA分子の成熟型で表される核酸配列を指す。成熟RNA分子は、メッセンジャーRNA（mRNA）又はrRNA又はtRNAのような非コードRNAの機能的形態であってもよい。ヒトジストロフィン遺伝子は約75のエクソンを有する。

【0088】

「エクソンスキッピング」とは、一般に、エクソン全体又はその一部が、所定の前駆体RNAから除去され、それにより、タンパク質に翻訳される成熟mRNAのような成熟RNAにおける存在を除去されるプロセスを指す。従って、スキップされたエクソンによってコードされるタンパク質の部位は、タンパク質の発現形態には存在せず、通常は、タンパク質の、まだ機能的ではあるが変質した形態を作り出す。特定の実施形態では、スキップされるエクソンは、ヒトジストロフィン遺伝子の異常エクソンであり、その配列内に異常スプライシングを引き起こす変異又は他の変質を含有している可能性がある。本明細書で述べるように、スキップされるエクソンはヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51である。

【0089】

「ハロ」又は「ハロゲノ」という用語は、本明細書において、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードを指す。

【0090】

カチオン性ドメインに関して「ヒスチジンリッチ」とは、カチオン性ドメインの少なくとも40%がヒスチジン残基で形成されることを意味する。

【0091】

「ヘテロアリアル」又は「ヘテロ芳香族」という用語は、本明細書において互換的に使用される場合、1、2、又は3個の環を含有する環系を指し、環のうち少なくとも1個は芳香族であり、窒素、酸素、及び硫黄からなる群から選択されるヘテロ原子を1から4個（例えば、1、2、又は3個）含有する。非置換ヘテロアリアル基は、合計1から9個の炭素原子を含有する。ヘテロアリアルという用語は、1価の種と2価の種の両方を含む。ヘテロアリアル基の例としては、5から12個の環員、より一般的には5から10個の環員を含有する、単環式及び二環式基が挙げられる。ヘテロアリアル基は、例えば、5-又は6-員の単環式環、又は9-又は10-員の二環式環、例えば、縮合した5及び6員環又は2個の縮合した6員環から形成される二環式構造であってもよい。各環は、典型的には窒素、硫黄及び酸素から選択されるヘテロ原子を約4個まで含有しうる。典型的には、ヘテロアリアル環は、3個までのヘテロ原子、より一般的には2個までの、例えば、単一のヘテロ原子を含む。いくつかの実施形態において、ヘテロアリアル環は、少なくとも1個の環窒素原子を含有する。ヘテロアリアル環の窒素原子は、イミダゾール又はピリジンの場合のように、塩基性であっても良く、又はインドール又はピロール窒素の場合のように、本質的に非塩基性であっても良い。一般に、ヘテロアリアル基に存在する塩基性窒素原子の数は、すべての環のアミノ基置換基を含めて、5個未満になる。

【0092】

ヘテロアリアル基の例としては、フリル、ピロリル、チエニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、1、3、5-トリアゼニル、ベンゾフラニル、インドリル、イソインドリル、ベンゾチエニル、ベンゾオキサゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアゾリル、インダゾリル、プリニル、ベンゾフラザニル、キノリル、イソキノリル、キナゾリニル、キノキサリニル、シノリニル、プテリジニル、ナフチリジニル、カルバゾリル、フェナジニル、ベンズイソキノリニル、ピリドピラジニル、チエノ[2,3-b]フラ

10

20

30

40

50

ニル、2H-フロ[3,2-b]-ピラニル、5H-ピリド[2,3-d]-オキサジニル、1H-ピラゾロ[4,3-d]-オキサゾリル、4H-イミダゾ[4,5-d]チアゾリル、ピラジノ[2,3-d]ピリダジニル、イミダゾ[2,1-b]チアゾリル、イミダゾ[1,2-b][1,2,4]トリアジニルが挙げられる。

「ヘテロアリール」はまた、少なくとも1個の環が芳香族環であり、他の環の1個以上が非芳香族、飽和又は部分飽和環である、部分芳香族の二環式又は多環式環系を含むが、ただし、少なくとも1個の環が窒素、酸素又は硫黄から選択される1個以上のヘテロ原子を含有する。部分芳香族ヘテロアリール基の例としては、例えば、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、2-オキソ1,2,3,4-テトラヒドロキノリニル、ジヒドロベンズチエニル、ジヒドロベンズフラニル、2,3-ジヒドロ-ベンゾ[1,4]ジオキシニル、ベンゾ[1,3]ジオキソイニル、2、2-ジオキソ-1,3-ジヒドロ-2-ベンズチエニル、4,5,6,7-テトラヒドロベンゾフラニル、インドリニル、1,2,3,4-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジニル、1,2,3,4-テトラヒドロピリド[2,3-b]ピラジニル及び3,4-ジヒドロ-2W-ピリド[3,2-b][1,4]オキサジニルが挙げられる。5員ヘテロアリール基の例としては、ピロリル、フラニル、チエニル、イミダゾリル、フラザニル、オキサゾリル、オキサジアゾリル、オキサトリアゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル及びテトラゾリル基が挙げられるが、これらに限定されない。6員ヘテロアリール基の例としては、ピリジル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリミジニル及びトリアジニルが挙げられるが、これらに限定されない。二環式ヘテロアリール基は、例えば、1、2又は3個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したベンゼン環；1、2又は3個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したピリジン環、1又は2個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したピリミジン環、1、2又は3個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したピロール環、1又は2個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したピラゾール環、1又は2個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したピラジン環、1又は2個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したイミダゾール環、1又は2個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したオキサゾール環、1又は2個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したイソキサゾール環、1又は2個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したチアゾール環、1又は2個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したイソチアゾール環、1、2又は3個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したチオフエン環、1、2又は3個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員環に縮合したフラン環、1、2又は3個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員ヘテロ芳香族環に縮合したシクロヘキシル環、及び1、2又は3個の環ヘテロ原子を含有する5-又は6-員ヘテロ芳香族環に縮合したシクロペンチル環から選択される基であってもよい。5員環に縮合した6員環を含有する二環式ヘテロアリール基の具体例としては、ベンゾフラニル、ベンズチオフエニル、ベンズイミダゾリル、ベンズオキサゾリル、ベンズイソオキサゾリル、ベンズチアゾリル、ベンズイソチアゾリル、イソベンゾフラニル、インドリル、イソインドリル、インドリジニル、インドリニル、イソインドリニル、プリニル（例えば、アデニル、グアニル、インダゾリル、ベンゾジオキソリル及びピラゾロピリジニル基が挙げられるが、これらに限定されない。2個の縮合6員環を含有する二環式ヘテロアリール基の具体例としては、キノリニル、イソキノリニル、クロマニル、チオクロマニル、クロメニル、イソクロメニル、クロマニル、イソクロマニル、ベンゾジオキサニル、キノリジニル、ベンゾオキサジニル、ベンゾジアジニル、ピリドピリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シノリニル、フタラジニル、ナフチリジニル及びプテリジニル基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0093】

「ヘテロシクリル」という用語は、本明細書において、1、2、又は3個の環を含有する環系を指し、環のうち少なくとも1個は芳香族であり、窒素、酸素、及び硫黄からなる群から選択されるヘテロ原子を1から4個（例えば、1、2、又は3個）含有し、ただし、環系は、環内ヘテロ原子をさらに含む芳香族環を含有しない。非置換ヘテロシクリル基は、合計2から9個の炭素原子を含有する。ヘテロシクリルという用語は、1価の種と2価の種の両方を含む。ヘテロシクリル基の例としては、5から12個の環員、より一般的

10

20

30

40

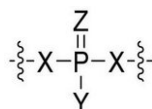
50

には5から10個の環員を含有する、単環式及び二環式基が挙げられる。ヘテロシクリル基は、例えば、5-又は6-員の単環式環、又は9-又は10-員の二環式環、例えば、縮合した5及び6員環又は2個の縮合した6員環から形成される二環式構造であってもよい。各環は、典型的には窒素、硫黄及び酸素から選択されるヘテロ原子を約4個まで含有してもよい。ヘテロシクリル基の非限定的な例としては、例えば、ピロリジン、ピペラジン、ペリジン、アゼパン、1,4-ジアゼパン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピラン、オキセパン、1,4-ジオキセパン、テトラヒドロチオフェン、テトラヒドロチオピラン、インドリン、ベンゾピロリジン、2,3-ジヒドロベンゾフラン、フタラン、イソクロマン、及び2,3-ジヒドロベンゾチオフェンが挙げられる。

【0094】

「ヌクレオシド間結合」という用語は、本明細書において、オリゴヌクレオチド中の隣接するヌクレオシド間に共有結合を形成する基又は結合を表す。ヌクレオシド間結合は非修飾ヌクレオシド間結合又は修飾ヌクレオシド間結合である。「非修飾ヌクレオシド間結合」はリン酸(-O-P(O)(OH)-O-)ヌクレオシド間結合(「リン酸ホスホジエステル」)である。「修飾ヌクレオシド間結合」はリン酸ホスホジエステル以外のヌクレオシド間結合である。修飾ヌクレオシド間結合の2つの主要な種類は、リン原子の有無によって定義される。リン含有ヌクレオシド間結合の非限定的な例としては、ホスホジエステル結合、ホスホトリエステル結合、ホスロチオエートジエステル結合、ホスホロチオエートトリエステル結合、モルホリノヌクレオシド間結合、メチルホスホネート、及びホスホルアミデートが挙げられる。非リンヌクレオシド間結合の非限定的な例としては、メチレンメチルイミノ(-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-)、チオジエステル(-O-C(O)-S-)、チオノカルバメート(-O-C(O)(NH)-S-)、シロキサン(-O-Si(H)₂-O-)、及びN、N'-ジメチルヒドラジン(-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-)が挙げられる。ホスホロチオエート結合は、非架橋酸素原子の1つが硫黄原子で置き換えられたホスホジエステル結合及びホスホトリエステル結合である。いくつかの実施形態において、ヌクレオシド間結合は、以下の構造の基である。

【化22】



(式中、

ZはO、S、又はSeであり、

Yは-X-L-R¹であり、

各Xは独立して-O-、-S-、-N(-L-R¹)-、又はLであり、

各Lは独立して共有結合又はリンカー(例えば、置換されていてもよいC₁₋₆₀脂肪族リンカー又は置換されていてもよいC₂₋₆₀ヘテロ脂肪族リンカー)であり、

各R¹は独立して水素、-S-S-R²、-O-CO-R²、-S-CO-R²、置換されていてもよいC₁₋₉ヘテロシクリル、又は疎水性部位であり、及び、

各R²は独立して置換されていてもよいC₁₋₁₀アルキル、置換されていてもよいC₂₋₁₀ヘテロアルキル、置換されていてもよいC₆₋₁₀アリール、置換されていてもよいC₆₋₁₀アリールC₁₋₆アルキル、置換されていてもよいC₁₋₉ヘテロシクリル、又は置換されていてもよいC₁₋₉ヘテロシクリルC₁₋₆アルキルである。)

【0095】

Lは共有結合、R¹は水素、Zは酸素、及び全てのX基は-O-である場合、ヌクレオシド間基は、リン酸ホスホジエステルとして知られている。Lは共有結合、R¹は水素、Zは硫黄、及び全てのX基は-O-である場合、ヌクレオシド間基はホスホロチオエートジエステルとして知られている。Zは酸素、全てのX基は-O-、及び(1)Lはリンカーであるか、又は(2)R¹は水素ではない場合、ヌクレオシド間基はホスホトリエステルとして知られている。Zは硫黄、全てのX基は-O-、及び(1)Lはリンカーであるか、又は(2)R¹は水素ではない場合、ヌクレオシド間基はホスホロチオエートトリエステルとして知られ

10

20

30

40

50

ている。ホスホロチオエートトリエステル結合及びホスホトリエステル結合の非限定的な例は、US2017/0037399に記載されており、その開示内容は参照により本明細書に組み込まれる。

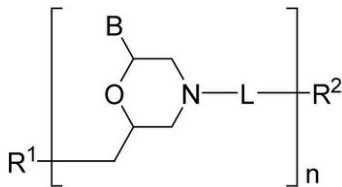
【0096】

「イントロン」は、タンパク質に翻訳されない（遺伝子内の）核酸領域を指す。イントロンは、前駆体mRNA（pre-mRNA）に転写され、その後成熟RNAの形成中にスプライシングにより除去される非コード部分である。

【0097】

「モルホリノ」という用語は、本明細書においてオリゴヌクレオチドの種類に関して使用される場合、モルホリノヌクレオシド間結合によって相互連結された、少なくとも10個のモルホリノモノマー単位のオリゴマーを表す。モルホリノは5'基及び3'基を含む。例えば、モルホリノは、以下の構造であってもよい。

【化23】



（式中、

n は、モルホリノサブユニット及び関連基 L の数を示す、少なくとも10（例えば、12から30）の整数であり、

各 B は独立して核酸塩基であり、

R^1 は、5'基（本明細書では、 R^1 を5'末端と呼ぶ場合がある）であり、

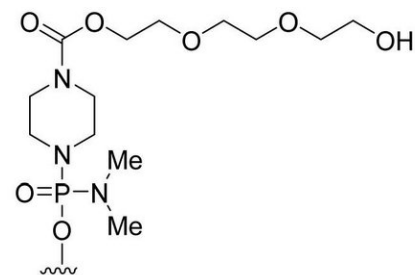
R^2 は、3'基（本明細書では、 R^2 を3'末端と呼ぶ場合がある）であり、及び、

L は、（i）モルホリノヌクレオシド間結合、又は、（ii） L は、 R^2 に結合している場合、共有結合である。）

【0098】

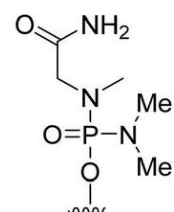
モルホリノの5'基は、例えば、ヒドロキシル、疎水性部位、リン酸、ニリン酸、三リン酸、ホスホロチオエート、ジホスホロチオエート、トリホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ジホロジチオエート、トリホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホルアミデート、ペプチドへの結合、ペプチド/リンカーの組み合わせへの結合、エンドソーム脱出部位、又は中性有機ポリマーであっても良い。いくつかの実施形態において、5'基は以下の構造である。

【化24】



又は

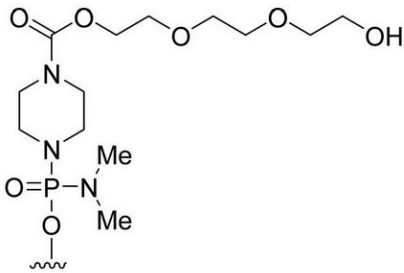
【化25】



【0099】

好ましい5'基は、ヒドロキシル及び以下の構造の基である。

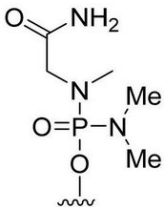
【化26】



又は

10

【化27】

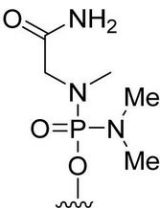


【0100】

より好ましい5'基は、以下の構造である。

20

【化28】



【0101】

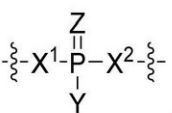
モルホリノの3'基は、例えば、水素、疎水性部位、リン酸、ニリン酸、三リン酸、ホスホロチオエート、ジホスホロチオエート、トリホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ジホロジチオエート、トリホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホルアミデート、ペプチドへの結合、ペプチド/リンカーの組み合わせへの結合、エンドソーム脱出部位、又は中性有機ポリマーであってもよい。モルホリノであるオリゴヌクレオチドと、そのオリゴヌクレオチドに共有結合又は連結されたペプチドとの複合体において、好ましい3'基はペプチドへの結合又はペプチド/リンカーの組み合わせへの結合である。

30

【0102】

「モルホリノヌクレオシド間結合」という用語は、本明細書において、以下の構造の2価の基を表す。

【化29】



40

(式中、

ZはO又はSであり、

X¹は結合、-CH₂-、又は-O-であり、

X²は結合、-CH₂-O-、又は-O-であり、及び、

Yは-NR₂であり、ここで、各Rは独立してH又はC₁₋₆アルキル（例えば、メチル）であり、又は両方のRは、共にそれらが結合している窒素原子と結合して、C₂₋₉ヘテロシクリル（例えば、N-ピペラジニル）を形成する。

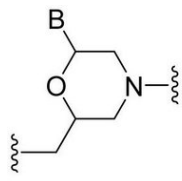
50

ただし、 X^1 及び X^2 の両方は同時に結合ではない。)

【0103】

「モルホリノサブユニット」という用語は、本明細書において、以下の構造を指す。

【化30】



10

(式中、Bは核酸塩基である。)

【0104】

「核酸塩基」という用語は、本明細書において、ヌクレオシドのリボフラノース/2'-デオキシリボフラノースの1'位に見られる窒素含有ヘテロ環式環を表す。核酸塩基は、非修飾又は修飾されている。本明細書において、「非修飾」又は「天然」核酸塩基は、プリン塩基であるアデニン(A)及びグアニン(G)、及びピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)、及びウラシル(U)を含む。修飾核酸塩基は、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、アルキル又はアルキニル置換ピリミジン、アルキル置換プリン、及びN-2、N-6及びO-6置換プリン、並びに、合成及び天然核酸塩基、例えば、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-アルキル(例えば、6-メチル)アデニン及びグアニン、2-アルキル(例えば、2-プロピル)アデニン及びグアニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、5-トリフルオロメチルウラシル、5-トリフルオロメチルシトシン、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、8-アザグアニン、8-アザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン、3-デアザアデニンを含む。特定の核酸塩基は、核酸の結合親和性を高めるのに特に有用である。例えば、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、N2-、N6-、及び／又はO6-置換プリンである。核酸二重鎖の安定性は、例えば、5-メチルシトシンを使用して増強することができる。核酸塩基の非限定的な例としては、2-アミノプロピルアデニン、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-N-メチルグアニン、6-N-メチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-プロピニル(-C≡C-CH₃)ウラシル、5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、5-リボシルウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオールアルキル、8-ヒドロキシル、8-アザ及び他の8-置換プリン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、5-ハロウラシル、及び5-ハロシトシン、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン、3-デアザアデニン、6-N-ベンゾイルアデニン、2-N-イソブチリルグアニン、4-N-ベンゾイルシトシン、4-N-ベンゾイルウラシル、5-メチル4-N-ベンゾイルシトシン、5-メチル4-N-ベンゾイルウラシル、ユニバーサル塩基、疎水性塩基、プロミスカス塩基、サイズ拡大塩基、及びフッ素化塩基が挙げられる。さらなる修飾核酸塩基には、1、3-ジアザフェノキサジン-2-オン、1、3-ジアザフェノチアジン-2-オン及び9-(2-アミノエトキシ)-1、3-ジアザフェノキサジン-2-オン(G-克蘭ブ)などの三環式ピリミジンが含まれる。修飾核酸塩基にはまた、プリン又はピリミジン塩基が他のヘテロ環、例えば、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン、又は2-ピリドンで置き換えられたものも含まれる。さらなる核酸塩基には、Merigan et al., U.S. Pat. No. 3,687,808に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz, J. I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y. S., Chapter 15,

20

30

40

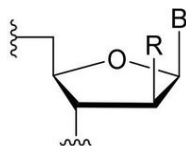
50

Antisense Research and Applications、Crooke, S. T.及びLebleu, B., Eds., CRC Press、1993、273-288；及びChapters 6及び15、Antisense Drug Technology、Crooke S. T., Ed., CRC Press、2008、163-166及び442-443に開示されているものが含まれる。

【0105】

「ヌクレオシド」という用語は、本明細書において、当該技術分野で知られている糖-核酸塩基化合物及び基、ならびに、当該技術分野で知られている修飾又は非修飾2'-デオキシリボフランボース-核酸塩基化合物及び基を表す。糖はリボフラノースであってもよい。糖は修飾されていても非修飾であってもよい。非修飾リボフラノース-核酸塩基は、非修飾核酸塩基へのアノマー炭素結合を有するリボフラノースである。非修飾リボフラノース-核酸塩基は、アデノシン、シチジン、グアノシン、及びウリジンである。非修飾2'-デオキシリボフラノース-核酸塩基化合物は2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシシチジン、2'-デオキシグアノシン、及びチミジンである。修飾化合物及び基は、本明細書に記載の核酸塩基修飾及び糖修飾からなる群から選択される1個以上の修飾を含む。核酸塩基修飾は、非修飾核酸塩基を修飾核酸塩基で置き換えることである。糖修飾は、例えば、2'-置換、ロック、炭素環化、又は非ロックであってもよい。2'-置換はリボフラノースの2'-ヒドロキシルを2'-フルオロ、2'-メトキシ、又は2'-（2-メトキシ）エトキシで置き換えるものであってもよい。あるいは、2'-置換は、2'-（アラ）置換であってもよく、以下の構造に対応する。

【化31】



（式中、Bは核酸塩基、及びRは2'-（アラ）置換（例えば、フルオロ）である。2'-（アラ）置換基は当該技術分野で知られており、本明細書に記載の他の2'-置換基と同一でもよい。いくつかの実施形態において、2'-（アラ）置換は、2'-（アラ）-F置換（Rはフルオロ）である。ロック修飾は、リボフラノースの4'-炭素原子及び2'-炭素原子の間に架橋を組み込むことである。ロック修飾を有するヌクレオシドは、架橋核酸、例えば、ロック核酸（LNA）、エチレン-架橋核酸（ENA）、及びcEt核酸として当該技術分野で知られている。架橋核酸は、典型的には、親和性を高めるヌクレオシドとして使用される。「ヌクレオシド」はまた、モルホリノサブユニットを指しうる。

【0106】

「ヌクレオチド」という用語は、本明細書において、ヌクレオシド間結合又は以下の構造- $X^1-P(X^2)(R^1)_2$ 、の1価の基に結合したヌクレオシドを表す。（式中、 X^1 はO、S、又はNHであり、及び X^2 は存在しないか、=O、又は=Sであり、各 R^1 は独立して-OH、-N(R^2)₂、又は-O-CH₂CH₂CNであり、ここで、各 R^2 は独立して置換されていてもよいアルキルであり、又は両方の R^2 基は、それらが結合する窒素原子と共に、結合して置換されていてもよいヘテロシクリルを形成する。）

【0107】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書において、ヌクレオシド間結合によって共有結合した10個以上の連続するヌクレオシドを含有する構造、10個以上のモルホリノサブユニットを含有するモルホリノ、又は10個以上のモルホリノサブユニットを含有するペプチド核酸を表す。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、モルホリノである。

【0108】

「置換されていてもよい」という用語は、各基について記載されているように、置換又は非置換であっても良い基、構造、又は分子を指す。「式中 R^1 基内の任意のCH、CH₂、CH₃基又はヘテロ原子（つまり、NH）は置換されていてもよい」という用語は、 R^1 基の水素ラジカルの（任意の）1つが、関連する規定の基によって置換されることを意味する

。

【0109】

本明細書において、「作動可能に連結された」という用語は、選択されたヌクレオチド配列及び調節ヌクレオチド配列が、ヌクレオチドコード配列の発現を調節配列の制御下に置くような方法で共有結合している状況を含んでもよい、然るが故に、調節配列は、選択されたヌクレオチド配列の一部又は全てを形成するヌクレオチドコード配列の転写に影響を与えることが出来る。必要に応じて、得られた転写物は所望のペプチドに翻訳されうる。

。

【0110】

本明細書において、「薬学的に許容される」という用語は、個体（例えば、ヒト）組織との接触に適するとともに、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、その他の問題合併症がなく、合理的なベネフィット／リスク比に見合った化合物、材料、組成物、及び／又は剤形を指す。

【0111】

本明細書において、「医薬組成物」という用語は、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドを含有し、薬学的に許容される賦形剤とともに製剤化され、対象の疾患の治療のための治療レジメンの一部として政府規制当局の承認を得て製造又は販売される組成物を表す。

【0112】

本明細書において、「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書に開示される複合体、オリゴヌクレオチド、及びペプチドの薬学的に許容される塩を意味する。本明細書に記載の任意の化合物の薬学的に許容される塩は、健全な医学的判断の範囲内にあり、ヒト及び動物の組織と接触して使用するのに適するとともに、過度の毒性、刺激、アレルギー反応がなく、合理的なベネフィット／リスク比に見合ったものを含んでもよい。薬学的に許容される塩は、当技術分野で周知である。例えば、薬学的に許容される塩は文献Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977及びPharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (Eds. P.H. Stahl及びC.G. Wermuth)、Wiley-VCH、2008に記載されている。塩は、本明細書に記載の化合物の最終的な単離及び精製中にその場で、及び遊離塩基を適切な酸と反応させることによって別々に調製することができる。代表的な酸付加塩には、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキササン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが含まれる。代表的なアルカリ及びアルカリ土類金属塩には、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなど、非毒性のアンモニウム、第4級アンモニウム、及びアミンカチオン（アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンが含まれるが、これらに限定されない）などが含まれる。

【0113】

「低減させる」又は「阻害する」という用語は、一般に、診断技術における日常技術によって測定される本明細書に記載の疾患又は状態の症状のような、関連する生理学的又は細胞応答を「減少させる」本発明の1以上の化合物の能力に関連しうる。関連する生理学的又は細胞応答（in vivo又はin vitro）は、当業者には明らかであり、筋ジストロフィーの症状又は病理の減少、又は、DMD又はBMDを有する個体で発現するジストロフィ

10

20

30

40

50

ンの変化形態のような、ジストロフィンの欠損型の発現の減少を含んでもよい。応答における「低減」は、アンチセンス化合物を含まない化合物又は対照組成物によって生じる応答と比較して統計的に有意である場合があり、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は100%の低減を含む場合があり、その間の全ての整数を含んでもよい。

【0114】

本明細書において、「対象」という用語は、対象からの試料の当該技術分野で知られた臨床検査の有無に関わらず、有資格の専門家（例えば、医師又は看護師）によって、疾患、障害、又は状態に罹患しているか又はその危険性があると判断された、ヒト又はヒトではない動物（例えば、哺乳類）を表す。疾患、障害、及び状態の非限定的な例としては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）及びベッカー型筋ジストロフィー（BMD）が挙げられる。

10

【0115】

「糖」又は「糖部位」は、フラノース環又はヌクレオシドのフラノース環を置換しうる構造を有する天然に存在する糖を含む。本発明のヌクレオシドに含まれる糖は、非フラノース（又は4'置換フラノース）環又は環系又は開放系であってもよい。このような構造は、天然のフラノース環（例えば、6員環）に対する単純な変化を含む。代替糖はまた、フラノース環が、例えばモルホリノ環系やヘキシトール環系などの別の環系で置換された糖代用物も含んでもよい。本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる有用な糖部位の非限定的な例としては、 β -D-リボース、 β -D-2'-デオキシリボース、置換糖（例えば、2'、5'及びビス置換糖）、4'-S-糖（例えば、4'-S-リボース、4'-S-2'-デオキシリボース、及び4'-S-2'-置換リボース）、二環式糖部位（例えば2'-O-CH₂-4'又は2'-O-(CH₂)₂-4'架橋リボース由来の二環式糖）及び糖代用物（リボース環がモルホリノ又はヘキシトール環系で置換されている場合）。

20

【0116】

本明細書において、「治療」及び「治療している」という用語は、疾患、障害、又は状態（例えば、DMD又はBMD）の改善、寛解、又は安定化を目的とした対象の医学的管理を指す。この用語は、積極的治療（DMD又はBMDの改善のための治療）、緩和治療（DMD又はBMDの症状の緩和のための治療）、及び支持的治療（他の治療を補うための治療）を含む。

30

【0117】

本明細書の記載及び特許請求の範囲を通して、「含む」及び「含有する」という語ならびにそれらの変形は、「含むが、これらに限定されない」という意味であり、他の部位、添加剤、成分、整数又は手段を除外することを意図しない（また、除外しない）。本明細書の記載及び特許請求の範囲を通じて、文脈上別段の定めがない限り、単数形は複数形を包含する。特に、不定冠詞が使用される場合、本明細書は、文脈上他に必要とされない限り、単数形だけでなく複数形も意図していると理解される。

【0118】

「複合体」とは全て、その薬学的に許容される溶媒和物を含む、その溶媒和物も指す。

40

【0119】

「オリゴヌクレオチド」とは全て、その薬学的に許容される塩及び／又は溶媒和物を含む、その塩及び／又は溶媒和物も指す。

【0120】

特に指定がない限りは、本明細書では全てのペプチドをN末端からC末端方向（左から右）に示す。特に指定がない限りは、本明細書では全てのオリゴヌクレオチドは5'から3'方向（左から右）に示す。

【0121】

本発明の特定の態様、実施形態又は実施例に関連して記載される特徴、整数、特性、化合物、化学部位又は基は、それと両立しない場合を除き、本明細書に記載される他の態様

50

、実施形態又は実施例にも適用可能であると理解される。本明細書（添付の特許請求の範囲、要約及び図面を含む）に開示された特徴のすべて、及び／又はそのように開示された任意の方法もしくはプロセスの工程のすべては、そのような特徴及び／又は工程の少なくとも一部が相互に排他的である組み合わせを除き、任意の組み合わせで組み合わせることができる。

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】図1は、複合体を投与した動物（ $n=2\sim4$ ）の主要筋群における用量反応を示すプロットである。TAは前脛骨筋である。グラフは平均値 $\pm$ SDでプロットした。40 mg/kg注入群の1匹は、TA及び心臓の両方でより低いレベルを示し、群平均を下回った。

10

【図2】図2A及び2Bは、動物（ $n=2\sim4$ ）における投与前及び投与後（1、4及び7日）の血清尿素及びクレアチニンレベル（腎機能マーカー）を示すプロットである。PD=投与前。グラフは平均値 $\pm$ SDでプロットした。

【図3】図3A、3B及び3Cは、動物（ $n=2\sim4$ ）における投与前及び投与後（1、4及び7日）の血清アルカリフォスファターゼ（ALP）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）レベル（肝機能マーカー）を示すプロットである。PD=投与前。グラフは平均値 $\pm$ SDでプロットした。

【図4A-4C】図4A、4B及び4Cは、投与前及び投与後（1、4及び7日）の白血球数、好中球血球数及び単球血球数を示すプロットである（ $n=2\sim4$ ）。PD=投与前。グラフは平均値 $\pm$ SDでプロットした。

20

【図5】図5は、複合体1で処置した動物（ $n=2\sim4$ ）におけるPMOの投与後血漿中濃度を示すプロットである。EOI=注入終了。

【図6】図6は、複合体1で処置した動物（ $n=2\sim4$ ）におけるPMO濃度についての組織生化学的分析結果を要約したプロットである。グラフは、平均値 $\pm$ SDでプロットした。LLOQ=直線定量下限（50 ng/g）。

【図7】図7は、複合体1の40 mg/kgのボラス又は40 mg/kgの注入（30分間）を受けた動物（ $n=2\sim4$ ）におけるPMO濃度についての組織生化学分析結果を要約したプロットである。グラフは平均値 $\pm$ SDでプロットした。LLOQ=直線定量下限（50 ng/g）。

【図8】図8は、複合体1の60 mg/kgボラス又は60 mg/kg注入（30分間）のいずれかを受けた動物（ $n=2\sim4$ ）におけるPMO濃度についての組織生化学分析結果を要約したプロットである。グラフは平均値 $\pm$ SDでプロットした。LLOQ=直線定量下限（50 ng/g）。

30

【図9A-B】図9A及びBは、試験動物（ $n=2\sim4$ ）におけるクレアチニン及びKIM-1の尿検査を要約したプロットである。グラフは平均値 $\pm$ SDでプロットした。

【図10A-10C】図10A、10B及び10Cは、複合体1を投与した動物（ $n=2\sim4$ ）における投与前及び投与後（1日及び7日）の凝固マーカーレベル（プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間及びフィブリノーゲンレベル）を示すプロットである。グラフは平均値 $\pm$ SDでプロットした。

【図11】図11は、試験中の試験動物（ $n=2\sim4$ ）の体重を示すプロットである。グラフは、平均値 $\pm$ SDでプロットした。

40

【図12A-12I】図12A～12Iは、0 mg/kg、40 mg/kg、又は60 mg/kgの複合体1を投与した動物の表示した組織の重量を示すプロットである。

【図13A-E】図13A～Eは、CH50、Bb、C3a、又はSC5b-9において血清補体活性化がないことを示すプロットである。C5aは試験中に検出されなかった。グラフは、平均値 $\pm$ SD（ $n=2\sim4$ ）でプロットした。

【図14】図14は、二頭筋、大腿四頭筋、及び横隔膜における、表示した複合体によるエクソン51スキッピングを示す一連のプロットである。

【図15】図15は、左心室、右心室、及び大動脈における、表示した複合体によるエクソン51スキッピングを示す一連のプロットである。

50

【図16】図16は、溶媒又は複合体2（60 mg/kg）投与1週間後のmdxマウス及び溶媒投与1週間後の野生型（WT）マウスにおけるクレアチニンキナーゼレベルを示すプロットである。

【図17A】図17Aは、mdxマウスの大腿四頭筋における複合体2及びR6G-PMOのエクソンスキッピング効果を示すプロットである。

【図17B】図17Bは、mdxマウスの大腿四頭筋における複合体2及びR6G-PMOのジストロフィン回復効果を示すプロットである。結果はWTマウスに対して標準化したものである。

【図18A】図18Aは、mdxマウス心臓における複合体2及びR6G-PMOのエクソンスキッピング効果を示すプロットである。

【図18B】図18Bは、mdxマウス心臓における複合体2及びR6G-PMOのジストロフィン回復効果を示すプロットである。結果はWTマウスに対して標準化したものである。

【図19A】図19Aは、複合体1をQ2Wで合計3回投与された非ヒト霊長類の上腕二頭筋におけるエクソン51スキッピング効果を示すプロットである。データは、平均値±SDで示した。1群あたりn=3。

【図19B】図19Bは、複合体1をQ2Wで合計3回投与された非ヒト霊長類の大腿四頭筋におけるエクソン51スキッピング効力を示すプロットである。データは、平均値±SDで示した。1群あたりn=3。

【発明を実施するための形態】

【0123】

典型的には、本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する対象を治療する方法を提供する。上記方法は、オリゴヌクレオチドと、オリゴヌクレオチドにリンカーを介して共有結合又は連結されたペプチドとの複合体1 mg/kgから60 mg/kgを対象（例えば、エクソン51スキッピングに感受性がある対象）に投与することを含む。

【0124】

いくつかの実施形態において、30 mg/kgから60 mg/kg（例えば、40 mg/kgから60 mg/kg、30 mg/kgから50 mg/kg、30 mg/kgから40 mg/kg、例えば、30 mg/kg、40 mg/kg、50 mg/kg、又は60 mg/kg）の複合体が投与される。

【0125】

いくつかの実施形態において、40 mg/kgから50 mg/kg、50 mg/kgから60 mg/kg、35 mg/kgから45 mg/kg、45 mg/kgから55 mg/kg、35 mg/kgから55 mg/kg、30 mg/kgから45 mg/kg、35 mg/kgから50 mg/kg、40 mg/kgから55 mg/kg、又は45 mg/kgから60 mg/kgの複合体が投与される。

【0126】

いくつかの実施形態において、1 mg/kgから30 mg/kg（例えば、1 mg/kgから20 mg/kg、5 mg/kgから25 mg/kg、10 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから15 mg/kg、5 mg/kgから20 mg/kg、10 mg/kgから25 mg/kg、15 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから10 mg/kg、5 mg/kgから15 mg/kg、10 mg/kgから20 mg/kg、15 mg/kgから25 mg/kg、又は20 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから25 mg/kg、4 mg/kgから20 mg/kg、6 mg/kgから15 mg/kg、又は8 mg/kgから10 mg/kgの複合体が投与される、例えば、1 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、又は30 mg/kg）の複合体が投与される。いくつかの実施形態において、十分な有効性を維持しつつ、薬物曝露量を少なくし、安全性を高めるために低用量（例えば、1 mg/kgから30 mg/kg）が投与される。

【0127】

いくつかの実施形態において、複合体は注入、例えば静注により投与されるが、この静注は任意にボラス注入又は持続注入であり、後者は任意に10分間から3時間、例えば0.25～2時間、又は0.5～1時間である。

10

20

30

40

50

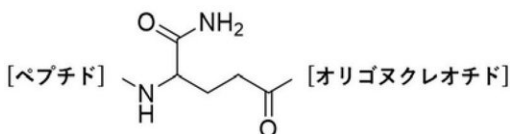
【0128】

上記ペプチドは、少なくとも4アミノ酸残基を含む少なくとも1個のカチオン性ドメイン及び少なくとも3アミノ酸残基を含む少なくとも1個の疎水性ドメインを含み、但し、上記ペプチドは合計7から40個のアミノ酸残基を含み、及び上記少なくとも1個のカチオン性ドメインは、アルギニン残基及び／又はヒスチジン残基と組み合わせてβ-アラニン残基を含む。上記オリゴヌクレオチドは、合計12から40個の連続した核酸塩基を含み、少なくとも12個の連続した核酸塩基がヒトジストロフィン遺伝子の標的配列に相補的である。

【0129】

好ましくは、上記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN-末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'-末端を有する5' CCCAACAATCAAAGAAGAAGGC ATTTCTAG-3' (配列番号106)を含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される。例えば、この複合体の5'基は、ホスホルアミデート (例えば、サルコシンアミド) であってもよい。あるいは、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'-末端を有する5'-CTCAATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合は、-CONH₂で置換される。例えば、この複合体の5'基はホスホルアミデートであってもよい。あるいは、複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'-末端を有する5'-CTCACAATCAAAAGAAGAAGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又はからなる。例えば、この複合体の5'基はホスホルアミデートであってもよい。更に好ましくは、上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'-末端を有する5'-CCC CAATCAAAAAGGAAAGGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又はからなる、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合は、-CONH₂で置換される。例えば、この複合体の5'基はホスホルアミデートであってもよい。いくつかの実施形態において、グルタミン酸残基リンカーを含む複合体は、以下の構造を有する。

【化32】



【0130】

有益なことに、実施例のセクションに記載されているように、本明細書に記載されている複合体の投与量は、持続的な肝臓及び腎臓の毒性を引き起こすことなく、非ヒト霊長類の心臓組織においてさえも、ジストロフィンのエクソン51のスキッピングを誘導することができる。有益なことに、実施例のセクションに記載されているように、本明細書に記載されている複合体の投与量は、従来届きにくかった組織にもカーゴオリゴヌクレオチドを送達することができる。本明細書に記載の非ヒト霊長類モデルの使用は、有益なことに、ヒトなどの他の霊長類に使用できる用量の同定を容易にした。

【0131】

好ましくは、上記複合体は、毎週から毎月 (例えば、毎週、隔週、3週間に1回、又は毎月)、又は3ヶ月に1回の頻度で対象に投与される。

【0132】

オリゴヌクレオチド

本明細書で開示される複合体に使用されるオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン (DMD) 遺伝子内の標的部位に相補的なものであってもよい。理論に束縛されることを望むものではないが、ヒトジストロフィン遺伝子内の特定の標的部位にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、ジストロフィンpre-mRNAのスプライシング中にエクソン51のス

キッピングを誘導し、それによってデュシェンヌ型筋ジストロフィーが寛解すると考えられる。

【0133】

オリゴヌクレオチドは、ヒトジストロフィン遺伝子に相補的な核酸塩基配列を含み、及び例えば、エクソン51スキッピングを誘導することができる。特定の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、5'-CCCAACUCAAGGAAGAUGGCAUUCUAG-3' (配列番号112) 又はそのチミン置換アナログ、5'-CCCAACATCAAGGAAGATGGCA TTTCTAG-3' (配列番号106) から選択される、少なくとも12 (例えば、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、又は少なくとも20) の連続する核酸塩基を含む。特定の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、5'-CCCACAAAGAAGGCATTTCTAG-3' (配列番号106) を含む又はからなる。本明細書に開示される複合体において使用され得るオリゴヌクレオチドの非限定的な例は、以下に列挙されるものである。

10

20

30

40

50

#	配列番号	配列
107		5'-ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGC-3'
108		5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3'
109		5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC-3'
110		5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3'
111		5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'
112		5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'
113		5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3'
114		5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3'
115		5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'
116		5'-AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCA-3'

【0134】

上述のオリゴヌクレオチド配列中の1つ以上のウラシル (例えば、全てのウラシル) は、チミンで置換される。例えば、オリゴヌクレオチド配列は、例えば、5'-CCCAACAU CAAGGAAGAUGGCAUUCUAG-3' (配列番号112) であってもよい。あるいは、オリゴヌクレオチド配列は、例えば、5'-CCCCAACAAAAAGGAAGGCCATTTCTAG-3' (配列番号106) であってもよい。

【0135】

本明細書に記載される上記及び他のオリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー (PMO) である。

【0136】

ペプチド

本明細書に記載の複合体に使用されうるペプチドは、WO 2020030927及びWO 2020115494に開示されるものを含む。好ましくは、本明細書に記載の複合体に含まれるペプチドは、人工アミノ酸残基を含まない。

【0137】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、アミノヘキサ酸残基を含有しない。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、任意の形態のアミノヘキサ酸残基を含有しない。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、6-アミノヘキサ酸残基を含有しない。

【0138】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、天然アミノ酸残基のみを含有し、従って、天然アミノ酸残基からなる。

【0139】

ペプチド天然アミノ酸によって置換される。いくつかの実施形態において、典型的に細胞透過性ペプチドに使用される6-アミノヘキサ酸のような人工アミノ酸は、β-アラニン、セリン、プロリン、アルギニン、及びヒスチジン又はヒドロキシプロリンから選択

されるアミノ酸によって置換される。

【0140】

いくつかの実施形態において、アミノヘキサン酸は、 β -アラニンによって置換される。いくつかの実施形態において、6-アミノヘキサン酸は、 β -アラニンによって置換される。

【0141】

いくつかの実施形態において、アミノヘキサン酸は、ヒスチジンによって置換される。いくつかの実施形態において、6-アミノヘキサン酸は、ヒスチジンによって置換される。

【0142】

いくつかの実施形態において、アミノヘキサン酸は、ヒドロキシプロリンによって置換される。いくつかの実施形態において、6-アミノヘキサン酸は、ヒドロキシプロリンによって置換される。

【0143】

いくつかの実施形態において、典型的に細胞透過性ペプチドに使用される6-アミノヘキサン酸のような人工アミノ酸は、 β -アラニン、セリン、プロリン、アルギニン、及びヒスチジン又はヒドロキシプロリンの任意の組み合わせ、例えば、 β -アラニン、ヒスチジン、及びヒドロキシプロリンのいずれかの組み合わせによって置換されていてもよい。

【0144】

いくつかの実施形態において、40アミノ酸残基以下の全長を有するペプチドが提供され、このペプチドは、各々が少なくとも4アミノ酸残基を含む2個以上のカチオン性ドメイン、及び各々が少なくとも3アミノ酸残基を含む1個以上の疎水性ドメインを含み、ここで少なくとも1個のカチオン性ドメインは、ヒスチジン残基を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1個のカチオン性ドメインはヒスチジンリッチである。

【0145】

いくつかの実施形態において、ヒスチジンリッチが意味するところは、カチオン性ドメインに関連して本明細書において定義される。

【0146】

カチオン性ドメイン

本発明は、一定の長さを有する少なくとも2個のカチオン性ドメインが存在する特定の構造を有する短鎖細胞透過性ペプチドに関する。

【0147】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、4個までのカチオン性ドメインを含み、3個までのカチオン性ドメインを含む。

【0148】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のカチオン性ドメインを含む。

【0149】

上記で定義したように、上記ペプチドは、それぞれ少なくとも4アミノ酸残基の長さを有するカチオン性ドメインを2個以上含む。

【0150】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、4から12アミノ酸残基の間の長さ、例えば、4から7アミノ酸残基の間の長さを有する。

【0151】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、4、5、6、又は7アミノ酸残基の長さを有する。

【0152】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、同様の長さであり、例えば、それぞれ各カチオン性ドメインは、同じ長さである。

【0153】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、カチオン性アミノ酸を含有し、極性及び／又は無極性アミノ酸を含有していてもよい。

【0154】

無極性アミノ酸は、アラニン、 β -アラニン、プロリン、グリシン、システイン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニンから選択されうる。いくつかの実施形態において、無極性アミノ酸は、電荷を持たない。

【0155】

極性アミノ酸は、セリン、アスパラギン、ヒドロキシプロリン、ヒスチジン、アルギニン、スレオニン、チロシン、及びグルタミンから選択されうる。いくつかの実施形態において、選択された極性アミノ酸は負電荷を持たない。

【0156】

カチオン性アミノ酸は、アルギニン、ヒスチジン、及びリジンから選択されうる。いくつかの実施形態において、カチオン性アミノ酸は生理的pHにおいて正電荷を有する。

【0157】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、アニオン性又は負に荷電したアミノ酸残基を含まない。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、アルギニン、ヒスチジン、 β -アラニン、ヒドロキシプロリン、及び／又はセリン残基を含む。

【0158】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、アルギニン、ヒスチジン、 β -アラニン、ヒドロキシプロリン、及び／又はセリン残基を含む又はからなる。

【0159】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%のカチオン性アミノ酸を含む。

【0160】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、カチオン性アミノ酸を過半数含む。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%のアミノ酸を含む。

【0161】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、少なくとも7.5、少なくとも8.0、少なくとも8.5、少なくとも9.0、少なくとも9.5、少なくとも10.0、少なくとも10.5、少なくとも11.0、少なくとも11.5、少なくとも12.0の等電点(pI)を有する。

【0162】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、少なくとも10.0の等電点(pI)を有する。

【0163】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、10.0及び13.0の間の等電点(pI)を有する。

【0164】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、10.4及び12.5の間の等電点(pI)を有する。

【0165】

いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインの等電点は、当該技術分野で利用可能な任意の適切な手段により、生理的pHにおいて計算される。いくつかの実施形態において、Lukasz Kozlowski (Biol. Direct. 2016, 11:55. DOI:10.1186/s13062-016-0159-9) によって開発されたウェブベースのアルゴリズムであるIPC (www.isoelectric.org) を使用することによって計算される。

【0166】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、少なくとも1個のカチオン性アミノ酸、例えば、1から5個のカチオン性アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、少なくとも2個のカチオン性アミノ酸、例えば、2から5

10

20

30

40

50

個のカチオン性アミノ酸を含む。

【0167】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、アルギニンリッチ及び／又はヒスチジンリッチである。いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、ヒスチジン及びアルギニンの両方を含有しうる。

【0168】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、アルギニン及び／又はヒスチジン残基を過半数含む。

【0169】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、又は少なくとも70%のアルギニン及び／又はヒスチジン残基を含む。いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、又は少なくとも70%アルギニン残基を含んでもよい。

【0170】

いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、又は少なくとも70%ヒスチジン残基を含んでもよい。

【0171】

いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、合計1から5個のヒスチジン及び1から5個のアルギニン残基を含んでもよい。いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、1から5個のアルギニン残基を含んでもよい。いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、1から5個のヒスチジン残基を含んでもよい。いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、合計2から5個のヒスチジン及び3から5個のアルギニン残基を含んでもよい。いくつかの実施形態において、カチオン性ドメイン3から5個のアルギニン残基を含んでもよい。いくつかの実施形態において、カチオン性ドメイン2から5個のヒスチジン残基を含んでもよい。

【0172】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメイン1つ以上のβ-アラニン残基を含む。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、合計2から5個のβ-アラニン残基、例えば、合計2又は3個のβ-アラニン残基を含んでもよい。

【0173】

いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、1個以上のヒドロキシプロリン残基又はセリン残基を含んでもよい。

【0174】

いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、1から2個のヒドロキシプロリン残基を含んでもよい。いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、1から2個のセリン残基を含んでもよい。

【0175】

いくつかの実施形態において、所与のカチオン性ドメインのカチオン性アミノ酸の全てがヒスチジンであってもよく、あるいは、例えば、所与のカチオン性ドメインのカチオン性アミノ酸の全てがアルギニンであってもよい。

【0176】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、少なくとも1個のヒスチジンリッチカチオン性ドメインを含んでもよい。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、少なくとも1個のアルギニンリッチカチオン性ドメインを含んでもよい。

【0177】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、少なくとも1個のアルギニンリッチカチオン性ドメインを含んでもよく、少なくとも1個のヒスチジンリッチなカチオン性ドメ

10

20

30

40

50

インを含んでもよい。

【0178】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のアルギニンリッチなカチオン性ドメインを含む。

【0179】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のヒスチジンリッチなカチオン性ドメインを含む。

【0180】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のアルギニン及びヒスチジンリッチなカチオン性ドメインを含む。

【0181】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、1個のアルギニンリッチなカチオン性ドメイン及び1個のヒスチジンリッチなカチオン性ドメインを含む。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、3個以下の連続するアルギニン残基を、例えば、2個以下の連続するアルギニン残基を含む。

【0182】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、連続するヒスチジン残基を含まない。

【0183】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、アルギニン、ヒスチジン及び／又はβ-アラニン残基を含む。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、アルギニン、ヒスチジン、及び／又はβ-アラニン残基を過半数含む。いくつかの実施形態において、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%の各カチオン性ドメイン中のアミノ酸残基は、アルギニン、ヒスチジン、及び／又はβ-アラニン残基。いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、アルギニン、ヒスチジン、及び／又はβ-アラニン残基からなる。

【0184】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、アルギニン及びβ-アラニン残基を含む第1カチオン性ドメイン、及び、アルギニン及びβ-アラニン残基を含む第2カチオン性ドメインを含む。

【0185】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、アルギニン及びβ-アラニン残基を含む第1のカチオン性ドメイン、及びヒスチジン、β-アラニン、及び任意にアルギニン残基を含む第2のカチオン性ドメインを含む。

【0186】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、アルギニン及びβ-アラニン残基を含む第1のカチオン性ドメイン、及びヒスチジン及びβ-アラニン残基を含む第2のカチオン性ドメインを含む。

【0187】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、アルギニン残基及びβ-アラニン残基からなる第1のカチオン性ドメインと、アルギニン残基及びβ-アラニン残基からなる第2のカチオン性ドメインとを含む。

【0188】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、アルギニン及びβ-アラニン残基からなる第1のカチオン性ドメイン、ならびにアルギニン、ヒスチジン及びβ-アラニン残基からなる第2のカチオン性ドメインを含む。

【0189】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、少なくとも2個のカチオン性ドメインを含み、例えば、これらのカチオン性ドメインは、上記ペプチドのアームを形成する。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態において、上記カチオン性ドメインは、上記ペプチドのN及びC末端に位置する。従って、いくつかの実施形態において、上記カチオン性ドメインは、カチオン性アームドメインとして知られる。

【0190】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のカチオン性ドメインを含み、1個は、上記ペプチドのN末端に位置し、1個は、上記ペプチドのC末端に位置する。いくつかの実施形態において、上記ペプチドのいずれかの末端に位置する。いくつかの実施形態において、末端修飾、リンカー及び／又はオリゴヌクレオチドなどの他の基を除いて、さらなるアミノ酸又はドメインは、上記ペプチドのN末端及びC末端には存在しない。疑義を避けるため、このような他の基は、本明細書に記載され請求される「ペプチド」に加えて存在しても良い。従って、いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、上記ペプチドの末端を形成する。いくつかの実施形態において、これは、本明細書に記載されるようなさらなるリンカー基の存在を排除するものではない。

10

【0191】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、4個までのカチオン性ドメインを含んでもよい。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のカチオン性ドメインを含む。

【0192】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、両方ともアルギニンリッチである2個のカチオン性ドメインを含む。

20

【0193】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、アルギニンリッチである1個のカチオン性ドメインを含む。

【0194】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、両方ともアルギニンリッチかつヒスチジンリッチである2個のカチオン性ドメインを含む。

【0195】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、アルギニンリッチである1個のカチオン性ドメインとヒスチジンリッチである1個のカチオン性ドメインを含む。

【0196】

いくつかの実施形態において、上記カチオン性ドメインは、R、H、B、RR、HH、BB、RH、HR、RB、BR、HB、BH、RBR、RBB、BRR、BBR、BRB、RBH、RHB、HRB、BRH、HRR、RRH、HRH、HBB、BBH、RHR、BHB、HBH、又はそれらの任意の組み合わせ、から選択されるアミノ酸単位を含む。

30

【0197】

いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインはまた、セリン、プロリン、及び／又はヒドロキシプロリン残基を含んでもよい。いくつかの実施形態において、上記カチオン性ドメインは、RP、PR、RPR、RRP、PRR、PRP、Hyp、R[Hyp]R、RR[Hyp]、[Hyp]RR、[Hyp]R[Hyp]、[Hyp][Hyp]R、R[Hyp][Hyp]、SB、BS、又はそれらの任意の組み合わせ、又は上記のアミノ酸単位との任意の組み合わせ、から選択されるアミノ酸単位をさらに含んでもよい。

40

【0198】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、以下の配列のいずれか1つを含む。RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBR（配列番号3）、RBR RBR（配列番号4）、RRBRBR（配列番号5）、RBRRB（配列番号6）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、HBHBR（配列番号9）、RBRHBHR（配列番号10）、RBRBBHR（配列番号11）、RBRRBH（配列番号12）、HBRRBR（配列番号13）、HBHBH（配列番号14）、BHBH（配列番号15）、BRBSB（配列番号16）、BRB[Hyp]B（配列番号17）、R[Hyp]H[Hyp]HB（配列番号18）、R[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）、又はそれらの任意の組み合わせ。

50

【0199】

いくつかの実施形態において、各カチオン性ドメインは、以下の配列を含むか、又は以下の配列のいずれか1つからなる。RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBRR（配列番号3）、RBRBR（配列番号4）、RRBRBR（配列番号5）、RBRRB（配列番号6）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、HBHBR（配列番号9）、RBRHBHR（配列番号10）、RBRBBHR（配列番号11）、RBRRBH（配列番号12）、HBRRBR（配列番号13）、HBHBH（配列番号14）、BHBH（配列番号15）、BRBSB（配列番号16）、BRB[Hyp]B、R[Hyp]H[Hyp]HB、R[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）、又はそれらの任意の組み合わせ。

【0200】

いくつかの実施形態において、それぞれのカチオン性ドメインは、以下の配列のうちの1つを含むか、又は以下の配列のうちの1つからなる。RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBRBR（配列番号4）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、又はHBHBR（配列番号9）。

【0201】

いくつかの実施形態において、上記ペプチド中の各カチオン性ドメインは、同一であっても異なってもよい。いくつかの実施形態において、上記ペプチド中の各カチオン性ドメインは異なる。

【0202】

疎水性ドメイン

本発明は、一定の長さを有する少なくとも1個の疎水性ドメインが存在する特定の構造を有する短鎖細胞透過性ペプチドに関する。

【0203】

本明細書において「疎水性」とは、水をはじく能力を有する、又は水と混合しないアミノ酸又はドメインを示す。

【0204】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、3個までの疎水性ドメインを含むか、又は2個までの疎水性ドメインを含む。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、1個の疎水性ドメインを含む。

【0205】

上記で定義したように、上記ペプチドは、それぞれが少なくとも3アミノ酸残基の長さを有する1個以上の疎水性ドメインを含む。

【0206】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、3から6アミノ酸残基の長さを有する。いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、5アミノ酸残基の長さを有する。

【0207】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、無極性、極性、及び疎水性アミノ酸残基であってもよい。

【0208】

疎水性アミノ酸残基は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、トリプトファンから選択されうる。

【0209】

無極性アミノ酸残基は、プロリン、グリシン、システイン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン、及びメチオニンから選択されうる。

【0210】

極性アミノ酸残基は、セリン、アスパラギン、ヒドロキシプロリン、ヒスチジンアルギニン、スレオニン、チロシン、グルタミンから選択されうる。

【0211】

いくつかの実施形態において、上記疎水性ドメインは、親水性アミノ酸残基を含まない。

【0212】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、疎水性アミノ酸残基を過半数含む。いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%の疎水性アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは疎水性アミノ酸残基からなる。

【0213】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、少なくとも0.3、少なくとも0.4、少なくとも0.5、少なくとも0.6、少なくとも0.7、少なくとも0.8、少なくとも0.8、少なくとも1.0、少なくとも1.1、少なくとも1.2、又は少なくとも1.3の疎水度を有する。

10

【0214】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、少なくとも0.3、少なくとも0.35、少なくとも0.4、又は少なくとも0.45の疎水度を有する。

【0215】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、少なくとも1.2、少なくとも1.25、少なくとも1.3、又は少なくとも1.35の疎水度を有する。

【0216】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、0.4及び1.4の間の疎水度を有する。

20

【0217】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、0.45及び0.48の間の疎水度を有する。

【0218】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、1.27及び1.39の間の疎水度を有する。

【0219】

いくつかの実施形態において、疎水度は、White及びWimley: W.C. Wimley及びS. H. White、「Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces」Nature Struct Biol 3:842 (1996)に記載のように測定される。

30

【0220】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、少なくとも3又は少なくとも4個の疎水性アミノ酸残基を含む。

【0221】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、トリプトファン、プロリン、及び／又はグルタミン残基を含む。いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、トリプトファン、プロリン、及び／又はグルタミン残基を含む又はからなる。

40

【0222】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン及び／又はグルタミン残基を含む又はからなる。

【0223】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、トリプトファン及び／又はプロリン残基を含む又はからなる。

【0224】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、1個の疎水性ドメインを含む。いくつ

50

かの実施形態において、各疎水性ドメインは、上記ペプチドの中心に位置する。従って、いくつかの実施形態において、上記疎水性ドメインは、コア疎水性ドメインとして知られる。いくつかの実施形態において、各疎水性コアドメインは、アームドメインによって両側に挟まれる。いくつかの実施形態において、上記アームドメインは、1個以上のカチオン性ドメイン及び1個以上のさらなる疎水性ドメインを含んでもよい。いくつかの実施形態において、各アームドメインは、カチオン性ドメインを含む。

【0225】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、疎水性コアドメインを挟む2個のアームドメインを含み、ここで、各アームドメインは、カチオン性ドメインを含む。

【0226】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、疎水性コアドメインを挟む2個のカチオン性アームドメインを含む。

【0227】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、以下の配列のうちの1つを含む。YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、WWPW（配列番号26）、又はそれらの任意の組み合わせ。

【0228】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、以下の配列のうちの1つを含むか、又は以下の配列のうちの1つからなる。YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、WWPW（配列番号26）、又はそれらの任意の組み合わせ。

【0229】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、以下の配列のうちの1つを含むか、又は以下の配列のうちの1つからなる。FQILY（配列番号21）、YQFLI（配列番号20）、又はILFQY（配列番号22）。

【0230】

いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、FQILY（配列番号21）を含むか、又はからなる。

【0231】

いくつかの実施形態において、上記ペプチド中の各疎水性ドメインは、同一の配列又は異なる配列。

【0232】

本発明は、病状の治療において治療用カーゴ分子を輸送する際に使用するための短鎖細胞透過性ペプチドに関する。

【0233】

上記ペプチドは、連続した単一分子である配列を有し、従って、上記ペプチドのドメインは連続する。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、N末端及びC末端との間に線状に配置された、いくつかのドメインを含む。いくつかの実施形態において、上記ドメインは、上記のカチオン性ドメイン及び疎水性ドメインから選択される。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、上記ドメインが上記で定義された通りであるカチオン性ドメイン及び疎水性ドメインを含む又はからなる。

【0234】

各ドメインは、上記の関連するセクションに記載されているように、共通の配列特性を有するが、各ドメインの正確な配列は変化し、変更することが可能である。従って、各ドメインには様々な配列が可能である。各可能なドメイン配列の組み合わせにより、様々なペプチド構造が得られ、それぞれが本発明の一部を形成する。ペプチド構造の特徴を以下に述べる。

【0235】

いくつかの実施形態において、疎水性ドメインは、任意の2個のカチオン性ドメインを分離する。いくつかの実施形態において、各疎水性ドメインは、その両側にカチオン性ドメインに挟まれる。

【0236】

いくつかの実施形態において、カチオン性ドメインは、他のカチオン性ドメインと連続しない。

【0237】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下の配置で、2個のカチオン性ドメインによって挟まれた1個の疎水性ドメインを含む。

[カチオン性ドメイン]-[疎水性ドメイン]-[カチオン性ドメイン]

【0238】

いくつかの実施形態において、疎水性ドメインは、コアドメインとして知られてもよく、カチオン性ドメインの各々は、アームドメインとして知られてもよい。いくつかの実施形態において、疎水性アームドメインは、その両側でカチオン性コアドメインを挟む。

【0239】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のカチオン性ドメイン及び1個の疎水性ドメインを含む又はからなる。

【0240】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、2個のカチオン性アームドメインに挟まれた1個の疎水性コアドメインからなる。

【0241】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBRR（配列番号3）、RBRBR（配列番号4）、RRBRBR（配列番号5）、RBRRB（配列番号6）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、HBHBR（配列番号9）、RBRHBHR（配列番号10）、RBRBBHR（配列番号11）、RBRRBH（配列番号12）、HBRRBR（配列番号13）、HBHBH（配列番号14）、BHBH（配列番号15）、BRBSB（配列番号16）、BRB[Hyp]B（配列番号17）、R[Hyp]H[Hyp]HB（配列番号18）、及びR[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）から選択される配列をそれぞれ含む2個のカチオン性アームドメインによって挟まれた、YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、及びWWPW（配列番号26）、から選択された配列を含む1個の疎水性コアドメインを含む又はからなる。

【0242】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBRBR（配列番号4）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、及びHBHBR（配列番号9）から選択される2個のカチオン性アームドメインによって挟まれた、FQILY（配列番号21）、YQFLI（配列番号20）、及びILFQY（配列番号22）から選択される配列を含む1個の疎水性コアドメインを含む又はからなる。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBRBR（配列番号4）、BRBR（配列番号7）、及びRBHBH（配列番号8）から選択される2個のカチオン性アームドメインによって挟まれた、配列FQILY（配列番号21）を含む1つの疎水性コアドメインを含む又はからなる。

【0243】

かかる実施形態のいずれにおいても、リンカー、末端修飾及び／又はオリゴヌクレオチドなどのさらなる基が存在しうる。

【0244】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、N末端修飾される。

【0245】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、N-アセチル化、N-メチル化、N-トリフルオロアセチル化、N-トリフルオロメチルスルホニル化、又はN-メチルスルホニル化

10

20

30

40

50

される。いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、N-アセチル化される。

【0246】

任意で、上記ペプチドのN末端は修飾されていなくてもよい。

【0247】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、N-アセチル化されている。

【0248】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、C末端修飾である。

【0249】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、カルボキシ基、チオ酸基、アミノオキシ基、ヒドラジノ基、チオエステル基、アジド基、ひずみアルキン、ひずみアルケン、アルデヒド基、チオール基又はハロアセチル基から選択されるC末端修飾を含む。

10

【0250】

有益なことに、上記C末端修飾は、上記ペプチドを上記オリゴヌクレオチドに結合するための手段を提供する。

【0251】

従って、C末端修飾はリンカーを含んでもよく、その逆でもよい。いくつかの実施形態において、C末端修飾は、リンカー又はその逆から構成されうる。適切なリンカーは、本明細書の他の箇所に記載されている。

【0252】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、C末端カルボキシル基を含む。

20

【0253】

いくつかの実施形態では、C末端カルボキシル基はグリシン残基又はβ-アラニン残基によって提供される。

【0254】

いくつかの実施形態において、C末端カルボキシル基は、β-アラニン残基によって提供される。いくつかの実施形態において、C末端β-アラニン残基は、リンカーである。

【0255】

いくつかの実施形態において、従って、各カチオン性ドメインは、N末端又はC末端の修飾をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態において、C末端のカチオン性ドメインは、C末端修飾を含む。いくつかの実施形態において、N末端のカチオン性ドメインは、N末端の修飾を含む。いくつかの実施形態において、C末端のカチオン性ドメインは、リンカー基を含む。いくつかの実施形態において、C末端のカチオン性ドメインは、C末端のβ-アラニンを含む。いくつかの実施形態において、N末端のカチオン性ドメインは、N-アセチル化されている。

30

【0256】

本発明のペプチドは、全長40アミノ酸残基以下と定義される。従って、このペプチドはオリゴペプチドとみなすことができる。

【0257】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、3～30アミノ酸残基、例えば、5～25アミノ酸残基、10～25アミノ酸残基、13～23アミノ酸残基、又は15～20アミノ酸残基の全長を有する。

40

【0258】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、又は少なくとも17アミノ酸残基の全長を有する。

【0259】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、細胞を透過する事ができる。従って、上記ペプチドは、細胞透過性ペプチドとみなすことができる。

【0260】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、オリゴヌクレオチドに付着するためのもの

50

である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、オリゴヌクレオチドを標的細胞に輸送するためのものである。いくつかの実施形態において、ペプチドは、オリゴヌクレオチドを標的細胞に送達するためのものである。従って、このペプチドはキャリアペプチドとみなすことができる。

【0261】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、細胞及び組織内へ、例えば、細胞の核内へ透過することが出来る。いくつかの実施形態において、筋組織内へ透過することができる。

【0262】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下の配列のいずれか1つから選択されるペプチドを含む又はからなるものであってもよい。

10

RBRRBRRFQILYRBRBR (配列番号27)

RBRRBRRFQILYRBR (配列番号28)

RBRRBRFQILYRRBRBR (配列番号29)

RBRBRFQILYRBRBR (配列番号30)

RBRRBRRYQFLIRBRBR (配列番号31)

RBRRBRRILFQYRBRBR (配列番号32)

RBRRBRFQILYRBRBR (配列番号33)

RBRRBFQILYRBRBR (配列番号34)

RBRRBRFQILYBRBR (配列番号35)

20

RBRRBFQILYRBRBR (配列番号36)

RBRRBRRFQILYRBHBH (配列番号37)

RBRRBRRFQILYHBHBR (配列番号38)

RBRRBRRFQILYHBRBH (配列番号39)

RBRRBRRYQFLIRBHBH (配列番号40)

RBRRBRRILFQYRBHBH (配列番号41)

RBRHBHRFQILYRBRBR (配列番号42)

RBRBBHRFQILYRBHBH (配列番号43)

RBRRBRFQILYRBHBH (配列番号44)

RBRRBRFQILYHBHBH (配列番号45)

30

RBRRBHFQILYRBHBH (配列番号46)

HBRRBRFQILYRBHBH (配列番号47)

RBRRBFQILYRBHBH (配列番号48)

RBRRBRFQILYBHBH (配列番号49)

RBRRBRYQFLIHBHBH (配列番号50)

RBRRBRILFQYHBHBH (配列番号51)

RBRRBRRFQILYHBHBH (配列番号52)

【0263】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下の追加配列のいずれか1つから選択されるペプチドを含む又はからなるものであってもよい。

40

RBRRBRFQILYBRBS (配列番号53)

RBRRBRFQILYBRB[Hyp] (配列番号54)

RBRRBRFQILYBR[Hyp]R (配列番号55)

RBRRBRRFQILYBRBR (配列番号56)

BRRBRRFQILYBRBR (配列番号57)

RBRRBRWWBRBR (配列番号58)

RBRRBRWWPWWBRBR (配列番号59)

RBRRBRWPWWBRBR (配列番号60)

RBRRBRWWPWWBRBR (配列番号61)

RBRRBRRWWWRBRBR (配列番号62)

50

RBRRBRRWWPWWRBRRBR (配列番号63)
RBRRBRRWWPWWRBRRBR (配列番号64)
RBRRBRRWWPWWRBRRBR (配列番号65)
RBRRBRRRFQILYBRBR (配列番号66)
RBRRBRRRFQILYRBR (配列番号67)
RBRRBWWPWWRBRRBR (配列番号68)
RBRRBRRRFQILYBHBH (配列番号69)
RBRRBRRRFQIYRBHBH (配列番号70)
RBRRBRRFQILYBRBH (配列番号71)
RBRRBRRFQILYR[Hyp]H[Hyp]H (配列番号72)
R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYRBHBH (配列番号73)
R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYR[Hyp]H[Hyp]H (配列番号74)
RBRRBRRWWWRBHBH (配列番号75)
RBRRBRRWWPRBHBH (配列番号76)
RBRRBRRPWWRBHBH (配列番号77)
RBRRBRRWWPWWRBHBH (配列番号78)
RBRRBRRWWPWRBHBH (配列番号79)
RBRRBRRWPWWRBHBH (配列番号80)
RBRRBRRWWWRBHBH (配列番号81)
RBRRBRRWWPWWRBHBH (配列番号82)
RBRRBRRWPWWRBHBH (配列番号83)
RBRRBRRWWPWRBHBH (配列番号84)
RBRRBRRRFQILYRBHBH (配列番号85)
RBRRBRRRFQILYRBHBH (配列番号86)
RBRRBRRRFQILYBHBH (配列番号87)
RBRRBRRFQILYBHBH (配列番号88)
RBRRBHRRFQILYRBHBH (配列番号89)
RBRRBRRFQILY[Hyp]R[Hyp]R (配列番号101)
R[Hyp]RR[Hyp]RFQILYBRBR (配列番号102)
R[Hyp]RR[Hyp]RFQILY[Hyp]R[Hyp]R (配列番号103)
RBRRBRRWWWRBRBR (配列番号104)
RBRRBRRWWPWWBRBR (配列番号105)

10

20

30

【0264】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下の配列の1つから選択されるペプチドを含むか、又は以下の配列の1つから選択されるペプチドからなるものであってもよい。RBRRBRRRFQILYBRBR (配列番号27)

RBRRBRRYQFLIRBRBR (配列番号31)
RBRRBRRILFQYRBRBR (配列番号32)
RBRRBRRFQILYBRBR (配列番号35)
RBRRBRRRFQILYRBHBH (配列番号37)
RBRRBRRRFQILYHBHBR (配列番号38)
RBRRBRRFQILYRBHBH (配列番号44)

40

【0265】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下の配列を含むか、又は以下の配列からなる。RBRRBRRFQILYBRBR (配列番号35)。

【0266】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下の配列を含むか、又は以下の配列からなる。RBRRBRRRFQILYRBHBH (配列番号37)。

【0267】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、以下の配列を含むか、又は以下の配列

50

からなる。RBRRBRFQILYRBHBH（配列番号44）。

【0268】

複合体

いくつかの実施形態において、上記複合体は、以下の配列のうちの1つから選択されるペプチドを含む。RBRRBRFQILYBRBR（配列番号35）、RBRRBRRFQILYRBHBH（配列番号37）、及びRBRRBRFQILYRBHBH（配列番号44）。

【0269】

いくつかの実施形態では、いずれの場合でも、ペプチドは、上記のようなN末端修飾をさらに含んでもよい。

【0270】

適切なリンカーとしては、例えば、ジスルフィド、チオエーテル又はチオール-マレイミド結合の形成を可能にするC末端システイン残基、オキシムを形成するためのC末端アルデヒド、クリック反応又はペプチド上の塩基性アミノ酸とのモルホリノ結合の形成、又はカルボキサミド結合を形成するためにアミノ基と共有結合したペプチド上のカルボン酸部分が挙げられる。

【0271】

いくつかの実施形態において、上記リンカーは、1～5アミノ酸の長さである。いくつかの実施形態において、リンカーは、当該分野で公知の任意のリンカーを含んでもよい。いくつかの実施形態において、上記リンカーは、以下の配列のいずれかから選択される。G、BC、XC、C、GGC、BBC、BXC、XBC、X、XX、B、BB、BX及びXB。いくつかの実施形態において、Xは6-アミノヘキサン酸である。いくつかの実施形態において、上記リンカーは、Gluリンカーである。

【0272】

いくつかの実施形態において、上記リンカーは、例えば、PEGなどのポリマーでも良い。

【0273】

いくつかの実施形態において、上記リンカーは、 β -アラニンである。

【0274】

いくつかの実施形態において、上記ペプチドは、カルボキサミド結合を介して上記オリゴヌクレオチドに結合される。

【0275】

上記複合体のリンカーは、ペプチドを結合させるオリゴヌクレオチドの一部を形成してもよい。あるいは、上記オリゴヌクレオチドの結合は、上記ペプチドのC末端に直接連結されてもよい。いくつかの実施形態において、そのような実施形態において、リンカーは必要ない。

【0276】

あるいは、上記ペプチドは、上記オリゴヌクレオチドに化学的に結合されうる。化学結合は、例えば、ジスルフィド、アルケニル、アルキニル、アリール、エーテル、チオエーテル、トリアゾール、アミド、カルボキサミド、尿素、チオ尿素、セミカルバジド、カルバジド、ヒドラジン、オキシム、ホスフェート、ホスホルアミデート、チオホスフェート、ボランホスフェート、イミノホスフェート、など。又はチオールマレイミド結合を介してもよい。

【0277】

任意で、ペプチドにジスルフィド結合を形成させるためにペプチドのN末端にシステインを付加してもよく、上記ペプチドにチオエーテルを結合させるためにN末端にブロモアセチル化を施してもよい。

【0278】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、細胞及び組織内へ、例えば、細胞の核内へ、例えば、筋組織内へ透過することができる。

【0279】

いくつかの実施形態において、上記複合体のオリゴヌクレオチド成分は、上記の「オリゴヌクレオチド」の項及び本明細書の他の箇所に記載されている通りである。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）である。

【0280】

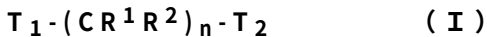
リンカー

上記に加えて、本明細書に記載の複合体は、本明細書に記載のペプチドを本明細書に記載のオリゴヌクレオチドに共有結合で連結するリンカーを含んでもよい。本発明において有用なリンカーは、WO2020/115494に見出すことができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0281】

上記リンカーは、独立して下記式（I）で示されるものであってよい。



（式中、 T_1 は、上記ペプチドに結合するための2価の基であり、-NH-及びカルボニルからなる群から選択され、

T_2 は、オリゴヌクレオチドに結合するための2価の基であり、-NH-及びカルボニルからなる群から選択され、

n は、1、2又は3であり、

各 R^1 は、独立して $-Y^1-X^1-Z^1$ であり、

ここで、

20

Y^1 は、存在しないか、又は $-(CRA^1RA^2)_m-$ であり、 m は、1、2、3又は4であり、 RA^1 及び RA^2 は、それぞれ独立して水素、OH、又は $(1-2C)$ アルキルであり、

X^1 は、存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-CH(OR^{A3})-$ 、 $-N(R^{A3})-$ 、 $-N(R^{A3})-C(O)-$ 、 $-N(R^{A3})-C(O)O-$ 、 $-C(O)-N(R^{A3})-$ 、 $-N(R^{A3})C(O)N(R^{A3})-$ 、 $-N(R^{A3})C(NR^{A3})N(R^{A3})-$ 、 $-SO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^{A3})-$ 、又は $-N(R^{A3})SO_2-$ であり、各 RA^3 は、独立して水素及びメチルから選択され、及び

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル、又はヘテロアリールであり、

ここで、各 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル、又はヘテロアリールは、 $(1-4C)$ アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 $NR^{A4}R^{A5}$ 、及び $(1-4C)$ アルコキシからなる群より選択される1つ以上（例えば、1、2、3、4、又は5）の置換基によって置換されていてもよく、 RA^4 及び RA^5 はそれぞれ独立して水素及び $(1-4C)$ アルキルからなる群より選択され、及び

30

各 R^2 は、独立して $-Y^2-X^2-Z^2$ であり、ここで、

Y^2 は、存在しないか、式 $-[CR^{B1}R^{B2}]_m-$ で示される基であり、 m は、1、2、3又は4、から選択される整数であり、 R^{B1} 及び R^{B2} はそれぞれ独立して水素、OH又は $(1-2C)$ アルキルから選択され、

X^2 は、存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-CH(OR^{B3})-$ 、 $-N(R^{B3})-$ 、 $-N(R^{B3})-C(O)-$ 、 $-N(R^{B3})-C(O)O-$ 、 $-C(O)-N(R^{B3})-$ 、 $-N(R^{B3})C(O)N(R^{B3})-$ 、 $-N(R^{B3})C(NR^{B3})N(R^{B3})-$ 、 $-SO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^{B3})-$ 、又は $-N(R^{B3})SO_2-$ であり、それぞれ R^{B3} は独立して水素又はメチルから選択され、及び

40

Z^2 は、水素、 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル又はヘテロアリールから選択され、各 $(1-6C)$ アルキル、 $(2-6C)$ アルケニル、 $(2-6C)$ アルキニル、アリール、 $(3-6C)$ シクロアルキル、 $(3-6C)$ シクロアルケニル又はヘテロアリールは、 $(1-4C)$ アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 $NR^{B4}R^{B5}$ 、及び $(1-4C)$ アルコキシからなる群より選択される1つ以上（例えば、1、2、3、4、又は5）の置換基によって置換されていてもよ

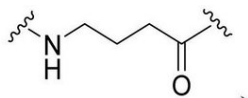
50

く、 R^{B4} 及び R^{B5} は、それぞれ独立して水素又は(1-2C)アルキルであり、ただし、 $n=1$ かつ、 T_1 及び T_2 は互いに異なるとき、 R^1 及び R^2 は、両方ともHではなく、 $n=1$ かつ、 T_1 及び T_2 は互いに異なり、 R^1 及び R^2 の一方はHであるとき、 R^1 及び R^2 の他方はメチルではなく、又は $n=2$ かつ、 R^1 及び R^2 の各存在はHであるとき T_1 及び T_2 は両方とも-C(O)-、又は両方とも-NH-である。)

【0282】

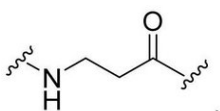
いくつかの実施形態において、上記リンカーは、以下の構造である。

【化33】

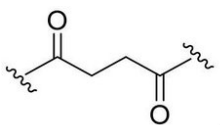


10

【化34】

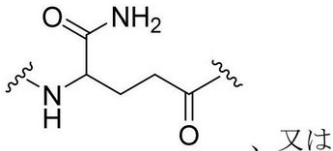


【化35】



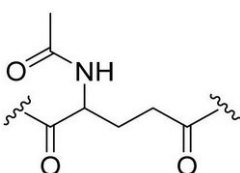
20

【化36】



、又は

【化37】



30

【0283】

医薬組成物

本発明の複合体、又はその薬学的に許容される塩は、医薬組成物に製剤化することができる。

【0284】

いくつかの実施形態において、上記医薬組成物は、本発明の複合体又はその薬学的に許容される塩を含む。

40

【0285】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される希釈剤、アジュバント、又は担体をさらに含んでもよい。

【0286】

適切な薬学的に許容される希釈剤、アジュバント又は担体は、当該技術分野でよく知られている。

【0287】

本開示の医薬組成物は、本明細書に記載の疾患、障害、及び状態を緩和、軽減、予防、

50

及び治療するための、追加の公知の治療剤、薬剤、プロドラッグへの化合物の改変物などを、医療用途の下でさらに含んでもよいことが理解されるべきである。

【0288】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、医薬品として使用するためのものであり、例えば、複合体について本明細書に記載したのと同じ方法で医薬品として使用するものである。複合体を使用する医療に関連して本明細書に記載される全ての特徴は、医薬組成物に適用される。

【0289】

従って、本発明のさらなる態様において、医薬品として使用するための第4の態様による医薬組成物が提供される。さらなる態様において、本明細書に開示される医薬組成物の有効量を投与することを含む、疾患状態の対象を治療する方法が提供される。

【0290】

医学的用途

本発明のペプチドを含む複合体は、上記の投薬量を用いて疾患の治療用の医薬品として使用することができる。

【0291】

医薬品は、上記で定義したような医薬組成物の形態であってもよい。

【0292】

疾患状態の治療を必要とする患者又は対象の治療方法も提供され、上記方法は、治療有効量の複合体を患者又は対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、医学的治療は、オリゴヌクレオチドの細胞内、例えば細胞の核内への送達を必要とする。

【0293】

治療すべき疾患には、オリゴヌクレオチドによる細胞膜及び／又は核膜への浸透が改善されることにより、治療効果が改善される可能性のある、あらゆる疾患が含まれる。

【0294】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、神経筋系の疾患の治療に使用される。

【0295】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、スプライシング不全によって引き起こされる疾患の治療における使用のためのものである。そのような実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、スプライシング不全を予防又は修正すること、及び／又は正しくスプライシングされたmRNA分子の産生を増加させることができるオリゴヌクレオチドを含んでもよい。

【0296】

いくつかの実施形態において、上記複合体はDMD又はBMDの治療に使用される。

【0297】

いくつかの実施形態において、複合体は、例えば、心筋症（例えば、拡張型心筋症、肥大型心筋症、又は拘束型心筋症）、心不全、及び／又は心臓不整脈を含むDMDなどの疾患の心臓への影響を治療するために使用される。

【0298】

いくつかの実施形態において、そのような実施形態において、上記複合体のオリゴヌクレオチドは、ジストロフィンタンパク質の発現を増加させるように作動可能である。いくつかの実施形態において、上記複合体のオリゴヌクレオチドは、機能的ジストロフィンタンパク質の発現を増加させるように作動可能である。

【0299】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ジストロフィンの発現を10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%増加させる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ジストロフィンの発現を50%まで増加させる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ジストロフィンの発現を10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%回復させる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ジストロフィンの発現50%まで回復

10

20

30

40

50

させる。

【0300】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、ジストロフィンタンパク質の機能を10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%回復させる。いくつかの実施形態において、上記複合体は、ジストロフィンタンパク質の機能を50%まで回復させる。

【0301】

いくつかの実施形態において、上記複合体のオリゴヌクレオチドは、ジストロフィンの転写中にエクソン51のスキッピングを引き起こすことによってそうするように作用可能である。

10

【0302】

いくつかの実施形態において、上記複合体のオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン遺伝子の1つ以上のエクソンの10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%のスキッピングを引き起こす。いくつかの実施形態において、上記複合体のオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン遺伝子の1つ以上のエクソンの50%までのスキッピングを引き起こす。

【0303】

いくつかの実施形態において、上述の治療される患者又は対象は、いかなる動物又はヒトであってもよい。いくつかの実施形態において、患者又は対象は、ヒトではない哺乳動物であってもよい。いくつかの実施形態において、患者又は対象は、男性（オス）又は女性（メス）であってもよい。いくつかの実施形態において、上記対象は男性（オス）である。

20

【0304】

いくつかの実施形態において、上述の治療される患者又は対象は、任意の年齢であってもよい。いくつかの実施形態では、治療される患者又は対象は、0から40歳、例えば、0～30歳、例えば、0～25歳、例えば、0～20歳である。

【0305】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、対象に、全身投与、例えば、髄内、髄腔内、脳室内、硝子体内、経腸、非経口、静脈内、動脈内、筋肉内、腫瘍内、皮下経口又は経鼻経路によって投与するためのものである。

30

【0306】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、対象に静脈内投与するためのものである。

【0307】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、対象に静脈注射によって投与するためのものである。

【0308】

いくつかの実施形態において、上記複合体は、静注によって投与される。いくつかの実施形態において、静注はボラス注入である。いくつかの実施形態において、静脈内投与は10分間～3時間、例えば0.25～2時間又は0.5～1時間継続する。

40

【0309】

有利なことに、本発明の上記複合体の投与量は、上記オリゴヌクレオチド単独から何らかの効果を見るために必要な投与量よりも低く、例えば、1桁以上低くてもよい。

【0310】

いくつかの実施形態において、本発明の上記複合体の投与後、毒性の1つ以上のマーカーは、現在利用可能なペプチド担体を使用する先行する複合体と比較して有意に低減する。

【0311】

適切な毒性マーカーは、腎毒性のマーカーであってもよい。

【0312】

50

適切な尿及び血清毒性マーカーとしては、KIM-1、NGAL、BUN、クレアチニン、アルカリフォスファターゼ、アラントランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼなどがある。

【0313】

いくつかの実施形態において、KIM-1、NGAL、及びBUNのうちの少なくとも1つのレベルは、現在利用可能なペプチド担体を用いた先行する複合体と比較して、本発明の複合体の投与後に低減する。

【0314】

いくつかの実施形態において、KIM-1、NGAL、及びBUNの各々のレベルは、現在利用可能なペプチド担体を用いた先行する複合体と比較して、本発明の複合体の投与後に低減する。

10

【0315】

いくつかの実施形態では、現在利用可能なペプチド担体を用いた先行複合体と比較して、各マーカーのレベルが有意に低減する。

【0316】

いくつかの実施形態において、各マーカーのレベルは、現在利用可能なペプチド担体を用いた先行する複合体と比較して、本発明の複合体の投与後に最大5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%低減する。

【0317】

上記で提供されるように、本発明の方法は、オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドにリンカーを介して共有結合又は連結されたペプチドの複合体1mg/kgから60mg/kgを対象（例えば、エクソン51スキッピングに感受性のある対象）に投与することを含む。いくつかの実施形態において、30 mg/kgから60 mg/kg（例えば、40 mg/kgから60 mg/kg、30 mg/kgから50 mg/kg; 30 mg/kgから40 mg/kg、例えば、30 mg/kg、40 mg/kg、50 mg/kg、又は60 mg/kg）の複合体が投与される。いくつかの実施形態において、40 mg/kgから50 mg/kg、50 mg/kgから60 mg/kg、35 mg/kgから45 mg/kg、45 mg/kgから55 mg/kg、35 mg/kgから55 mg/kg、30 mg/kgから45 mg/kg、35 mg/kgから50 mg/kg、40 mg/kgから55 mg/kg、又は45 mg/kgから60 mg/kgの複合体が投与される。いくつかの実施形態において、1 mg/kgから30 mg/kg（例えば、1 mg/kgから20 mg/kg、5 mg/kgから25 mg/kg、10 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから15 mg/kg、5 mg/kgから20 mg/kg、10 mg/kgから25 mg/kg、15 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから10 mg/kg、5 mg/kgから15 mg/kg、10 mg/kgから20 mg/kg、15 mg/kgから25 mg/kg、又は20 mg/kgから30 mg/kg、1 mg/kgから25 mg/kg、4 mg/kgから20 mg/kg、6 mg/kgから15 mg/kg、又は8 mg/kgから10 mg/kgの複合体が投与される、例えば、1 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、又は30 mg/kg）の複合体が投与される。いくつかの実施形態において、十分な有効性を維持しながら、薬物曝露量を少なくし、安全性を高めるために低用量（例えば、1 mg/kgから30 mg/kg）が投与される。

20

30

【0318】

ペプチドの調製

本発明のペプチドは、任意の標準的なタンパク質合成法、例えば化学合成、半化学合成、又は発現系の使用により製造されうる。従って、本発明はまた、上記ペプチドをコードするDNAを含むか又はそれからなるヌクレオチド配列、発現系、例えば、発現及び発現の制御に必要な配列を伴う配列からなるベクター、ならびに発現系によって形質転換された宿主細胞及び宿主生物に関する。

40

【0319】

従って、本発明によるペプチドをコードする核酸も提供される。

【0320】

いくつかの実施形態において、上記核酸は、単離された形態又は精製された形態で提供

50

されうる。

【0321】

本発明によるペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターもまた提供される。

【0322】

いくつかの実施形態において、上記ベクターは、プラスミドである。

【0323】

いくつかの実施形態において、上記ベクターは、本発明によるペプチドをコードする核酸に作動可能に連結された調節配列、例えば、プロモーターを含む。いくつかの実施形態において、上記発現ベクターは、適切な細胞、例えば、哺乳動物細胞、細菌細胞、又は真菌細胞にトランスフェクトされた場合に、上記ペプチドを発現することができる。

10

【0324】

本発明の上記発現ベクターを含む宿主細胞も提供される。

【0325】

発現ベクターは、本発明の上記核酸が挿入されうる宿主細胞に応じて選択されてもよい。宿主細胞のこのような形質転換には、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY、USA、2001に教示されているような従来技術を用いる。適切なベクターの選択は、当該分野に詳しい者の技能の範囲内である。適切なベクターとしては、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、ウイルスなどがある。

【0326】

産生された上記ペプチドは、例えば沈殿又は、例えばアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー分離など、任意の適切な方法によって宿主細胞から単離精製することができる。

20

【0327】

適切なベクター、宿主、組換え技術は当該技術分野でよく知られている。

【0328】

以下の実施例は、本発明を説明するためのものである。上記発明を何ら限定するものではない。

【実施例】

【0329】

実施例1. 複合体の調製

本明細書に記載の複合体は、例えば、WO 2020115494及びWO 2020030927に記載されている技術を用いて調製してもよい。

30

【0330】

9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 保護L-アミノ酸、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム (PyBOP)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-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)、及びFmoc⁺-Ala-OH preloaded Wang resin (0.19又は0.46 mmol/g) はMerck (Hohenbrunn、Germany) から入手した。HPLCグレードのアセトニトリル、メタノール、及び合成グレードのN-メチル-2-ピロリドン (NMP) は、Fisher Scientific (Loughborough、UK) から購入した。ペプチド合成グレードのN,N-ジメチルホルムアミド (DMF) とジエチルエーテルはVWR (Leicestershire、UK) から入手した。ピペリジンとトリフルオロ酢酸 (TFA) はAlfa Aesar (Heysham、England) から入手した。PMOはGene Tools Inc. (Philomath、USA) から購入した。ニワトリ胚抽出物及びウマ血清は、Sera Laboratories International Ltd (West Sussex、UK) から入手した。インターフェロンはRoche Applied Science社 (Penzberg、Germany) から入手した。その他の全ての試薬は、特に断りのない限り、Sigma-Aldrich (St. Louis、MO、USA) から入手した。MALDI-TOF質量分析は、Voyager DE Pro BioSpectrometry workstationを用いて行った。A-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸又はシナピン酸の10 mg/mLの水中50%アセトニトリル中のストック溶液をマトリック

40

50

スとして使用した。エラーバーは±0.1%で示した。

【0331】

ペプチドは、Intavis Parallel Peptide Synthesizerを用いて10 pmolスケールで調製するか、又はFmoc[^]-Ala-OH preloaded Wang resin (0.19又は0.46 mmol/g、Merck Millipore)を用いたCEM Liberty BlueTM Peptide Synthesizer (Buckingham、UK)を用いて100 pmolスケールで調製した。Intavis Parallel Peptide Synthesizerを用いた合成では、PyBOP/NMMカップリング混合物によるダブルカップリングステップを用い、その後各ステップの後に無水酢酸でキャッピングした。CEM Liberty Blue Peptide Synthesizerを用いた合成では、アルギニンを除く全てのアミノ酸に対してシングルスタンダードカップリングを実施し、これはダブルカップリングで実施した。カップリングは、アルギニン残基を除いて、75℃で5分間、60ワットのマイクロ波出力で一回行い、それぞれ2回カップリングした。各脱保護反応は、75℃で2回、1回目は30秒間、次に35ワットのマイクロ波出力で3分間行った。合成が完了したら、樹脂をDMF (3 x 50 mL)で洗浄し、固相に結合したペプチドのN末端を室温でDIPEA存在下、無水酢酸でアセチル化した。N末端のアセチル化後、ペプチド樹脂をDMF (3 x 20mL)及びDCM (3 x 20mL)で洗浄した。ペプチドはトリフルオロ酢酸 (TFA) : H₂O : トリイソプロピルシラン (TIPS) (95% : 2.5% : 2.5% : 3-10 mL) からの切断カクテルで室温で3時間処理して固体支持体から切断した。ペプチド放出後、過剰のTFAを窒素でスパージングして除去した。粗ペプチドを冷ジエチルエーテルの添加により沈殿させ (合成規模により15-40 mL)、3200 rpmで5分間遠心した。粗ペプチドペレットを冷ジエチルエーテル (3 x 15 mL)で3回洗浄し、445-LC Scale-up module及び440-LC fraction collectorを装着したVarian 940-LC HPLC Systemを使用してRP-HPLCで精製した。ペプチドは、RP-C18カラム (10 x 250 mm、Phenomenex Jupiter)で、0.1% TFA/H₂O中のCH₃CNの線形勾配を用い、流速15 mL/分でsemi-preparative HPLCにより精製した。検出は220nm及び260nmで行った。目的のペプチドを含むフラクションを合わせて凍結乾燥し、白色固体としてペプチドを得た。

10

20

【0332】

ジストロフィンのエクソン51スキッピングを誘導するためのPMOアンチセンス配列 (5'-CCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106))は、例えば、複合体1の調製に用いることができる。ペプチド (Ac-RBRRBRFQILYBRBR)はPMOの3'末端にグルタミン酸リンカーを介してそのC末端カルボキシル基に複合体化されていてもよく、ここでグルタミン酸残基中の遊離-COOHは-CONH₂で置換され、複合体 [ペプチド] -CO-CH (CONH₂) -CH₂CH₂CO- [3'-オリゴヌクレオチド-5']を生成し、これはまた以下の構造として同定された。

30

【化38】



40

これは、DMSO中のDIPEAの存在下、NMP中のPyBOP及びHOAtを用いて達成されてもよい。いくつかの例では、ペプチドのC末端カルボキシル基の活性化のために、PyBOPの代わりにHBTUを使用してもよい。一般に、N-メチルピロリドン (NMP)中のペプチドの溶液に、PyBOP (NMP中)、HOAt (NMP中)、ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA)、及びPMO (DMSO中)を添加する。得られた混合物を、例えば40℃まで加温し、H₂O中のTFAの添加によって反応をクエンチしてもよい。この溶液は、イオン交換クロマトグラフィーによって精製されてもよい。例えば、PMO-ペプチド複合体は、例えば、NaCl(aq.)/CH₃CN/リン酸緩衝液 (pH7.0)の直線勾配を用いて精製され得る。目的の化合物を含む画分を合わせて凍結乾燥し、生成したペプチド-PMOを得ることができる。ペプチド-PMO複合体からの過剰な塩の除去は、遠心フィルター装置を用いたイオ

50

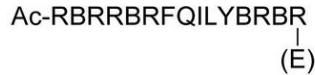
ン交換後に回収した画分の濾過によって行うことができる。複合体を凍結乾燥し、MALDI-TOFで分析してもよい。複合体は滅菌水に溶解し、使用前に酢酸セルロース膜でろ過してもよい。ペプチド-PMOの濃度は、0.1N HCl溶液中、265nmにおける複合体のモル吸光度によって決定してもよい。

【0333】

実施例2．非ヒト霊長類試験

以下に示す複合体1を0.9%滅菌生理食塩水で25 mg/mLに希釈した。

【化39】



5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'、ここで5'基は、

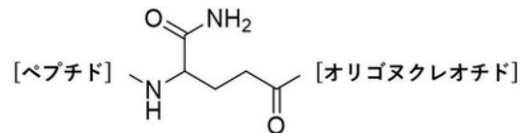
10

【化40】



20

【化41】



であり、及び、オリゴヌクレオチドは-P(=O)(NMe₂)-O-を介して連結されたPMOである。

【0334】

NHP単回注入用量反応試験

複合体1のエクソンスキッピングの有効性を非ヒト霊長類(NHP)で試験した。具体的には、2-3歳の無処置のカニクイザルに、複合体を40 mg/kg又は60 mg/kgの用量で30分間かけて単回静注した(各群オスn=2及びメスn=2)。対照群(オスn=1及びメスn=1)には対照品である0.9%滅菌生理食塩水を投与した。2~4歳の無処置のカニクイザルに、20mg/kg、40mg/kg、又は60mg/kgの複合体を単回静脈内緩徐ボラス注射(1~2分)した(各群オスn=1及びメスn=1)。

30

【0335】

動物は投与後1週間で剖検した。所定の剖検時に、エクソンスキッピング解析及び組織生化学分析のために組織(上腕二頭筋、腓腹筋、大腿四頭筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、横隔膜、肺、心臓、大脳皮質、小脳、結腸、十二指腸、食道、表皮、副腎、甲状腺、腎臓、肝臓、脾臓、膵臓、胸腺、精巣、及び卵巣)の一部を採取した。肝臓と腎臓の末端サンプルは肉眼的剖検の対象となった。試験期間中、投与後1日目、4日目、7日目に血液サンプルを臨床化学、血液学、補体、凝固について分析し、投与前と比較した。さらに、投与後1、4、7日目に尿を採取し、KIM-1を分析し、投与前と比較した。また、身体と臓器の重量プロファイルも評価した。

40

【0336】

50

【表 1】

表 1. 試験デザイン

群番号	試験物質	投与量 (mg/kg)	群あたりの例数 (M/F)	投与方式
1	0.9% 生理食塩水	0	1/1	30 分間 IV 注入
2	複合体 1	40	2/2	30 分間 IV 注入
3	複合体 1	60	2/2	30 分間 IV 注入
4	複合体 1	20	1/1	1-2 分間 IV ボーラス
5	複合体 1	40	1/1	1-2 分間 IV ボーラス
6	複合体 1	60	1/1	1-2 分間 IV ボーラス

10

【0337】

安全性評価

投与後1日目、4日目、及び7日目に臨床化学、血液学、補体、凝固を評価し、投与前と比較した。身体及び臓器の重量プロファイルも評価した。

【0338】

20

本試験で使用した臨床化学マーカーを表2に示す。

【表 2】

表 2

臨床化学パラメーター

アラニンアミノトランスフェラーゼ アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ アルカリフォスファターゼ γ グルタミルトランスぺプチターゼ 総ビリルビン 尿素窒素 クレアチン カルシウム リン 総タンパク	アルブミン グロブリン（計算値） アルブミン/グロブリン比 血糖 コレステロール 中性脂肪 ナトリウム カリウム クロール クレアチンキナーゼ
---	--

30

【0339】

40

本試験で使用した血液学的マーカーを表3にまとめた。

【表 3】

表 3

血液学パラメーター

赤血球数	血小板数
ヘモグロビン濃度	白血球数
ヘマトクリット	好中球数
平均赤血球容積	リンパ球数
赤血球分布幅	単球数
平均赤血球色素濃度	好酸球数
平均赤血球色素量	好塩基球数
網状赤血球	ペルオキシダーゼ非染色性大型細胞

10

【0 3 4 0】

本試験で使用した補体マーカーを表 4 にまとめた。

【表 4】

表 4

C3a	SC5b-9
Bb	C5a
CH50	

20

【0 3 4 1】

本試験で使用した凝固マーカーを表 5 にまとめた。

【表 5】

表 5

凝固パラメーター

活性化部分 トロンボプラスチン時間 フィブリノーゲン	プロトロンビン時間 検体品質
-------------------------------	-------------------

30

【0 3 4 2】

さらに、1、4、及び 7 日目に投与前と投与後に採取した検体について、KIM-1 及びクレアチニンの尿検査を行った。

【0 3 4 3】

RT-PCR 分析

40

エクソン 51 のスキッピングレベルは RT-PCR によって決定した。骨格筋、心筋、及び平滑筋組織は、ビーズ式ホモジナイズ法を用いてホモジナイズした。RNA は、Maxwell RSC 48 instrument (Promega) 及び simplyRNA Tissue Kit (Promega) を用いて、製造元の推奨に従って抽出した。RNA の濃度及び純度は、ClarioStar (BMG LabTech) を用いて測定した。定量した RNA を、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, 4368813) を用いて、表 6 に記載したサーマルサイクル条件下で逆転写した。

50

【表 6】

表 6. 逆転写サーマルサイクル条件。

サーマルサイクル条件		
手順	温度 (°C)	時間 (分)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	ホールド

10

【0344】

Nested-PCRは2回の連続したPCR反応として行った。最初のPCRは逆転写したcDNA鋳型を用いて行った。2回目のPCRは最初のPCRで得られた産物を用いて行った。PCR反応に用いたすべてのプライマーは表7に示し、サーマルサイクル条件は表8に概説する。最終PCR産物をアガロース(2%)ゲル電気泳動で分析した。ゲルはMidori Green Advance Stain (Nippon Genetics) を用いて調製した。HyperLadder 50 bp (BioLigne, BIO-33039) 及びPCR産物をアガロースゲルにロードし、適切な程度のバンド分離が得られるまで泳動した。その後、G:BOX (Syngene) gel imaging systemを用いて、分離されたゲルの画像取得を行った。nested-PCR ゲルから得られた非スキップ/native及びスキップ/ Δ ex51バンドを、ImageJソフトウェア(Fiji)を用いて濃度測定の対象とした。バンド定量からの濃度測定値を用いて、下式によりnhpDMDエクソン51のスキッピングを決定した。

20

【0345】

nhpDMDエクソン51スキッピングの計算式：([スキップされたフラグメントのピーク面積] / [スキップされたフラグメントのピーク面積 + スキップされていないフラグメントのピーク面積]) $\times 100$

【0346】

【表 7】

表 7. プライマー及びプライマー配列

	PCR プライマー		
	名称	エクソン標的	配列 (5'-3')
PCR-1	nhpDMDex48 (F)	Ex48	TGCTCCTGTGGCTGTCTCCT
	nhpDMDex53 (R)	Ex53	AGCTTGGCTCTGGCCTGTCCT
PCR-2	nhpDMDex49 (F)	Ex49	ACCAGCCACTCAGCCAGTGA
	nhpDMDex52 (R)	Ex52	GATTGTTCTAGCCTCTTGATTGC

40

【0347】

50

【表 8】
表 8. サーマルサイクリング条件

手順	温度 (℃)	時間	サイクル数
初期変性	95	5 分	1
変性	95	25 秒	20
アニーリング	62	35 秒	
伸長	72	65 秒	
最終伸長	72	5 分	1
ホールド	4	N/A	N/A
手順	温度 (℃)	時間	サイクル数
初期変性	95	5 分	1
変性	95	25 秒	32
アニーリング	58	35 秒	
伸長	72	65 秒	
最終伸長	72	5 分	1
ホールド	4	N/A	N/A

【 0 3 4 8 】
複合体 1 のポーラス又は注入を受けた非ヒト霊長類におけるエクソン 51スキッピング効率を表 9 にまとめた。

【 0 3 4 9 】
【表 9】

表 9. 複合体 1 のエクソン 51 スキッピング効率

前脛骨筋					
40 mg/kg			60 mg/kg		
ポーラス (%)	注入 (%)	差 (%)	ポーラス (%)	注入 (%)	差 (%)
61.8	73.5	19	75.7	87.5	16
横隔膜					
40 mg/kg			60 mg/kg		
ポーラス (%)	注入 (%)	差 (%)	ポーラス (%)	注入 (%)	差 (%)
88.1	88.3	0	91.8	95.8	4
心臓					
40 mg/kg			60 mg/kg		
ポーラス (%)	注入 (%)	差 (%)	ポーラス (%)	注入 (%)	差 (%)
45.8	33.0	-28	86.7	74.2	-14

【 0 3 5 0 】

結果を図 1 ～ 1 3 E に示す。

【 0 3 5 1 】

図 1 は、動物（n=2～4）の主要筋群における用量反応を示している。

【 0 3 5 2 】

図 2 A 及び 2 B は、尿素及びクレアチニン（腎機能マーカー）の投与後の上昇が一過性であることを示している。注入投与で見られる上昇は、ボーラス投与で見られたレベルよりも低い。すべての上昇は、投与後 7 日目までに投与前及び／又は対照レベルに戻る。

【 0 3 5 3 】

図 3 A、図 3 B、及び図 3 C は、ALP 及び ALT プロファイルが注入投与で良好であることを示す。注入投与で認められる AST の上昇は、検査項目に関連したものではない可能性があり、過去の対照の最小／最大値の範囲内である。ボーラスで認められた値よりも低い値が観察され、投与後 4 日目には投与前の値に戻る。

10

【 0 3 5 4 】

図 4 A、図 4 B、及び図 4 C は、複合体 1 の投与後の一次血液学的パラメーターに存在するわずかな変動が、生物学的に有意なレベルには達しないことを示している。注入投与の一次血液学的パラメーターは、ボーラス投与で見られたものと同じか、又はより低いプロファイルを有する。

【 0 3 5 5 】

図 5 は、注入投与により、血漿中濃度はボーラス投与よりわずかに低くなったが、血漿中の複合体の存在時間は長くなったことを示している（投与後 48 時間）。注入時間は 30 分間であった。

20

【 0 3 5 6 】

図 6 は、例えば心臓や中枢神経系など、従来到達が困難であった組織で検出された複合体 1 の広域送達による用量反応を示す。PMO は投与 7 日後に検出された。図 7 及び図 8 は、注入投与が、ボーラス投与と比較して、組織中の PMO 濃度及び存在において同等又はそれ以上のレベルをもたらすことを示す。

【 0 3 5 7 】

クレアチニンの尿検査については、動物間のばらつきがあるため、データの解釈がより複雑になるが、図 9 A では、60 mg/kg の注入で認められた一過性の変調は、投与後 4 日目までに溶媒対照レベルに戻ることがわかる。さらに、KIM-1（腎障害の尿中バイオマーカー）の尿検査では、試験中のいずれの動物についても、どの時点でも検出可能なレベルの KIM-1 は認められなかった（投与前、投与後 24 時間、投与後 4 日及び 7 日の尿を採取し、KIM-1 レベルを分析した；図 9 B）。

30

【 0 3 5 8 】

図 10 A、10 B、及び 10 C は、凝固マーカーがボーラス投与でも注入投与でも影響を受けないことを示している。

【 0 3 5 9 】

図 11 は、複合体 1 の注入が体重プロファイルに影響を及ぼさなかったことを示す。複合体 1 を投与された動物において、処置に関連した臓器重量の変化は観察されなかった（図 12 A ～ 12 I）。観察された偶発的な臓器重量の差異は、偶発的及び／又は性成熟の差異に関連し、投与とは無関係であると考えられた。

40

【 0 3 6 0 】

図 13 A – 13 E は、CH50、Bb、C3a 又は SC5b-9 における血清補体活性化を示す。C5a は試験中に検出されなかった。

【 0 3 6 1 】

結論の要約は以下の通りである。

- ・複合体 1 を 40 mg/kg 又は 60 mg/kg で注入した場合、死亡例、SAE 及び AE は認められなかった。
- ・複合体 1 の注入では、いずれの投与量でも巨視的な組織病理は観察されなかった。
- ・顕微鏡所見の大部分は、悪性ではなく（良性）、変性でもなく、オリゴの既知の効果

50

と考えられる。40 mg/kg又は60 mg/kgで腎臓に認められた主な顕微鏡所見は、最小から中等度の尿細管好塩基球増加症、最小から軽度の尿細管好塩基球性顆粒、60 mg/kgでの最小から軽度の尿細管拡張及び微小な多巣性硝子円柱であった。

- ・すべての投与量で、良性と考えられるいくつかの血液学的マーカーの一過性で回復可能な軽度の上昇が観察された。

- ・すべての投与量で、DMDの病態に対処するために不可欠な組織への送達が可能である。

- ・すべての投与量で、いくつかの臨床化学マーカーに一過性で回復可能な軽度の上昇が観察された。

- ・複合体1による臓器又は体重への影響はなかった。

10

【0362】

実施例3．追加のNHP試験

追加試験において、無処置のカニクイザルに、上記の複合体（複合体1）又は複合体1と同一のオリゴヌクレオチド配列を含むが、配列(Arg)₆Glyからなるペプチドに連結された別の複合体を投与した。複合体は、5、10、30、又は60 mg/kg (n=3) で30分間かけて静注した。対照として生理食塩水を用い、Q2Wで3回投与した。各投与の7日後に生検を行い、最終投与の7日後に病理組織を採取した。最終投与7日後の上腕二頭筋、大腿四頭筋及び横隔膜におけるエクソン51スキッピングのレベル(%)を図14に、最終投与7日後の心臓組織（左心室、右心室及び大動脈）におけるエクソン51スキップのレベル(%)を図15に示す。これらの図に示されるように、複合体1は、図に示される組織において、(Arg)₆Gly複合体よりもエクソン51スキッピングにおいて劇的に改善された有効性を示した。加えて、複合体1は、特定の組織において、例えば10 mg/kgという低用量で実質的な有効性を示したことは注目に値する。最初の投与及び2回目の投与の7日後に採取した生検試料、及び最終投与の7日後に採取した最終試料の分析は、エクソンスキッピングが複合体1の反復投与により累積したことを示した。結果を図19A及び19Bに示す。

20

【0363】

方法

RNAを抽出し、定量した後、ヌクレアーゼフリー水で50 ng/μLにノーマライズした。その後、ノーマライズしたRNA 500 ngを逆転写した。プライマーは100 μMのストックから10 μMのアリコートとして調製した。2X DreamTaq Master Mix、プライマー、及びヌクレアーゼフリー水を含むPCRマスターミックスをボルテックスし、解凍後短時間遠心した。

30

【0364】

【表10】

表10

PCR プライマー	
エクソン標的	配列 (5'-3')
Ex48	CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG
Ex53	CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC

40

【0365】

50

【表 1 1】

表 1 1

PCR 反応（1 サンプルあたり）		
試薬	容量（μL）	最終濃度
2X DreamTaq Master Mix	12.5	1X
フォワードプライマー、10 μM	1.25	0.5 μM
リバースプライマー、10 μM	1.25	0.5 μM
ヌクレアーゼフリー水	7.0	-
テンプレート cDNA	3	-
総容量	25	-

10

【0 3 6 6】

22 μl の反応マスターミックスを各薄肉PCR反応チューブに加えた。次に各サンプルのテンプレートcDNA 3 μl を各チューブに加え、十分に混合した。サンプルを静かにボルテックスし、作業を進める前に気泡がなくなるように注意しながら、PCRチューブを短時間スピンドウンした。チューブをProflexに入れ、以下のサーマルサイクル条件でPCRを行った。

20

【0 3 6 7】

【表 1 2】

表 1 2

PCR サーマルリサイクル条件			
手順	温度（℃）	時間	サイクル数
初期変性	94	2 分間	1
変性	94	30 秒間	34
アニーリング	55	30 秒間	
伸長	68	1 分間	
最終伸長	68	5 分間	1
ホールド	4	∞	N/A

30

【0 3 6 8】

PCR後、サンプルは氷上に置くか、又は-20℃で凍結した。処理準備後、サンプルを2%アガロースゲルで分画し、画像化した。バンドは以下のように分析した。

40

【0 3 6 9】

50

【表 1 3】

表 1 3

サンプル	予想バンドサイズ (bp)
コントロール (C) RNA	478
ネガティブコントロール (NTC)	バンドなし
非スキップ (native ex51)	478
スキップ (Δex51)	246

10

【 0 3 7 0】

バンドはImageJソフトウェアを用いて濃度測定により定量した。'plot lanes'コマンドを使用し、lineツールを使って曲線の底辺をマークした。wandツールを使用して曲線下の領域を選択し、面積を求めた。nhpDMDex51のスキッピングの割合は以下のようにして求めた。

$$\frac{\text{非スキップ (native ex51)}}{\text{非スキップ (native ex51) + スキップ (Δex51)}} \times 100$$

20

【 0 3 7 1】

実施例 4 . mdx マウスにおける単回投与試験

複合体 2 をmdxマウスに単回静脈内投与し、注射7日後に血清クレアチンキナーゼ値を測定した。本試験では対照剤として溶媒（0.9%生理食塩水）を用いた。本研究では、対照動物として野生型（WT）マウスを用いた。R6G-PMOを比較複合体として用いた。R6G-PMOは複合体 2 と同一のオリゴヌクレオチド配列からなるが、配列(Arg)₆Glyからなるペプチドに結合している。結果を図 1 6、1 7 A、1 7 B、1 8 A及び1 8 Bに示す。

【 0 3 7 2】

複合体 2 を以下に示す。

【化 4 2】



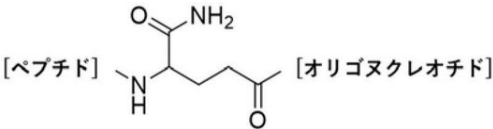
5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'、ここで5'基は、

【化 4 3】



40

【化 4 4】



であり、及びオリゴヌクレオチドは、-P(=O)(NMe₂)-O-を介して連結されたPMOであ

50

る。

【0373】

図16の結果は、正常化したクレアチンキナーゼレベルの測定によって示されるように、複合体2の許容可能な単回投与量の投与後、複合体2がさらなる筋損傷を防止していることを示唆している。

【0374】

図17A及び17Bの結果は、複合体2の単回投与から7日後に、大腿四頭筋において91%のジストロフィン回復が達成されたことを示している。

【0375】

図18A及び18Bの結果は、複合体2の単回投与から7日後に、心臓において26%のジストロフィン回復が達成されたことを示している。

10

【0376】

他の実施形態

記載された本発明の様々な修正及び変形は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明を特定の実施形態に関連して説明してきたが、特許請求される本発明はそのような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解されたい。実際、当業者に明らかな、本発明を実施するための記載された態様の様々な変更は、本発明の範囲内にあることが意図されている。

【0377】

いくつかの実施形態は、以下の番号のパラグラフの範囲内にある。

20

【0378】

1. デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する対象を治療する方法であって、上記方法は、オリゴヌクレオチドと、上記オリゴヌクレオチドに共有結合又はリンカーを介して連結されたペプチドとの複合体を1 mg/kgから60 mg/kg投与することを含み、

上記ペプチドは、少なくとも4個のアミノ酸残基を含む少なくとも1個のカチオン性ドメイン、及び少なくとも3個のアミノ酸残基を含む少なくとも1個の疎水性ドメインを含み、但し、上記ペプチドは合計7から40個のアミノ酸残基を含み、且つ、上記の少なくとも1個のカチオン性ドメインは、アルギニン残基及び／又はヒスチジン残基と組み合わせてβ-アラニン残基を含み、及び、

上記オリゴヌクレオチドは、合計12から40個の連続した核酸塩基を含み、少なくとも12個の連続する核酸塩基は、ヒトジストロフィン遺伝子の標的配列に相補的である、方法。

30

【0379】

2. 上記オリゴヌクレオチドは、

5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)、又は、5'-ACCAGAGUACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号107)、5'-CUCAUACC UUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号108)、

5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、5'-ACAUCAAG GAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、

5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号111)、

40

5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AU CAUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、

5'-AUCAUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号114)、

5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、

5'-AUCAUCUCGUUGAUUCCUCAA-3' (配列番号116)、及びそれらのチミン置換アナログからなる群から選択される配列を含む、パラグラフ1に記載の方法。

【0380】

各カチオン性ドメインは、4から12アミノ酸残基の間の長さを有する、パラグラフ1又は2に記載の方法。

50

【0381】

4. 各カチオン性ドメインは、4から7アミノ酸残基の間の長さを有する、パラグラフ3に記載の方法。

【0382】

5. 各カチオン性ドメインは、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%のカチオン性アミノ酸を含む、パラグラフ1から4のいずれか1項に記載の方法。

【0383】

6. 各カチオン性ドメインは、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%のアルギニン及び／又はヒスチジン残基を含む、パラグラフ1から4のいずれか1項に記載の方法。

【0384】

7. 各カチオン性ドメインは、以下の配列の1つを含む、パラグラフ1から4のいずれか1項に記載の方法。RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBRR（配列番号3）、RBRBR（配列番号4）、RRBRBR（配列番号5）、RBRRB（配列番号6）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、HBHBR（配列番号9）、RBRHBHR（配列番号10）、RBRBBHR（配列番号11）、RBRRBH（配列番号12）、HBRRBR（配列番号13）、HBHBH（配列番号14）、BHBH（配列番号15）、BRBSB（配列番号16）、BRB[Hyp]B（配列番号17）、R[Hyp]H[Hyp]HB（配列番号18）、R[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）又はそれらの任意の組み合わせ。

【0385】

8. 各カチオン性ドメインは、以下の配列の1つを含むか、又は以下の配列の1つからなる、パラグラフ1から4のいずれか1項に記載の方法。RBRRBRR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBRR（配列番号3）、RBRBR（配列番号4）、RRBRBR（配列番号5）、RBRRB（配列番号6）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、HBHBR（配列番号9）、RBRHBHR（配列番号10）、RBRBBHR（配列番号11）、RBRRBH（配列番号12）、HBRRBR（配列番号13）、HBHBH（配列番号14）、BHBH（配列番号15）、BRBSB（配列番号16）、BRB[Hyp]B（配列番号17）、R[Hyp]H[Hyp]HB（配列番号18）、R[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）又はそれらの任意の組み合わせ。

【0386】

9. 上記ペプチドは、2個のカチオン性ドメインを含む、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

【0387】

10. 各疎水性ドメインは、3から6アミノ酸の長さを有し、好ましくは、各疎水性ドメインは、5アミノ酸の長さを有する、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

【0388】

11. 各疎水性ドメインは、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%の疎水性アミノ酸を含む、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

【0389】

12. 各疎水性ドメインは、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、トリプトファン、プロリン、及び/又はグルタミン残基を含み、好ましくは、各疎水性ドメインは、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、トリプトファン、プロリン、及び/又はグルタミン残基を含む又はからなる、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

【0390】

13. 上記ペプチドは、1個の疎水性ドメインを含む、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

【0391】

14. 各疎水性ドメインは、以下の配列の1つを含む、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、WWPW（配列番号26）又はそれらの任意の組み合わせ。

【0392】

15. 各疎水性ドメインは、以下の配列の1つを含むか、又は以下の配列の1つからなる上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、WWPW（配列番号26）又はそれらの任意の組み合わせ。

10

【0393】

16. 上記ペプチドは、2個のカチオン性ドメイン及び1個の疎水性ドメインを含む又ははからなる、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

【0394】

17. 上記ペプチドは、2個のカチオン性ドメイン及び1個の疎水性ドメインを含む又ははからなる、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

【0395】

18. 上記ペプチドは、RBRBR（配列番号1）、RBRBR（配列番号2）、RBR（配列番号3）、RBRBR（配列番号4）、RRBR（配列番号5）、RBRB（配列番号6）、BRBR（配列番号7）、RBHBH（配列番号8）、HBHBR（配列番号9）、RBRHBHR（配列番号10）、RBRBBHR（配列番号11）、RBRRBH（配列番号12）、HBRBR（配列番号13）、HBHBH（配列番号14）、BHBH（配列番号15）、BRBSB（配列番号16）、BRB[Hyp]B（配列番号17）、R[Hyp]H[Hyp]HB（配列番号18）、及びR[Hyp]RR[Hyp]R（配列番号19）から選択される配列をそれぞれ含む2個のカチオン性アームドメインによって挟まれた、YQFLI（配列番号20）、FQILY（配列番号21）、ILFQY（配列番号22）、FQIY（配列番号23）、WWW、WWPWW（配列番号24）、WPWW（配列番号25）、及びWWPW（配列番号26）から選択される配列を含む1個の疎水性ドメインを含むか、又はそれらからなる、パラグラフ1から4のいずれか1項に記載の方法。

20

【0396】

19. 上記ペプチドは、以下の配列の1つを含むか、又は以下の配列の1つからなる、パラグラフ1から4のいずれか1項に記載の方法。RBRBRRFQILYRBRBR（配列番号27）、RBRBRRYQFLIRBRBR（配列番号31）、RBRBRRIILFQYRBRBR（配列番号32）、RBRBRFQILYBRBR（配列番号35）、RBRBRRFQILYRBHBH（配列番号37）、RBRBRRFQILYHBHBR（配列番号38）、及びRBRBRFQILYRBHBH（配列番号44）。

30

【0397】

20. 上記ペプチドは、以下のアミノ酸配列RBRBRFQILYBRBR（配列番号35）を有する、パラグラフ1から4のいずれか1項に記載の方法。

【0398】

21. 上記ペプチドは、以下のアミノ酸配列RBRBRRFQILYRBHBH（配列番号37）を有する、パラグラフ1から4のいずれか1項に記載の方法。

40

【0399】

22. 上記ペプチドは、以下のアミノ酸配列RBRBRFQILYRBHBH（配列番号44）を有する、パラグラフ1から4のいずれか1項に記載の方法。

【0400】

23. 上記ペプチドは、そのN末端を介して上記複合体の残りの部分に結合する、パラグラフ1から22のいずれか1項に記載の方法。

【0401】

24. 上記ペプチドのC末端は、-NH₂である、パラグラフ23に記載の方法。

50

【0402】

25. 上記ペプチドは、そのC末端を介して上記複合体の残りの部分に結合する、パラグラフ1から22のいずれか1項に記載の方法。

【0403】

26. 上記ペプチドは、そのN末端でアシル化される、パラグラフ25に記載の方法。

【0404】

27. 上記複合体は、以下の構造を含むか、以下の構造である、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

【化45】

[ペプチド]—[リンカー]—[オリゴヌクレオチド]

10

【0405】

28. 上記複合体は、以下の構造を含むか、以下の構造である、パラグラフ1から26のいずれか1項に記載の方法。

【化46】

[ペプチド]—[リンカー]— $\begin{cases} \text{[オリゴヌクレオチド]} \\ \text{[オリゴヌクレオチド]} \end{cases}$ 又は $\begin{cases} \text{[ペプチド]}—\begin{cases} \text{[リンカー]}—\text{[オリゴヌクレオチド]} \\ \text{[リンカー]}—\text{[オリゴヌクレオチド]} \end{cases} \end{cases}$

【0406】

29. 上記複合体は、以下の構造を含むか、以下の構造である、パラグラフ1から26のいずれか1項に記載の方法。

【化47】

[ペプチド]—[リンカー]—[ペプチド]—[リンカー]—[オリゴヌクレオチド]

20

【0407】

30. 上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法であって、各リンカーは、独立して下記式(I)で示される、方法。

$$T_1-(CR^1R^2)_n-T_2 \quad (I)$$

(式中、 T_1 は、上記ペプチドに結合するための2価の基であり、-NH-及びカルボニルからなる群から選択され、

T_2 は、オリゴヌクレオチドに結合するための2価の基であり、-NH-及びカルボニルからなる群から選択され、

n は、1、2又は3であり、

各 R^1 は、独立して $-Y^1-X^1-Z^1$ であり、

ここで、

Y^1 は、存在しないか、又は $-(CRA^1RA^2)_m-$ であり、 m は、1、2、3又は4であり、 RA^1 及び RA^2 は、それぞれ独立して水素、OH、又は(1-2C)アルキルであり、

X^1 は、存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-CH(ORA^3)-$ 、 $-N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)-C(O)-$ 、 $-N(RA^3)-C(O)O-$ 、 $-C(O)-N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)C(O)N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)C(NRA^3)N(RA^3)-$ 、 $-SO-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(O)_2N(RA^3)-$ 、又は $-N(RA^3)SO_2-$ であり、各 RA^3 は、独立して水素及びメチルから選択され、及び

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、(1-6C)アルキル、(2-6C)アルケニル、(2-6C)アルキニル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、(3-6C)シクロアルケニル、又はヘテロアリールであり、

ここで、各(1-6C)アルキル、(2-6C)アルケニル、(2-6C)アルキニル、アリール、(3-6C)シクロアルキル、(3-6C)シクロアルケニル、又はヘテロアリールは、(1-4C)アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 $NR^{A4}R^{A5}$ 、及び(1-4C)アルコキシからなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4、又は5)の置換基によって置換されていてもよく、 RA^4 及び R

30

40

50

A^5 はそれぞれ独立して水素及び (1-4 C) アルキルからなる群より選択され、及び各 R^2 は、独立して $-Y^2-X^2-Z^2$ であり、ここで、

Y^2 は、存在しないか、式 $-[CR^{B1}R^{B2}]_m$ で示される基であり、 m は、1、2、3又は4、から選択される整数であり、 R^{B1} 及び R^{B2} はそれぞれ独立して水素、OH又は(1-2 C) アルキルから選択され、

X^2 は、存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-CH(OR^{B3})-$ 、 $-N(R^{B3})-$ 、 $-N(R^{B3})-C(O)-$ 、 $-N(R^{B3})-C(O)O-$ 、 $-C(O)-N(R^{B3})-$ 、 $-N(R^{B3})C(O)N(R^{B3})-$ 、 $-N(R^{B3})C(NR^{B3})N(R^{B3})-$ 、 $-SO-$ 、 $-S--SO_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^{B3})-$ 、又は $-N(R^{B3})SO_2-$ であり、それぞれ R^{B3} は独立して水素又はメチルから選択され、及び

Z^2 は、水素、(1-6 C) アルキル、(2-6 C) アルケニル、(2-6 C) アルキニル、アリール、(3-6 C) シクロアルキル、(3-6 C) シクロアルケニル又はヘテロアリールから選択され、各 (1-6 C) アルキル、(2-6 C) アルケニル、(2-6 C) アルキニル、アリール、(3-6 C) シクロアルキル、(3-6 C) シクロアルケニル又はヘテロアリールは、(1-4 C) アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 $NR^{B4}R^{B5}$ 、及び (1-4 C) アルコキシからなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4、又は5)の置換基によって置換されていてもよく、 R^{B4} 及び R^{B5} は、それぞれ独立して水素又は(1-2 C) アルキルであり、ただし、 $n=1$ かつ、 T_1 及び T_2 は互いに異なるとき、 R^1 及び R^2 は、両方ともHではなく、 $n=1$ かつ、 T_1 及び T_2 は互いに異なり、 R^1 及び R^2 の一方はHであるとき、 R^1 及び R^2 の他方はメチルではなく、又は $n=2$ かつ、 R^1 及び R^2 の各存在はHであるとき T_1 及び T_2 は両方とも $-C(O)-$ 、又は両方とも $-NH-$ である。) 10

【0408】

31. T_2 は、 $-C(O)-$ である、パラグラフ 30 に記載の方法。

【0409】

32. 各 R^1 は、独立して $-Y^1-X^1-Z^1$ であり、

Y^1 は、存在しないか、又は $-(CRA^1RA^2)_m$ であり、 m は1、2、3又は4であり、 RA^1 と RA^2 はそれぞれ水素又は(1-2 C) アルキルであり、

X^1 は、存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)-C(O)-$ 、 $-C(O)-N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)C(O)N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)C(NRA^3)N(RA^3)-$ 又は $-S-$ であり、各 RA^3 は独立して水素又はメチルであり、及び、 30

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、(1-6 C) アルキル、(2-6 C) アルケニル、(2-6 C) アルキニル、アリール、(3-6 C) シクロアルキル、(3-6 C) シクロアルケニル、又はヘテロアリールであり、各 (1-6 C) アルキル、(2-6 C) アルケニル、(2-6 C) アルキニル、アリール、(3-6 C) シクロアルキル、(3-6 C) シクロアルケニル、及びヘテロアリールは(1-4 C) アルキル、オキソ、ハロ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、 NRA^4RA^5 、及び(1-4 C) アルコキシ、からなる群より選択される1つ以上(例えば、1、2、3、4、又は5)の置換基によって置換されていてもよく、 R^M と RA^5 は、それぞれ独立して水素又は(1-2 C) アルキルである、パラグラフ 30 又は 31 に記載の方法。

【0410】

33. 各 R^1 は、独立して $-Y^1-X^1-Z^1$ であり、

Y^1 は存在しないか、又は $-(CRA^1RA^2)_m$ であり、 m は1、2、3、又は4であり、 RA^1 と R^2 は、それぞれ独立して水素又は(1-2 C) アルキルであり、

X^1 は存在しないか、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)-C(O)-$ 、 $-C(O)-N(RA^3)-$ 、

$-N(RA^3)C(O)N(RA^3)-$ 、 $-N(RA^3)C(NRA^3)N(RA^3)-$ 、又は $-S-$ であり、各 RA^3 は、独立して水素又はメチルであり、及び、

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、(1-6 C) アルキル、アリール、(3-6 C) シクロアルキル、又はヘテロアリールであり、それぞれ (1-6 C) アルキル、アリール、(3-6 C) シクロアルキル、及びヘテロアリールは、(1-4 C 50

）アルキル、ハロ、及びヒドロキシからなる群より選択される1つ以上（例えば、1、2、3、4又は5）の置換基によって置換されていてもよい、パラグラフ30又は31に記載の方法。

【0411】

34. 各 R^1 は独立して $-Y^1-X^1-Z^1$ であり、

Y^1 は存在しないか、式 $-(CR^{A1}R^{A2})_m-$ で示される基であり、 m は、1、2、3又は4であり、 R^{A1} と R^{A2} は、それぞれ独立して水素又は（1-2C）アルキルであり、

X^1 は存在しないか、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(R^{A3})-C(O)-$ 、 $-C(O)-N(R^{A3})-$ であり、各 R^{A3} は水素又はメチルであり、及び、

Z^1 は、さらにオリゴヌクレオチドであるか、又は水素、（1-6C）アルキル、アリール、（3-6C）シクロアルキル、又はヘテロアリールであり、それぞれ（1-6C）アルキル、アリール、（3-6C）シクロアルキル、及びヘテロアリールは、（1-4C）アルキル、ハロ、及びヒドロキシからなる群より選択される1つ以上（例えば、1、2、3、4、又は5）の置換基によって置換されていてもよい、パラグラフ30又は31に記載の方法。

10

【0412】

35. 各 R^1 は、独立して $-Y^1-X^1-Z^1$ であり、

Y^1 は、存在しないか、 $-(CH_2)-$ 、又は $-(CH_2CH_2)-$ であり、

X^1 は、存在しないか、 $-N(R^{A3})-C(O)-$ 、 $-C(O)-N(R^{A3})-$ であり、各 R^{A3} は独立して水素又はメチルであり、及び、

20

Z^1 は、水素又は（1-2C）アルキルである、パラグラフ30又は31に記載の方法。

【0413】

36. 各 R^2 は、独立して $-Y^2-Z^2$ であり、

Y^2 は、存在しないか、 $-(CR^{B1}R^{B2})_m-$ であり、 m は、1、2、3又は4であり、 R^{B1} と R^{B2} はそれぞれ独立して水素又は（1-2C）アルキルであり、及び、

Z^2 は水素又は（1-6C）アルキルである、パラグラフ30から35のいずれか1項に記載の方法。

【0414】

37. 各 R_2 は、水素である、パラグラフ30から36のいずれか1項に記載の方法。

【0415】

38. n は2又は3である、パラグラフ30から37のいずれか1項に記載の方法。

30

【0416】

39. n は1である、パラグラフ30から37のいずれか1項に記載の方法。

【0417】

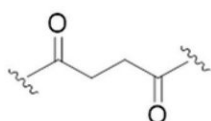
40. 上記リンカーは、グルタミン酸、コハク酸、及び γ -アミノ酪酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基である、パラグラフ1から39のいずれか1項に記載の方法。

【0418】

41. 上記リンカーは、以下の構造である、パラグラフ1から39のいずれか1項に記載の方法。

40

【化48】

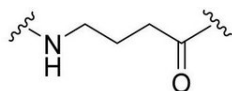


【0419】

42. 上記リンカーは、以下の構造である、パラグラフ1から39のいずれか1項に記載の方法。

50

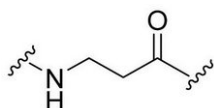
【化 4 9】



【0 4 2 0】

43. 上記リンカーは、以下の構造である、パラグラフ 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 5 0】

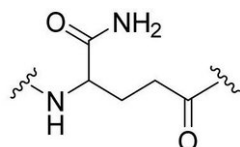


10

【0 4 2 1】

44. 上記リンカーは、以下の構造である、パラグラフ 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 5 1】

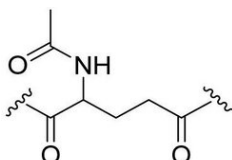


20

【0 4 2 2】

45. 上記リンカーは、以下の構造である、パラグラフ 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 5 2】

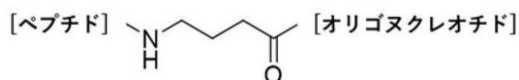


30

【0 4 2 3】

46. 上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、パラグラフ 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

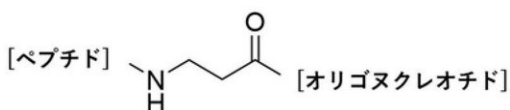
【化 5 3】



【0 4 2 4】

47. 上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、パラグラフ 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 5 4】



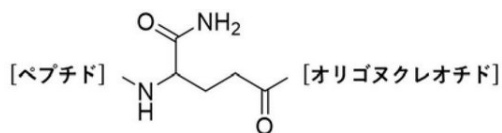
40

【0 4 2 5】

48. 上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、パラグラフ 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

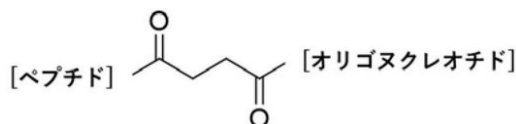
【化 5 5】



【0 4 2 6】

49. 上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、パラグラフ 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 5 6】

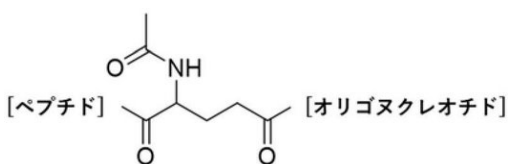


10

【0 4 2 7】

50. 上記複合体は、以下の構造を含むか、又は以下の構造である、パラグラフ 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【化 5 7】



20

【0 4 2 8】

51. 上記オリゴヌクレオチドは、その3'末端で上記リンカー又は上記ペプチドに結合する、パラグラフ 1 から 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0 4 2 9】

52. 上記複合体は、ペプチド Ac-RBRRBRFQILYBRBR の C 末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した 3' 末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号 106)、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号 107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号 108)、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号 109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3' (配列番号 110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号 111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号 112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号 113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号 114)、5'-CACCCACCAUACCCUCUGUG-3' (配列番号 115)、もしくは 5'-AUC AUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号 116)、又はそのチミン置換アナログを含むか、又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOH が存在する場合、-CONH₂ で置換される、パラグラフ 1 に記載の方法。

30

【0 4 3 0】

53. 上記複合体は、ペプチド Ac-RBRRBRFQILYBRBR の C 末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した 3' 末端を有する 5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号 106) を含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOH が存在する場合、-CONH₂ で置換される、パラグラフ 5 2 に記載の方法。

40

【0 4 3 1】

54. 上記複合体は、ペプチド Ac-RBRRBRFQILYBRBR の C 末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した 3' 末端を有する 5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号 109)、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOH が存在する場合、-CONH₂ で置換される、パラグラフ 5 2 に記載の方法。

50

【0432】

55. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、パラグラフ52に記載の方法。

【0433】

56. 上記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）、5'-ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGC-3'（配列番号107）、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3'（配列番号108）、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3'（配列番号109）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号111）、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号112）、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3'（配列番号113）、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3'（配列番号114）、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、もしくは5'-AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3'（配列番号116）又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、パラグラフ1に記載の方法。

【0434】

57. 上記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）を含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、パラグラフ56に記載の方法。

【0435】

58. 上記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3'（配列番号109）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、パラグラフ56に記載の方法。

【0436】

59. 上記複合体は、ペプチドRBRRBRFQILYBRBR-NH₂のN末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、パラグラフ56に記載の方法。

【0437】

60. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号106）、5'-ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGC-3'（配列番号107）、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3'（配列番号108）、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3'（配列番号109）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号111）、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号112）、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3'（配列番号113）、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3'（配列番号114）、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、もしくは5'-AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3'（配列番号116）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、パラグラフ1に記載の方法。

【0438】

61. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3'（配列番号106）を含む又ははからなる、パラグラフ60に記載の方法。

【0439】

62. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3'（配列番号109）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、パラグラフ60に記載の方法。

【0440】

63. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にγ-アミノ酪酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、パラグラフ60に記載の方法。

【0441】

64. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3'（配列番号106）、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3'（配列番号107）、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3'（配列番号108）、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3'（配列番号109）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3'（配列番号110）、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号111）、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3'（配列番号112）、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3'（配列番号113）、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3'（配列番号114）、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、もしくは5'-AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCA-3'（配列番号116）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、パラグラフ1に記載の方法。

【0442】

65. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3'（配列番号106）を含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、パラグラフ64に記載の方法。

【0443】

66. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3'（配列番号109）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、パラグラフ64に記載の方法。

【0444】

67. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にグルタミン酸残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなり、ここで、上記グルタミン酸残基中に遊離の-COOHが存在する場合、-CONH₂で置換される、パラグラフ64に記載の方法。

【0445】

68. 上記リンカーは、以下の構造である、パラグラフ52から59及び64から67のいずれか1項に記載の方法。

10

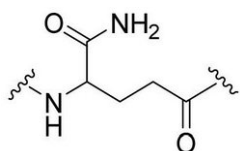
20

30

40

50

【化 5 8】



【0 4 4 6】

69. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号108)、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUC AUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号116)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、パラグラフ1に記載の方法。

10

【0 4 4 7】

70. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又ははからなる、パラグラフ69に記載の方法。

20

【0 4 4 8】

71. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、パラグラフ69に記載の方法。

【0 4 4 9】

72. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYBRBRのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、パラグラフ69に記載の方法。

30

【0 4 5 0】

73. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する、5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)、5'-ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC-3' (配列番号107)、5'-CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC-3' (配列番号108)、5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUUC-3' (配列番号109)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG-3' (配列番号110)、5'-ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号111)、5'-CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG-3' (配列番号112)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG-3' (配列番号113)、5'-AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAAAG-3' (配列番号114)、5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3' (配列番号115)、もしくは5'-AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAA-3' (配列番号116)、又はそのチミン置換アナログを含む又ははからなる、パラグラフ1に記載の方法。

40

【0 4 5 1】

74. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3' (配列番号106)を含む又ははからなる、パラグラフ73に記載の方法。

50

【0452】

75. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC-3'（配列番号109）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる、パラグラフ73に記載の方法。

【0453】

76. 上記複合体は、ペプチドAc-RBRRBRFQILYRBHBHのC末端にβ-アラニン残基を介して共有結合した3'末端を有する5'-CACCCACCAUCACCCUCUGUG-3'（配列番号115）、又はそのチミン置換アナログを含む又はからなる、パラグラフ73に記載の方法。

10

【0454】

77. 上記オリゴヌクレオチドは、モルホリノである、パラグラフ1から76のいずれか1項に記載の方法。

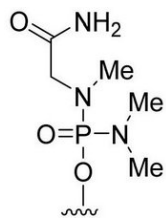
【0455】

78. 全てのモルホリノヌクレオシド間結合は、-P(O)(NMe₂)O-である、パラグラフ77に記載の方法。

【0456】

79. 上記ヌクレオチドは、その5'末端として下記の基を含む、パラグラフ78に記載の方法。

【化59】



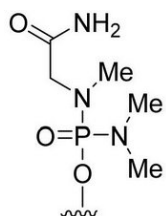
20

【0457】

80. 上記ヌクレオチドは、その5'末端として下記の基を含む、パラグラフ1から78のいずれか1項に記載の方法。

30

【化60】



【0458】

81. 上記複合体は、腹腔内投与される、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

40

【0459】

82. 上記複合体は、注入により投与される、パラグラフ81に記載の方法。

【0460】

83. 上記複合体は、静注によって投与される、パラグラフ82に記載の方法。

【0461】

84. 上記対象は、エクソン51スキッピングが適応となる、上記のパラグラフのいずれか1項に記載の方法。

【0462】

85. 上記複合体は、毎週から3ヶ月ごとの頻度で上記対象に投与される、上記のパラ

50

グラフのいずれか 1 項に記載の方法。

【0463】

86. 上記複合体は、毎週から毎月の頻度で上記対象に投与される、上記のパラグラフのいずれか 1 項に記載の方法。

【0464】

87. 上記頻度は、毎週、隔週、又は毎月である、パラグラフ 86 に記載の方法。

【0465】

88. 上記頻度は 3 ヶ月ごとである、パラグラフ 1 から 84 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0466】

89. 40 mg/kg から 60 mg/kg、30 mg/kg から 50 mg/kg、30 mg/kg から 40 mg/kg、40 mg/kg から 50 mg/kg、50 mg/kg から 60 mg/kg、35 mg/kg から 45 mg/kg、45 mg/kg から 55 mg/kg、35 mg/kg から 55 mg/kg、30 mg/kg から 45 mg/kg、35 mg/kg から 50 mg/kg、40 mg/kg から 55 mg/kg、45 mg/kg から 60 mg/kg、1 mg/kg から 30 mg/kg、1 mg/kg から 20 mg/kg、5 mg/kg から 25 mg/kg、10 mg/kg から 30 mg/kg、1 mg/kg から 15 mg/kg、5 mg/kg から 20 mg/kg、10 mg/kg から 25 mg/kg、15 mg/kg から 30 mg/kg、1 mg/kg から 10 mg/kg、5 mg/kg から 15 mg/kg、10 mg/kg から 20 mg/kg、15 mg/kg から 25 mg/kg、20 mg/kg から 30 mg/kg、1 mg/kg から 25 mg/kg、4 mg/kg から 20 mg/kg、6 mg/kg から 15 mg/kg、又は 8 mg/kg から 10 mg/kg の複合体が投与される、上記のパラグラフのいずれか 1 項に記載の方法。

【0467】

90. 1 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、30 mg/kg、35 mg/kg、40 mg/kg、45 mg/kg、50 mg/kg、又は 60 mg/kg の複合体が投与される、上記のパラグラフのいずれか 1 項に記載の方法。

【0468】

91. 1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、又は 20 mg/kg の複合体が投与される、パラグラフ 90 に記載の方法。

【0469】

92. 上記方法は、例えば、心筋症（例えば、拡張型、肥大型、又は拘束型心筋症）、心不全及び／又は心臓不整脈を含む DMD の心臓への影響に対する治療に使用するものである、上記のパラグラフのいずれか 1 項に記載の方法。

【0470】

他の実施形態は特許請求の範囲に含まれる。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

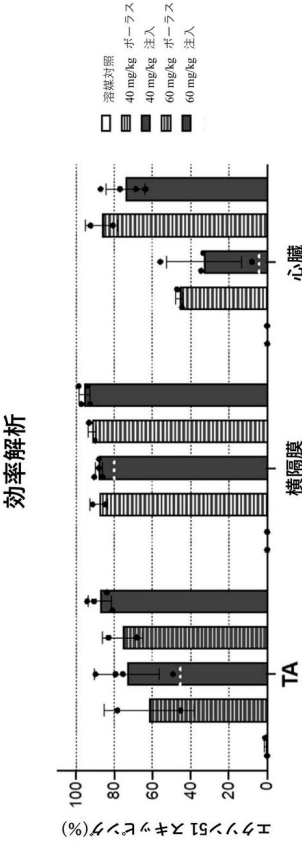
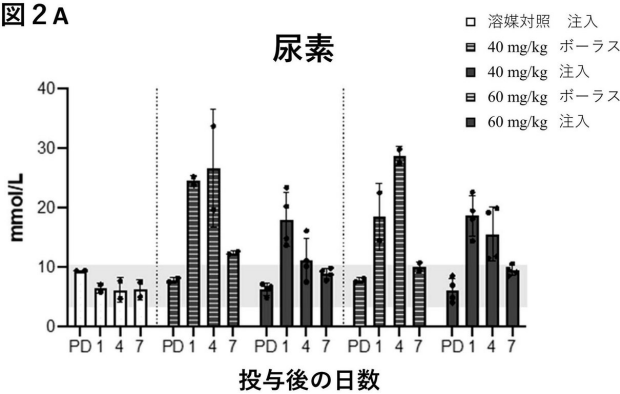


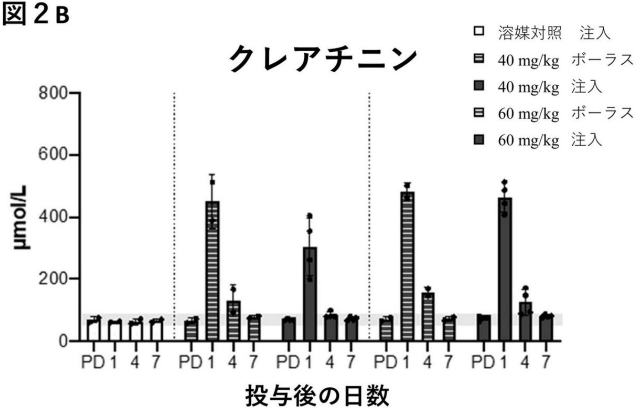
図 1

【図 2 A】

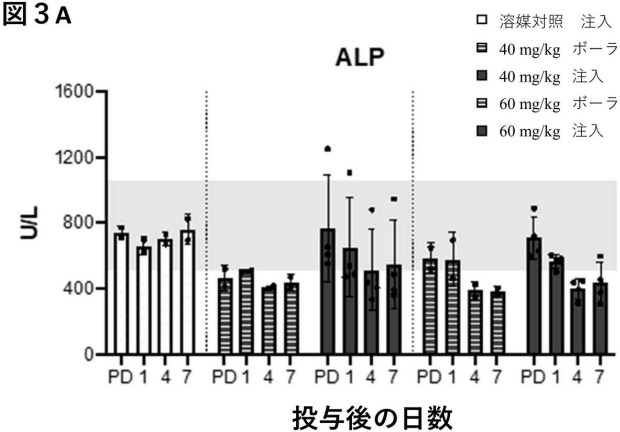


10

【図 2 B】



【図 3 A】



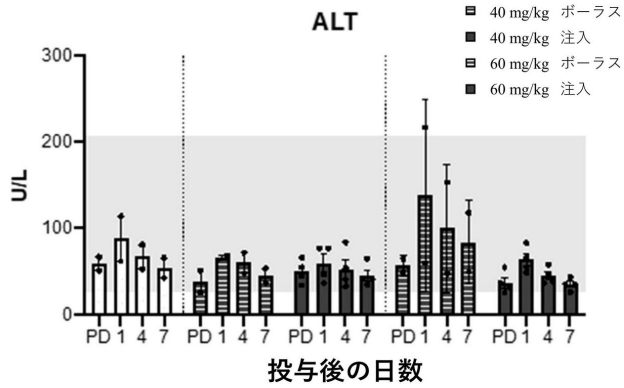
30

40

50

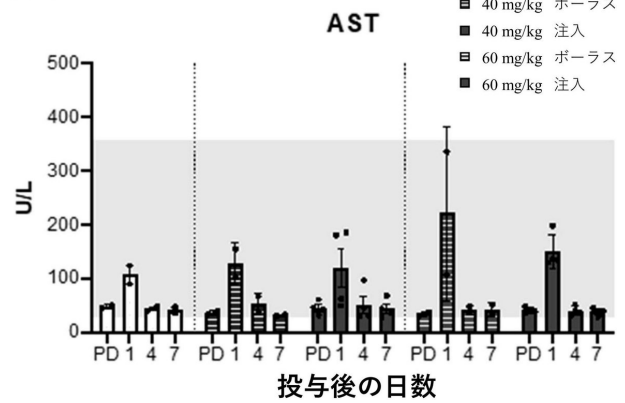
【図 3 B】

図 3 B



【図 3 C】

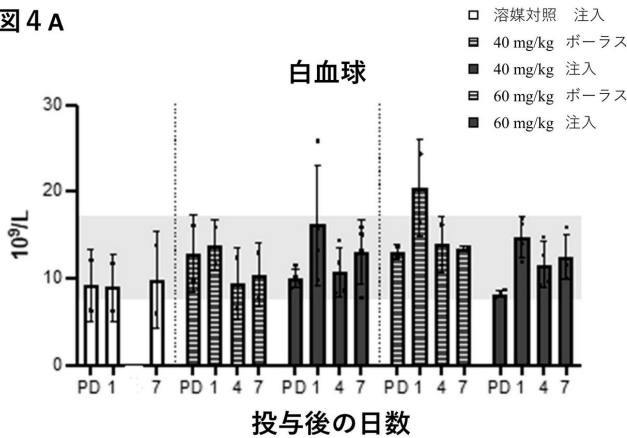
図 3 C



10

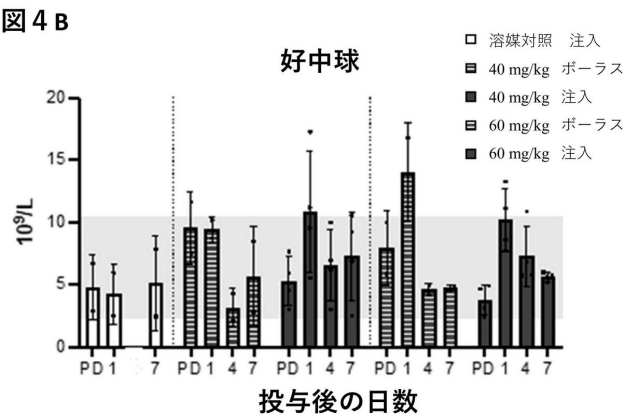
【図 4 A】

図 4 A



【図 4 B】

図 4 B



20

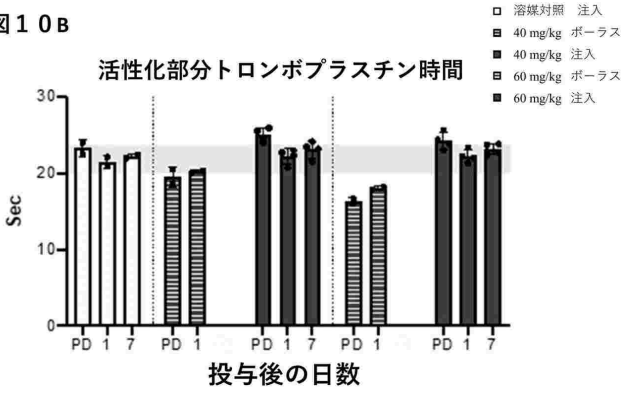
30

40

50

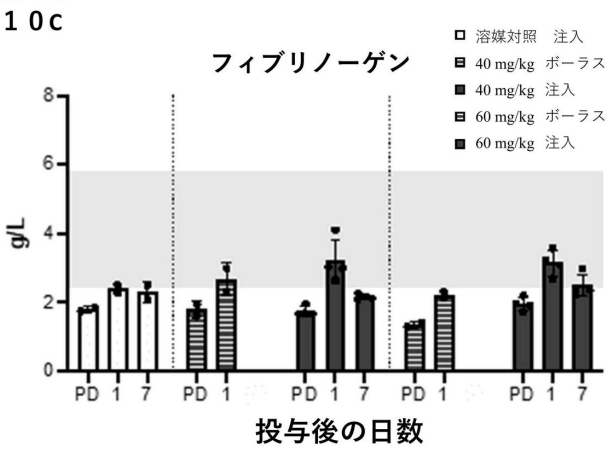
【図 1 0 B】

図 1 0 B



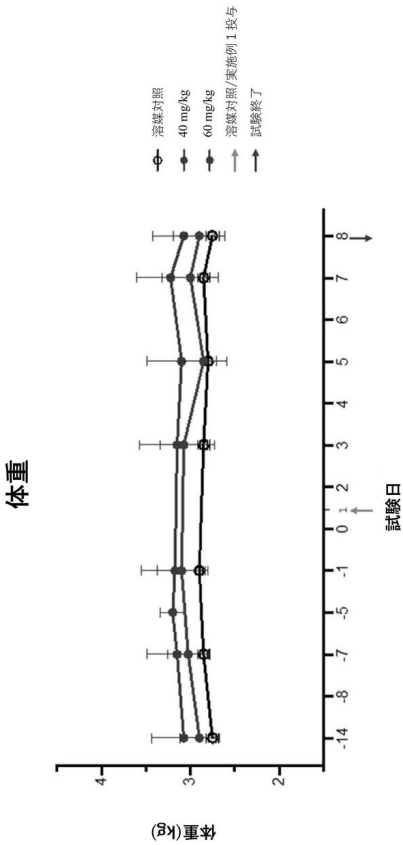
【図 1 0 C】

図 1 0 c



【図 1 1】

図 1 1



【図 1 2 A - 1 2 B】

図 1 2 A

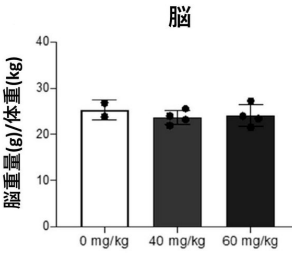
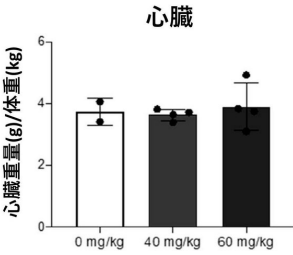


図 1 2 B



10

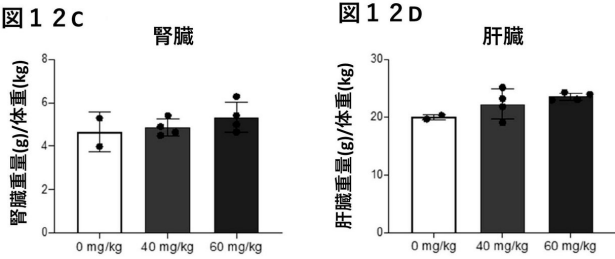
20

30

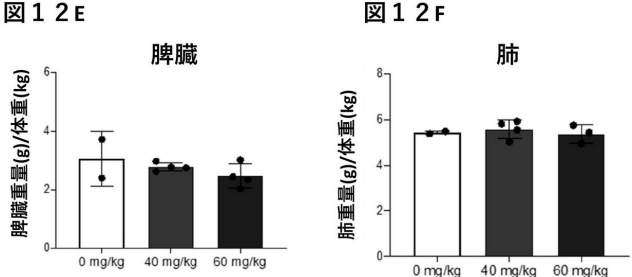
40

50

【図 1 2 C - 1 2 D】

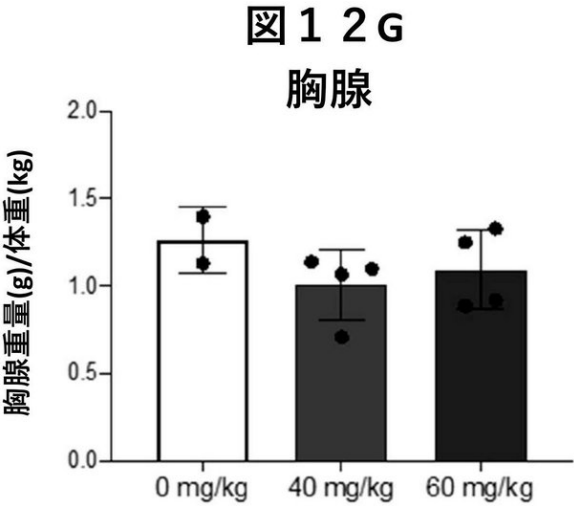


【図 1 2 E - 1 2 F】

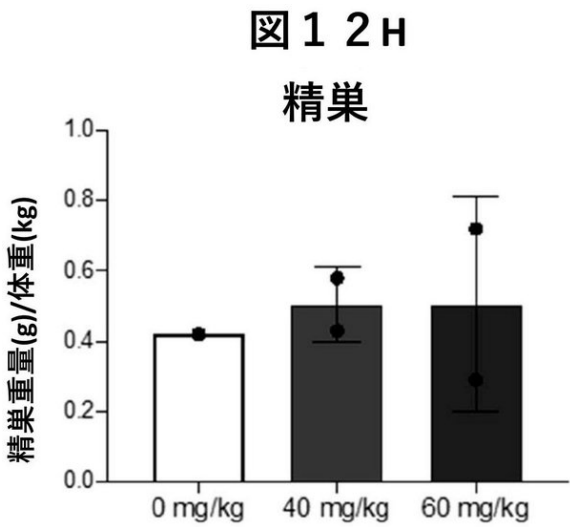


10

【図 1 2 G】

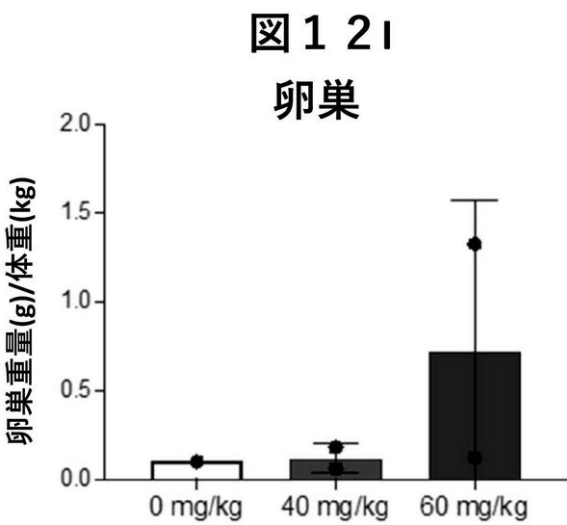


【図 1 2 H】

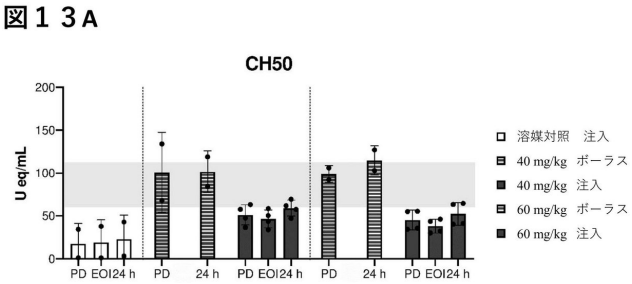


20

【図 1 2 I】



【図 1 3 A】

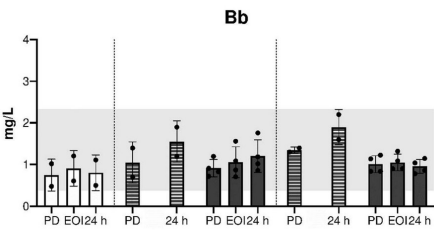


30

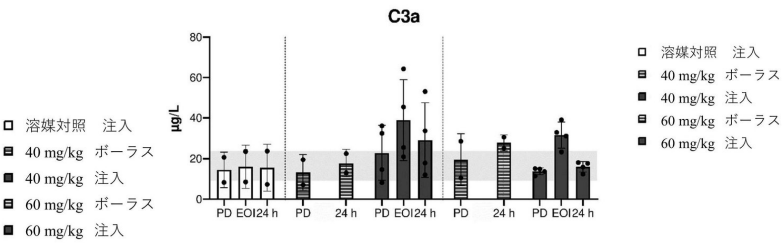
40

50

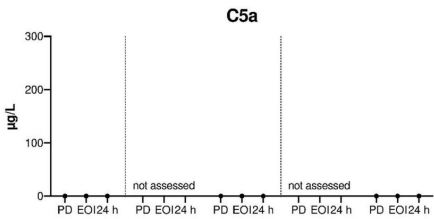
【図 1 3 B】
図 1 3 B



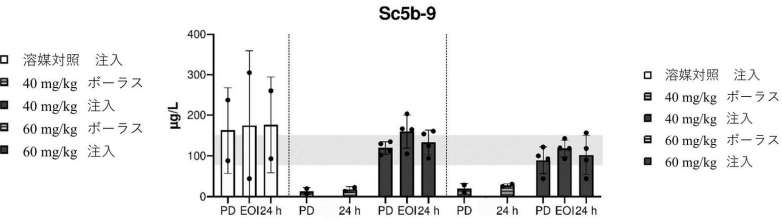
【図 1 3 C】
図 1 3 c



【図 1 3 D】
図 1 3 D



【図 1 3 E】
図 1 3 E



10

20

30

40

50

【図 1 4】

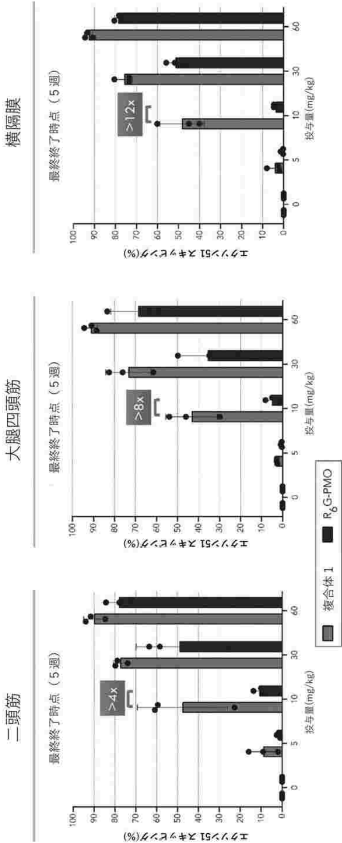


図 1 4

【図 1 6】

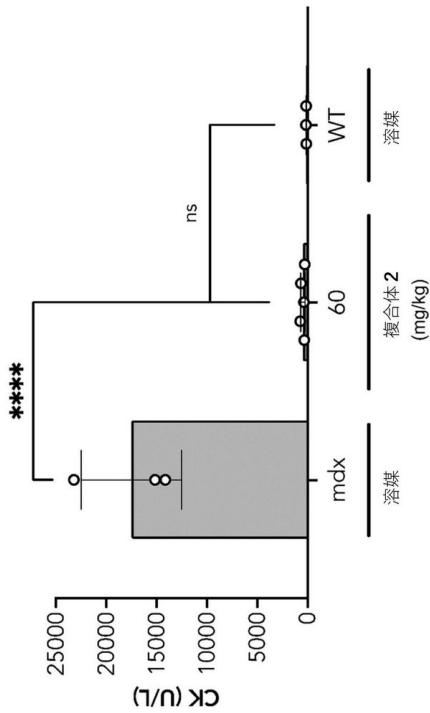


図 1 6

【図 1 5】

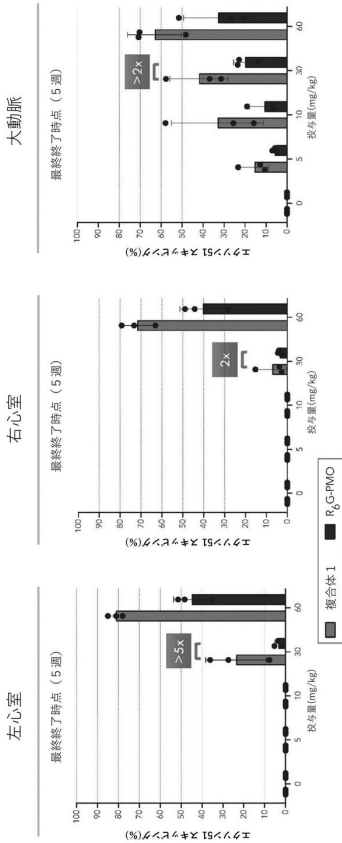


図 1 5

【図 1 7 A - 1 7 B】

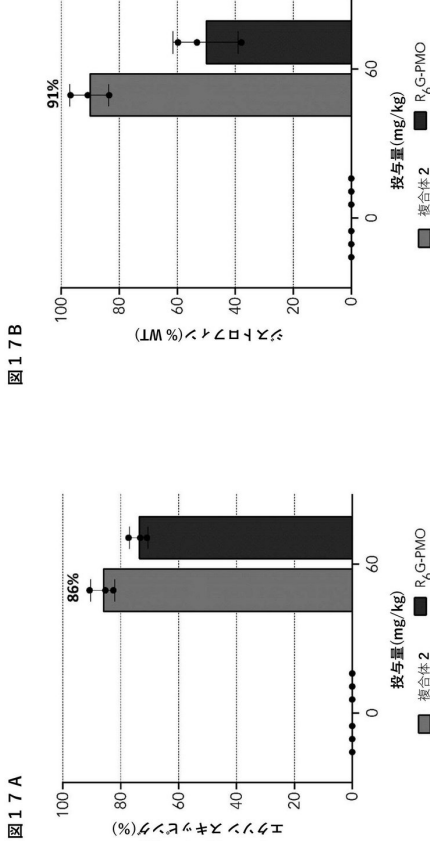


図 1 7 A

図 1 7 B

10

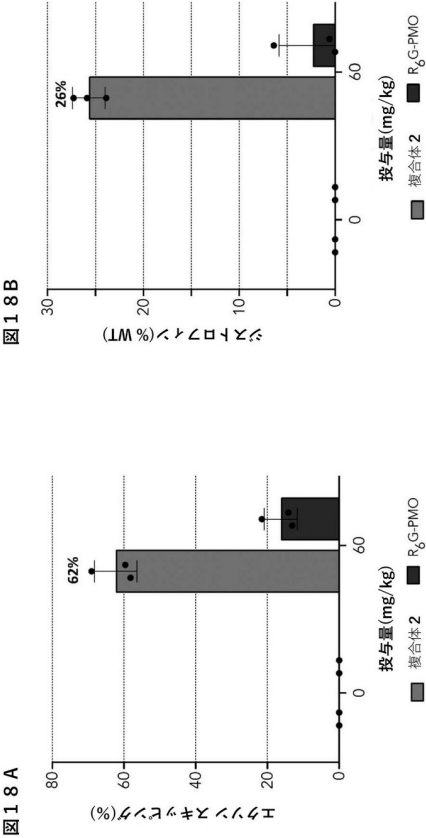
20

30

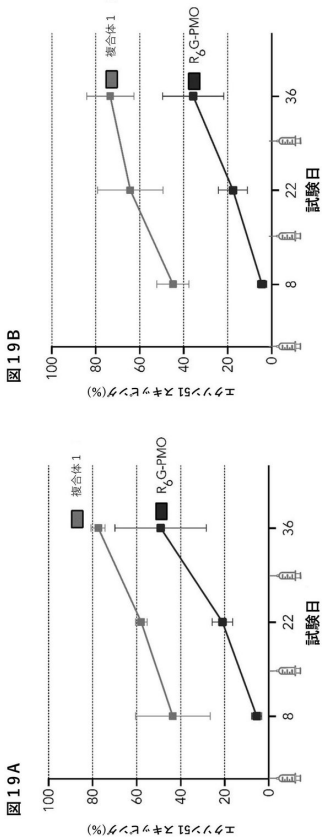
40

50

【図 18 A - 18 B】



【図 19 A - 19 B】



【配列表】

2024511955000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/20061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 38/16; A61K 47/64; A61P 21/00; C12N 15/11; C12Q 1/68; C07K 14/00 (2022.01)

ADD.

CPC - INV. A61K 38/16; A61K 47/64; A61P 21/00; C12N 15/11; C12Q 1/68; A61K 48/0075; C07K 7/04; C07K 14/00

ADD. C12N 2320/53

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	WO 2020/030927 A1 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) 13 February 2020; Page 3, 7, 9, 10, 12-18, 22-24, 26, 29, 31, 43	1-19, 23-27, 30, 32-34, 81-92
Y	US 2019/0177723 A1 (SAREPTA THERAPEUTICS, INC.) 13 June 2019; Paragraph [0012], [0014], [0017], [0054], [0177], [0178], [0292], [0784]	1-19, 23-27, 30, 32-34, 81-92
Y	WO 2020/115494 A1 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) 11 June 2020; Page 2-4, 8	30, 32-34
Y	WO 2015/161255 A1 (BOARD OF REGENTS OF THE NEVADA SYSTEM OF HIGHER EDUCATION, ON BEHALF OF THE UNIVERSITY OF NEVADA, RENO) 22 October 2015; Page 57	88

☐ 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

01 July 2022 (01.07.2022)

Date of mailing of the international search report

SEP 02 2022

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

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US22/20081
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item I.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: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US22/20061
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.: 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:	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
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: -***Please See Supplemental Page-***		
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.: Group I+, Claims 1-92; SEQ ID NO: 106 (oligonucleotide sequence); SEQ ID NO: 1 (cationic domain); SEQ ID NO: 20 (hydrophobic domain); SEQ ID NO: 31 (peptide sequence); [peptide]-[linker]-[oligonucleotide] (structure); T1-(CR1R2)n-T2 wherein T1 is NH-, T2 is -NH-, n is 1, Y1 is absent, X1 is absent, Z1 is an oligonucleotide, Y2 is absent, X2 is absent, Z2 is hydrogen (linker)	
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.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/20061

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-92; SEQ ID NO: 106 (oligonucleotide sequence); SEQ ID NO: 1 (cationic domain); SEQ ID NO: 20 (hydrophobic domain); SEQ ID NO: 31 (peptide sequence); [peptide]-[linker]-[oligonucleotide] (structure); T1-(CR1R2)n-T2 wherein T1 is NH-, T2 is -NH-, n is 1, Y1 is absent, X1 is absent, Z1 is an oligonucleotide, Y2 is absent, X2 is absent, Z2 is hydrogen (linker) are directed towards methods of treating a subject having Duchenne muscular dystrophy.

The methods of Claims 1, 2 (in-part), 3-4, 5-19 (each in-part), 23-27 (each in-part), 30 (in-part), 32-34 (each in-part), 39 (in-part), 81-92 (each in-part) are believed to encompass the first named invention of Group I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 106 (first exemplary oligonucleotide sequence); SEQ ID NO: 1 (first exemplary cationic domain); SEQ ID NO: 20 (first exemplary hydrophobic domain); SEQ ID NO: 31 (first exemplary peptide sequence); [peptide]-[linker]-[oligonucleotide] (first exemplary structure); T1-(CR1R2)n-T2 wherein T1 is NH-, T2 is -NH-, n is 1, Y1 is absent, X1 is absent, Z1 is an oligonucleotide, Y2 is absent, X2 is absent, Z2 is hydrogen (first exemplary linker).

Applicant is invited to elect additional oligonucleotide sequence(s), cationic domain(s), hydrophobic domain(s), peptide sequence(s), structure(s) and linker(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), to be searched. Additional oligonucleotide sequence(s), cationic domain(s), hydrophobic domain(s), peptide sequence(s), structure(s) and linker(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected oligonucleotide sequence(s), cationic domain(s), hydrophobic domain(s), peptide sequence(s), structure(s) and linker(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 107 (oligonucleotide sequence); SEQ ID NO: 2 (cationic domain); SEQ ID NO: 21 (hydrophobic domain); SEQ ID NO: 32 (peptide sequence).

No technical features are shared between the oligonucleotide sequences, cationic domains, hydrophobic domains, peptide sequences, structures and linkers of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a method of treating a subject having Duchenne muscular dystrophy, the method comprising administering 1 mg/kg to 60 mg/kg of a conjugate of an oligonucleotide and a peptide covalently bonded or linked via a linker to the oligonucleotide, the peptide comprising at least one cationic domain comprising at least 4 amino acid residues and at least one hydrophobic domain comprising at least 3 amino acid residues, provided that the peptide comprises a total of 7 to 40 amino acid residues, and provided that the at least one cationic domain comprises a beta-alanine residue in combination with arginine and/or histidine residues; and the oligonucleotide comprising a total of 12 to 40 contiguous nucleobases, wherein at least 12 contiguous nucleobases are complementary to a target sequence in a human dystrophin gene; these shared technical features are previously disclosed by US 9,862,946 B2 (SAREPTA THERAPEUTICS, INC.) (hereinafter 'Sarepta') in view of WO 2020/030927 A1 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) (hereinafter 'Oxford').

Sarepta discloses a method of treating a subject having Duchenne muscular dystrophy (a method of treating a subject having Duchenne muscular dystrophy; column 3, lines 9-15; column 116, lines 22-24), the method comprising administering 1 mg/kg to 60 mg/kg of a conjugate of an oligonucleotide (the method comprising administering 1 mg/kg to 60 mg/kg of a conjugate of an oligonucleotide; column 3, lines 9-15; column 148, lines 12-19) and a peptide covalently bonded or linked via a linker to the oligonucleotide (a peptide covalently bonded or linked via a linker to the oligonucleotide; abstract; column 13, lines 54-55), and the oligonucleotide comprising a total of 12 to 40 contiguous nucleobases, wherein at least 12 contiguous nucleobases are complementary to a target sequence in a human dystrophin gene (oligonucleotide comprises CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (the oligonucleotide comprising a total of 12 to 40 contiguous nucleobases, wherein at least 12 contiguous nucleobases are complementary to a target sequence in a human dystrophin gene); table 1).

Sarepta does not disclose the peptide comprising at least one cationic domain comprising at least 4 amino acid residues and at least one hydrophobic domain comprising at least 3 amino acid residues, provided that the peptide comprises a total of 7 to 40 amino acid residues, and provided that the at least one cationic domain comprises a beta-alanine residue in combination with arginine and/or histidine residues.

Oxford discloses wherein the peptide comprising at least one cationic domain comprising at least 4 amino acid residues and at least one hydrophobic domain comprising at least 3 amino acid residues, provided that the peptide comprises a total of 7 to 40 amino acid residues, and provided that the at least one cationic domain comprises a beta-alanine residue in combination with arginine and/or histidine residues (peptide comprises RBRBRBFQILYRBRBR (the peptide comprising at least one cationic domain comprising at least 4 amino acid residues and at least one hydrophobic domain comprising at least 3 amino acid residues, provided that the peptide comprises a total of 7 to 40 amino acid residues, and provided that the at least one cationic domain comprises a beta-alanine residue in combination with arginine and/or histidine residues); page 18, eighth paragraph).

It would have been a matter of obvious experimentation to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Sarepta, to include the peptide comprising at least one cationic domain comprising at least 4 amino acid residues and at least one hydrophobic domain comprising at least 3 amino acid residues, provided that the peptide comprises a total of 7 to 40 amino acid residues, and provided that the at least one cationic domain comprises a beta-alanine residue in combination with arginine and/or histidine residues, as disclosed by Oxford, in order to provide a superior conjugate for treating Duchenne muscular dystrophy.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Sarepta and Oxford references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A
C 0 7 K	2/00 (2006.01)	C 0 7 K	2/00	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(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,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,
LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO
,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,Z
M,ZW

ポレイテッド。

- (72)発明者 ブレイスガードル, ソニア
 アメリカ 0 2 1 1 6 マサチューセッツ ボストン バークレー ストリート 2 0 0 1 8階 シー
 ／オー ペプゲン インコーポレイテッド。
- (72)発明者 ホランド, アシュリング
 アメリカ 0 2 1 1 6 マサチューセッツ ボストン バークレー ストリート 2 0 0 1 8階 シー
 ／オー ペプゲン インコーポレイテッド。
- (72)発明者 ゲンヌー, スミタ
 アメリカ 0 2 1 1 6 マサチューセッツ ボストン バークレー ストリート 2 0 0 1 8階 シー
 ／オー ペプゲン インコーポレイテッド。

F ターム (参考) 4C076 BB13 BB21 BB40 EE59 FF34
 4C084 AA13 MA56 MA65 MA66 NA05 NA11 ZA36 ZA94
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA56 MA65 MA66 NA05 NA11
 ZA36 ZA94
 4H045 AA10 AA30 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 BA54 EA20
 FA34