

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-532464
(P2024-532464A)

(43)公表日 令和6年9月5日(2024.9.5)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 7 6
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00		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 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全267頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-513758(P2024-513758)	(71)出願人	523365620	エントラーダ セラピューティクス, インコーポレイティド アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 2 1 0, ボストン, ワン デザイン センター プレイス, スイート 1 7 - 5 0 0	
(86)(22)出願日	令和4年8月30日(2022.8.30)				
(85)翻訳文提出日	令和6年4月2日(2024.4.2)				
(86)国際出願番号	PCT/US2022/075691				
(87)国際公開番号	WO2023/034817				
(87)国際公開日	令和5年3月9日(2023.3.9)	(74)代理人	100099759	弁理士 青木 篤	
(31)優先権主張番号	63/239,645				
(32)優先日	令和3年9月1日(2021.9.1)	(74)代理人	100123582		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	63/239,671	(74)代理人	100117019		
(32)優先日	令和3年9月1日(2021.9.1)			弁理士 渡辺 陽一	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100141977		
(31)優先権主張番号	63/290,960				
		(74)代理人	100138210		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいてエクソン44をスキッピングするための化合物及び方法

(57)【要約】
細書に様々な実施形態で記載されるのは、(a)環状ペプチドと、(b)アンチセンス化合物とを含む組成物であり、当該アンチセンス化合物は、pre-mRNA配列中のDMD遺伝子のエクソン44を標的とする。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化合物であって、

(a) 環状ペプチドと、

(b) pre-mRNA 配列中の DMD 遺伝子のエクソン 44 の少なくとも一部を含む標的配列に対して相補的であるアンチセンス化合物 (AC) とを含む、前記化合物。

【請求項 2】

前記 AC が、

ホスホロチオエート (PS) ヌクレオチド、ホスホロジアミデートモルホリノヌクレオチド (PMO)、ロック核酸 (LNA)、ペプチド核酸 (PNA)、2'-O-メチル (2'-OMe) 修飾骨格を含むヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル (2'-MOE) ヌクレオチド、2', 4' 拘束エチル (cEt) ヌクレオチド、または 2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノ核酸 (2'-F-ANA) を含む少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたは核酸を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記 AC が、15～30 個の核酸を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

前記環状ペプチドが、前記 AC の 3' 末端にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

前記環状ペプチドが、前記 AC の 5' 末端にコンジュゲートされている、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記環状ペプチドが、前記 AC の骨格にコンジュゲートされている、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 7】

前記環状ペプチドを前記 AC にコンジュゲートさせるリンカーを更に含む、請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8】

前記リンカーが、前記 AC の 5' 末端に共有結合している、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 9】

前記リンカーが、前記 AC の 3' 末端に共有結合している、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 10】

前記リンカーが、前記 AC の骨格に共有結合している、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 11】

前記リンカーが、前記環状ペプチド上のアミノ酸残基の側鎖に共有結合している、請求項 7～10 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 12】

前記リンカーが、二価または三価の C₁～C₅₀ アルキレンであり、ここで、1～25 個のメチレン基が、任意選択で、かつ独立して、

—N(H)—、—N(C₁—C₄ アルキル)—、—N(シクロアルキル)—、—O—、—C(O)—、—C(O)O—、—S—、—S(O)—、—S(O)₂—、—S(O)₂N(C₁—C₄ アルキル)—、—S(O)₂N(シクロアルキル)—、—N(H)C(O)—、—N(C₁—C₄ アルキル)C(O)—、—N(シクロアルキル)C(O)—、—C(O)N(H)—、—C(O)N(C₁—C₄ アルキル)、—C(O)N(シクロアルキル)、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはシクロアルケニルによって置き換えられている、請求項 7～11 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 13】

前記リンカーが、

10

20

30

40

50

(i) 1つ以上のDもしくはLアミノ酸残基であって、各々が任意選択で置換されている、前記アミノ酸残基；

(ii) 任意選択で置換されているアルキレン；

(iii) 任意選択で置換されているアルケニレン；

(iv) 任意選択で置換されているアルキニレン；

(v) 任意選択で置換されているカルボシクリル；

(vi) 任意選択で置換されているヘテロシクリル；

(vii) 1つ以上の $-(R^1-J-R^2)-z-$ サブユニットであって、式中、 R^1 及び R^2 の各々が、各場合において、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボシクリル及びヘテロシクリルから独立して選択され、各Jが、独立して、C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S及びOであり、式中、 R^3 が、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル及びヘテロシクリルから独立して選択され、これらが各々任意選択で置換されており、zが1～50の整数である、前記サブユニット；

(viii) $-(R^1-J)-z-$ もしくは $(J-R^1)-z-$ であって、式中、各 R^1 が、各場合において、独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボシクリルもしくはヘテロシクリルであり、各Jが、独立して、C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、SもしくはOであり、式中、 R^3 が、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリルもしくはヘテロシクリルであり、これらが各々任意選択で置換されており、zが1～50の整数である前記 $-(R^1-J)-z-$ もしくは前記 $(J-R^1)-z-$ ；または

(ix) それらの組み合わせ

を含む、請求項7～12のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項14】

前記リンカーが、

(i) β アラニン及びリジン残基、

(ii) $-(J-R^1)-z$ 、

(iii) $-(J-R^2)-x$ 、または

(iv) それらの組み合わせ

を含む、請求項13に記載の化合物。

【請求項15】

R^1 及び R^2 の各々が独立してアルキレンであり、各JがOであり、各xが、独立して、1～20の整数であり、各zが、独立して、1～20の整数である、請求項13または14に記載の化合物。

【請求項16】

前記リンカーが、

(i) $-(OCH_2CH_2)_x-$ サブユニットであって、式中、xが1～20の整数である、前記サブユニット；

(ii) グリシン、 β -アラニン、4-アミノ酪酸、5-アミノペンタン酸もしくは6-アミノペンタン酸の1つ以上の残基、またはそれらの組み合わせ；あるいは

(iii) (i) と (ii) との組み合わせ

を含む、請求項7～11のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項17】

前記リンカーが、構造：

10

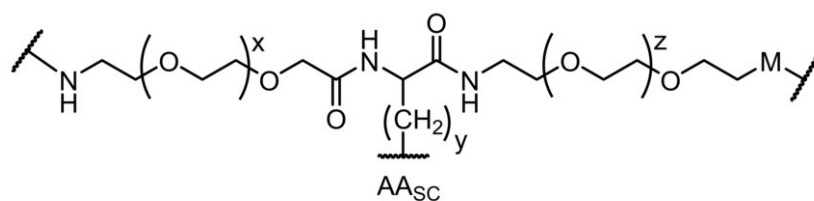
20

30

40

50

【化 1】



を有し、式中、

x が 1 ～ 20 の整数であり、

y が 1 ～ 5 の整数であり、

z が 1 ～ 20 の整数であり、

M が結合部分であり、

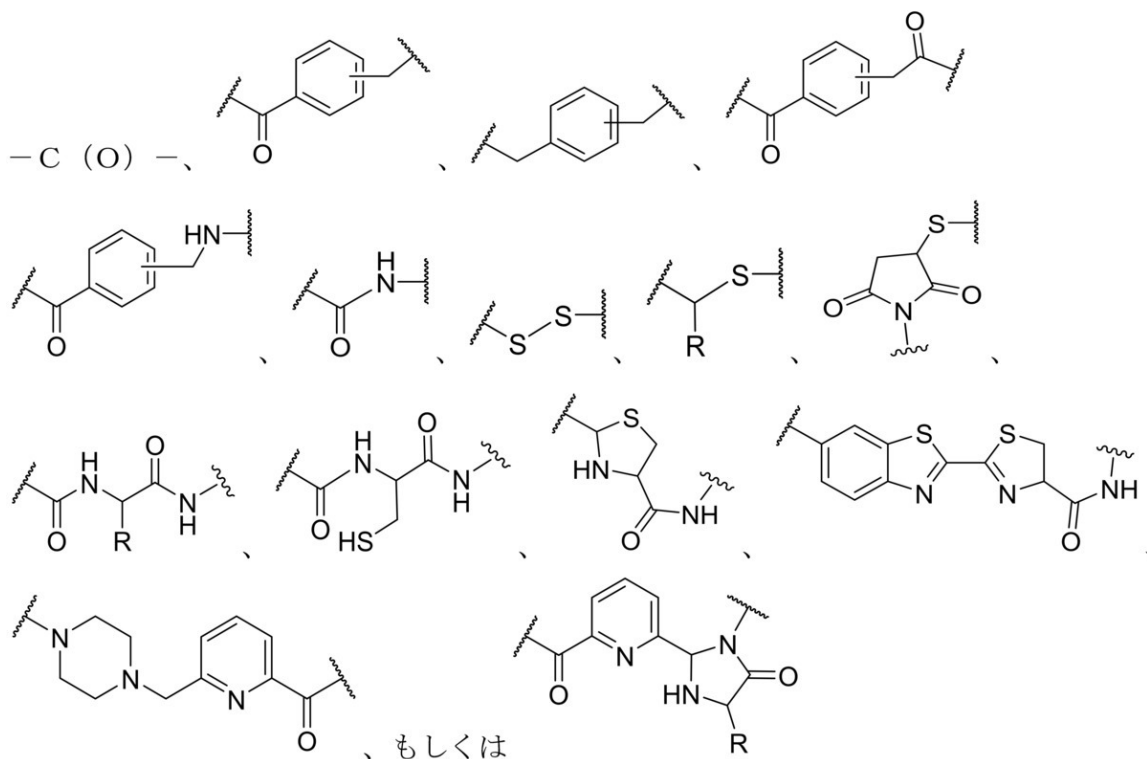
AA_{SC} が、前記環状ペプチドのアミノ酸残基である、

請求項 7 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 18】

M が、

【化 2】



であり、式中、R が、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリルもしくはヘテロシクリルである；または

M が、

10

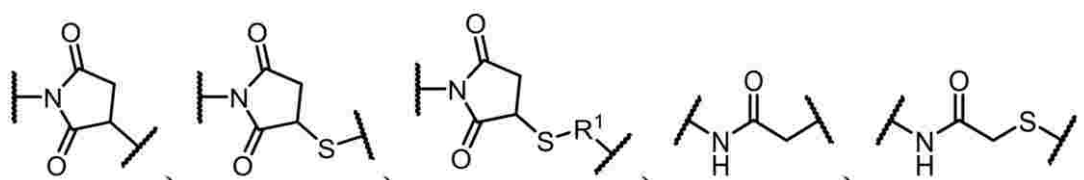
20

30

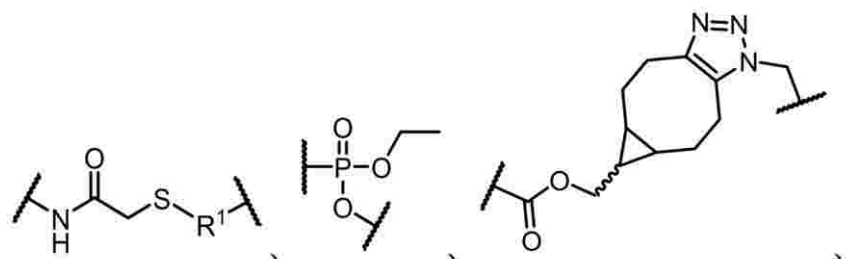
40

50

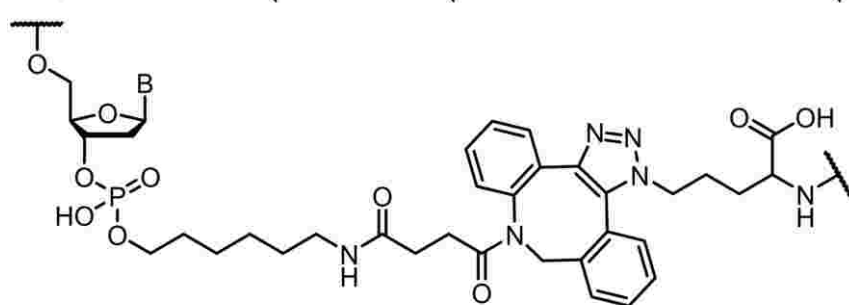
【化 3】



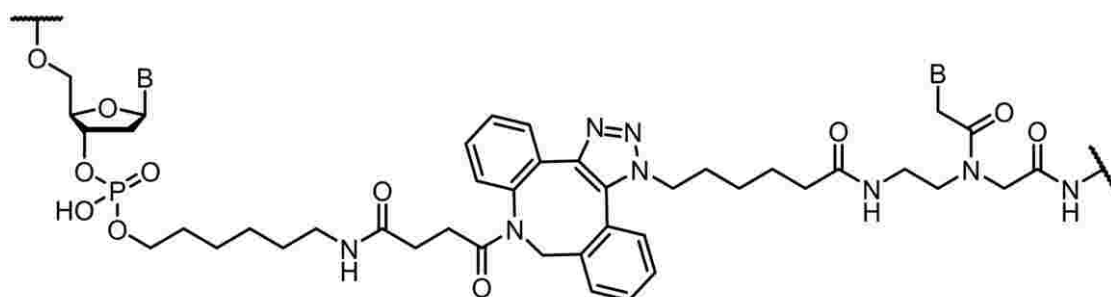
10



20

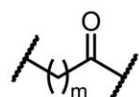


、もしくは



30

であり、式中、R¹が、アルキレン、シクロアルキル、もしくは
【化 4】



であり、mが0～10であり、各Rが、独立して、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリルもしくはヘテロシクリルであり、各Bが、核酸塩基から独立して選択される、

40

請求項17に記載の化合物。

【請求項19】

Mが-C(O)-である、請求項18に記載の化合物。

【請求項20】

zが11である、請求項17～19のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項21】

xが1である、請求項17～20のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項22】

前記リンカーのアミノ基において前記リンカーにコンジュゲートされている環外ペプチ

50

ド (EP)

を含む、請求項 17～21 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 23】

前記 EP が、2～10 個のアミノ酸残基を含む、請求項 22 に記載の化合物。

【請求項 24】

前記 EP が、4～8 個のアミノ酸残基を含む、請求項 22 または 23 に記載の化合物。

【請求項 25】

前記 EP が、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を含む 1 個または 2 個のアミノ酸を含む、請求項 22～24 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 26】

前記 EP が、1 個、2 個、3 個または 4 個のリジン残基を含む、請求項 22～25 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 27】

各リジン残基の側鎖上のアミノ基が、トリフルオロアセチル ($-\text{COCF}_3$) 基、アリルオキシカルボニル (Alloc)、1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)エチル (Dde)、または (4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン-3)-メチルブチル (ivDde) 基で置換されている、請求項 26 に記載の化合物。

【請求項 28】

前記環外ペプチド (EP) が、疎水性側鎖を有する少なくとも 2 個のアミノ酸残基を含む、請求項 22～27 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 29】

前記疎水性側鎖を有する前記アミノ酸残基が、バリン、プロリン、アラニン、ロイシン、イソロイシン及びメチオニンから選択される、請求項 28 に記載の化合物。

【請求項 30】

前記環外ペプチドが、以下の配列：

PKKKRKV、KR、RR、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、KKKKK、KKK RK、KBKBK、KKK RKV、PGKKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、PKKKGKV、PKKKRGV、または PKKKRK

の 1 つを含む、請求項 23～29 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 31】

前記環外ペプチドが、構造：

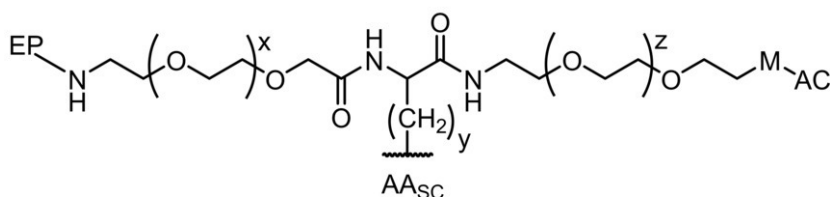
Ac-P-K-K-K-R-K-V-

を有する、請求項 22～30 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 32】

以下の構造：

【化 5】



を含み、式中、

x が 1～20 の整数であり、

y が 1～5 の整数であり、

10

20

30

40

50

z が 1 ～ 20 の整数であり、

E P が環外ペプチドであり、

M が結合部分であり、

A C がアンチセンス化合物であり、

A A s c が、前記環状ペプチドのアミノ酸残基である、

先行請求項のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 33】

前記環状ペプチドが 4 ～ 20 個のアミノ酸残基を含み、少なくとも 2 個のアミノ酸残基が、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を含み、少なくとも 2 個のアミノ酸残基が、独立して疎水性側鎖を含む、請求項 1 ～ 32 のいずれか 1 項に記載の化合物。

10

【請求項 34】

前記環状ペプチドが、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む 1 個、2 個、3 個または 4 個の酸酸残基を含む、請求項 1 ～ 33 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 35】

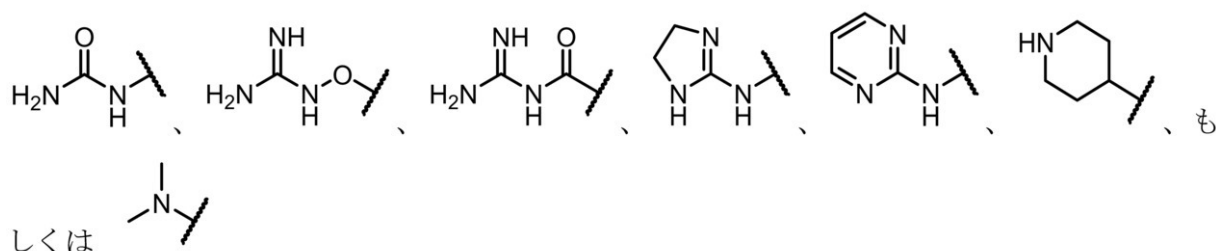
前記環状ペプチドが、疎水性側鎖を含む 2 個、3 個または 4 個のアミノ酸残基を含む、請求項 33 または 34 に記載の化合物。

【請求項 36】

前記環状ペプチドが、

【化 6】

20



、またはそのプロトン化形態

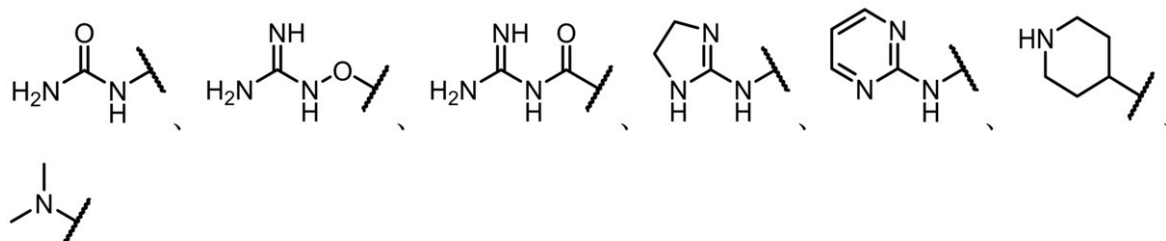
を含む側鎖を含む少なくとも 1 個のアミノ酸を含む、請求項 33 ～ 35 のいずれか 1 項に記載の化合物。

30

【請求項 37】

前記環状ペプチドが、

【化 7】



40

、またはそのプロトン化形態

から選択される側鎖を含む 1 個、2 個、3 個または 4 個のアミノ酸を含む、請求項 33 ～ 36 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 38】

前記環状ペプチドが、少なくとも 1 個のグリシン残基を含む、請求項 33 ～ 37 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 39】

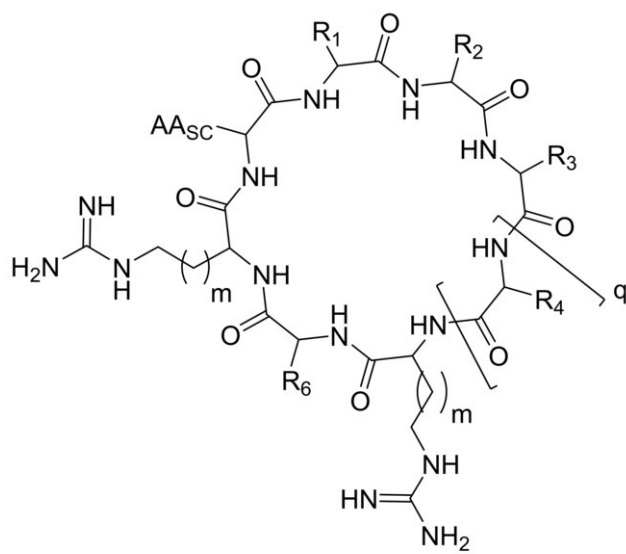
50

前記環状ペプチドが、1個、2個、3個または4個のグリシン残基を含む、請求項33～38のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項40】

前記環状ペプチドが、式(I)：

【化8】



10

20

またはそのプロトン化形態を含み、式中、

R₁、R₂及びR₃が、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

R₁、R₂及びR₃のうちの少なくとも1個が、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

R₄及びR₆が、独立して、Hまたはアミノ酸側鎖であり、

AA_{SC}がアミノ酸側鎖であり、

qが、1、2、3または4であり、

各mが、独立して、整数0、1、2または3である、

先行請求項のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項41】

R₄が、Hである、またはアリールもしくはヘテロアリール基を含む側鎖である、請求項40に記載の化合物。

【請求項42】

アリール基を含む前記側鎖が、フェニルアラニンの側鎖である、請求項40または41に記載の化合物。

【請求項43】

R₁、R₂、R₃及びR₄のうちの2個が、フェニルアラニンの側鎖を含む、請求項40～42のいずれか1項に記載の化合物。

40

【請求項44】

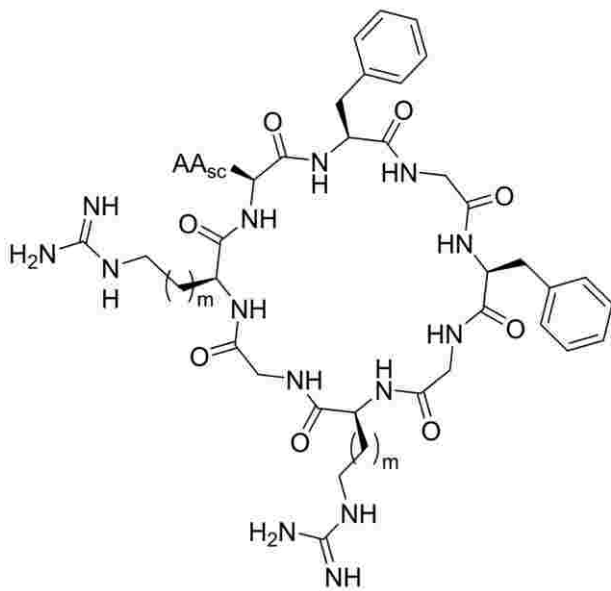
R₁、R₂、R₃及びR₄のうちの2個がHである、請求項40～43のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項45】

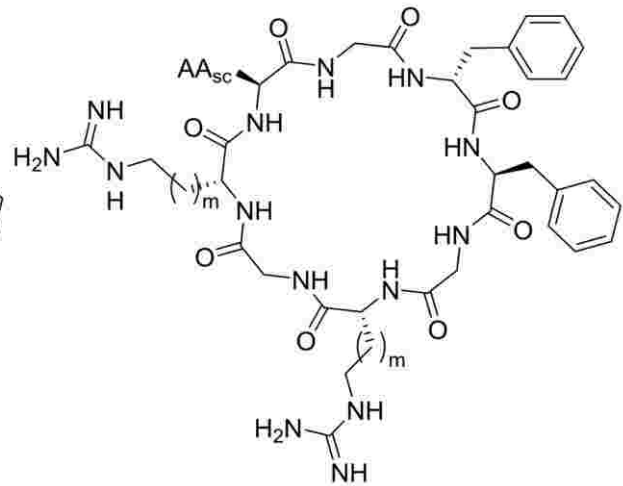
前記環状ペプチドが、式(I-1)、(I-2)、(I-3)または(I-4)：

50

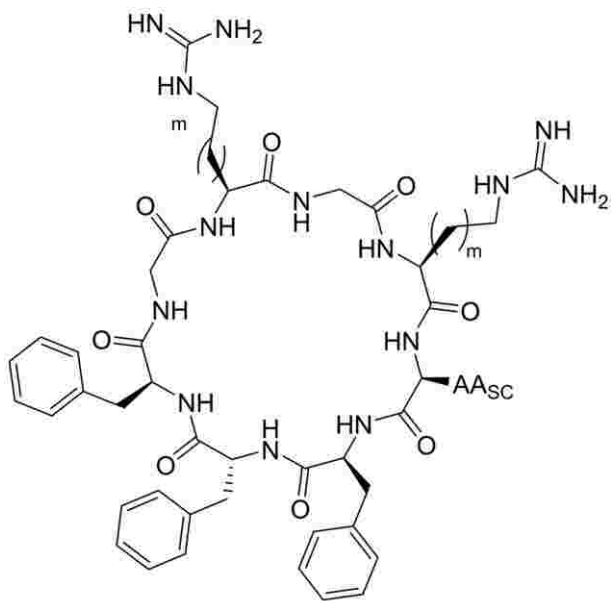
【化 9】



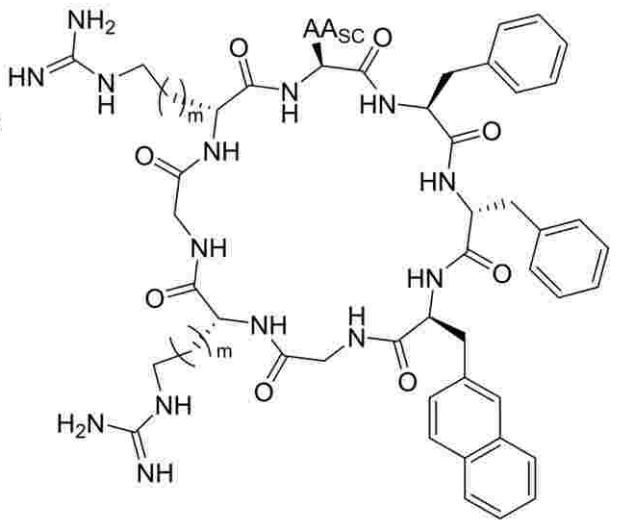
(I-1)、



(I-2)、



(I-3)、



(I-4)

またはそのプロトン化形態の構造を含み、式中、
 A A_{sc}がアミノ酸側鎖であり、
 各mが、独立して、0～3の整数である、
 請求項40～44のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項46】

前記環状ペプチドが、構造：

10

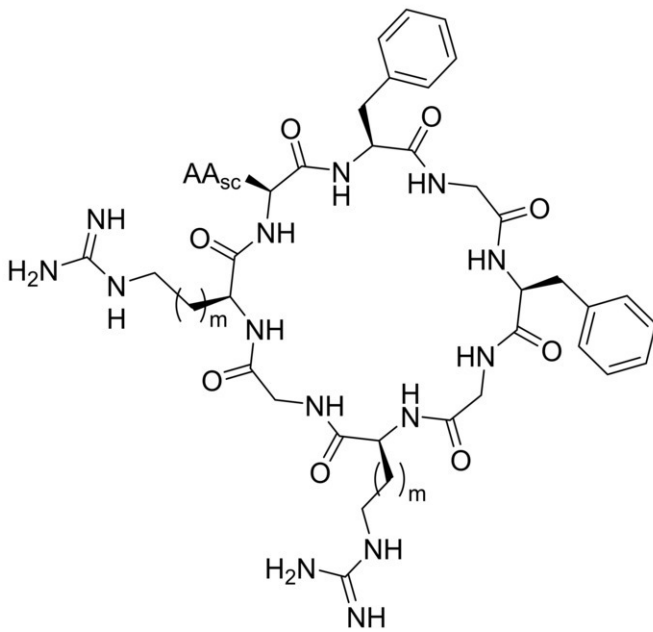
20

30

40

50

【化 1 0】



(I - 1)

またはそのプロトン化形態を含み、式中、

AA_{sc} がアミノ酸側鎖であり、

各 m が、独立して、0 ～ 3 の整数である、

請求項 40 ～ 44 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 47】

AA_{sc} が、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、ホモグルタミン酸残基またはホモグルタミン残基の側鎖を含む、請求項 40 ～ 46 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 48】

AA_{sc} が、グルタミンの側鎖を含む、請求項 40 ～ 47 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 49】

前記 AC が、

表 6A ～ 6M からの配列、その逆相補体、またはそれとの少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の核酸配列同一性を有する配列

を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 50】

前記 AC が、配列 5' - AAACGCCCGCCATTCTCAACAGATC - 3' を含む、請求項 1 ～ 49 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 51】

前記環状ペプチドが、FGFGRRGRQ を含む、請求項 1 ～ 50 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 52】

前記環状ペプチドが、GfFGrrGRQ を含む、請求項 1 ～ 50 のいずれか 1 項に記載の化合物。

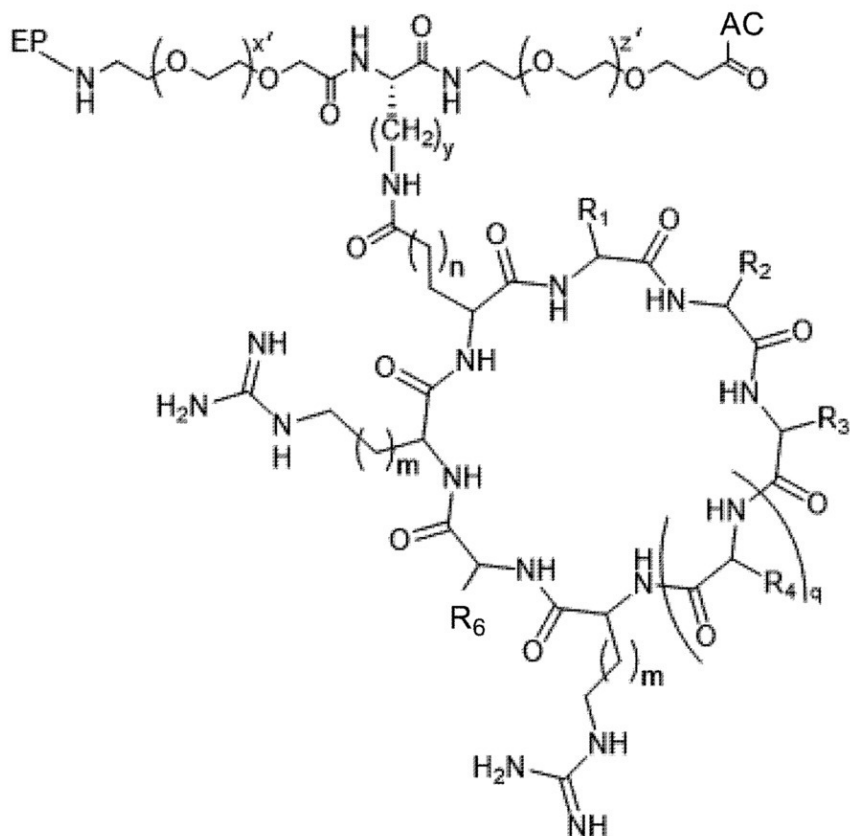
【請求項 53】

前記環状ペプチドが、FfΦGRGRQ を含む、請求項 1 ～ 50 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 5 4】

式 (C) :

【化 1 1】



(C)

またはそのプロトン化形態の構造を有し、式中、

R_1 、 R_2 及び R_3 が、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

R_4 及び R_6 が、独立して、H またはアミノ酸側鎖であり、

EP が、本明細書で定義される環外ペプチドであり、

各 m が、独立して、0～3 の整数であり、

n が 0～2 の整数であり、

x' が 2～20 の整数であり、

y が 1～5 の整数であり、

q が 1～4 の整数であり、

z' が 2～20 の整数であり、

前記 AC が、pre-mRNA 配列中の DMD 遺伝子のエクソン 44 の少なくとも一部を含む標的配列に対して相補的である 15～30 個の核酸の配列を含む、請求項 1～53 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 5 5】

式 (C-1)、式 (C-2)、式 (C-3) または式 (C-4) :

10

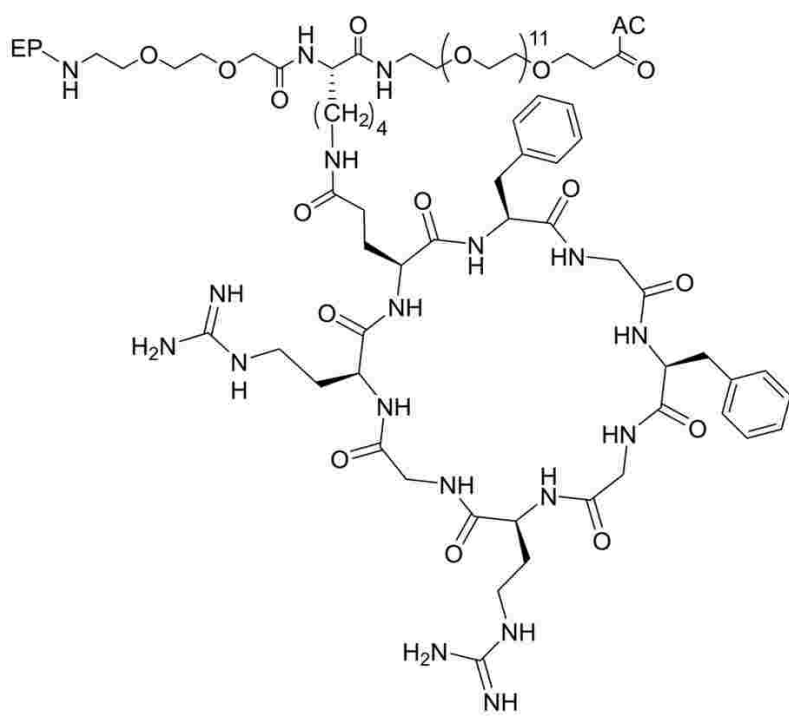
20

30

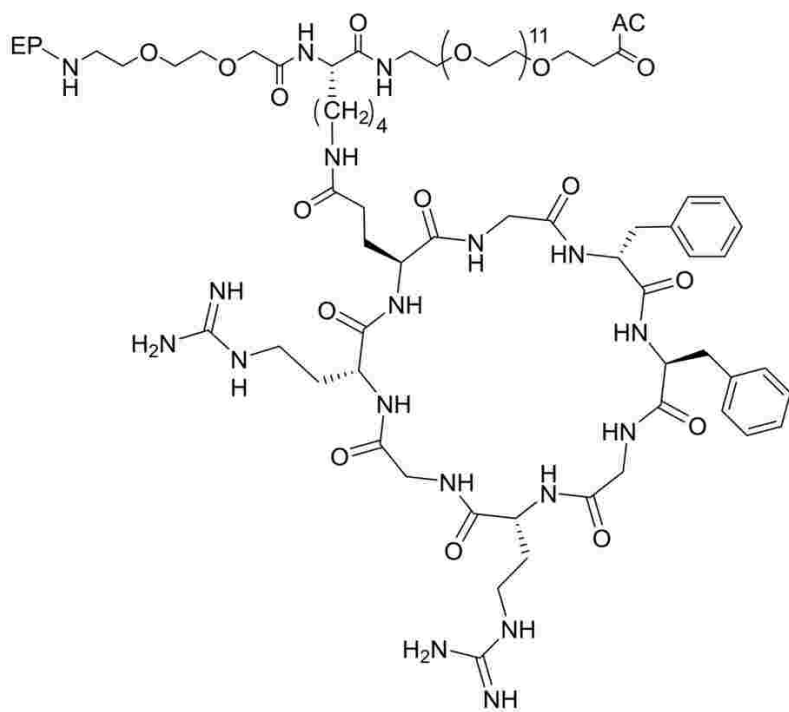
40

50

【化 1 2 - 1】



(C-1) 、



(C-2) 、

10

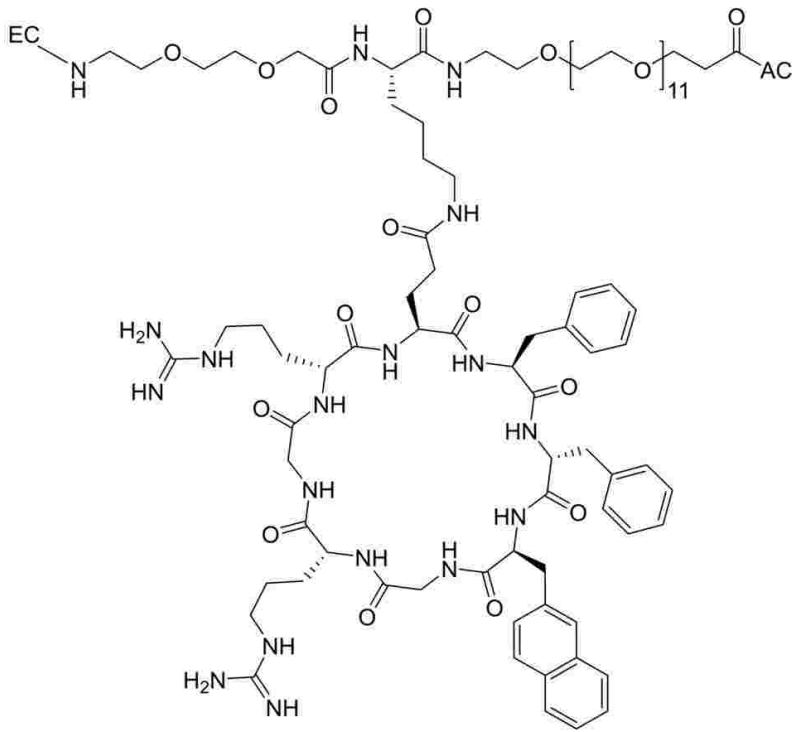
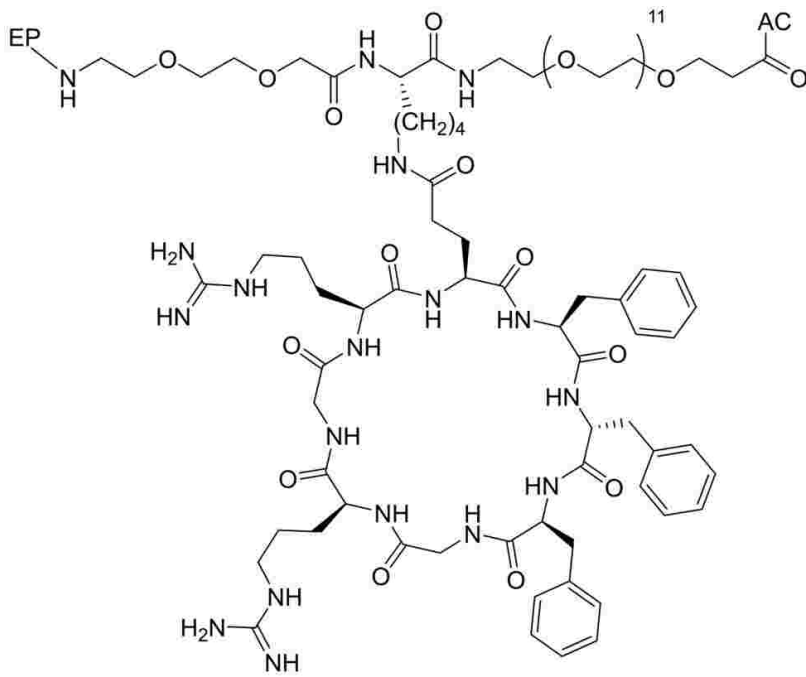
20

30

40

50

【化 1 2 - 2】



またはそのプロトン化形態の構造を含み；

pre-mRNA 配列中の DMD 遺伝子のエクソン 4 4 の少なくとも一部を含む標的配列に対して相補的である 15～30 個の核酸の配列を含む、請求項 1～53 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 56】

請求項 1～55 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 57】

請求項 1～55 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、細胞。

【請求項 58】

10

20

30

40

50

DMDを治療する方法であって、請求項1～55のいずれか1項に記載の化合物を、それを必要とする患者に投与することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2021年9月1日出願された米国仮出願第63/239,645号、2022年12月22日出願された米国仮出願第63/292,685号、2022年2月25日出願された米国仮出願第63/268,580号、2022年3月31日出願された米国仮出願第63/362,294号、2022年4月4日出願された米国仮出願第63/362,423号、2022年5月2日出願された米国仮出願第63/337,560号、2022年6月22日出願された米国仮出願第63/354,456号、2021年9月1日出願された米国仮出願第63/239,671号、2021年12月17日出願された米国仮出願第63/290,960号、2022年1月11日出願された米国仮出願第63/298,565号、及び2022年2月25日出願された米国仮出願第63/268,577号の出願日に基づく優先権の利益を主張するものであり、参照によりこれらの内容の全体を本明細書に具体的に援用する。

10

【背景技術】

【0002】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、タンパク質ジストロフィンの変化に起因する進行性の筋変性及び筋力低下を特徴とする遺伝子障害である。ジストロフィンをコードする遺伝子DMDにおける遺伝子修飾は、DMDを引き起こす。これらの遺伝子修飾は、DMDのリーディングフレームをシフトさせて、非機能性の切断型DMDタンパク質につながる。DMD患者を治療するための1つの方法は、DMDのリーディングフレームを回復させる化合物を患者に送達することを必然的に伴う。アンチセンス化合物は、非機能性の切断型DMDタンパク質につながるDMDのリーディングフレームのシフトに関連している内部エクソンをスキッピングすることによって、DMDのリーディングフレームを回復させることができる。エクソンスキッピングは、疾患状態で失われる機能性を保持するジストロフィタンパク質を生成させる。

20

【0003】

アンチセンスオリゴヌクレオチド治療薬の使用に関する重要な問題は、それらが全身投与されたときに細胞内区画に到達する能力に限界があることである。アンチセンス化合物の細胞内送達には、担体システム、例えば、ポリマー、カチオン性リポソームを使用することによって、または構築物の化学修飾によって、例えばコレステロール分子と共有結合させることによって、容易になり得る。しかしながら、細胞内送達効率は低いままであり、これらのアンチセンス化合物の有効性を向上させるための改善された送達システムが必要とされ続けている。

30

【0004】

疾患、例えば、異常な遺伝子転写、スプライシング及び／または翻訳によって引き起こされる疾患を治療するためにアンチセンス化合物を細胞内区画に送達するための有効な組成物の必要性は、満たされていない。

40

【発明の概要】

【0005】

核酸を送達するための化合物を本明細書に記載する。実施形態では、核酸はアンチセンス化合物（AC）である。実施形態では、アンチセンス化合物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）を有する対象において、エクソン44を標的とする。

【0006】

本開示は、化合物であって、

（a）細胞透過性ペプチド（CPP）配列（例えば、環状ペプチド）と、

（b）pre-mRNA配列中のDMD遺伝子のエクソン44の少なくとも一部を含む標的配列に対して相補的であるアンチセンス化合物（AC）と

50

を含む、当該化合物に関する。実施形態では、ACは、pre-mRNA配列中のDMD遺伝子のエクソン44の少なくとも一部、pre-mRNA配列中のDMD遺伝子のエクソン44に隣接するイントロン性配列の少なくとも一部、またはそれらの両方を含む標的配列に対して相補的である。実施形態では、標的配列とのACのハイブリダイゼーションは、DMD pre-mRNAのスプライシングパターンを変化させて、リーディングフレームを回復させ、機能性ジストロフィンタンパク質の産生を可能にする。

【0007】

実施形態では、ACは、ホスホロチオエート（PS）ヌクレオチド、ホスホロジアミデートモルホリノ（PMO）ヌクレオチド、ロック核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、2'-O-メチル（2'-OMe）修飾骨格を含むヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル（2'-MOE）ヌクレオチド、2', 4'拘束エチル（cEt）ヌクレオチド、及び2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノ核酸（2'-FANA）から選択される少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたは核酸を含む。実施形態では、ACは、少なくとも1つのPMO（例えば、中に含まれるあらゆる範囲を含めて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50個のPMO）を含む。実施形態では、AC中の各ヌクレオチドはPMOである。

【0008】

実施形態では、ACは、配列：

5'-AAACGCCGCATTCTCAACAGATC-3'

を含む。

【0009】

実施形態では、環状ペプチドは、FGFRGRQである。実施形態では、環状ペプチドは、GfFRGRQである。実施形態では、環状ペプチドは、FfΦGRGRQである。

【0010】

実施形態では、EEVは、Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys-(シクロ[FGFRGRQ])-PEG12-OHである。

【0011】

本開示は、本明細書に記載の化合物を含む医薬組成物に関する。

【0012】

本開示は、本明細書に記載の化合物を含む細胞に関する。

【0013】

本開示は、DMDを治療する方法であって、本明細書に記載の化合物を患者に投与することを含む、当該方法に関する。

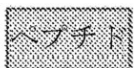
【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】A及びBは、治療薬部分、例えばアンチセンス化合物（AC）を細胞透過性ペプチド（CPP）に連結するためのコンジュゲーション化学を示す。CPPは、ACの5'末端、3'末端または骨格にコンジュゲートされ得る。

【図2】A及びBは、

【化1】



として示される細胞透過性ペプチド（CPP）とアンチセンス化合物（AC）とを連結す

るためのコンジュゲーション化学を示し、ここで、CPPはPEG 4リンカーを含んでおり、ACは、ポリエチレングリコール（PEG 2またはminiPEG）部分を含有するリンカーを有せずに（A）及び有して（B）示されている。図中の「R」は、パルミトイル基を表す。

【図3】代表的なCPPを用いたエンドソーム脱出ビヒクル（EEV）デザインの例を示す。CPPが、本明細書に開示されるCPPのいずれかを含み得ることは、理解される。

【図4A】EEV-PMO-MDX-23-1の調製の模式図を示す。

【図4B】PMO-MDX-23-1で処置したマウスと比較して、EEV-PMO-MDX-23-1で処置したマウスが、内部エクソンであるエクソン23を欠くジストロフィンを生じたことを示す、RT-PCR分析である。

【図4C】PMO-MDX-23-1及びEEV-PMO-MDX-23-1の投与の後の様々な被処置筋肉群でのジストロフィンエクソンスキッピング産物を示す。

【図5】A～Dは、PMO-MDX-23-1またはEEV-PMO-MDX-23-1の送達後のMDXマウスの四頭筋（A）、前脛骨筋（TA）（B）、横隔膜（C）及び心臓（D）におけるエクソンスキッピングのパーセンテージを示す。

【図6A】EEV-PMO-MDX-23-1の送達後のMDXマウスの前脛骨筋（TA）におけるエクソン23スプライシングのパーセンテージを示す。

【図6B】EEV-PMO-MDX-23-1の送達後のMDXマウスの四頭筋におけるエクソン23スプライシングのパーセンテージを示す。

【図6C】EEV-PMO-MDX-23-1の送達後のMDXマウスの横隔膜におけるエクソン23スプライシングのパーセンテージを示す。

【図6D】EEV-PMO-MDX-23-1の送達後のMDXマウスの心臓におけるエクソン23スプライシングのパーセンテージを示す。

【図7】A～Dは、PMO-MDX-23-1またはEEV-PMO-MDX-23-1の送達後に四頭筋（A）、前脛骨筋（TA）（B）、横隔膜（C）及び心臓（D）においてウェスタンブロットによって検出されたエクソン23修正ジストロフィンの量を示す。

【図8】10mpkまたは30mpkのEEV-PMO-MDX-23-1の静脈内送達後の、横隔膜（A）、心臓（B）、四頭筋（C）及び前脛骨筋（D）の中のエクソン23修正ジストロフィン及びα-アクチニンのウェスタンブロットを示す。

【図9】A～Bは、30mpkのEEV-PMO-MDX-23-1または30mpkのPMO-MDX-23-1による処置の2週間後（A）及び4週間後（B）のMDXマウスのジストロフィンレベルを示す。

【図10】A～Dは、30mpkのPMO-MDX-23-1または30mpkのEEV-PMO-MDX-23-1のいずれかを投与したMDXマウスの、前脛骨筋（A）、四頭筋（B）、横隔膜（C）及び心臓（D）におけるエクソン23修正のパーセンテージを示す。EEV-PMO-MDX-23-1を投与したマウスは、PMO-MDX-23-1単独を投与したマウスと比較して、増強されたスプライシング修正を呈した。

【図11】A～Cは、mdxマウスでEEV-PMO-MDX-23-1の単回IV用量（40mg/kg）の8週間後までに認められた心臓（A）、前脛骨筋（B）及び横隔膜（C）におけるエクソン23スキッピング及びジストロフィン修正を示す。

【図12A】D2-mdxモデルにおけるEEV-PMO-MDX-23-2の反復用量（20mg/kg）の後のエクソン23スキッピングを示す。（心臓）。

【図12B】D2-mdxモデルにおけるEEV-PMO-MDX-23-2の反復用量（20mg/kg）の後のエクソン23スキッピングを示す。（横隔膜）。

【図12C】D2-mdxモデルにおけるEEV-PMO-MDX-23-2の反復用量（20mg/kg）の後のエクソン23スキッピングを示す。（前脛骨筋）。

【図12D】D2-mdxモデルにおけるEEV-PMO-MDX-23-2の反復用量（20mg/kg）の後のエクソン23スキッピングを示す。（三頭筋）。

【図13】D2-mdxマウスは、20mg/kgのEEV-PMO-MDX-23-2

10

20

30

40

50

で月1回処置した場合、PMO-MDX-23単独と比較して、正常化した血清クレアチンキナーゼ（CK）レベル（A）、及び筋機能における有意な改善（B～C）を示した。（ns 非有意、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ ）。

【図14】A～Dは、2ステップRT-PCRによって評価したときの、EEV-PMO-MDX-23-2による注射の1週間後の用量依存的なエクソスキッピングを示す。A（三頭筋）、B（前脛骨筋）、C（横隔膜）、D（心臓）。

【図15】A～Dは、80mpkのEEV-PMO-MDX-23-2を投与した後の効果の持続時間を示す。A（三頭筋）、B（前脛骨筋）、C（横隔膜）、D（心臓）。

【図16】4つ全ての組織（三頭筋、前脛骨筋、横隔膜及び心臓）における累積的なエクソスキッピングを示す。

【図17】D2.mdxのワイヤーハングデータを示す。80mpkのEEV-PMO-MDX23-1による週2回の処置を受けた動物は、処置12週の後には、統計的に野生型動物との見分けが付かないワイヤーハング時間を有していた。DBA野生型ビヒクル（生理食塩水）；D2.mdx ビヒクル（生理食塩水）；D2.mdx EEV-PMO-MDX23-1；D2.mdx EEV-PMO-MDX23-2；D2.mdx PMO-MDX23（5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'）。

【図18A】投与前のD2 MDXマウスにおけるクレアチンキナーゼ活性を示す。

【図18B】投与の4週間後のD2 MDXマウスにおけるクレアチンキナーゼ活性を示す。

【図18C】投与の8週間後のD2 MDXマウスにおけるクレアチンキナーゼ活性を示す。

【図18D】投与の12週間後のD2 MDXマウスにおけるクレアチンキナーゼ活性を示す。

【図19】A～Bは、投与前（A）、及び投与の12週間後（B）のD2MDXマウスの握力を示す。

【図20A】EEV-PMO-DMD44-1の合成スキームを示す。

【図20B】EEV-PMO-DMD44-2の合成スキームを示す。

【図20C】EEV-PMO-DMD44-3の合成スキームを示す。

【図20D】EEV-PMO-DMD44-4の合成スキームを示す。

【図21】1、3または10 μ MのEEV-PMO-DMD44-1、EEV-PMO-DMD44-2またはEEV-PMO-DMD-3による処理の後のDMD Δ 45筋細胞におけるジストロフィンタンパク質回復を示す。

【図22A】IV注射によってEEV-PMO-DMD44-1で処置されたhDMDマウスの組織におけるエクソスキッピング及び薬物濃度を示す。

【図22B】IV注射によってEEV-PMO-DMD44-2で処置されたhDMDマウスの組織におけるエクソスキッピング及び薬物濃度を示す。

【図23】A～Bは、NHPモデルにおけるEEV-PMO-DMD44-1についてのエクソスキッピング（A）及び薬物曝露（B）を表したものである。

【図24】A～Bは、NHPモデルにおけるEEV-PMO-DMD44-2についてのエクソスキッピング（A）及び薬物曝露（B）を表したものである。

【図25A】EEV-PMO-DMD44-1で処理したDMD患者由来筋細胞におけるエクソスキッピングを示す。

【図25B】EEV-PMO-DMD44-1で処理したDMD患者由来筋細胞におけるジストロフィンの回復を示す。

【図26】10、20、40及び80mg/kgのEEV-PMO-DMD44-1を静脈内（IV）投与した後のhDMDトランスジェニックマウスの心筋（A）及び骨格筋（B及びC）において、用量依存的な組織曝露及びエクソスキッピングが認められた。

【図27】EEV-PMO-DMD44-1が非ヒト霊長類（NHP）に投与された場合

10

20

30

40

50

に延長された循環半減期を有することを示す。

【図 28】単回用量の E E V - P M O - D M D 4 4 - 1 が、3 0 m g / k g で 1 時間 にわたる I V 注入の 7 日後の N H P の骨格筋及び心臓の両方において意味深いレベルのエクソンスキッピングをもたらしたことを示す。

【図 29】A ~ C は、E E V - P M O - D M D 4 4 - 1、または R 6 (ポリアルギニン) とコンジュゲートしたエクソン 4 4 スキッピング P M O の単回 I V 用量 (1 5 m g / k g) の後の h ジストロフィンマウスの心臓 (A)、横隔膜 (B) 及び三頭筋 (C) におけるエクソンスキッピングを表したものである。

【図 30】A ~ E は、h D M D マウスの心臓 (A)、横隔膜 (B)、前脛骨筋 (C)、腓腹筋 (D) 及び三頭筋 (E) において 1 ステップ R T - P C R によって検出された最長 1 2 週間にわたるエクソンスキッピングを表したものである。

10

【図 31】単回 I V 用量の後の最長 1 2 週間にわたる N H P におけるエクソンスキッピングを示す。

【図 32 A】L C - M S / M S によって決定された、P M O 及び E E V - P M O 及び E E V - N L S - P M O についての T H P 細胞における局在化を対比して示す：全細胞取り込み。

【図 32 B】L C - M S / M S によって決定された、P M O 及び E E V - P M O 及び E E V - N L S - P M O についての T H P 細胞における局在化を対比して示す：細胞内局在化。

【図 32 C】L C - M S / M S によって決定された、P M O 及び E E V - P M O 及び E E V - N L S - P M O についての T H P 細胞における局在化を対比して示す：核内取り込み。

20

【発明を実施するための形態】

【0015】

化合物

本明細書に開示されるのは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) を治療するための化合物である。実施形態では、D M D は、エクソン 4 4 における変異によって引き起こされる。実施形態では、化合物は、p r e - m R N A 配列中の D M D 遺伝子の標的配列に対して相補的であるアンチセンス化合物 (A C) を送達するように設計され、当該標的配列は、エクソン 4 4 の 5 ' 隣接イントロンの少なくとも一部、エクソン 4 4 の少なくとも一部、エクソン 4 4 の 3 ' 隣接イントロンの少なくとも一部、またはそれらの組み合わせを含む。実施形態では、化合物は、アンチセンス化合物 (A C) を、それを必要とする対象に細胞内送達するように設計される。

30

【0016】

実施形態では、化合物は、A C によって結合される標的 p r e - m R N A のスプライシングパターンを変化させ、その結果、再スプライシングされた標的タンパク質が形成される。一実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、A C の非存在下で標的 p r e - m R N A のスプライシングによって産生された標的タンパク質に比べてより機能的である。実施形態では、スプライシングによって産生された標的タンパク質の機能と比較して、再スプライシングされた標的タンパク質は標的タンパク質機能を、少なくとも約 1 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 9 %、少なくとも約 1 0 0 %、少なくとも約 1 5 0 %、少なくとも約 2 0 0 %、少なくとも約 2 5 0 %、少なくとも約 3 0 0 %、少なくとも約 3 5 0 %、少なくとも約 4 0 0 %、少なくとも約 4 5 0 %、少なくとも約 5 0 0 %、またはそれより大きく増大させる。実施形態では、スプライシングによって産生された標的タンパク質の機能と比較して、再スプライシングされた標的タンパク質は標的タンパク質機能を、間にあるあらゆる値及び範囲を

40

50

含めて約 1 %、約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 99 %、約 100 %、約 150 %、約 200 %、約 250 %、約 300 %、約 350 %、約 400 %、約 450 %、約 500 %、またはそれより大きく増大させる。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、機能を、野生型標的タンパク質の機能の少なくとも約 1 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 % または少なくとも約 99 % に、及び最大約 100 % に回復させる。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、機能を、野生型標的タンパク質の機能の約 1 %、約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 99 % または約 100 %（これらの間のあらゆる値及び範囲を含む）に回復させる。

10

【0017】

様々な実施形態において、本明細書に開示される化合物は、AC 部分と、細胞透過性ペプチド（CPP）部分とを有する。実施形態では、CPP 部分は環状である（本明細書では環状ペプチドと呼称される）。実施形態では、化合物は、インビボで細胞膜を横断して標的 pre-mRNA に結合することができる。実施形態では、化合物は、a) 少なくとも 1 つの CPP 部分と、b) 少なくとも 1 つの AC とを含み、CPP は、直接的に、または間接的に（例えばリンカーを介して）AC にカップリングされている。実施形態では、化合物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個の、またはそれより多い AC 部分を含む。実施形態では、化合物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個の、またはそれより多い CPP 部分を含む。実施形態では、化合物は、1 個の AC 部分を含む。実施形態では、化合物は、2 個の AC 部分を含む。本明細書で使用される場合、「カップリングされた」は、CPP と AC との間での共有結合または非共有結合による会合を意味し得、これには、AC への CPP の融合、及び AC に対する CPP の化学的コンジュゲーションが含まれる。AC に CPP を非共有結合的に結合させる手段の非限定的な例は、ストレプトアビジン／ビオチン相互作用によるもの、例えば、ビオチンを CPP にコンジュゲートさせること、及び AC をストレプトアビジンに融合させることによるものである。結果として得られる化合物において、CPP は、ビオチンとストレプトアビジンとの間での非共有結合による会合によって AC にカップリングされている。

20

30

【0018】

実施形態では、CPP は、直接的に、またはリンカーを介して間接的に AC にコンジュゲートされて、それによって、CPP-AC コンジュゲートを形成している。CPP に対する AC のコンジュゲーションは、これらの部分の任意の適切な部位で起こり得る。実施形態では、AC の 5' または 3' 末端が、CPP 中のアミノ酸の C 末端、N 末端または側鎖にコンジュゲートされていてもよい。実施形態では、CPP は環状ペプチドである。

40

【0019】

実施形態では、AC は、AC の 5' または 3' 末端上の部分によって CPP に化学的にコンジュゲートされていてもよい。実施形態では、AC は、CPP 上のアミノ酸の側鎖によって CPP にコンジュゲートされていてもよい。共有結合を形成することが可能であるかまたはそのように修飾され得る CPP 上の任意のアミノ酸側鎖を用いて、CPP に AC を連結させることができる。CPP 上のアミノ酸は、天然または非天然アミノ酸であり得る。実施形態では、AC をコンジュゲートさせるために使用する CPP 上のアミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン、リジン、オルニチン、2,3-ジアミノプロピオン酸、またはそれらの類似体である。実施形態では、側鎖は、AC に対するまたはリンカーに対する結合で置換されている。実施形態では、アミノ酸は、リジ

50

ンまたはその類似体である。実施形態では、アミノ酸は、グルタミン酸またはその類似体である。実施形態では、アミノ酸は、アスパラギン酸またはその類似体である。実施形態では、C P Pは環状ペプチドである。

【0020】

エンドソーム脱出ビヒクル（E E V）

細胞膜を横切ってA Cを輸送するために、例えば、A Cを細胞のサイトゾルまたは核に送達するために使用することができるエンドソーム脱出ビヒクル（E E V）が本明細書において提供される。E E Vは、細胞透過性ペプチド（C P P）、例えば、環外ペプチド（E P）にコンジュゲートされた環状細胞透過性ペプチド（c C P P）を含み得る。E Pを、互換的に調節ペプチド（M P）と呼ぶ場合がある。E Pは、核局在化シグナル（N L S）の配列を含み得る。E PはA Cに結合することができる。E Pはc C P Pに結合することができる。E PはA C及びc C P Pに結合することができる。E P、A C、c C P P、またはそれらの組合せの間のカップリングは、非共有結合または共有結合であり得る。E Pはペプチド結合を介してc C P PのN末端に結合することができる。E Pはペプチド結合を介してc C P PのC末端に結合することができる。E Pはc C P P中のアミノ酸の側鎖を介してc C P Pに結合することができる。E Pは、c C P P中のグルタミンの側鎖にコンジュゲートされ得るリジンの側鎖を介してc C P Pに結合することができる。E Pは、A Cの5'または3'末端にコンジュゲートされ得る。E Pはリンカーに結合することができる。環外ペプチドは、リンカーのアミノ基にコンジュゲートされ得る。E Pは、E PのC末端によってリンカーに、並びにc C P P上及び／またはE P上の側鎖を介してc C P Pにカップリングされ得る。例えば、E Pは末端リジンを含んでいてもよく、リジンはその後、アミド結合を介してグルタミンを含有するc C P Pにカップリングされ得る。E Pが末端リジンを含み、リジンの側鎖を用いてc C P Pを結合し得る場合、C末端またはN末端は、A C上のリンカーに結合し得る。

【0021】

環外ペプチド

環外ペプチド（E P）は、2から10個のアミノ酸残基、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸残基（これらの間の全ての範囲及び値を含む）を含み得る。E Pは、6から9個のアミノ酸残基を含み得る。E Pは、4から8個のアミノ酸残基を含み得る。

【0022】

環外ペプチド中の各アミノ酸は、天然または非天然アミノ酸であってよい。「非天然アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸の構造及び反応性を模倣するように、天然アミノ酸に類似した構造を有するという点で、天然アミノ酸の同族体である有機化合物を指す。非天然アミノ酸は、20種の一般的な天然アミノ酸または希少な天然アミノ酸であるセレノシステインもしくはピロリシンのうちの1つではない修飾アミノ酸及び／またはアミノ酸類似体であり得る。非天然アミノ酸は、天然アミノ酸のD-異性体であってもよい。適切なアミノ酸の例としては、アラニン、アロソロイシン（allosoleucine）、アルギニン、シトルリン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、ナフチルアラニン、フェニルアラニン、プロリン、ピログルタミン酸、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、それらの誘導体、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。これらのアミノ酸及び他のアミノ酸を、本明細書で使用されるそれらの略語と共に表1に列挙する。例えば、アミノ酸は、A、G、P、K、R、V、F、H、Na L、またはシトルリンであり得る。

【0023】

E Pは、少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基、例えば、少なくとも1つのリジン残基、及び／またはグアニジン基もしくはそのプロトン化形態を含む側鎖を含む少なくとも1つのアミノ酸残基を含み得る。E Pは、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を含む1個または2個のアミノ酸残基を含み得る。グアニジン基を含む側鎖を含

むアミノ酸残基は、アルギニン残基であり得る。プロトン化形態は、本開示全体を通してその塩を意味する場合がある。

【0024】

EPは、少なくとも2個、少なくとも3個または少なくとも4個以上のリジン残基を含み得る。EPは、2、3、または4個のリジン残基を含み得る。各リジン残基の側鎖上のアミノ基は、例えば、トリフルオロアセチル ($-COCF_3$) 基、アリルオキシカルボニル (Alloc) 基、1-(4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソシクロヘキシリデン) エチル (Dde) 基、または(4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン-3)-メチルブチル (ivDde) 基などの保護基で置換され得る。各リジン残基の側鎖上のアミノ基は、トリフルオロアセチル ($-COCF_3$) 基で置換され得る。保護基は、アミドコンジュゲーションを可能にするために含めることができる。保護基は、EPがcCPPにコンジュゲートされた後に除去することができる。

10

【0025】

EPは、疎水性側鎖を有する少なくとも2個のアミノ酸残基を含み得る。疎水性側鎖を有するアミノ酸残基は、バリン、プロリン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、及びメチオニンから選択することができる。疎水性側鎖を有するアミノ酸残基は、バリンまたはプロリンであり得る。

【0026】

EPは、少なくとも1個の正に荷電したアミノ酸残基、例えば、少なくとも1個のリジン残基及び／または少なくとも1個のアルギニン残基を含み得る。EPは、少なくとも2個、少なくとも3個または少なくとも4個またはそれ以上のリジン残基及び／またはアルギニン残基を含み得る。

20

【0027】

EPは、KK、KR、RR、HH、HK、HR、RH、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKH、KHK、HKK、HRR、HRH、HHR、HBH、HHH、HHHH、KHKK、KKHK、KKKH、KHKH、HKHK、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、HBHBH、HBKBH、RRRRR、KKKKK、KKK RK、RKKKK、KRKKK、KKRKK、KKKKR、KBKBK、RKKKKG、KRKKKG、KKRKKG、KKKKRG、RKKKKB、KRKKKB、KKRKKB、KKKKRB、KKKRKV、RRRRRR、HHHHHH、RHRHRH、HRHRHR、KRKRKR、RKRKRK、RBRBRB、KBKBKB、PKKKRKV、PGKKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、PKKKRGVまたはPKKKRK Gを含み得、式中、Bはベータアラニンである。EPにおけるアミノ酸は、DまたはL立体化学を有し得る。

30

【0028】

EPは、KK、KR、RR、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、KKKKK、KKK RK、KBKBK、KKKRKV、PKKKRKV、PGKKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、PKKKRGVまたはPKKKRK Gを含み得る。EPは、PKKKRKV、RR、RRR、RHR、RBR、RBRBR、RBHBR、またはHBRBHを含み得、式中、Bはベータアラニンである。EPにおけるアミノ酸は、DまたはL立体化学を有し得る。

40

【0029】

EPは、KK、KR、RR、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、KKKKK、KKK RK、KBKBK、KKKRKV、PKKKRKV、PGKKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、PKKKRGVまたはPKKKRK Gからなり得る。EPは、PKKKRKV、RR、RRR、RHR、RBR、RBRBR、RBHBR、またはHBRBHからなり得、式中、Bはベータアラニン

50

である。EPにおけるアミノ酸は、DまたはL立体化学を有し得る。

【0030】

EPは、核局在化配列(NLS)として当技術分野で同定されたアミノ酸配列を含み得る。EPは、核局在化配列(NLS)として当該技術分野において同定されたアミノ酸配列からなり得る。EPは、アミノ酸配列PKKKRKVを含むNLSを含み得る。EPは、アミノ酸配列PKKKRKVを含むNLSからなり得る。EPは、NLSKRPAAIKKAGQAKKKK、PAAKRVKLD、RQRRNELKRSF、RMRKFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELR、KAKKDEQILKRRNV、VSRKRPRP、PPKKARED、PQPKKKKPL、SALIKKKKKKMAP、DRLRR、PKQKKRK、RKLKKKKIKKL、REKKKFLLKRR、KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK及びRKCLQAGMNLARKTKKから選択されるアミノ酸配列を含むNLSを含み得る。EPは、NLSKRPAAIKKAGQAKKKK、PAAKRVKLD、RQRRNELKRSF、RMRKFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELR、KAKKDEQILKRRNV、VSRKRPRP、PPKKARED、PQPKKKKPL、SALIKKKKKKMAP、DRLRR、PKQKKRK、RKLKKKKIKKL、REKKKFLLKRR、KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK及びRKCLQAGMNLARKTKKから選択されるアミノ酸配列を含むNLSからなり得る。

10

【0031】

全ての環外配列はまた、N末端アセチル基を含有し得る。したがって、例えば、EPは構造：Ac-PKKKRKVを有し得る。

20

【0032】

細胞透過性ペプチド(CPP)

細胞透過性ペプチド(CPP)は、6から20個のアミノ酸残基を含み得る。細胞透過性ペプチドは、環状細胞透過性ペプチド(cCPP)であり得る。cCPPは細胞膜を透過することができる。環外ペプチド(EP)をcCPPにコンジュゲートさせることができ、得られた構築物をエンドソーム脱出ビヒクル(EEV)と呼ぶことができる。cCPPはACを、細胞の膜を透過するように導くことができる。cCPPは、ACを細胞の細胞質ゾルに送達することができる。cCPPは、標的(例えば、pre-mRNA)が位置する細胞位置にACを送達することができる。cCPPをACにコンジュゲートするために、cCPP上の少なくとも1つの結合または孤立電子対を置換することができる。

30

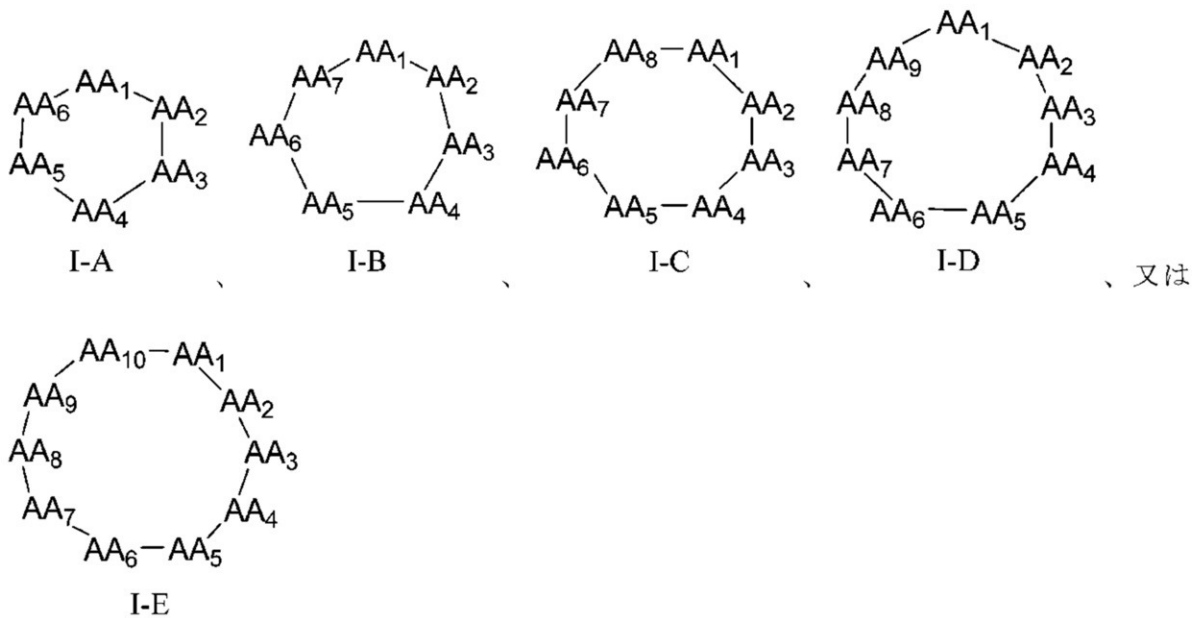
【0033】

cCPP中のアミノ酸残基の総数は、6から20個のアミノ酸残基の範囲、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸残基であり、これらの間の全ての範囲及び部分範囲を含む。cCPPは6から13個のアミノ酸残基を含み得る。本明細書に開示されるcCPPは、6から10個のアミノ酸を含み得る。例として、6～10個のアミノ酸残基を含むcCPPは、式I-AからI-E：

40

50

【化 2】



10

のいずれかによる構造を有することができ、式中、 AA_1 、 AA_2 、 AA_3 、 AA_4 、 AA_5 、 AA_6 、 AA_7 、 AA_8 、 AA_9 及び AA_{10} はアミノ酸残基である。

20

【0034】

cCPP は 6 から 8 個のアミノ酸を含み得る。cCPP は 8 個のアミノ酸を含み得る。

【0035】

cCPP 中の各アミノ酸は、天然または非天然アミノ酸であってもよい。「非天然アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸の構造及び反応性を模倣するように、天然アミノ酸に類似した構造を有するという点で、天然アミノ酸の同族体である有機化合物を指す。非天然アミノ酸は、20 種の一般的な天然アミノ酸または希少な天然アミノ酸であるセレノシステインもしくはピロリシンのうちの 1 つではない修飾アミノ酸及び／またはアミノ酸類似体であり得る。非天然アミノ酸は、天然アミノ酸の D-異性体であってもよい。適切なアミノ酸の例としては、アラニン、アロソロイシン (allosoleucine)、アルギニン、シトルリン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、ナフチルアラニン、フェニルアラニン、プロリン、ピログルタミン酸、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、それらの誘導体、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。これらのアミノ酸及び他のアミノ酸を、本明細書で使用されるそれらの略語と共に表 1 に列挙する。

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1. アミノ酸の略語

アミノ酸	略語* L-アミノ酸	略語* D-アミノ酸
アラニン	Ala (A)	ala (a)
アロイソロイシン	Aile	Aile
アルギニン	Arg (R)	arg (r)
アスパラギン	Asn (N)	asn (n)
アスパラギン酸	Asp (D)	asp (d)
システイン	Cys (C)	cys (c)
シトルリン	Cit	Cit
シクロヘキシルアラニン	Cha	cha
2,3-ジアミノプロピオン酸	Dap	dap
4-フルオロフェニルアラニン	Fpa (Σ)	pfa
グルタミン酸	Glu (E)	glu (e)
グルタミン	Gln (Q)	gln (q)
グリシン	Gly (G)	gly (g)
ヒスチジン	His (H)	his (h)
ホモプロリン (別名ピペコリン酸)	Pip (Θ)	pip (ø)
イソロイシン	Ile (I)	ile (i)
ロイシン	Leu (L)	leu (l)
リジン	Lys (K)	lys (k)
メチオニン	Met (M)	met (m)
3-(2-ナフチル)-アラニン	Nal (Φ)	nal (ϕ)
3-(1-ナフチル)-アラニン	1-Nal	1-nal
ノルロイシン	Nle (Ω)	nle
フェニルアラニン	Phe (F)	phe (f)
フェニルグリシン	Phg (Ψ)	phg
4-(ホスホノジフルオロメチル)フェニルアラニン	F ₂ Pmp (Λ)	f ₂ pmp
プロリン	Pro (P)	pro (p)
サルコシン	Sar (Ξ)	sar
セレノシステイン	Sec (U)	sec (u)
セリン	Ser (S)	ser (s)
スレオニン	Thr (T)	thr (y)
チロシン	Tyr (Y)	tyr (y)
トリプトファン	Trp (W)	trp (w)
バリン	Val (V)	val (v)
Tert-ブチル-アラニン	Tle	tle

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

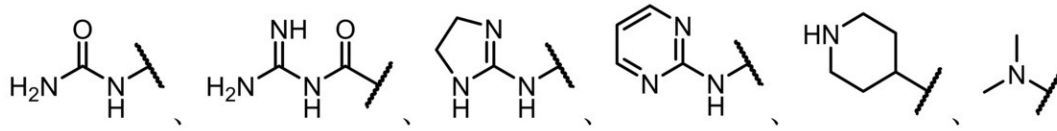
アミノ酸	略語*	略語*
	L-アミノ酸	D-アミノ酸
ペニシラミン	Pen	Pen
ホモアルギニン	HomoArg	homoarg
ニコチニル-リジン	Lys(NIC)	lys(NIC)
トリフルオロアセチル-リジン	Lys(TFA)	lys(TFA)
メチル-ロイシン	MeLeu	meLeu
3-(3-ベンゾチエニル)-アラニン	Bta	bta

*一文字略語：本明細書において大文字で示される場合、それはL-アミノ酸形態を示し、本明細書において小文字で示される場合、それはD-アミノ酸形態を示す。

【0036】

c CPP は、4 から 20 個のアミノ酸を含み得、ここで、(i) 少なくとも 1 個のアミノ酸は、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し、(ii) 少なくとも 1 個のアミノ酸は、側鎖を有さないか、または

【化 3】

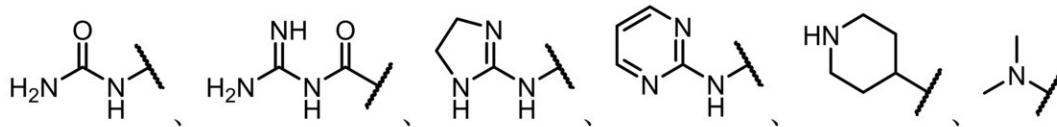


、もしくはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し、(iii) 少なくとも 2 個のアミノ酸は、独立して、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有する。

【0037】

少なくとも 2 個のアミノ酸は、側鎖を有さなくてもよく、または

【化 4】



、もしくはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し得る。本明細書で使用される場合、側鎖が存在しない場合、アミノ酸は、アミンとカルボン酸とを連結する炭素原子（複数可）の上に 2 個の水素原子を有する（例えば、 $-CH_2-$ ）。

【0038】

側鎖を有さないアミノ酸は、グリシンまたは β -アラニンであり得る。

【0039】

c CPP は、c CPP を形成する 6 から 20 個のアミノ酸残基を含み得、ここで、(i) 少なくとも 1 個のアミノ酸はグリシン、 β -アラニン、または 4-アミノ酪酸残基であり得、(ii) 少なくとも 1 個のアミノ酸は、アリールまたはヘテロアリール基を含む側鎖を有し得、(iii) 少なくとも 1 個のアミノ酸は、グアニジン基、

10

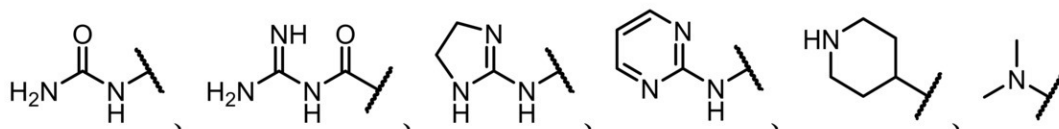
20

30

40

50

【化 5】



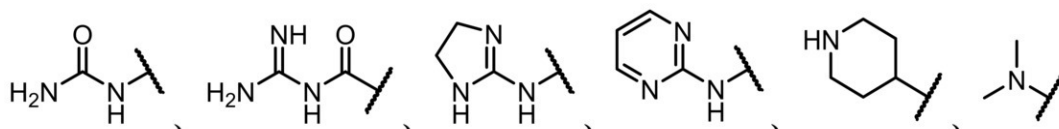
、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する。

【0040】

c C P Pは、c C P Pを形成する6から20個のアミノ酸残基を含み得、ここで、(i) 少なくとも2個のアミノ酸は独立してグリシン、β-アラニン、または4-アミノ酪酸残基であり得、(ii) 少なくとも1個のアミノ酸は、アリールまたはヘテロアリール基を含む側鎖を有し得、(iii) 少なくとも1個のアミノ酸は、グアニジン基、

10

【化 6】



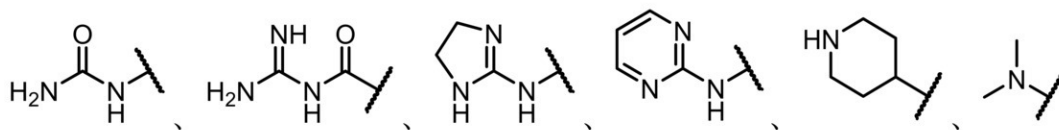
20

、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する。

【0041】

c C P Pは、c C P Pを形成する6から20個のアミノ酸残基を含み得、ここで、(i) 少なくとも3個のアミノ酸は、独立して、グリシン、β-アラニン、または4-アミノ酪酸残基であり得、(ii) 少なくとも1個のアミノ酸は、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有し得、(iii) 少なくとも1個のアミノ酸は、グアニジン基、

【化 7】



30

、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し得る。

【0042】

グリシン及び関連アミノ酸残基

c C P Pは、(i) 1、2、3、4、5または6個のグリシンβ-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 2個のグリシンβ-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 3個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 4個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 5個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 6個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 3、4または5個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 3または4個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。

40

【0043】

c C P Pは、(i) 1、2、3、4、5、または6個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 2個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 3個のグリシン残基

50

を含み得る。c C P Pは、(i) 4個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 5個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 6個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 3、4、または5個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 3個または4個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 2個または3個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 1個または2個のグリシン残基を含み得る。

【 0 0 4 4 】

c C P Pは、(i) 3、4、5または6個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 3個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 4個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 5個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 6個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 3、4または5個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。c C P Pは、(i) 3または4個のグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸残基、またはそれらの組み合わせを含み得る。

10

【 0 0 4 5 】

c C P Pは、少なくとも3個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 3、4、5、または6個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 3個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 4個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 5個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 6個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 3、4、または5個のグリシン残基を含み得る。c C P Pは、(i) 3または4個のグリシン残基を含み得る。

20

【 0 0 4 6 】

実施形態では、c C P P中のグリシン、β-アラニン、または4-アミノ酪酸残基のいずれも隣接していない。2個または3個のグリシン、β-アラニン、4-またはアミノ酪酸残基は隣接していてもよい。2個のグリシンβ-アラニン、または4-アミノ酪酸残基は隣接していてもよい。

【 0 0 4 7 】

実施形態では、c C P P中のグリシン残基のいずれも隣接していない。c C P P中の各グリシン残基は、グリシンであり得ないアミノ酸残基によって隔てられ得る。2個または3個のグリシン残基が隣接していてもよい。2個のグリシン残基は隣接していてもよい。

30

【 0 0 4 8 】

芳香族基またはヘテロ芳香族基を有するアミノ酸側鎖

c C P Pは、(i i) 芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を独立して有する2、3、4、5または6個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を独立して有する2個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を独立して有する3個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を独立して有する4個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を独立して有する5個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を独立して有する6個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を独立して有する2、3または4個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を独立して有する2または3個のアミノ酸残基を含み得る。

40

【 0 0 4 9 】

c C P Pは、(i i) 芳香族基を含む側鎖を独立して有する2、3、4、5または6個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基を含む側鎖を独立して有する2個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基を含む側鎖を独立して有する3個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基を含む側鎖を独立し

50

て有する4個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基を含む側鎖を独立して有する5個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基を含む側鎖を独立して有する6個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基を含む側鎖を独立して有する2、3、または4個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i) 芳香族基を含む側鎖を独立して有する2または3個のアミノ酸残基を含み得る。

【0050】

芳香族基は、6から14員アリールであり得る。アリールは、フェニル、ナフチルまたはアントラセニルであり得、これらは各々任意選択で置換されている。アリールは、フェニルまたはナフチルであり得、これらは各々任意選択で置換されている。ヘテロ芳香族基は、N、O、及びSから選択される1、2、または3個のヘテロ原子を有する6から14員ヘテロアリールであり得る。ヘテロアリールは、ピリジル、キノリル、またはイソキノリルであり得る。

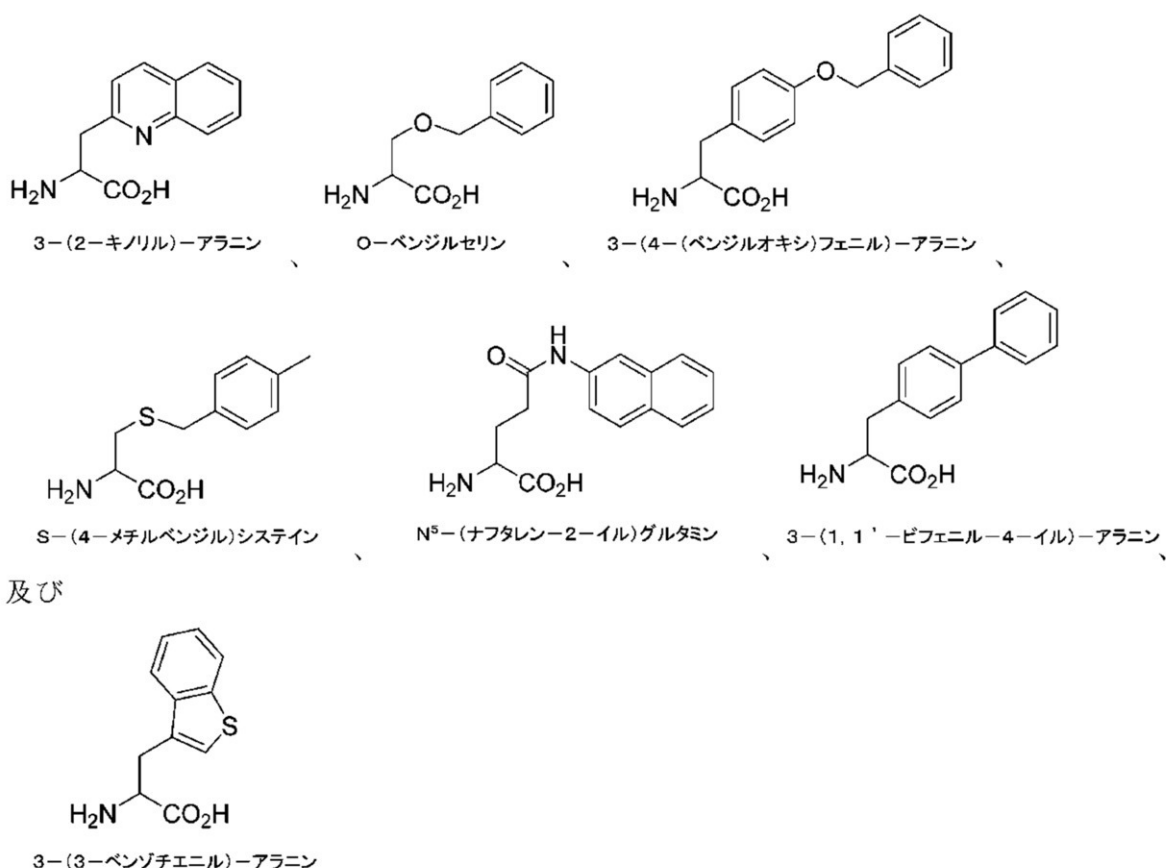
10

【0051】

芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基は、各々独立して、ビス(ホモナフチルアラニン)、ホモナフチルアラニン、ナフチルアラニン、フェニルグリシン、ビス(ホモフェニルアラニン)、ホモフェニルアラニン、フェニルアラニン、トリプトファン、3-(3-ベンゾチエニル)-アラニン、3-(2-キノリル)-アラニン、O-ベンジルセリン、3-(4-(ベンジルオキシ)フェニル)-アラニン、S-(4-メチルベンジル)システイン、N-(ナフタレン-2-イル)グルタミン、3-(1,1'-ビフェニル-4-イル)-アラニン、3-(3-ベンゾチエニル)-アラニンまたはチロシンであり得、これらは各々任意選択で1つ以上の置換基で置換される。芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸は、各々独立して、

20

【化8】



30

40

から選択され得、式中、N末端上のH及び／またはC末端上のHは、ペプチド結合によって置き換えられている。

50

【0052】

芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基は、各々独立して、フェニルアラニン、ナフチルアラニン、フェニルグリシン、ホモフェニルアラニン、ホモナフチルアラニン、ビス（ホモフェニルアラニン）、ビスー（ホモナフチルアラニン）、トリプトファン、またはチロシンの残基であり得、これらは各々任意選択で1つ以上の置換基で置換される。芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基は、各々独立して、チロシン、フェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、トリプトファン、3-ベンゾチエニルアラニン、4-フェニルフェニルアラニン、3,4-ジフルオロフェニルアラニン、4-トリフルオロメチルフェニルアラニン、2,3,4,5,6-ペンタフルオロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、 β -ホモフェニルアラニン、4-tert-butyl-フェニルアラニン、4-ピリジニルアラニン、3-ピリジニルアラニン、4-メチルフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、3-(9-アントリル)-アラニンの残基であり得る。芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基は、各々独立して、フェニルアラニン、ナフチルアラニン、フェニルグリシン、ホモフェニルアラニン、またはホモフェニルアラニンの残基であり得、これらは各々任意選択で1つ以上の置換基で置換される。芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基は、各々独立して、フェニルアラニン、ナフチルアラニン、ホモフェニルアラニン、ホモナフチルアラニン、ビス（ホモナフチルアラニン）、またはビス（ホモナフチルアラニン）の残基であり得、これらは各々任意選択で1つ以上の置換基で置換される。芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基は、各々独立して、フェニルアラニンまたはナフチルアラニンの残基であり得、これらは各々任意選択で1つ以上の置換基で置換される。芳香族基を含む側鎖を有する少なくとも1個のアミノ酸残基は、フェニルアラニンの残基であり得る。芳香族基を含む側鎖を有する少なくとも2個のアミノ酸残基は、フェニルアラニンの残基であり得る。芳香族基を含む側鎖を有する各アミノ酸残基は、フェニルアラニンの残基であり得る。

10

20

【0053】

実施形態では、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸はいずれも隣接していない。芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有する2個のアミノ酸は、隣接していてもよい。2個の隣接するアミノ酸は、反対の立体化学を有し得る。2個の隣接するアミノ酸は、同じ立体化学を有し得る。芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有する3個のアミノ酸は、隣接していてもよい。3個の隣接するアミノ酸は、同じ立体化学を有し得る。3個の隣接するアミノ酸は、互い違いの立体化学を有し得る。

30

【0054】

芳香族基またはヘテロ芳香族基を含むアミノ酸残基は、L-アミノ酸であり得る。芳香族基またはヘテロ芳香族基を含むアミノ酸残基は、D-アミノ酸であり得る。芳香族基またはヘテロ芳香族基を含むアミノ酸残基は、D-アミノ酸及びL-アミノ酸の混合物であり得る。

【0055】

任意選択の置換基は、例えば、置換基を有さない以外の点では同一の配列と比較して、c C P Pの細胞質送達効率を有意に（例えば、50%を超えて）低下させない任意選択の原子または基であり得る。任意選択の置換基は、疎水性置換基または親水性置換基であり得る。任意選択の置換基は疎水性置換基であり得る。置換基は、疎水性アミノ酸の溶媒接触表面積（本明細書で定義される）を増加させることができる。置換基は、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アルコキシ、アリールオキシ、アシル、アルキルカルバモイル、アルキルカルボキサミジル、アルコキシカルボニル、アルキルチオ、またはアリールチオであり得る。置換基はハロゲンであり得る。

40

【0056】

理論に拘束されることを望むものではないが、より高い疎水性値を有する芳香族基またはヘテロ芳香族基を有するアミノ酸（すなわち、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側

50

鎖を有するアミノ酸)は、より低い疎水性値を有するアミノ酸と比較して、c C P Pの細胞質送達効率を改善することができると考えられる。各疎水性アミノ酸は、独立して、グリシンの疎水性値よりも大きい疎水性値を有し得る。各疎水性アミノ酸は、独立して、アラニンの疎水性値よりも大きい疎水性値を有する疎水性アミノ酸であり得る。各疎水性アミノ酸は、独立して、フェニルアラニン以上の疎水性値を有し得る。疎水性は、当技術分野で公知の疎水性スケールを用いて測定することができる。表2は、Eisenberg及びWeissによって報告された種々のアミノ酸についての疎水性値を列挙する(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1984; 81(1): 140-144)、Engleman et al. (Ann. Rev. of Biophys. Biochem. 1986; 1986(15): 321-53)、Kyte and Doolittle (J. Mol. Biol. 1982; 157(1): 105-132)、Hoop and Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1981; 78(6): 3824-3828)、及びJanin (Nature. 1979; 277(5696): 491-492)(これらの各々の全体は、参照により本明細書に組み込まれる)。疎水性は、Englemanらに報告されている疎水性スケールを用いて測定することができる。

【表2】

表2. アミノ酸疎水性

アミノ酸	グループ	Eisenberg 及びWeiss	Engleman ら	Kyrie及び Doolittle	Hoop及び Woods	Janin
Ile	非極性	0.73	3.1	4.5	-1.8	0.7
Phe	非極性	0.61	3.7	2.8	-2.5	0.5
Val	非極性	0.54	2.6	4.2	-1.5	0.6
Leu	非極性	0.53	2.8	3.8	-1.8	0.5
Trp	非極性	0.37	1.9	-0.9	-3.4	0.3
Met	非極性	0.26	3.4	1.9	-1.3	0.4
Ala	非極性	0.25	1.6	1.8	-0.5	0.3
Gly	非極性	0.16	1.0	-0.4	0.0	0.3
Cys	非荷電／極性	0.04	2.0	2.5	-1.0	0.9
Tyr	非荷電／極性	0.02	-0.7	-1.3	-2.3	-0.4
Pro	非極性	-0.07	-0.2	-1.6	0.0	-0.3
Thr	非荷電／極性	-0.18	1.2	-0.7	-0.4	-0.2
Ser	非荷電／極性	-0.26	0.6	-0.8	0.3	-0.1
His	荷電	-0.40	-3.0	-3.2	-0.5	-0.1
Glu	荷電	-0.62	-8.2	-3.5	3.0	-0.7
Asn	非荷電／極性	-0.64	-4.8	-3.5	0.2	-0.5
Gln	非荷電／極性	-0.69	-4.1	-3.5	0.2	-0.7
Asp	荷電	-0.72	-9.2	-3.5	3.0	-0.6
Lys	荷電	-1.10	-8.8	-3.9	3.0	-1.8
Arg	荷電	-1.80	-12.3	-4.5	3.0	-1.4

【0057】

芳香族基またはヘテロ芳香族基のサイズは、c C P Pの細胞質送達効率を改善するように選択することができる。理論に束縛されることを望むものではないが、アミノ酸の側鎖上のより大きな芳香族基またはヘテロ芳香族基は、より小さな疎水性アミノ酸を有する以外の点では同一の配列と比較して、細胞質送達効率を改善し得ると考えられる。疎水性アミノ酸のサイズは、疎水性アミノ酸の分子量、疎水性アミノ酸の立体効果、側鎖の溶媒接触表面積(SASA)、またはそれらの組合せに関して測定することができる。疎水性アミノ酸のサイズは、疎水性アミノ酸の分子量に関して測定することができ、より大きな疎水性アミノ酸は、少なくとも約90 g/mol、または少なくとも約130 g/mol、

または少なくとも約 141 g/mol の分子量を有する側鎖を有する。アミノ酸のサイズは、疎水性側鎖の SASA に関して測定することができる。疎水性アミノ酸は、アラニン以上、またはグリシン以上の SASA を有する側鎖を有し得る。より大きな疎水性アミノ酸は、アラニンより大きい、またはグリシンより大きい SASA を有する側鎖を有し得る。疎水性アミノ酸は、約ピペリジン-2-カルボン酸以上、約トリプトファン以上、約フェニルアラニン以上、または約ナフチルアラニン以上の SASA を有する芳香族基またはヘテロ芳香族基を有し得る。第1の疎水性アミノ酸 (AA_{H1}) は、少なくとも約 $200 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $210 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $220 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $240 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $250 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $260 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $270 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $280 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $290 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $300 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $310 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $320 \text{ \AA}^2$ 、または少なくとも約 $330 \text{ \AA}^2$ の SASA を有する側鎖を有し得る。第2の疎水性アミノ酸 (AA_{H2}) は、少なくとも約 $200 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $210 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $220 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $240 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $250 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $260 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $270 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $280 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $290 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $300 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $310 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $320 \text{ \AA}^2$ 、または少なくとも約 $330 \text{ \AA}^2$ の SASA を有する側鎖を有し得る。 AA_{H1} 及び AA_{H2} の側鎖は、少なくとも約 $350 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $360 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $370 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $380 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $390 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $400 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $410 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $420 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $430 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $440 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $450 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $460 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $470 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $480 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $490 \text{ \AA}^2$ 、約 $500 \text{ \AA}^2$ 超、少なくとも約 $510 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $520 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $530 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $540 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $550 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $560 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $570 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $580 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $590 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $600 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $610 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $620 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $630 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $640 \text{ \AA}^2$ 、約 $650 \text{ \AA}^2$ 超、少なくとも約 $660 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $670 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $680 \text{ \AA}^2$ 、少なくとも約 $690 \text{ \AA}^2$ 、または少なくとも約 $700 \text{ \AA}^2$ の合計 SASA を有し得る。 AA_{H2} は、 AA_{H1} の疎水性側鎖の SASA 以下である SASA を有する側鎖を有する疎水性アミノ酸残基であり得る。例として、限定するものではないが、 NaI-Arg モチーフを有する cCPP は、 Phe-Arg モチーフを有する以外の点では同一の cCPP と比較して、改善された細胞質送達効率を示し得る。 Phe-NaI-Arg モチーフを有する cCPP は、 NaI-Phe-Arg モチーフを有する以外の点では同一の cCPP と比較して、改善された細胞質送達効率を示すことができ、 phe-NaI-Arg モチーフは、 naI-Phe-Arg モチーフを有する以外の点では同一の cCPP と比較して、改善された細胞質送達効率を示すことができる。

【0058】

本明細書で使用される場合、「疎水性表面積」または「SASA」は、溶媒接触可能なアミノ酸側鎖の表面積（平方オングストローム ($\text{\AA}^2$) として報告される）であり、例えば、SASA は、Shrake & Rupley によって開発された「ローリングボール」アルゴリズムを使用して計算することができ (*J Mol Biol.* 79 (2): 351-71)、これは、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。このアルゴリズムは、分子の表面を調べるために特定の半径の溶媒の「球」を使用する。球の典型的な値は $1.4 \text{ \AA}$ であり、これは水分子の半径に近似する。

【0059】

特定の側鎖の SASA 値を以下の表 3 に示す。本明細書に記載される SASA 値は、Tienら (*PLOS ONE* 8 (11): e80635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080635>) によって報告されているように、以下の表 3 に列挙される理論値に基づき、これは、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. アミノ酸 S A S A 値

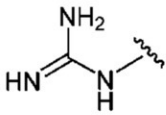
残基	理論	実験	Millerら(1987)	Roseら(1985)
アラニン	129.0	121.0	113.0	118.1
アルギニン	274.0	265.0	241.0	256.0
アスパラギン	195.0	187.0	158.0	165.5
アスパルテート	193.0	187.0	151.0	158.7
システイン	167.0	148.0	140.0	146.1
グルタミン酸塩	223.0	214.0	183.0	186.2
グルタミン	225.0	214.0	189.0	193.2
グリシン	104.0	97.0	85.0	88.1
ヒスチジン	224.0	216.0	194.0	202.5
イソロイシン	197.0	195.0	182.0	181.0
ロイシン	201.0	191.0	180.0	193.1
リジン	236.0	230.0	211.0	225.8
メチオニン	224.0	203.0	204.0	203.4
フェニルアラニン	240.0	228.0	218.0	222.8
プロリン	159.0	154.0	143.0	146.8
セリン	155.0	143.0	122.0	129.8
トレオニン	172.0	163.0	146.0	152.5
トリプトファン	285.0	264.0	259.0	266.3
チロシン	263.0	255.0	229.0	236.8
バリン	174.0	165.0	160.0	164.5

【0060】

グアニジン基、グアニジン置換基、またはそれらのプロトン化形態を含む側鎖を有するアミノ酸残基

本明細書で使用される場合、グアニジンは、構造：

【化9】

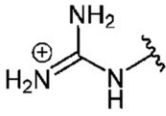


を指す。

【0061】

本明細書で使用される場合、グアニジンのプロトン化形態は、構造：

【化10】



を指す。

【0062】

グアニジン置換基は、生理学的 pH 以上で正に荷電するアミノ酸の側鎖上の官能基、またはグアニジニウム基の水素結合供与及び受容活性を再現することができる官能基を指す

。

【 0 0 6 3 】

グアニジン置換基は、グアニジン基またはそのプロトン化形態に関連する毒性を低減しながら、治療剤の細胞透過及び送達を促進する。c C P P は、グアニジンまたはグアニジニウム置換基を含む側鎖を有する少なくとも 1 個のアミノ酸を含み得る。c C P P は、グアニジンまたはグアニジニウム置換基を含む側鎖を有する少なくとも 2 個のアミノ酸を含み得る。c C P P は、グアニジンまたはグアニジニウム置換基を含む側鎖を有する少なくとも 3 個のアミノ酸を含み得る。

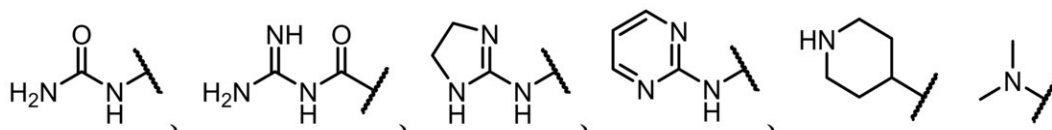
【 0 0 6 4 】

グアニジンまたはグアニジニウム基は、グアニジンまたはグアニジニウムの同配体であり得る。グアニジンまたはグアニジニウム置換基は、グアニジンよりも塩基性が低い場合がある。

【 0 0 6 5 】

本明細書で使用される場合、グアニジン置換基は、

【 化 1 1 】

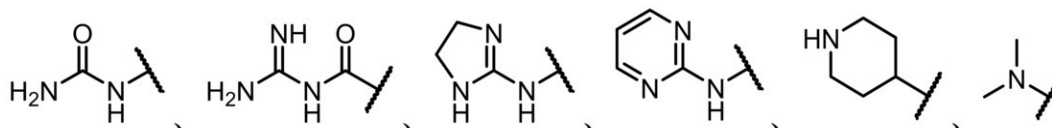


、またはそのプロトン化形態を指す。

【 0 0 6 6 】

本開示は、4 から 20 個のアミノ酸残基を含む c C P P であって、(i) 少なくとも 1 個のアミノ酸が、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し、(i i) 少なくとも 1 個のアミノ酸残基が、側鎖を有さないか、または

【 化 1 2 】

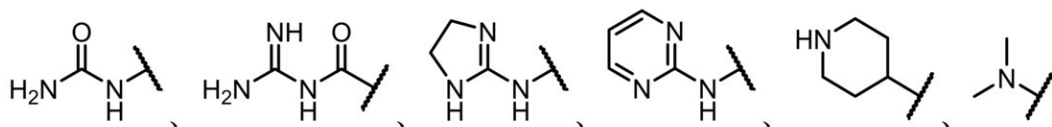


、もしくはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し、(i i i) 少なくとも 2 個のアミノ酸残基が、独立して、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有する。

【 0 0 6 7 】

少なくとも 2 個のアミノ酸残基は、側鎖を有さなくてもよく、または

【 化 1 3 】



、もしくはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し得る。本明細書で使用される場合、側鎖が存在しない場合、アミノ酸残基は、アミンとカルボン酸とを連結する炭素原子上に 2 個の水素原子を有する（例えば、 $-CH_2-$ ）。

【 0 0 6 8 】

c C P P は、以下の部分：

10

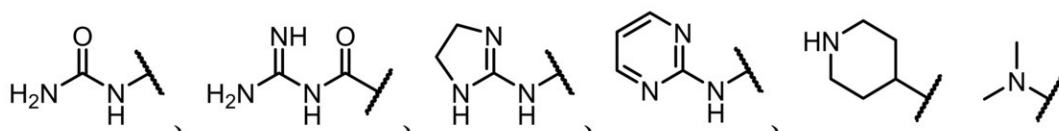
20

30

40

50

【化 1 4】



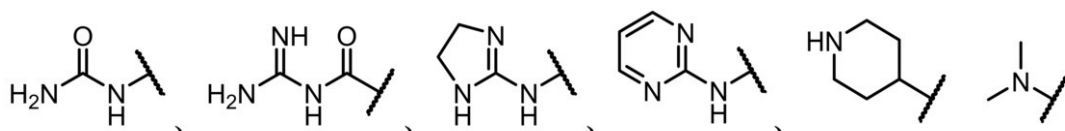
、またはそのプロトン化形態の 1 つを含む側鎖を有する少なくとも 1 個のアミノ酸を含み得る。

【0 0 6 9】

10

c C P P は、少なくとも 2 個のアミノ酸を含み得、各アミノ酸は独立して、以下の部分

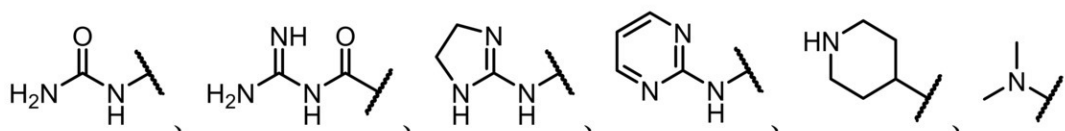
【化 1 5】



20

、またはそのプロトン化形態の 1 つを含む。少なくとも 2 個のアミノ酸は、

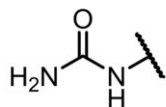
【化 1 6】



、またはそのプロトン化形態から選択される同じ部分を含む側鎖を有し得る。少なくとも 1 個のアミノ酸は、

30

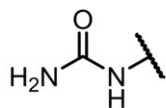
【化 1 7】



、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し得る。少なくとも 2 個のアミノ酸は、

【化 1 8】

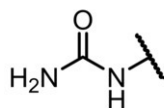
40



、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し得る。1 個、2 個、3 個、または 4 個のアミノ酸は、

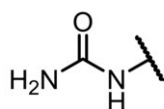
50

【化 1 9】



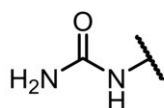
、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し得る。1 個のアミノ酸は、

【化 2 0】



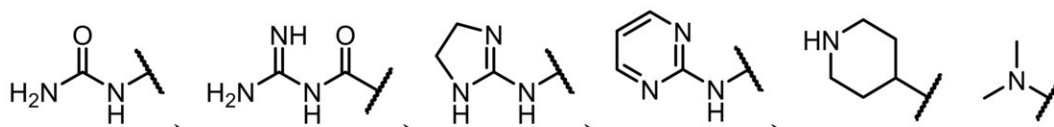
、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し得る。2 個のアミノ酸は、

【化 2 1】



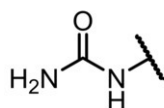
、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有し得る。

【化 2 2】



、またはそのプロトン化形態は、アミノ酸側鎖の末端に結合することができる。

【化 2 3】



は、アミノ酸側鎖の末端に結合することができる。

【0 0 7 0】

c C P P は、(i i i) グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有する 2、3、4、5 または 6 個のアミノ酸残基を含み得る。c C P P は、(i i i) グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有する 2 個のアミノ酸残基を含み得る。c C P P は、(i i i) グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有する 3 個のアミノ酸残基を含み得る。c C P P は、(i i i) グアニジン基、グアニジン置換基、またはそれらのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有する 4 個のアミノ酸残基を含み得る。c C P P は、(i i i) グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有する 5 個のアミノ酸残基を含み得る。c C P P は、(i i i) グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有する 6 個のアミノ酸残基を含み得る。c C P P は、(i i i) グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有する 2、3、4、または 5 個のアミノ酸残基を含み得る。c C P P は、(i i i) グアニジン基、グアニジン置換基、また

10

20

30

40

50

はそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有する2、3、または4個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i i) グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有する2または3個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i i) グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する少なくとも1個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i i) グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する2個のアミノ酸残基を含み得る。c C P Pは、(i i i) グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する3個のアミノ酸残基を含み得る。

【0071】

アミノ酸残基は、独立して、隣接していないグアニジン基、グアニジン置換基、またはそれらのプロトン化形態を含む側鎖を有し得る。2個のアミノ酸残基は、独立して、グアニジン基、グアニジン置換基を含む側鎖を有し得、またはそれらのプロトン化形態が隣接し得る。3個のアミノ酸残基は、独立して、グアニジン基、グアニジン置換基を含む側鎖を有し得、またはそれらのプロトン化形態が隣接し得る。4個のアミノ酸残基は、独立して、グアニジン基、グアニジン置換基を含む側鎖を有し得、またはそれらのプロトン化形態が隣接し得る。隣接するアミノ酸残基は、同じ立体化学を有し得る。隣接するアミノ酸は、互い違い立体化学を有し得る。

10

【0072】

グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有するアミノ酸残基は、L-アミノ酸であり得る。グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有するアミノ酸残基は、D-アミノ酸であり得る。グアニジン基、グアニジン置換基、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を独立して有するアミノ酸残基は、LまたはD-アミノ酸の混合物であり得る。

20

【0073】

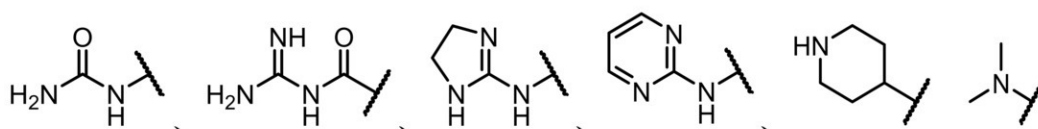
グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する各アミノ酸残基は、独立して、アルギニン、ホモアルギニン、2-アミノ-3-プロピオン酸、2-アミノ-4-グアニジノ酪酸またはそのプロトン化形態の残基であり得る。グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する各アミノ酸残基は、独立して、アルギニンまたはそのプロトン化形態の残基であり得る。

【0074】

グアニジン置換基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する各アミノ酸は、独立して、

30

【化24】



、またはそのプロトン化形態であり得る。

【0075】

40

理論に束縛されるものではないが、グアニジン置換基は、アルギニンと比較して低減された塩基性を有し、場合によっては、生理的pHで非荷電であり（例えば、-N(H)C(O)）、効果的な膜結合性及びその後の内在化を促進すると考えられる原形質膜上のリン脂質との二重水素結合相互作用を維持することができると仮定される。正電荷の除去はまた、c C P Pの毒性を減少させると考えられる。

【0076】

当業者は、上記非天然芳香族疎水性アミノ酸のN末端及び／またはC末端が、本明細書に開示されるペプチドへの組み込みの際に、アミド結合を形成することを理解するであろう。

【0077】

50

c C P Pは、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有する第1のアミノ酸と、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有する第2のアミノ酸とを含み得、ここで、第1のグリシンのN末端は、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有する第1のアミノ酸とペプチド結合を形成し、第1のグリシンのC末端は、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有する第2のアミノ酸とペプチド結合を形成する。慣例により、「第1のアミノ酸」という用語は、ペプチド配列のN末端アミノ酸を指すことが多いが、本明細書で使用される場合、「第1のアミノ酸」は、参照アミノ酸をc C P P中の別のアミノ酸（例えば、「第2のアミノ酸」）と区別するために使用され、したがって、「第1のアミノ酸」という用語は、ペプチド配列のN末端に位置するアミノ酸を指す場合がある。

【0078】

c C P Pは、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸とペプチド結合を形成する第2のグリシンのN末端を含み得、第2のグリシンのC末端は、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有するアミノ酸とペプチド結合を形成する。

【0079】

c C P Pは、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する第1のアミノ酸と、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する第2のアミノ酸とを含み得、第3のグリシンのN末端は、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する第1のアミノ酸とペプチド結合を形成し、第3のグリシンのC末端は、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する第2のアミノ酸とペプチド結合を形成する。

【0080】

c C P Pは、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、またはホモグルタミンの残基を含み得る。c C P Pはアスパラギン残基を含み得る。c C P Pはグルタミン残基を含み得る。

【0081】

c C P Pは、チロシン、フェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、トリプトファン、3-ベンゾチエニルアラニン、4-フェニルフェニルアラニン、3, 4-ジフルオロフェニルアラニン、4-トリフルオロメチルフェニルアラニン、2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、β-ホモフェニルアラニン、4-tert-ブチルフェニルアラニン、4-ピリジニルアラニン、3-ピリジニルアラニン、4-メチルフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、3-(9-アントリル)-アラニンの残基を含み得る。

【0082】

理論に束縛されることを望むものではないが、c C P P中のアミノ酸のキラリティは、細胞質取り込み効率に影響を与え得ると考えられる。c C P Pは、少なくとも1個のDアミノ酸を含み得る。c C P Pは、1から15個のDアミノ酸を含み得る。c C P Pは、1から10個のDアミノ酸を含み得る。c C P Pは、1、2、3、または4個のDアミノ酸を含み得る。c C P Pは、D及びLキラリティを互い違いに有する2、3、4、5、6、7、または8個の隣接アミノ酸を含み得る。c C P Pは、同じキラリティを有する3個の隣接するアミノ酸を含み得る。c C P Pは、同じキラリティを有する2個の隣接するアミノ酸を含み得る。少なくとも2個のアミノ酸は、反対のキラリティを有し得る。反対のキラリティを有する少なくとも2個のアミノ酸は、互いに隣接し得る。少なくとも3個のアミノ酸は、互いに対して互い違いの立体化学を有し得る。互いに対して互い違いのキラリティを有する少なくとも3個のアミノ酸は、互いに隣接し得る。少なくとも4個のアミノ酸は、互いに対して互い違いの立体化学を有する。互いに対して互い違いのキラリティを有する少なくとも4個のアミノ酸は、互いに隣接し得る。少なくとも2個のアミノ酸は、同じキラリティを有し得る。同じキラリティを有する少なくとも2個のアミノ酸は、互いに隣接し得る。少なくとも2個のアミノ酸は同じキラリティを有し、少なくとも2個のアミノ酸は反対のキラリティを有する。反対のキラリティを有する少なくとも2個のアミノ酸は、同じキラリティを有する少なくとも2個のアミノ酸に隣接し得る。したがって、c

10

20

30

40

50

C P P中の隣接アミノ酸は、以下の配列のいずれかを有し得る：D-L、L-D、D-L-L-D、L-D-D-L、L-D-L-L-D、D-L-D-D-L、D-L-L-L-D、またはL-D-D-L-D。c C P Pを形成するアミノ酸残基は、全てL-アミノ酸であり得る。c C P Pを形成するアミノ酸残基は、全てD-アミノ酸であり得る。

【0083】

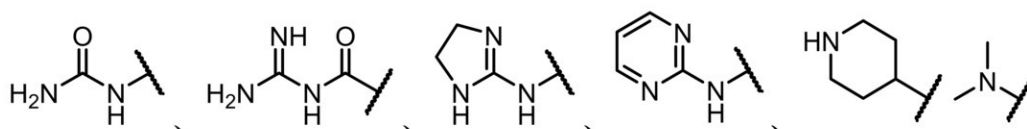
少なくとも2個のアミノ酸は、異なるキラリティを有し得る。異なるキラリティを有する少なくとも2個のアミノ酸は、互いに隣接し得る。少なくとも3個のアミノ酸は、隣接するアミノ酸に対して異なるキラリティを有し得る。少なくとも4個のアミノ酸は、隣接するアミノ酸に対して異なるキラリティを有し得る。少なくとも2個のアミノ酸は同じキラリティを有し、少なくとも2個のアミノ酸は異なるキラリティを有する。c C P Pを形成する1つ以上のアミノ酸残基はアキラルであり得る。c C P Pは、3、4、または5アミノ酸のモチーフを含み得、そのうち、同じキラリティを有する2個のアミノ酸は、アキラルアミノ酸によって隔てられ得る。c C P Pは以下の配列を含み得る：D-X-D、D-X-D-X、D-X-D-X-D、L-X-L、L-X-L-X、またはL-X-L-X-L（式中、Xはアキラルアミノ酸である）。アキラルアミノ酸は、グリシンであり得る。

10

【0084】

【化25】

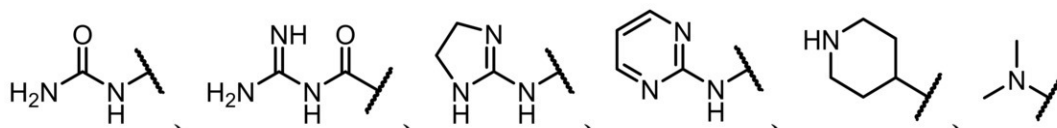
20



、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有するアミノ酸は、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸に隣接し得る。

【化26】

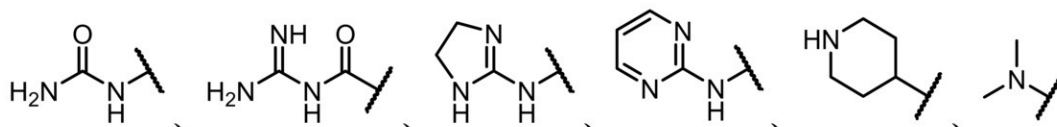
30



、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有するアミノ酸は、グアニジンまたはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する少なくとも1個のアミノ酸に隣接し得る。グアニジンまたはそのプロトン化形態を含む側鎖を有するアミノ酸は、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸に隣接し得る。

【化27】

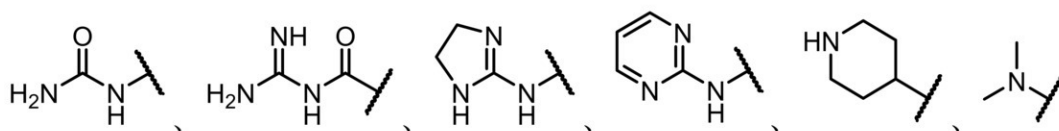
40



、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する2個のアミノ酸は、互いに隣接し得る。グアニジンまたはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する2個のアミノ酸は、互いに隣接している。c C P Pは、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含み得る側鎖を有する少なくとも2個の隣接するアミノ酸と、

50

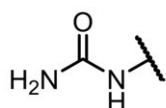
【化 2 8】



、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する少なくとも 2 個の隣接しないアミノ酸とを有し得る。c C P P は、芳香族基またはヘテロ芳香族基を含む側鎖を有する少なくとも 2 個の隣接するアミノ酸と、

10

【化 2 9】

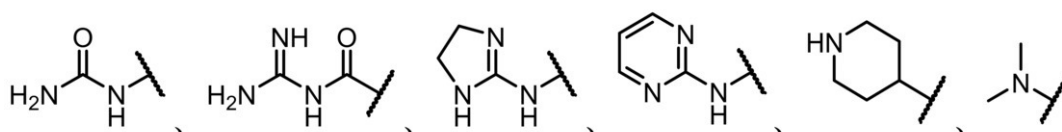


、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する少なくとも 2 個の隣接しないアミノ酸とを有し得る。隣接するアミノ酸は、同じキラリティを有し得る。隣接するアミノ酸は、反対のキラリティを有し得る。アミノ酸の他の組合せは、D 及び L アミノ酸の任意の配置、例えば、前段落に記載された配列のいずれかを有し得る。

20

【0 0 8 5】

【化 3 0】



30

、またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する少なくとも 2 個のアミノ酸は、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を有する少なくとも 2 個のアミノ酸と互い違いになっている。

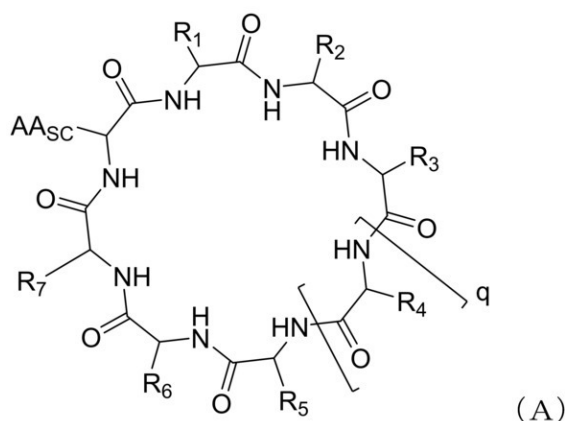
【0 0 8 6】

c C P P は、式 (A) :

40

50

【化 3 1】



10

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、
式中、

R_1 、 R_2 及び R_3 は、各々独立して、H または アミノ酸の芳香族もしくはヘテロ芳香族側鎖であり、

R_1 、 R_2 、及び R_3 のうちの少なくとも 1 つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

20

R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 は独立して、H または アミノ酸側鎖であり、

R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 のうちの少なくとも 1 つは、3-グアニジノ-2-アミノプロピオン酸、4-グアニジノ-2-アミノブタン酸、アルギニン、ホモアルギニン、N-メチルアルギニン、N,N-ジメチルアルギニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、リジン、N-メチルリジン、N,N-ジメチルリジン、N-エチルリジン、N,N,N-トリメチルリジン、4-グアニジノフェニルアラニン、シトルリン、N,N-ジメチルリジン、 β -ホモアルギニン、3-(1-ピペリジル)アラニンの側鎖であり、

AA_{SC} はアミノ酸側鎖であり、

q は、1、2、3 または 4 である。

30

【0087】

実施形態では、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 の少なくとも 1 つは、独立して、アミノ酸の非荷電の非芳香族側鎖である。実施形態では、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 の少なくとも 1 つは、独立して、H、またはシトルリンの側鎖である。

【0088】

実施形態では、化合物であって、6～12 個のアミノ酸を有する環状ペプチドを含み、環状ペプチドの少なくとも 2 個のアミノ酸が荷電アミノ酸であり、環状ペプチドの少なくとも 2 個のアミノ酸が芳香族疎水性アミノ酸であり、環状ペプチドの少なくとも 2 個のアミノ酸が非荷電の非芳香族アミノ酸である、当該化合物が提供される。実施形態では、環状ペプチドの少なくとも 2 個のアミノ酸はアルギニンである。実施形態では、環状ペプチドの少なくとも 2 個の芳香族疎水性アミノ酸は、フェニルアラニン、ナフトアラニン（3-ナフタ-2-イル-アラニン）またはその組み合わせである。実施形態では、環状ペプチドの少なくとも 2 個の非荷電の非芳香族アミノ酸は、シトルリン、グリシンまたはその組み合わせである。実施形態では、化合物は、6～12 個のアミノ酸を有する環状ペプチドであり、環状ペプチドの 2 個のアミノ酸はアルギニンであり、少なくとも 2 個のアミノ酸は、フェニルアラニン、ナフトアラニン及びその組み合わせから選択される芳香族疎水性アミノ酸であり、少なくとも 2 個のアミノ酸は、シトルリン、グリシン及びその組み合わせから選択される非荷電の非芳香族アミノ酸である。

40

【0089】

実施形態では、式 (A) の環状ペプチドは、以下の配列を有する環状ペプチドではない

50

【表 4】

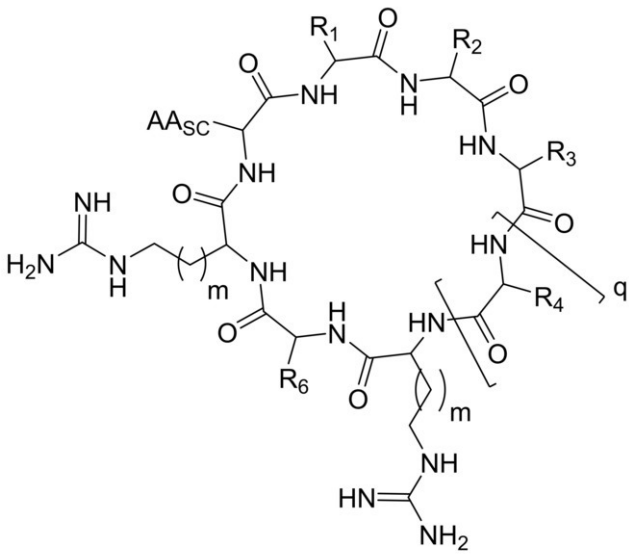
CPP 配列		
FΦRRRQ	RRFRΦRQ	FΦRRRRQK
FΦRRRC	FRRRRΦQ	FΦRRRRQC
FΦRRRU	rRFRΦRQ	fΦRrRrRQ
RRRΦFQ	RRΦFRRQ	FΦRRRRRQ
RRRRΦF	CRRRRFWQ	RRRRΦFDΩC
FΦRRRR	FfΦRrRrQ	FΦRRR
FφrRrRq	FFΦRRRRQ	FWRRR
FφrRrRQ	RFRFRΦRQ	RRRΦF
FΦRRRRQ	URRRRFWQ	RRRWF
fΦRrRrQ	CRRRRFWQ	

表中、Fは、L-フェニルアラニンであり、fは、D-フェニルアラニンであり、Φは、L-3-(2-ナフチル)-アラニンであり、Φは、D-3-(2-ナフチル)-アラニンであり、Rは、L-アルギニンであり、rは、D-アルギニンであり、Qは、L-グルタミンであり、qは、D-グルタミンであり、Cは、L-システインであり、Uは、L-セレノシステインであり、Wは、L-トリプトファンであり、Kは、L-システインであり、Dは、L-アスパラギン酸であり、Ωは、L-ノルロイシンである。

【0090】

c CPP は、式 (I) :

【化 32】



またはそのプロトン化形態の構造を含み得、
式中、

R₁、R₂及びR₃は、各々独立して、Hまたは芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であってもよく、

R₁、R₂、及びR₃のうちの少なくとも1つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

R_4 及び R_6 は、独立して、H または アミノ酸側鎖であり、
 $A A_{Sc}$ は、アミノ酸側鎖であり、
 q は、1、2、3 または 4 であり、
 各 m は、独立して、整数 0、1、2、または 3 である。

【0091】

R_1 、 R_2 、及び R_3 は、各々独立して、H、 α -アルキレン-アリール、またはアルキレン-ヘテロアリールであり得る。 R_1 、 R_2 、及び R_3 は、各々独立して、H、 $C_1 \sim 3$ アルキレン-アリール、または $C_1 \sim 3$ アルキレン-ヘテロアリールであり得る。 R_1 、 R_2 、及び R_3 は、各々独立して、H または アルキレン-アリールであり得る。 R_1 、 R_2 、及び R_3 は、各々独立して、H または $C_1 \sim 3$ アルキレン-アリールであり得る。 $C_1 \sim 3$ アルキレンはメチレンであり得る。アリールは、6 から 14 員アリールであり得る。ヘテロアリールは、N、O、及び S から選択される 1 つ以上のヘテロ原子を有する 6 から 14 員ヘテロアリールであり得る。アリールは、フェニル、ナフチル、またはアントラセニルから選択され得る。アリールは、フェニルまたはナフチルであり得る。アリールはフェニルであり得る。ヘテロアリールは、ピリジル、キノリル、及びイソキノリルであり得る。 R_1 、 R_2 及び R_3 は、各々独立して、H、 $C_1 \sim 3$ アルキレン-Ph または $C_1 \sim 3$ アルキレン-ナフチルであり得る。 R_1 、 R_2 、及び R_3 は、各々独立して、H、 CH_2Ph 、または CH_2 ナフチルであり得る。 R_1 、 R_2 、及び R_3 は、各々独立して、H または CH_2Ph であり得る。

10

【0092】

R_1 、 R_2 、及び R_3 は、各々独立して、チロシン、フェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、トリプトファン、3-ベンゾチエニルアラニン、4-フェニルフェニルアラニン、3, 4-ジフルオロフェニルアラニン、4-トリフルオロメチルフェニルアラニン、2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、 β -ホモフェニルアラニン、4-tert-ブチルフェニルアラニン、4-ピリジニルアラニン、3-ピリジニルアラニン、4-メチルフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、3-(9-アントリル)-アラニンの側鎖であり得る。

20

【0093】

R_1 は、チロシンの側鎖であり得る。 R_1 は、フェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、1-ナフチルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、2-ナフチルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、トリプトファンの側鎖であり得る。 R_1 は、3-ベンゾチエニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、4-フェニルフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、3, 4-ジフルオロフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、4-トリフルオロメチルフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、ホモフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、 β -ホモフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、4-tert-ブチルフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、4-ピリジニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、3-ピリジニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、4-メチルフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、4-フルオロフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、4-クロロフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_1 は、3-(9-アントリル)-アラニンの側鎖であり得る。

30

40

【0094】

R_2 は、チロシンの側鎖であり得る。 R_2 は、フェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_2 は、1-ナフチルアラニンの側鎖であり得る。 R_2 は、2-ナフチルアラニンの側鎖であり得る。 R_2 は、トリプトファンの側鎖であり得る。 R_2 は、3-ベンゾチエニルアラニンの側鎖であり得る。 R_2 は、4-フェニルフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_2 は、3, 4-ジフルオロフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_2 は、4-トリフルオロメチルフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_2 は、2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニルアラニンの側鎖であり得る。 R_2 は、ホモフェニルアラニンの側鎖であり得る。

50

。R₂は、β-ホモフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₂は、4-tert-ブチルフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₂は、4-ピリジニルアラニンの側鎖であり得る。R₂は、3-ピリジニルアラニンの側鎖であり得る。R₂は、4-メチルフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₂は、4-フルオロフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₂は、4-クロロフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₂は、3-(9-アントリル)アラニンの側鎖であり得る。

【0095】

R₃は、チロシンの側鎖であり得る。R₃は、フェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、1-ナフチルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、2-ナフチルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、トリプトファンの側鎖であり得る。R₃は、3-ベンゾチエニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、4-フェニルフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、3,4-ジフルオロフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、4-トリフルオロメチルフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、2,3,4,5,6-ペンタフルオロフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、ホモフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、β-ホモフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、4-tert-ブチルフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、4-ピリジニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、3-ピリジニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、4-メチルフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、4-フルオロフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、4-クロロフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₃は、3-(9-アントリル)アラニンの側鎖であり得る。

【0096】

R₄は、H、-アルキレン-アリール、-アルキレン-ヘテロアリールであり得る。R₄は、H、-C₁~₃アルキレン-アリール、またはC₁~₃アルキレン-ヘテロアリールであり得る。R₄は、Hまたはアルキレン-アリールであり得る。R₄は、HまたはC₁~₃アルキレン-アリールであり得る。C₁~₃アルキレンは、メチレンであり得る。アリールは、6から14員アリールであり得る。ヘテロアリールは、N、O、及びSから選択される1つ以上のヘテロ原子を有する6から14員ヘテロアリールであり得る。アリールは、フェニル、ナフチル、またはアントラセニルから選択され得る。アリールは、フェニルまたはナフチルであり得る。アリールは、フェニルであり得る。ヘテロアリールは、ピリジル、キノリル、及びイソキノリルであり得る。R₄は、H、-C₁~₃アルキレン-P_hまたはC₁~₃アルキレン-ナフチルであり得る。R₄は、Hまたは表1もしくは表3のアミノ酸の側鎖であり得る。R₄は、Hまたは芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得る。R₄は、H、-CH₂P_h、またはCH₂ナフチルであり得る。R₄は、HまたはCH₂P_hであり得る。

【0097】

R₅は、H、-アルキレン-アリール、-アルキレン-ヘテロアリールであり得る。R₅は、H、-C₁~₃アルキレン-アリール、またはC₁~₃アルキレン-ヘテロアリールであり得る。R₅は、Hまたはアルキレン-アリールであり得る。R₅は、HまたはC₁~₃アルキレン-アリールであり得る。C₁~₃アルキレンは、メチレンであり得る。アリールは、6から14員アリールであり得る。ヘテロアリールは、N、O、及びSから選択される1つ以上のヘテロ原子を有する6から14員ヘテロアリールであり得る。アリールは、フェニル、ナフチル、またはアントラセニルから選択され得る。アリールは、フェニルまたはナフチルであり得る。アリールは、フェニルであり得る。ヘテロアリールは、ピリジル、キノリル、及びイソキノリルであり得る。R₅は、H、-C₁~₃アルキレン-P_hまたはC₁~₃アルキレン-ナフチルであり得る。R₅は、Hまたは表1もしくは表3のアミノ酸の側鎖であり得る。R₄は、Hまたは芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得る。R₅は、H、-CH₂P_h、またはCH₂ナフチルであり得る。R₄は、HまたはCH₂P_hであり得る。

【0098】

R₆は、H、-アルキレン-アリール、-アルキレン-ヘテロアリールであり得る。R

6 は、H、 $-C_{1\sim3}$ アルキレン-アリール、または $C_{1\sim3}$ アルキレン-ヘテロアリールであり得る。R₆は、Hまたはアルキレン-アリールであり得る。R₆は、Hまたは $C_{1\sim3}$ アルキレン-アリールであり得る。 $C_{1\sim3}$ アルキレンはメチレンであり得る。アリールは、6 から 14 員アリールであり得る。ヘテロアリールは、N、O、及び S から選択される 1 つ以上のヘテロ原子を有する 6 から 14 員ヘテロアリールであり得る。アリールは、フェニル、ナフチル、またはアントラセニルから選択され得る。アリールは、フェニルまたはナフチルであり得る。アリールは、フェニルであり得る。ヘテロアリールは、ピリジル、キノリル、及びイソキノリルであり得る。R₆は、H、 $-C_{1\sim3}$ アルキレン-P h または $C_{1\sim3}$ アルキレン-ナフチルであり得る。R₆は、Hまたは表 1 もしくは表 3 のアミノ酸の側鎖であり得る。R₆は、Hまたは芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得る。R₆は、H、 $-CH_2Ph$ 、または CH_2 ナフチルであり得る。R₆は、Hまたは CH_2Ph であり得る。

10

【0099】

R₇は、H、 $-$ アルキレン-アリール、 $-$ アルキレン-ヘテロアリールであり得る。R₇は、H、 $-C_{1\sim3}$ アルキレン-アリール、または $C_{1\sim3}$ アルキレン-ヘテロアリールであり得る。R₇は、Hまたはアルキレン-アリールであり得る。R₇は、Hまたは $C_{1\sim3}$ アルキレン-アリールであり得る。 $C_{1\sim3}$ アルキレンは、メチレンであり得る。アリールは、6 から 14 員アリールであり得る。ヘテロアリールは、N、O、及び S から選択される 1 つ以上のヘテロ原子を有する 6 から 14 員ヘテロアリールであり得る。アリールは、フェニル、ナフチル、またはアントラセニルから選択され得る。アリールは、フェニルまたはナフチルであり得る。アリールは、フェニルであり得る。ヘテロアリールは、ピリジル、キノリル、及びイソキノリルであり得る。R₇は、H、 $-C_{1\sim3}$ アルキレン-P h または $C_{1\sim3}$ アルキレン-ナフチルであり得る。R₇は、Hまたは表 1 もしくは表 3 のアミノ酸の側鎖であり得る。R₇は、Hまたは芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得る。R₇は、H、 $-CH_2Ph$ 、または CH_2 ナフチルであり得る。R₇は、Hまたは CH_2Ph であり得る。

20

【0100】

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの1個、2個、または3個は、 $-CH_2Ph$ であり得る。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの1つは、 $-CH_2Ph$ であり得る。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの2個は、 $-CH_2Ph$ であり得る。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの3個は、 $-CH_2Ph$ であり得る。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも1つは、 $-CH_2Ph$ であり得る。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの4個以下は、 $-CH_2Ph$ であり得る。

30

【0101】

R₁、R₂、R₃及びR₄のうちの1個、2個または3個は、 $-CH_2Ph$ である。R₁、R₂、R₃、及びR₄のうちの1つは、 $-CH_2Ph$ である。R₁、R₂、R₃、及びR₄のうちの2個は、 $-CH_2Ph$ である。R₁、R₂、R₃、及びR₄のうちの3個は、 $-CH_2Ph$ である。R₁、R₂、R₃、及びR₄のうちの少なくとも1つは、 $-CH_2Ph$ である。

40

【0102】

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの1、2または3個は、Hであり得る。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうち1つは、Hであり得る。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの2個は、Hである。R₁、R₂、R₃、R₅、R₆、及びR₇のうちの3個は、Hであり得る。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも1つは、Hであり得る。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの3個以下は、 $-CH_2Ph$ であり得る。

【0103】

R₁、R₂、R₃、及びR₄のうちの1、2または3個は、Hである。R₁、R₂、R₃、及びR₄のうちの1つは、Hである。R₁、R₂、R₃、及びR₄のうちの2個は、H

50

20

30

40

50

R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、3-グアニジノ-2-アミノプロピオン酸の側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、4-グアニジノ-2-アミノブタン酸の側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、アルギニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、ホモアルギニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、N-メチルアルギニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、N,N-ジメチルアルギニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、2,3-ジアミノプロピオン酸の側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、2,4-ジアミノブタン酸、リジンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、N-メチルリジンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、N,N-ジメチルリジンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、N-エチルリジンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、N,N,N-トリメチルリジン、4-グアニジノフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆及びR₇の少なくとも2個は、シトルリンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、N,N-ジメチルリジン、β-ホモアルギニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも2個は、3-(1-ピペリジニル)アラニンの側鎖であり得る。

50

R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、3-グアニジノ-2-アミノプロピオン酸の側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、4-グアニジノ-2-アミノブタン酸の側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、アルギニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、ホモアルギニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、N-メチルアルギニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、N,N-ジメチルアルギニンの側鎖であり得る。

る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、2,3-ジアミノプロピオン酸の側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、2,4-ジアミノブタン酸、リジンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、N-メチルリジンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、N,N-ジメチルリジンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、N-エチルリジンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、N,N-トリメチルリジン、4-グアニジノフェニルアラニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個はシトルリンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、N,N-ジメチルリジン、β-ホモアルギニンの側鎖であり得る。R₄、R₅、R₆、及びR₇のうちの少なくとも3個は、3-(1-ピペリジニル)アラニンの側鎖であり得る。

10

【0107】

AA_{Sc}は、アスパラギン、グルタミン、またはホモグルタミンの残基の側鎖であり得る。AA_{Sc}は、グルタミン残基の側鎖であり得る。cCPPは、AA_{Sc}、例えば、アスパラギン、グルタミン、またはホモグルタミンの残基にコンジュゲートしたリンカーを更に含み得る。したがって、cCPPは、アスパラギン、グルタミン、またはホモグルタミンの残基にコンジュゲートされたリンカーを更に含み得る。cCPPは、グルタミン残基に結合したリンカーを更に含み得る。

20

【0108】

qは、1、2または3であり得る。qは1または2であり得る。qは1であり得る。qは2であり得る。qは3であり得る。qは4であり得る。

【0109】

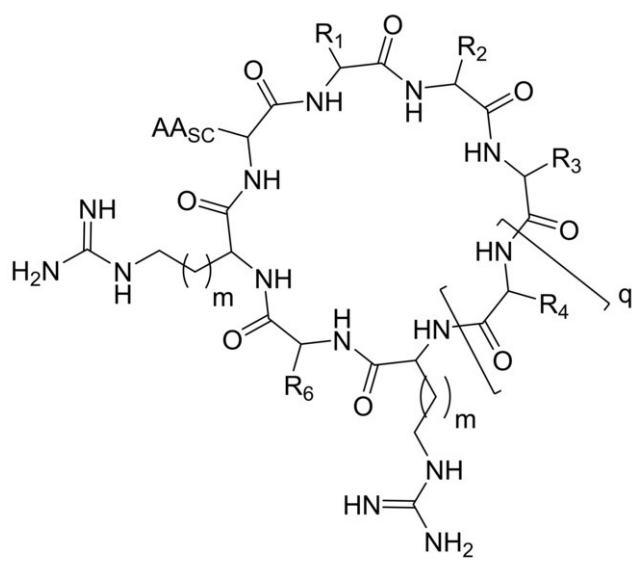
mは1~3であり得る。mは1または2であり得る。mは0であり得る。mは1であり得る。mは2であり得る。mは3であり得る。

【0110】

式(A)のcCPPは、式(I)

【化33】

30



40

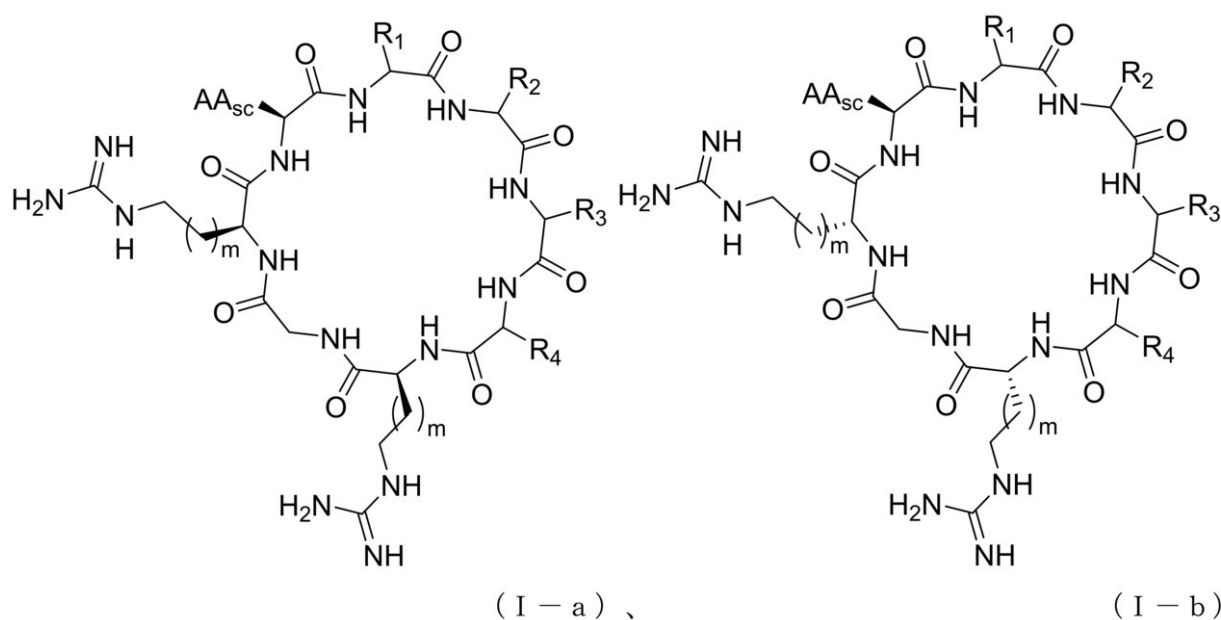
またはそのプロトン化形態の構造を含み得、式中、AA_{Sc}、R₁、R₂、R₃、R₄、R₇、m及びqは、本明細書に定義されるとおりである。

【0111】

式(A)のcCPPは、式(I-a)または式(I-b)：

50

【化 3 4】

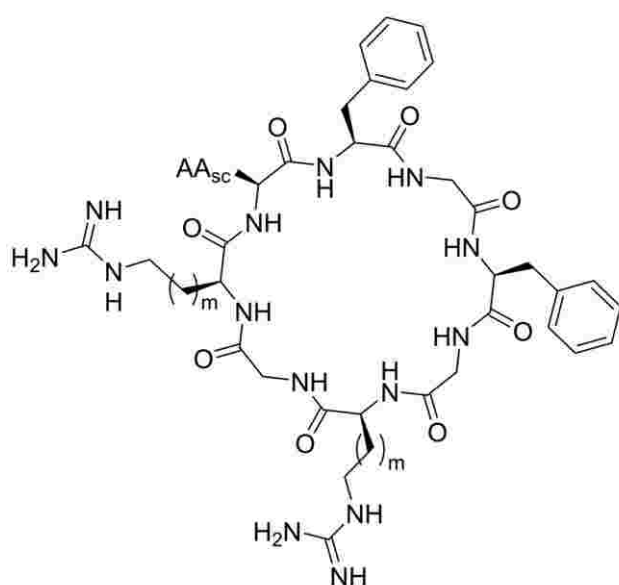


またはそのプロトン化形態の構造を含み得、 AA_{SC} 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、及び m は本明細書で定義される通りである。

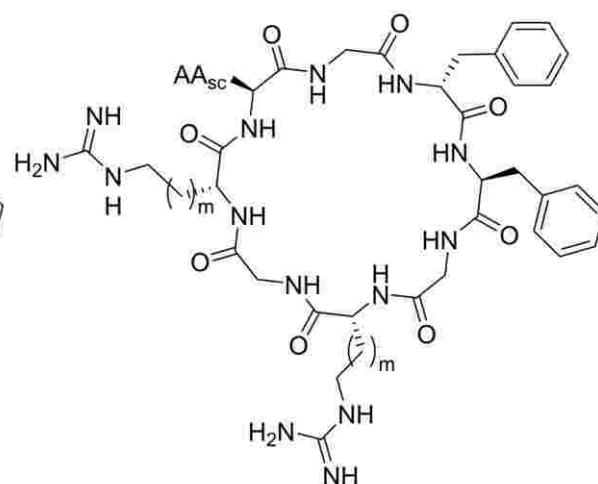
【 0 1 1 2 】

式 (A) の c C P P は、式 (I-1)、(I-2)、(I-3) または (I-4) :

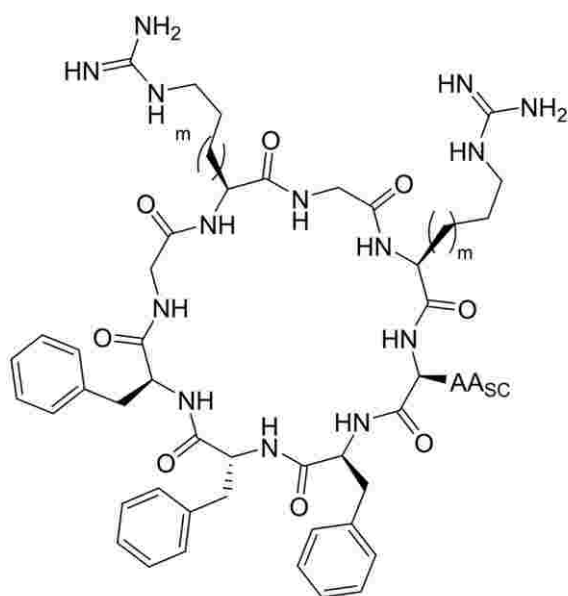
【化 3 5】



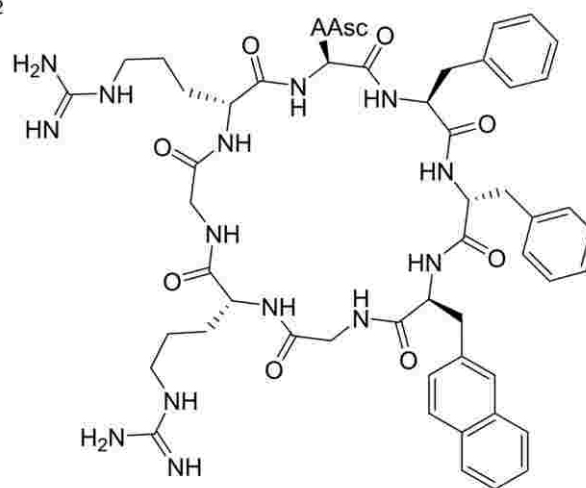
(I-1)、



(I-2)、



(I-3)、



(I-4)

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、式中、 AA_{sc} 及び m は、本明細書に定義される通りである。

【0113】

式 (A) の $cCPP$ は、式 (I-5) または (I-6) :

10

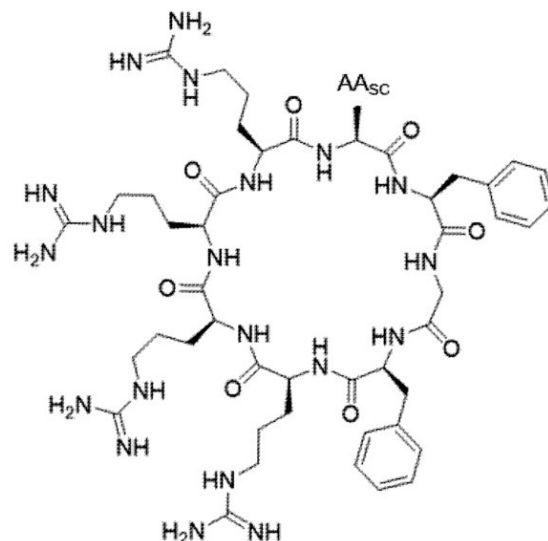
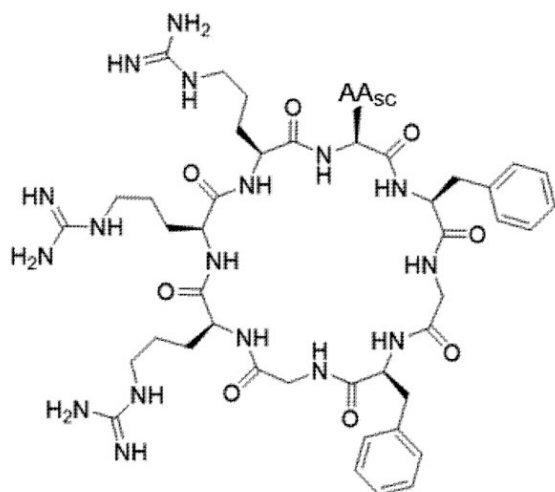
20

30

40

50

【化 3 6】



(I-5)、または

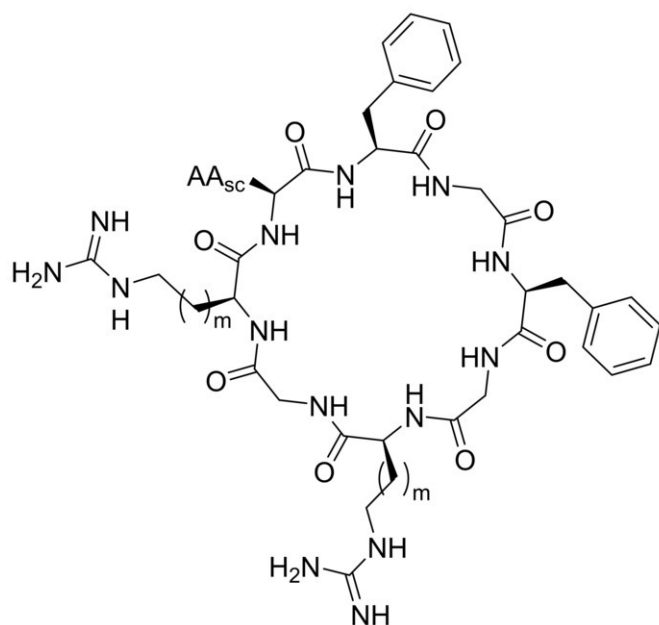
(I-6)

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、式中、AA_{SC}は本明細書で定義される通りである。

【0114】

式(A)のcCPPは、式(I-1)：

【化 3 7】



(I-1)

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、

式中、AA_{SC}及びmは、本明細書で定義される通りである。

【0115】

式(A)のcCPPは、式(I-2)：

10

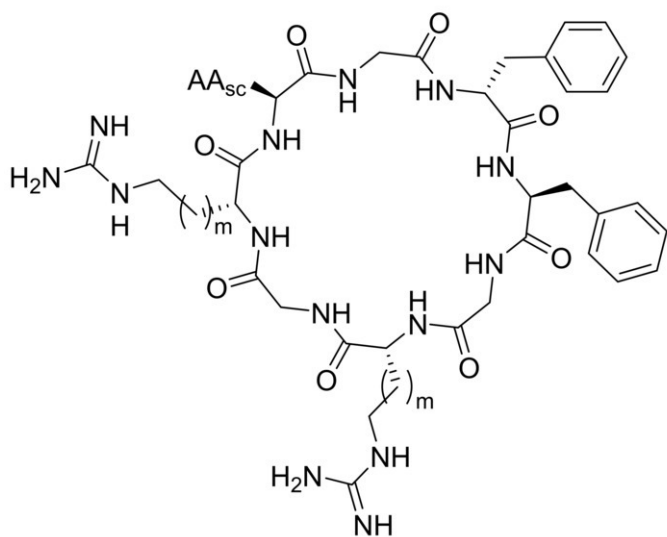
20

30

40

50

【化 3 8】



(I - 2)

10

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、

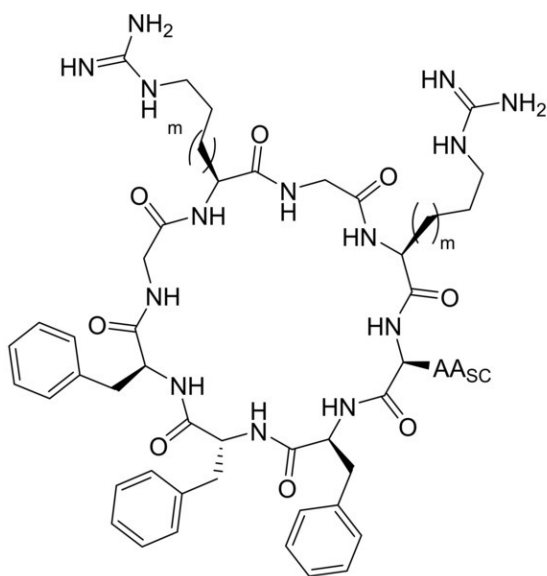
式中、 AA_{sc} 及び m は、本明細書で定義される通りである。

20

【0116】

式 (A) の $cCPP$ は、式 (I - 3) :

【化 3 9】



(I - 3)

30

40

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、

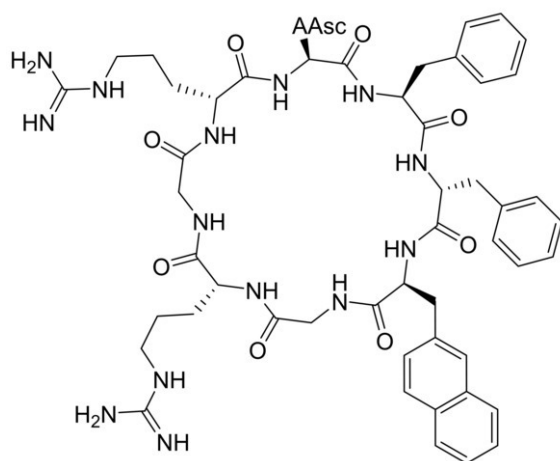
式中、 AA_{sc} 及び m は、本明細書で定義される通りである。

【0117】

式 (A) の $cCPP$ は、式 (I - 4) :

50

【化 4 0】



(I - 4)

10

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、

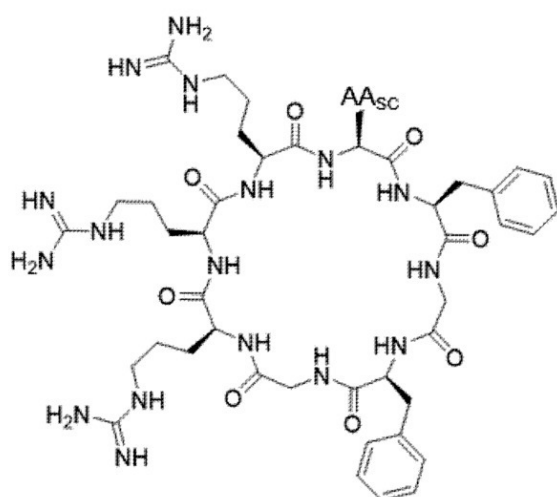
式中、A A s c 及びmは、本明細書で定義される通りである。

【 0 1 1 8】

式 (A) の c C P P は、式 (I - 5) :

20

【化 4 1】



(I - 5)

30

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、

式中、A A s c 及びmは、本明細書で定義される通りである。

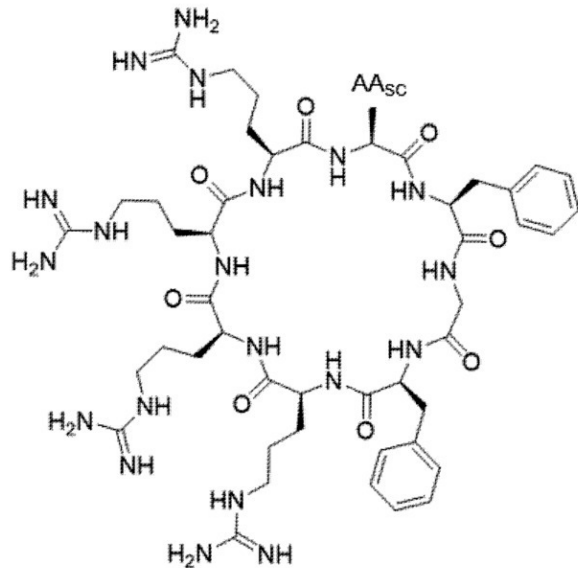
【 0 1 1 9】

式 (A) の c C P P は、式 (I - 6) :

40

50

【化 4 2】



(I - 6)

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、式中、A A s c 及び m は、本明細書に定義されたとおりである。

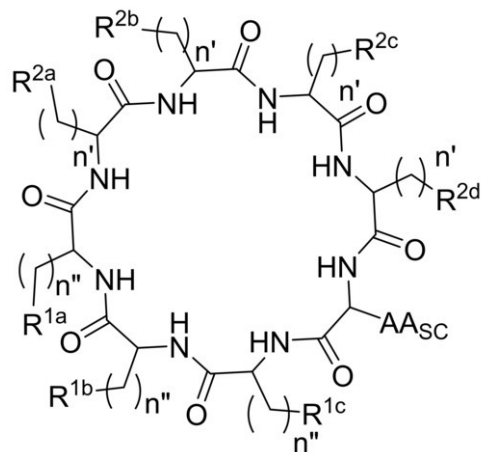
【 0 1 2 0 】

c C P P は、以下の配列：F G F G R G R、G f F G r G r、F f ϕ G R G R、F f F G R G R、または F f ϕ G r G r のうちの 1 つを含み得る。c C P P は、以下の配列：F G F G R G R Q、G f F G r G r Q、F f ϕ G R G R Q、F f F G R G R Q、または F f ϕ G r G r Q のうちの 1 つを有し得る。

【 0 1 2 1 】

本開示はまた、式 (I I) :

【化 4 3】



(I I)

の構造を有する c C P P に関し、

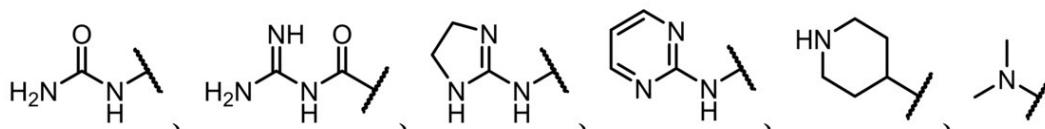
式中、

A A s c はアミノ酸側鎖であり、

R^{1a}、R^{1b}、及び R^{1c} は、各々独立して、6 から 14 員アリールまたは 6 から 14 員ヘテロアリールであり、

R^{2a}、R^{2b}、R^{2c} 及び R^{2d} は、独立してアミノ酸側鎖であり、

R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 及び R^{2d} のうちの少なくとも 1 つは、
【化 4 4】



またはそのプロトン化形態であり、

R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 及び R^{2d} のうちの少なくとも 1 つは、グアニジンまたはそのプロトン化形態であり、

各 n'' は、独立して、整数 0、1、2、3、4、または 5 であり、

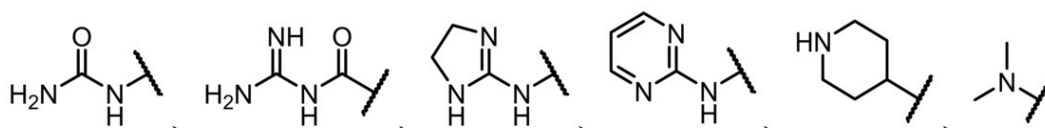
各 n' は、独立して、0、1、2、または 3 からの整数であり、

n' が 0 である場合、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} または R^{2d} は存在しない。

【0122】

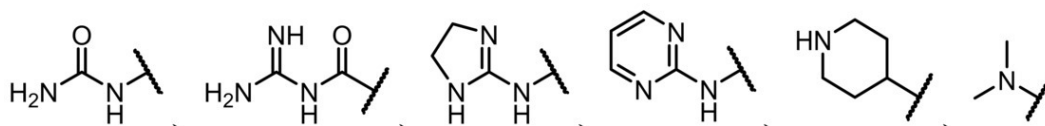
R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 及び R^{2d} のうちの少なくとも 2 個は、

【化 4 5】



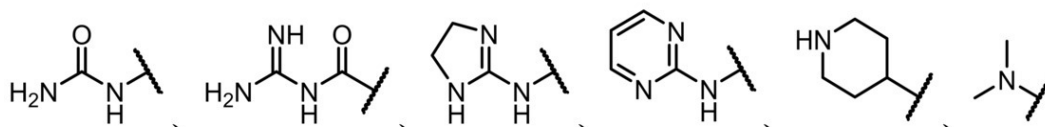
またはそのプロトン化形態であり得る。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 及び R^{2d} のうちの 2 個または 3 個は、

【化 4 6】



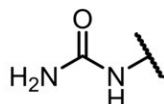
またはそのプロトン化形態であり得る。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 及び R^{2d} のうちの 1 つは、

【化 4 7】



またはそのプロトン化形態であり得る。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 及び R^{2d} のうちの少なくとも 1 つは、

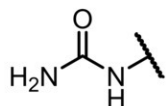
【化 4 8】



またはそのプロトン化形態であり得、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 及び R^{2d} の残りは、グアニ

ジンまたはそのプロトン化形態であり得る。R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}及びR^{2d}のうちの少なくとも2個は、

【化49】



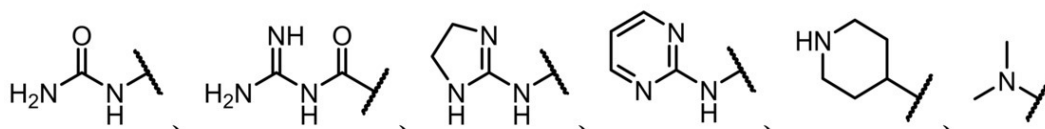
またはそのプロトン化形態であり得る。R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}及びR^{2d}の残りは、グアニジンまたはそのプロトン化形態であり得る。

10

【0123】

R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}及びR^{2d}の全ては、

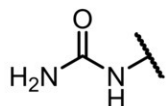
【化50】



またはそのプロトン化形態であり得る。R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}及びR^{2d}のうちの少なくとも1つは、

20

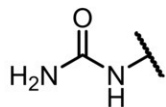
【化51】



またはそのプロトン化形態であり得、R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}及びR^{2d}の残りは、グアニニド (guaninide) またはそのプロトン化形態であり得る。少なくとも2個のR^{2a}、R^{2b}、R^{2c}及びR^{2d}基は、

30

【化52】



またはそのプロトン化形態であり得、R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}及びR^{2d}の残りは、グアニジンまたはそのプロトン化形態である。

【0124】

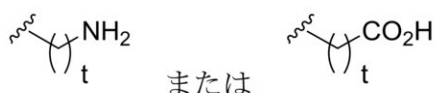
R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}及びR^{2d}の各々は、独立して、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノ酪酸側鎖、オルニチン、リジン、メチルリジン、ジメチルリジン、トリメチルリジン、ホモリジン、セリン、ホモセリン、スレオニン、アロースレオニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、2-アミノブタン二酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはホモグルタミン酸であり得る。

40

【0125】

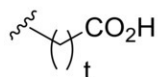
AAs_cは、

【化 5 3】



であり得、式中、 t は 0 から 5 の整数であり得る。A A s c は、

【化 5 4】



10

であり得、式中、 t は 0 から 5 の整数であり得る。 t は 1 から 5 であり得る。 t は 2 または 3 である。 t は 2 であり得る。 t は 3 であり得る。

【0 1 2 6】

本明細書に記載の A C は A A s c にカップリングされ得る。実施形態では、リンカー (L) が A C を A A s c にカップリングさせている。実施形態では、リンカー (L) は A C の骨格に共有結合している。

【0 1 2 7】

A A s c は、アスパラギン、グルタミンまたはホモグルタミンの残基の側鎖であり得る。A A s c は、グルタミンの残基の側鎖であり得る。環状ペプチドは、A A s c、例えば、アスパラギン、グルタミンまたはホモグルタミンの残基にコンジュゲートしているリンカーを含み得る。

20

【0 1 2 8】

R^{1a} 、 R^{1b} 、及び R^{1c} は、各々独立して、6 から 14 員アリールであり得る。 R^{1a} 、 R^{1b} 、及び R^{1c} は、各々独立して、N、O、または S から選択される 1 つ以上のヘテロ原子を有する 6 から 14 員ヘテロアリールであり得る。 R^{1a} 、 R^{1b} 、及び R^{1c} は、各々独立して、フェニル、ナフチル、アントラセニル、ピリジル、キノリル、またはイソキノリルから選択され得る。 R^{1a} 、 R^{1b} 、及び R^{1c} は、各々独立して、フェニル、ナフチル、またはアントラセニルから選択され得る。 R^{1a} 、 R^{1b} 、及び R^{1c} は、各々独立して、フェニルまたはナフチルであり得る。 R^{1a} 、 R^{1b} 、及び R^{1c} は、各々独立して、ピリジル、キノリル、またはイソキノリルから選択され得る。

30

【0 1 2 9】

各 n' は、独立して 1 または 2 であり得る。各 n' は、1 であり得る。各 n' は、2 であり得る。少なくとも 1 つの n' は、0 であり得る。少なくとも 1 つの n' は、1 であり得る。少なくとも 1 つの n' は、2 であり得る。少なくとも 1 つの n' は、3 であり得る。少なくとも 1 つの n' は、4 であり得る。少なくとも 1 つの n' は、5 であり得る。

【0 1 3 0】

各 n'' は、独立して、1 から 3 の整数であり得る。各 n'' は、独立して 2 または 3 であり得る。各 n'' は、2 であり得る。各 n'' は、3 であり得る。少なくとも 1 つの n'' は、0 であり得る。少なくとも 1 つの n'' は、1 であり得る。少なくとも 1 つの n'' は、2 であり得る。少なくとも 1 つの n'' は、3 であり得る。

40

【0 1 3 1】

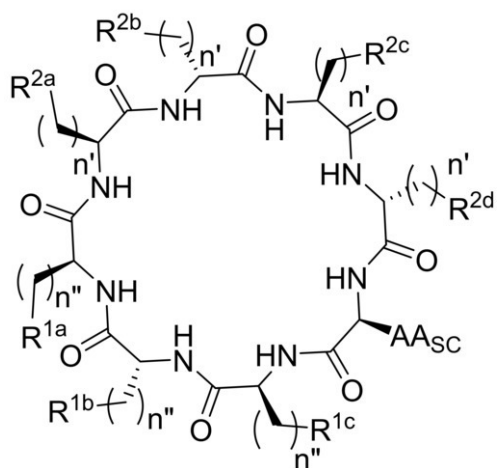
各 n'' は独立して 1 または 2 であり得、各 n' は独立して 2 または 3 であり得る。各 n'' は 1 であり得、各 n' は独立して 2 または 3 であり得る。各 n'' は 1 であり得、各 n' は 2 であり得る。各 n'' は 1 であり、各 n' は 3 である。

【0 1 3 2】

式 (I I) の c C P P は、式 (I I-1) :

50

【化 5 5】



(II-1)

10

の構造を有し得、

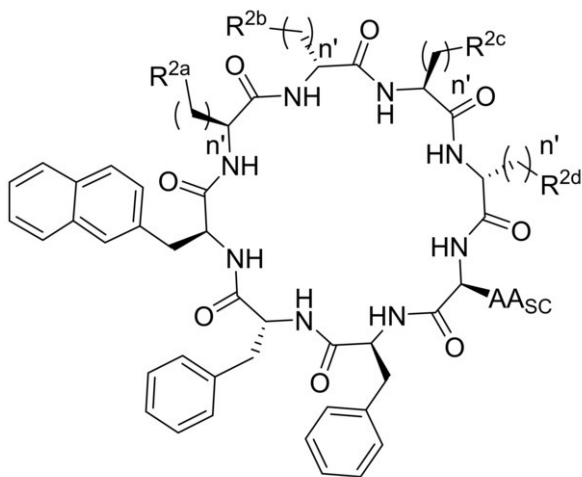
式中、 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{1c} 、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、 R^{2d} 、 AA_{SC} 、 n' 及び n'' は、本明細書で定義される通りである。

20

【0133】

式 (II) の cCPP は、式 (IIa) :

【化 5 6】



(IIa)

30

の構造を有し得、

式中、 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{1c} 、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、 R^{2d} 、 AA_{SC} 及び n' は、本明細書で定義される通りである。

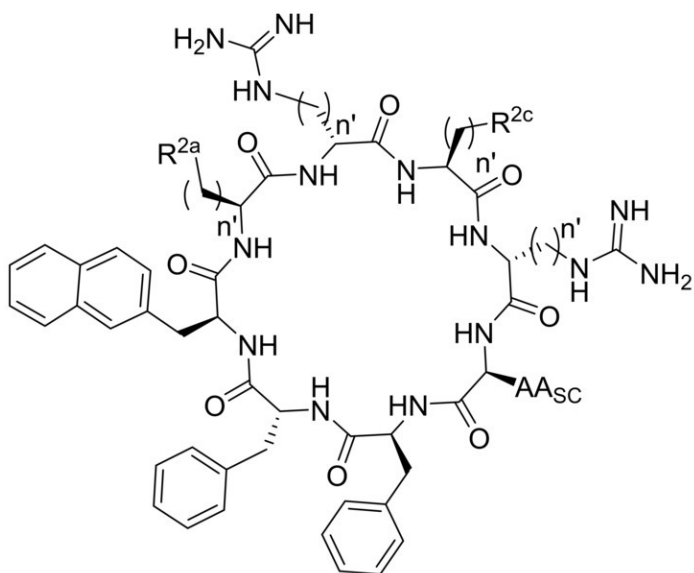
40

【0134】

式 (II) の cCPP は、式 (IIb) :

50

【化 5 7】



10

(IIb)

の構造を有し得、

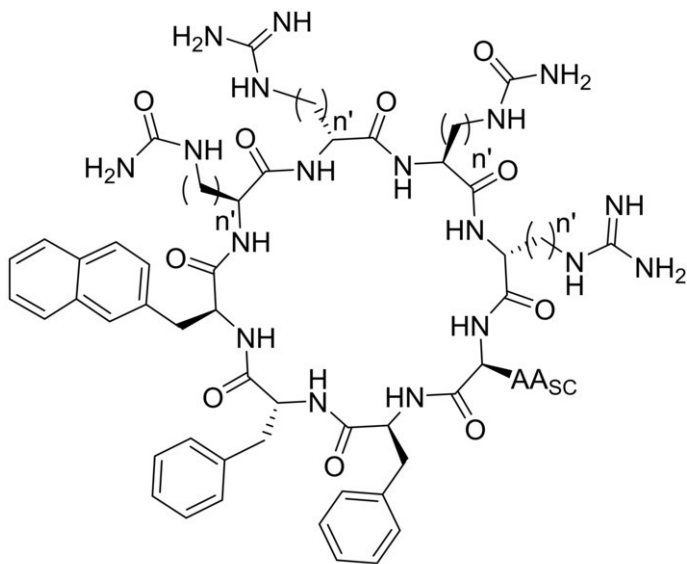
20

式中、R^{2a}、R^{2b}、AA_{Sc}及びn'は本明細書で定義される通りである。

【0135】

cCPPは、式(IIb)：

【化 5 8】



30

(IIc)

40

またはそのプロトン化形態の構造を有し得、

式中、

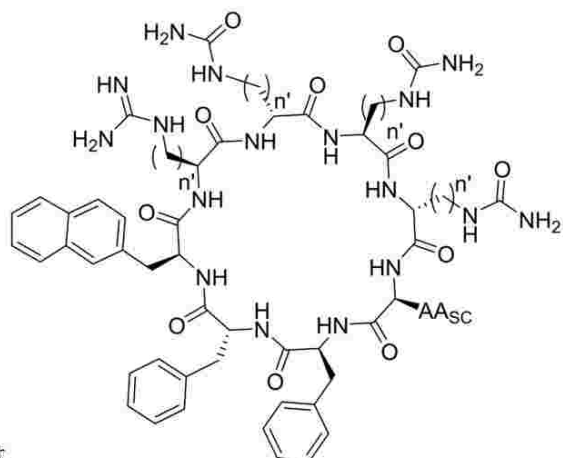
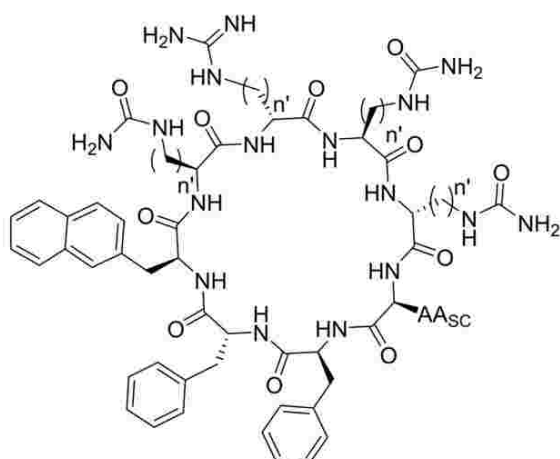
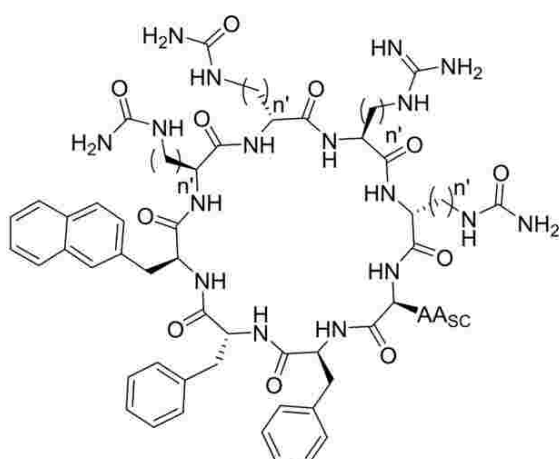
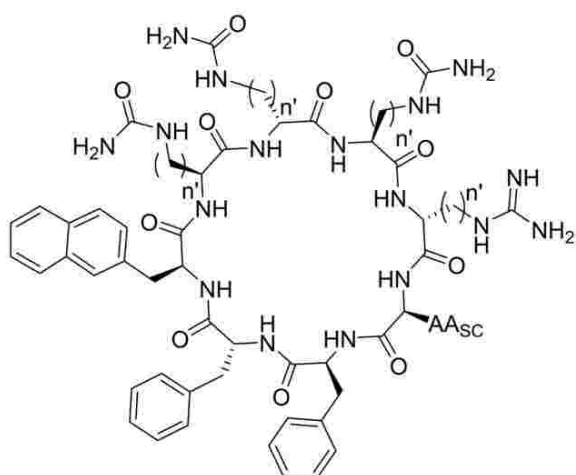
AA_{Sc}及びn'は、本明細書で定義される通りである。

【0136】

式(IIa)のcCPPは、以下の構造：

50

10

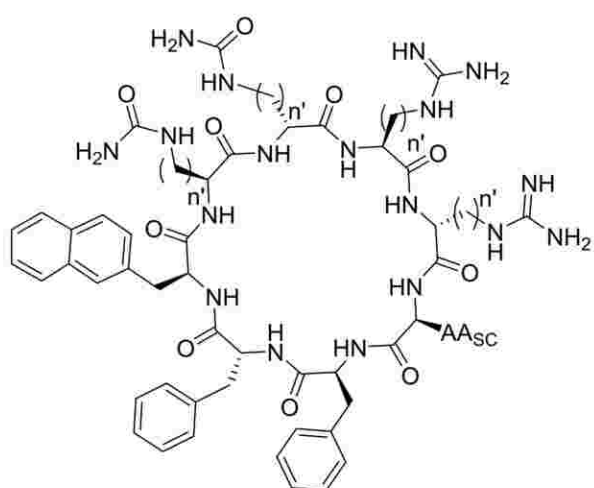
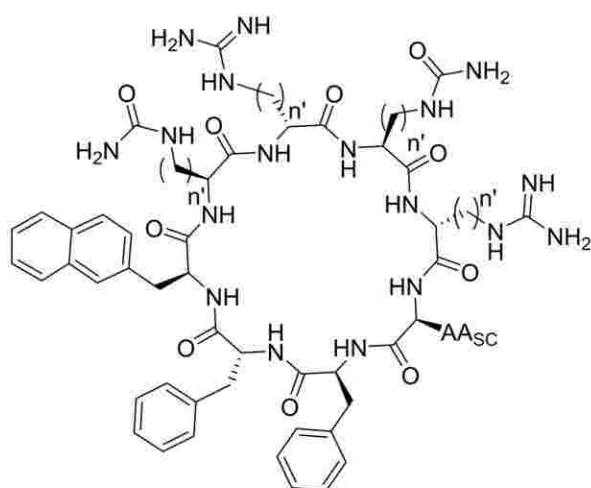


40

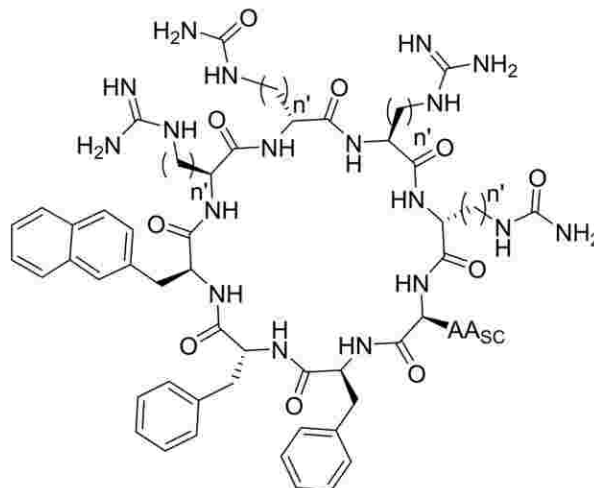
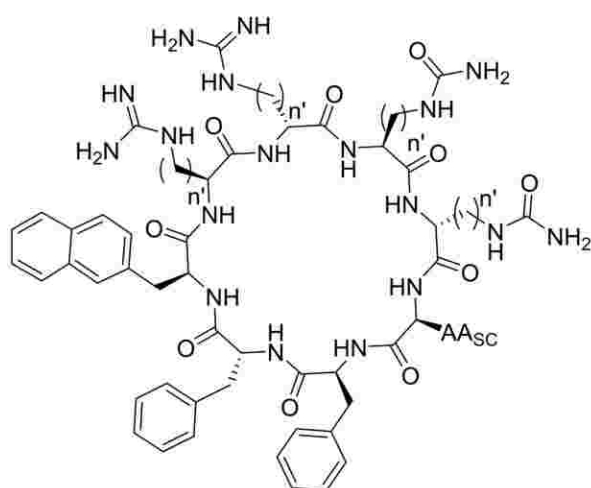
50

式 (I I a) の c C P P は、以下の構造：

【化 6 0】



10



20

、または

30

のうちの1つを有し、式中、AA_{Sc}及びnは本明細書に定義される通りである。

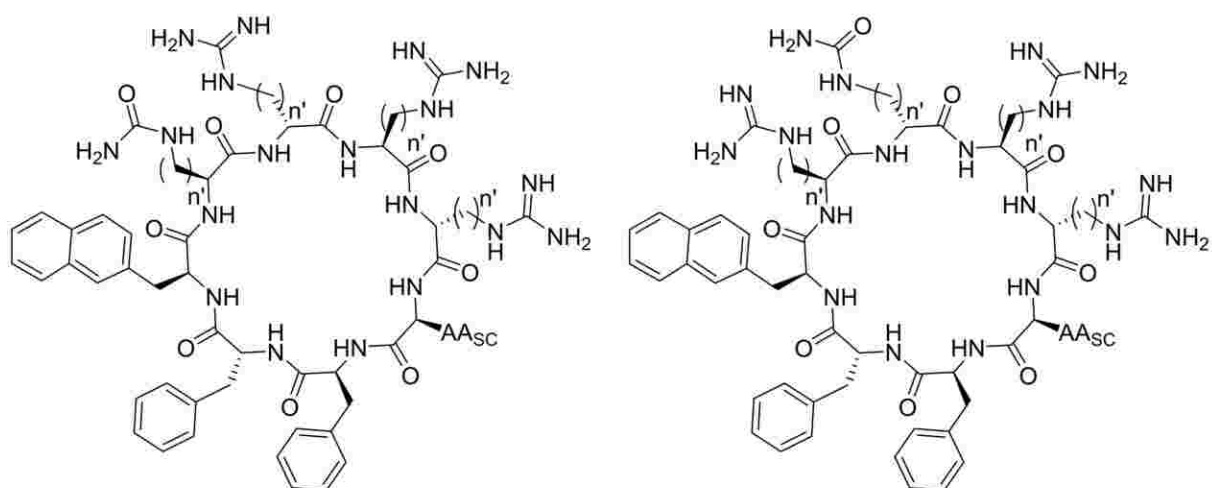
【0138】

式(I Ia)のcCPPは、以下の構造：

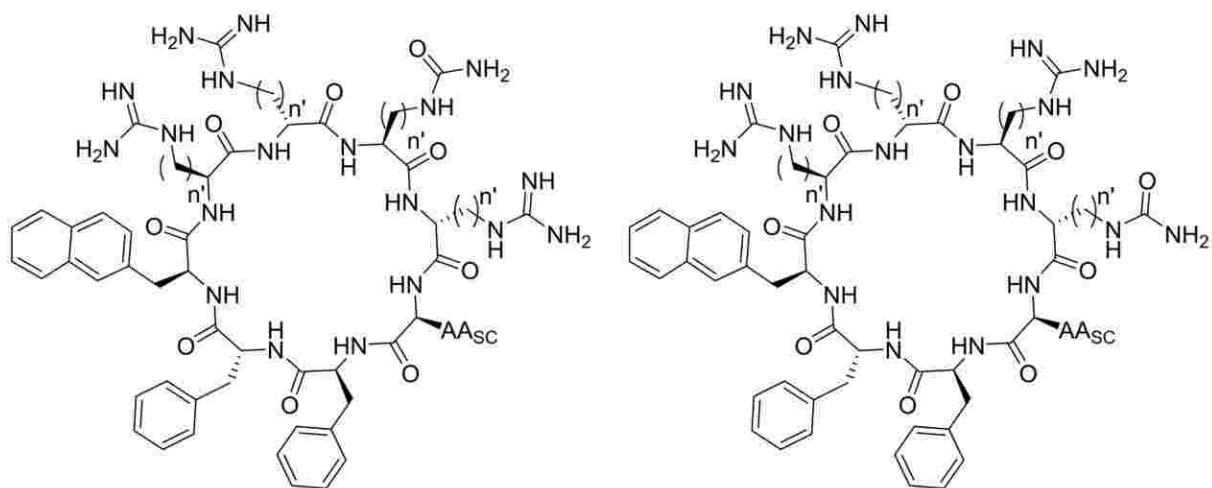
40

50

【化 6 1】



10



20

、または

30

のうちの1つを有し、式中、AA_{Sc}及びnは本明細書で定義される通りである。

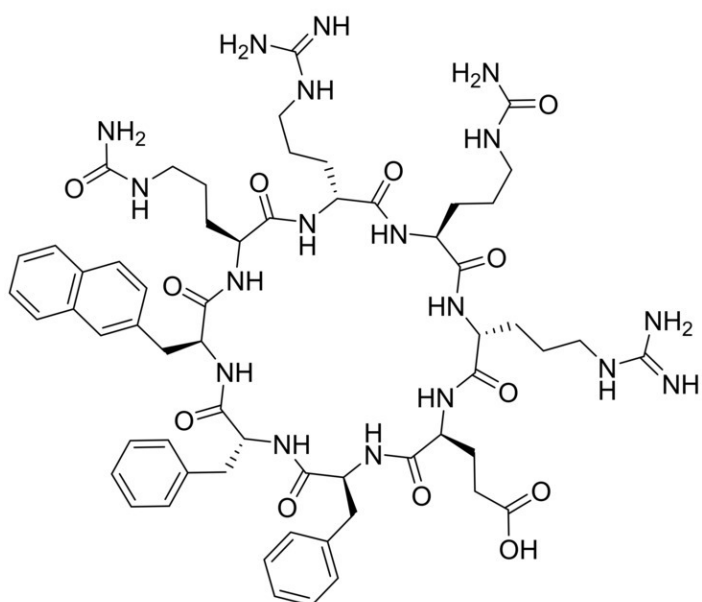
【0139】

式(I I)のcCPPは、構造：

40

50

【化 6 2】



10

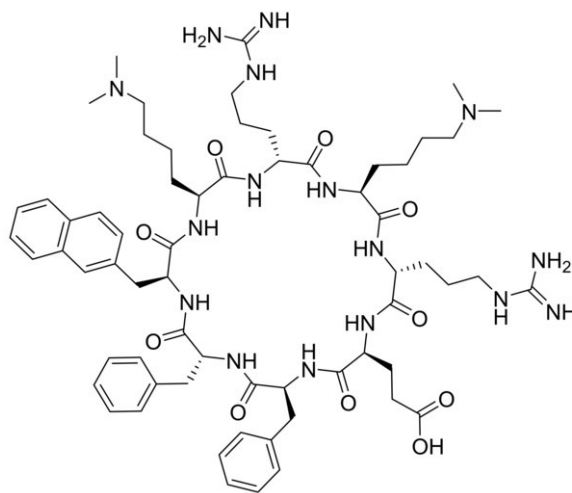
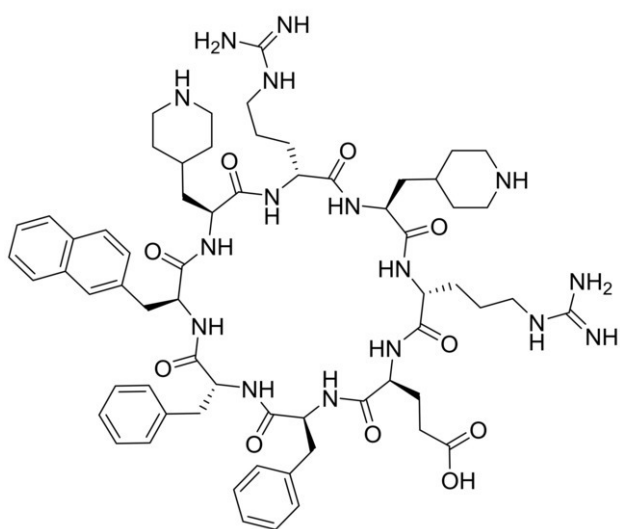
を有し得る。

20

【0140】

式 (I I) の c CPP は、構造：

【化 6 3】



30

または

40

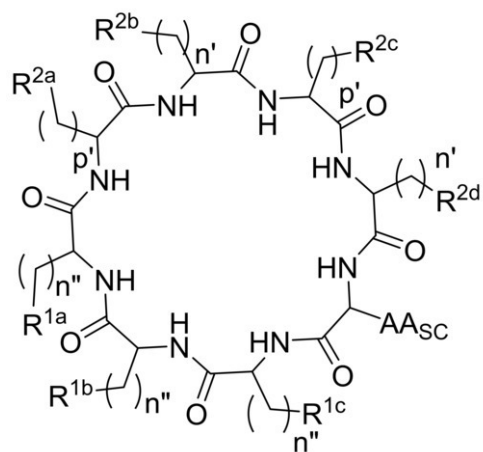
を有し得る。

【0141】

c CPP は、式 (I I I) の構造：

50

【化 6 4】



(I I I)

10

を有し得、

式中、

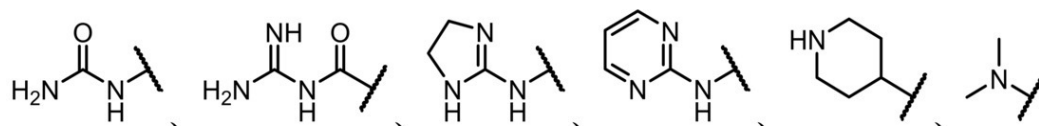
AA_{SC} はアミノ酸側鎖であり、

R^{1a}、R^{1b}、及び R^{1c} は、各々独立して、6 から 14 員アリールまたは 6 から 14 員ヘテロアリールであり、

20

R^{2a} 及び R^{2c} は、各々独立して、H、

【化 6 5】



30

、またはそのプロトン化形態であり、

R^{2b} 及び R^{2d} は、各々独立して、グアニジンまたはそのプロトン化形態であり、

各 n'' は、独立して、1 から 3 の整数であり、

各 n' は、独立して、1 から 5 の整数であり、

各 p' は、独立して、0 から 5 の整数である。

【0 1 4 2】

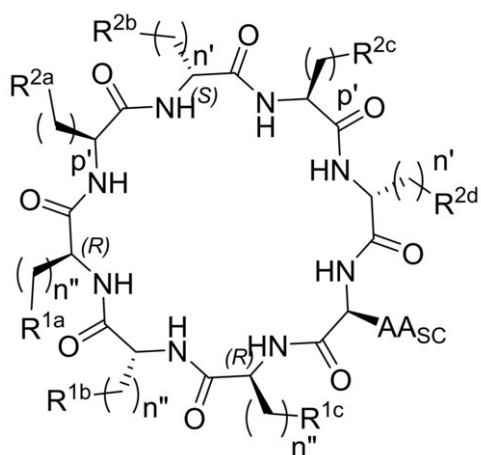
本明細書に記載の AC は AA_{SC} にカップリングされ得る。リンカーが AC を AA_{SC} にカップリングさせていてもよい。リンカーは、AC の骨格、AC の 5' 末端または AC の 3' 末端に共有結合され得る。

【0 1 4 3】

式 (I I I) の cCPP は、式 (I I I - 1) :

40

【化 6 6】



(III-1)

10

の構造を有し得、

式中、

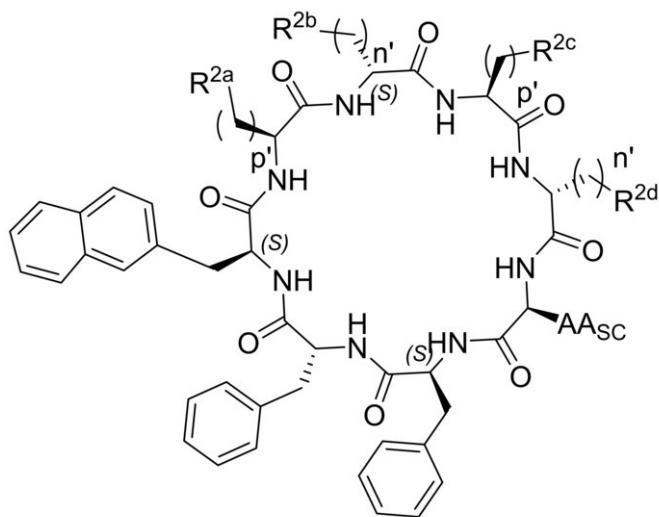
AA_{SC}、R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{2a}、R^{2c}、R^{2b}、R^{2d}、n'、n''及びp'は、本明細書で定義される通りである。

20

【0144】

式(III)のcCPPは、式(IIIa)：

【化 6 7】



(IIIa)

30

の構造を有し得、

式中、

AA_{SC}、R^{2a}、R^{2c}、R^{2b}、R^{2d}、n'、n''、及びp'は、本明細書で定義される通りである。

40

【0145】

式(III)、(III-1)、及び(IIIa)において、R^a及びR^cはHであり得る。R^a及びR^cはHであり得、R^b及びR^dは、各々独立して、グアニジンまたはそのプロトン化形態であり得る。R^aはHであり得る。R^bはHであり得る。p'は0であり得る。R^a及びR^cはHであり得、各p'は0であり得る。

【0146】

式(III)、(III-1)及び(IIIa)において、R^a及びR^cはHであり得

50

、 R^b 及び R^d は、各々独立して、グアニジンまたはそのプロトン化形態であり得、 n'' は 2 または 3 であり得、各 p' は 0 であり得る。

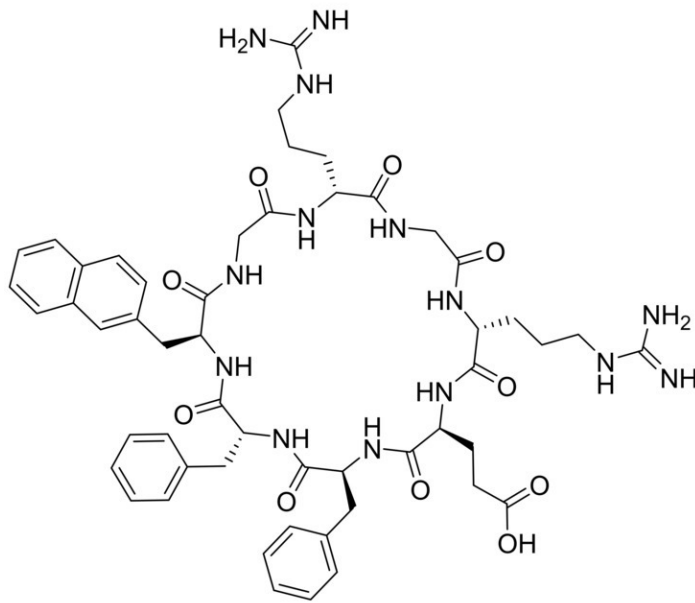
【0147】

p' は 0 であり得る。 p' は 1 であり得る。 p' は 2 であり得る。 p' は 3 であり得る。 p' は 4 であり得る。 p' は 5 であり得る。

【0148】

c CPP は、構造：

【化68】



を有し得る。

【0149】

式 (A) の c CPP は、以下から選択することができる。

【表5】

CPP 配列
(FfΦRrRrQ)
(FfΦCit-r-Cit-rQ)
(FfΦGrGrQ)
(FfFGRGRQ)
(FGFGRGRQ)
(GfFGrGrQ)
(FGFGRRRQ)
(FGFRRRRQ)

【0150】

式 (A) の c CPP は、以下から選択することができる。

10

20

30

40

50

【表 6】

CPP 配列
FΦRRRRQ
fΦRrRrQ
FfΦRrRrQ
FfΦCit-r-Cit-rQ
FfΦGrGrQ
FfΦRGRGQ
FfFGRGRQ
FGFGRGRQ
GfFGrGrQ
FGFGRRRQ
FGFRRRRQ

10

【 0 1 5 1 】

実施形態では、c C P P は、以下から選択される。

20

【表 7】

CPP 配列	CPP 配列	CPP 配列
FΦRRRQ	RRFRΦRQ	FΦRRRRQK
FΦRRRC	FRRRRΦQ	FΦRRRRQC
FΦRRRU	rRFRΦRQ	fΦRrRrRQ
RRRΦFQ	RRΦFRRQ	FΦRRRRRQ
RRRRΦF	CRRRRFWQ	RRRRΦFDΩC
FΦRRRR	FfΦRrRrQ	FΦRRR
FφrRrRq	FFΦRRRRQ	FWRRR
FφrRrRQ	RFRFRΦRQ	RRRΦF
FΦRRRRQ	URRRRFWQ	RRRWF
fΦRrRrQ	CRRRRFWQ	

30

Φ＝L－ナフチルアラニン、φ＝D－ナフチルアラニン、Ω＝L－ノルロイシン

【 0 1 5 2 】

実施形態では、c C P P は、以下から選択されない。

40

【表 8】

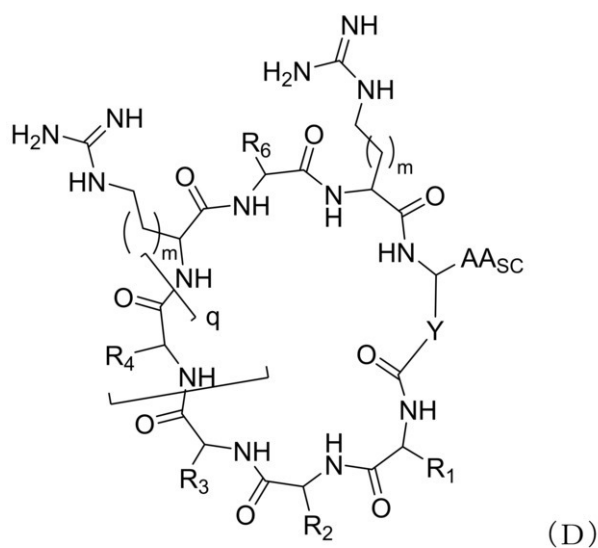
CPP 配列	CPP 配列	CPP 配列
FΦRRRQ	RRFRΦRQ	FΦRRRRQK
FΦRRRC	FRRRRΦQ	FΦRRRRQC
FΦRRRU	rRFRΦRQ	fΦRrRrRQ
RRRΦFQ	RRΦFRRQ	FΦRRRRRQ
RRRRΦF	CRRRRFWQ	RRRRΦFDΩC
FΦRRRR	FfΦRrRrQ	FΦRRR
FφrRrRq	FFΦRRRRQ	FWRRR
FφrRrRQ	RFRFRΦRQ	RRRΦF
FΦRRRRQ	URRRRFWQ	RRRWF
fΦRrRrQ	CRRRRFWQ	

Φ = L-ナフチルアラニン、 ϕ = D-ナフチルアラニン、 Ω = L-ノルロイシン

【 0 1 5 3 】

c C P P は、式 (D) :

【化 6 9】



またはそのプロトン化形態の構造を含み得、
式中、

R₁、R₂及びR₃は、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

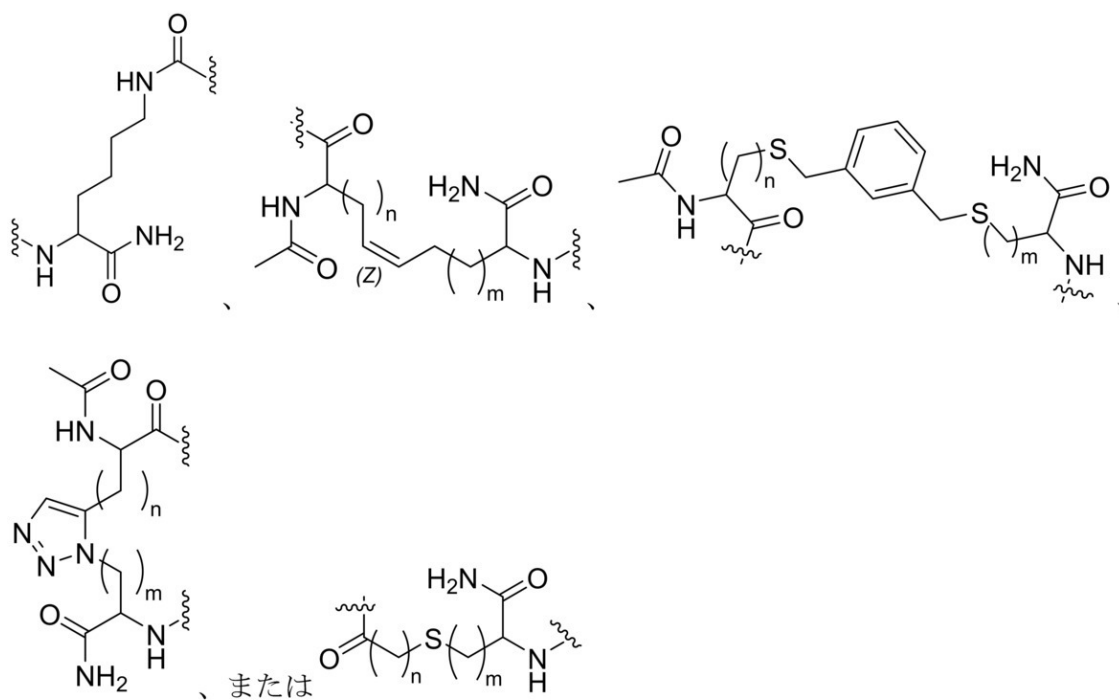
R₁、R₂及びR₃のうちの少なくとも1つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

R₄ 及び R₆ は、独立して、H、またはアミノ酸側鎖であり、

A A S C はアミノ酸側鎖であり、

Y は、

【化 7 0】



10

20

である。

q は、1、2、3 または 4 であり、

各 m は、独立して、整数 0、1、2 または 3 であり、

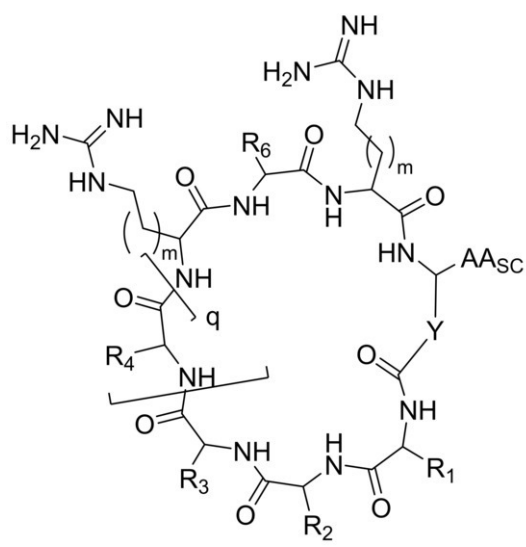
各 n は、独立して、整数 0、1、2 または 3 である。

【0 1 5 4】

式 (D) の c CPP は、式 (D-I) :

【化 7 1】

30



40

またはそのプロトン化形態の構造を有し得、

式中、

R₁、R₂ 及び R₃ は、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

50

R_1 、 R_2 及び R_3 のうちの少なくとも 1 つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

R_4 及び R_6 は、独立して、H、またはアミノ酸側鎖であり、

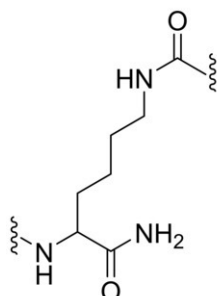
AA_{SC} はアミノ酸側鎖であり、

q は、1、2、3 または 4 であり、

各 m は、独立して、整数 0、1、2 または 3 であり、

Y は、

【化 7 2】



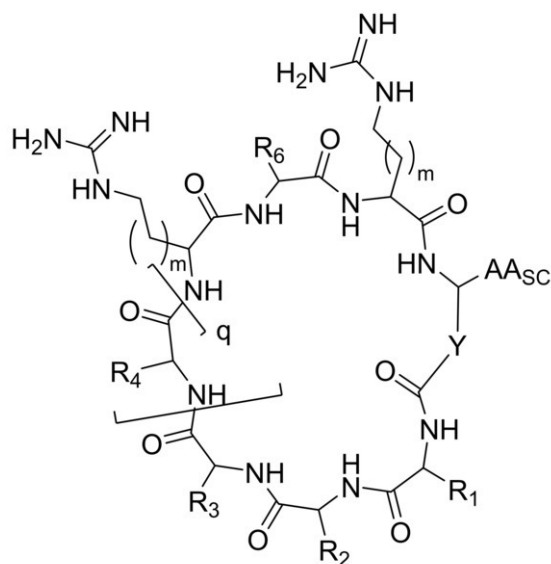
10

である。

【0155】

式 (D) の cCPP は、式 (D-I I) :

【化 7 3】



(D-I I)

30

またはそのプロトン化形態の構造を有し得、

式中、

R_1 、 R_2 及び R_3 は、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

R_1 、 R_2 及び R_3 のうちの少なくとも 1 つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

R_4 及び R_6 は、独立して、H、またはアミノ酸側鎖であり、

AA_{SC} はアミノ酸側鎖であり、

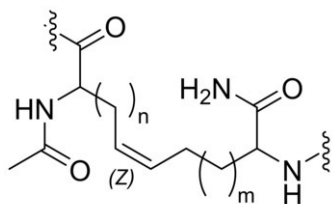
q は、1、2、3 または 4 であり、

各 m は、独立して、整数 0、1、2 または 3 であり、

各 n は、独立して、整数 0、1、2 または 3 であり、

50

Y は、
【化 7 4】



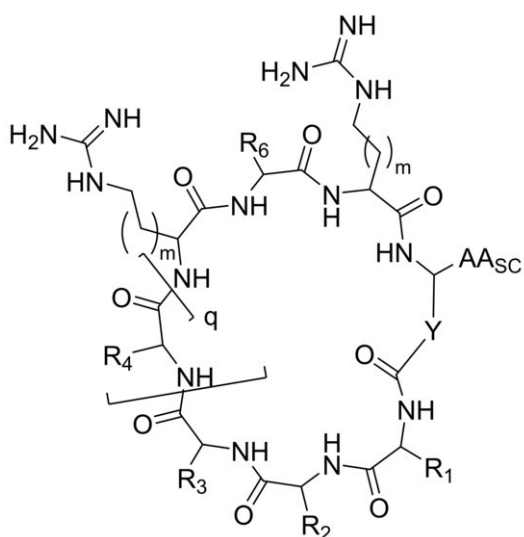
10

である。

【0156】

式 (D) の c C P P は、式 (D-I I I) :

【化 7 5】



20

(D-I I I)

30

またはそのプロトン化形態の構造を有し得、

式中、

R₁、R₂ 及び R₃ は、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

R₁、R₂ 及び R₃ のうちの少なくとも 1 つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

R₄ 及び R₆ は、独立して、H、またはアミノ酸側鎖であり、

AA_{sc} はアミノ酸側鎖であり、

q は、1、2、3 または 4 であり、

40

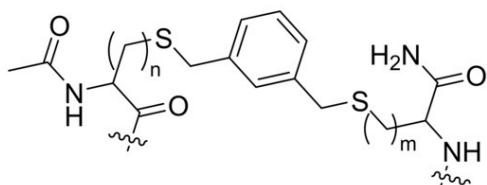
各 m は、独立して、整数 0、1、2 または 3 であり、

各 n は、独立して、整数 0、1、2 または 3 であり、

Y は、

50

【化 7 6】



である。

【0157】

式 (D) の cCPP は、式 (D-I V) :

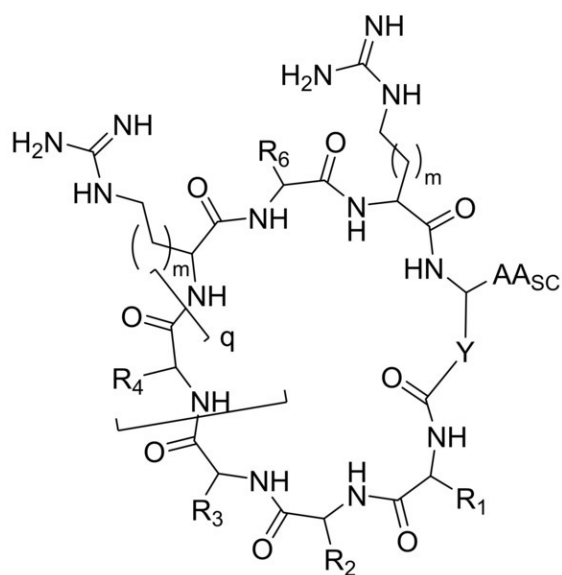
【0158】

【化 7 7】

10

20

30



(D-I V)

またはそのプロトン化形態の構造を有し得、

式中、

R_1 、 R_2 及び R_3 は、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

R_1 、 R_2 及び R_3 のうちの少なくとも1つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

R_4 及び R_6 は、独立して、H、またはアミノ酸側鎖であり、

AA_{sc} はアミノ酸側鎖であり、

q は、1、2、3 または 4 であり、

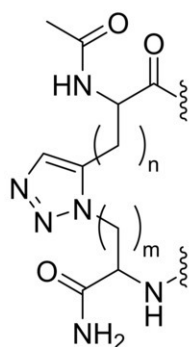
各 m は、独立して、整数 0、1、2 または 3 であり、

Y は、

40

50

【化 7 8】



10

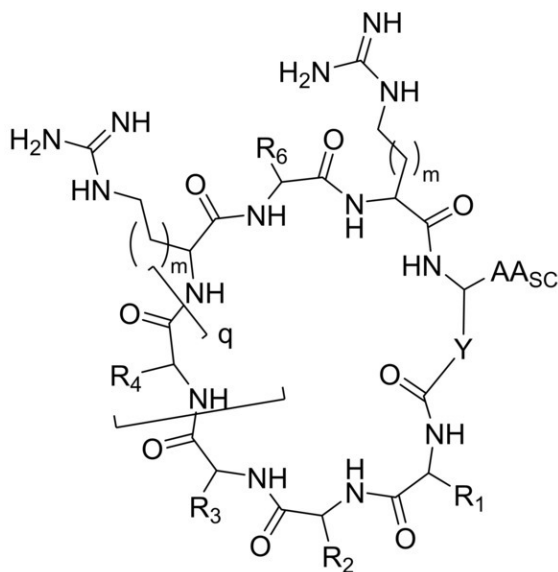
である。

【0159】

式 (D) の c C P P は、式 (D-V) :

【化 7 9】

20



30

(D-V)

またはそのプロトン化形態の構造を有し得、

式中、

R_1 、 R_2 及び R_3 は、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

R_1 、 R_2 及び R_3 のうちの少なくとも1つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

40

R_4 及び R_6 は、独立して、H、またはアミノ酸側鎖であり、

AA_{SC} はアミノ酸側鎖であり、

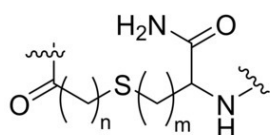
q は、1、2、3 または 4 であり、

各 m は、独立して、整数 0、1、2 または 3 であり、

Y は、

50

【化 8 0】



である。

【0160】

A A S c はリンカーにコンジュゲートされ得る。

10

【0161】

リンカー

本開示の c C P P はリンカーにコンジュゲートされ得る。リンカーは、A C を c C P P に連結することができる。リンカーは、c C P P のアミノ酸の側鎖に結合することができ、A C は、リンカー上の適切な位置に結合することができる。

【0162】

リンカーは、c C P P を 1 つ以上の更なる部分、例えば、環外ペプチド (E P) 及び／または A C にコンジュゲートすることができる任意の適切な部分であり得る。c C P P 及び 1 つ以上の更なる部分への結合の前に、リンカーは 2 個以上の官能基を有し、これらは各々独立して c C P P 及び 1 つ以上の更なる部分への共有結合を形成することができる。リンカーは A C の 5' 末端または A C の 3' 末端に共有結合することができる。リンカーは、A C の 5' 末端に共有結合することができる。リンカーは、A C の 3' 末端に共有結合することができる。リンカーは、本明細書に記載される c C P P を A C にコンジュゲートさせる任意の適切な部分であり得る。

20

【0163】

リンカーは炭化水素リンカーを含み得る。

【0164】

リンカーは切断部位を含み得る。切断部位は、ジスルフィドまたはカスパーゼ切断部位 (例えば、V a l - C i t - P A B C) であり得る。

【0165】

リンカーは、(i) 1 つ以上の D または L アミノ酸であって、これらは各々任意選択で置換されているアミノ酸、(ii) 任意選択で置換されているアルキレン、(iii) 任意選択で置換されているアルケニレン、(iv) 任意選択で置換されているアルキニレン、(v) 任意選択で置換されているカルボシクリル、(vi) 任意選択で置換されているヘテロシクリル、(vii) 1 つ以上の $-(R^1-J-R^2)-z$ サブユニットであって、式中、 R^1 及び R^2 の各々が、各場合において、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボシクリル、及びヘテロシクリルから独立して選択され、各 J が、独立して、C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S、及び O であり、式中、 R^3 が、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、及びヘテロシクリルから独立して選択され、これらは各々任意選択で置換されており、z が 1 から 50 の整数である、サブユニット、(viii) $-(R^1-J)-z$ または $(J-R^1)-z$ であって、式中、各 R^1 が、各場合において、独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボシクリル、またはヘテロシクリルであり、各 J が、独立して、C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S、または O であり、式中、 R^3 が、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、またはヘテロシクリルであり、これらは各々任意選択で置換されており、z が 1 から 50 の整数であるもの、を含み得、あるいは、(ix) リンカーは、(i) ~ (x) のうちの 1 つ以上を含み得る。

30

40

【0166】

リンカーは、1 つ以上の D もしくは L アミノ酸及び／または $-(R^1-J-R^2)-z$ であって、式中、 R^1 及び R^2 の各々が、各場合において、独立してアルキレンであり、

50

各 J が、独立して、C、 NR^3 、 $-\text{NR}^3\text{C}(\text{O})-$ 、S、及び O であり、式中、 R^4 が、独立して、H 及びアルキルから選択され、 z'' が、1 から 50 の整数であるもの、またはそれらの組み合わせを含み得る。

【0167】

リンカーは、 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{z'}-$ を（例えば、スペーサーとして）含み得、 z' は、1 から 23 の整数、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または 23 である。「 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{z'}$ 」は、ポリエチレングリコール（PEG）と呼ぶこともできる。

【0168】

リンカーは、1 つ以上のアミノ酸を含み得る。リンカーはペプチドを含み得る。リンカーは、 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{z'}$ （式中、 z' は 1 から 23 の整数である）、及びペプチドを含み得る。ペプチドは、2 から 10 個のアミノ酸を含み得る。リンカーは、クリックケミストリーを介して反応することができる官能基（FG）を更に含み得る。FG はアジドまたはアルキンであってもよく、AC がリンカーにコンジュゲートされるとトリアゾールが形成される。

【0169】

リンカーは、(i) β アラニン残基及びリジン残基、(ii) $-(\text{J}-\text{R}^1)_{z''}-$ 、または (iii) それらの組み合わせを含み得る。各 R^1 は、独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボシクリル、またはヘテロシクリルであり得、各 J は、独立して、C、 NR^3 、 $-\text{NR}^3\text{C}(\text{O})-$ 、S、または O であり、式中、 R^3 は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、またはヘテロシクリルであり、これらは各々任意選択で置換されており、 z'' は、1 から 50 の整数であり得る。各 R^1 はアルキレンであってもよく、各 J は O であってもよい。

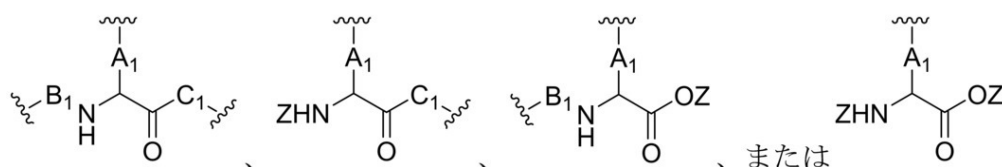
【0170】

リンカーは、(i) β -アラニン、グリシン、リジン、4-アミノ酪酸、5-アミノペントタン酸、6-アミノヘキサン酸またはそれらの組み合わせの残基、及び (ii) $-(\text{R}^1-\text{J})_{z''}-$ または $-(\text{J}-\text{R}^1)_{z''}-$ を含み得る。各 R^1 は、独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボシクリル、またはヘテロシクリルであり得、各 J は、独立して、C、 NR^3 、 $-\text{NR}^3\text{C}(\text{O})-$ 、S、または O であり、式中、 R^3 は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、またはヘテロシクリルであり、これらは各々任意選択で置換されており、 z'' は、1 から 50 の整数であり得る。各 R^1 はアルキレンであり得、各 J は O であり得る。リンカーは、グリシン、ベータアラニン、4-アミノ酪酸、5-アミノペントタン酸、6-アミノヘキサン酸、またはそれらの組み合わせを含み得る。

【0171】

リンカーは、三価リンカーであり得る。リンカーは、構造：

【化 81】



を有し得、式中、 A_1 、 B_1 及び C_1 は、独立して、炭化水素リンカー（例えば、 $\text{NRH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ ）、PEG リンカー（例えば、 $\text{NRH}-(\text{CH}_2\text{O})_n-\text{COOH}$ 、式中、 R は、H、メチルまたはエチルである）、または 1 つ以上のアミノ酸残基であり得、Z は、独立して、保護基である。リンカーはまた、ジスルフィド [$\text{NH}_2-(\text{CH}_2\text{O})_n-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2\text{O})_n-\text{COOH}$]、またはカスパーゼ切断部位 (Val-Cit-PABC) などの切断部位を組み込むことができる。

【0172】

炭化水素は、グリシンまたはベータアラニンの残基であり得る。

【0173】

リンカーは二価であり、c C P PをA Cに連結することができる。リンカーは二価であり、c C P Pを環外ペプチド（E P）に連結することができる。

【0174】

リンカーは三価であり得、c C P PをA C及びE Pに連結することができる。

【0175】

リンカーは、二価または三価のC₁～C₅₀アルキレンであり得、ここで、1～25個のメチレン基は、任意選択で、かつ独立して、-N(H)-、-N(C₁-C₄アルキル)-、-N(シクロアルキル)-、-O-、-C(O)-、-C(O)O-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(C₁-C₄アルキル)-、-S(O)₂N(シクロアルキル)-、-N(H)C(O)-、-N(C₁-C₄アルキル)C(O)-、-N(シクロアルキル)C(O)-、-C(O)N(H)-、-C(O)N(C₁-C₄アルキル)、-C(O)N(シクロアルキル)、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはシクロアルケニルによって置き換えられている。リンカーは、二価または三価のC₁～C₅₀アルキレンであり得、ここで、1～25個のメチレン基は、任意選択で、かつ独立して、-N(H)-、-O-、-C(O)N(H)-、またはこれらの組み合わせによって置換される。

10

【0176】

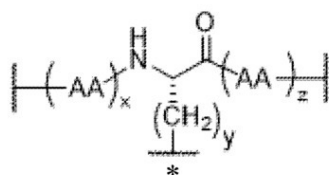
A Cは環状ペプチドのグルタミン酸にカップリングされ得るが、これによってグルタミン酸はグルタミンに変換される。リンカー（L）がA Cを環状ペプチドのグルタミン／グルタミン酸にカップリングさせ得る。実施形態では、リンカー（L）はA Cの骨格に共有結合している。

20

【0177】

リンカーは、構造：

【化82】



30

を有し得、式中、各A Aは独立してアミノ酸残基であり、*はA A_{S C}への結合点であり、A A_{S C}はc C P Pのアミノ酸残基の側鎖であり、xは1～10の整数であり、yは1～5の整数であり、zは1～10の整数である。xは1～5の整数であり得る。xは1～3の整数であり得る。xは1であり得る。yは2～4の整数であり得る。yは4であり得る。zは1～5の整数であり得る。zは1～3の整数であり得る。zは1であり得る。各A Aは、独立して、グリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸、5-アミノペンタン酸、及び6-アミノヘキサン酸から選択され得る。

40

【0178】

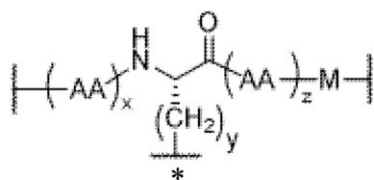
c C P Pはリンカー（「L」）を介してA Cに結合することができる。リンカーは、結合基（「M」）を介してA Cにコンジュゲートされ得る。

【0179】

リンカーは、構造：

50

【化 8 3】



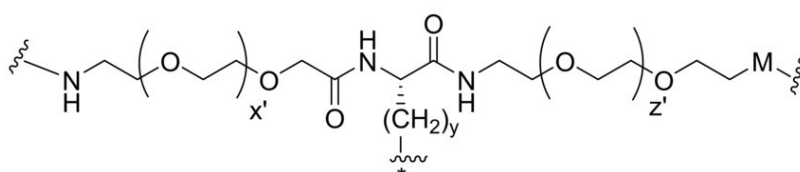
を有し得、式中、 x は 1 ～ 10 の整数であり、 y は 1 ～ 5 の整数であり、 z は 1 ～ 10 の整数であり、各 AA は独立してアミノ酸残基であり、 $*$ は AA_{Sc} への結合点であり、 AA_{Sc} は $cCpP$ のアミノ酸残基の側鎖であり、 M は本明細書で定義される結合基である。

10

【0180】

リンカーは、構造：

【化 8 4】



20

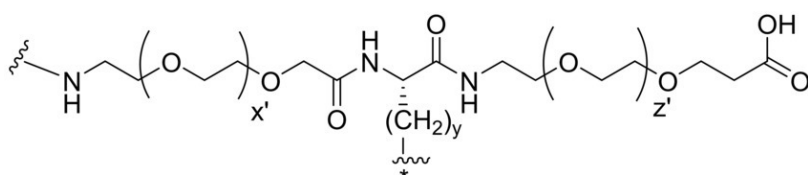
を有し得、

式中、 x' は 1 ～ 23 の整数であり、 y は 1 ～ 5 の整数であり、 z' は 1 ～ 23 の整数であり、 $*$ は AA_{Sc} への結合点であり、 AA_{Sc} は $cCpP$ のアミノ酸残基の側鎖であり、 M は本明細書で定義される結合基である。

【0181】

リンカーは、構造：

【化 8 5】



40

を有し得、

式中、 x' は 1 ～ 23 の整数であり、 y は 1 ～ 5 の整数であり、 z' は 1 ～ 23 の整数であり、 $*$ は AA_{Sc} への結合点であり、 AA_{Sc} は $cCpP$ のアミノ酸残基の側鎖である。

【0182】

x は、1 ～ 10 の整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10（これらの間の全ての範囲及び部分範囲を含む）であり得る。

【0183】

x' は、1 ～ 23 の整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または 23（これらの間の全ての範囲及び部分範囲を含む）であり得る。 x' は、5 ～ 15 の整数であ

50

り得る。x' は、9～13の整数であり得る。x' は、1～5の整数であり得る。x' は1であり得る。

【0184】

y は、1～5の整数、例えば、1、2、3、4、または5（これらの間の全ての範囲及び部分範囲を含む）であり得、y は、2～5の整数であり得る。y は3～5の整数であり得る。y は3または4であり得る。y は4または5であり得る。y は3であり得る。y は4であり得る。y は5であり得る。

【0185】

z は、1～10の整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10（これらの間の全ての範囲及び部分範囲を含む）であり得る。

10

【0186】

z' は、1～23の整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23（これらの間の全ての範囲及び部分範囲を含む）であり得る。z' は5～15の整数であり得る。z' は9～13の整数であり得る。z' は11であり得る。

【0187】

上記のように、リンカーまたはM（ここで、Mはリンカーの一部である）は、AC上の任意の適切な位置でACに共有結合することができる。リンカーまたはM（ここで、Mはリンカーの一部である）は、ACの3'末端またはACの5'末端に共有結合され得る。リンカーまたはM（ここで、Mはリンカーの一部である）は、ACの骨格に共有結合され得る。

20

【0188】

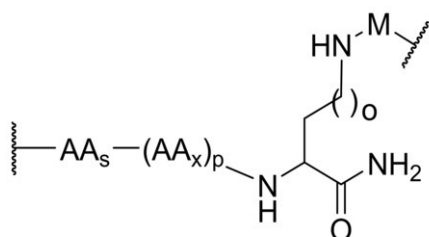
リンカーは、cCPP上のアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン、もしくはリジンの側鎖、またはグルタミンもしくはアスパラギンの修飾側鎖（例えば、アミノ基を有する還元側鎖）に結合することができる。リンカーは、cCPP上のリジンの側鎖に結合することができる。

【0189】

リンカーは、構造：

【化86】

30



を有し得、

式中、

40

Mは、LをACにコンジュゲートする基であり、

AA_sは、cCPP上のアミノ酸の側鎖または末端であり、

各AA_xは、独立してアミノ酸残基であり、

oは、0から10の整数であり、

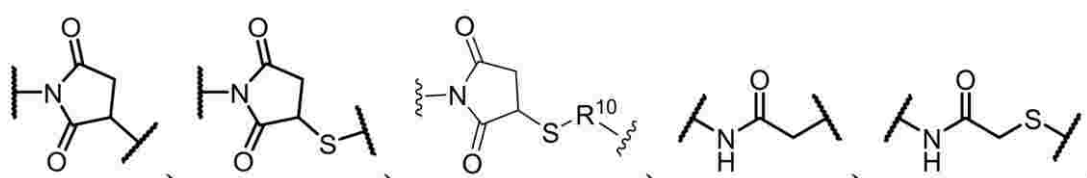
pは、0から5の整数である。

【0190】

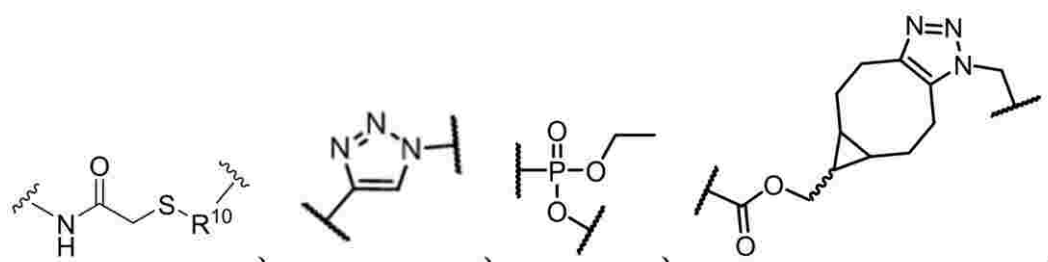
リンカーは、構造：

50

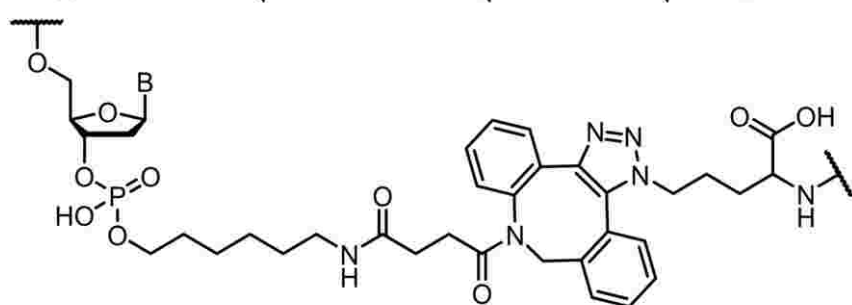
【化 8 9】



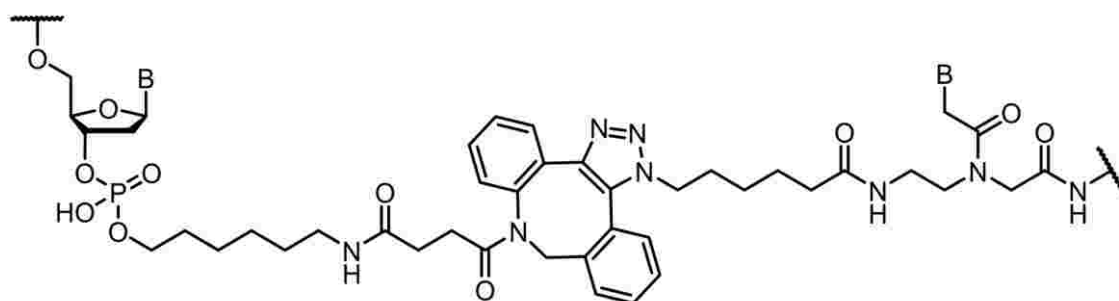
10



20



、及び

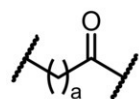


30

から選択することができ、

 R^{10} は、アルキレン、シクロアルキル、または

【化 9 0】

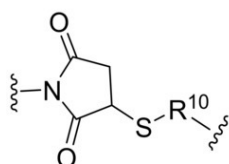
であり、式中、 a は 0 から 10 である。

40

【0 1 9 3】

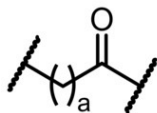
 M は、

【化 9 1】



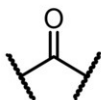
50

であり得、 R^{10} は、
【化92】



であり得、 a は0から10である。 M は、
【化93】

10

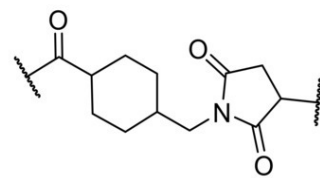


であり得る。

【0194】

M は、ヘテロ二官能性架橋剤、例えば、
【化94】

20



であり得、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Williams et al. Curr. Protoc Nucleic Acid Chem. 2010, 42, 4.41.1-4.41.20に開示されている。

【0195】

30

M は、 $-C(O)-$ であり得る。

【0196】

AA_s は、 $cC P P$ 上のアミノ酸の側鎖または末端であり得る。 AA_s の非限定的な例としては、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン、もしくはリジン、またはグルタミンもしくはアスパラギンの修飾された側鎖（例えば、アミノ基を有する還元側鎖）が挙げられる。 AA_s は、本明細書で定義される AA_{sc} であり得る。

【0197】

各 AA_x は、独立して、天然または非天然アミノ酸である。1つ以上の AA_x は、天然アミノ酸であり得る。1つ以上の AA_x は、非天然アミノ酸であり得る。1つ以上の AA_x は、 β -アミノ酸であり得る。 β -アミノ酸は、 β -アラニンであり得る。

40

【0198】

o は、0から10の整数、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10であり得る。 o は、0、1、2、または3であり得る。 o は0であり得る。 o は1であり得る。 o は2であり得る。 o は3であり得る。

【0199】

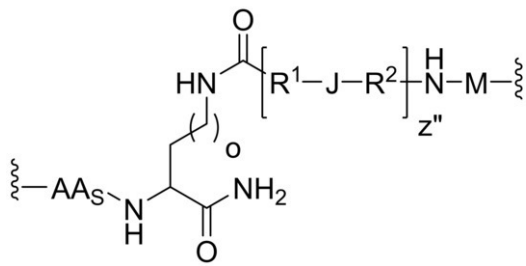
p は、0から5、例えば、0、1、2、3、4、または5であり得る。 p は0であり得る。 p は1であり得る。 p は2であり得る。 p は3であり得る。 p は4であり得る。 p は5であり得る。

【0200】

リンカーは、構造：

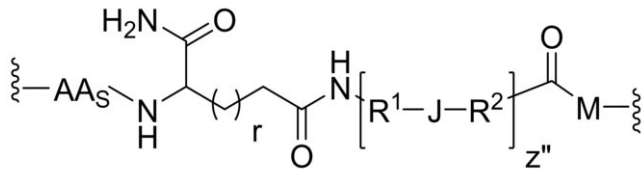
50

【化 9 5】



または

10



を有し得、

式中、 M 、 AA_s 、各 $-(R^1-J-R^2)_{z''}-$ 、 o 及び z'' は、本明細書で定義されている。 r は、0 または 1 であり得る。

【0201】

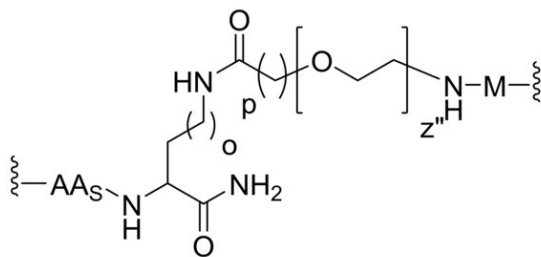
20

r は、0 であり得る。 r は 1 であり得る。

【0202】

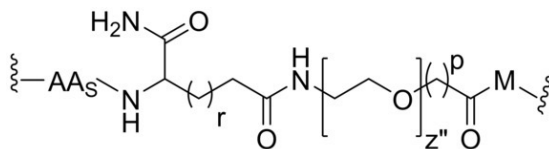
リンカーは、構造：

【化 9 6】



または

30



を有し得、

式中、 M 、 AA_s 、 o 、 p 、 q 、 r 及び z'' の各々は、本明細書で定義される通りであり得る。

40

【0203】

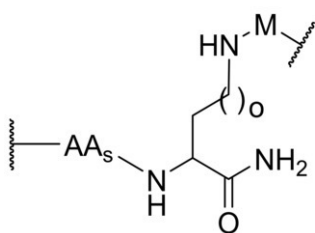
z'' は、1 から 50 の整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、及び 50（これらの間の全ての範囲及び値を含む）であり得る。 z'' は、5～20 の整数であり得る。 z'' は、10～15 の整数であり得る。

【0204】

リンカーは、構造：

50

【化 9 7】



を有し得、

10

式中、

M、A A_s 及び o は、本明細書で定義される通りである。

【0 2 0 5】

好適なリンカーの他の非限定的な例としては、

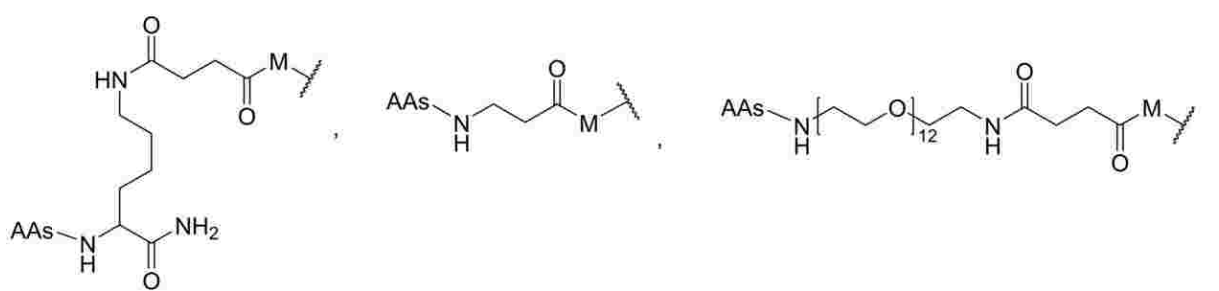
20

30

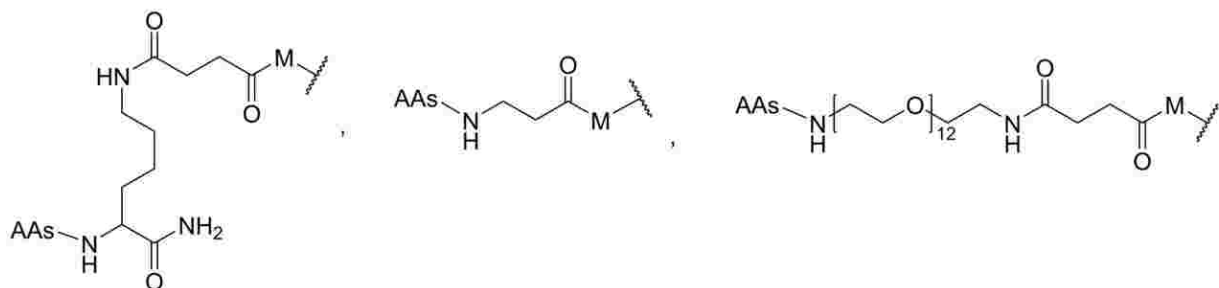
40

50

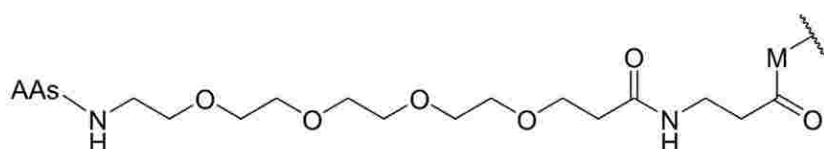
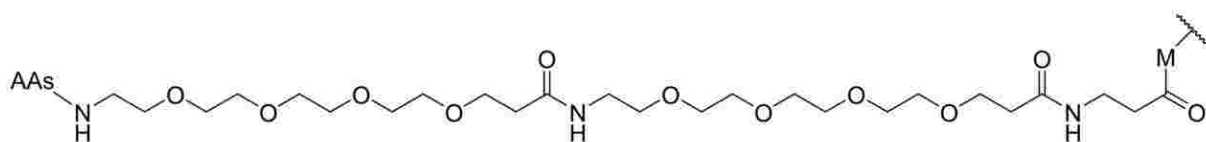
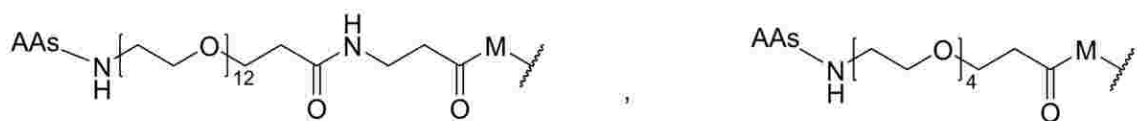
【化 9 8 - 1】



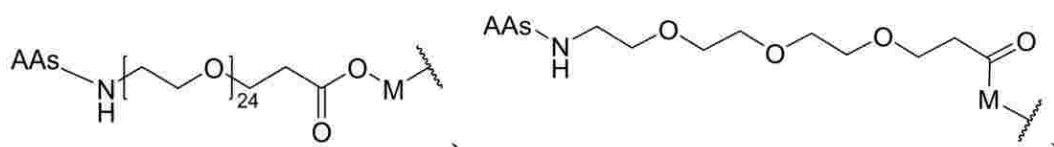
10



20



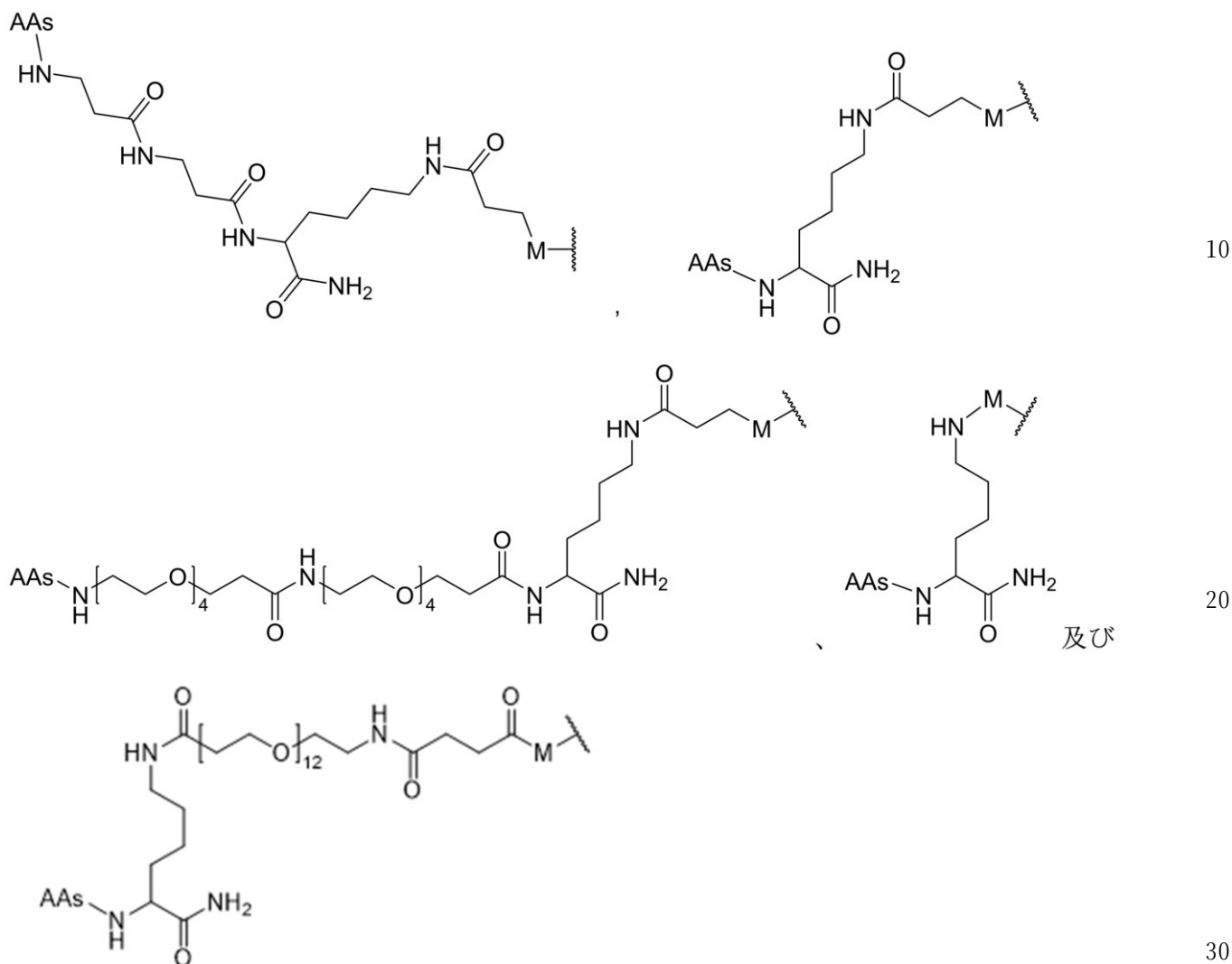
30



40

50

【化 9 8 - 2】



が挙げられ、式中、M及びAAsは、本明細書で定義される通りである。

【0206】

本明細書では、cCPPと、pre-mRNA配列中の標的に相補的なACとを含む化合物であって、Lを更に含み、リンカーが結合基(M)を介してACにコンジュゲートされており、Mが、

【化 9 9】

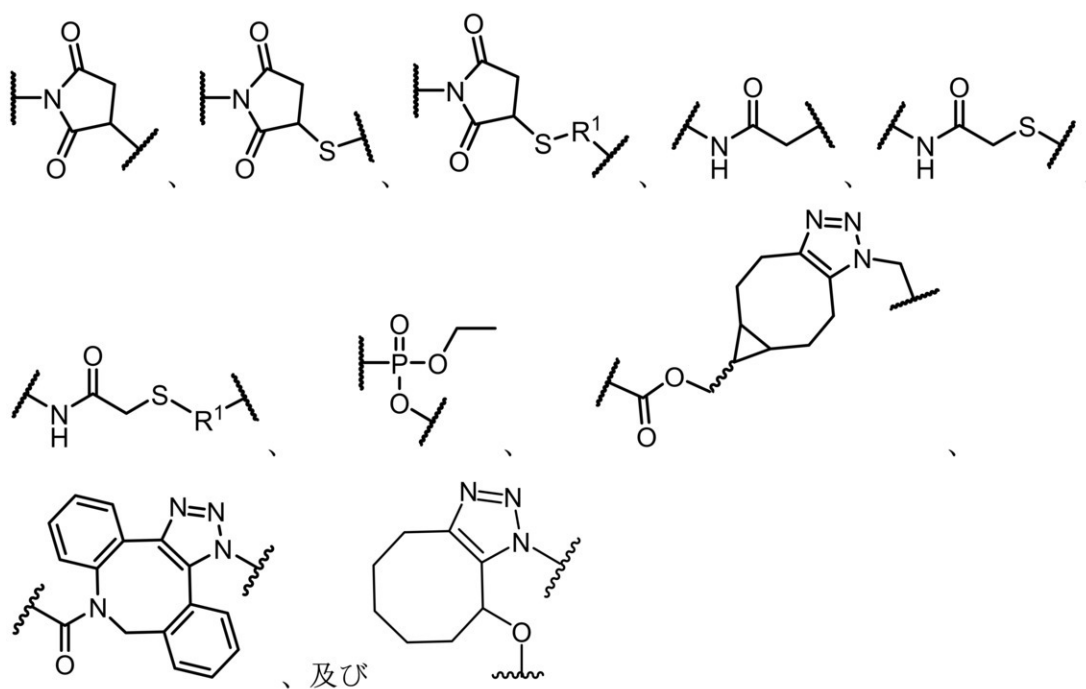


である、化合物が提供される。

【0207】

本明細書では、cCPPと、pre-mRNA配列中の標的に対して相補的であるアンチセンス化合物(AC)、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドとを含む化合物であって、Lを更に含み、リンカーが結合基(M)を介してACにコンジュゲートされており、Mが、

【化 1 0 0】

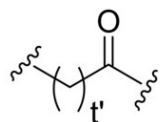


10

20

から選択され、 R^1 が、アルキレン、シクロアルキル、または

【化 1 0 1】

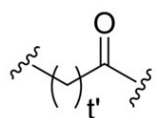


であり、式中、 t' が 0 から 10 であり、各 R が独立して、アルキル、アルケニル、アル

30

キニル、カルボシクリル、またはヘテロシクリルであり、 R^1 が、

【化 1 0 2】



であり、 t' が 2 である、当該化合物が提供される。

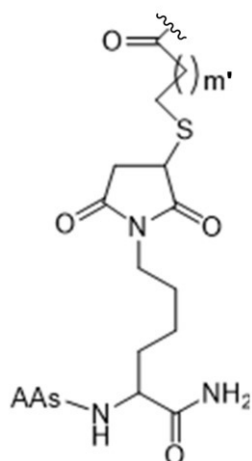
40

【0 2 0 8】

リンカーは、構造：

50

【化 1 0 3】



10

を有し得、

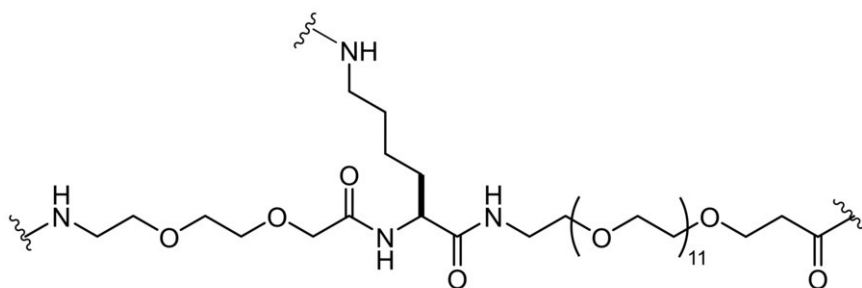
式中、 AAs は本明細書で定義される通りであり、 m' は 0 ～ 10 である。

【0 2 0 9】

リンカーは、式：

20

【化 1 0 4】



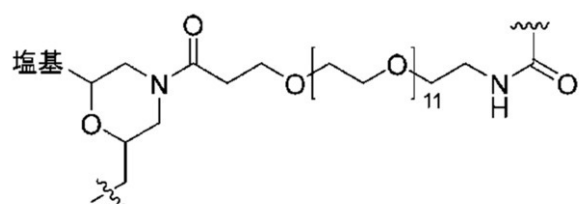
30

のものであり得る。

【0 2 1 0】

リンカーは、式：

【化 1 0 5】



40

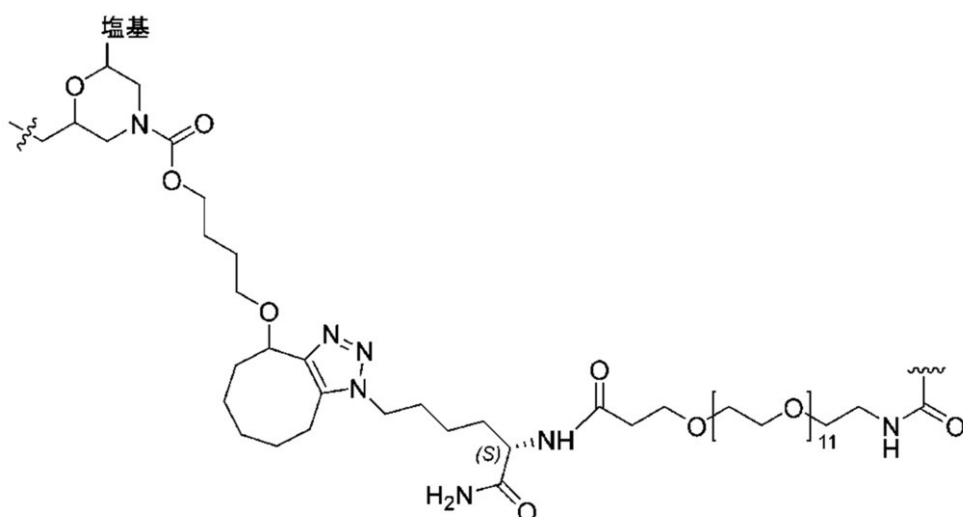
のものであり得、式中、「塩基」は、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーの 3' 末端の核酸塩基に対応する。

【0 2 1 1】

リンカーは、式：

50

【化 1 0 6】



10

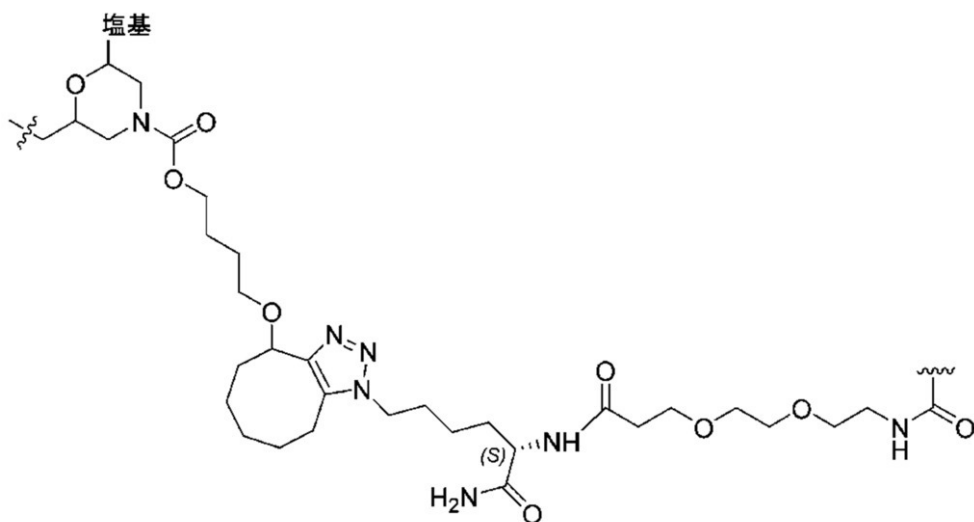
のものであり得、式中、「塩基」は、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーの 3' 末端の核酸塩基に対応する。

【 0 2 1 2】

20

リンカーは、式：

【化 1 0 7】



30

のものであり得、式中、「塩基」は、カーゴホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーの 3' 末端の核酸塩基に対応する。

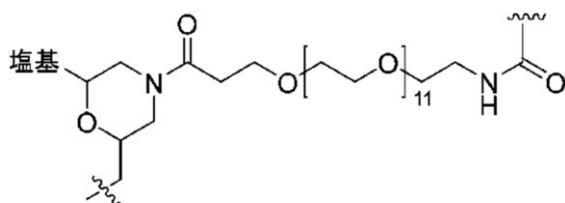
【 0 2 1 3】

40

リンカーは、式：

50

【化 1 0 8】



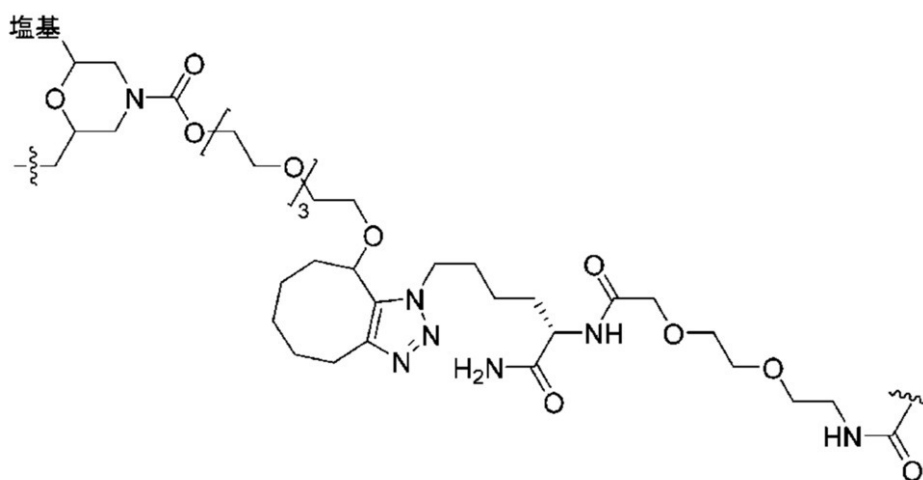
のものであり得、式中、「塩基」は、カーゴホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーの 3' 末端の核酸塩基に対応する。

10

【0 2 1 4】

リンカーは、式：

【化 1 0 9】



20

のものであり得る。

30

【0 2 1 5】

リンカーは、A C 上の任意の適切な位置でカーゴに共有結合することができる。リンカーは、カーゴの 3' 末端または A C の 5' 末端に共有結合される。リンカーは、A C の骨格に共有結合され得る。

【0 2 1 6】

リンカーは、c C P P 上のアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン、もしくはリジンの側鎖、またはグルタミンもしくはアスパラギンの修飾側鎖（例えば、アミノ基を有する還元側鎖）に結合することができる。リンカーは、c C P P 上のリジンの側鎖に結合することができる。

40

【0 2 1 7】

c C P P - リンカーコンジュゲート

c C P P は、本明細書で定義されるリンカーにコンジュゲートされ得る。リンカーは、本明細書で定義される c C P P の A A S c にコンジュゲートされ得る。

【0 2 1 8】

リンカーは、 $-(OCH_2CH_2)_z$ サブユニットを（例えば、スペーサーとして）含み得、式中、 z は、1 から 23 の整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 または 23 である。「 $-(OCH_2CH_2)_z$ 」は、PEG と呼ばれる。c C P P - リンカーコンジュゲートは、表 4 から選択される構造を有し得る。

50

【表 9】

表 4：c C P P－リンカーコンジュゲート

シクロ(FfΦ-4gp-r-4gp-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
シクロ(FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
シクロ(FfΦ-Pia-r-Pia-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
シクロ(FfΦ-Dml-r-Dml-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
シクロ(FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)-PEG ₁₂ -OH
シクロ(fΦR-Cit-R-Cit-Q)-PEG ₁₂ -OH

10

【0219】

リンカーは、 $-(OCH_2CH_2)_z-$ サブユニット（式中、 z' は 1 から 23 の整数である）及びペプチドサブユニットを含み得る。ペプチドサブユニットは、2 から 10 個のアミノ酸を含み得る。c C P P－リンカーコンジュゲートは、表 5 から選択される構造を有し得る。

【表 10】

20

表 5：エンドソーム脱出ビヒクル（c C P P－リンカーコンジュゲート）

Ac-PKKKRKV-Lys(シクロ[FfΦ-R-r-Cit-rQ])-PEG ₁₂ -K(N ₃)-NH ₂
Ac-PKKKRKV-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-R-rQ])-PEG ₁₂ -K(N ₃)-NH ₂
Ac-PKKKRKV-K(シクロ(FfΦR-cit-R-cit-Q))-PEG ₁₂ -K(N ₃)-NH ₂
Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-B-k(N ₃)-NH ₂
Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG2-k(N ₃)-NH ₂
Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG4-k(N ₃)-NH ₂
Ac-PKKKRKV-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
Ac-pkkkrkv-PEG2-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
Ac-rrv-PEG2-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG12-OH
Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-Cit-r-Q])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
Ac-PKKK-Cit-KV-PEG2-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-Cit-r-Q])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(シクロ[FfΦ-Cit-r-Cit-r-Q])-PEG12-K(N ₃)-NH ₂

30

【0220】

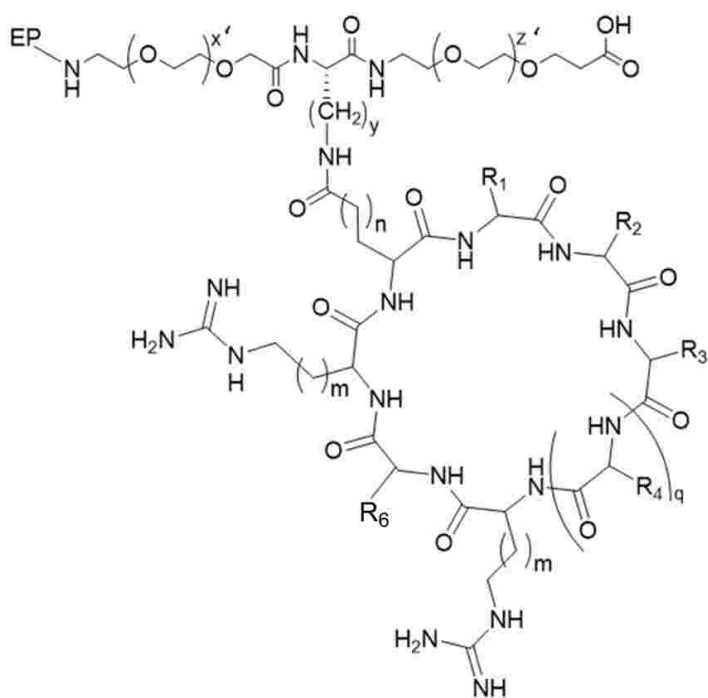
c C P P－リンカーコンジュゲートは、Ac-PKKKRKV-K（シクロ[FfΦGrGrQ]）-PEG12-K(N₃)-NH₂ であり得る。

【0221】

環状細胞透過性ペプチド（c C P P）、リンカー及び環外ペプチド（E P）を含む E E V が提供される。E E V は、式（B）：

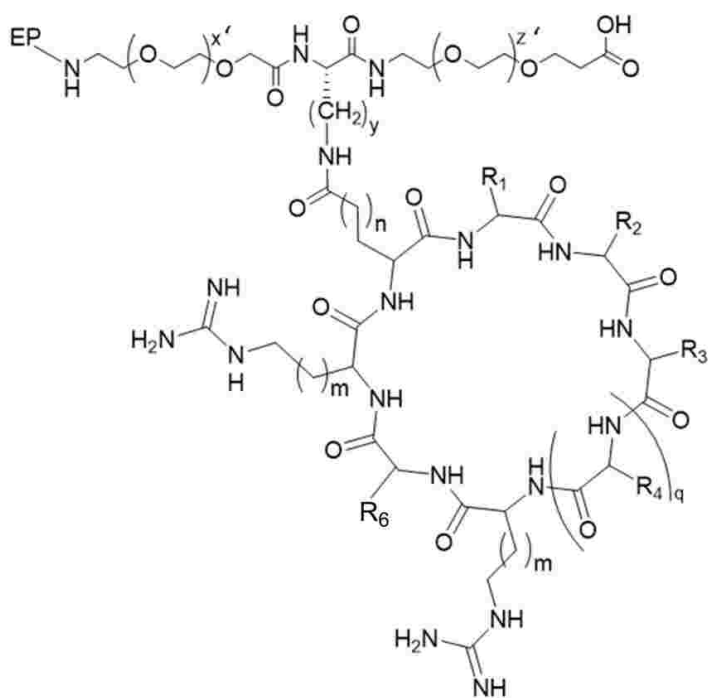
40

【化 1 1 0】



10

20



30

(B)

40

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、
式中、

R₁、R₂及びR₃は、各々独立して、H、またはアミノ酸の芳香族もしくはヘテロ芳香族側鎖であり、

R₄及びR₆は、独立して、Hまたはアミノ酸側鎖であり、

EPは、本明細書で定義される環外ペプチドであり、

各mは、独立して、0～3の整数であり、

nは、0～2の整数であり、

x'は、1～20の整数であり、

50

y は、1 ～ 5 の整数であり、
q は、1 ～ 4 であり、
z ' は、1 ～ 2 3 の整数である。

【 0 2 2 2 】

R 1、R 2、R 3、R 4、R 6、E P、m、q、y、x '、z ' は、本明細書に記載される通りである。

【 0 2 2 3 】

n は 0 であり得る。n は 1 であり得る。n は 2 であり得る。

【 0 2 2 4 】

E E V は、式 (B - a) または (B - b) :

10

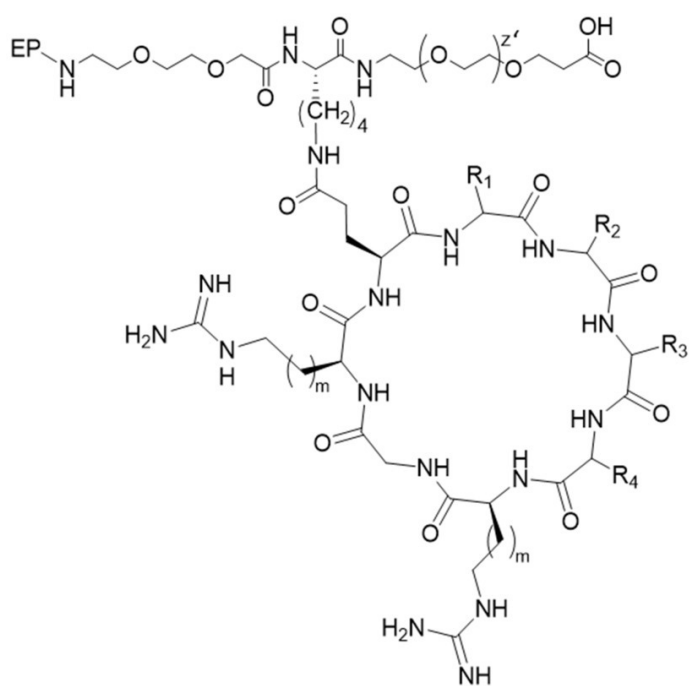
20

30

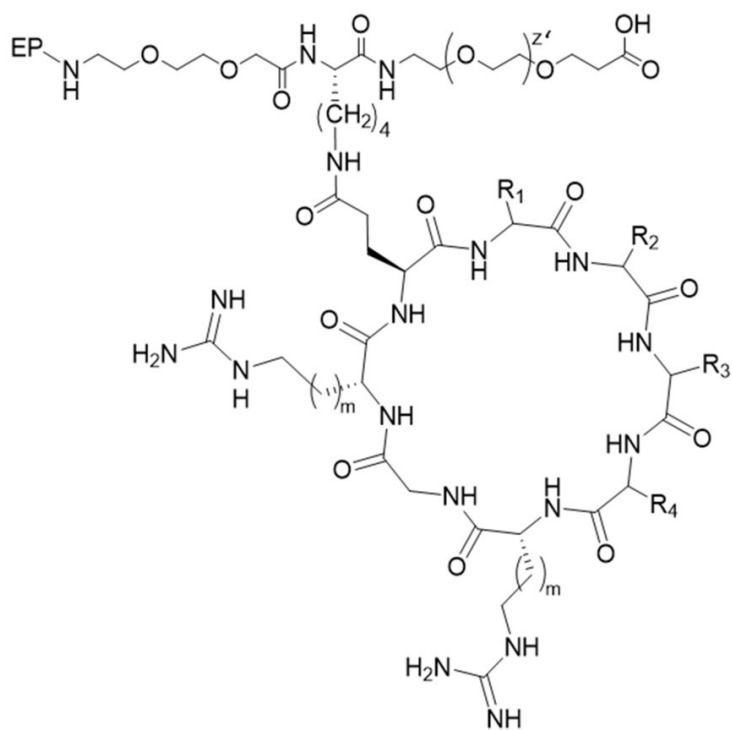
40

50

【化 1 1 1】



(B-a)、



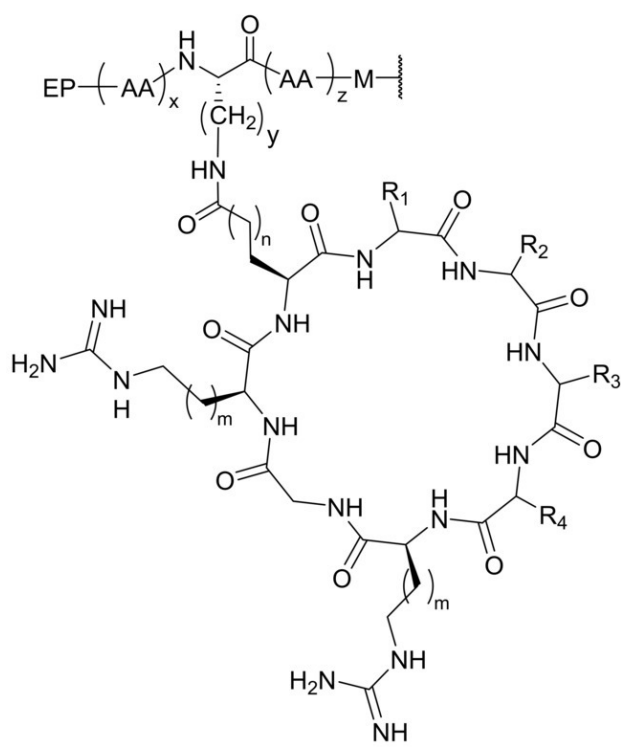
(B-b)

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、式中、EP、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、m及び z' は、式(B)において上で定義された通りである。

【0225】

EEVは、式(B-c)：

【化 1 1 2】



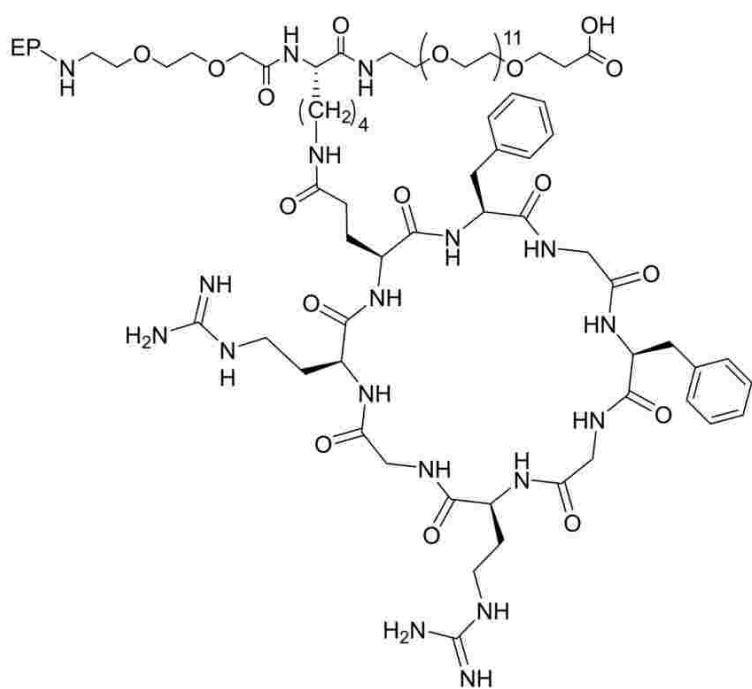
(B - c)

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、式中、EP、R¹、R²、R³、R⁴、及び m は、式 (B) において上で定義された通りであり、AA は、本明細書で定義されるアミノ酸であり、M は、本明細書で定義される通りであり、n は、0～2 の整数であり、x は、1～10 の整数であり、y は、1～5 の整数であり、z は 1～10 の整数である。

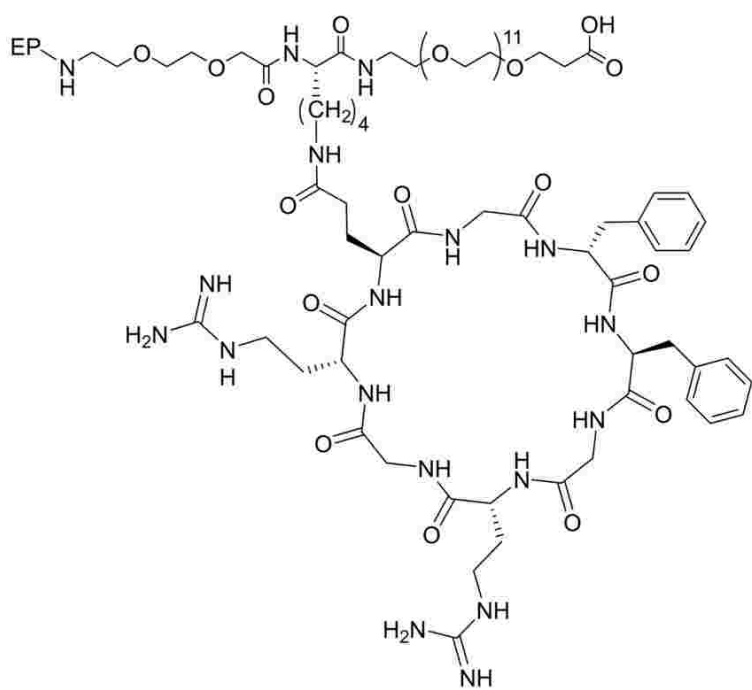
【0 2 2 6】

EEV は、式 (B - 1)、(B - 2)、(B - 3)、または (B - 4)：

【化 1 1 3 - 1】



(B-1) 、



(B-2) 、

10

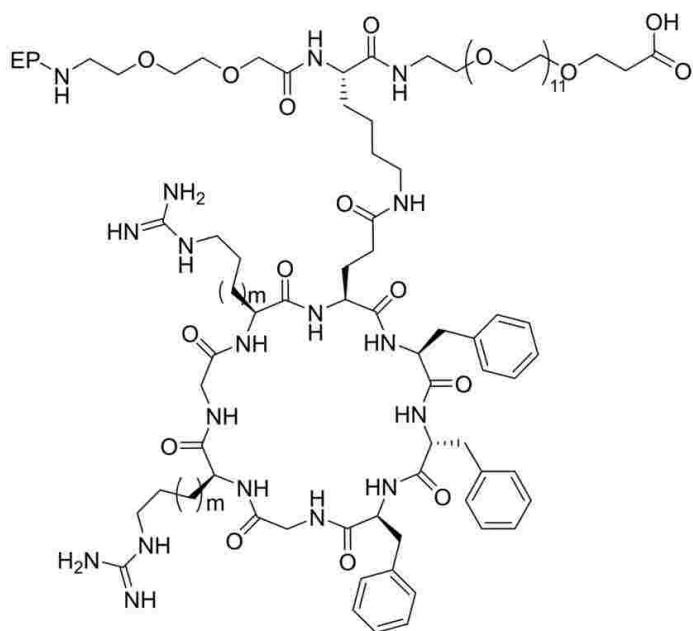
20

30

40

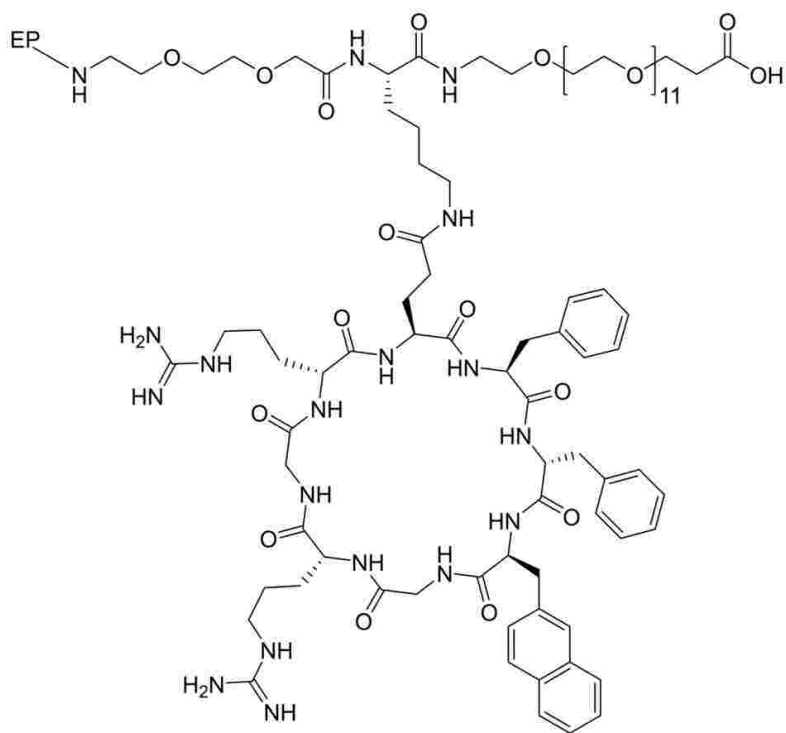
50

【化 1 1 3 - 2】



(B-3) 、

20



(B-4)

40

またはそのプロトン化形態の構造を有し得、式中、EPは、式(B)において上で定義されている通りである。

【0227】

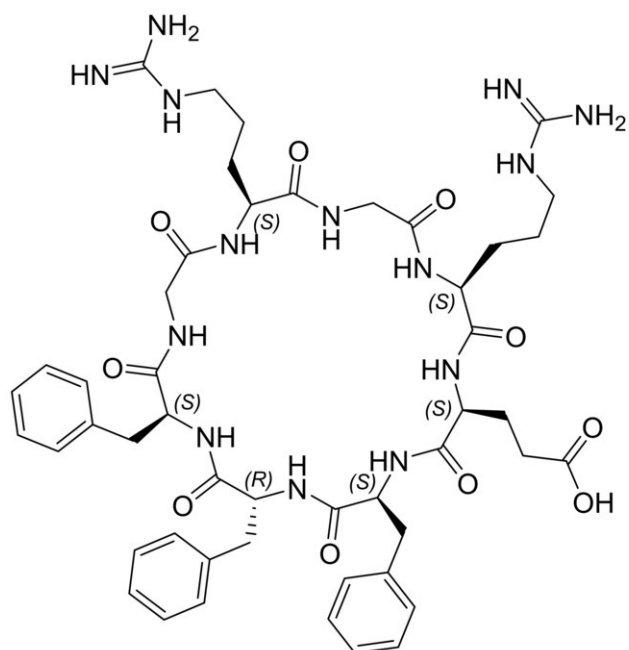
EEVは、式(B)を含み得、構造： Ac-PKKKRKV-AEEA-K （シクロ[FGFGGRGRQ]）-PEG₁₂-OH、または Ac-PKKKRKV-AEEA-K （シクロ[GfFGGrGrQ]）-PEG₁₂-OHを有し得る。

【0228】

EEVは、式：

50

【化 1 1 4】



10

20

の cCPP を含み得る。

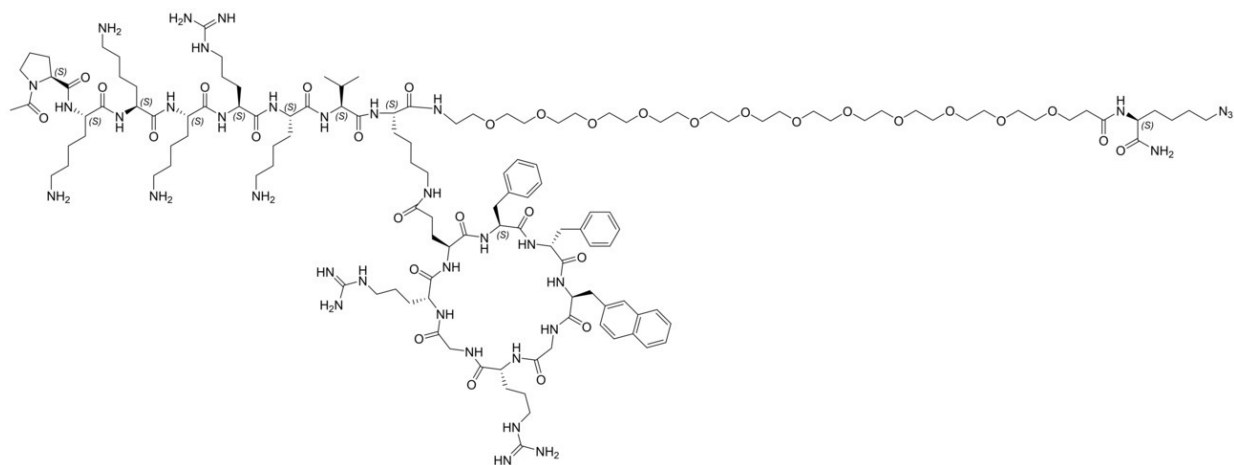
【0 2 2 9】

EEV は、式：Ac-PKKKRKV-miniPEG2-Lys (シクロ (FfFG RGRQ)-miniPEG2-K (N3)) を含み得る。

【0 2 3 0】

EEV は、

【化 1 1 5】



30

40

であり得る。

【0 2 3 1】

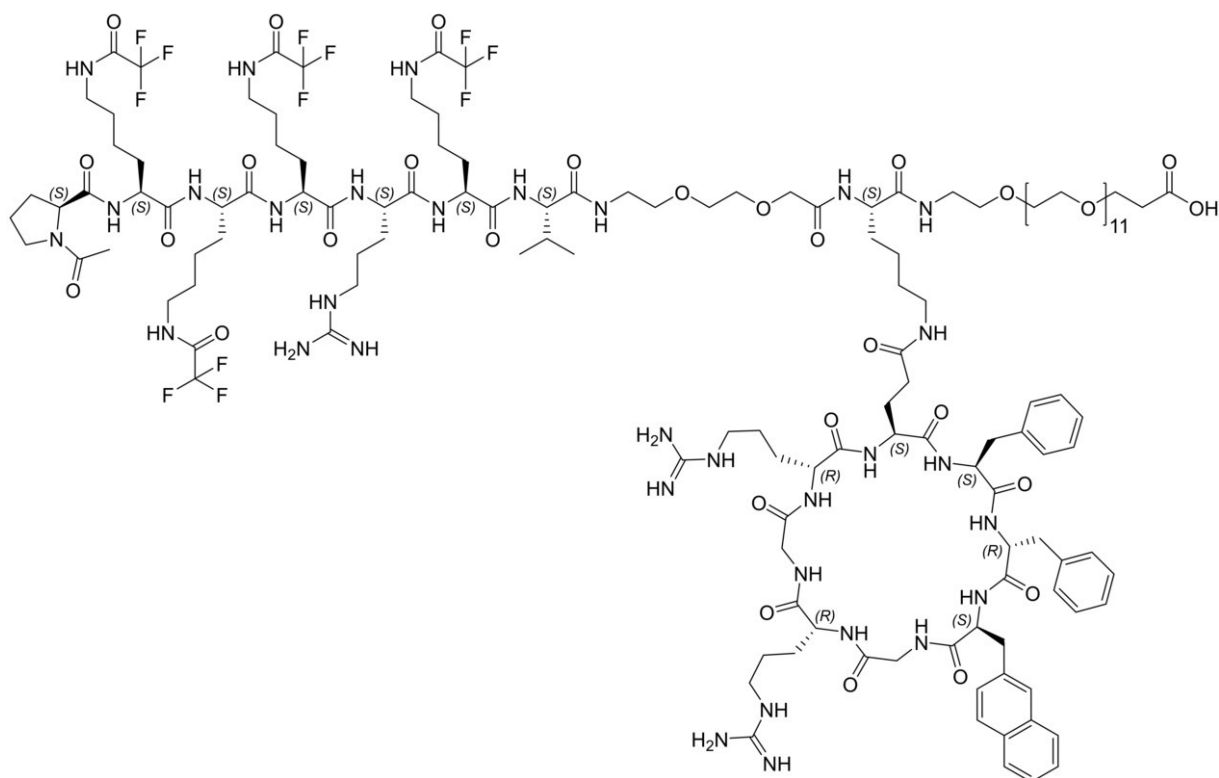
EEV は、Ac-PKKKRKV-K (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)-PEG₁₂-K (N3))-NH₂ であり得る。

【0 2 3 2】

EEV は、

50

【化 1 1 6】



10

20

であり得る。

【0 2 3 3】

EEVは、Ac-P-K(Tfa)-K(Tfa)-K(Tfa)-R-K(Tfa)-V-AEEA-K(シクロ(Ff-Nal-GrGrQ))-PEG₁₂-OH、またはAc-P-K(Tfa)-K(Tfa)-K(Tfa)-R-K(Tfa)-V-AEEA-K(シクロ(FGFGRGRQ))-PEG₁₂-OHであり得る。

30

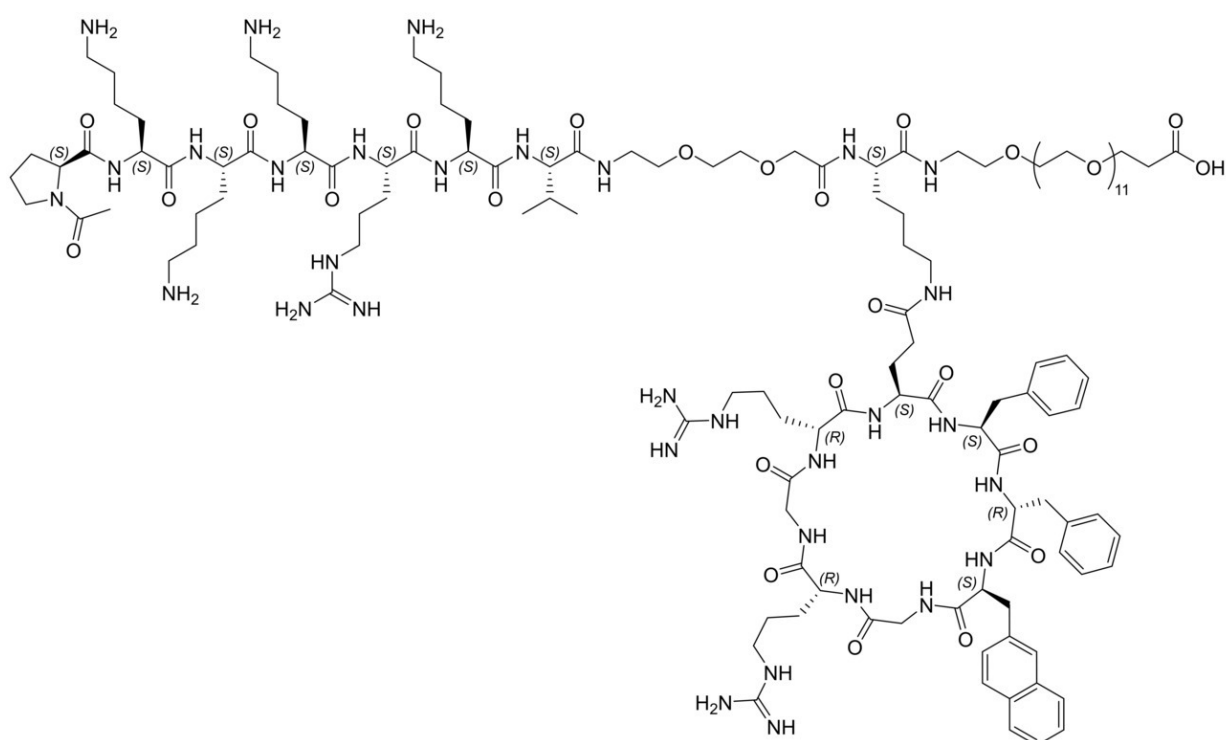
【0 2 3 4】

EEVは、

40

50

【化 1 1 7】



10

20

であり得る。

【0 2 3 5】

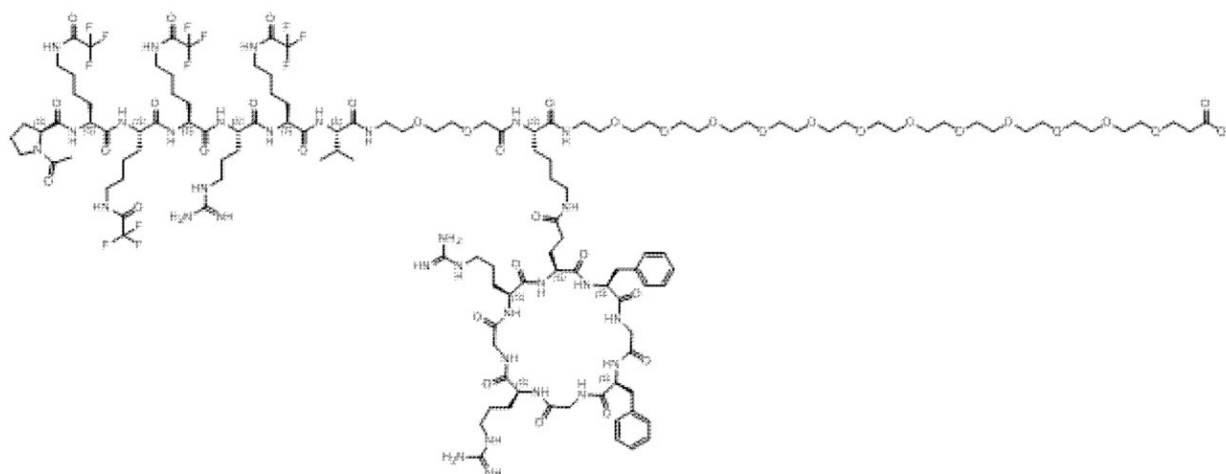
EEVは、Ac-PKKKRKV-miniPEG-K（シクロ（Ff-Nal-Gr
GrQ）-PEG12-OHであり得る。

【0 2 3 6】

EEVは、

【化 1 1 8】

30



40

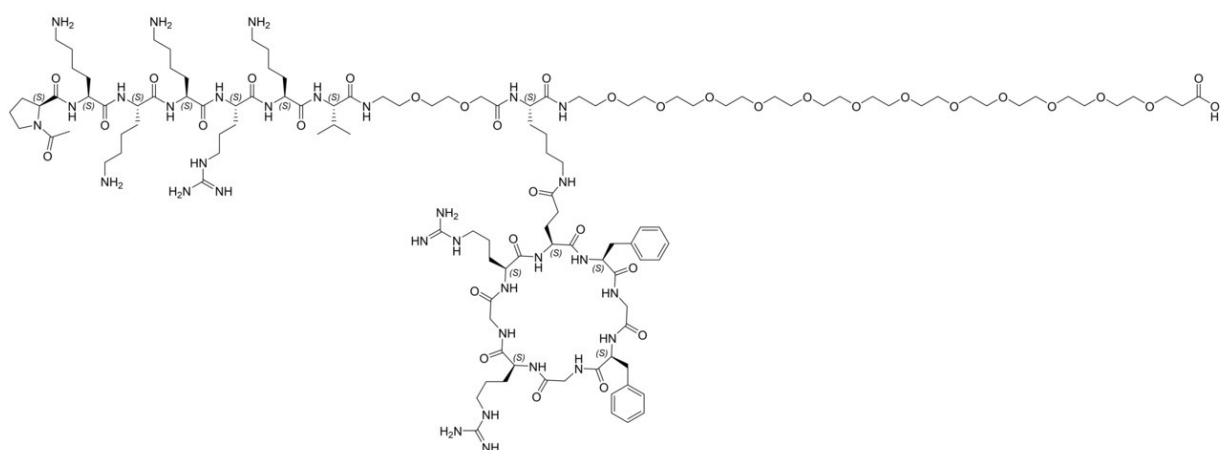
であり得る。

【0 2 3 7】

EEVは、

50

【化 1 1 9】



10

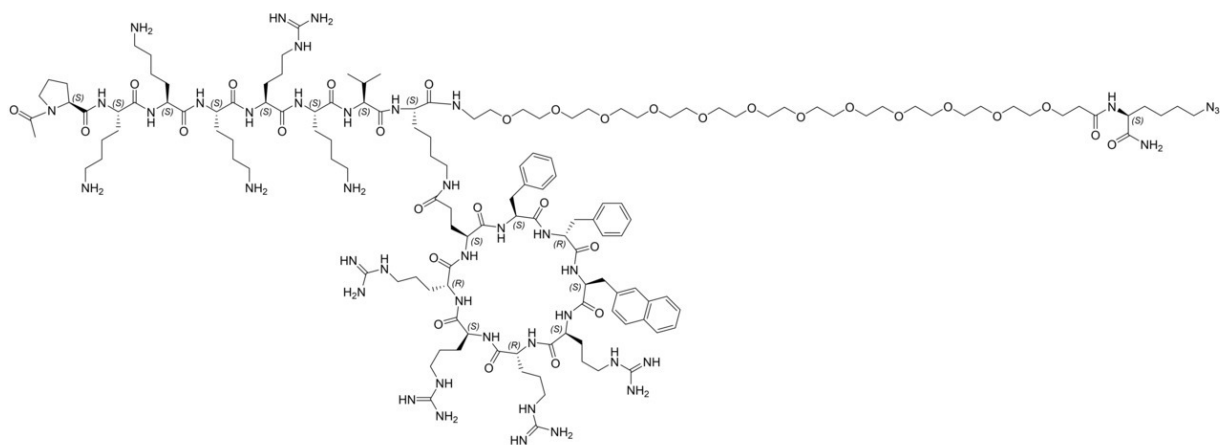
であり得る。

【 0 2 3 8】

E E V は、

【化 1 2 0】

20



30

であり得る。

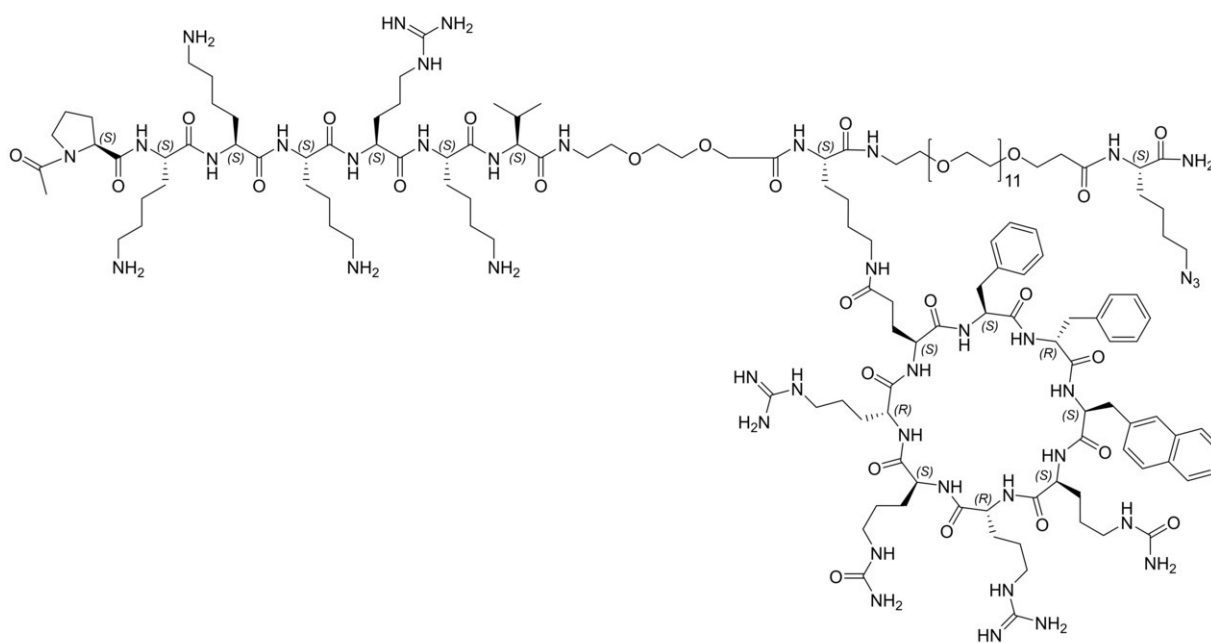
【 0 2 3 9】

E E V は、

40

50

【化 1 2 1】



10

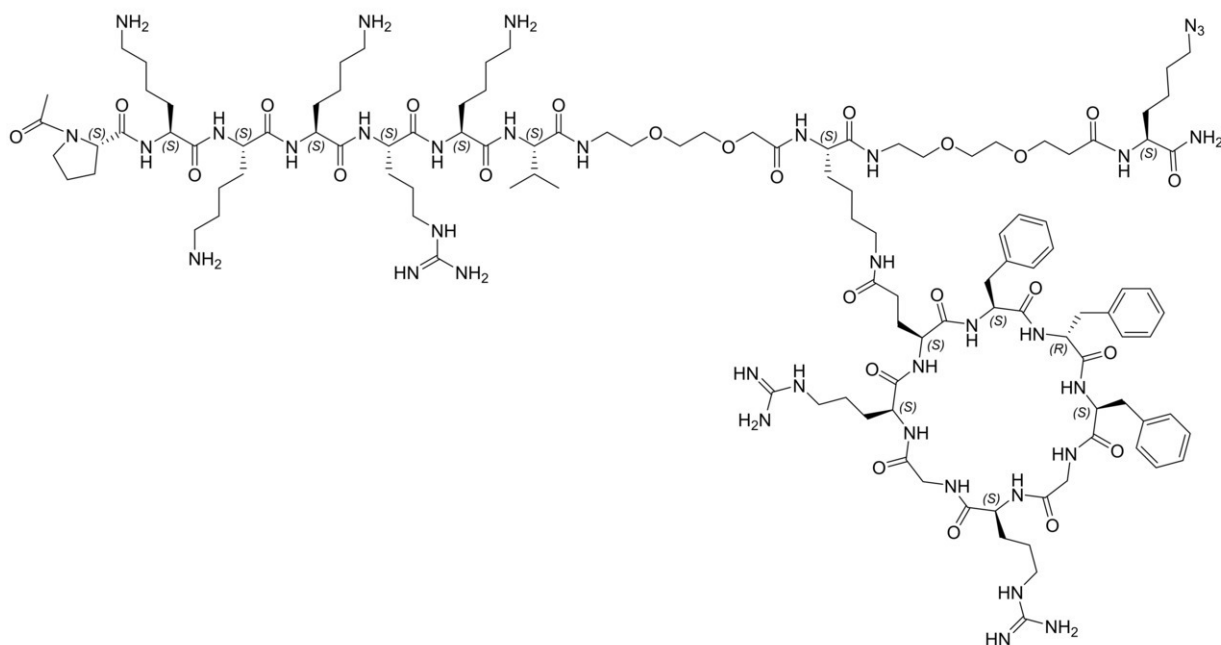
20

であり得る。

【0 2 4 0】

E E V は、

【化 1 2 2】



30

40

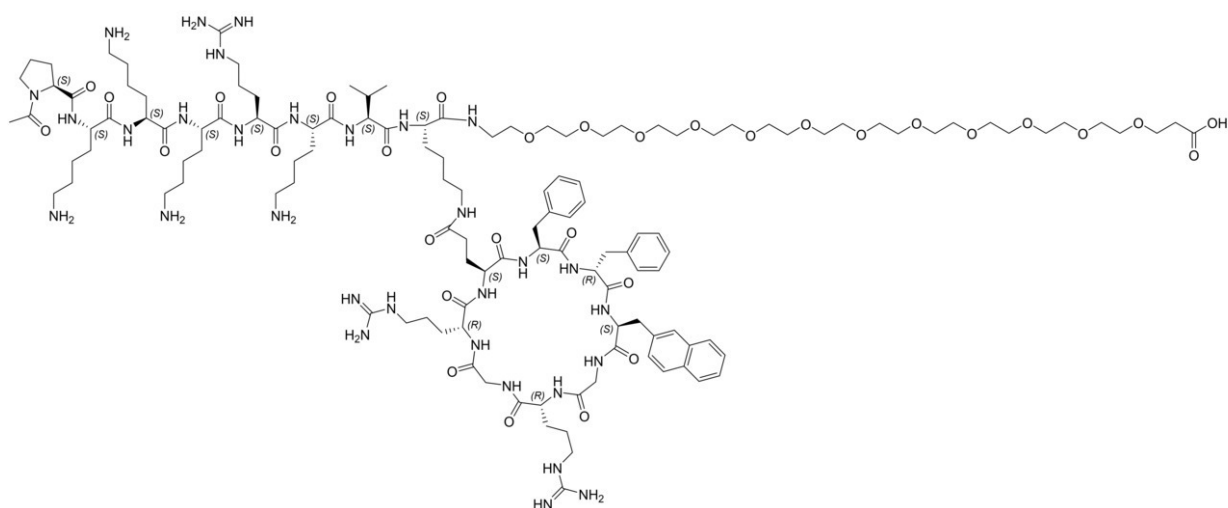
であり得る。

【0 2 4 1】

E E V は、

50

【化 1 2 3】



10

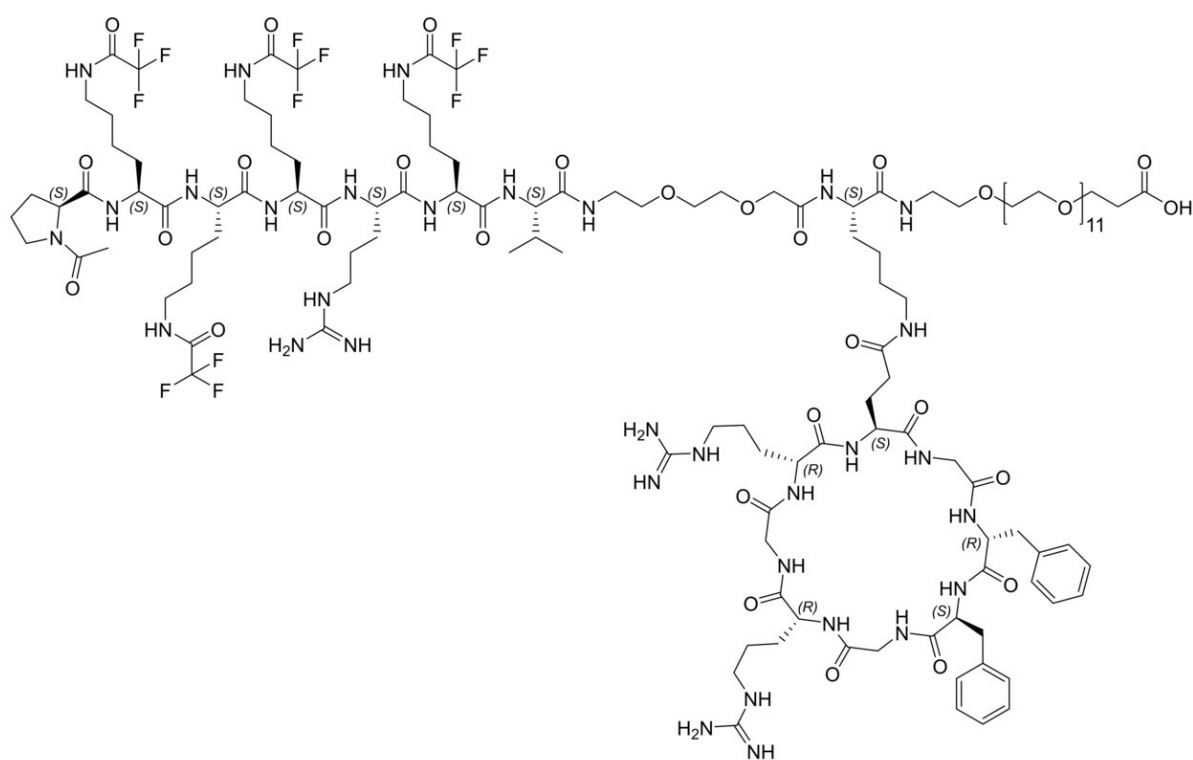
であり得る。

【 0 2 4 2】

E E V は、

【化 1 2 4】

20



30

40

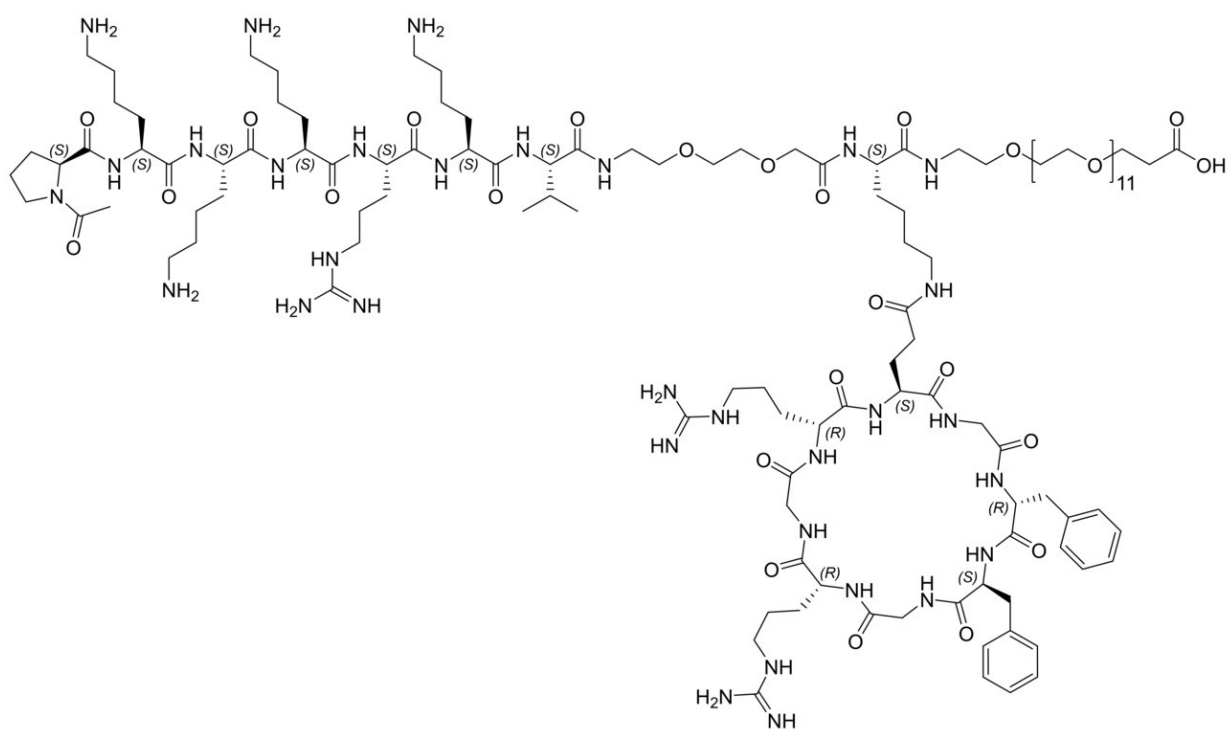
であり得る。

【 0 2 4 3】

E E V は、

50

【化 1 2 5】



10

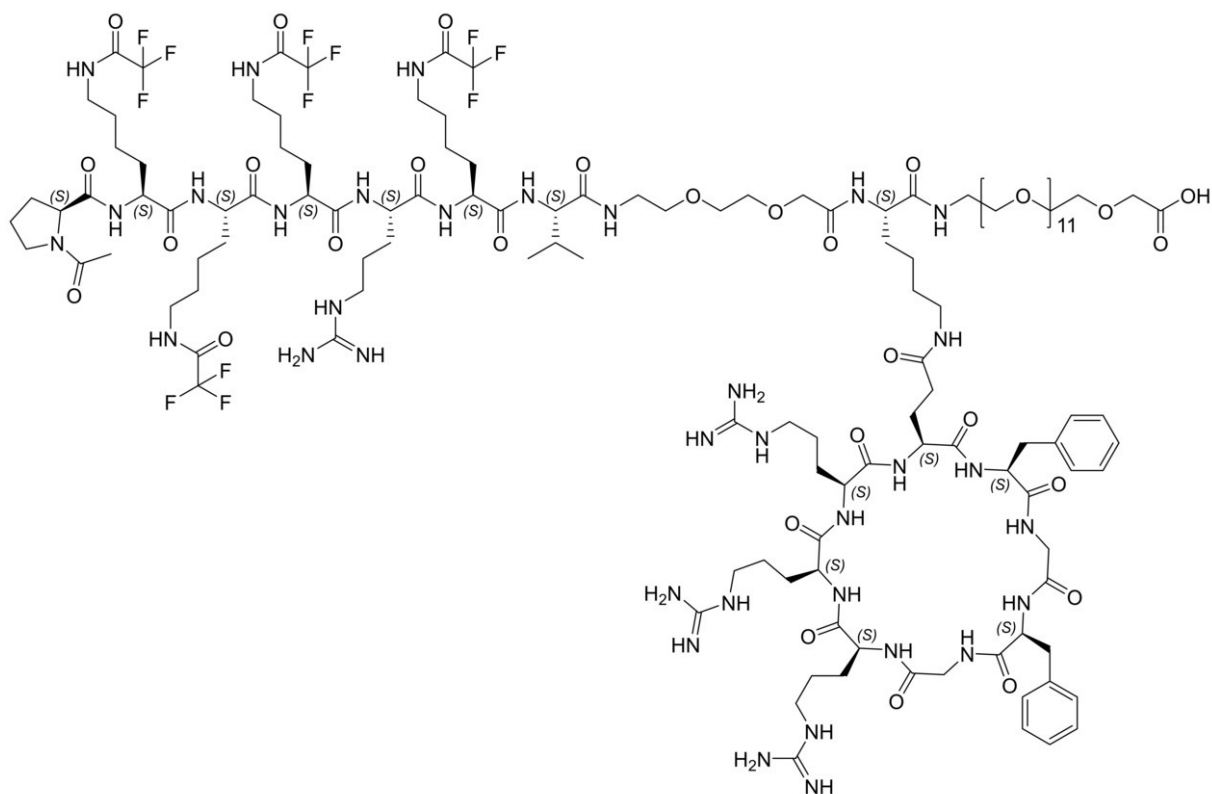
20

であり得る。

【0 2 4 4】

E E V は、

【化 1 2 6】



30

40

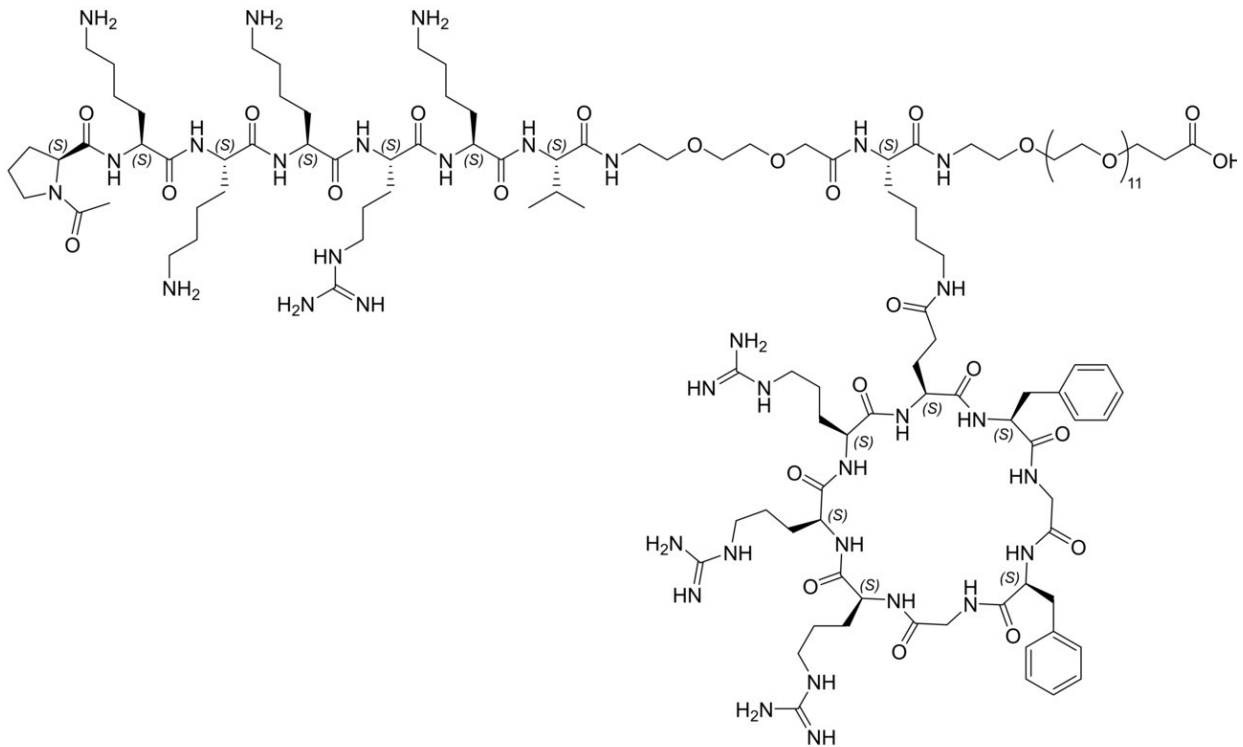
であり得る。

50

【 0 2 4 5 】

E E V は、

【 化 1 2 7 】



10

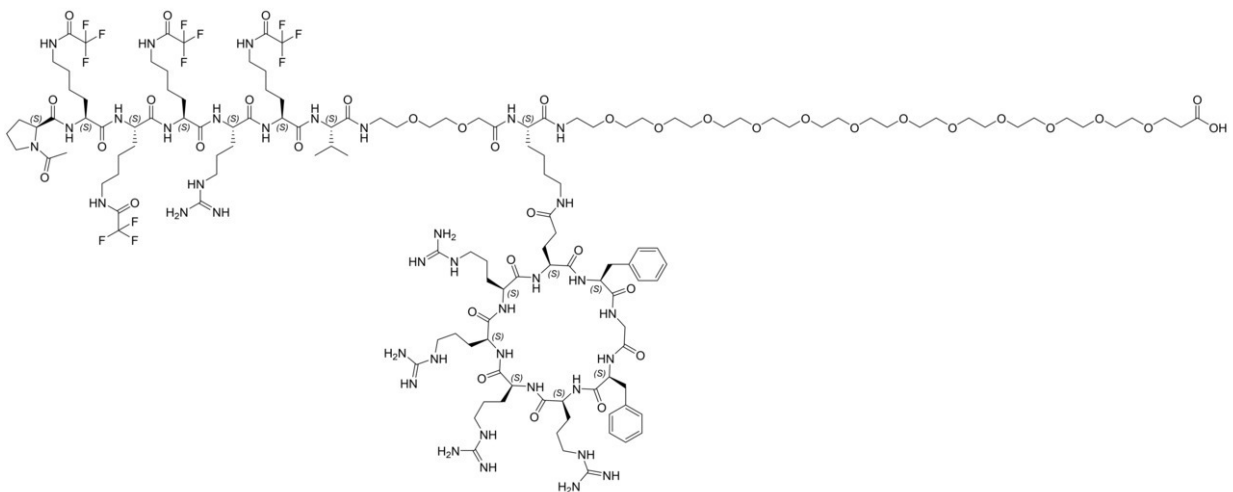
20

であり得る。

【 0 2 4 6 】

E E V は、

【 化 1 2 8 】



30

40

であり得る。

【 0 2 4 7 】

E E V は、

Ac-rr-miniPEG2-Dap [シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ
)] -PEG12-OH、

Ac-fr-r-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -

50

PEG12-OH、
 Ac-rfr-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -
 PEG12-OH、
 Ac-rbfbbr-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -
 PEG12-OH、
 Ac-rrrr-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -
 PEG12-OH、
 Ac-rbr-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -
 PEG12-OH、
 Ac-rbrbr-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) 10
) - PEG12-OH、
 Ac-hh-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) - P
 EG12-OH、
 Ac-hbh-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -
 PEG12-OH、
 Ac-hbhbbh-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ))
) - PEG12-OH、
 Ac-rbhbbh-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ))
) - PEG12-OH、
 Ac-hbrbbh-PEG2-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) 20
) - PEG12-OH、
 Ac-rr-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH、
 Ac-frr-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH、
 Ac-rfr-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH、
 Ac-rbfbbr-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-O
 H、
 Ac-rrrr-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH、
 Ac-rbr-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH、
 Ac-rbrbr-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-O
 H、 30
 Ac-hh-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH、
 Ac-hbh-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH、
 Ac-hbhbbh-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-O
 H、
 Ac-rbhbbh-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-O
 H、
 Ac-hbrbbh-Dap (シクロ (FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)) -b-O
 H、
 Ac-KKKK-miniPEG2-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ))
 -miniPEG2-K(N3)-NH2、 40
 Ac-KGKK-miniPEG2-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ))
 -miniPEG2-K(N3)-NH2、
 Ac-KKGK-miniPEG2-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ))
 -miniPEG2-K(N3)-NH2、
 Ac-KKK-miniPEG2-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
 miniPEG2-K(N3)-NH2、
 Ac-KK-miniPEG2-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -m
 iniPEG2-K(N3)-NH2、
 Ac-KGK-miniPEG2-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
 miniPEG2-K(N3)-NH2、 50

Ac-KBK-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-KBKKBK-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-KR-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-KBR-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PGKKRKV-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKGKRKV-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKKGRKV-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKKKGKV-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKKKRGV-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKKKRKG-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-KKKRK-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-KKRK-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、及び

Ac-KRK-miniPEG₂-Lys (シクロ (Ff-Nal-GrGrQ)) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂

から選択され得る。

【0248】

EEVは、

Ac-PKKKRKV-Lys (シクロ [FfΦGrGrQ]) -PEG₁₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (シクロ [FfΦGrGrQ]) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (シクロ [FGFGRGRQ]) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-KR-PEG₂-K (シクロ [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K (N₃) -
NH₂、

Ac-PKKKGKV-PEG₂-K (シクロ [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K
(N₃) -NH₂、

Ac-PKKKRKG-PEG₂-K (シクロ [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K
(N₃) -NH₂、

Ac-KKKRK-PEG₂-K (シクロ [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K (N₃) -
NH₂、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (シクロ [FFΦGRGRQ]) -
miniPEG₂-K (N₃) -NH₂、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (シクロ [βhFfΦGrGrQ])

10

20

30

40

50

) -miniPEG₂-K(N₃)-NH₂、及び

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(シクロ[FfΦSrSrQ])-miniPEG₂-K(N₃)-NH₂

から選択され得る。

【0249】

EEVは、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(シクロ(GfFGrGrQ))-PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(シクロ[FGFKRKRQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(シクロ[FGFRGRGQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(シクロ[FGFRGrRQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(シクロ[FGFRRRRQ])-PEG₁₂-OH、及び

Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(シクロ[FGFRRRRQ])-PEG₁₂-OH

から選択され得る。

【0250】

EEVは、

Ac-K-K-K-R-K-G-miniPEG₂-K(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-K-K-K-R-K-miniPEG₂-K(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-K-K-R-K-K-PEG₄-K(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-K-R-K-K-K-PEG₄-K(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-K-K-K-K-R-PEG₄-K(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-R-K-K-K-K-PEG₄-K(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₁₂-OH、及び

Ac-K-K-K-R-K-PEG₄-K(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₁₂-OH

から選択され得る。

【0251】

EEVは、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₂-K(N₃)-NH₂、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(シクロ[FGFRGRGRQ])-PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(シクロ[GfFGrGrQ])-PEG₂-K(N₃)-NH₂、及び

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(シクロ[GfFGrGrQ])-PEG₁₂-OH

から選択され得る。

【0252】

10

20

30

40

50

カーゴはACであり得、EEVは、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (シク口 [FfΦGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (シク口 [FfΦCit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (シク口 [FfFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (シク口 [FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (シク口 [GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (シク口 [FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (シク口 [FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦCit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-PEG₂-K (シク口 [FfF-GRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-PEG₂-K (シク口 [FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-PEG₂-K (シク口 [GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-PEG₂-K (シク口 [FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-PEG₂-K (シク口 [FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦCit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-r-PEG₂-K (シク口 [FfFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-r-PEG₂-K (シク口 [FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-r-PEG₂-K (シク口 [GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-r-PEG₂-K (シク口 [FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-r-r-PEG₂-K (シク口 [FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-h-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-h-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦCit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-h-r-PEG₂-K (シク口 [FfFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-h-r-PEG₂-K (シク口 [FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-h-r-PEG₂-K (シク口 [GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-h-r-PEG₂-K (シク口 [FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-h-r-PEG₂-K (シク口 [FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-b-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-b-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦCit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-b-r-PEG₂-K (シク口 [FfFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-b-r-PEG₂-K (シク口 [FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-b-r-PEG₂-K (シク口 [GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-b-r-PEG₂-K (シク口 [FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-b-r-PEG₂-K (シク口 [FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-b-r-b-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦGrGrQ]) -PEG₁₂-OH、

Ac-r-b-r-b-r-PEG₂-K (シク口 [FfΦCit-r-Cit-rQ]) -P

10

20

30

40

50

E G₁₂-OH、

A c-r b r b r-PEG₂-K (シクロ [F f F G R G R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b r b r-PEG₂-K (シクロ [F G F G R G R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b r b r-PEG₂-K (シクロ [G f F G r G r Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b r b r-PEG₂-K (シクロ [F G F G R R R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b r b r-PEG₂-K (シクロ [F G F R R R R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b h b r-PEG₂-K (シクロ [F f Φ G r G r Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b h b r-PEG₂-K (シクロ [F f Φ C i t-r-C i t-r Q]) -P

E G₁₂-OH、

A c-r b h b r-PEG₂-K (シクロ [F f F G R G R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b h b r-PEG₂-K (シクロ [F G F G R G R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b h b r-PEG₂-K (シクロ [G f F G r G r Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b h b r-PEG₂-K (シクロ [F G F G R R R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-r b h b r-PEG₂-K (シクロ [F G F R R R R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-h b r b h-PEG₂-K (シクロ [F f Φ G r G r Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-h b r b h-PEG₂-K (シクロ [F f Φ C i t-r-C i t-r Q]) -P

E G₁₂-OH、

A c-h b r b h-PEG₂-K (シクロ [F f F G R G R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-h b r b h-PEG₂-K (シクロ [F G F G R G R Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-h b r b h-PEG₂-K (シクロ [G f F G r G r Q]) -PEG₁₂-OH

、

A c-h b r b h-PEG₂-K (シクロ [F G F G R R R Q]) -PEG₁₂-OH

、及び

A c-h b r b h-PEG₂-K (シクロ [F G F R R R R Q]) -PEG₁₂-OH

から選択され得、ここで、bはベータアラニンであり、環外配列は、DまたはLの立体化学であり得る。

【0253】

実施形態では、環状ペプチドとACとを含む化合物は、AC単独を含む化合物と比較して改善された細胞質取り込み効率を有する。細胞質取り込み効率は、環状ペプチドとACとを含む化合物の細胞質送達効率をAC単独の細胞質送達効率と比較することによって測定することができる。

【0254】

アンチセンス化合物

様々な実施形態において、本明細書に開示される化合物は、アンチセンス化合物(AC)にコンジュゲートされたCPP(例えば、環状ペプチド)を含む。実施形態では、ACは、標的ポリヌクレオチドに指向されるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。「アン

10

20

30

40

50

チセンスオリゴヌクレオチド」または単に「アンチセンス」という用語は、標的とするポリヌクレオチド配列に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを含むことを意図している。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、選択された配列、例えば標的遺伝子mRNAに対して相補的な、DNAまたはRNAの一本鎖である。

【0255】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質の転写、翻訳及び発現の1つ以上の局面を調節し得る。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的pre-mRNA中の標的配列に指向され、pre-mRNAスプライシングの1つ以上の局面を調節する。本明細書で使用される場合、スプライシングの調節は、スプライスされたmRNA分子が、エクソンスキッピングもしくはエクソン組み込みの結果としてのエクソンの異なる組み合わせか、1つ以上のエクソンの欠失か、または正常ではスプライスされたmRNAの中に認められない配列（例えば、イントロン配列）の欠失もしくは付加のいずれかを含有するように、pre-mRNA転写物のプロセッシングを変化させることを指す。実施形態では、pre-mRNA分子中の標的配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、変異したpre-mRNA配列に対する天然のスプライシングを回復させる。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、標的pre-mRNAの選択的スプライシングをもたらす。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、1つ以上のエクソンのエクソン組み込みまたはエクソンスキッピングをもたらす。実施形態では、スキッピングされるエクソン配列は、フレームシフト変異、ナンセンス変異またはミスセンス変異を含む。実施形態では、スキッピングされるエクソン配列は、核酸欠失、置換または挿入を含む。実施形態では、スキッピングされるエクソン自体は配列変異を含まないが、隣接するエクソンは、フレームシフト変異またはナンセンス変異を招く変異を含む。実施形態では、標的pre-mRNA中の標的配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、成熟mRNA分子におけるエクソン配列の組み込みを防止する。実施形態では、標的pre-mRNA中の標的配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、野生型標的タンパク質異性体の優先的発現をもたらす。実施形態では、標的pre-mRNA中の標的配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、野生型標的タンパク質の活性断片を含む再スプライシングされた標的タンパク質の発現をもたらす。

【0256】

アンチセンス機構は、標的核酸とのアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物のハイブリダイゼーションを介して機能する。実施形態では、標的配列にハイブリダイズしているアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的タンパク質の発現を抑制する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのその標的配列に対するハイブリダイゼーションは、1つ以上の野生型標的タンパク質異性体の発現を抑制する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのその標的配列に対するハイブリダイゼーションは、標的タンパク質の発現を上方制御する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのその標的配列に対するハイブリダイゼーションは、1つ以上の野生型標的タンパク質異性体の発現を増加させる。

【0257】

実施形態では、アンチセンス化合物は、相補的mRNAに結合することによって遺伝子発現を阻害することができる。標的mRNAへの結合は、翻訳に関与するRNA結合タンパク質を立体的に遮断することで相補的mRNA鎖の翻訳を妨げることによって、または標的mRNAの分解をもたらすことによって、遺伝子発現の阻害をもたらすことができる。アンチセンスDNAを使用して、特定の相補的（コードまたは非コード）RNAを標的化することができる。結合が起こる場合、DNA/RNAハイブリッドは、酵素RNase Hによって分解され得る。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約10から約50ヌクレオチド、または約15から約30ヌクレオチドを含有する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的ヌクレオチド配列に対して完全に相補的でなくて

もよい。

【0258】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質合成の有効かつ標的化された阻害剤であることが実証されており、したがって、標的遺伝子によるタンパク質合成を特異的に阻害するために使用され得る。タンパク質合成を阻害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性は十分に証明されている。例えば、ポリガラクトナーゼ及びムスカリン2型アセチルコリン受容体の合成は、それらのそれぞれのmRNA配列に指向されるアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される（米国特許第5,739,119号及び米国特許第5,759,829号）。更には、アンチセンス阻害の例は、核内タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子（MDG1）、ICAM-1、E-セレクトイン、STK-1、線条体GABAA受容体、及びヒトEGFに関して示されている（Jaskulski et al, Science. 1988 Jun 10; 240(4858): 1544-6、Vasanthakumar and Ahmed, Cancer Commun. 1989; 1(4): 225-32、Peris et al, Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15; 57(2): 310-20、米国特許第5,801,154号、米国特許第5,789,573号、米国特許第5,718,709号、及び米国特許第5,610,288号）。更には、様々な異常な細胞増殖、例えばがんを抑制する及びその治療のために用いられ得るアンチセンス構築物も記述がなされている（米国特許第5,747,470号、米国特許第5,591,317号、及び米国特許第5,783,683号）。

【0259】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを産生する方法は、当該分野で公知であり、任意のポリヌクレオチド配列を標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチドを産生するために容易に適合させることができる。所与の標的配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の選択は、選択された標的配列の分析と、二次構造、T_m、結合エネルギー及び相対安定性の決定とに基づく。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、宿主細胞における標的mRNAへの特異的結合を減少させるかまたは妨げる二量体、ヘアピンまたは他の二次構造を形成することが相対的に不可能であることに基づいて選択され得る。mRNAの標的領域には、AUG翻訳開始コドンまたはその付近の領域、及びmRNAの5'領域に実質的に相補的な配列が含まれ得る。これらの二次構造解析及び標的部位選択の検討は、例えば、OLIGOプライマー解析ソフトウェアのバージョン4（Molecular Biology Insights）及び／またはBLASTN 2.0.5アルゴリズムソフトウェア（Altschul et al, Nucleic Acids Res. 1997, 25(17): 3389-402）を使用して行うことができる。

【0260】

本開示によれば、アンチセンス化合物（AC）は、例えば真核生物の標的pre-mRNAのスプライシングを変化させることによって、標的遺伝子のスプライシング、翻訳または発現の1つ以上の局面を変化させる。本開示に係るACは、標的pre-mRNA配列中に認められる配列、例えば、少なくともエクソンの一部、少なくともイントロンの一部、またはこれらの両方を含む配列に対して相補的な、核酸配列を含む。これらのACの利用は、特定の疾患原因遺伝子のスプライシングを調節する能力を有する直接的な遺伝学的手法を提供する。アンチセンス技術の背景にある原理は、標的核酸にハイブリダイズするアンチセンス化合物が遺伝子発現活性、例えばスプライシングまたは翻訳を、複数のアンチセンス機構のうちの1つによって調節するということである。ACの配列特異性は、この技術を、様々な疾患のうちのいずれか1つの発病に関与するpre-mRNAのスプライシングを選択的に調節するための治療薬として極めて魅力的なものにしている。アンチセンス技術は、1つ以上の特定の遺伝子産物の発現を変化させるための有効な手段であり、それゆえ、治療、診断及び研究の複数の用途において有用であるとわかる可能性がある。

【0261】

本明細書に記載される化合物は、1つ以上の不斉中心を含み得、ひいては、エナンチオマー、ジアステレオマー、及び絶対立体化学に関して、(R)もしくは(S)、 α もしくは β 、または(D)もしくは(L)として定義され得る他の立体異性配置を生じ得る。本明細書で提供されるアンチセンス化合物には、全てのそのような可能な異性体、並びにそれらのラセミ形態及び光学的に純粋な形態が含まれる。

【0262】

アンチセンス化合物ハイブリダイゼーション部位

アンチセンス機構は、標的核酸へのアンチセンス化合物のハイブリダイゼーションに依存する。実施形態では、本開示は、標的核酸に対して相補的であるアンチセンス化合物を提供する。実施形態では、標的核酸配列は、pre-mRNA分子中に存在する。実施形態では、標的核酸配列は、pre-mRNA分子のエクソンの中に存在する。実施形態では、標的核酸配列は、pre-mRNA分子のイントロンの中に存在する。

10

【0263】

pre-mRNA分子は、核内で作られ、翻訳のために細胞質への輸送の前またはその間にプロセッシングされる。pre-mRNAのプロセッシングは、5'メチル化キャップ及びおよそ200~250塩基のポリ(A)テールを転写物の3'末端に付加することを含む。mRNAプロセッシングにおける次のステップは、pre-mRNAのスプライシングであるが、これは、哺乳動物mRNAの90~95%の成熟において起こるものである。イントロン(または、介在配列)は、成熟mRNAのコード配列の中に含まれていない、一次転写物の領域(またはそれをコードするDNA)である。エクソンは、細胞質に到達したときに成熟mRNA中に留まっている、一次転写物の領域である。エクソン同士が一緒にスプライスされて、成熟mRNA配列を形成する。スプライスジャンクションはスプライス部位とも呼称され、当該ジャンクションの5'側はしばしば「5'スプライス部位」または「スプライスドナー部位」と呼ばれ、3'側は「3'スプライス部位」または「スプライスアクセプター部位」と呼ばれる。スプライシングにおいて、上流側エクソンの3'末端は下流側エクソンの5'末端に接合される。したがって、未スプライスRNA(またはpre-mRNA)は、イントロンの5'末端にエクソン/イントロン接合部を有し、イントロンの3'末端にイントロン/エクソン接合部を有する。イントロンが除去された後、成熟mRNA中の時としてエクソン/エクソン接合部または境界と呼称される場所において、エクソン同士は隣接している。隠れたスプライス部位は、使用される頻度がより少ないとはいえ、通常のスプライス部位が遮断されているかまたは利用できないときに使用されることがあるスプライス部位である。選択的スプライシングは、エクソンの異なる組み合わせがスプライスされ合うこととして定義されるものであるが、単一の遺伝子から複数のmRNA転写物をもたらすことが多い。

20

30

【0264】

実施形態では、ACは、スプライス部位内の配列とハイブリダイズする。実施形態では、ACは、スプライス部位の一部を含む配列とハイブリダイズする。実施形態では、ACは、スプライス部位の一部または全てを含む配列とハイブリダイズする。実施形態では、ACは、スプライスドナー部位の一部または全てを含む配列とハイブリダイズする。実施形態では、ACは、スプライスアクセプター部位の一部または全てを含む配列とハイブリダイズする。実施形態では、ACは、隠れたスプライス部位の一部または全てを含む配列とハイブリダイズする。実施形態では、ACは、エクソン/イントロン接合部を含む配列とハイブリダイズする。

40

【0265】

pre-mRNAスプライシングは、2つの逐次的生化学反応を伴う。両反応は、RNAヌクレオチド間でのスプライソソームエステル交換を伴う。第1の反応では、スプライソソーム組立て中に決まるものであるイントロン内の特定の分岐点ヌクレオチドの2'-OHが、5'スプライス部位においてイントロンの第1ヌクレオチドに求核攻撃を行って、投げ縄型中間体を形成する。第2の反応では、遊離した5'エクソンの3'-OHが、3'スプライス部位においてイントロンの最後のヌクレオチドに求核攻撃を行い、かくして

50

、エクソン同士が接合され、投げ縄型イントロンが遊離する。pre-mRNA スプライシングは、イントロン性サイレンサー配列（ISS）及び末端ステムループ（TSL）配列によって調節される。本明細書で使用される場合、「イントロン性サイレンサー配列（ISS）」及び「末端ステムループ（TSL）」という用語は、pre-mRNA 内でのトランス作用性タンパク質因子の結合によって選択的スプライシングを制御してそれによってスプライス部位の差次的利用をもたらす、それぞれイントロン内及びエクソン内の配列エレメントを指す。典型的には、イントロン性サイレンサー配列は8～16ヌクレオチドであり、エクソン-イントロン接合部にあるスプライス部位ほどには保存されていない。末端ステムループ配列は、典型的には12～24ヌクレオチドであり、相補性、よって結合性ゆえに、12～24ヌクレオチドの配列の中で二次ループを形成する。

10

【0266】

実施形態では、ACは、イントロン性サイレンサー配列の一部または全てを含む配列とハイブリダイズする。実施形態では、ACは、末端ステムループの一部または全てを含む配列とハイブリダイズする。

【0267】

点変異に起因するヒト遺伝子疾患の最大50%は、異常スプライシングによって引き起こされる。そのような点変異は、現行のスプライス部位を妨害するか、新たなスプライス部位を作り出すかのどちらかであり得、その結果、エクソンの異なる組み合わせからなるかまたはエクソンの欠失を有するmRNA転写物がもたらされる。また、点変異の結果として、隠れたスプライス部位が活性化すること、または調節性シスエレメント（すなわち

20

【0268】

実施形態では、ACは、標的遺伝子における変異に起因する異常スプライス部位の一部または全てを含む配列とハイブリダイズする。実施形態では、ACは、調節エレメントの一部または全てを含む配列とハイブリダイズする。更に提供されるのは、シス調節エレメントに指向されるアンチセンス化合物である。実施形態では、調節エレメントはエクソン内にある。実施形態では、調節エレメントはイントロン内にある。

【0269】

実施形態では、ACは、翻訳開始コドン領域、5'キャップ領域、イントロン／エクソン接合部、コード配列、翻訳終止コドン領域、または5'もしくは3'非翻訳領域内の配列と特異的にハイブリダイズし得る。実施形態では、ACは、pre-mRNA スプライス部位、エクソン-エクソン接合部またはイントロン-エクソン接合部の一部または全てとハイブリダイズし得る。実施形態では、ACは、再編成または欠失に起因する異常な融合接合部とハイブリダイズし得る。実施形態では、ACは、選択的にスプライスされるmRNAの中の特定のエクソンとハイブリダイズし得る。

30

【0270】

実施形態では、ACは、ACの長さとしても言及され得るものである5～50ヌクレオチドの長さの配列とハイブリダイズする。実施形態では、ACは、5～50ヌクレオチドの長さ、例えば、5～10、10～15、15～20、20～25、25～30、30～35、35～40、40～45、または45～50ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは、少なくとも約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20、及び最長約21、約22、約23、約24または約25、及び最長約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39または約40、及び最長約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49または約50ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約10ヌクレオチ

40

50

ドの長さである。実施形態では、ACは約15ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約16ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約17ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約18ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約19ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約20ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約21ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約22ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約23ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約24ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約25ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約26ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約27ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約28ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約29ヌクレオチドの長さである。実施形態では、ACは約30ヌクレオチドの長さである。

10

【0271】

実施形態では、ACは、標的核酸配列に対して100パーセント未満の相補性を有し得る。本明細書で使用される場合、「相補性パーセント」という用語は、オリゴマー化合物または核酸の対応する核酸塩基との核酸塩基相補性を有するACの核酸塩基の数を、ACの全長（核酸塩基の数）で割ったものを指す。当業者は、ミスマッチの包含が、アンチセンス化合物の活性を排除することなく可能であることを理解している。実施形態では、ACは、標的核酸に対するACの塩基対合を阻害する最大約20%のヌクレオチドを含有し得る。実施形態では、ACは、約15%以下、約10%以下、5%以下のミスマッチを含有する、またはミスマッチを含有しない。実施形態では、ACは、1、2、3、4または5個のミスマッチを含有する。実施形態では、ACは、標的核酸に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の相補性を有する。オリゴヌクレオチドの相補性パーセントは、相補的核酸塩基の数をオリゴヌクレオチドの核酸塩基の総数で割ることによって計算される。オリゴヌクレオチドの領域の相補性パーセントは、領域中の相補的核酸塩基の数を核酸塩基領域の総数で割ることによって計算される。

20

【0272】

実施形態では、ヌクレオチド親和性修飾の組み込みは、非修飾化合物と比較して、より多数のミスマッチを可能にする。同様に、特定のオリゴヌクレオチド配列は、他のオリゴヌクレオチド配列よりもミスマッチに対してより寛容であり得る。当業者は、オリゴヌクレオチド間、またはオリゴヌクレオチドと標的核酸との間のミスマッチの適切な数を、例えば、融解温度（ T_m ）を決定することによって決定することができる。 T_m または ΔT_m は、当業者によく知られている技術によって計算することができる。例えば、Freierら（Nucleic Acids Research, 1997, 25, 22: 4429-4443）に記載される技術は、当業者が、RNA:DNA二本鎖の融解温度を上昇させるそれらの能力についてヌクレオチド修飾を評価することを可能にする。

30

【0273】

アンチセンス機構

本開示によるACは、タンパク質の転写、翻訳及び発現の1つ以上の局面を調節し得る。実施形態では、標的pre-mRNA中の標的配列にハイブリダイズしているACは、pre-mRNAスプライシングの1つ以上の局面を調節する。本明細書で使用される場合、スプライシングの調節は、スプライスされたmRNA分子が、エクソンスキッピングもしくはエクソン組み込みの結果としてのエクソンの異なる組み合わせか、1つ以上のエクソンの欠失か、または正常ではスプライスされたmRNAの中に認められない配列（例えば、イントロン配列）の欠失もしくは付加のいずれかを含有するように、pre-mRNA転写物のプロセッシングを変化させることを指す。実施形態では、pre-mRNA分子中の標的配列に対するACのハイブリダイゼーションは、変異したpre-mRNA配列に対する天然のスプライシングを回復させる。実施形態では、ACのハイブリダイゼーションは、標的pre-mRNAの選択的スプライシングをもたらす。実施形態では、A

40

50

Cのハイブリダイゼーションは、1つ以上のエクソンのエクソン組み込みまたはエクソンスキッピングをもたらす。実施形態では、スキッピングされるエクソン配列は、フレームシフト変異、ナンセンス変異またはミスセンス変異を含む。実施形態では、スキッピングされるエクソン配列は、核酸欠失、置換または挿入を含む。実施形態では、スキッピングされるエクソン自体は配列変異を含まないが、隣接するエクソンは、フレームシフト変異またはナンセンス変異を招く変異を含む。実施形態では、配列変異を含まないエクソンの欠失は、成熟mRNAのリーディングフレームを回復させる。実施形態では、標的pre-mRNA中の標的配列に対するACのハイブリダイゼーションは、野生型標的タンパク質異性体の優先的発現をもたらす。実施形態では、標的pre-mRNA中の標的配列に対するACのハイブリダイゼーションは、野生型標的タンパク質の活性断片を含む再スプライシングされた標的タンパク質の発現をもたらす。

10

【0274】

アンチセンス機構は、標的核酸とのアンチセンス化合物のハイブリダイゼーションを介して機能する。実施形態では、標的配列にハイブリダイズしているACは、標的タンパク質の発現を抑制する。実施形態では、標的配列にハイブリダイズしているACは、1つ以上の野生型標的タンパク質異性体の発現を抑制する。実施形態では、標的配列にハイブリダイズしているACは、標的タンパク質の発現を上方制御する。実施形態では、標的配列にハイブリダイズしているACは、1つ以上の野生型標的タンパク質異性体の発現を増加させる。

【0275】

本開示のACの有効性は、それらの投与によってもたらされるアンチセンス活性を評価することによって評価することができる。本明細書で使用される場合、「アンチセンス活性」という用語は、アンチセンス化合物のその標的核酸へのハイブリダイゼーションに起因する任意の検出可能及び／または測定可能な活性を指す。そのような検出及び／または測定は、直接的または間接的であってもよい。実施形態では、アンチセンス活性は、標的タンパク質の量を検出及び／または測定することによって評価される。実施形態では、アンチセンス活性は、再スプライシングされた標的タンパク質の量を検出及び／または測定することによって評価される。実施形態では、アンチセンス活性は、標的核酸及び／または切断された標的核酸及び／または選択的にスプライスされた標的核酸の量を検出及び／または測定することによって評価される。

20

30

【0276】

アンチセンス化合物の設計

本開示によるACの設計は、標的とされる配列に依存する。ACを特定の標的核酸分子に標的化することは、多段階プロセスであり得る。このプロセスは、通常、その発現が調節される標的核酸の同定から始まる。本明細書で使用される場合、「標的核酸」及び「標的遺伝子をコードする核酸」という用語は、選択された標的遺伝子をコードするDNA、このようなDNAから転写されるRNA（pre-mRNA及びmRNAなど）、及びこのようなRNAに由来するcDNAもまた包含する。例えば、標的核酸は、その発現が特定の障害もしくは疾患状態と関連している細胞性遺伝子（または遺伝子から転写されるmRNA）、または感染性物質からの核酸分子であり得る。

40

【0277】

当業者は、アンチセンス活性をもたらす配列を同定するために、異なる核酸塩基配列のアンチセンス化合物を設計し、合成し、スクリーニングすることができるであろう。例えば、標的pre-mRNAのスプライシングを変化させるかまたは標的タンパク質の発現を阻害するアンチセンス化合物を設計することができる。予め選択された標的核酸に対するアンチセンス活性についてアンチセンス化合物を設計、合成及びスクリーニングする方法は、例えば、Stanley T. Crooke、CRC Press、Boca Raton、Floridaによって編集された「Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications」に見出すことができ、これは任意の目的のためにその全体が参照により組

50

み込まれる。

【0278】

実施形態では、アンチセンス化合物は、修飾ヌクレオシド、修飾ヌクレオシド間結合及び／またはコンジュゲート基を含む。

【0279】

実施形態では、アンチセンス化合物は、「トリシクロ-DNA (tc-DNA)」であり、これは、各ヌクレオチドがシクロプロパン環の導入によって修飾されて骨格の立体配座の柔軟性を制限し、ねじれ角 γ の骨格形状を最適化する、拘束されたDNA類似体のクラスを指す。ホモ塩基性アデニン及びチミン含有tc-DNAは、相補的RNAに対して非常に安定なA-T塩基対を形成する。

【0280】

ヌクレオシド

実施形態では、連結ヌクレオシドを含むアンチセンス化合物が提供される。実施形態では、ヌクレオシドの一部または全部が修飾ヌクレオシドである。実施形態では、1つ以上のヌクレオシドは、修飾核酸塩基を含む。実施形態では、1つ以上のヌクレオシドは、修飾糖を含む。化学的に修飾されたヌクレオシドは、ヌクレアーゼ耐性、薬物動態または標的RNAに対する親和性などの1つ以上の特性を増強するために、アンチセンス化合物への組み込みに日常的に使用される。

【0281】

一般に、核酸塩基は、別の核酸の塩基に水素結合することができる1つ以上の原子または原子群を含有する任意の基である。プリン核酸塩基アデニン(A)及びグアニン(G)、並びにピリミジン核酸塩基チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)などの「非修飾」または「天然」核酸塩基に加えて、当業者に公知の多くの修飾核酸塩基または核酸塩基模倣物が、本明細書に記載の化合物に適している。修飾核酸塩基及び核酸塩基模倣物という用語は重複し得るが、一般に、修飾核酸塩基は、例えば、7-デアザプリン、5-メチルシトシン、またはG-クランプなどの親核酸塩基に構造が類似している核酸塩基を指すのに対して、核酸塩基模倣物は、例えば、三環式フェノキサジン核酸塩基模倣物などのより複雑な構造を含む。上記修飾核酸塩基の調製方法は、当業者に周知である。

【0282】

実施形態では、本明細書に提供されるACは、修飾された糖部分を有する1つ以上のヌクレオシドを含む。実施形態では、天然ヌクレオシドのフラノシル糖環は、限定するものではないが、置換基の付加、二環式核酸(BNA)を形成するための2個の非ジェミナル環原子の架橋、及び4'位の環酸素の-S-、-N(R)-またはC(R₁)(R₂)などの原子または基の置換などの、いくつかの方法で修飾することができる。修飾糖部分は、周知であり、アンチセンス化合物のその標的に対する親和性を変化させ(典型的には増加させ)、かつ／またはヌクレアーゼ耐性を増加させるために使用することができる。修飾糖の代表的なリストには、非二環式置換糖、特に2'-F、2'-OC₃H₇または2'-O(CH₂)₂-OC₃H₇置換基を有する非二環式2'-置換糖、及び4'-チオ修飾糖が含まれるが、これらに限定されない。糖はまた、とりわけ糖模倣基で置換され得、例えば、フラノース環がモルホリン環で置換され得る。修飾糖の調製方法は、当業者に周知である。このような修飾糖の調製を教示するいくつかの代表的な特許及び刊行物としては、米国特許第4,981,957号、同第5,118,800号、同第5,319,080号、同第5,359,044号、同第5,393,878号、同第5,446,137号、同第5,466,786号、同第5,514,785号、同第5,519,134号、同第5,567,811号、同第5,576,427号、同第5,591,722号、同第5,597,909号、同第5,610,300号、同第5,627,053号、同第5,639,873号、同第5,646,265号、同第5,658,873号、同第5,670,633号、同第5,792,747号、同第5,700,920号、及び同第6,600,032号、並びに国際公開第2005/121371号、が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0283】

実施形態では、ヌクレオシドは、二環式修飾糖（BNA）、例えば、LNA（4'-（CH₂）-O-2'架橋）、2'-チオ-LNA（4'-（CH₂-S-2'架橋）、2'-アミノ-LNA（4'-（CH₂）-NR-2'架橋）、ENA（4'-（CH₂）₂-O-2'架橋）、4'-（CH₂）₃-2'架橋BNA、4'-（CH₂CH（CH₃））-2'架橋BNA、cEt（4'-（CH（CH₂）-O-2'架橋）、及びcMOE BNA（4'-（CH（CH₂OCH₃）-O-2'架橋）を含む。特定のこのようなBNAが調製されており、特許文献並びに科学文献に開示されている（例えば、Srivastava, et al. J. Am. Chem. Soc. 2007, ACS Advanced online publication, 10.1021/ja071106y, Albæk et al. J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740, Fluiter, et al. Chembiochem 2005, 6, 1104-1109, Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456, Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630, Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638, Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222、国際公開第94/14226号、国際公開第2005/021570号、Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039、国際公開第2007/090071号を参照されたい）。BNAを開示する発行済み米国特許及び公開出願の例としては、例えば、米国特許第7,053,207号、同第6,268,490号、同第6,770,748号、同第6,794,499号、同第7,034,133号、及び同第6,525,191号、並びに米国公開特許公報第2004-0171570号、同第2004-0219565号、同第2004-0014959号、同第2003~0207841号、同第2004-0143114号、及び同第20030082807号、が挙げられる。

【0284】

リボシル糖環の2'-ヒドロキシル基が糖環の4'炭素原子に連結され、それによって2'-C, 4'-C-オキシメチレン連結を形成して二環式糖部分を形成する「ロックド核酸」（LNA）も本明細書において提供される（Eayadi et al. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561, Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7、及びOrum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243に概説されており、米国特許第6,268,490号及び同第6,670,461号も参照されたい）。結合は、2'酸素原子と4'炭素原子とを架橋するメチレン（-CH₂-）基であり得、二環式部分に対してLNAという用語が使用され、この位置のエチレン基の場合、ENA（商標）という用語が使用される（Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456、ENA（商標）：Morita et al., Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2211-2226）。LNA及び他の二環式糖類似体は、相補的DNA及びRNAに対する非常に高い二本鎖熱安定性（T_m=+3から+10℃）、3'-エキソヌクラーゼ分解に対する安定性、及び良好な溶解特性を示す。LNAを含有する強力な非毒性のアンチセンスオリゴヌクレオチドが記載されている（Wahlestedt et al. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638）。

【0285】

同様に研究されているLNAの異性体は、3'-エキソヌクラーゼに対して改善された安定性を有することがわかっているアルファ-L-LNAである。アルファ-L-LNAは、強力なアンチセンス活性を示すアンチセンスギャップマー及びキメラに組み込まれた（Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372）。

10

20

30

40

50

【0286】

LNAモノマーアデニン、シトシン、グアニン、5-メチルシトシン、チミン及びウラシルの合成及び調製、並びにそれらのオリゴマー化、及び核酸認識特性が記載されている (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630)。LNA及びその調製は、国際公開第98/39352号及び国際公開第99/14226号にも記載されている。

【0287】

LNAの類似体、ホスホロチオエート-LNA及び2'-チオ-LNAも調製されている (Kumar et al. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222)。核酸ポリメラーゼの基質としてオリゴデオキシリボヌクレオチド二本鎖を含有するロックドヌクレオシド類似体の調製も記載されている (Wengelら、国際公開第99/14226号)。新規な立体構造的に制限された高親和性オリゴヌクレオチド類似体である2'-アミノ-LNAの合成は、当該技術分野において記載されている (Singh et al. Chem., 1998, 63, 10035-10039)。更に、2'-アミノ及び2'-メチルアミノ-LNAが調製されており、相補的なRNA鎖及びDNA鎖とのそれらの二重鎖の熱的安定性が以前に報告されている。

【0288】

ヌクレオシド間結合

ヌクレオシドまたはそうでなければ修飾モノマー単位と一緒に連結し、それによってアンチセンス化合物を形成するヌクレオシド間連結基が本明細書に記載される。ヌクレオシド間連結基の2つの主要なクラスは、リン原子の有無によって定義される。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合としては、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデート (ホスホロジアミデートを含む)、及びホスホロチオエートが挙げられるが、これらに限定されない。代表的な非リン含有ヌクレオシド間結合基としては、メチレンメチルイミノ ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$)、チオジエステル ($-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{S}-$)、チオノカルバメート ($-\text{O}-\text{C}(\text{O})(\text{NH})-\text{S}-$)、シロキサン ($-\text{O}-\text{Si}(\text{H})_2-\text{O}-$)、及びN, N'-ジメチルヒドラジン ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-$) が挙げられるが、これらに限定されない。非リンヌクレオシド間結合基を有するアンチセンス化合物は、オリゴヌクレオシドと呼ばれる。修飾ヌクレオシド間結合を用いて、天然のホスホジエステル結合と比較して、アンチセンス化合物のヌクレアーゼ耐性を変化させる (典型的には増加させる) ことができる。キラル原子を有するヌクレオシド間結合は、ラセミ、キラル、または混合物として調製することができる。代表的なキラルヌクレオシド間結合としては、アルキルホスホネート及びホスホロチオエートが挙げられるが、これらに限定されない。リン含有及び非リン含有結合の調製方法は、当業者に周知である。

【0289】

実施形態では、リン酸基は、糖の2'、3'または5'ヒドロキシル部分に連結され得る。オリゴヌクレオチドの形成において、リン酸基は、隣接するヌクレオシドを互いに共有結合して、直鎖状ポリマー化合物を形成する。オリゴヌクレオチド内で、リン酸基は、一般に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間骨格を形成するとみなされている。RNA及びDNAの通常の結合または骨格は、3'-5'ホスホジエステル結合である。

【0290】

コンジュゲート基

実施形態では、ACは、1つ以上のコンジュゲート基の共有結合によって修飾される。一般に、コンジュゲート基は、限定するものではないが、薬力学、薬物動態学、結合、吸収、細胞分布、細胞取り込み、電荷及びクリアランスなどの、結合しているACの1つ以上の特性を改変する。コンジュゲート基は化学分野で日常的に使用されており、直接または任意選択の連結部分もしくは連結基を介して親化合物、例えばACに連結される。コンジュゲート基としては、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、チオエーテル、ポリエーテル、コレステロール、チオコレス

テロール、コール酸部分、葉酸、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、フェナントリジン、アントラキノン、アダマンタン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン及び色素が挙げられるが、これらに限定されない。実施形態では、コンジュゲート基はポリエチレングリコール（PEG）であり、PEGは、ACまたは環状ペプチドのいずれかにコンジュゲートされる。

【0291】

コンジュゲート基は、脂質部分、例えば、コレステロール部分（Letsinger et al. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553）、コール酸（Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053）、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール（Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306、Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765）、チオコレステロール（Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533）、脂肪酸鎖、例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基（Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 111、Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327、Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49）、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム-1, 2-ジ-オ-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651、Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777）、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖（Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969）、アダマンタン酢酸（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651）、パルミチル部分（Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分（Crookeら、J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923）を含む。

【0292】

連結基または二官能性連結部分、例えば、当技術分野で公知のものを、本明細書で提供される化合物と共に含むことができる。結合基は、化学官能基、コンジュゲート基、レポーター基及び他の基を、例えば、ACなどの親化合物中の選択的部位に結合させるのに有用である。実施形態では、二官能性連結部分は、2個の官能基を有するヒドロカルビル部分を含む。実施形態では、官能基の一方は、目的の親分子または化合物に結合するように選択され、他方は、化学官能基またはコンジュゲート基などの本質的に任意の選択された基に結合するように選択される。本明細書に記載されるリンカーのいずれかが使用され得る。実施形態では、リンカーは、エチレングリコールまたはアミノ酸単位などの反復単位の鎖構造またはオリゴマーを含む。二官能性連結部分において使用される官能基の例としては、求核基と反応するための求電子剤及び求電子基と反応するための求核剤が挙げられるが、これらに限定されない。実施形態では、二官能性連結部分は、アミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、不飽和（例えば、二重または三重結合）などを含む。二官能性連結部分のいくつかの非限定的な例としては、8-アミノ-3, 6-ジオキサオクタン酸（ADO）、スクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）及び6-アミノヘキサン酸（AHEXまたはAHA）が挙げられる。他の連結基としては、限定するものではないが、置換C₁~C₁₀アルキル、置換もしくは非置換C₂~C₁₀アルケニルまたは置換もしくは非置換C₂~C₁₀アルキニルが挙げられ、置換基の非限定的なリストとしては、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルが挙げられる。

【0293】

実施形態では、ACをアルギニン-セリンジペプチドの10反復に連結してもよい。スプライシングエンハンサー因子の人為的動員のためにアルギニン-セリンジペプチドの10反復に連結されたACをインビトロで応用して、スキッピングされるはずであったBRCA1及びSMN2エクソンの組み込みを誘発したことがある。参照により本明細書に援用されるCartegni and Krainer 2003を参照されたい。

【0294】

実施形態では、ACは、5～50（例えば、中に含まれるあらゆる値及び範囲を含めて、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50）ヌクレオチドの長さであり得る。実施形態では、ACは、5～10ヌクレオチドの長さであり得る。実施形態では、ACは、10～15ヌクレオチドの長さであり得る。実施形態では、ACは、15～20ヌクレオチドの長さであり得る。実施形態では、ACは、20～25ヌクレオチドの長さであり得る。実施形態では、ACは、25～30ヌクレオチドの長さであり得る。実施形態では、ACは、30～35ヌクレオチドの長さであり得る。実施形態では、ACは、35～40ヌクレオチドの長さであり得る。実施形態では、ACは、40～45ヌクレオチドの長さであり得る。実施形態では、ACは、45～50ヌクレオチドの長さであり得る。

【0295】

実施形態では、ACは、ジストロフィンをコードするものであるヒトDMD遺伝子に結合する。実施形態では、ACは、DMDのエクソン44の少なくとも一部に結合する。実施形態では、ACは、DMDのエクソン44の3'隣接部の少なくとも一部に結合する。実施形態では、ACは、DMDのエクソン44の5'隣接イントロンの少なくとも一部に結合する。実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、約18～約30核酸の長さ、例えば、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29または約30核酸の長さである。

【0296】

実施形態では、DMDのエクソン44の核酸配列は、5'から3'に向かって、GCGATT T T G A C A G A T C T G T T G A G A A A T G G C G G C G T T T T C A T T A T G A T A T A A A G A T A T T T A A T C A G T G G C T A A C A G A A G C T G A A C A G T T T C T C A G A A A G A C A C A A A T T C C T G A G A A T T G G G A A C A T G C T A A A T A C A A A T G G T A T C T T A A G（配列番号1）である。

【0297】

実施形態では、DMDのエクソン44の核酸配列は、5'から3'に向かって、GGCGATT T T G A C A G A T C T G T T G A G A A A T G G C G G C G T T T T C A T T A T G A T A T A A A G A T A T T T A A T C A G T G G C T A A C A G A A G C T G A A C A G T T T C T C A G A A A G A C A C A A A T T C C T G A G A A T T G G G A A C A T G C T A A A T A C A A A T G G T A T C T T A A G（配列番号2）である。実施形態では、エクソン44の配列は、配列番号1の5'末端に、1、2、3、4もしくは5個の、またはそれより多いヌクレオチドを含む。実施形態では、エクソン44の配列は、配列番号2の5'末端に、1、2、3、4もしくは5個の、またはそれより多いヌクレオチドを含む。実施形態では、エクソン44の配列は、配列番号1の3'末端に、1、2、3、4もしくは5個の、またはそれより多いヌクレオチドを含む。実施形態では、エクソン44の配列は、配列番号2の3'末端に、1、2、3、4もしくは5個の、またはそれより多いヌクレオチドを含む。

【0298】

実施形態では、ACは、配列番号1の18個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは18merであり）、18merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18

、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130または131から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の18個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは18merであり）、18merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131または132から始まる。

10

20

30

40

50

【0299】

実施形態では、ACは、配列番号1の19個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは19merであり）、19merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129または130から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の19個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは19merであり）、19merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130または131から始まる。

【0300】

実施形態では、ACは、配列番号1の20個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは20merであり）、20merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128または129から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の20個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは20merであり）、20merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129または130から始まる。

10

20

30

40

50

【0301】

実施形態では、ACは、配列番号1の21個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは21merであり）、21merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127または128から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の21個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは21merであり）、21merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127

7、128または129から始まる。

【0302】

実施形態では、ACは、配列番号1の22個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは22merであり）、22merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126または127から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の22個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは22merであり）、22merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127または128から始まる。

10

20

30

40

50

【0303】

実施形態では、ACは、配列番号1の23個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは23merであり）、23merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125または126から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の23個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは23merであり）、23merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125または126から始まる。

9、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126または127から始まる。

【0304】

実施形態では、ACは、配列番号1の24個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは24merであり）、24merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124または125から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の24個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは24merであり）、24merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125または126から始まる。

10

20

【0305】

実施形態では、ACは、配列番号1の25個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは25merであり）、25merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123または124から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の25個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは25merであり）、25merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125または126から始まる。

30

40

50

1、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124または125から始まる。

【0306】

実施形態では、ACは、配列番号1の26個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは26merであり）、26merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122または123から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の26個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは26merであり）、26merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123または124から始まる。

10

20

【0307】

実施形態では、ACは、配列番号1の27個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは27merであり）、27merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121または122から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の27個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは27merであり）、27merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122または123から始まる。

30

40

50

3、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122または123から始まる。

【0308】

実施形態では、ACは、配列番号1の28個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは28merであり）、28merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120または121から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の28個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは28merであり）、28merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121または122から始まる。

10

20

【0309】

実施形態では、ACは、配列番号1の29個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは29merであり）、29merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119または120から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の29個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは29merであり）、29merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121または122から始まる。

30

40

50

5、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120または121から始まる。

【0310】

実施形態では、ACは、配列番号1の30個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは30merであり）、30merの最初のヌクレオチドは、配列番号1の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118または119から始まる。実施形態では、ACは、配列番号2の30個の連続ヌクレオチドを含み（例えば、ACは30merであり）、30merの最初のヌクレオチドは、配列番号2の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119または120から始まる。

10

20

30

40

50

【0311】

実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、表6A～6Mに示される核酸配列、その逆相補体、またはそれとの少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の核酸配列同一性を有する配列のうちのいずれか1つから選択される。

【0312】

実施形態では、ACは、表6A～6Mに示される核酸配列のうちのいずれか1つから選択されるDMDのエクソン44の配列に結合する。実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、表6A～6Mの中の核酸配列、その逆相補体、またはそれとの少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の核酸配列同一性を有する配列のうちのいずれか1つから選択される。実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、1つ以上の修飾核酸、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合、またはその組み合わせを含む。実施形態では、エクソン44に結合するACは、1つ以上のモルホリン環、1つ以上のホスホロジアミデート結合、またはその組み合わせを含む。実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、表6A～6Mの中の核酸配列、その逆相補体、またはそれとの少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の核酸配列同一性を有する配列のうちのいずれか1つから選択される配列を有するアンチセンスホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）である。

【0313】

実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、5'-TGAAAAACGCC

G C C A T T T C T C A A C A G - 3 ' である。実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、5' - A C T G T T C A G C T T C T G T T A G C C A C T G - 3 ' である。実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、1つ以上の修飾核酸、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合、またはその組み合わせを含む。実施形態では、エクソン44に結合するACは、1つ以上のモルホリン環、1つ以上のホスホロジアミデート結合、またはその組み合わせを含む。実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、5' - T G A A A A C G C C G C C A T T T C T C A A C A G - 3 ' である配列を有するアンチセンスホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー (PMO) である。実施形態では、DMDのエクソン44に結合するACは、5' - A C T G T T C A G C T T C T G T T A G C C A C T G - 3 ' である配列を有するアンチセンスホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー (PMO) である。

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 6 A. DMD のエクソン 4 4 に結合する 1 8 m e r の A C

核酸配列 (5' - 3')
GGCGATTTGACAGATCTG
GCGATTTGACAGATCTGT
CGATTTGACAGATCTGTT
GATTTGACAGATCTGTTG
ATTTGACAGATCTGTTGA
TTTGACAGATCTGTTGAG
TTGACAGATCTGTTGAGA
TGACAGATCTGTTGAGAA
GACAGATCTGTTGAGAAA
ACAGATCTGTTGAGAAAT
CAGATCTGTTGAGAAATG
AGATCTGTTGAGAAATGG
GATCTGTTGAGAAATGGC
ATCTGTTGAGAAATGGCG
TCTGTTGAGAAATGGCGG
CTGTTGAGAAATGGCGGC
TGTTGAGAAATGGCGGCG
GTTGAGAAATGGCGGCGT
TTGAGAAATGGCGGCGTT
TGAGAAATGGCGGCGTTT
GAGAAATGGCGGCGTTTT
AGAAATGGCGGCGTTTTC
GAAATGGCGGCGTTTTCA
AAATGGCGGCGTTTTCAT
AATGGCGGCGTTTTCATT
ATGGCGGCGTTTTCATT A
TGGCGGCGTTTTCATTAT
GGCGGCGTTTTCATTATG
GCGGCGTTTTCATTATGA
CGGCGTTTTCATTATGAT
GGCGTTTTCATTATGATA
GCGTTTTCATTATGATAT
CGTTTTCATTATGATATA
GTTTTCATTATGATATAA
TTTTCATTATGATATAAA

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTTCATTATGATATAAAG	
TTCATTATGATATAAAGA	
TCATTATGATATAAAGAT	
CATTATGATATAAAGATA	
ATTATGATATAAAGATAT	
TTATGATATAAAGATATT	
TATGATATAAAGATATTT	10
ATGATATAAAGATATTTA	
TGATATAAAGATATTTAA	
GATATAAAGATATTTAAT	
ATATAAAGATATTTAATC	
TATAAAGATATTTAATCA	
ATAAAGATATTTAATCAG	
TAAAGATATTTAATCAGT	
AAAGATATTTAATCAGTG	
AAGATATTTAATCAGTGG	
AGATATTTAATCAGTGGC	20
GATATTTAATCAGTGGCT	
ATATTTAATCAGTGGCTA	
TATTTAATCAGTGGCTAA	
ATTTAATCAGTGGCTAAC	
TTTAATCAGTGGCTAACA	
TTAATCAGTGGCTAACAG	
TAATCAGTGGCTAACAGA	
AATCAGTGGCTAACAGAA	
ATCAGTGGCTAACAGAAG	
TCAGTGGCTAACAGAAGC	30
CAGTGGCTAACAGAAGCT	
AGTGGCTAACAGAAGCTG	
GTGGCTAACAGAAGCTGA	
TGGCTAACAGAAGCTGAA	
GGCTAACAGAAGCTGAAC	
GCTAACAGAAGCTGAACA	
CTAACAGAAGCTGAACAG	
TAACAGAAGCTGAACAGT	
AACAGAAGCTGAACAGTT	
ACAGAAGCTGAACAGTTT	40

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
CAGAAGCTGAACAGTTTC	
AGAAGCTGAACAGTTTCT	
GAAGCTGAACAGTTTCTC	
AAGCTGAACAGTTTCTCA	
AGCTGAACAGTTTCTCAG	
GCTGAACAGTTTCTCAGA	
CTGAACAGTTTCTCAGAA	10
TGAACAGTTTCTCAGAAA	
GAACAGTTTCTCAGAAAG	
AACAGTTTCTCAGAAAGA	
ACAGTTTCTCAGAAAGAC	
CAGTTTCTCAGAAAGACA	
AGTTTCTCAGAAAGACAC	
GTTTCTCAGAAAGACACA	
TTTCTCAGAAAGACACAA	
TTCTCAGAAAGACACAAA	
TCTCAGAAAGACACAAAT	20
CTCAGAAAGACACAAATT	
TCAGAAAGACACAAATTC	
CAGAAAGACACAAATTCC	
AGAAAGACACAAATTCCT	
GAAAGACACAAATTCCTG	
AAAGACACAAATTCCTGA	
AAGACACAAATTCCTGAG	
AGACACAAATTCCTGAGA	
GACACAAATTCCTGAGAA	
ACACAAATTCCTGAGAAT	30
CACAAATTCCTGAGAATT	
ACAAATTCCTGAGAATTG	
CAAATTCCTGAGAATTGG	
AAATTCCTGAGAATTGGG	
AATTCCTGAGAATTGGGA	
ATTCCTGAGAATTGGGAA	
TTCCTGAGAATTGGGAAC	
TCCTGAGAATTGGGAACA	
CCTGAGAATTGGGAACAT	
CTGAGAATTGGGAACATG	40

50

【表 1 1 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
TGAGAATTGGGAACATGC	
GAGAATTGGGAACATGCT	
AGAATTGGGAACATGCTA	
GAATTGGGAACATGCTAA	
AATTGGGAACATGCTAAA	
ATTGGGAACATGCTAAAT	10
TTGGGAACATGCTAAATA	
TGGGAACATGCTAAATAC	
GGGAACATGCTAAATACA	
GGAACATGCTAAATACAA	
GAACATGCTAAATACAAA	
AACATGCTAAATACAAAT	
ACATGCTAAATACAAATG	
CATGCTAAATACAAATGG	20
ATGCTAAATACAAATGGT	
TGCTAAATACAAATGGTA	
GCTAAATACAAATGGTAT	
CTAAATACAAATGGTATC	
TAAATACAAATGGTATCT	
AAATACAAATGGTATCTT	
AATACAAATGGTATCTTA	
ATACAAATGGTATCTTAA	
TACAAATGGTATCTTAAG	30

【表 1 2 - 1】

表 6 B. DMD のエクソン 4 4 に結合する 1 9 m e r の A C

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGT	
GCGATTTGACAGATCTGTT	
CGATTTGACAGATCTGTTG	
GATTTGACAGATCTGTTGA	
ATTTGACAGATCTGTTGAG	
TTTGACAGATCTGTTGAGA	10
TTGACAGATCTGTTGAGAA	
TGACAGATCTGTTGAGAAA	
GACAGATCTGTTGAGAAAT	
ACAGATCTGTTGAGAAATG	
CAGATCTGTTGAGAAATGG	
AGATCTGTTGAGAAATGGC	
GATCTGTTGAGAAATGGCG	
ATCTGTTGAGAAATGGCGG	
TCTGTTGAGAAATGGCGGC	
CTGTTGAGAAATGGCGGCG	20
TGTTGAGAAATGGCGGCGT	
GTTGAGAAATGGCGGCGT	
TTGAGAAATGGCGGCGTTT	
TGAGAAATGGCGGCGTTTT	
GAGAAATGGCGGCGTTTTC	
AGAAATGGCGGCGTTTTCA	
GAAATGGCGGCGTTTTCAT	
AAATGGCGGCGTTTTCATT	
AATGGCGGCGTTTTCATTA	
ATGGCGGCGTTTTCATTAT	30
TGGCGGCGTTTTCATTATG	
GGCGGCGTTTTCATTATGA	
GCGGCGTTTTCATTATGAT	
CGGCGTTTTCATTATGATA	
GGCGTTTTCATTATGATAT	
GCGTTTTCATTATGATATA	
CGTTTTCATTATGATATAA	
GTTTTCATTATGATATAAA	
TTTTCATTATGATATAAAG	40

【表 1 2 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTTCATTATGATATAAAGA	
TTCATTATGATATAAAGAT	
TCATTATGATATAAAGATA	
CATTATGATATAAAGATAT	
ATTATGATATAAAGATATT	
TTATGATATAAAGATATTT	
TATGATATAAAGATATTTA	10
ATGATATAAAGATATTTAA	
TGATATAAAGATATTTAAT	
GATATAAAGATATTTAATC	
ATATAAAGATATTTAATCA	
TATAAAGATATTTAATCAG	
ATAAAGATATTTAATCAGT	
TAAAGATATTTAATCAGTG	
AAAGATATTTAATCAGTGG	
AAGATATTTAATCAGTGGC	20
AGATATTTAATCAGTGGCT	
GATATTTAATCAGTGGCTA	
ATATTTAATCAGTGGCTAA	
TATTTAATCAGTGGCTAAC	
ATTTAATCAGTGGCTAACA	
TTTAATCAGTGGCTAACAG	
TTAATCAGTGGCTAACAGA	
TAATCAGTGGCTAACAGAA	
AATCAGTGGCTAACAGAAG	
ATCAGTGGCTAACAGAAGC	30
TCAGTGGCTAACAGAAGCT	
CAGTGGCTAACAGAAGCTG	
AGTGGCTAACAGAAGCTGA	
GTGGCTAACAGAAGCTGAA	
TGGCTAACAGAAGCTGAAC	
GGCTAACAGAAGCTGAACA	
GCTAACAGAAGCTGAACAG	
CTAACAGAAGCTGAACAGT	
TAACAGAAGCTGAACAGTT	40

【表 1 2 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
AACAGAAGCTGAACAGTTT	
ACAGAAGCTGAACAGTTTC	
CAGAAGCTGAACAGTTTCT	
AGAAGCTGAACAGTTTCTC	
GAAGCTGAACAGTTTCTCA	
AAGCTGAACAGTTTCTCAG	
AGCTGAACAGTTTCTCAGA	10
GCTGAACAGTTTCTCAGAA	
CTGAACAGTTTCTCAGAAA	
TGAACAGTTTCTCAGAAAG	
GAACAGTTTCTCAGAAAGA	
AACAGTTTCTCAGAAAGAC	
ACAGTTTCTCAGAAAGACA	
CAGTTTCTCAGAAAGACAC	
AGTTTCTCAGAAAGACACA	
GTTTCTCAGAAAGACACAA	20
TTTCTCAGAAAGACACAAA	
TTCTCAGAAAGACACAAAT	
TCTCAGAAAGACACAAATT	
CTCAGAAAGACACAAATTC	
TCAGAAAGACACAAATTCC	
CAGAAAGACACAAATTCCT	
AGAAAGACACAAATTCCTG	
GAAAGACACAAATTCCTGA	
AAAGACACAAATTCCTGAG	30
AAGACACAAATTCCTGAGA	
AGACACAAATTCCTGAGAA	
GACACAAATTCCTGAGAAT	
ACACAAATTCCTGAGAATT	
CACAAATTCCTGAGAATTG	
ACAAATTCCTGAGAATTGG	
CAAATTCCTGAGAATTGGG	
AAATTCCTGAGAATTGGGA	
AATTCCTGAGAATTGGGAA	40

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
ATTCCTGAGAATTGGGAAC	
TTCCTGAGAATTGGGAACA	
TCCTGAGAATTGGGAACAT	
CCTGAGAATTGGGAACATG	
CTGAGAATTGGGAACATGC	
TGAGAATTGGGAACATGCT	10
GAGAATTGGGAACATGCTA	
AGAATTGGGAACATGCTAA	
GAATTGGGAACATGCTAAA	
AATTGGGAACATGCTAAAT	
ATTGGGAACATGCTAAATA	
TTGGGAACATGCTAAATAC	
TGGGAACATGCTAAATACA	
GGGAACATGCTAAATACAA	
GGAACATGCTAAATACAAA	20
GAACATGCTAAATACAAAT	
AACATGCTAAATACAAATG	
ACATGCTAAATACAAATGG	
CATGCTAAATACAAATGGT	
ATGCTAAATACAAATGGTA	
TGCTAAATACAAATGGTAT	
GCTAAATACAAATGGTATC	
CTAAATACAAATGGTATCT	
TAAATACAAATGGTATCTT	30
AAATACAAATGGTATCTTA	
AATACAAATGGTATCTTAA	
ATACAAATGGTATCTTAAG	

40

50

【表 13 - 1】

表 6 C. DMD のエクソン 44 に結合する 20mer の AC

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTT	
GCGATTTGACAGATCTGTTG	
CGATTTGACAGATCTGTTGA	
GATTTGACAGATCTGTTGAG	
ATTTGACAGATCTGTTGAGA	
TTTGACAGATCTGTTGAGAA	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAA	
TGACAGATCTGTTGAGAAAT	
GACAGATCTGTTGAGAAATG	
ACAGATCTGTTGAGAAATGG	
CAGATCTGTTGAGAAATGGC	
AGATCTGTTGAGAAATGGCG	
GATCTGTTGAGAAATGGCGG	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCG	20
CTGTTGAGAAATGGCGGCGT	
TGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCA	
AGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
GAAATGGCGGCGTTTTCATT	
AAATGGCGGCGTTTTCATT	
AATGGCGGCGTTTTCATTAT	30
ATGGCGGCGTTTTCATTATG	
TGGCGGCGTTTTCATTATGA	
GGCGGCGTTTTCATTATGAT	
GCGGCGTTTTCATTATGATA	
CGGCGTTTTCATTATGATAT	
GGCGTTTTCATTATGATATA	
GCGTTTTCATTATGATATAA	
CGTTTTCATTATGATATAAA	
GTTTTCATTATGATATAAAG	40

【表 1 3 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTTTCATTATGATATAAAGA	
TTTCATTATGATATAAAGAT	
TTCATTATGATATAAAGATA	
TCATTATGATATAAAGATAT	
CATTATGATATAAAGATATT	
ATTATGATATAAAGATATTT	
TTATGATATAAAGATATTTA	10
TATGATATAAAGATATTTAA	
ATGATATAAAGATATTTAAT	
TGATATAAAGATATTTAATC	
GATATAAAGATATTTAATCA	
ATATAAAGATATTTAATCAG	
TATAAAGATATTTAATCAGT	
ATAAAGATATTTAATCAGTG	
TAAAGATATTTAATCAGTGG	
AAAGATATTTAATCAGTGGC	20
AAGATATTTAATCAGTGGCT	
AGATATTTAATCAGTGGCTA	
GATATTTAATCAGTGGCTAA	
ATATTTAATCAGTGGCTAAC	
TATTTAATCAGTGGCTAACA	
ATTTAATCAGTGGCTAACAG	
TTTAATCAGTGGCTAACAGA	
TTAATCAGTGGCTAACAGAA	
TAATCAGTGGCTAACAGAAG	30
AATCAGTGGCTAACAGAAGC	
ATCAGTGGCTAACAGAAGCT	
TCAGTGGCTAACAGAAGCTG	
CAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
AGTGGCTAACAGAAGCTGAA	
GTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
TGGCTAACAGAAGCTGAACA	
GGCTAACAGAAGCTGAACAG	
GCTAACAGAAGCTGAACAGT	40

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
CTAACAGAAGCTGAACAGTT	
TAACAGAAGCTGAACAGTTT	
AACAGAAGCTGAACAGTTTC	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCT	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCA	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAG	10
AAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAA	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAA	
CTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGA	
GAACAGTTTCTCAGAAAGAC	
AACAGTTTCTCAGAAAGACA	
ACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
CAGTTTCTCAGAAAGACACA	
AGTTTCTCAGAAAGACACAA	20
GTTTCTCAGAAAGACACAAA	
TTTCTCAGAAAGACACAAAT	
TTCTCAGAAAGACACAAATT	
TCTCAGAAAGACACAAATTC	
CTCAGAAAGACACAAATTCC	
TCAGAAAGACACAAATTCCT	
CAGAAAGACACAAATTCCTG	
AGAAAGACACAAATTCCTGA	
GAAAGACACAAATTCCTGAG	
AAAGACACAAATTCCTGAGA	30
AAGACACAAATTCCTGAGAA	
AGACACAAATTCCTGAGAAT	
GACACAAATTCCTGAGAATT	
ACACAAATTCCTGAGAATTG	
CACAAATTCCTGAGAATTGG	
ACAAATTCCTGAGAATTGGG	
CAAATTCCTGAGAATTGGGA	
AAATTCCTGAGAATTGGGAA	
AATTCCTGAGAATTGGGAAC	40

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
ATTCCTGAGAATTGGGAACA	
TTCCTGAGAATTGGGAACAT	
TCCTGAGAATTGGGAACATG	
CCTGAGAATTGGGAACATGC	
CTGAGAATTGGGAACATGCT	
TGAGAATTGGGAACATGCTA	10
GAGAATTGGGAACATGCTAA	
AGAATTGGGAACATGCTAAA	
GAATTGGGAACATGCTAAAT	
AATTGGGAACATGCTAAATA	
ATTGGGAACATGCTAAATAC	
TTGGGAACATGCTAAATACA	
TGGGAACATGCTAAATACAA	
GGGGAACATGCTAAATACAAA	
GGAACATGCTAAATACAAAT	20
GAACATGCTAAATACAAATG	
AACATGCTAAATACAAATGG	
ACATGCTAAATACAAATGGT	
CATGCTAAATACAAATGGTA	
ATGCTAAATACAAATGGTAT	
TGCTAAATACAAATGGTATC	
GCTAAATACAAATGGTATCT	
CTAAATACAAATGGTATCTT	30
TAAATACAAATGGTATCTTA	
AAATACAAATGGTATCTTAA	
AATACAAATGGTATCTTAAG	

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表 6 D. DMD のエクソン 4 4 に結合する 2 1 m e r の A C

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTTG	
GCGATTTGACAGATCTGTTGA	
CGATTTGACAGATCTGTTGAG	
GATTTGACAGATCTGTTGAGA	
ATTTGACAGATCTGTTGAGAA	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAA	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAAT	
TGACAGATCTGTTGAGAAATG	
GACAGATCTGTTGAGAAATGG	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGC	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCG	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGG	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	20
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCA	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTA	
AAATGGCGGCGTTTTCATTAT	
AATGGCGGCGTTTTCATTATG	30
ATGGCGGCGTTTTCATTATGA	
TGGCGGCGTTTTCATTATGAT	
GGCGGCGTTTTCATTATGATA	
GCGGCGTTTTCATTATGATAT	
CGGCGTTTTCATTATGATATA	
GCGTTTTTCATTATGATATAA	
GCGTTTTTCATTATGATATAAA	
CGTTTTTCATTATGATATAAAG	
GTTTTTCATTATGATATAAAGA	40

【表 1 4 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTTTCATTATGATATAAAGAT	
TTTCATTATGATATAAAGATA	
TTCATTATGATATAAAGATAT	
TCATTATGATATAAAGATATT	
CATTATGATATAAAGATATTT	
ATTATGATATAAAGATATTTA	
TTATGATATAAAGATATTTAA	10
TATGATATAAAGATATTTAAT	
ATGATATAAAGATATTTAATC	
TGATATAAAGATATTTAATCA	
GATATAAAGATATTTAATCAG	
ATATAAAGATATTTAATCAGT	
TATAAAGATATTTAATCAGTG	
ATAAAGATATTTAATCAGTGG	
TAAAGATATTTAATCAGTGGC	
AAAGATATTTAATCAGTGGCT	
AAGATATTTAATCAGTGGCTA	20
AGATATTTAATCAGTGGCTAA	
GATATTTAATCAGTGGCTAAC	
ATATTTAATCAGTGGCTAACA	
TATTTAATCAGTGGCTAACAG	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAA	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAG	
TAATCAGTGGCTAACAGAAGC	
AATCAGTGGCTAACAGAAGCT	
ATCAGTGGCTAACAGAAGCTG	30
TCAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
CAGTGGCTAACAGAAGCTGAA	
AGTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
GTGGCTAACAGAAGCTGAACA	
TGGCTAACAGAAGCTGAACAG	
GGCTAACAGAAGCTGAACAGT	
GCTAACAGAAGCTGAACAGTT	
CTAACAGAAGCTGAACAGTTT	
TAACAGAAGCTGAACAGTTTC	40

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
AACAGAAGCTGAACAGTTTCT	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTCA	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	10
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	
GAACAGTTTCTCAGAAAGACA	
AACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAA	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
GTTTCTCAGAAAGACACAAAT	20
TTTCTCAGAAAGACACAAATT	
TTCTCAGAAAGACACAAATTC	
TCTCAGAAAGACACAAATTCC	
CTCAGAAAGACACAAATTCCT	
TCAGAAAGACACAAATTCCTG	
CAGAAAGACACAAATTCCTGA	
AGAAAGACACAAATTCCTGAG	
GAAAGACACAAATTCCTGAGA	
AAAGACACAAATTCCTGAGAA	30
AAGACACAAATTCCTGAGAAT	
AGACACAAATTCCTGAGAATT	
GACACAAATTCCTGAGAATTG	
ACACAAATTCCTGAGAATTGG	
CACAAATTCCTGAGAATTGGG	
ACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
CAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
AAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
AATTCCTGAGAATTGGGAACA	40

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
ATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
TTCCTGAGAATTGGGAACATG	
TCCTGAGAATTGGGAACATGC	
CCTGAGAATTGGGAACATGCT	
CTGAGAATTGGGAACATGCTA	
TGAGAATTGGGAACATGCTAA	10
GAGAATTGGGAACATGCTAAA	
AGAATTGGGAACATGCTAAAT	
GAATTGGGAACATGCTAAATA	
AATTGGGAACATGCTAAATAC	
ATTGGGAACATGCTAAATACA	
TTGGGAACATGCTAAATACAA	
TGGGAACATGCTAAATACAAA	
GGAACATGCTAAATACAAAT	20
GGAACATGCTAAATACAAATG	
GAACATGCTAAATACAAATGG	
AACATGCTAAATACAAATGGT	
ACATGCTAAATACAAATGGTA	
CATGCTAAATACAAATGGTAT	
ATGCTAAATACAAATGGTATC	
TGCTAAATACAAATGGTATCT	
GCTAAATACAAATGGTATCTT	
CTAAATACAAATGGTATCTTA	30
TAAATACAAATGGTATCTTAA	
AAATACAAATGGTATCTTAAG	

【表 15 - 1】

表 6 E. DMD のエクソン 4 4 に結合する 22mer の AC

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTTGA	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAG	
CGATTTGACAGATCTGTTGAGA	
GATTTGACAGATCTGTTGAGAA	
ATTTGACAGATCTGTTGAGAAA	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAAT	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAATG	
TGACAGATCTGTTGAGAAATGG	
GACAGATCTGTTGAGAAATGGC	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGCG	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCGG	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	20
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTCA	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTAT	
AAATGGCGGCGTTTTCATTATG	
AATGGCGGCGTTTTCATTATGA	30
ATGGCGGCGTTTTCATTATGAT	
TGGCGGCGTTTTCATTATGATA	
GGCGGCGTTTTCATTATGATAT	
GCGGCGTTTTCATTATGATATA	
CGGCGTTTTCATTATGATATAA	
GCGTTTTTCATTATGATATAAA	
GCGTTTTTCATTATGATATAAAG	
CGTTTTTCATTATGATATAAAGA	
GTTTTTCATTATGATATAAAGAT	40

【表 15 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTTCATTATGATATAAAGATA	
TTTCATTATGATATAAAGATAT	
TTCATTATGATATAAAGATATT	
TCATTATGATATAAAGATATTT	
CATTATGATATAAAGATATTTA	
ATTATGATATAAAGATATTTAA	
TTATGATATAAAGATATTTAAT	10
TATGATATAAAGATATTTAATC	
ATGATATAAAGATATTTAATCA	
TGATATAAAGATATTTAATCAG	
GATATAAAGATATTTAATCAGT	
ATATAAAGATATTTAATCAGTG	
TATAAAGATATTTAATCAGTGG	
ATAAAGATATTTAATCAGTGGC	
TAAAGATATTTAATCAGTGGCT	
AAAGATATTTAATCAGTGGCTA	20
AAGATATTTAATCAGTGGCTAA	
AGATATTTAATCAGTGGCTAAC	
GATATTTAATCAGTGGCTAACA	
ATATTTAATCAGTGGCTAACAG	
TATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGAA	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAAG	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAGC	
TAATCAGTGGCTAACAGAAGCT	
AATCAGTGGCTAACAGAAGCTG	30
ATCAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
TCAGTGGCTAACAGAAGCTGAA	
CAGTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
AGTGGCTAACAGAAGCTGAACA	
GTGGCTAACAGAAGCTGAACAG	
TGGCTAACAGAAGCTGAACAGT	
GGCTAACAGAAGCTGAACAGTT	
GCTAACAGAAGCTGAACAGTTT	
CTAACAGAAGCTGAACAGTTTC	40

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
TAACAGAAGCTGAACAGTTTCT	
AACAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCTCA	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	10
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACA	
GAACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
AACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACAA	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAAT	
GTTTCTCAGAAAGACACAAATT	20
TTTCTCAGAAAGACACAAATTC	
TTCTCAGAAAGACACAAATTCC	
TCTCAGAAAGACACAAATTCCT	
CTCAGAAAGACACAAATTCCTG	
TCAGAAAGACACAAATTCCTGA	
CAGAAAGACACAAATTCCTGAG	
AGAAAGACACAAATTCCTGAGA	
GAAAGACACAAATTCCTGAGAA	
AAAGACACAAATTCCTGAGAAT	
AAGACACAAATTCCTGAGAATT	30
AGACACAAATTCCTGAGAATTG	
GACACAAATTCCTGAGAATTGG	
ACACAAATTCCTGAGAATTGGG	
CACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
CAAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
AAATTCCTGAGAATTGGGAACA	
AATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
ATTCCTGAGAATTGGGAACATG	40

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
TTCCTGAGAATTGGGAACATGC	
TCCTGAGAATTGGGAACATGCT	
CCTGAGAATTGGGAACATGCTA	
CTGAGAATTGGGAACATGCTAA	
TGAGAATTGGGAACATGCTAAA	
GAGAATTGGGAACATGCTAAAT	10
AGAATTGGGAACATGCTAAATA	
GAATTGGGAACATGCTAAATAC	
AATTGGGAACATGCTAAATACA	
ATTGGGAACATGCTAAATACAA	
TTGGGAACATGCTAAATACAAA	
TGGGAACATGCTAAATACAAAT	
GGGAACATGCTAAATACAAATG	
GGAACATGCTAAATACAAATGG	
GAACATGCTAAATACAAATGGT	20
AACATGCTAAATACAAATGGTA	
ACATGCTAAATACAAATGGTAT	
CATGCTAAATACAAATGGTATC	
ATGCTAAATACAAATGGTATCT	
TGCTAAATACAAATGGTATCTT	
GCTAAATACAAATGGTATCTTA	
CTAAATACAAATGGTATCTTAA	
TAAATACAAATGGTATCTTAAG	30

40

50

【表 16 - 1】

表 6 F. DMD のエクソン 4 4 に結合する 23mer の AC

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTTGAG	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAGA	
CGATTTGACAGATCTGTTGAGAA	
GATTTGACAGATCTGTTGAGAAA	
ATTTGACAGATCTGTTGAGAAAT	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAATG	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAATGG	
TGACAGATCTGTTGAGAAATGGC	
GACAGATCTGTTGAGAAATGGCG	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGCGG	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	20
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCA	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCATTA	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATTAT	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTATG	
AAATGGCGGCGTTTTCATTATGA	
AATGGCGGCGTTTTCATTATGAT	30
ATGGCGGCGTTTTCATTATGATA	
TGGCGGCGTTTTCATTATGATAT	
GGCGGCGTTTTCATTATGATATA	
GCGGCGTTTTCATTATGATATAA	
CGGCGTTTTCATTATGATATAAA	
GGCGTTTTCATTATGATATAAAG	
GCGTTTTCATTATGATATAAAGA	
CGTTTTCATTATGATATAAAGAT	
GTTTTCATTATGATATAAAGATA	40

【表 16 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTTTCATTATGATATAAAGATAT	
TTTCATTATGATATAAAGATATT	
TTCATTATGATATAAAGATATTT	
TCATTATGATATAAAGATATTTA	
CATTATGATATAAAGATATTTAA	
ATTATGATATAAAGATATTTAAT	
TTATGATATAAAGATATTTAATC	10
TATGATATAAAGATATTTAATCA	
ATGATATAAAGATATTTAATCAG	
TGATATAAAGATATTTAATCAGT	
GATATAAAGATATTTAATCAGTG	
ATATAAAGATATTTAATCAGTGG	
TATAAAGATATTTAATCAGTGGC	
ATAAAGATATTTAATCAGTGGCT	
TAAAGATATTTAATCAGTGGCTA	
AAAGATATTTAATCAGTGGCTAA	
AAGATATTTAATCAGTGGCTAAC	20
AGATATTTAATCAGTGGCTAACA	
GATATTTAATCAGTGGCTAACAG	
ATATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
TATTTAATCAGTGGCTAACAGAA	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGAAG	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAAGC	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAGCT	
TAATCAGTGGCTAACAGAAGCTG	
AATCAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
ATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAA	30
TCAGTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
CAGTGGCTAACAGAAGCTGAACA	
AGTGGCTAACAGAAGCTGAACAG	
GTGGCTAACAGAAGCTGAACAGT	
TGGCTAACAGAAGCTGAACAGTT	
GGCTAACAGAAGCTGAACAGTTT	
GCTAACAGAAGCTGAACAGTTTC	
CTAACAGAAGCTGAACAGTTTCT	
TAACAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
AACAGAAGCTGAACAGTTTCTCA	40

10

20

30

40

50

【表 16 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	10
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
GAACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
AACAGTTTCTCAGAAAGACACAA	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAAAT	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAATT	
GTTTCTCAGAAAGACACAAATTC	
TTTCTCAGAAAGACACAAATTCC	
TTCTCAGAAAGACACAAATTCCT	20
TCTCAGAAAGACACAAATTCCTG	
CTCAGAAAGACACAAATTCCTGA	
TCAGAAAGACACAAATTCCTGAG	
CAGAAAGACACAAATTCCTGAGA	
AGAAAGACACAAATTCCTGAGAA	
GAAAGACACAAATTCCTGAGAAT	
AAAGACACAAATTCCTGAGAATT	
AAGACACAAATTCCTGAGAATTG	
AGACACAAATTCCTGAGAATTGG	
GACACAAATTCCTGAGAATTGGG	30
ACACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
CACAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
CAAATTCCTGAGAATTGGGAACA	
AAATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
AATTCCTGAGAATTGGGAACATG	
ATTCTGAGAATTGGGAACATGC	
TTCCTGAGAATTGGGAACATGCT	
TCCTGAGAATTGGGAACATGCTA	
CCTGAGAATTGGGAACATGCTAA	40

10

20

30

40

50

【表 16 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
CTGAGAATTGGGAACATGCTAAA	
TGAGAATTGGGAACATGCTAAAT	
GAGAATTGGGAACATGCTAAATA	
AGAATTGGGAACATGCTAAATAC	
GAATTGGGAACATGCTAAATACA	
AATTGGGAACATGCTAAATACAA	10
ATTGGGAACATGCTAAATACAAA	
TTGGGAACATGCTAAATACAAAT	
TGGGAACATGCTAAATACAAATG	
GGGGAACATGCTAAATACAAATGG	
GGAACATGCTAAATACAAATGGT	
GAACATGCTAAATACAAATGGTA	
AACATGCTAAATACAAATGGTAT	
ACATGCTAAATACAAATGGTATC	20
CATGCTAAATACAAATGGTATCT	
ATGCTAAATACAAATGGTATCTT	
TGCTAAATACAAATGGTATCTTA	
GCTAAATACAAATGGTATCTTAA	
CTAAATACAAATGGTATCTTAAG	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAA	

10

20

30

40

50

【表 17 - 1】

表 6 G. DMD のエクソン 44 に結合する 24mer の AC

核酸配列 (5' - 3')	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAA	
CGATTTGACAGATCTGTTGAGAAA	
GATTTGACAGATCTGTTGAGAAAT	
ATTTGACAGATCTGTTGAGAAATG	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAATGG	
TTGACAGATCTGTTGAGAAATGGC	10
TGACAGATCTGTTGAGAAATGGCG	
GACAGATCTGTTGAGAAATGGCGG	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCA	20
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTA	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCATTAT	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATTATG	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTATGA	
AAATGGCGGCGTTTTCATTATGAT	
AATGGCGGCGTTTTCATTATGATA	
ATGGCGGCGTTTTCATTATGATAT	
TGGCGGCGTTTTCATTATGATATA	30
GGCGGCGTTTTCATTATGATATAA	
GCGGCGTTTTCATTATGATATAAA	
CGGCGTTTTCATTATGATATAAAG	
GGCGTTTTCATTATGATATAAAGA	
GCGTTTTCATTATGATATAAAGAT	
CGTTTTCATTATGATATAAAGATA	
GTTTTCATTATGATATAAAGATAT	
TTTTCATTATGATATAAAGATATT	
TTTCATTATGATATAAAGATATTT	
TTCATTATGATATAAAGATATTTA	40

10

20

30

40

50

【表 17 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TCATTATGATATAAAGATATTTAA	
CATTATGATATAAAGATATTTAAT	
ATTATGATATAAAGATATTTAATC	
TTATGATATAAAGATATTTAATCA	
TATGATATAAAGATATTTAATCAG	
ATGATATAAAGATATTTAATCAGT	
TGATATAAAGATATTTAATCAGTG	10
GATATAAAGATATTTAATCAGTGG	
ATATAAAGATATTTAATCAGTGGC	
TATAAAGATATTTAATCAGTGGCT	
ATAAAGATATTTAATCAGTGGCTA	
TAAAGATATTTAATCAGTGGCTAA	
AAAGATATTTAATCAGTGGCTAAC	
AAGATATTTAATCAGTGGCTAACA	
AGATATTTAATCAGTGGCTAACAG	
GATATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
ATATTTAATCAGTGGCTAACAGAA	20
TATTTAATCAGTGGCTAACAGAAG	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGC	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCT	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTG	
TAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
AATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAA	
ATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
TCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACA	
CAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAG	
AGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGT	30
GTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTT	
TGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTT	
GGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTC	
GCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCT	
CTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
TAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCA	
AACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	40

10

20

30

40

50

【表 17 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA	
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
GAACAGTTTCTCAGAAAGACACAA	10
AACAGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACAAAT	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAAATT	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAATTC	
GTTTCTCAGAAAGACACAAATTCC	
TTTCTCAGAAAGACACAAATTCCT	
TTCTCAGAAAGACACAAATTCCTG	
TCTCAGAAAGACACAAATTCCTGA	
CTCAGAAAGACACAAATTCCTGAG	
TCAGAAAGACACAAATTCCTGAGA	20
CAGAAAGACACAAATTCCTGAGAA	
AGAAAGACACAAATTCCTGAGAAT	
GAAAGACACAAATTCCTGAGAATT	
AAAGACACAAATTCCTGAGAATTG	
AAGACACAAATTCCTGAGAATTGG	
AGACACAAATTCCTGAGAATTGGG	
GACACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
ACACAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
CACAAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAACA	30
CAAATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
AAATTCCTGAGAATTGGGAACATG	
AATTCCTGAGAATTGGGAACATGC	
ATTCCTGAGAATTGGGAACATGCT	
TTCCTGAGAATTGGGAACATGCTA	
TCCTGAGAATTGGGAACATGCTAA	
CCTGAGAATTGGGAACATGCTAAA	
CTGAGAATTGGGAACATGCTAAAT	
TGAGAATTGGGAACATGCTAAATA	
GAGAATTGGGAACATGCTAAATAC	40

【表 1 7 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
AGAATTGGGAACATGCTAAATACA	
GAATTGGGAACATGCTAAATACAA	
AATTGGGAACATGCTAAATACAAA	
ATTGGGAACATGCTAAATACAAAT	
TTGGGAACATGCTAAATACAAATG	
TGGGAACATGCTAAATACAAATGG	10
GGGAACATGCTAAATACAAATGGT	
GGAACATGCTAAATACAAATGGTA	
GAACATGCTAAATACAAATGGTAT	
AACATGCTAAATACAAATGGTATC	
ACATGCTAAATACAAATGGTATCT	
CATGCTAAATACAAATGGTATCTT	
ATGCTAAATACAAATGGTATCTTA	
TGCTAAATACAAATGGTATCTTAA	
GCTAAATACAAATGGTATCTTAAG	20

30

40

50

【表 18 - 1】

表 6 H. DMD のエクソン 4 4 に結合する 25mer の AC

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTTGAGAA	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAA	
CGATTTGACAGATCTGTTGAGAAAT	
GATTTGACAGATCTGTTGAGAAATG	
ATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGG	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGC	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCG	
TGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGG	
GACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	20
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTA	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTAT	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATG	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGA	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTATGAT	
AAATGGCGGCGTTTTCATTATGATA	
AATGGCGGCGTTTTCATTATGATAT	
ATGGCGGCGTTTTCATTATGATATA	30
TGGCGGCGTTTTCATTATGATATAA	
GGCGGCGTTTTCATTATGATATAAA	
GCGGCGTTTTCATTATGATATAAAG	
CGGCGTTTTCATTATGATATAAAGA	
GGCGTTTTCATTATGATATAAAGAT	
GCGTTTTCATTATGATATAAAGATA	
CGTTTTCATTATGATATAAAGATAT	
GTTTTTCATTATGATATAAAGATATT	
TTTTTCATTATGATATAAAGATATTT	
TTTCATTATGATATAAAGATATTTA	40

10

20

30

40

50

【表 18 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTCATTATGATATAAAGATATTTAA	
TCATTATGATATAAAGATATTTAAT	
CATTATGATATAAAGATATTTAATC	
ATTATGATATAAAGATATTTAATCA	
TTATGATATAAAGATATTTAATCAG	
TATGATATAAAGATATTTAATCAGT	
ATGATATAAAGATATTTAATCAGTG	10
TGATATAAAGATATTTAATCAGTGG	
GATATAAAGATATTTAATCAGTGGC	
ATATAAAGATATTTAATCAGTGGCT	
TATAAAGATATTTAATCAGTGGCTA	
ATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAA	
TAAAGATATTTAATCAGTGGCTAAC	
AAAGATATTTAATCAGTGGCTAACA	
AAGATATTTAATCAGTGGCTAACAG	
AGATATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
GATATTTAATCAGTGGCTAACAGAA	20
ATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAG	
TATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGC	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCT	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTG	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
TAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAA	
AATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
ATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACA	
TCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAG	
CAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGT	30
AGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTT	
GTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTT	
TGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTC	
GGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCT	
GCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
CTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCA	
TAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
AACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	40

10

20

30

40

50

【表 18 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAA	
GAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
AACAGTTTCTCAGAAAGACACAAAT	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATT	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTC	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCC	
GTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCT	
TTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTG	
TTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGA	
TCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAG	
CTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGA	
TCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAA	
CAGAAAGACACAAATTCCTGAGAAT	
AGAAAGACACAAATTCCTGAGAATT	
GAAAGACACAAATTCCTGAGAATTG	
AAAGACACAAATTCCTGAGAATTGG	
AAGACACAAATTCCTGAGAATTGGG	
AGACACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
GACACAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
ACACAAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
CACAAATTCCTGAGAATTGGGAACA	
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
CAAATTCCTGAGAATTGGGAACATG	
AAATTCCTGAGAATTGGGAACATGC	
AATTCCTGAGAATTGGGAACATGCT	
ATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTA	
TTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAA	
TCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAA	
CCTGAGAATTGGGAACATGCTAAAT	
CTGAGAATTGGGAACATGCTAAATA	

10

20

30

40

50

【表 18 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
TGAGAATTGGGAACATGCTAAATAC	
GAGAATTGGGAACATGCTAAATACA	
AGAATTGGGAACATGCTAAATACAA	
GAATTGGGAACATGCTAAATACAAA	
AATTGGGAACATGCTAAATACAAAT	
ATTGGGAACATGCTAAATACAAATG	10
TTGGGAACATGCTAAATACAAATGG	
TGGGAACATGCTAAATACAAATGGT	
GGGAACATGCTAAATACAAATGGTA	
GGAACATGCTAAATACAAATGGTAT	
GAACATGCTAAATACAAATGGTATC	
AACATGCTAAATACAAATGGTATCT	
ACATGCTAAATACAAATGGTATCTT	
CATGCTAAATACAAATGGTATCTTA	20
ATGCTAAATACAAATGGTATCTTAA	
TGCTAAATACAAATGGTATCTTAAG	
TGAAAACGCCGCCATTTCTCAACAG	
AAACGCCGCCATTTCTCAACAGATC	
AACGCCGCCATTTCTCAACAGATCT	

10

20

30

40

50

【表 19 - 1】

表 6 I. DMD のエクソン 44 に結合する 26mer の AC

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAA	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAAT	
CGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATG	
GATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGG	
ATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGC	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCG	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGG	
TGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
GACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCA	
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	20
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTAT	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATG	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGA	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGAT	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATA	
AAATGGCGGCGTTTTCATTATGATAT	
AATGGCGGCGTTTTCATTATGATATA	
ATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAA	30
TGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAA	
GGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAG	
GCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGA	
CGGCGTTTTCATTATGATATAAAGAT	
GGCGTTTTCATTATGATATAAAGATA	
GCGTTTTCATTATGATATAAAGATAT	
CGTTTTCATTATGATATAAAGATATT	
GTTTTCATTATGATATAAAGATATTT	
TTTTCATTATGATATAAAGATATTTA	40

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTTCATTATGATATAAAGATATTTAA	
TTCATTATGATATAAAGATATTTAAT	
TCATTATGATATAAAGATATTTAATC	
CATTATGATATAAAGATATTTAATCA	
ATTATGATATAAAGATATTTAATCAG	
TTATGATATAAAGATATTTAATCAGT	
TATGATATAAAGATATTTAATCAGTG	10
ATGATATAAAGATATTTAATCAGTGG	
TGATATAAAGATATTTAATCAGTGGC	
GATATAAAGATATTTAATCAGTGGCT	
ATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTA	
TATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAA	
ATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAAC	
TAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACA	
AAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAG	
AAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
AGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAA	20
GATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAG	
ATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGC	
TATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCT	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTG	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAA	
TAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
AATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACA	
ATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAG	
TCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGT	30
CAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTT	
AGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTT	
GTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTC	
TGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCT	
GGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
GCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCA	
CTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
TAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
AACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	40

10

20

30

40

50

【表 19 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAA	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
GAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAAT	
AACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATT	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTC	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCC	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCT	
GTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTG	
TTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGA	
TTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAG	
TCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGA	
CTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAA	
TCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAAT	
CAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATT	
AGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTG	
GAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGG	
AAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGG	
AAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
AGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
GACACAAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
ACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACA	
CACAAATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATG	
CAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGC	
AAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCT	
AATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTA	
ATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAA	
TTCTGAGAATTGGGAACATGCTAAA	
TCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAAT	

10

20

30

40

50

【表 19 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
CCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATA	
CTGAGAATTGGGAACATGCTAAATAC	
TGAGAATTGGGAACATGCTAAATACA	
GAGAATTGGGAACATGCTAAATACAA	
AGAATTGGGAACATGCTAAATACAAA	
GAATTGGGAACATGCTAAATACAAAT	10
AATTGGGAACATGCTAAATACAAATG	
ATTGGGAACATGCTAAATACAAATGG	
TTGGGAACATGCTAAATACAAATGGT	
TGGGAACATGCTAAATACAAATGGTA	
GGGAACATGCTAAATACAAATGGTAT	
GGAACATGCTAAATACAAATGGTATC	
GAACATGCTAAATACAAATGGTATCT	
AACATGCTAAATACAAATGGTATCTT	20
ACATGCTAAATACAAATGGTATCTTA	
CATGCTAAATACAAATGGTATCTTAA	
ATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAG	

10

20

30

40

50

【表 20 - 1】

表 6 J. DMD のエクソン 44 に結合する 27mer の AC

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAAT	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATG	
CGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGG	
GATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGC	
ATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCG	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGG	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
TGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	
GACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCA	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	20
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTAT	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATG	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGA	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGAT	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATA	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATAT	
AAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATA	
AATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAA	
ATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAA	30
TGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAG	
GGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGA	
GCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGAT	
CGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATA	
GGCGTTTTCATTATGATATAAAGATAT	
GCGTTTTCATTATGATATAAAGATATT	
CGTTTTCATTATGATATAAAGATATTT	
GTTTTCATTATGATATAAAGATATTTA	
TTTTCATTATGATATAAAGATATTTAA	
TTTCATTATGATATAAAGATATTTAAT	40

【表 20 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTCATTATGATATAAAGATATTTAATC	
TCATTATGATATAAAGATATTTAATCA	
CATTATGATATAAAGATATTTAATCAG	
ATTATGATATAAAGATATTTAATCAGT	
TTATGATATAAAGATATTTAATCAGTG	
TATGATATAAAGATATTTAATCAGTGG	
ATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGC	10
TGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCT	
GATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTA	
ATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAA	
TATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAAC	
ATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACA	
TAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAG	
AAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
AAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAA	
AGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAAG	
GATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAAGC	20
ATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAAGCT	
TATTTAATCAGTGGCTAACAGAAAGCTG	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGAAAGCTGA	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAAAGCTGAA	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAAGCTGAAC	
TAATCAGTGGCTAACAGAAAGCTGAACA	
AATCAGTGGCTAACAGAAAGCTGAACAG	
ATCAGTGGCTAACAGAAAGCTGAACAGT	
TCAGTGGCTAACAGAAAGCTGAACAGTT	
CAGTGGCTAACAGAAAGCTGAACAGTTT	30
AGTGGCTAACAGAAAGCTGAACAGTTTC	
GTGGCTAACAGAAAGCTGAACAGTTTCT	
TGGCTAACAGAAAGCTGAACAGTTTCTC	
GGCTAACAGAAAGCTGAACAGTTTCTCA	
GCTAACAGAAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
CTAACAGAAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
TAACAGAAAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	
AACAGAAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	
ACAGAAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
CAGAAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	40

10

20

30

40

50

【表 20 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAA	
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAAT	10
GAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATT	
AACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTC	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCC	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCT	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTG	
GTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGA	
TTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAG	
TTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGA	
TCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAA	
CTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAAT	20
TCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATT	
CAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTG	
AGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGG	
GAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGG	
AAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
AAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
AGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
GACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACA	
ACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
CACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATG	30
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGC	
CAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCT	
AAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTA	
AATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAA	
ATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAA	
TTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAAT	
TCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATA	
CCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATAC	
CTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACA	40

40

50

【表 20 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
TGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAA	
GAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAA	
AGAATTGGGAACATGCTAAATACAAAT	
GAATTGGGAACATGCTAAATACAAATG	
AATTGGGAACATGCTAAATACAAATGG	
ATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGT	10
TTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTA	
TGGGAACATGCTAAATACAAATGGTAT	
GGGAACATGCTAAATACAAATGGTATC	
GGAACATGCTAAATACAAATGGTATCT	
GAACATGCTAAATACAAATGGTATCTT	
AACATGCTAAATACAAATGGTATCTTA	
ACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAA	
CATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAG	20

30

40

50

【表 2 1 - 1】

表 6 K. DMD のエクソン 4 4 に結合する 2 8 m e r の A C

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATG	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGG	
CGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGC	
GATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCG	
ATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGG	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	
TGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	
GACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCA	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTA	20
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTAT	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATG	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGA	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGAT	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATA	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATAT	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATA	
AAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAA	
AATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAA	
ATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAG	30
TGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGA	
GGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGAT	
GCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATA	
CGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATAT	
GGCGTTTTCATTATGATATAAAGATATT	
GCGTTTTCATTATGATATAAAGATATTT	
CGTTTTCATTATGATATAAAGATATTTA	
GTTTTCATTATGATATAAAGATATTTAA	
TTTTCATTATGATATAAAGATATTTAAT	
TTTCATTATGATATAAAGATATTTAATC	40

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTCATTATGATATAAAGATATTTAATCA	
TCATTATGATATAAAGATATTTAATCAG	
CATTATGATATAAAGATATTTAATCAGT	
ATTATGATATAAAGATATTTAATCAGTG	
TTATGATATAAAGATATTTAATCAGTGG	
TATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGC	
ATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCT	10
TGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTA	
GATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAA	
ATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAAC	
TATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACA	
ATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAG	
TAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
AAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAA	
AAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAG	
AGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGC	
GATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCT	20
ATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTG	
TATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAA	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACA	
TAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAG	
AATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGT	
ATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTT	
TCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTT	
CAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTC	30
AGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCT	
GTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
TGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCA	
GGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
GCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
CTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	
TAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	
AACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	40

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAA	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAAT	10
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATT	
GAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTC	
AACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCC	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCT	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTG	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGA	
GTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAG	
TTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGA	
TTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAA	
TCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAAT	20
CTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATT	
TCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTG	
CAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGG	
AGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGG	
GAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
AAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
AAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
AGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACA	
GACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
ACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATG	30
CACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGC	
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCT	
CAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTA	
AAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAA	
AATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAA	
ATTCTGAGAATTGGGAACATGCTAAAT	
TTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATA	
TCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATAC	
CCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACA	
CTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAA	40

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
TGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAA	
GAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAAT	
AGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATG	
GAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGG	
AATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGT	
ATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTA	10
TTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTAT	
TGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATC	
GGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCT	
GGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTT	
GAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTA	
AACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAA	
ACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAG	

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1】

表 6 L. DMD のエクソン 4 4 に結合する 2 9 m e r の d A C

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGG	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGC	
CGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCG	
GATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGG	
ATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	
TGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
GACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCA	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTA	
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTAT	20
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATG	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGA	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGAT	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATA	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATAT	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATA	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAA	
AAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAA	
AATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAG	
ATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGA	30
TGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGAT	
GGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATA	
GCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATAT	
CGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATATT	
GGCGTTTTCATTATGATATAAAGATATTT	
GCGTTTTCATTATGATATAAAGATATTTA	
CGTTTTCATTATGATATAAAGATATTTAA	
GTTTTCATTATGATATAAAGATATTTAAT	
TTTTCATTATGATATAAAGATATTTAATC	
TTTCATTATGATATAAAGATATTTAATCA	40

【表 2 2 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTCATTATGATATAAAGATATTTAATCAG	
TCATTATGATATAAAGATATTTAATCAGT	
CATTATGATATAAAGATATTTAATCAGTG	
ATTATGATATAAAGATATTTAATCAGTGG	
TTATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGC	
TATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCT	
ATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTA	10
TGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAA	
GATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAAC	
ATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACA	
TATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAG	
ATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
TAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAA	
AAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAG	
AAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGC	
AGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCT	
GATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTG	20
ATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
TATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAA	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACA	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAG	
TAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGT	
AATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTT	
ATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTT	
TCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTC	
CAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCT	30
AGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
GTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCA	
TGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
GGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
GCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	
CTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	
TAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
AACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA	40

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAA	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAAT	
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATT	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTC	
GAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCC	
AACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCT	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTG	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGA	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAG	
GTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGA	
TTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAA	
TTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAAT	
TCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATT	
CTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTG	
TCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGG	
CAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGG	
AGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
GAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
AAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
AAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACA	
AGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
GACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATG	
ACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGC	
CACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCT	
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTA	
CAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAA	
AAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAA	
AATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAAT	
ATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATA	
TTCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATAC	
TCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACA	
CCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAA	
CTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAA	
TGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAAT	

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 4】

核酸配列 (5' - 3')	
GAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATG	
AGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGG	
GAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGT	
AATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTA	
ATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTAT	
TTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATC	10
TGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCT	
GGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTT	
GGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTA	
GAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAA	
AACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAG	

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 1】

表 6 M. DMD のエクソン 4 4 に結合する 3 0 m e r の A C

核酸配列 (5' - 3')	
GGCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGC	
GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCG	
CGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGG	
GATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	
ATTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCG	
TTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGT	10
TTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTT	
TGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTT	
GACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTT	
ACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTC	
CAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCA	
AGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCAT	
GATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATT	
ATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTA	
TCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTAT	
CTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATG	20
TGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGA	
GTTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGAT	
TTGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATA	
TGAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATAT	
GAGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATA	
AGAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAA	
GAAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAA	
AAATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAG	
AATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGA	
ATGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGAT	30
TGGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATA	
GGCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATAT	
GCGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATATT	
CGGCGTTTTCATTATGATATAAAGATATTT	
GGCGTTTTCATTATGATATAAAGATATTTA	
GCGTTTTCATTATGATATAAAGATATTTAA	
CGTTTTCATTATGATATAAAGATATTTAAT	
GTTTTCATTATGATATAAAGATATTTAATC	
TTTTCATTATGATATAAAGATATTTAATCA	40

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 2】

核酸配列 (5' - 3')	
TTTCATTATGATATAAAGATATTTAATCAG	
TTCATTATGATATAAAGATATTTAATCAGT	
TCATTATGATATAAAGATATTTAATCAGTG	
CATTATGATATAAAGATATTTAATCAGTGG	
ATTATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGC	
TTATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCT	
TATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTA	10
ATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAA	
TGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAAC	
GATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACA	
ATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAG	
TATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGA	
ATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAA	
TAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAG	
AAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGC	
AAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCT	
AGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTG	20
GATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGA	
ATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAA	
TATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAAC	
ATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACA	
TTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAG	
TTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGT	
TAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTT	
AATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTT	
ATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTC	
TCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCT	30
CAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTC	
AGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCA	
GTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAG	
TGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGA	
GGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAA	
GCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAA	
CTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAG	
TAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGA	
AACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC	40

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 3】

核酸配列 (5' - 3')	
ACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACA	
CAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACAC	
AGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACA	
GAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAA	
AAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAA	
AGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAAT	
GCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATT	10
CTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTC	
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCC	
GAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCT	
AACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTG	
ACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGA	
CAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAG	
AGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGA	
GTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAA	
TTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAAT	
TTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATT	20
TCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTG	
CTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGG	
TCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGG	
CAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGA	
AGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAA	
GAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAAC	
AAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACA	
AAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACAT	
AGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATG	
GACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGC	30
ACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCT	
CACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTA	
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAA	
CAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAA	
AAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAAT	
AATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATA	
ATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATAC	
TTCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACA	
TCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAA	
CCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAA	40

【表 2 3 - 4】

核酸配列 (5' - 3')
CTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAAT
TGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATG
GAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGG
AGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGT
GAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTA
AATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTAT
ATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATC
TTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCT
TGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTT
GGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTA
GGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAA
GAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAG
XGAAAACGCCGCCAXXXCXCAACAGAXCXG、式中、X=UまたはT
TGAAAACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTG

10

20

【0 3 1 4】

実施形態では、表 6 A ~ 6 M 中の A C、その逆相補体、またはそれとの少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % の核酸配列同一性を有する配列を含めて、本明細書に記載される任意の A C は、ホスホロチオエート (P S) ヌクレオチド、ホスホロジアミデートモルホリノ (P M O) ヌクレオチド、ロック核酸 (L N A)、ペプチド核酸 (P N A)、2' - O - メチル (2' - O M e) 修飾骨格を含むヌクレオチド、2' - O - メトキシエチル (2' - M O E) ヌクレオチド、2' , 4' 拘束エチル (c E t) ヌクレオチド、及び 2' - デオキシ - 2' - フルオロ - 3' - ベータ - D - アラビノ核酸 (2' F - A N A) から選択される少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたは核酸を含む。実施形態では、標的配列との A C のハイブリダイゼーションは、エクソン 4 4 のスプライシングを促進または誘発する。実施形態では、A C は、少なくとも 1 つのホスホロジアミデートモルホリノ (P M O) ヌクレオチドを含む。実施形態では、ヌクレオチドのうち 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くは、修飾されている。実施形態では、A C 中の各ヌクレオチドは、ホスホロジアミデートモルホリノ (P M O) ヌクレオチドである。

30

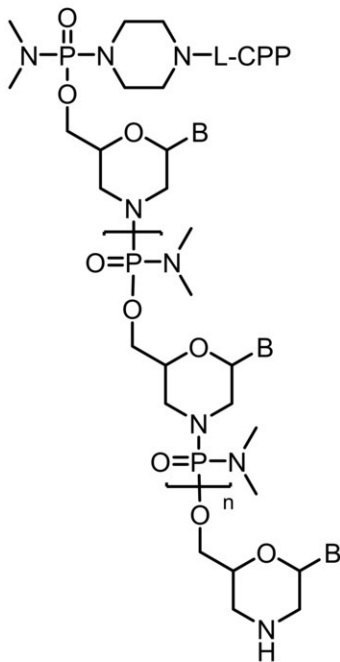
【0 3 1 5】

実施形態では、化合物は、以下の構造：

40

50

【化 1 2 9】



10

20

を有し、式中、

C P P は、本明細書に記載の環状ペプチド（細胞透過性ペプチドとも呼称される）であり、

L はリンカーであり、

B は、各々独立して、標的配列中の塩基に対して相補的である核酸塩基であり、

n は、1～50の整数である。実施形態では、Bとnとを合わせたものは、表6A～6Mに示される配列、その逆相補体、またはそれとの少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の核酸配列同一性を有する配列に対応する。

30

【0316】

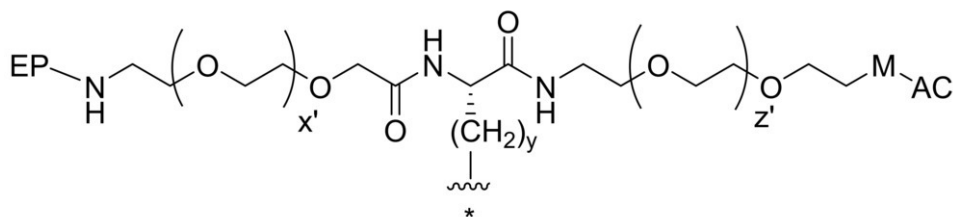
ACにコンジュゲートされた環状細胞透過性ペプチド（c C P P）

環状細胞透過性ペプチド（c C P P）は、ACにコンジュゲートされ得る。

【0317】

ACは、リンカーを介してc C P Pにコンジュゲートされ得る。カーゴ部分は、末端カルボニル基でリンカーにコンジュゲートされて、以下の構造：

【化 1 3 0】



40

を提供することができ、式中、

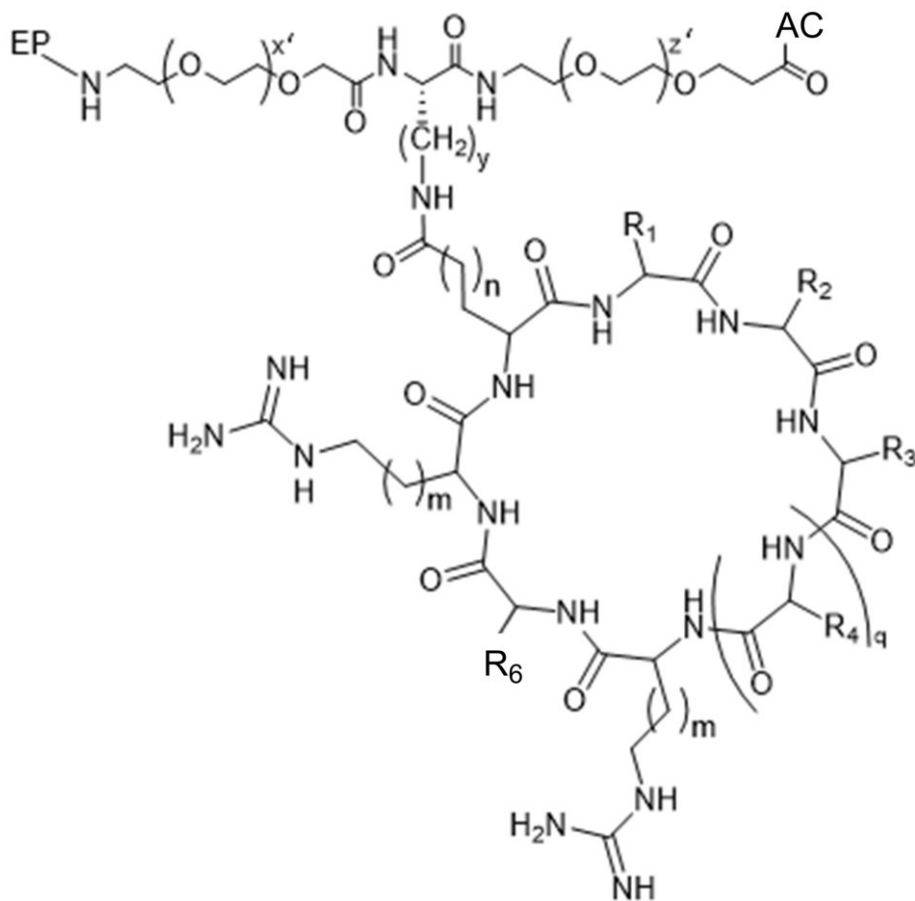
E P は環外ペプチドであり、M、A A S c、A C、x'、y及びz'は上に定義される通りであり、*はA A S cへの結合点である。x'は1であり得る。yは4であり得る。z' 50

は 11 であり得る。－(OCH₂CH-2)_x－及び／または (OCH₂CH-2)_z－は、独立して、例えば、グリシン、ベータアラニン、4-アミノ酪酸、5-アミノペンタン酸、6-アミノヘキサン酸、またはこれらの組み合わせなどの 1 つ以上のアミノ酸で置き換えることができる。

【0318】

エンドソーム脱出ビヒクル (EEV) は、環状細胞透過性ペプチド (cCPP)、環外ペプチド (EP) 及びリンカーを含み得、AC にコンジュゲートして、式 (C)：

【化 131】



(C)

またはそのプロトン化形態の構造を含む EEV-コンジュゲートを形成することができ、式中、

R₁、R₂ 及び R₃ は、各々独立して、H または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であってもよく、

R₄ 及び R₆ は、独立して、H またはアミノ酸側鎖であり、

EP は、本明細書で定義される環外ペプチドであり、

AC は、本明細書で定義されるとおりであり、

各 m は、独立して、0～3 の整数であり、

n は、0～2 の整数であり、

x' は、2～20 の整数であり、

10

20

30

40

50

y は、1～5の整数であり、
 q は、1～4の整数であり、
 z' は、2～20の整数である。

【0319】

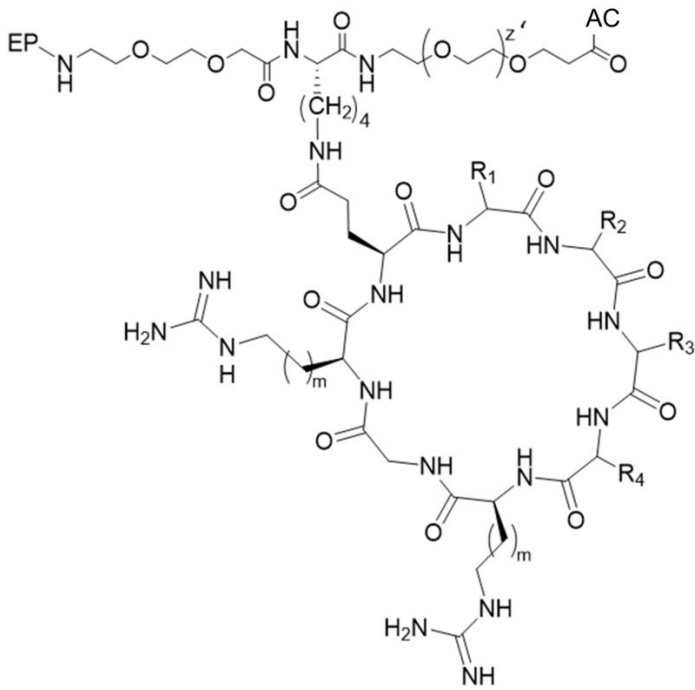
R₁、R₂、R₃、R₄、EP、AC、m、n、x'、y、q、及びz'は、本明細書で定義される通りである。

【0320】

EEVはACにコンジュゲートされ得、EEV-コンジュゲートは、式(C-a)もしくは(C-b)：

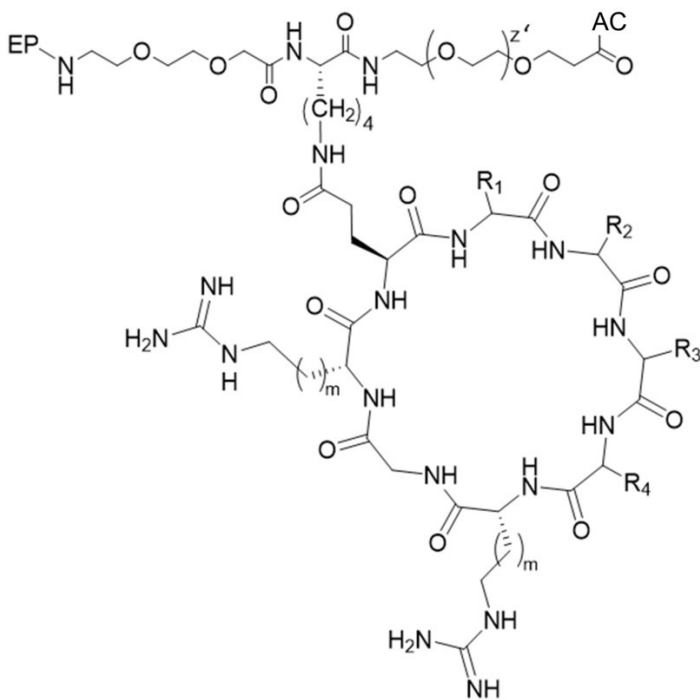
【化132】

10



(C-a)、

30



(C-b)

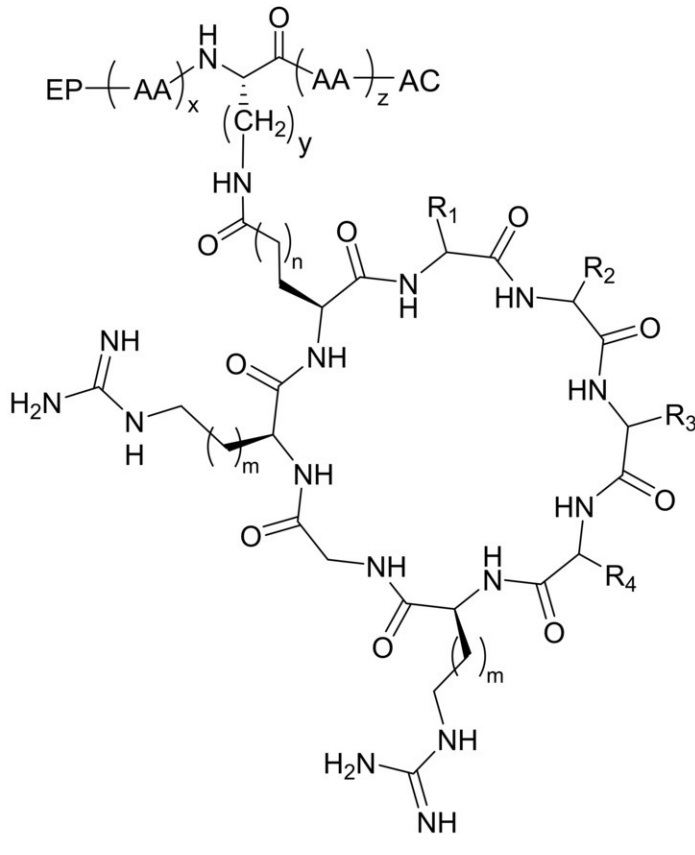
40

50

またはそのプロトン化形態の構造を含み得、式中、EP、m及びzは、式(C)において先に定義された通りである。

【0321】

EEVはACにコンジュゲートされ得、EEV-コンジュゲートは、式(C-c)：
【化133】



またはそのプロトン化形態の構造を含み得、式中、EP、R¹、R²、R³、R⁴、及びmは、式(III)において先に定義された通りであり、AAは、本明細書で定義されるアミノ酸であり得、nは0～2の整数であり得、xは1～10の整数であり得、yは1～5の整数であり得、zは1～10の整数であり得る。

【0322】

EEVは、オリゴヌクレオチドACにコンジュゲートされ得、EEV-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、式(C-1)、(C-2)、(C-3)、または(C-4)：

10

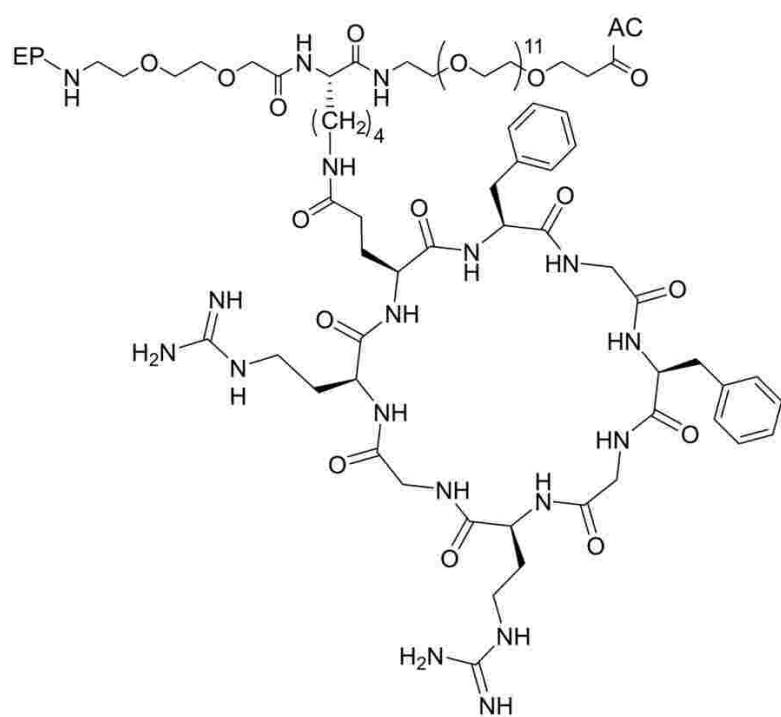
20

30

40

50

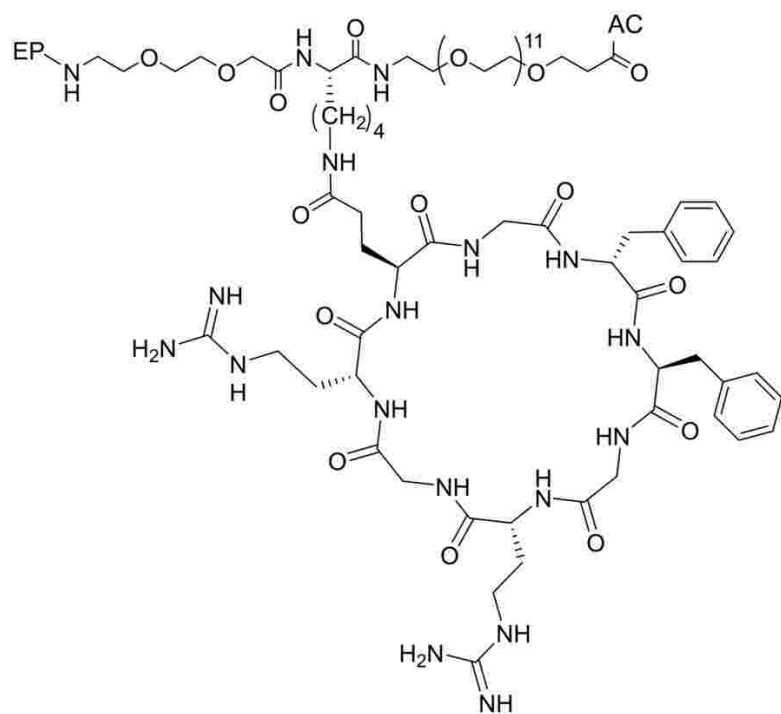
【化 1 3 4 - 1】



(C-1) 、

10

20



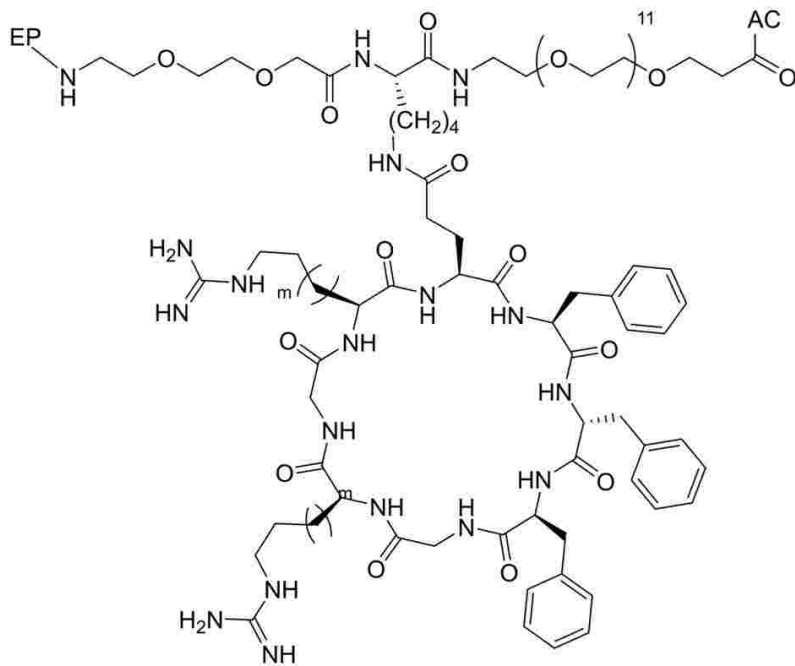
(C-2) 、

30

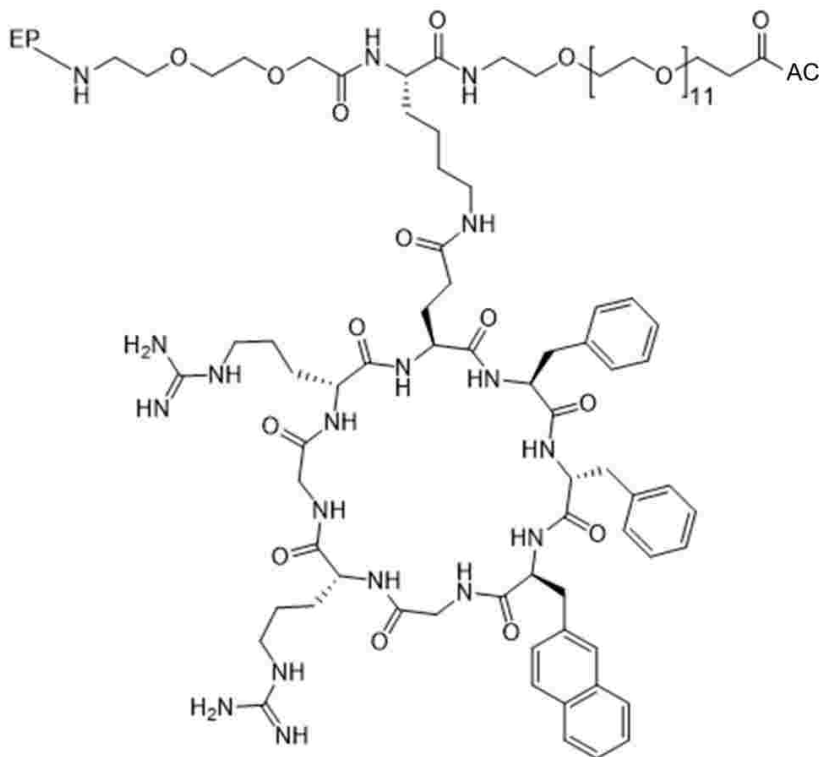
40

50

【化 1 3 4 - 2】



(C-3)、



(C-4)

の構造を含み得る。

【0 3 2 3】

上記式において、EPは環外ペプチドであり、ACは、pre-mRNA配列中のDM D遺伝子のエクソン44の少なくとも一部を含む標的配列に対して相補的である15～30ヌクレオチドの配列を有し得る。実施形態では、ACは、表6A～6Mに示されるオリゴヌクレオチド、その逆相補体、またはそれとの少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の核酸配列同一性を有する配列から選択され得る。

10

20

30

40

50

【0324】

実施形態では、本明細書に記載の化合物は、多量体を形成する。実施形態では、多量体化は、非共有結合的相互作用を介して、例えば、疎水性相互作用、イオン相互作用、水素結合または双極子-双極子相互作用によって起こる。実施形態では、化合物は、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体または九量体を形成する。実施形態では、化合物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の環状ペプチドを含む。実施形態では、化合物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のACを含む。実施形態では、化合物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のEPを含む。実施形態では、化合物は、1～10個の環状ペプチド、及び1～10個のACを含む。実施形態では、化合物は、1～10個の環状ペプチド、1～10個のAC、または1～10個のEPを含む。

10

【0325】

実施形態では、本開示の化合物は、以下の構造のうちのいずれか1つを含む。以下の化合物は例示であるにすぎず、以下の構造のうちのいずれかの中にある環状ペプチド、リンカー及びACのうちのいずれか1つが、本明細書に記載される環状ペプチド、リンカーまたはACのいずれか1つに置き換わってもよい。

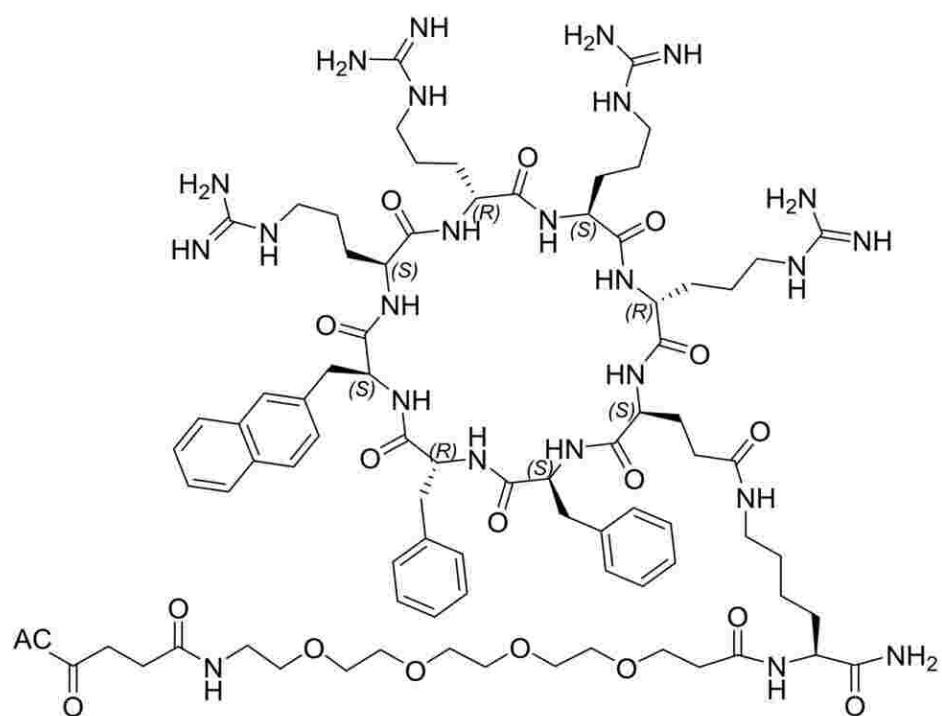
20

30

40

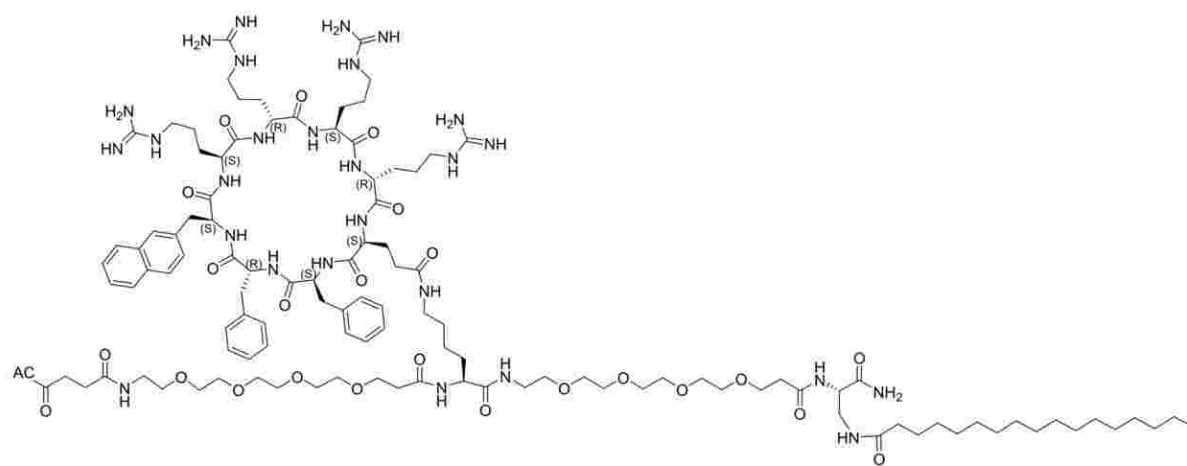
50

【化 1 3 5 - 1】



10

20

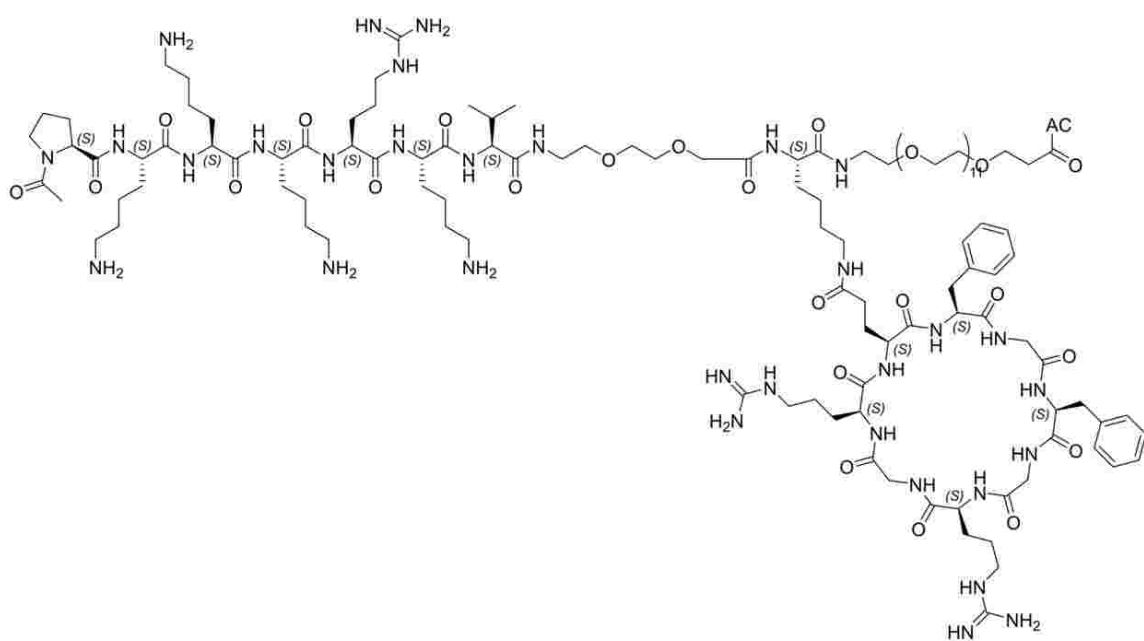
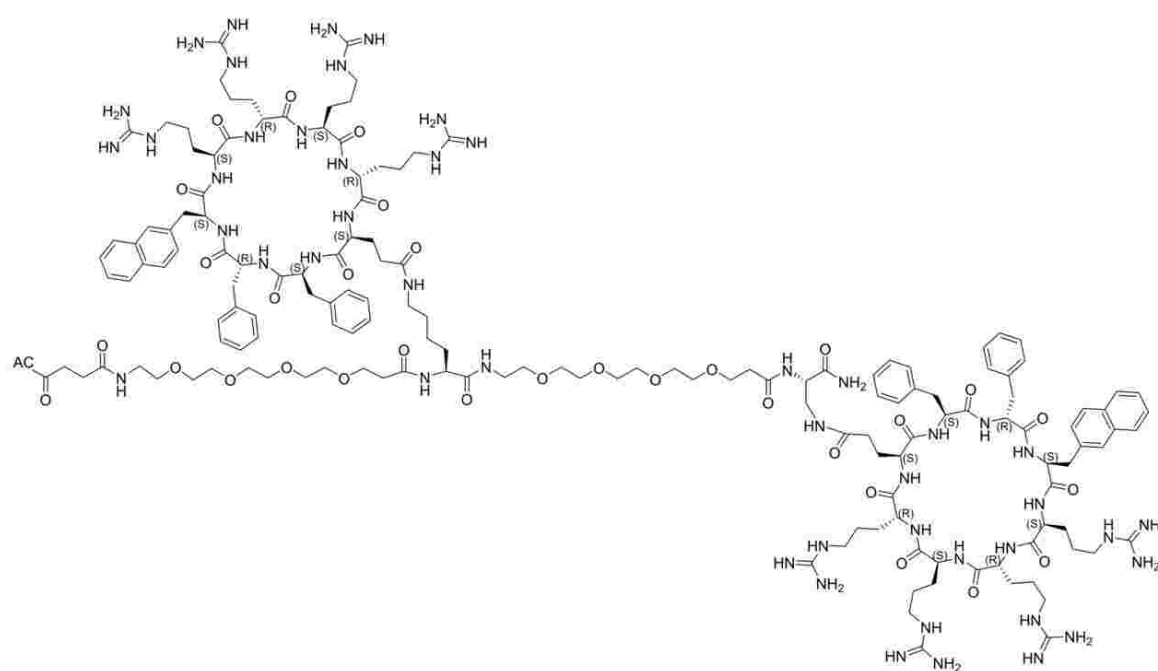


30

40

50

【化 1 3 5 - 2】



、または

10

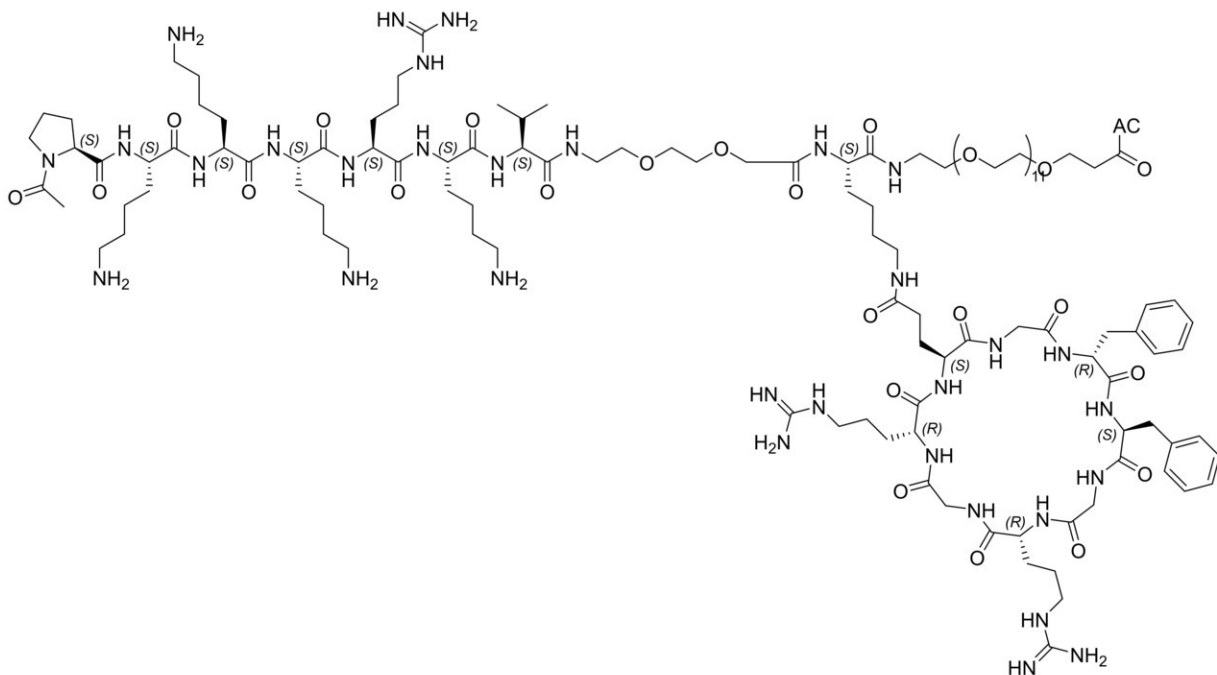
20

30

40

50

【化 1 3 5 - 3】



10

20

【0 3 2 6】

細胞質送達効率

環状細胞透過性ペプチド（c C P P）への修飾は、細胞質送達効率を改善し得る。改善された細胞質取り込み効率は、修飾配列を有するc C P Pの細胞質送達効率を対照配列と比較することによって測定することができる。対照配列は、修飾配列中の特定の置換アミノ酸残基（限定するものではないが、アルギニン、フェニルアラニン、及び／またはグリシンなど）を含まないが、それ以外の点では同一である。

【0 3 2 7】

実施形態では、環状ペプチドとA Cとを含む化合物は、A C単独を含む化合物と比較して改善された細胞質取り込み効率を有する。細胞質取り込み効率は、環状ペプチドとA Cとを含む化合物の細胞質送達効率をA C単独の細胞質送達効率と比較することによって測定することができる。

30

【0 3 2 8】

本明細書で使用される場合、細胞質送達効率は、細胞膜を横断して細胞の細胞質に入るc C P Pの能力を指す。c C P Pの細胞質送達効率は、受容体または細胞型に必ずしも依存しない。細胞質送達効率は、絶対的細胞質送達効率または相対的細胞質送達効率を指す場合がある。

【0 3 2 9】

絶対細胞質送達効率は、増殖培地中のc C P P（またはc C P P - A Cコンジュゲート）の濃度に対するc C P P（またはc C P P - A Cコンジュゲート）の細胞質ゾル濃度の比である。相対的細胞質送達効率は、細胞質ゾル中の対照c C P Pの濃度と比較した細胞質ゾル中のc C P Pの濃度を指す。定量化は、c C P Pを蛍光標識し（例えば、F I T C色素で）、当技術分野で周知の技術を用いて蛍光強度を測定することによって達成することができる。

40

【0 3 3 0】

相対的細胞質送達効率は、（i）細胞型（例えば、H e L a細胞）によって内在化された本発明のc C P Pの量を、（i i）同じ細胞型によって内在化された対照c C P Pの量と比較することによって求められる。相対的な細胞質送達効率を測定するために、細胞型は、特定の期間（例えば、3 0 分、1 時間、2 時間など）、c C P Pの存在下でインキュ

50

ベートしてもよく、その後、細胞によって内在化された c C P P の量が、当技術分野で公知の方法、例えば、蛍光顕微鏡法を用いて定量される。別個に、同じ濃度の対照 c C P P を同じ期間にわたって細胞型の存在下でインキュベートし、細胞によって内在化された対照 c C P P の量を定量する。

【0331】

相対的な細胞質送達効率は、細胞内標的に対する修飾配列を有する c C P P の I C ₅₀ を測定し、修飾配列を有する c C P P の I C ₅₀ を対照配列と比較することによって求めることができる（本明細書に記載のとおり）。

【0332】

c C P P の相対的な細胞質送達効率は、シクロ (F f Φ R r R r Q) と比較して、約 50 % から約 450 % の範囲、例えば、約 60 %、約 70 %、約 80 %、約 90 %、約 100 %、約 200 %、約 110 %、約 120 %、約 130 %、約 140 %、約 150 %、約 160 %、約 170 %、約 180 %、約 190 %、約 200 %、約 210 %、約 220 %、約 230 %、約 240 %、約 250 %、約 260 %、約 270 %、約 280 %、約 290 %、約 300 %、約 310 %、約 320 %、約 330 %、約 340 %、約 350 %、約 360 %、約 370 %、約 380 %、約 390 %、約 400 %、約 410 %、約 420 %、約 430 %、約 440 %、約 450 %、約 460 %、約 470 %、約 480 %、約 490 %、約 500 %、約 510 %、約 520 %、約 530 %、約 540 %、約 550 %、約 560 %、約 570 %、約 580 % または約 590 %（その間の全ての値及び部分範囲を含む）の範囲であり得る。c C P P の相対的な細胞質送達効率は、シクロ (F f Φ R r R r Q) を含む環状ペプチドと比較して約 600 % を超えて改善され得る。

【0333】

絶対細胞質送達効率は、約 40 % から約 100 %、例えば、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %（これらの間の全ての値及び部分範囲を含む）である。

【0334】

本開示の c C P P は、他の点では同一の配列と比較して、細胞質送達効率を、約 1.1 倍から約 30 倍、例えば、約 1.2 倍、約 1.3 倍、約 1.4 倍、約 1.5 倍、約 1.6 倍、約 1.7 倍、約 1.8 倍、約 1.9 倍、約 2.0 倍、約 2.5 倍、約 3.0 倍、約 3.5 倍、約 4.0 倍、約 4.5 倍、約 5.0 倍、約 5.5 倍、約 6.0 倍、約 6.5 倍、約 7.0 倍、約 7.5 倍、約 8.0 倍、約 8.5 倍、約 9.0 倍、約 10 倍、約 10.5 倍、約 11.0 倍、約 11.5 倍、約 12.0 倍、約 12.5 倍、約 13.0 倍、約 13.5 倍、約 14.0 倍、約 14.5 倍、約 15.0 倍、約 15.5 倍、約 16.0 倍、約 16.5 倍、約 17.0 倍、約 17.5 倍、約 18.0 倍、約 18.5 倍、約 19.0 倍、約 19.5 倍、約 20 倍、約 20.5 倍、約 21.0 倍、約 21.5 倍、約 22.0 倍、約 22.5 倍、約 23.0 倍、約 23.5 倍、約 24.0 倍、約 24.5 倍、約 25.0 倍、約 25.5 倍、約 26.0 倍、約 26.5 倍、約 27.0 倍、約 27.5 倍、約 28.0 倍、約 28.5 倍、約 29.0 倍、または約 29.5 倍（これらの間の全ての値及び部分範囲を含む）改善し得る。

【0335】

再スプライシングされた標的タンパク質

「標的タンパク質」は、標的遺伝子の転写及び翻訳の結果としてのアミノ酸配列である。「再スプライシングされた標的タンパク質」は、本明細書で使用される場合、標的遺伝子から転写された標的 p r e - m R N A に対する A C の結合の結果としてコードされるタンパク質を指す。「野生型標的タンパク質」は、野生型標的遺伝子にコードされる標的 p r e - m R N A の適切なスプライシングの結果としての、天然に存在する正確に翻訳されたタンパク質異性体を指す。本発明の化合物及び方法は、野生型標的タンパク質と比較して 1 つ以上のアミノ酸置換、欠失及び／または挿入を含有する再スプライシングされた標的タンパク質をもたらす得る。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は

、いくつかの野生型標的タンパク質活性を保持している。実施形態では、本発明の化合物の投与によって産生する再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質と相同である。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質と少なくとも50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%、及び最大100%同一であるアミノ酸配列を有する。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質と実質的に同一である。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質のアミノ酸配列は、野生型標的タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも50%同一である。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質のアミノ酸配列は、野生型標的タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも75%同一である。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質のアミノ酸配列は、野生型標的タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質の短縮された形態である。

10

【0336】

実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、標的遺伝子の転写及び翻訳に関連する疾患の1つ以上の表現型または症候を救済することができる。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、標的タンパク質の発現に関連する疾患の1つ以上の表現型または症候を救済することができる。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質の活性断片である。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質とかなり類似する様式で機能する。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、細胞が、野生型標的タンパク質を発現する類似細胞とかなり類似して機能することを、可能にする。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、標的遺伝子または標的タンパク質に関連する疾患を治癒させないが、疾患の1つ以上の症候を改善する。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、少なくとも約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%または約95%、及び最大約100%の標的タンパク質機能の改善をもたらす。

20

30

【0337】

実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質のサイズから約1個の、またはそれより多いアミノ酸、例えば、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約90、約95、約100、約105、約110、約115、約120、約125、約130、約135、約140、約145、約150、約155、約160、約165、約170、約175もしくは約180個の、またはそれより多いアミノ酸だけ減少したアミノ酸配列を有し得る。

40

【0338】

実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、標的タンパク質に比べて改善された1つ以上の特性を有し得る。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質に比べて改善された1つ以上の特性を有し得る。実施形態では、酵素の活性または安定性は、標的pre-mRNAの異なるスプライシングを促進することによって増強され得る。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、別の野生型標的タンパク質異性体と比較して改善された特性を有する野生型標的タンパク質異性体と同一であるまたはかなり類似する配列を有し得る。

【0339】

実施形態では、標的タンパク質の1つ以上の特性は、再スプライシングされた標的タン

50

パク質において存在していない（排除されている）か減少しているかのどちらかである。実施形態では、野生型標的タンパク質の1つ以上の特性は、再スプライシングされた標的タンパク質において存在していない（排除されている）か減少しているかのどちらかである。減少し得るかまたは排除され得る特性の非限定的な例としては、免疫原作用、血管形成作用、血栓形成作用、凝集作用及びリガンド結合作用が挙げられる。

【0340】

実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質と比較して1つ以上のアミノ酸置換を含有する。実施形態では、置換は、保存的置換または非保存的置換であり得る。保存的アミノ酸置換の例としては、あるアミノ酸を、以下の群の1つからの1つの中の別のアミノ酸で置換することが挙げられる：塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン及びバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）、及び小さなアミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、スレオニン及びメチオニン）。実施形態では、構造的に類似するアミノ酸を置換して残基の電荷を逆転させる（例えば、グルタミン酸をグルタミンで置換、またはその逆、アスパラギンをアスパラギン酸で置換、またはその逆）。実施形態では、チロシンによるフェニルアラニンの置換、またはその逆を行う。アミノ酸置換の他の非限定的な例は、例えば、H. Neurath and R. L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New Yorkによって記載されている。一般的な置換は、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、及びAsp/Glyである。

【0341】

実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質と比較して1つ以上の（例えば、いくつかの）位置における置換、欠失及び／または挿入を含み得る。実施形態では、再スプライシングされた標的タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸置換、欠失及び／または挿入の数は、200個以下、150個以下、100個以下、50個以下、40個以下、30個以下、20個以下、または10個以下、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個である。

【0342】

治療方法

実施形態では、本開示のACを、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）と診断される患者に、約0.1mg/kg～約1000mg/kg、例えば、中に含まれる及び間にあるあらゆる値及び範囲を含めて約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約11mg/kg、約12mg/kg、約13mg/kg、約14mg/kg、約15mg/kg、約16mg/kg、約17mg/kg、約18mg/kg、約19mg/kg、約20mg/kg、約21mg/kg、約22mg/kg、約23mg/kg、約24mg/kg、約25mg/kg、約26mg/kg、約27mg/kg、約28mg/kg、約29mg/kg、約30mg/kg、約31mg/kg、約32mg/kg、約33mg/kg、約34mg/kg、約35mg/kg、約36mg/kg、約37mg/kg、約38mg/kg、約39mg/kg、約40mg/kg、約41mg/kg、約42mg/kg、約43mg/kg、約44mg/kg、約45mg/kg、約46mg/kg、約47mg/kg、約48mg/kg、約49mg/kg、約50mg/kg、約51mg/kg、約52mg/kg、約53mg/kg、約54mg/kg、約55mg/kg、約56mg/kg

、約 57 mg/kg、約 58 mg/kg、約 59 mg/kg、約 60 mg/kg、約 61 mg/kg、約 62 mg/kg、約 63 mg/kg、約 64 mg/kg、約 65 mg/kg、約 66 mg/kg、約 67 mg/kg、約 68 mg/kg、約 69 mg/kg、約 70 mg/kg、約 71 mg/kg、約 72 mg/kg、約 73 mg/kg、約 74 mg/kg、約 75 mg/kg、約 76 mg/kg、約 77 mg/kg、約 78 mg/kg、約 79 mg/kg、約 80 mg/kg、約 81 mg/kg、約 82 mg/kg、約 83 mg/kg、約 84 mg/kg、約 85 mg/kg、約 86 mg/kg、約 87 mg/kg、約 88 mg/kg、約 89 mg/kg、約 90 mg/kg、約 91 mg/kg、約 92 mg/kg、約 93 mg/kg、約 94 mg/kg、約 95 mg/kg、約 96 mg/kg、約 97 mg/kg、約 98 mg/kg、約 99 mg/kg、約 100 mg/kg、約 110 mg/kg、約 120 mg/kg、約 130 mg/kg、約 140 mg/kg、約 150 mg/kg、約 160 mg/kg、約 170 mg/kg、約 180 mg/kg、約 190 mg/kg、約 200 mg/kg、約 210 mg/kg、約 220 mg/kg、約 230 mg/kg、約 240 mg/kg、約 250 mg/kg、約 260 mg/kg、約 270 mg/kg、約 280 mg/kg、約 290 mg/kg、約 300 mg/kg、約 310 mg/kg、約 320 mg/kg、約 330 mg/kg、約 340 mg/kg、約 350 mg/kg、約 360 mg/kg、約 370 mg/kg、約 380 mg/kg、約 390 mg/kg、約 400 mg/kg、約 410 mg/kg、約 420 mg/kg、約 430 mg/kg、約 440 mg/kg、約 450 mg/kg、約 460 mg/kg、約 470 mg/kg、約 480 mg/kg、約 490 mg/kg、約 500 mg/kg、約 510 mg/kg、約 520 mg/kg、約 530 mg/kg、約 540 mg/kg、約 550 mg/kg、約 560 mg/kg、約 570 mg/kg、約 580 mg/kg、約 590 mg/kg、約 600 mg/kg、約 610 mg/kg、約 620 mg/kg、約 630 mg/kg、約 640 mg/kg、約 650 mg/kg、約 660 mg/kg、約 670 mg/kg、約 680 mg/kg、約 690 mg/kg、約 700 mg/kg、約 710 mg/kg、約 720 mg/kg、約 730 mg/kg、約 740 mg/kg、約 750 mg/kg、約 760 mg/kg、約 770 mg/kg、約 780 mg/kg、約 790 mg/kg、約 800 mg/kg、約 810 mg/kg、約 820 mg/kg、約 830 mg/kg、約 840 mg/kg、約 850 mg/kg、約 860 mg/kg、約 870 mg/kg、約 880 mg/kg、約 890 mg/kg、約 900 mg/kg、約 910 mg/kg、約 920 mg/kg、約 930 mg/kg、約 940 mg/kg、約 950 mg/kg、約 960 mg/kg、約 970 mg/kg、約 980 mg/kg、約 990 mg/kg または約 1000 mg/kg の用量で投与する。

10

20

30

40

50

【0343】

本開示は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の治療を、それを必要とする対象において行う方法であって、本明細書に開示される化合物を投与することを含む、当該方法を提供する。実施形態では、標的遺伝子は DMD である。実施形態では、標的配列は、DMD のエクソン 44 の少なくとも一部、DMD のエクソン 44 に隣接する 3'イントロンの少なくとも一部、DMD のエクソン 44 に隣接する 5'イントロンの少なくとも一部、またはその組み合わせを含む。

【0344】

様々な実施形態において、治療は、対象における 1 つ以上の症候の部分的または完全な軽減、改善、緩和、抑制、発症の遅延、重症度及び／または発生率の低減を指す。

【0345】

実施形態では、標的遺伝子の発現を変化させることを、それを必要とする対象において行う方法であって、本明細書に開示される化合物を投与することを含む、当該方法が提供される。実施形態では、治療は、標的タンパク質の発現の低下をもたらす。実施形態では、治療は、再スプライシングされた標的タンパク質の発現をもたらす。実施形態では、治療は、野生型標的タンパク質異性体の優先的発現をもたらす。

【0346】

実施形態では、本開示による治療の結果として、対象における標的タンパク質の発現は、治療前の対象での、または類似疾患を治療されずに有する1名以上の対照個体の、標的タンパク質の平均レベルと比較して、約5%超、例えば、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%及び約100%だけ減少する。実施形態では、本開示による治療の結果として、対象における再スプライシングされた標的タンパク質の発現は、治療前の対象での、または類似疾患を治療されずに有する1名以上の対照個体の、標的タンパク質の平均レベルと比較して、約5%超、例えば、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%及び約100%だけ増加する。実施形態では、本開示による治療の結果として、対象における野生型標的タンパク質異性体の発現は、治療前の対象での、または類似疾患を治療されずに有する1名以上の対照個体の、標的タンパク質の平均レベルと比較して、約5%超、例えば、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%及び約100%だけ増加または減少する。

10

【0347】

「改善する」、「増加する」、「低減する」、「減少させる」という用語、及び類似する用語は、本明細書で使用される場合、対照に対する相対的な値を指している。実施形態では、好適な対照は、ベースライン測定値、例えば、本明細書に記載の治療を開始する前の同じ個体での測定値、または本明細書に記載の治療の非存在下にある対照個体（または複数の対照個体）での測定値である。「対照個体」は、（治療個体及び対照個体（複数可）において疾患のステージが同程度であることを保証するために）治療される個体とほぼ同じ年齢及び／または性別を有する、疾患を患っている個体である。

20

【0348】

治療される個体（「患者」または「対象」とも呼称される）は、疾患を有するか、または疾患を発症する可能性を有する、個体（胎児、乳児、小児、青年または成人のヒト）である。個体は、異常な遺伝子発現または異常な遺伝子スプライシングによって媒介される疾患を有し得る。様々な実施形態において、疾患を有する個体は、疾患を患っていない個体での正常なタンパク質発現または活性レベルの約1%～99%である野生型標的タンパク質発現または活性レベルを有し得る。実施形態では、当該範囲は、限定はされないが、正常なチミジンホスホリラーゼ発現または活性レベルの約80～99%、約65～80%、約50～65%、約30～50%、約25～30%、約20～25%、約15～20%、約10～15%、約5～10%、または約1～5%を含む。実施形態では、個体は、正常な野生型標的タンパク質発現または活性レベルよりも約1%～約500%高い標的タンパク質発現または活性レベルを有し得る。実施形態では、当該範囲は、限定はされないが、約1～10%、約10～50%、約50～100%、約100～200%、約200～300%、約300～400%、約400～500%、または約500～1000%高い標的タンパク質発現または活性レベルを含む。

30

40

【0349】

実施形態では、個体は、疾患を有することを最近診断された個体である。典型的に、疾患の影響を最小限に抑えるため及び治療の利益を最大限にするためには早期治療（診断後に可能な限り早く開始される治療）が重要である。

【0350】

実施形態では、DMDに対する本開示の化合物及びACの有効性は、DMDの動物モデルにおいて評価される。動物モデルは、疾患の発病機序を研究するための貴重な資源であり、ジストロフィン関連の活性を試験するための手段を提供する。実施形態では、共にジストロフィン陰性のものである、mdxマウス及びゴールドンレトリバー筋ジストロフィー（GRMD）イヌ（例えば、Collins & Morgan, Int J Exp

50

Pathol 84:165-172, 2003 参照)を利用して、本開示の化合物を評価する。実施形態では、C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J (BL10/mdx)、またはD2.B10-Dmdmdx/J (D2/mdx) マウスモデルを利用して本開示の化合物を評価する。実施形態では、ヒトDMD遺伝子を保有しておりマウスDmd遺伝子を欠いているトランスジェニックマウス(hDMD/Dmdヌルマウス)を使用して、本開示の化合物を評価する。このマウスは、雄のhDMDマウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME から入手可能)を雌のDMDヌルマウスと交雑することによって作出することができる。以下の参考文献の各々は、これらのモデルについて記載しており、参照によりそれらの全体が本明細書に援用される: J Neuromuscul Dis. 2018; 5(4):407-417.、Proc Natl Acad Sci U S A. 1984; 81(4):1189-92.、Am J Pathol. 2010; 176(5):2414-24.、J Clin Invest. 2009; 119(12):3703-12、国際公開第WO2019014772号。これら及び他の動物モデルを使用して様々なジストロフィンタンパク質の機能活性を測定することができる。

10

【0351】

実施形態では、インビトロモデルを使用して本開示の組成物の有効性を評価する。実施形態では、インビトロモデルは、不死化筋細胞モデルである。このモデルは、参照により全体が本明細書に援用される以下の論文に記載されている: Nguyen et al. J Pers Med. 2017 Dec; 7(4):13.

20

【0352】

製造方法

本明細書に記載の化合物は、有機合成の当業者に公知の様々な方法、または当業者によって理解されるようなその変形で調製することができる。本明細書に記載される化合物は、容易に入手可能な出発物質から調製することができる。最適な反応条件は、使用される特定の反応物または溶媒によって変化し得るが、当業者は、このような条件を決定することができる。

【0353】

本明細書に記載される化合物の変形は、各化合物について記載されるような種々の構成要素の付加、除去、または移動を含む。同様に、1つ以上のキラル中心が分子中に存在する場合、分子のキラリティを変化させることができる。更に、化合物の合成は、種々の化学基の保護及び脱保護を含み得る。当業者は、保護及び脱保護の使用、並びに適切な保護基の選択を決定することができる。保護基の化学は、例えば、Wuts and Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Ed., Wiley & Sons, 2006に見出すことができ、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0354】

本開示の化合物及び組成物を調製する際に使用される出発材料及び試薬は、アルドリッチ化学コーポレーション(ミルウォーキー、ウィスコンシン州)、アクロスオーガニクス(モリス・ブレインズ、ニュージャージー州)、フィッシャーサイエンティフィック(ピッツバーグ、ペンシルベニア州)、シグマ(セントルイス、ミズーリ州)、ファイザー(ニューヨーク、ニューヨーク州)、グラクソ・スミスクライン(ローリー、ノースカロライナ州)、メルク(ホワイトハウス駅、ニュージャージー州)、ジョンソン・エンド・ジョンソン(ニューブランズウィック、ニュージャージー州)、アベンティス(ブリッジウォーター、ニュージャージー州)、アストラゼネカ(ウィルミントン、デラウェア州)、ノバルティス社(バーゼル、スイス)、ワイエス(マディソン、ニュージャージー州)、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ社(ニューヨーク、ニューヨーク州)、ロシュ(バーゼル、スイス)、リリー(インディアナポリス、インディアナ州)、アボット(アボットパーク、イリノイ州)、シェーリング・プラウ(ケニルワース、ニュージャージー州)、もしくはベーリンガーインゲルハイム(インゲルハイム、ドイツ)などの商業的供給業者

40

50

から入手可能であるか、または Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Volumes 1-17 (John Wiley and Sons, 1991)、Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Volumes 1-5 and Supplementals (Elsevier Science Publishers, 1989)、Organic Reactions, Volumes 1-40 (John Wiley and Sons, 1991)、March's Advanced Organic Chemistry, (John Wiley and Sons, 4th Edition)、及び Larock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989) などの参考文献に記載される手順に従って当業者に公知の方法によって調製されるかのいずれかである。本明細書に開示される医薬担体などの他の材料は、商業的供給源から得ることができる。

10

【0355】

本明細書に記載の化合物を生成するための反応は、有機合成の当業者によって選択され得る溶媒中で行うことができる。溶媒は、反応が行われる条件、すなわち、温度及び圧力下で、出発物質（反応物）、中間体、または生成物と実質的に非反応性であり得る。反応は、1種の溶媒または2種以上の溶媒の混合物中で行うことができる。生成物または中間体の形成は、当技術分野で公知の任意の適切な方法に従ってモニタリングすることができる。例えば、生成物の形成は、分光学的手段、例えば、核磁気共鳴分光法（例えば、 ^1H または ^{13}C ）赤外分光法、分光光度法（例えば、UV-可視）、または質量分析によって、あるいはクロマトグラフィー、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）または薄層クロマトグラフィーによってモニタリングすることができる。

20

【0356】

本開示の化合物は、アミノ酸 α -N 末端が酸または塩基保護基によって保護される固相ペプチド合成によって調製することができる。そのような保護基は、成長中のペプチド鎖の破壊またはその中に含まれるキラル中心のいずれかのラセミ化を伴うことなく容易に除去することが可能でありながら、ペプチド結合形成の条件に対して安定であるという特性を有するべきである。好適な保護基は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)、*t*-ブチルオキシカルボニル (Boc)、ベンジルオキシカルボニル (Cbz)、ビフェニルイソプロピルオキシカルボニル、*t*-アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、 α , α -ジメチル-3, 5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、*o*-ニトロフェニルスルフェニル、2-シアノー-*t*-ブチルオキシカルボニルなどである。9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 保護基は、本開示の化合物の合成に特に好ましい。他の好ましい側鎖保護基は、リジン及びアルギニンのような側鎖アミノ基については、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル (pmc)、ニトロ、*p*-トルエンスルホニル、4-メトキシベンゼンスルホニル、Cbz、Boc、及びアダマンチルオキシカルボニルであり、チロシンについては、ベンジル、*o*-プロモベンジルオキシカルボニル、2, 6-ジクロロベンジル、イソプロピル、*t*-ブチル (*t*-Bu)、シクロヘキシル、シクロペンチル及びアセチル (Ac) であり、セリンについては、*t*-ブチル、ベンジル及びテトラヒドロピラニルであり、ヒスチジンについては、トリチル、ベンジル、Cbz、*p*-トルエンスルホニル及び2, 4-ジニトロフェニルであり、トリプトファンについては、ホルミルであり、アスパラギン酸及びグルタミン酸については、ベンジル及び *t*-ブチルであり、システインについては、トリフェニルメチル (トリチル) である。固相ペプチド合成法において、 α -C 末端アミノ酸は、適切な固体支持体または樹脂に結合される。上記の合成に有用な適切な固体支持体は、段階的縮合-脱保護反応の試薬及び反応条件に対して不活性であり、かつ、使用される媒体に不溶性である材料である。 α -C-末端カルボキシペプチドの合成のための固体支持体は、アブライド・バイオシステムズ（フォスターシティ、カリフォルニア州）から入手可能な4-ヒドロキシメチルフェノキシメチル-コポリ（スチレン-1%ジビニルベンゼン）

30

40

50

または4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)フェノキシアセトアミドエチル樹脂である。 α -C-末端アミノ酸は、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)またはO-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート(HBTU)を用いて、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート(BOP)またはビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィンクロリド(BOPCl)を用いてまたは用いずに、ジクロロメタンまたはDMFなどの溶媒中、10℃~50℃の温度で約1から約24時間、媒介カップリングにより樹脂にカップリングされる。固体支持体が4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)フェノキシアセトアミドエチル樹脂である場合、Fmoc基は、上記のように α -C-末端アミノ酸とカップリングする前に、第二級アミン、好ましくはピペリジンで切断される。脱保護された4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)フェノキシアセトアミドエチル樹脂へのカップリングのための1つの方法は、DMF中のO-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート(HBTU、1当量)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT、1当量)である。連続する保護アミノ酸のカップリングは、自動ポリペプチド合成装置で行うことができる。一例において、成長するペプチド鎖のアミノ酸における α -N末端は、Fmocで保護される。成長するペプチドの α -N末端側からのFmoc保護基の除去は、第二級アミン、好ましくはピペリジンでの処理によって達成される。次いで、各保護アミノ酸を約3倍モル過剰で導入し、カップリングを好ましくはDMF中で実施する。カップリング剤は、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート(HBTU、1当量)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT、1当量)であり得る。固相合成の最後に、連続的にあるいは単一の操作でポリペプチドを樹脂から除去し、脱保護する。ポリペプチドの除去及び脱保護は、樹脂に結合したポリペプチドを、チオアニソール、水、エタンジチオール及びトリフルオロ酢酸を含む切断試薬で処理することによって、単一の操作で達成され得る。ポリペプチドの α -C-末端がアルキルアミドである場合、樹脂は、アルキルアミンによるアミノリシスによって切断される。あるいは、ペプチドは、例えば、メタノールとのエステル交換と、それに続くアミノ分解または直接アミド交換によって除去することができる。保護されたペプチドは、この時点で精製することができ、または次の工程に直接持ち込むことができる。側鎖保護基の除去は、上記の切断カクテルを用いて達成することができる。完全に脱保護されたペプチドは、以下のタイプのいずれかまたは全てを用いる一連のクロマトグラフィー工程によって精製することができる。弱塩基性樹脂(アセテート形態)によるイオン交換、誘導体化されていないポリスチレン-ジビニルベンゼン(例えば、Amberlite XAD)による疎水性吸着クロマトグラフィー、シリカゲル吸着クロマトグラフィー、カルボキシメチルセルロースによるイオン交換クロマトグラフィー、例えば、Sephadex G-25、LH-20または向流分配による分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、特にオクチルまたはオクタデシルシリル-シリカ結合相カラム充填剤による逆相HPLC。

【0357】

上記ポリマー、例えばPEG基は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために用いられる任意の好適な条件の下で、ACに結合され得る。PEG部分上の反応性基(例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミドまたはヒドラジノ基)によるAC上の反応性基(例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミドまたはヒドラジノ基)に対するアクリル化、還元的アルキル化、マイケル付加、チオールアルキル化または他の化学選択的コンジュゲーション/ライゲーション法を介する手段を含めた、当技術分野で知られている任意の手段を用いることができる。水溶性ポリマーを1つ以上のタンパク質に連結するために使用でき

10

20

30

40

50

る活性化基としては、スルホン、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフラート、トレシラート、アジリジン、オキシラン、5-ピリジル、及びアルファ-ハロゲン化アシル基（例えば、 α -ヨード酢酸、 α -ブロモ酢酸、 α -クロロ酢酸）が挙げられるが、これらに限定されない。還元的アルキル化によってACに結合させる場合に選択されるポリマーは、重合度が制御されるように単一の反応性アルデヒドを有していなければならない。例えば、Kinstler et al., Adv. Drug Delivery Rev. 54: 477-485 (2002)、Roberts et al., Adv. Drug Delivery Rev. 54: 459-476 (2002)、及びZalipsky et al., Adv. Drug Delivery Rev. 16: 157-182 (1995)を参照されたい。

10

【0358】

CPPにACを直接共有結合で連結するためには、CPPの適切なアミノ酸残基を、アミノ酸の選択された側鎖またはNもしくはC末端と反応する能力を有する有機誘導体化剤と反応させてもよい。ペプチドまたはコンジュゲート部分上の反応性基としては、例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミドまたはヒドラジノ基が挙げられる。誘導体化剤には、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介するコンジュゲーション）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、または当技術分野で知られている他の薬剤が含まれる。

20

【0359】

オリゴマーアンチセンス化合物を合成する方法は、当技術分野で既知である。本開示は、ACを合成する方法に限定されない。実施形態では、例えばホスホジエステル及びホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含めたヌクレオシド間結合を形成するのに有用な反応性リン基を有する化合物を、本明細書に提供する。前駆体またはアンチセンス化合物を調製及び／または精製する方法は、本明細書に提供される組成物または方法の限定ではない。DNA、RNA及びアンチセンス化合物を合成及び精製する方法は、当業者によく知られている。

【0360】

修飾及び非修飾ヌクレオシドのオリゴマー化は、DNA (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) 及び／またはRNA (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait et al., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo et al., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713) に関する文献手順に従って慣例的に実施され得る。

30

【0361】

本明細書に提供されるアンチセンス化合物は、固相合成のよく知られている技術によって簡便かつ慣例的に作ることができる。そのような合成のための機器は、いくつかの供給業者、例えば、Applied Biosystems (Foster City, CA) によって販売されている。当技術分野で知られている他の任意のそのような合成のための手段を更にまたは代わりに採用してもよい。ホスホロチオエート及びアルキル化誘導体などのオリゴヌクレオチドを調製するために類似する技術を用いることは、よく知られている。本発明は、アンチセンス化合物合成の方法によって限定されない。

40

【0362】

オリゴヌクレオチド精製及び分析の方法は当業者に知られている。分析方法としては、キャピラリー電気泳動 (CE) 及びエレクトロスプレー質量分析が挙げられる。そのような合成及び分析方法は、マルチウェルプレートにおいて実施され得る。本発明の方法は、オリゴマー精製の方法によって限定されない。

【0363】

50

投与方法

本開示の化合物及びそれらを含む組成物のインビボ適用は、当業者に現在または将来的に知られる任意の適切な方法及び技術によって達成することができる。例えば、本開示の化合物は、生理学的または薬学的に許容される形態で製剤化され、例えば、経口及び非経口投与経路などの当技術分野で公知の任意の好適な経路を介して投与され得る。本明細書で使用される場合、非経口という用語は、注射などによる、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内及びクモ膜下腔内投与を含む。本開示の化合物または組成物の投与は、単回投与であってもよく、または当業者によって容易に決定され得るような連続的なもしくは異なる間隔をおいたものであってもよい。

【0364】

本明細書に開示される化合物及びそれらを含む組成物は、リポソーム技術、徐放性カプセル、埋め込み型ポンプ及び生分解性容器を利用して投与することもできる。これらの送達方法は、有利なことに、長期間にわたって均一な投与量を提供することができる。本化合物はまた、それらの塩誘導体形態または結晶形態で投与され得る。

【0365】

本明細書に開示される化合物は、薬学的に許容される組成物を調製するための既知の方法に従って製剤化することができる。製剤化は、周知であり、当業者が容易に入手することができるいくつかの情報源に詳細に記載されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Science by E. W. Martin (1995) は、本開示の方法に関連して使用され得る製剤化について記載する。一般に、本明細書に開示される化合物は、本化合物の有効な投与を容易にするために、有効量の本化合物が適切な担体と組み合わせられるように製剤化することができる。使用される組成物はまた、様々な形態であり得る。これらとしては、例えば、固体、半固体、及び液体の投薬形態、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液体溶液または懸濁液、坐剤、注射可能及び注入可能な溶液、並びにスプレーが挙げられる。好ましい形態は、意図される投与様式及び治療用途に依存する。本組成物はまた、好ましくは、当業者に公知である従来の薬学的に許容されるキャリア及び希釈剤を含む。本化合物と共に使用するための担体または希釈剤の例としては、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、アルミナ、デンプン、生理食塩水、並びに同等の担体及び希釈剤が挙げられる。所望の治療処置のためのそのような投与量の投与を可能にするために、本明細書に開示される組成物は、有利には、担体または希釈剤を含む組成物全体の重量に基づいて、1つ以上の主題の化合物の総量を、約0.1重量%～100重量%含むことができる。

【0366】

投与に適した製剤としては、例えば、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び製剤を対象とするレシピエントの血液と等張にする溶質を含有し得る水性滅菌注射溶液、並びに懸濁化剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性滅菌懸濁液が挙げられる。製剤は、単位用量または複数用量容器、例えば、密封アンプル及びバイアルで提供することができ、使用前に滅菌液体担体（例えば、注射用水）の状態にするだけでよいフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存することができる。即時注射溶液及び懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、錠剤などから調製することができる。先に特に言及した成分に加えて、本明細書に開示される組成物は、問題の製剤の種類を考慮して、当技術分野で標準的な他の薬剤を含み得ることを理解されたい。

【0367】

本明細書に開示される化合物、及びそれらを含む組成物は、細胞との直接接触、または担体手段のいずれかを介して細胞に送達され得る。化合物及び組成物を細胞に送達するための担体手段は、当該分野で公知であり、例えば、リポソーム部分中に組成物をカプセル化することを含む。本明細書に開示される化合物及び組成物を細胞に送達するための別の手段は、標的細胞への送達のために標的化されるタンパク質または核酸に化合物を結合させることを含む。米国特許第6,960,648号及び米国特許出願公開第20030032594号及び同第20020120100号は、別の組成物に結合させることができ

10

20

30

40

50

、その組成物が生体膜を横切って移行することを可能にするアミノ酸配列を開示している。米国特許出願公開第20020035243号にはまた、細胞内送達のために細胞膜を横切って生物学的部分を輸送するための組成物が記載されている。化合物はポリマーに組み込むこともでき、その例としては、頭蓋内腫瘍用のポリ(D-Lラクチド-コ-グリコリド)ポリマー、20:80のモル比のポリ[ビス(p-カルボキシフェノキシ)プロパン:セバシン酸](GLIADELにおいて使用される)、コンドロイチン、キチン、及びキトサンが挙げられる。

【0368】

本明細書に開示される化合物及び組成物は、その薬学的に許容される塩またはプロドラッグを含めて、注入または注射によって静脈内、筋肉内、または腹腔内に投与することができる。活性薬剤またはその塩の溶液は、水中で調製することができ、任意選択で、非毒性界面活性剤と混合することができる。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、及びそれらの混合物中、並びに油中で調製することができる。保存及び使用の通常の条件下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含有し得る。

【0369】

注射または注入に適した医薬剤形は、活性成分を含む滅菌水溶液もしくは分散液または滅菌粉末を含み得、これらは、滅菌注射用または注入用の溶液または分散液の即時調製に適合され、任意選択でリポソーム中にカプセル化される。最終的な剤形は、滅菌され、流動性であり、製造及び貯蔵の条件下で安定であるべきである。液体担体またはビヒクルは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステル、及びそれらの適切な混合物を含む溶媒または液体分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、リポソームの形成によって、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持によって、または界面活性剤の使用によって維持することができる。任意選択で、微生物の活動の防止は、種々の他の抗菌剤及び抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど）によってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖、緩衝剤または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによってもたらされ得る。

【0370】

滅菌注射用溶液は、本明細書に開示される化合物及び／または薬剤を、必要な量で、上に記に列挙される種々の他の成分と共に適切な溶媒中に組み込み、必要に応じて、その後濾過滅菌することによって調製される。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥法及び凍結乾燥法であり、これにより、活性成分に加えて、先に滅菌濾過された溶液中に存在する任意の更なる所望の成分の粉末が得られる。

【0371】

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

【0372】

本組成物の投与のための用量範囲は、症状または障害に作用する所望の効果をもたらすのに十分な量である。投与量は、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応などの有害な副作用を引き起こすほど多くすべきではない。一般に、投与量は、患者の年齢、状態、性別及び疾患の程度によって異なり、当業者が決定することができる。投与量は、何らかの禁忌がある場合には個々の医師が調整することができる。投与量は変動する場合があります、1日1回以上の投与で、1日または数日間投与することができる。

【0373】

薬学的に許容される担体と組み合わせて本明細書に開示される化合物を含む医薬組成物

10

20

30

40

50

も開示される。ある量の化合物を含む、経口、局所または非経口投与に適合した医薬組成物は、好ましい態様を構成する。患者、特にヒトに投与される用量は、致死毒性を伴わずに、好ましくは許容可能なレベル以下の副作用または病的状態を引き起こすことなく、妥当な時間枠にわたって患者において治療応答を達成するのに十分でなければならない。当業者は、投与量が、対象の状態（健康）、対象の体重、もしあれば併用治療の種類、治療の頻度、治療可能比、並びに病理学的状態の重症度及びステージなどの様々な因子に依存することを理解するであろう。

【0374】

1つ以上の容器の中に本明細書に開示される化合物を含むキットも開示される。本開示のキットは、薬学的に許容される担体及び／または希釈剤を任意選択で含み得る。一実施形態では、キットは、本明細書に記載される1つ以上の他の成分、補助剤、またはアジュバントを含む。別の実施形態では、キットは、本明細書に記載される薬剤などの1つ以上の抗がん剤を含む。一実施形態では、キットは、キットの化合物または組成物を投与する方法を記載する説明書または包装材料を含む。キットの容器は、任意の適切な材料、例えば、ガラス、プラスチック、金属などからなるものであってもよく、任意の好適なサイズ、形状、または構成のものである。一実施形態では、本明細書に開示される化合物及び／または薬剤は、錠剤、丸剤、または粉末形態などの固体の形でキットの中に設けられる。別の実施形態では、本明細書に開示される化合物及び／または薬剤は、液体または溶液の形でキットの中に設けられる。一実施形態では、キットは、本明細書に開示される化合物及び／または薬剤を液体または溶液の形態で含有するアンプルまたはシリンジを含む。

【0375】

本発明の複数の実施形態を記載してきた。それにもかかわらず、様々な改変が、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなくなされ得ることは、理解されよう。したがって、他の実施形態は以下の特許請求の範囲に含まれる。

【0376】

特定の定義

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「組成物（a composition）」への言及は、2個以上のそのような組成物の混合物を含み、「薬剤（an agent）」への言及は、2個以上のそのような薬剤の混合物を含み、「成分（the component）」への言及は、2個以上のそのような成分の混合物を含む、などである。

【0377】

「約」という用語は、それが数値の直前にある場合は、ある範囲（例えば、その値のプラスまたはマイナス10%）を意味する。本開示の文脈がそうでないことを示さない限り、またはそのような解釈と矛盾しない限り、例えば、「約50」は45から55を意味する場合があります。「約25,000」は22,500から27,500を意味する場合があります。などである。例えば、「約49、約50、約55、...」などの数値のリストにおいて、「約50」は、先行する値と後続の値との間の間隔の半分未満に及ぶ範囲、例えば、49.5超～52.5未満を意味する。更に、「約」値未満または「約」値より大きいという語句は、本明細書で提示される「約」という用語の定義を考慮して理解されるべきである。同様に、一連の数値または値の範囲に先行する場合の「約」という用語（例えば、「約10、20、30」または「約10～30」）は、それぞれ、一連の値の全て、または範囲の終点を指す。

【0378】

本明細書で使用される場合、「環状細胞透過性ペプチド」または「cCPP」という用語は、アンチセンスの送達を促進するペプチドを指す。

【0379】

「miniPEG」、「PEG2」及び「AEEA」という用語は、2-[2-[2-アミノエトキシ]エトキシ]酢酸を指すために本明細書で互換的に使用される。

【0380】

本明細書で使用される場合、「エンドソーム脱出ビヒクル」(EEV)という用語は、化学結合(すなわち、共有結合または非共有相互作用)によってリンカー及び／または環外ペプチド(EP)にコンジュゲートされたcCPPを指す。EEVは、式(B)のEEVであり得る。

【0381】

本明細書で使用される場合、「EEVコンジュゲート」という用語は、化学結合(すなわち、共有結合または非共有相互作用)によってACにコンジュゲートされた、本明細書で定義されるエンドソーム脱出ビヒクルを指す。ACは、EEVによって細胞内に送達され得る。EEV-コンジュゲートは、式(C)のEEV-コンジュゲートであり得る。

10

【0382】

本明細書で使用される場合、「環外ペプチド」(EP)及び「調節ペプチド」(MP)という用語は、本明細書で開示される環状細胞透過性ペプチド(cCPP)にコンジュゲートされ得るペプチド結合によって連結された2個以上のアミノ酸残基を指すために互換的に使用され得る。EPは、本明細書に開示される環状ペプチドにコンジュゲートされた場合、本化合物の組織分布及び／または保持を変化させ得る。典型的には、EPは、少なくとも1個の正に荷電したアミノ酸残基、例えば、少なくとも1個のリジン残基及び／または少なくとも1個のアルギニン残基を含む。EPの非限定的な例は本明細書に記載されている。EPは、当技術分野において「核局在化配列」(NLS)として同定されているペプチドであり得る。核局在化配列の非限定的な例としては、その最小機能単位が7個のアミノ酸配列PKKKRKVであるSV40ウイルスのラージT抗原の核局在化配列、配列NLSKRPAAIKKAGQAKKKKを有するヌクレオプラスミンバイパーティットNLS、アミノ酸配列PAAKRVKLDまたはRQRRNELKRSFを有するc-myc核局在化配列、インポーチン-アルファ由来のIBBDメインの配列RMRKFKNKGKDTAELRRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV、筋腫タンパク質の配列VSRKRPRP及びPPKKARE、ヒトp53の配列PQPKKKPL、マウスc-abl-IVの配列SALIKKKKKMAP、インフルエンザウイルスNS1の配列DRLRR及びPKQKKRK、肝炎ウイルスデルタ抗原の配列RKLKKKKIKKL及びマウスMx1タンパク質の配列REKKKKFLKRR、ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの配列KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK、及びステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイドの配列RKCQLQAGMNLARKTKK、が挙げられる。国際公開第2001/038547号には、NLSの追加の例が記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0383】

本明細書で使用される場合、「リンカー」または「L」は、1つ以上の部分(例えば、環外ペプチド(EP)及びACを、環状細胞透過性ペプチド(cCPP)に共有結合させる部分を指す。リンカーは、天然または非天然のアミノ酸またはポリペプチドを含み得る。リンカーは、cCPPをACに結合させ、それによって本明細書に開示される化合物を形成するのに適した2個以上の適切な官能基を含有する合成化合物であり得る。リンカーは、ポリエチレングリコール(PEG)部分を含み得る。リンカーは、1つ以上のアミノ酸を含み得る。cCPPは、リンカーを介してACに共有結合され得る。

40

【0384】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、複数の連結されたヌクレオチドまたはヌクレオシドを含むオリゴマー化合物を指す。オリゴヌクレオチドの1つ以上のヌクレオチドを修飾することができる。オリゴヌクレオチドは、リボ核酸(RNA)またはデオキシリボ核酸(DNA)を含み得る。オリゴヌクレオチドは、天然及び／または修飾核酸塩基、糖及び共有ヌクレオシド間結合から構成され得、更に非核酸結合体を含み得る。

【0385】

「ペプチド」、「タンパク質」、及び「ポリペプチド」という用語は、一方のアミノ酸

50

のカルボキシル基が他方のアミノ酸のアルファアミノ基に連結した2個以上のアミノ酸を含む天然または合成分子を指すために互換的に使用される。2個以上のアミノ酸残基は、一方のアミノ酸のカルボキシル基によって α アミノ基に連結され得る。ポリペプチドの2個以上のアミノ酸は、ペプチド結合によって連結され得る。ポリペプチドは、2個以上のアミノ酸がペプチド結合以外の結合によって共有結合しているペプチド骨格修飾を含み得る。ポリペプチドは、1つ以上の非天然アミノ酸、アミノ酸類似体、またはポリペプチドに組み込むことができる他の合成分子を含み得る。ポリペプチドという用語は、天然に存在するアミノ酸及び人工的に存在するアミノ酸を含む。ポリペプチドという用語は、例えば、約2から約100個のアミノ酸残基を含むペプチド、並びに、約100個を超えるアミノ酸残基または約1000個を超えるアミノ酸残基、例えば、限定するものではないが、抗体、酵素、受容体、可溶性タンパク質などの治療用タンパク質などのタンパク質を含む。

10

【0386】

「治療用ポリペプチド」という用語は、治療的、予防的または他の生物学的活性を有するポリペプチドを指す。治療用ポリペプチドは、任意の適切な様式で產生することができる。例えば、治療用ポリペプチドは、天然に存在する環境から単離もしくは精製することができ、化学的に合成することができ、組換えにより產生させることができ、またはそれらの組合せであり得る。

【0387】

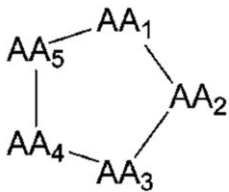
「小分子」という用語は、薬理活性及び約2000ダルトン未満、または約1000ダルトン未満、または約500ダルトン未満の分子量を有する有機化合物を指す。小分子治療薬は、典型的には化学合成によって製造される。

20

【0388】

本明細書で使用される場合、「隣接する」という用語は、共有結合によって接続されている2個のアミノ酸を指す。例えば、

【化136】



30

などの代表的な環状細胞透過性ペプチド(cCPP)との関連において、 AA_1/AA_2 、 AA_2/AA_3 、 AA_3/AA_4 、及び AA_5/AA_1 は、隣接アミノ酸の対を例示する。

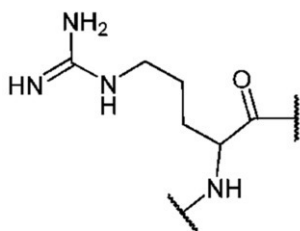
【0389】

化学種の残基は、本明細書で使用する場合、特定の生成物中に存在する化学種の誘導体を指す。生成物を形成するために、化学種の少なくとも1つの原子は、生成物が化学種の誘導体または残基を含有するように、別の部分への結合によって置き換えられる。例えば、本明細書に記載される環状細胞透過性ペプチド(cCPP)は、1つ以上のペプチド結合の形成を介してその中に組み込まれたアミノ酸(例えば、アルギニン)を有する。cCPPに組み込まれるアミノ酸を、残基、または単にアミノ酸と呼ぶ場合がある。したがって、アルギニンまたはアルギニン残基は、

40

50

【化 1 3 7】



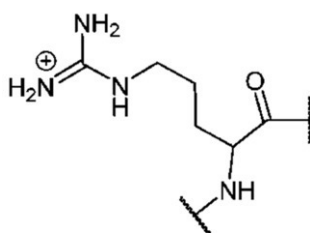
10

を指す。

【0 3 9 0】

「そのプロトン化形態」という用語は、アミノ酸のプロトン化形態を指す。例えば、アルギニンの側鎖上のグアニジン基は、プロトン化されてグアニジニウム基を形成し得る。アルギニンのプロトン化形態の構造は、

【化 1 3 8】



20

である。

【0 3 9 1】

本明細書で使用される場合、「キラリティ」という用語は、原子の3次元空間配置が異なる2つ以上の立体異性体を有する分子をいい、ここで、一方の立体異性体は、他方の重ね合わせることができない鏡像である。グリシンを除くアミノ酸は、カルボキシル基に隣接するキラル炭素原子を有する。「エナンチオマー」という用語は、キラルである立体異性体を指す。キラル分子は、「D」及び「L」鏡像異性体を有するアミノ酸残基であり得る。グリシンなどのキラル中心を持たない分子を「アキラル」と呼ぶ場合がある。

30

【0 3 9 2】

本明細書で使用される場合、「疎水性」という用語は、水に溶解しないか、または水への溶解度が最小である部分を指す。一般に、中性部分及び／もしくは非極性部分、または主に中性及び／もしくは非極性である部分は疎水性である。疎水性は、本明細書において以下に開示される方法のうちの1つを用いて測定することができる。

【0 3 9 3】

本明細書で使用される場合、「芳香族」は、 $4n + 2$ 個の π 電子を有する不飽和環状分子を指し、式中、 n は任意の整数である。「非芳香族」という用語は、芳香族の定義に含まれない任意の不飽和環状分子を指す。

40

【0 3 9 4】

「アルキル」、「アルキル鎖」または「アルキル基」は、1から40個の炭素原子を有し、単結合によって分子の残りの部分に結合している、完全飽和の直鎖または分岐鎖炭化水素鎖ラジカルを指す。1から40個の任意の数の炭素原子を含むアルキルが含まれる。40個までの炭素原子を含むアルキルは $C_1 \sim C_{40}$ アルキルであり、10個までの炭素原子を含むアルキルは $C_1 \sim C_{10}$ アルキルであり、6個までの炭素原子を含むアルキルは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、5個までの炭素原子を含むアルキルは $C_1 \sim C_5$ アルキルである。 $C_1 \sim C_5$ アルキルは、 C_5 アルキル、 C_4 アルキル、 C_3 アルキル、 C_2 アル

50

キル及びC₁アルキル（すなわち、メチル）を含む。C₁～C₆アルキルは、C₁～C₅アルキルについて上記した全ての部分を含むが、C₆アルキルも含む。C₁～C₁₀アルキルは、C₁～C₅アルキル及びC₁～C₆アルキルについて上記した全ての部分を含むが、C₇、C₈、C₉及びC₁₀アルキルも含む。同様に、C₁～C₁₂アルキルは、前述した全ての部分を含むが、C₁₁及びC₁₂アルキルも含む。C₁～C₁₂アルキルの非限定的な例としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*sec*-プロピル、*n*-ブチル、*i*-ブチル、*sec*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチル、*t*-アミル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチル、*n*-ノニル、*n*-デシル、*n*-ウンデシル、及び*n*-ドデシルが挙げられる。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、アルキル基は任意選択で置換され得る。

10

【0395】

「アルキレン」、「アルキレン鎖」または「アルキレン基」は、1から40個の炭素原子を有する、完全飽和の、直鎖または分岐鎖の二価炭化水素鎖ラジカルを指す。C₂～C₄₀アルキレンの非限定的な例としては、ブチレン、エチレン、プロピレン、*n*-ブチレン、エテニレン、プロペニレン、*n*-ブテニレン、プロピニレン、*n*-ブチニレンなどが挙げられる。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、アルキレン鎖は、任意選択で置換され得る。

【0396】

「アルケニル」、「アルケニル鎖」または「アルケニル基」は、2から40個の炭素原子を有し、1つ以上の炭素-炭素二重結合を有する直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖ラジカルを指す。各アルケニル基は、単結合によって分子の残りに結合している。2から40個の任意の数の炭素原子を含むアルケニル基が含まれる。40個までの炭素原子を含むアルケニル基はC₂～C₄₀アルケニルであり、10個までの炭素原子を含むアルケニル基はC₂～C₁₀アルケニルであり、6個までの炭素原子を含むアルケニル基はC₂～C₆アルケニルであり、5個までの炭素原子を含むアルケニル基はC₂～C₅アルケニルである。C₂～C₅アルケニルは、C₅アルケニル、C₄アルケニル、C₃アルケニル、及びC₂アルケニルを含む。C₂～C₆アルケニルは、C₂～C₅アルケニルについて上記した全ての部分を含むが、C₆アルケニルも含む。C₂～C₁₀アルケニルは、C₂～C₅アルケニル及びC₂～C₆アルケニルについて上記した全ての部分を含むが、C₇、C₈、C₉及びC₁₀アルケニルも含む。同様に、C₂～C₁₂アルケニルは、前述した全ての部分を含むが、C₁₁及びC₁₂アルケニルも含む。C₂～C₁₂アルケニルの非限定的な例としては、エテニル（ビニル）、1-プロペニル、2-プロペニル（アリル）、イソ-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、1-ヘプテニル、2-ヘプテニル、3-ヘプテニル、4-ヘプテニル、5-ヘプテニル、6-ヘプテニル、1-オクテニル、2-オクテニル、3-オクテニル、4-オクテニル、5-オクテニル、6-オクテニル、7-オクテニル、1-ノネニル、2-ノネニル、3-ノネニル、4-ノネニル、5-ノネニル、6-ノネニル、7-ノネニル、8-ノネニル、1-デセニル、2-デセニル、3-デセニル、4-デセニル、5-デセニル、6-デセニル、7-デセニル、8-デセニル、9-デセニル、1-ウンデセニル、2-ウンデセニル、3-ウンデセニル、4-ウンデセニル、5-デセニル、6-ウンデセニル、7-ウンデセニル、8-ウンデセニル、9-ウンデセニル、10-ウンデセニル、1-ドデセニル、2-ドデセニル、3-ドデセニル、4-ドデセニル、5-ドデセニル、6-ドデセニル、7-ドデセニル、8-ドデセニル、9-ドデセニル、10-ドデセニル及び11-ドデセニルが挙げられる。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、アルキル基は任意選択で置換され得る。

20

30

40

【0397】

「アルケニレン」、「アルケニレン鎖」または「アルケニレン基」は、2から40個の炭素原子を有し、1つ以上の炭素-炭素二重結合を有する、直鎖または分岐鎖の二価炭化

50

水素鎖ラジカルを指す。 $C_2 \sim C_{40}$ アルケニレンの非限定的な例としては、エテン、プロペン、ブテンなどが挙げられる。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、アルケニレン鎖は任意選択であり得る。

【0398】

「アルコキシ」または「アルコキシ基」は、 $-OR$ 基を指し、式中、 R は、本明細書で定義されるアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、またはヘテロシクリルである。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、アルコキシ基は、任意選択で置換され得る。

【0399】

「アシル」または「アシル基」は、 $-C(O)R$ 基を指し、式中、 R は、本明細書で定義される水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、またはヘテロシクリルである。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、アシルは、任意選択で置換され得る。

【0400】

「アルキルカルバモイル」または「アルキルカルバモイル基」は、 $-O-C(O)-NR_aR_b$ 基を指し、式中、 R_a 及び R_b は、同じかまたは異なり、独立して、本明細書で定義されるアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリールであるか、あるいは R_aR_b は、一緒になって、本明細書で定義されるシクロアルキル基またはヘテロシクリル基を形成し得る。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、アルキルカルバモイル基は、任意選択で置換され得る。

【0401】

「アルキルカルボキサミジル」または「アルキルカルボキサミジル基」は、 $-C(O)-NR_aR_b$ 基を指し、式中、 R_a 及び R_b は、同じかまたは異なり、独立して、本明細書で定義されるアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、シクロアルキニル基、またはヘテロシクリル基であるか、または R_aR_b は一緒になって、本明細書で定義されるシクロアルキル基を形成することができる。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、アルキルカルボキサミジル基は、任意選択で置換され得る。

【0402】

「アリール」は、水素、6から18個の炭素原子及び少なくとも1個の芳香環を含む炭化水素環系ラジカルを指す。本発明においては、アリールラジカルは、単環式、二環式、三環式または四環式環系であり得、これは、縮合環系または架橋環系を含み得る。アリールラジカルとしては、アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、ベンゼン、クリセン、フルオランテン、フルオレン、 as -インダセン、 s -インダセン、インダン、インデン、ナフタレン、フェナレン、フェナントレン、プレリアデン、ピレン、及びトリフェニレンから誘導されるアリールラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、「アリール」という用語は、任意選択で置換されているアリールラジカルを含むことを意味する。

【0403】

「ヘテロアリール」は、水素原子、1から13個の炭素原子、窒素、酸素及び硫黄から選択される1から6個のヘテロ原子、並びに少なくとも1個の芳香環を含む5から20員環系ラジカルを指す。本発明においては、ヘテロアリールラジカルは、単環式、二環式、三環式または四環式環系であり得、これは、縮合環系または架橋環系を含み得、ヘテロアリールラジカル中の窒素原子、炭素原子または硫黄原子は、任意選択で酸化され得る。窒素原子は任意選択で四級化され得る。例としては、限定するものではないが、アゼピニル、アクリジニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンズインドリル、ベンゾジオキサソリル、ベンゾフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾ[b] [1, 4] ジオキセピニル、1, 4-ベンゾジオキサニル、ベンゾナフトフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾジオキサソリル、ベンゾジオキシニル、ベン

ゾピラニル、ベンゾピラノニル、ベンゾフラニル、ベンゾフラノニル、ベンゾチエニル（ベンゾチオフェニル）、ベンゾトリアゾリル、ベンゾ〔4, 6〕イミダゾ〔1, 2-a〕ピリジニル、カルバゾリル、シンノリニル、ジベンゾフラニル、ジベンゾチオフェニル、フラニル、フラノニル、イソチアゾリル、イミダゾリル、インダゾリル、インドリル、インダゾリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、イソキノリル、インドリジニル、イソオキサゾリル、ナフチリジニル、オキサジアゾリル、2-オキサアゼピニル、オキサゾリル、オキシラニル、1-オキシドピリジニル、1-オキシドピリミジニル、1-オキシドピラジニル、1-オキシドピリダジニル、1-フェニル-1H-ピロリル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、フタラジニル、プテリジニル、プリニル、ピロリル、ピラゾリル、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、キノリニル、キヌクリジニル、イソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、チアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニル、及びチオフェニル（すなわちチエニル）が挙げられる。本明細書において具体的に別段の定めがない限り、ヘテロアリール基は、任意選択で置換され得る。

10

【0404】

本明細書で使用される「置換された」という用語は、上記の基（すなわち、アルキル、アルケニル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アルコキシ、アリールオキシ、アシル、アルキルカルバモイル、アルキルカルボキサミジル、アルコキシカルボニル、アルキルチオ、またはアリールチオ）のいずれかであって、いずれか少なくとも1つの原子が非水素原子、例えば、限定するものではないが、F、Cl、Br、及びIなどのハロゲン原子；水酸基、アルコキシ基、エステル基などの基中の酸素原子；チオール基、チオアルキル基、スルホン基、スルホニル基、スルホキシド基などの基中の硫黄原子；アミン、アミド、アルキルアミン、ジアルキルアミン、アリールアミン、アルキルアリールアミン、ジアリールアミン、N-オキシド、イミド、及びエナミンなどの基中の窒素原子；トリアルキルシリル基、ジアルキルアリールシリル基、アルキルジアリールシリル基、及びトリアリールシリル基などの基中のケイ素原子；並びに様々な他の基中の他のヘテロ原子によって置き換えられている基を意味する。「置換された」はまた、1つ以上の原子が、オキソ、カルボニル、カルボキシル、及びエステル基中の酸素、並びにイミン、オキシム、ヒドラゾン、及びニトリルなどの基中の窒素などのヘテロ原子への高次結合（例えば、二重または三重結合）によって置き換えられている上記の基のいずれかを意味する。例えば、「置換された」は、1つ以上の原子が $-NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)R_h$ 、 $-NR_gC(=O)NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)OR_h$ 、 $-NR_gSO_2R_h$ 、 $-OC(=O)NR_gR_h$ 、 $-OR_g$ 、 $-SR_g-SOR_g$ 、 $-SO_2R_g$ 、 $-OSO_2R_g$ 、 $-SO_2OR_g$ 、 $=NSO_2R_g$ 、及び $-SO_2NR_gR_h$ で置き換えられている上記の基のいずれかを含む。「置換されている」はまた、1つ以上の水素原子が $-C(=O)R_g$ 、 $-C(=O)OR_g$ 、 $-C(=O)NR_gR_h$ 、 $-CH_2SO_2R_g$ 、 $-CH_2SO_2NR_gR_h$ で置き換えられている上記の基のいずれかを意味する。上記において、 R_g 及び R_h は、同じかまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルアミノ、チオアルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、ヘテロシクリル、N-ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、N-ヘテロアリール及び／またはヘテロアリールアルキルである。「置換された」は更に、1個以上の原子がアミノ、シアノ、ヒドロキシル、イミノ、ニトロ、オキソ、チオキソ、ハロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルアミノ、チオアルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、シクロアルキルアルキル、ハロアルキル、ハロアルケニル、ハロアルキニル、ヘテロシクリル、N-ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、N-ヘテロアリール及び／またはヘテロアリールアルキル基によって置き換えられている上記の基のいずれかを意味する。「置換された」はまた、側鎖上の1つ以上の原子が、アルキル、アルケニ

20

30

40

50

ル、アルキニル、アシル、アルキルカルボキサミジル、アルコキシカルボニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、またはヘテロアリールによって置換されているアミノ酸を意味し得る。更に、前述の置換基の各々はまた、任意選択で1つ以上の上記置換基で置換され得る。

【0405】

本明細書で使用される場合、「対象」とは、個体を意味する。したがって、「対象」は、飼育動物（例えば、ネコ、イヌなど）、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモットなど）、及び鳥類を含み得る。「対象」はまた、哺乳動物（例えば、霊長類またはヒト）を含み得る。したがって、対象は、ヒトまたは獣医学的患者であり得る。「患者」という用語は、臨床医、例えば、内科医の治療を受けている対象を指す。

10

【0406】

「阻害する」という用語は、活性、応答、状態、疾患、または他の生物学的パラメータの減少を指す。これには、活性、応答、状態、または疾患の完全な除去が含まれ得るが、これらに限定されない。これはまた、例えば、天然または対照レベルと比較して、活性、応答、状態、または疾患の10%の低減を含み得る。したがって、この低減は、天然または対照レベルと比較して、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%、またはその間の任意の量の低減であり得る。

【0407】

「低減する」またはこの単語の他の形態、例えば、「低減すること」もしくは「低減」は、ある事象または特徴（例えば、腫瘍増殖）の低減を意味する。これは、典型的には、何らかの標準値または期待値に関連しており、言い換えれば、それは相対的なものであり、ただし、標準値または相対値が参照されることは必ずしも必要ではないことが理解される。例えば、「腫瘍増殖を低減する」は、標準または対照（例えば、未処置腫瘍）と比較して腫瘍の増殖速度を低減することを意味する。

20

【0408】

「治療」という用語は、疾患、病的状態、または障害を治癒、改善、安定化、または予防する意図を有する患者の医学的管理を指す。この用語は、積極的治療、すなわち、疾患、病的状態、または障害の改善を具体的に目指す治療を含み、原因治療、すなわち、関連する疾患、病的状態、または障害の原因の除去を目指す治療も含む。加えて、この用語は、対症療法、すなわち、疾患、病的状態、または障害の治癒ではなく症状の軽減のために設計された治療、予防的治療、すなわち、関連する疾患、病理学的状態、または障害の発症を最小限に抑えるか、または部分的もしくは完全に阻害することを対象とする治療、及び補助的治療、すなわち、関連する疾患、病理学的状態、または障害の改善を対象とする別の特定の療法を補うために用いられる治療、を含む。

30

【0409】

「治療上有効な」という用語は、使用される組成物の量が、疾患または障害の1つ以上の原因または症状を改善するのに十分な量であることを指す。このような改善は、低減または変化のみを必要とし、必ずしも排除を必要としない。

【0410】

「薬学的に許容される」という用語は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または合理的な利益／リスク比に見合った他の問題もしくは合併症を伴うことなく、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに適した化合物、材料、組成物、及び／または剤形を指す。

40

【0411】

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

50

【0412】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、滅菌水性または非水性の溶液、分散液、懸濁液またはエマルジョン、並びに使用直前に滅菌注射溶液または分散液に再構成するための滅菌粉末をいう。適切な水性及び非水性担体、希釈剤、溶媒またはビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、カルボキシメチルセルロース及びそれらの適切な混合物、植物油（オリーブ油など）、並びにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、また界面活性剤の使用によって維持することができる。これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤などのアジュバントを含有することもできる。微生物の活動は、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの様々な抗菌剤及び抗真菌剤を含めることによって確実に防止することができる。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを含むことも望ましい。注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを通す濾過によって、または使用直前に滅菌水もしくは他の滅菌注射用媒体に溶解もしくは分散させることができる滅菌固体組成物の形態で滅菌剤を組み込むことによって滅菌することができる。適切な不活性担体は、ラクトースなどの糖を含むことができる。

10

【0413】

本明細書で使用される場合、「配列同一性」という用語は、2つのポリペプチド配列の間で同じでありかつ同じ相対位置にあるアミノ酸のパーセンテージを指す。したがって、一方のポリペプチド配列は、もう一方のポリペプチド配列と比較して配列同一性の特定のパーセンテージを有する。配列の比較のために、典型的には1つの配列が基準配列の役目を果たし、試験配列がこれと比較される。当業者であれば、2つの配列が、一般的には、対応する位置に同一残基を含有する場合に「実質的に同一である」とみなされることを、理解するであろう。実施形態では、出願日現在で存在しているバージョンのEMBOSSパッケージ（EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277）のNeedleプログラムに実装されているような、Needleman-Wunschアルゴリズム（Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453）を用いて2つのアミノ酸配列の間の配列同一性を決定することがある。用いるパラメータは、10のギャップ開始ペナルティ、0.5のギャップ伸長ペナルティ、及びEBLUM62（BLUM62のEMBOSSバージョン）置換行列である。Needle標識付けされた「最長の同一性」の出力（-nobriefオプションを用いて得られる）は、同一性パーセントとして用いられ、以下のとおりに計算される：（同一残基×100）／（整列部分の長さ－整列部分中のギャップの総数）。

20

30

【0414】

実施形態では、配列同一性を、出願日現在で存在しているバージョンのSmith-Watermanアルゴリズムを用いて決定してもよい。

【0415】

本明細書で使用される場合、「配列相同性」は、2つのポリペプチド配列の間で相同でありかつ同じ相対位置にあるアミノ酸のパーセンテージを指す。したがって、一方のポリペプチド配列は、もう一方のポリペプチド配列と比較して配列相同性の特定のパーセンテージを有する。当業者であれば理解するであろうが、2つの配列は、一般的には、対応する位置に相同残基を含有する場合に「実質的に相同である」とみなされる。相同残基は同一残基であり得る。あるいは、相同残基は、適切に類似する構造及び／及び機能特徴を有する非同一残基であり得る。例えば、当業者にはよく知られているように、特定のアミノ酸は、典型的には、「疎水性」もしくは「親水性」アミノ酸として、及び／または「極性」もしくは「非極性」側鎖を有するものとして分類され、あるアミノ酸で同じタイプの別のアミノ酸を置換することは、しばしば「相同」置換とみなされることがある。

40

50

【0416】

当技術分野ではよく知られていることであるが、アミノ酸配列は、出願日現在で存在しているBLASTP、ギャップ付きBLAST、及びPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで利用できるものを含めた様々なアルゴリズムのいずれかを用いて比較され得る。例示的なそのようなプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215 (3) : 403-410, 1990、Altschul, et al., Methods in Enzymology, Altschul, et al., “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997、Baxevanis, et al., Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998、及びMisener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999に記載されている。相同配列を同定することに加えて、上に言及されたプログラムは、典型的には、相同性の度合いについての指標を提供する。

【0417】

本明細書で使用される場合、「アンチセンス化合物」及び「AC」という用語は、それ（AC）によってハイブリダイズされる標的核酸分子に対して少なくとも部分的に相補的である高分子核酸構造（オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと称されることもある）を指して互換的に使用される。ACは、標的pre-mRNA鎖中の標的配列に対して相補的である配列を含む短い（実施形態では、50塩基対未満の）ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド相同体であり得る。ACは、天然核酸、合成核酸、核酸相同体、またはその任意の組み合わせから形成され得る。実施形態では、ACはオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、ACは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、ACは、コンジュゲート基を含む。ACの非限定的な例としては、限定するものではないが、プライマー、プローブ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、外部ガイド配列（EGS）オリゴヌクレオチド、選択的スプライシング因子（alternate spli-
cers）、siRNA、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣体、及びこれらのキメラ的組み合わせが挙げられる。かくして、これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、環状、分岐型またはヘアピンの形態で導入され得、内部または末端バルジまたはループなどの構造要素を含有し得る。オリゴマー二本鎖化合物は、ハイブリダイズして二本鎖化合物を形成している2本の鎖、またはハイブリダイゼーション及び完全もしくは部分的な二本鎖化合物の形成を可能にする十分な自己相補性を有する一本鎖であり得る。実施形態では、ACは、標的核酸の発現を調節する（増加させる、減少させる、または変化させる）。高分子核酸構造に対してホスホロジアミデートモルホリノ（PMO）などの様々な修飾がなされ得る。したがって、本明細書で使用されるACは、PMOなどの、本明細書に記載の任意の修飾を包含する。

【0418】

本明細書で使用される「pre-mRNA」及び「一次転写物」という用語は、DNA転写の直後に新しく合成された真核生物mRNA分子を指す。pre-mRNAは、成熟mRNA配列を生成するためには、5'キャップを被せられなければならない、3'ポリAテールで修飾されなければならない、スプライスされなければならない。

【0419】

本明細書で使用される場合、「標的とする」または「指向する」という用語は、アンチセンス化合物（AC）が標的核酸分子または標的核酸分子の領域と会合することを指す。実施形態では、ACは、生理条件下で標的核酸とハイブリダイズする能力を有する。実施形態では、ACは、標的核酸中の固有の部分または部位、例えば、少なくとも1つの同定

可能な構造、機能もしくは特徴を有する標的核酸の一部、例えば特定のエクソンもしくはイントロン、またはエクソン内もしくはイントロン内の選択された核酸塩基もしくはモチーフを標的とする。

【0420】

本明細書で使用される場合、「標的核酸」及び「標的配列」という用語は、アンチセンス化合物によって結合またはハイブリダイズされる核酸配列を有する核酸分子を指す。標的核酸としては、限定するものではないが、RNA（限定するものではないが、pre-mRNA及びmRNA、またはその一部を含む）、そのようなRNAに由来するcDNA、及び非翻訳RNA、例えばmiRNAが挙げられる。例えば、実施形態では、標的核酸は、特定の障害もしくは疾患状態に発現が関連している細胞性遺伝子（またはそのような遺伝子から転写されるmRNA）、または感染性物質からの核酸分子であり得る。実施形態では、標的核酸は、標的RNAである。実施形態では、標的核酸は、標的mRNAである。実施形態では、標的核酸は、標的pre-mRNAである。

10

【0421】

本明細書で使用される場合、「スプライシング」及び「プロセッシング」という用語は、イントロンが除去されてエクソン同士が接合される、転写後のpre-mRNAの修飾を指す。スプライシングは、スプライソソームと称される5つの核内低分子リボ核タンパク質（snRNP）で構成される大きなRNA-タンパク質複合体によって触媒される一連の反応において起こる。スプライシングのためにはイントロン内に3'スプライス部位、5'スプライス部位、及び分岐部位が必要とされる。snRNPのRNA成分はイントロンと相互作用し、触媒作用に関与し得る。

20

【0422】

本明細書で使用される場合、「エクソン」という用語は、スプライシング後に典型的には成熟mRNA中に組み込まれる、pre-mRNAの一部を指す。

【0423】

本明細書で使用される場合、「イントロン」という用語は、スプライシング後に典型的には成熟mRNAから排除される、pre-mRNAの一部を指す。

【0424】

本明細書で使用される場合、「隣接（flanking）」という用語は、関連するエクソンのすぐ上流（5'）またはすぐ下流（3'）に位置するイントロンを指す。例えば、エクソン44の5'隣接イントロンは、エクソン44のすぐ上流にある（つまり、その5'末端に直接カップリングされている）イントロンを指す。例えば、エクソン44の3'隣接イントロンは、エクソン44のすぐ下流にある（つまり、その5'末端に直接カップリングされている）イントロンを指す。

30

【0425】

「標的pre-mRNA」は、ACによってハイブリダイズされる標的配列を含むpre-mRNAである。

【0426】

「標的mRNA」は、標的pre-mRNA配列のスプライシングの結果としてのmRNA配列である。実施形態では、標的mRNAは機能性タンパク質をコードしない。実施形態では、標的mRNAは1つ以上のイントロン配列を保持している。

40

【0427】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」という用語は、遺伝子産物の発現に関連する5'プロモーター領域、並びに任意のイントロン及びエクソン領域、並びに遺伝子産物の発現に関連する3'非翻訳領域（「UTR」）を包含する核酸配列を有する核酸分子を指す。

【0428】

本開示の「標的遺伝子」は、標的pre-mRNAをコードする遺伝子を指す。

【0429】

「標的タンパク質」は、標的mRNAにコードされるアミノ酸配列を指す。実施形態では、標的タンパク質は、機能性タンパク質でないことがある。

50

【0430】

「野生型標的タンパク質」は、野生型、正常または未変異形態の標的遺伝子によって産生される天然の機能性タンパク質異性体を指す。野生型標的タンパク質はまた、適切にスプライスされた標的 pre-mRNA に由来するタンパク質も指す。

【0431】

本明細書で使用される場合、「転写物」という用語は、DNA から転写される RNA 分子を指し、限定はされないが、mRNA、成熟 mRNA、pre-mRNA、及び部分的にプロセッシングされた RNA を含む。

【0432】

「再スプライシングされた標的タンパク質」は、本明細書で使用される場合、AC によってハイブリダイズされる標的 pre-mRNA のスプライシングの結果としての mRNA 分子にコードされるタンパク質を指す。再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質と同一である場合があり、野生型標的タンパク質と相同である場合があり、野生型標的タンパク質の機能性多様体である場合がありまたは野生型標的タンパク質の活性断片である場合がある。

【0433】

本明細書で使用される場合、「機能性断片」または「活性断片」は、活性、例えば完全長野生型標的タンパク質の1つ以上の活性を呈するか、または別の活性を有する、真核生物の野生型標的タンパク質の一部を指す。実施形態では、野生型標的タンパク質の少なくとも1つの生物活性を共有している再スプライシングされた標的タンパク質は、野生型標的タンパク質の活性断片であるとみなされる。活性は、完全長野生型標的タンパク質の活性の任意のパーセンテージであり得（つまり、より高い場合があり、またはより低い場合があり）、例えば、限定はされないが、野生型標的タンパク質と比較して活性の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、約200%、約300%、約400%、約500%の、またはそれを上回る活性であり得る（これらの値の間にあるあらゆる値及び範囲を含む）。したがって、実施形態では、活性断片は、野生型標的タンパク質の1つ以上の生物活性の少なくとも一部を保持していることがある。実施形態では、活性断片は、野生型標的タンパク質の1つ以上の生物活性を増強し得る。

【0434】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド」という用語は、核酸塩基及び糖を含むグリコシルアミンを意味する。ヌクレオシドには、天然ヌクレオシド、脱塩基ヌクレオシド、修飾ヌクレオシド、及び模倣塩基及び／または糖基を有するヌクレオシドが含まれるが、これらに限定されない。「天然ヌクレオシド」または「非修飾ヌクレオシド」は、天然核酸塩基及び天然糖を含むヌクレオシドである。天然ヌクレオシドには、RNA 及び DNA ヌクレオシドが含まれる。

【0435】

本明細書で使用される場合、「天然糖」という用語は、その RNA 中（2'-OH）または DNA 中（2'-H）に天然に存在する形態から修飾されていないヌクレオシドの糖を指す。

【0436】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、糖に共有結合で連結されたリン酸基を有するヌクレオシドを指す。ヌクレオチドは、様々な置換基のいずれかで修飾されていることがある。

【0437】

本明細書で使用される場合、「核酸塩基」という用語は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの塩基部分を指す。核酸塩基は、別の核酸の塩基に水素結合する能力を有する任意の原子または原子群を含み得る。天然核酸塩基は、その RNA 中または DNA 中に天然に存在する形態から修飾されていない核酸塩基である。

10

20

30

40

50

【0438】

本明細書で使用される場合、「複素環式塩基部分」という用語は、複素環を含む核酸塩基を指す。

【0439】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオシド」は、ヌクレオシド間結合がリン原子を含有していないオリゴヌクレオチドを指す。

【0440】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、連結された複数のヌクレオチドまたはヌクレオシドを含むオリゴマー化合物を指す。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの1つ以上のヌクレオチドは修飾されている。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA）を含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、天然及び／または修飾核酸塩基、糖、並びに共有結合性のヌクレオシド間結合で構成され、更に非核酸コンジュゲートを含む場合がある。

10

【0441】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド間結合」は、隣接ヌクレオシド間の共有結合性の結合を指す。

【0442】

本明細書で使用される場合、「天然ヌクレオチド間結合」は、3'から5'へのホスホジエステル結合を指す。

【0443】

本明細書で使用される場合、「修飾ヌクレオシド間結合」という用語は、天然に存在するヌクレオシド間結合以外の、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの間の任意の結合を指す。

20

【0444】

本明細書で使用される場合、「キメラアンチセンス化合物」または「キメラAC」という用語は、同じオリゴマー化合物内で他の糖、核酸塩基及びヌクレオシド間結合と比較して別様に修飾された少なくとも1つの糖、核酸塩基及び／またはヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物を指す。糖、核酸塩基及びヌクレオシド間結合の残部は、独立して、修飾されているかまたは修飾されていないものであり得る。一般的には、キメラオリゴマー化合物は、分離された位置にあるかまたは特定モチーフを画定することになる領域の中に寄せ集められた修飾ヌクレオシドを有するものである。修飾及びまたは模倣基の任意の組み合わせが、本明細書に記載されるキメラオリゴマー化合物を構成し得る。

30

【0445】

本明細書で使用される場合、「混合骨格アンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオシド間結合がアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の少なくとも1つのヌクレオチド間結合とは異なっているアンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。

【0446】

本明細書で使用される場合、「核酸塩基相補性」という用語は、別の核酸塩基と塩基対合する能力を有する核酸塩基を指す。例えば、DNAにおいて、アデニン（A）はチミン（T）に対して相補的である。例えば、RNAにおいて、アデニン（A）はウラシル（U）に対して相補的である。実施形態では、相補的核酸塩基は、標的核酸の核酸塩基と塩基対合する能力を有するアンチセンス化合物の核酸塩基を指す。例えば、アンチセンス化合物の特定位置にある核酸塩基が、標的核酸の特定位置にある核酸塩基と水素結合する能力を有する場合には、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間での水素結合の位置は、その核酸塩基対において相補的であるとみなされる。

40

【0447】

本明細書で使用される場合、「非相補的核酸塩基」という用語は、互いに水素結合を形成しないかあるいはハイブリダイゼーションを補助する核酸塩基の対を指す。

【0448】

50

本明細書で使用される場合、「相補的」という用語は、オリゴマー化合物が核酸塩基相補性によって別のオリゴマー化合物または核酸とハイブリダイズする能力を指す。実施形態では、アンチセンス化合物及びその標的は、各分子内の十分な数の対応する位置が、アンチセンス化合物と標的との間で互いに結合して安定した会合を許容することができる核酸塩基によって占められている場合、互いに相補的である。当業者であれば、オリゴマー化合物が会合状態にあり続ける能力を排除することなくミスマッチを組み込むことが可能であることを、認識する。したがって、ミスマッチであるヌクレオチド（すなわち、標的の対応ヌクレオチドに対して相補的でない核酸塩基）を最大約20%含むアンチセンス化合物が、本明細書に記載される。好ましくは、アンチセンス化合物は、約15%以下、より好ましくは約10%以下、最も好ましくは5%以下のミスマッチを含有する、またはミスマッチを含有しない。残存するヌクレオチドは、相補的であるかあるいはハイブリダイゼーションを妨害しない核酸塩基（例えば、ユニバーサル塩基）である。当業者であれば、本明細書に提供される化合物が標的核酸に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の核酸塩基相補性を有することを認識するであろう。

10

【0449】

本明細書で使用される場合、「ハイブリダイゼーション」は、相補的なオリゴマー化合物同士（例えば、アンチセンス化合物とその標的核酸）の対合を意味する。特定の機構に限定するわけではないが、最も一般的な対合機構は、相補的なヌクレオチドまたはヌクレオチド塩基（核酸塩基）の間での、ワトソン-クリック型、フーグスティーン型または逆フーグスティーン型水素結合であり得る水素結合を伴う。例えば、天然塩基アデニンは、水素結合の形成によって対合する天然核酸塩基チミジン及びウラシルに対して相補的な核酸塩基である。天然塩基グアニンは、天然塩基シトシン及び5-メチルシトシンに対して相補的な核酸塩基である。ハイブリダイゼーションは、様々な状況下で起こり得る。

20

【0450】

本明細書で使用される場合、「特異的にハイブリダイズする」という用語は、1つの核酸部位にオリゴマー化合物が、別の核酸部位にハイブリダイズするよりも大きな親和性でハイブリダイズする能力を指す。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つよりも多い標的部位に特異的にハイブリダイズする。実施形態では、オリゴマー化合物は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下でその標的と特異的にハイブリダイズする。

30

【0451】

「調節する」、「調節すること」及び「調節」という用語は、調節前の発現、機能または活性のレベルと比較したときの発現、機能または活性の攪乱を指す。調節は、発現、機能または活性の増加（刺激または誘発）または減少（阻害または低減）を含み得る。一実施形態では、調節は、pre-mRNAプロセッシング中のスプライス部位選択の攪乱を含み得る。

【0452】

「阻害する」、「阻害すること」または「阻害」という用語は、活性、発現、機能または他の生物学的パラメータの減少を指すが、これには、必ずというわけではないが、活性、発現、機能または他の生物学的パラメータの完全な除去が含まれることがある。阻害は、例えば、活性、応答、病状または疾患を対照と比較して少なくとも約10%低減することを含み得る。実施形態では、遺伝子またはタンパク質の発現、活性または機能は、統計的に有意な量だけ減少する。

40

【0453】

本明細書で使用される場合、「発現」という用語は、遺伝子のコードされた情報を細胞内で存在して機能する構造に変換することに用いられるあらゆる機能及びステップを指す。そのような構造としては、限定するものではないが、転写及び翻訳の生成物が挙げられる。

50

【0454】

本明細書で使用される場合、「2'修飾」または「2'置換」という用語は、2'位置にHまたはOH以外の置換基を含む糖を意味する。2'修飾モノマーとしては、限定するものではないが、2'置換基、例えば、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C₁-C₁₀アルキル、-OCF₃、O-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、またはO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)を有するBNA及びモノマー（例えば、ヌクレオシド及びヌクレオチド）が挙げられ、式中のR_m及びR_nは、独立して、H、または置換もしくは非置換C₁-C₁₀アルキルである。

【0455】

本明細書で使用される場合、「MOE」という用語は、2'-O-メトキシエチル置換基を指す。

【0456】

本明細書で使用される場合、「高親和性修飾ヌクレオチド」という用語は、修飾によって、修飾ヌクレオチドを含むアンチセンス化合物の標的核酸に対する親和性が増大するような、少なくとも1つの修飾核酸塩基、ヌクレオシド間結合または糖を有するヌクレオチドを指す。高親和性修飾としては、限定するものではないが、BNA、LNA、及び2'-MOEが挙げられる。

【0457】

本明細書で使用される場合、「模倣体」という用語は、AC中の糖、核酸塩基及び／またはヌクレオシド間結合の代わりに使用される基を指す。一般的には、模倣体は、糖に代わって、または糖-ヌクレオシド間結合の組み合わせに代わって使用され、核酸塩基は、選択された標的とのハイブリダイゼーションのために維持される。糖模倣体の代表例としては、限定するものではないが、シクロヘキセニルまたはモルホリノが挙げられる。糖-ヌクレオシド間結合の組み合わせの模倣体の代表例としては、限定するものではないが、ペプチド核酸(PNA)、及びモルホリノ基を非荷電アキラル結合によって連結したものが挙げられる。ある場合には、模倣体は、核酸塩基に代わって使用される。代表的な核酸塩基模倣体は、当技術分野でよく知られており、限定するものではないが、三環式フェノキサジン類似体、及びユニバーサル塩基(Berger et al., Nuc Acid Res. 2000, 28:2911-14、参照により本明細書に援用する)が挙げられる。糖、ヌクレオシド及び核酸塩基模倣体の合成方法は当業者によく知られている。

【0458】

本明細書で使用される場合、「二環式ヌクレオシド」または「BNA」という用語は、ヌクレオシドのフラノース部分が、フラノース環上の2つの原子を接続している架橋を含んでおり、それによって二環式の環系を形成している、ヌクレオシドを指す。BNAとしては、限定するものではないが、α-L-LNA、β-D-LNA、ENA、オキシアミノBNA(2'-O-N(CH₃)-CH₂-4')、及びアミノオキシBNA(2'-N(CH₃)-O-CH₂-4')が挙げられる。

【0459】

本明細書で使用される場合、「4'から2'への二環式ヌクレオシド」という用語は、フラノース環の2つの原子を接続している架橋部がフラノース環の4'炭素原子と2'炭素原子とをつないでおり、それによって二環式の環系を形成している、BNAを指す。

【0460】

本明細書で使用される場合、「ロック核酸」または「LNA」は、リボシル糖環の2'-ヒドロキシル基がメチレン基を介して糖環の4'炭素に連結されてそれによって2'-C, 4'-C-オキシメチレン結合を形成するように修飾されたヌクレオチドを指す。LNAとしては、限定するものではないが、α-L-LNA、及びβ-D-LNAが挙げられる。

【0461】

本明細書で使用される場合、「キャップ構造」または「末端キャップ部分」という用語

10

20

30

40

50

は、A Cのどちらかの末端に組み込まれているものである化学修飾を指す。

【0462】

本明細書で使用される場合、「投薬単位」という用語は、医薬剤が提供される形態を指す。実施形態では、投薬単位は、凍結乾燥されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むバイアルである。実施形態では、投薬単位は、再構成されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むバイアルである。

【0463】

本発明の複数の実施形態を記載してきた。それにもかかわらず、様々な改変が、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなくなされ得ることは、理解されよう。他の実施形態は以下の特許請求の範囲に含まれる。

【0464】

本明細書中で言及される全ての刊行物、特許及び特許出願は、本発明が属する技術分野の当業者の技術水準を示している。参照により、全ての刊行物、特許及び特許出願は、各個の刊行物または特許出願を参照により援用することを具体的かつ個別に示した場合と同じ程度に、本明細書に援用される。

【実施例】

【0465】

実施例1。細胞透過性ペプチドとのオリゴヌクレオチドのコンジュゲーション。

細胞透過性ペプチドに対するオリゴヌクレオチドのコンジュゲーション。図1のAに示されるように、5'ホスホロチオエート末端に(NH₂-(CH₂)₅-CH₂-)リンカーを有するオリゴヌクレオチドは、ペプチド上のカルボキシレートまたはN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHSエステル)官能基を介してCPPにコンジュゲートされる。図1のBに示されるように、オリゴヌクレオチドは、アミド結合形成(左)かクリックケミストリーかのいずれかによって細胞透過性ペプチド(CPP)にコンジュゲートされる。リンカー/CPPは、オリゴヌクレオチドの5'末端上か3'末端上かのいずれかに組み込まれる。

【0466】

PEGスペーサーを有するオリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートの合成。図2のA及びBに示されるように、オリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートは、オリゴヌクレオチド部分とペプチドとの間に挿入されるPEG(ポリエチレングリコール)リンカーを有せずに(図2のA)及び有して(図2のB)合成される。図中の「R」はパルミトイル基を表す。

様々な遺伝子標的のためのオリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートの合成。DM Dのエクソン44を標的とする例示的なアンチセンス化合物(AC)、例えば、表6A~6Mの中にあるもの、もしくはその逆相補体、または表7に示されるACは、本明細書に開示されるCPPまたはEEVにコンジュゲートされる。実施形態では、ACは、FfΦRrRrQのアミノ酸配列を有する環状ペプチド(EEV-1)にコンジュゲートされる。実施形態では、ACは、脂質基(R1)にコンジュゲートされたアミノ酸配列FfΦRrRrQを有する環状ペプチド(EEV-1(R1))にコンジュゲートされる。実施形態では、ACは、配列シクロ(FfΦRrRrQ)-PEG12-OHを有するエンドソーム脱出ビヒクル(EEV)にコンジュゲートされる。実施形態では、ACは、アミノ酸配列FGFGRRGRQを有する環状ペプチドにコンジュゲートされる。実施形態では、ACは、配列Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys-(シクロ[FGFGRRGRQ])-PEG12-OHを有するEEVにコンジュゲートされる。

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 7：DMD のエクソン 4 4 を標的とする A C

オリゴ ケミス トリー	デザイン
PMO-1	5'-GGCCAAACCTCGGCTTACTG AAAT-3'
PMO-2	5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'
PMO-3	5'-XGAAAACGCCGCCAXXXCXCAACAGAXCXG-3'、式中、X は U または T
PMO-4	5'-TGAAAACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTG-3'
PMO-5	5'-TGAAAACGCCGCCATTTCTCAACAG-3'
PMO-6	5'-AAACGCCGCCATTTCTCAACAGATC-3'
PMO-7	5'-AACGCCGCCATTTCTCAACAGATCT-3'

10

20

【0 4 6 7】

実施例 2。DMD のマウスモデルにおけるジストロフィンのエクソン 2 3 スプライシング修正のための、オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされた細胞透過性ペプチドの使用

30

マウス。この実験は、MDX マウス (Sicinski et al. (1989) “The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science. 244 (4912): 1578-80) を使用したが、当該マウスは、X 染色体上のジストロフィン筋ジストロフィー遺伝子 (Dmd) のエクソン 2 3 内の位置 2983 に終止コドンをもたらす C から T への変異を含むものである。この変異アレルを発現するマウスは、切断型ジストロフィンタンパク質を産生し、したがって、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (「DMD」) のモデルである。

【0 4 6 8】

40

試験デザイン。MDX マウスを使用して、エクソン 2 3 をスキッピングする、したがって DMD を治療する組成物の能力を評価した。この試験で使用した A C は、以下の配列：5'-GCTATTACCTTAACCCA-3' (PMO-MDX-23) を有するホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー (PMO) であったが、これは、エクソン 2 3 を標的とするものである。PMO-MDX-23 を、配列：シクロ (F f φ R r R r Q) -PEG 12-OH (EEV-1) を有するエンドソーム脱出ビヒクル (EEV) にコンジュゲートさせて、EEV-PMO コンジュゲート (EEV-PMO-MDX-23) を形成した。EEV を有さない PMO を PMO-MDX-23 と呼称する。EEV-PMO-MDX-23 の調製の模式図を図 4 A に示す。

【0 4 6 9】

50

EEV-PMO-MDX-23、及びPMO-MDX-23を、以下の用量でMDXマウスに筋肉内(IM)または静脈内(IV)投与した: 1mpk、3mpk、10mpk、30mpk; (mpk: mg化合物/kg体重)。組織試料から全RNAを抽出し、RT-PCRによって分析してスプライシング修正の効率を可視化した。

【0470】

RT-PCR及びウェスタンブロットによるスプライシング修正の検出。図4Bに示されるように、EEV-PMO-MDX-23 (1mpk、IM、または3mpk、IM)で処置したMDXマウスは、エクソン23を欠くジストロフィンを生じた一方、PMO-MDX-23単独で処置したMDXマウスは、エクソン23を含有するジストロフィンしか産生しなかった(未処置対照と同様)。

10

【0471】

MDXマウスに10mpkのPMO-MDX-23及びEEV-PMO-MDX-23を静脈内(IV)投与した。図4Cに示される、様々な筋肉群(例えば、四頭筋、前脛骨筋、横隔膜及び心臓)でのジストロフィン生成物は、MDXマウスへのEEV-PMO-MDX-23の送達、PMO-MDX-23単独の送達とは対照的に、四頭筋、前脛骨筋、横隔膜及び心臓における修正されたジストロフィンスプライシング(例えば、エクソン23が切除されたジストロフィン)をもたらしたことを実証している。

【0472】

図5のA~Dは、以下のIV投薬レジメンがエクソンスキッピング有効性に及ぼす効果を示す: 10mpkまたは30mpkを1回投与して1週間。注目すべきことに、30mpkのEEV-PMO-MDX-23を1回投与して1週間で、4つの組織: 四頭筋(A)、前脛骨筋(B)、横隔膜(C)及び心臓(D)の全てにおいてエクソンスキッピングのパーセンテージが最も高くなった。

20

【0473】

図6A~図6Dは、EEV-PMO-MDX-23の投与を10mpkで週2回、10mpkで週1回、10mpkで2週に1回、及び30mpkで週1回行った後での、前脛骨筋(図6A)、四頭筋(図6B)、横隔膜(図6C)及び心臓(図6D)におけるエクソン23スプライス修正のパーセンテージ(RT-PCRによって決定された)を示す。

【0474】

図7のA~Dは、PMO-MDX-23またはEEV-PMO-MDX-23の送達後に四頭筋(A)、前脛骨筋(TA)(B)、横隔膜(C)及び心臓(D)においてウェスタンブロットによって検出されたエクソン23修正ジストロフィンの量を示す。

30

【0475】

図8のA~Dは、10mpkまたは30mpkのEEV-PMO-MDX-23-1の静脈内送達の後での、横隔膜(A)、心臓(B)、四頭筋(C)及び前脛骨筋(D)の中のエクソン23修正ジストロフィン及びα-アクチニンのウェスタンブロットを示す。

【0476】

図9のA~Bは、30mpkのEEV-PMO-MDX-23または30mpkのPMO-MDX-23による処置の2週間後(A)及び4週間後(B)のMDXマウスのジストロフィンレベルを示す。

40

【0477】

図10のA~Dは、30mpkのPMO-MDX-23か、30mpkのEEV-PMO-MDX-23かのいずれかを投与したMDXマウスの前脛骨筋(A)、四頭筋(B)、横隔膜(C)及び心臓(D)におけるエクソン23修正のパーセンテージを示す。EEV-PMO-MDX-23を投与したマウスは、PMO-MDX-23単独を投与したマウスと比較して増強されたスプライシング修正を呈した。

【0478】

図11のA~Cは、mdxマウスにおいてEEV-PMO-MDX-23の単回IV用量(40mg/kg)の8週間後まで認められた、心臓(A)、前脛骨筋(B)及び横隔膜(C)におけるエクソン23スキッピング及びジストロフィン修正の高くかつ持続する

50

レベルを示す。

【0479】

実施例3。DMDのD2-mdxマウスモデルにおけるジストロフィンのエクソン23スプライス修正のための、オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされた細胞透過性ペプチドの使用。

マウス。この実験は、D2-mdxマウスモデルを使用した。(Fukada et al. (2010) "Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. Am. J. Path. 176 (5): 2414-24)。

【0480】

EEV-PMO-MDX-23-2 (EEV=Ac-PKKKRKV-miniPEG-K (シクロ (GfFGGrGrQ)) -PEG₁₂-OH、PMO=5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3') またはPMO-MDX-23-2 (5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3') の月1回の反復20mg/kg用量の後、種々の筋肉群 (n=6) においてロバストなエクソン23スキッピングが認められた。図12A~12Dは、D2-mdxマウスが心臓 (図12A)、横隔膜 (図12B)、前脛骨筋 (図12C) 及び三頭筋 (図12D) において広範なジストロフィン発現及び筋肉完全性の回復を呈したことを示している。

【0481】

サルコグリカン、ジストロフィン及び他のジストロフィン関連タンパク質と相互作用してジストロフィン結合糖タンパク質複合体 (DAGC) を形成する。DAGCは、筋鞘を収縮に起因する損傷から保護する。D2-mdxマウスモデルにおいて、ジストロフィンの喪失はアルファサルコグリカンの喪失を招く。D2-mdxマウスを、PMO-MDX-23-2またはEEV-PMO-MDX-23-2の4回にわたる4週に1回 (20mg/kg) のIV注射で処置した。EEV-PMO-MDX-23-2処置筋肉はジストロフィン及びアルファサルコグリカンの両方のほぼ完全な回復を示し、これは、ジストロフィンまたはアルファサルコグリカンの限られた回復を示したPMO-MDX-23-2処置マウスとは対照的であった (データ示さず)。

【0482】

D2-mdxマウスに20mg/kgのPMO-MDX-23-2またはEEV-PMO-MDX-23-2を投与した (月1回)。クレアチンキナーゼ (CK) レベル (図13のA)、及び機能読み出し値 (ワイヤーぶら下がり時間 (図13のB)、及び正規化された握力 (図13のC)) を、野生型 (DBA/2J) 及びビヒクル (生理食塩水) 処置マウスと比較した。EEV-PMO-MDX-23による処置は、PMO-MDX-23-2単独と比較して血清CKレベルを正常化させ、筋機能を有意に改善した (図13のA~C)。

【0483】

実施例4: EEV-PMO-MDX-23-2投与後のD2MDXマウスに対する持続時間及び反復用量効果

方法: D2/MDXマウスモデルにおけるエクソン23スキッピングを誘導する20、40または80mpkのEEV-PMO-MDX-23-2 (EEV=Ac-PKKKRKV-miniPEG-K (シクロ (GfFGGrGrQ)) -PEG₁₂-OH、PMO=5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3') またはPMO-MDX-23-2 (5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3') を、D2/MDXマウスに投与した。単回用量持続時間効果及び単回用量範囲知見について調べるために、1、2、4及び8週で組織を採取した。反復用量効果について調べるために、D2/MDXマウスに40mpkを週1回、4週間にわたって投与し、最終用量の1週間後に 殺した。

【0484】

結果: 単回用量の後、エクソンスキッピングは、ジストロフィン産生と同様に4つ全て

の組織において認められた（図 14 の A ～ D）。エクソンスキッピングは注射の 2 週間後にピークに達し、骨格筋：図 15 の A（三頭筋）及び図 15 の B（前脛骨筋）では少なくとも 8 週間にわたって維持された。横隔膜（図 15 の C）及び心臓（図 15 の D）では、4 及び 8 週間後にエクソンスキッピングに落ち込みが認められた。4 回の週 1 回用量の後、累積的なエクソンスキッピングが 4 つ全ての組織、特に心筋において認められた（図 16）（組織は最終用量の 1 週間後に採取した）。

【0485】

実施例 5：D2MDX における機能アッセイ

方法：雄の D2 / MDX 及び DBA / 2J（野生型）マウスの 6 つの群（群 1 つ当たり $n = 8$ ）に、ビヒクル（生理食塩水）、PMO-MDX-2（5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'）、またはエクソン 23 を標的とする 2 つの EEV-PMO 構築物（EEV-PMO-MDX-23-2：EEV=Ac-PKKKRKV-miniPEG-K（シクロ（GfFGGrGrQ））-PEG₁₂-OH、PMO=5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'、及び EEV-PMO-MDX-23-3：EEV=Ac-PKKKRKV-Lys（FfΦGrGrQ）-PEG₁₂-K（N₃）-NH₂、PMO=5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'-C4COT）のうちの 1 つによる静脈内への投与を 2 週に 1 回、合計 6 回用量にわたって行った。C4COT=シクロオクタ-2-イン-1-O-（CH₂）₄-O-C（O）。投薬量は図中に列挙されている。クレアチンキナーゼレベル、握力、及びワイヤーぶら下がり時間を 4 週に 1 回、合計 4 回にわたって決定した。

【0486】

結果：80mpk の EEV-PMO-MDX-23-2 による 2 週に 1 回の処置の場合、ぶら下がり時間は、最初の注射の 2 週間後までは残りの群よりもわずかに長く、最初の注射の 4 及び 8 週間後では共に、ビヒクル D2.mdx 群と比較して増大する統計的に有意な改善を示し続ける（図 17）。2 週に 1 回の 80mpk の EEV-PMO-MDX-23-2 は、処置 12 週の後は、統計的に野生型動物との見分けが付かなかった（図 17）。40pmk の EEV-PMO-MDX-23-2 による 2 週に 1 回の処置、及び 15mpk の EEV-PMO-MDX-23-3 による 2 週に 1 回の処置は、負荷用量（それぞれ 80mpk 及び 30mpk）を伴うと、ビヒクル D2.mdx 群よりも著しく長いワイヤーぶら下がり時間を示したが、これは最初の処置の 8 週間後から始まっており、表現型改善の兆候が最初に明白になる処置 12 週まで安定的に続いた（図 17）。PMO-MDX-23-2 処置単独は、ビヒクル D2.mdx 群及びビヒクル対照群と同じ傾向を辿っているように見受けられた。

【0487】

血清クレアチンキナーゼ（CK）レベルは、4 つの時間点において決定された：投与前、並びに 4、8 及び 12 週。野生型と似通って、EEV-PMO-MDX-23-2 または EEV-PMO-MDX-23-3 で処置したマウスは血清 CK の有意な低減を示した。PMO-MDX-23-2 で処置したマウスは、処置後のどの時間点においても、有意な減少を示さなかった（図 18A～18C）。

【0488】

投与前（図 19 の A）及び 12 週（図 19 の B）での握力を測定した。処置マウスにおいて、握力に用量依存的な増大が認められた。ビヒクル及び PMO 処置マウスは、有意な改善を示さなかった。

【0489】

実施例 6：hDMD のエクソン 44 のスプライシング修正のためのオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされた細胞透過性ペプチドの使用

目的：この実験は、hDMD 及び CD1 マウスモデル並びに NHP モデルを用いて、アンチセンス化合物及び細胞透過性ペプチドを含む化合物の効果を調べる。各化合物は、環外配列 PKKKRKV を含んでいた。

【0490】

評価した化合物：この実験では、EEV-PMO-DMD44-1、EEV-PMO-DMD44-2、及びEEV-PMO-DMD44-3について評価した。これらの化合物の配列情報を表8に示す。

【表25】

表8. EEV化合物

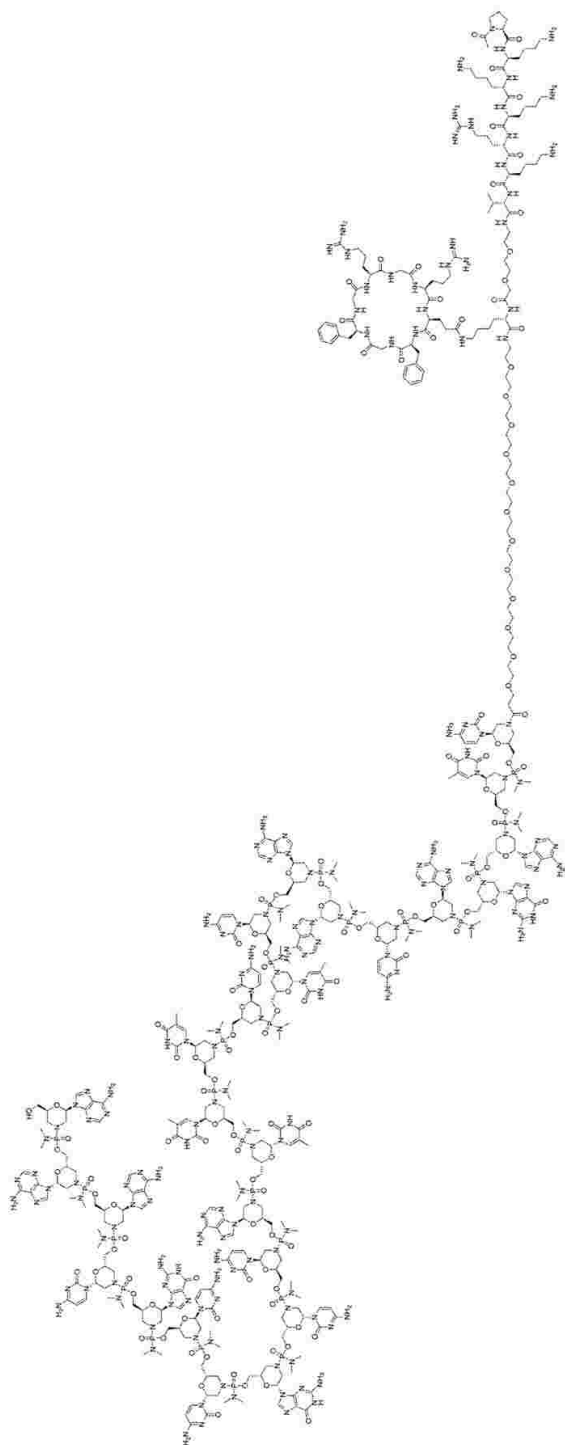
化合物	ペプチド配列	ACの核酸配列 (5' - 3')	化学
EEV-PMO-DMD44-1	Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys-(シクロ [FGFGRGRQ])-PEG ₁₂ -OH	5'-AAACGCCGCCATTTCTCAACAGATC-3'	PMO
EEV-PMO-DMD44-2	Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys(シクロ [GfFGrGrQ])-PEG ₁₂ -OH	5'-AAACGCCGCCATTTCTCAACAGATC-3'	PMO
EEV-PMO-DMD44-3	Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys(シクロ [FfΦGrGrQ])-PEG ₁₂ -OH	5'-AAACGCCGCCATTTCTCAACAGATC-3'	PMO
EEV-PMO-MDX-23-3	Ac-PKKKRKV-Lys(FfΦ-GrGrQ)-PEG12-K(N ₃)-NH ₂	5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'-C4COT	PMO

【0491】

EEV-PMO-DMD44-1、EEV-PMO-DMD44-2、及びEEV-PMO-DMD44-3の構造を以下に示す。図20A~20Dは、EEV-PMO-DMD44-1 (図20A)、EEV-PMO-DMD44-2 (図20B)、EEV-PMO-DMD44-3 (図20C) 及びEEV-PMO-MDX-23-3 (図20D) の合成スキームを示す。

【化 1 3 9 - 1】

EEV-PMO-DMD 4 4 - 1



10

20

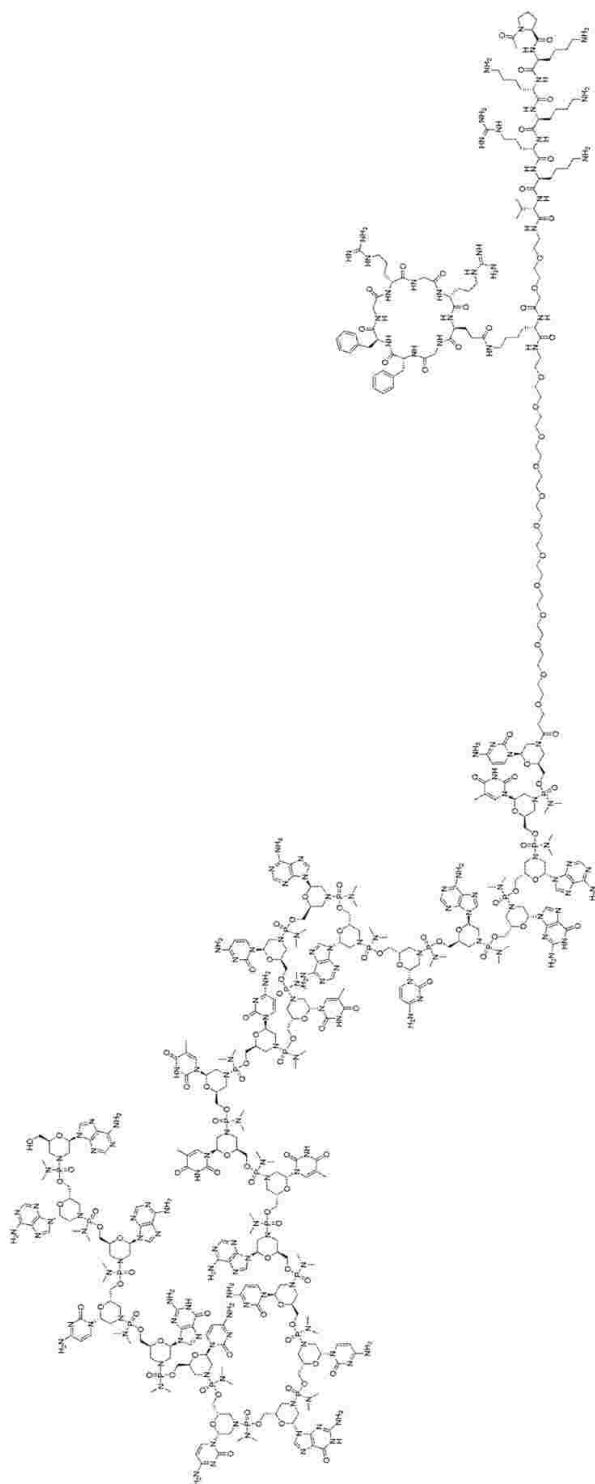
30

40

50

【化 1 3 9 - 2】

EEV-PMO-DMD 4 4 - 2



10

20

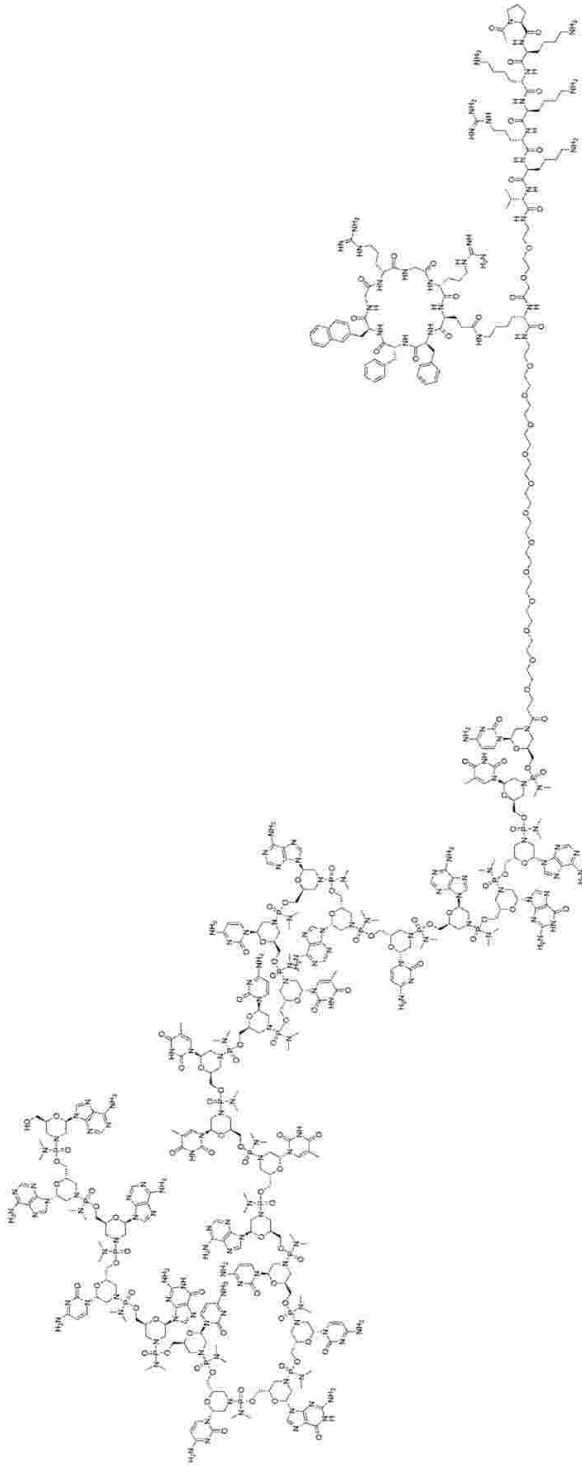
30

40

50

【化 1 3 9 - 3】

EEV-PMO-DMD44-3



【0492】

化合物の合成及び精製：以下の手順に従って化合物を合成した。TFA-リジンで保護したcCPPを表8のACと反応させ、続いて脱保護して、cCPP-ACコンジュゲートを得た。簡単に説明すると、cCPPを、DMSO（10mM、1.8mL）中のHATU（2.0当量）及びDIPEA（2.0当量）と反応させることによって予備活性化した。室温で10分後、予備活性化した溶液をDMSO中のACの溶液（10mM、1.8mL）と合わせ、十分に混合した。反応物を室温で2時間インキュベートした。反応を、BEH C18カラム（130Å、1.7μm、2.1mm×50mm）、緩衝液A：水（0.1%FA）、緩衝液B：アセトニトリル（0.1%FA）、流速：0.4mL／

10

20

30

40

50

分を使用し、2%緩衝液Bで開始し、3.4分かけて98%まで上昇させて、LCMS (Q-TOF) によってモニタリングした。完了後、反応混合物を0.2M KCl (水溶液) pH 12 (36 mL) で希釈することによって、TFA保護リシンの *in situ* 脱保護を開始した。上記の分析方法を使用して、反応をLCMS (Q-TOF) によってモニタリングした。粗混合物をC18逆相カラム (Oligo clarity カラム、150 mm × 2.1 mm) に直接充填した。次いで、粗生成物を、溶媒として0.1% FAを含む水及びアセトニトリルを用い、流速20 mL/分で60分間かけて5~20%の勾配を用いて精製した。所望の生成物を含有する画分をプールし、0.5M NaOHを用いて溶液のpHを7に調整した。溶液を凍結し、凍結乾燥して白色粉末を得た。水中1M NaClの中でcCPP-ACコンジュゲートを再構成し、3-kD MWカットオフアミコンチューブを通して繰り返し洗浄することによって (3500 rpmで20~40分間遠心分離)、ギ酸塩を塩化物と交換した。このプロセスを、1M NaClで3回、生理食塩水 (0.9% NaCl、滅菌、エンドトキシンフリー) で3回行った。最後の濾液の導電率を評価して、適切な塩濃度を確認した。溶液を更に生理食塩水で希釈して所望の製剤濃度とし、バイオセーフティキャビネット内で滅菌濾過した。各製剤の濃度を濾過後に再測定した。

10

【0493】

EEV-PMO-DMD 44-1を74%の収率で得た。各製剤の純度及び同一性を、液体クロマトグラフィー-質量分析四重極飛行時間型質量分析 (QTOF-LCMS) によって評価した。EEV-PMO-DMD 44-1は、RP-FAによって99%純粋であることが、また、CEXによって78%純粋であることが確認された。 $C_{41}H_{66}N_{17}O_{13}P_2$ のMW計算値は、10849.26であった。QTOF-LCMSにより同定されたMWは10850.95であった。製剤を更に、それらのエンドトキシン量、残留遊離ペプチド、FA含量及びpHについてアッセイした。

20

【0494】

EEV-PMO-DMD 44-2を70%の収率で得た。各製剤の純度及び同一性をQTOF-LCMSによって評価した。EEV-PMO-DMD 44-2は、RP-FAによれば99%純粋であり、CEXによれば78%純粋であった。 $C_{41}H_{66}N_{17}O_{13}P_2$ のMW計算値は、10849.26であった。QTOF-LCMSにより同定されたMWは、10850.88であった。

30

【0495】

EEV-PMO-DMD 44-3を68%の収率で得た。各製剤の純度及び同一性をQTOF-LCMSによって評価した。EEV-PMO-DMD 44-3は、RP-FAによれば86.3%純粋であった (不純物は未反応ACであった)。 $C_{42}H_{66}N_{17}O_{13}P_2$ のMW計算値は、10989.45であった。QTOF-LCMSにより同定されたMWは、10990.07であった。

hDMDマウスモデル：hDMDマウスをJackson Labに発注し (STOCK Tg (DMD) 72 Thoen/J; ストック番号：018900)、自家飼育した。ヘミ接合マウスを更にTransnetyxで遺伝子型を解析した。全ての群に、静脈内 (i.v.) 注射によって動物1匹当たり5 mL/kgを投与し、注射の5日後に殺した。全ての動物をCO₂窒息により安楽死させ、続いて心臓穿刺により終末血液を採取した。取得可能な全血の最大量をリチウムヘパリンチューブに採取し、血漿に処理した。血漿の一部を試験施設 (IDEXX) で臨床化学について分析し、残りを名目上-70℃で凍結保存した。組織 (三頭筋、TA、横隔膜、心臓、腎臓、肝臓、脳) を採取し、液体窒素中で急速凍結し、エクソンスキッピング及び薬物濃度測定のための-80℃で保存した。動物の年齢を一致させて、表9に従って8つの処置群に割り当てた。群1-1 (3匹のホモhDMDマウス、6週齢)、1-2 (3匹のホモhDMDマウス、6週齢)、1-3 (1匹の雄、1匹の雌、ヘミhDMD、11週齢)、1-4 (1匹の雄、1匹の雌、ヘミDMD、11週齢) に、EEV-PMO-DMD 44-1を、それぞれ体重1キログラム当たり10、20、40及び80ミリグラム (mpk) 投与した。群2-1 (

50

3匹のホモhDMDマウス、6週齢）、群2-2（3匹のホモhDMDマウス、6週齢）、群2-3（1匹の雄、1匹の雌、ヘミhDMD、11週齢）、群2-4（1匹の雄、1匹の雌、ヘミDMD、11週齢）に、EEV-PMO-DMD44-2を、それぞれ10、20、40及び80mpk投与した。全ての動物は、予定された安楽死時間まで生存した。プロトコルごとに組織を採取した。様々な組織試料中のAC及びcCYP-ACの量をLC-MSによって定量した。異なる組織におけるエクソスキッピングを、RT-PCR及びエクソン44修正の定量化によって分析した。

【表26】

表9：hDMD実験の実験計画

グループ	動物No.	試験項目	用量レベル mg/kg	投与体積(5mL/kg)	投与レジメン	終了時点
1-1	3	EEV-PMO-DMD44-1	10	5	IV	注射5日後
1-2	3	EEV-PMO-DMD44-1	20			
1-3	3	EEV-PMO-DMD44-1	40			
1-4	3	EEV-PMO-DMD44-1	80			
2-1	2	EEV-PMO-DMD44-2	10			
2-2	2	EEV-PMO-DMD44-2	20			
2-3	2	EEV-PMO-DMD44-2	40			
2-4	2	EEV-PMO-DMD44-2	80			

【0496】

CD1マウスモデル：7週齢のCD1雄マウスを用いて、EEV-PMO-DMD44-1及びEEV-PMO-DMD44-2の忍容性を評価した。それらをCharles River Labに発注し、受け取り次第、それらを注射前に5日間順化させた。動物の年齢を一致させ、表10のグループ1（3匹のマウス、生理食塩水）に従って9つの処置群に割り当て、グループ2-1（3匹のマウス）、2-2（マウス2匹）、2-3（マウス2匹）、2-4（マウス2匹）、2-5（マウス3匹）、2-6（マウス3匹）に、EEV-PMO-DMD44-1を、それぞれ80、100、120、160、200及び300mpk投与した。グループ3-1（3匹のマウス）、3-2（マウス2匹）、3-3（マウス2匹）、3-4（マウス2匹）、3-5（マウス3匹）、3-6（マウス3匹）に、EEV-PMO-DMD44-2を、それぞれ80、100、120、160、200及び300mpk投与した。

【表 2 7】

表 1 0 : C D 1 マウスにおける忍容性実験の実験計画

グループ	動物No.	試験項目	用量レベル mg/kg	投与体積 (5mL/kg)	投与レジメン	終了時点
1	3	生理食塩水		5	IV	注射7日後
2-1	3	EEV-PMO-DMD44-1	80			
2-2	2	EEV-PMO-DMD44-1	100			
2-3	2	EEV-PMO-DMD44-1	120			
2-4	2	EEV-PMO-DMD44-1	160			
2-5	3	EEV-PMO-DMD44-1	200			
2-6	3	EEV-PMO-DMD44-1	300			
3-1	2	EEV-PMO-DMD44-2	80			
3-2	2	EEV-PMO-DMD44-2	100			
3-3	2	EEV-PMO-DMD44-2	120			
3-4	2	EEV-PMO-DMD44-2	160			
3-5	3	EEV-PMO-DMD44-2	200			
3-6	3	EEV-PMO-DMD44-2	300			

10

20

【0 4 9 7】

NHPモデル：表 1 1 に従って、化合物（EEV-PMO-DMD44-1 及び EEV-PMO-DMD44-2）1 つにつき 1 匹の雌動物に 10 mL/kg の投与体積で 60 分間の IV 注入を施した。各試験物質を生理食塩水中に 4 mg/mL で製剤化した。更なる PK 分析のために、表 1 2 に示した時点で血液及び尿を採取した。注射 2 日後の生検を二頭筋に対して行った。注射後 7 日目に動物を殺し、骨格筋（四頭筋、横隔膜、二頭筋、三角筋、前脛骨筋（Tia）、平滑筋（食道、大動脈、結腸）及び心筋（心室、心房）を採取し、粉碎し、エクソンスキッピング及び組織における生体内分布の評価のために -80℃で保存した。

30

【表 2 8】

表 1 1 : NHP 実験の実験計画

グループ	動物の性別	試験項目	用量レベル mg/kg	投与体積 (5mL/kg)	投与レジメン	終了時点
1	雌	EEV-PMO-DMD44-1	40	10	IV 注入	注射7日後
2	雌	EEV-PMO-DMD44-2	40			

40

50

【表 2 9】

表 1 2 : NHP 実験の時点

グループ	母体	検出因子	血液量	サンプル量	投与後のサンプリング時点
1-2	血清	サイトカインパネルIL-2/4/5/6/10/13/TNF α /IFN- γ	0.5mL	2×100 μ L	投与前(0時間)、1.5時間(完全注入後30分)、24時間及び7日目
	血液	血液学	0.5mL	0.5mL	投与前(0時間)、5分(0.083時間)注入中、24時間及び7日目
	血清	マグネシウムを含む臨床化学	1mL	400 μ L	投与前(0時間)、5分(0.083時間)注入中、24時間及び7日目
	血液	凝固	1.8mL	1.8mL	投与前(0時間)、5分(0.083時間)注入中、24時間及び7日目
	尿	クレアチニンを含む尿検査		4mL	投与前(0時間)、及び25~29時間及び7日目
	尿及び糞便*	スポンサーへの追加の採取		4mL	投与前(0)、0~6時間、6~12時間、12~24時間、24~48時間
	筋肉*	上腕二頭筋における生検部位当たり2コア		2×(30~50)mg	2日目
	プラズマ*	PK分析サンプルはスポンサーに送られる	0.5mL	2×100 μ L	投与前(0時間)、30分(0.5時間)注入中、55分(0.92時間)注入中、65分(1.083時間)、1.5時間、3時間、9時間、25時間、39時間、97時間、及び169時間(7日目)。
1. 注入の開始時点からのタイマー。2. 血液学、臨床化学、凝固及び尿検査の投与前試験を、投与の1週間前に行う。					

【0498】

生体分析試料分析：組織を解凍し、秤量し、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル（ThermoFisher Scientific、参照番号1860932）を添加したRIPA緩衝液でホモジナイズした（w/v、1/5）。ホモジネートを4℃で5分間、5000rpmで遠心分離した。上清をH₂O、アセトニトリル及びMeOHの混合物で沈殿させ、15000rpm、4℃で15分間遠心分離した。Triple Quad Sciex 4500装置と統合されたShimadzu UPLCを使用するLC-MS/MS分析のために、上清を注入プレートに移した。LC-MS/MSアッセイのダイナミックレンジは、25~50,000ng/g組織であった。LC-MS/MS法の詳細は、本明細書及び表13に概説されている。簡単に説明すると、Waters Acuity UPLC BEH C4、300Å、1.7 μ m、2.1×150mm、緩衝液A：H₂O、0.2%FA、緩衝液B：H₂O中95%アセトニトリル、0.2%FA、流速（0.3mL/分）及び50℃のカラム温度を使用して、UPLCを操作した。10分間の実行は、2%緩衝液Bで開始し、3.5分間にわたって35%まで上昇させ、続いて1分間にわたって90%まで上昇させ、2.5分間にわたって90%勾配を維持し、最後に2分間にわたって2%勾配で実行した。MRM法は、7.5分間にわたって、正の極性、ターボスプレーイオン源、カーテングス：25、衝突ガス：6、イオンスプレー電圧：5500、温度：500、イオン源ガス1：60、イオン源ガス2：60、で確立された。表13の下線を引いた行は、インタクトな対応する代謝産物（235-PEG12）の定量化に使用される。

10

20

30

40

50

【表 3 0】

表 1 3 : LC-MS/MS アッセイ

分析物	Q1 質量 (Da)	電荷 状態 (m/z)	Q3 質量 (Da)	時間 (msec)	DP (ボルト)	EP (ボルト)	CE (ボルト)	CXP (ボルト)
EEV-PMO-DMD44-1/EEV-PMO-DMD44-2	835.6	13	112.0	50.0	80.0	8.0	80.0	10.0
EEV-PMO-DMD44-1/EEV-PMO-DMD44-2	776.0	14	112.0	300.0	80.0	8.0	80.0	10.0
EEV-PMO-DMD44-1/EEV-PMO-DMD44-2	724.3	15	112.0	50.0	80.0	8.0	80.0	10.0
M1	879.0	10	112.0	50.0	80.0	8.0	80.0	10.0
M1	799.2	11	112.0	50.0	80.0	8.0	80.0	10.0
M1/245-PEG12	732.7	12	112.0	300.0	80.0	8.0	80.0	10.0
IS	863.8	12	112.0	100.0	80.0	8.0	80.0	10.0

【0 4 9 9】

RT-PCRによるエクソンスキッピング分析：hDMDマウス及びNHPは、全長ヒトジストロフィンmRNAを発現する。ACの送達はスプライシングを変化させ、エクソン44スキッピング後に短縮されたジストロフィンmRNAをもたらす得る。組織を、1 mLのRLT溶解緩衝液（Qiagen、カタログ番号79216）を使用してホモジナイズした。スプライシング修正プロセスの検出をRT-PCRによって測定し、この場合、組織から抽出されたRNAをまずcDNAに逆転写し、更に以下のプライマーセット：順方向プライマー5'-GCTCAGGTCGGATTGACATT-3'及び逆方向プライマー5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3'を用いるワンステップRT-PCRによって分析した。スプライシング修正を伴わない組織のRT-PCR読み出しでは、641 bp遺伝子フラグメントが得られ、スプライシング修正後に新たな493 bp遺伝子フラグメントが現れた。スキッピングされた転写物及びスキッピングされていない転写物に対応するバンドの相対強度の定量化を実施して、AC誘導性エクソン44スキッピング有効性を評価した。RT-PCRによって検出されたスプライシング修正の程度（パーセンテージ）を、以下の式：修正% = (493 bpフラグメントバンドの強度) / (493 bpフラグメントバンドの強度 + 641 bpフラグメントバンドの強度) を使用して計算した。

【0 5 0 0】

結果：患者筋管におけるEEV-PMO-DMD44-1、EEV-PMO-DMD44-2、及びEEV-PMO-DMD44-3の有効性（図21）：各々ヒトジストロフィン（DMD）エクソン44を標的とするEEV-PMO-DMD44-1、EEV-P

MO-DMD44-2、及びEEV-PMO-DMD44-3を、DMD患者由来筋細胞におけるDMDエクソン44スキッピングについて評価した。簡単に説明すると、エクソン45欠失を有する患者由来筋芽細胞(DMDΔ45)を、2%ウマ血清及び1%ニワトリ胚抽出物を補充したPromoCell骨格筋細胞増殖培地中、1μM、3μM及び10μMのEEV-PMO-DMD44-1、EEV-PMO-DMD44-2、及びEEV-PMO-DMD44-3で24時間処理した。24時間後、化合物含有増殖培地をDMEM/2%ウマ血清と交換し、5日間インキュベートして筋芽細胞の融合及び筋管への分化を促進した。細胞を洗浄し、エクソン44スキッピングを評価するためのRNA抽出のために回収し、またはタンパク質抽出及びジストロフィンタンパク質回復のシンプルウェスタン分析のために、プロテアーゼ阻害剤を含有するRIPA緩衝液中に回収した。ジストロフィンレベルをHSP90に対して正規化し、未処置の健常試料と比較して表した。データは、平均±SD、n=3~4として表す。未処置のDMDΔ45患者由来細胞は、ベースラインで約10%の自発的DMDエクソン44スキッピング及び約4%のジストロフィンタンパク質を発現する。3個の化合物は全て、用量依存的にロバストなエクソンスキッピング及びジストロフィンタンパク質の回復をもたらした。

10

【0501】

図22A及び図22Bは、IV注射によってEEV-PMO-DMD44-1(図22A)及びEEV-PMO-DMD44-2(図22B)を投与したhDMDマウスにおけるエクソンスキッピングを示す。重篤な副作用は観察されなかった。マウスは全て、注射後、注射の24時間後及び殺日前に正常であった。肝臓及び腎臓毒性(アルカリホスファターゼ(ALP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(ALT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アルブミン、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン、カルシウム、リン、塩化物、カリウム、ナトリウム、BUN/クレアチニン、マグネシウム)並びに溶血及び脂肪血指数を測定する臨床化学を、IV注射の5日後に評価する。EEV-PMO-DMD44-1及びEEV-PMO-DMD44-2処置マウスにおいて、臨床化学評価によって有意な毒性は検出されなかった。様々な筋肉群における組織濃度及びエクソンスキッピングを、10、20、40、及び80mpkのIV投薬の5日後に評価した。心臓/三頭筋/TiA/横隔膜組織でそれぞれEEV-PMO-DMD44-1の各用量について以下のエクソンスキッピングを達成した: 10mpk(0%、6%、12%、6%)、20mpk(0%、22%、36%、33%)、40mpk(20%、94%、99%、82%)、80mpk(79%、97%、99%、98%)。心臓/三頭筋/TiA/横隔膜組織でそれぞれEEV-PMO-DMD44-2の各用量について以下のエクソンスキッピングを達成した: 10mpk(0%、17%、22%、14%)、20mpk(2%、44%、58%、35%)、40mpk(17%、92%、95%、83%)、80mpk(79%、98%、99%、99%)。フルサイズのヒトDMD遺伝子を有するトランスジェニックマウスモデルの心筋及び骨格筋において、EEV-PMO-DMD44-1及びEEV-PMO-DMD44-2の両方で強い用量依存的蓄積及び強力なエクソンスキッピングが観察された。より低い用量(10mpk及び20mpk)では、EEV-PMO-DMD44-2薬物の曝露及び有効性は、EEV-PMO-DMD44-1よりもわずかに高かった。しかしながら、この効果は40mpk用量で減少し始め、両化合物は全ての骨格筋において同じ高レベルのエクソンスキッピング(80%超)をもたらした。EEV-PMO-DMD44-1の対応する組織濃度は、100~300ng/g組織の範囲であったが、EEV-PMO-DMD44-2については、この範囲は、わずかにより高い数値、300~500ng/g組織の濃度にシフトした。興味深いことに、心臓におけるEEV-PMO-DMD44-1及びEEV-PMO-DMD44-2の両方についての最小有効用量は、それぞれ、組織1g当たり170ng及び350ngの濃度に相当する40mpkで達成された。

20

30

40

【0502】

EEV-PMO-DMD44-1は、80、100、160、200及び300mpk用量でCD1マウスに投与された全ての用量で非常に忍容性が高かった。一過性の症状の

50

みが観察され、それは注射1時間後に完全に消散した。注射の1日後及び7日後にバイオマーカー異常は観察されなかった。EEV-PMO-DMD44-2は、忍容性が低かった。最高用量のEEV-PMO-DMD44-2(300mpk)では、3匹のマウスのうち1匹が注射後1~3時間以内に死亡した。より低い用量のEEV-PMO-DMD44-2(200mpk)では、3匹のマウスのうち1匹が重度の症状を有していた(刺激に対して反応しない、耳が垂れ下がる、呼吸が遅い、自己を正そうともがく)。これらの症状は次第に悪化し、筋肉攣縮を併発した。160及び80mpkの低用量では、症状は観察されなかった。驚くべきことに、100mpkでは、3匹のマウスのうち1匹が注射2時間後に遅延症状を示したが、それらは注射の1日後及び7日後には完全に正常であった。

10

【0503】

cCOP-ACコンジュゲートのエクソンスキッピングの有効性を更に実証するために、NHPを利用した。具体的には、インタクトな筋肉組織を有するカニクイザルに、忍容性の良好なEEV-PMO-DMD44-1またはEEV-PMO-DMD44-2を40mg/kgで60分間にわたってIV注入を施した。より具体的には、動物は、処置の45分で生じる吐き気を経験し、これは、処置のおよそ3時間後に有意に解消され、動物は、より機敏になり、猫背でなくなり、提供された農産物を食べた。投与の約20時間後、動物は(明るく、機敏で、動物が表現型的に「正常」であるように反応する)(BAR)であり、ケージ内にはビスケットが全く残っておらず、農産物を食べることが観察された。

20

【0504】

注射の2日後及び7日後に臨床化学パネルにおいて異常は観察されなかった。異なる組織におけるエクソン44スキッピングパーセンテージを、標準的なプロトコルに従って分析した。図23のA~Bは、EEV-PMO-DMD44-1についてのエクソンスキッピング(図23のA)及び薬物曝露(図23のB)を示す。図24のA~Bは、EEV-PMO-DMD44-2についてのエクソンスキッピング(図24のA)及び薬物曝露(図24のB)を示す。両化合物は、注射の7日後にIVによって40mpkで、異なる筋肉群にわたって優れたエクソンスキッピングレベルを示した。EEV-PMO-DMD44-1は、有効性の観点から、TiA、横隔膜において優れており、心室及び心房においてはあまり顕著ではなかった。全ての骨格筋において、78%を超えるエクソンスキッピングが達成され、横隔膜においては最大98.4%であった。心臓組織では、40mpkでのEEV-PMO-DMD44-1は、心室及び心房においてそれぞれ31.9%及び23.4%をもたらした。平滑筋において、食道は、57.1%という最も高い有効性を示した。EEV-PMO-DMD44-1及びEEV-PMO-DMD44-2の両方は、薬理学的に適切な濃度で種々の組織に分布していた。いくつかの場合、例えば、心臓組織における心室及び心房や、より顕著には食道及び結腸においては、同じ組織濃度が同じ機能的送達に転じることはなかった。これは、異なる組織におけるエンドソーム脱出レベルが異なる可能性があることを示しているのかもしれない。それにもかかわらず、骨格筋では、組織1g当たり約200ngの濃度が80%を超える強いエクソンスキッピングに相関する一方で、心臓組織では、組織1g当たり800~1000ngの濃度が、心房及び心室におけるおよそ合わせて50%のエクソンスキッピングに相関していた。心臓組織は送達がより困難な組織であり、DMDなどの神経筋障害の治療に重要な組織であるので、40mpkのcCOP-ACコンジュゲートの単回用量のみによる50%エクソンスキッピングは非常に有望である。

30

40

【0505】

患者由来の筋細胞：エクソン44スキッピングのための化合物(EEV-PMO-DMD44-1)をDMD患者由来の筋細胞に添加し、完全長ヒトジストロフィン遺伝子を発現するhDMDトランスジェニックマウスに投与して、DMD転写物補正のためのヒト配列特異的PMOについて試験した。図25Aは、EEV-PMO-DMD44-1で処理したDMD患者由来筋細胞におけるジストロフィンのロバストな用量依存的エクソンスキ

50

ッピング及び回復を示す。EEV-PMO-DMD 44-1で処理したDMD患者由来筋細胞において、非処理患者由来細胞及び健常細胞の両方と比較して、用量依存的エクソン44スキッピング及びジストロフィンタンパク質回復が観察された（それぞれ最大100%及び43.7%）。図25Bは、10mg/kgから80mg/kgの範囲の様々なレベルで漸増IV用量のEEV-PMO-DMD 44-1を投与した後の、完全長ヒトDMD遺伝子の組み込まれたコピーを有するトランスジェニックマウスにおける心筋及び骨格筋における用量依存的組織曝露及びエクソンススキッピングを示す。エクソンススキッピング及び組織曝露を各々投与の5日後に評価した。並進的に関係する用量での最大80%の組織曝露及び最大100%のエクソンススキッピングの用量依存的レベルが観察された。

【0506】

hDMDトランスジェニックマウスの心臓（図26のA）、前脛骨筋（図26のB）及び横隔膜（図26のC）において、10、20、40及び80mg/kgでのEEV-PMO-DMD 44-1の静脈内（IV）投与の後に用量依存的な組織曝露及びエクソンススキッピングが認められた。

【0507】

EEV-PMO-DMD 44-1の単回の30mg/kgのIV用量（1時間の注入）をNHPに投与し、NHPの血漿においてEEV-PMO-DMD 44-1の循環半減期の延長が最長50時間にわたって認められた（データ示さず）。この薬物動態プロファイルは、延長された組織曝露、標的結合及び薬力学的効果を獲得するのに有利な状況を示唆している。IV注入の7日後には、EEV-PMO-DMD 44-1処置NHPから単離された種々の筋肉群にわたってロバストなエクソン44スキッピングが認められた（図11のB）。このように、EEV-PMO-DMD 44-1投与NHPでは、半減期の延長、及び高いレベル（二頭筋ではほぼ90%）のエクソンススキッピングが認められた。

【0508】

図27は、NHPにおいてEEV-PMO-DMD 44-1の循環半減期の延長が認められたことを示す。

【0509】

図28は、EEV-PMO-DMD 44-1の単回30mg/kg IV用量が、NHPの骨格筋及び心臓の両方において有意なレベルのエクソンススキッピングをもたらしたが、これにより、翻訳能の信頼性をもたらされることを示す。30mg/kgでの1時間のIV注入の7日後に、EEV-PMO-DMD 44-1処置NHPから単離された種々の筋肉群にわたってロバストなエクソン44スキッピングが観察された。

【0510】

これらの結果は、翻訳データのロバストなセットを表す。エクソンススキッピングは、心臓及び骨格筋における有望なジストロフィン産生につながる。ジストロフィン産生は、機能的改善をもたらすのに十分である。ジストロフィン産生は、単回注射後4週間以上にわたって持続した。

【0511】

hDMDマウス：ヒトジストロフィーマウスに15mg/kgのEEV-PMO-DMD 44-1か、同じエクソン44スキッピングPMOにコンジュゲートされたR6（ポリアルギニン）直鎖状ペプチドかのいずれかをIV投与した。心臓（図29のA）、横隔膜（図29のB）及び三頭筋（図29のC）におけるエクソンススキッピングは、EEV-PMO-DMD-44で処置したマウスでは60%～およそ95%であり、R6-PMOを投与したマウスでの20%未満のエクソンススキッピングとは対照的であった。

【0512】

実施例7。CD1マウスにおけるEEV-PMO-DMD 44-1の薬物動態試験

CD1マウスモデルを使用して、EEV-PMO-DMD 44-1、及びEEV-PMO-DMD 44-1の主要代謝産物であるPMO-DMD 44-1に対する血漿、腎臓及び前脛骨筋の薬物曝露（AUC）を調べた。

【0513】

10

20

30

40

50

5～7週齢のマウスを80mpkのEEV-PMO-DMD44-1またはPMO-DMD44-1で静脈内注射によって処置した。様々な時間点でマウスの採血及び／または殺を行った。

【0514】

表14、表15及び表16はそれぞれ、血漿、腎臓及び前脛骨筋において認められた薬物動態特性を示す。表において、 AUC_{last} =ゼロから最終定量可能濃度までの曲線下面積；D=用量； C_{max} =最大の血清または血漿濃度； T_{max} = C_{max} に達するまでの時間；CL=血漿、血清または血液総クリアランス； $t_{1/2}$ =消失半減期； V_{ss} =平衡時の見掛けの分布体積； Q_h =肝臓血流量（mL/分/kg）である。

【0515】

前脛骨筋において代謝産物のAUC値は、腎臓と比較して約1000分の1の低さである。血漿での代謝産物平均滞留時間（MRT）値は、尿排泄前に組織から血漿へと移動する結果として、そのまま組織MRT値と関係付けられ得る。

【表31】

表14．血漿薬物動態特性

	EEV-PMO-DMD44-1	PMO-DMD44-1
$AUC_{last}(nM \cdot \text{時})$	7768	522
AUC_{last}/D	1053	71
$C_{max}(nM)$	9322	6
C_{max}/D	1264	0.8
$T_{max}(\text{時間})$	0.1	48
CL (mL/分/kg)	16	-
$Q_h(\%)$	18	-
$t_{1/2}(\text{時間})$	21	56
$MRT_{last}(\text{時間})$	1.0	60.4
$V_{ss}(mL/kg)$	983	-

【表32】

表15．腎臓薬物動態特性

	EEV-PMO-DMD44-1	PMO-DMD44-1
$AUC_{last}(pmol/g \cdot \text{時})$	36171	8508417
AUC_{last}/D	4905	1153875
$C_{max}(pmol/g)$	4805	84778
C_{max}/D	652	11497
$T_{max}(\text{時間})$	4	72
$t_{1/2}(\text{時間})$	6	102
$MRT_{last}(\text{時間})$	9	75

【表 3 3】

表 1 6. 前脛骨筋薬物動態特性

	EEV-PMO-DMD44-1	PMO-DMD44-1
AUC _{last} (pmol/g*時)	-	8126
AUC _{last} /D	-	1102
C _{max} (pmol/g)	10	118
C _{max} /D	1	16
T _{max} (時間)	4	24
t _{1/2} (時間)	-	113
MRT _{last} (時間)	-	61

10

【0 5 1 6】

実施例 8：h D M D に対する有効性試験

方法：6つの群（n = 5）の雄の h D M D マウスを 8 0 m p k の E E V - P M O （E E V - P M O - D M D 4 4 - 1）で処置した。投与の 1、2 及び 4 週間後に組織を採取した。5つの組織：三頭筋、T A、横隔膜、心臓及び腓腹筋におけるエクソンスキッピングを R T - P C R によって判定した。

20

【0 5 1 7】

結果：横隔膜、T A、腓腹筋及び三頭筋ではエクソンスキッピングが少なくとも 1 2 週間にわたって維持された（図 3 0 の B ~ E）。心臓では 4 週でエクソンスキッピングに低下がみられた（図 3 0 の A）。

【0 5 1 8】

実施例 9：N H P に対する持続効果

方法：6匹の N H P に 4 5 m p k の単回用量の E E V - P M O - D M D 4 4 - 1 を 1 時間の I V 注入によって投与した。図 3 1 に示される時間点で二頭筋の生検を実施した。エクソンスキッピングを R T - P C R によって判定した。

30

【0 5 1 9】

結果：図 3 1 に示されるように、エクソンスキッピングは 2 日後に認められ、1 週頃にピークに達した。エクソンスキッピングは、単回 I V 用量の 1 2 週間後まで（見掛けの $t_{1/2} = 14$ 日で）持続した。ピークに近い有効性は、投与の 2 日後に認められた。

【0 5 2 0】

実施例 1 0：局在化

3つの構築物である、P M O 単独（P M O）、E E V にコンジュゲートされた P M O （E E V - P M O）、及び E E V と核局在化シグナルとにコンジュゲートされた P M O （E E V - N L S - P M O）の細胞内局在化を判定した。これらの構築物の配列情報を表 1 7 に示す。

40

【表 3 4】

表 1 7. 構築物

PMO:	5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'
EEV-PMO:	シクロ(FfΦRrRrQ)-PEG ₁₂ -NH-CH ₂ -CH ₂ -C(O)- 3'TAAAGTCCATTCGGCTCCAAACCGG ⁵
EEV-NLS-PMO	Ac-PKKKRKV-Lys[シクロ(FfΦRrRrQ)]-PEG ₁₂ -Lys(アジド-シクロ オクタ-2-イン-1-O-(CH ₂) ₄ -O-C(O))- 3'TAA AGT CCA TTC GGC TCC AAA CCG G ⁵

10

【0 5 2 1】

簡単に説明すると、THP-1 単球を 3 μM の PMO か EEV-PMO か EEV-NLS-PMO かのいずれかと接触させ、24 時間インキュベートし、LC-MS によって試験した。

【0 5 2 2】

図 3 2 A は、PMO 及び EEV-PMO 及び EEV-NLS-PMO についての全細胞取り込みを対比して示す。EEV-PMO 及び EEV-NLS-PMO は共に、PMO 単独に比べて細胞取り込みの著しい増加を示した。

20

- ・PMO に対して EEV-PMO : 約 3 倍
- ・PMO に対して EEV-NLS-PMO : 約 5 8 倍
- ・EEV-PMO に対して EEV-NLS-PMO : 約 1 9 倍

【0 5 2 3】

図 3 2 B は、LC-MS/MS を用いて決定された、PMO 及び EEV-PMO 及び EEV-NLS-PMO についての THP 細胞における細胞内局在化を対比して示す。図 3 2 B に示されるように、EEV-PMO は、PMO 単独に比べて改善された細胞浸透性を示す。-NLS の付加によって細胞浸透性が更に改善された。図 3 2 C は、3 つの構築物の核内取り込みを示す。

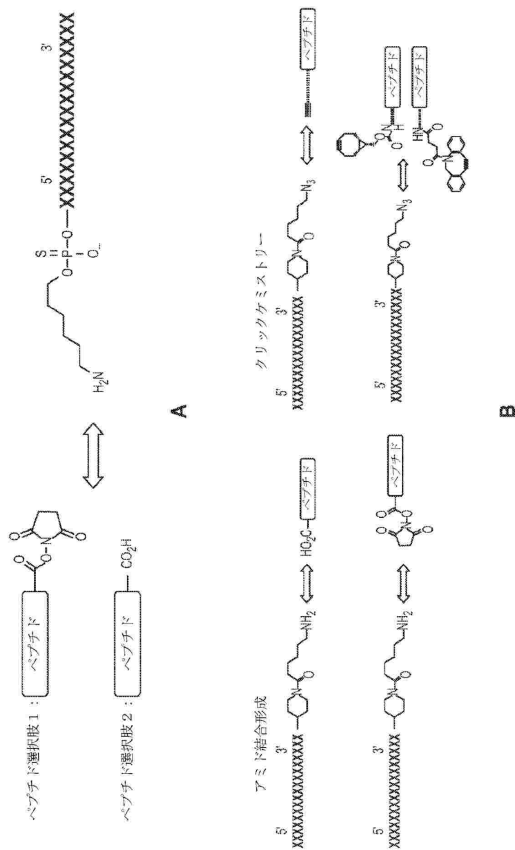
30

40

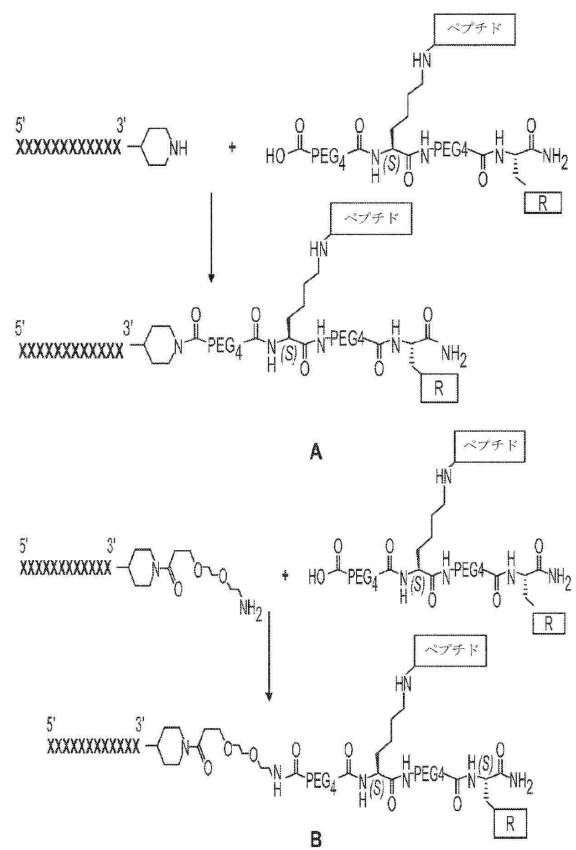
50

【図面】

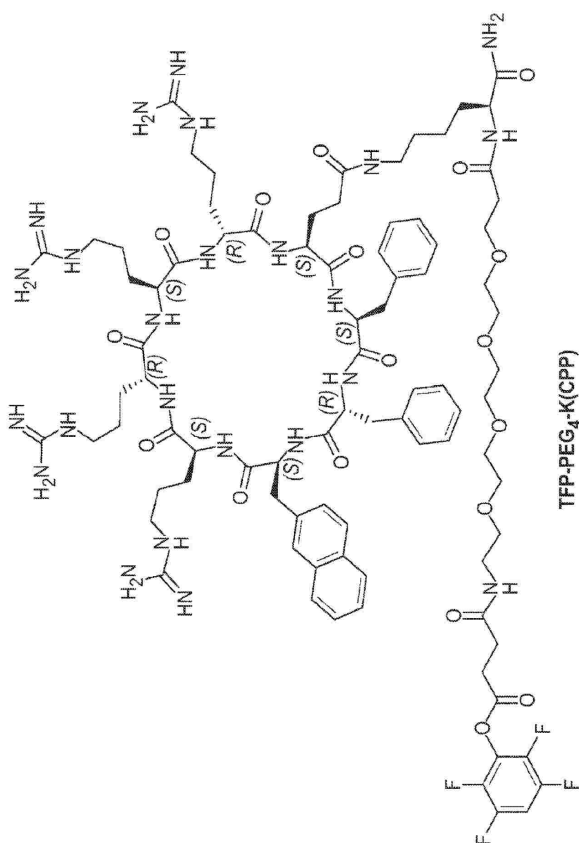
【図 1】



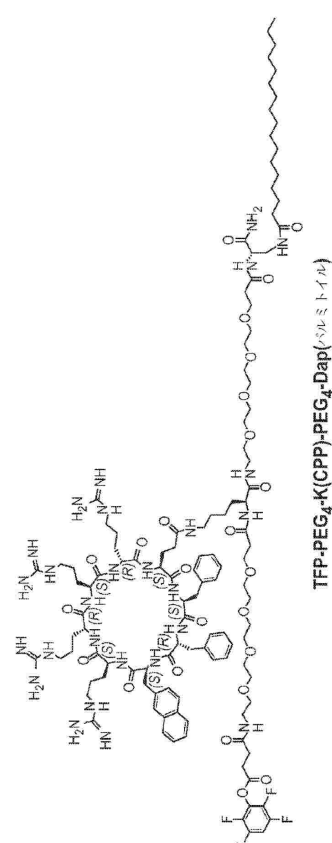
【図 2】



【図 3 - 1】



【図 3 - 2】



10

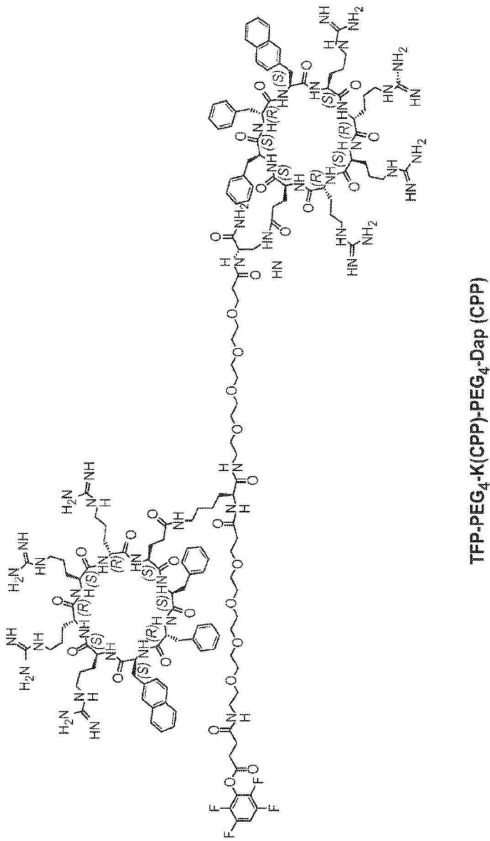
20

30

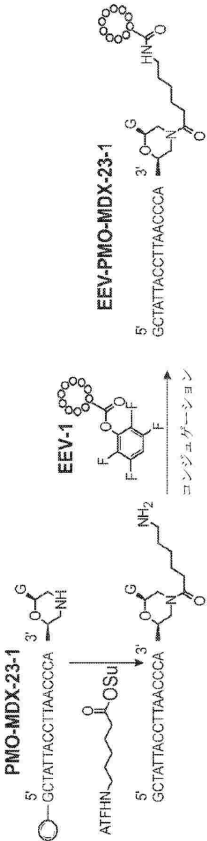
40

50

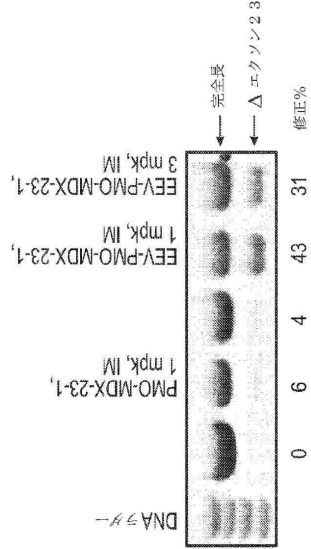
【図 3 - 3】



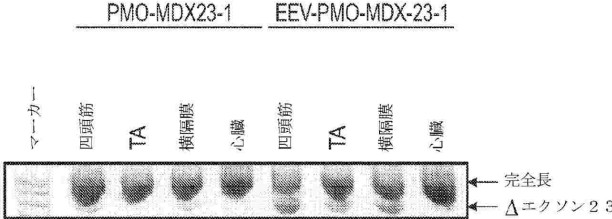
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



10

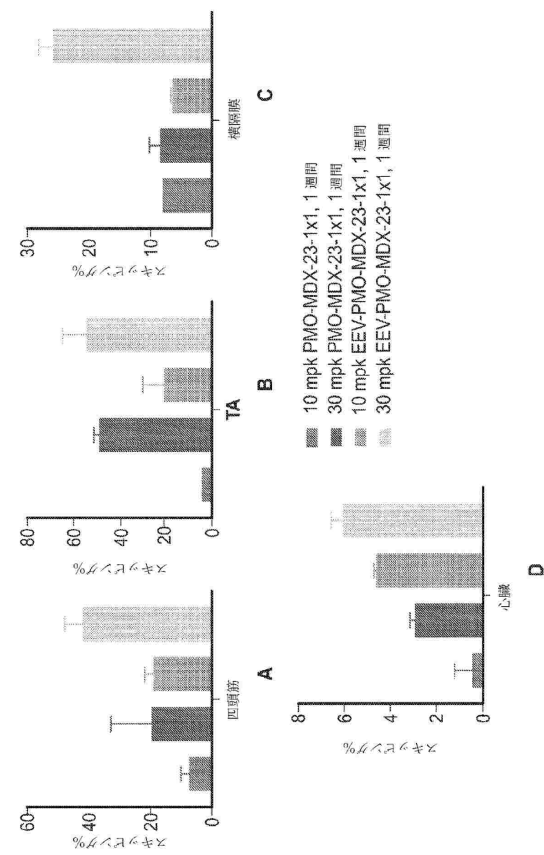
20

30

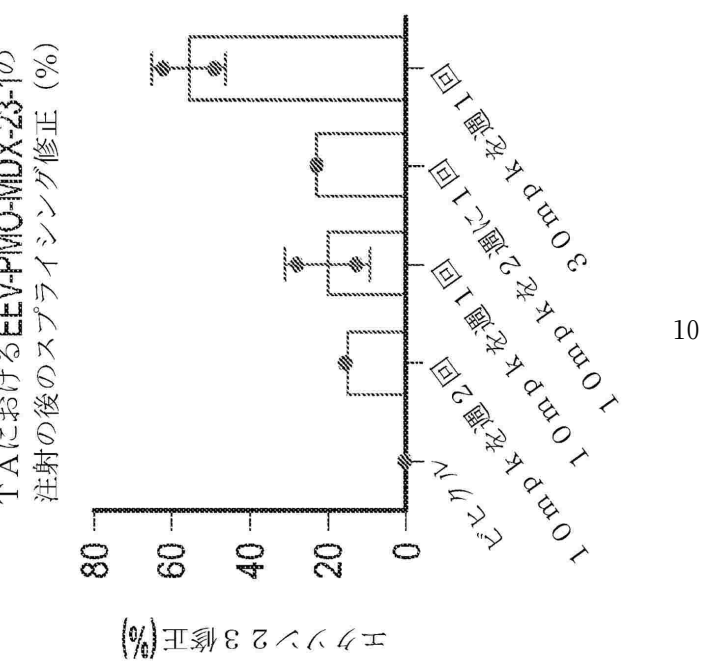
40

50

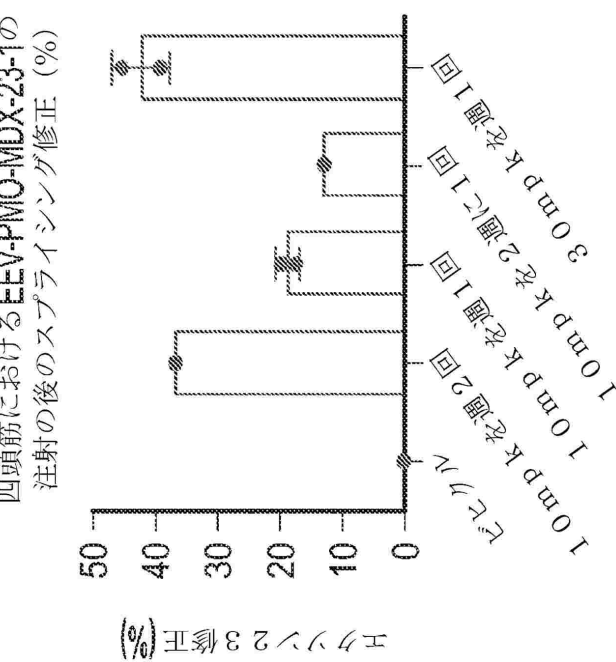
【図 5】



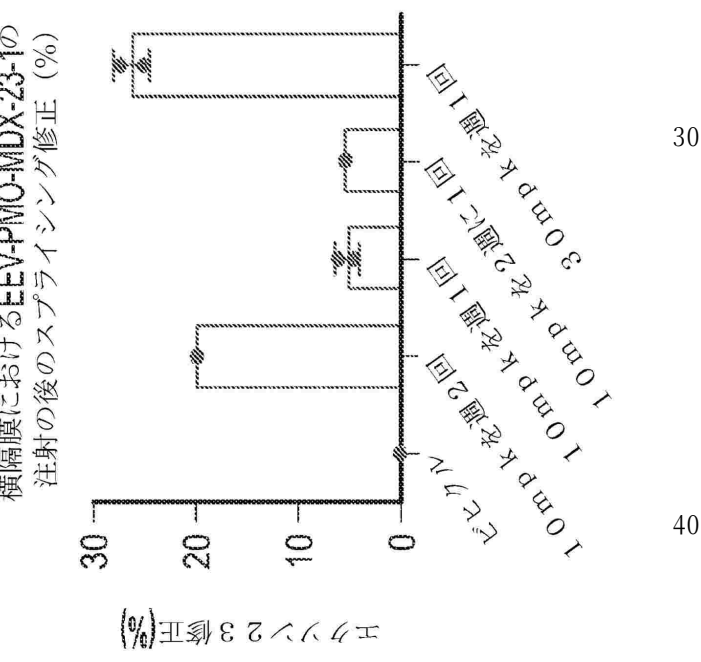
【図 6 A】



【図 6 B】

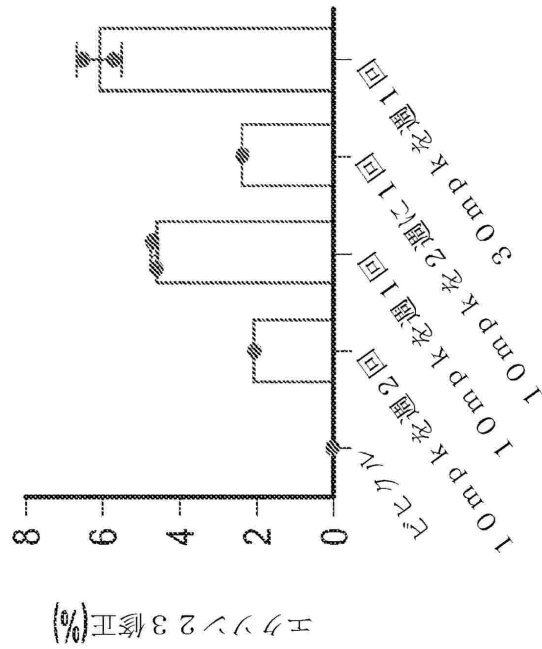


【図 6 C】

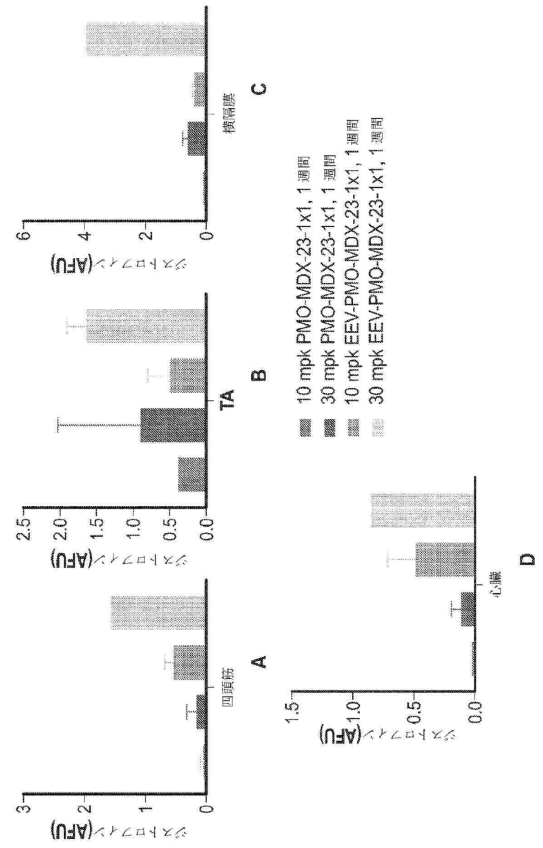


【図 6 D】

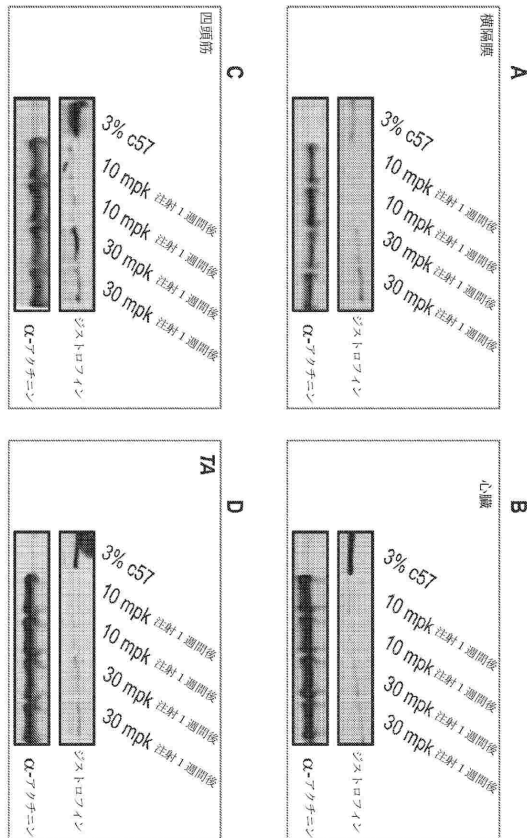
心臓におけるEEV-PMO-MDX-23-1の
注射の後のスプライシング修正 (%)



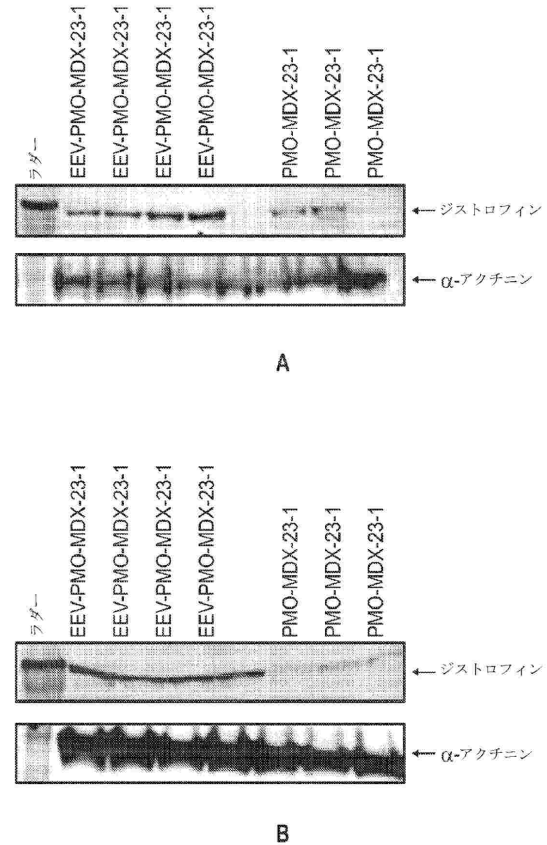
【図 7】



【図 8】



【図 9】



10

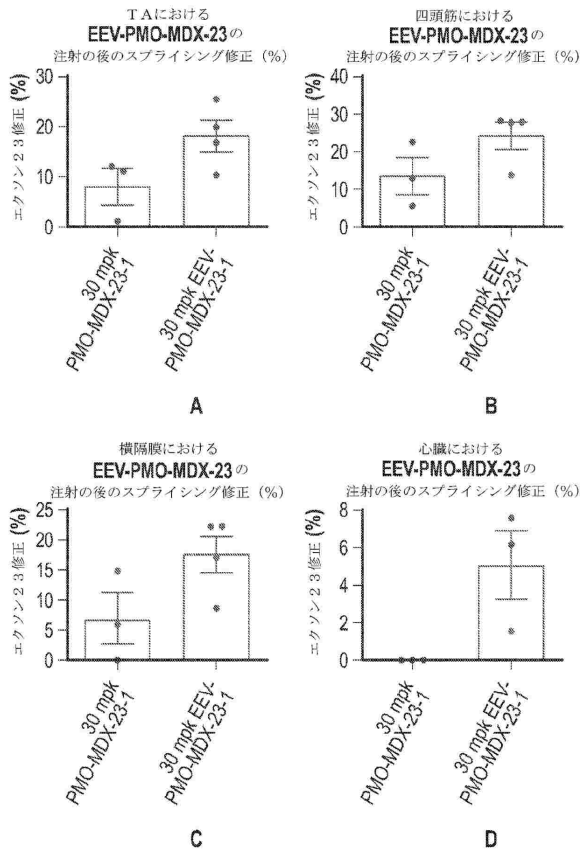
20

30

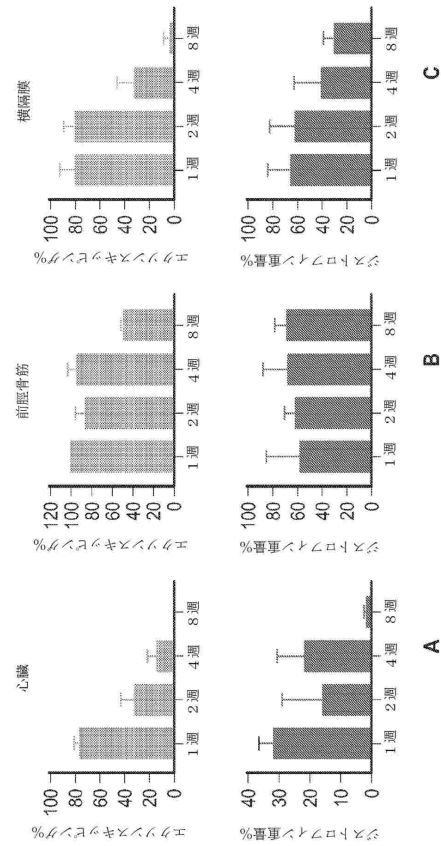
40

50

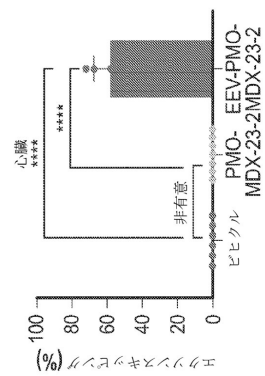
【図 10】



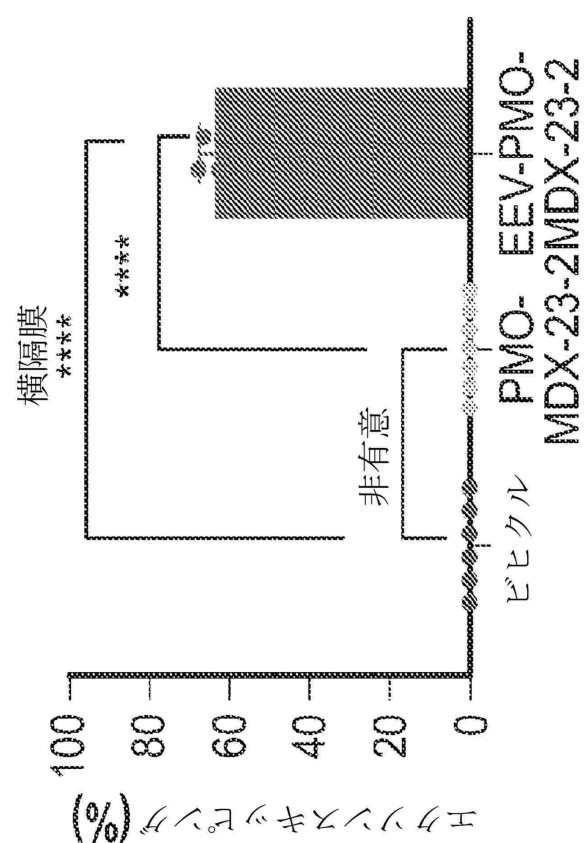
【図 11】



【図 12 A】



【図 12 B】



10

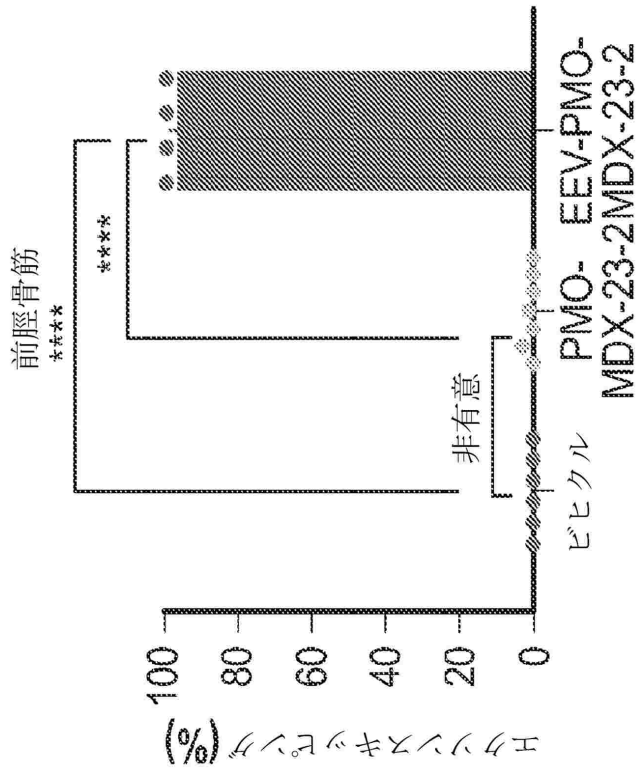
20

30

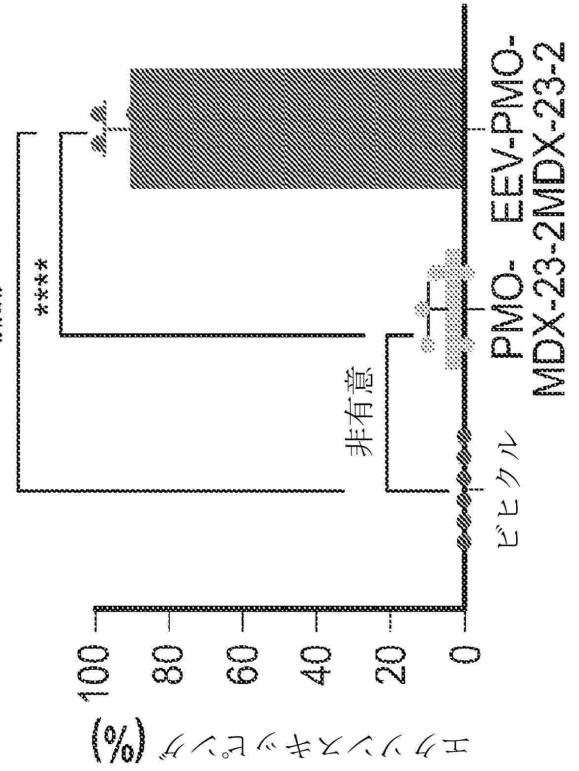
40

50

【図 1 2 C】



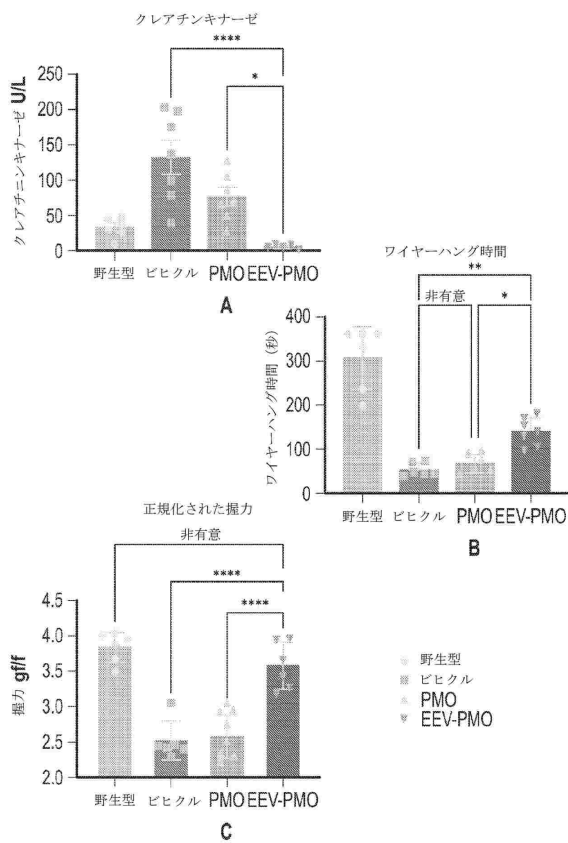
【図 1 2 D】



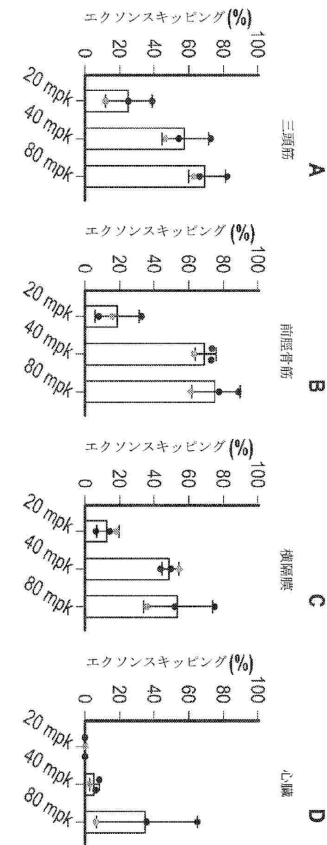
10

20

【図 1 3】



【図 1 4】

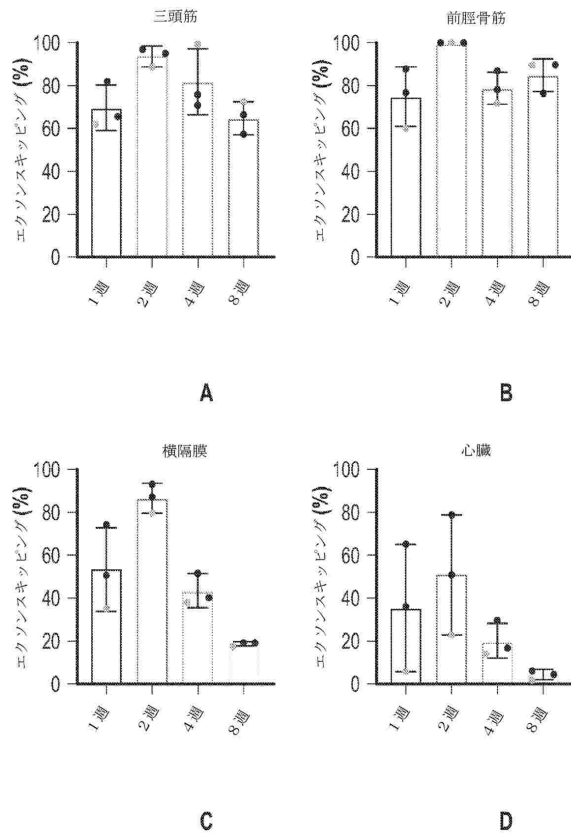


30

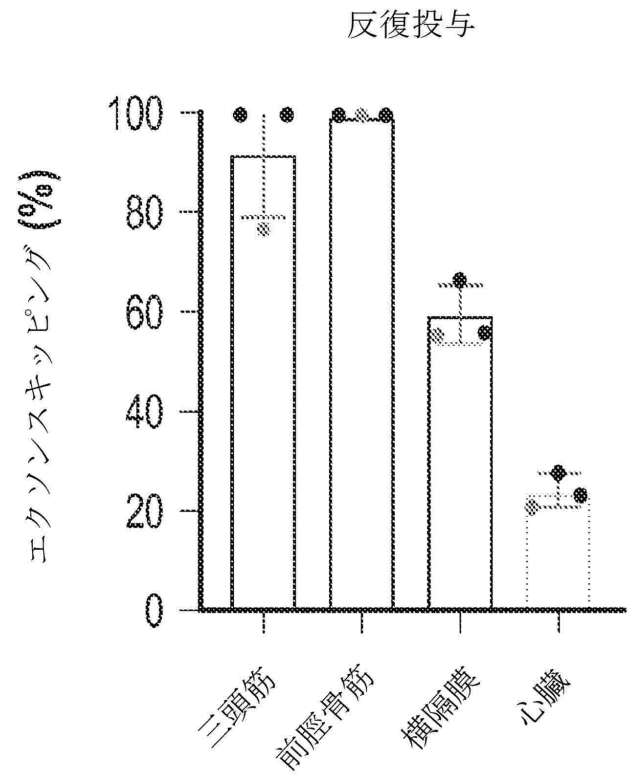
40

50

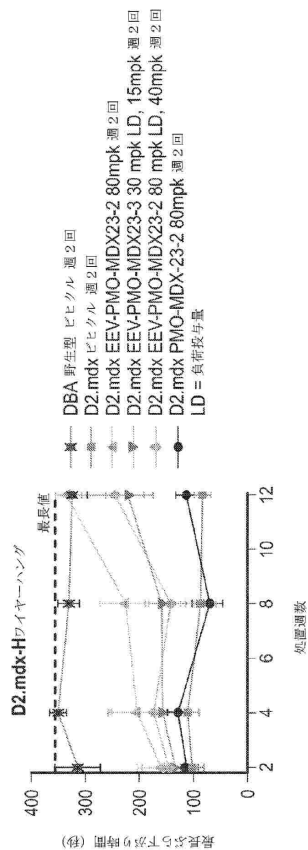
【図 15】



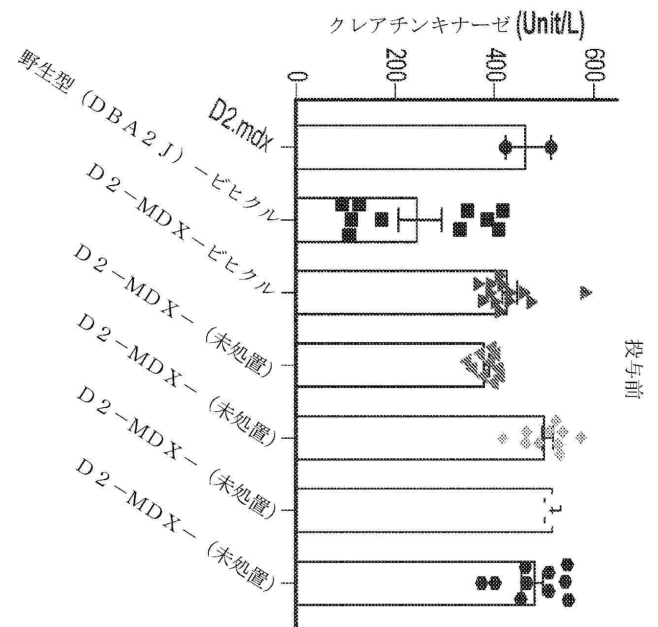
【図 16】



【図 17】



【図 18 A】



10

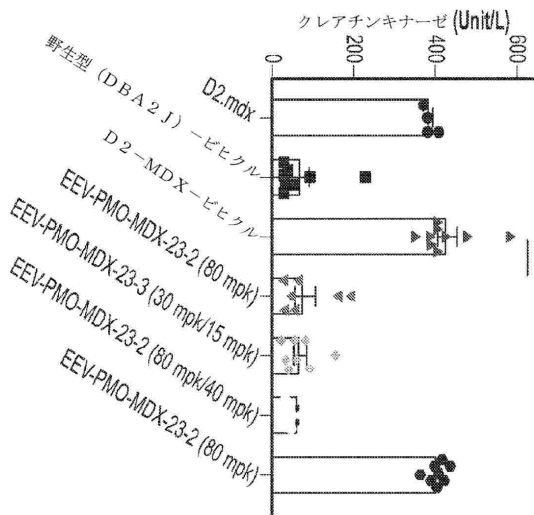
20

30

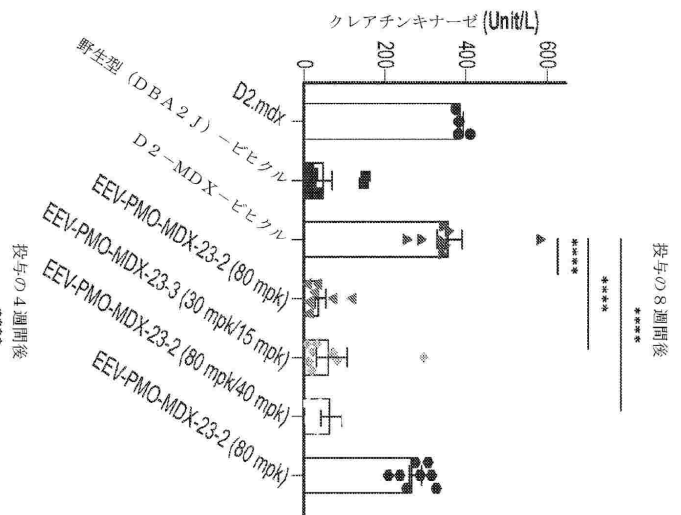
40

50

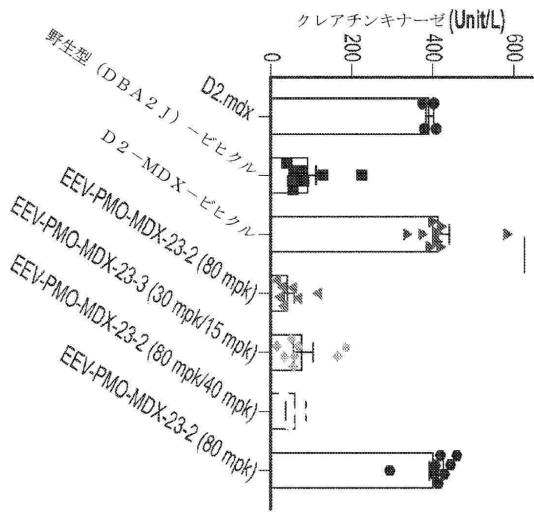
【図 18 B】



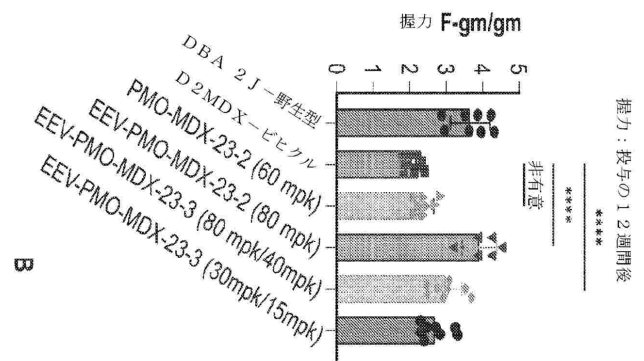
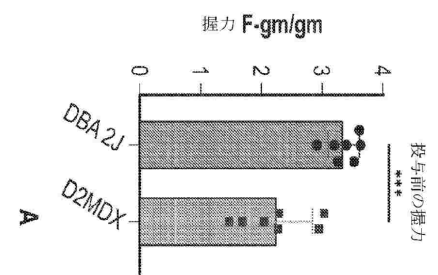
【図 18 C】



【図 18 D】



【図 19】



10

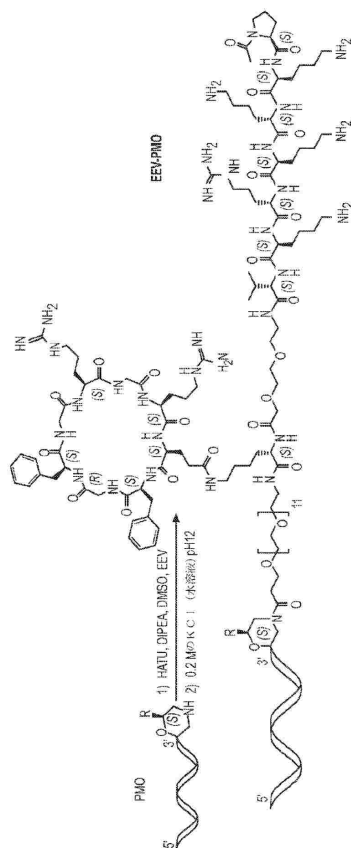
20

30

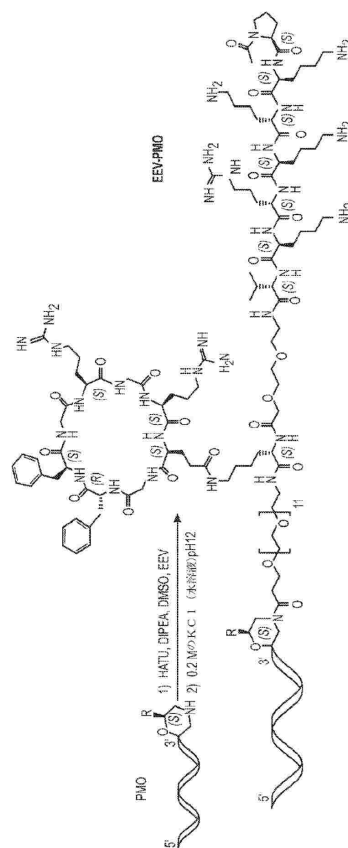
40

50

【図 20 A】



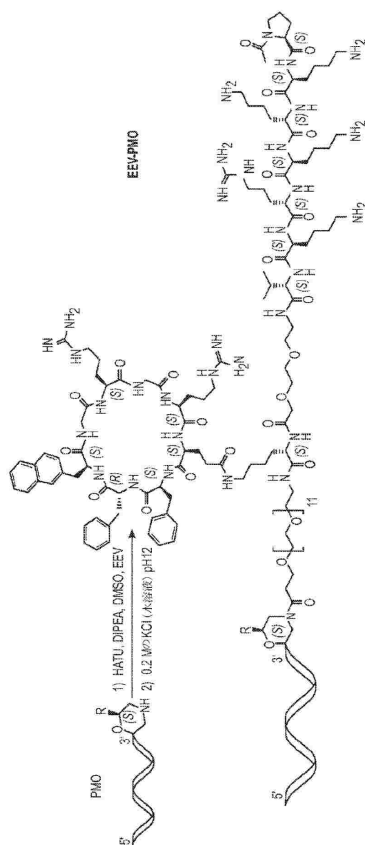
【図 20 B】



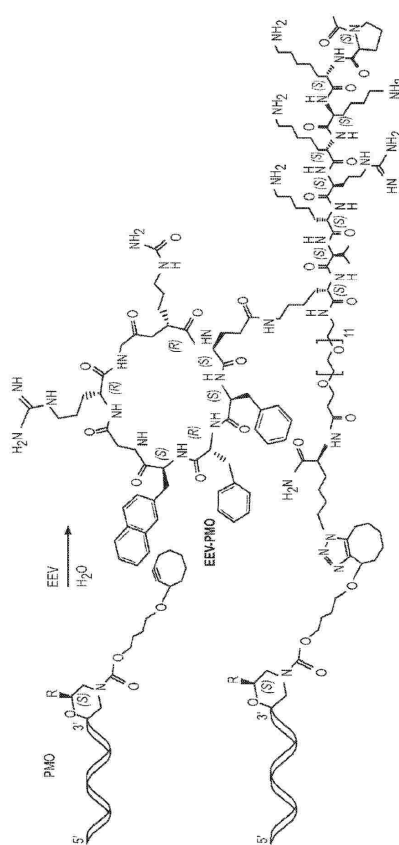
10

20

【図 20 C】



【図 20 D】

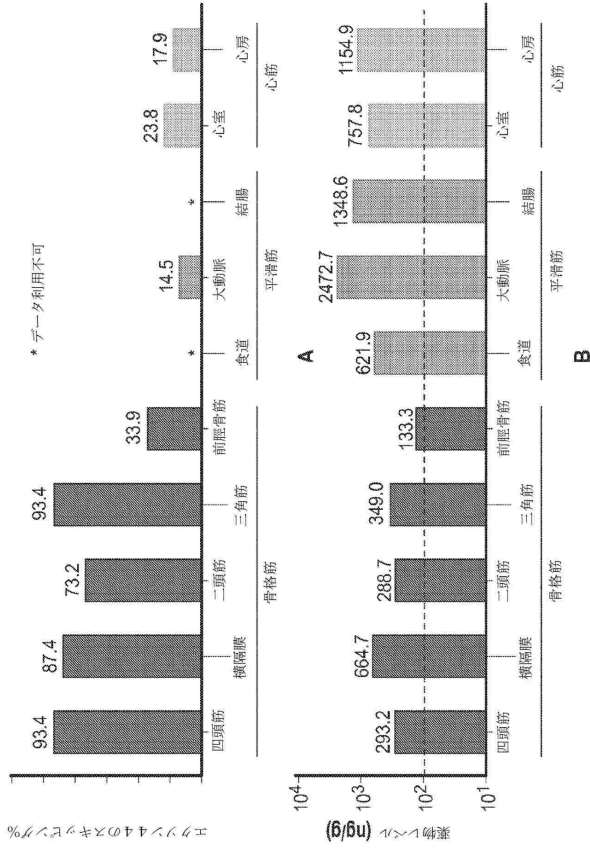


30

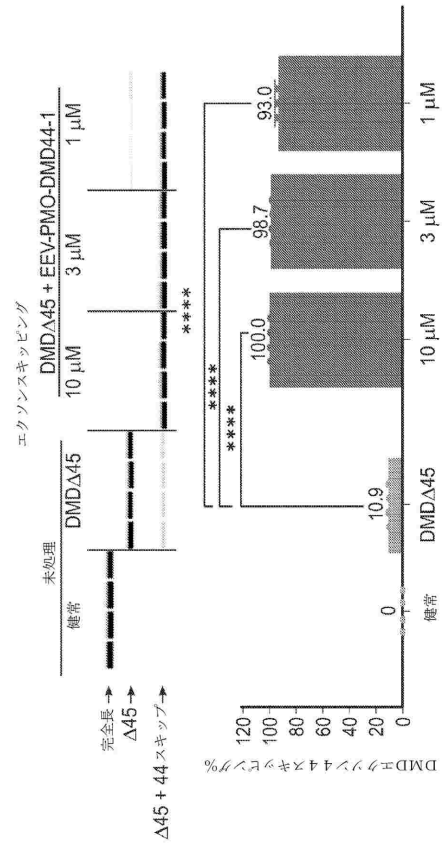
40

50

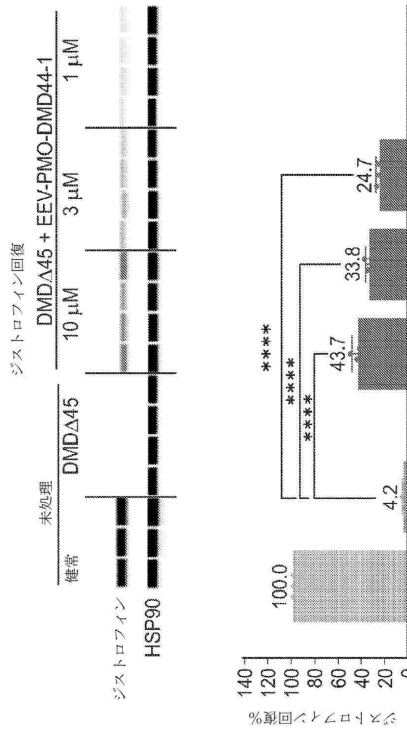
【図 2 4】



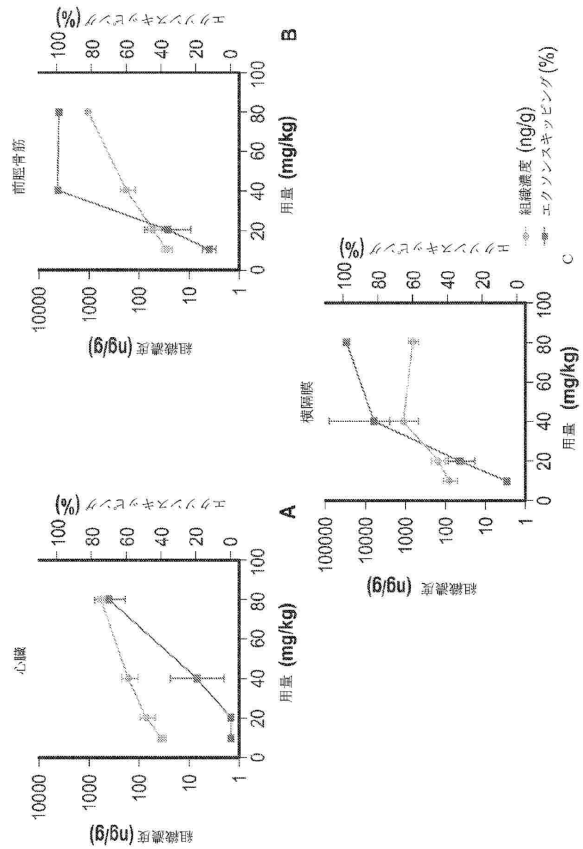
【図 2 5 A】



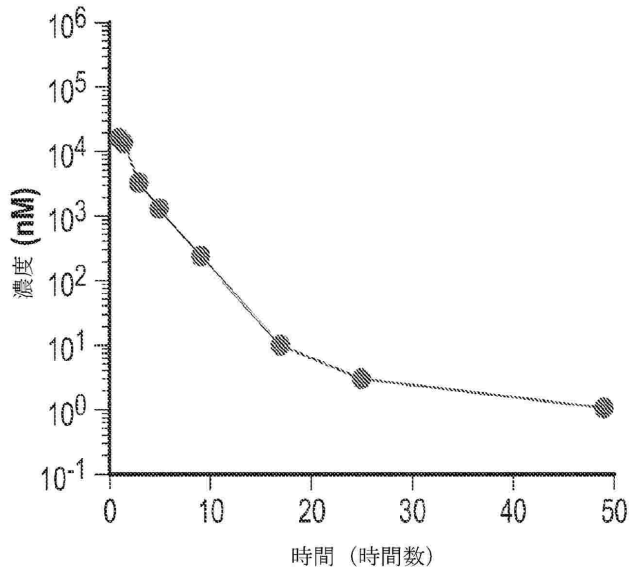
【図 2 5 B】



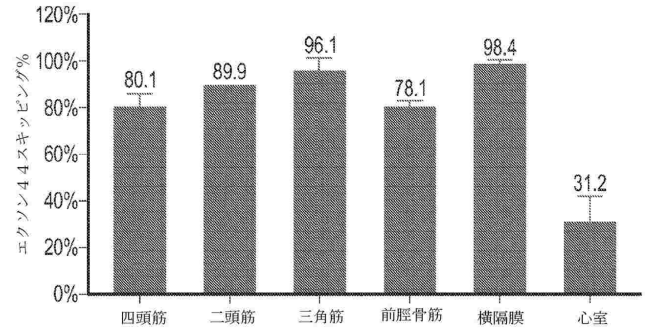
【図 2 6】



【図 27】

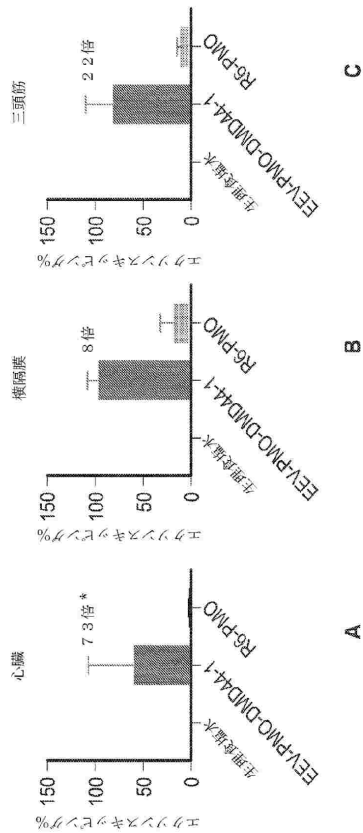


【図 28】

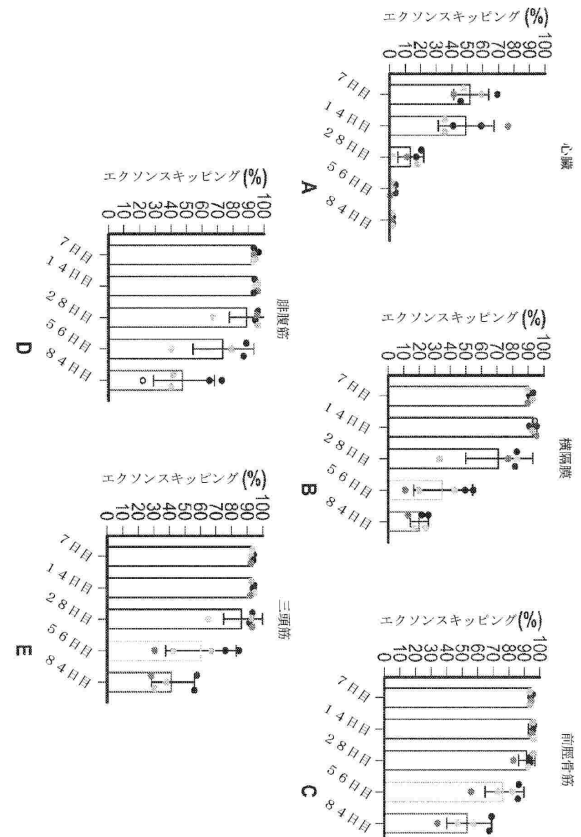


10

【図 29】



【図 30】



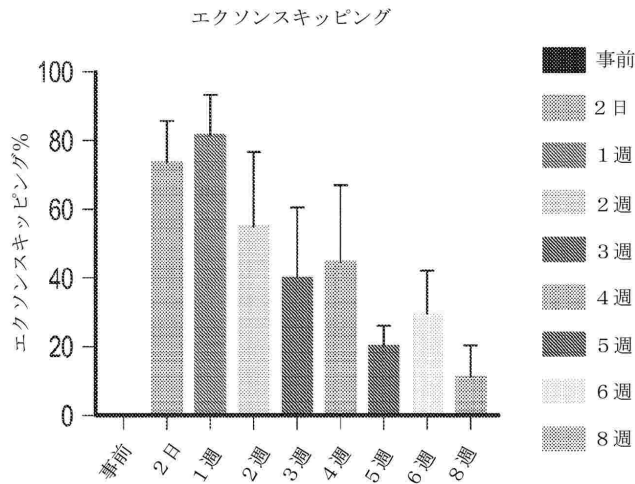
20

30

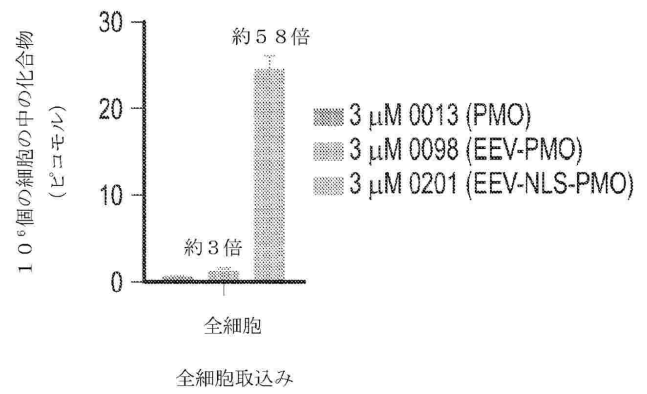
40

50

【図 3 1】

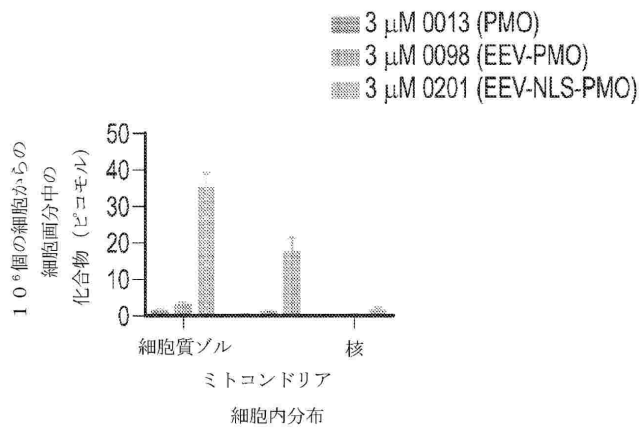


【図 3 2 A】

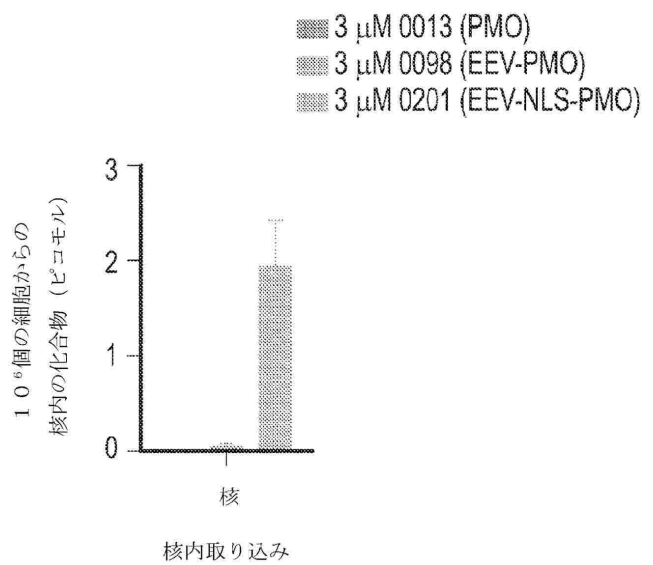


10

【図 3 2 B】



【図 3 2 C】



30

【配列表】

2024532464000001.xml

40

50

【手続補正書】

【提出日】 令和5年3月2日(2023.3.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

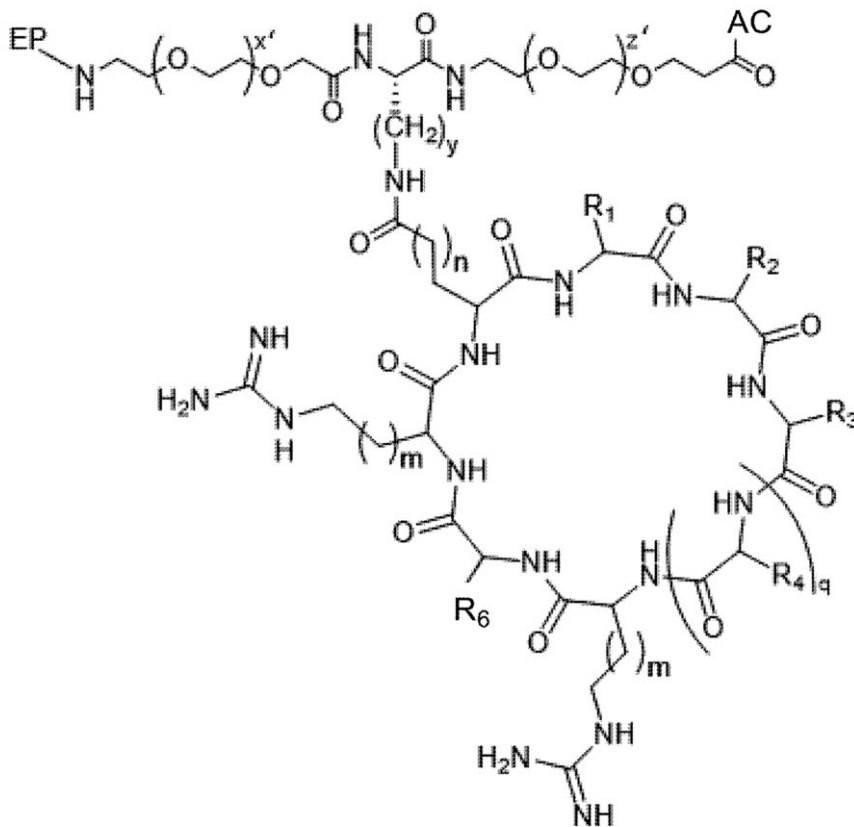
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(C)：

【化1】



(C)

またはそのプロトン化形態、

〔式中、

R₁、R₂及びR₃は、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

R₄及びR₆は、独立して、Hまたはアミノ酸側鎖であり、

R₁、R₂、R₃及びR₄のうちの2個は、フェニルアラニンの側鎖を含み、

EPは、

グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む側鎖を含む1個または2個のアミノ酸残基、及び

2個、3個または4個のリジン残基

を含む、4～8個のアミノ酸残基を含む環外ペプチドであり、

各mは、独立して、0～3の整数であり、

n は、0～2の整数であり、
x' は、2～20の整数であり、
y は、1～5の整数であり、
q は、1～4の整数であり、
z' は、2～20の整数であり、

AC は、pre-mRNA 配列中のDMD 遺伝子のエクソン44の少なくとも一部を含む標的配列に対して相補的であるアンチセンス化合物である）を含む化合物。

【請求項2】

q が1である、請求項1に記載の化合物。

10

【請求項3】

前記EP が、構造：

Ac-PKKKRKV

を有する、請求項1または2に記載の化合物。

【請求項4】

前記環状ペプチドが、FGFGRGRQを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項5】

Ac-PKKKRKV-PEG₂-K（シクロ[FGFGRGRQ]）-PEG₁₂-OHを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の化合物。

20

【請求項6】

前記AC が、配列：

5'-AAACGCCGCCATTTCTCAACAGATC-3'

を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項7】

前記AC が、配列：

-ACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTG-3'

を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項8】

前記AC が、配列：

5'-AACGCCGCCATTTCTCAACAGATCT-3'

を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

30

【請求項9】

前記AC が、配列：

5'-TGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGAT-3'

からなる配列番号1の位置59から始まる25個の連続ヌクレオチドを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項10】

前記AC が、配列：

5'-CCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCA-3'5'

からなる配列番号1の位置6から始まる25個の連続ヌクレオチドを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

40

【請求項11】

前記AC が、

ホスホロチオエート（PS）ヌクレオチド、ホスホロジアミデートモルホリノヌクレオチド（PMO）、ロック核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、2'-O-メチル（2'-OMe）修飾骨格を含むヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル（2'-MOE）ヌクレオチド、2'，4'拘束エチル（cEt）ヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノ核酸（2'-F-ANA）を含む少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたは核酸を含む、請求項1に記載の化合物。

50

【請求項 12】

前記 A C が、15 ～ 30 個の核酸を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 13】

前記環状ペプチドが、前記 A C の 3' 末端にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 14】

前記環状ペプチドが、前記 A C の 5' 末端にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 15】

前記環状ペプチドが、前記 A C の骨格にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 16】

前記環状ペプチドを前記 A C にコンジュゲートさせるリンカーを更に含む、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 17】

前記リンカーが、前記 A C の 5' 末端に共有結合している、請求項 16 に記載の化合物。

【請求項 18】

前記リンカーが、前記 A C の 3' 末端に共有結合している、請求項 16 に記載の化合物。

【請求項 19】

前記リンカーが、前記 A C の骨格に共有結合している、請求項 16 に記載の化合物。

20

【請求項 20】

前記リンカーが、前記環状ペプチド上のアミノ酸残基の側鎖に共有結合している、請求項 16 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 21】

前記リンカーが、二価または三価の $C_{1 \sim 50}$ アルキレンであり、ここで、1 ～ 25 個のメチレン基が、任意選択で、かつ独立して、

—N(H)—、—N($C_{1 \sim 4}$ アルキル)—、—N(シクロアルキル)—、—O—、—C(O)—、—C(O)O—、—S—、—S(O)—、—S(O)₂—、—S(O)₂N($C_{1 \sim 4}$ アルキル)—、—S(O)₂N(シクロアルキル)—、—N(H)C(O)—、—N($C_{1 \sim 4}$ アルキル)C(O)—、—N(シクロアルキル)C(O)—、—C(O)N(H)—、—C(O)N($C_{1 \sim 4}$ アルキル)、—C(O)N(シクロアルキル)、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはシクロアルケニルによって置き換えられている、請求項 16 ～ 20 のいずれか 1 項に記載の化合物。

30

【請求項 22】

前記リンカーが、

(i) 1 つ以上の D もしくは L アミノ酸残基であって、各々が任意選択で置換されている、前記アミノ酸残基；

(ii) 任意選択で置換されているアルキレン；

(iii) 任意選択で置換されているアルケニレン；

(iv) 任意選択で置換されているアルキニレン；

40

(v) 任意選択で置換されているカルボシクリル；

(vi) 任意選択で置換されているヘテロシクリル；

(vii) 1 つ以上の —($R^1 - J - R^2$)_z— サブユニットであって、式中、 R^1 及び R^2 の各々が、各場合において、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボシクリル及びヘテロシクリルから独立して選択され、各 J が、独立して、C、 NR^3 、— $NR^3C(O)$ —、S 及び O であり、式中、 R^3 が、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル及びヘテロシクリルから独立して選択され、これらが各々任意選択で置換されており、z が 1 ～ 50 の整数である、前記サブユニット；

(viii) —($R^1 - J$)_z— もしくは ($J - R^1$)_z— であって、式中、各 R^1 が、各場合において、独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボシク

50

リルもしくはヘテロシクリルであり、各 J が、独立して、 C 、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、 S もしくは O であり、式中、 R^3 が、 H 、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリルもしくはヘテロシクリルであり、これらが各々任意選択で置換されており、 z が $1 \sim 50$ の整数である前記 $-(R^1-J)z-$ もしくは前記 $(J-R^1)z-$ ；または (ix) それらの組み合わせ

を含む、請求項 16～21 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 23】

前記リンカーが、

(i) β アラニン及びリジン残基、

(ii) $-(J-R^1)z-$ 、

(iii) $-(J-R^2)x-$ 、または

(iv) それらの組み合わせ

を含む、請求項 22 に記載の化合物。

【請求項 24】

R^1 及び R^2 の各々が独立してアルキレンであり、各 J が O であり、各 x が、独立して、 $1 \sim 20$ の整数であり、各 z が、独立して、 $1 \sim 20$ の整数である、請求項 22 または 23 に記載の化合物。

【請求項 25】

前記リンカーが、

(i) $-(OCH_2CH_2)_x-$ サブユニットであって、式中、 x が $1 \sim 20$ の整数である、前記サブユニット；

(ii) グリシン、 β -アラニン、4-アミノ酪酸、5-アミノペンタン酸もしくは 6-アミノペンタン酸の 1 つ以上の残基、またはそれらの組み合わせ；あるいは

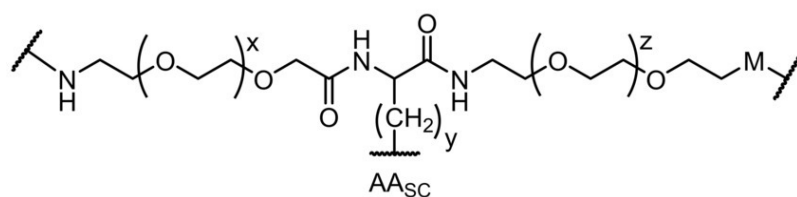
(iii) (i) と (ii) との組み合わせ

を含む、請求項 16～20 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 26】

前記リンカーが、構造：

【化 2】



を有し、式中、

x が $1 \sim 20$ の整数であり、

y が $1 \sim 5$ の整数であり、

z が $1 \sim 20$ の整数であり、

M が結合部分であり、

AA_{sc} が、前記環状ペプチドのアミノ酸残基である、請求項 16～25 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 27】

M が、

10

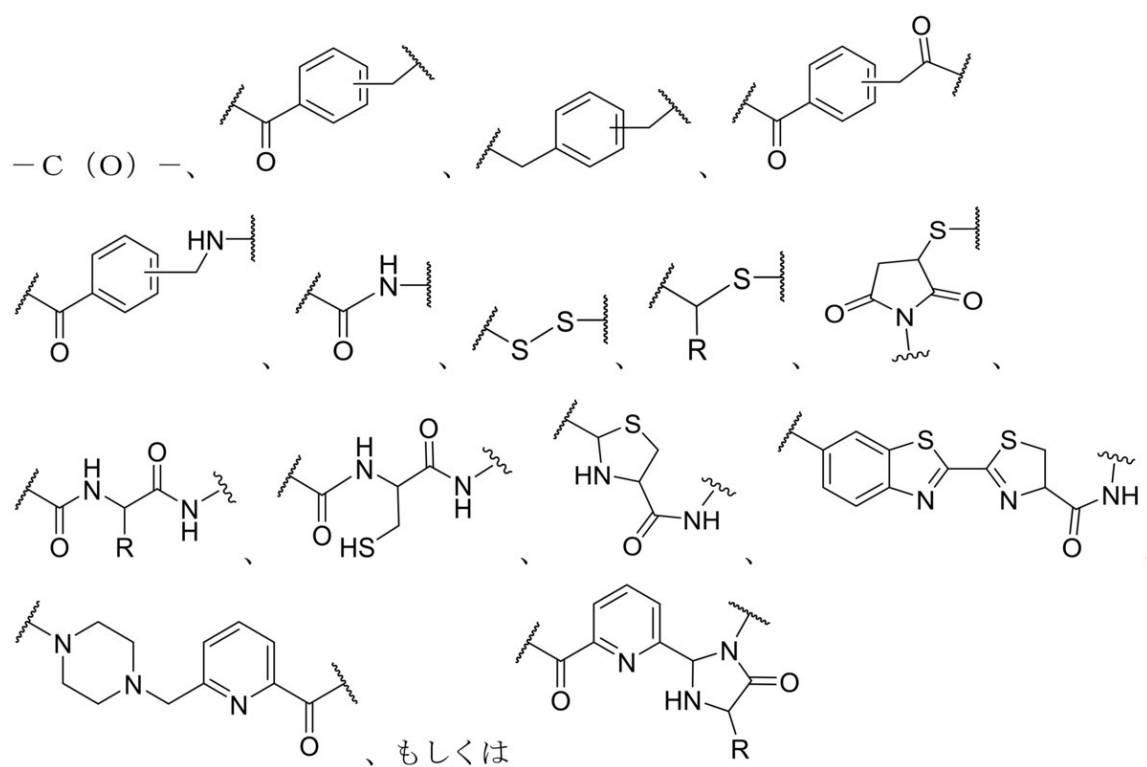
20

30

40

50

【化 3】



であり、式中、Rが、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリルもしくはヘテロシクリルである；または
 Mが、

10

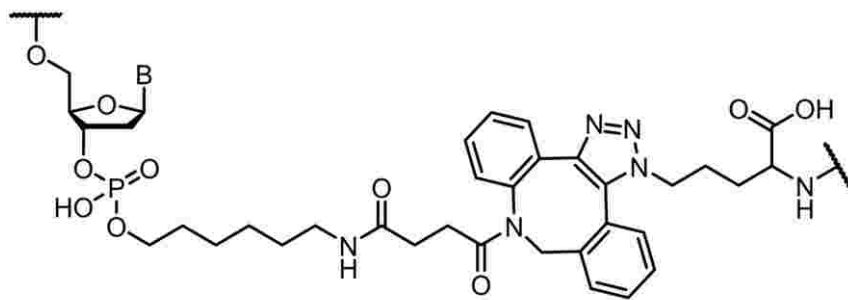
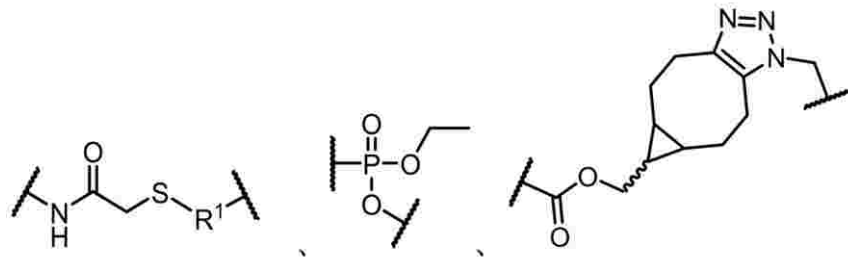
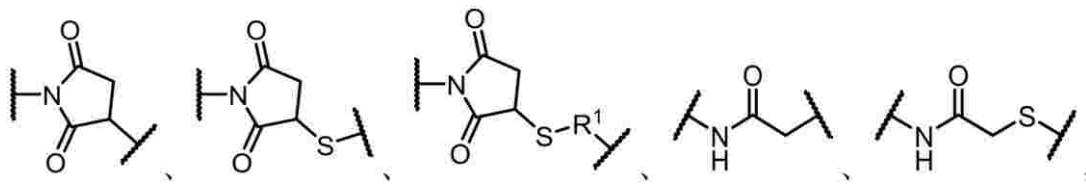
20

30

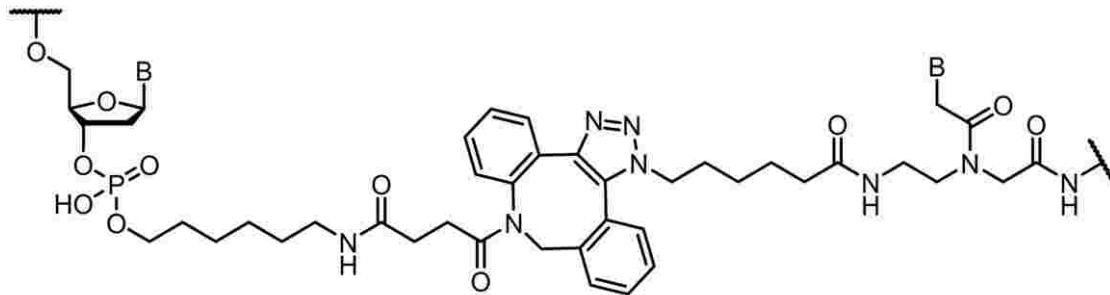
40

50

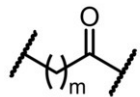
【化 4】



、もしくは



であり、式中、 R^1 が、アルキレン、シクロアルキル、もしくは
【化 5】



であり、 m が 0 ～ 10 であり、各 R が、独立して、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリルもしくはヘテロシクリルであり、各 B が、核酸塩基から独立して選択される、

請求項 26 に記載の化合物。

【請求項 28】

M が $-C(O)-$ である、請求項 27 に記載の化合物。

【請求項 29】

z が 11 である、請求項 26 ～ 28 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 30】

x が 1 である、請求項 26 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 31】

前記リンカーのアミノ基において前記リンカーにコンジュゲートされている環外ペプチ

10

20

30

40

50

前記環状ペプチドが、グアニジン基またはそのプロトン化形態を含む 1 個、2 個、3 個または 4 個の酸酸残基を含む、請求項 1 ～ 38 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 40】

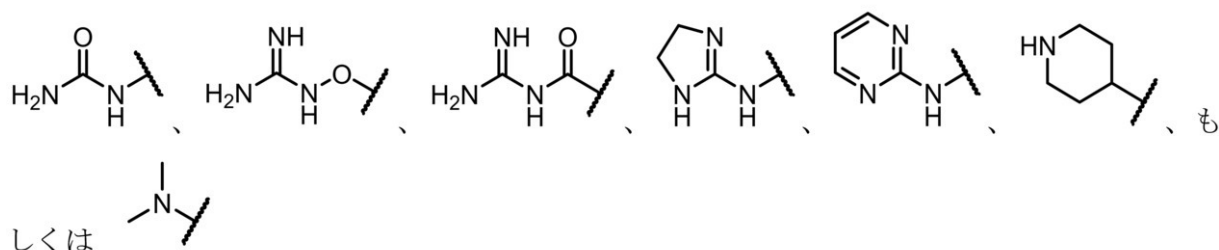
前記環状ペプチドが、疎水性側鎖を含む 2 個、3 個または 4 個のアミノ酸残基を含む、請求項 38 または 39 に記載の化合物。

【請求項 41】

前記環状ペプチドが、

【化 7】

10



、またはそのプロトン化形態

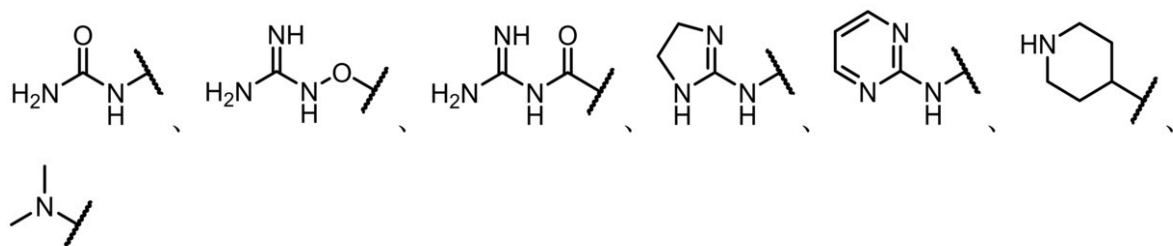
を含む側鎖を含む少なくとも 1 個のアミノ酸を含む、請求項 38 ～ 40 のいずれか 1 項に記載の化合物。

20

【請求項 42】

前記環状ペプチドが、

【化 8】



30

、またはそのプロトン化形態

から選択される側鎖を含む 1 個、2 個、3 個または 4 個のアミノ酸を含む、請求項 38 ～ 41 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 43】

前記環状ペプチドが、少なくとも 1 個のグリシン残基を含む、請求項 38 ～ 42 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 44】

前記環状ペプチドが、1 個、2 個、3 個または 4 個のグリシン残基を含む、請求項 38 ～ 43 のいずれか 1 項に記載の化合物。

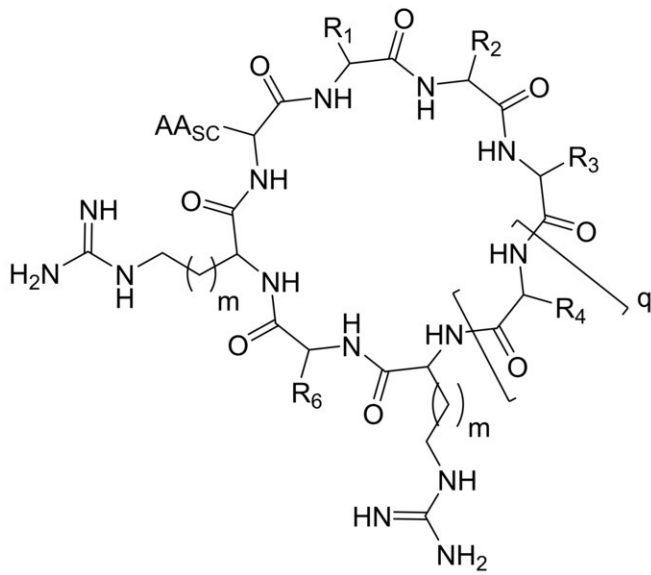
40

【請求項 45】

前記環状ペプチドが、式 (I) :

50

【化 9】



10

またはそのプロトン化形態を含み、式中、

20

R_1 、 R_2 及び R_3 が、各々独立して、H、または芳香族基を含む側鎖を有するアミノ酸残基であり得、

R_1 、 R_2 及び R_3 のうちの少なくとも 1 つが、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、

R_4 及び R_6 が、独立して、H またはアミノ酸側鎖であり、

AA_{sc} がアミノ酸側鎖であり、

q が、1、2、3 または 4 であり、

各 m が、独立して、整数 0、1、2 または 3 である、

請求項 1～44 のいずれか 1 項に記載の化合物。

30

【請求項 46】

アリール基を含む前記側鎖が、フェニルアラニンの側鎖である、請求項 45 に記載の化合物。

【請求項 47】

R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 のうちの 2 つが H である、請求項 45 または 46 のいずれか 1 項に記載の化合物。

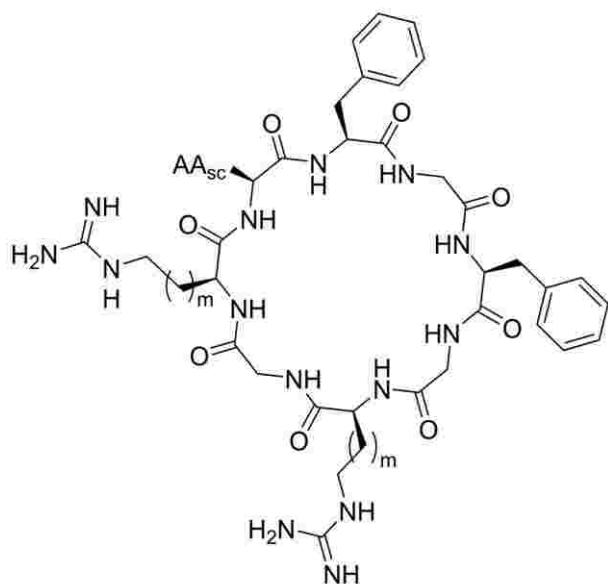
【請求項 48】

前記環状ペプチドが、式 (I-1)、(I-2)、(I-3) または (I-4)：

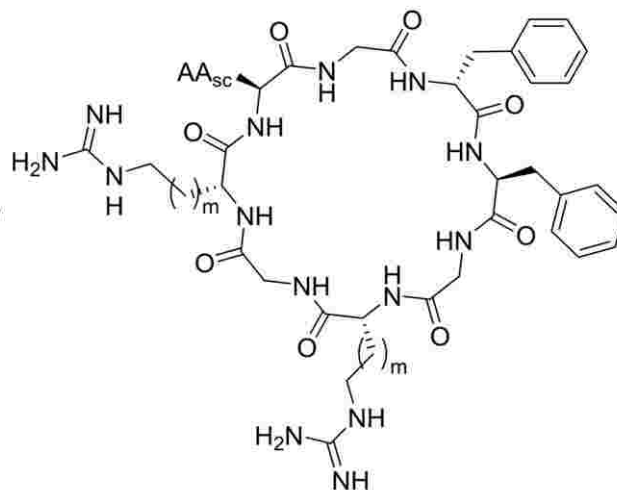
40

50

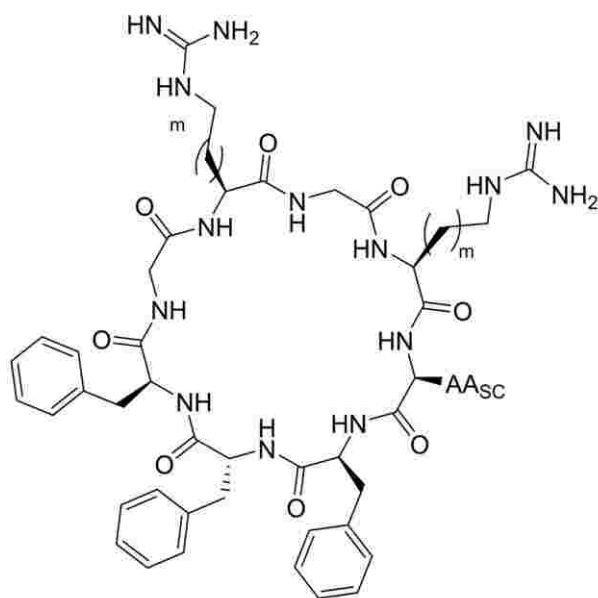
【化 10】



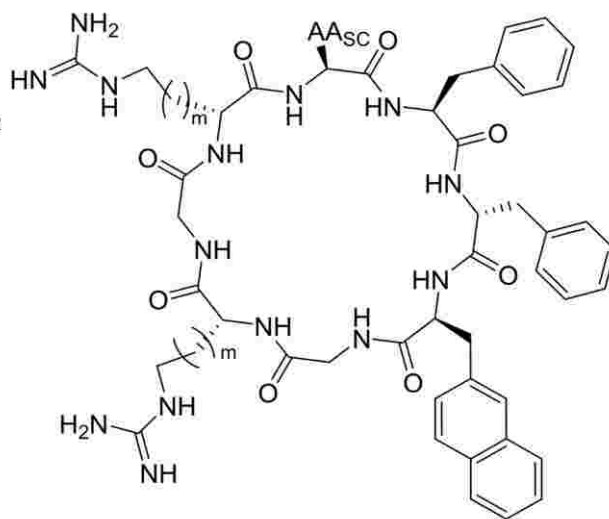
(I-1)、



(I-2)、



(I-3)、



(I-4)

またはそのプロトン化形態の構造を含み、式中、
 AA_{sc}がアミノ酸側鎖であり、
 各mが、独立して、0～3の整数である、
 請求項45～47のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項49】

前記環状ペプチドが、構造：

10

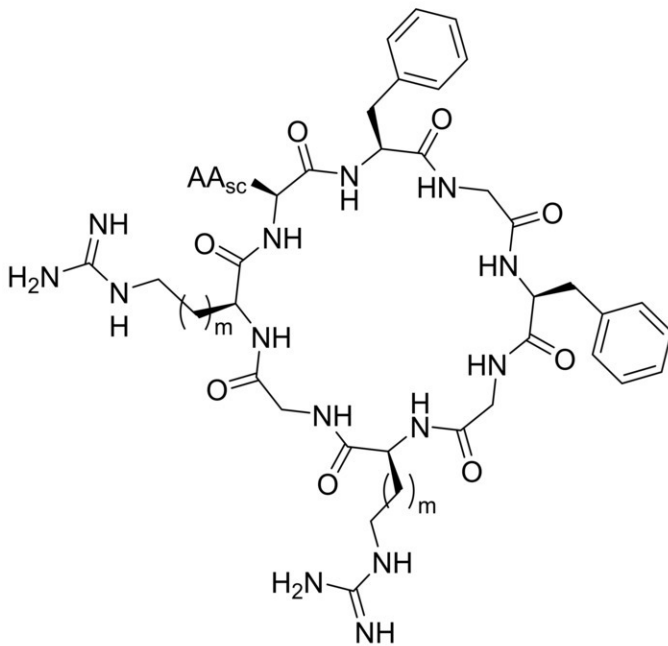
20

30

40

50

【化 1 1】



(I-1)

またはそのプロトン化形態を含み、式中、

AA_{sc} がアミノ酸側鎖であり、

各 m が、独立して、0～3の整数である、

請求項 45～48のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 50】

AA_{sc} が、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、ホモグルタミン酸残基またはホモグルタミン残基の側鎖を含む、請求項 45～49のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 51】

AA_{sc} が、グルタミンの側鎖を含む、請求項 45～50のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 52】

前記 A C が、

表 6 A～6 Mからの配列、その逆相補体、またはそれとの少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の核酸配列同一性を有する配列

を含む、請求項 1～51のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 53】

前記環状ペプチドが、G f F G r G r Qを含む、請求項 1～51のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 54】

前記環状ペプチドが、F f Φ G R G R Qを含む、請求項 1～51のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 55】

式 (C-1)、式 (C-2)、式 (C-3) または式 (C-4)：

10

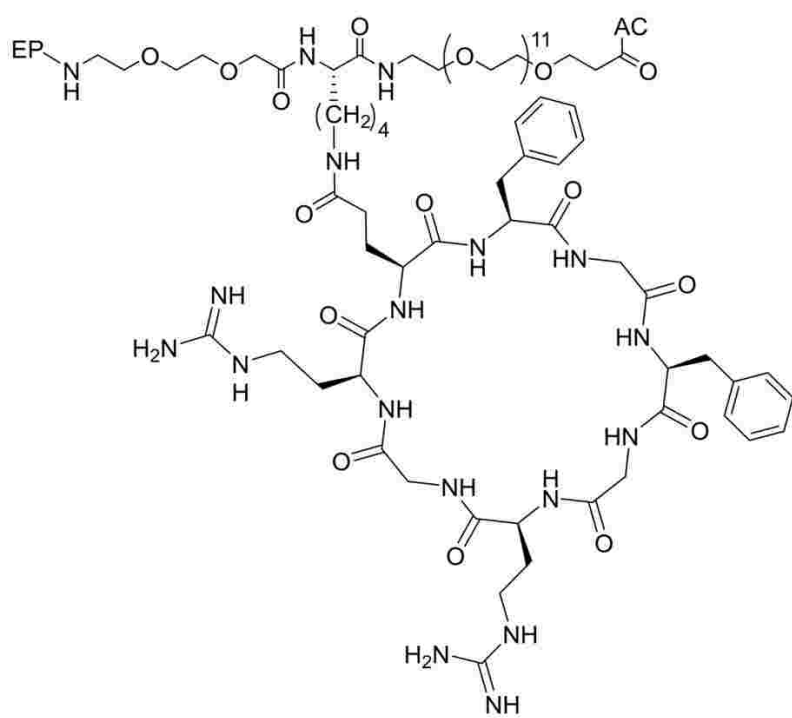
20

30

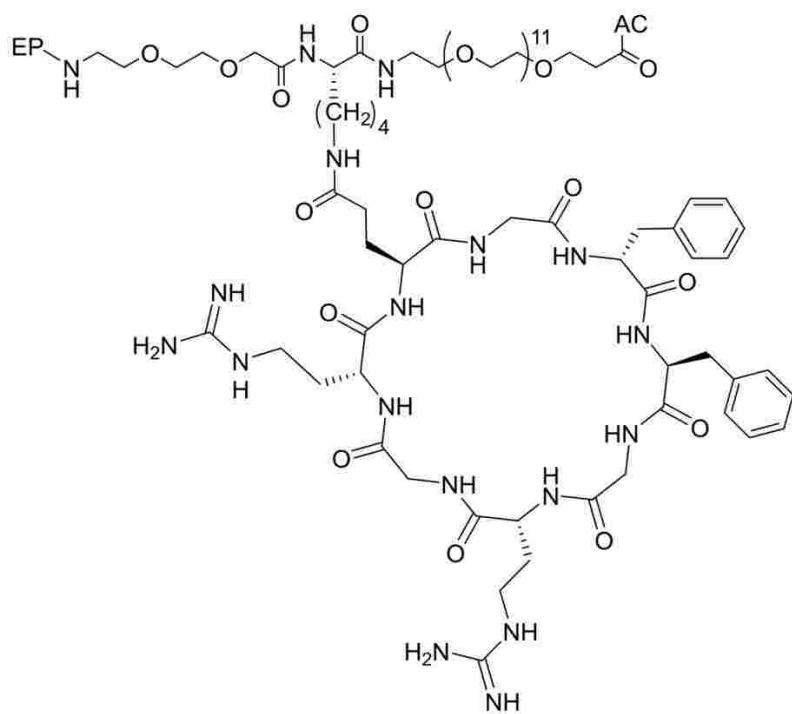
40

50

【化 1 2 - 1】



(C-1) 、



(C-2) 、

10

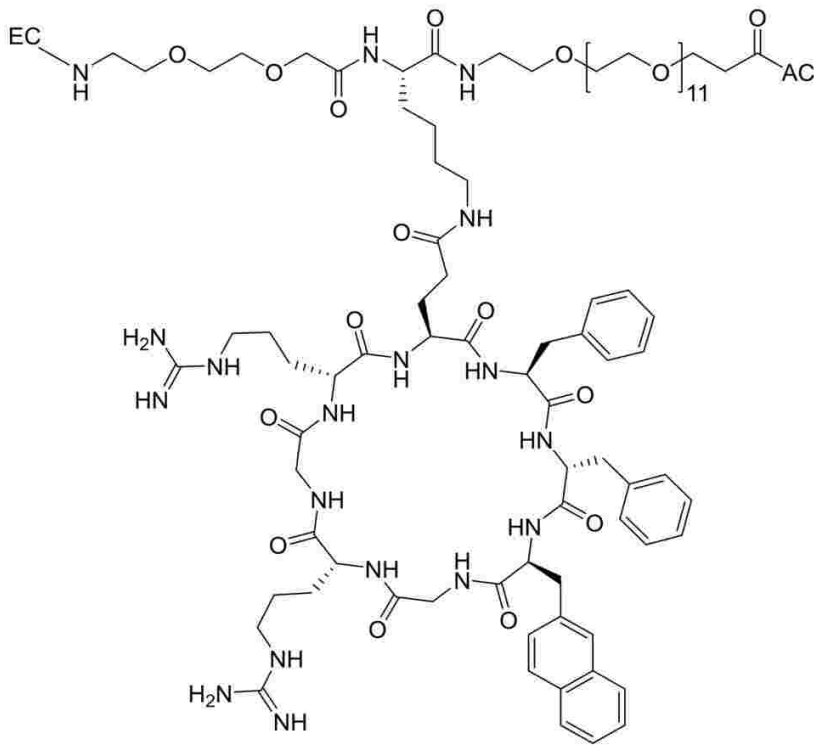
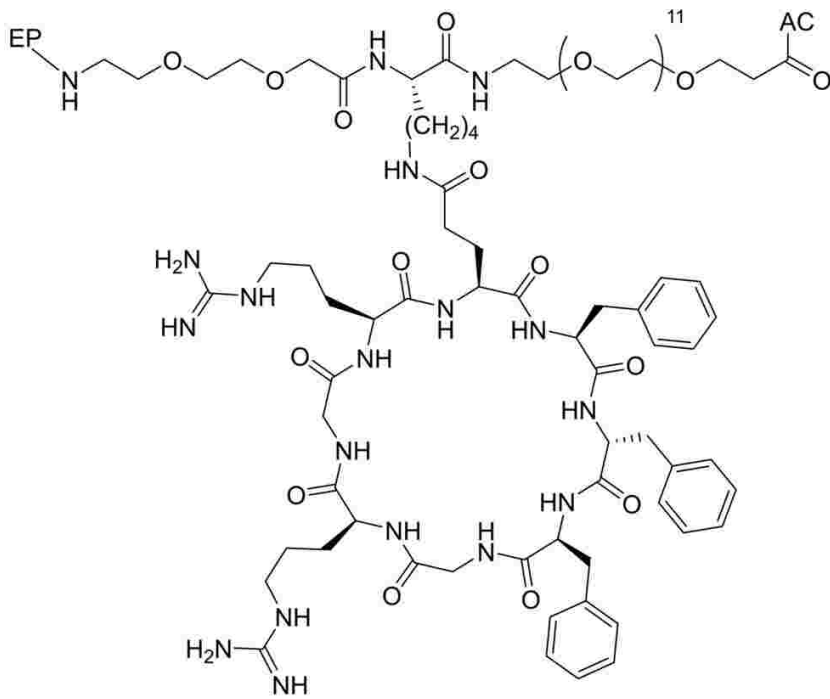
20

30

40

50

【化 1 2 - 2】



またはそのプロトン化形態の構造を含み；

pre-mRNA 配列中の DMD 遺伝子のエクソン 4 4 の少なくとも一部を含む標的配列に対して相補的である 15～30 個の核酸の配列を含む、請求項 1～53 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 56】

請求項 1～55 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 57】

請求項 1～55 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、細胞。

【請求項 58】

D M Dを治療する方法であって、請求項 1 ～ 5 5 のいずれか 1 項に記載の化合物を、それを必要とする患者に投与することを含む、前記方法。

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/075691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **A61K47/64 C07K7/64 C12N15/113**
ADD.

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)

A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SILVANA M.G. JIRKA ET AL: "Cyclic Peptides to Improve Delivery and Exon Skipping of Antisense Oligonucleotides in a Mouse Model for Duchenne Muscular Dystrophy", MOLECULAR THERAPY, 12 October 2017 (2017-10-12), XP055436795, US	1-58
Y	ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.10.004 Title; Abstract; Table 1; p. 135, right hand; figures 4-5; figure 4; table 1 ----- -/--	1-58

☒ 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

"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

19 December 2022

Date of mailing of the international search report

03/01/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

López García, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/075691

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/127650 A1 (ENTRADA THERAPEUTICS INC [US]) 24 June 2021 (2021-06-24)	1-4, 6, 7, 9-16, 33-35, 40-49, 56, 58
Y	Title; example 3A; tables B1, B2, B3; Table on p. 243; Table 4; paragraph 328; paragraph 685; Figures 21, 22; claim 1; claims 1-55; examples 3, 4 -----	1-58
Y	WO 2015/179691 A2 (OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION [US]) 26 November 2015 (2015-11-26) Abstrat; Table 2; Claims; Figures 1-4 -----	1-58
E	WO 2022/213118 A1 (ENTRADA THERAPEUTICS INC [US]; DOUGHERTY PATRICK [US] ET AL.) 6 October 2022 (2022-10-06) Abstract; claims; example 6 -----	1-58

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/075691

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/075691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021127650 A1	24-06-2021	EP 4058032 A1 WO 2021127650 A1	21-09-2022 24-06-2021
WO 2015179691 A2	26-11-2015	CA 2949705 A1 CN 106852146 A CN 113861268 A DK 3149025 T3 EP 3149025 A2 EP 3613426 A1 ES 2739613 T3 HK 1232239 A1 HR P20191254 T1 HU E045872 T2 JP 6807831 B2 JP 2017519041 A JP 2020169170 A LT 3149025 T PL 3149025 T3 PT 3149025 T SI 3149025 T1 US 2017190743 A1 WO 2015179691 A2	26-11-2015 13-06-2017 31-12-2021 22-07-2019 05-04-2017 26-02-2020 03-02-2020 05-01-2018 18-10-2019 28-01-2020 06-01-2021 13-07-2017 15-10-2020 25-09-2019 29-11-2019 01-08-2019 30-09-2019 06-07-2017 26-11-2015
WO 2022213118 A1	06-10-2022	NONE	

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 47/62 (2017.01)

A 6 1 K 47/62

C 0 7 K 7/64 (2006.01)

C 0 7 K 7/64

C 0 7 K 7/06 (2006.01)

C 0 7 K 7/06

(32)優先日 令和3年12月17日(2021.12.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/292,685

(32)優先日 令和3年12月22日(2021.12.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/298,565

(32)優先日 令和4年1月11日(2022.1.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/268,577

(32)優先日 令和4年2月25日(2022.2.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/268,580

(32)優先日 令和4年2月25日(2022.2.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/362,294

(32)優先日 令和4年3月31日(2022.3.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/362,423

(32)優先日 令和4年4月4日(2022.4.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/337,560

(32)優先日 令和4年5月2日(2022.5.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/354,456

(32)優先日 令和4年6月22日(2022.6.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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,DK,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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,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,ZM,ZW

弁理士 池田 達則

(72)発明者 リー シアン

- アメリカ合衆国，マサチューセッツ，ボストン，ワン デザイン センター プレイス，スイート
17-500
- (72)発明者 ツーチン チエン
アメリカ合衆国，マサチューセッツ，ボストン，ワン デザイン センター プレイス，スイート
17-500
- (72)発明者 マーボーベ ケイラバディ
アメリカ合衆国，マサチューセッツ，ボストン，ワン デザイン センター プレイス，スイート
17-500
- (72)発明者 マーク ウィスク
アメリカ合衆国，マサチューセッツ，ボストン，ワン デザイン センター プレイス，スイート
17-500
- (72)発明者 ナタラジャン セサラムン
アメリカ合衆国，マサチューセッツ，ボストン，ワン デザイン センター プレイス，スイート
17-500
- (72)発明者 リエン ウェンロン
アメリカ合衆国，マサチューセッツ，ボストン，ワン デザイン センター プレイス，スイート
17-500
- (72)発明者 マハシュウェタ ガーゲンラス
アメリカ合衆国，マサチューセッツ，ボストン，ワン デザイン センター プレイス，スイート
17-500
- (72)発明者 ネルサ エストレッラ
アメリカ合衆国，マサチューセッツ，ボストン，ワン デザイン センター プレイス，スイート
17-500
- F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 CA23 CA24 CA44
4C076 AA95 BB11 CC09 EE59 FF70
4C084 AA13 NA14 ZA94
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZC41
4H045 AA10 AA30 BA54 BA57 EA20