(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-536721
(P2024-536721A)
(43)公表日　令和6年10月8日(2024.10.8)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N	*15/113 (2010.01)*	C12N	15/113	ZZNA　4B063
C07K	*7/06 (2006.01)*	C07K	7/06	4C076
C07K	*7/08 (2006.01)*	C07K	7/08	4C084
C07K	*5/00 (2006.01)*	C07K	5/00	4C086
C12Q	*1/04 (2006.01)*	C12Q	1/04	4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全121頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-514047(P2024-514047)
(86)(22)出願日　令和4年9月1日(2022.9.1)
(85)翻訳文提出日　令和6年4月10日(2024.4.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/042365
(87)国際公開番号　WO2023/034515
(87)国際公開日　令和5年3月9日(2023.3.9)
(31)優先権主張番号　63/240,472
(32)優先日　令和3年9月3日(2021.9.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/314,855
(32)優先日　令和4年2月28日(2022.2.28)
(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
最終頁に続く

(71)出願人　501237039
サレプタ セラピューティクス， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ファースト ストリート ２１５
(71)出願人　507324290
マサチューセッツ・インスティトゥート・オブ・テクノロジー
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１３９－４３０７・ケンブリッジ・マサチューセッツ・アベニュー・７７
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
最終頁に続く

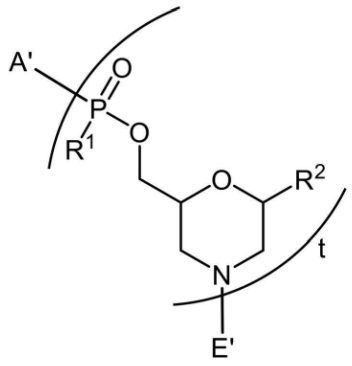
(54)【発明の名称】　鏡像ペプチドによるアンチセンスオリゴマーの送達

(57)【要約】
本明細書では、オリゴヌクレオチド、細胞膜透過ペプチド、及びペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートが提供される。また、本明細書では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド、ペプチド、及びペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートを対象に投与する工程を含む、それを必要とする対象における筋肉疾患、ウイルス感染、又は細菌感染を処置する方法も提供される。

10

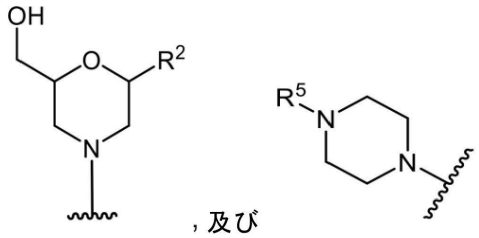
20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式I:
【化１】



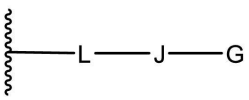
(I)

の化合物を含むオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩であって、
式中、
A'は、-N(H)CH_2C(O)NH_2、-N($C_{1～6}$-アルキル)CH_2C(O)NH_2、
【化２】



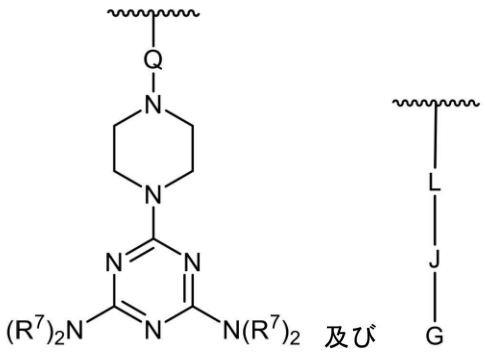
, 及び

から選択され、
R^5は、-C(O)(O-アルキル)$_x$-OHであり、xは３～１０であり、各アルキル基は、それぞれの存在毎に独立して、$C_{2～6}$-アルキルであるか、
又は、R^5は、H、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、トリチル、モノメトキシトリチル、-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-($C_{1～6}$-ヘテロアルキル)-R^6、アリール-R^6、ヘテロアリール-R^6、-C(O)O-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-C(O)O-アリール-R^6、-C(O)O-ヘテロアリール-R^6、及び
【化３】

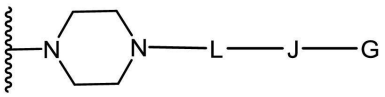


から選択され、
R^6は、OH、SH、及びNH_2から選択されるか、又はR^6は、O、S、若しくはNHであり、その各々は、固体担体に共有結合しており、
各R^1は、OH及び-N(R^3)(R^4)から独立して選択され、R^3及びR^4のそれぞれは、それぞれの存在毎に独立して、H又は-$C_{1～6}$-アルキルであり、
各R^2は、独立して、それぞれの存在毎に、H、核酸塩基、及び化学的保護基で官能化された核酸塩基から選択され、核酸塩基は、それぞれの存在毎に独立して、ピリジン、ピリミジン、プリン、及びデアザプリンから選択される$C_{3～6}$-複素環を含み、
tは８～４０であり、
E'は、H、-$C_{1～6}$-アルキル、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、ベンゾイル、ステアロイル、トリ

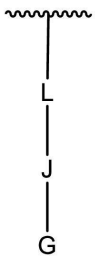
チル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチル、
【化４】



から選択され、
Qは、-C(O)(CH$_2$)$_6$C(O)-又は-C(O)(CH$_2$)$_2$S$_2$(CH$_2$)$_2$C(O)-であり、
R^{7}は、-(CH$_2$)$_2$OC(O)N(R^8)$_2$であり、R^{8}は-(CH$_2$)$_6$NHC(=NH)NH$_2$であり、
Lは、-C(O)(CH$_2$)$_{1～8}$C(O)-C$_{7～18}$-複素芳香環-((CH$_2$)$_{1～8}$C(O)-、-C(O)(CH$_2$)$_{1～8}$C(O)-C$_{7～18}$-複素芳香環-(W)-、-C(O)(CH$_2$)$_{1～8}$C(O)-C$_{7～18}$-複素芳香環-(W-W)-であり、
Wは、それぞれの存在毎に独立して、連結アミノ酸であり、
Jは、d-R$_8$、d-BPEP、d-DPV7、d-DPV6、d-ペネトラチン、d-Bac7、d-MPG、d-Hel11-7、d-TAT、d-TATp、d-WR$_8$、d-WBPEP、d-WDPV7、d-WDPV6、d-WTAT、又はd-WTATpから選択される細胞膜透過ペプチドであり、
Gは、H、-C(O)C$_{1～6}$-アルキル、ベンゾイル、及びステアロイルから選択され、GはJに共有結合しており、
但し、
A'は、
【化５】

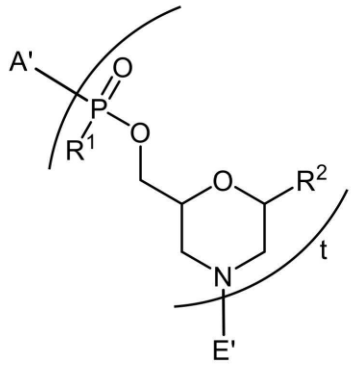


であるか、又はE'は、
【化６】



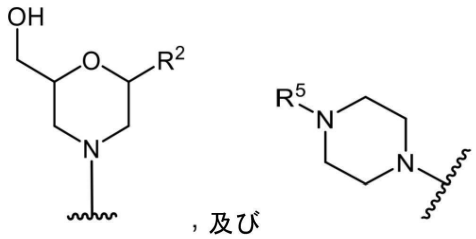
である、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩。
【請求項２】
式III:

【化７】



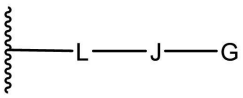
(III)

の化合物を含むオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩であって、
式中、
A'は、-N(H)CH_2C(O)NH_2、-N($C_{1～6}$-アルキル)CH_2C(O)NH_2、
【化８】



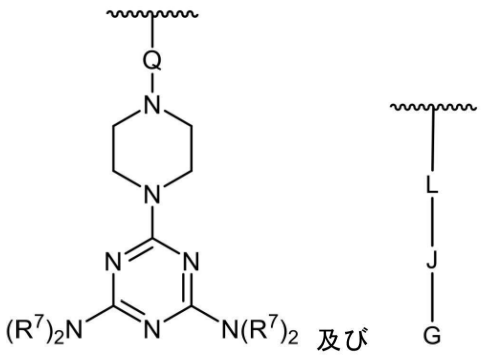
，及び

から選択され、
R^5は、-C(O)(O-アルキル)$_x$-OHであり、xは３～１０であり、各アルキル基は、それぞれの存在毎に独立して、$C_{2～6}$-アルキルであるか、
又は、R^5は、H、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、トリチル、モノメトキシトリチル、-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-($C_{1～6}$-ヘテロアルキル)-R^6、アリール-R^6、ヘテロアリール-R^6、-C(O)O-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-C(O)O-アリール-R^6、-C(O)O-ヘテロアリール-R^6、及び
【化９】

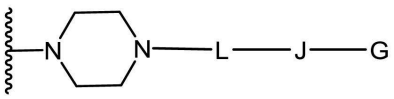


から選択され、
R^6は、OH、SH、及びNH_2から選択されるか、又は、R^6は、O、S、若しくはNHであり、その各々は、固体担体に共有結合しており、
各R^1は、OH及び-N(R^3)(R^4)から独立して選択され、R^3及びR^4のそれぞれは、それぞれの存在毎に独立して、H又は-$C_{1～6}$-アルキルであり、
各R^2は、独立して、それぞれの存在毎に、H、核酸塩基、及び化学的保護基で官能化された核酸塩基から選択され、核酸塩基は、それぞれの存在毎に独立して、ピリジン、ピリミジン、プリン、及びデアザプリンから選択される$C_{3～6}$-複素環を含み、
tは８～４０であり、
E'は、H、-$C_{1～6}$-アルキル、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、ベンゾイル、ステアロイル、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチル、

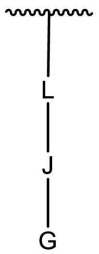
【化１０】



から選択され、
Qは、$-C(O)(CH_2)_6C(O)-$又は$-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$であり、
R^7は、$-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$であり、R^8は$-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$であり、
Lは、$-C(O)(CH_2)_{1\sim8}C(O)-C_{7\sim18}$-複素芳香環-$((CH_2)_{1\sim8}C(O)-$、$-C(O)(CH_2)_{1\sim8}C(O)-C_{7\sim18}$-複素芳香環-(W)-、$-C(O)(CH_2)_{1\sim8}C(O)-C_{7\sim18}$-複素芳香環-(W-W)-であり、
Wは、それぞれの存在毎に独立して、連結アミノ酸であり、
Jは、非天然アミノ酸又はD-アミノ酸から選択される3から15のアミノ酸を含み、KWKK、KKWK、KWWKK、WWKK、WKK、KKKK、又はKKモチーフを有するC末端配列を更に含む、細胞膜透過ペプチドであり、
Gは、H、$-C(O)C_{1\sim6}$-アルキル、ベンゾイル、及びステアロイルから選択され、GはJに共有結合しており、
但し、
A'は、
【化１１】

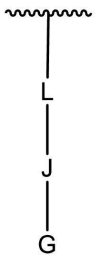


であるか、又はE'は、
【化１２】



である、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩。
【請求項３】
E'が、H、$-C_{1\sim6}$-アルキル、$-C(O)C_{1\sim6}$-アルキル、ベンゾイル、ステアロイル、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチル、及び

【化１３】

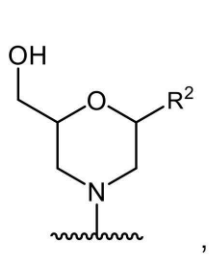
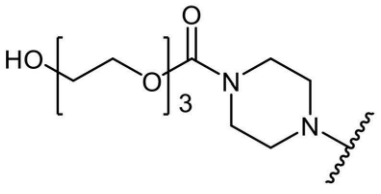
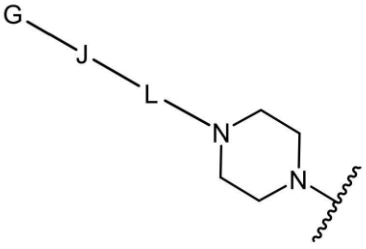


から選択される、請求項1又は2に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項４】

A'が、-N(C$_{1～6}$-アルキル)CH$_2$C(O)NH$_2$、

【化１４】


,

, 及び


から選択される、請求項1から3のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項５】

E'が、H、-C(O)CH$_3$、ベンゾイル、ステアロイル、トリチル、4-メトキシトリチル、及び

【化１５】

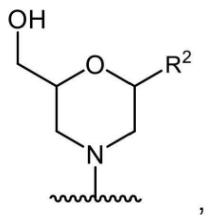
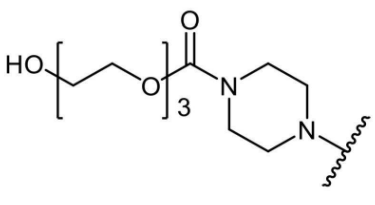


から選択される、請求項1から4のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項６】

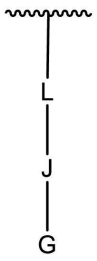
A'が、-N(C$_{1～6}$-アルキル)CH$_2$C(O)NH$_2$、

【化１６】


, 及び


から選択され、E'が、

【化１７】

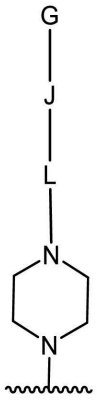


である、請求項1から5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項７】

A'が、

【化１８】

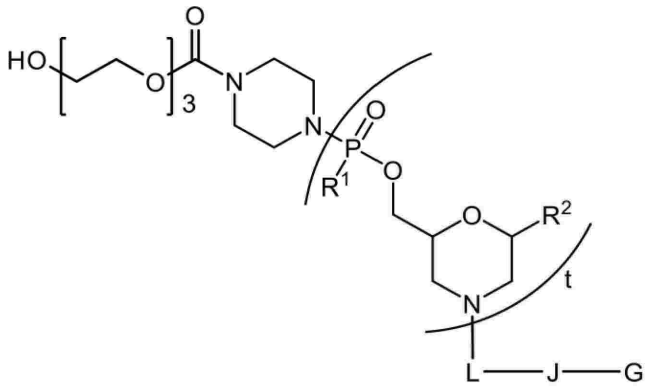


であり、E'が、H、-C(O)CH_3、トリチル、4-メトキシトリチル、ベンゾイル、及びステアロイルから選択される、請求項1から5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

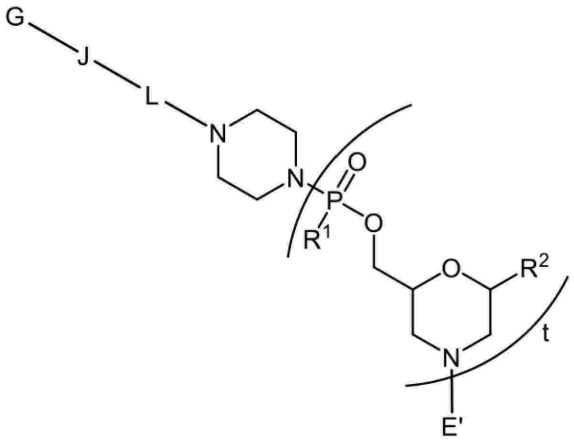
【請求項８】

式I又は式IIIのペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、

【化１９】



(Ia); 及び



(Ib)

から選択されるペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、
式中、E'が、H、$C_{1\sim6}$-アルキル、-C(O)CH_3、ベンゾイル、及びステアロイルから選択される、請求項1又は2に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項９】

ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、式(Ia)のペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、請求項1又は8に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項１０】

ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、式(Ib)のペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートである、請求項1又は8に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項１１】

各R^1が$N(CH_3)_2$である、請求項1から10のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項１２】

各R^2が核酸塩基であり、それぞれの存在毎に独立して、アデニン、グアニン、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、ウラシル、及びヒポキサンチンから選択される、請求項1から11のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

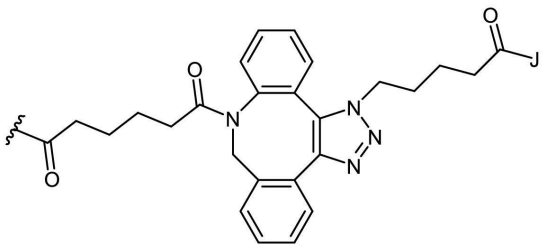
【請求項１３】

Lが、-C(O)$(CH_2)_{1\sim8}$C(O)-DBCO-$(CH_2)_{1\sim8}$C(O)-である、請求項1から12のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項１４】

Lが、

【化２０】



である、請求項1から13のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項１５】

Lが、-C(O)(CH_2)$_{1\sim8}$C(O)-DBCO-(W)-である、請求項1から12のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項１６】

Lが、-C(O)(CH_2)$_{1\sim8}$C(O)-DBCO-(W-W)-である、請求項1から12のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項１７】

Wが、グリシン、プロリン、β-アラニン、6-アミノヘキサン酸、又はリジンから独立して選択される、請求項1から12、15、及び16のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項１８】

Wがリジンである、請求項1から12及び15から17のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項１９】

W-Wが、リジン-(6-アミノヘキサン酸)である、請求項1から12及び15から17のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項２０】

Jが、d-DPV7、d-DPV6、d-ペネトラチン、d-Bac7、d-MPG、d-Hel11-7、d-WR_8、d-WBPEP、d-WDPV7、d-d-WDPV6、d-WTAT、又はd-WTATpから選択される、請求項1から19のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項２１】

非天然アミノ酸が、Abu(γ-アミノ酪酸)、B(β-アラニン)、Hle(ホモロイシン)、Nle(ノルロイシン)、Nap(ナフチルアラニン)、Dpa(ジフェニルアラニン)、Dab(ジアミノ酪酸)、Pip(アミノピペリジン-カルボン酸)、Amf(アミノメチルフェニルアラニン)、及びGba(2-アミノ-4-グアニジノブタン酸)から選択される、請求項2から19のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項２２】

細胞膜透過ペプチドが、配列番号33～669から選択される、請求項2から19及び21のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項２３】

細胞膜透過ペプチドが、
配列番号657 (B)(d-Arg)(d-Arg)(Abu)(Dab)(d-His)、
配列番号664 (Abu)(Gly)(d-Asn)(Nle)(d-Asn)(d-His)、
配列番号644 (Nle)(d-Pro)(d-Asp)(d-Glu)(d-Thr)、及び
配列番号646 (B)(Abu)(d-Ser)(Abu)(Hle)
から選択される、請求項1から19、21、及び22のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項２４】

C末端配列がKWKKモチーフである、請求項1から19、21、及び22のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項２５】
Gが、H、C(O)CH_3、ベンゾイル、及びステアロイルから選択される、請求項1から24のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。
【請求項２６】
Gが、H又は-C(O)CH_3である、請求項1から25のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。
【請求項２７】
GがHである、請求項1から26のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。
【請求項２８】
Gが、-C(O)CH_3である、請求項1から26のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。
【請求項２９】
請求項1から28のいずれか一項に記載のコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩、及び少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体を含む、組成物。
【請求項３０】
治療有効量の請求項1から28のいずれか一項に記載のコンジュゲート又は請求項29に記載の組成物を対象に投与する工程を含む、それを必要とする対象における疾患を処置する方法。
【請求項３１】
疾患が神経筋疾患である、請求項30に記載の方法。
【請求項３２】
神経筋疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項31に記載の方法。
【請求項３３】
ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー(PMO)を細胞に送達し得るペプチドを同定する方法であって、
(a)ペプチド又はペプチドにコンジュゲートしたホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー(PPMO)で細胞を処置する工程、
(b)消化酵素で細胞を処置する工程、
(c)全細胞抽出のために細胞を溶解して全細胞溶解物を形成するか、又はサイトゾル抽出のために細胞を溶解してサイトゾル画分を形成する工程、及び
(d)全細胞溶解物又はサイトゾル画分を質量分析で分析して、ペプチドを同定する工程
を含む、方法。
【請求項３４】
細胞を洗浄する工程を更に含む、請求項33に記載の方法。
【請求項３５】
細胞がPBSで洗浄される、請求項34に記載の方法。
【請求項３６】
サイトゾルマーカー(Erk 1/2)又は後期エンドソームマーカー(Rab5)の存在についてウェスタンブロットを介して全細胞溶解物又はサイトゾル画分を分析する工程を更に含む、請求項33から35のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
サイトゾル画分のウェスタンブロットでのRab5の不存在が、エンドソームの排除を示す、請求項36に記載の方法。
【請求項３８】
消化酵素がトリプシンである、請求項33から37のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
全細胞をRIPAバッファーで溶解する工程を含む、請求項33から38のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】

サイトゾルをジギトニンバッファーで溶解する工程を含む、請求項33から38のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
電子移動解離(ETD)、高エネルギーETD、及び高エネルギー衝突解離(HCD)からなる、陽イオン性ペプチドに最適化されたミックスフラグメンテーション方法を用いた質量分析でペプチド配列を分析する工程を含む、請求項33から40のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
細胞が、HeLa細胞又はC2C12マウス筋芽細胞である、請求項33から41のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
ペプチドが、非天然アミノ酸又はD-アミノ酸から選択される4から15のアミノ酸を含む、請求項33から42のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
ペプチドが、KWKK、KKWK、KWWKK、WWKK、WKK、KKKK、又はKKモチーフを有するC末端配列を更に含む、請求項33から43のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
ペプチドが、KWKKモチーフを有するC末端配列を更に含む、請求項33から44のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
非天然アミノ酸が、Abu(γ-アミノ酪酸)、B(β-アラニン)、Hle(ホモロイシン)、Nle(ノルロイシン)、Nap(ナフチルアラニン)、Dpa(ジフェニルアラニン)、Dab(ジアミノ酪酸)、Pip(アミノピペリジン-カルボン酸)、Amf(アミノメチルフェニルアラニン)、及びGba(2-アミノ-4-グアニジノブタン酸)から選択される、請求項33から45のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
細胞の処置が、ペプチドライブラリー又はPPMOライブラリーで細胞を処置する工程を含む、請求項33から46のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、2021年9月3日に出願された米国仮出願第63/240,472号、及び2022年2月28日に出願された米国仮出願第63/314,855号の優先権を主張する。各出願の内容は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
アンチセンス技術は、選択的スプライシング産物を含む1つ又は複数の特異的遺伝子産物の発現を調節するための手段を提供し、多くの治療的、診断的、及び研究的適用において比類なく有用である。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、例えばオリゴヌクレオチドが、多くのアンチセンスメカニズムのいずれか1つを介して、転写、スプライシング、又は翻訳等の遺伝子発現活性を調節するということである。アンチセンス化合物の配列特異性によって、アンチセンス化合物は、疾患に関与する遺伝子の発現を選択的に調節するための、標的の検証及び遺伝子の機能化のためのツール、並びに治療法として、魅力的なものとなっている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００３】
【特許文献１】米国特許第5,034,506号
【特許文献２】米国特許第5,142,047号

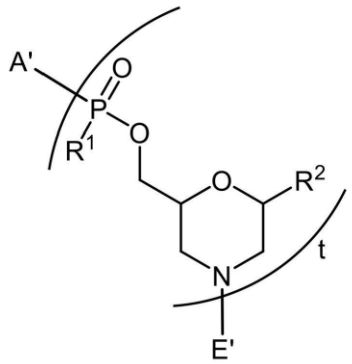
【特許文献３】米国特許第5,166,315号
【特許文献４】米国特許第5,185,444号
【特許文献５】米国特許第5,217,866号
【特許文献６】米国特許第5,506,337号
【特許文献７】米国特許第5,521,063号
【特許文献８】米国特許第5,698,685号
【特許文献９】米国特許第8,076,476号
【特許文献１０】米国特許第8,299,206号
【特許文献１１】WO2009/064471
【特許文献１２】米国特許第7,468,418号
【特許文献１３】WO2008/036127
【非特許文献】
【０００４】
【非特許文献１】Wolfe Justin M.、Fadzen Colin M.、Holden Rebecca L.、Yao Monica、Hanson Gunnar J.、Pentelute Bradley L.、Angew. Chem. Int. Ed. 2018、57、4756～4759
【非特許文献２】Oehlke, J.、Scheller, A.、Wiesner, B.、Krause, E.、Beyermann, M.、Klauschenz, E.、Melzig, M.、Bienert, M.、Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1998、1414 (1)、127～139
【非特許文献３】Margus, H.、Padari, K.、Pooga, M.、Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. 2012、20 (3)、525～533
【非特許文献４】Reissmann Siegmund. J. Pept. Sci. 2014、20 (10)、760～784
【非特許文献５】Fischer, R.、Waizenegger, T.、Kohler, K.、Brock, R.、A Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2002、1564 (2)、365～374
【非特許文献６】Lindgren, M. E.、Hallbrink, M. M.、Elmquist, A. M.、Langel, U.、Biochem. J. 2004、377 (第1部)、69～76
【非特許文献７】Illien, F.、Rodriguez, N.、Amoura, M.、Joliot, A.、Pallerla, M.、Cribier, S.、Burlina, F.、Sagan, S.、Sci. Rep. 2016、6、36938
【非特許文献８】Wolfe, J. M.、Fadzen, C. M.、Choo, Z.-N.、Holden, R. L.、Yao, M.、Hanson, G. J.、Pentelute, B. L.、ACS Cent. Sci. 2018、4 (4)、512～520
【非特許文献９】Frankel, A. D.、Pabo, C. O.、Cell 1988、55 (6)、1189～1193
【非特許文献１０】Green, M.、Loewenstein, P. M.、Cell 1988、55 (6)、1179～1188
【非特許文献１１】Jearawiriyapaisarn, N.ら、Molecular Therapy 2008、16 (9)、1624～1629
【非特許文献１２】Wimley, W. C.、In Cell Penetrating Peptides: Methods and Protocols、Langel, U.編、Methods in Molecular Biology、Springer US: New York, NY、2022、第73～89頁
【非特許文献１３】Kauffman, W. B.ら、Nature Communications 2018、9 (1)、2568
【非特許文献１４】Porosk, L.ら、Expert Opin Drug Discov 2021、16 (5)、553～565
【非特許文献１５】Lee, E. Y.ら、Bioorganic & medicinal chemistry 2018、26 (10)、2708～2718
【非特許文献１６】Manavalan, B.ら、J. Proteome Res. 2018、17 (8)、2715～2726
【非特許文献１７】Pandey, P.ら、J. Proteome Res. 2018、17 (9)、3214～3222
【非特許文献１８】Schissel, C. K.ら、Nat. Chem. 2021、13 (10)、992～1000
【非特許文献１９】Lopez-Vidal, E. M.ら、JACS Au 2021

【非特許文献２０】Wolfe, J. M.ら、ACS Cent Sci 2018、4 (4)、512～520
【非特許文献２１】Hoffmann, K.ら、Scientific Reports 2018、8 (1)
【非特許文献２２】Carney, R. P.ら、ACS Comb. Sci. 2017、19 (5)、299～307
【非特許文献２３】Quartararo, A. J.ら、Nat Commun 2020、11 (1)、3183
【非特許文献２４】Zuckermann, R. N.ら、Proc Natl Acad Sci U S A 1992、89 (10)、4505～4509
【非特許文献２５】Beck, S.ら、Biomaterials 2011、32 (33)、8518～8528
【非特許文献２６】Wu, C.-H.ら、Science Translational Medicine 2015、7 (290)
【非特許文献２７】Wu, C.-H.ら、Journal of Biomedical Science 2016、23 (1)、8
【非特許文献２８】Ren, Y.ら、Mol Pharm 2018、15 (2)、592～601
【非特許文献２９】Wei, X.ら、Angew Chem Int Ed Engl 2015、54 (10)、3023～3027
【非特許文献３０】Huang, L.ら、Mol Pharm 2017、14 (5)、1742～1753
【非特許文献３１】Eckert, D. M.ら、Cell 1999、99 (1)、103～115
【非特許文献３２】Baker, D. E.、Eteplirsen. Hosp. Pharm. 2017、52 (4)、302～305
【非特許文献３３】Lim, K. R. Q.、Maruyama, R.、Yokota, T.、Drug Des. Devel. Ther. 2017、11、533～545
【非特許文献３４】Inc, S. T. Sarepta Therapeutics Announces Positive Clinical Results from MOMENTUM, a Phase 2 Clinical Trial of SRP-5051 in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Skipping Exon 51.
【非特許文献３５】http://www.globenewswire.com/news-release/2020/12/07/2140613/0/en/Sarepta-Therapeutics-Announces-Positive-Clinical-Results-from-MOMENTUM-a-Phase-2-Clinical-Trial-of-SRP-5051-in-Patients-with-Duchenne-Muscular-Dystrophy-Amenable-to-Skipping-Exon-5.html
【非特許文献３６】Kurrikoff, K.、Vunk, B.、Langel, U.、Expert Opin. Biol. Ther. 2021、21 (3)、361～370
【非特許文献３７】Ma, Y.、Gong, C.、Ma, Y.、Fan, F.、Luo, M.、Yang, F.、Zhang, Y.-H.、J. Controlled Release 2012、162 (2)、286～294
【非特許文献３８】Henriques, S. T.、Peacock, H.、Benfield, A. H.、Wang, C. K.、Craik, D. J.、J. Am. Chem. Soc. 2019、141 (51)、20460～20469
【非特許文献３９】Verdurmen, W. P. R.、Bovee-Geurts, P. H.、Wadhwani, P.、Ulrich, A. S.、Hallbrink, M.、vanKuppevelt, T. H.、Brock, R.、Chem. Biol. 2011、18 (8)、1000～1010
【非特許文献４０】Sazani, P.、Gemignani, F.、Kang, S.-H.、Maier, M. A.、Manoharan, M.、Persmark, M.、Bortner, D.、Kole, R.、Nat. Biotechnol. 2002、20 (12)、1228～1233
【非特許文献４１】Erazo-Oliveras, A.、Muthukrishnan, N.、Baker, R.、Wang, T.-Y.、Pellois, J.-P.、Pharmaceuticals 2012、5 (11)、1177～1209
【非特許文献４２】Duncan, M. W.、Practical Quantitative Biomedical Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry
【非特許文献４３】Burlina, F.、Sagan, S.、Bolbach, G.、Chassaing, G.、Angew. Chem. Int. Ed. 2005、44 (27)、4244～4247
【非特許文献４４】Burlina, F.、Sagan, S.、Bolbach, G.、Chassaing, G.、Nat. Protoc. 2006、1 (1)、200
【非特許文献４５】Aubry, S.、Aussedat, B.、Delaroche, D.、Jiao, C.-Y.、Bolbach, G.、Lavielle, S.、Chassaing, G.、Sagan, S.、Burlina, F.、Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2010、1798 (12)、2182～2189

【非特許文献４６】Ho, H.-P.、Rathod, P.、Louis, M.、Tada, C. K.、Rahaman, S.、Mark, K. J.、Leng, J.、Dana, D.、Kumar, S.、Lichterfeld, M.、Chang, E.、J. Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM 2014, 28 (24)、2681～2689
【非特許文献４７】T.W. Greene、P.G.M. Wuts、Protective Groups in Organic Synthesis、第3版、John Wiley & Sons (1999)
【非特許文献４８】Chiu及びRana (2003) RNA 9:1034～1048
【非特許文献４９】Limbachら(1994) Nucleic Acids Res. 22:2183～2196
【非特許文献５０】Revankar及びRao、Comprehensive Natural Products Chemistry、第7巻、313
【非特許文献５１】www.glenresearch.com
【非特許文献５２】Krueger ATら(2007) Acc. Chem. Res. 40:141～150
【非特許文献５３】Kool ET (2002) Acc. Chem. Res. 35:936～943
【非特許文献５４】Benner SAら(2005) Nat. Rev. Genet. 6:553～543
【非特許文献５５】Romesberg FEら(2003) Curr. Opin. Chem. Biol. 7:723～733
【非特許文献５６】Hirao, I (2006) Curr. Opin. Chem. Biol. 10:622～627
【非特許文献５７】Miyadaら(1987) Methods Enzymol. 154:94～107
【非特許文献５８】P. Iversen、「Phosphoramidite Morpholino Oligomers」in Antisense Drug Technology、S.T. Crooke編、Marcel Dekker, Inc., New York、2001
【非特許文献５９】Hamesら、Nucleic Acid Hybridization, IRL Press、1985、第107～108頁
【非特許文献６０】Miyada CG.及びWallace RB (1987) Oligonucleotide hybridization techniques, Methods Enzymol.、第154巻、第94～107頁
【非特許文献６１】Simon, M. D.、Heider, P. L.、Adamo, A.、Vinogradov, A. A.、Mong, S. K.、Li, X.、Berger, T.、Policarpo, R. L.、Zhang, C.、Zou, Y.、Liao, X.、Spokoyny, A. M.、Jensen, K. F.、Pentelute, B. L.、2014、15 (5)、713～720
【非特許文献６２】Fadzen, C. M.、Holden, R. L.、Wolfe, J. M.、Choo, Z.-N.、Schissel, C. K.、Yao, M.、Hanson, G. J.、Pentelute, B. L.、Biochemistry、2019
【非特許文献６３】Kjeken, R.、Mousavi, S. A.、Brech, A.、Griffiths, G.、Berg, T.、Biochem. J.、2001、357 (第2部)、497～503
【非特許文献６４】Dutta, D.、Donaldson, J. G.、Cell. Logist.、2012、2 (4)、203～208
【非特許文献６５】Brock, R.、Bioconjug. Chem. 2014、25 (5)、863～868
【非特許文献６６】Fuchs, S. M.、Protein Sci.、2005、14 (6)、1538～1544

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
著しい進化がアンチセンス技術の分野でなされてはいるが、当技術分野では、アンチセンス性能又は抗原性能が改善されたオリゴヌクレオチド及びペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートが依然として必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本明細書では、アンチセンスオリゴマー及び共有結合したペプチドを含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートが提供される。アンチセンスオリゴマーはホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマーであり得、ペプチドは、本明細書で提供されるペプチドのいずれかであり得る。オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、それを必要とする対象における、限定はしないがデュシェンヌ型筋ジストロフィー等の神経筋疾患を含む様々な疾患の処置に有用である。

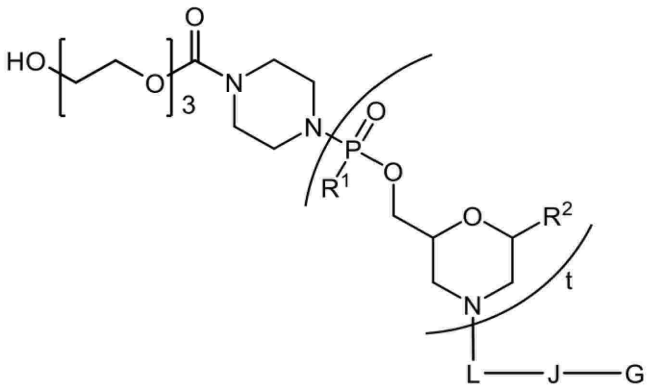
【０００７】
一実施形態では、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、式I:
【０００８】
【化１】



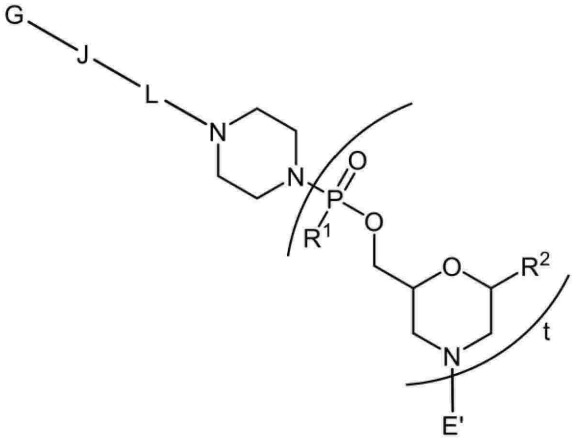
(I)

【０００９】
のオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩であり、式中、A'、E'、R^1、R^2、及びtは、本明細書で定義されている通りである。
【００１０】
一実施形態では、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、式IIIのオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩である。ある特定の実施形態では、式Iのオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、
【００１１】

【化２】



(Ia); 及び



(Ib)

【００１２】
から選択されるオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩であり、式中、E'、G、J、L、R^1、R^2、及びtは、本明細書で定義されている通りである。

【００１３】
ある特定の実施形態では、各R^1は、$N(CH_3)_2$である。ある特定の実施形態では、各R^2は、それぞれの存在毎に独立して、アデニン、グアニン、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、ウラシル、メチル化グアニン、及びメチル化アデニンから選択される核酸塩基である。

【００１４】
一実施形態では、Jは、d-R_8、d-BPEP、d-DPV7、d-DPV6、d-ペネトラチン、d-Bac7、d-MPG、d-Hel11-7、d-TAT、d-TATp、d-WR_8、d-WBPEP、d-WDPV7、d-WDPV6、d-WTAT、又はd-WTATpから選択される。更なる実施形態では、Jは、d-DPV7、d-DPV6、d-ペネトラチン、d-Bac7、d-MPG、d-Hel11-7、d-WR_8、d-WBPEP、d-WDPV7、d-WDPV6、d-WTAT、又はd-WTATpから選択される。更に別の実施形態では、Jは、WR_8、WTAT、WBPEP、WDPV7、WTATp、WDPV6、TATp、MPG、又はHel11-7から選択され、式中、ペプチドの全てのキラルアミノ酸は、L-立体配置である。

【００１５】
一実施形態では、Jは、非天然アミノ酸又はD-アミノ酸から選択される3から15のアミノ酸を含み、KWKK、KKWK、KWWKK、WWKK、WKK、KKKK、又はKKモチーフを有するC末端配列を更に含む、細胞膜透過ペプチドである。別の実施形態では、Jは、非天然アミノ酸又はD-アミノ酸から選択される3から15のアミノ酸を含み、(d-K)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-W)(d-K)、(d-K)(d-W)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-W)(d-W)

(d-K)(d-K)、(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-K)(d-K)、又は(d-K)(d-K)モチーフを有するC末端配列を更に含む、細胞膜透過ペプチドである。

【００１６】

更なる実施形態では、非天然アミノ酸は、Abu(γ-アミノ酪酸)、B(β-アラニン)、Hle(ホモロイシン)、Nle(ノルロイシン)、Nap(ナフチルアラニン)、Dpa(ジフェニルアラニン)、Dab(ジアミノ酪酸)、Pip(アミノピペリジン-カルボン酸)、Amf(アミノメチルフェニルアラニン)、及びGba(2-アミノ-4-グアニジノブタン酸)から選択される。

【００１７】

別の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号33～669から選択される。

【００１８】

一実施形態では、Lは、-C(O)(CH_2)$_{1～8}$C(O)-$C_{7～18}$-複素芳香環-((CH_2)$_{1～8}$C(O)-、-C(O)(CH_2)$_{1～8}$C(O)-$C_{7～18}$-複素芳香環-(W)-、-C(O)(CH_2)$_{1～8}$C(O)-$C_{7～18}$-複素芳香環-(W-W)-である。

【００１９】

別の態様では、本明細書では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドコンジュゲート及び薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物が提供される。

【００２０】

また、本明細書では、それを必要とする対象に本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドコンジュゲートを投与する工程を含む、神経筋疾患を処置する方法が提供される。

【００２１】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に罹患している患者における筋ジストロフィーの処置に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１】図1Aは、研究対象のコンジュゲートの一般的構造を示す図である。高分子カーゴであるPMO IVS-654が、その後のアフィニティーキャプチャーのためのビオチンハンドルと共に、ペプチドのN末端に結び付いている。トリプシン切断可能リンカーが、カーゴをペプチドに連結している。図1Bは、５μMのD型及びL型のいくつかの配列で行われたEGFP 654アッセイで得られた活性データを示す図である。各バーは群の平均±SDを表しており、N=単一の生物学的複製から得られた3つの異なる試料である。

【図２】PMO-CPPがいかにして細胞に侵入してエクソンスキップ活性を示し得るかを示す略図である。

【図３Ａ】後の実験で使用されるPMOペプチドの構造及び配列を示す図である。

【図３Ｂ】様々な濃度のD型及びL型のいくつかの配列の用量応答曲線を示す図である。各点は群の平均±SDを表しており、N=代表的な生物学的複製から得られた3つの異なる試料である。

【図３Ｃ】ヒト血清とインキュベートした後の、PMO-D-コンジュゲート及びPMO-L-コンジュゲートの質量スペクトルを示す図である。

【図４Ａ】取り込みアッセイのワークフローを示す図である。細胞をPMO-D-CPPで処置し、洗浄し、そして溶解して、全細胞溶解物又はサイトゾルを抽出する。

【図４Ｂ】HeLa細胞への内在化の後に単離されたインタクトなビオチン化D-ポリアルギニンペプチドのイオンを示すMALDI-TOF質量スペクトルを示す図である。スペクトルは、等モルのスパイクイン(黒)及び処置後の全細胞溶解物(赤)中のインタクトなコンジュゲートに対応するイオンを示している。

【図４Ｃ】等モルの標準での相対強度を示す図であり、応答係数(F)が、実験試料中の濃度の倍率変化を計算するために決定及び使用され、当該倍率変化が、BKr_4に対して正規化されて、棒グラフで示されている。また、相対濃度を決定するために使用される方程式も示されており、I(強度)、[X](濃度)、F(応答係数)、X(試料)、S(標準)である。

【図５Ａ】EGFP 654アッセイで得られたPMOの活性を示す図であり、当該アッセイで

は、細胞を、パルスチェイスフォーマットで、化学的エンドサイトーシス阻害剤、次いで5μMのPMO-コンジュゲートで処置した。クロルプロマジン(CPZ)は、PMO活性の用量依存性の阻害を生じさせている。バーは群の平均±SDを表しており、N=単一の生物学的複製から得られた3つの異なる試料である。

【図５Ｂ】それぞれRIPAバッファー及びジギトニンバッファーでの全細胞溶解物及びサイトゾル画分の抽出を示すウェスタンブロットを示す図である。Erk 1/2はサイトゾルマーカーであり、一方、Rab5は後期エンドソームマーカーである。ビオチン標識されたコンジュゲートはストレプトアビジン-HRPを使用してイメージングされるが、物質の量は、ウェスタンブロットを介して検出するには少なすぎることが多い。

【図５Ｃ】PMO-D-BPEPを含有するB)の溶解物の取り込み分析の後の、例となるMALDIスペクトルを示す図である。インタクトな構築物が、全細胞(上部)及びサイトゾル(下部)の画分で検出されている。

【図５Ｄ】PMO-D-R8を含有するB)の溶解物の取り込み分析の後の、例となるMALDIスペクトルを示す図である。インタクトな構築物が、全細胞(上部)及びサイトゾル(下部)の画分で検出されている。

【図６】図6Aは、C2C12マウス筋芽細胞の全細胞抽出物及びサイトゾル抽出物中の、BPEPと比較した、ビオチン-CPPの濃度を示す図である。

【図７】図7Aは、Hela細胞の全細胞抽出物及びサイトゾルの抽出物中の、BPEPと比較したPMO-ビオチン-CPPの濃度を示す図である。相対濃度は、BPEPに対して正規化されている。図7Bは、PMO-CPPの相対効率(PMO活性/相対サイトゾル濃度)を示す図である。バーは群の平均±SDを示しており、N=単一の生物学的複製から得られた2つの異なる試料であるが、(A)の全細胞条件では、N=2つの独立した生物学的複製から得られた2つの異なる試料である。

【図８】図8Aは、ライブラリーの設計を示す図である。図8Bは、ライブラリーで使用された非天然モノマーの構造を示す図である。全ての天然骨格モノマーはD型であった。図8Cは、イソセラモックス(isoseramox)リンカーまでの配列の様々なアミノ酸の相対量を示す、品質管理のヒートマップを示す図である。位置7～10はKWKKモチーフを示し、位置1～6は可変領域の変化した組成を示している。

【図９】図9Aは、約1000、約2000、又は約4000のメンバーを含有する5又は20μMのPPMOライブラリーで22時間処置し、その後フローサイトメトリーを行った、HeLa 654細胞を示す図である。結果は、細胞のみの蛍光と比較した、PMO-ペプチドで処置した細胞の平均EGFP蛍光として示されている。図9Bは、5又は20μMのPPMOライブラリーで22時間処置し、次いで、細胞用培地に放出されたLDHについて試験された、HeLa 654細胞を示す図である。結果は、完全に溶解した細胞と比較した、ビヒクルを上回るLDH放出として示されている。

【図１０】図10Aは、様々なメンバーサイズの20μMのPPMOライブラリー又は20μMのPMO単独で22時間処置し、その後フローサイトメトリーを行った、HeLa 654細胞を示す図である。結果は、PMO処置細胞の蛍光と比較して示されている。図10Bは、4℃又は37℃で30分間プレインキュベートし、その後、20μMのPPMOライブラリー又は20μMのPMO単独で、示された温度で2時間処置した、HeLa 654細胞を示す図である。結果は、PMO処置細胞の蛍光と比較して示されている。

【図１１】インセル透過選択-質量分析のワークフローを示す図である。

【図１２】ウェスタンブロットを介するサイトゾルの抽出の確認を示す図である。

【図１３】図13Aは、1、2.5、5、10、25、又は50μMのPMO-CPPで22時間処置し、その後フローサイトメトリーを行った、HeLa 654細胞を示す図である。結果は、ビヒクルのみで処置した細胞の蛍光と比較した、PMO-ペプチドで処置した細胞の平均EGFP蛍光として示されている。図13Bは、LDH放出について試験した、A)で得られた細胞上清の結果を示す図である。結果は、完全に溶解された細胞と比較した、ビヒクルを上回るLDH放出のパーセントとして示されている。図13Cは、0.5、1、2.5、5、10、25、又は50μMのPMO-CPPで22時間処置したHeLa 654細胞を示す図である。

【図１４】図14Aは、２０μＭのＰＰＭＯライブラリー又は19.9μＭのＰＰＭＯライブラリー及び0.1μＭのＰＭＯ-ＣＰＰで２２時間処置し、その後フローサイトメトリーを行った、ＨｅＬａ ６５４細胞を示す図である。結果は、ビヒクルのみで処置した細胞の蛍光と比較した、ＰＭＯ-ペプチドで処置した細胞の平均ＥＧＦＰ蛍光として示されている。図１４Ｂは、１又は５μＭのＰＭＯ-ＣＰＰ又は５つのＰＭＯ-ＣＰＰの組み合わせ溶液で２２時間処置し、その後フローサイトメトリーを行った、ＨｅＬａ ６５４細胞を示す図である。結果は、ビヒクルのみで処置した細胞の蛍光と比較した、ＰＭＯ-ペプチドで処置した細胞の平均ＥＧＦＰ蛍光として示されている。示されている濃度は、試料中に存在する総ＰＭＯ-ＣＰＰを表している。
【図１５】図15Aは、異なるエンドサイトーシス阻害剤で処置した細胞についての、ＰＭＯと比較したＥＧＦＰ平均蛍光強度のプロットを示す図である。図１５Ｂは、４℃又は３７℃でＰＭＯ-ＣＰＰとインキュベートした細胞についての、ＰＭＯと比較したＥＧＦＰ平均蛍光強度のプロットを示す図である。
【図１６Ａ】ＰＭＯ-スルホＣｙ５-ＣＰＰ構築物の配列を示す図であり、Ｎ末端カーゴは完全に引き延ばされている(Ｚ)。小文字はＤ-アミノ酸を示している。
【図１６Ｂ】１、２.５、５、１０、２５、又は５０μＭのＰＭＯ-ＣＰＰ又はＰＭＯ-スルホＣｙ５-ＣＰＰで２２時間処置し、その後フローサイトメトリーを行った、ＨｅＬａ ６５４細胞を示す図である。結果は、ビヒクルのみで処置した細胞の蛍光と比較した、ＰＭＯ-ペプチドで処置した細胞の平均ＥＧＦＰ蛍光として示されている。図１６ＢはＤ-Ｂｐｅｐ構築物での処置を示している。
【図１６Ｃ】１、２.５、５、１０、２５、又は５０μＭのＰＭＯ-ＣＰＰ又はＰＭＯ-スルホＣｙ５-ＣＰＰで２２時間処置し、その後フローサイトメトリーを行った、ＨｅＬａ ６５４細胞を示す図である。結果は、ビヒクルのみで処置した細胞の蛍光と比較した、ＰＭＯ-ペプチドで処置した細胞の平均ＥＧＦＰ蛍光として示されている。図１６ＣはＰｅｐ１ａ構築物での処置を示している。
【図１６Ｄ】１、２.５、５、１０、２５、又は５０μＭのＰＭＯ-ＣＰＰ又はＰＭＯ-スルホＣｙ５-ＣＰＰで２２時間処置し、その後フローサイトメトリーを行った、ＨｅＬａ ６５４細胞を示す図である。結果は、ビヒクルのみで処置した細胞の蛍光と比較した、ＰＭＯ-ペプチドで処置した細胞の平均ＥＧＦＰ蛍光として示されている。図１６ＤはＰｅｐ１ｃ構築物での処置を示している。
【図１７】図17A～図17Cは、１、２.５、５、１０、２５、又は５０μＭのＰＭＯ-スルホＣｙ５-ＣＰＰで２２時間処置し、その後フローサイトメトリーを行った、ＨｅＬａ ６５４細胞を示す図である。結果は、各チャネルについての、ビヒクルのみで処置した細胞の蛍光と比較した、ＰＭＯ-スルホＣｙ５-ペプチドで処置した細胞の平均蛍光として示されている。図１７ＡはＤ-Ｂｐｅｐ構築物での処置を示している。図１７ＢはＰｅｐ１ａ構築物での処置を示している。図１７ＣはＰｅｐ１ｃ構築物での処置を示している。
【発明を実施するための形態】
【００２３】
細胞膜透過ペプチド(ＣＰＰ)は、細胞非透過性カーゴの送達を増強することによって、疾患の処置の助けとなり得る。ＣＰＰは、細胞サイトゾルに直接進入することができる、５～３０アミノ酸残基長のペプチドのクラスである(Ｗｏｌｆｅ Ｊｕｓｔｉｎ Ｍ.、Ｆａｄｚｅｎ Ｃｏｌｉｎ Ｍ.、Ｈｏｌｄｅｎ Ｒｅｂｅｃｃａ Ｌ.、Ｙａｏ Ｍｏｎｉｃａ、Ｈａｎｓｏｎ Ｇｕｎｎａｒ Ｊ.、Ｐｅｎｔｅｌｕｔｅ Ｂｒａｄｌｅｙ Ｌ.、Ａｎｇｅｗ. Ｃｈｅｍ. Ｉｎｔ. Ｅｄ. ２０１８、５７、４７５６～４７５９;Ｏｅｈｌｋｅ, Ｊ.、Ｓｃｈｅｌｌｅｒ, Ａ.、Ｗｉｅｓｎｅｒ, Ｂ.、Ｋｒａｕｓｅ, Ｅ.、Ｂｅｙｅｒｍａｎｎ, Ｍ.、Ｋｌａｕｓｃｈｅｎｚ, Ｅ.、Ｍｅｌｚｉｇ, Ｍ.、Ｂｉｅｎｅｒｔ, Ｍ.、Ｂｉｏｃｈｉｍ. Ｂｉｏｐｈｙｓ. Ａｃｔａ ＢＢＡ - Ｂｉｏｍｅｍｂｒ. １９９８、１４１４ (１)、１２７～１３９;Ｍａｒｇｕｓ, Ｈ.、Ｐａｄａｒｉ, Ｋ.、Ｐｏｏｇａ, Ｍ.、Ｍｏｌ. Ｔｈｅｒ. Ｊ. Ａｍ. Ｓｏｃ. Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ. ２０１２、２０ (３)、５２５～５３３)。これらの配列は、共有結合したカーゴを送達して、高分子に、さもなければ細胞外標的に限定される治療可能性を付与し得る。ＣＰＰはそれらの発見以来広く研究されているが、当分野には、細胞の進入及び透過の有効性を定量するためのロバストな方法論が存在していない。この知見不足は、ＣＰＰの細胞進入の複雑なメカニズム、並びに任意の所与のアッセイにおけるＣＰＰの有効性に影響する

多くの変数、例えばペプチド濃度、細胞型、温度、処置時間、及びカーゴに起因している(Reissmann Siegmund. J. Pept. Sci. 2014、20 (10)、760～784)。研究の進んだCPPであるペネトラチン(RQIKIWFQNRRMKWKK)では、報告された細胞内濃度と細胞外濃度との間の比率の範囲は、0.6:1.0から95.0:1.0である(Fischer, R.、Waizenegger, T.、Kohler, K.、Brock, R.、A Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2002、1564 (2)、365～374;Lindgren, M. E.、Hallbrink, M. M.、Elmquist, A. M.、Langel, U.、Biochem. J. 2004、377 (第1部)、69～76)。加えて、蛍光、イムノブロット、及び質量分析での検出が進歩しているとは言え、一度ペプチドが内在化したら、細胞内局在を決定することは困難である(Illien, F.、Rodriguez, N.、Amoura, M.、Joliot, A.、Pallerla, M.、Cribier, S.、Burlina, F.、Sagan, S.、Sci. Rep. 2016、6、36938)。CPPカーゴの選択は、更なる交絡因子を追加する。10を超える一般的なCPPの細胞膜透過能力は、シアニン色素に結合した場合と高分子薬に結合した場合とでは異なり、識別可能な傾向はこれまでに記載されていない(Wolfe, J. M.、Fadzen, C. M.、Choo, Z.-N.、Holden, R. L.、Yao, M.、Hanson, G. J.、Pentelute, B. L.、ACS Cent. Sci. 2018、4 (4)、512～520)。結果として、CPPの効果的な開発には、CPP-カーゴコンジュゲートで行うことができる、CPPの細胞進入及び細胞内局在化を理解するための新たな方法論が必要である。

【００２４】

CPPの臨床的進歩を遅らせているいくつかの制限が存在している。歴史的に、タンパク質形質導入ドメイン(PTD)としても知られているCPPは、ウイルスタンパク質及び転写タンパク質の膜貫通部分から派生した。例えば、ポリアルギニンペプチドTATは、転写タンパク質のHIV-トランスアクチベーターから派生し、また、核に透過し、遺伝子発現を標的化することが明らかにされた(Frankel, A. D.、Pabo, C. O.、Cell 1988、55 (6)、1189～1193;Green, M.、Loewenstein, P. M.、Cell 1988、55 (6)、1179～1188)。この配列及び類似の配列から、PMOカーゴの送達に合わせて作られたものを含む合成ペプチド、例えばBpepを設計することができ、このBpepは、取り込みの誘起にはアルギニンに依拠し、エンドソーム脱出の誘起には、非天然残基であるβ-アラニン及び6-アミノ-ヘキサン酸に依拠する(Jearawiriyapaisarn, N.ら、Molecular Therapy 2008、16 (9)、1624～1629)。ポリアルギニン配列の誘導体を使用する、実験に基づいた設計を超えて、新規な配列を合理的に設計することは、依然として困難なままである。ある程度の合理的設計を伴う方法には、合成分子進化が含まれる(Wimley, W. C.、In Cell Penetrating Peptides: Methods and Protocols、Langel, U.編、Methods in Molecular Biology、Springer US: New York, NY、2022、第73～89頁;Kauffman, W. B.ら、Nature Communications 2018、9 (1)、2568)。

【００２５】

合理的設計を伴う他の方法としては、インシリコ法が含まれる(Porosk, L.ら、Expert Opin Drug Discov 2021、16 (5)、553～565;Lee, E. Y.ら、Bioorganic & medicinal chemistry 2018、26 (10)、2708～2718;Manavalan, B.ら、J. Proteome Res. 2018、17 (8)、2715～2726;Pandey, P.ら、J. Proteome Res. 2018、17 (9)、3214～3222)。

【００２６】

更なるこれまでに発見された方法は、所望の活性である核局在化について試験したコンビナトリアルライブラリーで訓練されたモデルを使用して新規な配列を設計するために機械学習を利用している(Schissel, C. K.ら、Nat. Chem. 2021、13 (10)、992～1000;Lopez-Vidal, E. M.ら、JACS Au 2021;Wolfe, J. M.ら、ACS Cent Sci 2018、4 (4)、512～520)。最後に、別の一般的な戦略は、ファージディスプレイ又はmRNAディスプレイのライブラリーを利用するスクリーニングプラットフォームを伴う。しかし、これらの方法は、カーゴを細胞内区画に送達するペプチドの発見についての進歩が限られている。

【００２７】
更なるアプローチは、細菌ゲノム及びウイルスゲノムからいくつかの「フィロマー(phylomer)」CPPを同定したスクリーニングプラットフォームであり、当該「フィロマー」CPPはその後、インビボでアンチセンスカーゴを送達することが示された(Hoffmann, K.ら、Scientific Reports 2018、8 (1))。依然として、これらのアプローチで今も存在している制限は、拡張した化学的空間へのアクセスをもたらすD-キラル又は非天然アミノ酸の組み込みが困難なことである。非天然アミノ酸は合成の1ビーズ1化合物(one-bead one-compound)(OBOC)ライブラリーに組み込まれやすいが、これらの方法によるCPPの発見は、合成小胞に依拠することが多い(Carney, R. P.ら、ACS Comb. Sci. 2017、19 (5)、299～307)。従来のアフィニティー選択は、固定されたタンパク質標的に対して合成ライブラリー(OBOC)、ファージディスプレイ、又はmRNAディスプレイからペプチドリガンドをスクリーニングすること、及びヒットをデコードすることを伴う(Quartararo, A. J.ら、Nat Commun 2020、11 (1)、3183;Zuckermann, R. N.ら、Proc Natl Acad Sci U S A 1992、89 (10)、4505～4509)。

【００２８】
これらの方法は、細胞及び組織の外表面への親和性を有する新たなリガンドを発見するためのオンセル選択プラットフォームにおいて生物学的に関連する条件まで進歩した(Beck, S.ら、Biomaterials 2011、32 (33)、8518～8528;Wu, C.-H.ら、Science Translational Medicine 2015、7 (290);Wu, C.-H.ら、Journal of Biomedical Science 2016、23 (1)、8)。しかし、生物学的ディスプレイ技術は、ほぼ天然のアミノ酸の使用に限定されており、その結果得られるライブラリーの多様性及びタンパク質分解安定性が限定され(Ren, Y.ら、Mol Pharm 2018、15 (2)、592～601;Wei, X.ら、Angew Chem Int Ed Engl 2015、54 (10)、3023～3027)、また、D-ペプチドの発見を可能にする鏡像技術でさえも、非カノニカルな残基を組み込むことが依然として困難である(Huang, L.ら、Mol Pharm 2017、14 (5)、1742～1753;Eckert, D. M.ら、Cell 1999、99 (1)、103～115)。

【００２９】
本明細書では、新規な更に効率的なペプチド配列の実験に基づいた設計を行うための方法が提供される。増強型CPPの発見に、非天然ペプチドを使用する改良されたスクリーニングプラットフォームを開発することによって、並びに、インセル選択、及び送達対象の特定のカーゴを含めること等の、生物学的に関連するスクリーニング条件をプロトコールに組み込むことによって、本明細書で提供される方法は、より優れた化学的多様性及びタンパク質分解安定性を得る。

【００３０】
また、本明細書では、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー(PMO)を細胞に送達し得るペプチドを同定する方法、すなわち、全細胞溶解物及びサイトゾル中に存在する配列を発見するための方法が提供される。この方法は、エンドソームを含む全細胞抽出物から単離されるペプチドと比較して更に活性であり、核に更に効率的に局在化しているペプチドを発見することを可能にする。増大した送達の利益を受けるであろう治療用高分子は、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー(PMO)であり、これは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)のためのアンチセンス「エクソンスキップ」療法として、最近市場に出された。エテプリルセンという薬物は、その治療効果のためには核に到達し、pre-mRNAを結合しなければならない、10kDaの合成アンチセンスオリゴマーである。しかし、エテプリルセンは細胞膜透過性が低いため、50mg/kgに達する高用量が必要であり、しかも、この薬物の大部分は、投与の24時間以内に腎臓で除去される(Baker, D. E.、Eteplirsen. Hosp. Pharm. 2017、52 (4)、302～305;Lim, K. R. Q.、Maruyama, R.、Yokota, T.、Drug Des. Devel. Ther. 2017、11、533～545(以降、Limらと記載する))。いくつかのCPPはPMOの取り込みを増大させることが示されており、最近の臨床試験の結果は、DMD患者で、CPPに結び付いたPMOへの曝露が10倍増大することを示している(Inc, S. T. Sarepta Therapeutics Announces Po

sitive Clinical Results from MOMENTUM, a Phase 2 Clinical Trial of SRP-5051 in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Skipping Exon 51.、http://www.globenewswire.com/news-release/2020/12/07/2140613/0/en/Sarepta-Therapeutics-Announces-Positive-Clinical-Results-from-MOMENTUM-a-Phase-2-Clinical-Trial-of-SRP-5051-in-Patients-with-Duchenne-Muscular-Dystrophy-Amenable-to-Skipping-Exon-5.html(2020年12月7日にアクセスした))。広範なCPPがPMOの送達について試験されているが、これらCPPはネイティブなL型に限定されており、活性ベースのアッセイで主に研究され、細胞内の物質量についての定量的情報については調べられていない(Kurrikoff, K.、Vunk, B.、Langel, U.、Expert Opin. Biol. Ther. 2021、21 (3)、361～370)。

【００３１】

Dペプチドは、CPPとして調査されている(Ma, Y.、Gong, C.、Ma, Y.、Fan, F.、Luo, M.、Yang, F.、Zhang, Y.-H.、J. Controlled Release 2012、162 (2)、286～294;Henriques, S. T.、Peacock, H.、Benfield, A. H.、Wang, C. K.、Craik, D. J.、J. Am. Chem. Soc. 2019、141 (51)、20460～20469)。一部の報告では、Dアミノ酸への変異がCPP活性にとって有害であるかについての論争があるが(Verdurmen, W. P. R.、Bovee-Geurts, P. H.、Wadhwani, P.、Ulrich, A. S.、Hallbrink, M.、vanKuppevelt, T. H.、Brock, R.、Chem. Biol. 2011、18 (8)、1000～1010(以降、「Verdurmenら」と記載する)、鏡像CPPを使用したPMOの送達についての研究は行われていない。鏡像ペプチドのタンパク質分解安定性は、細胞内への取り込み後のそれらの特徴付けを可能にし、直交性の情報を活性ベースのアッセイに提供する。現在、PMO-CPPの内在化を特徴付けるために使用される主な方法は、活性なオリゴマーが核にうまく送達されると緑色の蛍光が生じるインビトロアッセイである(Sazani, P.、Gemignani, F.、Kang, S.-H.、Maier, M. A.、Manoharan, M.、Persmark, M.、Bortner, D.、Kole, R.、Nat. Biotechnol. 2002、20 (12)、1228～1233)。これはPMO-CPPの活性を測定するための優れたアッセイであるが、このアッセイは、細胞内の物質量についての情報を提供しない。特に、エンドサイトーシスメカニズムが分かっているコンジュゲートでは、エンドソーム脱出の理解は極めて重要である。エンドソームに捕捉された高濃度のペプチドは活性アッセイのみでは明らかにならないが、活性なペプチドのこの喪失は大きな治療上の損害となり得る(Erazo-Oliveras, A.、Muthukrishnan, N.、Baker, R.、Wang, T.-Y.、Pellois, J.-P.、Pharmaceuticals 2012、5 (11)、1177～1209)。したがって、細胞の異なる部分における相対物質量を明らかにする追加のアッセイは、CPP送達の有益で新規な計量方法を提供する。活性と相対量との比較は、効率の有益な計量方法となり、この場合、効率の高いペプチドは、内部濃度に対するアンチセンス活性の比率が高いペプチドである。

【００３２】

細胞への取り込みを定量するための既存の方法としては、蛍光、イムノブロット、及び質量分析が含まれるが、エンドソーム局在化とサイトゾル局在化との区別は依然として困難である。加えて、L-ペプチドのタンパク質分解不安定性は、内在化後の質量分析によるそれらの特徴付けを複雑にしている。質量分析は、生物学的混合物から回収されたペプチドの濃度についての情報をもたらす直接定量のツールである。過去の研究は、MALDI-TOF質量分析がいかにペプチド及びタンパク質の絶対的及び相対的定量のための実践的なツールであるかを示している。例えば、検量線の作成には、分子量が近い内部標準を使用すれば十分である(Duncan, M. W.、Practical Quantitative Biomedical Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry)。L-CPPの総取り込みの定量は、重原子標識された内部標準を使用して行われた(Burlina, F.、Sagan, S.、Bolbach, G.、Chassaing, G.、Angew. Chem. Int. Ed. 2005、44 (27)、4244～4247(以降、「Burlinaら、2005」と記載する);Burlina, F.、Sagan, S.、Bolbach, G.、Chassaing, G.、Nat. Protoc. 2006、1 (1)、200(以降、「Burlinaら、2006」と記載する))。このアッセイはCPP及びCPP-ペプチドコンジュゲートの全細胞取り込みに関

する情報を提供したが、これは、L-ペプチドの重原子標識及び迅速な分解が必要であることによって限定的である(Aubry, S.、Aussedat, B.、Delaroche, D.、Jiao, C.-Y.、Bolbach, G.、Lavielle, S.、Chassaing, G.、Sagan, S.、Burlina, F.、Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2010、1798 (12)、2182～2189)。ホスホペプチドの相対的定量のための、重原子標識された標準のスパイクインの必要性を回避するための方法が開発された(Ho, H.-P.、Rathod, P.、Louis, M.、Tada, C. K.、Rahaman, S.、Mark, K. J.、Leng, J.、Dana, D.、Kumar, S.、Lichterfeld, M.、Chang, E.、J. Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM 2014, 28 (24)、2681～2689)。

【００３３】

本明細書で提供されるD-ペプチドのタンパク質分解安定性は、細胞及び動物内部からのそれらの回収及び分析を可能にし、アンチセンス送達効率の新規な計量方法の使用を可能にする。

【００３４】

本明細書では、L-ペプチド又はD-ペプチドに共有結合したオリゴヌクレオチドを含むペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートが提供される。また、本明細書では、本明細書で記載されるペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートを対象に投与する工程を含む、それを必要とする対象における疾患を処置する方法が提供される。本明細書で記載されるD-ペプチド及びこれによるペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートは、L-ペプチドと比較して増大したタンパク質分解安定性を示す。この増大したタンパク質分解安定性は、サイトゾル送達後の質量分析ベースの特徴付けを可能にする。サイトゾル送達は、細胞内部からのインタクトな構築物の回収に基づいて定量することができる。

【００３５】

加えて、本明細書では、細胞膜透過ペプチドに共有結合したオリゴヌクレオチドを含むペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートであって、非天然アミノ酸又はD-アミノ酸を含み、KWKK、KKWK、KWWKK、WWKK、WKK、KKKK、又はKKモチーフを有するC末端配列を更に含む、ペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートが提供される。

【００３６】

また、本明細書では、細胞膜透過ペプチドに共有結合したオリゴヌクレオチドを含むペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートであって、非天然アミノ酸又はD-アミノ酸を含み、(d-K)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-W)(d-K)、(d-K)(d-W)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-W)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-K)(d-K)、又は(d-K)(d-K)モチーフを有するC末端配列を更に含む、ペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲートが提供される。

【００３７】

ペプチドは、核へのPMOの送達を改善するための有望な戦略である。細胞膜透過ペプチド(CPP)は、特に、サイトゾルに理想的にアクセスし、カーゴの細胞内送達を促進し得る、5～40アミノ酸の比較的短い配列である。例えば、PMOにコンジュゲートしている場合、オリゴアルギニンペプチドは、PMO送達の促進において最も効果的なペプチドのうちのいくつかとされている。

【００３８】

また、本明細書では、ビオチン化されたCPP及びPMO-CPPの取り込みを判定して、MALDI-TOFを介する抽出及び直接的な検出を使用して全細胞及びサイトゾル内でのそれらの相対濃度を決定するための方法が提供される。PMO送達活性を相対内部濃度と比較することによって、本明細書で提供される方法は、DMDのためのPMOカーゴ送達を改善するために有用なカーゴ送達効率の新規な計量方法を得る。

【００３９】

また、本明細書では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチドコンジュゲートを使用して神経筋疾患を処置するための方法が提供される。

【００４０】

I.定義

別段の規定がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般に理解されているものと同一の意味を有する。本明細書で記載されるものに類似の又は同等のあらゆる方法及び材料が、本開示の対象の実施又は試験で使用され得るが、好ましい方法及び材料が記載されている。本開示において、次の用語は以下で定義される通りである。

【００４１】

「約」という用語は、当業者によって理解され、これが使用される文脈に応じてある程度変化する。測定可能な値、例えば量、時間、及びこれらに類するものに言及する場合に本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特定された値からの、±５％、±１％、及び±０.１％を含む±１０％の変化を包含することを意味しており、そのような意味では、変化は、開示されている方法を行うために適切である。

【００４２】

「アルキル」という用語は、ある特定の実施形態では１個から６個の間の又は１個から８個の間の炭素原子をそれぞれ有する、飽和した直鎖状又は分枝鎖状の炭化水素部分を指す。$C_{1\sim6}$アルキル部分の例としては、限定はしないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチル、ネオペンチル、n-ヘキシル部分が含まれ、$C_{1\sim8}$アルキル部分の例としては、限定はしないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、ヘプチル、及びオクチル部分が含まれる。

【００４３】

アルキル置換基内の炭素原子の数は、接頭辞「$C_{x\sim y}$」によって示すことができ、ここで、xは最小の、yは最大の、置換基内の炭素原子数である。同様に、C_x鎖は、x個の炭素原子を有するアルキル鎖を意味する。

【００４４】

「ヘテロアルキル」という用語は、それ自体で、又は別の用語と組み合わせて、別段の記載がない限り、記載された数の炭素原子並びにO、N、及びSからなる群から選択される１つ又は２つのヘテロ原子からなる安定な直鎖状又は分枝鎖状のアルキル基を意味し、ここで、窒素原子及び硫黄原子は場合によって酸化されていてよく、窒素ヘテロ原子は場合によって四級化されていてよい。ヘテロ原子は、ヘテロアルキル基の残り部分とヘテロ原子が結び付いている断片との間を含む、ヘテロアルキル基のあらゆる位置に置かれていてよく、また、ヘテロアルキル基内の最も遠位の炭素原子に結び付いていてもよい。例としては、$-O-CH_2-CH_2-CH_3$、$-CH_2-CH_2-CH_2-OH$、$-CH_2-CH_2-NH-CH_3$、$-CH_2-S-CH_2-CH_3$、及び$-CH_2-CH_2-S(=O)-CH_3$が含まれる。最大２つのヘテロ原子が連続していてよく、例えば、$-CH_2-NH-OCH_3$、又は$-CH_2-CH_2-S-S-CH_3$等である。

【００４５】

単独で又は他の用語と組み合わせて利用される「アリール」という用語は、別段の記載がない限り、１つ又は複数の環(典型的には１つ、２つ、又は３つの環)を有する炭素環式の芳香族系を意味し、ここで、このような環は、ビフェニルのようにぶら下がった状態で共に結び付いていても、又は、ナフタレンのように融合していてもよい。アリール基の例としては、フェニル、アントラシル、及びナフチルが含まれる。様々な実施形態では、アリール基の例としては、フェニル(例えば、C_6-アリール)及びビフェニル(例えば、C_{12}-アリール)が含まれ得る。一部の実施形態では、アリール基は、６個から１６個の炭素原子を有する。一部の実施形態では、アリール基は、６個から１２個の炭素原子を有する(例えば、$C_{6\sim12}$-アリール)。一部の実施形態では、アリール基は、６個の炭素原子を有する(例えば、C_6-アリール)。

【００４６】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール」又は「複素芳香環」という用語は、芳香族の特性を有する複素環を指す。ヘテロアリール置換基は炭素原子の数によって定義さ

れ得、例えば、$C_{1\sim9}$-ヘテロアリールは、ヘテロ原子の数を含まない、ヘテロアリール基に含まれる炭素原子の数を示している。例えば、$C_{1\sim9}$-ヘテロアリールは、追加の1個から4個のヘテロ原子を含む。多環ヘテロアリールは、部分的に飽和している1つ又は複数の環を含み得る。ヘテロアリールの非限定的な例としては、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル(例えば、2-及び4-ピリミジニルを含む)、ピリダジニル、チエニル、フリル、ピロリル(例えば、2-ピロリルを含む)、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、ピラゾリル(例えば、3-及び5-ピラゾリルを含む)、イソチアゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1,3,4-トリアゾリル、テトラゾリル、1,2,3-チアジアゾリル、1,2,3-オキサジアゾリル、1,3,4-チアジアゾリル、並びに1,3,4-オキサジアゾリルが含まれる。

【００４７】

多環複素環及びヘテロアリールの非限定的な例としては、インドリル(例えば、3-、4-、5-、6-、及び7-インドリルを含む)、インドリニル、キノリル、テトラヒドロキノリル、イソキノリル(例えば、1-及び5-イソキノリルを含む)、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリル、シンノリニル、キノキサリニル(例えば、2-及び5-キノキサリニルを含む)、キナゾリニル、フタラジニル、1,8-ナフチリジニル、1,4-ベンゾジオキサニル、クマリン、ジヒドロクマリン、1,5-ナフチリジニル、ベンゾフリル(例えば、3-、4-、5-、6-、及び7-ベンゾフリルを含む)、2,3-ジヒドロベンゾフリル、8,9-ジヒドロ-3H-ジベンゾ[b,f][1,2,3]トリアゾロ[4,5-d]アゾシン、1,2-ベンズイソオキサゾリル、ベンゾチエニル(例えば、3-、4-、5-、6-、及び7-ベンゾチエニルを含む)、ベンズオキサゾリル、ベンゾチアゾリル(例えば、2-ベンゾチアゾリル及び5-ベンゾチアゾリルを含む)、プリニル、ベンズイミダゾリル(例えば、2-ベンズイミダゾリルを含む)、ベンゾトリアゾリル、チオキサンチニル、カルバゾリル、カルボリニル、アクリジニル、ピロリジジニル、並びにキノリジジニルが含まれる。

【００４８】

本明細書で使用される場合、頭字語DBCOは、8,9-ジヒドロ-3H-ジベンゾ[b,f][1,2,3]トリアゾロ[4,5-d]アゾシンを指す。

【００４９】

「保護基」又は「化学的保護基」という用語は、化合物の一部又は全ての反応性部分をブロックし、保護基が除去されるまでこのような部分が化学的反応に関与することを防ぐ、化学的部分を指し、例えば、このような化学的部分は、T.W. Greene、P.G.M. Wuts、Protective Groups in Organic Synthesis、第3版、John Wiley & Sons (1999)に列挙及び記載されている。異なる保護基が利用される場合、各(異なる)保護基が異なる手段によって除去可能であることが有利であり得る。完全に異種の反応条件下で切断される複数の保護基は、このような保護基の差別的な除去を可能にする。例えば、保護基は、酸、塩基、及び水素化分解によって除去することができる。トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、アセタール、及びtert-ブチルジメチルシリル等の基は酸に不安定であり、水素化分解によって除去可能なCbz基及び塩基に不安定なFmoc基で保護されているアミノ基の存在下で、カルボキシ及びヒドロキシ反応性部分を保護するために使用することができる。カルボン酸部分は、限定はしないがメチル又はエチル等の塩基に不安定な基でブロックすることができ、ヒドロキシ反応性の部分は、tert-ブチルカルバメート等の酸に不安定な基、又は酸及び塩基の両方に安定であるが加水分解によって除去可能なカルバメートでブロックされているアミンの存在下で、アセチル等の塩基に不安定な基でブロックすることができる。

【００５０】

カルボン酸反応性部分及びヒドロキシル反応性部分はまた、ベンジル基等の加水分解で除去可能な保護基でもブロックすることができ、一方、アミン基は、Fmoc等の塩基に不安定な基でブロックすることができる。式(I)の化合物を合成するための特に有用なアミン保護基は、トリフルロアセトアミドである。カルボン酸反応性部分は、2,4-ジメトキシベンジル等の酸化で除去可能な保護基でブロックすることができ、一方、共存している

アミノ基は、フルオリドに不安定なシリルカルバメートでブロックすることができる。

【００５１】

アリルブロック基は、安定であり、金属触媒又はパイ酸触媒によってその後除去され得るため、酸保護基及び塩基保護基の存在下で有用である。例えば、アリルでブロックされたカルボン酸は、酸に不安定なt-ブチルカルバメート保護基又は塩基に不安定なアセテートアミン保護基の存在下で、パラジウム(0)によって触媒される反応で脱保護することができる。更に別の形態の保護基は、化合物又は中間体が結び付き得る樹脂である。残基が樹脂に結び付いている限り、この官能基はブロックされ、反応することができない。樹脂から放出されると、官能基は反応に利用可能となる。

【００５２】

「核酸塩基」、「塩基対合部分」、「核酸塩基対合部分」、又は「塩基」という用語は、ヌクレオシド、ヌクレオチド、及び/又はモルフォリノサブユニットの複素環部分を指す。核酸塩基は天然に生じるものであり得る(例えば、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、及びグアニン)か、又は、これらの天然に生じる核酸塩基の修飾されたもの若しくは類似体であり得、例えば、核酸塩基の1つ又は複数の窒素原子は、それぞれの存在毎に独立して炭素によって置き換えられていてよい。典型的な類似体としては、ヒポキサンチン(ヌクレオシドイノシンの塩基成分)、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾型ピリミジン、10-(9-(アミノエトキシ)フェノキサジニル)(G-クランプ)、及びこれらに類するものが含まれる。

【００５３】

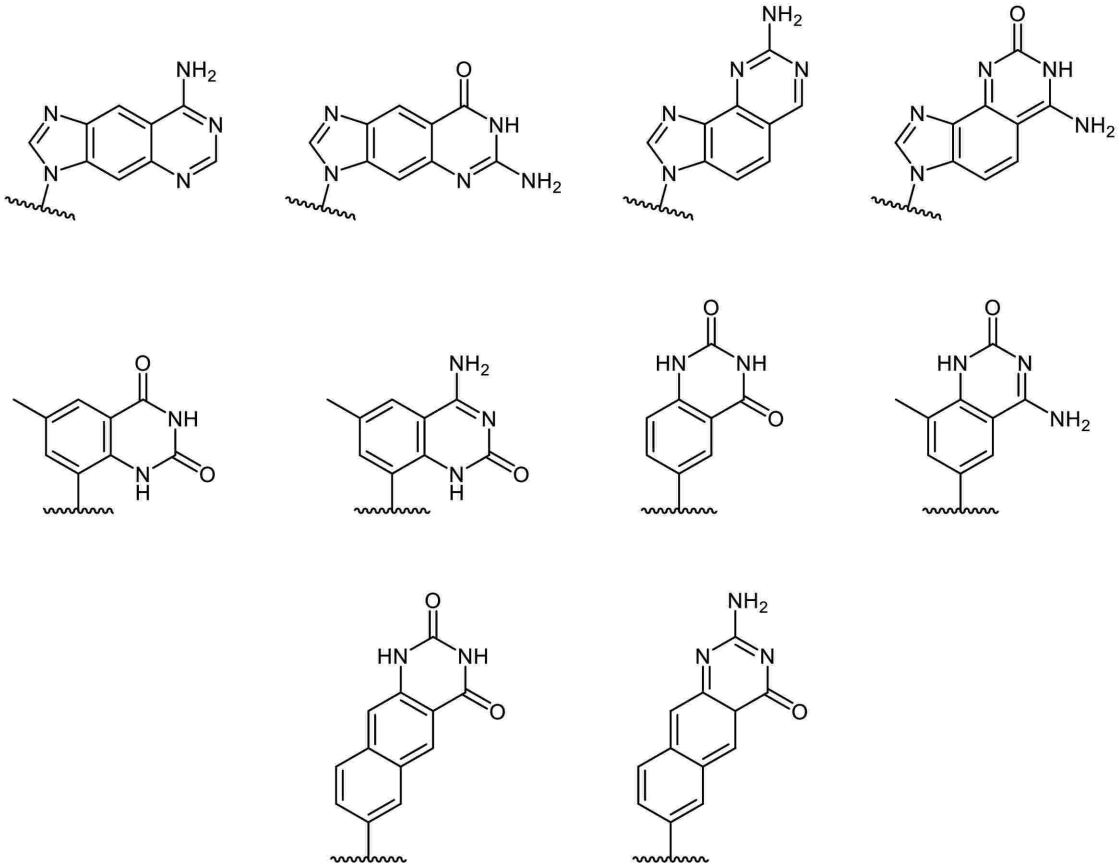
塩基対合部分の更なる例としては、限定はしないが、それらのそれぞれのアミノ基がアシル保護基によって保護されているウラシル、チミン、アデニン、シトシン、グアニン、及びヒポキサンチン、2-フルオロウラシル、2-フルオロシトシン、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、2,6-ジアミノプリン、アザシトシン、ピリミジン類似体、例えばシュードイソシトシン及びシュードウラシル、並びに他の修飾された核酸塩基、例えば8置換型プリン、キサンチン、又はヒポキサンチン(最後の2つは天然分解産物である)が含まれる。Chiu及びRana (2003) RNA 9:1034～1048;Limbachら(1994) Nucleic Acids Res. 22:2183～2196;並びにRevankar及びRao、Comprehensive Natural Products Chemistry、第7巻、313で開示されている修飾された核酸塩基もまた検討され、これら文献の内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【００５４】

塩基対合部分の更なる例としては、限定はしないが、1つ又は複数のベンゼン環が付加されている、サイズの大きな核酸塩基が含まれる。その内容が参照によって本明細書に組み込まれるGlen Researchカタログ(www.glenresearch.com)、Krueger ATら(2007) Acc. Chem. Res. 40:141～150;Kool ET (2002) Acc. Chem. Res. 35:936～943;Benner SAら(2005) Nat. Rev. Genet. 6:553～543;Romesberg FEら(2003) Curr. Opin. Chem. Biol. 7:723～733;Hirao, I (2006) Curr. Opin. Chem. Biol. 10:622～627に記載されている核酸塩基の置き換えは、本明細書で記載されるオリゴマーの合成に有用であると検討される。サイズの大きな核酸塩基の例を以下に示す。

【００５５】

【化３】



【００５６】

「オリゴヌクレオチド」又は「オリゴマー」という用語は、複数の連結したヌクレオシド、ヌクレオチド、又はヌクレオシド及びヌクレオチド両方の組み合わせを含む化合物を指す。本明細書で提供される具体的な実施形態では、オリゴヌクレオチドは、モルフォリノオリゴヌクレオチドである。

【００５７】

アンチセンスオリゴマーは、当該オリゴマーが、37℃を超える、45℃を超える、好ましくは少なくとも50℃の、及び典型的には60℃～80℃の、又はそれを超えるTmで、生理学的条件下で標的にハイブリダイズする場合、標的ポリヌクレオチドに「特異的にハイブリダイズする」。オリゴマーの「Tm」は、50％が相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする温度である。Tmは、例えばMiyadaら(1987) Methods Enzymol. 154:94～107で記載されているように、生理食塩水中で、標準的な条件下で決定される。このようなハイブリダイゼーションは、標的配列へのアンチセンスオリゴマーの「おおよその」又は「実質的な」相補性及び厳密な相補性で生じ得る。

【００５８】

「相補的な」及び「補体性」という用語は、塩基対合のルールによって関連しているオリゴヌクレオチド(すなわちヌクレオチドの配列)を指す。例えば、配列「T-G-A(5'～3')」は、配列「T-C-A(5'～3')」に相補的である。補体性は「部分的」であり得、この場合、核酸の塩基の一部のみが塩基対合のルールに従ってマッチしている。又は、核酸の間に「完全な」、「全体的な」、又は「パーフェクトな」(100％の)補体性が存在していることもある。核酸鎖の間の補体性の程度は、核酸鎖の間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に大きな影響を有する。パーフェクトな相補性が望まれる場合が多いが、一部の実施形態は、標的RNAとの1つ又は複数の、しかし好ましくは6つ、5つ、4つ、3つ、2つ、又は1つのミスマッチを含み得る。このようなハイブリダイゼーションは、標的配列へのアンチセンスオリゴマーの「おおよその」又は「実質的な」相補性、及び厳密な相補

性で生じ得る。一部の実施形態では、オリゴマーは、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、又は100%の相補性で標的配列にハイブリダイズし得る。オリゴマー内の任意の位置で変化が含まれる。ある特定の実施形態では、オリゴマーの末端近くの配列における変化が、内部での変化よりも一般に好ましく、存在する場合には、典型的には、5'末端、3'末端、又は両末端から約6、5、4、3、2、又は1ヌクレオチド以内である。

【００５９】

天然に生じるヌクレオチド塩基としては、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、及びウラシルが含まれ、これらは、それぞれA、G、C、T、及びUという記号を有する。ヌクレオチド塩基はまた、天然に生じるヌクレオチド塩基の類似体も包含し得る。塩基対合は、典型的には、プリンAとピリミジンT又はUとの間、及びプリンGとピリミジンCとの間で生じる。

【００６０】

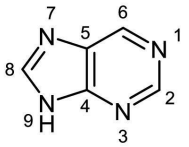
オリゴヌクレオチドはまた、核酸塩基(当技術分野では単純に「塩基」と呼ばれることが多い)の修飾又は置換も含み得る。修飾又は置換された塩基を有するオリゴヌクレオチドには、核酸で最も一般に見られるプリン又はピリミジン塩基の1つ又は複数があまり一般的ではないか又は非天然の塩基で置き換えられているオリゴヌクレオチドが含まれる。一部の実施形態では、核酸塩基は、プリン塩基のN9原子又はピリミジン塩基のN1原子で、ヌクレオチド又はヌクレオシドのモルホリン環に共有結合している。

【００６１】

プリン塩基は、一般式:

【００６２】

【化４】



【００６３】

によって記載される、イミダゾール環に融合しているピリミジン環を含む。

【００６４】

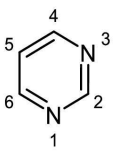
アデニン及びグアニンは、核酸で最も一般に見られる2つのプリン核酸塩基である。これらは、限定はしないが、N6-メチルアデニン、N2-メチルグアニン、ヒポキサンチン、及び7-メチルグアニンを含む他の天然に生じるプリンで置換されていてよい。

【００６５】

ピリミジン塩基は、一般式:

【００６６】

【化５】



【００６７】

によって記載される6員のピリミジン環を含む。

【００６８】

シトシン、ウラシル、及びチミンは、核酸で最も一般に見られるピリミジン塩基である。これらは、限定はしないが、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、シュードウラシル、及び4-チオウラシルを含む、他の天然に生じるピリミジンで置換されていてよい。一実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチドは、ウラシルの代

わりにチミン塩基を有する。

【００６９】

他の修飾又は置換された塩基としては、限定はしないが、2,6-ジアミノプリン、オロト酸、アグマチジン、リシジン、2-チオピリミジン(例えば、2-チオウラシル、2-チオチミン)、G-クランプ及びその誘導体、5置換型ピリミジン(例えば、5-ハロウラシル、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、5-アミノメチルウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、5-アミノメチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、Super T)、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、7-アザ-2,6-ジアミノプリン、8-アザ-7-デアザグアニン、8-アザ-7-デアザアデニン、8-アザ-7-デアザ-2,6-ジアミノプリン、Super G、Super A、及びN4-エチルシトシン、又はこれらの誘導体;N2-シクロペンチルグアニン(cPent-G)、N2-シクロペンチル-2-アミノプリン(cPent-AP)、及びN2-プロピル-2-アミノプリン(Pr-AP)、シュードウラシル、又はこれらの誘導体;並びに、2,6-ジフルオロトルエンのような縮重塩基若しくはユニバーサル塩基、又は脱塩基部位のような不在塩基(例えば、1-デオキシリボース、1,2-ジデオキシリボース、l-デオキシ-2-O-メチルリボース、又は環の酸素が窒素で置き換えられているピロリジン誘導体(アザリボース))が含まれる。シュードウラシルは、ウリジン内の通常のN-グリコシドの代わりにC-グリコシドを有する、天然に生じる異性体型のウラシルである。

【００７０】

ある特定の修飾又は置換された核酸塩基は、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドの結合親和性を増大させるために特に有用である。これらとしては、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、及び5-プロピニルシトシンを含む、5置換型ピリミジン、6-アザピリミジン、並びにN-2、N-6、及び0～6置換されたプリンが含まれる。様々な実施形態では、核酸塩基は5-メチルシトシン置換を含み得、これは、核酸二本鎖の安定性を0.6～1.2℃増大させることが示されている。

【００７１】

一部の実施形態では、修飾又は置換された核酸塩基は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの精製を容易にするために有用である。例えば、ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、3つ以上の(例えば、3つ、4つ、5つ、6つ、又はそれを超える)連続するグアニン塩基を有し得る。ある特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、3つ以上の連続するグアニン塩基からなる鎖はオリゴヌクレオチドの凝集を生じさせ得、精製を複雑にしている。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、連続するグアニンの1つ又は複数をヒポキサンチンで置換することができる。3つ以上の連続するグアニン塩基からなる鎖で、ヒポキサンチンを1つ又は複数のグアニンで置換すると、アンチセンスオリゴヌクレオチドの凝集が低減し得、これによって精製が容易になる。

【００７２】

本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、合成され、生物由来のアンチセンス組成物を含まない。本開示の分子はまた、他の分子、分子構造、又は化合物混合物、例えば、取り込み、分布、又は吸収を補助するためのリポソーム、受容体に標的化された分子、経口製剤、直腸製剤、局所製剤、若しくは他の製剤、又はこれらの組み合わせと、混合、カプセル化、コンジュゲート、又は他の方法で組み合わせてもよい。

【００７３】

本明細書で使用される場合、「核酸類似体」は、天然に生じない核酸分子を指す。核酸は、共に連結して直鎖状構造となったヌクレオチドサブユニットのポリマーである。各ヌクレオチドは、窒素を含有する芳香族塩基から構成され、これはペントース(5炭素)糖に結び付いており、ペントース糖はリン酸基に結び付いている。連続するリン酸基は、ホスホジエステル結合を介して共に連結して、ポリマーを形成している。天然に生じる核酸の2つの一般的形態は、デオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA)である。鎖の一方の末端は、糖部分の5'炭素原子に結び付いている遊離リン酸基を有している。この末端は、分子の5'末端と呼ばれる。他方の末端は、糖部分の3'炭素で遊離ヒドロキシル(-OH)基を有しており、分子の3'末端と呼ばれる。核酸類似体は、1つ又は複数の天然に生じない

核酸塩基、糖、及び/又はヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー(ＰＭＯ)を含み得る。本明細書で開示されているように、ある特定の実施形態では、「核酸類似体」はＰＭＯであり、ある特定の実施形態では、「核酸類似体」は正に帯電した陽イオン性のＰＭＯである。

【００７４】

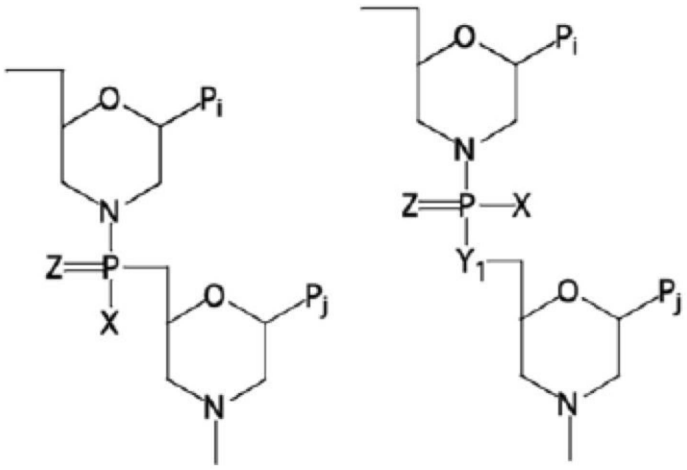
「モルフォリノオリゴマー」又は「ＰＭＯ」は、典型的なポリヌクレオチドに水素結合し得る塩基を支持する骨格を有するポリマー分子を指し、ここで、当該ポリマーはペントース糖骨格部分を有しておらず、更に具体的には、ヌクレオチド及びヌクレオシドに典型的なホスホジエステル結合によって連結したリボース骨格を有しておらず、しかしその代わりに環窒素を有しており、この環窒素を介してカップリングしている。典型的な「モルフォリノ」オリゴマーは、1つのサブユニットのモルフォリノ窒素を隣接するサブユニットの5'環外炭素に繋ぐホスホロアミデート結合又はホスホロジアミデート結合によって共に連結した、複数のモルフォリノサブユニット構造を含み、各サブユニットはプリン又はピリミジン塩基対合部分を含み、当該部分は、塩基特異的な水素結合によって、ポリヌクレオチド内の塩基への結合に効果的である。モルフォリノオリゴマー(アンチセンスオリゴマーを含む)は、例えば、全てが参照によってその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第5,034,506号、米国特許第5,142,047号、米国特許第5,166,315号、米国特許第5,185,444号、米国特許第5,217,866号、米国特許第5,506,337号、米国特許第5,521,063号、米国特許第5,698,685号、米国特許第8,076,476号、及び米国特許第8,299,206号、並びにＰＣＴ公開第ＷＯ2009/064471号で詳述されている。

【００７５】

好ましいモルフォリノオリゴマーは、ホスホロジアミデートに連結したモルフォリノオリゴマーであり、本明細書でＰＭＯと呼ばれる。このようなオリゴマーは、モルフォリノサブユニット構造、例えば、

【００７６】

【化６】



【００７７】

で示すモルフォリノサブユニット構造から構成され、

式中、Ｘは、NH_2、ＮＨＲ、又はNR_2であり(ここで、Ｒは低級アルキル、好ましくはメチルである)、Y_1はＯであり、ＺはＯであり、P_i及びP_jは、塩基特異的な水素結合によるポリヌクレオチド内塩基への結合に効果的な、プリン又はピリミジン塩基対合部分である。また、Ｘが低級アルコキシ、例えばメトキシ又はエトキシであり、Y_1がＮＨ又はＮＲであり、Ｒが低級アルキルであり、ＺがＯである、代替のホスホロジアミデートの連結を有する構造も好ましい。

【００７８】

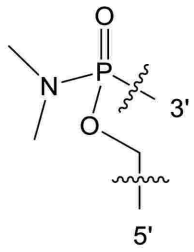
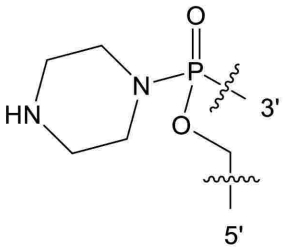
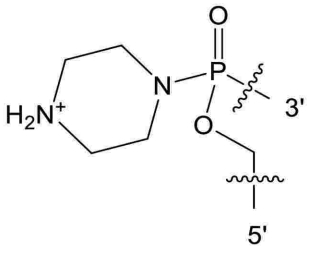
代表的なＰＭＯとしては、サブユニット間の連結が連結(Ａ1)であるＰＭＯが含まれる。Ｔ

able 1(表1)を参照されたい。

【００７９】

【表１】

Table 1. 代表的なサブユニット間連結

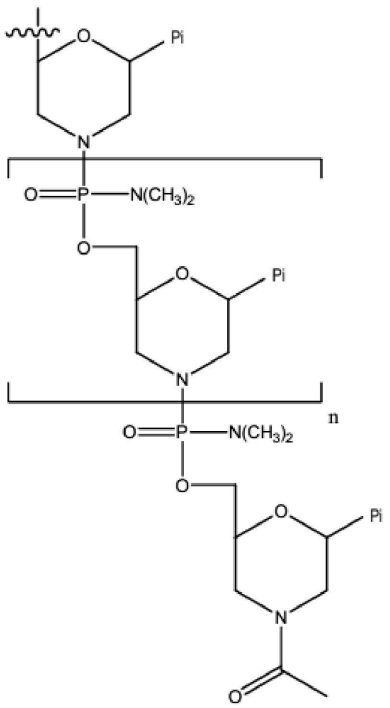
番号	名称	構造
A1	PMO	
A2	PMO^+ (プロトン化されていない形態が示されている)	
A3	PMO^+ (+)	

【００８０】

「ホスホロアミデート」基は、3つの酸素原子が結び付き1つの窒素原子が結び付いているリンを含むが、「ホスホロジアミデート」基は、2つの酸素原子が結び付き2つの窒素原子が結び付いているリンを含む。代表的なホスホロジアミデートの例は、

【００８１】

【化７】



【００８２】
であり、
各P_iは、Ｈ、核酸塩基、及び化学的保護基で官能化された核酸塩基から独立して選択され、核酸塩基は、それぞれの存在毎に独立して、ピリジン、ピリミジン、トリアジナン、プリン、及びデアザプリンから選択された$C_{3\sim6}$複素環を含み、ｎは６～３８の整数である。
【００８３】
本明細書で記載されるオリゴマーの帯電していない又は修飾されたサブユニット間連結では、１つの窒素は常に、骨格鎖に対するペンダントである。ホスホロジアミデート連結内の第２の窒素は、典型的には、モルフォリノ環構造の環窒素である。
【００８４】
ＰＭＯは、スプライシング機構成分又は翻訳機構成分の結合又は進行を防ぐことによって遺伝子発現を阻害する、水溶性の、帯電していない、又は実質的に帯電していないアンチセンス分子である。ＰＭＯはまた、ウイルス複製を阻害又はブロックすることも示されている(Stein, Skillingら、２００１;McCaffrey, Meuseら、２００３)。これらは、酵素消化に対して非常に耐性がある(Hudziak, Barofskyら、１９９６)。ＰＭＯは、無細胞培養モデル及び細胞培養モデルにおいてインビトロで(Stein, Fosterら、１９９７;Summerton及びWeller、１９９７)、並びに、ゼブラフィッシュ、カエル、及びウニの胚においてインビボで(Heasman、Kofronら、２０００;Nasevicius及びEkker、２０００)、並びに、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、及びブタ等の成体動物モデルで(例えば、Arora及びIversen、２０００;Qin、Taylorら、２０００;Iversen、２００１;Kipshidze、Keaneら、２００１;Devi、２００２;Devi、Oldenkampら、２００２;Kipshidze、Kimら、２００２;Ricker、Mataら、２００２を参照されたい)、高いアンチセンス特異性及び有効性を示した。
【００８５】
アンチセンスＰＭＯオリゴマーは、細胞に取り込まれること、及び、他の広く使用されているアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも小さな非特異的影響を有し、インビボでより一貫して効果的であることが示されている(例えば、P. Iversen、「Phosphoramidite Morpholino Oligomers」in Antisense Drug Technology、S.T. Crooke編、Marcel Dekker, Inc., New York、２００１を参照されたい)。アルギニンに富んだペプチドへのＰＭＯのコンジュゲーションは、それらの細胞取り込みを増大させることが示

されている(例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第7,468,418号を参照されたい)。

【００８６】

「帯電した」、「帯電していない」、「陽イオン性の」、及び「陰イオン性の」は、本明細書で使用される場合、中性に近いpH、例えば約6から8での化学的部分の主な状態を指す。例えば、これらの用語は、生理学的pH、すなわち約7.4での化学的部分の主な状態を指し得る。

【００８７】

「陽イオン性のＰＭＯ」又は「ＰＭＯ+」は、これまでに記載されている(例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるPCT公開ＷＯ2008/036127を参照されたい)あらゆる数の(1-ピペラジノ)ホスフィニリデンオキシ連結、(1-(4-(ω-グアニジノ-アルカノイル))-ピペラジノ)ホスフィニリデンオキシ連結(A2及びA3、Table (表1)を参照されたい)を含む、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマーを指す。

【００８８】

オリゴヌクレオチド類似体(例えば、帯電していないオリゴヌクレオチド類似体)の「骨格」は、塩基対合部分を支持する構造を指す。例えば、モルフォリノオリゴマーでは、本明細書で記載される場合、「骨格」は、サブユニット間連結(例えばリン含有連結)によって接続されたモルフォリノ環構造を含む。「実質的に帯電していない骨格」は、サブユニット間連結の50％未満が中性に近いpHで帯電しているオリゴヌクレオチド類似体の骨格を指す。例えば、実質的に帯電していない骨格が含み得るサブユニット間連結は、50％未満、40％未満、30％未満、20％未満、10％未満、5％未満、又は更には0％が、中性に近いpHで帯電している。一部の実施形態では、実質的に帯電していない骨格は、4つの帯電していない(生理学的pHで)連結につき最大1つの、8つの帯電していない連結につき最大1つの、又は16個の帯電していない連結につき最大1つの、帯電した(生理学的pHで)サブユニット間連結を含む。一部の実施形態では、本明細書で記載される核酸類似体は、全く帯電していない。

【００８９】

「標的化塩基配列」又は単純に「標的化配列」という用語は、標的配列、例えば、ヒトのRNAゲノム内の標的配列に相補的な(加えて、実質的に相補的な)核酸類似体内の配列である。類似体化合物の配列全体又はわずか一部分が標的配列に相補的であり得る。例えば、20塩基を有する類似体では、12～14塩基のみが標的化配列であり得る。典型的には、標的化配列は類似体内の連続する塩基で形成されるが、代わりに、例えば類似体の両末端から共に置いていくと標的配列の全長に及ぶ配列を構成する、非連続的な配列で形成されていてもよい。

【００９０】

本明細書で使用される場合、「細胞膜透過ペプチド」(CPP)又は「担体ペプチド」は、細胞によるＰＭＯの取り込みを促進し、これによって、細胞の内部(細胞質)にＰＭＯを送達し得る、比較的短いペプチドである。CPP又は担体ペプチドは、典型的には、約12から約40アミノ酸長である。担体ペプチドの長さは特に限定されておらず、異なる実施形態で変化する。一部の実施形態では、担体ペプチドは、4から40のアミノ酸サブユニットを含む。他の実施形態では、担体ペプチドは、6から30、6から20、8から25、又は10から20のアミノ酸サブユニットを含む。特定の実施形態では、本明細書で提供されるコンジュゲートの連結ペプチドは、酵素切断の際にCPPとして作用し得る。別の実施形態では、本明細書で提供されるコンジュゲートの連結ペプチドは、酵素切断を伴わなくてもCPPとして作用する。一部の実施形態では、酵素切断は、M部分とJ部分との間で優先的に生じる。更なる実施形態では、酵素切断は、L-立体配置の2つの隣接したアミノ酸の間で優先的に生じる。

【００９１】

ある特定の実施形態では、連結部分は、オリゴヌクレオチドコンジュゲートのアンチセンスオリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートに結び付いている。ある特定の実施形

態では、担体ペプチドは、アンチセンスオリゴマーにコンジュゲートしている場合、コンジュゲートしていない形態のアンチセンスオリゴマーと比較して、アンチセンスオリゴマーのその標的配列への結合の増強に効果的であり、このことは、
(i)アンチセンスオリゴマーのその標的配列への結合が、コードされるタンパク質の翻訳開始コドンのブロックに効果的である場合の、コンジュゲートしていないオリゴマーによって生じるものと比較した、コードされるタンパク質の発現の低下、又は
(ii)アンチセンスオリゴマーのその標的配列への結合が、正確にスプライシングされた場合にタンパク質をコードするpre-mRNA内の異常なスプライス部位のブロックに効果的である場合、コンジュゲートしていないオリゴマーによって生じるものと比較した、コードされたタンパク質の発現の増大
によって証明される。これらの効果の測定に適したアッセイを以下に更に記載する。一実施形態では、ペプチドのコンジュゲーションは、本明細書で記載されるように、無細胞翻訳アッセイでこの活性をもたらす。一部の実施形態では、活性は、少なくとも2倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍増強される。

【００９２】

或いは、又は更に、担体ペプチドは、コンジュゲートしていない形態の類似体よりも、細胞内への核酸類似体の輸送の増強に効果的である。ある特定の実施形態では、輸送は、少なくとも2倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍増強される。

【００９３】

本明細書で使用される場合、「ペプチドにコンジュゲートしたホスホロジアミデート連結型モルフォリノオリゴマー」又は「PPMO」は、細胞膜透過ペプチド(CPP)又は担体ペプチド等のペプチドに共有結合したPMOを指す。細胞膜透過ペプチドは、細胞によるPMOの取り込みを促進し、これによって、PMOを細胞の内部(細胞質)に送達する。そのアミノ酸配列に応じて、CPPは全体的に効果的であり得るか、又は、CPPは、特定の1つのタイプ若しくは特定の複数のタイプの細胞へのPMO送達について特異的若しくは選択的に効果的であり得る。PMO及びCPPは、典型的には、それらの末端で連結しており、例えば、CPPのC末端はPMOの5'末端に連結していてよいか、又は、PMOの3'末端はCPPのN末端に連結していてよい。PPMOには、帯電していないPMO、帯電した(例えば陽イオン性の)PMO、及びこれらの混合物が含まれ得る。一実施形態では、本明細書で記載されるコンジュゲートの連結部分は切断されて、PPMOを放出し得る。

【００９４】

担体ペプチドは、直接的に、或いは、任意選択のリンカー、例えば1つ若しくは複数の更なる天然に生じるアミノ酸、例えばシステイン(C)、グリシン(G)、若しくはプロリン(P)、又は更なるアミノ酸類似体、例えば、6-アミノヘキサン酸(X)、ベータ-アラニン(B)、若しくはXBを介して、核酸類似体に連結していてよい。

【００９５】

「アミノ酸サブユニット」は一般に、α-アミノ酸残基(-CO-CHR-NH-)であるが、β-アミノ酸残基又は他のアミノ酸残基(例えば、-CO-CH_2CHR-NH-)でもあり得、式中、Rはアミノ酸側鎖である。

【００９６】

「天然に生じるアミノ酸」という用語は、天然で見られるタンパク質中に存在するアミノ酸を指し、例としては、アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)。メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、スレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、及びチロシン(Y)が含まれる。「非天然アミノ酸(non-natural amino acid、unnatural amino acid)」という用語は、天然で見られるタンパク質中に存在しないアミノ酸を指す。例としては、ベータ-アラニン(β-Ala)及び6-アミノヘキサン酸(Ahx)、γ-アミノ酪酸(Abu)、ホモロイシン(Hle)、ノルロイシン(Nle)、ナフチルアラニン(Nap)、ジフェニルアラニン(Dpa)、ジアミノ酪酸(Dab)、アミノピペリジン-カルボン酸(Pip)、ア

ミノメチルフェニルアラニン(Amf)、及び2-アミノ-4-グアニジノブタン酸(Gba)が含まれる。本明細書で使用される場合、「有効量」は、所望の生物学的結果を達成するために十分な任意の物質量を指す。「治療有効量」は、所望の治療結果を達成するために十分な任意の物質量を指す。

【００９７】

本明細書で使用される場合、「対象」は哺乳動物であり、これとしては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、非ヒト霊長類、又はヒトが含まれ得る。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。

【００９８】

個体(例えば、ヒト等の哺乳動物)又は細胞の「処置」は、個体又は細胞の天然の過程を改変するために使用される任意のタイプの介入である。処置は、限定はしないが医薬組成物の投与を含み、予防的に、又は病理学的事象の開始若しくは病因物質との接触の後に行われ得る。

【００９９】

II.ペプチド-オリゴヌクレオチド-コンジュゲート

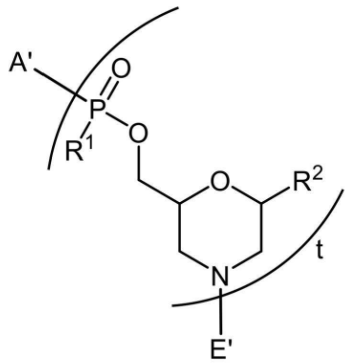
一実施形態では、本明細書では、細胞膜透過ペプチドに共有結合したアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むコンジュゲートが提供される。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書で記載される1つ又は複数の化学物質から選択される。

【０１００】

一実施形態では、本明細書では、式I:

【０１０１】

【化８】



(I)

【０１０２】

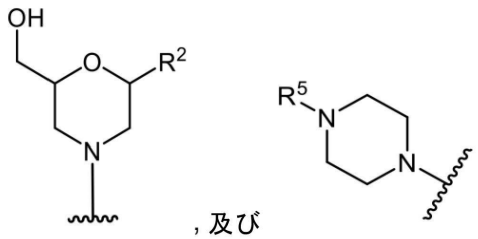
の化合物を含むオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩であって、

式中、

A'は、-N(H)CH_2C(O)NH_2、-N($C_{1～6}$-アルキル)CH_2C(O)NH_2、

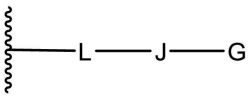
【０１０３】

【化９】

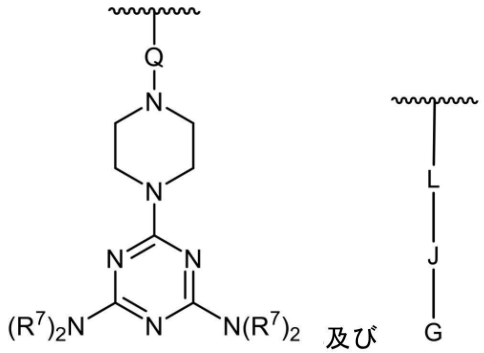


,及び

【０１０４】
から選択され、
R^5は、-C(O)(O-アルキル)$_x$-OHであり、xは３～１０であり、各アルキル基は、それぞれの存在毎に独立して、$C_{2～6}$-アルキルであるか、
又は、R^5は、H、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、トリチル、モノメトキシトリチル、-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-($C_{1～6}$-ヘテロアルキル)-R^6、アリール-R^6、ヘテロアリール-R^6、-C(O)O-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-C(O)O-アリール-R^6、-C(O)O-ヘテロアリール-R^6、及び
【０１０５】
【化１０】

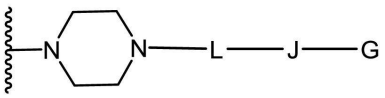


【０１０６】
から選択され、
R^6は、OH、SH、及びNH_2から選択されるか、又はR^6は、O、S、若しくはNHであり、その各々は、固体担体に共有結合しており、
各R^1は、OH及び-N(R^3)(R^4)から独立して選択され、R^3及びR^4のそれぞれは、それぞれの存在毎に独立して、H又は-$C_{1～6}$-アルキルであり、
各R^2は、独立して、それぞれの存在毎に、H、核酸塩基、及び化学的保護基で官能化された核酸塩基から選択され、核酸塩基は、それぞれの存在毎に独立して、ピリジン、ピリミジン、プリン、及びデアザプリンから選択される$C_{3～6}$-複素環を含み、
tは８～４０であり、
E'は、H、-$C_{1～6}$-アルキル、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、ベンゾイル、ステアロイル、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチル、
【０１０７】
【化１１】

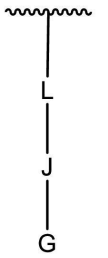


【０１０８】
から選択され、
Qは、-C(O)(CH_2)$_6$C(O)-又は-C(O)(CH_2)$_2$$S_2$($CH_2$)$_2$C(O)-であり、
R^7は、-(CH_2)$_2$OC(O)N(R^8)$_2$であり、R^8は-(CH_2)$_6$NHC(=NH)NH_2であり、
Lは、-C(O)(CH_2)$_{1～8}$C(O)-$C_{7～18}$-複素芳香環-((CH_2)$_{1～8}$C(O)-、-C(O)(CH_2)$_{1～8}$C(O)-$C_{7～18}$-複素芳香環-(W)-、-C(O)(CH_2)$_{1～8}$C(O)-$C_{7～18}$-複素芳香環-(W-W)-であり、
Wは、それぞれの存在毎に独立して、連結アミノ酸であり、
Jは、d-R_8、d-BPEP、d-DPV7、d-DPV6、d-ペネトラチン、d-Bac7、d-MPG、d-Hel11-7、d-TAT、d-TATp、d-WR_8、d-WBPEP、d-WDPV7、d-WDPV6、d-WTAT、又はd-WTATpから選択される細胞膜透過ペプチドであり、
Gは、H、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、ベンゾイル、及びステアロイルから選択され、GはJに

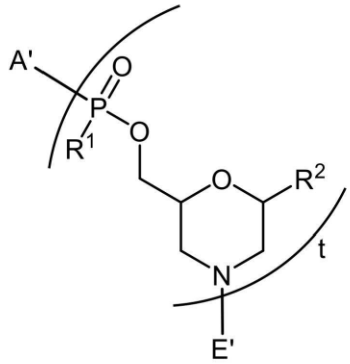
共有結合しており、
但し、
A'は、
【０１０９】
【化１２】



【０１１０】
であるか、又はE'は、
【０１１１】
【化１３】



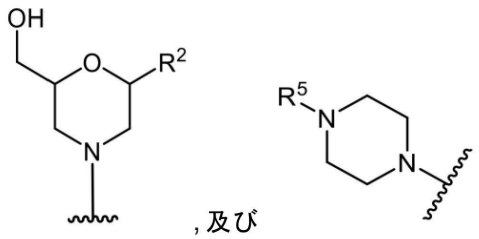
【０１１２】
である、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。
【０１１３】
別の態様では、本明細書では、式II:
【０１１４】
【化１４】



(II)

【０１１５】
の化合物を含むオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩であって、
式中、
A'は、-N(H)CH2C(O)NH2、-N(C1～6-アルキル)CH2C(O)NH2、
【０１１６】

【化１５】



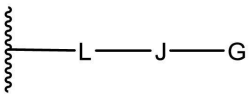
,及び

【０１１７】

から選択され、
R^5は-C(O)(O-アルキル)$_x$-OHであり、xは3～10であり、各アルキル基は、それぞれの存在毎に独立して、$C_{2～6}$-アルキルであるか、
又は、R^5は、H、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、トリチル、モノメトキシトリチル、-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-($C_{1～6}$-ヘテロアルキル)-R^6、アリール-R^6、ヘテロアリール-R^6、-C(O)O-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-C(O)O-アリール-R^6、-C(O)O-ヘテロアリール-R^6、及び

【０１１８】

【化１６】

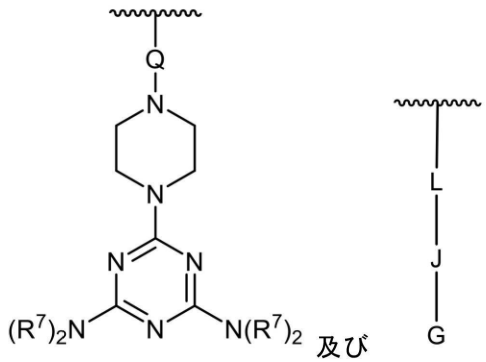


【０１１９】

から選択され、
R^6は、OH、SH、及びNH_2から選択されるか、又はR^6は、O、S、若しくはNHであり、その各々は、固体担体に共有結合しており、
各R^1は、OH及び-N(R^3)(R^4)から独立して選択され、R^3及びR^4のそれぞれは、それぞれの存在毎に独立して、H又は-$C_{1～6}$-アルキルであり、
各R^2は、独立して、それぞれの存在毎に、H、核酸塩基、及び化学的保護基で官能化された核酸塩基から選択され、核酸塩基は、それぞれの存在毎に独立して、ピリジン、ピリミジン、プリン、及びデアザプリンから選択される$C_{3～6}$-複素環を含み、
tは8～40であり、
E'は、H、-$C_{1～6}$-アルキル、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、ベンゾイル、ステアロイル、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチル、

【０１２０】

【化１７】



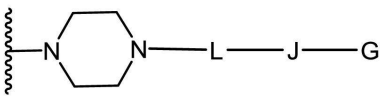
及び

【０１２１】

から選択され、
Qは、-C(O)(CH_2)$_6$C(O)-又は-C(O)(CH_2)$_2$$S_2$($CH_2$)$_2$C(O)-であり、

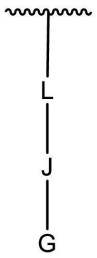
R^7は、$-(CH_2)_2OC(O)N(R^8)_2$であり、R^8は$-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$であり、
Lは、$-C(O)(CH_2)_{1～8}C(O)-C_{7～18}$-複素芳香環-$((CH_2)_{1～8}C(O)-$、$-C(O)(CH_2)_{1～8}C(O)-C_{7～18}$-複素芳香環-(W)-、$-C(O)(CH_2)_{1～8}C(O)-C_{7～18}$-複素芳香環-(W-W)-であり、
Wは、それぞれの存在毎に独立して、連結アミノ酸であり、
Jは、WR_8、WTAT、WBPEP、WDPV7、WTATp、WDPV6、TATp、MPG、又はHel11-7から選択される細胞膜透過ペプチドであり、ペプチドの全てのキラルアミノ酸はL-立体配置であり、
Gは、H、$-C(O)C_{1～6}$-アルキル、ベンゾイル、及びステアロイルから選択され、GはJに共有結合しており、
但し、
A'は、

【０１２２】
【化１８】



【０１２３】
であるか、又はE'は、

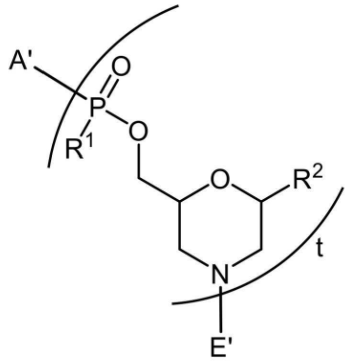
【０１２４】
【化１９】



【０１２５】
である、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。

【０１２６】
更に別の態様では、本明細書では、式III:

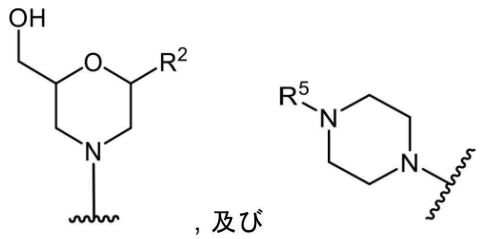
【０１２７】
【化２０】



(III)

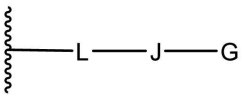
【０１２８】

の化合物を含むオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩であって、
式中、
A'は、-N(H)CH_2C(O)NH_2、-N($C_{1～6}$-アルキル)CH_2C(O)NH_2、
【０１２９】
【化２１】



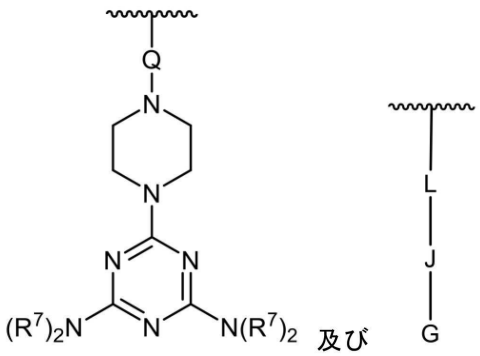
, 及び

【０１３０】
から選択され、
R^5は、-C(O)(O-アルキル)$_x$-OHであり、xは３～１０であり、各アルキル基は、それぞれの存在毎に独立して、$C_{2～6}$-アルキルであるか、
又は、R^5は、H、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、トリチル、モノメトキシトリチル、-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-($C_{1～6}$-ヘテロアルキル)-R^6、アリール-R^6、ヘテロアリール-R^6、-C(O)O-($C_{1～6}$-アルキル)-R^6、-C(O)O-アリール-R^6、-C(O)O-ヘテロアリール-R^6、及び
【０１３１】
【化２２】

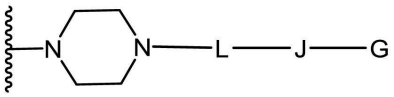


【０１３２】
から選択され、
R^6は、OH、SH、及びNH_2から選択されるか、又は、R^6は、O、S、若しくはNHであり、その各々は、固体担体に共有結合しており、
各R^1は、OH及び-N(R^3)(R^4)から独立して選択され、R^3及びR^4のそれぞれは、それぞれの存在毎に独立して、H又は-$C_{1～6}$-アルキルであり、
各R^2は、独立して、それぞれの存在毎に、H、核酸塩基、及び化学的保護基で官能化された核酸塩基から選択され、核酸塩基は、それぞれの存在毎に独立して、ピリジン、ピリミジン、プリン、及びデアザプリンから選択される$C_{3～6}$-複素環を含み、
tは８～４０であり、
E'は、H、-$C_{1～6}$-アルキル、-C(O)$C_{1～6}$-アルキル、ベンゾイル、ステアロイル、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチル、
【０１３３】

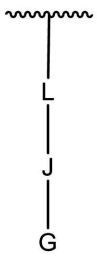
【化２３】



【０１３４】
から選択され、
Qは、-C(O)(CH2)6C(O)-又は-C(O)(CH2)2S2(CH2)2C(O)-であり、
R7は、-(CH2)2OC(O)N(R8)2であり、R8は-(CH2)6NHC(=NH)NH2であり、
Lは、-C(O)(CH2)1～8C(O)-C7～18-複素芳香環-((CH2)1～8C(O)-、-C(O)(CH2)1～8C(O)-C7～18-複素芳香環-(W)-、-C(O)(CH2)1～8C(O)-C7～18-複素芳香環-(W-W)-であり、
Wは、それぞれの存在毎に独立して、連結アミノ酸であり、
Jは、非天然アミノ酸又はD-アミノ酸から選択される3から15のアミノ酸を含み、KWKK、KKWK、KWWKK、WWKK、WKK、KKKK、又はKKモチーフを有するC末端配列を更に含む、細胞膜透過ペプチドであり、
Gは、H、-C(O)C1～6-アルキル、ベンゾイル、及びステアロイルから選択され、GはJに共有結合しており、
但し、
A'は、
【０１３５】
【化２４】

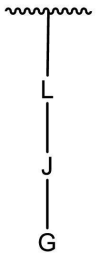


【０１３６】
であるか、又はE'は、
【０１３７】
【化２５】

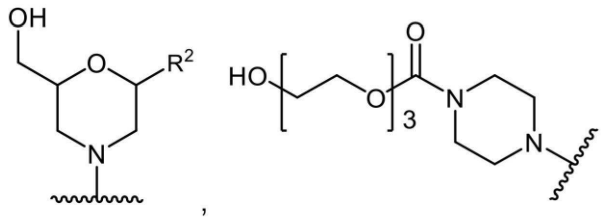


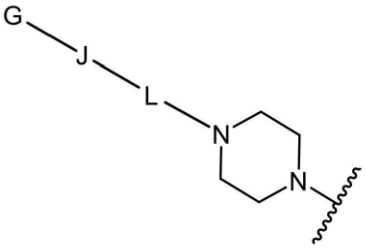
【０１３８】
である、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。一実施形態では、E'は、H、-C1～6-アルキル、-C(O)C1～6-アルキル、ベンゾイル、ステアロイル、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチル、及び

【０１３９】
【化２６】



【０１４０】
から選択される。
【０１４１】
一実施形態では、A'は、-N(C$_{1～6}$-アルキル)CH$_2$C(O)NH$_2$、
【０１４２】
【化２７】


, 及び

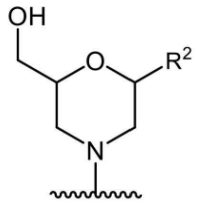


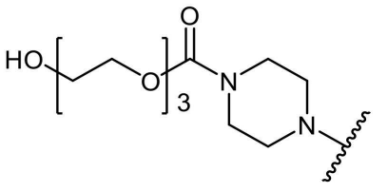
【０１４３】
から選択される。
【０１４４】
一実施形態では、E'は、H、-C(O)CH$_3$、ベンゾイル、ステアロイル、トリチル、4-メトキシトリチル、及び
【０１４５】
【化２８】



【０１４６】
から選択される。
【０１４７】
別の実施形態では、A'は、-N(C$_{1～6}$-アルキル)CH$_2$C(O)NH$_2$、
【０１４８】

【化２９】





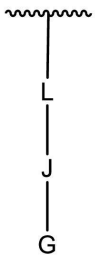
，及び

【０１４９】

から選択され、E'は、

【０１５０】

【化３０】



【０１５１】

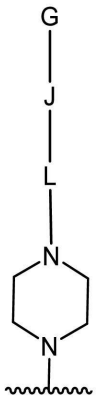
である。

【０１５２】

別の実施形態では、A'は、

【０１５３】

【化３１】



【０１５４】

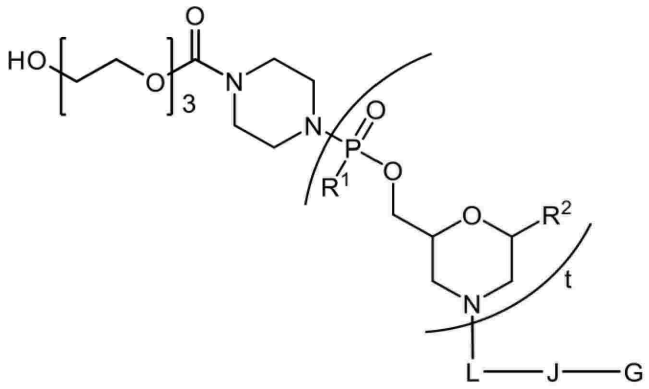
であり、E'は、H、-C(O)CH_3、トリチル、4-メトキシトリチル、ベンゾイル、及びステアロイルから選択される。

【０１５５】

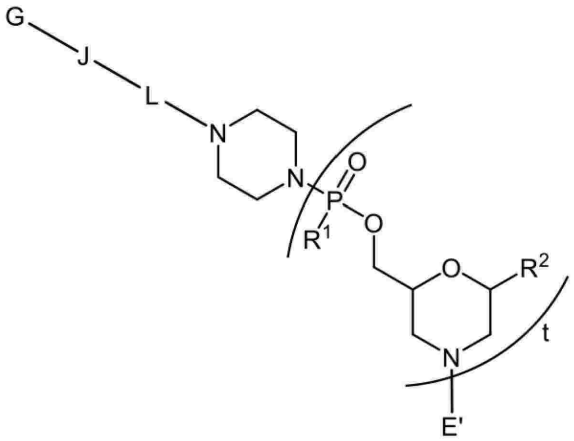
一実施形態では、式I又は式IIのペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、

【０１５６】

【化３２】



(Ia); 及び



(Ib)

【０１５７】
から選択されるペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、
式中、E'は、H、$C_{1～6}$-アルキル、-C(O)CH_3、ベンゾイル、及びステアロイルから選択される。

【０１５８】
別の実施形態では、Lは、場合によって、ビオチンに更に結合している。

【０１５９】
別の実施形態では、Jは、場合によって、トリプシン切断可能リンカーを介してLに結合している。

【０１６０】
別の実施形態では、ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、式(Ia)のペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。

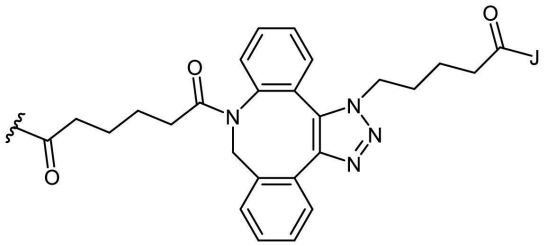
【０１６１】
別の実施形態では、ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、式(Ib)のペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。

【０１６２】
別の実施形態では、各R^1は、$N(CH_3)_2$である。

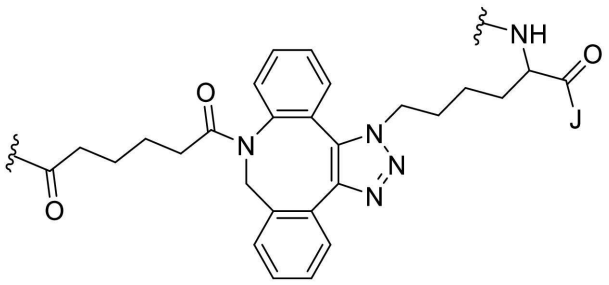
【０１６３】
別の実施形態では、各R^2は核酸塩基であり、それぞれの存在毎に独立して、アデニン、グアニン、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、ウラシル、及びヒポキサンチンから選択される。

【０１６４】
別の実施形態では、Lは、-C(O)$(CH_2)_{1～8}$C(O)-DBCO-$(CH_2)_{1～8}$C(O)-である。

【０１６５】
別の実施形態では、Ｌは、
【０１６６】
【化３３】

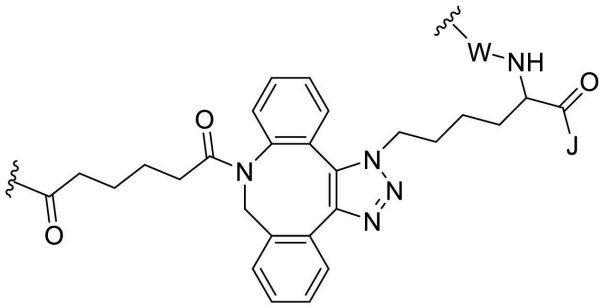


【０１６７】
である。
【０１６８】
一実施形態では、Ｌは、-C(O)(CH_2)$_{1\sim8}$C(O)-DBCO-(W)-である。
【０１６９】
一実施形態では、Ｌは、-C(O)(CH_2)$_{1\sim8}$C(O)-DBCO-(W-W)-である。
【０１７０】
一実施形態では、Ｗは、グリシン、プロリン、β-アラニン、6-アミノヘキサン酸、又はリジンから独立して選択される。別の実施形態では、Ｗはリジンである。
【０１７１】
一実施形態では、W-Ｗは、リジン-(6-アミノヘキサン酸)である。
【０１７２】
一実施形態では、Ｌは、場合によって、連結アミノ酸のＮ末端でビオチンに更に結合している。
【０１７３】
一実施形態では、Ｌは、
【０１７４】
【化３４】

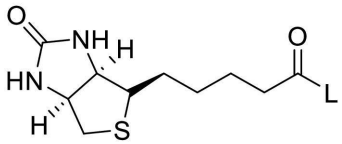


【０１７５】
であり、N(H)はビオチンに結合している。
【０１７６】
一実施形態では、Ｌは、
【０１７７】

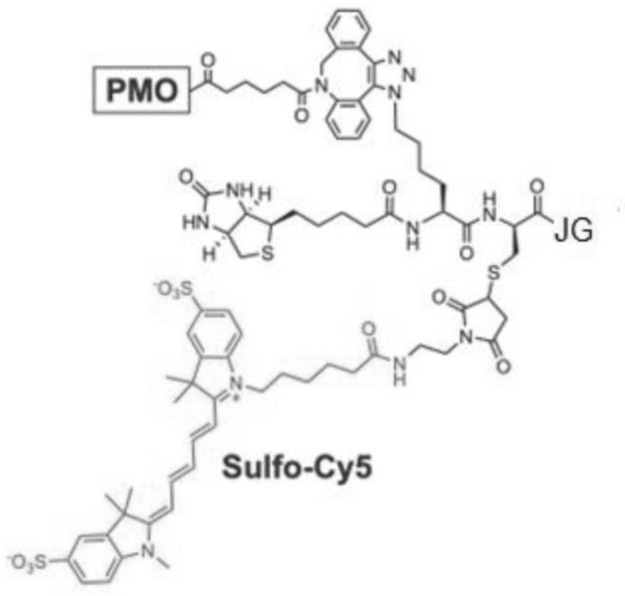
【化３５】



【０１７８】
であり、Ｗはビオチンに結合している。
【０１７９】
一実施形態では、ビオチンは、構造:
【０１８０】
【化３６】



【０１８１】
を有する。
【０１８２】
更なる実施形態では、ビオチンは、6-アミノヘキサン酸又はリジンを介してLに結合している。
【０１８３】
一実施形態では、本明細書では、以下の構造:
【０１８４】
【化３７】



【０１８５】
を有するビオチン-スルホCy5標識型ＰＭＯ-ＣＰＰであって、

式中、Jは、C末端配列を除いて、非天然アミノ酸又はD-アミノ酸から選択される3から15のアミノ酸を含む、細胞膜透過ペプチドである、ビオチン-スルホCy5標識型PMO-CPPが提供される。一実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、KWKK、KKWK、KWWKK、WWKK、WKK、KKKK、又はKKモチーフを有するC末端配列を更に含む。別の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、(d-K)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-W)(d-K)、(d-K)(d-W)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-W)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-K)(d-K)、又は(d-K)(d-K)モチーフを有するC末端配列を更に含む。

【０１８６】

一実施形態では、Jは、d-R_8、d-BPEP、d-DPV7、d-DPV6、d-ペネトラチン、d-Bac7、d-MPG、d-Hel11-7、d-TAT、d-TATp、d-WR_8、d-WBPEP、d-WDPV7、d-WDPV6、d-WTAT、又はd-WTATpから選択される。更なる実施形態では、Jは、d-DPV7、d-DPV6、d-ペネトラチン、d-Bac7、d-MPG、d-Hel11-7、d-WR_8、d-WBPEP、d-WDPV7、d-WDPV6、d-WTAT、又はd-WTATpから選択される。

【０１８７】

一実施形態では、非天然アミノ酸は、Abu(γ-アミノ酪酸)、B(β-アラニン)、Hle(ホモロイシン)、Nle(ノルロイシン)、Nap(ナフチルアラニン)、Dpa(ジフェニルアラニン)、Dab(ジアミノ酪酸)、Pip(アミノピペリジン-カルボン酸)、Amf(アミノメチルフェニルアラニン)、及びGba(2-アミノ-4-グアニジノブタン酸)から選択される。

【０１８８】

一実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号33～669から選択される。

【０１８９】

一実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、
配列番号657 (B)(d-Arg)(d-Arg)(Abu)(Dab)(d-His)、
配列番号664 (Abu)(Gly)(d-Asn)(Nle)(d-Asn)(d-His)、
配列番号644 (Nle)(d-Pro)(d-Asp)(d-Glu)(d-Thr)、及び
配列番号646 (B)(Abu)(d-Ser)(Abu)(Hle)
から選択される。

【０１９０】

一実施形態では、C末端配列はKWKKモチーフである。別の実施形態では、C末端配列は、(d-K)(d-W)(d-K)(d-K)モチーフである。

【０１９１】

一実施形態では、Jは、トリプシン切断可能リンカーを介してLに結合している。

【０１９２】

一実施形態では、トリプシン切断可能リンカーはGGKGGである。

【０１９３】

一実施形態では、Gは、H、C(O)CH_3、ベンゾイル、及びステアロイルから選択される。別の実施形態では、Gは、H又は-C(O)CH_3である。更なる実施形態では、GはHである。別の実施形態では、Gは-C(O)CH_3である。

【０１９４】

III.オリゴマー化学の特徴

また、本明細書では、オリゴヌクレオチドが、修飾されたアンチセンスオリゴマーである、オリゴヌクレオチドコンジュゲートが提供される。修飾されたアンチセンスオリゴマーの例としては、限定はしないが、モルフォリノオリゴマーが含まれる。一部の実施形態では、修飾されたアンチセンスオリゴマーの核酸塩基はモルフォリノ環構造に連結しており、これらモルフォリノ環構造は、1つの環構造のモルフォリノ窒素を隣接する環構造の5'環外炭素に繋ぐリン含有サブユニット間結合によって繋がれている。

【０１９５】

IV.標的配列

アンチセンス適用のための一部の実施形態では、オリゴマーは核酸標的配列に100%相補的であり得るか、又は、オリゴマーは、オリゴマーと核酸標的配列との間で形成された

ヘテロ二本鎖が細胞ヌクレアーゼの及びインビボで生じ得る他の分解様式の作用に耐えるために十分に安定である限りの、例えばバリアントをもたらすためのミスマッチを含んでいてもよい。ミスマッチは、存在する場合、ハイブリッド二本鎖の中間部よりも末端領域に向かって不安定化が小さい。可能なミスマッチの数は、二本鎖安定性の良く理解された原理に従って、オリゴマーの長さ、二本鎖内のG:C塩基対のパーセンテージ、及び二本鎖内のミスマッチの位置に応じる。このようなアンチセンスオリゴマーは必ずしも核酸標的配列に100%相補的でなくても良いが、核酸標的の生物学的活性、例えば、コードされるタンパク質の発現が調節されるには、標的配列に安定的及び特異的に結合することが効果的である。

【０１９６】

オリゴマーと標的配列との間で形成された二本鎖の安定性は、結合T_mの機能、及び細胞酵素切断に対する二本鎖の感受性に応じる。相補配列RNAに関するアンチセンス化合物のT_mは、従来の方法、例えばHamesら、Nucleic Acid Hybridization, IRL Press、1985、第107～108頁によって記載されている方法によって、又はMiyada CG. 及びWallace RB (1987) Oligonucleotide hybridization techniques, Methods Enzymol.、第154巻、第94～107頁で記載されているように、測定することができる。

【０１９７】

一部の実施形態では、各アンチセンスオリゴマーは、体温を超える、相補配列RNAに関する結合T_mを有し、又は他の実施形態では、これは50℃を超える。他の実施形態では、T_mは、60～80℃又はそれを超える範囲である。周知の原理に従って、相補塩基RNAハイブリッドに関するオリゴマー化合物のT_mは、二本鎖内のC:G対合塩基の比率を増大させることによって、及び/又はヘテロ二本鎖の長さ(塩基対での)を増大させることによって、増大させることができる。同時に、細胞の取り込みを最適化させることを目的として、オリゴマーのサイズを制限することが有利であり得る。この理由から、20塩基以下の長さの、高いT_m(50℃以上)を示す化合物が、高いT_m値にために20を超える塩基を必要とする化合物よりも一般に好ましい。一部の適用では、より長いオリゴマー、例えば20塩基よりも長いオリゴマーが、ある特定の利点を有し得る。

【０１９８】

標的化配列塩基は、通常のDNA塩基又はその類似体、例えば、標的配列RNA塩基に対してワトソン・クリックの塩基対合が可能なウラシル及びイノシンであり得る。

【０１９９】

アンチセンスオリゴマーは、mRNAの翻訳をブロック若しくは阻害若しくは調節するように、又はpre-mRNAのスプライシングプロセシングを阻害若しくは調節するように、又は標的化されたmRNAの分解を誘発するように設計され得、また、それがハイブリダイズする標的配列に「向けられている」又は「標的化されている」と記載され得る。ある特定の実施形態では、標的配列は、予備プロセシングされたmRNAの3'若しくは5'スプライス部位、分岐点、又はスプライシングの調節に関与する他の配列を含む領域を含む。標的配列は、エクソン内にあっても、又はイントロン内にあっても、又はイントロン/エクソンジャンクションに広がっていてもよい。

【０２００】

標的RNAのスプライシングを調節するための、標的RNA配列に対する十分な配列相補性を有するアンチセンスオリゴマーは、アンチセンス物質が、そうでなければスプライシングを調節してしまう、ネイティブタンパク質への結合部位のマスキングを引き起こすために十分な配列を有し、且つ/又は、標的化されたRNAの三次元構造を改変することを意味する。同様に、標的RNAのスプライシングを調節するための、標的RNA配列に対する十分な配列相補性を有するオリゴマー試薬は、オリゴマー試薬が、そうでなければスプライシングを調節してしまう、ネイティブタンパク質への結合部位のマスキングを引き起こすために十分な配列を有し、且つ/又は、標的化されたRNAの三次元構造を改変することを意味する。

【０２０１】
ある特定の実施形態では、標的配列とアンチセンス標的化配列との間の相補性の程度は、安定な二本鎖を形成するために十分である。アンチセンスオリゴマーと標的ＲＮＡ配列との相補性の領域は、8～11塩基と短い場合があるが、12～15塩基以上、例えば、10～40塩基、12～30塩基、12～25塩基、15～25塩基、12～20塩基、又は15～20塩基でもあり得、これには、これらの範囲の間にある全ての整数が含まれる。約14～15塩基のアンチセンスオリゴマーは一般に、固有の相補配列を有するために十分に長い。ある特定の実施形態では、本明細書で論じられる必須の結合Ｔｍを達成するためには、最短の長さの相補塩基があればよい。
【０２０２】
ある特定の実施形態では、40塩基程度の長いオリゴマーが適切であり得、この場合、少なくとも最小数の塩基、例えば10～12塩基が、標的配列に相補的である。一部の実施形態では、細胞への促進された又は活性な取り込みは、約30塩基未満のオリゴマー長で最適化される。本明細書で更に記載されるＰＭＯオリゴマーでは、結合安定性と取り込みとの最適なバランスは一般に、18～25塩基長で生じる。本開示には、約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、又は40塩基からなるアンチセンスオリゴマー(例えばＰＭＯ)が含まれ、これら塩基において、少なくとも約6、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、又は40の連続する又は連続しない塩基が、所望の標的配列に相補的である。
【０２０３】
ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは標的配列に100％相補的であり得るか、又は、オリゴマーと標的配列との間で形成されたヘテロ二本鎖が細胞ヌクレアーゼの及びインビボで生じ得る他の分解様式の作用に耐えるために十分に安定である限りの、例えばバリアントをもたらすためのミスマッチを含んでいてもよい。したがって、ある特定のオリゴマーは、オリゴマーと標的配列との間で、実質的な相補性、すなわち、約又は少なくとも約70％の配列相補性、例えば、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％、又は100％の配列相補性を有し得る。ヌクレアーゼによる切断をそれほど受けないオリゴマー骨格が本明細書で論じられる。ミスマッチは、存在する場合、典型的には、ハイブリッド二本鎖の中間部よりも末端領域に向かって不安定化が小さい。可能なミスマッチの数は、二本鎖安定性の良く理解された原理に従って、オリゴマーの長さ、二本鎖内のG:C塩基対のパーセンテージ、及び二本鎖内のミスマッチの位置に応じる。このようなアンチセンスオリゴマーは必ずしも標的配列に100％相補的ではなくてもよいが、核酸pre-ＲＮＡのスプライシングが調節されるには、標的配列に安定的及び特異的に結合することが効果的である。
【０２０４】
オリゴマーと標的配列との間で形成された二本鎖の安定性は、結合Ｔｍ、及び細胞酵素切断に対する二本鎖の感受性に応じる。相補配列ＲＮＡに関するオリゴマーのＴｍは、従来の方法、例えばHamesら、Nucleic Acid Hybridization, IRL Press、1985、第107～108頁によって記載されている方法によって、又はMiyada CG. and Wallace R.B. (1987) Oligomer Hybridization Techniques, Methods Enzymol、第154巻、第94～107頁で記載されているように、測定することができる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、体温を超える、好ましくは約45℃又は50℃を超える、相補配列ＲＮＡに関する結合Ｔｍを有し得る。60～80℃又はそれを超える範囲のＴｍも含まれる。周知の原理に従って、相補塩基ＲＮＡハイブリッドに関するオリゴマーのＴｍは、二本鎖内のC:G対合塩基の比率を増大させることによって、及び/又はヘテロ二本鎖の長さ(塩基対での)を増大させることによって、増大させることができる。同時に、細胞の取り込みを最適化させることを目的として、オリゴマーのサイズを制限することが有利

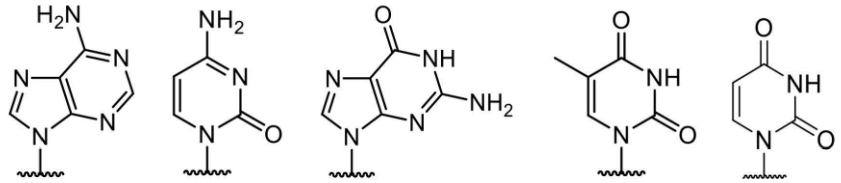
であり得る。この理由から、25塩基以下の長さの、高いTm(45～50℃又はそれを超える)を示す化合物が、高いTm値のために25を超える塩基を必要とする化合物よりも一般に好ましい。

【０２０５】

一態様では、本開示は、選択された標的を結合してヒトジストロフィン遺伝子においてエクソンスキップを誘導することができるアンチセンスオリゴマーコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩を提供し、ここで、アンチセンスオリゴマーコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩は、アニーリング部位と呼ばれるジストロフィンpre-mRNAのエクソン標的領域に相補的な塩基配列を含み、式(I)、式(II)、式(III)で示され、明細書全体を通して記載されている、各核酸塩基R^2は、1からt及び5'から3'まで、

【０２０６】

【化３８】

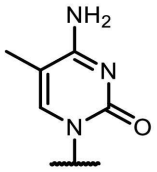


【０２０７】

、メチル化グアニン、メチル化アデニン、及び

【０２０８】

【化３９】



【０２０９】

から選択され得る。

【０２１０】

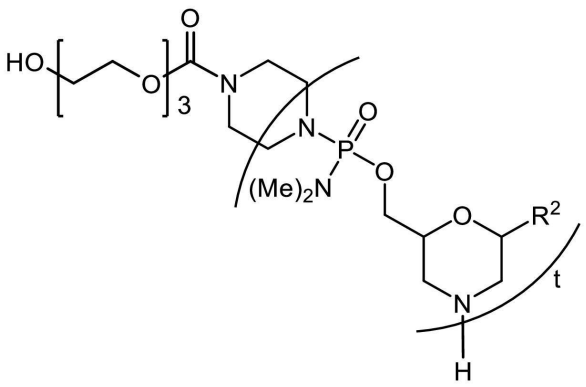
特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの配列一覧は、GCTATTACCTTAACCCAGである。

【０２１１】

一実施形態では、本明細書では、以下の構造:

【０２１２】

【化４０】



【０２１３】

を有する化合物であって、式中、zは18であり、R^2は、GCTATTACCTTAACCCAGの配列を有する核酸塩基の配列である、化合物が提供される。この化合物はまた、本明細書では「PMO IVS2-654」とも記載される。

【０２１４】

V.細胞膜透過ペプチド(CPP)

記載されているように、置換基Jの範囲内の細胞膜透過ペプチド(CPP)は、細胞内へのアンチセンスオリゴマーの透過の増強に効果的であること、及び動物モデルにおける異なる筋肉群でエクソンスキップを生じさせることが示されている。

【０２１５】

典型的なペプチドをTable 2(表2)で以下に示す。

【０２１６】

【表２】

Table 2: 細胞膜透過ペプチド

名称 (呼称)	配列	配列 番号
R_8	RRRRRRRR	1
BPEP	RXRRBRRXRRBR	2
DPV7	KRKKKGKLGKKRDP	3
DPV6	GRPRESGKKRKRKRLKP	4
ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK	5
Bac7	RRIRPRPPRLPRPRPRPLPFPRPG	6
MPG	LAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	7
Hel11-7	LLKLLLKLWKKLLKLLK	8
TAT	RKKRRQRRR	9
TATp	GRKKRRQRRRPPQ	10
WR_8	WRRRRRRRR	11
WBPEP	WRXRRBRRXRRBR	12
WDPV7	WKRKKKGKLGKKRDP	13
WDPV6	WGRPRESGKKRKRKRLKP	14
WTAT	WRKKRRQRRR	15
WTATp	WGRKKRRQRRRPPQ	16
d-R_8	dRdRdRdRdRdRdRdR	17
d-BPEP	dRXdRdRBdRdRXdRdRBdR	18
d-DPV7	dKdRdKdKdKGdKdLGdKdKdRdDdP	19
d-DPV6	GdRdPdRdEdSdGdKdKdRdKdRdKdRdLdKdP	20
d-ペネトラチン	dRdQdIdKdIdWdFdQdNdRdRdMdKdWdKdK	21
d-Bac7	dRdRdIdRdPdRdPdPdRdLdPdRdPdRdPdRdPdLdPdFdPdRdPG	22
d-MPG	dLdAdFdLGdFdLdGdAdAGdSdTdMGdAdWdSdQdPdKdKdKdRdKdV	23
d-Hel11-7	dLdLdKdLdLdLdKdLdWdKdKdLdLdKdLdLdK	24
d-Tat	dRdKdKdRdRdQdRdRdR	25
d-TATp	GdRdKdKdRdRdQdRdRdRdPdPdQ	26
d-WR_8	dWdRdRdRdRdRdRdRdR	27
d-WBPEP	dWdRXdRdRBdRdRXdRdRBdR	28
d-WDPV7	dWdKdRdKdKdKGdKdLGdKdKdRdDdP	29
d-WDPV6	dWGdRdPdRdEdSdGdKdKdRdKdRdKdRdLdKdP	30
d-WTat	dWdRdKdKdRdRdQdRdRdR	31
d-WTATp	dWGdRdKdKdRdRdQdRdRdRdPdPdQ	32

【０２１７】

[a]配列番号に割り当てられた配列は、連結部分(例えば、プロリン、ベータ-アラニン、及びグリシン)を含まない。X及びBは、それぞれ6-アミノヘキサン酸及びベータ-アラニンを指す。

【０２１８】

一実施形態では、上記で提供された細胞膜透過ペプチドは、トリプシン切断可能リンカーを介してLに結合している。一実施形態では、トリプシン切断可能リンカーは、GGKGGである。

【０２１９】

別の実施形態では、本明細書では、式:ビオチン-GGKGG-D-Arg$_4$、ビオチン-GGKGG-D-Arg$_6$、ビオチン-GGKGG-D-Arg$_8$、及びビオチン-GGKGG-D-Arg$_{10}$を有する、本明細書で提供される組成物において使用され得るビオチン/トリプシン切断可能リンカー/細胞膜透過ペプチドコンジュゲートが提供される。

【０２２０】

更に別の実施形態では、本明細書では、式:GGKGG-D-Arg$_4$、GGKGG-D-Arg$_6$、GGKGG-D-Arg$_8$、及びGGKGG-D-Argを有する、本明細書で提供される組成物において使用され得るトリプシン切断可能リンカー/細胞膜透過ペプチドコンジュゲートが提供される。

【０２２１】

更なる典型的なペプチドをTable 3(表3)で以下に示す。

【０２２２】

【表３Ａ】

Table 3. 細胞膜透過ペプチド

配列	配列番号
33	(Hle)(Pip)(d-Asp)(Nap)(d-Asp)(Dpa)
34	(Dpa)(d-Phe)(d-Lys)(d-Phe)(d-Asn)(d-Thr)
35	(Nap)(d-Nle)(Abu)(d-Pro)(d-Nle)(Amf)
36	(Dpa)(d-Asn)(d-Thr)(d-Arg)(Dpa)(d-Asn)
37	(Nap)(d-Thr)(d-Phe)(d-Nle)(Gly)(d-Glu)
38	(Dpa)(d-Phe)(d-Lys)(Nap)(d-Ser)(d-Asp)
39	(Gly)(Dpa)(B)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)
40	(d-Asp)(d-Thr)(B)(d-Nle)(Dpa)(Dpa)
41	(Nap)(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)
42	(Hle)(d-Phe)(Hle)(d-Asn)(d-Thr)(d-Gln)
43	(d-Asn)(d-Nle)(Abu)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)
44	(d-Asp)(Dpa)(Amf)(d-Asp)(Dpa)(d-Lys)
45	(d-Ser)(Dab)(Nap)(d-Asp)(Dpa)(d-Gln)
46	(d-Phe)(d-Ser)(Dpa)(Gly)(Hle)(d-Arg)
47	(Gly)(Dpa)(d-Nle)(d-His)(Dpa)(Gly)
48	(d-Ser)(d-Glu)(Dpa)(d-Thr)(Nap)(Gly)
49	(Hle)(d-Thr)(d-Glu)(Hle)(Dpa)(d-Pro)
50	(Gly)(d-Phe)(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(Dpa)
51	(Nap)(Hle)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)(d-Glu)
52	(Dpa)(Nap)(Hle)(d-Gln)(Pip)(d-Phe)
53	(d-Pro)(d-Lys)(d-Nle)(d-Asp)(d-Phe)(d-Nle)
54	(Hle)(Dab)(d-Phe)(d-Gln)(d-Arg)(Dpa)
55	(Dpa)(Dpa)(d-Lys)(d-His)(Hle)(d-Thr)
56	(d-Ser)(d-Asn)(Dpa)(d-Asp)(Dpa)(Pip)
57	(d-Thr)(d-Asn)(d-Phe)(d-Nle)(Gly)(Dpa)
58	(d-Phe)(Hle)(Hle)(d-Asn)(d-Thr)(d-Gln)
59	(d-Lys)(d-Phe)(d-Ser)(d-Nle)(d-Glu)(Dab)
60	(B)(d-Lys)(d-Gln)(Dpa)(d-Phe)(d-Asn)
61	(Pip)(Hle)(d-Arg)(Amf)(Gly)(Dpa)
62	(Dpa)(Gly)(d-Glu)(d-Asn)(d-Asp)(d-Nle)
63	(d-Phe)(Dpa)(d-Gln)(d-Glu)(Abu)(d-Nle)
64	(Nap)(B)(d-Phe)(Dpa)(Amf)(d-Glu)
65	(d-Asp)(d-Thr)(B)(d-Nle)(Nap)(Dpa)
66	(d-Phe)(Gly)(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(Dpa)

【０２２３】

【表３Ｂ】

67	(Dpa)(Gly)(B)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)
68	(d-Phe)(d-Lys)(Nap)(d-Asn)(d-Phe)(d-Lys)
69	(d-Asn)(d-Phe)(d-Asp)(d-Ser)(Dpa)(Amf)
70	(d-Pro)(d-Ser)(d-Phe)(Dpa)(d-Glu)(B)
71	(d-Pro)(d-Nle)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)
72	(Abu)(Dpa)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)(Hle)
73	(Gly)(Dpa)(Nle)(Dpa)(Gly)
74	(B)(Hle)(d-Thr)(d-Nle)(Gly)(d-Asn)
75	(d-Lys)(Dpa)(Gly)(d-Gln)(Amf)(d-Nle)
76	(Dpa)(Abu)(d-Asn)(d-Arg)(d-Nle)(d-Thr)
77	(d-Glu)(B)(Dpa)(Dab)(d-Nle)(Gly)
78	(d-Thr)(d-Arg)(Dpa)(d-Gln)(B)(d-Phe)
79	(d-Thr)(d-Lys)(Dpa)(Abu)(d-Lys)(Dpa)
80	(Dab)(Dpa)(d-Asn)(Dpa)(Hle)(B)
81	(d-Glu)(Hle)(d-Thr)(Nap)(d-Gln)(Nap)
82	(Abu)(d-Asp)(Dpa)(Dab)(d-Nle)(Gly)
83	(Hle)(d-Lys)(Dpa)(Gly)(d-Thr)(d-Pro)
84	(d-Gln)(Nap)(d-Nle)(Pip)(Amf)(Hle)
85	(d-Asn)(Gly)(Dpa)(d-Thr)(Nap)(Gly)
86	(Gly)(d-Asn)(Dpa)(d-Thr)(Nap)(Gly)
87	(d-Ser)(d-Phe)(d-Glu)(d-Asp)(Gly)(Gly)
88	(d-Phe)(d-Phe)(d-Thr)(d-Phe)(d-Thr)(Abu)
89	(d-Pro)(Dpa)(Hle)(Hle)(Abu)(d-Pro)
90	(d-Asn)(Abu)(d-Glu)(d-Lys)(d-Nle)(Nap)
91	(d-Phe)(Dpa)(Dpa)(Pip)(d-Phe)(Dpa)
92	(d-Lys)(Hle)(Dpa)(Gly)(d-Thr)(d-Pro)
93	(Hle)(d-Thr)(d-Glu)(Hle)(d-Pro)(Dpa)
94	(d-Thr)(Dab)(d-Asp)(d-Nle)(d-Lys)(Nap)
95	(d-Glu)(d-Phe)(Nap)(d-Asn)(Nap)(Amf)
96	(B)(d-Pro)(d-Pro)(Nap)(Nap)(d-Asn)
97	(d-Lys)(d-Thr)(Dpa)(Abu)(d-Lys)(Dpa)
98	(Gly)(d-Lys)(d-Glu)(Hle)(d-Phe)(Amf)
99	(d-Lys)(Dab)(d-Thr)(Dpa)(d-Gln)(d-Nle)
100	(d-Phe)(d-Nle)(B)(Abu)(Dab)(Nap)
101	(Dpa)(Hle)(B)(Gly)(Pip)(d-Phe)
102	(Dpa)(d-Gln)(Abu)(Abu)(Pip)(Dpa)

【０２２４】

【表３Ｃ】

103	(d-Lys)(Gly)(d-Glu)(Hle)(d-Phe)(Amf)
104	(d-Phe)(d-Phe)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)
105	(d-Ser)(d-Asn)(d-Phe)(d-Nle)(Gly)(Dpa)
106	(d-Phe)(d-Phe)(d-Asn)(Nap)(B)(Nap)
107	(d-Asp)(Abu)(Dpa)(Dab)(d-Nle)(Gly)
108	(d-Pro)(Nap)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)
109	(B)(B)(d-Lys)(d-Asp)(d-Nle)(d-Phe)
110	(d-Phe)(Amf)(d-Asp)(d-Asp)(Dpa)(d-Phe)
111	(d-Nle)(d-Asn)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)(d-Glu)
112	(d-Phe)(d-Ser)(d-Glu)(d-Asp)(Gly)(Gly)
113	(Amf)(B)(d-Gln)(Hle)(Dpa)(Gly)
114	(Gly)(Dpa)(Dpa)(Gly)(Gly)(Dab)
115	(Abu)(Dpa)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)(Pip)
70	(d-Pro)(d-Ser)(d-Phe)(Dpa)(d-Glu)(B)
116	(d-Thr)(Pip)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)(d-Glu)
117	(d-Arg)(d-Lys)(d-Nle)(Hle)(d-Lys)(d-Nle)
118	(Gly)(Gly)(Dab)(d-Nle)(Hle)(d-Nle)
119	(d-Gln)(d-His)(d-Asn)(Dpa)(Hle)(B)
120	(Dpa)(B)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)
121	(d-Glu)(d-Phe)(Gly)(Gly)(Nap)(Amf)
122	(d-Phe)(d-Phe)(d-Asn)(d-Arg)(Abu)(Dpa)
123	(d-Asn)(d-Glu)(d-His)(d-Thr)(Nap)(Gly)
124	(d-Arg)(d-Thr)(Dpa)(d-Gln)(B)(d-Phe)
125	(d-His)(d-Gln)(d-Asn)(Dpa)(Hle)(B)
126	(Abu)(d-Phe)(d-Glu)(d-Glu)(B)(d-Asp)
127	(B)(Abu)(B)(Dpa)(Hle)(Gly)
128	(d-Asn)(d-His)(d-Asn)(Dpa)(Hle)(B)
129	(Abu)(d-Pro)(d-Pro)(B)(d-Ser)(d-Glu)
130	(d-Thr)(d-Arg)(Dpa)(Abu)(d-Asn)(d-Phe)
131	(d-Pro)(Abu)(d-Pro)(Gly)(Gly)(d-His)
132	(Pip)(Nap)(Hle)(d-Asp)(d-Thr)(Pip)
133	(B)(Gly)(d-Pro)(Abu)(Dpa)(Nap)
134	(d-Asn)(d-His)(d-Glu)(d-Thr)(Nap)(Gly)
135	(d-Nle)(B)(Abu)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)
136	(Hle)(d-Lys)(d-Nle)(d-Glu)(d-Ser)(d-Glu)
137	(Amf)(d-Thr)(d-Lys)(d-Nle)(d-Gln)(Dpa)

【０２２５】

【表３Ｄ】

138	(Dpa)(B)(Dpa)(d-Phe)(B)(Gly)
139	(B)(d-Ser)(d-Ser)(d-Ser)(Hle)(Hle)
140	(d-Glu)(d-Ser)(ox-His)(d-Ser)(Dpa)(Gly)
141	(Dab)(Gly)(ox-His)(d-Glu)(Nap)(Hle)
142	(B)(Abu)(d-Nle)(d-Ser)(d-Gln)(d-Gln)
143	(Abu)(d-Nle)(B)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)
144	(Dpa)(d-Glu)(d-Pro)(B)(d-His)(Gly)
145	(Gly)(Gly)(Hle)(d-Arg)(d-Nle)(d-Phe)
146	(Dpa)(d-Phe)(d-Lys)(d-Phe)(d-Asp)(Dab)
147	(d-Glu)(d-Asn)(d-His)(d-Thr)(Nap)(Gly)
148	(d-Nle)(d-Gln)(d-Arg)(d-Glu)(d-Gln)(Nap)
149	(d-Nle)(d-Glu)(d-Phe)(d-Thr)(d-Asp)(d-Thr)
150	(d-Glu)(Hle)(d-Thr)(Gly)(B)(Nap)
151	(Pip)(d-Ser)(d-Pro)(d-Glu)(Nap)(Hle)
152	(d-Gln)(d-Pro)(Abu)(d-Glu)(Nap)(Hle)
153	(d-Ser)(d-Arg)(d-Asn)(Dpa)(Abu)(Gly)
154	(Dpa)(d-Thr)(d-Asn)(d-Glu)(d-Thr)(d-Ser)
155	(d-Asn)(Hle)(d-Pro)(Nap)(B)(d-Ser)
156	(Pip)(Gly)(Gly)(d-Phe)(Hle)(Dpa)
157	(Abu)(d-Pro)(B)(Gly)(Dpa)(Nap)
158	(Gly)(Dab)(d-Ser)(d-Nle)(d-Glu)(Dpa)
159	(Abu)(d-Gln)(Abu)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)
160	(Amf)(d-Asn)(Abu)(Hle)(Dpa)(Gly)
161	(d-Glu)(ox-His)(d-Ser)(d-Ser)(Dpa)(Gly)
162	(d-Arg)(d-Asn)(d-Glu)(d-Ser)(d-His)(d-Phe)
163	(d-Gln)(d-Gln)(d-Ser)(d-Pro)(d-Nle)(Gly)
164	(d-Asn)(Gly)(d-His)(d-Asn)(B)(Dpa)
165	(B)(Dpa)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)
166	(B)(Gly)(B)(Hle)(Dpa)(Gly)
167	(Pip)(d-His)(d-Asp)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)
168	(Dpa)(d-Gln)(d-Nle)(Gly)(Pip)(Dpa)
169	(Dab)(Dpa)(d-Asn)(Dpa)(d-Nle)(Abu)
170	(d-Pro)(Gly)(d-Asn)(Hle)(Gly)(d-Asn)
171	(Pip)(Gly)(d-His)(Nap)(Amf)(Dab)
172	(Gly)(Gly)(ox-His)(Nap)(d-Asp)(Dpa)
173	(d-Thr)(B)(Pip)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)

【０２２６】

【表３Ｅ】

174	(d-Asn)(d-His)(Gly)(B)(d-Asn)(Dpa)
175	(d-Thr)(d-Phe)(d-Asp)(Dpa)(Hle)(B)
176	(d-Glu)(d-His)(d-Pro)(Dpa)(Hle)(B)
177	(Abu)(B)(B)(Dpa)(Hle)(Gly)
178	(d-Lys)(d-Pro)(d-Nle)(d-Asp)(d-Phe)(d-Nle)
179	(Hle)(d-Pro)(d-Nle)(d-Ser)(Abu)(B)
180	(Dpa)(d-Thr)(B)(Abu)(Dpa)(d-Asn)
181	(Abu)(Dpa)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)(Dpa)
182	(d-His)(d-Pro)(d-Glu)(Dpa)(Hle)(B)
183	(d-Nle)(Abu)(d-Thr)(d-Nle)(Gly)(d-Asn)
184	(B)(Nap)(d-Phe)(Dpa)(Amf)(d-Glu)
185	(Dpa)(Gly)(d-Nle)(d-His)(Dpa)(Gly)
186	(Pip)(d-Ser)(Abu)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)
187	(d-Asp)(Abu)(d-Ser)(d-Nle)(Dpa)(Dpa)
188	(d-Gln)(Abu)(d-Pro)(d-Glu)(Nap)(Hle)
189	(Amf)(Abu)(B)(Abu)(Hle)(Dpa)
190	(d-Nle)(Abu)(d-Nle)(Hle)(B)(Gly)
191	(d-His)(Gly)(B)(d-Nle)(Dpa)(Gly)
192	(Gly)(B)(d-His)(d-Nle)(Dpa)(Gly)
193	(Pip)(d-His)(Gly)(Nap)(Amf)(Dab)
194	(Dpa)(Hle)(Gly)(B)(Pip)(d-Phe)
195	(d-Nle)(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)
196	(Pip)(B)(d-Nle)(Gly)(Hle)(d-His)
197	(Amf)(d-Ser)(Gly)(Nap)(Amf)(Dab)
198	(Hle)(d-Pro)(B)(Gly)(Gly)(Nap)
199	(d-Arg)(d-Lys)(d-Nle)(Hle)(d-Nle)(d-Lys)
200	(d-Nle)(Gly)(B)(d-Arg)(d-Nle)(d-Phe)
201	(Gly)(Gly)(Abu)(Hle)(Dpa)(Gly)
202	(Gly)(Gly)(d-His)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)
203	(d-Asn)(d-Phe)(Gly)(d-Glu)(d-Pro)(Dpa)
204	(d-Asp)(Nap)(Gly)(d-Ser)(Dpa)(Gly)
205	(d-Thr)(ox-His)(d-Asp)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)
206	(d-Asn)(Nap)(Gly)(d-Glu)(d-Pro)(Dpa)
207	(d-Nle)(Abu)(B)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)
208	(d-Thr)(Gba)(d-Asn)(Dpa)(Abu)(Gly)
209	(d-Thr)(Pip)(B)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)

【０２２７】

【表３Ｆ】

210	(d-Asp)(Abu)(d-Ser)(d-Nle)(Nap)(Dpa)
211	(B)(Gly)(d-His)(d-Nle)(Dpa)(Gly)
212	(Nap)(Gly)(d-Asp)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)
213	(d-Lys)(B)(d-Phe)(B)(Hle)(Dpa)
214	(Gly)(d-Phe)(d-Ser)(d-Nle)(d-Nle)(d-Phe)
215	(d-Lys)(B)(ox-His)(d-Gln)(Dpa)(d-Asn)
216	(Gly)(Gly)(d-Asn)(d-Phe)(d-Phe)(d-Gln)
217	(d-Asp)(Pip)(d-His)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)
218	(ox-His)(d-Gln)(d-Pro)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)
219	(Gly)(d-Ser)(Amf)(Nap)(Amf)(Dab)
220	(Pip)(d-Asp)(d-His)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)
221	(Gly)(ox-His)(Gly)(Nap)(d-Asp)(Dpa)
222	(B)(Dab)(d-His)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)
223	(Nap)(d-Glu)(d-Gln)(d-Pro)(Pip)(d-Phe)
224	(Abu)(B)(d-Nle)(d-Ser)(d-Gln)(d-Gln)
225	(Abu)(Dpa)(d-Asn)(d-Arg)(d-Nle)(d-Thr)
226	(Dpa)(d-Thr)(Abu)(B)(Dpa)(d-Asn)
227	(d-His)(Gly)(Gly)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)
228	(d-Pro)(d-Nle)(d-Asn)(d-Asp)(d-Pro)(Hle)
229	(Gly)(d-His)(Gly)(Abu)(d-Lys)(Dpa)
230	(Nap)(d-Glu)(ox-His)(B)(Hle)(d-Phe)
231	(d-Asp)(d-Pro)(d-Asp)(d-His)(d-Asp)(Dpa)
232	(Pip)(Pip)(d-Glu)(d-Pro)(d-Thr)(Pip)
233	(Dpa)(d-Glu)(d-Asn)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)
234	(d-Asn)(Nap)(d-Asp)(B)(d-Pro)(Dpa)
235	(Abu)(B)(d-Asn)(Hle)(d-His)(d-Asn)
236	(B)(d-Ser)(d-Thr)(Dab)(Dpa)(d-Asn)
237	(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(d-Pro)(d-Thr)(Pip)
238	(d-Asn)(d-His)(B)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)
239	(Dpa)(Abu)(d-Gln)(Abu)(Pip)(Dpa)
240	(Abu)(d-Pro)(Gly)(B)(Dpa)(Nap)
241	(d-Ser)(ox-His)(d-Glu)(d-Ser)(Dpa)(Gly)
242	(d-Gln)(d-Gln)(d-Nle)(d-Ser)(d-Pro)(Gly)
243	(d-Ser)(Amf)(d-Ser)(Gly)(Pip)(Dab)
244	(d-Asn)(d-Pro)(B)(Gly)(Gly)(Dpa)
245	(Abu)(B)(d-Nle)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)

【０２２８】

【表３Ｇ】

246	(d-Asn)(Hle)(d-Pro)(B)(Nap)(d-Ser)
247	(ox-His)(Gly)(Gly)(Nap)(d-Asp)(Dpa)
248	(d-Nle)(Abu)(d-Ser)(B)(d-Asn)(d-Asp)
249	(Pip)(Gly)(d-Ser)(Hle)(d-His)(d-Asn)
250	(Dpa)(d-Lys)(B)(Gly)(Gly)(d-Pro)
251	(B)(d-Nle)(d-Asp)(Gly)(Pip)(Pip)
252	(d-Lys)(B)(Amf)(d-Thr)(d-Thr)(Dab)
253	(d-Pro)(d-Glu)(Amf)(Gly)(d-Ser)(B)
254	(Dpa)(B)(Gly)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)
255	(Abu)(d-Glu)(d-His)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)
256	(Abu)(B)(d-Ser)(d-Phe)(d-Phe)(d-Gln)
257	(Gly)(Gly)(Dab)(ox-His)(Nap)(Hle)
258	(d-Phe)(d-Asp)(Gly)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)
259	(Gly)(Pip)(d-Ser)(Hle)(d-His)(d-Asn)
260	(d-Lys)(Abu)(Amf)(d-Ser)(d-Thr)(Dab)
261	(Abu)(Gly)(Gly)(Hle)(Dpa)(Gly)
262	(d-Glu)(d-Ser)(B)(d-Nle)(Dpa)(Dpa)
263	(Abu)(d-Pro)(d-Gln)(d-Glu)(Nap)(Hle)
264	(d-Ser)(B)(Gly)(Abu)(Gly)(Hle)
265	(d-Phe)(d-Pro)(B)(Hle)(d-Arg)(d-Asp)
266	(B)(Dab)(ox-His)(Amf)(Gly)(Nap)
267	(Pip)(d-Nle)(d-Glu)(d-Gln)(d-His)(d-Asn)
268	(d-Asp)(Abu)(d-His)(Dpa)(Hle)(B)
269	(Gly)(Gly)(d-Nle)(B)(d-His)(Dpa)
270	(B)(d-Nle)(d-Asp)(Pip)(Gly)(Pip)
271	(Gly)(Gly)(d-His)(Abu)(d-Lys)(Dpa)
272	(Nap)(d-Glu)(Pip)(d-Pro)(d-Gln)(d-Phe)
273	(d-Gln)(B)(d-Glu)(d-Lys)(d-Nle)(Nap)
274	(d-Asn)(B)(d-Asp)(Nap)(d-Pro)(Dpa)
275	(d-Nle)(d-Lys)(Abu)(d-Asn)(d-Glu)(Amf)
276	(B)(ox-His)(Dab)(d-Glu)(d-Thr)(d-Ser)
277	(d-Asn)(Pip)(d-Gln)(d-Ser)(Hle)(d-Ser)
278	(ox-His)(d-Pro)(d-Ser)(Dpa)(Hle)(B)
279	(d-Thr)(Gly)(d-Phe)(d-Pro)(Gly)(Dpa)
280	(d-Asn)(Gly)(d-Glu)(Nap)(d-Pro)(Dpa)
281	(d-Asn)(d-Asp)(Nap)(B)(d-Pro)(Dpa)

【０２２９】

【表３Ｈ】

282	(d-Nle)(B)(Gly)(d-Arg)(d-Nle)(d-Phe)
283	(d-Thr)(d-Pro)(Dab)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)
284	(d-Asn)(Nap)(d-Glu)(Gly)(d-Pro)(Dpa)
285	(d-Asn)(Gly)(Nap)(d-Glu)(d-Pro)(Dpa)
286	(Abu)(Dpa)(d-Pro)(Gly)(Abu)(B)
287	(d-Lys)(Dpa)(Gly)(B)(Amf)(d-Nle)
288	(d-His)(Gly)(Amf)(d-Lys)(d-Ser)(d-Asp)
289	(d-Gln)(Dpa)(d-Asn)(d-Nle)(d-His)(Abu)
290	(Dpa)(d-Gln)(Pip)(d-Pro)(Hle)(d-Thr)
291	(ox-His)(Gly)(Gly)(Gly)(Nap)(Hle)
292	(d-Gln)(Gba)(d-Glu)(d-Ser)(d-His)(d-Phe)
293	(Dpa)(Pip)(d-Ser)(Abu)(Pip)(Dpa)
294	(d-Asp)(d-His)(Pip)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)
295	(Dpa)(B)(Dpa)(d-Phe)(Gly)(B)
296	(B)(d-Gln)(d-Glu)(d-Lys)(d-Nle)(Nap)
297	(Pip)(Gly)(Gly)(Hle)(Hle)(d-His)
298	(Abu)(B)(Amf)(Abu)(Hle)(Dpa)
299	(d-Asn)(d-Pro)(d-Pro)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)
300	(d-His)(B)(Dab)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)
301	(d-Glu)(d-His)(Abu)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)
302	(d-Glu)(Hle)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)(Nap)
303	(Hle)(d-Pro)(d-Glu)(d-Pro)(d-Thr)(Pip)
304	(Nap)(d-Asp)(Gly)(d-Ser)(Dpa)(Gly)
305	(d-Glu)(Hle)(d-Thr)(Nap)(B)(Gly)
306	(d-Asn)(Abu)(B)(Hle)(d-His)(d-Asn)
307	(d-Nle)(Hle)(d-His)(d-Asp)(d-His)(Amf)
308	(Dpa)(Amf)(d-Ser)(d-Phe)(Gly)(B)
309	(d-Thr)(Dpa)(Abu)(B)(Dpa)(d-Asn)
310	(Hle)(Gly)(Dpa)(d-Phe)(d-Ser)(B)
311	(Nap)(Dab)(B)(d-Ser)(Hle)(d-Ser)
312	(Abu)(Dpa)(d-Pro)(Gly)(B)(Abu)
313	(Dpa)(d-Ser)(Pip)(Abu)(Pip)(Dpa)
314	(d-Ser)(d-Glu)(d-Nle)(Gly)(Gly)(d-Gln)
315	(d-Lys)(d-Arg)(d-Asp)(Gly)(d-Pro)(Gly)
316	(d-Gln)(d-Pro)(Pip)(B)(d-Asn)(d-Pro)
317	(Dpa)(Pip)(Gly)(Gly)(Hle)(Dab)

【０２３０】

【表３Ｉ】

318	(Abu)(d-Pro)(Gly)(d-Pro)(Gly)(d-His)
319	(B)(Abu)(ox-His)(Abu)(d-Nle)(d-Phe)
320	(Dpa)(Pip)(B)(d-Thr)(Pip)(Dpa)
321	(d-Pro)(Abu)(Gly)(d-Pro)(Gly)(d-His)
322	(d-Arg)(d-Gln)(d-Asp)(d-Ser)(d-Phe)(d-Gln)
323	(Dpa)(Abu)(ox-His)(d-Nle)(Hle)(d-Thr)
324	(d-Pro)(Hle)(d-Nle)(d-Ser)(Abu)(B)
325	(B)(d-Nle)(Pip)(d-Asp)(Gly)(Pip)
326	(B)(d-His)(Dab)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)
327	(d-Pro)(B)(d-Pro)(Nap)(Nap)(d-Asn)
328	(Gly)(Dab)(Gly)(ox-His)(Nap)(Hle)
329	(d-Pro)(d-Nle)(d-Asp)(B)(Gly)(Hle)
330	(d-Lys)(d-Ser)(d-Thr)(Dab)(Dab)(Nap)
331	(d-Phe)(Abu)(Gly)(d-Ser)(d-Phe)(Nap)
332	(Abu)(B)(d-Pro)(d-Pro)(Abu)(Gly)
333	(d-Asp)(Gly)(d-Phe)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)
334	(Abu)(Hle)(Gly)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)
335	(d-Ser)(d-Phe)(Gly)(d-Nle)(d-Nle)(d-Phe)
336	(Hle)(Gly)(Dpa)(d-Phe)(d-Thr)(Gly)
337	(Abu)(d-Pro)(B)(d-Pro)(d-Ser)(d-Glu)
338	(d-Asp)(d-Phe)(Gly)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)
339	(Gly)(Gly)(Gly)(Gly)(d-Nle)(d-Asp)
340	(d-Pro)(d-Glu)(Amf)(d-Thr)(Gly)(Gly)
341	(Hle)(Dpa)(Gly)(B)(Pip)(d-Phe)
342	(B)(Nap)(d-Phe)(Abu)(Hle)(Hle)
343	(Hle)(d-Pro)(d-Glu)(Pip)(d-Pro)(d-Thr)
344	(d-Pro)(Hle)(d-Nle)(d-Ser)(B)(Abu)
345	(Nap)(d-Pro)(Abu)(d-Nle)(d-Nle)(Amf)
346	(Pip)(B)(d-Thr)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)
347	(d-Phe)(Dpa)(Dpa)(d-Phe)(Pip)(Dpa)
348	(d-Lys)(d-Thr)(Amf)(d-Ser)(d-His)(Amf)
349	(Pip)(d-Pro)(d-Ser)(Pip)(Gly)(Gly)
350	(d-Lys)(d-Lys)(B)(Gba)(d-Thr)(Nap)
351	(d-Arg)(d-Thr)(Dpa)(Abu)(d-Asn)(d-Phe)
352	(d-Nle)(Abu)(B)(Gly)(Dpa)(Gly)
353	(d-Pro)(B)(d-Phe)(Abu)(Dpa)(Dpa)

【０２３１】

【表３Ｊ】

354	(d-Asp)(d-Asp)(d-Lys)(d-Nle)(Dpa)(Dpa)
355	(d-Nle)(d-Thr)(d-Ser)(d-His)(d-Nle)(Nap)
356	(d-Asp)(d-Phe)(d-Thr)(d-Asp)(Gly)(Gly)
357	(Pip)(Dpa)(Gly)(Gly)(Hle)(Dab)
358	(d-Phe)(Gly)(d-Ser)(d-Nle)(d-Nle)(d-Phe)
359	(Hle)(d-Lys)(Dpa)(Gly)(d-Pro)(d-Thr)
360	(Gly)(Gly)(d-Gln)(B)(Amf)(d-Asp)
361	(B)(Gly)(Abu)(d-Glu)(Gly)(d-Phe)
362	(B)(d-Nle)(d-Thr)(d-Thr)(Abu)(d-His)
363	(Gly)(Dab)(d-Lys)(d-Glu)(d-Glu)(Dpa)
364	(Gly)(Dpa)(d-Pro)(Abu)(d-Pro)(d-Asn)
365	(d-Nle)(Abu)(B)(d-Ser)(d-Gln)(d-Gln)
366	(Dab)(B)(ox-His)(Amf)(Gly)(Nap)
367	(Hle)(d-Glu)(d-Thr)(Nap)(d-Gln)(Nap)
368	(d-Ser)(d-Glu)(d-Nle)(d-Asn)(B)(Gly)
369	(d-Lys)(d-Phe)(Gly)(Abu)(Hle)(Dpa)
370	(d-Nle)(Gly)(d-Phe)(Dab)(Hle)(Dpa)
371	(ox-His)(B)(Hle)(Dpa)(Hle)(d-Thr)
372	(d-Pro)(Pip)(d-Gln)(Dpa)(Hle)(d-Thr)
373	(Gly)(B)(Dpa)(d-Phe)(Gly)(B)
374	(Gly)(Gly)(B)(d-Gln)(Amf)(d-Asp)
375	(Amf)(B)(Abu)(Abu)(Hle)(Dpa)
376	(d-Ser)(B)(d-Ser)(d-Ser)(Hle)(Hle)
377	(B)(d-Lys)(Dab)(ox-His)(Gly)(d-Pro)
378	(d-Lys)(Abu)(d-Ser)(Amf)(d-Thr)(Dab)
379	(Abu)(B)(d-Ser)(Dpa)(Gly)(d-Ser)
380	(d-Ser)(Amf)(Gly)(d-Ser)(Pip)(Dab)
381	(Hle)(Nle)(d-Glu)(d-Ser)(d-Thr)(d-Asn)
382	(B)(B)(d-Asp)(Gly)(Dpa)(d-Asn)
383	(Gly)(d-Ser)(Hle)(d-Phe)(d-Glu)(d-Gln)
384	(d-Pro)(d-Thr)(d-Asp)(Gly)(d-Thr)(Gly)
385	(d-Pro)(d-Thr)(Hle)(d-Ser)(d-Asp)(Nap)
386	(d-Asn)(d-Ser)(d-Ser)(Pip)(Hle)(Nle)
387	(Gly)(d-Pro)(d-Glu)(d-Glu)(Gly)(Nap)
388	(B)(d-Asn)(Dpa)(d-Ser)(Hle)(Dab)
389	(Gly)(d-Asp)(d-Asp)(Dpa)(d-Asn)(d-Ser)

【０２３２】

【表３Ｋ】

390	(d-Asp)(d-Thr)(Hle)(d-Pro)(d-Gln)(Hle)
391	(d-Pro)(d-Thr)(d-Asp)(d-Asp)(d-Asn)(Hle)
392	(d-Thr)(d-Pro)(Hle)(d-Ser)(d-Asp)(Nap)
393	(Gly)(d-Arg)(d-Glu)(d-Thr)(Hle)(d-Asn)
394	(B)(Hle)(d-Glu)(d-Gln)(d-Glu)(Amf)
395	(Gly)(d-Phe)(d-Pro)(Pip)(Nle)(Gly)
396	(B)(d-Thr)(d-Gln)(Hle)(d-Glu)(d-Asp)
397	(d-Phe)(Hle)(d-Glu)(d-Ser)(B)(d-Thr)
398	(d-Asn)(Gly)(Hle)(B)(Nle)(d-Asp)
399	(B)(d-Arg)(Nle)(d-Arg)(d-Glu)(d-Gln)
400	(Gly)(Gly)(B)(d-Phe)(d-Asn)(d-Thr)
401	(Nle)(d-Arg)(Nle)(d-Gln)(B)(d-Asp)
402	(d-Asp)(d-Asn)(d-Gln)(Abu)(d-Thr)(d-Phe)
403	(Nle)(Hle)(d-Glu)(d-Ser)(d-Thr)(d-Asn)
404	(d-Asn)(d-Ser)(Amf)(Dab)(d-Phe)(Gly)
405	(d-Gln)(B)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asn)(Amf)
406	(d-Asn)(d-Lys)(d-Thr)(Gly)(Hle)(Abu)
407	(B)(B)(B)(Hle)(d-His)(Hle)
408	(Gly)(B)(B)(d-Glu)(Nle)(Dpa)
409	(d-Pro)(d-Thr)(Dpa)(Abu)(B)(d-Lys)
410	(B)(Nle)(Dab)(d-Phe)(Gly)(d-Thr)
411	(B)(Nle)(Dab)(d-Lys)(B)(d-Phe)
412	(d-Gln)(d-Ser)(d-Lys)(Hle)(d-Phe)(Dab)
413	(d-Arg)(d-Phe)(d-Lys)(d-Asp)(Hle)(Gly)
414	(Abu)(Gly)(d-Asp)(Gly)(Dpa)(d-Asn)
415	(B)(d-Thr)(Dpa)(d-Asn)(d-Gln)(Nap)
416	(Abu)(B)(d-Glu)(Pip)(d-Arg)(Nle)
417	(Gly)(d-Asp)(d-Arg)(d-Ser)(Dab)(d-Phe)
418	(B)(d-Arg)(Hle)(d-Phe)(Gly)(d-Arg)
419	(d-Arg)(d-Asp)(Hle)(d-Ser)(Pip)(d-Gln)
420	(Gly)(Gly)(d-Ser)(Pip)(Hle)(Nle)
421	(d-Asn)(d-Asp)(d-Gln)(Abu)(d-Thr)(d-Phe)
422	(B)(Nle)(B)(B)(d-Thr)(Hle)
423	(Gly)(Dpa)(Gly)(d-Asp)(Gly)(B)
424	(Gly)(Gly)(d-Asn)(d-Pro)(Hle)(Dab)
425	(d-Phe)(d-Thr)(d-Lys)(d-Asn)(d-Thr)(d-Phe)

【０２３３】

【表３Ｌ】

426	(d-Asn)(d-Asp)(B)(d-Thr)(Gly)(d-Phe)
427	(d-Asn)(Gly)(d-Gln)(d-Ser)(Nap)(d-Asp)
428	(Gly)(Abu)(d-Asp)(Gly)(Dpa)(d-Asn)
429	(B)(Abu)(d-Asp)(Hle)(Amf)(Nle)
430	(d-Asn)(Gly)(d-Glu)(Nap)(d-Asn)(d-Asp)
431	(B)(Gly)(Gly)(d-Gln)(Dpa)(d-Phe)
432	(B)(Abu)(d-Glu)(Pip)(d-Arg)(Nle)
433	(B)(Abu)(Nle)(d-Arg)(d-Pro)(d-Pro)
434	(Gly)(Gly)(Nle)(d-Thr)(d-Asp)(Hle)
435	(B)(d-Asn)(Gly)(B)(Dpa)(d-Phe)
436	(Gly)(Gly)(Abu)(d-Glu)(Nle)(Dpa)
437	(d-Asn)(d-Gln)(d-Glu)(d-Gln)(d-Ser)(d-Phe)
438	(Gly)(Dpa)(Gly)(B)(d-His)(B)
439	(Gly)(Gly)(d-Thr)(Abu)(d-Gln)(Nap)
440	(Dab)(d-Thr)(d-Asp)(Gly)(d-Thr)(Gly)
441	(d-Asn)(Gly)(d-Asp)(d-Asp)(d-Pro)(Nap)
442	(d-Pro)(d-Thr)(d-Phe)(d-Glu)(Gly)(B)
443	(d-Lys)(d-Asn)(d-Thr)(Gly)(Hle)(Abu)
444	(d-Thr)(d-Pro)(Dpa)(Abu)(B)(d-Lys)
445	(B)(Nle)(Amf)(B)(Gly)(d-Thr)
446	(Nle)(Nle)(d-Arg)(d-Glu)(Gly)(B)
447	(d-Pro)(d-Ser)(d-Pro)(d-Lys)(Pip)(d-Gln)
448	(d-Asn)(d-Lys)(B)(d-Phe)(d-Asp)(d-Asp)
449	(Gly)(Gly)(Dpa)(Abu)(d-Lys)(d-Ser)
450	(B)(Abu)(Nle)(d-Pro)(d-Pro)(d-Arg)
451	(Gly)(d-Gln)(Gba)(d-Ser)(d-Ser)(d-Asn)
452	(d-Ser)(d-Pro)(d-Pro)(d-Glu)(d-Glu)(Dab)
453	(Gly)(Gly)(Nle)(d-Asn)(B)(Hle)
454	(Gly)(Gly)(d-Gln)(d-Ser)(Nap)(d-Asp)
455	(B)(Gly)(B)(Hle)(d-Phe)(d-Ser)
456	(d-Asn)(Nle)(d-Pro)(d-Asn)(d-Ser)(Nap)
457	(Gly)(d-Ser)(Hle)(d-Asp)(Gly)(Gly)
458	(Abu)(d-Pro)(Nle)(d-Pro)(d-Pro)(Gly)
459	(Abu)(Gly)(Gly)(Gly)(d-Arg)(Dpa)
460	(d-Gln)(Dab)(d-Asp)(Pip)(d-Gln)(Gly)
461	(Abu)(B)(d-Lys)(B)(d-Thr)(d-Ser)

【０２３４】

【表３Ｍ】

462	(Gly)(Nle)(d-Glu)(d-His)(B)(Dab)
463	(Abu)(d-Ser)(B)(d-Asn)(Amf)(d-Phe)
464	(d-Asp)(Hle)(B)(Gly)(Gly)(d-Glu)
465	(d-Asn)(Gly)(Dpa)(Gly)(B)(Gly)
466	(d-Thr)(d-Pro)(d-Asp)(Gly)(d-Thr)(Gly)
467	(d-Asn)(d-Asp)(Gly)(d-Asp)(d-Pro)(Nap)
468	(d-Pro)(d-Thr)(d-Phe)(d-Glu)(B)(Gly)
469	(d-Lys)(B)(d-Asn)(d-Phe)(d-Asp)(d-Asp)
470	(d-Gln)(d-Glu)(d-Lys)(d-Asp)(Hle)(Gly)
471	(Gly)(Dpa)(B)(Gly)(d-His)(B)
472	(B)(Nle)(d-Arg)(Hle)(Gly)(B)
473	(B)(Abu)(Gly)(Hle)(d-His)(Hle)
474	(d-Arg)(B)(d-Ser)(d-Pro)(d-Phe)(d-Glu)
475	(ox-His)(d-Asp)(d-Asp)(d-Glu)(Abu)(d-Ser)
476	(Abu)(B)(d-Asp)(Pip)(d-Glu)(d-His)
477	(d-Asp)(d-Gln)(Hle)(Gly)(Gly)(Nle)
478	(d-Pro)(d-Gln)(Gly)(Nap)(d-Glu)(d-Asp)
479	(d-Pro)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)(d-Glu)(Pip)
480	(Gly)(d-Asn)(d-Phe)(Gly)(d-Glu)(Nle)
481	(Gly)(d-Asn)(Dpa)(Gly)(B)(Gly)
482	(d-Asn)(Dab)(Dab)(d-Pro)(d-Phe)(d-Glu)
483	(d-Asn)(B)(Gly)(d-Asn)(Nle)(d-Arg)
484	(Gly)(B)(d-Gln)(Amf)(Nap)(d-Gln)
485	(d-Phe)(d-Asp)(d-Ser)(B)(Hle)(Pip)
486	(Gba)(d-Glu)(Gly)(d-Ser)(Dab)(d-Phe)
487	(Gly)(Gly)(Gly)(Nle)(d-Pro)(d-Asp)
488	(Gly)(Gly)(Gly)(Dpa)(d-Gln)(Gly)
489	(Pip)(d-Thr)(d-Pro)(d-Asn)(d-Ser)(Nap)
490	(Nle)(Abu)(d-Glu)(d-Gln)(d-Glu)(Amf)
491	(d-Phe)(Hle)(d-Glu)(B)(d-Ser)(d-Thr)
492	(d-Asp)(Dpa)(d-Ser)(B)(Gly)(B)
493	(d-Asp)(d-Ser)(d-Phe)(d-Asn)(d-Lys)(d-Phe)
494	(B)(Gly)(B)(Hle)(B)(d-Arg)
495	(Abu)(Pip)(d-Asn)(d-Arg)(d-Ser)(Nap)
496	(Gly)(Gly)(d-Asn)(Abu)(d-Phe)(d-Gln)
497	(Gly)(d-Asn)(d-Asn)(Gly)(Dpa)(d-Asn)

【０２３５】

【表３Ｎ】

498	(Gly)(Pip)(d-Asp)(Nle)(B)(d-Asn)
499	(d-Lys)(d-Pro)(d-Pro)(d-Ser)(Pip)(d-Gln)
500	(Gly)(B)(d-Phe)(Gly)(Gly)(d-Thr)
501	(d-Asp)(B)(Gly)(Abu)(d-Thr)(d-Phe)
502	(Gly)(Gly)(Gly)(Nap)(d-Asp)(Dab)
503	(Gly)(d-Asn)(d-Glu)(Nap)(d-Asn)(d-Asp)
504	(B)(d-Arg)(Nle)(d-Pro)(Gly)(Gly)
505	(Gly)(Gba)(d-Glu)(d-Ser)(Dab)(d-Phe)
506	(Gly)(B)(Gly)(d-Phe)(d-Asn)(d-Thr)
507	(d-Glu)(d-Ser)(d-Ser)(d-Thr)(Gly)(d-Phe)
508	(B)(d-Phe)(Nle)(d-Asp)(Abu)(B)
509	(Nle)(B)(d-Thr)(Nap)(Gly)(Gly)
510	(B)(Dab)(Nap)(ox-His)(d-Asp)(Nap)
511	(B)(d-Asn)(d-Pro)(Nle)(Pip)(d-Gln)
512	(Abu)(B)(d-Arg)(d-Pro)(Pip)(d-Gln)
513	(Dab)(d-Thr)(Gly)(d-Asp)(d-Thr)(Gly)
514	(Nle)(d-Asp)(d-His)(d-Asp)(Nle)(d-Phe)
515	(Gly)(d-Asn)(d-Asp)(d-Asp)(d-Pro)(Nap)
516	(Gly)(Gly)(Nle)(Gly)(d-Phe)(d-Asn)
517	(d-Lys)(B)(ox-Amf)(d-Asp)(B)(d-Lys)
518	(Nle)(B)(Dab)(d-Phe)(Gly)(d-Thr)
519	(Abu)(B)(d-Ser)(d-Asn)(Amf)(d-Phe)
520	(Dab)(d-Ser)(d-Asn)(Pip)(Nle)(Gly)
521	(d-Phe)(Dab)(d-Asp)(Abu)(Abu)(Dpa)
522	(ox-Nap)(Dab)(Gly)(Abu)(d-Phe)(Gly)
523	(Gly)(Pip)(Gba)(d-Ser)(d-Thr)(d-Gln)
524	(d-Lys)(d-Asp)(Gly)(Gly)(Amf)(d-Phe)
525	(B)(Abu)(d-Asn)(d-Arg)(d-Asn)(Gly)
526	(d-Asn)(Nle)(Gly)(Gly)(B)(Hle)
527	(d-Pro)(Gly)(d-Glu)(d-Glu)(Gly)(Nap)
528	(Abu)(Amf)(d-His)(Gly)(d-Phe)(Gly)
529	(Abu)(Dab)(Hle)(d-Thr)(Gly)(Abu)
530	(Nle)(d-Arg)(Nle)(Abu)(d-Asn)(d-Asp)
531	(d-Pro)(Gly)(B)(Gly)(Abu)(Hle)
532	(d-Asp)(Dpa)(d-Ser)(Gly)(Gly)(Abu)
533	(Abu)(Gba)(d-Ser)(d-Pro)(d-Phe)(d-Glu)

【０２３６】

【表３０】

534	(B)(Gly)(B)(d-Glu)(Nle)(Dpa)
535	(d-Lys)(ox-His)(ox-His)(d-Ser)(d-Asp)(Nap)
536	(Nle)(d-Asn)(Abu)(d-Pro)(Pip)(d-Gln)
537	(Amf)(d-Thr)(d-Pro)(d-Pro)(B)(d-Asp)
538	(Gly)(d-Ser)(ox-Amf)(B)(Gly)(Amf)
539	(Gly)(Gly)(B)(d-Gln)(Dpa)(d-Phe)
540	(d-Arg)(d-Asp)(Gly)(d-Ser)(Dab)(d-Phe)
541	(Abu)(d-Gln)(Dab)(d-Phe)(d-Asp)(d-Asp)
542	(d-Lys)(d-Asn)(B)(d-Phe)(d-Asp)(d-Asp)
543	(Gly)(Gly)(d-Phe)(d-Asn)(d-Lys)(d-Phe)
544	(Nle)(d-Glu)(B)(Gly)(Gly)(d-Glu)
545	(d-Asn)(B)(Gly)(d-Ser)(Nap)(d-Asp)
546	(d-Asp)(B)(Abu)(Hle)(Amf)(Nle)
547	(B)(d-Asn)(d-Pro)(Nap)(d-Glu)(d-Asp)
548	(Gly)(Nle)(d-Glu)(B)(d-His)(Dab)
549	(d-Arg)(d-Pro)(d-Asp)(ox-His)(d-Asp)(Nap)
550	(Abu)(B)(d-Thr)(Amf)(d-Phe)(d-His)
551	(Abu)(B)(B)(d-Asn)(d-Phe)(Pip)
552	(Gly)(Gly)(d-Pro)(B)(d-Glu)(Nle)
553	(Gly)(Gly)(d-Ser)(Nle)(Abu)(Nap)
554	o(d-Ser)(Hle)(B)(Gly)(Gly)
555	(B)(d-Asn)(d-Asp)(Nap)(d-Asn)(d-Asp)
556	(B)(d-Asp)(Amf)(Gly)(d-Ser)(d-Thr)
557	(B)(Nle)(Dab)(B)(ox-His)(Nle)
558	(d-Lys)(B)(B)(B)(d-Thr)(ox-His)
559	(d-Lys)(B)(Gly)(ox-His)(d-Thr)(d-Gln)
560	(Gly)(d-Ser)(Amf)(Gly)(d-Ser)(Amf)
561	(Abu)(B)(Gba)(d-Ser)(d-Asp)(d-Phe)
562	(d-Thr)(d-Phe)(d-Lys)(d-Asn)(d-Thr)(d-Phe)
563	(Abu)(B)(Gly)(d-Ser)(Dab)(d-Thr)
564	(B)(Gly)(Abu)(Hle)(d-His)(Hle)
565	(Abu)(Gly)(d-Glu)(Hle)(Amf)(Nle)
566	(d-Asp)(B)(Dab)(d-Pro)(ox-His)(d-Glu)
567	(d-Pro)(d-Glu)(Gly)(d-Glu)(Gly)(Nap)
568	(Nle)(Nle)(Abu)(B)(d-Glu)(d-Gln)
569	(d-Asn)(Abu)(Hle)(B)(Abu)(B)

【０２３７】

【表３Ｐ】

570	(Gly)(Gly)(Gly)(d-Asp)(Nap)(Dab)
571	(Gly)(d-Asn)(d-Gln)(d-Ser)(Nap)(d-Asp)
572	(ox-Nap)(d-Pro)(d-Asp)(Gly)(Hle)(d-Pro)
573	(B)(Gly)(B)(B)(Hle)(d-Arg)
574	(Nle)(d-Thr)(Nle)(Gly)(Gly)(d-Thr)
575	(d-Asn)(d-Asp)(Pip)(d-Ser)(d-Thr)(d-Phe)
576	(d-His)(d-His)(Gly)(B)(Gly)(Gly)
577	(Abu)(Nle)(d-Pro)(d-Pro)(d-Pro)(Gly)
578	(Dab)(Hle)(Hle)(Abu)(B)(Gly)
579	(Gly)(d-Glu)(Nle)(Pip)(d-Asn)(Gly)
580	(d-Ser)(d-Pro)(d-Pro)(d-Lys)(Pip)(d-Gln)
581	(Gly)(d-Ser)(Nle)(d-Glu)(Gly)(Gly)
582	(B)(Nle)(B)(Abu)(Hle)(d-Gln)
583	(Gly)(Gly)(d-Glu)(Hle)(d-Asn)(Nle)
584	(B)(d-Asn)(Dpa)(Nle)(d-Thr)(Dab)
585	(B)(Nle)(d-Arg)(Hle)(B)(Gly)
586	(B)(Nle)(Abu)(B)(Hle)(d-Gln)
587	(Gly)(Gly)(Abu)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)
588	(d-Asp)(d-Thr)(d-Pro)(Hle)(d-Gln)(Hle)
589	(Nap)(Hle)(Gly)(Gly)(d-Ser)(Nap)
590	(B)(Nle)(Dab)(d-Pro)(B)(ox-His)
591	(B)(d-His)(Dab)(d-Phe)(d-Phe)(Gly)
592	(Abu)(Gly)(Hle)(B)(Amf)(d-Glu)
593	(Gly)(d-Gln)(Gba)(d-Ser)(d-Asn)(d-Ser)
594	(d-Ser)(d-Ser)(Dpa)(B)(Gly)(Gly)
595	(Nle)(d-Asp)(d-Asp)(Pip)(d-Gln)(Gly)
596	(d-Pro)(B)(d-Asp)(d-Thr)(Hle)(d-Asp)
597	(d-Asp)(d-Phe)(d-Ser)(B)(Hle)(Pip)
598	(d-Pro)(Pip)(d-Thr)(d-Asn)(d-Ser)(Nap)
599	(d-Gln)(ox-His)(d-Asn)(Pip)(d-Asp)(Nap)
600	(d-Gln)(Pip)(ox-His)(d-Asn)(d-Asp)(Nap)
601	(Abu)(Gly)(d-Asn)(Abu)(B)(Dpa)
602	(B)(B)(Gly)(Gly)(d-Arg)(Dpa)
603	(Gly)(d-Ser)(Gly)(d-Ser)(Amf)(Amf)
604	(d-Asp)(d-Ser)(d-Phe)(B)(Hle)(Pip)
605	(Gly)(Hle)(d-Thr)(Nap)(Gly)(Gly)

【０２３８】

【表３Ｑ】

606	(B)(Nap)(Dab)(d-Ser)(d-Phe)(Gly)
607	(Dab)(d-Ser)(d-His)(Nap)(d-Asp)(Nap)
608	(Nle)(d-Phe)(d-Asn)(B)(d-Ser)(d-Ser)
609	(d-Asn)(B)(d-Pro)(d-Pro)(Nle)(d-His)
610	(d-Gln)(d-Asn)(d-Glu)(d-Gln)(d-Ser)(d-Phe)
611	(Abu)(B)(d-Lys)(Abu)(d-Ser)(d-Ser)
612	(B)(d-Lys)(Gly)(ox-His)(d-Thr)(d-Gln)
613	(B)(d-Asp)(d-Asn)(Pip)(Nle)(Gly)
614	(Gly)(d-Ser)(Abu)(B)(d-Gln)(Nap)
615	(Gly)(d-Ser)(Abu)(d-Arg)(d-Asp)(d-Phe)
616	(Nle)(d-Lys)(Gly)(d-Glu)(ox-His)(d-Lys)
617	(B)(d-Ser)(d-Ser)(d-Thr)(Gba)(Pip)
618	(B)(Gly)(d-Phe)(Gly)(Gly)(d-Thr)
619	(Abu)(Gly)(Gly)(Gly)(Gly)(d-Phe)
620	(d-Pro)(d-Pro)(d-Ser)(d-Glu)(d-Glu)(Dab)
621	(Gly)(Abu)(Gly)(Gly)(d-Arg)(Dpa)
622	(d-Asp)(Abu)(B)(Hle)(Amf)(Nle)
623	(d-Asn)(d-Pro)(d-Ser)(Nle)(d-Phe)(d-Glu)
624	(d-Lys)(B)(B)(d-Asp)(ox-Amf)(d-Lys)
625	(d-Gln)(B)(d-Pro)(Nle)(Pip)(d-Gln)
626	(d-Gln)(d-Phe)(d-Asp)(d-His)(Gly)(Gly)
627	(d-Pro)(d-Asn)(d-Ser)(Nle)(d-Phe)(d-Glu)
628	(d-Asp)(d-Thr)(d-Gln)(Hle)(d-Pro)(Hle)
629	(B)(d-Glu)(Gly)(d-His)(Dab)(Hle)
630	(Nle)(d-His)(d-His)(B)(d-Glu)(Amf)
631	(d-Thr)(Dab)(d-Asp)(Gly)(d-Thr)(Gly)
632	(B)(Abu)(d-Phe)(Gba)(d-Ser)(d-Ser)
633	(d-Phe)(Dab)(d-Glu)(B)(Abu)(Dpa)
634	(Gly)(Gly)(d-Glu)(Hle)(d-His)(d-Pro)
635	(Gly)(Dpa)(B)(Gly)(B)(d-His)
636	(B)(Abu)(Nle)(d-Lys)(d-His)(Abu)
637	(Gly)(d-Ser)(B)(Gly)(ox-Amf)(Amf)
638	(Gly)(Abu)(ox-His)(d-His)(d-Ser)(d-Asn)
639	(B)(d-Pro)(d-Asp)(Hle)(d-Thr)(d-Asp)
640	(Gly)(Gly)(Gly)(d-Pro)(Nle)(d-Asp)
641	(Abu)(d-Pro)(d-Pro)

【０２３９】

【表３Ｒ】

642	(d-Pro)(d-Pro)(Abu)
643	(Nle)(d-Thr)(d-Glu)(d-Arg)
644	(Nle)(d-Pro)(d-Asp)(d-Glu)(d-Thr)
645	(Nle)(d-Pro)(d-Asp)(d-Arg)(ox-Trp)
646	(B)(Abu)(d-Ser)(Abu)(Hle)
647	(d-Lys)(Nap)(d-Glu)(d-Thr)
643	(Nle)(d-Thr)(d-Glu)(d-Arg)
648	(Nle)(d-Pro)(d-Asp)(d-Arg)W(ox-Trp)
649	(Nle)(d-Asp)(Dab)(Hle)
650	(d-Lys)(d-Asp)(Nle)(d-Gln)(d-Gln)
651	(Nle)(d-Thr)(d-Glu)(B)(Abu)
652	(d-Ser)(Pip)(d-Ser)(Gly)(Hle)
653	(Nle)(d-Thr)(d-Pro)(d-Thr)(d-Ser)
654	(B)(Abu)(B)(d-Thr)(Hle)
655	(d-Lys)(d-Asp)(d-Asn)(Hle)
656	(B)(d-Glu)(Dab)(Gly)(Hle)
657	(B)(d-Arg)(d-Arg)(Abu)(Dab)(d-His)
658	(B)(d-Arg)(Abu)(d-Arg)(Dab)(d-His)
659	(Nle)(d-Asn)(Hle)(Nle)(d-Thr)(d-His)
660	(Gba)(d-Asn)(Nle)(d-Asn)(d-His)
661	(ox-His)(d-His)(Hle)
662	(d-Arg)(ox-Nap)(d-Asn)(d-His)
663	(d-Lys)(B)(Abu)(d-Arg)(d-His)
664	(Abu)(Gly)(d-Asn)(Nle)(d-Asn)(d-His)
665	(d-Lys)(d-Arg)(d-Arg)(d-His)
666	(B)(d-Arg)(Nle)(Gba)(Dpa)
667	(Nle)(d-Asn)(d-Lys)(B)(Gba)(d-His)
668	(Nle)(Hle)(ox-Amf)(d-Pro)(d-Phe)
669	(B)(d-Arg)(Gba)(Dpa)(Nle)

【０２４０】

一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、Ｃ末端配列を除いて、非天然アミノ酸又はＤ-アミノ酸から選択される３から１５のアミノ酸であり得る。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、Ｃ末端配列を含めて、非天然アミノ酸又はＤ-アミノ酸から選択される３から１５のアミノ酸であり得る。本開示には、Ｃ末端配列を除いて、非天然アミノ酸又はＤ-アミノ酸から選択される３から１５、３から１２、３から１０、３から８、３から６、４から１５、４から１２、４から１０、４から８、４から６、５から１５、５から１２、５から１０、５から８、５から６、６から１５、６から１２、６から１０、６から８、４個、６個、又は８個のアミノ酸であり得る、細胞膜透過ペプチドが含まれる。一実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＫＷＫＫ、ＫＫＷＫ、ＫＷＷＫＫ、ＷＷＫＫ、ＷＫＫ、ＫＫＫＫ、又はＫＫモチーフを有するＣ末端配列を更に含む。別の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、(d-K)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-W)(d-K)、(d-K)(d-W)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-W)(d-W)(d-K)(d-K

)、(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-K)(d-K)、又は(d-K)(d-K)モチーフを有するC末端配列を更に含む。

【０２４１】

一実施形態では、上記で提供された細胞膜透過ペプチドは、トリプシン切断可能リンカーを介してLに結合している。一実施形態では、トリプシン切断可能リンカーは、GGKGGである。

【０２４２】

別の実施形態では、本明細書では、式:GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KWKK)、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KKWK)、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KWWKK)、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(WWKK)、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(WKK)、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KKKK)、又はGGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KK)を有する、本明細書で提供される組成物において使用され得るトリプシン切断可能リンカー/細胞膜透過ペプチドコンジュゲートが提供される。

【０２４３】

更に別の実施形態では、本明細書では、式:ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KWKK)、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KKWK)、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KWWKK)、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(WWKK)、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(WKK)、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KKKK)、又はビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(KK)を有する、本明細書で提供される組成物において使用され得るビオチン/トリプシン切断可能リンカー/細胞膜透過ペプチドコンジュゲートが提供される。

【０２４４】

更に別の実施形態では、本明細書では、式:GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-(KWKK)、GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-(KKWK)、GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-(KWWKK)、GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-(WWKK)、GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-(WKK)、GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-(KKKK)、又はGGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-(KK)を有する、本明細書で提供される組成物において使用され得るトリプシン切断可能リンカー/イソセラモックス又はd-Ser切断可能リンカー/細胞膜透過ペプチドコンジュゲートが提供される。

【０２４５】

別の実施形態では、本明細書では、式:GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-W)(d-K)(d-K))、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-(((d-K)(d-K)(d-W)(d-K))、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-W)(d-W)(d-K)(d-K))、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-W)(d-W)(d-K)(d-K))、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-W)(d-K)(d-K))、GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-K)(d-K)(d-K))、又はGGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-K))を有する、本明細書で提供される組成物において使用され得るトリプシン切断可能リンカー/細胞膜透過ペプチドコンジュゲートが提供される。

【０２４６】

更に別の実施形態では、本明細書では、式:ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-W)(d-K)(d-K))、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-K)(d-W)(d-K))、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-W)(d-W)(d-K)(d-K))、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-W)(d-W)(d-K)(d-K))、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-W)(d-K)(d-K))、ビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-K)(d-K)(d-K))、又はビオチン-GGKGG-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-K))を有する、本明細書で提供される組成物において使用され得るビオチン/トリプシン切断可能リンカー/細胞膜透過ペプチドコンジュゲートが提供される。

【０２４７】

更に別の実施形態では、本明細書では、式:GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-W)(d-K)(d-K))、GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-K)(d-W)(d-K))、GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-W)(d-W)(d-K)(d-K))、GGKGG-(s)-(細

胞膜透過ペプチド)-((d-W)(d-W)(d-K)(d-K))、GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-((d-W)(d-K)(d-K))、GGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-K)(d-K)(d-K))、又はGGKGG-(s)-(細胞膜透過ペプチド)-((d-K)(d-K))を有する、本明細書で提供される組成物において使用され得るトリプシン切断可能リンカー/イソセラモックス又はd-Ser切断可能リンカー/細胞膜透過ペプチドコンジュゲートが提供される。

【０２４８】

VI.医薬組成物

本開示はまた、開示されているコンジュゲートの製剤及び送達を提供する。したがって、本開示の態様は、本明細書で開示されているコンジュゲート及び薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物である。

【０２４９】

標的核酸へのコンジュゲートの効果的な送達は、処置の重要な態様である。コンジュゲート送達の経路としては、限定はしないが、経口経路及び非経口経路を含む様々な全身経路、例えば、静脈内経路、皮下経路、腹腔内経路、及び筋肉内経路、並びに、吸入送達、経皮送達、及び局所送達が含まれる。適切な経路は、処置下にある対象の状態に応じて、当業者によって決定され得る。

【０２５０】

コンジュゲートは、生理学的に及び/又は薬学的に許容可能な任意の都合の良いビヒクル中で投与することができる。このような組成物は、当業者によって利用される様々な標準的な薬学的に許容可能な担体のいずれかを含み得る。例としては、限定はしないが、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、水(例えば、注射用滅菌水)、水性エタノール、エマルジョン、例えば油/水エマルジョン又はトリグリセリドエマルジョン、錠剤、及びカプセルが含まれる。適切な生理学的に許容可能な担体の選択は、選択された投与態様に応じて変化する。

【０２５１】

本化合物(例えばコンジュゲート)は、一般に、遊離酸又は遊離塩基として利用することができる。或いは、本化合物は、酸付加塩又は塩基付加塩の形態で使用することができる。遊離アミノ化合物の酸付加塩は、当技術分野で周知の方法によって調製することができ、有機酸及び無機酸から形成することができる。適切な有機酸としては、マレイン酸、フマル酸、安息香酸、アスコルビン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、プロピオン酸、酒石酸、サリチル酸、クエン酸、グルコン酸、乳酸、マンデル酸、ケイ皮酸、アスパラギン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、グリコール酸、グルタミン酸、及びベンゼンスルホン酸が含まれる。適切な無機酸としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、及び硝酸が含まれる。塩基付加塩としては、カルボン酸陰イオンと形成される塩基付加塩が含まれ、また、有機陽イオン及び無機陽イオン、例えばアルカリ金属及びアルカリ土類金属から選択されるもの(例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、バリウム、及びカルシウム)、並びにアンモニウムイオン及びこれらの置換された誘導体(例えば、ジベンジルアンモニウム、ベンジルアンモニウム、2-ヒドロキシエチルアンモニウム、及びこれらに類するもの)と形成される塩が含まれる。したがって、式(I)及び式(II)の「薬学的に許容可能な塩」という用語は、任意の及び全ての許容可能な塩形態を包含するものである。

【０２５２】

加えて、プロドラッグもまた、本発明の文脈内で含まれる。プロドラッグは、このようなプロドラッグが患者に投与された場合に、インビボで式(I)又は式(II)の化合物を放出する、任意の共有結合した担体である。プロドラッグは一般に、官能基を修飾することによって調製されるが、修飾は、当該修飾が通常の操作によって又はインビボで切断されて、親化合物を生じさせるような様式のものである。プロドラッグとしては、例えば、ヒドロキシ基、アミン基、又はスルフヒドリル基が任意の基に結合しており、当該任意の基が、患者に投与されると切断されて、ヒドロキシ基、アミン基、又はスルフヒドリル基を形成する、本発明の化合物が含まれる。したがって、プロドラッグの代表的な例としては(

限定はしないが)、式(I)及び式(II)の化合物のアルコール官能基及びアミン官能基のアセテート誘導体、ホルメート誘導体、及びベンゾエート誘導体が含まれる。更に、カルボン酸(-COOH)のケースでは、エステル、例えば、メチルエステル、エチルエステル、及びこれらに類するものが利用され得る。

【０２５３】

VII.処置の方法

本明細書では、神経筋疾患を処置する方法が提供される。本方法は、それを必要とする患者に治療有効量の本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその医薬組成物を投与する工程を含む。一実施形態では、神経筋疾患は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

【０２５４】

ある特定の実施形態では、本方法は、インビトロでの方法である。ある特定の他の実施形態では、方法は、インビボでの方法である。

【０２５５】

ある特定の実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、非ヒト霊長類細胞である。ある特定の実施形態では、宿主細胞はヒト細胞である。

【０２５６】

ある特定の実施形態では、宿主細胞は、天然に生じる細胞である。ある特定の他の実施形態では、宿主細胞は、操作された細胞である。

【０２５７】

ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、適切な薬学的担体中で、哺乳動物対象、例えばヒト又は実験動物又は飼育動物に投与される。

【０２５８】

ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、追加の薬剤と共に、哺乳動物対象、例えばヒト又は実験動物又は飼育動物に投与される。コンジュゲート及び追加の薬剤は、同一の又は異なる投与経路及び/又は投与部位を介して、同時に又は連続的に投与することができる。ある特定の実施形態では、コンジュゲート及び追加の薬剤は、共製剤及び同時投与することができる。ある特定の実施形態では、コンジュゲート及び追加の薬剤は、キット内で共に提供することができる。

【０２５９】

一実施形態では、薬学的に許容可能な担体に含有されるコンジュゲートは、経口送達される。

【０２６０】

一実施形態では、薬学的に許容可能な担体に含有されるコンジュゲートは、静脈内(i.v.)送達される。

【０２６１】

更なる投与経路、例えば、皮下経路、腹腔内経路、及び肺経路もまた、本開示によって検討される。

【０２６２】

本方法の他の適用では、対象は、家畜動物、例えば、ブタ、ウシ、又はヤギ等であり、処置は、予防的又は治療的のいずれかである。また、食物を家畜に給餌する方法において、食物に有効量の上記のコンジュゲート組成物を添加する改善も検討される。

【０２６３】

一実施形態では、コンジュゲートは、少なくとも200nMのコンジュゲートというピーク血中濃度をもたらすために効果的な量及び様式で投与される。一実施形態では、コンジュゲートは、少なくとも200nMのコンジュゲートというピーク血漿中濃度をもたらすために効果的な量及び様式で投与される。一実施形態では、コンジュゲートは、少なくとも200nMのコンジュゲートというピーク血清中濃度をもたらすために効果的な量及び様式で投与される。

【０２６４】
一実施形態では、コンジュゲートは、少なくとも４００ｎＭのコンジュゲートというピーク血中濃度をもたらすために効果的な量及び様式で投与される。一実施形態では、コンジュゲートは、少なくとも４００ｎＭのコンジュゲートというピーク血漿中濃度をもたらすために効果的な量及び様式で投与される。一実施形態では、コンジュゲートは、少なくとも４００ｎＭのコンジュゲートというピーク血清中濃度をもたらすために効果的な量及び様式で投与される。
【０２６５】
典型的には、１用量又は複数用量のコンジュゲートが、一般には一定の間隔で、約１週間から２週間にわたり投与される。経口投与のための好ましい用量は、体重１ｋｇ当たり約０.０１～１５ｍｇのコンジュゲートである。一部のケースでは、１ｋｇ当たり１５ｍｇを超えるコンジュゲート用量が必要であり得る。ｉ.ｖ.投与では、好ましい用量は、体重１ｋｇ当たり約０.００５ｍｇから１５ｍｇのコンジュゲートである。コンジュゲートは、一定の間隔で短期間、例えば、１日に１回で２週間以下、投与され得る。しかし、一部のケースでは、コンジュゲートは、より長い期間にわたり断続的に投与される。投与は、その後に抗生物質若しくは他の治療的処置の投与が行われてもよいし、又は抗生物質若しくは他の治療的処置の投与を伴ってもよい。処置レジメンは、処置下にある対象のイムノアッセイ、他の生化学的試験、及び生理学的検査の結果に基づいて、示されているように調整することができる(用量、頻度、経路等)。
【０２６６】
コンジュゲートを使用する効果的なインビボ処置レジメンは、期間、用量、頻度、及び投与経路、並びに処置下にある対象の状態に従って変化し得る(すなわち、予防的投与と、局所感染又は全身感染を受けての投与)。したがって、このようなインビボ療法は、最適な治療結果を達成するために、処置下での試験によるモニタリング、及び用量又は処置レジメンの対応する調整が必要となることが多い。
【０２６７】
一部の実施形態では、コンジュゲートは、哺乳動物細胞によって積極的に取り込まれる。更なる実施形態では、コンジュゲートは、このような取り込みを促進するために、本明細書で記載される輸送部分(例えば、輸送ペプチド)にコンジュゲートしていてよい。
【０２６８】
一部の実施形態では、本願のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、コンジュゲートしていないオリゴマーと比較して約２０％低い腎臓蓄積を有する。更なる実施形態では、本願のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、コンジュゲートしていないオリゴマーと比較して、筋肉細胞における約５倍の濃度増大を有する。更なる実施形態では、本願のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、コンジュゲートしていないオリゴマーと比較して、筋肉細胞における約５０倍の濃度増大を有する。
【０２６９】
ＶＩＩＩ.ペプチドを同定する方法
本明細書では、ペプチド又はペプチドにコンジュゲートしたホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー(ＰＰＭＯ)を細胞に送達し得るペプチドを同定する方法が提供される。特に、本明細書では、高分子カーゴをサイトゾルに送達し得るペプチドを同定するための方法が提供される。
【０２７０】
本方法は、
(ａ)ペプチド又はペプチドにコンジュゲートしたホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー(ＰＰＭＯ)で細胞を処置する工程、
(ｂ)消化酵素で細胞を処置する工程、
(ｃ)全細胞抽出のために細胞を溶解して全細胞溶解物を形成するか、又はサイトゾル抽出のために細胞を溶解してサイトゾル画分を形成する工程、及び
(ｄ)全細胞溶解物又はサイトゾル画分を質量分析で分析して、ペプチドを同定する工程

を含む。

【０２７１】

一実施形態では、本方法は、細胞を洗浄する工程を更に含む。別の実施形態では、細胞は、PBS、TRIS、又はHEpesで洗浄される。更に別の実施形態では、細胞はPBSで洗浄される。

【０２７２】

一実施形態では、本方法は、サイトゾルマーカー(Erk 1/2)又は後期エンドソームマーカー(Rab5)の存在についてウェスタンブロットを介して全細胞溶解物又はサイトゾル画分を分析する工程を更に含む。更なる実施形態では、サイトゾル画分のウェスタンブロットでRab5が不存在であることは、エンドソームの排除を示す。

【０２７３】

一実施形態では、消化酵素は、キモトリプシン又はトリプシンである。別の実施形態では、消化酵素はトリプシンである。

【０２７４】

一実施形態では、本方法は、全細胞をRIPAバッファーで溶解する工程を含む。別の実施形態では、本方法は、サイトゾルをジギトニンバッファーで溶解する工程を含む。

【０２７５】

一実施形態では、本方法は、電子移動解離(ETD)、高エネルギーETD、及び高エネルギー衝突解離(HCD)からなる陽イオン性ペプチドに最適化された混合型フラグメンテーション方法を用いた質量分析でペプチド配列を分析する工程を含む。

【０２７６】

一実施形態では、細胞は、HeLa細胞、C2C12マウス筋芽細胞、又はCHOK1細胞である。別の実施形態では、細胞は、HeLa細胞又はC2C12マウス筋芽細胞である。

【０２７７】

一実施形態では、ペプチドは、非天然アミノ酸又はD-アミノ酸から選択される4から15のアミノ酸を含む。別の実施形態では、ペプチドは、KWKK、KKWK、KWWKK、WWKK、WKK、KKKK、又はKKモチーフを有するC末端配列を更に含む。更に別の実施形態では、ペプチドは、KWKKモチーフを有するC末端配列を更に含む。更に別の実施形態では、ペプチドは、(d-K)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-W)(d-K)、(d-K)(d-W)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-W)(d-W)(d-K)(d-K)、(d-W)(d-K)(d-K)、(d-K)(d-K)(d-K)(d-K)、又は(d-K)(d-K)モチーフを有するC末端配列を更に含む。

【０２７８】

一実施形態では、非天然アミノ酸は、Abu(γ-アミノ酪酸)、B(β-アラニン)、Hle(ホモロイシン)、Nle(ノルロイシン)、Nap(ナフチルアラニン)、Dpa(ジフェニルアラニン)、Dab(ジアミノ酪酸)、Pip(アミノピペリジン-カルボン酸)、Amf(アミノメチルフェニルアラニン)、及びGba(2-アミノ-4-グアニジノブタン酸)から選択される。

【０２７９】

一実施形態では、細胞の処置は、ペプチドライブラリー又はPPMOライブラリーで細胞を処置する工程を含む。

【０２８０】

更に、本明細書では、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー(PMO)を細胞に送達し得るペプチドを同定する方法が提供される。本方法は、

a)PPMOライブラリー又はペプチドライブラリーで細胞を処置する工程、

b)PBS及びヘパリンで細胞を洗浄する工程、

c)RIPA(全細胞抽出物)又はジギトニン(サイトゾル抽出物)で細胞を溶解する工程、

d)全細胞抽出物又はジギトニン抽出物を磁気ストレプトアビジンビーズとインキュベートする工程、

e)酸化条件下でペプチドをストレプトアビジンビーズから切断する工程、

f)固相抽出を介してペプチドを脱塩して、PPMOライブラリー画分又はペプチドライブラリー画分を得る工程、

g)nLC-MS/MSによってペプチドをシーケンシングする工程、及び
h)細胞のみのコントロール又はペプチドライブラリー画分で見られたペプチドとオーバーラップしない、PPMOライブラリー画分でのみ見られたペプチド配列を同定する工程
を含む。

【０２８１】

参照による組み込み

本明細書で記載される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、それぞれの個々の刊行物、特許、又は特許出願が参照によって組み込まれることが具体的且つ個別に示されているのと同様に、参照によって本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【０２８２】

本開示のある特定の具体的な実施形態を説明する目的で、及びこれを記載するために、実施例を以下に示す。しかし、特許請求の範囲は、本明細書で示す実施例によっては決して限定されない。開示されている実施形態に対する様々な変更及び修正は当業者に自明であり、限定はしないが本開示の化学構造、置換基、誘導体、製剤、又は方法に関するものを含む、このような変更及び修正は、本開示の趣旨及び添付の特許請求の範囲から逸脱することなく行うことができる。本明細書のスキームの構造における変数の定義は、本明細書で示される式における対応する位置の定義に見合ったものである。

【０２８３】

(実施例1)

ペプチドの調製及び精製のための全般的方法

構築物を合成するために、自動ファストフローペプチド合成を介してLペプチドを合成し、半自動ファストフローペプチド合成を使用してDペプチドを合成した。アジド-リジン部分及びビオチン部分をペプチドのN末端に手動で付加し、ペプチドを同時に切断し、脱保護し、その後、RP-HPLCを介して精製した。

【０２８４】

ファストフローペプチド合成:L-ペプチドでは自動ファストフローペプチド合成装置を、D-ペプチドでは半自動ファストフローペプチド合成装置を使用して、ペプチドを0.1mmolのスケールで合成した。以前に報告されているような自動合成条件を使用した。簡潔に述べると、100mg部のChemMatrix Rink Amide HYR樹脂を、90℃で維持したリアクターにロードした。全ての試薬は、HPLCポンプを用いて、90℃で維持したステンレス鋼のループを通して40mL/分で流し、その後、リアクター内に導入した。各カップリングで、DMF中の0.4Mのアミノ酸及び0.38MのHATUを含有する溶液10mLを、600μLのジイソプロピルエチルアミンと混合し、リアクターに送った。20%(v/v)ピペリジン10.4mLを使用してFmoc除去を行った。各工程の間で、DMF(15mL)を使用してリアクターを洗浄した。非天然アミノ酸をカップリングするため、又はペプチドをキャッピングするため(例えば、4-ペンチン酸で)に、樹脂を、DMF中の0.4MのHATU 2.5mLに溶解したアミノ酸(1mmol)及び500μLのジイソプロピルエチルアミンと、室温で30分間インキュベートした。合成が完了した後、樹脂をジクロロメタンで3回洗浄し、真空下で乾燥させた。

【０２８５】

半自動合成を以前に記載されているように行った(Simon, M. D.、Heider, P. L.、Adamo, A.、Vinogradov, A. A.、Mong, S. K.、Li, X.、Berger, T.、Policarpo, R. L.、Zhang, C.、Zou, Y.、Liao, X.、Spokoyny, A. M.、Jensen, K. F.、Pentelute, B. L.、2014、15 (5)、713～720)。1mmolのアミノ酸を0.4MのHATU 2.5mL及び500μLのDIEAと組み合わせ、混合し、その後、樹脂を含有するリアクターに、シリンジポンプを介して6mL/分で送った。リアクターを、70℃に加熱したウォーターバスに沈めた。HPLCポンプで、洗浄ではDMF(20mL)を、又はFmoc脱保護では20%ピペリジン/DMF(6.7mL)を、20mL/分で送った。

【０２８６】

ペプチド切断及び脱保護:各ペプチドに、5mLの94%のトリフルオロ酢酸(TFA)、2.5%のチオアニソール、2.5%の水、及び1%のトリイソプロピルシラン(TIPS)(v/v)での、室温で2から4時間の処置によって、全体的な側鎖の脱保護及び樹脂からの切断を同時に行った。混合物にN_2を通気することによって、切断カクテルをまず濃縮し、切断されたペプチドを沈殿させ、40mLの冷たいエーテル(ドライアイスで冷やした)で粉砕した。粗生成物を、4000rpmで3分間の遠心分離によってペレット化し、エーテルをデカンテーションした。この洗浄工程を更に2回繰り返した。3回目の洗浄の後、ペレットを、0.1%TFAを含有する50%の水及び50%のアセトニトリルに溶解し、フリットシリンジを通して濾過して樹脂を除去し、凍結乾燥した。

【0287】

ペプチド精製:ペプチドを、0.1%TFAを含有する水及びアセトニトリルに溶解し、0.22μmのナイロンフィルターを通して濾過し、そして質量分析セミ分取逆相HPLCによって精製した。溶媒Aは0.1%のTFAが添加された水であり、溶媒Bは0.1%のTFAが添加されたアセトニトリルであった。0.5%B/分という速度で変化する線形勾配を使用した。ペプチドのほとんどを、Agilent社のZorbax SB C18カラム:9.4×250mm、5μmで精製した。機器からの各画分についての質量データを使用して、純粋な画分のみをプールし、凍結乾燥した。画分プールの純度を、LC-MSによって確認した。

【0288】

(実施例2)

ペプチドのコンジュゲーション

PMOをジベンゾシクロオクチン(DBCO)部分で修飾し、精製し、その後、アジドペプチドに結び付けた。PMO IVS-654(50mg、8μmol)を150μLのDMSOに溶解した。この溶液に、40μLのDMF中のHBTU(DMF中で0.4MのHBTUを37.5μL、15μmol)及びDIEA(2.8μL、16μmol)で活性化した2当量のジベンゾシクロオクチン酸(5.3mg、16μmol)を含有する溶液を添加した(最終反応容積=0.23mL)。反応を25分間進行させ、その後、1mLの水及び2mLの水酸化アンモニウムでクエンチした。水酸化アンモニウムは、反応の過程で形成された全てのエステルを加水分解した。1時間後、溶液を水/アセトニトリル中で40mLまで希釈し、逆相HPLC(Agilent社のZorbax SB C3カラム:21.2×100mm、5μm)、及び58分間で2から60%のB(溶媒A:水、溶媒B:アセトニトリル)(1%B/分)という線形勾配を使用して、精製した。機器からの各画分についての質量データを使用して、純粋な画分のみをプールし、凍結乾燥した。画分プールの純度を、LC-MSによって確認した。

【0289】

ペプチドへのコンジュゲーション:PMO-DBCO(1eq、5mM、水)を室温で2時間、アジドペプチド(1.5eq、5mM、水)にコンジュゲートした。反応の進行を液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)によってモニタリングし、PMO-DBCOが消費されたら精製した。精製は、Agilent社のZorbax SB C13カラム:9.4×250mm、5μmで、0.5%B/分という速度で変化する線形勾配を用いて、質量分析HPLC(溶媒A:水中の100mMの酢酸アンモニウム、溶媒B:アセトニトリル)を使用して行った。機器からの各画分についての質量データを使用して、純粋な画分のみをプールし、凍結乾燥した。画分プールの純度を、LC-MSによって確認した。

【0290】

(実施例3)

増強型緑色蛍光タンパク質アッセイ

精製された構築物を次いで、核送達が蛍光を生じさせる、活性ベースの読み出しを使用して試験した。簡潔に述べると、β-グロビン(IVS2-654)の変異型イントロンが介在する増強型緑色蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を安定的にトランスフェクトされたHeLa細胞は、非蛍光EGFPタンパク質を生じさせる。PMO IVS2-654が核にうまく送達されると、正しいスプライシング及びEGFP合成が生じる。

【0291】

核に送達されるPMOの量は、したがって、フローサイトメトリーによって定量されるEGFP蛍光と相関する。活性は、PMO単独と比較した平均蛍光強度(MFI)として報告される。この活性アッセイは、どの程度の量の活性なPMOが核に送達されるかについての間接的な情報を提供する。PMO-CPPの相対効率は、後に論じるように(図2)、活性を内部濃度と比較することによって特徴付けされ得る。

【０２９２】

ノースカロライナ大学の組織培養コア施設から入手したHeLa 654細胞を、10%(v/v)ウシ胎児血清(FBS)及び1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したMEM中で、37℃及び5%CO2で維持した。処置の18時間前に、細胞を、10%FBS及び1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したMEM中で、96ウェルプレートにウェル当たり5000細胞の密度で播種した。

【０２９３】

個々のペプチドの試験では、PMO-ペプチドを、Ca2+もMg2+も含有しないPBSに1mMの濃度(UVによって決定される)で溶解し、その後、MEM中で希釈した。細胞を、示された濃度で、37℃及び5%CO2で22時間インキュベートした。次に、処置培地を除去し、細胞を1回洗浄し、その後、0.25%トリプシン-EDTAで、37℃及び5%CO2で15分間インキュベートした。浮かんでいる細胞をV底の96ウェルプレートに移し、PBSで1回洗浄し、その後、2%FBS及び2μg/mLのヨウ化プロピジウム(PI)を含有するPBS中に再懸濁した。フローサイトメトリー分析を、Koch Institute社で、BD LSRIIフローサイトメーターで行った。ゲートをデータに適用して、ヨウ化プロピジウムが陽性であった細胞、又は主要な細胞集団と十分に異なる前方/側方散乱の読み出しを有していた細胞を確実に排除した。各試料を、5000のゲートされたイベントでキャップした。

【０２９４】

分析を、Graphpad Prism 7及びFlowJoを使用して行った。各試料について、平均蛍光強度(MFI)及びゲートされた細胞の数を測定した。活性を報告するために、3つのMFI値を平均し、PMO単独の条件に対して正規化した。

【０２９５】

(実施例4)

エンドサイトーシス阻害アッセイ

化学的エンドサイトーシス阻害剤を使用して、パルスチェイスフォーマットでのこれらのペプチドによるPMOの送達のメカニズムを調べた。このような分析は、類似のPMO-ペプチド構築物で以前に行われており、同等の結果が示されている(Fadzen, C. M.、Holden, R. L.、Wolfe, J. M.、Choo, Z.-N.、Schissel, C. K.、Yao, M.、Hanson, G. J.、Pentelute, B. L.、Biochemistry、2019)。PMO構築物では、HeLa 654細胞を様々な化学的阻害剤と30分間プレインキュベートし、その後、PMO-CPP構築物で3時間処置した。パネルは、クラスリン介在性のエンドサイトーシスに干渉することが示されているクロルプロマジン(CPZ)、食作用及び微飲作用を阻害するサイトカラシンD(CyD)、ホスファチジルイノシトールキナーゼを阻害することによって様々なエンドサイトーシス経路を改変するワートマニン(Wrt)、微飲作用を阻害するEIPA(5-(N-エチル-N-イソプロピル)アミロライド)、及び同様にクラスリン介在性のエンドサイトーシスを阻害するダイナソア(Dyn)を含む、エンドサイトーシス阻害剤のパネルを含んでいた(Kjeken, R.、Mousavi, S. A.、Brech, A.、Griffiths, G.、Berg, T.、Biochem. J.、2001、357 (第2部)、497～503;Dutta, D.、Donaldson, J. G.、Cell. Logist.、2012、2 (4)、203～208)。処置培地を次いで、新鮮な培地で置き換え、細胞を37℃及び5%CO_2で22時間インキュベートした。細胞を次いで、以前に記載されているように浮かばせ、EGFP合成をフローサイトメトリーによって測定した。

【０２９６】

(実施例5)

乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)放出アッセイ

細胞傷害性アッセイを、HeLa 654細胞で行った。フローサイトメトリーのための処

置の後の細胞上清を、新たな96ウェルプレートに移し、LDH放出の分析を行った。上清を含有する96ウェルプレートの各ウェルに、CytoTox 96試薬(Promega社)を添加した。プレートを光から遮り、室温で30分間インキュベートした。等容積の停止溶液を各ウェルに添加し、混合し、そして各ウェルの吸光度を490nmで測定した。ブランク測定値を各測定値から差し引き、LDH放出の%を、細胞傷害性%=100×実験LDH放出(OD490)/最大LDH放出(OD490)として計算した。

【０２９７】

(実施例6)

血清安定性アッセイ

各PMO-ペプチドを1mMの濃度までPBS中に溶解し、濃度はUV-Visによって確認した。PMO-ペプチドを次いで、PBS溶液、又は25%ヒト血清を含有するPBS溶液に50μMの最終濃度まで添加し、37℃でインキュベートした。10μLのアリコートを様々な時点(t=0、1時間、6時間、24時間)で取り出し、20μLの1Mのグアニジン塩酸塩及び50mMのEDTAでクエンチした。50μLの氷冷したアセトニトリルを次いで添加し、アリコートを瞬間冷凍してLCMS分析まで置いた。試料を解凍し、水性層の部分を希釈し、その後、LC-qTOFによって分析した。分析物がインタクトなままであったか又は分解されたかを最も良く示すために、PMO-ペプチドの質量スペクトルをデコンボリューションによって分析した。

【０２９８】

(実施例7)

取り込みアッセイ

細胞の処置:細胞を、これらが翌日に80%のコンフルエンシーに達するような密度で、6ウェルプレート又は12ウェルプレートに播種した。CPP又はPMO-CPPストック溶液を新たに作製して、陽イオンフリーのPBS中で1mMとし、濃度はUV-Visによって決定した。次いで、記載されている濃度でストック溶液を細胞培地に添加することによって、処置溶液を調製した。2つのウェルはコントロールとして未処置のままとした。プレートを次いで、37℃及び5%CO_2で、示された時間にわたりインキュベートした。エネルギーに依存する取り込みを止める実験のために、プレートを4℃でインキュベートした。インキュベーションの後、細胞を培地で3回洗浄し、その後、PBS中で0.1mg/mLのヘパリンで5分間洗浄した。上清を吸引し、トリプシン-EDTA中で、37℃で10分間インキュベートすることによって、細胞を浮かばせた。細胞培地を添加することによってトリプシンをクエンチし、細胞をエッペンドルフチューブに移し、500rcfで3分間ペレット化した。PBSと混合することによってペレットを洗浄し、2回繰り返した。

【０２９９】

溶解:全細胞溶解物を得るために、50μLのRIPA(1×RIPA、プロテアーゼ阻害剤カクテル、水)を細胞ペレットに添加し、穏やかに混合し、そして氷上に1時間置いた。サイトゾルを抽出するために、50μLのジギトニンバッファー(0.05mg/mLのジギトニン、250mMのショ糖、PBS)を細胞ペレットに添加し、非常に穏やかに混合し、そして氷上に10分間置いた。試料を次いで、16000rcfで5分間遠心分離することによってペレット化した。上清を新たなエッペンドルフチューブに移し、氷上で維持した。抽出されたタンパク質を、Pierce Rapid Gold BCAタンパク質アッセイキット(Thermo Fisher社)を使用して定量した。各試料の10μgのタンパク質を次いで、SDS-PAGEゲルによって165Vで35分間分析し、次いで、TransBlot Turbo Semi-Dry Transfer Unit(Bio Rad社)を使用して、7分間、48mMのTris、39mMのグリシン、0.0375%のSDS、20%のメタノールに浸したニトロセルロース膜に移した。膜を、LI-Cor Odysseyブロックバッファー(PBS)中で、4℃で一晩ブロックした。膜を次いで、TBST中の抗Erk1/2及び抗Rab5で、室温1時間、免疫染色した。インキュベーションの後、膜をTBSTで3回洗浄し、TBST中の適切な二次抗体で、室温で1時間インキュベートし、次いでTBSTで洗浄した。最後に、膜をストレプトアビジン-HRPで1時間インキュベートし、TBSTで洗浄した。HRPを可視化するために、膜をSuperSignal West Pico PLUS化学発光基質

(Thermo Fisher社)で処置し、その直後に、ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad社)でイメージングした。

【０３００】

MALDI-TOF:残りの細胞抽出物を次いで、適合されたプロトコールに従って、アフィニティーキャプチャー及びMALDI-TOF分析に使用した[6]。１０μＬのDynabeads(商標)MyOne(商標)ストレプトアビジンT1(Thermo Fisher社)をマグネットスタンド内の試験管に移し、PBSで洗浄した。細胞抽出物を、対応するビーズ含有試験管に添加し、4℃で一晩回転させた。1つの試験管は、実験で使用された等モルのペプチドコンジュゲート溶液に添加されたビーズを含有していた。実験で使用されるコントロール用試験管に同一の当量が存在することを確実にするために、このコントロール溶液は、最初の細胞処置で使用した組み合わせストック溶液から直接得た。翌日、ビーズのスラリーを、一連のバッファー:２×１００μＬのバッファーA(５０mMのTris-HCl(pH7.4)及び0.1mg/mLのBSA)、２×１００μＬのバッファーB(５０mMのTris-HCl(pH7.4)、0.1mg/mLのBSA、及び0.1%のSDS)、２×１００μＬのバッファーC(５０mMのTris-HCl(pH7.4)、0.1mg/mLのBSA、及び1MのNaCl)、及び２×１００μＬの水で洗浄した。ビーズを次いで、1mMのビオチン１００μＬで2分間インキュベートし、その後、５×５０μＬの水で洗浄した。上清を除去し、ビーズを３μＬのMALDIマトリックス(飽和アルファ-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、CHCA)中に入れ、MALDIプレートに移して乾燥させた。ビーズを高解像度のBruker Autoflex LRF Speed質量分析計で、MALDI-ToFによってリニアポジティブモードで分析した。

【０３０１】

混合物中のペプチドの相対濃度を以下のように決定した。混合物中の分析物は、応答係数(F)に従ってイオン化する。Fは、各分析物の強度をコントロール試料中の一分析物に対して正規化することによって決定し、各分析物の濃度は任意に1に設定されている。Fの値を次いで、同一の分析物混合物を含有する実験スペクトルで使用して、分析物の相対濃度を決定した。

【０３０２】

【数１】

$$\frac{I_x}{[X]} = F\left(\frac{I_s}{[S]}\right)$$

【０３０３】

D-ペプチドのタンパク質分解安定性によって、細胞に内在化した後のインタクトな構築物の混合物の回収が可能である。MALDI-ToFは、細胞内部から回収されたL-ペプチドの量を分析するためにこれまで使用されているが、これは、薬物-ペプチドコンジュゲート、D-ペプチド、又は一度に4つ以上のコンジュゲートの混合物をプロファイリングするために使用されたことはない。D-ペプチドの使用は分析対象のコンジュゲートの混合を可能にし、それは、分解が起こらずに親ピークのみが観察されるためである。更に、このプラットフォームは、細胞画分から回収されたペプチドの研究に使用されたことはない。一連の実験を通して、結果は、インタクトなPMO-D-CPPの混合物を細胞のサイトゾルから回収することができ、MALDI-ToFによって分析して、同位体標識又は標準曲線を必要とせずにそれらの相対量を推定することができることを示している(図4A)。

【０３０４】

最初の工程は、Arg残基が多いほどより多くの取り込みが生じるという、既知の、実験に基づいた傾向を再現することであった。トリプシン切断可能リンカー(本明細書ではKと記載されるGGKGG)及び1つのビオチン標識を有する4つのポリアルギニンペプチドからなる単純なモデル系を使用した。ビオチン-K-D-Arg_4、D-Arg_6、D-Arg_8、及びD-Arg_{10}を、HeLa細胞と1時間インキュベートした。細胞を次いで、PBS及びヘパリンで十

分に洗浄し、トリプシン処置し、そして全細胞溶解物を抽出した。完全にインタクトなビオチン化されたペプチドを磁気ストレプトアビジンダイナビーズでキャプチャーし、洗浄し、そしてMALDI分析のために直接播種した。また、UV-Visによって決定された等モルの同一構築物の混合物中でインキュベートしたダイナビーズも播種した(図4B)。

【０３０５】

ビーズ上のペプチドの相対濃度は、分析物の応答係数(F)を等モルの標準から決定することによって推定することができる(図4C)。標準では、各分析物の濃度は1mMに等しく、各分析物の応答係数(F)は、それらの強度を内部コントロール(S)に対して正規化することによって決定される。ここで、BKr_6を任意の標準として選択し、この場合、F=1であった。各分析物の応答係数は、同一の分析物を含有する試料全てで一定なままでなければならず(Duncan, M. W.、Practical Quantitative Biomedical Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry;Ho, H.-P.、Rathod, P.、Louis, M.、Tada, C. K.、Rahaman, S.、Mark, K. J.、Leng, J.、Dana, D.、Kumar, S.、Lichterfeld, M.、Chang, E. J.、Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM 2014、28 (24)、2681～2689)、実験試料中の濃度の倍率変化を計算するために使用された。「内部標準」BKr_6に対して正規化された、分析物の相対濃度[X]が、棒グラフで示されている(図4C)。Arg残基が多いほど、構築物の濃度が明らかに増大しており、BKr_{10}はBKr_6よりも40倍大きな濃度を有している。Arg残基の数が多いほどより多くの取り込みが生じるというこの傾向は、文献で既に良く説明されている(Brock, R.、Bioconjug. Chem. 2014、25 (5)、863～868;Fuchs, S. M.、Protein Sci.、2005、14 (6)、1538～1544)。

【０３０６】

この研究は、直交性の手段によって、PMO-ペプチドコンジュゲートがエネルギー依存性の取り込みを介して進入したこと、及び外膜に結合したコンジュゲートが溶解物試料を汚染しないことを裏付けた。まず、EGFPアッセイは、PMO-D-DPV7及びPMO-L-DPV7の両方で、低温でのインキュベーションがPMO送達に負の影響を与えることを判定した。そこで、HeLa細胞を3つのPMO-D-CPPと37℃又は4℃でインキュベートし、その後、前と同様に洗浄及び溶解を行った。ウェスタンブロットによる分析は、両全細胞溶解物中でのサイトゾルマーカー及びエンドソームマーカーの両方の存在を示しているが、ストレプトアビジン標識によって、4℃の条件下でのビオチン化された構築物の顕著な不存在も示している。MALDI-TOFによるこれらの試料の分析はまた、37℃と比較して4℃の条件下でシグナルが有意に低減し、PMO-D-DPV7のみが低温で検出されていることを示している。同時に、4℃のサイトゾル条件では構築物は検出されなかった。等モル条件から得られた、構築物の応答係数(F)を使用することによって、3つの構築物は非常に類似した濃度を有していたにもかかわらず、PMO-D-DPV7が最も高い相対細胞内濃度を有していたことが明らかとなった。

【０３０７】

(実施例8)

補足的な取り込みデータ(ウェスタンブロット)

直交性の手段によって、PMO-ペプチドコンジュゲートがエネルギー依存性の取り込みを介して進入したこと、及び外膜に結合したコンジュゲートが溶解物試料を汚染しないことが確認された。まず、EGFPアッセイは、PMO-D-DPV7及びPMO-L-DPV7の両方で、低温でのインキュベーションがPMO送達に負の影響を与えることを判定した。そこで、HeLa細胞を3つのPMO-D-CPPと37℃又は4℃でインキュベートし、その後、前と同様に洗浄及び溶解を行った。ウェスタンブロットによる分析は、両全細胞溶解物中でのサイトゾルマーカー及びエンドソームマーカーの両方の存在を示しているが、ストレプトアビジン標識によって、4℃の条件下でのビオチン化された構築物の顕著な不存在も示している。MALDI-TOFによるこれらの試料の分析はまた、37℃と比較して4℃の条件下でシグナルが有意に低減し、PMO-D-DPV7のみが低温で検出されていることを示している。同時に、4℃のサイトゾル条件では構築物は検出されなかった。等モル条件で得られた

、構築物の応答係数(F)を使用することによって、3つの構築物は非常に類似した濃度を有していたにもかかわらず、PMO-D-DPV7が最も高い相対細胞内濃度を有していたことが明らかとなった。

【０３０８】

興味深いことに、低温は、オリゴヌクレオチドカーゴを有さないビオチン化されたCPPの取り込みを阻害せず、むしろ、全細胞画分及びサイトゾル画分の相対濃度を等しくした。PMO-D-CPPでの実験と同様の様式で、ビオチン-D-DPV7、TATp、及びDPV6を、HeLa細胞中で、37℃及び4℃でインキュベートした。サイトゾル及び全細胞溶解物を抽出し、ウェスタンブロットによって確認した。試料を次いでMALDIによって分析し、相対濃度を決定し、TATpに対して正規化した。37℃で、決定された相対計算値は、全細胞試料とサイトゾル試料との間で変化している。DPV7は、サイトゾル中で最大濃度を有すると思われる。しかし、低温では、相対濃度は溶解物の間でほぼ同一である。これらの実験は、この方法が、相対内部濃度を決定することに加えて、取り込みのメカニズムを調べるために有用であることを示している。

【０３０９】

(実施例9)

用量応答研究

D型及びL型の配列を用いた用量応答研究は、鏡像CPPの間で活性が類似していることを裏付けた。L型及びD型の8つの配列を単一濃度(5μM)で試験した最初の概念実証実験の結果、鏡像ペプチドの活性の間に有意差はなかった(図1B)。これらの構築物をEGFP 654アッセイにおいて様々な濃度で試験し、結果は、鏡像ペプチドがほぼ同一のPMO送達活性を有していることを更に示唆した(図3A及び実施例4)。

【０３１０】

更に、これらのアッセイで得られた上清を、膜毒性の指標である乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)放出について試験し、構築物が試験した用量で膜毒性を引き起こさないことが確認された(実施例5)。

【０３１１】

D-ペプチドは、両型のPMO-CPPを25%ヒト血清中でインキュベートした時間経過研究によって示されるように、分解に対して安定である。研究対象のPMO-D-CPPは24時間後にインタクトなままであったが、L型は複数の断片に迅速に分解され、インキュベーションのわずか1時間後には、親構築物は微量の生成物であった(図3B)。この観察は、L-ペプチドが、生物学的設定からの回収後の質量分析を使用する調査には不適切であるという考えを更に進めるものである。しかし、D-ペプチドコンジュゲートは、分解されることなく血清等の生物学的環境から回収され得、質量分析を介するそれらの特徴付けを可能にしている。

【０３１２】

(実施例10)

サイトゾルの抽出及びCPP送達効率の評価

化学的エンドサイトーシス阻害剤のパネルを使用してCPP送達効率を評価するために、細胞を阻害剤とプレインキュベートし、その後、L型及びD型のPMO-DPV7及びPMO-Bac7で処置する、パルスチェイスEGFP 654アッセイフォーマットを行った(実施例5)。フローサイトメトリーによる分析は、クロルプロマジンが用量依存性の様式で活性を低減させたことを明らかにした(図5A)。クロルプロマジンは、クラスリン介在性のエンドサイトーシスの阻害剤であり、類似のPMO構築物の活性を阻害することが以前に明らかにされている。複数の取り込みメカニズムが生じる可能性があるが、これらのPMO-CPPコンジュゲートは、活性な輸送によって取り込まれる可能性が高い。

【０３１３】

PMO-CPPがエンドサイトーシスを介して進入するとなると、サイトゾルの抽出及び全細胞溶解物との比較は、細胞に内在化した構築物の相対濃度を評価する際に重要である。エンドサイトーシスされた化合物の全てがエンドソームを脱出することができるわけでは

なく、また、全細胞溶解物と比較してサイトゾルの濃度が低いことによって測定されるように、エンドソームによる閉じ込めによって、あまり活性ではないPMOがサイトゾルに送達される。そこで、ビオチン化されたPMO-CPPを、内在化の後にサイトゾル及び全細胞溶解物から抽出し、これらをウェスタンブロット及びMALDIによって検出した。個別に、5μMのPMO-D-R_8又はPMO-D-BpepをHeLa細胞と12ウェルプレート内で1時間インキュベートし、その後、洗浄及びトリプシンでの消化を行った。サイトゾルを、外膜を選択的に透過処理するジギトニンバッファーを使用して抽出した。RIPAバッファーを使用して、全細胞溶解物を調製した。サイトゾル抽出を確認するために、各試料の一部を、サイトゾルマーカー(Erk 1/2)及び後期エンドソームマーカー(Rab5)を使用して、ウェスタンブロットを介して分析した。サイトゾル抽出物の試料はRab5が著しく低減していたが、全ての試料は、Erk 1/2を含有していた(図5B)。最後に、ビオチン化されたペプチドと同様に、PMO-CPPを次いで、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ダイナビーズを用いて試料から抽出し、十分に洗浄し、そしてMALDI-TOFを介して分析した。PMO-D-R_8及びPMO-D-Bpepがそれらのそれぞれの試料中で検出され、インタクトなペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートが細胞から抽出されたのはこれが初めてであり、そしてこれらを質量分析によって分析した(図5C～図5D)。更に、低温でのインキュベーションはPMO-D-CPPのサイトゾル局在化を阻害すると思われたが、ビオチン-D-CPPでは全細胞画分とサイトゾル画分との間で等しい相対濃度をもたらした(実施例7)。

【０３１４】

次に、試験対象の分析物を増やし、6つのビオチン-D-CPPの取り込みを、異なる細胞系のサイトゾルにおいてプロファイルした。ビオチン-D-R_8、TAT、Bpep、DPV7、TATp、及びDPV6を、HeLa細胞系(図6A)及びC2C12マウス筋芽細胞系(図6B)の両方において、MALDIによってプロファイルした。2つの細胞系の間で、異なる取り込みパターンが見られた。ポリアルギニンは、他のペプチドと比較してC2C12細胞で有意に豊富であり、DPV6及びDPV7は、サイトゾルでは検出されなかった。HeLaでは、ポリアルギニンはサイトゾル及び全細胞の両方で最も高い相対濃度を有しており、DPV7はここでも、サイトゾルでは検出されなかった。しかし、TAT、TATp、及びDPV6は全て、同様の相対サイトゾル濃度を有していた。これらの実験で、このプロファイリングプラットフォームが、2つの異なる細胞系の全細胞及びサイトゾルから抽出された6つのインタクトなペプチドの相対濃度を決定することができることが示されている。

【０３１５】

最後に、6つのPMO-D-CPPの取り込み。PMO-D-R_8、TAT、BPEP、DPV7、TATp、及びDPV6をHeLa細胞において通常通りプロファイルした。サイトゾルの抽出をウェスタンブロットによって確認し、試料をMALDIによって分析した。相対濃度をBPEPに対して正規化した。全細胞抽出物では、相対濃度は、ペプチド全てで全体的に一定であり、DPV6は1.5倍高い相対濃度を有していた。他方、サイトゾルにおける相対濃度はポリアルギニンペプチドR_8及びTATでより低く、BPEP及びDPV6で最も高かった(図7A)。サイトゾル及び全細胞溶解物における相対濃度を比較することによって、相対効率は、6つのCPPのうちのどれがPMOをサイトゾルに効果的に送達し得るかを決定するための効果的な計量方法を示している(図7B)。

【０３１６】

相対内部濃度をPMO送達活性と組み合わせることによって、相対送達効率を決定することができる。送達効率は、カーゴの活性及び内部濃度の両方を考慮するため、活性な治療用カーゴを送達するCPPを比較するための有用な計量方法となる。非常に効率的なペプチドは、高い活性と低い内部濃度を有し、したがって高い相対効率を有する。

【０３１７】

(実施例11)

ペプチドライブラリーの調製

ライブラリーを、「CPP様」のC末端配列と、D-アミノ酸及び非天然アミノ酸を有する

6つの可変位置とで調製した(図8A)。スプリット・アンド・プール合成では、冗長性が低い、理論上の多様性が108を超える、95000メンバーからなるライブラリーで、ビーズ当たり0.016μgのペプチドとなった。確立された細胞膜透過ペプチドであるペネトラチンに由来するKWKKモチーフを、C末端に組み込んだ。化学的多様性を増し、ライブラリーペプチドの細胞膜透過を潜在的に増強させるために、非天然アミノ酸を選択した。ライブラリーは、非α骨格(γ-アミノ酪酸及びβ-アラニン)を有する非天然残基、疎水性及び芳香族の官能性を有する8つの残基(ホモロイシン、ノルロイシン、ナフチルアラニン、及びジフェニルアラニン)、並びに追加の帯電した残基及びアルギニン類似体(ジアミノ酪酸、アミノピペリジン-カルボン酸、アミノメチルフェニルアラニン、及び2-アミノ-4-グアニジノブタン酸)を含んでいる(図8B)。酸化切断可能リンカーであるイソセラモックスを、可変領域の直後、トリプシン切断部位の前に、還元的アミノ化によって組み込んだ。最後に、PMOのコンジュゲーション及びアフィニティーキャプチャーをそれぞれ可能にするために、アジドリジン及びビオチンで配列のN末端をキャップした。樹脂から切断した後、ライブラリーの一部を、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)で誘導体化されたモデルPMOに、アジド-アルキン付加環化によってコンジュゲートし、LC-MSによってモニタリングした。Orbitrapナノ液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(nLC-MS/MS)によるライブラリーの品質管理分析は合成の成功を裏付け、組み込まれた残基の範囲を示した(図8C)。このライブラリー設計は、タンデム質量分析を介するシーケンシングに適した、ネイティブなN末端を有する10-merのペプチドの単離を確実にした。

【０３１８】

【表４Ａ】

Table 4. ペプチドライブラリー

配列番号	ペプチド配列	末端モチーフ (d-アミノ酸)
33	(Hle)(Pip)(d-Asp)(Nap)(d-Asp)(Dpa)	KWKK
34	(Dpa)(d-Phe)(d-Lys)(d-Phe)(d-Asn)(d-Thr)	KWKK
35	(Nap)(d-Nle)(Abu)(d-Pro)(d-Nle)(Amf)	KWKK
36	(Dpa)(d-Asn)(d-Thr)(d-Arg)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
37	(Nap)(d-Thr)(d-Phe)(d-Nle)(Gly)(d-Glu)	KWKK
38	(Dpa)(d-Phe)(d-Lys)(Nap)(d-Ser)(d-Asp)	KWKK
39	(Gly)(Dpa)(B)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
40	(d-Asp)(d-Thr)(B)(d-Nle)(Dpa)(Dpa)	KWKK
41	(Nap)(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
42	(Hle)(d-Phe)(Hle)(d-Asn)(d-Thr)(d-Gln)	KWKK
43	(d-Asn)(d-Nle)(Abu)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)	KWKK
44	(d-Asp)(Dpa)(Amf)(d-Asp)(Dpa)(d-Lys)	KWKK
45	(d-Ser)(Dab)(Nap)(d-Asp)(Dpa)(d-Gln)	KWKK
46	(d-Phe)(d-Ser)(Dpa)(Gly)(Hle)(d-Arg)	KWKK
47	(Gly)(Dpa)(d-Nle)(d-His)(Dpa)(Gly)	KWKK
48	(d-Ser)(d-Glu)(Dpa)(d-Thr)(Nap)(Gly)	KWKK
49	(Hle)(d-Thr)(d-Glu)(Hle)(Dpa)(d-Pro)	KWKK
50	(Gly)(d-Phe)(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(Dpa)	KWKK
51	(Nap)(Hle)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)(d-Glu)	KWKK
52	(Dpa)(Nap)(Hle)(d-Gln)(Pip)(d-Phe)	KWKK
53	(d-Pro)(d-Lys)(d-Nle)(d-Asp)(d-Phe)(d-Nle)	KWKK
54	(Hle)(Dab)(d-Phe)(d-Gln)(d-Arg)(Dpa)	KWKK
55	(Dpa)(Dpa)(d-Lys)(d-His)(Hle)(d-Thr)	KWKK
56	(d-Ser)(d-Asn)(Dpa)(d-Asp)(Dpa)(Pip)	KWKK
57	(d-Thr)(d-Asn)(d-Phe)(d-Nle)(Gly)(Dpa)	KWKK
58	(d-Phe)(Hle)(Hle)(d-Asn)(d-Thr)(d-Gln)	KWKK
59	(d-Lys)(d-Phe)(d-Ser)(d-Nle)(d-Glu)(Dab)	KWKK
60	(B)(d-Lys)(d-Gln)(Dpa)(d-Phe)(d-Asn)	KWKK
61	(Pip)(Hle)(d-Arg)(Amf)(Gly)(Dpa)	KWKK
62	(Dpa)(Gly)(d-Glu)(d-Asn)(d-Asp)(d-Nle)	KWKK
63	(d-Phe)(Dpa)(d-Gln)(d-Glu)(Abu)(d-Nle)	KWKK
64	(Nap)(B)(d-Phe)(Dpa)(Amf)(d-Glu)	KWKK
65	(d-Asp)(d-Thr)(B)(d-Nle)(Nap)(Dpa)	KWKK

【０３１９】

【表４Ｂ】

66	(d-Phe)(Gly)(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(Dpa)	KWKK
67	(Dpa)(Gly)(B)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
68	(d-Phe)(d-Lys)(Nap)(d-Asn)(d-Phe)(d-Lys)	KWKK
69	(d-Asn)(d-Phe)(d-Asp)(d-Ser)(Dpa)(Amf)	KWKK
70	(d-Pro)(d-Ser)(d-Phe)(Dpa)(d-Glu)(B)	KWKK
71	(d-Pro)(d-Nle)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
72	(Abu)(Dpa)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)(Hle)	KWKK
73	(Gly)(Dpa)(Nle)(Dpa)(Gly)	KWWKK
74	(B)(Hle)(d-Thr)(d-Nle)(Gly)(d-Asn)	KWKK
75	(d-Lys)(Dpa)(Gly)(d-Gln)(Amf)(d-Nle)	KWKK
76	(Dpa)(Abu)(d-Asn)(d-Arg)(d-Nle)(d-Thr)	KWKK
77	(d-Glu)(B)(Dpa)(Dab)(d-Nle)(Gly)	KWKK
78	(d-Thr)(d-Arg)(Dpa)(d-Gln)(B)(d-Phe)	KWKK
79	(d-Thr)(d-Lys)(Dpa)(Abu)(d-Lys)(Dpa)	KWKK
80	(Dab)(Dpa)(d-Asn)(Dpa)(Hle)(B)	KWKK
81	(d-Glu)(Hle)(d-Thr)(Nap)(d-Gln)(Nap)	KWKK
82	(Abu)(d-Asp)(Dpa)(Dab)(d-Nle)(Gly)	KWKK
83	(Hle)(d-Lys)(Dpa)(Gly)(d-Thr)(d-Pro)	KWKK
84	(d-Gln)(Nap)(d-Nle)(Pip)(Amf)(Hle)	KWKK
85	(d-Asn)(Gly)(Dpa)(d-Thr)(Nap)(Gly)	KWKK
86	(Gly)(d-Asn)(Dpa)(d-Thr)(Nap)(Gly)	KWKK
87	(d-Ser)(d-Phe)(d-Glu)(d-Asp)(Gly)(Gly)	KWKK
88	(d-Phe)(d-Phe)(d-Thr)(d-Phe)(d-Thr)(Abu)	KWKK
89	(d-Pro)(Dpa)(Hle)(Hle)(Abu)(d-Pro)	KWKK
90	(d-Asn)(Abu)(d-Glu)(d-Lys)(d-Nle)(Nap)	KWKK
91	(d-Phe)(Dpa)(Dpa)(Pip)(d-Phe)(Dpa)	KWKK
92	(d-Lys)(Hle)(Dpa)(Gly)(d-Thr)(d-Pro)	KWKK
93	(Hle)(d-Thr)(d-Glu)(Hle)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
94	(d-Thr)(Dab)(d-Asp)(d-Nle)(d-Lys)(Nap)	KWKK
95	(d-Glu)(d-Phe)(Nap)(d-Asn)(Nap)(Amf)	KWKK
96	(B)(d-Pro)(d-Pro)(Nap)(Nap)(d-Asn)	KWKK
97	(d-Lys)(d-Thr)(Dpa)(Abu)(d-Lys)(Dpa)	KWKK
98	(Gly)(d-Lys)(d-Glu)(Hle)(d-Phe)(Amf)	KWKK
99	(d-Lys)(Dab)(d-Thr)(Dpa)(d-Gln)(d-Nle)	KWKK
100	(d-Phe)(d-Nle)(B)(Abu)(Dab)(Nap)	KWKK
101	(Dpa)(Hle)(B)(Gly)(Pip)(d-Phe)	KWKK
102	(Dpa)(d-Gln)(Abu)(Abu)(Pip)(Dpa)	KWKK

【０３２０】

【表４Ｃ】

103	(d-Lys)(Gly)(d-Glu)(Hle)(d-Phe)(Amf)	KWKK
104	(d-Phe)(d-Phe)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
105	(d-Ser)(d-Asn)(d-Phe)(d-Nle)(Gly)(Dpa)	KWKK
106	(d-Phe)(d-Phe)(d-Asn)(Nap)(B)(Nap)	KWKK
107	(d-Asp)(Abu)(Dpa)(Dab)(d-Nle)(Gly)	KWKK
108	(d-Pro)(Nap)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
109	(B)(B)(d-Lys)(d-Asp)(d-Nle)(d-Phe)	KWKK
110	(d-Phe)(Amf)(d-Asp)(d-Asp)(Dpa)(d-Phe)	KWKK
111	(d-Nle)(d-Asn)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)(d-Glu)	KWKK
112	(d-Phe)(d-Ser)(d-Glu)(d-Asp)(Gly)(Gly)	KWKK
113	(Amf)(B)(d-Gln)(Hle)(Dpa)(Gly)	KWKK
114	(Gly)(Dpa)(Dpa)(Gly)(Gly)(Dab)	KWKK
115	(Abu)(Dpa)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)(Pip)	KWKK
70	(d-Pro)(d-Ser)(d-Phe)(Dpa)(d-Glu)(B)	KKWK
116	(d-Thr)(Pip)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)(d-Glu)	KWKK
117	(d-Arg)(d-Lys)(d-Nle)(Hle)(d-Lys)(d-Nle)	KWKK
118	(Gly)(Gly)(Dab)(d-Nle)(Hle)(d-Nle)	KWKK
119	(d-Gln)(d-His)(d-Asn)(Dpa)(Hle)(B)	KWKK
120	(Dpa)(B)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
121	(d-Glu)(d-Phe)(Gly)(Gly)(Nap)(Amf)	KWKK
122	(d-Phe)(d-Phe)(d-Asn)(d-Arg)(Abu)(Dpa)	KWKK
123	(d-Asn)(d-Glu)(d-His)(d-Thr)(Nap)(Gly)	KWKK
124	(d-Arg)(d-Thr)(Dpa)(d-Gln)(B)(d-Phe)	KWKK
125	(d-His)(d-Gln)(d-Asn)(Dpa)(Hle)(B)	KWKK
126	(Abu)(d-Phe)(d-Glu)(d-Glu)(B)(d-Asp)	KWKK
127	(B)(Abu)(B)(Dpa)(Hle)(Gly)	KWKK
128	(d-Asn)(d-His)(d-Asn)(Dpa)(Hle)(B)	KWKK
129	(Abu)(d-Pro)(d-Pro)(B)(d-Ser)(d-Glu)	KWKK
130	(d-Thr)(d-Arg)(Dpa)(Abu)(d-Asn)(d-Phe)	KWKK
131	(d-Pro)(Abu)(d-Pro)(Gly)(Gly)(d-His)	KWKK
132	(Pip)(Nap)(Hle)(d-Asp)(d-Thr)(Pip)	KWKK
133	(B)(Gly)(d-Pro)(Abu)(Dpa)(Nap)	KWKK
134	(d-Asn)(d-His)(d-Glu)(d-Thr)(Nap)(Gly)	KWKK
135	(d-Nle)(B)(Abu)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
136	(Hle)(d-Lys)(d-Nle)(d-Glu)(d-Ser)(d-Glu)	KWKK
137	(Amf)(d-Thr)(d-Lys)(d-Nle)(d-Gln)(Dpa)	KWKK
138	(Dpa)(B)(Dpa)(d-Phe)(B)(Gly)	KWKK

【０３２１】

【表４Ｄ】

139	(B)(d-Ser)(d-Ser)(d-Ser)(Hle)(Hle)	KWKK
140	(d-Glu)(d-Ser)(ox-His)(d-Ser)(Dpa)(Gly)	KKKK
141	(Dab)(Gly)(ox-His)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
142	(B)(Abu)(d-Nle)(d-Ser)(d-Gln)(d-Gln)	KWKK
143	(Abu)(d-Nle)(B)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
144	(Dpa)(d-Glu)(d-Pro)(B)(d-His)(Gly)	KWKK
145	(Gly)(Gly)(Hle)(d-Arg)(d-Nle)(d-Phe)	KWKK
146	(Dpa)(d-Phe)(d-Lys)(d-Phe)(d-Asp)(Dab)	KWKK
147	(d-Glu)(d-Asn)(d-His)(d-Thr)(Nap)(Gly)	KWKK
148	(d-Nle)(d-Gln)(d-Arg)(d-Glu)(d-Gln)(Nap)	KWKK
149	(d-Nle)(d-Glu)(d-Phe)(d-Thr)(d-Asp)(d-Thr)	KWKK
150	(d-Glu)(Hle)(d-Thr)(Gly)(B)(Nap)	KWKK
151	(Pip)(d-Ser)(d-Pro)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
152	(d-Gln)(d-Pro)(Abu)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
153	(d-Ser)(d-Arg)(d-Asn)(Dpa)(Abu)(Gly)	KWKK
154	(Dpa)(d-Thr)(d-Asn)(d-Glu)(d-Thr)(d-Ser)	KWKK
155	(d-Asn)(Hle)(d-Pro)(Nap)(B)(d-Ser)	KWKK
156	(Pip)(Gly)(Gly)(d-Phe)(Hle)(Dpa)	KWKK
157	(Abu)(d-Pro)(B)(Gly)(Dpa)(Nap)	KWKK
158	(Gly)(Dab)(d-Ser)(d-Nle)(d-Glu)(Dpa)	KWKK
159	(Abu)(d-Gln)(Abu)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)	KWKK
160	(Amf)(d-Asn)(Abu)(Hle)(Dpa)(Gly)	KWKK
161	(d-Glu)(ox-His)(d-Ser)(d-Ser)(Dpa)(Gly)	KKKK
162	(d-Arg)(d-Asn)(d-Glu)(d-Ser)(d-His)(d-Phe)	KWKK
163	(d-Gln)(d-Gln)(d-Ser)(d-Pro)(d-Nle)(Gly)	KWKK
164	(d-Asn)(Gly)(d-His)(d-Asn)(B)(Dpa)	KWKK
165	(B)(Dpa)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
166	(B)(Gly)(B)(Hle)(Dpa)(Gly)	KWKK
167	(Pip)(d-His)(d-Asp)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)	KWKK
168	(Dpa)(d-Gln)(d-Nle)(Gly)(Pip)(Dpa)	KWKK
169	(Dab)(Dpa)(d-Asn)(Dpa)(d-Nle)(Abu)	KWKK
170	(d-Pro)(Gly)(d-Asn)(Hle)(Gly)(d-Asn)	KWKK
171	(Pip)(Gly)(d-His)(Nap)(Amf)(Dab)	KWKK
172	(Gly)(Gly)(ox-His)(Nap)(d-Asp)(Dpa)	KWKK
173	(d-Thr)(B)(Pip)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)	KWKK
174	(d-Asn)(d-His)(Gly)(B)(d-Asn)(Dpa)	KWKK
175	(d-Thr)(d-Phe)(d-Asp)(Dpa)(Hle)(B)	KWKK

【０３２２】

【表４Ｅ】

176	(d-Glu)(d-His)(d-Pro)(Dpa)(Hle)(B)	KWKK
177	(Abu)(B)(B)(Dpa)(Hle)(Gly)	KWKK
178	(d-Lys)(d-Pro)(d-Nle)(d-Asp)(d-Phe)(d-Nle)	KWKK
179	(Hle)(d-Pro)(d-Nle)(d-Ser)(Abu)(B)	KWKK
180	(Dpa)(d-Thr)(B)(Abu)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
181	(Abu)(Dpa)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)(Dpa)	KWKK
182	(d-His)(d-Pro)(d-Glu)(Dpa)(Hle)(B)	KWKK
183	(d-Nle)(Abu)(d-Thr)(d-Nle)(Gly)(d-Asn)	KWKK
184	(B)(Nap)(d-Phe)(Dpa)(Amf)(d-Glu)	KWKK
185	(Dpa)(Gly)(d-Nle)(d-His)(Dpa)(Gly)	KWKK
186	(Pip)(d-Ser)(Abu)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)	KWKK
187	(d-Asp)(Abu)(d-Ser)(d-Nle)(Dpa)(Dpa)	KWKK
188	(d-Gln)(Abu)(d-Pro)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
189	(Amf)(Abu)(B)(Abu)(Hle)(Dpa)	KWKK
190	(d-Nle)(Abu)(d-Nle)(Hle)(B)(Gly)	KWKK
191	(d-His)(Gly)(B)(d-Nle)(Dpa)(Gly)	KWKK
192	(Gly)(B)(d-His)(d-Nle)(Dpa)(Gly)	KWKK
193	(Pip)(d-His)(Gly)(Nap)(Amf)(Dab)	KWKK
194	(Dpa)(Hle)(Gly)(B)(Pip)(d-Phe)	KWKK
195	(d-Nle)(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
196	(Pip)(B)(d-Nle)(Gly)(Hle)(d-His)	KWKK
197	(Amf)(d-Ser)(Gly)(Nap)(Amf)(Dab)	KWKK
198	(Hle)(d-Pro)(B)(Gly)(Gly)(Nap)	KWKK
199	(d-Arg)(d-Lys)(d-Nle)(Hle)(d-Nle)(d-Lys)	KWKK
200	(d-Nle)(Gly)(B)(d-Arg)(d-Nle)(d-Phe)	KWKK
201	(Gly)(Gly)(Abu)(Hle)(Dpa)(Gly)	KWKK
202	(Gly)(Gly)(d-His)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)	KWKK
203	(d-Asn)(d-Phe)(Gly)(d-Glu)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
204	(d-Asp)(Nap)(Gly)(d-Ser)(Dpa)(Gly)	KWKK
205	(d-Thr)(ox-His)(d-Asp)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
206	(d-Asn)(Nap)(Gly)(d-Glu)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
207	(d-Nle)(Abu)(B)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
208	(d-Thr)(Gba)(d-Asn)(Dpa)(Abu)(Gly)	KWKK
209	(d-Thr)(Pip)(B)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)	KWKK
210	(d-Asp)(Abu)(d-Ser)(d-Nle)(Nap)(Dpa)	KWKK
211	(B)(Gly)(d-His)(d-Nle)(Dpa)(Gly)	KWKK
212	(Nap)(Gly)(d-Asp)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)	KWKK

【０３２３】

【表４Ｆ】

213	(d-Lys)(B)(d-Phe)(B)(Hle)(Dpa)	KWKK
214	(Gly)(d-Phe)(d-Ser)(d-Nle)(d-Nle)(d-Phe)	KWKK
215	(d-Lys)(B)(ox-His)(d-Gln)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
216	(Gly)(Gly)(d-Asn)(d-Phe)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
217	(d-Asp)(Pip)(d-His)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)	KWKK
218	(ox-His)(d-Gln)(d-Pro)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)	KWKK
219	(Gly)(d-Ser)(Amf)(Nap)(Amf)(Dab)	KWKK
220	(Pip)(d-Asp)(d-His)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)	KWKK
221	(Gly)(ox-His)(Gly)(Nap)(d-Asp)(Dpa)	KWKK
222	(B)(Dab)(d-His)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)	KWKK
223	(Nap)(d-Glu)(d-Gln)(d-Pro)(Pip)(d-Phe)	KWKK
224	(Abu)(B)(d-Nle)(d-Ser)(d-Gln)(d-Gln)	KWKK
225	(Abu)(Dpa)(d-Asn)(d-Arg)(d-Nle)(d-Thr)	KWKK
226	(Dpa)(d-Thr)(Abu)(B)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
227	(d-His)(Gly)(Gly)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)	KWKK
228	(d-Pro)(d-Nle)(d-Asn)(d-Asp)(d-Pro)(Hle)	KWKK
229	(Gly)(d-His)(Gly)(Abu)(d-Lys)(Dpa)	KWKK
230	(Nap)(d-Glu)(ox-His)(B)(Hle)(d-Phe)	KWKK
231	(d-Asp)(d-Pro)(d-Asp)(d-His)(d-Asp)(Dpa)	KWKK
232	(Pip)(Pip)(d-Glu)(d-Pro)(d-Thr)(Pip)	KWKK
233	(Dpa)(d-Glu)(d-Asn)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
234	(d-Asn)(Nap)(d-Asp)(B)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
235	(Abu)(B)(d-Asn)(Hle)(d-His)(d-Asn)	KWKK
236	(B)(d-Ser)(d-Thr)(Dab)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
237	(d-Pro)(d-Nle)(d-Glu)(d-Pro)(d-Thr)(Pip)	KWKK
238	(d-Asn)(d-His)(B)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
239	(Dpa)(Abu)(d-Gln)(Abu)(Pip)(Dpa)	KWKK
240	(Abu)(d-Pro)(Gly)(B)(Dpa)(Nap)	KWKK
241	(d-Ser)(ox-His)(d-Glu)(d-Ser)(Dpa)(Gly)	KKKK
242	(d-Gln)(d-Gln)(d-Nle)(d-Ser)(d-Pro)(Gly)	KWKK
243	(d-Ser)(Amf)(d-Ser)(Gly)(Pip)(Dab)	KWKK
244	(d-Asn)(d-Pro)(B)(Gly)(Gly)(Dpa)	KWKK
245	(Abu)(B)(d-Nle)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
246	(d-Asn)(Hle)(d-Pro)(B)(Nap)(d-Ser)	KWKK
247	(ox-His)(Gly)(Gly)(Nap)(d-Asp)(Dpa)	KWKK
248	(d-Nle)(Abu)(d-Ser)(B)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
249	(Pip)(Gly)(d-Ser)(Hle)(d-His)(d-Asn)	KWKK

【０３２４】

【表４Ｇ】

250	(Dpa)(d-Lys)(B)(Gly)(Gly)(d-Pro)	KWKK
251	(B)(d-Nle)(d-Asp)(Gly)(Pip)(Pip)	KWKK
252	(d-Lys)(B)(Amf)(d-Thr)(d-Thr)(Dab)	KWKK
253	(d-Pro)(d-Glu)(Amf)(Gly)(d-Ser)(B)	KWKK
254	(Dpa)(B)(Gly)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
255	(Abu)(d-Glu)(d-His)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
256	(Abu)(B)(d-Ser)(d-Phe)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
257	(Gly)(Gly)(Dab)(ox-His)(Nap)(Hle)	KWKK
258	(d-Phe)(d-Asp)(Gly)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
259	(Gly)(Pip)(d-Ser)(Hle)(d-His)(d-Asn)	KWKK
260	(d-Lys)(Abu)(Amf)(d-Ser)(d-Thr)(Dab)	KWKK
261	(Abu)(Gly)(Gly)(Hle)(Dpa)(Gly)	KWKK
262	(d-Glu)(d-Ser)(B)(d-Nle)(Dpa)(Dpa)	KWKK
263	(Abu)(d-Pro)(d-Gln)(d-Glu)(Nap)(Hle)	KWKK
264	(d-Ser)(B)(Gly)(Abu)(Gly)(Hle)	KWKK
265	(d-Phe)(d-Pro)(B)(Hle)(d-Arg)(d-Asp)	KWKK
266	(B)(Dab)(ox-His)(Amf)(Gly)(Nap)	KWKK
267	(Pip)(d-Nle)(d-Glu)(d-Gln)(d-His)(d-Asn)	KWKK
268	(d-Asp)(Abu)(d-His)(Dpa)(Hle)(B)	KWKK
269	(Gly)(Gly)(d-Nle)(B)(d-His)(Dpa)	KWKK
270	(B)(d-Nle)(d-Asp)(Pip)(Gly)(Pip)	KWKK
271	(Gly)(Gly)(d-His)(Abu)(d-Lys)(Dpa)	KWKK
272	(Nap)(d-Glu)(Pip)(d-Pro)(d-Gln)(d-Phe)	KWKK
273	(d-Gln)(B)(d-Glu)(d-Lys)(d-Nle)(Nap)	KWKK
274	(d-Asn)(B)(d-Asp)(Nap)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
275	(d-Nle)(d-Lys)(Abu)(d-Asn)(d-Glu)(Amf)	KWKK
276	(B)(ox-His)(Dab)(d-Glu)(d-Thr)(d-Ser)	KWKK
277	(d-Asn)(Pip)(d-Gln)(d-Ser)(Hle)(d-Ser)	KWKK
278	(ox-His)(d-Pro)(d-Ser)(Dpa)(Hle)(B)	KWKK
279	(d-Thr)(Gly)(d-Phe)(d-Pro)(Gly)(Dpa)	KWKK
280	(d-Asn)(Gly)(d-Glu)(Nap)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
281	(d-Asn)(d-Asp)(Nap)(B)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
282	(d-Nle)(B)(Gly)(d-Arg)(d-Nle)(d-Phe)	KWKK
283	(d-Thr)(d-Pro)(Dab)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)	KWKK
284	(d-Asn)(Nap)(d-Glu)(Gly)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
285	(d-Asn)(Gly)(Nap)(d-Glu)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
286	(Abu)(Dpa)(d-Pro)(Gly)(Abu)(B)	KWKK

【０３２５】

【表４Ｈ】

287	(d-Lys)(Dpa)(Gly)(B)(Amf)(d-Nle)	KWKK
288	(d-His)(Gly)(Amf)(d-Lys)(d-Ser)(d-Asp)	KWKK
289	(d-Gln)(Dpa)(d-Asn)(d-Nle)(d-His)(Abu)	KWKK
290	(Dpa)(d-Gln)(Pip)(d-Pro)(Hle)(d-Thr)	KWKK
291	(ox-His)(Gly)(Gly)(Gly)(Nap)(Hle)	KWKK
292	(d-Gln)(Gba)(d-Glu)(d-Ser)(d-His)(d-Phe)	KWKK
293	(Dpa)(Pip)(d-Ser)(Abu)(Pip)(Dpa)	KWKK
294	(d-Asp)(d-His)(Pip)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asp)	KWKK
295	(Dpa)(B)(Dpa)(d-Phe)(Gly)(B)	KWKK
296	(B)(d-Gln)(d-Glu)(d-Lys)(d-Nle)(Nap)	KWKK
297	(Pip)(Gly)(Gly)(Hle)(Hle)(d-His)	KWKK
298	(Abu)(B)(Amf)(Abu)(Hle)(Dpa)	KWKK
299	(d-Asn)(d-Pro)(d-Pro)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)	KWKK
300	(d-His)(B)(Dab)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)	KWKK
301	(d-Glu)(d-His)(Abu)(Dpa)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
302	(d-Glu)(Hle)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)(Nap)	KWKK
303	(Hle)(d-Pro)(d-Glu)(d-Pro)(d-Thr)(Pip)	KWKK
304	(Nap)(d-Asp)(Gly)(d-Ser)(Dpa)(Gly)	KKWK
305	(d-Glu)(Hle)(d-Thr)(Nap)(B)(Gly)	KWKK
306	(d-Asn)(Abu)(B)(Hle)(d-His)(d-Asn)	KWKK
307	(d-Nle)(Hle)(d-His)(d-Asp)(d-His)(Amf)	KWKK
308	(Dpa)(Amf)(d-Ser)(d-Phe)(Gly)(B)	KWKK
309	(d-Thr)(Dpa)(Abu)(B)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
310	(Hle)(Gly)(Dpa)(d-Phe)(d-Ser)(B)	KWKK
311	(Nap)(Dab)(B)(d-Ser)(Hle)(d-Ser)	KWKK
312	(Abu)(Dpa)(d-Pro)(Gly)(B)(Abu)	KWKK
313	(Dpa)(d-Ser)(Pip)(Abu)(Pip)(Dpa)	KWKK
314	(d-Ser)(d-Glu)(d-Nle)(Gly)(Gly)(d-Gln)	KWKK
315	(d-Lys)(d-Arg)(d-Asp)(Gly)(d-Pro)(Gly)	KWKK
316	(d-Gln)(d-Pro)(Pip)(B)(d-Asn)(d-Pro)	KWKK
317	(Dpa)(Pip)(Gly)(Gly)(Hle)(Dab)	KWKK
318	(Abu)(d-Pro)(Gly)(d-Pro)(Gly)(d-His)	KWKK
319	(B)(Abu)(ox-His)(Abu)(d-Nle)(d-Phe)	KWKK
320	(Dpa)(Pip)(B)(d-Thr)(Pip)(Dpa)	KWKK
321	(d-Pro)(Abu)(Gly)(d-Pro)(Gly)(d-His)	KWKK
322	(d-Arg)(d-Gln)(d-Asp)(d-Ser)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
323	(Dpa)(Abu)(ox-His)(d-Nle)(Hle)(d-Thr)	KWKK

【０３２６】

【表４Ｉ】

324	(d-Pro)(Hle)(d-Nle)(d-Ser)(Abu)(B)	KWKK
325	(B)(d-Nle)(Pip)(d-Asp)(Gly)(Pip)	KWKK
326	(B)(d-His)(Dab)(d-Phe)(Hle)(d-Ser)	KWKK
327	(d-Pro)(B)(d-Pro)(Nap)(Nap)(d-Asn)	KWKK
328	(Gly)(Dab)(Gly)(ox-His)(Nap)(Hle)	KWKK
329	(d-Pro)(d-Nle)(d-Asp)(B)(Gly)(Hle)	KWKK
330	(d-Lys)(d-Ser)(d-Thr)(Dab)(Dab)(Nap)	KWKK
331	(d-Phe)(Abu)(Gly)(d-Ser)(d-Phe)(Nap)	KWKK
332	(Abu)(B)(d-Pro)(d-Pro)(Abu)(Gly)	KWKK
333	(d-Asp)(Gly)(d-Phe)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
334	(Abu)(Hle)(Gly)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
335	(d-Ser)(d-Phe)(Gly)(d-Nle)(d-Nle)(d-Phe)	KWKK
336	(Hle)(Gly)(Dpa)(d-Phe)(d-Thr)(Gly)	KWKK
337	(Abu)(d-Pro)(B)(d-Pro)(d-Ser)(d-Glu)	KWKK
338	(d-Asp)(d-Phe)(Gly)(d-Gln)(d-Pro)(Dpa)	KWKK
339	(Gly)(Gly)(Gly)(Gly)(d-Nle)(d-Asp)	KWKK
340	(d-Pro)(d-Glu)(Amf)(d-Thr)(Gly)(Gly)	KWKK
341	(Hle)(Dpa)(Gly)(B)(Pip)(d-Phe)	KWKK
342	(B)(Nap)(d-Phe)(Abu)(Hle)(Hle)	KWKK
343	(Hle)(d-Pro)(d-Glu)(Pip)(d-Pro)(d-Thr)	KWKK
344	(d-Pro)(Hle)(d-Nle)(d-Ser)(B)(Abu)	KWKK
345	(Nap)(d-Pro)(Abu)(d-Nle)(d-Nle)(Amf)	KWKK
346	(Pip)(B)(d-Thr)(d-Nle)(Hle)(d-Gln)	KWKK
347	(d-Phe)(Dpa)(Dpa)(d-Phe)(Pip)(Dpa)	KWKK
348	(d-Lys)(d-Thr)(Amf)(d-Ser)(d-His)(Amf)	KWKK
349	(Pip)(d-Pro)(d-Ser)(Pip)(Gly)(Gly)	KWKK
350	(d-Lys)(d-Lys)(B)(Gba)(d-Thr)(Nap)	KWKK
351	(d-Arg)(d-Thr)(Dpa)(Abu)(d-Asn)(d-Phe)	KWKK
352	(d-Nle)(Abu)(B)(Gly)(Dpa)(Gly)	KWKK
353	(d-Pro)(B)(d-Phe)(Abu)(Dpa)(Dpa)	KWKK
354	(d-Asp)(d-Asp)(d-Lys)(d-Nle)(Dpa)(Dpa)	KWKK
355	(d-Nle)(d-Thr)(d-Ser)(d-His)(d-Nle)(Nap)	KWKK
356	(d-Asp)(d-Phe)(d-Thr)(d-Asp)(Gly)(Gly)	KWKK
357	(Pip)(Dpa)(Gly)(Gly)(Hle)(Dab)	KWKK
358	(d-Phe)(Gly)(d-Ser)(d-Nle)(d-Nle)(d-Phe)	KWKK
359	(Hle)(d-Lys)(Dpa)(Gly)(d-Pro)(d-Thr)	KWKK
360	(Gly)(Gly)(d-Gln)(B)(Amf)(d-Asp)	KWKK

【０３２７】

【表４Ｊ】

361	(B)(Gly)(Abu)(d-Glu)(Gly)(d-Phe)	KWKK
362	(B)(d-Nle)(d-Thr)(d-Thr)(Abu)(d-His)	KWKK
363	(Gly)(Dab)(d-Lys)(d-Glu)(d-Glu)(Dpa)	KWKK
364	(Gly)(Dpa)(d-Pro)(Abu)(d-Pro)(d-Asn)	KWKK
365	(d-Nle)(Abu)(B)(d-Ser)(d-Gln)(d-Gln)	KWKK
366	(Dab)(B)(ox-His)(Amf)(Gly)(Nap)	KWKK
367	(Hle)(d-Glu)(d-Thr)(Nap)(d-Gln)(Nap)	KWKK
368	(d-Ser)(d-Glu)(d-Nle)(d-Asn)(B)(Gly)	KWKK
369	(d-Lys)(d-Phe)(Gly)(Abu)(Hle)(Dpa)	KWKK
370	(d-Nle)(Gly)(d-Phe)(Dab)(Hle)(Dpa)	KWKK
371	(ox-His)(B)(Hle)(Dpa)(Hle)(d-Thr)	KWKK
372	(d-Pro)(Pip)(d-Gln)(Dpa)(Hle)(d-Thr)	KWKK
373	(Gly)(B)(Dpa)(d-Phe)(Gly)(B)	KWKK
374	(Gly)(Gly)(B)(d-Gln)(Amf)(d-Asp)	KWKK
375	(Amf)(B)(Abu)(Abu)(Hle)(Dpa)	KWKK
376	(d-Ser)(B)(d-Ser)(d-Ser)(Hle)(Hle)	KWKK
377	(B)(d-Lys)(Dab)(ox-His)(Gly)(d-Pro)	KWKK
378	(d-Lys)(Abu)(d-Ser)(Amf)(d-Thr)(Dab)	KWKK
379	(Abu)(B)(d-Ser)(Dpa)(Gly)(d-Ser)	KWKK
380	(d-Ser)(Amf)(Gly)(d-Ser)(Pip)(Dab)	KWKK

【０３２８】

スプリット・アンド・プール合成を、９５０００メンバーからなるライブラリーで、３００μｍのＴｅｎｔａＧｅｌ樹脂(０.２３ｍｍｏｌ/ｇ)で行った。樹脂をＤＣＭに懸濁し、これを、バキュームマニホールド上の２２のプラスチックフリットシリンジに等しく分けることによって(ピペッティングを介して)、スプリットを行った。カップリングを以下の通りに行った:Ｆｍｏｃ保護されたアミノ酸の溶液(樹脂のロードに対して１０当量)、ＰｙＡＯＰ(ＤＭＦ中で０.３８Ｍ、アミノ酸に対して０.９ｅｑ.)、及びＤＩＥＡ(ヒスチジンでは１.１ｅｑ.、全ての他のアミノ酸では３ｅｑ.)をそれぞれ、個々の樹脂部分に添加した。カップリングを６０分間進行させた。樹脂部分を再び組み合わせ、ＤＣＭ及びＤＭＦで洗浄した。ＤＭＦ中の２０％ピペリジンで樹脂を処置することによってＦｍｏｃ除去を行った(１回のフロー洗浄、２回の５分間のバッチ処置)。樹脂をＤＭＦ及びＤＣＭで再び洗浄し、その後、次のスプリットを行った。

【０３２９】

(実施例１２)

ペプチドライブラリーの活性

一連の活性実験を行って、ライブラリー内のペプチドが核局在化活性を有していることを確認した。使用した表現型アッセイは、正確なスプライシングを生じさせて、フローサイトメトリーによって定量される増強型緑色蛍光タンパク質(ＥＧＦＰ)を生じさせることによって、核に送達された活性なＰＭＯの量と相関している。まず、ＰＰＭＯライブラリーアリコートは、濃度依存性の活性増大を示した(図９Ａ)。同時に、これらの濃度のライブラリーは、乳酸デヒドロゲナーゼ(ＬＤＨ)放出アッセイによって決定したところ、いかなる膜破壊も膜毒性も示さなかった(図９Ｂ)。異なる配列量を含有する同一濃度のライブラリーアリコートを試験し、こうして多様性を増大させると、活性の差は示されなかった(図１０Ａ)。

【０３３０】
ＰＰＭＯライブラリーの１０００メンバーからなる部分を、エネルギー依存性の取り込みを止める条件である４℃で細胞とインキュベートした。ＰＭＯ-ＣＰＰコンジュゲートとインキュベートした後、各ウェルをＰＢＳ及びヘパリンで十分に洗浄して、膜に結合したコンジュゲートを破壊し、除去した。細胞を再び３７℃まで温め、アッセイを標準的なフォーマットで継続し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。５μＭ及び２０μＭのライブラリーインキュベーション条件の両方で、４℃でライブラリーＰＭＯの送達が有意に減少したこと(ＰＭＯ単独と比較して)は、ＰＭＯ-ＣＰＰのエネルギー依存性の取り込みを示している(図１０Ｂ)。処置の後、細胞を０.１ｍｇ/ｍＬのヘパリンで洗浄し、培地中で２２時間インキュベートし、その後、フローサイトメトリーを行った。
【０３３１】

【表５Ａ】

Table 5. PPMO-ライブラリー

配列番号	ペプチド配列	末端モチーフ (d-アミノ酸)
381	(Hle)(Nle)(d-Glu)(d-Ser)(d-Thr)(d-Asn)	KWKK
382	(B)(B)(d-Asp)(Gly)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
383	(Gly)(d-Ser)(Hle)(d-Phe)(d-Glu)(d-Gln)	KWKK
384	(d-Pro)(d-Thr)(d-Asp)(Gly)(d-Thr)(Gly)	KWKK
385	(d-Pro)(d-Thr)(Hle)(d-Ser)(d-Asp)(Nap)	KWKK
386	(d-Asn)(d-Ser)(d-Ser)(Pip)(Hle)(Nle)	KWKK
387	(Gly)(d-Pro)(d-Glu)(d-Glu)(Gly)(Nap)	KWKK
388	(B)(d-Asn)(Dpa)(d-Ser)(Hle)(Dab)	KWKK
389	(Gly)(d-Asp)(d-Asp)(Dpa)(d-Asn)(d-Ser)	KWKK
390	(d-Asp)(d-Thr)(Hle)(d-Pro)(d-Gln)(Hle)	KWKK
391	(d-Pro)(d-Thr)(d-Asp)(d-Asp)(d-Asn)(Hle)	KWKK
392	(d-Thr)(d-Pro)(Hle)(d-Ser)(d-Asp)(Nap)	KWKK
393	(Gly)(d-Arg)(d-Glu)(d-Thr)(Hle)(d-Asn)	KWKK
394	(B)(Hle)(d-Glu)(d-Gln)(d-Glu)(Amf)	KWKK
395	(Gly)(d-Phe)(d-Pro)(Pip)(Nle)(Gly)	KWKK
396	(B)(d-Thr)(d-Gln)(Hle)(d-Glu)(d-Asp)	KWKK
397	(d-Phe)(Hle)(d-Glu)(d-Ser)(B)(d-Thr)	KWKK
398	(d-Asn)(Gly)(Hle)(B)(Nle)(d-Asp)	KWKK
399	(B)(d-Arg)(Nle)(d-Arg)(d-Glu)(d-Gln)	KWKK
400	(Gly)(Gly)(B)(d-Phe)(d-Asn)(d-Thr)	KWKK
401	(Nle)(d-Arg)(Nle)(d-Gln)(B)(d-Asp)	KWKK
402	(d-Asp)(d-Asn)(d-Gln)(Abu)(d-Thr)(d-Phe)	KWKK
403	(Nle)(Hle)(d-Glu)(d-Ser)(d-Thr)(d-Asn)	KWKK
404	(d-Asn)(d-Ser)(Amf)(Dab)(d-Phe)(Gly)	KWKK
405	(d-Gln)(B)(d-Phe)(d-Arg)(d-Asn)(Amf)	KWKK
406	(d-Asn)(d-Lys)(d-Thr)(Gly)(Hle)(Abu)	KWKK
407	(B)(B)(B)(Hle)(d-His)(Hle)	KWKK
408	(Gly)(B)(B)(d-Glu)(Nle)(Dpa)	KWKK
409	(d-Pro)(d-Thr)(Dpa)(Abu)(B)(d-Lys)	KWKK
410	(B)(Nle)(Dab)(d-Phe)(Gly)(d-Thr)	KWKK
411	(B)(Nle)(Dab)(d-Lys)(B)(d-Phe)	KWKK
412	(d-Gln)(d-Ser)(d-Lys)(Hle)(d-Phe)(Dab)	KWKK
413	(d-Arg)(d-Phe)(d-Lys)(d-Asp)(Hle)(Gly)	KWKK
414	(Abu)(Gly)(d-Asp)(Gly)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
415	(B)(d-Thr)(Dpa)(d-Asn)(d-Gln)(Nap)	KWKK
416	(Abu)(B)(d-Glu)(Pip)(d-Arg)(Nle)	KWKK
417	(Gly)(d-Asp)(d-Arg)(d-Ser)(Dab)(d-Phe)	KWKK
418	(B)(d-Arg)(Hle)(d-Phe)(Gly)(d-Arg)	KWKK
419	(d-Arg)(d-Asp)(Hle)(d-Ser)(Pip)(d-Gln)	KWKK
420	(Gly)(Gly)(d-Ser)(Pip)(Hle)(Nle)	KWKK
421	(d-Asn)(d-Asp)(d-Gln)(Abu)(d-Thr)(d-Phe)	KWKK
422	(B)(Nle)(B)(B)(d-Thr)(Hle)	KWKK
423	(Gly)(Dpa)(Gly)(d-Asp)(Gly)(B)	KWKK
424	(Gly)(Gly)(d-Asn)(d-Pro)(Hle)(Dab)	KWKK
425	(d-Phe)(d-Thr)(d-Lys)(d-Asn)(d-Thr)(d-Phe)	KWKK
426	(d-Asn)(d-Asp)(B)(d-Thr)(Gly)(d-Phe)	KWKK
427	(d-Asn)(Gly)(d-Gln)(d-Ser)(Nap)(d-Asp)	KWKK
428	(Gly)(Abu)(d-Asp)(Gly)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
429	(B)(Abu)(d-Asp)(Hle)(Amf)(Nle)	KWKK

【０３３２】

【表５Ｂ】

430	(d-Asn)(Gly)(d-Glu)(Nap)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
431	(B)(Gly)(Gly)(d-Gln)(Dpa)(d-Phe)	KWKK
432	(B)(Abu)(d-Glu)(Pip)(d-Arg)(Nle)	KWKK
433	(B)(Abu)(Nle)(d-Arg)(d-Pro)(d-Pro)	KWKK
434	(Gly)(Gly)(Nle)(d-Thr)(d-Asp)(Hle)	KWKK
435	(B)(d-Asn)(Gly)(B)(Dpa)(d-Phe)	KWKK
436	(Gly)(Gly)(Abu)(d-Glu)(Nle)(Dpa)	KWKK
437	(d-Asn)(d-Gln)(d-Glu)(d-Gln)(d-Ser)(d-Phe)	KWKK
438	(Gly)(Dpa)(Gly)(B)(d-His)(B)	KWKK
439	(Gly)(Gly)(d-Thr)(Abu)(d-Gln)(Nap)	KWKK
440	(Dab)(d-Thr)(d-Asp)(Gly)(d-Thr)(Gly)	KWKK
441	(d-Asn)(Gly)(d-Asp)(d-Asp)(d-Pro)(Nap)	KWKK
442	(d-Pro)(d-Thr)(d-Phe)(d-Glu)(Gly)(B)	KWKK
443	(d-Lys)(d-Asn)(d-Thr)(Gly)(Hle)(Abu)	KWKK
444	(d-Thr)(d-Pro)(Dpa)(Abu)(B)(d-Lys)	KWKK
445	(B)(Nle)(Amf)(B)(Gly)(d-Thr)	KWKK
446	(Nle)(Nle)(d-Arg)(d-Glu)(Gly)(B)	KWKK
447	(d-Pro)(d-Ser)(d-Pro)(d-Lys)(Pip)(d-Gln)	KWKK
448	(d-Asn)(d-Lys)(B)(d-Phe)(d-Asp)(d-Asp)	KWKK
449	(Gly)(Gly)(Dpa)(Abu)(d-Lys)(d-Ser)	KWKK
450	(B)(Abu)(Nle)(d-Pro)(d-Pro)(d-Arg)	KWKK
451	(Gly)(d-Gln)(Gba)(d-Ser)(d-Ser)(d-Asn)	KWKK
452	(d-Ser)(d-Pro)(d-Pro)(d-Glu)(d-Glu)(Dab)	KWKK
453	(Gly)(Gly)(Nle)(d-Asn)(B)(Hle)	KWKK
454	(Gly)(Gly)(d-Gln)(d-Ser)(Nap)(d-Asp)	KWKK
455	(B)(Gly)(B)(Hle)(d-Phe)(d-Ser)	KWKK
456	(d-Asn)(Nle)(d-Pro)(d-Asn)(d-Ser)(Nap)	KWKK
457	(Gly)(d-Ser)(Hle)(d-Asp)(Gly)(Gly)	KWKK
458	(Abu)(d-Pro)(Nle)(d-Pro)(d-Pro)(Gly)	KWKK
459	(Abu)(Gly)(Gly)(Gly)(d-Arg)(Dpa)	KWKK
460	(d-Gln)(Dab)(d-Asp)(Pip)(d-Gln)(Gly)	KWKK
461	(Abu)(B)(d-Lys)(B)(d-Thr)(d-Ser)	KWKK
462	(Gly)(Nle)(d-Glu)(d-His)(B)(Dab)	KWKK
463	(Abu)(d-Ser)(B)(d-Asn)(Amf)(d-Phe)	KWKK
464	(d-Asp)(Hle)(B)(Gly)(Gly)(d-Glu)	KWKK
465	(d-Asn)(Gly)(Dpa)(Gly)(B)(Gly)	KWKK
466	(d-Thr)(d-Pro)(d-Asp)(Gly)(d-Thr)(Gly)	KWKK
467	(d-Asn)(d-Asp)(Gly)(d-Asp)(d-Pro)(Nap)	KWKK
468	(d-Pro)(d-Thr)(d-Phe)(d-Glu)(B)(Gly)	KWKK
469	(d-Lys)(B)(d-Asn)(d-Phe)(d-Asp)(d-Asp)	KWKK
470	(d-Gln)(d-Glu)(d-Lys)(d-Asp)(Hle)(Gly)	KWKK
471	(Gly)(Dpa)(B)(Gly)(d-His)(B)	KWKK
472	(B)(Nle)(d-Arg)(Hle)(Gly)(B)	KWKK
473	(B)(Abu)(Gly)(Hle)(d-His)(Hle)	KWKK
474	(d-Arg)(B)(d-Ser)(d-Pro)(d-Phe)(d-Glu)	KWKK
475	(ox-His)(d-Asp)(d-Asp)(d-Glu)(Abu)(d-Ser)	KWKK
476	(Abu)(B)(d-Asp)(Pip)(d-Glu)(d-His)	KWKK
477	(d-Asp)(d-Gln)(Hle)(Gly)(Gly)(Nle)	KWKK
478	(d-Pro)(d-Gln)(Gly)(Nap)(d-Glu)(d-Asp)	KWKK
479	(d-Pro)(d-Ser)(d-Asn)(d-Asp)(d-Glu)(Pip)	KWKK
480	(Gly)(d-Asn)(d-Phe)(Gly)(d-Glu)(Nle)	KWKK
481	(Gly)(d-Asn)(Dpa)(Gly)(B)(Gly)	KWKK
482	(d-Asn)(Dab)(Dab)(d-Pro)(d-Phe)(d-Glu)	KWKK
483	(d-Asn)(B)(Gly)(d-Asn)(Nle)(d-Arg)	KWKK
484	(Gly)(B)(d-Gln)(Amf)(Nap)(d-Gln)	KWKK

【０３３３】

【表５Ｃ】

485	(d-Phe)(d-Asp)(d-Ser)(B)(Hle)(Pip)	KWKK
486	(Gba)(d-Glu)(Gly)(d-Ser)(Dab)(d-Phe)	KWKK
487	(Gly)(Gly)(Gly)(Nle)(d-Pro)(d-Asp)	KWKK
488	(Gly)(Gly)(Gly)(Dpa)(d-Gln)(Gly)	KWKK
489	(Pip)(d-Thr)(d-Pro)(d-Asn)(d-Ser)(Nap)	KWKK
490	(Nle)(Abu)(d-Glu)(d-Gln)(d-Glu)(Amf)	KWKK
491	(d-Phe)(Hle)(d-Glu)(B)(d-Ser)(d-Thr)	KWKK
492	(d-Asp)(Dpa)(d-Ser)(B)(Gly)(B)	KWKK
493	(d-Asp)(d-Ser)(d-Phe)(d-Asn)(d-Lys)(d-Phe)	KWKK
494	(B)(Gly)(B)(Hle)(B)(d-Arg)	KWKK
495	(Abu)(Pip)(d-Asn)(d-Arg)(d-Ser)(Nap)	KWKK
496	(Gly)(Gly)(d-Asn)(Abu)(d-Phe)(d-Gln)	KWKK
497	(Gly)(d-Asn)(d-Asn)(Gly)(Dpa)(d-Asn)	KWKK
498	(Gly)(Pip)(d-Asp)(Nle)(B)(d-Asn)	KWKK
499	(d-Lys)(d-Pro)(d-Pro)(d-Ser)(Pip)(d-Gln)	KWKK
500	(Gly)(B)(d-Phe)(Gly)(Gly)(d-Thr)	KWKK
501	(d-Asp)(B)(Gly)(Abu)(d-Thr)(d-Phe)	KWKK
502	(Gly)(Gly)(Gly)(Nap)(d-Asp)(Dab)	KWKK
503	(Gly)(d-Asn)(d-Glu)(Nap)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
504	(B)(d-Arg)(Nle)(d-Pro)(Gly)(Gly)	KWKK
505	(Gly)(Gba)(d-Glu)(d-Ser)(Dab)(d-Phe)	KWKK
506	(Gly)(B)(Gly)(d-Phe)(d-Asn)(d-Thr)	KWKK
507	(d-Glu)(d-Ser)(d-Ser)(d-Thr)(Gly)(d-Phe)	KWKK
508	(B)(d-Phe)(Nle)(d-Asp)(Abu)(B)	KWKK
509	(Nle)(B)(d-Thr)(Nap)(Gly)(Gly)	KWKK
510	(B)(Dab)(Nap)(ox-His)(d-Asp)(Nap)	KWKK
511	(B)(d-Asn)(d-Pro)(Nle)(Pip)(d-Gln)	KWKK
512	(Abu)(B)(d-Arg)(d-Pro)(Pip)(d-Gln)	KWKK
513	(Dab)(d-Thr)(Gly)(d-Asp)(d-Thr)(Gly)	KWKK
514	(Nle)(d-Asp)(d-His)(d-Asp)(Nle)(d-Phe)	KWKK
515	(Gly)(d-Asn)(d-Asp)(d-Asp)(d-Pro)(Nap)	KWKK
516	(Gly)(Gly)(Nle)(Gly)(d-Phe)(d-Asn)	KWKK
517	(d-Lys)(B)(ox-Amf)(d-Asp)(B)(d-Lys)	KWKK
518	(Nle)(B)(Dab)(d-Phe)(Gly)(d-Thr)	KWKK
519	(Abu)(B)(d-Ser)(d-Asn)(Amf)(d-Phe)	KWKK
520	(Dab)(d-Ser)(d-Asn)(Pip)(Nle)(Gly)	KWKK
521	(d-Phe)(Dab)(d-Asp)(Abu)(Abu)(Dpa)	KWKK
522	(ox-Nap)(Dab)(Gly)(Abu)(d-Phe)(Gly)	KWKK
523	(Gly)(Pip)(Gba)(d-Ser)(d-Thr)(d-Gln)	KWKK
524	(d-Lys)(d-Asp)(Gly)(Gly)(Amf)(d-Phe)	KWKK
525	(B)(Abu)(d-Asn)(d-Arg)(d-Asn)(Gly)	KWKK
526	(d-Asn)(Nle)(Gly)(Gly)(B)(Hle)	KWKK
527	(d-Pro)(Gly)(d-Glu)(d-Glu)(Gly)(Nap)	KWKK
528	(Abu)(Amf)(d-His)(Gly)(d-Phe)(Gly)	KWKK
529	(Abu)(Dab)(Hle)(d-Thr)(Gly)(Abu)	KWKK
530	(Nle)(d-Arg)(Nle)(Abu)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
531	(d-Pro)(Gly)(B)(Gly)(Abu)(Hle)	KWKK
532	(d-Asp)(Dpa)(d-Ser)(Gly)(Gly)(Abu)	KWKK
533	(Abu)(Gba)(d-Ser)(d-Pro)(d-Phe)(d-Glu)	KWKK
534	(B)(Gly)(B)(d-Glu)(Nle)(Dpa)	KWKK
535	(d-Lys)(ox-His)(ox-His)(d-Ser)(d-Asp)(Nap)	KWKK
536	(Nle)(d-Asn)(Abu)(d-Pro)(Pip)(d-Gln)	KWKK
537	(Amf)(d-Thr)(d-Pro)(d-Pro)(B)(d-Asp)	KWKK
538	(Gly)(d-Ser)(ox-Amf)(B)(Gly)(Amf)	KWKK
539	(Gly)(Gly)(B)(d-Gln)(Dpa)(d-Phe)	KWKK

【０３３４】

【表５Ｄ】

540	(d-Arg)(d-Asp)(Gly)(d-Ser)(Dab)(d-Phe)	KWKK
541	(Abu)(d-Gln)(Dab)(d-Phe)(d-Asp)(d-Asp)	KWKK
542	(d-Lys)(d-Asn)(B)(d-Phe)(d-Asp)(d-Asp)	KWKK
543	(Gly)(Gly)(d-Phe)(d-Asn)(d-Lys)(d-Phe)	KWKK
544	(Nle)(d-Glu)(B)(Gly)(Gly)(d-Glu)	KWKK
545	(d-Asn)(B)(Gly)(d-Ser)(Nap)(d-Asp)	KWKK
546	(d-Asp)(B)(Abu)(Hle)(Amf)(Nle)	KWKK
547	(B)(d-Asn)(d-Pro)(Nap)(d-Glu)(d-Asp)	KWKK
548	(Gly)(Nle)(d-Glu)(B)(d-His)(Dab)	KWKK
549	(d-Arg)(d-Pro)(d-Asp)(ox-His)(d-Asp)(Nap)	KWKK
550	(Abu)(B)(d-Thr)(Amf)(d-Phe)(d-His)	KWKK
551	(Abu)(B)(B)(d-Asn)(d-Phe)(Pip)	KWKK
552	(Gly)(Gly)(d-Pro)(B)(d-Glu)(Nle)	KWKK
553	(Gly)(Gly)(d-Ser)(Nle)(Abu)(Nap)	KWKK
554	o(d-Ser)(Hle)(B)(Gly)(Gly)	KWKK
555	(B)(d-Asn)(d-Asp)(Nap)(d-Asn)(d-Asp)	KWKK
556	(B)(d-Asp)(Amf)(Gly)(d-Ser)(d-Thr)	KWKK
557	(B)(Nle)(Dab)(B)(ox-His)(Nle)	KWKK
558	(d-Lys)(B)(B)(B)(d-Thr)(ox-His)	KWKK
559	(d-Lys)(B)(Gly)(ox-His)(d-Thr)(d-Gln)	KWKK
560	(Gly)(d-Ser)(Amf)(Gly)(d-Ser)(Amf)	KWKK
561	(Abu)(B)(Gba)(d-Ser)(d-Asp)(d-Phe)	KWKK
562	(d-Thr)(d-Phe)(d-Lys)(d-Asn)(d-Thr)(d-Phe)	KWKK
563	(Abu)(B)(Gly)(d-Ser)(Dab)(d-Thr)	KWKK
564	(B)(Gly)(Abu)(Hle)(d-His)(Hle)	KWKK
565	(Abu)(Gly)(d-Glu)(Hle)(Amf)(Nle)	KWKK
566	(d-Asp)(B)(Dab)(d-Pro)(ox-His)(d-Glu)	KWKK
567	(d-Pro)(d-Glu)(Gly)(d-Glu)(Gly)(Nap)	KWKK
568	(Nle)(Nle)(Abu)(B)(d-Glu)(d-Gln)	KWKK
569	(d-Asn)(Abu)(Hle)(B)(Abu)(B)	KWKK
570	(Gly)(Gly)(Gly)(d-Asp)(Nap)(Dab)	KWKK
571	(Gly)(d-Asn)(d-Gln)(d-Ser)(Nap)(d-Asp)	KWKK
572	(ox-Nap)(d-Pro)(d-Asp)(Gly)(Hle)(d-Pro)	KWKK
573	(B)(Gly)(B)(B)(Hle)(d-Arg)	KWKK
574	(Nle)(d-Thr)(Nle)(Gly)(Gly)(d-Thr)	KWKK
575	(d-Asn)(d-Asp)(Pip)(d-Ser)(d-Thr)(d-Phe)	KWKK
576	(d-His)(d-His)(Gly)(B)(Gly)(Gly)	KWKK
577	(Abu)(Nle)(d-Pro)(d-Pro)(d-Pro)(Gly)	KWKK
578	(Dab)(Hle)(Hle)(Abu)(B)(Gly)	KWKK
579	(Gly)(d-Glu)(Nle)(Pip)(d-Asn)(Gly)	KWKK
580	(d-Ser)(d-Pro)(d-Pro)(d-Lys)(Pip)(d-Gln)	KWKK
581	(Gly)(d-Ser)(Nle)(d-Glu)(Gly)(Gly)	KWKK
582	(B)(Nle)(B)(Abu)(Hle)(d-Gln)	KWKK
583	(Gly)(Gly)(d-Glu)(Hle)(d-Asn)(Nle)	KWKK
584	(B)(d-Asn)(Dpa)(Nle)(d-Thr)(Dab)	KWKK
585	(B)(Nle)(d-Arg)(Hle)(B)(Gly)	KWKK
586	(B)(Nle)(Abu)(B)(Hle)(d-Gln)	KWKK
587	(Gly)(Gly)(Abu)(d-Thr)(d-Gln)(Nap)	KWKK
588	(d-Asp)(d-Thr)(d-Pro)(Hle)(d-Gln)(Hle)	KWKK
589	(Nap)(Hle)(Gly)(Gly)(d-Ser)(Nap)	KWKK
590	(B)(Nle)(Dab)(d-Pro)(B)(ox-His)	KWKK
591	(B)(d-His)(Dab)(d-Phe)(d-Phe)(Gly)	KWKK
592	(Abu)(Gly)(Hle)(B)(Amf)(d-Glu)	KWKK
593	(Gly)(d-Gln)(Gba)(d-Ser)(d-Asn)(d-Ser)	KWKK
594	(d-Ser)(d-Ser)(Dpa)(B)(Gly)(Gly)	KWKK

【０３３５】

【表５Ｅ】

595	(Nle)(d-Asp)(d-Asp)(Pip)(d-Gln)(Gly)	KWKK
596	(d-Pro)(B)(d-Asp)(d-Thr)(Hle)(d-Asp)	KWKK
597	(d-Asp)(d-Phe)(d-Ser)(B)(Hle)(Pip)	KWKK
598	(d-Pro)(Pip)(d-Thr)(d-Asn)(d-Ser)(Nap)	KWKK
599	(d-Gln)(ox-His)(d-Asn)(Pip)(d-Asp)(Nap)	KWKK
600	(d-Gln)(Pip)(ox-His)(d-Asn)(d-Asp)(Nap)	KWKK
601	(Abu)(Gly)(d-Asn)(Abu)(B)(Dpa)	KWKK
602	(B)(B)(Gly)(Gly)(d-Arg)(Dpa)	KWKK
603	(Gly)(d-Ser)(Gly)(d-Ser)(Amf)(Amf)	KWKK
604	(d-Asp)(d-Ser)(d-Phe)(B)(Hle)(Pip)	KWKK
605	(Gly)(Hle)(d-Thr)(Nap)(Gly)(Gly)	KWKK
606	(B)(Nap)(Dab)(d-Ser)(d-Phe)(Gly)	KWKK
607	(Dab)(d-Ser)(d-His)(Nap)(d-Asp)(Nap)	KWKK
608	(Nle)(d-Phe)(d-Asn)(B)(d-Ser)(d-Ser)	KWKK
609	(d-Asn)(B)(d-Pro)(d-Pro)(Nle)(d-His)	KWKK
610	(d-Gln)(d-Asn)(d-Glu)(d-Gln)(d-Ser)(d-Phe)	KWKK
611	(Abu)(B)(d-Lys)(Abu)(d-Ser)(d-Ser)	KWKK
612	(B)(d-Lys)(Gly)(ox-His)(d-Thr)(d-Gln)	KWKK
613	(B)(d-Asp)(d-Asn)(Pip)(Nle)(Gly)	KWKK
614	(Gly)(d-Ser)(Abu)(B)(d-Gln)(Nap)	KWKK
615	(Gly)(d-Ser)(Abu)(d-Arg)(d-Asp)(d-Phe)	KWKK
616	(Nle)(d-Lys)(Gly)(d-Glu)(ox-His)(d-Lys)	KWKK
617	(B)(d-Ser)(d-Ser)(d-Thr)(Gba)(Pip)	KWKK
618	(B)(Gly)(d-Phe)(Gly)(Gly)(d-Thr)	KWKK
619	(Abu)(Gly)(Gly)(Gly)(Gly)(d-Phe)	KWKK
620	(d-Pro)(d-Pro)(d-Ser)(d-Glu)(d-Glu)(Dab)	KWKK
621	(Gly)(Abu)(Gly)(Gly)(d-Arg)(Dpa)	KWKK
622	(d-Asp)(Abu)(B)(Hle)(Amf)(Nle)	KWKK
623	(d-Asn)(d-Pro)(d-Ser)(Nle)(d-Phe)(d-Glu)	KWKK
624	(d-Lys)(B)(B)(d-Asp)(ox-Amf)(d-Lys)	KWKK
625	(d-Gln)(B)(d-Pro)(Nle)(Pip)(d-Gln)	KWKK
626	(d-Gln)(d-Phe)(d-Asp)(d-His)(Gly)(Gly)	KWKK
627	(d-Pro)(d-Asn)(d-Ser)(Nle)(d-Phe)(d-Glu)	KWKK
628	(d-Asp)(d-Thr)(d-Gln)(Hle)(d-Pro)(Hle)	KWKK
629	(B)(d-Glu)(Gly)(d-His)(Dab)(Hle)	KWKK
630	(Nle)(d-His)(d-His)(B)(d-Glu)(Amf)	KWKK
631	(d-Thr)(Dab)(d-Asp)(Gly)(d-Thr)(Gly)	KWKK
632	(B)(Abu)(d-Phe)(Gba)(d-Ser)(d-Ser)	KWKK
633	(d-Phe)(Dab)(d-Glu)(B)(Abu)(Dpa)	KWKK
634	(Gly)(Gly)(d-Glu)(Hle)(d-His)(d-Pro)	KWKK
635	(Gly)(Dpa)(B)(Gly)(B)(d-His)	KWKK
636	(B)(Abu)(Nle)(d-Lys)(d-His)(Abu)	KWKK
637	(Gly)(d-Ser)(B)(Gly)(ox-Amf)(Amf)	KWKK
638	(Gly)(Abu)(ox-His)(d-His)(d-Ser)(d-Asn)	KWKK
639	(B)(d-Pro)(d-Asp)(Hle)(d-Thr)(d-Asp)	KWKK
640	(Gly)(Gly)(Gly)(d-Pro)(Nle)(d-Asp)	KWKK

【０３３６】

(実施例１３)

インセル透過選択-質量分析

ライブラリーをインセル透過選択-質量分析プラットフォーム(インセルPS-MS)にかけて、全細胞溶解物及びサイトゾルに存在する配列を見つけ出した(図１１)。１２ウェルプレート内のコンフルエントなHeLa細胞を２０μMのペプチドライブラリー(１０００メンバー)又はPPMOライブラリー(約１０３メンバー、ビーズ当たり3.5nmolの個々のペプチド)で、３７℃で１時間処置し、その後、PBS及び0.1mg/mLのヘパリンで洗浄して、膜に結合したコンジュゲートを解離させた。細胞を次いで浮かばせ、細胞外コンジュゲートをトリプシンで消化し、ペレット化し、そしてPBSで洗浄した。細胞を、RIPAバッファー(全細胞抽出で)又はジギトニンバッファー(サイトゾル抽出で)のいずれかを使用して穏やかに溶解させた。未処置コントロール溶解物中のタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を介して分析し、ウェスタンブロットを

行って、ERK1/2(サイトゾルマーカー)及びRab5(エンドソームマーカー)の存在を可視化した。Rab5は全細胞溶解物で見られるが、サイトゾル抽出物では見られない(図12)。実験試料に加えて、未処置溶解物の半分を、ポジティブコントロールとして、ライブラリーでスパイクした。

【0337】

溶解物中のビオチン化された種を磁気ストレプトアビジンビーズでアフィニティーキャプチャーし、最終的に、過ヨウ素酸ナトリウムとの簡単なインキュベーションを使用する酸化切断によって放出させた。単離されたペプチドを固相抽出によって脱塩し、電子移動解離(ETD)、高エネルギーETD、及び高エネルギー衝突解離(HCD)からなる、陽イオン性ペプチドに最適化されたミックスフラグメンテーション方法を使用して、Orbitrapタンデム質量分析を介して分析した。ライブラリー設計にマッチする配列を次いで、Pythonスクリプトを使用して同定した。

【0338】

(実施例12)

顕微鏡法

HeLa細胞を、底がカバーガラスの96ウェルプレートに、8000細胞/ウェルの密度で播種し、翌日、実験を行った。標準的な局在化イメージングでは、細胞を、5μM又は25μMのPMO-スルホ-Cy5-CPPコンジュゲートで、37℃及び5%CO_2で30分間処置した。各ウェルを培地で洗浄し、新鮮な培地中で1時間インキュベートし、その後、ヘキスト(核)及びリソトラッカーグリーン(エンドソーム)蛍光追跡色素を添加し、すぐにイメージングした。細胞を、50μMの7-ジエチルアミノクマリン-3-カルボン酸(DEAC)-k5で、37℃及び5%CO_2で1時間処置し、その後、培地で洗浄した。次いで、PMO-スルホ-Cy5-CPPコンジュゲートを前回と同様に添加した。イメージングの直前にサイトックスグリーンを添加して、非生存細胞が観察されないようにした。イメージングは、ホワイトヘッド研究所のKeckイメージング施設で、RPIスピニングディスク共焦点顕微鏡で、40倍の対物レンズで行った。

【0339】

【表６】

Table 6. ペプチド-PMO コンジュゲートライブラリー - 実験試料から同定されたペプチド

全細胞抽出物		
配列番号	ペプチド配列	末端モチーフ (d-アミノ酸)
641	(Abu)(d-Pro)(d-Pro)	KWKK
642	(d-Pro)(d-Pro)(Abu)	KWKK
643	(Nle)(d-Thr)(d-Glu)(d-Arg)	KWKK
644	(Nle)(d-Pro)(d-Asp)(d-Glu)(d-Thr)	KWKK
645	(Nle)(d-Pro)(d-Asp)(d-Arg)(ox-Trp)	WKK
646	(B)(Abu)(d-Ser)(Abu)(Hle)	KWKK
647	(d-Lys)(Nap)(d-Glu)(d-Thr)	KWKK
643	(Nle)(d-Thr)(d-Glu)(d-Arg)	KKWK
648	(Nle)(d-Pro)(d-Asp)(d-Arg)W(ox-Trp)	KK
649	(Nle)(d-Asp)(Dab)(Hle)	KWKK
650	(d-Lys)(d-Asp)(Nle)(d-Gln)(d-Gln)	KWKK
651	(Nle)(d-Thr)(d-Glu)(B)(Abu)	KWKK
652	(d-Ser)(Pip)(d-Ser)(Gly)(Hle)	KWKK
653	(Nle)(d-Thr)(d-Pro)(d-Thr)(d-Ser)	KWKK
654	(B)(Abu)(B)(d-Thr)(Hle)	KWKK
655	(d-Lys)(d-Asp)(d-Asn)(Hle)	KWKK
656	(B)(d-Glu)(Dab)(Gly)(Hle)	KWKK
サイトゾル抽出物		
配列番号	ペプチド配列	末端モチーフ (d-アミノ酸)
657	(B)(d-Arg)(d-Arg)(Abu)(Dab)(d-His)	KWKK
658	(B)(d-Arg)(Abu)(d-Arg)(Dab)(d-His)	KWKK
659	(Nle)(d-Asn)(Hle)(Nle)(d-Thr)(d-His)	KWKK
660	(Gba)(d-Asn)(Nle)(d-Asn)(d-His)	KWKK
661	(ox-His)(d-His)(Hle)	KWKK
662	(d-Arg)(ox-Nap)(d-Asn)(d-His)	KWKK
663	(d-Lys)(B)(Abu)(d-Arg)(d-His)	KWKK
664	(Abu)(Gly)(d-Asn)(Nle)(d-Asn)(d-His)	KWKK
665	(d-Lys)(d-Arg)(d-Arg)(d-His)	KWKK
666	(B)(d-Arg)(Nle)(Gba)(Dpa)	KWKK
667	(Nle)(d-Asn)(d-Lys)(B)(Gba)(d-His)	KWKK
668	(Nle)(Hle)(ox-Amf)(d-Pro)(d-Phe)	KWKK
669	(B)(d-Arg)(Gba)(Dpa)(Nle)	KWKK

【０３４０】

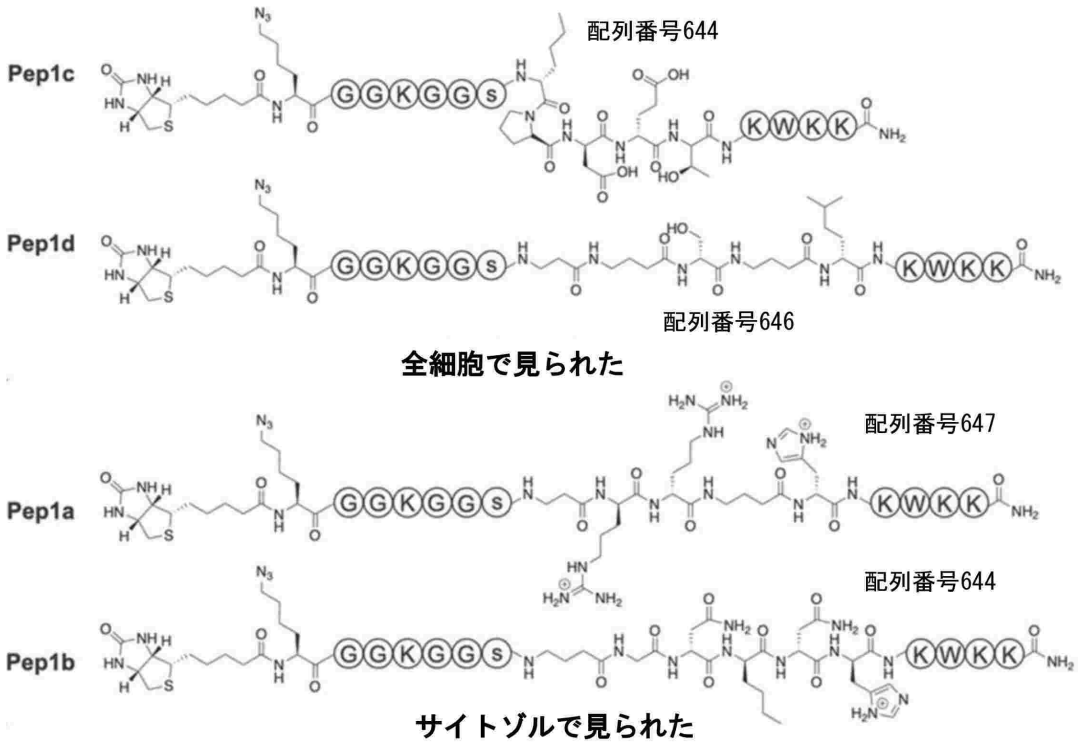
(実施例１３)

ヒットペプチド

いくつかのヒットペプチドを実験検証のために選択し、これらペプチドは、それらが見られた画分に応じて異なる活性を示した。ヒットＰＭＯ送達配列は、したがって、細胞のみのコントロール又はペプチドライブラリーで処置した試料で見られるペプチドとオーバーラップしない、ＰＰＭＯライブラリー画分でのみ見られるペプチドとして同定した。サイトゾル抽出物で見られた２つの配列(Ｐｅｐ１ａ、Ｐｅｐ１ｂ)及び全細胞抽出物から得られた２つ(Ｐｅｐ１ｃ、Ｐｅｐ１ｄ)を選択し、これらの配列を以下に示す。

【０３４１】

【化４１】



【０３４２】

これらのペプチドを、イソセラモックスリンカーを置き換えるためのd-Ser残基を除いてライブラリー設計と同一の配列を用いて、半自動固相ファストフローペプチド合成を介して合成した。これらの配列をまず、濃度応答EGFPアッセイで試験した。サイトゾルから抽出された配列は、全細胞溶解物から得られた配列と比較して有意に増大した活性を示し、Pep1aは43μMのEC50を示し、それに対し、Pep1cは380μMのEC50であった(図13A)。これらの配列が、試験した濃度で膜毒性を示さなかったことも確認された(図13B)。ペプチドは、電荷と活性との間で正の相関を示し、最も性能の良いペプチド(Pep1a)は+7の電荷を有しており、それに対し、Pep1cは+2の電荷であった。

【０３４３】

ヒットペプチドは親ペプチドであるペネトラチンよりも高い活性を示さないが、これらが示す毒性及び膜破壊は有意に低く、このことは、PMO送達ビヒクルとしてのこれらの潜在的な有用性を示している。Pep1a及びPep1cを、３μMに近いEC50を示す、間に非α骨格残基であるβ-アラニン及び6-アミノヘキサン酸を有する8つのArg残基からなる公知のエンドソーム脱出ペプチドであるBpepと比較した(図13C)。

【０３４４】

生物活性なヒットペプチドは、単独では、全体で1000メンバーからなるライブラリーによって示されるPMO送達は生じさせない。約1000メンバーからなるライブラリーの20μMの処置用量以内では、それぞれの個々のペプチドは、どのペプチドも単一ではPMOカーゴを送達しないことが分かっている濃度である約20nMで存在する。

【０３４５】

ライブラリーの全体的なPMO送達有効性が、わずかな数の高度に活性なペプチドに起因し得るかどうかを調べるために、HeLa 654細胞を20μMの250メンバーからなるライブラリーで処置し、個々のライブラリーメンバーの濃度とほぼ同じ濃度で透過ペプチド(Pep1a又はポジティブコントロールD-Bpepのいずれか)をスパイクした同一のライブラリーで処置したHeLa細胞の活性と比較した(図14A)。250メンバーからなるライブラリー単独と、強力なペプチドをスパイクしたライブラリーとの間でPMO送達に有意な差はなく、このことは、全体的な、組み合わされたライブラリーの透過が、わずかな数のメ

ンバーの活性によって影響を受ける可能性が低いことを示している。この所見を更に裏付けるために、実験を、2500メンバーからなる、より大きなライブラリーで、個々のライブラリーメンバーの10倍高い濃度で透過ペプチドをスパイクして反復したところ、これも、ライブラリーのPMO送達において有意な変化を示さなかった。

【０３４６】

4つのヒットライブラリー候補、及びライブラリーの品質管理シーケンシングで見られたが細胞からは抽出されていない「ライブラリーペプチド」を、個別及び組み合わせの両方で、PMO送達について試験した(図14B)。5μMの「組み合わせペプチド」試料は、1μMのそれぞれの個々のペプチドを含有しているが、この5つのメンバーからなるライブラリーは、1μMの個々のペプチドのいずれよりも有意に高いPMO送達を示している。実際、5μMの総ペプチドで組み合わせたペプチドのPMO送達は、それぞれ5μMの5つのペプチド全ての平均値に、より近く適合しており、このことは更に、ライブラリーで見られる活性が、多くの陽イオン性の個々のペプチドの活性のアンサンブル効果に起因しており、わずかな数の高度に活性な配列には起因していないことを示唆している。

【０３４７】

Pep1aを、パルスチェイスフォーマットEGFPアッセイで、一連の化学的エンドサイトーシス阻害剤で試験し、ここでは、HeLa 654細胞を阻害剤とプレインキュベートして様々なエンドサイトーシス経路を止め、その後、PMO-CPPを添加した。細胞を、示されている化合物と30分間プレインキュベートし、次いで、5μMのPMO-Pep1aを添加した。構築物で3時間処置した後、細胞を0.1mg/mLのヘパリンで洗浄し、培地を新鮮な未処置の培地に22時間交換して、膜に結合した構築物を解離させ、その後、フローサイトメトリーを行った。Pep1aの活性は、10μMのクロルプロマジンによって影響を受けた(図15A)。

【０３４８】

細胞を4℃又は37℃で30分間プレインキュベートし、その後、PMO-ペプチドコンジュゲートを5μMの濃度で各ウェルに添加した。4℃又は37℃で2時間インキュベートした後、細胞を0.1mg/mLのヘパリンで洗浄し、培地を新鮮な未処置の培地に22時間交換し、その後、フローサイトメトリーを行った。4℃の条件は、各コンジュゲートの活性に有意に影響を与え、このことは、ライブラリー試料全体と同様に(図10B)、4つのヒットペプチドの取り込みがエネルギー依存性であり、ペプチドがエンドサイトーシスを介して細胞に侵入する可能性が最も高いことを示している(図15B)。

【０３４９】

サイトゾルで見られた配列と全細胞溶解物で見られた配列との間の活性の差を調べ、フローサイトメトリーを使用して、基準の化合物であるPMO-D-Bpepと比較した。この目的のために、いくつかのスルホCy5標識されたPMO-CPPを作製し、フルオロフォアがPMO送達活性に影響を与えないことを確認するために試験を行った(図16A)。フルオロフォアを有するコンジュゲートのEGFPアッセイの結果と、フルオロフォアを有さないコンジュゲートの結果を比較すると、構築物のEC50値の間で有意な差は見られなかった(図16B～図16D)。

【０３５０】

加えて、PMO-スルホCy5-CPPの取り込み及び核送達を、EGFPアッセイからのEGFP蛍光及び蛍光類似体の総取り込みからのCy5蛍光の両方をモニタリングすることによって分析した。各コンジュゲートは、EGFP及びCy5蛍光の両方で類似の濃度依存性の増大を示した(図17A～図17C)。Pep1cは、EGFPチャネル及びCy5チャネルの両方で低い蛍光シグナルを示した。他方で、Pep1aは、各チャネルでより高い蛍光シグナルを示し、このことは、Pep1cと比較した、より多くの取り込み及び核局在化を示している。興味深いことに、D-Bpepは、より多くのEGFP蛍光を示したが、Pep1aよりもCy5蛍光がわずかに弱く、このことは、D-Bpepがエンドソームに取り込まれるとより効率的に核にアクセスし得るが、総取り込みはPep1aと比較して低いことを示している。

【０３５１】

PS-MSによって発見されたヒットペプチドは、エンドソーム膜を透過性にして他のカーゴの放出を可能にする可能性が低い。HeLa細胞をまず、D-リジン残基から構成される、エンドソームに局在化しているペプチドであるDEAC-k5とプレインキュベートした[47]。DEAC-k5は、CPP処置なしのコントロールでは青い点として見ることができ、予想されるエンドソーム局在化を示している(図13)。PMO-スルホCy5-CPP構築物で処置した後、DEAC-k5はエンドソームに存在し続け、このことは、Pep1a及びPep1cが、他のエンドソームカーゴが放出されるようにエンドソームを非特異的に透過性にすることはないことを示している。

【０３５２】

本明細書では、化学的ライブラリーが、タンパク質へのペプチドバインダーを同定するための他のディスプレイ技術の多様性を達成し得ること、及びこの戦略がインビボでの細胞表面選択に適用され得ることが示されている。加えて、サイトゾルを抽出して、モデルアンチセンスカーゴにコンジュゲートした完全に合成のペプチドライブラリーのインセル選択を行うことによって、及びこれらの配列を全細胞抽出物で見られる配列と比較することによって、エンドソームに蓄積する配列を排除することができる。

【０３５３】

細胞内分画と組み合わされたインセルPS-MSは、サイトゾルにアクセスし得、PMOを核に送達し得る、新規な非生物的ペプチドの同定をもたらした。Pep1aは、ポジティブコントロールペプチドのBpepと同様に、エンドソームを脱出することによって、PMOを核に送達することが可能であった。更に、Pep1aは、エンドソームを透過性にして他のエンドソームカーゴの脱出を可能にするとは考えられず、また、細胞膜毒性も示さない。この新規なプラットフォームを通して発見された全てのペプチドは、CPPペネトラチンよりも低い毒性を示した。非カノニカルな残基によってもたらされた低い毒性及び優れた化学的多様性を有していることによって、インセルPS-MSプラットフォームで発見されたペプチドは、ライブラリーの親ペプチドよりも優れた利点を示す。しかし、個別にシーケンシング及び検証されたわずかな数の活性なPMO-CPPは、単独では、ライブラリーの全体的な細胞膜透過に関与しない。実際、PMO送達は、本明細書におけるプラットフォームで発見されたヒットを含む多くの低濃度のペプチドの組み合わされた活性から生じる可能性の方が高い。

【図面】

【図１】

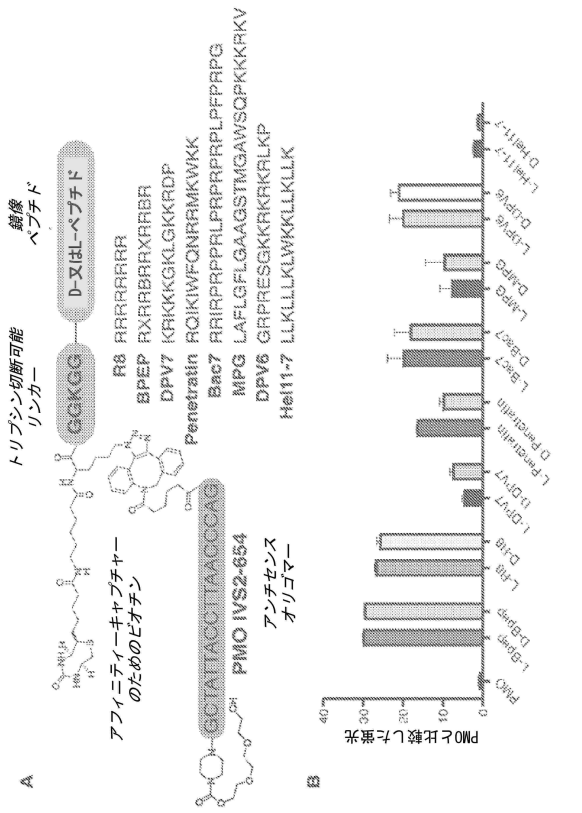


FIG. 1

【図２】

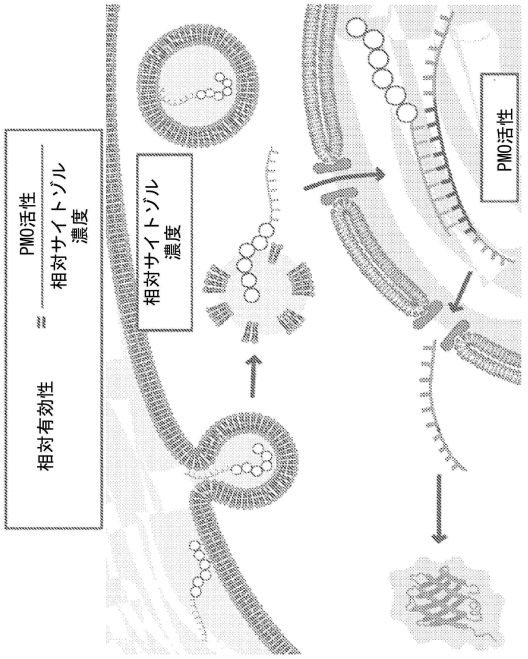


FIG. 2

【図３Ａ】

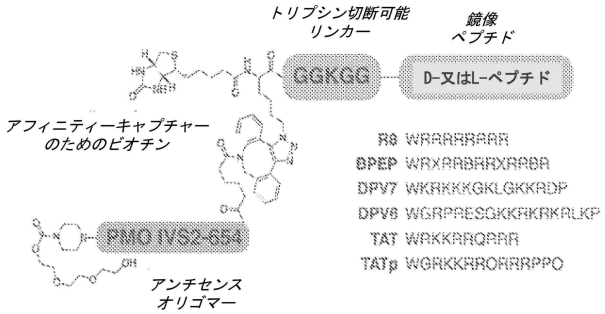


FIG. 3A

【図３Ｂ】

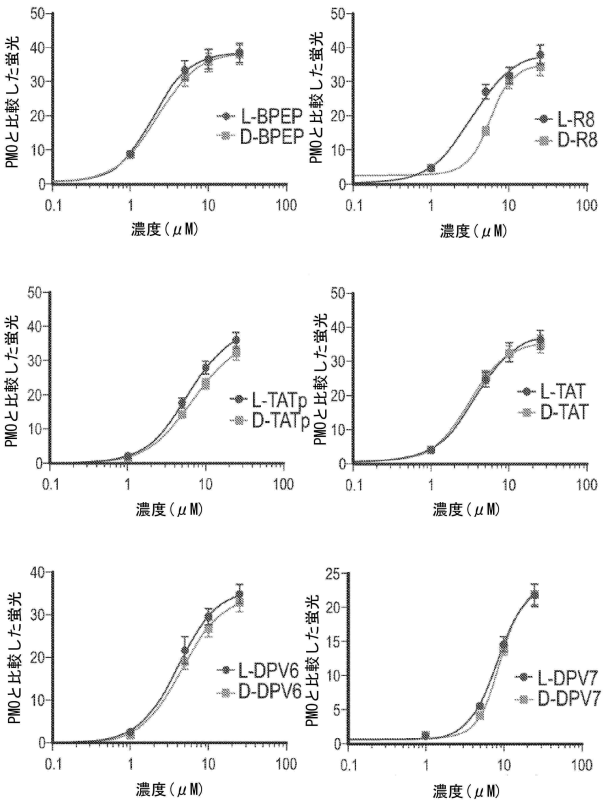


Fig. 3B

【図３Ｃ】

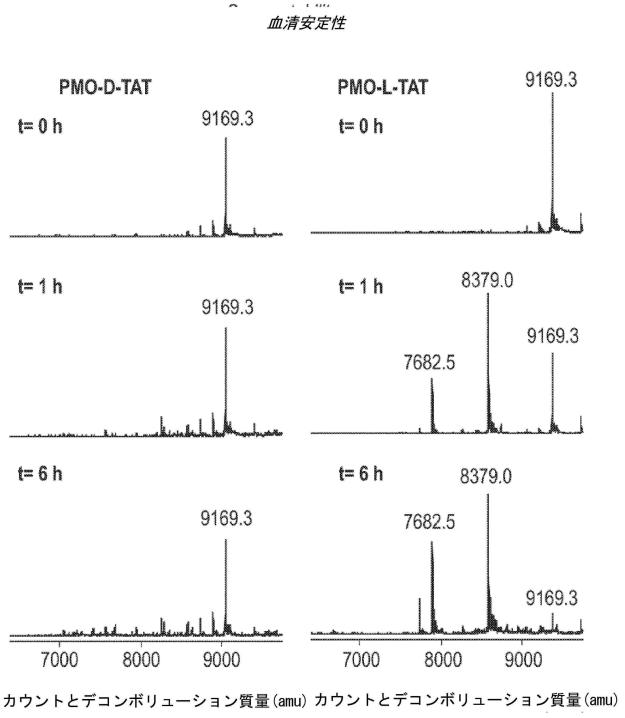


Fig. 3C

【図４Ａ】

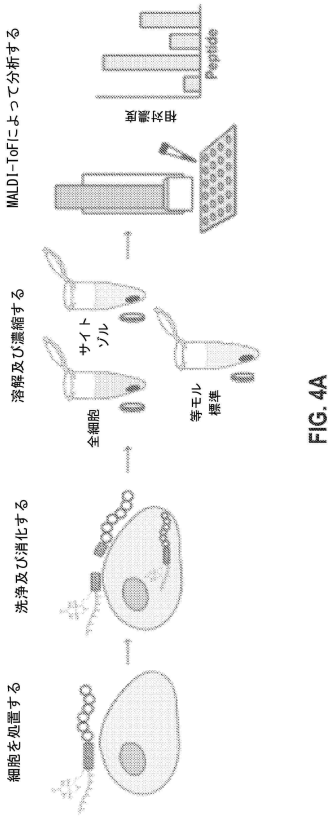


FIG. 4A

【図４Ｂ】

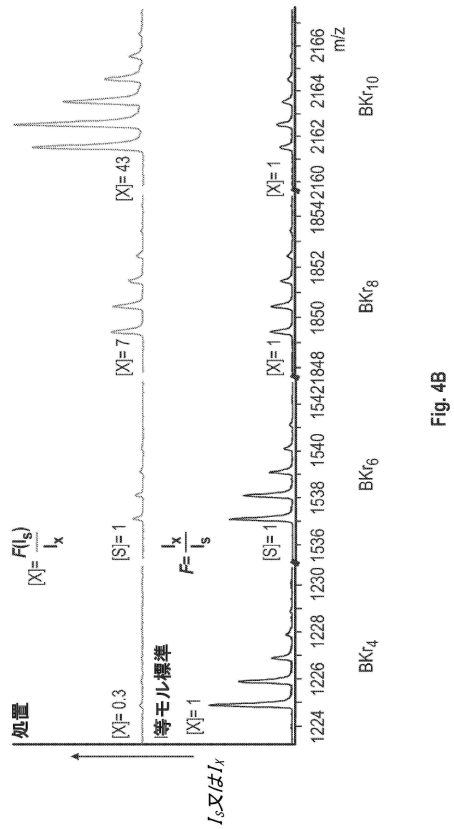


Fig. 4B

【図４Ｃ】

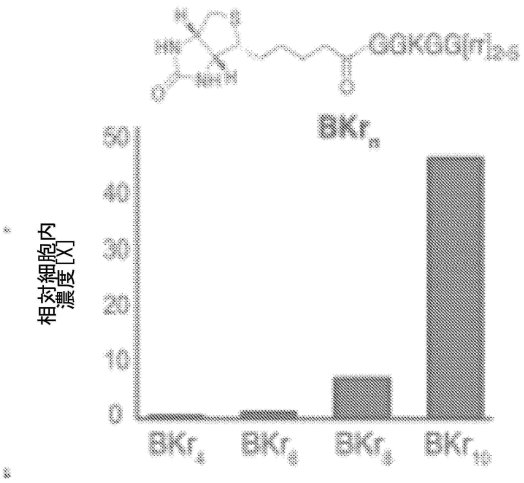


FIG. 4C

【図５－１】

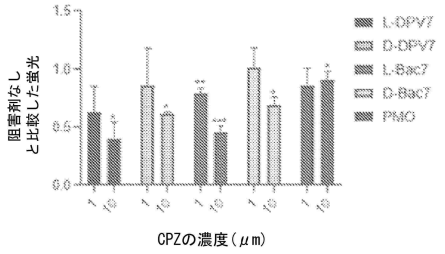


FIG. 5A

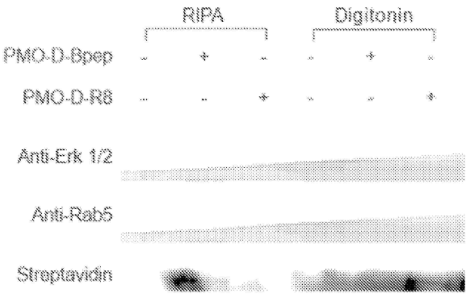


FIG. 5B

【図５－２】

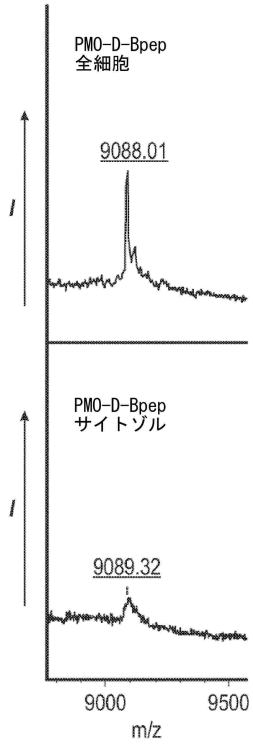


Fig. 5C

【図５－３】

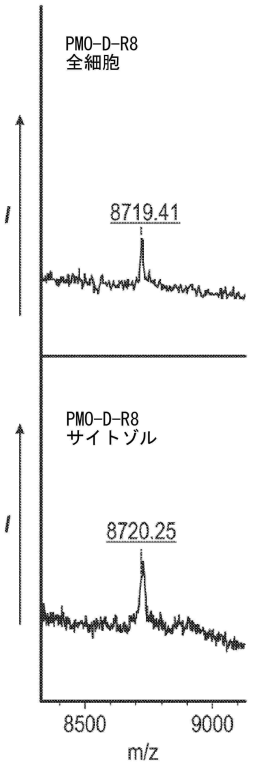


Fig. 5D

【図６】

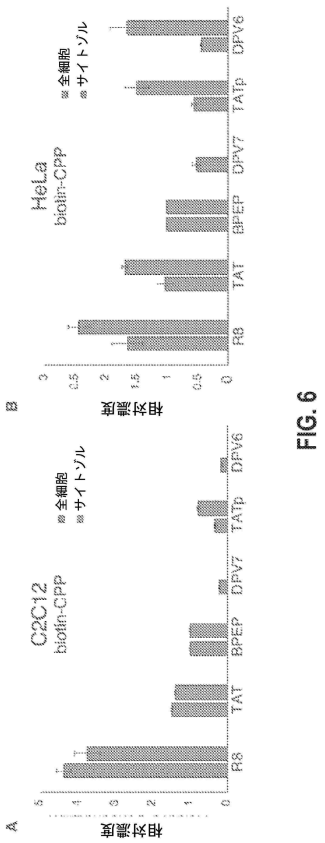


FIG. 6

【図７】

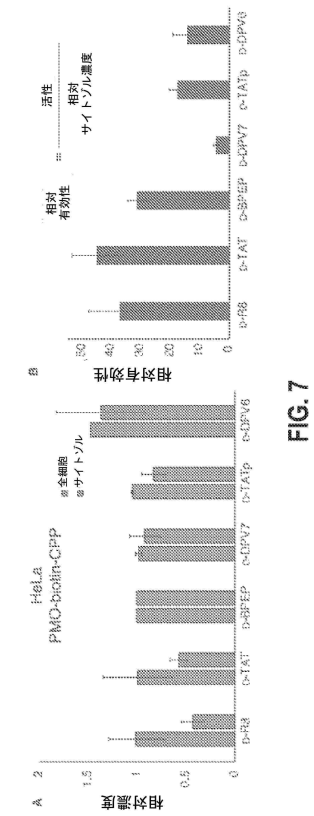


FIG. 7

【図８】

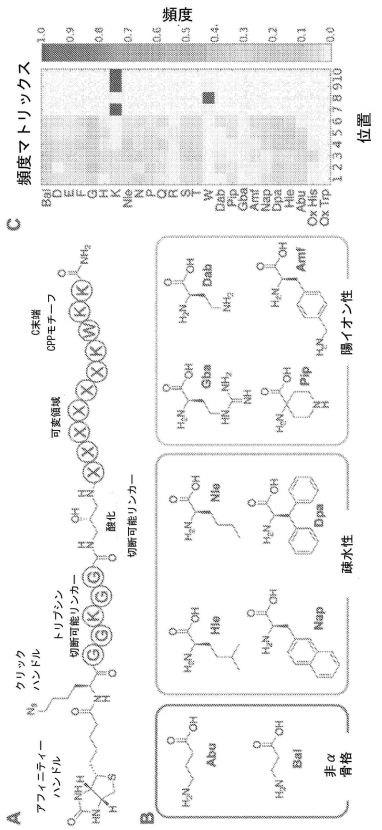


FIG. 8

【図９】

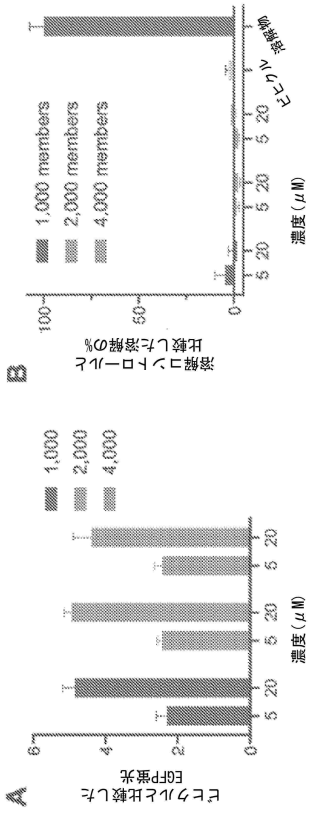


FIG. 9

【図１０】

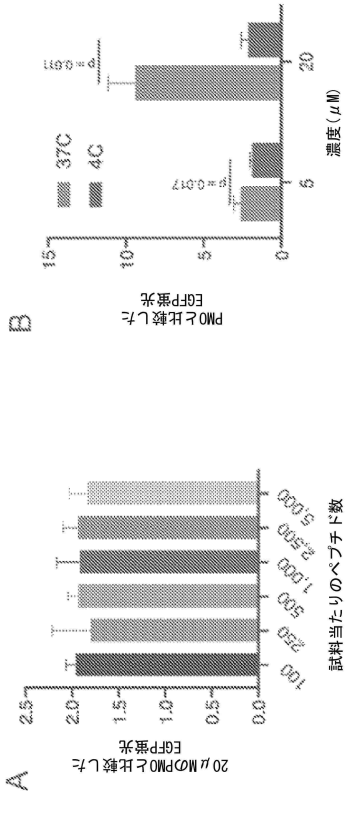


FIG. 10

【図１１】

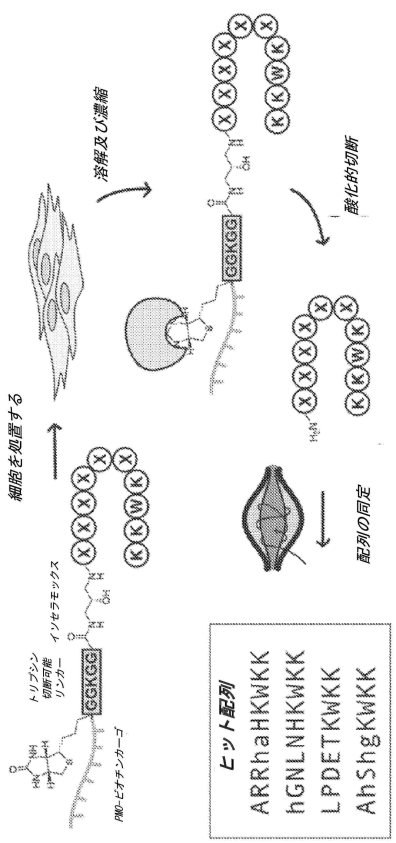


FIG. 11

【図１２】

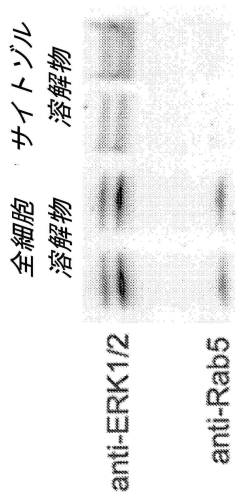


FIG. 12

【図１３】

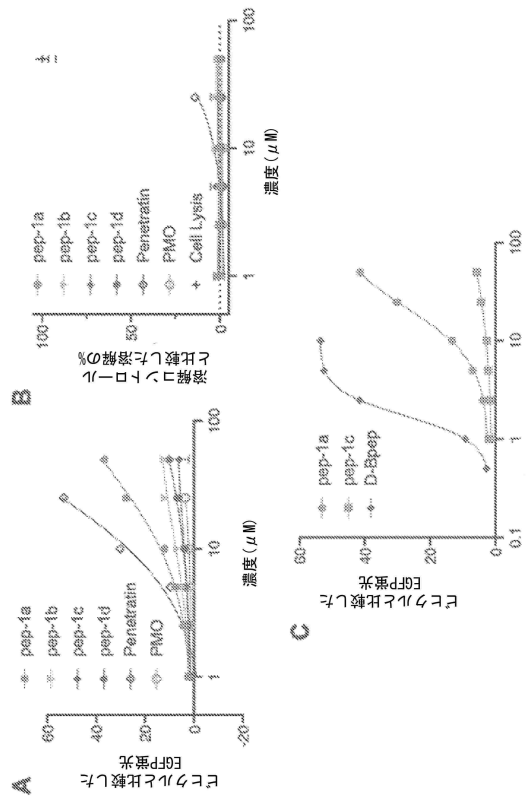


FIG. 13

【図１４】

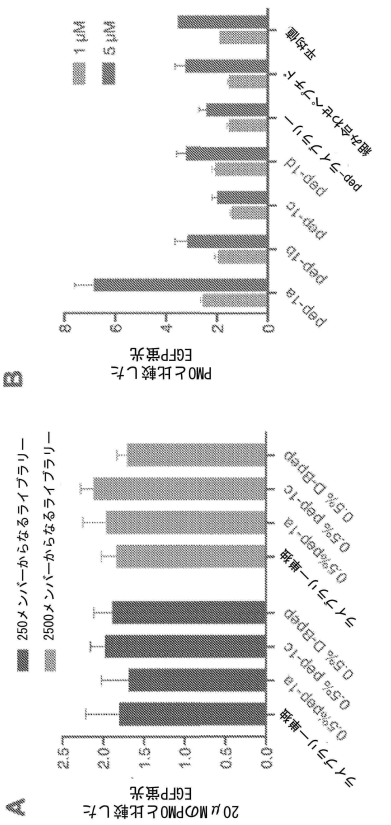


FIG. 14

【図１５】

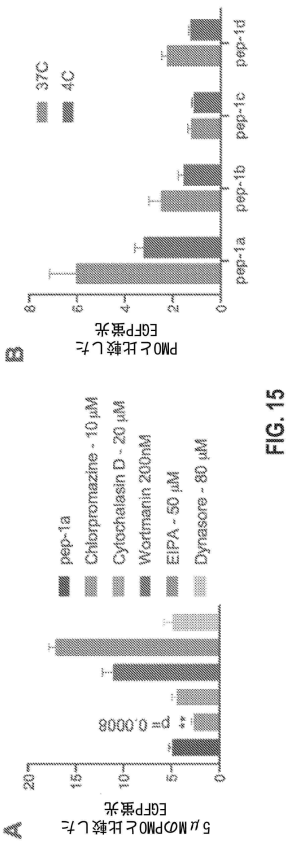


FIG. 15

【図１６－１】

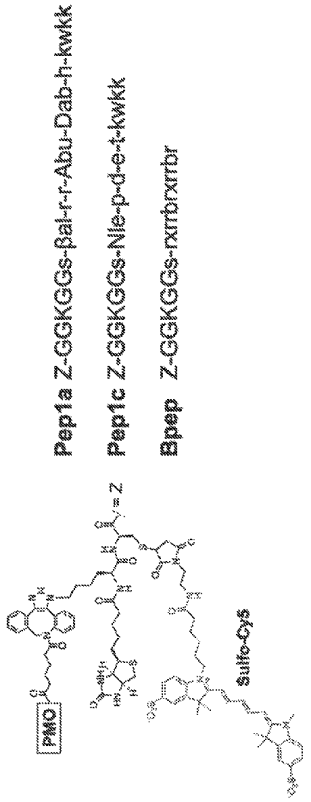


FIG. 16A

【図１６－２】

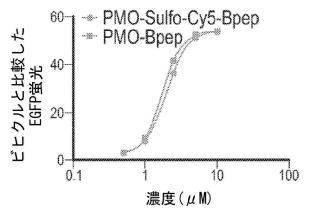


Fig. 16B

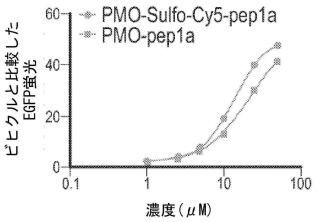


Fig. 16C

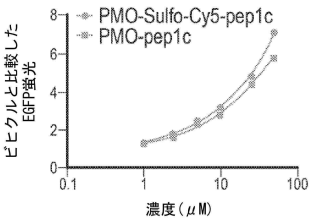


Fig. 16D

【図１７】

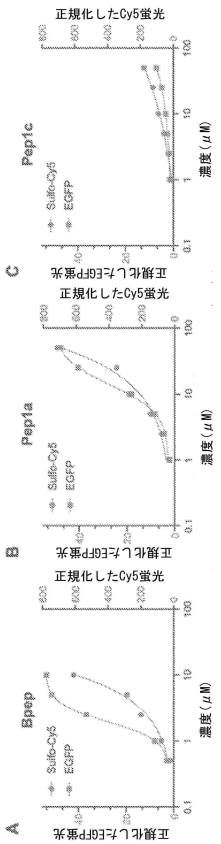


FIG. 17

【配列表】
2024536721000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/042365

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/64 C07K19/00
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

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/079386 A1 (SAREPTA THERAPEUTICS INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 25 April 2019 (2019-04-25) Abstract; p.1,l. 22-25; p. 4, l. 25-26; claims 1, 15	1,3-32
Y	WO 2017/106304 A1 (SAREPTA THERAPEUTICS INC [US]) 22 June 2017 (2017-06-22) Abstract; p. 39, table 2; claims 1; claim 63	1,3-32

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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	Date of mailing of the international search report
30 March 2023	12/04/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	López García, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/042365

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1, 3-32(all partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/042365

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WERLE M ET AL: "Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs", AMINO ACIDS ; THE FORUM FOR AMINO ACID AND PROTEIN RESEARCH, SPRINGER-VERLAG, VI, vol. 30, no. 4, 20 April 2006 (2006-04-20) , pages 351-367, XP019430805, ISSN: 1438-2199, DOI: 10.1007/S00726-005-0289-3 Abstractd; p. 360,"3.2 Replacement of labile amino acids"	1,3-32
X,P	SCHISSEL CARLY K. ET AL: "-Peptides Retain Antisense Morpholino Oligomer Delivery Activity", ACS BIO & MED CHEM AU, vol. 2, no. 2, 20 April 2022 (2022-04-20), pages 150-160, XP055962026, ISSN: 2694-2437, DOI: 10.1021/acsbiomedchemau.1c00053 Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsbiomedchemau.1c00053> the whole document	1,3-32
X	WO 2015/179742 A1 (GENZYME CORP [US]) 26 November 2015 (2015-11-26)	1,3-5,7, 8,10-12, 25-29
Y	Abstract;embodiments on pp. 34-38; Fig. 1; claim 2; examples	1,3-32
X	WO 2009/005793 A2 (AVI BIOPHARMA INC [US]; MOULTON HONG M [US]; IVERSEN PATRICK L [US]) 8 January 2009 (2009-01-08)	1,3-5,7, 8,10-12, 25-32
Y	Abstract; examples; claims; Fig. 1, 5.	1,3-32
Y	ECHIGOYA YUSUKE ET AL: "Effects of systemic multiexon skipping with peptide-conjugated morpholinos in the heart of a dog model of Duchenne muscular dystrophy", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 114, no. 16, 3 April 2017 (2017-04-03), pages 4213-4218, XP055910994, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1613203114 Abstract; Fig. 1B	1,3-32

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International Application No. PCT/US2022/042365

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 3-32(all partially)

Oligonucleotide conjugate comprising a compound of formula (I) wherein J is d-R8

---

2. claims: 1, 3-32(all partially)

Oligonucleotide conjugate comprising a compound of formula (I) wherein J is d-BPEP or d-WBPEP

---

3. claims: 1, 3-32(all partially)

Oligonucleotide conjugate comprising a compound of formula (I) wherein J is d-DPV7, d-DPV6, d-WDPV7 or d-WDPV6

---

4. claims: 1, 3-32(all partially)

Oligonucleotide conjugate comprising a compound of formula (I) wherein J is d-penetratin

---

5. claims: 1, 3-32(all partially)

Oligonucleotide conjugate comprising a compound of formula (I) wherein J is d-Bac7

---

6. claims: 1, 3-32(all partially)

Oligonucleotide conjugate comprising a compound of formula (I) wherein J is d-MPG

---

7. claims: 1, 3-32(all partially)

Oligonucleotide conjugate comprising a compound of formula (I) wherein J is d-Hel11-7

---

8. claims: 1, 3-32(all partially)

Oligonucleotide conjugate comprising a compound of formula (I) wherein J is d-TAT, d-TATp, d-WTAT or d-WTATp

---

9. claims: 2(completely); 3-32(partially)

Oligonucleotide conjugate comprising a compound of formula (III)

International Application No. PCT/US2022/042365

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

10. claims: 33-47

Method of identifying a peptide capable of delivering a phosphorodiamidate morpholino oligomer into a cell

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/042365

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FADZEN COLIN M. ET AL: "Chimeras of Cell-Penetrating Peptides Demonstrate Synergistic Improvement in Antisense Efficacy", BIOCHEMISTRY, vol. 58, no. 38, 26 August 2019 (2019-08-26), pages 3980-3989, XP055837081, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00413 Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.biochem.9b00413> Abstract; Fig.1 -----	1,3-32

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/042365

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019079386 A1	25-04-2019	EP 3697422 A1	26-08-2020
		JP 2020537654 A	24-12-2020
		MA 50834 A	26-08-2020
		TW 201928056 A	16-07-2019
		US 2020316210 A1	08-10-2020
		WO 2019079386 A1	25-04-2019
WO 2017106304 A1	22-06-2017	AR 107220 A1	11-04-2018
		AU 2016372026 A1	21-06-2018
		BR 112018012237 A2	04-12-2018
		CA 3006748 A1	22-06-2017
		CN 108472504 A	31-08-2018
		EA 201891419 A1	31-01-2019
		EP 3389719 A1	24-10-2018
		ES 2901772 T3	23-03-2022
		IL 259587 A	31-07-2018
		IL 284753 A	31-08-2021
		JP 2018538302 A	27-12-2018
		KR 20180088874 A	07-08-2018
		TW 201728341 A	16-08-2017
		US 2019030176 A1	31-01-2019
		WO 2017106304 A1	22-06-2017
WO 2015179742 A1	26-11-2015	AR 101542 A1	28-12-2016
		AU 2015263963 A1	01-12-2016
		BR 112016027236 A2	17-10-2017
		CA 2949104 A1	26-11-2015
		CN 106459975 A	22-02-2017
		EP 3151841 A1	12-04-2017
		JP 6825914 B2	03-02-2021
		JP 2017517253 A	29-06-2017
		JP 2021063128 A	22-04-2021
		KR 20170005118 A	11-01-2017
		RU 2020142530 A	26-04-2021
		SG 10202004611S A	29-06-2020
		SG 11201608880V A	29-11-2016
		TW 201617373 A	16-05-2016
		US 2017182171 A1	29-06-2017
		US 2019388547 A1	26-12-2019
		WO 2015179742 A1	26-11-2015
WO 2009005793 A2	08-01-2009	AU 2008271050 A1	08-01-2009
		CA 2691673 A1	08-01-2009
		EP 2170363 A2	07-04-2010
		EP 3443976 A1	20-02-2019
		ES 2694726 T3	26-12-2018
		JP 5864100 B2	17-02-2016
		JP 6584888 B2	02-10-2019
		JP 2010532168 A	07-10-2010
		JP 2016047050 A	07-04-2016
		JP 2018171066 A	08-11-2018
		US 2009099066 A1	16-04-2009
		WO 2009005793 A2	08-01-2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*21/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/04	
Ａ６１Ｐ	*21/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00	
Ａ６１Ｋ	*31/712(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/712	
Ａ６１Ｋ	*31/7125(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7125	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*47/65 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/65	
Ａ６１Ｋ	*47/64 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/64	

,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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＰＹＴＨＯＮ

弁理士　実広 信哉

(74)代理人　100133400

弁理士　阿部 達彦

(72)発明者　カーリー・ケー・シッセル

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１３９・ケンブリッジ・マサチューセッツ・アベニュー・７７・マサチューセッツ・インスティトュート・オブ・テクノロジー内

(72)発明者　シャーロット・イー・ファーカー

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１３９・ケンブリッジ・マサチューセッツ・アベニュー・７７・マサチューセッツ・インスティトュート・オブ・テクノロジー内

(72)発明者　アンニカ・ビー・マルムバーグ

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・ファースト・ストリート・２１５・サレプタ・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者　アンドレイ・ロアス

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１３９・ケンブリッジ・マサチューセッツ・アベニュー・７７・マサチューセッツ・インスティトュート・オブ・テクノロジー内

(72)発明者　ブラッドリー・エル・ペンテルート

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１３９・ケンブリッジ・マサチューセッツ・アベニュー・７７・マサチューセッツ・インスティトュート・オブ・テクノロジー内

Ｆターム（参考）　4B063　QR32 QR48

4C076　CC09 EE59 FF34

4C084　AA13 NA11 NA14 ZA94

4C086　AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA11 NA14 ZA94

4H045　AA10 AA30 BA10 BA12 BA13 BA54 EA20