

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6757373号
(P6757373)

(45) 発行日 令和2年9月16日(2020.9.16)

(24) 登録日 令和2年9月1日(2020.9.1)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113 Z N A Z

請求項の数 31 (全 308 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2018-145256 (P2018-145256)</p> <p>(22) 出願日 平成30年8月1日(2018.8.1)</p> <p>(62) 分割の表示 特願2016-564442 (P2016-564442) の分割</p> <p>原出願日 平成27年1月16日(2015.1.16)</p> <p>(65) 公開番号 特開2018-186829 (P2018-186829A)</p> <p>(43) 公開日 平成30年11月29日(2018.11.29)</p> <p>審査請求日 平成30年8月31日(2018.8.31)</p> <p>(31) 優先権主張番号 62/063, 359</p> <p>(32) 優先日 平成26年10月13日(2014.10.13)</p> <p>(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 61/928, 405</p> <p>(32) 優先日 平成26年1月16日(2014.1.16)</p> <p>(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)</p>	<p>(73) 特許権者 516212924 ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド WAVE LIFE SCIENCES LTD. シンガポール 018936 シンガポール, #12-00 マリナ ワン イースト タワー, 7 ストライツ ビュー</p> <p>(74) 代理人 100116850 弁理士 廣瀬 隆行</p> <p>(72) 発明者 ミーナ アメリカ合衆国 02478 マサチューセッツ, 39 トローブリッジ ストリート ベルモント</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 キラルデザイン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- 1) 共通塩基配列および長さ;
- 2) 骨格結合の共通パターン; および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義される特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物であって、この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、前記特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるようにキラル制御され、前記骨格キラル中心の共通パターンは、5'から3'のRp(Sp)2を含み、前記特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドは、5又はそれ以上のキラルな修飾されたリン酸結合を有し、前記特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドのキラルな修飾されたリン酸結合の少なくとも50%は、Sp構造を有する組成物。

【請求項2】

請求項1に記載の組成物であって、骨格キラル中心の前記共通パターンが、5'から3'の(Sp)t(Rp)n(Sp)m(式中、tは、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7又は8であり、nは1であり、mは、2, 3, 4, 5, 6, 7又は8である。)を含む、組成物。

【請求項 3】

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義される特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物であって、

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、前記特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるようにキラル制御され、

前記骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ (式中、 n は1であり、 t は、独立して、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7又は8であり、 m は、2, 3, 4, 5, 6, 7又は8である。)を含み、

前記共通塩基配列は、少なくとも10塩基を含む組成物。

10

【請求項 4】

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義される特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物であって、

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、前記特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるようにキラル制御され、

前記骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ (式中、 n は1であり、 t は、独立して、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7又は8であり、 m は、2, 3, 4, 5, 6, 7又は8である。)を含み、

前記共通塩基配列は、少なくとも18塩基を含み、

約10%以上約50%未満の前記ヌクレオチドのキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は前記Rp構造を含む組成物。

20

【請求項 5】

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義される特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物であって、

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、前記特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるようにキラル制御され、

前記骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ (式中、 n は1であり、 t は、独立して、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7又は8であり、 m は、2, 3, 4, 5, 6, 7又は8である。)を含み、

前記特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの前記共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、又は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列を含む、組成物。

30

40

【請求項 6】

請求項 5 に記載の組成物であって、前記特徴的な配列要素がSNPである、組成物。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の組成物であって、前記特徴的な配列要素が突然変異である、組成物。

【請求項 8】

請求項 5 ~ 7 のいずれか1項に記載の組成物であって、前記特定の対立遺伝子が疾患を

50

引き起こす，又は，引き起こす恐れのあるものである，組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか1項に記載の組成物であって，前記オリゴヌクレオチドは，それぞれ翼 - コア - 翼構造を含み，それぞれの翼領域は，独立して，2 又はそれ以上の塩基を有し，前記コア領域は 1 1，1 2，1 3，1 4，1 5，1 6，1 7，1 8，1 9，2 0，2 5 又はそれ以上の塩基長を有する，組成物。

【請求項 10】

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義される特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物であって，この組成物は，この組成物は，同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて，前記特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるようにキラル制御され，

前記オリゴヌクレオチドは，翼 - コア - 翼構造を有し，

前記骨格キラル中心の共通パターンは， $(S_p)_t(R_p)_n(S_p)_m$ (式中， t は，1，2，3，4，5，6，7 又は 8 であり， n は 1 であり， m は，2，3，4，5，6，7 又は 8 である。) を含み，それぞれの翼領域は，独立して，2 又はそれ以上の塩基長を有し，

前記コア領域は，1 1，1 2，1 3，1 4，1 5，1 6，1 7，1 8，1 9，2 0，2 5 又はそれ以上の塩基長を有し，

前記コア領域は，少なくとも 2 つの R_p ヌクレオチド間結合を有し，

前記骨格キラル中心の共通パターンは，約 50% 以上の前記 S_p 構造の骨格キラル中心を有する，

組成物。

【請求項 11】

請求項 9 ~ 10 のいずれか1項に記載の組成物であって，前記第 1 の翼領域は，独立して 2，3，4，5 又はそれ以上の塩基長を有する，組成物。

【請求項 12】

請求項 9 ~ 11 のいずれか1項に記載の組成物であって，前記第 1 の翼領域は，独立して 5 又はそれ以上の塩基長を有する，組成物。

【請求項 13】

請求項 9 ~ 12 のいずれか1項に記載の組成物であって，前記第 1 の翼領域は，独立して 8 未満の塩基長を有する，組成物。

【請求項 14】

請求項 9 ~ 13 のいずれか1項に記載の組成物であって，前記第 2 の翼領域は，独立して 2，3，4，5 又はそれ以上の塩基長を有する，組成物。

【請求項 15】

請求項 9 ~ 14 のいずれか1項に記載の組成物であって，前記第 2 の翼領域は，独立して 5 又はそれ以上の塩基長を有する，組成物。

【請求項 16】

請求項 9 ~ 15 のいずれか1項に記載の組成物であって，前記第 2 の翼領域は，独立して 8 未満の塩基長を有する，組成物。

【請求項 17】

請求項 9 ~ 16 のいずれか1項に記載の組成物であって，前記特定のオリゴヌクレオチドタイプの前記オリゴヌクレオチドは，修飾糖を含む，組成物。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の組成物であって，前記修飾糖が 2' 修飾を含む，組成物。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

請求項 18 に記載の組成物であって、前記 2' 修飾が、2' - OR¹ (式中、R¹ は置換されてもよい C₁ - 6 アルキル基である。) 組成物。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の組成物であって、前記 2' 修飾が 2' - MOE である、組成物。

【請求項 21】

請求項 19 に記載の組成物であって、前記 2' 修飾が 2' - OMe である、組成物。

【請求項 22】

請求項 17 に記載の組成物であって、前記修飾糖は二価の置換基 - L - を有し、ここで - L - は糖の C₂ と C₄ の間にある、組成物。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の組成物であって、- L - は - O - CH₂ - であり、- CH₂ - は置換されてもよい。

【請求項 24】

請求項 9 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記翼領域が修飾糖を含む、組成物。

【請求項 25】

請求項 9 ~ 19、及び 21 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記 2' 修飾が 2' - OMe である、組成物。

【請求項 26】

請求項 9 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの前記コア領域は、糖分子に 2' - OR¹ を有さない、組成物

【請求項 27】

請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、それぞれのキラルな修飾されたリン酸結合は独立してキラルなホスホロチオエートジエステル結合である、組成物。

【請求項 28】

請求項 2 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、m が 5、6、7 又は 8 である、組成物。

【請求項 29】

請求項 2 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、t が、2、3、4、5、6、7 又は 8 である組成物。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、骨格キラル中心の前記共通パターンが、繰返し (Rp) (Sp)_m (式中、m は、2、3、4、5、6、7 又は 8 である。) を含む、組成物。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記キラルなヌクレオチド間結合の 66% 又はそれ以上は S_p 構造である、組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2014年1月16日に出願された米国特許仮出願第 61/928,405 号及び 2014年10月13日に出願された同第 62/063,359 号の優先権を主張し、各出願の全文は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【背景技術】

【0002】

オリゴヌクレオチドは治療上または診断上の研究およびナノマテリアルの応用に役立っている。自然発生した核酸 (たとえば、未修飾 DNA または RNA) はその細胞外および細胞内ヌクレアーゼに対する不安定な性質および/または細胞透過および細胞分布がしにくい性質により治療での使用が限られている。さらに、生体外での研究ではアンチセンス

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドの特性である結合親和性、相補的なRNAとの配列特異的結合、(C o s s t i c k a n d E c k s t e i n , 1 9 8 5 ; L a P l a n c h e e t a l . , 1 9 8 6 ; L a t i m e r e t a l . , 1 9 8 9 ; H a c i a e t a l . , 1 9 9 4 ; M e s m a e k e r e t a l . , 1 9 9 5)、ヌクレアーゼの安定性はリン原子の立体化学的な絶対配置の影響を受けやすいと示されている。それゆえに、たとえば新たなアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNAオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物のような新しく改良されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物が必要とされている。

【発明の概要】

【0003】

とりわけ、本発明は、ステレオランダムなオリゴヌクレオチド調製物が、オリゴヌクレオチド鎖内の個々の骨格キラル中心の立体化学構造において互いに異なる複数の特異な化学的実体を含むという認識を包含する。さらに、本発明は、ステレオランダムなオリゴヌクレオチド調製物が、関連するオリゴヌクレオチドの可能性のあるあらゆる立体異性体を含むことは通常はありそうにないという洞察を包含する。したがって、とりわけ、本発明は、興味あるオリゴヌクレオチドの特定の立体異性体である新規な化学的実体を提供する。すなわち、本発明は、特定のオリゴヌクレオチド化合物が、その塩基配列、その長さ、その骨格結合のパターン、およびその骨格キラル中心のパターンにより定義されてもよい、単一のオリゴヌクレオチド化合物の実質的に純粋な調製物を提供する。

【0004】

本発明は、とりわけ、特定のオリゴヌクレオチドの個々の立体異性体が、互いに異なる安定性および/または活性を示し得ることを示す。さらに、本開示は、オリゴヌクレオチド内の特定のキラル構造の含有および/または位置により実現される安定性の改善が、特定の修飾された骨格結合、塩基、および/または糖の使用により(例えば、特定のタイプの修飾されたリン酸エステル(phosphates)、2'-修飾、塩基修飾などの使用により)実現される安定性の改善と同等か、またはそれよりもさらに良くなり得ることを示す。

【0005】

とりわけ、本発明は、オリゴヌクレオチドの特性および活性が、その骨格キラル中心のパターンを最適化することによって調節され得ることを認める。いくつかの実施形態において、本発明は、オリゴヌクレオチドの組成物を提供し、ここで、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの安定性および/または生物活性を予想外に大きく向上させる骨格キラル中心の共通パターンを有する。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、増加した安定性をもたらす。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、驚いたことに増加した活性をもたらす。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、増加した安定性および活性をもたらす。いくつかの実施形態において、核酸高分子を切断するためにオリゴヌクレオチドが利用されるとき、オリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターンは、驚いたことに単独で、標的核酸高分子の切断パターンを変化させる。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、第2の部位での切断を効果的に防ぐ。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、新たな切断部位を生み出す。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、切断部位の数を最小にする。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドに対して相補的である標的核酸高分子の配列内のただ1つの部位で標的核酸高分子が切断されるように、骨格キラル中心のパターンは、切断部位の数を最小にする。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、切断部位での切断効率を向上させる。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターンは、標的核酸高分子の切断を改善する。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、選択性を増加させる。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、オフターゲット効果を最小にする。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、選択性、例えば、一塩基多型(SNP)のみが異なる2つの標的配列間の切断選択

10

20

30

40

50

性を増加させる。

【0006】

本出願で引用したすべての刊行物および特許文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0007】

定義

脂肪族：本明細書中で使用されるとき、「脂肪族」または「脂肪族基」という語は、他の分子へのひとつの結合点を有する、完全に飽和もしくは1つ以上の不飽和単位を含有する直鎖（すなわち、分岐でない）もしくは分岐鎖、置換もしくは非置換炭化水素鎖、または完全に飽和もしくは1つ以上の不飽和単位を含有するが、芳香族でない単環式炭化水素もしくは多環式炭化水素（本明細書で、「炭素環」、「脂環式」または「シクロアルキル」とも呼ぶ）を意味する。いくつかの実施形態では、脂肪族基は、1～50個の脂肪族炭素原子を含む。特に指定しない限り、脂肪族基は、1～10個の脂肪族炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、脂肪族基は、1～6個の脂肪族炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、脂肪族基は、1～5個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態では、脂肪族基は、1～4個の脂肪族炭素原子を含む。更に他の実施形態では、脂肪族基は、1～3個の脂肪族炭素原子を含み、更に他の実施形態では、脂肪族基は、1～2個の脂肪族炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、「脂環式」（または「炭素環」または「シクロアルキル」）は、他の分子へのひとつの結合点を有する、完全に飽和もしくは1つ以上の不飽和単位を含有するが、芳香族でない単環式もしくは二環式 $C_3 \sim C_{10}$ 炭化水素を表す。いくつかの実施形態では、「脂環式」（または「炭素環」または「シクロアルキル」）は、他の分子へのひとつの結合点を有する、完全に飽和もしくは1つ以上の不飽和単位を含有するが、芳香族でない単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭化水素を表す。適切な脂肪族基としては、直鎖または分岐鎖、置換または非置換アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、および（シクロアルキル）アルキル、（シクロアルケニル）アルキルまたは（シクロアルキル）アルケニルなどのそれらの複合体が挙げられるが、これに限定されない。

【0008】

アルキレン：「アルキレン」という語は、二価アルキル基を表す。「アルキレン鎖」は、ポリメチレン基、すなわち、 $-(CH_2)_n-$ であり、式中、 n は正整数、好ましくは、1～6、1～4、1～3、1～2、または2～3である。置換アルキレン鎖は、1つ以上のメチレン水素原子が、置換基で置換されたポリメチレン基である。適切な置換基としては、置換脂肪族基について下に記載のものが挙げられる。

【0009】

アルケニレン：「アルケニレン」という語は、二価アルケニル基を表す。置換アルケニレン基は、1つ以上の水素原子が、置換基で置換された、少なくとも1つの二重結合を含有するポリメチレン基である。適切な置換基としては、置換脂肪族基について下に記載のものが挙げられる。

【0010】

動物：本明細書中で使用されるとき、「動物」という語は、動物界の任意の成員を表す。いくつかの実施形態では、「動物」は、発育の任意の段階における、ヒトを表す。いくつかの実施形態では、「動物」は、発育の任意の段階における、非ヒト動物を表す。特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳類（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、および/またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物としては、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、および/または蠕虫類を挙げられるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子組み換え動物、および/またはクローンであり得る。

【0011】

およそ：本明細書中で使用されるとき、数を表すときの「およそ」または「約」という語は、一般に、特に明記もしくは特に文脈から明白でない限り（かかる数が、0%より小さいまたは100%超の可能な値である場合を除き）、該数のどちらの方向でも（より大

10

20

30

40

50

きいまたはより小さい)、5%、10%、15%、または20%の範囲内に含まれる数を含むと考える。いくつかの実施形態では、投与量を表すときの「約」という語の使用は、 $\pm 5 \text{ mg / kg / 日}$ を意味する。

【0012】

アリール：単独でまたは「アラルキル」、「アラルコシ」、または「アリールオキシアルキル」として大きな部分の一部として使用される「アリール」という語は、構造の少なくとも1つの環が芳香族であり、構造の各環が3~7環員を含む、全5~14環員を有する単環式および二環式環構造を表す。「アリール」という語は、「アリール環」という語と、互換的に使用され得る。本発明の特定の実施形態では、「アリール」は、限定されないが、1つ以上の置換基を有してもよい、フェニル、ピフェニル、ナフチル、アントラシル(anthracyl)などを含む芳香族環構造を表す。インダニル、フタルイミジル、ナフトイミジル(naphthimidyl)、フェナントリジニル、またはテトラヒドロナフチルなどの、芳香族環が1つ以上の非芳香族環と縮合している基も、本明細書で、「アリール」という語の範囲に含まれる。

10

【0013】

特徴的部分：本明細書中で使用されるとき、タンパク質またはポリペプチドの「特徴的部分」という言い回しは、全体で、タンパク質またはポリペプチドの特徴である一続きのアミノ酸、または一続きのアミノ酸の集合を含むものである。かかる各連続鎖は、一般に、少なくとも2つのアミノ酸を含むだろう。さらに、当業者は、通常、少なくとも、5、10、15、20またはそれ以上のアミノ酸が、タンパク質の特徴であるために必要であることを認識するだろう。一般に、特徴的部分は、上記特定の配列相同性に加えて、少なくとも1つの機能的特徴を、関連性ある無傷タンパク質と共有する。

20

【0014】

特徴的配列：「特徴的配列」は、ポリペプチドまたは核酸のファミリーの全成員中で見られる配列であり、従って、該ファミリーの成員を定義するために、当業者により使用され得る。

【0015】

特徴的構造要素：「特徴的構造要素」という語は、ポリペプチド、小分子、または核酸のファミリーの全成員中で見られる、はっきりと区別できる構造要素(例えば、骨格構造、懸垂部分の集合、配列要素、他)を表し、従って、該ファミリーの成員を定義するために、当業者により使用され得る。

30

【0016】

同等：「同等」という語は、得られた結果または観察された現象の比較を可能となるように、互いに十分似ている状態または環境の2つ(またはそれ以上)のセットを言い表すために、本明細書で使用される。いくつかの実施形態では、状態または環境の同等なセットは、複数の実質的に同じ特徴および1つまたは少数の変更された特徴により特徴付けられる。当業者は、実質的に同じ特徴の十分な数と型により特徴付けられ、異なるセットの状態または環境下で得られる結果または観察される現象における違いが、状態のセットが、変更されるそれらの特徴中の差異を原因とするまたは示すという合理的結論を正当化できるとき、互いに同等であることを認識するだろう。

40

【0017】

投与計画：本明細書中で使用されるとき、「投与計画」または「治療レジメン」は、通常、ある期間により分けられて、対象に個別に投与される1組の単位用量(通常、1つ以上)を表す。いくつかの実施形態では、所与の治療薬は、1つ以上の用量を含み得る所要投与計画を有する。いくつかの実施形態では、投与計画は、その各々が、同じ長さの期間により互いに分離した複数の用量を含み；いくつかの実施形態では、投与計画は、複数の用量および別々の用量を分ける少なくとも2つの異なる期間を含む。いくつかの実施形態では、投与計画内の全用量は、同じ単位投与量である。いくつかの実施形態では、投与計画内の異なる用量は、異なる量である。いくつかの実施形態では、投与計画は、1番目の投与量で1番目の用量、次いで、1番目の投与量と異なる2番目の用量で1つ以上の追加

50

の用量を含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、1番目の投与量で1番目の用量、次いで、1番目の投与量と同じ2番目の用量で1つ以上の追加の用量を含む。

【0018】

同等の薬剤：本開示を読んで、当業者は、本発明の文脈中の有用な薬剤の範囲が、本明細書で具体的に言及または例示したものに限定されないことを認識するだろう。具体的には、当業者は、活性剤が、通常、骨格および結合した懸垂部分から成る構造を有することを認識しており、従ってかかる骨格および/または懸垂部分の簡単な変更が、薬剤の活性を有意に変化させないことを理解するだろう。例えば、いくつかの実施形態では、同等の3次元構造および/または化学反応特性の基を有する1つ以上の懸垂部分の置換は、親の基準化合物または部分と同等の置換された化合物または部分を生成し得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の懸垂部分の付加または分離は、親の基準化合物と同等な置換された化合物を生成し得る。いくつかの実施形態では、例えば、少数の結合（通常、5、4、3、2以下、または1つの結合、およびしばしば一重結合のみ）の付加または分離による骨格構造の変更は、親の基準化合物と同等置換された化合物を生成し得る。多くの実施形態では、同等の化合物は、例えば、容易に入手可能な物質、試薬および従来または提供される合成手順を用いて、下記一般的反応スキームで示された方法、またはその変法により、合成され得る。これらの反応で、それ自体では既知であるが、ここで言及されない変更も利用可能である。

10

【0019】

同等の投与量：「同等の投与量」という語は、同じ生物学的結果をもたらす異なる薬剤的に活性な薬剤の投与量を比較するために、本明細書で使用される。2つの異なる薬剤の投与量は、もし、それらが、同等のレベルまたは程度の生物学的結果を達成するならば、本発明に従って、互いに「同等」と見なされる。いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される異なる医薬の同等の投与量は、本明細書で記載の生体外および/または生体内アッセイを用いて決定される。いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される1つ以上のリソソーム活性剤は、基準リソソーム活性剤の用量と同等の用量で利用され；いくつかの実施形態では、かかる目的の基準リソソーム活性剤は、小分子アロステリック活性化剤（例えば、ピラゾロピリミジン類 (pyrazolopyrimidines)）、イミノ糖類 (imminosugars)（例えば、イソファゴミン）、酸化防止剤（例えば、n - アセチルシステイン）、および細胞輸送の制御因子（例えば、R a b 1 a ポリペプチド）から成る群から

20

30

【0020】

ヘテロ脂肪族：「ヘテロ脂肪族」という語は、C、CH、CH₂、またはCH₃から選択される1つ以上の単位が、独立して、ヘテロ原子により置換された脂肪族基を表す。いくつかの実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルケニルである。

【0021】

ヘテロアリール：単独でまたは大きな部分、例えば、「ヘテロアラルキル」、または「ヘテロアラルコシ」の一部として使用される「ヘテロアリール」および「ヘテロアル - 」という語は、5 ~ 10個の環原子、好ましくは、5個、6個、または9個の環原子を有し；環状配列中で共有される6個、10個、または14個の電子を有し；および炭素原子に加えて、1 ~ 5個のヘテロ原子を有する基を表す。「ヘテロ原子」という語は、窒素、酸素、または硫黄を表し、窒素もしくは硫黄のいずれの酸化形態も、およびいずれの塩基性窒素の四級化形態も含む。ヘテロアリール基としては、チエニル、フラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、ピリジリル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、インドリジニル、プリニル、ナフチリジニル、およびプテリジニルが挙げられるが、これに限定されない。本明細書で、「ヘテロアリール」および「ヘテロアル - 」という語は、ヘテロ芳香族環が、ラジカルまたは結合点が芳香族環上にある1つ以上のアリール、脂環式、またはヘテロシクリル環に縮合している

40

50

基も含む。制限されない例としては、インドリル、イソインドリル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、ジベンゾフラニル、インダゾリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、4H-キノリジニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、およびピリド[2,3-b]-1,4-オキサジン-3(4H)-オンが挙げられる。ヘテロアリアル基は、単環式または二環式であり得る。「ヘテロアリアル」という語は、「ヘテロアリアル環」、「ヘテロアリアル基」、または「芳香族複素環」という語と互換的に使用され得、その語のいずれも、置換されていてよい環を含む。「ヘテロアラルキル」という語は、ヘテロアリアルにより置換されたアルキル基を表し、該アルキルおよびヘテロアリアル部分は、独立して、置換されていてよい。

10

【0022】

ヘテロ原子：「ヘテロ原子」という語は、1つ以上の酸素、硫黄、窒素、リン、ホウ素、セレンまたはケイ素（窒素、ホウ素、セレン、硫黄、リン、もしくはケイ素のいずれもの酸化形態；いずれもの塩基性窒素の四級化形態または；複素環、例えば、N(3,4-ジヒドロ-2H-ピロリル中の)、NH(ピロリジニル中の)もしくはNR⁺(N-置換ピロリジニル中の)の置換可能な窒素を含む)を意味する。

【0023】

複素環：本明細書中で使用されるとき、「複素環(heterocycle)」、「ヘテロシクリル」、「複素環式ラジカル」、および「複素環(heterocyclic ring)」という語は、互換的に使用され、飽和あるいは部分的に不飽和であり、炭素原子に加えて、1つ以上の、好ましくは、1~4個の上記のヘテロ原子を有する安定な3~7員単環式または7~10員二環式複素環式部分を表す。複素環の環原子を表すのに使用されるとき、「窒素」という語は、置換された窒素を含む。例えば、酸素、硫黄または窒素から選択される0~3個のヘテロ原子を有する飽和または部分的に不飽和な環で、該窒素は、N(3,4-ジヒドロ-2H-ピロリル中のような)、NH(ピロリジニル中のような)または⁺NR(N-置換ピロリジニル中のような)であり得る。

20

【0024】

複素環は、安定構造をもたらすいずれのヘテロ原子または炭素原子にあるその側基に結合され得、いずれの環原子も置換されていてよい。かかる飽和または部分的に不飽和な複素環式ラジカルの例としては、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフェニル、ピロリジニル、ペペリジニル、ピロリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オキサゾリジニル、ピペラジニル、ジオキサニル、ジオキサソラニル、ジアゼピニル、オキサゼピニル、チアゼピニル、モルホリニル、およびキヌクリジニルが挙げられるが、これに限定されない。「複素環」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロシクリル環」、「複素環式基」、「複素環式部分」、および「複素環式ラジカル」という用語は、本明細書で、互換的に使用され、インドリニル、3H-インドリル、クロマニル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロキノリニルなどの、ヘテロシクリル環が1つ以上のアリアル基、ヘテロアリアル基、または脂肪族環に縮合する基を含み、該ラジカルまたは結合点は、ヘテロシクリル環上にある。ヘテロシクリル環は、単環式または二環式であり得る。「ヘテロシクリルアルキル」という語は、ヘテロシクリルにより置換されたアルキル基を表し、該アルキルおよびヘテロシクリル部は、独立して、置換されていてよい。

30

40

【0025】

腹腔内：本明細書中で使用されるとき、「腹腔内投与」および「腹腔内に投与された」という言い回しは、対象の腹膜中への化合物または組成物の投与を表すその技術分野で理解される意味を有する。

【0026】

生体外：本明細書中で使用されるとき、「生体外」という語は、生物(例えば、動物、植物、および/または微生物)内でなく、人工的環境、例えば、試験管または反応器中、

50

細胞培養液中、その他で起こる事象を表す。

【0027】

生体内：本明細書で、「生体内」という語は、生物（例えば、動物、植物、および/または微生物）内で起こる事象を表す。

【0028】

低級アルキル：「低級アルキル」という語は、 C_{1-4} 直鎖または分岐鎖アルキル基を表す。実例として低級アルキル基は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、およびtert-ブチルである。

【0029】

低級ハロアルキル：「低級ハロアルキル」という語は、1つ以上のハロゲン原子で置換された C_{1-4} 直鎖または分岐鎖アルキル基を表す。

【0030】

置換されていてもよい：本明細書に記載される時、本発明の化合物は、「置換されていてもよい」部分を含み得る。一般に、「置換された」という語は、「してもよい」という語があるかないかに係わらず、該指定部分の1つ以上の水素が適切な置換基で置換されることを意味する。特に指示されない限り、「置換されていてもよい」基は、いずれかの所与の構造中の1つ以上の位置が、位置毎に同じあるいは異なり得るとき、該基の各置換可能な位置で適切な置換基を有し得る。本発明により考えられる置換基の組み合わせは、好ましくは、安定または化学的に有り得る化合物の生成をもたらすものである。本明細書中で使用される時、「安定」という語は、それらの製造、検出、および、特定の実施形態では、本明細書で開示の1つ以上の目的のそれらの回収、精製および使用を可能にする状態にある時、実質的に変化しない化合物を表す。

【0031】

「置換されていてもよい」基の置換可能な炭素原子上の適切な一価置換基は、独立して、ハロゲン； $-(CH_2)_{0-4}R$ ； $-(CH_2)_{0-4}OR$ ； $-O(CH_2)_{0-4}R$ 、 $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR$ ； $-(CH_2)_{0-4}CH(OR)_2$ ； $-(CH_2)_{0-4}SR$ ；Rで置換されていてもよい $(CH_2)_{0-4}Ph$ ；Rで置換されていてもよい $(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$ ；Rで置換されていてもよい $CH=CHPh$ ；Rで置換されていてもよい $(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -ピリジル； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-N_3$ ； $(CH_2)_{0-4}N(R)_2$ ； $-(CH_2)_{0-4}N(R)C(O)R$ ； $-N(R)C(S)R$ ； $-(CH_2)_{0-4}N(R)C(O)NR_2$ ； $N(R)C(S)NR_2$ ； $-(CH_2)_{0-4}N(R)C(O)OR$ ； $-N(R)N(R)C(O)R$ ； $N(R)N(R)C(O)NR_2$ ； $N(R)N(R)C(O)OR$ ； $-(CH_2)_{0-4}C(O)R$ ； $-C(S)R$ ； $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR$ ； $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR$ ； $(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR_3$ ； $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R$ ； $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR$ 、 $SC(S)SR$ ； $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R$ ； $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR_2$ ； $-C(S)NR_2$ ； $-C(S)SR$ ； $SC(S)SR$ 、 $(CH_2)_{0-4}OC(O)NR_2$ ； $C(O)N(OR)R$ ； $-C(O)C(O)R$ ； $-C(O)CH_2C(O)R$ ； $-C(NOR)R$ ； $(CH_2)_{0-4}SSR$ ； $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R$ ； $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR$ ； $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R$ ； $-S(O)_2NR_2$ ； $(CH_2)_{0-4}S(O)R$ ； $N(R)S(O)_2NR_2$ ； $-N(R)S(O)_2R$ ； $-N(OR)R$ ； $-C(NH)NR_2$ ； $-P(O)_2R$ ； $P(O)R_2$ ； $OP(O)R_2$ ； $-OP(O)(OR)_2$ ； $-SiR_3$ ； $-(C_{1-4}$ 直鎖または分岐鎖アルキレン) $O-N(R)_2$ ；または $-(C_{1-4}$ 直鎖または分岐鎖アルキレン) $C(O)O-N(R)_2$ （式中、各Rは、下記のように置換されてもよく、独立して、水素、 C_{1-6} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、 $-CH_2-(5-6員ヘテロアリール環)$ または5-6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0-4個のヘテロ原子を有するアリール環、または、上記定

10

20

30

40

50

義にもかかわらず、独立して出現する2つのR が、それらの介在する原子と一緒にあって、下記のように置換されてもよく、独立して、窒素、酸素、もしくは硫黄から選択される0~4個のヘテロ原子を有する3~12員飽和、部分的に不飽和、もしくはアリール単環式もしくは二環式環を形成する)である。

【0032】

R 上の適切な一価置換基(または独立して出現する2つのR が、それらの介在する原子と一緒にあって形成する環)は、独立して、ハロゲン、 $-(CH_2)_{0-2}R$ 、 $-(CH_2)_{0-2}OH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}OR$ 、 $-(CH_2)_{0-2}CH(OR)_2$; $O(CH_2)_{0-2}R$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)R$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR$ 、 $-(CH_2)_{0-2}SR$ 、 $-(CH_2)_{0-2}SH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NH_2$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NHR$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NR_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SiR_3$ 、 $-OSiR_3$ 、 $C(O)SR$ 、 $-(C_{1-4}直鎖または分岐鎖アルキレン)C(O)OR$ 、または $-SSR$ (式中、各R は非置換または、「ハロ」が前に付く場合、1つ以上のハロゲンでのみ置換され、および、独立して、 C_{1-4} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、または5~6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有するアリール環から選択される)である。R の飽和炭素原子上の適切な二価置換基としては、 $=O$ および $=S$ が挙げられる。

10

【0033】

「置換されていてもよい」基の飽和炭素原子上の適切な二価置換基としては、次のもの: $=O$ 、 $=S$ 、 $=NNR^*_2$ 、 $=NNHC(O)R^*$ 、 $=NNHC(O)OR^*$ 、 $=NHS(O)_2R^*$ 、 $=NR^*$ 、 $=NOR^*$ 、 $-O(C(R^*_2))_{2-3}O-$ 、または $-S(C(R^*_2))_{2-3}S-$ (式中、独立して出現する各 R^* は、水素、下記の置換され得る C_{1-6} 脂肪族、または非置換5~6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有するアリール環から選択される)が挙げられる。「置換されていてもよい」基の隣接する置換可能な炭素に結合した適切な二価置換基として: $-O(CR^*_2)_{2-3}O-$ (式中、独立して出現する各 R^* は、水素、下記の置換され得る C_{1-6} 脂肪族、または非置換5~6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有するアリール環から選択される)が挙げられる。

20

30

【0034】

R^* の脂肪族基上の適切な置換基としては、ハロゲン、 $-R$ 、 $-(ハロR)$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-O(ハロR)$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR$ 、 $-NR_2$ 、または $-NO_2$ (式中、各R は、非置換または、「ハロ」が前に付く場合、1つ以上のハロゲンにのみ置換され、および、独立して、 C_{1-4} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、または5~6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有するアリール環である)が挙げられる。

【0035】

「置換されていてもよい」基の置換可能な窒素上の適切な置換基としては、 $-R^+$ 、 $-NR^+_2$ 、 $-C(O)R^+$ 、 $-C(O)OR^+$ 、 $-C(O)C(O)R^+$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^+$ 、 $-S(O)_2R^+$ 、 $S(O)_2NR^+_2$ 、 $-C(S)NR^+_2$ 、 $-C(NH)NR^+_2$ 、または $-N(R^+)S(O)_2R^+$; (式中、各 R^+ は、独立して、ハロゲン、下記の置換され得る C_{1-6} 脂肪族、非置換 $-OPh$ 、または非置換5~6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有するアリール環、または、上記定義にもかかわらず、独立して出現する2つの R^+ が、それらの介在する原子と一緒にあって、独立して、窒素、酸素、もしくは硫黄から選択される0~4個のヘテロ原子を有する非置換3~12員飽和、部分的に不飽和、もしくはアリール単環式もしくは二環式環を形成する)が挙げられる。

40

【0036】

50

R⁺の脂肪族基上の適切な置換基は、独立して、ハロゲン、-R、-(ハロR)、-OH、-OR、-O(ハロR)、-CN、-C(O)OH、-C(O)OR、-NH₂、-NHR、-NR₂、または-NO₂(式中、各Rは、非置換または、「ハロ」が前に付く場合、1つ以上のハロゲンにのみ置換され、および、独立して、C₁~4脂肪族、-CH₂Ph、-O(CH₂)₀~1Ph、または5~6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有するアリール環である)である。

【0037】

経口：本明細書中で使用されるとき、「経口投与」および「経口的に投与した」という言い回しは、化合物または組成物の、口による投与を表し、その技術分野で理解される意味を有する。

10

【0038】

非経口：本明細書中で使用されるとき、「非経口投与」および「非経口的に投与した」という言い回しは、通常注射による、腸内および局所的投与でない投与方法を表す、その技術分野で理解される意味を有し、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、および胸骨内注射および注入が挙げられるが、これに限定されない。

【0039】

部分的に不飽和：本明細書中で使用されるとき、「部分的に不飽和」という語は、少なくとも1つの二重結合または三重結合を含む環部分を表す。「部分的に不飽和」という語は、不飽和の複数部を有する環を包含することを意図するが、本明細書で定義したアリールまたはヘテロアリール部分を含むことを意図しない。

20

【0040】

中で使用されるときで、「医薬組成物」という語は、1つ以上の薬剂的に許容可能な担体と一緒に処方した活性剤を表す。いくつかの実施形態では、活性剤は、適切な集団に投与した時に、所定の治療効果を達成する統計的有意な確率を示す治療レジメンでの投与に適切な単位投与量中に存在する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、固体または液体の形態で投与するために特に処方され得、次の用途のもの：経口投与、例えば、水薬(水性もしくは非水性溶液または懸濁液)、錠剤、例えば、口腔、舌下、および全身吸収用途のもの、巨丸剤、散剤、顆粒剤、舌に適用するペースト剤；例えば、滅菌溶液もしくは懸濁液、または徐放処方物として、例えば、皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射による非経口投与；例えば、皮膚、肺、もしくは口腔に適用するクリーム剤、軟膏剤、または徐放性パッチ剤もしくはスプレー剤として局所投与；例えば、ベッサリー、クリーム剤、もしくは泡沫剤として腔内または直腸内に；舌下に；眼に；経皮的に；または経鼻的に、肺、および他の粘膜面が挙げられる。

30

【0041】

薬剂的に許容可能：本明細書中で使用されるとき、「薬剂的に許容可能」という言い回しは、健全な医学的判断内で、合理的な利益/リスク比に見合っており、過剰な有害性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症なしで、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに適切な、化合物、物質、組成物、および/または剤形を表す。

40

【0042】

薬剂的に許容可能な担体：本明細書中で使用されるとき、「薬剂的に許容可能な担体」という語は、1つの器官、または身体の部分から、別の器官、または身体の部分に運搬または輸送にかかわる液体もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、または溶媒封入材料などの薬剂的に許容可能な材料、組成物または媒体を意味する。各担体は、処方物の他成分と適合性があり、患者に有害でないという意味で、「許容可能」でなければならない。薬剂的に許容可能な担体として役立つ材料のいくつかの例としては：ラクトース、グルコースおよびショ糖などの糖類；コーンスターチおよびジャガイモデンプンなどのデンプン類；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなどのセルロースおよびその誘導体；トラガント；麦芽；ゼラチン；タルク；カカオ脂およ

50

び坐薬蠟などの賦形剤；ピーナッツ油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油などの油類；プロピレングリコールなどのグルコール類；グリセリンなどのポリオール類、ソルビトール、マニトールおよびポリエチレングリコール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル類；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；発熱物質フリー水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；pH緩衝溶液；ポリエステル類、ポリカーボネート類および／またはポリ酸無水物；および製剤処方物で使用される他の無害性適合物質が挙げられる。

【0043】

薬剂的に許容可能な塩：本明細書中で使用されるとき、「薬剂的に許容可能な塩」という語は、薬剂的文脈中での使用に適切なかかる化合物の塩、すなわち、健全な医学的判断内で、合理的な利益／リスク比に見合っており、過度の有害性、刺激、アレルギー応答などがなく、ヒトおよび下等動物の組織と接触して使用するのに適切な塩を表す。薬剂的に許容可能な塩は、当技術分野で周知である。例えば、S. M. Bergeらは、*J. Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19 (1977)で、詳細に、薬剂的に許容可能な塩を記載している。いくつかの実施形態では、薬剂的に許容可能な塩としては、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩 (camphorate)、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシ - エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリル酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられるが、これに限定されない。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩類は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む。いくつかの実施形態では、薬剂的に許容可能な塩としては、適切な場合、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、1 ~ 6個の炭素原子を有するアルキルスルホン酸塩およびアリールスルホン酸塩などの対イオンを用いて生成した無害性のアンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンカチオンが挙げられる。

【0044】

プロドラッグ：一般的、「プロドラッグ」は、本明細書で使用される語として、当技術分野で理解されるように、生物に投与した時、身体中で代謝されて、興味ある活性（例えば、治療または診断）剤を送達する実体である。典型的に、かかる代謝は、活性剤が生成されるように、少なくとも1つの「プロドラッグ部分」の除去を引き起こす。「プロドラッグ」の様々な形態が、当技術分野で周知である。かかるプロドラッグ部分の例としては：

- a) Design of Prodrugs, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) and Methods in Enzymology, 42:309-396, edited by K. Widder, et al. (Academic Press, 1985) ;
- b) Prodrugs and Targeted Delivery, edited by J. Rautio (Wiley, 2011) ;
- c) Prodrugs and Targeted Delivery, edited by J. Rautio (Wiley, 2011) ;
- d) A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krogsgaard-Larsen ;
- e) Bundgaard, Chapter 5 "Design and Application of Prodrugs", by H. Bundgaard, p. 113-191 (1991) ;
- f) Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8:1-38 (1992) ;
- g) Bundgaard, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77:285 (1988) ; および

10

20

30

40

50

h) Kakeya, et al., Chem. Pharm. Bull., 32:692 (1984)
参照。

【 0 0 4 5 】

本明細書に記載の他の化合物のように、プロドラッグは、様々な形態、例えば、結晶形、塩形態、他などのいずれでも、提供され得る。いくつかの実施形態では、プロドラッグは、その薬剂的に許容可能な塩として提供される。

【 0 0 4 6 】

保護基：本明細書中で使用されるとき、「保護基」という語は、当技術分野で周知であり、Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999 (この全文をおは、参照することにより、本明細書中に組み入れられたものとする) 中、詳細に記載されたものを含む。Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, edited by Serge L. Beaucage et al. 06/2012 (第2章の全文は、参照することにより、本明細書中に組み入れられたものとする) 中に記載のヌクレオチドおよびヌクレオチド化学に特に適応される保護基も含まれる。適切なアミノ保護基としては、メチルカルバメート、エチルカルバメート、9-フルオレニルメチルカルバメート (Fmoc)、9-(2-スルホ)フルオレニルメチルカルバメート、9-(2,7-ジプロモ)フルオレニルメチルカルバメート、2,7-ジ-t-ブチル-[9-(10,10-ジオキソ-10,10,10,10-テトラヒドロチオキサンチル)]メチルカルバメート (DBD-Tmoc)、4-メトキシフェナンシルカルバメート (Phenoc)、2,2,2-トリクロロエチルカルバメート (Troc)、2-トリメチルシリルエチルカルバメート (Teoc)、2-フェニルエチルカルバメート (hZ)、1-(1-アダマンチル)-1-メチルエチルカルバメート (Adpoc)、1,1-ジメチル-2-ハロエチルカルバメート、1,1-ジメチル-2,2-ジプロモエチルカルバメート (DB-t-BOC)、1,1-ジメチル-2,2,2-トリクロロエチルカルバメート (TCBOC)、1-メチル-1-(4-ピフェニル)エチルカルバメート (Bpoc)、1-(3,5-ジ-t-ブチルフェニル)-1-メチルエチルカルバメート (t-Bumeoc)、2-(2'-および4'-ピリジル)エチルカルバメート (Pyoc)、2-(N,N-ジシクロヘキシルカルボキサミド)エチルカルバメート、t-ブチルカルバメート (BOC)、1-アダマンチルカルバメート (Adoc)、ビニルカルバメート (Voc)、アリルカルバメート (Alloc)、1-イソプロピルアリルカルバメート (Ipaoc)、シンナミルカルバメート (Coc)、4-ニトロシンナミルカルバメート (Noc)、8-キノリルカルバメート、N-ヒドロキシピペリジニルカルバメート、アルキルジチオカルバメート、ベンジルカルバメート (Cbz)、p-メトキシベンジルカルバメート (Moz)、p-ニトロベンジルカルバメート、p-プロモベンジルカルバメート、p-クロロベンジルカルバメート、2,4-ジクロロベンジルカルバメート、4-メチルスルフィニルベンジルカルバメート (MsZ)、9-アントリルメチルカルバメート、ジフェニルメチルカルバメート、2-メチルチオエチルカルバメート、2-メチルスルホニルエチルカルバメート、2-(p-トルエンスルホニル)エチルカルバメート、[2-(1,3-ジチアニル)]メチルカルバメート (Dmoc)、4-メチルチオフエニルカルバメート (Mtpc)、2,4-ジメチルチオフエニルカルバメート (Bmpc)、2-ホスホニオエチルカルバメート (Peoc)、2-トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバメート (Ppoc)、1,1-ジメチル-2-シアノエチルカルバメート、m-クロロ-p-アクリロキシベンジルカルバメート、p-(ジヒドロキシボリル)ベンジルカルバメート、5-ベンズイソオキサゾリルメチルカルバメート、2-(トリフルオロメチル)-6-クロモニルメチルカルバメート (Tcroc)、m-ニトロフェニルカルバメート、3,5-ジメトキシベンジルカルバメート、o-ニトロベンジルカルバメート、3,4-ジメトキシ-6-ニトロベンジルカルバメート、フェニル(o-ニトロフェニル)メチルカルバメート、フェノチアジニル-(10)-カルボニル誘導体、N'-p-トルエンスルホニルアミノカルボニル誘導体、N'-フェニルアミノチオカルボニル誘導体、t-アミルカルバメート、S-ベンジルチオカルバメート、p-シアノベンジル

10

20

30

40

50

カルバメ - ト、シクロブチルカルバメ - ト、シクロヘキシルカルバメ - ト、シクロペンチ
 ルカルバメ - ト、シクロプロピルメチルカルバメ - ト、p - デシルオキシベンジルカルバ
 メート、2, 2 - ジメトキシカルボニルビニルカルバメート、o - (N, N - ジメチルカル
 ボキサミド)ベンジルカルバメート、1, 1 - ジメチル - 3 - (N, N - ジメチルカル
 ボキサミド)プロピルカルバメート、1, 1 - ジメチルプロピニルカルバメート、ジ(2
 - ピリジル)メチルカルバメート、2 - フラニルメチルカルバメート、2 - ヨードエチル
 カルバメート、イソボルニルカルバメート、イソブチルカルバメート、イソニコチニルカル
 バメート、p - (p' - メトキシフェニルアゾ)ベンジルカルバメート、1 - メチルシ
 クロブチルカルバメート、1 - メチルシクロヘキシルカルバメート、1 - メチル - 1 - シ
 クロプロピルメチルカルバメート、1 - メチル - 1 - (3, 5 - ジメトキシフェニル)エ
 チルカルバメート、1 - メチル - 1 - (p - フェニルアゾフェニル)エチルカルバメート
 、1 - メチル - 1 - フェニルエチルカルバメート、1 - メチル - 1 - (4 - ピリジル)エ
 チルカルバメート、フェニルカルバメート、p - (フェニルアゾ)ベンジルカルバメート
 、2, 4, 6 - トリ - t - ブチルフェニルカルバメート、4 - (トリメチルアンモニウム
)ベンジルカルバメート、2, 4, 6 - トリメチルベンジルカルバメート、ホルムアミド
 、アセトアミド、クロロアセトアミド、トリクロロアセトアミド、トリフルオロアセトア
 ミド、フェニルアセトアミド、3 - フェニルプロパンアミド、ピコリンアミド、3 - ビリ
 ジルカルボキサミド、N - ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、ベンズアミド、p - フェ
 ニルベンズアミド、o - ニトロフェニルアセトアミド、o - ニトロフェノキシアセトアミ
 ド、アセトアセトアミド、(N' - ジチオベンジルオキシカルボニルアミノ)アセトアミ
 ド、3 - (p - ヒドロキシフェニル)プロパンアミド、3 - (o - ニトロフェニル)プロ
 パンアミド、2 - メチル - 2 - (o - ニトロフェノキシ)プロパンアミド、2 - メチル -
 2 - (o - フェニルアゾフェノキシ)プロパンアミド、4 - クロロブタンアミド、3 - メ
 チル - 3 - ニトロブタンアミド、o - ニトロシンナミド、N - アセチルメチオニン誘導体
 、o - ニトロベンズアミド、o - (ベンゾイルオキシメチル)ベンズアミド、4, 5 - ジ
 フェニル - 3 - オキサゾリン - 2 - オン、N - フタルイミド、N - ジチアコハク酸イミド
 (D t s)、N - 2, 3 - ジフェニルマレイミド、N - 2, 5 - ジメチルピロール、N -
 1, 1, 4, 4 - テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物 (S T A B A S E)、
 5 - 置換 1, 3 - ジメチル - 1, 3, 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、5 - 置換
 1, 3 - ジベンジル - 1, 3, 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、1 - 置換 3, 5
 - ジニトロ - 4 - ピリドン、N - メチルアミン、N - アリルアミン、N - [2 - (トリメ
 チルシリル)エトキシ]メチルアミン (S E M)、N - 3 - アセトキシプロピルアミン、
 N - (1 - イソプロピル - 4 - ニトロ - 2 - オキソ - 3 - ピロオリン - 3 - イル)アミン
 、第四級アンモニウム塩類、N - ベンジルアミン、N - ジ(4 - メトキシフェニル)メチ
 ルアミン、N - 5 - ジベンゾスベリルアミン、N - トリフェニルメチルアミン (T r)、
 N - [(4 - メトキシフェニル)ジフェニルメチル]アミン (M M T r)、N - 9 - フェ
 ニルフルオレニルアミン (P h F)、N - 2, 7 - ジクロロ - 9 - フルオレニルメチレン
 アミン、N - フェロセニルメチルアミノ (F c m)、N - 2 - ピコリルアミノ N' - オキ
 シド、N - 1, 1 - ジメチルチオメチレンアミン、N - ベンジリデンアミン、N - p - メ
 トキシベンジリデンアミン、N - ジフェニルメチレンアミン、N - [(2 - ピリジル)メ
 シチル]メチレンアミン、N - (N', N' - ジメチルアミノメチレン)アミン、N, N'
 ' - イソプロピリデンアミン、N - p - ニトロベンジリデンアミン、N - サリシリデンア
 ミン、N - 5 - クロロサリシリデンアミン、N - (5 - クロロ - 2 - ヒドロキシフェニル
)フェニルメチレンアミン、N - シクロヘキシリデンアミン、N - (5, 5 - ジメチル -
 3 - オキソ - 1 - シクロヘキセニル)アミン、N - ボラン誘導体、N - ジフェニルボリン
 酸誘導体、N - [フェニル(ペンタカルボニルクロム - またはタングステン)カルボニル
]アミン、N - 銅キレート、N - 亜鉛キレート、N - ニトロアミン、N - ニトロソアミン
 、アミン N - オキシド、ジフェニルホスフィンアミド (D p p)、ジメチルチオホスフィ
 ンアミド (M p t)、ジフェニルチオホスフィンアミド (P p t)、ジアルキルホスホロ
 アミダート類、ジベンジルホスホロアミダート、ジフェニルホスホロアミダート、ベンゼ

10

20

30

40

50

ンスルフェナミド、*o*-ニトロベンゼンスルフェナミド(Nps)、2,4-ジニトロベンゼンスルフェナミド、ペンタクロロベンゼンスルフェナミド、2-ニトロ-4-メトキシベンゼンスルフェナミド、トリフェニルメチルスルフェナミド、3-ニトロピリジンスルフェナミド(Npys)、*p*-トルエンシルホンアミド(Ts)、ベンゼンスルホンアミド、2,3,6-トリメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mtr)、2,4,6-トリメトキシベンゼンスルホンアミド(Mtb)、2,6-ジメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Pme)、2,3,5,6-テトラメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mte)、4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mbs)、2,4,6-トリメチルベンゼンスルホンアミド(Mts)、2,6-ジメトキシ-4-メチルベンゼンスルホンアミド(iMds)、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-シルホンアミド(Pmc)、メタンスルホンアミド(Ms)、-トリメチルシリルエタンスルホンアミド(SES)、9-アントラセンスルホンアミド、4-(4',8'-ジメトキシナフチルメチル)ベンゼンスルホンアミド(DNMBs)、ベンジルシルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミド、およびフェナシルスルホンアミドが挙げられる。

10

【0047】

適切に保護されたカルボン酸としては、シリル-、アルキル-、アルケニル-、アリール-、およびアリールアルキル-保護カルボン酸が挙げられるが、これに限定されない。適切なシリル基の例としては、トリメチルシリル、トリエチルシリル、*t*-ブチルジメチルシリル、*t*-ブチルジフェニルシリル、トリエチルシリルなどが挙げられる。適切なアルキル基の例としてはメチル、ベンジル、*p*-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、トリチル、*t*-ブチル、テトラヒドロピラン-2-イルが挙げられる。適切なアルケニル基の例としては、アリルが挙げられる。適切なアリール基の例としては、置換されていてもよいフェニル、ピフェニル、またはナフチルが挙げられる。適切なアリールアルキル基の例としては、置換されていてもよいベンジル(例えば、*p*-メトキシベンジル(MPM)、3,4-ジメトキシベンジル、*O*-ニトロベンジル、*p*-ニトロベンジル、*p*-ハロベンジル、2,6-ジクロロベンジル、*p*-シアノベンジル)、および2-および4-ピコリルが挙げられる。

20

【0048】

適切なヒドロキシル保護基としては、メチル、メトキシメチル(MOM)、メチルチオメチル(MTM)、*t*-ブチルチオメチル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチル(SMOM)、ベンジルオキシメチル(BOM)、*p*-メトキシベンジルオキシメチル(PMBM)、(4-メトキシフェノキシ)メチル(*p*-AOM)、グアヤコールメチル(GUM)、*t*-ブトキシメチル、4-ペンテニルオキシメチル(POM)、シロキシメチル、2-メトキシエトキシメチル(MEM)、2,2,2-トリクロロエトキシメチル、ビス(2-クロロエトキシ)メチル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル(SEMOR)、テトラヒドロピラニル(THP)、3-プロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、1-メトキシシクロヘキシル、4-メトキシテトラヒドロピラニル(MTHP)、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルS、S-ジオキソド、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル]-4-メトキシピペラジン-4-イル(CTMP)、1,4-ジオキサソ-2-イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、2,3,3a,4,5,6,7,7a-オクタヒドロ-7,8,8-トリメチル-4,7-メタノベンゾフラン-2-イル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、1-メチル-1-メトキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、2-(フェニルセレニル)エチル、*t*-ブチル、アリル、*p*-クロロフェニル、*p*-メトキシフェニル、2,4-ジニトロフェニル、ベンジル、*p*-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、*o*-ニトロベンジル、*p*-ニトロベンジル、*p*-ハロベンジル、2,6-ジクロロベンジル、*p*-シアノベンジル、*p*-フェニルベンジル、2-ピコリル、4-ピコリル、3-メチ

30

40

50

ル - 2 - ピコリル N - オキシド、ジフェニルメチル、p, p' - ジニトロベンズヒドリル、5 - ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、 - ナフチルジフェニルメチル、p - メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ (p - メトキシフェニル) フェニルメチル、トリ (p - メトキシフェニル) メチル、4 - (4' - ブロモフェナシルオキシフェニル) ジフェニルメチル、4, 4', 4'' - トリス (4, 5 - ジクロロフタルイミドフェニル) メチル、4, 4', 4'' - トリス (レブリノイルオキシフェニル) メチル、4, 4', 4'' - トリス (ベンゾイルオキシフェニル) メチル、3 - (イミダゾール - 1 - イル) ビス (4', 4'' - ジメトキシフェニル) メチル、1, 1 - ビス (4 - メトキシフェニル) - 1' - ピレニルメチル、9 - アントリル、9 - (9 - フェニル) キサンテニル、9 - (9 - フェニル - 10 - オキソ) アントリル、1, 3 - ベンゾジチオラン - 2 - イル、ベンズイソチアゾリル S, S - ジオキシド、トリメチルシリル (TMS)、トリエチルシリル (TES)、トリイソプロピルシリル (TIPS)、ジメチルイソプロピルシリル (IPDMS)、ジエチルイソプロピルシリル (DEIPS)、ジメチルテキシルシリル、t - ブチルジメチルシリル (TBDMS)、t - ブチルジフェニルシリル (TBDPS)、トリベンジルシリル、トリ - p - キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル (DPMS)、t - ブチルメトキシフェニルシリル (TBMPMS)、ギ酸エステル、ベンゾイルギ酸エステル、酢酸エステル、クロロ酢酸エステル、ジクロロ酢酸エステル、トリクロロ酢酸エステル、トリフルオロ酢酸エステル、メトキシ酢酸エステル、トリフェニルメトキシ酢酸エステル、フェノキシ酢酸エステル、p - クロロフェノキシ酢酸エステル、3 - フェニルプロピオン酸エステル、4 - オキソペンタン酸エステル (レブリン酸エステル)、4, 4 - (エチレンジチオ) ペンタン酸エステル (レブリノイルジチオアセタール)、ピバル酸エステル、アダマンテート、クロトン酸エステル、4 - メトキシクロトン酸エステル、安息香酸エステル、p - フェニル安息香酸エステル、2, 4, 6 - トリメチル安息香酸エステル (メシトエート (mesitoate))、炭酸アルキルメチル、炭酸 9 - フォレニルメチル (Fmoc)、炭酸アルキルエチル、炭酸アルキル 2, 2, 2 - トリクロロエチル (Troc)、炭酸 2 - (トリメチルシリル) エチル (TMS EC)、炭酸 2 - (フェニルスルホニル) エチル (Psec)、炭酸 2 - (トリフェニルホスホニオ) エチル (Peoc)、炭酸アルキルイソブチル、炭酸アルキルビニル、炭酸アルキルアリル、炭酸アルキル p - ニトロフェニル、炭酸アルキルベンジル、炭酸アルキル p - メトキシベンジル、炭酸アルキル 3, 4 - ジメトキシベンジル、炭酸アルキル o - ニトロベンジル、炭酸アルキル p - ニトロベンジル、チオ炭酸アルキル S - ベンジル、炭酸 4 - エトキシ - 1 - ナフチル、ジチオ炭酸メチル、2 - ヨード安息香酸エステル、4 - アジド酪酸エステル、4 - ニトロ - 4 - メチルペンタン酸エステル、o - (ジブromoメチル) 安息香酸エステル、2 - ホルミルベンゼンスルホン酸エステル、2 - (メチルチオメトキシ) エチル、4 - (メチルチオメトキシ) 酪酸エステル、2 - (メチルチオメトキシメチル) 安息香酸エステル、2, 6 - ジクロロ - 4 - メチルフェノキシ酢酸エステル、2, 6 - ジクロロ - 4 - (1, 1, 3, 3 - テトラメチルブチル) フェノキシ酢酸エステル、2, 4 - ビス (1, 1 - ジメチルプロピル) フェノキシ酢酸エステル、クロロジフェニル酢酸エステル、イソ酪酸エステル、モノコハク酸エステル、(E) - 2 - メチル - 2 - ブテン酸エステル、o - (メトキシカルボニル) 安息香酸エステル、 - ナフトエ酸、硝酸エステル、アルキル N, N, N', N' - テトラメチルホスホロジアミダート、アルキル N - フェニルカルバメート、ハウ酸エステル、ジメチルホスフィノチオニル、アルキル 2, 4 - ジニトロフェニルスルフェネート、硫酸エステル、メタンスルホン酸エステル (メシル酸エステル)、ベンジルスルホン酸エステル、およびトシレート (Ts) が挙げられる。1, 2 - または 1, 3 - ジオール類を保護するためには、該保護基としては、メチレンアセタール、エチリデンアセタール、1 - t - ブチルエチリデンケタール、1 - フェニルエチリデンケタール、(4 - メトキシフェニル) エチリデンアセタール、2, 2, 2 - トリクロロエチリデンアセタール、アセトニド、シクロペンチリデンケタール、シクロヘキシリデンケタール、シクロヘプチリデンケタール、ベンジリデンアセタール、p - メトキシベンジリデンアセタール、2, 4 - ジメトキシベンジリデンケタール、3, 4 - ジメトキシベ

10

20

30

40

50

ンジリデンアセタール、2-ニトロベンジリデンアセタール、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、ジメトキシメチレンオルトエステル、1-メトキシエチリデンオルトエステル、1-エトキシエチリデンオルトエステル、1,2-ジメトキシエチリデンオルトエステル、-メトキシベンジリデンオルトエステル、1-(N,N-ジメチルアミノ)エチリデン誘導体、-(N,N'-ジメチルアミノ)ベンジリデン誘導体、2-オキサシクロペンチリデンオルトエステル、ジ-t-ブチルシリレン基(DTBS)、1,3-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサニリデン)誘導体(TIPDS)、テトラ-t-ブトキシジシロキサン-1,3-ジイリデン誘導体(TBDS)、環状炭酸エステル類、環状ボロン酸エステル類、ボロン酸エチル、およびボロン酸フェニルが挙げられる。

10

【0049】

いくつかの実施形態では、ヒドロキシル保護基は、アセチル、t-ブチル、t-ブトキシメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、2-トリメチルシリルエチル、p-クロロフェニル、2,4-ジニトロフェニル、ベンジル、ベンゾイル、p-フェニルベンゾイル、2,6-ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、p-ニトロベンジル、トリフェニルメチル(トリチル)、4,4'-ジメトキシトリチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、トリイソプロピルシリル、ベンゾイルギ酸エステル、クロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、ピバロイル、炭酸9-フルオレニルメチル、メシレート、トシレート、トリフレート、トリチル、モノメトキシトリチル(MMTr)、4,4'-ジメトキシトリチル、(DMTr)および4,4',4''-トリメトキシトリチル(TMTr)、2-シアノエチル(CEまたはCne)、2-(トリメチルシリル)エチル(TSE)、2-(2-ニトロフェニル)エチル、2-(4-シアノフェニル)エチル2-(4-ニトロフェニル)エチル(NPE)、2-(4-ニトロフェニルスルホニル)エチル、3,5-ジクロロフェニル、2,4-ジメチルフェニル、2-ニトロフェニル、4-ニトロフェニル、2,4,6-トリメチルフェニル、2-(2-ニトロフェニル)エチル、ブチルチオカルボニル、4,4',4''-トリス(ベンゾイルオキシ)トリチル、ジフェニルカルバモイル、レブリニル、2-(ジブプロモメチル)ベンゾイル(Dbmb)、2-(イソプロピルチオメトキシメチル)ベンゾイル(Ptmt)、9-フェニルキサントン-9-イル(pixel)または9-(p-メトキシフェニル)キサントン-9-イル(MOX)である。いくつかの実施形態では、ヒドロキシル保護基の各々は、独立して、アセチル、ベンジル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリルおよび4,4'-ジメトキシトリチルから選択される。いくつかの実施形態では、ヒドロキシル保護基は、トリチル、モノメトキシトリチルおよび4,4'-ジメトキシトリチル基から成る群から選択される。

20

30

【0050】

いくつかの実施形態では、亜リン酸保護基は、オリゴヌクレオチド合成の至る所でのヌクレオチド間亜リン酸結合に結合した基である。いくつかの実施形態では、該亜リン酸保護基は、ヌクレオチド間ホスホロチオエート結合の硫黄原子に結合する。いくつかの実施形態では、該亜リン酸保護基は、ヌクレオチド間ホスホロチオエート結合の酸素原子に結合する。いくつかの実施形態では、該亜リン酸保護基は、ヌクレオチド間リン酸結合の酸素原子に結合する。いくつかの実施形態では、該亜リン酸保護基は、2-シアノエチル(CEまたはCne)、2-トリメチルシリルエチル、2-ニトロエチル、2-スルホニルエチル、メチル、ベンジル、o-ニトロベンジル、2-(p-ニトロフェニル)エチル(NPEまたはNpe)、2-フェニルエチル、3-(N-tert-ブチルカルボキサミド)-1-プロピル、4-オキソペンチル、4-メチルチオ-1-ブチル、2-シアノ-1,1-ジメチルエチル、4-N-メチルアミノブチル、3-(2-ピリジル)-1-プロピル、2-[N-メチル-N-(2-ピリジル)]アミノエチル、2-(N-ホルミル,N-メチル)アミノエチル、4-[N-メチル-N-(2,2,2-トリフルオロアセチル)アミノ]ブチルである。

40

50

【0051】

タンパク質：本明細書中で使用されるとき、「タンパク質」という語は、ポリペプチド（すなわち、ペプチド結合によりもう1つと結合した少なくとも2つのアミノ酸の鎖）を表す。いくつかの実施形態では、タンパク質は、天然に存在するアミノ酸のみを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、1つ以上の天然に存在しないアミノ酸（例えば、隣接アミノ酸と1つ以上のペプチド結合を形成する部分）を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質鎖の1つ以上の残基は、非アミノ酸部分（例えば、グリカン、他）を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、例えば、1つ以上のジスルフィド結合により結合または他手段により会合した1つより多いポリペプチド鎖を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または両方を含む；いくつかの実施形態では、タンパク質は、当技術分野で周知の1つ以上のアミノ酸修飾物または類似体を含む。有用な修飾としては、例えば、末端アセチル化、アミド化、メチル化、他が挙げられる。「ペプチド」という語は、一般に、約100個未満のアミノ酸、約50個未満のアミノ酸、約20個未満のアミノ酸、または約10個未満のアミノ酸の長さを有するポリペプチドを表すために使用される。いくつかの実施形態では、タンパク質は抗体、抗体フラグメント、その生物学的活性部分、および/またはその特徴的部分である。

10

【0052】

試料：本明細書において用いられる「試料」は、そこから得られる、特異的な生物または材料である。いくつかの実施形態において、試料は、本明細書に記載の、対象となる源から得られる、またはそれに由来する生物試料である。いくつかの実施形態では、対象となる源は、動物またはヒトなどの生物を含む。いくつかの実施形態では、生物試料は、生物組織または生体液を含む。いくつかの実施形態では、生物試料は、骨髄；血液；血液細胞；腹水；組織または細針生検試料；細胞含有体液；浮遊核酸；痰；唾液；尿；脳脊髄液、腹水；胸水；糞便；リンパ液；婦人科液；皮膚スワブ；膣スワブ；口腔スワブ；鼻スワブ；導管洗浄液または気管支肺胞洗浄液などの洗液または洗浄液；吸引液；擦過；骨髄検体；組織生検検体；外科検体；糞便、他の体液、分泌液、および/またはそれからの細胞、他であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、生物試料は、個体から得られる細胞であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、試料は、いずれかの適切な手段により、対象となる源から直接得られる「一次試料」である。例えば、いくつかの実施形態では、一次生物試料は、生検（例えば、細針吸または組織生検）、手術、体液（例えば、血液、リンパ液、糞便、他）の収集、他から成る群から選択される方法により得られる。いくつかの実施形態では、文脈から明白になるように、「試料」という語は、一次試料を処理により（例えば、その1つ以上の成分の除去および/またはそれに1つ以上の薬剤の添加により）得られる調製物を表す。例えば、半透膜を用いた濾過。かかる「処理試料」は、例えば、試料から抽出または一次試料を、mRNAの増幅もしくは逆転写、単離および/または特定成分の精製、他などの技術による処理により得られる核酸またはタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態において、試料は生物である。いくつかの実施形態において、試料は植物である。いくつかの実施形態において、試料は動物である。いくつかの実施形態において、試料はヒトである。いくつかの実施形態において、試料は、ヒト以外の生物である。

20

30

40

【0053】

立体化学異性体：本明細書中で使用されるとき、「立体化学異性体」という言い回しは、同じ一連の結合により結合された同じ原子で組み立てられているが、互換性でない異なる三次元構造を有する異なる化合物を表す。本発明のいくつかの実施形態では、提供される化学組成物は、化合物の個々の立体化学異性体の純粋な合成物であり得、またはそれを含み得る；いくつかの実施形態では、提供される化学組成物は、該化合物の2つ以上の立体化学異性体の混合物であり得、またはそれを含み得る。特定の実施形態では、かかる混合物は、同量の異なる立体化学異性体を含む；特定の実施形態では、かかる混合物は、異なる量の少なくとも2つの異なる立体化学異性体を含む。いくつかの実施形態では、化学組成物は、該化合物の全ジアステレオマーおよび/または鏡像異性体を含み得る。いくつ

50

かの実施形態では、化学組成物は、化合物の全部より少ないジアステレオマーおよび/または鏡像異性体を含み得る。いくつかの実施形態では、もし、本発明の化合物の特定の鏡像異性体が所望されるならば、例えば、不斉合成、またはキラル補助基を用いた誘導により合成され得、得られたジアステレオマー混合物は分離し、補助基を開裂して、純粋な所望の鏡像異性体を得る。あるいは、分子がアミノなどの塩基性官能基を含む場合、ジアステレオマー塩を、適切な光学活性酸を用いて生成し、例えば、分別再結晶により分割する。

【0054】

対象：本明細書中で使用されるとき、「対象」または「被験者」という語は、提供される化合物または組成物が、例えば、実験、診断、予防、および/または治療目的用途で、本発明に従って投与されるいずれもの生物を表す。典型的な対象としては、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、およびヒト；昆虫；蠕虫；他などの哺乳類）および植物が挙げられる。いくつかの実施形態では、対象は、疾病、障害、および/または症状を患っている、および/またはこれらにかかり易い。

10

【0055】

実質的：本明細書中で使用されるとき、「実質的」という語は、対象としている特徴または特性の全部またはほとんど全部の範囲もしくは程度を示す定性的状態を表す。生物学技術分野の当業者は、生物学および化学的現象が、めったに、完結および/または完了もしくは達成もしくは絶対的結果を回避しないことを理解するだろう。従って、「実質的」という語は、多くの生物学および/または化学的現象に本来備わる完全性の潜在的欠如を取り込むために、本明細書で使用される。

20

【0056】

患っている：疾病、障害、および/または症状を「患っている」個体は、疾病、障害、および/または症状の1つ以上の症候を診断された、および/または示している。

【0057】

（病気に）かかり易い：疾病、障害、および/または症状「にかかり易い」個体は、一般社会の成員よりも、該疾病、障害、および/または症状を発病するリスクが高いものである。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および/または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および/または症状と診断されない可能性がある。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および/または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および/または症状の症候を示し得る。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および/または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および/または症状の症候を示さない可能性がある。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および/または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および/または症状を発病するだろう。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および/または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および/または症状を発病しないだろう。

30

【0058】

全身的：本明細書中で使用されるとき、「全身的投与」、「全身的に投与された」、「末梢投与」、および「末梢的に投与された」という言い回しは、それが、レシピエントの全身に入るように化合物または組成物を投与することを表す、その技術分野で理解される意味を有する。

40

【0059】

互変異性体：本明細書中で使用されるとき、「互変異性体」という言い回しは、容易に転換可能な異なる異性体の有機化合物を言い表すために使用される。互変異性体は、一重結合および隣接する二重結合の転換と同時に起こる、水素原子またはプロトンのホルマー移動により特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、互変異性体は、プロトン互変異性（すなわち、プロトンの再配置）からもたらされ得る。いくつかの実施形態では、互変異性体は、原子価互変異性（すなわち、結合電子の急速な再配置）からもたらされ得る。かかる全互変異性体は、本発明の範囲内に含まれるものとする。いくつかの実施形態では、化合物の互変異性体は、別々の物質を合成する試みが、結果的に、混合物を生成する

50

ように、互いに可動な平衡中に存在する。いくつかの実施形態では、化合物の互変異性体は、分離可能および単離可能な化合物である。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、化合物の単一の互変異性体の純粋な合成物である、またはそれを含みものを提供され得る。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、化合物の2つ以上の互変異性体の混合物として提供され得る。特定の実施形態では、かかる混合物は、同量の異なる互変異性体を含む；特定の実施形態では、かかる混合物は、化合物の、異なる量の少なくとも2つの互変異性体を含む。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、化合物の全互変異性体を含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、化合物の全部より少ない互変異性体を含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、相互転換の結果として時間とともに変化する量で、化合物の1つ以上の互変異性体を含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、該互変異性は、ケトエノール互変異性である。化学技術分野の当業者は、ケトエノール互変異性を、化学技術分野で周知のいずれかの適切な試薬を用いて、「捕捉」（すなわち、「エノール」体を保持するように化学的に修飾）し得、当技術分野で周知の1つ以上の適切な技術を用いて、引き続いて単離され得るエノール誘導体を得られる。特に指示がない限り、本発明は、純粋な形態または互いの混合物であろうとなかろうと、関連する化合物の全互変異性体を包含する。

10

【0060】

治療薬：本明細書中で使用されるとき、「治療薬」という語は、対象に投与されたとき、治療効果および/または所望の生物学および/または薬理学的効果を誘発するいずれもの薬剤を表す。いくつかの実施形態では、治療薬は、疾病、障害、および/または症状の1つ以上の症候もしくは特徴を、軽減、寛解、解放、抑制、予防、発病遅延、重篤度軽減、および/または発生率低下させるために使用され得るいずれもの物質である。

20

【0061】

治療有効量：本明細書中で使用されるとき、「治療有効量」という語は、治療レジメンの一部として投与されるとき、所望の生物学の応答を誘発する物質（例えば、治療薬、組成物、および/または処方物）の量を意味する。いくつかの実施形態では、物質の治療有効量は、疾病、障害、および/または症状を患っている、またはかかり易い対象に投与するとき、該疾病、障害、および/または症状を治療、診断、予防、および/または発病遅延するために十分な量である。当業者により認識されるように、物質の有効量は、所望の生物学のエンドポイント、送達される物質、標的の細胞または組織、他などの要因に依存して変化し得る。例えば、疾病、障害、および/または症状を治療するための処方物中の化合物の有効量は、該疾病、障害、および/または症状の1つ以上の症候もしくは特徴を、軽減、寛解、解放、抑制、予防、発病遅延、重篤度軽減、および/または発生率低下させる量である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、単一の用量で投与される；いくつかの実施形態では、複数の単位用量が、治療有効量を送達するために必要である。

30

【0062】

治療：本明細書中で使用されるとき、「治療する」、「治療」または「治療すること」という語は、疾病、障害、および/または症状の1つ以上の症候もしくは特徴を、部分的にもしくは完全に、軽減、寛解、解放、抑制、予防、発病遅延、重篤度軽減、および/または発生率低下させるために使用されるいずれもの方法表す。治療は、疾病、障害、および/または症状の徴候を示さない対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、例えば、疾病、障害、および/または症状に関連する病理を発病するリスクを低下させる目的で、治療は、該疾病、障害、および/または症状の初期徴候のみ示す対象に投与され得る。

40

【0063】

不飽和：本明細書中で使用されるとき、「不飽和」という語は、部分が、1つ以上の不飽和単位を有することを意味する。

【0064】

単位用量：本明細書中で使用されるとき、「単位用量」という表現は、医薬組成物の単一用量として、および/または物理的に別々単位で投与される量を表す。多くの実施形態では、単位用量は、所定量の活性薬を含む。いくつかの実施形態では、単位用量は、全単

50

一用量の該薬剤を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の単位用量は、全単一用量を達成するために投与される。いくつかの実施形態では、複数の単位用量の投与は、意図された効果を達成するために、必要または必要であると期待される。単位用量は、例えば、所定量の1つ以上の治療薬、所定量の固体形態、徐放性処方物または所定量の1つ以上の治療薬を含む薬剤送達装置、他を含むある体積の液体（例えば、許容可能な担体）であり得る。単位用量は、治療薬に加えて、いずれかの様々な成分を含む処方物中に存在し得ることは、認識されるだろう。例えば、許容可能な担体（例えば、薬剤的に許容可能な担体）、希釈剤、安定剤、緩衝剤、保存剤、他が、下記のように、含まれ得る。多くの実施形態では、特定治療薬の1日の適切な全投与量が、一部分、または複数の単位用量を含み得、例えば、健全な医学的判断の範囲内で主治医により決定され得ることは、当業者により理解されるだろう。いくつかの実施形態では、いずれかの特定対象もしくは生物のための具体的有効用量レベルは、治療される障害および該障害の重篤度；使用される具体的活性化化合物の活性度；使用される具体的組成物；対象の年齢、体重、健康状態、性別および食事；投与回数、および使用される具体的化合物の排出率；治療持続期間；使用される具体的化合物と併用または同時使用される薬剤および/または追加療法、および医学分野で周知の同様な要因を含む様々な要因に依存し得る。

10

【0065】

野生型：本明細書中で使用されるとき、「野生型」という語は、「正常な」（突然変異の、病気の、変更された、他とは対照的に）状態または文脈中に、実際に見られる構造および/または活性を有する実体を表す、その技術分野で理解される意味を有する。当業者は、野生型遺伝子およびポリペプチドが、しばしば、複数の異なる形態（例えば、アレル）で存在することを認識するだろう。

20

【0066】

核酸：「核酸」という語は、いずれものヌクレオチド、その類似体、およびその重合体を含む。本明細書中で使用されるとき、「ポリヌクレオチド」という語は、いずれもの長さのヌクレオチド類の重合形態、リボヌクレオチド（RNA）あるいはデオキシリボヌクレオチド（DNA）を表す。これらの語は、該分子の一次構造を表し、従って、二本鎖および一本鎖DNA、および二本鎖および一本鎖RNAを含む。これらの語は、同等物として、限定されないが、メチル化、保護化および/またはキャップされたヌクレオチドまたはポリヌクレオチドなどのヌクレオチド類似体および修飾ポリヌクレオチドから合成されたRNAあるいはDNAいずれかの類似体を含む。該語は、ポリまたはオリゴリボヌクレオチド（RNA）およびポリまたはオリゴデオキシリボヌクレオチド（DNA）；核酸塩基および/または修飾核酸塩基のN-グリコシド類またはC-グリコシド類由来のRNAまたはDNA；糖類および/または修飾糖類由来の核酸類；およびリン酸架橋および/または修飾リン原子架橋（本明細書中、「ヌクレオチド間結合」とも呼ぶ）由来の核酸類を包含する。該語は、核酸塩基、修飾核酸塩基、糖類、修飾糖類、リン酸架橋または修飾リン原子架橋のいずれかの組み合わせを含む核酸を包含する。例としては、限定されないが、リボース部分を含む核酸、デオキシリボース部分を含む核酸、リボース部分とデオキシリボース部分の両方を含む核酸、リボース部分と修飾リボース部分を含む核酸が挙げられる。接頭語ポリは、2～約10、000ヌクレオチドモノマー単位を含む核酸を表し、接頭語オリゴは、2～約200ヌクレオチドモノマー単位を表す。

30

40

【0067】

ヌクレオチド：本明細書中で使用されるとき、「ヌクレオチド」という語は、複素環式塩基、糖、および1つ以上のリン酸基またはリン含有ヌクレオチド間結合から成るポリヌクレオチドのモノマー単位を表す。天然塩基（グアニン（G）、アデニン（A）、シトシン（C）、チミン（T）、およびウラシル（U））は、プリンまたはピリミジン誘導体であるが、天然および非天然塩基類似体も含まれると理解すべきである。天然糖は、ペントース（五炭糖）デオキシリボース（DNAを形成する）またはリボース（RNAを形成する）であるが、天然および非天然塩基類似体も含まれると理解すべきである。ヌクレオチドは、ヌクレオチド間結合を介して結合して、核酸、またはポリヌクレオチドを生成する

50

。多くのヌクレオチド間結合は、当技術分野で周知である（限定されないが、リン酸、ホスホロチオエート、ボラノリン酸など）。人工核酸としては、PNA類（ペプチド核酸）、ホスホトリエステル類、ホスホロチオナート類、H-ホスホン酸エステル、アミド亜リン酸エステル類、ボラノリン酸エステル類、メチルホンスホン酸エステル類、ホスホノ酢酸エステル類、チオホスホノ酢酸エステル類および本明細書に記載したものなど天然核酸のリン酸骨格の他の変異体が挙げられる。

【0068】

ヌクレオシド：「ヌクレオシド」という語は、核酸塩基または修飾核酸塩基が、糖または修飾糖に共有結合で結合している部分を表す。

【0069】

糖：「糖」という語は、閉形態および/または開形態の単糖を表す。糖類としては、リボース、デオキシリボース、ペントフラノース、ペントピラノース、およびヘキソピラノース部分を挙げられるが、これに限定されない。本明細書で、該語は、その重合体が核酸類似体、グリコール核酸（「GNA」）の骨格を形成するグリコールなどの通常の糖分子の代わりに使用される構造的類似体も包含する。

【0070】

修飾糖：「修飾糖」という語は、糖を置き換え得る部分を表す。該修飾糖は、空間配置、電子状態、または糖のいくつかの他物理化学的特性を模倣する。

【0071】

核酸塩基：「核酸塩基」という語は、配列特異的方法で、1つの核酸鎖をもう1つの相補鎖と結合させる水素結合に関連する核酸部分を表す。ほとんどの天然核酸塩基は、アデニン（A）、グアニン（G）、ウラシル（U）、シトシン（C）、およびチミン（T）である。いくつかの実施形態では、該天然核酸塩基は、修飾されたアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、またはチミンである。いくつかの実施形態では、該天然核酸塩基は、メチル化されたアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、またはチミンである。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、「修飾核酸塩基」、例えば、アデニン（A）、グアニン（G）、ウラシル（U）、シトシン（C）、およびチミン（T）以外の核酸塩基である。いくつかの実施形態では、該修飾核酸塩基は、メチル化されたアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、またはチミンである。いくつかの実施形態では、該修飾核酸塩基は、空間配置、電子状態、または核酸塩基のいくつかの他物理化学的特性を模倣し、配列特異的方法で、1つの核酸鎖をもう1つの相補鎖と結合させる水素結合の特性を保持する。いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、融解挙動、細胞間酵素による認識またはオリゴヌクレオチド二本鎖の活性に実質的に影響なしで、該5つの全天然塩基（ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、またはグアニン）と対合し得る。

【0072】

キラルリガンド：「キラルリガンド」または「キラル助剤」という語は、キラルであり、反応が特定の立体選択性を有して実行され得るように、反応物中に取り入れ得る部分を表す。

【0073】

縮合試薬：縮合反応で、「縮合試薬」という語は、反応性の低い部位を活性化し、別試薬との作用感受性をより高くする試薬を表す。いくつかの実施形態では、かかる別試薬は、求核剤である。

【0074】

ブロック基：「ブロック基」という語は、官能基の反応性を遮蔽する基を表す。該官能基は、続いて、該ブロック基の除去により遮蔽を取り除き得る。いくつかの実施形態では、ブロック基は、保護基である。

【0075】

部分：「部分」という語は、分子の特異的セグメントまたは官能基を表す。化学的部分は、分子中に組み込まれた、または追加された化学的実体と、しばしば認識される。

【0076】

10

20

30

40

50

固形担体：「固形担体」という語は、核酸の合成を可能にするいずれもの担体を表す。いくつかの実施形態では、該語は、核酸合成を実行し、反応性基を導入するために誘導化する反応ステップで使用される媒体中に不溶なガラスまたは重合体を表す。いくつかの実施形態では、該固形担体は、高度架橋ポリスチレン（HCP）またはコントロールドポアガラス（CPG）である。いくつかの実施形態では、該固形担体は、コントロールドポアガラス（CPG）である。いくつかの実施形態では、該固形担体は、コントロールドポアガラス（CPG）および高度架橋ポリスチレン（HCP）の複合担体である。

【0077】

結合部分：「結合部分」という語は、末端ヌクレオチドと該固形担体間または末端ヌクレオチドと別のヌクレオチド、ヌクレオチドまたは核酸間に位置してもよいいずれの部分を表す。

10

【0078】

DNA分子：「DNA分子」という語は、その一本鎖形態または二重らせんデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）の重合形態を表す。本用語は、該分子の一次および二次構造のみを表し、いずれの特定の三次形態にも限定しない。従って、本用語は、とりわけ、直鎖DNA分子（例えば、制限酵素フラグメント）、ウィルス、プラスミド、および染色体中に見られる二本鎖DNAを含む。特定二本鎖DNA分子構造を論じる中で、配列は、非転写鎖のDNA（すなわち、mRNAと相同配列を有する鎖）に沿って5'から3'の方向の配列のみを与える通例に従って、本明細書中で記載され得る。

20

【0079】

コード配列：DNA「コード配列」または「コード領域」は、適切な発現制御配列の制御下に置かれたとき、生体内ポリペプチドに転写および翻訳される二本鎖DNAである。コード配列の境界（「オープンリーディングフレーム」または「ORF」）は、5'（アミノ）末端での開始コドンおよび3'（カルボン酸）末端での翻訳終止コドンにより決定される。コード配列としては、限定されないが、原核生物配列、原核生物のmRNAからのcDNA、原核生物（例えば、哺乳類）のDNAからのゲノムDNA配列、および合成DNA配列が挙げられる。ポリアデニル化シグナルおよび転写終止配列は、通常、該コード配列の3'側に位置する。「非コード配列」または「非コード領域」という語は、アミノ酸に翻訳されないポリヌクレオチド配列の領域（例えば、5'および3'非翻訳領域）を表す。

30

【0080】

リーディングフレーム：「リーディングフレーム」という語は、二本鎖DNA分子の各方向に3つの計6つの可能なリーディングフレームの内の1つを表す。使用される該リーディングフレームは、DNA分子のコード配列内のアミノ酸をコードするために、どのコドンを使用するかを決定する。

【0081】

アンチセンス：本明細書中で使用されるとき、「アンチセンス」核酸分子は、例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補の、mRNA配列に相補の、または遺伝子コード鎖に相補の「センス」核酸コードタンパク質に相補の核酸配列を含む。従って、アンチセンス核酸分子は、センス核酸分子と水素結合を介して会合し得る。

40

【0082】

ゆらぎ位置：本明細書中で使用されるとき、「ゆらぎ位置」は、コドンの3番目の位置を表す。いくつかの実施形態では、コドンのゆらぎ位置内のDNA分子中の突然変異は、アミノ酸レベルでサイレント変異または保存的変異をもたらす。例えば、グリシンをコードする4つのコドン、すなわち、GGU、GGC、GGAおよびGGGがあり、従って、いずれものゆらぎ位置のヌクレオチドの、A、U、CおよびGから選択される他のヌクレオチドへの変異は、コードされるタンパク質のアミノ酸レベルでの変化をもたらさず、従って、サイレント置換である。

【0083】

50

サイレント置換：「サイレント置換」または「サイレント変異」は、コドン内のヌクレオチドが変更されるが、該コドンによりコードされるアミノ酸残基の変化がもたらされないものである。例としては、A G Gに変異したときでもまだ、A r gをコードするコドン「C G G」などの特定のコードンの1番目の位置だけでなく、コードンの3番目の位置の突然変異が挙げられる。

【 0 0 8 4 】

遺伝子：本明細書中で使用されるとき、「遺伝子」、「組み換え遺伝子」および「遺伝子構築物」という語は、タンパク質またはその部分をコードするDNA分子、またはDNA分子部分を表す。該DNA分子は、該タンパク質（エキソン配列として）をコードするオープンリーディングフレームを含み得、イントロン配列をさらに含み得る。本明細書で、「イントロン」という語は、タンパク質に翻訳されない所与の遺伝子中に存在、および全ての場合ではないが、いくつかの場合に、エキソン間で見られるDNA配列を表す。当技術分野で周知であるように、遺伝子が、1つ以上のプロモーター、エンハンサー、リプレッサーおよび/または該遺伝子の活性または発現を調節する他の制御配列と作動可能に結合する（または含み得る）ことは望まれ得る。

10

【 0 0 8 5 】

相補DNA：本明細書中で使用されるとき、「相補DNA」または「cDNA」は、mRNAの逆転写により合成された組み換えポリヌクレオチドを含み、それから、介在配列（イントロン）が除去される。

【 0 0 8 6 】

相同性：「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つの核酸分子間の配列類似性を表す。相同性および同一性は各々、比較目的で配置し得る各配列の位置の比較により決定され得る。該比較される配列の同位置が、同じ塩基により占有されるとき、その時、該分子は、その位置で同一である；同部位が、同じまたは類似の核酸残基（例えば、立体的および/または電子状態で類似）により占有されるとき、その時、該分子は、その位置で相同（類似）であると呼ばれ得る。相同性/類似性または同一性の百分率での表現は、比較される配列により共有される位置で、同一または類似の核酸の数の関数を表す。「無関係」または「非相同」な配列は、本明細書に記載の配列と、40%未満の同一性、35%未満の同一性、30%未満の同一性、または25%未満の同一性を共有する。2つの配列を比較するとき、残基（アミノ酸または核酸）の欠如または余分な残基の存在も、該同一性および相同性/類似性を低下させる。

20

30

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、「相同性」という語は、類似の機能またはモチーフと同一の遺伝子に使用される配列類似性の数学的に基づいた比較を記述する。本明細書に記載の核酸配列は、例えば、他のファミリー成員、関連する配列または相同体を特定するために、公開データベースに対して検索実行するための「問い合わせ配列」として使用され得る。いくつかの実施形態では、かかる検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を用いて実行され得る。いくつかの実施形態では、BLASTヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12で実行され得る。いくつかの実施形態では、比較目的でギャップアライメントを得るため、ギャップBLASTを、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402中に記載のように利用され得る。BLASTおよびギャップBLASTプログラムを利用するとき、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびBLAST）のデフォルトパラメータを使用され得る（www.ncbi.nlm.nih.gov参照）。

40

【 0 0 8 8 】

同一性：本明細書中で使用されるとき、「同一性」は、配列を、配列マッチングが最大限になるように、すなわち、ギャップおよび挿入を考慮して、アライメントするとき、2つ以上の配列中の対応する位置における同一のヌクレオチド残基の百分率を意味する。同一性は、既知の方法により、容易に算出され得、Computational Molecular Biology, Les

50

k, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)に記載のものが挙げられるが、これに限定されない。同一性を決定する方法は、被検配列間で最大に一致するように設計されている。さらに、同一性を決定する方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラムでコードされている。2つの配列間の同一性を決定するコンピュータプログラム方法としては、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990) and Altschul et al. Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))が挙げられるが、これに限定されない。BLAST Xプログラムは、NCBIおよび他出所から公的に入手可能である (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。周知のスミスウォーターマンアルゴリズムも、同一性決定に使用できる。

【0089】

非相同的：DNA配列の「非相同」領域は、より大きな配列に関連して全く発見されないより大きなDNA配列内のDNAの同定可能なセグメントである。従って、非相同領域が哺乳類遺伝子をコードするとき、該遺伝子は、通常、源生物ゲノム中の哺乳類ゲノムDNAに隣接しないDNA側にあり得る。非相同性コード配列の別例は、該コード配列自体が、全く発見されない配列 (例えば、ゲノムコード配列が無修飾遺伝子と異なるコドンまたはモチーフを有するイントロンまたは合成配列を含むcDNA) である。アレル変異または天然突然変異イベントは、本明細書に定義のDNAの非相同領域を生じさせない。

【0090】

塩基転位型突然変異：「塩基転位型突然変異」という語は、ピリミジン (シチジン (C) またはチミジン (T)) が、別のピリミジンにより置換される、またはプリン (アデノシン (A) またはグアノシン (G)) が、別のプリンにより置換される、DNA配列中の塩基の変化を表す。

【0091】

塩基転換型突然変異：「塩基転換型突然変異」という語は、ピリミジン (シチジン (C) またはチミジン (T)) が、プリンにより置換される、またはプリン (アデノシン (A) またはグアノシン (G)) が、ピリミジンにより置換される、DNA配列中の塩基の変化を表す。

【0092】

オリゴヌクレオチド：「オリゴヌクレオチド」という語は、核酸塩基、修飾核酸塩基、糖、修飾糖、リン酸架橋、または修飾リン原子架橋 (本明細書中、本明細書にさらに定義の「ヌクレオチド間結合」とも呼ぶ) のいずれもの組み合わせを含むヌクレオチドモノマーの重合体またはオリゴマーを表す。

【0093】

オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であり得る。本明細書で、「オリゴヌクレオチド鎖」という語は、一本鎖オリゴヌクレオチドを包含する。一本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖領域を有し得、二本鎖オリゴヌクレオチドは、一本鎖領域を有し得る。実例となるオリゴヌクレオチドとしては、構造遺伝子、制御領域および終端領域を含む遺伝子、ウイルスまたはプラスミドDNA、一本鎖および二本鎖 siRNA および他のRNA干渉剤 (RNAi 剤またはiRNA 剤) などの自己複製系、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNA、マイクロRNA擬態、スーパーmir (supermir)、アプタマー、抗mir (antimir)、アンタゴmir (antagomir)、U1アダプター、三重鎖形成性オリゴヌクレオチド、グアニン四重鎖オリゴヌクレオチド、RN

10

20

30

40

50

A アクチベーター、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、およびデコイオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0094】

RNA干渉の誘導に有効である二本鎖および一本鎖オリゴヌクレオチドは、本明細書中、siRNA、RNAi剤、またはiRNA剤とも呼ぶ。いくつかの実施形態では、これらのRNA干渉誘導オリゴヌクレオチドは、RNAi誘導サイレンシング複合体(RISC)として知られる細胞質多タンパク質複合体と関連する。多くの実施形態では、一本鎖および二本鎖RNAi剤は、それらが、RISC機構に入り、標的配列、例えば、標的mRNAのRISC介在の切断に参与し得るより小さいオリゴヌクレオチドを産生するために、内因性分子、例えば、ダイサーにより切断され得るほど十分に長い。

10

【0095】

本発明のオリゴヌクレオチドは、様々な長さであり得る。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約2~約200ヌクレオチド長さの範囲であり得る。様々な関係する実施形態では、一本鎖、二本鎖、および三本鎖のオリゴヌクレオチドは、約4~約10ヌクレオチド、約10~約50ヌクレオチド、約20~約50ヌクレオチド、約15~約30ヌクレオチド、約20~約30ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、約9~約39ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも4ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも5ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも6ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも7ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも8ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも9ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも11ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも12ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも15ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも20ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも25ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも30ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも18ヌクレオチド長さの二本鎖の相補鎖である。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも21ヌクレオチド長さの二本鎖の相補鎖である。

20

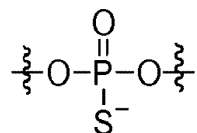
30

【0096】

ヌクレオチド間結合：本明細書中で使用されるとき、「ヌクレオチド間結合」という言い回しは、一般に、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位間のリン含有結合を表し、上記および本明細書中で、「糖間結合」および「リン原子架橋」と同義である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間結合は、天然DNAおよびRNA分子中に見られるホスホジエステル結合である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間結合は、該ホスホジエステル結合の各酸素原子が任意におよび独立して、有機部分または無機部分により置換される「修飾ヌクレオチド間結合」である。いくつかの実施形態では、かかる有機部分または無機部分は、 $=S$ 、 $=Se$ 、 $=NR'$ 、 $-SR'$ 、 $-SeR'$ 、 $-N(R')_2$ 、 $B(R')_3$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、および $-N(R')-$ (式中、各 R' は、独立して、下記定義および記載の通りである)から選択されるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間結合は、ホスホトリエステル結合、ホスホロチオエートジエステル結合

40

【化 1】



または修飾ホスホロチオエートトリエステル結合である。該ヌクレオチド間結合が、該結合の酸または塩基部分の存在により、所与の pH において、アニオンまたはカチオンとして存在し得ることを、当業者は理解している。

10

【0097】

特に指定しない限り、オリゴヌクレオチド配列を用いて使用されるとき、各 s、s 1、s 2、s 3、s 4、s 5、s 6 および s 7 は、独立して、下記表 1 に示される次の修飾ヌクレオチド間結合を表す。

【0098】

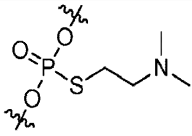
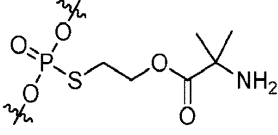
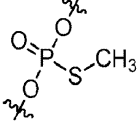
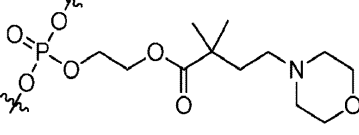
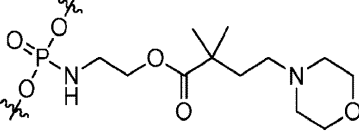
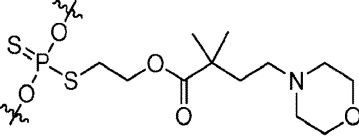
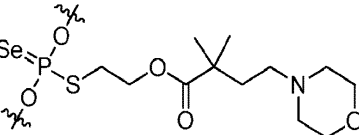
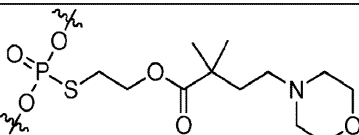
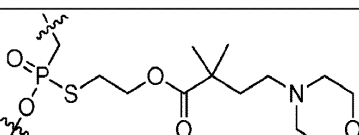
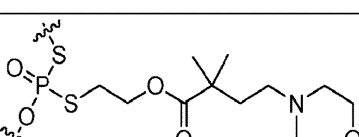
表 1 . 実例となる修飾ヌクレオチド間結合

【表 1】

記号	置換ヌクレオチド間結合
s	 ホスホロチオエート ()
s1	
s2	
s3	
s4	

20

30

s5	
s6	
s7	
s8	
s9	
s10	
s11	
s12	
s13	
s14	

10

20

30

40

s15	
s16	
s17	
s18	

10

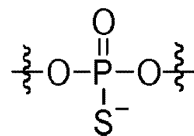
【0099】

例えば、(Rp, Sp) - ATsCs1GAは、1) TとC間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合

20

(

【化2】

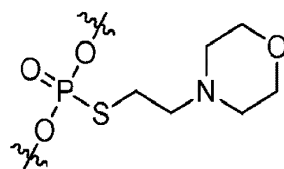


)

; および 2) CとG間の

30

【化3】



の構造を有するホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を有する。特に指定しない限り、オリゴヌクレオチド配列に先行するRp / Spの表記は、該オリゴヌクレオチド配列の順次5'から3'の該ヌクレオチド間結合のキラル結合リン原子の立体配置を言い表す。例えば、(Rp, Sp) - ATsCs1GAでは、TとC間の「s」結合のリンは、Rp立体配置を有し、CとG間の「s1」結合のリンは、Sp立体配置を有する。いくつかの実施形態では、「全(Rp)」または「全(Sp)」は、オリゴヌクレオチドの全キラル結合リン原子が、それぞれ、同じRpまたはSp立体配置を有することを示すために使用される。例えば、全(Rp) - GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsCは、該オリゴヌクレオチドの全ての該キラル結合リン原子が、Rp立体配置を有することを示す；全(Sp) - GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsCは、該オリゴヌクレオチドの全ての該キラル結合リン原子が、Sp立体配置を有することを示す。

40

【0100】

50

オリゴヌクレオチド型：本明細書中で使用されるとき、「オリゴヌクレオチド型」という言い回しは、特定の塩基配列、骨格結合パターン（すなわち、ヌクレオチド間結合型パターン、例えば、リン酸、ホスホロチオエート、他）、骨格キラル中心パターン（すなわち、結合リン立体化学パターン（ R_p / S_p ））、および骨格リン修飾パターン（例えば、式Iの「 $-XLR^1$ 」基のパターン）を有するオリゴヌクレオチドを定義するために使用される。共通に表記された「型」のオリゴヌクレオチドは、互いに、構造的に同一である。

【0101】

当業者は、オリゴヌクレオチド鎖の各ヌクレオチド単位が、該結合リンにおける特定の立体化学および/または該結合リンにおける特定の修飾および/または特定の塩基および/または特定の糖を有するように、設計されおよび/または前以て選択され得るように、本発明の合成方法が、オリゴヌクレオチド鎖の合成中にある程度の制御を提供することを認識するだろう。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖は、該結合リンにおける特定の組み合わせの修飾を有するように、設計されおよび/または決定される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖は、特定の組み合わせの塩基を有するため、設計されおよび/または選択される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖は、特定の組み合わせの1つ以上の上記構造的な特徴を有するように、設計されおよび/または選択される。本発明は、複数のオリゴヌクレオチド分子を含むまたはから成る組成物（例えば、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物）を提供する。いくつかの実施形態では、かかる全分子は、同じ型である（すなわち、互いに構造的に同一である）。しかしながら、多くの実施形態では、提供される組成物は、通常、所定の相対量で、異なる型の複数のオリゴヌクレオチドを含む。

【0102】

キラル制御：本明細書中で使用されるとき、「キラル制御」は、オリゴヌクレオチド鎖内のキラル結合リン毎の立体化学表記を制御する能力を表す。「キラル制御されたオリゴヌクレオチド」という言い回しは、該キラル結合リンに関して単一のジアステレオ異性体で存在するオリゴヌクレオチドを表す。

【0103】

キラル制御オリゴヌクレオチド組成物：本明細書中で使用されるとき、「キラル制御オリゴヌクレオチド組成物」という言い回しは、所定のレベルの個々のオリゴヌクレオチド型を含むオリゴヌクレオチド組成物を表す。例えば、いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物は、1つのオリゴヌクレオチド型を含む。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチド型の混合物を含む。実例となるキラル制御オリゴヌクレオチド組成物が、本明細書中にさらに記載される。

【0104】

キラル純粋：本明細書で、「キラル純粋」という言い回しは、全オリゴヌクレオチドが、該結合リンに関して単一のジアステレオ異性体で存在するキラル制御オリゴヌクレオチド組成物を言い表すために使用される。

【0105】

キラル均一：本明細書中で使用されるとき、「キラル均一」という言い回しは、全ヌクレオチド単位が、該結合リンにおいて、同じ立体化学を有するオリゴヌクレオチド分子または型を言い表すために使用される。例えば、そのヌクレオチド単位が、全て、結合リンにおいて、 R_p 立体化学を有するオリゴヌクレオチドは、キラル均一である。同様に、そのヌクレオチド単位が、全て、結合リンにおいて、 S_p 立体化学を有するオリゴヌクレオチドは、キラル均一である。

【0106】

所定の：所定は、例えば、無作為に起こるまたは達成の反対語として、計画的に選択されることを意味する。当業者は、本明細書を読み、本発明が、提供される組成物の調剤および/または封入のための特定のオリゴヌクレオチド型の選択を可能にし、提供される組

10

20

30

40

50

成物が調剤されるように、任意に、選択された特定の相対量で、正確に、選択された特定の型の制御された調剤をさらに可能にする新規および驚くべき技術を提供することを理解するであろう。かかる提供される組成物は、本明細書に記載の「所定の」ものである。それらが、偶然、特定のオリゴヌクレオチド型の意図的な作成を制御できないプロセスを通して作成されたので、特定の個々のオリゴヌクレオチド型を含み得る組成物は、「所定の」組成物ではない。いくつかの実施形態では、所定の組成物は、（例えば、制御されたプロセスの反復を通して）意図的に複製され得るものである。

【0107】

結合リン：本明細書中で定義されるとき、「結合リン」という言い回しは、表される特定のリン原子が、ヌクレオチド間結合中に存在し、該リン原子が、天然DNAおよびRNA中に起こるヌクレオチド間結合のホスホジエステルのリン原子に対応することを示すために使用される。いくつかの実施形態では、結合リン原子は、修飾ヌクレオチド間結合中にあり、ホスホジエステル結合の各酸素原子が、有機または無機部分により、任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態では、結合リン原子は、式IのP*である。いくつかの実施形態では、結合リン原子は、キラルである。いくつかの実施形態では、キラル結合リン原子は、式IのP*である。

10

【0108】

P修飾：本明細書中で使用されるとき、「P修飾」という語は、立体化学的修飾以外の結合リンにおけるいずれもの修飾を表す。いくつかの実施形態では、P修飾は、結合リンに共有結合した懸垂部分の付加、置換、または除去を含む。いくつかの実施形態では、該「P修飾」は、 $-X-L-R^1$ （式中、X、Lおよび R^1 は、独立して、本明細書および下記に定義および記載の通りである）である。

20

【0109】

ブロックマー：本明細書中で使用されるとき、「ブロックマー」という語は、その各個別のヌクレオチド単位を特徴付ける構造的特徴のパターンが、該ヌクレオチド間リン結合において共通の構造的特徴を共有する少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位の存在により特徴付けられるオリゴヌクレオチド鎖を表す。共通の構造的特徴は、該結合リンにおける共通立体化学または該結合リンにおける共通修飾を意味する。いくつかの実施形態では、該ヌクレオチド間リン結合における共通構造的特徴を共有する該少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、「ブロック」と呼ばれる。

30

【0110】

いくつかの実施形態では、ブロックマーは、「ステレオブロックマー」であり、例えば、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて、同じ立体化学を有する。かかる少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、「ステレオブロックマー」を形成する。例えば、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位、TsおよびCs1が、結合リン（両方のSp）において、同じ立体化学を有するので、 $(R_p, S_p) - A T s C s 1 G A$ は、ステレオブロックマーである。同じオリゴヌクレオチドでは、 $(R_p, S_p) - A T s C s 1$ は、ブロックを形成し、それは、立体ブロックである。

【0111】

いくつかの実施形態では、ブロックマーは、「P修飾ブロックマー」であり、例えば、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて、同じ修飾を有する。かかる少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、「P修飾ブロック」を形成する。例えば、 $(R_p, S_p) - A T s C s G A$ は、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位、TsおよびCsが、同じP修飾（すなわち、両方がホスホロチオエートジエステルである）を有するので、P修飾ブロックマーである。 $(R_p, S_p) - A T s C s G A$ の同じオリゴヌクレオチドでは、TsCsは、ブロックを形成し、それは、P修飾ブロックである。

40

【0112】

いくつかの実施形態では、ブロックマーは、「結合ブロックマー」であり、例えば、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて、同じ立体化学および同じ修飾を有する。少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、「結合ブロック」を形成する。

50

リンを有する、全 (S p) - C s A s 1 G s T。

【 0 1 2 0 】

いくつかの実施形態では、ユニマーは、「 P 修飾ユニマー」であり、例えば、全ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて同じ修飾を有する。例えば、該ヌクレオチド間結合全てがホスホロチオエートジエステルである、(R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p) - G s C s C s T s C s A s G s T s C s T s G s C s T s T s C s G s C s A s C s C。

【 0 1 2 1 】

いくつかの実施形態では、ユニマーは、「結合ユニマー」であり、例えば、全ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて同じ立体化学および同じ修飾を有する。例えば、該ヌクレオチド間結合全てが、 S p 結合リンを有するホスホロチオエートジエステルである、全 (S p) - G s C s C s T s C s A s G s T s C s T s G s C s T s T s C s G s C s A s C s C。

10

【 0 1 2 2 】

ギャップマー：本明細書中で使用されるとき、「ギャップマー」という語は、オリゴヌクレオチド鎖の少なくとも1つのヌクレオチド間リン結合がリン酸ジエステル結合、例えば、天然 DNA または RNA 中に見られるものなどであることで特徴付けられるオリゴヌクレオチド鎖を表す。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチド鎖の1つ以上のヌクレオチド間リン結合は、天然 DNA または RNA 中に見られるものなどのリン酸ジエステル結合である。例えば、 C と A 間の該ヌクレオチド間結合がリン酸ジエステル結合である、全 (S p) - C A s 1 G s T。

20

【 0 1 2 3 】

スキップマー：本明細書中で使用されるとき、「スキップマー」という語は、該オリゴヌクレオチド鎖の1つおきのヌクレオチド間リン結合が、リン酸ジエステル結合、例えば、天然 DNA または RNA 中に見られるものなどであり、該オリゴヌクレオチド鎖の1つおきのヌクレオチド間リン結合が、修飾されたヌクレオチド間結合である、ギャップマーの型を表す。例えば、全 (S p) - A s T C s 1 G A s 2 T C s 3 G である。

【 0 1 2 4 】

本発明の目的のため、化学元素は、 C A S 編集、化学と物理のハンドブック、67版、1986 - 87年、内表紙の元素周期表に従って特定される。

30

【 0 1 2 5 】

本発明の化合物および組成物に関する本明細書に記載の方法および構造は、薬剂的に許容可能な酸または塩基付加酸ならびにこれらの化合物および組成物の全立体異性体にも適用する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 2 6 】

【 図 1 】ラット肝臓ホモジネートのインキュベーション後の逆相 H P L C を示す図である。ラット全肝臓ホモジネートを 37 で異なる日数でインキュベートしたときに残留するオリゴヌクレオチドの総量を測定した。 O N T - 1 5 4 のインビトロ代謝安定性は、 2 ' - M O E 翼を有する O N T - 8 7 と同様であることが明らかになったが、いずれも、ステレオランダムである 2 ' - M O E ギャップマー (O N T - 4 1 、 ミポメルセン) よりもはるかに良い安定性を有する。残留する全長のオリゴマーの量を逆相 H P L C で測定し、対象となるピークのピーク面積を内部標準で規格化した。

40

【 0 1 2 7 】

【 図 2 】ラット全肝臓ホモジネート中のミポメルセン (O N T - 4 1) の様々なキラル純粋な類似体の分解を示す図である。ラット全肝臓ホモジネートを 37 で異なる日数でインキュベートしたときに残留するオリゴヌクレオチドの総量を測定した。 S p ヌクレオチド間結合の増加と共に、ヒト A p o B 配列 O N T - 4 1 (ミポメルセン) のキラル純粋なジアステレオマーのインビトロ代謝安定性が増加することが明らかになった。残留する全長のオリゴマーの量を逆相 H P L C で測定し、対象となるピークのピーク面積を内部標準

50

で規格化した。

【0128】

【図3】ラット全肝臓ホモジネート中のマウスApoB配列（ISIS 147764、ONT-83）の様々なキラル純粋な類似体の分解を示す図である。ラット全肝臓ホモジネートを37で異なる日数でインキュベートしたときに残留するオリゴヌクレオチドの総量を測定した。Spヌクレオチド間結合の増加と共に、マウスApoB配列（ONT-83、2'-MOEギャップマー、ステレオランダムなホスホロチオエート）のキラル純粋なジアステレオマーのインビトロ代謝安定性が増加することが明らかになった。残留する全長のオリゴマーの量を逆相HPLCで測定し、対象となるピークのピーク面積を内部標準で規格化した。

10

【0129】

【図4】ラット全肝臓ホモジネート中のミボメルセン類似体ONT-75の分解を24時間にわたって示す図である。この図は、ラット（rate）全肝臓ホモジネート中のONT-75の安定性を示す。

【0130】

【図5】ラット全肝臓ホモジネート中のミボメルセン類似体ONT-81の分解を24時間にわたって示す図である。この図は、ラット（rate）全肝臓ホモジネート中のONT-81の安定性を示す。

【0131】

【図6】ONT-87、ONT-88、およびONT-89におけるノックダウンの期間を示す図である。立体異性体は、大幅に異なるノックダウンの期間を示し得る。ONT-87は、他の立体異性体よりも耐久性が大幅に高い抑制をもたらす。ONT-87の長い作用時間が複数のインビボ試験で観察された。ONT-88は、特定のインビボ試験において、ONT-41（ミボメルセン）と同様の効果および回復プロファイルを示した。Hu ApoBトランスジェニックマウス（n=4）に、10 mpk IPボラスを投与した（2x/週、3週間）。マウスを無作為化して群を調査し、各投与日に投与する前に測定した個々のマウスの体重に基づいて、10 mg/kgを腹腔内に（IP）投与した（1日目、4日目、8日目、11日目、15日目、18日目、および22日目）。0日目、17日目、24日目、31日目、38日目、45日目および52日目に顎下（頬）で出血させて血液を採取し、次に、52日目に心穿刺により屠殺して血清処理した。ApoBをELISAにより測定した。強調表示部：投与3週後の維持されたノックダウン（72%対35%）。

20

【0132】

【図7】いくつかのRp、Spまたはステレオランダムなホスホロチオエート結合を有するsiRNA二本鎖における代謝安定性の違いを示す、ヒト血清中で測定されるHPLCプロファイルを示す図である。

30

【0133】

【図8】リボヌクレアーゼHの活性に対する立体化学の影響。オリゴヌクレオチドをRNAとハイブリダイズさせ、次に、1xリボヌクレアーゼH緩衝液の存在下、リボヌクレアーゼHと共に37でインキュベートした。上から下へ（120分）：ONT-89、ONT-77、ONT-81、ONT-80、ONT-75、ONT-41、ONT-88、ONT-154、ONT-87。ONT-77/154は互いに非常に近い。

40

【0134】

【図9】ヒトApoB mRNAの同じ領域を標的にするホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの立体異性体の異なる調製物とハイブリダイズさせたときの20-mer RNAのヒトリボヌクレアーゼH1切断の分析。切断の特異的部位は、特異な立体化学の強い影響を受ける。矢印は、切断位置（切断部位）を示す。産物は、UPLC/MSで分析した。矢印の長さは、反応混合物中に存在する産物の量を表し、この量は、UVピーク面積と、そのフラグメントの理論上の吸光係数との比から求めた（矢印が長いほど、検出された切断産物が多い）。（A）は、切断地図の記号を説明する。（B）および（C）は、オ

50

リボヌクレオチドの切断地図を示す。

【0135】

【図10】異なるオリゴヌクレオチド組成物の切断地図を示す((A)~(C))。これら3つの配列は、FOXO1 mRNA中の異なる領域を標的にする。各配列を5つの異なる化学で調査した。切断地図は、1×PBS緩衝液の存在下、それぞれの二本鎖をリボヌクレアーゼH1Cと共に37℃で30分インキュベーションした後、得られた反応混合物から作成される。矢印は、切断部位を示す。()は、両方のフラグメント、5'-リン酸エステル種ならびに5'-OH 3'-OH種(specie)が反応混合物中で同定されたことを示す。()は、5'-リン酸エステル種のみが検出されたことを示し、()は、5'-OH 3'-OH成分が質量分析で検出されたことを示す。矢印の長さは、反応混合物中に存在する産物の量を表し、この量は、UVピーク面積と、そのフラグメントの理論上の吸光係数との比から求めた(矢印が長いほど、検出可能な切断産物が多い)。5'-OH 3'-OHが反応混合物中に検出されなかった場合のみ、5'-リン酸エステル種ピークを定量化に用いた。切断速度は、反応混合物中に残留する全長RNAの量を逆相HPLCで測定することによって求めた。定めた時点で、30mM Na₂EDTAで反応を止めた。

10

【0136】

【図11】異なる共通塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチド組成物の切断地図を示す図である((A)~(B))。切断地図は、ステレオランダムなDNA組成物(上のパネル)と、立体化学的に純粋な、3つの特異なオリゴヌクレオチド組成物との比較を示す。データは、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の結果と、FOXO1 mRNA中の異なる領域を標的にする2つのステレオランダムなホスホロチオエートオリゴヌクレオチド組成物(ONT-366およびONT-367)の結果とを比較する。各パネルは、ステレオランダムな(set random)DNA(上のパネル)と、立体化学的に純粋な、3つの特異なオリゴヌクレオチド調製物(preparations)との比較を示す。切断地図は、1×PBS緩衝液の存在下、それぞれの二本鎖をリボヌクレアーゼH1Cと共に37℃で30分インキュベーションした後、得られた反応混合物から作成した。矢印は、切断部位を示す。()は、両方のフラグメント、5'-リン酸エステル種ならびに5'-OH 3'-OH種(specie)が反応混合物中で同定されたことを示す。()は、5'-リン酸エステル種のみが検出されたことを示し、()は、5'-OH 3'-OH成分が質量分析で検出されたことを示す。矢印の長さは、反応混合物中に存在する代謝産物の量を表し、この量は、UVピーク面積と、そのフラグメントの理論上の吸光係数との比から求めた(矢印が長いほど、検出可能な切断産物が多い)。5'-OH 3'-OHが反応混合物中に検出されなかった場合のみ、5'-リン酸エステル種ピークを定量化に用いた。

20

30

【0137】

【図12】リボヌクレアーゼHの活性に対する立体化学の影響。独立した2つの実験において、FOXO1 mRNAの同一領域を標的にするアンチセンスオリゴヌクレオチドをRNAとハイブリダイズさせ、次に、1×リボヌクレアーゼH緩衝液の存在下、リボヌクレアーゼHと共に37℃でインキュベートした。全長RNAの消失を、RP-HPLCを用いて、254nmでのそのピーク面積から測定した。(A)は、残留するRNA基質(%)を示す(上から下へ(60分):ONT-355、ONT-316、ONT-367、ONT-392、ONT-393およびONT-394(60分のとき、ONT-393およびONT-394はほぼ同じ;5分のとき、ONT-393のほうが、残留するRNA基質(%)が高かった))。(B)は、残留するRNA基質(%)を示す(上から下へ(60分):ONT-315、ONT-354、ONT-366、ONT-391、ONT-389およびONT-390)。切断速度は、反応混合物中に残留する全長RNAの量を逆相HPLCで測定することによって求めた。定めた時点で、30mM Na₂EDTAで反応を止めた。

40

【0138】

50

【図13】アンチセンスオリゴヌクレオチドのターンオーバーを示す図である。二本鎖は、6 μ Mに等しい各DNA鎖濃度およびRNA 100 μ Mで形成させた。これらの二本鎖を、0.02 μ M リボヌクレアーゼH酵素と共にインキュベートし、全長RNAの消失を、RP-HPLCを用いて、254 nmでのそのピーク面積から測定した。切断速度は、反応混合物中に残留する全長RNAの量を逆相HPLCで測定することによって求めた。定めた時点で、30 mM Na₂EDTAで反応を止めた。上から下へ(40分)：ONT-316、ONT-367およびONT-392。

【0139】

【図14】ステレオランダムなホスホロチオエートオリゴヌクレオチドと、同じFOXO1 mRNA領域を標的にする立体化学的に純粋な、6つの特異なオリゴヌクレオチド調製物とを比較する切断地図を示す図である。

10

【0140】

【図15】リボヌクレアーゼHの活性に対する立体化学の影響。アンチセンスオリゴヌクレオチドをRNAとハイブリダイズさせ、次に、1×リボヌクレアーゼH緩衝液の存在下、リボヌクレアーゼHと共に37 でインキュベートした。リボヌクレアーゼHの活性への立体化学の依存性が観察された。同様に、ONT-367(ステレオランダムなDNA)とONT-316(5'-10-5' 2'-MOEギャップマー)との比較において明らかなのは、リボヌクレアーゼHの活性への組成物の化学の強い依存性である。上から下へ(40分)：ONT-316、ONT-421、ONT-367、ONT-392、ONT-394、ONT-415、およびONT-422(40分のとき、ONT-394 / 415 / 422は同等のレベルである；5分のとき、DNA/RNA二本鎖内に残留するRNA(%)は、ONT-422 > ONT-394 > ONT-415)。

20

【0141】

【図16】リボヌクレアーゼHの活性に対する立体化学の影響。FOXO1 mRNAの同一領域を標的にするアンチセンスオリゴヌクレオチドをRNAとハイブリダイズさせ、次に、1×リボヌクレアーゼH緩衝液の存在下、リボヌクレアーゼHと共に37 でインキュベートした。リボヌクレアーゼHの活性への立体化学の依存性が観察された。上から(form)下へ(40分)：ONT-396、ONT-409、ONT-414、ONT-408(40分のとき、ONT-396 / 409 / 414 / 408は同等のレベルである。)、ONT-404、ONT-410、ONT-402(40分のとき、ONT-404 / 410 / 408は同等のレベルである。)、ONT-403、ONT-407、ONT-405、ONT-401、ONT-406およびONT-400(40分のとき、ONT-401 / 405 / 406 / 400は同等のレベルである)。

30

【0142】

【図17】リボヌクレアーゼHの活性に対する立体化学の影響。FOXO1 mRNAの同一領域を標的にするアンチセンスオリゴヌクレオチドをRNAとハイブリダイズさせ、次に、1×リボヌクレアーゼH緩衝液の存在下、リボヌクレアーゼHと共に37 でインキュベートした。リボヌクレアーゼHの活性への立体化学の依存性が観察された。ホスホジエステルオリゴヌクレオチドONT-415の切断速度をわずかに上回る速度で、ONT-406が、二本鎖RNAの切断を誘発することが観察された。上から下へ(40分)：ONT-396、ONT-421、ONT-392、ONT-394、ONT-415、ONT-406、およびONT-422(40分のとき、ONT-394 / 415 / 406は同等のレベルである；5分のとき、DNA/RNA二本鎖内に残留するRNA(%)は、ONT-394 > ONT-415 > ONT-406)。

40

【0143】

【図18】RNA(ONT-388)をステレオランダムなDNA(ONT-367)と二本鎖にしたとき(上)、および、ステレオ純粋なDNAを繰り返してトリプレットモチーフ-3'-SSR-5'(ONT-394)と二本鎖にしたとき(下)に得られたRNA切断産物の例示的なUVクロマトグラムを示す図である。)。2.35分：7mer；3.16分：8merおよびP-6mer；4.48分：P-7mer；5.83分：P-

50

8mer; 6.88分: 12mer; 9.32分: 13mer; 10.13分: P-11mer; 11.0分: P-12merおよび14mer; 11.93分: P-13mer; 13.13分: P-14mer。ONT-394(下)のピークの帰属: 4.55分: p-7mer; 4.97分: 10mer; 9.53分: 13mer。

【0144】

【図19】RNA切断産物のエレクトロスプレーイオン化スペクトルを示す図である。二本鎖を、1×RNase H緩衝液の存在下、リボヌクレアーゼHと共に30分間インキュベートしたときに、二本鎖ONT-387、RNA/ONT-354、(7-6-7、DNA-2'-OMe-DNA)(上)およびONT-387、RNA/ONT-315、(5-10-5, 2'-MOEギャップマー)(下)から得られたRNAフラグメント。

10

【0145】

【図20】リボヌクレアーゼHと共に30分インキュベーションした後のONT-406およびONT-388二本鎖のUVクロマトグラムおよびTICを示す図である。

【0146】

【図21】提案されている例示的な切断を示す図である。提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、示す通り標的を切断することができる。

【0147】

【図22】変異ハンチンチンのmRNAを標的にする例示的な対立遺伝子特異的切断を示す図である。(A)および(B): 例示的なオリゴヌクレオチド。(C)~(E): 切断地図。(F)~(H): RNA切断。変異ハンチンチンを対立遺伝子選択的に抑制する目的で一塩基多型を標的にするために、ステレオランダムなオリゴヌクレオチド組成物およびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を調製した。ONT-453(muHTT)およびONT-454(wtHTT)を標的にするONT-450(ステレオランダム)は、RNA切断およびそれらの切断地図において、わずかな差異を示した。ONT-453(muHTT)およびONT-454(wtHTT)を標的にし、リボヌクレアーゼH認識部位内に3'-SSR-5'モチーフの選択的な配置を有するキラル制御されたONT-451は、RNA切断速度において大きな差異を示した。切断地図において、RNAの5'-末端から読まれる場合に、ミスマッチ後である8位と9位の間に切断を導くよう3'-SSR-5'モチーフが配置されることは注目に値する。ONT-453(muHTT)およびONT-454(wtHTT)を標的にし、リボヌクレアーゼH認識部位内に3'-SSR-5'モチーフの選択的な配置を有するONT-452は、RNA切断速度において中程度の差異を示した。RNAの5'-末端から読まれる場合にはミスマッチ前である7位および8位での切断を導くよう3'-SSR-5'モチーフは配置された。例示的なデータは、対立遺伝子特異的切断のために高度な識別を実現するには、3'-SSR-5'モチーフの配置の位置が重要であることを示す。すべての切断地図は、1×PBS緩衝液の存在下、それぞれの二本鎖をリボヌクレアーゼH1Cと共に37°Cで5分インキュベーションした後、得られた反応混合物から作成される。矢印は、切断部位を示す。()は、両方のフラグメント、5'-リン酸エステル種ならびに5'-OH 3'-OH種が反応混合物中で同定されたことを示す。()は、5'-リン酸エステル種のみが検出されたことを示し、()は、5'-OH 3'-OH成分が質量分析で検出されたことを示す。矢印の長さは、反応混合物中に存在する代謝産物の量を表し、この量は、UVピーク面積と、そのフラグメントの理論上の吸光係数との比から求めた。5'-OH 3'-OHが反応混合物中に検出されなかった場合のみ、5'-リン酸エステル種ピークを定量化に用いた。

20

30

40

【0148】

【図23】(A)~(C)は、FOXO1 mRNAを標的にする例示的な対立遺伝子特異的切断を示す図である。

【0149】

【図24】ApoBオリゴヌクレオチドで処理後のApoB mRNAのインビトロ用量反応サイレンシング(in vitro dose response silenci

50

ng)を示す図である。2'-MOE翼ありとなしの立体化学的に純粋なジアステロマー(diastereomers)は、ONT-41(ミポメルセン)と同様の効果を示す。

【0150】

【図25】ステレオランダムな組成物(ONT-367)およびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物(ONT-421(すべてSp)およびONT-455(すべてRp))およびDNA(ONT-415)のリボヌクレアーゼH切断地図(A)およびRNA切断速度(B)の比較を示す図である。これらの配列は、FOXO1 mRNA中の同じ領域を標的にする。切断地図は、1xPBS緩衝液の存在下、それぞれの二本鎖をリボヌクレアーゼH1Cと共に37°Cで5分インキュベーションした後、得られた反応混合物から作成した。矢印は、切断部位を示す。()は、両方のフラグメント、5'-リン酸エステル種ならびに5'-OH/3'-OH種が反応混合物中で同定されたことを示す。()は、5'-リン酸エステル種のみが検出されたことを示し、()は、5'-OH/3'-OH成分が質量分析で検出されたことを示す。矢印の長さは、反応混合物中に存在する代謝産物の量を表し、この量は、UVピーク面積と、そのフラグメントの理論上の吸光係数との比から求めた。5'-OH/3'-OHが反応混合物中に検出されなかった場合のみ、5'-リン酸エステル種ピークを定量化に用いた。切断速度は、反応混合物中に残留する全長RNAの量を逆相HPLCで測定することによって求めた。定めた時点で、30mM Na₂EDTAで反応を止める。

10

【0151】

【図26】DNAの3'-末端から開始する位置の変更を伴う1つのRpを含む配列の切断地図の比較を示す図である。これらの配列は、FOXO1 mRNA中の同じ領域を標的にする。切断地図は、1xPBS緩衝液の存在下、それぞれの二本鎖をリボヌクレアーゼH1Cと共に37°Cで5分インキュベーションした後、得られた反応混合物から作成される。矢印は、切断部位を示す。()は、両方のフラグメント、5'-リン酸エステル種ならびに5'-OH/3'-OH種が反応混合物中で同定されたことを示す。()は、5'-リン酸エステル種のみが検出されたことを示し、()は、5'-OH/3'-OH成分が質量分析で検出されたことを示す。矢印の長さは、反応混合物中に存在する代謝産物の量を表し、この量は、UVピーク面積と、そのフラグメントの理論上の吸光係数との比から求めた。5'-OH/3'-OHが反応混合物中に検出されなかった場合のみ、5'-リン酸エステル種ピークを定量化に用いた。

20

30

【0152】

【図27】(A)ステレオ純粋なオリゴヌクレオチド(ONT-406)、(ONT-401)、(ONT-404)および(ONT-408)のリボヌクレアーゼH切断速度の比較を示す図である。4つの配列はすべて、1つのRp結合を有するステレオ純粋なホスホロチオエートである。これらの配列は、FOXO1 mRNA中の同じ領域を標的にする。すべての二本鎖を、1xPBS緩衝液の存在下、リボヌクレアーゼH1Cと共に37°Cでインキュベーションした(were incubation)。定めた時点で、30mM Na₂EDTAで反応を止めた。切断速度は、反応混合物中に残留する全長RNAの量を逆相HPLCで測定することによって求めた。ONT-406およびONT-401は、優れた切断速度を有することが明らかになった。(B)リボヌクレアーゼHアッセイ(10μMオリゴヌクレオチド)において切断されたRNA(%)と、インビトロアッセイ(20nMオリゴヌクレオチド)におけるmRNAノックダウン(%)との相関関係を示す図である。すべての配列が、FOXO1標的内のmRNAの同じ領域を標的にする。残留するRNAの量は、同じ反応混合物中のDNAに対して規格化したときのRNAのUVピーク面積により求められる。上述の切断地図はすべて、1xPBS緩衝液の存在下、それぞれの二本鎖をリボヌクレアーゼH1Cと共に37°Cで5分インキュベーションした後、得られた反応混合物から作成される。ONT-396からONT-414のすべての配列は、1つのRpホスホロチオエートを有し、これらの配列は、Rpの位置が異なる。ONT-421(すべてSp)ホスホロチオエートは、不活性なインビトロアッセイで

40

50

あった。これは、ONT-421を相補RNAと二本鎖にしたときのリボヌクレアーゼHアッセイにおけるRNAの低い切断速度に関係する。

【0153】

【図28】単一のRpウォーク(walk)PS DNA(ONT-396-ONT-414)、ステレオランダムなPS DNA(ONT-367)、全Sp PS DNA(ONT-421)および全Rp PS DNA(ONT-455)のラット血清中の2日間の血清安定性アッセイを示す図である。ONT-396およびONT-455は、試験した時点で分解したことに留意されたい。

【0154】

【図29】ヘミマーを含む例示的なオリゴヌクレオチドを示す図である。(A):切断地
10
図。(B):RNA切断アッセイ。(C):FOXO1 mRNAノックダウン。いくつか
の実施形態において、配列の5'-末端への2'-修飾の導入は、リボヌクレアーゼH
の活性を維持しながら、標的RNAとの結合の安定性を増加させる。ONT-367(ス
ステレオランダムなホスホロチオエートDNA)およびONT-440(5'-15、2'-
F-DNA)は、リボヌクレアーゼHアッセイ(10μMオリゴヌクレオチド)において
同様の切断地図および同様のRNA切断速度を有する。いくつかの実施形態において、O
NT-440(5'-11、2'-F-DNA)配列は、より良い細胞透過性を有することが
15
できる。いくつかの実施形態において、非対称の2'-修飾は、リボヌクレアーゼHの
活性を維持しながら、Tmの利点をもたらす。RSSモチーフの導入は、ヘミマーにおい
てリボヌクレアーゼHの効率をさらに向上させ得る。切断地図は、1×PBS緩衝液の存
20
在下、それぞれの二本鎖をリボヌクレアーゼH1Cと共に37で5分インキュベーショ
ンした後、得られた反応混合物から作成される。矢印は、切断部位を示す。()は、両
方のフラグメント、5'-リン酸エステル種ならびに5'-OH 3'-OH種が反応混
合物中で同定されたことを示す。()は、5'-リン酸エステル種のみが検出されたこ
25
とを示し、()は、5'-OH 3'-OH成分が質量分析で検出されたことを示す。
矢印の長さは、反応混合物中に存在する代謝産物の量を表し、この量は、UVピーク面積
と、そのフラグメントの理論上の吸光係数との比から求めた。5'-OH 3'-OHが
反応混合物中に検出されなかった場合のみ、5'-リン酸エステル種ピークを定量化に用
いた。

【0155】

【図30】切断アッセイの例示的な質量分析データを示す図である。上:ONT-367
30
のデータ:2.35分:7mer;3.16分:8merおよびP-6mer;4
.58分:P-7mer;5.91分:P-8mer;7.19分:12mer;
9.55分:13mer;10.13分:P-11mer;11.14分:P-12
merおよび14mer;12.11分:P-13mer;13.29分:P-1
4mer;14.80分:全長RNA(ONT-388)および18.33分:ステレ
オランダムなDNA(ONT-367)。下:ONT-406のデータ:4.72分:p
-rArUrGrGrCrUrA、5'-リン酸化7merRNA;9.46分:5
'-rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrA、5'-OH 3'-OH
13merRNA;16.45分:全長RNA(ONT-388);19.48分
40
および19.49分:ステレオ純粋なDNA(ONT-406)。

【発明を実施するための形態】

【0156】

合成オリゴヌクレオチドは、幅広い種類の応用へ有用な分子ツールを提供する。例えば、
オリゴヌクレオチドは、治療、診断、研究および新規ナノマテリアル用途において有用
である。天然の核酸の使用は(例えば、非修飾DNAまたはRNA)、例えば、エンドお
よびエキソヌクレアーゼに対するそれらの感受性により制限される。よって、これらの短
所を回避するために、さまざまな合成同等物が開発されている。合成同等物にはそれらの
分子を分解されにくくする骨格修飾を含む合成オリゴヌクレオチドが含まれる。構造的な
50
観点から見ると、そのようなインターヌクレオチドのリン酸結合に対する修飾は、キラリ

ティーを導入する。オリゴヌクレオチドのある特性は、オリゴヌクレオチドの骨格を形成するリン原子の配置により影響を受ける可能性があることが明らかになっている。例えば、インビトロの研究では、結合親和性、相補RNAと特に結合する配列、ヌクレアーゼに対する安定性といったアンチセンスヌクレオチドの特性は、特に、骨格のキラリティーによって影響を受けることを示している（例えば、リン原子の配置）。

【0157】

とりわけ、本発明は、ステレオランダムなオリゴヌクレオチド調製物が、オリゴヌクレオチド鎖内の個々の骨格キラル中心の立体化学構造において互いに異なる複数の特異な化学的実体を含むという認識を包含する。さらに、本発明は、ステレオランダムなオリゴヌクレオチド調製物が、関連するオリゴヌクレオチドの可能性のあるあらゆる立体異性体を含むことは通常はありそうにないという洞察を包含する。したがって、とりわけ、本発明は、興味あるオリゴヌクレオチドの特定の立体異性体である新規な化学的実体を提供する。すなわち、本発明は、特定のオリゴヌクレオチド化合物が、その塩基配列、その長さ、その骨格結合のパターン、およびその骨格キラル中心のパターンにより定義されてもよい、単一のオリゴヌクレオチド化合物の実質的に純粋な調製物を提供する。

【0158】

本発明は、とりわけ、特定のオリゴヌクレオチドの個々の立体異性体が、互いに異なる安定性および/または活性を示し得ることを示す。さらに、本開示は、オリゴヌクレオチド内の特定のキラル構造の含有および/または位置により実現される安定性の改善が、修飾された骨格結合、塩基、および/または糖の使用により（例えば、特定のタイプの修飾されたリン酸エステル、2'-修飾、塩基修飾などの使用により）実現される安定性の改善と同等か、またはそれよりもさらに良くなり得ることを示す。いくつかの実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチド内の特定のキラル構造の含有および/または位置により実現される活性の向上が、修飾された骨格結合、塩基、および/または糖の使用により（例えば、特定のタイプの修飾されたリン酸エステル、2'-修飾、塩基修飾などの使用により）実現される活性の向上と同等か、またはそれよりもさらに良くなり得ることも示す。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチド内の特定のキラル結合の含有および/または位置は、驚いたことに、このようなオリゴヌクレオチドが核酸高分子の切断に利用されるとき、核酸高分子の切断パターンを変化させ得る。例えば、いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、予想外に高い標的核酸高分子の切断効率をもたらす。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、新たな切断部位をもたらす。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、例えば、特定の既存の切断部位をブロックすることにより、より少ない切断部位をもたらす。さらにもっと予想外に、いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、切断に利用されるオリゴヌクレオチドに対して相補的である配列内の標的核酸高分子のただ1つの部位での切断をもたらす。いくつかの実施形態において、切断部位の数を最小にする骨格キラル中心のパターンを選択することにより、さらに高い切断効率を実現される。

【0159】

いくつかの実施形態において、本発明は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義されるオリゴヌクレオチドを含むキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）オリゴヌクレオチド組成物を提供し、この組成物は、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約10%が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、単一のオリゴヌクレオチドの実質的に純粋な調製物である。オリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターンは、5'から3'の結合リン立体化学の組み合わせ（Rp/Sp）により指定することができる。例えば、下に例示の通り、ONT-154は、5S-(SSR)₃-5Sのパターンを有し、ONT-80はS₁₉を有する。

【0160】

いくつかの実施形態において、本発明は、同じオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、単一のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して組成物が濃縮されるオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、同じオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を共有する単一のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して組成物が濃縮されるオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドの実質的にラセミの（またはキラル制御されない）調製物において、カップリングステップは、立体選択性を向上させるように特異的に行われなければならないという点で、すべてまたはほとんどのカップリングステップはキラル制御されない。オリゴヌクレオチドの例示的な実質的にラセミの調製物は、テトラエチルチウラムジスルフィド（*tetraethylthiuram disulfide*）または（*TETD*）または3H-1,2-ベンゾジチオール（*benzodithiol*）-3-オン1,1-ジオキシド（*BDTD*）のいずれかで亜リン酸トリエステルを硫化する当技術分野において周知のプロセスによるホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの調製物である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物は、実質的にラセミのオリゴヌクレオチド組成物（またはキラル制御されないオリゴヌクレオチド組成物）をもたらす。

【0161】

いくつかの実施形態において、本発明は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供し、この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御される。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、オリゴヌクレオチドタイプの実質的に純粋な調製物であり、ここで、オリゴヌクレオチドタイプのものではない組成物中のオリゴヌクレオチドは、前記オリゴヌクレオチドタイプの調製プロセスからの（*form*）（場合によっては、特定の精製手順後の）不純物である。

【0162】

いくつかの実施形態において、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約20%は、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する。いくつかの実施形態において、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約25%は、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する。いくつかの実施形態において、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約30%は、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する。いくつかの実施形態において、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約35%は、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する。いくつかの実施形態において、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約40%は、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する。いくつかの実施形態において、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約45%は、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する。いくつか

オリゴヌクレオチドの少なくとも約70%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約80%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約90%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約92%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約94%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約95%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約96%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約97%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約98%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約99%は、同じオリゴヌクレオチドタイプのものである。

10

【0164】

20

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の純度は、その調製プロセスにおける各結合工程の立体選択性により制御することができる。いくつかの実施形態において、結合工程は、60%の立体選択性（例えば、ジアステレオ選択性）を有する（結合工程により形成される新たなヌクレオチド間結合の60%は、所期の立体化学を有する）。このような結合工程の後、形成された新たなヌクレオチド間結合は、60%の純度を有すると言われることもある。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも60%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも70%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも80%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも85%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも90%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも91%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも92%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも93%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも94%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも95%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも96%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも97%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも98%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、少なくとも99%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、各結合工程は、実質的に100%の立体選択性を有する。いくつかの実施形態において、結合工程は、実質的に100%の立体選択性を有し、ここで、分析法（例えば、NMR、HPLCなど）によって検出可能な、結合工程によるすべての産物は、所期の立体選択性を有する。

30

40

【0165】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、*chiromers en*）である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、*siRNA*オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンタゴ*mir*、マイクロRNA、プレマイクロRN*s*、抗*m*

50

mir、スーパーmir、リボザイム、U1アダプター、RNAアクチベーター、RNAi剤、デコイオリゴヌクレオチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、アプタマーまたはアジュバントであり得るオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、アンタゴmirオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、マイクロRNAオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、プレマイクロRNAオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、抗mirオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、スーパーmirオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、リボザイムオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、U1アダプターオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、RNAアクチベーターオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、RNAi剤オリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、デコイオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、三重鎖形成オリゴヌクレオチドオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、アプタマーオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、アジュバントオリゴヌクレオチドのものである。

【0166】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、1つまたは複数の修飾された骨格結合、塩基、および/または糖を含むオリゴヌクレオチドのものである。

【0167】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、2つ以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、3つ以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、4つ以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、5つ以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、または25個のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドタイプは、5以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドタイプは、6以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドタイプは、7以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドタイプは、8以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドタイプは、9以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドタイプは、10以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドタイプは、11以上のキラルな修飾されたリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドタイプは、12以上のキラルな

10

20

30

40

50

るオリゴヌクレオチドの少なくとも約95%のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約10%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約20%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約30%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約40%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約50%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約60%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約70%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約80%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約90%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの約95%未満のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Rp構造のものである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ただ1つのRpキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ただ1つのRpキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有し、ここで、すべてのヌクレオチド間結合は、キラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。いくつかの実施形態において、キラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、キラルなホスホロチオエートジエステル結合である。いくつかの実施形態において、キラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合はそれぞれ独立して、キラルなホスホロチオエートジエステル結合である。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド間結合はそれぞれ独立して、キラルなホスホロチオエートジエステル結合であり、ただ1つの結合は、Rpである。

【0171】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、1つまたは複数の修飾塩基を含むオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、修飾塩基を含まないオリゴヌクレオチドである。例示的なこのような修飾塩基は、上および本明細書に記述される。

【0172】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも8個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも9個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも10個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも11個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は

10

20

30

40

50

、少なくとも12個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも13個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも14個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも15個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも16個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも17個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも18個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも19個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも20個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも21個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも22個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも23個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも24個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも25個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、少なくとも30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、または75個の塩基の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのものである。

【0173】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、糖部分で修飾される1つまたは複数の残基を含むオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、糖部分の2'位で修飾される1つまたは複数の残基を含むオリゴヌクレオチドを含む（本明細書において、「2'-修飾」と呼ぶ）。例示的なこのような修飾は、上および本明細書に記述され、2'-OMe、2'-MOE、2'-LNA、2'-Fなどを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、2'-修飾される1つまたは複数の残基を含むオリゴヌクレオチドを含む。例えば、いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル（2'-MOE）-修飾残基である1つまたは複数の残基を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、どのような2'-修飾も含まないオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、どのような2'-MOE残基も含まないオリゴヌクレオチドである。すなわち、いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、MOE-修飾されない。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 4 】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および／または立体化学的に純粋な）オリゴヌクレオチドは、翼 - コア - 翼の一般的なモチーフのものである（本明細書において、一般に、X - Y - Xとも表される）。いくつかの実施形態において、各翼は、特定の修飾を有する1つまたは複数の残基を含み、この修飾は、コア「Y」部分にはない。いくつかの実施形態において、各翼は、コア部分に存在しない2'修飾を有する1つまたは複数の残基を含む。例えば、いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および／または立体化学的に純粋な）オリゴヌクレオチドは、X - Y - Xと表される翼 - コア - 翼モチーフを有し、ここで、各「X」部分の残基は、特定のタイプの2' - 修飾残基であり、コア「Y」部分の残基は、同じ特定のタイプの2' - 修飾残基ではない。例えば、いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および／または立体化学的に純粋な）オリゴヌクレオチドは、X - Y - Xと表される翼 - コア - 翼モチーフを有し、ここで、各「X」部分の残基は、2' - MOE - 修飾残基であり、コア「Y」部分の残基は、2' - MOE - 修飾残基ではない。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御された（および／または立体化学的に純粋な）オリゴヌクレオチドは、X - Y - Xと表される翼 - コア - 翼モチーフを有し、ここで、各「X」部分の残基は、2' - MOE - 修飾残基であり、コア「Y」部分の残基は、2' - デオキシリボヌクレオチドである。このようなX - Y - Xモチーフの文脈において、上および本明細書に記述されるすべてのこのような2' - 修飾が意図されることを当業者は理解されよう。

10

【 0 1 7 5 】

いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、1塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、2塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、3塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、4塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、5塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、6塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、7塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、8塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、9塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、各翼領域が独立して、10塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、各翼領域が、1塩基の長さを有する。特定の実施形態では、各翼領域が、2塩基の長さを有する。特定の実施形態では、各翼領域が、3塩基の長さを有する。特定の実施形態では、各翼領域が、4塩基の長さを有する。特定の実施形態では、各翼領域が、5塩基の長さを有する。

20

30

【 0 1 7 6 】

いくつかの実施形態において、コア領域が、1塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、2塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、3塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、4塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、5塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、6塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、7塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、8塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、9塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、10塩基以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、コア領域が、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、10塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、3塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、4塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、5塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、6塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、7塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、8塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、9塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、10塩基の長さを有する

40

50

。特定の実施形態では、コア領域が、11塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、12塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、13塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、14塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、15塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、16塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、17塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、18塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、19塩基の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、11塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、12塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、13塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、14塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、15塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、16塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、17塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、18塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、19塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、20塩基以上の長さを有する。特定の実施形態では、コア領域が、20以上の塩基の長さを有する。

10

【0177】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの翼 - コア - 翼 (すなわち、X - Y - X) モチーフは、数字で、例えば、5 - 10 - 5と表され、これは、オリゴヌクレオチドの各翼領域が、5塩基長であり、オリゴヌクレオチドのコア領域が、10塩基長であることを意味する。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフは、例えば、2 - 16 - 2、3 - 14 - 3、4 - 12 - 4、5 - 10 - 5などのいずれかである。特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、5 - 10 - 5である。

20

【0178】

いくつかの実施形態において、このような翼 - コア - 翼 (すなわち、X - Y - X) モチーフの提供されるオリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合は、すべてキラルな修飾されたリン酸結合である。いくつかの実施形態において、このような翼 - コア - 翼 (すなわち、X - Y - X) モチーフの提供されるオリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合は、すべてキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。いくつかの実施形態において、このような翼 - コア - 翼モチーフの提供されるオリゴヌクレオチドのキラルなヌクレオチド間結合は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、50%、70%、80%、または90%のキラルな修飾されたリン酸エステルヌクレオチド間結合である。いくつかの実施形態において、このような翼 - コア - 翼モチーフの提供されるオリゴヌクレオチドのキラルなヌクレオチド間結合は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。いくつかの実施形態において、このような翼 - コア - 翼モチーフの提供されるオリゴヌクレオチドのキラルなヌクレオチド間結合は、Sp構造の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、50%、70%、80%、または90%のキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。

30

【0179】

いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフの各翼領域は、キラルな修飾されたリン酸エステルヌクレオチド間結合を含んでもよい。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフの各翼領域は、キラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含んでもよい。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフの各翼領域は、キラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフの2つの翼領域は、同じヌクレオチド間結合立体化学を有する。いくつかの実施形態において、2つの翼領域は、異なるヌクレオチド間結合立体化学を有する。いくつかの実施形態において、翼内のヌクレオチド間結合はそれぞれ独立して、キラルなヌクレオチド間結合である。

40

【0180】

いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、キラルな修飾され

50

たリン酸エステルヌクレオチド間結合を含んでもよい。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、キラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含んでもよい。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを含む。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有する。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを含み、ここで、繰り返しパターンは、 $(Sp)mRp$ または $Rp(Sp)m$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7 または 8 である。) である。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有し、ここで、繰り返しパターンは、 $(Sp)mRp$ または $Rp(Sp)m$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7 または 8 である。) である。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有し、ここで、繰り返しパターンは、 $Rp(Sp)m$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7 または 8 である。) である。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有し、ここで、繰り返しパターンは、 $(Sp)mRp$ または $Rp(Sp)m$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7 または 8 である。) である。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有し、ここで、繰り返しパターンは、 S 構造に、少なくとも 33% のヌクレオチド間結合を含むモチーフである。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有し、ここで、繰り返しパターンは、 S 構造に、少なくとも 50% のヌクレオチド間結合を含むモチーフである。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有し、ここで、繰り返しパターンは、 S 構造に、少なくとも 66% のヌクレオチド間結合を含むモチーフである。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有し、ここで、繰り返しパターンは、 $RpRpSp$ および $SpSpRp$ から選択される繰り返しトリプレットモチーフである。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有し、ここで、繰り返しパターンは、繰り返し $RpRpSp$ である。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有し、ここで、繰り返しパターンは、繰り返し $SpSpRp$ である。

【0181】

いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(Sp)mRp$ または $Rp(Sp)m$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $Rp(Sp)m$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(Sp)mRp$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、 m は 2 である。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $Rp(Sp)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(Rp)_2Rp(Sp)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $R_p S_p R_p (S_p)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $S_p R_p R_p (S_p)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(S_p)_2 R_p$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0182】

いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(S_p)_m R_p$ または $R_p (S_p)_m$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $R_p (S_p)_m$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(S_p)_m R_p$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、 m は2である。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $R_p (S_p)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(S_p)_2 R_p (S_p)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(R_p)_2 R_p (S_p)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $R_p S_p R_p (S_p)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $S_p R_p R_p (S_p)_2$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(S_p)_2 R_p$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0183】

本明細書において定義される通り、 m は、2、3、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 m は、3、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 m は、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 m は、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 m は、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 m は、7または8である。いくつかの実施形態において、 m は2である。いくつかの実施形態において、 m は3である。いくつかの実施形態において、 m は4である。いくつかの実施形態において、 m は5である。いくつかの実施形態において、 m は6である。いくつかの実施形態において、 m は7である。いくつかの実施形態において、 m は8である。

【0184】

いくつかの実施形態において、繰り返しパターンは、 $(S_p)_m (R_p)_n$ であり、式中、 n は独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、 m は独立して、上で定義され、本明細書に記述される通りである。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(S_p)_m (R_p)_n$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(S_p)_m (R_p)_n$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、繰り返しパターンは、 $(R_p)_n (S_p)_m$ であり、式中、 n は独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、 m は独立して、上で定義され、本明細書に記述される通りである。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(R_p)_n (S_p)_m$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、 $(Rp)_n(Sp)_m$ は $(Rp)(Sp)_2$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)_n(Rp)_m$ は $(Sp)_2(Rp)$ である。

【0185】

いくつかの実施形態において、繰り返しパターンは、 $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$ であり、式中、 n および t はそれぞれ独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、 m は、上で定義され、本明細書に記述される通りである。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、繰り返しパターンは、 $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$ であり、式中、 n および t はそれぞれ独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、 m は、上で定義され、本明細書に記述される通りである。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0186】

いくつかの実施形態において、繰り返しパターンは、 $(Np)_t(Rp)_n(Sp)_m$ であり、式中、 n および t はそれぞれ独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、 Np は独立して、 Rp または Sp であり、 m は、上で定義され、本明細書に記述される通りである。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(Np)_t(Rp)_n(Sp)_m$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(Np)_t(Rp)_n(Sp)_m$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、繰り返しパターンは、 $(Np)_m(Rp)_n(Sp)_t$ であり、式中、 n および t はそれぞれ独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、 Np は独立して、 Rp または Sp であり、 m は、上で定義され、本明細書に記述される通りである。いくつかの実施形態において、本発明は、骨格キラル中心のパターンが $(Np)_m(Rp)_n(Sp)_t$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、コア領域の骨格キラル中心のパターンが $(Np)_m(Rp)_n(Sp)_t$ を含むオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、 Np は Rp である。いくつかの実施形態において、 Np は Sp である。いくつかの実施形態において、 Np はすべて同じである。いくつかの実施形態において、 Np はすべて Sp である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの Np は、他の Np とは異なる。いくつかの実施形態において、 t は2である。

【0187】

本明細書において定義される通り、 n は、1、2、3、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 n は、2、3、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 n は、3、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 n は、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 n は、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 n は、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 n は、7または8である。いくつかの実施形態において、 n は1である。いくつかの実施形態において、 n は2である。いくつかの実施形態において、 n は3である。いくつかの実施形態において、 n は4である。いくつかの実施形態において、 n は5である。いくつかの実施形態において、 n は6である。いくつかの実施

形態において、 n は7である。いくつかの実施形態において、 n は8である。

【0188】

本明細書において定義される通り、 t は、1、2、3、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 t は、2、3、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 t は、3、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 t は、4、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 t は、5、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 t は、6、7または8である。いくつかの実施形態において、 t は、7または8である。いくつかの実施形態において、 t は1である。いくつかの実施形態において、 t は2である。いくつかの実施形態において、 t は3である。いくつかの実施形態において、 t は4である。いくつかの実施形態において、 t は5である。いくつかの実施形態において、 t は6である。いくつかの実施形態において、 t は7である。いくつかの実施形態において、 t は8である。

10

【0189】

いくつかの実施形態において、 m および t のうちの少なくとも1つは、2より大きい。いくつかの実施形態において、 m および t のうちの少なくとも1つは、3より大きい。いくつかの実施形態において、 m および t のうちの少なくとも1つは、4より大きい。いくつかの実施形態において、 m および t のうちの少なくとも1つは、5より大きい。いくつかの実施形態において、 m および t のうちの少なくとも1つは、6より大きい。いくつかの実施形態において、 m および t のうちの少なくとも1つは、7より大きい。

【0190】

いくつかの実施形態において、 n は1であり、 m および t のうちの少なくとも1つは、1より大きい。いくつかの実施形態において、 n は1であり、 m および t はそれぞれ独立して、1より大きい。いくつかの実施形態において、 $m > n$ および $t > n$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)m(Rp)n(Sp)t$ は、 $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $SpRp(Sp)_2$ である。いくつかの実施形態において、 $(Np)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Np)tRp(Sp)m$ である。いくつかの実施形態において、 $(Np)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Np)_2Rp(Sp)m$ である。いくつかの実施形態において、 $(Np)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Rp)_2Rp(Sp)m$ である。いくつかの実施形態において、 $(Np)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)_2Rp(Sp)m$ である。いくつかの実施形態において、 $(Np)t(Rp)n(Sp)m$ は $SpSpRp(Sp)m$ である。いくつかの実施形態において、 $(Np)t(Rp)n(Sp)m$ は $SpRpRp(Sp)m$ である。

20

30

【0191】

いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $SpRpSpSp$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)_3Rp(Sp)_3$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)_4Rp(Sp)_4$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)tRp(Sp)_5$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $SpRp(Sp)_5$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)_2Rp(Sp)_5$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)_3Rp(Sp)_5$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)_4Rp(Sp)_5$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ は $(Sp)_5Rp(Sp)_5$ である。

40

【0192】

いくつかの実施形態において、 $(Sp)m(Rp)n(Sp)t$ は $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ である。いくつかの実施形態において、 $(Sp)m(Rp)n(Sp)t$ は (Sp)

50

)₃ R p (S p)₃ である。いくつかの実施形態において、(S p)_m (R p)_n (S p)_t は (S p)₄ R p (S p)₄ である。いくつかの実施形態において、(S p)_m (R p)_n (S p)_t は (S p)_m R p (S p)₅ である。いくつかの実施形態において、(S p)_m (R p)_n (S p)_t は (S p)₂ R p (S p)₅ である。いくつかの実施形態において、(S p)_m (R p)_n (S p)_t は (S p)₃ R p (S p)₅ である。いくつかの実施形態において、(S p)_m (R p)_n (S p)_t は (S p)₄ R p (S p)₅ である。いくつかの実施形態において、(S p)_m (R p)_n (S p)_t は (S p)₅ R p (S p)₅ である。

【 0 1 9 3 】

いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、少なくとも1つの R p ヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、少なくとも1つの R p ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、少なくとも2つの R p ヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、少なくとも2つの R p ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、少なくとも3つの R p ヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、少なくとも3つの R p ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、少なくとも4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の R p ヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態において、翼 - コア - 翼モチーフのコア領域は、少なくとも4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の R p ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

【 0 1 9 4 】

特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、各「X」翼領域の残基が、2' - MOE - 修飾残基である5 - 10 - 5モチーフである。特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、コア「Y」領域の残基が、2' - デオキシリボヌクレオチド残基である5 - 10 - 5モチーフである。特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、5 - 10 - 5モチーフであり、ここで、すべてのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、5 - 10 - 5モチーフであり、ここで、すべてのヌクレオシド間結合は、キラルなホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、各「X」翼領域の残基が、2' - MOE - 修飾残基であり、コア「Y」領域の残基が、2' - デオキシリボヌクレオチドであり、すべてのヌクレオシド間結合が、キラルなホスホロチオエートヌクレオシド間結合である5 - 10 - 5モチーフである。

【 0 1 9 5 】

特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、各「X」翼領域の残基が、2' - MOE - 修飾残基ではない5 - 10 - 5モチーフである。特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、コア「Y」領域の残基が、2' - デオキシリボヌクレオチド残基である5 - 10 - 5モチーフである。特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、5 - 10 - 5モチーフであり、ここで、すべてのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、5 - 10 - 5モチーフであり、ここで、すべてのヌクレオシド間結合は、キラルなホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。特定の実施形態では、翼 - コア - 翼モチーフは、各「X」翼領域の残基が、2' - MOE - 修飾残基ではなく、コア「Y」領域の残基が、2' - デオキシリボヌクレオチドであり、すべてのヌクレオシド間結合が、キラルなホスホロチオエートヌクレオシド間結合である5 - 10 - 5モチーフである。

【 0 1 9 6 】

特定の実施形態では、提供されるキラル制御された（および/または立体化学的に純粋な）調製物は、塩基配列 G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C のオリゴヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【0197】

いくつかの実施形態において、本発明は、オリゴヌクレオチドの立体化学設計パラメータ (stereochemical design parameter) を提供する。すなわち、とりわけ、本開示は、例えば、同種リガンドおよび/またはプロセッシング酵素を有するオリゴヌクレオチドの相互作用に対する影響を含む、オリゴヌクレオチドの安定性および/または活性に対する、オリゴヌクレオチド鎖に沿った異なる位置の立体化学構造の影響を示す。本発明は、具体的には、構造が、設計パラメータを取り入れ、または反映したオリゴヌクレオチドを提供する。このようなオリゴヌクレオチドは、同じ塩基配列および長さを有するステレオランダムな調製物に比べて新規な化学的実体である。

【0198】

いくつかの実施形態において、本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの立体化学設計パラメータを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、具体的には、リボヌクレアーゼHにより結合および/または切断されてもよいオリゴヌクレオチドの設計パラメータを提供する。1つの(ome)実施形態では、本発明は、siRNAオリゴヌクレオチドの立体化学設計パラメータを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、具体的には、例えば、DICER、アルゴノートタンパク質(例えば、アルゴノート-1およびアルゴノート-2)などにより結合および/または切断されてもよいオリゴヌクレオチドの設計パラメータを提供する。

【0199】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも1個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも2個がキラルである。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも3個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも4個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも5個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも6個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも7個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも8個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも9個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち1個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち2個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち3個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち4個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19

10

20

30

40

50

番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち5個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち6個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち7個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち8個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち9個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうち10個がキラルである領域を含む。

10

【0200】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも1個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも2個はキラルである。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも3個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも4個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも5個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも6個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも7個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも8個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも9個がキラルである領域を含む。いくつかの実施形態において、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも10個がキラルである領域を含む。

20

30

40

【0201】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、8番目、9番目、18番目、19番目および20

50

かの実施形態において、領域の19番目のヌクレオチド間結合は、R_p修飾ヌクレオチド間結合である。いくつかの実施形態において、領域の20番目のヌクレオチド間結合は、S_p修飾ヌクレオチド間結合である。いくつかの実施形態において、領域の20番目のヌクレオチド間結合は、R_p修飾ヌクレオチド間結合である。

【0205】

いくつかの実施形態において、領域は、少なくとも21塩基の長さを有する。いくつかの実施形態において、領域は、21塩基の長さを有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、少なくとも21塩基の長さを有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、21塩基の長さを有する。

10

【0206】

いくつかの実施形態において、キラルなヌクレオチド間結合は、式Iの構造を有する。いくつかの実施形態において、キラルなヌクレオチド間結合はホスホロチオエートである。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドのキラルなヌクレオチド間結合それぞれは独立して、式Iの構造を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドのキラルなヌクレオチド間結合はそれぞれ、ホスホロチオエートである。

【0207】

当業者には既知であり、かつ、本開示に記載の通り、様々な修飾を糖部分の2'-位に導入することができる。一般に用いられる2'-修飾は、2'-OR¹（式中、R¹は水素ではない。）を含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、修飾は2'-OR（式中、Rは、置換脂肪族でもよい。）である。いくつかの実施形態において、修飾は2'-OMeである。いくつかの実施形態において、修飾は2'-OMEである。いくつかの実施形態において、本発明は、特定のキラル純粋なヌクレオチド間結合の含有および/または位置が、修飾された骨格結合、塩基、および/または糖の使用により実現される安定性の改善と同等か、それよりも良い安定性の改善をもたらし得ることを示す。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、糖上に修飾を持たない。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、糖の2'-位に修飾を持たない（すなわち、2'-位の2つの基は、-H/-Hまたは-H/-OHのいずれかである）。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、どのような2'-OME修飾も持たない。

20

30

【0208】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、ステロランダムなオリゴヌクレオチド組成物と比べて、アルゴノートタンパク質（例えば、hAgo-1およびhAgo-2）のより良い基質である。本開示（present disclosure）に記載のキラル純粋な結合の選択および/または位置は、siRNAなど、このようなタンパク質と相互に作用するオリゴヌクレオチドに有用な設計パラメータである。

【0209】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、S_p配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約25%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、S_p配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約30%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、S_p配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約35%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、S_p配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約40%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、S_p配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約45%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、S_p配置に、そのヌクレオチド間結合

40

50

の少なくとも約50%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、Sp配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約55%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、Sp配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約60%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、Sp配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約65%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、Sp配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約70%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、Sp配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約75%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、Sp配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約80%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、Sp配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約85%を有する。いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、Sp配置に、そのヌクレオチド間結合の少なくとも約90%を有する。

10

【0210】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、以下から選択されるオリゴヌクレオチドではない：

143	(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp)- d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	(SSR) ₃ -SS
ONT-87	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)- GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC	(5R-(SSR) ₃ -5R)

20

下線のヌクレオチドは、2' - 修飾されている。

【0211】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、以下から選択されるオリゴヌクレオチドではない：

143	(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp)- d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	(SSR) ₃ -SS
ONT-87	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)- GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC	(5R-(SSR) ₃ -5R)

30

下線のヌクレオチドは、2' - O - MOE 修飾されている。

【0212】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、以下から選択されるオリゴヌクレオチドではない：

40

ONT-106	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sense
ONT-107	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sense
ONT-108	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-109	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-110	(Rp, Rp)- asAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-111	(Sp, Rp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-112	(Sp, Sp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-113	(Rp, Sp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense

10

表中、小文字は、2' - OMe RNA 残基を表す；大文字は、2' - OH RNA 残基を表す；太字および「s」は、ホスホ口チオエート部分を示す；

PCSK9 (1)	(All (Sp))- ususcSusAsGsAscscSusGsuscSusGscscSusdTsdT
PCSK9 (2)	(All (Rp))- ususcSusAsGsAscscSusGsuscSusGscscSusdTsdT
PCSK9 (3)	(All (Sp))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuudTsdT
PCSK9 (4)	(All (Rp))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuudTsdT
PCSK9 (5)	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-ususcSusAsGsAscscSusGsuscSusGscscSusdTsdT
PCSK9 (6)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-ususcSusAsGsAscscSusGsuscSusGscscSusdTsdT

20

表中、小文字は、2' - OMe RNA 残基を表す；大文字は、RNA 残基を表す；d = 2' - デオキシ残基；「s」は、ホスホ口チオエート部分を示す；

PCSK9 (7)	(All (Rp))- AsAsGscsAsAsAsAscSAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (8)	(All (Sp))- AsAsGscsAsAsAsAscSAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT

30

PCSK9 (9)	(All (Rp))- AsAGcAAAacsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (10)	(All (Sp))- AsAGcAAAacsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (11)	(All (Rp))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAAdTsdT
PCSK9 (12)	(All (Sp))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAAdTsdT
PCSK9 (13)	(All (Rp))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (14)	(All (Sp))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (15)	(All (Rp))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (16)	(All (Sp))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (17)	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (18)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT

10

表中、小文字は、2' - OMe RNA 残基を表す；大文字は、RNA 残基を表す；d = 2' - デオキシ残基；「s」は、ホスホロチオエート部分を示す；

20

PCSK9 (19)	(All (Rp))- UfsusCfsusAfsGsAfsCsCfsusGfsusUfsusUfsGsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (20)	(All (Sp))- UfsusCfsusAfsGsAfsCsCfsusGfsusUfsusUfsGsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (21)	(All (Rp))- UfsuCfsuAfsGafscCfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT
PCSK9 (22)	(All (Sp))- UfsuCfsuAfsGafscCfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT
PCSK9 (23)	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)- UfsusCfsusAfsGsAfsCsCfsusGfsusUfsusUfsGsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (24)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)- UfsusCfsusAfsGsAfsCsCfsusGfsusUfsusUfsGsCfsusUfsdTsdT

30

表中、小文字は、2' - OMe RNA 残基を表す；大文字は、2' - F RNA 残基を表す；d = 2' - デオキシ残基；「s」は、ホスホロチオエート部分を示す；

PCSK9 (25)	(All (Rp))- asAfsGsCfsasAfsasAfsCsAfsGsGfsusCfsusAfsGsAfsasdTsdT
PCSK9 (26)	(All (Sp))- asAfsGsCfsasAfsasAfsCsAfsGsGfsusCfsusAfsGsAfsasdTsdT
PCSK9 (27)	(All (Rp))- asAfgCfaAfaAfcAfsGsGfsusCfsusAfsGsAfsasdTsdT
PCSK9 (28)	(All (Sp))- asAfgCfaAfaAfcAfsGsGfsusCfsusAfsGsAfsasdTsdT
PCSK9 (29)	(All (Rp))- asAfsGcfAsAfsaAfsCafsgGfsuCfsuAfsGafsdTsdT

40

PCSK9 (30)	(All (Sp))- asAfgCfSaAfsaAfsCfsgGfsuCfsuAfgAfsadTsdT
PCSK9 (31)	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)- asAfgCfaAfasAfsCfsgsGfsusCfsusAfgsAfsadTsdT
PCSK9 (32)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)- asAfgCfaAfasAfsCfsgsGfsusCfsusAfgsAfsadTsdT

表中、小文字は、2' - OMe RNA 残基を表す；大文字は、2' - F RNA 残基を表す；d = 2' - デオキシ残基；「s」は、ホスホロチオエート部分を示す。

10

【0213】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、以下から選択されるオリゴヌクレオチドではない：

$d [A_R C_S A_R C_S A_R C_S A_R C_S A_R C]$ 、 $d [C_S C_S C_S C_R C_R C_S C_S C_S C_S C]$ 、 $d [C_S C_S C_S C_S C_S C_S C_R C_R C_S C]$ および $d [C_S C_S C_S C_S C_S C_R C_R C_S C_S C]$ (式中、Rは、Rpホスホロチオエート結合であり、Sは、Spホスホロチオエート結合である)。

【0214】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、以下

から選択されるオリゴヌクレオチドではない： $G G A_R T_S G_R T_S T_R^m C_S T C G A$ 、 $G G A_R T_R G_S T_S T_R^m C_R T C G A$ 、 $G G A_S T_S G_R T_R T_S^m C_S T C G A$ (式中、Rは、Rpホスホロチオエート結合であり、Sは、Spホスホロチオエート結合であり、他のすべての結合は、POであり、各 $m C$ は、5 - メチルシトシン修飾ヌクレオチドである)。

20

【0215】

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、以下

から選択されるオリゴヌクレオチドではない： $T_k T_k^m C_k A G T^m C A T G A^m C T_k T^m C_k^m C_k$ (式中、下付きの「k」が続く各ヌクレオチドは、(S) - cet修飾を示し、Rは、Rpホスホロチオエート結合であり、Sは、Spホスホロチオエート結合であり、各 $m C$ は、5 - メチルシトシン修飾ヌクレオチドであり、すべてのヌクレオチド間結合は、 $R S S S R S R R R S$ 、 $R S S S S S S S S S S S$ 、 $S R R S R S S S S S R$ 、 $S R S R S S R S S R$ 、 $R R R S S S R S S S$ 、 $R R R S R S S R S R$ 、 $R R S S S R S R S R$ 、 $S R S S S R S S S S$ 、 $S S R R S S R S R S$ 、 $S S S S S S R R S S$ 、 $R R R S S R R R S R$ 、 $R R R R S S S S R S$ 、 $S R R S R R R R R R$ 、 $R S S R S S R R R R$ 、 $R S R R S R R S R R$ 、 $R R S R S S R S R S$ 、 $S S R R R R R S R R$ 、 $R S R R S R S S S R$ 、 $R R S S R S R R R R$ 、 $R R S R S R R S S S$ 、 $R R S R S S S R R R$ 、 $R S R R R R S R S R$ 、 $S S R S S S R R R S$ 、 $R S S R S R S R S R$ 、 $R S R S R S S R S S$ 、 $R R R S S R R S R S$ 、 $S R R S S R R S R S$ 、 $R R R R S R S R R R$ 、 $S S S S R R R R R R S R$ 、 $R R R R R R R R R R$ 及び $S S S S S S S S S S$ から選択される立体化学パターンを含むホスホロチオエート (PS) である)。

30

40

いくつかの実施形態において、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチドは、以下

から選択されるオリゴヌクレオチドではない： $T_k T_k^m C_k A G T^m C A T G A^m C T_k T^m C_k^m C_k$ (式中、下付きの「k」が続く各ヌクレオチドは、(S) - cet修飾を示し、Rは、Rpホスホロチオエート結合であり、Sは、Spホスホロチオエート結合であり、各 $m C$ は、5 - メチルシトシン修飾ヌクレオチドであり、すべてのヌクレオチド間結合は、 $R S S S R S R R R S$ 、 $R S S S S S S S S S S S$ 、 $S R R S R S S S S S R$ 、 $S R S R S S R S S R$ 、 $R R R S S S R S S S$ 、 $R R R S R S S R S R$ 、 $R R S S S R S R S R$ 、 $S R S S S R S S S S$ 、 $S S R R S S R S R S$ 、 $S S S S S S R R S S$ 、 $R R R S S R R R S R$ 、 $R R R R S S S S R S$ 、 $S R R S R R R R R R$ 、 $R S S R S S R R R R$ 、 $R S R R S R R S R R$ 、 $R R S R S S R S R S$ 、 $S S R R R R R S R R$ 、 $R S R R S R S S S R$ 、 $R R S S R S R R R R$ 、 $R R S R S R R S S S$ 、 $R R S R S S S R R R$ 、 $R S R R R R S R S R$ 、 $S S R S S S R R R S$ 、 $R S S R S R S R S R$ 、 $R S R S R S S R S S$ 、 $R R R S S R R S R S$ 、 $S R R S S R R S R S$ 、 $R R R R S R S R R R$ 、 $S S S S R R R R R R S R$ 、 $R R R R R R R R R R$ 及び $S S S S S S S S S S$ から選択される立体化学パターンを含むホスホロチオエート (PS) である)。

50

RSRRSRRSRR、RRSRSSRSRS、SSRRRRRSRR、RSRRSRS
SSR、RRSSRSRRRR、RRSRSSRSRS、RRSRSSSRRR、RSR
RRRSRSR、SSRSSSRRRS、RSSRSRSRSR、RSRSRSRSRS
、RRRSRRRSRS、SRRSSRSRS、RRRRSRSRRR、SSSSRR
RRRSR、RRRRRRRRRR及びSSSSSSSSSSから選択される立体化学パ
ターンを含むホスホロチオエート(PS)である。

【0216】

修飾オリゴヌクレオチド構造

上述の通り、さまざまな用途および症状におけるオリゴヌクレオチド組成物の有用性を
考慮して、当業者は、天然のオリゴヌクレオチド分子と比較し、例えば、特定の用途およ
び症状に利用される、好ましいまたは望ましい特性や性質を有し得るオリゴヌクレオチド
構造の修飾の開発の努力を行ってきた。そのような例示的な修飾が、以下に記載される。

10

【0217】

国際公開第2010/141471号(以下「Traversa I」)は、還元され
た正味ポリアニオン電荷を有するように修飾された異なる種類の核酸構成の修飾を教示し
ている。国際公開第2010/039543号(以下「Travera II」)は、還
元ポリアニオン電荷を用いた中性ポリヌクレオチド(NN)の組成物および作製方法を教
示している。国際公開第2008/008476号(ここでは、「Traversa I
II」)は、SATE(Imbach-タイプ)リン酸プロドラッグの合成について記載
している。Traversa I、IIおよびIIIは、本発明に記載されるキラル制御
されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示してい
ない。

20

【0218】

国際公開第2010/072831号(以下「Girindusら」)もまた、オリゴ
ヌクレオチドの修飾を教示している。特に、Girindusらは、プロドラッグとして
のホスホロチオエートトリエステルを生成する硫化剤の使用を開示している。Girin
dusらは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、お
よびそれを用いた作成方法を開示していない。

【0219】

同様に、国際公開第2004/085454号(以下「Avecia I」)は、例え
ば、ポリ-H-ホスホネートジエステルの一時的なシリル化を通じたホスホロチオエート
オリゴヌクレオチドの調製について教示している。国際公開第2001/027126号
(以下「Avecia II」)は、H-ホスホネートモノマーを固体支持された5'-
ヒドロキシルオリゴヌクレオチドにカップリングし、さらに、得られたH-ホスホネート
ジエステルをホスホロチオエートトリエステルに硫化するホストトリエステルオリゴヌク
レオチドの固相合成のプロセスを教示している。国際公開第2001/064702号(
以下「Avecia III」)の開示は、Avecia IIに類似しており、さらに
異なる固体支持体に関する固相合成を記載している。Avecia I、II、およびI
IIは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、および
それを用いた作成方法を開示していない。

30

40

【0220】

国際公開第1997/006183号(以下「Chiron」)は、カチオンインター
ヌクレオチド結合を有し、立体的に純粋なアミド化物などの非対称のリンを含むオリゴヌ
クレオチドを教示している。Chironは、ジアステレオマーの混合物または例えば、
カラムクロマトグラフィーなどの解決手段を用いて結晶化させて得られた立体的に純粋な
オリゴヌクレオチドを教示している。Chironは、本発明に記載されるキラル制御さ
れたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を教示していない。

【0221】

国際公開第2009/146123号(以下「Spring Bank I」)は、置
換されたリン酸オリゴヌクレオチドおよびホスホロチオエートトリエステルを用いた、ウ

50

ウイルス感染を治療する組成物および方法を開示している。国際公開第2007/070598号(以下「Spring Bank II」)は、抗ウイルス核酸としてのホスホトリエステルプロドラッグおよびホスホロチオエートプロドラッグの合成について教示している。Spring Bank IおよびIIは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

【0222】

欧州特許第0779893号(以下「Hybridon」)は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの多くの細胞を取り込む脂溶性プロドラッグを教示しており、RpおよびSpホスホロチオエートおよびホスホロチオエートトリエステルダイマーは、異なる酵素安定性を有することを確認した。Hybridonは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

10

【0223】

国際公開第1997/047637号(以下「Imbach I」)は、一般的にImbach「SATE」(S-アシルチオエチル)プロドラッグオリゴヌクレオチド組成物および方法を教示している。Imbach Iは、例えば、生物可逆性ホスホトリエステルプロドラッグ、および合成後のアルキル化またはプロドラッグ基を含むホスホラミダイトを用いたあるプロドラッグオリゴヌクレオチドの調製を記載している。米国特許第6,124,445号(以下「Imbach II」)は、修飾アンチセンスおよびキメラプロドラッグオリゴヌクレオチドを教示している。Imbach IおよびIIは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

20

【0224】

国際公開第2006/065751号(以下「Beaucage」)は、熱的に不安定な置換基(ホスホラミダイトモノマーを通じて導入される置換基)を含むCpGオリゴヌクレオチドホスホロチオエートプロドラッグおよびその用途について教示している。Beaucageは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

【0225】

Takeishi Wadaらは、アミダイトキラル補助剤を用いたP-キラル核酸の立体制御された合成の新規方法を開発した(日本特許第4348077号、国際公開第2005/014609号、国際公開第2005/92909号、および国際公開第2010/064146号、ここで「Wada I」と順に呼ぶ)。特に、国際公開第2010/064146号(ここで「Wada II」と呼ぶ)は、リンにおける立体化学的な配置が制御された、リン酸原子修飾核酸の合成方法を開示している。しかしながら、Wada IIの方法は、各キラル結合したリン酸の個々のP-修飾を制御および設計された方法で提供していないという点において限定される。つまり、Wada IIのP-修飾の結合方法は、一度、所望の長さで作られると、結合したリン酸で質量変更され、例えば、所望のホスホロチオエートジエステル、ホスホロアミド酸またはボラノリン酸または別のそのようなリン酸原子修飾核酸を提供する、縮合中間体ポリH-ホスホネートオリゴヌクレオチド鎖の生成を提供する(文献中、ルートBと呼ぶ、スキーム6、36頁)。さらに、Wada IIのH-ホスホネートオリゴヌクレオチド鎖は、より短い長さである(例えば、ダイマー、トリマー、またはテトラマー)。カップリングステップ、経路Bにおいてカップリングステップが含まれておらず、それは「n-1」型副生成物の蓄積の結果として、一般的に低い純度を示す事実と組み合わせると、Wada II経路には、より長いオリゴヌクレオチドの合成に関して限定が含まれる。Wada IIは、特定のオリゴヌクレオチドが、結合した各リン酸での異なる修飾を含みうるということが予想されると一般的に企図するが、Wada IIでは、そのような制御された修飾を繰り返し組み込む、本明細書に記載する方法を記載または示唆していない。Wada IIは、結合したリン酸での修飾より前にH-ホスホネート中間体オリゴヌクレオチドが完全に組み込まれることを必要としない合成サイクルを記載している限りにおいて(文献中では、ルートA、35頁、

30

40

50

スキーム5、「ルートAを通じた式1のキラルX-ホスホネート部分を含む核酸の合成」と呼ぶ)、この一般的な開示は、本発明によって提供される、あるP-修飾を組み込むために必要とされる重要なステップを教示しておらず、このサイクルがキラル制御されたP-修飾のオリゴヌクレオチドの合成、特により長いオリゴヌクレオチドの合成において、有用となり得るほどの効率性や多様性を有しているわけでもない。

【0226】

Wada I Iにおける少なくともそのような1つの非効率性は、Wada et alの国際公開第2012/039448号(以下「Wada I I I」)によって記載されている。Wada I I Iは、新規キラル補助剤をWada I Iの方法に使用して、一度構築したH-ホスホネートオリゴヌクレオチドを生成し、連続的に修飾して、とりわけ、ホスホロチオエートなどを得ることを開示している。Wadaらは、Wada I Iで開示されている4つの種類のキラル補助剤は、結合したリン酸において、リンとの強い結合を形成するため、効率的に除去できないことをWada I I Iの中で確認した。Wada I I Iは、Wada I Iのキラル補助剤を除去するためには、オリゴヌクレオチド生成物の統合性を損なう傾向がある厳しい条件が必要とされる、と記載している。Wada I I Iは、長鎖オリゴヌクレオチドを合成する場合、この点が特に問題であることを確認した。その理由としては、少なくとも分解反応が進むにつれ、さらにオリゴヌクレオチド生成物と反応し、オリゴヌクレオチド生成物を分解する更なる副生成物が生成されるためである。したがって、Wada I I Iは、S_N1の仕組みを用いて、弱酸性の状態下でH-ホスホネートインターヌクレオチド結合を開放し(ルートB)、または、比較的弱塩基性条件下の - 除去経路を通じてオリゴヌクレオチドから効率よく切断できるキラル補助剤を提供している。

10

20

【0227】

化学および合成の技術分野の当業者は、例えば、本発明により提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドの生成に関連する複雑さを容易に理解できるであろう。例えば、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを合成および単離するために、モノマー1回ごとの添加の条件は、以下のとおりになるように設計されなければならない。(1)化学作用は、増加するオリゴヌクレオチドの各部分と適合する；(2)各モノマーを添加する間に生成される副生成物は、増加するオリゴヌクレオチドの構成的および立体化学的な統合性を損なわない；および(3)最終粗生成物の組成は、所望のキラル制御されたオリゴヌクレオチド生成物を単離させる組成である。

30

【0228】

オリゴヌクレオチドホスホロチオエートは、治療の潜在的な可能性を示した(Stein et al., Science (1993), 261:1004-12; Agrawal et al., Antisense Res. and Dev. (1992), 2:261-66; Bayever et al., Antisense Res. and Dev. (1993), 3:383-390)。ホスホロチオエートの立体化学と関連せずに調製されたオリゴヌクレオチドホスホロチオエートは、2ⁿジアステレオマーの混合物として存在し、ここでnは、インターヌクレオチドホスホロチオエート結合の数である。これらのジアステレオマーホスホロチオエートの化学的および生物学的な特性は、他のものとは明確に異なり得る。例えば、Wadaら(Nucleic Acids Symposium Series No. 51 p. 119-120; doi:10.1093/nass/nrm060)は、立体的に定義された-(Rp)-(Ups)9U/(Ap)9A二本鎖は、通常の-(Up)9U/(Ap)9Aおよび立体的に定義され二本鎖を形成しなかった-(Sp)-(Ups)9Uよりも、より高いT_m値を示すことを発見した。別の例において、Tangらによる研究は、(Nucleosides Nucleotides (1995), 14:985-990)立体的に純粋なRpオリゴデオキシリボヌクレオシドホスホロチオエートは、定義されていないリンキラリティを有する親オリゴデオキシリボヌクレオシドホスホロチオエートよりも、ヒト血清に内在するヌクレアーゼに対して低い安定性を有することが発

40

50

見された。

【0229】

キラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物
本発明は、粗高純度および高ジアステレオマー純度のキラル制御されたオリゴヌクレオチド、およびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、粗純度が高いキラル制御されたオリゴヌクレオチド、およびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド、およびキラル制御されたジアステレオマーの純度が高いオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0230】

いくつかの実施形態において、本発明は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義されるオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供し、この組成物は、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約10%が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、単一のオリゴヌクレオチドの実質的に純粋な調製物である。

【0231】

いくつかの実施形態において、本発明は、同じオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、単一のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して組成物が濃縮されるオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、同じオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を共有する単一のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して組成物が濃縮されるオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0232】

いくつかの実施形態において、本発明は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供し、この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御される。

【0233】

いくつかの実施形態において、当業者には理解されるように、オリゴヌクレオチドの実質的にラセミの（またはキラル制御されない）調製物において、結合工程は、立体選択性を向上させるように特異的に行われたいという点で、すべてまたはほとんどの結合工程はキラル制御されない。オリゴヌクレオチドの例示的な実質的にラセミの調製物は、テトラエチルチウラムジスルフィド (tetraethylthiuram disulfide) または (TETD) または 3H-1, 2-ベンゾジチオール (bensodithiol) - 3-オン 1, 1-ジオキシド (BDTD) のいずれかで亜リン酸トリエステルを硫化する当技術分野において周知のプロセスによるホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの調製物である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物は、実質的にラセミのオリゴヌクレオチド組成物（またはキラル制御されないオ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチド組成物)をもたらす。

【0234】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、オリゴヌクレオチドタイプの実質的に純粋な調製物であり、ここで、オリゴヌクレオチドタイプのものではない組成物中のオリゴヌクレオチドは、前記オリゴヌクレオチドタイプの調製プロセスからの(form)(場合によっては、特定の精製手順後の)不純物である。

【0235】

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル結合したリン酸に関してジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合を1以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの構造を有するジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合を1以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、キラル結合したリン酸に関してジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合を1以上、およびリン酸ジエステル結合を1以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、ジアステレオマー的に純粋な式Iの構造を有するインターヌクレオチド結合を1以上、およびリン酸ジエステル結合を1以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、ジアステレオマー的に純粋な式I-cの構造を有するインターヌクレオチド結合を1以上、およびリン酸ジエステル結合を1以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、そのようなオリゴヌクレオチドは、本出願に記載されるとおり、立体選択的オリゴヌクレオチド合成を使用して調製され、キラル結合したリン酸に関して予め設計されたジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合を形成する。例えば、(Rp/Sp, Rp/Sp, Rp/Sp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, SpSp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp) - d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGs1Cs1As1CsC]で示される1つの例示的なオリゴヌクレオチドにおいて、始めの3つのインターヌクレオチド結合は、従来のオリゴヌクレオチド合成方法を用いて作製され、ジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合は、本出願に記載されるとおり、立体化学的な制御により作製される。例示的なインターヌクレオチド結合には、式Iの構造を有する結合も含まれるが、さらに以下に記載される。

【0236】

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、互いに異なる立体化学および/または異なるP-修飾を有する。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の少なくとも2個の個々のインターヌクレオチド結合は、互いに異なるP-修飾を有する。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、異なるP-修飾を互いに有し、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合を含む。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、異なるP-修飾を互いに有し、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも1個のホスホロチオエートジエステルインターヌクレオチド結合を含む。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、異なるP-修飾を互いに有し、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のホスホロチオエートトリエステルインターヌクレオチド結合を含む。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、異なるP-修飾を互いに有し、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌ

10

20

30

40

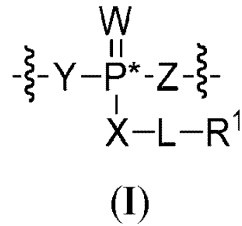
50

クレオチド結合および少なくとも1個のホスホロチオエートトリエステルインターヌクレオチド結合を含む。

【0237】

ある特定の実施形態において、本発明は、独立して式I：

【化4】



10

の構造を有する1以上の修飾インターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、各変数は、下記のとおり定義され、記載するとおりである。いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの1個以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のインターヌクレオチド結合が互いに異なるP-修飾を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの1個以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のインターヌクレオチド結合は、互いに異なる-X-L-R¹を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの1個以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のインターヌクレオチド結合は、互いに異なるXを有する。いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの1個以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のインターヌクレオチド結合は、互いに異なる-L-R¹を有する。

20

【0238】

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、互いに異なる立体化学および/または異なるP-修飾を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、互いに異なる立体化学を有し、少なくともキラル制御されたオリゴヌクレオチドの構造の一部分は、交互の立体化学の繰り返しパターンを特徴とする。

30

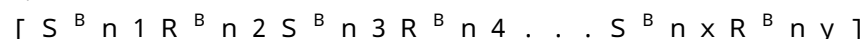
【0239】

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、-XLR¹部分で異なるX原子を有する、および/または-XLR¹部分で異なるL基を有する、および/または-XLR¹部分で異なるR¹原子を有するという意味で、異なるP-修飾を互いに有する。

40

【0240】

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、互いに異なる立体化学および/または異なるP-修飾を有し、オリゴヌクレオチドは、下記の式：



によって表される構造を有し、

ここで、各R^Bは、独立して、結合したリン酸においてR配置を有するヌクレオチド単位のブロックを表し；

各S^Bは、独立して、結合したリン酸においてS配置を有するヌクレオチド単位のブロッ

50

クを表し；

$n_1 \sim n_y$ のそれぞれは、少なくとも1つの奇数 n および少なくとも1つの偶数 n は、ゼロ以外の数であるという要件のもとに、ゼロまたは整数であることにより、オリゴヌクレオチドは、互いに異なる立体化学の少なくとも2個の個々のインターヌクレオチド結合を含み；および

ここで、 $n_1 \sim n_y$ の合計は、2～200であり、およびいくつかの実施形態においては、下限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25以上から成るグループから選択され、上限は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、および200以上から成るグループから選択され、上限は、下限より大きい。

10

【0241】

そのようないくつかの実施形態において、各 n は、同じ値である；いくつかの実施形態において、各偶数 n は、互いに偶数 n と同じ値である；いくつかの実施形態において、各奇数 n は、互いに奇数 n と同じ値である；いくつかの実施形態において、少なくとも2個の偶数 n は、互いに異なる値である；いくつかの実施形態において、少なくとも2個の奇数 n は、互いに異なる値である。

【0242】

いくつかの実施形態において、少なくとも2個の隣接する n は、互いに等しく、提供されるオリゴヌクレオチドは、等しい長さのS立体化学結合およびR立体化学結合の隣接するブロックを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、等しい長さのSおよびR立体化学結合の繰り返しブロックを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、SおよびR立体化学結合の繰り返しブロックを含み、少なくとも2個のそのようなブロックは、互いに異なる長さである；いくつかのそのような実施形態において、各S立体化学ブロックは、同じ長さで、各R立体化学の長さとは異なっており、各R立体化学の長さは、互いに任意に同じ長さであっても良い。

20

【0243】

いくつかの実施形態において、 n 以外をスキップして隣接する少なくとも2つの n は、互いに等しく、提供されるオリゴヌクレオチドは、互いに長さが等しい第1立体化学の結合を少なくとも2ブロックを含み、別の立体化学の結合のブロックごとに分割され、分割されたブロックは、第1立体化学のブロックと同じ長さまたは異なる長さであっても良い。

30

【0244】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの末端で結合ブロックに関連する n は、は、同じ長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、同じ結合立体化学の末端ブロックを有する。そのようないくつかの実施形態において、末端ブロックは、別の結合立体化学の中間ブロックにより、互いに分離される。

【0245】

いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオスキップマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。

40

【0246】

いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、上記に記載したいずれのパター

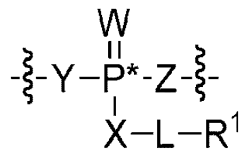
50

ンであってもよく、さらにP - 修飾のパターンを含む。例えば、いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオスキップマーであり、P - 修飾スキップマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーであり、P - 修飾アルトマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーであり、およびP - 修飾ブロックマーである。

【0247】

いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示される、提供されるオリゴヌクレオチドは、独立して式 I :

【化5】



(I)

の構造を有する1以上の修飾されたインターヌクレオチドの結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドであり、

ここで、P* は、不斉リン原子であり、R_pまたはS_pのいずれかであり；

Wは、O、SまたはS_eであり；

X、YおよびZのそれぞれは、独立して - O -、- S -、- N (- L - R¹) -、またはLであり；

Lは、共有結合または置換されていてもよい、直鎖または分岐のC₁ ~ C₁₀アルキレンであり、ここでLの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁ ~ C₆アルキレン、C₁ ~ C₆アルケニレン、- C - C -、- C (R')₂ -、- C_y -、- O -、- S -、- S - S -、- N (R') -、- C (O) -、- C (S) -、- C (N R') -、- C (O) N (R') -、- N (R') C (O) N (R') -、- N (R') C (O) -、- N (R') C (O) O -、- O C (O) N (R') -、- S (O) -、- S (O)₂ -、- S (O)₂ N (R') -、- N (R') S (O)₂ -、- S C (O) -、- C (O) S -、- O C (O) -、または - C (O) O - により任意におよび独立して置換され；

R¹は、ハロゲン、R、または置換されていてもよいC₁ ~ C₅₀脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁ ~ C₆アルキレン、C₁ ~ C₆アルケニレン、- C - C -、- C (R')₂ -、- C_y -、- O -、- S -、- S - S -、- N (R') -、- C (O) -、- C (S) -、- C (N R') -、- C (O) N (R') -、- N (R') C (O) N (R') -、- N (R') C (O) -、- N (R') C (O) O -、- O C (O) N (R') -、- S (O) -、- S (O)₂ -、- S (O)₂ N (R') -、- N (R') S (O)₂ -、- S C (O) -、- C (O) S -、- O C (O) -、または - C (O) O - により任意におよび独立して置換され；

各R'は、独立して - R、- C (O) R、- C O₂ R、もしくは - S O₂ Rであるか、または：

同じ窒素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテロ環式、もしくはヘテロアリアル環を形成するか、または

同じ炭素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいアリアル、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリアル環を形成し；

- C_y - は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい2価の環であり；

10

20

30

40

50

各 R は、独立して水素である、または、C₁ ~ C₆ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリアル、ヘテロアリアル、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基であり；および各



は、独立してヌクレオシドとの結合を表す。

【0248】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾されたインターヌクレオチドのリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、例えば、ホスホロチオエートまたはホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも2個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも3個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも4個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも5個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。そのような例示的な修飾インターヌクレオチドのリン酸結合は、さらにここに記載される。

【0249】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、異なるインターヌクレオチドのリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも1個の修飾インターヌクレオチド結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも1個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも2個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも3個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも4個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも5個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。そのような例示的な修飾されたインターヌクレオチドのリン酸結合については、さらにここに記載される。

【0250】

いくつかの実施形態において、ホスホロチオエートトリエステル結合は、例えば、反応の立体選択性を制御するために用いられるキラル補助剤を含む。いくつかの実施形態において、ホスホロチオエートトリエステル結合は、キラル補助剤を含まない。いくつかの実施形態において、ホスホロチオエートトリエステル結合は、対象に対して投与を行うまで、および/または投与の間中、意図的に持続される。

【0251】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、固体支持体に結合されている。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、固体支持体から切断される。

【0252】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および連続して修飾されたインターヌク

10

20

30

40

50

レオチド結合を少なくとも2個含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも2個の連続するホスホロチオエートリエステルインターヌクレオチド結合を含む。

【0253】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ブロックマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、P-修飾ブロックマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、結合ブロックマーである。

10

【0254】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、アルトマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、P-修飾アルトマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、結合アルトマーである。

【0255】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ユニマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ステレオユニマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、P-修飾ユニマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、結合ユニマーである。

20

【0256】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。

【0257】

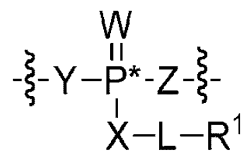
いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、スキップマーである。

【0258】

いくつかの実施形態において、本発明は、式 I :

30

【化6】



(I)

の構造を独立して有する1以上の修飾されたインターヌクレオチドの結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、

40

ここで、P*は、不斉リン原子であり、RpまたはSpのいずれかであり；

Wは、O、SまたはSeであり；

X、YおよびZのそれぞれは、独立して-O-、-S-、-N(-L-R¹)-、またはLであり；

Lは、共有結合または置換されていてもよい、直鎖または分岐のC₁~C₁₀アルキレンであり、ここでLの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-

50

、 - S (O) ₂ N (R ') - 、 - N (R ') S (O) ₂ - 、 - S C (O) - 、 - C (O) S - 、 - O C (O) - 、 または - C (O) O - により任意におよび独立して置換され；
 R ¹ は、ハロゲン、R、または置換されていてもよい C ₁ ~ C ₅ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい C ₁ ~ C ₆ アルキレン、C ₁ ~ C ₆ アルケニレン、 - C - C - 、 - C (R ') ₂ - 、 - C y - 、 - O - 、 - S - 、 - S - S - 、 - N (R ') - 、 - C (O) - 、 - C (S) - 、 - C (N R ') - 、 - C (O) N (R ') - 、 - N (R ') C (O) N (R ') - 、 - N (R ') C (O) - 、 - N (R ') C (O) O - 、 - O C (O) N (R ') - 、 - S (O) - 、 - S (O) ₂ - 、 - S (O) ₂ N (R ') - 、 - N (R ') S (O) ₂ - 、 - S C (O) - 、 - C (O) S - 、 - O C (O) - 、 または - C (O) O - により任意におよび独立して置換され；

10

各 R ' は、独立して - R 、 - C (O) R 、 - C O ₂ R 、もしくは - S O ₂ R であるか、または：

同じ窒素上の2つの R ' は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテロ環式、もしくはヘテロアリアル環を形成するか、または

同じ炭素上の2つの R ' は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいアリアル、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリアル環を形成し；

- C y - は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい2価の環であり；

各 R は、独立して水素である、または、C ₁ ~ C ₆ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリアル、ヘテロアリアル、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基であり；および各

20



は、独立してヌクレオシドとの結合を表す。

【 0 2 5 9 】

一般的に上記およびここに記載される通り、P * は、不斉リン原子であり、R p または S p のいずれかである。いくつかの実施形態において、P * は、R p である。別の実施形態において、P * は、S p である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、各 P * は、独立して R p または S p である式 I のインターヌクレオチド結合を1以上含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、各 P * は、R p である式 I のインターヌクレオチド結合を1以上含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、各 P * は、S p である式 I のインターヌクレオチド結合を1以上含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、P * は、R p である式 I のインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、の、P * は、S p である式 I のインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、P * は、R p である式 I のインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む、P * は、S p である式 I のインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む。

30

【 0 2 6 0 】

一般的に上記およびここに記載される通り、W は、O、S、または S e である。いくつかの実施形態において、W は、O である。いくつかの実施形態において、W は、S である。いくつかの実施形態において、W は、S e である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、式 I のインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む、W は、O である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、式 I のインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む、W は、S である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、W は、S e である式 I のインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む。

40

【 0 2 6 1 】

一般的に上記およびここに記載される通り、各 R は、独立して水素、または、C ₁ ~ C ₆ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリアル、ヘテロアリアル、またはヘテロシクリ

50

ルから選択される置換されていてもよい基である。

【0262】

いくつかの実施形態において、Rは、水素である。いくつかの実施形態において、Rは、 $C_1 \sim C_6$ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基である。

【0263】

いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ 脂肪族である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい、直鎖または分岐のヘキシルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい、直鎖または分岐のペンチルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい、直鎖または分岐のブチルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい、直鎖または分岐のプロピルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいエチルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいメチルである。

10

【0264】

いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいフェニルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されたフェニルである。いくつかの実施形態において、Rは、フェニルである。

【0265】

いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいカルボシクリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい単環式カルボシクリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいシクロヘブチルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいシクロヘキシルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいシクロペンチルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいシクロブチルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいシクロプロピルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい2環式カルボシクリルである。

20

【0266】

いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいアリールである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい2環式アリール環である。

30

【0267】

いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいヘテロアリールである。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、硫黄、または酸素から選択される1~3個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい5~6員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~3個のヘテロ原子を有する、置換された5~6員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、硫黄、または酸素から選択される1~3個のヘテロ原子を有する、非置換の5~6員単環式ヘテロアリール環である。

40

【0268】

いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素または硫黄から選択される1~3個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい5員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~3個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい6員単環式ヘテロアリール環である。

【0269】

いくつかの実施形態において、Rは、窒素、酸素または硫黄から選択される1個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい5員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、ピロリル、フラニル、またはチエニルから選択される。

50

【0270】

いくつかの実施形態において、Rは、窒素、酸素、または硫黄から独立して選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5員ヘテロアリアル環である。ある特定の実施形態において、Rは、1個の窒素原子を有する置換されていてもよい5員ヘテロアリアル環であり、さらなるヘテロ原子は、硫黄または酸素から選択される。例示的なR基は、置換されていてもよいピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリルまたはイソオキサゾリルを含む。

【0271】

いくつかの実施形態において、Rは、1～3個の窒素原子を有する6員ヘテロアリアル環である。別の実施形態において、Rは、1～2個の窒素原子を有する置換されていてもよい6員ヘテロアリアル環である。いくつかの実施形態において、Rは、2個の窒素原子を有する置換されていてもよい6員ヘテロアリアル環である。ある特定の実施形態において、Rは、1個の窒素を有する置換されていてもよい6員ヘテロアリアル環である。例示的なR基は、置換されていてもよいピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、またはテトラジニルである。

【0272】

ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい8～10員2環式ヘテロアリアル環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5,6-縮合ヘテロアリアル環である。別の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5,6-縮合ヘテロアリアル環である。ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5,6-縮合ヘテロアリアル環である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいインドリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいアザビシクロ[3.2.1]オクタニルである。ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5,6-縮合ヘテロアリアル環である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいアザインドリル(azaindolyl)である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいベンズイミダゾリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいベンゾチアゾリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいベンゾオキサゾリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいインダゾリルである。ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される3個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5,6-縮合ヘテロアリアル環である。

【0273】

ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6,6-縮合ヘテロアリアル環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6,6-縮合ヘテロアリアル環である。別の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6,6-縮合ヘテロアリアル環である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいキノリニルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいイソキノリニルである。ある観点によれば、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6,6-縮合ヘテロアリアル環である。いくつかの実施形態において、Rは、キナゾリンまたはキノキサリンである。

【0274】

いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいヘテロシクリルである。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい3～7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換された3～7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する非置換の3～7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。

【0275】

いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいヘテロシクリルである。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい部分的に不飽和の6員ヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、2個の酸素原子を有する置換されていてもよい部分的に不飽和の6員ヘテロ環式環である。

10

【0276】

ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する3～7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。ある特定の実施形態において、Rは、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフランニル、テトラヒドロピラニル、オキセパニル、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、アゼパニル、チイラニル、チエタニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、チエパニル、ジオキサラニル、オキサチオラニル、オキサゾリジニル、イミダゾリジニル、チアゾリジニル、ジチオラニル、ジオキサニル、モルホリニル、オキサチアニル、ピペラジニル、チオモルホリニル、ジチアニル、ジオキセパニル、オキサゼパニル、オキサチエパニル、ジチエパニル、ジアゼパニル、ジヒドロフランニル、テトラヒドロピラノニル、オキセパノニル、ピロリジノニル、ピペリジノニル、アゼパノニル、ジヒドロチオフェノニル、テトラヒドロチオピラノニル、チエパノニル、オキサゾリジノニル、オキサジナノニル、オキサゼパノニル、ジオキサラノニル、ジオキサニル、ジオキセパノニル、オキサチオリノニル、オキサチアノニル、オキサチエパノニル、チアゾリジノニル、チアジナノニル、チアゼパノニル、イミダゾリジノニル、テトラヒドロピリミジノニル、ジアゼパノニル、イミダゾリジンジオニル、オキサゾリジンジオニル、チアゾリジンジオニル、ジオキサランジオニル、オキサチオランジオニル、ピペラジンジオニル、モルホリンジオニル、チオモルホリンジオニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフランニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピロリジニル、テトラヒドロチオフェニル、またはテトラヒドロチオピラニルである。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。

20

30

【0277】

ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5～6員部分的に不飽和の単環式環である。ある特定の実施形態において、Rは、置換されていてもよいテトラヒドロピリジニル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロオキサゾリル、またはオキサゾリニル基である。

40

【0278】

いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい8～10員2環式飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいインドリニルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいイソインドリニルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい1、2、3、4-テトラヒドロキノリンである。いくつかの実施形態において、Rは、置換さ

50

れていてもよい1、2、3、4-テトラヒドロイソキノリンである。

【0279】

一般的に上記およびここに記載される通り、各R'は、独立して-R、-C(O)R、-CO₂R、もしくは-SO₂Rであるか、または：同じ窒素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテロ環式、もしくはヘテロアリアル環を形成するか、または同じ炭素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいアリアル、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリアル環を形成する；

【0280】

いくつかの実施形態において、R'は、-R、-C(O)R、-CO₂R、または-SO₂Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

10

【0281】

いくつかの実施形態において、R'は、-Rであり、Rは、上記およびここに定義し記載したとおりである。である。いくつかの実施形態において、R'は、水素である。

【0282】

いくつかの実施形態において、R'は、-C(O)Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R'は、-CO₂Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R'は、-SO₂Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

20

【0283】

いくつかの実施形態において、同じ窒素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテロ環式、もしくはヘテロアリアル環を形成する。いくつかの実施形態において、同じ炭素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいアリアル、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリアル環を形成する。

【0284】

一般的に上記およびここに記載される通り、-Cy-は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい2価の環である。

30

【0285】

いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいフェニレンである。いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいカルボシクリレンである。いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいアリーレンである。いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいヘテロアリーレンである。いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいヘテロシクリレンである。

【0286】

一般的に上記およびここに記載される通り、X、YおよびZのそれぞれは、独立して-O-、-S-、-N(-L-R¹)-、またはLであり、LおよびR¹のそれぞれは、独立して上記のとおり定義し、下記に記載されるとおりである。

40

【0287】

いくつかの実施形態において、Xは、-O-である。いくつかの実施形態において、Xは、-S-である。いくつかの実施形態において、Xは、-O-または-S-である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチドの結合を含み、Xは、-O-である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチドの結合を含み、Xは、-S-である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチド結合を含み、Xは、-O-であり、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチド結合を含み、Xは、-S-である。いくつかの実施形態におい

50

て、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチド結合を含み、Xは、 $-O-$ であり、少なくとも1個の、式Iインターヌクレオチド結合を含み、Xは、 $-S-$ であり、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチド結合を含み、Lは、置換されていてもよい、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C-C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。

10

【0288】

いくつかの実施形態において、Xは、 $-N(-L-R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Xは、 $-N(R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Xは、 $-N(R')$ である。いくつかの実施形態において、Xは、 $-N(R)-$ である。いくつかの実施形態において、Xは、 $-NH-$ である。

【0289】

いくつかの実施形態において、Xは、Lである。いくつかの実施形態において、Xは、共有結合である。いくつかの実施形態において、Xは、置換されていてもよい、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C-C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、Xは、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンまたは $C_1 \sim C_{10}$ アルケニレンである。いくつかの実施形態において、Xは、メチレンである。

20

【0290】

いくつかの実施形態において、Yは、 $-O-$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-S-$ である。

30

【0291】

いくつかの実施形態において、Yは、 $-N(-L-R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-N(R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-N(R')$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-N(R)-$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-NH-$ である。

【0292】

いくつかの実施形態において、Yは、Lである。いくつかの実施形態において、Yは、共有結合である。いくつかの実施形態において、Yは、置換されていてもよいか、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C-C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、Yは、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンまたは $C_1 \sim C_{10}$ アルケニレンである。いくつかの実施形態において、Yは、メチレンである。

40

50

【0293】

いくつかの実施形態において、Zは、-O-である。いくつかの実施形態において、Zは、-S-である。

【0294】

いくつかの実施形態において、Zは、-N(-L-R¹)-である。いくつかの実施形態において、Zは、-N(R¹)-である。いくつかの実施形態において、Zは、-N(R')-である。いくつかの実施形態において、Zは、-N(R)-である。いくつかの実施形態において、Zは、-NH-である。

【0295】

いくつかの実施形態において、Zは、Lである。いくつかの実施形態において、Zは、共有結合である。いくつかの実施形態において、Zは、または置換されていてもよい、直鎖または分岐のC₁~C₁₀アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、Zは、置換されていてもよいC₁~C₁₀アルキレンまたはC₁~C₁₀アルケニレンである。いくつかの実施形態において、Zは、メチレンである。

10

20

【0296】

一般的に上記およびここに記載される通り、Lは、共有結合または任意に置換され、直鎖または分岐のC₁~C₁₀アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換される。

30

【0297】

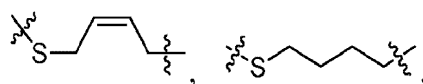
いくつかの実施形態において、Lは、共有結合である。いくつかの実施形態において、Lは、任意に置換され、直鎖または分岐のC₁~C₁₀アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換される。

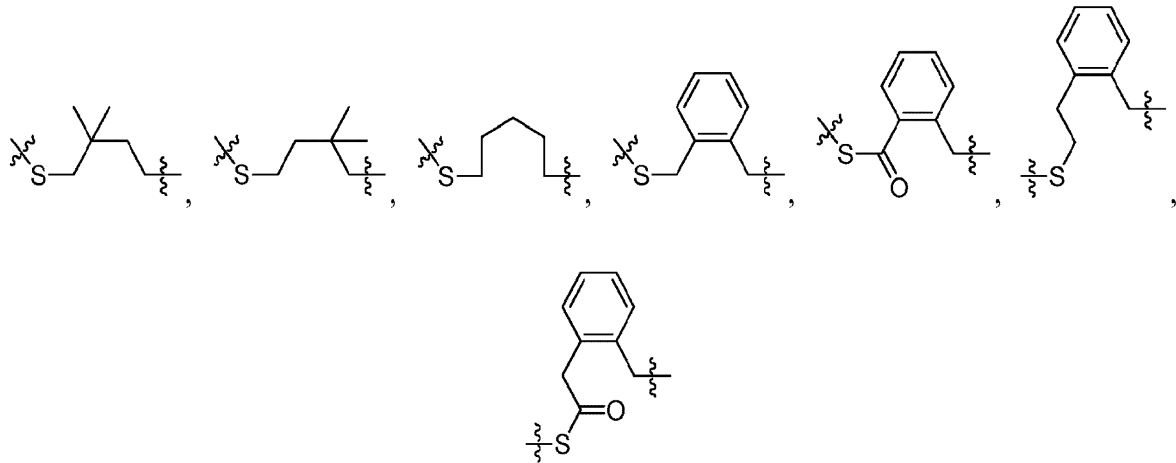
40

【0298】

いくつかの実施形態において、Lは、-L¹-V-の構造を有し、ここでL¹は、置換されていてもよい基：

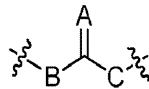
【化7】





10

$C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、カルボシクリレン、アリーレン、 $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、ヘテロシクリレン、およびヘテロアリーレンから選択され；
 Vは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'-$ 、 $C(R')_2$ 、 $-S-S-$ 、 $-B-S-S-C-$ 、
 【化8】



20

、または、 $C_1 \sim C_6$ アルキレン、アリーレン、 $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、ヘテロシクリレン、およびヘテロアリーレンから選択される置換されていてもよい基から選択され；

Aは、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=NR'$ 、または $=C(R')_2$ であり；

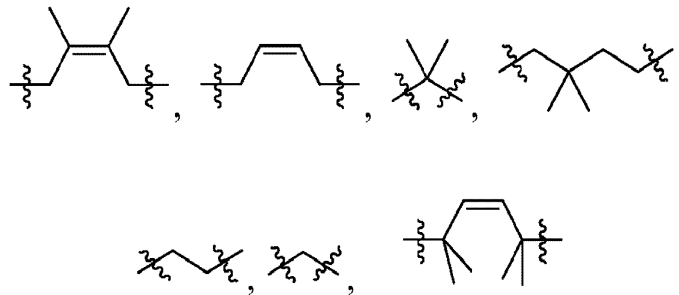
BおよびCのそれぞれは、独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'-$ 、 $-C(R')_2-$ 、または、 $C_1 \sim C_6$ アルキレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロシクリレン、またはヘテロアリーレンから選択される置換されていてもよい基であり；および各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0299】

30

いくつかの実施形態において、 L^1 は、

【化9】



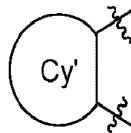
40

である。

【0300】

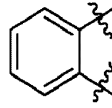
いくつかの実施形態において、 L^1 は、

【化10】

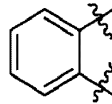


50

であり、
 ここで環 C y ' は、置換されていてもよいアリーレン、カルボシクリレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンである。いくつかの実施形態において、L¹ は、置換されていてもよい
 【化 1 1】



である。いくつかの実施形態において、L¹ は、
 【化 1 2】

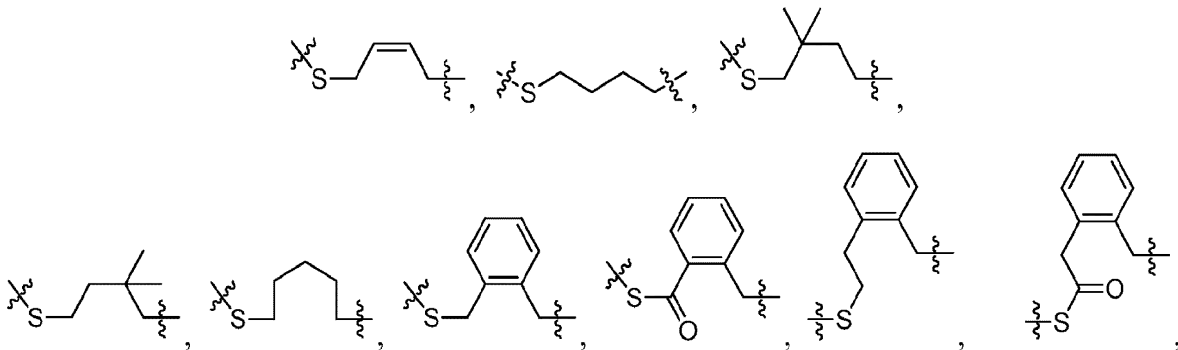


10

である。
 【0301】

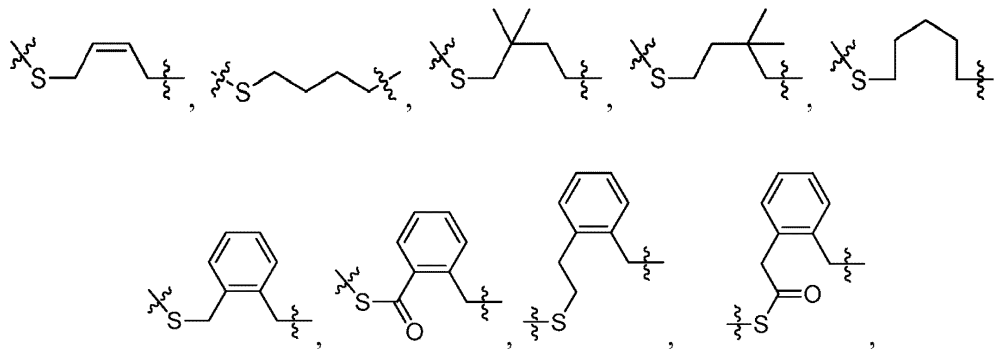
いくつかの実施形態において、L¹ は、X と結合している。である。いくつかの実施形態において、L¹ は、置換されていてもよい基
 【化 1 3】

20



30

から選択され、硫黄原子はVに結合されている。いくつかの実施形態において、L¹ は、置換されていてもよい基
 【化 1 4】

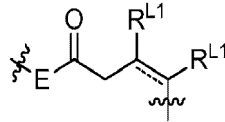


40

から選択され、炭素原子はXに結合されている。
 【0302】

いくつかの実施形態では、L は、

【化15】



の構造を有し、

ここで、

Eは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'$ - 又は $-C(R')$ $_2-$ であり；

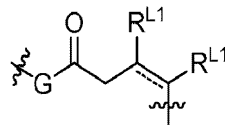
$-$ $-$ $-$ は単結合又は二重結合であり；

2つの R^{L1} は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒に、置換されていてもよいアリール、炭素環式、ヘテロアリール又はヘテロ環式環を形成し；各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。 10

【0303】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化16】



の構造を有し、

20

ここで、

Gは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

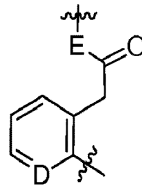
$-$ $-$ $-$ は単結合又は二重結合であり；および

2つの R^{L1} は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒に、置換されていてもよいアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリール又はヘテロ環式環を形成し。

【0304】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化17】



30

の構造を有し、

ここでEは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'$ - 又は $-C(R')$ $_2-$ であり；

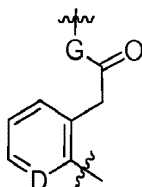
Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。 40

【0305】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化18】



の構造を有し、

50

ここで、

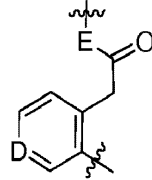
Gは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ である。

【0306】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化19】



10

の構造を有し、

ここで、

Eは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'$ - 又は $-C(R')$ ₂ - であり；

Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

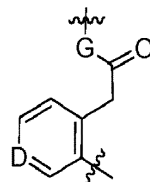
20

各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0307】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化20】



30

の構造を有し、

ここで、

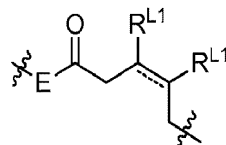
Gは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ である。

【0308】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化21】



40

の構造を有し、

ここでEは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'$ - 又は $-C(R')$ ₂ - であり；

$-$ - $-$ は単結合又は二重結合であり；

2つのR^{L1}は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されていてもよいアリール、C₃ ~ C₁₀炭素環式、ヘテロアリール又はヘテロ環式環を形成し；

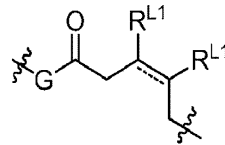
50

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0309】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化22】



の構造を有し、

ここでGは、-O-、-S-、または-NR'であり；

10

- - -は単結合又は二重結合であり；

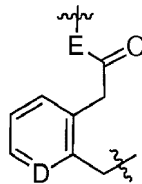
2つのR^{L1}は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されても良いアリール、C₃~C₁₀炭素環式、ヘテロアリールまたはヘテロ環式環を形成し；

各R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0310】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化23】



20

の構造を有し、

ここで、

Eは、-O-、-S-、-NR'-又は-C(R')₂-であり；

Dは、=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO₂)-、=C(CO₂-(C₁~C₆脂肪族))-、または=C(CF₃)-であり；および

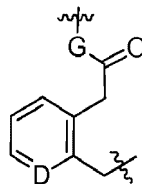
各R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

30

【0311】

いくつかの実施形態において、Lは：

【化24】



(式中、

40

Gは、-O-、-S-、または-NR'であり；

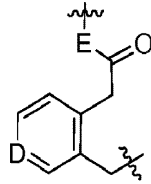
Dは、=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO₂)-、=C(CO₂-(C₁-C₆脂肪族))-、または=C(CF₃)-であり；

R' はそれぞれ独立して、上で定義され、本明細書に記述される通りである。)の構造を有する。

【0312】

いくつかの実施形態において、Lは：

【化25】



(式中、

Eは、-O-、-S-、-NR'-または-C(R')₂-であり；

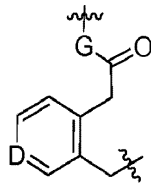
Dは、=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO₂)-、=C(CO₂-(C₁-C₆脂肪族))-、または=C(CF₃)-であり；

R'はそれぞれ独立して、上で定義され、本明細書に記述される通りである。)の構造を有する。

【0313】

いくつかの実施形態において、Lは：

【化26】



(式中、

Gは、-O-、-S-、または-NR'であり；

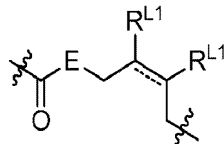
Dは、=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO₂)-、=C(CO₂-(C₁-C₆脂肪族))-、または=C(CF₃)-であり；

R'はそれぞれ独立して、上で定義され、本明細書に記述される通りである。)の構造を有する。

【0314】

いくつかの実施形態において、Lは：

【化27】



(式中、Eは、-O-、-S-、-NR'-または-C(R')₂-であり；

- - -は、単結合または二重結合であり；2つのR^{L1}は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されてもよいアリール、C₃-C₁₀炭素環、ヘテロアリール環または複素環を形成し；R'はそれぞれ独立して、上で定義され、本明細書に記述される通りである。)の構造を有する。

【0315】

いくつかの実施形態において、Lは、

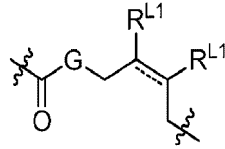
10

20

30

40

【化28】



の構造を有し、

ここでGは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

$-$ は単結合又は二重結合であり；

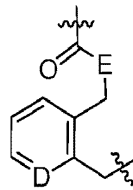
2つの R^{L1} は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されても良いアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリールまたはヘテロ環式環を形成し；

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0316】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化29】



の構造を有し、

ここでEは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'$ 又は $-C(R')_2$ であり；

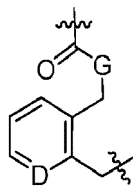
Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0317】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化30】



の構造を有し、

ここで、

Gは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

R' は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0318】

いくつかの実施形態において、Lは、

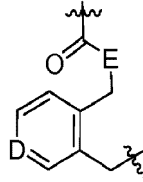
10

20

30

40

【化31】



の構造を有し、
ここで、

Eは、-O-、-S-、-NR'-又は-C(R')₂-であり；

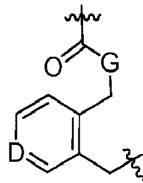
Dは、=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO₂)-、=C(CO₂-(C₁~C₆脂肪族))-、または=C(CF₃)-であり；および

各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0319】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化32】



の構造を有し、
ここで、

Gは、-O-、-S-、または-NR'であり；

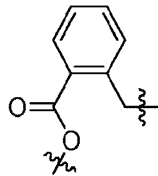
Dは、=N-、=C(F)-、=C(Cl)-、=C(Br)-、=C(I)-、=C(CN)-、=C(NO₂)-、=C(CO₂-(C₁~C₆脂肪族))-、または=C(CF₃)-であり；および

R'は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0320】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化33】



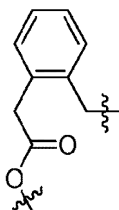
の構造を有し、

ここで、フェニル環は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、フェニル環は、置換されない。いくつかの実施形態において、フェニル環は、置換される。

【0321】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化34】



10

20

30

40

50

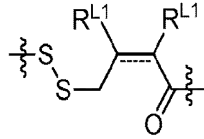
の構造を有し、

ここで、フェニル環は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、フェニル環は、置換されない。いくつかの実施形態において、フェニル環は、置換される。

【0322】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化35】



10

の構造を有し、

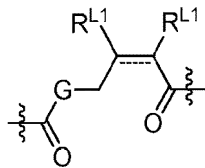
ここで - - - は単結合又は二重結合であり；および

2つの R^{L1} は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されていてもよいアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリール又はヘテロ環式環を形成する。

【0323】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化36】



20

の構造を有し、

ここで、

Gは、-O-、-S-、または-NR'であり；

- - - は単結合又は二重結合であり；および

2つの R^{L1} は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されてもよいアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリールまたはヘテロ環式環を形成する。

【0324】

一般的に上記およびここに記載される通り、Eは、-O-、-S-、-NR'-または $-C(R')_2-$ であり、各 R' は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、Eは、-O-、-S-、または-NR'-である。いくつかの実施形態において、Eは、-O-、-S-、または-NH-である。いくつかの実施形態において、Eは、-O-である。いくつかの実施形態において、Eは、-S-である。いくつかの実施形態において、Eは、-NH-である。

30

【0325】

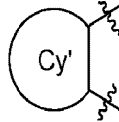
一般的に上記およびここに記載される通り、Gは、-O-、-S-、または-NR'であり、各 R' は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、Gは、-O-、-S-、または-NH-である。いくつかの実施形態において、Gは、-O-である。いくつかの実施形態において、Gは、-S-である。いくつかの実施形態において、Gは、-NH-である。

40

【0326】

いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^3-G-$ であり、ここで L^3 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_5$ アルキレンまたはアルケニレンであり、1以上のメチレン単位は、任意におよび独立して-O-、-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-S(O)-、-S(O)₂-、または

【化37】



により置換され、

GおよびR'のそれぞれおよび環Cy'は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0327】

いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^3-S-$ であり、 L^3 は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^3-O-$ であり、 L^3 は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^3-N(R')$ であり、ここで L^3 およびR'のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^3-NH-$ であり、 L^3 およびR'のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

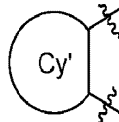
10

【0328】

いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_5 アルキレンまたはアルケニレンであり、1以上のメチレン単位は、任意におよび独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または

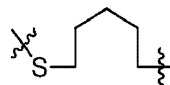
20

【化38】



により置換され、R'および環Cy'のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_5 アルキレンである。いくつかの実施形態において、 $-L^3-G-$ は、

【化39】



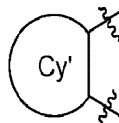
である。

【0329】

いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_4 アルキレンまたはアルケニレンであり、1以上のメチレン単位は、任意におよび独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または

30

【化40】



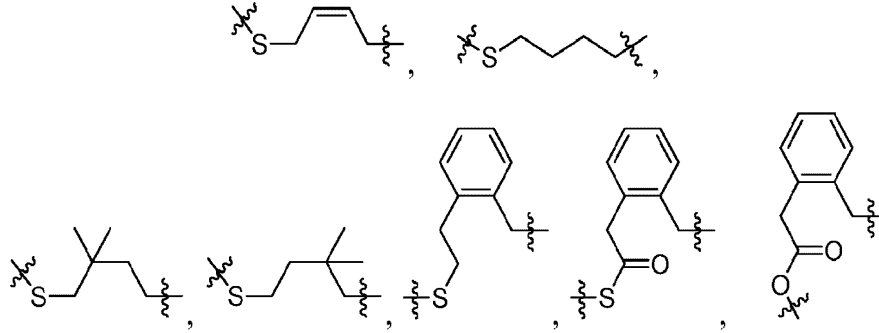
により置換され、R'およびCy'のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0330】

いくつかの実施形態において、 $-L^3-G-$ は、

40

【化41】



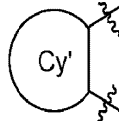
10

である。

【0331】

いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_3 アルキレンまたはアルケニレンであり、1以上のメチレン単位は、任意におよび独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または

【化42】



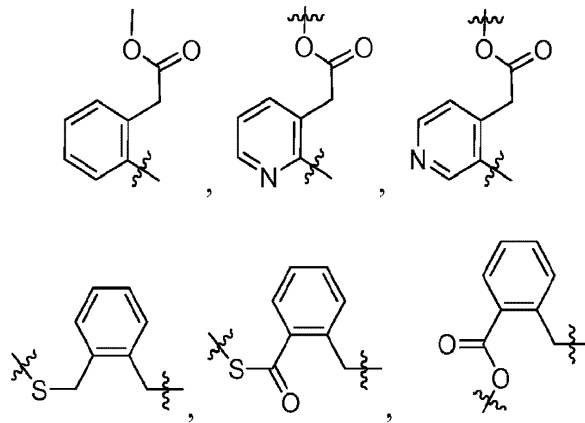
20

により置換され、 R' および Cy' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0332】

いくつかの実施形態において、 $-L^3-G-$ は、

【化43】



30

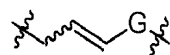
である。

40

【0333】

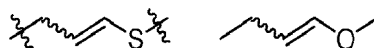
いくつかの実施形態において、 L は、

【化44】



である。いくつかの実施形態において、 L は、

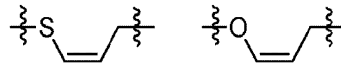
【化45】



である。いくつかの実施形態において、 L は、

50

【化46】

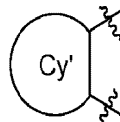


である。

【0334】

いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_2 は、アルキレンまたはアルケニレンであり、1以上のメチレン単位は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または

【化47】



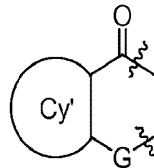
10

により任意におよび独立して置換され、 R' および Cy' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0335】

いくつかの実施形態において、 $-L^3-G-$ は、

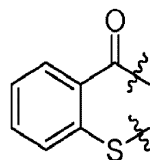
【化48】



20

であり、 G および Cy' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 L は、

【化49】



30

である。

【0336】

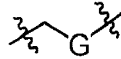
いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_2$ アルキレンである；および G は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_2$ アルキレンである； G は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである； G は、 R^1 に結合されている。いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、置換されていてもよいメチレンである； G は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである；および G は、 R^1 と結合している。いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、メチレンである； G は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである；および G は、 R^1 と結合している。いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、置換されていてもよい $-(CH_2)_2-$ である； G は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである；および G は、 R^1 と結合している。いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、 $-(CH_2)_2-$ である； G は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである；および G は、 R^1 と結合している。

40

【0337】

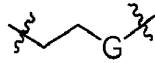
いくつかの実施形態において、 L は、

【化50】



または

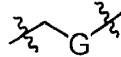
【化51】



であり、ここで、Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりであり、Gは、R¹に結合されている。いくつかの実施形態において、Lは、

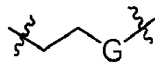
【化52】

10



であり、Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりであり、Gは、R¹に結合されている。いくつかの実施形態において、Lは、

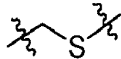
【化53】



であり、Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりであり、Gは、R¹に結合されている。いくつかの実施形態において、Lは、

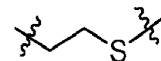
【化54】

20



または

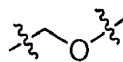
【化55】



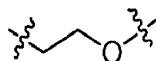
であり、ここで硫黄原子は、R¹に結合されている。いくつかの実施形態において、Lは、

【化56】

30



または



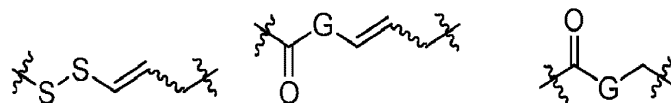
であり、ここで酸素原子は、R¹に結合されている。

【0338】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化57】

40



であり、Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0339】

いくつかの実施形態において、Lは、-S-R^{L3}-または-S-C(O)-R^{L3}-であり、R^{L3}は、任意に置換され、直鎖または分岐のC₁~C₉アルキレンであり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケ

50

いくつかの実施形態において、上記およびここに記載する実施形態におけるLの硫黄原子は、Xと結合している。いくつかの実施形態において、上記およびここに記載する実施形態におけるLの硫黄原子は、R¹に結合されている。

【0343】

一般的に上記およびここに記載される通り、R¹は、ハロゲン、R、または置換されていてもよいC₁~C₅₀脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-CY-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R¹は、ハロゲン、R、または置換されていてもよいC₁~C₁₀脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-CY-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

10

20

【0344】

いくつかの実施形態において、R¹は、水素である。いくつかの実施形態において、R¹は、ハロゲンである。いくつかの実施形態において、R¹は、-Fである。いくつかの実施形態において、R¹は、-Clである。いくつかの実施形態において、R¹は、-Brである。いくつかの実施形態において、R¹は、-Iである。

【0345】

いくつかの実施形態において、R¹は、Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

30

【0346】

いくつかの実施形態において、R¹は、水素である。いくつかの実施形態において、R¹は、C₁~C₅₀脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基である。

【0347】

いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいC₁~C₅₀脂肪族である。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいC₁~C₁₀脂肪族である。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいC₁~C₆脂肪族である。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキルである。いくつかの実施形態において、R¹は、任意に置換され、直鎖または分岐のヘキシルである。いくつかの実施形態において、R¹は、任意に置換され、直鎖または分岐のペンチルである。いくつかの実施形態において、R¹は、任意に置換され、直鎖または分岐のブチルである。いくつかの実施形態において、R¹は、任意に置換され、直鎖または分岐のプロピルである。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいエチルである。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいメチルである。

40

【0348】

いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいフェニルである。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されたフェニルである。いくつかの実施形態におい

50

て、 R^1 は、フェニルである。

【0349】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいカルボシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい単環式カルボシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロヘプチルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロヘキシルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロペンチルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロブチルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロプロピルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい2環式カルボシクリルである。

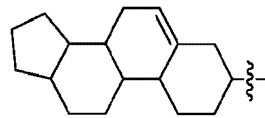
10

【0350】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 多環式炭化水素である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 多環式炭化水素であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C-C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい

20

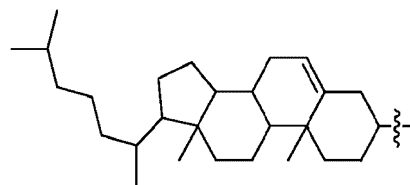
【化62】



である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、

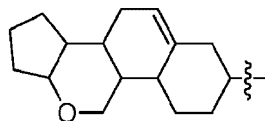
30

【化63】



である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい

【化64】



40

である。

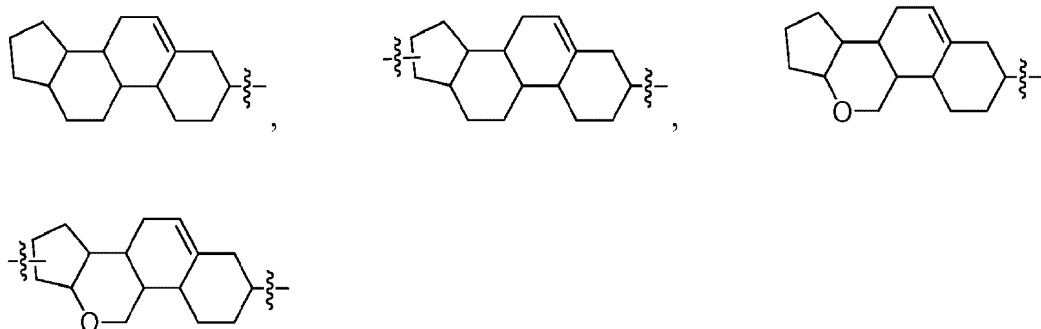
【0351】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、1以上の、置換されていてもよい多環式炭化水素部分を含む置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 脂肪族である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、1以上の、置換されていてもよい多環式炭化水素部分を含む置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C-C-$ 、 $-C(R')$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$

50

-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R¹は、1以上の、置換されていてもよいC₁~C₅₀脂肪族

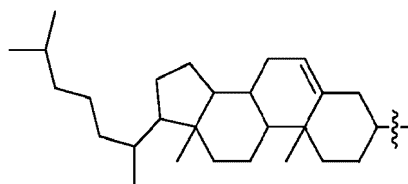
【化65】



10

を含む。いくつかの実施形態において、R¹は、

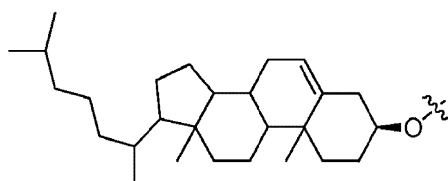
【化66】



20

である。いくつかの実施形態において、R¹は、

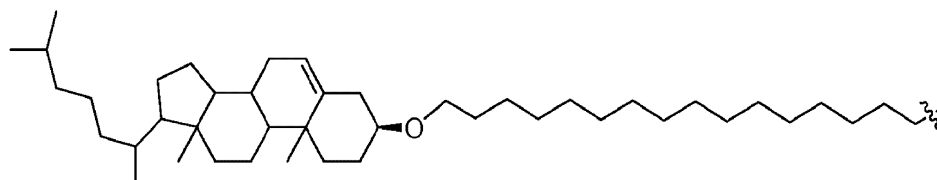
【化67】



30

である。いくつかの実施形態において、R¹は、

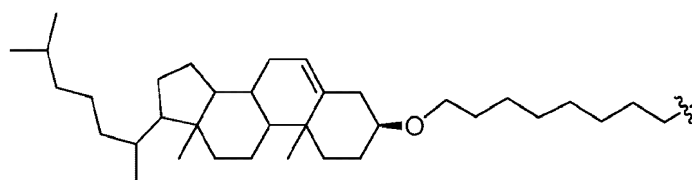
【化68】



40

である。いくつかの実施形態において、R¹は、

【化69】



である。いくつかの実施形態において、R¹は、

ル環である。ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5,6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいインドリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいアザピシクロ[3.2.1]オクタニルである。ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5,6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいアザインドリル(azaindolyl)である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいベンズイミダゾリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいベンゾチアゾリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいベンゾオキサゾリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいインダゾリルである。ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される3個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5,6-縮合ヘテロアリール環である。

10

【0359】

ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6,6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6,6-縮合ヘテロアリール環である。別の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6,6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいキノリニルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいイソキノリニルである。ある態様によれば、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6,6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、キナゾリンまたはキノキサリンである。

20

【0360】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいヘテロシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい3~7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換された3~7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する非置換の3~7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。

30

【0361】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいヘテロシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい部分的に不飽和の6員ヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、2個の酸素原子を有する置換されていてもよい部分的に不飽和の6員ヘテロ環式環である。

40

【0362】

ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する3~7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。ある特定の実施形態において、 R^1 は、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、オキセパニル、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ペリリジニル、アゼパニル、チエラニル、チエタニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、チエパニル、ジオキサラニル、オキサチオラニル、オキ

50

サゾリジニル、イミダゾリジニル、チアゾリジニル、ジチオラニル、ジオキサニル、モルホリニル、オキサチアニル、ピペラジニル、チオモルホリニル、ジチアニル、ジオキセパニル、オキサゼパニル、オキサチエパニル、ジチエパニル、ジアゼパニル、ジヒドロフラノニル、テトラヒドロピラノニル、オキセパノニル、ピロリジノニル、ピペリジノニル、アゼパノニル、ジヒドロチオフェノニル、テトラヒドロチオピラノニル、チエパノニル、オキサゾリジノニル、オキサジナノニル、オキサゼパノニル、ジオキサラノニル、ジオキサノニル、ジオキセパノニル、オキサチオリノニル、オキサチアノニル、オキサチエパノニル、チアゾリジノニル、チアジナノニル、チアゼパノニル、イミダゾリジノニル、テトラヒドロピリミジノニル、ジアゼパノニル、イミダゾリジンジオニル、オキサゾリジンジオニル、チアゾリジンジオニル、ジオキサランジオニル、オキサチオランジオニル、ピペラジンジオニル、モルホリンジオニル、チオモルホリンジオニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピロリジニル、テトラヒドロチオフェニル、またはテトラヒドロチオピラニルである。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、R¹は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。

10

【0363】

ある特定の実施形態において、R¹は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5-6員部分的に不飽和の単環式環である。ある特定の実施形態において、R¹は、置換されていてもよいテトラヒドロピリジニル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロオキサゾリル、またはオキサゾリニル基である。

20

【0364】

いくつかの実施形態において、R¹は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい8~10員2環式飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいインドリニルである。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいイソインドリニルである。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよい1、2、3、4-テトラヒドロキノリンである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい1、2、3、4-テトラヒドロイソキノリンである。

30

【0365】

いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいC₁~C₁₀脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、-C(C)-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいC₁~C₁₀脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換され、各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R¹は、置換されていてもよいC₁~C₁₀脂肪族であり

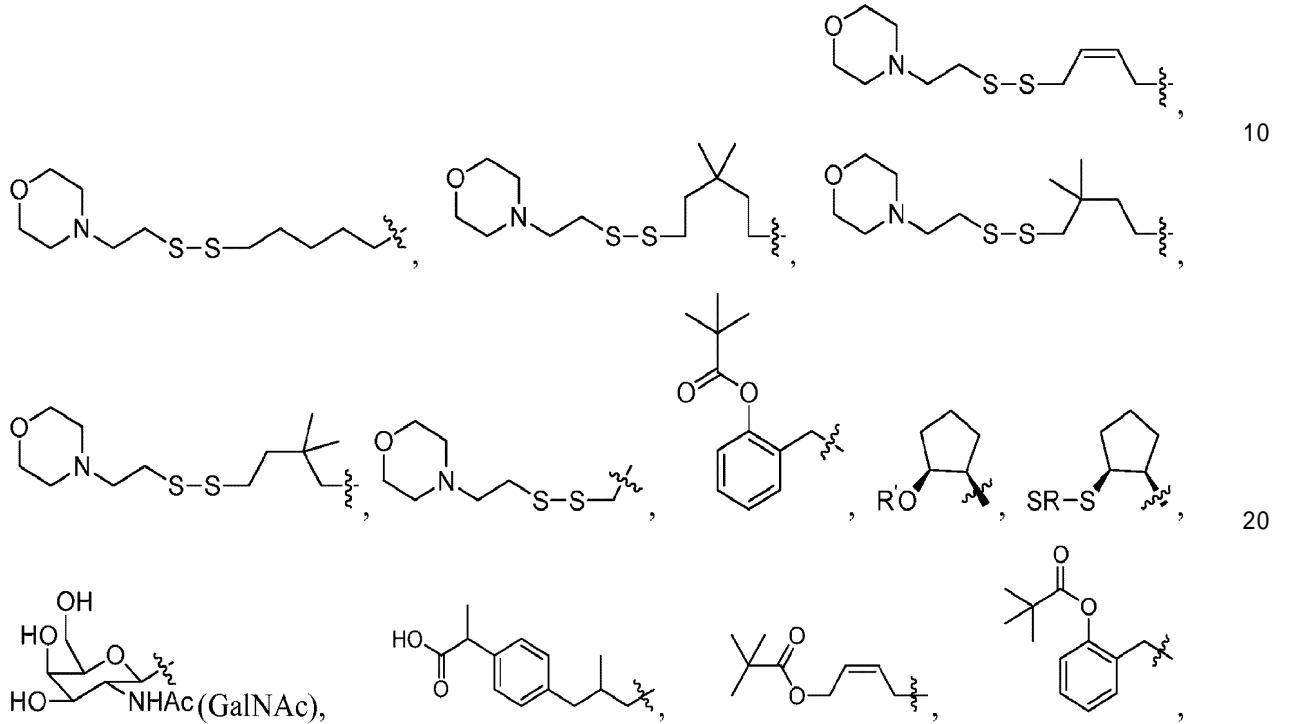
40

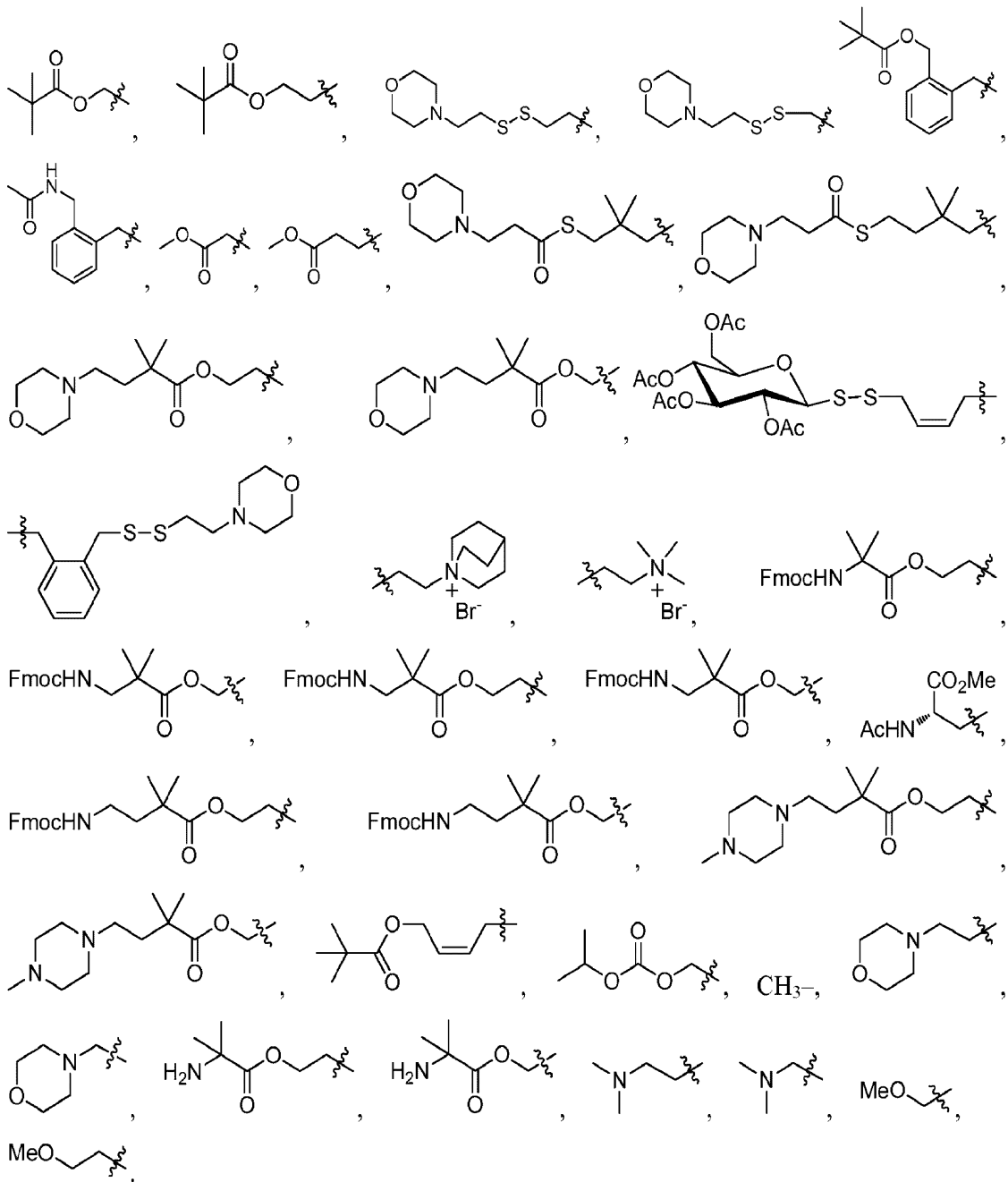
50

、1以上のメチレン単位は、任意の - Cy -、- O -、- S -、- S - S -、- N (R ') -、- C (O) -、- O C (O) -、または - C (O) O - により、任意におよび独立して置換され、各 R ' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0366】

いくつかの実施形態において、R¹は、
【化71】





10

20

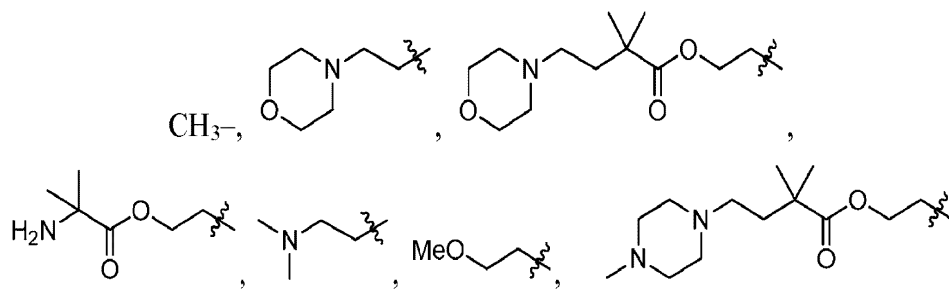
30

である。

【0367】

いくつかの実施形態において、R¹は、

【化72】



40

である。

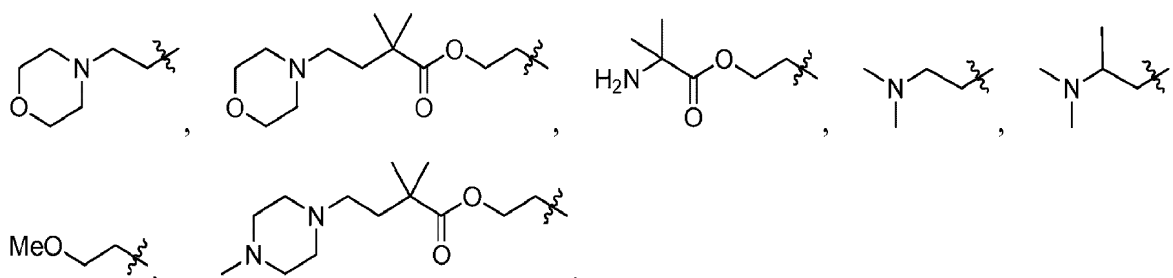
【0368】

いくつかの実施形態において、R¹は、Lに結合された置換されていてもよい - (C H

50

2) 2 - 部分を有する末端を含む。そのような例示的な R¹ 基は、下記の通りである：

【化 7 3】

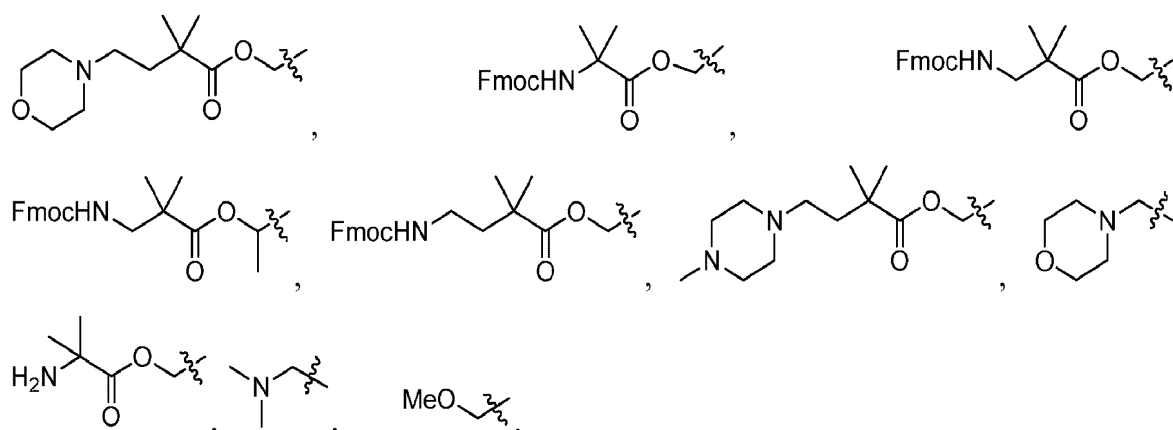


10

【0369】

いくつかの実施形態において、R¹ は、L に結合され、置換されていてもよい置換されていてもよい - (CH₂) - 部分を含む。そのような例示的な R¹ 基は、下記の通りである：

【化 7 4】



20

【0370】

いくつかの実施形態において、R¹ は、-S-R^{L2} であり、R^{L2} は、であり、置換されていてもよい C₁ ~ C₉ 脂肪族であり、1 以上のメチレン単位は、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキレン、C₁ ~ C₆ アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または -C(O)O- により任意におよび独立して置換され、R' および -Cy- のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R¹ は、-S-R^{L2} であり、硫黄原子は、L 基の硫黄原子と結合される。

30

【0371】

いくつかの実施形態において、R¹ は、-C(O)-R^{L2} であり、R^{L2} は、置換されていてもよい C₁ ~ C₉ 脂肪族であり、1 以上のメチレン単位は、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキレン、C₁ ~ C₆ アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または -C(O)O- により任意におよび独立して置換され、R' および -Cy- のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R¹ は、-C(O)-R^L

40

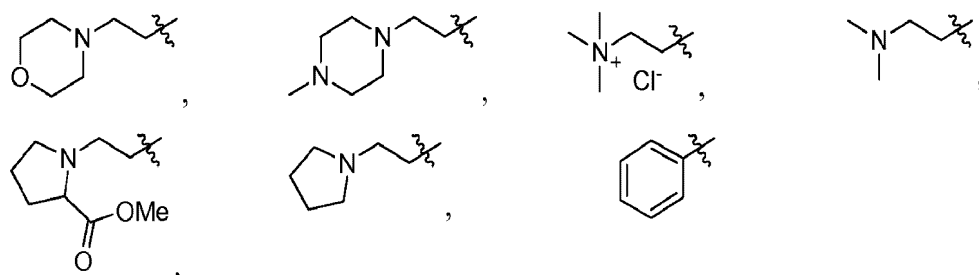
50

²であり、カルボニル基は、L基のGと結合される。いくつかの実施形態において、R¹は、-C(O)-R^{L2}であり、カルボニル基は、L基の硫黄原子と結合される。

【0372】

いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉脂肪族である。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉アルキルである。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉アルケニルである。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉アルキニルである。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、任意におよび独立して-Cy-または-C(O)-により置換される。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、-Cy-により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいヘテロシレンにより任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいアリーレンにより任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉脂肪族であり、以上のメチレン単位は、置換されていてもよいヘテロアリーレンにより任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₃~C₁₀カルボシクリレンにより任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉脂肪族であり、2つのメチレン単位は、-Cy-または-C(O)-により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、R^{L2}は、置換されていてもよいC₁~C₉脂肪族であり、2つのメチレン単位は、-Cy-または-C(O)-により任意におよび独立して置換される。例示的なR^{L2}基は、下記の通りである：

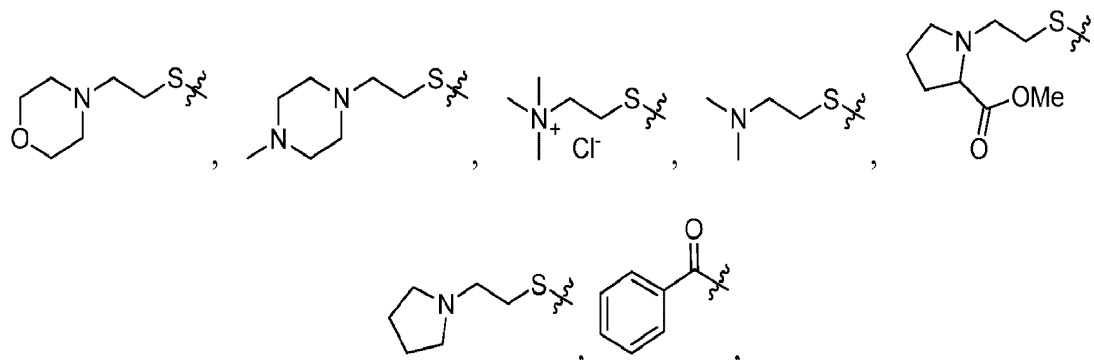
【化75】



【0373】

いくつかの実施形態において、R¹は、水素であり、または、置換されていてもよい基

【化76】



-S-(C₁~C₁₀脂肪族)、C₁~C₁₀脂肪族、アリール、C₁~C₆ヘテロアルキル、ヘテロアリールおよびヘテロシクリルから選択される。いくつかの実施形態において、R¹は、

10

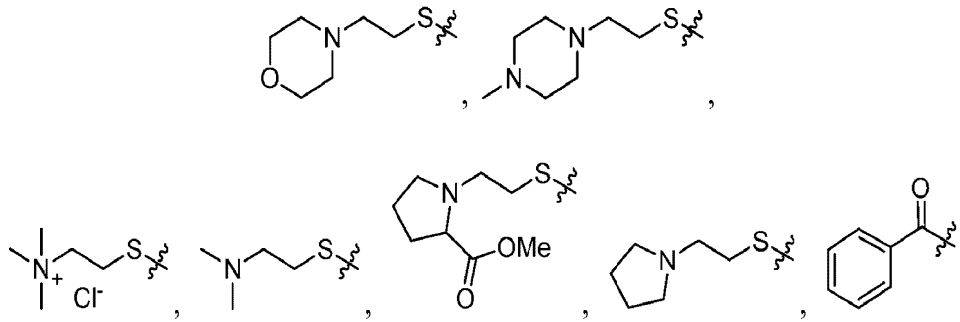
20

30

40

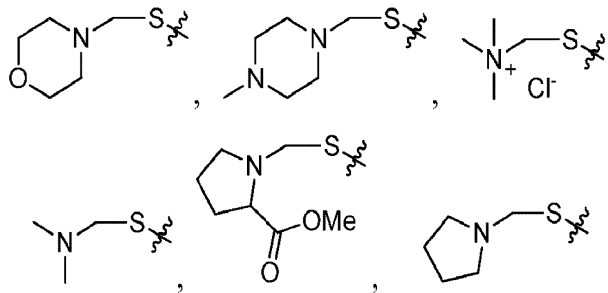
50

【化77】



10

または -S-(C₁~C₁₀ 脂肪族) である。いくつかの実施形態において、R¹ は、
【化78】



20

である。

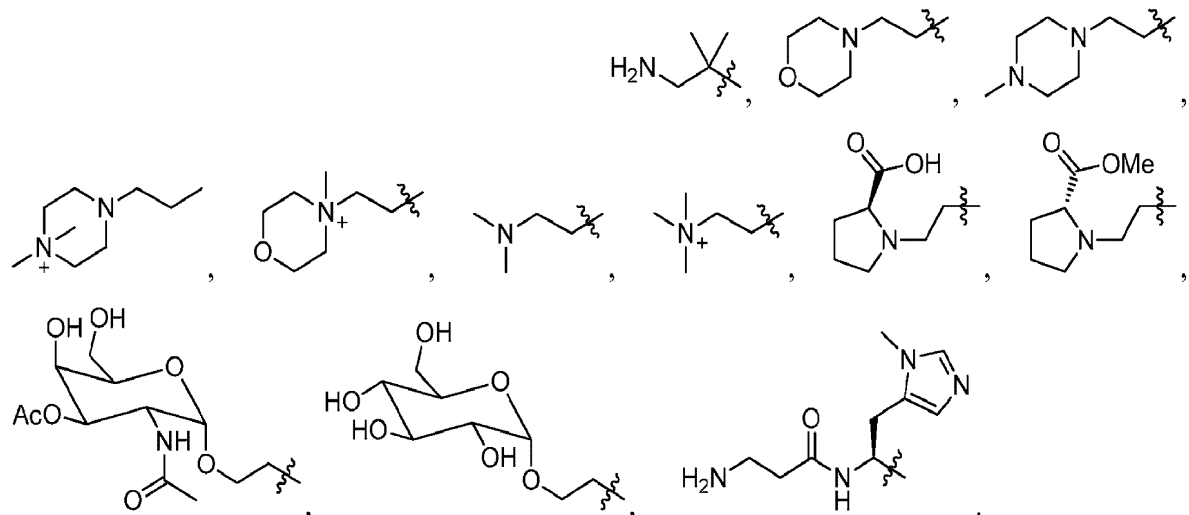
【0374】

いくつかの実施形態において、R¹ は、-S-(C₁~C₆ 脂肪族)、C₁~C₁₀ 脂肪族、C₁~C₆ ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールから選択される置換されていてもよい基である。

【0375】

いくつかの実施形態において、R¹ は、

【化79】



30

40

である。

【0376】

いくつかの実施形態において、上記およびここに記載した R¹ の実施形態の硫黄原子は、上記およびここに記載した L の実施形態の硫黄原子、G、E、または -C(O)-部分に結合されている。いくつかの実施形態において、上記およびここに記載した R¹ の実施形態の -C(O)-部分は、上記およびここに記載した L の実施形態の硫黄原子、G、E、または -C(O)-部分と結合されている。

【0377】

50

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、上記およびここに記載したLの実施形態および R^1 の実施形態組み合わせのいずれかである。

【0378】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-L^3-G-R^1$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0379】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-L^4-G-R^1$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0380】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-L^3-G-S-R^{L2}$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

10

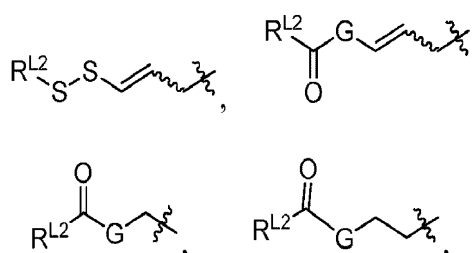
【0381】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-L^3-G-C(O)-R^{L2}$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0382】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化80】



20

であり、ここで R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C-C-$ 、 $-C(R')$ ₂-、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ -、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ -、 $-C(O)N(R')$ -、 $-N(R')C(O)N(R')$ -、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ -、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ -、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、各Gは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

30

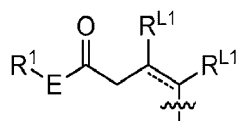
【0383】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-R^{L3}-S-S-R^{L2}$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-R^{L3}-C(O)-S-S-R^{L2}$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0384】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化81】



40

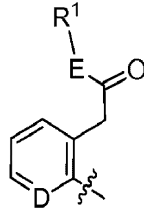
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0385】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 8 2】



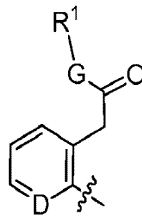
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0386】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化 8 3】



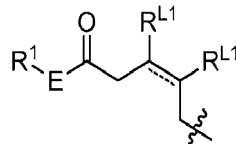
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0387】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化 8 4】



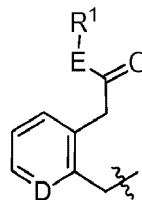
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0388】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化 8 5】



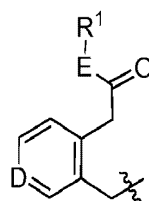
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0389】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化 8 6】



10

20

30

40

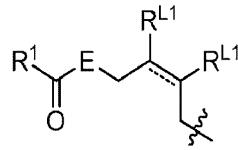
50

の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0390】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、
【化87】



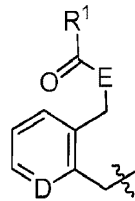
10

の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0391】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、
【化88】



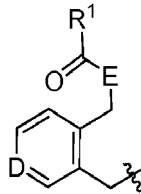
20

の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0392】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、
【化89】



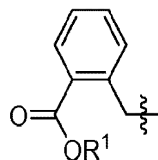
30

の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0393】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、
【化90】



40

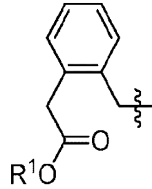
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0394】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化91】



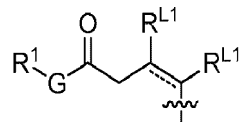
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0395】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化92】



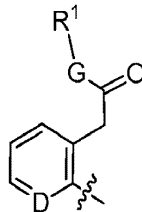
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0396】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化93】



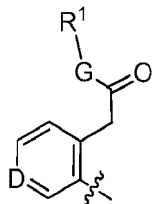
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0397】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化94】



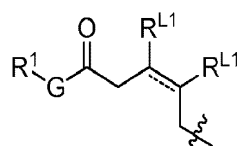
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0398】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化95】



の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0399】

10

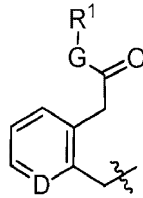
20

30

40

50

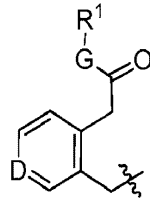
いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、
【化96】



の構造を有し、
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。
【0400】

10

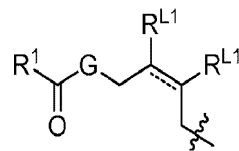
いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、
【化97】



の構造を有し、
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。
【0401】

20

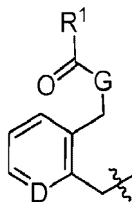
いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、
【化98】



の構造を有し、
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。
【0402】

30

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、
【化99】

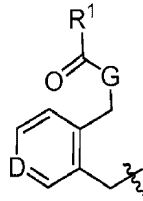


の構造を有し、
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。
【0403】

40

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化100】



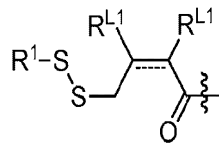
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0404】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化101】



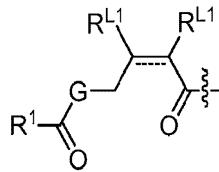
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0405】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化102】



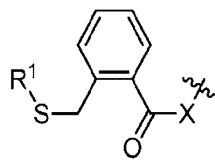
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0406】

いくつかの実施形態において、-X-L-R¹は、

【化103】



の構造を有し、

ここでフェニル環は、置換されていてもよく、および

R¹およびXのそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0407】

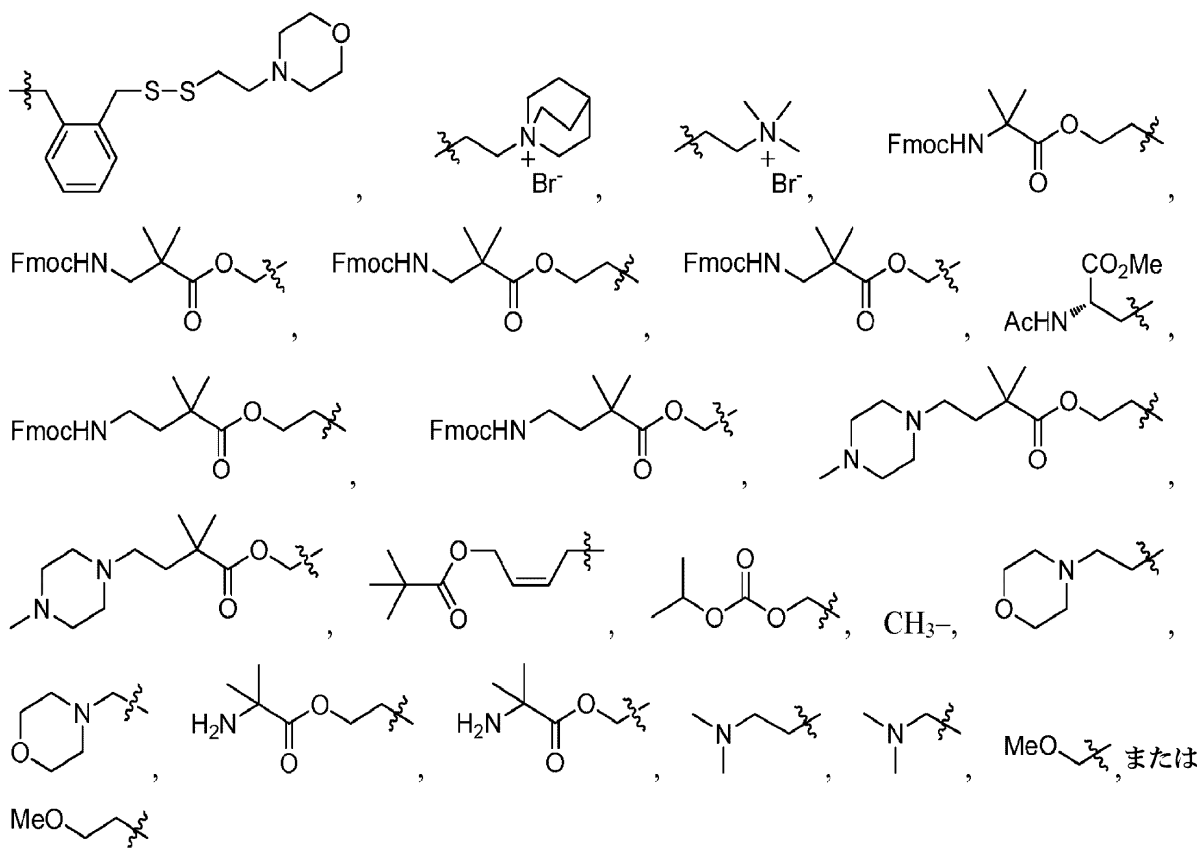
いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

10

20

30

40



10

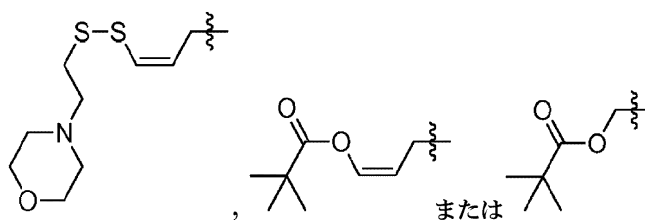
20

である。

【0408】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化105】



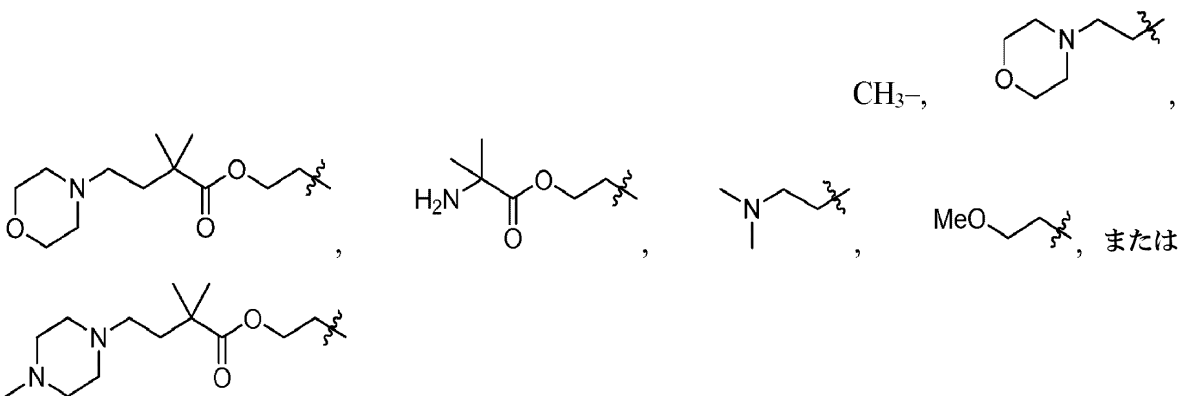
30

である。

【0409】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化106】

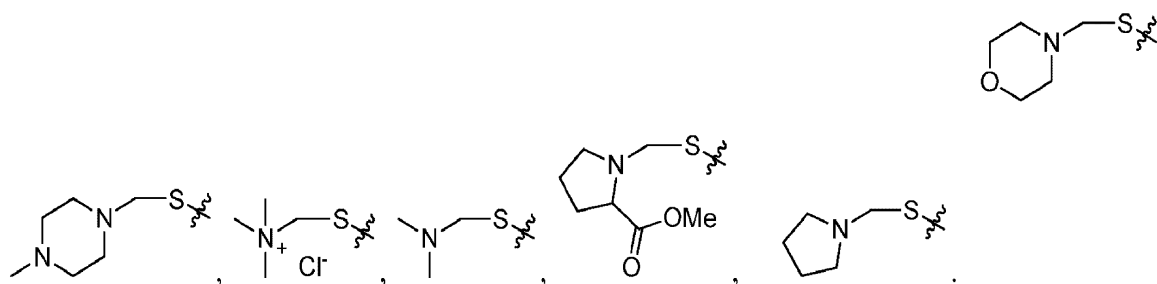


40

である。いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

50

【化107】



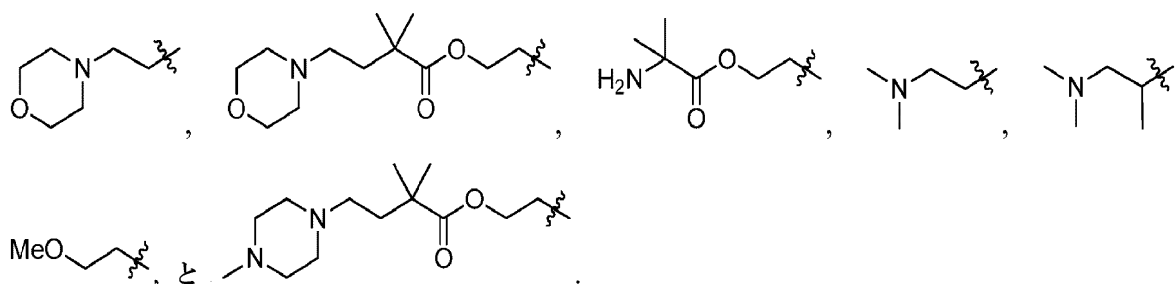
である。

10

【0410】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 X に結合された置換されていてもよい $-(CH_2)_2$ -部分の末端を含む。いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 X に結合された $-(CH_2)_2$ -部分の末端を含む。そのような例示的な $-L-R^1$ 部分は、下記の通りである：

【化108】

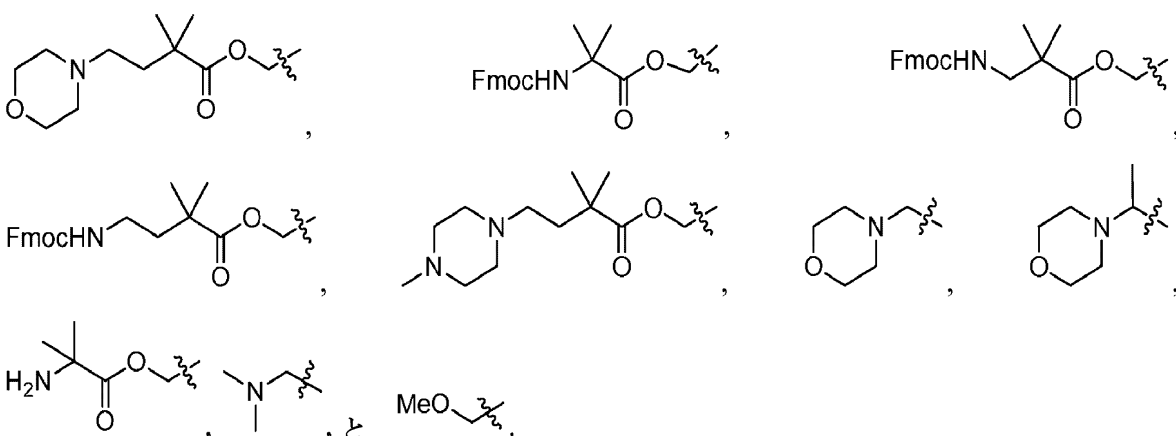


20

【0411】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 X に結合された置換されていてもよい $-(CH_2)$ -部分の末端を含む。いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 X に結合された $-(CH_2)$ -部分の末端を含む。そのような例示的な $-L-R^1$ 部分は、下記の通りである：

【化109】



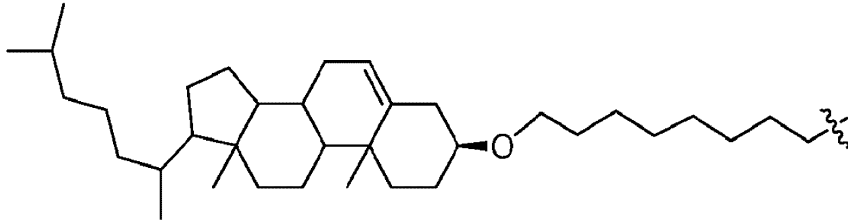
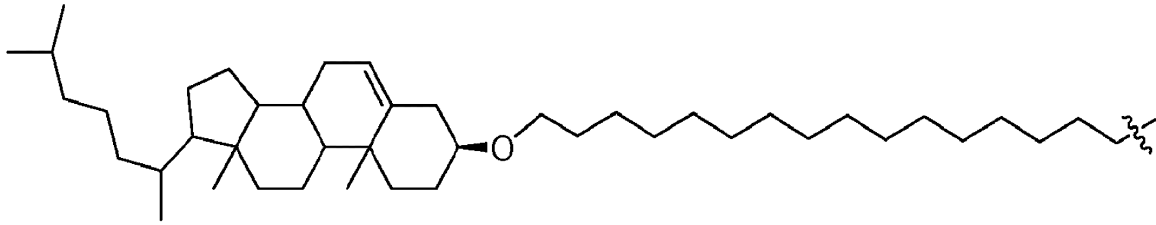
30

40

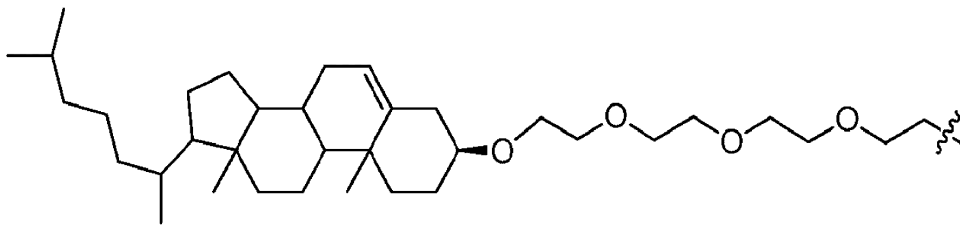
【0412】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化110】



, または



10

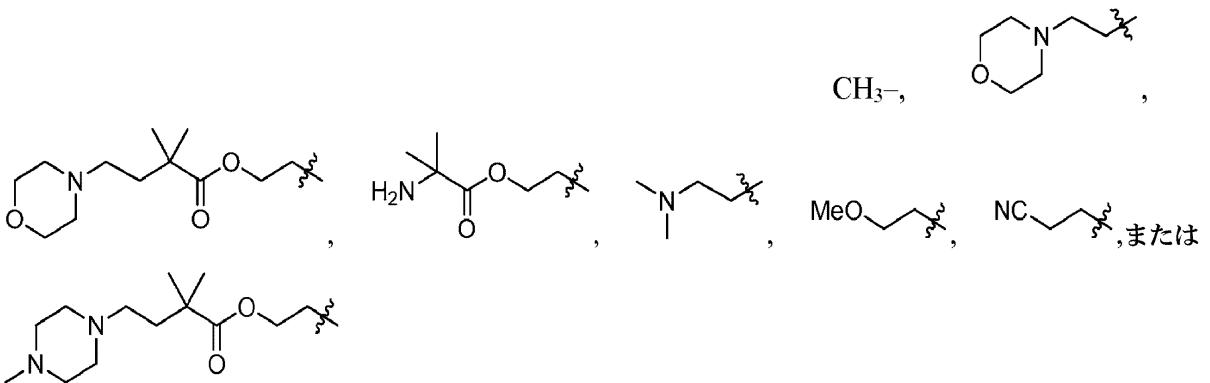
20

である。

【0413】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化111】



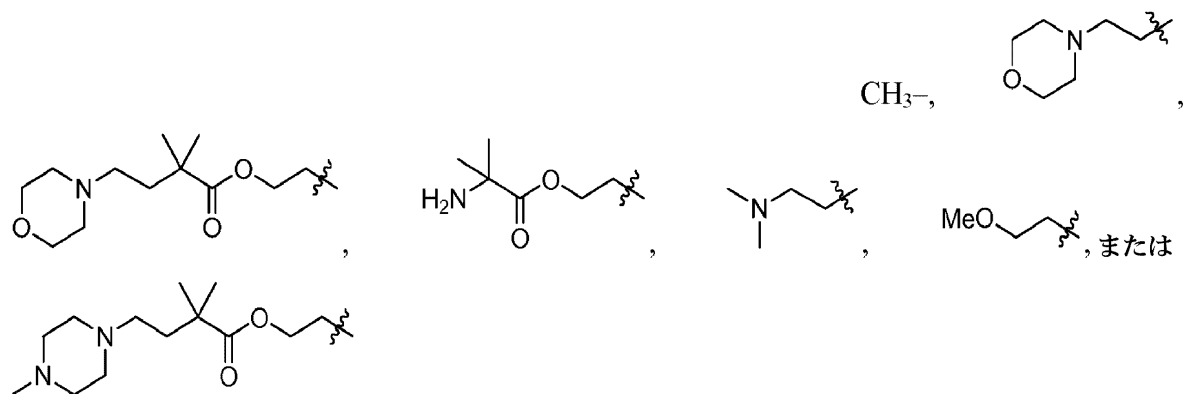
30

であり; およびXは、-S-である。

【0414】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、

【化112】



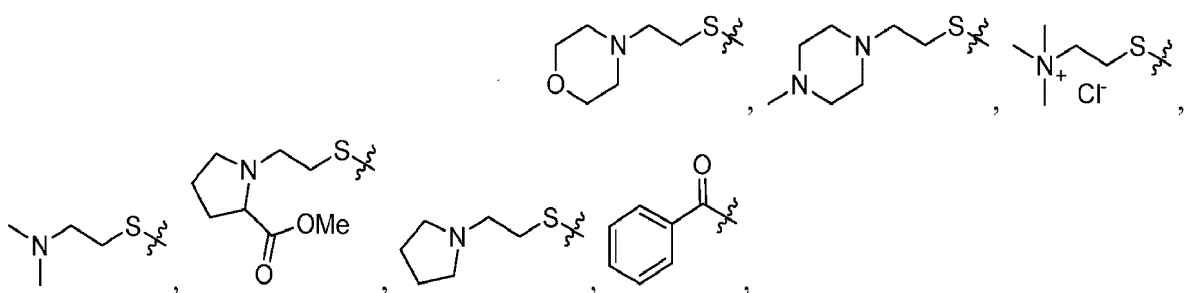
10

であり、Xは、-S-、Wは、O、Yは、-O-、およびZは、-O-である。

【0415】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、

【化113】



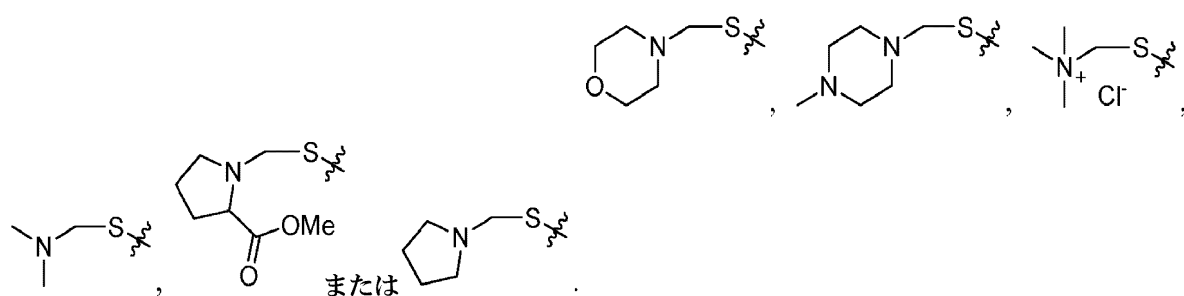
20

または -S- ($C_1 \sim C_{10}$ 脂肪族) である。

【0416】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、

【化114】



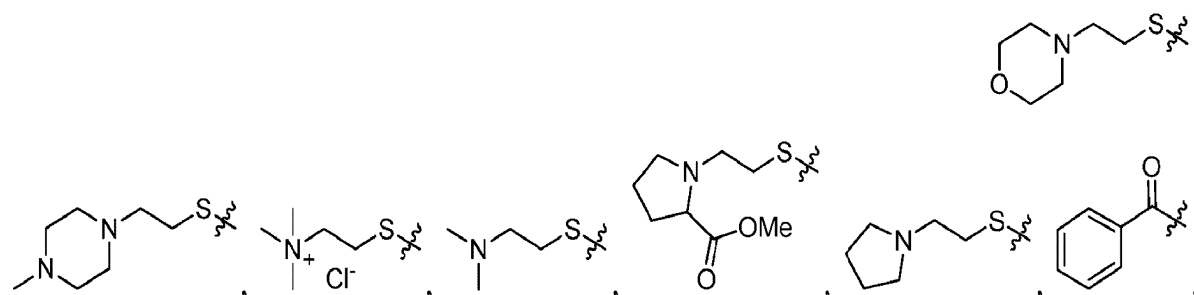
30

である。

【0417】

いくつかの実施形態において、Xは、-O-または-S-であり、および R^1 は、

【化115】



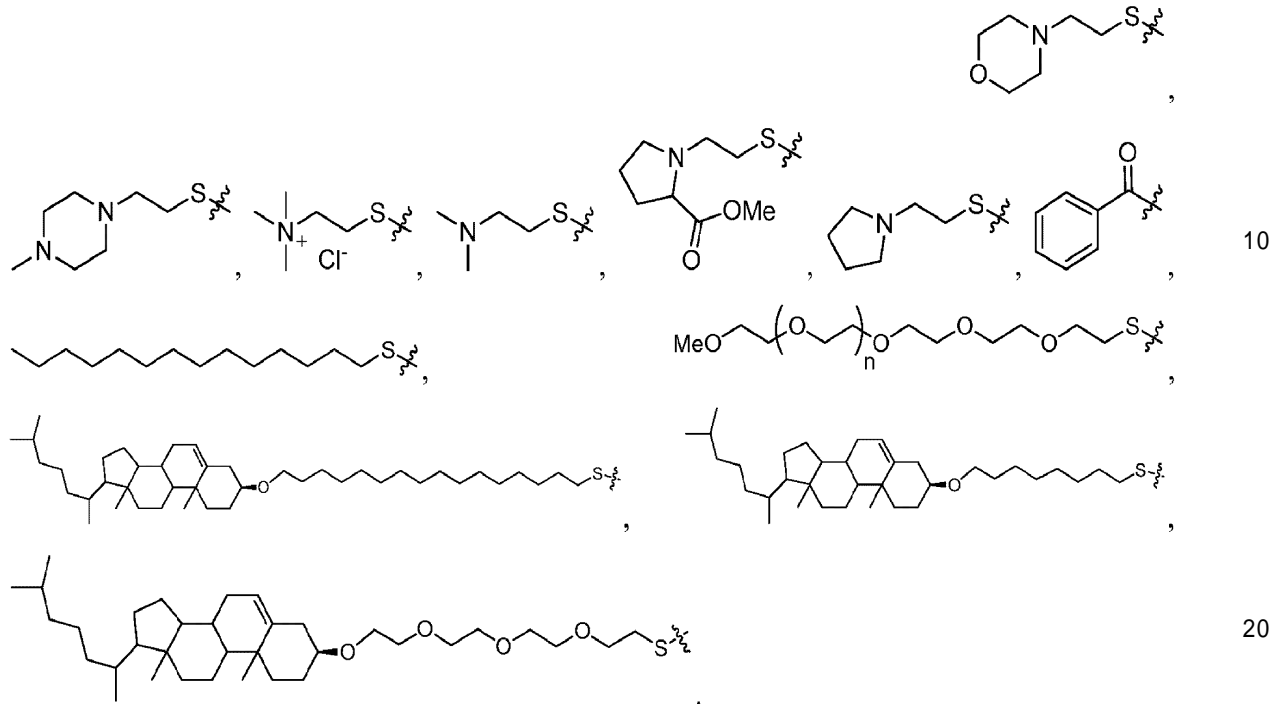
40

または -S- ($C_1 \sim C_{10}$ 脂肪族) である。

50

【0418】

いくつかの実施形態において、Xは、-O-または-S-であり、およびR¹は、
【化116】



-S- (C₁ ~ C₁₀ 脂肪族) または -S- (C₁ ~ C₅₀ 脂肪族) である。

【0419】

いくつかの実施形態において、Lは、共有結合であり、-L-R¹は、R¹である。

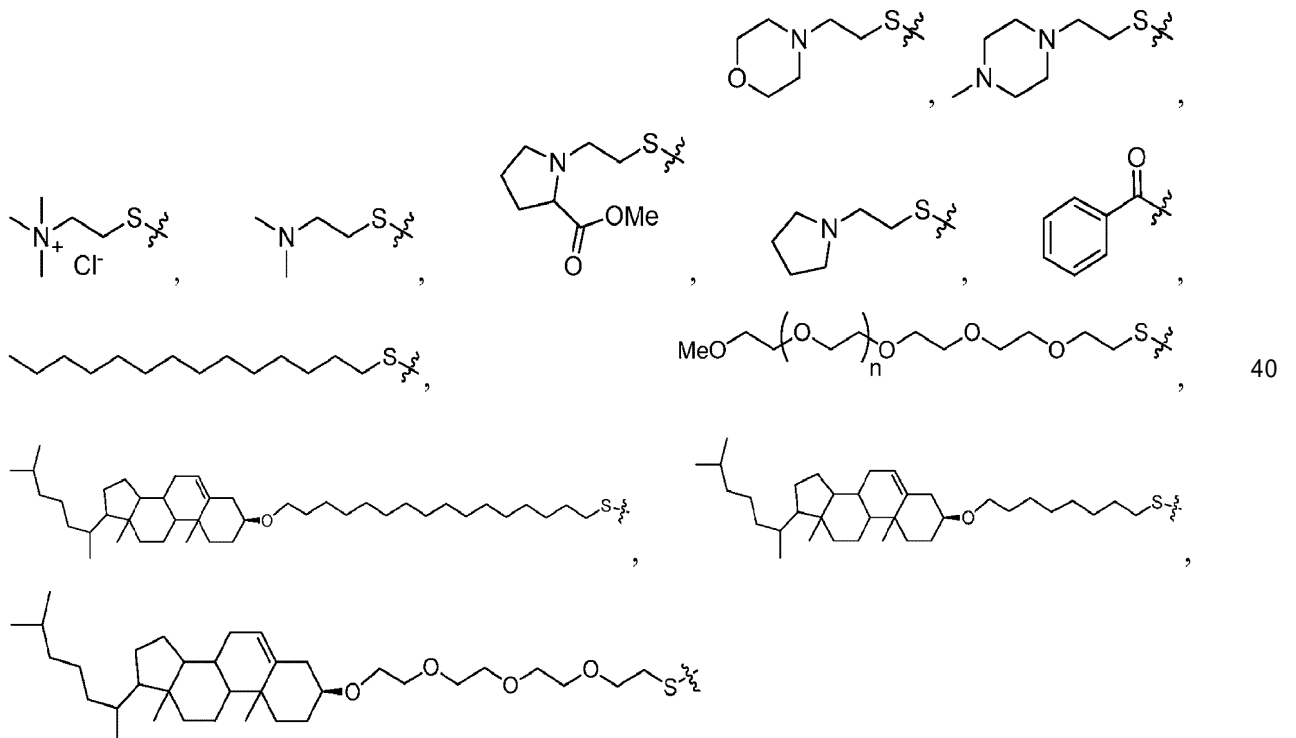
【0420】

いくつかの実施形態において、-L-R¹は、水素以外である。

【0421】

いくつかの実施形態において、-X-L-R¹は、R¹は、

【化117】

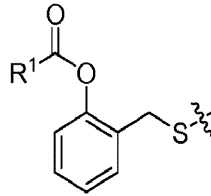


、 - S - (C₁ ~ C₁₀ 脂肪族) または - S - (C₁ ~ C₅₀ 脂肪族) である。

【 0 4 2 2 】

いくつかの実施形態において、 - X - L - R¹ は、

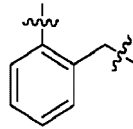
【 化 1 1 8 】



10

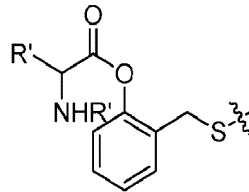
の構造を有し、部分

【 化 1 1 9 】



は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、 - X - L - R¹ は、

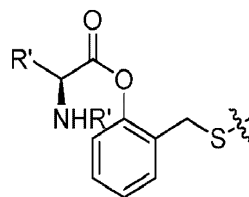
【 化 1 2 0 】



20

である。いくつかの実施形態において、 - X - L - R¹ は、

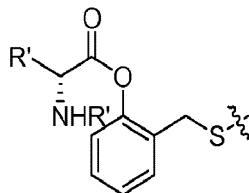
【 化 1 2 1 】



30

である。いくつかの実施形態において、 - X - L - R¹ は、

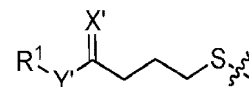
【 化 1 2 2 】



40

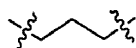
である。いくつかの実施形態において、 - X - L - R¹ は、

【 化 1 2 3 】



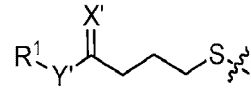
の構造を有し、 X ' は、 O または S であり、 Y ' は、 - O - であり、 - S - または - N R ' - であり、部分

【 化 1 2 4 】



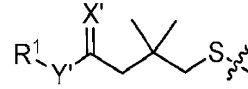
50

は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、Y' は、- O - であり、- S - または - NH - である。いくつかの実施形態において、
【化 1 2 5】



は、

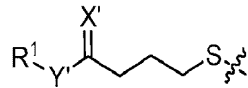
【化 1 2 6】



10

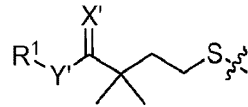
である。いくつかの実施形態において、

【化 1 2 7】



は、

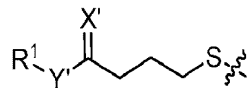
【化 1 2 8】



20

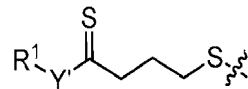
である。いくつかの実施形態において、

【化 1 2 9】



は、

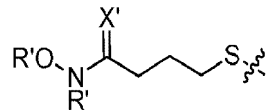
【化 1 3 0】



30

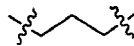
である。いくつかの実施形態において、- X - L - R¹ は、

【化 1 3 1】



の構造を有し、X' は、O または S であり、部分

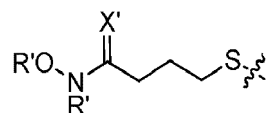
【化 1 3 2】



40

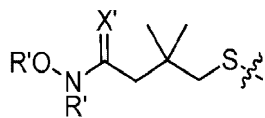
は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、

【化 1 3 3】



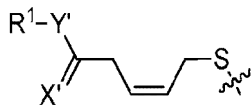
は、

【化134】



である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

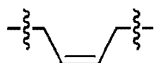
【化135】



10

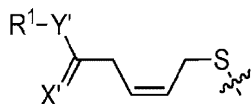
であり、

【化136】



は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

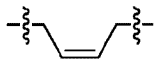
【化137】



20

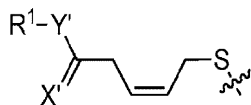
であり、

【化138】



は、置換される。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

【化139】



30

であり、

【化140】

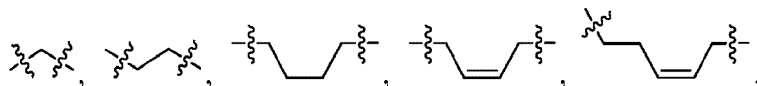


は、非置換である。

【0423】

いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、 $R^1-C(O)-S-L^x-S-$ であり、 L^x は、置換されていてもよい基

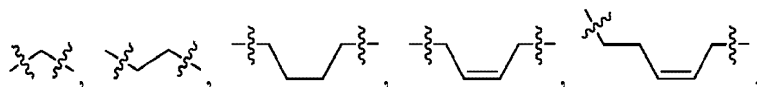
【化141】



40

から選択される。いくつかの実施形態において、 L^x は、

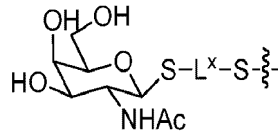
【化142】



である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、 $(CH_3)_3C-S-S-L^x-S-$ である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、 $R^1-C(=X')-Y'-C(R)_2-S-L^x-S-$ である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、 $R-C(=X')-Y'-CH_2-S-L^x-S-$ である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

50

【化143】



である。

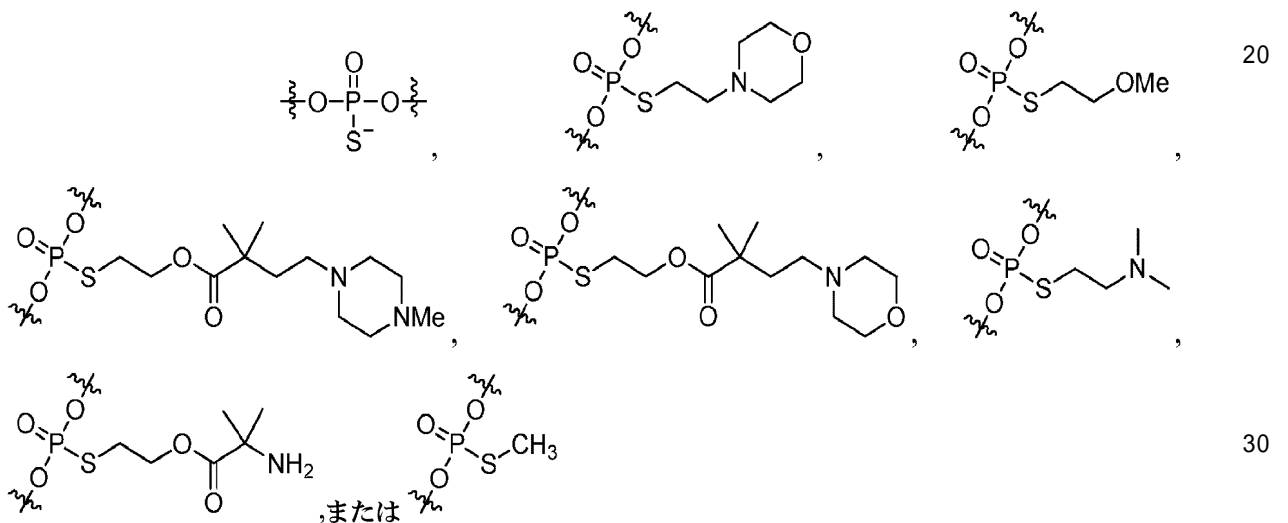
【0424】

技術分野の当業者によって理解されるように、ここに記載した - X - L - R¹ 基の多くは、切断可能で、対象に対して投与を行った後に、- X⁻へ変換可能である。いくつかの実施形態において、- X - L - R¹ は、切断可能である。いくつかの実施形態において、
10
- X - L - R¹ は、- S - L - R¹ であり、対象に対して投与を行った後に - S⁻へ変換される。いくつかの実施形態において、対象の酵素により変換が促される。技術分野の当業者によって理解されるように、- S - L - R¹ 基は、投与後に - S⁻に変換されることは、技術分野において公知であり、薬物代謝や薬物動態の研究に用いられるものを含め、実践されている。

【0425】

いくつかの実施形態において、式 I の構造を有するインターヌクレオチド結合は、

【化144】

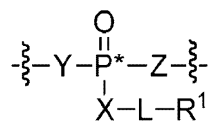


である。

【0426】

いくつかの実施形態において、式 I のインターヌクレオチド結合は、式 I - a の構造：

【化145】



(I-a)

を有する。

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0427】

いくつかの実施形態において、式 I のインターヌクレオチド結合は、式 I - b の構造：

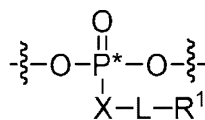
10

20

30

40

【化146】



(I-b)

を有し、

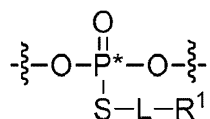
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0428】

いくつかの実施形態において、式Iのインターヌクレオチド結合は、式I-c:

10

【化147】



(I-c)

の構造を有するホスホロチオエートトリエステル結合であり、

ここで、P*は、不斉リン原子であり、R_pまたはS_pのいずれかであり；

Lは、共有結合または任意に置換され、直鎖または分岐のC₁~C₁₀アルキレンであり、ここでLの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換され；

20

R¹は、ハロゲン、R、または置換されていてもよいC₁~C₅₀脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、-C-C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または-C(O)O-により任意におよび独立して置換され；

30

各R'は、独立して-R、-C(O)R、-CO₂R、もしくは-SO₂Rであるか、または：

同じ窒素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテロ環式、もしくはヘテロアリアル環を形成するか、または

同じ炭素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいアリアル、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリアル環を形成し；

40

-Cy-は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい2価の環であり；

各Rは、独立して水素であるか、または、C₁~C₆脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリアル、ヘテロアリアル、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基であり；および

各

【化148】



は、独立してヌクレオシドとの結合を表し；

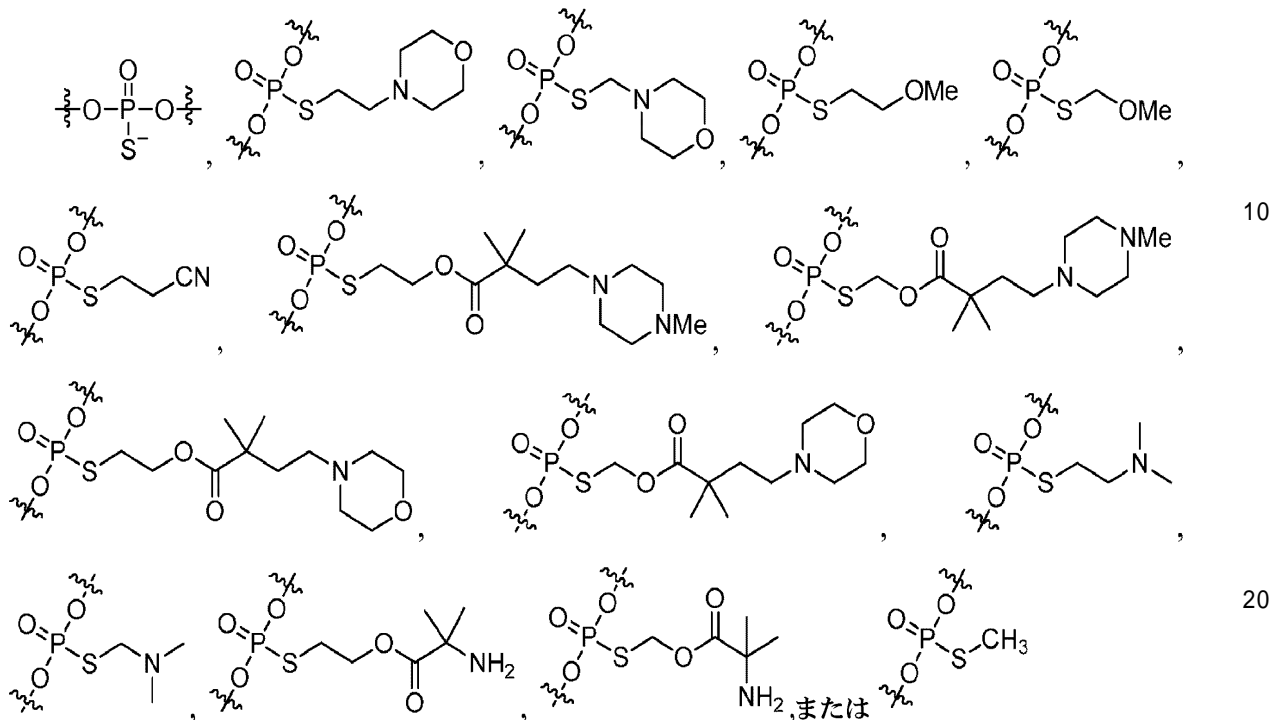
50

R¹ は、L が共有結合のとき、-H 以外である。

【0429】

いくつかの実施形態において、式 I の構造を有するインターヌクレオチド結合は、

【化149】

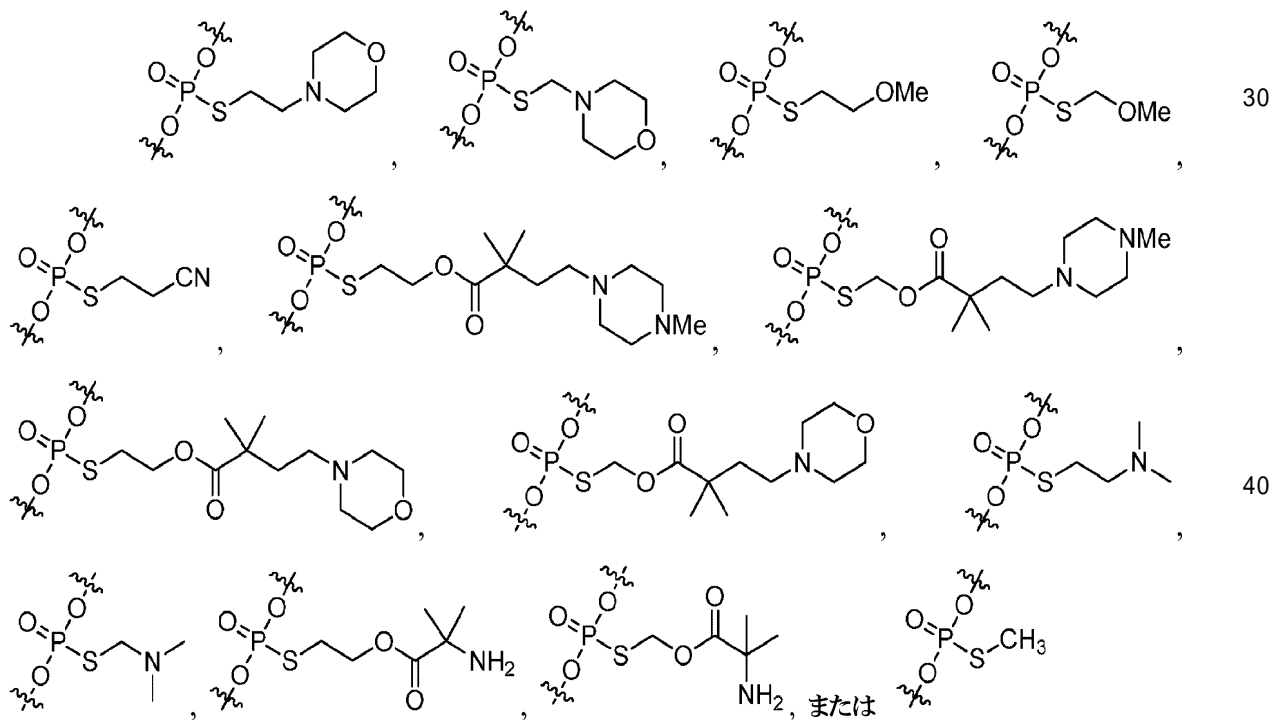


である。

【0430】

いくつかの実施形態において、式 I - c の構造を有するインターヌクレオチド結合は、

【化150】



である。

【0431】

いくつかの実施形態において、本発明は、1以上のリン酸ジエステル結合、および式 I - a、I - b、または I - c を有する1以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含

むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。

【0432】

いくつかの実施形態において、本発明は、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合、および式I - cの構造を有する少なくとも1個のホスホロチオエートトリエステル結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合、および式I - cの構造を有する少なくとも2個のホスホロチオエートトリエステル結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合、および式I - cの構造を有する少なくとも3個のホスホロチオエートトリエステル結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合、および式I - cの構造を有する少なくとも4個のホスホロチオエートトリエステル結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合、および式I - cの構造を有する少なくとも5個のホスホロチオエートトリエステル結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。

10

【0433】

いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCと50%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCと60%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCと70%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCと80%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCと90%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCと95%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。

20

30

40

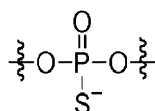
【0434】

いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、キラル結合したリン酸を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式Iの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、式Iの構造を有する。いくつかの実施形態におい

50

て、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C に示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式 I - c の構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C に示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、式 I - c の構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C に示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

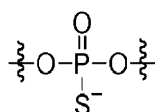
【化 1 5 1】



10

である。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C に示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、

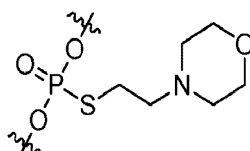
【化 1 5 2】



20

である。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C に示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

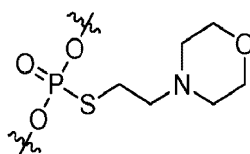
【化 1 5 3】



30

である。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C に示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、

【化 1 5 4】



である。

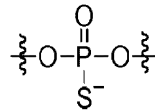
40

【0 4 3 5】

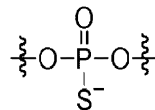
いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、キラル結合したリン酸を有する。本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式 I の構造を有する。本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、各インターヌクレオチド結合は、式 I の構造を有する。本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式 I - c の構造を有する。本発明は、G C C T

50

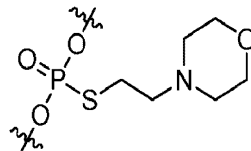
CAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、各インターヌクレオチド結合は、式I-cの構造を有する。本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、
【化155】



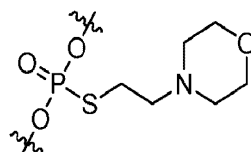
である。本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、各インターヌクレオチド結合は、
【化156】



である。本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、
【化157】



である。本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、各インターヌクレオチド結合は、
【化158】

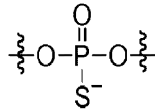


である。

【0436】

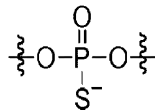
いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、キラル結合したリン酸を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式Iの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、式I-cの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式I-cの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTCGCACCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

【化 1 5 9】



である。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、

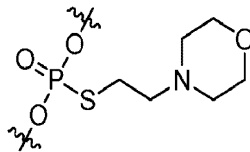
【化 1 6 0】



10

である。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

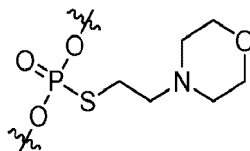
【化 1 6 1】



20

である。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、

【化 1 6 2】



30

である。

【0 4 3 7】

いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの結合したリン酸は、R_pである。ある特定の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、RNA配列を含み、各Tは、独立してかつ任意にUと置換されることは、技術分野の当業者により理解される。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、結合したリン酸のそれぞれは、R_pである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの結合したリン酸は、S_pである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、結合したリン酸のそれぞれは、S_pである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ブロックマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド

40

50

を提供し、オリゴヌクレオチドは、P - 修飾ブロックマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、結合ブロックマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、アルトマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、P - 修飾アルトマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、結合アルトマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ユニマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ステレオユニマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、P - 修飾ユニマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、結合ユニマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、スキップマーである。

【 0 4 3 8 】

いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各シトシンは、任意におよび独立して5 - メチルシトシンに置換される。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つのシトシンは、任意におよび独立して5 - メチルシトシンに置換される。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各シトシンは、任意におよび独立して5 - メチルシトシンに置換される。

【 0 4 3 9 】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1以上のヌクレオチドが、ある特定状況下においてオートリリースしやすいリン酸修飾を含むように設計されている。つまり、ある条件下において、特定のリン修飾が、オリゴヌクレオチドから自力で切断し、天然のDNAおよびRNA内に見られる、例えば、リン酸ジエステルを得るように設計される。いくつかの実施形態において、そのようなリン酸修飾は、- O - L - R¹の構造を有し、LおよびR¹のそれぞれは、は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、オートリリース基は、モルホリノ基を含む。いくつかの実施形態において、オートリリース基は、インターヌクレオチドのリン酸リンカーに薬剤を送達する能力を特徴としており、薬剤は、例えば、脱硫などで、リン原子の修飾を促進する。いくつかの実施形態において、薬剤は、水であり、加水分解により更に修飾され、天然のDNAおよびRNAに見られるリン酸ジエステルを形成する。

【 0 4 4 0 】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、得られる薬剤

10

20

30

40

50

の性質がリン酸での1以上の特定の修飾を通じて改善されるように設計されている。あるオリゴヌクレオチドがヌクレアーゼにより急速に分解され、細胞膜を通じた細胞の取り込みが低下することは、当該技術分野において、多くの文書に記載されている(Poijarvi-Virta et al., Curr. Med. Chem. (2006), 13(28):3441-65; Wagner et al., Med. Res. Rev. (2000), 20(6):417-51; Peyrottes et al., Mini Rev. Med. Chem. (2004), 4(4):395-408; Gosselin et al., (1996), 43(1):196-208; Bologna et al., (2002), Antisense & Nucleic Acid Drug Development 12:33-41)。例えば、Vives̄(Nucleic Acids Research (1999), 27(20):4071-76)は、親オリゴヌクレオチドと比較すると、tert-ブチルSATEプロ-オリゴヌクレオチドの細胞透過性が著しく上昇することを示したことを発見した。

10

【0441】

いくつかの実施形態において、結合したリン酸おける修飾は、天然のDNAおよびRNAに存在するようなリン酸ジエステルへ変換される能力を特徴としており、1以上のエステラーゼ、ヌクレアーゼ、および/またはシトクロムP450酵素、下記の表3に列挙するものにより変換されるが、これらに限定されるものではない。

例示的な酵素

20

【表2】

ファミリー	遺伝子
-------	-----

CYP1	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1	
CYP2	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1	
CYP3	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43	10
CYP4	CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1	
CYP5	CYP5A1	
CYP7	CYP7A1, CYP7B1	20
CYP8	CYP8A1 (prostacyclin synthase), CYP8B1 (bile acid biosynthesis)	
CYP11	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2	
CYP17	CYP17A1	
CYP19	CYP19A1	30
CYP20	CYP20A1	
CYP21	CYP21A2	
CYP24	CYP24A1	
CYP26	CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1	
CYP27	CYP27A1 (bile acid biosynthesis), CYP27B1 (vitamin D3 1-alpha hydroxylase, activates vitamin D3), CYP27C1 (unknown function)	40
CYP39	CYP39A1	
CYP46	CYP46A1	
CYP51	CYP51A1 (lanosterol 14-alpha demethylase)	50

【0442】

いくつかの実施形態において、リン酸における修飾が、プロドラッグとして機能することを特徴とするP-修飾部分になり、例えば、P-修飾部分は、オリゴヌクレオチドを除去する前に所望の位置へ送達しやすくする。例えば、いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、結合したリン酸でのペグ化によるものである。関連技術の当業者は、さまざまなPEG鎖の長さが有用であり、鎖の長さの選択は、一部は、ペグ化により実現しようとする結果によって決定されることを理解するであろう。例えば、いくつかの実施形態において、ペグ化は、RES取り込みを少なくし、オリゴヌクレオチドのインビボでの循環寿命を延ばす効果がある。

【0443】

いくつかの実施形態において、本発明によるペグ化に用いる試薬は、分子量が約300g/mol～約100,000g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約300g/mol～約10,000g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約300g/mol～約5,000g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約500g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約1000g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約3000g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約5000g/molである。

【0444】

ある特定の実施形態において、ペグ化に用いる試薬は、PEG500である。ある特定の実施形態において、ペグ化に用いる試薬は、PEG1000である。ある特定の実施形態において、ペグ化に用いる試薬は、PEG3000である。ある特定の実施形態において、ペグ化に用いる試薬は、PEG5000である。

【0445】

いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、例えば、脂質、PEG化脂質などのPKエンハンサーとして機能することを特徴とする。

【0446】

いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、膜破壊脂質またはペプチドなどの細胞への侵入および/またはエンドソームの回避を促進する薬剤として機能することを特徴とする。

【0447】

いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、標的薬剤として機能することを特徴とする。いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、標的薬剤である、または標的薬剤を含む。ここでの「標的薬剤」という用語は、対象のペイロードと関連するものであり（例えば、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド組成物と関連）、また対象の標的部位と相互に作用する。そのため、確認されるより、または対象のペイロードが標的薬剤と関連していない場合の同等の状況下よりも、実質的により多くの標的薬剤と関連するとき、対象のペイロードが対象の標的部位を標的にする。標的薬剤は、例えば、小分子部分、核酸、ポリペプチド、炭水化物など種々の化学的部分のいずれかであってもよい、またはこれらを含む。標的薬剤は、さらにAdarsh et al., "Organelle Specific Targeted Drug Delivery - A Review," International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2011, p. 895に記載される。

【0448】

例示的なそのような標的薬剤には、限定するものではないが、タンパク質（例えば、トランスフェリン）、オリゴペプチド（例えば、環式および非環式のRGD含有オリゴペプチド）、抗体（単クローン抗体および多クローン性抗体、例えば、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE抗体）、糖/炭水化物（例えば、単糖および/またはオリゴ糖（マン

10

20

30

40

50

ノース、マンノース - 6 - リン酸、ガラクトースなど)、ビタミン(例えば、葉酸)、または別の小生体分子が含まれる。いくつかの実施形態において、標的部分は、ステロイド分子である(例えば、コール酸、デオキシコール酸、デヒドロコール酸を含む胆汁酸; コルチゾン; ジゴキシゲニン; テストステロン; コレステロール; コルチゾン環の3位での二重結合を通じて結合するトリメチルアミノメチルヒドラジド基を有するコルチゾンなどのカチオン性ステロイドなど)。いくつかの実施形態において、標的部分は、脂溶性分子(例えば、脂環式炭化水素、飽和および不飽和脂肪酸、ワックス、テルペン、およびエナメル質およびバックミンスターフラレンなどの多脂環式炭化水素)である。いくつかの実施形態において、脂溶性分子は、ビタミンA, レチノイン酸、レチナール、またはデヒドロレチナールなどのテルペノイドである。いくつかの実施形態において、標的部分は、

10

【0449】

いくつかの実施形態において、P - 修飾部分は、式 - - X - L - R¹ で示される標的薬剤であり、X、L、およびR¹のそれぞれは、上記の式Iに定義のとおりである。

【0450】

いくつかの実施形態において、P - 修飾部分は、細胞の特異的送達を容易にすることを特徴とする。

【0451】

いくつかの実施形態において、P - 修飾部分は、上記記載の1以上のカテゴリーに含まれることを特徴とする。例えば、いくつかの実施形態において、P - 修飾部分は、PKエンハンサーおよび標的リガンドとして機能する。いくつかの実施形態において、P - 修飾部分は、プロドラッグおよびエンドソーム回避剤として機能する。関連技術の当業者であれば、本発明により、そのような組み合わせが他にも数多く可能であり、企図されることを理解するであろう。

20

【0452】

核酸塩基

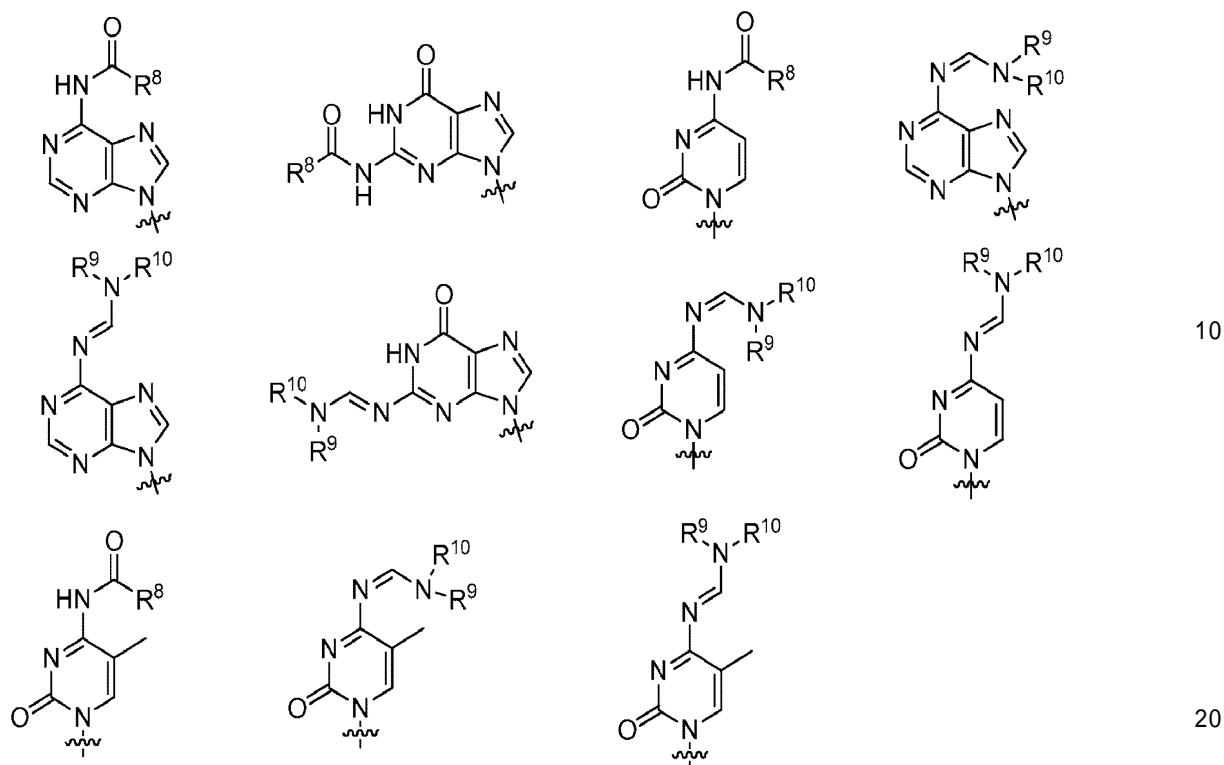
いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドに存在する核酸塩基は、自然の核酸塩基である、または自然の核酸塩基に由来する修飾された核酸塩基である。例としては、限定するものではないが、それぞれのアミノ基がアシル保護基により保護されているウラシル、チミン、アデニン、シトシン、およびグアニン、2 - フルオロウラシル、2 - フルオロシトシン、5 - プロモウラシル、5 - ヨードウラシル、2, 6 - ジアミノプリン、アザシトシン、疑似イソシトシンや疑似ウラシルなどのピリミジン類似体、および8 - 置換プリン、キサントシン、またはヒポキサントシンなどの別の修飾された核酸塩基が挙げられる(最後の2つは、自然分解生成物)。例示的な修飾された核酸塩基は、Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196 and Revankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313に開示される。

30

【0453】

以下の一般式で表される化合物もまた、修飾された核酸塩基として企図される:

【化163】



ここで、R⁸は、置換されていてもよい、脂肪族、アリール、アラルキル、アリーロキシアルキル、カルボシクリル、1～15個の炭素原子を有するヘテロシクリルまたはヘテロアリール基から選択される直鎖または分岐の基であり、例にすぎないが、メチル、イソプロピル、フェニル、ベンジル、またはフェノキシメチル基が含まれ；およびR⁹ならびにR¹⁰のそれぞれは、独立して直鎖または分岐の脂肪族、カルボシクリル、アリール、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールから選択される置換されていてもよい基である。

【0454】

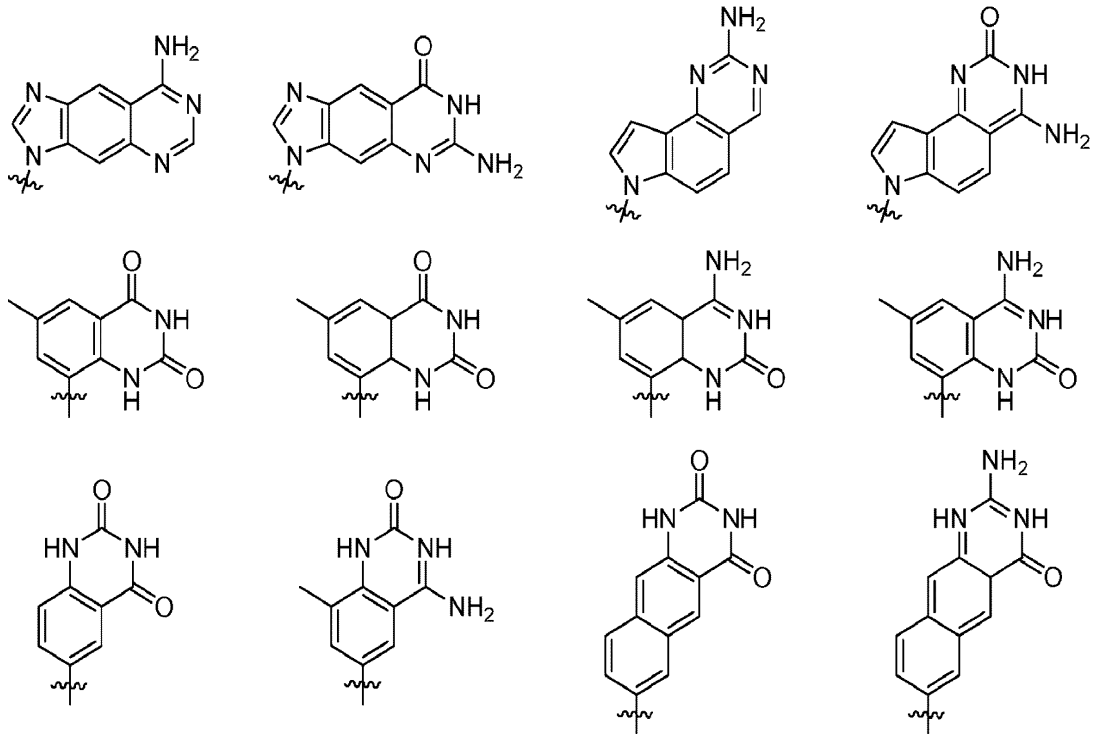
修飾された核酸塩基には、例えばフェニル環などの1以上のアリール環が加えられた、拡大された大きさの核酸塩基も含まれる。核塩基の置換は、the Glen Research catalog (www.glenresearch.com); Krueger AT et al, Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A., et al., Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627に記載され、本明細書中に記載される核酸の合成に有用であると考えられる。拡大された大きさの核酸塩基のいくつかの例は、下記の通りである。

10

20

30

【化164】



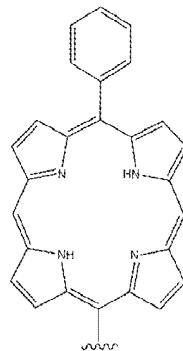
10

20

【0455】

ここで、修飾された核酸塩基は、核酸塩基とは見做されない構造も含有されるが、例えば、限定するものではないが、コリンまたはポルフィリン誘導環のような別の部分である。ポルフィリン誘導塩基置換は、Morales-Rojas, H and Kool, ET, Org. Lett., 2002, 4, 4377-4380に記載されている。塩基置換として使用されるポルフィリン誘導環の一例を以下に示す：

【化165】



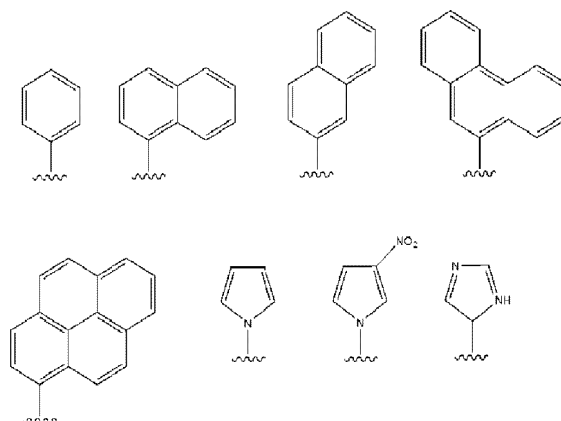
30

【0456】

いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、以下の構造のいずれかであり、置換されていてもよい：

40

【化166】

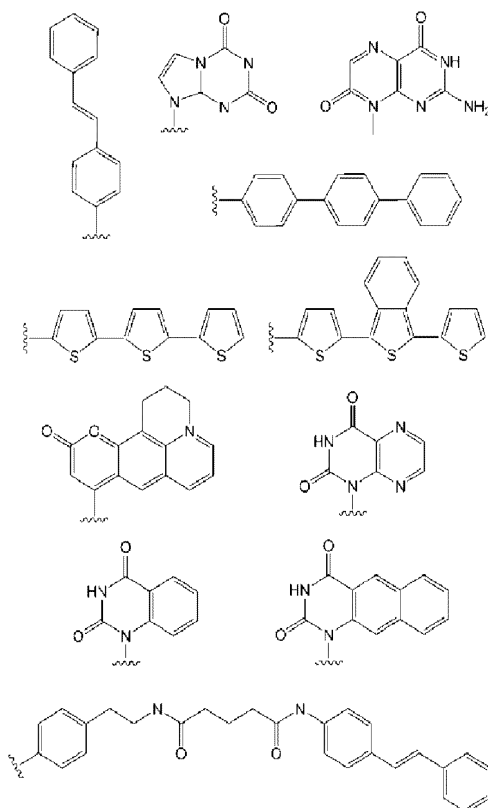


10

【0457】

いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、蛍光性である。そのような蛍光性の例示的な修飾された核酸塩基には、以下に示すフェナントレン、ピレン、スチルベン、イソキサントシン、イソザントプテリン (isozanthopterin)、テルフェニル、テルチオフエン、ベンゾテルチオフエン、クマリン、ルマジン、テザースチルベン、ベンゾ-ウラシル、およびナフト-ウラシルが含まれる：

【化167】



20

30

40

【0458】

いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、非置換である。いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、置換される。いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、例えば、ヘテロ原子、アルキル基、または蛍光部分に結合された結合部分、ビオチンもしくはアビジン部分、または別のタンパク質もしくはペプチドを含むように置換される。いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、最も古典的な意味では核酸塩基ではないが、核酸塩基と同様に機能する「ユニバーサル塩基」である。そのようなユニバーサル塩基の代表的な一例は、3-ニトロピロールである。

50

【0459】

いくつかの実施形態において、別のヌクレオシドもまた本明細書中に開示されるプロセスにおいて使用することができ、修飾された核酸塩基、または修飾された糖と共有結合する核酸塩基を組み込んだヌクレオシドを含む。修飾された核酸塩基を組み込むヌクレオシドのいくつかの例には、4 - アセチルシチジン；5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン；2 - O - メチルシチジン；5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン；5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン；ジヒドロウリジン；2 - O - メチルプソイドウリジン；ベータD - ガラクトシルキューオシン (beta,D-galactosylqueosine)；2 - O - メチルグアノシン；N⁶ - イソペンテニルアデノシン；1 - メチルアデノシン；1 - メチルプソイドウリジン；1 - メチルグアノシン；1 - メチルイノシン；2, 2 - ジメチルグアノシン；2 - メチルアデノシン；2 - メチルグアノシン；N⁷ - メチルグアノシン；3 - メチル - シチジン；5 - メチルシチジン；5 - ヒドロキシメチルシチジン；5 - ホルミルシトシン；5 - カルボキシルシトシン；N⁶ - メチルアデノシン；7 - メチルグアノシン；5 - メチルアミノエチルウリジン；5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウリジン；ベータD - マンノシルキューオシン (beta,D-mannosylqueosine)；5 - メトキシカルボニルメチルウリジン；5 - メトキシウリジン；2 - メチルチオ - N⁶ - イソペンテニルアデノシン；N - ((9 - ベータDリボフラノシル - 2 - メチルチオプリン - 6 - イル) カルバモイル) トレオニン；N - ((9 - ベータDリボフラノシルプリン - 6 - イル) - N - メチルカルバモイル) トレオニン；ウリジン - 5 - オキシ酢酸メチルエステル；ウリジン - 5 - オキシ酢酸 (v)；プソイドウリジン；キューオシン (queosine)；2 - チオシチジン；5 - メチル - 2 - チオウリジン；2 - チオウリジン；4 - チオウリジン；5 - メチルウリジン；2 - O - メチル - 5 - メチルウリジン；および 2 - O - メチルウリジンである。

10

20

【0460】

いくつかの実施形態において、ヌクレオシドは、6 位に (R) または (S) のいずれかのキラリティーを有する 6 - 修飾 2 環式ヌクレオシド類似体を含み、米国特許第 7, 399, 845 号に記載される類似体を含む。別の実施形態において、ヌクレオシドは、5 位に (R) または (S) のいずれかのキラリティーを有する 5 - 修飾 2 環式ヌクレオシド類似体を含み、米国特許出願公開第 20070287831 号に記載される類似体を含む。

30

【0461】

いくつかの実施形態において、核酸塩基または修飾された核酸塩基は、例えば、抗体、抗体フラグメント、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、受容体リガンド、またはキレート部分などの 1 以上の生体分子結合部分を含む。別の実施形態において、核酸塩基または修飾された核酸塩基は、5 - プロモウラシル、5 - ヨードウラシル、または 2, 6 - ジアミノプリンである。いくつかの実施形態において、核酸塩基または修飾された核酸塩基は、蛍光または生体分子結合部分の置換により修飾される。いくつかの実施形態において、核酸塩基または修飾された核酸塩基上の置換基は、蛍光部分である。いくつかの実施形態において、核酸塩基上の置換基または修飾された核酸塩基は、ビオチンまたはアビジンである。

40

【0462】

上記の修飾された核酸塩基および別の修飾された核酸塩基のうちのある特定のものの作製について教示する代表的な米国特許は、限定するものではないが、上述の米国特許第 3, 687, 808 号、および米国特許第 4, 845, 205 号；第 5, 130, 30 号；第 5, 134, 066 号；第 5, 175, 273 号；第 5, 367, 066 号；第 5, 432, 272 号；第 5, 457, 187 号；第 5, 457, 191 号；第 5, 459, 255 号；第 5, 484, 908 号；第 5, 502, 177 号；第 5, 525, 711 号；第 5, 552, 540 号；第 5, 587, 469 号；5, 594, 121, 第 5, 596, 091 号；第 5, 614, 617 号；第 5, 681, 941 号；第 5, 750, 692 号；第 6, 015, 886 号；第 6, 147, 200 号；第 6, 166, 197 号；第 6, 222, 025 号；第 6, 235, 887 号；

50

第6,380,368号;第6,528,640号;第6,639,062号;第6,617,438号;第7,045,610号;第7,427,672号;および第7,495,088号、が挙げられ、これらは、そのまま本明細書に組み込まれるものとする。

【0463】

糖

最も一般的な天然のヌクレオチドは、核酸塩基、アデノシン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、およびチミン(T)またはウラシル(U)に結合したリボース糖から成る。また、ヌクレオチド内のリン酸基または結合したリン酸が、糖または修飾された糖のさまざまな位置に結合可能である修飾されたヌクレオチドが企図される。非制限的な例としては、リン酸基または結合したリン酸は、糖または修飾された糖の2、3、4または5ヒドロキシル部分に結合可能である。本明細書中で記載される修飾された核酸塩基を組み込むヌクレオチドもまたこの文脈で企図される。いくつかの実施形態において、保護されていない-OH部分を含むヌクレオチドまたは修飾されたヌクレオチドが、本発明の方法により使用される。

【0464】

別の修飾された糖もまた提供されるオリゴヌクレオチド内に組み込まれる。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、以下のうちの1つ: -F; -CF₃、-CN、-N₃、-NO、-NO₂、-OR'、-SR'、または-N(R')₂を2位に含む1以上の置換基を含み、ここで、各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである; -O-(C₁~C₁₀アルキル)、-S-(C₁~C₁₀アルキル)、-NH-(C₁~C₁₀アルキル)、または-N(C₁~C₁₀アルキル)₂; -O-(C₂-C₁₀アルケニル)、-S-(C₂-C₁₀アルケニル)、-NH-(C₂-C₁₀アルケニル)、または-N(C₂-C₁₀アルケニル)₂; -O-(C₂-C₁₀アルキニル)、-S-(C₂-C₁₀アルキニル)、-NH-(C₂-C₁₀アルキニル)、または-N(C₂-C₁₀アルキニル)₂; または-O-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-(C₁~C₁₀アルキル)もしくは-O-(C₁~C₁₀アルキレン)-NH-(C₁~C₁₀アルキル)₂、-NH-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-(C₁~C₁₀アルキル)、または-N(C₁~C₁₀アルキル)-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-(C₁~C₁₀アルキル)、ここで、アルキル、アルキレン、アルケニルおよびアルキニルは、置換若しくは非置換であってよい。置換基の例としては、限定するものではないが、-O(CH₂)_nOCH₃および-O(CH₂)_nNH₂が挙げられ、ここで、nは、1から約10であり、MOE、DMAOE、DMAEOEが挙げられる。また、ここで企図されるものは、国際公開第2001/088198号;およびMartin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504に記載される修飾された糖である。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、置換されたシリル基、RNA切断基、レポーター基、蛍光標識、インターカレーター、核酸の薬物動態性を向上させる基、核酸の薬力学的性質を向上させる基、または同様の性質を持つ別の置換基から選択される1以上の基を含む。いくつかの実施形態において、3'-末端ヌクレオチドの糖の3位または5'-末端ヌクレオチドの5位を含む、糖または修飾された糖の2、3、4、5、または6位の1以上で修飾が行われる。

【0465】

いくつかの実施形態において、リボースの2'-OHは、以下: -H、-F; -CF₃、-CN、-N₃、-NO、-NO₂、-OR'、-SR'、または-N(R')₂の1つを含む置換基と置換され、ここで、各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである; -O-(C₁~C₁₀アルキル)、-S-(C₁~C₁₀アルキル)、-NH-(C₁~C₁₀アルキル)、または-N(C₁~C₁₀アルキル)₂; -O-(C₂-C₁₀アルケニル)、-S-(C₂-C₁₀アルケニル)、-NH-(C₂-C₁₀アルケニル)、または-N(C₂-C₁₀アルケニル)₂; -O-(C₂-C₁₀アルキニル)、-S-(C₂-C₁₀アルキニル)、-NH

- (C₂ - C₁₀ アルキニル)、または - N (C₂ - C₁₀ アルキニル)₂; または - O - (C₁ ~ C₁₀ アルキレン) - O - (C₁ ~ C₁₀ アルキル)、 - O - (C₁ ~ C₁₀ アルキレン) - NH - (C₁ ~ C₁₀ アルキル) もしくは - O - (C₁ ~ C₁₀ アルキレン) - NH (C₁ ~ C₁₀ アルキル)₂、 - NH - (C₁ ~ C₁₀ アルキレン) - O - (C₁ ~ C₁₀ アルキル)、または - N (C₁ ~ C₁₀ アルキル) - (C₁ ~ C₁₀ アルキレン) - O - (C₁ ~ C₁₀ アルキル)、ここで、アルキル、アルキレン、アルケニルおよびアルキニルは、置換若しくは非置換であってよい。いくつかの実施形態において、2' - OH は、- H (デオキシリボース) により置換される。いくつかの実施形態において、2' - OH は、- F により置換される。いくつかの実施形態において、2' - OH は、- OR' により置換される。いくつかの実施形態において、2' - OH は、- OMe により置換される。いくつかの実施形態において、2' - OH は、- OCH₂CH₂OMe により置換される。

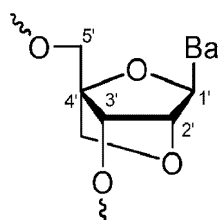
10

【0466】

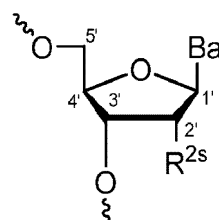
修飾糖は、ロックド核酸 (LNA) も含む。いくつかの実施形態において、糖炭素原子上の2つの置換基は、一緒になって二価部分を形成する。いくつかの実施形態において、2つの置換基は、2個の異なる糖炭素原子上にある。いくつかの実施形態において、形成された二価部分は、本明細書において定義される - L - の構造を有する。いくつかの実施形態において、- L - は、- O - CH₂ - であり、ここで、- CH₂ - は、置換されてもよい。いくつかの実施形態において、- L - は、- O - CH₂ - である。いくつかの実施形態において、- L - は、- O - CH (Et) - である。いくつかの実施形態において、- L - は、糖部分の C2 と C4 の間にある。いくつかの実施形態において、ロックド核酸は、以下に示す構造を有する。下の構造のロックド核酸を示しており、式中、Ba は、本明細書に記載の核酸塩基または修飾核酸塩基を表し、式中、R^{2s} は、- OCH₂C4' - である。

20

【化168】



≡

C2'OCH₂C4' = LNA (ロックド核酸)R^{2s} = OCH₂C4'

30

【0467】

いくつかの実施形態において、修飾された糖は、例えば、Sethet al., Jam Chem Soc. 2010 October 27; 132(42): 14942 - 14950 に記載されるような ENA である。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、XNA (ゼノ核酸) に見られるものであり、例えば、アラビノース、アンヒドロヘキシトール、トレオース、2'フルオロアラビノース、またはシクロヘキセンである。

【0468】

修飾された糖は、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチルまたはシクロペンチル部分のような糖の模倣物を含む。そのような修飾された糖の構造の調製を教示する代表的な米国特許は、限定するものではないが、米国特許第 4,981,957 号; 5,118,800 号; 5,319,080 号; および 5,359,044 号が挙げられる。企図されるいくつかの修飾された糖には、リボース環の酸素原子が、窒素、硫黄、セレン、または炭素で置換される糖が含まれる。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、修飾されたリボースであり、リボース環内の酸素原子は、窒素と置換され、窒素は、アルキル基 (例えば、メチル、エチル、イソプロピルなど) と置換されていてもよい。

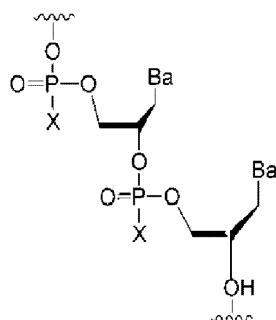
40

【0469】

修飾された糖の非限定的な例としては、グリセロール核酸 (GNA) 類似体を形成する

50

グリセロールを含む。GNA類似体の一例は、以下に示され、Zhang, R et al., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 5846-5847; Zhang L, et al., J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 4174-4175 and Tsai CH et al., PNAS, 2007, 14598-14603 ($X = O^-$)に記載される：
【化169】

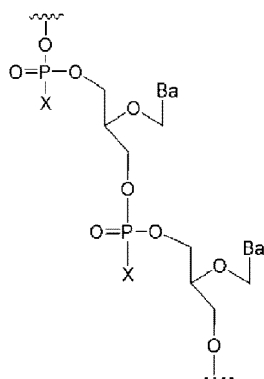


10

。 【0470】

GNA誘導類似体の別の例である、ホルミルグリセロールの混合アセタールアミナルに基づく柔軟性核酸(FNA)は、Joyce GF et al., PNAS, 1987, 84, 4398-4402およびHeuberger BD and Switzer C, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 412-413に記載され、以下の通りである：

【化170】



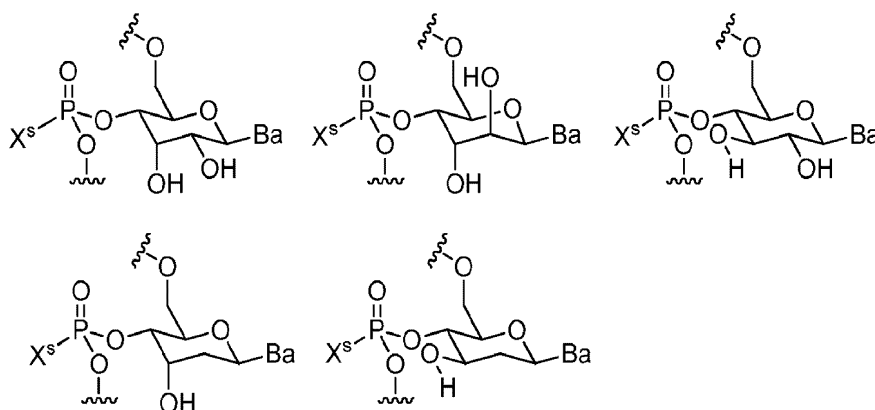
20

30

。 【0471】

修飾された糖のさらなる非限定的な例は、ヘキソピラノシル(6'~4')、ペントピラノシル(4'~2')、ペントピラノシル(4'~3')、またはテトロフラノシル(3'~2')糖が挙げられる。いくつかの実施形態において、ヘキソピラノシル(6'~4')糖は、次式：

【化171】



40

のいずれかが1つであり、

ここで、 X^s は、本明細書中に記載されるP-修飾基「-XLR¹」に対応し、Baは、

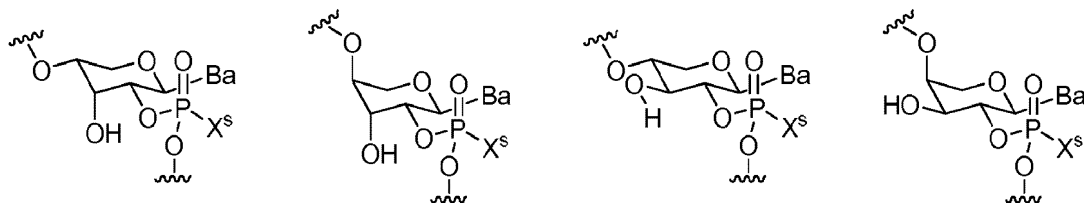
50

ここに定義するとおりである。

【0472】

いくつかの実施形態において、ペントピラノシル(4'~2')糖は、次式：

【化172】



10

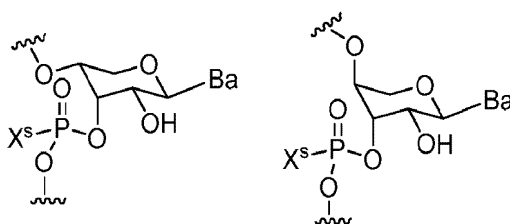
のいずれか1つであり、

ここで、 X^s は、本明細書中に記載されるP-修飾基「-XLR¹」に対応し、Baは、ここに定義するとおりである。

【0473】

いくつかの実施形態において、ペントピラノシル(4'~3')糖は、次式：

【化173】



20

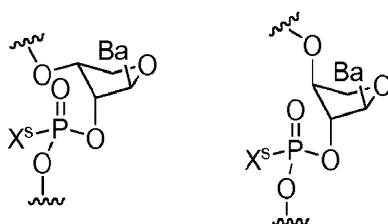
のいずれか1つであり、

ここで、 X^s は、本明細書中に記載されるP-修飾基「-XLR¹」に対応し、Baは、ここに定義するとおりである。

【0474】

いくつかの実施形態において、テトロフラノシル(3'~2')糖は、次式：

【化174】



30

のいずれかであり、

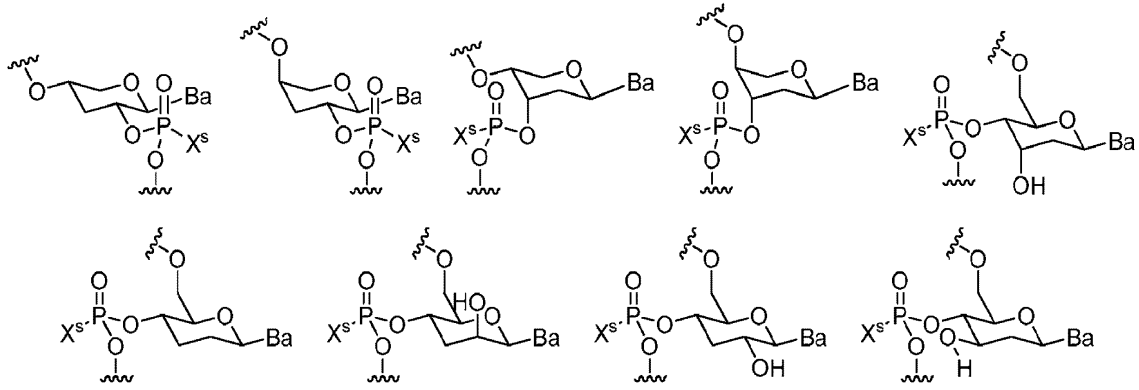
ここで、 X^s は、本明細書中に記載されるP-修飾基「-XLR¹」に対応し、Baは、ここに定義するとおりである。

【0475】

いくつかの実施形態において、修飾された糖は、次式：

40

【化 175】



10

のいずれか1つであり、

ここで、 X^s は、本明細書中に記載されるP-修飾基「 $-XLR^1$ 」に対応し、Baは、ここに定義するとおりである。

【0476】

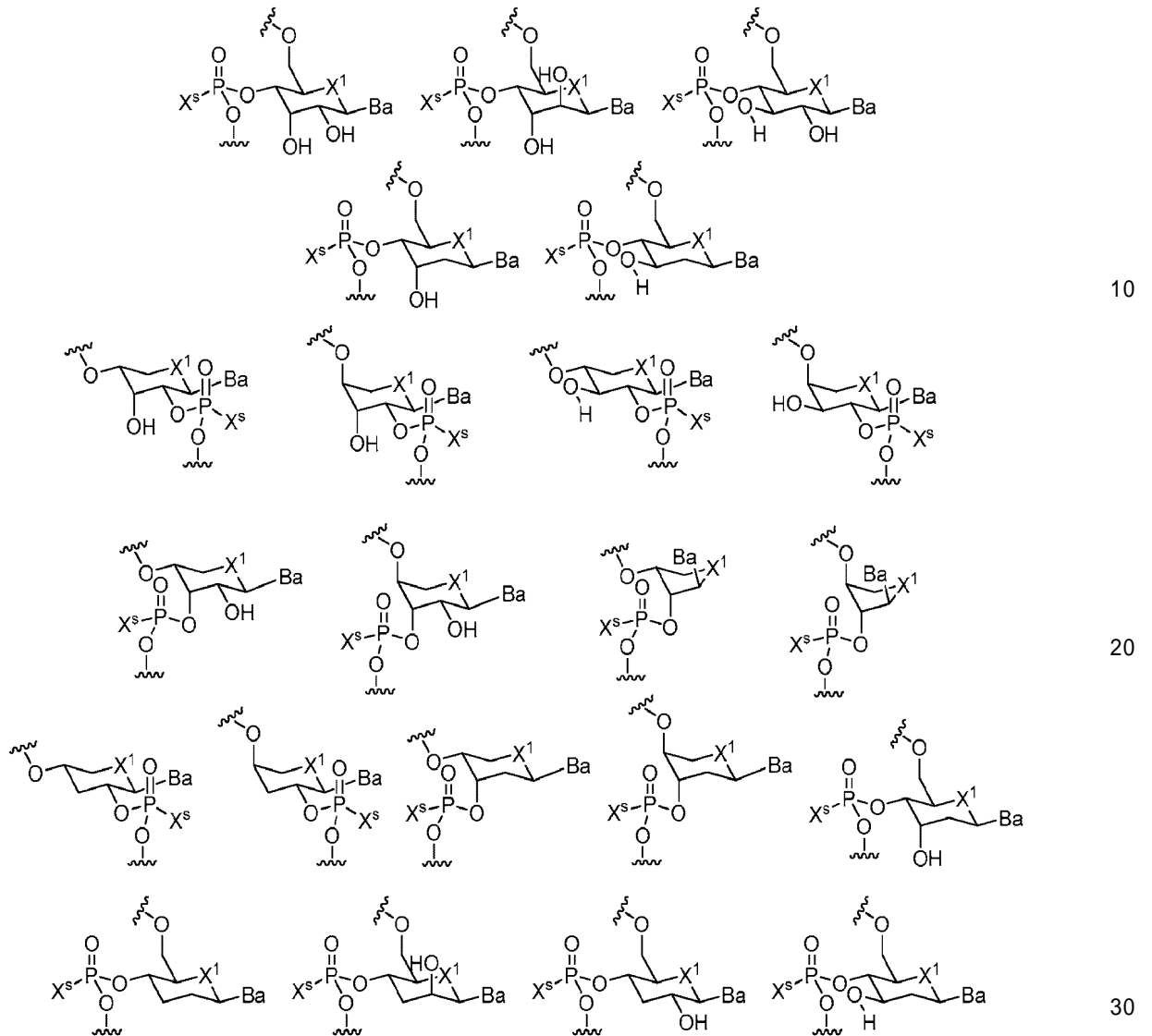
いくつかの実施形態において、糖部分の1以上のヒドロキシル基は、独立してハロゲン、 $R^1-N(R^1)_2$ 、 $-OR^1$ 、または $-SR^1$ で置換されていてもよく、各 R^1 は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0477】

いくつかの実施形態において、糖の模倣物は、以下に示されるとおりであり、 X^s は、本明細書中に記載されるP-修飾基「 $-XLR^1$ 」に対応し、Baは、ここに定義するとおりであり、 X^1 は、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NMe-$ 、 $-NEt-$ または $-NiPr-$ から選択される。

20

【化176】



【0478】

いくつかの実施形態において、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、またはそれ以上（例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上）（それらを含む）キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の糖が、修飾される。いくつかの実施形態において、プリン残留物のみが修飾される（例えば、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、またはそれ以上〔例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または以上〕のプリン残留物が修飾される）。いくつかの実施形態において、ピリミジン残留物のみが修飾される（例えば、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%

40

50

%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、またはそれ以上 [例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上] のピリジミン (pyridimine) 残留物が修飾される)。いくつかの実施形態において、プリンおよびピリミジン残留物の両方が修飾される。

【 0 4 7 9 】

修飾された糖および糖の模倣物は、公知の方法により調製可能であり、限定されるものではないが、A.Eschenmoser, Science(1999), 284:2118; M.Bohringer et al, Helv.Chim.Acta(1992), 75:1416-1477; M.Egli et al, J.Am.Chem.Soc.(2006), 128(33):10847-56; A.Eschenmoser in Chemical Synthesis: Gnosis to Prognosis, C.Chatgililoglu and V.Sniekus, Ed., (Kluwer Academic, Netherlands, 1996), p.293; K.-U.Schoning et al, Science(2000), 290:1347-1351; A.Eschenmoser et al, Helv.Chim.Acta(1992), 75:218; J.Hunziker et al, Helv.Chim.Acta(1993), 76:259; G.Otting et al, Helv.Chim.Acta(1993), 76:2701; K.Groebke et al, Helv.Chim.Acta(1998), 81:375; and A.Eschenmoser, Science(1999), 284:2118が含まれる。2' 修飾に対する修飾は、Verma, S. et al. Annu. Rev. Biochem. 1998, 67, 99-134 およびそれに記載されるすべての文献に記載される。リボースに対する具体的な修飾は、以下の文献に記載される: 2'-fluoro (Kawasaki et al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841), 2'-MOE (Martin, P. Helv. Chim. Acta 1996, 79, 1930-1938), "LNA" (Wengel, J. Acc. Chem. Res. 1999, 32, 301-310)。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、PCT 公開、国際公開第 2012/030683 号に記載されるいずれかであり、公報は、参照により、本明細書に組み込まれものとし、本出願の図 26 ~ 30 に記載される。

【 0 4 8 0 】

オリゴヌクレオチド

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物を提供する。例えば、いくつかの実施形態において、提供される組成物は、1以上の個々のオリゴヌクレオチドタイプの所定のレベルを含み、オリゴヌクレオチドタイプは、1) 塩基配列; 2) 骨格結合のパターン; 3) 骨格キラル中心のパターン; および 4) 骨格 P - 修飾のパターンにより定義される。

【 0 4 8 1 】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ユニマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、P - 修飾ユニマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオユニマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、Rp 配置のステレオユニマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、Sp 配置のステレオユニマーである。

【 0 4 8 2 】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アルトマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、P - 修飾アルトマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーである。

【 0 4 8 3 】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ブロックマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、P - 修飾ブロックマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーである。

【 0 4 8 4 】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。

【 0 4 8 5 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、スキップマーである。

【0486】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドはヘミマーである。いくつかの実施形態において、ヘミマーは、残りのオリゴヌクレオチドが持たない構造特徴を5'-末端または3'-末端が持つ配列を有するオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、5'-末端または3'-末端は、2~20個のヌクレオチドを有するか、または含む。いくつかの実施形態において、構造的特徴は、塩基修飾である。いくつかの実施形態において、構造的特徴は、糖修飾である。いくつかの実施形態において、構造的特徴は、P-修飾である。いくつかの実施形態において、構造的特徴は、キラルなヌクレオチド間結合の立体化学である。いくつかの実施形態において、構造的特徴は、塩基修飾、糖修飾、P-修飾、またはキラルなヌクレオチド間結合の立体化学、あるいはその組み合わせであるか、または、これらを含む。いくつかの実施形態において、ヘミマーは、5'-末端配列の各糖部分が、共通修飾を共有するオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、ヘミマーは、3'-末端配列の各糖部分が、共通修飾を共有するオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、5'または3'末端配列の共通糖修飾は、オリゴヌクレオチド内のその他の任意の糖部分によって共有されない。いくつかの実施形態において、例示的なヘミマーは、一方の末端に、置換または非置換の2'-O-アルキル糖修飾ヌクレオシド、二環式糖修飾ヌクレオシド、-D-リボヌクレオシドまたは-D-デオキシリボヌクレオシド(例えば、2'-MOE修飾ヌクレオシド、およびLNA(商標)またはENA(商標)二環式糖(sugar)修飾ヌクレオシド)の配列、もう一方の末端に、異なる糖部分を持つヌクレオシド(置換または非置換の2'-O-アルキル糖修飾ヌクレオシド、二環式糖修飾ヌクレオシドまたは天然のものなど)の配列を含むオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のユニマー、アルトマー、ブロックマー、ギャップマー、ヘミマーおよびスキップマーの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のユニマー、アルトマー、ブロックマー、ギャップマー、およびスキップマーの組み合わせである。例えば、いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アルトマーおよびギャップマーの両方である。いくつかの実施形態において、提供されるヌクレオチドは、ギャップマーおよびスキップマーの両方である。他の多くのパターンの組み合わせが利用可能であり、それらは、本発明の方法にしたがって提供されるオリゴヌクレオチドを合成するために必要な成分の商業的な入手可能性および/または合成の利用可能性によってのみ限定されることを化学および合成の技術分野の当業者は理解されよう。いくつかの実施形態において、ヘミマー構造は、図29により例示の通り、有利な利益をもたらす。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、5'-末端配列に修飾糖部分を含む5'-ヘミマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、5'-末端配列に修飾2'-糖部分を含む5'-ヘミマーである。

【0487】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾されたヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたLNAを含む。

【0488】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された核酸塩基を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された天然核酸塩基を含む。いくつかの実施形態において、提供さ

10

20

30

40

50

れるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された修飾された核酸塩基を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の5 - メチルシチジン；5 - ヒドロキシメチルシチジン，5 - ホルミルシトシン、または5 - カルボキシルシトシンを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の5 - メチルシチジンを含む。

【0489】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された糖を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された、天然のDNAおよびRNAに見出される糖を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたリボースまたはデオキシリボースを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたリボースまたはデオキシリボースを含み、リボースまたはデオキシリボース部分の1以上のヒドロキシル基は、独立してハロゲン、R'、-N(R')₂、-OR'または-SR'により置換されていてもよく、各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立してハロゲン、R'、-N(R')₂、-OR'、または-SR'により置換されていてもよく、各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立してハロゲンにより置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立して1以上の-F、ハロゲンにより置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立して-OR'により置換されていてもよく、各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立して-OR'により置換されていてもよく、各R'は、独立して置換されていてもよいC₁~C₆脂肪族である。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立して-OR'により置換されていてもよく、各R'は、独立して置換されていてもよいC₁~C₆アルキルである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立して-OMeにより置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立して-O-メトキシエチルにより置換されていてもよい。

【0490】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、一本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0491】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド鎖である。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、部分的にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド鎖である。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、完全にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド鎖である。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、二本鎖オリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、三重鎖オリゴヌクレオチド（例えば、三重鎖）である。

【0492】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、キメラ性である。例

10

20

30

40

50

えば、いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、DNA-RNAキメラ、DNA-LNAキメラなどである。

【0493】

いくつかの実施形態において、国際公開第2012/030683号に記載されるオリゴヌクレオチドを含む構造のいずれか1つは、本発明の方法に基づき修飾され、キラル制御されたその変異体を提供する。例えば、いくつかの実施形態において、キラル制御された変異体は、1以上の結合したリン酸のいずれかに立体化学的な修飾を含む、および/または1以上の結合したリン酸のいずれかにP-修飾を含む。例えば、いくつかの実施形態において、国際公開第2012/030683号のオリゴヌクレオチドの特定のヌクレオチド単位は、予め選択され、そのヌクレオチド単位の結合したリン酸で立体化学的に修飾される、および/またはそのヌクレオチド単位の結合したリン酸で、P-修飾されるようにする。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、図26~30に示されるいずれか1つの構造である。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、図26~30に示されるいずれか1つの構造の変異体（例えば、修飾されたバージョン）である。国際公開第2012/030683号の開示内容は、参照により全体を本明細書に組み込まれるものとする。

10

【0494】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、治療の薬剤である。

【0495】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

20

【0496】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アンチジーンオリゴヌクレオチドである。

【0497】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、デコイオリゴヌクレオチドである。

【0498】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、DNAワクチンの一部である。

30

【0499】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、免疫調節オリゴヌクレオチド、例えば、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび免疫抑制オリゴヌクレオチドである。

【0500】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アジュバントである。

【0501】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アプタマーである。

【0502】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、リボザイムである。

40

【0503】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、デオキシリボザイム（DNAザイムまたはDNA酵素）である。

【0504】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、低分子干渉RNAである。

【0505】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、マイクロRNA（microRNA）、またはミクロRNA（miRNA）である。

50

【0506】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ncRNA（非コードRNA）であり、長鎖非コードRNA（lncRNA）およびP i w i結合RNA（piRNA）などの小分子非コードRNAが含まれる。

【0507】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、構造的RNA、例えば、tRNAに対して相補的である。

【0508】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、核酸類似体であり、例えば、GNA、LNA、PNA、TNAおよびモルホリノである。

10

【0509】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、P-修飾のプロドラッグである。

【0510】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、プライマーである。いくつかの実施形態において、プライマーは、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase-based chain reactions）（すなわちPCR）に用いるものを使い、核酸を増幅させる。いくつかの実施形態において、プライマーは、逆転写PCR（RT-PCR）およびリアルタイムPCRのような、公知のPCRの変形のいずれかに用いるものである。

【0511】

20

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA分解酵素H活性化を調節する能力を有することを特徴とする。例えば、いくつかの実施形態において、RNA分解酵素H活性化は、立体制御されたホスホロチオエート核酸類似体の存在により調節され、天然のDNA/RNAは、Rp立体異性体と比べて同等またはより高い感受性があり、Rp立体異性体は、対応するSp立体異性体よりもより高い感受性がある。

【0512】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、タンパク質の活性を間接的もしくは直接的に増加もしくは減少させる、または、タンパク質の発現を抑制もしくは促進する能力を有することを特徴とする。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、細胞の増殖、ウイルス複製、および/または別の細胞シグナル伝達過程の制御において有用であることを特徴とする。

30

【0513】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約200ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約180ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約160ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約140ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約120ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約100ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約90ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約80ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約70ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約60ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約50ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約40ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約30ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約2～約29ヌクレオチド単位の長さである

40

50

4、または25ヌクレオチド単位の長さである。

【0516】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも2のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも3のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも4のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも5のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも6のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも7のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも8のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも9のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも11のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも12のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも13のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも14のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも15のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも16のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも17のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも18のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも19のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも20のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも21のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも22のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも23のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも24のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも25のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも30のヌクレオチド単位の長さである。いくつかの他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも18ヌクレオチド単位の長さの相補鎖の二本鎖である。いくつかの他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも21ヌクレオチド単位の長さの相補鎖の二本鎖である。

【0517】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの5'末端および/または3'末端は、修飾される。いくつかの実施形態において提供されるオリゴヌクレオチドの5'末端および/または3'末端は、末端キャップ部分で修飾される。末端キャップ部分を含むそのような例示的な修飾は、本明細書中や技術分野で詳しく記載され、例えば、限定されるものではないが、米国特許出願公開第2009/0023675A1に記載される。

【0518】

いくつかの実施形態において、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられるオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドは、同じ化学構造を有する。例えば、これらは、同じ塩基配列、骨格結合の同じパターン（すなわち、

ヌクレオチド間結合タイプのパターン、例えば、リン酸エステル、ホスホロチオエートなど)、骨格キラル中心の同じパターン(すなわち、結合リン立体化学のパターン(R_p/S_p))、および骨格リン修飾の同じパターン(例えば、式Iの「-XLR¹」基のパターン)を有する。

【0519】

オリゴヌクレオチドの種

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ミボメルセンの配列を、またはミボメルセンの配列の一部を含む。ミボメルセンは、以下の塩基配列GCCCT/UCAGT/UCT/UGCT/UT/UCGCACCに基づく。いくつかの実施形態において、1以上のヌクレオチドまたは結合のいずれかは、本発明に基づき、修飾されてもよい。いくつかの実施形態において、本発明は、3' - 5'のホスホロチオエート結合で以下の配列：G* - C* - C* - U* - C* - dA - dG - dT - dC - dT - dG - dmC - dT - dT - dmC - G* - C* - A* - C* - C* [d = 2' - デオキシ、* = 2' - O - (2 - メトキシエチル)]を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。例示的な修飾されたミボメルセン配列は、本出願を通じて記載され、限定するものではないが、表2に記載されるものが含まれる。

10

【0520】

ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ミボメルセンユニマーである。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、R_p配置のミボメルセンユニマーである。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、S_p配置のミボメルセンユニマーである。

20

【0521】

ミボメルセンの配列、またはミボメルセンの配列の一部を含む例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、以下の表2に記載される。

【0522】

表2 . 例示的なミボメルセンに関連する配列

【表 3】

オリゴ	立体化学／配列	摘要
101	All-(Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	All-R
102	All-(Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	All-S
103	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	5R-9S-5R
104	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	5S-9R-5S
105	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	1S-17R-1S
106	(Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	1R-17S-1R
107	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	(R/S) ₉ R
108	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	(S/R) ₉ S
109	(Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	3S-13R-3S
110	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	3R-13S-3R
111	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R ¹⁹
112	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R ⁹
113	(Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R ²
114	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	(RRS) ₆ -R
115	(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	S-(RRS) ₆
116	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	RS-(RRS) ₅ -RR
122	All-(Rp)- d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1 As1Cs1C]	All-R
123	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1 Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	1S-17R-1S
124	All-(Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1 Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	All-S
126	All-(Rp)-d[Cs2As2Gs2T]	All-R
127	All-(Rp)-d[Cs3As3Gs3T]	All-R

10

20

30

40

	Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1CsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCs1GsCs2As2Cs2C]	
160	All-(Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	All-R
161	All-(Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	All-S
162	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	5R-9S-5R
163	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	5S-9R-5S
164	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	1S-17R-1S
165	(Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	1R-17S-1R
166	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	(R/S) ₉ R
167	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	(S/R) ₉ S
168	(Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	3S-13R-3S
169	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	3R-13S-3R
170	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	18S/R ¹⁹
171	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	18S/R ⁹
172	(Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	18S/R ²
173	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	(RRS) ₆ -R
174	(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]	S-(RRS) ₆

10

20

30

40

	(Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	
175	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	RS-(RRS) ₅ -RR
176	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)(Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1) _{MOE} d[As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1] (Gs15mCs1As15mCs15mC) _{MOE}	RS-(RRS) ₅ -RR
177	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)(Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1) _{MOE} d[AGT5mCTG5mCTT5mC] (Gs25mCs2As25mCs25mC) _{MOE}	RS-(RRS) ₅ -RR
178	(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Sp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _F (F: 2-fluorodeoxyribose)	S-(RRS) ₆
179	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs8Cs8Cs8Ts8Cs8As8Gs8Ts8Cs8Ts8Gs8Cs8Ts8Ts8Cs8Gs8Cs8As8Cs8C]	RS-(RRS) ₅ -RR
180	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs9Cs9Cs9Ts9Cs9As9Gs9Ts9Cs9Ts9Gs9Cs9Ts9Ts9Cs9Gs9Cs9As9Cs9C]	RS-(RRS) ₅ -RR
181	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs10Cs10Cs10Ts10Cs10As10Gs10Ts10Cs10Ts10Gs10Cs10Ts10Ts10Cs10Gs10Cs10As10Cs10C]	RS-(RRS) ₅ -RR
182	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs11Cs11Cs11Ts11Cs11As11Gs11Ts11Cs11Ts11Gs11Cs11Ts11Ts11Cs11Gs11Cs11As11Cs11C]	RS-(RRS) ₅ -RR
183	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs12Cs12Cs12Ts12Cs12As12Gs12Ts12Cs12Ts12Gs12Cs12Ts12Ts12Cs12Gs12Cs12As12Cs12C]	RS-(RRS) ₅ -RR
184	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs13Cs13Cs13Ts13Cs13As13Gs13Ts13Cs13Ts13Gs13Cs13Ts13Ts13Cs13Gs13Cs13As13Cs13C]	RS-(RRS) ₅ -RR
185	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs14Cs14Cs14Ts14Cs14As14Gs14Ts14Cs14Ts14Gs14Cs14Ts14Ts14Cs14Gs14Cs14As14Cs14C]	RS-(RRS) ₅ -RR
186	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs15Cs15Cs15Ts15Cs15As15Gs15Ts15Cs15Ts15Gs15Cs15Ts15Ts15Cs15Gs15Cs15As15Cs15C]	RS-(RRS) ₅ -RR
187	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[GsCsCs1TsCsAs]GsUs2CsUsGsd[CsTs3TsCsGs]CsAs4CsC	RS-(RRS) ₅ -RR
188	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsACsC]	5S-9R-4S
189	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	5S-9R-4S
190	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[Gs8Cs8Cs8Ts8Cs8As8Gs8Ts8Cs8Ts8Gs8Cs8Ts8Ts8Cs8Gs8Cs1A	5S-9R-4S

10

20

30

40

	Cs8C]	
191	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs9Cs9Cs9Ts9Cs9As9Gs9Ts9Cs9Ts9Gs9Cs9Ts9Ts9Cs9Gs9Cs1A Cs9C]	5S-9R-4S
192	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs10Cs10Cs10Ts10Cs10As10Gs10Ts10Cs10Ts10Gs10Cs10Ts10Ts 10Cs10Gs10Cs1ACs10C]	5S-9R-4S
193	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs11Cs11Cs11Ts11Cs11As11Gs11Ts11Cs11Ts11Gs11Cs11Ts11Ts 11Cs11Gs11Cs1ACs11C]	5S-9R-4S
194	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs12Cs12Cs12Ts12Cs12As12Gs12Ts12Cs12Ts12Gs12Cs12Ts12Ts 12Cs12Gs12Cs1ACs12C]	5S-9R-4S
195	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs13Cs13Cs13Ts13Cs13As13Gs13Ts13Cs13Ts13Gs13Cs13Ts13Ts 13Cs13Gs13Cs1ACs13C]	5S-9R-4S
196	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs14Cs14Cs14Ts14Cs14As14Gs14Ts14Cs14Ts14Gs14Cs14Ts14Ts 14Cs14Gs14Cs1ACs14C]	5S-9R-4S
197	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs15Cs15Cs15Ts15Cs15As15Gs15Ts15Cs15Ts15Gs15Cs15Ts15Ts 15Cs15Gs15Cs1ACs15C]	5S-9R-4S
198	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- GsCsCsUsCsAsGsUsCsUsGsCsUsUsCsGsCsACsC	5S-9R-4S
199	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs1Cs1Cs1Us1Cs1As1Gs1Us1Cs1Us1Gs1Cs1Us1Us1Cs1Gs1CsACs 1C	5S-9R-4S
200	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs8Cs8Cs8Us8Cs8As8Gs8Us8Cs8Us8Gs8Cs8Us8Us8Cs8Gs8Cs1AC s8C	5S-9R-4S
201	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs9Cs9Cs9Us9Cs9As9Gs9Us9Cs9Us9Gs9Cs9Us9Us9Cs9Gs9Cs1AC s9C	5S-9R-4S
202	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs10Cs10Cs10Us10Cs10As10Gs10Us10Cs10Us10Gs10Cs10Us10Us 10Cs10Gs10Cs1ACs10C	5S-9R-4S
203	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs11Cs11Cs11Us11Cs11As11Gs11Us11Cs11Us11Gs11Cs11Us11Us 11Cs11Gs11Cs1ACs11C	5S-9R-4S
204	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs12Cs12Cs12Us12Cs12As12Gs12Us12Cs12Us12Gs12Cs12Us12Us 12Cs12Gs12Cs1ACs12C	5S-9R-4S
205	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs13Cs13Cs13Us13Cs13As13Gs13Us13Cs13Us13Gs13Cs13Us13Us 13Cs13Gs13Cs1ACs13C	5S-9R-4S
206	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-	5S-9R-4S
	Gs14Cs14Cs14Us14Cs14As14Gs14Us14Cs14Us14Gs14Cs14Us14Us 14Cs14Gs14Cs1ACs14C	
207	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs15Cs15Cs15Us15Cs15As15Gs15Us15Cs15Us15Gs15Cs15Us15Us 15Cs15Gs15Cs1ACs15C	5S-9R-4S

10

20

30

40

50

【0523】

オリゴヌクレオチド組成物

本発明は、複数の提供されるオリゴヌクレオチドを含む組成物、または、複数の提供されるオリゴヌクレオチドから成る組成物を提供する（例えば、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物）。いくつかの実施形態において、そのような提供されるオリゴヌクレオチドは、全て同じタイプであり、つまり、全て同じ塩基配列、骨格結合のパターン（つまり、インターヌクレオチド結合タイプのパターン、例えば、リン酸塩、ホスホロチオエートなど）、骨格キラル中心のパターン（つまり、結合したリン酸の立体化学（ R_p/S_p ）のパターン）、およびリン酸骨格修飾のパターン（例えば、式Iのパターンの「 $-XLR^1$ 」基）を有する。しかしながら、多くの実施形態において、提供される組成物は、一般的には、予め決められた相対量の複数のオリゴヌクレオチドタイプを含む。

10

【0524】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、キラル的に純粋なミボメルセン組成物である。すなわち、いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、結合したリン酸の配置に関して、1つのジアステレオマーとしてミボメルセンを提供する。

【0525】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、キラル的に均一なミボメルセン組成物である。つまり、いくつかの実施形態において、ミボメルセンのそれぞれ全ての結合したリン酸は、 R_p 配置で存在するか、またはミボメルセンのそれぞれ全ての結合したリン酸は、 S_p 配置で存在する。

20

【0526】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせを含む。提供される組成物における、提供されるオリゴヌクレオチドの1以上の各タイプの選択および量は、組成物の使用目的によって決まることは、化学および医薬分野の当業者により、認識されるであろう。つまり、関連技術分野の当業者は、提供されるオリゴヌクレオチドに含まれる量およびタイプが、組成物全体としてある望ましい特性（例えば、生物学的に好ましい特性、治療上好ましい特性、等）を有するように、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を設計するであろう。

30

【0527】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、2以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、3以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、4以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、5以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、6以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、7以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、8以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、9以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、10以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、15以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。

40

50

【0528】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、R_p配置のキラル的に均一なミボメルセンの一定量およびS_p配置のキラル的に均一なミボメルセンの一定量の組み合わせである。

【0529】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、R_p配置のキラル的に均一なミボメルセンの一定量、S_p配置のキラル的に均一なミボメルセンの一定量および、所望のジアステレオマー形態の1以上のキラル的に純粋なミボメルセンの一定量の組み合わせである。

【0530】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドタイプは、PCT/US 2013/050407（参照により本明細書に組み込まれる。）に記載のものから選択される。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、PCT/US 2013/050407に記載のものから選択されるオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む。

【0531】

キラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびその組成物の作製方法

本発明は、1以上の特異なヌクレオチドタイプを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびキラル制御された組成物の作製方法を提供する。上記の通り、ここでの「オリゴヌクレオチドタイプ」という用語は、特定の塩基配列、骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、およびリン酸骨格修飾のパターン（例えば、「-XLR¹」基）を有するオリゴヌクレオチドを定義する。一般的に指定される「タイプ」のオリゴヌクレオチドは、塩基配列、骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、およびリン酸骨格修飾のパターンに関して互いに構造的に同一である。

【0532】

いくつかの実施形態において、本発明で提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物に対応するものとは異なる性質を有する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物のものとは異なる脂溶性を有する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、HPLCにおいて異なる保持時間を有する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物に対応するものとは、大きく異なるピーク保持時間であってよい。一般的に技術分野で行われるように、HPLCを用いたオリゴヌクレオチド精製の間、ある特定のキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、完全にではないにせよ、大部分が失われる。一般的に技術分野で行われるように、HPLCを用いたオリゴヌクレオチド精製の間ある特定のキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、完全にではないにせよ、大部分が失われる。1つの結果は、立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物の、ある特定のジアステレオマー（あるキラル制御されたオリゴヌクレオチド）は、アッセイで試験されない。別の結果は、バッチごとに、不可避な機器的および人為的エラーにより、「純粋」であると推定される立体的にランダムなオリゴヌクレオチドは、組成物中のジアステレオマーおよびそれらの相対量ならびに絶対量がバッチごとで異なるという点において矛盾した組成物を含むであろう。キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1つのジアステレオマーとして、キラル制御された方法で合成され、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、所定のレベルの1以上の個々のオリゴヌクレオチドタイプを含むため、本発明で提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、そのような問題点を克服する。

【0533】

化学および合成分野の当業者は、本発明の合成方法が、提供されるオリゴヌクレオチドの合成の各ステップの間、ある程度の制御を提供し、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオチド単位が予め、結合したリン酸で特定の立体化学、および/または、結合したリン酸で特

10

20

30

40

50

定の修飾、および/または、特定の塩基、および/または、特定の糖を有するように設計可能および/または選択可能であることを認識するであろう。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、インターヌクレオチド結合の結合したリン酸で立体中心の特定の組み合わせを有するように予め設計および/または選択される。

【0534】

いくつかの実施形態において、本発明の方法を用いて作られ、提供されるオリゴヌクレオチドは、結合したリン酸修飾の特定の組み合わせを有するように設計および/または決定される。いくつかの実施形態において、本発明の方法を用いて作られ、提供されるオリゴヌクレオチドは、塩基の特定の組み合わせを有するように設計および/または決定される。いくつかの実施形態において、本発明の方法を用いて作られ、提供されるオリゴヌクレオチドは、糖の特定の組み合わせを有するように設計および/または決定される。いくつかの実施形態において、本発明の方法を用いて作られ、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の上記の構造的特性の特定の組み合わせを有するように設計および/または決定される。

10

【0535】

本発明の方法は、高度なキラル制御を示す。例えば、本発明の方法は、提供されるオリゴヌクレオチド内で各1個の結合したリン酸の立体化学的な配置の制御を容易にする。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、独立して式Iの構造を有する、1以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むオリゴヌクレオチドを提供する。

【0536】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、ミボメルセンユニマーであるオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、R_p配置のミボメルセンユニマーであるオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、S_p配置のミボメルセンユニマーであるオリゴヌクレオチドを提供する。

20

【0537】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物、つまり、所定のレベルの個々のオリゴヌクレオチドタイプを含むオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1つのオリゴヌクレオチドタイプを含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1より多いオリゴヌクレオチドタイプを含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチドタイプを含む。本発明により作製される例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書中に記載されるとおりである。

30

【0538】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、結合したリン酸の配置に関してキラル的に純粋なミボメルセン組成物を提供する。つまり、いくつかの実施形態において、本発明の方法は、結合したリン酸の配置に関してミボメルセンが単一のジアステレオマーの形態で組成物に存在するミボメルセンの組成物を提供する。

【0539】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、結合したリン酸の配置に関して、キラル的に均一なミボメルセン組成物を提供する。つまり、いくつかの実施形態において、本発明の方法は、全てのヌクレオチド単位が結合したリン酸の配置に関して、同じ立体化学を有するミボメルセンの組成物を提供し、例えば、全てのヌクレオチド単位が、結合したリン酸において、R_p配置である、または全てのヌクレオチド単位が、結合したリン酸において、S_p配置である組成物である。

40

【0540】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、50%超純粋である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、約55%超純粋である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル

50

な組成物は、約98%ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約99%ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約99.5%ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約99.6%ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約99.7%ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約99.8%ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約99.9%ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、少なくとも約99%ジアステレオマー的に純粋である。

【0542】

10

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチドタイプを含むように設計された組成物である。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドのライブラリの生成を可能にし、任意の1以上のキラル制御されたオリゴヌクレオチドタイプの予め選択された量を任意の1以上の別のキラル制御されたオリゴヌクレオチドタイプと混合させ、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を作るようにできる。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドタイプの予め選択された量は、上記記載のジアステレオマー純度のいずれか1つを有する組成物である。

【0543】

20

いくつかの実施形態において、本発明は、以下のステップ：

- (1) カップリング；
 - (2) キャッピング；
 - (3) 修飾；
 - (4) 脱ブロッキング；および
 - (5) 所望の長さが実現されるまで、(1)～(4)の繰り返しステップを行う
- を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド作製方法を提供する。

【0544】

提供される方法を記載する場合、「サイクル」という用語は、当業者に理解される通常の意味を有する。いくつかの実施形態において、(1)～(4)のステップの一巡をサイクルと呼ぶ。

30

【0545】

いくつかの実施形態において、本発明は、以下のステップ：

- (a) 第1のキラル制御されたオリゴヌクレオチドの一定量を提供する；および
 - (b) 任意で1以上のさらなるキラル制御されたオリゴヌクレオチドの一定量を提供すること
- を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の作製方法を提供する。

【0546】

いくつかの実施形態において、第1のキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、本明細書中に記載されるオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態において、1以上のさらなるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、本明細書中に記載される1以上のオリゴヌクレオチドタイプである。

40

【0547】

関連する化学および合成分野の当業者は、本発明の方法を用いて合成する場合、提供されるオリゴヌクレオチドは、一定の多用途性を有し、構造的変形ならびに立体化学的な配置に対して制御が可能であることを理解するであろう。例えば、第1のサイクル完了後、次に続くサイクルに対して個々に選択されたヌクレオチド単位を使用して次に続くサイクルを行うことが可能であり、いくつかの実施形態においては、第1サイクルの核酸塩基および/または糖とは異なる核酸塩基および/または糖が含まれる。同様に、次に続くサイクルのカップリングステップで用いられるキラル補助剤は、第1サイクルで用いられるキラル補助剤とは、異なってもよく、第2サイクルでは、異なった立体化学的な配置の

50

リン酸結合を生成する。いくつかの実施形態において、新たに形成されたインターヌクレオチド結合で結合したリン酸の立体化学は、立体化学的に純粋なホスホラミダイトを使用して制御される。さらに、次に続くサイクルの修飾ステップで使用される修飾剤は、第1または前のサイクルで使用された修飾剤とは異なっていてもよい。この反復的な構築アプローチの累積的な効果は、提供されるオリゴヌクレオチドの各成分が、構造的および配置的に、高度に目的に合わせることができる。本アプローチのさらなる利点は、「n - 1」不純物の形成を最小限にするキャッピングステップである。キャッピングステップがない場合、提供されるオリゴヌクレオチドの単離は、特に長いオリゴヌクレオチドに関して、非常に難しくなるであろう。

【0548】

10

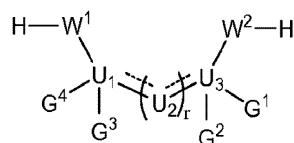
いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを作る方法の例示的なサイクルが、スキームIに記載される。スキームIでは、

【化177】



は、固体支持体を示し、固体支持体と結合した成長するキラル制御されたオリゴヌクレオチドの一部であってもよい。例示的なキラル補助剤は、式3-I:

【化178】



式3-I

20

の構造を有し、

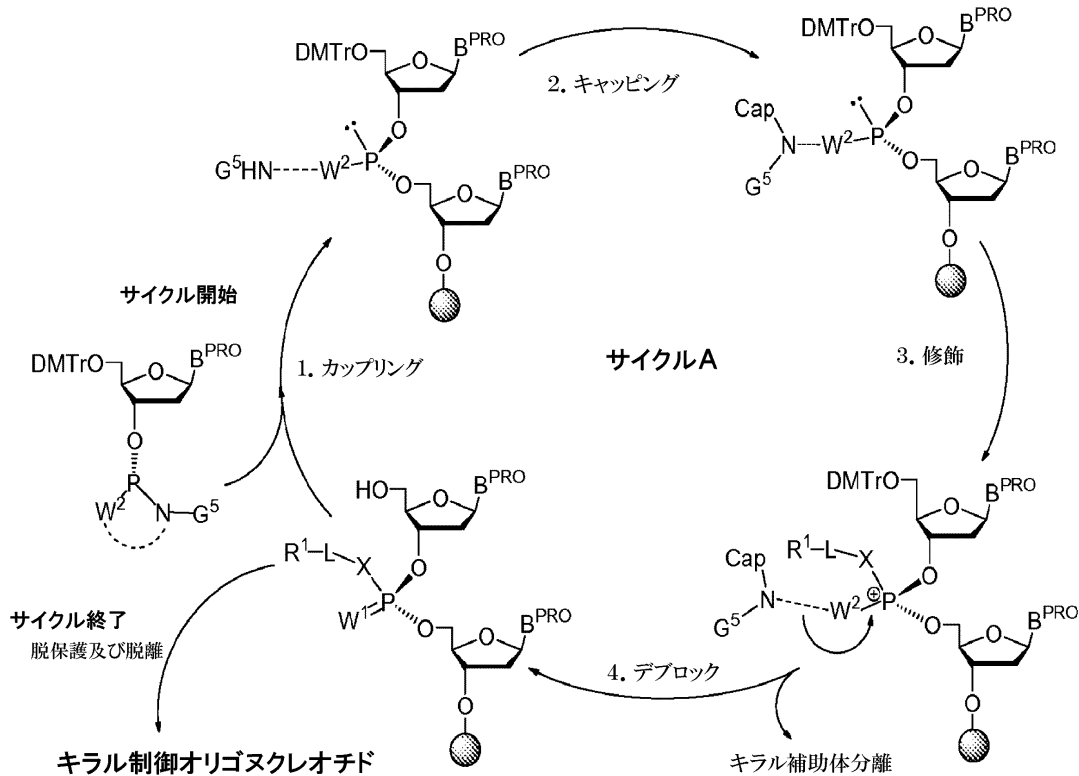
さらなる詳細は以下に記載される。「キャップ」は、キャッピングステップで窒素原子に導入される化学部分であり、いくつかの実施形態において、アミノ保護基である。第1サイクルでは、開始時に固体支持体に結合したヌクレオチドは、1つのみである可能性があるが、脱ブロッキングの前にサイクルの終了を行ってもよいことを、当業者は理解する。当業者により理解される通り、B^{P R O}は、オリゴヌクレオチド合成で使用される保護基である。スキームIの上記のサイクルの各ステップは、さらに以下に記載される。

30

【0549】

スキームI . キラル制御されたオリゴヌクレオチドの合成

【化179】



10

20

【0550】

固体支持体上の合成

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの合成は、固相上で行われる。いくつかの実施形態において、固体支持体に存在する反応基は、保護される。いくつかの実施形態において、固体支持体に存在する反応基は、保護されていない。オリゴヌクレオチド合成の最中、固体支持体は、数回の合成サイクルにおいて、さまざまな試薬で処理され、個々のヌクレオチド単位で成長するオリゴヌクレオチド鎖の段階的の伸長を実現する。固体支持体に直接結合し、鎖の末端のヌクレオチド単位を、ここでは「第1ヌクレオチド」と呼ぶ。第1のヌクレオチドは、リンカー部分、つまりジラジカルを通じて、CPG、ポリマーまたは別の固体支持体のいずれかとヌクレオチドの間の共有結合により固体支持体に結合される。リンカーは、オリゴヌクレオチド鎖を構築する合成サイクルの間、無傷のままであり、鎖構築後に切り離され、支持体からオリゴヌクレオチドを遊離させる。

30

【0551】

固相核酸合成の固体支持体には、例えば、米国特許第4,659,774号、第5,141,813号、第4,458,066号; Caruthersの米国特許第4,415,732号、第4,458,066号、第4,500,707号、第4,668,777号、第4,973,679号、および第5,132,418号; Andrusらの米国特許第5,047,524号、第5,262,530号; およびKosterの米国特許第4,725,677号(Re34,069として再発行)に記載される支持体が含まれる。いくつかの実施形態において、固相は、有機ポリマー支持体である。いくつかの実施形態において、固相は、無機ポリマー支持体である。いくつかの実施形態において、有機ポリマー支持体は、ポリスチレンであり、アミノメチルポリスチレン、ポリエチレングリコール-ポリスチレングラフト共重合体、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリビニルアルコール、高度に架橋したポリマー(HCP)、または別の合成ポリマー、セルロースおよびデンプンまたは別の高分子炭水化物のような炭水化物、または別の有機ポリマーおよび共重合体、上記の無機または有機材料の複合材料または組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態において、無機ポリマー支持体は、シリカ、アルミナ、シリカゲル支持体、またはアミノ

40

50

プロピルCPGなどの制御ポリグラス(CPG)である。別の有用な固体支持体には、フルオラス固体支持体(例えば、WO/2005/070859参照)、長鎖アルキルアミン(LCAA)制御多孔性ガラス(CPG)固体支持体(例えば、S. P. Adams, K. S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Holder and G. R. Galluppi, J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 661-663; G. R. Gough, M. J. Bruden and P. T. Gilham, Tetrahedron Lett., 1981, 22, 4177-4180参照)が挙げられる。膜支持体およびポリマー膜(例えば、Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides, Proteins and Nucleic Acids, ch 21 pp 157-162, 1994, Ed. Roger Eptonおよび米国特許第4,923,901号参照)もまた核酸の合成に有用である。いったん形成されると、膜は、核酸合成において使用するために、化学的に官能化させることができる。膜への官能基の結合に加えて、膜に結合されたリンカーまたはスパーサ基の使用が、膜と合成鎖との間の立体障害を最小に抑えるために、用いられる。

10

【0552】

別の好ましい固体支持体には、技術分野で一般的に知られ、固相方法で用いられる好ましいものが含まれ、例えば、PrimerTM200サポートとして販売されるガラス、制御多孔性ガラス(CPG)、オキサリル-制御多孔性ガラス(例えば、Alul, et al., Nucleic Acids Research, 1991, 19, 1527を参照)、TentaGelサポート-アミノポリエチレングリコール誘導支持体(例えば、Wright, et al., Tetrahedron Lett., 1993, 34, 3373を参照)およびPoros-ポリスチレン/ジビニルベンゼンの共重合体が挙げられる。

20

【0553】

表面活性されたポリマーは、いくつかの固体支持体媒体上で天然および修飾された核酸やタンパク質の合成に利用されている。固体支持体の材料は、どのようなポリマーであってもよく、多孔度が均一で、十分なアミン含有量、および十分な柔軟性を有して、統合性を失うことなく、付随するどのような操作にも耐えうるものが好ましい。選択される材料の例としては、好ましくは、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、およびニトロセルロースである。別の材料が、研究者の設計に依存して、固体支持体として機能し得る。いくつかの設計を考慮すると、例えば、特に金または白金をコーティングした金属が選択され得る(例えば、米国公開公報第20010055761参照)。オリゴヌクレオチド合成の一実施形態において、例えば、ヌクレオシドは、ヒドロキシルまたはアミノ残基を用いて官能化された固体支持体に固定される。また、固体支持体は、誘導体化され、トリメトキシトリチル基(TMT)のような、酸に不安定なトリアルコキシトリチル基を提供する。理論に縛られることなく、トリアルコキシトリチル保護基の存在は、DNA合成装置で一般的に使用される条件下で、初期の脱トリチル化を可能にすることが予想される。アンモニア水溶液中のオリゴヌクレオチド材料をより早く切り離すためには、ジグリコートリンカー(diglycoate linker)を支持体上に導入してもよい。

30

【0554】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、代替として、5'-3'方向で合成される。いくつかの実施形態において、核酸は、成長する核酸の5'末端を通じて固体支持体に結合され、それにより3'基を反応のために提示する。すなわち5'-ヌクレオシドホスホラミダイトを用いて、または酵素反応中で反応が起こる(例えば、ヌクレオシド5'-三リン酸を用いたライゲーションおよび重合)。5'-3'合成を考慮する場合、本発明の反復ステップは、変化しない(つまり、キラルリン酸のキャッピングおよび修飾)。

40

【0555】

結合部分

固体支持体を、自由求核部分を含む化合物に結合させるために結合部分またはリンカーを用いても良い。好適なリンカー、例えば、固相合成技術において固体支持体を初期ヌクレオシド分子の官能基(例えば、ヒドロキシル基)に結合させるように機能する短分子が

50

知られている。いくつかの実施形態において、結合部分は、スクシニアミド酸リンカー、またはコハク酸リンカー(-CO-CH₂-CH₂-CO-)、またはオキサリルリンカー(-CO-CO-)である。いくつかの実施形態において、結合部分およびヌクレオシドはエステル結合を介して一緒に結合される。いくつかの実施形態において、結合部分およびヌクレオシドはアミド結合を介して一緒に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分はヌクレオシドを別のヌクレオチドまたは核酸に結合させる。開示される好ましいリンカーは、例えば、Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach, Ekstein, F. Ed., IRL Press, N.Y., 1991, Chapter 1 およびSolid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis, Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28に記載される。

10

【0556】

リンカー部分は、自由求核部分を含む化合物を別のヌクレオシド、ヌクレオチド、または核酸に結合させるために使用される。いくつかの実施形態において、結合部分は、ホスホジエステル結合である。いくつかの実施形態において、結合部分は、H-ホスホネート部分である。いくつかの実施形態において、結合部分は、本明細書中に記載される修飾されたリン酸結合である。いくつかの実施形態において、ユニバーサルリンカー(ユニリンカー(UnyLinker))が、固体支持体にオリゴヌクレオチドを結合させるために使用される(Ravikumar et al., Org. Process Res. Dev., 2008, 12 (3), 399 - 410)。いくつかの実施形態において、別のユニバーサルリンカーが使用される(Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28)。いくつかの実施形態において、さまざまな直交するリンカー(例えば、ジスルフィドリンカー)が使用される(Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28)。

20

【0557】

一般的な条件 - 合成に用いる溶媒

提供されるオリゴヌクレオチドの合成は、一般的に非プロトン性有機溶媒中で行われる。いくつかの実施形態において、溶媒は、例えば、アセトニトリルのようなニトリル溶媒中で行われる。いくつかの実施形態において、溶媒は、例えば、ピリジンのような塩基性アミン溶媒である。いくつかの実施形態において、溶媒は、例えば、テトラヒドロフランのようなエーテル溶媒である。いくつかの実施形態において、溶媒は、例えば、ジクロロメタンのようなハロゲン化炭化水素である。いくつかの実施形態において、溶媒の混合物を使用する。ある実施形態において、溶媒は、上記記載の分類の1以上の溶媒の混合物である。

30

【0558】

いくつかの実施形態において、非プロトン性有機溶媒が塩基性ではない場合、塩基が、反応ステップに存在する。いくつかの実施形態において、塩基が存在する場合、塩基は、例えば、ピリジン、キノリン、またはN,N-ジメチルアニリンのように、アミン塩基である。例示的な別のアミン塩基には、ピロリジン、ペリリジン、N-メチルピロリジン、ピリジン、キノリン、N,N-ジメチルアミノピリジン(DMAP)、またはN,N-ジメチルアニリンが挙げられる。

【0559】

いくつかの実施形態において、塩基は、アミン塩基以外である。

40

【0560】

いくつかの実施形態において、非プロトン性有機溶媒は、無水である。いくつかの実施形態において、無水非プロトン性有機溶媒は、新たに蒸留される。いくつかの実施形態において、新たに蒸留される無水非プロトン性有機溶媒は、例えば、ピリジンのような塩基性アミン溶媒である。いくつかの実施形態において、新たに蒸留される無水非プロトン性有機溶媒は、例えば、テトラヒドロフランなどのエーテル溶媒である。いくつかの実施形態において、新たに蒸留される無水非プロトン性有機溶媒は、例えば、アセトニトリルのようなニトリル溶媒である。

【0561】

50

活性化

アキラルなH-ホスホネート成分を第1の活性化試薬で処理して第1の中間体を形成する。一実施形態では、第1の活性化試薬を縮合ステップの間に反応混合物に加える。第1の活性化試薬の使用は、反応に用いる溶媒等、反応条件による。第1の活性化試薬の例としては、ホスゲン、クロロギ酸トリクロロメチル、ビス(トリクロロメチル)カーボネート(BTC)、塩化オキサリル、 Ph_3PCl_2 、 $(\text{PhO})_3\text{PCl}_2$ 、N,N'-ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド(BopCl)、1,3-ジメチル-2-(3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール-1-イル)-2-ピロリジン-1-イル-1,3,2-ジアザホスホリジニウムヘキサフルオロホスフェート(MNTP)、又は3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール-1-イル-トリス(ピロリジン-1-イル)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyNTP)がある。

10

【0562】

アキラルなH-ホスホネート成分の例としては、上記スキームに示す化合物がある。DBUは、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エンを表す。H⁺DBUは、例えば、それぞれが第1級、第2級、第3級若しくは第4級のアンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、複素環式芳香族イミニウムイオン、又は複素環式イミニウムイオンであってもよく、一価金属イオンであってもよい。

【0563】

キラル試薬との反応

第1の活性化ステップの後、活性化したアキラルなH-ホスホネート成分は、式(Z-I)又は(Z-I')で表されるキラル試薬と反応して、式(Z-Va)、(Z-Vb)、(Z-Va')、又は(Z-Vb')のキラル中間体を形成する。

20

【0564】

立体特異的縮合ステップ

式Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va')、又は(Z-Vb'))のキラル中間体を第2の活性化試薬及びヌクレオシドで処理して縮合中間体を形成する。ヌクレオシドは固体支持体上にあってもよい。第2の活性化試薬の例としては、4,5-ジシアノイミダゾール(DCI)、4,5-ジクロロイミダゾール、1-フェニルイミダゾリウムトリフレート(PhIMT)、ベンジミダゾリウムトリフレート(BIT)、ベンゾトリアゾール(benzotriazole)、3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(NT)、テトラゾール、5-エチルチオテトラゾール(ETT)、5-ベンジルチオテトラゾール(BTT)、5-(4-ニトロフェニル)テトラゾール、N-シアノメチルピロリジニウムトリフレート(CMPT)、N-シアノメチルペリジニウムトリフレート、N-シアノメチルジメチルアンモニウムトリフレートが挙げられる。式Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va')、又は(Z-Vb'))のキラル中間体はモノマーとして単離してもよい。通常、Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va')、又は(Z-Vb'))のキラル中間体は単離せず、同じ容器の中でヌクレオシド又は修飾ヌクレオシドと反応を起こさせ、キラル亜リン酸化合物、即ち縮合中間体を得る。他の実施形態では、本方法を固相合成によって実施する場合、化合物を含む固体支持体からろ過によって副産物、不純物、及び/又は試薬を取り除く。

30

40

【0565】

キャッピング・ステップ

最終的な核酸がダイマーより大きい場合、未反応の-OH成分をブロック基でキャッピングし、化合物中のキラル補助基もまたブロック基でキャッピングして、キャッピングされた縮合中間体を形成してもよい。最終的な核酸がダイマーである場合、キャッピング・ステップは必要ない。

【0566】

修飾ステップ

化合物は、求電子試薬との反応によって修飾する。キャッピングされた縮合中間体に修飾ステップを行ってもよい。いくつかの実施形態では、修飾ステップをイオウ求電子試薬

50

、セレンウム求電子試薬、又はホウ素化剤を用いて実施する。修飾ステップの例としては、酸化及び硫化のステップがある。

【0567】

本方法のいくつかの実施形態では、イオウ求電子試薬は、次の式の1つを有する化合物であり：

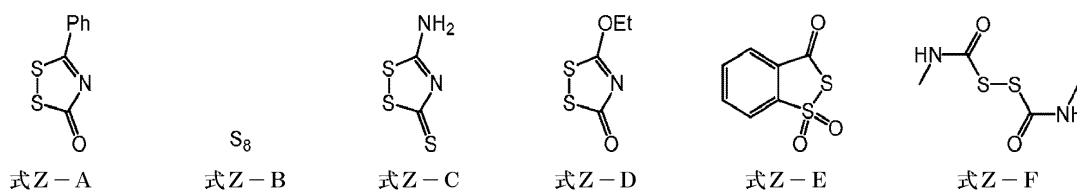
S_8 (式Z-B)、 $Z^{z1} - S - S - Z^{z2}$ 、又は $Z^{z1} - S - V^z - Z^{z2}$ 、
式中、 Z^{z1} 及び Z^{z2} は互いに独立してアルキル、アミノアルキル、シクロアルキル、
複素環式、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、
アルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アシル、アミド、イミド、
又はチオカルボニル、又は、 Z^{z1} 及び Z^{z2} が一緒になって3～8員環の脂環式環又は
複素環を形成したものであり、これらは置換されていても置換されていなくてもよく；
 V^z は SO_2 、O、又は NR^f であり；
 R^f は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、又はアリールである。

10

【0568】

本方法のいくつかの実施形態では、イオウ求電子試薬は次の式Z-A、Z-B、Z-C、
Z-D、Z-E、又はZ-Fの化合物である：

【化180】



20

【0569】

いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬は、次の式の1つを有する化合物であり：

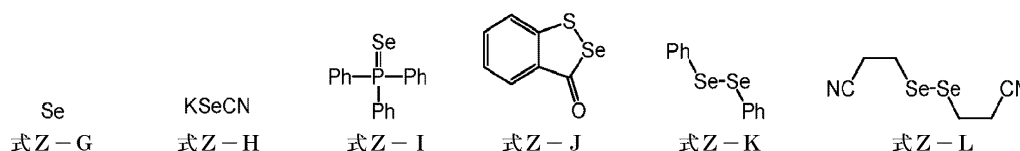
Se (式Z-G)、 $Z^{z3} - Se - Se - Z^{z4}$ 、又は $Z^{z3} - Se - V^z - Z^{z4}$ 、
式中、 Z^{z3} 及び Z^{z4} は互いに独立してアルキル、アミノアルキル、シクロアルキル、
複素環式、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、
アルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アシル、アミド、イミド、
又はチオカルボニル、又は、 Z^{z3} 及び Z^{z4} は一緒になって3～8員環の脂環式環又は
複素環を形成したものであり、これらは置換されていても置換されていなくてもよく；
 V^z は SO_2 、S、O、又は NR^f であり；
 R^f は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、又はアリールである。

30

【0570】

いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬は式Z-G、Z-H、Z-I、Z-J、
Z-K、又はZ-Lの化合物である。

【化181】



40

【0571】

いくつかの実施形態では、ホウ素化剤は、ボラン-N、N-ジイソプロピルエチルアミン
($BH_3 \cdot DIPEA$)、ボラン-ピリジン($BH_3 \cdot Py$)、ボラン-2-クロロピリジン
($BH_3 \cdot CPy$)、ボラン-アニリン($BH_3 \cdot An$)、ボラン-テトラヒドロフィ
イラン($tetrahydrofuran$) ($BH_3 \cdot THF$)、又はボラン-ジメ
チルスルフィド($BH_3 \cdot Me_2S$)である。

【0572】

50

本方法のいくつかの実施形態では、修飾ステップは酸化ステップである。本方法のいくつかの実施形態では、修飾ステップは、本願において上に記載する同様の条件を用いた酸化ステップである。いくつかの実施形態では、酸化ステップは、例えばJP 2010-265304A及びWO 2010/064146に開示される通りである。

【0573】

鎖伸長サイクル及び脱保護ステップ

キャッピングされた縮合中間体は、脱ブロッキングして、増殖している核酸鎖の5'-末端でブロック基を除去して、化合物を提供する。化合物は、鎖伸長サイクルに再度入って、縮合中間体、キャッピングされた縮合中間体、修飾されキャッピングされた縮合中間体、及び5'-脱保護され修飾されキャッピングされた中間体を形成してもよい。鎖伸長サイクルを少なくとも1周した後、5'-脱保護され修飾されキャッピングされた中間体は、キラル補助基リガンド及び他の保護基、例えば核酸塩基、修飾核酸塩基、糖及び修飾糖保護基の除去によってさらに脱ブロッキングし、核酸を提供する。他の実施形態では、5'-OH成分を含むヌクレオシドは、本明細書に記載される前出の鎖伸長サイクルからの中間体である。なおも別の実施形態では、5'-OH成分を含むヌクレオシドは、他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。固体支持体を用いる実施形態では、次いで、リン原子修飾核酸を固体支持体から切断する。ある特定の実施形態では、核酸は、精製を目的として固体支持体上に付けたままとし、次いで、精製後に固体支持体から切断する。

【0574】

なおも別の実施形態では、5'-OH成分を含むヌクレオシドは、他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。なおも別の実施形態では、5'-OH成分を含むヌクレオシドは、本願に記載される他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。なおも別の実施形態では、5'-OH成分を含むヌクレオシドは、スキームIに示す1つ又は複数のサイクルを含む他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。なおも別の実施形態では、5'-OH成分を含むヌクレオシドは、スキームI-b、I-c、又はI-dに例示する1つ又は複数のサイクルを含む他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。

【0575】

いくつかの実施形態では、本発明は、出発材料として安定な市販される材料を用いるオリゴヌクレオチド合成方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、アキラルな出発材料を用いた立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体を産生するようにオリゴヌクレオチド合成方法を提供する。

【0576】

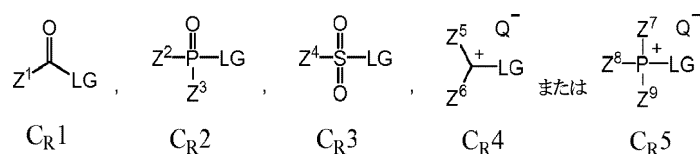
いくつかの実施形態では、本方法は脱保護ステップの下で分解を起こさない。さらに本方法では特別なキャッピング剤を必要とすることなくリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体を産生する。

【0577】

縮合試薬

本発明の方法に従って有用な縮合試薬(C_R)は、次の一般式のいずれのものでもよく：

【化182】



式中、Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁶、Z⁷、Z⁸、及びZ⁹は、互いに独立してアルキル、アミノアルキル、シクロアルキル、複素環、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルオキシ、アリールオキシ、若しく

10

20

30

40

50

はヘテロアリーールオキシより選択される、任意に置換された置換基であってもよく、あるいは、 Z^2 と Z^3 、 Z^5 と Z^6 、 Z^7 と Z^8 、 Z^8 と Z^9 、 Z^9 と Z^7 、若しくは Z^7 と Z^8 と Z^9 、のいずれかの組み合わせにより3～20員環脂環式環又は複素環を形成し； Q^- は対アニオンであり、 LG は脱離基である。

【0578】

いくつかの実施形態では、縮合試薬 C_R の対イオンは Cl^- 、 Br^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 TfO^- 、 Tf_2N^- 、 AsF_6^- 、 ClO_4^- 、又は SbF_6^- であり、 Tf は CF_3SO_2 である。いくつかの実施形態では、縮合試薬 C_R の脱離基は F 、 Cl 、 Br 、 I 、3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール、イミダゾール、アルキルトリアゾール、テトラゾール、ペンタフルオロベンゼン、又は1-ヒドロキシベンゾトリアゾールである。

10

【0579】

本発明の方法に従って用いる縮合試薬の例としては、ペンタフルオロベンゾイルクロリド、カルボニルジイミダゾール(CDI)、1-メシチレンスルフォニル-3-ニトロトリアゾール(MSNT)、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド(EDCI-HCl)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)、N,N'-ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド(BopCl)、2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)、及びO-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)、DIPCDI；N,N'-ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸ブロミド(BopBr)、1,3-ジメチル-2-(3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール-1-イル)-2-ピロリジン-1-イル-1,3,2-ジアザホスホリジニウムヘキサフルオロホスフェート(MNTP)、3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール-1-イル-トリス(ピロリジン-1-イル)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyNTP)、プロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBrOP)；O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート(TBTU)；及びテトラメチルフルオロホルムアミジニウムヘキサフルオロホスフェート(TFFH)が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の

20

30

【0580】

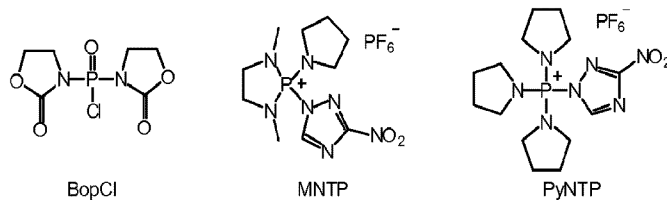
いくつかの実施形態では、縮合試薬は、1-(2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニル)-5-(ピロリジン-2-イル)テトラゾリド、ピバロイルクロリド、プロモトリスピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、N,N'-ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド(BopCl)、又は2-クロロ-5,5-ジメチル-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスフィナンである。いくつかの実施形態では、縮合試薬はN,N'-ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド(BopCl)である。いくつかの実施形態では、縮合試薬はWO2006/066260に記載のものより選択される。

40

【0581】

いくつかの実施形態では、縮合試薬は1,3-ジメチル-2-(3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール-1-イル)-2-ピロリジン-1-イル-1,3,2-ジアザホスホリジニウムヘキサフルオロホスフェート(MNTP)、又は3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール-1-イル-トリス(ピロリジン-1-イル)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyNTP)：

【化183】



である。

【0582】

ヌクレオシド・カップリングパートナーの塩基及び糖の選択

10

本明細書に記載される通り、本発明の方法に従って用いられるヌクレオシド・カップリングパートナーは、互いに同じでもよく、互いに異なっていてもよい。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの合成において用いられるヌクレオチド・カップリングパートナーは、互いに同じ構造及び/又は立体化学的配置のものである。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの合成において用いられる各ヌクレオシド・カップリングパートナーは、オリゴヌクレオチドの所定の他のヌクレオシド・カップリングパートナーとは同じ構造及び/又は立体化学的配置のものではない。本発明の方法に従って用いられる例示的な核酸塩基及び糖は本明細書に記載される。関連する化学・合成技術分野の当業者は、本明細書に記載される核酸塩基及び糖のどのような組み合わせも本発明の方法による使用が意図されていると、認識するであろう。

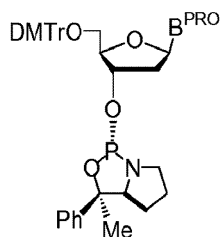
20

【0583】

カップリング・ステップ

本発明に従って用いられる例示的なカップリング手順、キラル試薬、及び縮合試薬は、とりわけ、Wada I (JP 4348077; WO 2005/014609; WO 2005/092909)、Wada II (WO 2010/064146)、及びWada III (WO 2012/039448)に概説される。本発明に従って用いられるキラルヌクレオシド・カップリングパートナーはまた、本明細書では「Wada アミダイト」と称す。いくつかの実施形態では、カップリングパートナーは、

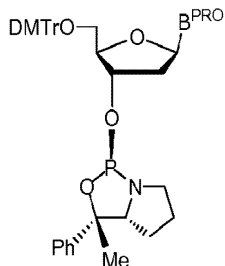
【化184】



30

の構造を有し、B^{P R O}は保護核酸塩基である。いくつかの実施形態では、カップリングパートナーは、

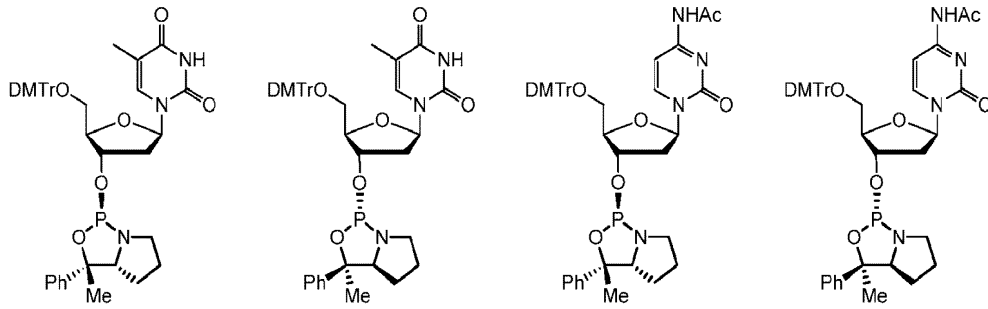
【化185】



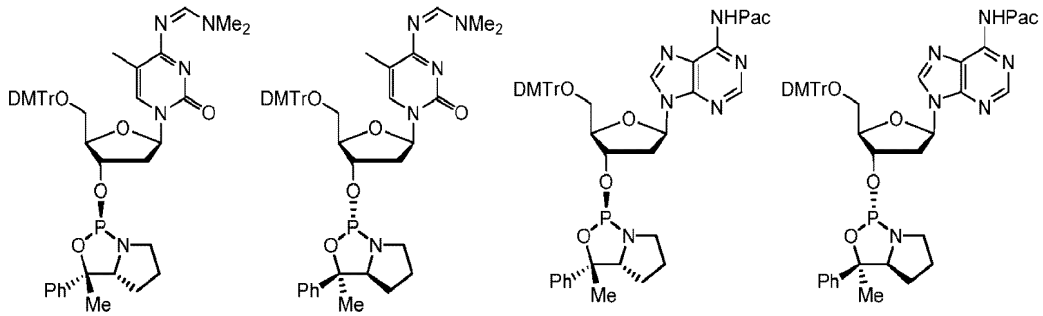
40

の構造を有し、B^{P R O}は保護核酸塩基である。カップリングパートナーとして例示的なキラルホスホラミダイトを下に示す。

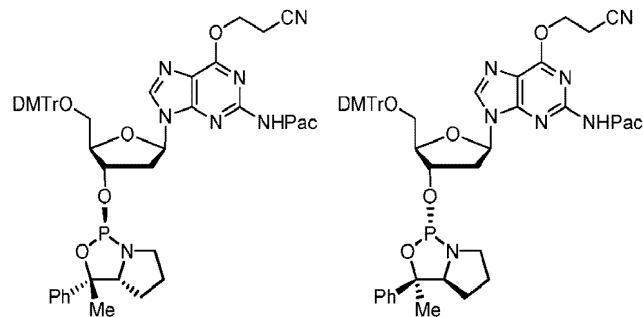
【化 1 8 6】



10



20



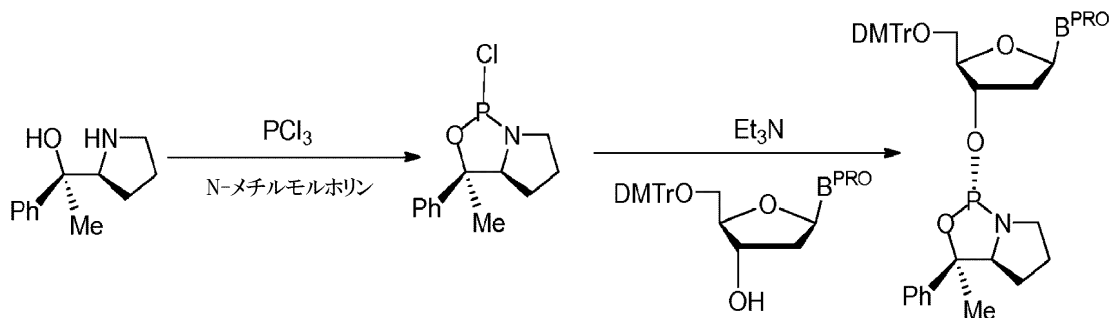
30

【 0 5 8 4】

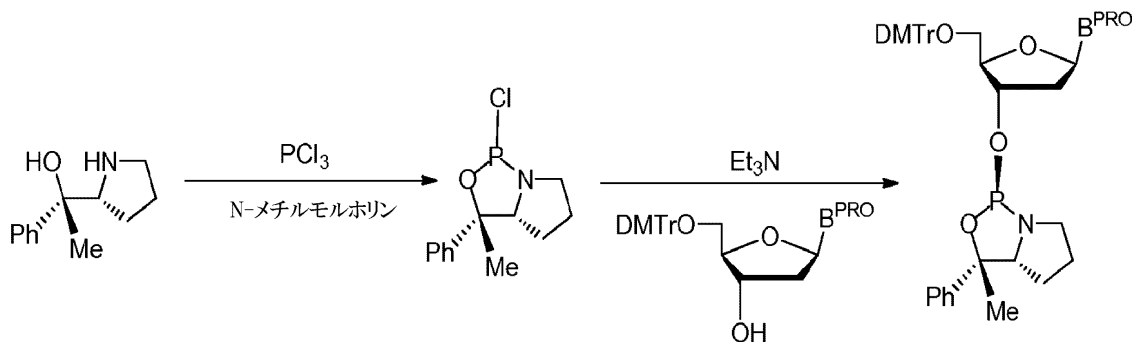
カップリングパートナーを合成するために用いる方法の1つを下スキームIIに示す。

スキームII カップリングパートナーの合成例

【化187】



10



20

【0585】

いくつかの実施形態では、カップリングのステップは、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位の遊離ヒドロキシル基をヌクレオシド・カップリングパートナーと適切な条件下で反応させてカップリングを起こすことを含む。いくつかの実施形態では、カップリングのステップの前に脱ブロッキングのステップを行う。例えば、いくつかの実施形態では、増殖しているオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基はブロックされ（即ち、保護され）、その後ヌクレオシド・カップリングパートナーと反応させるためには脱ブロッキングしなければならない。

【0586】

増殖しているオリゴヌクレオチドの適切なヒドロキシル基を脱ブロッキングした後、キラル試薬を含む溶液と活性化剤を含む溶液との送り込みの準備に当たって、支持体を洗浄し、乾燥する。いくつかの実施形態では、キラル試薬及び活性化剤を同時に送り込む。いくつかの実施形態では、同時の送り込みは、溶液（例えば、ホスホラミダイト溶液）中キラル試薬いくらかと、溶液（例えば、CMP T溶液）中活性化剤いくらかとを、ニトリル溶媒（例えば、アセトニトリル）等の極性非プロトン性溶媒中に送り込むことを含む。

30

【0587】

いくつかの実施形態では、カップリングのステップは、キラル亜リン酸エステル産物が95%超のジアステレオマー過剰率で存在する粗産物組成物を提供する。いくつかの実施形態では、キラル亜リン酸エステル産物が96%超のジアステレオマー過剰率で存在する。いくつかの実施形態では、キラル亜リン酸エステル産物が97%超のジアステレオマー過剰率で存在する。いくつかの実施形態では、キラル亜リン酸エステル産物が98%超のジアステレオマー過剰率で存在する。いくつかの実施形態では、キラル亜リン酸エステル産物が99%超のジアステレオマー過剰率で存在する。

40

【0588】

キャッピング・ステップ

キラル制御オリゴヌクレオチドを作るために提供される方法は、キャッピングのステップを含む。いくつかの実施形態では、キャッピングのステップは単一のステップである。いくつかの実施形態では、キャッピングのステップは2つのステップである。いくつかの実施形態では、キャッピングのステップは2つより多くのステップである。

【0589】

50

いくつかの実施形態では、キャッピングのステップは、キラル補助基の遊離アミンをキャッピングするステップと、残留未反応5'ヒドロキシル基をキャッピングするステップとを含む。いくつかの実施形態では、キラル補助基の遊離アミンと未反応5'ヒドロキシル基は、同じキャッピング基でキャッピングされる。いくつかの実施形態では、キラル補助基の遊離アミンと未反応5'ヒドロキシル基は、同じキャッピング基でキャッピングされる。いくつかの実施形態では、キラル補助基の遊離アミンと未反応5'ヒドロキシル基は、異なるキャッピング基でキャッピングされる。ある特定の実施形態では、異なるキャッピング基でのキャッピングは、オリゴヌクレオチドの合成の間、1つのキャッピング基を他のキャッピング基より先に選択的に除去することを可能とする。いくつかの実施形態では、両方の基のキャッピングは同時に起こる。いくつかの実施形態では、両方の基のキャッピングは繰り返し起こる。

10

【0590】

ある特定の実施形態では、キャッピングは繰り返し起こり、遊離アミンをキャッピングする第1ステップと、その後遊離5'ヒドロキシル基をキャッピングする第2ステップとを含み、遊離アミン及び5'ヒドロキシル基の両方は同じキャッピング基でキャッピングされる。例えば、いくつかの実施形態では、キラル補助基の遊離アミンは、無水物（例えばフェノキシ酢酸無水物、即ち Pac_2O ）で5'ヒドロキシル基がキャッピングされる前に、同じ無水物を用いてキャッピングされる。ある特定の実施形態では、その同じ無水物による5'ヒドロキシル基のキャッピングは異なる条件下（例えば、1つ又は複数の追加試薬の存在下）で起こる。いくつかの実施形態では、5'ヒドロキシル基のキャッピングは、エーテル性溶媒中アミン塩基（例えば、THF中NMI（N-メチルイミダゾール））の存在下で起こる。「キャッピング基」という表現は本明細書では、「保護基」及び「ブロック基」という句と互換的に用いられる。

20

【0591】

いくつかの実施形態では、アミンキャッピング基は、中間体亜リン酸エステル種の転位及び/又は分解を防ぐようにアミンを効果的にキャッピングすることを特徴とする。いくつかの実施形態では、キャッピング基は、それがヌクレオチド間結合リンの分子内切断を防ぐことを目的としてキラル補助基のアミンを保護する能力で選択される。

【0592】

いくつかの実施形態では、「ショートマー（shortmers）」例えば、「n-m」（m及びnは整数であり、 $m < n$ であり；nは標的オリゴヌクレオチドにおける塩基数である）不純物であって、第1サイクルで反応せず次の1つ又は複数のサイクルで反応するオリゴヌクレオチド鎖の反応から起こる不純物、の発生を防ぐようにヒドロキシル基を効果的にキャッピングすることを、5'ヒドロキシル基キャッピング基は特徴とする。かかるショートマー、特に「n-1」の存在は、粗オリゴヌクレオチドの純度に有害な影響を有し、オリゴヌクレオチドの最終的な精製を時間がかかって概して低収率なものとする。

30

【0593】

いくつかの実施形態では、特定のキャップは、特定の条件下で特定のタイプの反応を容易にする傾向に基づいて選択される。例えば、いくつかの実施形態では、キャッピング基はE1脱離反応を容易にする能力で選択され、この反応はキャップ及び/又は補助基を増殖しているオリゴヌクレオチドから切断する。いくつかの実施形態では、キャッピング基はE2脱離反応を容易にする能力で選択され、この反応はキャップ及び/又は補助基を増殖しているオリゴヌクレオチドから切断する。いくつかの実施形態では、キャッピング基はE3脱離反応を容易にする能力で選択され、この反応はキャップ及び/又は補助基を増殖しているオリゴヌクレオチドから切断する。

40

【0594】

修飾ステップ

本明細書で使われる場合、「修飾ステップ（modifying step）」、「修飾ステップ（modification step）」、及び「P-修飾ステップ」とい

50

う句は互換的に用いられ、修飾ヌクレオチド間結合を導入するように用いられるいずれか1つ又は複数のステップを一般的に指す。いくつかの実施形態では、式Iの構造を有する修飾ヌクレオチド間結合。本発明のP-修飾ステップは、提供されるオリゴヌクレオチドの構築が完了する後ではなく、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の間に起こる。こうして、提供されるオリゴヌクレオチドの各ヌクレオチド単位は、ヌクレオチド単位が導入されるサイクルの間、結合リンで個別に修飾され得る。

【0595】

いくつかの実施形態では、適切なP-修飾試薬はイオウ求電子試薬、セレンウム求電子試薬、酸素求電子試薬、ホウ素化試薬、又はアジド試薬である。

【0596】

例えば、いくつかの実施形態では、セレンウム試薬は元素セレンウム、セレンウム塩、又は置換ジセレニドである。いくつかの実施形態では、酸素求電子試薬は元素酸素、ペルオキシド、又は置換ペルオキシドである。いくつかの実施形態では、ホウ素化試薬は、ボラン-アミン(例えば、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(BH₃·DIPEA)、ボラン-ピリジン(BH₃·Py)、ボラン-2-クロロピリジン(BH₃·CPy)、ボラン-アニリン(BH₃·An))、ボラン-エーテル試薬(例えば、ボラン-テトラヒドロフラン(BH₃·THF))、ボラン-ジアルキルスルフィド試薬(例えば、BH₃·Me₂S)、アニリン-シアノボラン、又はトリフェニルホスフィン-カルボアルコキシボランである。いくつかの実施形態では、アジド試薬は、続く還元を経てアミン基を提供することができるアジド基を含む。

【0597】

いくつかの実施形態では、P-修飾試薬は本明細書に記載される硫化試薬である。いくつかの実施形態では、修飾のステップは、リンを硫化してホスホロチオエート結合又はホスホロチオエートトリエステル結合を提供することを含む。いくつかの実施形態では、修飾のステップは式Iのヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドを提供する。

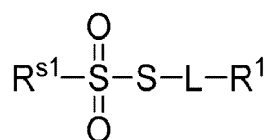
【0598】

いくつかの実施形態では、本発明は硫化試薬、同試薬を作る方法、及び同試薬の使用法を提供する。

【0599】

いくつかの実施形態では、かかる硫化試薬はチオスルホン酸試薬である。いくつかの実施形態では、チオスルホン酸試薬は式S-Iの構造を有し：

【化188】



S-I

S-I、

式中、

R^{s1}はRであり；

R、L、及びR¹のそれぞれは互いに独立して上及び本明細書に定義され記載される通りである。

【0600】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はビス(チオスルホン酸)試薬である。いくつかの実施形態では、ビス(チオスルホン酸)試薬は式S-IIの構造を有し：

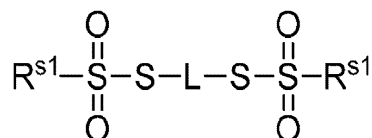
10

20

30

40

【化189】



S-II

S - I I、
 式中、 $\text{R}^{\text{s}1}$ 及び L のそれぞれは互いに独立して上及び本明細書に定義され記載される通りである。

10

【0601】

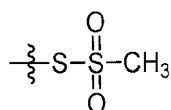
一般的に上に定義される通り、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は R であり、R は上及び本明細書に定義され記載される通りである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよい脂肪族、アリアル、ヘテロシクリル、又はヘテロアリアルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよいアルキルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよいアルキルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はメチルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はシアノメチルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はニトロメチルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよいアリアルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよいフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は p - ニトロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は p - メチルフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は p - クロロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は o - クロロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は 2, 4, 6 - トリクロロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はペンタフルオロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよい置換ヘテロシクリルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよい置換ヘテロアリアルである。

20

【0602】

いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1} - \text{S}(\text{O})_2\text{S} -$ は

【化190】

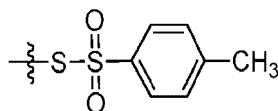


30

(MTS)

である。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1} - \text{S}(\text{O})_2\text{S} -$ は

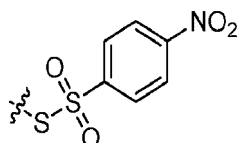
【化191】



(TTS)

である。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1} - \text{S}(\text{O})_2\text{S} -$ は

【化192】

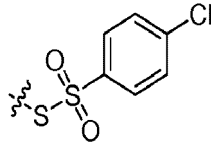


40

(NO₂PheTS)

である。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1} - \text{S}(\text{O})_2\text{S} -$ は

【化193】

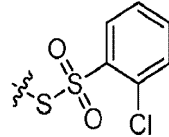


(p-ClPhETS)

である。いくつかの実施形態では、

 $R^{s1} - S(O)_2S -$ は

【化194】

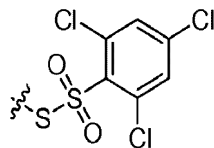


(o-ClPhETS)

である。いくつかの実施形態では、

 $R^{s1} - S(O)_2S -$ は

【化195】

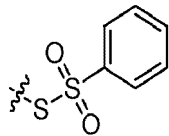


(2,4,6-TrichlorophETS)

である。いくつかの実施形態では、

 $R^{s1} - S(O)_2S -$ は

【化196】

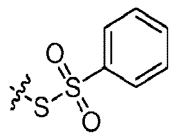


(PhETS)

である。いくつかの実施形態では、

 $R^{s1} - S(O)_2S -$ は

【化197】

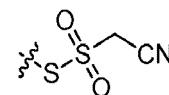


(PFPhETS)

である。いくつかの実施形態では、

 $R^{s1} - S(O)_2S -$ は

【化198】

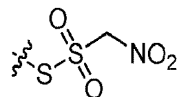


(a-CNMTS)

である。いくつかの実施形態では、

 $R^{s1} - S(O)_2S -$ は

【化199】

(a-NO₂MTS)

である。いくつかの実施形態では、

 $R^{s1} - S(O)_2S -$ は

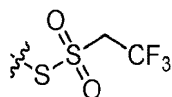
10

20

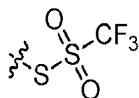
30

40

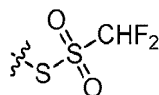
【化200】

(a - CF₃ M T S)である。いくつかの実施形態では、 $R^{S1} - S(O)_2 S -$ は

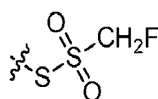
【化201】

(a - CF₃ T S)である。いくつかの実施形態では、 $R^{S1} - S(O)_2 S -$ は

【化202】

(a - CHF₂ T S)である。いくつかの実施形態では、 $R^{S1} - S(O)_2 S -$ は

【化203】

(a - CH₂ F T S)

である。

【0603】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はS - I又はS - IIの構造を有し、Lは - S - R^{L3} - 又は - S - C(O) - R^{L3} - である。いくつかの実施形態では、Lは - S - R^{L3} - 又は - S - C(O) - R^{L3} - であり、R^{L3}は置換されてもよいC₁ ~ C₆アルキレンである。いくつかの実施形態では、Lは - S - R^{L3} - 又は - S - C(O) - R^{L3} - であり、R^{L3}は置換されてもよいC₁ ~ C₆アルケニレンである。いくつかの実施形態では、Lは - S - R^{L3} - 又は - S - C(O) - R^{L3} - であり、R^{L3}は置換されてもよいC₁ ~ C₆アルキレンであり、1つ又は複数のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁ ~ C₆アルケニレン、アリーレン、又はヘテロアリーレンによって互いに独立して置換されていてもよい。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、R^{L3}は置換されていてもよい - S - (C₁ ~ C₆アルケニレン) - 、 - S - (C₁ ~ C₆アルキレン) - 、 - S - (C₁ ~ C₆アルキレン) - アリーレン - (C₁ ~ C₆アルキレン) - 、 - S - CO - アリーレン - (C₁ ~ C₆アルキレン) - 、又は - S - CO - (C₁ ~ C₆アルキレン) - アリーレン - (C₁ ~ C₆アルキレン) - である。いくつかの実施形態では、硫化試薬はS - I又はS - IIの構造を有し、Lは - S - R^{L3} - 又は - S - C(O) - R^{L3} - であり、イオウ原子はR¹に結合する。

【0604】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はS - I又はS - IIの構造を有し、Lはアルキレン、アルケニレン、アリーレン、又はヘテロアリーレンである。

【0605】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はS - I又はS - IIの構造を有し、Lは

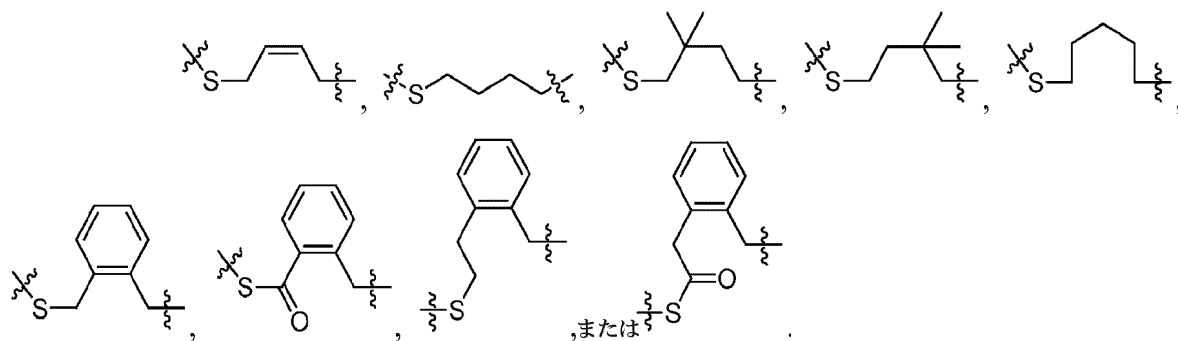
10

20

30

40

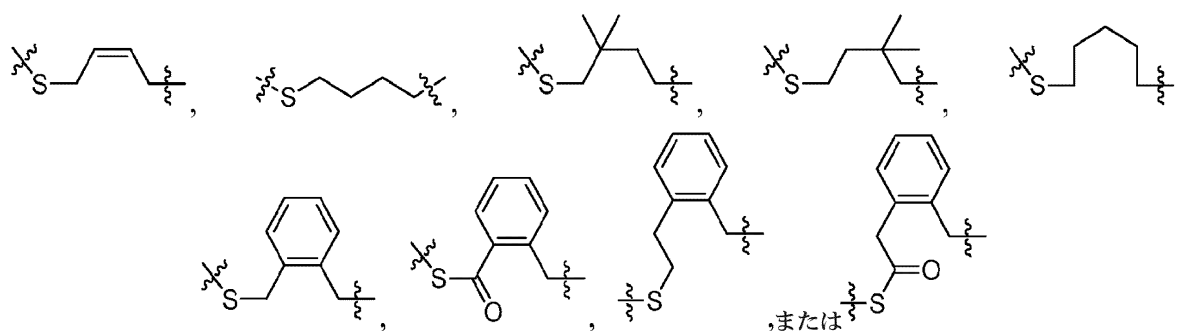
【化204】



10

である。いくつかの実施形態では、Lは

【化205】



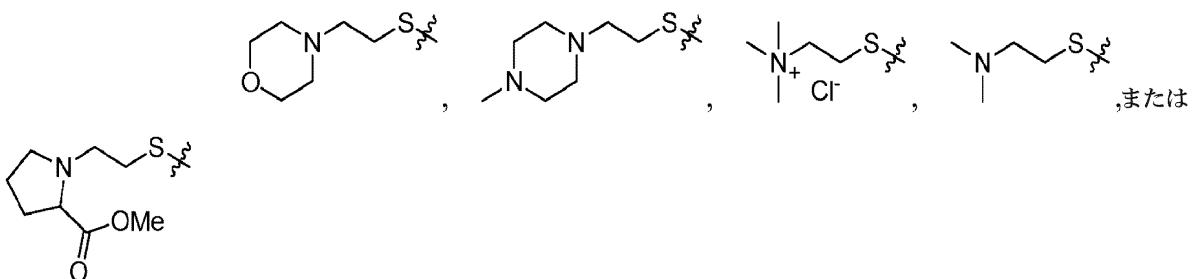
20

であり、イオウ原子はR¹に結合する。

【0606】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はS-I又はS-IIの構造を有し、R¹は

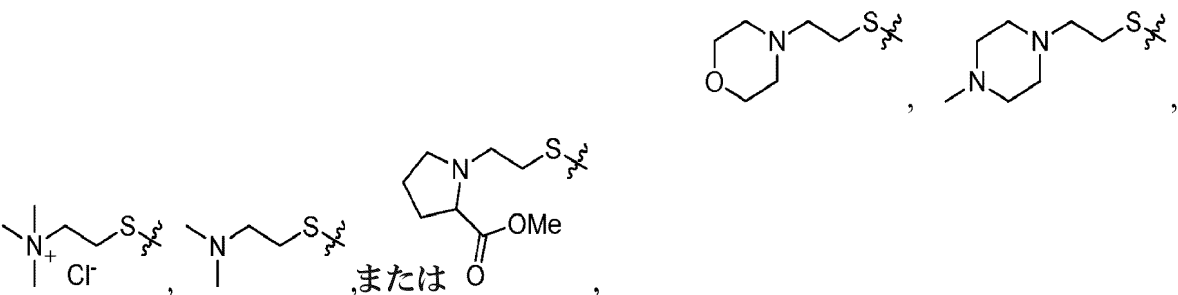
【化206】



30

である。いくつかの実施形態では、R¹は

【化207】



40

であり、イオウ原子はLに結合する。

【0607】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はS-I又はS-IIの構造を有し、Lは

R^{s2} 及び R^{s3} はそれらが結合している原子とともに一緒になって、置換されているもよい複素環又はヘテロアリアル環を形成し；

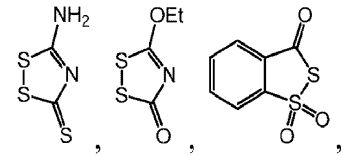
X^s は $-S(O)_2-$ 、 $-O-$ 、又は $-N(R')$ - であり；及び

R' は上及び本明細書に定義され記載される通りである。

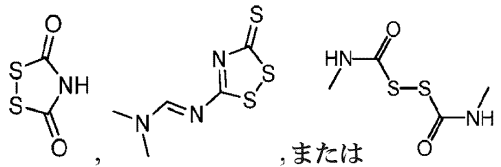
【0612】

いくつかの実施形態では、硫化試薬は S_8 、

【化211】

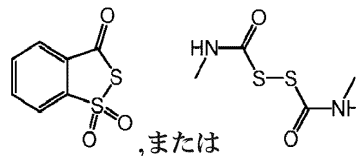


10



である。いくつかの実施形態では、硫化試薬は S_8 、

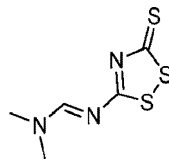
【化212】



20

である。いくつかの実施形態では、硫化試薬は

【化213】



30

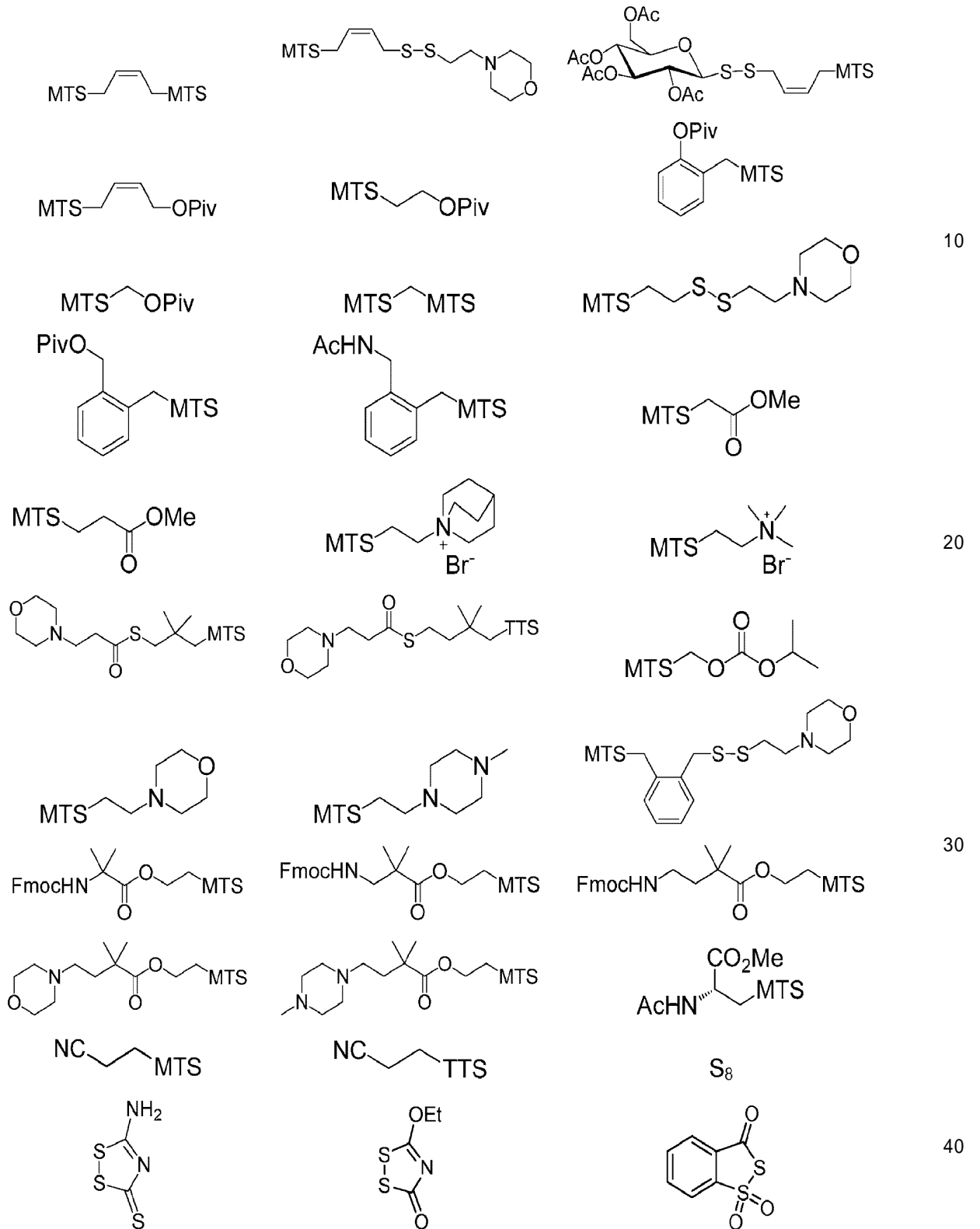
である。

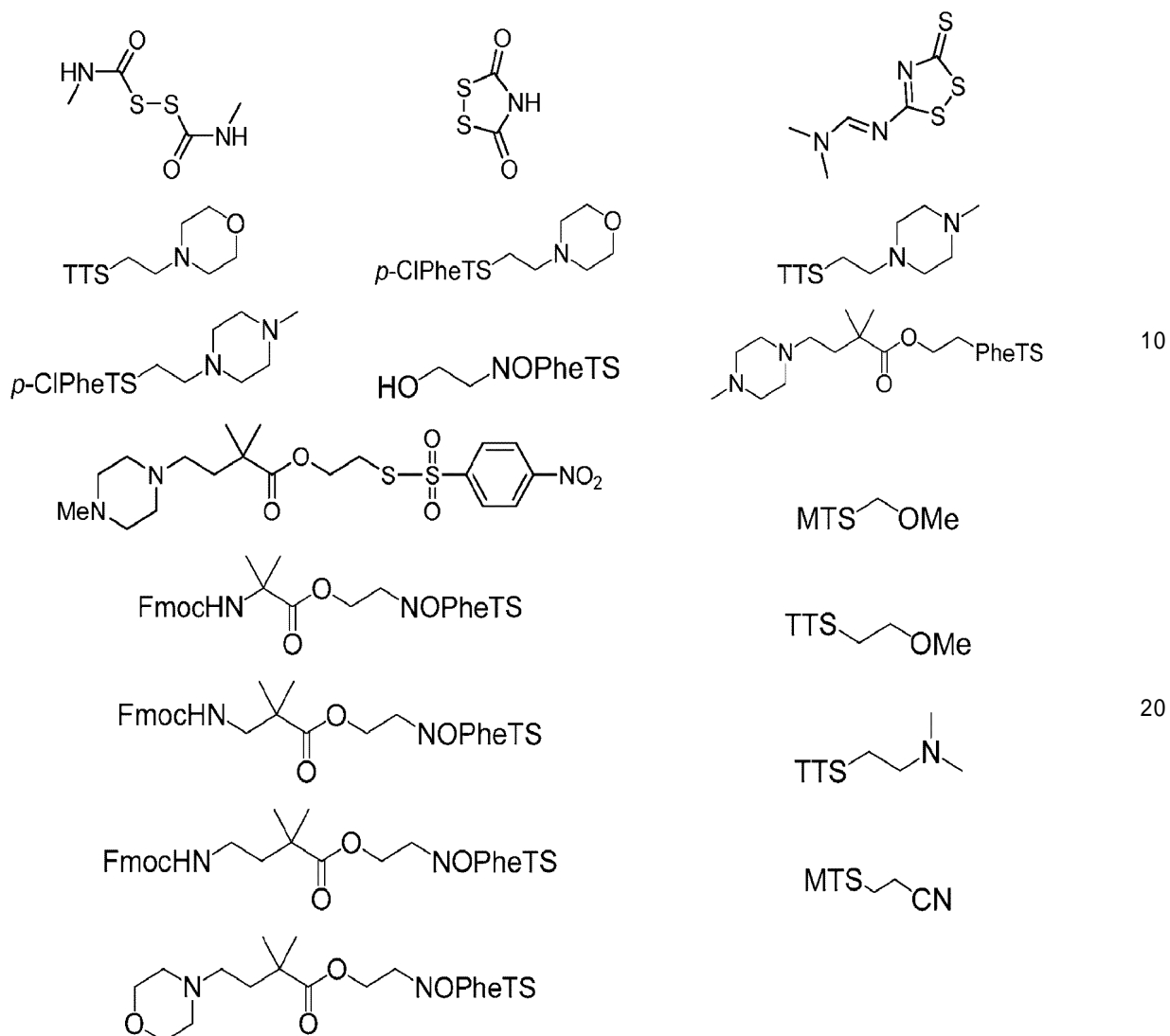
【0613】

例示的な硫化試薬を下の表5に示す。

表5 例示的硫化試薬

【表 4】

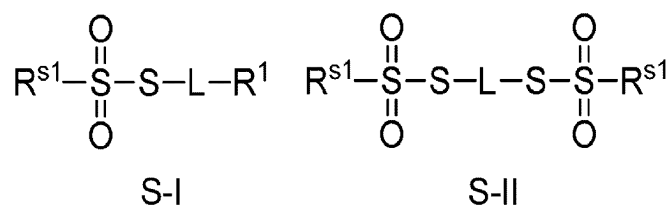




【0614】

いくつかの実施形態では、提供される硫化試薬を用いてH-ホスホネートを修飾する。例えば、いくつかの実施形態では、H-ホスホネートオリゴヌクレオチドは、例えば、Wada I又はWada IIの方法を用いて合成し、式S-I又はS-IIの硫化試薬を用いて修飾する：

【化214】



式中、 $\text{R}^{\text{S}1}$ 、L、及び R^1 のそれぞれは上及び本明細書に記載され定義される通りである。

【0615】

いくつかの実施形態では、本発明はホスホロチオエートトリエステルを合成する方法を提供し、本方法は、

i) 構造：

10

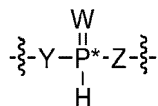
20

30

40

50

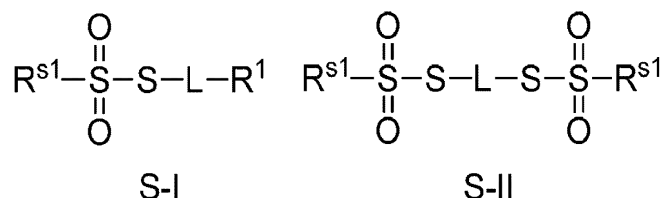
【化 2 1 5】



(式中、W、Y、及びZのそれぞれは上及び本明細書に記載され定義される通りであり、シリル化試薬とともにシリルオキシホスホネートを提供する)のH-ホスホネートを反応させるステップと、

i i) シリルオキシホスホネートを構造 S - I 又は S - II :

【化 2 1 6】



の硫化試薬と反応させ、ホスホロチオトリエステルを提供するステップと、を含む。

【0 6 1 6】

いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬を硫化試薬の代わりに用いてヌクレオチド間結合へ修飾を導入する。いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬は次の式の1つを有する化合物であり：

Se 、 $\text{R}^{\text{s}2}\text{-Se-Se-R}^{\text{s}3}$ 、又は $\text{R}^{\text{s}2}\text{-Se-X}^{\text{s}}\text{-R}^{\text{s}3}$ 、
式中、 $\text{R}^{\text{s}2}$ 及び $\text{R}^{\text{s}3}$ のそれぞれは互いに独立して、脂肪族、アミノアルキル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アシル、アミド、イミド、又はチオカルボニルより選択される置換されていてよい基であり；又は

$\text{R}^{\text{s}2}$ 及び $\text{R}^{\text{s}3}$ はそれらが結合している原子とともに一緒になって、置換されていてよい複素環又はヘテロアリール環を形成し；

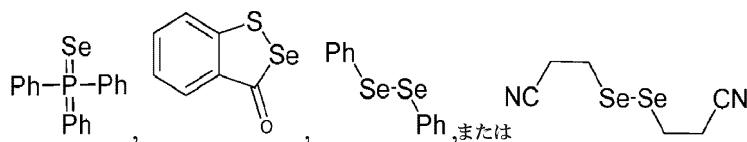
X^{s} は $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、又は $-\text{N}(\text{R}')-$ であり；及び

R' は上及び本明細書に定義され記載される通りである。

【0 6 1 7】

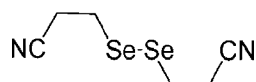
他の実施形態では、セレンウム求電子試薬は Se 、 KSeCN 、

【化 2 1 7】



の化合物である。いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬は Se 又は

【化 2 1 8】



である。

【0 6 1 8】

いくつかの実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、硫化の間リンに移動する成分が単一イオウ原子(例えば、 $-\text{S}-$ 又は $=\text{S}$)ではなく置換イオウ(例えば、 $-\text{SR}$)であることを特徴とする。

【0 6 1 9】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、試薬の活性が、所定の電子吸引基又は電子供与基で試薬を修飾することによって調節可能であることを特徴とする。

【0620】

いくつかの実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、それが結晶性であることを特徴とする。いくつかの実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、それが高い結晶化度を有することを特徴とする。ある特定の実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、例えば再結晶によって試薬の精製が容易であることを特徴とする。ある特定の実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、それにイオウ含有不純物が実質的にないことを特徴とする。いくつかの実施形態では、イオウ含有不純物が実質的にない硫化試薬は効率の向上を示す。

10

【0621】

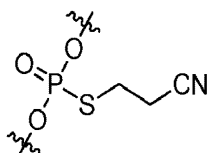
いくつかの実施形態では、提供されるキラル制御オリゴヌクレオチドは1つ又は複数のリン酸ジエステル結合を含む。かかるキラル制御オリゴヌクレオチドを合成するために、1つ又は複数の修飾ステップを酸化ステップに置き換えて、同等のリン酸ジエステル結合を導入してもよい。いくつかの実施形態では、酸化ステップは、通常のオリゴヌクレオチド合成と同様に実施する。いくつかの実施形態では、酸化ステップは I_2 の使用を含む。いくつかの実施形態では、酸化ステップは I_2 及びピリジンの使用を含む。いくつかの実施形態では、酸化ステップは、THF/ピリジン/水(70:20:10-v/v/v)共溶媒系中0.02M I_2 の使用を含む。例示的サイクルをスキームI-cに示す。

20

【0622】

いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート前駆体を用いて、ホスホロチオエート結合を含むキラル制御オリゴヌクレオチドを合成する。いくつかの実施形態では、かかるホスホロチオエート前駆体は

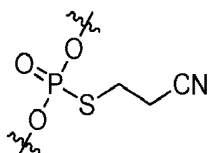
【化219】



30

である。いくつかの実施形態では、

【化220】



は、サイクル終了後、標準脱保護/放出手順の間、ホスホロチオエートジエステル結合へと変換される。例をさらに下に示す。

【0623】

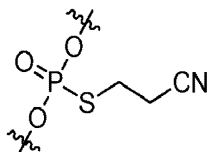
40

いくつかの実施形態では、提供されるキラル制御オリゴヌクレオチドは1つ又は複数のリン酸ジエステル結合及び1つ又は複数のホスホロチオエートジエステル結合を含む。いくつかの実施形態では、提供されるキラル制御オリゴヌクレオチドは1つ又は複数のリン酸ジエステル結合及び1つ又は複数のホスホロチオエートジエステル結合を含み、少なくとも1つのリン酸ジエステル結合は、3'から5'に合成されるとき全てのホスホロチオエートジエステル結合の後で導入される。かかるキラル制御オリゴヌクレオチドを合成するために、いくつかの実施形態では、1つ又は複数の修飾ステップを酸化ステップに置き換えて、同等のリン酸ジエステル結合を導入してもよく、ホスホロチオエート前駆体をホスホロチオエートジエステル結合のそれぞれに対して導入する。いくつかの実施形態では、所望のオリゴヌクレオチド長を達成した後、ホスホロチオエート前駆体をホスホロチオ

50

エートジエステル結合に変換する。いくつかの実施形態では、サイクル終了の間か後の脱保護 / 放出ステップでホスホロチオエート前駆体をホスホロチオエートジエステル結合に変換する。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート前駆体は、それを脱離経路によって除去できることを特徴とする。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート前駆体は

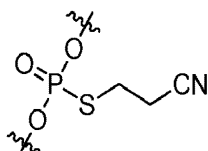
【化 2 2 1】



10

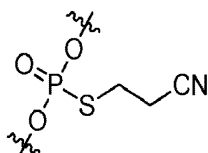
である。当業者に理解されるように、合成の間、ホスホロチオエート前駆体、例えば、

【化 2 2 2】



を使用する利点の 1 つは、

【化 2 2 3】



20

はある特定の条件下でホスホロチオエートより安定しているということである。

【0624】

いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート前駆体は、本明細書に記載されるリン保護基、例えば、2 - シアノエチル (CE 又は Cne)、2 - トリメチルシリルエチル、2 - ニトロエチル、2 - スルホニルエチル、メチル、ベンジル、o - ニトロベンジル、2 - (p - ニトロフェニル)エチル (NPE 又は Npe)、2 - (tert - ブチルカルボキサミド) - 1 - プロピル、4 - オキソペンチル、4 - メチルチオ - 1 - ブチル、2 - シアノ - 1, 1 - ジメチルエチル、4 - N - メチルアミノブチル、3 - (2 - ピリジル) - 1 - プロピル、2 - [N - メチル - N - (2 - ピリジル)] アミノエチル、2 - (N - ホルミル、N - メチル) アミノエチル、4 - [N - メチル - N - (2, 2, 2 - トリフルオロアセチル) アミノ] ブチルである。例をさらに下に示す。

30

【0625】

所望の硫化試薬を合成する方法は、本明細書及び実施例の項に記載される。

【0626】

上に記する通り、いくつかの実施形態では、硫化は、増殖しているオリゴヌクレオチドからキラル試薬を切断する条件下で起こる。いくつかの実施形態では、硫化は、増殖しているオリゴヌクレオチドからキラル試薬を切断しない条件下で起こる。

40

【0627】

いくつかの実施形態では、硫化試薬を適切な溶媒に溶解させ、カラムに送り込む。ある特定の実施形態では、溶媒は、ニトリル溶媒等の極性非プロトン性溶媒である。いくつかの実施形態では、溶媒はアセトニトリルである。いくつかの実施形態では、硫化試薬の溶液は、ニトリル溶媒 (例えば、アセトニトリル) 中で、硫化試薬 (例えば、本明細書に記載されるチオスルホン酸誘導体) を BSTFA (N, O - ビス - トリメチルシリル - トリフルオロアセトアミド) と混合することによって調製する。いくつかの実施形態では、BSTFA を含まない。例えば、本発明者は、一般式 $R^{s2} - S - S(O)_2 - R^{s3}$ の比

50

較的より反応性のある硫化試薬がしばしば、BSTFAの不存在下、硫化反応に問題なく関与できることを見出した。ほんの一例を挙げると、発明者は、 R^s ² が p - ニトロフェニルで、 R^s ³ がメチルである場合 BSTFA が不要ないことを例証した。本開示を参考にすると、当業者は、BSTFA を必要としない他の状況及び / 又は硫化試薬を決定することが容易に可能となるであろう。

【0628】

いくつかの実施形態では、硫化ステップを室温で実施する。いくつかの実施形態では、硫化ステップをより低い温度、例えば、約 0 、約 5 、約 10 、又は約 15 で実施する。いくつかの実施形態では、硫化ステップを約 20 より高い温度で実施する。

【0629】

いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分 ~ 約 120 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分 ~ 約 90 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分 ~ 約 60 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分 ~ 約 30 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分 ~ 約 25 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分 ~ 約 20 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分 ~ 約 15 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分 ~ 約 10 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 5 分 ~ 約 60 分間行う。

【0630】

いくつかの実施形態では、硫化反応は約 5 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 10 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 15 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 20 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 25 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 30 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 35 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 40 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 45 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 50 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 55 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 60 分間行う。

【0631】

本発明の方法に従って作られる硫化修飾産物のいくつかは予想外に安定であることが期待せずに見い出された。いくつかの実施形態では、予想外に安定な産物はホスホロチオエートトリエステルである。いくつかの実施形態では、予想外に安定な産物は、式 I - c の構造を有する 1 つ又は複数のヌクレオチド間結合を含むキラル制御オリゴヌクレオチドである。

【0632】

当業者は、本明細書に記載される硫化方法及び本明細書に記載される硫化試薬はまた、Wada II (WO2010/064146) に記載されるもの等、修飾 H - ホスホネートオリゴヌクレオチドに関連して有用であることを認識する。

【0633】

いくつかの実施形態では、硫化反応は、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、又は 98 % の段階的硫化効率を有する。いくつかの実施形態では、硫化反応は少なくとも純度 98 % の粗ジヌクレオチド産物組成物を提供する。いくつかの実施形態では、硫化反応は少なくとも純度 90 % の粗テトラヌクレオチド産物組成物を提供する。いくつかの実施形態では、硫化反応は少なくとも純度 70 % の粗ドデカヌクレオチド産物組成物を提供する。いくつかの実施形態では、硫化反応は少なくとも純度 50 % の粗イコサヌクレオチド産物組成物を提供する。

【0634】

結合リンを修飾するステップが完了すると、オリゴヌクレオチドは、サイクルを再開するための準備として別の脱ブロッキングステップを経る。いくつかの実施形態では、キラル補助基は硫化後無傷のままであり、続く脱ブロッキングステップの間脱ブロッキングされ、この脱ブロッキングステップはサイクルを再開する前に必ず起こる。脱ブロッキング、カップリング、キャッピング、及び修飾のステップは、増殖しているオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドが所望の長さに達するまで繰り返し、所望の長さに達した時点でオリゴヌクレオチドを、固体支持体から直ぐに切断するか、精製目的の支持体に付けたままとして後で切断するか、どちらかが可能である。いくつかの実施形態では、1つ又は複数の保護基は、ヌクレオチド塩基の1つ又は複数において存在し、支持体からのオリゴヌクレオチドの切断と塩基の脱保護は単一ステップにおいて起こる。いくつかの実施形態では、1つ又は複数の保護基は、ヌクレオチド塩基の1つ又は複数において存在し、支持体からのオリゴヌクレオチドの切断と塩基の脱保護は1つより多数のステップにおいて起こる。いくつかの実施形態では、脱保護と、支持体からの切断とは、例えば、1つ又は複数のアミン塩基を用いた塩基性条件下で起こる。ある特定の実施形態では、1つ又は複数のアミン塩基はプロピルアミンを含む。ある特定の実施形態では、1つ又は複数のアミン塩基はピリジンを含む。

10

【0635】

いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び/又は脱保護は、約30 ~ 約90の高温で起こる。いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び/又は脱保護は、約40 ~ 約80の高温で起こる。いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び/又は脱保護は、約50 ~ 約70の高温で起こる。いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び/又は脱保護は、約60の高温で起こる。いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び/又は脱保護は、周囲温度で起こる。

【0636】

例示的な精製手順は、本明細書に記載されかつ当技術分野で周知であるか、又はそのいずれかである。

20

【0637】

注目すべきは、各サイクル中、増殖しているオリゴヌクレオチドからキラル補助基を除去することが少なくとも次の理由で有利であることであり、その理由とは、(1) 敏感な可能性のある官能基をリンに導入するオリゴヌクレオチド合成の最後に、何らかの分離ステップで補助基を除去する必要がないこと、(2) 副反応を起こしやすく、かつ/又は後続化学作用へ干渉しやすい不安定なリン-補助基中間体が避けられることである。このようにして、各サイクル中のキラル補助基の除去は合成全体をより効率的にする。

【0638】

脱ブロッキングのステップがサイクルとの関連において上に記載されているが、一方、追加の一般的方法が下の通り含まれる。

30

【0639】

脱ブロッキングステップ

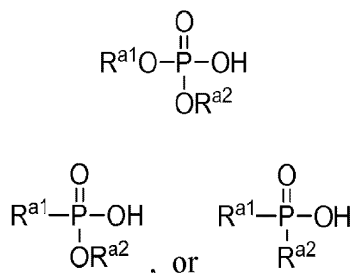
いくつかの実施形態では、カップリングのステップは、その前に脱ブロッキングのステップが来る。例えば、いくつかの実施形態では、増殖しているオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基をブロッキングし(即ち、保護し)、それを続いてヌクレオシド・カップリングパートナーと反応させるためには脱ブロッキングしなければならない。

【0640】

いくつかの実施形態では、酸性化を用いてブロック基を除去する。いくつかの実施形態では、酸はブレンステッド酸又はルイス酸である。有用なブレンステッド酸としては、有機溶媒又は水(80%酢酸の場合)中に-0.6(トリフルオロ酢酸)~4.76(酢酸)の pK_a (水中25)値を有する、カルボン酸、アルキルスルホン酸、アリールスルホン酸、リン酸及びその誘導体、ホスホン酸及びその誘導体、アルキルホスホン酸及びそれらの誘導体、アリールホスホン酸及びそれらの誘導体、ホスフィン酸、ジアルキルホスフィン酸、並びにジアリールホスフィン酸がある。酸性化ステップで用いられる酸(1~80%)の濃度は酸の酸性度による。強酸性条件は、脱プリン/脱ピリミジンを生じ、プリン塩基又はピリミジニル塩基がリボース環及び/又は他の糖環から切断されるので、酸強度を考慮に入れなければならない。いくつかの実施形態では、酸は $R^{a1}COOH$ 、 $R^{a1}SO_3H$ 、 $R^{a3}SO_3H$ 、

40

【化 2 2 4】



より選択され、式中、 $\text{R}^{\text{a}1}$ 及び $\text{R}^{\text{a}2}$ のそれぞれは互いに独立して水素又は置換されていてもよいアルキル若しくはアリールであり、 $\text{R}^{\text{a}3}$ は置換されていてもよいアルキル又はアリールである。

10

【0641】

いくつかの実施形態では、酸性化は有機溶媒中ルイス酸によって達成する。例示的なかかる有用なルイス酸としては、 $\text{Zn}(\text{X}^{\text{a}})_2$ があり、 X^{a} は Cl 、 Br 、 I 、又は CF_3SO_3 である。

【0642】

いくつかの実施形態では、酸性化のステップは、プリン成分を縮合中間体から除去することなくブロック基を除去するのに有効な量のプレンステッド酸又はルイス酸を添加することを含む。

20

【0643】

酸性化ステップに有用な酸としてはまた、有機溶媒中 10% リン酸、有機溶媒中 10% 塩酸、有機溶媒中 1% トリフルオロ酢酸、有機溶媒中 3% ジクロロ酢酸又はトリクロロ酢酸又は水中 80% 酢酸が挙げられるが、これらに限定されない。このステップで用いられるようなプレンステッド酸又はルイス酸の濃度も、酸の濃度が、糖成分からの核酸塩基の切断を起こす濃度を超えないように選択する。

【0644】

いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中約 1% トリフルオロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中約 0.1% ~ 約 8% トリフルオロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中 3% のジクロロ酢酸又はトリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中約 0.1% ~ 約 10% ジクロロ酢酸又はトリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中 3% トリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中約 0.1% ~ 約 10% トリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、水中 80% 酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、水中約 50% ~ 約 90%、又は約 50% ~ 約 80%、約 50% ~ 約 70%、約 50% ~ 約 60%、約 70% ~ 約 90% 酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、さらに酸性溶媒へカチオンスカベンジャーを添加することを含む。ある特定の実施形態では、カチオンスカベンジャーはトリエチルシラン又はトリイソプロピルシランであってもよい。いくつかの実施形態では、ブロック基を酸性化によって脱ブロッキングし、これは有機溶媒中 1% トリフルオロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、ブロック基を酸性化によって脱ブロッキングし、これは有機溶媒中 3% ジクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、ブロック基を酸性化によって脱ブロッキングし、これは有機溶媒中 3% トリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、ブロック基を酸性化によって脱ブロッキングし、これはジクロロメタン中 3% トリクロロ酢酸を添加することを含む。

30

40

【0645】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、合成装置上で完了し、増殖しているオリゴヌクレオチドのヒドロキシル基を脱ブロッキングするステップは、いくらかの量の溶媒を

50

合成装置カラムへ送り込むことを含み、このカラムは、オリゴヌクレオチドを付ける固体支持体を含有する。いくつかの実施形態では、溶媒は、ハロゲン化溶媒（例えば、ジクロロメタン）である。ある特定の実施形態では、溶媒は、いくらかの量の酸を含む。いくつかの実施形態では、溶媒は、いくらかの量の有機酸、例えばトリクロロ酢酸を含む。ある特定の実施形態では、酸は約1%～約20% w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は約1%～約10% w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は約1%～約5% w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は約1%～約3% w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は約3% w/vの量で存在する。ヒドロキシル基を脱ブロッキングする方法は本明細書にさらに記載される。いくつかの実施形態では、酸は、ジクロロメタン中3% w/vで存在する。

10

【0646】

いくつかの実施形態では、キラル補助基は、脱ブロッキングステップの前に除去する。いくつかの実施形態では、キラル補助基は脱ブロッキングステップの間に除去する。

【0647】

いくつかの実施形態では、サイクル終了を脱ブロッキングステップの前に実施する。いくつかの実施形態では、サイクル終了を脱ブロッキングステップの後に実施する。

【0648】

ブロック基ノ保護基除去の一般的条件

核酸塩基又は糖成分上に位置するヒドロキシル成分又はアミノ成分等の官能基は、合成の間ブロック（保護）基（成分）でルーチン的にブロッキングされ、その後脱ブロッキングされる。一般に、ブロック基は分子の化学官能成分を特定の反応条件に対して不活性とし、後でブロック基を分子内のそのような官能成分から、分子の残りを実質的に損傷することなく除去することが可能である（例えば、Green and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1991参照）。例えば、アミノ基は、フタルイミド、9-フルドレニルメトキシカルボニル (fludrenylmethoxycarbonyl) (FMOC)、トリフェニルメチルスルフェニル、t-BOC、4,4'-ジメトキシトリチル (DMTr)、4-メトキシトリチル (MMTr)、9-フェニルキサンチン-9-イル (ピキシル)、トリチル (Tr)、又は9-(p-メトキシフェニル)キサンチン-9-イル (MOX) 等の窒素ブロック基でブロッキングすることができる。カルボキシル基はアセチル基として保護できる。ヒドロキシル基は、テトラヒドロピラニル (THP)、t-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル]-4-メトキシピペリジン-4-イル (Ctmp)、1-(2-フルオロフェニル)-4-メトキシピペリジン-4-イル (Fpmp)、1-(2-クロロエトキシ)エチル、3-メトキシ-1,5-ジカルボメトキシペンタン-3-イル (MDP)、ビス(2-アセトキシエトキシ)メチル (ACE)、トリイソプロピルシリルオキシメチル (TOM)、1-(2-シアノエトキシ)エチル (CEE)、2-シアノエトキシメチル (CEM)、[4-(N-ジクロロアセチル-N-メチルアミノ)ベンジルオキシ]メチル、2-シアノエチル (CN)、ピバロイルオキシメチル (PivOM)、レヴュニル (levunyl) オキシメチル (ALE) 等として保護できる。他の代表的なヒドロキシルブロック基については記載がなされている（例えば、Beaucage et al., *Tetrahedron*, 1992, 46, 2223参照）。いくつかの実施形態では、ヒドロキシルブロック基は、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、9-フェニルキサンチン-9-イル (ピキシル) 及び9-(p-メトキシフェニル)キサンチン-9-イル (MOX) 等、酸に不安定な基である。化学官能基はまた、それらを前駆体形式で含むことによってブロッキングすることが可能である。このようにして、アジド基は容易にアミンに変換されるので、アミンのブロッキング形式と考えることができる。核酸合成において利用されるさらなる代表的保護基が知られている（例えば、Agrawal et al., *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, Eds.

20

30

40

50

, Humana Press, New Jersey, 1994, Vol. 26, pp. 1-72 参照)。

【0649】

核酸からブロック基を除去する種々の方法が知られ、用いられる。いくつかの実施形態では、全てのブロック基を除去する。いくつかの実施形態では、ブロック基の一部を除去する。いくつかの実施形態では、反応条件は、所定のブロック基を選択的に除去するように調整可能である。

【0650】

いくつかの実施形態では、核酸塩基ブロック基が存在する場合、それは、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の後、酸性試薬で切断可能である。いくつかの実施形態では、核酸塩基ブロック基が存在する場合、それは、酸性条件下でも塩基性条件下でも切断可能ではなく、例えば、フッ化物塩又はフッ化水素酸複合体で切断可能である。いくつかの実施形態では、核酸塩基ブロック基が存在する場合、それは、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の後、塩基又は塩基性溶媒の存在下で切断可能である。ある特定の実施形態では、核酸塩基ブロック基の1つ又は複数は、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の後、塩基又は塩基性溶媒の存在下で切断可能であるが、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の間先に起こる1つ又は複数の脱保護ステップの特定の条件に対して安定していることを特徴とする。

【0651】

いくつかの実施形態では、核酸塩基にブロック基は必要とされない。いくつかの実施形態では、核酸塩基にブロック基が必要とされる。いくつかの実施形態では、所定の核酸塩基は1つ又は複数のブロック基を必要とし、一方、他の核酸塩基は1つ又は複数のブロック基を必要としない。

【0652】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、合成の後固体支持体から切断される。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、ピリジン中プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、ピリジン中20%プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、無水ピリジン中プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、アセトニトリル、NMP、DMSO、スルホン、及び/又はルチジン等の極性非プロトン性溶媒の使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、溶媒、例えば極性非プロトン性溶媒、並びに1つ若しくは複数の一次アミン(例えば、C₁₋₁₀アミン)、並びに/又は、1つ又は複数のメトキシルアミン(methoxylamine)、ヒドラジン、及び純無水アンモニアの1つ若しくは複数、の使用を含む。

【0653】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護はプロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護はピリジン中プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護はピリジン中20%プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護は無水ピリジン中プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護は無水ピリジン中20%プロピルアミンの使用を含む。

【0654】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、切断中に脱保護される。

【0655】

いくつかの実施形態では、固体支持体からのオリゴヌクレオチドの切断、又はオリゴヌクレオチドの脱保護は、およそ室温で実施する。いくつかの実施形態では、固体支持体からのオリゴヌクレオチドの切断、又はオリゴヌクレオチドの脱保護は、高温で実施する。いくつかの実施形態では、固体支持体からのオリゴヌクレオチドの切断、又はオリゴヌク

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、固体支持体からのオリゴヌクレオチドの切断、又はオリゴヌクレオチドの脱保護は、プロピルアミンの使用を含み、室温又は高温で、0.1時間、1時間、2時間、5時間、10時間、15時間、20時間、24時間、30時間、又は40時間のそれぞれより長く実施する。例示的な条件は、室温で約18時間ピリジン中20%プロピルアミン、及び60で約18時間ピリジン中20%プロピルアミンである。

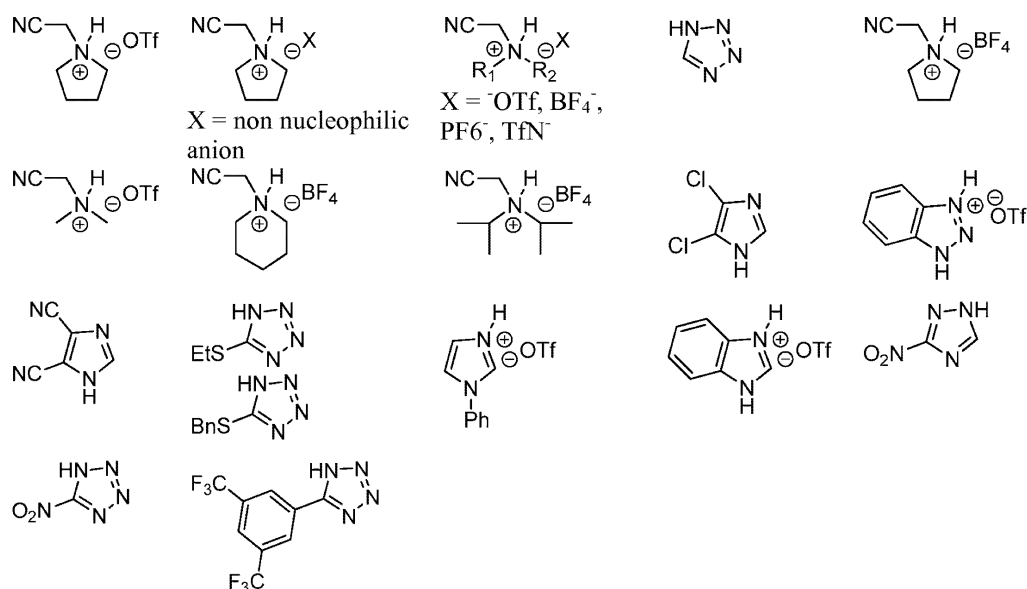
【0659】

いくつかの実施形態では、活性化剤は「Wada」活性化剤であり、即ち、活性化剤は、上に引用されるWada I、II、又はIII文書のいずれかを拠り所とする。

【0660】

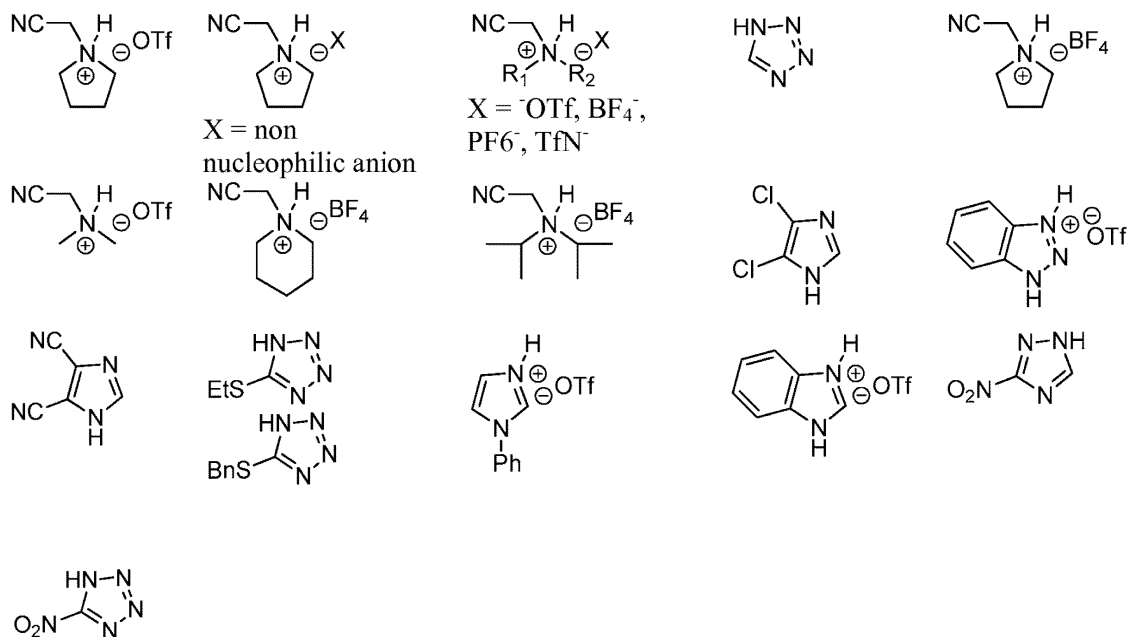
例示的な活性化基を下に示す：

【化225】



10

20



30

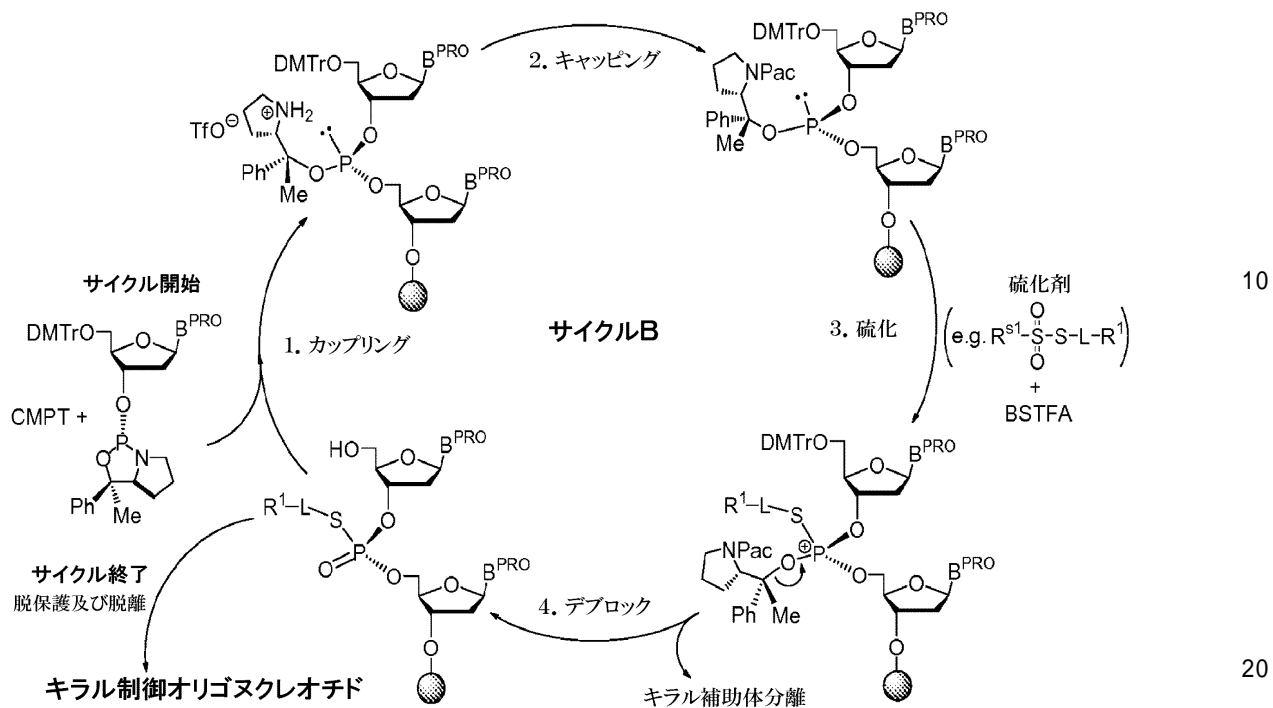
40

【0661】

例示のサイクルをスキームI - bに示す。

50

スキーム I - b ホスホロチオエート結合の導入
【化 2 2 6】

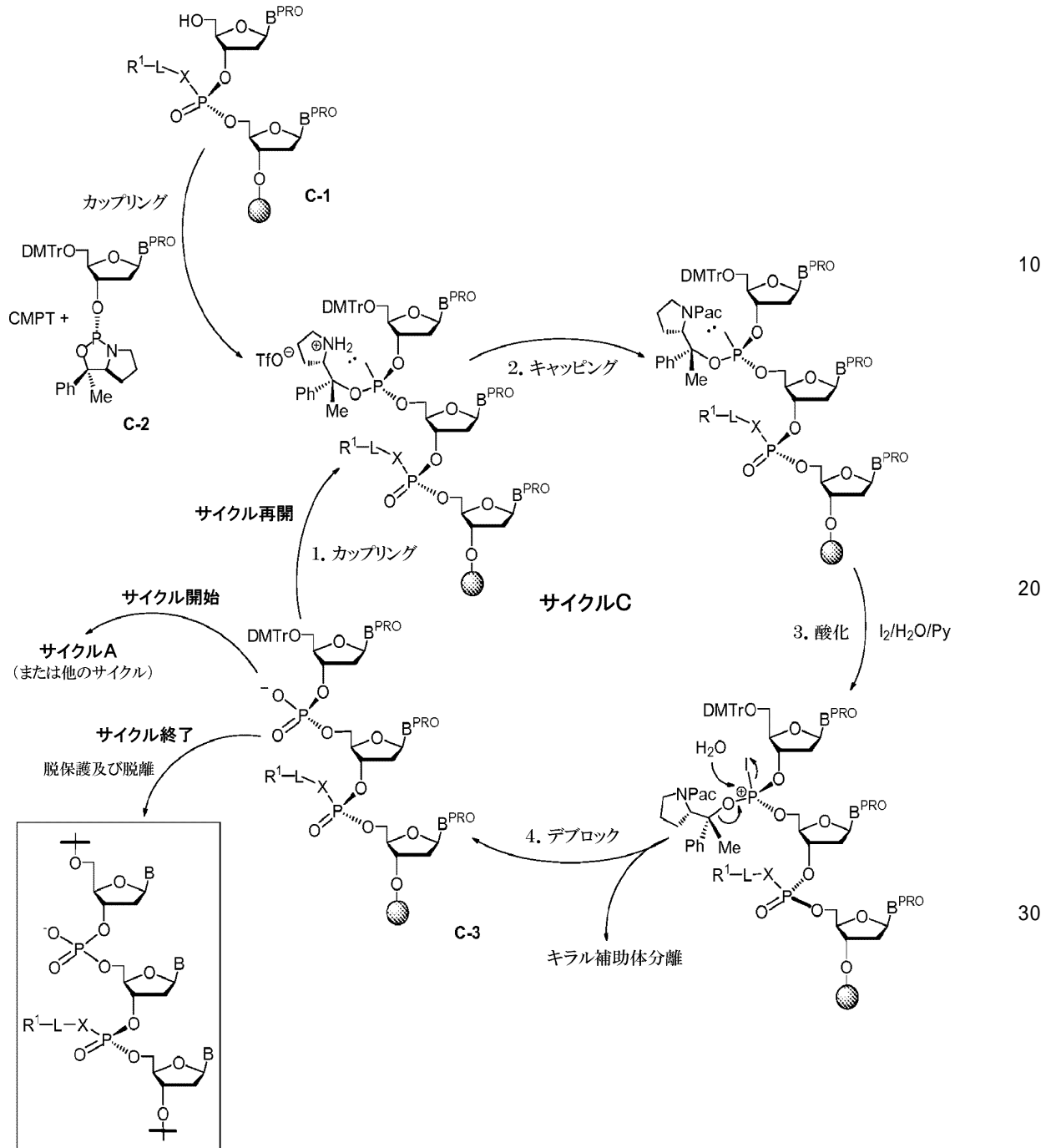


【 0 6 6 2】

例示的サイクルをスキーム I - c に示す。

スキーム I - c キラル制御オリゴヌクレオチドにおけるリン酸ジエステル及び修飾ヌクレオチド間結合の両方の導入

【化 2 2 7】



【0663】

スキーム I - c において、固体支持体 (C - 1) 上のオリゴヌクレオチド (又はヌクレオチド、又は、修飾ヌクレオチド間結合をもったオリゴヌクレオチド) は、ホスホラミダイト C - 2 とカップリングされる。カップリングとキャッピングの後、酸化ステップを実施する。脱ブロッキングの後、リン酸ジエステル結合を形成する。サイクル産物 C - 3 は、サイクル C を再開してさらにリン酸ジエステル結合を導入するか、他のサイクルを開始して他のタイプのヌクレオチド間結合を導入するか、又はサイクル終了へと進むか、いずれかとなる。

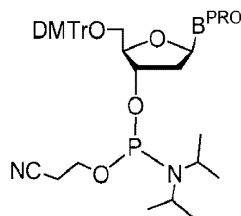
40

【0664】

いくつかの実施形態では、非キラル純粋ホスホラミダイトを、スキーム I - c において C - 2 の代わりに用いることができる。いくつかの実施形態では、DMTr で保護した - シアノエチルホスホラミダイトを用いる。いくつかの実施形態では、用いられるホスホラミダイトは

50

【化 2 2 8】



の構造を有する。

【0665】

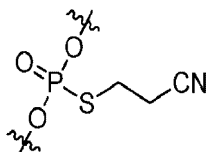
いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用は、合成の間、オリゴヌクレオチドの安定性を増加させる。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用はキラル制御オリゴヌクレオチド合成の効率を向上させる。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用はキラル制御オリゴヌクレオチド合成の収率を向上させる。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用はキラル制御オリゴヌクレオチド合成の産物純度を向上させる。

10

【0666】

いくつかの実施形態では、上記方法におけるホスホロチオエートジエステル前駆体は、

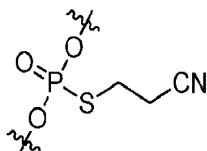
【化 2 2 9】



20

である。いくつかの実施形態では、

【化 2 3 0】

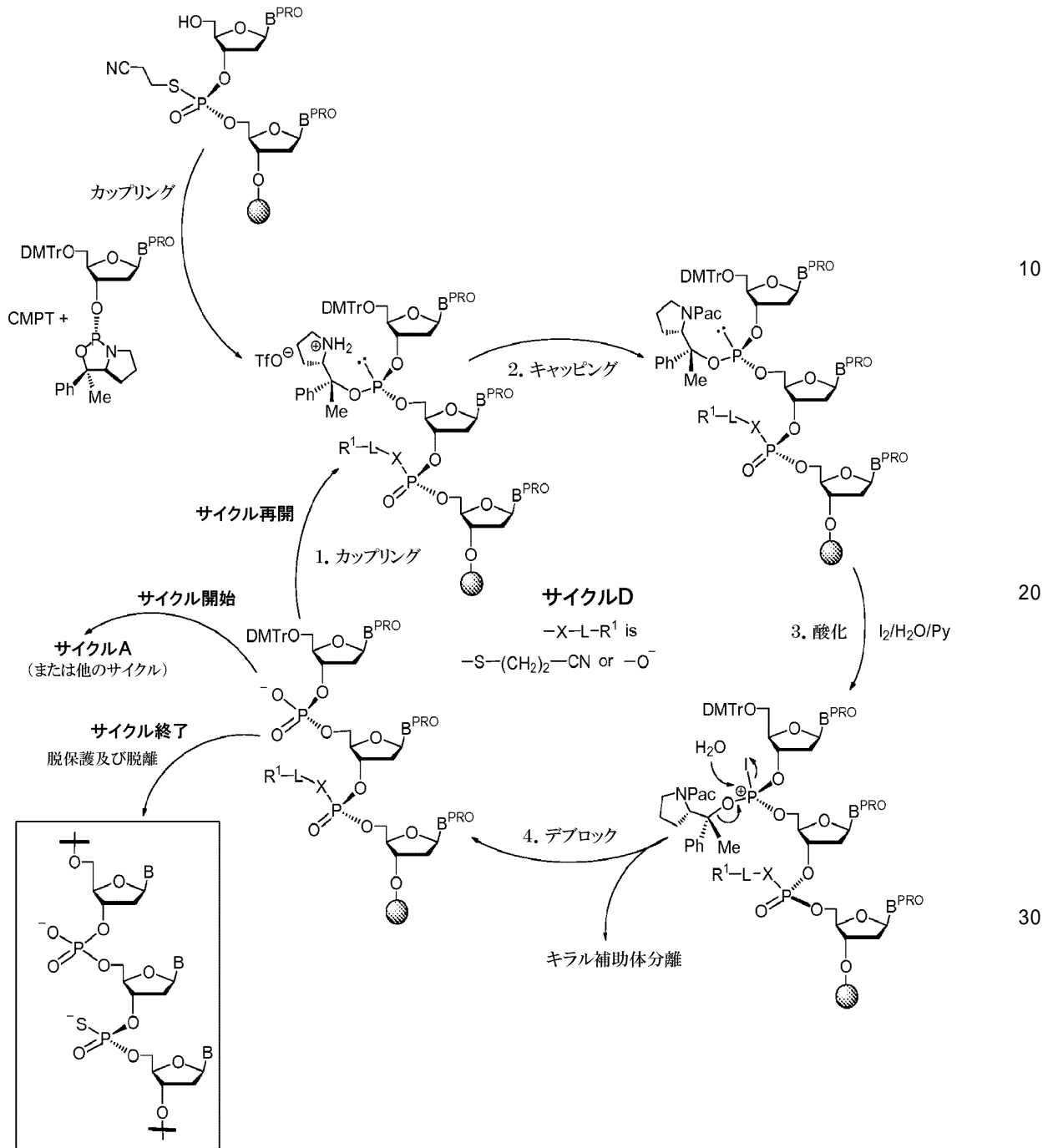


30

は、脱保護 / 放出の間、ホスホロチオエートジエステル結合に変換される。例示的なサイクルをスキーム I - d に示す。さらに例を下に示す。

スキーム I - d キラル制御オリゴヌクレオチド合成におけるホスホロチオエートジエステル前駆体

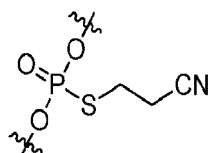
【化231】



【0667】

スキーム I - d に例示する通り、ホスホロチオエート及びリン酸ジエステル結合の両方を、同じキラル制御オリゴヌクレオチドに組み入れることができる。当業者に理解される通り、提供される方法は、ホスホロチオエートジエステルとリン酸ジエステルが連続していることを必要とせず、両者間に他のヌクレオチド間結合が、上に記載のサイクルを用いて形成され得る。スキーム I - d において、ホスホロチオエートジエステル前駆体、

【化232】



が、ホスホロチオエートジエステル結合の代わりに導入される。いくつかの実施形態では

10

20

30

40

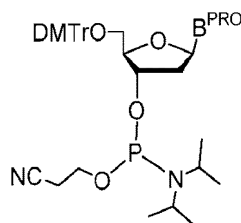
50

、かかる置き換えは、所定のステップ、例えば酸化ステップの間、合成効率の向上を提供した。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用は一般的に、合成及び/又は貯蔵の間の、キラル制御オリゴヌクレオチドの安定性を向上させる。サイクルの後、脱保護/放出の間、ホスホロチオエートジエステル前駆体はホスホロチオエートジエステル結合に変換される。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチドにリン酸ジエステル結合が存在しないとき、又は、合成の間酸化ステップが必要でないときでも、ホスホロチオエートジエステル前駆体を用いることは有益である。

【0668】

スキームI-cにある通り、いくつかの実施形態では、非キラル純粋ホスホラミダイトを、酸化ステップを含むサイクルに用いることができる。いくつかの実施形態では、DMTrで保護された -シアノエチルホスホラミダイトを用いる。いくつかの実施形態では、用いられるホスホラミダイトは

【化233】



の構造を有する。

【0669】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、特定のオリゴヌクレオチドタイプに濃縮されるキラル制御オリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0670】

いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約10%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約20%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約30%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約40%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約50%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約60%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約70%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約80%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約90%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約95%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。

【0671】

いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約1%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約2%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約3%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約4%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約5%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約10%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約20%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約30%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約40%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約50%は特定の

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約60%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約70%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約80%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約90%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約95%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。

【0672】

生物学的応用および例示的な使用

とりわけ、本発明は、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の使用を通じて、オリゴヌクレオチドの特性および活性が、その骨格キラル中心のパターンを最適化することによって調節され得ることを認める。いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、オリゴヌクレオチドは、その安定性および/または生物活性を向上させる骨格キラル中心の共通パターンを有する。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、予想外に増加した安定性をもたらす。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、驚いたことに、大幅に増加した活性をもたらす。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、増加した安定性および活性の両方をもたらす。いくつかの実施形態において、核酸高分子を切断するためにオリゴヌクレオチドが利用されるとき、オリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターンは、驚いたことに単独で、標的核酸高分子の切断パターンを変化させる。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、第2の部位での切断を効果的に防ぐ。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、新たな切断部位を生み出す。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、切断部位の数を最小にする。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドに対して相補的である標的核酸高分子の配列内のただ1つの部位で標的核酸高分子が切断されるように、骨格キラル中心のパターンは、切断部位の数を最小にする。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、切断部位での切断効率を向上させる。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターンは、標的核酸高分子の切断を改善する。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、選択性を増加させる。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、オフターゲット効果を最小にする。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、選択性、例えば、点変異または一塩基多型(SNP)が異なる標的配列の間の切断選択性を増加させる。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、選択性、例えば、ただ1つの点変異または一塩基多型(SNP)が異なる標的配列の間の切断選択性を増加させる。

【0673】

いくつかの実施形態において、本発明は、

- 1) 核酸高分子に見られる配列に対して相補的である配列であるか、または、これらを含む、共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義されるオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供するステップを含む核酸高分子の制御された切断のための方法を提供し、この組成物は、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約10%が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、単一のオリゴヌクレオチドの実質的に純粋な調製物であり；ここで、核酸高分子は、キラル制御されないオリゴヌクレオチド組成物がもたらされるとき切断パターンとは異なる切断パターンで切断される。

【0674】

本明細書において用いられるとき、核酸高分子の切断パターンは、切断部位の数、切断

10

20

30

40

50

部位の位置、および各部位での切断割合により定義される。いくつかの実施形態において、切断パターンは、複数の切断部位を有し、各部位での切断割合は異なる。いくつかの実施形態において、切断パターンは、複数の切断部位を有し、各部位での切断割合は同じである。いくつかの実施形態において、切断パターンは、ただ1つの切断部位を有する。いくつかの実施形態において、切断パターンは、切断部位の数が異なるという点で、互いに異なる。いくつかの実施形態において、切断パターンは、少なくとも1つの切断位置が異なるという点で、互いに異なる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの共通の切断部位での切断割合が異なるという点で、切断パターンは、互いに異なる。いくつかの実施形態において、切断パターンは、切断部位の数が異なり、かつ/または、少なくとも1つの切断位置が異なり、かつ/または、少なくとも1つの共通の切断部位での切断割合が異なるという点で、切断パターンは、互いに異なる。

10

【0675】

いくつかの実施形態において、本発明は、核酸高分子の制御された切断のための方法を提供し、本方法は、

- 1) 核酸高分子に見られる標的配列に対して相補的である配列であるか、または、これらを含む、共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、ヌクレオチド配列が標的配列を含む核酸高分子とを接触させるステップを含み、この組成物は、特定の塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御される。

20

【0676】

いくつかの実施形態において、本発明は、核酸高分子の制御された切断のための方法を提供し、本方法は、

- 1) 核酸高分子に見られる標的配列に対して相補的である配列であるか、または、これらを含む、共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、ヌクレオチド配列が標的配列を含む核酸高分子とを接触させるステップを含み、この組成物は、特定の塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され、接触は、核酸高分子の切断が起こるような条件下で実施される。

30

【0677】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1のオリゴヌクレオチド組成物を用いる結果生じる第1の核酸高分子の切断パターンを変化させるための方法を提供し、本方法は、

- 1) 核酸高分子に見られる配列に対して相補的である配列であるか、または、これらを含む、共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

40

を有することにより定義されるオリゴヌクレオチドを含む第2のキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供するステップを含み、この組成物は、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約10%が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、単一のオリゴヌクレオチドの実質的に純粋な調製物であり、ここで、核酸高分子は、第1の切断パターンとは異なる切断パターンで切断される。

【0678】

50

いくつかの実施形態において、本発明は、ヌクレオチド配列が標的配列を含む核酸高分子を、特定の塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドを含む基準オリゴヌクレオチド組成物と接触させるときに観察される切断パターンを変更するための方法を提供し、この特定の塩基配列は、標的配列に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、本方法は、

核酸高分子と、特定の塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物とを接触させるステップを含み、この組成物は、特定の塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、

- 1) 特定の塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の特定のパターン；および
- 3) 骨格キラル中心の特定のパターン

によって特徴づけられる単一のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され、接触は、核酸高分子の切断が起こるような条件下で実施される。

【0679】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的配列内の切断部位の数を減少させる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的配列内の単一部分の切断をもたらす。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的配列内の切断部位での切断速度を高める。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的配列内の切断部位での効率を高める。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的核酸高分子の切断のターンオーバーを高める。

【0680】

いくつかの実施形態において、基準切断パターンとは異なる切断パターンで切断が起こる。いくつかの実施形態において、基準切断パターンは、核酸高分子を、同等な条件下で、基準オリゴヌクレオチド組成物と接触させるときに観察されるものである。いくつかの実施形態において、基準オリゴヌクレオチド組成物は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の共通塩基配列および長さを共有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されない（例えば、ステレオランダムな）オリゴヌクレオチド組成物である。いくつかの実施形態において、基準オリゴヌクレオチド組成物は、共通配列および長さを共有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物である。

【0681】

いくつかの実施形態において、核酸高分子はRNAである。いくつかの実施形態において、核酸高分子はオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、核酸高分子はRNAオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、核酸高分子は転写物である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドは、切断される核酸高分子と二本鎖を形成する。

【0682】

いくつかの実施形態において、核酸高分子は、酵素により切断される。いくつかの実施形態において、酵素は、核酸高分子によって形成された二本鎖を切断する。いくつかの実施形態において、酵素はリボヌクレアーゼHである。いくつかの実施形態において、酵素はDicerである。いくつかの実施形態において、酵素はアルゴノートタンパク質である。いくつかの実施形態において、酵素はAgo2である。いくつかの実施形態において、酵素は、タンパク質複体内にある。例示的なタンパク質複合体は、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)である。

【0683】

いくつかの実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドを含む、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、予想外に高い選択性をもたらす、したがって、標的領域内で配列が少ししか変化しない核酸高分子が選択

10

20

30

40

50

的に標的にされ得る。いくつかの実施形態において、核酸高分子は、対立遺伝子からの転写物である。いくつかの実施形態において、異なる対立遺伝子からの転写物は、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物によって選択的に標的にされ得る。

【0684】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物およびその方法は、標的配列内の切断部位の正確な制御を可能にする。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の周辺である。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の上流および付近にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の上流5塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の上流4塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の上流3塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の上流2塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の上流1塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の下流および付近にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の下流5塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の下流4塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の下流3塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の下流2塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、切断部位は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の下流1塩基対以内にある。したがって、とりわけ、本発明は、標的配列内の切断部位の制御を可能にする。いくつかの実施形態において、例示的な切断を図21に示す。いくつかの実施形態において、図21に示す切断は、R p S p S p 骨格キラル中心の配列の2塩基対下流の部位での切断と呼ぶ。本開示に詳しく記載の通り、R p S p S p 骨格キラル中心の配列は、(N p) m (R p) n (S p) t、(N p) t (R p) n (S p) m、(S p) m (R p) n (S p) t、(S p) t (R p) n (S p) m、(R p) n (S p) m、(R p) m (S p) n、(S p) m R p および / または R p (S p) m の単一単位または繰り返し単位内に見られ、そのそれぞれは独立して、上で定義され、本明細書に記述される通りである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的分子内のR p S p S p 骨格キラル中心の2塩基対下流に新たな切断部位を生み出し(例えば、図21参照)、ここで、基準(例えば、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物が用いられる場合、前記新たな切断部位は存在しない(検出されない)。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的分子内のR p S p S p 骨格キラル中心の2塩基対下流の切断部位での切断(例えば、図21参照)を増加させ、ここで、このような部位での切断は、基準(例えば、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物が用いられるときよりも高い割合で起こる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物によるこのような部位での切断は、基準オリゴヌクレオチド組成物による切断の少なくとも、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、500倍または1000倍である(例えば、部位での切断割合によって測定されるとき)。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準(例えば、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物による切断より、少なくとも、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、500倍または1000倍速い。いくつかの実施形態において、基準(例えば

10

20

30

40

50

、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物が用いられるとき、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の、標的分子内のR p S p S p骨格キラル中心の2塩基対下流の切断部位(例えば、図21参照)が切断部位である。いくつかの実施形態において、基準(例えば、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物が用いられるとき、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の、標的分子内のR p S p S p骨格キラル中心の2塩基対下流の切断部位(例えば、図21参照)は、切断部位の1塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、基準(例えば、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物が用いられるとき、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の、標的分子内のR p S p S p骨格キラル中心の2塩基対下流の切断部位(例えば、図21参照)は、切断部位の2塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、この切断部位は、3塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、この切断部位は、4塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、この切断部位は、5塩基対以内にある。いくつかの実施形態において、基準(例えば、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物が用いられるとき、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の、標的分子内のR p S p S p骨格キラル中心の2塩基対下流の切断部位は、主要な切断部位のうちの一つである。いくつかの実施形態において、基準(例えば、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物が用いられるとき、このような部位は、切断割合が最も高い切断部位である。いくつかの実施形態において、基準(例えば、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物が用いられるとき、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の、標的分子内のR p S p S p骨格キラル中心の2塩基対下流の切断部位は、切断速度がより大きい切断部位のうちの一つである。いくつかの実施形態において、基準(例えば、キラル制御されない)オリゴヌクレオチド組成物が用いられるとき、このような部位は、切断速度が最も大きい切断部位である。

【0685】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、基準(例えば、キラル制御されない/ステレオランダムな)オリゴヌクレオチド組成物に比べて、1つまたは複数の部位での切断を増加させる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準(例えば、キラル制御されない/ステレオランダムな)組成物に比べて、単一部位での切断を選択的に増加させる。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、より大きい切断速度をもたらすことにより、部位での切断を増加させる。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、より高い切断割合を部位にもたらすことにより、前記部位での切断を増加させる。部位での切断割合は、当技術分野において広く知られ、かつ、行われている様々な方法により求めることができる。いくつかの実施形態において、部位での切断割合は、例えば、図18、図19および図30に示すHPLC-MSによる分析のように、切断産物の分析により求められる;図9、図10、図11、図14、図22、図25および図26などの例示的な切断地図も参照。いくつかの実施形態において、増加は、基準オリゴヌクレオチド組成物との比較である。いくつかの実施形態において、増加は、別の切断部位との比較である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準オリゴヌクレオチド組成物の好ましい切断部位である部位での切断を増加させる。いくつかの実施形態において、好ましい切断部位、または好ましい切断部位の基は、1つまたは複数の他の切断部位と比べて切断割合が比較的高い1つまたは複数の部位である。いくつかの実施形態において、好ましい切断部位は、酵素の選好を示し得る。例えば、リボヌクレアーゼHでは、DNAオリゴヌクレオチドが用いられるとき、生じる切断部位は、リボヌクレアーゼHの選好を示すことがある。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、酵素の好ましい切断部位である部位での切断を増加させる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準オリゴヌクレオチド組成物の好ましい切断部位ではない部位での切断を増加させる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組

10

20

30

40

50

成物は、基準オリゴヌクレオチド組成物の切断部位ではない部位での切断を増加させ、基準オリゴヌクレオチド組成物が用いられるときには存在しない新たな切断部位を効果的に生み出す。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的突然変異またはS N Pから5塩基対以内の部位での切断を増加させ、それによって、望まれていない標的オリゴヌクレオチドの選択的な切断を増加させる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的突然変異またはS N Pから4塩基対以内の部位での切断を増加させ、それによって、望まれていない標的オリゴヌクレオチドの選択的な切断を増加させる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的突然変異またはS N Pから3塩基対以内の部位での切断を増加させ、それによって、望まれていない標的オリゴヌクレオチドの選択的な切断を増加させる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的突然変異またはS N Pから2塩基対以内の部位での切断を増加させ、それによって、望まれていない標的オリゴヌクレオチドの選択的な切断を増加させる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的突然変異またはS N Pのすぐ上流または下流の部位での切断を増加させ、それによって、望まれていない標的オリゴヌクレオチドの選択的な切断を増加させる（例えば、図22、パネルD、m u R N A）。

【0686】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、基準（例えば、キラル制御されない/ステレオランダムな）オリゴヌクレオチド組成物に比べて、1つまたは複数の部位での切断を抑制する。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準（例えば、キラル制御されない/ステレオランダムな）組成物に比べて、単一部位での切断を選択的に抑制する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、より小さい切断速度をもたらすことにより、部位での切断を抑制する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、より低い切断割合を部位にもたらすことにより、前記部位での切断を抑制する。いくつかの実施形態において、抑制は、基準オリゴヌクレオチド組成物との比較である。いくつかの実施形態において、抑制は、別の切断部位との比較である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準オリゴヌクレオチド組成物の好ましい切断部位である部位での切断を抑制する。いくつかの実施形態において、好ましい切断部位、または好ましい切断部位の基は、1つまたは複数の他の切断部位と比べて切断割合が比較的高い1つまたは複数の部位である。いくつかの実施形態において、好ましい切断部位は、酵素の選好を示し得る。例えば、リボヌクレアーゼHでは、DNAオリゴヌクレオチドが用いられるとき、生じる切断部位は、リボヌクレアーゼHの選好を示すことがある。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、酵素の好ましい切断部位である部位での切断を抑制する。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準オリゴヌクレオチド組成物の好ましい切断部位ではない部位での切断を抑制する。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準オリゴヌクレオチド組成物のすべての切断部位を抑制する。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、一般に、標的オリゴヌクレオチドの切断を増加させる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、一般に、非標的オリゴヌクレオチドの切断を抑制する。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的オリゴヌクレオチドの切断を増加させ、非標的オリゴヌクレオチドの切断を抑制する。一例として、図22、パネルDを用いると、切断のための標的オリゴヌクレオチドは、m u R N Aである一方、非標的オリゴヌクレオチドは、w t R N Aである。突然変異またはS N Pを含む患部組織を含む対象において、切断のための標的オリゴヌクレオチドは、突然変異またはS N Pを有する転写物であり得る一方、非標的オリゴヌクレオチドは、健康な組織において発現される

10

20

30

40

50

ものなど、突然変異またはSNPのない正常な転写物であり得る。

【0687】

いくつかの実施形態において、本明細書に記述される骨格キラル中心のパターンに加えて、提供されるオリゴヌクレオチドは、修飾塩基、修飾糖、修飾骨格結合および任意のその組み合わせを含んでもよい。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ユニマー、アルトマー、ブロックマー、ギャップマー、ヘミマーおよびスキップマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のユニマー部分、アルトマー部分、ブロックマー部分、ギャップマー部分、ヘミマー部分またはスキップマー部分、あるいは任意のその組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、本明細書における骨格キラル中心のパターンに加えて、提供されるオリゴヌクレオチドはヘミマーである。いくつかの実施形態において、本明細書における骨格キラル中心のパターンに加えて、提供されるオリゴヌクレオチドは、修飾糖部分を有する5' - ヘミマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、2' - 修飾糖部分を有する5' - ヘミマーである。適した修飾は、当技術分野において広く知られており、例えば、本出願に記載のものである。いくつかの実施形態において、修飾は2' - Fである。いくつかの実施形態において、修飾は2' - MOEである。いくつかの実施形態において、修飾はs - c E tである。

10

【0688】

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的核酸配列からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ標的核酸配列の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

20

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的核酸配列の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるといってキラル制御され；

30

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的対立遺伝子および同じ核酸配列の別の対立遺伝子の両方の転写物を含む系と組成物とを接触させるとき、特定の対立遺伝子の転写物が、同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも高いレベルで抑制されることを特徴とする。

【0689】

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的核酸配列からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ標的核酸配列の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

40

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的核酸配列の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮

50

されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的対立遺伝子および同じ核酸配列 (s e q u e n c e) の別の対立遺伝子の両方の転写物を含む系と組成物とを接触させるとき、特定の対立遺伝子の転写物が、同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも高いレベルで抑制されることを特徴とし、接触は、特定の対立遺伝子の転写物を組成物が抑制できるように定められた条件下で実施される。

【 0 6 9 0 】

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的核酸配列からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ標的核酸配列の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的核酸配列の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、同じ標的核酸配列の転写物を含む系と組成物とを接触させるとき、

- a) 組成物がないときより高い；
- b) 同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルより高い；または
- c) 組成物がないときよりも高く、かつ、同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも高いレベルでの特定の対立遺伝子の転写物の抑制を示すことを

【 0 6 9 1 】

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的核酸配列からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ標的核酸配列の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的核酸配列の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、同じ標的核酸配列の転写物を含む系と組成物とを接触させるとき、

- a) 組成物がないときより高い；

b) 同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルより高い；または
c) 組成物がないときよりも高く、かつ、同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも高いレベルでの特定の (p a r t i c u l e) 対立遺伝子の転写物の抑制を示すことを特徴とし、接触は、特定の対立遺伝子の転写物を組成物が抑制できるよう定められた条件下で実施される。

【 0 6 9 2 】

いくつかの実施形態において、転写物は、前記転写物の切断により抑制される。いくつかの実施形態において、特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素は、イントロン内にある。いくつかの実施形態において、特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素は、エキソン内にある。いくつかの実施形態において、特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素は、部分的にエキソン内に、部分的にイントロン内にある。いくつかの実施形態において、特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素は、ある対立遺伝子と他の対立遺伝子を区別する突然変異を含む。いくつかの実施形態において、突然変異は欠失である。いくつかの実施形態において、突然変異は挿入である。いくつかの実施形態において、突然変異は点変異である。いくつかの実施形態において、特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素は、ある対立遺伝子と他の対立遺伝子を区別する少なくとも1つの一塩基多型 (S N P) を含む。

10

【 0 6 9 3 】

いくつかの実施形態において、標的核酸配列は標的遺伝子である。

【 0 6 9 4 】

いくつかの実施形態において、本発明は、配列が、少なくとも1つの一塩基多型 (S N P) を含む遺伝子の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、本方法は、

20

1) 第1の対立遺伝子からの転写物に見られる配列に対して完全に相補的であるが、第2の対立遺伝子からの転写物に見られる対応する配列に対しては完全には相補的でない配列であるか、または、これを含み、転写物に見られる配列が、S N P 部位を含む、共通塩基配列および長さ；

2) 骨格結合の共通パターン；

3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義されるオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供するステップを含み、この組成物は、組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約10%が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、単一のオリゴヌクレオチドの実質的に純粋な調製物であり；

30

ここで、第1の対立遺伝子からの転写物は、第2の対立遺伝子からの転写物よりも少なくとも5倍大きく抑制される。

【 0 6 9 5 】

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

1) 共通塩基配列および長さ；

2) 骨格結合の共通パターン；

3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

40

【 0 6 9 6 】

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特

50

定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的対立遺伝子および同じ遺伝子の別の対立遺伝子の両方の転写物を含む系と組成物とを接触させるとき、特定の対立遺伝子の転写物が、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルで抑制されることを特徴とする。

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的対立遺伝子および同じ遺伝子の別の対立遺伝子の両方の転写物を含む系と組成物とを接触させるとき、特定の対立遺伝子の転写物が、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルで抑制されることを特徴とし、接触は、特定の対立遺伝子の転写物を組成物が抑制できるよう定められた条件下で実施される。

【0697】

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的対立遺伝子および同じ遺伝子の別の対立遺伝子の両方の転写物を発現させる系と組成物とを接触させるとき、特定の対立遺伝子の転写物が、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルで抑制されることを特徴とし、

接触は、特定の対立遺伝子の発現を組成物が抑制できるよう定められた条件下で実施される。

【0698】

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ

10

20

30

40

50

標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的遺伝子の転写物を発現させる系と組成物とを接触させるとき、

a) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍；

b) 同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高い；または

c) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍で、かつ、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルでの特定の対立遺伝子の転写物の発現の抑制を示すことを特徴とする。

【0699】

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的遺伝子の転写物を発現させる系と組成物とを接触させるとき、

a) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍；

b) 同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高い；または

c) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍で、かつ、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルでの特定の対立遺伝子の転写物の発現の抑制を示すことを特徴とし、接触は、特定の対立遺伝子の転写物を組成物が抑制できるよう定められた条件下で実施される。

【 0 7 0 0 】

いくつかの実施形態において、本発明は、複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法を提供し、そのそれぞれは、同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的なヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的遺伝子の転写物を発現させる系と組成物とを接触させるとき、

a) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍；

b) 同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高い；または

c) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍で、かつ、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルでの特定の対立遺伝子の転写物の発現の抑制を示すことを特徴とし、

接触は、特定の対立遺伝子の発現を組成物が抑制できるよう定められた条件下で実施される。

【 0 7 0 1 】

いくつかの実施形態において、特定の対立遺伝子の転写物の抑制は、組成物がないときよりも高いレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて少なくとも1.1倍少ない量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で、特定の対立遺伝子の転写物の抑制は、組成物がないときと比べて少なくとも1.1倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも1.2倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも1.3倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも1.4倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも1.5倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも1.6倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも1.7倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも1.8倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも1.9倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも2倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも3倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも4倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも5倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも6倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも7倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも8倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも9倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも10倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施

10

20

30

40

50

る。いくつかの実施形態において、少なくとも400倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも500倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも750倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも1000倍であるレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、少なくとも5000倍であるレベルでの抑制である。

【0703】

いくつかの実施形態において、特定の対立遺伝子の転写物の抑制は、組成物がないときよりも高いレベルでの抑制、および、同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも高いレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、特定の対立遺伝子の転写物の抑制は、組成物がないときと比べて少なくとも1.1倍であるレベルでの抑制、および、同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも1.1倍高いレベルでの抑制である。いくつかの実施形態において、倍数はそれぞれ独立して、上述の通りである。

10

【0704】

いくつかの実施形態において、系は、転写物を含む組成物である。いくつかの実施形態において、系は、異なる対立遺伝子からの転写物を含む組成物である。いくつかの実施形態において、系は、インピボまたはインピトロにすることができて、いずれの方法でも、1つまたは複数の細胞、組織、臓器または生物を含むことができる。いくつかの実施形態において、系は、1つまたは複数の細胞を含む。いくつかの実施形態において、系は、1つまたは複数の組織を含む。いくつかの実施形態において、系は、1つまたは複数の臓器を含む。いくつかの実施形態において、系は、1つまたは複数の生物を含む。いくつかの実施形態において、系は対象である。

20

【0705】

いくつかの実施形態において、転写物の抑制、または転写物が転写される対立遺伝子の発現の抑制は、インピトロアッセイで測定することができる。いくつかの実施形態において、アッセイでは、全長の転写物の代わりに、特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含む、転写物からの配列が用いられる(usned)。いくつかの実施形態において、アッセイは、生化学アッセイである。いくつかの実施形態において、アッセイは、核酸高分子、例えば、転写物、または、特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含む、転写物からの配列が、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の存在下で、酵素による切断について試験される生化学アッセイである。

30

【0706】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、対象に投与される。いくつかの実施形態において、対象は動物である。いくつかの実施形態において、対象は植物である。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。

【0707】

いくつかの実施形態において、特定の対立遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のために、転写物は、特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素内の配列相違(sequence difference)、例えば、変異付近の部位で切断され、この配列相違は、特定の対立遺伝子からの転写物と他の対立遺伝子からの転写物を区別する。いくつかの実施形態において、転写物は、このような配列相違付近の部位で選択的に切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、キラル制御されないオリゴヌクレオチド組成物が用いられるときよりも(that)、このような配列相違付近の部位で高い割合で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素内の配列相違の部位でのみ切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流または上流5塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流または上流4塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流または上流3塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流または上流2塩基対以内の部位で切断される。い

40

50

くつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流または上流 1 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流 5 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流 4 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流 3 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流 2 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の下流 1 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の上流 5 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の上流 4 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の上流 3 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の上流 2 塩基対以内の部位で切断される。いくつかの実施形態において、転写物は、配列相違の上流 1 塩基対以内の部位で切断される。このような切断パターンの正確な制御、および、その結果である、特定の対立遺伝子からの転写物の選択性の高い抑制は、本開示において出願人により提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物およびその方法がなければ、可能ではないであろう。

【0708】

いくつかの実施形態において、本発明は、特定の対立遺伝子からの転写物、例えば、疾患を引き起こす、または、引き起こす恐れのある対立遺伝子の特異的に抑制することにより、対象を治療するための方法、または、対象の疾患を予防するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、疾患を患う対象を治療するための方法を提供し、本方法は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含み、ここで、疾患を引き起こす、または、疾患に寄与する対立遺伝子からの転写物は、選択的に抑制される。いくつかの実施形態において、本発明は、疾患を患う対象を治療するための方法を提供し、本方法は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含み、ここで、疾患を引き起こす対立遺伝子からの転写物は、選択的に抑制される。いくつかの実施形態において、本発明は、疾患を患う対象を治療するための方法を提供し、本方法は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含み、ここで、疾患に寄与する対立遺伝子からの転写物は、選択的に抑制される。いくつかの実施形態において、本発明は、疾患を患う対象を治療するための方法を提供し、本方法は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含み、ここで、疾患に関係する対立遺伝子からの転写物は、選択的に抑制される。いくつかの実施形態において、本発明は、疾患を引き起こす恐れのある特定の対立遺伝子からの転写物の特異的に抑制することにより、対象の疾患を予防するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、対象の疾患のリスクを高める特定の対立遺伝子からの転写物の特異的に抑制することにより、対象の疾患を予防するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、提供される方法は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含む。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、医薬担体をさらに含む。

【0709】

疾患を引き起こす対立遺伝子に関わる疾患は、当技術分野において広く知られており、Hohjoh, Pharmaceuticals 2013, 6, 522-535; 米国特許出願公開第 2013/0197061 号; Ostergaardら、Nucleic Acids Research 2013, 41(21), 9634-9650; Jiangら、Science 2013, 342, 111-114 に記載のものを含むが、これらには限定されない。いくつかの実施形態において、疾患はハンチントン病である。いくつかの実施形態において、疾患はヒト肥大型心筋症 (HCM) である。いくつかの実施形態において、疾患は拡張型心筋症である。いくつかの実施形態において、疾患を引き起こす対立遺伝子は、ミオシン重鎖 (MHC) の対立遺伝子である。いくつかの実施形態において、例示的な疾患は、以下から選択される：

10

20

30

40

50

【表5】

疾患	ターゲット 遺伝子	ターゲット バリエーション	疾患	ターゲット 遺伝子	ターゲット バリエーション
家族性 アルツハイマー病	アミロイド前駆体 タンパク質 (APP)	K670N- M671L	17番染色体に連鎖 する家族性 前頭側頭型認知症	微小管結合 タンパク質 タウ (MAPT)	V337M
	アミロイド前駆体 タンパク質 (APP)	K670N- M671L	パーキンソニズム (FDP-17)	3型プロコラーゲン (COL3A1)	G252V
	アミロイド前駆体 タンパク質 (APP)	V717F	エーラス・ ダンロス症候群 (vEDS)	β ヘモグロビン部位 (HBB)	E6V
	アミロイド前駆体 タンパク質 (APP)	V717I	家族性アミロイド ポリニューロパチー (FAP)	トランス サイレチン (TTR)	V30M
	プレセニン1 (PSEN1)	L392V	進行性骨化性 線維異形成症 (FOP)	1型アクチビンA受容体 (ACVR1)	R206H, G356D
	スーパーオキシドジス ムターゼ1 (SOD1)	G93A	腫瘍	ホスホイノサイド3キナーゼ, カタリティック α ポリペプチド (PK3CA)	1633G \rightarrow A \geq 140A \rightarrow G
筋萎縮性 側索硬化症	スーパーオキシドジス ムターゼ1 (SOD1)	G85R	1型脊小脳失調症 (SCA1)	アタキシン1 (ATXN1)	伸張CAG リピート 結合SNPs
スローチャネル型 先天性筋無力症	アセチルコリン レセプター (AChR)	sS226F			

10

20

疾患	ターゲット 遺伝子	ターゲット バリエーション
マチャド・ジョセフ病 /3型脊髄小脳変性症 (MJD/SCA3)	アタキシン3 /MJD1	伸張CAG リピート 結合SNPs
(SCA7)	アタキシン7 (ATXN7)	伸張CAG リピート 結合SNPs
パーキンソン病	ロイシンリッチリピート キナーゼ2 (LRRK2)	R1441G, R1441C
	ロイシンリッチリピート キナーゼ2 (LRRK2)	G20195S
	α シヌクレイン	A30P
ハンチントン病	ハンチンチン(HTT)	伸張CAG リピート 結合SNPs
肥大型心筋症	MYH7	R403Q

30

40

および方法の例示的な標的、および、これらによって治療することができる疾患は、以下を含む：

【表 6】

疾患	ターゲット遺伝子	ターゲットバリエーション
家族性アルツハイマー病	アミロイド前駆体タンパク質 (APP)	K670N-M671L (スイス変異)
	アミロイド前駆体タンパク質 (APP)	K670N-M671L (スイス変異)
	アミロイド前駆体タンパク質 (APP)	V717F (ロンドン変異)
	アミロイド前駆体タンパク質 (APP)	V717I (ロンドン変異)
	プレセニン 1 (PSEN1)	L392V
筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1)	G93A
	スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1)	G85R

疾患	ターゲット遺伝子	ターゲットバリエーション
スローチャンネル型 先天性筋無力症 (SCCMS)	アセチルコリンレセプター (AChR)	aS226F, aT254I, aS269I
17番染色体に連鎖する 家族性前頭側頭型 パーキンソニズム (FTDP-17)	微小管結合タンパク質タウ (MAPT)	V337M
エーラス・ダンロス症候群 (vEDS)	3型プロコラーゲン (COL3A1)	G252V
鎌状赤血球貧血病	β ヘモグロビン部位 (HBB)	E6V
家族性アミロイドポリ ニューロパチー(FAP)	トランスサイレチン(TTR)	V30M
進行性骨化性 繊維異形成賞 (FOP)	1型アクチビンA受容体 (ACVR1)	R206H, G356D
	1型アクチビンA受容体 (ACVR1)	R206H
腫瘍	KRAS	G12V, G12D, G13D
腫瘍	ホスホイノサイド3キナーゼ, カタリティック α ポリペプチド (PIK3CA)	G1633A, A3140G
脊髄小脳変性症1型 (SCA1)	アタキシン1 (ATXN1)	伸張CAGリピート 結合SNPs
脊髄小脳変性症7型 (SCA7)	アタキシン7(ATXN7)	伸張CAGリピート 結合SNPs
マチャド・ジョセフ病 ／3型脊椎小脳変性症	アタキシン3 (ATXN3)	伸張CAGリピート 結合SNPs
パーキンソン病	ロイシンリッチリピートキナーゼ2 (LRRK2)	R1441G, R1441C
	ロイシンリッチリピートキナーゼ2 (LRRK2)	G2019S
	α シヌクレイン (SNCA)	A30P, A53T, E46K
ハンチントン病	ハンチンチン (HTT)	伸張CAGリピート 結合SNPs
ハンチントン病類縁疾患2型	JPH3	伸張CTGリピート 結合SNPs
フリードライヒ運動失調症	FXN	伸張GAAリピート 結合SNPs

10

20

30

40

疾患	ターゲット遺伝子	ターゲットバリエーション
脆弱X精神遅滞症候群 ／脆弱X振戦運動失調症候群	FMR1	伸張CGGリピート 結合SNP s
筋強直性ジストロフィー(DM1)	DMPK	伸張CTGリピート 結合SNP s
筋強直性ジストロフィー(DM2)	ZNF9	伸張CTGリピート 結合SNP s
球脊髄性筋萎縮症	AR	伸張CAGリピート 結合SNP s
肥大型心筋症	MHY7	R403Q

10

【0710】

いくつかの実施形態において、標的ハンチンチンサイトはrs9993542__C, rs362310__C, rs362303__C, rs10488840__G, rs363125__C, rs363072__A, rs7694687__C, rs363064__C, rs363099__C, rs363088__A, rs34315806__C, rs2298967__T, rs362272__G, rs362275__C, rs362306__G, rs3775061__A, rs1006798__A, rs16843804__C, rs3121419__C, rs362271__G, rs362273__A, rs7659144__C, rs3129322__T, rs3121417__G, rs3095074__G, rs362296__C, rs108850__C, rs2024115__A, rs916171__C, rs7685686__A, rs6844859__T, rs4690073__G, rs2285086__A, rs362331__T, rs363092__C, rs3856973__G, rs4690072__T, rs7691627__G, rs2298969__A, rs2857936__C, rs6446723__T, rs762855__A, rs1263309__T, rs2798296__G, rs363096__T, rs10015979__G, rs11731237__T, rs363080__C, rs2798235__G及びrs362307__Tから選択される。いくつかの実施形態において、標的ハンチンチンサイトはrs34315806__C, rs362273__A, rs362331__T, rs363099__C, rs7685686__A, rs362306__G, rs363064__C, rs363075__G, rs2276881__G, rs362271__G, rs362303__C, rs362322__A, rs363088__A, rs6844859__T, rs3025838__C, rs363081__G, rs3025849__A, rs3121419__C, rs2298967__T, rs2298969__A, rs16843804__C, rs4690072__T, rs362310__C, rs3856973__G, 及びrs2285086__Aから選択される。いくつかの実施形態において、標的ハンチンチンサイトはrs362331__T, rs7685686__A, rs6844859__T, rs2298969__A, rs4690072__T, rs2024115__A, rs3856973__G, rs2285086__A, rs363092__C, rs7691627__G, rs10015979__G, rs916171__C, rs6446723__T, rs11731237__T, rs362272__G, rs4690073__G及びrs363096__Tから選択される。いくつかの実施形態において、標的ハンチンチンサイトはrs362267, rs6844859, rs1065746, rs7685686, rs362331, rs362336, rs2024115, rs362275, rs362273, rs362272, rs3025805, rs3025806, rs35892913, rs363125, rs17781557, rs4690072

20

30

40

50

, rs4690074, rs1557210, rs363088, rs362268, rs362308, rs362307, rs362306, rs362305, rs362304, rs362303, rs362302, rs363075及びrs2298969から選択される。いくつかの実施形態において、標的ハンチンチンサイトは以下から選択される：

【表7】

ハンチンチン mRNA 中における 24 の SNP サイトのヘテロ接合の頻度			
mRNA 中の場所 (位置, nt)	リファレンス ナンバー	ヘテロ接合の割合	
		対照群	HD 患者群
ORF, exon 20 (2822)	rs363075	G/A, 10.3% (G/G, 89.7%)	G/A, 12.8% (G/G, 86.2%; A/A, 0.9%)
ORF, exon 25 (3335)	rs35892913	G/A, 10.3% (G/G, 89.7%)	G/A, 13.0% (G/G, 86.1%; A/A, 0.9%)
ORF, exon 25 (3389)	rs1065746	G/C, 0% (G/G, 100%)	G/C, 0.9% (G/G, 99.1%)
ORF, exon 25 (3418)	rs17781557	T/G, 12.9% (T/T, 87.1%)	T/G, 1.9% (T/T, 98.1%)
ORF, exon 29 (3946)	rs4690074	C/T, 37.9% (C/C, 50.9%; T/T, 11.2)	C/T, 35.8% (C/C, 59.6%; T/T, 4.6%)
ORF, exon 39 (5304)	rs363125	C/A, 17.5% (C/C, 79.0%; A/A, 3.5%)	C/A, 11.0% (C/C, 87.2%; A/A, 1.8%)
ORF, exon 44 (6150)	exon 44	G/A, 0% (G/G, 100%)	G/A, 2.8% (G/G, 97.2%)
ORF, exon 48 (6736)	rs362336	G/A, 38.7% (G/G, 49.6%; A/A, 11.7%)	G/A, 37.4% (G/G, 57.9%; A/A, 4.7%)
ORF, exon 50 (7070)	rs362331	T/C, 45.7% (T/T, 31.0%; C/C, 23.3%)	T/C, 39.4% (T/T, 49.5%; C/C, 11.0%)
ORF, exon 57 (7942)	rs362273	A/G, 40.3% (A/A, 48.2%; G/G, 11.4%)	A/G, 35.2% (A/A, 60.2%; G/G, 4.6%)
ORF, exon 61 (8501)	rs362272	G/A, 37.1% (G/G, 51.7%; A/A, 11.2%)	G/A, 36.1% (G/G, 59.3%; A/A, 4.6%)
ORF, exon 65 (9053)	rs3025806	A/T, 0% (C/C, 100%)	A/T, 0% (C/C, 100%)
ORF, exon 65 (9175)	exon 65	G/A, 2.3% (G/G, 97.7%)	G/A, 0% (G/G, 100%)
ORF, exon 67 (9523)	rs362308	T/C, 0% (T/T, 100%)	T/C, 0% (T/T, 100%)
3'UTR, exon 67 (9633)	rs362307	C/T, 13.0% (C/C, 87.0%)	C/T, 48.6% (C/C, 49.5%; T/T, 1.9%)
3'UTR, exon 67 (9888)	rs362306	G/A, 36.0% (G/G, 52.6%; A/A, 11.4%)	G/A, 35.8% (G/G, 59.6%; A/A, 4.6%)
3'UTR, exon 67 (9936)	rs362268	C/G, 36.8% (C/C, 50.0%; G/G 13.2%)	C/G, 35.8% (C/C, 59.6%; G/G, 4.6%)
3'UTR, exon 67 (9948)	rs362305	C/G, 20.2% (C/C, 78.1%; G/G 1.8%)	C/G, 11.9% (C/C, 85.3%; G/G, 2.8%)
3'UTR, exon 67	rs362304	C/A, 22.8% (C/C, 73.7%;	C/A, 11.9% (C/C, 85.3%;

10

20

30

40

(10060)		A/A, 3.5%)	AA, 2.8%)
3'UTR, exon 67 (10095)	rs362303	C/T, 18.4% (C/C, 79.8%; T/T, 1.8%)	C/A, 11.9% (C/C, 85.3%; T/T, 2.8%)
3'UTR, exon 67 (10704)	rs1557210	C/T, 0% (C/C, 100%)	C/T, 0% (C/C, 100%)
3'UTR, exon 67 (10708)	rs362302	C/T, 4.3% (C/C, 95.7%)	C/T, 0% (C/C, 100%)
3'UTR, exon 67 (10796)	rs3025805	G/T, 0% (G/G, 100%)	G/T, 0% (G/G, 100%)
3'UTR, exon 67 (11006)	rs362267	C/T, 36.2% (C/C, 52.6%; T/T, 11.2%)	C/T, 35.5% (C/C, 59.8%; T/T, 4.7%)

10

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は2つ以上のサイトを標的にする。いくつかの実施形態において、標的となる2つ以上のサイトは、本明細書中に記載されたサイトから選択される。

【0711】

提供される方法は、ミスマッチを含む任意の同様の標的に当てはまるのが当業者には理解される。いくつかの実施形態において、ミスマッチは、母系遺伝子と父系遺伝子の間にある。対立遺伝子特異的抑制および/またはノックダウンを含む、抑制および/またはノックダウンのための別の例示的な標的は、任意の疾患に関連する任意の遺伝子異常 (genetic abnormalities)、例えば、突然変異であり得る。いくつかの実施形態において、標的、または1組の標的は、例えば、Xiongら、The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. Science Vol. 347 no. 6218 DOI: 10.1126/science.1254806に開示されている疾患の遺伝的決定要因から選択される。いくつかの実施形態において、ミスマッチは、変異型と野生型の間にある。

20

【0712】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物および方法は、疾患において突然変異を有するオリゴヌクレオチドを選択的に抑制するために用いられる。いくつかの実施形態において、疾患は癌である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物および方法は、癌において突然変異を有する転写物を選択的に抑制するために用いられる。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物および方法は、KRASの転写物を抑制するために用いられる。例示的な標的KRAS部位は、G12V = GGU GUU 227位 GU、G12D = GGU GAU 227位 GAおよびG13D = GGC GAC 230位 GAを含む。

30

【0713】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物および方法は、生物において、転写物の対立遺伝子特異的抑制をもたらす。いくつかの実施形態において、生物は、2つ以上の対立遺伝子が存在する標的遺伝子を含む。例えば、対象は、その正常組織において野生型遺伝子を有する一方、同じ遺伝子は、腫瘍においてなど、患部組織において変異される。いくつかの実施形態において、本発明は、1つの対立遺伝子、例えば、突然変異またはSNPを有する対立遺伝子を選択的に抑制するキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物および方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、より高い効果および/または低い毒性、および/または本出願に記載の他の利益を有する治療を提供する。

40

【0714】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1つのオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態

50

において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、ただ1つのオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、ただ1つのオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、2つ以上のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、このような組成物を用いて、提供される方法は、1つを超える標的を標的にすることができる。いくつかの実施形態において、2つ以上のオリゴヌクレオチドタイプを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、2つ以上の標的を標的にする。いくつかの実施形態において、2つ以上のオリゴヌクレオチドタイプを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、2つ以上のミスマッチを標的にする。いくつかの実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドタイプは、2つ以上の標的、例えば、突然変異を標的にする。いくつかの実施形態において、1つのオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの標的領域は、2つの突然変異またはSNPなど、2つ以上の「標的部位」を含む。

【0715】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドは、修飾塩基または糖を含んでもよい。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、どのような修飾塩基または糖も持たない。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、どのような修飾塩基も持たない。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドは、修飾塩基および糖を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドは、修飾塩基を含む。オリゴヌクレオチドの修飾塩基および糖は、当技術分野において広く知られており、本開示に記載のものを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、修飾塩基は5'-mCである。いくつかの実施形態において、修飾糖は2'-修飾糖である。オリゴヌクレオチド糖の適した2'-修飾は、当業者に広く知られている。いくつかの実施形態において、2'-修飾は2'-OR¹（式中、R¹は水素ではない。）を含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、2'-修飾は2'-OR¹（式中、R¹は、置換されてもよいC₁₋₆脂肪族である。）である。いくつかの実施形態において、2'-修飾は2'-MOEである。いくつかの実施形態において、修飾は2'-ハロゲンである。いくつかの実施形態において、修飾は2'-Fである。いくつかの実施形態において、修飾塩基または糖は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の活性、安定性および/または選択性をさらに向上させてもよく、その組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、予想外の活性、安定性および/または選択性をもたらす。

【0716】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、どのような修飾糖も持たない。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、どのような2'-修飾糖も持たない。いくつかの実施形態において、本発明は、驚いたことに、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を用いることにより、安定性、活性、および/または切断パターンの制御に修飾糖が必要ないことが明らかになった。さらに、いくつかの実施形態において、本発明は、驚いたことに、修飾糖を持たないオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、安定性、活性、ターンオーバーおよび/または切断パターンの制御の点で、より良い特性を与えることが明らかになった。例えば、いくつかの実施形態において、驚いたことに、修飾糖を持たないオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、修飾糖を持つオリゴヌクレオチドの組成物よりも、はるかに速く切断産物から解離し、大幅に高いターンオーバーをもたらすことが明らかになった。

【0717】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、提供される方法に有用な、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドは、本開示に詳しく記載の構造を有する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、記載の翼 - コア - 翼構造を有する。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、記載の $(Sp)mRp$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)_2Rp$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、記載の $(Sp)m(Rp)n$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、記載の $(Rp)n(Sp)m$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、記載の $Rp(Sp)m$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $Rp(Sp)_2$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、記載の $(Sp)m(Rp)n(Sp)t$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、記載の $(Sp)mRp(Sp)t$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、記載の $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、記載の $(Sp)tRp(Sp)m$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $SpRpSpSp$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)_3Rp(Sp)_3$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)_4Rp(Sp)_4$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)_tRp(Sp)_5$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $SpRp(Sp)_5$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)_2Rp(Sp)_5$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)_3Rp(Sp)_5$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)_4Rp(Sp)_5$ を含む。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、 $(Sp)_5Rp(Sp)_5$ を含む。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、ただ1つの Rp を有し、他のヌクレオチド間結合はそれぞれ、 Sp である。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、本開示に記載の通り、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、35、40、45または50より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、10より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、11より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、12より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、13より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、14より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、15より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、16より長い。いくつかの実施形態において、

10

20

30

40

50

共通塩基の長さは、18より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、19より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、20より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、21より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、22より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、23より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、24より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、25より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、26より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、27より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、28より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、29より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、30より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、31より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、32より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、33より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、34より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、35より長い。いくつかの実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、ただ1つのR_pを有し、他のヌクレオチド間結合はそれぞれ、S_pである。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、本開示に記載の通り、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、35、40、45または50より長い。いくつかの実施形態において、共通塩基の長さは、10より長い。

10

【0718】

20

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、高いターンオーバーをもたらす。いくつかの実施形態において、核酸高分子からの切断産物は、基準オリゴヌクレオチド組成物（例えば、キラル制御されないオリゴヌクレオチド組成物）のオリゴヌクレオチドからの解離よりも速い速度で、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドから解離する。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、キラル制御されないオリゴヌクレオチド組成物よりも、少ない単位投与、および/または総投与量、および/または少ない服用で投与することができる。

【0719】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準オリゴヌクレオチド組成物と比べたとき、その共通塩基配列に対して相補的である核酸高分子の配列、または、その共通塩基配列内の配列に、少ない切断部位をもたらす。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、その共通塩基配列に対して相補的である核酸高分子の配列に、より少ない切断部位をもたらす。いくつかの実施形態において、核酸高分子は、共通塩基配列に対して相補的（complementary）である配列内の単一部位、または、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の、共通塩基配列内の配列で、選択的に切断される。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、共通塩基配列に対して相補的（complementary）である配列内の切断部位、または、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の、共通塩基配列内の配列で、より高い切断割合をもたらす。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の共通塩基配列に対して相補的（complementary）である配列内の切断部位で、より高い切断割合をもたらす。いくつかの実施形態において、より高い切断割合を有する部位は、基準オリゴヌクレオチド組成物が用いられるときの切断部位である。いくつかの実施形態において、より高い切断割合を有する部位は、基準オリゴヌクレオチド組成物が用いられるときに存在しない切断部位である。

30

40

【0720】

驚いたことに、相補的（complementary）配列の切断部位の数が減少すると、切断速度が予想外に高くなり、かつ/または、より高い切断割合が実現されることが明らかになっている。本開示の実施例に示される通り、標的核酸高分子の相補的な配列内

50

に、より少ない切断部位を生じる、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物、特に単一部位の切断をもたらすものは、はるかに高い切断速度、および、はるかに低いレベルの残留する未切断の核酸高分子をもたらす。このような結果は、切断速度を高めるために、より多くの切断部位が追求されてきた当技術分野の一般的な教示とは著しい対照をなす。

【0721】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準オリゴヌクレオチド組成物と比べて、切断速度を1.5倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも2倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも3倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも4倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも5倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも6倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも7倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも8倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも9倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも10倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも11倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも12倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも13倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも14倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも15倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも20倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも30倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも40倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも50倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも60倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも70倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも80倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも90倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも100倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも200倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも300倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも400倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも500倍高める。いくつかの実施形態において、切断速度を少なくとも500倍以上高める。

【0722】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、基準オリゴヌクレオチド組成物よりも、低いレベルの残留する未切断の標的核酸高分子をもたらす。いくつかの実施形態において、残留するレベルは1.5倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも2倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも3倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも4倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも5倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも6倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも7倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも8倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも9倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも10倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも11倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも12倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも13倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも14倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも15倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも20倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも30倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも40倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも50倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも60倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも70倍

10

20

30

40

50

低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも80倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも90倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも100倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも200倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも300倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも400倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも500倍低い。いくつかの実施形態において、残留するレベルは少なくとも1000倍低い。

【0723】

本明細書に詳細に論じられる通り、本発明は他のことに加えてとりわけキラル制御オリゴヌクレオチド組成物を提供し、このことはその組成物が少なくとも1つのタイプのオリゴヌクレオチドを複数含有することを意味する。特定の「タイプ」の各オリゴヌクレオチド分子は、(1)塩基配列、(2)骨格結合のパターン、(3)骨格キラル中心のパターン、及び(4)骨格P-修飾成分のパターン、の点から予め選択した(例えば、所定の)構造要素からなる。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、単一の合成プロセスで調製されるオリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、単一オリゴヌクレオチド分子(例えば、オリゴヌクレオチドに沿った複数の異なる残基が異なる立体化学を有する)内に1つより多いキラル構成を有するオリゴヌクレオチドを含有し;いくつかの実施形態では、かかるオリゴヌクレオチドは、1つより多いキラル結合をもった個々のオリゴヌクレオチド分子を二次的な結合ステップで生成する必要なく、単一の合成プロセスで得ることができる。

【0724】

本明細書で提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、転写、翻訳、免疫応答、エピジェネティクス等を含み、但しこれらに限定されないいくつかの細胞関連のプロセス及び機構を調節する剤として用いることができる。加えて、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、研究及び/又は診断目的の試薬として用いることができる。当業者は、本明細書の本発明開示は、特定の使用に限定されないが、合成オリゴヌクレオチドの使用が望ましいどのような状況にも応用し得るということを容易に認識するものである。他のことに加えてとりわけ、提供される組成物は、治療、診断、農業、及び/又は研究の種々の用途において有用である。

【0725】

いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に詳細に記載される1つ又は複数の構造的修飾を含むオリゴヌクレオチド及び/又はその残基を含む。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、1つ又は複数の核酸類縁体を含有するオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、ペプチド核酸(PNA)、モルホリノ及びロックト(locked)核酸(LNA)、グリコン(glycon)核酸(GNA)、トレオース核酸(TNA)、ゼノ核酸(ZNA)、並びにそのいずれもの組み合わせ等、但しこれらに限定されない1つ又は複数の人工的核酸又は残基を含有するオリゴヌクレオチドを含む。

【0726】

いずれの実施形態においても本発明は、遺伝子発現、免疫応答等のオリゴヌクレオチドに基づく調節に有用である。したがって、本発明の立体的に規定されるオリゴヌクレオチド組成物は、所定のタイプの(即ち、キラル制御されており、任意でキラル純粋である)オリゴヌクレオチドを含有するものであり、従来の立体的にランダム又はキラル不純(chirally impure)な相当物の代わりに用いることができる。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、意図する効果の増強及び/又は望ましくない副作用の低減を示す。本発明の生物学的用途及び臨床的/治療的用途のある特定の実施形態は、下に明示的に論じる。

【0727】

種々の投与計画を利用して、提供されるキラル制御オリゴヌクレオチド組成物を投与することが可能である。いくつかの実施形態では、時間の間隔を空けて複数単位用量を投与

10

20

30

40

50

する。いくつかの実施形態では、所与の組成物は推奨投与計画を有し、これには1回又は複数回の服用が関わる。いくつかの実施形態では、投与計画は、同じ長さの時間によってそれぞれ互いに隔てられる複数回の服用を含み；いくつかの実施形態では、投与計画は複数回の服用と、個々の服用を隔てる少なくとも2つの異なる時間とを含む。いくつかの実施形態では、投与計画内の全ての服用は、単位用量が同じである。いくつかの実施形態では、投与計画内の複数の異なる服用は、量が異なる。いくつかの実施形態では、投与計画は、第1の用量の第1の服用と、それに続く第1の用量とは異なる第2の用量の1回又は複数回の服用を含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、第1の用量の第1の服用と、それに続く第1の服用（又は前の別の服用）の量と同じか又は異なる第2の（又は後続の）用量の1回又は複数回の追加服用を含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、少なくとも1日間に少なくとも1単位用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、少なくとも1日の期間、時には1日より長い期間にわたって1回分より多い用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は少なくとも週の期間にわたって複数回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、期間は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40週間、又はそれ以上（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100週間、又はそれ以上）の期間である。いくつかの実施形態では、投与計画は、1週間より長い間に、1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40週間、又はそれ以上（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100週間、又はそれ以上）の期間に、1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、2週間より長い間に、2週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40週間、又はそれ以上（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100週間、又はそれ以上）の期間に、2週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、1ヶ月間に1ヶ月当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、1ヶ月より長い間に1ヶ月当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月、又はそれより長い間に1ヶ月当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、約10週間に1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、約20週間に1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、約30週間に1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、26週間に1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物は、同じ配列のキラル制御されていない（例えば、立体的ランダムな）オリゴヌクレオチド組成物、及び/又は、同じ配列の異なるキラル制御オリゴヌクレオチド組成物に利用される投与計画とは異なる投与計画に従って投与する。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物は、同じ配列のキラル制御されていない（例えば、立体的ランダムな）オリゴヌクレオチド組成物の投与計画に比べて低減された投与計画に従って投与し、これは、後者が所与の単位時間にわたってより低い総曝露量レベルを達成し、1回又は複数回のより低い単位用量を含み、かつ/又は、所与の単位時間にわたってより少数回の服用を含むということである。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物は、同じ配列のキラル制御されてい

10

20

30

40

50

ない（例えば、立体的ランダムな）オリゴヌクレオチド組成物の投与計画よりも長い期間にわたる投与計画に従って投与する。理論によって限定されることを望まないが、いくつかの実施形態では、より短期的な投与計画及び/又はより長期的な服用間期間は、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物の安定性、生物学的利用率、及び/又は有効性の向上によるものであり得る、ということを出願人は注記する。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物は、同等のキラル制御されていないオリゴヌクレオチド組成物に比べてより長い投与計画を有する。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物は、同等のキラル制御されていないオリゴヌクレオチド組成物に比べて、2つの服用間の期間がより短い。理論によって限定されることを望まないが、いくつかの実施形態では、より長期的な投与計画及び/又はより短期的な服用間期間は、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物の安全性の向上によるものであり得る、ということを出願人は注記する。

10

【0728】

単一用量は、用途によって適当に望まれる種々の量のタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有していてもよい。いくつかの実施形態では、単一用量は、約1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、又はそれ以上（例えば、約350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、又それ以上）mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約1mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約5mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約10mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約15mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約20mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約50mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約100mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約150mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約200mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約250mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、単一用量は、約300mgのタイプのキラル制御オリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも、単一用量及び/又は総用量が少ない量で投与する。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも、単一用量及び/又は総用量が少ない量で投与し、それは有効性が向上することによる。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも、単一用量及び/又は総用量が多い量で投与する。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも、単一用量及び/又は総用量が多い量で投与し、それは安全性が向上することによる。

20

30

40

【0729】

生物活性オリゴヌクレオチド

本明細書で使用される、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖及び/又は複数鎖のオリゴヌクレオチドを含んでよい。いくつかの実施形態では、一本鎖オリゴヌクレオチドは、使用される一本鎖オリゴヌクレオチドさえも少なくとも部分的に二本鎖の特性を有することができるように、関連条件下でハイブリダイズし得る自己相補性部分を含む。いくつかの実施形態では、提供される組成物に含まれるオリゴヌクレオチドは、一本鎖

50

、二本鎖、又は三本鎖である。いくつかの実施形態では、提供される組成物に含まれるオリゴヌクレオチドは、該オリゴヌクレオチド内に一本鎖部分及び複数鎖部分を含む。いくつかの実施形態では、上記のように、各々の一本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖領域及び複数鎖領域を有することができる。

【0730】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、以下の鎖に完全に又は部分的に相補的な1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む：構造遺伝子、遺伝子制御及び/又は終端領域、及び/又は自己複製系、例えばウイルス又はプラスミドDNA。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、siRNA又は他のRNA干渉試薬（RNAi剤又はiRNA剤）、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、自己開裂RNA、リボザイム、その断片及び/又はその変異体（例えば、ペプチジルトランスフェラーゼ23S rRNA、RNase P、グループI及びグループIIイントロン、GIR1分岐リボザイム、レッドザイム、ヘアピンリボザイム、ハンマーヘッド型リボザイム、HDVリボザイム、哺乳動物CPEB3リボザイム、VSリボザイム、glmSリボザイム、CoTCリボザイム等）、マイクロRNA、マイクロRNAミミック、スーパーmir、アプタマー、アンチmir、アンタゴニスト、アンタゴmir、UIアダプター、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、RNAアクチベータ、長鎖非コーディングRNA、短鎖非コーディング（例えば、piRNAs）、免疫調節オリゴヌクレオチド（免疫刺激オリゴヌクレオチド、免疫阻害オリゴヌクレオチド）、GNA、LNA、ENA、PNA、TNA、モルフォルノ、G-四重鎖（RNA及びDNA）、抗ウイルスオリゴヌクレオチド、及びデコイ・オリゴヌクレオチドである、又はそのようなものとして働く、1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【0731】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、1又はそれ以上のハイブリッド（例えば、キメラ）オリゴヌクレオチドを含む。本開示の文脈において、「ハイブリッド」という用語は、オリゴヌクレオチドの混合構成成分を広く意味する、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、例えば、（1）混合した種類のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド分子、例えば、単一分子（例えば、DNA-RNA）内の部分的DNA及び部分的RNA；（2）DNA-RNA塩基対形成が分子内又は分子間のいずれか、あるいはその両方で起こるような、異なった種類の核酸の相補対；（3）2又はそれ以上の種類の骨格又は塩基間結合を有するオリゴヌクレオチド、である。

【0732】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、単一分子内に1種類超の核酸残基を含む1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。例えば、本明細書に記載の実施態様のいずれかでは、オリゴヌクレオチドは、DNA部分及びRNA部分を含み得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、不変部分及び変更部分を含み得る。

【0733】

提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、例えば本明細書に記載の、多数の変更のいずれかを含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、例えば意図した使用の点から特定の変更が選択される。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチド（又は、一本鎖オリゴヌクレオチドの二本鎖部分）の1又は両鎖を変更することが好ましい。いくつかの実施形態では、該二本鎖（又は部分）は、異なった変更を含む。いくつかの実施形態では、該二本鎖は、同一の変更を含む。当業者は、本発明の方法によって可能となる変更の程度及び種類が、変更の多数の順列を作成できることを理解するだろう。このような変更の例は、本明細書に記載され、限定されるものではない。

【0734】

本明細書で使用される用語「アンチセンス鎖」は、対象の標的配列に実質的に又は100%相補性であるオリゴヌクレオチドを意味する。「アンチセンス鎖」という用語は、2つの別々の鎖から形成される両オリゴヌクレオチドのアンチセンス領域、及びヘアピン又はダンベル型構造を形成することができる単分子オリゴヌクレオチドを含む。「アンチセンス」及び「ガイド鎖」という用語は本明細書で交換的に使用される。

【0735】

「センス鎖」という用語は、全部又は一部において、メッセンジャーRNA又はDNAの配列のような標的配列と同一のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを意味する。「センス鎖」という用語及び「パッセンジャー鎖」は本明細書で交換的に使用される。

【0736】

「標的配列」は、その発現又は活性が調節される任意の核酸配列を意味する。標的核酸は、DNA又はRNA、例えば、内因性DNAもしくはRNA、ウイルスDNAもしくはウイルスRNA、又は遺伝子によってコードされる他のRNA、ウイルス、細菌、真菌、哺乳動物、あるいは植物でよい。いくつかの実施形態では、標的配列は疾患又は障害に関連する。

【0737】

「特異的にハイブリダイズすることができる」及び「相補的」は、核酸が、典型的なワトソクリック又は他の非典型型のいずれかによって、もう一つの核酸と水素結合（複数）を形成することができることを意味する。本発明の核酸分子と関連して、核酸分子とその相補性配列との結合自由エネルギーは、核酸の関連機能を進行させる、例えば、RNAi活性、には十分である。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は、当該分野では周知である（例えば、Turner 他, 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LIT pp.123-133; Frier他., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA83: 9373-9377; Turner他, 1987, /. Ain. Chem. Soc. 109: 3783-3785参照）。

【0738】

相補性のパーセントは、第二の核酸配列との水素結合（例えば、ワトソクリック塩基対）を形成できる核酸分子中の連続残基のパーセンテージを示す（例えば、10個のうち5、6、7、8、9、10個は、50%、60%、70%、80%、90%、及び100%相補性である）。「完全に相補性」又は100%相補性は、核酸配列のすべての連続残基が同数の第2核酸配列中の連続残基と水素結合を形成することになる、ことを意味する。完全ではない相補性とは、2つの鎖のヌクレオチド単位の一部、但しすべてではない、が互いに水素結合を形成できる状態を意味する。「実質的に相補性」とは、非相補性であるように選択される、オーバーハングのようなポリヌクレオチド鎖領域を除いて、90%以上の相補性を示すポリヌクレオチド鎖を意味する。特異的結合は、特異的結合が望ましい条件下、例えばインビボアッセイ又は治療方法の場合、又はアッセイが行われる条件下でのインビトロアッセイの場合の生理学的条件下で、オリゴマー化合物の非標的配列への非特異的結合を避けるために十分な相補性の程度を必要とする。いくつかの実施形態では、非標的配列は、対応する標的配列と少なくとも5個のヌクレオチドが異なる。

【0739】

治療として使用されるとき、提供されるオリゴヌクレオチドは、医薬組成物として投与される。いくつかの実施形態では、該医薬組成物は、その薬剂的に許容可能な塩を含む提供されるオリゴヌクレオチド、またはその薬剂的に許容可能な塩の治療効果量、および薬剂的に許容可能な希釈剤、薬剂的に許容可能な賦形剤、および薬剂的に許容可能な担体から選択される少なくとも1つの薬剂的に許容可能な不活性成分を含む。別の実施形態では、該医薬組成物は、静脈注射、経口投与、口腔投与、吸入、鼻腔内投与、局所投与、眼投与または耳投与用途に処方される。さらなる実施形態では、該医薬組成物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、吸入剤、点鼻液剤、坐剤、懸濁剤、ゲル剤、コロイド剤、分散剤、懸濁剤、液剤、乳剤、軟膏剤、ローション剤、点眼剤または点耳剤である。

【0740】

医薬組成物

治療として使用されるとき、本明細書に記載の提供されるオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド組成物は、医薬組成物として投与される。いくつかの実施形態では、該医薬組成物は、提供されるオリゴヌクレオチド、またはその薬剂的に許容可能な塩の治療効果量、および薬剂的に許容可能な希釈剤、薬剂的に許容可能な賦形剤、および薬剂的に許容可能な担体から選択される少なくとも1つの薬剂的に許容可能な不活性成分を含む。いくつかの実施形態では、該医薬組成物は、静脈注射、経口投与、口腔投与、吸入、鼻腔内投与、局所投与、眼投与または耳投与用途に処方される。いくつかの実施形態では、該

10

20

30

40

50

医薬組成物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、吸入剤、点鼻液剤、坐剤、懸濁剤、ゲル剤、コロイド剤、分散剤、懸濁剤、液剤、乳剤、軟膏剤、ローション剤、点眼剤または点耳剤である。

【0741】

いくつかの実施形態では、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド、または薬剤的に許容可能な賦形剤と混合したその組成物を含む医薬組成物を提供する。当業者は、該医薬組成物は、上記の該キラル制御されたオリゴヌクレオチドの薬剤的に許容可能な塩、またはその組成物を含むことを認識するだろう。

【0742】

様々な超分子ナノ担体は、核酸の送達のために使用され得る。実例となるナノ担体としては、リポソーム、カチオン性ポリマー複合体および様々な高分子が挙げられるが、これに限定されない。様々なポリカチオンと核酸の複合体形成は、細胞間送達のための別のアプローチであり；これは、PEG化ポリカチオン、ポリエチレンアミン(PEI)複合体、カチオン性ブロック共重合体、およびデンドリマーの使用が挙げられる。PEIおよびポリアミドアミンデンドリマーを含むいくつかのカチオン性ナノ担体は、エンドソームからの内容物の放出を助ける。他のアプローチとしては、ポリマーナノ粒子、ポリマーミセル、量子ドットおよびリポプレックスの使用が挙げられる。

10

【0743】

さらなる核酸送達戦略が、本明細書に記載の例示的送達戦略に加えて知られている。

【0744】

治療および/または診断応用では、本発明の化合物は、全身および局所または局在的投与を含む様々な投与方法用途で処方され得る。技術および処方物は、一般に、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed. 2000)中に見出される。

20

【0745】

提供されるオリゴヌクレオチド、およびその組成物は、広い用量範囲に渡って有効である。例えば、成人治療では、1日に、約0.01~約1000mg、約0.5~約100mg、約1~約50mg、および1日に、約5~約100mgが、使用され得る用量の例である。正確な用量は、投与経路、化合物が投与される形態、被治療対象、被治療対象の体重、ならびに主治医の選好および経験に依存するだろう。

【0746】

薬剤的に許容可能な塩は、一般に、当業者に周知であり、例えば、酢酸塩、ベンゼンシルホン酸塩、ベシル酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、重酒石酸塩、臭化物、エデト酸カルシウム、カルンシレート(carnsylate)、炭酸塩、クエン酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、エシレート、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニレート、ヘキシルレゾルシン酸塩、ヒドラバミン、臭化水素、塩化水素、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、粘液酸塩、ナプシル酸塩、硝酸塩、パモ酸塩(パモ酸塩)、パントテン酸塩、リン酸塩/ニリン酸塩、ポリガラクトツロ酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、塩基性酢酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、またはテオクル酸塩が挙げられるが、これに限定されない。他の薬剤的に許容可能な塩は、例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)で、見られ得る。好ましい薬剤的に許容可能な塩としては、例えば、酢酸塩、安息香酸塩、臭化物、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、臭化水素、塩化水素、マレイン酸塩、メシル酸塩、ナプシル酸塩、パモ酸塩(エンボン酸塩)、リン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、または酒石酸塩が挙げられる。

30

40

【0747】

治療される特定の症状に依存して、かかる薬剤は、液または固体剤形に処方され、全身的にまたは局所的に投与され得る。該薬剤は、例えば、当業者に周知の時限的または持続的低放出形態で送達され得る。製剤技術および投与は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)で見出され得る。適当な経路としては、経口、口腔

50

、吸入スプレー、舌下、直腸内、経皮、経膈、経粘膜、経鼻または腸投与；筋肉内、皮下、くも膜下腔内、直接的脳（心）室内、静脈内、関節内、胸骨内、髄液包内、肝内、病巣内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注射だけでなく、髄内注射を含む非経口送達、または他の送達方法が挙げられ得る。

【0748】

注射用では、本発明の薬剤は、ハanks液、リンゲル溶液、または生理食塩水などの生理的に適合した緩衝液中などの水溶液中に処方および希釈され得る。かかる経粘膜投与用では、浸透される該開門に適切な浸透剤が、該処方物に使用される。かかる浸透剤は、一般に、当分野で周知である。

【0749】

全身投与に適切な製剤中に、本発明の実践のため開示された本明細書中の化合物を処方するための薬剤的に許容可能な不活性担体の使用は、本発明の範囲内である。担体の適切な選択および適切な製造実践で、本発明の組成物、特に、液剤のこれらの処方物は、静脈内注射など、非経口投与され得る。

【0750】

該化合物は、経口投与用途に適切な製剤中に、当業者に周知の薬剤的に許容可能な担体を使用して、容易に処方され得る。かかる担体は、本発明の化合物を、被治療対象（例えば、患者）の経口摂取用途の錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとしての処方を可能にする。

【0751】

経鼻または吸入送達用途では、本発明の薬剤は、当業者に周知の方法によっても処方され得、例えば、生理食塩水などの可溶化、希釈、または分散物質、ベンジルアルコールなどの保存剤、吸収促進剤、およびフッ化炭素の例が挙げられるが、これに限定されない。

【0752】

本発明の使用に適切な医薬組成物としては、該活性成分がその意図される目的を達成するための効果量で含有される組成物が挙げられる。効果量の決定は、特に、本明細書で提供される詳細な開示に照らして、当業者なら十分に行うことができる。

【0753】

該活性成分に加えて、これらの医薬組成物は、薬剤的に使用され得る製剤中に、該活性化合物の過程を促進する賦形剤および助剤を含む適当な薬剤的に許容可能な担体を含み得る。経口投与用途に処方される該製剤は、錠剤、糖衣剤、カプセル剤、または液剤の形態であり得る。

【0754】

経口使用用途の医薬製剤は、該活性化合物を、適当な助剤を添加後、必要に応じて、錠剤または糖衣剤コアを得るために、固体賦形剤と混合し、得られた混合物を粉碎してもよく、および顆粒剤の混合加工により得られ得る。適当な賦形剤は、特に、ラクトース、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類；セルロース製剤、例えば、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース（CMC）ナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン（PVP：ポビドン）などの充填剤である。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩など、崩壊剤が添加され得る。

【0755】

糖衣剤コアは、適当なコーティングと一緒に提供される。この目的のため、高濃度糖溶液が使用され得、これは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール（PEG）、および/または二酸化チタン、ラッカー液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含有してもよい。色素または顔料が、種々の組み合わせの活性化合物用量を識別または特徴付けするために、該錠剤または糖衣剤コーティングに添加され得る。

【0756】

10

20

30

40

50

経口的に使用され得る医薬製剤としては、ゼラチンで製造される密封軟カプセル剤およびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤だけでなく、ゼラチンで製造されたプッシュフィットカプセル剤が挙げられる。該プッシュフィットカプセル剤は、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、および/またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤との混合物中、および安定剤を混合してもよく、該活性成分を含み得る。軟カプセル剤中、該活性化合物は、脂肪油、流動パラフィンまたは液体ポリエチレングリコール（PEG）などの適当な液体中に溶解または懸濁され得る。加えて、安定剤が添加され得る。

【0757】

治療または予防される特定に症状または病状に依存して、その症状を治療または予防するために正常に投与される追加の治療薬は、本発明のオリゴヌクレオチドと一緒に投与され得る。例えば、化学療法薬または他の抗増殖剤は、増殖性疾患および癌を治療するため、本発明のオリゴヌクレオチドと併用し得る。周知の化学療法薬の例としては、アドリアマイシン、デキサメタゾン、ピンクリスチン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、トポテカン、タキソール、インターフェロン類、および白金誘導体が挙げられるが、これに限定されない。

【0758】

本発明のこれらおよび他の実施形態の機能および利点は、下記実施例からもっと詳しく理解されるだろう。次の実施例は、本発明の利益を例示することを意図し、本発明の全範囲を例証するものではない。

【0759】

いくつかの実施形態において、本発明は、以下の例示的实施形態を提供する：

E 1 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 10 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、単一のオリゴヌクレオチドの実質的に純粋な調製物であり、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；および
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することにより定義されるオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物。

E 2 . 1 つまたは複数の塩基が修飾される、例 E 1 の組成物。

E 3 . いずれの塩基も修飾されない、例 E 1 の組成物。

E 4 . 共通塩基配列が、少なくとも 8 塩基を有する、例 E 1 から E 3 のいずれか 1 つの組成物。

E 5 . 共通塩基配列が、少なくとも 10 塩基を有する、例 E 1 から E 4 のいずれか 1 つの組成物。

E 6 . 共通塩基配列が、少なくとも 15 塩基を有する、例 E 1 から E 5 のいずれか 1 つの組成物。

E 7 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 20 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、例 E 1 から E 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 8 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 50 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、例 E 1 から E 7 のいずれか 1 つの組成物。

E 9 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 80 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、例 E 1 から E 7 のいずれか 1 つの組成物。

E 10 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 85 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、例 E 1 から E 9 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 1 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 9 0 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、例 E 1 から E 1 0 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 2 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 9 5 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、例 E 1 から E 1 1 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 3 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 9 7 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、例 E 1 から E 1 2 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 4 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 9 8 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、例 E 1 から E 1 3 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 5 . 組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも約 9 9 % が、共通塩基配列および長さ、骨格結合の共通パターン、および骨格キラル中心の共通パターンを有する、例 E 1 から E 1 4 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 6 . 単一のオリゴヌクレオチドが、1 つまたは複数のキラルな修飾されたリン酸結合を含む、例 E 1 から E 1 5 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 7 . 単一のオリゴヌクレオチドが、翼 - コア - 翼構造を有する、例 E 1 から E 1 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 8 . 各翼が、キラルなヌクレオチド間結合を含んでもよい、例 E 1 から E 1 7 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 9 . 各翼内のキラルなヌクレオチド間結合が独立して、同じ立体化学を有する、例 E 1 から E 1 8 のいずれか 1 つの組成物。

E 2 0 . 両方の翼のキラルなヌクレオチド間結合が、同じ立体化学のものである、例 E 1 から E 1 9 のいずれか 1 つの組成物。

E 2 1 . 各翼内のキラルなヌクレオチド間結合が独立して、同じ立体化学を有し、第 1 の翼の立体化学が、第 2 の翼の立体化学とは異なる、例 E 1 から E 2 0 のいずれか 1 つの組成物。

E 2 2 . 第 1 の翼領域が独立して、1 つまたは複数の塩基長を有する、例 E 1 から E 2 1 のいずれか 1 つの組成物。

E 2 3 . 第 1 の翼領域が独立して、2 つまたはそれ以上の塩基長を有する、例 E 1 から E 2 2 のいずれか 1 つの組成物。

E 2 4 . 第 1 の翼領域が独立して、3 つまたはそれ以上の塩基長を有する、例 E 1 から E 2 3 のいずれか 1 つの組成物。

E 2 5 . 第 1 の翼領域が独立して、4 つまたはそれ以上の塩基長を有する、例 E 1 から E 2 4 のいずれか 1 つの組成物。

E 2 6 . 第 1 の翼領域が独立して、5 つまたはそれ以上の塩基長を有する、例 E 1 から E 2 5 のいずれか 1 つの組成物。

E 2 7 . 第 1 の翼領域が独立して、8 未満の塩基長を有する、例 E 1 から E 2 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 2 8 . 第 2 の翼領域が独立して、1 つまたは複数の塩基長を有する、例 E 1 から E 2 7 のいずれか 1 つの組成物。

E 3 3 . 第 2 の翼領域が独立して、8 未満の塩基長を有する、例 E 1 から E 3 2 のいずれか 1 つの組成物。

E 3 4 . コア領域が、5 以上の塩基長を有する、例 E 1 から E 3 3 のいずれか 1 つの組成物。

E 3 6 . コア領域が、6 以上の塩基長を有する、例 E 1 から E 3 3 のいずれか 1 つの組成物。

E 3 7 . コア領域が、7 以上の塩基長を有する、例 E 1 から E 3 3 のいずれか 1 つの組成物。

10

20

30

40

50

E 3 8 . コア領域が、8以上の塩基長を有する、例E 1 からE 3 3 のいずれか1つの組成物。

E 3 9 . コア領域が、9以上の塩基長を有する、例E 1 からE 3 3 のいずれか1つの組成物。

E 4 0 . コア領域が、10以上の塩基長を有する、例E 1 からE 3 3 のいずれか1つの組成物。

E 4 1 . コア領域が、15以上の塩基長を有する、例E 1 からE 3 3 のいずれか1つの組成物。

E 4 2 . コア領域が、ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンを有する、例E 1 からE 4 1 のいずれか1つの組成物。

E 4 3 . ヌクレオチド間結合立体化学の繰り返しパターンが、 $(S_p)_m(R_p)_n$ または $(R_p)_n(S_p)_m$ (式中、 m および n はそれぞれ独立して、1、2、3、4、5、6、7または8である。)である、例E 1 からE 4 2 のいずれか1つの組成物。

E 4 4 . $m > n$ である、例E 4 3 の組成物。

E 4 5 . n が1である、例E 4 3 またはE 4 4 の組成物。

E 4 6 . コア領域が、 $(S_p)_m(R_p)_n$ または $(R_p)_n(S_p)_m$ (式中、 m および n はそれぞれ独立して、2、3、4、5、6、7または8である。)のヌクレオチド間結合立体化学パターンを含む、例E 1 からE 4 5 のいずれか1つの組成物。

E 4 7 . $m > n$ である、例E 4 6 の組成物。

E 4 8 . n が1である、例E 4 7 の組成物。

E 4 9 . コア領域のキラルなヌクレオチド間結合の50%以上が、 S_p 配置を有する、例E 1 からE 4 8 のいずれか1つの組成物。

E 5 0 . コア領域のキラルなヌクレオチド間結合の60%以上が、 S_p 配置を有する、例E 1 からE 4 8 のいずれか1つの組成物。 E 5 1 . コア領域が、少なくとも2つの R_p ヌクレオチド間結合を含む、例E 1 からE 5 0 のいずれか1つの組成物。

E 5 2 . コア領域が、少なくとも3つの R_p ヌクレオチド間結合を含む、例E 1 からE 5 0 のいずれか1つの組成物。

E 5 3 . コア領域が、少なくとも4つの R_p ヌクレオチド間結合を含む、例E 1 からE 5 0 のいずれか1つの組成物。

E 5 4 . コア領域が、少なくとも5つの R_p ヌクレオチド間結合を含む、例E 1 からE 5 0 のいずれか1つの組成物。

E 5 5 . 少なくとも5個の骨格ヌクレオチド間結合がキラルである、例E 1 からE 5 4 のいずれか1つの組成物。

E 5 6 . 各骨格ヌクレオチド間結合がキラルである、例E 1 からE 5 5 のいずれか1つの組成物。

E 5 7 . 少なくとも1個の骨格ヌクレオチド間結合が、リン酸結合である、例E 1 ~ E 5 5 のいずれか1つの組成物。

E 5 8 . 単一のオリゴヌクレオチドが、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも1個がキラルである領域を含む、例E 1 ~ E 1 6 のいずれか1つの組成物。

E 5 9 . 1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも2個がキラルである、例E 5 8 の組成物。

E 6 0 . 1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも3個がキラルである、例E 5 8 ~ E 5 9 のいずれか1つの組成物。

E 6 1 . 1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、18番目、19番目および20番目のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも3個がキラルである、例E 5 8 ~ E 6 0 のいずれか1つの組成物。

E 6 2 . 領域の少なくとも1個のヌクレオチド間結合がアキラルである、例E 5 8 ~ E 6 1 のいずれか1つの組成物。

10

20

30

40

50

E 6 3 . 領域の少なくとも 1 個のヌクレオチド間結合がリン酸結合である、例 E 5 8 ~ E 6 2 のいずれか 1 つの組成物。

E 6 4 . 領域のヌクレオチド間結合の少なくとも 1 0 % がリン酸結合である、例 E 5 8 ~ E 6 3 のいずれか 1 つの組成物。

E 6 5 . 1 番目のヌクレオチド間結合が、S p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 6 4 のいずれか 1 つの組成物。

E 6 6 . 1 番目のヌクレオチド間結合が、R p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 6 4 のいずれか 1 つの組成物。

E 6 7 . 2 番目のヌクレオチド間結合が、S p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 6 6 のいずれか 1 つの組成物。

10

E 6 8 . 2 番目のヌクレオチド間結合が、R p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 6 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 6 9 . 3 番目のヌクレオチド間結合が、S p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 6 8 のいずれか 1 つの組成物。

E 7 0 . 3 番目のヌクレオチド間結合が、R p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 6 8 のいずれか 1 つの組成物。

E 7 1 . 5 番目のヌクレオチド間結合が、S p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 0 のいずれか 1 つの組成物。

E 7 2 . 5 番目のヌクレオチド間結合が、R p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 0 のいずれか 1 つの組成物。

20

E 7 3 . 7 番目のヌクレオチド間結合が、S p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 0 のいずれか 1 つの組成物。

E 7 4 . 7 番目のヌクレオチド間結合が、R p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 2 のいずれか 1 つの組成物。

E 7 5 . 1 8 番目のヌクレオチド間結合が、S p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 4 のいずれか 1 つの組成物。

E 7 6 . 1 8 番目のヌクレオチド間結合が、R p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 4 のいずれか 1 つの組成物。

E 7 7 . 1 9 番目のヌクレオチド間結合が、S p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 6 のいずれか 1 つの組成物。

30

E 7 8 . 1 9 番目のヌクレオチド間結合が、R p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 7 9 . 2 0 番目のヌクレオチド間結合が、S p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 8 のいずれか 1 つの組成物。

E 8 0 . 2 0 番目のヌクレオチド間結合が、R p 修飾ヌクレオチド間結合である、例 E 5 8 ~ E 7 8 のいずれか 1 つの組成物。

E 8 1 . 領域が、2 1 塩基の長さを有する、例 E 5 8 ~ E 8 0 のいずれか 1 つの組成物。

E 8 2 . 単一のオリゴヌクレオチドが、2 1 塩基の長さを有する、例 E 5 8 ~ E 8 1 のいずれか 1 つの組成物。

40

E 8 3 . キラルなヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエートである、例 E 5 8 ~ E 8 2 のいずれか 1 つの組成物。

E 8 4 . キラルなヌクレオチド間結合が、式 I の構造を有する、例 E 1 から E 8 3 のいずれか 1 つの組成物。

E 8 5 . 単一のオリゴヌクレオチドが、糖部分に 2 ' - O R ¹ を持たない、例 E 1 から E 8 4 のいずれか 1 つの組成物。

E 8 6 . 各糖部分が、2 ' - M O E を持たない、例 E 1 から E 8 5 のいずれか 1 つの組成物。

E 8 7 . 単一のオリゴヌクレオチドが、(S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p) - d [5 m C s 1 A s 1 G s 1 T s 1 5 m C s 1 T s 1 G s

50

1 5 m C s 1 T s 1 T s 1 5 m C s 1 G] または (R p 、 R p 、 R p 、 R p 、 R p 、 S p 、 S p 、 R p 、 S p 、 S p 、 R p 、 S p 、 S p 、 R p 、 R p 、 R p 、 R p 、 R p 、 R p) - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C (5 R - (S S R) 3 - 5 R) (式中、下線のヌクレオチド内は、2' - O - M O E 修飾されている。) ではない、例 E 1 から E 8 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 8 8 . 単一のオリゴヌクレオチドが、以下から選択されるオリゴヌクレオチドではない、例 E 1 から E 8 7 のいずれか 1 つの組成物 :

【表 8】

ONT-106	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sense	10
ONT-107	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sense	
ONT-108	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense	
ONT-109	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense	
ONT-110	(Rp, Rp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense	
ONT-111	(Sp, Rp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense	
ONT-112	(Sp, Sp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense	20
ONT-113	(Rp, Sp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense	

表中、小文字は、2' O M e RNA 残基を表す ; 大文字は、2' O H RNA 残基を表す ; 太字および「 s 」は、ホスホロチオエート部分を示す ;

【表 9】

PCSK9 (1)	(All (Sp))- ususcusAsGsAscscsusGsusususGscsusudTsdT	
PCSK9 (2)	(All (Rp))- ususcusAsGsAscscsusGsusususGscsusudTsdT	
PCSK9 (3)	(All (Sp))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT	
PCSK9 (4)	(All (Rp))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT	30
PCSK9 (5)	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-ususcusAsGsAscscsusGsusususGscsusudTsdT	
PCSK9 (6)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-ususcusAsGsAscscsusGsusususGscsusudTsdT	

表中、小文字は、2' - O M e RNA 残基を表す ; 大文字は、RNA 残基を表す ; d = 2' - デオキシ残基 ; 「 s 」は、ホスホロチオエート部分を示す ;

【表 1 2】

PCSK9 (25)	(All (Rp))- asAfgsCfsasAfsasAfsasAfsasAfsasGfsusCfsusAfsasAfsadTsdT
PCSK9 (26)	(All (Sp))- asAfgsCfsasAfsasAfsasAfsasAfsasGfsusCfsusAfsasAfsadTsdT
PCSK9 (27)	(All (Rp))- asAfgCfaAfaAfaAfsasAfsasGfsusCfsusAfsasAfsadTsdT
PCSK9 (28)	(All (Sp))- asAfgCfaAfaAfaAfsasAfsasGfsusCfsusAfsasAfsadTsdT
PCSK9 (29)	(All (Rp))- asAfgCfsaAfsaAfsaAfsaAfsaGfsuAfsuAfsaAfsadTsdT
PCSK9 (30)	(All (Sp))- asAfgCfsaAfsaAfsaAfsaAfsaGfsuAfsuAfsaAfsadTsdT
PCSK9 (31)	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)- asAfgCfaAfasAfsaAfsaAfsaAfsaGfsuAfsuAfsaAfsadTsdT
PCSK9 (32)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)- asAfgCfaAfasAfsaAfsaAfsaAfsaGfsuAfsuAfsaAfsadTsdT

10

表中、小文字は、2' - O Me RNA 残基を表す；大文字は、2' - F RNA 残基を表す；d = 2' - デオキシ残基；「s」は、ホスホロチオエート部分を示す。

E 8 9 . ヌクレオチド間結合の少なくとも約 5 0 % が、S p 配置にある、例 E 1 から E 8 8 のいずれか 1 つの組成物。

20

E 9 0 . コア部分が、少なくとも約 5 個のヌクレオチドを含む、例 E 1 から E 8 9 のいずれか 1 つの組成物。

E 9 1 . コア部分が、少なくとも約 1 0 個のヌクレオチドを含む、例 E 1 から E 8 9 のいずれか 1 つの組成物。

E 9 2 . コア部分が、少なくとも約 1 5 個のヌクレオチドを含む、例 E 1 から E 8 9 のいずれか 1 つの組成物。

E 9 3 . コア部分が、少なくとも約 2 0 個のヌクレオチドを含む、例 E 1 から E 8 9 のいずれか 1 つの組成物。

E 9 4 . コア部分が、少なくとも約 2 5 個のヌクレオチドを含む、例 E 1 から E 8 9 のいずれか 1 つの組成物。

30

E 9 5 . (S p) m (R p) n または (R p) n (S p) m が S S R である、例 E 1 から E 9 4 のいずれか 1 つの組成物。

E 9 6 . (S p) m (R p) n または (R p) n (S p) m が R R S である、例 E 1 ~ E 9 5 のいずれか 1 つの組成物。

E 9 7 . 繰り返しパターンが、S p 構造に骨格キラル中心の少なくとも約 2 0 % を含むモチーフである、例 E 1 から E 9 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 9 8 . 繰り返しパターンが、S p 構造に骨格キラル中心の少なくとも約 5 0 % を含むモチーフである、例 E 1 から E 9 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 9 9 . 繰り返しパターンが、S p 構造に骨格キラル中心の少なくとも約 6 6 % を含むモチーフである、例 E 1 から E 9 6 のいずれか 1 つの組成物。

40

E 1 0 0 . 繰り返しパターンが、S p 構造に骨格キラル中心の少なくとも約 7 5 % を含むモチーフである、例 E 1 から E 9 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 0 1 . 繰り返しパターンが、S p 構造に骨格キラル中心の少なくとも約 8 0 % を含むモチーフである、例 E 1 から E 9 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 0 2 . 同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御されたキラル (c h i r a l e s) 。

E 1 0 3 . 共通塩基配列が、標的配列に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、標的配列を含む核酸高分子と接触させたとき、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、基準オリゴヌクレオチド組成物からの基準切断パターンより変更された

50

切断パターンをもたらず、例 E 1 0 2 の組成物。

E 1 0 4 . 核酸高分子が RNA であり、基準オリゴヌクレオチド組成物が、共通配列および長さを共有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物である、例 E 1 0 3 の組成物。

E 1 0 5 . 核酸高分子が RNA であり、基準オリゴヌクレオチド組成物が、共通配列および長さを共有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されないオリゴヌクレオチド組成物である、例 E 1 0 3 の組成物。

E 1 0 6 . 変更された切断パターンが、基準切断パターンより少ない切断部位を有する、例 E 1 0 3 ~ E 1 0 5 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 0 7 . 変更された切断パターンが、標的配列内にただ 1 つの切断部位を有し、基準切断パターンが、標的配列内に 2 つ以上の切断部位を有する、例 E 1 0 3 ~ E 1 0 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 0 8 . 単一のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列が、集団内に存在する同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して標的遺伝子の特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的対立遺伝子および同じ遺伝子の別の対立遺伝子の両方の転写物を発現させる系と組成物とを接触させるとき、特定の対立遺伝子の転写物が、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも 2 倍高いレベルで抑制されることを特徴とする、例 E 1 0 2 の組成物。

E 1 0 9 . 単一のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列が、集団内に存在する同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して標的遺伝子の特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的遺伝子の転写物を発現させる系と組成物とを接触させるとき、

a) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて 2 分の 1 の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも 2 倍；

b) 同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも 2 倍高い；または

c) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて 2 分の 1 の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも 2 倍で、かつ、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも 2 倍高いレベルでの特定の対立遺伝子の転写物の発現の抑制を示すことを特徴とする、例 E 1 0 2 の組成物。

E 1 1 0 . 特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドが修飾塩基を含む、例 E 1 0 2 ~ E 1 0 9 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 1 1 . 特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドが修飾糖を含む、例 E 1 0 2 ~ E 1 1 0 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 1 2 . 修飾糖が 2' - 修飾を含む、例 E 1 1 1 の組成物。

E 1 1 3 . 2' - 修飾が 2' - OR¹ である、例 E 1 1 2 の組成物。

E 1 1 4 . 2' - 修飾が 2' - MOE である、例 E 1 1 3 の組成物。

E 1 1 5 . 特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドが、修飾塩基または修飾糖を持たない、例 E 1 0 2 ~ E 1 0 9 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 1 6 . 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが (Sp)_m (Rp)_n (式中、m は、2、3、4、5、6、7 または 8 であり、および n は、1、2、3、4、5、6、7 または 8 である。) を含む、例 E 1 0 2 ~ E 1 1 5 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 1 7 . 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが (Sp)_m Rp (式中、m は、2、3、4、5、6、7 または 8 である。) を含む、例 E 1 0 2 ~ E 1 1 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 1 8 . 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが (Sp)₂ Rp を含む、例 E 1 0 2 ~ E 1 1 7 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 1 9 . 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが繰り返し (

10

20

30

40

50

$S_p)_m(R_p)_n$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7または8であり、および n は、1、2、3、4、5、6、7または8である。)を含む、例E102~E118のいずれか1つの組成物。

E120. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが繰り返し $(S_p)_m R_p$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7または8である。)を含む、例E102~E119のいずれか1つの組成物。

E121. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが繰り返し $(S_p)_2 R_p$ を含む、例E102~E120のいずれか1つの組成物。

E122. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが $(R_p)_n(S_p)_m$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7または8であり、および n は、1、2、3、4、5、6、7または8である。)を含む、例E102~E115のいずれか1つの組成物。

10

E123. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが $R_p(S_p)_m$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7または8である。)を含む、例E102~E115のいずれか1つの組成物。

E124. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが $R_p(S_p)_2$ を含む、例E102~E115のいずれか1つの組成物。

E125. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが繰り返し $(R_p)_n(S_p)_m$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7または8であり、および n は、1、2、3、4、5、6、7または8である。)を含む、例E102~E115のいずれか1つの組成物。

20

E126. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが繰り返し $R_p(S_p)_m$ (式中、 m は、2、3、4、5、6、7または8である。)を含む、例E102~E115のいずれか1つの組成物。

E127. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが繰り返し $R_p(S_p)_2$ を含む、例E102~E115のいずれか1つの組成物。

E128. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが $(N_p)_t(R_p)_n(S_p)_m$ (式中、 n および t のそれぞれは独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、 m は、2、3、4、5、6、7または8であり、および各 N_p は、独立した R_p または S_p である。)を含む、例E102~E115のいずれか1つの組成物。

30

E129. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが $(S_p)_t(R_p)_n(S_p)_m$ (式中、 n および t はそれぞれ独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、および m は、2、3、4、5、6、7または8である。)を含む、例E102~E115のいずれか1つの組成物。

E130. n が1である、例E128またはE129の組成物。

E131. t が、2、3、4、5、6、7または8である、例E128~E130のいずれか1つの組成物。

E132. m が、2、3、4、5、6、7または8である、例E128~E131のいずれか1つの組成物。

40

E133. t および m のうちの少なくとも1つが5より大きい、例E128~E131のいずれか1つの組成物。

E134. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの骨格キラル中心のパターンが $S_p S_p R_p S_p S_p$ を含む、例E102~E115のいずれか1つの組成物。

E135. 特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドが、ただ1つの R_p を有し、他のヌクレオチド間結合がそれぞれ S_p である、例E102~E134のいずれか1つの組成物。

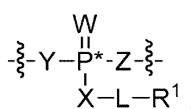
E136. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの共通塩基の長さが10より大きい、例E102~E135のいずれか1つの組成物。

E137. 特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチド内のキラルなヌクレ

50

オチド間結合がそれぞれ、式 I :

【化 2 3 4】



(I)

の構造を有する、例 E 1 0 2 ~ E 1 3 6 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 3 8 . X が S であり、かつ Y および Z が O である、例 E 1 3 7 の組成物。

E 1 3 9 . - L - R¹ が - H ではない、例 E 1 3 7 または E 1 3 8 の組成物。

E 1 4 0 . 式 I の構造が、ホスホロチオエートジエステル結合である、例 E 1 3 7 または E 1 3 8 の組成物。

E 1 4 1 . 特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンタゴmir、マイクロRNA、プレマイクロRNAs、抗mir、スーパーmir、リボザイム、U1アダプター、RNAアクチベーター、RNAi剤、デコイオリゴヌクレオチド、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、アプタマーまたはアジュバントである、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 0 のいずれか 1 つの組成物。

E 1 4 2 . 1) 核酸高分子に見られる標的配列に対して相補的である配列であるか、または、これらを含む、共通塩基配列および長さ；

2) 骨格結合の共通パターン；および

3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、ヌクレオチド配列が標的配列を含む核酸高分子とを接触させるステップを含み、

この組成物は、特定の塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御される、核酸高分子の制御された切断のための方法。

E 1 4 3 . 接触が、核酸高分子の切断が起こるような条件下で実施される、例 E 1 4 2 の方法。

E 1 4 4 . 核酸高分子を、同等な条件下で、基準オリゴヌクレオチド組成物と接触させるときに観察される基準切断パターンとは異なる切断パターンで切断が起こる、例 E 1 4 2 ~ E 1 4 3 のいずれか 1 つの方法。

E 1 4 5 . ヌクレオチド配列が標的配列を含む核酸高分子を、特定の塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドを含む基準オリゴヌクレオチド組成物と接触させるときに観察される切断パターンを変更するための方法であって、この特定の塩基配列は、標的配列に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、本方法は、

核酸高分子と、特定の塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物とを接触させるステップを含み、組成物は、特定の塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、

1) 特定の塩基配列および長さ；

2) 骨格結合の特定のパターン；および

3) 骨格キラル中心の特定のパターン

によって特徴づけられる単一のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御される方法。

E 1 4 6 . 接触が、核酸高分子の切断が起こるような条件下で実施される、例 E 1 4 5 の方法。

E 1 4 7 . 基準オリゴヌクレオチド組成物が、共通配列および長さを共有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物である、例 E 1 4 4 ~ E 1 4 6 のいずれか 1 つの方法。

10

20

30

40

50

E 1 4 8 . 基準オリゴヌクレオチド組成物が、共通配列および長さを共有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されないオリゴヌクレオチド組成物である、例 E 1 4 4 ~ E 1 4 6 のいずれか 1 つの方法。

E 1 4 9 . キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物によってもたらされる切断パターンが、核酸高分子に見られる標的配列内に基準切断パターンよりも少ない切断部位を有するという点で基準切断パターンとは異なる、例 E 1 4 4 ~ E 1 4 8 のいずれか 1 つの方法。

E 1 5 0 . キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物によってもたらされる切断パターンが、核酸高分子に見られる標的配列内に基準切断パターンよりも単一の切断部位を有する、例 E 1 4 9 の方法。

E 1 5 1 . 単一の切断部位が、基準切断パターンの切断部位である、例 E 1 5 0 の方法。

E 1 5 2 . 単一の切断部位が、基準切断パターンではない切断部位である、例 E 1 5 0 の方法。

E 1 5 3 . キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物によってもたらされる切断パターンが、切断部位での切断割合を高めるという点で基準切断パターンとは異なる、例 E 1 4 4 ~ E 1 4 8 のいずれか 1 つの方法。

E 1 5 4 . 切断割合が増加した切断部位が、基準切断パターンの切断部位である、例 E 1 5 3 の方法。

E 1 5 5 . 切断割合が増加した切断部位が、基準切断パターンではない切断部位である、例 E 1 5 3 の方法。

E 1 5 6 . キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、基準オリゴヌクレオチド組成物よりも、大きい標的核酸高分子の切断速度をもたらず、例 E 1 4 2 ~ E 1 5 5 のいずれか 1 つの方法。

E 1 5 7 . 切断速度が少なくとも 5 倍大きい、例 E 1 4 2 ~ E 1 5 6 のいずれか 1 つの方法。

E 1 5 8 . キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、基準オリゴヌクレオチド組成物よりも、低いレベルの残留する未切断の標的核酸高分子をもたらず、例 E 1 4 2 ~ E 1 5 7 のいずれか 1 つの方法。

E 1 5 9 . 残留する未切断の標的核酸高分子が少なくとも 5 倍少ない、例 E 1 4 2 ~ E 1 5 8 のいずれか 1 つの方法。

E 1 6 0 . 核酸高分子からの切断産物が、基準オリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドからの解離よりも速い速度で、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中の特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドから解離する、例 E 1 4 2 ~ E 1 5 9 のいずれか 1 つの方法。

E 1 6 1 . 複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的核酸配列からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法であって、そのそれぞれは、同じ標的核酸配列の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ ;
- 2) 骨格結合の共通パターン ;
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によっても特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的核酸配列の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み ;

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され ;

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または

10

20

30

40

50

、これを含み、組成物は、標的対立遺伝子および同じ核酸配列の別の対立遺伝子の両方の転写物を含む系と組成物とを接触させるとき、特定の対立遺伝子の転写物が、同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも高いレベルで抑制されることを特徴とする方法。

E 1 6 2 . 複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法であって、そのそれぞれは、同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ ;
- 2) 骨格結合の共通パターン ;
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み ;

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され ;

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的対立遺伝子および同じ遺伝子の別の対立遺伝子の両方の転写物を含む系と組成物とを接触させるとき、特定の対立遺伝子の転写物が、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルで抑制されることを特徴とする。

E 1 6 3 . 接触が、特定の対立遺伝子の転写物を組成物が抑制できるよう定められた条件下で実施される、例 E 1 6 1 または E 1 6 2 の方法。

E 1 6 4 . 複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法であって、そのそれぞれは、同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ ;
- 2) 骨格結合の共通パターン ;
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み ;

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され ;

特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的対立遺伝子および同じ遺伝子の別の対立遺伝子の両方の転写物を発現させる系と組成物とを接触させるとき、特定の対立遺伝子の転写物が、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルで抑制されることを特徴とする方法。

E 1 6 5 . 接触が、特定の対立遺伝子の発現を組成物が抑制できるよう定められた条件下で実施される、例 E 1 6 4 の方法。

E 1 6 6 . 特定の対立遺伝子の転写物が、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍または500倍高いレベルで抑制される、例 E 1 6 1 ~ E 1 6 5 のいずれか1つの方法。

E 1 6 7 . 複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的核酸配列からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法であって、そのそれぞれは、同じ標的核酸配列の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法

10

20

30

40

50

は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的核酸配列の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

ここで、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、同じ標的核酸配列の転写物を含む系と組成物とを接触させるとき、

- a) 組成物がないときより高い；
- b) 同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルより高い；または
- c) 組成物がないときよりも高く、かつ、同じ核酸配列の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも高いレベルでの特定の対立遺伝子の転写物の抑制を示すことを特徴とする。

E 1 6 8 . 複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法であって、そのそれぞれは、同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的遺伝子の転写物を発現させる系と組成物とを接触させるとき、

- a) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍；
- b) 同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高い；または

c) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍で、かつ、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルでの特定の対立遺伝子の転写物の発現の抑制を示すことを特徴とする。

E 1 6 9 . 接触が、特定の対立遺伝子の転写物を組成物が抑制できるよう定められた条件下で実施される、例 E 1 6 7 または E 1 6 8 の方法。

E 1 7 0 . 複数の対立遺伝子が集団内に存在する標的遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のための方法であって、そのそれぞれは、同じ標的遺伝子の他の対立遺伝子に対して対立遺伝子を定義する特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素を含み、本方法は、

- 1) 共通塩基配列および長さ；
- 2) 骨格結合の共通パターン；
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴づけられる、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、標的遺伝子の転写物を含む試料とを接触させるステップを含み；

この組成物は、同じ塩基配列および長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミの調製物に比べて、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドに関して濃縮されるという点でキラル制御され；

特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの共通塩基配列は、特定の対立遺伝子を定義する特徴的な配列要素に対して相補的である配列であるか、または、これを含み、組成物は、標的遺伝子の転写物を発現させる系と組成物とを接触させるとき、

a) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍；

b) 同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高い；または

c) 組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で少なくとも2倍で、かつ、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも2倍高いレベルでの特定の対立遺伝子の転写物の発現の抑制を示すことを特徴とする。

E 1 7 1 . 接触が、特定の対立遺伝子の発現を組成物が抑制できるよう定められた条件下で実施される、例 E 1 7 0 の方法。

E 1 7 2 . 特定の対立遺伝子の転写物が、組成物が存在するとき、組成物がないときと比べて2分の1の量で特定の対立遺伝子からの転写物が検出されるという点で、少なくとも5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍または500倍であるレベルで抑制される、例 E 1 6 7 ~ E 1 7 1 のいずれか1つの方法。

E 1 7 3 . 特定の対立遺伝子の転写物が、同じ遺伝子の別の対立遺伝子において観察される抑制のレベルよりも少なくとも5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍または500倍高いレベルで抑制される、例 E 1 6 7 ~ E 1 7 2 のいずれか1つの方法。

E 1 7 4 . 系が、インピトロまたはインピボの系である、例 E 1 6 1 ~ E 1 7 3 のいずれか1つの方法。

E 1 7 5 . 系が、1つまたは複数の細胞、組織または臓器を含む、例 E 1 6 1 ~ E 1 7 4 のいずれか1つの方法。

E 1 7 6 . 系が、1つまたは複数の生物を含む、例 E 1 6 1 ~ E 1 7 4 のいずれか1つの方法。

E 1 7 7 . 系が、1つまたは複数の対象を含む、例 E 1 6 1 ~ E 1 7 4 のいずれか1つの方法。

E 1 7 8 . 特定の対立遺伝子の転写物が切断される、例 E 1 6 1 ~ E 1 7 7 のいずれか1つの方法。

E 1 7 9 . 特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素が、標的核酸配列または遺伝子のイントロン内に存在する、例 E 1 6 1 ~ E 1 7 8 のいずれか1つの方法。

E 1 8 0 . 特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素が、標的核酸配列または遺伝子のエキソン内に存在する、例 E 1 6 1 ~ E 1 7 8 のいずれか1つの方法。

E 1 8 1 . 特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素が、標的核酸配列または遺伝子のエキソンおよびイントロンにまたがる、例 E 1 6 1 ~ E 1 7 8 のいずれか1つの方法。

E 1 8 2 . 特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素が突然変異を含む、例 E 1 6 1 ~ E 1 8 1 のいずれか1つの方法。

E 1 8 3 . 特異的ヌクレオチドに特徴的な配列要素がSNPを含む、例 E 1 6 1 ~ E 1 8 1 のいずれか1つの方法。

E 1 8 4 . キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、対象に投与される、例 E 1 4 2 ~ E 1 8 3 のいずれか1つの方法。

E 1 8 5 . 標的核酸高分子または転写物がオリゴヌクレオチドである、例 E 1 4 2 ~ E 1 8 4 のいずれか1つの方法。

10

20

30

40

50

E 1 8 6 . 標的核酸高分子または転写物がRNAである、例E 1 4 2 ~ E 1 8 5のいずれか1つの方法。

E 1 8 7 . キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中の特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドが、核酸高分子または転写物と二本鎖を形成する、例E 1 4 2 ~ E 1 8 6のいずれか1つの方法。

E 1 8 8 . 核酸高分子または転写物が酵素により切断される、例E 1 4 2 ~ E 1 8 7のいずれか1つの方法。

E 1 8 9 . 酵素がリボヌクレアーゼHである、例E 1 4 2 ~ E 1 8 8のいずれか1つの方法。

E 1 9 0 . 酵素がアルゴノートタンパク質であるか、または、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)内にある、例E 1 4 2 ~ E 1 8 8のいずれか1つの方法。

E 1 9 1 . オリゴヌクレオチドタイプが、(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp) - d [5 m C s 1 A s 1 G s 1 T s 1 5 m C s 1 T s 1 G s 1 5 m C s 1 T s 1 T s 1 5 m C s 1 G] または (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp) - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C (5 R - (S S R) 3 - 5 R) (式中、下線のヌクレオチド内は、2' - O - MOE修飾されている。)ではない、例E 1 0 2 ~ E 1 4 1のいずれか1つの組成物。

E 1 9 2 . オリゴヌクレオチドが翼 - コア - 翼モチーフを有し、コア領域の骨格キラル中心のパターンが(Np)t(Rp)n(Sp)m(式中、nおよびtのそれぞれは独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、mは、2、3、4、5、6、7または8であり、および各Npは、独立したRpまたはSpである。)を含む、例E 1 0 2 ~ E 1 4 1のいずれか1つの組成物。

E 1 9 3 . オリゴヌクレオチドが翼 - コア - 翼モチーフを有し、コア領域の骨格キラル中心のパターンが(Sp)t(Rp)n(Sp)m(式中、nおよびtのそれぞれは独立して、1、2、3、4、5、6、7または8であり、およびmは、2、3、4、5、6、7または8である。)を含む、例E 1 0 2 ~ E 1 4 1のいずれか1つの組成物。

E 1 9 4 . nが1である、例E 1 9 2またはE 1 9 3のいずれか1つの組成物。

E 1 9 5 . mが2である、例E 1 9 2またはE 1 9 4のいずれか1つの組成物。

E 1 9 6 . mが3、4、5、6、7または8である、例E 1 9 2またはE 1 9 4のいずれか1つの組成物。

E 1 9 7 . mが4、5、6、7または8である、例E 1 9 2 ~ E 1 9 4のいずれか1つの組成物。

E 1 9 8 . mが5、6、7または8である、例E 1 9 2 ~ E 1 9 4のいずれか1つの組成物。

E 1 9 9 . mが6、7または8である、例E 1 9 2 ~ E 1 9 4のいずれか1つの組成物。

E 2 0 0 . mが7または8である、例E 1 9 2 ~ E 1 9 4のいずれか1つの組成物。

E 2 0 1 . mが8である、例E 1 9 2 ~ E 1 9 4のいずれか1つの組成物。

E 2 0 2 . tが1である、例E 1 9 2 ~ E 2 0 1のいずれか1つの組成物。

E 2 0 3 . tが2、3、4、5、6、7または8である、例E 1 9 2 ~ E 2 0 1のいずれか1つの組成物。

E 2 0 4 . tが3、4、5、6、7または8である、例E 1 9 2 ~ E 2 0 1のいずれか1つの組成物。

E 2 0 5 . tが4、5、6、7または8である、例E 1 9 2 ~ E 2 0 1のいずれか1つの組成物。

E 2 0 6 . tが5、6、7または8である、例E 1 9 2 ~ E 2 0 1のいずれか1つの組成物。

E 2 0 7 . tが6、7または8である、例E 1 9 2 ~ E 2 0 1のいずれか1つの組成物

10

20

30

40

50

- 。 E 2 0 8 . t が 7 または 8 である、例 E 1 9 2 ~ 2 0 1 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 0 9 . t が 8 である、例 E 1 9 2 ~ E 2 0 1 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 1 0 . 各翼領域が独立して、2 塩基以上の長さを有する、例 E 1 9 2 ~ E 2 0 9 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 1 1 . すべてのヌクレオチド間結合が、キラルな修飾されたリン酸結合である、例 E 1 9 2 ~ E 2 1 0 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 1 2 . コア領域が、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 5 塩基以上の長さを有する、例 E 1 9 2 ~ E 2 1 1 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 1 3 . 共通塩基配列が、少なくとも 1 8 塩基を有する、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 1 2 のいずれか 1 つの組成物。 10
- E 2 1 4 . 共通塩基配列が、少なくとも 1 9 塩基を有する、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 1 2 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 1 5 . 共通塩基配列が、少なくとも 1 9 塩基を有する、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 1 2 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 1 6 . 共通塩基配列が、少なくとも 1 9 塩基を有する、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 1 2 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 1 7 . 共通塩基配列が、少なくとも 1 9 塩基を有する、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 1 2 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 1 8 . 共通塩基配列が、少なくとも 1 9 塩基を有する、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 1 2 のいずれか 1 つの組成物。 20
- E 2 1 9 . 共通塩基配列が、少なくとも 1 9 塩基を有する、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 1 2 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 2 0 . 共通塩基配列が、少なくとも 1 9 塩基を有する、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 1 2 のいずれか 1 つの組成物。
- E 2 2 1 . オリゴヌクレオチドが、以下から選択されるオリゴヌクレオチドではない、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 2 0 のいずれか 1 つの組成物：(S p、S p、R p、S p、S p、R p、S p、S p、R p、S p、S p) - d [5 m C s 1 A s 1 G s 1 T s 1 5 m C s 1 T s 1 G s 1 5 m C s 1 T s 1 T s 1 5 m C s 1 G] または (R p、R p、R p、R p、S p、S p、R p、S p、S p、R p、S p、S p、R p、R p、R p、R p、R p) - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C (5 R - (S S R) 3 - 5 R) (式中、下線のヌクレオチド内は、2 ' - O - M O E 修飾されている)。
- E 2 2 2 . オリゴヌクレオチドが、以下から選択されるオリゴヌクレオチドではない、例 E 1 0 2 ~ E 1 4 1 および E 1 9 2 ~ E 2 2 1 のいずれか 1 つの組成物： 30
- 【表 1 3】

ONT-106	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sense
ONT-107	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sense
ONT-108	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-109	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-110	(Rp, Rp)- asAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-111	(Sp, Rp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-112	(Sp, Sp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-113	(Rp, Sp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense

表中、小文字は、2 ' O M e RNA 残基を表す；大文字は、2 ' O H RNA 残基を 50

RSRSSSSR、SRSRSSRSSR、RRRSSSSRSSS、RRRSRSSRSR、RRSSSSRSSRS、SSSSSSRRSS、RRRSSRRRSR、RRRSSSSSSRS、SRRSRRRRRR、RSSRSSRRRR、RSRRSRRRSR、RRSSSSRSSRS、SSRRRRRSRR、RSRRSRSSSR、RRSSRSRRRR、RRSRSRRSSS、RRSSSSSSRRR、RRSRSSSSSRR、RSRRRRRSRSR、SSRSSSSRRRS、RSSRSRSRSR、RSRSRSRSSS、RRRSSRSRSRS、SRRSSRRSRS、RRRRSRSRRR、SSSSRRRRRSR、RRRRRRRRRRおよびSSSSSSSSSSから選択される立体化学パターンを含むホスホロチオエート(PS)である)。

10

E226. オリゴヌクレオチドが、以下から選択されるオリゴヌクレオチドではない、例E1~E141およびE192~E225のいずれか1つの組成物： $T_k T_k^m C_k A G T^m C A T G A^m C T T_k^m C_k^m C_k$ (式中、下付きの「k」が続く各ヌクレオシドは、(S)-cEt修飾を示し、Rは、Rpホスホロチオエート結合であり、Sは、Spホスホロチオエート結合であり、各 C_k は、5-メチルシトシン修飾ヌクレオシドであり、すべてのヌクレオシド間結合は、RSSRSRRRS、RSSSSSSSSS、RSRSRSSSSR、SRSRSSRSSR、RRRSSSSRSSS、RRRSRSSRSR、RRSSSSRSRSR、SSSSSSRSSSS、SSRRSSRSRS、SSSSSSRRSS、RRRSRRRRRSR、RRRSSSSSSRS、SRRSRRRRRR、RSSRSSRRRR、RSRRSRRRSR、RRSRSRSRSR、SSRRRRRSRR、RSRRSRSSSR、RRSSRSRRRR、RRSRSRRSSS、RRSSSSSSRRR、RRSRSSSSSRR、RSRRRRRSRSR、SSRSSSSRRRS、RSSRSRSRSR、RSRSRSSSSRS、RRRSSRSRSRS、SRRSSRRSRS、RRRRSRSRRR、SSSSRRRRRSR、RRRRRRRRRRおよびSSSSSSSSSSから選択される立体化学パターンを含むホスホロチオエート(PS)である)。

20

E227. 共通塩基配列、骨格結合の共通パターン、骨格キラル中心の共通パターン、および骨格リン修飾の共通パターンによって特徴づけられる1つのオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを所定のレベル含む、例E1~E141およびE192~E226のいずれか1つの組成物。

30

E228. 骨格キラル中心の共通パターンが、Sp構造に骨格キラル中心の少なくとも約20%を含む、請求項E1~E141およびE192~E226のいずれか一項に記載の組成物。

E229. 骨格キラル中心の共通パターンが、Sp構造に骨格キラル中心の少なくとも約50%を含む、請求項E1~E141およびE192~E226のいずれか一項に記載の組成物。

E230. 骨格キラル中心の共通パターンが、Sp構造に骨格キラル中心の少なくとも約66%を含む、請求項E1~E141およびE192~E226のいずれか一項に記載の組成物。

E231. 骨格キラル中心の共通パターンが、Sp構造に骨格キラル中心の少なくとも約75%を含む、請求項E1~E141およびE192~E226のいずれか一項に記載の組成物。

40

E232. 骨格キラル中心の共通パターンが、Sp構造に骨格キラル中心の少なくとも約80%を含む、請求項E1~E141およびE192~E226のいずれか一項に記載の組成物。

E233. 請求項E1~E141およびE191~E232のいずれか一項に記載の組成物を含む医薬組成物。

E234. キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、例E1~E101のいずれか1つの組成物である、例E142~E190のいずれか1つの方法。

E235. キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、例E102~E141およ

50

びE 1 9 1のいずれか1つの組成物である、例E 1 4 2 ~ E 1 9 0のいずれか1つの方法。

E 2 3 6 . キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、例E 1 0 2 ~ E 1 4 1およびE 1 9 1 ~ E 2 3 3のいずれか1つの組成物である、例E 1 4 2 ~ E 1 9 0のいずれか1つの方法。

【実施例】

【0760】

前述のものは、本発明の特定の非限定的な実施形態の記載である。したがって、本明細書において記載される本発明の実施形態は、本発明の原理の適用について単に説明するものであることが理解されるべきである。説明する実施形態の詳細について、本明細書における言及は、請求の範囲を限定することを意図するものではない。

10

【実施例1】

【0761】

プレインキュベートしたラット全肝臓ホモジネートにおけるヒトChiromersensのインビトロ代謝安定性

【0762】

本実施例は、ミボメルセン（立体化学的混合物）と、ミボメルセンのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物（「chiromersens」）とのインビトロのラット全肝臓ホモジネート安定性の比較を示す。本方法は、とりわけ、インビボでの半減期を予測する化合物のスクリーニングにおいて有用である。

20

【0763】

当技術分野において既知の通り、ミボメルセン（旧ISIS 301012、Kynamroという商品名で販売された。）は、塩基配列がアポリポタンパク質B遺伝子の一部に対するアンチセンスである、20merのオリゴヌクレオチドである。ミボメルセンは、おそらくmRNAを標的にする（targeting）ことにより、アポリポタンパク質Bの遺伝子発現を抑制する。ミボメルセンは、3' 5'ホスホロチオエート結合を有する以下の構造を有する：

$\underline{G}^* - \underline{C}^* - C^* - \underline{U}^* - C^* - d\underline{A} - dG - d\underline{T} - dC - dT - dG - d\underline{mC} - dT - dT - dmC - G^* - C^* - A^* - C^* - C^*$

[d = 2' - デオキシ、* = 2' - O - (2 - メトキシエチル)]したがって、ミボメルセンは、2' - O - メトキシエチル - 修飾リボース残基を両端に、デオキシリボース残基を中間に有する。

30

【0764】

この実施例に記述される試験したキラル純粋なミボメルセン類似体は、3' 5'ホスホロチオエート結合を含んでいた。いくつかの実施形態において、試験した類似体は、1つまたは複数の2' - O - (2 - メトキシエチル) - 修飾残基を含む；いくつかの実施形態において、試験した類似体は、2' - デオキシ残基のみを含む。試験した特定の類似体は、以下の表3および表4に記載の構造を有していた。

【0765】

プロトコル：Gearyらによって報告されているプロトコルをいくらか変更して利用した（Oligonucleotides, Volume 20, Number 6, 2010）。

40

【0766】

試験系：6匹の雄のスプレーグドローラット（Rattus norvegicus）が、Charles River Laboratories, Inc.,（カリフォルニア州ホリスター）から供給され、SNBL USAにて受領した。

【0767】

組織採取：組織採取前に2日間、動物を試験室に順化させた。組織採取時、ペントバルビタールナトリウム溶液を腹腔内（IP）注射して動物を麻酔した。肝門脈から投与した冷食塩水500ml / 動物を用いて肝灌流を行った。灌流後、肝臓を切離して、氷上で保

50

持した。肝臓を小片に刻み、秤量した。

【0768】

肝臓ホモジネート調製：刻んだ肝臓組織の小片を、風袋を量った50 mL遠心分離管に移して秤量した。冷却した均質化緩衝液(100 mMトリス pH 8.0、1 mM酢酸マグネシウム、および抗生物質 - 抗真菌剤)を各管に加え、(1本または複数本の)管に、組織1グラムあたり5 mLの緩衝液が含まれるようにした。Q I A G E N T i s s u e R u p t o r組織ホモジナイザーを用いて、管を氷上で保持しながら肝臓/緩衝液混合物をホモジナイズした。肝臓ホモジネートプールのタンパク質濃度は、P i e r c e B C Aタンパク質アッセイを用いて求めた。肝臓ホモジネートを5 mLの一定分量に分割して適切な大きさのラベル付きc r y o v i a lに移し、-60 で保管した。

10

【0769】

インキュベーション条件：冷凍した肝臓ホモジネート(タンパク質濃度 = 22.48 mg/ml)の一定分量5 mlを解凍し、37 で24時間インキュベートした。表1の各オリゴマーについて、6本のエッペンドルフチューブ(2 ml)を取り、450 ulのホモジネートを各チューブに加えた。50 ul ASO(200 uM)を各チューブに加えた。混合直後に、125 ulの(5x)停止緩衝液(2.5% I G E P A L、0.5 M NaCl、5 mM EDTA、50 mM トリス、pH = 8.0)および12.5 ulの20 mg/mlプロテイナーゼK(Ambion、#AM2546)を0時間の時点として1本のチューブに加えた。残りの反応混合物を、VWRインキュベティングマイクロプレート振盪機で400 rpmで振盪しながら、37 でインキュベートした。指定の期間(1、2、3、4、および5日)のインキュベーション後、各混合物を、125 ulの(5x)停止緩衝液(2.5% I G E P A L、0.5 M NaCl、5 mM EDTA、50 mM トリス、pH = 8.0)および12.5 ulの20 mg/mlプロテイナーゼK(Ambion、#AM2546)で処理した。

20

【0770】

後処理および生物分析：I S I S 355868(5' - G C G T T T G C T C T T C T T C T T G C G T T T T T T - 3')、27-merのオリゴヌクレオチド(下線付きの塩基がMOE修飾される。)を、chiromersensの定量のために内部標準として用いた。50 ulの内部標準(200 uM)を各チューブに加え、続いて、250 ulの30%水酸化アンモニウム、800 ulのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)を加えた。混合して、600 rpmで遠心分離後、水層をspeed vacで100 ulまで蒸発させ、Sep Pakカラム(C18、1g、WAT036905)に負荷した。Sep Pakカラムのすべての水洗液(2x20 ml)を高速イオン交換法で試験し、そこで産物が見られないことを確かめた。50% ACN(3.5 ml)を用いてオリゴヌクレオチドおよび代謝産物を溶離し、70% CAN(3.5)でカラムをさらに洗浄して、カラムに何も残らないようにした。各配列につき5つの分画を集めた。Visiprep system(Sigma、部品番号：57031-U)を用いた水洗1、2、3、ACN1および2。

30

イオン交換法

【表 18】

	時間	流量 (ml/min)	%A	%B	曲線
	時間	1.0	95	5	
1	2	1.0	95	5	1
2	3	1.0	75	25	6
3	10	1.0	35	65	6
4	10.1	1.0	95	5	6
5	12.5	1.0	95	5	1

10

緩衝液 A = 10 mM トリス HCl、50% ACN、pH = 8.0

緩衝液 B = A + 800 mM NaClO₄

カラム = DNA pac 100

カラム温度 60

各試験 (M9 - Exp 21 に記載) の後、上述の同じ緩衝液および緩衝液ライン C の 50 : 50 (メタノール : 水) を用いて、洗浄方法を適用した。

20

【表 19】

	時間	流量 (ml/min)	%A	%B	%C	曲線
	時間	1.0	0	0	100	
1	5.5	1.0	0	0	100	1
2	5.6	1.0	100	0	0	6
3	7.5	1.0	100	0	0	6
4	7.6	1.0	95	5	0	6
5	12.5	1.0	95	5	0	1

30

アセトニトリル溶離液を濃縮乾固して 100 μ l の水に溶解し、RPHPIPC を用いて分析した。

溶離液 A = 10 mM 酢酸トリブチルアンモニウム、pH = 7.0

溶離液 B = ACN (HPLC グレード、B & J)

カラム (Column) : XTerra MS C18、3.5 μ m、4.6 \times 50 mm、部品番号 : 186000432

Phenomenex 製ガードカラム、部品番号 : KJ0-4282

40

カラム温度 = 60

HPLC 勾配 :

【表 2 0】

	時間	流量 (ml/min)	%A	%B	曲線
1		1.0	65	35	
2	5.0	1.0	65	35	1
3	30.0	1.0	40	60	6
4	35.0	1.0	5	90	6
5	36.0	1.0	65	35	6
6	40.0	1.0	65	35	1

10

R P H P L C 分析のために、この原液 1 0 u l を 4 0 u l の水に加え、4 0 u l 注入した。

表 3

【表 2 1】

20

S.NO.	配列	説明
ONT-41	<u>Gs5mCs5mCs Ts5mCsAs GsTs5mCs TsGs5mCs TsTs5mCs Gs5mCsAs 5mCs5mC</u>	ミポメルセン
ONT-87	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	MOE翼- コア-翼設計 (ヒト)RNAse H substrate 1 SR-(SSR) ₃ -SR
ONT-154	Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC	All deoxy, (SS- (SSR) ₃ -SS)
ONT-70	<u>Gs5mCsGsTsTsTsGs5mCsTs5mCsTsTs5mCsTsTs5mCsTsGs5mCGsTsTsTsTsT</u>	ISIS 355868 ミポメルセン 定量のための 内部標準

30

40

【0771】

考察：野生型のDNAおよびsiRNAと比較して、アンチセンスおよびsiRNAの2'修飾は、これらの分子を安定化し、血漿および組織におけるこれらの持続性を向上させると予想される。

【0772】

ミポメルセンの2'-MOE翼-コア-翼設計。最初のアンチセンス臨床試験に用いられた第一世代のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、2'-デオキシリボヌクレオチド残基およびホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していた。続いて、第二世代のアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製したが、これは、各末端の5個の残基が2'-O-メ

50

トキシエチル(2'-MOE)-修飾残基、中間の10個の残基が2'-デオキシリボヌクレオチドであったので、通常、本明細書において「5-10-5 2'-MOE翼-コア-翼設計」と呼ぶものであった；このようなオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合はホスホロチオエートであった。このような「5-10-5 2'-MOE翼-コア-翼」オリゴヌクレオチドは、第一世代に対して顕著な有効性の改善を示した(PCT/US2005/033837)。ヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの安定性を改善し、同時に、リボヌクレアーゼ活性のための十分なDNA構造を維持するために、2-16-2、3-14-3、4-12-4、または5-10-5のような同様の翼-コア-翼モチーフが設計された。

【0773】

キラル純粋なオリゴヌクレオチド。本発明は、キラル純粋なオリゴヌクレオチドを提供し、とりわけ、それ自体における、かつ、それ自体の立体化学の選択が、オリゴヌクレオチドの安定性を改善し得ることを示す(すなわち、2'MOE修飾などの残基修飾に依存しない)。実際、本発明は、キラル純粋なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドが、対応するステレオランダムな2'-修飾ホスホロチオエート化合物と同じか、それよりも良い安定性をもたらし得ることを示す。

【0774】

いくつかの実施形態において、試験したキラル純粋なオリゴヌクレオチドは、立体化学に関して一般構造X-Y-Xのものであり、その構造内に、立体化学が変化するコアの「Y」領域に隣接し、すべての残基が同じ立体化学を有する翼の「X」領域(通常、約1~10残基の長さ)を含む。多くの実施形態において、試験したこのようなオリゴヌクレオチドのヌクレオチド類似体の約20~50%は、リボヌクレアーゼHの基質ではない。DNAのホスホロチオエートの立体化学を制御できると、われわれは、リボヌクレアーゼの活性部位を保持しながら、ヌクレアーゼによる分解からオリゴマーを保護することができる。これらの設計のうちの一つは、ONT-154であり、ここで、オリゴヌクレオチドの翼は、リボヌクレアーゼHのより良い基質であるRpホスホロチオエートをほとんど保持しないSpホスホロチオエートの化学により、安定化されている(Molecular Cell, 2007)。DNA/RNA二本鎖と複合体を形成したヒトリボヌクレアーゼHの結晶構造は、DNAの近接する4つのリン酸エステルと接触する酵素のリン酸結合ポケットを示す。最初の3つの接触は、4つ目の接触よりも強いようであり、Pro-R/Pro-R/Pro-Sの3つのリン酸エステルそれぞれの酸素原子を好む。Sp立体化学に由来する安定性の利点とリボヌクレアーゼHの活性部位とを組み合わせ、2'-修飾と競争する/または2'-修飾を改良するいくつかの配列を設計することができる。ミボメルセン(ONT-41)と、われわれの2'-修飾ありとなしの合理的(キラル制御)設計(ONT-87およびONT-154)とを比較するラット全肝臓ホモジネート安定性実験(表1および図1)から、2'-修飾を除去し、RpおよびSpホスホロチオエートを注意深くキラル制御することにより、後にインピボでの効果に影響を与えるこれらのオリゴヌクレオチドの安定性をわれわれが改善できることは明らかである。

表4. ラット全肝臓(live)ホモジネート安定性について調査したHuchiro mersens

【表22】

配列	説明	ターゲット	Tm(°C)
ONT-41	<u>Gs5mCs5mCs Ts5mCsAs</u> GsTs5mCs TsGs5mCs TsTs5mCs <u>Gs5mCsAs 5mCs5mC</u>	Hu ApoB	80.7

10

20

30

40

ONT-75	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	Hu ApoB	85.0
ONT-77	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	Hu ApoB	79.9
ONT-80	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	Hu ApoB	75.8
ONT-81	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	Hu ApoB	80.7
ONT-87	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	Hu ApoB	82.4
ONT-88	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	Hu ApoB	78.9
ONT-89	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	Hu ApoB	80.9
ONT-70	<u>Gs5mCsGsTsTsTsGs5mCsTs5mCsTsTs5mCsTsTs5mCsTsTsGs5mCGsTsTsTsTsT</u>	ISIS 355868 内部標準	

10

20

表5. ラット全肝臓 (live) ホモジネート安定性について調査したマウス chimersens

【表23】

配列	説明	ターゲット
ONT-83	<u>GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC</u>	マウス ApoB
ONT-82	<u>GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC</u>	マウス ApoB
ONT-84	<u>GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC</u>	マウス ApoB
ONT-85	<u>GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC</u>	マウス ApoB
ONT-86	<u>GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC</u>	マウス ApoB

30

【実施例2】

【0775】

40

例示的なキラル制御された siRNA 分子

【表 2 4】

表 1. h-Ago-2 及び h-Ago-1 とのホスホジエステル極性相互作用の概要

Science 2012 hAgo-2				Cell 2012 hAgo-2				Cell Rep 2013, h-Ago-1 [†]				
Phosphate*	Residue	Length/Å	Config	Phosphate	Residue	Length/Å	Config	Phosphate	Residue	Length/Å	Config	
2	Asn551	2.7	Pro(S)	2	Asn551	2.7	Pro(R)	2	Asn549	2.7	Pro(S)	
	Gln548	2.9	Pro(S)		Gln548	3.1	Pro(S)		Gln546	2.9	Pro(S)	
3	Lys566	3.1	Pro(R)	3	Lys566	2.9	Pro(R)	2	Lys564	2.9	Pro(R)	
	Arg792	3.4	Pro(R)		Gln548	2.9	Pro(R)		Arg790	3.4	Pro(R)	
4	Tyr790	2.6	Pro(R)	4	Tyr790	2.8	Pro(R)	4	Try788	2.7	Pro(R)	
	Arg792	3.0	Pro(R)		Arg792	2.8	Pro(R)		Arg790	3.3	Pro(R)	
		2.8	Pro(R)									
		3.4	Pro(S)									
5	Ser798	2.7	Pro(R)	5	Ser798	2.6	Pro(R)	5	Ser796	2.5	Pro(R)	
		2.9	Pro(R)			2.9	Pro(R)			2.8	Pro(R)	
	Tyr804	2.8	Pro(S)		Tyr804	2.5	Pro(S)		Tyr802	2.6	Pro(S)	
6	Lys709	3.0	Pro(S)	6	Lys709	3.2	Pro(S)	6	Lys707	2.8	Pro(S)	
	Arg761	2.9	Pro(R)		Arg761	2.8	Pro(R)		Arg759	2.7	Pro(R)	
	His753	2.8	Pro(R)		His753	3.0	Pro(R)		His751	3.0	Pro(R)	
7	Arg714	2.9	Pro(R)	7	Arg714	2.8	Pro(R)	7	Arg712	3.1	Pro(S)	
		3.0	Pro(R)			3.1	Pro(R)			3.3	Pro(S)	
	Arg761	3.0	Pro(S)		Arg761	2.8	Pro(S)		Arg373	3.4	Pro(R)	
								Thr757	2.9	Pro(R)		
				8	Arg761	2.4	Pro(S)		Arg759	2.2	Pro(S)	
					Ala221	3.5	Pro(R)		His710	3.4	Pro(R)	
									Ser218	2.7	Pro(R)	
				9	Arg351	2.2	Pro(R)		Arg349	3.5	Pro(R)	
									Arg708	2.9	Pro(S)	
				10	Arg71G	2.5	Pro(R)		Arg708	3.2	Pro(R)	
										2.9	Pro(R)	
				18	No contacts				21	Tyr309	2.6	Pro(S)
				19	Tyr311	3.1	Pro(R)			Tyr314	2.6	Pro(S)
					Arg315	2.8	Pro(R)			His269	3.0	Pro(R)
				20	His271	3.1	Pro(R)					
					His319	3.4	Pro(S)					
					Tyr311	2.2	Pro(S)					

*Phosphate No. from 5'-end

[†]Complexed with h-let-7 22mer

【0776】

当技術分野の異なる教示にも関わらず、本発明は、ヌクレオチド間結合の立体化学を利用して、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物により、オリゴヌクレオチドの安定性および活性を増加することができることを認める。このようなキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、本開示に示す通り、キラル制御されないオリゴヌクレオチド組成物よりもはるかに良い結果をもたらす得る。

【0777】

ヒトアルゴノート - 2 タンパク質 (hAgo2) と複合体を形成した RNA の結晶構造が 2 種類報告されている: The Crystal Structure of Human Argonaute - 2, Science, 2012 (PDB - 4ei3); および The Structure of Human Argonaute - 2 in Complex with miR - 20a Cell, 2012 (PDB - 4f3t)。さらに、ヒトアルゴノート - 1 タンパク質 (hAgo - 1) と複合体を形成した Let - 7 RNA の結晶構造が 1 種類報告されている: The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute - 1, Cell Rep. 2013 (PDB - 4krf)。

【0778】

これらの刊行物に含まれる情報に基づいて、ホスホジエステル結合が、ホスホロチオエートジエステル結合で置換される場合に、ヌクレオチド間のリン酸結合における立体化学に関する有利な選好について、いくつかの判断を行い得ることが予想された。これらの利点は、大幅に改善された有効性、安定性および他の薬理特性に関連し得る。これを念頭に置いて、コンピュータプログラム Pymol を利用し、3 つの構造すべてについて、結晶化した RNA のタンパク質およびヌクレオチド間ホスホジエステル結合のすべての極性相互作用を突き止めた。3.5 を超える距離の極性相互作用は無視した。

【0779】

この解析結果を表 1 にまとめた。ホスホロチオエートジエステル類似体においては、ア

10

20

30

40

50

ミノ酸残基の極性基とそれぞれの (r e s p e c t f u l) リン酸エステルの酸素原子との間に、よく似た結合が形成されるであろうという仮定に基づいて、RNA上のホスホジエステル骨格からの特定のリン原子は、Pro (R) または Pro (S) 配置と帰属された。したがって、非架橋酸素の代わりに、硫黄置換が、そのモチーフ内のリン原子に特有の立体化学 (S p) または (R p) 絶対配置) を与えるであろう。

【 0 7 8 0 】

注目すべきは、RNAとの複合体の h A g o - 2 の 2 つの構造が並外れて良く一致していることである。また、RNAとの複合体の h A g o - 1 と h A g o - 2 の構造が非常に良く一致しており、これは、RNA分子が取る構造が、これら 2 つのタンパク質間で非常に良く保存されることを示す。したがって、この解析結果に基づいて導かれるどのような結論または規則も、両方のタンパク質分子において有効である可能性がある。

10

【 0 7 8 1 】

見て分かる通り、通常、どのホスホジエステル (p h o s p o d i e s t e r) 基にも 1 つを超える極性相互作用がある。ただし、9 位および 10 位リン酸エステルのホスホジエステルと、A r g 3 5 1 および A r g 7 1 0 それぞれとの結合を通じて排他的に Pro (R p) を選好する h A g o - 2 (C e l l 2 0 1 2) との間の極性相互作用を除く。

【 0 7 8 2 】

しかし、(より強い相互作用に対応する) より短い距離、ならびに、酸素あたりの結合の数は、Pro (R p) 酸素または Pro (S p) 酸素における優勢な相互作用 (したがって、優勢に 1 つの立体化学のタイプ、またはその他のものである、いくつかの相互作用を生じる。) を示唆する可能性がある。この群内では、2 位 (S p) 、 3 位 (R p) 、 4 位 (R p) 、 6 位 (R p) 、 8 位 (S p) 、 19 位 (R p) 、 20 位 (S p) および 21 位 (S p) リン酸エステルのホスホジエステル間の相互作用である。

20

【 0 7 8 3 】

残りの相互作用については、他の立体化学に対して、特定の立体化学を取る選好はないように見受けられ、よって、好ましい立体化学は、(S p) か (R p) のいずれかであり得る。

【 0 7 8 4 】

この区分内では、5 位 (R p または S p) および 7 位 (R p または S p) リン酸エステルのホスホジエステル間に生じる相互作用である。

30

【 0 7 8 5 】

他のリン酸エステル骨格での相互作用については、結晶構造の情報がなく、よって、これらの位置の立体化学は、実験データがそれ以外を示すまでは、同様に (R p) または (S p) のいずれかであり得る。

【 0 7 8 6 】

そこで、表 6 に、個々のホスホリボチオエートジエステルモチーフでの立体化学に対するこの選好を利用することが想起される、非限定的で例示的な s i R N A の一般的な構成体をいくつか示す。

表 6 . 例示的で一般的な s i R N A 構成体

【表 2 5】

PS*	キラル制御されたアンチセンス鎖構成体					
2	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)
3	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)
4	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
5	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
6	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
7	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
8	(Sp)	(Rp)	PO	PO	(Sp)	(Rp)
9	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
10	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
11	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
12	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
13	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
14	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
15	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
16	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
17	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
18	(Rp) or (Sp)	(Sp) or (Rp)	PO	PO	PO	PO
19	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
20	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)
21	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)

* 数字は、*s i R N A*のアンチセンス鎖の5'末端からのリン酸エステルの位置を示す（例えば、#2は、ヌクレオチド1と2の間に位置し、#21は、ヌクレオチド20と21の間に位置する）。（*S p*）および（*R p*）は、示した位置のホスホロチオエート（*P S*）ジエステルヌクレオチド間結合のリン原子の立体化学を表す。POは、示した位置のホスホジエステルヌクレオチド間結合を表す。

【0787】

例示的な*s i R N A*には、*s i R N A*二本鎖のアンチセンス鎖の3'末端および5'末端のキラルなホスホロチオエートにおいて*S p*配置を有する*s i R N A*が含まれ、これは、ヒト血清中または生体液中で、これまでになく増加した安定性を与えるが、これに限定されない。*s i R N A*二本鎖のアンチセンス鎖の3'末端および5'末端のキラルなホスホロチオエートにおけるその同じ*S p*配置は、*A g o 2*タンパク質に対する親和性（*a f f i t n i t y*）が向上したことによってもたらされる、これまでになく向上した生物学的有効性を与え、*R I S C R N A i*サイレンシング複合体内の活性の増加につながる。

【0788】

1つの実施形態では、単一のキラルなホスホロチオエートモチーフが独立して、*s i R N A*分子のアンチセンス鎖またはセンス鎖に沿った各位置に導入される。21merでは、これにより、（*S p*）または（*R p*）キラル制御されたホスホロチオエート基と共に、80のユニーク配列がもたらされる。独立して二本鎖にしたとき、*s i R N A*の1600のユニークな組み合わせが調製される。

【0789】

キラルな siRNA 分子の siRNA トランスフェクション

Hep3B 細胞、または HeLa 細胞を、96 ウェルプレートにおいて 2.0×10^4 細胞/ウェルの密度で逆トランスフェクトした。siRNA のトランスフェクションは、リポフェクタミン RNAi Max (Life Technologies、カタログ番号 13778-150) で、メーカーのプロトコルを用いて行われる。ただし、リポフェクタミン RNAi Max の量を 1 ウェルあたり 0.2 μ l に減らしたことを除く。1 μ M から出発して、12 の 1:3 siRNA 二本鎖希釈液を作製する。次に、10 μ l の $10 \times$ siRNA 二本鎖を、1 ウェルあたり 9.8 μ l の血清を含まない培地および 0.2 μ l のリポフェクタミン RNAi Max の調製混合物とリボプレックスにした。10~15 分のインキュベーション後、80 μ l の細胞増殖培地中の 2.0×10^4 細胞 (ATCC、30-2003) を加え、最終的に 1 ウェルあたり体積 100 μ l にする。各投与について、別々のトランスフェクション作業を 2 回行う。

10

【0790】

トランスフェクションの 24 時間後、Hep3B または HeLa 細胞を溶解し、Mag MAX (商標) - 96 全 RNA 単離キット (Life Technologies、AM1830) を用いて、siRNA が標的にされる mRNA を精製する；リボヌクレアーゼ阻害剤を用いる高容量 cDNA 逆転写キット (Life Technologies、4374967) で 15 μ l の cDNA を合成する。遺伝子発現は、Probes Master Mix (Roche、04707494001) を用い、メーカーのプロトコルに従って、Lightcycler 480 (Roche) でリアルタイム PCR により評価する。

20

【0791】

IC50 およびデータ解析

デルタデルタ Ct 法を用いて値を計算する。試料は hGAPDH に規格化し、偽トランスフェクトした未処理の試料にあわせて校正する。ステレオランダムな分子を対照として用いる。Graphpad Prism を用いて、2 つの生物学的複製の平均としてデータを表す。相対的な IC50 を計算するために、4 パラメータの線形回帰曲線をデータにあてはめ、下端と上端を 0 と 100 の定数にそれぞれ固定する。

30

【0792】

本実施例は、本明細書に記述されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドからなる siRNA 薬剤を用いて、標的遺伝子発現の抑制に成功することを示す。具体的には、この実施例は、本明細書に記載のキラル制御された合成により調製される個々のオリゴヌクレオチド鎖のハイブリダイゼーションを表し、したがって、キラル制御された二本鎖 siRNA オリゴヌクレオチド組成物がもたらされる。この実施例はさらに、このような薬剤を用いて細胞のトランスフェクションに成功することを示し、さらには、標的遺伝子発現の抑制に成功することを示す。

立体制御されたホスホロチオエートジエステル結合を有するヒト PCSK9 siRNA 二本鎖のヒト血清中のインビトロ代謝安定性。

40

【0793】

10 μ M の siRNA 二本鎖を、90% ヒト血清 (50 μ L、Sigma、H4522) 中、37 °C で 24 時間インキュベートした。0 分時点 (50 μ L) ならびに PBS 対照インキュベーション時点 (50 μ L) を調製し、ここで、10 μ M siRNA 二本鎖を 90% 1 \times PBS 中でインキュベートした (50 μ L、37 °C で 24 時間)。インキュベーション完了後、各時点に、10 μ L の停止液 (0.5 M NaCl、50 mM トリス、5 mM EDTA、2.5% IGEPAL) を加え、続いて、3.2 μ L のプロテイナーゼ K (20 mg/mL、Ambion) を加えた。試料を 60 °C で 20 分間インキュベートし、次に、2000 rpm で 15 分間遠心分離した。最終的な反応混合物を変性 IEX HPLC (注入量 50 μ L) で直接分析した。24 時間および 0 分の積分面積の比を用いて、各 siRNA の分解 % を求めた。

50

【0794】

s i R N A のアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方において、ヒト血清中でのインキュベーション時に、21位(3'末端)の単一のホスホロチオエートの立体化学配置が、二本鎖の安定性に極めて重要な影響を持つことが観察された(図1)。図1に示し、分解パターンの積分比に従って求められるように、(R p、R p) s i R N A 二本鎖は、24時間後、55.0%の著しい分解を示した。ステレオランダムな s i R N A 中のホスホロチオエートのステレオランダムな混合物は、24時間後に25.2%の分解を示した。(S p / S p) s i R N A は、24時間後にわずか7.3%の分解を示した。これは、ホスホロチオエートの立体化学が治療用 s i R N A に与える多大な影響を示す。別の例示的なデータを図2、図3、図4および図5に提示した。

10

【0795】

ステレオ純粋な構成体はそれぞれ、骨格に沿ったホスホロチオエートモチーフの位置に応じて、異なる有効性(I C₅₀値)を示すことが観察される。また、任意の単一の位置のホスホロチオエートモチーフが(S p)か(R p)かによって異なるI C₅₀値が得られることも観察される(o b s e r v e r e d)。安定性に対する立体化学の影響も同じく明確で、上述のヒト血清、あるいはヒト肝サイトゾル抽出物またはヘビ毒ホスホジエステラーゼ、あるいは単離されたエンドヌクレアーゼまたは単離されたエキソヌクレアーゼのいずれかを用いて差異を生じるものである。

【0796】

上述の実施例で得られたデータに基づいて、特定の設計規則が定められてもよい。これらの設計情報は、下に例示の通り、s i R N A のアンチセンス鎖および/またはセンス鎖内への複数のキラルなホスホロチオエート結合の導入に適用することができる。本発明は、適切な位置に導入され、適切な立体化学配置を有する s i R N A のアンチセンス鎖および/またはセンス鎖内のキラルなホスホロチオエートの増量が、インビトロでの有効性および代謝安定性の点で大幅に改善された s i R N A 構成体 - 言い換えれば、薬理学的に大幅に向上した治療用 s i R N A につながることを認める。

20

P C S K 9 を 標 的 に す る 例 示 的 な キ ラ ル 制 御 さ れ た s i R N A オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド

【0797】

プロタンパク質転換酵素スブチリシン/ケキシン9型(P C S K 9)は、コレステロール代謝に關与する酵素である。P C S K 9 は、低密度リポタンパク質(L D L)の受容体に結合し、その破壊を誘発する。受容体が破壊されるとき、受容体と会合したL D L も排除されるが、普通なら受容体は循環して細胞表面に戻り、より多くのコレステロールを除去するはずなので、P C S K 9 が結合する正味の作用は、実際、L D L のレベルを上昇させる。

30

【0798】

いくつかの会社が、P C S K 9 を標的にする治療薬を開発している。本開示に特に關連する会社のうち、I s i s P h a r m a c e u t i c a l s、S a n t a r i s P h a r m a、およびA l n y l a m P h a r m a c e u t i c a l s がそれぞれ、P C S K 9 を阻害する核酸薬剤を開発している。I s i s P h a r m a c e u t i c a l s の製品のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、マウスにおいてL D L R の発現を増加させ、循環総コレステロール値を下げることを示されている(G r a h a m ら、「A n t i s e n s e i n h i b i t i o n o f p r o p r o t e i n c o n v e r t a s e s u b t i l i s i n / k e x i n t y p e 9 r e d u c e s s e r u m L D L i n h y p e r l i p i d e m i c m i c e」J . L i p i d R e s . 4 8 (4) : 7 6 3 - 7 , A p r i l 2 0 0 7)。A l n y l a m P h a r m a c e u t i c a l s の製品、A L N - P C S での初期臨床試験では、R N A 干渉が、P C S K 9 を阻害する有効な機構を提供することが明らかになっている(F r a n k - K a m e n e t s k y ら、「T h e r a p e u t i c R N A i t a r g e t i n g P C S K 9 a c u t e l y l o w e r s p l a s m a c h o l e s t e r o l i n r o d e n t s a n d L D L c h o l e s t e r o l i n n o n h u m a n p r i m a

40

50

tes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (33): 11915-20, August 2008).

【0799】

既知の異なる結果にも関わらず、いくつかの実施形態において、本発明は、ある立体化学構造または別の立体化学構造のホスホロチオエートモチーフが、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物により、向上した有効性、安定性および他の薬理的品質を利用するよう合理的に設計され得ることを認める。この考え方を補強するために、表3に、PCSK9メッセンジャーRNAを標的にするsiRNA配列に基づいた例示的な立体化学的に純粋な構成体を示す。

【0800】

この例示的实施形態において、単一のキラルなホスホロチオエートモチーフが独立して、siRNA分子のアンチセンス鎖またはセンス鎖に沿った各位置に導入される。21merでは、これにより、(Sp)または(Rp)キラル制御されたホスホロチオエート基と共に、80のユニーク配列がもたらされる。独立して二本鎖にしたとき、siRNAの1600のユニークな組み合わせが調製される。

【0801】

他の例示的实施形態において、単一のキラルなホスホロチオエートモチーフが独立して、siRNA分子のアンチセンス鎖またはセンス鎖に沿った各位置に導入される一方、3'-(Sp)ホスホロチオエート結合は保存される。21merでは、これにより、(Sp)または(Rp)キラル制御されたホスホロチオエート基と共に、さらに別の80のユニーク配列がもたらされる。独立して二本鎖にしたとき、siRNAの1600のユニークな組み合わせが調製される。

【0802】

他の例示的实施形態において、複数のキラルなホスホロチオエートモチーフが独立して、表7に示すコードに従って、siRNA分子のアンチセンス鎖またはセンス鎖に沿ったいくつかの位置に導入される一方、3'-(Sp)ホスホロチオエート結合は保存される。

表7. PCSK-9センスおよびアンチセンスRNAの実施例

【表26】

PCSK9 siRNA センス鎖	
PCSK9 (1)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT
PCSK9 (2)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT
PCSK9 (3)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuusdTdT

10

20

30

PCSK9 (4)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (5)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcusudTdT
PCSK9 (6)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcusudTdT
PCSK9 (7)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGesudTdT
PCSK9 (8)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcsudTdT
PCSK9 (9)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGscudTdT
PCSK9 (10)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGscudTdT
PCSK9 (11)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuusGcuudTdT
PCSK9 (12)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuusGcuudTdT
PCSK9 (13)	(Rp)- uucuAGAccuGuuusuGcuudTdT
PCSK9 (14)	(Sp)- uucuAGAccuGuuusuGcuudTdT
PCSK9 (15)	(Rp)- uucuAGAccuGuusuuGcuudTdT
PCSK9 (16)	(Sp)- uucuAGAccuGuusuuGcuudTdT
PCSK9 (17)	(Rp)- uucuAGAccuGusuuuGcuudTdT
PCSK9 (18)	(Sp)- uucuAGAccuGusuuuGcuudTdT
PCSK9 (19)	(Rp)- uucuAGAccuGsuuuuGcuudTdT
PCSK9 (20)	(Sp)- uucuAGAccuGsuuuuGcuudTdT
PCSK9 (21)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (22)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (23)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (24)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (25)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (26)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (27)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (28)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (29)	(Rp)- uucuAGsAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (30)	(Sp)- uucuAGsAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (31)	(Rp)- uucuAsGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (32)	(Sp)- uucuAsGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (33)	(Rp)- uucusAGAccuGuuuuGcuudTdT

10

20

30

40

PCSK9 (34)	(Sp)- uucusAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (35)	(Rp)- uucusAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (36)	(Sp)- uucusAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (37)	(Rp)- uucusAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (38)	(Sp)- uucusAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (38)	(Rp)- usucuAGAccuGuuuuGcuudTdT
PCSK9 (40)	(Sp)- usucuAGAccuGuuuuGcuudTdT

10

注記：小文字は、2' - OMe RNA 残基を表す；大文字は、RNA 残基を表す；d = 2' - デオキシ残基；「s」は、ホスホロチオエート部分を示す。

【0803】

いくつかのキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合および全部がキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有するヒトPCSK9 siRNA アンチセンス鎖の合成例。

【表27】

	ヒトPCSK9 siRNA アンチセンス鎖
PCSK9 (41)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT
PCSK9 (42)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT
PCSK9 (43)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAsdTdT
PCSK9 (44)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAsdTdT
PCSK9 (45)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAsAdTdT
PCSK9 (46)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAsAdTdT
PCSK9 (47)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGsAAAdTdT
PCSK9 (48)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGsAAAdTdT
PCSK9 (49)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAsGAAdTdT
PCSK9 (50)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAsGAAdTdT
PCSK9 (51)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCusAGAAAdTdT
PCSK9 (52)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCusAGAAAdTdT
PCSK9 (53)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCsuAGAAAdTdT
PCSK9 (54)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCsuAGAAAdTdT
PCSK9 (55)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUsCuAGAAAdTdT

20

30

40

PCSK9 (56)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUsCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (57)	(Rp)- AAGcAAAACAGGsUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (58)	(Sp)- AAGcAAAACAGGsUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (59)	(Rp)- AAGcAAAACAGsGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (60)	(Sp)- AAGcAAAACAGsGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (61)	(Rp)- AAGcAAAACAsGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (62)	(Sp)- AAGcAAAACAsGGUCuAGAAAdTdT	10
PCSK9 (63)	(Rp)- AAGcAAAACsAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (64)	(Sp)- AAGcAAAACsAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (65)	(Rp)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (66)	(Sp)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (67)	(Rp)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (68)	(Sp)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (69)	(Rp)- AAGcAAsAAcAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (70)	(Sp)- AAGcAAsAAcAGGUCuAGAAAdTdT	20
PCSK9 (71)	(Rp)- AAGcAsAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (72)	(Sp)- AAGcAsAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (73)	(Rp)- AAGcsAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (74)	(Sp)- AAGcsAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (75)	(Rp)- AAGscAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (76)	(Sp)- AAGscAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (77)	(Rp)- AAsGcAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (78)	(Sp)- AAsGcAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	30
PCSK9 (77)	(Rp)- AsAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (78)	(Sp)- AsAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTdT	
PCSK9 (79)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAsdTsdT	
PCSK9 (80)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAsdTsdT	
PCSK9 (81)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAsAdTsdT	
PCSK9 (82)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAsAdTsdT	
PCSK9 (83)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGsAAdTsdT	40

PCSK9 (84)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGsAAAdTsdT	
PCSK9 (85)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAsGAAdTsdT	
PCSK9 (86)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAsGAAdTsdT	
PCSK9 (87)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCusAGAAAdTsdT	
PCSK9 (88)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCusAGAAAdTsdT	
PCSK9 (89)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCsuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (90)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAGGUCsuAGAAAdTsdT	10
PCSK9 (91)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAGGUsCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (92)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAGGUsCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (93)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAGGsUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (94)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAGGsUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (95)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAGsGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (96)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAGsGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (97)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACAsGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (98)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACAsGGUCuAGAAAdTsdT	20
PCSK9 (99)	(Rp, Sp)- AAGcAAAACsAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (100)	(Sp, Sp)- AAGcAAAACsAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (101)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (102)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (103)	(Rp, Sp)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (104)	(Sp, Sp)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (105)	(Rp, Sp)- AAGcAAsAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (106)	(Sp, Sp)- AAGcAAsAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	30
PCSK9 (107)	(Rp, Sp)- AAGcAsAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (108)	(Sp, Sp)- AAGcAsAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (109)	(Rp, Sp)- AAGcsAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (110)	(Sp, Sp)- AAGcsAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (111)	(Rp, Sp)- AAGscAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (112)	(Sp, Sp)- AAGscAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	
PCSK9 (113)	(Rp, Sp)- AAsGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	40

PCSK9 (114)	(Sp, Sp)- AAsGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT
PCSK9 (115)	(Rp, Sp)- AsAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT
PCSK9 (116)	(Sp, Sp)- AsAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT
PCSK9 (117)	(Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp)- AsAsGscAsAAsAscsAGGUCuAGAsAsdTsdt
PCSK9 (118)	(Sp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp)- AsAsGscAsAAsAscsAGGUCuAGAsAsdTsdt

10

注記：小文字は、2' - OMe RNA残基を表す；大文字は、RNA残基を表す；d = 2' - デオキシ残基；「s」は、ホスホロチオエート部分を示す。

【実施例3】

【0804】

ステレオ純粋なFOXO-1アンチセンス類似体。

合理的設計 - キラル制御されたアンチセンスオリゴヌクレオチド組成物

Spキラルなホスホロチオエートヌクレオチド間結合のインビボおよびラット全肝臓ホモジネートモデルにおいて測定された、これまでにないヌクレアーゼ安定性は、新しいタイプのリボヌクレアーゼH基質ギャップマーの新規設計に適用され、これにより、外側面は、非修飾DNAから構成され、内側のギャップコアは、2'化学修飾(2'OMe、2'MOE、2'LNA、2'Fなど)で修飾される。最終的に、この設計は、ホスホロチオエート骨格の注意深いキラル制御が、リボヌクレアーゼH治療用オリゴヌクレオチドの所望の薬理特性を与える、完全に非修飾のDNA治療用オリゴヌクレオチドに適用される。

20

【0805】

ヒトリボヌクレアーゼHの結晶構造を調査した後に設計されたトリプレット-リン酸エステル繰り返しモチーフの応用も同様に利用されてきた。リボヌクレアーゼHの結晶構造は以前に公開されている(Structure of Human RNase H1 Complexed with an RNA/DNA Hybrid: Insight into HIV Reverse Transcription, Nowotnyら、Molecular Cell, Volume 28, Issue 2, 264-276, 2007, pdb file: 2qkb)。とりわけ、本発明は、例えば、本明細書の状況における、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合立体化学の重要性を認める。コンピュータによるこの構造の解析をプログラムPymolを用いて実施したとき、出願人は、ヒトリボヌクレアーゼH1のリン酸結合ポケットが、複合体を形成したDNAの近接する3つのリン酸エステルと極性の接触を持ち、Pro-R/Pro-R/Pro-S(または、Pro-S/Pro-S/Pro-R)のこれら3つのリン酸エステルそれぞれの各酸素原子と優先的に相互作用することを見出した。この観察に基づいて、われわれは、設計したリボヌクレアーゼH基質として、繰り返し(RRS)および(SSR)トリプレットホスホロチオエートモチーフを有する2つのキラルな構造を設計した。また、出願人は、他のヌクレオチド間結合立体化学パターンも設計した。本明細書に記載の例示的な結果により示される通り、特定の骨格ヌクレオチド間結合パターン(骨格キラル中心のパターンを形成する。)を含むオリゴヌクレオチドタイプの提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、大幅に増加した活性および/または速度をもたらす。とりわけ、5'-RSS-3'骨格キラル中心の配列は特に有用であり、本開示に記載の通り、予想外の結果をもたらす。

30

40

【0806】

また、(酵素安定性および他の薬理的に有利な特性のための)増加したSpキラルな骨格と、(リボヌクレアーゼH基質としての特性を向上させるための)(RRS)または

50

(SSR)キラルな繰り返しトリプレット骨格モチーフとの組み合わせも、新規設計において利用される。；「S」は、Spホスホロチオエート結合を表し、「R」は、Rpホスホロチオエート結合を表す。

【0807】

別の代替設計は、伸長した繰り返しモチーフ、例えば：

(SSSR)n、SR(SSSR)n、SSR(SSSR)n、SSR(SSSR)n
 ; (SSSSR)n、SR(SSSSR)n、SSR(SSSSR)n、SSR(SSSSR)n、SSSR(SSSSR)n、SSSR(SSSSR)n ; (SSSSSR)n ; SR(SSSSSR)n、SSR(SSSSSR)n、SSR(SSSSSR)n、SSSR(SSSSSR)n、SSSSR(SSSSSR)nなど(式中、各ヌクレオチド間結合の数に応じて、n = 0 ~ 50 ; 「S」は、Spホスホロチオエート結合を表し、「R」は、Rpホスホロチオエート結合を表す。)のSpキラルなホスホロチオエート骨格の増量に基づいている。いくつかの実施形態において、nは0である。いくつかの実施形態において、Rは1 ~ 50である。いくつかの実施形態において、Rは1である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、本明細書に記述されるモチーフを含む。いくつかの実施形態において、モチーフは、コア領域にある。いくつかの実施形態において、nは0である。いくつかの実施形態において、Rは1 ~ 50である。いくつかの実施形態において、Rは1である。いくつかの実施形態において、nは2である。いくつかの実施形態において、nは3である。いくつかの実施形態において、nは4である。いくつかの実施形態において、nは5である。

10

20

【0808】

別の代替設計は、ステレオ骨格の「反転」構造設計に基づいている(「ステレオインバートマー」)。これらは、キラルなホスホロチオエートの立体化学を反転させて配置し、オリゴヌクレオチドの5'および3'-末端ならびにオリゴヌクレオチドの中間部分でいくつかのSpに富むモチーフを露出させ、両側に倒立像で配置した繰り返し立体化学モチーフ、例えば：

SS(SSSR)n(SSS)(RSS)nSS ;
 SS(SSSR)n(SRS)(RSS)nSS ;
 SS(SSSR)n(SSR)(RSS)nSS ;
 SS(SSSR)n(RSS)(RSS)nSS ;
 SS(RSS)n(SSS)(SSR)nSS ;
 SS(RSS)n(SRS)(SSR)nSS ;
 SS(RSS)n(SSR)(SSR)nSS ;
 SS(RSS)n(RSS)(SSR)nSS ; など

30

(式中、各ヌクレオチド間結合の数に応じて、n = 0 ~ 50 ; 「S」は、Spホスホロチオエート結合を表し、「R」は、Rpホスホロチオエート結合を表す。)を有することによる結果である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンは、本明細書に記述されるモチーフを含む。いくつかの実施形態において、モチーフは、コア領域にある。いくつかの実施形態において、nは0である。いくつかの実施形態において、nは1である。いくつかの実施形態において、nは1 ~ 50である。いくつかの実施形態において、nは2である。いくつかの実施形態において、nは3である。いくつかの実施形態において、nは4である。いくつかの実施形態において、nは5である。

40

初期スクリーニング(initial screen)

合成：DNA/RNA合成装置MerMade-12でのオリゴヌクレオチド合成の概要(2'-デオキシおよび2'-OMeサイクル)

【表 2 8】

工程	反応	試薬	運搬量 (mL)	待機時間(秒)
1	脱トリチル	3% TCA in DCM	4 x 1	N. A.
2	カップリング	0.15 M ホスホラミダイト in ACN + 0.45 M ETT in ACN	2 x 0.5 mL	60 + 60 (DNA), 300 + 300 (2'-OMe RNA)
3	キャッピング	5% Pac ₂ O in THF/2,6- ルチジン + 16% NMI in THF	1	60
4	酸化	0.02ロチン in 水/ピリジン	1	240

10

DNA - 2' - OMe - DNA (7 - 6 - 7) 設計を有するステレオランダムな P S オ
リゴヌクレオチド :

20

ONT - 141 d (C s C s C s T s C s T s G s) g s a s t s t s g s a s
d (G s C s A s T s C s C s A)

ONT - 142 d (A s A s G s C s T s T s T s) g s g s t s t s g s g s
d (G s C s A s A s C s A s C)

ONT - 143 d (A s G s T s C s A s C s T s) t s g s g s g s a s g s
d (C s T s T s C s T s C s C)

ONT - 144 d (C s A s C s T s T s G s G s) g s a s g s c s t s t s
d (C s T s C s C s T s G s G)

ONT - 145 d (A s T s A s G s C s C s A s) t s t s g s c s a s g s
d (C s T s G s C s T s C s A)

30

ONT - 146 d (T s G s G s A s T s T s G s) a s g s c s a s t s c s
d (C s A s C s C s A s A s G)

ONT - 147 d (C s C s A s T s A s G s C s) c s a s t s t s g s c s
d (A s G s C s T s G s C s T)

ONT - 148 d (G s T s C s A s C s T s T s) g s g s g s a s g s c s
d (T s T s C s T s C s C s T)

ONT - 149 d (C s C s A s G s G s G s C s) a s c s t s c s a s t s
d (C s T s G s C s A s T s G)

ONT - 150 d (G s C s C s A s T s C s C s) a s a s g s t s c s a s
d (C s T s T s G s G s G s A)

40

ONT - 151 d (G s A s A s G s C s T s T s) t s g s g s t s t s g s
d (G s G s C s A s A s C s A)

ONT - 152 d (C s T s G s G s A s T s T s) g s a s g s c s a s t s
d (C s C s A s C s C s A s A)

ONT - 183 d (C s A s A s G s T s C s A s) c s t s t s g s g s g s
d (A s G s C s T s T s C s T)

ONT - 184 d (A s T s G s C s C s A s T s) c s c s a s a s g s t s
d (C s A s C s T s T s G s G)

ONT - 185 d (A s T s G s A s G s A s T s) g s c s c s t s g s g s

50

d (C s T s G s C s C s A s T)
ONT - 186 d (T s T s G s G s G s A s G s) c s t s t s c s t s c s
d (C s T s G s G s T s G s G)
ONT - 187 d (T s G s G s G s A s G s C s) t s t s c s t s c s c s
d (T s G s G s T s G s G s A)
ONT - 188 d (T s T s A s T s G s A s G s) a s t s g s c s c s t s
d (G s G s C s T s G s C s C)
ONT - 189 d (G s T s T s A s T s G s A s) g s a s t s g s c s c s
d (T s G s G s C s T s G s C)
ONT - 190 d (C s C s A s A s G s T s C s) a s c s t s t s g s g s 10
d (G s A s G s C s T s T s C)
ONT - 191 d (A s G s C s T s T s T s G s) g s t s t s g s g s g s
d (C s A s A s C s A s C s A)
ONT - 192 d (T s A s T s G s A s G s A s) t s g s c s c s t s g s
d (G s C s T s G s C s C s A)
ONT - 193 d (T s G s T s T s A s T s G s) a s g s a s t s g s c s
d (C s T s G s G s C s T s G)
ONT - 194 d (A s T s C s C s A s A s G s) t s c s a s c s t s t s
d (G s G s G s A s G s C s T)
ONT - 195 d (G s G s G s A s A s G s C s) t s t s t s g s g s t s 20
d (T s G s G s G s C s A s A)
ONT - 196 d (C s T s C s C s A s T s C s) c s a s t s g s a s g s
d (G s T s C s A s T s T s C)
ONT - 197 d (A s A s G s T s C s A s C s) t s t s g s g s g s a s
d (G s C s T s T s C s T s C)
ONT - 198 d (C s C s A s T s C s C s A s) a s g s t s c s a s c s
d (T s T s G s G s G s A s G)
ONT - 199 d (T s C s C s A s A s G s T s) c s a s c s t s t s g s
d (G s G s A s G s C s T s T)
ONT - 200 d (C s C s T s C s T s G s G s) a s t s t s g s a s g s 30
d (C s A s T s C s C s A s C)
ONT - 201 d (A s C s T s T s G s G s G s) a s g s c s t s t s c s
d (T s C s C s T s G s G s T)
ONT - 202 d (C s T s T s G s G s G s A s) g s c s t s t s c s t s
d (C s C s T s G s G s T s G)
ONT - 203 d (C s A s T s G s C s C s A s) t s c s c s a s a s g s
d (T s C s A s C s T s T s G)
ONT - 204 d (T s G s C s C s A s T s C s) c s a s a s g s t s c s
d (A s C s T s T s G s G s G)
ONT - 205 d (T s C s C s A s T s C s C s) a s t s g s a s g s g s 40
d (T s C s A s T s T s C s C)
ONT - 206 d (A s G s G s G s C s A s C s) t s c s a s t s c s t s
d (G s C s A s T s G s G s G)
ONT - 207 d (C s C s A s G s T s T s C s) c s t s t s c s a s t s
d (T s C s T s G s C s A s C)
ONT - 208 d (C s A s T s A s G s C s C s) a s t s t s g s c s a s
d (G s C s T s G s C s T s C)
ONT - 209 d (T s C s T s G s G s A s T s) t s g s a s g s c s a s
d (T s C s C s A s C s C s A)
ONT - 210 d (G s G s A s T s T s G s A s) g s c s a s t s c s c s 50

d (A s C s C s A s A s G s A)

初期のDNA - 2' - OMe - DNA (7 - 6 - 7) 設計のHepG2細胞におけるインビトロの生物学データ：(d大文字) = DNA ; 小文字 = 2' - OMe ; s = ホスホリチオエート。

FOXO1			
20 nM時のレベル (%)			SD
ONT - 141	89	6	
ONT - 142	45	1	
ONT - 143	98	2	10
ONT - 144	89	1	
ONT - 145	46	5	
ONT - 146	99	1	
ONT - 147	66	6	
ONT - 148	101	2	
ONT - 149	95	6	
ONT - 150	58	4	
ONT - 151	41	5	
ONT - 152	84	5	20
ONT - 183	95	2	
ONT - 184	58	4	
ONT - 185	42	2	
ONT - 186	96	4	
ONT - 187	92	3	
ONT - 188	47	5	
ONT - 189	63	5	
ONT - 190	83	2	
ONT - 191	58	4	
ONT - 192	46	2	30
ONT - 193	58	2	
ONT - 194	76	1	
ONT - 195	66	0	
ONT - 196	77	2	
ONT - 197	90	6	
ONT - 198	42	4	
ONT - 199	68	1	
ONT - 200	89	6	
ONT - 201	91	2	
ONT - 202	94	2	
ONT - 203	86	1	40
ONT - 204	58	2	
ONT - 205	75	3	
ONT - 206	94	5	
ONT - 207	96	0	
ONT - 208	54	0	
ONT - 209	87	4	
ONT - 210	92	4	

FOXO1

200 nM時のレベル (%) SD

50

ONT - 1 4 1	3 7	4	
ONT - 1 4 2	4 5	4	
ONT - 1 4 3	4 6	2	
ONT - 1 4 4	4 2	5	
ONT - 1 4 5	5 3	4	
ONT - 1 4 6	3 1	2	
ONT - 1 4 7	2 8	8	
ONT - 1 4 8	4 5	4	
ONT - 1 4 9	2 9	5	
ONT - 1 5 0	3 2	6	10
ONT - 1 5 1	3 8	4	
ONT - 1 5 2	3 0	5	
ONT - 1 8 3	6 0	5	
ONT - 1 8 4	3 4	2	
ONT - 1 8 5	5 0	2	
ONT - 1 8 6	8 6	3	
ONT - 1 8 7	7 6	6	
ONT - 1 8 8	5 0	5	
ONT - 1 8 9	3 8	2	
ONT - 1 9 0	5 1	1	20
ONT - 1 9 1	4 3	5	
ONT - 1 9 2	5 4	7	
ONT - 1 9 3	4 1	6	
ONT - 1 9 4	5 0	1	
ONT - 1 9 5	4 3	6	
ONT - 1 9 6	3 3	7	
ONT - 1 9 7	5 7	4	
ONT - 1 9 8	4 0	5	
ONT - 1 9 9	5 0	5	
ONT - 2 0 0	2 8	9	30
ONT - 2 0 1	4 6	6	
ONT - 2 0 2	5 7	9	
ONT - 2 0 3	2 7	7	
ONT - 2 0 4	3 6	6	
ONT - 2 0 5	2 9	5	
ONT - 2 0 6	8 1	0	
ONT - 2 0 7	3 7	4	
ONT - 2 0 8	4 3	3	
ONT - 2 0 9	3 5	4	
ONT - 2 1 0	4 0	4	40

2' - OMe - DNA - 2' OMe (3 - 14 - 3) 設計を有するステレオランダムな PS オリゴヌクレオチド: (d大文字) = DNA; 小文字 = 2' - OMe; s = ホスホリチオエート。

ONT - 1 2 9 c s c s c s d (T s C s T s G s G s A s T s T s G s A s G
s C s A s T s) c s c s a
ONT - 1 3 0 a s a s g s d (C s T s T s T s G s G s T s T s G s G s G
s C s A s A s) c s a s c
ONT - 1 3 1 a s g s t s d (C s A s C s T s T s G s G s G s A s G s C
s T s T s C s) t s c s c

ONT - 132 c s a s c s d (T s T s G s G s G s A s G s C s T s T s C
 s T s C s C s) t s g s g
 ONT - 133 a s t s a s d (G s C s C s A s T s T s G s C s A s G s C
 s T s G s C s) t s c s a
 ONT - 134 t s g s g s d (A s T s T s G s A s G s C s A s T s C s C
 s A s C s C s) a s a s g
 ONT - 135 c s c s a s d (T s A s G s C s C s A s T s T s G s C s A
 s G s C s T s) g s c s t
 ONT - 136 g s t s c s d (A s C s T s T s G s G s G s A s G s C s T
 s T s C s T s) c s c s t
 ONT - 137 c s c s a s d (G s G s G s C s A s C s T s C s A s T s C
 s T s G s C s) a s t s g
 ONT - 138 g s c s c s d (A s T s C s C s A s A s G s T s C s A s C
 s T s T s G s) g s g s a
 ONT - 139 g s a s a s d (G s C s T s T s T s G s G s T s T s G s G
 s G s C s A s) a s c s a
 ONT - 140 c s t s g s d (G s A s T s T s G s A s G s C s A s T s C
 s C s A s C s) c s a s a
 ONT - 155 c s a s a s d (G s T s C s A s C s T s T s G s G s G s A
 s G s C s T s) t s c s t
 ONT - 156 a s t s g s d (C s C s A s T s C s C s A s A s G s T s C
 s A s C s T s) t s g s g
 ONT - 157 a s t s g s d (A s G s A s T s G s C s C s T s G s G s C
 s T s G s C s) c s a s t
 ONT - 158 t s t s g s d (G s G s A s G s C s T s T s C s T s C s C
 s T s G s G s) t s g s g
 ONT - 159 t s g s g s d (G s A s G s C s T s T s C s T s C s C s T
 s G s G s T s) g s g s a
 ONT - 160 t s t s a s d (T s G s A s G s A s T s G s C s C s T s G
 s G s C s T s) g s c s c
 ONT - 161 g s t s t s d (A s T s G s A s G s A s T s G s C s C s T
 s G s G s C s) t s g s c
 ONT - 162 c s c s a s d (A s G s T s C s A s C s T s T s G s G s G
 s A s G s C s) t s t s c
 ONT - 163 a s g s c s d (T s T s T s G s G s T s T s G s G s G s C
 s A s A s C s) a s c s a
 ONT - 164 t s a s t s d (G s A s G s A s T s G s C s C s T s G s G
 s C s T s G s) c s c s a
 ONT - 165 t s g s t s d (T s A s T s G s A s G s A s T s G s C s C
 s T s G s G s) c s t s g
 ONT - 166 a s t s c s d (C s A s A s G s T s C s A s C s T s T s G
 s G s G s A s) g s c s t
 ONT - 167 g s g s g s d (A s A s G s C s T s T s T s G s G s T s T
 s G s G s G s) c s a s a
 ONT - 168 c s t s c s d (C s A s T s C s C s A s T s G s A s G s G
 s T s C s A s) t s t s c
 ONT - 169 a s a s g s d (T s C s A s C s T s T s G s G s G s A s G
 s C s T s T s) c s t s c
 ONT - 170 c s c s a s d (T s C s C s A s A s G s T s C s A s C s T
 s T s G s G s) g s a s g

10

20

30

40

50

ONT - 171 t s c s c s d (A s A s G s T s C s A s C s T s T s G s G
 s G s A s G s) c s t s t
 ONT - 172 c s c s t s d (C s T s G s G s A s T s T s G s A s G s C
 s A s T s C s) c s a s c
 ONT - 173 a s c s t s d (T s G s G s G s A s G s C s T s T s C s T
 s C s C s T s) g s g s t
 ONT - 174 c s t s t s d (G s G s G s A s G s C s T s T s C s T s C
 s C s T s G s) g s t s g
 ONT - 175 c s a s t s d (G s C s C s A s T s C s C s A s A s G s T
 s C s A s C s) t s t s g
 ONT - 176 t s g s c s d (C s A s T s C s C s A s A s G s T s C s A
 s C s T s T s) g s g s g
 ONT - 177 t s c s c s d (A s T s C s C s A s T s G s A s G s G s T
 s C s A s T s) t s c s c
 ONT - 178 a s g s g s d (G s C s A s C s T s C s A s T s C s T s G
 s C s A s T s) g s g s g
 ONT - 179 c s c s a s d (G s T s T s C s C s T s T s C s A s T s T
 s C s T s G s) c s a s c
 ONT - 180 c s a s t s d (A s G s C s C s A s T s T s G s C s A s G
 s C s T s G s) c s t s c
 ONT - 181 t s c s t s d (G s G s A s T s T s G s A s G s C s A s T
 s C s C s A s) c s c s a
 ONT - 182 g s g s a s d (T s T s G s A s G s C s A s T s C s C s A
 s C s C s A s) a s g s a

10

20

2' - OMe - DNA - 2' - OMe (3 - 14 - 3) 設計の Hep G 2 細胞における
 インビトロの生物学データ :

FOXO1		
	20 nM時のレベル (%)	SD
ONT - 129	82	5
ONT - 130	49	4
ONT - 131	92	3
ONT - 132	91	2
ONT - 133	58	3
ONT - 134	73	2
ONT - 135	65	5
ONT - 136	92	2
ONT - 137	94	2
ONT - 138	78	1
ONT - 139	61	1
ONT - 140	82	4
ONT - 155	95	2
ONT - 156	74	1
ONT - 157	56	2
ONT - 158	93	1
ONT - 159	94	1
ONT - 160	71	1
ONT - 161	67	1
ONT - 162	89	1
ONT - 163	55	7

30

40

50

ONT - 164	68	4	
ONT - 165	70	1	
ONT - 166	89	4	
ONT - 167	81	0	
ONT - 168	81	0	
ONT - 169	94	0	
ONT - 170	88	1	
ONT - 171	92	4	
ONT - 172	86	2	
ONT - 173	90	1	10
ONT - 174	93	2	
ONT - 175	84	1	
ONT - 176	80	2	
ONT - 177	83	2	
ONT - 178	95	2	
ONT - 179	93	8	
ONT - 180	68	7	
ONT - 181	85	5	
ONT - 182	80	5	
FOXO1			20
<u>200 nM時のレベル (%) S D</u>			
ONT - 129	27	1	
ONT - 130	46	4	
ONT - 131	53	9	
ONT - 132	53	2	
ONT - 133	48	6	
ONT - 134	35	9	
ONT - 135	45	15	
ONT - 136	40	7	
ONT - 137	50	4	30
ONT - 138	80	3	
ONT - 139	40	3	
ONT - 140	33	13	
ONT - 155	52	2	
ONT - 156	35	4	
ONT - 157	39	2	
ONT - 158	87	6	
ONT - 159	89	5	
ONT - 160	33	10	
ONT - 161	40	11	40
ONT - 162	60	7	
ONT - 163	42	8	
ONT - 164	34	10	
ONT - 165	38	1	
ONT - 166	62	9	
ONT - 167	64	1	
ONT - 168	38	2	
ONT - 169	67	3	
ONT - 170	74	8	
ONT - 171	65	5	50

ONT - 172 33 18
 ONT - 173 72 15
 ONT - 174 65 15
 ONT - 175 38 21
 ONT - 176 48 8
 ONT - 177 28 5
 ONT - 178 97 11
 ONT - 179 47 6
 ONT - 180 56 12
 ONT - 181 45 26
 ONT - 182 33 17

10

Hitの選択:

ONT - 151 d (G s A s A s G s C s T s T s) t s g s g s t s t s g s
 d (G s G s C s A s A s C s A)
 ONT - 198 d (C s C s A s T s C s C s A s) a s g s t s c s a s c s
 d (T s T s G s G s G s A s G)
 ONT - 185 d (A s T s G s A s G s A s T s) g s c s c s t s g s g s
 d (C s T s G s C s C s A s T)
 ONT - 142 d (A s A s G s C s T s T s T s) g s g s t s t s g s g s
 d (G s C s A s A s C s A s C)
 ONT - 145 d (A s T s A s G s C s C s A s) t s t s g s c s a s g s
 d (C s T s G s C s T s C s A)
 ONT - 192 d (T s A s T s G s A s G s A s) t s g s c s c s t s g s
 d (G s C s T s G s C s C s A)
 ONT - 188 d (T s T s A s T s G s A s G s) a s t s g s c s c s t s
 d (G s G s C s T s G s C s C)

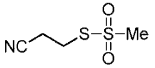
20

二次スクリーニング。化学および立体化学スクリーニング

DNA / RNA合成装置 MerMade - 12でのオリゴヌクレオチド合成の概要 (立
 体化学が明確な (s t e r e o d e f i n e d) ホスホリボチオエート2' - デオキシおよ
 び2' - OMeサイクル)

30

【表 29】

工程	反応	試薬	運搬量 (mL)	待機時間 (秒)	
1	脱トリチル	3% TCA in DCM	4 x 1	N. A.	
2	カップリング	0.15 M ホスホラミダイト in ACN + 2 M CMPT in ACN	2 x 0.5	2 x 450 (2'-OMe RNA) 2 x 300 (DNA)	10
3	キャッピング 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6- ルチジン	1	60	
4	キャッピング 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6- ルチジン + 16% NMI in THF	1	60	
5	硫化	0.3 M S-(2-シアノエチル) メチルチオスルホン酸  in ACN/BSTFA	1	600	20

FOXO1 Hit 配列に適用される例：

例には、以下が含まれるが、これらに限定されない：

(S p , S p , S p , S p , S p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , S p , S p , S p) d [C s C s A s T s C s C s A s A s G s T s C s A s C s T s T s G s G s G s A s G]	
(S p , S p , S p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , S p , S p) d [C s C s A s T s C s C s A s A s G s T s C s A s C s T s T s G s G s G s A s G]	30
(S p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , S p) d [G s A s A s G s C s T s T s T s G s G s T s T s G s G s G s C s A s A s C s A]	
(S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p) d [C s C s A s T s C s C s A s A s G s T s C s A s C s T s T s G s G s G s A s G]	
(S p , S p , S p , S p , S p , R p , R p , S p , R p , R p , S p , R p , R p , S p , S p , S p , S p , S p , S p) d [C s C s A s T s C s C s A s A s G s T s C s A s C s T s T s G s G s G s A s G]	40
(S p , S p , S p , S p , R p , R p , S p , R p , R p , S p , R p , R p , S p , R p , R p , S p , S p , S p , S p) d [G s A s A s G s C s T s T s T s G s G s T s T s G s G s G s C s A s A s C s A]	
(S p , S p , S p , S p , S p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , S p , S p , S p) d [A s T s G s A s G s A s T s G s C s C s T s G s G s C s T s G s C s C s A s T]	
(S p , S p , S p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , S p , S p) d [A s T s G s A s G s A s T s G s C s C s T s G s G s C s T s G s C s C s A s T]	
(S p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p , S p , R p , S p , S p , R p , S p , S p) d [C s C s A s T s C s C s A s A s G s T s C s A s C s T s T s G s G s G s A s G]	50

Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp) (CsC
s)_{OME}d [AsTsCsCsAsAs] (GsTsCs)_{OME}d [AsCsTsT
 sGsGsGs] (AsG)_{OME}
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp,
 Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp) (Cs
Cs)_{LNA}d [AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGs
] (AsG)_{LNA}
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp,
 Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp) (Cs
Cs)_{MOE}d [AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGs
] (AsG)_{MOE}
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp,
 Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp) (Cs
Cs)_{OME}d [AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGs
] (AsG)_{OME}

10

【実施例 4】

【0809】

核酸高分子の抑制

とりわけ、本発明は、例えば、場合によって、核酸高分子の切断により、このような核酸高分子を抑制するために用いられるとき、予想外の結果をもたらすキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物およびその方法を提供する。例には、本明細書に提示されているものが含まれるが、それらに限定されない。

20

【0810】

リボヌクレアーゼHアッセイ

【0811】

ヌクレアーゼによる核酸高分子の切断速度、例えば、リボヌクレアーゼHによるRNAの切断速度は、アンチセンス技術などの治療技術におけるオリゴヌクレオチドの使用に関して重要である。われわれのアッセイを用いて、われわれは、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドが相補RNAに結合するときの切断速度を調査し、特定のオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物 (P - ジアステレオマー) の代謝産物を分析した。以下の結果も、本発明により認められる切断パターンの重要性を示す。

30

【0812】

本明細書において用いられるリボヌクレアーゼHは、RNA/DNAハイブリッドのRNA鎖を加水分解する、普遍的に発現したエンドヌクレアーゼである。これは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの作用機序において重要な役割を果たす。いくつかの実施形態において、RNA基質が構成されるとき、リボヌクレアーゼH切断速度は大幅に小さくなる (Lima, W. F., Venkatraman, M., Crooke, S. T. The Influence of Antisense Oligonucleotide-induced RNA Structure on Escherichia coli RNase H1 Activity, The Journal Of Biological Chemistry 272, No. 29, 18191 - 18199 (1997))。さらに、2' - MOEギャップマー設計 (5 - 10 - 5) は、RNA標的に対するより高い親和性をもたらす、最小限のアンチセンス鎖のターンオーバーにつながる。翼内の2' - MOE修飾の存在も、リボヌクレアーゼH切断部位の数を減少させる。

40

【0813】

RNA切断速度を調査するために、本発明は、リボヌクレアーゼHと共にインキュベーションした後に残留するRNAの長さを定量する簡便なアッセイを提供する。提供される方法は、とりわけ、ステレオランダムな2' - 修飾ギャップマー、ステレオランダムなDNAオリゴヌクレオチド組成物、および異なる標的の様々なオリゴマーのキラル純粋なP

50

- ジアステレオマー（対応するオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物）のリボヌクレアーゼH切断の相対速度をもたらす。2'-修飾領域およびDNAコアの立体化学を変化させると、これらの領域の立体化学が、その基質に対するリボヌクレアーゼHの相互作用にどのように影響を与えるかについての情報が得られる。異なる時点でのリボヌクレアーゼH反応混合物をLCMSで分析して切断パターンを求めた。本発明は、とりわけ、最適な活性、例えば、アンチセンス活性のための立体化学的核酸構造の設計に極めて重要な核酸高分子（例えば、RNA）切断速度および切断パターン（地図）を提供する。

【0814】

装置：

【0815】

Alliance HPLC、2489-TUV、2695E-オートサンプラーを装備

【0816】

Cary100 (Agilent Technologies)

【0817】

方法：

【0818】

DNA/RNA二本鎖調製物：オリゴヌクレオチド濃度は、水中で260nmの吸光度を測定して求めた。DNA/RNA二本鎖は、鎖の濃度が10μMの等モルのオリゴヌクレオチド溶液を混合して調製した。混合物は、水浴中、90℃で2分間加熱し、数時間かけてゆっくりと冷却した。

【0819】

ヒトリボヌクレアーゼHタンパク質の発現および精製：NIH BethesdaのWei Yang教授の研究室からヒトリボヌクレアーゼHCクローンを入手した。このヒトリボヌクレアーゼHC（残基136~286）を得るためのプロトコルが記述されている（Nowotny, M.ら、Structure of Human RNase H1 Complexed with an RNA/DNA Hybrid: Insight into HIV Reverse Transcription. Molecular Cell 28, 264-276, (2007)）。タンパク質の発現は、生じるタンパク質がN末端のHis6タグを有していたことを除いて、報告されているプロトコルに従って行った。LB培地のBL21(DE3)E. coli細胞をタンパク質発現に用いた。細胞は、OD600がおよそ0.7に達するまで37℃で増殖させた。次に、培地を冷却し、0.4mM IPTGを加えて、16℃で一晩、タンパク質発現を誘導した。プロテアーゼ阻害剤（Sigma-Aldrich）を加えた緩衝液A（40mM NaH₂PO₄ (pH7.0)、1M NaCl、5%グリセロール、2.8mM β-メルカプトエタノールおよび10mM イミダゾール）中で超音波処理して、E. coliの抽出物を調製した。緩衝液Aに60mM イミダゾールを加えたものを用いて、Niアフィニティークラムにより抽出物を精製した。60~300mM イミダゾールの直線勾配でタンパク質を溶離した。タンパク質のピークを集め、Mono Sカラム（GE Healthcare）で、緩衝液Bにおいて100mM - 500mM NaCl勾配でさらに精製した。リボヌクレアーゼHCを含む分画を、保存緩衝液（20mM HEPES (pH7.0)、100mM NaCl、5%グリセロール、0.5mM EDTA、2mM DTT）中、0.3mg/mlまで濃縮し、-20℃で保管した。0.3mg/mlの酵素濃度は、その報告された吸光係数（32095cm⁻¹M⁻¹）およびMW（18963.3Da単位）に基づき、17.4μMに対応する。

【0820】

リボヌクレアーゼHアッセイ：96ウェルプレートで、25μL DNA/RNA二本鎖（10μM）に、5μLの10×リボヌクレアーゼH緩衝液、続いて、15μLの水を加えた。混合物を37℃で数分間インキュベートし、次に、5μLの0.1μM酵素原液

10

20

30

40

50

を加え、最終的な基質/酵素濃度 $5 \mu\text{M} / 0.01 \mu\text{M}$ (500 : 1) で全体積 $50 \mu\text{L}$ にして、さらに 37 でインキュベートした。様々な比の DNA/RNA 二本鎖：これらの条件を用いてリボヌクレアーゼ H タンパク質を調査し、速度の調査に最適な比を求めた。 $10 \mu\text{L}$ の 500 mM EDTA 二ナトリウム水溶液を用いて、様々な時点で反応を停止した。ゼロ分の時点では、酵素を加える前に反応混合物に EDTA を加えた。対照を試験して、EDTA が酵素活性を完全にうまく抑制できることを確かめた。すべての反応を停止した後、 $10 \mu\text{L}$ の各反応混合物を分析用 HPLC カラム (X Bridge C18、 $3.5 \mu\text{m}$ 、 $4.6 \times 150 \text{ mm}$ 、Waters 部品番号 186003034) に注入した。Kcat/Km は、二重標識した RNA を用いる依存型 FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) リボヌクレアーゼ H アッセイなど、いくつかの方法で測定することができ、 SpectraMax でモニターすることができる。

10

【0821】

LCMS 用サンプル調製の固相抽出カラムプロトコル：LCMS 分析の前に、96 ウェルプレート (Waters 部品番号 186002321) を用いて、リボヌクレアーゼ H 反応混合物をきれいにした。マニホールド (Millipore 部品番号 MSV MHT S00) を利用して、弱い真空下、 $500 \mu\text{L}$ のアセトニトリル、続いて水を用いてプレートを平衡にした。プレートを乾燥させないように注意した。約 $50 \sim 100 \mu\text{L}$ のリボヌクレアーゼ H 反応混合物を各ウェルに入れ、続いて、弱い真空下、水洗浄 (2 mL) した。 $2 \times 500 \mu\text{L}$ の 70% ACN/水を用いて試料を回収した。回収した試料を 2 mL 遠心分離管に移し、speed vac で濃縮乾固した。LCMS 分析のために、乾燥した各試料を $100 \mu\text{L}$ の水で戻して、Acquity UPLC (OST C18 $1.7 \mu\text{m}$ 、 $2.1 \times 50 \text{ mm}$ (部品番号 186003949)) に $10 \mu\text{L}$ 注入した。

20

【0822】

質量分析のために、C₁₈ 96 ウェルプレート (Waters) を用いて、反応停止後の反応混合物をきれいにした。オリゴマーを 70% アセトニトリル/水で溶離した。speed vac を用いてアセトニトリルを蒸発させ、生じた残留物を注入するため水で戻した。

溶離液 A = 50 mM 酢酸トリエチルアンモニウム

溶離液 B = アセトニトリル

カラム温度 = 60

UV を 254 nm および 280 nm で記録した

RP-HPLC 勾配法

30

【表 30】

	時間 (分)	流量 (ml/分)	%A	%B	曲線
1	0.0	1.00	95.0	5.0	
2	2.00	1.00	95.0	5.0	1
3	22.00	1.00	80.0	20.0	6
4	25.00	1.00	5.0	95.0	6
5	25.5	1.00	95.0	5.0	1
6	30	1.00	95.0	5.0	1

40

【0823】

HPLC クロマトグラム上で、全長 RNA オリゴマー (ONT-28) に対応するピーク面積を積分して DNA ピークを用いて規格化し、時間に対してプロットした (図 8)。ONT-87 は、二本鎖の形態のときの相補 RNA において、他の産物候補およびミボメルセンと比較して優れた切断を示した。このパネルのすべてのジエステロマーは、リボヌクレアーゼ H 酵素を活性化しない 2' - MOE 修飾翼を有するため、理論によって制限されることは意図しないが、活性は DNA コアの立体化学の影響を受ける可能性があることに願人は言及する。アンチセンス鎖にミボメルセンを含む ONT-77 から ONT-

50

81を有するヘテロ二本鎖は、非常に似たRNA切断速度を示す。交互のSp/Rp立体化学を有するONT-89は、試験した条件下、試験した時間枠で最も低い活性を示した。MOE修飾を有する試験したオリゴヌクレオチドのうち、アンチセンス鎖のONT-87およびONT-88単位は、残りのヘテロ二本鎖と比較して、活性の増加を示した。特に、ONT-87は驚いたことに、大きな切断速度および予想外に低レベルの残留標的RNAをもたらした。別の例示的なデータを図6および図24に示した。

【0824】

インビトロのオリゴヌクレオチドトランスフェクションアッセイ：トランスフェクションアッセイは当業者に広く知られており、行われている。例示的なプロトコルは、本明細書に記述される。Hep3B細胞は、リポフェクタミン2000 (Life Technologies、カタログ番号11668-019)を用い、メーカーのプロトコルを用いて、96ウェルプレートにおいて 1.8×10^3 細胞/ウェルの密度でリバーストランスフェクトする。用量反応曲線のために、60~100nMから出発して81/3連続希釈を用いる。25 μ Lの6 \times オリゴヌクレオチド濃縮物は、0.4 μ Lのリポフェクタミン2000と、1ウェルあたり25 μ Lの血清を含まない培地Opti-MEM培地 (Gibco、カタログ番号31985-062)との調製混合物と混合される。20分のインキュベーション後、DMEM細胞培地 (Gibco、カタログ番号11965-092)中の10% FBSに懸濁させた100 μ Lの 1.80×10^3 細胞/mLを加え、最終的に1ウェルあたり体積150 μ Lにする。遺伝子導入後24~48時間に、培養細胞用のQuantigene試料処理キット (Affymetrix、カタログ番号QS0103)を用いて、0.5mg/mLのプロテイナーゼKを含む75 μ Lの溶解混合物を加えてHep3B細胞を溶解する。細胞可溶化物中の標的mRNAおよびGAPDH mRNAの発現レベルは、Affymetrix Quantigene 2.0アッセイキット (カタログ番号QS0011)を用い、メーカーのプロトコルに従って測定する。標的mRNA発現は、同じ試料からのGAPDH mRNA発現に対して規格化する；相対的な標的/GAPDHレベルは、リポフェクタミン2000のみ (オリゴヌクレオチドなし)の対照を用いるトランスフェクションと比較する。用量反応曲線は、GraphPad Prism 6により、傾きが変化する (4パラメータ) 反応曲線フィットに対する非線形回帰ログ (阻害剤)を用いて作成する。例示的な結果については、図24、図27および図29を参照されたい。

【実施例5】

【0825】

提供される組成物および方法は、切断パターンを制御する

本発明では、驚いたことに、ヌクレオチド間結合立体化学パターンが、核酸高分子の切断パターンに対して予想外の影響を与えることが明らかになった。キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の骨格キラル中心の共通パターンを変化させることにより、驚いたことに、切断部位の数、切断部位での切断割合および/または切断部位の位置を単独でも組み合わせでも変更することができる。本明細書の実施例に記載の通り、提供される組成物および方法は、核酸高分子の切断パターンを制御することができる。

【0826】

同様のアッセイ条件を用いて、異なるオリゴヌクレオチドタイプの様々なキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を試験した。例示的な標的RNA配列の切断パターンを図9に提示している。ONT-87およびONT-154のパターンなど、特定の骨格キラル中心のパターンは、驚いたことに、標的配列にただ1つの切断部位を生じる。さらに、驚いたことに、ONT-87およびONT-154など、単一の切断部位をもたらすオリゴヌクレオチドは、予想外に大きな切断速度および低レベルの残留標的核酸高分子をもたらすことが明らかになった。図8、図10および図11も参照。

【実施例6】

【0827】

FOXO1 mRNAの例示的な切断

10

20

30

40

50

FOXO1 mRNAの異なる領域を標的にするオリゴヌクレオチド組成物を上述の通り切断アッセイにて試験した。それぞれの場合において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、同じ共通塩基配列および長さを共有するキラル制御されないオリゴヌクレオチド組成物からの基準切断パターンと比べて、変更された切断パターンをもたらすことができることが示された。例示的な結果については、図10および図11を参照されたい。図12に示す通り、例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、キラル制御されない基準オリゴヌクレオチド組成物と比べたとき、著しく速い切断速度および予想外に低レベルの残留する基質の両方をもたらす。いくつかの実施形態において、図11に示す通り、切断部位は、RpSpSp骨格キラル中心の配列に関連する。いくつかの実施形態において、切断部位は、RpSpSpの2塩基対上流である。

10

【0828】

例示的なオリゴヌクレオチド組成物を以下に一覧にした。

【表31】

オリゴ	配列	説明	Tm (°C)
ONT-366	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTs dGsdCsdCsdAsdTsdA	All DNA	66.5
ONT-389	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTs dGsdCsdCsdAsdTsdA	S ₇ RSSRSSRS ₅	64.3
ONT-390	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTs dGsdCsdCsdAsdTsdA	S ₆ RSSRSSRS ₆	64.6
ONT-391	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTs dGsdCsdCsdAsdTsdA	S ₅ RSSRSSRS ₇	64.3
ONT-387	rUrArUrGrGrCrArGrCrCrArGrGrCrArUrCrUrCrA	complementary RNA	
ONT-367	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTs dGsdCsdTsdCsdAsdC	All DNA	62.9
ONT-392	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTs dGsdCsdTsdCsdAsdC	S ₇ RSSRSSRS ₅	59.5
ONT-393	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTs dGsdCsdTsdCsdAsdC	S ₆ RSSRSSRS ₆	60
ONT-394	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTs dGsdCsdTsdCsdAsdC	S ₅ RSSRSSRS ₇	59.5
ONT-388	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrArArUrGrGrCrUrA	相補的 RNA	

20

30

【実施例7】

【0829】

例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、より高いターンオーバーをもたらす。

40

オリゴヌクレオチドに切断された核酸高分子フラグメント（例えば、RNAフラグメント）のTmが生理的溫度より高い場合、産物の解離が抑制されることがあり、オリゴヌクレオチドが解離できずに、他の標的鎖を見つけて二本鎖を形成し、標的鎖を切断させられないことがある。相補RNAに対するONT-316（5'-10-5' 2'-MOEギャップマー）のTmは76である。オリゴヌクレオチドに対して相補的なRNA配列における1回の切断または少数回の切断の後、2'-MOEフラグメントがRNAと結合したままになることがあり、したがって、他の標的分子を切断させることができない。RNAと二本鎖にしたとき、DNA鎖の熱融解溫度は一般にはるかに低く、例えば、ONT-367（63）およびONT-392（60）である。さらに、DNA配列の熱安定性は、2'-MOE修飾オリゴヌクレオチドと比べて、比較的均一に分布することが多い。

50

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドは、2'-MOEなどの2'-修飾を含まない。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドは、2'-MOEなどの2'-修飾を含まないが、2'-MOEなどの2'-修飾を有するオリゴヌクレオチドよりも、核酸高分子切断フラグメントから容易に解離し、ターンオーバーが高い。いくつかの実施形態において、本発明は、すべてのDNA設計を提供し、その設計ではオリゴヌクレオチドは2'-修飾を持たない。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドが2'-修飾を持たないキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、リボヌクレアーゼHなどのヌクレアーゼのより高いターンオーバーをもたらす。いくつかの実施形態において、切断後、リボヌクレアーゼHは、RNAおよび提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドによって形成された二本鎖からもっと容易に解離する。上述の同様のプロトコルを用いて、2つの例示的なオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物ONT-367およびONT-392のターンオーバーは、実際、キラル制御されない基準オリゴヌクレオチド組成物よりも高いターンオーバー率を示した(図13参照)。

10

【実施例8】**【0830】**

図14に例示の通り、本開示のキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物およびその方法は、核酸高分子の制御された切断をもたらす。いくつかの実施形態において、本発明のキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、切断部位の数、切断部位の位置、および/または相対的な切断部位の切断割合の点から変更された切断パターンを生じる。いくつかの実施形態において、ONT-401およびONT-406により例示の通り、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、単一部位の切断をもたらす。

20

【0831】

いくつかの実施形態において、RNA切断から、ただ1つの成分が検出された。理論によって制限されることは意図しないが、このような観察は、同じ二本鎖上で複数切断して、はるかに短い5'-OH 3'-OHフラグメントを生じ得るリボヌクレアーゼH酵素の加工性による可能性があることに発明者は言及する。

【0832】

別のキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物をさらに試験した。上述の通り、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、切断速度、およびDNA/RNA二本鎖に残留するRNA(%)の点から、予想外の結果をもたらす。図15~図17を参照されたい。例の分析データを図18~図20に提示した。理論によって制限されることは意図しないが、いくつかの実施形態において、切断が図21に示す通り起こることがあることに発明者は言及する。図17では、ONT-406が、同じ塩基配列および長さを有する天然のDNAオリゴヌクレオチドONT-415の切断速度をわずかに上回る速度で二本鎖RNAの切断を誘発することが観察されたことに留意されたい。本開示において提供されるONT-406のキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物、および他のキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、ONT-415組成物が持たない他の好ましい特性、例えば、インピトロおよび/またはインピボでのより良い安定性プロファイルを有することに発明者は言及する。別の例示的なデータを図25に提示した。また、当業者によって理解されるように、図26および図27に示す例示的なデータは、提供される例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、特に、骨格キラル中心のパターンによって切断パターンを制御するよう設計されたときに、基準オリゴヌクレオチド組成物、例えば、ステレオランダムなオリゴヌクレオチド組成物よりもはるかに良い結果をもたらしたことを裏づける。図26に例示した通り、制御された骨格キラル中心のパターンは、とりわけ、DNAオリゴヌクレオチドが用いられるとき、既存の切断部位での切断を選択的に増加および/または減少させることができ、あるいは、DNAオリゴヌクレオチドが用いられるときには存在しない、全く新しい切断部位を生み出す(図25、ONT-415参照)。いくつかの実施形態において、DNAオリゴヌクレオチドから

30

40

50

の切断部位は、リボヌクレアーゼHの内因性の切断選好を示す。図27により確認される通り、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的切断速度を調節することができる。いくつかの実施形態において、細胞活性の分散の約75%は、骨格キラル中心のパターンによって制御され得る切断速度の差によって説明される。本出願において提供される通り、塩基修飾およびこれらのパターン、糖修飾およびこれらのパターン、ヌクレオチド間結合修飾およびこれらのパターン、ならびに/または任意のその組み合わせなどの別の構造的特徴と、骨格キラル中心のパターンとを組み合わせると、所望のオリゴヌクレオチドの特性をもたらすことができる。

【実施例9】

【0833】

mHTTの例示的な対立遺伝子特異的抑制

いくつかの実施形態において、本発明は、他の対立遺伝子よりも選択性を有する1つの特定の対立遺伝子からの転写物の対立遺伝子特異的抑制のためのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物およびその方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、mHTTの対立遺伝子特異的抑制を提供する。

【0834】

図22は、1つの対立遺伝子からの転写物を特異的に抑制するが、他の対立遺伝子からの転写物は特異的に抑制しない、例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を示す。オリゴヌクレオチド451および452を、上述の生化学アッセイを用いて、例示した両方の対立遺伝子からの転写物で試験した。対立遺伝子特異的抑制も、以下に記載の同様の手順を用いて、細胞および動物モデルにおいて試験した。Hohjoh, *Pharmaceuticals* 2013, 6, 522-535; 米国特許出願公開第2013/0197061号; および、Ostergaardら、*Nucleic Acids Research*, 2013, 41(21), 9634-9650。すべての場合において、標的対立遺伝子からの転写物は、他の対立遺伝子からの転写物よりも選択的に抑制される。当業者によって理解されるように、図22に示す例示的なデータは、提供される例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物が、特に、立体化学によって切断パターンを制御するよう設計されたときに、基準オリゴヌクレオチド組成物、この場合、ステレオランダムなオリゴヌクレオチド組成物よりもはるかに良い結果をもたらしたことを裏づける図22により確認される通り、骨格キラル中心のパターンは、切断パターンを劇的に変化させることができ(図22C~図22E)、かつ、立体化学パターンを用いて、ミスマッチ部位に切断部位を配置することができて(図22C~図22E)、かつ/または、変異型と野生型の間の選択性を劇的に改善することができる(図22G~図22H)。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的のwtRNAおよびmRNAと共にインキュベートされ、両方の二本鎖は、リボヌクレアーゼHと共にインキュベートされる。

【0835】

ハンチンチン対立遺伝子のT_m

【表32】

変異型ハンチンチン対立遺伝子 ONT-453/ONT-451	38.8 °C
野生型ハンチンチン対立遺伝子 ONT-454/ONT-451	37.3 °C
変異型ハンチンチン対立遺伝子 ONT-453/ONT-452	38.8 °C
野生型ハンチンチン対立遺伝子 ONT-454/ONT-452	36.5 °C
変異型ハンチンチン対立遺伝子 ONT-453/ONT-450	40.3 °C
野生型ハンチンチン対立遺伝子 ONT-454/ONT-450	38.8 °C

【実施例10】

【0836】

FOXO1の例示的な対立遺伝子特異的抑制

いくつかの実施形態において、本発明は、FOXO1の対立遺伝子特異的抑制を提供する。

【0837】

図23は、1つの対立遺伝子からの転写物を特異的に抑制するが、他の対立遺伝子からの転写物は特異的に抑制しない、例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を示す。オリゴヌクレオチドONT-400、ONT-402およびONT-406を、上述の生化学アッセイを用いて、例示した両方の対立遺伝子からの転写物で試験した。対立遺伝子特異的抑制も、以下に記載の同様の手順を用いて、細胞および動物モデルにおいて試験した。Hohjoh, *Pharmaceuticals* 2013, 6, 522-535; 米国特許出願公開第2013/0197061号; Ostergaardら、*Nucleic Acids Research* 2013, 41(21), 9634-9650; および、Jiangら、*Science* 2013, 342, 111-114。標的対立遺伝子からの転写物は、他の対立遺伝子からの転写物よりも選択的に抑制される。場合によっては、ONT-388からのミスマッチONT-442(A/G、7位)およびONT-443(A/G、13位)を有する2つのRNAが合成され、ONT-396からONT-414と二本鎖にされる。リボヌクレアーゼHアッセイを実施して、切断速度および切断地図を得る。

【実施例11】

【0838】

特定の例示的なオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物

相補RNAと二本鎖にしたとき、熱融解温度を持つFOXO1 mRNAの3つの特異な領域を標的にする異なる2'置換化学を有するステレオランダムなオリゴヌクレオチド。各鎖の濃度は、1×PBS緩衝液中、1μMであった。

【表33】

オリゴ	配列	説明	Tm(°C)
ONT-316	TeosAeosGeos5mCeos5mCeosdAsdTsdGs5mdCsdAsdGs5mdCsdTsdGs5mCeosTeos5mCeosAeos5mCeo	5-10-5 (2'-MOE ギャップマー)	76.7
ONT-355	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTstsgscscasgscsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	7-6-7 (DNA-2'- OMe-DNA)	71.2
ONT-361	tsasgsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTscsasc	3-14-3 (2'-OMe- DNA-2'-OMe) ギャップマー	65.8
ONT-367	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	All DNA	62.9
ONT-373	tsasgscscsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGscstscsasc	5-10-5 (2'-OMe ギャップマー)	71.8
ONT-388	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrArArUrGrGrCrUrA	相補的 RNA	
ONT-302	Teos5mCeos5mCeosAeosGeosdTsTs5mdCs5mdCsdTsdTs5mdCsdAsdTsdTs5mCeosTeosGeos5mCeosAeo	5-10-5 (2'-MOE ギャップマー)	72.5
ONT-352	dTsdCsdCsdAsdGsdTsdTscscststscsasdTsdTsdCsdTsdGsdCsdA	7-6-7 (DNA-2'- OMe-DNA) ギャップマー	65.4
ONT-358	tscscsdAsdGsdTsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTsdCsdTsgscsas	3-14-3 (2'-OMe- DNA-2'-OMe) ギャップマー	62.6
ONT-364	dTsdCsdCsdAsdGsdTsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTsdCsdTsdGsdCsdA	All DNA	58.4

オリゴ	配列	説明	Tm(°C)
ONT-370	tsescsasgsdTsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTscstsgscsa	5-10-5 (2'-OMe ギャップマー)	68
ONT-386	rUrGrCrArGrArArUrGrArArGrGrArArCrUrGrGrA	相補的 RNA	
ONT-315	TeosGeosAeosGeosAeosdTsdGs5mdCs5mdCsdTsdGsdGs5 mdCsdTsdGs5mCeos5mCeosAeosTeosAeo	5-10-5 (2'-MOE ギャップマー)	77.5
ONT-354	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGscscstsgsgscsdTsdGsdCsdCsdAsd TsdA	7-6-7 (DNA-2'- OMe-DNA) ギャップマー	75.5
ONT-360	tsgsasdTsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdCsdCs astsas	3-14-3 (2'-OMe- DNA-2'-OMe) ギャップマー	69
ONT-366	dTsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdC sdCsdAsdTsdA	All DNA	66.5
ONT-372	tsgsasgsasdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGscscsasts	5-10-5 (2'-OMe ギャップマー)	74.4
ONT-387	rUrArUrGrGrCrArGrCrCrArGrGrCrArUrCrUrCrA	相補的 RNA	

10

【 0 8 3 9 】

別の例示的なステレオランダムなオリゴヌクレオチド組成物を以下に一覧にする。

【 表 3 4 】

20

オリゴ	配列 (5' to 3')
ONT-41	(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs](Gs5mCsAs5m Cs5mC) _{MOE}
ONT-70	(Gs5mCs) _{MOE} d[GsTsTsTsGs5mCsTs5mCsTsTs5mCsTsTs](5mCsTsTsGs5mCGs) _{MOE} d[TsTsTsTs](TsT) _{MOE}
ONT-83	(GsTs5mCs5mCs5mCs) _{MOE} d(TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs)(AsAsTsGs5mC) _{MOE}
ONT-302	(Ts5mCs5mCsAsGs) _{MOE} d[TsTs5mCs5mCsTsTs5mCsAsTsTs](5mCsTsGs5mCsA) _{MOE}
ONT-315	(TsGsAsGsAs) _{MOE} d[TsGs5mCs5mCsTsGsGs5mCsTsGs](5mCs5mCsAsTsA) _{MOE}
ONT-316	(TsAsGs5mCs5mCs) _{MOE} d[AsTsTsGs5mCsAsGs5mCsTsGs5m] (CsTs5mCsAs5mC) _{MOE}
ONT-352	[TsCsCsAsGsTsTs](cscststscsas) _{OMe} d[TsTsCsTsGsCsA]
ONT-354	[TsGsAsGsAsTsGs](CsCsTsGsGsCs) _{OMe} d[TsGsCsCsAsTsA]
ONT-355	[TsAsGsCsCsAsTs](TsGsCsAsGsCs) _{OMe} d[TsGsCsTsCsAsC]
ONT-358	(TsCsCs) _{OMe} d[AsGsTsTsCsCsTsTsCsAsTsTsCsTs](GsCsA) _{OMe}
ONT-360	(TsGsAs) _{OMe} d[GsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCs](AsTsA) _{OMe}
ONT-361	(TsAsGs) _{OMe} d[CsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTs](CsAsC) _{OMe}

30

オリゴ	配列 (5' to 3')
ONT-364	[TsCsCsAsGsTsTsCsCsTsTsCsAsTsTsCsTsGsCsA]
ONT-366	[TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsTsA]
ONT-367	[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]
ONT-370	(TsCsCsAsGs) _{OMe} d[TsTsCsCsTsTsCsAsTsTs](CsTsGsCsA) _{OMe}
ONT-372	(TsGsAsGsAs) _{OMe} d[TsGsCsCsTsGsGsCsTsGs](CsCsAsTsA) _{OMe}
ONT-373	(TsAsGsCsCs) _{OMe} d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGs](CsTsCsAsC) _{OMe}
ONT-440	(UsAsGsCsCs) _F d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]
ONT-441	(UsAsGsCsCs) _F d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsC]
ONT-460	(TsAsGsCsCs) _{OMe} d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]
ONT-450	[AsTsTsAsAsTsAsAsTsTsGsTsCsAsTsCsAsCsC]

10

【 0 8 4 0 】

例示的なRNAおよびDNAオリゴヌクレオチドを以下に一覧にする。

【 表 3 5 】

オリゴ	配列 (5' to 3')
ONT-28	rGrGrUrGrCrGrArArGrCrArGrArCrUrGrArGrGrC
ONT-386	rUrGrCrArGrArArUrGrArArGrGrArArCrUrGrGrA
ONT-387	rUrArUrGrGrCrArGrCrCrArGrGrCrArUrCrUrCrA
ONT-388	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrArArUrGrGrCrUrA
ONT-415	d[TAGCCATTGCAGCTGCTCAC]
ONT-442	rGrUrGrArGrCrGrGrCrUrGrCrArArUrGrGrCrUrA
ONT-443	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrGrArUrGrGrCrUrA
ONT-453	rGrGrUrGrArUrGrArCrArArUrUrUrArUrUrArArU
ONT-454	rGrGrUrGrArUrGrGrCrArArUrUrUrArUrUrArArU

20

【 0 8 4 1 】

例示的なキラル純粋なオリゴヌクレオチドを以下に提示する。いくつかの実施形態において、本発明は、以下の例示的なオリゴヌクレオチドそれぞれの対応するキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

30

【 表 3 6 】

オリゴ	立体化学/配列 (5' to 3')	説明
ONT-389	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsTsA]	7S-(RSS) ₃ -3S
ONT-390	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsTsA]	6S-(RSS) ₃ -4S
ONT-391	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsTsA]	5S-(RSS) ₃ -5S
ONT-392	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	7S-(RSS) ₃ -3S
ONT-393	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	6S-(RSS) ₃ -4S

40

オリゴ	立体化学/配列 (5' to 3')	説明
ONT-394	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	5S-(RSS) ₃ -5S
ONT-396	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	18S-1R
ONT-397	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	17S-RS
ONT-398	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	16S-(RSS)
ONT-399	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	15S-(RSS)-1S
ONT-400	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	14S-(RSS)-2S
ONT-401	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	13S-(RSS)-3S
ONT-402	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	12S-(RSS)-4S
ONT-403	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	11S-(RSS)-5S
ONT-404	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	10S-(RSS)-6S
ONT-405	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	9S-(RSS)-7S
ONT-406	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	8S-(RSS)-8S
ONT-407	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	7S-(RSS)-9S
ONT-408	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	6S-(RSS)-10S
ONT-409	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	5S-(RSS)-11S
ONT-410	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	4S-(RSS)-12S
ONT-411	(Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	3S-(RSS)-13S
ONT-412	(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	2S-(RSS)-14S
ONT-413	(Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	S-(RSS)-15S
ONT-414	(Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	(RSS)-16S
ONT-421	All-(Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	All S
ONT-422	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-C6-amino-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	8S-(RSS)-3S-(RSS)-2S
ONT-455	All-(Rp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	All R

10

20

30

【表 3 7】

オリゴ	配列 (5' to 3')	T _m (°C)
ONT-439	[UsAsGs] _F d[CsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTs][CsAsC] _F	68.3
ONT-440	[UsAsGsCsCs] _F d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	70.0
ONT-441	[UsAsGsCsCs] _F d[AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsC]	65.5
ONT-455	All-(Rp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	66.8
ONT-316	[TsAsGs5mCs5mCs] _{MOE} d[AsTsTsGs5mCsAsGs5mCsTsGs][5mCsTs5mCsAs5mC] _{MOE}	76.9
ONT-367	d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	62.8
ONT-415	d[TAGCCATTGCAGCTGCTCAC]	72.6
ONT-416	[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCs] _{OMe} d[TsGsCsTsCsAsC]	78.4
ONT-421	All-(Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	59.2
ONT-394	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	60.0
ONT-406	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	58.5

10

20

【実施例 1 2】

【0 8 4 3】

提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物による例示的な別の制御された切断

当業者によって理解されるように、図 2 6 に示す例示的なデータは、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物およびその方法が、ステレオランダムなオリゴヌクレオチド組成物などの基準組成物と比べて、予想外の結果をもたらしたことを裏づける。とりわけ、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、切断部位の位置、切断部位の数、および相対的な切断部位の切断割合の制御を含むが、これらには限定されない制御された切断パターンをもたらし得る。図 2 7 に提示されている例示的なデータも参照されたい。

30

【実施例 1 3】

【0 8 4 4】

キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の安定性

当業者によって理解されるように、図 2 6 に示す例示的なデータは、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の安定性が、様々な骨格キラル中心のパターンによって調節され得ることを裏づける。例示的なデータについては、図 7 および図 2 8 を参照されたい。血清安定性実験を実施するための例示的なプロトコルを以下で説明する。

40

【0 8 4 5】

プロトコル：P - 立体化学的に純粋な PS DNA (ONT - 396 - ONT - 414 (3' 末端から 5' 末端の単一の Rp ウォーク))、ステレオランダムな PS DNA (ONT - 367)、全 Sp PS DNA (ONT - 421) および全 Rp PS DNA (ONT - 455) をラット血清 (Sigma, R9759) 中でインキュベート (0 時間および 4 8 時間) し、IEX - HPLC で分析した。

【0 8 4 6】

インキュベーション法：5 μL の 250 μM の各 DNA 溶液および 45 μL のラット血清を混合し、各時点 (0 時間および 4 8 時間) について 37 °C でインキュベートした。各

50

時点において、25 μ L の 150 mM EDTA 溶液、30 μ L の溶解緩衝液 (erpilcentre、MTC096H) および 3 μ L のプロテイナーゼ K 溶液 (20 mg/mL) を加えて反応を停止した。混合物を 60 で 20 分間インキュベートし、次に、20 μ L の混合物を IEX-HPLC に注入して分析した。

【0847】

インキュベーション対照サンプル：絶対的定量を確認するために、5 μ L の 250 μ M の各 DNA 溶液および 103 μ L の 1 \times PBS 緩衝液の混合物を調製し、対照として 20 μ L の混合物を IEX-HPLC で分析した。

【0848】

例示的な分析法：

IEX-HPLC

A：10 mM トリス HCl、50% ACN (pH 8.0)

B：10 mM トリス HCl、800 mM NaCl、50% ACN (pH 8.0)

C：水-ACN (1:1、v/v)

温度：60

カラム：DIONEX DNAPac PA-100、250 \times 4 mm

勾配：

【表38】

	時間	フロー	%A	%B	%C	%D	曲線
1	0.00	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	6
2	1.00	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	1
3	2.00	1.00	75.0	25.0	0.0	0.0	6
4	10.00	1.00	5.0	95.0	0.0	0.0	6
5	10.10	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	6
6	12.50	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	1

洗浄：

【表39】

	時間	フロー	%A	%B	%C	%D	曲線
1	0.01	1.00	0.0	0.0	100.0	0.0	6
2	5.50	1.00	0.0	0.0	100.0	0.0	1
3	5.60	1.00	0.0	100.0	0.0	0.0	6
4	7.50	1.00	0.0	100.0	0.0	0.0	1
5	7.60	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	6
6	12.50	1.00	95.0	5.0	0.0	0.0	1

カラム温度：60。

試料注入後に毎回洗浄を実施した。

HPLCクロマトグラムの積分面積を用いて0時間から48時間の比を解析し、残留PS DNAの割合を計算した。

【実施例14】

【0849】

例示的な分析結果 (図19)

図19のピークの帰属 (上のパネル、M12-Exp11 B10、ONT-354、30分)

10

20

30

40

【表 4 0】

保持時間 (分)	(M-2) ²⁻	(M-3) ³⁻	(M-4) ⁴⁻	(M-5) ⁵⁻	(M-6) ⁶⁻
2.34	1100.6	733.7			
11.91		1390.6	1042.6		
13.07		1500.08	1125.5		750.73
		1805.29	1354.19		
13.58		1603.39	1202.2	961.35	801.15
14.80			1589.9	1271.4	1059.5
18.59			1653.3	1323.3	1101.6

10

保持時間 (分)	観測された 分子量	質量一致に基づく割り当て		
		5'-p-RNA 断片	3'-OH and 5'-OH, RNA	DNA
2.34	2203.2		7mer	
11.91	4176	13mer		
13.07	4505.7	14mer		
	5418.87		17mer	
13.58	4812.8	15mer		
14.80	6362.5		20mer, ONT-387	
18.59	6615.4			ONT-354

20

【 0 8 5 0】

図 19 のピークの帰属 (下のパネル、 M 1 2 - E x p 1 1 A 1 0、 O N T - 3 1 5、
3 0 分)

【表 4 1】

保持時間 (分)	(M-2) ²⁻	(M-3) ³⁻	(M-4) ⁴⁻	(M-5) ⁵⁻	(M-6) ⁶⁻
4.01	1425.33	950.15			
4.4	1100.83	733.69			
4.94	1578.34	1051.54			
6.21	1741.91	1161.89	870.37		
	1445.42	963.31	722.97		
8.48	1610	1073.3			
9.15		1391.2	1043.1		
9.93	1763.4	1174.7			
11.8		1602.3	1201.7		
14.82					
20.73			1809.94	1447.82	1205.9

30

40

保持時間 (分)	観測された 分子量			
		5'-p-RNA 断片	3'-OH and 5'-OH, RNA	DNA
4.01	2853.45		9mer	
4.4	2203.66	7mer		
4.94	3158.47		10mer	
6.21	3487.52		11mer	
	2892.84	9mer		
8.48	3220.94	10mer		
9.15	4177		13mer	
9.93	3528.88	11mer		
11.8	4810		15mer	
14.82			20mer, ONT-387	
20.73	7244.3			ONT-315

10

【実施例 15】

【0851】

例示的な分析結果 (図 30)

図 30 のピークの帰属 (上のパネル、M12 - Exp11 D2、ONT-367、30分)

【表 42】

20

保持時間 (分)	(M-2) ²⁻	(M-3) ³⁻	(M-4) ⁴⁻	(M-5) ⁵⁻	(M-6) ⁶⁻
2.36	1120.28	746.25			
3.15	1292.41	861.32			
4.04	975.92				
4.49	1140.6	759.78			
5.83	1305.21	869.65	652.31		
6.88	1923.23	1281.69	961.28		
9.32		1390.76	1043.29	833.72	
9.96	1783.85	1187.98	891.6	712.94	
11.01	1936.14	1289.93			
		1501.52	1125.4	899.89	

30

11.93		1405.25	1053.78	842.84	
13.15		1514.72	1135.72		
14.81			1609.95	1287.53	1072.58
18.33			1587.9	1270.2	1058.3

保持時間 (分)	観測された 分子量	質量一致に基づく割り当て		
		5'-p-RNA 断片	3'-OH and 5'-OH, RNA	DNA
2.36	2242.56		7mer	
3.15	2586.82		8mer	
4.04	1953.84	6mer		
4.49	2283.2	7mer		
5.83	2612.42	8mer		
6.88	3849.14		12mer	
9.32	4175.28		13mer	
9.96	3569.7	11mer		
11.01	3874.28	12mer		
	4507.56		14mer	
11.93	4218.75	13mer		
13.15	4547.16	14mer		
14.81	6441.8		20mer, ONT-388	
18.33	6355.6			ONT-367

10

【 0 8 5 2 】

図 3 0 のピークの帰属 (下のパネル、M 1 2 - E x p 2 1 N M プレート 1 (プール)
F 1 1 O N T - 4 0 6 3 0 分

20

【表 4 3】

保持時間 (分)	(M-2) ²⁻	(M-3) ³⁻	(M-4) ⁴⁻	(M-5) ⁵⁻	(M-6) ⁶⁻
4.72	1140.6	759.78			
9.46		1390.76	1043.29	833.72	
16.45			1609.95	1287.53	1072.58
19.48			1588.1	1270.4	1058.4

30

保持時間 (分)	観測された 分子量	質量一致に基づく割り当て		
		5'-p-RNA 断片	3'-OH and 5'-OH, RNA	DNA
4.72	2203.2	2283.2	7mer	
9.46	4176	4175.28		13mer
16.45	6362.5	6441.8		20mer, ONT-388
19.48	6615.4	6355.9		

【 図 1 】

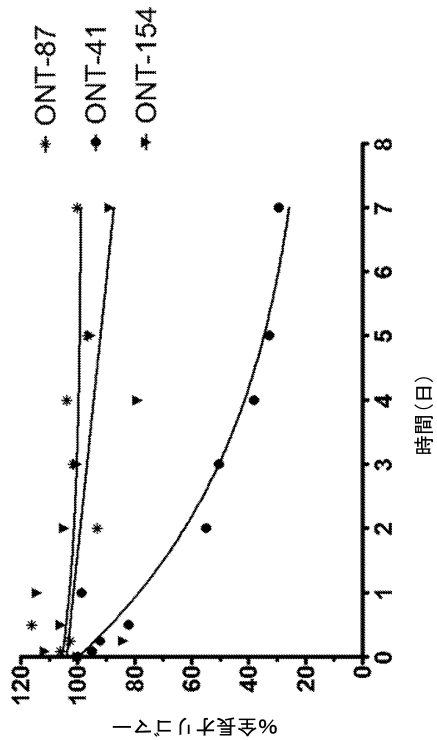


FIG. 1

【 図 2 】

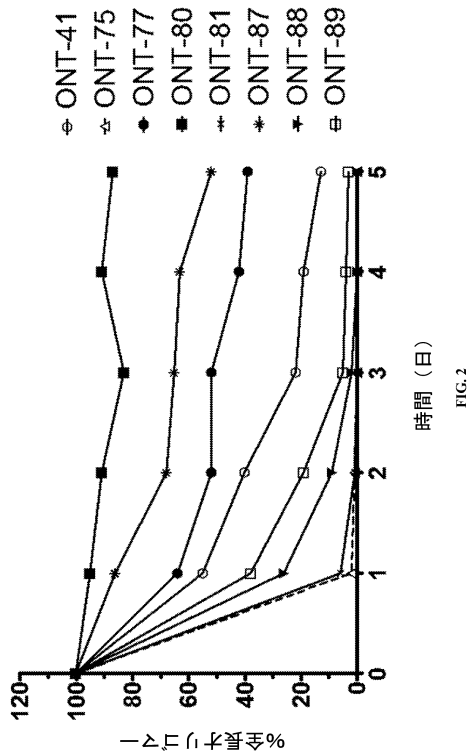


FIG. 2

【 図 3 】

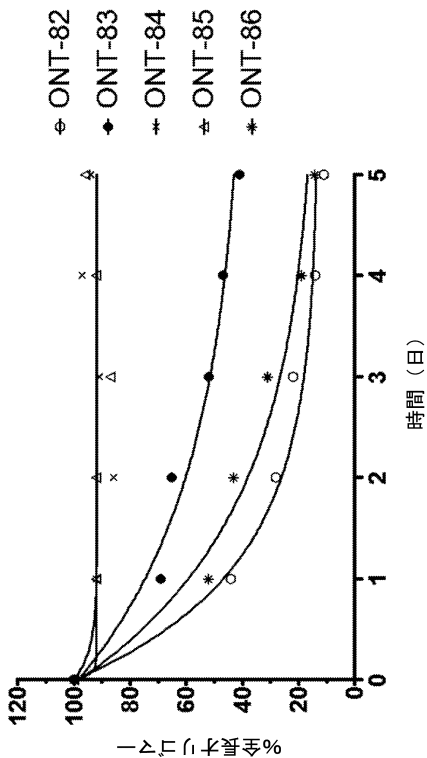
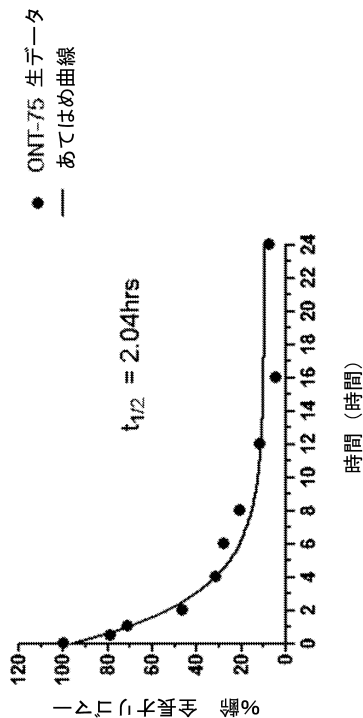


FIG. 3

【 図 4 】



【 図 5 】

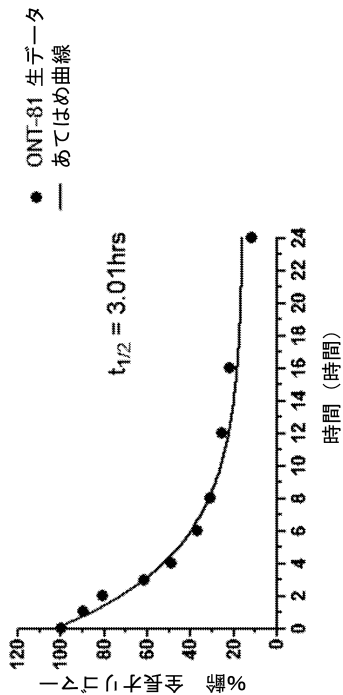


FIG. 5

【 図 6 】

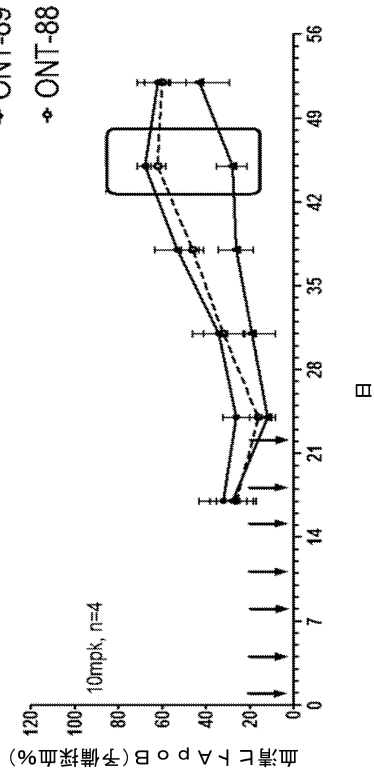


FIG. 6

【 図 7 】

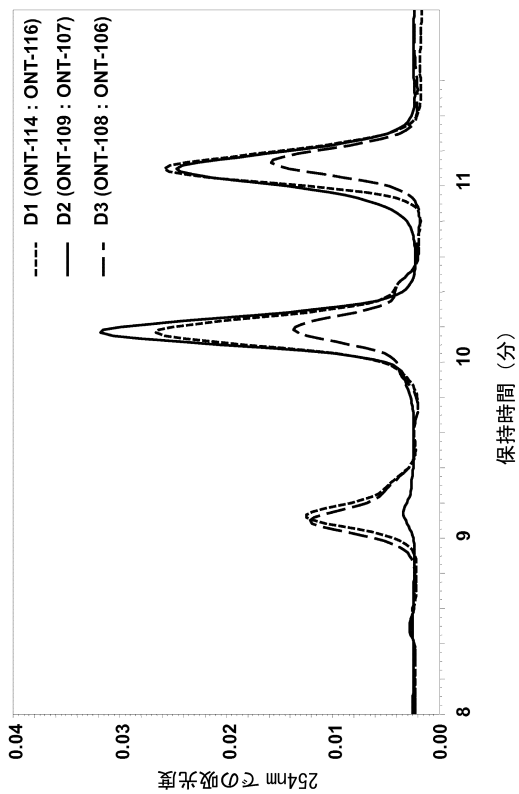


FIG. 7

【 図 8 】

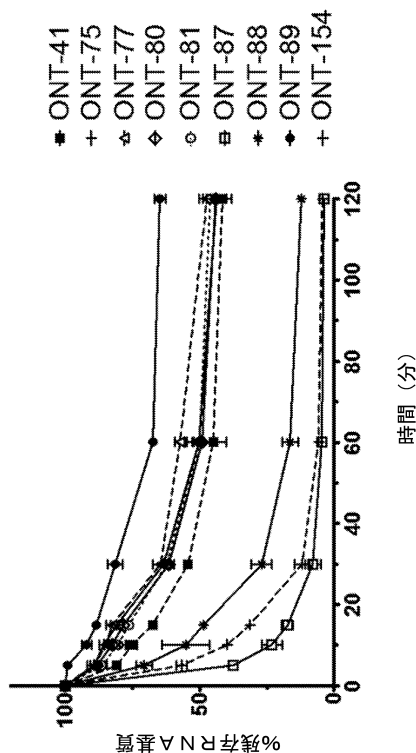
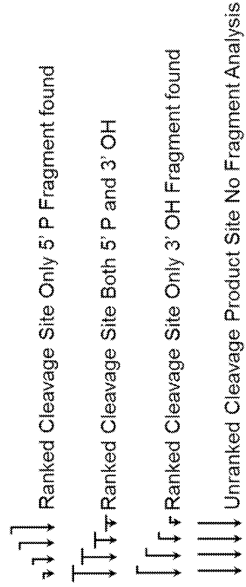
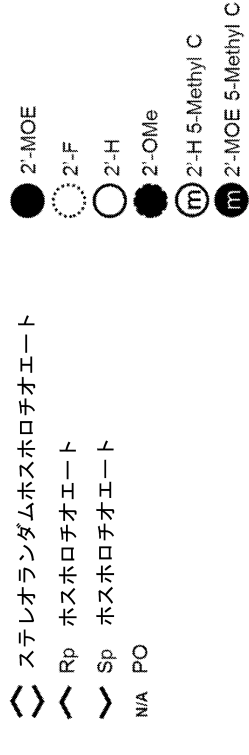


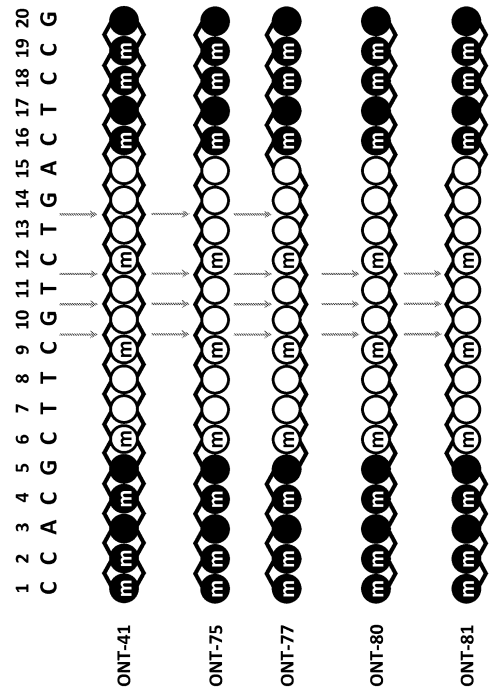
FIG. 8

【 図 9 A 】



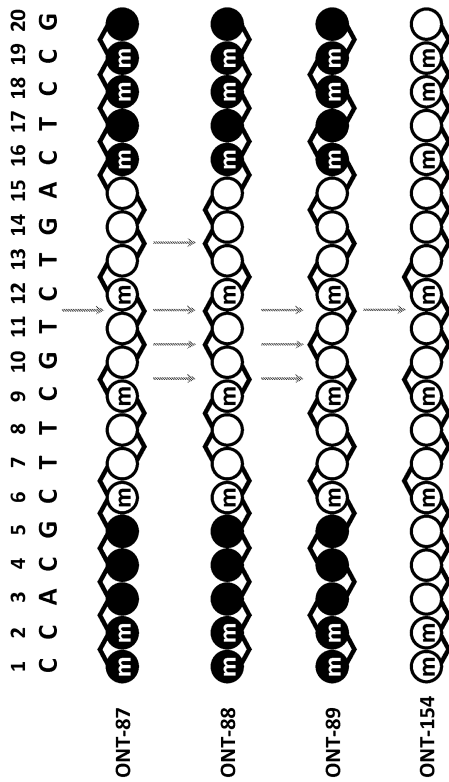
(ハネル A)
FIG. 9

【 図 9 B 】



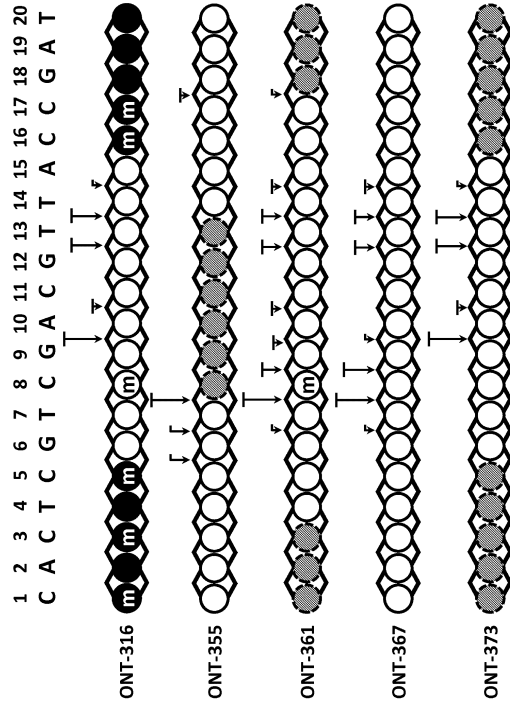
(ハネル B)
FIG. 9 (連続)

【 図 9 C 】



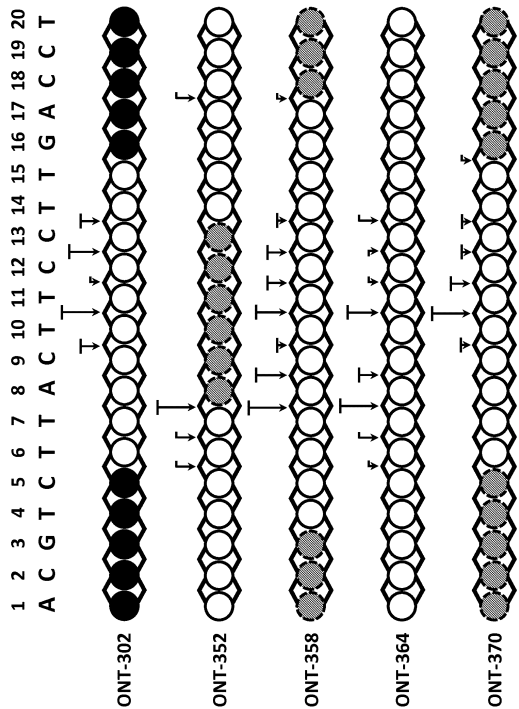
(ハネル C)
FIG. 9 (連続)

【 図 10 A 】



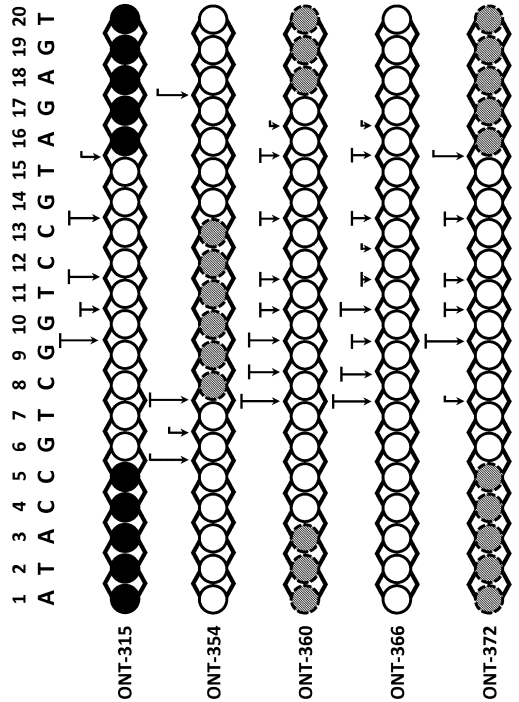
(ハネル A)
FIG. 10

【 図 1 0 B 】



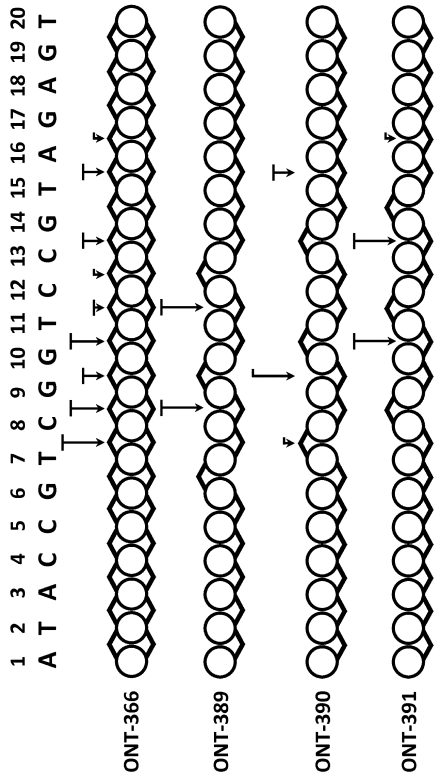
(ハネル B)
 FIG. 10 (連続)

【 図 1 0 C 】



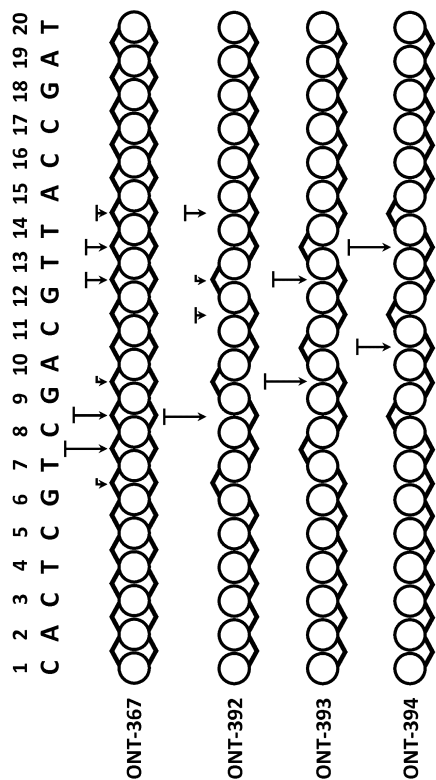
(ハネル C)
 FIG. 10 (連続)

【 図 1 1 A 】



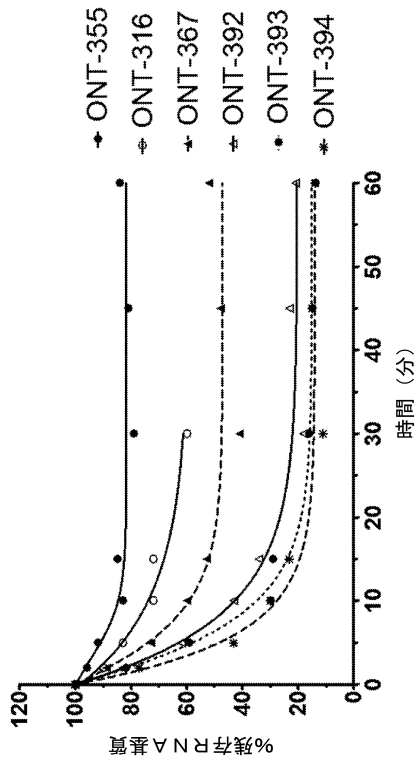
(ハネル A)
 FIG. 11

【 図 1 1 B 】



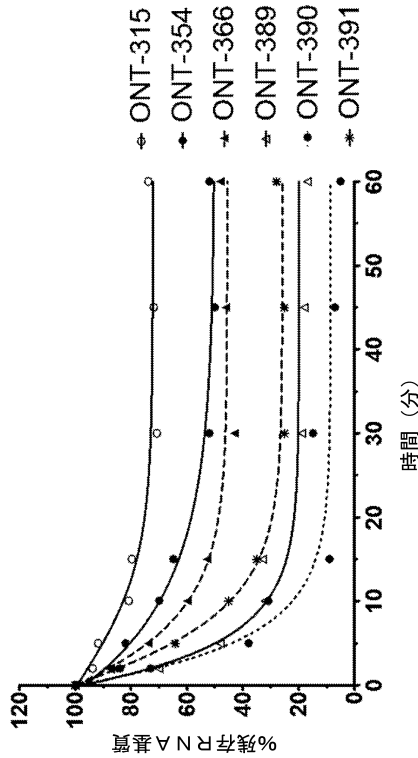
(ハネル B)
 FIG. 11 (連続)

【 図 1 2 A 】



(ハネル A)
FIG. 12

【 図 1 2 B 】



(ハネル B)
FIG. 12 (連続)

【 図 1 3 】

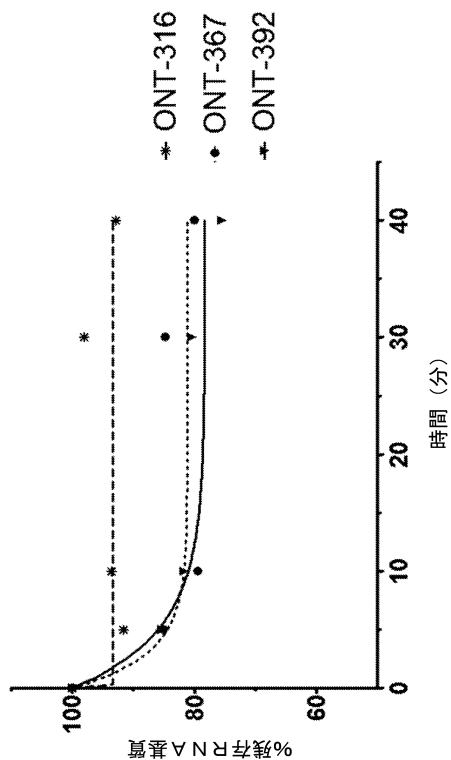


FIG. 13

【 図 1 4 】

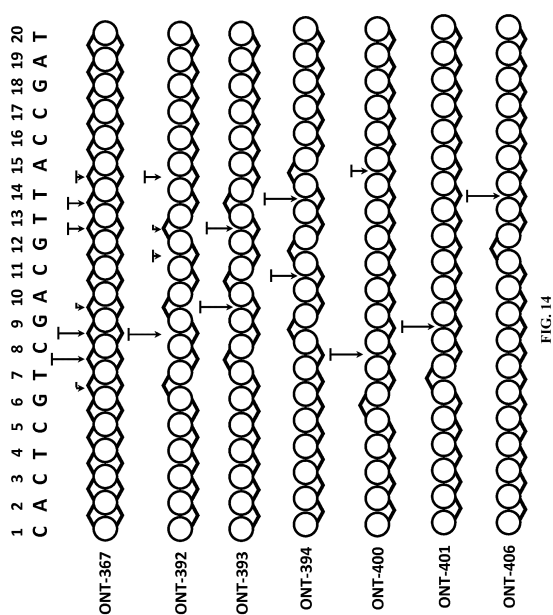


FIG. 14

【 図 15 】

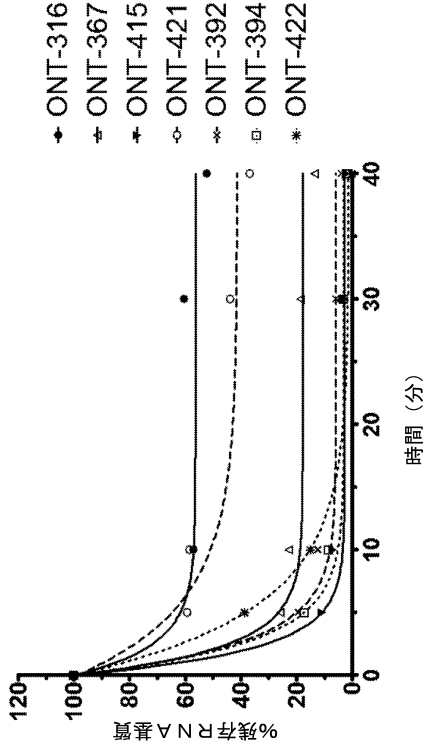


FIG. 15

【 図 16 】

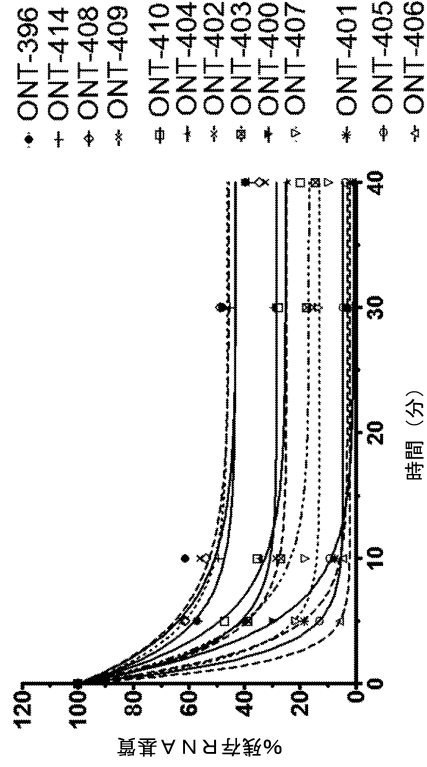


FIG. 16

【 図 17 】

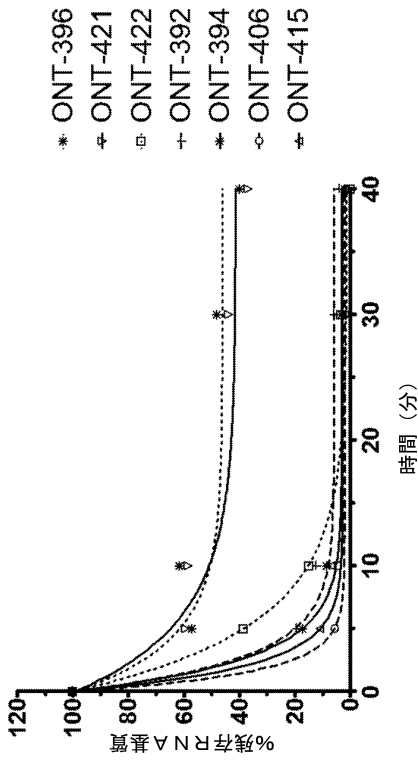


FIG. 17

【 図 18 】

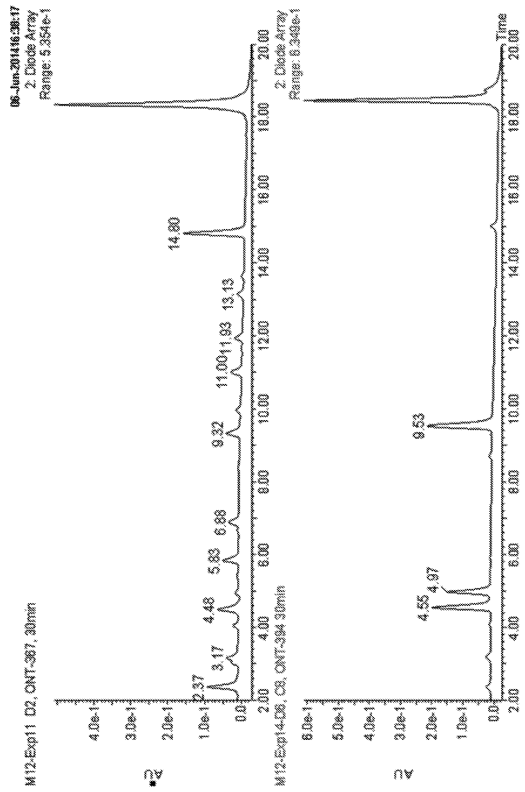


FIG. 18

【 図 19 】

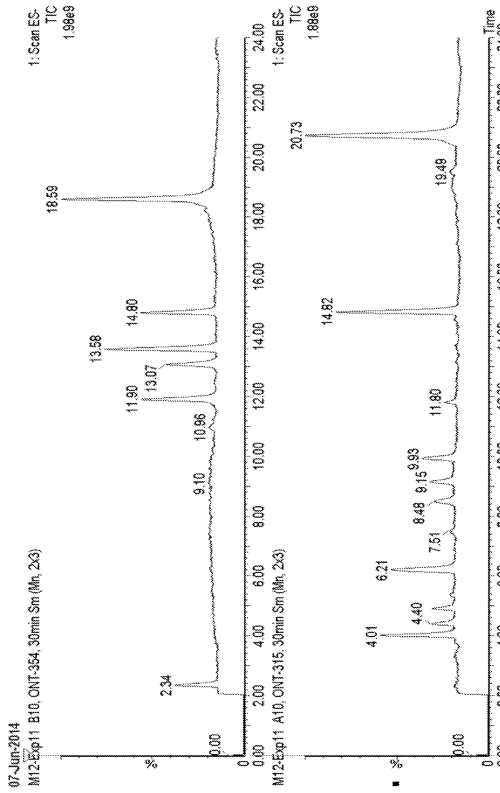


FIG. 19

【 図 20 】

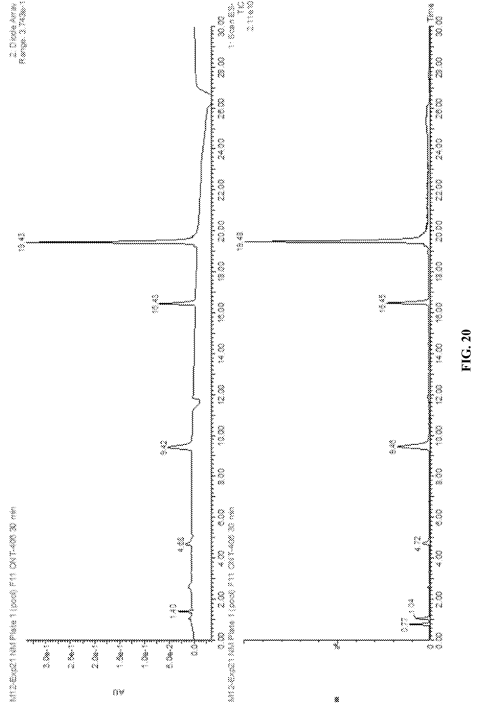


FIG. 20

【 図 21 】

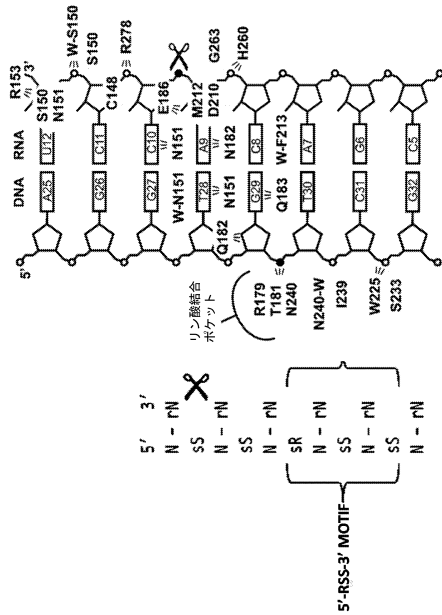
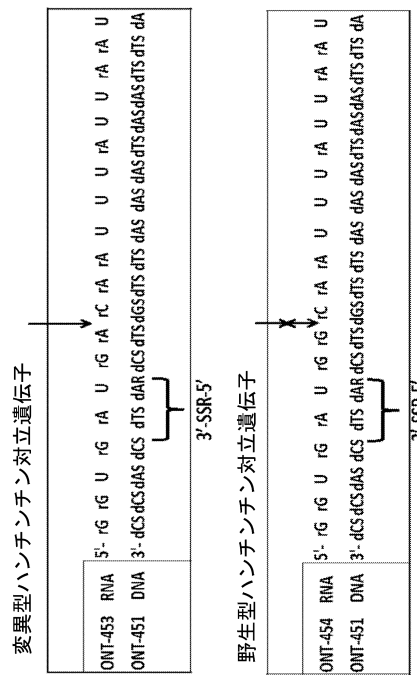


FIG. 21

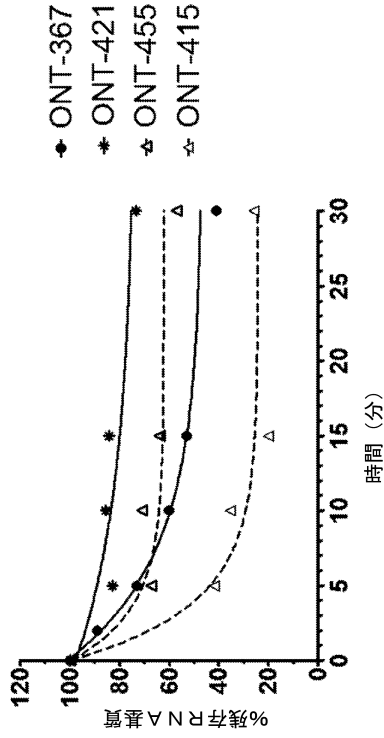
【 図 22 A 】



(ハナセルA)

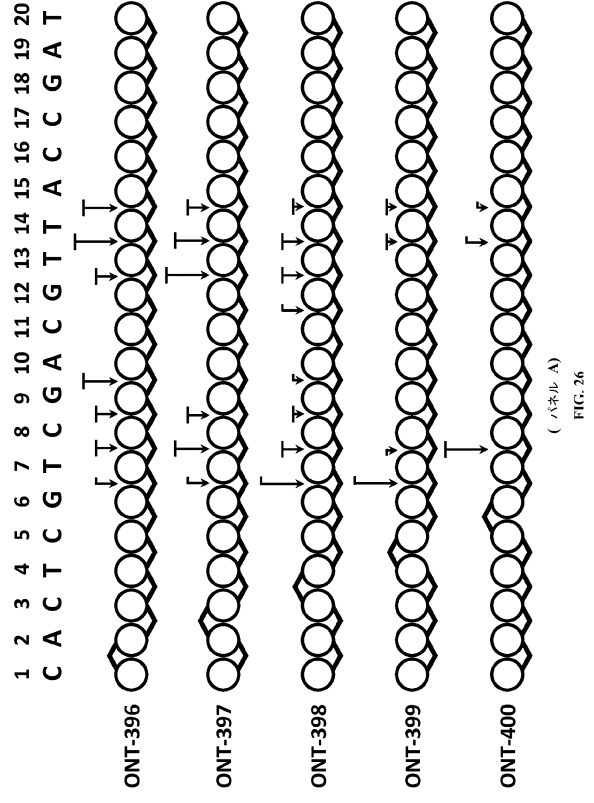
FIG. 22

【 図 2 5 B 】



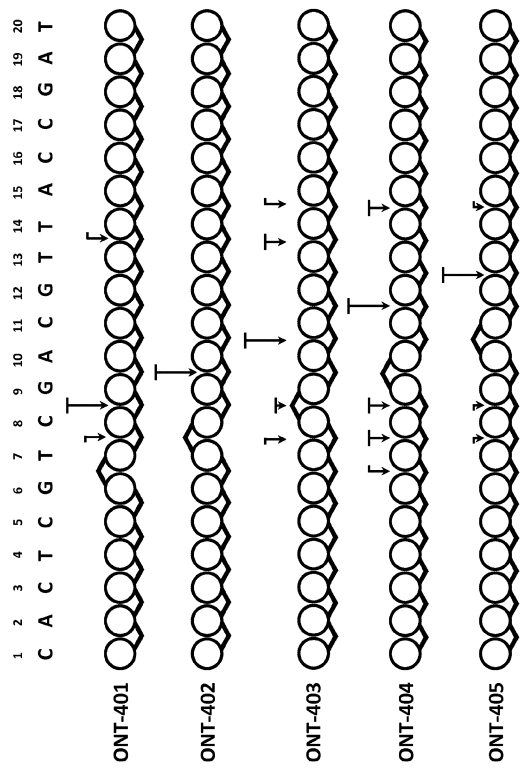
(ハネル B)
FIG. 25 (連続)

【 図 2 6 A 】



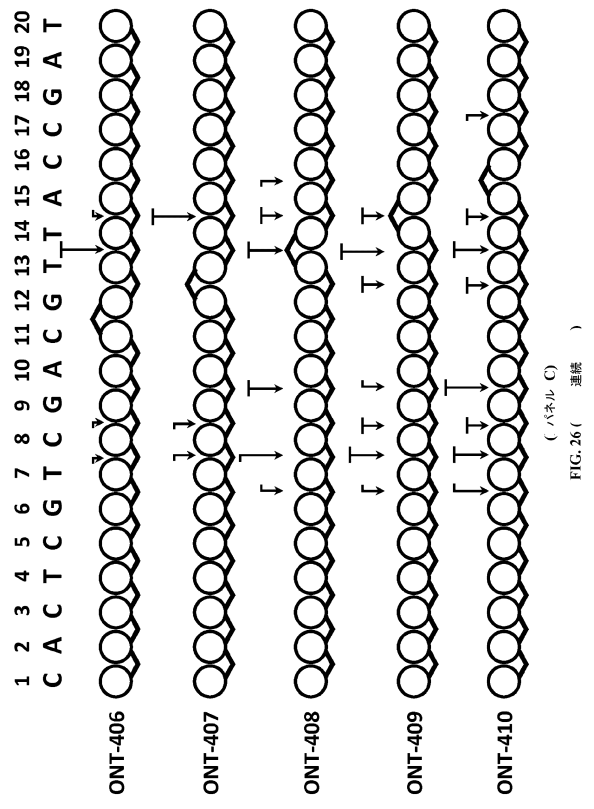
(ハネル A)
FIG. 26

【 図 2 6 B 】



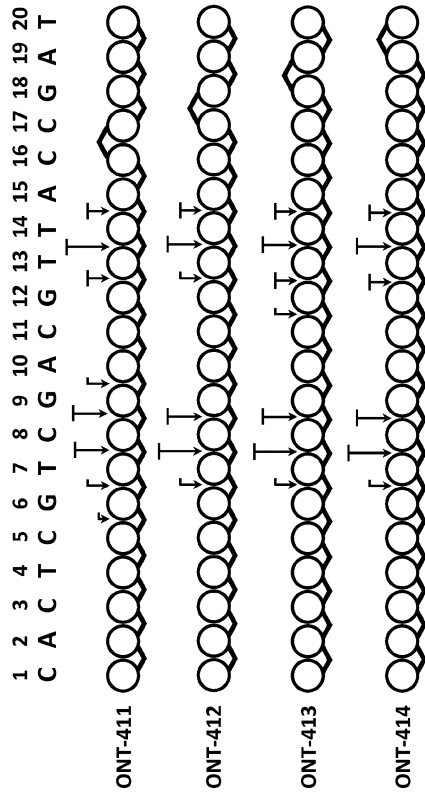
(ハネル B)
FIG. 26 (連続)

【 図 2 6 C 】

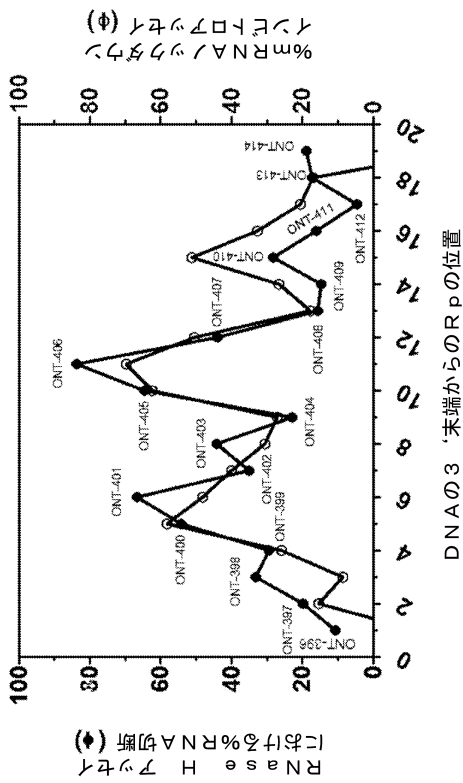


(ハネル C)
FIG. 26 (連続)

【 図 26 D 】

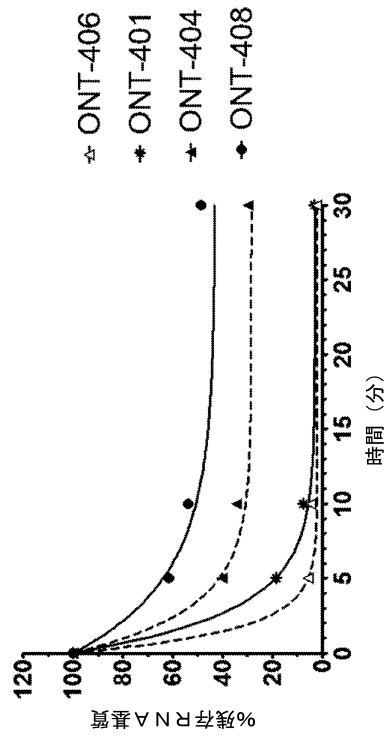


【 図 27 B 】



(ハネル D)
 FIG. 26 (連続)

【 図 27 A 】



(ハネル A)
 FIG. 27

【 図 28 】

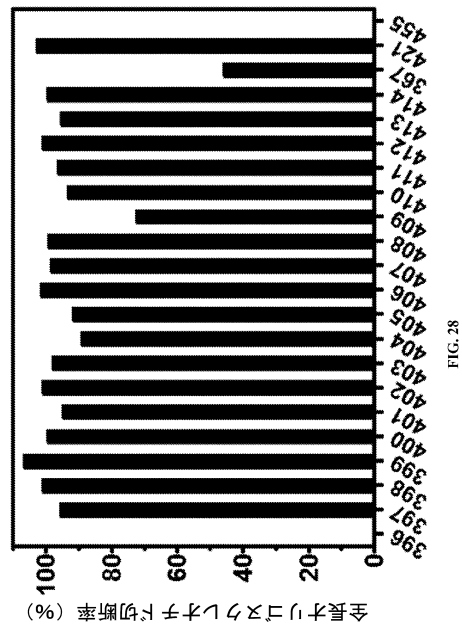
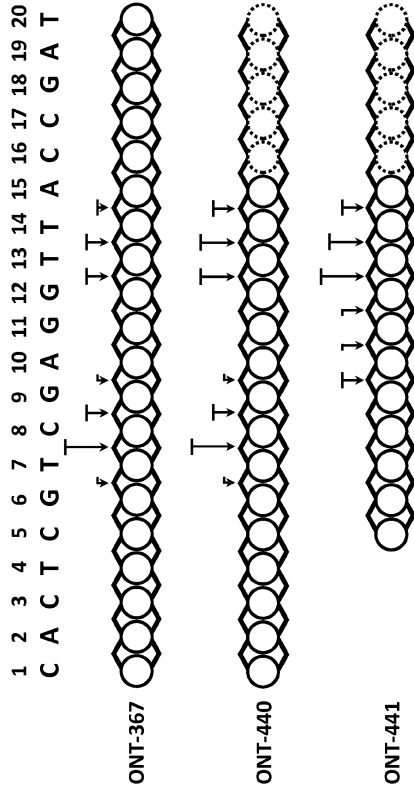


FIG. 28

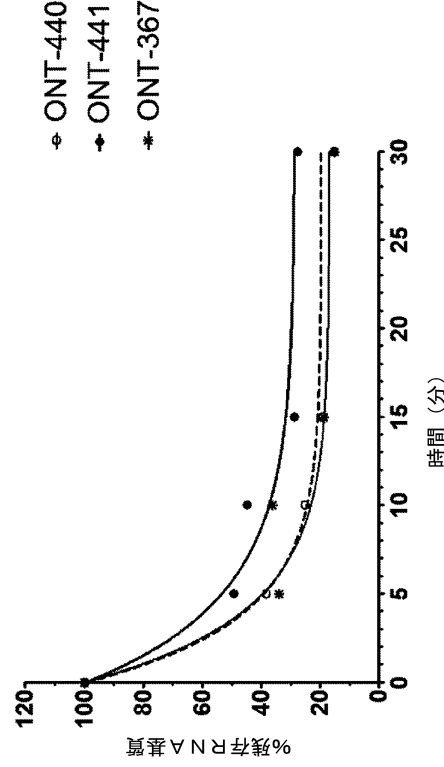
(ハネル B)
 FIG. 27 (連続)

【 図 29 A 】



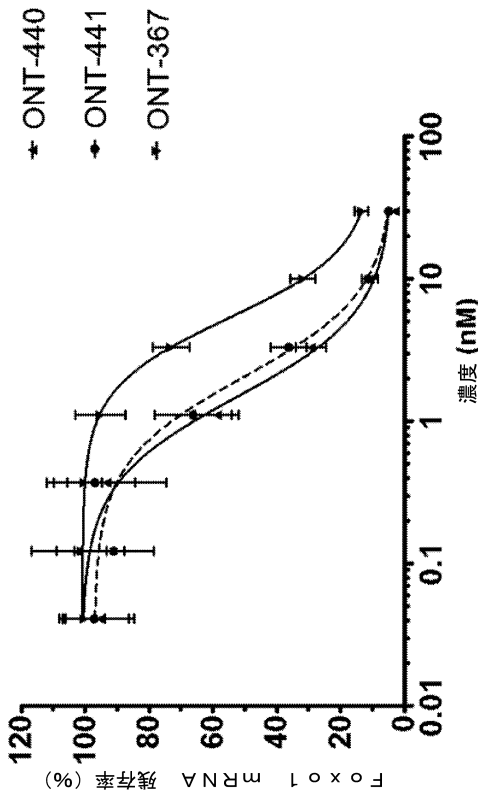
(ハネル A)
FIG. 29

【 図 29 B 】



(ハネル B)
FIG. 29 (連続)

【 図 29 C 】



(ハネル C)
FIG. 29 (連続)

【 図 30 】

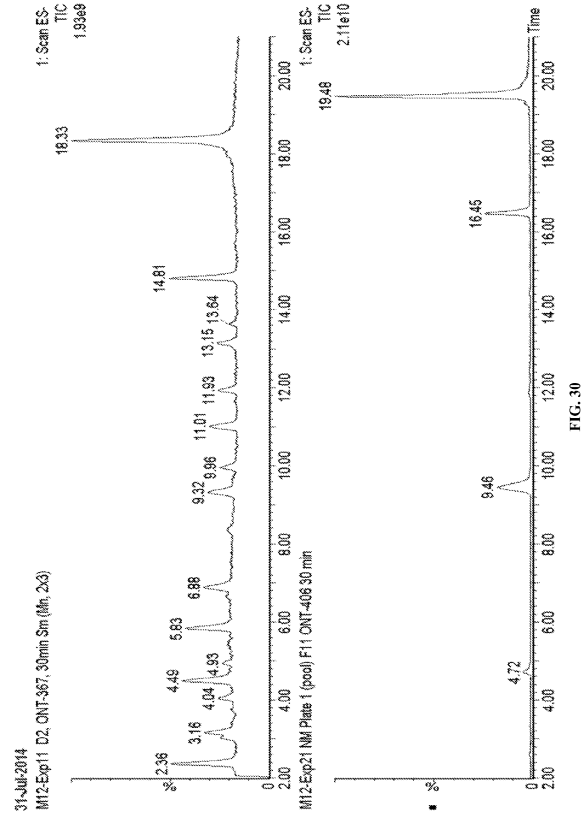


FIG. 30

フロントページの続き

- (72)発明者 バトラー, デビッド
アメリカ合衆国 02155 マサチューセッツ, アパートメント 2 メドフォード, 6 エヴェレット ストリート
- (72)発明者 イワモト, ナオキ
アメリカ合衆国 02135 マサチューセッツ, アパートメント 9 ブライトン, 10 ローティアン ロード
- (72)発明者 シビルジカバ, ネナド
アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ, 35 1/2 キアネード ストリート
- (72)発明者 ヴァーダイン, グレゴリー, エル
アメリカ合衆国 02458 マサチューセッツ, 52 ハイド アベニュー ニュートン
- (72)発明者 ズラテフ, イヴァン
アメリカ合衆国 02138 マサチューセッツ, ケンブリッジ, 220 パンクス ストリート

審査官 小林 薫

- (56)参考文献 特表2002-520420(JP, A)
特開平06-220083(JP, A)
特表平06-511492(JP, A)
FEBS Letters, 2002, Vol. 528, pp. 48-52
Biochemistry, 2000, Vol. 39, pp. 11057-11064
Biochemistry, 2002, Vol. 41, pp. 827-838
Biochemistry, 1999, Vol. 38, pp. 16058-16066

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)