

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2017-536119
(P2017-536119A)**

(43) 公表日 平成29年12月7日(2017.12.7)

| (51) Int.Cl. | F 1 | | | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|--------|---------|---------|-------------|
| C 12 N 15/09 (2006.01) | C 12 N | 15/00 | Z N A A | 4 B 0 5 0 |
| C 12 N 15/113 (2010.01) | C 12 N | 15/00 | G | 4 B 0 6 3 |
| C 12 Q 1/44 (2006.01) | C 12 Q | 1/44 | | 4 C 0 8 4 |
| A 61 K 31/7088 (2006.01) | A 61 K | 31/7088 | | 4 C 0 8 6 |
| A 61 K 48/00 (2006.01) | A 61 K | 48/00 | | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2017-526918 (P2017-526918) | (71) 出願人 | 515129320 ロシュ イノベーション センター コペ ンハーゲン エーエス デンマーク王国 ホルスホルム フレムテ ィズヴァイ 3 |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年11月18日 (2015.11.18) | (74) 代理人 | 100102978 弁理士 清水 初志 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成29年7月4日 (2017.7.4) | (74) 代理人 | 100102118 弁理士 春名 雅夫 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/EP2015/076967 | (74) 代理人 | 100160923 弁理士 山口 裕幸 |
| (87) 國際公開番号 | W02016/079181 | (74) 代理人 | 100119507 弁理士 刑部 俊 |
| (87) 國際公開日 | 平成28年5月26日 (2016.5.26) | (74) 代理人 | 100142929 弁理士 井上 隆一 |
| (31) 優先権主張番号 | 14193887.8 | | |
| (32) 優先日 | 平成26年11月19日 (2014.11.19) | | |
| (33) 優先権主張国 | 歐州特許庁 (EP) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 14198167.0 | | |
| (32) 優先日 | 平成26年12月16日 (2014.12.16) | | |
| (33) 優先権主張国 | 歐州特許庁 (EP) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 15182401.8 | | |
| (32) 優先日 | 平成27年8月25日 (2015.8.25) | | |
| (33) 優先権主張国 | 歐州特許庁 (EP) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】キラルホスホロチオエート連結を含むLNAギャップマーオリゴヌクレオチド

(57) 【要約】

本発明は、立体的に規定されたホスホラミダイト連結を含むLNAギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。LNAギャップマーにおける立体的に規定されたホスホラミダイト連結の使用は、増強されたRNアーゼH活性を提供することが明らかにされており、立体特異性を修飾することで、毒性の低減、体内分布の変更、およびミスマッチ識別力の増強が可能となる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも5個以上の連続ヌクレオシドの中心領域(Y')、ならびに1~6個のLNAまたは $2'$ 置換ヌクレオシドを含む5' ウィング領域(X')および1~6個のLNAまたは $2'$ 置換ヌクレオシドを含む3' ウィング領域(Z')

を含むLNAオリゴヌクレオチドであって、中心領域のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1つが立体的に規定されており、かつ中心領域がRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含み；かつLNAまたは $2'$ 置換ヌクレオシドの領域(X')または(Z')の少なくとも1個がベータ-D-オキシLNAヌクレオシドである、LNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

5' ウィング領域(X')が1~6個のLNAヌクレオシドを含み、かつ3' ウィング領域(Z')が1~6個のLNAヌクレオシドを含む、請求項1に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結のうち1、2、3、4または5箇所だけが立体的に規定されたホスホロチオエート連結であり、残りのヌクレオシド間連結が無作為にRpまたはSpである、請求項1または2に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結のすべてが立体的に規定されたホスホロチオエート連結である、請求項1または2に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

中心領域(Y')が、少なくとも5個の、ホスホロチオエート連結した連続DNAヌクレオシドを含む、請求項1~4のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

中心領域が少なくとも8または9 DNAヌクレオシド長である、請求項1~5のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結が独立にRpまたはSpホスホロチオエート連結のいずれかであり、かつウィング領域(X' または Z')の少なくとも1つが、LNAヌクレオシドとそれに続く(3')ヌクレオシドとの間の少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結を含む、請求項1~6のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

ヌクレオチド対の他のヌクレオシドが、DNA以外、例えばヌクレオシド類縁体、例えばさらなるLNAヌクレオシドまたは $2'$ 置換ヌクレオシドである、請求項7記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

中心領域(Y')のヌクレオシド同士を連結している、または領域 Y' の3' ヌクレオシドと3' ウィング(X')の最初のヌクレオシドとを連結している、ヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所が、立体的に規定されたホスホロチオエート連結である、請求項1~8のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

各ウィング領域が1、2または3個のLNAヌクレオシドを含む、請求項1~9のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

少なくとも1つのウィング領域が $2'$ 置換ヌクレオシドを含む、請求項1~10のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

$2'$ 置換ヌクレオシドが $2'$ -O-MOEおよび $2'$ フルオロからなる群より選択される、請求項1~11のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 13】

5' (X') および3' (Z') ウィング領域のヌクレオシドが、LNAヌクレオシド/ヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド、例えばベータ-D-オキシLNAヌクレオシド/ヌクレオチドを含むか、またはそれからなる、請求項1～12のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項14】

ギャップマー(X'-Y'-Z')中のすべてのヌクレオシド間連結がホスホロチオエート連結、例えば立体的に規定されたホスホロチオエート連結である、請求項1～13のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項15】

ギャップ領域Y'が、cc、tg、tc、ac、tt、gt、caおよびgcからなる群より選択されるDNAジヌクレオチドモチーフを含み、ここでジヌクレオチドのDNAヌクレオシドの間のヌクレオシド間連結が、立体的に規定されたホスホラミダイト連結、例えばSpまたはRpのいずれかの立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である、請求項1～14のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

10

【請求項16】

例えば実施例7において提供するRNアーゼH動員アッセイを用いて、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチドと比べると、増強されたヒトRNアーゼH動員活性を有する、請求項1～15のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項17】

非ヌクレオシド部分と共有結合した、請求項1～16のいずれか一項に記載の立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドを含む、結合体。

20

【請求項18】

請求項1～16のいずれか一項に記載の立体的に規定されたホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドまたは請求項17のいずれか一項に記載の結合体、および

薬学的に許容される溶媒(水または食塩水など)、希釈剤、担体、塩またはアジュvantを含む、薬学的組成物。

【請求項19】

医学において用いるための、請求項1～16のいずれか一項に記載の立体的に規定されたホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドまたは請求項17のいずれか一項に記載の結合体。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、立体的に規定されたホスホロチオエート連結を含むベータ-D-オキシLNAギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。ベータ-D-オキシLNAギャップマーにおける立体的に規定されたホスホロチオエート連結の使用は、増強されたRNアーゼH活性を提供することが明らかにされており、立体特異性を修飾することで、毒性の低減、体内分布の変更、およびミスマッチ識別力の増強が可能となる。

40

【背景技術】

【0002】

背景

Kozolkiewicz et al. (NAR 1995 24; 5000-5005) (非特許文献1)は、ホスホロチオエート連結が[全Rp]立体配置、もしくは[全Sp]立体配置、またはジアステレオマーの無作為混合物のいずれかである、15マーのDNAホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを開示している。ハイブリッドまたは[全Sp]オリゴヌクレオチドに比べて、[全Rp]は、RNアーゼH依存性分解に対して「より感受性である」ことが判明し、より高い二重鎖熱安定性を有することが判明した。実用化のために、[全Rp]オリゴはそれらの3'末端で[Sp]ホスホロチオエートによって保護すべきであることが示唆されている。

【0003】

50

Stec et al. (J. Am. Chem. Soc. 1998, 120; 7156-7167) (非特許文献2) は、オキサチアホスホランアプローチによるPS-オリゴの立体制御された合成における使用のための、5'-DMT-デオキシリボヌクレオシド3'-O-(2-チオ-“スピロ”-4,4-ペニタメチレン-1,2,3-オキサチアホスホラン)の新しいモノマーについて報告している。

【0004】

Karwowski et al. (Bioorganic & Med. Chem. Letts. 2001 11; 1001-1003) (非特許文献3) は、LNAジヌクレオシドホスホロチオエートの立体制御された合成のためのオキサチアホスホランアプローチを用いている。R立体異性体ジヌクレオチドはヘビ毒ホスホジエステラーゼによって容易に加水分解された。

【0005】

Krieg et al. (Oligonucleotides 13;491-499) (非特許文献4) は、CpG PS-オリゴによる免疫刺激がそれらのP-キラリティーのキラリティーに依存するかどうかを調査した。CpG PS Rpオリゴは、Spオリゴに比べて、はるかに高いMAPK活性化およびI_B分解の誘導を示した。異なる立体異性体オリゴヌクレオチドの取り込みの差についての証拠はなかった。Rpオリゴヌクレオチドは、急速な分解によると思われる短い持続時間(48時間未満)を有していた。免疫刺激のために、急速な短期使用にはRpキラリティーを有するCpGオリゴ、および長期効果にはSpオリゴが推奨される。

【0006】

Levin et al. Chapter 7 Antisense Drug Technology 2008; 183-215 (非特許文献5) は、ホスホロチオエートのキラリティーについて概観し、特にSp立体異性体のエキソヌクレアーゼ抵抗性により、ホスホロチオエートDNAオリゴヌクレオチドのキラリティーがそれらの薬物動態に大いに影響することを確認している。ホスホロチオエートキラリティーのPK効果は、エキソヌクレアーゼ分解を妨げる3'および5'末端での2'修飾により第二世代ASOにおいてあまり著しくないと報告されているが、おそらくはRp末端残基を有する個々の分子はエキソヌクレアーゼに対してより感受性であると考えられ、すなわち、より長い半減期に関して、末端にSp残基を有する分子はより長い半減期を有するであろう。

【0007】

Wave Life Sciences Poster (TIDES, May 3-6 2014, San Diego) (非特許文献6) : ミポメルセン内の524,288種の可能な異なる立体異性体の計算に基づき、彼らはTm、RNアーゼH動員、親油性、代謝安定性、インビボでの有効性、および特異的活性に関して顕著に異なる7つの立体異性体を例示している。

【0008】

Wan et al., Nucleic Acids Research, November 14, 2014 (非特許文献7) (早期公開) は、ギャップ領域のキラリティーがDNA-オキサザホスホリン(oxazaphospholine)アプローチ(Oka et al., J. Am. Chem. Soc. 2008; 16031-16037 (非特許文献8))を用いて制御された31種のアンチセンスオリゴヌクレオチドを開示し、ギャップマーのギャップ領域におけるPSキラリティーを制御することで、立体的に無作為なPS ASOの混合物に比べて、治療的適用のために著しい利益が提供されることはないと結論付けた。Wanらはさらに、キラルPS ASOの合成および特徴付けに関連するさらなる複雑さおよび費用が、それらの有用性を最小化している。

【0009】

Swayze et al., 2007, NAR 35(2): 687-700 (非特許文献9) は、LNAアンチセンス化合物は動物において効力を改善するが、著しい肝毒性を引き起こすと報告している。WO 2008/049085 (特許文献1) は、LNA隣接領域に2'-O-MOEを含むLNA混合ウイングギャップマーについて報告しており、これらは一定のLNA化合物の毒性を明らかに低減するが、効力を著しく低下させる。

【0010】

WO 2014/012081 (特許文献2) およびWO 2014/010250 (特許文献3) は、オリゴヌクレオチドの合成のためのキラル試薬を提供している。

【0011】

10

20

30

40

50

WO 2015/107425（特許文献4）は、キラルに規定されたオリゴヌクレオチドのキラルデザインについて報告しており、一定のキラルに規定された化合物はRNアーゼH切断パターンを変更し得ることを報告している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】WO 2008/049085

【特許文献2】WO 2014/012081

【特許文献3】WO 2014/010250

【特許文献4】WO 2015/107425

10

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Koziolkiewicz et al. (NAR 1995 24; 5000-5005)

【非特許文献2】Stec et al. (J. Am. Chem. Soc. 1998, 120; 7156-7167)

【非特許文献3】Karwowski et al. (Bioorganic & Med. Chem. Letts. 2001 11; 1001-1003)

【非特許文献4】Krieg et al. (Oligonucleotides 13;491-499)

【非特許文献5】Levin et al. Chapter 7 Antisense Drug Technology 2008; 183-215

【非特許文献6】Wave Life Sciences Poster (TIDES, May 3-6 2014, San Diego)

20

【非特許文献7】Wan et al., Nucleic Acids Research, November 14, 2014

【非特許文献8】Oka et al., J. Am. Chem. Soc. 2008; 16031-16037

【非特許文献9】Swayze et al., 2007, NAR 35(2): 687-700

【発明の概要】

【0014】

本発明は、ギャップ領域内に少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結を含むLNA-ギャップマーオリゴヌクレオチドであって、LNA-ギャップマーが少なくとも1個のベータ-D-オキシLNAヌクレオシドユニットを含む、オリゴヌクレオチドを提供する。

【0015】

本発明は、ギャップ領域内に少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結を含む、12ヌクレオチド長よりも長いLNA-ギャップマーオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの態様において、LNA-ギャップマーは、少なくとも1個のベータ-D-オキシLNAヌクレオシドユニットまたは少なくとも1個のScETヌクレオシドユニットを含む。

30

【0016】

本発明のLNA-ギャップマーオリゴヌクレオチドにおいて、ギャップマーオリゴヌクレオチドは、少なくとも5個以上のDNAヌクレオシドなどの、少なくとも5個以上の連續ヌクレオシドの中心領域(Y')（またはRNアーゼHを動員可能な領域）、ならびにLNAおよび/または2'置換ヌクレオシドなどの、1~6個のヌクレオシド類縁体を含む5'ウイング領域(X')と、LNAおよび/または2'置換ヌクレオシドなどの、1~6個のヌクレオシド類縁体を含む3'ウイング領域(Z')とを含んでもよい。適切には、領域X'およびZ'の少なくとも1つは、ベータ-D-オキシ-LNAヌクレオシドまたはいくつかの態様においてはScETヌクレオシドなどの、LNAヌクレオシドを含む。

40

【0017】

本発明は、少なくとも5個以上の連續ヌクレオシドの中心領域(Y')、ならびに1~6個のLNAヌクレオシドを含む5'ウイング領域(X')、および1~6個のLNAヌクレオシドを含む3'ウイング領域(Z')を含むオリゴヌクレオチドであって、中心領域のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所が立体的に規定されており、かつ中心領域がRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含み、かつオリゴヌクレオチドが少なくとも1個のベータ-D-オキシLNAヌクレオシドユニットを含む、オリゴヌクレオチドを提供する。

50

【0018】

本発明は、本発明のオリゴマーに共有結合された、少なくとも1つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分（「結合部分」）を含む、本発明のオリゴマーを含む結合体をさらに提供する。

【0019】

本発明は、本発明のオリゴマーまたは結合体、および薬学的に許容される溶媒（水または食塩水などの）、希釈剤、担体、塩またはアジュバントを含む、薬学的組成物を提供する。

【0020】

本発明のオリゴマーを含む薬学的および他の組成物も提供する。さらに提供するのは、細胞または組織中の標的核酸、例えば、mRNAまたはマイクロRNAなどのRNAの発現をダウンレギュレートする方法であって、該細胞または組織を、インビトロまたはインビボで、本発明の1つまたは複数のオリゴマー、結合体または組成物の有効量と接触させる段階を含む方法である。10

【0021】

同様に開示するのは、RNAの発現、または過剰発現に関連する疾患または状態を有することが疑われる、またはそれになりやすい動物（非ヒト動物またはヒト）の処置法であって、非ヒト動物またはヒトに、本発明の1つまたは複数のオリゴマー、結合体または薬学的組成物の治療的または予防的有効量を投与することによる方法である。

【0022】

本発明は、細胞または組織中の標的核酸の発現を阻害する（例えば、ダウンレギュレートすることにより）方法であって、細胞または組織を、インビトロまたはインビボで、1つまたは複数のオリゴマー、結合体、またはその薬学的組成物の有効量と接触させて、標的核酸の発現のダウンレギュレーションに影響をおよぼす段階を含む方法を提供する。20

【0023】

本発明は、LNAヌクレオシドとそれに続く(3')ヌクレオシドとの間の少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結を含む、ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドを提供する。そのようなLNAオリゴヌクレオチドは、例えば、本明細書において記載または特許請求するものなどの、LNAギャップマーであってもよい。そのようなオリゴヌクレオチドは立体選択的と記載してもよい。30

【0024】

いくつかの態様において、本発明のLNAオリゴヌクレオチドは、LNAヌクレオシドとそれに続く(3')ヌクレオシドとの間の少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結を含む。立体的に規定されたホスホロチオエート連結を、立体選択的または立体特異的ホスホロチオエート連結と呼んでもよい。

【0025】

いくつかの態様において、本発明のLNAオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオチド対を含み、ここで立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオチド対のヌクレオシドの間のヌクレオシド間連結はRp立体配置またはRs立体配置のいずれかであり、かつここでヌクレオチド対のヌクレオシドのうち少なくとも1つはLNAヌクレオチドである。いくつかの態様において、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオチド対の他のヌクレオシドは、DNA以外、例えばヌクレオシド類縁体、例えばさらなるLNAヌクレオシドまたは2'置換ヌクレオシドである。40

【0026】

本発明は、同じ核酸塩基配列および化学的修飾（立体的に規定されたホスホロチオエート連結以外）を有する立体的に規定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（親）に比べて、インビボまたはインビトロで毒性が低減されている、立体的に規定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの態様において、立体的に規定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチド/立体的に規定されたオリゴヌクレオチドは、LNA-ギャップマーなどのギャップマーであってもよい。毒性の比較のた50

めに、立体的に規定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは親オリゴヌクレオチドに存在する修飾および未修飾ヌクレオシドのパターンを保持する。

【0027】

本発明は、オリゴヌクレオチドにおける立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結の使用を提供し、ここでオリゴヌクレオチドは、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結を含まない同一のオリゴヌクレオチドに比べて、低減された毒性を有する。

【0028】

本発明は、毒性低減オリゴヌクレオチド（立体的に規定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチド）の合成のための、立体制御性ホスホラミダイトモノマーの使用を提供する。

10

【0029】

本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列（親オリゴヌクレオチド）の体内分布を変更する方法であって、

- a. 親オリゴヌクレオチドの中心的核酸塩基配列を保持している、立体的に規定されたオリゴヌクレオチド変種（子オリゴヌクレオチド）のライプラリを作製する段階、
- b. 段階a.で作製したライプラリを、それらの体内分布についてスクリーニングする段階、
- c. 親オリゴヌクレオチドに比べて、変更された（好ましいなどの）体内分布を有する、ライプラリに存在する1つまたは複数の立体的に規定された変種を同定する段階を含む方法を提供する。

20

【0030】

いくつかの態様において、親オリゴヌクレオチドは異なる立体異性体の混合物であってもよく、したがって本発明の方法は、親オリゴヌクレオチドに比べて、低減された毒性、増強された特異性、変更された体内分布、増強された効力などの、1つまたは複数の改善された特性を有する、個々の立体的に規定されたオリゴヌクレオチド、または個々の立体異性体（子オリゴヌクレオチド）を同定する方法を含み得ることが理解される。

【0031】

いくつかの態様において、本発明の化合物、または本発明の方法によって同定された化合物は、肝臓への増強された体内分布を有する。

30

【0032】

いくつかの態様において、本発明の化合物、または本発明の方法によって同定された化合物は、増強された肝臓/腎臓体内分布比を有する。

【0033】

いくつかの態様において、本発明の化合物、または本発明の方法によって同定された化合物は、増強された腎臓/肝臓体内分布比を有する。

【0034】

いくつかの態様において、本発明の化合物、または本発明の方法によって同定された化合物は、腎臓への増強された体内分布を有する。

40

【0035】

いくつかの態様において、本発明の化合物、または本発明の方法によって同定された化合物は、肝細胞での増強された細胞への取込を有する。

【0036】

いくつかの態様において、本発明の化合物、または本発明の方法によって同定された化合物は、腎細胞での増強された細胞への取込を有する。

【0037】

増強された機能特性を有する化合物に言及する場合、増強は、それ以外は同一の、立体的に規定されていないオリゴヌクレオチドなどの、親オリゴヌクレオチドに関してなされていてもよい。

【0038】

50

体内分布試験は典型的にはインピボで実施するが、例えば、異なる種類の細胞中、例えば、インピトロでの肝細胞（例えば、初代肝細胞）または腎細胞（例えば、PTEC-TERT1細胞などの腎上皮細胞）での細胞への取込を比較することにより、インピトロ系で実施してもよい。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】本発明のLNAオリゴヌクレオチドの概略図。図は、15箇所のヌクレオシド間ホスホロチオエート連結を有する3'-10'-3'ギャップマーオリゴヌクレオチドを示す。ウィング領域X'およびY'におけるヌクレオシド間連結は本明細書に記載のとおりであってもよく、例えば、無作為にRpまたはSpホスホロチオエート連結であってもよい。図1の表部分は、ギャップ領域Y'のすべてのヌクレオシド間連結も無作為に組み込まれたRpまたはSpホスホロチオエート連結（M）である親化合物（P）を提供し、化合物1～10では、ホスホロチオエート連結のうち1箇所がRpホスホロチオエートヌクレオシド間連結（R）として立体的に規定されている。

【図2】化合物1～10において、ホスホロチオエート連結のうち1箇所がSpホスホロチオエートヌクレオシド間連結（S）として立体的に規定されている以外は、図1のとおり。

【図3】3箇所のホスホロチオエートヌクレオシド間連結が、S（化合物#10）またはR（化合物#14）立体配置のいずれかに固定されているLNAオリゴヌクレオチドの肝毒性の可能性（ALT）を、すべてのヌクレオシド間連結がRおよびS立体配置の混合物であるジアステレオ異性体の親混合物（化合物#1）のALTと比較した。

【図4 a】肝臓中のオリゴヌクレオチド含有量。

【図4 b】腎臓中のオリゴヌクレオチド含有量。

【図4 c】脾臓中のオリゴヌクレオチド含有量。

【図5】それぞれのLNAで3日間処理した細胞の、上清中のLDHレベルおよび細胞内ATPレベルの変化。標的ノックダウン（Myd88）を48時間後に評価した。

【図6】初代肝細胞におけるインピトロ毒性スクリーニング：それぞれのLNAで3日間処理した細胞の、上清中のLDHレベルおよび細胞内ATPレベルの変化。データは平均値であり、媒体対照に対する割合（%）として表す（#56についてはn=4実験の三つ組で、他のLNAについてはすべてn=2実験の三つ組）。

【図7】腎臓近位尿細管細胞におけるインピトロ毒性スクリーニング：10 μMおよび30 μMのLNA Myd88立体変種で処理したPTEC-TERT1の、9日後に測定した生存度（細胞ATP）。

【発明を実施するための形態】

【0040】

発明の詳細な説明

オリゴマー

本発明は、細胞内で標的核酸を阻害するなどの、調節を行う際に用いるためのオリゴマー化合物（本明細書においてオリゴマーまたはオリゴヌクレオチドとも呼ぶ）を提供する。オリゴマーはギャップマーオリゴヌクレオチドであってもよい。

【0041】

いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは10～20ヌクレオチド長、例えば10～16ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは12～20または12～24ヌクレオチド長、例えば12～20または12～24ヌクレオチド長である。

【0042】

少なくとも1つのLNAヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドは、本明細書においてLNAオリゴヌクレオチドまたはLNAオリゴマーと呼ばれ得る。

【0043】

本発明は、少なくとも5個以上の連続ヌクレオシドの中心領域（Y'）、ならびに1～6個のLNAまたは2'置換ヌクレオシドを含む5' ウィング領域（X'）および1～6個のLNAまたは2'置換ヌクレオシドを含む3' ウィング領域（Z'）を含むギャップマーオリゴヌクレオチドで

あって、中心領域のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所が立体的に規定されており、かつ中心領域がRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含み；かつLNAまたは2'置換ヌクレオシドの領域(X')または(Z')の少なくとも1個がベータ-D-オキシLNAヌクレオシドである、オリゴヌクレオチドを提供する。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドはLNAオリゴヌクレオチドである。

【0044】

本発明のギャップマーオリゴヌクレオチドは、RNアーゼHを動員可能な少なくとも5個以上の連續ヌクレオシドの中心領域(Y')、ならびに1~6個のLNAヌクレオシドを含む5'ウイング領域(X')および1~6個のLNAヌクレオシドを含む3'ウイング領域(Z')を含んでもよく、ここで中心領域のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所は立体的に規定されており、かつここで中心領域はRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含む。適切には、領域Y'は6、7、8、9、10、11または12個（またはいくつかの態様において13、14、15または16個）の連續ヌクレオチド、例えばDNAヌクレオチドを有してもよく、かつ領域Y'に隣接する領域X'およびZ'のヌクレオチドはLNAヌクレオチドである。いくつかの態様において、領域X'およびZ'は1~6個のヌクレオチドを有し、各側部(X'およびZ')におけるその少なくとも1個はLNAである。いくつかの態様において、領域X'および領域Z'におけるすべてのヌクレオチドはLNAヌクレオチドである。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドはLNAおよびDNAヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、混合ウイングLNAギャップマーであってもよく、ここでウイング領域の1つにおけるLNAヌクレオシドのうち少なくとも1個（または各ウイングにおける少なくとも1個のLNA）はDNAヌクレオシド、または2'置換ヌクレオシド、例えば2'MOEヌクレオシドで置き換えられている。いくつかの態様において、LNAギャップマーはウイング領域において2'置換ヌクレオシドを含まない。

10

20

30

40

【0045】

領域X'-Y'-Z'のヌクレオチドの連續配列におけるヌクレオチドの間のヌクレオシド間連結はすべて、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結であってもよい。いくつかの態様において、領域Y'内のヌクレオシド間連結はすべて、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、領域X'およびY'内のヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、領域X'とY'との間および領域Y'とZ'との間のヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、領域X'-Y'-Z'の連續ヌクレオシド内のすべてのヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。

【0046】

オリゴヌクレオチドのギャップ領域における少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結の導入（任意で、LNAヌクレオシドに隣接の、または1つもしくは両方のウイング領域における、少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結の導入を含む）を用いて、オリゴヌクレオチドの生物学的側面を調節してもよく、例えば、毒性側面を調節してもよい。いくつかの態様において、ギャップ領域におけるホスホロチオエート連結のうち2、3、4または5箇所は立体的に規定されている。いくつかの態様において、ギャップ領域における残りのヌクレオシド間連結は立体的に規定されていない：それらはオリゴヌクレオチド種の集団においてRpおよびSpの（例えば、ラセミ）混合物として存在する。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドにおける残りのヌクレオシド間連結は立体的に規定されていない。いくつかの態様において、ギャップ領域におけるすべてのヌクレオシド間連結は立体的に規定されている。本明細書におけるギャップ領域(Y'を呼ぶ)は、RNアーゼHを動員可能なヌクレオチドの領域であり、かつ、例えば、少なくとも5個の連續DNAヌクレオシドの領域であってもよい。いくつかの態様において、ギャップおよびウイング領域におけるすべてのヌクレオシド間連結は立体的に規定されている（すなわち、X'-Y'-Z'内）。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドにおけるすべてのホスホロチオエートヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホス

50

ホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドにおけるすべてのヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。

【0047】

典型的には、オリゴヌクレオチドホスホロチオエートをRpおよびSpホスホロチオエート連結の無作為混合物（ラセミ混合物とも呼ぶ）として合成する。本発明において、ギャップ領域オリゴヌクレオチドのホスホロチオエート連結のうち少なくとも1箇所が立体的に規定されている、すなわち、少なくとも75%、例えば少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも97%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%、または（本質的に）オリゴヌクレオチド試料中に存在するオリゴヌクレオチド分子のすべてで、RpまたはSpのいずれかである、ギャップマー¹⁰ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを提供する。そのようなオリゴヌクレオチドは、立体的に規定されている、立体選択的である、または立体的に特定されていると言ってもよい：それらは立体特異的な少なくとも1箇所のホスホロチオエート連結を含む。立体的に規定されたおよび立体的に特定された/立体選択的、なる用語は、本明細書において交換可能に用いてもよい。立体的に規定された、立体選択的および立体的に特定された、なる用語は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結（RpまたはSp）を記載するために用いてもよく、またはそのようなホスホロチオエートヌクレオシド間連結を含むオリゴヌクレオチドを記載するために用いてもよい。立体的に規定されたオリゴヌクレオチドは、任意の1つの位置で少量の別の立体異性体を含み得ることが理解され、例えば、Wanらは、NAR, November 2014において報告したギャップマーの98%の立体選択性を報告している。²⁰

【0048】

いくつかの態様において、オリゴマーのギャップ領域における連結のうち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15箇所は、立体的に規定されたホスホロチオエート連結である。

【0049】

いくつかの態様において、オリゴマー中の連結の5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%は、立体的に規定されたホスホロチオエート連結である。いくつかの態様において、オリゴマー中のすべてのホスホロチオエート連結は、立体的に規定されたホスホロチオエート連結である。いくつかの態様において、オリゴマーのすべてのヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホスホロチオエート連結である。立体的に規定された（立体特異性）とは、規定されたヌクレオシド間連結におけるRpまたはSpヌクレオシド間連結のいずれかの高い比率、すなわち、少なくとも75%の組み込みを意味することが理解されるべきである。³⁰

【0050】

LNAモノマー（二環式核酸、BNAとも呼ぶ）は、リボース環の2'位と4'位との間にビラジカルがあるヌクレオシドである。2' - 4'ビラジカルは架橋とも呼ぶ。LNAモノマーは、オリゴヌクレオチドに組み込まれた場合、オリゴヌクレオチドの相補的DNAまたはRNA配列への結合親和性を増強することが公知であり、典型的にはオリゴヌクレオチド/標的二重鎖を融解するために必要な温度（T_m）の上昇として測定または計算される。⁴⁰

【0051】

LNAオリゴマーは、少なくとも1つの「ロックド核酸」（LNA）ヌクレオシド、例えば2'位と4'位との間に共有結合架橋（ラジカルとも呼ぶ）（2' - 4'架橋）を含むヌクレオシドを含む。LNAヌクレオシドは「二環式ヌクレオシド」とも呼ぶ。LNAオリゴマーは、典型的には、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0052】

いくつかの態様において、LNAオリゴマーは、ギャップマーを含むか、またはギャップマーである。いくつかの態様において、オリゴマー中に存在するヌクレオシド類縁体はすべてLNAである。⁵⁰

【0053】

様々な態様において、本発明の化合物はRNA(ユニット)を含まない。いくつかの態様において、オリゴマーは、線状分子であるか、または線状分子として合成される、単一の連続配列を有する。したがって、オリゴマーは、一本鎖分子であってもよい。いくつかの態様において、オリゴマーは、同じオリゴマー内の同等の領域に相補的な、例えば、少なくとも3、4または5個の連続ヌクレオチドの短い領域(すなわち、二重鎖)を含まない。いくつかの態様において、オリゴマーは(本質的に)二本鎖でなくてもよい。オリゴマーは本質的に二本鎖ではなく、例えばsiRNAではない。いくつかの態様において、オリゴマー化合物は、(実質的に)相補的オリゴヌクレオチドとの二重鎖の形ではなく、例えば、siRNAではない。

10

【0054】

本発明の文脈における「オリゴマー」なる用語は、複数のヌクレオチドの共有結合により生成される分子(すなわち、オリゴヌクレオチド)を意味する。本明細書において、1個のヌクレオチド(ユニット)をモノマーまたはユニットと呼んでもよい。いくつかの態様において、「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」、「ユニット」および「モノマー」なる用語は交換可能に用いられる。ヌクレオチドまたはモノマーの配列に言及する場合、言及されるものは、A、T、G、CまたはUなどの、塩基の配列であることが理解されよう。モノマーなる用語は本明細書において、オリゴヌクレオチドの各ユニット(ヌクレオシド/ヌクレオチド)ならびにオリゴヌクレオチド合成において用いられる(ホスホラミダイト)モノマーの両方を記載するために用いる。

20

【0055】

利点

RNアーゼH動員

実施例に示すとおり、いくつかの態様において、本発明の立体的に規定されたオリゴヌクレオチドは、そうではなく立体的に規定されていないオリゴヌクレオチド(親オリゴヌクレオチド)に比べて、増強されたRNアーゼH動員活性を有する。事実、本発明者らは、一般に、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結の、RNアーゼH動員LNAオリゴヌクレオチド、例えば、LNAギャップマーオリゴヌクレオチドへの導入が、親(立体的に規定されていない)の活性の最大30倍までの、増強されたRNアーゼH動員活性をもたらすことを見出で驚いた。したがって、本発明は、それ以外は同一の、立体的に規定されていないオリゴヌクレオチドに比べて、RNアーゼH動員活性が増強されたオリゴヌクレオチドの合成のための、立体制御された(立体特異的とも呼ぶ)ホスホラミダイトモノマーの使用を提供する。

30

【0056】

本発明は、RNA標的にに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド配列(親オリゴヌクレオチド)のRNアーゼH動員活性を増強するための方法であって:

- 親オリゴヌクレオチドの中心的核酸塩基配列を保持している、立体的に規定されたオリゴヌクレオチド変種(子オリゴヌクレオチド)のライプラリを作製する段階
- 段階a.で作製したライプラリを、RNA標的にに対するそれらのインピトロRNアーゼH動員活性についてスクリーニングする段階、
- 親オリゴヌクレオチドに比べて、増強されたRNアーゼH動員活性を有する、ライプラリに存在する1つまたは複数の立体的に規定された変種を同定する段階
- 任意で、段階c.で同定した立体的に規定された変種のうち少なくとも1つを製造する段階

40

を含む方法を提供する。

【0057】

本発明は、それ以外は同一の、立体的に規定されていないLNAオリゴヌクレオチド(または親オリゴヌクレオチド)に比べて、増強されたRNアーゼH動員活性を有するLNAオリゴヌクレオチドを提供する。

50

【0058】

それ以外は同一の、立体的に規定されていないLNAオリゴヌクレオチド（例えば、親オリゴヌクレオチド）は、同じ核酸塩基配列および立体的に規定されたホスホロチオエート連結以外の化学的修飾を有する、立体的に規定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである。立体的に規定されていないLNAオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結以外の化合物の部分、例えば、ヌクレオシド内に、立体的に規定された中心を含んでもよい。

【0059】

LNAオリゴヌクレオチドにおけるキラルに規定されたホスホロチオエート連結の使用は、驚くことに、RNアーゼH活性の増大をもたらす。これは、ギャップ領域が立体的に規定されたRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含む場合に見られると考えられる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのギャップ領域は、少なくとも2箇所のRpおよび少なくとも2箇所のSpの、立体的に規定されたヌクレオシド間連結を含む。いくつかの態様において、そのギャップ領域内の立体的に規定されたヌクレオシド間連結（ワインディング領域に隣接するヌクレオシド間連結を含む）のRp対Spの比率は、約0.25～約0.75の間である。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのギャップ領域は、立体的に規定されたRpまたはSpヌクレオシド間連結のいずれかである、少なくとも2箇所の連続ヌクレオシド間連結を含む。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのギャップ領域は、立体的に規定されたRpまたはSpヌクレオシド間連結のいずれかである、少なくとも3箇所の連続ヌクレオシド間連結を含む。

10

【0060】

いくつかの態様において、例えば、実施例7において提供するRNアーゼH動員アッセイを用いて、LNAオリゴヌクレオチドは、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチドに比べて、増強されたヒトRNアーゼH動員活性を有する。いくつかの態様において、RNアーゼH活性の増大は、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチド（例えば、親オリゴヌクレオチド）のRNアーゼH活性の少なくとも2×、例えば少なくとも5×、例えば少なくとも10×である。実施例7は、RNアーゼH活性（RNアーゼH動員とも呼ぶ）を評価するために用い得る、適切なRNアーゼHアッセイを提供する。

20

【0061】

RNアーゼH活性の、活性における顕著な改善は、ギャップ領域がRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含み、かついくつかの態様において、ギャップ領域が少なくとも2箇所のRpヌクレオシド間連結および少なくとも2箇所のSpヌクレオシド間連結、例えば少なくとも3箇所のRpヌクレオシド間連結および/または少なくとも3箇所のSpヌクレオシド間連結を含んでもよい、LNAギャップマー化合物で見出されることが明らかにされている。

30

【0062】

RNアーゼH活性の、活性における顕著な改善は、ギャップ領域のヌクレオシド間連結が立体的に規定されているLNAギャップマー化合物で見出されることが明らかにされている。したがって、いくつかの態様において、LNAヌクレオシドとそれに続く(3')ヌクレオシドとの間の少なくとも1箇所の立体選択的ホスホロチオエート連結を含む、少なくとも1つの立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドがある。いくつかの態様において、領域X'および/またはZ'内のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所はRpヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、オリゴマー中または領域X'中の最も5'端のヌクレオシド間連結はSpヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、隣接領域X'およびZ'は少なくとも1箇所のSpヌクレオシド間連結および少なくとも1箇所のRpヌクレオシド間連結を含む。いくつかの態様において、オリゴマーまたは領域Z'の3'ヌクレオシド間連結はSpヌクレオシド間連結である。

40

【0063】

いくつかの態様において、本発明の立体的に規定されたオリゴヌクレオチドは、そうではなく立体的に規定されていないオリゴヌクレオチドまたは親オリゴヌクレオチドに比べて、改善された効力を有する。

【0064】

50

特異性およびミスマッチ識別力

実施例に示すとおり、いくつかの態様において、本発明の立体的に規定されたオリゴヌクレオチドは、そうではなく立体的に規定されていないオリゴヌクレオチド（親オリゴヌクレオチド）に比べて、増強されたミスマッチ識別力（または増強された標的特異性）を有する。事実、本発明者らは、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結の、RNアーゼH動員LNAオリゴヌクレオチド、例えば、LNAギャップマーオリゴヌクレオチドへの導入が、増強されたミスマッチ識別力（または標的特異性）をもたらし得ることを見出で驚いた。したがって、本発明は、それ以外は同一の、立体的に規定されていないオリゴヌクレオチドに比べて、ミスマッチ識別力（または標的特異性）が増強されたオリゴヌクレオチドの合成のための、立体制御性ホスホロチオエートモノマーの使用を提供する。

【0065】

したがって、本発明は、細胞中のRNA標的に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド配列（親オリゴヌクレオチド）のミスマッチ識別力（または標的特異性）を増強するための方法であって：

- 親オリゴヌクレオチドの中心的核酸塩基配列を保持している、立体的に規定されたオリゴヌクレオチド変種（子オリゴヌクレオチド）のライプラリを作製する段階
- 段階a.で作製したライプラリを、RNA標的に対するそれらの活性および存在する少なくとも1つの他のRNAに対するそれらの活性についてスクリーニングする段階、
- 親オリゴヌクレオチドに比べて、少なくとも1つの他のRNAに対する低減された活性を有する、ライプラリに存在する1つまたは複数の立体的に規定された変種を同定する段階を含む方法を提供する。少なくとも1つの他のRNAに対する低減された活性は、意図する標的/意図しない標的（少なくとも1つの他のRNA）の活性の比として判定してもよい。この方法は、増強されたRNアーゼH動員活性および増強されたミスマッチ識別力（すなわち、増強された標的指向特異性）の両方を有する本発明のオリゴヌクレオチドを同定するために、RNA標的に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド配列（親オリゴヌクレオチド）のRNアーゼH動員活性を増強する方法と組み合わせてもよい。

【0066】

本発明は、それ以外は同一の、立体的に規定されていないLNAオリゴヌクレオチド（または親オリゴヌクレオチド）に比べて、増強されたミスマッチ識別力（または増強された標的特異性）を有するLNAオリゴヌクレオチドを提供する。

【0067】

本発明は、それ以外は同一の、立体的に規定されていないLNAオリゴヌクレオチド（または親オリゴヌクレオチド）に比べて、増強されたRNアーゼH動員活性および増強されたミスマッチ識別力（または増強された標的特異性）を有するLNAオリゴヌクレオチドを提供する。

【0068】

したがって、本発明は、それ以外は同一の、立体的に規定されていないオリゴヌクレオチドに比べて、増強されたミスマッチ識別力（または標的特異性）および増強されたRNアーゼH動員活性を有するオリゴヌクレオチドの合成のための、立体制御性/立体制御された（立体的に規定された、または立体特異的と呼ぶこともできる）ホスホラミダイトモノマーの使用を提供する。

【0069】

いくつかの態様において、立体制御性ホスホラミダイトモノマーはLNA立体特異的ホスホラミダイトモノマーである。いくつかの態様において、立体制御性ホスホラミダイトモノマーはDNA立体制御性ホスホラミダイトモノマーである。いくつかの態様において、立体特異的ホスホラミダイトモノマーは2'修飾立体特異的ホスホラミダイトモノマー、例えば、2'メトキシエチル立体特異的ホスホラミダイトRNAモノマーである。立体特異的ホスホラミダイトモノマーは、いくつかの態様において、オキサザホスホリンモノマー、例えば、DNA-オキサザホスホリンLNA-オキサザホスホリンモノマーであってもよい。いくつか

の態様において、立体特異的ホスホラミダイトモノマーは、A、T、U、C、5-メチル-CまたはG核酸塩基からなる群より選択される核酸塩基を含んでもよい。

【0070】

インビボ最適化

本発明は、インビボ（例えば、薬理学的）有用性のための、遺伝子歩行（gene-walk）により同定したオリゴヌクレオチドなどの、オリゴヌクレオチドを最適化するための方法を提供する。特に、本発明のモノマーを、血清タンパク質結合、体内分布、細胞内取込などの、有益なインビボ特性を増強するため、または毒性もしくは炎症感受性などの望ましくない特性を低減するために、オリゴマーの合成において用いてもよい。

【0071】

低減された毒性

本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列（親オリゴヌクレオチド）の毒性を低減する方法であって：

- a. 親オリゴヌクレオチドの中心的核酸塩基配列を保持している、立体的に規定されたオリゴヌクレオチド変種（子オリゴヌクレオチド）のライプラリを作製する段階、
- b. 段階a.で作製したライプラリを、細胞中でのそれらのインビトロまたはインビボ毒性についてスクリーニングする段階、
- c. 親オリゴヌクレオチドに比べて、細胞中で低減された毒性を有する、ライプラリに存在する1つまたは複数の立体的に規定された変種を同定する段階

を含む方法を提供する。

10

【0072】

いくつかの態様において、低減された毒性は低減された肝毒性である。オリゴヌクレオチドの肝毒性は、インビボで、例えば、マウスにおいて評価してもよい。インビボ肝毒性アッセイは、典型的には、ALT、ASTまたはGGTなどの、肝損傷の血清マーカーの定量に基づく。正常の上限の3倍を超えるレベルをインビボ毒性の指標と考える。インビボ毒性は、マウスで、例えば、30mg/kgの単一用量のオリゴヌクレオチド、および7日後の毒性評価（7日インビボ毒性アッセイ）を用いて評価してもよい。

20

【0073】

細胞毒性の適切なマーカーには、LDHの上昇、または細胞ATPの減少が含まれ、これらのマーカーを、例えば、初代細胞または細胞培養物を用いて、インビトロで細胞毒性を判定するために用いてもよい。肝毒性の判定のために、初代肝細胞を含む、マウスまたはラット肝細胞を用いてもよい。入手可能であれば、ヒト肝細胞などの初代靈長類肝細胞を用いてもよい。マウス肝細胞において、LDHの上昇は毒性の指標である。細胞ATPの低減は毒性の指標である。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、初代マウス肝細胞において、例えば、実施例8において提供するアッセイを用いて判定して、低減されたインビトロ肝毒性を有する。

30

【0074】

いくつかの態様において、低減された毒性は低減された腎毒性である。腎毒性は、血清クレアチニンレベルの上昇、またはkim-1 mRNA/タンパク質の上昇を含む、腎損傷マーカーの使用により、インビボで評価してもよい。適切には、マウスまたは齧歯類を用いてもよい。

40

【0075】

インビトロ腎傷害アッセイを用いて腎毒性を評価してもよく、kim-1 mRNA/タンパク質の上昇、または細胞ATPの変化（減少）を含んでもよい。いくつかの態様において、PTEC-TERT1細胞を用いて、例えば、細胞ATPレベルを測定することにより、インビトロで腎毒性を判定してもよい。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、実施例9において提供するアッセイを用いて、PTEC-TERT1細胞で判定して、低減されたインビトロ腎毒性を有する。

【0076】

毒性を評価するために用い得る、他のインビトロ毒性アッセイには、カスパーゼアッセ

50

イ、および細胞生存度アッセイ、例えば、MTSアッセイが含まれる。いくつかの態様において、本発明の毒性低減オリゴヌクレオチドは、少なくとも1箇所の立体的に規定されたR_pヌクレオチド間連結、例えば少なくとも2、3、または4箇所の立体的に規定されたRpヌクレオチド間連結を含む。実施例は、インビトロおよびインビボで低減された肝毒性を有する、立体的に規定されたRpヌクレオチド間連結を含む化合物を例示する。いくつかの態様において、少なくとも1箇所の立体的に規定されたRpヌクレオチド間連結は、LNAギャップマーのギャップ領域内に存在する。いくつかの態様において、本発明の毒性低減オリゴヌクレオチドは、少なくとも1箇所の立体的に規定されたSpヌクレオチド間連結、例えば少なくとも2、3、または4箇所の立体的に規定されたSpヌクレオチド間連結を含む。実施例は、少なくとも1箇所の立体的に規定されたSpヌクレオシド間連結を含む、低減された腎毒性を有する化合物を例示する。いくつかの態様において、少なくとも1箇所の立体的に規定されたSpヌクレオチド間連結は、LNAギャップマーのギャップ領域内に存在する。

【0077】

本発明は、毒性低減オリゴヌクレオチド、例えば、肝毒性低減または腎毒性低減オリゴヌクレオチドの合成のための立体制御された（立体特異的、または立体的に特定していると呼んでもよい）ホスホラミダイトモノマーの使用を提供する。いくつかの態様において、立体制御されたホスホラミダイトモノマーはLNA立体制御ホスホラミダイトモノマーである。いくつかの態様において、立体制御されたホスホラミダイトモノマーはDNA立体制御ホスホラミダイトモノマーである。いくつかの態様において、立体制御されたホスホラミダイトモノマーは2'修飾立体制御ホスホラミダイトモノマー、例えば、2'メトキシエチル立体制御ホスホラミダイトRNAモノマーである。立体制御されたホスホラミダイトモノマーは、いくつかの態様において、オキサザホスホリンモノマー、例えば、DNA-オキサザホスホリンLNA-オキサザホスホリンモノマーであってもよい。

【0078】

本発明のモノマーを、インビトロまたはインビボでLNAオリゴヌクレオチドの肝毒性を低減するために用いてもよい。

【0079】

LNA肝毒性はモデルマウス系を用いて判定してもよく、例えば、EP 1 984 381を参照されたい。本発明のモノマーを、LNAオリゴヌクレオチドの腎毒性を低減するために用いてもよい。LNA腎毒性はモデルラット系を用いて判定してもよく、Kim-1バイオマーカーを用いて判定することが多い（例えば、WO 2014118267参照）。本発明のモノマーを、インビボでLNAオリゴマーの免疫原性を低減するために用いてもよい。EP 1 984 381によれば、4'-CH₂-O-2'基を有するLNAは特に毒性である。

【0080】

本発明のオリゴヌクレオチドは、改善されたヌクレアーゼ抵抗性、生体内安定性、標的親和性、RNアーゼH活性、および/または親油性を有し得る。したがって、本発明は、インビボでのオリゴマーの活性を増強するための方法ならびにオリゴマーの薬理学的および/または毒物学的側面を改善するための方法の両方を提供する。

【0081】

いくつかの態様において、LNAオリゴヌクレオチドは、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチドに比べて、例えば実施例6において提供するアッセイを用いて測定した、低減されたインビボ肝毒性、または例えば実施例8において提供するアッセイを用いて測定した、低減されたインビトロ肝毒性、または例えば実施例9において提供するアッセイを用いて測定した、低減された腎毒性などの、低減された毒性を有する。低減された毒性は、当技術分野において公知の他の方法、例えば、カスパーゼアッセイおよび初代肝細胞毒性アッセイ（例えば、実施例8）を用いて評価してもよい。

【0082】

標的

オリゴヌクレオチドの標的は、典型的には、生理的条件下でオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ可能な核酸である。標的核酸は、例えば、mRNAまたはマイクロRNAであっても

10

20

30

40

50

よい（標的遺伝子なる用語に含まれる）。そのようなオリゴヌクレオチドを、アンチセンスオリゴヌクレオチドと呼ぶ。

【0083】

適切には、本発明のオリゴマーは標的遺伝子の発現をダウンレギュレート（例えば、低減または除去）可能である。これに関して、本発明のオリゴマーは、典型的には、ヒト細胞などの哺乳動物細胞中の標的遺伝子の阻害に影響をおよぼし得る。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは標的核酸に結合し、正常な発現レベルに比べて少なくとも10%または20%、より好ましくは正常な発現レベル（オリゴマーまたは結合体非存在下での発現レベルなどの）に比べて少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または95%の発現の阻害に影響をおよぼす。いくつかの態様において、そのような調節は、0.04～25nM、例えば0.8～20nMの濃度の本発明の化合物を用いる場合に見られる。同じまたは異なる態様において、発現の阻害は100%未満、例えば98%未満の阻害、95%未満の阻害、90%未満の阻害、80%未満の阻害、例えば70%未満の阻害である。発現レベルの調節は、タンパク質レベルを測定することにより、例えば、標的タンパク質に対して產生させた適切な抗体を用いてのSDS-PAGEと、それに続くウェスタンブロッティングなどの方法により、判定してもよい。または、発現レベルの調節は、mRNAのレベルを測定することにより、例えば、ノーザンブロッティングまたは定量的RT-PCRにより判定することもできる。mRNAレベルにより測定する場合、適切な用量、例えば0.04～25nM、例えば0.8～20nMの濃度を用いる場合のダウンレギュレーションのレベルは、いくつかの態様において、典型的には、本発明の化合物、結合体または組成物非存在下での正常レベルの10～20%のレベルまでである。
10

【0084】

したがって、本発明は、標的タンパク質および/またはRNAを発現している細胞中の標的タンパク質および/または標的RNAの発現をダウンレギュレートまたは阻害する方法であって、該細胞に本発明のオリゴマーまたは結合体を投与して、該細胞中の標的タンパク質またはRNAの発現をダウンレギュレートまたは阻害する段階を含む方法を提供する。適切には、細胞はヒト細胞などの哺乳動物細胞である。投与は、いくつかの態様において、インビトロで行ってもよい。投与は、いくつかの態様において、インビボで行ってもよい。
20

【0085】

オリゴマーは、標的核酸中に存在するヌクレオチド配列の逆相補体に対応する、連続ヌクレオチド配列を含んでもよく、またはそれからなってもよい。
30

【0086】

本発明のオリゴマー（またはその領域）と核酸の標的領域との間の「相補性」の程度を判定する際に、「相補性」（同様に「相同性」または「同一性」）の程度は、オリゴマー（またはその領域）の配列と、それと最もよく整列する標的領域（または標的領域の逆相補体）の配列との間の同一性パーセンテージ（または相同性パーセンテージ）として表す。パーセンテージは、2つの配列間で同一の整列した塩基の数を計数し、オリゴマー中の連続モノマーの総数で除し、かつ100をかけることによって算出する。そのような比較において、ギャップが存在する場合、そのようなギャップは、本発明のオリゴマーと標的領域との間でギャップ内のモノマーの数が異なる区域であるよりも、単なるミスマッチであることが好ましい。
40

【0087】

本明細書において用いられる「相同」および「相同性」なる用語は、「同一性」および「同一」なる用語と交換可能である。

【0088】

「対応の」および「対応する」なる用語は、オリゴマーのヌクレオチド配列（すなわち、核酸塩基または塩基配列）または連続ヌクレオチド配列（第1領域）と、i) 標的タンパク質をコードするmRNAなどの、核酸標的の逆相補体の部分配列のいずれかから選択されるさらなる配列の同等の連続ヌクレオチド配列との間の比較を意味する。WO2014/118267は、治療的に関連する多くの標的mRNA、ならびに本発明を用いて最適化し得るオリゴマー配
50

列を提供する（例えば、表1を参照されたく、NCBI Genbank標準はWO2014/118257に開示されるとおりである）。

【0089】

（表1）

| | |
|---|------------------------|
| 本発明の化合物は下記からなる群より選択される核酸 (例えば、コードするmRNA、またはmiRNA) を標的とし得る | 下記などの疾患または 障害の処置のため |
| AAT | AAT-LivD |
| ALDH2 | アルコール依存 |
| HAMP 経路 | 貧血または炎症/CKD |
| Apo(a) | アテローム性硬化症/高リポタンパク質(a) |
| Myc | 肝臓癌 |
| 5'UTR | HCV |
| 5'UTR & NS5B | HCV |
| NS3 | HCV |
| TMPRSS6 | ヘモクロマトーシス |
| 抗トロンビンIII | 血友病A, B |
| ApoCIII | 高トリグリセリド血症 |
| ANGPTL3 | 高脂血症 |
| MTP | 高脂血症 |
| DGAT2 | NASH |
| ALAS1 | ポルフィリン症 |
| 抗トロンビンIII | 希少出血障害 |
| 血清アミロイドA | SAA-アミロイド症 |
| 第VII因子 | 血栓症 |
| 成長ホルモン受容体 | 先端巨大症 |
| ApoB-100 | 高コレステロール血症 |
| ApoCIII | 高トリグリセリド血症 |
| PCSK9 | 高コレステロール血症 |
| CRP | 炎症性障害 |
| KSP または VEGF | 肝臓癌 |
| PLK1 | 肝臓癌 |
| FGFR4 | 肥満 |
| 第IXa因子 | 血栓症 |
| 第XI因子 | 血栓症 |
| TTR | TTRアミロイド症 |
| GCCR | 2型糖尿病 |
| PTP-1B | 2型糖尿病 |
| GCGR | クッシング症候群 |
| 肝臓グルコース-6-リン酸 トランスポーター-1 | グルコース恒常性、糖尿病、 2型糖尿病 |

【0090】

1つの態様において、標的はMyd88、ApoB、およびPTENからなる群より選択される。

【0091】

「対応するヌクレオチド類縁体」および「対応するヌクレオチド」なる用語は、ヌクレオチド類縁体および天然ヌクレオチド中のヌクレオチドが同一であることを示すことが意図される。例えば、ヌクレオチドの2-デキシリボースユニットがアデニンに連結されている場合、「対応するヌクレオチド類縁体」はアデニンに連結されたペントースユニット（

10

20

30

40

50

2-デオキシリボースとは異なる)を含む。

【0092】

本明細書において用いられる「逆相補体」、「逆相補的」および「逆相補性」なる用語は、「相補体」、「相補的」および「相補性」なる用語と交換可能である。

【0093】

長さ

オリゴマーは、長さが7~30、例えば7~26または8~25、例えば9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25ヌクレオチド、例えば長さが10~20ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列からなってもよく、またはそれを含んでもよい。いくつかの態様において、LNAオリゴマーの長さは10~16ヌクレオチド、例えば12、13または14ヌクレオシドである。

10

【0094】

いくつかの態様において、オリゴマーは、長さが合計10~22、例えば12~18、例えば13~17または12~16、例えば13、14、15、16連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる。

【0095】

いくつかの態様において、オリゴマーは、長さが合計10、11、12、13、または14連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる。

【0096】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、22以下のヌクレオチド、例えば20以下のヌクレオチド、例えば18以下のヌクレオチド、例えば15、16または17ヌクレオチドからなる。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、20未満のヌクレオチドを含む。オリゴマー、または連続ヌクレオチド配列の長さの範囲が示される場合、それは範囲に示される下限および上限の長さを含む、例えば、10~30(またはその間)は、10および30の両方を含むことが理解されるべきである。

20

【0097】

いくつかの態様において、オリゴマーは、20未満、例えば18未満、例えば16以下または15もしくは14以下の長さを有する。LNAオリゴマーは20未満の長さを有することが多い。

【0098】

いくつかの態様において、オリゴマーは、長さが合計10、11、12、13、または14連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる。

30

【0099】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、22以下のヌクレオチド、例えば20以下のヌクレオチド、例えば18以下のヌクレオチド、例えば15、16または17ヌクレオチドからなる。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、20未満のヌクレオチドを含む。オリゴマー、または連続ヌクレオチド配列の長さの範囲が示される場合、それは範囲に示される下限および上限の長さを含む、例えば、10~30(またはその間)は、10および30の両方を含むことが理解されるべきである。

【0100】

スクリーニング法

本発明は、立体的に特定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチド配列の毒性を低減する方法であつて：

a. インビポまたはインビトロで毒性表現型を有する、立体的に特定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチド(親)を提供する段階

b. 親ギャップマーオリゴヌクレオチドの中心的核酸塩基配列を保持している、立体的に特定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチド(子)のライプラリを作製する段階

c. 段階b.で作製したライプラリをインビポまたはインビトロ毒性アッセイでスクリーニングする段階

d. 立体的に特定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチドに比べて、低減された毒性を有する、1つまたは複数の立体的に特定されたホスホロチオエートオリゴヌク

40

50

レオチドを同定する段階
を含む方法を提供する。

【0101】

立体的に特定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、本明細書において開示する、本発明のオリゴヌクレオチドのとおりであってもよい。いくつかの態様において、親オリゴヌクレオチドはギャップマーオリゴヌクレオチド、例えば本明細書において開示するLNAギャップマーオリゴヌクレオチドである。いくつかの態様において、立体的に特定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドのライプラリは、少なくとも2、例えば少なくとも5または少なくとも10または少なくとも15または少なくとも20の立体的に規定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを含む。

10

【0102】

スクリーニング法は、少なくとも1つの他の機能パラメーター、例えば、RNアーゼH動員活性、RNアーゼH切断特異性、体内分布、標的特異性、標的結合親和性、および/またはインビボもしくはインビトロ効力の1つまたは複数について、子オリゴヌクレオチドをスクリーニングする段階をさらに含んでもよい。

【0103】

したがって、本発明の方法を用いて、親オリゴヌクレオチドに関連する毒性を低減してもよい。オリゴヌクレオチドの毒性はインビトロまたはインビボで評価してもよい。インビトロアッセイには、カスパーゼアッセイ（例えば、WO2005/023995に開示されているカスパーゼアッセイ参照）または肝細胞毒性アッセイ（例えば、Soldatow et al., Toxicol Res (Camb). 2013 Jan 1; 2(1): 23-39. 参照）が含まれる。インビボ毒性は、多くの場合、前臨床スクリーニングで、例えば、マウスまたはラットにおいて同定される。インビボ毒性は肝毒性であり、これは典型的には血清中の肝臓トランスアミナーゼレベル、例えば、ALTおよび/もしくはASTを分析することにより測定し、または、例えば、腎毒性であってもよく、これは腎毒性の分子マーカー、例えば、血清クレアチニンレベル、もしくは腎傷害マーカーmRNA、kim-1のレベルを測定することによりアッセイしてもよい。細胞ATPレベルを用いて、肝毒性または腎毒性などの細胞毒性を判定してもよい。

20

【0104】

スクリーニング法により同定した、選択した子オリゴヌクレオチドは、したがって、より安全で有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

30

【0105】

立体制御されたモノマー

立体制御されたモノマーは、オリゴヌクレオチド中の立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結、すなわちSpまたはRpのいずれかを付与する、オリゴヌクレオチド合成において用いられるモノマーである。いくつかの態様において、モノマーはホスホラミダイトなどのアミダイトであってもよい。したがって、モノマーは、いくつかの態様において、立体制御性/制御されたホスホラミダイトなどの、立体性御製/制御されたアミダイトであってもよい。適切なモノマーは実施例、またはOka et al., J. AM. CHEM. SOC. 2008, 130, 16031-16037 9 16031において提供される。同様に、WO 10064146、WO 11 005761、WO 13012758、WO 14010250、WO 14010718、WO 14012081、およびWO 15107425も参照されたい。立体制御された/立体制御性なる用語は本明細書において交換可能に用いられ、立体特異的/立体的に特定されたまたは立体的に規定されたモノマーと呼んでもよい。

40

【0106】

立体制御されたモノマーは、したがって、立体制御された「ホスホロチオエート」モノマーと呼んでもよいため。立体制御された、および立体制御性、なる用語は本明細書において交換可能に用いられる。いくつかの態様において、立体制御性モノマーは、オリゴヌクレオチド合成中に硫化剤と共に用いる場合、新しく組み込んだヌクレオシドの3'側（または伸長したオリゴヌクレオチド鎖の5'側）に立体的に規定されたヌクレオシド間連結を生成する。

50

【0107】

立体的に規定されたホスホロチオエート連結を有するギャップ領域

Wanらにおいて報告されたとおり、ホスホロチオエート連結の無作為ラセミ混合物に比べて、ギャップマー中に全てがRpであるまたは全てがSpであるギャップ領域を導入することに利点はほとんどない。本発明は、少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結の導入がオリゴヌクレオチドの生物学的特性を実質的に改善し得るという、驚くべき利点に基づいており、例えば、利点の項を参照されたい。これは、ギャップ領域中に1箇所またはいくつか、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13もしくは4箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結を導入すること、あるいはすべてのホスホロチオエート連結を立体的に特定することのいずれかによって達成し得る。

10

【0108】

いくつかの態様において、中心領域(Y')のヌクレオシド間連結の1、2、3、4または5箇所だけが立体選択的ホスホロチオエート連結であり、残りのヌクレオシド間連結は無作為にRpまたはSpである。

【0109】

いくつかの態様において、中心領域(Y')のヌクレオシド間連結のすべては立体選択的ホスホロチオエート連結である。

【0110】

いくつかの態様において、中心領域(Y')は少なくとも5個の、ホスホロチオエート連結した連続DNAヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、中心領域は少なくとも8または9 DNAヌクレオシド長である。いくつかの態様において、中心領域は少なくとも10または11 DNAヌクレオシド長である。いくつかの態様において、中心領域は少なくとも12または13 DNAヌクレオシド長である。いくつかの態様において、中心領域は少なくとも14または15 DNAヌクレオシド長である。

20

【0111】

立体選択的DNAモチーフ

本発明者らは以前、あるDNAジヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドの毒性側面に寄与し得ることを特定した(Hagedorn et al., Nucleic Acid Therapeutics 2013, 23; 302-310)。本発明のいくつかの態様において、本明細書に記載のLNAギャップマーオリゴヌクレオチドなどの、アンチセンスオリゴヌクレオチド中のDNAジヌクレオチドの毒性は、DNAジヌクレオチド、特に毒性、例えば、肝毒性に寄与することが公知のジヌクレオチドのDNAヌクレオシドの間に立体選択的ホスホロチオエートヌクレオシド間連結を導入することにより調節してもよい。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、cc、tg、tc、ac、tt、gt、caおよびgcからなる群より選択されるDNAジヌクレオチドモチーフを含み、ここでジヌクレオチドのDNAヌクレオシドの間のヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホスホロチオエート連結、例えばSpまたはRpホスホロチオエートヌクレオシド間連結のいずれかである。典型的には、そのようなジヌクレオチドは、LNAギャップマーオリゴヌクレオチドなどの、ギャップマーオリゴヌクレオチドのギャップ領域内にあってもよい。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、前述のDNAジヌクレオチドモチーフのリストから、独立せずにまたは独立して選択される、少なくとも2つ、例えば少なくとも3つのジヌクレオチドを含む。

30

【0112】

RNアーゼ動員

オリゴマーコンポジットは、翻訳の立体障害、または他の方法などによる、標的mRNAの非RNアーゼ仲介性分解を介して機能し得ることが理解され、いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、RNアーゼHなどのエンドリボヌクレアーゼ(RNアーゼ)を動員することができる。

【0113】

そのようなオリゴマーは、相補的標的RNAと共に二重鎖に形成されるとRNアーゼを動員することができる、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個の連続ヌクレオチドを

40

50

含む、少なくとも6個、例えば少なくとも7個の連続ヌクレオチドユニット、例えば少なくとも8個または少なくとも9個の連続ヌクレオチドユニット(残基)の領域からなる、連続ヌクレオチド配列(領域Y')を含むことが好ましい。RNアーゼを動員することができる連続配列は、本明細書に記載のギャップマーの文脈において言及する領域Y'であってもよい。いくつかの態様において、領域Y'などの、RNアーゼを動員することができる連続配列のサイズは、より大きい、例えば10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20ヌクレオチドのユニットであってもよい。

【0114】

EP 1 222 309は、RNアーゼH活性を判定するためのインピトロでの方法を提供しており、これを用いてRNアーゼHを動員する能力を判定してもよい。オリゴマーは、相補的RNA標的と共に提供された場合に、EP 1 222 309の実施例91～95によって提供される方法を用い、pmol/11分で測定して、同じ塩基配列を有するが、DNAモノマーのみを含み、2'置換はなく、オリゴヌクレオチド中のすべてのモノマーの間にホスホロチオエート連結基を有する、DNAのみのオリゴヌクレオチドを用いて判定した初期速度の少なくとも1%、例えば少なくとも5%、例えば少なくとも10%または20%を超える初期速度を有するならば、RNアーゼHを動員することができると見なされる。10

【0115】

いくつかの態様において、オリゴマーは、相補的RNA標的、およびRNアーゼHと共に提供された場合に、EP 1 222 309の実施例91～95によって提供される方法を用い、pmol/11分で測定して、RNアーゼHの初期速度が、2'置換はなく、オリゴヌクレオチド中のすべてのヌクレオチドの間にホスホロチオエート連結基を有する、等価のDNAのみのオリゴヌクレオチドを用いて判定した初期速度の1%未満、例えば5%未満、例えば10%未満または20%未満であれば、RNアーゼHを動員することができないと見なされる。20

【0116】

他の態様において、オリゴマーは、相補的RNA標的、およびRNアーゼHと共に提供された場合に、EP 1 222 309の実施例91～95によって提供される方法を用い、pmol/11分で測定して、RNアーゼHの初期速度が、2'置換はなく、オリゴヌクレオチド中のすべてのヌクレオチドの間にホスホロチオエート連結基を有する、等価のDNAのみのオリゴヌクレオチドを用いて判定した初期速度の少なくとも20%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも80%であれば、RNアーゼHを動員することができると見なされる30。

【0117】

典型的には、相補的標的RNAと共に二重鎖に形成されると、RNアーゼを動員することができる、連続ヌクレオチドユニットを形成するオリゴマーの領域は、RNA標的と共にDNA/RNA様二重鎖を形成するヌクレオチドユニットからなる。第1の領域などの、本発明のオリゴマーは、ヌクレオチドおよびヌクレオチド類縁体の両方を含むヌクレオチド配列を含んでもよく、かつ、例えれば、ギャップマー、ヘッドマーまたはテールマーの形であってもよい。

【0118】

「ヘッドマー」は、領域X'およびそれに連続する領域Y'を含むオリゴマーと定義され、領域Y'の最も5'端のモノマーが領域X'の最も3'端のモノマーに連結されている。領域X'は非RNアーゼ動員ヌクレオシド類縁体の連続配列を含み、領域Y'はRNアーゼによって認識可能かつ切断可能なDNAモノマーまたはヌクレオシド類縁体モノマーの連続配列(少なくとも7つの連続モノマーなどの)を含む。40

【0119】

「テールマー」は、領域X'およびそれに連続する領域Y'を含むオリゴマーと定義され、領域Y'の最も5'端のモノマーが領域X'の最も3'端のモノマーに連結されている。領域X'はRNアーゼによって認識可能かつ切断可能なDNAモノマーまたはヌクレオシド類縁体モノマーの連続配列(少なくとも7つの連続モノマーなどの)を含み、領域Y'は非RNアーゼ動員ヌクレオシド類縁体の連続配列を含む。50

【0120】

いくつかの態様において、オリゴマーの標的領域に対する親和性を増強することに加えて、いくつかのヌクレオシド類縁体はRNアーゼ（例えば、RNアーゼH）結合および切断も仲介する。-L-LNA（BNA）モノマーはRNアーゼH活性をある程度まで動員するため、いくつかの態様において、-L-LNAモノマーを含むオリゴマーのギャップ領域（例えば、本明細書において言及する領域Y'）は、RNアーゼHによって認識可能かつ切断可能なより少数のモノマーからなり、ミックスマー構造により高い柔軟性が導入される。

【0121】

ギャップマー設計

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、LNAギャップマーを含むか、またはLNAギャップマーである。ギャップマーオリゴマーは、RNアーゼHなどのRNアーゼを動員することができるヌクレオチドの連続配列、例えば本明細書において領域Y'（Y'）と呼ぶ、少なくとも5、6または7個のDNAヌクレオチドの領域を含むオリゴマーであり、ここで領域Y'は5'および3'の両方で、親和性増強ヌクレオチド類縁体、例えば1~6個の親和性増強ヌクレオチド類縁体の領域（これらの領域はそれぞれ領域X'（X'）およびZ'（Z'）と呼ばれる）が、（RNアーゼを動員することができるヌクレオチドの連続配列の5'および3'で）隣接している。ギャップマーの例はWO2004/046160、WO2008/113832、およびWO2007/146511に開示されている。本発明のLNAギャップマーオリゴマーは、領域X'またはZ'に少なくとも1つのLNAヌクレオシド、例えば、領域X'に少なくとも1つのLNAヌクレオシドおよび領域Z'に少なくとも1つのLNAヌクレオチドを含む。

10

20

【0122】

いくつかの態様において、RNアーゼを動員することができるモノマーは、DNAモノマー、アルファ-L-LNAモノマー、C4'アルキル化DNAモノマー（PCT/EP2009/050349およびVester et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2296-2300を参照されたく、参照により本明細書に組み入れられる）、およびUNA（非連結核酸）ヌクレオチド（Fluit et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039を参照されたく、参照により本明細書に組み入れられる）からなる群より選択される。UNAは、典型的には、リボースのC2-C3 C-C結合が除去されて、非ロッド「糖」残基を形成する、非ロッド核酸である。好ましくは、ギャップマーは、式（5'から3'）、X'-Y'-Z'の（ポリ）ヌクレオチド配列を含み、ここで：領域X'（X'）（5'領域ウィング）は少なくとも1個の高親和性ヌクレオチド類縁体、例えば少なくとも1個のLNAユニット、例えば1~6個の親和性増強ヌクレオチド類縁体、例えばLNAユニットからなるか、またはそれらを含み、かつ；領域Y'（Y'）はRNアーゼを動員することができる（mRNA標的などの、相補的RNA分子との二重鎖に形成されると）少なくとも5個の連続ヌクレオチド、例えばDNAヌクレオチドからなるか、またはそれらを含み、かつ；領域Z'（Z'）（3'領域）は少なくとも1個の高親和性ヌクレオチド類縁体、例えば少なくとも1個のLNAユニット、例えば1~6個の親和性増強ヌクレオチド類縁体、例えばLNAユニットからなるか、またはそれらを含む。

30

【0123】

いくつかの態様において、領域X'は1、2、3、4、5もしくは6個のLNAユニット、例えば2~5個のLNAユニット、例えば3個もしくは4個のLNAユニットを含むか、もしくはそれらからなり；かつ/または領域Z'は1、2、3、4、5もしくは6個のLNAユニット、例えば2~5個のLNAユニット、例えば3個もしくは4個のLNAユニットからなるか、もしくはそれらを含む。

40

【0124】

いくつかの態様において、領域X'は1、2、3、4、5もしくは6個の2'置換ヌクレオチド類縁体、例えば2'MOEを含み；かつ/または領域Z'は1、2、3、4、5もしくは6個の2'置換ヌクレオチド類縁体、例えば2'MOEユニットを含む。

【0125】

いくつかの態様において、2'位の置換基はF；CF₃、CN、N₃、NO、NO₂、O-、S-、もしくはN-アルキル；O-、S-、もしくはN-アルケニル；O-、S-もしくはNアルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル、O-アルキル-N-アルキルもしくはN-アルキル-O-アルキルからなる

50

群より選択され、ここでアルキル、アルケニルおよびアルキニルは置換または無置換C₁-C₁₀アルキルまたはC₂-C₁₀アルケニルおよびアルキニルであり得る。2'置換基の例には、nが1~約10である、O(CH₂)OCH₃、およびO(CH₂)NH₂、例えば、MOE、DMAOE、DMAEOEが含まれるが、それらに限定されない。

【0126】

いくつかの態様において、Y'はRNアーゼを動員することができる5、6、7、8、9、10、11もしくは12個の連続ヌクレオチド、またはRNアーゼを動員することができる6~10個、もしくは7~9個、例えば8個の連続ヌクレオチドからなるか、またはそれらを含む。いくつかの態様において、領域Y'は少なくとも1個のDNAヌクレオチドユニット、例えば1~12個のDNAユニット、好ましくは4~12個のDNAユニット、より好ましくは6~10個のDNAユニット、例えば7~10のDNAユニット、例えば8、9または10個のDNAユニットからなるか、またはそれらを含む。
10

【0127】

いくつかの態様において、領域X'は3個または4個のヌクレオチド類縁体、例えばLNAからなり、領域X'は7、8、9または10個のDNAユニットからなり、かつ領域Z'は3個または4個のヌクレオチド類縁体、例えばLNAからなる。そのような設計には(X'-Y'-Z')3-10-3、3-10-4、4-10-3、3-9-3、3-9-4、4-9-3、3-8-3、3-8-4、4-8-3、3-7-3、3-7-4、4-7-3が含まれる。

【0128】

さらなるギャップマー設計はWO2004/046160において開示されており、これは参照により本明細書に組み入れられる。WO2008/113832は、参照により本明細書に組み入れられている米国特許仮出願第60/977,409号からの優先権を主張し、「ショートマー」ギャップマー・オリゴマーに言及している。いくつかの態様において、本明細書において提示するオリゴマーは、そのようなショートマー・ギャップマーであってもよい。
20

【0129】

いくつかの態様において、オリゴマー、例えば、領域X'は、合計10、11、12、13または14ヌクレオチドユニットの連続ヌクレオチド配列からなり、ここで連続ヌクレオチド配列は式(5'-3')、X'-Y'-Z'を含むか、またはこの式のものであり、ここで：X'は1、2または3個の親和性増強ヌクレオチド類縁体ユニット、例えばLNAユニットからなり；Y'は、相補的RNA分子(mRNA標的などの)との二重鎖に形成されると、RNアーゼを動員することができる7、8または9個の連続ヌクレオチドユニットからなり；かつZ'は1、2または3個の親和性増強ヌクレオチド類縁体ユニット、例えばLNAユニットからなる。
30

【0130】

いくつかの態様においてオリゴマーは、合計10、11、12、13、14、15または16ヌクレオチドユニットの連続ヌクレオチド配列を含み、ここで連続ヌクレオチド配列は式(5'-3')、X'-Y'-Z'を含むか、またはこの式のものであり、ここで：X'は1、2、3または4個のLNAユニットを含み；Y'は、相補的RNA分子(mRNA標的などの)との二重鎖に形成されると、RNアーゼを動員することができる7、8、9または10個の連続ヌクレオチドユニット、例えば、DNAヌクレオチドからなり；かつZ'は1、2、3または4個のLNAユニットを含む。
40

【0131】

いくつかの態様において、X'は1個のLNAユニットからなる。いくつかの態様において、X'は2個のLNAユニットからなる。いくつかの態様において、X'は3個のLNAユニットからなる。いくつかの態様において、Z'は1個のLNAユニットからなる。いくつかの態様において、Z'は2個のLNAユニットからなる。いくつかの態様において、Z'は3個のLNAユニットからなる。いくつかの態様において、Y'は7個のヌクレオチドユニットからなる。いくつかの態様において、Y'は8個のヌクレオチドユニットからなる。いくつかの態様において、Y'は9個のヌクレオチドユニットからなる。一定の態様において、領域Y'は1~10個のヌクレオシドモノマーからなる。一定の態様において、領域Y'は1~10個のDNAモノマーからなるか、またはそれらを含む。いくつかの態様において、Y'は1~9個のDNAユニット、例えば2、3、4、5、6、7、8または9個のDNAユニットを含む。いくつかの態様において、Y'はDNAユ
50

ニットからなる。いくつかの態様において、Y'はアルファ-L立体配置の少なくとも1個のLNAユニット、例えばアルファ-L立体配置の2、3、4、5、6、7、8または9個のLNAユニットを含む。いくつかの態様において、Y'は少なくとも1個のアルファ-L-オキシLNAユニットを含み、またはここでアルファ-L立体配置のすべてのLNAユニットはアルファ-L-オキシLNAユニットである。いくつかの態様において、X'-Y'-Z'中に存在するヌクレオチドの数は（ヌクレオチド類縁体ユニット-領域Y'-ヌクレオチド類縁体ユニット）：1-8-1、1-8-2、2-8-1、2-8-2、3-8-3、2-8-3、3-8-2、4-8-1、4-8-2、1-8-4、2-8-4、または；1-9-1、1-9-2、2-9-1、2-9-2、2-9-3、3-9-2、1-9-3、3-9-1、4-9-1、1-9-4、または；1-10-1、1-10-2、2-10-1、2-10-2、1-10-3、3-10-1からなる群より選択される。いくつかの態様において、X'-Y'-Z'中のヌクレオチドの数は：2-7-1、1-7-2、2-7-2、3-7-3、2-7-3、3-7-2、3-7-4、および4-7-3からなる群より選択される。一定の態様において、領域X'およびY'のそれぞれは3個のLNAモノマーからなり、かつ領域Y'は8または9または10個のヌクレオシドモノマー、好ましくはDNAモノマーからなる。いくつかの態様において、X'およびZ'はいずれも、それぞれ2個のLNAユニットからなり、かつY'は8または9個のヌクレオチドユニット、好ましくはDNAユニットからなる。様々な態様において、他のギャップマー設計には、領域X'および/またはZ'が3、4、5または6個のヌクレオシド類縁体、例えば2'-O-メトキシエチル-リボース糖（2'-MOE）を含むモノマーまたは2'-フルオロ-デオキシリボース糖を含むモノマーからなり、かつ領域Y'が8、9、10、11または12個のヌクレオシド、例えばDNAモノマーからなるものであって、領域X'-Y'-Z'は3-9-3、3-10-3、5-10-5または4-12-4モノマーを有するものが含まれる。さらなるギャップマー設計はWO 2007/146511A2に開示されており、参照により本明細書に組み入れられる。

【0132】

本明細書において報告するギャップマー設計において、ギャップ領域（Y'）は1箇所または複数箇所の立体特異的ホスホロチオエート連結を含んでもよく、かつギャップ領域の残りのヌクレオシド間連結は、例えば、非立体特異的ヌクレオシド間連結であってもよく、または立体的に規定されたホスホロチオエート連結であってもよい。ギャップ領域が少なくとも5個の連続DNA（または他のRNアーゼH動員ヌクレオシド）を含まないための、ベータ-D-オキシLNAまたはScETヌクレオシドなどのベータ-D-LNAによるギャップ領域（G）の分裂は、通常はRNアーゼH動員を妨害するが、いくつかの態様において、ギャップの分裂はRNアーゼH動員の保持をもたらし得ることが理解される。これは、典型的には、少なくとも3または4個の連続DNAヌクレオシドの保持によって達成され、典型的には、配列特異的または化合物特異的でさえある - Rukov et al., NAR published online on July 28^t 2015を参照されたく、これは、いくつかの場合には標的RNAのより特異的切断を提供するRNアーゼHを動員する、「ギャップブレーカー」オリゴヌクレオチドを開示している。したがって、いくつかの態様において、領域Gは、ベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを含んでもよい。いくつかの態様において、LNAヌクレオシドが5'または3'で少なくとも3個の（5'）および3個の（3'）または少なくとも3個の（5'）および4個の（3'）または少なくとも4個の（5'）および3個の（3'）DNAヌクレオシドと隣接し、ここでオリゴヌクレオチドはRNアーゼHを動員することができるように、ギャップ領域Gは、ギャップ領域内にLNAヌクレオチド（例えば、ベータ-D-オキシ、ScETまたはアルファ-L-LNA）を含む。

【0133】

ヌクレオチド間連結

本発明のオリゴマーは、少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結を含む。治療のために用いられる化合物の大多数はホスホロチオエートヌクレオチド間連結を用いるが、他のヌクレオシド間連結を用いることもできる。しかし、いくつかの態様において、本発明のオリゴマーのすべてのヌクレオシド間連結はホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、ギャップ領域中の連結はすべてホスホロチオエートであり、かつウイング領域のヌクレオシド間連結はホスホロチオエートまたはホスホジエステル連結のいずれであってもよい。

【0134】

10

20

30

40

50

本明細書に記載のオリゴマーのヌクレオシドモノマーは[ヌクレオシド間]連結基を介して一緒に結合される。適切には、各モノマーは3'隣接モノマーに連結基を介して連結される。

【0135】

当業者であれば、本発明の文脈において、オリゴマーの末端の5'モノマーは5'連結基を含まないが、5'末端基を含んでもよく、または含まなくてもよいことを理解するであろう。

【0136】

「連結基」または「ヌクレオチド間連結」なる用語は、2個のヌクレオチドと一緒に共有結合することができる基を意味することが意図される。具体的かつ好ましい例には、ホスフェート基およびホスホロチオエート基が含まれる。

10

【0137】

本発明のオリゴマーのヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列を、連結基を介して一緒に結合する。適切には、各ヌクレオチドを、連結基を介して3'隣接ヌクレオチドに連結する。

【0138】

適切なヌクレオチド間連結には、WO2007/031091内に挙げられているもの、例えば、WO2007/031091(参照により本明細書に組み入れられる)の34ページの最初のパラグラフに挙げられているヌクレオチド間連結が含まれる。

20

【0139】

いくつかの態様において、ヌクレオチド間連結をその通常のホスホジエステルからヌクレアーゼの攻撃に対してより抵抗性のもの、例えばホスホロチオエートまたはボラノホスフェートへと修飾することが望ましく-これら2種類の連結はRNアーゼHによって切断可能であり、標的遺伝子の発現を低減する際のアンチセンス阻害の経路も可能にする。

【0140】

本明細書において提供される適切な硫黄(S)含有ヌクレオチド間連結、例えばホスホロチオエートまたはホスホジチオエートが好ましいこともある。

【0141】

ギャップマーのために、オリゴマー中のヌクレオチド間連結は、標的化RNAのRNアーゼH切断を可能にするために、例えば、ホスホロチオエートまたはボラノホスフェートであってもよい。ヌクレアーゼ抵抗性の改善、および製造の容易さなどの他の理由のために、ホスホロチオエートが通常は好ましい。

30

【0142】

WO09124238は、中性ヌクレオシド間連結により3'または5'末端に連結された少なくとも1個の二環式ヌクレオシド(LNA)を有するオリゴマー化合物に言及している。したがって、本発明のオリゴマーは、1つまたは複数のホスホトリエステル、メチルホスホネート、M MI、アミド-3、ホルムアセタールまたはチオホルムアセタールなどの、中性ヌクレオシド間連結により3'または5'末端に連結された少なくとも1個の二環式ヌクレオシドを有してもよい。残りの連結はホスホロチオエートであってもよい。

40

【0143】

ヌクレオシドおよびヌクレオシド類縁体

いくつかの態様において、「ヌクレオシド類縁体」および「ヌクレオチド類縁体」なる用語は、交換可能に用いられる。

【0144】

本明細書において用いられる「ヌクレオチド」なる用語は、糖部分、塩基部分およびホスフェートまたはホスホロチオエートヌクレオチド間連結基などの共有結合された基(連結基)を含むグリコシドを意味し、DNAまたはRNAなどの天然ヌクレオチド、および本明細書において「ヌクレオチド類縁体」とも呼ぶ、修飾された糖および/または塩基部分を含む非天然ヌクレオチドの両方を含む。本明細書において、単一ヌクレオチド(ユニット)はモノマーまたは核酸ユニットと呼んでもよい。

50

【 0 1 4 5 】

生化学の分野において、「ヌクレオシド」なる用語は一般に、糖部分および塩基部分を含むグリコシドを指すために用い、したがってオリゴマーのヌクレオチドの間でヌクレオチド間連結により共有結合されているヌクレオチドユニットを指す場合に用いてもよい。バイオテクノロジーの分野において、「ヌクレオチド」なる用語は、核酸モノマーまたはユニットを指すために用いることが多く、したがって、オリゴヌクレオチドの文脈において、塩基を指すこともあり - 例えば、「ヌクレオチド配列」は、典型的には核酸塩基配列を意味する（すなわち、糖骨格およびヌクレオシド間連結の存在が暗に示される）。同様に、特にヌクレオシド間連結基の1つまたは複数が修飾されているオリゴヌクレオチドの場合、「ヌクレオチド」なる用語は「ヌクレオシド」を指すこともあり、例えば、ヌクレオシド間の連結の存在または性質を明記している場合であっても、「ヌクレオチド」なる用語を用いてもよい。

10

【 0 1 4 6 】

当業者であれば理解するであろうとおり、オリゴヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドは5'ヌクレオチド間連結基を含まないが、5'末端基を含んでもよく、または含まなくてもよい。

20

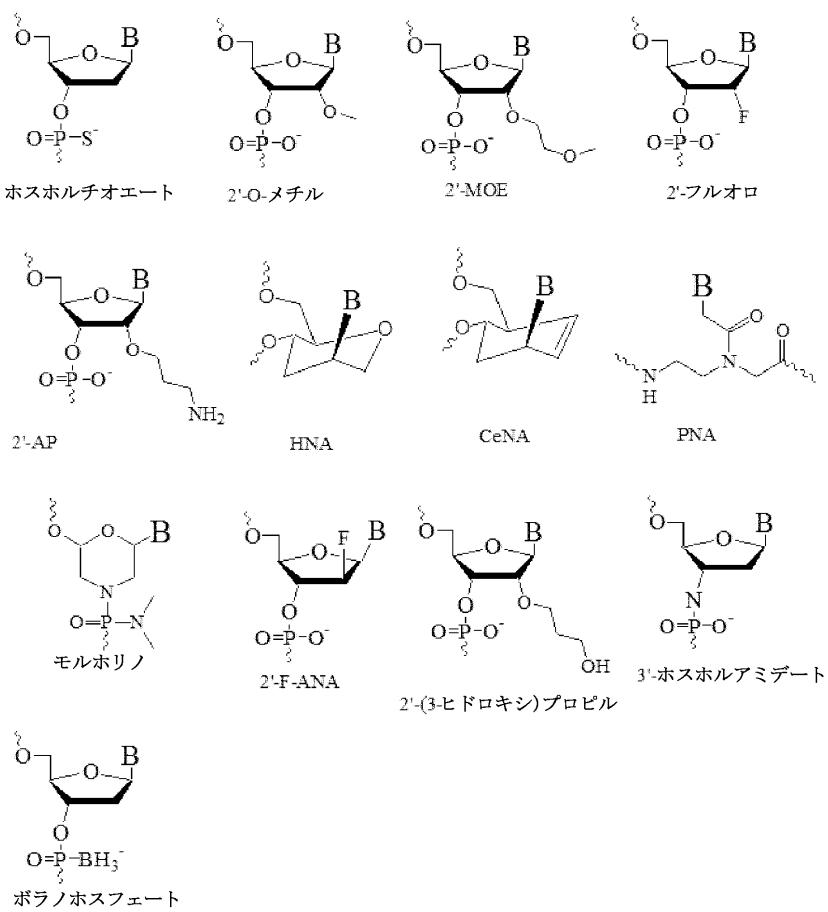
【 0 1 4 7 】

非天然ヌクレオチドには、二環式ヌクレオチドなどの修飾糖部分を有するヌクレオチド、または2'置換ヌクレオチドなどの2'修飾ヌクレオチドが含まれる。

【 0 1 4 8 】

「ヌクレオチド類縁体」は、糖および/または塩基部分の修飾による、DNAまたはRNAヌクレオチドなどの天然ヌクレオチドの変種である。類縁体は、原理的には、オリゴヌクレオチドの文脈において、天然ヌクレオチドに対して単に「サイレント」または「等価」であり得、すなわち、オリゴヌクレオチドが標的遺伝子発現を阻害するようはたらくやり方に、機能的効果を持たない。そのような「等価」の類縁体は、それにもかかわらず、例えば、製造がより容易もしくは安価である、または保存もしくは製造条件に対してより安定である、またはタグもしくは標識に相当するならば、有用であり得る。しかし、好ましくは、類縁体は、例えば、標的にに対する高い結合親和性および/または細胞内ヌクレアーゼに対する高い抵抗性および/または細胞への輸送の高い容易さを生じることにより、オリゴマーが発現を阻害するようはたらくやり方に機能的効果を有する。ヌクレオシド類縁体の具体例は、例えば、Freier & Altman; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443およびUhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213によって記載され、以下のスキーム1に示される。

30

**スキーム1****【0149】**

したがって、オリゴマーは、天然ヌクレオチド - 好ましくは2'-デオキシヌクレオチド（本明細書において一般に「DNA」と呼ぶ）であるが、おそらくはリボヌクレオチド（本明細書において一般に「RNA」と呼ぶ）、またはそのような天然ヌクレオチドと、1つもしくは複数の非天然ヌクレオチド、すなわちヌクレオチド類縁体との組み合わせの単純な配列を含むか、またはそれからなってもよい。そのようなヌクレオチド類縁体はオリゴマーの標的配列に対する親和性を適切に増強し得る。

【0150】

適切かつ好ましいヌクレオチド類縁体の例は、WO2007/031091により提供されるか、またはその中で言及される。

【0151】

オリゴマー、例えばLNAまたは2'-置換糖における親和性増強ヌクレオチド類縁体の組み込みは、特異的に結合するオリゴマーのサイズ低下を可能にし得、非特異的または異常な結合が起こる前のオリゴマーのサイズの上限も低下させ得る。

【0152】

いくつかの態様において、オリゴマーは少なくとも1個のヌクレオチド類縁体を含む。いくつかの態様において、オリゴマーは少なくとも2個のヌクレオチド類縁体を含む。いくつかの態様において、オリゴマーは3~8個のヌクレオチド類縁体、例えば、6または7個のヌクレオチド類縁体を含む。最も好ましい態様において、前記ヌクレオチド類縁体のうち少なくとも1個はロックド核酸（LNA）であり；例えば、ヌクレオチド類縁体のうち少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、または少なくとも6個、または少なくとも7個、または8個はLNAであり得る。いくつかの態様において、すべてのヌクレオチド類縁体はLNAであり得る。

【0153】

ヌクレオチドだけからなる、好ましいヌクレオチド配列モチーフまたはヌクレオチド配

列に言及する場合、その配列によって規定される本発明のオリゴマーは、該配列中に存在するヌクレオチドの1つまたは複数の代わりに、オリゴマー/標的二重鎖の二重鎖安定性/T_mを上げる、対応するヌクレオチド類縁体、例えばLNAユニットまたは他のヌクレオチド類縁体（すなわち、親和性増強ヌクレオチド類縁体）を含んでもよいことが理解されるであろう。

【0154】

ヌクレオチドのそのような修飾の例には、糖部分を修飾して、結合親和性を増強し、同時にヌクレアーゼ抵抗性の増大を提供し得る、2'置換基を提供すること、または架橋（ロックド核酸）構造を生じることが含まれる。

【0155】

好みのヌクレオチド類縁体は、LNA、例えばオキシ-LNA（ベータ-D-オキシ-LNA、およびアルファ-L-オキシ-LNAなどの）、および/またはアミノ-LNA（ベータ-D-アミノ-LNAおよびアルファ-L-アミノ-LNAなどの）および/またはチオ-LNA（ベータ-D-チオ-LNAおよびアルファ-L-チオ-LNAなどの）および/またはENA（ベータ-D-ENAおよびアルファ-L-ENAなどの）である。最も好みののはベータ-D-オキシ-LNAである。

【0156】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマー内（本明細書において言及する領域X'およびY'内などの）に存在するヌクレオチド類縁体は、独立に、例えば：2'-O-アルキル-RNAユニット、2'-アミノ-DNAユニット、2'-フルオロ-DNAユニット、LNAユニット、アラビノ核酸（ANA）ユニット、2'-フルオロ-ANAユニット、HNAユニット、INA（インターラーティング核酸 - Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 2002 30: 4918-4925、参照により本明細書に組み入れられる）ユニットおよび2'MOEユニットから選択される。いくつかの態様において、本発明のオリゴマー内には前述のヌクレオチド類縁体の型の1つ、またはその連続ヌクレオチド配列だけが存在する。

【0157】

いくつかの態様において、ヌクレオチド類縁体は2'-O-メトキシエチル-RNA（2'MOE）、2'-フルオロ-DNAモノマーまたはLNAヌクレオチド類縁体であり、したがって本発明のオリゴヌクレオチドは、これら3つの型の類縁体から独立に選択されるヌクレオチド類縁体を含んでもよく、または3つの型から選択される類縁体の1つの型だけを含んでもよい。いくつかの態様において、前記ヌクレオチド類縁体のうち少なくとも1つは2'-MOE-RNA、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-MOE-RNAヌクレオチドユニットである。いくつかの態様において、前記ヌクレオチド類縁体のうち少なくとも1つは2'-フルオロDNA、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-フルオロ-DNAヌクレオチドユニットである。

【0158】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、少なくとも1個のロックド核酸（LNA）ユニット、例えば1、2、3、4、5、6、7、または8個のLNAユニット、例えば3~7個、もしくは4~8個のLNAユニット、または3、4、5、6もしくは7個のLNAユニットを含む。いくつかの態様において、すべてのヌクレオチド類縁体はLNAである。いくつかの態様において、オリゴマーはベータ-D-オキシ-LNA、および以下のLNAユニットの1つまたは複数の両方を含んでもよい：ベータ-Dもしくはアルファ-L配置のいずれか、またはその組み合わせのチオ-LNA、アミノ-LNA、オキシ-LNA、および/またはENA。いくつかの態様において、すべてのLNAシトシンユニットは5'メチル-シトシンである。本発明のいくつかの態様において、オリゴマーはLNAおよびDNAユニットの両方を含んでもよい。好ましくは、LNAおよびDNAユニットを合わせた合計は10~25個、例えば10~24個、好ましくは10~20個、例えば10~18個、さらにより好ましくは12~16個である。本発明のいくつかの態様において、オリゴマーのヌクレオチド配列、例えば連続ヌクレオチド配列は、少なくとも1個のLNAからなり、残りのヌクレオチドユニットはDNAユニットである。いくつかの態様において、オリゴマーは、任意でホスホチオエートなどの修飾ヌクレオチド間連結を有する、LNAヌクレオチド類縁体および天然ヌクレオチド（例えばRNAまたはDNA、最も好ましくはDNAヌク

10

20

30

40

50

レオチド)だけを含む。

【0159】

「核酸塩基」なる用語は、ヌクレオチドの塩基部分を意味し、天然ならびに非天然変種の両方を含む。したがって「核酸塩基」は、公知のプリンおよびピリミジン複素環のみならず、その複素環式類縁体および互変異性体も含む。

【0160】

核酸塩基の例には、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、ウラシル、キサンチン、ヒポキサンチン、5-メチルシトシン、イソシトシン、ブソイドイソシトシン、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、および2-クロロ-6-アミノプリンが含まれるが、それらに限定されない。

10

【0161】

いくつかの態様において、オリゴマー内に存在する核酸塩基のうち少なくとも1つは、5-メチルシトシン、イソシトシン、ブソイドイソシトシン、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、および2-クロロ-6-アミノプリンからなる群より選択される修飾核酸塩基である。

【0162】

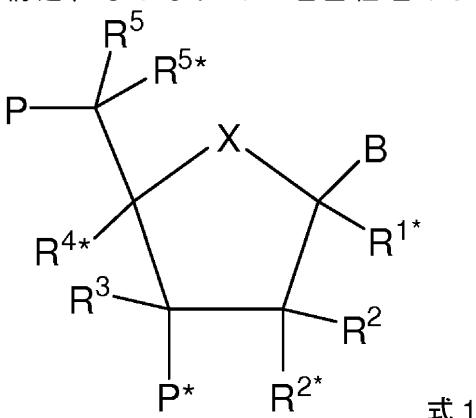
LNA

「LNA」なる用語は、「ロックド核酸」として公知の、二環式ヌクレオシド類縁体を意味する。これはLNAモノマーを指してもよく、または、「LNAオリゴヌクレオチド」の文脈で用いる場合、LNAは1つまたは複数のそのような二環式ヌクレオチド類縁体を含むオリゴヌクレオチドを指す。LNAヌクレオチドは、例えば、以下に記載するビラジカル $R^{4*} - R^{2*}$ として示す、リボース糖環のC2' と C4'との間のリンカー基(架橋などの)の存在によって特徴付けられる。

20

【0163】

本発明のオリゴヌクレオチド化合物において用いられるLNAは、好ましくは、一般式Iの構造、ならびにその塩基性塩および酸付加塩を有する：



30

ここで、すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよく；

式中、Xは-O-、-S-、-N(R^{N*})-、-C(R⁶R^{6*})-から選択され、例えば、いくつかの態様において、-O-であり；

40

Bは水素、置換されていてもよいC₁₋₄-アルコキシ、置換されていてもよいC₁₋₄-アルキル、置換されていてもよいC₁₋₄-アシリルオキシ、天然および核酸塩基類縁体を含む核酸塩基、DNAインターラーカー、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート化基、レポータ基、およびリガンドから選択され；好ましくは、Bは核酸塩基または核酸塩基類縁体であり；

Pは、隣接モノマーへのヌクレオチド間連結、または5'末端基を示し、そのようなヌクレオチド間連結または5'末端基は任意で置換基R⁵または同等に適用可能な置換基R^{5*}を含み；

P*は、隣接モノマーへのヌクレオチド間連結、または3'末端基を示し；

50

R^{4*} および R^{2*} は一緒に、 $-C(R^aR^b)-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R^a)-$ 、および $>C=Z$ から選択される 1~4 つの基/原子からなる二価のリンカーベースを示し、ここで Z は $-O-$ 、 $-S-$ 、および $-N(R^a)-$ から選択され、かつ R^a および R^b はそれぞれ独立に水素、置換されていてもよい C_{1-12} -アルキル、置換されていてもよい C_{2-12} -アルケニル、置換されていてもよい C_{2-12} -アルキニル、ヒドロキシ、置換されていてもよい C_{1-12} -アルコキシ、 C_{2-12} -アルコキシアルキル、 C_{2-12} -アルケニルオキシ、カルボキシ、 C_{1-12} -アルコキシカルボニル、 C_{1-12} -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ-カルボニル、アリールカルボニル、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、 C_{1-6} -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、 C_{1-6} -アルカノイルオキシ、スルホノ、 C_{1-6} -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 C_{1-6} -アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート化基、レポーター基、およびリガンドから選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは置換されていてもよく、かつここで 2 つのジェミナルな置換基 R^a および R^b は一緒に、置換されていてもよいメチレン ($=CH_2$) を示してもよく、ここですべてのキラル中心について、不斉基は R または S 配向のいずれで見出されてもよく、かつ；

存在する置換基 R^{1*} 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、 R^{5*} 、 R^6 および R^{6*} はそれぞれ独立に水素、置換されていてもよい C_{1-12} -アルキル、置換されていてもよい C_{2-12} -アルケニル、置換されていてもよい C_{2-12} -アルキニル、ヒドロキシ、 C_{1-12} -アルコキシ、 C_{2-12} -アルコキシアルキル、 C_{2-12} -アルケニルオキシ、カルボキシ、 C_{1-12} -アルコキシカルボニル、 C_{1-12} -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ-カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、 C_{1-6} -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、 C_{1-6} -アルカノイルオキシ、スルホノ、 C_{1-6} -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 C_{1-6} -アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート化基、レポーター基、およびリガンドから選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは置換されていてもよく、かつここで 2 つのジェミナルな置換基は一緒に、オキソ、チオキソ、イミノ、または置換されていてもよいメチレンを示してもよく；；ここで R^N は水素および C_{1-4} -アルキルから選択され、かつここで 2 つの隣接（非ジェミナル）置換基はさらなる結合を示して二重結合をもたらしてもよく；かつ R^{N*} は、存在し、ビラジカルに関与しない場合、水素および C_{1-4} -アルキルから選択される。すべてのキラル中心について、不斉基は R または S 配向のいずれで見出されてもよい。

【0164】

いくつかの態様において、 R^{4*} および R^{2*} は一緒に、 $C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-$ 、 $C(R^aR^b)-O-$ 、 $C(R^aR^b)-NR^a-$ 、 $C(R^aR^b)-S-$ 、および $C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-$ からなる群より選択される基からなるビラジカルを示し、ここで各 R^a および R^b は任意で独立に選択されてもよい。いくつかの態様において、 R^a および R^b は、任意で独立に水素および C_{1-6} -アルキルからなる群より選択されてもよく、例えばメチル、例えば水素である。

【0165】

いくつかの態様において、 R^{4*} および R^{2*} は一緒に、 R -または S -配置のいずれかの、ビラジカル-O-CH(CH₂OCH₃)- (2'0-メトキシエチル二環式核酸 - Seth et al., 2010, J. Org. Chem.) を示す。

【0166】

いくつかの態様において、 R^{4*} および R^{2*} は一緒に、 R -または S -配置のいずれかの、ビラ

10

20

30

40

50

ジカル-O-CH(CH₂CH₃)- (2'O-エチル二環式核酸 - Seth et al., 2010, J. Org. Chem) を示す。

【0167】

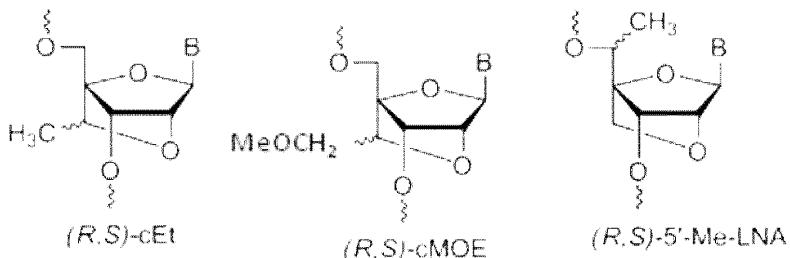
いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}は一緒に、R-またはS-配置のいずれかの、ビラジカル-O-CH(CH₃)-を示す。いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}は一緒に、ビラジカル-O-CH₂-O-CH₂- (Seth et al., 2010, J. Org. Chem) を示す。

【0168】

いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}は一緒に、ビラジカル-O-NR-CH₃- (Seth et al., 2010, J. Org. Chem) を示す。

【0169】

いくつかの態様において、LNAユニットは以下の群：



から選択される構造を有する。

10

【0170】

いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³、R⁵、R^{5*}は独立に水素、ハロゲン、C₁₋₆アルキル、置換C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニルまたは置換C₂₋₆アルキニル、C₁₋₆アルコキシリル、置換C₁₋₆アルコキシリル、アシル、置換アシル、C₁₋₆アミノアルキルまたは置換C₁₋₆アミノアルキルからなる群より選択される。すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよい。

【0171】

いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³、R⁵、R^{5*}は水素である。

【0172】

いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³は独立に水素、ハロゲン、C₁₋₆アルキル、置換C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニルまたは置換C₂₋₆アルキニル、C₁₋₆アルコキシリル、置換C₁₋₆アルコキシリル、アシル、置換アシル、C₁₋₆アミノアルキルまたは置換C₁₋₆アミノアルキルからなる群より選択される。すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよい。

30

【0173】

いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³は水素である。

【0174】

いくつかの態様において、R⁵およびR^{5*}はそれぞれ独立にH、-CH₃、-CH₂-CH₃、-CH₂-O-C_H₃、および-CH=CH₂からなる群より選択される。適切には、いくつかの態様において、R⁵またはR^{5*}のいずれかは水素であるが、他の基（それぞれR⁵またはR^{5*}）はC₁₋₅アルキル、C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニル、置換C₁₋₆アルキル、置換C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルキニルまたは置換アシル（-C(=O)-）からなる群より選択され；ここで各置換された基はハロゲン、C₁₋₆アルキル、置換C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニル、置換C₂₋₆アルキニル、OJ₁、SJ₁、NJ₁J₂、N₃、COOJ₁、CN、O-C(=O)NJ₁J₂、N(H)C(=NH)NJ₁J₂またはN(H)C(=X)N(H)J₂から独立に選択される置換基で一または多置換されており、ここでXはOまたはSであり；かつ各J₁およびJ₂は、独立に、H、C₁₋₆アルキル、置換C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニル、置換C₂₋₆アルキニル、C₁₋₆アミノアルキル、置換C₁₋₆アミノアルキルまたは保護基である。いくつかの態様において、R⁵またはR^{5*}のいずれかは置換C₁₋₆アルキルである。いくつかの態様において、R⁵またはR^{5*}のいずれかは置換メチレンであり、ここで好ましい置換基にはF、

40

50

NJ₁J₂、N₃、CN、OJ₁、SJ₁、O-C(=O)NJ₁J₂、N(H)C(=NH)NJ₁J₂またはN(H)C(O)N(H)J₂から独立に選択される1つまたは複数の基が含まれる。いくつかの態様において、各J₁およびJ₂は、独立にHまたはC₁₋₆アルキルである。いくつかの態様において、R⁵またはR^{5*}のいずれかはメチル、エチルまたはメトキシメチルである。いくつかの態様において、R⁵またはR^{5*}のいずれかはメチルである。さらなる態様において、R⁵またはR^{5*}のいずれかはエチレニルである。いくつかの態様において、R⁵またはR^{5*}のいずれかは置換アシルである。いくつかの態様において、R⁵またはR^{5*}のいずれかはC(=O)NJ₁J₂である。すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよい。そのような5'修飾二環式ヌクレオチドはWO 2007/134181に開示されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0175】

いくつかの態様において、Bは、核酸塩基類縁体および天然核酸塩基、例えばプリンもしくはピリミジン、または置換プリンもしくは置換ピリミジン、例えば本明細書において言及する核酸塩基、例えばアデニン、シトシン、チミン、アデニン、ウラシルからなる群より選択される核酸塩基、および/または修飾もしくは置換核酸塩基、例えば5'-チアゾロ-ウラシル、2'-チオ-ウラシル、5'-プロピニル-ウラシル、2'-チオ-チミン、5'-メチルシトシン、5'-チオゾロ-シトシン、5'-プロピニル-シトシン、および2',6'-ジアミノプリンを含む、核酸塩基である。

【0176】

いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}は一緒に、-C(R^aR^b)-O-、-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-O-、-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-O-、-C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-、-C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-O-、-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-、-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-、-C(R^a)=C(R^b)-C(R^cR^d)-、-C(R^aR^b)-N(R^c)-、-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-N(R^e)-、-C(R^aR^b)-N(R^c)-O-、および-C(R^aR^b)-S-、-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-S-から選択されるビラジカルを示し、ここでR^a、R^b、R^c、R^d、R^e、およびR^fはそれぞれ独立に水素、置換されていてもよいC₁₋₁₂-アルキル、置換されていてもよいC₂₋₁₂-アルケニル、置換されていてもよいC₂₋₁₂-アルキニル、ヒドロキシ、C₁₋₁₂-アルコキシ、C₂₋₁₂-アルコキシアルキル、C₂₋₁₂-アルケニルオキシ、カルボキシ、C₁₋₁₂-アルコキシカルボニル、C₁₋₁₂-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ-カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ-C₁₋₆-アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ-C₁₋₆-アルキル-アミノカルボニル、C₁₋₆-アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、C₁₋₆-アルカノイルオキシ、スルホノ、C₁₋₆-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C₁₋₆-アルキルチオ、ハロゲン、DNAインターラーカレーター、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート化基、レポーター基、およびリガンドから選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは置換されていてもよく、かつ2つのジェミナルな置換基R^aおよびR^bは一緒に、置換されていてもよいメチレン(=CH₂)を示してもよい。すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよい。

20

【0177】

さらなる態様において、R^{4*}およびR^{2*}は一緒に、-CH₂-O-、-CH₂-S-、-CH₂-NH-、-CH₂-N(CH₃)-、-CH₂-CH₂-O-、-CH₂-CH(CH₃)-、-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-CH₂-NH-、-CH₂-CH₂-CH₂-、-C(H₂-CH₂-CH₂-O-、-CH₂-CH₂-CH(CH₃)-、-CH=CH-CH₂-、-CH₂-O-CH₂-O-、-CH₂-NH-O-、-CH₂-N(CH₃)-O-、-CH₂-O-CH₂-、-CH(CH₃)-O-、および-CH(CH₂-O-CH₃)-O-、ならびに/または、-CH₂-CH₂-、および-CH=CH-から選択されるビラジカル(二価の基)を示す。すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよい。

30

【0178】

いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}は一緒に、ビラジカルC(R^aR^b)-N(R^c)-O-を示し、ここでR^aおよびR^bは独立に水素、ハロゲン、C₁₋₆アルキル、置換C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニルまたは置換C₂₋₆アルキニル、C₁₋₆アルコ

40

50

キシル、置換C₁₋₆アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁₋₆アミノアルキルまたは置換C₁₋₆アミノアルキルからなる群より選択され、例えば水素であり、かつ；ここでR^cは水素、ハロゲン、C₁₋₆アルキル、置換C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニルまたは置換C₂₋₆アルキニル、C₁₋₆アルコキシル、置換C₁₋₆アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁₋₆アミノアルキルまたは置換C₁₋₆アミノアルキルからなる群より選択され、例えば水素である。

【0179】

いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}は一緒に、ビラジカルC(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-O-を示し、ここでR^a、R^b、R^c、およびR^dは独立に水素、ハロゲン、C₁₋₆アルキル、置換C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニルまたは置換C₂₋₆アルキニル、C₁₋₆アルコキシル、置換C₁₋₆アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁₋₆アミノアルキルまたは置換C₁₋₆アミノアルキルからなる群より選択され、例えば水素である。
10

【0180】

いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}はビラジカル-CH(Z)-O-を形成し、ここでZはC₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニル、置換C₁₋₆アルキル、置換C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルキニル、アシル、置換アシル、置換アミド、チオールまたは置換チオからなる群より選択され；かつここで置換された基はそれぞれ独立に、ハロゲン、オキソ、ヒドロキシル、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、OC(=X)J₁、OC(=X)NJ₁J₂、NJ³C(=X)NJ₁J₂およびCNから独立に選択される、任意で保護された置換基で一または多置換されており、ここで各J₁、J₂およびJ₃は、独立に、HまたはC₁₋₆アルキルであり、かつXはO、SまたはNJ₁である。
20 いくつかの態様において、ZはC₁₋₆アルキルまたは置換C₁₋₆アルキルである。いくつかの態様において、Zはメチルである。いくつかの態様において、Zは置換C₁₋₆アルキルである。いくつかの態様において、前記置換基はC₁₋₆アルコキシである。いくつかの態様において、ZはCH₃OCH₂-である。すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよい。そのような二環式ヌクレオチドはUS 7,399,845において開示されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³、R⁵、R^{5*}は水素である。いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³*は水素であり、かつR⁵、R^{5*}の1つまたは両方は、前述およびWO 2007/134181に記載のとおり、水素以外であってもよい。

【0181】

いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}は一緒に、架橋中に置換アミノ基を含むビラジカルを示し、例えばビラジカル-CH₂-N(R^c)-からなるか、またはそれを含み、ここでR^cはC₁₋₁₂アルキルオキシである。いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}は一緒に、ビラジカル-Cq₃q₄-NOR-を示し、ここでq₃およびq₄は独立に水素、ハロゲン、C₁₋₆アルキル、置換C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニルまたは置換C₂₋₆アルキニル、C₁₋₆アルコキシル、置換C₁₋₆アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁₋₆アミノアルキルまたは置換C₁₋₆アミノアルキルからなる群より選択され；ここで各置換された基は、独立に、ハロゲン、OJ₁、SJ₁、NJ₁J₂、COOJ₁、CN、O-C(=O)NJ₁J₂、N(H)C(=NH)NJ₁J₂またはN(H)C(=X=N(H)J₂から独立に選択される置換基で一または多置換されており、ここでXはOまたはSであり；かつJ₁およびJ₂は、それぞれ独立に、H、C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニル、C₁₋₆アミノアルキルまたは保護基である。すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよい。そのような二環式ヌクレオチドはWO2008/150729に開示されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³、R⁵、R^{5*}は独立に水素、ハロゲン、C₁₋₆アルキル、置換C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、置換C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニルまたは置換C₂₋₆アルキニル、C₁₋₆アルコキシル、置換C₁₋₆アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁₋₆アミノアルキルまたは置換C₁₋₆アミノアルキルからなる群より選択される。いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³、R⁵、R^{5*}は水素である。いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³は水素であり、かつR⁵、R^{5*}の1つまたは両方は、前述およびWO 2007/134181に記載のとおり、水素以外であってもよい。いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}は
40

10

20

30

40

50

一緒に、ビラジカル(二価の基)C(R^aR^b)-O-を示し、ここでR^aおよびR^bはそれぞれ独立にハロゲン、C₁-C₁₂アルキル、置換C₁-C₁₂アルキル、C₂-C₁₂アルケニル、置換C₂-C₁₂アルケニル、C₂-C₁₂アルキニル、置換C₂-C₁₂アルキニル、C₁-C₁₂アルコキシ、置換C₁-C₁₂アルコキシ、OJ₁ SJ₁、SO₂J₁、NJ₁J₂、N₃、CN、C(=O)OJ₁、C(=O)NJ₁J₂、C(=O)J₁、O-C(=O)NJ₁J₂、N(H)C(=NH)NJ₁J₂、N(H)C(=O)NJ₁J₂またはN(H)C(=S)NJ₁J₂であり；またはR^aおよびR^bは一緒に、=C(q3)(q4)であり；q₃およびq₄はそれぞれ、独立に、H、ハロゲン、C₁-C₂アルキルまたは置換C₁-C₁₂アルキルであり；各置換された基は、独立に、ハロゲン、C₁-C₆アルキル、置換C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、置換C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニル、置換C₂-C₆アルキニル、OJ₁、SJ₁、NJ₁J₂、N₃、CN、C(=O)OJ₁、C(=O)NJ₁J₂、C(=O)J₁、O-C(=O)NJ₁J₂、N(H)C(=O)NJ₁J₂またはN(H)C(=S)NJ₁J₂から独立に選択される置換基で10
一または多置換されており、かつ；各J₁およびJ₂は、独立に、H、C₁-C₆アルキル、置換C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、置換C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニル、置換C₂-C₆アルキニル、C₁-C₆アミノアルキル、置換C₁-C₆アミノアルキルまたは保護基である。そのような化合物はWO2009006478Aに開示されており、参照により本明細書に組み入れられる。

【0182】

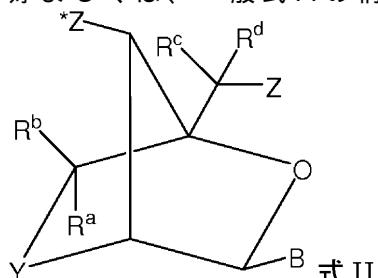
いくつかの態様において、R^{4*}およびR^{2*}はビラジカル-Q-を形成し、ここでQはC(q₁)(q₂)C(q₃)(q₄)、C(q₁)=C(q₃)、C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄)またはC(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)]であり；q₁、q₂、q₃、q₄はそれぞれ独立に、H、ハロゲン、C₁-C₁₂アルキル、置換C₁-C₁₂アルキル、C₂-C₁₂アルケニル、置換C₂-C₁₂アルコキシ、OJ₁、SJ₁、SO₂J₁、NJ₁J₂、N₃、CN、C(=O)OJ₁、C(=O)-NJ₁J₂、C(=O)J₁、-C(=O)NJ₁J₂、N(H)C(=NH)NJ₁J₂、N(H)C(=O)NJ₁J₂またはN(H)C(=S)NJ₁J₂であり；各J₁およびJ₂は、独立に、H、C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニル、C₁-C₆アミノアルキルまたは保護基であり；かつ、任意で、ここでQがQC(q₁)(q₂)(q₃)(q₄)であり、かつq₃またはq₄の1つがCH₃である場合、q₃もしくはq₄の他方またはq₁およびq₂の1つのうち少なくとも1つはH以外である。いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³、R⁵、R^{5*}は水素である。すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよい。そのような二環式ヌクレオチドはWO2008/154401に開示されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³、R⁵、R^{5*}は独立に水素、ハロゲン、C₁-C₆アルキル、置換C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、置換C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニルまたは置換C₂-C₆アルキニル、C₁-C₆アルコキシル、置換C₁-C₆アルコキシル、アシリル、置換アシリル、C₁-C₆アミノアルキルまたは置換C₁-C₆アミノアルキルからなる群より選択される。いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³、R⁵、R^{5*}は水素である。いくつかの態様において、R^{1*}、R²、R³は水素であり、かつR⁵、R^{5*}の1つまたは両方は、前述およびWO 2007/134181またはWO2009/067647に記載(アルファ-L-二環式核酸類縁体)のとおり、水素以外であってもよい。
30

【0183】

さらなる二環式ヌクレオシド類縁体およびそれらのアンチセンスオリゴヌクレオチドにおける使用は、WO2011 115818、WO2011/085102、WO2011/017521、WO09100320、WO10036698、WO09124295およびWO2009006478に開示されている。そのようなヌクレオシド類縁体は、いくつかの局面において、本発明の化合物において有用であり得る。

【0184】

いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド化合物において用いるLNAは、好ましくは、一般式IIの構造を有する：



10

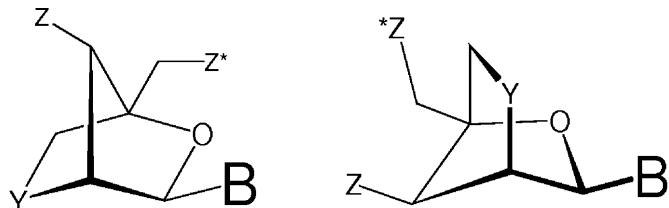
20

30

40

50

式中、Yは-O-、-CH₂O-、-S-、-NH-、N(R^e)および/または-CH₂-からなる群より選択され；ZおよびZ*は独立にヌクレオチド間連結、R^H、末端基または保護基の間で選択され；Bは天然または非天然ヌクレオチド塩基部分（核酸塩基）を構成し、かつR^Hは水素およびC₁₋₄-アルキルから選択され；R^a、R^b R^c、R^dおよびR^eは、任意で、独立に、水素、置換されていてもよいC₁₋₁₂-アルキル、置換されていてもよいC₂₋₁₂-アルケニル、置換されていてもよいC₂₋₁₂-アルキニル、ヒドロキシ、C₁₋₁₂-アルコキシ、C₂₋₁₂-アルコキシアルキル、C₂₋₁₂-アルケニルオキシ、カルボキシ、C₁₋₁₂-アルコキシカルボニル、C₁₋₁₂-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ-カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ-C₁₋₆-アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ-C₁₋₆-アルキル-アミノカルボニル、C₁₋₆-アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、C₁₋₆-アルカノイルオキシ、スルホノ、C₁₋₆-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C₁₋₆-アルキルチオ、ハロゲン、DNAインターナレーター、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート化基、レポーター基、およびリガンドからなる群より選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは置換されていてもよく、かつここで2つのジェミナルな置換基R^aおよびR^bは一緒に、置換されていてもよいメチレン(=CH₂)を示してもよく；かつR^Hは水素およびC₁₋₄-アルキルから選択される。いくつかの態様において、R^a、R^b、R^c、R^dおよびR^eは、任意で、独立に、水素およびC₁₋₆アルキルからなる群より選択され、例えばメチルである。すべてのキラル中心について、不斉基はRまたはS配向のいずれで見出されてもよく、例えば、2つの例示的な立体化学異性体にはベータ-Dおよびアルファ-Lイソ型が含まれ、これらは以下のとおりに例示されうる。



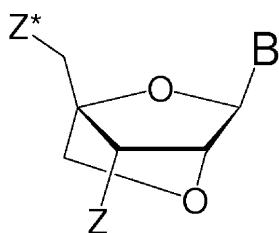
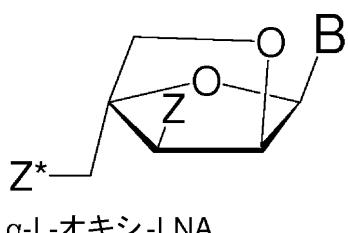
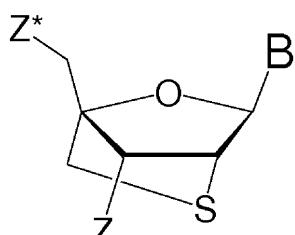
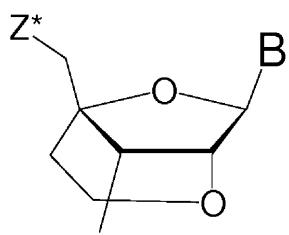
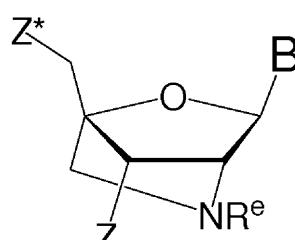
【0185】

具体的な例示的LNAユニットを以下に示す。

10

20

30

 β -D-オキシ-LNA α -L-オキシ-LNA β -D-チオ-LNA β -D-ENA β -D-アミノ-LNA

【0186】

「チオ-LNA」なる用語は、上の一般式中のYがSまたは-CH₂-S-から選択される、ロックドヌクレオチドを含む。チオ-LNAは、ベータ-Dおよびアルファ-L配置の両方であり得る。

【0187】

「アミノ-LNA」なる用語は、上の一般式中のYが-N(H)-、N(R)-、CH₂-N(H)-、および-CH₂-N(R)-から選択される、ロックドヌクレオチドを含み、ここでRは水素およびC₁₋₄-アルキルから選択される。アミノ-LNAは、ベータ-Dおよびアルファ-L配置の両方であり得る。

【0188】

「オキシ-LNA」なる用語は、上の一般式中のYが-O-を表す、ロックドヌクレオチドを含む。オキシ-LNAは、ベータ-Dおよびアルファ-L配置の両方であり得る。

【0189】

「ENA」なる用語は、上の一般式中のYが-CH₂-O-（ここで-CH₂-O-の酸素原子は塩基Bに対して2'位に連結している）である、ロックドヌクレオチドを含む。R°は水素またはメチルである。

【0190】

いくつかの例示的態様において、LNAはベータ-D-オキシ-LNA、アルファ-L-オキシ-LNA、ベータ-D-アミノ-LNAおよびベータ-D-チオ-LNAから選択され、特にベータ-D-オキシ-LNAである。

【0191】

結合体

この文脈において、「結合体」なる用語は、本明細書に記載のオリゴマーの1つまたは複数の非ヌクレオチド、または非ポリヌクレオチド部分への共有結合（「結合」）によって形成される、不均一分子を示すことが意図される。非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分の例には、タンパク質、脂肪酸鎖、糖残基、糖タンパク質、ポリマー、またはその組み合わせなどの、高分子作用物質が含まれる。典型的には、タンパク質は標的タンパク質に対する抗体であり得る。典型的ポリマーはポリエチレングリコールであり得る。

10

20

30

40

50

【0192】

したがって、様々な態様において、本発明のオリゴマーは、典型的にはヌクレオチドの連続配列からなるポリヌクレオチド領域、およびさらなる非ヌクレオチド領域の両方を含んでもよい。連続ヌクレオチド配列からなる本発明のオリゴマーに言及する場合、化合物は、結合成分などの、非ヌクレオチド成分を含んでもよい。

【0193】

本発明の様々な態様において、オリゴマー化合物は、例えば、オリゴマー化合物の細胞への取込を増大させるために用い得る、リガンド/結合体に連結する。WO2007/031091は適切なリガンドおよび結合体を提供し、これらは参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0194】

本発明は、本明細書に記載の本発明の化合物、および該化合物と共有結合した少なくとも1つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分を含む結合体も提供する。したがって、本発明の化合物が本明細書において開示する特定された核酸またはヌクレオチド配列からなる、様々な態様において、化合物は該化合物と共有結合した少なくとも1つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分（例えば、1つまたは複数のヌクレオチドまたはヌクレオチド類縁体を含まない）を含んでもよい。

20

【0195】

いくつかの態様において、非ヌクレオチド部分（結合部分）は、炭水化物、細胞表面受容体リガンド、薬物物質、ホルモン、タンパク質、例えば酵素、抗体もしくは抗体断片またはペプチド；親油性物質、ポリマー、タンパク質、ペプチド、毒素（例えば、細菌毒素）、ビタミン、ウイルスタンパク質（例えば、カプシド）またはその組み合わせ部分、例えば脂質、リン脂質、ステロール；ポリマー、例えばポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコール；受容体リガンド；小分子；レポーター分子；および非ヌクレオチド炭水化物からなる群より選択される。

20

【0196】

結合（結合部分への）は、本発明のオリゴマーの活性、細胞分布または細胞への取込を増強させ得る。そのような部分には、抗体、ポリペプチド、脂質部分、例えばコレステロール部分、コール酸、チオエーテル、例えば、ヘキシリ-s-トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたは1,2-ジ-o-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-h-ホスホン酸トリエチルアンモニウム、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンまたはヘキシリアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分が含まれるが、それらに限定されない。

30

【0197】

本発明のオリゴマーは、活性薬物物質、例えば、アスピリン、イブプロフェン、サルファ薬、抗糖尿病薬、抗菌薬または抗生物質に結合してもよい。

【0198】

一定の態様において、結合部分はステロール、例えばコレステロールである。

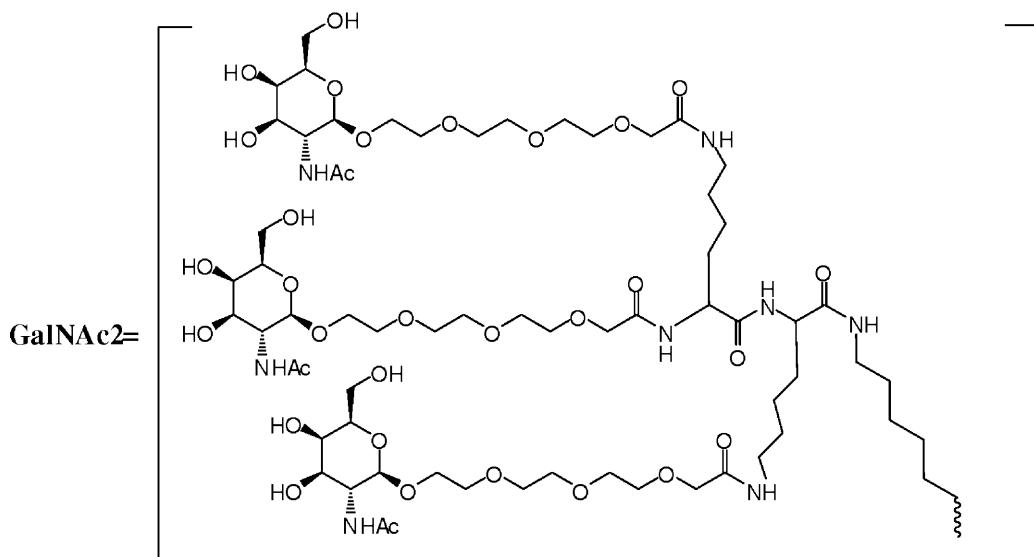
【0199】

様々な態様において、結合部分は、長さが、例えば、1~50、例えば2~20、例えば3~10アミノ酸残基の正に荷電したペプチド、および/またはポリエチレングリコール（PEG）もしくはポリプロピレングリコールなどのポリアルキレンオキシドなどの、正に荷電したポリマーを含むか、またはそれらからなる - WO 2008/034123を参照されたく、参照により本明細書に組み入れられる。適切には、ポリアルキレンオキシドなどの正に荷電したポリマーは、本発明のオリゴマーに、WO 2008/034123に記載の遊離可能なリンカーなどのリンカーを介して連結してもよい。

40

【0200】

例として、以下のGalNAc結合部分を本発明の結合体において用いてもよい。



【0201】

本発明は、本発明のオリゴマーを含む結合体をさらに提供し、これは本発明のオリゴマーに共有結合した少なくとも1つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分（「結合部分」）を含む。いくつかの態様において、本発明の結合体はオリゴマーに、生体切断可能なリンカーを介して共有結合し、リンカーは、例えば、ホスホジエステル連結ヌクレオチド、例えば1~5個のPO連結DNAヌクレオシドの領域であってもよい（WO2014/076195、参照により本明細書に組み入れられる）。好ましい結合基には、炭水化物結合体、例えばGalNAc結合体、例えば三価GalNAc結合体（例えば、WO2014/118267を参照されたく、参照により本明細書に組み入れられる）または親油性結合体、例えばステロール、例えばコレステロール（WO2014/076195、参照により本明細書に組み入れられる）が含まれる。

20

【0202】

活性化オリゴマー

本明細書において用いられる「活性化オリゴマー」なる用語は、オリゴマーの1つまたは複数の結合部分、すなわち、それ自体は核酸またはモノマーではない部分への共有結合を可能にして、本明細書に記載の結合体を形成する、少なくとも1つの官能性部分に共有結合した（すなわち、官能基化した）、本発明のオリゴマーを意味する。典型的には、官能性部分は、例えば、3'-ヒドロキシル基またはアデニン塩基の環外NH₂基を介してオリゴマーに共有結合することができる化学基、好ましくは親油性であるスペーサー、および結合部分に結合することができる末端基（例えば、アミノ、スルフヒドリルまたはヒドロキシル基）を含む。いくつかの態様において、この末端基は保護されておらず、例えば、NH₂基である。他の態様において、末端基は、例えば、“Protective Groups in Organic Synthesis” by Theodora W Greene and Peter G M Wuts, 3rd edition (John Wiley & Sons, 1999)に記載のものなどの、任意の適切な保護基で保護されている。適切なヒドロキシル保護基の例には、酢酸エステルなどのエステル、ベンジル、ジフェニルメチル、またはトリフェニルメチルなどのアラルキル基、およびテトラヒドロピラニルが含まれる。適切なアミノ保護基の例には、ベンジル、アルファ-メチルベンジル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、ベンジルオキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル、およびトリクロロアセチルまたはトリフルオロアセチルなどのアシリル基が含まれる。いくつかの態様において、官能性部分は自己切断性である。他の態様において、官能性部分は生体分解性である。例えば、米国特許第7,087,229号を参照されたく、これはその全体が参考により本明細書に組み入れられる。

30

【0203】

いくつかの態様において、オリゴマーの5'末端への結合部分の共有結合を可能にするために、本発明のオリゴマーを5'末端で官能基化する。他の態様において、本発明のオリゴマーを3'末端で官能基化することもできる。さらに他の態様において、本発明のオリゴマ

40

50

ーを骨格に沿って、または複素環塩基部分で官能基化することもできる。さらに他の態様において、本発明のオリゴマーを、5'末端、3'末端、骨格および塩基から独立に選択される複数の位置で官能基化することもできる。

【0204】

いくつかの態様において、本発明の活性化オリゴマーは、官能性部分に共有結合される1つまたは複数のモノマーを合成中に組み込むことにより合成する。他の態様において、本発明の活性化オリゴマーは、官能基化していないモノマーで合成し、合成完了後にオリゴマーを官能基化する。いくつかの態様において、オリゴマーを、アミノアルキルリンカーを含むヒンダードエステルで官能基化し、ここでアルキル部分は式 $(CH_2)_w$ を有し、ここで w は1~10の範囲の整数、好ましくは約6であり、ここでアルキルアミノ基のアルキル部分は直鎖または分枝鎖であり得、かつここで官能基はオリゴマーにエステル基(-O-C(O)-(CH₂)₂NH)を介して連結している。10

【0205】

他の態様において、オリゴマーを(CH₂)₂-スルフヒドリル(SH)リンカーを含むヒンダードエステルで官能基化し、ここで w は1~10の範囲の整数、好ましくは約6であり、ここでアルキルアミノ基のアルキル部分は直鎖または分枝鎖であり得、かつここで官能基はオリゴマーにエステル基(-O-C(O)-(CH₂)₂SH)を介して連結している。

【0206】

いくつかの態様において、スルフヒドリル活性化オリゴヌクレオチドを、ポリエチレンギリコールまたはペプチドなどのポリマー部分と結合する(ジスルフィド結合の形成を介して)。20

【0207】

前述のヒンダードエステルを含む活性化オリゴマーは、当技術分野において公知の任意の方法により、特にPCT公報WO 2008/034122に開示される方法およびその中の実施例により合成することができ、この開示はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0208】

さらに他の態様において、本発明のオリゴマーを、スルフヒドリル、アミノまたはヒドロキシル基をオリゴマー中に、実質的に米国特許第4,962,029号および第4,914,210号に記載の官能基化試薬、すなわち、一端にホスホラミダイトを有し、親油性スペーサー鎖を通じて保護または無保護スルフヒドリル、アミノまたはヒドロキシル基を含む他端に連結された、実質的に直鎖の試薬によって導入することにより官能基化する。そのような試薬は主にオリゴマーのヒドロキシル基と反応する。いくつかの態様において、そのような活性化オリゴマーは、オリゴマーの5'-ヒドロキシル基に結合した官能基化試薬を有する。他の態様において、活性化オリゴマーは、3'-ヒドロキシル基に結合した官能基化試薬を有する。さらに他の態様において、本発明の活性化オリゴマーは、オリゴマーの骨格上のヒドロキシル基に結合した官能基化試薬を有する。さらなる態様において、本発明のオリゴマーは、米国特許第4,962,029号および第4,914,210号に記載の官能基化試薬の複数で官能基化し、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。そのような官能基化試薬を合成し、それらをモノマーまたはオリゴマーに組み込む方法は、米国特許第4,962,029号および第4,914,210号に開示されている。30

【0209】

いくつかの態様において、固相結合オリゴマーの5'末端をジエニルホスホラミダイト誘導体で官能基化し、続いて脱保護したオリゴマーを、例えば、アミノ酸またはペプチドと、ディールス-アルダー付加環化反応により結合させる。

【0210】

様々な態様において、2'-カルバメート置換糖または2'-(O-ペンチル-N-フタルイミド)-デオキシリボース糖などの2'-糖修飾を含むモノマーの、オリゴマー中の組み込みは、オリゴマーの糖への結合部分の共有結合を容易にする。他の態様において、1つまたは複数のモノマーの2'位にアミノ含有リンカーを有するオリゴマーを、例えば、5'-ジメトキシトリチル-2'-O-(e-フタルイミジルアミノペンチル)-2'-デオキシアデノシン-3'--N,N-40

10

20

30

40

50

ジイソプロピル-シアノエトキシホスホラミダイトなどの、試薬を用いて調製する。例えば、Manoharan, et al., Tetrahedron Letters, 1991, 34, 7171参照。

【0211】

さらなる態様において、本発明のオリゴマーは、N6プリンアミノ基上、グアニンの環外N2上、またはシトシンのN4もしくは5位上を含む、核酸塩基上のアミン含有官能性部分を有し得る。様々な態様において、そのような官能基化は、オリゴマー合成においてすでに官能基化されている市販の試薬を用いることにより達成してもよい。

【0212】

いくつかの官能性部分は市販されており、例えば、ヘテロ二官能性およびホモ二官能性連結部分がPierce Co. (Rockford, Ill.) から入手可能である。他の市販の連結基は5'-アミノ-修飾試薬C6および3'-アミノ修飾試薬で、いずれもGlen Research Corporation (Sterling, Va.) から入手可能である。5'-アミノ-修飾試薬C6はABI (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) からもAminolink-2として入手可能で、3'-アミノ-修飾試薬はClontech Laboratories Inc. (Palo Alto, Calif.) からも入手可能である。いくつかの態様においていくつかの態様において。

10

【0213】

組成物

本発明のオリゴマーを、薬学的製剤および組成物中で用いてもよい。適切には、そのような組成物は薬学的に許容される希釈剤、担体、塩またはアジュバントを含む。PCT/DK2006/000512は、適かつ好ましい薬学的に許容される希釈剤、担体およびアジュバントを提供しており - これは参照により本明細書に組み入れられる。適切な用量、製剤、投与経路、組成物、剤形、他の治療剤との組み合わせ、プロドラッグ製剤もPCT/DK2006/000512において提供され - これは参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0214】

適用

本発明のオリゴマーを、例えば、診断、治療および予防のための研究試薬として用いてもよい。

【0215】

研究において、そのようなオリゴマーを用いて、細胞および実験動物における標的タンパク質の合成を特異的に阻害し（典型的には、mRNAを分解または阻害し、それによりタンパク質生成を防止することにより）、それにより標的の機能分析または治療的介入のための標的としてのその有用性の評価を容易にしてもよい。

30

【0216】

診断において、オリゴマーを用いて、細胞および組織における標的の発現を、ノーザンブロッティング、インサイチューハイブリダイゼーションまたは同様の技術により検出および定量してもよい。

【0217】

治療のために、標的の発現を調節することにより処置し得る疾患または障害を有することが疑われる動物またはヒトを、本発明のオリゴマー化合物を投与することにより処置する。さらに提供するのは、標的の発現に関連する疾患または障害を有する、または罹りやすいことが疑われる、ヒトの処置法などの、哺乳動物の処置法であって、本発明の1つまたは複数のオリゴマーまたは組成物の治療的または予防的有効量を投与することによる方法である。典型的には、本発明の結合体または薬学的組成物を有効量で投与する。

40

【0218】

本発明は、本明細書において言及する障害の処置用薬剤の製造のため、または本明細書において言及する障害の処置法のための、前述の本発明の化合物または結合体の使用も提供する。

【0219】

本発明は、本明細書において言及する障害の処置法であって、本明細書に記載の本発明の化合物、および/または本発明の結合体、および/または本発明の薬学的組成物を、それ

50

を必要としている患者に投与する段階を含む方法も提供する。

【0220】

医学的適応

本発明のオリゴマーおよび他の組成物を、標的の変異体の過剰発現または発現に関連する状態の処置のために用いることができる。

【0221】

本発明は、本明細書において言及する疾患、障害または状態の処置用薬剤の製造における、本発明の化合物の使用をさらに提供する。

【0222】

一般的には、本発明の1つの局面は、異常なレベルの標的に関連する状態を患っている、またはそれに罹りやすい哺乳動物の処置法であって、その哺乳動物に、1つまたは複数のLNAユニットを含む標的指向オリゴマーの治療的有効量を投与する段階を含む方法を目的とする。本発明のオリゴマー、結合体または薬学的組成物を、典型的には、有効量で投与する。

【0223】

態様

1.

少なくとも5個以上の連続ヌクレオシドの中心領域(Y')、ならびに1~6個のLNAヌクレオシドを含む5' ウィング領域(X')および1~6個のLNAヌクレオシドを含む3' ウィング領域(Z')

を含むLNAオリゴヌクレオチドであって、中心領域のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所が立体的に規定されており、かつ中心領域がRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含む、LNAオリゴヌクレオチド。

2.

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結のうち1、2、3、4または5箇所だけが立体選択的ホスホロチオエート連結であり、残りのヌクレオシド間連結が無作為にRpまたはSpである、態様1記載のLNAオリゴヌクレオチド。

3.

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結のすべてが立体選択的ホスホロチオエート連結である、態様1記載のLNAオリゴヌクレオチド。

4.

中心領域(Y')が、少なくとも5個の、ホスホロチオエート連結した連続DNAヌクレオシドを含む、態様1~4のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

5.

中心領域が、少なくとも8または9 DNAヌクレオシド長である、態様1~5のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

6.

中心領域が、少なくとも10または11 DNAヌクレオシド長である、態様1~5のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

7.

中心領域が、少なくとも12または13 DNAヌクレオシド長である、態様1~5のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

8.

中心領域が、少なくとも14または15 DNAヌクレオシド長である、態様1~5のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

9.

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結がRpまたはSpホスホロチオエート連結のいずれかであり、かつウィング領域(X' または Z')の少なくとも1つが、LNAヌクレオシドとそれに続く(3')ヌクレオシドとの間の少なくとも1箇所の立体選択的ホスホロチオエート連結を含む、態様1~8のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

10.

少なくとも1つの立体特異的ホスホロチオエートヌクレオチド対を含み、ここでヌクレオチド対の間のヌクレオシド間連結がRp立体配置またはRs立体配置のいずれかであり、かつここでヌクレオチド対のヌクレオシドのうち少なくとも1個がLNAヌクレオチドである、態様1~9のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

11.

ヌクレオチド対の他のヌクレオチドが、DNA以外、例えばヌクレオシド類縁体、例えばさらなるLNAヌクレオシドまたは2'置換ヌクレオシドである、態様10記載のLNAオリゴヌクレオチド。

12.

中心領域(Y')のヌクレオシド同士を連結している、または領域Y'の3'ヌクレオシドと3'ウィング(X')の最初のヌクレオシドとを連結している、ヌクレオシド感連結のうち少なくとも1箇所が、立体選択的ホスホロチオエート連結である、態様1~11のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

13.

各ウィング領域が1、2または3個のLNAヌクレオシドを含む、態様1~12のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

14.

少なくとも1つのウィング領域が2'置換ヌクレオシドを含む、態様1~13のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

15.

2'置換ヌクレオシドが2'-O-MOEおよび2'フルオロからなる群より選択される、態様14記載のLNAオリゴヌクレオチド。

16.

5'(X')および3'(Z')ウィング領域のヌクレオシドが、LNAヌクレオシド/ヌクレオチド、例えばベータ-D-オキシLNAヌクレオシド/ヌクレオチドを含むか、またはそれらからなる、態様1~13のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

17.

領域X'-Y'-Z'におけるオリゴマーの長さまたはヌクレオシドの連續配列の長さが10~20、例えば10~16の長さである、態様1~16のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

18.

各領域(X'-Y'-Z')中のヌクレオシドの数が1-8-1、1-8-2、2-8-1、2-8-2、3-8-3、2-8-3、3-8-2、4-8-1、4-8-2、1-8-4、2-8-4；または、1-9-1、1-9-2、2-9-1、2-9-2、2-9-3、3-9-2、1-9-3、3-9-1、4-9-1、1-9-4；または、1-10-1、1-10-2、2-10-1、2-10-2、1-10-3、および3-10-1からなる群より選択される、態様1~17のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

19.

各領域(X'-Y'-Z')中のヌクレオシドの数が3-10-3、3-10-4、4-10-3、3-9-3、3-9-4、4-9-3、3-8-3、3-8-4、4-8-3、3-7-3、3-7-4、4-7-3からなる群より選択される、態様1~17のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

20.

各領域(X'-Y'-Z')中のヌクレオシドの数が3-10-3、3-11-3、3-12-3、3-13-3、3-14-3、2-10-2、2-11-2、2-11-2、2-12-2、2-13-2、2-14-2、2-10-3、3-10-2、2-11-3、3-11-2、3-12-2、2-12-3、3-12-2、2-12-3、3-13-2、2-12-3、3-13-2、2-13-3、3-14-2および2-14-3からなる群より選択される、態様1~17のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

21.

5'ウィング領域が少なくとも1箇所の立体特異的ホスホロチオエート連結、RpまたはSpを含む、態様1~20のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

22.

残りのヌクレオシド間連結が立体的に規定されていない、態様21記載のLNAオリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチド。

23.

3' ウィング領域が少なくとも1箇所の立体特異的ホスホロチオエート連結、RpまたはSpを含む、態様1～20のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

24.

残りのヌクレオシド間連結が立体的に規定されていない、態様23記載のLNAオリゴヌクレオチド。

25.

5' および3' ウィング領域の両方がそれぞれ、独立にまたは独立せずに、RpまたはSpから選択される少なくとも1箇所の立体特異的ホスホロチオエート連結を含む、態様1～20のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。 10

26.

残りのヌクレオシド間連結が立体的に規定されたホスホロチオエート連結ではない、態様25記載のLNAオリゴヌクレオチド。

27.

ギャップマー(X'-Y'-Z')中のすべてのヌクレオシド間連結がホスホロチオエート連結である、態様1～26のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

28.

配列X'-Y'-Z'が表1の標的核酸中に存在する標的配列に対して相補的である、態様1～27のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。 20

29.

ギャップ領域Y'が、cc、tg、tc、ac、tt、gt、caおよびgcからなる群より選択されるDNAジヌクレオチドモチーフを含み、ここでジヌクレオチドのDNAヌクレオシドの間のヌクレオシド間連結が、立体特異的ホスホロチオエート連結、例えばSpまたはRpホスホロチオエートヌクレオシド間連結のいずれかである、態様1～28のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

30.

例えば実施例7において提供するRNアーゼH動員アッセイを用いて、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチドと比べると、増強されたヒトRNアーゼH動員活性を有する、態様1～29のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。 30

31.

LNAオリゴヌクレオチドが、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチドに比べて低減された毒性、例えば、実施例6または8において提供するアッセイを用いて測定した、低減されたインビボ肝毒性、または、例えば、実施例9において提供するアッセイを用いて測定した、低減されたインビトロ腎毒性を有する、態様1～30のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

32.

LNAオリゴヌクレオチドがインビボまたはインビトロで変更された体内分布を有する、態様1～30のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

33.

非ヌクレオシド部分と共有結合した、態様1～32のいずれかに記載の立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチド
を含む、結合体。

34.

結合部分が、GalNAc2などのGalNAcである、態様33記載の結合体。

35.

結合部分がLNAオリゴヌクレオチドの5'または3'に、1、2または3個のホスホジエステル連結したDNAヌクレオシドの領域を介して共有結合している、態様33または34の結合体。

36.

態様1～32のいずれかに記載の立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドま 50

たは態様33～35のいずれかに記載の結合体、および

薬学的に許容される溶媒(水または食塩水など)、希釈剤、担体、塩またはアジュvantト

を含む、薬学的組成物。

37.

医学において用いるための、態様1～32のいずれかに記載の立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドまたは態様33～35のいずれかに記載の結合体。

38.

立体的に特定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチド配列の毒性を低減する方法であって：

a. インビボまたはインビトロで毒性表現型を有する、立体的に特定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを提供する段階

b. 親ギャップマーオリゴヌクレオチドの中心的核酸塩基配列を保持している、立体的に特定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドのライプラリを作製する段階

c. 段階b.で作製したライプラリをインビボまたはインビトロ毒性アッセイでスクリーニングする段階

d. 立体的に特定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチドに比べて、低減された毒性を有する、1つまたは複数の立体的に特定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを同定する段階

を含む方法。

39.

オリゴヌクレオチドにおける立体的に特定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結の使用であって、立体的に特定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結を含まない同一のオリゴヌクレオチドに比べて、オリゴヌクレオチドが、低減された毒性を有する、使用。

40.

毒性低減オリゴヌクレオチドの合成のための、立体特異的ホスホロチオエートモノマー(例えば、ホスホラミダイト)の使用。

【実施例】

【0224】

配列

本明細書において用いる化合物は、以下の核酸塩基配列を有する。

| | |
|------------------|-------------|
| actgcttccactctg | SEQ ID NO 1 |
| tcatggctgcagct | SEQ ID NO 2 |
| gcattggtattca | SEQ ID NO 3 |
| cacattccttgctctg | SEQ ID NO 4 |

【0225】

実施例1

DNA 3'-O-オキサザホスホリジンモノマーの合成を、以前に記載された通りに実施した(Oka et al., J. Am. Chem. Soc. 2008 130: 16031 - 16037、およびWan et al., NAR 2014, November, online publication)。

【0226】

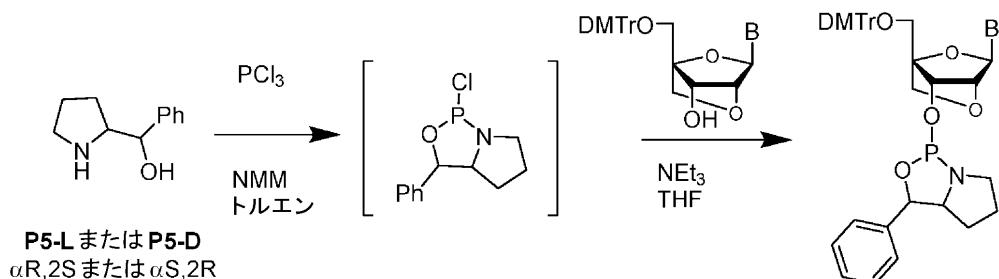
LNA 3'-O-オキサザホスホリジンモノマーの合成
合成スキーム

10

20

30

40

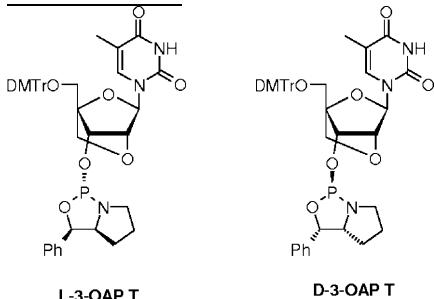


【0227】

-フェニル-2-ピロリジンメタノール (P5-LおよびP5-D) を文献 (Oka et al., JACS, 2008, 16031-16037.) に記載の通りに合成した。 10

【0228】

3-OAP-LNA T



20

L-3-OAP-LNA Tの合成 :

PCl₃ (735 μL, 6.30mmol) をトルエン (7mL) に溶解し、0 (氷浴) まで冷却し、トルエン (7mL) 中のP5-L (1.12g, 6.30mmol) およびNMM (1.38mL, 12.6mmol) の溶液を滴加した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、次いで-72 まで冷却した。沈澱をアルゴン雰囲気下でろ過し、トルエン (4mL) で洗浄し、ろ液を40 、減圧下 (シュレンク法) で濃縮した。残渣をTHF (8mL) に溶解し、次の段階で用いた。

【0229】

THF (16mL) 中の5'-ODMT-LNA-T (2.40g, 4.20mmol) の溶液に、NEt₃ (4.10mL, 29.4mmol) を加えた。反応混合物を-74 まで冷却し、THF中の2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジンの溶液を滴加した。反応混合物を室温で4時間攪拌した。EtOAcを加え、反応混合物を飽和NaHCO₃ (2回) 、食塩水で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィ (溶離剤ヘキサン/EtOAc 30/70 + NEt₃ 6%) で精製した。生成物を白色泡状物1.00g (収率30%) として単離した。

¹H-NMRスペクトル (400 MHz): (DMSO-d₆) δ: 11.53

(1H, s), 7.64 (1H, m), 7.46-7.41 (2H, m), 7.40 -7.19 (12H, m), 6.92-6.83 (4H, m), 5.51 (1H, d, J = 6.3 Hz), 5.49 (1H, s), 4.78 (1H, d, J = 7.4 Hz), 4.37 (1H, s), 3.91 (1H, m), 3.76 -3.67 (2H, m), 3.72 (3H, s), 3.71 (3H, s), 3.50 (1H, m), 3.41 (2H, s), 2.90 (1H, m), 1.60-1.46 (2H, m), 1.51 (3H, s), 1.15 (1H, m), 0.82 (1H, m). ³¹P-NMRスペクトル (160 MHz): (DMSO-d₆) δ:

151.3. LCMS ESI (m/z): 776.2 [M-H]⁻

【0230】

D-3-OAP-LNA Tの合成

PCl₃ (1.05mL, 9.0mmol) をトルエン (12mL) に溶解し、0 (氷浴) まで冷却し、トルエン (12mL) 中のP5-D (1.13g, 12mmol) およびNMM (2.06mL, 24mmol) の溶液を滴加した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、次いで-72 まで冷却した。沈澱をアルゴン雰囲気下でろ過し、トルエンで洗浄し、ろ液を40 、減圧下 (シュレンク法) で濃縮した。残渣をTHF (18mL) に溶解し、次の段階で用いた。

【0231】

30

40

50

THF (30mL) 中の5'-ODMT-LNA-T (3.44g、6.0mmol) の溶液に、NEt₃ (5.82mL、42mmol) を加えた。反応混合物を-74まで冷却し、THF中の2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジンの溶液を滴加した。反応混合物を室温で4時間攪拌した。EtOAcを加え、反応混合物を飽和NaHCO₃ (2回)、食塩水で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィ (溶離剤ヘキサン/EtOAc 30/70 + NEt₃ 6%) で精製した。生成物を白色泡状物1.86g (収率36%) として単離した。

¹H-NMRスペクトル (400 MHz): (DMSO-d₆) δ: 11.55 (1H, s), 7.60 (1H, m), 7.46-7.41 (2H, m), 7.39-7.22 (12H, m), 6.91-6.84 (4H, m), 5.66 (1H, d, J = 6.3 Hz), 5.51 (1H, s), 4.60 (1H, d, J = 7.4 Hz), 4.41 (1H, s), 3.80-3.70 (3H, m), 3.72 (3H, s), 3.71 (3H, s), 3.48-3.37 (3H, m), 2.96 (1H, m), 1.61-1.43 (2H m), 1.51 (3H, s) 1.10 (1H, m), 0.80 (1H, m). ³¹P-NMRスペクトル (160 MHz): (DMSO-d₆) δ: 152.5. LCMS ESI (m/z): 776.2 [M-H]⁻

10

20

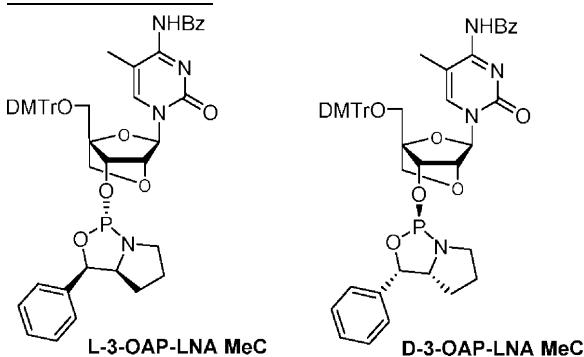
30

40

50

【0232】

3-OAP-LNA MeC



L-3-OAP-LNA MeCの合成

PCl₃ (110 μL、1.25mmol) をトルエン (3mL) に溶解し、0 (氷浴) まで冷却し、トルエン (3mL) 中のP5-L (222mg、1.25mmol) およびNMM (275 μL、2.5mmol) の溶液を滴加した。反応混合物を室温で45分間攪拌し、次いで-72まで冷却した。沈澱をアルゴン雰囲気下でろ過し、トルエンで洗浄し、ろ液を40、減圧下 (シュレンク法) で濃縮した。残渣をTHF (5mL) に溶解し、次の段階で用いた。

【0233】

THF (2.5mL) 中の5'-ODMT-LNA-C (338mg、0.50mmol) の溶液に、NEt₃ (485 μL、3.6mmol) を加えた。反応混合物を-70まで冷却し、次いで蛍光体2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジンの溶液を滴加した。反応混合物を室温で1.45時間攪拌した。EtOAc (30mL) を加え、反応混合物を飽和NaHCO₃ (2 × 20mL)、食塩水 (20mL) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィ (溶離剤ヘキサン中EtOAc 20% ~ 30% + トルエン10% + NEt₃ 7%) で精製した。生成物を白色泡状物228mg (収率47%) として単離した。

¹H-NMRスペクトル

(400 MHz): (CD₃CN) δ: 13.3 (1H, br s), 8.41-8.25 (2H, m), 7.88 (1H, m), 7.59 (1H, m), 7.54-7.47 (4H, m), 7.41-7.19 (12H, m), 6.90-6.79 (4H, m), 5.62 (1H, m), 5.58 (1H, s), 4.79 (1H, d, J = 7.5 Hz), 4.47 (1H, s), 3.93 (1H, m), 3.86 (1H, m), 3.75 (1H, m), 3.76 (3H, s), 3.75 (3H, s), 3.60-3.47 (3H, m), 2.99 (1H, m), 1.83 (3H, d, J = 1.2 Hz), 1.65-1.51 (2H, m), 1.17 (1H, m), 0.89 (1H, m). ³¹P-NMRスペクトル (160 MHz): (CD₃CN) δ: 153.4. LCMS ESI (m/z): 881.2

[M+H]⁺

【0234】

D-3-OAP-LNA MeCの合成

PCl₃ (1.10mL、12.3mmol) をトルエン (10mL) に溶解し、0 (氷浴) まで冷却し、ト

ルエン (10mL) 中のP5-D (2.17g、12.3mmol) およびNMM (2.70mL、2.5mmol) の溶液を滴加した。反応混合物を室温で45分間攪拌し、次いで-72まで冷却した。沈澱をアルゴン雰囲気下でろ過し、トルエンで洗浄し、ろ液を40、減圧下(シュレンク法)で濃縮した。残渣をTHF (10mL) に溶解し、次の段階で用いた。

【0235】

THF (20mL) 中の5'-ODMT-LNA-C (3.38g、5mmol) の溶液に、NEt₃ (4.85mL、35mmol) を加えた。反応混合物を-70まで冷却し、蛍光体2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジンの溶液を滴加した。反応混合物を室温で1.45時間攪拌した。EtOAcを加え、反応混合物を飽和NaHCO₃ (2回)、食塩水で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィ(溶離剤ヘキサン中EtOAc 20% ~ 30% + トルエン10% + NEt₃ 7%)で精製した。生成物を白色泡状物1.09g (収率23%) として単離した。

10

¹H-NMRスペクトル(400 MHz):

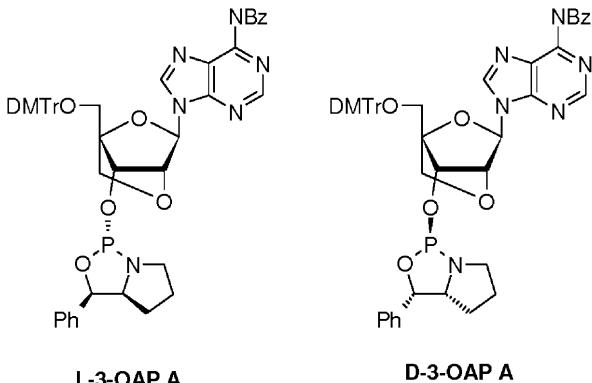
(CD₃CN) δ: 12.8 (1H, br s), 8.34-8.24 (2H, m), 7.85 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 7.57 (1H, m), 7.53-7.45 (4H, m), 7.41-7.22 (12H, m), 6.89-6.84 (4H, m), 5.72 (1H, d, *J* = 6.5 Hz), 5.59 (1H, s), 4.62 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.52 (1H, s), 3.82 (2H, dd, *J* = 24.4 8.2 Hz), 3.77 (1H, m), 3.76 (3H, s), 3.75 (3H, s), 3.51 (2H, s), 3.46 (1H, m), 3.05 (1H, m), 1.81 (3H, s), 1.65-1.47 (2H, m), 1.12 (1H, m), 0.85 (1H, m). ³¹P-NMRスペクトル (160 MHz): (CD₃CN) δ: 153.5. LCMS ESI

(m/z): 881.2 [M+H]⁺

20

【0236】

3-OAP-LNA A



30

L-3-OAP-LNA Aの合成

PCl₃ (184 μL、2.1mmol) をトルエン (5mL) に溶解し、0 (氷浴) まで冷却し、トルエン (5mL) 中のP5-L (373mg、2.10mmol) およびNMM (463 μL、4.20mmol) の溶液を滴加した。反応混合物を室温で45分間攪拌し、次いで-72まで冷却した。沈澱をアルゴン雰囲気下でろ過し、トルエン (4mL) で洗浄し、ろ液を40、減圧下(シュレンク法)で濃縮した。残渣をTHF (5mL) に溶解し、次の段階で用いた。

【0237】

THF (7mL) 中の5'-ODMT-LNA-A (960mg、1.40mmol) の溶液に、NEt₃ (1.36mL、9.80mmol) を加えた。反応混合物を-70まで冷却し、蛍光体2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジンの溶液を滴加した。反応混合物を室温で4時間攪拌した。EtOAc (50mL) を加え、反応混合物を飽和NaHCO₃ (2 × 30mL)、食塩水 (30mL) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィ(溶離剤ヘキサン/EtOAc 30/70 + NEt₃ 6 ~ 7%)で精製した。生成物を白色泡状物455mg (収率35%) として単離した。

40

¹H-NMR スペクトル (400 MHz): (DMSO-d₆)

δ : 11.33 (1H, s), 8.76 (1H, s), 8.53 (1H, s), 8.11-8.02 (2H, m), 7.66 (1H, m), 7.60-7.53 (2H, m), 7.44-7.38 (2H, m), 7.35-7.18 (10H, m), 7.05-6.99 (2H, m), 6.89-6.82 (4H, m), 6.21 (1H, s), 5.27 (1H, d, J = 6.6 Hz), 5.19 (1H, d, J = 7.9 Hz), 4.81 (1H, s), 3.93 (2H, dd, J = 29.0 Hz), 8.2 Hz), 3.77 (1H, m), 3.71 (6H, s), 3.51-3.35 (3H, m), 2.70 (1H, m), 1.56-1.34 (2H, m), 1.10 (1H, m), 0.73 (1H, m). ³¹P-NMR スペクトル (160 MHz): (DMSO-d₆) δ : 149.9. LCMS ESI (m/z):

891.1 [M+H]⁺

【0 2 3 8】

10

D-3-OAP-LNA A の合成

PCl₃ (0.84mL、9.63mmol) をトルエン (12mL) に溶解し、0 (氷浴) まで冷却し、トルエン (12mL) 中のP5-D (1.70g、9.63mmol) およびNMM (2.12mL、19.3mmol) の溶液を滴加した。反応混合物を室温で45分間攪拌し、次いで-72 まで冷却した。沈澱をアルゴン雰囲気下でろ過し、トルエンで洗浄し、ろ液を40 、減圧下 (シュレンク法) で濃縮した。残渣をTHF (12mL) に溶解し、次の段階で用いた。

【0 2 3 9】

20

THF (20mL) 中の5'-ODMT-LNA-A (3.77、5.50mmol) の溶液に、NEt₃ (5.30mL、38.5mmol) を加えた。反応混合物を-70 まで冷却し、蛍光体2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジンの溶液を滴加した。反応混合物を室温で4時間攪拌した。EtOAcを加え、反応混合物を飽和NaHCO₃、食塩水で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィ (溶離剤ヘキサン/EtOAc 30/70 + NEt₃ 6~7%) で精製した。生成物を白色泡状物1.86g (収率36%) として単離した。

¹H-NMR スペクトル (400 MHz): (DMSO-d₆) δ : 11.28 (1H, s),

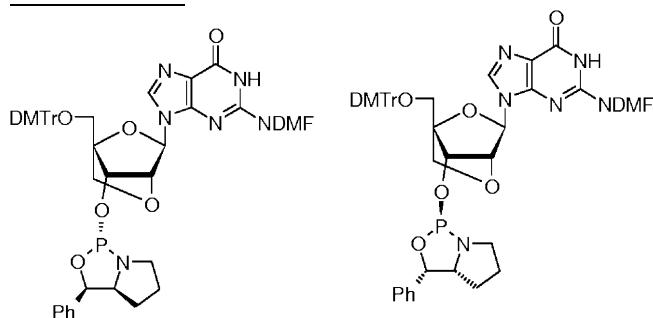
8.78 (1H, s), 8.54 (1H, s), 8.09-8.04 (2H, m), 7.67 (1H, m), 7.60-7.54 (2H, m), 7.42-7.15 (14H, m), 6.89-6.82 (4H, m), 6.21 (1H, s), 5.58 (1H, d, J = 6.7 Hz), 5.02 (1H, d, J = 8.1 Hz), 4.89 (1H, s), 3.96 (2H, dd, J = 35.4 8.2 Hz), 3.71 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.53-3.33 (4H, m), 2.90 (1H, m), 1.54-1.37 (2H, m), 0.98 (1H, m), 0.71 (1H, m). ³¹P-NMR スペクトル (160 MHz):

(DMSO-d₆) δ : 150.6, 150.5 (2%), 150.4. LCMS ESI (m/z): 891.1 [M+H]⁺

30

【0 2 4 0】

3-OAP-LNA G



L-3-OAP G

D-3-OAP G

40

D-3-OAP-LNA G の合成

PCl₃ (1.09mL、12.4mmol) をトルエン (12.5mL) に溶解し、0 (氷浴) まで冷却し、トルエン (12.5mL) 中のP5-D (2.20g、12.4mmol) およびNMM (2.73mL、27.8mmol) の溶液を滴加した。反応混合物を室温で45分間攪拌し、次いで-72 まで冷却した。沈澱をアルゴン雰囲気下でろ過し、トルエンで洗浄し、ろ液を40 、減圧下 (シュレンク法) で濃縮した。残渣をTHF (19mL) に溶解し、次の段階で用いた。

【0 2 4 1】

50

合成前に、5'-ODMT-LNA-Gをトルエンと、次いでピリジン（順序は必須）と共に同時に蒸発させた。THF（15mL）およびピリジン（8mL）中の5'-ODMT-LNA-G（3.26g、5.0mmol）の溶液に、NEt₃（4.85mL、35.0mmol）を加えた。反応混合物を-70まで冷却し、蛍光体2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジンの溶液を滴加した。反応混合物を室温で2.5時間攪拌した。EtOAcを加え、反応混合物を飽和NaHCO₃、食塩水で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィ（溶離剤EtOAc中THF 10%～20%+NEt₃ 6%）で精製した。生成物を白色泡状物1.49g（収率33%）として単離した。

¹H-NMRスペクトル(400

MHz): (DMSO-d₆) δ: 11.42 (1H, s), 8.56 (1H, s), 7.95 (1H, s), 7.49-7.38 (2H, m), 7.36-7.16 (12H, m), 6.90-6.83 (4H, m), 5.96 (1H, s), 5.58 (1H, d, J=6.7 Hz), 4.99 (1H, d, J=8.2 Hz), 4.76 (1H, s), 3.96-3.85 (2H, m), 3.72 (6H, s), 3.62 -3.54 (1H, m), 3.45 (2H, s), 3.40-3.33 (1H, m), 3.08 (3H, s), 2.99 (3H, s), 2.93 -2.84 (1H, m), 1.53-1.39 (2H, m), 1.06-0.97 (1H, m), 0.79-0.63 (1H, m). ³¹P-NMRスペクトル(160 MHz): (DMSO-d₆) δ: 151.6. LCMS ESI (m/z):

858.2 [M+H]⁺

【0 2 4 2】

L-3-OAP-LNA Gの合成

PCl₃（1.00mL、11.4mmol）をトルエン（10mL）に溶解し、0（冰浴）まで冷却し、トルエン（10mL）中のP5-L（2.02g、11.4mmol）およびNMM（2.50mL、22.7mmol）の溶液を滴加した。反応混合物を室温で45分間攪拌し、次いで-72まで冷却した。沈澱をアルゴン雰囲気下でろ過し、トルエンで洗浄し、ろ液を40、減圧下（シュレンク法）で濃縮した。残渣をTHF（7mL）に溶解し、次の段階で用いた。

【0 2 4 3】

合成前に、5'-ODMT-LNA-Gをトルエンと、次いでピリジン（順序は必須）と共に同時に蒸発させた。THF（20mL）およびピリジン（12mL）中の5'-ODMT-LNA-G（2.86g、4.54mmol）の溶液に、NEt₃（4.40mL、31.8mmol）を加えた。反応混合物を-70まで冷却し、蛍光体2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジンの溶液を滴加した。反応混合物を室温で2.5時間攪拌した。EtOAcを加え、反応混合物を飽和NaHCO₃、食塩水で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィ（溶離剤EtOAc中THF 10%～20%+NEt₃ 6%）で精製した。生成物を白色泡状物1.44g（収率34%）として単離した。

¹H-NMR(400MHz, DMSO-

d₆): δ: 11.44 (1H, s), 8.42 (1H, s), 7.94 (1H, s), 7.44-7.38 (2H, m), 7.34-7.23 (10H, m), 7.03-6.98 (2H, m), 5.94 (1H, s), 5.17 (1H, d, J=6.5Hz), 5.07 (1H, d, J=7.8Hz), 4.68 (1H, s), 3.88 (1H, d, J=8.2Hz), 3.84 (1H, d, J=8.2Hz), 3.73 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.68 (1H, m), 3.46-3.36 (3H, m), 3.05 (3H, s), 2.95 (3H, s), 2.77 (1H, m), 1.55-1.38 (2H, m), 1.07 (1H, m), 0.75 (1H, m). ³¹P-NMR(160MHz, DMSO-d₆): δ: 148.4. LCMS ESI(m/z): 858.5 [M+H]⁺; 856.5 [M-H]⁻

【0 2 4 4】

一般的合成の説明

蛍光体2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジンの合成：PCl₃（1当量）をトルエンに溶解し、0（冰浴）まで冷却し、トルエン中のP5-L（1当量）およびNMM（2.1当量）の溶液を滴加した。反応混合物を室温で攪拌し、次いで-72まで冷却した。沈澱をアルゴン雰囲気下でろ過し、トルエンで洗浄し、ろ液を40、減圧下（シュレンク法）で濃縮した。残渣をTHFに溶解し、次の段階で用いた。

【0 2 4 5】

THF（およびGスクレオシドの場合はピリジン）中の5'-ODMT-LNAスクレオシド（1当量）の溶液に、NEt₃（7当量）を加えた。反応混合物を-70まで冷却し、蛍光体2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジン（2.5当量）の溶液を滴加した。反応混合物を室温で攪拌した。

10

20

30

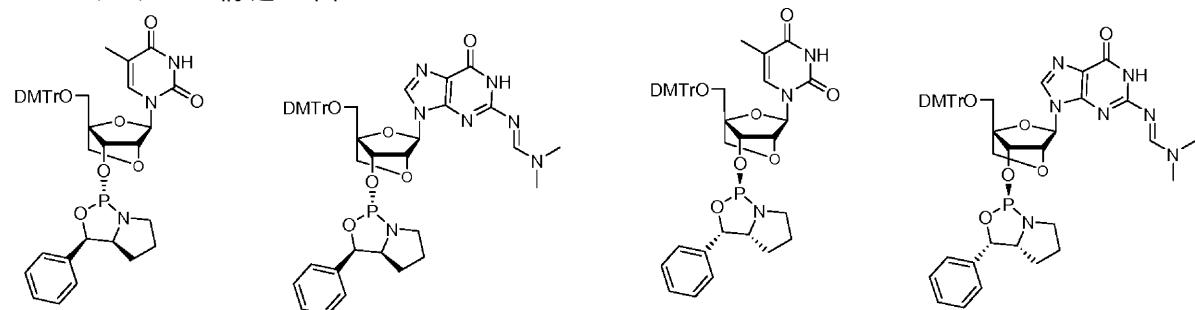
40

50

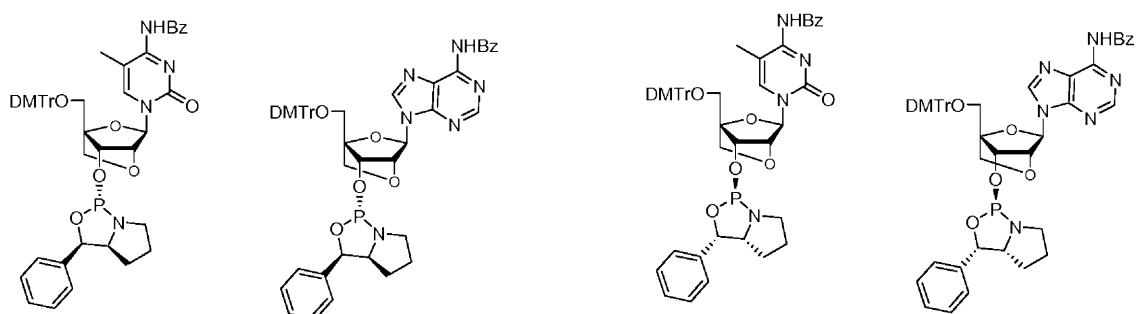
EtOAcを加え、反応混合物を飽和NaHCO₃、食塩水で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィで精製した。

【0246】

LNAモノマーの構造の図



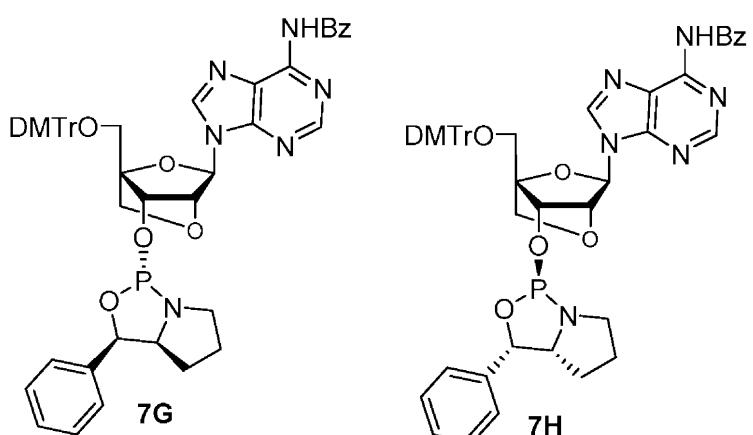
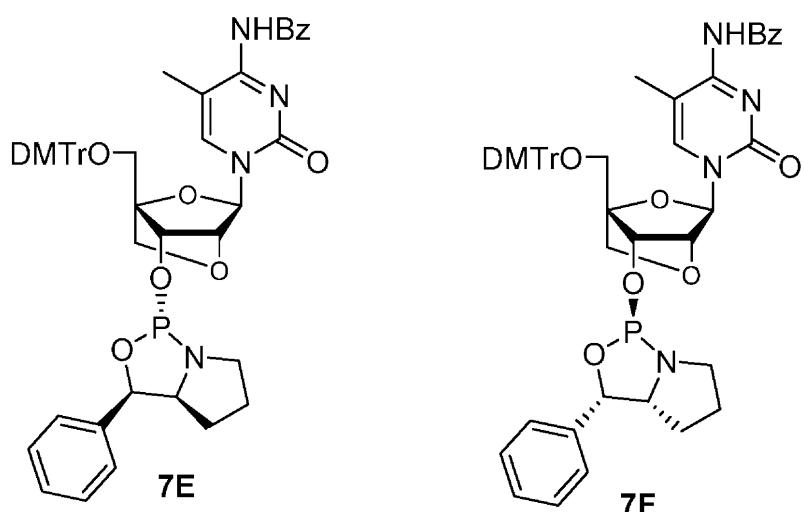
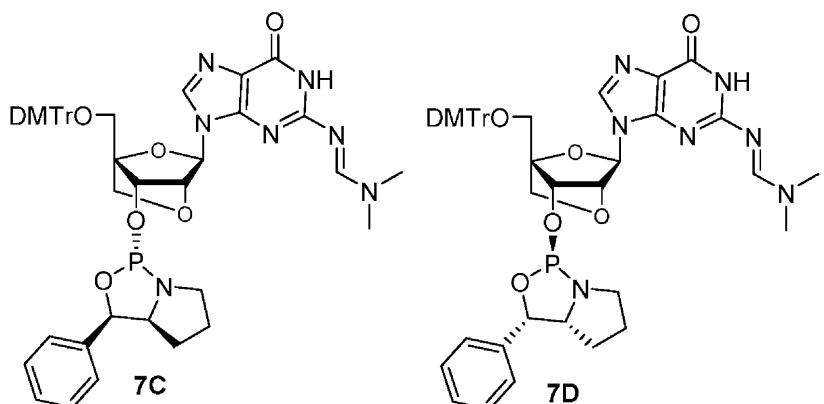
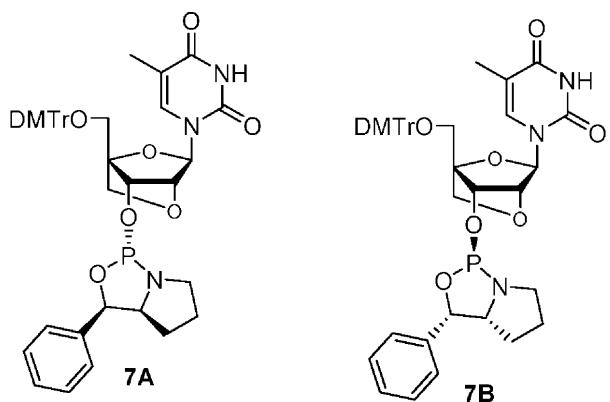
10



20

【0247】

以下のLNA-オキサザホスホリンLNAモノマーをOka et al., J. Am. Chem. Soc. 2008; 130(20), 6031-16037に開示されている方法を用いて合成した。



前記LNAモノマーをオリゴヌクレオチド合成において用い、HPLCにより判定して、立体制御ホスホラミダイトLNAオリゴヌクレオチドを生じたことが示された。

【 0 2 4 8 】

実施例2

Myd88を標的とする以下のLNAオリゴヌクレオチドを合成する。

$A_x^mC_xT_xg_xc_xt_xt_t_xC_xC_xa_xc_xt_x^mC_xT_xG$ (親 #1) (SEQ ID NO 1)

$A_x^mC_xT_xg_xc_xt_xt_t_xC_xC_xa_xc_xt_x^mC_xT_xG$ (親 #1)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_t_xC_xC_xa_xc_xt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #2)

$A_x^mC_xT_xg_xc_xt_xt_t_xC_xC_sC_xa_xc_xt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #3)

$A_x^mC_xT_xg_xc_xt_xt_t_xC_xC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #4)

$A_x^mC_xT_xg_xc_rt_xt_xt_t_xC_xC_xa_xc_xt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #5)

$A_x^mC_xT_xg_xc_xt_xt_t_xC_xC_rC_xa_xc_xt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #6)

$A_x^mC_xT_xg_xc_xt_xt_t_xC_xC_xa_xc_rt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #7)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_sC_xa_xc_xt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #8)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #9)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_sC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #10)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_sC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #11)

$A_x^mC_xT_xg_xc_rt_xt_xt_t_xC_xC_rC_xa_xc_xt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #12)

$A_x^mC_xT_xg_xc_rt_xt_xt_t_xC_xC_xa_xc_rt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #13)

$A_x^mC_xT_xg_xc_rt_xt_xt_t_xC_xC_rC_xa_xc_rt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #14)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_rC_xa_xc_rt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #15)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_rC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #16)

$A_x^mC_xT_xg_xc_xt_xt_t_xC_xC_sC_xa_xc_rt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #17)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_rC_xa_xc_xt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #18)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #19)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_rC_xa_xc_rt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #20)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_rC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #21)

$A_x^mC_xT_xg_xc_st_xt_xt_t_xC_xC_sC_xa_xc_rt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #22)

$A_x^mC_xT_xg_xc_rt_xt_xt_t_xC_xC_sC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #23)

$A_x^mC_xT_xg_xc_rt_xt_xt_t_xC_xC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #24)

$A_x^mC_xT_xg_xc_rt_xt_xt_t_xC_xC_sC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #25)

$A_x^mC_xT_xg_xc_rt_xt_xt_t_xC_xC_sC_xa_xc_rt_x^mC_xT_xG$ (化合物 #26)

$A_x^mC_xT_xg_xc_rt_xt_xt_t_xC_xC_rC_xa_xc_st_x^mC_xT_xG$ (化合物 #27)

大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドである。

下付き文字x = RpおよびSpモノマーのラセミ混合物から無作為に組み込まれたホスホロチオエート連結。

下付き文字s = Spモノマーによる立体制御ホスホラミダイト連結。

下付き文字r = Rpモノマーによる立体制御ホスホラミダイト連結。

大文字Cの前の上付き文字mは5-メチルシトシンLNAヌクレオシドを表す。

【 0 2 4 9 】

実施例3

親化合物#1はマウスにおいて肝毒性があることがわかっている。化合物#1～27#をインビボアッセイでそれらの肝毒性について評価する：1群につき5匹のNMRI雌マウスを用い、15mg/kgの化合物を各マウスに第0、3、7、10および14日に投与し、第16日に屠殺する。血

10

20

30

40

50

清ALTを測定する。肝毒性は、NMRマウスを用いる以外は、EP 1 984 381、実施例41に記載の通りに測定してもよく、またはインビトロ肝細胞毒性アッセイを用いて測定してもよい。

【0250】

実施例4

Seth et al J. Med. Chem 2009, 52, 10-13において毒性であると同定された以下のLNAオリゴヌクレオチドを合成する。

$T_x^mC_xa_xt_xg_xg_xC_xt_xg_xC_xa_xg_x^mC_xT$ (親 #28) (SEQ ID NO 2)

$T_x^mC_xa_xt_sg_xg_xc_xt_g_xc_xa_xg_x^mC_xT$ (化合物 #29)

10

$T_x^mC_xa_xt_xg_xg_sC_xt_g_xc_xa_xg_x^mC_xT$ (化合物 #31)

$T_x^mC_xa_xt_xg_xg_sC_xt_g_xc_s a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #32)

$T_x^mC_xa_xt_sg_xg_sC_xt_g_xc_xa_xg_x^mC_xT$ (化合物 #33)

$T_x^mC_xa_xt_sg_xg_sC_xt_g_xc_s a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #34)

$T_x^mC_xa_xt_sg_xg_sC_xt_g_xc_s a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #35)

$T_x^mC_xa_xt_xg_xg_sC_xt_g_xc_s a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #36)

20

$T_x^mC_xa_xt_sg_xg_sC_xt_g_xc_xa_xg_x^mC_xT$ (化合物 #37)

$T_x^mC_xa_xt_sg_xg_sC_xt_g_xc_r a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #38)

$T_x^mC_xa_xt_sg_xg_sC_xt_g_xc_r a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #39)

$T_x^mC_xa_xt_xg_xg_sC_xt_g_xc_r a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #40)

$T_x^mC_xa_xt_sg_xg_sC_xt_g_xc_s a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #41)

$T_x^mC_xa_xt_sg_xg_sC_xt_g_xc_r a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #42)

$T_x^mC_xa_xt_r g_xg_xc_xt_g_xc_xa_xg_x^mC_xT$ (化合物 #43)

$T_x^mC_xa_xt_xg_xg_r C_xt_g_xc_xa_xg_x^mC_xT$ (化合物 #44)

30

$T_x^mC_xa_xt_xg_xg_sC_xt_g_xc_r a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #45)

$T_x^mC_xa_xt_r g_xg_r C_xt_g_xc_xa_xg_x^mC_xT$ (化合物 #46)

$T_x^mC_xa_xt_r g_xg_sC_xt_g_xc_r a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #47)

$T_x^mC_xa_xt_r g_xg_r C_xt_g_xc_r a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #48)

$T_x^mC_xa_xt_xg_xg_r C_xt_g_xc_r a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #49)

$T_x^mC_xa_xt_r g_xg_sC_xt_g_xc_xa_xg_x^mC_xT$ (化合物 #50)

$T_x^mC_xa_xt_r g_xg_sC_xt_g_xc_s a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #51)

40

$T_x^mC_xa_xt_r g_xg_sC_xt_g_xc_s a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #52)

$T_x^mC_xa_xt_xg_xg_r C_xt_g_xc_s a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #53)

$T_x^mC_xa_xt_r g_xg_sC_xt_g_xc_r a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #54)

$T_x^mC_xa_xt_r g_xg_r C_xt_g_xc_s a_xg_x^mC_xT$ (化合物 #55)

大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドである。

下付き文字x = RpおよびSpモノマーのラセミ混合物から無作為に組み込まれたホスホロチオエート連結。

下付き文字s = Spモノマーによる立体制御ホスホラミダイト連結。

下付き文字r = Rpモノマーによる立体制御ホスホラミダイト連結。

50

大文字Cの前の上付き文字mは5-メチルシトシンLNAヌクレオシドを表す。

【0251】

実施例5

親化合物#28はマウスにおいて肝毒性があることがわかっている。化合物#28～27#をインビボアッセイでそれらの肝毒性について評価する：1群につき5匹のNMRI雌マウスを用い、15mg/kgの化合物を各マウスに第0、3、7、10および14日に投与し、第16日に屠殺する。血清ALTを測定する。肝毒性は、NMRIマウスを用いる以外は、EP 1 984 381、実施例41に記載の通りに測定してもよく、またはインビトロ肝細胞毒性アッセイを用いて測定してもよい。

【0252】

実施例6. 3箇所の固定PSヌクレオシド間連結を有する化合物ライブラリの、インビボでの耐容性および組織含有量

C57BL6/Jマウス（5匹/群）に、単一用量の食塩水または食塩水中の30mg/kg LNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド（seq ID # 1、10、または14）を第0日に静脈内注射し、第8日に屠殺した。

【0253】

すべての群について、血清を採取し、ALTを測定した。オリゴヌクレオチド含有量を、LNA投与群でELISA法を用いて測定した。

【0254】

結論：

3箇所のホスホロチオエートヌクレオシド間連結が、S（化合物#10）またはR（化合物#14）配置のいずれかに固定されている、LNAオリゴヌクレオチドの部分群の肝毒性の可能性（ALT）を、すべてのヌクレオシド間連結がRおよびS配置の混合物であるジアステレオ異性体の親混合物（化合物#1）のALTと比較した。1つの部分群（化合物#14）で、ALT読み出し値は親混合物（化合物#1）よりも有意に低く、他の化合物部分群（化合物#10）では、ALT読み出し値は親とほぼ同等であると認められる（図3）。さらに、肝臓取込の特徴（図4a）は、ALT読み出し値が低いLNAオリゴヌクレオチドの部分群（化合物#14）は、親LNA混合物（化合物#1）と同程度に肝臓に取り込まれるが、ALTが親混合物（化合物#1）と同等の他の部分群（化合物#10）は、肝臓への取込が少ないことを示している。腎臓取込（図4b）は、親LNA（化合物#1）および1つの部分群（化合物#10）でほぼ同等であり、他のLNAオリゴヌクレオチドの部分群（化合物#14）では高い。脾臓への取込は3つの化合物群すべてでほぼ同等である（図4c）。一般に、いくつかの位置において立体化学を固定し、それによりLNAオリゴヌクレオチドの部分群を生じることで、LNAオリゴヌクレオチドの親混合物に比べて、取込および肝毒性の可能性などの特性の相違が誘導されることがわかる。

【0255】

材料と方法：

実験設計：

（表2）

10

20

30

| 群 | 化合物 | 第1日 | 第2日 | 第3日 | 第5日 | 第8日 |
|---|-------------------|----------|-----|-----|-----|----------------|
| 1 | 食塩水 | 体重 投与 | 体重 | 体重 | 体重 | 血液 体重 終了 |
| 2 | 化合物#1 30mg/kg | 体重 投与 | 体重 | 体重 | 体重 | 血液 体重 終了 |
| 3 | 化合物#10 30mg/kg | 体重 投与 | 体重 | 体重 | 体重 | 血液 体重 終了 |
| 4 | 化合物#14 30mg/kg | 体重 投与 | 体重 | 体重 | 体重 | 血液 体重 終了 |

【0256】

投与。表2に従って、受け取り時約20gのC57BL/6J Bom雌動物に、10ml/kg BW（第0日の体重による）の食塩水中で製剤した化合物または食塩水単独を静脈内投与した。

【0257】

肝および腎組織の採取。表2に従って、動物を70%CO₂-30%O₂で麻酔し、頸椎脱臼により屠殺した。肝臓の半分および腎臓を凍結し、組織分析のために用いた。

【0258】

肝臓および腎臓中のオリゴヌクレオチド含有量をサンドイッチELISA法により測定した。

【0259】

ALTレベルを測定した。

【0260】

実施例7 キラルに規定されたホスホロチオエートLNAギャップマーのRNアーゼH活性
用いた親化合物、3833を用いた：

5'-G_s^mC_sa_st_st_sg_sg_st_sa_st_sT_s^mC_sA-3' (SEQ ID NO 3)

ここで、大文字はペータ-D-オキシ-LNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、下付き文字sは無作為sまたはrホスホロチオエート連結（オリゴヌクレオチド合成中にキラルに規定されていない）を表し、かつCの前の上付き文字mは5-メチルシトシンLN Aヌクレオシドを表す。

【0261】

一連の完全にキラルに規定された3833の変種を、SまたはRのいずれかで例示するとおり、12箇所のヌクレオシド間の位置それぞれにおいてRおよびSの独特的のパターンで設計した。RNアーゼH動員活性および切断パターンを、ヒトRNアーゼHを用いて判定し、親化合物3833（キラリティー混合物）ならびに3833の完全ホスホジエステル連結変種（完全PO）、および中心DNAギャップ領域内にホスホジエステル連結を含みLNA側部に無作為PS連結を含む、3833化合物（POギャップ）と比較した。

【0262】

化合物

10

20

30

40

| オリゴ 番号 | 核酸塩基連結のキラリティー | | | | | | | | | | | |
|-----------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 16614 | S | R | S | R | R | S | R | S | S | S | R | R |
| 16615 | S | R | S | S | R | S | R | S | R | S | S | S |
| 16617 | S | R | S | R | S | S | R | R | R | S | R | R |
| 16618 | S | R | R | S | S | S | R | S | S | S | R | R |
| 16620 | S | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | R |
| 16621 | S | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | S |
| 16622 | S | R | S | R | R | R | R | S | S | R | S | R |
| 16623 | S | S | R | R | S | S | S | R | S | R | S | S |
| 16625 | S | R | S | S | S | S | S | R | S | R | R | S |
| 16626 | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S | R | S |
| 16627 | S | R | S | S | S | S | S | R | R | R | R | S |
| 16629 | S | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | S |
| 16631 | S | R | R | R | S | R | R | S | S | R | S | S |
| 16633 | R | S | R | S | S | R | R | S | R | R | S | S |
| 16635 | R | S | S | R | S | R | S | R | R | R | R | R |
| 16636 | S | R | R | R | S | R | R | R | R | S | R | S |
| 16639 | S | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S | R |
| 16641 | S | S | S | S | R | R | R | S | R | R | R | R |

10

20

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16645 | S | S | R | S | R | R | S | S | S | R | R | R |
| 16648 | S | S | S | S | R | R | R | S | S | S | S | S |
| 16649 | S | S | S | R | S | S | R | S | R | S | R | S |
| 16650 | S | R | R | S | R | S | R | R | S | R | S | R |
| 16652 | S | S | S | S | S | R | R | R | S | S | R | R |
| 16655 | S | R | R | S | S | S | R | R | R | S | R | S |
| 16657 | S | R | S | R | S | R | S | S | R | S | R | S |
| 16658 | S | S | S | R | R | S | S | S | R | S | R | S |
| 16660 | S | S | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S |
| 16663 | S | R | S | R | S | S | S | R | R | S | S | S |
| 16666 | S | R | S | R | R | R | S | R | R | S | R | R |
| 16667 | S | R | S | S | R | S | S | S | R | R | S | R |
| 16668 | S | R | R | S | R | S | R | R | S | S | S | S |
| 16669 | S | R | S | R | R | R | S | R | S | S | S | S |
| 16671 | S | S | S | R | R | R | S | R | R | R | S | S |
| 16673 | R | S | S | S | R | R | R | S | R | S | S | S |
| 16674 | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S |
| 16675 | S | S | R | R | R | S | S | R | R | R | S | R |
| 16676 | S | S | S | S | R | S | S | R | R | R | S | R |
| 16677 | S | R | S | S | R | S | S | R | R | S | S | R |
| 16683 | S | S | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S |
| 16684 | S | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S |
| 16685 | S | R | R | S | S | R | S | S | R | R | S | R |
| 16687 | S | R | S | R | R | S | S | S | R | R | R | R |
| 16688 | S | R | R | R | S | S | R | R | R | S | S | S |
| 16692 | R | S | S | S | R | R | R | R | R | S | S | R |
| 16693 | S | S | S | S | R | S | S | R | S | S | R | R |
| 16694 | S | S | R | S | R | S | R | S | S | R | R | S |
| 16697 | S | R | S | R | R | R | S | S | S | S | S | R |
| 16699 | S | R | S | R | S | S | R | S | S | S | R | S |
| 16701 | S | S | S | S | R | S | R | R | R | R | R | S |
| 16702 | S | S | S | S | R | R | R | S | R | S | S | R |
| 16704 | S | R | R | R | R | R | S | R | R | S | S | R |
| 16709 | S | S | R | S | S | R | S | R | S | R | S | S |
| 17298 | | | R | | | R | R | | R | | | |
| 17299 | | | S | | | S | S | | S | | | |
| 17300 | | | R | | | S | S | | R | | | |
| 17301 | | | S | | | R | R | | S | | | |
| 3833 | キラリティー混合物 | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 3833 | キラリティー混合物* | | | | | | | | | | | |
| 18946 | ギャップ中のP0* | | | | | | | | | | | |
| 18947 | 完全P0* | | | | | | | | | | | |

【0263】

すべての化合物を单一の実験で評価したが、*印を付けたものは例外で、別の実験を行った。

【0264】

10

20

30

40

50

実験 :

RNアーゼH1(組換えヒト)によるRNAのLNAオリゴヌクレオチド仲介性切断。

LNAオリゴヌクレオチド15pmolおよび5'fam標識RNA 45pmolを13μLの水に加えた。アニーリング緩衝液6μL(200mM KCl、2mM EDTA、pH7.5)を加え、温度を90まで2分間上昇させた。試料を室温に戻し、3μLの750mM KCl、500mM トリス-HCl、30mM MgCl₂、100mMジチオスレイトール、pH8.3中のRNアーゼH酵素(0.15U)を加えた。試料を37で30分間維持し、EDTA溶液4μL(0.25M)を加えて反応を停止した。

【0265】**切斷したRNA試料のAIE-HPLC**

試料15μLを200μLの緩衝液A(10mM NaClO₄、1mM EDTA、20mM トリス-HCL pH7.8)に加えた。試料をAIE-HPLCにかけた：注入量50μL(カラム：DNA pac 100 2×250、勾配：0分、0.25mL/分、100%A、22分、22%B(1mM NaClO₄、1mM EDTA、20mM トリス-HCL pH7.8)、25分、0.25mL/分、100%B、30分、0.25mL/min、100%B、31分、0.5mL/分、0%B、35分、0.25mL/分、0%B、40分、0.25mL/分、0%B。シグナル検出：蛍光発光518nm、励起494nm。

【0266】**結果**

すべてのリン連結がチオール化された、配列G^mCattggatT^mCAを有するLNAオリゴヌクレオチド。連結中のチオホスフェートの特定のキラリティーを記す。何も記していない場合、キラリティーはRおよびSの混合である。AIE-HPLC保持時間の下に、すべてのピーク面積合計に対するピーク面積のパーセンテージを示す。異なるLNAオリゴヌクレオチドの活性の順位を、キラリティー混合LNAオリゴヌクレオチド3833の酵素反応後に残った全長RNAを、他のLNAオリゴヌクレオチドでの残ったRNAで除した%から計算する。

| オリゴ番号 | AIE HPLC 保持時間(全体のうちの割合(%)) | | | | | | | 全長(%) | 全長3833/キラル全長3833 |
|-------|----------------------------|--------|--------|------|-------|--------|--------|-------|------------------|
| | | | | | | | | | |
| | 11,05 | 11,367 | 11,742 | 12,3 | 12,75 | 12,942 | 15,017 | | |
| 16614 | 1,9 | 19,3 | 3,5 | 63,4 | 0,0 | 0,0 | 11,9 | 4,4 | |
| 16615 | | | | | | | | | |
| 16617 | 0,7 | 18,6 | 4,1 | 44,4 | 5,8 | 7,0 | 19,5 | 2,7 | |
| 16618 | 2,2 | 16,1 | 6,1 | 45,9 | 5,1 | 8,1 | 16,5 | 3,2 | |

10

20

30

| | | | | | | | | |
|-------|-----|------|------|------|------|------|-------|------|
| 16620 | 1,1 | 8,8 | 14,5 | 26,4 | 4,0 | 31,4 | 13,9 | 3,8 |
| 16621 | 2,2 | 1,8 | 32,9 | 37,4 | 0,0 | 11,5 | 14,2 | 3,7 |
| 16622 | 2,3 | 57,1 | 15,5 | 16,7 | 1,6 | 2,1 | 4,7 | 11,2 |
| 16623 | 2,8 | 3,7 | 22,9 | 60,7 | 1,7 | 3,6 | 4,7 | 11,2 |
| 16625 | 2,7 | 3,2 | 20,7 | 28,9 | 2,8 | 20,6 | 21,1 | 2,5 |
| 16626 | 1,3 | 3,2 | 4,6 | 34,0 | 6,0 | 30,1 | 20,9 | 2,5 |
| 16627 | 1,8 | 3,8 | 26,4 | 19,0 | 4,2 | 29,8 | 15,0 | 3,5 |
| 16629 | 1,7 | 2,4 | 36,3 | 38,6 | 2,6 | 5,7 | 12,8 | 4,1 |
| 16631 | 2,6 | 55,3 | 7,8 | 6,5 | 14,9 | 3,8 | 9,2 | 5,7 |
| 16633 | 0,0 | 50,3 | 7,1 | 4,8 | 6,4 | 18,8 | 12,5 | 4,2 |
| 16635 | 1,8 | 7,2 | 64,9 | 7,1 | 11,1 | 4,0 | 3,9 | 13,5 |
| 16636 | 2,1 | 3,8 | 8,9 | 6,4 | 27,9 | 11,6 | 39,3 | 1,3 |
| 16639 | 3,8 | 17,9 | 71,3 | 5,3 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 30,6 |
| 16641 | 1,9 | 41,7 | 10,3 | 10,7 | 2,5 | 13,5 | 19,4 | 2,7 |
| 16645 | 2,2 | 14,1 | 39,8 | 8,6 | 0,0 | 19,2 | 16,0 | 3,3 |
| 16648 | 1,2 | 3,3 | 22,2 | 55,7 | 1,8 | 2,6 | 13,2 | 3,9 |
| 16649 | 2,4 | 37,4 | 3,7 | 28,2 | 7,6 | 0,0 | 20,8 | 2,5 |
| 16650 | 1,3 | 5,6 | 5,6 | 58,3 | 0,0 | 22,3 | 6,8 | 7,7 |
| 16652 | 2,8 | 3,3 | 10,4 | 5,1 | 9,7 | 43,0 | 25,8 | 2,0 |
| 16655 | 0,0 | 3,5 | 3,8 | 20,2 | 4,7 | 21,2 | 46,5 | 1,1 |
| 16657 | 0,0 | 12,2 | 73,4 | 3,5 | 7,8 | 0,0 | 3,1 | 16,8 |
| 16658 | 0,0 | 15,9 | 34,2 | 37,0 | 0,9 | 2,4 | 9,6 | 5,5 |
| 16660 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,5 |
| 16663 | 0,0 | 4,5 | 38,3 | 25,9 | 7,5 | 4,9 | 19,0 | 2,7 |
| 16666 | 0,0 | 2,0 | 76,0 | 3,7 | 0,0 | 0,0 | 18,3 | 2,9 |
| 16667 | 0,0 | 31,5 | 30,1 | 25,5 | 0,0 | 9,3 | 3,7 | 14,3 |
| 16668 | 0,0 | 4,7 | 4,7 | 61,3 | 0,0 | 21,9 | 7,5 | 7,0 |
| 16669 | 0,0 | 3,7 | 76,3 | 6,4 | 1,9 | 2,6 | 9,1 | 5,7 |
| 16671 | | | | | | | | |
| 16673 | 0,0 | 9,1 | 15,7 | 31,1 | 0,0 | 3,7 | 40,4 | 1,3 |
| 16674 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 7,8 | 0,0 | 0,0 | 92,2 | 0,6 |
| 16675 | 0,0 | 15,4 | 20,5 | 25,3 | 4,0 | 21,9 | 12,9 | 4,1 |
| 16676 | 0,0 | 1,6 | 29,2 | 33,1 | 0,0 | 17,2 | 18,9 | 2,8 |
| 16677 | 2,1 | 36,5 | 7,0 | 47,6 | 0,0 | 5,2 | 1,6 | 32,4 |
| 16683 | 1,5 | 17,8 | 34,3 | 20,2 | 2,8 | 2,3 | 20,9 | 2,5 |
| 16684 | 1,2 | 13,6 | 1,6 | 35,4 | 8,6 | 0,0 | 39,5 | 1,3 |
| 16685 | 0,0 | 3,4 | 78,6 | 7,4 | 2,1 | 2,2 | 6,3 | 8,3 |
| 16687 | 1,1 | 54,8 | 8,9 | 7,4 | 1,0 | 6,8 | 19,9 | 2,6 |
| 16688 | 1,1 | 16,8 | 55,1 | 3,4 | 6,3 | 12,1 | 5,2 | 10,1 |
| 16692 | 0,0 | 4,4 | 33,2 | 51,1 | 3,0 | 5,9 | 2,4 | 21,5 |
| 16693 | 0,0 | 4,4 | 30,4 | 28,7 | 0,0 | 28,9 | 7,6 | 6,8 |
| 16694 | 0,0 | 5,2 | 37,6 | 20,8 | 2,2 | 17,3 | 16,9 | 3,1 |
| 16697 | | | | | | | | |

10

20

30

40

| | | | | | | | | |
|-------|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| 16699 | 1,5 | 1,6 | 17,5 | 19,3 | 6,8 | 9,0 | 44,3 | 1,2 |
| 16701 | 0,0 | 4,2 | 6,4 | 44,2 | 0,0 | 29,4 | 15,7 | 3,3 |
| 16702 | 0,0 | 27,3 | 20,4 | 22,9 | 1,2 | 8,7 | 19,5 | 2,7 |
| 16704 | 0,0 | 3,2 | 52,4 | 3,3 | 1,4 | 2,8 | 36,9 | 1,4 |
| 16709 | 8,5 | 31,4 | 4,1 | 2,3 | 8,7 | 25,0 | 20,0 | 2,6 |
| 17298 | 0,0 | 12,0 | 25,1 | 44,4 | 4,1 | 11,7 | 2,7 | 19,2 |
| 17299 | | | | | | | | |
| 17300 | | | | | | | | |
| 17301 | 1,8 | 17,2 | 2,7 | 4,7 | 8,9 | 16,2 | 48,5 | 1,1 |
| 3833 | 1,0 | 6,8 | 13,7 | 11,1 | 3,9 | 11,2 | 52,3 | 1,0 |
| | | | | | | | | |
| 3833 | | | | | | | 10 | 1 |
| 18946 | 2,4 | 8,3 | 29,9 | 18,3 | 10,9 | 10,6 | 19,6 | 0,5 |
| 18947 | 0,0 | 8,8 | 34,0 | 21,6 | 10,5 | 10,5 | 14,6 | 0,7 |

【 0 2 6 7 】

結論

Sキラリティーが選択された最後の5'連結およびスポットキラリティーが選択されたLNAオリゴヌクレオチド17298～17301を除いて、LNAオリゴヌクレオチドのホスホロチオエート連結のキラリティーは無作為に選択されている。LNAオリゴヌクレオチドの完全ジエステルおよびギャップにおいてジエステルのみの変種は、混合キラル変種3833よりも低い活性を有する。キラル配列はRNAの活性化および切断を増強する。特定のキラルLNAオリゴヌクレオチドのほとんどについて、RNアーゼH1の活性化はキラリティー混合3833のものよりも良好にはたらいた。特定の配列のうち最良のものは、3833よりも実質的に多くのRNA切断を開始した（30分後に98.4%対47.7%）。特定のLNAオリゴヌクレオチドそれぞれの特徴は、1ヶ所から数ヶ所の切断点まで変動する、それらの独特なRNA切断パターンである。

【 0 2 6 8 】

実施例8 初代肝細胞におけるインピトロ毒性スクリーニング

マウス肝臓灌流

初代マウス肝細胞を、10～13週齢雄C57B16マウスから、逆行性2段階コラゲナーゼ肝臓灌流により単離した。簡単に言うと、餌を与えたマウスをペントバルビタールナトリウム（120mg/kg、i.p.）で麻酔した。灌流チューブを右心室から尾大静脈中に挿入した。総腸骨静脈遠位の尾大静脈の結紮後、門脈を切開し、2段階肝臓灌流および細胞単離を行った。肝臓をまず、カルシウム無し、EGTA（0.5mM）を補充したHEPES（20mM）緩衝化ハンクス平衡塩溶液からなる前灌流溶液で5分間灌流し、続いてCaCl₂（5mM）およびコラゲナーゼ（0.2U/ml；II型コラゲナーゼ、Worthington）を含むNaHCO₃（25mM）補充ハンクス液で12分間灌流した。流速は7ml/分に維持し、すべての溶液を37℃に維持した。インサイチュー灌流後、肝臓を摘出し、肝臓被膜を機械的に切開し、フェノールレッドを含まないウィリアム培地E（WME）（Sigma W-1878）に細胞を懸濁し、1組のナイロンセルストレーナー（40および70メッシュ）を通してろ過した。死滅細胞をパーコール（Sigma P-4937）遠心分離段階（パーコール密度：1.06g/ml、50g、10分）およびWME中の追加の遠心分離（50xg、3分）により除去した。

【 0 2 6 9 】

用いた化合物

10

20

30

40

| | |
|---|-----------|
| $5' - {}^mC_xA_x {}^mC_xa_xt_xt_xc_xc_xt_xg_xc_xt_x {}^mC_xT_xG-3'$ | (親#56) |
| $5' - {}^mC_xA_x {}^mC_xa_xt_xt_s c_xc_xt_xt_sg_xc_xt_s {}^mC_xT_sG-3'$ | (化合物 #57) |
| $5' - {}^mC_xA_x {}^mC_xa_xt_xt_rc_xc_xt_xt_rg_xc_xt_r {}^mC_xT_rG-3'$ | (化合物 #58) |
| $5' - {}^mC_xA_x {}^mC_xa_xt_xt_s c_s c_xt_xt_sg_s c_xt_x {}^mC_xT_xG-3'$ | (化合物 #59) |
| $5' - {}^mC_xA_x {}^mC_xa_xt_xt_rc_rc_xt_xt_rg_rc_xt_x {}^mC_xT_xG-3'$ | (化合物 #60) |

大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドである。

下付き文字x = RpおよびSpモノマーのラセミ混合物から無作為に組み込まれたホスホロチオエート連結。10

下付き文字s = Spモノマーによる立体制御ホスホラミダイト連結。

下付き文字r = Rpモノマーによる立体制御ホスホラミダイト連結。

大文字Cの前の上付き文字mは5-メチルシトシンLNAヌクレオシドを表す。

【0270】

肝細胞培養

細胞培養のために、初代マウス肝細胞を、10%ウシ胎仔血清、ペニシリソ (100U/mL)、ストレプトマイシン (0.1mg/mL) を補充したWMEに、約 5×10^6 細胞/mLの密度で懸濁し、コラーゲンコーティングした96穴プレート (Becton Dickinson AG, Allschwil, Switzerland) 中に 0.25×10^6 細胞/ウェルの密度で播種した。細胞を3~4時間予備培養して細胞培養プレートに接着させた後、オリゴヌクレオチド処理を開始した。PBSに溶解したオリゴヌクレオチドを細胞培養物に加え、細胞上に3日間放置した。細胞毒性レベルを、細胞毒性検出キット (Roche 11644793001, Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, Germany) を製造者のプロトコル通りに用いて、培地中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の量を測定することにより判定した。細胞ATPレベルの判定のために、本発明者らはCellTiter-Glo(登録商標) Luminescent Cell Viability Assay (G9242, Promega Corporation, Madison WI, USA) を製造者のプロトコル通りに用いた。各試料を三つ組で試験した。20

【0271】

標的ノックダウン分析

マウス肝細胞からのmRNA精製 製造者の指示に従ってのRNアーゼなしのDNアーゼIを含むRNeasy 96 Kit (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) 処理。cDNAをiScript一本鎖cDNA合成キット (Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Switzerland) を用いて合成した。定量的リアルタイムPCRアッセイ (qRT-PCR) を、Roche SYBR Green I PCR KitおよびLight Cycler 480 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) を、特異的DNAプライマーと共に用いて実施した。分析を Ct閾値法により行って、RPS12 mRNAに比べての発現を判定した。各分析反応を、条件毎に2試料を用い、二つ組で実施した。結果を図5および6に示す。化合物#58および#60は、標的 (Myd88) に対する有効なアンチセンス活性を保持しているが、有意に低減された毒性を有する。これらの化合物はRpの立体的に規定されたホスホロチオエート連結を含む。30

【0272】

実施例9 腎毒性スクリーニングアッセイ

実施例6および8で用いたのと同じ化合物を、以下のRPTEC-TERT1培養、オリゴヌクレオチド処理および生存度アッセイで用いた。

【0273】

RPTEC-TERT1 (Evercyte GmbH, Austria) を、製造者の指示に従い、PTEC培地 (1%Pen/Strep、10mM Hepes、5.0 μg/mlヒトインスリン、5.0 μg/mlヒトトランスフェリン、8.65ng/ml亜セレン酸ナトリウム、0.1 μMヒドロコルチゾン、10ng/mlヒト組換上皮成長因子、3.5 μg/mlアスコルビン酸、25ng/mlプロスタグランジンE1、3.2pg/mlトリヨード-L-サイロニンおよび100 μg/mlジェネテシンを含むDMEM/F12) 中で培養した。生存度アッセイ

10

20

30

40

50

のために、PTEC-TERT1を96穴プレート（Falcon、353219）中にPTEC培地中 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種し、コンフルエントになるまで増殖させた後、オリゴヌクレオチドで処理した。オリゴヌクレオチドをPBSに溶解し、細胞培養物に10または30 μMの最終濃度で加えた。培地を交換し、オリゴヌクレオチドを3日ごとに新しく加えた。9日間のオリゴヌクレオチド処理後、細胞生存度を、CellTiter-Glo(登録商標) Luminescent Cell Viability Assay (G7571、Promega Corporation、Madison WI、USA) を製造者のプロトコル通りに用いての細胞ATPレベルの測定により判定した。三つ組ウェルの平均ATP濃度および標準偏差を計算した。PBSを媒体対照とした。

【0274】

結果を図8に示す。化合物#10は、立体的に特定されていない化合物#1および化合物#14に比べて低減された腎毒性を示す。立体的に特定された化合物#57、#58、#60は、親化合物 (#56) に比べて有意に低減された腎毒性を示す。

10

【0275】

実施例10 キラルに規定されたホスホロチオエートLNAギャップマーのミスマッチ特異性
用いた実験手順は、親3833化合物と比べて様々な位置にミスマッチを導入した代替RNA基質を用いた以外は、実施例7に記載の通りであった。完全マッチRNA基質およびミスマッチRNA基質に対するRNアーゼH活性を判定した。

20

【0276】

(表3) 3833のRNアーゼH活性に対するミスマッチの影響

| RNA: SEQ ID | RNA 基質 | TM アップ | Tm ダウン | 全長 (%) |
|-------------|------------------------|--------|--------|--------|
| 620 | ACAGAAUACCAUAGCACAGA | 59.5 | 59.4 | 39.1 |
| 6 | UGAGAAUACCAUAGCUAAGU | 57.8 | 59.8 | |
| 7 | CAGGAAUACCAUAGCAGAGA | 59.2 | 61.8 | 58.3 |
| 8 | AGUGGAUACCAUAGCUGCAG | 53.4 | 55.7 | 54.6 |
| 9 | UUUGGGAUACCAUAGCAUAGG | 54.1 | 57.1 | 60.7 |
| 10 | UCUGAGUACCAUAGCCAUGA | 55.0 | 55.5 | 43.7 |
| 11 | GCUGAAUUGCCAUAGCUGAGU | 56.9 | 57.6 | 67.4 |
| 12 | UCUGAAUACCGAUGCUUUA | 57.3 | 58.0 | 42.8 |
| 13 | UCUGAAUACCAUGCUGCUUAA | 56.0 | 57.7 | 43.9 |
| 14 | CUUGUAUACCAUAGCUAUAA | 51.9 | 52.5 | 48.5 |
| 15 | AAAGAAUACCAUAGUUCUCU | 49.2 | 49.8 | |
| 16 | UAUGAAUACCAUUGUCUUUA | 40.5 | 41.4 | 72.0 |
| 17 | CCGAAUUGCCAUAGCAGAGUU | 57.1 | 58.0 | 75.2 |
| 18 | GAUGAAAUACCAUAGGUUAACU | 39.6 | 40.8 | |
| 19 | CUGAAUACCAUAGCUGAACUU | 59.0 | 59.9 | 49.9 |

30

ミスマッチを大きいフォントサイズを用いて示す。RNアーゼH切断は30分後に分析した。
切斷生成物はミスマッチの位置によって変化する。

【0277】

(表4) 3833の立体的に規定された変種のRNアーゼH活性に対するミスマッチの影響

| SEQ ID NO | RNA 基質 | LNA | 全長 (%) | ミスマッチの相対的活性 | 完全マッチの相対的活性 |
|-----------|----------------------|--|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 9 | UUUGGAUACCAAUGCAUAGG | 3833 16639 16657 16685 | 37,7 25,5 7,9 32,8 | 1 1,5 4,8 1,2 | 1 30,6 16,8 8,3 |
| 12 | UCUGAAUACCGAUGCUUUA | 3833 16650 16668 | 53,0 71,7 79,5 | 1 0,7 0,7 | 1 7,7 7,0 |
| 13 | UCUGAAUACCAGUGCUUUAA | 3833 16635 16639 16657 16685 | 46,4 8,5 2,6 28,3 33,8 | 1 5,4 18,0 1,6 1,4 | 1 13,5 30,6 16,8 8,3 |

【 0 2 7 8 】

完全マッチRNA基質に対して、キラルに規定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、混合キラリティーを有するASOよりも著しくRNアーゼH介性RNA切断を活性化する傾向がある。しかし、ミスマッチRNAの顕著に低減されたRNアーゼH切断を有する、選択したホスホロチオエート(ASO)配置のキラルに規定されたオリゴヌクレオチドを見出すことができ、改善されたミスマッチ選択性を有する個々の立体的に規定された化合物を同定するための、オリゴヌクレオチドのキラルに規定された変種のライブラリをスクリーニングする能力が強調されている。

【 0 2 7 9 】

実施例11

用いた親化合物、4358を用いた：

5'G_s^mC_sa_sg_sc_sa_st_sc_sc_st_sG_sT 3' (SEQ ID NO 5)

ここで、大文字はベータ-D-オキシ-LNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、下付き文字sは無作為sまたはrホスホロチオエート連結(オリゴヌクレオチド合成中にキラルに規定されていない)を表し、かつCの前の上付き文字mは5-メチルシトシンLNAヌクレオシドを表す。

【 0 2 8 0 】

一連の完全にキラルに規定された4358の変種を、SまたはRのいずれかで例示するとおり、11箇所のヌクレオシド間の位置それぞれにおいてRおよびSの独特的のパターンで設計した。RNアーゼH動員活性および切断パターンを、ヒトRNアーゼHを用いて判定し、親化合物4358(キラリティー混合物)と比較した。得られた結果は以下のとおりであった。

10

20

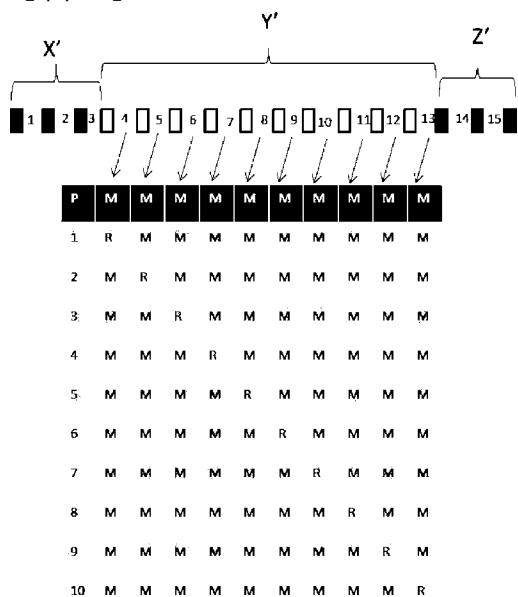
30

40

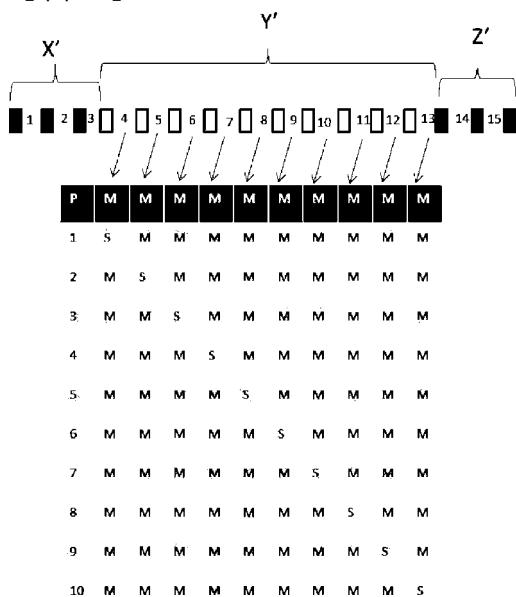
| オリゴ番号 | | | | | | | | | | | | 全長(%) | 全長4358/全長キラル |
|-------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|-------|--------------|
| | 核酸塩基連結のキラリティー | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | |
| 4358 | キラリティー混合物 | | | | | | | | | | | 4.34 | 1.0 |
| 24387 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | 4.30 | 1.01 |
| 24388 | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | 2.64 | 1.64 |
| 24389 | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | 4.01 | 1.08 |
| 24390 | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | 4.14 | 1.05 |

10

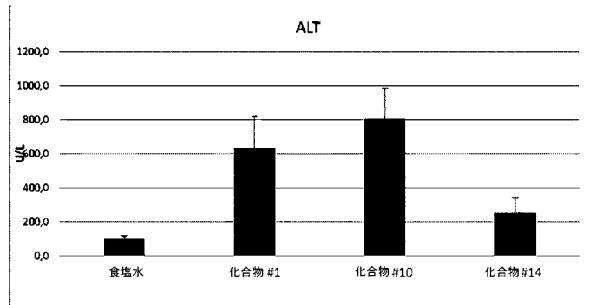
【図1】



【図2】

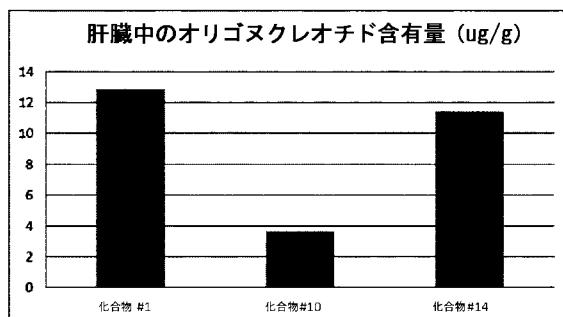


【図3】



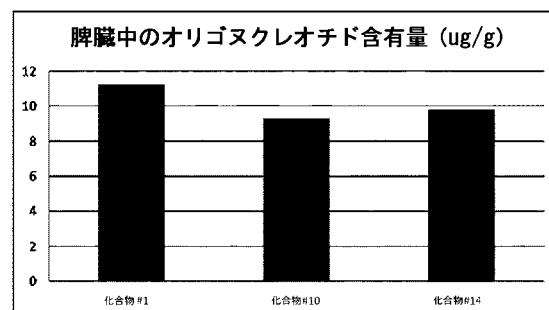
【図4a】

肝臓中の含有量



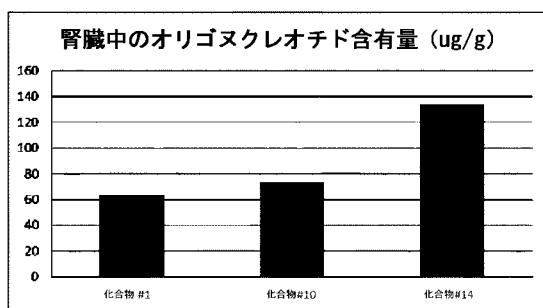
【図4c】

脾臓中の含有量

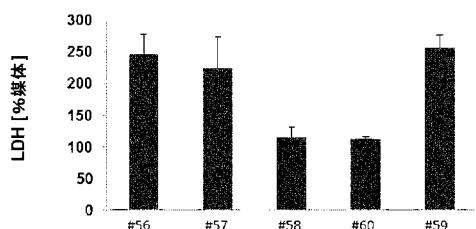


【図4b】

腎臓中の含有量



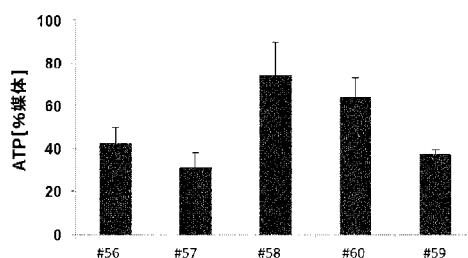
【図5】



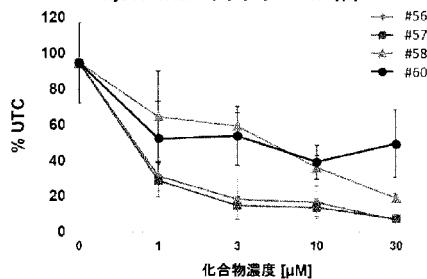
【図6】

| 読み出し | c [μM] | 化合物 | | | | | 対照 LNA | |
|---------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|
| | | #56 | #57 | #58 | #60 | #59 | - | + |
| LDH %対照 | 1 | 168 | 175 | 91 | 85 | 129 | | |
| | 3 | 184 | 198 | 93 | 98 | 217 | | |
| | 10 | 210 | 223 | 112 | 112 | 256 | | |
| ATP %対照 | 30 | 246 | 225 | 116 | 112 | 257 | 114 | 256 |
| | 1 | 71 | 58 | 87 | 81 | 64 | | |
| | 3 | 55 | 42 | 83 | 71 | 56 | | |
| | 10 | 50 | 40 | 78 | 69 | 59 | | |
| | 30 | 35 | 32 | 75 | 64 | 37 | 101 | 28 |

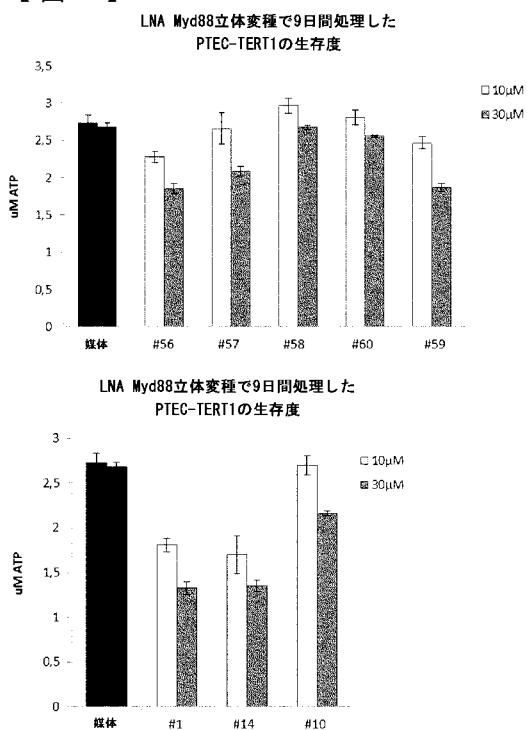
重症度
無毒性
毒性



MyD88 mRNAノックダウン-48時間



【図7】



【配列表】

2017536119000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年8月17日(2017.8.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも5個以上の連続ヌクレオシドの中心領域(Y')、ならびに1~6個のLNAまたは2'置換ヌクレオシドを含む5' ウィング領域(X') および1~6個のLNAまたは2'置換ヌクレオシドを含む3' ウィング領域(Z')

を含むLNAオリゴヌクレオチドであって、中心領域のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1つが立体的に規定されており、かつ中心領域がRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含み；かつ領域(X')または(Z')におけるLNAまたは2'置換ヌクレオシドの少なくとも1個がベータ-D-オキシLNAヌクレオシドである、LNAオリゴヌクレオチド。

【請求項2】

5' ウィング領域(X')が1~6個のLNAヌクレオシドを含み、かつ3' ウィング領域(Z')が1~6個のLNAヌクレオシドを含む、請求項1に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項3】

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結のうち1、2、3、4または5箇所だけが立体的に規定されたホスホロチオエート連結であり、残りのヌクレオシド間連結が無作為にRpまたはSpである、請求項1または2に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結のすべてが立体的に規定されたホスホロチオエート連結である、請求項1または2に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

中心領域(Y')が、少なくとも5個の、ホスホロチオエート連結した連続DNAヌクレオシドを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

中心領域が少なくとも8または9 DNAヌクレオシド長である、請求項1～5のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結が独立にRpまたはSpホスホロチオエート連結のいずれかであり、かつウイング領域(X'またはZ')の少なくとも1つが、LNAヌクレオシドとそれに続く(3')ヌクレオシドとの間の少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

ヌクレオチド対の他のヌクレオシドが、DNA以外、例えばヌクレオシド類縁体、例えばさらなるLNAヌクレオシドまたは2'置換ヌクレオシドである、請求項7記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

中心領域(Y')のヌクレオシド同士を連結している、または領域Y'の3'ヌクレオシドと3'ウイング(Z')の最初のヌクレオシドとを連結している、ヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所が、立体的に規定されたホスホロチオエート連結である、請求項1～8のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

各ウイング領域が1、2または3個のLNAヌクレオシドを含む、請求項1～9のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

少なくとも1つのウイング領域が2'置換ヌクレオシドを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

2'置換ヌクレオシドが2'-O-MOEおよび2'フルオロからなる群より選択される、請求項1～11のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 13】

5'(X')および3'(Z')ウイング領域のヌクレオシドが、LNAヌクレオシド/ヌクレオチド、例えばベータ-D-オキシLNAヌクレオシド/ヌクレオチドを含むか、またはそれらからなる、請求項1～12のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

ギャップマー(X'-Y'-Z')中のすべてのヌクレオシド間連結がホスホロチオエート連結、例えば立体的に規定されたホスホロチオエート連結である、請求項1～13のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

ギャップ領域Y'が、cc、tg、tc、ac、tt、gt、caおよびgcからなる群より選択されるDNAジヌクレオチドモチーフを含み、ここでジヌクレオチドのDNAヌクレオシドの間のヌクレオシド間連結が、立体的に規定されたホスホラミダイト連結、例えばSpまたはRpのいずれかの立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である、請求項1～14のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

例えば実施例7において提供するRNアーゼH動員アッセイを用いて、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチドと比べると、増強されたヒトRNアーゼH動員活性を有する、請求項1～15のいずれか一項に記載のLNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

非ヌクレオシド部分と共有結合した、請求項1～16のいずれか一項に記載の立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドを含む、結合体。

【請求項 18】

請求項1～16のいずれか一項に記載の立体的に規定されたホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドまたは請求項17に記載の結合体、および

薬学的に許容される溶媒（水または食塩水など）、希釈剤、担体、塩またはアジュvantを含む、薬学的組成物。

【請求項 19】

医学において用いるための、請求項1～16のいずれか一項に記載の立体的に規定されたホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドまたは請求項17に記載の結合体。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

体内分布試験は典型的にはインビオで実施するが、例えば、異なる種類の細胞中、例えば、インビトロでの肝細胞（例えば、初代肝細胞）または腎細胞（例えば、PTEC-TERT1細胞などの腎上皮細胞）での細胞への取込を比較することにより、インビトロ系で実施してもよい。

[本発明1001]

少なくとも5個以上の連続ヌクレオシドの中心領域（Y'）、ならびに1～6個のLNAまたは2'置換ヌクレオシドを含む5' ウィング領域（X'）および1～6個のLNAまたは2'置換ヌクレオシドを含む3' ウィング領域（Z'）

を含むLNAオリゴヌクレオチドであって、中心領域のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1つが立体的に規定されており、かつ中心領域がRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含み；かつLNAまたは2'置換ヌクレオシドの領域（X'）または（Z'）の少なくとも1個がベータ-D-オキシLNAヌクレオシドである、LNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1002]

5' ウィング領域（X'）が1～6個のLNAヌクレオシドを含み、かつ3' ウィング領域（Z'）が1～6個のLNAヌクレオシドを含む、本発明1001のLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1003]

中心領域（Y'）のヌクレオシド間連結のうち1、2、3、4または5箇所だけが立体的に規定されたホスホロチオエート連結であり、残りのヌクレオシド間連結が無作為にRpまたはSpである、本発明1001または1002のLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1004]

中心領域（Y'）のヌクレオシド間連結のすべてが立体的に規定されたホスホロチオエート連結である、本発明1001または1002のLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1005]

中心領域（Y'）が、少なくとも5個の、ホスホロチオエート連結した連続DNAヌクレオシドを含む、本発明1001～1004のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1006]

中心領域が少なくとも8または9 DNAヌクレオシド長である、本発明1001～1005のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1007]

中心領域（Y'）のヌクレオシド間連結が独立にRpまたはSpホスホロチオエート連結のいずれかであり、かつウィング領域（X'またはZ'）の少なくとも1つが、LNAヌクレオシドと

それに続く(3')ヌクレオシドとの間の少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結を含む、本発明1001～1006のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1008]

ヌクレオチド対の他のヌクレオシドが、DNA以外、例えばヌクレオシド類縁体、例えばさらなるLNAヌクレオシドまたは2'置換ヌクレオシドである、本発明1007のLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1009]

中心領域(Y')のヌクレオシド同士を連結している、または領域Y'の3'ヌクレオシドと3'ウィング(X')の最初のヌクレオシドとを連結している、ヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所が、立体的に規定されたホスホロチオエート連結である、本発明1001～1008のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1010]

各ウィング領域が1、2または3個のLNAヌクレオシドを含む、本発明1001～1009のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1011]

少なくとも1つのウィング領域が2'置換ヌクレオシドを含む、本発明1001～1010のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1012]

2'置換ヌクレオシドが2'-O-MOEおよび2'フルオロからなる群より選択される、本発明1001～1011のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1013]

5'(X')および3'(Z')ウィング領域のヌクレオシドが、LNAヌクレオシド/ヌクレオチド、例えばベータ-D-オキシLNAヌクレオシド/ヌクレオチドを含むか、またはそれらからなる、本発明1001～1012のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1014]

ギャップマー(X'-Y'-Z')中のすべてのヌクレオシド間連結がホスホロチオエート連結、例えば立体的に規定されたホスホロチオエート連結である、本発明1001～1013のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1015]

ギャップ領域Y'が、cc、tg、tc、ac、tt、gt、caおよびgcからなる群より選択されるDNAジヌクレオチドモチーフを含み、ここでジヌクレオチドのDNAヌクレオシドの間のヌクレオシド間連結が、立体的に規定されたホスホラミダイト連結、例えばSpまたはRpのいずれかの立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である、本発明1001～1014のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1016]

例えば実施例7において提供するRNアーゼH動員アッセイを用いて、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチドと比べると、増強されたヒトRNアーゼH動員活性を有する、本発明1001～1015のいずれかのLNAオリゴヌクレオチド。

[本発明1017]

非ヌクレオシド部分と共有結合した、本発明1001～1016のいずれかの立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドを含む、結合体。

[本発明1018]

本発明1001～1016のいずれかの立体的に規定されたホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドまたは本発明1017のいずれかの結合体、および
薬学的に許容される溶媒(水または食塩水など)、希釈剤、担体、塩またはアジュバントを含む、薬学的組成物。

[本発明1019]

医学において用いるための、本発明1001～1016のいずれかの立体的に規定されたホスホ

口チオエートLNAオリゴヌクレオチドまたは本発明1017のいずれかの結合体。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

【図1】本発明のLNAオリゴヌクレオチドの概略図。図は、15箇所のヌクレオシド間ホスホ口チオエート連結を有する3'-10-3'ギャップマーオリゴヌクレオチドを示す。ウイング領域X'およびZ'におけるヌクレオシド間連結は本明細書に記載のとおりであってもよく、例えば、無作為にRpまたはSpホスホ口チオエート連結であってもよい。図1の表部分は、ギャップ領域Y'のすべてのヌクレオシド間連結も無作為に組み込まれたRpまたはSpホスホ口チオエート連結(M)である親化合物(P)を提供し、化合物1~10では、ホスホ口チオエート連結のうち1箇所がRpホスホ口チオエートヌクレオシド間連結(R)として立体的に規定されている。

【図2】化合物1~10において、ホスホ口チオエート連結のうち1箇所がSpホスホ口チオエートヌクレオシド間連結(S)として立体的に規定されている以外は、図1のとおり。

【図3】3箇所のホスホ口チオエートヌクレオシド間連結が、S(化合物#10)またはR(化合物#14)立体配置のいずれかに固定されているLNAオリゴヌクレオチドの肝毒性の可能性(ALT)を、すべてのヌクレオシド間連結がRおよびS立体配置の混合物であるジアステロ異性体の親混合物(化合物#1)のALTと比較した。

【図4a】肝臓中のオリゴヌクレオチド含有量。

【図4b】腎臓中のオリゴヌクレオチド含有量。

【図4c】脾臓中のオリゴヌクレオチド含有量。

【図5】それぞれのLNAで3日間処理した細胞の、上清中のLDHレベルおよび細胞内ATPレベルの変化。標的ノックダウン(Myd88)を48時間後に評価した。

【図6】初代肝細胞におけるインピトロ毒性スクリーニング：それぞれのLNAで3日間処理した細胞の、上清中のLDHレベルおよび細胞内ATPレベルの変化。データは平均値であり、媒体対照に対する割合(%)として表す(#56についてはn=4実験の三つ組で、他のLNAについてはすべてn=2実験の三つ組)。

【図7】腎臓近位尿細管細胞におけるインピトロ毒性スクリーニング：10 μMおよび30 μMのLNA Myd88立体変種で処理したPTEC-TERT1の、9日後に測定した生存度(細胞ATP)。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0043】

本発明は、少なくとも5個以上の連続ヌクレオシドの中心領域(Y')、ならびに1~6個のLNAまたは2'置換ヌクレオシドを含む5'ウイング領域(X')および1~6個のLNAまたは2'置換ヌクレオシドを含む3'ウイング領域(Z')を含むギャップマーオリゴヌクレオチドであって、中心領域のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所が立体的に規定されており、かつ中心領域がRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含み；かつ領域(X')または(Z')におけるLNAまたは2'置換ヌクレオシドの少なくとも1個がベータ-D-オキシLNAヌクレオシドである、オリゴヌクレオチドを提供する。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドはLNAオリゴヌクレオチドである。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】**【0045】**

領域X'-Y'-Z'のヌクレオチドの連続配列におけるヌクレオチドの間のヌクレオシド間連結はすべて、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結であってもよい。いくつかの態様において、領域Y'内のヌクレオシド間連結はすべて、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、領域X'およびZ'内のヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、領域X'与Y'との間および領域Y'与Z'との間のヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの態様において、領域X'-Y'-Z'の連続ヌクレオシド内のすべてのヌクレオシド間連結は、立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。

【手続補正6】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0105****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0105】**

立体制御されたモノマー

立体制御されたモノマーは、オリゴヌクレオチド中の立体的に規定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結、すなわちSpまたはRpのいずれかを付与する、オリゴヌクレオチド合成において用いられるモノマーである。いくつかの態様において、モノマーはホスホラミダイトなどのアミダイトであってもよい。したがって、モノマーは、いくつかの態様において、立体制御性/制御されたホスホラミダイトなどの、立体制御性/制御されたアミダイトであってもよい。適切なモノマーは実施例、またはOka et al., J. AM. CHEM. SOC. 2008, 130, 16031-16037 9 16031において提供される。同様に、WO 10064146、WO 11005761、WO 13012758、WO 14010250、WO 14010718、WO 14012081、およびWO 15107425も参照されたい。立体制御された/立体制御性なる用語は本明細書において交換可能に用いられ、立体特異的/立体的に特定されたまたは立体的に規定されたモノマーと呼んでもよい。

【手続補正7】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0107****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0107】**

立体的に規定されたホスホロチオエート連結を有するギャップ領域

Wanらにおいて報告されたとおり、ホスホロチオエート連結の無作為ラセミ混合物に比べて、ギャップマー中に全てがRpであるまたは全てがSpであるギャップ領域を導入することに利点はほとんどない。本発明は、少なくとも1箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結の導入がオリゴヌクレオチドの生物学的特性を実質的に改善し得るという、驚くべき利点に基づいており、例えば、利点の項を参照されたい。これは、ギャップ領域中に1箇所またはいくつか、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13もしくは14箇所の立体的に規定されたホスホロチオエート連結を導入すること、あるいはすべてのホスホロチオエート連結を立体的に特定することのいずれかによって達成し得る。

【手続補正8】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0119****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0119】**

「テールマー」は、領域X'およびそれに連続する領域Y'を含むオリゴマーと定義され、領域Y'の最も5'端のモノマーが領域X'の最も3'端のモノマーに連結されている。領域X'はRNアーゼによって認識可能かつ切断可能なDNAモノマーまたはヌクレオシド類縁体モノマーの連続配列(少なくとも7つの連続モノマーなどの)を含み、領域Y'は非RNアーゼ動員ヌクレオシド類縁体の連続配列を含む。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 7】

いくつかの態様において、領域X'は3個または4個のヌクレオチド類縁体、例えばLNAからなり、領域Y'は7、8、9または10個のDNAユニットからなり、かつ領域Z'は3個または4個のヌクレオチド類縁体、例えばLNAからなる。そのような設計には(X'-Y'-Z')3-10-3、3-10-4、4-10-3、3-9-3、3-9-4、4-9-3、3-8-3、3-8-4、4-8-3、3-7-3、3-7-4、4-7-3が含まれる。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 2 3】

態様

1.

少なくとも5個以上の連続ヌクレオシドの中心領域(Y')、ならびに1~6個のLNAヌクレオシドを含む5'ウイング領域(X')および1~6個のLNAヌクレオシドを含む3'ウイング領域(Z')

を含むLNAオリゴヌクレオチドであって、中心領域のヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所が立体的に規定されており、かつ中心領域がRpおよびSpヌクレオシド間連結の両方を含む、LNAオリゴヌクレオチド。

2.

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結のうち1、2、3、4または5箇所だけが立体選択的ホスホロチオエート連結であり、残りのヌクレオシド間連結が無作為にRpまたはSpである、態様1記載のLNAオリゴヌクレオチド。

3.

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結のすべてが立体選択的ホスホロチオエート連結である、態様1記載のLNAオリゴヌクレオチド。

4.

中心領域(Y')が、少なくとも5個の、ホスホロチオエート連結した連続DNAヌクレオシドを含む、態様1~3のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

5.

中心領域が、少なくとも8または9 DNAヌクレオシド長である、態様1~4のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

6.

中心領域が、少なくとも10または11 DNAヌクレオシド長である、態様1~4のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

7.

中心領域が、少なくとも12または13 DNAヌクレオシド長である、態様1~4のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

8.

中心領域が、少なくとも14または15 DNAヌクレオシド長である、態様1～4のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

9.

中心領域(Y')のヌクレオシド間連結がRpまたはSpホスホロチオエート連結のいずれかであり、かつウィング領域(X'またはZ')の少なくとも1つが、LNAヌクレオシドとそれに続く(3')ヌクレオシドとの間の少なくとも1箇所の立体選択的ホスホロチオエート連結を含む、態様1～8のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

10.

少なくとも1つの立体特異的ホスホロチオエートヌクレオチド対を含み、ここでヌクレオチド対の間のヌクレオシド間連結がRp立体配置またはRs立体配置のいずれかであり、かつここでヌクレオチド対のヌクレオシドのうち少なくとも1個がLNAヌクレオチドである、態様1～9のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

11.

ヌクレオチド対の他のヌクレオチドが、DNA以外、例えばヌクレオシド類縁体、例えばさらなるLNAヌクレオシドまたは2'置換ヌクレオシドである、態様10記載のLNAオリゴヌクレオチド。

12.

中心領域(Y')のヌクレオシド同士を連結している、または領域Y'の3'ヌクレオシドと3' ウィング(Z')の最初のヌクレオシドとを連結している、ヌクレオシド間連結のうち少なくとも1箇所が、立体選択的ホスホロチオエート連結である、態様1～11のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

13.

各ウィング領域が1、2または3個のLNAヌクレオシドを含む、態様1～12のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

14.

少なくとも1つのウィング領域が2'置換ヌクレオシドを含む、態様1～13のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

15.

2'置換ヌクレオシドが2'-O-MOEおよび2'フルオロからなる群より選択される、態様14記載のLNAオリゴヌクレオチド。

16.

5'(X')および3'(Z') ウィング領域のヌクレオシドが、LNAヌクレオシド/ヌクレオチド、例えばベータ-D-オキシLNAヌクレオシド/ヌクレオチドを含むか、またはそれらからなる、態様1～13のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

17.

領域X'-Y'-Z'におけるオリゴマーの長さまたはヌクレオシドの連続配列の長さが10～20、例えば10～16の長さである、態様1～16のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

18.

各領域(X'-Y'-Z')中のヌクレオシドの数が1-8-1、1-8-2、2-8-1、2-8-2、3-8-3、2-8-3、3-8-2、4-8-1、4-8-2、1-8-4、2-8-4；または、1-9-1、1-9-2、2-9-1、2-9-2、2-9-3、3-9-2、1-9-3、3-9-1、4-9-1、1-9-4；または、1-10-1、1-10-2、2-10-1、2-10-2、1-10-3、および3-10-1からなる群より選択される、態様1～17のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

19.

各領域(X'-Y'-Z')中のヌクレオシドの数が3-10-3、3-10-4、4-10-3、3-9-3、3-9-4、4-9-3、3-8-3、3-8-4、4-8-3、3-7-3、3-7-4、4-7-3からなる群より選択される、態様1～17のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

20.

各領域(X'-Y'-Z')中のヌクレオシドの数が3-10-3、3-11-3、3-12-3、3-13-3、3-14-3、2-10-2、2-11-2、2-11-2、2-12-2、2-13-2、2-14-2、2-10-3、3-10-2、2-11-3、3-11-2

、3-12-2、2-12-3、3-12-2、2-12-3、3-13-2、2-12-3、3-13-2、2-13-3、3-14-2および2-14-3からなる群より選択される、態様1～17のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

21.

5' ウィング領域が少なくとも1箇所の立体特異的ホスホロチオエート連結、RpまたはSpを含む、態様1～20のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

22.

残りのヌクレオシド間連結が立体的に規定されていない、態様21記載のLNAオリゴヌクレオチド。

23.

3' ウィング領域が少なくとも1箇所の立体特異的ホスホロチオエート連結、RpまたはSpを含む、態様1～20のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

24.

残りのヌクレオシド間連結が立体的に規定されていない、態様23記載のLNAオリゴヌクレオチド。

25.

5' および3' ウィング領域の両方がそれぞれ、独立にまたは独立せずに、RpまたはSpから選択される少なくとも1箇所の立体特異的ホスホロチオエート連結を含む、態様1～20のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

26.

残りのヌクレオシド間連結が立体的に規定されたホスホロチオエート連結ではない、態様25記載のLNAオリゴヌクレオチド。

27.

ギャップマー(X'-Y'-Z')中のすべてのヌクレオシド間連結がホスホロチオエート連結である、態様1～26のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

28.

配列X'-Y'-Z'が表1の標的核酸中に存在する標的配列に対して相補的である、態様1～27のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

29.

ギャップ領域Y'が、cc、tg、tc、ac、tt、gt、caおよびgcからなる群より選択されるDNAジヌクレオチドモチーフを含み、ここでジヌクレオチドのDNAヌクレオシドの間のヌクレオシド間連結が、立体特異的ホスホロチオエート連結、例えばSpまたはRpホスホロチオエートヌクレオシド間連結のいずれかである、態様1～28のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

30.

例えば実施例7において提供するRNアーゼH動員アッセイを用いて、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチドと比べると、増強されたヒトRNアーゼH動員活性を有する、態様1～29のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

31.

LNAオリゴヌクレオチドが、同等の非立体選択的LNAオリゴヌクレオチドに比べて低減された毒性、例えば、実施例6または8において提供するアッセイを用いて測定した、低減されたインビボ肝毒性、または、例えば、実施例9において提供するアッセイを用いて測定した、低減されたインビトロ腎毒性を有する、態様1～30のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

32.

LNAオリゴヌクレオチドがインビボまたはインビトロで変更された体内分布を有する、態様1～30のいずれかに記載のLNAオリゴヌクレオチド。

33.

非ヌクレオシド部分と共有結合した、態様1～32のいずれかに記載の立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチド
を含む、結合体。

34.

結合部分が、GalNAc2などのGalNAcである、態様33記載の結合体。

35.

結合部分がLNAオリゴヌクレオチドの5'または3'に、1、2または3個のホスホジエステル連結したDNAヌクレオシドの領域を介して共有結合している、態様33または34の結合体。

36.

態様1～32のいずれかに記載の立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドまたは態様33～35のいずれかに記載の結合体、および

薬学的に許容される溶媒（水または食塩水など）、希釈剤、担体、塩またはアジュvantを含む、薬学的組成物。

37.

医学において用いるための、態様1～32のいずれかに記載の立体選択的ホスホロチオエートLNAオリゴヌクレオチドまたは態様33～35のいずれかに記載の結合体。

38.

立体的に特定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチド配列の毒性を低減する方法であって：

- a. インピボまたはインピトロで毒性表現型を有する、立体的に特定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを提供する段階
- b. 親ギャップマーオリゴヌクレオチドの中心的核酸塩基配列を保持している、立体的に特定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドのライプラリを作製する段階
- c. 段階b. で作製したライプラリをインピボまたはインピトロ毒性アッセイでスクリーニングする段階
- d. 立体的に特定されていないホスホロチオエートオリゴヌクレオチドに比べて、低減された毒性を有する、1つまたは複数の立体的に特定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを同定する段階

を含む方法。

39.

オリゴヌクレオチドにおける立体的に特定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結の使用であって、立体的に特定されたホスホロチオエートヌクレオシド間連結を含まない同一のオリゴヌクレオチドに比べて、オリゴヌクレオチドが、低減された毒性を有する、使用。

40.

毒性低減オリゴヌクレオチドの合成のための、立体特異的ホスホロチオエートモノマー（例えば、ホスホラミダイト）の使用。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0276

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0276】

（表3）3833のRNアーゼH活性に対するミスマッチの影響

| RNA: SEQ ID | RNA 基質 | TM アップ | Tm ダウン | 全長 (%) |
|-------------|------------------------|--------|--------|--------|
| 20 | ACAGAAUACCAAUUGCACAGA | 59.5 | 59.4 | 39.1 |
| 6 | UGAGAAUACCAAUUGCUAAGU | 57.8 | 59.8 | |
| 7 | CAGGAAUACCAAUGCAGAGA | 59.2 | 61.8 | 58.3 |
| 8 | AGUGGAUACCAAUUGCUGCAG | 53.4 | 55.7 | 54.6 |
| 9 | UUUGGGAUACCAAUGCAGUAGG | 54.1 | 57.1 | 60.7 |
| 10 | UCUGAGUACCAAUGCCAUGA | 55.0 | 55.5 | 43.7 |
| 11 | GCUGAAUGCCAAUGCUGAGU | 56.9 | 57.6 | 67.4 |
| 12 | UCUGAAUACCGAUGCUCUUA | 57.3 | 58.0 | 42.8 |
| 13 | UCUGAAUACCAUGGUUUAA | 56.0 | 57.7 | 43.9 |
| 14 | CUUGUAAUACCAAUUGCUAUA | 51.9 | 52.5 | 48.5 |
| 15 | AAAGAAUACCAAUUGUUCUCU | 49.2 | 49.8 | |
| 16 | UAUGAAUACCAUUGUCUUAU | 40.5 | 41.4 | 72.0 |
| 17 | CCGAUGCCAUGCAGAGUU | 57.1 | 58.0 | 75.2 |
| 18 | GAUGAAAUACCAAUGUUAACU | 39.6 | 40.8 | |
| 19 | CUGAAUACCAAUGCUGAACU | 59.0 | 59.9 | 49.9 |

ミスマッチを大きいフォントサイズを用いて示す。RNアーゼH切断は30分後に分析した。
切断生成物はミスマッチの位置によって変化する。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2017536119000001.app

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No PCT/EP2015/076967 | | | | | | | | | |
|---|---|--|-----------|--|-----------------------|---|---|-----------------|---|--|----|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07H21/00 A61K31/712 A61K31/7125 ADD. | | | | | | | | | | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | | | | | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H | | | | | | | | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | | | | | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data | | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> W. B. WAN ET AL: "Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 42, no. 22, 14 November 2014 (2014-11-14), pages 13456-13468, XP055238014, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gku1115 cited in the application Whole document, in particular oligomers A3, A4, A7, A8, A11, A12, A15 and A16 in Table 1 ----- -/-/ </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">1-16, 18, 19</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"></td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">17</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | W. B. WAN ET AL: "Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 42, no. 22, 14 November 2014 (2014-11-14), pages 13456-13468, XP055238014, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gku1115 cited in the application Whole document, in particular oligomers A3, A4, A7, A8, A11, A12, A15 and A16 in Table 1 ----- -/-/ | 1-16, 18, 19 | Y | | 17 |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | |
| X | W. B. WAN ET AL: "Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 42, no. 22, 14 November 2014 (2014-11-14), pages 13456-13468, XP055238014, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gku1115 cited in the application Whole document, in particular oligomers A3, A4, A7, A8, A11, A12, A15 and A16 in Table 1 ----- -/-/ | 1-16, 18, 19 | | | | | | | | | |
| Y | | 17 | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | | | | | | | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search 22 February 2016 | | Date of mailing of the international search report 29/02/2016 | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Lécaillon, Jennifer | | | | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2015/076967 |
|---|

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | WO 2014/118267 A1 (SANTARIS PHARMA AS [DK]) 7 August 2014 (2014-08-07) cited in the application | 17 |
| A | Whole document, in particular claims 12, 13, 15 and 17, examples 1, 4, 7 and 10, and pages 45-50 and 59 ----- | 1-16,18, 19 |
| A | NATSUHISA OKA ET AL: "Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms", CHEMICAL SOCIETY REVIEWS, vol. 40, no. 12, 1 January 2011 (2011-01-01), page 5829, XP055114271, ISSN: 0306-0012, DOI: 10.1039/c1cs15102a the whole document ----- | 1-19 |
| A | JEPSEN J S ET AL: "LNA-ANTISENSE RIVALS SIRNA FOR GENE SILENCING", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 7, no. 2, 1 January 2004 (2004-01-01) , pages 188-194, XP009083873, ISSN: 1367-6733 the whole document ----- | 1-19 |
| 2 | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2015/076967

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2014118267 | A1 07-08-2014 | AU 2014211406 A1 | 04-06-2015 |
| | | CA 2893801 A1 | 07-08-2014 |
| | | CN 104955952 A | 30-09-2015 |
| | | EP 2951305 A1 | 09-12-2015 |
| | | KR 20150110562 A | 02-10-2015 |
| | | SG 11201505387 P A | 28-08-2015 |
| | | US 2015368642 A1 | 24-12-2015 |
| | | WO 2014118267 A1 | 07-08-2014 |

フロントページの続き

(51) Int.CI. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 9/22 (2006.01) C 1 2 N 9/22

(31) 優先権主張番号 15191074.2
 (32) 優先日 平成27年10月22日(2015.10.22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31) 優先権主張番号 15191075.9
 (32) 優先日 平成27年10月22日(2015.10.22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31) 優先権主張番号 15191076.7
 (32) 優先日 平成27年10月22日(2015.10.22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,Th,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74) 代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74) 代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74) 代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀
 (74) 代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74) 代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
 (74) 代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
 (72) 発明者 アルベク ナンナ
 デンマーク王国 ディーケイ - 3 4 6 0 ピアケレズ フェルスケンガンゲン 2 2
 (72) 発明者 ハンセン ヘンリック フリデンランド
 デンマーク王国 ディーケイ - 4 1 0 0 リングステズ トレカンテン 1 2 エイ
 (72) 発明者 コッホ トロールス
 デンマーク王国 ディーケイ - 2 3 0 0 コペンハーゲン エス ファンキアヴァイ 4 7
 (72) 発明者 ラバン ジェイコブ
 デンマーク王国 ディーケイ - 2 7 4 0 スコウルネ スケバイヴァイ 5
 (72) 発明者 ローゼンバーム クリストフ
 デンマーク王国 ディーケイ - 3 4 6 0 ピアケレズ ツリストヴァイ 1 7 0
 (72) 発明者 ヘッジドーン ピーター
 デンマーク王国 ディーケイ - 2 9 8 0 ヘルスホルム セルマーズ ヴァンジェ 2 2
 F ターム(参考) 4B050 CC07 HH01 KK13 LL01 LL03

4B063 QA01 QA08 QA20 QQ34 QQ52 QR14 QR24 QS25 QS34
4C084 AA13 NA06
4C086 AA01 AA03 EA16 NA06