

(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2016-518842

(P2016-518842A)

(43) 公表日 平成28年6月30日 (2016. 6. 30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010. 01)	C 1 2 N 15/00	Z N A G 4 B O 5 O
A 6 1 P 31/14 (2006. 01)	A 6 1 P 31/14	4 B O 6 5
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 C O 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 119 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-512010 (P2016-512010)	(71) 出願人	513267855
(86) (22) 出願日	平成26年4月30日 (2014. 4. 30)		レグルス セラピューティクス インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月24日 (2015. 12. 24)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ サイエンス センター ドライブ 1 0 6 1 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/036137	(74) 代理人	110000796
(87) 国際公開番号	W02014/179446		特許業務法人三枝国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成26年11月6日 (2014. 11. 6)	(72) 発明者	バット バルクリシェン
(31) 優先権主張番号	61/818, 432		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ ジョン ホブキンズ コート 3 5 4 5 スイート 2 1 0
(32) 優先日	平成25年5月1日 (2013. 5. 1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/822, 112		
(32) 優先日	平成25年5月10日 (2013. 5. 10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/839, 550		
(32) 優先日	平成25年6月26日 (2013. 6. 26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 マイクロRNA化合物およびmiR-122をモジュレートする方法

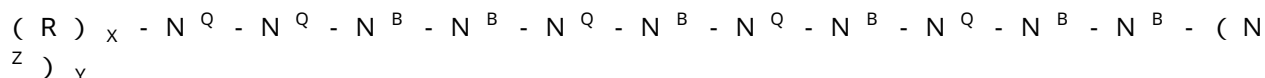
(57) 【要約】

本明細書において、miR-122活性の阻害のための組成物および方法が記載される。組成物は、miR-122活性の強力な阻害剤を生じさせるあるヌクレオシド修飾を有する。化合物は、肝臓への送達を容易にするためのコンジュゲートを含み得る。組成物は、C型肝炎ウイルスおよび関連病態のための治療としてC型肝炎ウイルスに感染している対象に投与することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

16 ~ 22 個の結合ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドの前記ヌクレオ塩基配列は、m i R - 1 2 2 (配列番号 1) に相補的であり、前記修飾オリゴヌクレオチドは、5' から 3' 配向の以下のヌクレオシドパターン I :



[式中、それぞれの R は、独立して、非二環式ヌクレオシドまたは二環式ヌクレオシドであり ;

X は、4 ~ 10 であり ;

それぞれの N^B は、独立して、二環式ヌクレオシドであり ;

それぞれの N^Q は、独立して、非二環式ヌクレオシドであり ;

Y は、0 または 1 であり ; および

N^Z は、修飾ヌクレオシドまたは非修飾ヌクレオシドである]

の少なくとも 16 個の連続ヌクレオシドを含む化合物。

【請求項 2】

前記修飾オリゴヌクレオチドは、ヌクレオシドパターン I の少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、または 22 個の連続ヌクレオシドを含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

それぞれの二環式ヌクレオシドは、LNAヌクレオシド、cEtヌクレオシド、およびENAヌクレオシドから独立して選択される、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

少なくとも 2 つの二環式ヌクレオシドは、互いに異なる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 5】

全ての二環式ヌクレオシドは、互いに同一の糖部分を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

それぞれの二環式ヌクレオシドは、cEtヌクレオシドである、請求項 5 に記載の化合物。

【請求項 7】

前記 cEtヌクレオシドは、S - cEtヌクレオシドである、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

前記 cEtヌクレオシドは、R - cEtヌクレオシドである、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 9】

それぞれの二環式ヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである、請求項 5 に記載の化合物。

【請求項 10】

少なくとも 2 つの非二環式ヌクレオシドは、互いに異なる糖部分を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 11】

それぞれの非二環式ヌクレオシドは、同一タイプの糖部分を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 12】

それぞれの非二環式ヌクレオシドは、- D - デオキシリボヌクレオシド、- D - リボヌクレオシド、2' - O - メチルヌクレオシド、2' - O - メトキシエチルヌクレオシ

10

20

30

40

50

ド、および 2' - フルオロヌクレオシドから独立して選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 13】

それぞれの非二環式ヌクレオシドは、 - D - デオキシリボヌクレオシド、および 2' - O - メトキシエチルヌクレオシドから独立して選択される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 14】

それぞれの非二環式ヌクレオシドは、 - D - デオキシリボヌクレオシドである、請求項 1 ~ 9 または 11 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 15】

それぞれの非二環式ヌクレオシドは、2' - MOEヌクレオシドである、請求項 1 ~ 9 または 11 のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項 16】

2つ以下の非二環式ヌクレオシドは、2' - MOEヌクレオシドであり、それぞれの他の非二環式ヌクレオシドは、 - D - デオキシリボヌクレオシドである、請求項 1 ~ 10、12 または 13 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 17】

前記 5' 末端および 3' 末端非二環式ヌクレオシドは、2' - MOEヌクレオシドであり、およびそれぞれの他の非二環式ヌクレオシドは、 - D - デオキシリボヌクレオシドである、請求項 16 に記載の化合物。

20

【請求項 18】

2つの非二環式ヌクレオシドは、2' - MOEヌクレオシドであり、およびそれぞれの他の非二環式ヌクレオシドは、 - D - デオキシリボヌクレオシドである、請求項 16 に記載の化合物。

【請求項 19】

それぞれの R は、2' - MOEヌクレオシドである、請求項 1 ~ 13 または 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 20】

X は、4、5、6、7、8、9、または 10 である、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項 21】

Y は、0 である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 22】

Y は、1 である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 23】

a) X は、7 であり；

それぞれの R は、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E tヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、 - D - デオキシリボヌクレオシドであり；および Y は、0 であり；

b) X は、4 であり；(R)_X は、N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} であり、N^{R1} および N^{R3} のそれぞれは、S - c E tヌクレオシドであり、かつ N^{R2} および N^{R4} のそれぞれは、 - D - デオキシリボヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E tヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、 - D - デオキシリボヌクレオシドであり；

Y は、1 であり；および N^Z は、 - D - デオキシリボヌクレオシドであり、

c) X は、4 であり；(R)_X は、N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} であり、N^{R1} および N^{R4} のそれぞれは、S - c E tヌクレオシドであり、かつ N^{R2} および N^{R3} のそれぞれは、 - D - デオキシリボヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E tヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、 - D - デオキシリボヌクレオシドであり；

40

50

Y は、1 であり；および N^Z は、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドであり、
 d) X は、7 であり；(R)_X は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、および N^{R4} のそれぞれは、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R5} および N^{R7} のそれぞれは、- D - デオキシリボヌクレオシドであり、および N^{R6} は、S - c E t ヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E t ヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；および Y は、0 であり；

e) X は、7 であり；(R)_X は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、および N^{R5} のそれぞれは、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R6} は、S - c E t ヌクレオシドであり、かつ N^{R7} は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E t ヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；および Y は、0 であり；

f) X は、7 であり；(R)_X は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、 N^{R5} 、および N^{R6} のそれぞれは、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドであり、かつ N^{R7} は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E t ヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；および Y は、0 であり；

g) X は、10 であり；(R)_X は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7} - N^{R8} - N^{R9} - N^{R10}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、 N^{R5} 、および N^{R6} のそれぞれは、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R7} および N^{R9} のそれぞれは、S - c E t ヌクレオシドであり； N^{R8} および N^{R10} のそれぞれは、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E t ヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；および Y は、0 であり；

h) X は、10 であり；(R)_X は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7} - N^{R8} - N^{R9} - N^{R10}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、 N^{R5} 、および N^{R6} のそれぞれは、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R7} および N^{R9} のそれぞれは、S - c E t ヌクレオシドであり；かつ N^{R8} および N^{R10} のそれぞれは、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E t ヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

Y は、1 であり、および N^Z は、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドであり；

i) X は、4 であり；(R)_X は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4}$ であり、 N^{R1} および N^{R4} のそれぞれは、S - c E t ヌクレオシドであり、かつ N^{R1} および N^{R3} のそれぞれは、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E t ヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

Y は、1 であり、および N^Z は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

j) X は、4 であり；(R)_X は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4}$ であり、 N^{R1} は、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R2} および N^{R4} のそれぞれは、S - c E t ヌクレオシドであり、かつ N^{R3} は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

それぞれの N^B は、S - c E t ヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；

Y は、1 であり、および N^Z は、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドである、

請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 24】

前記修飾オリゴヌクレオチドの前記ヌクレオ塩基配列は、m i R - 1 2 2 (配列番号 1) のヌクレオ塩基配列に少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少な

10

20

30

40

50

くとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 相補的である、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 25】

少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であり、またはそれぞれのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であり、任意選択的に前記修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 26】

前記修飾オリゴヌクレオチドの前記ヌクレオ塩基配列は、配列番号 3 ~ 6 から選択され、それぞれの T は、T および U から独立して選択される、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の化合物。

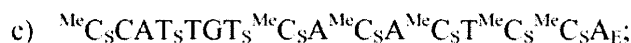
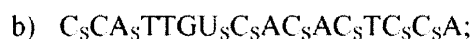
【請求項 27】

前記修飾オリゴヌクレオチドは、miR - 122 のヌクレオ塩基配列に対して 0、1、2、または 3 つのミスマッチを有する、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 28】

構造：

【化 1】



20

30

を有し、

上付き文字「Me」は、5 - メチルシトシンを示し；下付き文字が続かないヌクレオシドは、D - デオキシリボヌクレオシドであり；下付き文字「E」が続くヌクレオシドは、2' - MOEヌクレオシドであり；下付き文字「S」が続くヌクレオシドは、S - c E tヌクレオシドであり；およびそれぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 29】

前記修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端または 3' 末端に結合しているコンジュゲート部分を含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 30】

前記修飾オリゴヌクレオチドの前記 3' 末端に結合しているコンジュゲート部分を含む、請求項 29 に記載の化合物。

【請求項 31】

前記修飾オリゴヌクレオチドの前記 5' 末端に結合しているコンジュゲート部分を含む、請求項 29 に記載の化合物。

【請求項 32】

前記修飾オリゴヌクレオチドの前記 3' 末端に結合している第 1 のコンジュゲート部分

40

50

および前記修飾オリゴヌクレオチドの前記 5' 末端に結合している第 2 のコンジュゲート部分を含む、請求項 29 に記載の化合物。

【請求項 33】

前記コンジュゲート部分は、炭水化物、コレステロール、脂質、リン脂質、抗体、リポタンパク質、ホルモン、ペプチド、ビタミン、ステロイド、およびカチオン脂質から選択される少なくとも 1 つのリガンドを含む、請求項 29 ~ 32 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 34】

構造：



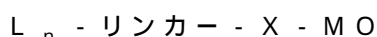
を有し、

それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである、請求項 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項 35】

構造：



を有し、

それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；X は、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである、請求項 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 36】

構造：



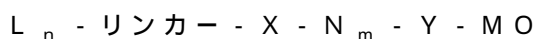
を有し、

それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつ m は、1 ~ 5 であり；X₁ および X₂ は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである、請求項 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項 37】

構造：



を有し、

それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつ m は、1 ~ 5 であり；X は、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；Y は、ホスホジエステル結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである、請求項 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 38】

構造：



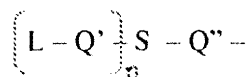
を有し、

それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつ m は、1 ~ 5 であり；それぞれの Y は、ホスホジエステル結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである、請求項 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 39】

n が 1 を上回る場合、L_n - リンカーは、構造：

【化 2】



[式中、それぞれの L は、独立して、リガンドであり； n は、1 ～ 10 であり； S は、足場であり；ならびに Q' および Q'' は、独立して、結合基である]
を有する、請求項 34 ～ 38 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 40】

Q' および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、C₁ ～ C₂₀ アルキル、置換 C₁ ～ C₂₀ アルキル、C₂ ～ C₂₀ アルケニル、置換 C₂ ～ C₂₀ アルケニル、C₂ ～ C₂₀ アルキニル、置換 C₂ ～ C₂₀ アルキニル、C₁ ～ C₂₀ アルコキシ、置換 C₁ ～ C₂₀ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される、請求項 39 に記載の化合物。

10

【請求項 41】

前記足場は、2、3、4、または 5 つのリガンドを修飾オリゴヌクレオチドに結合させる、請求項 39 または 40 に記載の化合物。

【請求項 42】

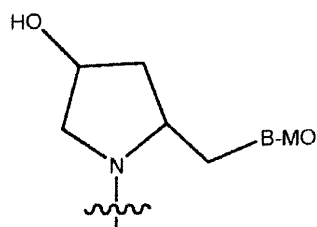
前記足場は、3 つのリガンドを修飾オリゴヌクレオチドに結合させる、請求項 41 に記載の化合物。

20

【請求項 43】

構造：

【化 3】



30

[式中、

B は、- O -、- S -、- N (R^N) -、- Z - P (Z') (Z'') O -、- Z - P (Z') (Z'') O - N_m - X -、および - Z - P (Z') (Z'') O - N_m - Y - から選択され；

MO は、修飾オリゴヌクレオチドであり；

R^N は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、およびベンジルから選択され；

Z、Z'、および Z'' は、O および S からそれぞれ独立して選択され；

40

それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり；

m は、1 ～ 5 であり；

X は、ホスホジエステル結合およびホスホロチオエート結合から選択され；

Y は、ホスホジエステル結合であり；および

波線は、前記リンカーおよびリガンドの残部への連結を示す]

を有する、請求項 34 ～ 42 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 44】

X は、ホスホジエステル結合である、請求項 35、37、39 または 43 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 45】

50

n は、1 ~ 5、1 ~ 4、1 ~ 3、または 1 ~ 2 である、請求項 3 4 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 4 6】

n は、3 である、請求項 3 4 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 4 7】

少なくとも 1 つのリガンドは、炭水化物である、請求項 3 4 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 4 8】

少なくとも 1 つのリガンドは、マンノース、グルコース、ガラクトース、リボース、アラビノース、フルクトース、フコース、キシロース、D - マンノース、L - マンノース、D - ガラクトース、L - ガラクトース、D - グルコース、L - グルコース、D - リボース、L - リボース、D - アラビノース、L - アラビノース、D - フルクトース、L - フルクトース、D - フコース、L - フコース、D - キシロース、L - キシロース、アルファ - D - マンノフラノース、ベータ - D - マンノフラノース、アルファ - D - マンノピラノース、ベータ - D - マンノピラノース、アルファ - D - グルコフラノース、ベータ - D - グルコフラノース、アルファ - D - グルコピラノース、ベータ - D - グルコピラノース、アルファ - D - ガラクトフラノース、ベータ - D - ガラクトフラノース、アルファ - D - ガラクトピラノース、ベータ - D - ガラクトピラノース、アルファ - D - リボフラノース、ベータ - D - リボフラノース、アルファ - D - リボピラノース、ベータ - D - リボピラノース、アルファ - D - フルクトフラノース、アルファ - D - フルクトピラノース、グルコサミン、ガラクトサミン、シアル酸、N - アセチルガラクトサミンから選択される、請求項 3 4 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 4 9】

少なくとも 1 つのリガンドは、N - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、ガラクトサミン、N - ホルミルガラクトサミン、N - プロピオニル - ガラクトサミン、N - n - ブタノイルガラクトサミン、および N - イソ - ブタノイル - ガラクトサミンから選択される、請求項 3 4 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の化合物。

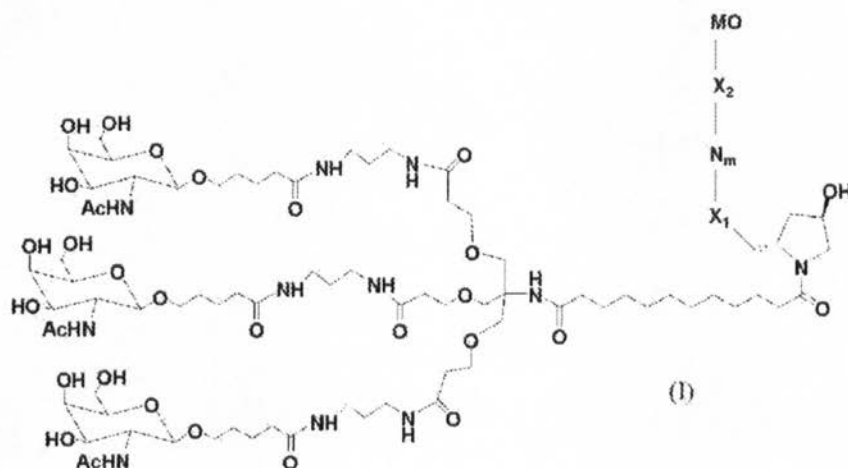
【請求項 5 0】

それぞれのリガンドは、N - アセチルガラクトサミンである、請求項 3 4 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 5 1】

構造：

【化 4】



[式中、それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつ m は、1 ~ 5 であり；X₁ および X₂ は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである]

を有する、請求項 34 ~ 50 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 52】

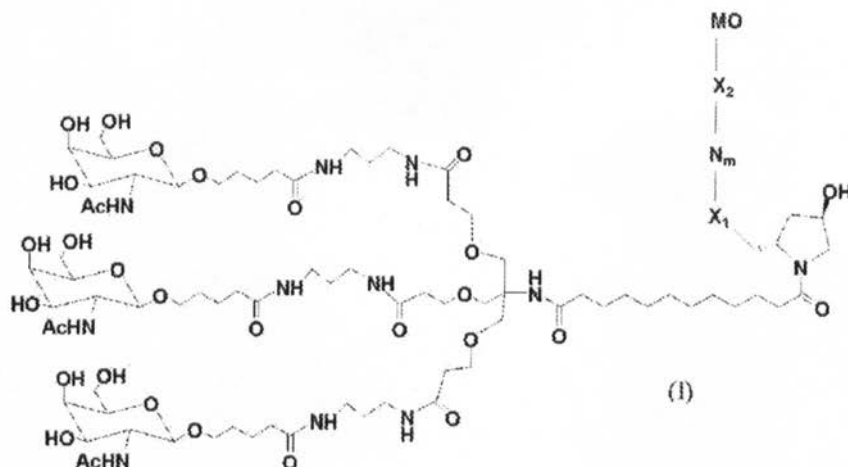
修飾ヌクレオチドおよびコンジュゲート部分を含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドは、構造



を有し、下付き文字「L」は、LNAを示し、かつ下付き文字が続かないヌクレオシドは、
- D - デオキシリボヌクレオシドであり、およびそれぞれのヌクレオシド間結合は、
ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、前記コンジュゲート部分は、前記修飾オリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合しており、かつ構造：

【化 5】

10



20

[式中、それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつ m は、
1 ~ 5 であり；X₁ および X₂ は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホス
ホロチオエート結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである]

を有する化合物。

【請求項 53】

X₁ および X₂ の少なくとも一方は、ホスホジエステル結合である、請求項 51 または
52 に記載の化合物。

30

【請求項 54】

X₁ および X₂ のそれぞれは、ホスホジエステル結合である、請求項 51 ~ 53 のい
ずれか一項に記載の化合物。

【請求項 55】

m は、1 である、請求項 35 ~ 54 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 56】

m は、2、3、4、または 5 である、請求項 35 ~ 54 のいずれか一項に記載の化合物

。

【請求項 57】

40

N_m は、N'_pN'' であり、それぞれの N' は、独立して、修飾または非修飾ヌクレ
オシドであり、かつ p は、0 ~ 4 であり；および N'' は、非修飾糖部分を含むヌクレオ
シドである、請求項 35 ~ 56 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 58】

p は、0 である、請求項 57 に記載の化合物。

【請求項 59】

p は、1、2、3、または 4 である、請求項 57 に記載の化合物。

【請求項 60】

それぞれの N' は、非修飾糖部分を含む、請求項 55 ~ 59 のいずれか一項に記載の化
合物。

50

【請求項 6 1】

それぞれの非修飾糖部分は、独立して、 α -D-リボースまたは α -D-デオキシリボースである、請求項 5 7 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 2】

N' は、プリンヌクレオ塩基を含む、請求項 5 7 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 3】

N' は、ピリミジンヌクレオ塩基を含む、請求項 5 7 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 4】

少なくとも 1 つの N' は、プリンヌクレオ塩基を含む、請求項 5 7 または 5 9 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 5】

それぞれのプリンヌクレオ塩基は、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、および 7 - メチルグアニンから独立して選択される、請求項 6 2 または 6 4 に記載の化合物。

【請求項 6 6】

N' は、 α -D-デオキシリボアデノシンまたは α -D-デオキシリボグアノシンである、請求項 5 7 ~ 6 2、6 4、または 6 5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 7】

少なくとも 1 つの N' は、ピリミジンヌクレオ塩基を含む、請求項 5 7 または 5 9 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 8】

それぞれのピリミジンヌクレオ塩基は、シトシン、5 - メチルシトシン、チミン、ウラシル、および 5 , 6 - ジヒドロウラシルから独立して選択される、請求項 6 3 または 6 7 に記載の化合物。

【請求項 6 9】

それぞれの n の前記糖部分は、 α -D-リボース、 α -D-デオキシリボース、2' - O - メトキシ糖、2' - O - メチル糖、2' - フルオロ糖、および二環式糖部分から独立して選択される、請求項 3 5 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7 0】

それぞれの二環式糖部分は、c E t 糖部分、L N A 糖部分、および E N A 糖部分から独立して選択される、請求項 6 9 に記載の化合物。

【請求項 7 1】

前記 c E t 糖部分は、S - c E t 糖部分である、請求項 7 0 に記載の化合物。

【請求項 7 2】

前記 c E t 糖部分は、R - c E t 糖部分である、請求項 7 0 に記載の化合物。

【請求項 7 3】

修飾ヌクレオチドおよびコンジュゲート部分を含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドは、構造



を有し、下付き文字が続かないヌクレオチドは、 α -D-デオキシリボヌクレオチドであり、下付き文字「E」が続くヌクレオチドは、2' - MOEヌクレオチドであり、下付き文字「S」が続くヌクレオチドは、S - c E tヌクレオチドであり、およびそれぞれのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合であり；前記コンジュゲート部分は、前記修飾オリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合しており、かつ構造：

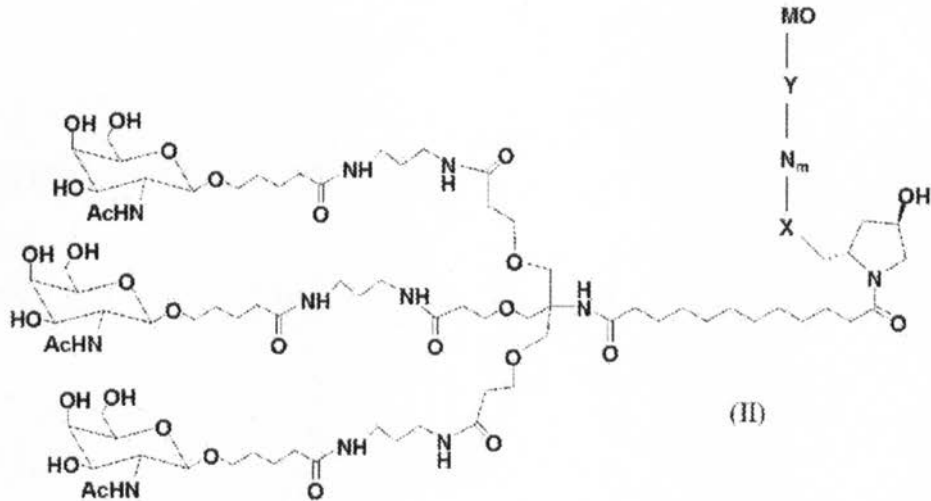
10

20

30

40

【化 6】



10

[式中、X は、ホスホジエステル結合であり；m は、1 であり；N は、 β -D-デオキシリボアデノシンであり；Y は、ホスホジエステル結合であり；およびMO は、前記修飾オリゴヌクレオチドである]

20

を有する化合物。

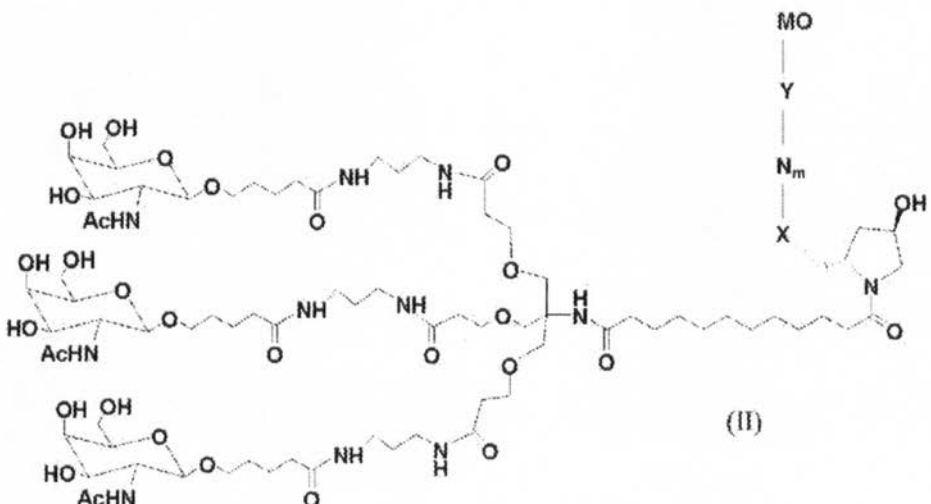
【請求項 7 4】

修飾ヌクレオチドおよびコンジュゲート部分を含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドは、構造

$C_L C A_L T T G_L T_L C A C_L A C_L T C_L C_L$

を有し、下付き文字「L」は、LNAを示し、かつ下付き文字が続かないヌクレオチドは、 β -D-デオキシリボヌクレオチドであり、およびそれぞれのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合であり、前記コンジュゲート部分は、前記修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に結合しており、かつ構造：

【化 7】



30

40

[式中、X は、ホスホジエステル結合であり；m は、1 であり；N は、 β -D-デオキシリボアデノシンであり；Y は、ホスホジエステル結合であり；およびMO は、前記修飾オリゴヌクレオチドである]

を有する化合物。

【請求項 7 5】

細胞を、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の化合物と接触させることを含む、細胞

50

中の mi R - 1 2 2 の活性を阻害する方法。

【請求項 7 6】

前記細胞は、インビボである、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記細胞は、インビトロである、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

H C V 感染対象に、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の化合物を投与することを含む方法。

【請求項 7 9】

前記投与は、H C V 感染の症状を低減させる、請求項 7 8 に記載の方法。

10

【請求項 8 0】

前記投与は、血清 H C V R N A のリバウンドを予防する、請求項 7 8 または 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記投与は、血清 H C V R N A のリバウンドを遅延させる、請求項 7 8 または 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

H C V 感染を有する対象を選択することを含む、請求項 7 8 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 3】

20

前記対象は、ゲノタイプ 1、ゲノタイプ 2、ゲノタイプ 3、ゲノタイプ 4、ゲノタイプ 5、およびゲノタイプ 6 から選択される 1 つ以上の H C V ゲノタイプに感染している、請求項 7 8 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記化合物の投与前、前記対象がゲノタイプ 1、ゲノタイプ 2、ゲノタイプ 3、ゲノタイプ 4、ゲノタイプ 5、およびゲノタイプ 6 から選択される 1 つ以上の H C V ゲノタイプに感染していることを決定した、請求項 7 8 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記 H C V ゲノタイプは、ゲノタイプ 1 a、ゲノタイプ 1 b、ゲノタイプ 2 a、ゲノタイプ 2 b、ゲノタイプ 2 c、ゲノタイプ 2 d、ゲノタイプ 3 a、ゲノタイプ 3 b、ゲノタイプ 3 c、ゲノタイプ 3 d、ゲノタイプ 3 e、ゲノタイプ 3 f、ゲノタイプ 4 a、ゲノタイプ 4 b、ゲノタイプ 4 c、ゲノタイプ 4 d、ゲノタイプ 4 e、ゲノタイプ 4 f、ゲノタイプ 4 g、ゲノタイプ 4 h、ゲノタイプ 4 i、ゲノタイプ 4 j、ゲノタイプ 5 a、およびゲノタイプ 6 a から選択される、請求項 8 3 または 8 4 に記載の方法。

30

【請求項 8 6】

前記 H C V ゲノタイプは、ゲノタイプ 1 a、1 b、および 2 から選択される、請求項 8 3 または 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】

少なくとも 1 つの追加の治療剤を投与することを含む、請求項 7 8 ~ 8 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 8 8】

前記対象は、少なくとも 1 つの治療剤に対して耐性である H C V 変異体に感染している、請求項 7 8 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記少なくとも 1 つの治療剤が、プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、補因子阻害剤、R N A ポリメラーゼ阻害剤、構造タンパク質阻害剤、非構造タンパク質阻害剤、シクロフィリン阻害剤、侵入阻害剤、T L R 7 アゴニスト、およびインターフェロンから選択される、請求項 8 7 または 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記少なくとも 1 つの治療剤は、プロテアーゼ阻害剤、N S 5 A 阻害剤、N S 3 / 4 A

50

阻害剤、ヌクレオシドNS5B阻害剤、ヌクレオチドNS5B阻害剤、非ヌクレオシドNS5B阻害剤、シクロフィリン阻害剤およびインターフェロンから選択される、請求項87または88に記載の方法。

【請求項91】

前記少なくとも1つの治療剤は、インターフェロンアルファ-2a、インターフェロンアルファ-2b、インターフェロンアルファコン-1、ペグインターフェロンアルファ-2b、ペグインターフェロンアルファ-2a、徐放インターフェロン-アルファ-2b、インターフェロンラムダ、ソホスブビル、リバビリン、テラプラビル、ボセプレビル、パニプレビル、アスナプレビル、リトナビル、セトロブビル、ダクラスタビル、シメプレビル、アリスポリビル、メリシタピン、テゴブビル、ダノプレビル、ソバプレビル、およびネセプレビルから選択される、請求項87または88に記載の方法。

10

【請求項92】

前記少なくとも1つの治療剤は、インターフェロン、リバビリン、およびテラプラビルから選択される、請求項87または88に記載の方法。

【請求項93】

前記対象は、少なくとも1つの治療剤に対する非応答者である、請求項78～92のいずれか一項に記載の方法。

【請求項94】

前記対象は、インターフェロン非応答者である、請求項93に記載の方法。

【請求項95】

前記対象は、直接作用型抗ウイルス剤非応答者である、請求項93または94に記載の方法。

20

【請求項96】

血清1ミリリットル当たり350,000コピーを上回るHCV RNAレベルを有する対象を選択することを含む、請求項78～95のいずれか一項に記載の方法。

【請求項97】

血清1ミリリットル当たり350,000～3,500,000コピーのHCV RNAレベルを有する対象を選択することを含む、請求項78～95のいずれか一項に記載の方法。

【請求項98】

血清1ミリリットル当たり3,500,000コピーを上回るHCV RNAレベルを有する対象を選択することを含む、請求項78～95のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項99】

前記対象は、HCV関連疾患を有する、請求項78～98のいずれか一項に記載の方法。

【請求項100】

前記HCV関連疾患は、肝硬変、肝線維症、脂肪性肝炎、脂肪症、または肝細胞癌腫である、請求項99に記載の方法。

【請求項101】

HCV RNAレベルを低減させるための十分なある用量の前記化合物を投与することを含む、請求項78～100のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項102】

HCV RNAレベルを血清1ml当たり40コピー未満に低減させるある用量の前記化合物を投与することを含む、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

HCV RNAレベルの少なくとも2log低減を達成するために十分なある用量の前記化合物を投与することを含む、請求項101に記載の方法。

【請求項104】

前記投与は、持続性ウイルス学的著効を達成する、請求項78～103のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 105】

少なくとも 0.5 倍、少なくとも 1.0 倍、少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2.0 倍、または少なくとも 2.5 倍の HCV RNA レベル低減を達成するために十分なある用量の前記化合物を投与することを含む、請求項 78 ~ 104 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

前記 HCV RNA レベル低減は、前記化合物の最初の投与の 2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、または 6 週間後に達成される、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 107】

前記化合物を、1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回、1 ヶ月に 1 回、2 ヶ月に 1 回、または 3 ヶ月に 1 回投与する、請求項 78 ~ 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 108】

前記化合物の前記用量は、10 mg/kg 以下、7.5 mg/kg 以下、1 週間当たり 5 mg/kg 以下、4.5 mg/kg 以下、4.0 mg/kg 以下、3.5 mg/kg 以下、3.0 mg/kg 以下、2.5 mg/kg 以下、2.0 mg/kg 以下、1.5 mg/kg 以下、または 1.0 mg/kg 以下である、請求項 78 ~ 107 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 109】

前記投与が、肝酵素レベルを正常化させ、前記肝酵素は、任意選択的にアラニンアミノトランスフェラーゼである、請求項 78 ~ 108 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 110】

前記対象は、ヒトである、請求項 78 ~ 109 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 111】

前記化合物は、医薬組成物中に存在する、請求項 78 ~ 110 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 112】

治療法において使用される、請求項 1 ~ 74 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 113】

HCV 感染対象の治療において使用される、請求項 1 ~ 74 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 114】

前記対象は、ヒトである、請求項 113 に記載の使用される化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書において、miR-122 の活性のモジュレーションにおいて使用される化合物および方法が提供される。このような方法は、miR-122 活性に関連する疾患、例えば、HCV 感染の治療を含む。

【背景技術】

【0002】

マイクロ RNA (microRNA) は、「成熟マイクロ RNA」としても公知であり、植物および動物のゲノム中でコードされる小型 (約 18 ~ 24 ヌクレオチド長) の非コード RNA 分子である。ある例において、高度に保存される内因的に発現されるマイクロ RNA は、特異的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' - UTR) に結合することにより遺伝子の発現を調節する。1000 個を超える異なるマイクロ RNA が、植物および動物において同定されている。ある成熟マイクロ RNA は、数百ヌクレオチド長であることが多い長い内因性一次マイクロ RNA 転写物 (プリマイクロ RNA、プリ miR、プリ miR またはプリプレマイクロ RNA としても公知) に由来すると考えられる (Lee, et al., EMBO J., 2002, 21(17), 4663 - 4670)。

【0003】

肝臓中で豊富におよび特異的に発現されるマイクロRNAのmiR-122は、C型肝炎ウイルス蓄積に重要な宿主因子である(Jopling et al., Science, 2005, 309(5740), 1577-81)。miR-122は、HCVゲノムの5'非コード領域中の2つの狭い間隔のシード配列部位に結合することによりHCVと相互作用し、HCVゲノムの安定化をもたらし、複製および翻訳を支持する(Jang et al., J Virol., 2010, 84:6615-6625; Machlin, et al., 2011)。重要なことに、miR-122結合部位は、HCVゲノム中で全てのゲノタイプおよびサブタイプにわたり完全に保存されている(Wilson et al., J. Virol., 2011, 85:2342-2350)。抗miRによるmiR-122の阻害は、マウスおよびカニクイザルにおける総循環コレステロールレベルの低減、ならびにコレステロールホメオスタシス、脂肪酸、および脂質代謝に關与する遺伝子の発現の変化をもたらす(Esau et al., 2006, Cell Metabolism, 3:87-98)。慢性的にHCV感染しているチンパンジーにおいて、HCV RNAレベルの長期的および可逆的抑制ならびに総血清コレステロールの低減への抗miRの毎週の静脈内投与(Lanford et al., 2010, Science, 327:198-201)。ナীবHCV感染患者の慢性治療において、抗miR-122治療は血清HCV RNAの低減をもたらし、したがって、臨床的概念実証を証明する。

【0004】

C型肝炎(HCV)は、フラビウイルス科(Flaviviridae)の肝臓指向性RNAウイルスであり、HCV感染の原因に加え、慢性肝疾患および肝細胞癌腫の主因である。現在の標準的治療のペグ化インターフェロンとリバビリンとの組合せは、多くの患者により不十分に忍容され、一部の患者において50%という低い応答率を有し得る。いくつかの直接作用型抗ウイルス剤NS3プロテアーゼ阻害剤が、現在、HCV感染患者における使用のために承認されているが、HCVにおける耐性突然変異の出現により、追加の薬剤による治療が要求される。開発中の治療法としては、NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤、NS5Aタンパク質阻害剤、ヌクレオシド/チドNS5Bポリメラーゼ阻害剤および非ヌクレオシドNS5B阻害剤が挙げられる。しかしながら、現在の治療に対して応答せず、良好な治療後に再発し、または1つ以上の現在使用されている薬物について低い忍容性を有する感染個体を治療するための追加の治療法が依然として必要とされている。抗ウイルス剤療法に対する耐性は、HCVの高い成熟速度に伴う主要な問題であり、複数の機序を介して機能する薬物の組合せについても見られる。したがって、保存されている突然変異耐性ウイルス宿主因子、例えば、miR-122を標的化する治療法は、より高い、およびより持続的な治癒率を達成するための機会となる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書において、16~22個の結合ヌクレオシドからなる修飾ヌクレオチドを含む化合物であって、修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、miR-122(配列番号1)に相補的であり、修飾オリゴヌクレオチドは、5'から3'配向の以下のヌクレオシドパターンI:

$$(R)_X - N^Q - N^Q - N^B - N^B - N^Q - N^B - N^Q - N^B - N^Q - N^B - N^B - (N^Z)_Y$$

[式中、それぞれのRは、独立して、非二環式ヌクレオシドまたは二環式ヌクレオシドであり；

Xは、4~10であり；

それぞれの N^B は、独立して、二環式ヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、独立して、非二環式ヌクレオシドであり；

Yは、0または1であり；および

N^Z は、修飾ヌクレオシドまたは非修飾ヌクレオシドである]

の少なくとも 16 個の連続ヌクレオシドを含む化合物が提供される。

【0006】

ある実施形態において、本明細書に提供される化合物は、ヌクレオシドパターン I の少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、または 22 個の連続ヌクレオシドを含む修飾ヌクレオチドを含む。

【0007】

ある実施形態において、それぞれの二環式ヌクレオシドは、LNAヌクレオシド、cEtヌクレオシド、およびENAヌクレオシドから独立して選択される。ある実施形態において、少なくとも 2 つの二環式ヌクレオシドは、互いに異なる。ある実施形態において、全ての二環式ヌクレオシドは、互いに同一の糖部分を有する。ある実施形態において、それぞれの二環式ヌクレオシドは、cEtヌクレオシドである。ある実施形態において、cEtヌクレオシドは、S-cEtヌクレオシドである。ある実施形態において、cEtヌクレオシドは、R-cEtヌクレオシドである。ある実施形態において、それぞれの二環式ヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。

【0008】

ある実施形態において、少なくとも 2 つの非二環式ヌクレオシドは、互いに異なる糖部分を含む。ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、同一タイプの糖部分を有する。ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシド、-D-リボヌクレオシド、2'-O-メチルヌクレオシド、2'-O-メトキシエチルヌクレオシド、および 2'-フルオロヌクレオシドから独立して選択される。ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシド、および 2'-O-メトキシエチルヌクレオシドから独立して選択される。ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドである。ある実施形態において、2 つ以下の非二環式ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドであり、それぞれの他の非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。ある実施形態において、5'末端および 3'末端非二環式ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドであり、およびそれぞれの他の非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。ある実施形態において、2 つの非二環式ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドであり、およびそれぞれの他の非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。

【0009】

ある実施形態において、それぞれの R は、2'-MOEヌクレオシドである。ある実施形態において、X は、4、5、6、7、8、9、または 10 である。ある実施形態において、Y は、0 である。ある実施形態において、Y は、1 である。

【0010】

ある実施形態において、X は、7 であり、それぞれの R は、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり、それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり、および Y は、0 である。

【0011】

ある実施形態において、X は、4 であり；(R)_X は、N^{R1}-N^{R2}-N^{R3}-N^{R4}であり、N^{R1}およびN^{R3}のそれぞれは、S-cEtヌクレオシドであり、かつN^{R2}およびN^{R4}のそれぞれは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれのN^Bは、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれのN^Qは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Y は、1 であり；およびN^Zは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。

【0012】

ある実施形態において、X は、4 であり；(R)_X は、N^{R1}-N^{R2}-N^{R3}-N^{R4}であり、N^{R1}およびN^{R4}のそれぞれは、S-cEtヌクレオシドであり、かつN^{R2}およびN^{R3}のそれぞれは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれのN

B は、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり； Y は、 1 であり；および N^Z は、 $2' - O -$ メトキシエチルヌクレオシドである。

【0013】

ある実施形態において、 X は、 7 であり； $(R)_X$ は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、および N^{R4} のそれぞれは、 $2' - O -$ メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R5} および N^{R7} のそれぞれは、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり、および N^{R6} は、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり；および Y は、 0 である。

10

【0014】

ある実施形態において、 X は、 7 であり； $(R)_X$ は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} および N^{R5} のそれぞれは、 $2' - O -$ メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R6} は、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり、かつ N^{R7} は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり；および Y は、 0 である。

【0015】

ある実施形態において、 X は、 7 であり； $(R)_X$ は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、 N^{R5} 、および N^{R6} のそれぞれは、 $2' - O -$ メトキシエチルヌクレオシドであり、かつ N^{R7} は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり；および Y は、 0 である。

20

【0016】

ある実施形態において、 X は、 10 であり； $(R)_X$ は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7} - N^{R8} - N^{R9} - N^{R10}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、 N^{R5} 、および N^{R6} のそれぞれは、 $2' - O -$ メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R7} および N^{R9} のそれぞれは、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり； N^{R8} および N^{R10} のそれぞれは、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり；および Y は、 0 である。

30

【0017】

ある実施形態において、 X は、 10 であり； $(R)_X$ は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7} - N^{R8} - N^{R9} - N^{R10}$ であり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、 N^{R5} 、および N^{R6} のそれぞれは、 $2' - O -$ メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R7} および N^{R9} のそれぞれは、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；かつ N^{R8} および N^{R10} のそれぞれは、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり； Y は、 1 であり、および N^Z は、 $2' - O -$ メトキシエチルヌクレオシドである。

40

【0018】

ある実施形態において、 X は、 4 であり； $(R)_X$ は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4}$ であり、 N^{R1} および N^{R4} のそれぞれは、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり、かつ N^{R2} および N^{R3} のそれぞれは、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドであり； Y は、 1 であり、および N^Z は、 $- D -$ デオキシリボヌクレオシドである。

【0019】

ある実施形態において、 X は、 4 であり； $(R)_X$ は、 $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4}$

50

⁴であり、N^{R 1}は、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、N^{R 2}およびN^{R 4}のそれぞれは、S-c E tヌクレオシドであり、かつN^{R 3}は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれのN^Bは、S-c E tヌクレオシドであり；それぞれのN^Qは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、1であり、およびN^Zは、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドである。

【0020】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、mi R - 1 2 2 (配列番号1)のヌクレオ塩基配列に少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的である。

10

【0021】

ある実施形態において、少なくとも1つのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であり、またはそれぞれのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であり、任意選択的に修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0022】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、配列番号3～6から選択され、それぞれのTは、TおよびUから独立して選択される。

【0023】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、mi R - 1 2 2のヌクレオ塩基配列に対して0、1、2、または3つのミスマッチを有する。

20

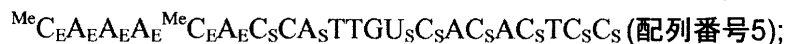
【0024】

ある実施形態において、化合物は、構造：

【化1】



30



を有し、

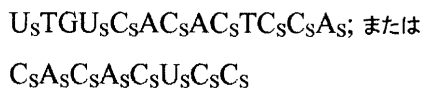
上付き文字「Me」は、5-メチルシトシンを示し；下付き文字が続かないヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；下付き文字「E」が続くヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドであり；下付き文字「S」が続くヌクレオシドは、S-c E tヌクレオシドであり；およびそれぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

40

【0025】

一部の実施形態において、化合物は、構造：

【化 2】



を有し、

下付き文字が続かないヌクレオシドは、 $-D-$ デオキシリボヌクレオシドであり；下付き文字「S」が続くヌクレオシドは、 $S-cEt$ ヌクレオシドであり；およびそれぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。一部のこのような実施形態において、化合物は、化合物 38591、38633、38998、または 38634 である。

10

【0026】

本明細書に提供される化合物のいずれかは、修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端または 3' 末端に結合しているコンジュゲート部分を含み得る。ある実施形態において、化合物は、修飾オリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合しているコンジュゲート部分を含む。ある実施形態において、化合物は、修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合しているコンジュゲート部分を含む。ある実施形態において、化合物は、修飾オリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合している第 1 のコンジュゲート部分および修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合している第 2 のコンジュゲート部分を含む。ある実施形態において、コンジュゲート部分は、炭水化物、コレステロール、脂質、リン脂質、抗体、リボタンパク質、ホルモン、ペプチド、ビタミン、ステロイド、およびカチオン脂質から選択される少なくとも 1 つのリガンドを含む。

20

【0027】

ある実施形態において、化合物は、構造 L_n - リンカー - MO を有し、それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである。

【0028】

ある実施形態において、化合物は、構造 L_n - リンカー - X - MO を有し、それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；X は、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである。

30

【0029】

ある実施形態において、化合物は、構造 L_n - リンカー - X_1 - N_m - X_2 - MO を有し、それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつ m は、1 ~ 5 であり； X_1 および X_2 は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである。

【0030】

ある実施形態において、化合物は、構造 L_n - リンカー - X - N_m - Y - MO を有し、それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつ m は、1 ~ 5 であり；X は、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；Y は、ホスホジエステル結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである。

40

【0031】

ある実施形態において、化合物は、構造 L_n - リンカー - Y - N_m - Y - MO を有し、それぞれの L は、独立して、リガンドであり、かつ n は、1 ~ 10 であり；それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつ m は、1 ~ 5 であり；それぞれの Y は、ホスホジエステル結合であり；および MO は、修飾オリゴヌクレオチドである。

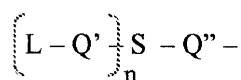
。

【0032】

50

ある実施形態において、 n が 1 を上回る場合、 L_n - リンカーは、構造：

【化 3】



[式中、それぞれの L は、独立して、リガンドであり； n は、1 ~ 10 であり； S は、足場であり；ならびに Q' および Q'' は、独立して、結合基である]
を有する。

【0033】

ある実施形態において、 Q' および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。

10

【0034】

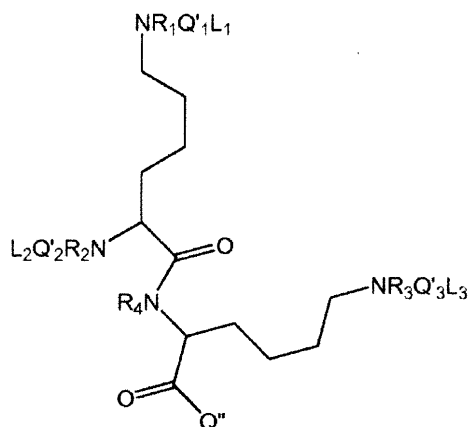
ある実施形態において、足場は、2、3、4、または 5 つのリガンドを修飾オリゴヌクレオチドに結合させる。ある実施形態において、足場は、3 つのリガンドを修飾オリゴヌクレオチドに結合させる。

20

【0035】

非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (i)：

【化 4】



30

[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり；ならびに R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキルおよび置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]
である。

40

【0036】

一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2

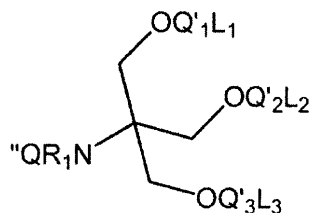
50

、 R_3 、および R_4 は、Hおよびメチルからそれぞれ選択される。

【0037】

さらなる非限定的な例示的な構造Eは、構造E (ii) :

【化5】



10

[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり；ならびに R_1 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される]である。

【0038】

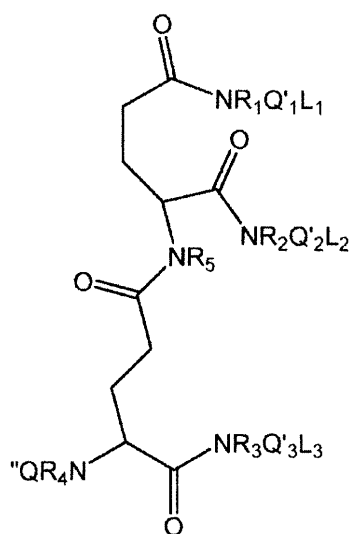
一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(ADO)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、および6-アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルから選択される。一部の実施形態において、 R_1 は、Hまたはメチルである。

20

【0039】

さらなる非限定的な例示的な構造Eは、構造E (iii) :

【化6】



30

40

[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり；ならびに R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、および R_5 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]である。

【0040】

一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エー

50

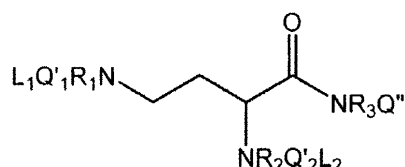
テル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、および R_5 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、および R_5 は、H およびメチルからそれぞれ選択される。

【0041】

10

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (iv) :

【化 7】



[式中、 L_1 および L_2 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり；ならびに R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]

20

である。

【0042】

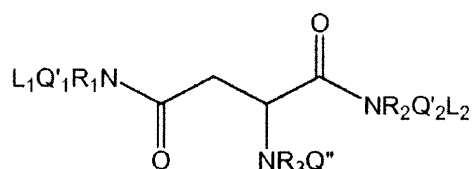
一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H およびメチルからそれぞれ選択される。

30

【0043】

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (v) :

【化 8】



40

[式中、 L_1 および L_2 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり；ならびに R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]

である。

【0044】

一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポ

50

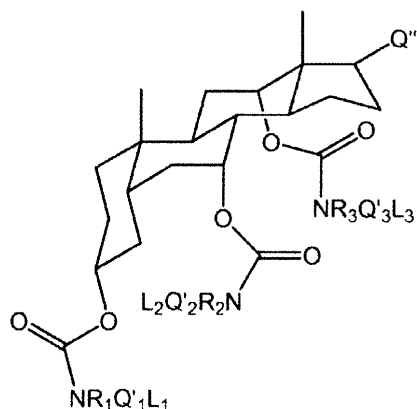
リエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H およびメチルからそれぞれ選択される。

【0045】

10

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (v i) :

【化 9】



20

[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり；ならびに R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]

である。

【0046】

30

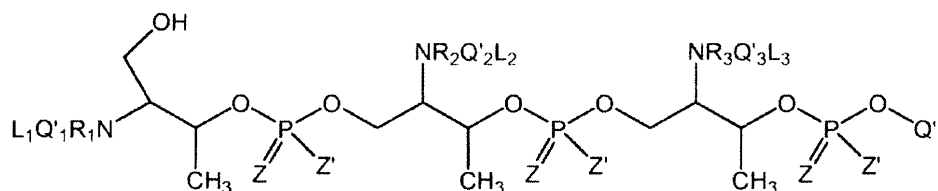
一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H およびメチルからそれぞれ選択される。

40

【0047】

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (v i i) :

【化 10】



[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり；ならびに R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]

50

2、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり； R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択され；ならびにZおよびZ'は、OおよびSからそれぞれ独立して選択される]である。

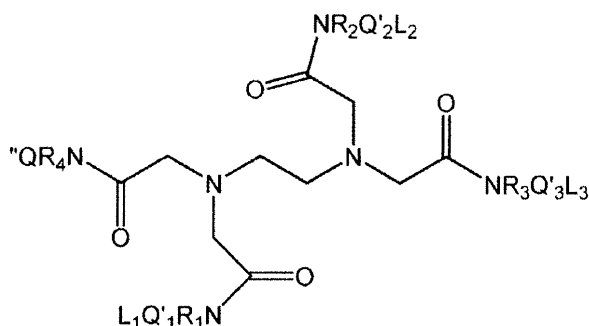
【0048】

一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(ADO)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、および6-アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、Hおよびメチルからそれぞれ選択される。一部の実施形態において、少なくとも1つのP原子上のZまたはZ'は、Sであり、他のZまたはZ'は、Oである(すなわち、ホスホロチオエート結合)。一部の実施形態において、それぞれの-OP(Z)(Z')O-は、ホスホロチオエート結合である。一部の実施形態において、ZおよびZ'は、両方とも少なくとも1つのP原子上のOである(すなわち、ホスホジエステル結合)。一部の実施形態において、それぞれの-OP(Z)(Z')O-は、ホスホジエステル結合である。

【0049】

さらなる非限定的な例示的な構造Eは、構造E(viii)：

【化11】



[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり；ならびに R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]である。

【0050】

一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(ADO)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、および6-アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、Hおよびメチルからそれぞれ選択される。

【0051】

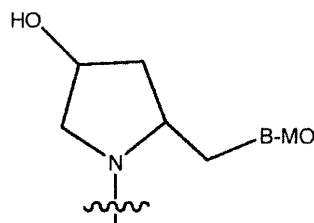
非限定的な例示的な足場および/または足場を含むリンカー、ならびにそれらの合成は、例えば、PCT公開の国際公開第2013/033230号パンフレット、米国特許第8,106,022B2号明細書、米国特許出願公開第2012/0157509A1号明細書；米国特許第5,994,517号明細書；米国特許第7,491,805B2号明細書；米国特許第8,313,772B2号明細書；Manoharan, M., Chapter 16, Antisense Drug Technology, Crooke, S.T., Marcel Dekker, Inc., 2001, 391-469に記載されている。

【0052】

ある実施形態において、化合物は、構造：

10

【化12】



[式中、

Bは、-O-、-S-、-N(R^N)-、-Z-P(Z')(Z'')O-、-Z-P(Z')(Z'')O-N_m-X-、および-Z-P(Z')(Z'')O-N_m-Y-から選択され；

20

MOは、修飾オリゴヌクレオチドであり；

R^Nは、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、およびベンジルから選択され；

Z、Z'、およびZ''は、OおよびSからそれぞれ独立して選択され；

それぞれのNは、独立して、修飾または非修飾ヌクレオチドであり；

mは、1～5であり；

Xは、ホスホジエステル結合およびホスホロチオエート結合から選択され；

Yは、ホスホジエステル結合であり；および

30

波線は、リンカーおよびリガンドの残部への連結を示す]を有する。

【0053】

ある実施形態において、Xは、ホスホジエステル結合である。

【0054】

ある実施形態において、nは、1～5、1～4、1～3、または1～2である。ある実施形態において、nは、3である。

【0055】

ある実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、炭水化物である。

【0056】

40

ある実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、マンノース、グルコース、ガラクトース、リボース、アラビノース、フルクトース、フコース、キシロース、D-マンノース、L-マンノース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、D-グルコース、L-グルコース、D-リボース、L-リボース、D-アラビノース、L-アラビノース、D-フルクトース、L-フルクトース、D-フコース、L-フコース、D-キシロース、L-キシロース、アルファ-D-マンノフラノース、ベータ-D-マンノフラノース、アルファ-D-マンノピラノース、ベータ-D-マンノピラノース、アルファ-D-グルコフラノース、ベータ-D-グルコフラノース、アルファ-D-グルコピラノース、ベータ-D-グルコピラノース、アルファ-D-ガラクトフラノース、ベータ-D-ガラクトフラノース、アルファ-D-ガラクトピラノース、ベータ-D-ガラクトピラノース、アルファ-

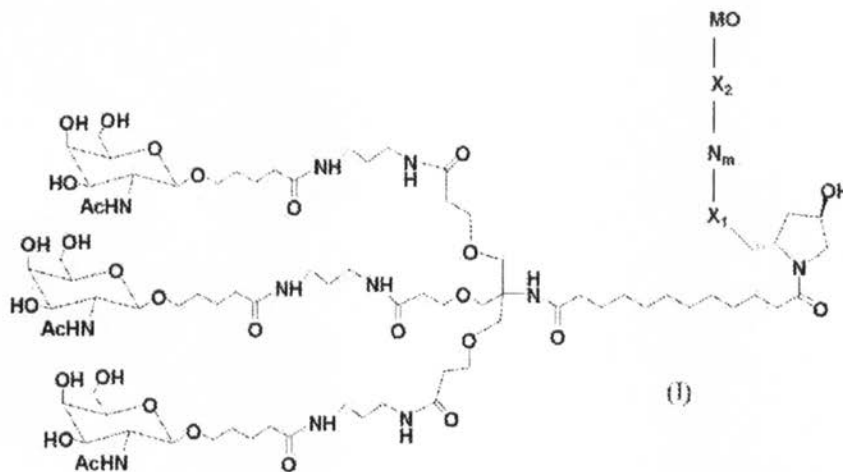
50

【 0 0 5 7 】

【 0 0 5 8 】

【 0 0 5 9 】

【化 1 3】

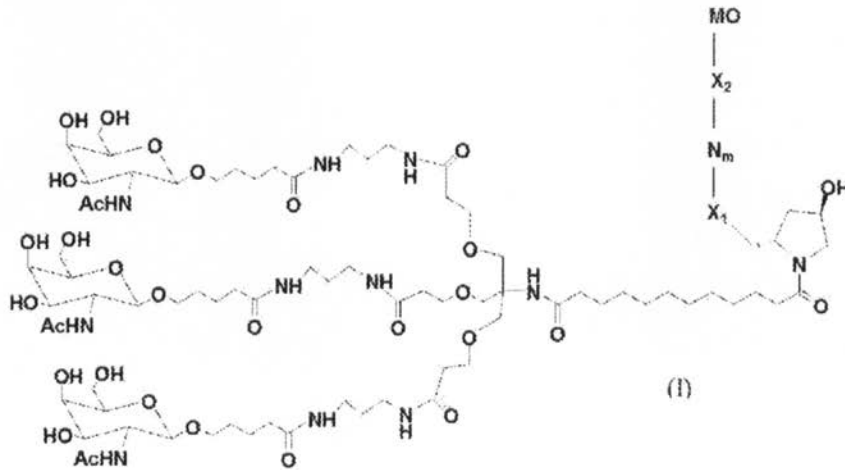


【 0 0 6 0 】

C, C A, T T G, T, C A C, A C, T C, C, (配列番号7)

を有し、下付き文字「L」は、LNAを示し、かつ下付き文字が続かないヌクレオシドは、
 - D - デオキシリボヌクレオシドであり、およびそれぞれのヌクレオシド間結合は、
 ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、コンジュゲート部分は、修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に結合しており、かつ構造：

【化 1 4】



10

〔式中、それぞれのNは、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつmは、1～5であり； X_1 および X_2 は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；およびMOは、修飾オリゴヌクレオチドである〕を有する。

【0061】

20

ある実施形態において、 X_1 および X_2 少なくとも一方は、ホスホジエステル結合である。ある実施形態において、 X_1 および X_2 のそれぞれは、ホスホジエステル結合である。ある実施形態において、mは、1である。ある実施形態において、mは、2、3、4、または5である。

【0062】

ある実施形態において、 N_m は、 $N'_p N''$ であり、それぞれの N' は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、かつpは、0～4であり；および N'' は、非修飾糖部分を含むヌクレオシドである。ある実施形態において、pは、0である。ある実施形態において、pは、1、2、3、または4である。

【0063】

30

ある実施形態において、それぞれの N' は、非修飾糖部分を含む。ある実施形態において、それぞれの非修飾糖部分は、独立して、 $-D$ -リボースまたは $-D$ -デオキシリボースである。ある実施形態において、 N'' は、プリンヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、 N'' は、ピリミジンヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、少なくとも1つの N' は、プリンヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、それぞれのプリンヌクレオ塩基は、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、および7-メチルグアニンから独立して選択される。ある実施形態において、 N'' は、 $-D$ -デオキシリボアデノシンまたは $-D$ -デオキシリボグアノシンである。ある実施形態において、少なくとも1つの N' は、ピリミジンヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、それぞれのピリミジンヌクレオ塩基は、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、ウラシル、および5, 6-ジヒドロウラシルから独立して選択される。

40

【0064】

本明細書に記載の実施形態のいずれかにおいて、それぞれのNの糖部分は、 $-D$ -リボース、 $-D$ -デオキシリボース、2'-O-メトキシ糖、2'-O-メチル糖、2'-フルオロ糖、および二環式糖部分から独立して選択される。ある実施形態において、それぞれの二環式糖部分は、cEt糖部分、LNA糖部分、およびENA糖部分から独立して選択される。ある実施形態において、cEt糖部分は、S-cEt糖部分である。ある実施形態において、cEt糖部分は、R-cEt糖部分である。本明細書に記載の任意の実施形態において、それぞれのNの糖部分は、 $-D$ -リボース、 $-D$ -デオキシリボース、および2'-フルオロ糖から独立して選択することができる。

50

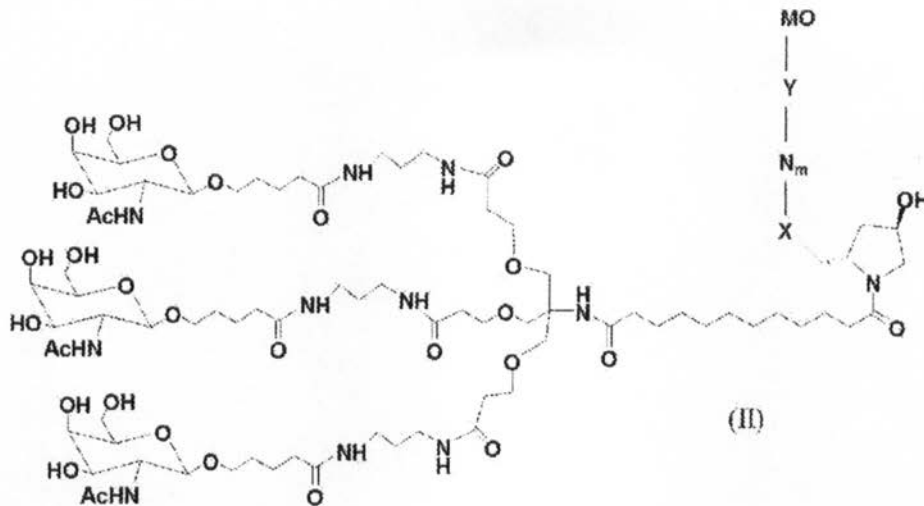
【 0 0 6 5 】

本明細書において、修飾ヌクレオチドおよびコンジュゲート部分を含む化合物であって、修飾オリゴヌクレオチドは、構造

$A_E^{Me} C_E A_E^{Me} C_E^{Me} C_E A_E T_E T G U_S C_S A C_S A C_S T C_S C_S$ (配列番号 4)

を有し、下付き文字が続かないヌクレオシドは、 $-D-$ デオキシリボヌクレオシドであり、下付き文字「E」が続くヌクレオシドは、 $2'$ -MOEヌクレオシドであり、下付き文字「S」が続くヌクレオシドは、 S -cEtヌクレオシドであり、およびそれぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり；コンジュゲート部分は、修飾オリゴヌクレオチドの $3'$ 末端に結合しており、かつ構造：

【 化 1 5 】



[式中、Xは、ホスホジエステル結合であり；mは、1であり；Nは、 $-D-$ デオキシリボアデノシンであり；Yは、ホスホジエステル結合であり；およびMOは、修飾オリゴヌクレオチドである]

を有する化合物が提供される。

【 0 0 6 6 】

本明細書において、修飾ヌクレオチドおよびコンジュゲート部分を含む化合物であって、修飾オリゴヌクレオチドは、構造

$C_L C A_L T T G_L T_L C A C_L A C_L T C_L C_L$ (配列番号 7)

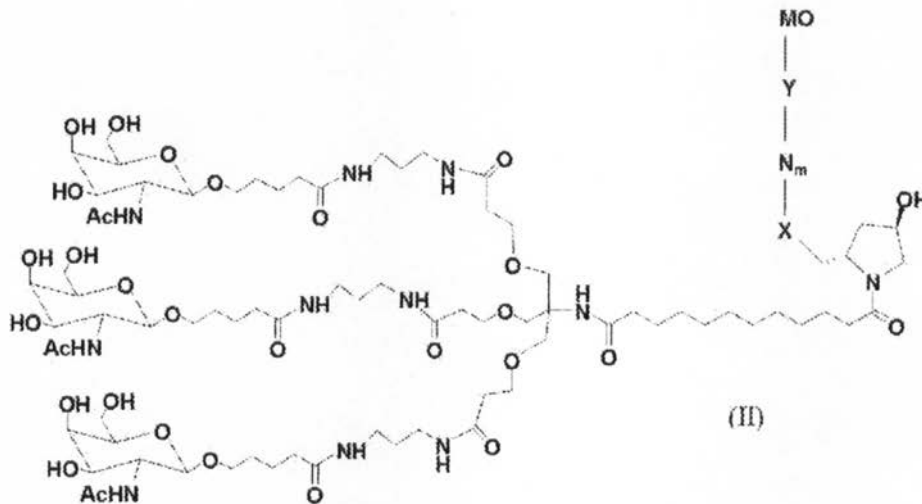
を有し、下付き文字「L」は、LNAを示し、かつ下付き文字が続かないヌクレオシドは、 $-D-$ デオキシリボヌクレオシドであり、およびそれぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、コンジュゲート部分は、修飾オリゴヌクレオチドの $3'$ 末端に結合しており、かつ構造：

10

20

30

【化 1 6】



10

[式中、X は、ホスホジエステル結合であり；m は、1 であり；N は、 β -D-デオキシリボアデノシンであり；Y は、ホスホジエステル結合であり；およびMO は、修飾オリゴヌクレオチドである]

を有する化合物が提供される。一部の実施形態において、C_Lヌクレオシドの全ては、^Me C_Lヌクレオシドであり、上付き文字「Me」は、5-メチルシトシンを示す。

20

【0067】

本明細書において、細胞を、本明細書に提供される任意の化合物と接触させることを含む、細胞中のmiR-122の活性を阻害する方法が提供される。ある実施形態において、細胞は、インビボである。ある実施形態において、細胞は、インビトロである。

【0068】

本明細書において、HCV感染対象に、本明細書に提供される化合物のいずれかを投与する方法が提供される。ある実施形態において、投与は、HCV感染の症状を低減させる。ある実施形態において、投与は、血清HCV RNAのリバウンドを予防する。ある実施形態において、投与は、血清HCV RNAのリバウンドを遅延させる。ある実施形態において、HCV感染を有する対象を、本明細書に提供される化合物による治療のために選択する。ある実施形態において、HCV感染対象は、ゲノタイプ1、ゲノタイプ2、ゲノタイプ3、ゲノタイプ4、ゲノタイプ5、およびゲノタイプ6から選択される1つ以上のHCVゲノタイプに感染している。ある実施形態において、本明細書に提供される化合物の投与前、対象がゲノタイプ1、ゲノタイプ2、ゲノタイプ3、ゲノタイプ4、ゲノタイプ5、およびゲノタイプ6から選択される1つ以上のHCVゲノタイプに感染していることを決定した。ある実施形態において、HCVゲノタイプは、ゲノタイプ1a、ゲノタイプ1b、ゲノタイプ2a、ゲノタイプ2b、ゲノタイプ2c、ゲノタイプ2d、ゲノタイプ3a、ゲノタイプ3b、ゲノタイプ3c、ゲノタイプ3d、ゲノタイプ3e、ゲノタイプ3f、ゲノタイプ4a、ゲノタイプ4b、ゲノタイプ4c、ゲノタイプ4d、ゲノタイプ4e、ゲノタイプ4f、ゲノタイプ4g、ゲノタイプ4h、ゲノタイプ4i、ゲノタイプ4j、ゲノタイプ5a、およびゲノタイプ6aから選択される。ある実施形態において、HCVゲノタイプは、ゲノタイプ1a、1b、および2から選択される。

30

40

【0069】

本明細書に提供される方法のいずれかは、少なくとも1つの追加の治療剤を投与することを含み得る。ある実施形態において、少なくとも1つの治療剤は、プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、補因子阻害剤、RNAポリメラーゼ阻害剤、構造タンパク質阻害剤、非構造タンパク質阻害剤、シクロフィリン阻害剤、侵入阻害剤、TLR7アゴニスト、およびインターフェロンから選択される。ある実施形態において、少なくとも1つの治療剤は、プロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤、NS3/4A阻害剤、ヌクレオシドNS

50

5 B 阻害剤、ヌクレオチド NS 5 B 阻害剤、非ヌクレオシド NS 5 B 阻害剤、シクロフィリン阻害剤およびインターフェロンから選択される。ある実施形態において、少なくとも1つの治療剤は、インターフェロンアルファ - 2 a、インターフェロンアルファ - 2 b、インターフェロンアルファコン - 1、ペグインターフェロンアルファ - 2 b、ペグインターフェロンアルファ - 2 a、徐放インターフェロン - アルファ - 2 b、インターフェロンラムダ、ソホスブビル、リバビリン、テラプラビル (telaprevir)、ボセプレビル、パニプレビル、アスナプレビル、リトナビル、セトロブビル、ダクラスタビル (dactavir)、シメプレビル、アリスボリビル、メリシタピン、テゴブビル、ダノプレビル、ソバプレビル、およびネセプレビルから選択される。ある実施形態において、少なくとも1つの治療剤は、インターフェロン、リバビリン、およびテラプラビルから選択される。

10

【0070】

ある実施形態において、対象は、少なくとも1つの治療剤に対して耐性である HCV 変異体に感染している。ある実施形態において、対象は、直接作用型抗ウイルス剤に対して耐性である HCV 変異体に感染している。ある実施形態において、対象は、プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、補因子阻害剤、RNA ポリメラーゼ阻害剤、構造タンパク質阻害剤、非構造タンパク質阻害剤、およびシクロフィリン阻害剤から選択される少なくとも1つの治療剤に対して耐性である HCV 変異体に感染している。ある実施形態において、対象は、プロテアーゼ阻害剤、NS 5 A 阻害剤、NS 3 / 4 A 阻害剤、ヌクレオシド NS 5 B 阻害剤、ヌクレオチド NS 5 B 阻害剤、非ヌクレオシド NS 5 B 阻害剤、およびシクロフィリン阻害剤から選択される少なくとも1つの治療剤に対して耐性である HCV 変異体に感染している。ある実施形態において、対象は、ソホスブビル、リバビリン、テラプラビル、ボセプレビル、パニプレビル、アスナプレビル、リトナビル、セトロブビル、ダクラスタビル、シメプレビル、アリスボリビル、メリシタピン、テゴブビル、ダノプレビル、ソバプレビル、およびネセプレビルから選択される少なくとも1つの治療剤に対して耐性である HCV 変異体に感染している。

20

【0071】

ある実施形態において、HCV 感染対象は、少なくとも1つの治療剤に対する非応答者である。ある実施形態において、HCV 感染対象は、インターフェロン非応答者である。ある実施形態において、HCV 感染対象は、直接作用型抗ウイルス剤非応答者である。

30

【0072】

本明細書に提供される方法のいずれかは、血清 1 ミリリットル当たり 350,000 コピーを上回る HCV RNA レベルを有する対象を選択することを含み得る。ある実施形態において、対象は、血清 1 ミリリットル当たり 350,000 ~ 3,500,000 コピーの HCV RNA レベルを有する。ある実施形態において、対象は、血清 1 ミリリットル当たり 3,500,000 コピーを上回る HCV RNA レベルを有する。

【0073】

ある実施形態において、HCV 感染対象は、HCV 関連疾患を有する。ある実施形態において、HCV 関連疾患は、肝硬変、肝線維症、脂肪性肝炎、脂肪症、または肝細胞癌腫である。

40

【0074】

ある実施形態において、HCV 感染対象は、HCV 関連疾患でない1つ以上の疾患を有する。ある実施形態において、HCV 感染対象は、HCV 以外の1つ以上のウイルスに感染している。ある実施形態において、HCV 感染対象は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に感染している。ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、追加の治療剤を投与することを含み、それは、HIV 感染の治療において使用される抗ウイルス剤である。ある実施形態において、追加の治療剤は、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) である。ある実施形態において、追加の治療剤は、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤 (NRTI) である。ある実施形態において、追加の治療剤は、プロテアーゼ阻害剤である。ある実施形態において、追加の治療剤は、侵入阻害剤または融合阻害剤である。ある

50

実施形態において、追加の治療剤は、インテグラーゼ阻害剤である。ある実施形態において、追加の治療剤は、エファビレンツ、エトラビリン、ネビラピン、アバカビル、エムトリシタビン、テノホビル、ラミブジン、ジドブジン、アタザナビル、ダルナビル、フォサムプレナビル、リトナビル、エンフビルチド、マラビロク、およびラルテグラビルから選択される。

【0075】

本明細書に提供される方法のいずれかは、HCV RNAレベルを低減させるために十分なある用量の化合物を投与することを含み得る。ある実施形態において、投与用量の化合物は、HCV RNAレベルを血清1ml当たり40コピー未満に低減させる。ある実施形態において、投与用量の化合物は、HCV RNAレベルの少なくとも2log低減を達成する。ある実施形態において、本明細書に提供される化合物の投与は、持続性ウイルス学的著効を達成する。ある実施形態において、投与用量の化合物は、少なくとも0.5倍、少なくとも1.0倍、少なくとも1.5倍、少なくとも2.0倍、または少なくとも2.5倍のHCV RNAレベル低減を達成するために十分である。ある実施形態において、HCV RNAレベル低減は、化合物の最初の投与の2週間、3週間、4週間、5週間、または6週間後に達成される。ある実施形態において、本明細書に提供される化合物は、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、または1カ月に1回投与する。ある実施形態において、本明細書に提供される化合物は、2カ月に1回または3カ月に1回投与する。一部の実施形態において、本明細書に提供される化合物は、4週間に1回投与する。

10

20

【0076】

ある実施形態において、投与される化合物の用量は、1週間当たり5mg/kg、5mg/kg以下、4.5mg/kg以下、4.0mg/kg以下、3.5mg/kg以下、3.0mg/kg以下、2.5mg/kg以下、2.0mg/kg以下、1.5mg/kg以下、または1.0mg/kg以下である。ある実施形態において、化合物は、1~5mg/kg、または1~4mg/kg、または2~5mg/kg、または2~4mg/kgの範囲内の用量において投与する。ある実施形態において、投与される化合物の用量は、10mg/kg以下、7.5mg/kg以下、1週間当たり10mg/kg以下、または1週間当たり7.5mg/kg以下である。

30

【0077】

ある実施形態において、本明細書に提供される化合物の投与は、肝酵素レベルを正常化させ、肝酵素は、任意選択的にアラニンアミノトランスフェラーゼである。

【0078】

本明細書に提供される実施形態のいずれかにおいて、化合物は、医薬組成物中に存在する。

【0079】

本明細書において、HCV感染対象の治療において使用される化合物が提供される。

【0080】

ある実施形態において、対象は、ヒトである。

【図面の簡単な説明】

40

【0081】

【図1A-B】抗miR-122修飾オリゴヌクレオチドのインビボ効力。(A)示される用量における化合物の単回投与後の抗miR-122の作用の発生および持続時間。(B)示される用量における抗miR-122化合物の単回投与7日後のALDOAの脱抑制。

【図2】3つのGalNAcリガンドを含むコンジュゲート部分の構造。

【図3A-C】コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチド構造。

【図4A-C】GalNAc-コンジュゲート抗miR-122修飾オリゴヌクレオチドのインビボ効力。

【図5A-B】miR-122のアンチセンス阻害は、HCVタイターを低減させる。

50

【図 6 A - B】GalNAc - コンジュゲート抗 miR - 122 修飾オリゴヌクレオチドのインビボ効力。

【図 7 A - B】GalNAc - コンジュゲート抗 miR - 122 修飾オリゴヌクレオチドのインビボ効力。

【図 8 A - B】GalNAc - コンジュゲート抗 miR - 122 修飾オリゴヌクレオチドのインビボ効力。

【図 9 A - B】抗 miR - 122 化合物の薬物動態。

【発明を実施するための形態】

【0082】

特に定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同一の意味を有する。規定の定義が提供されない限り、本明細書に記載の分析化学、合成有機化学、ならびに医学および薬化学に関連して利用される命名、ならびにそれらの手順および技術は、当技術分野において周知であり、一般に使用されるものである。本明細書の用語について複数の定義が存在する場合、そのセクションにおけるものが優先される。標準的な技術を化学合成、化学分析、医薬調製、配合および送達、ならびに対象の治療に使用することができる。あるこのような技術および手順は、“Carbohydrate Modifications in Antisense Research” Edited by Sangvi and Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; および “Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18th edition, 1990に見出すことができ、それらは、例えば、任意の目的のために参照により本明細書に組み込まれる。許容される場合、本明細書の全開示にわたり言及される全ての特許、特許出願、公開出願および刊行物、GENBANK配列、ウェブサイトならびに他の公開材料は、特に記載のない限り、参照により全体として組み込まれる。URLまたは他のそのような識別子もしくはアドレスが参照される場合、そのような識別子は、変化し得、インターネット上の特定の情報は変化し得るが、インターネットを検索することにより同等の情報を見出すことができることが理解される。その言及は、そのような情報の利用可能性および公的な普及を証明する。

【0083】

本組成物および方法が開示および記載される前、本明細書において使用される用語は、特定の実施形態を記載する目的のためのものであるにすぎず、限定的なものではないことを理解すべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される単数形「a」、「an」および「the」は、特に文脈が明確に指定しない限り、複数形の参照物を含むことに留意しなければならない。

【0084】

定義

「HCV感染」は、C型肝炎ウイルスの1つ以上のゲノタイプによる感染を意味する。

【0085】

「HCV感染対象」は、C型肝炎ウイルスの1つ以上のゲノタイプに感染した対象を意味する。HCV感染対象は、HCV感染の症状を示しても示さなくてもよい。HCV感染対象は、HCVの1つ以上のゲノタイプに感染したが、対象の血液中のHCV RNAは検出レベル未満である対象を含む。

【0086】

「HCV関連疾患」は、HCV感染により媒介される病理学的プロセスを意味する。HCV関連疾患としては、限定されるものではないが、肝硬変、肝線維症、脂肪性肝炎、および肝細胞癌腫が挙げられる。

【0087】

「血液HCV RNA」は、HCV感染対象の血液中に存在するC型肝炎ウイルスRNAを意味する。血液は、全血および血清を含む。

【0088】

「血清HCV RNAのリバンド」は、事前のHCV RNAレベルの減少後のHCV RNAレベルの増加を意味する。

【0089】

「HCV RNAレベル」は、対象の血液の所与の容量中のHCV RNAの量を意味する。HCV RNAレベルは、1ミリリットル当たりのRNAのコピー数として表現することができる。「HCV RNAレベル」は、「HCVウイルス負荷」または「HCV RNAタイター」と呼ぶこともできる。

【0090】

「持続性ウイルス学的著効」は、全治療過程の終了時における、およびさらなる6ヵ月後の対象の血液中の検出不能なC型肝炎ウイルスRNAを意味する。ある実施形態において、HCV RNAは、血液1ミリリットル当たり40コピー未満で検出不能とみなされる。

10

【0091】

「非応答者」は、治療を受けたが、疾患マーカーまたは症状の臨床的に許容可能な改善が認められない対象を意味する。

【0092】

「インターフェロン非応答者」は、インターフェロンによる治療を受けたが、HCV RNAレベルの臨床的に許容可能な低減が認められないHCV感染対象を意味する。

【0093】

「直接作用型抗ウイルス剤」は、HCV酵素の活性を阻害する医薬剤を意味する。

20

【0094】

「直接作用型抗ウイルス剤非応答者」は、直接作用型抗ウイルス剤による治療を受けたが、HCV RNAレベルの臨床的に許容可能な低減が認められないHCV感染対象を意味する。ある実施形態において、ウイルスは、直接作用型抗ウイルス剤に対する耐性を発現している。

【0095】

「miR-122関連病態」は、miR-122をモジュレートすることにより治療、予防または改善することができる任意の疾患、障害または病態を意味する。miR-122関連疾患は、過剰のmiR-122により特性決定されることを要しない。miR-122関連疾患としては、限定されるものではないが、HCV感染、コレステロール上昇、および鉄過剰負荷障害が挙げられる。

30

【0096】

「鉄過剰負荷障害」は、体内の過剰の鉄により特性決定される任意の疾患、障害または病態を意味する。「対象」は、治療または治療法のために選択されるヒトまたは非ヒト動物を意味する。

【0097】

「それが必要とされる対象」は、治療法または治療が必要とされると同定される対象を意味する。

【0098】

「有する疑いのある対象」は、疾患の1つ以上の臨床的指標を呈する対象を意味する。

40

【0099】

「投与すること」は、医薬剤または組成物を対象に提供することを意味し、それとしては、限定されるものではないが、医療専門家による投与および自己投与が挙げられる。

【0100】

「非経口投与」は、注射または注入を介する投与を意味する。非経口投与としては、限定されるものではないが、皮下投与、静脈内投与、および筋肉内投与が挙げられる。

【0101】

「皮下投与」は、皮膚直下の投与を意味する。

【0102】

50

「静脈内投与」は、静脈中への投与を意味する。

【0103】

「同時投与する」は、それぞれの薬剤の薬理学的効果が対象中に存在する任意の様式における2つ以上の薬剤の対象への共投与を指す。同時投与は、両方の薬剤を単一医薬組成物中で投与することも、同一の剤形において投与することも、同一の投与経路により投与することも要求しない。両方の薬剤の効果は、同時に存在する必要はない。効果は、一定期間の重複のみを必要とし、同一の広がりである必要もない。

【0104】

「持続時間」は、活性またはイベントが継続する時間の期間を意味する。ある実施形態において、治療の持続時間は、医薬剤または医薬組成物の用量が投与される時間の期間である。

10

【0105】

「治療法」は、疾患治療法を意味する。ある実施形態において、治療法としては、限定されるものではないが、化学療法、放射線療法、または医薬剤の投与が挙げられる。

【0106】

「治療」は、疾患の治癒または改善に使用される1つ以上の規定の手順の適用を意味する。ある実施形態において、規定の手順は、1つ以上の医薬剤の投与である。

【0107】

「改善」は、病態または疾患の少なくとも1つの指標の重症度の低下を意味する。ある実施形態において、改善は、病態または疾患の1つ以上の指標の進行の遅延または遅滞を含む。指標の重症度は、当業者に公知の主観または客観的尺度により決定することができる。

20

【0108】

「発症するリスクがある」は、対象が病態または疾患を発症しやすい状態を意味する。ある実施形態において、病態または疾患を発症するリスクがある対象は、病態または疾患の1つ以上の症状を呈するが、その病態または疾患と診断するために十分な数の症状を呈さない。ある実施形態において、病態または疾患を発症するリスクがある対象は、病態または疾患の1つ以上の症状を呈するが、その病態または疾患と診断するために要求されるよりも低い程度で呈する。

【0109】

「の発生を予防する」は、疾患または病態を発症するリスクがある対象における病態または疾患の発生を予防することを意味する。ある実施形態において、疾患または病態を発症するリスクがある対象は、既にその疾患または病態を有する対象が受けた治療と同様の治療を受ける。

30

【0110】

「の発生を遅延させる」は、疾患または病態を発症するリスクがある対象における病態または疾患の発生を遅延させることを意味する。ある実施形態において、疾患または病態を発症するリスクがある対象は、既にその疾患または病態を有する対象が受けた治療と同様の治療を受ける。

【0111】

「治療剤」は、疾患の治癒、改善または予防に使用される医薬剤を意味する。

40

【0112】

「用量」は、単回投与において提供される医薬剤の規定量を意味する。ある実施形態において、用量は、2つ以上のボラス、錠剤、または注射剤中で投与することができる。例えば、皮下投与が望まれるある実施形態において、所望用量は、単回注射により容易に適合しない容量を要求する。このような実施形態において、2つ以上の注射剤を使用して所望用量を達成することができる。ある実施形態において、用量は、2つ以上の注射剤中で投与して個体における注射部位反応を最小化することができる。ある実施形態において、用量は、低速注入として投与する。

【0113】

50

「投与量単位」は、医薬剤が提供される形態を意味する。ある実施形態において、投与量単位は、凍結乾燥オリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。ある実施形態において、投与量単位は、再構成オリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。

【0114】

「治療有効量」は、治療利益を動物に提供する医薬剤の量を指す。

【0115】

「医薬組成物」は、医薬剤を含む個体への投与に好適な物質の混合物を意味する。例えば、医薬組成物は、無菌水溶液を含み得る。

【0116】

「医薬剤」は、対象に投与された場合に治療効果を提供する物質を意味する。

10

【0117】

「活性医薬成分」は、所望の効果を提供する医薬組成物中の物質を意味する。

【0118】

「臓器機能の改善」は、臓器機能の正常範囲への変化を意味する。ある実施形態において、臓器機能は、対象の血液または尿に見出される分子を計測することにより評価される。例えば、ある実施形態において、肝機能の改善は、血中肝トランスアミナーゼレベルの低減により計測される。ある実施形態において、腎機能の改善は、血中尿窒素の低減、タンパク尿の低減、アルブミン尿の低減などにより計測される。

【0119】

「許容可能な安全性プロファイル」は、臨床的に許容可能な限界値内の副作用のパターンを意味する。

20

【0120】

「副作用」は、所望の効果以外の治療に起因する生理学的応答を意味する。ある実施形態において、副作用としては、限定されるものではないが、注射部位反応、肝機能試験異常、腎機能異常、肝毒性、腎毒性、中枢神経系異常、およびミオパシーが挙げられる。このような副作用は、直接または間接的に検出することができる。例えば、血清中のアミノトランスフェラーゼレベルの増加は、肝毒性または肝機能異常を示し得る。例えば、ビリルビンの増加は、肝毒性または肝機能異常を示し得る。

【0121】

「注射部位反応」は、個体における注射の部位における皮膚の炎症または異常発赤を意味する。

30

【0122】

「対象コンプライアンス」は、対象による推奨または処方される治療法に従うことを意味する。

【0123】

「遵守する」は、対象による推奨される治療法に従うことを意味する。

【0124】

「推奨される治療法」は、疾患を治療し、改善し、遅延させ、または予防するために医療専門家により推奨される治療を意味する。

【0125】

「miR-122」は、ヌクレオ塩基配列

40

【化17】

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG (配列番号1)

を有するマイクロRNAを意味する。

【0126】

「miR-122ステムループ」は、ヌクレオ塩基配列

【化 18】

CCUUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUC'UAAACUAUCAAAACGCCAUU
AUCACACUAAAUAGCUACUGCUAGGC' (配列番号2)

を有するマイクロRNA前駆体を意味する。

【0127】

「抗miR」は、マイクロRNAに相補的なヌクレオ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを意味する。ある実施形態において、抗miRは、修飾オリゴヌクレオチドである。

【0128】

「抗miR-122」は、miR-122に相補的なヌクレオ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを意味する。ある実施形態において、抗miR-122は、miR-122に完全に相補的である（すなわち、100%相補的）。ある実施形態において、抗miR-122は、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、または100%相補的である。ある実施形態において、抗miR-122は、修飾オリゴヌクレオチドである。

【0129】

「標的核酸」は、オリゴマー化合物がハイブリダイズするように設計される核酸を意味する。

【0130】

「標的化」は、標的核酸にハイブリダイズするヌクレオ塩基配列の設計および選択のプロセスを意味する。

【0131】

「に標的化される」は、標的核酸へのハイブリダイゼーションを可能とするヌクレオ塩基配列を有することを意味する。

【0132】

「モジュレーション」は、機能、量、または活性の摂動を意味する。ある実施形態において、モジュレーションは、機能、量、または活性の増加を意味する。ある実施形態において、モジュレーションは、機能、量、または活性の減少を意味する。

【0133】

「発現」は、遺伝子コード情報が細胞中で存在し、作動する構造に変換される任意の機能およびステップを意味する。

【0134】

「5'標的部位」は、特定のオリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオ塩基に相補的な標的核酸のヌクレオ塩基を意味する。

【0135】

「3'標的部位」は、特定のオリゴヌクレオチドの5'末端ヌクレオ塩基に相補的な標的核酸のヌクレオ塩基を意味する。

【0136】

「領域」は、核酸内の結合ヌクレオシドの一部を意味する。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の領域に相補的なヌクレオ塩基配列を有する。例えば、あるこのような実施形態において、オリゴヌクレオチドは、マイクロRNA配列の領域に相補的である。あるこのような実施形態において、オリゴヌクレオチドは、マイクロRNAの領域に完全に相補的である。

【0137】

「セグメント」は、領域のより小さいまたは下位部分を意味する。

【0138】

「ヌクレオ塩基配列」は、オリゴマー化合物または核酸中の連続ヌクレオ塩基の順序を意味し、典型的には、5'から3'配向で、いかなる糖、結合、および/またはヌクレオ塩基修飾からも独立して列記される。

10

20

30

40

50

【0139】

「連続ヌクレオ塩基」は、核酸中の互いに直接隣接するヌクレオ塩基を意味する。

【0140】

「ヌクレオ塩基相補性」は、水素結合を介して非共有結合により対合する2つのヌクレオ塩基の能力を意味する。

【0141】

「相補的」は、ある核酸が別の核酸またはオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得ることを意味する。ある実施形態において、相補的は、標的核酸にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドを指す。

【0142】

「完全に相補的」は、オリゴヌクレオチドのそれぞれのヌクレオ塩基が標的核酸中のそれぞれの対応位置におけるヌクレオ塩基と対合し得ることを意味する。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、マイクロRNAに完全に相補的であり、すなわち、オリゴヌクレオチドのそれぞれのヌクレオ塩基は、マイクロRNA中の対応位置におけるヌクレオ塩基に相補的である。ある実施形態において、それぞれのヌクレオ塩基がマイクロRNA配列の領域内のヌクレオ塩基への相補性を有するオリゴヌクレオチドは、マイクロRNA配列に完全に相補的である。

【0143】

「相補性パーセント」は、標的核酸の等長部分に相補的なオリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基の割合を意味する。相補性パーセントは、標的核酸中の対応位置におけるヌクレオ塩基に相補的なオリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基の数を、オリゴヌクレオチド中のヌクレオ塩基の総数により除すことにより算出される。

【0144】

「同一性パーセント」は、第2の核酸中の対応位置におけるヌクレオ塩基と同一である第1の核酸中のヌクレオ塩基の数を、第1の核酸中のヌクレオ塩基の総数により除したものを意味する。ある実施形態において、第1の核酸は、マイクロRNAであり、第2の核酸は、マイクロRNAである。ある実施形態において、第1の核酸は、オリゴヌクレオチドであり、第2の核酸は、オリゴヌクレオチドである。

【0145】

「ハイブリダイズする」は、ヌクレオ塩基相補性を介して生じる相補的核酸のアニールングを意味する。

【0146】

「ミスマッチ」は、第2の核酸の対応位置におけるヌクレオ塩基とワトソンクリック対合し得ない第1の核酸のヌクレオ塩基を意味する。

【0147】

ヌクレオ塩基配列に関する「同一」は、糖、結合、および/またはヌクレオ塩基修飾から独立して、および存在するいかなるピリミジンのメチル状態からも独立して同一のヌクレオ塩基配列を有することを意味する。

【0148】

「マイクロRNA」は、酵素DicerによるプレマイクロRNAの開裂の産物である、18~25ヌクレオ塩基長の内因性非コードRNAを意味する。成熟マイクロRNAの例は、miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)として公知のマイクロRNAデータベースに見出される。ある実施形態において、マイクロRNAは、「microRNA」または「miR」と略される。

【0149】

「プレマイクロRNA」または「プレmiR」は、Droshaとして公知の二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼによるプリmiRの開裂の産物である、ヘアピン構造を有する非コードRNAを意味する。

【0150】

「ステムループ配列」は、ヘアピン構造を有し、成熟マイクロRNA配列を含有するR

10

20

30

40

50

NAを意味する。プレマイクロRNA配列およびステムループ配列は、重複し得る。ステムループ配列の例は、miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)として公知のマイクロRNAデータベースに見出される。

【0151】

「プリマイクロRNA」または「プリmiR」は、二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼDroshaについての基質であるヘアピン構造を有する非コードRNAを意味する。

【0152】

「マイクロRNA前駆体」は、ゲノムDNAに由来し、1つ以上のマイクロRNA配列を含む非コード構造化RNAを含む転写物を意味する。例えば、ある実施形態において、マイクロRNA前駆体は、プレマイクロRNAである。ある実施形態において、マイクロRNA前駆体は、プリマイクロRNAである。

10

【0153】

「マイクロRNA調節転写物」は、マイクロRNAにより調節される転写物を意味する。

【0154】

「モノシストロン性転写物」は、単一マイクロRNA配列を含有するマイクロRNA前駆体を意味する。

【0155】

「ポリシストロン性転写物」は、2つ以上のマイクロRNA配列を含有するマイクロRNA前駆体を意味する。

20

【0156】

「シード配列」は、成熟マイクロRNA配列の5'末端のヌクレオ塩基1~9の6~8つの連続ヌクレオ塩基を含むヌクレオ塩基配列を意味する。

【0157】

「シードマッチ配列」は、シード配列に相補的であり、シード配列と同一の長さであるヌクレオ塩基配列を意味する。

【0158】

「オリゴマー化合物」は、複数の結合モノマーサブユニットを含む化合物を意味する。オリゴマー化合物としては、オリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0159】

30

「オリゴヌクレオチド」は、それぞれが互いに独立して修飾または非修飾であり得る複数の結合ヌクレオシドを含む化合物を意味する。

【0160】

「天然存在のヌクレオシド間結合」は、ヌクレオシド間の3'から5'ホスホジエステル結合を意味する。

【0161】

「天然糖」は、DNA(2'-H)またはRNA(2'-OH)中に見出される糖を意味する。

【0162】

「ヌクレオシド間結合」は、隣接ヌクレオシド間の共有結合を意味する。

40

【0163】

「結合ヌクレオシド」は、共有結合により結合しているヌクレオシドを意味する。

【0164】

「ヌクレオ塩基」は、別のヌクレオ塩基と非共有結合により対合し得る複素環式部分を意味する。

【0165】

「ヌクレオシド」は、糖部分に結合しているヌクレオ塩基を意味する。

【0166】

「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分に共有結合しているリン酸基を有するヌクレオシドを意味する。

50

【0167】

ある数の結合ヌクレオシド「からなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物」は、規定数の結合ヌクレオシドを有する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を意味する。したがって、化合物は、追加の置換基またはコンジュゲートを含み得る。特に記載のない限り、化合物は、修飾オリゴヌクレオチドのものの他にいかなる付加ヌクレオシドも含まない。

【0168】

「修飾オリゴヌクレオチド」は、天然存在の末端、糖、ヌクレオ塩基、および/またはヌクレオシド間結合に対して1つ以上の修飾を有するオリゴヌクレオチドを意味する。修飾オリゴヌクレオチドは、非修飾ヌクレオシドを含み得る。

【0169】

「一本鎖修飾オリゴヌクレオチド」は、相補鎖にハイブリダイズされない修飾ヌクレオチドを意味する。

【0170】

「修飾ヌクレオシド」は、天然存在のヌクレオシドからの任意の変化を有するヌクレオシドを意味する。修飾ヌクレオシドは、修飾糖、および非修飾ヌクレオ塩基を有し得る。修飾ヌクレオシドは、修飾糖および修飾ヌクレオ塩基を有し得る。修飾ヌクレオシドは、天然糖および修飾ヌクレオ塩基を有し得る。ある実施形態において、修飾ヌクレオシドは、二環式ヌクレオシドである。ある実施形態において、修飾ヌクレオシドは、非二環式ヌクレオシドである。

【0171】

「2'-修飾ヌクレオシド」は、位置が2'-デオキシリボースまたはリボース中で番号付与されるフラノシル環の2'位に等価の位置における任意の修飾を有する糖を含むヌクレオシドを意味する。2'-修飾ヌクレオシドとしては、限定されるものではないが、二環式糖部分を含むヌクレオシドが挙げられることを理解すべきである。

【0172】

「修飾ヌクレオシド間結合」は、天然存在のヌクレオシド間結合からの任意の変化を意味する。

【0173】

「ホスホロチオエートヌクレオシド間結合」は、非架橋原子の1つが硫黄原子である、ヌクレオシド間の結合を意味する。「ホスホロチオエート結合」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合と同一の構造を有する2つの化学部分間の結合、例えば、 $-OP(O)(S)O-$ を意味する。

【0174】

「ホスホジエステル結合」は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合と同一の構造を有する2つの化学部分間の結合、例えば、 $-OP(O)_2O-$ を意味する。

【0175】

「非修飾ヌクレオ塩基」は、RNAまたはDNAの天然存在の複素環式塩基：プリン塩基のアデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基のチミン(T)、シトシン(C)(5-メチルシトシンを含む)、およびウラシル(U)を意味する。

【0176】

「5-メチルシトシン」は、5位に結合しているメチル基を含むシトシンを意味する。

【0177】

「非メチル化シトシン」は、5位に結合しているメチル基を有さないシトシンを意味する。

【0178】

「修飾ヌクレオ塩基」は、非修飾ヌクレオ塩基でない任意のヌクレオ塩基を意味する。

【0179】

「フラノシル」は、4つの炭素原子および1つの酸素原子からなる5員環を含む構造を意味する。

【0180】

10

20

30

40

50

「天然存在のフラノシル」は、天然存在のRNA中に見出されるリボフラノシルまたは天然存在のDNA中に見出されるデオキシリボフラノシルを意味する。

【0181】

「糖部分」は、天然存在のフラノシルまたは修飾糖部分を意味する。

【0182】

「修飾糖部分」は、置換糖部分または糖サロゲートを意味する。

【0183】

「置換糖部分」は、天然存在のフラノシルでないフラノシルを意味する。置換糖部分としては、限定されるものではないが、天然存在のフラノシルの2'位、5'位および/または4'位における修飾を含む糖部分が挙げられる。ある置換糖部分は、二環式糖部分である。

10

【0184】

「糖サロゲート」は、フラノシルを含まず、得られるヌクレオシドが(1)オリゴヌクレオチド中に取り込まれ、(2)相補的ヌクレオシドにハイブリダイズし得るように、ヌクレオシドの天然存在のフラノシルと置き換わり得る構造を意味する。このような構造としては、フラノシルの比較的単純な変化、例えば、異なる数の原子を含む環(例えば、4、6、または7員環)；フラノシルの酸素の非酸素原子(例えば、炭素、硫黄、または窒素)による置き換え；または原子数の変化および酸素の置き換への両方が挙げられる。このような構造は、置換糖部分について記載のものに対応する置換(例えば、追加の置換基を任意選択的に含む6員炭素環式二環式糖サロゲート)も含み得る。糖サロゲートとしては、より複雑な糖の置き換え(例えば、ペプチド核酸の非環系)も挙げられる。糖サロゲートとしては、限定されるものではないが、モルホリノ、シクロヘキセニルおよびシクロヘキシトールが挙げられる。

20

【0185】

「-D-デオキシリボース」は、天然存在のDNA糖部分を意味する。

【0186】

「-D-リボース」は、天然存在のRNA糖部分を意味する。

【0187】

「2'-O-メチル糖」または「2'-OMe糖」は、2'位におけるO-メチル修飾を有する糖を意味する。

30

【0188】

「2'-O-メトキシエチル糖」または「2'-MOE糖」は、2'位におけるO-メトキシエチル修飾を有する糖を意味する。

【0189】

「2'-O-フルオロ」または「2'-F」は、2'位におけるフルオロ修飾を有する糖を意味する。

【0190】

「二環式糖部分」は、4~7員環の2つの原子を連結して第2の環を形成し、二環式構造をもたらす架橋を含む4~7員環(例として、限定されるものではないが、フラノシル)を含む修飾糖部分を意味する。ある実施形態において、4~7員環は、糖環である。ある実施形態において、4~7員環は、フラノシルである。あるこのような実施形態において、架橋は、フラノシルの2'炭素および4'炭素を連結する。非限定的な例示的な二環式糖部分としては、LNA、ENA、cEt、S-cEt、およびR-cEtが挙げられる。

40

【0191】

「ロックド核酸(LNA)糖部分」は、4'および2'フラノース環原子間の(CH₂)₂-O架橋を含む置換糖部分を意味する。

【0192】

「ENA糖部分」は、4'および2'フラノース環原子間の(CH₂)₂-O架橋を含む置換糖部分を意味する。

50

【0193】

「拘束エチル(c E t)糖部分」は、4'および2'フラノース環原子間のCH(CH₃)-O架橋を含む置換糖部分を意味する。ある実施形態において、CH(CH₃)-O架橋は、S配向で拘束される。ある実施形態において、CH(CH₃)-O架橋は、R配向で拘束される。

【0194】

「S-c E t糖部分」は、4'および2'フラノース環原子間のS-拘束CH(CH₃)-O架橋を含む置換糖部分を意味する。

【0195】

「R-c E t糖部分」は、4'および2'フラノース環原子間のR-拘束CH(CH₃)-O架橋を含む置換糖部分を意味する。

10

【0196】

「2'-O-メチルヌクレオシド」は、2'-O-メチル糖修飾を有する修飾ヌクレオシドを意味する。

【0197】

「2'-O-メトキシエチルヌクレオシド」は、2'-O-メトキシエチル糖修飾を有する修飾ヌクレオシドを意味する。2'-O-メトキシエチルヌクレオシドは、修飾または非修飾ヌクレオ塩基を含み得る。

【0198】

「2'-フルオロヌクレオシド」は、2'-フルオロ糖修飾を有する修飾ヌクレオシドを意味する。2'-フルオロヌクレオシドは、修飾または非修飾ヌクレオ塩基を含み得る。

20

【0199】

「二環式ヌクレオシド」は、二環式糖部分を有する修飾ヌクレオシドを意味する。二環式ヌクレオシドは、修飾または非修飾ヌクレオ塩基を有し得る。

【0200】

「c E tヌクレオシド」は、c E t糖部分を含むヌクレオシドを意味する。c E tヌクレオシドは、修飾または非修飾ヌクレオ塩基を含み得る。

【0201】

「S-c E tヌクレオシド」は、S-c E t糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

30

【0202】

「R-c E tヌクレオシド」は、R-c E t糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0203】

「非二環式ヌクレオシド」は、二環式糖以外の糖を有するヌクレオシドを意味する。ある実施形態において、非二環式ヌクレオシドは、天然存在の糖を含む。ある実施形態において、非二環式ヌクレオシドは、修飾糖を含む。ある実施形態において、二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。ある実施形態において、非二環式ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドである。

【0204】

「-D-デオキシリボヌクレオシド」は、天然存在のDNAヌクレオシドを意味する。

40

【0205】

「-D-リボヌクレオシド」は、天然存在のRNAヌクレオシドを意味する。

【0206】

「LNAヌクレオシド」は、LNA糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0207】

「ENAヌクレオシド」は、ENA糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0208】

「モチーフ」は、オリゴヌクレオチド中の修飾および/もしくは非修飾ヌクレオ塩基、糖、ならびに/またはヌクレオシド間結合のパターンを意味する。ある実施形態において

50

、モチーフは、ヌクレオシドパターンである。

【0209】

「ヌクレオシドパターン」は、修飾オリゴヌクレオチドまたはその領域中のヌクレオシド修飾のパターンを意味する。ヌクレオシドパターンは、オリゴヌクレオチド中のヌクレオシド修飾の配置を記載するモチーフである。

【0210】

「完全修飾オリゴヌクレオチド」は、それぞれのヌクレオ塩基、それぞれの糖、および/またはそれぞれのヌクレオシド間結合が修飾されていることを意味する。

【0211】

「均一修飾オリゴヌクレオチド」は、それぞれのヌクレオ塩基、それぞれの糖、および/またはそれぞれのヌクレオシド間結合が、修飾オリゴヌクレオチド全体にわたる同一の修飾を有することを意味する。

【0212】

「安定化修飾」は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合により結合している2'-デオキシヌクレオシドにより提供されるものに対してヌクレアーゼの存在下の修飾オリゴヌクレオチドに安定性の向上を提供するヌクレオシドへの修飾を意味する。例えば、ある実施形態において、安定化修飾は、安定化ヌクレオシド修飾である。ある実施形態において、安定化修飾は、ヌクレオシド間結合修飾である。

【0213】

「安定化ヌクレオシド」は、2'-デオキシヌクレオシドにより提供されるものに対してオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ安定性の向上を提供するように修飾されているヌクレオシドを意味する。一実施形態において、安定性ヌクレオシドは、2'-修飾ヌクレオシドである。

【0214】

「安定化ヌクレオシド間結合」は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合により提供されるものに対してオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ安定性の改善を提供するヌクレオシド間結合を意味する。一実施形態において、安定化ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0215】

本明細書において使用される「結合基」は、第1の化学実体を第2の化学実体に1つ以上の共有結合を介して結合させる原子または原子の基を指す。

【0216】

本明細書において使用される「リンカー」は、1つ以上のリガンドを、修飾または非修飾ヌクレオシドに1つ以上の共有結合を介して結合させる原子または原子の基を指す。修飾または非修飾ヌクレオシドは、本明細書に記載の修飾オリゴヌクレオチドの一部であり得、または修飾オリゴヌクレオチドにホスホジエステルもしくはホスホロチオエート結合を介して結合している。一部の実施形態において、リンカーは、1つ以上のリガンドを修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に結合させる。一部の実施形態において、リンカーは、1つ以上のリガンドを修飾オリゴヌクレオチドの5'末端に結合させる。一部の実施形態において、リンカーは、1つ以上のリガンドを、修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に結合している修飾または非修飾ヌクレオシドに結合させる。一部の実施形態において、リンカーは、1つ以上のリガンドを、修飾オリゴヌクレオチドの5'末端に結合している修飾または非修飾ヌクレオシドに結合させる。リンカーが1つ以上のリガンドを修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に、または修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に結合している修飾もしくは非修飾ヌクレオシドに結合させる場合、一部の実施形態において、リンカーのための結合点は、修飾または非修飾糖部分の3'炭素であり得る。リンカーが1つ以上のリガンドを、修飾オリゴヌクレオチドの5'末端に、または修飾オリゴヌクレオチドの5'末端に結合している修飾もしくは非修飾ヌクレオシドに結合させる場合、一部の実施形態において、リンカーのための結合点は、修飾または非修飾糖部分の5'炭素であり得る。

10

20

30

40

50

【 0 2 1 7 】

概要

m i R - 1 2 2 の強力な阻害剤を同定するため、多数の抗 m i R - 1 2 2 化合物を設計および合成した。化合物は、長さならびに二環式ヌクレオシドおよび非二環式ヌクレオシドの数、配置、およびアイデンティティが変動する修飾オリゴヌクレオチドを含んだ。初期の系列の化合物をインビトロシフェラーゼアッセイにおいて試験し、化合物のサブセットをインビトロ活性化合物として同定した。次いで、これらのインビトロ活性化合物をインビボアッセイにおいて試験してインビボで m i R - 1 2 2 の強力な阻害剤であるそれらの化合物を同定した。初期インビトロおよびインビボスクリーンから、ある化合物を追加の化合物の設計のための基礎として選択した。構造と活性（インビトロおよびインビボの両方）との間の実験的に観察された相関を使用してそれらの追加の化合物の設計に、長さならびに二環式および非二環式ヌクレオシドの選択および配置のさらなる変動を与えた。インビトロおよびインビボスクリーニングアッセイをそれらの追加の化合物について繰り返した。ある化合物は、他の特性、例えば、エキソヌクレアーゼ活性に対する感受性、組織蓄積、および組織半減期についても試験した。

10

【 0 2 1 8 】

このプロセスの間にインビトロでスクリーニングされた 4 0 0 個を超える化合物のうち、約 1 5 0 個がインビトロシフェラーゼアッセイにおいて活性と同定された。これらの化合物の約 7 0 個を、インビボ効力および安全性についてさらに評価した。化合物の設計およびスクリーニングのこの反復プロセスを介し、ある化合物、非コンジュゲート抗 m i R - 1 2 2 修飾オリゴヌクレオチドおよびコンジュゲート m i R - 1 2 2 修飾オリゴヌクレオチドの両方が、インビボで m i R - 1 2 2 の強力な阻害剤であることが観察された。したがって、これらの化合物は、m i R - 1 2 2 の活性により促進される細胞プロセスのモジュレーションに有用である。さらに、このような化合物は、m i R - 1 2 2 に関連する疾患の発生の治療、予防、および / または遅延に有用である。このような疾患としては、限定されるものではないが、H C V 感染および H C V 関連合併症、例えば、肝硬変、肝線維症、脂肪性肝炎、脂肪症、および肝細胞癌腫が挙げられる。

20

【 0 2 1 9 】

ある抗 m i R - 1 2 2 化合物

本明細書において、あるパターンの二環式および非二環式ヌクレオシドを有する修飾オリゴヌクレオチドが提供される。本明細書において同定されたパターンを有する修飾オリゴヌクレオチドは、m i R - 1 2 2 活性の有効な阻害剤である。

30

【 0 2 2 0 】

本明細書において説明されるヌクレオシドパターンのそれぞれは、5' から 3' 配向で示す。

【 0 2 2 1 】

ある実施形態において、本明細書において、16 ~ 22 個の結合ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、m i R - 1 2 2 (配列番号 1) に相補的であり、修飾オリゴヌクレオチドは、5' から 3' 配向の以下のヌクレオシドパターン I の少なくとも 16 個の連続ヌクレオシドを含む化合物：

40

$$(R)_X - N^Q - N^Q - N^B - N^B - N^Q - N^B - N^Q - N^B - N^Q - N^B - N^B - (N^Z)_Y$$

[式中、それぞれの R は、独立して、非二環式ヌクレオシドまたは二環式ヌクレオシドであり；

X は、4 ~ 10 であり；

それぞれの N^B は、独立して、二環式ヌクレオシドであり；

それぞれの N^Q は、独立して、非二環式ヌクレオシドであり；

Y は、0 または 1 であり；

N^Z は、修飾ヌクレオシドまたは非修飾ヌクレオシド非二環式ヌクレオシドまたは二環式

50

ヌクレオシドである]
が提供される。

【 0 2 2 2 】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、ヌクレオシドパターン I の少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、少なくとも 2 0、少なくとも 2 1、または 2 2 個の連続ヌクレオシドを含む。

【 0 2 2 3 】

ある実施形態において、それぞれの二環式ヌクレオシドは、独立して、LNAヌクレオシド、cEtヌクレオシド、およびENAヌクレオシドから選択される。

【 0 2 2 4 】

ある実施形態において、少なくとも 2 つの二環式ヌクレオシドは、互いに異なる。

【 0 2 2 5 】

ある実施形態において、全ての二環式ヌクレオシドは、同一タイプの糖部分を有する。

【 0 2 2 6 】

ある実施形態において、それぞれの二環式ヌクレオシドは、cEtヌクレオシドである。ある実施形態において、cEtヌクレオシドは、S-cEtヌクレオシドである。ある実施形態において、cEtヌクレオシドは、R-cEtヌクレオシドである。

【 0 2 2 7 】

ある実施形態において、それぞれの二環式ヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。

【 0 2 2 8 】

ある実施形態において、少なくとも 2 つの非二環式ヌクレオシドは、互いに異なる糖部分を含む。ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、同一タイプの糖部分を有する。

【 0 2 2 9 】

ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシド、-D-リボヌクレオシド、2'-O-メチルヌクレオシド、2'-O-メトキシエチルヌクレオシド、および2'-フルオロヌクレオシドから独立して選択される。ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシド、および2'-O-メトキシエチルヌクレオシドから独立して選択される。ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。ある実施形態において、それぞれの非二環式ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドである。

【 0 2 3 0 】

ある実施形態において、2つ以下の非二環式ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドである。ある実施形態において、2つ以下の非二環式ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドであり、それぞれの他の非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。

【 0 2 3 1 】

ある実施形態において、5'末端および3'末端非二環式ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドであり、それぞれの他の非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。

【 0 2 3 2 】

ある実施形態において、2つの非二環式ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドであり、それぞれの他の非二環式ヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドである。

【 0 2 3 3 】

ある実施形態において、Rのそれぞれのヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドである。

【 0 2 3 4 】

ある実施形態において、Xは、4、5、6、7、8、9、または10である。

【0235】

ある実施形態において、Yは、0である。ある実施形態において、Yは、1である。

【0236】

ある実施形態において、Rは、7つの結合ヌクレオシドからなり、それぞれのヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、0である。

【0237】

ある実施形態において、Rは、4つの結合ヌクレオシド $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4}$ からなり、 N^{R1} および N^{R3} のそれぞれは、S-cEtヌクレオシドであり、 N^{R2} および N^{R4} のそれぞれは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、1であり； N^Z は、-D-デオキシリボヌクレオシドである。

10

【0238】

ある実施形態において、Rは、4つの結合ヌクレオシド $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4}$ からなり、 N^{R1} および N^{R4} のそれぞれは、S-cEtヌクレオシドであり、 N^{R2} および N^{R3} のそれぞれは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、1であり； N^Z は、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドである。

20

【0239】

ある実施形態において、Rは、7つの結合ヌクレオシド $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7}$ からなり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、および N^{R4} のそれぞれは、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R5} および N^{R7} のそれぞれは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり、 N^{R6} は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、0である。

【0240】

ある実施形態において、Rは、7つの結合ヌクレオシド $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7}$ からなり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、および N^{R5} のそれぞれは、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R6} は、S-cEtヌクレオシドであり、 N^{R7} は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、0である。

30

【0241】

ある実施形態において、Rは、7つの結合ヌクレオシド $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7}$ からなり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、 N^{R5} 、および N^{R6} のそれぞれは、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R7} は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、0である。

40

【0242】

ある実施形態において、Rは、10個の結合ヌクレオシド $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4} - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7} - N^{R8} - N^{R9} - N^{R10}$ からなり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、 N^{R5} 、および N^{R6} のそれぞれは、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R7} および N^{R9} のそれぞれは、S-cEtヌクレオシドであり； N^{R8} および N^{R10} のそれぞれは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、0である。

【0243】

ある実施形態において、Rは、10個の結合ヌクレオシド $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N$

50

$R^4 - N^{R5} - N^{R6} - N^{R7} - N^{R8} - N^{R9} - N^{R10}$ からなり、 N^{R1} 、 N^{R2} 、 N^{R3} 、 N^{R4} 、 N^{R5} 、および N^{R6} のそれぞれは、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R7} および N^{R9} のそれぞれは、S-cEtヌクレオシドであり； N^{R8} および N^{R10} のそれぞれは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、1であり、 N_Z は、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドである。

【0244】

ある実施形態において、Rは、4つの結合ヌクレオシド $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4}$ からなり、 N^{R1} および N^{R4} のそれぞれは、S-cEtヌクレオシドであり、 N^{R1} および N^{R3} のそれぞれは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、1であり、 N_Z は、-D-デオキシリボヌクレオシドである。

10

【0245】

ある実施形態において、Rは、4つの結合ヌクレオシド $N^{R1} - N^{R2} - N^{R3} - N^{R4}$ からなり、 N^{R1} は、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、 N^{R2} および N^{R4} のそれぞれは、S-cEtヌクレオシドであり、 N^{R3} は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；それぞれの N^B は、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれの N^Q は、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；Yは、1であり、 N_Z は、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドである。

20

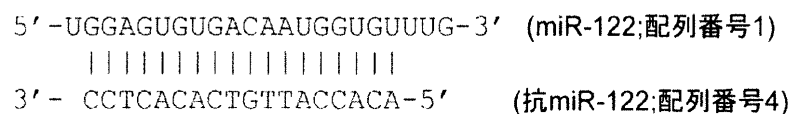
【0246】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、miR-122 (配列番号1) のヌクレオ塩基配列に少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、または100%相補的である。

【0247】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、配列番号1の2位がオリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオ塩基と対合するように、miR-122に相補的である。例えば、以下のとおりである。

【化19】

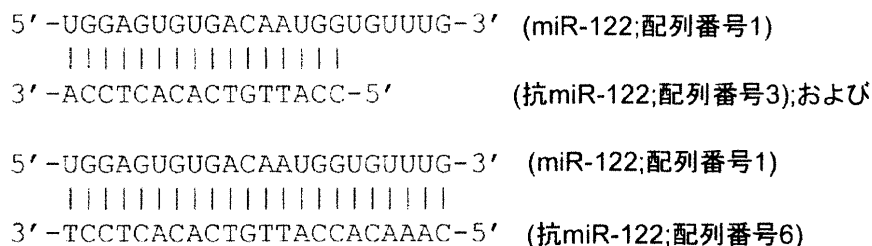


30

【0248】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、配列番号1の1位がオリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオ塩基と対合するように、miR-122に相補的である。例えば、以下のとおりである。

【化20】



40

【0249】

ある実施形態において、少なくとも1つのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。ある実施形態において、それぞれのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシ

50

ド間結合である。ある実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0250】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのピリミジンは、5 - メチル基を含む。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのシトシンは、5 - メチルシトシンである。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのそれぞれのシトシンは、5 - メチルシトシンである。ある実施形態において、シトシンを含むそれぞれの修飾ヌクレオチドは、5 - メチルシトシンを含む。ある実施形態において、シトシンを含むそれぞれの2' - O - メトキシエチルヌクレオシドは、5 - メチルシトシンを含む。

10

【0251】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、配列番号3 ~ 6から選択され、それぞれのTは、TおよびUから独立して選択される。

【0252】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、miR - 122のヌクレオ塩基配列に対して0、1、2、または3つのミスマッチを有する。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、miR - 122のヌクレオ塩基配列に対して0個のミスマッチを有する。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、miR - 122のヌクレオ塩基配列に対して1つのミスマッチを有する。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、miR - 122のヌクレオ塩基配列に対して2つのミスマッチを有する。

20

【0253】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、22個を超える結合ヌクレオシドからなり、ヌクレオシドパターンIの少なくとも8つの結合ヌクレオシドを含む。ヌクレオシドパターンIにより記載されるヌクレオシドに加えて存在するヌクレオシドは、修飾または非修飾のいずれかである。

【0254】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、16個未満の結合ヌクレオシドからなり、ヌクレオシドパターンIの少なくとも8つの結合ヌクレオシドを含む。

【0255】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、表1に示されるヌクレオ塩基配列および修飾を有する。ヌクレオシドおよびヌクレオ塩基を以下のとおり示す：上付き文字「Me」は、5 - メチルシトシンを示し；下付き文字が続かないヌクレオシドは、- D - デオキシリボヌクレオシドであり；下付き文字「E」が続くヌクレオシドは、2' - MOEヌクレオシドであり；下付き文字「S」が続くヌクレオシドは、S - cEtヌクレオシドであり；それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

30

【0256】

【表 1】

表1:抗miR-122化合物

化合物番号	配列および修飾	配列番号
38649	$A_E^{Mc}C_EA_E^{Mc}C_E^{Mc}C_EA_ET_E TGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5$	4
38012	$C_5CA_5TTGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5A$	3
38016	$^{Mc}C_5CAT_5TGT_5^{Mc}C_5A^{Mc}C_5A^{Mc}C_5T^{Mc}C_5^{Mc}C_5A_E$	3
38646	$A_E^{Mc}C_EA_E^{Mc}C_ECA_5TTGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5$	4
38647	$A_E^{Mc}C_EA_E^{Mc}C_E^{Mc}C_EA_5TTGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5$	4
38648	$A_E^{Mc}C_EA_E^{Mc}C_E^{Mc}C_EA_ETTU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5$	4
38652	$^{Mc}C_EA_EA_EA_E^{Mc}C_EA_EC_5CA_5TTGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5$	5
38659	$C_5CA_5TTGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5T_E$	10
38660	$^{Mc}C_EA_EA_EA_E^{Mc}C_EA_EC_5CA_5TTGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5T_E$	6
38872	$C_5CAU_5TGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5A$	3
38910	$^{Mc}C_EC_5AU_5TGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5A_E$	3

10

20

【0257】

一部の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、以下に示されるヌクレオ塩基配列および修飾：

【化21】

$U_5TGU_5C_5AC_5AC_5TC_5C_5A_5$ (配列番号8);または

$C_5A_5C_5A_5C_5U_5C_5C_5$ (配列番号9);

30

を有し、

下付き文字が続かないヌクレオシドは、 $-D-$ デオキシリボヌクレオシドであり；下付き文字「S」が続くヌクレオシドは、 $S-cEt$ ヌクレオシドであり；それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。一部のこのような実施形態において、化合物は、38591、38633、38998、または38634である。

【0258】

コンジュゲートを含む抗miR-122化合物

40

ある実施形態において、本明細書に提供される化合物は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布および/または細胞取り込みを向上させる1つ以上の部分にコンジュゲートしている修飾オリゴヌクレオチドを含む。例えば、化合物の細胞取り込みの増加は、細胞表面受容体についてのリガンドであるコンジュゲートを利用することにより達成することができる。外因性分子（例えば、薬物）にコンジュゲートしているリガンドの、その細胞表面受容体への結合は、コンジュゲート分子の内在化をもたらし、それにより外因性分子の膜貫通輸送を向上させる。本明細書に提供される抗miR-122修飾オリゴヌクレオチドのいずれかは、1つ以上の部分に結合させてコンジュゲート抗miR-122修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を形成することができる。

【0259】

50

ある実施形態において、本明細書に提供される化合物は、修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端または 3' 末端に結合しているコンジュゲート部分を含む。ある実施形態において、化合物は、修飾オリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合しているコンジュゲート部分を含む。ある実施形態において、化合物は、修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合しているコンジュゲート部分を含む。ある実施形態において、化合物は、修飾オリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合している第 1 のコンジュゲート部分および修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合している第 2 のコンジュゲート部分を含む。

【0260】

ある実施形態において、コンジュゲート部分は、炭水化物、コレステロール、脂質、リン脂質、抗体、リポタンパク質、ホルモン、ペプチド、ビタミン、ステロイド、またはカチオン脂質から選択される少なくとも 1 つのリガンドを含む。

10

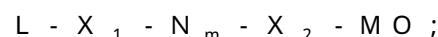
【0261】

リガンドは、修飾オリゴヌクレオチドに任意の好適なリンカーを介して共有結合させることができる。種々のリンカーが当技術分野において公知であり、ある非限定的な例示的なリンカーは、例えば、PCT 公開の国際公開第 2013/033230 号パンフレットおよび米国特許第 8,106,022 B2 号明細書に記載されている。一部の実施形態において、インビボ酵素的開裂に対して耐性であるリンカーを選択することができる。一部の実施形態において、インビボ加水分解開裂に対して耐性であるリンカーを選択することができる。一部の実施形態において、インビボ酵素的開裂を受けるリンカーを選択することができる。一部の実施形態において、インビボ加水分解開裂を受けるリンカーを選択することができる。

20

【0262】

ある実施形態において、本明細書に記載のコンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物は、構造：



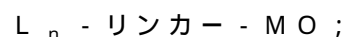
を有し、

それぞれの L は、リガンドであり；それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、m は、1 ~ 5 であり； X_1 および X_2 は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；MO は、修飾オリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、m は、1 である。ある実施形態において、m は、2 である。ある実施形態において、m は、2、3、4、または 5 である。ある実施形態において、m は、3、4、または 5 である。ある実施形態において、m が 1 を上回る場合、 N_m のそれぞれの修飾または非修飾ヌクレオシドは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホロチオエートヌクレオシド間結合により N_m の隣接修飾または非修飾ヌクレオシドに連結してよい。ある実施形態において、m は、1 であり、 X_1 および X_2 は、それぞれホスホジエステルである。

30

【0263】

ある実施形態において、本明細書に記載のコンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物は、構造 A：



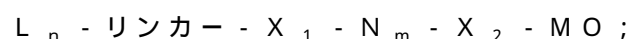
を有し、

それぞれの L は、独立して、リガンドであり、n は、1 ~ 10 であり；MO は、修飾オリゴヌクレオチドである。

40

【0264】

ある実施形態において、本明細書に記載のコンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物は、構造 B：



を有し、

それぞれの L は、独立して、リガンドであり、n は、1 ~ 10 であり；それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、m は、1 ~ 5 であり； X_1 および X_2

50

は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；MOは、修飾オリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、mは、1である。ある実施形態において、mは、2である。ある実施形態において、mは、2、3、4、または5である。ある実施形態において、mは、3、4、または5である。ある実施形態において、mが1を上回る場合、N_mのそれぞれの修飾または非修飾ヌクレオシドは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によりN_mの隣接修飾または非修飾ヌクレオシドに連結してよい。

【0265】

ある実施形態において、本明細書に記載のコンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物は、構造C：

L_n - リンカー - X - N_m - Y - MO；

を有し、

それぞれのLは、独立して、リガンドであり、nは、1～10であり；それぞれのNは、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、mは、1～5であり；Xは、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；Yは、ホスホジエステル結合であり；MOは、修飾オリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、mは、1である。ある実施形態において、mは、2である。ある実施形態において、mは、2、3、4、または5である。ある実施形態において、mは、3、4、または5である。ある実施形態において、mが1を上回る場合、N_mのそれぞれの修飾または非修飾ヌクレオシドは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によりN_mの隣接修飾または非修飾ヌクレオシドに連結してよい。

【0266】

ある実施形態において、本明細書に記載のコンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物は、構造D：

L_n - リンカー - Y - N_m - Y - MO；

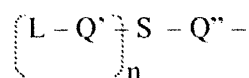
を有し、

それぞれのLは、独立して、リガンドであり、nは、1～10であり；それぞれのNは、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、mは、1～5であり；それぞれのYは、ホスホジエステル結合であり；MOは、修飾オリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、mは、1である。一部の実施形態において、mは、2である。ある実施形態において、mは、3、4、または5である。ある実施形態において、mは、2、3、4、または5である。ある実施形態において、mが1を上回る場合、N_mのそれぞれの修飾または非修飾ヌクレオシドは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によりN_mの隣接修飾または非修飾ヌクレオシドに連結してよい。

【0267】

ある実施形態において、nが1を上回る場合、リンカーは、2つ以上のLを化合物の残部に結合させ得る足場を含む（すなわち、修飾オリゴヌクレオチド（MO）に、X₁ - N_m - X₂ - MOに、X - N_m - Y - MOに、など）。一部のこのような実施形態において、化合物（例えば、構造A、B、C、またはDの化合物）のL_n - リンカー部分は、構造E：

【化22】



[式中、それぞれのLは、独立して、リガンドであり；nは、1～10であり；Sは、足場であり；Q'およびQ''は、独立して、結合基である]を含む。

【0268】

ある実施形態において、それぞれのQ'およびQ''は、ペプチド、エーテル、ポリエ

チレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸から独立して選択される。

【0269】

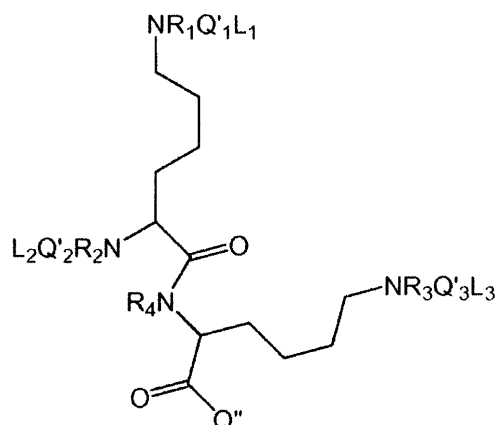
ある実施形態において、足場は、2、3、4、または5つのリガンドを修飾オリゴヌクレオチドに結合させる。ある実施形態において、足場は、3つのリガンドを修飾オリゴヌクレオチドに結合させる。

10

【0270】

非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (i) :

【化23】



20

[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり； R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]

である。

30

【0271】

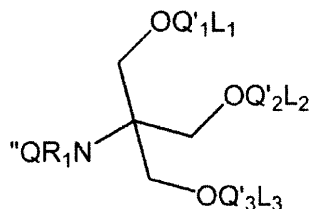
一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、H およびメチルからそれぞれ選択される。

40

【0272】

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (ii) :

【化 2 4】



[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり； R_1 は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される]
である。

10

【 0 2 7 3】

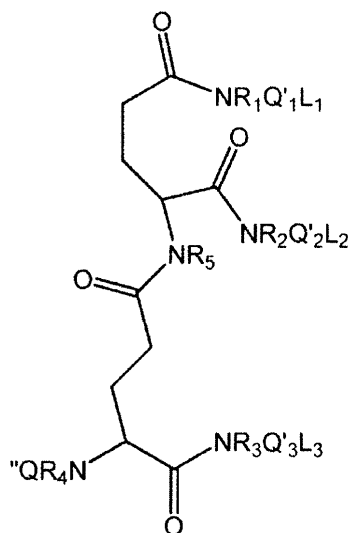
一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 は、 H 、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルから選択される。一部の実施形態において、 R_1 は、 H またはメチルである。

20

【 0 2 7 4】

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (i i i) :

【化 2 5】



30

40

[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり； R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、および R_5 は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]
である。

【 0 2 7 5】

一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ

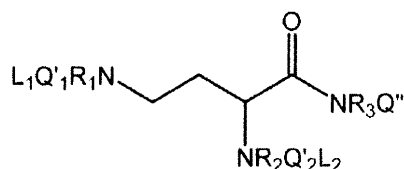
50

、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸 (A D O) 、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、および R_5 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、および R_5 は、H およびメチルからそれぞれ選択される。

【 0 2 7 6 】

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (i v) :

【 化 2 6 】



10

[式中、 L_1 および L_2 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり； R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される] である。

【 0 2 7 7 】

20

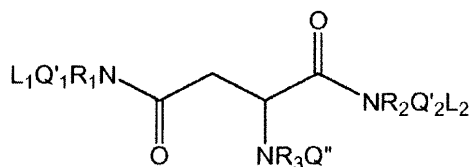
一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸 (A D O) 、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H およびメチルからそれぞれ選択される。

30

【 0 2 7 8 】

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (v) :

【 化 2 7 】



[式中、 L_1 および L_2 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり； R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される] である。

40

【 0 2 7 9 】

一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸 (A D O) 、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、およ

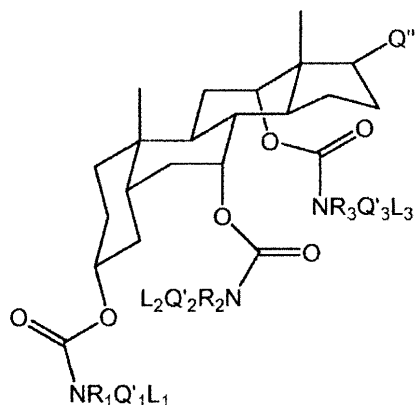
50

び 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H およびメチルからそれぞれ選択される。

【0280】

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (v i) :

【化28】



10

[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり； R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]

20

である。

【0281】

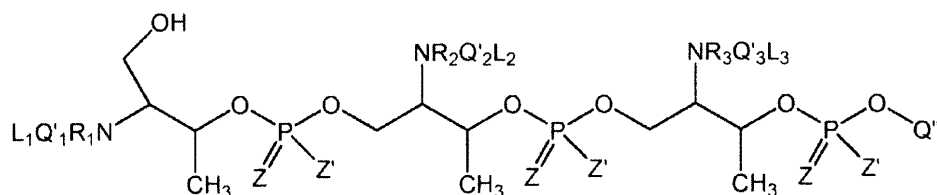
一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、および 6 - アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H およびメチルからそれぞれ選択される。

30

【0282】

さらなる非限定的な例示的な構造 E は、構造 E (v i i) :

【化29】



40

[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり； R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択され；Z および Z' は、O および S からそれぞれ独立して選択される]

である。

50

【0283】

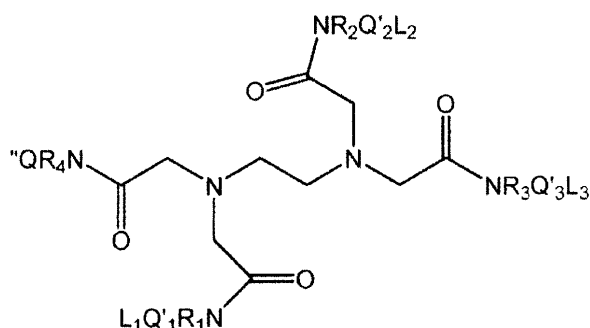
一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(ADO)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、および6-アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、Hおよびメチルからそれぞれ選択される。一部の実施形態において、少なくとも1つのP原子上のZまたはZ'は、Sであり、他のZまたはZ'は、Oである(すなわち、ホスホロチオエート結合)。一部の実施形態において、それぞれの-OP(Z)(Z')O-は、ホスホロチオエート結合である。一部の実施形態において、ZおよびZ'は、両方とも少なくとも1つのP原子上のOである(すなわち、ホスホジエステル結合)。一部の実施形態において、それぞれの-OP(Z)(Z')O-は、ホスホジエステル結合である。

10

【0284】

さらなる非限定的な例示的な構造Eは、構造E(viii)：

20



30

[式中、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立して、リガンドであり； Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、それぞれ独立して、結合基であり； R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、および置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルからそれぞれ独立して選択される]

である。

【0285】

一部の実施形態において、 Q'_1 、 Q'_2 、 Q'_3 、および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(ADO)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、および6-アミノヘキサン酸からそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチルからそれぞれ独立して選択される。一部の実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 は、Hおよびメチルからそれぞれ選択される。

40

【0286】

非限定的な例示的な足場および/または足場を含むリンカー、ならびにそれらの合成は、例えば、PCT公開の国際公開第2013/033230号パンフレット、米国特許第8,106,022B2号明細書、米国特許出願公開第2012/0157509A1号

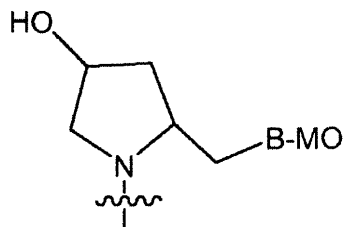
50

明細書；米国特許第 5,994,517 号明細書；米国特許第 7,491,805 B2 号明細書；米国特許第 8,313,772 B2 号明細書；Manoharan, M., Chapter 16, Antisense Drug Technology, Crooke, S.T., Marcel Dekker, Inc., 2001, 391-469 に記載されている。

【0287】

ある実施形態において、化合物の L_n - リンカー部分は、構造 F：

【化 3 1】



10

[式中、

B は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^N)-$ 、 $-Z-P(Z')(Z'')O-$ 、 $-Z-P(Z')(Z'')O-N_m-X-$ 、および $-Z-P(Z')(Z'')O-N_m-Y-$ から選択され；

20

M O は、修飾オリゴヌクレオチドであり；

R^N は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、およびベンジルから選択され；

Z、Z'、および Z'' は、O および S からそれぞれ独立して選択され；

それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり；

m は、1 ~ 5 であり；

X は、ホスホジエステル結合およびホスホロチオエート結合から選択され；

Y は、ホスホジエステル結合であり；

波線は、リンカーおよびリガンドの残部への連結を示す] を含む。

30

【0288】

ある実施形態において、波線は、上記構造 E への連結を示す。

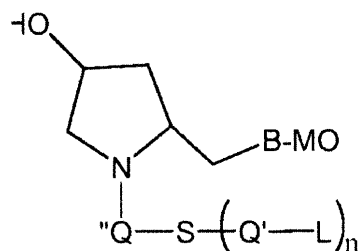
【0289】

ある実施形態において、n は、1 ~ 5、1 ~ 4、1 ~ 3、または 1 ~ 2 である。ある実施形態において、n は、1 である。ある実施形態において、n は、2 である。ある実施形態において、n は、3 である。ある実施形態において、n は、4 である。ある実施形態において、n は、5 である。

【0290】

ある実施形態において、化合物の L_n - リンカー部分は、構造 G：

【化 3 2】



40

[式中、

B は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^N)-$ 、 $-Z-P(Z')(Z'')O-$ 、 $-Z-P(Z')(Z'')O-N_m-X-$ 、および $-Z-P(Z')(Z'')O-N_m-Y-$ から選択され；

50

Z') (Z'') $O - N_m - X -$ 、および $- Z - P (Z') (Z'') O - N_m - Y -$ から選択され；

MO は、修飾オリゴヌクレオチドであり；

R^N は、 H 、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、およびベンジルから選択され；

Z 、 Z' 、および Z'' は、 O および S からそれぞれ独立して選択され；

それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり；

m は、 $1 \sim 5$ であり；

X は、ホスホジエステル結合およびホスホロチオエート結合から選択され；

Y は、ホスホジエステル結合であり；

それぞれの L は、独立して、リガンドであり； n は、 $1 \sim 10$ であり； S は、足場であり； Q' および Q'' は、独立して、結合基である]

を含む。

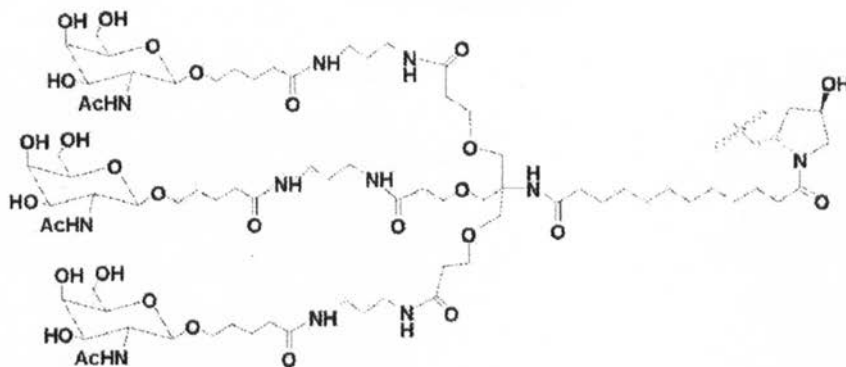
【0291】

ある実施形態において、それぞれの Q' および Q'' は、ペプチド、エーテル、ポリエチレングリコール、アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシ、アミノ、アミド、ピロリジン、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸 (ADO)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、および6-アミノヘキサン酸から独立して選択される。

【0292】

化合物の非限定的な例示的な L_n - リンカー部分 (例えば、構造 F または G の) を、以下の構造 H :

【化33】



[式中、波線は、修飾オリゴヌクレオチド (MO) への、例えば、構造 B 中の X_1 への、または例えば、構造 C、もしくは D 中の X もしくは Y への結合を示す]

に示す。

【0293】

ある実施形態において、それぞれのリガンドは、炭水化物である。炭水化物 - コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物は、細胞表面レクチンにより認識される場合、細胞膜を通過して細胞中に輸送される。ある実施形態において、細胞表面レクチンは、C 型レクチンである。ある実施形態において、C 型レクチンは、クッパー細胞上に存在する。ある実施形態において、C 型レクチンは、マクロファージ上に存在する。ある実施形態において、C 型レクチンは、内皮細胞上に存在する。ある実施形態において、C 型レクチンは、単球上に存在する。ある実施形態において、C 型レクチンは、白血球上に存在する。ある実施形態において、C 型レクチンは、樹状細胞上に存在する。ある実施形態において、C 型レクチンは、B 細胞上に存在する。コンジュゲートは、C 型レクチンを発現する任意の細胞型中への抗 $miR - 122$ 化合物の取り込みを容易にし得る。

【 0 2 9 4 】

ある実施形態において、C型レクチンは、アシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）である。ある実施形態において、コンジュゲートは、ASGPRについての親和性を有する1つ以上のリガンド、例として、限定されるものではないが、ガラクトースまたはガラクトース誘導体を含む。ある実施形態において、ASGPRについての親和性を有するリガンドは、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、ガラクトサミン、N-ホルミルガラクトサミン、N-プロピオニル-ガラクトサミン、N-n-ブタノイルガラクトサミン、またはN-イソ-ブタノイル-ガラクトサミンである。このようなコンジュゲートは、ASGPRを発現する細胞、例えば、肝細胞および樹状細胞中への化合物の取り込みを容易にする。

10

【 0 2 9 5 】

ある実施形態において、リガンドは、マンノース、グルコース、ガラクトース、リボース、アラビノース、フルクトース、フコース、キシロース、D-マンノース、L-マンノース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、D-グルコース、L-グルコース、D-リボース、L-リボース、D-アラビノース、L-アラビノース、D-フルクトース、L-フルクトース、D-フコース、L-フコース、D-キシロース、L-キシロース、アルファ-D-マンノフラノース、ベータ-D-マンノフラノース、アルファ-D-マンノピラノース、ベータ-D-マンノピラノース、アルファ-D-グルコフラノース、ベータ-D-グルコフラノース、アルファ-D-グルコピラノース、ベータ-D-グルコピラノース、アルファ-D-ガラクトフラノース、ベータ-D-ガラクトフラノース、アルファ-D-ガラクトピラノース、ベータ-D-ガラクトピラノース、アルファ-D-リボフラノース、ベータ-D-リボフラノース、アルファ-D-リボピラノース、ベータ-D-リボピラノース、アルファ-D-フルクトフラノース、アルファ-D-フルクトピラノース、グルコサミン、ガラクトサミン、シアル酸、およびN-アセチルガラクトサミンから選択される炭水化物である。

20

【 0 2 9 6 】

ある実施形態において、リガンドは、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、ガラクトサミン、N-ホルミルガラクトサミン、N-プロピオニル-ガラクトサミン、N-n-ブタノイルガラクトサミン、およびN-イソ-ブタノイル-ガラクトサミンから選択される。

30

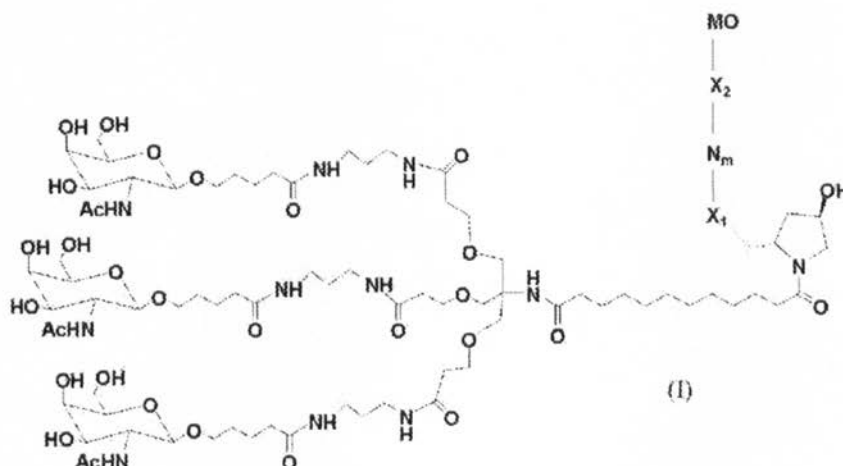
【 0 2 9 7 】

ある実施形態において、リガンドは、N-アセチルガラクトサミンである。

【 0 2 9 8 】

ある実施形態において、化合物は、構造：

【 化 3 4 】



40

[式中、それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、m は、1 ~

50

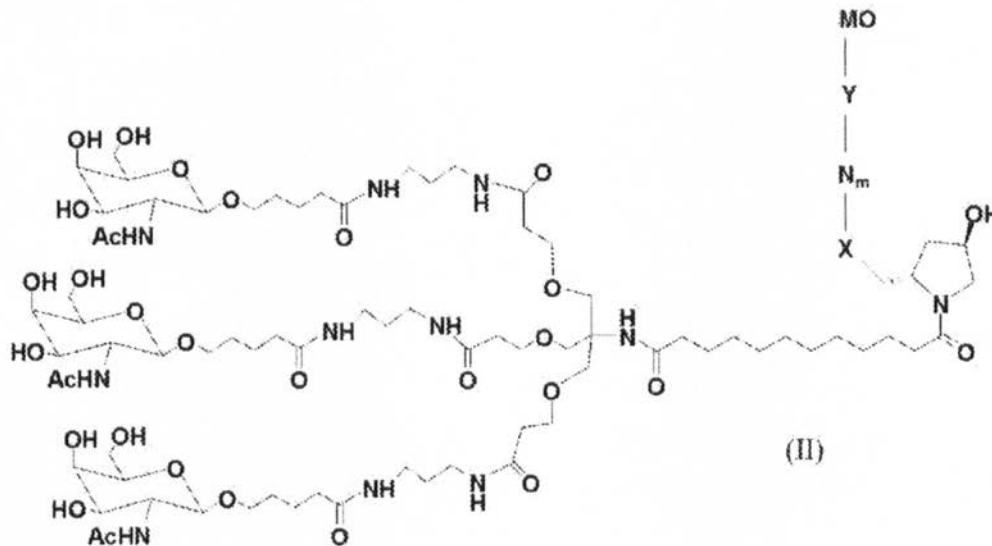
5であり； X_1 および X_2 は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；MOは、修飾オリゴヌクレオチドである]を含む。ある実施形態において、 m は、1である。ある実施形態において、 m は、2である。ある実施形態において、 m は、3、4、または5である。ある実施形態において、 m は、2、3、4、または5である。ある実施形態において、 m は、1を上回る場合、 N_m のそれぞれの修飾または非修飾ヌクレオシドは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホロチオエートヌクレオシド間結合により N_m の隣接修飾または非修飾ヌクレオシドに連結してよい。

【0299】

ある実施形態において、化合物は、構造：

10

【化35】



20

[式中、 X は、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、 m は、1～5であり； Y は、ホスホジエステル結合であり；MOは、修飾オリゴヌクレオチドである]

30

を含む。ある実施形態において、 m は、1である。ある実施形態において、 m は、2である。ある実施形態において、 m は、2、3、4、または5である。ある実施形態において、 m は、3、4、または5である。ある実施形態において、 m は、1を上回る場合、 N_m のそれぞれの修飾または非修飾ヌクレオシドは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホロチオエートヌクレオシド間結合により N_m の隣接修飾または非修飾ヌクレオシドに連結してよい。

【0300】

ある実施形態において、化合物は、修飾ヌクレオチドおよびコンジュゲート部分を含み、修飾オリゴヌクレオチドは、構造

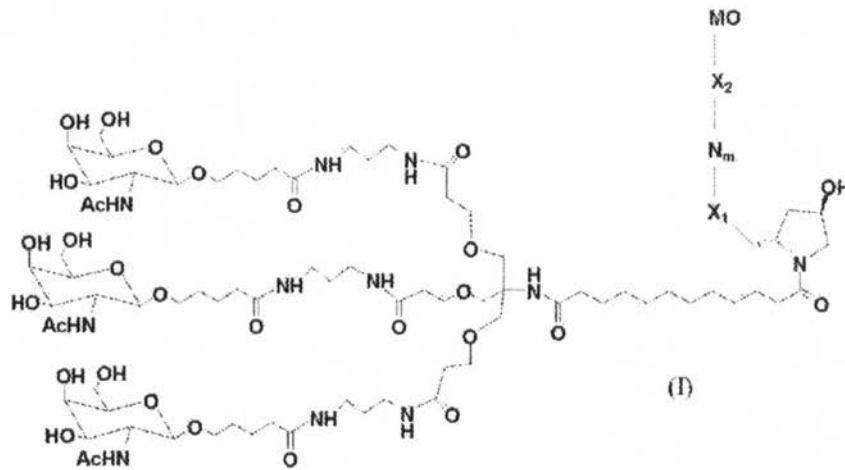
$C_L C A_L T T G_L T_L C A C_L A C_L T C_L C_L$ (配列番号7)

40

を有し、下付き文字「L」は、LNAを示し、下付き文字が続かないヌクレオシドは、

-D-デオキシリボヌクレオシドであり、それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、コンジュゲート部分は、修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に結合しており、構造：

【化 3 6】



10

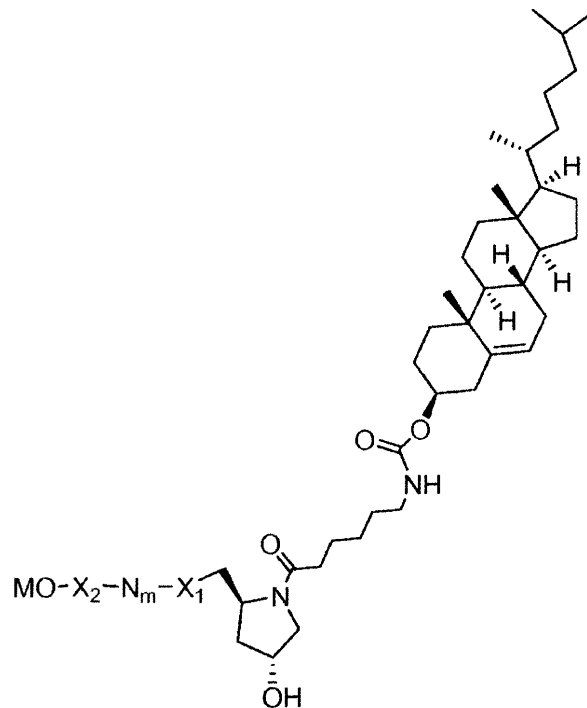
[式中、それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、m は、1 ~ 5 であり； X_1 および X_2 は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；MO は、修飾オリゴヌクレオチドである]
を有する。一部の実施形態において、 C_L ヌクレオシドの全ては、 MeC_L ヌクレオシド

20

【 0 3 0 1】

一部の実施形態において、化合物は、構造：

【化 3 7】



30

40

[式中、それぞれの N は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、m は、1 ~ 5 であり； X_1 および X_2 は、それぞれ独立して、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合であり；MO は、修飾オリゴヌクレオチドである] を有する。

【 0 3 0 2】

ある実施形態において、 X_1 および X_2 の少なくとも一方は、ホスホジエステル結合である。ある実施形態において、 X_1 および X_2 のそれぞれは、ホスホジエステル結合である。

50

【0303】

ある実施形態において、 m は、1である。ある実施形態において、 m は、2である。ある実施形態において、 m は、3、4、または5である。ある実施形態において、 m は、2、3、4、または5である。ある実施形態において、 m が1を上回る場合、 N_m のそれぞれの修飾または非修飾ヌクレオシドは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホロチオエートヌクレオシド間結合により N_m の隣接修飾または非修飾ヌクレオシドに連結してよい。

【0304】

本明細書に記載の実施形態のいずれかにおいて、 N_m は、 $N'_p N''$ であり得、それぞれの N' は、独立して、修飾または非修飾ヌクレオシドであり、 p は、0～4であり； N'' は、非修飾糖部分を含むヌクレオシドである。

10

【0305】

ある実施形態において、 p は、0である。ある実施形態において、 p は、1、2、3、または4である。ある実施形態において、 p が1、2、3、または4である場合、それぞれの N' は、非修飾糖部分を含む。

【0306】

ある実施形態において、非修飾糖部分は、 $-D-$ リボースまたは $-D-$ デオキシリボースである。

【0307】

ある実施形態において、 p が1、2、3、または4である場合、 N' は、プリンヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、 N'' は、プリンヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、プリンヌクレオ塩基は、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、および7-メチルグアニンから選択される。ある実施形態において、 N' は、 $-D-$ デオキシリボアデノシンまたは $-D-$ デオキシリボグアノシンである。ある実施形態において、 N'' は、 $-D-$ デオキシリボアデノシンまたは $-D-$ デオキシリボグアノシンである。

20

【0308】

ある実施形態において、 p は、1であり、 N' および N'' は、それぞれ、 $-D-$ デオキシリボアデノシンであり、 N' および N'' は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合により結合している。ある実施形態において、 p は、1であり、 N' および N'' は、それぞれ、 $-D-$ デオキシリボアデノシンであり、 N' および N'' は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合により結合している。ある実施形態において、 p は、1であり、 N' および N'' は、それぞれ、 $-D-$ デオキシリボアデノシンであり、 N' および N'' は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合により結合している。

30

【0309】

ある実施形態において、 p が1、2、3、または4である場合、 N' は、ピリミジンヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、 N'' は、ピリミジンヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、ピリミジンヌクレオ塩基は、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、ウラシル、および5,6-ジヒドロウラシルから選択される。

【0310】

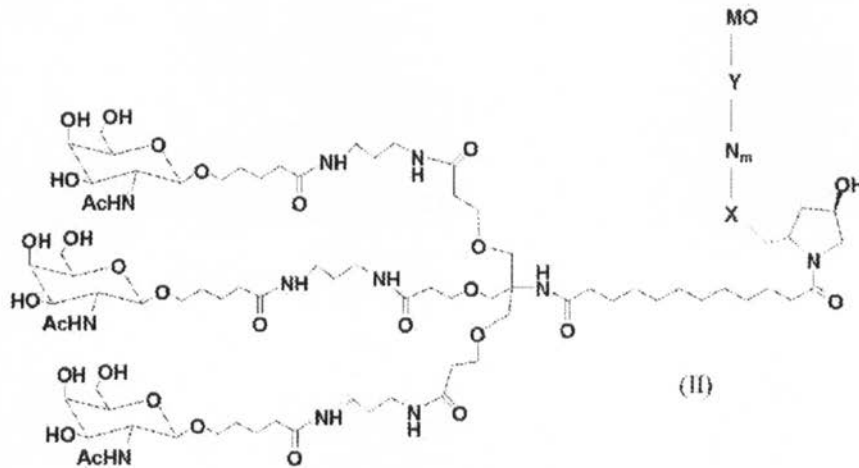
ある実施形態において、それぞれの N の糖部分は、独立して、 $-D-$ リボース、 $-D-$ デオキシリボース、2'- O -メトキシ糖、2'- O -メチル糖、2'-フルオロ糖、および二環式糖部分から選択される。ある実施形態において、それぞれの二環式糖部分は、独立して、 cEt 糖部分、 LNA 糖部分、および ENA 糖部分から選択される。ある実施形態において、 cEt 糖部分は、 $S-cEt$ 糖部分である。ある実施形態において、 cEt 糖部分は、 $R-cEt$ 糖部分である。

40

【0311】

ある実施形態において、化合物は、構造：

【化 3 8】



10

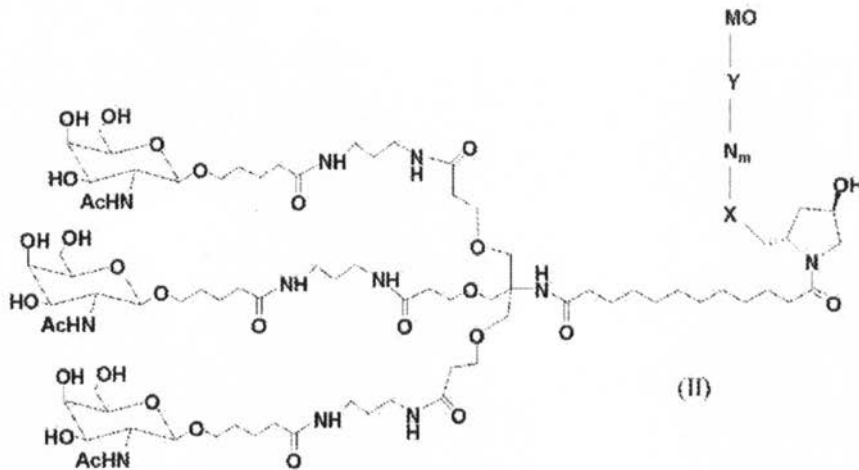
[式中、X は、ホスホジエステル結合であり；m は、1 であり；N は、 β -D-デオキシリボアデノシンであり；Y は、ホスホジエステル結合であり；MO は、修飾オリゴヌクレオチドである]
を含む。

20

【 0 3 1 2 】

ある実施形態において、化合物は、構造：

【化 3 9】



30

[式中、X は、ホスホジエステル結合であり；m は、2 であり；それぞれの N は、 β -D-デオキシリボアデノシンであり；N のヌクレオシドは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合により結合しており；Y は、ホスホジエステル結合であり；MO は、修飾オリゴヌクレオチドである]
を含む。

40

【 0 3 1 3 】

ある実施形態において、化合物は、修飾ヌクレオチドおよびコンジュゲート部分を含み、修飾オリゴヌクレオチドは構造

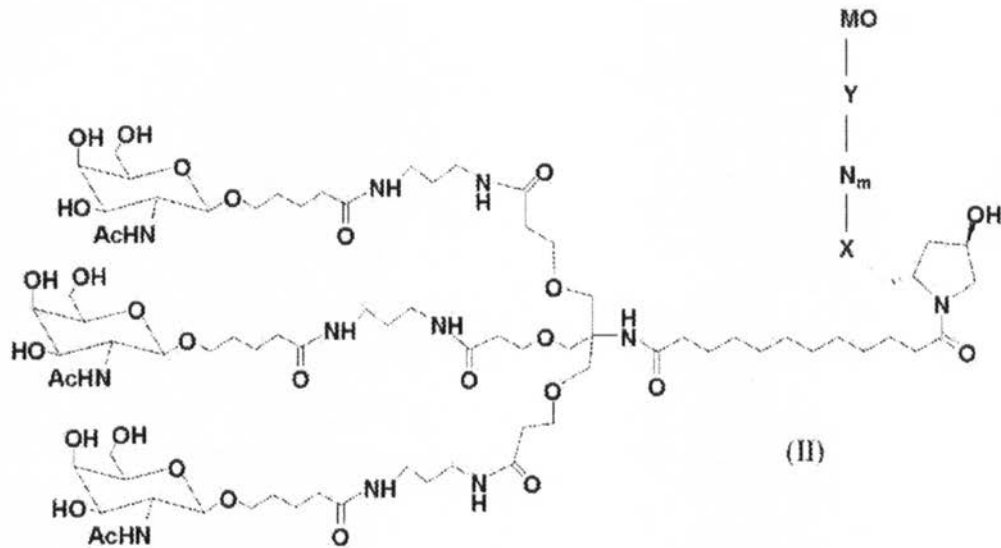
$A_E^M e C_E A_E^M e C_E^M e C_E A_E T_E T G U_S C_S A C_S A C_S T C_S C_S$ (配列番号 4)

を有し、下付き文字が続かないヌクレオシドは、 β -D-デオキシリボヌクレオシドであり；下付き文字「E」が続くヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドであり；下付き文字「S」が続くヌクレオシドは、S-cEtヌクレオシドであり；それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり；コンジュゲート部分は、

50

修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に結合しており、構造：

【化40】



10

[式中、Xは、ホスホジエステル結合であり；mは、1であり；Nは、 β -D-デオキシリボアデノシンであり；Yは、ホスホジエステル結合であり；MOは、修飾オリゴヌクレオチドである]

20

を有する。

【0314】

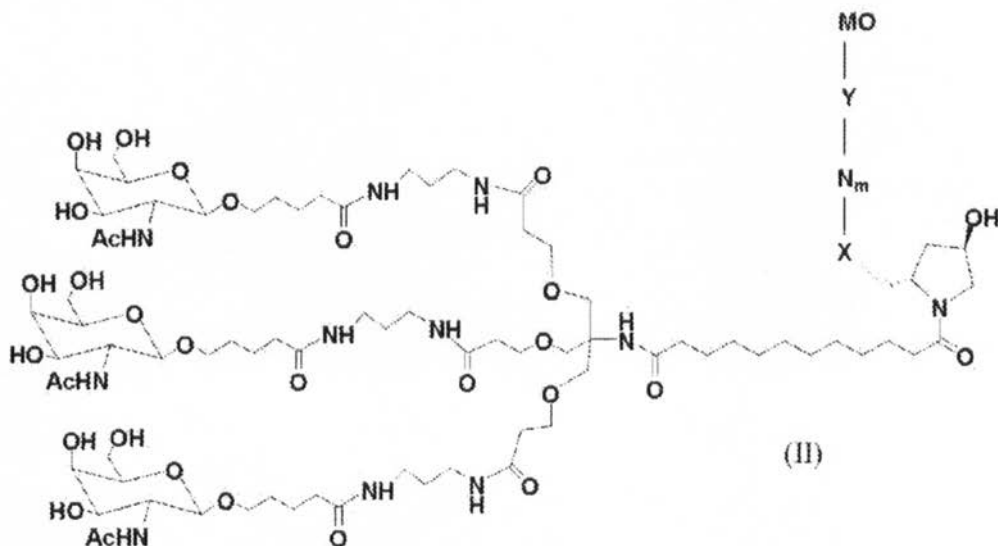
ある実施形態において、化合物は、修飾ヌクレオチドおよびコンジュゲート部分を含み、修飾オリゴヌクレオチドは、構造

$C_L C A_L T T G_L T_L C A C_L A C_L T C_L C_L$ (配列番号7)

を有し、下付き文字「L」は、LNAを示し、下付き文字が続かないヌクレオシドは、 β -D-デオキシリボヌクレオシドであり、それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、コンジュゲート部分は、修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に結合しており、構造：

30

【化41】



40

[式中、Xは、ホスホジエステル結合であり；mは、1であり；Nは、 β -D-デオキシリボアデノシンであり；Yは、ホスホジエステル結合であり；MOは、修飾オリゴヌクレオチドである]

50

を有する。一部の実施形態において、 C_L ヌクレオシドの全ては、 $^M e C_L$ ヌクレオシドであり、上付き文字「 $M e$ 」は、5 - メチルシトシンを示す。

【0315】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、表2に示されるヌクレオ塩基配列および修飾を有する。ヌクレオシドおよびヌクレオ塩基を以下のとおり示す：上付き文字「 $M e$ 」は、5 - メチルシトシンを示し；下付き文字が続かないヌクレオシドは、 $- D$ - デオキシリボヌクレオシドであり；下付き文字「 E 」が続くヌクレオシドは、 $2' - M O E$ ヌクレオシドであり；下付き文字「 S 」が続くヌクレオシドは、 $S - c E t$ ヌクレオシドであり；それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0316】

【表 2】

表2:コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチド

化合物 番号	配列(5'から3')および修飾																	GalNAc構造への結合	配列 番号		
38368	A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	MeC _E	A _E	T _E	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	図3Cの構造III、式中、X ₁ は、ホス ホジエステル結合であり、MOIは、 化合物38649である	4
38371	A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	MeC _E	A _E	T _E	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	図3Cの構造III、式中、X ₁ は、ホス ホロチオエート結合であり、MOは 、化合物38649である	4
38458	A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	MeC _E	A _E	T _E	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	図3Cの構造I、式中、X ₂ は、ホホ ロチオエート(phosphorothioate) 結合であり、m ₁ は、lであり、N _m は 、β-D-デオキシヌクレオシド(dA) であり、X ₁ は、ホスホロチオエート 結合であり、MOIは、化合物 38649である	4
38459	A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	MeC _E	A _E	T _E	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	図3Cの構造I、式中、X ₂ は、ホホ ジエステル(phosphodiester)結合 であり、m ₁ は、lであり、N _m は、 β-D-デオキシヌクレオシド(dA)で あり、X ₁ は、ホスホロチオエート結 合であり、MOIは、化合物38649 である	4
38597	A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	MeC _E	A _E	T _E	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	図3Cの構造I、式中、X ₂ は、ホホ ロチオエート結合であり、m ₁ は、l であり、N _m は、2'-O-メトキシエチ ルヌクレオシドであり、X ₁ は、ホス ホロチオエート結合であり、MOIは 、化合物38649である	4
38598	A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	MeC _E	A _E	T _E	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	図3Cの構造I、式中、X ₂ は、ホホ ロチオエート結合であり、m ₁ は、l であり、N _m は、X ₁ は、ホスホロチ オエート結合であり、MOIは、化合 物38649である	4

【0317】

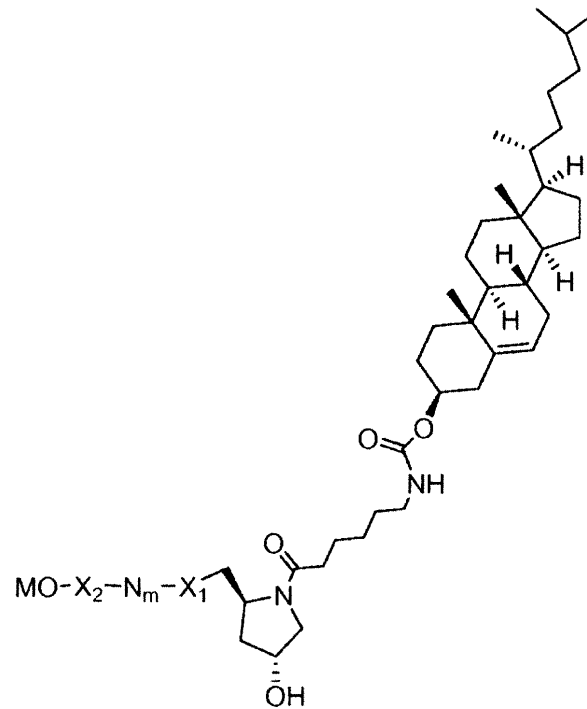
ある実施形態において、本明細書に提供される化合物は、修飾ヌクレオチドおよびコン
ジュゲート部分を含み、修飾オリゴヌクレオチドは、構造

C_S A_S C_S A_S C_S U_S C_S C_S (配列番号9)

を有し、下付き文字「S」は、S - c e tを示し、下付き文字が続かないヌクレオシドは
、 - D - デオキシリボヌクレオシドであり、それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホ
ロチオエートヌクレオシド間結合であり、コンジュゲート部分は、修飾オリゴヌクレオチ

ドの 3' 末端に結合しており、構造：

【化 4 2】



10

20

【式中、 X_1 および X_2 は、ホスホジエステル結合であり； m は、1 であり； N は、 D -デオキシリボアデノシンであり； MO は、修飾オリゴヌクレオチドである】を有する。

【0318】

修飾オリゴヌクレオチドへのコンジュゲーションのための追加の部分としては、フェナジン、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および色素が挙げられる。ある実施形態において、コンジュゲート基は、修飾オリゴヌクレオチドに直接結合している。

30

【0319】

ある代謝産物

エキソヌクレアーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼへのインビトロまたはインビボ曝露時、化合物は、化合物全体にわたる種々の位置における開裂を受け得る。このような開裂の産物は、親化合物の活性のいくらかの程度を保持し得、したがって、活性代謝産物とみなされる。したがって、化合物の代謝産物を本明細書に記載の方法において使用することができる。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチド（非コンジュゲートまたはコンジュゲート）は、5' 末端および/または 3' 末端における開裂を受け、親修飾オリゴヌクレオチドに対して 5' 末端および/または 3' 末端におけるヌクレオチドが 1、2、または 3 つ少ない代謝産物をもたらす。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、5' 末端における開裂を受け、5' 末端ヌクレオチドを放出し、親修飾オリゴヌクレオチドに対して 5' 末端におけるヌクレオチドが 1 つ少ない代謝産物をもたらす。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、5' 末端における開裂を受け、2 つの 5' 末端ヌクレオチドを放出し、親修飾オリゴヌクレオチドに対して 5' 末端におけるヌクレオチドが 2 つ少ない代謝産物をもたらす。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、3' 末端における開裂を受け、3' 末端ヌクレオチドを放出し、親修飾オリゴヌクレオチドに対して 3' 末端におけるヌクレオチドが 1 つ少ない代謝産物をもたらす。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、3' 末端における開裂を受け、2 つの 3' 末端ヌクレオチドを放出し、親修飾オリゴヌクレオチドに対して 3' 末端におけるヌクレオチドが 2 つ少ない代謝産物をもたらす。

40

50

【0320】

コンジュゲート部分に結合している修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物は、修飾オリゴヌクレオチドおよびリガンド間のリンカー内の部位における開裂も受け得る。ある実施形態において、開裂は、コンジュゲート部分の一部を含む親修飾オリゴヌクレオチドを生じさせる。ある実施形態において、開裂は、修飾オリゴヌクレオチドおよびリガンド間のリンカーの1つ以上のサブユニットを含む親修飾オリゴヌクレオチドを生じさせる。例えば、化合物が構造 L_n - リンカー - N_m - P - MO を有する場合、一部の実施形態において、開裂は、 N_m の1つ以上のヌクレオチドを含む親修飾オリゴヌクレオチドを生じさせる。一部の実施形態において、コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドの開裂は、親修飾オリゴヌクレオチドを生じさせる。一部のこのような実施形態において、例えば、化合物が構造 L_n - リンカー - N_m - P - MO を有する場合、一部の実施形態において、開裂は、いかなる N_m のヌクレオチドも有さない親修飾オリゴヌクレオチドを生じさせる。

10

【0321】

あるヌクレオ塩基配列

成熟 *miR-122* およびその対応ステムループ配列のヌクレオ塩基配列は、*microRNA.sanger.ac.uk* において見出されるマイクロRNA配列およびアノテーションのオンライン検索可能なデータベースの *miRBase* に見出される。*miRBase* 配列データベース中のエントリーは、マイクロRNA転写物の予測ヘアピン部分（ステムループ）を、成熟マイクロRNA配列の局在および配列に関する情報とともに表す。データベース中のマイクロRNAステムループ配列は、厳密に、前駆体マイクロRNA（プレマイクロRNA）でなく、一部の例において、想定される一次転写物からのプレマイクロRNAおよび一部のランキング配列を含み得る。本明細書に記載のマイクロRNAヌクレオ塩基配列は、マイクロRNAの任意のバージョン、例として、*miRBase* 配列データベースのリリース15.0に記載の配列および*miRBase* 配列データベースの任意の以前のリリースに記載の配列を包含する。配列データベースリリースは、あるマイクロRNAの改名をもたらし得る。本発明は、本明細書に記載のマイクロRNAの任意のヌクレオ塩基配列バージョンに相補的な修飾オリゴヌクレオチドを包含する。

20

【0322】

ある実施形態において、*miR-122* に標的化される修飾オリゴヌクレオチドのそれぞれのヌクレオ塩基は、*miR-122*、またはその前駆体のヌクレオ塩基配列中の対応位置におけるヌクレオ塩基との塩基対合を受け得る。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、その標的マイクロRNAまたは前駆体配列に対して1つ以上のミスマッチ塩基対を有し得、その標的配列にハイブリダイズし得るまでである。

30

【0323】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、*miR-122* 前駆体、例えば、*miR-122* ステムループ配列のヌクレオ塩基配列に相補的なヌクレオ塩基配列を有する。*miR-122* は、*miR-122* 前駆体配列内に含有されるため、*miR-122* に相補的なヌクレオ塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドは、*miR-122* 前駆体の領域にも相補的である。

40

【0324】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオ塩基1~16、1~17、1~18、1~19、1~20、1~21、または1~22に相補的なヌクレオ塩基配列を有する。

【0325】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオ塩基2~16、2~17、2~18、2~19、2~20、2~21、または2~22に相補的なヌクレオ塩基配列を有する。

【0326】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオ塩基3~1

50

7、3～18、3～19、3～20、3～21、または3～22に相補的なヌクレオ塩基配列を有する。

【0327】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの結合ヌクレオシド数は、miR-122、またはその前駆体の長さ未満である。あるこのような実施形態において、オリゴヌクレオチドは、miR-122、またはその前駆体の領域に相補的なヌクレオ塩基配列を有する。miR-122の長さ未満である結合ヌクレオシドの数を有する修飾オリゴヌクレオチド（修飾オリゴヌクレオチドのそれぞれのヌクレオ塩基は、miR-122ヌクレオ塩基配列中の対応位置におけるそれぞれのヌクレオ塩基に相補的である）は、miR-122に完全に相補的なヌクレオ塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドとみなされる。例えば、19個の結合ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチド（ヌクレオシド1～19のヌクレオ塩基は、miR-122の対応位置にそれぞれ相補的であり、miR-122は、22ヌクレオ塩基長である）は、miR-122の19個の連続ヌクレオ塩基に完全に相補的である。このような修飾オリゴヌクレオチドは、miR-122のヌクレオ塩基配列に100%相補的なヌクレオ塩基配列を有する。

10

【0328】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの結合ヌクレオシドの数は、miR-122の長さよりも1つ少ない。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、5'末端におけるヌクレオシドが1つ少ない。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、3'末端におけるヌクレオシドが1つ少ない。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、5'末端におけるヌクレオシドが2つ少ない。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、3'末端におけるヌクレオシドが2つ少ない。

20

【0329】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの15個の連続ヌクレオ塩基は、miR-122の15個の連続ヌクレオ塩基にそれぞれ相補的である。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの16個の連続ヌクレオ塩基は、miR-122の16個の連続ヌクレオ塩基にそれぞれ相補的である。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの17個の連続ヌクレオ塩基は、miR-122の17個の連続ヌクレオ塩基にそれぞれ相補的である。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの18個の連続ヌクレオ塩基は、miR-122の18個の連続ヌクレオ塩基にそれぞれ相補的である。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの19個の連続ヌクレオ塩基は、miR-122の19個の連続ヌクレオ塩基にそれぞれ相補的である。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの20個の連続ヌクレオ塩基は、miR-122の20個の連続ヌクレオ塩基にそれぞれ相補的である。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの21個の連続ヌクレオ塩基は、miR-122の21個の連続ヌクレオ塩基にそれぞれ相補的である。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの22個の連続ヌクレオ塩基は、miR-122の22個の連続ヌクレオ塩基にそれぞれ相補的である。

30

【0330】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、シード配列に相補的なヌクレオ塩基配列を含み、すなわち、修飾オリゴヌクレオチドは、シードマッチ配列を含む。ある実施形態において、シード配列は、ヘキサマーシード配列である。あるこのような実施形態において、シード配列は、miR-122のヌクレオ塩基1～6である。あるこのような実施形態において、シード配列は、miR-122のヌクレオ塩基2～7である。あるこのような実施形態において、シード配列は、miR-122のヌクレオ塩基3～8である。ある実施形態において、シード配列は、ヘプタマーシード配列である。あるこのような実施形態において、ヘプタマーシード配列は、miR-122のヌクレオ塩基1～7である。あるこのような実施形態において、ヘプタマーシード配列は、miR-122のヌクレオ塩基2～8である。ある実施形態において、シード配列は、オクタマーシード配列である。あるこのような実施形態において、オクタマーシード配列は、miR-1

40

50

2 2 のヌクレオ塩基 2 ~ 9 である。

【 0 3 3 1 】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの結合ヌクレオシドの数は、 $miR - 122$ 配列の長さよりも多い。あるこのような実施形態において、付加ヌクレオシドのヌクレオ塩基は、 $miR - 122$ ステムループ配列のヌクレオ塩基に相補的である。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの結合ヌクレオシドの数は、 $miR - 122$ の長さよりも 1 つ多い。あるこのような実施形態において、付加ヌクレオシドは、修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端において存在する。あるこのような実施形態において、付加ヌクレオシドは、修飾オリゴヌクレオチドの 3' 末端において存在する。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの結合ヌクレオシドの数は、 $miR - 122$ の長さよりも 2 つ多い。あるこのような実施形態において、2 つの付加ヌクレオシドは、修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端において存在する。あるこのような実施形態において、2 つの付加ヌクレオシドは、修飾オリゴヌクレオチドの 3' 末端において存在する。あるこのような実施形態において、1 つの付加ヌクレオシドは、修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端において局在し、1 つの付加ヌクレオシドは、その 3' 末端において局在する。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドの領域は、 $miR - 122$ のヌクレオ塩基配列に完全に相補的であり得るが、全修飾オリゴヌクレオチドは、 $miR - 122$ に完全には相補的でない。例えば、23 個の結合ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチド（ヌクレオシド 1 ~ 22 のヌクレオ塩基が、22 ヌクレオ塩基長である $miR - 122$ の対応位置にそれぞれ相補的である）は、 $miR - 122$ のヌクレオ塩基配列に完全に相補的な 22 個のヌクレオシド部分を有する。

【 0 3 3 2 】

ある実施形態において、化合物は、1 つ以上のヌクレオシドを含むリンカーを介してリガンドに結合している修飾オリゴヌクレオチドを含む。相補性の割合を算出する目的のため、リンカーの任意の付加ヌクレオシドは、リンカーの一部とみなされ、修飾オリゴヌクレオチドの一部とはみなされない。したがって、コンジュゲート化合物の修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオ塩基配列は、リンカーが $miR - 122$ に相補的でない 1 つ以上のヌクレオシドを含む場合であっても、 $miR - 122$ に依然として 100 % 相補的であり得る。

【 0 3 3 3 】

本明細書に記載の $miR - 122$ ヌクレオ塩基配列、例として、限定されるものではないが、実施例および配列表に見出されるものは、核酸へのいかなる修飾からも独立している。したがって、配列番号により定義される核酸は、独立して、1 つ以上の糖部分への、1 つ以上のヌクレオシド間結合への、および / または 1 つ以上のヌクレオ塩基への 1 つ以上の修飾を含み得る。

【 0 3 3 4 】

本出願に付属する配列表は、それぞれのヌクレオ塩基配列を適宜「RNA」または「DNA」のいずれかとして識別するが、実際、それらの配列は、化学修飾の任意の組合せにより修飾されていてよい。当業者は、修飾オリゴヌクレオチドを記載するための「RNA」または「DNA」としてのこのような指定が、いくぶん任意であることを容易に認識する。例えば、2' - OH 糖部分およびチミン塩基を含むヌクレオシドを含む修飾オリゴヌクレオチドは、修飾糖（DNA の天然 2' - H について 2' - OH）を有する DNA として、または修飾塩基（RNA の天然ウラシルについてチミン（メチル化ウラシル））を有する RNA として記載することができる。

【 0 3 3 5 】

したがって、本明細書に提供される核酸配列、例として、限定されるものではないが、配列表中のものは、天然または修飾 RNA および / または DNA の任意の組合せを含有する核酸、例として、限定されるものではないが、修飾ヌクレオ塩基を有するこのような核酸を包含するものとする。さらなる例として、限定されるものではないが、ヌクレオ塩基配列「ATCGATCG」を有する修飾オリゴヌクレオチドは、そのようなヌクレオ塩基

配列（修飾または非修飾を問わない）を有する任意のオリゴヌクレオチド、例として、限定されるものではないが、RNA塩基を含むそのような化合物、例えば、配列「AUCGAUCG」を有するものならびにいくつかのDNA塩基およびいくつかのRNA塩基、例えば、「AUCGATCG」を有するものならびに他の修飾塩基、例えば、「AT^meCGAUCG」（^meCは、5-メチルシトシンを示す）を有するオリゴヌクレオチドを包含する。同様に、ヌクレオ塩基配列「AUCGAUCG」を有する修飾オリゴヌクレオチドは、そのようなヌクレオ塩基配列（修飾または非修飾を問わない）を有する任意のオリゴヌクレオチド、例として、限定されるものではないが、DNA塩基を含むそのような化合物、例えば、配列「ATCGATCG」を有するものならびにいくつかのDNA塩基およびいくつかのRNA塩基、例えば、「AUCGATCG」を有するものならびに他の修飾塩基、例えば、「AT^meCGAUCG」（^meCは、5-メチルシトシンを示す）を有するオリゴヌクレオチドを包含する。

10

20

30

40

50

【0336】

miR-122組成物のある使用

マイクロRNAのmiR-122は、HCVの複製のための重要な内因性「宿主因子」である肝臓発現マイクロRNAであり、miR-122を標的化するオリゴヌクレオチドは、HCV複製を遮断する（Jopling et al. (2005) Science 309, 1577-81）。C型肝炎ウイルスに慢性的に感染しているチンパンジーにおけるmiR-122の阻害は、HCV RNAレベルを低減させた。HCV感染患者において、miR-122の阻害は、抗miR-122化合物の5週間の投与後にHCV RNAレベルの平均2log低減をもたらした。本明細書に記載の化合物は、miR-122活性の強力な阻害剤である。したがって、本明細書において、HCV感染対象への本明細書に提供される化合物を含む、HCV感染を治療する方法が提供される。

【0337】

本明細書において、対象に本明細書に提供される化合物を投与することを含む、HCV感染対象を治療する方法が提供される。ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、HCV感染対象を選択することを含む。ある実施形態において、対象は、ヒトである。

【0338】

ある実施形態において、投与は、HCV感染の症状を低減させる。HCV感染の症状としては、限定されるものではないが、肝臓にわたる疼痛、黄疸、嘔吐、食欲不振、および疲労が挙げられる。

【0339】

HCV治療レジメン後、HCV感染対象は、HCV RNAレベルの減少と、それに続くHCV RNAレベルの増加が認められ得、この後続の増加は、HCV RNAレベルのリバウンドとして公知である。ある実施形態において、本明細書に提供される化合物および方法は、HCV RNAレベルのリバウンドを予防する。ある実施形態において、本明細書に提供される化合物および方法は、HCV RNAレベルのリバウンドを遅延させる。

【0340】

HCV RNAレベルを使用してHCV感染を診断し、疾患活性をモニタリングし、治療に対する対象の応答をモニタリングすることができる。ある実施形態において、本明細書に提供される化合物の投与は、HCV RNAレベルを低減させる。ある実施形態において、本明細書の化合物は、HCV RNAレベルを低減させるために十分な用量において投与する。ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、血清1ミリリットル当たり350,000コピーを上回る、血清1ミリリットル当たり350,000~3,500,000コピーの、または血清1ミリリットル当たり3,500,000コピーを上回るHCV RNAレベルを有する対象を選択することを含む。ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、HCV RNAレベルを低減させることを含む。ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、HCV RNAレベルを血清1ミリリッ

トル当たり 200 コピー未満に、血清 1 ミリリットル当たり 100 コピー未満に、または血清 1 ミリリットル当たり 40 コピー未満に低減させることを含む。HCV RNA レベルは、「ウイルス負荷」または「HCV RNA タイター」と称することができる。

【0341】

HCV RNA レベルの変化は、log 変化率として記載することができる。例えば、60,000 ~ 600 の降下は、HCV RNA レベルの 2 log 降下である。ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、2 log 以上の HCV RNA レベル減少を達成する。ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、少なくとも 0.5 倍、少なくとも 1.0 倍、少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2.0 倍、または少なくとも 2.5 倍の HCV RNA レベル減少を達成する。

10

【0342】

ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、持続性ウイルス学的著効を達成することを含む。

【0343】

HCV 感染対象は、HCV 関連疾患を発症し得る。HCV 感染の主要な肝臓病学的結果は、肝硬変およびその合併症、例として、出血、肝不全、および肝細胞癌腫である。追加の合併症は、線維症であり、これは細胞外マトリックス構成成分の堆積を引き起こす慢性炎症の結果であり、肝構造の破壊ならびに微小循環および肝機能の遮断をもたらす。肝硬変が進行し、線維性組織が構築されるにつれ、重度の壊死炎症活性が起き、脂肪症が発生する。脂肪症は、肝外病変、例として、糖尿病、タンパク質栄養不良、高血圧、細胞毒、肥満、および酸素欠乏症をもたらす。線維症および脂肪症が重度になるにつれ、肝臓は最終的には機能せず、肝移植が要求される。HCV 感染対象は、肝細胞癌腫も発症し得る。ある実施形態において、HCV 感染対象は、HCV 関連疾患を有する。ある実施形態において、HCV 関連疾患は、肝硬変、線維症、脂肪性肝炎、脂肪症、および/または肝細胞癌腫である。

20

【0344】

ある実施形態において、HCV 感染対象は、1 つ以上の疾患を有する。ある実施形態において、HCV 感染対象は、HCV 以外の 1 つ以上のウイルスに感染している。ある実施形態において、HCV 感染対象は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に感染している。本明細書に提供される化合物は、1 つ以上の追加の治療剤と同時投与することができる。ある実施形態において、1 つ以上の追加の治療剤は、免疫療法、免疫調節剤、治療ワクチン、抗線維症剤、抗炎症剤、気管支拡張剤、粘液溶解剤、抗ムスカリン剤、抗ロイコトリエン剤、細胞接着の阻害剤、酸化防止剤、サイトカインアゴニスト、サイトカインアンタゴニスト、肺サーファクタント、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗 HCV 剤、抗癌剤、抗 miR-122 化合物、RNAi 剤またはシクロフィリン阻害剤を含む。

30

【0345】

ある実施形態において、1 つ以上の追加の治療剤は、プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、補因子阻害剤、RNA ポリメラーゼ阻害剤、構造タンパク質阻害剤、非構造タンパク質阻害剤、シクロフィリン阻害剤、侵入阻害剤、TLR7 アゴニスト、およびインターフェロンから選択することができる。

40

【0346】

ある実施形態において、追加の治療剤は、構造

$C_L C A_L T T G_L T_L C A C_L A C_L T C_L C_L$ (配列番号 7)

を有する修飾オリゴヌクレオチドであり、下付き文字が続かないヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドを示し；下付き文字「L」が続くヌクレオシドは、LNAヌクレオシドを示し；それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。ある実施形態において、治療剤は、

Ga1NAc-コンジュゲート $C_L C A_L T T G_L T_L C A C_L A C_L T C_L C_L$ (配列番号 7)

である。一部の実施形態において、 C_L ヌクレオシドの全ては、 $M^e C_L$ ヌクレオシドで

50

あり、上付き文字「Me」は、5 - メチルシトシンを示す。

【0347】

ある実施形態において、追加の治療剤は、プロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤、NS3/4A阻害剤、ヌクレオシドNS5B阻害剤、ヌクレオチドNS5B阻害剤、非ヌクレオシドNS5B阻害剤、シクロフィリン阻害剤およびインターフェロンから選択される。

【0348】

ある実施形態において、追加の治療剤は、インターフェロンアルファ - 2a、インターフェロンアルファ - 2b、インターフェロンアルファコン - 1、ペグインターフェロンアルファ - 2b、ペグインターフェロンアルファ - 2a、徐放インターフェロン - アルファ - 2b、インターフェロンラムダ、ソホスブビル、リバビリン、テラプラビル、ボセプレビル、パニプレビル、アスナプレビル、リトナビル、セトロブビル、ダクラスタビル、シメプレビル、アリスボリビル、メリシタピン、テゴブビル、ダノプレビル、ソバプレビル、およびネセプレビルから選択される。ある実施形態において、追加の治療剤は、ファルダプレビル、ABT - 450、MK - 5172、メリシタピン、レジバスビル、オムピタスビル、GS - 5816、MK - 8742、ダサビル、BMS - 791325、およびABT - 072から選択される。

【0349】

ある実施形態において、追加の治療剤は、インターフェロン、リバビリン、およびテラプラビルから選択される。ある実施形態において、インターフェロンは、インターフェロンアルファ - 2a、インターフェロンアルファ - 2b、インターフェロンアルファコン - 1、ペグインターフェロンアルファ - 2b、およびペグインターフェロンアルファ - 2aから選択される。

【0350】

ある実施形態において、追加の治療剤は、ペグインターフェロンアルファ - 2bおよびリバビリンを含む。例えば、対象は、本明細書に提供される化合物、ペグインターフェロンアルファ - 2bおよびリバビリンを含む治療法を受け得る。ある実施形態において、少なくとも1つの追加の治療剤は、ペグインターフェロンアルファ - 2aおよびリバビリンを含む。例えば、対象は、本明細書に提供される化合物、ペグインターフェロンアルファ - 2aおよびリバビリンを含む治療法を受け得る。ある実施形態において、追加の治療剤は、オムピタスビルおよびABT - 450である。ある実施形態において、追加の治療剤は、アスナプレビル、ダクラスタビル、およびBMS - 791325である。ある実施形態において、追加の治療剤は、ソホスブビルおよびレジパシブル (ledipasvir) である。ある実施形態において、追加の治療剤は、MK - 8742およびMK - 5172である。

【0351】

ある治療法、例えば、インターフェロンまたはリバビリン療法を受けるある対象は、HCV RNAレベルの有意な、または治療的に有益な低減が認められないことがある。このような対象は、1つ以上の追加の治療剤の投与から利益を受け得る。ある実施形態において、本明細書に提供される方法の対象は、非応答者である。ある実施形態において、対象は、インターフェロン非応答者である。ある実施形態において、対象は、直接作用型抗ウイルス剤非応答者である。

【0352】

ある実施形態において、追加の治療剤は、HIV感染の治療において使用される抗ウイルス剤である。ある実施形態において、追加の治療剤は、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) である。ある実施形態において、追加の治療剤は、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤 (NRTI) である。ある実施形態において、追加の治療剤は、プロテアーゼ阻害剤である。ある実施形態において、追加の治療剤は、侵入阻害剤または融合阻害剤である。ある実施形態において、追加の治療剤は、インテグラーゼ阻害剤である。ある実施形態において、追加の治療剤は、エファビレンツ、エトラビリン、ネビラピン、アバカビル、エムトリシタピン、テノホビル、ラミブジン、ジドブジン、アタザナビル、ダルナビ

10

20

30

40

50

ル、フォサムブレナビル、リトナビル、エンフビルチド、マラビロク、およびラルテグラビルから選択される。

【0353】

HCVに感染している対象は、ビリルビン、アルブミン、およびプロトンピン (p r o t h o m b i n) 時間の1つ以上を計測することにより評価される異常肝機能が認められ得る。肝酵素アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T)、およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) の計測を実施して肝炎症を評価する。これらのマーカーの異常レベルの1つ以上が、異常肝機能を呈し得る。ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、肝機能を正常化させることを含む。ある実施形態において、本明細書に提供される方法は、肝酵素レベルを正常化させることを含む。

10

【0354】

本明細書に提供される方法のいずれかにおいて、化合物は、医薬組成物中に存在し得る。

【0355】

本明細書に提供される化合物は、治療法において使用され得る。ある実施形態において、化合物は、HCV感染対象の治療において使用される。ある実施形態において、対象は、ヒトである。HCV感染対象の治療において使用される化合物は、ある実施形態において、本明細書に記載の任意の治療方法において使用され得る。

【0356】

本明細書において、本明細書に提供される化合物を、miR-122関連病態を有する対象に投与することを含む方法が提供される。ある実施形態において、miR-122関連病態は、HCV感染である。

20

【0357】

ある実施形態において、miR-122関連病態は、コレステロール上昇である。ある実施形態において、抗miR-122化合物の対象への投与は、血清コレステロールの低減をもたらす。したがって、ある実施形態において、本明細書において、対象に本明細書に提供される化合物を投与することを含む、対象におけるコレステロールを低下させる方法が提供される。ある実施形態において、コレステロールレベルをバイオマーカーとして使用して本明細書に提供される抗miR-122化合物の活性を、単独で、または効力の別の指標、例えば、HCV RNAレベルの低減に加えて評価することができる。したがって、本明細書において、本明細書に提供される化合物を対象に投与すること、対象から血液試料を回収すること、および対象からの血液試料中のコレステロールを計測することを含む方法が提供される。コレステロールのレベルを、対象における抗miR-122化合物活性の指標として使用することができる。

30

【0358】

ある実施形態において、miR-122関連病態は、肥満症である。したがって、ある実施形態において、本明細書において、対象に本明細書に提供される化合物を投与することを含む、対象における肥満症を低減させる方法が提供される。

【0359】

ある実施形態において、miR-122関連病態は、鉄過剰負荷障害である。鉄過剰負荷障害は、過剰量の鉄を体内に吸収させる遺伝子突然変異の結果として生じ得る。鉄過剰負荷障害は、非遺伝子的原因、例として、限定されるものではないが、慢性輸血、慢性肝炎、または過剰量の鉄の摂取も有し得る。ある実施形態において、鉄過剰負荷障害は、輸血性鉄過剰負荷、食事性鉄過剰負荷、遺伝性血色素症、鎌状赤血球貧血、サラセミア、X連鎖性鉄芽球性貧血、ビルビン酸キナーゼ欠損症、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損症から選択される。ある実施形態において、鉄過剰負荷障害は、血色素症1型、血色素症2A型、血色素症2B型、血色素症3型、血色素症4型（またはフェロポーチン疾患）、アフリカ血色素症、新生児血色素症、無セルロプラスミン血症、および無トランスフェリン血症から選択される遺伝性血色素症である。ある実施形態において、鉄過剰負荷障害を有する対象への本明細書に提供される化合物の投与は、対象の体内の過剰

40

50

鉄の低減をもたらす。

【0360】

ある修飾

修飾オリゴヌクレオチドは、ヌクレオ塩基、糖、および/またはヌクレオシド間結合への1つ以上の修飾を含み得る。修飾ヌクレオ塩基、糖、および/またはヌクレオシド間結合は、所望の特性、例えば、細胞取り込みの向上、他のオリゴヌクレオチドまたは核酸標的についての親和性の向上およびヌクレアーゼ存在下の安定性の増加などのため、非修飾形態を上回って選択することができる。

【0361】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む。ある実施形態において、修飾ヌクレオシドは、安定化ヌクレオシドである。安定化ヌクレオシドの例は、2'-修飾ヌクレオシドである。

10

【0362】

ある実施形態において、修飾ヌクレオシドは、修飾糖部分を含む。ある実施形態において、修飾糖部分を含む修飾ヌクレオシドは、非修飾ヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、修飾糖は、修飾ヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、修飾ヌクレオシドは、2'-修飾ヌクレオシドである。

【0363】

ある実施形態において、2'-修飾ヌクレオシドは、二環式糖部分を含む。あるこのような実施形態において、二環式糖部分は、アルファ立体配置のD糖である。あるこのような実施形態において、二環式糖部分は、ベータ立体配置のD糖である。あるこのような実施形態において、二環式糖部分は、アルファ立体配置のL糖である。あるこのような実施形態において、二環式糖部分は、ベータ立体配置のL糖である。

20

【0364】

ある実施形態において、二環式糖部分は、2'および4'炭素原子間の架橋基を含む。あるこのような実施形態において、架橋基は、1~8つの結合ビラジカル基を含む。ある実施形態において、二環式糖部分は、1~4つの結合ビラジカル基を含む。ある実施形態において、二環式糖部分は、2または3つの結合ビラジカル基を含む。ある実施形態において、二環式糖部分は、2つの結合ビラジカル基を含む。このような4'から2'糖置換基の例としては、限定されるものではないが、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ 、 $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ または $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ ；4'- CH_2-2' 、4'- $(CH_2)_2-2'$ 、4'- $(CH_2)_3-2'$ ；4'- $(CH_2)-O-2'$ (LNA)；4'- $(CH_2)-S-2'$ ；4'- $(CH_2)_2-O-2'$ (ENA)；4'- $CH(CH_3)-O-2'$ (cet)および4'- $CH(CH_2OCH_3)-O-2'$ 、ならびにそのアナログ(例えば、2008年7月15日に発行された米国特許第7,399,845号明細書参照)；4'- $C(CH_3)(CH_3)-O-2'$ およびそのアナログ、(例えば、2009年1月8日に公開された国際公開第2009/006478号パンフレット参照)；4'- $CH_2-N(OCH_3)-2'$ およびそのアナログ(例えば、2008年11月11日に公開された国際公開第2008/150729号パンフレット参照)；4'- $CH_2-O-N(CH_3)-2'$ (例えば、2004年9月2日に公開された米国特許出願公開第2004/0171570号明細書参照)；4'- $CH_2-O-N(R)-2'$ 、および4'- $CH_2-N(R)-O-2'$ -(式中、それぞれのRは、独立して、H、保護基、または C_1-C_1 アルキルである)；4'- $CH_2-N(R)-O-2'$ -(式中、Rは、H、 C_1-C_1 アルキル、または保護基である)(2008年9月23日に発行された米国特許第7,427,672号明細書参照)；4'- $CH_2-C(H)(CH_3)-2'$ (例えば、Chattopadhyaya, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134参照)；および4'- $CH_2-C(=CH_2)-2'$ およびそのアナログ(2008年12月8日に公開された公開中のPCT国際出願の国際公開第2008/154401号パンフレット参照)が挙げられる。

30

40

50

【0365】

ある実施形態において、このような4'から2'架橋は、独立して、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-C(R_a)=C(R_b)-$ 、 $-C(R_a)=N-$ 、 $-C(=NR_a)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R_a)_2-$ 、 $-S(=O)_x-$ 、および $-N(R_a)-$ から独立して選択される1または2~4つの結合基を含み；

xは、0、1、または2であり；

nは、1、2、3、または4であり；

それぞれの R_a および R_b は、独立して、H、保護基、ヒドロキシル、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、置換 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、 $C_5 \sim C_7$ 脂環式ラジカル、置換 $C_5 \sim C_7$ 脂環式ラジカル、ハロゲン、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $COOJ_1$ 、アシル($C(=O)-H$)、置換アシル、 CN 、スルホニル($S(=O)_2-J_1$)、またはスルホキシル($S(=O)-J_1$)であり；

それぞれの J_1 および J_2 は、独立して、H、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、置換 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、アシル($C(=O)-H$)、置換アシル、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、 $C_1 \sim C_{12}$ アミノアルキル、置換 $C_1 \sim C_{12}$ アミノアルキル、または保護基である。

【0366】

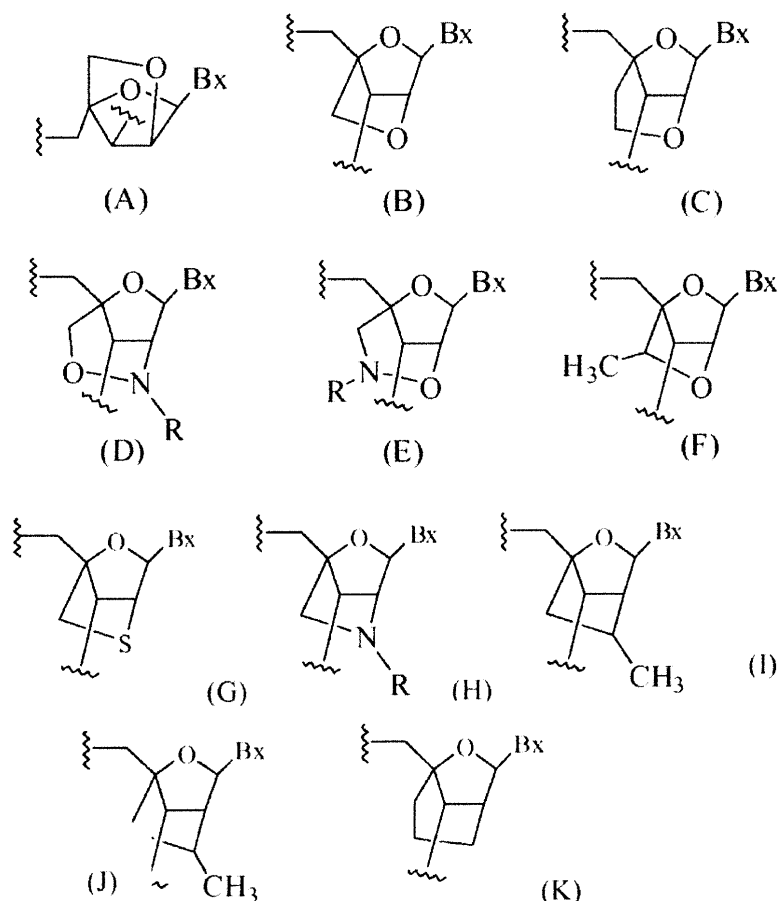
二環式糖部分を含むヌクレオシドは、二環式ヌクレオシドまたはBNAと称される。ある実施形態において、二環式ヌクレオシドとしては、限定されるものではないが、以下に示される(A) $-L-$ メチレンオキシ($4'-CH_2-O-2'$)BNA；(B) $-D-$ メチレンオキシ($4'-CH_2-O-2'$)BNA；(C)エチレンオキシ($4'-(CH_2)_2-O-2'$)BNA；(D)アミノオキシ($4'-CH_2-O-N(R)-2'$)BNA；(E)オキシアミノ($4'-CH_2-N(R)-O-2'$)BNA；(F)メチル(メチレンオキシ)($4'-CH(CH_3)-O-2'$)BNA(拘束エチルまたはcEtとも称される)；(G)メチレン-チオ($4'-CH_2-S-2'$)BNA；(H)メチレン-アミノ($4'-CH_2-N(R)-2'$)BNA；(I)メチル炭素環式($4'-CH_2-CH(CH_3)-2'$)BNA；(J)c-MOE($4'-CH_2-OMe-2'$)BNAおよび(K)プロピレン炭素環式($4'-(CH_2)_3-2'$)BNA

10

20

30

【化 4 3】



10

20

30

40

50

[式中、Bxは、ヌクレオ塩基部分であり、Rは、独立して、H、保護基、またはC₁ ~ C₁₂アルキルである]
が挙げられる。

【0367】

ある実施形態において、2'-修飾ヌクレオシドは、ハロ、アリル、アミノ、アジド、SH、CN、OCN、CF₃、OCF₃、O-、S-、またはN(R_m)-アルキル；O-、S-、またはN(R_m)-アルケニル；O-、S-またはN(R_m)-アルキニル；O-アルキレニル-O-アルキル、アルキニル、アルカール、アラール、O-アルカール、O-アラール、O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)またはO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)から選択される2'-置換基を含み、それぞれのR_mおよびR_nは、独立して、H、アミノ保護基または置換もしくは非置換C₁ ~ C₁₀アルキルである。これらの2'-置換基は、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ(NO₂)、チオール、チオアルコキシ(S-アルキル)、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルから独立して選択される1つ以上の置換基によりさらに置換されていてよい。

【0368】

ある実施形態において、2'-修飾ヌクレオシドは、F、NH₂、N₃、OCF₃、O-CH₃、O(CH₂)₃NH₂、CH₂-CH=CH₂、O-CH₂-CH=CH₂、OCH₂CH₂OCH₃、O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、-O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂、およびN-置換アセトアミド(O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n))から選択される2'-置換基を含み、それぞれのR_mおよびR_nは、独立して、H、アミノ保護基または置換もしくは非置換C₁ ~ C₁₀アルキルである。

【0369】

ある実施形態において、2' - 修飾ヌクレオシドは、F、 OCF_3 、 $\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、2' - $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{SCH}_3$ 、 $\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、および $\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$ から選択される2' - 置換基を含む。

【0370】

ある実施形態において、2' - 修飾ヌクレオシドは、F、 $\text{O}-\text{CH}_3$ 、および $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ から選択される2' - 置換基を含む。

【0371】

ある実施形態において、2' - 修飾ヌクレオシドは、4' - チオ修飾ヌクレオシドである。ある実施形態において、2' - 修飾ヌクレオシドは、4' - チオ - 2' - 修飾ヌクレオシドである。4' - チオ修飾ヌクレオシドは、 $-\text{D}-$ リボヌクレオシドを有し、4' - $-\text{O}$ は、4' - $-\text{S}$ により置き換えられている。4' - チオ - 2' - 修飾ヌクレオシドは、2' - 置換基により置き換えられている2' - $-\text{OH}$ を有する4' - チオ修飾ヌクレオシドである。好適な2' - 置換基としては、2' - OCH_3 、2' - $\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{OCH}_3$ 、および2' - Fが挙げられる。

【0372】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオシド間修飾を含む。あるこのような実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのそれぞれのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。ある実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、リン原子を含む。

【0373】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドのそれぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0374】

ある実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、リン原子を含まない。あるこのような実施形態において、ヌクレオシド間結合は、短鎖アルキルヌクレオシド間結合により形成される。あるこのような実施形態において、ヌクレオシド間結合は、シクロアルキルヌクレオシド間結合により形成される。あるこのような実施形態において、ヌクレオシド間結合は、混合ヘテロ原子およびアルキルヌクレオシド間結合により形成される。あるこのような実施形態において、ヌクレオシド間結合は、混合ヘテロ原子およびシクロアルキルヌクレオシド間結合により形成される。あるこのような実施形態において、ヌクレオシド間結合は、1つ以上の短鎖ヘテロ原子ヌクレオシド間結合により形成される。あるこのような実施形態において、ヌクレオシド間結合は、1つ以上の複素環式ヌクレオシド間結合により形成される。あるこのような実施形態において、ヌクレオシド間結合は、アミド骨格を有する。あるこのような実施形態において、ヌクレオシド間結合は、混合N、O、Sおよび CH_2 構成部分を有する。

【0375】

ある実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾ヌクレオ塩基を含む。ある実施形態において、修飾ヌクレオ塩基は、7 - デアザグアニン、7 - デアザアデニン、ヒポキサンチン、キサンチン、7 - メチルグアニン、2 - アミノピリジンおよび2 - ピリドンから選択される。ある実施形態において、修飾ヌクレオ塩基は、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジンならびにN - 2、N - 6およびO - 6置換プリン、例として、2アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンから選択される。

【0376】

ある実施形態において、修飾ヌクレオ塩基は、多環式複素環を含む。ある実施形態において、修飾ヌクレオ塩基は、三環式複素環を含む。ある実施形態において、修飾ヌクレオ塩基は、フェノキサジン誘導体を含む。ある実施形態において、フェノキサジンをさらに修飾してGクランプとして当技術分野において公知のヌクレオ塩基を形成することができ

10

20

30

40

50

る。

【0377】

あるこのような実施形態において、化合物は、特性、例えば、ヌクレアーゼ安定性などを向上させるために修飾オリゴヌクレオチドの一方または両方の末端に結合している1つ以上の安定化基を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む。安定化基には、キャップ構造が含まれる。これらの末端修飾は、修飾オリゴヌクレオチドをエキソヌクレアーゼ分解から保護し、送達および/または細胞内の局在化において役立ち得る。キャップは、5'末端(5'-キャップ)、もしくは3'末端(3'-キャップ)において存在し得、または両方の末端上に存在し得る。キャップ構造としては、例えば、逆向きデオキシ非塩基(a b a s i c)キャップが挙げられる。

10

【0378】

好適なキャップ構造としては、4', 5'-メチレンヌクレオチド、1-(ベータ-D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、1, 5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド、アルファ-ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、ホスホロジチオエート結合、トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド、非環式3', 4'-セコヌクレオチド、非環式3, 4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環式3, 5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-逆向きヌクレオチド部分、3'-3'-逆向き非塩基部分、3'-2'-逆向きヌクレオチド部分、3'-2'-逆向き非塩基部分、1, 4-ブタンジオールホスフェート、3'-ホスホラミデート、ヘキシルホスフェート、アミノヘキシルホスフェート、3'-ホスフェート、3'-ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、架橋メチルホスホネート部分、および非架橋メチルホスホネート部分5'-アミノ-アルキルホスフェート、1, 3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート、3-アミノプロピルホスフェート、6-アミノヘキシルホスフェート、1, 2-アミノドデシルホスフェート、ヒドロキシプロピルホスフェート、5'-5'-逆向きヌクレオチド部分、5'-5'-逆向き非塩基部分、5'-ホスホラミデート、5'-ホスホロチオエート、5'-アミノ、架橋および/または非架橋5'-ホスホラミデート、ホスホロチオエート、ならびに5'-メルカプト部分が挙げられる。

20

【0379】

ある合成方法

30

修飾オリゴヌクレオチドは、当技術分野において公知の自動化固相合成方法により作製することができる。固相合成の間、ホスホラミダイトモノマーを、固体担体に共有結合しているヌクレオシドに連続的にカップリングさせる。このヌクレオシドは、修飾オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオシドである。典型的には、カップリングサイクルは、4つのステップ: 脱トリチル化(酸による5'-ヒドロキシル保護基の除去)、カップリング(担体結合ヌクレオシドまたはオリゴヌクレオチドへの活性化ホスホロアミダイトの結合)、酸化または硫化(酸化剤または硫化剤による新たに形成されたホスファイトトリメスター(trimester)の変換)、およびキャッピング(未反応5'-ヒドロキシル基のアセチル化)を含む。最後のカップリングサイクル後、固体担体結合オリゴヌクレオチドを脱トリチル化ステップに供し、次いでオリゴヌクレオチドを同時に固体担体から放出させ、保護基を塩基から除去する開裂および脱保護ステップを行う。固体担体を濾過により除去し、濾液を濃縮し、得られた溶液をアイデンティティおよび純度について試験する。次いで、例えば、アニオン交換樹脂が充填されたカラムを使用してオリゴヌクレオチドを精製する。

40

【0380】

G a l N A c-コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドは、非コンジュゲートオリゴヌクレオチドを産生した固相合成に類似の自動化固相合成により作製することができる。G a l N A c-コンジュゲートオリゴヌクレオチドの合成の間、ホスホラミダイトモノマーを、固体担体に共有結合しているG a l N A cコンジュゲートに連続的にカップリングする。G a l N A cコンジュゲートの合成およびG a l N A cコンジュゲート固体担体は、

50

例えば、米国特許第 8, 106, 022 号明細書、および国際出願公開の国際公開第 2013/033230 号パンフレット（それぞれ、炭水化物含有コンジュゲート、例として、1 つ以上の GalNAc 部分を含むコンジュゲートの合成の、および固体担体に共有結合しているコンジュゲートの合成の記載について参照により全体として本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0381】

ある医薬組成物

本明細書に提供される化合物のいずれかは、医薬組成物として調製することができる。ある実施形態において、医薬組成物は、投与量単位（例えば、錠剤、カプセル剤、ポーラスなど）の形態で投与される。一部の実施形態において、医薬組成物は、本明細書に提供される化合物を、25 mg ~ 800 mg、25 mg ~ 700 mg、25 mg ~ 600 mg、25 mg ~ 500 mg、25 mg ~ 400 mg、25 mg ~ 300 mg、25 mg ~ 200 mg、25 mg ~ 100 mg、100 mg ~ 800 mg、200 mg ~ 800 mg、300 mg ~ 800 mg、400 mg ~ 800 mg、500 mg ~ 800 mg、600 mg ~ 800 mg、100 mg ~ 700 mg、150 mg ~ 650 mg、200 mg ~ 600 mg、250 mg ~ 550 mg、300 mg ~ 500 mg、300 mg ~ 400 mg、および 400 mg ~ 600 mg から選択される範囲内の用量において含む。ある実施形態において、このような医薬組成物は、本明細書に提供される化合物を、25 mg、30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、55 mg、60 mg、65 mg、70 mg、75 mg、80 mg、85 mg、90 mg、95 mg、100 mg、105 mg、110 mg、115 mg、120 mg、125 mg、130 mg、135 mg、140 mg、145 mg、150 mg、155 mg、160 mg、165 mg、170 mg、175 mg、180 mg、185 mg、190 mg、195 mg、200 mg、205 mg、210 mg、215 mg、220 mg、225 mg、230 mg、235 mg、240 mg、245 mg、250 mg、255 mg、260 mg、265 mg、270 mg、270 mg、280 mg、285 mg、290 mg、295 mg、300 mg、305 mg、310 mg、315 mg、320 mg、325 mg、330 mg、335 mg、340 mg、345 mg、350 mg、355 mg、360 mg、365 mg、370 mg、375 mg、380 mg、385 mg、390 mg、395 mg、400 mg、405 mg、410 mg、415 mg、420 mg、425 mg、430 mg、435 mg、440 mg、445 mg、450 mg、455 mg、460 mg、465 mg、470 mg、475 mg、480 mg、485 mg、490 mg、495 mg、500 mg、505 mg、510 mg、515 mg、520 mg、525 mg、530 mg、535 mg、540 mg、545 mg、550 mg、555 mg、560 mg、565 mg、570 mg、575 mg、580 mg、585 mg、590 mg、595 mg、600 mg、605 mg、610 mg、615 mg、620 mg、625 mg、630 mg、635 mg、640 mg、645 mg、650 mg、655 mg、660 mg、665 mg、670 mg、675 mg、680 mg、685 mg、690 mg、695 mg、700 mg、705 mg、710 mg、715 mg、720 mg、725 mg、730 mg、735 mg、740 mg、745 mg、750 mg、755 mg、760 mg、765 mg、770 mg、775 mg、780 mg、785 mg、790 mg、795 mg、および 800 mg から選択される用量において含む。あるこのような実施形態において、医薬組成物は、25 mg、50 mg、75 mg、100 mg、150 mg、200 mg、250 mg、300 mg、350 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、および 800 mg から選択される本明細書に提供される化合物の用量を含む。

【0382】

ある実施形態において、本明細書に提供される化合物を含む医薬組成物は、10 mg / kg 以下、9 mg / kg 以下、8 mg / kg 以下、7.5 mg / kg 以下、7 mg / kg 以下、6.5 mg / kg 以下、6 mg / kg 以下、5.5 mg / kg 以下、5 mg / kg 以下、4.5 mg / kg 以下、4 mg / kg 以下、3.5 mg / kg 以下、3 mg / kg

10

20

30

40

50

以下、 2.5 mg/kg 以下、 2 mg/kg 以下、 1.5 mg/kg 以下、 1 mg/kg 以下、 0.75 mg/kg 以下、 0.5 mg/kg 以下、または 0.25 mg/kg 以下の用量において投与される。

【0383】

ある実施形態において、医薬剤は、好適な希釈剤、例えば、注射用無菌水または注射用無菌生理食塩水により再構成される無菌凍結乾燥化合物である。再構成された生成物は、生理食塩水中に希釈された後に皮下注射として、または静脈内注入として投与される。凍結乾燥薬物生成物は、調製の間に酸または塩基により $\text{pH } 7.0 \sim 9.0$ に調整された注射用水中で、または注射用生理食塩水中で調製され、次いで凍結乾燥された化合物からなる。凍結乾燥化合物は、 $25 \sim 800 \text{ mg}$ のオリゴヌクレオチドであり得る。これは、 25 、 50 、 75 、 100 、 125 、 150 、 175 、 200 、 225 、 250 、 275 、 300 、 325 、 350 、 375 、 425 、 450 、 475 、 500 、 525 、 550 、 575 、 600 、 625 、 650 、 675 、 700 、 725 、 750 、 775 、および 800 mg の修飾凍結乾燥オリゴヌクレオチドを包含することが理解される。さらに、一部の実施形態において、凍結乾燥化合物は、 $25 \text{ mg} \sim 800 \text{ mg}$ 、 $25 \text{ mg} \sim 700 \text{ mg}$ 、 $25 \text{ mg} \sim 600 \text{ mg}$ 、 $25 \text{ mg} \sim 500 \text{ mg}$ 、 $25 \text{ mg} \sim 400 \text{ mg}$ 、 $25 \text{ mg} \sim 300 \text{ mg}$ 、 $25 \text{ mg} \sim 200 \text{ mg}$ 、 $25 \text{ mg} \sim 100 \text{ mg}$ 、 $100 \text{ mg} \sim 800 \text{ mg}$ 、 $200 \text{ mg} \sim 800 \text{ mg}$ 、 $300 \text{ mg} \sim 800 \text{ mg}$ 、 $400 \text{ mg} \sim 800 \text{ mg}$ 、 $500 \text{ mg} \sim 800 \text{ mg}$ 、 $600 \text{ mg} \sim 800 \text{ mg}$ 、 $100 \text{ mg} \sim 700 \text{ mg}$ 、 $150 \text{ mg} \sim 650 \text{ mg}$ 、 $200 \text{ mg} \sim 600 \text{ mg}$ 、 $250 \text{ mg} \sim 550 \text{ mg}$ 、 $300 \text{ mg} \sim 500 \text{ mg}$ 、 $300 \text{ mg} \sim 400 \text{ mg}$ 、または $400 \text{ mg} \sim 600 \text{ mg}$ の範囲の量で存在する。凍結乾燥薬物生成物は、 2 mL の I 型透明ガラスバイアル（硫酸アンモニウム処理）中で包装し、プロンプチルゴムクロージャにより封入し、アルミニウム FLIP-OFF（登録商標）オーバーシールにより密封することができる。

【0384】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、治療有効量の化合物を含む。ある実施形態において、治療有効量は、疾患の症状を予防、緩和もしくは改善するため、または治療される対象の生存を持続させるために十分である。治療有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0385】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、医薬組成物中に慣用的に見出される他の補助構成成分を、それらの当技術分野において確立された使用レベルにおいてさらに含有し得る。したがって、例えば、組成物は、追加の適合性の薬学的に活性な材料、例えば、鎮痒剤、収斂剤、局所麻酔剤もしくは抗炎症剤などを含有し得、または本発明の組成物の種々の剤形の物理的配合において有用な追加の材料、例えば、色素、着香剤、保存剤、酸化防止剤、乳白剤、増粘剤および安定剤を含有し得る。しかしながら、このような材料は、添加される場合、本発明の組成物の構成成分の生物学的活性と過度に干渉すべきでない。配合物は、滅菌し、所望により、配合物のオリゴヌクレオチドと有害に相互作用しない助剤、例えば、滑沢剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧影響のための塩、緩衝液、着色剤、着香剤および/または芳香物質などと混合することができる。

【0386】

脂質部分は、種々の方法において核酸療法において使用されている。ある方法においては、核酸を、カチオン脂質および中性脂質の混合物から作製された事前形成リポソームまたはリブレックス中に導入する。別の方法においては、モノまたはポリカチオン脂質との DNA 複合体を中性脂質の存在なしで形成する。ある実施形態において、脂質部分は、特定の細胞または組織に対する医薬剤の分布を増加させるように選択する。ある実施形態において、脂質部分は、脂肪組織に対して医薬剤の分布を増加させるように選択する。ある実施形態において、脂質部分は、筋組織に対して医薬剤の分布を増加させるように選択する。

10

20

30

40

50

【0387】

ある実施形態において、INTRALIPIDを使用してオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物を調製する。Intralipidは、静脈内投与のために調製された脂肪エマルションである。これは、10%のダイズ油、1.2%の卵黄リン脂質、2.25%のグリセリン、および注射用水から構成される。さらに、最終生成物pH範囲が6~8.9になるようにpHを調整するために水酸化ナトリウムが添加されている。

【0388】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、核酸と複合体形成しているポリアミン化合物または脂質部分を含む。このような製剤は、脂質製剤の開示について参照により全体として本明細書に組み込まれるPCT公開の国際公開第2008/042973号パンフレットに記載されている。ある追加の製剤は、脂質製剤の開示について参照により全体として本明細書に組み込まれるAkin et al., Nature Biotechnology 26, 561-569 (01 May 2008)に記載されている。

10

【0389】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、1つ以上の化合物および1つ以上の賦形剤を含む。あるこのような実施形態において、賦形剤は、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミラーゼ、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロースおよびポリビニルピロリドンから選択される。

20

【0390】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、公知の技術、例として、限定されるものではないが、混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、粉末化、乳化、カプセル封入、捕捉または製錠プロセスを使用して調製される。

【0391】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、液体（例えば、懸濁液、エリキシル剤および/または液剤）である。あるこのような実施形態において、液体医薬組成物は、当技術分野において公知の成分、例として、限定されるものではないが、水、グリコール、油、アルコール、着香剤、保存剤、および着色剤を使用して調製される。

【0392】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、固体（例えば、散剤、錠剤および/またはカプセル剤）である。あるこのような実施形態において、1つ以上のオリゴヌクレオチドを含む固体医薬組成物は、当技術分野において公知の成分、例として、限定されるものではないが、デンプン、糖、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤、および崩壊剤を使用して調製される。

30

【0393】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、デポー製剤として配合される。あるこのようなデポー製剤は、典型的には、非デポー製剤よりも長期作用性である。ある実施形態において、このような製剤は、移植（例えば、皮下または筋肉内）により、または筋肉内注射により投与される。ある実施形態において、デポー製剤は、好適なポリマーもしくは疎水性材料（例えば、許容可能な油中のエマルション）もしくはイオン交換樹脂を使用して、または難溶性誘導体として、例えば、難溶性塩として調製される。

40

【0394】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、送達系を含む。送達系の例としては、限定されるものではないが、リボソームまたはエマルションが挙げられる。ある送達系は、疎水性化合物を含むものを含むある医薬組成物の調製に有用である。ある実施形態において、ある有機溶媒、例えば、ジメチルスルホキシドが使用される。

【0395】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、本明細書に提供される1つ以上の化合物を特異的な組織または細胞型に送達するように設計された1つ以上の組織

50

特異的送達分子を含む。例えば、ある実施形態において、医薬組成物は、組織特異的抗体によりコーティングされたりポソームを含む。

【0396】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、共溶媒系を含む。あるこのような共溶媒系は、例えば、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機ポリマー、および水相を含む。ある実施形態において、このような共溶媒系は、疎水性化合物に使用される。このような共溶媒系の非現実的な例は、3% w/vのベンジルアルコール、8% w/vの非極性界面活性剤 Polysorbate 80 (商標) および 65% w/vのポリエチレングリコール 300を含む絶対エタノールの溶液である VPD 共溶媒系である。このような共溶媒系の比率は、それらの溶解度および毒性特性を顕著に変えずにかなり変動させることができる。さらに、共溶媒系構成成分のアイデンティティは、変動させることができる：例えば、他の界面活性剤を、Polysorbate 80 (商標) に代えて使用することができ；ポリエチレングリコールの分画サイズを変動させることができ；他の生体適合性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドンは、ポリエチレングリコールと置き換わり得；他の糖または多糖はデキストロースの代わりになり得る。

10

【0397】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、徐放系を含む。このような徐放系の非現実的な例は、固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスである。ある実施形態において、徐放系は、それらの化学性質に応じて、医薬剤を数時間、数日間、数週間または数ヶ月間の期間にわたり放出させ得る。

20

【0398】

ある実施形態において、本明細書に提供される医薬組成物は、経口投与のために調製される。あるこのような実施形態において、医薬組成物は、修飾オリゴヌクレオチドを含む1つ以上の化合物を、1つ以上の薬学的に許容可能な担体と合わせることで配合される。あるこのような担体により、対象による経口摂取のための錠剤、ビル剤、糖衣錠、カプセル剤、液体、ゲル剤、シロップ剤、スラリー、懸濁液などとしての医薬組成物の配合が可能となる。ある実施形態において、経口使用のための医薬組成物は、オリゴヌクレオチドおよび1つ以上の固体賦形剤を混合することにより得られる。好適な賦形剤としては、限定されるものではないが、増量剤、例えば、糖、例として、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトール；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、イネデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、および/またはポリビニルピロリドン (PVP) などが挙げられる。ある実施形態において、このような混合物は任意選択的に粉碎され、助剤が任意選択的に添加される。ある実施形態において、医薬組成物は、錠剤または糖衣錠コアを得るように形成される。ある実施形態において、崩壊剤 (例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸またはその塩、例えば、アルギン酸ナトリウム) が添加される。

30

【0399】

ある実施形態において、糖衣錠コアには、コーティングが提供される。あるこのような実施形態において、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、carboxypolゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに好適な有機溶媒もしくは溶媒混合物を任意選択的に含有し得る濃縮糖溶液を使用することができる。染料または顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに添加することができる。

40

【0400】

ある実施形態において、経口投与のための医薬組成物は、ゼラチン製のプッシュフィット (push-fit) カプセル剤である。あるこのようなプッシュフィットカプセル剤は、1つ以上の増量剤、例えば、ラクトース、結合剤、例えば、デンプン、および/または滑沢剤、例えば、タルクもしくはステアリン酸マグネシウム、および任意選択的に安定剤との混合物の本発明の1つ以上の医薬剤を含む。ある実施形態において、経口投与のための医薬組成物は、ゼラチンおよび可塑剤、例えば、グリセロールまたはソルビトール製

50

の軟質密封カプセル剤である。ある軟質カプセル剤において、本発明の1つ以上の医薬剤は、好適な液体、例えば、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコール中で溶解または懸濁している。さらに、安定剤を添加することができる。

【0401】

ある実施形態において、医薬組成物は、バツカル投与のために調製される。あるこのような医薬組成物は、慣用の様式で配合される錠剤またはトローチ剤である。

【0402】

ある実施形態において、医薬組成物は、注射（例えば、静脈内、皮下、筋肉内など）による投与のために調製される。あるこのような実施形態において、医薬組成物は、担体を含み、水溶液、例えば、水または生理学的に適合性の緩衝液、例えば、ハanks液、リンガー液、もしくは生理食塩緩衝液中で配合される。ある実施形態において、他の成分が含まれる（例えば、溶解性を補助し、または保存剤として機能する成分）。ある実施形態において、注射用懸濁液は、適切な液体担体、懸濁化剤などを使用して調製される。ある注射用医薬組成物は、単位剤形、例えば、アンプルまたは多用量容器中で提供される。ある注射用医薬組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、液剤またはエマルションであり、配合剤、例えば、懸濁化剤、安定剤および/または分散剤を含有し得る。注射用医薬組成物における使用に好適なある溶媒としては、限定されるものではないが、親油性溶媒および脂肪油、例えば、ゴマ油、合成脂肪酸エステル、例えば、オレイン酸エチルまたはトリグリセリド、およびリボソームが挙げられる。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘度を増加させる物質、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランを含有し得る。任意選択的に、このような懸濁液は、好適な安定剤または高濃縮溶液の調製を可能とするために医薬剤の溶解度を増加させる薬剤も含有し得る。

【0403】

ある実施形態において、医薬組成物は、経粘膜投与のために調製される。あるこのような実施形態において、障壁の浸透に適切な浸透剤が配合物中で使用される。このような浸透剤は、一般に当技術分野において公知である。

【0404】

ある実施形態において、本明細書に提供される1つ以上の修飾オリゴヌクレオチドは、プロドラッグとして投与される。ある実施形態において、インビボ投与時、プロドラッグは、生物学的、薬学的または治療的により活性形態のオリゴヌクレオチドに化学的または酵素的に変換される。ある実施形態において、プロドラッグは、それらに対応する活性形態よりも投与が容易であるため、有用である。例えば、ある例において、プロドラッグは、対応する活性形態よりもバイオアベイラブル（例えば、経口投与を介して）であり得る。ある実施形態において、プロドラッグは、細胞膜を越える優れた伝達を有する。ある実施形態において、プロドラッグは、所望の細胞型、組織、または臓器への修飾オリゴヌクレオチドの送達を容易にする。ある実施形態において、プロドラッグは、コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物である。ある例において、プロドラッグは、対応する活性形態と比較して改善された溶解度を有し得る。ある実施形態において、プロドラッグは、対応する活性形態よりも水溶性でない。ある実施形態において、プロドラッグは、エステルである。あるこのような実施形態において、エステルは、投与時にカルボン酸に代謝的に加水分解される。ある例において、カルボン酸を含有する化合物は、対応する活性形態である。ある実施形態において、プロドラッグは、酸基に結合している短鎖ペプチド（ポリアミノ酸）を含む。あるこのような実施形態において、ペプチドは、投与時に開裂されて対応する活性形態を形成する。ある実施形態において、プロドラッグは、活性化合物がインビボ投与時に再生されるように、薬学的に活性な化合物を修飾することにより産生される。プロドラッグは、薬物の代謝安定性もしくは輸送特徴を変えるように、副作用もしくは毒性をマスクするように、薬物の風味を改善するように、または薬物の他の特徴もしくは特性を変えるように設計することができる。インビボの薬力学的プロセスおよび薬物代謝の知識から、当業者は、薬学的に活性な化合物が公知になると、その化合物のプロドラッグを設計することができる（例えば、Nogady (1985) Medici

10

20

30

40

50

nal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388 - 392 参照)。

【0405】

ある投与経路

ある実施形態において、対象への投与は、非経口投与を含む。ある実施形態において、対象への投与は、静脈内投与を含む。ある実施形態において、対象への投与は、皮下投与を含む。

【0406】

ある実施形態において、対象への投与は、動脈内、経肺、経口、経直腸、経粘膜、経腸、腸内、局所、経皮、坐剤、鞘内、脳室内、腹腔内、鼻腔内、眼内、筋肉内、髄内、および腫瘍内投与を含む。

【0407】

あるmiR-122キット

本発明はまた、キットを提供する。一部の実施形態において、キットは、本明細書に提供される1つ以上の化合物を含む。一部の実施形態において、本明細書に提供される化合物は、バイアル内に存在する。複数のバイアル、例えば、10個が、例えば、調剤バック中に存在し得る。一部の実施形態において、バイアルは、シリンジにより利用可能であるように製造される。キットは、本明細書に提供される化合物を使用するための説明書も含有し得る。

【0408】

一部の実施形態において、キットは、対象への本明細書に提供される化合物の投与のために使用することができる。このような例において、本明細書に提供される少なくとも1つの化合物を含むことに加え、キットは、以下のもの：シリンジ、アルコール綿棒、綿ボール、および/またはガーゼパッドの1つ以上をさらに含み得る。一部の実施形態において、miR-122に相補的である化合物は、バイアル中ではなく、プレフィルドシリンジ(例えば、例として、ニードルガードを有する27ゲージ、1/2インチ針を有する単回用量シリンジ)中に存在し得る。複数のプレフィルドシリンジ、例えば、10個が、例えば、調剤バック中に存在し得る。キットは、本明細書に提供される化合物を投与するための説明書も含有し得る。

【0409】

ある実験モデル

ある実施形態において、本発明は、本明細書に提供される化合物を実験モデルにおいて使用および/または試験する方法を提供する。当業者は、このような実験モデルを選択および改変して本明細書に提供される化合物を評価することができる。

【0410】

抗miR化合物の投与後のマイクロRNAのアンチセンス阻害の効果は、当技術分野において公知の種々の方法により評価することができる。ある実施形態において、これらの方法を使用して細胞または組織中のマイクロRNAレベルをインビトロまたはインビボで定量する。ある実施形態において、マイクロRNAレベルの変化をマイクロアレイ分析により計測する。ある実施形態において、マイクロRNAレベルの変化を、いくつかの市販のPCRアッセイの1つ、例えば、TaqMan(登録商標)MicroRNA Assay(Applied Biosystems、Life Technologiesブランド)により計測する。

【0411】

抗miR化合物のインビトロ活性は、ルシフェラーゼ細胞培養アッセイを使用して評価することができる。このアッセイにおいて、マイクロRNAルシフェラーゼセンサ構築物は、ルシフェラーゼ遺伝子に融合している目的マイクロRNAの1つ以上の結合部位を含有するようにエンジニアリングされる。マイクロRNAがルシフェラーゼセンサ構築物中のそのコグネート部位に結合した場合、ルシフェラーゼ発現が抑制される。適切な抗mi

10

20

30

40

50

Rが細胞中に導入された場合、それは、標的マイクロRNAに結合し、ルシフェラーゼ発現の抑制を緩和させる。したがって、このアッセイにおいて、目的マイクロRNAの有効な阻害剤である抗miRは、ルシフェラーゼ発現の増加を引き起こす。

【0412】

抗miR化合物の活性は、マイクロRNAの標的のmRNAおよび/またはタンパク質レベルを計測することにより評価することができる。マイクロRNAは、1つ以上の標的RNA内の相補的部位に結合し、標的RNAの抑制をもたらす。したがって、マイクロRNAの阻害はマイクロRNAの標的のmRNAまたはタンパク質のレベルの増加（すなわち、脱抑制）をもたらす。1つ以上の標的RNAの脱抑制は、インビボまたはインビトロで計測することができる。例えば、miR-122の標的は、アルドラーゼA（ALDOA）である。miR-122の阻害は、ALDOA mRNAのレベルの増加をもたらす。したがって、ALDOA mRNAレベルを使用して抗miR-122化合物の阻害活性を評価することができる。

10

【0413】

HCV複製に対する抗miR-122化合物の効果は、HCVレプリコンアッセイにおいて計測することができる。このアッセイにおいて、安定ルシフェラーゼレポーターおよび3つの細胞培養適合突然変異（luc-ubi-neo/ET）を有するHCVのサブゲノムレプリコンを含有する細胞系（例えば、ヒト肝癌細胞系）中に化合物を導入する。ルシフェラーゼレポーターは、HCV複製の間接的尺度として使用する。使用されるレプリコンは、親HCVゲノタイプまたは抗ウイルス剤に対して耐性を付与する突然変異を有するHCVゲノタイプであり得る。抗miR-122化合物は、単独で、またはHCV感染の治療において使用される他の薬剤との組合せで評価することができる。一部の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、インビボまたはインビトロアッセイにおいて試験し、続いてコンジュゲートして本明細書に記載の方法において使用される化合物を形成することができる。

20

【実施例】

【0414】

以下の実施例は、本発明の一部の実施形態をより十分に説明するために提供する。しかしながら、これらは、決して本発明の広い範囲を限定するものと解釈すべきでない。当業者は、本発明の基礎原理を容易に適合させ、本発明の趣旨から逸脱せずに種々の化合物を設計する。

30

【0415】

実施例1

抗miR-122化合物の設計および評価

miR-122の強力な阻害剤を同定するため、多数の抗miR-122修飾オリゴヌクレオチドを設計および合成した。修飾オリゴヌクレオチドは、長さ、ならびに二環式ヌクレオシドおよび非二環式ヌクレオシドの数、配置、およびアイデンティティが変動した。化合物を多数のアッセイにおいて評価してHCV感染の治療に好適な治療剤である抗miRを同定した。化合物の評価は、反復様式で実施し、高度に活性な化合物を設計変化を介してさらに最適化し、次いで、得られた化合物を追加のスクリーニングに供した。化合物評価プロセスは、効力、安全性、および物理化学的特徴の評価を含んだ。

40

【0416】

合計で、400個を超える抗miR-122修飾オリゴヌクレオチドを設計し、最初のルシフェラーゼ細胞培養活性アッセイにおいて試験した。追加のルシフェラーゼアッセイ後、およびある化合物について代謝安定性の計測後、それらの化合物の約70個をさらなるインビボ試験のために選択した。これらの70個の化合物のうち、約10個の化合物が、好適なインビボ効力（例えば、5mg/kg未満のED₅₀）を有すると同定された。これらの化合物のサブセットは、げっ歯類および非ヒト霊長類においてある安全性プロファイルを有すると同定された。したがって、スクリーニングされた数百個の化合物のうち、最初の400個を超える化合物の小さいサブセットのみが、ある効力、安全性および物

50

理化学的基準を満たした。

【 0 4 1 7 】

ある抗 m i R - 1 2 2 化合物を表 A に示す。「 m i R - 1 2 2 上の位置」は、その欄内のヌクレオシドが、配列番号 1 の 5 ' 末端からカウントして配列番号 1 に相補的である位置である。

【 0 4 1 8 】

【表 3】

表A:ある抗miR-122化合物

化合物 番号	配列(5'から3')および修飾																					配列番号	
	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2		1
miR-122 上の位置																							
38011								C _S	C	A	U _S	T	G _S	U _S	C	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	A 3
38012								C _S	C	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	A 3
38013								C _S	C	A	U _S	T	G _S	T	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	A 3
38014								C _S	C	A	U _S	T	G _S	U _S	C	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	A _E 3
38015								MeC _S	C	A	T _S	T	G _S	T _S	C	A	MeC _S	A	MeC _S	T	MeC _S	MeC _S	A _E 3
38016								MeC _S	C	A	T _S	T	G	T _S	MeC _S	A	MeC _S	A	MeC _S	T	MeC _S	MeC _S	A _E 3
38021								C _L	C	A	T _L	T	G	T _L	C _L	A	C _L	A	C _L	T	C _L	C _L	4
38646				A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	C	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38647				A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38648				A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38649				A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	T _E	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38650				A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	T _E	T _E	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38651				A _E	MeC _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	T _E	T _E	G _E	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38652	MeC _E	A _E	A _E	A _E	MeC _E	A _E	C _S	C	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		5
38660	MeC _E	A _E	A _E	A _E	MeC _E	A _E	C _S	C	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	T _E	6
38872							C _S	C	A	U _S	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	A 3	
38910							MeC _E	C _S	A	U _S	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	A _E 3	

糖部分を以下のとおり示す：下付き文字が続かないヌクレオシドは、 α - D - デオキシリボヌクレオシドを示し；下付き文字「E」が続くヌクレオシドは、2' - MOEヌクレオシドを示し；下付き文字「S」が続くヌクレオシドは、S - c E tヌクレオシドを示し；下付き文字「L」が続くヌクレオシドは、L N Aヌクレオシドを示す。それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を示す。上付き文字「Me」は、ヌクレオシドの塩基上の5 - メチル基を示す。

【0420】

効力

インビトロおよびインビボ効力

インビトロルシフェラーゼアッセイを使用して細胞培養物中のmiR - 122の活性を阻害するそれぞれの化合物の能力を計測した。このアッセイにおいて、マイクロRNAルシフェラーゼセンサ構築物は、ルシフェラーゼ遺伝子に融合している複数のmiR - 122結合部位を含有するようにエンジニアリングした。miR - 122がルシフェラーゼセンサ構築物中のその標的部位に結合した場合、ルシフェラーゼ発現は抑制される。活性抗miR - 122化合物を細胞中に導入した場合、それがmiR - 122に結合し、ルシフェラーゼ発現の抑制を緩和させる。したがって、このアッセイにおいて、miR - 122の有効な阻害剤である抗miR - 122化合物は、ルシフェラーゼ発現の増加を引き起こす。

【0421】

ルシフェラーゼセンサ構築物、およびmiR - 122を発現する第2の構築物を、HeLa細胞中に導入した。抗miR - 122化合物を、いくつかの異なる濃度において細胞中に形質移入した。100 nM未満のEC₅₀を有する化合物を追加のルシフェラーゼアッセイに、最初のルシフェラーゼアッセイよりも広い範囲の抗miR濃度において供して活性を確認した。表Bに示されるとおり、化合物を2つの別個の実験において試験した。それぞれの化合物についての平均EC₅₀を表Bに示す。結果は、糖部分またはヌクレオ塩基の変更が、抗miR - 122化合物のインビトロ効力に影響を及ぼし得ることを実証する。

【0422】

10

20

【表 4】

表B:ルシフェラーゼ細胞培養アッセイにおける平均EC50

化合物 番号	配列および化学物質	配列 番号	実験 番号	ルシフェ ラーゼ 平均 EC ₅₀
38011	C ₅ CAU ₅ TG ₅ U ₅ CAC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A	3	1	38.45
38012	C ₅ CA ₅ TTGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A	3	1	43.78
38013	C ₅ CAU ₅ TG ₅ TC ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A	3	1	53.27
38014	C ₅ CAU ₅ TG ₅ U ₅ CAC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A _E	3	1	42.71
38015	^{Me} C ₅ CAT ₅ TG ₅ T ₅ CA ^{Me} C ₅ A ^{Me} C ₅ T ^{Me} C ₅ ^{Me} C ₅ A _E	3	1	42.40
38016	^{Me} C ₅ CAT ₅ TGT ₅ ^{Me} C ₅ A ^{Me} C ₅ A ^{Me} C ₅ T ^{Me} C ₅ ^{Me} C ₅ A _E	3	1	14.07
38021	^{Me} C _L CAT _L TGT _L ^{Me} C _L A ^{Me} C _L A ^{Me} C _L T ^{Me} C _L ^{Me} C _L A _E	3	1	11.18
38872	C ₅ CAU ₅ TGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A	3	2	18.3
38910	^{Me} CC ₅ AU ₅ TGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A _E	3	試験せず	
38646	A _E ^{Me} C _E A _E ^{Me} C _E CA ₅ TTGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅	4	2	77.15
38647	A _E ^{Me} C _E A _E ^{Me} C _E ^{Me} C _E A ₅ TTGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅	4	2	57.44
38648	A _E ^{Me} C _E A _E ^{Me} C _E ^{Me} C _E A _E TTGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅	4	2	97.68
38649	A _E ^{Me} C _E A _E ^{Me} C _E ^{Me} C _E A _E T _E TGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅	4	2	46.76
38650	A _E ^{Me} C _E A _E ^{Me} C _E ^{Me} C _E A _E T _E T _E TGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅	4	2	28.16
38651	A _E ^{Me} C _E A _E ^{Me} C _E ^{Me} C _E A _E T _E T _E G _E U ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅	4	2	26.12
38652	^{Me} C _E A _E A _E A _E ^{Me} C _E A _E C ₅ CA ₅ TTGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅	5	2	31.86
38659	C ₅ CA ₅ TTGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ T _E	10	2	130.01
38660	^{Me} C _E A _E A _E A _E ^{Me} C _E A _E C ₅ CA ₅ TTGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ T _E	6	2	17.02

【0423】

インビボ効力を測定するため、ある化合物を、miR-122 活性により通常抑制される遺伝子の肝アルドラーゼA (ALDOA) の発現を脱抑制するそれらの能力について評価した。miR-122 の阻害は、ALDOA 発現の増加をもたらした。したがって、ALDOA mRNA レベルを使用してインビボ miR-122 阻害活性を計測することができる。化合物をマウスに、表Cに示される量の単回用量で投与し、7日後に試験を終了させ、ALDOA mRNA レベルを定量的PCRにより肝臓から単離されたRNA中で計測した。化合物38910を除き、表Cのそれぞれの化合物を同一試験において試験した。生理食塩水に対するALDOA mRNA の変化倍率を算出してインビボ効力を測定した(「ND」は、「未測定を示す」)。

【0424】

10

20

30

40

【表 5】

表C:抗miR-122化合物構造および効力の比較

化合物番号	配列および化学物質	配列番号	生理食塩水に対するALDOAの変化倍率		
			1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
38011	C ₅ CAU ₅ TG ₅ U ₅ CAC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A	3	1.47	2.10	3.89
38012	C ₅ CA ₅ TTGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A	3	1.79	4.69	4.57
38013	C ₅ CAU ₅ TG ₅ TC ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A	3	1.31	1.61	2.55
38014	C ₅ CAU ₅ TG ₅ U ₅ CAC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A _E	3	1.16	1.82	2.94
38015	^{Me} C ₅ CAT ₅ TG ₅ T ₅ CA ^{Me} C ₅ A ^{Me} C ₅ T ^{Me} C ₅ ^{Me} C ₅ A _E	3	1.43	1.64	1.82
38016	^{Me} C ₅ CAT ₅ TGT ₅ ^{Me} C ₅ A ^{Me} C ₅ A ^{Me} C ₅ T ^{Me} C ₅ ^{Me} C ₅ A _E	3	1.43	2.34	4.18
38021	^{Me} C _L CAT _L TGT _L ^{Me} C _L A ^{Me} C _L A ^{Me} C _L T ^{Me} C _L ^{Me} C _L A _E	3	1.46	3.01	3.91
38872	C ₅ CAU ₅ TGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A	3	1.80	4.04	4.89
38910	^{Me} CC ₅ AU ₅ TGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A _E	3	ND	2.35	3.26

10

【0425】

20

表Cにおいて確認することができるのとおり、糖部分またはヌクレオ塩基の配置の単一変化は、インビボ効力に対する影響を有し得る。例えば、38872および38011間の差は、cEt糖部分の配置のみであるが、0011のインビボ効力は、38872よりも有意に低く、10mg/kgの38011のより高用量においてのみ達成されるALDOA脱抑制は、化合物38872についての3mg/kg用量と比較して同等レベルである。化合物38021は、38016に対してcEt糖部分に代えてLNAを有し、38016に類似の効力を有し、したがって、この差は効力に影響を及ぼさなかった。この群の化合物のうち、化合物38012、38016、38021および38872が活性化化合物として同定された。

【0426】

30

追加の試験を実施してある追加の抗miR-122化合物を評価した。これらの試験の結果を表Dに示す。化合物38646、38647、38648、38649、38650、38651、および38652を、1つのインビボ試験において一緒に試験し、化合物38659および38660を別のインビボ試験において一緒に試験した。

【0427】

【表 6】

表D:抗miR-122化合物構造および効力の比較

化合物 番号	配列および構造	配列 番号	生理食塩水に対する ALDOAの変化倍率		
			ルシフェラーゼ 平均EC ₅₀	3 mg/kg	10 mg/kg
38646	A ^{Me} _E C ^{Me} _E A ^{Me} _E C ^{Me} _E CA _S TTGU _S C _S AC _S AC _S TC _S C _S --	4	77.15	ND	ND
38647	A ^{Me} _E C ^{Me} _E A ^{Me} _E C ^{Me} _E C ^{Me} _E A _S TTGU _S C _S AC _S AC _S TC _S C _S --	4	57.44	2.61	4.81
38648	A ^{Me} _E C ^{Me} _E A ^{Me} _E C ^{Me} _E C ^{Me} _E A _E TTGU _S C _S AC _S AC _S TC _S C _S --	4	97.68	3.28	4.36
38649	A ^{Me} _E C ^{Me} _E A ^{Me} _E C ^{Me} _E C ^{Me} _E A _E T _E TGU _S C _S AC _S AC _S TC _S C _S --	4	46.76	2.84	4.46
38650	A ^{Me} _E C ^{Me} _E A ^{Me} _E C ^{Me} _E C ^{Me} _E A _E T _E T _E GU _S C _S AC _S AC _S TC _S C _S --	4	28.16	1.51	2.03
38651	A ^{Me} _E C ^{Me} _E A ^{Me} _E C ^{Me} _E C ^{Me} _E A _E T _E T _E G _E U _S C _S AC _S AC _S TC _S C _S --	4	26.12	1.26	1.46
38652	^{Me} C _E A _E A _E A _E ^{Me} C _E A _E C _S CA _S TTGU _S C _S AC _S AC _S TC _S C _S --	5	31.86	1.86	4.27
38659	C _S CA _S TTGU _S C _S AC _S AC _S TC _S C _S T _E	10	130.01	4.44	4.82
38660	^{Me} C _E A _E A _E A _E ^{Me} C _E A _E C _S CA _S TTGU _S C _S AC _S AC _S TC _S C _S T _E	6	17.02	3.84	4.44

10

【0428】

上記のとおり、これらのデータは、糖部分の配置の単一変化が、インビボ効力に対する実質的な影響を有し得ることを説明する。さらに、インビトロおよびインビボ効力は、必ずしも相関しないことが示される。例えば、化合物38659は低いインビトロ効力を有するが、インビボではmiR-122の極めて強力な阻害剤である。

20

【0429】

抗miR-122化合物構造およびインビボ効力の比較により、活性抗miR-122の群に共通する11個のヌクレオシドコア配列が明らかになった。B-D-デオキシ糖部分および二環式糖部分が抗miR-122ヌクレオチド配列の同一位置に存在するこのコア配列を、表D-2に強調する。11個のヌクレオシドコアのヌクレオ塩基配列は、miR-122(配列番号1)のヌクレオ塩基2~12に相補的である。

【0430】

【表 7】

表D-2:共通コア配列を有する強力な抗miR-122修飾オリゴヌクレオチド

化合物 番号	配列(5'から3')および構造																						配列 番号
	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
miR-122 上の位置																							
38012							C _S	C	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	A	3
38016							MeC _S	C	A	T _S	T	G	T _S	MeC _S	A	MeC _S	A	MeC _S	T	MeC _S	MeC _S	A _E	3
38021							C _L	C	A	T _L	T	G	T _L	C _L	A	C _L	A	C _L	T	C _L	C _L		4
38646					MeC _E	A _E	MeC _E	C	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38647					A _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38648					A _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38649					A _E	A _E	MeC _E	MeC _E	A _E	T _E	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		4
38652	MeC _E	A _E	A _E	A _E	MeC _E	A _E	C _S	C	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S		5
38659							C _S	C	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	T _E	10
38660	MeC _E	A _E	A _E	A _E	MeC _E	A _E	C _S	C	A _S	T	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	T _E	6
38872							C _S	C	A	U _S	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	A	3
38910							MeC _E	C _S	A	U _S	T	G	U _S	C _S	A	C _S	A	C _S	T	C _S	C _S	A _E	3

これらのデータは、インビボの $miR-122$ の強力な阻害剤を生じさせるあるコアヌクレオシドパターンの発見を説明する。

【0432】

HCVレプリコン試験

HCVレプリコンアッセイを使用してHCV、例として、親HCVゲノタイプおよび抗ウイルス剤に対する耐性を付与する突然変異を有するHCVゲノタイプの複製を阻害する抗 $miR-122$ 化合物の能力を決定した。化合物38649をこのアッセイにおいて試験してゲノタイプ1a (H77株)、ゲノタイプ1b、およびゲノタイプ1bのいくつかの変異体 (A156T、A156S、D168a、およびV36M) のHCVサブゲノムレプリコンの複製を阻害するその能力を決定した。

【0433】

このアッセイのため、使用される細胞系は、細胞系ET、安定なルシフェラーゼレポーターおよび3つの細胞培養適合突然変異を有するHCVのサブゲノムレプリコンを含有するHuH7ヒト肝癌細胞系 (luc-ubi-neo/ET) であった。ルシフェラーゼレポーターは、HCV複製の間接的尺度として使用する。HCVレプリコン抗ウイルス評価アッセイは、それぞれの化合物の6つの半 \log 濃度において化合物の効果を試験した。ヒトインターフェロンアルファ-2bを陽性対照化合物として含めた。ET系のサブコンフルエント培養物を96ウェルプレート中にプレーティングし、翌日に抗 $miR-122$ 化合物をカチオン脂質により細胞に形質移入した。細胞が依然としてサブコンフルエントである場合、細胞を72時間後に処理した。HCVレプリコンレベルは、HCV RNAレプリコン由来ルシフェラーゼ活性として評価した。EC₅₀ (50%阻害が観察された濃度) をそれぞれのHCVゲノタイプについて算出し、表Eに示す。選択指数 (SI₅₀、ウイルス複製についてのEC₅₀と、固有の細胞毒性についてのEC₅₀との比) も算出し、表Eに示す。

【0434】

【表8】

表E: 化合物38649の抗ウイルス活性

HCVゲノタイプ	抗ウイルス活性 EC ₅₀ (nM)	選択指数 SI ₅₀
HCVゲノタイプ1b	57.8 nM	4.0
HCVゲノタイプ1b変異体V36M	139.6 nM	> 2.0
HCV突然変異体A156S	45.9 nM	5.7
HCV突然変異体A156T	26.7 nM	10.0
HCV突然変異体D168A	16.2 nM	12.0
HCVゲノタイプ1a (H77株)	14.1 nM	15.0

【0435】

レプリコンアッセイからの結果は、複数のHCVゲノタイプに対する化合物38649の抗ウイルス活性を実証する。抗ウイルス活性は、アッセイを実施した一定期間 (18日間) 持続した。化合物38649の活性は、HCV感染を治療するために処方されるあるプロテアーゼ阻害剤に対して耐性であることが公知の突然変異を含むHCVレプリコンに対して同様にロバストである。

【0436】

抗 $miR-122$ の単回投与試験

化合物38649をマウスにおける単回投与試験において試験して作用の発生、最大標的脱抑制、および作用の持続時間を、0.3 mg/kg ~ 30 mg/kg の範囲の用量に

において決定した。この試験から ED_{50} も算出した。

【0437】

抗miR化合物を、5匹のマウスの群に、それぞれ、0.3、1.0、3.0、10、および30mg/kgの用量において腹腔内投与した。0.3および1.0の用量については、動物群を3、7、および28日目に安楽死させた。3.0、10および30mg/kgの用量については、動物群を3、5、7、14、21、および2838649日目に安楽死させた。肝臓中のALDOA mRNAレベルは、定量的PCRにより計測し、生理食塩水処理マウスの肝臓中のALDOA mRNAレベルと比較してALDOA発現の変化倍率を算出した。

【0438】

図1Aに示されるとおり、ALDOA脱抑制は、3日目という早さで観察され、化合物38649の投与後28日間を超えて維持された。最大標的脱抑制は、10mg/kgにおいて達成された。7日目のデータから、6.7mg/kgの ED_{50} が算出された(図1B)。

【0439】

物理化学的特徴

物理化学的特徴の評価としては、抗miRの溶液があるタイプの非経口投与を介する投与、例えば、皮下投与に好適か否かを決定するための粘度の計測；抗miR-122化合物をヒト対象中に投与することができる頻度を推定するための肝臓中の抗miR半減期の算出；およびヌクレアーゼによる開裂に対して感受性であり得る化合物を同定するための代謝安定性アッセイを挙げることができる。

【0440】

代謝安定性は、抗miR-122化合物を非ヒト霊長類肝臓溶解物とインキュベートすることにより評価した。肝組織ホモジネート中のヌクレアーゼ活性は、ヌクレアーゼ活性に対する公知の耐性を有する化合物、3'-エキソヌクレアーゼ活性に対して感受性である化合物、およびエンドヌクレアーゼ活性に対して感受性である化合物を含む参照オリゴヌクレオチドを使用することにより確認した。内部標準化合物を使用して抽出効率を制御した。0時間および24時間の時点において、それぞれの試料を高速液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析(HPLC-TOF MS)に供してオリゴヌクレオチドの長さおよび量を計測した。損失割合は、0時間および24時間の時点における全長化合物の量を比較することにより決定した。化合物38646、38647、38648、38649、38650、38651、38652、38659、および38660は、24時間の時点において10%以下の損失割合を示した。化合物38012は、24時間の時点において約50%の損失割合を示した。

【0441】

追加の単回投与試験をマウスにおいて実施して化合物38649の半減期を推定した。肝臓中の半減期は、少なくとも2週間であると推定された。

【0442】

安全性

種々の安全性パラメータを評価するため、げっ歯類におけるインビボ試験を本明細書に記載のある化合物について実施して化合物が炎症促進応答を誘発する潜在性を評価した。評価されたパラメータは、臓器重量、例えば、脾重量および肝重量の変化、ならびに肝臓中のインターフェロン誘導遺伝子、例えば、IFITおよびOASLの発現を含んだ。血清化学物質も評価した。さらに、ある化合物について、安全性パラメータは、非ヒト霊長類において評価し、血液学的エンドポイント、血清化学物質、臓器重量、凝集、補体活性化、サイトカイン/ケモカイン変化、および炎症促進遺伝子発現を含んだ。

【0443】

試験化合物が評価された安全性パラメータのうちでいくつかの変動性を示した一方、化合物のいくつか、例として、化合物38649は、特に好適な安全性プロファイルを有することが見出された。

10

20

30

40

50

【 0 4 4 4 】

実施例 2

コンジュゲート抗 m i R - 1 2 2 修飾オリゴヌクレオチド

抗 m i R - 1 2 2 修飾オリゴヌクレオチドを、G a l N A c 含有部分にコンジュゲートしてコンジュゲーションがオリゴヌクレオチドの効力を改善するか否かを決定した。

【 0 4 4 5 】

G a l N A c 含有化合物は、図 2 の構造を 3 8 6 4 9 修飾オリゴヌクレオチドの 3 ' 末端にコンジュゲートすることにより形成した。G a l N A c 含有部分および 3 8 6 4 9 の 3 ' 末端間の結合は、表 F - 1 に示されるとおりに変動した。例えば、化合物 3 8 3 6 8 において、G a l N A c 含有部分は、ホスホジエステル結合を介して 3 8 6 4 9 の 3 ' 末端ヌクレオシドに直接結合しており、図 3 C に示されるとおり、X は、ホスホジエステル結合であり、M O は、化合物 3 8 6 4 9 である。化合物 3 8 4 5 8 において、G a l N A c 含有部分は、- D - デオキシヌクレオシドを介して 3 8 6 4 9 の 3 ' 末端ヌクレオシドに結合しており、3 8 6 4 9 の 3 ' 末端ヌクレオシド間はホスホロチオエート結合であり、- D - デオキシヌクレオシドおよび G a l N A c 含有部分間はホスホジエステル結合であり、図 3 A に示されるとおり、X₂ は、ホスホロチオエート結合であり、m は、1 であり、N_m は、- D - デオキシヌクレオシドであり、X₁ は、ホスホジエステル結合であり、M O は、化合物 3 8 6 4 9 である。

【 0 4 4 6 】

【 表 9 】

表F-1:GalNAc含有化合物

化合物番号	化合物構造
38368	図3Cの構造III、式中、Xは、ホスホジエステル結合であり、MOは、化合物38649である
38371	図3Cの構造III、式中、Xは、ホスホロチオエート結合であり、MOは、化合物38649である
38458	図3Aの構造I、式中、X ₂ は、ホスホロチオエート結合であり、mは、1であり、N _m は、β-D-デオキシヌクレオシド(dA)であり、X ₁ は、ホスホジエステル結合であり、MOは、化合物38649である
38459	図3Aの構造I、式中、X ₂ は、ホスホジエステル結合であり、mは、1であり、N _m は、β-D-デオキシヌクレオシド(dA)であり、X ₁ は、ホスホジエステル結合であり、MOは、化合物38649である
38597	図3Aの構造I、式中、X ₂ は、ホスホロチオエート結合であり、mは、1であり、N _m は、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、X ₁ は、ホスホジエステル結合であり、MOは、化合物38649である
38598	図3Aの構造I、式中、X ₂ は、ホスホロチオエート結合であり、mは、1であり、N _m は、X ₁ は、ホスホジエステル結合であり、MOは、化合物38649である

【 0 4 4 7 】

G a l N A c - コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドを、インビボ効力、G a l N A c - コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドからの非コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドの放出、ならびに肝臓および組織濃度について評価した。

【 0 4 4 8 】

効力試験は、上記の非コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドを評価するために使用されるプロトコルに従って実施した。化合物をマウス中に注射し、7日目においてALDOAの脱抑制を計測することによりインビボ効力を評価した。コンジュゲート化合物の投与量は、投与される修飾オリゴヌクレオチドの投与量を示す。

【 0 4 4 9 】

図4に示されるとおり、3つの試験GalNAc-コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドのそれぞれは、非コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドよりも強力であった。化合物38368および38371は、非コンジュゲート38649に対して約3倍の効力の増加を示した(図4A)。それぞれが-D-デオキシリボヌクレオシド結合基を有する化合物38458および38459は、効力の少なくとも10倍の増加を示した(図4B)。それぞれが2'-糖修飾結合基を有する化合物38597および38598も、効力の少なくとも10倍の増加を示した(図4C)。追加の試験において、最大20倍の効力増加が化合物38459、38458、38597、および38598について観察された。

【 0 4 5 0 】

追加の実験を実施してより広い範囲の用量の化合物38459を含めた。化合物38459(n=6)または化合物38649(n=3)をマウスに投与し、肝臓中のALDOAレベルおよび血液中のコレステロールレベルを7日後に計測した。平均ALDOAおよびコレステロールレベルを算出し、表F-2に示す。表F-2に示されるとおり、単回皮下用量の化合物38459は、ALDOAレベルの増加およびコレステロールレベルの低下について、非コンジュゲート化合物38649に対して効力の増加を示した。この実験において、化合物38459についての算出ED₅₀は0.19mg/kgであり、化合物38649についての算出ED₅₀は3.5mg/kg(18倍の効力差)であった。

【 0 4 5 1 】

【表10】

表F-2: コンジュゲート抗miR-122化合物の効力の増加

化合物	用量	ALDOA 変化倍率	コレステロール mg/dL
38649 (非コンジュゲート)	1.0 mg/kg	1.2	100.2
	3.0 mg/kg	2.2	81.2
	10 mg/kg	3.3	73.4
38459 (GalNAc-コンジュゲート)	0.03 mg/kg	1.1	95.4
	0.1 mg/kg	1.7	84.4
	0.3 mg/kg	2.8	74
	1 mg/kg	3.5	59.2
	3 mg/kg	3.8	61.8
	10 mg/kg	3.8	61.4

【 0 4 5 2 】

1mg/kgおよび3mg/kgの用量における化合物38368および38371、ならびに0.3mg/kg、1mg/kg、および3mg/kgの用量における化合物38458および38459の単回皮下投与7日後の肝および腎組織中の非コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドの量も計測した。それぞれの試料を高速液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析(HPLC-TOFMS)に供してオリゴヌクレオチドの長さおよ

び量を計測した。この方法による定量下限 (L L O Q) は、 $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g/g}$ である。

【0453】

G a l N A c - コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドは、非コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドの形成の変動速度を有することが見出された。例えば、化合物 38368 の投与後、10%未満の化合物 38649 (非コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチド) が肝臓中で検出される。化合物 38371 の投与後、化合物 38649 は化合物 38371 のいずれの用量においても肝臓中で検出されなかった。逆に、化合物 38459 の皮下投与 7 日後、検出された唯一の非コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチド種は、非コンジュゲート 38649 であり；親化合物 38459 は検出されなかった。化合物 38458 の投与後、非コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドが 2 つの形態：38649、および 38649 - P O - A (化合物 38458 の代謝産物) で検出された。この代謝産物は、非コンジュゲート 38649 よりも高いレベルにおいて検出された。

10

【0454】

0.3 mg/kg 、 1 mg/kg 、および 3 mg/kg の用量における化合物 38458 および 38459 の単回皮下投与 24 時間後の肝臓中の非コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドの量も計測した。抗 m i R レベルは、L C - T O F により計測した。この方法による定量下限 (L L O Q) は、 $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g/g}$ である。化合物 38459 の投与後、肝臓中に存在する総化合物の 90% が非コンジュゲート化合物 38649 であることが観察された。38458 の投与後、肝臓中に存在する総化合物の約 46% が、非コンジュゲート化合物 38649 であった。したがって、非コンジュゲート化合物 38649 は、化合物 38458 よりも急速に化合物 38459 から放出される。これらのデータは、コンジュゲート化合物の代謝がリンカーおよび修飾オリゴヌクレオチド間の結合により影響されることを示唆する。

20

【0455】

オリゴヌクレオチドは、一般に、腎組織中で最大レベルに蓄積し、次いで肝組織中で蓄積する。非コンジュゲート化合物に対し、G a l N A c コンジュゲートが腎組織と比較して肝組織中の化合物の蓄積を変更したか否かを決定するため、腎組織中の非コンジュゲート 38649 の量も計測した。上記のとおり、化合物 38459 の投与後、肝臓に見出される総化合物の 100% は、非コンジュゲート 38649 であり、このことは、G a l N A c - コンジュゲート化合物 38459 からの 38649 の完全な放出を示す。化合物 38459 の投与後、化合物 38649 は、化合物 38649 の投与後の化合物 38649 の蓄積に対し、肝臓と比較して腎臓中であまり蓄積しなかった (すなわち、より低い腎臓：肝臓比を示した)。したがって、化合物 38459 は、非コンジュゲート 38649 と比較して化合物 38649 を肝臓に優先的に送達し得る一方、腎臓への送達を最小化する。

30

【0456】

化合物 38459 についての作用の発生および持続時間は、インビボ試験において評価した。マウス群に、 0.1 mg/kg 、 0.3 mg/kg 、 1 mg/kg 、および 3 mg/kg における単回皮下 (S C) 用量の化合物 38459 を与えた。追加のマウス群に、 10 mg/kg の用量における化合物 38649 を投与した。それぞれの処理からの動物群を、1、2、3、4、5、6、14、21、28、および 56 日目のそれぞれで安楽死させた。R N A を肝臓から単離し、A L D O A m R N A レベルをリアルタイム P C R により計測した。それぞれの群についての平均 A L D O A レベルを算出した。対照群 (P B S 処理) に対する変化倍率を表 G に示す。

40

【0457】

【表 1 1】

表G: 化合物38459の作用の発生および持続時間

単回SC 投与後の 日数	ALDOAの変化倍率				
	38459 3 mg/kg	38459 1 mg/kg	38459 0.3 mg/kg	38459 0.1 mg/kg	38649 10 mg/kg
1	4.9	3.6	1.7	1.4	2.2
2	4.2	3.2	2.4	1.4	4.7
3	4.4	4.6	3.5	1.6	3.4
4	5.1	4.9	3.3	2.2	4.6
5	5.9	4.9	3.9	2.1	4.5
6	5.1	4.5	3.2	2.2	3.6
14	4.8	4.3	3.4	1.7	3.1
21	5.9	4.9	4.0	2.2	3.6
28	4.8	4.7	2.9	2.0	4.2
56	5.6	4.6	2.6	1.7	3.2

10

20

【0458】

表Gのデータは、化合物38459、および化合物38649が、化合物の単回投与1日後という早さのALDOA脱抑制により証明されたとおり、作用の急速な発生を有することを実証する。さらに、ALDOA脱抑制は、化合物の単回投与後少なくとも8週間維持される。

【0459】

これらのデータは、非コンジュゲート38649化合物よりも少なくとも10倍強力であるGalNAc-コンジュゲート化合物38459が、有意に低い肝組織濃度においてこの効力を達成し、肝組織に優先的に送達されることを実証する。さらに、化合物38459は、作用の急速な発生、および少なくとも8週間の作用の持続時間を示す。

30

【0460】

表Hに示されるLNA含有非コンジュゲートおよびコンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドも試験した。

【0461】

【表 1 2】

表H:LNA含有化合物

化合物 番号	配列(5'から3')および修飾	構造	配列 番号
36848	C _L CA _L TTG _L T _L CAC _L AC _L TC _L C _L	非コンジュゲート	7
36852	C _L CA _L TTG _L T _L CAC _L AC _L TC _L C _L	図3Cの構造IIIに記載のコンジュゲート、式中、 Xは、POであり、MOは、36848である。	7
36632	C _L CA _L TTG _L T _L CAC _L AC _L TC _L C _L	図3Aの構造Iに記載のコンジュゲート、式中、 X ₂ は、ホホジエステル結合であり、mは、1で あり、N _m は、β-D-デオキシヌクレオシド(dA)で あり、X ₁ は、ホスホジエステル結合であり、 MOは、化合物36848である。	7

10

【0462】

糖および結合部分を以下のとおり示す：下付き文字が続かないヌクレオシドは、
- D
- デオキシリボヌクレオシドを示し；下付き文字「L」が続くヌクレオシドは、LNAヌ
クレオシドを示し；それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド
間結合である。

20

【0463】

化合物36848および36852を、上記と同一のプロトコルに従ってインビボ効力
について試験してmiR-122活性を阻害し、ALDOA発現を増加させる化合物の能
力を評価した。それぞれの化合物はmiR-122の強力な阻害剤であった一方、Gal
NAc-コンジュゲート化合物36852は、非コンジュゲート化合物36848よりも
大きい効力を示した（約3倍大きい）。

【0464】

化合物36632も、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1
.0mg/kg、3.0mg/kg、および10.0mg/kgの用量における上記と同
様のプロトコル後の単回用量投与試験におけるインビボ効力について試験した。化合物3
6632は、それぞれ、PBS処理対照に対して1.6、2.7、3.7、4.3、4.
7、6.0のALDOA発現の増加倍率を実証した。1.0mg/kg、3.0mg/kg
、および10mg/kgの用量における化合物36848は、それぞれ、1.6、2.
5、および5.3のALDOA発現の増加倍率をもたらした。化合物36632と化合物
36848との比較により、非コンジュゲート化合物に対してコンジュゲート化合物につ
いて約30倍の効力の増加が明らかになった。

30

【0465】

実施例3

HCV感染のマウスモデル

宿主-病原体特異性に起因して、HCVは、ヒトおよびチンパンジーにのみ感染し得る
。したがって、実験的インビボ試験に典型的に使用されるより小型の種、例えば、マウス
を、HCV感染の治療のための候補薬剤の試験のためにHCVにより感染させることがで
きない。この問題に対処するため、ヒト肝臓キメラマウスモデルを利用することができる
(例えば、Bissig et al., Proc Natl Acad Sci US
A, 2007, 104:20507-20511; Bissig et al., J
Clin Invest., 2010, 120:924-930参照)。このモデルにお
いて、免疫不全マウスの肝臓をヒト肝細胞により再増殖させ、肝細胞のほとんどがヒト肝
細胞であるキメラ肝をもたらす。次いで、マウスをHCVにより感染させ、抗HCV剤に
より処理する。このマウスモデルは、例えば、Phoenix Bioから市販されている
。

40

50

【0466】

抗miR-122化合物を、HCVに感染したヒトキメラ肝を有するマウスにおいて試験する。動物群(n=5~10)は、1つ以上の用量の抗miR-122化合物を、例えば、治療レジメン試験から同定された用量において受けた。薬物動態分析およびHCV RNAレベルの計測のため、血漿を種々の時点において回収する。試験を終了させる場合、肝組織を回収する。

【0467】

一部の実施形態において、miR-122の阻害は、ヒトALDOA mRNAレベルを計測することにより確認する。抗miR-122化合物の投与がマウスの血清中のHCV RNAレベルを低減させることが予測される。

10

【0468】

実施例4

miR-122阻害に応答するHCV RNAレベルの低減

ヒトキメラマウス肝モデルを使用してmiR-122標的遺伝子発現およびHCVウイルスタイターに対するmiR-122阻害の効果を評価した。

【0469】

ヒトキメラ肝マウス

標的遺伝子発現に対するmiR-122阻害の効果は、HCV感染を有さないヒトキメラ肝マウスにおいて評価した。マウス群(n=6)を、単回用量のPBS、0.3mg/kg、1.0mg/kg、3.0mg/kg、または10mg/kgの化合物38459により処理した。処理7日後、試験を終了させ、ALDOA発現および化合物組織濃度の計測のために肝組織を回収した。ALDOA mRNAレベルは、PBS処理マウスにおけるALDOA mRNAレベルに対して増加したが、ALDOA発現の脱抑制は、野生型マウスにおいて観察されたものよりも3倍から5倍低かった。化合物38459レベルは、野生型マウスにおける濃度に対してキメラ肝マウスにおいて約3倍低かった。これらの観察は、野生型マウスに対するヒトキメラ肝マウスにおけるアシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)の発現の低減と一致する。肝細胞中の化合物の蓄積はASGPRによる取り込みに依存するため、ASGPRの発現の低減は、GalNAc-コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチドの蓄積の低減をもたらし、結果的にmiR-122の内因性標的、例えば、ALDOAを脱抑制する化合物38459の能力に対する感受性の低減をもたらすことが予測される。したがって、ヒトキメラ肝マウスモデルは、ASGPR発現が維持される対象における化合物38459の活性を過少評価し得る。予備データは、ASGPR発現が非HCV感染対象の肝臓に対してHCV感染患者の肝臓において類似レベルにおいて維持されることを示唆する。

20

30

【0470】

HCV感染ヒトキメラ肝マウスの処理

抗miR-122化合物を、HCV感染のヒトキメラ肝マウスモデルにおいて試験した。免疫不全マウスの肝臓を、ヒト肝細胞により再増殖させ、肝細胞のほとんどがヒト肝細胞であるキメラ肝をもたらした。HCVゲノタイプ1aの接種約3.5週間後、 $>1 \times 10^6$ コピー/mLのHCV RNAレベルを有するマウスをこの試験に含めるために選択した(-7日目)。

40

【0471】

1週間の試験のため、3匹の動物群を、0日目に単回10mg/kg用量の38459により処理した。血液を-7、0、3、および7日目に回収した。試験を7日目に終了させ、そのとき、血液に加えて肝組織および腎組織を回収した。この試験において、HCV RNAレベルは3および7日目において低減した。

【0472】

複数週の試験のため、5匹の動物群を、それぞれ、以下のとおり処理した：PBS(n=5)；3mg/kgの38459(n=5)；10mg/kgの38459(n=4~5)；または30mg/kgの38459(n=4~5)。追加の動物群を、10mg/kg

50

kg の非コンジュゲート化合物 36848 (n = 5) により処理した。処理は、0 日目に単回皮下注射として施した。血液を、- 7、0、3、7、10、14、17、21、24、28、および 35 日目に回収した。血液中の HCV RNA レベルを、定型的方法に従ってリアルタイム PCR により計測し、表 I に示す。特に記載のない限り、それぞれの処理群は、5 匹の動物を含有した。表 I に示されるとおり、HCV RNA レベルは、10 mg/kg または 30 mg/kg の化合物 38459 により処理された群において 3 日目という早さで有意に低減し、この低減は、少なくとも 35 日目まで持続した。統計的有意性を、PBS 処理動物における平均 HCV RNA レベルに正規化された化合物処理動物における平均 HCV RNA レベルの二元 ANOVA 分析により算出した。この試験において、非コンジュゲート化合物 36848 は、HCV RNA レベルを低減させなかった。これらの結果を図 5 A にもグラフ形式で説明する。

【0473】

【表 13】

表I:GalNAc-コンジュゲート抗miR-122は、HCVタイターを低減させる

日数	PBS平均	36848 10 mg/kg	38459 3 mg/kg	38459 10 mg/kg	38459 30 mg/kg
-7	2.66E+08	2.90E+08	2.54E+08	2.76E+08	2.60E+08
0	2.08E+08	2.92E+08	3.26E+08	2.38E+08	2.70E+08
3	1.97E+08	3.20E+08	2.90E+08	8.10E+07*	4.76E+07****
7	1.65E+08	3.26E+08	1.76E+08	3.16E+07****	1.22E+07****
10	1.59E+08	2.74E+08	1.21E+08	2.70E+07****	7.52E+06****
14	1.19E+08	2.02E+08	9.34E+07	2.37E+07****	4.82E+06****
17	1.67E+08	2.10E+08	9.68E+07	2.94E+07****	4.89E+06****
21	1.49E+08	2.36E+08	9.72E+07	3.06E+07****	7.65E+06**** (n=4)
24	1.43E+08	2.14E+08	8.46E+07	3.35E+07****	7.95E+06**** (n=4)
28	1.43E+08	1.63E+08	8.48E+07	4.16E+07***	1.13E+07**** (n=4)
31	1.37E+08	1.99E+08	9.22E+07	5.18E+07* (n=4)	1.98E+07**** (n=4)
35	1.44E+08	1.88E+08	1.03E+08	5.80E+07* (n=4)	2.35E+07**** (n=4)

****p<.0001; ***p<0.0005; *p<0.05

【0474】

これらの結果は、GalNAc-コンジュゲート修飾オリゴヌクレオチド 38459 の単回投与後、HCV ウイルスタイターが HCV 感染動物において有意に低減し、作用の発生が早期であり、持続時間が持続したことを実証する。

【0475】

追加の試験を実施し、マウスが HCV ゲノタイプ 3a に感染している HCV 感染のヒトキメラ肝マウスモデルにおける化合物 38459 の効果を評価した。5 匹の動物群を、それぞれ、以下のとおり処理した：PBS (n = 4)；10 mg/kg の 38459 (n = 5)；または 30 mg/kg の 38459 (n = 5)。マウスに HCV ゲノタイプ 3a を

10

20

30

40

50

接種した。処理の7日前、ウイルスタイターの計測のために血液をマウスから回収した。処理は、0日目に単回皮下注射として施した。血液を処理後0、3、7、10、14、17、21、24、および28日目に回収した。血液中のHCV RNAレベルを定型的方法に従ってリアルタイムPCRにより計測した。図5Bに示されるとおり、HCV RNAレベルは、10mg/kgまたは30mg/kgの化合物38459により処理された群において3日目という早さで有意に低減し、この低減は、少なくとも28日目まで持続した。

【0476】

化合物38459により処理されたマウスの肝臓中の肥満症の実質的な低減も観察された。肥満症の低減は、HCVに感染しているマウス、および非感染マウスにおいて観察され、このことは、miR-122の阻害がHCV感染の存在および不存在下の両方において肥満症を低減させ得ることを示唆する。

【0477】

実施例5

コンジュゲート短鎖修飾オリゴヌクレオチド

Ga1NAc含有化合物を、図3の構造を表Jに示される修飾オリゴヌクレオチドの3'末端にコンジュゲートすることにより形成した。糖部分、ヌクレオシド間結合、およびヌクレオ塩基を以下のとおり示す：下付き文字が続かないヌクレオシドは、-D-デオキシリボヌクレオシドであり；下付き文字「S」が続くヌクレオシドは、S-cetヌクレオシドであり；それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0478】

【表14】

表J:非コンジュゲートおよびコンジュゲート修飾オリゴヌクレオチド

	配列および修飾	構造	配列番号
38591	U ₅ TGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A ₅	非コンジュゲート	8
38633	U ₅ TGU ₅ C ₅ AC ₅ AC ₅ TC ₅ C ₅ A ₅	図3Aの構造I、式中、X ₂ は、ホホジエステル結合であり、mは、1であり、N _m は、β-D-デオキシヌクレオシド(dA)であり、X ₁ は、ホスホジエステル結合である。	8
38998	C ₅ A ₅ C ₅ A ₅ C ₅ U ₅ C ₅ C ₅	非コンジュゲート	9
38634	C ₅ A ₅ C ₅ A ₅ C ₅ U ₅ C ₅ C ₅	図3Aの構造I、式中、X ₂ は、ホホジエステル結合であり、mは、1であり、N _m は、β-D-デオキシヌクレオシド(dA)であり、X ₁ は、ホスホジエステル結合である。	9

【0479】

インビボ効力を決定するため、化合物を、肝アルドラーゼA(ALDOA)の発現を脱抑制するそれらの能力について評価した。化合物をマウスに投与し、ALDOA mRNAレベルを定量的PCRにより肝臓から単離されたRNAにおいて計測した。生理食塩水に対するALDOA mRNAの変化倍率を算出してインビボ効力を決定した(図6Aおよび6Bならびに7Aおよび7B)。それらの実験の結果から算出されたED50(ALDOA脱抑制が最大の50%である化合物の濃度)およびED90(ALDOA脱抑制が最大の90%である化合物の濃度)を、表KおよびLに示す。

【0480】

【表 15】

表K:コンジュゲートおよび非コンジュゲート抗miR-122化合物のインビボ効力

化合物	ED50(mg/kg)	変化倍率	ED90(mg/kg)	変化倍率
実験1(図6A)				
38634	0.03	456	0.3	212
38998	13.7		63.8	
実験2(図6B)				
38634	0.04	290	0.43	99.3
38998	11.6		42.7	

10

【0481】

【表 16】

表L:コンジュゲートおよび非コンジュゲート抗miR-122化合物のインビボ効力

化合物	ED50(mg/kg)	変化倍率	ED90(mg/kg)	変化倍率
実験1(図7A)				
38633	0.08	27	0.25	26
38591	2.2		6.62	
実験2(図7B)				
38633	0.15	20	0.94	10
38591	3.0		8.9	

20

【0482】

表 K に示されるとおり、本発明による GalNAc コンジュゲーションは、8mer の抗 miR - 122 化合物の ED₅₀ および ED₉₀ を少なくとも 100 倍だけ改善した。表 L に示されるとおり、本発明による GalNAc コンジュゲーションは、13mer の抗 miR - 122 化合物の ED₅₀ および ED₉₀ を少なくとも 10 倍だけ改善した。

30

【0483】

別の miR - 122 標的遺伝子、CD320 の脱抑制も、化合物 38634 および 38998 について決定した。結果は、表 K に示される ALDOA について得られた結果と同様であった：本発明による GalNAc コンジュゲーションは、実験 1 および 2 においてそれぞれ ED₅₀ を 343 倍および 272 倍だけを改善し、実験 1 および 2 においてそれぞれ ED₉₀ を 492 倍および 545 倍だけ改善した。

40

【0484】

本明細書に記載の GalNAc コンジュゲーションは、コレステロール低下効力も改善し、これは、GalNAc を含む化合物についても観察された。実験 1 からの例示的な結果を図 8A および 8B に示す。GalNAc コンジュゲートである化合物 38633 および 38634 は、GalNAc を欠く化合物 38591 および 38998 よりも強力であった。同様の結果が実験 2 について得られた（データ示さず）。

【0485】

実施例 6

非ヒト霊長類における抗 miR - 122 化合物の薬力学的活性

抗 miR - 122 化合物を、正常非ヒト霊長類（カニクイザル）において試験した。単回用量の GalNAc - コンジュゲート化合物 38459 または非コンジュゲート化合物

50

38649を、皮下投与した（それぞれの化合物について $n = 3$ ）。PBSを対照処理（ $n = 5$ ）として投与した。化合物の投与後4日目および8日目、肝組織を回収し、ALDOAレベルの計測のためにRNAを単離した。血液中の総コレステロールを8日目に計測した。表Lに示されるとおり、ALDOA脱抑制は、それぞれの化合物38459の用量、例として、1 mg / kgの最低用量において4日目および8日目に観察される。コレステロール低下も、最低用量の化合物38459について観察された。したがって、GalNAc-コンジュゲート化合物38459は、非コンジュゲート化合物38649に対して非ヒト霊長類において有意に強力である。さらに、両方の化合物は、非ヒト霊長類における単回投与後少なくとも1週間の作用の持続時間を有する。

【0486】

10

【表17】

表L:非ヒト霊長類におけるmiR-122の阻害

処理	ALDOA(4日目) 変化倍率	ALDOA(8日目) 変化倍率	コレステロール(8日目) mg/dL
PBS	1.0		95.3
38649, 100 mg/kg	3.4	4.0	67.0
38459, 1 mg/kg	5.0	3.9	64.3
38459, 10 mg/kg	3.0	3.6	66.7
38459, 100 mg/kg	4.0	4.1	65.3

20

【0487】

実施例7

コンジュゲート抗miR-122化合物の薬物動態活性

抗miR-122化合物の血漿および組織薬物動態を、マウスおよび非ヒト霊長類において評価した。

【0488】

30

単回皮下用量の化合物38649またはGalNAc-コンジュゲート化合物38459を、CD-1マウスに投与した。投与後の24時間の期間にわたり複数の時点において血液を回収し、血液中の化合物の総量をハイブリダイゼーションベースELISAにより計測した。

【0489】

単回皮下用量の化合物38649またはGalNAc-コンジュゲート化合物38459を、非ヒト霊長類に投与した。投与後の24時間の期間にわたり複数の時点において血液を回収し、血液中の化合物の総量をLC-MSにより計測した。

【0490】

40

図9に示されるとおり、マウス（図9A）および非ヒト霊長類（図9B）において、GalNAc-コンジュゲート化合物38459は、非コンジュゲート化合物38649と比較して急速に血漿からクリアランスされる。GalNAc-コンジュゲート化合物38459の投与後、非コンジュゲート化合物38649は検出されず、このことは、コンジュゲート化合物38459が血液中では代謝されないことを示す（データ示さず）。

【0491】

この試験において、化合物の組織レベルを、マウス（表M）および非ヒト霊長類（表N）の肝臓および腎臓中에서도計測した。

【0492】

【表 18】

表M:単回投与24時間後のマウスにおける化合物組織レベル

投与化合物:		38459(+GalNAc)			38649		
組織:		腎臓	肝臓	K/L	腎臓	肝臓	K/L
用量	検出化合物	平均 ($\mu\text{g/g}$)	平均 ($\mu\text{g/g}$)	比	平均 ($\mu\text{g/g}$)	平均 ($\mu\text{g/g}$)	比
1 mg/kg	38649	1.1	5.7	0.19	18.4	4	4.6
	総化合物	1.1	7.4	0.15			
3 mg/kg	38649	8.2	15.8	0.52	83.9	10.8	7.6
	総化合物	16.8	27.7	0.61			

10

【0493】

【表 19】

表N:単回投与72時間後の非ヒト霊長類における化合物組織レベル

投与化合物:		38459 (+GalNAc)			38649		
組織:		腎臓	肝臓	K/L	腎臓	肝臓	K/L
用量	検出化合物	平均 ($\mu\text{g/g}$)	平均 ($\mu\text{g/g}$)	比	平均 ($\mu\text{g/g}$)	平均 ($\mu\text{g/g}$)	比
1 mg/kg	38649	5.6	27.2	0.21			
	総化合物	31.3	34	0.92			
10 mg/kg	38649	124	148	0.84	283.3	61.2	4.6
	総化合物	513.5	186.3	2.7			
100 mg/kg	38649	374.1	418.8	0.89	1430	242.3	5.9
	総化合物	2129.1	547.2	3.9			

20

30

【0494】

投与後、化合物38459は、肝臓および腎臓中で非コンジュゲート化合物38649に急速に代謝される。さらに、上記のマウス試験からのデータと一致して、化合物38459の腎臓肝臓比は、化合物38649よりも有意に低い。

【0495】

投与24時間後の肝臓中の化合物の濃度に基づき、約 $6\mu\text{g/g}$ のGalNAc-コンジュゲート化合物38459および約 $30\mu\text{g/g}$ の非コンジュゲート化合物38459が、7日目に90%の最大効力(ALDOA脱抑制により計測)をもたらすことが推定された。したがって、化合物38459は、非コンジュゲート化合物38649に対して低い肝組織濃度において大きい効力をもたらす。

40

【0496】

これらのデータは、非ヒト霊長類およびマウスにおいて、GalNAc含有部分へのコンジュゲーションが肝臓への修飾オリゴヌクレオチドの送達の有意な向上をもたらすことを実証する。さらに、より低い腎臓肝臓比と結びつけられる低いED₅₀は、GalNAc-コンジュゲート化合物38459が高い治療指数を有し得ることを示唆する。

50

【 0 4 9 7 】

実施例 8

抗 m i R - 1 2 2 化合物の毒性学および安全性試験

複数の試験をマウス、げっ歯類および非ヒト霊長類において実施して G a l N A c - コンジュゲート化合物 3 8 4 5 9 の安全性および忍容性を評価した。

【 0 4 9 8 】

例えば、化合物 3 8 4 5 9 を、ラットにおける炎症促進試験において評価した。雄 S p r a g u e D a w l e y ラットに単回皮下用量の化合物 3 8 4 5 9 を投与した。投与後 1 4 日目、A L D O A および C X C L 1 3 (インターフェロン誘導遺伝子) の発現を肝臓中で計測した。

【 0 4 9 9 】

表 O に示されるとおり、C X C L 1 3 発現の増加は 1 0 0 m g / k g という高い用量において検出されなかった一方、A L D O A レベルは、1 m g / k g の用量において開始して上昇した。公知の炎症抗 m i R - 1 2 2 化合物も試験し、1 0 、 3 0 および 1 0 0 m g / k g の用量における 2 ~ 2 . 5 倍の C X C L 1 3 レベルの増加をもたらした。

【 0 5 0 0 】

【表 2 0 】

表O:化合物38459は、炎症促進遺伝子発現を増加させない

化合物38459の用量	ALDOA 変化倍率	CXCL13 変化倍率
0.1 mg/kg	1.2	1.4
0.3 mg/kg	1.6	1.6
1 mg/kg	2.5	1.5
3 mg/kg	2.9	0.8
10 mg/kg	2.8	0.6
30 mg/kg	3.2	0.8
100 mg/kg	3.4	0.7

【 0 5 0 1 】

追加の毒性学試験をマウスおよび非ヒト霊長類 (カニクイザル) において実施し、治療関連用量において有意な有害効果は観察されなかった。

【 0 5 0 2 】

実施例 9

コンジュゲート短鎖修飾オリゴヌクレオチド

コレステロール含有化合物を、コレステロールを表 P に示される修飾オリゴヌクレオチドの 3 ' 末端にコンジュゲートすることにより形成した。糖部分、ヌクレオシド間結合、およびヌクレオ塩基を以下のとおり示す：下付き文字が続かないヌクレオシドは、 - D - デオキシリボヌクレオシドであり；下付き文字「 S 」が続くヌクレオシドは、S - c E t ヌクレオシドであり；それぞれのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、但し、ホスホジエステル結合である下付き文字 (O) により示されるヌクレオシド間結合を除く。

【 0 5 0 3 】

10

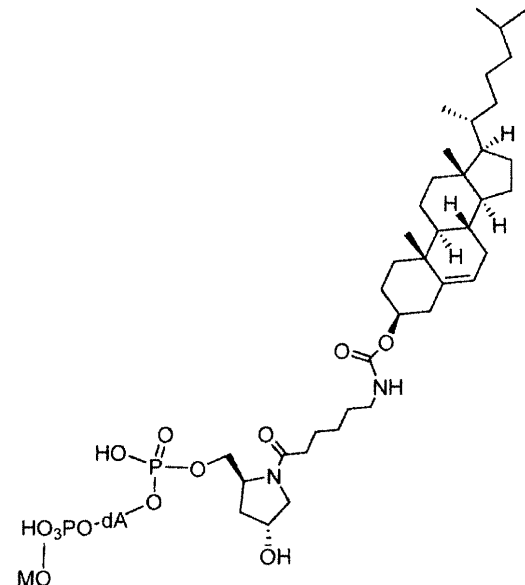
20

30

40

【表 2 1】

表P:非コンジュゲートおよびコンジュゲート修飾オリゴヌクレオチド

	配列および修飾	構造	配列番号
38998	C ₅ A ₅ C ₅ A ₅ C ₅ U ₅ C ₅ C ₅	非コンジュゲート	9
38070	C ₅ A ₅ C ₅ A ₅ C ₅ U ₅ C ₅ C ₅	 <p>MOは、C₅A₅C₅A₅C₅U₅C₅C₅である</p>	9

【0504】

インビボ効力を決定するため、化合物を、肝アルドラーゼA (ALDOA) の発現を脱抑制するそれらの能力について評価した。化合物をマウスに投与し、ALDOA mRNA レベルを定量的PCRにより肝臓から単離されたRNAにおいて計測した。生理食塩水に対するALDOA mRNAの変化倍率を算出してインビボ効力を決定した。それらの実験の結果から算出されたED50 (ALDOA脱抑制が最大の50%である化合物の濃度) およびED90 (ALDOA脱抑制が最大の90%である化合物の濃度) を、表Qに示す。

【0505】

【表 2 2】

表Q:コンジュゲートおよび非コンジュゲート抗miR-122化合物のインビボ効力

化合物	ED50(mg/kg)	変化倍率	ED90(mg/kg)	変化倍率
38070	0.08	78.8	1.27	31.6
38998	6.3		40.1	

【0506】

表Qに示されるとおり、本発明によるコレステロールコンジュゲーションは、8merの抗miR-122化合物のED₅₀およびED₉₀を少なくとも30倍だけ改善した。

【0507】

別のmiR-122標的遺伝子、CD320の脱抑制も、化合物38070および38998について決定した。結果は、ALDOAについて得られた結果と同様であった(データ示さず)。

【 0 5 0 8 】

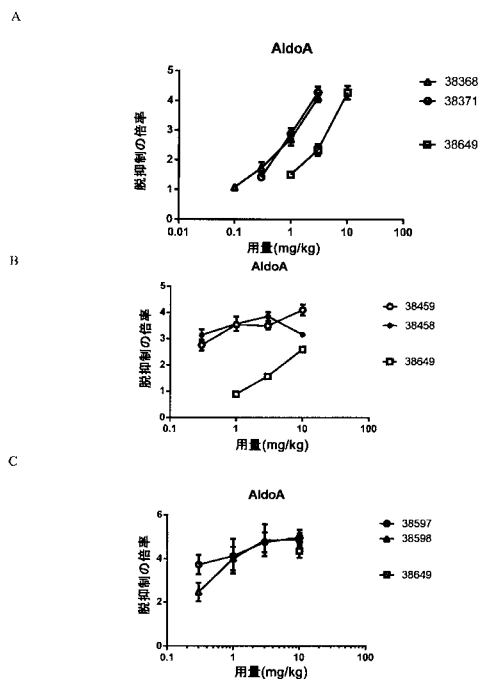
本明細書に記載のコレステロールコンジュゲーションは、コレステロール低下効力も改善した。ほとんどの試験濃度において、化合物 3 8 0 7 0 は、コレステロールを同一濃度の化合物 3 8 9 9 8 よりも大きい程度で低減させた（データ示さず）。

【 0 5 0 9 】

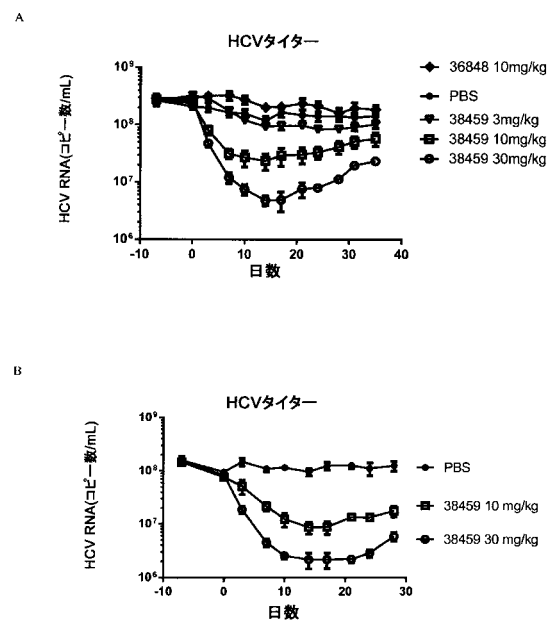
本明細書に記載のものに加え、本発明の種々の改変形態は、上記説明から当業者に明らかである。このような改変形態も、添付の特許請求の範囲の範囲内であるものとする。本出願において引用されるそれぞれの参照文献（例として、限定されるものではないが、雑誌論文、米国および非米国特許、特許出願公開、国際特許出願公開、G E N B A N K（登録商標）寄託番号など）は、参照により全体として本明細書に具体的に組み込まれる。

10

【 図 4 】

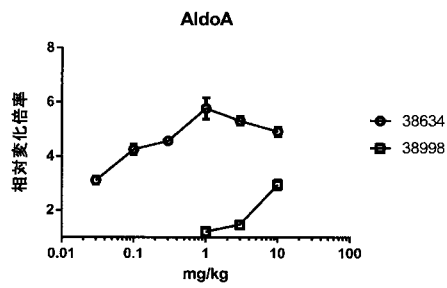


【 図 5 】

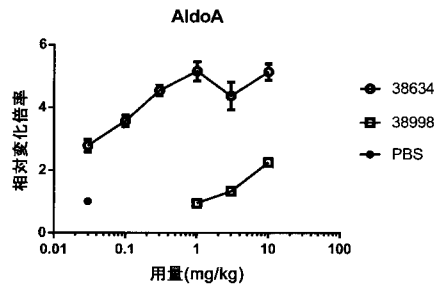


【 図 6 】

A

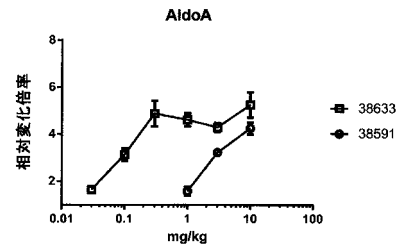


B

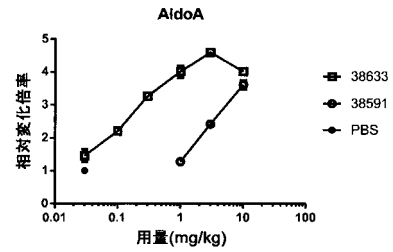


【 図 7 】

A

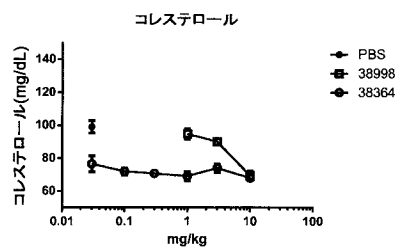


B

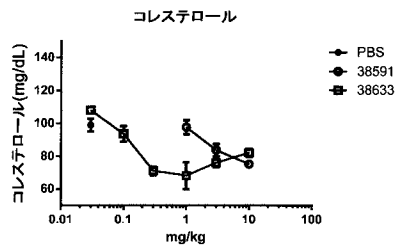


【 図 8 】

A

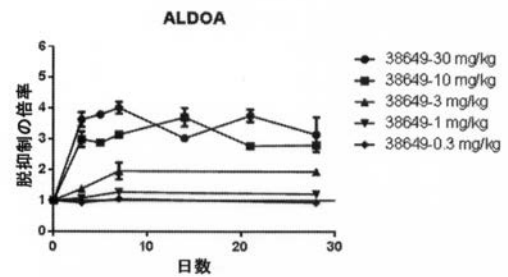


B

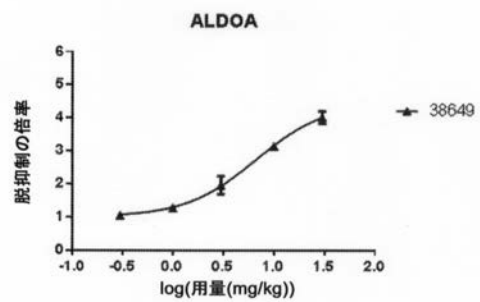


【 図 1 】

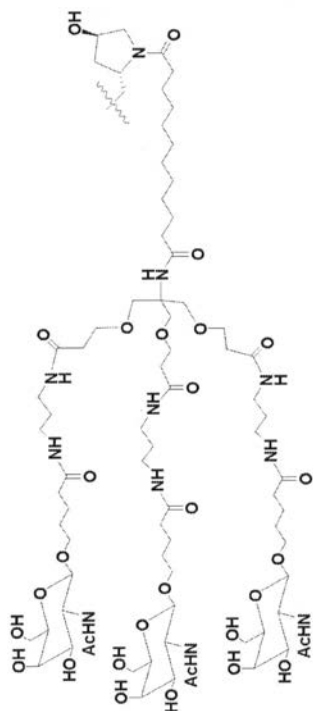
A



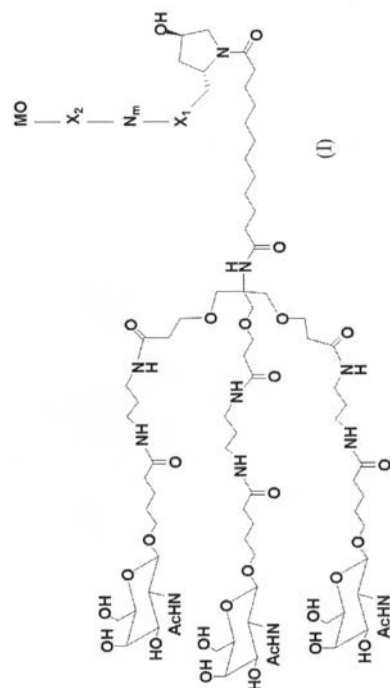
B



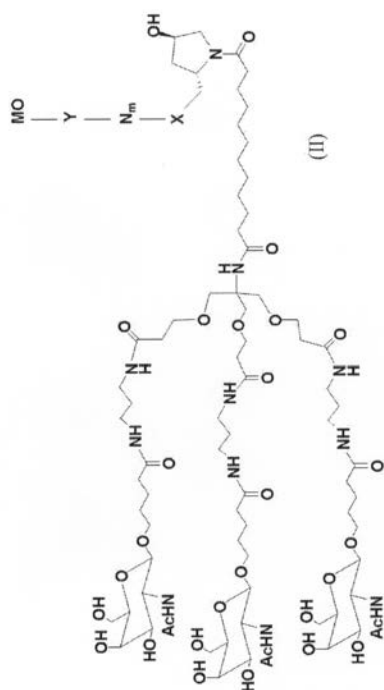
【図 2】



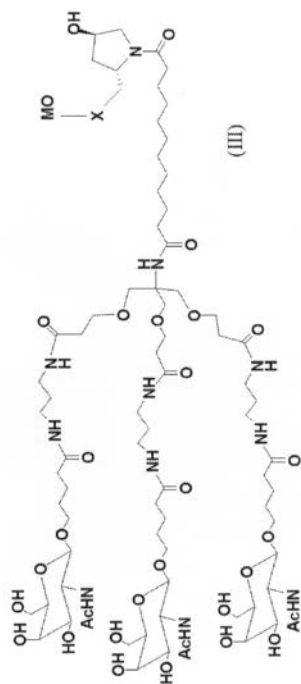
【図 3 A】



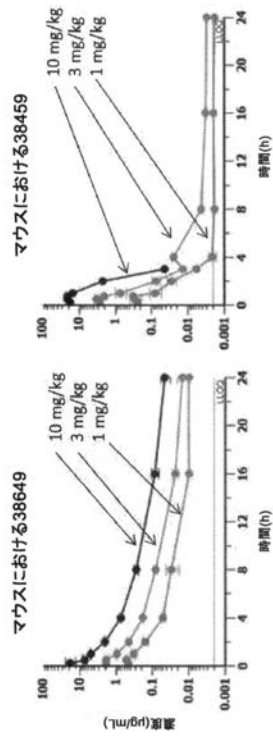
【図 3 B】



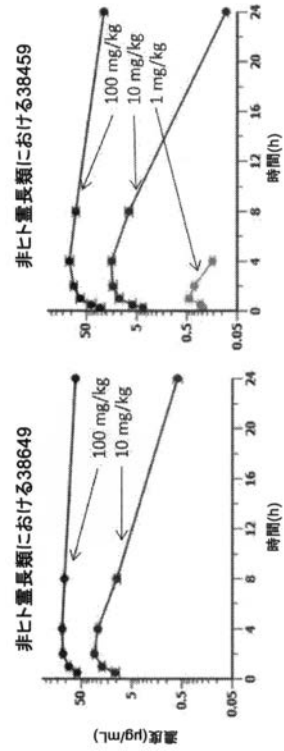
【図 3 C】



【図 9 A】



【図 9 B】



【配列表】

2016518842000001.app

【 国 際 調 査 報 告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/036137
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)		
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of: a. (means) <div style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form</div> b. (time) <div style="margin-left: 20px;"><input checked="" type="checkbox"/> in the international application as filed <input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form <input type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purpose of search</div>	
2.	<input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3.	Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/036137**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-51, 73(completely); 53-72, 75-114(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/036137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/11 C12N15/113 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)

C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/043353 A2 (SANTARIS PHARMA AS [DK]; OBAD SUSANNA [SE]; KAUPPINEN SAKARI [DK]; ELM) 9 April 2009 (2009-04-09) pages 24-26,29; example 1; tables 2,4; sequence 5 page 33 - page 34 -----	1-51, 53-73, 75-114
Y	WO 2008/091703 A2 (UNIV ROCKEFELLER [US]; ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; STOFFEL MARKU) 31 July 2008 (2008-07-31) page 28; figure 5; table 4 -----	1-51, 53-73, 75-114
Y	WO 2007/027775 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; ESAU CHRISTINE [US]; BHANOT SANJAY [US]) 8 March 2007 (2007-03-08) page 25 - page 26; table 4 -----	1-51, 53-73, 75-114
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 2014

Date of mailing of the international search report

15/12/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/036137

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 2013/033230 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; PRAKASH THAZHA P [US]; SWAYZE ERIC E [U] 7 March 2013 (2013-03-07) claims 1,478-490 -----	1-51, 53-73, 75-114
A	FABANI M M ET AL: "miR-122 targeting with LNA/2'-O-methyl oligonucleotide mixmers, peptide nucleic acids (PNA), and PNA-peptide conjugates", RNA, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 14, 11 December 2007 (2007-12-11), pages 336-346, XP002533356, ISSN: 1355-8382, DOI: 10.1261/RNA.844108 page 344, left-hand column; figure 5 -----	1-51, 53-73, 75-114
A	MAIER M A ET AL: "Synthesis of antisense oligonucleotides conjugated to a multivalent carbohydrate cluster for cellular targeting", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 14, 3 December 2002 (2002-12-03), pages 18-29, XP002510288, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC020028V [retrieved on 2002-12-03] table 2 -----	1-51, 53-73, 75-114
A	KARSKELA MARIKA ET AL: "Synthesis and Cellular Uptake of Fluorescently Labeled Multivalent Hyaluronan Disaccharide Conjugates of Oligonucleotide Phosphorothioates", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 19, no. 12, 19 November 2008 (2008-11-19), pages 2549-2558, XP002551183, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC800260Y [retrieved on 2008-11-19] figures 2,3 -----	1-51, 53-73, 75-114
A	KATAJISTO J ET AL: "Solid-phase synthesis of multiantennary oligonucleotide glycoconjugates utilizing on-support oximation", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 15, no. 4, 29 June 2004 (2004-06-29), pages 890-896, XP002551180, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC049955N [retrieved on 2004-06-29] the whole document ----- -/--	1-51, 53-73, 75-114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/036137

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZATSEPIN TIMOFEEV S ET AL: "Synthesis and applications of oligonucleotide-carbohydrate conjugates", CHEMISTRY & BIODIVERSITY, HELVETICA CHIMICA ACTA, ZUERICH, CH, vol. 1, no. 10, 21 October 2004 (2004-10-21), pages 1401-1417, XP002428047, ISSN: 1612-1872, DOI: 10.1002/CBDV.200490104 page 1413 - page 1415 -----	1-51, 53-73, 75-114
A	E. VAN ROOIJ ET AL: "Developing MicroRNA Therapeutics", CIRCULATION RESEARCH, vol. 110, no. 3, 3 February 2012 (2012-02-03), pages 496-507, XP055144403, ISSN: 0009-7330, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247916 page 497, right-hand column - page 498, left-hand column page 505 -----	1-51, 53-73, 75-114
X,P	BALKRISHN BHAT ET AL: "RG-101, a GalNAC-conjugated anti-miR employing a unique mechanism of action by targeting host factor microRNA-122 (miR-122), demonstrates potent activity and reduction of HCV in preclinical studies", HEPATOLOGY; 64TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-THE-STUDY-OF-LIVER-DISEASES; WASHINGTON, DC, USA; NOVEMBER 01 -05, 2013, JOHN WILEY & SONS, INC, USA, vol. 58, no. 6, suppl, December 2013 (2013-12), page 1393A, XP002723153, ISSN: 0270-9139 [retrieved on 2013-11-06] the whole document -----	1-51, 53-73, 75-114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/036137

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009043353 A2	09-04-2009	AU 2008306327 A1	09-04-2009
		CA 2701547 A1	09-04-2009
		CN 101821391 A	01-09-2010
		DK 2205737 T3	21-05-2013
		EA 201070421 A1	29-10-2010
		EP 2203559 A2	07-07-2010
		EP 2205737 A2	14-07-2010
		EP 2623598 A1	07-08-2013
		EP 2623599 A1	07-08-2013
		ES 2406686 T3	07-06-2013
		ES 2463665 T3	28-05-2014
		JP 2010539959 A	24-12-2010
		KR 20100100774 A	15-09-2010
		NZ 583677 A	29-06-2012
		US 2009143326 A1	04-06-2009
		US 2010280099 A1	04-11-2010
		US 2010298410 A1	25-11-2010
		WO 2009043353 A2	09-04-2009
		WO 2009043354 A2	09-04-2009
WO 2008091703 A2	31-07-2008	US 2007213292 A1	13-09-2007
		US 2010222413 A1	02-09-2010
		US 2014073684 A1	13-03-2014
		WO 2008091703 A2	31-07-2008
WO 2007027775 A2	08-03-2007	AT 494372 T	15-01-2011
		AU 2006284855 A1	08-03-2007
		CA 2620856 A1	08-03-2007
		EP 1931782 A2	18-06-2008
		EP 2338991 A2	29-06-2011
		JP 5523705 B2	18-06-2014
		JP 2009506124 A	12-02-2009
		US 2007049547 A1	01-03-2007
		WO 2007027775 A2	08-03-2007
WO 2013033230 A1	07-03-2013	EP 2751270 A1	09-07-2014
		WO 2013033230 A1	07-03-2013

International Application No. PCT/US2014/036137

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-51, 73(completely); 53-72, 75-114(partially)

A compound comprising a modified oligonucleotide consisting of 16 to 22 linked nucleosides, wherein the nucleobase sequence of the modified oligonucleotide is complementary to miR-122 (SEQ ID NO: 1) and wherein the modified oligonucleotide comprises at least 16 contiguous nucleosides of the following nucleoside pattern I in the 5' to 3' orientation: (R)X -NQ -NQ -NB -NB -NQ -NB -NQ -NB -NB -(NZ)Y wherein each R is, independently, a non-bicyclic nucleoside or a bicyclic nucleoside; X is from 4 to 10; each NB is, independently, a bicyclic nucleoside; each NQ is, independently, a non-bicyclic nucleoside; Y is 0 or 1; and Nz is a modified nucleoside or an unmodified nucleoside; N-acetylgalactosamine conjugates thereof.

2. claims: 52, 74(completely); 53-72, 75-114(partially)

A compound comprising a modified nucleotide and a conjugate moiety, wherein the modified oligonucleotide has the structure CL CAL TTGL TL CACL ACL TCL CL, wherein the subscript "L" indicates an LNA and nucleosides not followed by a subscript are p-D-deoxyribonucleosides, and each internucleoside linkage is a phosphorothioate internucleoside linkage, and wherein the conjugate moiety is linked to the 3' terminus of the modified oligonucleotide and has the structure shown in claims 52 and 74, respectively, wherein each N is, independently, a modified or unmodified nucleoside and m is from 1 to 5; Xi and X2 are each, independently, a phosphodiester linkage or a phosphorothioate linkage; and MO is a modified oligonucleotide.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66	G
A 6 1 K 31/7056 (2006.01)	A 6 1 K 31/7056	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/427 (2006.01)	A 6 1 K 31/427	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	

- (31)優先権主張番号 61/895,784
 (32)優先日 平成25年10月25日(2013.10.25)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/898,704
 (32)優先日 平成25年11月1日(2013.11.1)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/927,897
 (32)優先日 平成26年1月15日(2014.1.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, LT, 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

(72)発明者 ホーガン ダニエル
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ ジョン ホブキンズ コート
 3 5 4 5 スイート 2 1 0

F ターム(参考) 4B050 CC07 DD11 HH02 LL01
 4B065 AA97X AC20 BA14 BD32 BD34 BD35 CA44
 4C084 AA02 AA19 BA44 DA21 DA22 DA23 DC50 NA05 ZC202 ZC412
 4C086 AA01 AA02 AA03 BC82 EA16 GA10 HA25 MA01 MA04 NA14
 ZA75 ZB33 ZC41