

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6452614号
(P6452614)

(45) 発行日 平成31年1月16日 (2019. 1. 16)

(24) 登録日 平成30年12月21日 (2018. 12. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 H 21/04 (2006. 01)

C O 7 H 21/04 C S P Z

A 6 1 K 31/7125 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 47/54 (2017. 01)

A 6 1 K 47/54

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 14 (全 123 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-542264 (P2015-542264)
 (86) (22) 出願日 平成25年11月14日 (2013. 11. 14)
 (65) 公表番号 特表2016-501195 (P2016-501195A)
 (43) 公表日 平成28年1月18日 (2016. 1. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/073858
 (87) 国際公開番号 W02014/076195
 (87) 国際公開日 平成26年5月22日 (2014. 5. 22)
 審査請求日 平成28年9月28日 (2016. 9. 28)
 (31) 優先権主張番号 12192773.5
 (32) 優先日 平成24年11月15日 (2012. 11. 15)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 13153296.2
 (32) 優先日 平成25年1月30日 (2013. 1. 30)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 515129320
 ロシュ イノベーション センター コペ
 ンハーゲン エーエス
 デンマーク王国 ホルスホルム フレムテ
 ィズヴァイ 3
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチドコンジュゲート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の3種の領域：

(i) 核酸標的に相補的である7～26個の連続ヌクレオチドを含み、かつ該標的核酸を調節することができるアンチセンスオリゴマーである第1領域（領域A）であって、該第1領域が少なくとも1個のヌクレオシド類似体を含み、かつ該第1領域のヌクレオシド間連結が、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結である、第1領域；

(ii) ホスホジエステル連結を介して、第1領域の5'ヌクレオチドまたは3'ヌクレオチドに共有結合で連結された第2領域（領域B）であって、該第2領域が2～10個のホスホジエステルによって連結されたDNAヌクレオシドもしくはRNAヌクレオシドからなる、第2領域；

(iii) コンジュゲート部分を含み、第2領域に共有結合で連結されている、第3領域を含む、8～35ヌクレオチド長のオリゴマー化合物。

【請求項 2】

前記核酸標的が、マイクロRNA、mRNA、lncRNA（長鎖非コードRNA）、snRNA、snoRNA、およびウイルスRNAからなる群より選択される、請求項1記載のオリゴマー化合物。

【請求項 3】

前記第1領域が、ギャップマー（gapmer）、ミックスマー（mixmer）、またはトータルマー（totalmer）を含む、請求項1～2のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

【請求項 4】

前記第1領域が、少なくとも1個の二環式ヌクレオチド類似体（LNA）を含む、請求項1～

3のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

【請求項 5】

第2領域が第1領域の5'に在る、請求項1～4のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

【請求項 6】

第2領域が第1領域の3'に在る、請求項1～4のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

【請求項 7】

第3領域が、ステロール、コレステロール、GalNAc、GalNAcクラスター、親油基、タンパク質、ペプチド、抗体またはその断片、アプタマー、ポリマー、レポーター基、色素、受容体リガンド、小分子薬物、プロドラッグ、およびビタミンからなる群より選択される部分を含む、請求項1～6のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

10

【請求項 8】

第2領域および第3領域が、リンカー基によって共有結合で接合されている、請求項1～7のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

【請求項 9】

第2領域と第3領域との間のリンカー基が、ホスホジエステル基またはホスホロチオエート基である、請求項1～8のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか一項記載のオリゴマー化合物と、薬学的に許容される希釈剤、担体、塩、または佐剤とを含む薬学的組成物。

【請求項 11】

20

細胞における核酸標的の阻害において使用するための、請求項1～9のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

【請求項 12】

医薬において使用するための、請求項1～9のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

【請求項 13】

医学的な疾患または障害の処置において使用するための、請求項1～9のいずれか一項記載のオリゴマー化合物。

【請求項 14】

疾患または障害の処置のための医薬の調製のための、請求項1～9のいずれか一項記載のオリゴマー化合物の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の領域

本発明は、オリゴヌクレオチド薬物療法学の分野、具体的には、オリゴヌクレオチドの特性を増強するための、例えば、治療指数を改善するための、コンジュゲート、ターゲティング基、またはブロック基の使用に関する。

【0002】

関連案件

本願は、参照によって本明細書に組み入れられるEP12192773.5、EP13153296.2、EP13157237.2、およびEP13174092.0に基づく優先権を主張する。

40

【背景技術】

【0003】

背景

オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、siRNAにおいて使用するために広範囲に評価されており、十分なインビボ効力を入手するために不可欠であると見なされている。例えば、RNA干渉経路を介して遺伝子発現を調節する修飾型オリゴマー化合物に言及しているW02004/044141（特許文献1）を参照されたい。オリゴマー化合物は、付着しているオリゴマー化合物の薬物動態学的特性および薬力学的特性を修飾するかまたは増強することができる1種以上のコンジュゲート部分を含む。

50

【0004】

対照的に、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、コンジュゲーションまたは製剤化なしに治療的に投与される。アンチセンスオリゴヌクレオチドの主な標的組織は、肝臓および腎臓であるが、リンパ節、脾臓、骨髄を含む広範囲のその他の組織も、アンチセンスモダリティによって到達可能である。

【0005】

WO2008/113832 (特許文献2) は、隣接領域が、LNAヌクレオシド間にまたはLNAヌクレオシドに隣接して少なくとも1個のホスホジエステルを含む、LNAホスホロチオエートギャップマー (gapmer) オリゴヌクレオチドを開示している。オリゴマーは、腎臓へ優先的に標的指向化された。

10

【0006】

WO2004/087931 (特許文献3) は、酸によって切断可能な親水性ポリマー (PEG) コンジュゲートを含むオリゴヌクレオチドに言及している。

【0007】

WO2005/086775 (特許文献4) は、治療用化学部分、切断可能リンカー、および標識ドメインを使用した、特定の器官への治療剤の標的特異的な送達に言及している。切断可能リンカーは、例えば、ジスルフィド基、ペプチド、または制限酵素によって切断可能なオリゴヌクレオチドドメインであり得る。

【0008】

WO2009/126933 (特許文献5) は、ターゲティングリガンドをエンドソーム溶解 (endosomalytic) 成分と組み合わせることによる、siRNA核酸の特異的な送達に言及している。

20

【0009】

WO2011/126937 (特許文献6) は、小分子リガンドとのコンジュゲーションを介した、オリゴヌクレオチドの標的特異的な細胞内送達に言及している。

【0010】

WO2009/025669 (特許文献7) は、ピリジルジスルフィド部分を含有しているポリマー (ポリエチレングリコール) リンカーに言及している。Zhao et al., Bioconjugate Chem. 2005 16 758-766 (非特許文献1) も参照されたい。

【0011】

Chaltin et al., Bioconjugate Chem. 2005 16 827-836 (非特許文献2) は、デンドリマー送達系を作製するため、アンチセンスオリゴヌクレオチドをカチオン性リポソームへ組み入れるために使用された、コレステロールによって修飾されたモノマー型、ダイマー型、およびテトラマー型のオリゴヌクレオチドについて報告している。コレステロールは、リジンリンカーを介して、オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされる。

30

【0012】

他の非切断可能コレステロールコンジュゲートは、siRNAおよびアンタゴミル (antagomir) を肝臓へ標的指向化するために使用されている。例えば、Soutscheck et al., Nature 2004 vol. 432 173-178 (非特許文献3) および Krutzfeldt et al., Nature 2005 vol. 438, 685-689 (非特許文献4) を参照されたい。部分的にホスホロチオエート化されたsiRNAおよびアンタゴミルのための、肝臓ターゲティングエンティティとしてのコレステロールの使用は、インビボ活性にとって不可欠であることが見出された。

40

【0013】

本発明は、ホスホジエステルによって連結されたDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドのようなヌクレアーゼ不安定ヌクレオシドの短い領域によってオリゴヌクレオチドに連結されたホーミングデバイスの使用によって、オリゴヌクレオチドの高度に効果的な標的的特異的な送達が達成されるという発見に基づく。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】 WO2004/044141

50

【特許文献 2】WO2008/113832
【特許文献 3】WO2004/087931
【特許文献 4】WO2005/086775
【特許文献 5】WO2009/126933
【特許文献 6】WO2011/126937
【特許文献 7】WO2009/025669

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献 1】Zhao et al., Bioconjugate Chem. 2005 16 758-766
【非特許文献 2】Chaltin et al., Bioconjugate Chem. 2005 16 827-836
【非特許文献 3】Soutscheck et al., Nature 2004 vol. 432 173-178
【非特許文献 4】Krutzfeldt et al., Nature 2005 vol. 438, 685-689

10

【発明の概要】

【0016】

本発明は、以下の3種の領域を含む、オリゴマー化合物を提供する：

(i) 7~26個の連続ヌクレオチドを含む第1領域（領域A）；

(ii) 例えば、ヌクレオシド間連結基、例えばホスホジエステル連結を介して、第1領域の5'ヌクレオチドまたは3'ヌクレオチドに共有結合で連結された1~10個のヌクレオチドを含む第2領域（領域B）、ここで、

(a) 第1領域と第2領域との間のヌクレオシド間連結がホスホジエステル連結であり、第1領域に〔例えば、直接〕隣接した第2領域のヌクレオシドがDNAもしくはRNAのいずれかであり；かつ/または

20

(b) 第2領域の少なくとも1個のヌクレオシドがホスホジエステルによって連結されたDNAヌクレオシドもしくはRNAヌクレオシドである；

(iii) コンジュゲート部分、ターゲティング部分、反応基、活性化基、またはブロッキング部分を含み、第2領域に共有結合で連結されている、第3領域（C）。

【0017】

いくつかの態様において、領域Aおよび領域Bは、8~35ヌクレオチド長の単一の連続ヌクレオチド配列を形成する。

【0018】

いくつかの局面において、第1領域と第2領域との間のヌクレオシド間連結は、第2領域の一部と見なされ得る。

30

【0019】

いくつかの態様において、第2領域と第3領域との間にリン含有連結基が存在する。リン連結基は、例えば、ホスフェート（ホスホジエステル）基、ホスホロチオエート基、ホスホロジチオエート基、またはボラノホスフェート基であり得る。いくつかの態様において、このリン含有連結基は、第2領域と、第3領域に付着しているリンカー領域との間に位置する。いくつかの態様において、ホスフェート基はホスホジエステルである。

【0020】

従って、いくつかの局面において、オリゴマー化合物は、少なくとも2個のホスホジエステル基を含み、少なくとも1個は、本発明の上記の通りであり、その他は、第2領域と第3領域との間、任意で、リンカー基と第2領域との間に位置する。

40

【0021】

いくつかの態様において、第3領域は、活性化基、例えばコンジュゲーションにおいて使用するための活性化基である。この点で、本発明は、領域Aおよび領域Bならびに活性化基を含む活性化されたオリゴマー、例えば、その後の第3領域との連結に適した、例えばコンジュゲーションに適した中間体も提供する。

【0022】

いくつかの態様において、第3領域は、反応基、例えばコンジュゲーションにおいて使用するための反応基である。この点で、本発明は、領域Aおよび領域Bならびに反応基を含

50

むオリゴマー、例えば、その後の第3領域との連結に適した、例えばコンジュゲーションに適した中間体も提供する。反応基は、いくつかの態様において、アミン基またはアルコール基、例えば、アミン基を含み得る。

【0023】

いくつかの態様において、領域Aは、ホスホジエステル以外のヌクレオシド間連結、例えば、（任意で独立に）ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、およびボラノホスフェート、およびメチルホスホネートからなる群より選択されるヌクレオシド間連結、例えば、ホスホロチオエートを、少なくとも1個、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、または24個、含む。いくつかの態様において、領域Aは、少なくとも1個のホスホロチオエート連結を含む。いくつかの態様において、ヌクレオシド間連結の少なくとも50%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも90%、例えば、領域A内の全てのヌクレオシド間連結が、ホスホジエステル以外であり、例えば、ホスホロチオエート連結である。いくつかの態様において、領域A内の全てのヌクレオシド間連結が、ホスホジエステル以外である。

10

【0024】

いくつかの態様において、オリゴマー化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、第1領域、任意で、第1領域および第2領域であってもよいまたはそれを含んでいてもよい。この点で、いくつかの態様において、領域Bは、（核酸）標的に相補的な連続核酸塩基配列の一部を形成し得る。他の態様において、領域Bは、標的との相補性を欠いていてもよい。

20

【0025】

換言すると、いくつかの態様において、本発明は、ホスホジエステル連結を介してオリゴヌクレオチドの隣接ヌクレオシドに連結された少なくとも1個の末端（5'および/または3'）のDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドを有する、非ホスホジエステルによって連結された、例えば、ホスホロチオエートによって連結されたオリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）を提供する。末端のDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオチドは、任意でリンカー部分を介して、コンジュゲート部分、ターゲティング部分、またはブロック部分にさらに共有結合で連結されている。

30

【0026】

本発明は、本発明のオリゴマー化合物と、薬学的に許容される希釈剤、担体、塩、または佐剤とを含む、薬学的組成物を提供する。

【0027】

本発明は、細胞における核酸標的の阻害において使用するための、本発明によるオリゴマー化合物を提供する。いくつかの態様において、使用はインビトロである。いくつかの態様において、使用はインビボである。

【0028】

本発明は、医療において使用するための、例えば、医薬として使用するための、本発明のオリゴマー化合物を提供する。

40

【0029】

本発明は、医学的な疾患または障害の処置において使用するための、本発明のオリゴマー化合物を提供する。

【0030】

本発明は、疾患または障害、例えば、代謝疾患または代謝障害の処置のための医薬の調製のための、本発明のオリゴマー化合物の使用を提供する。

【0031】

本発明は、オリゴマー化合物、例えば、本発明のオリゴマー化合物の合成（または製造）方法を提供する。本法は、

（a）以下のうちの一つ〔第3領域〕：

50

(i) 任意でリンカー基 (-Y-)、
 (ii) コンジュゲート、ターゲティング基、ブロッキング基、反応基 [例えば、アミンもしくはアルコール]、もしくは活性化基からなる群より選択される基を含む基X (X-)、または-Y-X基
 が付着している [固相] オリゴヌクレオチド合成支持体を準備する工程、ならびに
 (b) 領域B、続いて領域Aの [逐次] オリゴヌクレオチド合成の工程、ならびに / または
 (c) 第1領域 (A) および第2領域 (B) の [逐次] オリゴヌクレオチド合成の工程を含み、合成工程に続いて、
 (d) 第3領域 [ホスホラミダイトを含む] である、

(i) 任意でのリンカー基 (-Y-)、
 (ii) コンジュゲート、ターゲティング基、ブロッキング基、反応基 [例えば、アミンもしくはアルコール]、もしくは活性化基からなる群より選択される基を含む基X (X-)、または任意での-Y-X基
 を付加する工程、それに続く、
 (e) [固相] 支持体からオリゴマー化合物を切断する工程を含み、任意で、
 (f) 第3基が活性化基であり、反応基を生成するため活性化基を活性化し、続いて、任意でリンカー基 (Y) を介して、コンジュゲート基、ブロッキング基、またはターゲティング基を反応基に付加する工程：

(g) 第3領域が反応基であり、任意でリンカー基 (Y) を介して、コンジュゲート基、ブロッキング基、またはターゲティング基を反応基に付加する工程、

(h) 第3領域がリンカー基 (Y) であり、コンジュゲート基、ブロッキング基、またはターゲティング基をリンカー基 (Y) に付加する工程

より選択されるさらなる工程

をさらに含み、

工程 (f)、(g)、または (h) は、オリゴヌクレオチド合成支持体からのオリゴマー化合物の切断の前または後のいずれかに実施される。いくつかの態様において、本法は、標準的なホスホラミダイト化学を使用して実施され得、従って、領域Xおよび / または領域Xまたは領域XおよびYは、ホスホラミダイトとして、オリゴマーへの組み入れの前に準備され得る。本発明の方法の非限定的な局面を例示する図5~10を参照されたい。

【0032】

本発明は、オリゴマー化合物、例えば、本発明のオリゴマー化合物の合成 (または製造) 方法を提供し、本法は、第1領域 (A)、および任意で第2領域 (B) の [逐次] オリゴヌクレオチド合成の工程を含み、合成工程の後に、第3領域 [ホスホラミダイトを含む] である領域X (領域Cとも呼ばれる)、もしくはY、例えば、コンジュゲート、ターゲティング基、ブロッキング基、官能基、反応基 [例えば、アミンもしくはアルコール]、もしくは活性化基 (X) からなる群より選択される基を含む領域、または-Y-X基を付加する工程、それに続く、[固相] 支持体からオリゴマー化合物を切断する工程を含む。

【0033】

しかしながら、領域XまたはX-Yは、固体支持体からの切断の後に付加されてもよいことが認識される。あるいは、合成の方法は、第1領域 (A)、および任意で第2領域 (B) を合成する工程、続いて、支持体からオリゴマーを切断する工程、ならびに第3領域、例えば、X基またはX-Y基をオリゴマーへ付加するその後の工程を含み得る。第3領域の付加は、例えば、(支持体上の) オリゴマー合成の最終工程においてアミノホスホラミダイト単位を添加することによって達成され得る。それは、支持体からの切断の後に、任意でX基上またはY基 (存在する場合) 上の活性化基を介して、X基またはX-Y基と接合するために使用され得る。切断可能リンカーがヌクレオチド領域でない態様において、領域Bは、領域X (領域Cとも呼ばれる) の一部を形成するかまたは領域Y (もしくはその一部) であり得る非ヌクレオチド切断可能リンカー、例えば、ペプチドリinkerであり得る。

【0034】

方法のいくつかの態様において、領域X（例えば、C）または（X-Y）、例えばコンジュゲート（例えば、GalNAcコンジュゲート）は、活性化基（活性化された官能基）を含み、合成の方法において、活性化されたコンジュゲート（または領域XまたはX-Y）が、第1領域および第2領域、例えば、アミノによって連結されたオリゴマーに付加される。アミノ基は、標準的なホスホラミダイト化学によって、例えば、（典型的には、オリゴマーの5'末端にアミノ基をもたす）オリゴマー合成の最終工程として、オリゴマーに付加され得る。例えば、オリゴヌクレオチド合成の最終工程において、保護されたアミノ-アルキルホスホラミダイト、例えば、TFA-アミノC6ホスホラミダイト（6-(トリフルオロアセチルアミノ)-ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホラミダイト）が使用される。領域X（または本明細書において言及される領域C）、例えばコンジュゲート（例えば、GalNAcコンジュゲート）は、NHSエステル法を介して活性化され得、次いで、アミノによって連結されたオリゴマーが付加される。例えば、N-ヒドロキシサクシニミド（NHS）が、領域X（または領域C）、例えばコンジュゲート、例えばGalNAcコンジュゲート部分のための活性化基として使用され得る。本発明は、本発明の方法によって調製されたオリゴマーを提供する。

10

【0035】

いくつかの態様において、領域Xおよび/または領域Xまたは領域XおよびYは、ホスフェートヌクレオシド連結、例えば、本明細書に記載されたもの、例えば、ホスホジエステルもしくはホスホトリオエートを介して、または代替的な基、例えば、トリアゾール基を介して、領域Bに共有結合で接合（連結）され得る。

20

【0036】

本発明は、本発明のオリゴマー化合物を含む薬学的組成物を治療的に有効な量で対象へ投与する工程を含む、処置を必要とする対象における疾患または障害の処置の方法を提供する。

【0037】

本発明は、本発明によるオリゴマー化合物を、細胞における標的遺伝子の発現を低下させるのに有効な量で、適切に、標的遺伝子を発現している細胞へ投与する工程を含む、細胞における標的遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、インビトロ、即ち、生物の体外で行われるが、（例えば、エキスピボの）細胞または組織において行われてもよい。いくつかの態様において、方法はインビボである。

30

【0038】

本発明は、8~24個のホスホトリオエートによって連結されたヌクレオシドの連続領域を含み、LNAオリゴマーと連続している1~6個のDNAヌクレオシドをさらに含むLNAオリゴマーも提供する。DNA間の、かつ/またはDNAヌクレオシドに隣接したヌクレオシド間連結は、生理学的に不安定なものであり、例えば、ホスホジエステル連結である。そのようなLNAオリゴマーは、本明細書に記載されるコンジュゲートの形態をとっていてもよいし、または、例えば、その後のコンジュゲーション工程において使用される中間体であってもよい。コンジュゲートされる時、コンジュゲートは、例えば、ステロール、例えば、コレステロールもしくはトコフェロールであるかもしくはそれを含んでいてもよいし、または（非ヌクレオチド）炭水化物、例えば、GalNAcコンジュゲート、例えば、GalNAcクラスタ、例えば、トリGalNAc、もしくは本明細書に記載される他のコンジュゲートであるかもしくはそれを含んでいてもよい。

40

【0039】

本発明は、アンチセンスオリゴマーと、さらなる領域（領域Cと呼ばれる）の一部を形成し得るアシアロ糖タンパク質受容体ターゲティング部分コンジュゲート部分、例えば、GalNAc部分とを含む、LNAアンチセンスオリゴマー（本明細書において領域Aと呼ばれ得る）を提供する。LNAアンチセンスオリゴマーは、7~30ヌクレオシド長、例えば、8~26ヌクレオシド長であり得、少なくとも1個のLNA単位（ヌクレオシド）を含む。

【0040】

本発明は、（非ヌクレオシド）炭水化物部分、例えば、炭水化物コンジュゲート部分に

50

共有結合で接合された（例えば、連結された）LNAアンチセンスオリゴマーを提供する。いくつかの態様において、炭水化物部分は、直鎖状の炭水化物ポリマーではない。しかしながら、炭水化物部分は、多価、例えば、2価、3価、4価であってもよいし、または4個の同一のもしくは同一でない炭水化物部分が、任意でリンカーを介して、オリゴマーに共有結合で接合されていてもよい。

【0041】

本発明は、アンチセンスオリゴマーと、炭水化物を含むコンジュゲート部分、例えば、炭水化物コンジュゲート部分とを含む、LNAアンチセンスオリゴマー（コンジュゲート）を提供する。

【0042】

本発明は、本発明のLNAオリゴマー化合物と、薬学的に許容される希釈剤、担体、塩、または佐剤とを含む、薬学的組成物を提供する。

【0043】

本発明は、細胞における核酸標的の阻害において使用するための、本発明によるオリゴマー化合物を提供する。いくつかの態様において、使用はインビトロである。いくつかの態様において、使用はインビボである。

【0044】

本発明は、医療において使用するための、例えば、医薬として使用するための、本発明のオリゴマー化合物を提供する。

【0045】

本発明は、医学的な疾患または障害の処置において使用するための、本発明のオリゴマー化合物を提供する。

【0046】

本発明は、疾患または障害、例えば、代謝疾患または代謝障害の処置のための医薬の調製のための、本発明のオリゴマー化合物の使用を提供する。

[本発明1001]

以下の3種の領域：

(i) 7~26個の連続ヌクレオチドを含む第1領域（領域A）；

(ii) 例えば、ヌクレオシド間連結基、例えばホスホジエステル連結を介して、第1領域の5'ヌクレオチドまたは3'ヌクレオチドに共有結合で連結された1~10個のヌクレオチドを含む第2領域（領域B）、ここで、

(a) 第1領域と第2領域との間のヌクレオシド間連結がホスホジエステル連結であり、第1領域に隣接した第2領域のヌクレオシドがDNAもしくはRNAのいずれかであり；かつ／または

(b) 第2領域の少なくとも1個のヌクレオシドがホスホジエステルによって連結されたDNAヌクレオシドもしくはRNAヌクレオシドである；

(iii) コンジュゲート部分、ターゲティング部分、反応基、またはブロッキング部分を含み、第2領域に共有結合で連結されている、第3領域を含む、8~35ヌクレオチド長のオリゴマー化合物。

[本発明1002]

第1領域のヌクレオシド間連結が、ホスホジエステル以外のヌクレオシド間連結を少なくとも1個含み、例えば、領域A内のヌクレオシド間連結のうちの、少なくとも1個、例えば少なくとも50%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも90%、例えば100%が、ホスホジエステル以外である、本発明1001のオリゴマー。

[本発明1003]

ホスホジエステル以外のヌクレオシド間連結が、硫黄含有ヌクレオシド間連結、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、およびボラノホスフェート、例えば、ホスホロチオエートである、本発明1001または1002のオリゴマー。

[本発明1004]

第1領域が、核酸標的に相補的な配列を含むアンチセンスオリゴマーである、本発明100

10

20

30

40

50

1～1003のいずれかのオリゴマー。

[本発明1005]

前記核酸標的が、マイクロRNA、mRNAからなる群より選択される、本発明1004のオリゴマー。

[本発明1006]

第1領域が、少なくとも1個のヌクレオシド類似体を含む、本発明1001～1005のいずれかのオリゴマー。

[本発明1007]

例えば、第1領域が、ギャップマー（gapmer）、ミックスマー（mixmer）、またはトータルマー（totalmer）を含む、本発明1006のオリゴマー。

10

[本発明1008]

例えば、第1領域が、少なくとも1個の二環式ヌクレオチド類似体（LNA）を含む、本発明1006または1007のオリゴマー。

[本発明1009]

第1領域および第2領域が連続ヌクレオチド配列を形成する、本発明1001～1008のいずれかのオリゴマー。

[本発明1010]

第2領域が第1領域の5'に在る、本発明1001～1009のいずれかのオリゴマー。

[本発明1011]

第2領域が第1領域の3'に在る、本発明1001～1009のいずれかのオリゴマー。

20

[本発明1012]

第2領域が、ホスホジエステル連結によって連結され得る、DNA単位およびRNA単位の群より選択される連続ヌクレオシド単位を、少なくとも2個、例えば少なくとも3個含む、本発明1001～1011のいずれかのオリゴマー。

[本発明1013]

第2領域が、第2領域の末端ヌクレオシド（即ち、第1領域の位置に依って、3'末端または5'末端）において第3領域に共有結合で連結されている、本発明1001～1012のいずれかのオリゴマー。

[本発明1014]

第3領域が、非ヌクレオチド部分、例えばコンジュゲート基、例えばステロール、例えばコレステロール、または炭水化物、例えばGalNac/GalNacクラスタを含む、本発明1001～1013のいずれかのオリゴマー。

30

[本発明1015]

第3領域が、親油基（例えば、脂質、脂肪酸、ステロール）、タンパク質、ペプチド、抗体またはその断片、ポリマー、レポーター基、色素、受容体リガンド、小分子薬物、プロドラッグ、およびビタミンからなる群より選択される部分を含む、本発明1014のオリゴマー。

[本発明1016]

第3領域が、核酸もしくはそのポリマー、例えばアプタマー、またはブロッキングヌクレオチド配列を含む、本発明1001～1013のいずれかのオリゴマー。

40

[本発明1017]

第3領域がターゲティング基を含む、本発明1001～1016のいずれかのオリゴマー。

[本発明1018]

第3領域が活性化された基を含む、本発明1001～1013のいずれかのオリゴマー。

[本発明1019]

第2領域および第3領域が、リンカー基によって共有結合で接合されている、本発明1001～1018のいずれかのオリゴマー。

[本発明1020]

第2領域と第3領域との間のリンカー基が、ホスホジエステル基、ホスホロチオエート基、ホスホロジチオエート基、またはボラノホスフェート基より選択される基、例えば、ホ

50

スホジエステル基を含む、本発明1001～1019のいずれかのオリゴマー。

[本発明1021]

前記本発明のいずれかのオリゴマー化合物と、薬学的に許容される希釈剤、担体、塩、または佐剤とを含む薬学的組成物。

[本発明1022]

細胞における核酸標的の阻害において使用するための、前記本発明のいずれかのオリゴマー化合物。

[本発明1023]

医薬において使用するための、前記本発明のいずれかのオリゴマー化合物。

[本発明1024]

医学的な疾患または障害の処置において使用するための、前記本発明のいずれかのオリゴマー化合物。

[本発明1025]

疾患または障害、例えば、代謝疾患または代謝障害の処置のための医薬の調製のための、前記本発明のいずれかのオリゴマー化合物の使用。

[本発明1026]

本発明1001～1025において定義される、第1領域、第2領域、および第3領域を含み、任意で、リンカー領域(Y)を含むオリゴマー化合物を合成する方法であって、

(a) 以下のうちの一つ [第3領域] :

(i) リンカー基(-Y-)、

(ii) コンジュゲート、ターゲティング基、ブロッキング基、反応基 [例えば、アミンもしくはアルコール]、または活性化基からなる群より選択される基(X-)、

(iii) -Y-X基

が付着している [固相] オリゴヌクレオチド合成支持体を準備する工程、ならびに

(b) 領域B、続いて、領域Aの [逐次] オリゴヌクレオチド合成の工程、ならびに / または

(c) 第1領域(A) および第2領域(B) の [逐次] オリゴヌクレオチド合成の工程を含み、合成工程に続いて、

(d) 第3領域 [ホスホラミダイトを含む] である、

(i) リンカー基(-Y-)、

(ii) コンジュゲート、ターゲティング基、ブロッキング基、反応基 [例えば、アミンもしくはアルコール]、または活性化基からなる群より選択される基(X-)、

(iii) -Y-X基

を付加する工程、それに続いて、

(e) [固相] 支持体からオリゴマー化合物を切断する工程を含み、任意で、

(f) 第3の基が活性化基であり、反応基を生成するため活性化基を活性化し、続いて、任意でリンカー基(Y)を介して、コンジュゲート基、ブロッキング基、またはターゲティング基を反応基に付加する工程 ;

(g) 第3領域が反応基であり、任意でリンカー基(Y)を介して、コンジュゲート基、ブロッキング基、またはターゲティング基を反応基に付加する工程、

(h) 第3領域がリンカー基(Y)であり、コンジュゲート基、ブロッキング基、またはターゲティング基をリンカー基(Y)に付加する工程

より選択されるさらなる工程

をさらに含み、

工程(f)、(g)、または(h)が、オリゴヌクレオチド合成支持体からのオリゴマー化合物の切断の前または後のいずれかに実施される、方法。

[本発明1027]

本発明のオリゴマー化合物を含む薬学的組成物を治療的に有効な量で対象へ投与する工程を含む、処置を必要とする対象における疾患または障害の処置の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1028]

本発明によるオリゴマー化合物を、細胞における標的遺伝子の発現を低下させるのに有効な量で、適切に、標的遺伝子を発現している細胞へ投与する工程を含む、細胞における標的遺伝子の発現を阻害する方法。

【図面の簡単な説明】【0047】

【図1】活性化基(すなわち保護された反応基 - 第3の領域として)に付着された本発明のオリゴマーの非限定的な図解。ヌクレオシド間結合Lは、例えばホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェートまたはメチルホスホネート、例えばホスホジエステルでありうる。POはホスホジエステル結合である。化合物(a)は、単一のDNAまたはRNAを有する領域Bを有し、第2の領域と第1の領域との間の結合はPOである。化合物(b)は、ホスホジエステル結合によって連結された2つのDNA/RNA (例えばDNA)ヌクレオシドを有する。化合物(c)は、ホスホジエステル結合によって連結された3つのDNA/RNA (例えばDNA)ヌクレオシドを有する。いくつかの態様において、領域BはさらなるホスホジエステルDNA/RNA (例えばDNAヌクレオシド)によってさらに伸長されうる。活性化基は各化合物の左側に図解されており、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基、またはいくつかの態様において、トリアゾール結合を介して領域Bの末端ヌクレオシドに任意で連結されてもよい。化合物(d)、(e)、および(f)は領域Bと活性化基との間にリンカー(Y)をさらに含み、領域Yは、例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基、またはいくつかの態様において、トリアゾール結合を介して領域Bに連結されうる。

【図2】図1に示されたのと等価な化合物; しかしながら活性化基の代わりに反応基が用いられている。反応基は、いくつかの態様において活性化基の活性化(例えば脱保護)の結果でありうる。反応基は、非限定的な例において、アミンまたはアルコールでありうる。

【図3】本発明の化合物の非限定的な図解。図1と同じ用語体系。Xはいくつかの態様において、コレステロールなどの親油性コンジュゲート、または本明細書において記述されるものなどの別のコンジュゲートのような、コンジュゲートでありうる。加えて、またはあるいは、Xはターゲティング基またはブロッキング基でありうる。いくつかの局面において、Xは活性化基(図1参照)、または反応基(図2参照)でありうる。Xは、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基を介して領域Bに共有結合的に付着されてもよく、または代替的な結合、例えばトリアゾール結合を介して連結されてもよい(化合物(d)、(e)、および(f)中のLを参照のこと)。

【図4】第3の領域(X)と第2の領域(領域B)との間に任意選択的なリンカーを含む、本発明の化合物の非限定的な図解である。図1と同じ用語体系。適当なリンカーは、本明細書において開示されており、例えばアルキルリンカー、例えばC6リンカーを含む。化合物A、B、およびCにおいて、Xと領域Bとの間のリンカーは、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基を介して領域Bに付着されるか、または代替的な結合、例えばトリアゾール結合(Li)を介して連結されてもよい。これらの化合物において、Liiは第1の領域(A)と第2の領域(B)との間のヌクレオシド間結合を表す。

【図5】5bは、本発明の化合物の合成方法の非限定的な例を示す。USはオリゴヌクレオチド合成支持体を表し、これは固体支持体であってよい。Xは第3の領域、例えばコンジュゲート、ターゲティング基、ブロッキング基などである。任意選択的な前段階において、Xはオリゴヌクレオチド合成支持体に付加される。そうでなければ、Xが既に付着されている支持体を得てもよい(i)。第1の段階において、領域Bが合成され(ii)、引き続いて領域Aが合成され(iii)、その後オリゴヌクレオチド合成支持体からの本発明のオリゴマー化合物の切断が行われる(iv)。代替的な方法において、前段階は、領域Xおよびリンカー基(

Y)が付着されているオリゴヌクレオチド合成支持体の提供を伴う(図5aを参照のこと)。いくつかの態様において、XまたはY(存在する場合)のどちらかがホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基、またはトリアゾール結合のような、代替的な結合を介して領域Bに付着される。

【図6】第3の領域(X)と第2の領域(B)との間にリンカー(Y)を含む、本発明の化合物の合成方法の非限定的な例。USはオリゴヌクレオチド合成支持体を表し、これは固体支持体であってよい。Xは第3の領域、例えばコンジュゲート、ターゲティング基、ブロッキング基などである。任意選択的な前段階において、Yはオリゴヌクレオチド合成支持体に付加される。そうでなければ、Yが既に付着されている支持体を得てもよい(i)。第1の段階において、領域Bが合成され(ii)、引き続いて領域Aが合成され(iii)、その後にオリゴヌクレオチド合成支持体からの本発明のオリゴマー化合物の切断が行われる(iv)。いくつかの態様(示した通り)において、領域Xは切断段階の後にリンカー(Y)に付加されうる(v)。いくつかの態様において、Yはホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基、またはトリアゾール結合のような、代替的な結合を介して領域Bに付着される。

【図7】活性化基を利用する、本発明の化合物の合成方法の非限定的な例。任意選択的な前段階において、活性化基がオリゴヌクレオチド合成支持体に付着される(i)か、または活性化基を有するオリゴヌクレオチド合成支持体が別の方法で得られる。段階(ii)において、領域Bが合成され、その後に領域Aが合成される(iii)。オリゴマーが次に、オリゴヌクレオチド合成支持体から切断される(iv)。中間体のオリゴマー(活性化基を含む)がその後活性化されて(vi)または(viii)、第3の領域(X)が付加され(vi)、付加は任意でリンカー(Y)を介する(ix)。いくつかの態様において、X(または存在する場合にはY)はホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基、またはトリアゾール結合のような、代替的な結合を介して領域Bに付着される。

【図8】二官能性オリゴヌクレオチド合成支持体が用いられる(i)、本発明の化合物の合成方法の非限定的な例。そのような方法において、いずれのオリゴヌクレオチドも初期の一連の段階(ii)~(iii)において合成され、続いて(任意でリンカー基Yを介して)第3の領域の付着が行われ、本発明のオリゴマー化合物がその後、切断されうる(v)。あるいは、段階(vi)~(ix)において示されるように、第3の領域(任意でリンカー基(Y)を有する)が、オリゴヌクレオチド合成支持体に付着され(これは任意選択的な前段階でありうる) - または、第3の領域(任意でYを有する)を有するオリゴヌクレオチド合成支持体が別の方法で提供され、オリゴヌクレオチドがその後、合成される(vii~viii)。本発明のオリゴマー化合物がその後、切断されうる(ix)。いくつかの態様において、X(または存在する場合にはY)はホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基、またはトリアゾール結合のような、代替的な結合を介して領域Bに付着される。USはいくつかの態様において、(前段階のような)方法の前に、オリゴヌクレオチドの独立合成ならびに基X、Y(またはXおよびY)の共有結合性の付着を可能にする双方向性(二官能性)基を支持体に付加する段階を含みうる(表示の通り) - これは、例えば、トリアゾールまたはヌクレオシド基を用いて達成されうる。オリゴマーが付着された、双方向性(二官能性)基がその後、支持体から切断されうる。

【図9】本発明の化合物の合成方法の非限定的な例：初期段階において、第1の領域(A)が合成され(ii)、続いて領域Bが合成される。いくつかの態様において、第3の領域がその後、任意でリン酸ヌクレオシド結合(または例えばトリアゾール結合)を介して、領域Bに付着される(iii)。本発明のオリゴマー化合物がその後、切断されうる(iv)。リンカー(Y)が用いられる場合、いくつかの態様において、段階(v)~(viii)が続けて行われうる：領域Bの合成後、リンカー基(Y)が付加され、その後に、(Y)に付着されるか、または後続の段階において、領域Xが付加される(vi)。本発明のオリゴマー化合物がその後、切断されうる(

10

20

30

40

50

vii)。いくつかの態様において、X (または存在する場合にはY)はホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基、またはトリアゾール結合のような、代替的な結合を介して領域Bに付着される。

【図10】本発明の化合物の合成方法の非限定的な例：この方法において、活性化基が用いられる：段階(i)~(iii)は図9の通りである。しかしながら、オリゴヌクレオチド合成の後(段階iii)、活性化基(または反応基)が、任意でリン酸ヌクレオシド結合を介して、領域Bに付加される。オリゴヌクレオチドがその後、支持体から切断される(v)。活性化基をその後、活性化して反応基をもたらすことができ、その後、第3の領域(X)、例えばコンジュゲート、ブロッキング基、またはターゲティング基を反応基(これは活性化された活性化基または反応基でありうる)に付加して、オリゴマーをもたらす(vi)。(vii)~(viii)に示されるように、切断後、リンカー基(Y)が付加され(vii)、その後に、(Y)に付着されるか、または後続の段階において、領域Xが付加されて、オリゴマーをもたらす(viii)。代替手段においては、段階(ii)~(viii)の全てがオリゴヌクレオチド合成支持体上で行われてもよく、そのような場合には、支持体からオリゴマーを切断する最終段階が行われてもよいことが認識されるべきである。いくつかの態様において、反応基または活性化基はホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネートのような、リンヌクレオシド結合基、またはトリアゾール結合のような、代替的な結合を介して領域Bに付着される。

【図11】インビボでのコレステロールコンジュゲートによるアポB mRNAのサイレンシング。マウスに単回用量の1 mg/kgの非コンジュゲートLNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド(#3833)、または等モル量の、さまざまなリンカーでコレステロールにコンジュゲートされたLNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを注射し(表3)、投薬後1、3、7、および10日に殺処理した。RNAを肝臓および腎臓から単離し、アポB特異的なRT-qPCRに供した。A. GAPDHに対して正規化し、等価な生理食塩水対照の平均の割合として示した肝臓サンプル由来アポB mRNAの定量化。B. GAPDHに対して正規化し、等価な生理食塩水対照の平均の割合として示した腎臓サンプル由来アポB mRNAの定量化。

【図12-1】本発明の化合物においてX-Y-として用いられうるコレステロールC6コンジュゲート、ならびに本発明の特定化合物を含む、実施例において用いられる特定化合物を示す。

【図12-2】本発明の化合物においてX-Y-として用いられうるコレステロールC6コンジュゲート、ならびに本発明の特定化合物を含む、実施例において用いられる特定化合物を示し、図12-1の続きである。

【図12-3】本発明の化合物においてX-Y-として用いられうるコレステロールC6コンジュゲート、ならびに本発明の特定化合物を含む、実施例において用いられる特定化合物を示し、図12-2の続きである。

【図12-4】本発明の化合物においてX-Y-として用いられうるコレステロールC6コンジュゲート、ならびに本発明の特定化合物を含む、実施例において用いられる特定化合物を示し、図12-3の続きである。

【図12-5】本発明の化合物においてX-Y-として用いられうるコレステロールC6コンジュゲート、ならびに本発明の特定化合物を含む、実施例において用いられる特定化合物を示し、図12-4の続きである。

【図13-1】実験において用いられるコレステロール、三価GalNac、FAM、葉酸、一価GalNac、およびトコフェロールコンジュゲート(例えば図12の化合物)の例。

【図13-2】実験において用いられるコレステロール、三価GalNac、FAM、葉酸、一価GalNac、およびトコフェロールコンジュゲート(例えば図12の化合物)の例であり、図13-1の続きである。

【図14】インビボでのコレステロールコンジュゲートによるアポB mRNAのサイレンシング。マウスに単回用量の1 mg/kgの非コンジュゲートLNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド(#3833)、または等モル量の、さまざまなリンカーでコレステロールにコンジュゲート

されたLNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを注射し(表3)、投薬後1、3、7、10、13および16日目に殺処理した。RNAを肝臓および腎臓から単離し、アポB特異的なRT-qPCRに供した。A. GAPDHに対して正規化し、等価な生理食塩水対照の平均の割合として示した肝臓サンプル由来アポB mRNAの定量化。B. GAPDHに対して正規化し、等価な生理食塩水対照の平均の割合として示した腎臓サンプル由来アポB mRNAの定量化。

【図15】インビボでの肝臓および腎臓中の特異的LNAオリゴヌクレオチドの含量。マウスに単回用量の1 mg/kgの非コンジュゲートLNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド(#1)、または等モル量の、さまざまなリンカーでコレステロールにコンジュゲートされたLNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを注射し(表4)、投薬後1、3、7、10、13および16日目に殺処理した。LNAに基づくサンドイッチELISA法を用いてLNAオリゴヌクレオチド含量を測定した。

10

【図16】インビボでのコレステロールコンジュゲートによるPCSK9 mRNAのサイレンシング。マウスに単回用量の10 mg/kgの非コンジュゲートLNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド(#7)、または等モル量の、さまざまなリンカーでコレステロールにコンジュゲートされたLNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを注射し(表5)、投薬後1、3、7および10日目に殺処理した。RNAを肝臓および腎臓から単離し、PCSK9特異的なRT-qPCRに供した。A. BACTに対して正規化し、等価な生理食塩水対照の平均の割合として示した肝臓サンプル由来PCSK9 mRNAの定量化。B. BACTに対して正規化し、等価な生理食塩水対照の平均の割合として示した腎臓サンプル由来PCSK9 mRNAの定量化。

【図17-1】用いられうるトリ-GalNacコンジュゲートの例。コンジュゲート1~4は4つの適当なGalNacコンジュゲート部分を図示し、コンジュゲート1a~4aは、同じコンジュゲートであって、コンジュゲートをオリゴマー(領域Aまたは生物切断性(biocleavable)リンカー、例えば領域B)に連結させるために用いられるさらなるリンカー部分(Y)を有するものを示す。波線はオリゴマーへの共有結合を表す。コレステロールおよびトコフェロールコンジュゲート部分の例も示される(5aおよび6a)。波線はオリゴマーへの共有結合を表す。

20

【図17-2】用いられうるトリ-GalNacコンジュゲートの例であり、図17-1の続きである。コンジュゲート1~4は4つの適当なGalNacコンジュゲート部分を図示し、コンジュゲート1a~4aは、同じコンジュゲートであって、コンジュゲートをオリゴマー(領域Aまたは生物切断性リンカー、例えば領域B)に連結させるために用いられるさらなるリンカー部分(Y)を有するものを示す。波線はオリゴマーへの共有結合を表す。コレステロールおよびトコフェロールコンジュゲート部分の例も示される(5aおよび6a)。波線はオリゴマーへの共有結合を表す。

30

【図17-3】用いられうるトリ-GalNacコンジュゲートの例であり、図17-2の続きである。コンジュゲート1~4は4つの適当なGalNacコンジュゲート部分を図示し、コンジュゲート1a~4aは、同じコンジュゲートであって、コンジュゲートをオリゴマー(領域Aまたは生物切断性リンカー、例えば領域B)に連結させるために用いられるさらなるリンカー部分(Y)を有するものを示す。波線はオリゴマーへの共有結合を表す。コレステロールおよびトコフェロールコンジュゲート部分の例も示される(5aおよび6a)。波線はオリゴマーへの共有結合を表す。

40

【図17-4】用いられうるトリ-GalNacコンジュゲートの例であり、図17-3の続きである。コンジュゲート1~4は4つの適当なGalNacコンジュゲート部分を図示し、コンジュゲート1a~4aは、同じコンジュゲートであって、コンジュゲートをオリゴマー(領域Aまたは生物切断性リンカー、例えば領域B)に連結させるために用いられるさらなるリンカー部分(Y)を有するものを示す。波線はオリゴマーへの共有結合を表す。コレステロールおよびトコフェロールコンジュゲート部分の例も示される(5aおよび6a)。波線はオリゴマーへの共有結合を表す。

【図18】実施例7a: FVIIの血清中タンパク質レベル

【図19】実施例7a: 4日目の肝臓中のFVII mRNAレベル

【図20】実施例7a: 4日目の肝臓および腎臓中のオリゴヌクレオチド含量

50

【図 2 1】実施例7b - FVIIの血清中タンパク質レベル

【図 2 2】24日目の肝臓中のFVII mRNAレベル

【図 2 3】4日目の肝臓および腎臓中のオリゴヌクレオチド含量

【図 2 4】さまざまなコンジュゲートおよびPO-リンカーによるアポB mRNAのインビボ・サイレンシング。生物切断性リンカーを有しないか、ジチオ-リンカー(SS)を有するか、またはDNA/PO-リンカー(PO)を有するかのいずれかでさまざまなコンジュゲートを有するASO 1 mg/kgでマウスを処置した。RNAを肝臓(A)および腎臓サンプル(B)から単離し、アポB mRNAノックダウンについて分析した。データを生理食塩水(=1)と比べて示す。

【図 2 5】PO-リンカーを有するループLNA ASOによる標的X mRNAのインビトロ・サイレンシング。それぞれ、PO-リンカーを有するまたはPO-リンカーを有しないループLNA ASOでNeuro 2a細胞を処理した。6日後、ジムノシス(gymnosis) mRNAを抽出し、標的X mRNAノックダウンについて分析した。mRNA発現をモック処理サンプルの割合として示す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

発明の説明

本発明は、(例えば、1~10個の)ホスホジエステルによって連結されたDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドを含む短い領域を介して、コンジュゲート基、ターゲティング基、反応基、活性化基、またはブロッキング基に共有結合で連結されたオリゴマー化合物、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。

【0049】

オリゴマー

本発明は、細胞内の標的核酸の調節、例えば、阻害において使用するため、(本明細書においてオリゴマーとも呼ばれる)オリゴマー化合物を利用する。オリゴマーは、8~35個の連続するヌクレオチドの長さを有してもよく、7~25個の連続するヌクレオチドの第1領域、および1~10個の連続するヌクレオチドの第2領域を含み、例えば、第1領域と第2領域との間のヌクレオシド間連結が、第2領域の最初の(または唯一の)DNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドにホスホジエステルによって連結されているか、または領域Bが、少なくとも1個のホスホジエステルによって連結されたDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドを含む。

【0050】

第2領域は、いくつかの態様において、ホスホジエステルによって連結され得るさらなるDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドを含み得る。第2領域は、例えば、コンジュゲート、ターゲティング基、反応基、および/またはブロッキング基であり得る第3領域に、さらに共有結合で連結されている。

【0051】

いくつかの局面において、本発明は、第1領域、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドと、コンジュゲート基または官能基、例えば、ターゲティング基またはブロッキング基とを連結する、不安定領域である第2領域の提供に基づく。不安定領域は、少なくとも1個のホスホジエステルによって連結されたヌクレオシド、例えば、DNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシド、例えば1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のホスホジエステルによって連結されたヌクレオシド、例えばDNAまたはRNAを含む。いくつかの態様において、オリゴマー化合物は、切断可能(不安定)リンカーを含む。この点で、切断可能リンカーは、好ましくは、領域B内(または、いくつかの態様において、領域Aと領域Bとの間)に存在する。

【0052】

本発明に関して「オリゴマー」という用語は、2個以上のヌクレオチドの共有結合によって形成された分子(即ち、オリゴヌクレオチド)をさす。本明細書において、単一のヌクレオチド(単位)は、モノマーまたは単位とも呼ばれ得る。いくつかの態様において、「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」、「単位」、および「モノマー」という用語は、交換可能に使用される。ヌクレオチドまたはモノマーの配列に言及する時、言及されるのは

10

20

30

40

50

、A、T、G、C、またはUのような塩基の配列であることが認識されるであろう。

【0053】

オリゴマーは、8~25ヌクレオチド長、例えば、9ヌクレオチド長、10ヌクレオチド長、11ヌクレオチド長、12ヌクレオチド長、13ヌクレオチド長、14ヌクレオチド長、15ヌクレオチド長、16ヌクレオチド長、17ヌクレオチド長、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、21ヌクレオチド長、22ヌクレオチド長、23ヌクレオチド長、24ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、例えば、10~20ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列からなるかまたはそれを含む。

【0054】

様々な態様において、本発明の化合物は、RNA（単位）を含まない。いくつかの態様において、本発明による化合物、第1領域、または（例えば、単一の連続配列として）第1領域と第2領域とを合わせたものは、直鎖状分子であるかまたは直鎖状分子として合成される。従って、オリゴマーは、一本鎖分子であり得る。いくつかの態様において、オリゴマーは、同一オリゴマー内の等価な領域に相補的である短い領域、例えば、少なくとも3連続ヌクレオチド、4連続ヌクレオチド、または5連続ヌクレオチドの領域（即ち、二重鎖）を含まない。オリゴマーは、いくつかの態様において、（本質的に）二本鎖でなくてよい。いくつかの態様において、オリゴマーは、本質的に、二本鎖でなく、例えば、siRNAでない。

10

【0055】

いくつかの態様において、オリゴマーは、同一第1領域内の領域に相補的である短い領域、例えば、少なくとも3連続ヌクレオチド、4連続ヌクレオチド、または5連続ヌクレオチドの領域（即ち、領域内二重鎖）を含まない第1領域を含み得る。この点で、第1オリゴマーは、いくつかの態様において、非共有結合で連結された相補鎖とのハイブリダイゼーションを形成し得ず、例えば、siRNAの一部を形成しない。

20

【0056】

例えば、いくつかの態様において、例えば、第1領域がsiRNAの一部を形成する時、または、例えば、第3領域がアプタマーもしくはブロックングオリゴヌクレオチドを含む時、オリゴマー化合物は、相補的な領域を含み、本発明のオリゴマー化合物は、いくつかの態様において、二本鎖核酸の領域を含み得る。そのような態様において、例えば、少なくとも3ヌクレオチド長、例えば、少なくとも4ヌクレオチド長、例えば、少なくとも5ヌクレオチド長、例えば、少なくとも6ヌクレオチド長の二重鎖を形成する二本鎖核酸の領域が、第3領域内、もしくは第3領域と、例えば、第1領域との間にあり得、または、いくつかの態様において、第2領域、もしくは第1領域および第2領域にかかる領域にあり得る（例えば、第3領域がオリゴヌクレオチドブロックング領域を含む時）。

30

【0057】

いくつかの態様において、オリゴマー化合物は、（実質的に）相補的なオリゴヌクレオチドとの二重鎖の形態になく、例えば、siRNAでない。

【0058】

いくつかの態様において、オリゴマー化合物は、アンチセンスオリゴマーと、本明細書において定義される領域Bと、炭水化物コンジュゲート（領域Cと呼ばれ得る）とを含む、LNAオリゴマー、例えば、LNAアンチセンスオリゴマー（本明細書において領域Aと呼ばれ得る）である。LNAアンチセンスオリゴマーは、7~30ヌクレオシド長、例えば、8~26ヌクレオシド長であり得、少なくとも1個のLNA単位（ヌクレオシド）を含む。いくつかの態様において、炭水化物部分は、直鎖状の炭水化物ポリマーでない。

40

【0059】

いくつかの態様において、オリゴマー化合物は、アンチセンスオリゴマーと、本明細書において定義される領域Bと、アシアロ糖タンパク質受容体ターゲティング部分コンジュゲート部分、例えば、GalNAc部分（領域Cと呼ばれ得る）とを含む、LNAオリゴマー、例えば、LNAアンチセンスオリゴマー（本明細書において領域Aと呼ばれ得る）である。炭水化物部分は、多価、例えば、2価、3価、4価であってもよいし、または4個の同一のもしくは

50

非同一の炭水化物部分が、任意で（領域Yのような）リンカーを介して、オリゴマーに共有結合で接合されていてもよい。

【0060】

第1領域

いくつかの態様において、第1領域は、核酸ベースのオリゴマー、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様において、第1領域は、7~25ヌクレオチド長のホスホロチオエートによって連結されたオリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。第1領域は、少なくとも1個の修飾型ヌクレオシド（ヌクレオシド類似体）、例えば、少なくとも1個の二環式ヌクレオシド（例えば、LNA）または2'置換ヌクレオシドを含み得る。いくつかの態様において、第1領域のヌクレオシドのいくつかまたは全部が、本明細書においてヌクレオシド類似体とも呼ばれる修飾型ヌクレオシドであり得る。いくつかの態様において、修飾型ヌクレオシドは、糖修飾型である（例えば、リボースまたはデオキシリボース以外の糖または糖代替部分を含む）。

10

【0061】

いくつかの態様において、第1領域は、核酸標的に相補的な配列を含むアンチセンスオリゴマー（アンチセンスオリゴヌクレオチド）、例えば、一本鎖オリゴマーである。

【0062】

いくつかの態様において、第1領域は、ギャップマーを含むかまたはギャップマーである。いくつかの態様において、第1領域は、ミックスマー（mixmer）を含むかまたはミックスマーである。いくつかの態様において、第1領域は、トータルマー（totalmer）を含むかまたはトータルマーである。

20

【0063】

いくつかの態様において、第1領域は、少なくとも1個、例えば、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20個、少なくとも21個、少なくとも22個、少なくとも23個、少なくとも24個、または25個のヌクレオシド類似体を含む。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、（任意で独立に）二環式ヌクレオシド類似体（例えば、LNA）および/または2'置換ヌクレオシド類似体からなる群より選択され、例えば、（任意で独立に）2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-AP、2'-FANA、2'-(3-ヒドロキシ)プロピル、および2'-フルオロ-DNA単位、ならびに/またはその他の（任意での）糖修飾型ヌクレオシド類似体、例えば、モルホリノ、ペプチド核酸（PNA）、CeNA、アンリンクト（unlinked）核酸（UNA）、ヘキシトール核酸（HNA）、ピシクロ-HNA（例えば、WO2009/100320を参照）からなる群より選択される。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、その標的核酸（または相補的なDNA配列もしくはRNA配列）に対する第1領域の親和性を増加させる。様々なヌクレオシド類似体が、参照によって本明細書に組み入れられるFreier & Altman; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443およびUhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213に開示されている。

30

40

【0064】

いくつかの態様において、オリゴマー、例えば、その第1領域、例えば、ギャップマー、ミックスマー、またはトータルマーは、少なくとも1個の二環式ヌクレオチド類似体、例えば、LNAを含む。いくつかの態様において、第1領域は、少なくとも1個の二環式ヌクレオシド類似体（例えば、LNA）および/または2'置換ヌクレオシド類似体を含む。いくつかの態様において、第1領域内に存在するヌクレオシド類似体は、全て、同一の糖修飾を含む。いくつかの態様において、第1領域内に存在する少なくとも1個のヌクレオシド類似体は、二環式ヌクレオシド類似体であり、例えば、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なく

50

とも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、例えば、全てのヌクレオシド類似体（またはトータルマーにおいては、全てのヌクレオシド）が、二環式ヌクレオシド類似体、例えば、LNA、例えば、 $-D-X-LNA$ もしくは $-L-X-LNA$ （Xは、オキシ、アミノ、もしくはチオである）、または以下に限定されないが、(R/S)cET、cMOE、もしくは5'-Me-LNAを含む、本明細書に開示されたその他のLNAである。いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、DNA、ならびに糖修飾型ヌクレオシド類似体、例えば、二環式ヌクレオシド類似体および/または2'置換ヌクレオシド類似体を含む。いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、DNAおよびLNAヌクレオシド類似体を含む。

【0065】

WO05013901、WO07/027775、WO07027894は、完全2'-O-MOEのような完全2'置換オリゴマーに言及している。いくつかの態様において、オリゴマーの第1領域は、2'置換ヌクレオシドを含み得る。WO07/027775は、マイクロRNAを標的とするために使用するためのMOE、LNA、DNAミックスマーにも言及している。

【0066】

いくつかの態様において、第1領域、または第1領域と第2領域との組み合わせは、4個または5個を超える連続DNA単位の領域を含まない。そのような第1領域は、（本質的に）RNAseHをリクルートすることができない可能性がある。

【0067】

第1領域は、例えば、5'末端または3'末端のヌクレオシド間連結、例えば、ホスホジエステル連結を介して、第2領域に共有結合で連結される。従って、ホスホジエステル連結は、領域Aの最も5'に在るヌクレオシドと領域Bの最も3'に在るヌクレオシドとの間、および/または領域Aの最も3'に在るヌクレオシドと領域Bの最も5'に在るヌクレオシドとの間に位置し得る。この点で、いくつかの態様において、領域Aに共有結合で接合された2個の領域Bが、1個は領域Aの5'末端に、1個は領域Aの3'末端に、存在してもよい。2個の領域Bは、同一であってもよいしまたは異なってもよく、任意で独立に、リンカー（Y）を介して、同一のまたは異なる第3領域に共有結合で連結されてもよい。

【0068】

いくつかの態様において、第1領域のヌクレオシドのいくつかまたは全部は、本明細書においてヌクレオシド類似体とも呼ばれる修飾型ヌクレオシド、例えば、糖修飾型ヌクレオシド類似体、例えば、二環式ヌクレオシド類似体（例えば、LNA）および/または2'置換ヌクレオシド類似体であり得る。いくつかの態様において、第1領域内に存在するヌクレオシド類似体は、全て、同一の糖修飾を含み、例えば、全て、二環式ヌクレオシド類似体、例えば、LNA、例えば、 $-D-X-LNA$ もしくは $-L-X-LNA$ （Xは、オキシ、アミノ、もしくはチオである）、または以下に限定されないが、(R/S)cET、cMOE、もしくは5'-Me-LNAを含む、本明細書に開示されたその他のLNAである。

【0069】

いくつかの態様において、第1領域のヌクレオシド間連結は、ホスホジエステル以外のヌクレオシド間連結を少なくとも1個含み、例えば、領域A内のヌクレオシド間連結のうちの少なくとも1個、例えば少なくとも50%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも90%、例えば100%が、ホスホジエステル以外である。いくつかの態様において、ホスホジエステル以外のヌクレオシド間連結は、硫黄含有ヌクレオシド間連結、例えば、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、およびボラノホスフェート、例えば、ホスホロチオエートである。

【0070】

第2領域（領域B）

第2領域は、ホスホジエステル連結を介して第1領域に連結された少なくとも1個のDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドを含むかまたはそれからなっていてよい。いくつかの局面において、第1領域と第2領域との間のヌクレオシド間連結は、領域Bの一部と見なされる。

【0071】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、第2領域は、少なくとも1～10個の連結されたヌクレオシド、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の連結されたDNAヌクレオチドまたはRNAヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。DNA/RNAホスホジエステルの領域は、切断可能リンカーの提供において重要であると考えられるが、領域Bも、糖修飾型ヌクレオシド類似体、例えば、上記の第1領域について言及されたものを含むことが可能である。しかしながら、いくつかの態様において、領域Bのヌクレオシドは、（任意で独立に）DNAおよびRNAからなる群より選択される。領域Bのヌクレオシドは、天然に存在する核酸塩基または天然には存在しない核酸塩基を含み得ることが、認識されるであろう。領域Bは、（いくつかの態様において、領域Aに隣接している最初のヌクレオシドであってもよい）少なくとも1個のホスホジエステルによって連結されたDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドを含む。領域Bが他のヌクレオシドを含む場合、領域Bは、ホスホジエステル以外の他のヌクレオシド結合、例えば、（任意で独立に）ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、またはメチルホスホネートも含み得る。しかしながら、他の態様において、領域B内の全てのヌクレオシド間連結が、ホスホロチオエートである。いくつかの態様において、領域Bの全てのヌクレオシドが、（任意で独立に）2'-OHリボース糖（RNA）または2'-H糖のいずれかを含む（即ち、RNAまたはDNA）。

【0072】

いくつかの態様において、第2領域は、少なくとも1～10個の（例えば、ホスホジエステルによって）連結されたDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシド、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の（例えば、ホスホジエステルによって）連結されたDNAヌクレオチドまたはRNAヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。

【0073】

いくつかの態様において、領域Bは、3個以下または4個以下の連続するDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシド、例えば、DNAヌクレオシドを含む。従って、領域Bは、RNAseHをリクルートしないよう短くてよく、この局面は、領域Bが、標的に相補的な単一の連続核酸塩基配列の一部を形成しない時、重要であり得る。より短い領域B、例えば、1～4nt長の領域Bは、配列特異的な制限酵素の標的となる可能性が低いことから、いくつかの態様において、好ましい可能性がある。従って、エンドヌクレアーゼ切断に対する領域Bの感受性を変動させ、それによって、インビボまたは細胞内での活性オリゴマーの活性化の速度を微調整することが可能である。極めて急速な活性化が必要とされる場合には、適宜、より長い領域B、および/または（例えば、細胞もしくは組織に特異的なまたは差次的に発現される）制限酵素の認識部位を含む領域Bが利用され得る。

【0074】

実施例において例示されるように、領域Bは、例えば、ホスホジエステル連結、および/または任意での適切なリンカー基、例えば、本明細書に提供されたもの、例えば、ホスフェートヌクレオシド連結（例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、もしくはメチルホスホネート）、もしくはトリアゾール基を含み得るリンカー基を介して、コンジュゲート基、ターゲティング基、反応基、活性化基、またはブロッキング基（X）にコンジュゲートされ得る。いくつかの局面において、連結基は、領域Aと領域Bとの間の連結基と同一であり、従って、ホスホジエステル連結であり得る。いくつかの局面において、連結基はホスホロチオエート連結である。

【0075】

いくつかの態様において、第2領域のDNAヌクレオチドまたはRNAヌクレオチドは、DNAヌクレオチドおよびRNAヌクレオチドより独立に選択される。いくつかの態様において、第2領域のDNAヌクレオチドまたはRNAヌクレオチドは、DNAヌクレオチドである。いくつかの態様において、第2領域のDNAヌクレオチドまたはRNAヌクレオチドは、RNAヌクレオチドである。

【0076】

第2領域に関して、DNAヌクレオシドおよびRNAヌクレオシドという用語には、天然に存在する塩基、または天然には存在しない塩基（塩基類似体もしくは修飾型塩基とも呼ばれ

10

20

30

40

50

る)が含まれ得る。

【0077】

いくつかの態様において、第2領域は、他のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体をさらに含んでいてもよいことが認識されるであろう。いくつかの態様において、第2領域は、DNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドのみを含む。いくつかの態様において、第2領域が複数個のヌクレオシドを含む時、第2領域内のヌクレオシド間連結は、ホスホジエステル連結を含む。いくつかの態様において、第2領域が複数個のヌクレオシドを含む時、第2領域内の全てのヌクレオシド間連結が、ホスホジエステル連結を含む。

【0078】

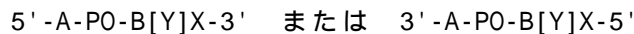
いくつかの態様において、第2領域の少なくとも2個の連続ヌクレオシドは、DNAヌクレオシド(例えば、少なくとも3個または4個または5個の連続DNAヌクレオチド)である。いくつかの態様において、第2領域の少なくとも2個の連続ヌクレオシドは、RNAヌクレオシド(例えば、少なくとも3個または4個または5個の連続RNAヌクレオチド)である。いくつかの態様において、第2領域の少なくとも2個の連続ヌクレオシドは、少なくとも1個のDNAおよび少なくとも1個のRNAヌクレオシドである。領域Aと領域Bとの間のヌクレオシド間連結はホスホジエステル連結である。いくつかの態様において、領域Bが複数個のヌクレオシドを含む時、少なくとも1個のさらなるヌクレオシド間連結、例えば、領域Aに隣接している2個(または3個または4個または5個)のヌクレオシドの間の連結基は、ホスホジエステルである。

【0079】

第2領域の片側(5'または3'のいずれか)には、第1領域、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドが隣接しており、反対側(それぞれ3'または5'のいずれか)には、任意で(即ち、第2領域とコンジュゲート/ブロッキング基等の部分との間の)リンカー基を介して、コンジュゲート部分または類似した基(例えば、ブロッキング部分/基、ターゲティング部分/基、もしくは治療用小分子部分)が隣接している。

【0080】

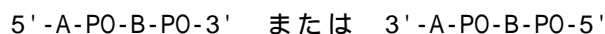
そのような態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、以下の式によって説明され得る：



式中、Aは、領域Aであり、POは、ホスホジエステル連結であり、Bは、領域Bであり、Yは、任意の連結基であり、Xは、コンジュゲート基、ターゲティング基、ブロッキング基、または反応基もしくは活性化基である。

【0081】

いくつかの態様において、領域Bは、3'~5'または5'~3'に：(i)領域Aの5'ヌクレオシドとのホスホジエステル連結、(ii)DNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシド、例えば、DNAヌクレオシド、および(iii)さらなるホスホジエステル連結を含む。

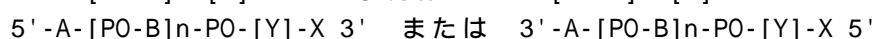
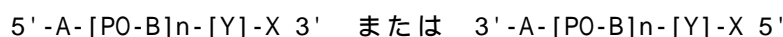


【0082】

さらなるホスホジエステル連結は、領域Bのヌクレオシドを、1個以上のさらなるヌクレオシド、例えば、1個以上のDNAヌクレオシドもしくはRNAヌクレオシドに連結するか、または、任意で連結基(Y)を介して、X(コンジュゲート基、ターゲティング基、もしくはブロッキング基、もしくは反応基もしくは活性化基)に連結することができる。

【0083】

いくつかの態様において、領域Bは、3'~5'または5'~3'に：(i)領域Aの5'ヌクレオシドとのホスホジエステル連結、(ii)2~10個の、ホスホジエステルによって連結されたDNAまたはRNAヌクレオシド、例えば、DNAヌクレオシド、および任意で(iii)さらなるホスホジエステル連結を含む：



式中、Aは、領域Aを表し、[PO-B]nは、領域Bを表し、nは、1~10、例えば、1、2、3、4、

10

20

30

40

50

5、6、7、8、9、または10であり、POは、領域BとX（または存在する場合、Y）との間の任意でのホスホジエステル連結基である。

【0084】

いくつかの態様において、本発明は、以下の式のうちの一つによる（またはそれを含む）化合物を提供する。

5' [領域A]-PO-[領域B] 3'-Y-X

5' [領域A]-PO-[領域B]-PO 3'-Y-X

5' [領域A]-PO-[領域B] 3'-X

5' [領域A]-PO-[領域B]-PO 3'-X

3' [領域A]-PO-[領域B] 5'-Y-X

3' [領域A]-PO-[領域B]-PO 5'-Y-X

3' [領域A]-PO-[領域B] 5'-X

3' [領域A]-PO-[領域B]-PO 5'-X

10

【0085】

領域Bは、例えば、以下のものを含むかまたはそれからなる。

5' DNA 3'

3' DNA 5'

5' DNA-PO-DNA-3'

3' DNA-PO-DNA-5'

5' DNA-PO-DNA-PO-DNA 3'

3' DNA-PO-DNA-PO-DNA 5'

5' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 3'

3' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 5'

5' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 3'

3' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 5'

20

【0086】

第2領域における配列選択：

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチド領域AおよびBを、相補的な標的配列と整列させた時、領域Bは相補的な配列を形成しない。

【0087】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチド領域AおよびBを、相補的な標的配列と整列させた時、領域Bは相補的な配列を形成する。この点で、領域Aおよび領域Bは、共に、標的配列に相補的である単一の連続配列を形成し得る。

30

【0088】

いくつかの態様において、領域B内の塩基の配列は、標的の組織または細胞または細胞内コンパートメントに存在する優勢なエンドヌクレアーゼ切断酵素に基づき、最適のエンドヌクレアーゼ切断部位を提供するよう選択される。この点で、標的組織および非標的組織から細胞抽出物を単離することによって、非標的細胞（例えば、腎臓）と比較して、所望の標的細胞（例えば、肝臓／ヘパトサイト）において優先的な切断活性に基づき、領域Bにおいて使用するためのエンドヌクレアーゼ切断配列が、選択され得る。この点で、標

40

【0089】

いくつかの態様において、領域Bは、配列AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、C C、CG、GA、GT、GC、またはGG（Cは5-メチルシトシンであってもよくかつ／またはTはUに交換されてもよい）のジヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、領域Bは、配列A AA、AAT、AAC、AAG、ATA、ATT、ATC、ATG、ACA、ACT、ACC、ACG、AGA、AGT、AGC、AGG、T AA、TAT、TAC、TAG、TTA、TTT、TTC、TAG、TCA、TCT、TCC、TCG、TGA、TGT、TGC、TGG、C AA、CAT、CAC、CAG、CTA、CTG、CTC、CTT、CCA、CCT、CCC、CCG、CGA、CGT、CGC、CGG、G AA、GAT、GAC、GAG、GTA、GTT、GTC、GTG、GCA、GCT、GCC、GCG、GGA、GGT、GGC、および GGG（Cは5-メチルシトシンであってもよくかつ／またはTはUに交換されてもよい）のトリ

50

ヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、領域Bは、配列AAAX、AATX、AACX、AAGX、ATAX、ATTX、ATCX、ATGX、ACAX、ACTX、ACCX、ACGX、AGAX、AGTX、AGCX、AGGX、TAAX、TATX、TACX、TAGX、TTAX、TTTX、TTCX、TAGX、TCAX、TCTX、TCCX、TCGX、TGAX、TGTX、TG CX、TGGX、CAAX、CATX、CACX、CAGX、CTAX、CTGX、CTCX、CTTX、CCAX、CCTX、CCCX、CCGX、CGAX、CGTX、CGCX、CGGX、GAAX、GATX、GACX、CAGX、GTAX、GTTX、GTCX、GTGX、GCAX、GCTX、GCCX、GCGX、GGAX、GGTX、GGCX、およびGGGX (Xは、A、T、U、G、C、およびそれらの類似体からなる群より選択され得、Cは5-メチルシトシンであってもよく、かつ/またはTはUに交換されてもよい) のトリヌクレオチドを含む。(天然に存在する) 核酸塩基A、T、U、G、Cに言及する時、これらは、等価な天然核酸塩基として機能する(例えば、相補的なヌクレオシドと塩基対形成する) 核酸塩基類似体に置換されてもよいことが認識されるであろう。

10

【0090】

いくつかの態様において、本発明の化合物は、複数個のコンジュゲート基(または複数個の官能基X - 例えば、コンジュゲート基、ターゲティング基、ブロック基、または活性化された基、または反応基もしくは活性化基)、例えば、2個または3個のそのような基を含み得る。いくつかの態様において、領域Bは、任意で[例えば、非ヌクレオチド]リンカー基を介して、少なくとも1個の官能基、例えば、2個または3個の官能基に共有結合で連結されている。いくつかの態様において、第1領域は、2個の領域B(例えば、1個は第1領域の5'、1個は3')に、共有結合で連結されていてもよく(例えば、ヌクレオシド間連結、例えば、ホスホジエステル連結を介する)、各領域Bは、(任意で独立に)本明細書

20

【0091】

ポリオリゴマー化合物

本発明は、第1領域(領域A)、第2領域(領域B)、および第3領域(領域C)を含んでいてよく、第1領域が、少なくとも1個のさらなるオリゴマー化合物(領域A')に共有結合で連結されており、第1領域(領域A)と領域A'とが、例えば、本明細書に開示される第2領域のものと同様であり得る生物切断性リンカー(領域B')、例えば、少なくとも1個のホスホジエステルによって連結されたDNAまたはRNA(例えば、DNA)、例えば、2個、3個、4個、または5個のホスホジエステルによって連結されたDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシド(例えば、DNAヌクレオシド)の領域を介して共有結合で連結されている、ポリオリゴマー化合物を提供する。領域BおよびB'は、いくつかの態様において、同一の構造、例えば、同数のDNA/RNAヌクレオシドおよびホスホジエステル連結ならびに/または同一の核酸塩基配列を有する。他の態様において、領域BおよびB'は、異なってもよい。例えば、そのようなポリオリゴマー化合物は、(5'~3'または3'~5')コンジュゲート-PO-ON-PO'-ON'(コンジュゲートは、領域Cであり、POは、領域Bであり、PO'は、領域B'であり、ON 1は、領域Aであり、ON'は、領域A'である)のような構造を有する。

30

【0092】

領域A'は、いくつかの態様において、生物切断性リンカーを介して一列に(または平行に)連結された複数個のさらなるオリゴマー化合物(例えば、2個または3個のさらなるオリゴマー化合物)、例えば、コンジュゲート-PO-ON-PO-ON'-PO''-ON''またはコンジュゲート-PO-ON-[PO-ON']_n(_nは、例えば、1、2、または3であり得、各ON'は、同一であってもよいしまたは異なってもよく、異なる場合、同一の標的を有していてもよいしまたは異なる標的を有していてもよい)を含み得ることが理解されるべきである。

40

【0093】

マルチコンジュゲートオリゴマー化合物

いくつかの態様において、オリゴマー化合物は、同一であってもよいしまたは異なってもよい複数個のコンジュゲート領域(領域C)にコンジュゲートされていてもよい。

50

例えば、本発明のオリゴマー化合物は、以下のような構造を有し得る：（5'～3'または3'～5'）ON-P0'-コンジュゲート1-P0''-コンジュゲート2（コンジュゲート1およびコンジュゲート2は、2個のコンジュゲート基であり、P0またはP0''のうちの少なくとも一方または両方は、本明細書中の領域Bのものと同様であり、ONは、領域Aである）。コンジュゲート1およびコンジュゲート2は、同一であってもよいまたは異なってもよい。例えば、いくつかの態様において、コンジュゲート1およびコンジュゲート2のうちの一方が、炭水化物またはステロールコンジュゲートであり、他方が、親油性コンジュゲートであり、例えば、5'～3'または3'～5'：ON-P0'-パルミトイル-P0''-コレステロールまたはON-P0'-パルミトイル-P0''-GalNacである。

【0094】

10

上記式においてGalNacで表された炭水化物コンジュゲート部分（例えば、コンジュゲート1またはコンジュゲート2として使用される場合）は、例えば、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アセチルガラクトサミン、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ース-アミンからなる群より選択され得る。親油性コンジュゲート（例えば、コンジュゲート1またはコンジュゲート2として使用され、上記式中にパルミトイルとして表される場合）は、疎水基、例えば、C16～20疎水基、ステロール、コレステロールであり得る。使用され得るその他の炭水化物および親油基は、例えば、本明細書に開示されている。

【0095】

標的

20

いくつかの態様において、非限定的な例として、本発明のオリゴマーは、mRNA、マイクロRNA、lncRNA（長鎖非コードRNA）、snRNA、snoRNA、およびウイルスRNAからなる群より選択される核酸（即ち、標的）の調節において使用するためのものである。

【0096】

例示的な、しかし非限定的なmRNA標的およびマイクロRNA標的には、例えば、以下のものが含まれる。

【0097】

癌において示されている遺伝子、例えば、Hif1-、サバイピン、Bcl2、Mcl1、Her2、アンドロゲン受容体、 β -カテニン、ヒトトランスフォーミング増殖因子TGF- β 2、ras、TNF- α 、c-RAF、HSP、例えば、Hsp27、eIF-4E（例えば、ISIS-EIF4ER_x）、STAT3（例えば、ISIS-STAT3Rx）、クラスタリン（例えば、OGX-011）、AurkB、AurkA、PBK、miR-155、miR-21、miR-10b、mir-34（WO2011088309を参照）、miR-199a、miR-182。

30

【0098】

炎症に関与する遺伝子のmRNA、例えば、ICAM-1（例えば、Alicoforsen）、CD49d、VLA-4、オステオポンチン、miR-21（乾癬）。

【0099】

その他の医学的に関連するmRNA標的には、CTGF（局所線維症）およびc-Raf-キナーゼ（眼疾患）、miR-29（心線維症）、第XI因子（凝固）、第VII因子（凝固）、miR15、miR-159（心筋梗塞後モデリング）、miR-138（骨量減少）、mir-21（WO12148952を参照）、およびmir214（線維症）（WO2012012716を参照）が含まれる。

40

【0100】

代謝疾患または代謝障害の標的、例えば、アポ-B（高LDLコレステロール、ACS）、アポCIII（高血清TG、糖尿病）、アポ（a）（心血管疾患）、FGFR4（肥満）、GCCR（T2糖尿病）、GCCR（T2糖尿病）、PTP1B（T2糖尿病）、DGAT2（NASH）、PCSK9（高脂血症および関連障害）、MtGPAT（肥満およびNAFLD）、miR-122（高コレステロール）、miR-33（代謝症候群、アテローム性動脈硬化症）、miR-208（慢性心不全）、miR-499（慢性心不全）、miR-378（心血管代謝疾患）、mir-143（血管疾患）、miR-145（血管疾患）、miR-92（末梢動脈疾患）、miR-375（糖尿病）、miR-27b（糖尿病）、miR-34a（糖尿病）、miR-199a、miR-27a（心疾患、虚血）、miR-338（糖尿病）。

【0101】

50

代謝疾患には、例えば、代謝症候群、肥満、高脂血症、HDL/LDLコレステロール不均衡、脂質異常症、例えば、家族性複合型高脂血症（FCHL）、後天性高脂血症、スタチン抵抗性高コレステロール血症、冠動脈疾患（CAD）、ならびに冠動脈心疾患（CHD）、アテローム性動脈硬化症、心疾患、糖尿病（I型および/またはII型）、NASH、急性冠症候群（ACS）が含まれる。

【0102】

ウイルス性疾患：miR-451（赤血球増加症）、miR-122（HCV）、HBV、HCV、BKV等。重篤な希少疾患には、SMN2（脊髄性筋萎縮症）、TTR（TTRアミロイドーシス）、GHR（先端巨大症）、AAT（AATD関連肝疾患）、ジストロフィン（デュシェンヌ型筋ジストロフィー）が含まれる。

10

【0103】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、肝臓において発現される核酸、例えば、肝臓において発現されるmRNA、例えば、PCSK9、アポB、またはMtGPATを標的とする。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、PCSK9 mRNAを標的とする。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、アポB mRNAを標的とする。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、肝臓において発現されるマイクロRNA、例えば、miR-122を標的とする。

【0104】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、標的（例えば、標的核酸）の発現を下方制御する（例えば、低下させるかまたは除去する）ことができる。この点に関して、本発明のオリゴマーは、標的の阻害に影響を与えることが可能である。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、標的核酸に結合し、正常発現レベル（例えば、オリゴマーまたはコンジュゲートの非存在下での発現レベル）と比較した、少なくとも10%または20%の発現の阻害、より好ましくは、正常発現レベルと比較した少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%の阻害に影響を与える。いくつかの態様において、そのような調節は、0.04~25nM、例えば、0.8~20nMの濃度の本発明の化合物を使用した時に見られる。同一のまたは異なる態様において、発現の阻害は、100%未満、例えば、98%未満の阻害、95%未満の阻害、90%未満の阻害、80%未満の阻害、例えば、70%未満の阻害である。発現レベルの調節は、例えば、SDS-PAGE後の標的タンパク質に対する適切な抗体を使用したウエスタンブロッティングのような方法により、タンパク質レベルを測定することによって、決定され得る。あるいは、発現レベルの調節は、例えば、ノーザンブロッティングまたは定量的RT-PCRにより、mRNAのレベルを測定することによって、決定され得る。mRNAレベルを介して測定する場合、適切な投薬量、例えば0.04~25nM、例えば0.8~20nMの濃度を使用した時の下方制御のレベルは、いくつかの態様において、典型的には、本発明の化合物、コンジュゲート、または組成物の非存在下での正常レベルの10~20%のレベルとなる。

20

30

【0105】

従って、本発明は、細胞における標的の発現を下方制御するかまたは阻害するため、本発明によるオリゴマーまたはコンジュゲートを細胞へ投与する工程を含む、標的を発現している細胞における標的の発現を下方制御するかまたは阻害する方法を提供する。適切には、細胞は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である。投与は、いくつかの態様において、インビトロで行われ得る。投与は、いくつかの態様において、インビボで行われ得る。本発明の化合物、例えば、オリゴマーおよびそれらのコンジュゲートは、種々の標的、例えば、肝臓において発現されるmRNAまたはマイクロRNAまたはその他の核酸標的へ標的指向化され得る（NCBI Genbank/遺伝子IDの参照は、本発明の化合物によって標的とされ得る配列の例として与えられ、Genbank/NCBI配列は、参照によって本明細書に組み入れられる）。

40

【0106】

アポB

いくつかの態様において、第1領域（または第1領域および第2領域）は、アポB mRNA標

50

的、例えば、アポB-100（参照によって本明細書に組み入れられるNCBI Genbank ID NM_00384.2 GI: 105990531）の対応する領域に相補的である（即ち、それを標的とする）単一の連続核酸塩基配列を形成する。

【0107】

アポBを標的とする本発明の化合物は、急性冠症候群の処置において使用され得る（WO20100076248を参照のこと）。従って、本発明は、急性冠症候群の処置において使用するための、アポB100を標的とする本発明によるオリゴマーを提供する。本発明は、本発明のオリゴマーを、処置を必要とする対象へ投与する工程を含む、急性冠症候群の処置の方法をさらに提供する。

【0108】

アポBを標的とする本発明の化合物は、アテローム性動脈硬化症の処置において使用され得る。従って、本発明は、アテローム性動脈硬化症の処置において使用するための、アポB100を標的とする本発明によるオリゴマーを提供する。本発明は、本発明のオリゴマーを、処置を必要とする対象へ投与する工程を含む、アテローム性動脈硬化症の処置の方法をさらに提供する。アポBを標的とする本発明の化合物は、高コレステロール血症または高脂血症の処置において使用され得る。従って、本発明は、高コレステロール血症または高脂血症の処置において使用するための、アポB100を標的とする本発明によるオリゴマーを提供する。本発明は、本発明のオリゴマーを、処置を必要とする対象へ投与する工程を含む、高コレステロール血症または高脂血症の処置の方法をさらに提供する。

【0109】

本発明は、細胞におけるアポBを阻害するため、本発明によるオリゴマーまたはコンジュゲートまたは薬学的組成物を細胞へ投与する工程を含む、アポBを発現している細胞におけるアポBの阻害のためのインビボまたはインビトロの方法を提供する。

【0110】

本発明のオリゴマー/コンジュゲートにおいて第1領域として使用され得るLNAオリゴマーの例には、例えば、参照によって本明細書に組み入れられるWO2007/031081、WO2008/113830、WO2007131238、およびWO2010142805に開示されたものが含まれる。具体的な好ましい化合物には、以下のものが含まれる：

5'-G_s^mC_sa_st_sg_sg_sa_st_sT_s^mC_sA-3' (SEQ ID NO 1)

5'-G_sT_st_sg_sa_sc_sa_sc_st_sg_sT_s^mC-3' (SEQ ID NO 53)

配列中、大文字は、-D-オキシLNA単位（ヌクレオシド）であり、小文字は、DNA単位であり、下付きのsは、ホスホロチオエート連結であり、大文字のCの前の上付きのmは、全てのLNAシトシンが5-メチルシトシンであることを示す。アポBを標的とする本発明の化合物は、本明細書に開示される、オリゴマーを肝臓へ標的指向化するコンジュゲート、例えば、炭水化物または親油性コンジュゲート、例えば、GalNacコンジュゲートまたはステロールコンジュゲート（例えば、コレステロールもしくはトコフェロール）に、コンジュゲートされていてもよい。コンジュゲートは、例えば、（適宜領域Bを介して）オリゴマー化合物の5'末端または3'末端に在り得る。アポBを標的とするその他のオリゴマーは、WO03/011887、WO04/044181、WO2006/020676、WO2007/131238、WO2007/031081、およびWO2010142805に開示されている。

【0111】

PCSK9

いくつかの態様において、第1領域（または第1領域および第2領域）は、PCSK9 mRNA標的、例えば、ヒトPCSK9 mRNA（参照によって本明細書に組み入れられるNCBI Genbank ID NM_174936.3 GI: 299523249）の対応する領域に相補的である（即ち、それを標的とする）単一の連続核酸塩基配列を形成する。

【0112】

本発明は、医薬として使用するための、例えば、高コレステロール血症または関連障害、例えば、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、高コレステロール血症、家族性高コレス

10

20

30

40

50

テロール血症、例えば、PCSK9の機能獲得型変異、HDL/LDLコレステロール不均衡、脂質異常症、例えば、家族性高脂血症（FCHL）、後天性高脂血症、スタチン抵抗性高コレステロール血症、冠動脈疾患（CAD）、および冠動脈心疾患（CHD）からなる群より選択される障害の処置のための、PCSK9を標的とする本発明によるオリゴマーを提供する。

【0113】

本発明は、高コレステロール血症または関連障害、例えば、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、例えば、PCSK9の機能獲得型変異、HDL/LDLコレステロール不均衡、脂質異常症、例えば、家族性高脂血症（FCHL）、後天性高脂血症、スタチン抵抗性高コレステロール血症、冠動脈疾患（CAD）、および冠動脈心疾患（CHD）からなる群より選択される障害の処置のための医薬の製造のための、PCSK9を標的とする本発明のオリゴマーの使用を提供する。

10

【0114】

本発明は、PCSK9を標的とする有効量の本発明によるオリゴマーを高コレステロール血症または関連障害に罹患しているかまたは罹患する可能性が高い患者へ投与する工程を含む、高コレステロール血症または関連障害、例えば、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、例えば、PCSK9の機能獲得型変異、HDL/LDLコレステロール不均衡、脂質異常症、例えば、家族性高脂血症（FCHL）、後天性高脂血症、スタチン抵抗性高コレステロール血症、冠動脈疾患（CAD）、および冠動脈心疾患（CHD）からなる群より選択される障害を処置する方法を提供する。

20

【0115】

本発明は、細胞におけるPCSK9を阻害するため、PCSK9を標的とする本発明によるオリゴマーを細胞へ投与する工程を含む、PCSK9を発現している細胞におけるPCSK9の阻害のためのインビボまたはインビトロの方法を提供する。

【0116】

以下は、ヒトPCSK9 mRNAを標的とし、本発明の化合物において領域Aとして使用され得るオリゴマーである。

5'-T_sG_s^mC_st_sa_sC_sa_sa_sa_sa_sa_sC_s^mC_s^mC_sA-3' (SEQ ID NO 37)

配列中、大文字は、-D-オキシLNA単位（ヌクレオシド）であり、小文字は、DNA単位であり、下付きのsは、ホスホロチオエート結合であり、大文字のCの前の上付きのmは、全てのLNAシトシンが5-メチルシトシンであることを示す。PCSK9を標的とする本発明の化合物は、本明細書に開示される、オリゴマーを肝臓へ標的指向化するコンジュゲート、例えば、炭水化物または親油性コンジュゲート、例えば、GalNAcコンジュゲートまたはステロールコンジュゲート（例えば、コレステロールもしくはトコフェロール）へコンジュゲートされていてもよい。コンジュゲートは、例えば、（適宜領域Bを介して）オリゴマー化合物の5'末端または3'末端に在り得る。PCSK9を標的とするその他のオリゴマーは、SEQ ID NO 36~52として開示され、他は、参照によって本明細書に組み入れられるWO2008/043753、WO2011/009697、WO08/066776、WO07/090071、WO07/146511、WO0/143315、WO09/148605、WO11/123621、およびWO11133871に開示されている。

30

【0117】

miR-122

いくつかの態様において、第1領域（または第1領域および第2領域）は、マイクロRNA-122、例えば、miR-122a、例えば、has-miR-122配列（miRBaseリリース20：MI0000442）、例えば、

>hsa-mir-122 MI0000442

CCUUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCUAAACUAUCAACGCCAUUAUCACACUAAAUAGCU
ACUGCUAGGC

>hsa-miR-122-5p MIMAT0000421

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

40

50

の対応する領域に相補的である（即ち、それを標的とする）単一の連続核酸塩基配列を形成する。miR-122は、HCV感染において示されており、感染の維持のために必要とされる不可欠の宿主因子である。従って、miR-122の阻害剤は、C型肝炎感染の処置において使用され得る。

【 0 1 1 8 】

miR-122を標的とする本発明の化合物は、HCV感染の処置において使用され得る。従って、本発明は、HCV感染の処置において使用するための、miR-122を標的とする本発明によるオリゴマーを提供する。本発明は、本発明のオリゴマーを、処置を必要とする対象へ投与する工程を含む、HCV感染の処置の方法をさらに提供する。

【 0 1 1 9 】

本発明は、HCV感染の処置のための医薬の製造のための、miR-122を標的とする本発明のオリゴマーの使用を提供する。

【 0 1 2 0 】

本発明は、miR-122を標的とする有効量の本発明によるオリゴマーをHCV感染に罹患している患者へ投与する工程を含む、HCV感染を処置する方法を提供する。

【 0 1 2 1 】

本発明は、細胞におけるmiR-122を阻害するため、本発明によるオリゴマーまたはコンジュゲートまたは薬学的組成物を細胞へ投与する工程を含む、miR-122を発現している細胞、例えば、HCV感染細胞またはHCVレプリコン発現細胞におけるmiR-122の阻害のためのインピボまたはインピトロの方法を提供する。

【 0 1 2 2 】

miR-122は、コレステロール代謝においても示されており、miR-122の阻害が、血漿コレステロールレベルを低下させる処置のために使用され得ることが示唆されている（Esau, Cell Metab. 2006 Feb; 3(2):87-98）。

【 0 1 2 3 】

従って、miR-122の阻害剤は、血漿コレステロールレベルを低下させるための処置において、またはコレステロールレベル上昇に関連した代謝疾患（関連障害）、例えば、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、脂質異常症、冠動脈疾患（CAD）、および冠動脈心疾患（CHD）からなる群より選択される適応症の処置において使用され得る。miR-122を標的とする本発明の化合物は、コレステロールレベル上昇または関連障害の処置において使用され得る。従って、本発明は、コレステロールレベル上昇または関連障害の処置において使用するための、miR-122を標的とする本発明によるオリゴマーを提供する。本発明は、本発明のオリゴマーを、処置を必要とする対象へ投与する工程を含む、コレステロールレベル上昇または関連障害の処置の方法をさらに提供する。

【 0 1 2 4 】

本発明は、コレステロールレベル上昇または関連障害の処置のための医薬の製造のための、miR-122を標的とする本発明のオリゴマーの使用を提供する。

【 0 1 2 5 】

本発明は、miR-122を標的とする有効量の本発明によるオリゴマーを障害に罹患している患者へ投与する工程を含む、コレステロールレベル上昇または関連障害を処置する方法を提供する。

【 0 1 2 6 】

本発明は、細胞におけるmiR-122を阻害するため、本発明によるオリゴマーまたはコンジュゲートまたは薬学的組成物を細胞へ投与する工程を含む、miR-122を発現している細胞、例えば、HCV感染細胞またはHCVレプリコン発現細胞におけるmiR-122の阻害のためのインピボまたはインピトロの方法を提供する。

【 0 1 2 7 】

miR-122を標的とするオリゴマーは、WO2007/112754、WO2007/112753、WO2009/043353に開示されており、ミックスマー、例えばSPC3649（ミラビルセン（miravirsen））とも呼ば

10

20

30

40

50

れる。下記参照)、または小型LNA、例えばWO2009/043353に開示されたもの(例えば、5'-ACACTCC-3'、5'-CACACTCC-3'、5'-TCACACTCC-3'、配列中、大文字は、-D_オキシLNA、完全ホスホロチオエートであり、LNA Cは5-メチルシトシンである)であり得る。いくつかの態様において、miR-122を標的とするオリゴマーは、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、もしくは18ヌクレオチド(または19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、もしくは23ヌクレオチド)の長さを有する。いくつかの態様において、miR-122を標的とするオリゴマーは、オリゴマーの長さの全てにわたって測定してmiR-122に完全に相補的である配列を含み、好ましくは、配列5'-CACACTCC-3'を含む。いくつかの態様において、マイクロRNA、例えば、miR-122を標的とするオリゴマーは、オリゴマーの長さの全てにわたってマイクロRNAの対応する領域に相補的であり、いくつかの態様において、オリゴマーの3'ヌクレオチドは、マイクロRNA、例えばmiR-122の、最初の、2番目の、3番目の、または4番目の5'ヌクレオチド、例えば、マイクロRNA、例えばmiR-122の、2番目の5'ヌクレオチドに相補的(すなわちそれらに対し整列する)である。

【0128】

以下は、has-miR-122(ヒトmiR-122)を標的とし、本発明の化合物において領域Aとして使用され得るオリゴマーである。

ミラビルセン：5'-^mC_sC_sA_st_sG_sT_sC_sa_s^mC_sa_s^mC_st_s^mC_s^mC-3'

本発明(領域A)に関して使用され得る、その他のmiR-122を標的とする化合物は、WO2007/027894、WO2007/027775に開示されている。

【0129】

MtGPAT：(NCBI遺伝子ID 57678 - 染色体：10；NC_000010.10(113907971..113975153、相補鎖)ミトコンドリアグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ1(EC 2.3.1.15、GPAT1、mtGPAT1、GPAM、mtGPAMとしても公知)は、肝臓におけるトリグリセリド形成において主要な役割を果たし、高レベルのmtGPAT1活性は、脂肪肝(肝臓脂肪過多症)をもたらす、mtGPAT1の欠如は、低レベルの肝臓トリグリセリドおよび刺激された脂肪酸酸化をもたらす(mtGPATを標的とするオリゴマーを開示しているWO2010/000656を参照のこと)。MtGPATを標的とする本発明の化合物は、過体重、肥満、脂肪肝、肝臓脂肪過多症、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、インスリン抵抗性、糖尿病、例えば、インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)のような状態を処置するために使用され得る。

【0130】

第VII因子(NCBI遺伝子ID 2155、NCBI J02933.1 GI：180333、またはEU557239.1 GI：182257998)。本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートは、第VII因子を標的とし、それによって、組織因子凝固経路の重大な成分である第VII因子の産生を阻害することができる。第VII因子を標的とする本発明の化合物は、(典型的には、出血を引き起こさずに)血栓性疾患、例えば、心発作、脳卒中、および血餅、または炎症性状態の処置または防止のために使用され得る。参照によって本明細書に組み入れられるWO2013/119979およびWO2012/174154は、本発明のコンジュゲートへ組み入れられ得る、FVIIを標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。

【0131】

第XI因子(NCBI Genbank BC122863.1 GI：114108211) - 肝臓において産生される凝固因子である第XI因子。高レベルの第XI因子は、心発作、脳卒中、および血餅に関連している。参照によって本明細書に組み入れられるWO2013/070771は、本発明のコンジュゲートへ組み入れられ得る、XIを標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。第XI因子を標的とする本発明の化合物は、血栓性疾患、例えば、心発作、脳卒中、および血餅、または炎症性状態、例えば、関節炎および大腸炎の処置または防止のために使用され得る。

。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 2 】

アポCIII (NCBI Genbank BC027977.1 GI : 20379764) 血中トリグリセリド代謝を制御するタンパク質。高レベルのアポC-IIIは、炎症、高トリグリセリド、アテローム性動脈硬化症、および代謝症候群に関連している。アポCIIIを標的とする本発明の化合物は、単一薬剤として、または他のトリグリセリド低下剤と組み合わせて、血清トリグリセリドレベルを低下させるため、または、例えば、家族性カイロミクロン血症症候群および重症高トリグリセリドの処置において使用され得る。参照によって本明細書に組み入れられるWO11085271は、本発明のコンジュゲートへ組み入れられ得る、アポCIIIを標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。

【 0 1 3 3 】

10

アポ(a) (NCBI Genbank NM_005577.2 GI : 116292749) は、肝臓におけるアポ(a)の産生を阻害し、心疾患の独立危険因子であるLp(a)を低下させるための直接アプローチを提示するため設計される。高レベルのLp(a)は、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、心発作、および脳卒中のリスク増加に関連している。Lp(a)は、動脈における早熟のプラーク発達またはアテローム性動脈硬化症を促進する。アポ(a)を標的とする本発明の化合物は、例えば、アテローム性動脈硬化症および冠動脈心疾患の処置において使用され得る。参照によって本明細書に組み入れられるWO05000201およびWO03014307は、本発明のコンジュゲートへ組み入れられ得る、アポリポタンパク質(a)を標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。

【 0 1 3 4 】

20

B型肝炎 (HBV) (例えば、全て参照によって本明細書に組み入れられるNCBI D23684.1 GI : 560092 ; D23683.1 GI : 560087 ; D23682.1 GI : 560082 ; D23681.1 GI : 560077 ; D23680.1 GI : 560072 ; D23679.1 GI : 560067 ; D23678.1 GI : 560062 ; D23677.1 GI : 560057を参照)

【 0 1 3 5 】

HBVを標的とするオリゴマーは、当技術分野において周知である。例えば、WO96/03152、WO97/03211、WO2011/052911、WO2012/145674、WO2012/145697、WO2013/003520、およびWO2013/159109を参照されたい。

【 0 1 3 6 】

HBVを標的とする本発明の化合物は、HBV感染の処置において使用され得る。従って、本発明は、HBVの処置において使用するための、HBVを標的とする本発明によるオリゴマーを提供する。本発明は、本発明のオリゴマーを、処置を必要とする対象へ投与する工程を含む、HBV感染の処置の方法をさらに提供する。

30

【 0 1 3 7 】

本発明は、医薬として使用するための、例えば、B型肝炎感染または関連障害の処置のための、B型肝炎 (HBV) を標的とする本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートを提供する。

【 0 1 3 8 】

本発明は、B型肝炎感染または関連障害の処置のための医薬の製造のための、B型肝炎 (HBV) を標的とする本発明によるオリゴマーまたはコンジュゲートまたは薬学的組成物の使用を提供する。本発明は、HBVを標的とする有効量の本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートをB型肝炎ウイルスに感染した患者へ投与する工程を含む、B型肝炎感染または関連障害を処置する方法を提供する。本発明は、HBV複製を阻害するために、HBVを標的とする本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートを細胞へ投与する工程を含む、HBV感染細胞におけるHBV複製の阻害のためのインビボまたはインビトロの方法を提供する。本発明のオリゴマー (領域A) として使用され得る、(WO2011/47312に開示されたような) HBVを標的とするLNAオリゴマーの例は、

40



である。さらなる化合物は、参照によって本明細書に組み入れられる、WO2011/47312の表

50

1、ならびにW02011/052911、W02012/145674、W02012/145697、W02013/003520、およびW02013/159109に開示されている。

【 0 1 3 9 】

RG-101は、miR-122を標的とし、GalNacコンジュゲートを含み、Regulus TherapeuticsによってHCVの処置のために開発中の化合物である。

【 0 1 4 0 】

ANGPTL3（例えば、NCBI BC007059.1 GI：14712025またはBC058287.1 GI：34849466）アンジオポエチン様3-脂質、グルコース、およびエネルギーの代謝を制御するタンパク質。ANGPTL3レベルの上昇を有するヒトは、早熟心発作のリスクの増加、動脈壁厚の増加に関連した高脂血症、および複数の代謝異常、例えば、インスリン抵抗性を有する。対照的に、より低いANGPTL3レベルを有するヒトは、より低いLDLCおよびトリグリセリドのレベル、ならびに心血管疾患のより低いリスクを有する。ANGPTL3を標的とする本発明の化合物は、例えば、高脂血症および関連障害、代謝異常、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、またはインスリン抵抗性の処置において使用され得る。参照によって本明細書に組み入れられるW011085271は、本発明のコンジュゲートへ組み入れられ得る、ANGPTL3を標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。

10

【 0 1 4 1 】

グルカゴン受容体またはGCGR（BC112041.1 GI：85567507；L20316.1 GI：405189）：グルカゴンは、特に、2型糖尿病において、インスリンの作用に対抗し、グルコースを産生するよう肝臓を刺激するホルモンである。進行糖尿病を有する患者において、調節されないグルカゴン作用は、血中グルコースレベルの有意な増加に至る。従って、グルカゴン作用の減弱は、重度糖尿病を有する患者において有意なグルコース低下効果を有し得る。さらに、GCGRの低下によって、膵機能を保存しインスリン分泌を増強するホルモンである活性型のグルカゴン様ペプチドまたはGLP-1がより多く産生される。GCGRを標的とする本発明の化合物は、例えば、インスリン抵抗性、高血糖、糖尿病、例えば、1型または2型糖尿病の処置において、膵機能の保存において、そして血中グルコースレベルを調節するため、使用され得る。W02007/134014は、本発明のコンジュゲートへ組み入れられ得る、GCGRを標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。

20

【 0 1 4 2 】

線維芽細胞増殖因子受容体4またはFGFR4（NCBI遺伝子2264 - NC_000005.9（176513906.176525143））FGFR4は、肝臓および脂肪組織において発現され、脂肪を貯蔵する身体的能力を減少させると同時に、脂肪燃焼およびエネルギー消費を増加させることが示されている。多くの抗肥満薬が、食欲を抑制するよう脳に作用し、一般的に、CNS副作用をもたらす。FGFR4を標的とする本発明の化合物は、例えば、インスリン抵抗性、高血糖、糖尿病、例えば、1型または2型糖尿病の処置、肥満の保存（例えば、食欲抑制薬と組み合わせて使用された時）、体重の低下、およびインスリン感受性、糖尿病、例えば、1型糖尿病または2型糖尿病の改善、および血中グルコースレベルの調節において使用され得る。参照によって本明細書に組み入れられるW009046141およびW012174476は、本発明のコンジュゲートへ組み入れられ得る、FGFR4を標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。

30

40

【 0 1 4 3 】

ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ-2またはDGAT-2（NCBI遺伝子ID 84649）：トリグリセリドの合成における重大な成分。DGATの阻害は、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を有する患者において肝臓脂肪を低下させることができ、2型糖尿病およびインスリン抵抗性を処置するためにも使用され得る。DGAT-2を標的とする本発明の化合物は、NASHを処置するため、肝臓脂肪を低下させるため、糖尿病、例えば、2型糖尿病を処置するため、インスリン抵抗性を処置するため、使用され得る。参照によって本明細書に組み入れられるW005019418およびW02007136989は、本発明のコンジュゲートへ組み入れられ得る、DGAT-2を標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。

【 0 1 4 4 】

50

グルココルチコイド受容体またはGCCR (BC150257.1 GI:152013043): グルココルチコイドホルモンは、身体中の多様な過程に影響を与え、過剰なレベルのグルココルチコイドホルモンは、体内の組織および器官の多くに有害な効果を及ぼし得る。クッシング症候群は、高レベルのグルココルチコイドへの長期曝露によって引き起こされる奇病である。未処置の場合、クッシング症候群を有する患者は、高血圧、糖尿病、および免疫機能障害を発症し、早期死亡の増加したリスクを有し得る。クッシング症候群のため認可された処置が存在するが、現在の医薬は、高血圧および糖尿病のような重大な副作用に関連しており、これらの患者のための新しい治療の高い満たされていない医学的必要性が残存している。GCCR-2を標的とする本発明の化合物は、クッシング症候群および関連状態(例えば、上にリストされたもの)を処置するために使用され得る。参照によって本明細書に組み入れられるWO07035759およびWO2007136988は、本発明のコンジュゲートへ組み入れられ得る、GCCRを標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。

10

【0145】

補体成分C5 (M57729.1 GI:179982): 補体系は、宿主防御のための保護機序として免疫において中心的な役割を果たしているが、その制御異常は、とりわけ、発作性夜間血色素尿症(PNH)、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、重症筋無力症、視神経脊髄炎を含む広範囲のヒト疾患において、重篤な命にかかわる合併症をもたらす。補体成分C5を標的とする本発明の化合物は、これらの障害のうちの一つ以上を処置するために使用され得る。C5は、遺伝学的にも臨床的にもバリデートされた標的であり; 機能喪失型ヒト変異が、ある種の感染に対する免疫防御の減弱と関連付けられており、抗C5モノクローナル抗体の静脈内投与による治療は、補体によって媒介される多数の疾患において臨床活性および認容性を示している。サラセミアおよび鉄過剰障害の処置のための膜貫通セリンプロテアーゼ6(Tmprss6)。

20

【0146】

-1アンチトリプシン(AAT): (M11465.1 GI:177826) 肝疾患に関連している。参照によって本明細書に組み入れられるWO13142514は、本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートへ組み入れられ得る、AATを標的とするオリゴヌクレオチド化合物を開示している。AATを標的とする本発明の化合物は、その必要のある個体において、AIAT mRNAおよびタンパク質の発現を減少させ、線維症、例えば、AIATD関連肝疾患、および肺疾患、例えば、AIATD関連肺疾患を処置するか、寛解させるか、防止するか、進行を遅くするか、または進行を止めるための方法において使用され得る。

30

【0147】

トランスサイレチン - TTR (BC005310.1 GI:13529049): TTRを標的とする本発明のオリゴマーは、トランスサイレチンアミロイドーシスまたはTTRアミロイドーシス(組織に次第に蓄積するTTRの誤って折り畳まれた型を産生する変異遺伝子が、患者に遺伝する、重篤な希少な遺伝性疾患)を処置するために使用され得る。TTRアミロイドーシスを有する患者においては、TTRの変異型および正常型の両方が、心臓、末梢神経、および胃腸管を含む組織において小線維として発達し得る。TTR小線維の存在は、これらの組織の正常な機能に干渉し、TTRタンパク質小線維が拡大するにつれ、より多くの組織傷害が起こり疾患が悪化する。TTRは、血中の甲状腺ホルモンおよびレチノールを輸送する担体タンパク質である。TTRアミロイドーシスを有する患者においては、TTRの変異型および正常型の両方が、組織において小線維として発達し得る。本発明の化合物は、TTRアミロイドーシスを処置するために使用され得る。Benson et al., Amyloid.2010 Jun;17(2):43-9およびAckermann et al., Amyloid.2012 Jun;19 Suppl 1:43-4を参照されたい。本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートにおいて使用され得る、TTRを標的とするアンチセンス化合物は、参照によって本明細書に組み入れられるUS8101743、WO11139917、およびWO10017509に開示されている。

40

【0148】

アミノレブリン酸合成酵素-1 (ALAS-1) (BC011798.2 GI:33877783; AK312566.1 GI:164690365; NM_199166.2 GI:362999012; NM_000688.5 GI:362999011)。ALAS1は、ボル

50

フィリン症の処置のための、例えば、急性間欠性ポルフィリン症（AIP）を含む肝性ポルフィリン症の処置のためのバリデートされた標的である。ALAS-1を標的とする本発明の化合物は、これらの障害の処置において使用され得る。

【 0 1 4 9 】

血管内皮増殖因子またはVEGF（遺伝子ID 7422、ヒト配列：染色体：6；NC_000006.11（43737946..43754224））。VEGFは、癌において示されている。VEGFを標的とする本発明の化合物は、過剰増殖性障害、例えば、癌、例えば、肝臓癌の処置において使用され得る。

【 0 1 5 0 】

表1は、本発明の化合物によって標的とされ得る肝臓標的の群、および（例えば、関連障害に罹患した者を）処置するためにそのような化合物が使用され得る医学的適応症 / 障害を提供する（Sehgal et al., Liver as a target for oligonucleotide therapeutics, J. of Hepatology 2013, In Pressを参照）。

【 0 1 5 1 】

【表 1】

本発明の化合物は、以下のものからなる群より選択される核酸（例えば、mRNAをコード化またはmiRNA）を標的とすることができる	以下のような疾患または障害の処置のため
AAT	AAT-LivD
ALDH2	アルコール依存症
HAMP 経路	貧血または炎症/CKD
miR-33	アテローム性動脈硬化症
Apo(a)	アテローム性動脈硬化症／高Lp(a)
miR-7	肝臓癌
miR-378	心血管代謝疾患
miR-21	肝臓癌
Myc	肝臓癌
miR-122	HCV
5'UTR	HCV
5'UTR & NS5B	HCV
NS3	HCV
TMPRSS6	ヘモクロマトーシス
アンチトロンビンIII	血友病A、B
ApoCIII	高トリグリセリド血症
ANGPLT3	高脂血症
MTP	高脂血症
DGAT2	NASH
ALAS1	ポルフィリン症
アンチトロンビンIII	希少出血性障害
血清アミロイドA	SAA-アミロイドーシス
第VII因子	血栓症
成長ホルモン受容体	先端巨大症
miR-122	C型肝炎ウイルス
ApoB-100	高コレステロール血症
ApoCIII	高トリグリセリド血症
PCSK9	高コレステロール血症
CRP	炎症性障害
KSP または VEGF	肝臓癌
PLK1	肝臓癌
miR-34	肝臓癌
FGFR4	肥満
第IXa因子	血栓症
第XI因子	血栓症
TTR	TTRアミロイドーシス
GCCR	2型糖尿病
PTP-1B	2型糖尿病
GCGR	クッシング症候群
肝グルコース6-リン酸 トランスポーター-1	グルコースホメオスタシス、糖尿病、 2型糖尿病

配列

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、標的核酸内に存在するヌクレオチド配列（即ち、オリゴマーが標的とする配列）の逆相補鎖に対応する連続ヌクレオチド配列を含む。表3は、関連適応症に対してオリゴヌクレオチド化合物を使用した前臨床開発または臨床開発の途中にあり、従って、本発明の化合物によって標的とするのに適したmRNA標的およびmiRNA標的の群を提供する。

【0153】

いくつかの態様において、標的は、miR-122、アポB-100、アポCIII、PCSK9、CRP、KSP、VEGF、PLK1、miR-34、FGFR4、第IXa因子、第XI因子、TTR、GCCR、PTP-1B、GCGR、AAT、ALDH2、HAMP経路、miR-33、アポ(a)、miR-7、miR-378、miR-21、Myc、miR-122、HCVゲノム、例えば、HCV 5'UTRまたはHCV NS5B RNAもしくはNS3 RNA、TMPRSS6、アンチトロンビンIII、アポCIII、ANGPLT3、MTP、DGAT2、ALAS1、アンチトロンビンIII、血清アミロイドA、および第VII因子からなる群より選択される。

10

【0154】

いくつかの態様において、連続ヌクレオチド配列は、標的配列とハイブリダイズする時、1個以下のミスマッチを含む。

【0155】

本発明のオリゴマー（またはその領域）と、核酸の標的領域、例えば、本明細書に開示されたものとの間の「相補性」の程度の決定において、「相補性」（「同一性」または「同一性」とも）の程度は、オリゴマー（またはその領域）の配列と、最適にそれと整列する標的領域（または標的領域の逆相補鎖）の配列との間の同一性百分率（または相補性百分率）として表される。百分率は、2種の配列の間で同一である整列した塩基の数を計数し、オリゴマー内の連続モノマーの総数で割り、100を掛けることによって計算される。そのような比較において、ギャップが存在する場合、そのようなギャップは、ギャップ内のモノマーの数が本発明のオリゴマーと標的領域との間で異なる区域ではなく、単なるミスマッチであることが好ましい。

20

【0156】

本明細書において使用される、「相同の」および「相補性」という用語は、「同一性」および「同一の」という用語と交換可能である。

【0157】

「～に対応する（corresponding to）」および「～に対応する（corresponds to）」という用語は、オリゴマーのヌクレオチド配列（即ち、核酸塩基または塩基の配列）または連続ヌクレオチド配列（第1領域）と、（i）核酸標的の逆相補鎖の部分配列のいずれかより選択されるさらなる配列の等価な連続ヌクレオチド配列との間の比較をさす。ヌクレオチド類似体は、それらの等価なまたは対応するヌクレオチドと直接比較される。（i）または（ii）のさらなる配列に対応する第1配列は、典型的には、第1配列（例えば、連続ヌクレオチド配列）の全長にわたりその配列と同一であるか、または、本明細書に記載されるように、いくつかの態様において、対応する配列と少なくとも80%、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、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%相同、例えば、100%相同（同一）であり得る。

40

【0158】

「対応するヌクレオチド類似体」および「対応するヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチド類似体および天然に存在するヌクレオチドにおけるヌクレオチドが同一であることを示すためのものである。例えば、ヌクレオチドの2-デオキシリボース単位がアデニンに連結されている時、「対応するヌクレオチド類似体」は、アデニンに連結された（2-デオキシリボースと異なる）ペントース単位を含有している。

【0159】

本明細書において使用される、「逆相補鎖」、「逆相補的」、および「逆相補性」という用語は、「相補鎖」、「相補的」、および「相補性」という用語と交換可能である。

50

【0160】

従って、オリゴマー（第1領域または第1領域および第2領域）の連続核酸塩基配列は、標的、例えば、本明細書において言及されたものに相補的であり得る。

【0161】

いくつかの態様において、第1領域または第1領域および第2領域は、mRNA標的、例えば、本明細書において言及されたもの、例えば、アポB-100（NM_000384.2 GI:105990531）またはPCSK9（NM_174936.3 GI:299523249）の領域に相補的な単一の連続核酸塩基配列を形成する。

【0162】

長さ

10

オリゴマーは、全部で8連続ヌクレオチド長、9連続ヌクレオチド長、10連続ヌクレオチド長、11連続ヌクレオチド長、12連続ヌクレオチド長、13連続ヌクレオチド長、14連続ヌクレオチド長、15連続ヌクレオチド長、16連続ヌクレオチド長、17連続ヌクレオチド長、18連続ヌクレオチド長、19連続ヌクレオチド長、20連続ヌクレオチド長、21連続ヌクレオチド長、22連続ヌクレオチド長、23連続ヌクレオチド長、24連続ヌクレオチド長、25連続ヌクレオチド長、26連続ヌクレオチド長、27連続ヌクレオチド長、28連続ヌクレオチド長、29連続ヌクレオチド長、30連続ヌクレオチド長、31連続ヌクレオチド長、32連続ヌクレオチド長、33連続ヌクレオチド長、34連続ヌクレオチド長、および35連続ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなっていてよい。

【0163】

20

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

【0164】

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

【0165】

いくつかの態様において、本発明によるオリゴマーは、22個以下、例えば、20個以下、例えば、18個以下、例えば、15個、16個、または17個のヌクレオチドからなる。いくつかの態様において、本発明によるオリゴマーは、20個未満のヌクレオチドを含む。オリゴマーまたは連続ヌクレオチド配列の長さについて範囲が与えられる時、それには、範囲内に提供された下限および上限の長さが含まれること、例えば、10～30には、10および30の両方が含まれることが理解されるべきである。

30

【0166】

ヌクレオシドおよびヌクレオシド類似体

本明細書において使用される、「ヌクレオチド」という用語は、糖部分（またはその類似体）と、塩基部分と、共有結合で連結された基（連結基）、例えば、ホスフェート型またはホスホロチオエート型のヌクレオチド間連結基とを含む配糖体をさし、天然に存在するヌクレオチド、例えば、DNAまたはRNA、ならびに、本明細書において「ヌクレオチド類似体」とも呼ばれる、修飾型の糖および/または塩基部分を含む天然には存在しないヌクレオチドの両方を含む。本明細書において、単一のヌクレオチド（単位）は、モノマーまたは核酸単位とも呼ばれ得る。

40

【0167】

本発明に関して、ヌクレオシドおよびヌクレオチドという用語は、天然に存在するヌクレオチド/ヌクレオシド、例えば、DNAおよびRNA、ならびにヌクレオチド/ヌクレオシド類似体の両方をさすために使用されることが認識されるであろう。

【0168】

生化学の領域において、「ヌクレオシド」という用語は、糖部分と塩基部分とを含む配

50

糖体をさすために一般的に使用され、従って、オリゴマーのヌクレオチドの間のヌクレオシド間連結によって共有結合で連結されたヌクレオチド単位をさす時に使用され得る。バイオテクノロジーの領域において、「ヌクレオチド」という用語は、核酸モノマーまたは単位をさすためにしばしば使用され、従って、オリゴヌクレオチドに関しては、塩基、例えば、「ヌクレオチド配列」をさすことができ、典型的には、核酸塩基配列をさす（即ち、糖骨格およびヌクレオシド間連結の存在は、潜在的である）。同様に、特に、ヌクレオシド間連結基のうちの1個以上が修飾されているオリゴヌクレオチドの場合、「ヌクレオチド」という用語は「ヌクレオシド」をさすことができ、例えば、ヌクレオシドの間の連結の存在または性質を特定する時ですら、「ヌクレオチド」という用語が使用され得る。

【0169】

10

当業者が認識するように、オリゴヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドは、5'末端基を含んでいてもよいしまたは含んでいなくてもよいが、5'ヌクレオシド間連結基を含まない。

【0170】

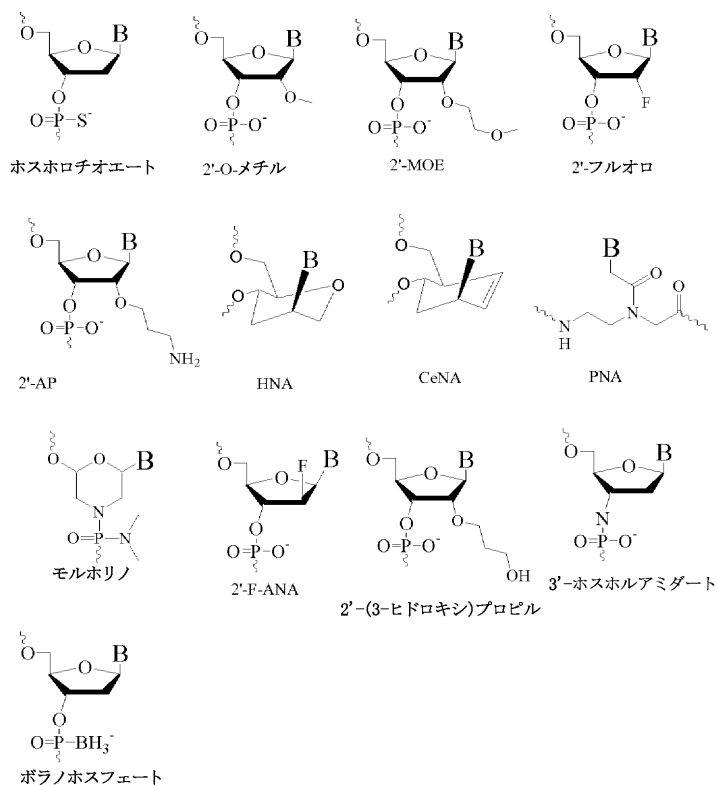
天然には存在しないヌクレオチドには、修飾型糖部分を有するヌクレオチド、例えば、二環式ヌクレオチド、または2'修飾型ヌクレオチド、例えば、2'置換型ヌクレオチドが含まれる。

【0171】

「ヌクレオチド類似体」は、糖および/または塩基部分の修飾による、天然ヌクレオチド、例えば、DNAヌクレオチドまたはRNAヌクレオチドのバリエーションである。類似体は、原則として、「サイレント」であるに過ぎないか、またはオリゴヌクレオチドに関して、天然ヌクレオチドと「等価」であり、即ち、標的遺伝子発現を阻害するためにオリゴヌクレオチドが機能する方式に対して機能的な効果を及ぼさないものであり得る。しかしながら、そのような「等価な」類似体は、例えば、製造がより容易であるかもしくはより安価であるか、または保管もしくは製造の条件に対してより安定しているか、またはタグもしくは標識を表す場合、有用であり得る。しかしながら、好ましくは、類似体は、例えば、標的に対する結合親和性を増加させ、かつ/または細胞内ヌクレアーゼに対する抵抗性を増加させ、かつ/または細胞への輸送の容易さを増加させることによって、発現を阻害するためにオリゴマーが機能する方式に対して機能的な効果を及ぼすであろう。ヌクレオシド類似体の具体例は、例えば、Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443およびUhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213によって記載されており、スキーム1に記載される。

20

30



10

20

スキーム1

【 0 1 7 2 】

従って、オリゴマーは、天然に存在するヌクレオチド、好ましくは、2'-デオキシヌクレオチド（本明細書において「DNA」と一般に呼ばれる）の単純な配列を含むかまたはそれからなっていてよいが、リボヌクレオチド（本明細書において「RNA」と一般に呼ばれる）、またはそのような天然に存在するヌクレオチドと1個以上の天然には存在しないヌクレオチド、即ち、ヌクレオチド類似体との組み合わせを含むかまたはそれからなることも可能である。そのようなヌクレオチド類似体は、適宜、標的配列に対するオリゴマーの親和性を増強し得る。

30

【 0 1 7 3 】

適当な好ましいヌクレオチド類似体の例は、WO2007/031091によって提供されるか、またはその中で参照されている。本発明のオリゴマーにおいて使用され得るその他のヌクレオチド類似体には、三環式核酸が含まれ、例えば、参照によって本明細書に組み入れられるWO2013154798およびWO2013154798を参照されたい。

【 0 1 7 4 】

親和性増強ヌクレオチド類似体、例えば、LNAまたは2'置換型糖のオリゴマーへの組み入れは、特異的に結合するオリゴマーのサイズの低下を可能にすることができ、非特異的なまたは異常な結合が起こる前にオリゴマーのサイズに対する上限を低下させることもできる。

40

【 0 1 7 5 】

オリゴマー化合物、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、本明細書において言及された化合物、例えば領域A、および、いくつかの任意の態様において、領域Bは、糖基が修飾されたヌクレオシドを1個以上含有していてもよい。そのような糖修飾型ヌクレオシド（ヌクレオシド類似体）は、増強されたヌクレアーゼ安定性、増加した結合親和性、または他の何らかの有益な生物学的特性を、アンチセンス化合物へ付与することができる。いくつかの態様において、ヌクレオシドは、化学的に修飾されたりボフラノース環部分を含む。

【 0 1 7 6 】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、少なくとも1個、例えば、

50

少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20個、少なくとも21個、少なくとも22個、少なくとも23個、少なくとも24個、または25個のヌクレオシド類似体、例えば、糖修飾型ヌクレオシド類似体を含む。

【0177】

二環式ヌクレオシド類似体には、リボース環の第2炭素と第4炭素とを連結する架橋（またはピラジカル）（ $C4^+-C2^+$ 架橋またはピラジカル）を含むヌクレオシド類似体が含まれる。第2炭素と第4炭素との間のピラジカルの存在は、リボースを3'エンド-（N型）立体構造へロックし、従って、 $C2^+-C4^+$ ピラジカルを有する二環式ヌクレオシド類似体は、しばしば、ロックド核酸（LNA）と呼ばれる。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、（任意で独立に）二環式ヌクレオシド類似体（例えば、LNA）および/または2'置換型ヌクレオシド類似体からなる群より選択され、例えば、（任意で独立に）2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-AP、2'-FANA、2'-(3-ヒドロキシ)プロピル、および2'-フルオロ-DNA単位、ならびに/またはその他の（任意での）糖修飾型ヌクレオシド類似体、例えば、モルホリノ、ペプチド核酸（PNA）、CeNA、アンリンクト核酸（UNA）、ヘキシトール核酸（HNA）、ビシクロ-HNA（例えば、WO2009/100320を参照）からなる群より選択される。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、その標的核酸（または相補的なDNA配列もしくはRNA配列）に対する第1領域の親和性を増加させる。

【0178】

いくつかの態様において、オリゴマーは、少なくとも1個の二環式ヌクレオシド類似体、例えば、LNAを含む。いくつかの態様において、第1領域は、少なくとも1個の二環式ヌクレオシド類似体（例えば、LNA）および/または2'置換型ヌクレオシド類似体を含む。いくつかの態様において、オリゴマー内に存在するヌクレオシド類似体は、全て同一の糖修飾を含む。いくつかの態様において、第1領域内に存在する少なくとも1個のヌクレオシド類似体が、二環式ヌクレオシド類似体であり、例えば、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、例えば、全てのヌクレオシド類似体（領域BのDNAヌクレオシドおよびまたはRNAヌクレオシド以外）が、糖修飾型ヌクレオシド類似体、例えば、二環式ヌクレオシド類似体、例えば、LNA、例えば、-D-X-LNAもしくは-L-X-LNA（Xはオキシ、アミノ、もしくはチオである）、または本明細書に開示されたその他のLNA、例えば、以下に限定されないが、(R/S)cET、cMOE、もしくは5'-Me-LNAである。

【0179】

化学的に修飾されたリボフラノース環の例には、非限定的に、置換基（例えば、5'置換基および2'置換基）の付加；二環式核酸（BNA）を形成するための非ジェミナル環原子の架橋；リボシル環酸素原子のS、N(R)、または $C(R_1)(R_2)$ （ $R=H$ 、 C_1-C_2 アルキル、または保護基）への置換；ならびにそれらの組み合わせが含まれる。化学的に修飾された糖の例には、2'-F-5'-メチル置換型ヌクレオシド（他の開示された5',2'-ビス置換型ヌクレオシドについては、8/21/08に公開されたPCT国際出願WO2008/101157を参照）、リボシル環酸素原子のSへの置換および2'位でのさらなる置換（2005年6月16日に公開された、公開された米国特許出願US2005/0130923を参照）、あるいはBNAの5'置換（LNAが、例えば、5'-メチル基または5'-ビニル基によって置換された、11/22/07に公開されたPCT国際出願WO2007/134181を参照）が含まれる。

【0180】

修飾型糖部分を有するヌクレオシドの例には、非限定的に、5'-ビニル置換基、5'-メチル置換基（RまたはS）、4'-S置換基、2'-F置換基、2'-OCH₃置換基、および2'-O(CH₂)₂₀CH

10

20

30

40

50

置換基を含むヌクレオシドが含まれる。2'位の置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、0-アリル、0-C₁-C₁₀アルキル、OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(Rm)(Rn)、およびO-CH₂-C(=O)-N(Rm)(Rn) [RmおよびRnは、各々独立に、Hまたは置換型もしくは非置換型のC₁-C₁₀アルキルである]からも選択され得る。

【0181】

本明細書において使用される、「二環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分を含む修飾型ヌクレオシドをさす。二環式ヌクレオシドの例には、非限定的に、4'リボシル環原子と2'リボシル環原子との間に架橋を含むヌクレオシドが含まれる。いくつかの態様において、本明細書に提供される化合物には、架橋が4'~2'二環式ヌクレオシドを含む、1種以上の二環式ヌクレオシドが含まれる。そのような4'~2'二環式ヌクレオシドの例には、以下の式のうちのいずれかが含まれるが、これらに限定されない：4'-(CH₂)-O-2' (LNA)；4'-(CH₂)-S-2'；4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA)；4'-CH(CH₃)-O-2'、および4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'、ならびにそれらの類似体（2008年7月15日に発行された米国特許第7,399,845号を参照）；4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'およびその類似体（2009年1月8日に公開された公開されたPCT国際出願WO2009/006478を参照）；4'-CH₂-N(OCH₃)-2'およびその類似体（2008年12月11日に公開された、公開されたPCT国際出願WO2008/150729を参照）；4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'（2004年9月2日に公開された、公開された米国特許出願US2004/0171570を参照）；4'-CH₂-N(R)-O-2' [Rは、H、C₁-C₁₀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号を参照）；4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (Chattopadhyaya, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134を参照)；ならびに4'-CH₂-C(=CH₂)-2'およびその類似体（2008年12月8日に公開された、公開されたPCT国際出願WO2008/154401を参照）。例えば、Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456；Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630；Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638；Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222；Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039；Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 129(26)8362-8379 (Jul. 4, 2007)；Elayadi et al., Curr. Opin. Invers. Drugs, 2001, 2, 558-561；Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7；Oram et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3, 239-243；米国特許第6,670,461号、第7,053,207号、第6,268,490号、第6,770,748号、第6,794,499号、第7,034,133号、第6,525,191号、第7,399,845号；公開されたPCT国際出願WO2004/106356、WO94/14226、WO2005/021570、およびWO2007/134181；米国特許公開番号US2004/0171570、US2007/0287831、およびUS2008/0039618；ならびに米国特許出願番号12/129,154、60/989,574、61/026,995、61/026,998、61/056,564、61/086,231、61/097,787、および61/099,844；ならびにPCT国際出願番号PCT/US2008/064591、PCT/US2008/066154、およびPCT/US2008/068922も参照。上記二環式ヌクレオシドの各々は、1種以上の立体化学的糖配置、例えば、α-L-リボフラノースおよびβ-D-リボフラノースを有して、調製され得る（1999年3月25日にWO99/14226として公開されたPCT国際出願PCT DK98/00393を参照）。

【0182】

いくつかの態様において、BNAヌクレオシドの二環式糖部分には、ペントフラノシル糖部分の4'位と2'位との間に少なくとも1個の架橋を有する化合物が含まれるが、これらに限定されない。そのような架橋は、独立に、-[C(R_a)X(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)- [式中、xは、0、1、または2であり；nは、1、2、3、または4であり；R_aおよびR_bは、各々独立に、H、保護基、ヒドロキシル、C₁-C₁₂アルキル、置換型C₁-C₁₂アルキル、C₂-C₁₂アルケニル、置換型C₂-C₁₂アルケニル、C₂-C₁₂アルキニル、置換型C₂-C₁₂アルキニル、C₅-C₂₀アリール、置換型C₅-C₂₀アリール、複素環ラジカル、置換型複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換型ヘテロアリール、C₅-C₇脂環式ラジカル、置換型C₅-C₇脂環式ラジカル、ハロゲン、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、アシル(C(=O)-H)、置換型アシル、CN、スルホニル(S(=O)₂-J₁)、またはスルホキシル(S(=O)-J₁)であり；J₁およびJ₂は、各々独立に、H、C₁-C₆アルキル、置換型C₁-C₁₂アルキル、C₂-C₁₂アルケニル、置換型C₂-C₁₂アルケニル、C₂-C₁₂アルキニル、置換型C₂-C₁₂アルキニル、C₅-C₂₀アリール、置換型C₅-C₂₀アリール、アシ

ル (C(=O)-H)、置換型アシル、複素環ラジカル、置換型複素環ラジカル、C₁-C₁₂アミノアルキル、置換型C₁-C₁₂アミノアルキル、または保護基である]より独立に選択される1個または2~4個の連結された基を含む。

【0183】

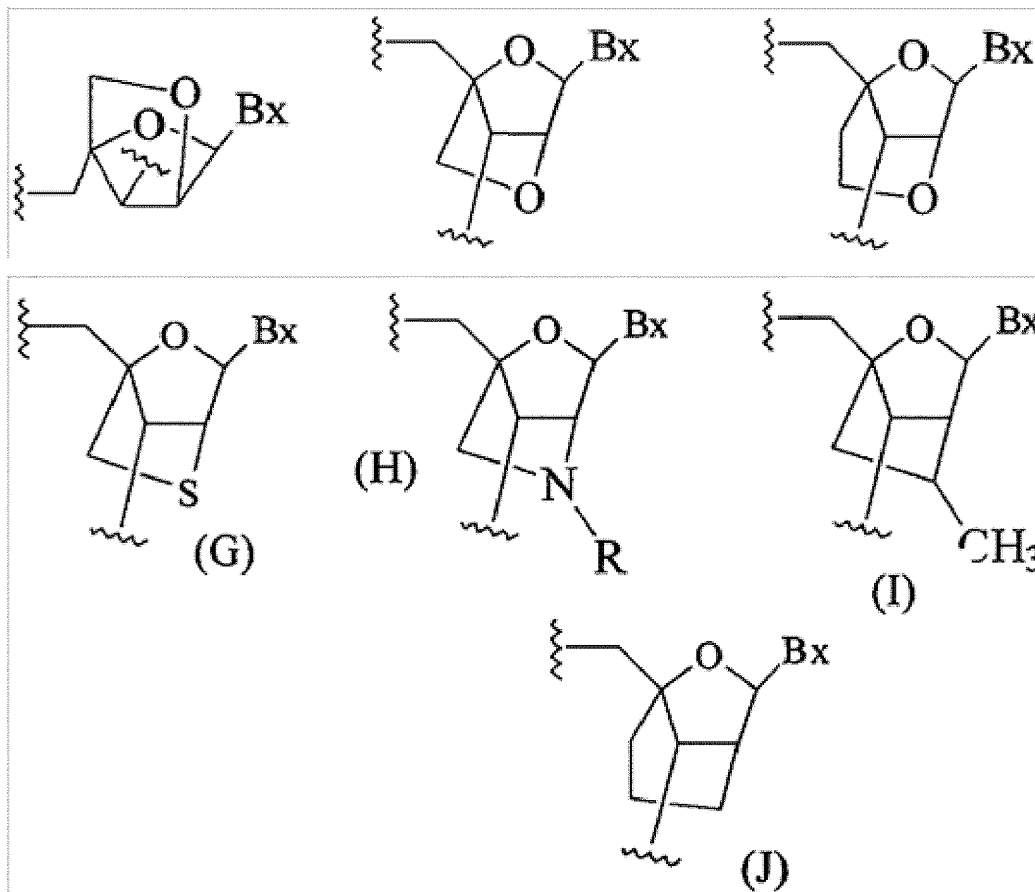
いくつかの態様において、二環式糖部分の架橋は、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ 、 $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ 、または $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ である。いくつかの態様において、架橋は、4'-CH₂-2'、4'-(CH₂)₂-2'、4'-(CH₂)₃-2'、4'-CH₂-O-2'、4'-(CH₂)₂-O-2'、4'-CH₂-O-N(R)-2'、および4'-CH₂-N(R)-O-2'-[式中、Rは、各々独立に、H、保護基、またはC₁-C₁₂アルキルである]である。

【0184】

いくつかの態様において、二環式ヌクレオシドは、異性体配置によってさらに定義される。例えば、4'-2'メチレン-オキシ架橋を含むヌクレオシドは、a-L配置または-D配置にあり得る。以前に、アンチセンス活性を示したアンチセンスオリゴヌクレオチドへ、a-L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNAが組み入れられた(Frieden et al, Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372)。

【0185】

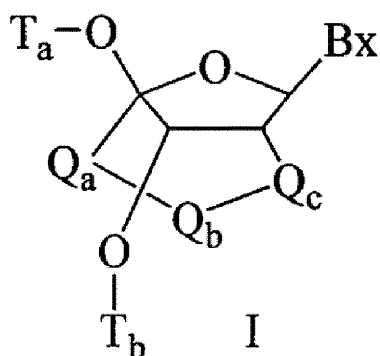
いくつかの態様において、二環式ヌクレオシドには、以下に図示されるような、(A) a-L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA、(B) -D-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA、(C) エチレンオキシ(4'-(CH₂)₂-O-2')BNA、(D) アミノオキシ(4'-CH₂-O-N(R)-2')BNA、(E) オキシアミノ(4'-CH₂-N(R)-O-2')BNA、(F) メチル(メチレンオキシ)(4'-CH(CH₃)-O-2')BNA、(G) メチレン-チオ(4'-CH₂-S-2')BNA、(H) メチレン-アミノ(4'-CH₂-N(R)-2')BNA、(I) メチル炭素環式(4'-CH₂-CH(CH₃)-2')BNA、および(J) プロピレン炭素環式(4'-(CH₂)₃-2')BNAが含まれるが、これらに限定されない。



式中、Bxは、塩基部分であり、Rは、独立に、H、保護基、またはC₁-C₂アルキルである。

【0186】

特定の態様において、二環式ヌクレオシドは、式Iを有する：



10

式中、Bxは、複素環式塩基部分であり；

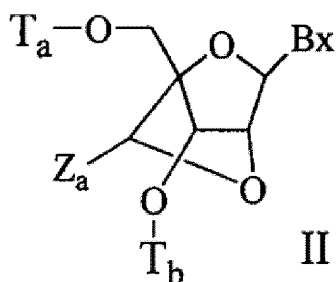
-Q_a-Q_b-Q_c-は、-CH₂-N(R_c)-CH₂-、-C(=O)-N(R_c)-CH₂-、-CH₂-O-N(R_c)-、-CH₂-N(R_c)-O-、または-N(R_c)-O-CH₂であり；

R_cは、C₁-C₁₂アルキルまたはアミノ保護基であり；かつ

T_aおよびT_bは、各々独立に、H、ヒドロキシル保護基、コンジュゲート基、反応性リン基、リン部分、または支持媒体への共有結合性の付着である。

【 0 1 8 7 】

いくつかの態様において、二環式ヌクレオシドは、式IIを有する：



20

式中、Bxは、複素環式塩基部分であり；

T_aおよびT_bは、各々独立に、H、ヒドロキシル保護基、コンジュゲート基、反応性リン基、リン部分、または支持媒体への共有結合性の付着であり；Z_aは、C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニル、置換型C₁-C₆アルキル、置換型C₂-C₆アルケニル、置換型C₂-C₆アルキニル、アシル、置換型アシル、置換型アミド、チオール、または置換型チオである。

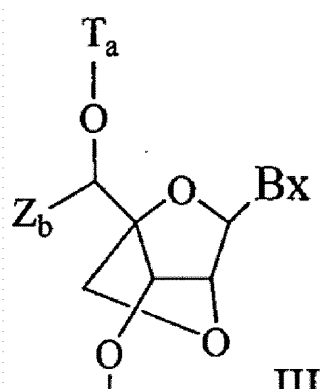
30

【 0 1 8 8 】

いくつかの態様において、置換型の基は、各々独立に、ハロゲン、オキソ、ヒドロキシル、OJ_c、NJ_d、SJ_c、N₃、OC(=X)J_c、およびNJ_eC(=X)NJ_cJ_dより独立に選択される置換基によって一置換または多置換されている。J_c、J_d、およびJ_eは、各々独立に、H、C₁-C₆アルキル、または置換型C₁-C₆アルキルであり、Xは、OまたはNJ_cである。

【 0 1 8 9 】

いくつかの態様において、二環式ヌクレオシドは、式IIIを有する：



40

式中、Bxは、複素環式塩基部分であり；

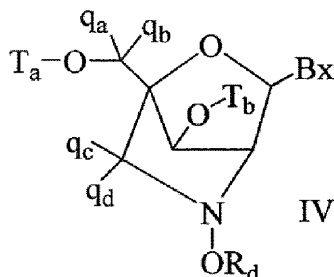
50

T_a および T_b は、各々独立に、H、ヒドロキシル保護基、コンジュゲート基、反応性リン基、リン部分、または支持媒体への共有結合性の付着であり；

R_d は、 C_1 - C_6 アルキル、 C_2 - C_6 アルケニル、 C_2 - C_6 アルキニル、置換型 C_1 - C_6 アルキル、置換型 C_2 - C_6 アルケニル、置換型 C_2 - C_6 アルキニル、または置換型アシル($C(=O)-$)である。

【0190】

いくつかの態様において、二環式ヌクレオシドは、式IVを有する：



10

式中、 Bx は、複素環式塩基部分であり；

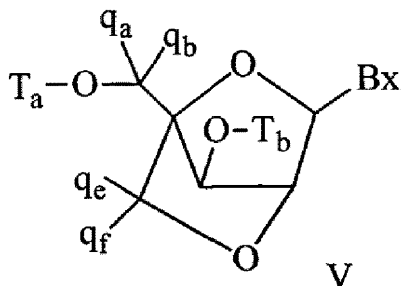
T_a および T_b は、各々独立に、H、ヒドロキシル保護基、コンジュゲート基、反応性リン基、リン部分、または支持媒体への共有結合性の付着であり；

R_d は、 C_1 - C_6 アルキル、置換型 C_1 - C_6 アルキル、 C_2 - C_6 アルケニル、置換型 C_2 - C_6 アルケニル、 C_2 - C_6 アルキニル、置換型 C_2 - C_6 アルキニルであり； q_b 、 q_c 、および q_d は、各々独立に、H、ハロゲン、 C_1 - C_6 アルキル、置換型 C_1 - C_6 アルキル、 C_2 - C_6 アルケニル、置換型 C_2 - C_6 アルケニル、 C_2 - C_6 アルキニル、または置換型 C_2 - C_6 アルキニル、 C_1 - C_6 アルコキシル、置換型 C_1 - C_6 アルコキシル、アシル、置換型アシル、 C_1 - C_6 アミノアルキル、または置換型 C_1 - C_6 アミノアルキルである。

20

【0191】

いくつかの態様において、二環式ヌクレオシドは、式Vを有する：



30

式中、 Bx は、複素環式塩基部分であり；

T_a および T_b は、各々独立に、H、ヒドロキシル保護基、コンジュゲート基、反応性リン基、リン部分、または支持媒体への共有結合性の付着であり； q_a 、 q_b 、 q_c 、および q_f は、各々独立に、水素、ハロゲン、 C_1 - C_{12} アルキル、置換型 C_1 - C_{12} アルキル、 C_2 - C_{12} アルケニル、置換型 C_2 - C_{12} アルケニル、 C_2 - C_{12} アルキニル、置換型 C_2 - C_{12} アルキニル、 C_1 - C_{12} アルコキシ、置換型 C_1 - C_{12} アルコキシ、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 、もしくは $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ であるか；または q_e および q_f は、共に、 $=C(q_g)(q_h)$ であり； q_g および q_h は、各々独立に、H、ハロゲン、 C_1 - C_{12} アルキル、または置換型 C_1 - C_{12} アルキルである。

40

【0192】

メチレンオキシ(4'- CH_2 -O-2') BNAモノマー、アデニン、シトシン、グアニン、5-メチル-シトシン、チミン、およびウラシルの合成および調製は、それらのオリゴマー化および核酸認識特性と共に記載されている(例えば、Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630を参照)。BNAおよびその調製は、WO98/39352およびWO99/4226にも記載されている。

【0193】

メチレンオキシ(4'- CH_2 -O-2') BNA、メチレンオキシ(4'- CH_2 -O-2') BNA、および2'-

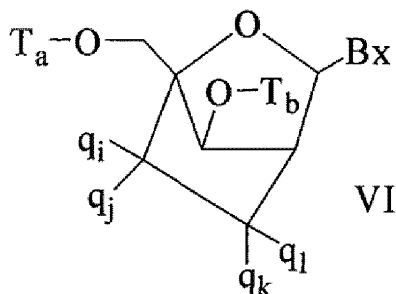
50

チオ-BNAの類似体も、調製されている（例えば、Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222を参照）。核酸ポリメラーゼの基質としてのロックドヌクレオシド類似体を含むオリゴデオキシリボヌクレオチド二重鎖の調製も記載されている（例えば、Wengel et al., WO99/14226を参照）。さらに、新規の立体構造的に制限された高親和性オリゴヌクレオチド類似体である2'-アミノ-BNAの合成が、当技術分野において記載されている（例えば、Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039を参照）。さらに、2'-アミノ-BNAおよび2'-メチルアミノ-BNAが調製されており、相補的なRNA鎖およびDNA鎖とのそれらの二重鎖の熱安定性が以前に報告されている。

【0194】

いくつかの態様において、二環式ヌクレオシドは、式VIを有する：

10



式中、Bxは、複素環式塩基部分であり；

TaおよびTbは、各々独立に、H、ヒドロキシル保護基、コンジュゲート基、反応性リン基、リン部分、または支持媒体へ共有結合性の付着であり；qj、qj、qk、およびqlは、各々独立に、H、ハロゲン、C₁-C₁₂アルキル、置換型C₁-C₁₂アルキル、C₂-C₁₂アルケニル、置換型C₂-C₁₂アルケニル、C₂-C₁₂アルキニル、置換型C₂-C₁₂アルキニル、C₁-C₁₂アルコキシ、置換型C₂-C₁₂アルコキシ、OJ_j、SJ_j、SOJ_j、SO₂J_j、NJ_jJ_k、N₃、CN、C(=O)OJ_j、C(=O)NJ_jJ_k、C(=O)J_j、O-C(=O)NJ_jJ_k、N(H)C(=NH)NJ_jJ_k、N(H)C(=O)NJ_jJ_k、または(H)C(=S)NJ_jJ_kであり；かつqiおよびqjまたはqlおよびqkは、共に、=C(q_g)(q_h) [式中、q_gおよびq_hは、各々独立に、H、ハロゲン、C₁-C₁₂アルキル、または置換型C₁-C₆アルキルである]である。

20

【0195】

4'-(CH₂)₃-2'架橋およびアルケニル類似体、架橋4'-CH=CH-CH₂-2'を有する炭素環式二環式ヌクレオシドが、記載されている（例えば、Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443およびAlbaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740を参照）。炭素環式二環式ヌクレオシドの合成および調製も、それらのオリゴマー化および生化学的研究と共に記載されている（例えば、Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(26), 8362-8379を参照）。

30

【0196】

本明細書において使用される、「4'~2'（4'-2'）二環式ヌクレオシド」または「4'~2'（4' to 2'）二環式ヌクレオシド」とは、2'炭素原子と4'炭素原子とを接続する架橋を含むフラノース環を含む二環式ヌクレオシドをさす。

【0197】

40

本明細書において使用される、「単環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分でない修飾型糖部分を含むヌクレオシドをさす。いくつかの態様において、ヌクレオシドの糖部分または糖部分類似体は、任意の位置で修飾または置換されてよい。本明細書において使用される、「2'修飾型糖」とは、2'位において修飾されたフラノシル糖を意味する。いくつかの態様において、そのような修飾には、以下のものより選択される置換基が含まれる：ハロゲン化物、例えば、以下に限定されないが、置換型および非置換型のアルコキシ、置換型および非置換型のチオアルキル、置換型および非置換型のアミノアルキル、置換型および非置換型のアルキル、置換型および非置換型のアリル、ならびに置換型および非置換型のアルキニル。いくつかの態様において、2'修飾は、O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_n, NH₂、O(CH₂)_n, CH₃、O(CH₂)_n, ONH₂、OCH₂C(=O)N(H)CH₃、およびO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂（式中

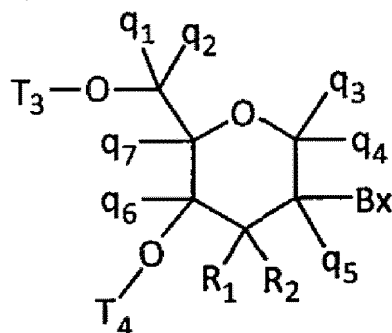
50

、 n および m は、1～約10である)を含むが、これらに限定されない置換基より選択される。その他の2'置換基も、以下のものより選択され得る： C_1 - C_{12} アルキル；置換型アルキル；アルケニル；アルキニル；アルカリル；アラルキル；O-アルカリルまたはO-アラルキル；SH；SCH₃；OCN；Cl；Br；CN；CF₃；OCF₃；SOCH₃；SO₂CH₃；ONO₂；NO₂；N₃；NH₂；ヘテロシクロアルキル；ヘテロシクロアルカリル；アミノアルキルアミノ；ポリアルキルアミノ；置換型シリル；R；切断基；レポーター基；インターカレーター；薬物動態学的特性を改善するための基；およびアンチセンス化合物の薬力学的特性を改善するための基、ならびに類似の特性を有するその他の置換基。いくつかの態様において、修飾型ヌクレオシドは、2'-MOE側鎖を含む（例えば、Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 1 1944-12000を参照）。そのような2'-MOE置換は、未修飾ヌクレオシド、ならびに2'-O-メチル、O-プロピル、およびO-アミノプロピルのようなその他の修飾型ヌクレオシドと比較して改善された結合親和性を有することが記載されている。2-MOE置換基を有するオリゴヌクレオチドは、インビボで使用するための有望な特色を有する遺伝子発現のアンチセンス阻害剤であることも示されている（例えば、Martin, P., He/v. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504；Altman et al., Chimia, 1996, 50, 168-176；Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637；およびAltmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926を参照）。

【0198】

本明細書において使用される、「修飾型テトラヒドロピランヌクレオシド」または「修飾型THPヌクレオシド」とは、通常のヌクレオシドにおけるペントフラノシル残基が6員テトラヒドロピラン「糖」（糖代替物）に置換されているヌクレオシドを意味する。修飾されたTHPヌクレオシドには、ヘキシトール核酸（HNA）、アニトール核酸（ANA）、マニトール（manitol）核酸（MNA）（Leumann, C. J. Bioorg. and Med. Chem. (2002) 10: 841-854を参照）、フルオロHNA（F-HNA）と当技術分野において呼ばれているもの、または式Xを有する化合物が含まれるが、これらに限定されない：

式X



式中、式Xの少なくとも1つの前記テトラヒドロピランヌクレオシド類似体のそれぞれについて独立に、

Bxは、複素環式塩基部分であり；

T₃およびT₄は、各々独立に、テトラヒドロピランヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物と連結しているヌクレオシド間連結基であるか、またはT₃およびT₄の一方が、テトラヒドロピランヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物と連結しているヌクレオシド間連結基であり、かつT₃およびT₄の他方が、H、ヒドロキシル保護基、連結されたコンジュゲート基、または5'末端もしくは3'末端の基であり；q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、およびq₇は、各々独立に、H、C₁-C₆アルキル、置換型C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、置換型C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニル、または置換型C₂-C₆アルキニルであり；かつR₁およびR₂の一方は、水素であり、かつ他方は、ハロゲン、置換型または非置換型のアルコキシ、NJ、J₂、SJ、N₃、OC(=X)J₁、OC(=X)NJ₁J₂、NJ₃C(=X)NJ₁J₂、およびCN[式中、Xは、O、S、またはNJ₁であり、J₁、J₂、およびJ₃は、各々独立に、HまたはC₁-C₆アルキルである]より選択される。

【0199】

いくつかの態様において、q_m、q_n、q_p、q_r、q_s、q_t、およびq_uが各々Hである、式Xの修

飾型THPヌクレオシドが提供される。いくつかの態様において、 q_m 、 q_n 、 q_p 、 q_r 、 q_s 、 q_t 、および q_u のうちの少なくとも1個は、H以外である。いくつかの態様において、 q_m 、 q_n 、 q_p 、 q_r 、 q_s 、 q_t 、および q_u のうちの少なくとも1個は、メチルである。いくつかの態様において、 R_1 および R_2 のうちの一方がFである、式XのTHPヌクレオシドが提供される。いくつかの態様において、 R_1 がフルオロであり、かつ R_2 がHであり、 R_1 がメトキシであり、かつ R_2 がHであり、 R_1 がメトキシエトキシであり、かつ R_2 がHである。

【0200】

本明細書において使用される、「2'修飾型」または「2'置換型」とは、HまたはOH以外の置換基を2'位に含む糖を含むヌクレオシドをさす。2'修飾型ヌクレオシドには、非架橋2'置換基、例えば、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリルおよびO- C_1 - C_{10} アルキル、 $-OCF_3$ 、O- $(CH_2)_2$ -O- CH_3 、2'-O $(CH_2)_2SCH_3$ 、O- $(CH_2)_2$ -O-N(R_m)(R_n)、またはO- CH_2 -C(=O)-N(R_m)(R_n) [式中、 R_m および R_n は、各々独立に、Hまたは置換型もしくは非置換型の C_1 - C_{10} アルキルである]を有するヌクレオシドが含まれるが、これらに限定されない。2'修飾型ヌクレオシドは、例えば、糖の他の位置および/または核酸塩基に、他の修飾をさらに含んでいてもよい。

10

【0201】

本明細書において使用される、「2'-F」とは2'位にフルオロ基を含む糖をさす。

【0202】

本明細書において使用される、「2'-OMe」または「2'-OCH₃」または「2'-O-メチル」とは、各々、糖環の2'位に-OCH₃基を含む糖を含むヌクレオシドをさす。

20

【0203】

本明細書において使用される、「オリゴヌクレオチド」とは、多数の連結されたヌクレオシドを含む化合物をさす。

【0204】

いくつかの態様において、多数のヌクレオシドのうちの1個以上が修飾型である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1個以上のリボヌクレオシド(RNA)および/またはデオキシリボヌクレオシド(DNA)を含む。

【0205】

アンチセンス化合物へ組み入れるためのヌクレオシドを修飾するために使用され得るその他の多くのピシクロ糖代替環系およびトリシクロ糖代替環系も、当技術分野において公知である(例えば、概説論文:Leumann,J.C,Bioorganic and Medicinal Chemistry,2002,10,841-854を参照)。そのような環系は、活性を増強するために様々な付加的な置換を受けることができる。修飾型糖の調製の方法は、当業者に周知である。修飾型糖部分を有するヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分(天然、修飾型、またはそれらの組み合わせ)は、適切な核酸標的とのハイブリダイゼーションのため、維持される。

30

【0206】

いくつかの態様において、アンチセンス化合物は、修飾型糖部分を有するヌクレオチドを1個以上含む。いくつかの態様において、修飾型糖部分は2'-MOEである。いくつかの態様において、2'-MOE修飾型ヌクレオチドは、ギャップマーモチーフに配置される。いくつかの態様において、修飾型糖部分は、cEtである。いくつかの態様において、cEt修飾型ヌクレオチドは、ギャップマーモチーフのウィング(wing)全体に配置される。

40

【0207】

いくつかの態様において、BNA(LNA)において、 R^{4*} および R^{2*} は、共に、R配置またはS配置のいずれかにあるピラジカル-O-CH(CH_2OCH_3)-を表す(2'-O-メトキシエチル二環式核酸 - Seth at al.,2010,J.Org.Chem)。

【0208】

いくつかの態様において、BNA(LNA)において、 R^{4*} および R^{2*} は、共に、R配置またはS配置のいずれかにあるピラジカル-O-CH- (CH_2CH_3) -を表す(2'-エチル二環式核酸 - Seth at al.,2010,J.Org.Chem)。

【0209】

50

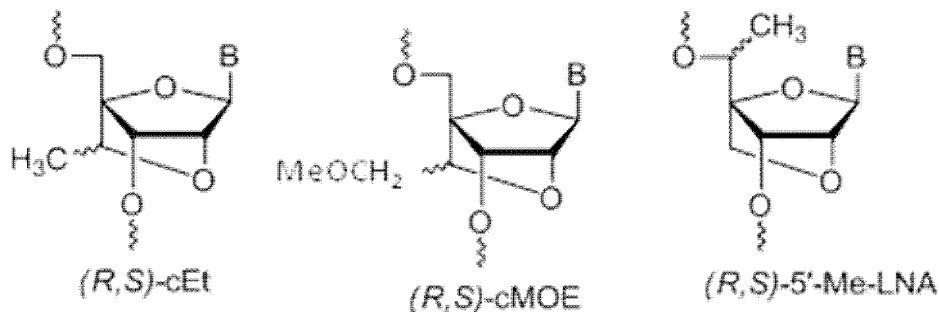
いくつかの態様において、BNA (LNA) において、 R^{4*} および R^{2*} は、共に、R配置またはS配置のいずれかにあるピラジカル-O-CH-(CH₃)-を表す。いくつかの態様において、 R^{4*} および R^{2*} は、共に、ピラジカル-O-CH₂-O-CH₂-を表す (Seth et al., 2010, J.Org.Chem)。

【0210】

いくつかの態様において、BNA (LNA) において、 R^{4*} および R^{2*} は、共に、ピラジカル-O-NR-CH₃-を表す (Seth et al., 2010, J.Org.Chem)。

【0211】

いくつかの態様において、LNA単位は、以下の群より選択される構造を有する。



10

【0212】

従って、オリゴマーは、天然に存在するヌクレオチド、好ましくは、2'-デオキシヌクレオチド (本明細書において「DNA」と一般に呼ばれる) の単純な配列を含むかまたはそれからなっているてもよいが、リボヌクレオチド (本明細書において「RNA」と一般に呼ばれる)、またはそのような天然に存在するヌクレオチドと1個以上の天然には存在しないヌクレオチド、即ち、ヌクレオチド類似体との組み合わせを含むかまたはそれからなることも可能である。そのようなヌクレオチド類似体は、適宜、標的配列に対するオリゴマーの親和性を増強し得る。

20

【0213】

親和性増強ヌクレオチド類似体、例えば、BNA (例えば、LNA) または2'置換型糖のオリゴマーへの組み入れは、特異的に結合するオリゴマーのサイズの低下を可能にすることができ、非特異的なまたは異常な結合が起こる前にオリゴマーのサイズに対する上限を低下させることもできる。

30

【0214】

いくつかの態様において、オリゴマーは、少なくとも1個のヌクレオチド類似体を含む。いくつかの態様において、オリゴマーは、少なくとも2個のヌクレオチド類似体を含む。いくつかの態様において、オリゴマーは、3~8個のヌクレオチド類似体、例えば、6個または7個のヌクレオチド類似体を含む。現在最も好ましい態様において、該ヌクレオチド類似体のうちの少なくとも1個は、BNA、例えば、ロックド核酸 (LNA) であり；例えば、ヌクレオチド類似体のうちの少なくとも3個または少なくとも4個または少なくとも5個または少なくとも6個または少なくとも7個または8個が、BNA、例えば、LNAであり得る。いくつかの態様において、全てのヌクレオチド類似体が、BNA、例えば、LNAであり得る。

【0215】

ヌクレオチドのみからなる好ましいヌクレオチド配列モチーフまたはヌクレオチド配列に言及する際、その配列によって定義される本発明のオリゴマーは、該配列に存在するヌクレオチドのうちの1個以上の代わりに、対応するヌクレオチド類似体、例えば、オリゴマー/標的二重鎖の二重鎖安定性/ T_m を上昇させるBNA単位またはその他のヌクレオチド類似体 (即ち、親和性増強ヌクレオチド類似体) を含んでいてもよいことが認識されるであろう。

40

【0216】

好ましいヌクレオチド類似体は、LNA、例えば、オキシ-LNA (例えば、-D-オキシ-LNA および -L-オキシ-LNA) ならびに/またはアミノ-LNA (例えば、-D-アミノ-LNA および -L-アミノ-LNA) ならびに/またはチオ-LNA (例えば、-D-チオ-LNA および -L-チオ-

50

LNA)ならびに/またはENA(例えば、-D-ENAおよび-L-ENA)である。最も好ましいのは、-D-オキシ-LNAである。

【0217】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマー内に存在するヌクレオチド類似体は、例えば、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、BNA単位、例えば、LNA単位、アラビノ核酸(ANA)単位、2'-フルオロ-ANA単位、HNA単位、INA単位(インターカレーティング核酸 - 参照によって本明細書に組み入れられるChristensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 2002 30:4918-4925)、および2'MOE単位:より独立に選択される。いくつかの態様において、ヌクレオチド類似体の上記のタイプのうちの一つのみが、本発明のオリゴマー、例えば、その第1領域または連続ヌクレオチド配列に存在する。

10

【0218】

いくつかの態様において、ヌクレオチド類似体は、2'-O-メトキシエチル-RNA(2'MOE)、2'-フルオロ-DNAモノマー、またはLNAヌクレオチド類似体であり、従って、本発明のオリゴヌクレオチドは、これらの三つのタイプの類似体より独立に選択されるヌクレオチド類似体を含んでいてもよい、または三つのタイプより選択される一つのタイプの類似体のみを含んでいてもよい。いくつかの態様において、ヌクレオチド類似体のうちの少なくとも1個は、2'-MOE-RNAであり、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個が、2'-MOE-RNAヌクレオチド単位である。いくつかの態様において、ヌクレオチド類似体のうちの少なくとも1個は、2'-フルオロDNAであり、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個が、2'-フルオロ-DNAヌクレオチド単位である。

20

【0219】

いくつかの態様において、本発明によるオリゴマーは、少なくとも1個のBNA、例えば、ロックド核酸(LNA)単位、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、もしくは8個のBNA/LNA単位、例えば、3~7個もしくは4~8個のBNA/LNA単位、または3個、4個、5個、6個、もしくは7個のBNA/LNA単位を含む。いくつかの態様において、全てのヌクレオチド類似体が、BNA、例えば、LNAである。いくつかの態様において、オリゴマーは、-D-オキシ-LNA、および以下のLNA単位のうちの1種以上の両方を含み得る:-D配置もしくは-L配置のいずれかまたはそれらの組み合わせにあるチオ-LNA、アミノ-LNA、オキシ-LNA、および/またはENA。いくつかの態様において、全てのBNA、例えば、LNAシトシン単位が、5'-メチル-シトシンである。本発明のいくつかの態様において、オリゴマー(例えば、第1領域、任意で第2領域)は、BNA単位およびLNA単位ならびにDNA単位の両方を含み得る。いくつかの態様において、LNA単位およびDNA単位の合計は、10~25、例えば、10~24、好ましくは、10~20、例えば、10~18、例えば、12~16である。本発明のいくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域のヌクレオチド配列、例えば、連続ヌクレオチド配列は、少なくとも1個のBNA、例えば、LNAからなり、残りのヌクレオチド単位はDNA単位である。いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、BNA、例えば、LNA、ヌクレオチド類似体、および天然に存在するヌクレオチド(例えば、RNAヌクレオチドまたはDNAヌクレオチド、最も好ましくは、DNAヌクレオチド)のみを、任意で、修飾型ヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロチオエートと共に含む。

30

【0220】

「核酸塩基」という用語は、ヌクレオチドの塩基部分をさし、天然に存在するバリエーションおよび天然には存在しないバリエーションの両方を含む。従って、「核酸塩基」は、公知のプリン複素環およびピリミジン複素環のみならず、それらの複素環式類似体および互変異性体も含む。領域BのDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドは、天然に存在する核酸塩基および/または天然には存在しない核酸塩基を有し得ることが認識されるであろう。

40

【0221】

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

50

つかの態様において、核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、ウラシル、5-メチルシトシンからなる群より独立に選択され得る。いくつかの態様において、核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、および5-メチルシトシンからなる群より独立に選択され得る。

【0222】

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

【0223】

10

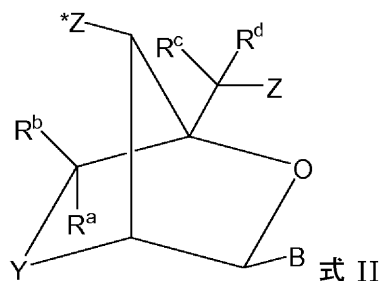
LNA

「LNA」という用語は、C2'-C4'ピラジカル（架橋）を含み、「ロックド核酸」として公知である二環式ヌクレオシド類似体をさす。それはLNAモノマーをさす場合もあるし、または「LNAオリゴヌクレオチド」に関して使用された時、LNAとは、1個以上のそのような二環式ヌクレオチド類似体を含有しているオリゴヌクレオチドをさす。いくつかの局面において、二環式ヌクレオシド類似体は、LNAヌクレオチドであり、従って、これらの用語は、交換可能に使用され得、そのような態様において、いずれも、リボース糖環のC2'とC4'との間のリンカー基（例えば、架橋）の存在を特徴とする。

【0224】

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

20



式中、Yは、-O-、-CH₂O-、-S-、-NH-、N(R^e)、および/または-CH₂-からなる群より選択され；

30

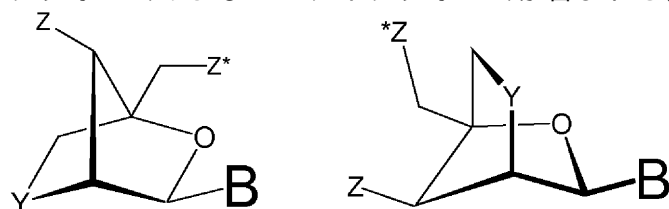
ZおよびZ*

は、ヌクレオチド間連結、R^H、末端基、または保護基の中から独立に選択され；Bは、天然または非天然のヌクレオチド塩基部分（核酸塩基）を構成し、R^Hは、水素およびC₁₋₄-アルキルより選択され；R^a、R^b、R^c、R^d、およびR^eは、任意で独立に、水素、置換されていてもよいC₁₋₁₂-アルキル、置換されていてもよいC₂₋₁₂-アルケニル、置換されていてもよいC₂₋₁₂-アルキニル、ヒドロキシ、C₁₋₁₂-アルコキシ、C₂₋₁₂-アルコキシアルキル、C₂₋₁₂-アルケニルオキシ、カルボキシ、C₁₋₁₂-アルコシカルボニル、C₁₋₁₂-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロ-アリールオキシ-カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノ-およびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノ-およびジ(C₁₋₆-アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ-C₁₋₆-アルキル-アミノカルボニル、モノ-およびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ-C₁₋₆-アルキル-アミノカルボニル、C₁₋₆-アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、C₁₋₆-アルカノイルオキシ、スルホノ（sulphono）、C₁₋₆-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C₁₋₆-アルキルチオ、ハロゲン、DNAインターカレーター、光化学的活性を有する基、熱化学的活性を有する基、キレート基、レポーター基、ならびにリガンドからなる群より選択され、ここで、アリールおよびヘテロアリールは、置換されていてもよく、2個のジェミナル置換基R^aおよびR^bは、共に、置換されていてもよいメチレン（=CH₂）を表し得；R^Hは、

40

50

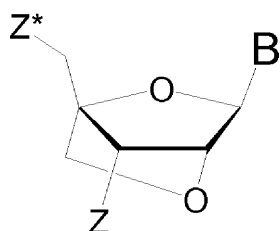
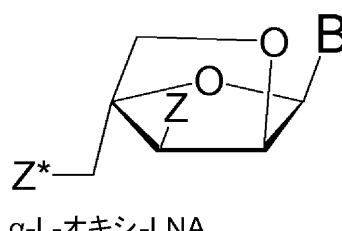
水素および C_{1-4} -アルキルより選択される。いくつかの態様において、 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、および R^e は、任意で独立に、水素および C_{1-6} アルキル、例えば、メチルからなる群より選択される。全ての不斉中心について、非対称基はR方向またはS方向のいずれかで見出され得、例えば、2種の例示的な立体化学的異性体には、以下のように図示され得る -Dアイソフォームおよび -Lアイソフォームが含まれる。



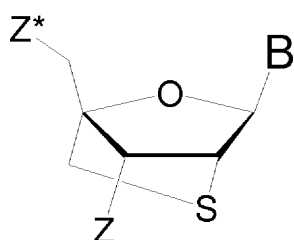
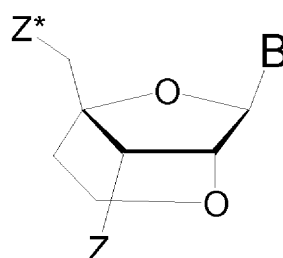
10

【 0 2 2 5 】

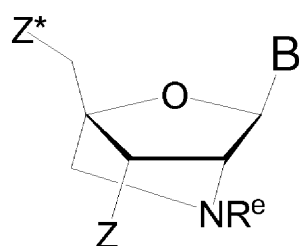
具体的な例示的なLNA単位は以下に示される。

 β -D-オキシ-LNA α -L-オキシ-LNA

20

 β -D-チオ-LNA β -D-ENA

30

 β -D-アミノ-LNA

【 0 2 2 6 】

「チオ-LNA」という用語には、上記一般式中のYがSまたは $-CH_2-S-$ より選択される、ロックドヌクレオチドが含まれる。チオ-LNAは、 -D配置および -L配置の両方であり得る。

40

【 0 2 2 7 】

「アミノ-LNA」という用語には、上記一般式中のYが $-N(H)-$ 、 $N(R)-$ 、 $CH_2-N(H)-$ 、および $-CH_2-N(R)-$ （式中、Rは水素および C_{1-4} -アルキルより選択される）より選択される、ロックドヌクレオチドが含まれる。アミノ-LNAは、 -D配置および -L配置の両方であり得る。

【 0 2 2 8 】

「オキシ-LNA」という用語には、上記一般式中のYが $-O-$ を表す、ロックドヌクレオチドが含まれる。オキシ-LNAは、 -D配置および -L配置の両方であり得る。

【 0 2 2 9 】

50

「ENA」という用語には、上記一般式中のYが-CH₂-O-（式中、-CH₂-O-の酸素原子は塩基Bに対して2'位に付着している）である、ロックドヌクレオチドが含まれる。R^oは水素またはメチルである。

【0230】

いくつかの例示的な態様において、LNAは、-D-オキシ-LNA、-L-オキシ-LNA、-D-アミノ-LNA、および-D-チオ-LNAより選択され、具体的には、-D-オキシ-LNAである。

【0231】

RNAseリクルートメント

オリゴマー化合物は、非RNAse媒介型の標的mRNAの分解を介して、例えば、翻訳の立体的な障害またはその他の方法によって機能し得ることが認識される。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、エンドリボヌクレアーゼ（RNAse）、例えば、RNAseHをリクルートすることができる。

【0232】

そのようなオリゴマー、例えば、領域Aまたは連続ヌクレオチド配列は、少なくとも6連続ヌクレオチド単位、例えば、少なくとも7連続ヌクレオチド単位、例えば、少なくとも8または少なくとも9連続ヌクレオチド単位（残基）の領域を含むことが好ましく、7連続ヌクレオチド、8連続ヌクレオチド、9連続ヌクレオチド、10連続ヌクレオチド、11連続ヌクレオチド、12連続ヌクレオチド、13連続ヌクレオチド、14連続ヌクレオチド、15連続ヌクレオチド、または16連続ヌクレオチドを含み、相補的な標的RNAとの二重鎖を形成した時に、RNAseをリクルートすることができる。RNAseをリクルートすることができる連続配列は、本明細書に記載されるギャップマーに関して言及される領域Y'であり得る。いくつかの態様において、RNAseをリクルートすることができる連続配列、例えば、領域Y'のサイズは、より大きく、例えば、10ヌクレオチド単位、11ヌクレオチド単位、12ヌクレオチド単位、13ヌクレオチド単位、14ヌクレオチド単位、15ヌクレオチド単位、16ヌクレオチド単位、17ヌクレオチド単位、18ヌクレオチド単位、19ヌクレオチド単位、または20ヌクレオチド単位であってもよい。

【0233】

EP 1 222 309は、RNAseHをリクルートする能力を決定するために使用され得る、RNAseH活性を決定するためのインビトロの方法を提供する。相補的なRNA標的と共に準備された時に、EP 1 222 309の実施例91～95によって提供された方法論を使用して、同一の塩基配列を有するが、DNAモノマーのみを含有しており、2'置換を有しておらず、オリゴヌクレオチド内の全てのモノマーの間にホスホロチオエート連結基を有するDNAのみのオリゴヌクレオチドを使用して決定された初速度の少なくとも1%、例えば、少なくとも5%、例えば、少なくとも10%、または20%を超える、pmol/l/分で測定される初速度を有している場合、そのオリゴマーは、RNAseHをリクルートできると見なされる。

【0234】

いくつかの態様において、相補的なRNA標的およびRNAseHと共に準備された時に、EP 1 222 309の実施例91～95によって提供される方法論を使用して、pmol/l/分で測定されるRNAseH初速度が、2'置換を有しておらず、オリゴヌクレオチド内の全てのヌクレオチドの間にホスホロチオエート連結基を有する等価なDNAのみのオリゴヌクレオチドを使用して決定された初速度の1%未満、例えば、5%未満、例えば、10%未満、または20%未満である場合、そのオリゴマーはRNAseHをリクルートすることが本質的にできないと見なされる。

【0235】

他の態様において、相補的なRNA標的およびRNAseHと共に準備された時に、EP 1 222 309の実施例91～95によって提供される方法論を使用して、pmol/l/分で測定されるRNAseH初速度が、2'置換を有しておらず、オリゴヌクレオチド内の全てのヌクレオチドの間にホスホロチオエート連結基を有する等価なDNAのみのオリゴヌクレオチドを使用して決定された初速度の少なくとも20%、例えば、少なくとも40%、例えば、少なくとも60%、例えば、少なくとも80%である場合、そのオリゴマーはRNAseHをリクルートできると見なされる。

【0236】

典型的には、相補的な標的RNAとの二重鎖を形成した時にRNaseをリクルートすることができる連続ヌクレオチド単位を形成するオリゴマーの領域は、RNA標的と共にDNA/RNA様二重鎖を形成するヌクレオチド単位からなる。本発明のオリゴマー、例えば、第1領域は、ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体の両方を含むヌクレオチド配列を含んでいてよく、例えば、ギャップマー、ヘッドマー (headmer)、またはミックスマーの形態にあり得る。

【0237】

「ヘッドマー」とは、領域Y'の最も5'のモノマーが、領域X'の最も3'のモノマーに連結されている、領域X'およびそれと連続している領域Y'を含むオリゴマーとして定義される。領域X'は、RNaseをリクルートしないヌクレオシド類似体の連続ストレッチを含み、領域Y'は、RNaseによって認識可能であり切断可能であるDNAモノマーまたはヌクレオシド類似体モノマーの連続ストレッチ (例えば、少なくとも7連続モノマー) を含む。

10

【0238】

「テールマー (tailmer)」とは、領域Y'の最も5'のモノマーが領域X'の最も3'のモノマーに連結されている、領域X'およびそれと連続している領域Y'を含むオリゴマーとして定義される。領域X'は、RNaseによって認識可能であり切断可能であるDNAモノマーまたはヌクレオシド類似体モノマーの連続ストレッチ (例えば、少なくとも7連続モノマー) を含み、領域Y'は、RNaseをリクルートしないヌクレオシド類似体の連続ストレッチを含む。

20

【0239】

「ミックスマー」と呼ばれる他の「キメラ」オリゴマーは、(i) RNaseによって認識可能であり切断可能であるDNAモノマーまたはヌクレオシド類似体モノマーと、(ii) RNaseをリクルートしないヌクレオシド類似体モノマーとの交互の組成からなる。

【0240】

いくつかの態様において、標的領域に対するオリゴマーの親和性の増強に加えて、いくつかのヌクレオシド類似体は、RNase (例えば、RNaseH) の結合および切断も媒介する。

-L-LNA (BNA) モノマーは、ある程度までRNaseH活性をリクルートするため、いくつかの態様において、-L-LNAモノマーを含有しているオリゴマーのギャップ領域 (例えば、本明細書において言及される領域Y') は、RNaseHによって認識可能でありかつ切断可能である、より少ないモノマーからなり、ミックスマー構築に、より高い柔軟性が導入される。

30

【0241】

ギャップマー設計

いくつかの態様において、本発明のオリゴマー、例えば、第1領域は、ギャップマーを含むかまたはギャップマーである。ギャップマーオリゴマーは、RNase、例えば、RNaseHをリクルートすることができるヌクレオチドの連続ストレッチ、例えば、本明細書において領域Y' (Y') と呼ばれる、少なくとも6 DNAヌクレオチドまたは7 DNAヌクレオチドの領域を含むオリゴマーであり、領域Y'の5'および3'の両方に、親和性増強ヌクレオチド類似体の領域が隣接している。例えば、RNaseをリクルートすることができるヌクレオチドの連続ストレッチの5'および3'に、1~6個のヌクレオチド類似体が隣接している。これらの領域は、それぞれ領域X' (X') および領域Z' (Z') と呼ばれる。ギャップマーの例は、WO 2004/046160、WO2008/113832、およびWO2007/146511に開示されている。

40

【0242】

いくつかの態様において、RNaseをリクルートすることができるモノマーは、DNAモノマー、-L-LNAモノマー、C4'アルキル化DNAモノマー (参照によって本明細書に組み入れられるPCT/EP2009/050349およびVester et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 18(2008)2296-2300を参照)、ならびにUNA (アンリンクト核酸) ヌクレオチド (参照によって本明細書に組み入れられるFluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039を参照) からなる群より選択される。UNAは、典型的には、リボースのC2-C3 C-C結合が除去され、ロックされていない「

50

糖」残基が形成されている、ロックされていない核酸である。好ましくは、ギャップマーは、式(5'~3')X'-Y'-Z'の(ポリ)ヌクレオチド配列を含み；領域X'(X')(5'領域)は、少なくとも1個のヌクレオチド類似体、例えば少なくとも1個のBNA(例えば、LNA)単位、例えば、1~6個のヌクレオチド類似体、例えばBNA(例えば、LNA)単位からなるかまたはそれを含み；領域Y'(Y')は、(相補的なRNA分子、例えば、mRNA標的との二重鎖を形成した時に)RNaseをリクルートすることができる少なくとも5個の連続ヌクレオチド、例えば、DNAヌクレオチドからなるかまたはそれを含み、かつ；領域Z'(Z')(3'領域)は、少なくとも1個のヌクレオチド類似体、例えば少なくとも1個のBNA(例えば、LNA単位)、例えば、1~6個のヌクレオチド類似体、例えばBNA(例えば、LNA)単位からなるかまたはそれを含む。

10

【0243】

いくつかの態様において、領域X'は、1個、2個、3個、4個、5個、もしくは6個のヌクレオチド類似体、例えばBNA(例えば、LNA)単位、例えば、2~5個のヌクレオチド類似体、例えば2~5個のLNA単位、例えば、3個もしくは4個のヌクレオチド類似体、例えば3個もしくは4個のLNA単位からなり；かつ/または領域Z'は、1個、2個、3個、4個、5個、もしくは6個のヌクレオチド類似体、例えばBNA(例えば、LNA)単位、例えば、2~5個のヌクレオチド類似体、例えば2~5個のBNA(例えば、LNA単位)、例えば、3個もしくは4個のヌクレオチド類似体、例えば3個もしくは4個のBNA(例えば、LNA)単位からなる。

【0244】

いくつかの態様において、Y'は、RNaseをリクルートすることができる5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、もしくは12個の連続ヌクレオチド、またはRNaseをリクルートすることができる6~10個もしくは7~9個、例えば、8個の連続ヌクレオチドからなるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、領域Y'は、少なくとも1個のDNAヌクレオチド単位、例えば1~12個のDNA単位、好ましくは、4~12個のDNA単位、より好ましくは、6~10個のDNA単位、例えば、7~10個のDNA単位、最も好ましくは、8個、9個、または10個のDNA単位からなるかまたはそれを含む。

20

【0245】

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

30

【0246】

さらなるギャップマー設計は、参照によって本明細書に組み入れられるWO2004/046160に開示されている。参照によって本明細書に組み入れられる米国仮出願第60/977,409号に基づく優先権を主張するWO2008/113832は、「ショートマー(shortmer)」ギャップマーオリゴマーに言及している。いくつかの態様において、本明細書に提示されたオリゴマーは、そのようなショートマーギャップマーであってもよい。

【0247】

いくつかの態様において、オリゴマー、例えば、領域X'は、式(5'~3')X'-Y'-Z'を含むかまたは該式である、全部で10ヌクレオチド単位、11ヌクレオチド単位、12ヌクレオチド単位、13ヌクレオチド単位、または14ヌクレオチド単位の連続ヌクレオチド配列からなっている。X'は、1個、2個、または3個のヌクレオチド類似体単位、例えばBNA(例えば、LNA)単位からなり；Y'は、相補的なRNA分子(例えば、mRNA標的)との二重鎖を形成した時にRNaseをリクルートすることができる7個、8個、または9個の連続ヌクレオチド単位からなり；かつZ'は、1個、2個、または3個のヌクレオチド類似体単位、例えばBNA(例えば、LNA)単位からなる。

40

【0248】

いくつかの態様において、X'は、1個のBNA(例えば、LNA)単位からなる。いくつかの態様において、X'は、2個のBNA(例えば、LNA)単位からなる。いくつかの態様において

50

、X'は、3個のBNA（例えば、LNA）単位からなる。いくつかの態様において、Z'は、1個のBNA（例えば、LNA）単位からなる。いくつかの態様において、Z'は、2個のBNA（例えば、LNA）単位からなる。いくつかの態様において、Z'は、3個のBNA（例えば、LNA）単位からなる。いくつかの態様において、Y'は、7個のヌクレオチド単位からなる。いくつかの態様において、Y'は、8個のヌクレオチド単位からなる。いくつかの態様において、Y'は、9個のヌクレオチド単位からなる。ある特定の態様において、領域Y'は、10個のヌクレオシドモノマーからなる。ある特定の態様において、領域Y'は、1～10個のDNAモノマーからなるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、Y'は、1～9個のDNA単位、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、または9個のDNA単位を含む。いくつかの態様において、Y'は、DNA単位からなる。いくつかの態様において、Y'は、 --L 配置にある少なくとも1個のBNA単位、例えば、 --L 配置にある2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、または9個のLNA単位を含む。いくつかの態様において、Y'は、少なくとも1個の --L -オキシBNA/LNA単位を含むか、または --L 配置の全てのLNA単位が --L -オキシLNA単位である。いくつかの態様において、X'-Y'-Z'内に存在するヌクレオチドの数は、次からなる群より選択される（ヌクレオチド類似体単位-領域Y'-ヌクレオチド類似体単位）：1-8-1、1-8-2、2-8-1、2-8-2、3-8-3、2-8-3、3-8-2、4-8-1、4-8-2、1-8-4、2-8-4、または；1-9-1、1-9-2、2-9-1、2-9-2、2-9-3、3-9-2、1-9-3、3-9-1、4-9-1、1-9-4、または；1-10-1、1-10-2、2-10-1、2-10-2、1-10-3、3-10-1。いくつかの態様において、X'-Y'-Z'内のヌクレオチドの数は、2-7-1、1-7-2、2-7-2、3-7-3、2-7-3、3-7-2、3-7-4、および4-7-3からなる群より選択される。ある特定の態様において、領域X'およびY'の各々は、3個のBNA（例えば、LNA）モノマーからなり、領域Y'は、8個または9個または10個のヌクレオシドモノマー、好ましくは、DNAモノマーからなる。いくつかの態様において、X'およびZ'の両方が、各々2個のBNA（例えば、LNA）単位からなり、Y'は、8個または9個のヌクレオチド単位、好ましくは、DNA単位からなる。様々な態様において、その他のギャップマー設計には、領域X'および/またはZ'が、3個、4個、5個、または6個のヌクレオシド類似体、例えば、2'-O-メトキシエチル-リボース糖（2'-MOE）を含有しているモノマーまたは2'-フルオロ-デオキシリボース糖を含有しているモノマー）からなり、領域Y'が、8個、9個、10個、11個、または12個のヌクレオシド、例えば、DNAモノマーからなり、ここで、領域X'-Y'-Z'が、3-9-3、3-10-3、5-10-5、または4-12-4のモノマーを有しているものが含まれる。さらなるギャップマー設計は、参照によって本明細書に組み入れられるWO2007/146511A2に開示されている。

【0249】

スプライススイッチングオリゴマー

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、スプライススイッチングオリゴマー、即ち、プレmRNAのオルタナティブスプライシングを引き起こす、プレmRNAを標的とするオリゴマーである。

【0250】

スプライススイッチングオリゴマーの標的には、TNF受容体が含まれ得、例えば、スプライススイッチングオリゴマー（SSO）は、参照によって本明細書に組み入れられるWO2007/058894、WO08051306 A1、およびPCT/EP2007/061211に開示されたTNFR SSOのうちの1種以上であり得る。

【0251】

スプライススイッチングオリゴマーは、典型的には（本質的には）RNaseHをリクルートすることができず、従って、ギャップマー設計、テールマー設計、またはヘッドマー設計は一般に望ましくない。しかしながら、ミックスマー設計およびトータルマー設計は、SSOに適した設計である。

【0252】

スプライススイッチングオリゴマーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおけるジストロフィン欠損を標的とするためにも使用されている。

【0253】

10

20

30

40

50

ミックスマー

大部分のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それらの意図された標的を分解するためにRNase酵素（例えば、RNaseH）をリクルートするよう設計されている化合物である。そのような化合物には、DNAホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、ならびにギャップマー、ヘッドマー、およびテールマーが含まれる。これらの化合物は、典型的には、少なくとも5 DNAヌクレオチドまたは6 DNAヌクレオチドの領域を含み、ギャップマーの場合には、親和性増強ヌクレオチド類似体が両側に隣接している。本発明のオリゴマーは、RNase（例えば、RNaseH）非依存性の機序を介して作動してもよい。非RNaseH（または非RNase）機序を介して作動するオリゴマーの例は、ミックスマーおよびトータルマーである。

【0254】

10

「ミックスマー」という用語は、ギャップマー、テールマー、およびヘッドマーとは対照的に、5個を超える隣接配列が存在しない、およびいくつかの態様において、4個を超える、例えば、3個を超える連続的な天然に存在するヌクレオチド、例えば、DNA単位が存在しない、天然に存在するヌクレオチドおよび天然には存在しないヌクレオチドの両方を含むオリゴマーをさす。いくつかの態様において、ミックスマーは、5個を超える連続ヌクレオチド類似体、例えば、BNA（LNA）を含まず、いくつかの態様において、4個を超える、例えば、3個を超える連続ヌクレオチド類似体、例えば、BNA（LNA）を含まない。そのようなミックスマーにおいて、残りのヌクレオチドは、例えば、DNAヌクレオチド、および/または非二環式ヌクレオチド類似体、例えば、本明細書において言及されたもの、例えば、2'置換型ヌクレオチド類似体、例えば、2'-O-MOEもしくは2'フルオロであり得る。

20

【0255】

本発明によるオリゴマーは、ミックスマーであり得、実際、オリゴマーもしくはその第1領域として（特に、マイクロRNA（抗miR）、mRNA上のマイクロRNA結合部位（Blockmir）を標的とする時）、またはスプライススイッチングオリゴマー（SSO）として、様々なミックスマー設計が高度に効果的である。例えば、WO2007/112754（LNA-抗miR（商標））およびWO2008/131807（LNAスプライススイッチングオリゴ）を参照されたい。

【0256】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはミックスマーは、任意で、DNAヌクレオチドと共に、BNAおよび2'置換型ヌクレオチド類似体を含み得る。例えば、参照によって本明細書に組み入れられるWO07027894およびWO2007/112754を参照されたい。具体例には、LNAと2'-O-MOEとDNA、LNAと2'フルオロと2'-O-MOE、2'-O-MOEと2'フルオロ、2'-O-MOEと2'フルオロとLNA、またはLNAと2'-O-MOEとLNAとDNAを含むオリゴマーまたは第1領域が含まれる。

30

【0257】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはミックスマーは、ヌクレオチド類似体および天然に存在するヌクレオチド、またはあるタイプのヌクレオチド類似体および第2のタイプのヌクレオチド類似体の繰り返しパターンの連続ヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。繰り返しパターンは、例えば、2個毎または3個毎のヌクレオチドが、ヌクレオチド類似体、例えば、BNA（LNA）であり、残りのヌクレオチドが、天然に存在するヌクレオチド、例えば、DNAであるか、または2'置換型ヌクレオチド類似体、例えば、本明細書において言及される2'MOE類似体もしくは2'フルオロ類似体であるか、または、いくつかの態様において、本明細書において言及されたヌクレオチド類似体の群より選択されるものであり得る。ヌクレオチド類似体、例えば、LNA単位の繰り返しパターンは、固定された位置、例えば、5'末端または3'末端のヌクレオチド類似体と組み合わせられてもよいことが認識される。

40

【0258】

いくつかの態様において、3'末端から数えて、オリゴマーまたはミックスマーの最初のヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体、例えば、LNAヌクレオチドである。

【0259】

同一であってもよいしまたは異なってもよいいくつかの態様において、3'末端から

50

数えて、オリゴマーまたはミックスマーの2番目のヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体、例えば、LNAヌクレオチドである。

【0260】

同一であってもよいしまたは異なってもよいいくつかの態様において、3'末端から数えて、オリゴマーまたはミックスマーの7番目および/または8番目のヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体、例えば、LNAヌクレオチドである。

【0261】

同一であってもよいしまたは異なってもよいいくつかの態様において、3'末端から数えて、第1オリゴマーおよび/または第2オリゴマーの9番目および/または10番目のヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体、例えば、LNAヌクレオチドである。

10

【0262】

同一であってもよいしまたは異なってもよいいくつかの態様において、オリゴマーまたはミックスマーの5'末端は、ヌクレオチド類似体、例えば、LNAヌクレオチドである。

【0263】

上記の設計特色は、いくつかの態様において、ミックスマー設計、例えば、抗miRミックスマーへ組み入れられ得る。

【0264】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはミックスマーは、4個を超える連続DNAヌクレオチド単位または3個を超える連続DNAヌクレオチド単位の領域を含まない。いくつかの態様において、ミックスマーは、2個を超える連続DNAヌクレオチド単位の領域を含まない。

20

【0265】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはミックスマーは、少なくとも2個の連続ヌクレオチド類似体単位、例えば、少なくとも2個の連続LNA単位からなる領域を少なくとも含む。

【0266】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはミックスマーは、少なくとも3個の連続ヌクレオチド類似体単位、例えば、少なくとも3個の連続LNA単位からなる領域を少なくとも含む。

30

【0267】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーまたはミックスマーは、7個を超える連続ヌクレオチド類似体単位、例えば、LNA単位の領域を含まない。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーまたはミックスマーは、6個を超える連続ヌクレオチド類似体単位、例えば、LNA単位の領域を含まない。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーまたはミックスマーは、5個を超える連続ヌクレオチド類似体単位、例えば、LNA単位の領域を含まない。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーまたはミックスマーは、4個を超える連続ヌクレオチド類似体単位、例えば、LNA単位の領域を含まない。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーまたはミックスマーは、3個を超える連続ヌクレオチド類似体単位、例えば、LNA単位の領域を含まない。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーまたはミックスマーは、2個を超える連続ヌクレオチド類似体単位、例えば、LNA単位の領域を含まない。ミックスマーは、4個以下の連続DNAヌクレオチドのDNAの短い領域を1個以上含み得るオリゴマーであり、典型的には、ヌクレオチド類似体（例えば、LNA単位）およびDNAヌクレオチドの交互の領域、任意で、他のヌクレオチド類似体（例えば、非LNAヌクレオチド類似体）の領域を含む。トータルマーは、（DNAおよびRNAの類似体または誘導体を含み得るが）DNAヌクレオチドまたはRNAヌクレオチドを含まない。いくつかの態様において、本発明のオリゴマー（例えば、領域A）は、いくつかの態様において、4個以下の連続DNAヌクレオチドまたは3個以下の連続DNAヌクレオチドを含み得る。

40

【0268】

以下の態様が、（例えば、領域Aとしての）ミックスマーまたはトータルマーオリゴマ

50

ーに当てはまり得る：本発明のオリゴマー（例えば、領域A）は、いくつかの態様において、LNAヌクレオチドおよび非LNAヌクレオチド（例えば、DNAまたは2'置換型ヌクレオチド類似体）の少なくとも2個の交互の領域を含み得る。

【0269】

本発明のオリゴマーは、いくつかの態様において、式： $5'([LNAヌクレオチド]_{1-5}および[非LNAヌクレオチド]_{1-4})_{2-12} \cdot 3'$ の連続配列を含み得る。

【0270】

いくつかの態様において、連続ヌクレオチド配列（またはオリゴマー）の5'ヌクレオチドは、LNAヌクレオチドである。

【0271】

いくつかの態様において、連続ヌクレオチド配列の3'ヌクレオチドが、ヌクレオチド類似体、例えばLNAであるか、または、2個、3個、4個、5個の3'ヌクレオチドが、ヌクレオチド類似体、例えばLNAヌクレオチド、もしくは増強された血清安定性をオリゴマーに付与するその他のヌクレオチド類似体である。

【0272】

いくつかの態様において、オリゴマーの連続ヌクレオチド配列は、式 $5'([LNAヌクレオチド]_{1-5}-[非LNAヌクレオチド]_{1-4})_{2-11}-[LNAヌクレオチド]_{1-5} \cdot 3'$ を有する。

【0273】

いくつかの態様において、オリゴマーの連続ヌクレオチド配列は、LNAヌクレオチドおよび非LNAヌクレオチドの連続領域を2個、3個、または4個有し、例えば、式 $5'([LNAヌクレオチド]_{1-5}および[非LNAヌクレオチド]_{1-4})_{2-3}$ を含み、任意で、さらなる3'LNA領域[LNAヌクレオチド] $_{1-5}$ を含む。

【0274】

いくつかの態様において、オリゴマーの連続ヌクレオチド配列は、 $5'([LNAヌクレオチド]_{1-3}および[非LNAヌクレオチド]_{1-3})_{2-5}$ を含み、任意で、さらなる3'LNA領域[LNAヌクレオチド] $_{1-3}$ を含む。

【0275】

いくつかの態様において、オリゴマーの連続ヌクレオチド配列は、 $5'([LNAヌクレオチド]_{1-3}および[非LNAヌクレオチド]_{1-3})_3$ を含み、任意で、さらなる3'LNA領域[LNAヌクレオチド] $_{1-3}$ を含む。

【0276】

いくつかの態様において、非LNAヌクレオチドは全てDNAヌクレオチドである。

【0277】

いくつかの態様において、非LNAヌクレオチドは、DNA単位、RNA単位、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、および2'-フルオロ-DNA単位からなる群より独立にまたは依存的に選択される。

【0278】

いくつかの態様において、非LNAヌクレオチドは（任意で独立に）2'置換型ヌクレオシド類似体からなる群より選択され、例えば、（任意で独立に）2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-AP、2'-FANA、2'-(3-ヒドロキシ)プロピル、および2'-フルオロ-DNA単位、ならびに／またはその他の（任意での）糖修飾型ヌクレオシド類似体、例えば、モルホリノ、ペプチド核酸（PNA）、CeNA、アンリンクト核酸（UNA）、ヘキシトール核酸（HNA）、ピシクロ-HNA（例えば、WO2009/100320を参照）からなる群より選択される。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、その標的核酸（または相補的なDNA配列またはRNA配列）に対する第1領域の親和性を増加させる。様々なヌクレオシド類似体が、参照によって本明細書に組み入れられるFreier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443およびUhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213に開示されている。

【0279】

いくつかの態様において、非LNAヌクレオチドはDNAヌクレオチドである。いくつかの態

10

20

30

40

50

様において、オリゴマーまたは連続ヌクレオチド配列は、LNAヌクレオチドを含み、任意で、親和性増強ヌクレオチド類似体および/または血清安定性増強ヌクレオチド類似体であり得るその他のヌクレオチド類似体（例えば、非LNAヌクレオチドについてリストされたヌクレオチド類似体）を含む。

【0280】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその連続ヌクレオチド配列は、該ヌクレオチド類似体の連続ヌクレオチド配列からなる。

【0281】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその連続ヌクレオチド配列は、LNAヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列からなる。

10

【0282】

いくつかの態様において、オリゴマーまたは連続ヌクレオチド配列は、8~12nt長、例えば、8~10nt長または10~20nt長、例えば、12~18nt長または14~16nt長である。

【0283】

いくつかの態様において、オリゴマーまたは連続ヌクレオチド配列は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結を有する相補的な一本鎖RNA核酸分子と共に、少なくとも約60、例えば、少なくとも65の T_m を有する二重鎖を形成することができる。

【0284】

T_m アッセイの例：オリゴヌクレオチド：オリゴヌクレオチドとRNA標的（P0）との二重鎖を、500mlのRNase不含有水で3mMに希釈し、500mlの2× T_m 緩衝液（200mM NaCl、0.2mM EDTA、20mMリン酸Na、pH7.0）と混合する。その溶液を3分間95に加熱し、次いで、30分間室温でアニールさせる。二重鎖融解温度（ T_m ）を、PE Templabソフトウェア（Perkin Elmer）を使用して、Peltier温度プログラマPTP6が装備されたLambda 40 UV/VIS分光光度計で測定する。温度を20から95まで上昇させ、次いで、25まで降下させ、260nmでの吸光を記録する。融解およびアニーリングの両方の一次導関数および極大を、二重鎖 T_m を査定するために使用する。

20

【0285】

トータルマー

トータルマーは、天然には存在しないヌクレオシド、例えば、糖修飾型ヌクレオシド類似体のみを含む一本鎖オリゴマーである。

30

【0286】

本発明による第1領域はトータルマーであり得、実際、オリゴマーまたはその第1領域として（例えば、特に、マイクロRNA（抗miR）を標的とする時）、またはスプライススイッチングオリゴマー（SSO）として、様々なトータルマー設計が高度に効果的である。いくつかの態様において、トータルマーは、少なくとも1個のXYX配列モチーフまたはYXY配列モチーフ、例えば、配列XYXまたはYXY（配列中、Xは、LNAであり、Yは、代替的な（即ち、非LNA）ヌクレオチド類似体、例えば、2'-O-MOE RNA単位および2'-フルオロDNA単位である）の反復を含むかまたはそれからなる。上記配列モチーフは、いくつかの態様において、例えば、XXY、XYX、YXY、またはYYXであり得る。

【0287】

いくつかの態様において、トータルマーは、7~16ヌクレオチド、例えば、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、または15ヌクレオチド、例えば、7~12ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなり得る。

40

【0288】

いくつかの態様において、トータルマーの連続ヌクレオチド配列は、少なくとも30%、例えば、少なくとも40%、例えば、少なくとも50%、例えば、少なくとも60%、例えば、少なくとも70%、例えば、少なくとも80%、例えば、少なくとも90%、例えば、95%、例えば、100%、BNA（LNA）単位を含む。残りの単位は、本明細書において言及された非LNAヌクレオチド類似体より選択され得、例えば、2'-O_アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位

50

、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、LNA単位、PNA単位、HNA単位、INA単位、および2'-MOE RNA単位からなる群、または2'-OMe RNA単位および2'-フルオロDNA単位からなる群より選択され得る。

【0289】

いくつかの態様において、トータルマーは、LNA単位のみからなる連続ヌクレオチド配列からなるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、トータルマー、例えば、LNAトータルマーは、7~12ヌクレオシド単位長である。いくつかの態様において、(オリゴマーまたはその第1領域としての)トータルマーは、参照によって本明細書に組み入れられるWO2009/043353において言及されたように、マイクロRNAに対して標的指向化され得る(即ち、抗miRである)。

10

【0290】

いくつかの態様において、オリゴマーまたは連続ヌクレオチド配列は、LNAヌクレオチドを含み、任意で、親和性増強ヌクレオチド類似体および/または血清安定性増強ヌクレオチド類似体であり得るその他のヌクレオチド類似体を含む。

【0291】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその連続ヌクレオチド配列は、該ヌクレオチド類似体の連続ヌクレオチド配列からなる。

【0292】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはそれらの連続ヌクレオチド配列は、LNAヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列からなる。

20

【0293】

オリゴマーまたはその第1領域を介したマイクロRNAの調節

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、成熟マイクロRNA全体に対応するかまたは完全に相補的である連続ヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる抗miRである。マイクロRNAのインビボ活性を調節するための本発明の使用は、マイクロRNAが典型的には対象における多数のmRNAを制御するという事実のため、最重要と考えられる。従って、治療用の抗miRを不活化する能力は、極めて望ましい。

【0294】

多数のマイクロRNAが、多数の疾患に関連している。例えば、本発明の薬学的組成物によって処置され得る治療的適応症の非限定的な例は、以下である。

30

マイクロRNA	可能性がある医学的適応症
miR-1	不整脈
miR-21	神経膠芽腫、乳癌、肝細胞癌、結腸直腸癌、細胞傷害性薬物に対する神経膠腫の感作、心肥大
miR-21, miR-200b および miR-141	化学療法に対する応答および胆管細胞癌成長の制御
miR-122	高コレステロール血症、C型肝炎感染、ヘモクロマトーシス
miR-19b	リンパ腫およびその他の腫瘍型
miR-26a	ヒト幹細胞の骨芽細胞分化
miR-155	リンパ腫、脾臓腫瘍発達、乳癌および肺癌
miR-203	乾癬
miR-375	糖尿病、代謝障害、グルコースによって誘導される膵内分泌細胞からのインスリン分泌
miR-181	筋芽細胞分化、自己免疫障害
miR-10b	乳癌細胞の浸潤および転移
miR-125b-1	乳癌、肺癌、卵巣癌、および子宮頸癌
miR-221 および 222	前立腺癌、ヒト甲状腺乳頭癌、ヒト肝細胞癌
miRNA-372 および 373	精巣胚細胞腫瘍
miR-142	B細胞白血病
miR-17 – 19b クラスタ	B細胞リンパ腫、肺癌、肝細胞癌

10

20

【 0 2 9 5 】

腫瘍抑制遺伝子トロポマイシン (tropomyosin) 1 (TPM1) mRNAが、miR-21の標的として示されている。ミオトロフィン (mtpn) mRNAが、miR375の標的として示されている。従って、オリゴマーまたはその第1領域は、上にリストされたマイクロRNAのうちの1種を標的とする（即ち、その対応する領域に完全に相補的である連続ヌクレオチド配列を含むかもしくははそれからなる）か、またはそれに対する1個以下のミスマッチを含む抗mirであり得る。

【 0 2 9 6 】

従って、本発明のいくつかの局面は、感染性疾患、例えば、ウイルス性疾患、例えば、C型肝炎ウイルスおよびHIV、脆弱X精神遅滞、炎症性疾患、癌、例えば、慢性リンパ球性白血病、乳癌、肺癌、および結腸癌からなる群より選択される、マイクロRNAの発現に関連した疾患の処置に関する。

30

【 0 2 9 7 】

マイクロRNA (miRNA) は、標的mRNAと塩基対形成することによって遺伝子発現の転写後制御因子として作用する短い内在性RNAの豊富なクラスである。成熟miRNAは、RNAse III リボヌクレアーゼドローシャによって、より長いヘアピン転写物から逐次プロセッシングされる。成熟マイクロRNA (miR) は、典型的には、20～25個の連続RNAヌクレオチドを含む。数種のマイクロRNAが医学的な状態および疾患に関連していることは、現在広く確立されており、いくつかの会社が、マイクロRNAを模倣するか、または疾患表現型に関連した特異的なマイクロRNAと特異的にハイブリダイズする、オリゴマーに基づく治療薬を開発中である。そのようなオリゴマーは、本明細書において、それぞれ、マイクロRNA模倣物および抗miRと呼ばれ、オリゴマーまたはその第1領域は、いくつかの態様において、そのようなマイクロRNAを調節するオリゴマーであり得る。

40

【 0 2 9 8 】

いくつかの態様において、本発明によるオリゴマーまたはその第1領域は、マイクロRNA配列、例えば、成熟マイクロRNA配列、例えば、miRBase (http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/mirna_summary.pl?org=hsa) に発表されたヒトマイクロRNAに対応するかまたは完全に相補的である連続ヌクレオチド配列からなるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、マイクロRNAは、ウイルスマイクロRNAである。本明細書作成の時点

50

で、miRbase 19では、1600の前駆体および2042の成熟ヒトmiRNA配列がmiRBase内に存在しており、それらは、各ヒトマイクロRNAの成熟マイクロRNA配列を含め、全て、参照によって本明細書に組み入れられる。オリゴマーまたはその第1領域によって標的とされ得るその他のヒトマイクロRNAには、参照によって本明細書に組み入れられるWO08040355Aに開示されたものが含まれる。いくつかの態様において、本発明によるオリゴマーまたはその第1領域は、hsa-miR19b、hsa-miR21、hsa-miR 122、hsa-miR 142 a7b、hsa-miR 155、およびhsa-miR 375からなる群より選択されるマイクロRNA配列に対応するかまたは完全に相補的である連続ヌクレオチド配列からなるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、本発明によるオリゴマーまたはその第1領域は、hsa-miR221およびhsa-miR222からなる群より選択されるマイクロRNA配列に対応するかまたは完全に相補的である連続ヌクレオチド配列からなるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、本発明によるオリゴマーまたはその第1領域は、hsa-miR122 (NR_029667.1 GI : 262205241)、例えば、成熟has-miR122に対応するかまたは完全に相補的である連続ヌクレオチド配列からなるかまたはそれを含む。

10

【0299】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域がmiR-122を標的とする時、そのオリゴマーは、C型肝炎感染の処置において使用するためのものである。

【0300】

抗miRオリゴマー

好ましいオリゴマーまたはその第1領域の「抗miR」設計およびオリゴマーは、WO2007/112754、WO2007/112753、PCT/DK2008/000344、ならびに米国仮出願第60/979217号および第61/028062号に開示されており、それらは、全て、参照によって本明細書に組み入れられる。いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、ミックスマーまたはトータルマーである抗miRである。

20

【0301】

抗miRオリゴマーは、マイクロRNA配列またはその対応する部分配列に完全に相補的であるかまたは本質的に相補的である（即ち、1個もしくは2個のミスマッチを含んでもよい）連続ヌクレオチド配列からなるかまたはそれを含むオリゴマーである。この点に関して、抗miRは、成熟マイクロRNA全体に相補的であるかもしくは本質的に相補的である連続ヌクレオチド配列を含んでもよいし、または抗miRは、成熟マイクロRNAもしくはプレマイクロRNAの部分配列に相補的であるかもしくは本質的に相補的である連続ヌクレオチド配列を含んでもよいと考えられ、そのような部分配列（従って、対応する連続ヌクレオチド配列）は、典型的には、少なくとも8ヌクレオチド長、例えば、8~25ヌクレオチド、例えば、9ヌクレオチド長、10ヌクレオチド長、11ヌクレオチド長、12ヌクレオチド長、13ヌクレオチド長、14ヌクレオチド長、15ヌクレオチド長、16ヌクレオチド長、17ヌクレオチド長、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、21ヌクレオチド長、22ヌクレオチド長、23ヌクレオチド長、24ヌクレオチド長、例えば、10~17ヌクレオチドまたは10~16ヌクレオチド、例えば、12~15ヌクレオチドである。

30

【0302】

抗miRの多数の設計が提唱されており、典型的には、治療的に使用するための抗miR、例えば、その連続ヌクレオチド配列は、1個以上のヌクレオチド類似体単位を含む。

40

【0303】

いくつかの態様において、抗miRは、本明細書に記載されるギャップマー構造を有し得る。しかしながら、WO2007/112754およびWO2007/112753に説明されるように、その他の設計、例えば、ミックスマーまたはトータルマーも、好ましい場合がある。

【0304】

いずれも参照によって本明細書に組み入れられるWO2007/112754およびWO2007/112753は、成熟マイクロRNAに相補的な抗miRオリゴマーおよび抗miRオリゴマー設計を提供している。

【0305】

50

いくつかの態様において、抗miRの部分配列はmiRNAシード（seed）領域に対応する。いくつかの態様において、オリゴマーの1番目または2番目の3'核酸塩基は、マイクロRNA配列の2番目の5'ヌクレオチドに対応する。

【0306】

いくつかの抗miR態様において、オリゴマーの領域の3'末端から測定されるオリゴマーの核酸塩基単位1～6（両端を含む）は、マイクロRNAシード領域配列に相補的である。

【0307】

いくつかの抗miR態様において、オリゴマーの領域の3'末端から測定されるオリゴマーの核酸塩基単位1～7（両端を含む）は、マイクロRNAシード領域配列に相補的である。

【0308】

いくつかの抗miR態様において、オリゴマーの領域の3'末端から測定されるオリゴマーの核酸塩基単位2～7（両端を含む）は、マイクロRNAシード領域配列に相補的である。

【0309】

いくつかの態様において、抗miRオリゴマーは、miRNAシード領域に相補的な領域内の位置に、少なくとも1個のヌクレオチド類似体単位、例えば、少なくとも1個のLNA単位を含む。抗miRオリゴマーは、いくつかの態様において、miRNAシード領域に相補的な領域内の位置に、1～6個または1～7個のヌクレオチド類似体単位、例えば、1～6個および1～7個のLNA単位を含み得る。

【0310】

いくつかの態様において、本発明の抗miRは、7ヌクレオチド長、8ヌクレオチド長、または9ヌクレオチド長であり、ヒトまたはウイルスのマイクロRNAのシード領域に相補的な連続ヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの少なくとも80%、例えば85%、例えば90%、例えば95%、例えば100%が、LNAである。

【0311】

いくつかの態様において、本発明の抗miRは、7ヌクレオチド長、8ヌクレオチド長、または9ヌクレオチド長であり、ヒトまたはウイルスのマイクロRNAのシード領域に相補的な連続ヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの少なくとも80%がLNAであり、ヌクレオチド間結合の少なくとも80%、例えば85%、例えば90%、例えば95%、例えば100%がホスホロチオエート結合である。

【0312】

いくつかの態様において、抗miRは、3'末端から数えて、3～8位に1個または2個のLNA単位を含む。これは、RNA:RNA二重鎖と構造が類似している二重鎖であるオリゴヌクレオチド:マイクロRNA二重鎖によって形成されるAヘリックスの安定性に有利であると考えられる。

【0313】

WO2007/112754の48頁15行目～51頁9行目までの表は、抗マイクロRNAオリゴマー（即ち、オリゴマーまたはその第1領域であり得る抗miR）の例を提供しており、参照によって本明細書に具体的に組み入れられる。

【0314】

マイクロRNA模倣物

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、1種以上のmRNA標的の発現を抑制するために細胞へ導入され得るmiRNA模倣物の形態にある。miRNA模倣物は、典型的には、全長miRNA配列に完全に相補的である。miRNA模倣物は、本明細書において提供されたまたは参照されたmiRNA配列のうちの1種以上の対応する領域に相同である連続ヌクレオチド配列を含む化合物である。miRNA模倣物または抗miRの使用は、（任意で）さらにmRNA標的を抑制するため、またはmiRNAをサイレンシング（下方制御）し、それによって、内在性miRNAの機能を阻害し、mRNA標的の抑制解除を引き起こし、発現を増加させるために使用され得る。

【0315】

アダプター

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、治療用アプタマー、スピーゲルマー（spiegelmer）であり得る。アプタマーは、リガンド、例えば、受容体リガンドであってもよく、従って、ターゲティング部分（即ち、領域3）として使用され得ることに注意されたい。本発明に関するアプタマー（スピーゲルマーとも呼ばれる）は、ヌクレオチドの配列ではなく、立体構造に基づいて選択された、20～50ヌクレオチド長の核酸であり、インピボで直接、標的タンパク質に結合することによって治療効果を顕現させ、従って、標的の逆相補鎖を含まない。実際、それらの標的は、核酸ではなくタンパク質である。オリゴマーまたはその第1領域であり得る具体的なアプタマーには、Macugen（OSI Pharmaceuticals）またはARC1779（Archemix, Cambridge, MA）が含まれる。いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、アプタマーではない。いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、アプタマーでもスピーゲルマーでもない。

10

【0316】

siRNA複合体

いくつかの態様において、オリゴマーまたはその第1領域は、siRNA複合体の一部、即ち、siRNA複合体のアンチセンス鎖またはパッセンジャー鎖であり得る。siRNA複合体は、RNA干渉を媒介することができる。

【0317】

いくつかの態様において、siRNA複合体は、17～25nt長、例えば、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、21ヌクレオチド長、22ヌクレオチド長、23ヌクレオチド長、24ヌクレオチド長、例えば、21～23ヌクレオチド長の2本の一本鎖オリゴマーを含む。いくつかの態様において、siRNAのセンス鎖および/またはアンチセンス鎖は、典型的には、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、または3ヌクレオチドの3'突出部を含み得る。適宜、センス鎖およびまたはアンチセンス鎖は、1個以上のヌクレオチド類似体を含み得る。

20

【0318】

いくつかの態様において、siRNA複合体は、siLNA、例えば、全て参照によって本明細書に組み入れられるWO2004/000192、WO2005/073378、WO2007/085485に記載されたsiRNA設計である。siLNAは、少なくとも1個のLNA単位を含むsiRNAである。

【0319】

いくつかの態様において、siRNA複合体は、sisilNA、例えば、参照によって本明細書に組み入れられるWO2007/107162に記載されたものである。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーまたはその第1領域は、siRNAのセンス鎖であり、従って、標的に非相補的であり得る（実際、意図された標的に相同であり得る）。

30

【0320】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーまたは化合物は、siRNAでもsiLNAでもない。

【0321】

ヌクレオチド間連結

本明細書に記載されたオリゴマー（例えば、第1領域および第2領域）のヌクレオシドモノマーは、[ヌクレオシド間]連結基を介して、共に結合されている。適宜、各モノマーは、連結基を介して、3'隣接モノマーに連結されている。

40

【0322】

本発明に関して、オリゴマーの末端の5'モノマーは、5'末端基を含んでいてもよいまたは含んでいなくてもよいが、5'連結基を含まないことを、当業者は理解するであろう。

【0323】

「連結基」または「ヌクレオチド間連結」という用語は、2個のヌクレオチドを共有結合で共に結合することができる基を意味するものである。具体的な好ましい例には、ホスフェート基およびホスホロチオエート基が含まれる。

【0324】

本発明のオリゴマーのヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列は、連結基を介し

50

て、共に結合されている。適宜、各ヌクレオチドは、連結基を介して、3'隣接ヌクレオチドに連結されている。

【0325】

適したヌクレオチド間連結には、W02007/031091にリストされたもの、例えば、(参照によって本明細書に組み入れられる) W02007/031091の34頁の第1段落にリストされたヌクレオチド間連結が含まれる。

【0326】

いくつかの態様において、ホスホジエステル連結または領域B以外のヌクレオチド間連結を、通常ホスホジエステルから、ヌクレアーゼによる攻撃に対してより抵抗性のもの、例えば、ホスホロチオエートまたはボラノホスフェートへ修飾することが好ましい。これらの2種は、RNaseHによって切断可能であり、標的遺伝子の発現の低下におけるアンチセンス阻害の経路も可能にする。

【0327】

本明細書に提供される適切な硫黄(S)含有ヌクレオチド間連結、例えば、ホスホロチオエートまたはホスホジチオエートが、好ましい場合がある。ホスホロチオエートヌクレオチド間連結は、特に、第1領域のため、例えば、ギャップマー、ミックスマー、抗mir、スプライススイッチングオリゴマー、およびトータルマーにおいても好ましい。

【0328】

ギャップマーについて、オリゴマー内のヌクレオチド間連結は、例えば、標的とされたRNAのRNaseHによる切断を可能にするため、ホスホロチオエートまたはボラノホスフェートであり得る。ホスホロチオエートは、改善されたヌクレアーゼ抵抗性およびその他の理由、例えば、製造の容易さのため、好ましい。

【0329】

一つの局面において、第1領域と第2領域との間のホスホジエステル連結を除き、および任意で、領域B内のホスホジエステル連結を除き、本発明のオリゴマーの残りのヌクレオシド間連結、ヌクレオチドおよび/またはヌクレオチド類似体は、ホスホロチオエート基によって相互に連結されている。いくつかの態様において、第1領域内のヌクレオシド間の少なくとも50%、例えば、少なくとも70%、例えば、少なくとも80%、例えば、少なくとも90%、例えば、全てのヌクレオシド間連結が、ホスホジエステル(ホスフェート)以外であり、例えば、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、またはボラノホスフェートからなる群より選択される。いくつかの態様において、第1領域内のヌクレオシド間の少なくとも50%、例えば、少なくとも70%、例えば、少なくとも80%、例えば、少なくとも90%、例えば、全てのヌクレオシド間連結が、ホスホロチオエートである。

【0330】

W009124238は、中性ヌクレオシド間連結によって3'末端または5'末端に付着した少なくとも1個の二環式ヌクレオシドを有するオリゴマー化合物に言及している。従って、本発明のオリゴマーは、中性ヌクレオシド間連結、例えば、1個以上のホスホトリエステル、メチルホスホネート、MMI、アミド-3、ホルムアセタール(formacetal)、またはチオホルムアセタールによって3'末端または5'末端に付着した少なくとも1個の二環式ヌクレオシドを有し得る。残りの結合は、ホスホロチオエートであり得る。

【0331】

コンジュゲート、ターゲティング部分、およびブロッキング基

「コンジュゲート」という用語は、本明細書に記載されるオリゴマーの、1個以上の非ヌクレオチド部分または非ポリヌクレオチド部分への共有結合性の付着(「コンジュゲーション」)によって形成された不均質の分子を示すものである。非ヌクレオチド部分または非ポリヌクレオチド部分の例には、高分子薬剤、例えば、タンパク質、脂肪酸鎖、糖残基、糖タンパク質、ポリマー、またはそれらの組み合わせが含まれる。典型的には、タンパク質は、標的タンパク質に対する抗体であり得る。典型的なポリマーは、ポリエチレングリコールであり得る。

【0332】

従って、様々な態様において、本発明のオリゴマーは、典型的にはヌクレオチドの連続配列からなるポリヌクレオチド領域、およびさらなる非ヌクレオチド領域の両方を含み得る。連続ヌクレオチド配列からなる本発明のオリゴマーに言及する時、化合物は、非ヌクレオチド成分、例えば、コンジュゲート成分を含み得る。

【0333】

本発明の様々な態様において、オリゴマー化合物は、例えば、オリゴマー化合物の細胞取り込みを増加させるために使用され得るリガンド/コンジュゲートに連結されている。WO2007/031091は、適当なリガンドおよびコンジュゲートを提供しており、それらは参照によって本明細書に組み入れられる。

【0334】

本発明の化合物が、本明細書に開示される指定された核酸またはヌクレオチド配列からなる、様々な態様において、化合物は、該化合物に共有結合で付着した少なくとも1個の非ヌクレオチド部分または非ポリヌクレオチド部分（例えば、1個以上のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を含まない）を含んでいてもよい。

【0335】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、親油性コンジュゲートまたはタンパク質（例えば、抗体、酵素、血清タンパク質）；ペプチド；ビタミン（水溶性または脂溶性）；ポリマー（水溶性または脂溶性）；薬物、毒素、レポーター分子、および受容体リガンドを含む小分子；炭水化物複合体；核酸切断複合体；金属キレート剤（例えば、ポリフィリン、テキサフィリン、クラウンエーテル等）；ハイブリッドフォトヌクレアーゼ（phot onuclease）/インターカレーターを含むインターカレーター；架橋剤（例えば、光活性、酸化還元活性）、ならびにそれらの組み合わせおよび誘導体であり得る。多数の適当なコンジュゲート部分、それらの調製およびオリゴマー化合物との連結は、例えば、各々参照によってその全体が本明細書に組み入れられるWO93/07883および米国特許第6,395,492号に提供されている。オリゴヌクレオチドコンジュゲートおよびそれらの合成は、各々参照によってその全体が本明細書に組み入れられるManoharan in Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T. Crooke, ed., Ch.16, Marcel Dekker, Inc., 2001、およびManoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103による包括的な概説においても報告されている。

【0336】

（コンジュゲート部分との）コンジュゲーションは、本発明のオリゴマーの活性、細胞分布、または細胞取り込みを増強し得る。そのような部分には、抗体、ポリペプチド、脂質部分、例えば、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、例えば、ヘキシル-s-トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオール残基もしくはウンデシル残基、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-o-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-h-ホスホネート、ポリアミン鎖もしくはポリエチレングリコール鎖、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミン、またはヘキシルアミノ-カルボニル-オキサコレステロール部分が含まれるが、これらに限定されない。

【0337】

本発明のオリゴマーは、活性原薬、例えば、アスピリン、イブプロフェン、サルファ薬、抗糖尿病薬、抗菌薬、または抗生物質にコンジュゲートされてもよい。

【0338】

ある特定の態様において、コンジュゲートされる部分は、ステロール、例えば、コレステロールである。

【0339】

様々な態様において、コンジュゲートされる部分は、正の電荷を有するポリマー、例えば、1~50アミノ酸残基長、例えば、2~20アミノ酸残基長、例えば、3~10アミノ酸残基長の正の電荷を有するペプチド、および/またはポリアルキレンオキシド、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）もしくはポリプロピレンエチレングリコールを含むかまたは

10

20

30

40

50

それからなる（参照によって本明細書に組み入れられるWO2008/034123を参照）。

【0340】

コンジュゲートの使用は、しばしば、増強された薬物動態学的または薬力学的な動的特性に関連している。しかしながら、コンジュゲート基の存在は、例えば、ハイブリダイゼーションまたはヌクレアーゼリクルートメント（例えば、RNAseHもしくはRISCのリクルートメント）を防止する立体障害を介して、その意図された標的に対するオリゴヌクレオチドの活性に干渉する場合がある。本発明によるオリゴヌクレオチド（領域A）とコンジュゲート部分（X）との間のDNAおよび/またはRNAホスホジエステル領域（領域B）の使用は、コンジュゲート基の存在による改善された特性を可能にしながら、標的組織においては、コンジュゲート基がオリゴヌクレオチドの有効な活性を防止しないことを確実にする。

10

【0341】

本発明のオリゴヌクレオチドは、いくつかの態様において、任意で1個以上のリンカーを通して、1個以上のコンジュゲート基に共有結合で付着させられる。得られたコンジュゲート化合物は、例えば、コンジュゲートされていないオリゴマー化合物と比較して、改良された増強された特性、例えば、改良されたまたは増強された薬物動態学的特性、薬力学的特性、およびその他の特性を有し得る。オリゴマー化合物の薬物動態学的特性を改良するかまたは増強することができるコンジュゲート部分は、オリゴマー化合物の細胞分布、生物学的利用能、代謝、排出、透過性、および/または細胞取り込みを改善し得る。オリゴマー化合物の薬力学的特性を改良するかまたは増強することができるコンジュゲート部分は、活性、分解に対する抵抗性、配列特異的なハイブリダイゼーション、取り込み等を改善し得る。いくつかの態様において、コンジュゲート基は、オリゴヌクレオチドの不適切な活性、例えば、オフターゲット活性、または非標的組織もしくは非標的器官における活性を低下させるかまたは防止することができる。これは、例えば、コンジュゲートであり得るブロッキング部分の使用によって達成され得、オリゴヌクレオチドに共有結合で付着した（任意でリンカーを介する）ブロッキング基の存在は、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよび/または活性を防止するかまたは妨害することができる。DNA/RNAホスホジエステル領域（例えば、意図された標的部位にある）の切断は、ブロッキング基を除去し、意図された部位への活性オリゴヌクレオチドの送達を可能にする。

20

【0342】

いくつかの態様において、本発明の化合物は、コンジュゲート基を含む。例えば、特異的な組織への標的指向化のため、あるコンジュゲート基を使用し、例えば、肝臓への標的指向化のため、親油基を使用し、さらなる利益を提供するため、第2のコンジュゲート基、例えば、ブロッキング基またはさらなる治療用エンティティを使用してよいことが認識されるであろう。コンジュゲート/部分の適当な一方または両方が、本発明によるDNA/RNAホスホジエステル領域を介して、オリゴヌクレオチドに連結され得る。いくつかの態様において、コンジュゲートは、オリゴヌクレオチドの5'末端および/または3'末端で、任意でリンカーを介して、オリゴヌクレオチドに共有結合で結合する。この点で、2個のコンジュゲート/部分基が使用される場合、1個は5'末端に、1個は3'末端に連結され得る。

30

【0343】

炭水化物コンジュゲート

いくつかの態様において、コンジュゲート基は、炭水化物、親油性部分、ポリマー、タンパク質またはペプチド、標識または色素、小分子、例えば、小分子治療用部分、細胞表面受容体リガンドからなる群より選択される。

40

【0344】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、炭水化物であるかもしくは炭水化物を含んでいてもよく、または炭水化物基を含む。いくつかの態様において、炭水化物は、ガラクトース、ラクトース、n-アセチルガラクトサミン、マンノース、およびマンノース-6-リン酸からなる群より選択される。いくつかの態様において、コンジュゲート基は、マンノースもしくはマンノース-6-リン酸であるかまたはそれを含んでいてもよい。炭水化物

50

コンジュゲートは、ある範囲の組織、例えば、肝臓および/または筋肉における送達または活性を増強するために使用され得る。例えば、EP1495769、WO99/65925、Yang et al., *Bioconjug Chem*(2009)20(2):213-21、Zatsepin & Oretskaya *Chem Biodivers.*(2004)1(10):1401-17を参照されたい。

【0345】

いくつかの態様において、コンジュゲート基は炭水化物部分である。さらに、オリゴマーは、1個以上の付加的なコンジュゲート部分をさらに含んでもよく、それらのうち、親油性部分または疎水性部分が特に関心対象である。これらは、例えば、薬物動態モジュレーターとして作用することができ、任意で、リンカー、例えば、生物切断性リンカーを介して、炭水化物コンジュゲート、炭水化物コンジュゲートをオリゴマーに連結するリンカー、または複数の炭水化物コンジュゲート(多価コンジュゲート)をオリゴマーに連結するリンカーに、または共有結合で連結され得る。

10

【0346】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、炭水化物であるかもしくは炭水化物を含んでもよく、または炭水化物基を含む。いくつかの態様において、炭水化物は、ガラクトース、ラクトース、n-アセチルガラクトサミン、マンノース、およびマンノース-6-リン酸からなる群より選択される。いくつかの態様において、コンジュゲート基は、マンノースもしくはマンノース-6-リン酸であるかまたはそれを含んでもよい。炭水化物コンジュゲートは、ある範囲の組織、例えば、肝臓および/または筋肉における送達または活性を増強するために使用され得る。例えば、EP1495769、WO99/65925、Yang et al., *Bioconjug Chem*(2009)20(2):213-21、Zatsepin & Oretskaya *Chem Biodivers.*(2004)1(10):1401-17を参照されたい。

20

【0347】

GaINAcコンジュゲート

本発明は、アシアロ糖タンパク質受容体ターゲティング部分にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド、例えば、LNAアンチセンスオリゴマーも提供する。いくつかの態様において、コンジュゲート部分(例えば、第3領域または領域C)は、アシアロ糖タンパク質受容体ターゲティング部分、例えば、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-アセチルガラクトサミン、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を含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、ガラクトースクラスター、例えば、N-アセチルガラクトサミン三量体を含む。いくつかの態様において、コンジュゲート部分は、GaINAc(N-アセチルガラクトサミン)、例えば、一価、二価、三価、または四価のGaINAcを含む。3価GaINAcコンジュゲートは、化合物を肝臓へ標的指向化するために使用され得る。GaINAcコンジュゲートは、メチルホスホネートおよびPNAアンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば、US 5,994,517およびHangeland et al., *Bioconjug Chem.*1995 Nov-Dec;6(6):695-701)ならびにsiRNA(例えば、WO2009/126933、WO2012/089352 & WO2012/083046)と共に使用されている。GaINAcの参照およびそこで使用された具体的なコンジュゲートは、参照によって本明細書に組み入れられる。WO2012/083046は、本発明において使用するために適当である切断可能な薬物動態モジュレーターを含むGaINAcコンジュゲート部分を有するsiRNAを開示しており、好ましい薬物動態モジュレーターは、C16疎水基、例えば、パルミトイル、ヘキサデカ-8-エノイル、オレイル、(9E,12E)-オクタデカ-9,12-ジエノイル、ジオクタノイル、およびC16-C20アシルである。'046号の切断可能な薬物動態モジュレーターは、コレステロールでもあり得る。

30

40

【0348】

ターゲティング部分(コンジュゲート部分)は、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-アセチルガラクトサミン、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、N-イソ-ブタノイルガラクトサミン、ガラクトースクラスター、およびN-アセチルガラクトサミン三量体からなる群より選択され得、16個以上の炭素原子を有する疎水基、16~20個の炭素原子を有する疎水基、パルミトイル、ヘキサデカ

50

-8-エノイル、オレイル、(9E,12E)-オクタデカ-9,12-ジエノイル、ジオクタノイル、およびC16-C20アシル、およびコレステロールからなる群より選択される薬物動態モジュレーターを有し得る。'046号に開示されたある特定のGalNAcクラスタには、(E)-ヘキサデカ-8-エノイル(C16)、オレイル(C18)、(9E,12E)-オクタデカ-9,12-ジエノイル(C18)、オクタノイル(C8)、ドデカノイル(C12)、C-20アシル、C24アシル、ジオクタノイル(2×C8)が含まれる。ターゲティング部分-薬物動態モジュレーターターゲティング部分は、生理学的に不安定な結合、または、例えば、ジスルフィド結合、またはPEGリンカーを介して、ポリヌクレオチドに連結され得る。本発明は、オリゴマーとコンジュゲート基との間のホスホジエステルリンカーの使用にも関する(これらは本明細書において領域Bと呼ばれ、適宜、LNAオリゴマーと炭水化物コンジュゲート基との間に位置する)。

10

【0349】

肝臓のヘパトサイトを標的とするため、好ましいターゲティングリガンドは、ガラクトースクラスタである。

【0350】

ガラクトースクラスタには、2~4個の末端ガラクトース誘導体を有する、例えば、それを含む、分子が含まれる。本明細書において使用される、ガラクトース誘導体という用語には、ガラクトース、およびガラクトースと同等以上のアシアロ糖タンパク質受容体に対する親和性を有するガラクトースの誘導体の両方が含まれる。末端ガラクトース誘導体は、そのC-1炭素を通して分子に付着する。アシアロ糖タンパク質受容体(ASGPr)は、ヘパトサイトに特有であり、枝分かれした末端にガラクトースを有する糖タンパク質に結合する。好ましいガラクトースクラスタは、各々アシアロ糖タンパク質受容体に対する親和性を有するガラクトサミンまたはガラクトサミン誘導体を、3個、末端に有する。より好ましいガラクトースクラスタは、3個のN-アセチルガラクトサミンを末端に有する。当技術分野において一般的な他の用語には、三分岐型ガラクトース、三価ガラクトース、およびガラクトース三量体が含まれる。三分岐型ガラクトース誘導体クラスタは、二分岐型または単分岐型のガラクトース誘導体構造より大きい親和性で、ASGPrに結合することが公知である(Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, 1. Biol. Chern., 257, 939-945)。nMレベルの親和性を達成するためには多価が必要とされる。WO2012/083046によると、アシアロ糖タンパク質受容体に対する親和性を有する単一のガラクトース誘導体の付着は、送達ポリマーと共に同時投与された時、インビボでRNAiポリヌクレオチドのヘパトサイトへの機能的送達を可能にしない。

20

30

【0351】

ガラクトースクラスタは、各々中心分岐点に連結された2個、または好ましくは3個のガラクトース誘導体を含み得る。ガラクトース誘導体は、糖類のC-1炭素を通して中心分岐点に付着する。ガラクトース誘導体は、好ましくは、リンカーまたはスペーサー(領域Yであり得る)を介して分岐点に連結される。好ましいスペーサーは、フレキシブル親水性スペーサー(米国特許第5885968号; Biessen et al. J. Med. Chern. 1995 Vol. 39 p. 1538-1546)である。好ましいフレキシブル親水性スペーサーは、PEGスペーサーである。好ましいPEGスペーサーは、PEG3スペーサーである。分岐点は、3個のガラクトース誘導体の付着を可能にし、さらにオリゴマーへの分岐点の付着を可能にする任意の小分子であり得る。例示的な分岐点基はジリジンである。ジリジン分子は、3個のガラクトース誘導体が付着し得る3個のアミン基、およびジリジンがオリゴマーに付着し得るカルボキシル反応基を含有している。分岐点のオリゴマーへの付着は、リンカーまたはスペーサーを通して起こり得る。好ましいスペーサーは、フレキシブル親水性スペーサーである。好ましいフレキシブル親水性スペーサーは、PEGスペーサーである。好ましいPEGスペーサーは、PEG3スペーサー(3個のエチレン単位)である。ガラクトースクラスタは、当技術分野において公知の方法を使用して、オリゴマーの3'末端または5'末端に付着させられ得る。

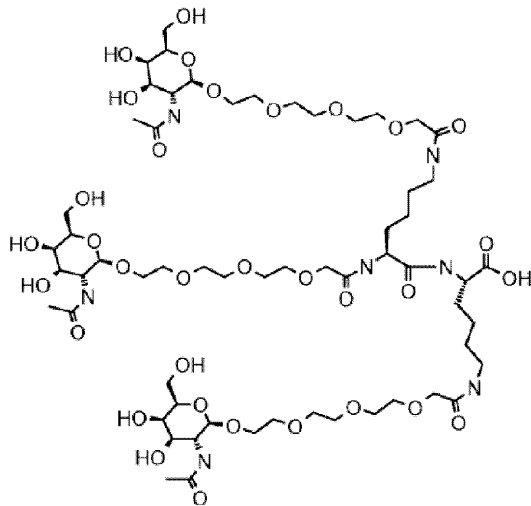
40

【0352】

好ましいガラクトース誘導体は、N-アセチル-ガラクトサミン(GalNAc)である。アシアロ糖タンパク質受容体に対する親和性を有するその他の糖類は、ガラクトサミン、N-n-

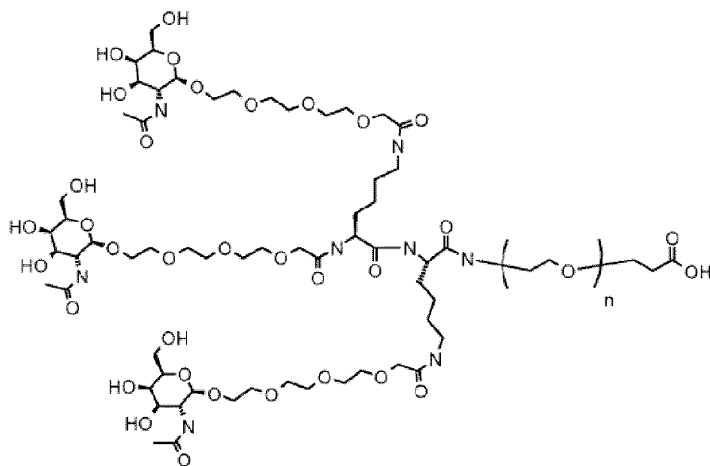
50

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を含むリストより選択され得る。アシアロ糖タンパク質受容体に対する多数のガラクトース誘導体の親和性が研究されており（例えば、Jobst, S.T. and Drickamer, K. JB.C. 1996, 271, 6686を参照）、または当技術分野において典型的な方法を使用して、容易に決定される。



10

ガラクトースクラスターの一つの態様



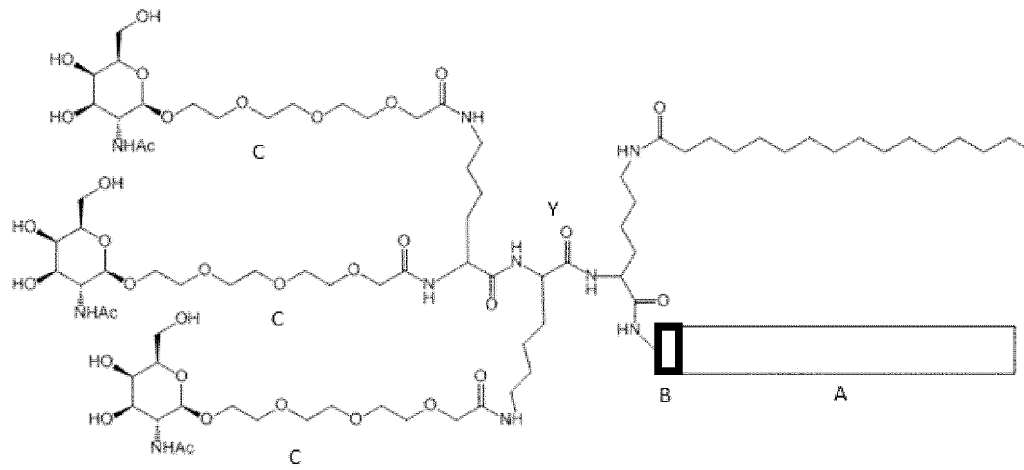
20

分岐点と核酸との間にPEGスペーサーを有するガラクトースクラスター

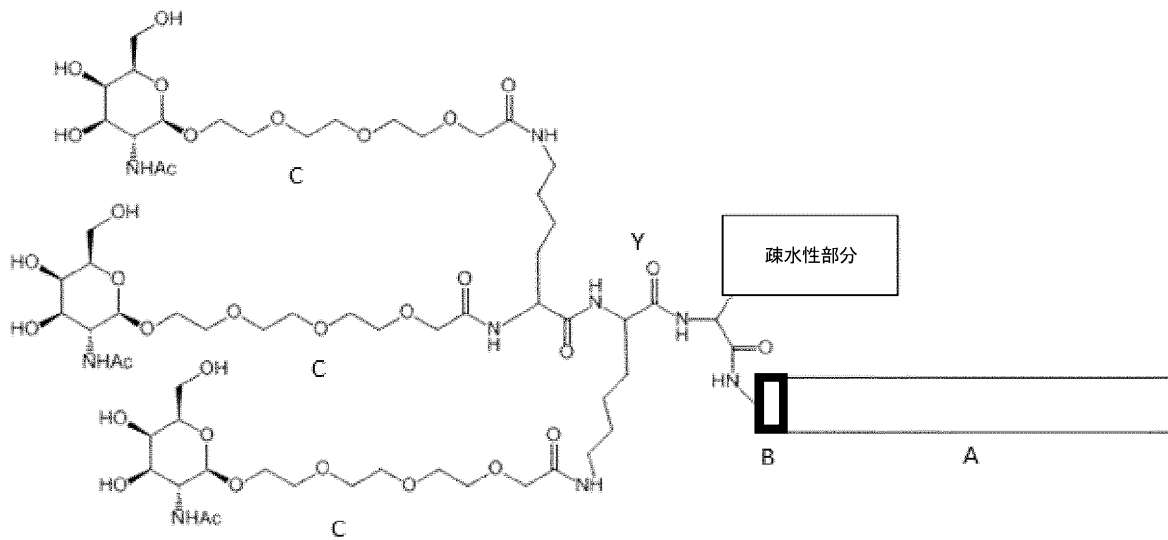
【 0 3 5 3 】

GalNacコンジュゲートは図1に図示される。本発明のコンジュゲートのさらなる例は、以下に図示される。

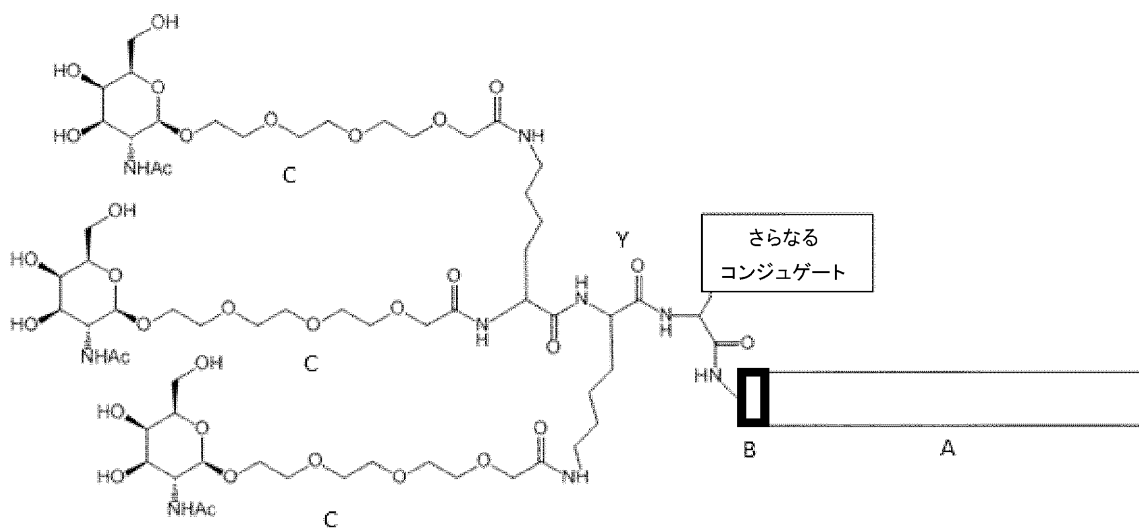
30



10



20



30

40

領域Aは、例えば、LNAアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。

【 0 3 5 4 】

従って、本明細書に記載されるように、炭水化物コンジュゲート（例えば、GalNAc）は、生物切断性リンカー、例えば、本明細書において定義される領域Bを介して、任意で、上記図中にジリジンとして図示された領域Yを介して、オリゴマーに連結され得る。

50

【0355】

ここで、上記GalNacクラスタコンジュゲート内の疎水性または親油性の部分（またはさらなるコンジュゲート部分）（即ち、薬物動態モジュレーター）は、BNAオリゴマーまたはLNAオリゴマー、例えば、LNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用する時には、任意である。

【0356】

本研究において使用された具体的なGalNacクラスタ、コンジュゲート1、2、3、4、ならびにコンジュゲート1a、2a、3a、および4a（GalNacクラスタをオリゴマーに接合する任意でのC6リンカーと共に示されている - 図12および17を参照）については、図面を参照されたい。

10

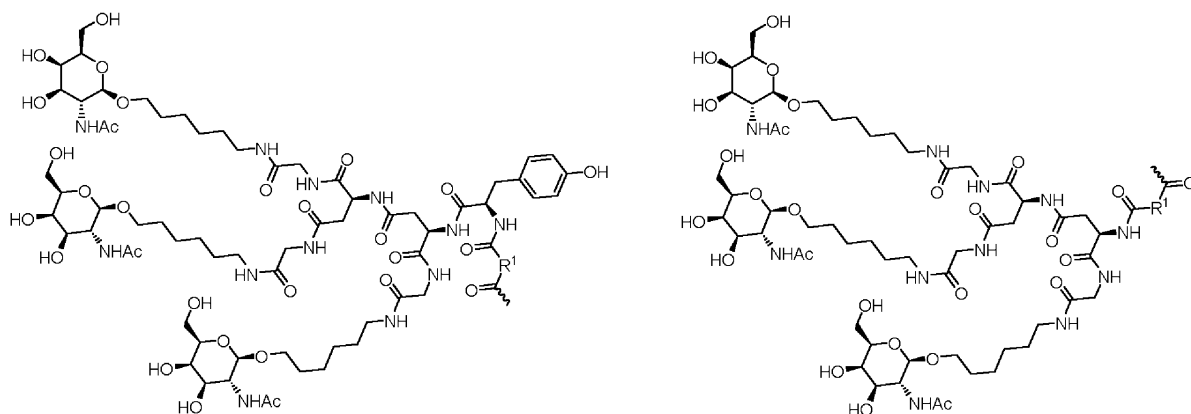
【0357】

従って、GalNacクラスタの各炭水化物部分（例えば、GalNac）は、スペーサー、例えば、（ポリ）エチレングリコールリンカー（PEG）、例えば、ジエチレングリコールリンカー、トリエチレングリコールリンカー、テトラエチレングリコールリンカー、ペンタエチレングリコールリンカー、ヘキサエチレングリコールリンカーを介して、オリゴマーに接合され得る。上に示されるように、PEG部分は、ガラクトース糖部分とペプチド（トリリジンが示されている）リンカーとの間のスペーサーを形成する。

【0358】

いくつかの態様において、GalNacクラスタは、ピラジカルリンカーを介してオリゴマー（または領域Yもしくは領域B）に付着したペプチドリンカー、例えば、Tyr-Asp(Asp)トリペプチドまたはAsp(Asp)ジペプチドを含み、例えば、GalNacクラスタは、以下のピラジカルリンカーを含み得る。

20



30

R¹は、-C₂H₄-、-C₃H₆-、-C₄H₈-、-C₅H₁₀-、-C₆H₁₂-、1,4-シクロヘキシル（-C₆H₁₀-）、1,4-フェニル（-C₆H₄-）、-C₂H₄OC₂H₄-、-C₂H₄(OC₂H₄)₂-、または-C₂H₄(OC₂H₄)₃-より好ましくは選択されるピラジカルである。

【0359】

さらに、炭水化物コンジュゲート（例えば、GalNac）または炭水化物-リンカー部分（例えば、炭水化物-PEG部分）は、分岐点基、例えば、アミノ酸または適宜2個以上（例えば、3個、4個、または5個）のアミノ基を含むペプチド、例えば、リジン、ジリジンまたはトリリジンまたはテトラリジンを介して、オリゴマー（または領域B）に共有結合で接合（連結）され得る。トリリジン分子は、3個の炭水化物コンジュゲート基、例えば、ガラクトース&誘導体（例えば、GalNac）およびさらなるコンジュゲート部分/基、例えば、疎水性または親油性の部分/基が付着させられ得る4個のアミン基、ならびにトリリジンがオリゴマーに付着させられ得るカルボキシル反応基を含有している。さらなるコンジュゲート部分、例えば、親油性/疎水性部分は、オリゴマーに付着しているリジン残基に付着させられ得る。いくつかの態様において、コンジュゲート（C）は、1価GalNacではない。

40

【0360】

本発明は、アシアロ糖タンパク質受容体ターゲティング部分にコンジュゲートされたLN

50

Aアンチセンスオリゴヌクレオチドも提供する。いくつかの態様において、コンジュゲート部分（例えば、第3領域または領域C）は、アシアロ糖タンパク質受容体ターゲティング部分、例えば、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アセチルガラクトサミン、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を含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、ガラクトースクラスタ、例えば、N-アセチルガラクトサミン三量体を含む。いくつかの態様において、コンジュゲート部分は、GalNac（N-アセチルガラクトサミン）、例えば、一価、二価、三価、または四価のGalNacを含む。3価のGalNacコンジュゲートは、化合物を肝臓へ標的指向化するために使用され得る。GalNacコンジュゲートは、メチルホスホネートおよびPNAアンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、US 5,994,517およびHangeland et al., Bioconjug Chem. 1995 Nov-Dec; 6(6):695-701）ならびにsiRNA（例えば、WO2009/126933、WO2012/089352 & WO2012/083046）と共に使用されている。GalNacの参照およびそこで使用された具体的なコンジュゲートは、参照によって本明細書に組み入れられる。WO2012/083046は、切断可能な薬物動態モジュレーターを含むGalNacコンジュゲート部分を開示しており、好ましい薬物動態モジュレーターは、C16疎水基、例えば、パルミトイル、ヘキサデカ-8-エノイル、オレイル、(9E,12E)-オクタデカ-9,12-ジエノイル、ジオクタノイル、およびC16-C20アシルである。'046号の切断可能な薬物動態モジュレーターは、コレステロールでもあり得る。'046号のターゲティング部分は、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-アセチルガラクトサミン、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、N-イソ-ブタノイルガラクトサミン、ガラクトースクラスタ、およびN-アセチルガラクトサミン三量体からなる群より選択され得、16個以上の炭素原子を有する疎水基、16~20個の炭素原子を有する疎水基、パルミトイル、ヘキサデカ-8-エノイル、オレイル、(9E,12E)-オクタデカ-9,12-ジエノイル、ジオクタノイル、およびC16-C20アシル、およびコレステロールからなる群より選択される薬物動態モジュレーターを有し得る。'046号に開示されたある特定のGalNacクラスタには、(E)-ヘキサデカ-8-エノイル（C16）、オレイル（C18）、(9,E,12E)-オクタデカ-9,12-ジエノイル（C18）、オクタノイル（C8）、ドデカノイル（C12）、C-20アシル、C24アシル、ジオクタノイル（2×C8）が含まれる。'046号によると、ターゲティング部分-薬物動態モジュレーターターゲティング部分は、生理学的に不安定な結合、または、例えば、ジスルフィド結合、またはPEGリンカーを介して、ポリヌクレオチドに連結され得る。

【0361】

その他のコンジュゲート部分には、例えば、オリゴ糖および炭水化物クラスタ、例えば、Tyr-Glu-Glu-(アミノヘキシルGalNac)₃(YEE(ahGalNac)₃；ヘパトサイト上のGal/GalNac受容体に結合するグリコトリペプチド、例えば、Duff, et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 297を参照)；リジンベースのガラクトースクラスタ（例えば、L3G4；Biessen, et al., Cardiovasc. Med., 1999, 214）；ならびにコランベースのガラクトースクラスタ（例えば、アシアロ糖タンパク質受容体の炭水化物認識モチーフ）が含まれ得る。さらなる適当なコンジュゲートには、アシアロ糖タンパク質受容体（ASGP-R）上に見出される炭水化物認識ドメイン（CRD）に結合することができるオリゴ糖が含まれ得る。オリゴ糖および/または炭水化物複合体を含有しているコンジュゲート部分の例は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第6,525,031号に提供されている。

【0362】

薬物動態モジュレーター

本発明の化合物は、1個以上の付加的なコンジュゲート部分をさらに含むことができ、その中で、例えば、コンジュゲート基が炭水化物部分である場合、親油性または疎水性の部分が特に関心対象である。そのような親油性または疎水性の部分は、薬物動態モジュレーターとして作用することができ、任意で、リンカー、例えば、生物切断性リンカーを介して、炭水化物コンジュゲート、炭水化物コンジュゲートをオリゴマーに連結するリンカー、または複数の炭水化物コンジュゲート（多価コンジュゲート）をオリゴマーに連結するリンカーに、共有結合で連結され得る。

【0363】

従って、オリゴマーまたはコンジュゲート部分は、薬物動態モジュレーター、例えば、親油性または疎水性の部分を含み得る。そのような部分は、WO2012/082046においてsiRNAコンジュゲートに関して開示されている。疎水性部分には、飽和または不飽和であり得るC8～C36脂肪酸が含まれ得る。いくつかの態様において、C10、C12、C14、C16、C18、C20、C22、C24、C26、C28、C30、C32、およびC34脂肪酸が使用され得る。疎水基は、16個以上の炭素原子を有し得る。例示的な適当な疎水基は、ステロール、コレステロール、パルミトイル、ヘキサデカ-8-エノイル、オレイル、(9E,12E)-オクタデカ-9,12-ジエノイル、ジオクタノイル、およびC16-C20アシルからなる群より選択され得る。WO'346号によると、16個未満の炭素原子を有する疎水基は、ポリヌクレオチドのターゲティングを増強する効果が劣っているが、複数コピー（例えば、2×、例えば、2×C8、C10、C12、C14）で使用する、効力が増強され得る。ポリヌクレオチドターゲティング部分として有用な薬物動態モジュレーターは、コレステロール、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アラルキル基、アラルケニル基、およびアラルキニル基からなる群より選択され得、それらは、各々、直鎖状、分岐状、または環状であり得る。薬物動態モジュレーターは、好ましくは、炭素原子および水素原子のみを含有している炭化水素である。しかしながら、疎水性を維持する置換またはヘテロ原子、例えば、フッ素は、許容され得る。

10

【0364】

驚くべきことに、本発明者らは、LNAオリゴマーと共に使用するためのGalNacコンジュゲートが、薬物動態モジュレーターを必要としないことを見出し、従って、いくつかの態様において、GalNacコンジュゲートは、親油性または疎水性の部分、例えば、本明細書に記載されたものに共有結合で連結されていない、例えば、C8-C36脂肪酸またはステロールを含まない。従って、本発明は、親油性または疎水性の薬物動態モジュレーターまたはコンジュゲート部分/基を含まないLNAオリゴマーGalNacコンジュゲートも提供する。

20

【0365】

親油性コンジュゲート

本発明の化合物は、オリゴマー（A）および親油性コンジュゲート（C）を含むコンジュゲートであってもよい。生物切断性リンカー（B）は、そのようなオリゴマーコンジュゲートの活性の維持または増強において特に有効であることが見出された。いくつかの態様において、コンジュゲート基（C）およびまたはリンカー基（Y）は、親油基を含む。

30

【0366】

代表的なコンジュゲート部分には、ステロール分子およびステロイド分子を含む親油性分子（芳香族および非芳香族）が含まれ得る。親油性コンジュゲート部分は、例えば、オリゴマー化合物の親水性に対抗し、細胞侵入を増強するため、使用され得る。親油性部分には、例えば、ステロイドおよび関連化合物、例えば、コレステロール（米国特許第4,958,013号およびLetsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553）、チオコレステロール（Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533）、ラノステロール、コプロスタノール、スチグマステロール、エルゴステロール、カルシフェロール、コール酸、デオキシコール酸、エストロン、エストラジオール、エストラトリオール、プロゲステロン、スチルベストロール、テストステロン、アンドロステロン、デオキシコルチコステロン、コルチゾン、17-ヒドロキシコルチコステロン、それらの誘導体等が含まれる。

40

【0367】

その他の親油性コンジュゲート部分には、脂肪族基、例えば、直鎖状、分岐状、および環状のアルキル、アルケニル、およびアルキニルが含まれる。脂肪族基は、例えば、5～約50個、6～約50個、8～約50個、または10～約50個の炭素原子を有し得る。脂肪族基の例には、ウンデシル、ドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、テルペン、ボルニル、アダマンチル、それらの誘導体等が含まれる。いくつかの態様において、脂肪族基内の1個以上の炭素原子が、ヘテロ原子、例えば、O、S、またはNに置換されていてもよい（例えば、ゲラニルオキシヘキシル）。さらなる適当な親油性コンジュゲート部分には、グリセロールの脂肪族誘導体、例えば、アルキルグリセロール、ビス(

50

アルキル)グリセロール、トリス(アルキル)グリセロール、モノグリセリド、ジグリセリド、およびトリグリセリドが含まれる。いくつかの態様において、親油性コンジュゲートは、ジ-ヘキシルデシル-rac-グリセロールもしくは1,2-ジ-0-ヘキシルデシル-rac-グリセロール (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651; Shea, et al., *Nuc. Acids Res.*, 1990, 18, 3777)、またはそれらのホスホネートである。飽和および不飽和の脂肪族官能性、例えば、脂肪酸、脂肪族アルコール、脂肪酸エステル、および脂肪族アミンも、親油性コンジュゲート部分として役立ち得る。いくつかの態様において、脂肪族官能性は、約6~約30個または約8~約22個の炭素を含有し得る。脂肪酸の例には、カプリン酸、カプリル酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサン酸等が含まれる。

10

【0368】

さらなる態様において、親油性コンジュゲート基は、6~約50個、10~約50個、または14~約40個の炭素原子を有する多環芳香族基であり得る。多環芳香族基の例には、ピレン、プリン、アクリジン、キサンテン、フルオレン、フェナントレン、アントラセン、キノリン、イソキノリン、ナフタレン、それらの誘導体等が含まれる。その他の適当な親油性コンジュゲート部分には、メントール、トリチル(例えば、ジメトキシトリチル(DMT))、フェノキサジン、リボ酸、リン脂質、エーテル、チオエーテル(例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール)、それらの誘導体等が含まれる。オリゴマー化合物の親油性コンジュゲートの調製は、当技術分野において、例えば、Saison-Behmoaras et al, *EMBO J.*, 1991, 10, 1111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327; Svinarchuk et al, *Biochimie*, 1993, 75, 49; Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229、およびManoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651に十分に記載されている。

20

【0369】

低密度リボタンパク質(LDL)に対する親和性を有するコンジュゲート部分を含有しているオリゴマー化合物は、効果的な標的特異的送達系の提供を支援することができる。腫瘍細胞上における、LDLの受容体の高い発現レベルから、LDLは、これらの細胞に対する薬物の選択的送達のための、魅力的な担体である(Rump, et al., *Bioconjugate Chem.*, 1998, 9, 341; Firestone, *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 105; Mishra, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229)。LDLに対する親和性を有する部分には、多くの親油基、例えば、ステロイド(例えば、コレステロール)、脂肪酸、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの態様において、LDL親和性を有するコンジュゲート部分は、コール酸、例えば、ケノデオキシコール酸およびリトコール酸のジオレイルエステルであり得る。

30

【0370】

いくつかの態様において、コンジュゲート基は、親油性部分、例えば、ステロール(例えば、コレステロール、コレステリル、コレスタノール、スチグマステロール、コラン酸、およびエルゴステロール)であるかまたはそれを含み得る。いくつかの態様において、コンジュゲートは、コレステロールであるかまたはそれを含み得る。例えば、Soutschek et al., *Nature* (2004) 432, 173; Krutzfeldt *Nature* 2005, NAR 2007を参照されたい。

【0371】

40

いくつかの態様において、コンジュゲートは、脂質、リン脂質、または親油性アルコール、例えば、カチオン性脂質、中性脂質、スフィンゴ脂質、ならびに脂肪酸、例えば、ステアリン酸、オレイン酸、エライジン酸、リノール酸、リノールエライジン酸、リノレン酸、およびミリスチン酸であるかまたはそれを含み得る。いくつかの態様において、脂肪酸には、飽和または不飽和のC4~C30アルキル鎖が含まれる。アルキル鎖は、直鎖状であってもよいしまたは分岐状であってもよい。

【0372】

いくつかの態様において、親油性コンジュゲートは、ビオチンであってもよいしまたはビオチンを含んでいてもよい。いくつかの態様において、親油性コンジュゲートは、グリセリドもしくはグリセリドエステルであってもよいしまたはグリセリドもしくはグリセリ

50

ドエステルを含んでいてもよい。

【0373】

親油性コンジュゲート、例えば、コレステロールまたは本明細書に開示されるものは、オリゴヌクレオチドの、例えば、肝臓（典型的には、ヘパトサイト）への送達を増強するために使用され得る。

【0374】

以下の参照が、親油性コンジュゲートの使用に言及している：Kobylanska et al., *Acta Biochim Pol.* (1999); 46(3):679-91; Felber et al., *Biomaterials* (2012) 33(25):599-65; Grijalvo et al., *J Org Chem* (2010) 75(20):6806-13; Koufaki et al., *Curr Med Chem* (2009) 16(35):4728-42; Godeau et al. *J. Med. Chem.* (2008) 51(15):4374-6.

10

【0375】

ポリマーコンジュゲート

コンジュゲート部分には、ポリマーも含まれ得る。ポリマーは、コンジュゲートされたオリゴマー化合物の透過、細胞輸送、および局在化に影響を与えるために、かさの増大および様々な官能基を提供することができる。例えば、オリゴマー化合物のポリマーとのコンジュゲーションによって引き起こされる水力学的半径の増加は、核への進入の防止に役立ち、細胞質への局在化を助長することができる。いくつかの態様において、ポリマーは、細胞取り込みを実質的に低下させず、相補鎖またはその他の標的へのハイブリダイゼーションにも干渉しない。さらなる態様において、コンジュゲートポリマー部分は、例えば、約40kDa未満、約30kDa未満、または約20kDa未満の分子量を有する。さらに、ポリマーコンジュゲート部分は、水溶性であり得、任意で、その他のコンジュゲート部分、例えば、ペプチド、炭水化物、薬物、レポーター基、またはさらなるコンジュゲート部分をさらに含み得る。

20

【0376】

いくつかの態様において、ポリマーコンジュゲートには、ポリエチレングリコール（PEG）ならびにそのコポリマーおよび誘導体が含まれる。PEGへのコンジュゲーションは、オリゴマー化合物のヌクレアーゼ安定性を増加させることが示されている。PEGコンジュゲート部分は、任意の分子量、例えば、約100、約500、約1000、約2000、約5000、約10,000、またはそれ以上のものであり得る。いくつかの態様において、PEGコンジュゲート部分は、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、または少なくとも25個のエチレングリコール残基を含有している。さらなる態様において、PEGコンジュゲート部分は、約4～約10個、約4～約8個、約5～約7個、または約6個のエチレングリコール残基を含有している。PEGコンジュゲート部分は、修飾されていてもよく、例えば、末端ヒドロキシルが、アルコキシ、カルボキシ、アシル、アミド、またはその他の官能性に置換されていてもよい。その他のコンジュゲート部分、例えば、レポーター基、例えば、ビオチンまたはフルオレセインが、PEGコンジュゲート部分に付着していてもよい。PEGのコポリマーも、コンジュゲート部分として適当である。オリゴヌクレオチドのポリエチレングリコールコンジュゲートの調製および生物学的活性は、例えば、Bonora, et al., *Nucleosides Nucleotides*, 1999, 18, 1723; Bonora, et al., *Farmaco*, 1998, 53, 634; Efimov, *Bioorg. Khim.* 1993, 19, 800; および Jaschke, et al., *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 4810に記載されている。PEGコンジュゲート部分のさらなる例および対応するコンジュゲートされたオリゴマー化合物の調製は、例えば、各々参照によってその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第4,904,582号および第5,672,662号に記載されている。1個以上のPEG部分にコンジュゲートされたオリゴマー化合物は、市販されている。

30

40

【0377】

コンジュゲート部分として適当なその他のポリマーには、ポリアミン、ポリペプチド、ポリメタクリレート（例えば、ヒドロキシルプロピルメタクリレート（HPMA））、ポリ（L-乳酸）、DL乳酸-グリコール酸コポリマー（PGLA）、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン（PEI）、ポリアルキルアクリル酸、ポリウレタン、ポリアクリルアミド、N-アルキル

50

アクリルアミド、ポリスペルミン (PSP)、ポリエーテル、シクロデキストリン、それらの誘導体、およびそれらのコポリマーが含まれる。多くのポリマー、例えば、PEGおよびポリアミンは、ある特定の細胞に存在する受容体を有し、それにより、細胞取り込みを容易にする。ポリアミンおよびその他のアミン含有ポリマーは、生理学的pHにおいてプロトン化された形態で存在することができ、いくつかのオリゴマー化合物の陰イオン性骨格に効果的に対抗し、細胞透過を効果的に増強する。ポリアミンのいくつかの例には、ポリペプチド (例えば、ポリリジン、ポリオルニチン、ポリヒスチジン、ポリアルギニン、およびそれらのコポリマー)、トリエチレンテトラアミン、スペルミン、ポリスペルミン、スペルミジン、synノルスペルミジン、C分岐型スペルミジン、ならびにそれらの誘導体が含まれる。ポリアミンコンジュゲートの調製および生物学的活性は、例えば、Guzaev, et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 3671; Corey, et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 9373; およびPrakash, et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1733に記載されている。オリゴヌクレオチドのポリペプチドコンジュゲートの例は、例えば、Wei, et al., *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24, 655およびZhu, et al., *Antisense Res. Dev.*, 1993, 3, 265に提供されている。デンドリマーポリマーも、コンジュゲート部分として使用され得、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第5,714,166号に記載されている。ポリアミンおよび関連ポリマーについて上に記述されたように、その他のアミン含有部分も、例えば、生理学的条件におけるカチオン種の形成のため、適当なコンジュゲート部分として役立ち得る。アミン含有部分の例には、3-アミノプロピル、3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル、2-(2-(N,N-ジメチルアミノ)エトキシ)エチル、2-(N-(2-アミノエチル)-N-メチルアミノオキシ)エチル、2-(1-イミダゾリル)エチル等が含まれる。G-クランプ部分も、アミン含有コンジュゲート部分として役立ち得る (Lin, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 8531)。

【0378】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリアミドアミン (PAA)、ポリエチレンオキシド、およびポリエチレンイミン (PEI) からなる群より選択されるポリマーであってもよいしまたはそれを含んでもよい。ガラクトース、ラクトース、n-アセチルガラクトサミン、マンノース、マンノース-6-リン酸。いくつかの態様において、ポリマーは、ポリカチオン性ポリマーである。いくつかの態様において、コンジュゲート部分は、カチオン性ポリマーであってもよいし、またはカチオン性ポリマーに基づいていてもよい (含んでもよい)。カチオン性ポリマー、例えば、カチオン性アルブミンが、特定の細胞型および/または組織への送達を大いに増強し得ることを、多数の研究が証明している (例えば、脳送達。Lu, W. et al. (2005) *J. of Control Release* 107:428-448を参照)。これらの分子の利点から、コンジュゲート部分は、カチオン性ポリマー、例えば、ポリエチレンイミン、デンドリマー、ポリ(アルキルピリジニウム)塩、またはカチオン性アルブミンであり得る。いくつかの態様において、親水性ポリマーである。いくつかの態様において、ポリマーは、ポリ(ビニルピロリドン) (PVP) である。いくつかの態様において、ポリマーは、ポリアミンまたはポリアミド (例えば、US7,816,337 & US5525465) である。ポリマーコンジュゲートについては、例えば、Zhao et al., *Bioconjugate Chem* 2005, 16, 758-766; Kim et al., *J. Control Release* (2006) 116; 123; Pettit et al., *Ther. Deliv.* (2011) 2(7):907-17; Yang et al., *Bioconjug Chem* (2009) 20(2):213-21; Winkler et al (2009) *Eur J Med Chem* 44(2):670-7; Zelikin et al, *Biomacromolecules* (2007) 8(9):2950-3を参照されたい。酵素によって切断可能なポリヌクレオチド送達コンジュゲートに言及しているWO12092373も参照されたい。

【0379】

タンパク質コンジュゲートおよびペプチドコンジュゲート

その他のコンジュゲート部分には、タンパク質、サブユニット、またはそれらの断片が含まれ得る。タンパク質には、例えば、酵素、レポーター酵素、抗体、受容体等が含まれる。いくつかの態様において、タンパク質コンジュゲート部分は、抗体またはその断片であり得る (Kuijpers, et al, *Bioconjugate Chem.*, 1993, 4, 94)。抗体は、所望の標的、例えば、腫瘍およびその他の疾患に関連する抗原に結合するよう設計され得る。さらなる態

様において、タンパク質コンジュゲート部分は、血清タンパク質、例えば、HAS、または糖タンパク質、例えば、アシアロ糖タンパク質であり得る (Rajur, et al., Bioconjugate Chem., 1997, 6, 935)。さらなる態様において、オリゴマー化合物は、RNAiに関連するタンパク質、RNAiに関連するタンパク質複合体、サブユニット、およびそれらの断片にコンジュゲートされ得る。例えば、オリゴマー化合物は、ダイサーまたはRISCにコンジュゲートされ得る。インターカレーターおよび副溝結合剤 (MGB) も、コンジュゲート部分として適当であり得る。いくつかの態様において、MGBは、DPI (1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ (2,3-e) インドール-7-カルボキシレート) サブユニットまたはその誘導体の繰り返しを含有し得る (Lukhtanov, et al., Bioconjugate Chem., 1996, 7, 564 および Afonina, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 3199)。適当なインターカレーターには、例えば、多環式芳香族化合物、例えば、ナフタリン、ペリレン、フェナントリジン、ベンゾフェナントリジン、フェナジン、アントラキノン、アクリジン、およびそれらの誘導体が含まれる。ハイブリッドインターカレーター/リガンドには、フォトヌクレアーゼ/インターカレーターリガンド 6-[[[9-[[6-(4-ニトロベンズアミド)ヘキシル]アミノ]アクリジン-4-イル]カルボニル]アミノ]ヘキサノイル-ペンタフルオロフェニルエステルが含まれる。この化合物は、インターカレーターであるアクリジン部分であり、かつフォトヌクレアーゼであるp-ニトロベンズアミド基でもある。さらなる態様において、切断剤がコンジュゲート部分として役立ち得る。切断剤は、加水分解または酸化還元切断機序によって、標的、例えば、標的核酸の分解を容易にし得る。コンジュゲート部分として適当であり得る切断基には、例えば、金属錯体、ペプチド、アミン、酵素、およびヌクレアーゼの活性部位の構成要素を含有している構築物、例えば、イミダゾール、グアニジウム、カルボキシル、アミノ基等が含まれる。金属錯体の例には、例えば、Cu-テルピリジル錯体、Fe-ポルフィリン錯体、Ru錯体、およびランタニド錯体、例えば、様々なEu(III)錯体が含まれる (Hall, et al., Chem. Biol., 1994, 1, 185; Huang, et al., J. Biol. Inorg. Chem., 2000, 5, 85; および Baker, et al., Nucleic Acids Res., 1999, 27, 1547)。切断特性を有するその他の金属錯体には、メタロポルフィリンおよびその誘導体が含まれる。標的切断特性を有するペプチドの例には、ジンクフィンガーが含まれる (米国特許第6,365,379号; Lima, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 10010)。ヌクレアーゼ活性部位構成要素を含有している構築物の例には、ビスイミダゾールおよびヒスタミンが含まれる。

【0380】

コンジュゲート部分には、ペプチドも含まれ得る。適当なペプチドは、2~約30個、2~約20個、2~約15個、または2~約10個のアミノ酸残基を有し得る。アミノ酸残基は、D異性体およびL異性体の両方を含む、天然に存在するものまたは天然には存在しないものであり得る。いくつかの態様において、ペプチドコンジュゲート部分は、pH感受性ペプチド、例えば、融合性ペプチドである。融合性ペプチドは、薬剤、例えば、オリゴマー化合物の細胞質へのエンドソーム放出を容易にすることができる。融合性ペプチドは、酸性pHにおいて立体構造を変化させ、効果的にエンドソーム膜を不安定にし、それによって、エンドソーム内容物の細胞質送達を増強すると考えられている。融合性ペプチドの例には、ポリミクシンB、インフルエンザHA2、GALA、KALA、EALAに由来するペプチド、メリチン由来ペプチド、 α -ヘリカルペプチド、またはアルツハイマー - アミロイドペプチド等が含まれる。融合性ペプチドにコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの調製および生物学的活性は、例えば、Bongartz, et al., Nucleic Acids Res., 1994, 22, 4681ならびに米国特許第6,559,279号および第6,344,436号に記載されている。コンジュゲート部分として役立ち得るその他のペプチドには、細胞膜を越えて比較的大きい極性分子 (例えば、ペプチド、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質) を輸送する能力を有する送達ペプチドが含まれる。送達ペプチドの例には、HIV Tatタンパク質由来のTatペプチドおよびショウジョウバエ触角 (*Drosophila antenna*) タンパク質由来のAntペプチドが含まれる。TatおよびAntのオリゴヌクレオチドとのコンジュゲーションは、例えば、Astriaab-Fisher, et al., Biochem. Pharmacol., 2000, 60, 83に記載されている。コンジュゲート部分として使用され得るこれらおよびその他の送達ペプチドは、下記表Iに提供される。

【0381】

コンジュゲートされた送達ペプチドは、細胞の特定の領域、例えば、細胞質、核、核小体、および小胞体（ER）へのオリゴマー化合物の局在化の調節に役立ち得る。核局在化は、核局在化シグナル（NLS）のコンジュゲーションによって達成され得る。対照的に、細胞質局在化は、核輸出シグナル（NES）のコンジュゲーションによって容易になり得る。コンジュゲートされたオリゴマー化合物の核への局在化のために適当なペプチドには、例えば、N,N-ジパルミチルグリシル-アポEペプチドまたはN,N-ジパルミチルグリシル-アポEペプチド（dpGアポE）が含まれる（Liu, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, 19, 2207; Chaloin, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 243, 601）。核または核小体への局在化は、アルギニンリッチモチーフおよび/またはリジンリッチモチーフを有するペプチド、例えば、HIV-1 Tat、FXR2P、およびアンジオゲニン由来ペプチド（Lixin, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 284, 185）によっても容易になり得る。さらに、SV40抗原T由来の核局在化シグナル（NLS）ペプチド（Branden, et al., *Nature Biotech.*, 1999, 17, 784）が、コンジュゲートされたオリゴマー化合物を細胞の核へ送達するために使用され得る。核または核小体への局在化特性を有するその他の適当なペプチドは、例えば、Antopolsky, et al., *Bioconjugate Chem.*, 1999, 10, 598; Zanta, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999（サルウイルス40ラージ腫瘍抗原）; Hum. Mol. Genetics, 2000, 9, 1487; および FEBS Lett., 2002, 532, 36に記載されている。

【0382】

いくつかの態様において、核または核小体への局在化のための送達ペプチドは、少なくとも3個の連続アルギニン残基または少なくとも4個の連続アルギニン残基を含む。核局在化は、RSリピートモチーフ、REリピートモチーフ、またはRDリピートモチーフを含有しているペプチドコンジュゲートによっても容易になり得る（Cazalla, et al., *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22, 6871）。いくつかの態様において、ペプチドコンジュゲートは、少なくとも2個のRSモチーフ、REモチーフ、またはRDモチーフを含有している。

【0383】

例えば、オリゴマー化合物のERへの局在化は、シグナルペプチドKDEL（SEQ ID NO:18）（Arar, et al., *Bioconjugate Chem.*, 1995, 6, 573; Pichon, et al., *Mol. Pharmacol.*, 1997, 57, 431）へのコンジュゲーションによって達成され得る。オリゴマー化合物の細胞質局在化は、例えば、核輸出シグナル（NES）（Meunier, et al., *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27, 2730）を有するペプチドへのコンジュゲーションによって容易になり得る。NESペプチドには、HIV-1 Rev由来のロイシンリッチNESペプチド（Henderson, et al., *Exp. Cell Res.*, 2000, 256, 213）、転写因子III A、MAPKK、PKI-、サイクリンBI、およびアクチン（Wada, et al., *EMBO J.*, 1998, 17, 1635）、ならびに関連タンパク質が含まれる。抗菌ペプチド、例えば、デルマセプチン（dermaseptin）誘導体も、細胞質局在化を容易にすることができる（Hariton-Gazal, et al., *Biochemistry*, 2002, 41, 9208）。RGリピートモチーフおよび/またはKSリピートモチーフを含有しているペプチドも、オリゴマー化合物を細胞質へ指し向けるために適当であり得る。いくつかの態様において、ペプチドコンジュゲート部分は、少なくとも2個のRGモチーフ、少なくとも2個のKSモチーフ、または少なくとも1個のRGモチーフおよび1個のKSモチーフを含有している。本明細書において使用される、「ペプチド」には、本明細書に記述された具体的な分子または配列（存在する場合）のみならず、所望の機能が保持されている、それらの断片、および記述された配列の全部または一部を含む分子も含まれる。いくつかの態様において、ペプチド断片は、6個以上のアミノ酸を含有している。ペプチドは、その機能的特徴を実質的に変化させない保存的なアミノ酸置換を含有していてもよい。保存的置換は、機能的に類似したアミノ酸の以下のセットの中でなされ得る：中性-弱疎水性（A、G、P、S、T）、親水性-酸性アミン（N、D、Q、E）、親水性-塩基性（I、M、L、V）、および疎水性-芳香族（F、W、Y）。ペプチドには、相同ペプチドも含まれる。相同性は、例えば、BLASTアルゴリズム（短い配列のためのデフォルトパラメーター）を使用して同一性パーセントによって測定され得る。例えば、相同ペプチドは、50パーセント、60パーセント、70パーセント、80パーセント、90パーセント

、95パーセント、または99パーセントを越える同一性を有し得る。ペプチドを、オリゴマー化合物、例えば、オリゴヌクレオチドへコンジュゲートする方法は、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第6,559,279号に記載されている。

【0384】

いくつかの態様において、コンジュゲート部分は、タンパク質もしくはペプチドであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、細胞侵入ペプチド、例えば、ペネトラチン、トランスポータン、ペプタイボール（例えば、トリコロピン（trichorovin）-XIIa(TV-XIIa)）、TATペプチド（HIV）である。いくつかの態様において、ペプチドは、ポリアルギニン（例えば、ステアリル-(RxR)(4)）である。いくつかの態様において、ペプチドは、テトラペプチドGly-Phe-Leu-Gly（GFLG）を含有しているN-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド（HPMA）である。いくつかの態様において、ペプチドは、

-アミロイドペプチドである。いくつかの態様において、タンパク質またはペプチドは、抗体またはその抗原結合部位含有断片（エピトープ結合部位）である。いくつかの態様において、コンジュゲートは、M6P-HPMA-GFLG（Yang et al 2009を参照）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、アルギニンリッチペプチド（WO2005/115479）であるかまたはそれを含む。WO09005793（RGDペプチド）も参照されたい。いくつかの態様において、コンジュゲートは、タンパク質担体（例えば、アルブミン、アルブミン-PEGコンジュゲート、RGD-PEG-アルブミン）（Kang et al）であるかまたはそれを含む。WO09045536も参照されたい。いくつかの態様において、コンジュゲートは、ヒスチジル化オリゴリジン（例えば、WO0032764）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、糖タンパク質：トランスフェリン-ポリカチオン（例えば、US5354844、WO9217210、WO9213570）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、アシアロ糖タンパク質（US5346696）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、ポリカチオン性タンパク質（例えば、US603095）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、ポリ-ブソイド-リジンコンジュゲート（例えば、WO07113531）であるかまたはそれを含む。

【0385】

レポーター基および色素コンジュゲート基

コンジュゲート部分として適当であるレポーター基には、例えば、分光学的手段によって検出され得る任意の部分が含まれる。レポーター基の例には、色素、フルオロフォア、リン光体、放射標識等が含まれる。いくつかの態様において、レポーター基は、ビオチン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、または関連化合物である。レポーター基は、他のコンジュゲート部分に付着していてもよい。いくつかの態様において、コンジュゲートは、標識または色素、例えば、フルオロフォア、例えば、FAM（カルボキシフルオレセイン）であるかまたはそれを含む。

【0386】

架橋剤も、コンジュゲート部分として役立ち得る。架橋剤は、コンジュゲートされたオリゴマー化合物の、他の化合物との共有結合性の連結を容易にする。いくつかの態様において、架橋剤は、二本鎖核酸を共有結合で連結し、効果的に、二重鎖安定性を増加させ、薬物動態学的特性を調節することができる。いくつかの態様において、架橋剤は、光活性または酸化還元活性を有し得る。架橋剤の例には、光活性化によって核酸の鎖間架橋を容易にすることができるソラレン（Lin, et al, Faseb J, 1995, 9, 1371）が含まれる。他の架橋剤には、例えば、マイトマイシンCおよびそれらの類似体（Maruenda, et al., Bioconjugate Chem., 1996, 7, 541; Maruenda, et al., Anti-Cancer Drug Des., 1997, 12, 473; および Hu, et al, Bioconjugate Chem., 1996, 7, 659）が含まれる。マイトマイシンCによって媒介される架橋は、還元的活性化、例えば、生物学的還元剤（例えば、NADPH-シトクロムc還元酵素/NADPH系）によって達成され得る。さらなる光架橋剤には、例えば、N-ヒドロキシサクシニミジル-4'-アジドベンゾエート（HSAB）およびN-サクシニミジル-6(-4'-アジド-2'-ニトロフェニル-アミノ)ヘキサノエート（SANPAH）のようなアリアルアジドが含まれ

る。オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされたアリアルアジドは、照射によって核酸およびタンパク質との架橋を達成する。それらは、アーナー (earner) タンパク質 (例えば、KLHまたはBSA) ととも架橋する。

【0387】

様々な機能性コンジュゲート基

その他の適当なコンジュゲート部分には、例えば、ポリボラン、カルボラン、メタロポリボラン、メタロカルボラン、それらの誘導体等が含まれる (例えば、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第5,272,250号を参照)。

【0388】

多くの薬物、受容体リガンド、毒素、レポーター分子、およびその他の小分子が、コンジュゲート部分として役立ち得る。小分子コンジュゲート部分は、しばしば、ある特定の受容体またはその他の生体分子と特異的に相互作用し、それによって、コンジュゲートされたオリゴマー化合物の特定の細胞または組織への標的指向化を可能にする。小分子コンジュゲート部分の例には、ミコフェノール酸 (イノシン-5'-リン酸ジヒドロゲナーゼの阻害剤; 乾癬およびその他の皮膚障害を処置するために有用)、クルクミン (乾癬、癌、細菌性疾患、およびウイルス性疾患への治療的適用を有する) が含まれる。さらなる態様において、小分子コンジュゲート部分は、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン (HSA) のリガンドであり得る。HSAの多数のリガンドが、公知であり、例えば、アリアルプロピオン酸、イブプロフェン、ワルファリン、フェニルブタゾン、スプロフェン、カプロフェン、フェンフフェン (fenfufen)、ケトプロフェン、アスピリン、インドメタシン、(S)-(+)-プラノプロフェン、ダンシルサルコシン、2,3,5-トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリニン酸、ベンゾチアジアジド (benzothiadiazide)、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン (indomethicin)、バルビツール酸、セファロスポリン、サルファ薬、抗菌薬、抗生物質 (例えば、ピューロマイシンおよびパラマイシン) 等を含む。オリゴヌクレオチド-薬物コンジュゲートおよびそれらの調製は、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み入れられるWO00/76554に記載されている。

【0389】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、小分子、例えば、小分子薬物または小分子プロドラッグであるかまたはそれを含み得る。ある特定の薬物は、特定の標的組織または標的細胞を標的とするために高度に効果的であり、従って、それらは、オリゴヌクレオチドをその意図された作用部位へ標的指向化するために使用され得る。さらに、小分子は、典型的には、コンジュゲートのオリゴヌクレオチド成分から切断された後、それ自体、治療活性を有し得る。例には、ビスホスホネート (骨粗鬆症の処置のために広く使用されており、骨組織を標的とするために有効である)、抗癌薬、および化学療法剤 (例えば、ドキソルビシンまたはマイトマイシンC - US5776907を参照) が含まれる。いくつかの態様において、薬物は、ヌクレオシド類似体、例えば、ヌクレオシドポリメラーゼ阻害剤であり得る。

【0390】

さらなる態様において、小分子コンジュゲートは、ある特定の受容体または細胞を標的とするかまたはそれに結合することができる。T細胞は適切な分子とのシッフ塩基複合体を形成することができる露出アミノ基を有することが公知である。従って、露出アミノ基と相互作用するかまたは反応することができる官能基、例えば、アルデヒドを含有している小分子も、適当なコンジュゲート部分であり得る。ツカレソール (Tucarezol) および関連化合物は、アルデヒドがT細胞標的と自由に相互作用することができるような方式で、オリゴマー化合物にコンジュゲートされ得る。ツカレソールのT細胞との相互作用は、シッフ塩基形成によって、免疫系の治療的な強化をもたらすと考えられている (Rhodes, et al., Nature, 1995, 377, 6544)。

【0391】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、(例えば、細胞表面) 受容体リガンドであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、コンジュゲートは、葉酸受容体リガ

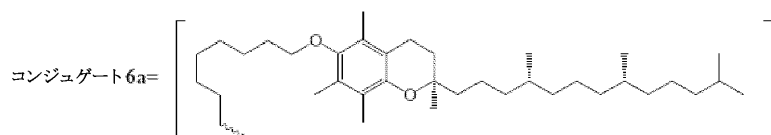
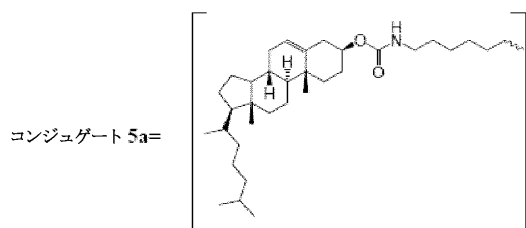
ンド、例えば、葉酸基であるかまたはそれを含む（例えば、EP1572067またはW02005/069994、W02010/045584を参照）。その他の細胞表面受容体リガンドには、抗体およびその断片、前立腺特異膜抗原、ニューロン表面抗原（W02011/131693を参照）が含まれる。

【0392】

いくつかの態様において、コンジュゲート部分は、受容体のリガンドであるか、または（次に）受容体と結合する分子と結合することができる。このクラスには、胆汁酸、小分子薬物リガンド、ビタミン、アプタマー、炭水化物、ペプチド（ホルモン、タンパク質、タンパク質断片、抗体、または抗体断片を含むが、これらに限定されない）、ウイルスタンパク質（例えば、カプシド）、毒素（例えば、細菌毒素）等が含まれる。このクラスには、ステロイド性のコンジュゲート、例えば、コレステロール、コレスタノール、コラン酸、スチグマステロール、プレグノロン（pregnolones）、プロゲステロン、コルチコステロン、アルドステロン、テストステロン、エストラジオール、エルゴステロール等も含まれる。本開示の好ましいコンジュゲート部分は、コレステロール（CHOL）、コレスタノール（CHLN）、コラン酸（CHLA）、スチグマステロール（STIG）、およびエルゴステロール（ERGO）である。ある特定の好ましい態様において、コンジュゲート部分はコレステロールである。

【0393】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、ステロール、例えば、コレステロールまたはトコフェロールを含み、リンカー、例えば、脂肪酸リンカー、例えば、C6リンカーを任意で含む。いくつかの態様において、コンジュゲートには、コンジュゲート5aまたはコンジュゲート6aが含まれる。



【0394】

コンジュゲート部分には、ビタミンも含まれ得る。ビタミンは、多数の細胞輸送系によって細胞へ輸送されることが公知である。典型的には、ビタミンは、水溶性または脂溶性として分類され得る。水溶性ビタミンには、チアミン、リボフラビン、ニコチン酸またはナイアシン、ビタミンB6ピリドキサル基、パントテン酸、ビオチン、葉酸、B12コバミド補酵素、イノシトール、コリン、およびアスコルビン酸が含まれる。脂溶性ビタミンには、ビタミンAファミリー、ビタミンD、ビタミンEトコフェロールファミリー、およびビタミンK（およびフィトール）が含まれる。関連化合物には、レチノイド誘導体、例えば、タザロテンおよびエトレチナートが含まれる。いくつかの態様において、コンジュゲート部分には、葉酸（葉酸塩）および/またはその様々な形態のうちの1種以上、例えば、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸、フォリン酸、プテロ（ptero）ポリグルタミン酸、ジヒドロ葉酸塩、テトラヒドロ葉酸塩、テトラヒドロプテリン、葉酸塩の1-デアザ類似体、3-デアザ類似体、5-デアザ類似体、8-デアザ類似体、10-デアザ類似体、1,5-ジデアザ類似体、5,10-ジデアザ類似体、8,10-ジデアザ類似体、および5,8-ジデアザ類似体、ならびに葉酸代謝拮抗薬が含まれる。葉酸塩は、核酸の生合成に関与し、従って、細胞の生存および増殖に影響を与える。葉酸塩補助因子は、ピリミジンヌクレオシドの生合成のために必要とされる1炭素移動において役割を果たす。従って、細胞は、葉酸塩を細胞質へ輸送する系を有している。葉酸受容体は、多くのヒト癌細胞において過剰発現される傾向もあ

り、オリゴヌクレオチドの卵巣癌細胞への葉酸塩によって媒介されるターゲティングが報告されている（参照によってその全体が本明細書に組み入れられるLi, et al, Pharm. Res. 1998, 15, 1540）。核酸の葉酸コンジュゲートの調製は、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第6,528,631号に記載されている。

【0395】

ビタミンコンジュゲート部分には、例えば、ビタミンA（レチノール）および/または関連化合物が含まれる。レチノイン酸およびレチノールを含むビタミンAファミリー（レチノイド）は、典型的には、特異的なタンパク質、例えば、サイトゾルレチノール結合タンパク質II型（CRBP-II）、レチノール結合タンパク質（RBP）、および細胞レチノール結合タンパク質（CRBP）との相互作用を通して、吸収され、標的組織へ輸送される。化合物のビタミンAファミリーは、様々なファミリーメンバーに見出される酸官能性またはアルコール官能性を介してオリゴマー化合物に付着させられ得る。例えば、レチノイン酸の酸部分のN-ヒドロキシサクシニミドエステルの、オリゴヌクレオチドに付属しているリンカー上のアミン官能へのコンジュゲーションは、アミド結合を介したビタミンA化合物のオリゴマー化合物への連結をもたらすことができる。レチノールは、5'コンジュゲーションのために有用であるそのホスホラミダイトに変換されてもよい。トコフェロール（ビタミンE）およびその他のトコフェロール（〜）は、親油特徴によって取り込みを増強するため、オリゴマー化合物にコンジュゲートされ得る。ビタミンDおよびそのエルゴステロール前駆体も、まずヒドロキシル基を、例えば、ヘミコハク酸エステルへ活性化することによって、ヒドロキシル基を通してオリゴマー化合物にコンジュゲートされ得る。次いで、オリゴマー化合物、またはオリゴマー化合物に付属しているアミノリンカーと、直接、コンジュゲーションが達成され得る。オリゴマー化合物に同様にコンジュゲートされ得る他のビタミンには、チアミン、リボフラビン、ピリドキシン、ピリドキサミン、ピリドキサル、デオキシピリドキシンが含まれる。脂溶性ビタミンKおよび関連キノン含有化合物は、キノン環上のカルボニル基を介してコンジュゲートされ得る。ビタミンKのフィトール部分も、オリゴマー化合物の細胞との結合を増強するために役立ち得る。

【0396】

本発明の化合物においてコンジュゲートとして使用され得るその他の官能基には、イミダゾールコンジュゲート - RNase A触媒中心模倣物（ポリアミン-イミダゾールコンジュゲート）が含まれる（Guerniou et al Nucleic Acids Res(2007);35(20):6778-87を参照）。

【0397】

コンジュゲートは、典型的には、非ヌクレオチド部分である。しかしながら、ブロッキング基もしくはターゲティング基、またはヌクレオチド類似体小分子治療薬に関して、オリゴヌクレオチドは、本発明のDNA/RNAホスホジエステル領域を介して、ヌクレオチド部分に共有結合で連結され得ることが認識される。適宜、本発明に関して使用される核酸基は、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチド（領域A）の標的に対する相補性を欠いていてもよい。

【0398】

いくつかの態様において、ブロッキング部分またはターゲティング部分は、アプタマーである（例えば、Meng et al., PLoS(2012)7(4):e33434、WO2005/111238 & WO12078637を参照）。

【0399】

ブロッキング基は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの一部に相補的であるオリゴヌクレオチド領域であってもよいしまたはそれを含んでいてもよい。この点に関して、ブロッキングオリゴヌクレオチドは、DNA/RNAホスホジエステル領域（領域b）を介して、任意でリンカーを介して、アンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合で結合している。従って、ブロッキングオリゴヌクレオチドは、いくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドと二重鎖を形成することができる。適宜、（第3領域または領域Cとしての）ブロッキングヌクレオチド配列は、等しい長

さの第1領域と二重鎖を形成する（即ち、それに相補的である）、例えば3～10ヌクレオチド長の短いオリゴヌクレオチド配列である。いくつかの態様において、リンカーは、第2領域とブロッキング領域との間に使用される。

【0400】

送達ペプチドと同様に、核酸も、細胞におけるコンジュゲートされたオリゴマー化合物の局在化に影響を与えることができるコンジュゲート様部分として役立つ。例えば、核酸コンジュゲート部分は、ポリA含有分子を細胞質へ局在化させるポリA結合タンパク質（PABP）によって認識されるモチーフであるポリAを含有することができる（Gorlach, et al., Exp. Cell Res., 1994, 211, 400）。いくつかの態様において、核酸コンジュゲート部分は、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、
10 少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個の連続A塩基を含有している。核酸コンジュゲート部分は、1個以上のAUリッチ配列要素（ARE）を含有していてもよい。AREは、細胞質への局在化を容易にすることができるELAVファミリータンパク質によって認識される（Bollig, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 301, 665）。AREの例には、UUAUUUAUU、およびこのモチーフの複数の繰り返しを含有している配列が含まれる。他の態様において、核酸コンジュゲート部分は、2個以上のAUモチーフまたはAUUモチーフを含有している。同様に、核酸コンジュゲート部分は、タンパク質のELAVファミリーのタンパク質HuDおよび/またはHuRに結合することができるCUリッチ配列要素（CRE）（Wein, et al., Eur. J. Biochem., 2003, 270, 350）を1個以上
20 含有していてもよい。AREと同様に、CREは、コンジュゲートされたオリゴマー化合物の細胞質への局在化に役立つ。いくつかの態様において、核酸コンジュゲート部分は、モチーフ(CUUU)_n（例えば、_nは1～約20、1～約15、または1～約11であり得る）を含有している。任意で、(CUUU)_nモチーフの前または後に1個以上のUが存在していてもよい。いくつかの態様において、_nは、約9～約12または約11である。核酸コンジュゲート部分には、hnRNPタンパク質（ヘテロ核リボヌクレオタンパク質）の基質も含まれ得、これらのいくつかは、核と細胞質との間の核酸の往復に関与している（例えば、hnRNP A1、hnRNP K；
例えば、Mili, et al., Mol. Cell Biol., 2001, 21, 7307を参照）。hnRNP基質のいくつかの例には、配列UAGGA/Uまたは(GG)ACUAGC(A)を含有している核酸が含まれる。その他の核酸コンジュゲート部分には、Yストリング、または、例えば、linRNP Iに結合することができる
30 その他のトラクト（tract）が含まれ得る。いくつかの態様において、核酸コンジュゲート部分は、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、および少なくとも25個の連続ピリミジン塩基を含有していてもよい。他の態様において、核酸コンジュゲートは、50パーセントを越える、60パーセントを越える、70パーセントを越える、80パーセントを越える、90パーセントを越える、または95パーセントを越えるピリミジン塩基を含有していてもよい。

【0401】

その他の核酸コンジュゲート様部分には、例えば、Wang, et al., Cell, 2002, 110, 501に記載されたようなpumilio（pufタンパク質）認識配列が含まれ得る。pumilio認識配列の例には、UGUANAUR（Nは、任意の塩基であり得、Rは、プリン塩基であり得る）が含まれ得る。細胞質への局在化は、AREおよび/またはCREを含有している核酸コンジュゲート部分によって容易になり得る。hnRNPの基質として役立つ核酸コンジュゲート様部分は、コン
40 ジュゲートされたオリゴマー化合物の細胞質（例えば、hnRNP A1もしくはK）または核（例えば、hnRNP I）への局在化を容易にすることができる。さらに、核局在化は、ポリピリミジントラクトを含有している核酸コンジュゲート様部分によって容易になり得る。

【0402】

反応基

反応基は、本発明に関して、第3領域（X）、例えば、コンジュゲート基、ブロッキング基、もしくはターゲティング基、または任意でリンカー（Y）にオリゴヌクレオチドを「
50 コンジュゲートする」ため、またはオリゴヌクレオチドを共有結合で連結するために使用

され得る、化学合成において使用される基である。反応基の一例は、オリゴヌクレオチド合成において広く使用されているホスホラミダイトである。

【0403】

活性化基

活性化基は、反応基を形成するよう活性化され得る基である。この点で、活性化基は、例えば、本明細書に開示された合成/製造の方法において、反応基の使用を可能にするために事前に脱保護され得る、保護された反応基と見なされ得る。

【0404】

連結基

ヌクレオシド連結は、オリゴヌクレオチド内のヌクレオシド間の連結基であるか、または、存在する場合、第3領域(XもしくはC)またはリンカー(Y)を領域Bに付着させる基も意味し得る。例えば、このリンカーは、ホスフェート(含有)連結基またはトリアゾール基であり得る。

【0405】

ブロッカー基(ブロッキング/ブロッカー部分とも呼ばれる)

いくつかの局面において、第3領域はブロッキング領域である。ブロッカーは、典型的には、例えば、(以下に限定されないが)立体障害を通して、または第1領域(もしくは第1領域および第2領域)とのハイブリダイゼーションを通して、オリゴマーの活性を防止するかまたは低下させるコンジュゲートまたはオリゴヌクレオチド(典型的には、標的領域に相補的でない)である。(阻止される)活性は、その意図された標的(ターゲット)に対するものであってもよいし、または、いくつかの態様において、意図されない標的(オフターゲット(off-target))に対するものであってもよい。

【0406】

従って、本発明のオリゴマー化合物は、第1領域、例えば、ギャップマーまたはLNAギャップマーオリゴヌクレオチド(例えば、式X'Y'Zのギャップマー)と、生物切断性リンカーである第2領域、例えば、本明細書に記載される領域Bと、第1領域の対応する成分に相補的である少なくとも2個の連続ヌクレオシド、例えば、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個のヌクレオチドの領域を含む第3領域である領域Cとを含み得る。いくつかの態様において、領域Cの少なくとも2個のヌクレオシド、例えば、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のヌクレオシドは、高親和性ヌクレオシド類似体、例えば、LNA(BNA)であり、いくつかの態様において、これらは、領域Cの遠位成分を形成し得る。領域Cの高親和性ヌクレオシド類似体は、高親和性ヌクレオシド類似体の連続配列を形成していてもよく、これに、他のヌクレオシド、例えば、DNAヌクレオシド(同じく領域Cの一部であり、領域Cの近位成分と呼ばれる)が隣接していてもよい。いくつかの態様において、領域Cは、2~8個、例えば、3個、4個、5個、6個、7個のLNA(BNA)ヌクレオチドを含み、同一のまたは異なる態様において、2~16個(例えば、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個)のDNAヌクレオチドの領域を含む。いくつかの態様において、領域Bの遠位成分は、高親和性ヌクレオチド類似体の連続領域、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、または8個のLNAヌクレオチドの連続領域を含む。近位領域は、非LNAヌクレオチド、例えば、本明細書において言及されたもの、例えば、DNAヌクレオチドの連続領域、例えば、2~16個の非LNAヌクレオチドの領域を含み得る。しかしながら、近位領域は、LNAを含む高親和性ヌクレオチド類似体を含み得るが、LNAの連続領域は、近位領域(ループとして作用すると考えられる)の構造的柔軟性を制限し得ることも理解される。いくつかの態様において、近位(またはループ形成成分)内のLNAの長いストレッチの使用を限定することが有用であり得る(例えば、4個以下の連続LNA、例えば、3個以下の連続LNA、または2個以下の連続LNA)。

【0407】

いくつかの態様において、領域C内の他のヌクレオチド(例えば、DNAヌクレオチド)の領域は、領域Bとの連続配列を形成する、即ち、領域Bの末端ヌクレオチドに近位であるた

10

20

30

40

50

め、高親和性ヌクレオチドの領域は領域Bに対して遠位である。そのような態様において、領域B、および領域Cの近位成分（例えば、DNAヌクレオチドを含む領域）は、フレキシブルループを形成することができ、これは、領域Cの遠位成分が第1領域とハイブリダイズすることを可能にする。領域Cの近位成分は、領域Aの対応する成分に相補的であってもよいしまたは相補的でなくてもよい。いくつかの態様において、領域Cの遠位成分は、RNase Hをリクルートすることができる領域、例えば、ギャップマーのギャップ領域（本明細書において領域Y'と呼ばれる）を形成するヌクレオチドに相補的である。そのような態様において、ブロッキング領域（領域C）は、ギャップ領域またはその一部と二重鎖を形成し、それによって、他の分子またはターゲットまたはオフターゲットと相互作用するためのギャップマーの中央領域の利用可能性を阻止する。従って、本発明は、標的組織または標的細胞におけるギャップマーオリゴマー（領域A）の調節された活性化を可能にするため、DNAホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（ギャップマーのギャップ領域のために典型的に使用される）の固有の毒性を解決する。この点で、ブロッキング領域の使用は、プロドラッグとして作用することができる。ブロッキング領域（領域Cまたはその遠位成分）は、ミックスマーまたはトータルマーオリゴマーを含むオリゴマーの他の領域、またはギャップマーの隣接領域、またはギャップマーのウィング領域およびギャップ領域にかかる領域に対するものであってもよいことが認識される。そのような態様において、領域C（またはその遠位成分）の、領域A（または領域Aの一部）に対するハイブリダイゼーションは、領域Aの対応する成分の、生体分子に対するハイブリダイゼーションを防止し、従って、他の生体分子との意図されない相互作用を防止し、特異性、組織特異的活性を増強し、毒性のリスクを減じるためにも使用され得る。領域Cのヌクレオチド間のヌクレオシド間連結は、ホスホジエステル以外のものであり得、例えば、ホスホロチオエートであり得る。

【0408】

ターゲティング基（ターゲティング部分とも呼ばれる）

ターゲティング部分は、オリゴマー化合物上に存在する場合に、オリゴマー化合物の、ディファレンシャルなパターンの体内分布および/または細胞取り込みを引き起こす基である。ターゲティング基は、例えば、受容体リガンド、抗体、ホルモン、またはホルモン類似体、アプタマー等であり得る。実施例は、ターゲティング基としてのコレステロールの使用を示す。コレステロールは、ヘパトサイトの表面にあるLDL受容体によって認識され、コレステロールがコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの、肝臓への優先的な取り込みをもたらす。実施例は、GalNAc、トコフェロール、および葉酸のターゲティング基としての使用も例証する。

【0409】

オリゴマーと連結された生物切断性コンジュゲート

オリゴマー化合物は、任意で、オリゴマー（領域Aと呼ばれる）とコンジュゲート（領域Cと呼ばれる）との間に位置する第2領域（領域B）を含み得る。領域Bは、リンカー、例えば、切断可能なリンカー（生理学的に不安定な連結とも呼ばれる）であり得る。

【0410】

いくつかの態様において、本発明の化合物は、オリゴマー（または連続ヌクレオチド配列または領域A）をコンジュゲート部分（または領域C）に接合する、生物切断性リンカー（生理学的に不安定なリンカー、ヌクレアーゼ感受性の生理学的に不安定な連結、またはヌクレアーゼ感受性リンカーとも呼ばれる）、例えば、ホスフェートヌクレオチドリナー（例えば、領域B）またはペプチドリナーを含む。

【0411】

本発明による生物切断性リンカーとは、標的組織、例えば、肝臓および/または腎臓において、切断に対して感受性（即ち、生理学的に不安定）であるリンカーをさす。標的組織において見られる切断速度は、血清において見られるものより大きいことが好ましい。組織（例えば、肝臓または腎臓）および血清における切断のレベル（%）を決定するための適当な方法は、実施例6に見出される。いくつかの態様において、本発明の化合物にお

ける生物切断性リンカー（生理学的に不安定なリンカーまたはヌクレアーゼ感受性リンカーとも呼ばれる）、例えば、領域Bは、実施例6の肝臓または腎臓のホモジネートアッセイにおいて、少なくとも約20%切断され、例えば、少なくとも約30%切断され、例えば、少なくとも約40%切断され、例えば、少なくとも約50%切断され、例えば、少なくとも約60%切断され、例えば、少なくとも約70%切断され、例えば、少なくとも約75%切断される。いくつかの態様において、実施例6におけるアッセイにおいて使用される血清における切断（%）は、約20%未満、例えば、約10%未満、例えば、5%未満、例えば、約1%未満である。

【0412】

本発明による生物切断性リンカーとは、標的組織、例えば、肝臓および/または腎臓において、切断に対して感受性（即ち、生理学的に不安定）であるリンカーをさす。標的組織において見られる切断速度は、血清において見られるものより大きいことが好ましい。組織（例えば、肝臓または腎臓）および血清における切断のレベル（%）を決定するための適当な方法は、実施例6に見出される。いくつかの態様において、本発明の化合物における生物切断性リンカー（生理学的に不安定なリンカーまたはヌクレアーゼ感受性リンカーとも呼ばれる）、例えば、領域Bは、実施例6の肝臓または腎臓のホモジネートアッセイにおいて、少なくとも約20%切断され、例えば、少なくとも約30%切断され、例えば、少なくとも約40%切断され、例えば、少なくとも約50%切断され、例えば、少なくとも約60%切断され、例えば、少なくとも約70%切断され、例えば、少なくとも約75%切断される。いくつかの態様において、実施例6におけるアッセイにおいて使用される血清における切断（%）は、約30%未満であり、約20%未満、例えば、約10%未満、例えば、5%未満、例えば、約1%未満である。

【0413】

同一であってもよいしまたは異なってもよいいくつかの態様において、本発明の化合物における生物切断性リンカー（生理学的に不安定なリンカーまたはヌクレアーゼ感受性リンカーとも呼ばれる）、例えば、領域Bは、S1ヌクレアーゼ切断に対して感受性である。S1切断に対する感受性は、実施例6において示されるS1ヌクレアーゼアッセイを使用して評価され得る。いくつかの態様において、本発明の化合物における生物切断性リンカー（生理学的に不安定なリンカーまたはヌクレアーゼ感受性リンカーとも呼ばれる）、例えば、領域Bは、実施例6において使用されるアッセイによるS1ヌクレアーゼとの120分のインキュベーションの後に、少なくとも約30%切断され、例えば、少なくとも約40%切断され、例えば、少なくとも約50%切断され、例えば、少なくとも約60%切断され、例えば、少なくとも約70%切断され、例えば、少なくとも約80%切断され、例えば、少なくとも約90%切断され、例えば、少なくとも約95%切断される。

【0414】

ヌクレアーゼ感受性の生理学的に不安定な連結：いくつかの態様において、本発明のオリゴマー（オリゴマー化合物とも呼ばれる）、（またはコンジュゲート）は、以下の3種の領域を含む：

- (i) 10~18個の連続ヌクレオチドを含む第1領域（領域A）；
- (ii) 生物切断性リンカーを含む第2領域（領域B）
- (iii) コンジュゲート部分、ターゲティング部分、活性化部分を含み、第2領域に共有結合で連結されている、第3領域（C）。

【0415】

いくつかの態様において、領域Bは、ホスフェートヌクレオチドリinkerであり得る。例えば、そのようなリンカーは、コンジュゲートが、親油性コンジュゲート、例えば、脂質、脂肪酸、ステロール、例えば、コレステロールまたはトコフェロールである時、使用され得る。ホスフェートヌクレオチドリinkerは、他のコンジュゲート、例えば、炭水化物コンジュゲート、例えば、GalNAcのためにも使用され得る。

【0416】

ペプチドおよびその他のリンカー

いくつかの態様において、生物切断性リンカー（領域B）は、ポリGalNacコンジュゲート、例えば、トリGalNacコンジュゲートにおいて使用され得るペプチド、例えば、トリリジンペプチドリリンカーである。ジスルフィドリリンカー（本明細書においてジチオまたはジスルフィドとも呼ばれる）を含む、当技術分野において公知の他のリンカーも、使用され得る。他のペプチドリリンカーには、例えば、Tyr-Asp(Asp)トリペプチドまたはAsp(Asp)ジペプチドが含まれる。

【0417】

ホスフェートヌクレオチドリリンカー

いくつかの態様において、領域Bは、例えば、ヌクレオシド間連結基、例えば、ホスホジエステル連結を介して、第1領域の5'ヌクレオチドまたは3'ヌクレオチドに共有結合で連結された1~6個のヌクレオチドを含み、ここで、

（a）第1領域と第2領域との間のヌクレオシド間連結は、ホスホジエステル連結であり、第1領域に〔例えば、直接〕隣接している第2領域のヌクレオシドは、DNAもしくはRNAのいずれかであり；かつ/または

（b）第2領域の少なくとも1個のヌクレオシドは、ホスホジエステルによって連結されたDNAヌクレオシドもしくはRNAヌクレオシドである。

【0418】

いくつかの態様において、領域Aおよび領域Bは、10~22ヌクレオチド長、例えば、12~20ヌクレオチド長の単一の連続ヌクレオチド配列を形成する。

【0419】

いくつかの局面において、第1領域と第2領域との間のヌクレオシド間連結は、第2領域の一部と見なされ得る。

【0420】

リンカー

連結またはリンカーは、1個以上の共有結合を介して、ある関心対象の化学基またはセグメントを、もう一つの関心対象の化学基またはセグメントに連結する、2個の原子の間の接続である。コンジュゲート部分（またはターゲティング部分またはブロッキング部分）は、直接、または連結部分（リンカーもしくはテザー）を通して、オリゴマー化合物に付着し得る。リンカーは、第3領域、例えば、コンジュゲート部分を、オリゴマー化合物（例えば、領域B）に、共有結合で接続するために役立つ二官能性部分である。いくつかの態様において、リンカーは、反復単位、例えば、エチレングリコール単位またはアミノ酸単位の鎖構造またはオリゴマーを含む。リンカーは、少なくとも2種類の官能性を有することができ、一つは、オリゴマー化合物に対する付着のためのものであり、他方は、コンジュゲート部分に対する付着のためのものである。リンカーの官能性の例は、オリゴマー上もしくはコンジュゲート部分上の求核基と反応するため求電子性であるか、または求電子基と反応するため求核性であり得る。いくつかの態様において、リンカーの官能性には、アミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、ホスホルアミダート、ホスフェート、ホスファイト、不飽和（例えば、二重結合または三重結合）等が含まれる。リンカーのいくつかの例には、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（ADO）、サクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）、6-アミノヘキサン酸（AH EXまたはAHA）、6-アミノヘキシルオキシ、4-アミノ酪酸、4-アミノシクロヘキシルカルボン酸、サクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミド-カプロエート)（LCSMCC）、サクシニミジルm-マレイミド-ベンゾイレート（MBS）、サクシニミジルN-e-マレイミド-カプロイレート（EMCS）、サクシニミジル6-(-マレイミド-プロピオンアミド)ヘキサノエート（SMPH）、サクシニミジルN-(a-マレイミドアセテート)（AMAS）、サクシニミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート（SMPB）、 -アラニン（ -ALA）、フェニルグリシン（PHG）、4-アミノシクロヘキサン酸（ACHC）、 -(シクロプロピル)アラニン（ -CYPR）、アミノドデカン酸（ADC）、アルキレンジオール、ポリエチレングリコール、アミノ酸等が含まれる。

【0421】

コンジュゲート部分のオリゴマー化合物への付着において有用であり得る多様なさらなるリンカー基が、当技術分野において公知である。有用なリンカー基の多くの概説が、例えば、Antisense Research and Applications, S.T. Crooke and B. Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, p. 303-350に見出され得る。ジスルフィド連結は、オリゴヌクレオチドの3'末端を、ペプチドに連結するために使用されている (Corey, et al., Science 1987, 238, 1401; Zuckermann, et al., J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 1614; および Corey, et al., J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8524)。Nelson, et al., Nuc. Acids Res. 1989, 17, 7187は、オリゴヌクレオチドの3'末端にビオチンを付着させるための連結試薬を記載している。この試薬、N-Fmoc-O-DMT-3'-アミノ-1,2-プロパンジオールは、3'-Amineの名称でClontech Laboratories (Palo Alto, Calif.) から市販されている。それは、Glen Research Corporation (Sterling, Va.) から3'-Amino-Modifier試薬の名称で市販されている。この試薬は、Judy, et al., Tetrahedron Letters 1991, 32, 879によって報告されたように、ペプチドをオリゴヌクレオチドに連結するためにも利用された。オリゴヌクレオチドの5'末端に連結するための類似の市販の試薬は、5'-Amino-Modifier C6である。これらの試薬は、Glen Research Corporation (Sterling, Va.) から入手可能である。これらの化合物または類似のものは、フルオレセインをオリゴヌクレオチドの5'末端に連結するため、Krieg, et al., Antisense Research and Development 1991, 1, 161によって利用された。他の化合物、例えば、アクリジンは、ポリメチレン連結を介して、オリゴヌクレオチドの3'末端ホスフェート基に付着させられた (Asseline, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81, 3297)。上記の基のいずれかは、単一のリンカーとして、または1種以上のさらなるリンカーと組み合わせて使用され得る。

【0422】

リンカー、およびオリゴマー化合物のコンジュゲートの調製におけるそれらの使用は、当技術分野において、例えば、各々参照によってその全体が組み入れられる、WO96/11205 および WO98/52614ならびに米国特許第4,948,882号; 第5,525,465号; 第5,541,313号; 第5,545,730号; 第5,552,538号; 第5,580,731号; 第5,486,603号; 第5,608,046号; 第4,587,044号; 第4,667,025号; 第5,254,469号; 第5,245,022号; 第5,112,963号; 第5,391,723号; 第5,510,475号; 第5,512,667号; 第5,574,142号; 第5,684,142号; 第5,770,716号; 第6,096,875号; 第6,335,432号; および第6,335,437号に提供されている。

【0423】

本明細書において使用される、生理学的に不安定な結合とは、哺乳動物体内に通常見られる条件またはそれに類似している条件の下で切断可能である不安定結合である (切断可能リンカーとも呼ばれる)。生理学的に不安定な連結基は、ある特定の生理学的条件に存在する時に化学的変換 (例えば、切断) を受けるよう選択される。哺乳動物の細胞内の条件には、哺乳動物細胞内に見出される化学的条件、例えば、pH、温度、酸化条件もしくは還元条件、酸化剤もしくは還元剤、および塩濃度、またはそれらに類似している条件が含まれる。哺乳動物の細胞内の条件には、哺乳動物細胞に通常存在する、例えば、タンパク質分解酵素または加水分解酵素からの酵素活性の存在も含まれる。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、例えば、標的細胞において発現され得るヌクレアーゼに対して感受性であり、従って、本明細書に詳述されるように、リンカーは、例えば、1~10個のホスホジエステルによって連結されたヌクレオシド、例えば、DNAヌクレオシドの短い領域であり得る。

【0424】

化学的変形 (不安定結合の切断) は、薬学的に許容される薬剤の細胞への添加によって開始し得るか、または不安定結合を含有している分子が、適切な細胞内および/もしくは細胞外の環境に到達した時に自然に起こり得る。例えば、pH不安定結合は、分子が酸性化されたエンドソームに進入する時に切断され得る。従って、pH不安定結合は、エンドソーム切断可能結合であると見なされ得る。酵素切断可能結合は、酵素、例えば、エンドソームもしくはリソソームまたは細胞質に存在するものに曝された時に切断され得る。ジスルフィド結合は、細胞質のより還元性の環境に分子が進入する時に切断され得る。従って、

ジスルフィドは、細胞質切断可能結合であると見なされ得る。本明細書において使用される、pH不安定結合とは、酸性条件（ $\text{pH} < 7$ ）下で選択的に分解される不安定結合である。細胞エンドソームおよびリソソームは7未満のpHを有するため、そのような結合は、エンドソーム不安定結合とも名付けられ得る。

【0425】

活性化されたオリゴマー

いくつかの態様において、本発明は、活性化されたオリゴマー、即ち、本発明のオリゴマー、例えば、コンジュゲートされたオリゴマーの合成において使用される中間体を提供する。この点で、本発明のオリゴマーは、いくつかの態様において、本明細書に記載される領域Aおよび領域Bを含んでいてよく、領域Bは、オリゴマーのコンジュゲーションにおいて使用するために適当な活性化（または反応）基に共有結合で連結されている。

10

【0426】

本明細書において使用される、「活性化されたオリゴマー」という用語は、本明細書に記載されたコンジュゲートを形成するため、1種以上のコンジュゲートされる部分、即ち、それ自体核酸またはモノマーでない部分へのオリゴマーの共有結合性の連結を許容する少なくとも1個の官能基部分に共有結合で連結されている（即ち、官能化されている）本発明のオリゴマーをさす。典型的には、官能基部分は、例えば、アデニン塩基の3'ヒドロキシル基または環外 NH_2 基、好ましくは親水性であるスペーサー、およびコンジュゲートされる部分に結合することができる末端基（例えば、アミノ基、スルフヒドリル基、またはヒドロキシル基）を介して、オリゴマーに共有結合で結合することができる化学基を含むであろう。いくつかの態様において、この末端基は、保護されておらず、例えば、 NH_2 基である。他の態様において、末端基は、例えば、適当な保護基、例えば、"Protective Groups in Organic Synthesis" by Theodora W Greene and Peter G M Wuts, 3rd edition (John Wiley & Sons, 1999)に記載されたものによって保護されている。適当なヒドロキシル保護基の例には、エステル、例えば、酢酸エステル、アラルキル基、例えば、ベンジル、ジフェニルメチル、またはトリフェニルメチル、およびテトラヒドロピラニルが含まれる。適当なアミノ保護基の例には、ベンジル基、 α -メチルベンジル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基、ベンジルオキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基、およびアシル基、例えば、トリクロロアセチルまたはトリフルオロアセチルが含まれる。いくつかの態様において、官能基部分は、自己切断性である。他の態様において、官能基部分は、生分解性である。例えば、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第7,087,229号を参照されたい。

20

30

【0427】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーは、該オリゴマーの5'末端に対する、コンジュゲートされた部分の共有結合性の付着を可能にするために5'末端で官能化されている。他の態様において、本発明のオリゴマーは、3'末端で官能化されていてもよい。さらに他の態様において、本発明のオリゴマーは、骨格に沿って、または複素環式塩基部分において官能化されている。さらに他の態様において、本発明のオリゴマーは、5'末端、3'末端、骨格、および塩基より独立に選択される複数の位置で官能化されていてもよい。

【0428】

40

いくつかの態様において、本発明の活性化されたオリゴマーは、合成中に、官能基部分に共有結合で付着している1個以上のモノマーを組み入れられることによって合成される。他の態様において、本発明の活性化されたオリゴマーは、官能化されていないモノマーによって合成され、合成の完了後にオリゴマーが官能化される。いくつかの態様において、オリゴマーは、アルキル部分が式 $(\text{CH}_2)_w$ （式中、 w は、1~10の範囲の整数、好ましくは、約6である）を有するアミノアルキルリンカーを含有しているヒンダード（hindered）エステルによって官能化される。アルキルアミノ基のアルキル部分は、直鎖または分岐鎖であり得、官能基はエステル基（ $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_w\text{NH}$ ）を介してオリゴマーに付着している。

【0429】

50

他の態様において、オリゴマーは、 $(\text{CH}_2)_w$ -スルフヒドリル(SH)リンカー(式中、 w は、1~10の範囲の整数、好ましくは、約6である)を含有しているヒンダードエステルによって官能化される。アルキルアミノ基のアルキル部分は、直鎖または分岐鎖であり得、官能基はエステル基($-\text{O}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_w\text{SH}$)を介してオリゴマーに付着している。

【0430】

いくつかの態様において、スルフヒドリルによって活性化されたオリゴヌクレオチドは、(ジスルフィド結合の形成を介して)ポリマー部分、例えば、ポリエチレングリコールまたはペプチドとコンジュゲートされる。

【0431】

上記のヒンダードエステルを含有している活性化されたオリゴマーは、当技術分野において公知の方法によって、特に、参照によってその全体が本明細書に組み入れられるPCT公開番号W02008/034122およびその実施例に開示された方法によって合成され得る。

【0432】

さらに他の態様において、本発明のオリゴマーは、米国特許第4,962,029号および第4,914,210号に実質的に記載されるような官能化試薬、即ち、保護されたまたは保護されていないスルフヒドリル基、アミノ基、またはヒドロキシル基を含む反対の末端へ親水性スパーサー鎖を通して連結された、一方の末端にホスホラミダイトを有する実質的に直鎖状の試薬によって、スルフヒドリル基、アミノ基、またはヒドロキシル基をオリゴマーを導入することによって官能化される。そのような試薬は、主として、オリゴマーのヒドロキシル基と反応する。いくつかの態様において、そのような活性化されたオリゴマーは、オリゴマーの5'-ヒドロキシル基に結合された官能化試薬を有する。他の態様において、活性化されたオリゴマーは、3'-ヒドロキシル基に結合された官能化試薬を有する。さらに他の態様において、本発明の活性化されたオリゴマーは、オリゴマーの骨格上のヒドロキシル基に結合された官能化試薬を有する。さらなる態様において、本発明のオリゴマーは、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第4,962,029号および第4,914,210号に記載されるような官能化試薬のうちの2種以上によって官能化される。そのような官能化試薬を合成し、モノマーまたはオリゴマーへそれらを組み入れる方法は、米国特許第4,962,029号および第4,914,210号に開示されている。

【0433】

いくつかの態様において、固相に結合したオリゴマーの5'末端をジエニルホスホラミダイト誘導体によって官能化し、その後、ディールス・アルダー環付加反応を介して、脱保護されたオリゴマーを、例えば、アミノ酸またはペプチドとコンジュゲートする。

【0434】

様々な態様において、2'-糖修飾、例えば、2'-カルバメート置換型糖または2'-(0-ペンチル-N-フタリミド)デオキシリボース糖を含有しているモノマーのオリゴマーへの組み入れは、コンジュゲートされた部分の、オリゴマーの糖への共有結合性の付着を容易にする。他の態様において、1個以上のモノマーの2'-位にアミノ含有リンカーを有するオリゴマーは、例えば、5'-ジメトキシトリチル-2'-0-(e-フタリミジルアミノペンチル)-2'-デオキシアデノシン-3'--N,N-ジイソプロピル-シアノエトキシホスホラミダイトのような試薬を使用して調製される。例えば、Manoharan, et al., Tetrahedron Letters, 1991, 34, 7171を参照されたい。

【0435】

さらなる態様において、本発明のオリゴマーは、核酸塩基、例えば、N6プリンアミノ基、グアニンの環外N2、またはシトシンのN4位もしくは5位に、アミン含有官能基部分を有し得る。様々な態様において、そのような官能化は、オリゴマー合成において既に官能化されている市販の試薬を使用することによって達成され得る。

【0436】

いくつかの官能基部分が市販されており、例えば、ヘテロ二官能性およびホモ二官能性の連結部分が、Pierce Co. (Rockford, Ill.) から入手可能である。他の市販の連結基は、5'-Amino-Modifier C6試薬および3'-Amino-Modifier試薬(両方ともGlen Research Cor

poration (Sterling, Va.) から入手可能) である。5'-Amino-Modifier C6は、Aminolink-2として、ABI (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) から入手可能であり、3'-Amino-Modifierは、Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, Calif.) から入手可能である。

【0437】

合成および製造の方法

本発明は、本発明のオリゴマーの合成または製造の方法も提供する。オリゴマーは、典型的には、固体支持体、例えば、ユニバーサル支持体で実施される、標準的なオリゴヌクレオチド合成を使用して作製され得る。図5~10に図示されるように、本発明のオリゴマーは、例えば、第1領域および第2領域を逐次合成し、その後、任意でリンカー(Y)を介して、第3領域(X)を付加(例えば、コンジュゲート)することによって合成され得る。領域Y(存在する場合)を領域Bに接合し、その後、領域Xを領域Yに付加してもよいし、または単一の反応工程で、領域Yおよび領域Xを領域Bに付加してもよい。

10

【0438】

あるいは、領域Xまたは領域XおよびYのオリゴヌクレオチド支持カラムへの最初の結合、それに続く、領域B、次いで領域Aの逐次オリゴヌクレオチド合成を介して、オリゴマー合成を行ってもよい。

【0439】

あるいは、(最初の工程または前工程において)オリゴヌクレオチド合成支持体に付着させられた切断可能な双方向基の使用は、オリゴヌクレオチド領域BおよびAを二官能基の1個の反応基で合成し、領域Xまたは領域XおよびYを二官能基の第2の反応基で合成する方法を可能にし、ここで、オリゴヌクレオチド合成または支持体へのX(またはXおよびY)の付加は、いかなる順序で行われてもよく、または共に行われてもよい。次いで、支持体からの二官能基の切断は、本発明のオリゴマーをもたらす。二官能基は、例えば、1個のエンティティ(例えば、領域BまたはXまたはX-Y-)がヌクレオシド上のホスフェート含有基(例えば、5'または3'の基)に付着しており、他方(例えば、領域BまたはXまたはX-Y-)が、例えば、核酸塩基上に存在する反応基に付着しているヌクレオシドであり得る。

20

【0440】

あるいは、領域XまたはX-Yは、オリゴヌクレオチド合成の後、例えば、切断工程の後、オリゴマー(領域B)に接合されてもよい。従って、本発明は、領域AおよびB、ならびに領域Xまたは領域XおよびYを領域Bに接合するためにその後に使用される領域Bに付着した反応基または活性化基を含む中間体オリゴマーにも関する。

30

【0441】

領域Yまたは領域Xは、例えば、単一のオリゴヌクレオチド合成でのオリゴマーの形成、それに続く、オリゴヌクレオチド合成支持体(US)からのオリゴマーの切断を可能にするホスホラミダイトとして、領域Bに連結され得る。この点に関して、いくつかの態様において、領域Bと領域XまたはYとの間の連結基は、ホスフェート含有基、例えば、ヌクレオシド連結、例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、ボラノホスフェート、メチルホスホネート、またはその他、例えば、本明細書において言及されたものであり得る。あるいは、他の化学的連結、例えば、トリアゾール基が使用されてもよい。

40

【0442】

いくつかの態様において、第3領域(X)またはX-Y-は、5'または3'のホスフェート以外の基を介して、例えば、別の位置にある反応基、例えば、領域B内のヌクレオシドの塩基上の反応基、例えば、アミンを介して、領域Bに連結され得る。

【0443】

オリゴヌクレオチド合成は、5'~3'方向に行われてもよいし、または大部分のオリゴヌクレオチド合成に典型的であるように、3'~5'方向に行われてもよい。

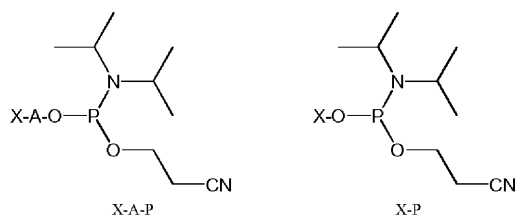
【0444】

いくつかの非限定的な例において、オリゴヌクレオチド-コンジュゲート構築物は、異

50

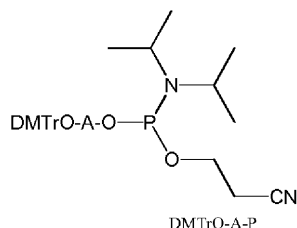
なる方式で組み立てられ得る。例えば、

(A) 構築物のB~A成分を、ホスホロチオエート連結およびホスホジエステル連結の両方を合成することができるオリゴヌクレオチド合成機で作製することができる。次いで、任意で、X-A-B-Aを作製するためビルディングブロックX-A-P (リンカーが付着しているコンジュゲート部分) を使用して、またはX-B-Aを作製するためビルディングブロックX-P (リンカーを含まないコンジュゲート部分) を用いて、標準的なホスホラミダイト化学によって、B~Aを延長することができる。



10

(B) 構築物のB~A成分を、ホスホロチオエート連結およびホスホジエステル連結の両方を合成することができるオリゴヌクレオチド合成機で作製することができる。次いで、任意で、X成分とA成分との間にPO連結またはPS連結を有するX-A-B-Aを作製するため、ビルディングブロックDMTrO-A-Pを使用し、続いて、ビルディングブロックX-Pを使用して、標準的なホスホラミダイト化学によって、B~Aを逐次延長することができる。



20

【 0 4 4 5 】

構築物のB~A成分を、ホスホロチオエート連結およびホスホジエステル連結の両方を合成することができるオリゴヌクレオチド合成機で作製することができる。次いで、任意で、 H_2N -A-B-Aを作製するため、ビルディングブロックPGN-A-Pを使用して、標準的なホスホラミダイト化学によってB~Aを逐次延長することができる。オリゴヌクレオチドの切断および脱保護の後、オリゴヌクレオチドの遊離アミンを、Xの官能基がオリゴヌクレオチドの末端第一級アミンと反応するよう活性化された部分Xとコンジュゲートすることができる。

30

【 0 4 4 6 】

組成物

本発明のオリゴマーは、薬学的な製剤および組成物において使用され得る。適宜、そのような組成物は、薬学的に許容される希釈剤、担体、塩、または佐剤を含む。WO2007/031091は、適当な好ましい薬学的に許容される希釈剤、担体、および佐剤を提供しており、それらは、参照によって本明細書に組み入れられる。適当な投薬量、製剤、投与経路、組成物、剤形、他の治療剤との組み合わせ、プロドラッグ製剤も、WO2007/031091に提供されており、それらも、参照によって本明細書に組み入れられる。

40

【 0 4 4 7 】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、薬学的組成物または製剤の調製のため、薬学的に許容される活性物質または不活性物質と混合され得る。薬学的組成物の製剤化のための組成物および方法は、投与経路、疾患の程度、または投与すべき用量を含むが、これらに限定されない、多数の基準に依る。

【 0 4 4 8 】

アンチセンス化合物は、適当な薬学的に許容される希釈剤または担体とアンチセンス化合物を組み合わせることによって、薬学的組成物において利用され得る。薬学的に許容される希釈剤には、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が含まれる。PBSは、非経口送達される組成物において使用するために適当な希釈剤である。

50

【0449】

アンチセンス化合物を含む薬学的組成物は、薬学的に許容される塩、エステル、またはそのようなエステルの塩、またはヒトを含む動物への投与によって生物学的活性を有する代謝物質もしくはその残基を（直接もしくは間接的に）提供することができる他のオリゴヌクレオチドを包含する。従って、例えば、本開示は、アンチセンス化合物の薬学的に許容される塩、プロドラッグ、そのようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、およびその他の生物学的等価物にも関する。適当な薬学的に許容される塩には、ナトリウム塩およびカリウム塩が含まれるが、これらに限定されない。プロドラッグは、活性アンチセンス化合物が形成されるよう体内の内在性ヌクレアーゼによって切断される付加的なヌクレオシドの、アンチセンス化合物の一方または両方の末端への組み入れを含み得る。この点に関して、プロドラッグは、本発明による領域B、およびコンジュゲート部分、ターゲティング部分、またはブロッキング部分を含み得る。いくつかの態様において、本発明のオリゴマーはプロドラッグである。

10

【0450】

本発明による親油性コンジュゲートの使用は、例えば、肝臓、例えば、siRNAへのオリゴマーの送達のために特に有用であるリポイド（lipidoid）またはリポソーム、例えば、カチオン性リポソーム、例えば、カチオン性リポソームSNALP（安定核酸脂質粒子）への本発明のオリゴマーの組み入れを可能にする。

【0451】

適用

20

本発明のオリゴマーは、例えば、診断、治療、および予防のための研究試薬として利用され得る。

【0452】

研究において、いくつかの態様において、そのようなオリゴマーは、細胞および実験動物において（典型的には、mRNAを分解するかまたは阻害し、それによって、タンパク質形成を防止することによって）タンパク質の合成を特異的に阻害し、それによって、標的の機能的分析、または治療的介入のための標的としての有用性の評価を容易にするために使用され得る。

【0453】

治療のため、標的の発現を調節することによって処置され得る疾患または障害を有すると推測される動物またはヒトが、本発明によるオリゴマー化合物を投与することによって処置される。本発明のオリゴマーまたは組成物のうちの1種以上を、治療的にまたは予防的に有効な量で投与することによって、哺乳動物を処置する方法、例えば、標的の発現に関連した疾患または状態を有するかまたはその素因を有すると推測されるヒトを処置する方法が、さらに提供される。本発明によるオリゴマー、コンジュゲート、または薬学的組成物は、典型的には、有効量で投与される。

30

【0454】

本発明は、本明細書において言及される障害の処置のための医薬の製造のための、または本明細書において言及される障害の処置の方法のための、記載される本発明の化合物またはコンジュゲートの使用も提供する。

40

【0455】

本発明は、本明細書に記載される本発明による化合物、および/または本発明によるコンジュゲート、および/または本発明による薬学的組成物を、その必要のある患者へ投与する工程を含む、本明細書において言及される障害を処置する方法も提供する。

【0456】

医学的適応症

いくつかの態様において、疾患は、癌である。いくつかの態様において、疾患は、炎症性疾患である。いくつかの態様において、疾患は、心血管疾患であり、いくつかの態様において、疾患または障害は、心筋梗塞（MI）である。

【0457】

50

いくつかの態様において、疾患または障害は、線維症、例えば、肝線維症、心線維症、もしくは局所線維症であるか、またはそれらをもたらすか、またはそれらに関連している。

【0458】

いくつかの態様において、疾患または障害は、血液凝固障害である。

【0459】

いくつかの態様において、疾患または障害は、骨量減少であるかまたはそれを含む（それをもたらすかまたはそれに関連している）。

【0460】

いくつかの態様において、疾患または障害は、肝疾患または肝障害である。

10

【0461】

いくつかの態様において、疾患または障害は、例えば、肝疾患もしくは肝障害、および/または、いくつかの局面において、心血管疾患もしくは新血管障害であり得る代謝障害である。

【0462】

心血管/代謝疾患には、例えば、代謝症候群、肥満、高脂血症、HDL/LDLコレステロール不均衡、脂質異常症、例えば、家族性複合型高脂血症（FCHL）、後天性高脂血症、スタチン抵抗性高コレステロール血症、冠動脈疾患（CAD）、および冠動脈心疾患（CHD）、アテローム性動脈硬化症、心疾患、糖尿病（I型および/またはII型）、NASH、急性冠症候群（ACS）、NASH、慢性心不全、心疾患、心代謝疾患、高脂血症および関連障害、代謝症候群、アテローム性動脈硬化症、慢性心不全、血管疾患、末梢動脈障害、心疾患、虚血、2型糖尿病、1型糖尿病が含まれる。

20

【0463】

いくつかの態様において、疾患または障害は、代謝症候群、肥満、高脂血症、アテローム性動脈硬化症、HDL/LDLコレステロール不均衡、脂質異常症、例えば、家族性複合型高脂血症（FCHL）、後天性高脂血症、スタチン抵抗性高コレステロール血症、冠動脈疾患（CAD）、および冠動脈心疾患（CHD）からなる群より選択される。

【0464】

いくつかの態様において、疾患または障害は、慢性心不全、心血管疾患、心代謝疾患、慢性心不全、血管疾患、末梢動脈障害、心疾患、虚血、急性冠症候群（ACS）からなる群より選択される。

30

【0465】

いくつかの態様において、疾患または障害は、2型糖尿病、1型糖尿病である。

【0466】

いくつかの態様において、疾患または障害は、ウイルス性疾患、例えば、赤血球増加症、C型肝炎、B型肝炎、BKV、HIVである。

【0467】

いくつかの態様において、疾患または障害は、重篤な希少疾患（または遺伝病）である。

【0468】

40

本発明は、疾患、障害、または状態、例えば、本明細書において言及されたものの処置のための医薬の製造における、本発明の化合物の使用をさらに提供する。

【0469】

一般的に述べると、本発明のいくつかの局面は、1個以上のLNA単位を含む標的へ標的指向化されたオリゴマーを、治療的に有効な量で哺乳動物へ投与する工程を含む、標的の異常なレベルに関連した状態に罹患しているかまたは罹患し易い哺乳動物を処置する方法に関する。本発明によるオリゴマー、コンジュゲート、または薬学的組成物は、典型的には、有効量で投与される。

【0470】

本発明の重要な局面は、本明細書において言及される疾患、障害、または状態の処置の

50

ための医薬の調製のための、本明細書において定義される化合物の使用に関する。

【0471】

さらに、本発明は、疾患または状態、例えば、本明細書において言及されたものに罹患している対象を処置する方法に関する。

【0472】

処置を必要とする患者は、疾患もしくは障害に罹患しているかまたは罹患する可能性が高い患者である。

【0473】

いくつかの態様において、本明細書において使用される、「処置」という用語は、既存の疾患（例えば、本明細書において言及される疾患もしくは障害）の処置、または疾患の防止、即ち、予防の両方をさす。従って、本明細書において言及される処置とは、いくつかの態様において、予防的であり得ることが認識されるであろう。

【実施例】

【0474】

オリゴヌクレオチドのリスト

以下のリストにおいて、大文字は -D- オキシLNAのような、LNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表す。大文字のLは -D- オキシのような、LNAであり、小文字dはDNAヌクレオシドである。LNAシトシンは任意で5'メチルシトシンであってよい。領域A内のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートであり、領域B内のヌクレオシド間結合は、ホスホジエステルである（表示の通り）。領域AとBとの間のヌクレオシド間結合は、ホスホジエステルであるが、しかし領域Bが>1のDNAヌクレオチドである場合、任意でホスホジエステル以外であってもよい（例えばホスホロチオエートであってもよい）。領域Bと領域Cとの間に、C6リンカーのような、任意でさらなるリンカー(Y)が存在してもよい。＃はSEQ ID Noを意味する。

10

20

アポBターゲティング化合物

#	Seq (5'-3') (領域A)	切断可能なリンカー (領域B)	領域C – コンジュゲート
1	GCattggtatTCA	なし	なし
2	GCattggtatTCA	なし	コレステロール
3	GCattggtatTCA	SS	コレステロール
4	GCattggtatTCA	3PO-DNA (5'tca3')	コレステロール
5	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
6	GCattggtatTCA	1PO-DNA (5'a3')	コレステロール

10

PCSK9 – マウス特異的な化合物

#	Seq (5'-3') (A)	切断可能なリンカー (B)	コンジュゲート (C)
7	GTctgtggaaGCG	なし	なし
8	GTctgtggaaGCG	なし	コレステロール
9	GTctgtggaaGCG	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
10	GTctgtggaaGCG	2PO-DNA (5'ct3')	コレステロール

FVII (マウスFVII)

#	Seq (5'-3')	切断可能なリンカー (B)	コンジュゲート (C)
11	LLdddddddddLLL	なし	なし
12	LLdddddddddLLL		GalNAc クラスター
13	LLdddddddddLLL	2PO (ca)	GalNAc クラスター
14	LLdddddddddLLL	SS	コレステロール
15	LLdddddddddLLL	2PO (ca)	コレステロール

20

FAM標識コンジュゲートを有するアポBターゲティング化合物

#	Seq (5'-3')	切断可能なリンカー (B)	コンジュゲート (C)
16	GCattggtatTCA	3PO-DNA (5'tca3')	FAM
17	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	FAM
18	GCattggtatTCA	1PO-DNA (5'a3')	FAM
19	GCattggtatTCA	3PO-DNA (5'gac3')	FAM
20	GCattggtatTCA	なし	FAM

30

標的X化合物 (ヒト治療標的)

#	Seq (5'-3')	切断可能なリンカー (B)	領域C (3'末端において)
21	LLLdddddddddLLL	3PO-DNA (5'tgc3')	5'-ddddddLLL-3'
22	LLLdddddddddLLL		5'-ddddddLLL-3'
23	LLLdddddddddLLL	3PO-DNA (5'tgc3')	5'-ddddddLLL-3'
24	LLLdddddddddLLL		5'-ddddddLLL-3'

【0475】

上記の化合物において、領域Cは、領域Cの3'ヌクレオチドが、5'末端由来の領域Aの8番目のヌクレオチドと整列する(塩基対を形成する)よう、Seq (領域A)に対する相補体を含む。領域Cはそれゆえ、折れ曲がり、ギャップマーの3'翼およびDNAギャップ領域の5塩基にわたって領域Aとの8塩基のハイブリダイゼーションを形成し、それによって、リンカー領域(B)が切断されるまで不活性である「プロドラッグ」を作製する。

40

アポBターゲティング化合物

#	Seq (5'-3')	切断可能なリンカー (B)	コンジュゲート
25	GCattggtatTCA	なし	葉酸
26	GCattggtatTCA	SS	葉酸
27	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	葉酸
28	GCattggtatTCA	なし	モノGalNAc
29	GCattggtatTCA	SS	モノGalNAc
30	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	モノGalNAc
31	GCattggtatTCA	なし	FAM
32	GCattggtatTCA	SS	FAM
33	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	FAM
34	GCattggtatTCA	なし	トコフェロール
35	GCattggtatTCA	SS	トコフェロール
36	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	トコフェロール

10

PCSK9 化合物

#	Seq (5'-3')	リンカー	コンジュゲート
37	TGctacaaaacCCA	なし	
38	AATgctacaaaacCCA	なし	
39	AATgctacaaaacCCA	なし	
40	GCtgtgtgagcttGG	なし	
41	TGctgtgtgagctTGG	なし	
42	TGctgtgtgagctTGG	なし	
43	TCCtggctgtgtTCC	なし	
44	TCCtggctgtgttCC	なし	
45	TGctacaaaacCCA	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
46	AATgctacaaaacCCA	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
47	AATgctacaaaacCCA	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
48	GCtgtgtgagcttGG	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
49	TGctgtgtgagctTGG	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
50	TGctgtgtgagctTGG	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
51	TCCtggctgtgtTCC	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
52	TCCtggctgtgttCC	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール

20

30

サル試験 化合物 アポB

53	GTtgacactgTC	なし	なし
5	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
54	GTtgacactgTC	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
46	AATgctacaaaacCCA	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール
49	TGctgtgtgagctTGG	2PO-DNA (5'ca3')	コレステロール

SEQ ID NO 53はSEQ ID NO 54の親化合物として提供されている。

【0476】

40

マウス試験： 特別の定めのない限り、マウス試験は以下のように行われうる：

用量投与およびサンプリング：

7～10週齢のC57BL6-Nマウスを用い、動物を年齢および性別について適合させた(試験1、2および4の場合には雌性、試験3においては雄性)。化合物を尾静脈へ静脈内注射した。中間の血清サンプリングの場合、顔面静脈の穿刺によって2～3滴の血液を集め、下大静脈から最後の採血をした。血清は、ゲルを含んだ血清分離管(Greiner)に集め、分析まで凍結保存した。

【0477】

C57BL6マウスに、示した情報にしたがって生理食塩水中に処方された1 mg/kgのASOの単回用量(もしくは示した量)または生理食塩水のみを静脈内に投薬した。動物を、例えば投

50

薬後4日目もしくは7日目(または示した時)に殺処理し、肝臓および腎臓をサンプリングした。

【0478】

RNA単離およびmRNA分析:

Qantigene mRNA定量化キット(「bDNA-アッセイ法」, Panomics/Affimetrix)を、製造元のプロトコルにしたがって用い、組織由来のmRNA分析を行った。組織溶解物の場合、プロテイナーゼKを含有する溶解用緩衝液1 ml中での超音波処理により組織50~80 mgを溶解させた。RNA抽出なしに溶解物をbDNA-アッセイ法に直接用いた。標的およびGAPDHに対するプローブセットは、特注デザインしてPanomicsから入手した。分析のため、標的遺伝子に対して得られた発光単位をハウスキーパーGAPDHに対して正規化した。

10

【0479】

ALT、ASTおよびコレステロールの血清分析は、血清10 μ lを用い、「Cobas INTEGRA 400 plus」臨床化学プラットフォーム(Roche Diagnostics)にて行った。

【0480】

第VII因子の血清中レベルの定量化の場合、BIOPHEN FVII酵素活性キット(#221304, Hyp hen BioMed)を製造元のプロトコルにしたがって用いた。

【0481】

オリゴヌクレオチド定量化の場合、蛍光標識されたPNAプローブを組織溶解物中の関心対象のオリゴとハイブリダイズさせる。bDNA-アッセイ法に関しては、正確に秤量した量の組織だけで、同じ溶解物を用いる。AEX-HPLCおよび蛍光検出を用いてヘテロ二本鎖を定量化する。

20

【0482】

実施例1: 化合物SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2、SEQ ID NO 3、SEQ ID NO 4、およびSEQ ID NO 5の合成

オリゴヌクレオチドはウリジン・ユニバーサル支持体上に、Expedite 8900/MOSS合成機(Multiple Oligonucleotide Synthesis System)上でホスホロアミダイト法を用いまたは4 μ molのスケールで同等のものを用いて合成された。合成の終わりに、オリゴヌクレオチドを、室温で1~2時間アンモニア水を用いて固体支持体から切断し、65 $^{\circ}$ Cで16時間さらに脱保護した。オリゴヌクレオチドを逆相HPLC (RP-HPLC)によって精製し、UPLCによって特徴付けし、分子量をESI-MSによってさらに確認した。さらに詳しくは以下を参照されたい。

30

【0483】

オリゴヌクレオチドの伸長

-シアノエチル-ホスホロアミダイト(DNA-A(Bz)、DNA-G(ibu)、DNA-C(Bz)、DNA-T、LNA-A-5'-メチル-C(Bz)、LNA-A(Bz)、LNA-G(dmf)、LNA-TまたはC6-S-Sリンカー)の結合は、0.1 Mの5'-O-DMT保護アミダイトのアセトニトリル溶液およびDCI (4,5-ジシアノイミダゾール)のアセトニトリル溶液(0.25 M)を活性化物質として用いることにより行われる。最後のサイクルの場合、市販のC6結合コレステロール・ホスホロアミダイトをDCM中0.1 Mで用いた。ホスホロチオエート結合の導入のためのチオール化は、キサンタンハイドライド(アセトニトリル/ピリジン9:1中で0.01 M)を用いることにより行われる。ホスホジエステル結合は、THF/ピリジン/水 7:2:1中0.02 Mのヨウ素を用いて導入される。試薬の残りのものは、オリゴヌクレオチド合成のために通常用いられるものである。

40

【0484】

RP-HPLCによる精製:

未精製の化合物をPhenomenex Jupiter C18 10 μ 150 \times 10 mmカラム上での分取RP-HPLCによって精製した。0.1 Mの酢酸アンモニウムpH 8およびアセトニトリルを5 mL/分の流速で緩衝液として用いた。集められた画分を凍結乾燥して、典型的には白色の固体として精製化合物を得た。

【0485】

略語:

50

DCI: 4,5-ジシアノイミダゾール

DCM: ジクロロメタン

DMF: ジメチルホルムアミド

DMT: 4,4'-ジメトキシトリチル

THF: テトラヒドロフラン

Bz: ベンゾイル

Ibu: イソブチリル

RP-HPLC: 逆相高速液体クロマトグラフィー

【0486】

実施例2: LNAアンチセンスオリゴヌクレオチドのデザイン

10

実施例および図において用いられたオリゴマー。SEQ#は、実施例および図の全体にわたって用いられた識別子である。

【0487】

【表2】

SEQ ID NO	化合物配列	注釈
#1	5'- G _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ A ⁰ -3'	コンジュゲートしたコレステロールなしの母体化合物
#2	5'- コレステロール G _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ A ⁰ -3'	コレステロール-3833
#3	5'-コレステロール_C6 C6SSC6 G _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ A ⁰ -3'	コレステロール-SS-3833
#4	5'- コレステロール_C6 t c a G _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ A ⁰ -3'	コレステロール-3PO-3833
#5	5'- コレステロール_C6 c a G _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ A ⁰ -3'	コレステロール-2PO-3833
#6	5'- コレステロール_C6 a G _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ⁰ m _s ⁰ C _s ⁰ A ⁰ -3'	コレステロール-1PO-3833
#7	5'- G _s o T _s o c _s t _s g _s t _s g _s a _s a _s G _s o m _s C _s o G _s o -3'	コンジュゲートなしの母体化合物
#8	5'- コレステロール_C6 G _s ⁰ T _s ⁰ c _s t _s g _s t _s g _s a _s a _s G _s ⁰ m _s C _s ⁰ G _s ⁰ -3'	コレステロール-4061
#9	5'- コレステロール_C6 c a G _s ⁰ T _s ⁰ c _s t _s g _s t _s g _s a _s a _s G _s ⁰ m _s C _s ⁰ G _s ⁰ -3'	コレステロール-2PO(ca)-4061
#10	5'- コレステロール_C6 c t G _s ⁰ T _s ⁰ c _s t _s g _s t _s g _s a _s a _s G _s ⁰ m _s C _s ⁰ G _s ⁰ -3'	コレステロール-2PO(ct)-4061

20

30

【0488】

実施例3 インビボでのコレステロールコンジュゲートによるアポB mRNAのノックダウン

C57BL6/Jマウスに単回用量の生理食塩水、または1 mg/kgの非コンジュゲートLNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド(SEQ ID #1)、または等モル量の、さまざまなリンカーでコレステロールにコンジュゲートされたLNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを注射し、これを表3にしたがって1~10日目に殺処理した。

40

【0489】

RNAを肝臓および腎臓から単離し、アポB特異的プライマーおよびプローブによるqPCRに供して、アポB mRNAノックダウンについて分析した。

【0490】

結論:

ホスホジエステル骨格を有する2個または3個のDNAから構成されるリンカーを有するアポB LNAアンチセンスオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされたコレステロール(Seq#4および5)は、アポBの、肝臓特異的なノックダウンの優先性を示した(図11)。これは、非コンジュゲート化合物(Seq #1)と比べて、ならびに安定したリンカーを有するコレステロールコンジュゲート(Seq#2)およびジスルフィドリンカーを有するコレステロールコンジ

50

ユゲート(Seq.#3)と比べて、肝臓組織におけるアポB mRNAノックダウンの効率および持続時間が増していることや、それと同時に、腎臓組織におけるSeq#4および#5のノックダウン活性がそれより低いことを意味する。

【0491】

材料および方法：

実験デザイン：

【表3】

	群番号	動物 ID番号	動物の 数	動物系統/ 性別/ 飼料	化合物 用量レベル/日	用量 10ml/kg での濃度	体重	殺処理
A	1	1-4	4	C57BL/6J- ♀- Chow	NaCl 0.9%	-	-1, 7, および 10日目	10日目
	2	5-8	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0.1 mg/ml	-1, 7, および 10日目	10日目
	3	9-12	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 2 1,2 mg/kg	0.12mg/ml	-1, 7, および 10日目	10日目
	4	13-16	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 3 1,2 mg/kg	0.12mg/ml	-1, 7, および 10日目	10日目
	5	17-20	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 4 1,3 mg/kg	0.13mg/ml	-1, 7, および 10日目	10日目
	6	21-24	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3 mg/kg	0.13mg/ml	-1, 7, および 10日目	10日目
B	7	25-28	4	C57BL/6J- ♀- Chow	NaCl 0.9%	-	-1, 7日目	7日目
	8	29-32	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0.1 mg/ml	-1, 7日目	7日目
	9	33-36	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 2 1,2 mg/kg	0.12mg/ml	-1, 7日目	7日目
	10	37-40	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 3 1,2mg/kg	0.12mg/ml	-1, 7日目	7日目
	11	41-44	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 4 1,3mg/kg	0.13mg/ml	-1, 7日目	7日目
	12	45-48	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3mg/kg	0.13mg/ml	-1, 7日目	7日目
C	13	49-52	4	C57BL/6J- ♀- Chow	NaCl 0.9%	-	0, 3日目	3日目
	14	53-56	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0.1 mg/ml	0, 3日目	3日目
	15	57-60	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 2 1,2mg/kg	0.12mg/ml	0, 3日目	3日目
	16	61-64	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 3 1,2mg/kg	0.12mg/ml	0, 3日目	3日目

10

20

30

40

	群番号	動物 ID番号	動物の 数	動物系統/ 性別/ 飼料	化合物 用量レベル/日	用量 10 ml/kg での濃度	体重	殺処理
	17	65-68	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 4 1,3mg/kg	0.13mg/ml	0、3日目	3日目
	18	69-72	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3mg/kg	0.13mg/ml	0、3日目	3日目
D	19	73-76	4	C57BL/6J- ♀- Chow	NaCl 0.9%	-	-1、1日目	1日目
	20	77-80	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0.1 mg/ml	-1、1日目	1日目
	21	81-84	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 2 1,2mg/kg	0.12mg/ml	-1、1日目	1日目
	22	85-88	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 3 1,2mg/kg	0.12mg/ml	-1、1日目	1日目
	23	89-92	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 4 1,3mg/kg	0.13mg/ml	-1、1日目	1日目
	24	93-96	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3mg/kg	0.13mg/ml	-1、1日目	1日目

10

20

【 0 4 9 2 】

用量投与

到着時およそ20 gのC57BL/6JBom雌性動物に、(0日目の体重にしたがって) 10 ml/kg体重で、表3にしたがって生理食塩水中に処方された化合物または生理食塩水のみを静脈内投与した。

【 0 4 9 3 】

肝臓および腎臓組織のサンプリング

動物を70% CO₂-30% O₂で麻酔し、表3にしたがって頸椎脱臼により殺処理した。2分の1の大肝葉および1つの腎臓を細かく刻み、RNAlaterの中に浸した。

30

【 0 4 9 4 】

全RNA単離および第一鎖合成

Qiagen RNeasyキット(Qiagenカタログ番号74106)を製造元の使用説明書にしたがって用いRLT-Lysis緩衝液の存在下でビーズミル粉砕法によりホモジナイズした組織の最大30 mgから全RNAを抽出した。第一鎖合成は、製造元の使用説明書にしたがってAmbionの逆転写酵素試薬を用いて行った。

【 0 4 9 5 】

サンプルごとに、全RNA 0.5 µgをRNase不含H₂Oで(10.8 µl)に調整し、ランダムデカマー(50 µM) 2 µlおよびdNTPミックス(2.5 mMの各dNTP) 4 µlと混合し、70 °Cにまで3分間加熱し、その後にサンプルを氷上で素早く冷却した。10×緩衝液RT 2 µl、MMLV逆転写酵素(100 U/µl) 1 µlおよびRNase阻害剤(10 U/µl) 0.25 µlを各サンプルに加え、引き続き42 °Cで60分間のインキュベーション、95 °Cで10分間の酵素の熱不活性化を行い、その後、サンプルを4 °Cにまで冷却した。cDNAサンプルを1:5希釈し、Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2× (Applied Biosystems Cat #4364103)およびTaqman遺伝子発現アッセイ(mアポB, Mn01545150_m1およびmGAPDH #4352339E)を製造元のプロトコルにしたがって用いRT-QPCRに供し、Applied Biosystems RT-qPCR機器(7500/7900またはViiA7)において高速モードで処理した。

40

【 0 4 9 6 】

実施例4 インビボでのコレステロールコンジュゲートによるアポB mRNAのノックダウンならびに肝臓および腎臓へのLNA分布

50

C57BL6/Jマウスに単回用量の生理食塩水、または1 mg/kgの非コンジュゲートLNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド(SEQ ID #1)、または等モル量の、さまざまなリンカーでコレステロールにコンジュゲートされたLNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを注射し、これを表4にしたがって1～16日目に殺処理した。RNAを肝臓および腎臓から単離し、アポB特異的プライマーおよびプローブによるqPCRに供して、アポB mRNAノックダウンについて分析した。LNAに基づくサンドイッチELISA法を用いてLNAオリゴヌクレオチド含量を肝臓および腎臓において測定した。

【 0 4 9 7 】

結論：

ホスホジエステル骨格を有する1個、2個、または3個のDNAから構成されるリンカーを有するアポB LNAアンチセンスオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされたコレステロール(Seq#4、#5、および#6)は、アポBの肝臓特異的なノックダウンの優先性を示した(図14)。これは、非コンジュゲート化合物(Seq #1)と比べて、肝臓組織におけるアポB mRNAノックダウンの効率および持続時間が増していることや、それと同時に、腎臓組織におけるSeq#4、#5、および#6のノックダウン活性がそれより低いことを意味する。コレステロールコンジュゲートLNAアンチセンスオリゴヌクレオチドは、非コンジュゲートLNAオリゴヌクレオチドと比べて、肝臓における、より高い取り込み、および腎臓における、より低い取り込みを有する(図15)。

【 0 4 9 8 】

材料および方法：

実験デザイン：

【 表 4 】

成分	群番号	動物ID番号	動物の数	動物系統/性別/飼料	化合物 用量レベル/日	用量10 ml/kg での濃度	投与経路	投薬日	体重日	殺処理日
A	1	1-3	3	C57BL/6J/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0, 1	1
	2	4-6	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	0.1 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	3	7-9	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等モル 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	4	10-12	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 等モル 1.28mg/kg	0.128 mg/ml	iv	0	0, 1	1

10

20

30

成分	群番号	動物ID番号	動物の数	動物系統/性別/飼料	化合物 用量レベル/日	用量10 ml/kg での濃度	投与 経路	投薬日	体重日	殺処理日
	5	13-15	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 等モル 1.21mg/kg	0.121 mg/ml	iv	0	0, 1	1
B	6	16-18	3	C57BL/6J/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0, 3	3
	7	19-21	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	0.1 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	8	22-24	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等モル 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	9	25-27	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 等モル 1.28mg/kg	0.128 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	10	28-30	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 等モル 1.21mg/kg	0.121 mg/ml	iv	0	0, 3	3
C	11	31-33	3	C57BL/6J/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0, 3	3
	12	34-36	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	0.1 mg/ml	iv	0	0, 7	7
	13	37-39	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等モル 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0, 7	7
	14	40-42	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 等モル 1.28mg/kg	0.128 mg/ml	iv	0	0, 7	7
	15	43-45	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 等モル 1.21mg/kg	0.121 mg/ml	iv	0	0, 7	7
D	16	46-48	3	C57BL/6J/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0,7,10	10
	17	49-51	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	0.1 mg/ml	iv	0	0,7,10	10
	18	52-54	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等モル 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0,7,10	10
	19	55-57	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 等モル 1.28mg/kg	0.128 mg/ml	iv	0	0,7,10	10
	20	58-60	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 等モル 1.21mg/kg	0.121 mg/ml	iv	0	0,7,10	10
E	21	61-63	3	C57BL/6J/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0,7,13	13
	22	64-66	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	0.1 mg/ml	iv	0	0,7,13	13
	23	67-69	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等モル 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0,7,13	13

10

20

30

40

成分	群番号	動物ID番号	動物の数	動物系統/性別/飼料	化合物 用量レベル/日	用量10 ml/kg での濃度	投与 経路	投薬日	体重日	殺処理日
F	24	70-72	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 等モル 1.28mg/kg	0.128 mg/ml	iv	0	0,7,13	13
	25	73-75	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 等モル 1.21mg/kg	0.121 mg/ml	iv	0	0,7,13	13
	26	76-78	3	C57BL/6J/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0,7,14,16	16
	27	79-81	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	0.1 mg/ml	iv	0	0,7,14,16	16
	28	82-84	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等モル 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0,7,14,16	16
	29	85-87	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 等モル 1.28mg/kg	0.128 mg/ml	iv	0	0,7,14,16	16
	30	88-90	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 等モル 1.21mg/kg	0.121 mg/ml	iv	0	0,7,14,16	16

【 0 4 9 9 】

用量投与

到着時およそ20 gのC57BL/6JBom雌性動物に、(0日目の体重にしたがって) 10 ml/kg体重で、表4にしたがって生理食塩水中に処方された化合物または生理食塩水のみを静脈内投与した。

【 0 5 0 0 】

肝臓および腎臓組織のサンプリング

動物を70% CO₂-30% O₂で麻酔し、表4にしたがって頸椎脱臼により殺処理した。2分の1の大肝葉および1つの腎臓を細かく刻み、RNAlaterの中に浸した。

【 0 5 0 1 】

全RNA単離および第一鎖合成

Qiagen RNeasyキット(Qiagenカタログ番号74106)を製造元の使用説明書にしたがって用いRLT-Lysis緩衝液の存在下でビーズミル粉碎法によりホモジナイズした組織の最大30 mgから全RNAを抽出した。

【 0 5 0 2 】

第一鎖合成は、製造元の使用説明書にしたがってAmbionの逆転写酵素試薬を用いて行った。

【 0 5 0 3 】

サンプルごとに、全RNA 0.5 μgをRNase不含H₂Oで(10.8 μl)に調整し、ランダムデカマー(50 μM) 2 μlおよびdNTPミックス(2.5 mMの各dNTP) 4 μlと混合し、70 °Cにまで3分間加熱し、その後にサンプルを氷上で素早く冷却した。10×緩衝液RT 2 μl、MLLV逆転写酵素(100 U/μl) 1 μlおよびRNase阻害剤(10 U/μl) 0.25 μlを各サンプルに加え、引き続き42 °Cで60分間のインキュベーション、95 °Cで10分間の酵素の熱不活性化を行い、その後、サンプルを4 °Cにまで冷却した。cDNAサンプルを1:5希釈し、Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2× (Applied Biosystems Cat #4364103)およびTaqman遺伝子発現アッセイ(mアポB, Mn01545150_m1およびmGAPDH #4352339E)を製造元のプロトコルにしたがって用いRT-QPCRに供し、Applied Biosystems RT-qPCR機器(7500/7900またはViiA7)において高速モードで処理した。

【 0 5 0 4 】

オリゴ含量サンドイッチELISA:

肝臓および腎臓サンプル(100 mg)を投与後のさまざまな時点で試験管の中に集めた。サンプルに緩衝液(pH 8.0 100 mM NaCl、25 mM EDTA、0.25 mM Tris)、プロテアーゼk (1%,

10

20

30

40

50

Sigma P4850-5)および2 Tungsten Carbide Beads (3 mm) (Qiagen)を加え、8分間ホモジナイズし(Retsch MM300, 25 Hz [1/s])、ホモジネートを終夜37 °Cでインキュベートした。サンプルを使用前に15分間14000 gで回転させた。

【0505】

腎臓および肝臓中のLNAオリゴヌクレオチドの標準物質1~100 µg/gを上記のように調製および処理した。標準物質およびサンプルを、ビオチン化かつジゴキシゲニン修飾された捕捉用および検出用プローブの35 nM溶液(5×SSCT緩衝液[(750 mM NaCl、および75 mM クエン酸ナトリウム、0.05% (v/v) Tween-20 pH 7.0含有)] 150 µlへ(100~5000 ng/L)にまで希釈し、1時間混合した。ストレプトアビジン・コーティング(Nunc Immobilizer Streptavidin F96 CLEARモジュールプレートNuncカタログ番号436014)を3回洗浄した(5×SSCT緩衝液、300 µl)。サンプル100 µLをストレプトアビジン・コーティングプレートに移し、穏やかな振盪下で1時間インキュベートした。ウェルを吸引し、2×SSCT緩衝液(0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.0を含有する300 mM NaCl + 30 mMクエン酸ナトリウム) 300 µlで3回洗浄した。PBST (リン酸緩衝生理食塩水, pH 7.2)に1:4000希釈された抗Dig-AP Fab断片(Roche Applied Science, カタログ番号11 093 274 910) 100マイクロリットルをウェルに加え、穏やかな攪拌下、室温で1時間インキュベートした。ウェルを吸引し、2×SSCT緩衝液300 µlで3回洗浄した。基質溶液(KPL BluePhos Microwell Phosphatase基質系50-88-00) 100マイクロリットルを各ウェルに加えた。発色の強度を振盪後5分ごとに615 nmで分光学的に測定した。試験サンプルを標準サンプルと比較参照した。

【0506】

実施例5: インビボでのコレステロールコンジュゲートによるPCSK9 mRNAのノックダウン

NMRIマウスに単回用量の生理食塩水、または10 mg/kgの非コンジュゲートLNA-アンチセンスオリゴヌクレオチド(Seq ID 7)、または等モル量の、さまざまなリンカーでコレステロールにコンジュゲートされたLNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを注射し、これを表5にしたがって1~10日目に殺処理した。

【0507】

RNAを肝臓および腎臓から単離し、PCSK9特異的プライマーおよびプローブによるqPCRに供して、PCSK9 mRNAノックダウンについて分析した。

【0508】

結論:

ホスホジエステル骨格を有する2個のDNAから構成されるリンカーを有するPCSK9 LNAアンチセンスオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされたコレステロール(Seq#9および#10)は、非コンジュゲート化合物(Seq #7)と比べて、および安定したリンカーを有するコレステロールコンジュゲート(Seq#8)と比べて、PCSK9の肝臓でのノックダウンの増強(図16)を示した。

【0509】

材料および方法:

実験デザイン:

10

20

30

【表 5】

成分	群番号	動物 ID 番号	動物の数	動物系統/ 性別/飼料	化合物 用量レベル/日	用量10 ml/kg での濃度	投与経路	投薬日	体重日	殺処理日
A	1	1-3	3	NMRI/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0, 1	1
	2	4-6	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	3	7-9	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 等モル 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	5	13-15	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 9 等モル 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	6	16-18	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 等モル 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 1	1
B	7	19-21	3	NMRI/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0, 3	3
	8	22-24	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	9	25-27	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 等モル 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	11	31-33	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 9 等モル 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	12	34-36	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 等モル 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 3	3
C	13	37-39	3	NMRI/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0, 7	7
	14	40-42	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0, 7	7
	15	43-45	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 等モル 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0, 7	7
	17	49-51	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 9 等モル 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 7	7
	18	52-54	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 等モル 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 7	7
D	19	55-57	3	NMRI/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0, 7, 10	10
	20	58-60	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0, 7, 10	10
	21	61-63	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 等モル 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0, 7, 10	10
	24	70-72	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 等モル 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 7, 10	10
A	25	73-75	3	NMRI/♀/Chow	生理食塩水	-	iv	0	0, 1	1

【 0 5 1 0 】

用量投与

到着時およそ20 gのNMRI雌性動物に、(0日目の体重にしたがって) 10 ml/kg体重で、表5にしたがって生理食塩水中に処方された化合物または生理食塩水のみを静脈内投与した

10

20

30

40

50

。

【0511】

肝臓および腎臓組織のサンプリング

動物を70% CO₂-30% O₂で麻酔し、表4にしたがって頸椎脱臼により殺処理した。2分の1の大肝葉および1つの腎臓を細かく刻み、RNAlaterの中に浸した。

【0512】

MagNa Pure 96 Cellular RNA Large Volumeキット(Rocheカタログ番号5467535001)を製造元の使用説明書にしたがって用いMagNa Pure LC RNA Isolation Tissue緩衝液(Rocheカタログ番号03 604 721 001)の存在下でビーズミル粉碎法によりホモジナイズした組織の最大10 mgから全RNAを抽出した。第一鎖合成は、製造元の使用説明書にしたがってAmbionの逆転写酵素試薬を用いて行った。サンプルごとに、全RNA 0.5 µgをRNase不含H₂Oで(10.8 µl)に調整し、ランダムデカマー(50 µM) 2 µlおよびdNTPミックス(2.5 mMの各dNTP) 4 µlと混合し、70 °Cにまで3分間加熱し、その後にサンプルを氷上で素早く冷却した。10×緩衝液RT 2 µl、MLLV逆転写酵素(100 U/µl) 1 µlおよびRNase阻害剤(10 U/µl) 0.25 µlを各サンプルに加え、引き続き42 °Cで60分間のインキュベーション、95 °Cで10分間の酵素の熱不活性化を行い、その後、サンプルを4 °Cにまで冷却した。cDNAサンプルを1:5希釈し、Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2×(Applied Biosystems Cat #4364103)およびTaqman遺伝子発現アッセイ(mPCKSK9, Mn00463738_m1およびmアクトチン#4352341E)を製造元のプロトコルにしたがって用いRT-QPCRに供し、Applied Biosystems RT-qPCR機器(7500/7900またはViiA7)において高速モードで処理した。

【0513】

実施例6. さまざまなDNA/PO-リンカーのインビトロ切断

さまざまなDNA/PO-リンカー(POリンカー)を有するFAM標識ASOをS1ヌクレアーゼ抽出物中でのインビトロ切断に供し(図6A)、肝臓もしくは腎臓ホモジネートまたは血清中のさまざまなDNA PO-リンカーを有するFAM標識ASO 100 µMを20および120分間のヌクレアーゼ緩衝液中でのS1ヌクレアーゼ(60 U/100 µL)によるインビトロ切断に供した(A)。EDTAを緩衝溶液に加えることによって、酵素活性を停止させた。溶液を次に、Dionex DNAPac p-10 0カラムおよび10 mM ~ 1 Mの過塩素酸ナトリウムpH 7.5に及ぶ勾配を用いたDionex Ultimate 3000でのAIE HPLC分析に供した。蛍光検出器を615 nmでおよびuv検出器を260 nmとともに用いて、切断オリゴヌクレオチドおよび非切断オリゴヌクレオチドの含量を標準物質に対して判定した。

SEQ ID NO	リンカー配列	20分のS1後に切断された%	120分のS1後に切断された%
20	--	2	5
18	a	29.1	100
17	ca	40.8	100
16	tca	74.2	100
19	gac	22.9	n.d

【0514】

結論:

POリンカー(または本明細書においていわれるように領域B)は、コンジュゲート(または群C)が切断されることを可能にし、リンカーの長さおよび/または配列組成の両方を用いて、領域Bの核酸分解切断に対する感受性を調節することができる。ヌクレアーゼS1抽出物中で20分後に見られたようにDNA PO-リンカーの配列は切断速度を調節することができ、それゆえ領域Bに対する(例えばDNA PO-リンカーに対する)配列の選択を用いて、血清中でのおよび標的組織の細胞中での切断のレベルを調節することもできる。

【0515】

肝臓、腎臓、および血清(B)に200 µg/g組織の濃度にまでオリゴヌクレオチドSEQ ID N 0 16を添加した。NMRIマウスから集められた肝臓および腎臓サンプルをホモジナイゼーション緩衝液(0.5% Igepal CA-630, 25 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, pH 8.0 (1 N NaOHで調整)中でホモジナイズした。ホモジネートを37 °Cで24時間インキュベートし、その後、ホモジネートをフェノール・クロロホルムで抽出した。肝臓および腎臓由来の、ならびに血清由来の抽出物中の切断オリゴヌクレオチドおよび非切断オリゴヌクレオチドの含量を、上記のHPLC法を用い標準物質に対して判定した。

Seq ID	リンカー配列	24時間の肝臓 ホモジネート後に 切断された%	24時間の腎臓 ホモジネート後に 切断された%	血清中で 24時間後に 切断された%
16	tca	83	95	0

10

【 0 5 1 6 】

結論:

POリンカー(または本明細書においていわれるように領域B)は、肝臓または腎臓ホモジネートにおいて、オリゴヌクレオチドからのコンジュゲート(または群C)の切断をもたらすが、しかし血清においてはそうでない。

【 0 5 1 7 】

注釈:

上記のアッセイ法における切断は、切断可能なリンカーの切断をいい、オリゴマーまたは領域Aは機能的に完全なままでなければならない。上記のアッセイ法での切断に対する感受性を用いて、リンカーが生物学的に切断可能であるかどうか、または生理学的に不安定であるかどうかを判定することができる。

20

【 0 5 1 8 】

実施例7a: FVIIのインビボ阻害(1 mg/kg)

マウス(n=3)の計6群を用いてインビボでのマウス試験を準備した。各マウスにSEQ ID # 12と比べて1 mg/kgまたは等モルで、FVII mRNAを標的とするLNA化合物の単回の静脈内用量を投与した。生理食塩水の対照群を含めた。投与の1日前にマウスから予め採血し、その後の採血は投与後1日目および2日目に行った。マウスを4日目に殺処理し、肝臓、腎臓、および血液を採取した。試験設定は表7を参照されたい。

30

【 0 5 1 9 】

標準的なアッセイ技法を用いて、第VII因子の血清中レベル、mRNAレベル、およびオリゴヌクレオチド組織含量を測定した。

【 0 5 2 0 】

結論:

DNA PO-リンカー(PO)は、広く使われているジチオリンカー(ジスルフィド)と比較した場合、コレステロールコンジュゲートを有するFVII mRNA標的化LNAオリゴヌクレオチドについて、血清中FVIIタンパク質の下方制御を改善する(図18)(POリンカーSEQ ID # 15はSリンカーSEQ ID #14に匹敵する)。GalNAcをコンジュゲートとして用いると、POリンカーが、アミノ連結されたコンジュゲートLNAオリゴヌクレオチドと比べてFVIIタンパク質の下方制御を改善することが明らかである(POリンカーSEQ ID # 13はアミノ連結されたSEQ ID #12に匹敵する)。GalNAcコンジュゲートは、(場合によってはペプチドリリンカーにより)生物学的に切断可能であることが知られており、したがって、POリンカーは標的細胞中での活性かつ強力な化合物の放出をさらに増強するものと思われる。これらのデータは、mRNA発現データに一致する(図19)。腎臓および肝臓におけるオリゴヌクレオチドの組織含量は、コンジュゲートがどのように分布を変化させるかを示している(図20)。2つのコレステロールコンジュゲート化合物は類似の分布を示し(SEQ ID #14および#15を比較されたい)、したがってPOリンカー化合物(SEQ ID #15)のmRNAおよびFVIIタンパク質下方制御の増強が分かり、POリンカーがSEQ ID #14と比較してFVIIを標的とするLNAオリゴヌクレオ

40

50

チドの活性をどのように増強させるかが分かる。

【 0 5 2 1 】

材料および方法：

実験デザイン：

【 表 7 】

群	化合物	投与後の 終了時点	群 サイズ	用量 (d0) mg/kg
1	生理食塩水	d4	3	なし
2	SEQ ID #11	d4	3	1
3	SEQ ID #12	d4	3	1
4	SEQ ID #13	d4	3	1
5	SEQ ID #14	d4	3	1
6	SEQ ID #15	d4	3	1

10

【 0 5 2 2 】

雌性マウスに静脈内投与し、肝臓、腎臓、および血液を4日目の殺処理時にサンプリングした。さらなる採血を投与前に、ならびに、投与後1日目および2日目に行った。

【 0 5 2 3 】

20

実施例7b: FVIIのインビボ阻害(0,1および0,25 mg/kg)

マウス(n=3)の計7群を用いてインビボでのマウス試験を準備した。各マウスにSEQ ID #12と比べて等モル量の0,1 mg/kgまたは0,25 mg/kgのいずれかで、FVII mRNAを標的とするLNA化合物の単回の静脈内用量を投与した。生理食塩水の対照群を含めた。投与の1日前にマウスから予め採血し、その後の採血は投与後4日目、7日目、11日目、14日目、および18日目に行った。マウスを24日目に殺処理し、肝臓、腎臓、および血液サンプルを採取した。試験設定は表8を参照されたい。標準的なアッセイ技法を用いて第VII因子の血清中レベル、mRNAレベル、およびオリゴヌクレオチド組織含量を測定した。

【 0 5 2 4 】

結論：

30

DNA/PO-リンカー(PO)は0,1 mg/kgおよび0,25 mg/kgの両方で、広く使われているジチオリンカーと比較した場合、コレステロールコンジュゲートを有するFVII mRNA標的化LNAオリゴヌクレオチドについて、FVIIタンパク質の下方制御を改善する(図21)(POリンカーSEQ ID #15はSSリンカーSEQ ID #14に匹敵する)。GalNAcをコンジュゲートとして用いると、mRNAデータ(図22)から、POリンカーが、アミノ連結されたコンジュゲートLNAオリゴヌクレオチドと比べて下方制御を改善することが示唆される(POリンカーSEQ ID #13はアミノ連結されたSEQ ID #12に匹敵する)。mRNA発現データ(図22)から、POリンカー化合物(SEQ ID #15)の活性の改善が、ジチオ連結されたコンジュゲート(SEQ ID #14)に匹敵したことが支持される。腎臓および肝臓におけるオリゴヌクレオチドの組織含量は、コンジュゲートがどのように分布を変化させるかを示している(図23)。データから、POリンカーがコレステロールコンジュゲートおよびGalNAcコンジュゲートの両方に対してこれらの用量範囲で肝臓および腎臓の両方において取り込みを増強することが示唆される(SEQ ID #14および#15を比較、ならびにSEQ ID #13を#12と比較)。

40

【 0 5 2 5 】

材料および方法：

実験デザイン：

【表 8】

群	化合物	投与後の 終了時点	群 サイズ	用量 (d0) mg/kg
1	生理食塩水	d24	3	なし
2	SEQ ID #12	d24	3	0,1
3	SEQ ID #13	d24	3	0,1
4	SEQ ID #14	d24	3	0,1
5	SEQ ID #14	d24	3	0,25
6	SEQ ID #15	d24	3	0,1
7	SEQ ID #15	d24	3	0,25

10

【 0 5 2 6 】

雄性マウスに静脈内投与し、肝臓、腎臓、および血液を24日目の殺処理時にサンプリングした。さらなる採血を投与前に、ならびに、投与後4日目、7日目、11日目、14日目、および18日目に行った。

【 0 5 2 7 】

実施例8. さまざまなコンジュゲートおよびPO-リンカーによるアポB mRNAのインビボ・サイレンシング

20

さらなるコンジュゲートに対する生物切断性DNA PO-リンカーの影響を探索するため、C57BL/6Jマウスを生理食塩水対照により、または単回用量の1 mg/kgの親化合物#1、もしくは等モル量の、生物切断性リンカーなし、ジチオ-リンカー(SS)あり、もしくはDNA/PO-リンカー(PO)ありでモノ-GalNAc、葉酸、Fam、もしくはトコフェロールにコンジュゲートされたASOにより、静脈内処置した。7日後、動物を殺処理し、RNAを肝臓および腎臓サンプルから単離し、アポB mRNA発現について分析した(図24)。

【 0 5 2 8 】

結論:

全4つのコンジュゲートの場合、DNA/PO-リンカーは、広く使われているジチオ-リンカーと比べて肝臓におけるアポBノックダウンを改善する(#27を#26と、#30を#29と、#33を#32と、および#36を#35と比較されたい)。モノ-GalNAcおよびトコフェロールの場合、DNA/PO-リンカーは、非コンジュゲート化合物との比較でも、肝臓におけるアポBのノックダウンを改善する(#30および#36を#1と比較されたい)。DNA/PO-リンカーと組み合わされたトコフェロールは、化合物を腎臓から肝臓へ向け直す能力を示す(AおよびB、#36を#1と比較されたい)。

30

【 0 5 2 9 】

材料および方法:

実験デザイン:

【表 9】

群番号	動物 ID番号	動物系統/ 性別/ 飼料	化合物 Seq ID、 用量 1 mg/kg	投与経路	投薬日	殺処理日
1	1-5	NMRI ♀- Chow	1	i.v.	0	7
2	5-10	NMRI ♀- Chow	28	i.v.	0	7
3	11-15	NMRI ♀- Chow	29	i.v.	0	7
4	16-20	NMRI ♀- Chow	30	i.v..	0	7
5	21-25	NMRI ♀- Chow	25	i.v.	0	7
6	26-30	NMRI ♀- Chow	26	i.v.	0	7
7	31-35	NMRI ♀- Chow	27	i.v.	0	7
8	36-40	NMRI ♀- Chow	NaCl 0.9%	i.v.	0	7

10

20

群番号	動物 ID番号	動物系統/ 性別/ 飼料	化合物 Seq ID、 用量 1 mg/kg	投与経路	投薬日	殺処理日
1	1-5	NMRI ♀- Chow	1	i.v.	0	7
2	5-10	NMRI ♀- Chow	31	i.v.	0	7
3	11-15	NMRI ♀- Chow	32	i.v.	0	7
4	16-20	NMRI ♀- Chow	33	i.v..	0	7
5	21-25	NMRI ♀- Chow	34	i.v.	0	7
6	26-30	NMRI ♀- Chow	35	i.v.	0	7
7	31-35	NMRI ♀- Chow	36	i.v.	0	7
8	36-40	NMRI ♀- Chow	NaCl 0.9%	i.v.	0	7

30

40

【0530】

用量投与およびサンプリング

C57BL6マウスに、上記の表にしたがって生理食塩水中に処方された1 mg/kgのASOの単回用量または生理食塩水のみを静脈内に投薬した。動物を投薬後7日目に殺処理し、肝臓および腎臓をサンプリングした。

【0531】

RNA単離およびmRNA分析

50

全RNAを肝臓および腎臓サンプルから抽出し、分岐DNAアッセイ法を用いてアポB mRNAレベルを分析した。

【0532】

実施例9. PO-リンカーを有するループLNA ASOによる標的X mRNAのインビトロ・サイレンシング

ブロッカー基は、ASOの耐容性、特異性または低減されたオフターゲット効果に関して有益でありうるが、しかしオリジナルの、非ブロック化ASOの活性の保存という点では困難でありうる。ブロッカー基の一例として、本発明者らは、非相補的なヌクレオチドストレッチによりオリゴヌクレオチドにつながれている相補的配列であって、ヘアピンループを生じているものを用いた。ループ中の不対合塩基は、ホスホジエステル骨格を有する3つのDNAヌクレオチド(PO-リンカー)またはホスホロチオエート骨格を有する同じDNAヌクレオチドのいずれかであった。ループLNA-ASOの活性を試験するため、Neuro 2a細胞をジムノシス・アッセイ法において1 μ M ASOで処理し、RNAを抽出し、RT-QPCRに供して標的X mRNAのノックダウンについて分析した(図25)。

【0533】

結論:

PO-リンカーを有するループASO (Seq ID #21および#23)は、PO-リンカーを有しない同じASO配列(Seq ID #22および#24)と比べて改善された標的X mRNAのノックダウンを示した。

【0534】

材料および方法:

N2a細胞におけるジムノシス・アッセイ法:

Neuro 2a (マウス神経芽細胞腫)細胞を細胞 1.8×10^4 個/ウェルで24ウェルプレートに播種し、DMEM+Glutamax (gibco-life, #61965-026)、2 mMグルタミン、10% FBS、1 mMビルビン酸ナトリウム、25 μ g/mlゲンタマイシン中でそれぞれ、PO-リンカーを有するおよび有しない1 μ MループLNA ASOにより処理した。

【0535】

全RNA単離および第一鎖合成

Qiagen RNeasyキット(Qiagenカタログ番号74106)を製造元の使用説明書にしたがって用い、ジムノシスより6日後に全RNAを抽出した。第一鎖合成は、製造元の使用説明書にしたがってAmbionの逆転写酵素試薬を用いて行った。

【0536】

サンプルごとに、全RNA 0.5 μ gをランダムデカマー(50 μ M) 2 μ lおよびdNTPミックス(2.5 mMの各dNTP) 4 μ lと混合し、70 $^{\circ}$ Cにまで3分間加熱し、その後にサンプルを氷上で素早く冷却した。10 \times 緩衝液RT 2 μ l、MLLV逆転写酵素(100 U/ μ l) 1 μ lおよびRNase阻害剤(10 U/ μ l) 0.25 μ lを各サンプルに加え、引き続き42 $^{\circ}$ Cで60分間のインキュベーション、95 $^{\circ}$ Cで10分間の酵素の熱不活性化を行い、その後、サンプルを4 $^{\circ}$ Cにまで冷却した。cDNAサンプルを1:5希釈し、Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2 \times (Applied Biosystems Cat #4364103)および標的Xに対するTaqman遺伝子発現アッセイを製造元のプロトコルにしたがって用い、RT-QPCRに供し、Applied Biosystems RT-qPCR機器(ViiA7)において高速モードで処理した。標的X mRNA発現を α クチンmRNA発現(mBACT # 4352341E)に対して正規化し、モックmRNAレベルと比較した。

【0537】

実施例10: 非ヒト霊長類試験

この試験の主な目的は、カニクイザルへの抗PCSK9および抗アポB LNAコンジュゲート化合物の単回の低速静脈内ボラス後に7週にわたって選択された脂質マーカーを調べることと、サルにおける化合物の潜在毒性を評価することである。本試験において用いられた化合物は、SEQ ID NO 46および49、5および54であり、これらは0.625および2.5 mg/mlの初期濃度にて無菌生理食塩水(0.9%)中で調製された。

【0538】

少なくとも24ヶ月齢の雄性(PCSK9)または雌性(ApoB)サルを用い、それらが水道水を自由に利用できるようにし、動物1頭あたりMWM(E) SQC SHORT過剰餌(Dietex France, SDS, Saint Gratien, France) 180 gが毎日分配されるものとする。各檻に分配される飼料の総量は、その日の檻の中の動物の数によって算出される。加えて、果実または野菜を各動物に毎日与える。処置期間の開始前に少なくとも14日の間、動物を試験条件に慣らす。この期間中に、前処置調査を行う。動物に、例えば、0.25 mg/kgまたは1 mg/kgの場合、1用量で静脈内投与する。用量は0.4 mL/kgである。1群あたり動物2頭を用いる。3週後、データを分析し、より高用量またはより低用量の計画を用いて第2の動物群で着手することができる - 予備的な用量設定は0.5 mg/kgおよび1 mg/kgであるか、または最初のデータセットに基づいたものよりも低い。

10

【0539】

用量処方物を1日目に1回投与する。動物を処置後7週の間にはわたって観察し、51日目に試験から解放する。1日目は処置期間の初日に当たる。臨床観察および体重および食物摂取(1群あたり)を試験の前および間に記録する。

【0540】

血液をサンプリングし、以下の時点で分析する。

試験日	パラメータ	
-8	RCP, L, Apo-B, PCSK9*, OA	
-1	L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA	20
1	投薬	
4	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, OA	
8	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA	
15	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA	
22	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA	
29	L, Apo-B, PCSK9* PK, OA	
36	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA	
43	L, PK, Apo-B, PCSK9* PK, OA	30
50	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA	

RCP 0 日常的な臨床病理学、LSB = 肝臓安全性の生化学、PK = 薬物動態学、OA = 他の分析、L = 脂質。

【0541】

血液生化学

以下のパラメータを、下記の際に、生存している全ての動物について判定する：

完全な生化学パネル(下記の完全なリスト) - -8、15、および50日目、

肝臓安全性(ASAT、ALP、ALAT、TBILおよびGGTのみ) - 4、8、22、および36日目、

脂質プロファイル(総コレステロール、HDL-C、LDL-C、およびトリグリセリド)ならびにアポ-Bのみ - -1、4、8、22、29、36、および43日目。

40

【0542】

血液(およそ1.0 mL)をリチウムヘパリン管へ採る(ADVIA 1650血液生化学分析器を用いる)：アポ-B、ナトリウム、カリウム、塩化物、カルシウム、無機リン、グルコース、HDL-C、LDL-C、尿素、クレアチニン、総ビリルビン(TBIL)、総コレステロール、トリグリセリド、アルカリホスファターゼ(ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、クレアチンキナーゼ、 - グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、乳酸脱水素酵素、総タンパク質、アルブミン、アルブミン/グロブリン比。

50

【0543】

血液の分析:

PCSK9分析のための血液サンプルを、-8、-1、4、8、15、22、29、36、43、および50日目に第16群の動物のみから集める。

【0544】

静脈血(およそ2 mL)を各動物における適切な静脈から血清分離管(SST)へ集め、室温で少なくとも60 ± 30分の間、凝固させる。血液を冷蔵条件(+4 °C)を維持するように設定した)の下で10分間、1000 gで遠心分離する。血清を3本の別個の管へ移し、ELISA法(Circul ex Human PCSK9 ELISAキット、CY-8079、カニクイザル由来の血清に対して確証された)を用いCitoxLAB Franceにて分析されるまで-80 °Cで貯蔵した。

10

【0545】

他の分析:

WO2011009697およびWO2010142805は、以下の分析のための方法を提供している: qPCR、PCSK9/ApoB mRNA分析。他の分析には、PCSK9/アポBタンパク質ELISA、ELISAによる血清Lp(a)分析(Mercodia番号10-1106-01)、組織および血漿オリゴヌクレオチド分析(薬物含量)、サンプルの抽出、標準サンプルおよびQCサンプル、ELISAによるオリゴヌクレオチド含量判定が含まれる。

【0546】

実施例11: ラットにおける肝臓および腎臓毒性評価

本発明の化合物は、マウスまたはラットでのような、げっ歯類でのその毒性プロファイルについて評価することができる。例として、以下のプロトコルが用いられうる: Wistar Han CrI:WI(Han)をおよそ8週齢の年齢で用いる。この年齢で、雄はおよそ250 gの重さがあるはずである。全ての動物がSSNIFF R/M-Hペレット維持食(SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany)を、およびボトルに含有された水道水(0.22 μmのフィルタでろ過された)を自由に利用できるようにする。10および40 mg/kg/用量の用量レベルを用い(皮下投与)、1日目および8日目に投与する。動物を15日目に安楽死させる。尿および血液サンプルを7日目および14日目に集める。臨床病理学評価を14日目に行う。体重を試験の前に、投与の初日に、および剖検の1週間前に判定する。1群あたりの飼料消費を毎日評価する。血液サンプルを絶食6時間後に尾静脈から採取する。以下の血清分析を行う: 赤血球数 平均細胞容積 血中血球容積 ヘモグロビン 平均細胞ヘモグロビン濃度 平均細胞ヘモグロビン 血小板数 白血球数 細胞形態とともに白血球分画 網状赤血球数、ナトリウム カリウム 塩化物 カルシウム 無機リン グルコース 尿素 クレアチニン 総ビリルビン 総コレステロール トリグリセリド アルカリホスファターゼ アラニンアミノトランスフェラーゼ アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ 総タンパク質 アルブミン アルブミン/グロブリン比。 -GST、 -2ミクログロブリン、カルビンジン、クラスτεリン、シスタチンC、KIM-1、オステオポンチン、TIMP-1、VEGF、およびNGALについて検尿を行う。7つの被分析物(カルビンジン、クラスτεリン、GST-、KIM-1、オステオポンチン、TIMP-1、VEGF)は、パネル1 (MILLIPLEX(登録商標) MAP Rat Kidney Toxicity Magnetic Bead Panel 1, RKTX1 MAG-37K)の下で定量化される。3つの被分析物(-2ミクログロブリン、シスタチンC、リポカリン-2/NGAL)は、パネル2 (MILLIPLEX(登録商標) MAP Rat Kidney Toxicity Magnetic Bead Panel 2, RKTX2MAG-37K)の下で定量化される。ラット尿中のこれらのバイオマーカーの濃度の判定のためのアッセイ法は、Luminex xMAP(登録商標)技術に基づく。抗-GST/ -2ミクログロブリン/カルビンジン/クラスτεリン/シスタチンC/KIM-1/オステオポンチン/TIMP-1/VEGF/NGAL抗体でコーティングされたミクロスフェアを2種類の異なる蛍光色素で色分けする。以下のパラメータを判定する(尿 ADVIA 1650を用いて): 尿中タンパク質、尿中クレアチニン。定量的パラメータ: 容積、pH (10-Multistix SG試験ストリップ/Clinitek 500尿分析器を用いて)、比重(屈折計を用いて)。半定量的パラメータ(10-Multistix SG試験ストリップ/Clinitek 500尿分析器を用いて): タンパク質、グルコース、ケトン、ビリルビン、亜硝酸塩、血液、ウロビリノーゲン、沈降細胞診断(顕微鏡検査による)。定性的パラメータ: 外観、色。殺処理後、体重ならびに腎臓、肝臓および脾臓

20

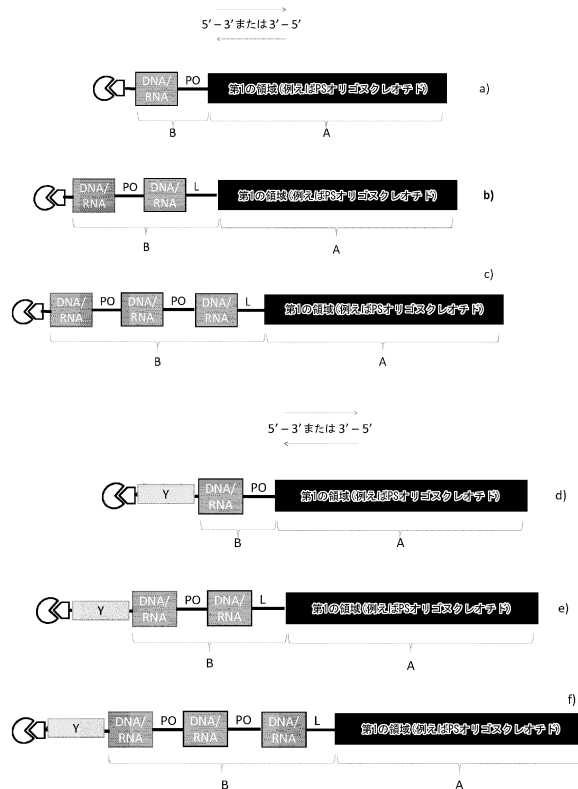
30

40

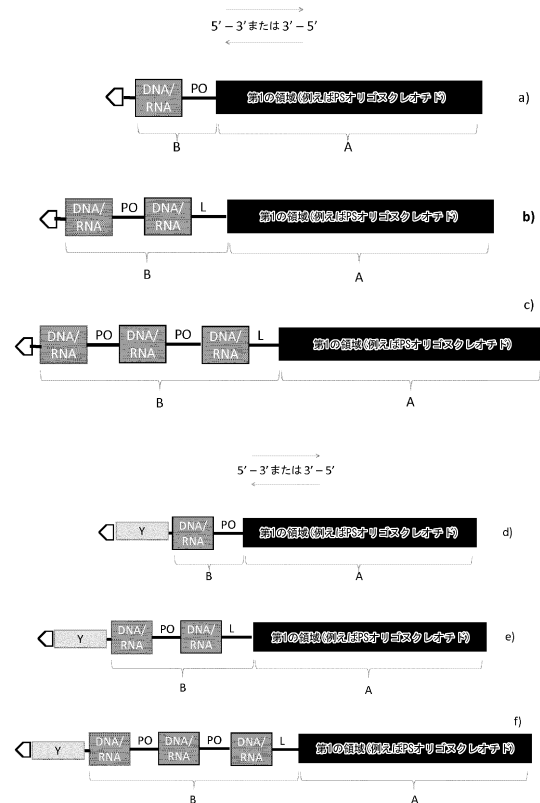
50

の重量を測定し、臓器の対体重比を算出する。腎臓および肝臓サンプルを採取し、凍結させるかまたはホルマリン中で貯蔵する。顕微分析を行う。

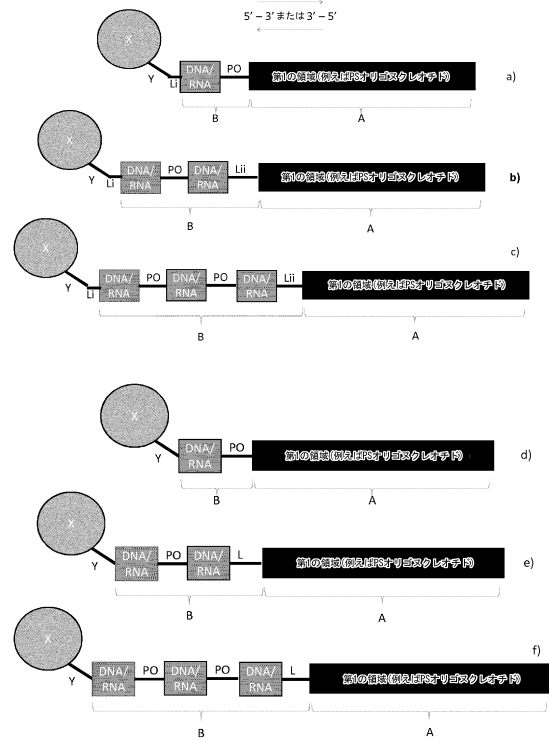
【図 1】



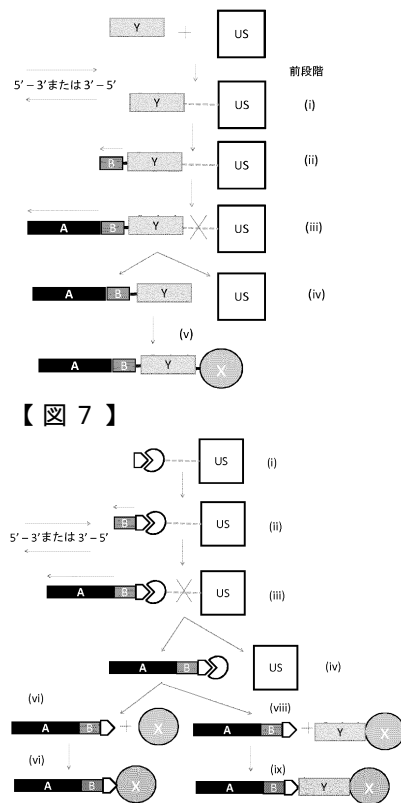
【図 2】



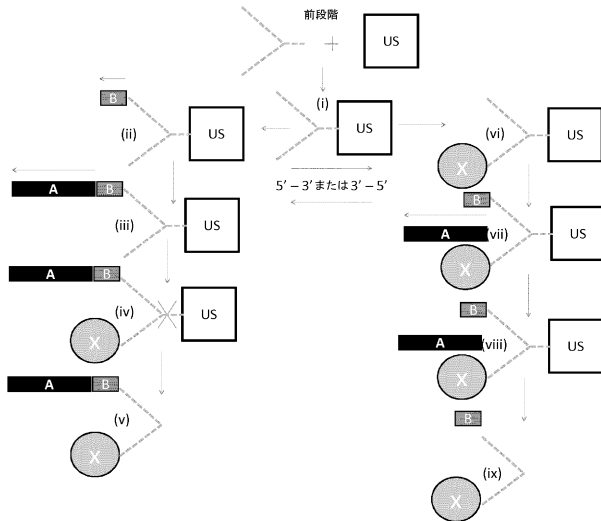
【 図 4 】



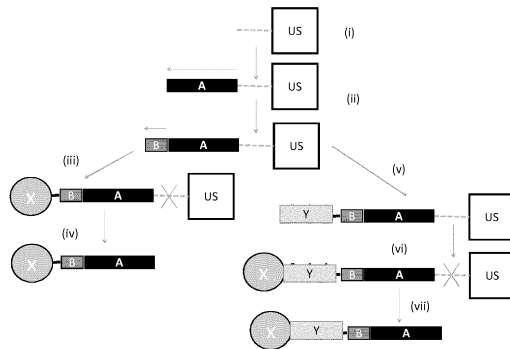
【圖 6】



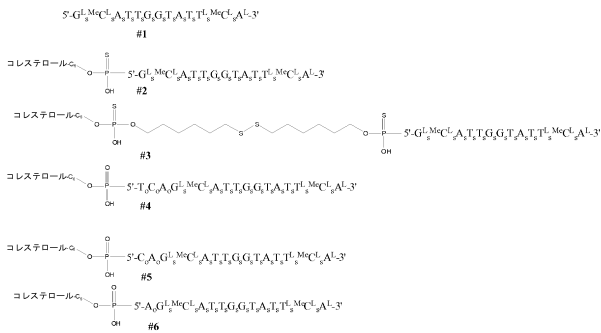
【図 8】



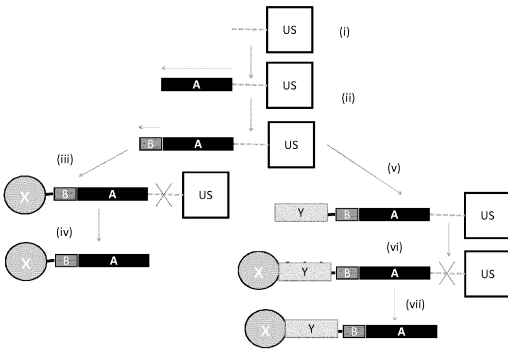
【図 9】



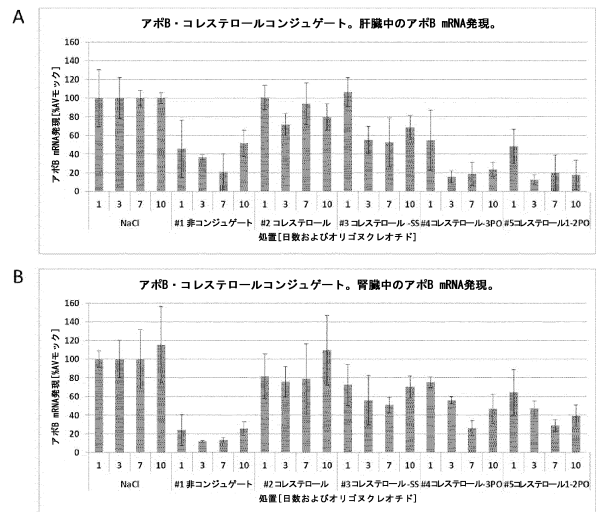
【図 12 - 1】



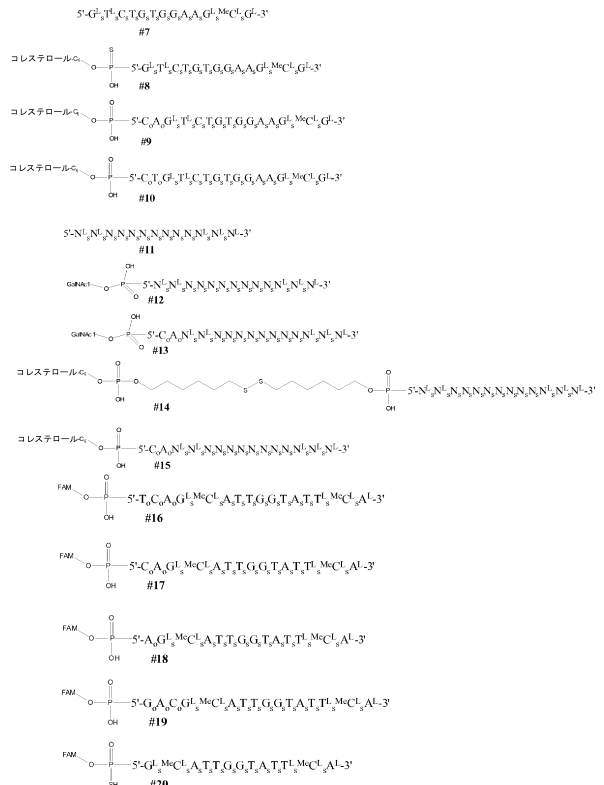
【図 10】



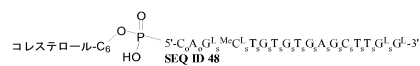
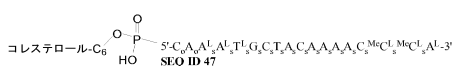
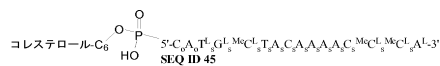
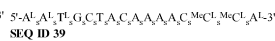
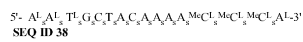
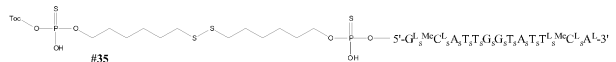
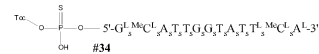
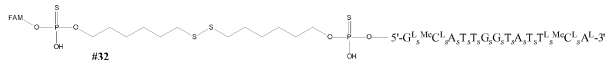
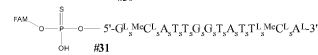
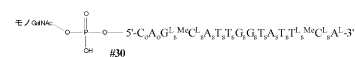
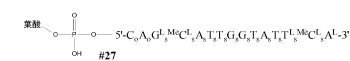
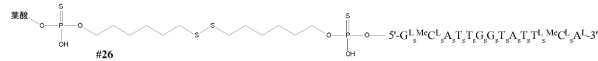
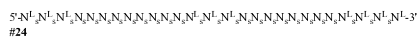
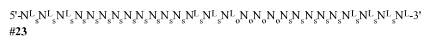
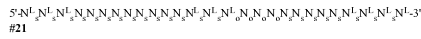
【図 11】



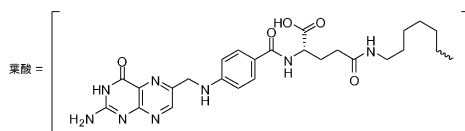
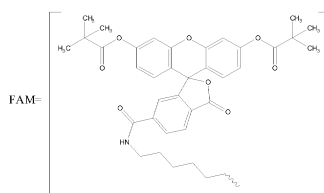
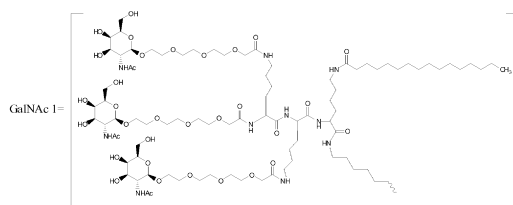
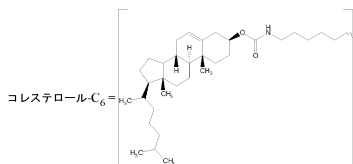
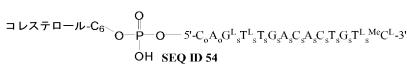
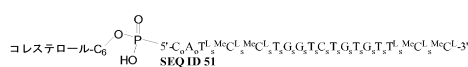
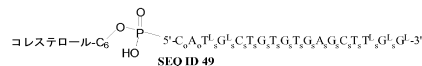
【図 12 - 2】



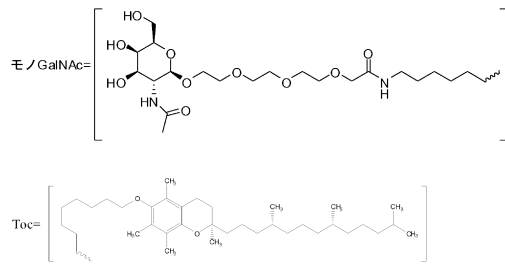
【 図 1 2 - 4 】



【 図 1 3 - 1 】

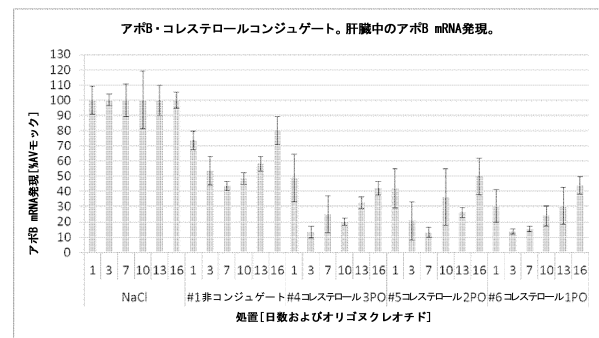


【図 13 - 2】

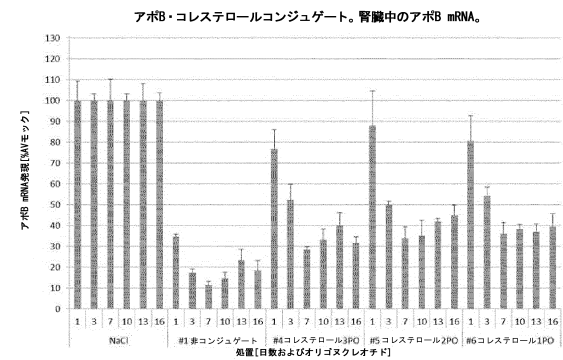


【図 14】

A

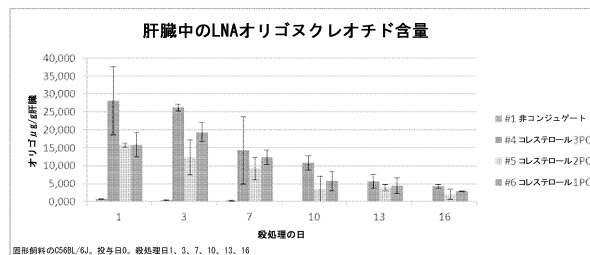


B

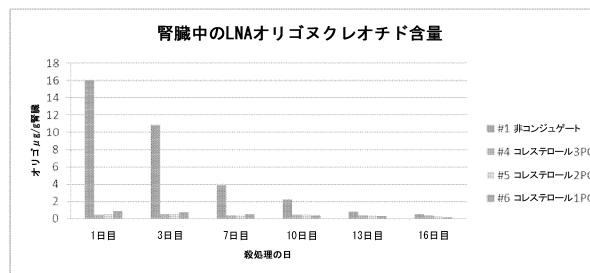


【図 15】

A

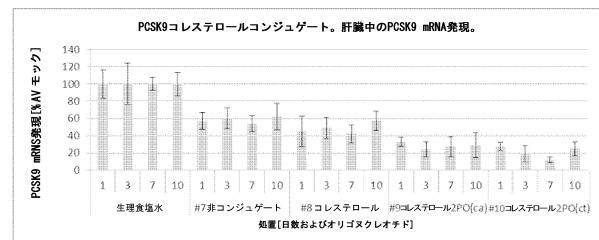


B

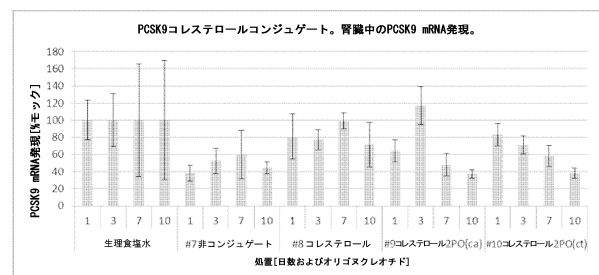


【図 16】

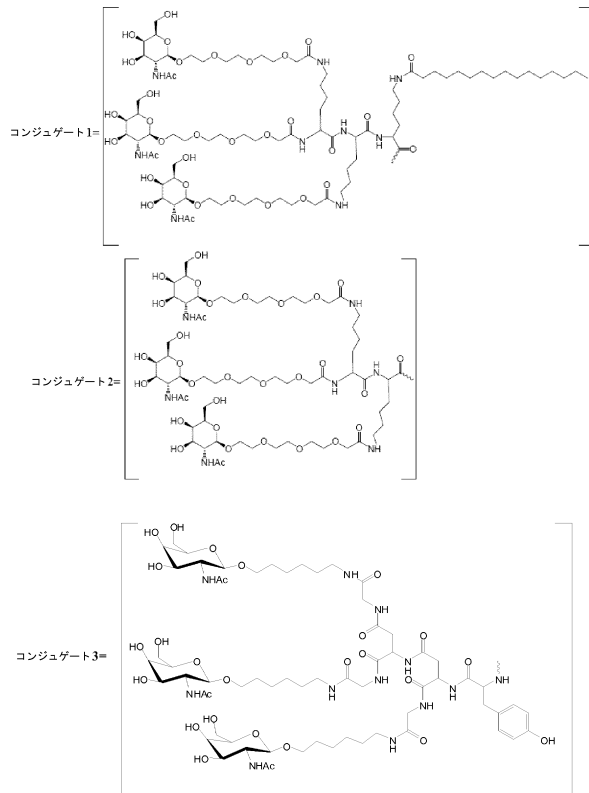
A



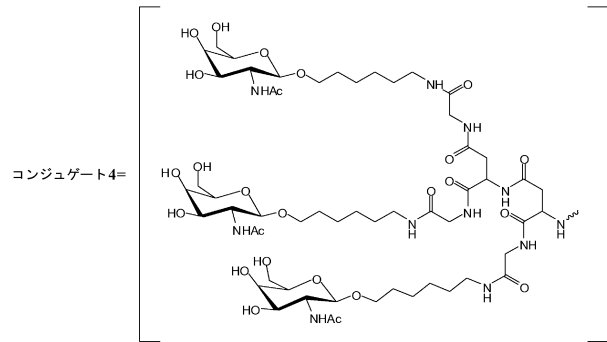
B



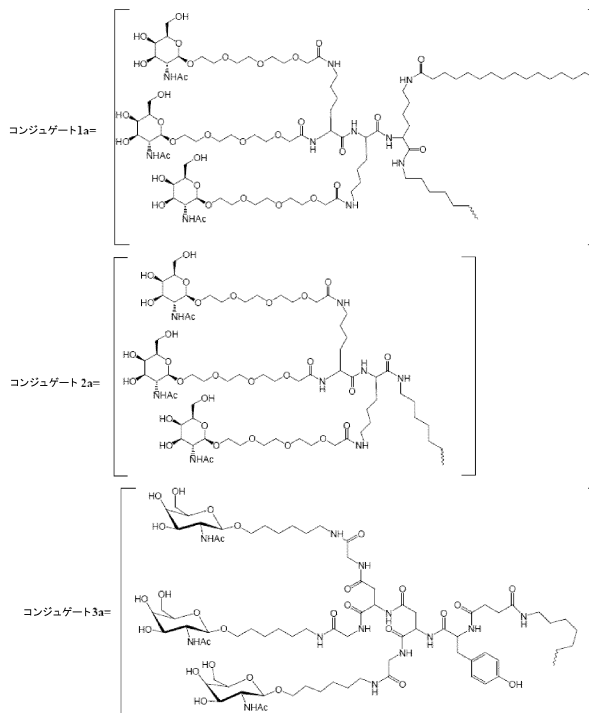
【図 17 - 1】



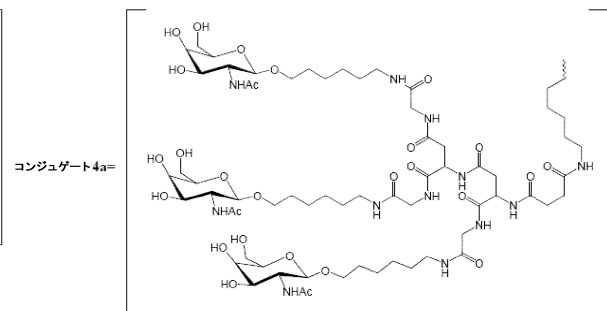
【図 17 - 2】



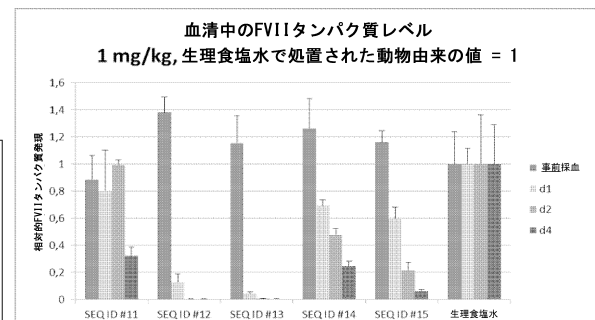
【図 17 - 3】



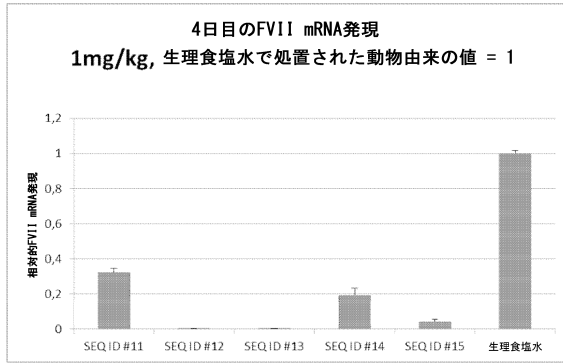
【図 17 - 4】



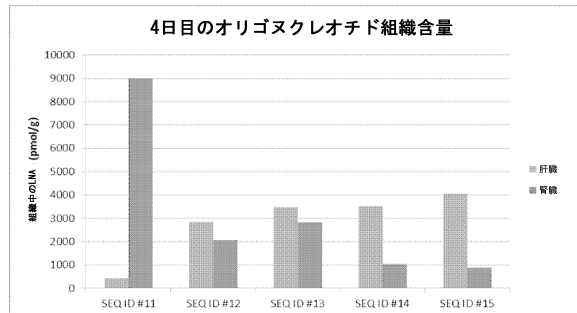
【図 18】



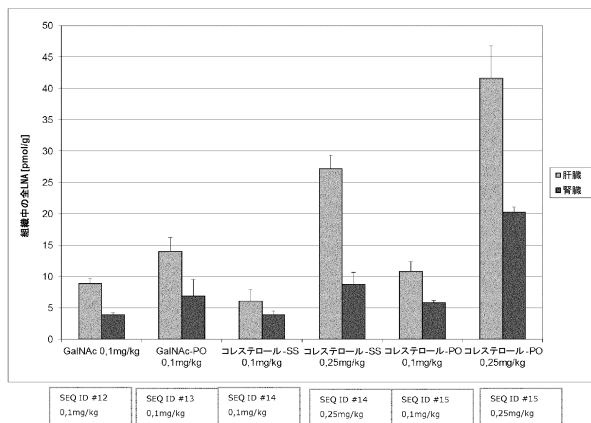
【図 19】



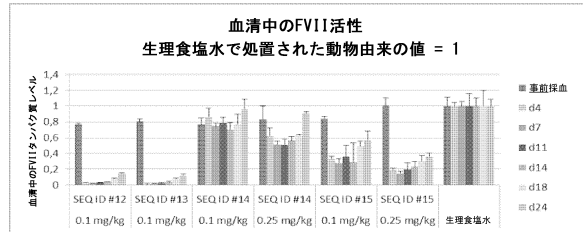
【図 20】



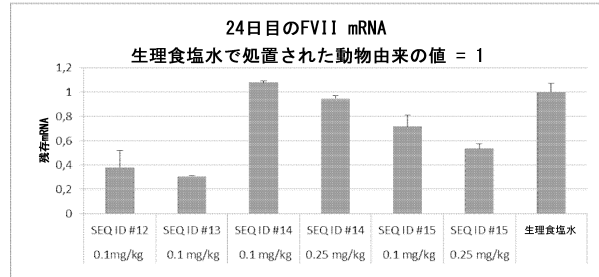
【図 23】



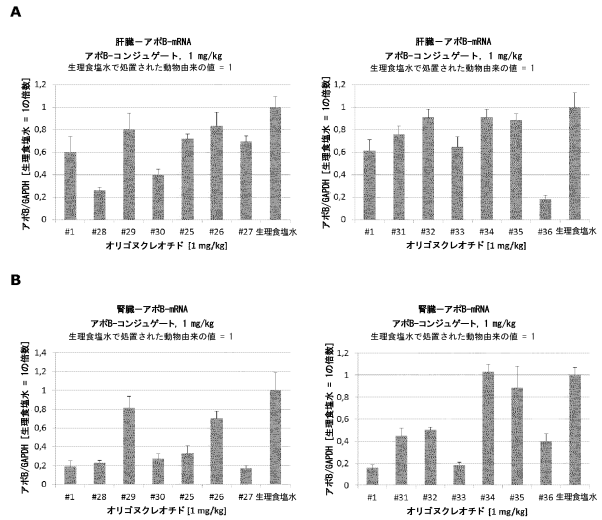
【図 21】



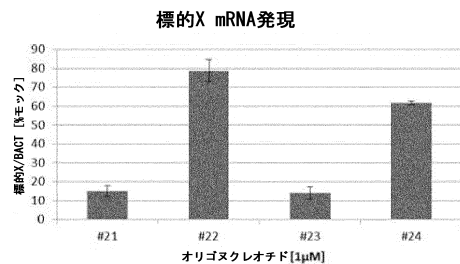
【図 22】



【図 24】



【図 25】



【配列表】

0006452614000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N 15/113

- (31)優先権主張番号 13157237.2
 (32)優先日 平成25年2月28日(2013.2.28)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 13174092.0
 (32)優先日 平成25年6月27日(2013.6.27)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

- (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
 (72)発明者 アルベク ナンナ
 デンマーク王国 ピアケレズ フェルスケンガンゲン 2 2
 (72)発明者 ハンセン ヘンリック フリュージェンロン
 デンマーク王国 レングステズ トレカンテン 1 2 エー
 (72)発明者 カムラー スザンヌ
 デンマーク王国 ホルテ ルーデ バング 2
 (72)発明者 オルム ヘンリック
 デンマーク王国 ベルローズ アネモネヴァイ 4
 (72)発明者 ラバン ジェイコブ
 デンマーク王国 スコウルネ スケバイヴァイ 5

審査官 伊佐地 公美

- (56)参考文献 特表2003-501487(JP,A)
 特表2007-506790(JP,A)
 特表2010-539959(JP,A)
 国際公開第2011/081415(WO,A2)

特表2012-514021(JP,A)

特表2012-524539(JP,A)

国際公開第98/014615(WO,A1)

特表2010-504750(JP,A)

国際公開第2012/029870(WO,A1)

特表2011-505124(JP,A)

国際公開第2012/089602(WO,A1)

LEHMANN, T. J. et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2001年, Vol. 9, pp. 182
7-1835

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H

A61K

A61P

CAPLUS/REGISTRY(STN)